

り組んでデータを取得している。

画像として、マウス全体、リンパ節、肺の画像を解析することで、転移に対する薬剤の抑制効果を示すことができている。

#### 8. 論文構成

血管新生阻害剤の新規な作用機序の解明として、リンパ管に対する作用を検討するという新しい試みがなされている。その過程において、低分子マルチキナーゼ阻害剤の特性、チロシンキナーゼ VEGFR ファミリーの特徴、VEGFR3 の生理学的役割、腫瘍におけるリンパ管新生の意義等を理解していると考えられる。

またこの分野における、近年の新しい研究成果をフォローし、本研究に役立てている。検証の過程では、仮説に基づき、不十分な点はあるものの、生化学、細胞物学的手法や動物モデル等必要な実験を行っている。

Discussion では他の研究成果の報告を援用しつつ、薬剤の治療効果の可能性について議論している

以上から、本論文は学位論文として十分な内容を有していると考えられる。

氏 名 久保厚子

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 医第1076号

学位授与の日付 平成24年3月22日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

学位論文題目 Profile of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in the olfactory bulb of prokineticin type 2 receptor-deficient mice during embryonic development  
(プロキネティシン受容体2型変異マウス嗅球におけるチロシン水酸化酵素含有神経細胞の発達異常)

論文審査委員 (主査) 教授 重 吉 康 史

(副主査) 教授 伊 藤 彰 彦

(副主査) 教授 楠 進

論文内容の要旨

【目的】

嗅覚の一次中枢である嗅球は終脳の先端に位置し、嗅神経細胞の軸索入力を受け嗅覚情報を脳の高次中枢へ伝達している。嗅球は形態的、機能的に異なるいくつかの層から成っており、層ごとに存在する細胞や形成されるシナプスの種類が異なっている。嗅球糸球体層の傍糸球体細胞や房飾細胞はドーパミン作動性であり、嗅覚機能の調節に重要である。我々はこれまでにプロキネチシン2型受容体ノックアウトマウス (*Pkr2*<sup>-/-</sup>マウス) を用いて、胎児期において嗅上皮から嗅球への軸索投射異常、成体における糸球体層の消失を見出した。今回我々は、*Pkr2* 遺伝子欠損がマウス嗅球のドーパミンニューロンの分化や移動にどのような影響を与えているのかを解明するために、胎児期での観察を行った。

【方法】

*Pkr2*<sup>-/-</sup>マウスの嗅球の層形成およびドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) を発現している神経細胞について、その発達期における組織学的変化を免疫組織化学法によって比較観察した。胎生16.5日 (E16.5)、18.5日 (E18.5)、生下時 (P0) において、野生型マウスおよび変異マウスの脳サンプルを採取し検索を行った。

【結果】

E16.5 の野生型マウスでは、嗅神経層、発生初期の外網状層と僧帽細胞層は確認できるが、糸球体層と外網状層は区別できなかった。また内網状層と顆粒細胞層も区別ができなかった。E18.5 では嗅神経層、僧帽細胞層とその層にある僧帽細胞が確認でき、糸球体層と外網状層も区別できるようになった。P0 においては成体マウスと同じように全ての層が区別できた。一方、*Pkr2*<sup>-/-</sup>マウスでは E16.5、E18.5 および P0 全てのステージにおいて嗅球の層構造を確認することができなかった。さらに TH 陽性細胞についても明瞭な差が、特に P0 において認められた。野生型マウスでは既に E16.5 の嗅球において2つの TH 陽性神経細胞集団が糸球体層と顆粒細胞層に確認された。さらに E18.5 および P0 では TH 陽性神経細胞は糸球体層に発現し P0 では TH 細胞の数が急激に増加してサイズも大きくなっていることが確認できた。一方、*Pkr2*<sup>-/-</sup>マウスにおいても、すべてのステージにおいて TH 陽性神経細胞は嗅球の辺縁部で確認された。しかし発生ステージが進んでも細胞の数やサイズの著明な増大を認めなかった。この点が野生型マウスと変異マウスの大きな相違である。

【考察及び結論】

今回検索された胎仔期において、野生型のみならず *Pkr2*<sup>-/-</sup>において嗅球の辺縁部ではほぼ同数の TH 陽性神経細胞が確認された。これは胎仔期においては PKR2 受容体の変異は、脳室下帯 (SVZ) から嗅球辺縁にいたるドーパミンニューロンの遊走に影響を与えないことを示す。一方、野生型では TH 陽性細胞数および細胞サイズの増大が P0 にいたって著明となるのに対し変異マウスにおいては同様の変化を認めなかった。傍糸球体細胞は生後急激に増加するとの報告がある。よって今回の検索の結果は傍糸球体細胞の遊走あるいは生存において PKR2 受容体が必須であることを示唆している。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2012年6月 日 公表予定	出版物名 Acta Med Kinki Univ Vol. 37 No. 1
	公 表 内 容	2012年6月 日 発行予定
	全 文	

## 論文審査結果の要旨

本学位論文は、Prokineticin シグナル伝達を受容体である prokineticin receptor 2 ノックアウトマウス (*Pkr2*<sup>-/-</sup>) の胎児期、生下時の嗅球を解析し、PKR2 遺伝子欠損による嗅球に存在するドーパミンニューロンへの影響を述べたものである。

プロキネチシン(PK)は分泌性蛋白質で、7 回膜貫通型の G 蛋白質共役受容体であるプロキネチシン受容体(PKR)を介して、中枢神経系および末梢組織においてさまざまな生理的機能に関与することが知られている。教室ではすでに PKR タイプ 2(PKR2)の変異 (*Pkr2*<sup>-/-</sup>)マウスが、成体マウスにおいて糸球体の欠損による嗅球形態形成不全を生じること、胎仔期の嗅上皮から主嗅球への投射が欠損していることを確認している。マウスの糸球体層では、嗅覚機能に重要なドーパミンニューロンが存在している。

実験手法として嗅球発達期である *Pkr2*<sup>-/-</sup>マウスの胎生 16.5 日 (E16.5)、18.5 日 (E18.5)、生下時 (P0) を用いて、HE 染色により嗅球層構造の発達および嗅覚の形成に重要な役割を果たすドーパミンニューロンをドーパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) に対する抗体を用いた免疫組織化学法を用いてそれぞれ解析を行った。

実験の結果以下のようなことを明らかにした。

1. 嗅球発達期である E16.5、E18.5 および P0 においては野生型では層構造の形成が明瞭に観察される。一方で *Pkr2*<sup>-/-</sup>マウスの嗅球では明瞭な層構造がほとんど現れない。
2. E16.5、E18.5 において *Pkr2*<sup>-/-</sup>マウスの嗅球の辺縁部で、TH-陽性細胞が確認できた。E16.5、E18.5 においては辺縁部への局在、TH 発現、数、大きさなど野生型に見られる所見と近似していた。
3. 一方、野生型マウスでは P0 (生下時) で TH 陽性細胞の数が急激に増えたが、ノックアウトマウスでは P0 で細胞数の増加は確認されなかった。
4. 野生型マウスでは P0 (生下時) で大きなサイズの TH 陽性細胞が現れたが、ノックアウトマウスでは大きなサイズの TH 陽性細胞は現れなかった。

これらのことより久保は以下のような考察に至っている。

嗅球のドーパミンニューロンには、E13-E18 に発生しはじめる房飾細胞と生後まもなく発生しはじめる傍糸球体細胞の発生時期の異なる 2 つの集団が存在する。今回、野生型マウスに見られた、P0 の嗅球において確認された TH-陽性細胞数の増加やサイズの大きな TH-陽性細胞の発生は時期から考えて傍糸球体細胞であると思われる。一方、ノックアウトマウスではこのような細胞は現れなかったことから、*Pkr2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて TH-陽性傍糸球体細胞の発生あるいは遊走に異常が生じたと考えられる。このことから PKR2 受容体は、胎仔期での TH-陽性傍糸球体細胞の遊走、生存に必須であり、嗅球発達に大きな役割を果たすことを示唆する。一方、胎児期に現れた TH 陽性細胞は発生時期から房飾細胞であると考えられる。局在、数、大きさなどが野生型と大きな変異が存在しなかったことより、この細胞の TH の発現、辺縁部への遊走には *Pkr2* 受容体は大きな影響を持たないことを示唆する。

### 本論文が対象とする研究の評価

#胎児期および生下時における TH 陽性ドーパミン含有細胞の解析は、PKR2 遺伝子の嗅球発達期における役割を解明したという点で大きく評価できる。

#組織サンプルの作成から機能解析に至る過程を単独で行っており、久保自身の組織解析の能力を示したものである。

以上をふまえ、主査と副主査は博士学位論文公聴会 (平成 24 年 1 月 23 日) を行い、慎重に審査を行った。その結果、本論文が博士学位論文に値すると判断された。