

哺乳類中枢神経系の発生と分化

御子柴 克彦

大阪大学蛋白質研究所 蛋白質機能制御部門

はじめに

神経系は外界の情報を集め、シナプスという情報伝達装置を介して情報を伝え、解析しその結果を各効果器に対して伝える。その情報処理を効率よく行なうためヒトでは140億とも云われているニューロンが互いに複雑な神経回路網を形成している。

またニューロンの周囲には更にその数を上まわるグリア細胞がとりまき、両者が密接な相関関係を維持することによりはじめて、高度な複雑な機能の発現がおきるものと考えられる。

神経系が高度になればなる程、構造と機能との関連はその重要性をましてくる。哺乳類神経系の場合では、細胞分裂の過程、細胞移動の過程と細胞分化の過程が複雑にからみあっており、高度な発達をとげている大脳皮質や小脳皮質などでは、分裂した無数のニューロンがこれら三過程を完遂し、整然と細胞の並んでいる皮質構造を形成している。この形態形成こそが高度な神経系の情報処理機能を付与する上で非常に重要である。

神経系はこのような発生過程の複雑さとその構築細胞の多様さ、さらにそれら細胞間の相互関連はいずれもかなりの部分が遺伝子の支配下にあることが次第に明らかになりつつある。

近年数多くの突然変異動物が知られてきた。神経系突然変異動物は、組織レベルでの異常がみられ、強い行動異常を特徴としている。これらの変異動物と正常動物とを比較することにより、何が正常発生に重要であるかを明らかにすることが可能である。

最近、突然変異動物を用いて、人工キメラマウスを作成しながら、神経系の形態形成と機能発現に関する研究が急速に進みつつある。その最近の成果を紹介する。

ニューロン・グリア相関の解析

神経系における細胞間相互作用のうちで、ニューロン・グリア相関は非常に重要なものの一つである。特にミエリン形成は、その障害が直接機能障害と結びつくために古くから重要な課題として注目されてきた。

ミエリンとはニューロンの軸索をとり囲む密な膜構造を有し、電氣的に絶縁体として働き、神経インパルスの跳躍伝導を助ける。ミエリン形成過程については神経性外胚葉から分化してきたニューロンと、グリア細胞の細胞間認識も含めてミエリンの構成成分の発現調節機構、分子集合の機構などの興味深い問題が多い。

中枢神経系におけるミエリン形成

中枢神経系では神経管のマトリックス細胞からニューロblast (神経芽細胞)が分化し、その後残ったマトリックス細胞がグリア細胞へ分化する。グリア細胞からアストロサイトとオリゴデンドロサイト

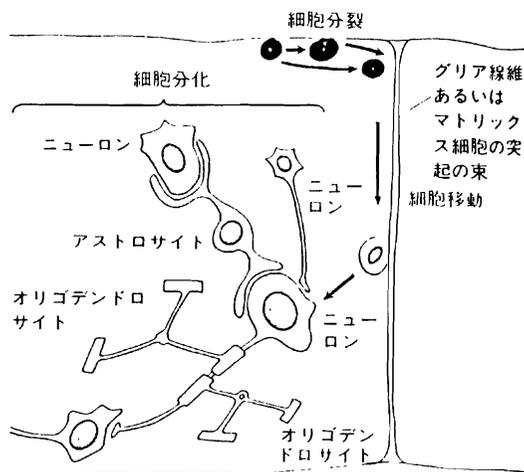


図1 神経組織におけるおのおのの構成細胞成分の相関

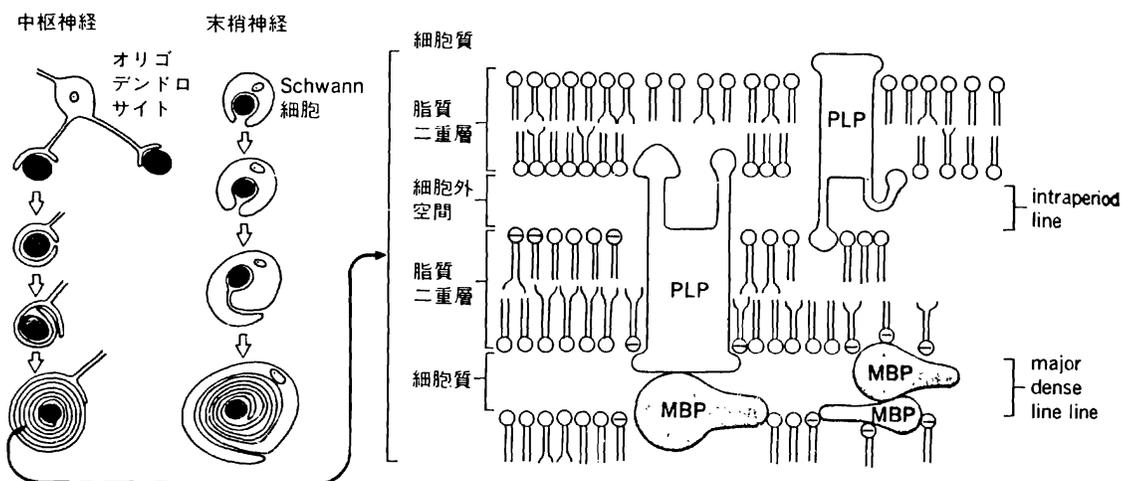


図2 中枢神経と末梢神経のミエリン形成過程と中枢ミエリンの分子構築

ドロサイトが分化する。オリゴデンドロサイトが何本もの突起を伸ばし、周囲の軸索にミエリンを形成する。オリゴデンドロサイトの突起は軸索と接触後、もぐりこむようにして何回も軸索のまわりを包みこむ。突起中の細胞質は周囲におし出され inner loop, outer loop とよばれる構造を形成する。また内膜同士は融合し、電子顕微鏡上電子密度の高い周期線を形成する。また外膜同士も融合して周期線形成を形成する。

ミエリン膜の特徴は脂質が約60—70%で蛋白質含量(30%程度)の約2倍多いことで、電気的絶縁効果を高めている。

ミエリンの構造蛋白としては、比較的その数が限られており、ミエリン塩基性蛋白とプロテオリピド蛋白(PLP, ploteolipid protein)が主でその他MAG(myelin associated glycoprotein), CNPase 又は Wolfgram 蛋白などがある。

ミエリン塩基性蛋白は中枢ミエリンの蛋白質のうち約1/3量を占め、実験的アレルギー性脳炎の起炎性蛋白質である。実験的アレルギー性脳炎の抗原決定部位については種により異なることが知られている。

マウスミエリン塩基性蛋白は18.5k, 14k 成分はその含量が比較的多いが、17k, 21k は少ない。この4つの分子の比率は種間で大きな差がある。

MAG は中枢ミエリンのうちの数少ない糖蛋白の一つであり、MAG はミエリン形成以前にオリゴデ

ンドロサイトの細胞体中出现しその後ミエリンに存在する。オリゴデンドロサイトと軸索の認識に関与していることも示唆されている。MAG は発育とともにみかけの分子量(約100k)が低分子側に変化するが、単に糖鎖の変化だけでなく蛋白質の変化の関与が示唆されている。また、N-CAM(neural cell adhesion molecule)との免疫学的交差性が報告されており、神経系の細胞間認識に関与している可能性がある。

CNPase(2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase)は2', 3'-cyclicAMPを水解する酵素として、中枢神経のミエリンに高い活性を示し、ミエリンの指標酵素として知られている。報告者により差があるが分子量4万~5万の二つの成分から成ることが知られている。Wolfgram 蛋白の成分との同一性を示す報告も出ている。生理的機能は不明で、天然基質もみい出されていない。

PCP は分子量30kの水不溶性、有機溶媒可溶性蛋白質でそのタミノ酸配列から、膜も貫通しており、BPとの相関も考えられ、膜の安定化に関与している可能性も考えられている。

末梢神経におけるミエリン形成

神経堤に由来する Schwann 細胞が、ニューロンの突起に接触後、細胞自体が軸索の周囲を回転しながらミエリンを形成する。

末梢ミエリンは、中枢ミエリンとその構成蛋白

成分は大きく異っている。PO 蛋白が主な蛋白であり、全蛋白の50%を占めている。末梢に特異的な蛋白で、分子量は28kで、分子の大部分は膜に埋まっている。

ミエリン塩基性蛋白は中枢ミエリンのみならず末梢ミエリンにも存在し、4つの共通抗原性を示す蛋白がみられる。

P₂蛋白は末梢ミエリンに特異的な塩基性蛋白で実験的アレルギー性神経炎の抗原物質として知られている。

ミエリン形成障害ミュータントマウス

ミエリン形成障害をおこしたミュータントマウスが多数報告され、ヒトの leukodystrophy のモデルとしても注目されている。

Jimpy ミュータントはヒトの Pelizaeus-Merzbacher 病に、twitcher ミュータントはヒトの Krabbe 病に対応している。その他、jimpy, quaking, shiverer, myelin deficient (mld) など数多く知られている。これらはいずれも強い企図振戦と運動障害を特徴としている。

これらのミエリン形成障害が一次的にどこに障害があるかを明らかにすることは、観察された病態像の理解の上で必須である。ここではシバラーマウスにつきその解析をすすめた結果を紹介する。

シバラーマウスの中枢神経系のミエリン形成は強く障害されており、しかもわずかに形成されているミエリンもその内膜同士が融合して形成されるべき周期線がみられない。また蛋白パターンの解析によりミエリン塩基性蛋白がほぼ特異的に欠損していることが明らかとなっている。

しかし、シバラーマウスの中枢神経系のニューロンは鍍銀法により突起形成に異常のあることも明らかにされており、ミエリンで観察されている変化がニューロンの一義的变化に対応する二次的なものである可能性や、ミエリン形成に関与していない細胞からの体液性因子によることも考えられているため、キメラ作成による解析は重要である。

GPI アイソザイムパターンと体毛色の異なる野生型マウスを用いたシバラーマウスとのキメラでは、体毛色と脳内の混合比は強い相関を示した。

両者の成分から構成されているキメラ脳内をミエリン塩基性蛋白抗体を用いて免疫組織化学的に解析したところ、ミエリン塩基性蛋白陽性部位と陰性部位、更には両者が混在している部位が白質で観察された。

このようにシバラーマウス脳内で両形質発現がパッチ状に観察されたことから、シバラーマウスのミエリン形成障害は構成細胞成分に内在したものであって、体液性因子によるものではないものと考えられる。

もし、毒性の体液性因子がミエリン形成異常の原因とするならば、シバラーマウスの脳は全てシバラーマウスタイプの白質となっていると考えられる。又、もし、正常の脳にあるかも知れない栄養因子がシバラーマウスで欠損しているならば、キメラの脳内は正常化しているものと考えられる。

構成細胞成分に内在したものであるとするならば、ミエリンを形成するオリゴデンドロサイトか、ミエリンが巻かれるニューロンの軸索のいずれかが障害をうけていることになる。

もし軸索そのものに障害があり、そのために変化がでてきたとするならば、正常の軸索には電子顕微鏡上、周期線を有する正常のミエリンがあり、シバラーマウスタイプの軸索には、周期線のないシバラーマウスタイプのミエリンが形成されると考えられる。

一方軸索とは無関係に正常タイプのミエリンとシバラーマウスタイプのミエリン、同じ軸索上に観察されれば、シバラーマウスではオリゴデンドロサイトそのものに変異がおきているものと考えられる。

事実、電子顕微鏡上では、一本の軸索上に両方のタイプのミエリンが観察されたので、オリゴデンドロサイトそのものの変化の結果ミエリン形成障害がおきたものと考えられている。

以上の結果から、早期の症状として観察される企図振戦はミエリン形成障害のためにひきおこされる症状であり、加齢とともに現われる運動失調はミエリン形成障害のための二次的なニューロンの機能障害によってひきおこされるもので、ニューロンの突起形成異常は、まさに二次的な変化であろうと思われる。

大脳皮質の形態形成機構の解析

大脳皮質は6層の神経細胞層から形成されているが、この整然と並んだ皮質構造の形成のもとに、はじめて高度な脳の機能の発現が可能であろう。

大脳皮質は胎生期に側脳室壁で分裂した細胞が移動して形成される。脳室壁で分裂したニューロンは移動して表層に位置し層を形成する。次に分裂したニューロンはすでに形成された層の間を通りぬけてその上にまで移動し、そこで層を形成する。最後に分裂したニューロンは最外層に位置する。すなわち古いニューロンほど深部に位置し、新しいニューロンほど表層に位置するという inside out パターンをとっている。

この種の大脳皮質形成機構は脊椎動物になってはじめて形成されるものである。この形成過程で細胞が移動し、目的の場所へ到達するが、その移動の機構には、古くから走行性の原理が働いているとか、ニューロン表面分子の相互認識の結果、相対的な位置を決定するとか、あるいは、ガイド構造があり、それにそってニューロンは移動して位置を認識するなどの仮説が出されていたが、いずれも決定的なものではなかった。

大脳皮質構築障害を伴う reeler という突然変異がマウスでみつかった。分裂の各時期に [³H] チミジンラベルして大脳皮質形成後に大脳をオートラジオグラフィで調べた研究により、ニューロン相互の位置が相対的に逆転していることが明らかとなった。この reeler 変異による構築異常の解明は、大脳皮質構築の機構の解明やさらにはニューロンの移動の機構の解明につながるものと考えられる。

reeler の大脳内の解析ではニューロンの位置異常ばかりでなく、ニューロンの突起の伸展にも形態学的異常がみられ、更に線維連絡の走行にも変化がみられる。reeler の脳内の病態解析のみでは、何が一次的な変化であり、何が二次的な変化であるか不明である。

そこで reeler と野生型マウスとのキメラが作成され解析が進められた。reeler 遺伝子は BALB/C 系のマウスにのっているため、体毛色と系統特異な GPI アイソザイムパターンの異なる C57BL/6N

を用いてキメラの作成が進められた。

8細胞期胚の集合によりキメラが得られ、まず体毛パターンや GPI アイソザイムパターンからはほぼ半々から構成されている行動的には正常なキメラの脳内の解析がすすめられた。

この大脳皮質では、reeler の特徴であった分子層（第一層）の欠損、鍍銀法によるニューロンの突起形成異常、皮質の層構築の著しい乱れ、視床一皮質の線維連絡の異常（正常マウスでは下方より垂直に表層に伸びるのに対して、reeler では斜めの束として一度表層へ達した後分裂した線維として下降する）などが消失して正常とほとんど同じような線維連絡パターンを示していた。

キメラ脳内の半分の細胞は reeler 由来であるので、reeler 由来のニューロンそのものに変異がおきていたとするならば、半分のニューロンは reeler の形質を示すはずである。しかし脳内が正常化したことは、ニューロンそのものは正常であることを示している。この結果から移動に関する体液性因子や移動のガイド機構の障害があるために reeler の異常がおきたと考えられる。

次に reeler 成分が体毛と GPI アイソザイムパターンから90%ほど占めるキメラマウスでも行動は正常と区別がつかない程である。皮質的には正常な大脳皮質構築と reeler タイプの構築とがパッチ状に観察されたことから体液性因子の可能性は除外しうるものと考えられた。

胎生期の細胞移動時期の走査電子顕微鏡による解析により、正常ではニューロンを産生するマトリックス細胞層の突起が集合して形成されるマトリックスの線維束がみられ、その束にそって産生されたばかりの移動中のニューロブラストが観察されている。しかし、reeler ではマトリックスの線維束がほとんど形成されていないことが知られており、更にキメラでは、大脳皮質構築障害の部位では、reeler にみられたような構造である。正常皮質部位では束形成が認められているので、このマトリックス細胞の線維の束形成がガイド構造となってニューロンの移動を助けているものと考えられる。

現在大脳皮質形成機構の分子機構の解析が進められている。

小脳皮質の形成機構

中枢神経系のうちで小脳は形態学的にも、電気生理学的にもよく解析が進んでいる。小脳を構成するニューロンは5種類と少なく、それぞれ形態学的に容易に同定可能であり、各ニューロン間の連絡も明らかとなっている。

しかし、マウスでは小脳は大部分生後発達する

ために外界からの影響を強くうけるために遺伝的に規定されている小脳皮質の形態と機能と環境因子との相関を明らかにする上でも良い材料となっている。

しかし小脳の特徴の一つにあげられるのは何と云っても運動制御系としての中枢の一つとしての重要な役割を荷っていることであろう。そのために行動変化と小脳内の形態変化や物質変化との対

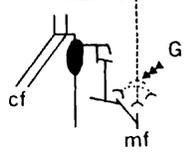
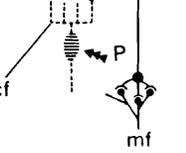
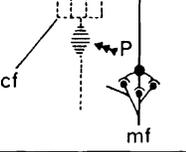
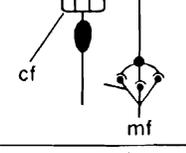
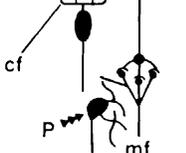
ウィーバー (weaver) マウス	小脳 	<ul style="list-style-type: none"> ● 形態学的変化 顆粒細胞の変性 (顆粒層の形成なし) 〔苔状線維と Purkinje 細胞との異常シナプスなども観察される〕 ● 遺伝的変異細胞 顆粒細胞またはベルグマングリア
ナーバス (nervous) マウス	小脳 	<ul style="list-style-type: none"> ● 形態学的変化 Purkinje 細胞の変性 (ミトコンドリアに変化) ● 遺伝的変異細胞 Purkinje 細胞
	網膜 	<ul style="list-style-type: none"> ● 形態学的変化 光受容細胞の変性
pcd (Purkinje cell degeneration) マウス	小脳 	<ul style="list-style-type: none"> ● 形態学的変化 Purkinje 細胞の変性(小胞体に変化) ● 遺伝的変異細胞 Purkinje 細胞
	網膜 	<ul style="list-style-type: none"> ● 形態学的変化 光受容細胞の変性
スタゲラー (staggerer) マウス	小脳 	<ul style="list-style-type: none"> ● 形態学的変化 Purkinje 細胞の樹状突起上の棘突起欠損 (Purkinje 細胞-顆粒細胞間のシナプス欠損), 顆粒細胞の減少 (ごく一部の Purkinje 細胞は正常部位にある) ● 遺伝的変異細胞 Purkinje 細胞
リーラー (reeler) マウス	小脳 	<ul style="list-style-type: none"> ● 形態学的変化 Purkinje 細胞層と顆粒細胞層の層構造の逆転, 顆粒細胞の減少, 一部のプルキンエ細胞は正常部位にある。 ● 遺伝的変異部位 Purkinje 細胞以外の因子

図3 小脳発育障害突然変異マウスの小脳内変化

▶▶▶ : 変位部位, G : 顆粒細胞, mf : 苔状線維, cf : 登上線維, P : Purkinje 細胞

応も明らかにしうる点で非常に良いモデル系と考えられる。

更に小脳に変異を伴う数多くの動物がみい出されており、ある特定の細胞の欠損、シナプスの形成不全、皮質構築の障害などの形態学的変化を伴うことが明らかにされ、しかもそれらは、それぞれに特有な運動失調を伴っている。

しかし一方で神経系の特徴として可塑性が近年

注目されており、種々の外的条件に対応して比較的自由に線維連絡が変化することも明らかとなっているため、何が本質的な変化をみきわめることは重要な点であり、この点に関しても発生工学的手法は重要な解析手段となっている。ここでは、各種ミュータント小脳内での変化について紹介する。