

(様式4)

学位論文の内容の要旨

矢島 弘之 印

(学位論文のタイトル)

Absence of thyroid hormone induced delayed dendritic arborization in mouse primary hippocampal neurons through insufficient expression of brain-derived neurotrophic factor.

(マウス海馬初代培養神経細胞において甲状腺ホルモン欠乏はBDNFの発現低下を介して樹状突起分枝数の低下を引き起こす。)

(学位論文の要旨)

1. 研究の背景と目的

甲状腺ホルモンは、中枢神経系を含む多くの臓器の発達や機能維持に重要な役割を果たしている。周産期の甲状腺ホルモン欠乏症は、ヒトではクレチン症と呼ばれ、不可逆的な中枢神経障害が生じる。甲状腺ホルモンの脳発達への影響を評価するため、齧歯類がモデルとして広く用いられてきた。そして、行動学的実験・電気生理学的実験などから、甲状腺ホルモンが強い影響を及ぼす領域の一つに海馬があることが明らかとなった。先行研究において、周産期甲状腺ホルモン低下モデル動物で、海馬錐体細胞の樹状突起の分枝数の低下が報告されている。しかし、海馬の発達過程における甲状腺ホルモンの作用メカニズムは依然として不明な点が多い。そこで本研究では、海馬初代培養神経細胞を用い、ニューロンの成熟過程における甲状腺ホルモンの作用を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

C57BL/6Jマウスの胎生15/16日の脳から、海馬を単離しパパイイン処理にて分散培養した。海馬初代培養神経細胞に使用される無血清サプリメントB27[®]には甲状腺ホルモンが含まれている。そこで、Chenら (J Neurosci Methods., 2008) の組成を基に活性型の甲状腺ホルモンであるトリヨードサイロニン (T_3) を含まない無血清培養液を作成し、 T_3 添加群と T_3 未添加群で培養を行った。培養7、10、14日目において免疫細胞化学染色を行ない、顕微鏡下で観察した。Microtubule-associated protein 2 (MAP2)、Glial fibrillary acidic protein (GFAP) を染色し、神経細胞数および、グリア細胞数を計測した。また、神経細胞の形態学的解析として、Sholl解析で細胞体の中心から10 μ m間隔で引かれた同心円と樹状突起との交点数を計測し、さらに各神経細胞における分枝数を計測した。培養14日目においてSynpatophysinを免疫細胞化学染色し、シナプス数計測を行った。また、培養7、10、14日目において細胞からTotal RNAを抽出し甲状腺ホルモン標的遺伝子やシナプス関連遺伝子の定量リアルタイムPCRを行った。培養10日目までBDNF受容体であるNeurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (Ntrk2, TrkB) のリン酸化レベルをWestern blotで評価した。さらに、培養8、9日目に培地中に T_3 未添加群へBDNFを添加し、培養10日目にSholl解析、分枝数の計測を行った。

3. 結果

細胞数を計測したところ、神経細胞数、グリア細胞数において T_3 添加群と T_3 非添加群の間に有意な差はなかった。形態解析の結果、Sholl解析において、培養10日目に T_3 添加群と比較し T_3 未添加群の有意な交点数の低下が見られ、分枝数の計測においても、培養10日目に T_3 添加群と比較し T_3 未添加群の第二・第三分枝数の有意な減少が見られた。定量リアルタイムPCRにおいて、甲状腺ホルモン標的遺伝子*Bdnf*は培養10日目に T_3 添加群と比較し、 T_3 未添加群の有意なmRNA量の減少が認められた。培養14日目におけるシナプス数解析の結果に差はなかった。培養10日目にBDNFの分泌量を評価するため、BDNFの受容体であるTrkBのリン酸化レベルを調べたところ、 T_3 未添加群と比較し T_3 添加群は有意にリン酸化レベルが増加した。形態解析において、培養10日目に T_3 未添加群で樹状突起の形態変化が生じ、同時期において樹状突起の成長に関与している神経栄養因子である*Bdnf*の転写量が低下し、さらにBDNFの受容体であるTrkBのリン酸化レベルが T_3 未添加群において低下したことから、 T_3 未添加群へBDNFの添加により樹状突起の形態変化が正常化するか解析した。培養8、9日目に T_3 未添加群に対しBDNFを外部から添加したBDNF添加群では、培養10日目における T_3 未添加群のSholl解析での交点数の低下、並びに分枝数の計測での第二・第三分枝の低下が正常化した。

4. 考察・まとめ

先行研究においてBDNFノックアウト動物で神経細胞の類似の形態変化が報告されており、 T_3 未添加による*Bdnf*の発現低下がより形態的变化の一因になっている可能性を支持している。本研究の結果から、甲状腺ホルモンの低下により、海馬初代培養神経細胞では一時的な発達遅滞が生じることが明らかになった。さらに、発達期の海馬神経細胞において甲状腺ホルモンを介した*Bdnf*の発現変化により神経細胞の形態変化が生じている可能性が示唆された。