

—総説—

大脳皮質構築過程における 神経栄養因子の役割に関する研究

大宮 誠

要約: 脳神経系の形成過程を分子レベルで解明し、神経疾患の病態の理解、治療法の開発に生かすことは神経科学研究の大きな目標のひとつである。神経栄養因子は脳の形成過程で重要な役割を果たすと推定されているが、実際には培養系を用いた断片的な知見しか得られていないのが現状である。成熟脳にも神経幹細胞が見いだされ、その臨床応用が視野に入った現在、神経幹細胞から神経細胞へと至る道筋に神経栄養因子がどのような役割を果たすのかを解明することは大きな意義があると考えている。本研究では大脳皮質形成過程に着目し、特に生体系での実験を中心に脳の形成過程に及ぼす神経栄養因子の役割について検討した。本研究結果から水頭症をはじめとする先天性の脳形成異常疾患に神経栄養因子の発現異常が関与している可能性が示唆された。ならびに正常な大脳皮質の発達には秩序だった神経栄養因子の発現が密接に関わっていることも明らかにした。

索引用語: 神経栄養因子, 大脳皮質, 水頭症, 塩基性繊維芽細胞成長因子, 脳由来神経栄養因子

Roles of neurotrophic factors for the development of the rodent cerebral cortex

Makoto OHMIYA

Abstract: Elucidation of molecular mechanisms and cellular processes during development of the nervous system is one of the major targets of neuroscience, because of merit for understanding or treatment of neurological diseases. Neurotrophic factors are thought to play a vital role during the course of constructing the cerebral cortex, but their actual functions in vivo remain unknown except for patchy findings obtained from in vitro experiments. Recently, neural stem cells have been found even in the mature brain, and their activation or proper differentiation is now expected to be useful for the clinical treatment of neurological diseases with neuronal loss such as Parkinson's disease or Alzheimer's disease. This encouraged us to investigate the effects of neurotrophic factors on neural stem cells. In the present study, we focused on the effects of neurotrophic factors on the developing rodent cerebral cortex, especially using in vivo experimental techniques. The obtained results suggest that abnormal expression of particular neurotrophic factors is responsible for brain malformation including hydrocephalus, and that timely- and spatially-regulated expression of neurotrophic factors is important in normal development of the cerebral cortex.

Keyphrases: neurotrophic factors, cerebral cortex, hydrocephalus, FGF-2, BDNF

1. 緒言

人の脳は 10^{11} 個もの神経細胞とその数十倍からなるグリア細胞から構成されている。さらに神経細胞は各々数万に及ぶシナプスを介して他の神経細胞と連絡しあい、精緻な神経回路網を形成している。この複雑な構造と多彩な高

次機能が脳神経系の研究を困難にしていると同時に、研究意欲をかきたててきた。脳が生物学研究の最後のフロンティアといわれるゆえんでもある。

脳は主に神経細胞とグリア細胞から構成され、いずれも神経幹細胞から分化して生じる。脳の発生の初期に神経幹

細胞は活発に増殖し、その後神経細胞あるいはグリア細胞への分化の方向づけがなされ、定められた位置へと移動する。未分化な神経細胞は神経突起の伸長、神経機能の獲得、神経細胞間のシナプス構築などの複雑な分化過程を経て成熟し、機能する神経系を形成する。この間に多くの細胞がプログラム細胞死の洗礼を受け、機能的細胞だけが生き残る。しかしこの間のプロセスは必ずしも分子レベルで明らかになっておらず、その説明は神経科学に残された課題のひとつである。

脳の形成過程は大脳皮質のそれに集約されており、多くの研究が大脳皮質に向けられている。大脳皮質はその構造の特徴から6つの層に分類され、II層からVI層の各層にはそれぞれ共通の形態と線維連絡をもつ神経細胞群が整然と配置されている。神経系の発生が進むと外胚葉から神経管が形成され、その端に脳のもとになる部分ができる。この時期、大脳皮質の原基は神経上皮と呼ばれる薄い膜状構造をしている。神経上皮内では細胞が上下運動を繰り返しながら分裂し、神経細胞へと分化する細胞が発生する。この細胞は直ちに髄膜側の外縁部へと移動し、叢原基層 (Primordium Plexiform Layer, preplate) を形成する。ここからカハール・レツイス (Cajal・Retzius: CR) 細胞を含む辺縁帯とサブプレート (Subplate: SP) 細胞が分化してくる。移動せずに残った神経上皮細胞は神経幹細胞と呼ばれ脳室周囲層 (Ventricular Zone: VZ) を形成する。神経幹細胞は増殖能 (自己複製能) をもつと同時に、神経細胞、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトという中枢神経系を構成する3種類の細胞に分化できる (多分化能) 細胞と定義される (Fig. 1)。

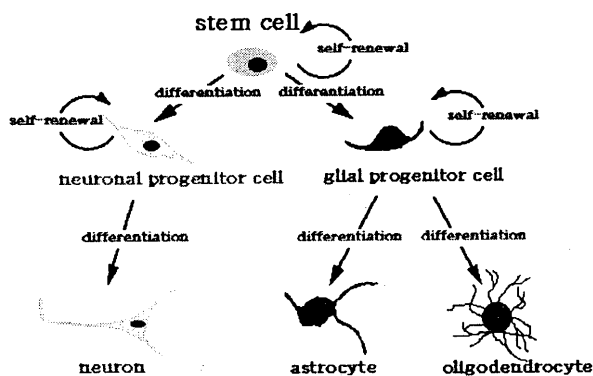
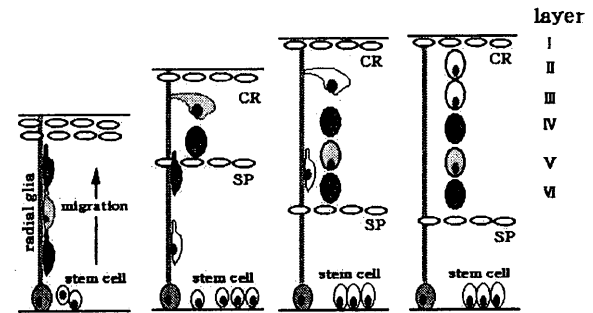


Fig. 1 Self-renewal and Multipotency of Neural Stem Cell

VZ 内で最終分裂を終えた神経幹細胞は未分化神経細胞となって髄膜側へ移動し大脳皮質神経細胞に分化する。この時、未分化な神経細胞は先に発生した辺縁帯 (将来の大脳皮質第 I 層) と SP 神経細胞の間に進入するが、後から発生した細胞は先に発生した細胞の間隙を通り抜け、より辺縁側に位置を占める。すなわち早く生まれた細胞ほど大脳皮質の深部に、遅く生まれた細胞ほど表層側に位置を占める

という inside-out の法則に従い大脳皮質の第 II-VI 層が形成される (Fig. 2)。そして最終的な位置の決定には辺縁帯内の CR 細胞がリーリンと呼ばれるタンパク質の発現を介して重要な役割を果たしていることが知られている¹⁻³⁾。



以上述べた脳の形成過程に神経栄養因子と総称される一群のタンパク質が重要な役割を担っていると考えられる

Fig. 2 Cellular Lineage of Developing Cerebral Cortex
Abbreviations used: CR, Cajal-Retzius; SP, subplate

ようになってきた。神経栄養因子とは神経細胞に作用しその生存、分化促進、神経機能維持に働き、神経細胞の発生から機能発現、老化に至る過程をコントロールする分子と考えられている。神経栄養因子はこれまで未分化神経細胞や分化した神経細胞を対象として詳しく研究されてきたが、神経分化以前の神経幹細胞の増殖や分化に関する知見は実際のところ非常に乏しい。本研究はその時期の神経栄養因子の働きに焦点を絞り、特に生体系での実験を中心に脳の形成過程に及ぼす影響を検討したものである。以下に神経栄養因子のこれまでの知見を概説することによって、本研究がこれまでの概念を超えた神経栄養因子の新しい機能を扱っていること、本研究の結果が神経栄養因子の機能領域の拡大を示唆していることを強調したい。

神経栄養因子の研究の歴史は神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) の発見に始まる。NGF は 1950 年代の初めに見出され、培養下で末梢交感神経細胞や知覚神経細胞の生存維持や神経突起形成作用をもつことが明らかにされた⁴⁻⁶⁾。しかし NGF の作用は特定の神経細胞に限られており、副交感神経細胞や運動神経細胞には全く作用を及ぼさないことから、これらの神経細胞に作用する未知因子が存在すると想定された。未同定因子を含めて NGF と類似の作用をもつ因子を神経栄養因子と総称するようになり、新しい神経栄養因子の探索が盛んに行われるようになった。Barde ら⁷⁾ は NGF に次ぐ 2 番目の神経栄養因子として脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) を単離した。遺伝子解析の結果、BDNF が NGF と約 50% のアミノ酸配列ホモロジーをもつことが明らかとなり⁸⁾ ファミリーを形成している可能性が指摘された。他の類似因子が探索された結果、新たに

neurotrophin-3 (NT-3)^{9,10)}, NT-4/5¹¹⁾, NT-6¹²⁾ が発見されるに至った。これらの因子は相互に55%のアミノ酸配列ホモロジーを有し、ニューロトロフィンファミリーと総称されている。

個々のニューロトロフィンファミリー構成因子が作用する神経細胞種はある程度重複しており、BDNF は NGF 同様、神経冠由来知覚神経細胞、前脳基底核コリン作動性神経細胞に作用するが、NGF に応答しない神経板由来知覚神経細胞、中脳黒質ドーパミン作動性神経細胞、前脳基底核 GABA 作動性神経細胞、網膜神経細胞にも作用する^{11,13,14)}。また NT-3 の作用する神経細胞の多くは BDNF と共通するが、神経板由来知覚神経細胞に強い作用を示すのが NT-3 の特徴である^{9,11,15)}。また、BDNF や NT-3 は NGF に応答しない大脳皮質や海馬神経細胞にも作用し、様々な遺伝子発現を高めることが知られている¹⁶⁻²⁰⁾。

NGF と構造的に類似性をもたない神経栄養因子が数多く発見されたこともこの領域の研究発展に寄与した。たとえば免疫系に作用するいくつかのサイトカインに神経栄養効果があることは、神経系と免疫系のクロストークを示唆する有力な根拠となっている²¹⁻²⁴⁾。同様に非神経細胞に対する細胞増殖作用など、他の生理活性を持つ既知タンパク質の中にも神経栄養効果をもつものが見い出され、神経栄養因子はその数や機能の面で益々多様になってきている。

脳神経系の形成過程を分子レベルで解明し、神経疾患の病態の理解、治療法の開発に生かすことは神経科学研究の大きな目標のひとつである。神経栄養因子は脳の形成過程で重要な役割を果たすと推定されているが、実際には培養系を用いた断片的な知見しか得られていないのが現状である。そこで本研究では大脳皮質形成過程に着目し、神経栄養因子の役割に関する以下の研究を行い、いくつかの新知見を得た。

2. 先天性水頭症ラット VZ における神経栄養因子の発現異常

先天性水頭症ラット (HTX ラット) は多因子性の病態モデルであり^{25,26)}、比較的長期間生存できる (4-5 週) ことや、高い発病率 (50%) から水頭症研究の有用なモデルとして用いられている²⁵⁾。一般的に水頭症とは脳髄液の産生、循環、吸収の平衡が何らかの原因により崩れ、脳室 (一部ではなくも膜下腔) に脳髄液が大量に貯留した病態の名称である。脳髄液の循環障害については導管の狭窄や閉塞²⁷⁾、骨膜、硬膜内の血管の未発達および軟膜、くも膜細胞の未成熟が報告されているが²⁵⁾、その病因は不明である。HTX ラット脳では脳室の拡大と嚢胞性空洞が認められるが²⁸⁻³²⁾、水頭症の特徴である脳圧の亢進は生後 10 日齢 (P10) もしくはそれ以降でしか認められていない²⁸⁾。しかし脳室の拡大、細胞配列異常を伴う VZ の形成不全および側

室の奇形は胎生 20 日齢 (E20) 頃から認められることから³⁰⁾、先天性水頭症 HTX ラットにおける脳形成異常は脳圧の亢進よりむしろ脳実質内の何らかの異常によると考えられる。

近年、脳の発達異常にいくつかの神経栄養因子の関与が示唆されている。例えば、大脳皮質の形成途上で BDNF や NT-4/5 を脳室内に注入すると大脳皮質第 I 層に本来認められない神経細胞の集合塊が形成されること³³⁾、分泌型の酸性線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor-1: FGF-1) や FGF レセプター遺伝子を組み込んだレトロウイルスをニワトリ胚の神経幹細胞に感染させ過剰発現させると、細胞移動の異常と中脳神経細胞層の発達が抑制されること³⁴⁾、さらに成熟したキヌザルの脳室内に塩基性線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor-2: FGF-2) を持続注入すると水頭症様症状を引き起こすこと³⁵⁾、などである。このような研究背景のもと、水頭症の病因と神経栄養因子との関連を調べる目的で、脳圧の亢進が起こる以前の段階 (P6) を用い、脳圧亢進による影響を排除した状態で、HTX ラット大脳皮質内での神経栄養因子の発現・分布を免疫組織学的手法により解析した。

神経細胞の分化、形態異常

クレシルバイオレット染色した脳切片を観察したところ、水頭症 HTX ラット、非水頭症 HTX ラットのいずれにおいても神経細胞層構造は正常に形成されていたが、水頭症 HTX ラットは非水頭症 HTX ラットに比べて大脳皮質が薄く、形成不全が明瞭であった (Fig. 3; Fig. 4)。また水頭症 HTX ラット大脳皮質神経細胞では樹状突起の数が少ない傾向があり構造的に未発達である可能性が考えられた。

そこで、分化した神経細胞の細胞体や軸索、樹状突起に特異的に局在する微小管結合タンパク質 2 (microtubule-associated protein: MAP2)³⁶⁾ の発現・分布を免疫組織学的に検討した。水頭症の有無を問わず大脳皮質の神経細胞体と樹状突起が明瞭に染色されたが、水頭症 HTX ラットの染色強度がやや弱い傾向であった (Fig. 4 A, B)。VZ にも MAP2 陽性細胞が観察され、水頭症 HTX ラットの MAP2 陽性細胞は非水頭症ラットのそれに比べ長い突起を持つものが多く存在した (Fig. 4 C, D)。すなわち、水頭症 HTX ラットでは大脳皮質神経細胞の形態的分化は抑制されているが、VZ の神経細胞は分化が亢進していると考えられた。

MAP2 は分化した神経細胞に特異的に発現する骨格タンパク質であり、細胞体より樹状突起に主に分布している。通常の発生過程では、神経幹細胞が VZ から皮質板 (cortical plate) 内の叢原基層 (promordial plexiform) と副脳室周囲層 (subventricular zone) の間に移動し分化することによって MAP2 陽性細胞が生じてくる。本研究では、水頭症 HTX ラットの VZ 内に長い神経突起を持つ MAP2

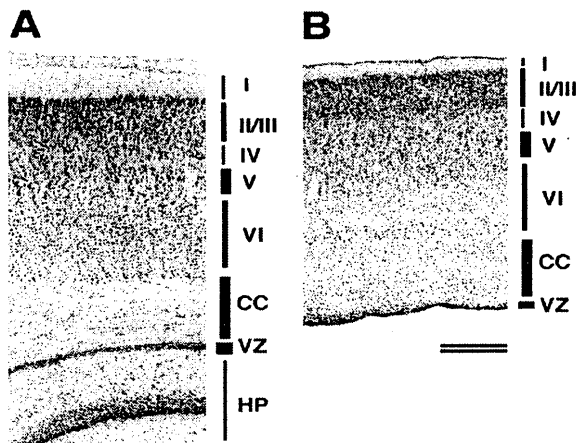


Fig. 3 Cresyl violet staining of HTX rats brains. Photomicrographs of cresyl violet-stained coronal sections of brains from non-hydrocephalic (A) and hydrocephalic (B) 6-day-old HTX rats. Vertical bars indicate neuronal layers (I-VI), corpus callosum (CC), ventricular zone (VZ), and hippocampus (HP). Horizontal double line indicates the scale: 200 μ m. Note the thin cerebral cortex in (B).

陽性細胞を見出した。これまでに水頭症 HTX ラットの脳に関して様々な形態的、機能的異常が報告されており、本結果はこれらと良く一致している。例えば大脳皮質神経細胞の樹状突起にみられる形態、構造異常は³¹⁾³⁸⁾、記憶・学習能力の低下²⁹⁾をもたらすと報告などがその例である。この神経細胞の形態異常の原因として、細胞移動の障害による異所性の神経分化あるいは早過ぎる神経分化による細胞移動の障害のいずれかの機構が推定される。神経分化と細胞移動を調節する候補分子として最も可能性が高いのは神経栄養因子であると考えられる。なぜなら、これまでに発達中の脳に神経栄養因子を作用させると、正常な発達が阻害されることがいくつか知られているからである。BDNF, NT-4/5 によって神経細胞の異常な集合塊が形成されること³³⁾、FGF-1 が細胞移動や神経細胞層の発達を抑制すること³⁴⁾、FGF-2 が水頭症様病態を引き起こすこと³⁵⁾などがその例である。つまりこのような神経細胞の形態的な異常は、神経栄養因子の発現の障害に起因する可能性がある。そこで次に神経栄養因子の発現について検討した。

神経栄養因子の発現

BDNF, NT-3 および FGF-1 の 3 種の神経栄養因子について検討した。非水頭症 HTX ラットの VZ には BDNF, NT-3 および FGF-1 の発現がほとんど認められないのに対し (Fig. 5) 水頭症 HTX ラットの VZ にはいずれの神経栄養因子も強く発現していた (Fig. 5 A, B, C)。

この結果は、正常なラットの発達過程の VZ における BDNF, NT-3 の発現は E20 までに徐々に減少し⁴⁰⁾、P6 で

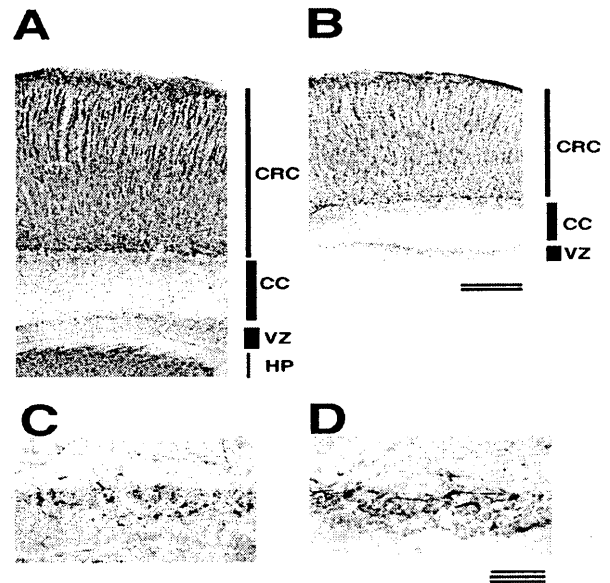


Fig. 4 Distribution of immunoreactivity of MAP2 in the cerebral cortex of HTX rats.

Typical low-power (A, B) and high-power (C, D) light microscopic views of anti-MAP2-stained coronal sections of brains from nonhydrocephalic (A, C) and hydrocephalic (B, D) 6-day-old HTX rats. C, D Enlargement of the ventricular zone seen in A, B, respectively. Sections were prepared from four or five rats and immunostained, and a typical one was photographed. Vertical bars indicate the cerebral cortex (CRC), corpus callosum (CC), ventricular zone (VZ), and hippocampus (HP). Horizontal bars indicate scales: double bar 200 μ m (A, B); triple bar 50 μ m (C, D).

Note that the MAP2-positive cells of the hydrocephalic rats have long horizontal neurites.

はほぼ消失する (Fig. 5 D, E) ことと大きく異なっている。一方、FGF-1 については、神経幹細胞の増殖を刺激し¹²⁾、神経分化を抑制する作用⁴¹⁾が知られており BDNF および NT-3 と共に発現が上昇することは一見相反する結果とも捉えられる。近年 FGF-2 には細胞の移動や分化に関する報告がなされている^{12, 18, 42-45)}。FGF-1 と FGF-2 は受容体を共有することから、FGF-1 もこれらの作用を持ち合わせているかもしれない。しかし *in vivo* での FGF の作用について統一的な見解が得られていないのが現状であり、今後の研究に期待したいところである。

以上、先天性水頭症 HTX ラットの VZ において MAP 2 と 3 種の神経栄養因子の異常な発現を観察した。過剰な神経栄養因子の発現とそれに続く作用は大脳皮質の細胞移動や神経分化に多大な影響を与え、結果として水頭症の病態形成の原因となっていると考えられた。しかし、これら神経栄養因子の過剰発現がなぜおこるのか今のところ不明である。この問題の解決には、多因子疾患である水頭症 HTX ラットの原因遺伝子の同定とその機能の解明が必要と思われる。

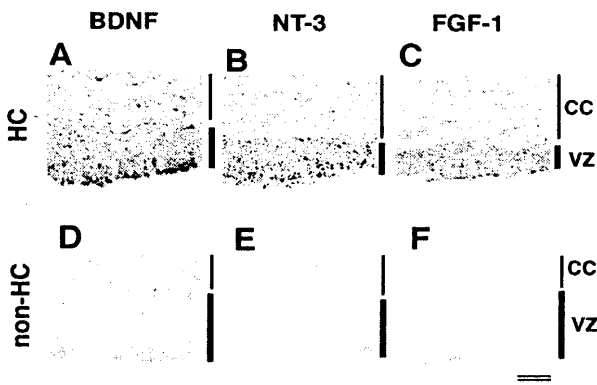


Fig. 5 Expression of neurotrophic factors in the ventricular zone of HTX rats.

Sections from 6-day-old hydrocephalic (HC ; A, B, C) and nonhydrocephalic (non-HC ; D, E, F) HTX rats were stained with antibody against BDNF (A, D), NT-3 (B, E), or FGF-1(C, F). A section from a rat showing a typical immunostaining pattern was selected from among sections from four to five animals. Vertical bars indicate the corpus callosum (CC) and ventricular zone (VZ). Horizontal double bars indicate the scale : 50 μ m. Note the intense labeling of the neurotrophic factors in the hydrocephalics.

3. FGF-2の脳室内投与によるマウス大脳皮質の細胞分化異常とその解析

FGF-2はマウス線維芽細胞を増殖させる因子としてウシ下垂体から⁴⁷⁾、また、等電点の異なる類似活性分子としてFGF-1が単離、同定された⁴⁸⁾。FGF-1とFGF-2は55%のアミノ酸配列ホモロジーを有し類似の生物活性を示すが、*in vitro*の系ではFGF-2の方がFGF-1に比べ10~100倍も強い活性を示すと報告されている^{47,49)}。FGF-2遺伝子の塩基配列が決定され、遺伝子組み換え分子が得られるようになり研究が加速された。その結果、FGF-2は線維芽細胞の増殖因子として作用するだけでなく血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、軟骨細胞、骨芽細胞など様々な細胞の増殖を刺激すること⁵⁰⁻⁵³⁾、脊椎動物の形態形成で重要な役割を担うこと⁵⁴⁾が示されている。

マウス胎子のVZに高濃度のFGF-2タンパク質やmRNA、さらにFGFレセプターの発現があることから^{44,45,55)}、FGF-2が大脳皮質の形成に重要な役割を担っていることが示唆されている。*in vivo*での機能を解明するには遺伝子欠損動物の作製、解析が有効な手段であるが、二つのグループから全く異なる解析結果が報告されている^{45,55)}。Donoら⁴⁵⁾は彼らの作製したFGF-2遺伝子欠損マウスを解析し、神経幹細胞の増殖には影響を認めず、一部の細胞の移動が妨げられ大脳皮質の層構造に異常が生じたこと、海馬交連には異所性にパルブアルブミン陽性神経細胞を認めたこと、を報告している。この結果はFGF-2が神経細胞の移動や分化に深く関与しているが、細胞増殖には必ずしも影響しないことを示唆している。しかしVaccarinoら⁵⁵⁾

はDonoら⁴⁵⁾とは別の系統のFGF-2遺伝子欠損マウスを解析した。彼らは細胞増殖が抑制され、成熟後の大脳皮質における神経細胞とグリア細胞の総細胞数と細胞密度が野生型マウスに比べ減少していると報告した。すなわち*in vivo*におけるFGF-2の作用について一貫する結果が得られておらず、統一的な理解には至っていない。

FGF-2の機能を調べる他の有力な手法として、直接脳室内へタンパク質を注入する方法がある。Vaccarinoら⁵⁵⁾は、ラット脳室内にFGF-2(75 ng)をE15.5で注入すると神経細胞数が、E20.5で注入するとグリア細胞数が増加したと報告している。この結果は神経幹細胞の増殖をFGF-2が刺激することを示唆している。

これまでの培養系を用いた研究から、FGF-2は神経幹細胞の増殖を刺激するばかりでなく、分化促進や生存維持作用ももつことが報告されている^{12,18,42-44)}。神経幹細胞の運命や分化を決定する過程へのFGF-2の作用は非常に複雑である。例えば、FGF-2の濃度に依存して増殖と分化の作用バランスが変化し^{12,44)}、ニューロトロフィンなどとともに低濃度のFGF-2を作用させると神経分化が誘導されるが⁵⁶⁾、高濃度のFGF-2はグリア細胞への分化を促進するといった具合である。このように神経幹細胞に対する*in vitro*でのFGF-2の作用ですら統一的に理解されておらず、*in vivo*での機能についてはなおさら不明な点が多く残されている。

本研究ではFGF-2の大脳皮質発達過程における役割を検討する目的で、E14マウスの脳室内にFGF-2を直接注入し、大脳皮質形成および構成細胞への影響について検討した。

大脳皮質の形態変化およびマーカータンパク質の発現・分布

胎生14日(E14)マウス側脳室にFGF-2またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を投与し、自然分娩させた後、生後10日齢(P10)まで育て脳の形態を観察した。FGF-2投与群は、脳室の拡大と大脳皮質が薄いという大きな脳構造変化をきたし、水頭症にきわめて類似する病態を呈した(Fig. 6 a, b)。変化の程度は用量依存的であった。脳切片を作成し大脳皮質を細胞レベルで観察すると、対照群に比べてFGF-2投与群では細胞数、細胞密度が有意に上昇していた(Fig. 6 c-f, Table 1)。この結果はFGF-2が*in vivo*で大脳皮質神経幹細胞の増殖に寄与することを示唆している。また、細胞間隙には軸索、樹状突起およびシナプスといった細胞間情報伝達のための構造が集積しているが、FGF-2投与群ではこの細胞間隙の狭小化が起こっていた。これが大脳皮質薄層化の主な原因と考えられるが、これらの構造異常に加え神経線維入力の変化など機能的な異常も存在する可能性がある。本結果からFGF-2は発達途上の増殖を促すことが示唆された。FGF-2投与群の大脳皮質を

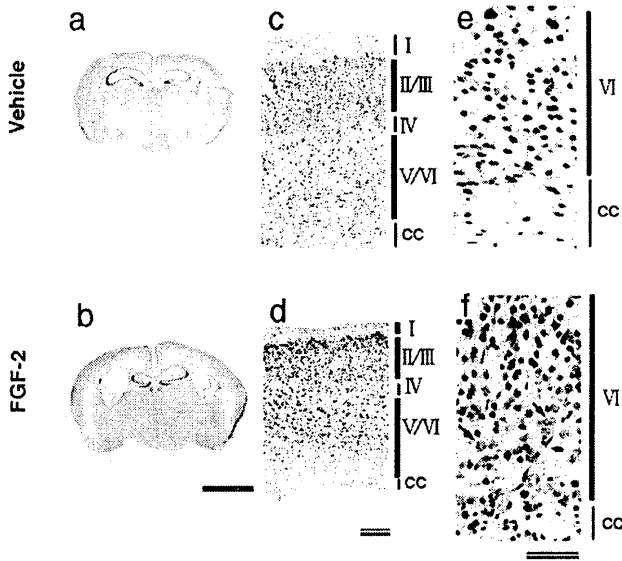


Fig. 6 Morphology of the postnatal cerebral cortex with or without injection of FGF-2.

FGF-2 (1 μ l of 300 ng/ μ l in PBS) or 1 μ l of PBS alone (vehicle) was injected into the telencephalic vesicle at E14. Most of the mice had a normal delivery. Brain sections from P10 mice with vehicle- (a, c, e) or FGF-2-treatment (b, d, f) were stained with Mayer's hematoxylin dye. Photographs (c-f) are enlarged ones of (a) and (b), respectively. Arrows in (f) indicate ectopic pyramidal neuron-like cells.

Scalebars: 200 μ m (single); 100 μ m (double).

観察すると、本来第V層に位置する錐体細胞様の大型細胞が、最深部第VI層に数多く存在していた (Fig. 6 f)。

そこでこれら大脳皮質深部に認められる構成細胞の分化の程度を検討するため、P10の脳切片を用いて各種タンパク質発現を免疫組織学的に検討した。ニューロトロフィンファミリーの一つであり本来大脳皮質第V層で強く発現するBDNF、カテコラミン合成の律速酵素でありドーパミン、ノルエピネフリンまたはエピネフリン作動性神経の細胞体や軸索に分布するTyrosine hydroxylase (TH)⁵⁸、神経幹細胞のマーカーであり胎生期のVZで発現が認められるネスチン⁵⁹、分化した神経細胞の細胞体や軸索、樹状突起に分布するMAP2³⁶を対象とした。

BDNFはFGF-2投与群の大脳皮質深部(第VI層の脳室側)に発現が局限していた (Fig. 7 A a, b)。TH、ネスチン陽性細胞は対照群の大脳皮質には全く発現が認められないが (Fig. 7 A c, e)、FGF-2投与群ではBDNFと同じく大脳皮質深部に発現が認められた (Fig. 7 A d, f)。対照群の大脳皮質第V層の錐体細胞は樹状突起を外縁側に向かってまっすぐ伸ばした典型的な成熟錐体神経細胞の形態をもち、抗MAP2抗体で強く染色された (Fig. 7 B a)。しかしFGF-2投与群では大脳皮質深部に位置する大型細胞にMAP2の強い染色が認められた。この細胞は成熟錐体神経細胞に類似する形態をもつが、樹状突起の方向が一定でなく、突起の数もより多く認められた (Fig. 7 B b)。

次に、これらのタンパク質が同一の細胞に共発現するか

Cell number		
Regions	Vehicle (n=3)	FGF-2 (n=3)
Whole cerebral cortex	267.3 \pm 4.4	320.8 \pm 8.7**
Upper layers (II/III)	101.1 \pm 1.2	130.2 \pm 0.4***
Lower layers (IV-VI)	168.9 \pm 2.2	196.5 \pm 8.9*
Cell density (cells/ $10^5 \mu\text{m}^3$)		
Regions	Vehicle (n=3)	FGF-2 (n=3)
Whole cerebral cortex	2.09 \pm 0.04	4.04 \pm 0.147**
Upper layers (II/III)	4.10 \pm 0.08	6.41 \pm 0.27**
Lower layers (IV-VI)	2.12 \pm 0.03	3.24 \pm 0.20*

Table 1 Cell number and Cell Density in the Cerebral Cortex of the Vehicle- and FGF-2-injected Mice

Coronal sections (20 μ m thickness) of the brain were prepared from P10 mice that had been injected with vehicle or FGF-2 at E14, and stained with Mayer's hematoxylin dye. The parietal region of the cerebral cortex (450 μ m wide circumferential band) was selected, and total cell number and cell density (cells/ $10^5 \mu\text{m}^3$) of the whole cerebral cortex (layers II-VI), upper layers (II/III), and lower layers (IV-VI) were calculated by counting the number of the stained nuclei with diameters more than 5 μ m. Significance vs. vehicle-injected group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0001$.

どうかを検討するため、BDNFとそれぞれの抗原との間で蛍光二重染色を行った。対照群、FGF-2投与群ともに大部分の細胞でMAP2とBDNFの共発現が認められた。さらにTHまたはネスチン陽性細胞の約半数はBDNFを共発現していた (Table 2)。

TH陽性神経細胞は成熟した大脳皮質には存在しないが⁶²、培養下では高率に出現する。この事実より神経細胞のフェノタイプはプログラムされたものではなく、環境因子による影響を受けることが示唆される。この環境因子の候補としてBDNFがあげられる。BDNFは単独もしくはドーパミンと共に、器官培養したラット胎仔やヒトの大脳皮質に作用し、ドーパミン作動性神経細胞を誘導することが報告されている⁶³⁻⁶⁵。本研究においてもFGF-2投与群で大脳皮質深部にドーパミン作動性神経細胞と思われるTH陽性細胞が多数認められた (Fig. 7)。FGF-2が直接THの発現を調節する作用をもつかどうかは不明であるが、FGF-2が海馬由来の神経幹細胞に作用してBDNF発現を上昇させる⁶²ことや、本研究において大脳皮質深部のTH陽性細胞の約半数がBDNF陽性であった (Fig. 7)こと、BDNFレセプターであるTrkBもこの部位に発現が局限していること (データ提示せず)、などから、FGF-2により発現誘導されたBDNFが二次的にTH発現を誘導した可能性も考えられる。

ネスチンは神経幹細胞に一過性に多量に発現する中間径フィラメントタンパクであり、齧歯類の成熟脳では血管内皮細胞やVZに限定して発現する^{66,67}ことから、大脳皮質深部のネスチン陽性細胞 (Fig. 7)には、神経幹細胞の性質が部分的に残存している可能性が考えられる。脳損傷を起こすとFGF-2を含めた様々な神経栄養因子が一過性に誘導され、このとき分化した神経細胞にもネスチンが発

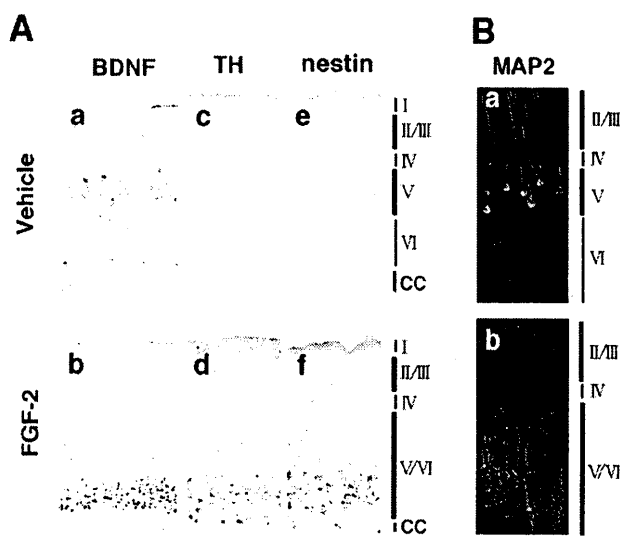


Fig. 7 Expression of various marker proteins in the cerebral cortex with or without FGF-2 administration.

A : Brain sections of P10 mice that had been injected with PBS (a, c, e) or FGF-2 (300 ng) (b, d, f) at E14 were stained with anti-BDNF (a, b), anti-TH (c, d), or anti-nestin (e, f), antibody. B : Brain sections of the vehicle-treated (a) or FGF-2- treated (b) mice were doublestained with anti-BDNF rabbit antibody and anti-MAP2 mouse antibody. Abbreviation: cc, corpus callosum. Scale bars : 100 μ m (single), double, 50 μ m (double).

現するという報告がある⁶⁸⁾. FGF-2 投与は損傷後の脳内環境に類似しているのかもしれない.

以上, FGF-2 の投与によって 1) 本来第 V 層に存在する錐体細胞様の大型細胞が脳皮質深部に出現すること, 2) この大型細胞は MAP2 を発現して分化神経細胞の性質を示すと同時に, ネスチンを発現する神経幹細胞の性質も併せてもっていること, 3) 本来脳皮質では発現しない TH を発現すること, などが明らかとなった. すなわち, FGF-2 投与により脳皮質深部に出現した大型細胞は正常の脳には存在しない異常な形質をもつ細胞であることが明らかとなった.

大脳皮質発達過程での BDNF の発現変化

FGF-2 投与後のどの時期に異常な細胞群が出現するのか, BDNF の発現を指標として検討した. E17 から P1 にかけて皮質板の上部領域で BDNF の強い発現が認められ, この間は対照群と FGF-2 投与群の間に違いは認められなかった (Fig. 8 a-d). P5 になると, 対照群では大脳皮質第 V 層に強く BDNF が発現し, 他の層でも発現が散見されるのに対し, FGF-2 投与群では大脳皮質深部に BDNF 発現が局在するようになり, その傾向は P10 でより顕著になった (Fig. 8 e-h). このことからタンパク質の発現異常は P5 以降で起こると考えられた.

大脳皮質深部の神経細胞は FGF-2 を投与した E14 以前に移動を完了している. したがって, 脳室内に投与された

BDNF/TH	% (n=3)	BDNF/nestin	% (n=3)
+/+	29.1±0.4	+/+	26.2±1.7
+/-	24.6±0.4	+/-	26.5±1.3
-/+	7.1±0.3	-/+	6.7±0.9
-/-	39.2±0.4	-/-	60.6±1.0

Table 2 Percentage of the Cells Expressing BDNF or TH, or BDNF or nestin in the Bottom Layers of the Cerebral Cortex.

Brain sections from P10 mice that had been injected with FGF-2 (300 ng) at E14 were reacted separately with both anti-BDNF rabbit antibody and anti-TH mouse antibody, or with both anti-BDNF rabbit antibody and anti-nestin mouse antibody. BDNF was then visualized with FITC-labeled anti-rabbit IgG antibody. Layers V and VI of the parietal cerebral cortex (120 μ m-wide circumferential band of the corpus callosum) were selected, and total cell number, numbers of cells positive for BDNF or TH, or BDNF or nestin were counted with a phase-contrast or a confocal laser microscope. Total cell number was ranged from 250-350/individual. The percent values of the positive cells are expressed as the means \pm SE.

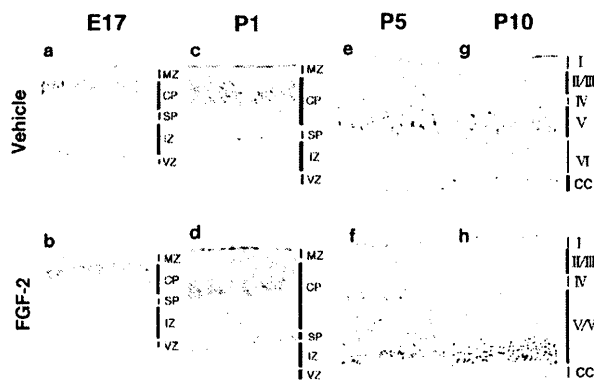


Fig. 8 Developmental changes in BDNF protein expression in the cerebral cortex after FGF-2 administration.

Developmental expression of BDNF protein in the cerebral cortex was followed immunochemically by using anti-BDNF antibody after injection of FGF-2 at a dose of 300 ng (a, c, e, g) or vehicle (b, d, f, h). Abbreviations: MZ, marginal zone; CP, cortical plate; SP, subplate; IZ, intermediate zone; VZ, ventricular zone; CC, corpus callosum. Scale bar : 300 μ m.

FGF-2 は, 拡散によってこれら深部の細胞に直接作用を及ぼした可能性が考えられる. 正常脳での BDNF 発現は興奮性のグルタミン酸刺激によって上昇し, 抑制性の GABA 入力によって抑制される^{60,61)}. 投与された FGF-2 によって神経線維投射パターンに変化を生じ, 大脳皮質深部にグルタミン線維や GABA 線維が深部の細胞に投射した可能性も否定できない. このような変化が投射を受けた神経細胞に異所性の異常なタンパク質発現を起こしているのかもしれない.

以上の結果から, FGF-2 は発達途上の大脳皮質神経幹細胞の増殖を促すほか, 特定の大脳皮質神経細胞の分化を制御する働きがあることが明らかとなった.

4. マウス大脳皮質の細胞移動におよぼす BDNF の作用

BDNF には神経細胞の分化、生存維持など幅広い役割が知られている²⁾。Fukumitsu ら⁴⁰⁾は大脳皮質発達過程の初期から BDNF とその特異的レセプターである TrkB が CR 細胞と VZ に発現していることを報告している。同様のことは mRNA の発現でも裏付けられている¹⁰⁾。CR 細胞はリーリンタンパク質を分泌する⁶⁹⁾ ことにより、大脳皮質の細胞移動を調節し、その結果として層構造の構築に重要な役割を担っていると考えられている。CR 細胞が BDNF を産生し、そのレセプターを発現することは BDNF にオートクライン応答することを意味しており、その生存、分化および機能が BDNF によって調節されることを示唆している。すなわち、BDNF は CR 細胞のリーリン産生を介して間接的に大脳皮質構築過程に関与していると考えられる。Ringstedt ら⁷⁰⁾は BDNF トランスジェニックマウスを解析し、過剰の BDNF によってリーリンの発現が減少し、その結果、大脳皮質の層構造に異常が認められたことを報告している。しかし BDNF が真に細胞移動に影響をおよぼすかどうか、もしそうだとすると BDNF の作用はリーリン依存的なのか、他の機構は存在しないのかなど、核心の部分はほとんど明らかになっていない。

本研究では、マウス大脳皮質発達過程での VZ から皮質板への細胞の移動に BDNF がどのような影響を与えるかを検討する目的で、E13 および E14 マウスの側脳室に直接 BDNF タンパク質を注入し、その影響を解析した。

Bromodeoxyuridine (BrdU) 標識細胞の移動におよぼす BDNF の影響

E13 胎子を在胎する親マウスの腹腔内に BrdU を投与し、3 時間後に胎仔の大脳皮質内 BrdU 分布を観察すると、VZ に限局して多数の陽性細胞が認められた (Fig. 9 a)。この方法で検出される BrdU 陽性細胞のほとんどが神経幹細胞であることがわかる。そこで E13 胎子を在胎する親マウスへ BrdU を投与し 1 時間後に胎仔側脳室に BDNF を投与した。そしてその 2 日後 (E15) に BrdU 陽性細胞を観察した。対照群、BDNF 投与群共に皮質板内に BrdU 陽性細胞が多数認められ、VZ で BrdU 標識された神経幹細胞が皮質板内へと移動したことを示している。興味深いことに対照群に比べ BDNF 投与群ではその数が 2 倍以上に上昇していた (Fig. 9 b, c; Table 3)。

この結果は、E13 で BrdU 標識された細胞のうち E15 までに皮質板へと移動する細胞の比率が BDNF によって亢進することを示している。次に、同様に E13 胎子を在胎する親マウスへ BrdU を投与し 1 時間後に胎仔側脳室に BDNF を投与した。自然分娩させた後、P1 で BrdU 陽性細胞を観察した。対照群では 30 % の陽性細胞が大脳皮質第 IV-V 層に認められたのに対し、BDNF 投与群では 60 % が第 V-VI 層に位置していた (Fig. 10 a, b; Table 3)。つまり P1

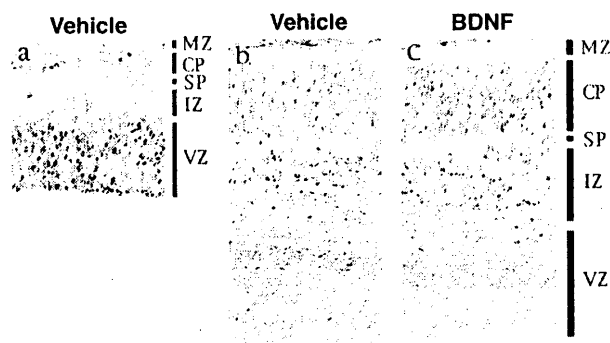


Fig. 9 Early migration profiles of BrdU-labeled cells after BDNF administration.

Ventricular progenitor cells were pre-labeled with BrdU at E13, and BrdU was visualized 1h later (a). The progenitor cells were pre-labeled with BrdU at E13 1h before injection of vehicle (b) or BDNF (700ng) (c) into the ventricular space. BrdU was visualized in the brain sections of the E15 embryos. Scale bar : 50 μ m. Abbreviations used : MZ, marginal zone; CP, cortical plate; SP, subplate; IZ, intermediate zone; VZ, ventricular zone. The results were almost equal in separate three experiments.

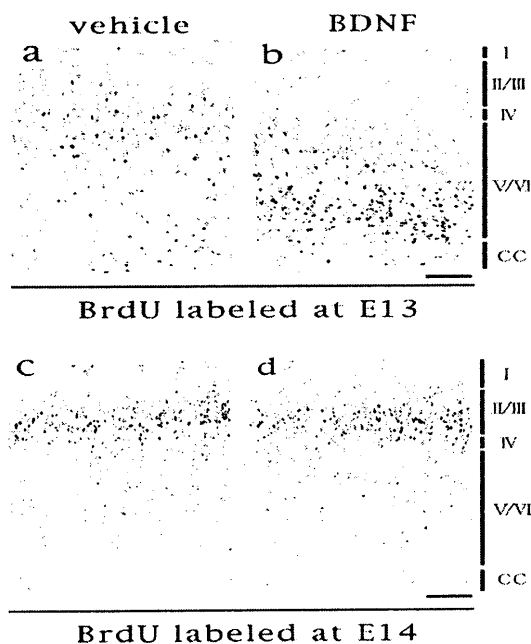


Fig. 10 Migration profiles in the cerebral laminated structures of BrdU-labeled progenitor cells after BDNF administration.

Ventricular progenitor cells were pre-labeled with BrdU at E13 (a, b) or E14 (c, d) 1h before injection of vehicle (a, c) or BDNF (700ng) (b, d) into the ventricular space. BrdU was visualized in the brain sections of P1 mice. Scale bar : 50 μ m. Abbreviations used : CC, corpus callosum. The results were almost equal in separate four experiments.

で観察すると BrdU 標識細胞は大脳皮質のより深部に位置するように BDNF の影響を受けたことを意味している。

次に E14 で BrdU 標識し、その 1 時間後に BDNF を脳室内に投与し、P1 で観察したところ、BrdU 陽性細胞は対照群と変化なく大脳皮質第 II/III 層に位置を占めていた (Fig. 10 c, d; Table 3)。

一般にマウス大脳皮質の構築は inside-out の法則に従

BrdU label, BDNF Injection	Observation	Vehicle (n=3) (cells/10 ⁵ µm ³)	BDNF (n=3) (cells/10 ⁵ µm ³)
A: E13	E15 Cortical Plate PI	84.1 ± 4.8	175.1 ± 14.2*
B: E13	Upper Layers (IV-V)	158.3 ± 12.7	104.3 ± 24.3*
	Lower Layers (V-VI) PI	56.1 ± 12.4	159.5 ± 12.8*
C: E14	Upper Layers (II/III-IV)	146.2 ± 9.0	141.2 ± 10.4*
	Lower Layers (V-VI)	39.3 ± 2.4	35.6 ± 0.5*

Table 3 Density of the BrdU-labeled cells in the cortical plate or cerebral cortex of vehicle- or BDNF-treated mice.

BDNF or vehicle injection into the embryonic ventricles after BrdU administration to pregnant mice was performed at E13 (A, B) or E14 (C). Mice treated at E13 were used for observation at E15 (A) or P1 (B). One animal was arbitrarily selected from each group of both BDNF- and vehicle-treated littermates of three mother mice. Namely, three animals of each group used for the experiment were derived from different three mother mice. Coronal brain sections (50µm thickness) were prepared from each animal, and stained with Mayer's hematoxylin dye. The parietal region of the cerebral cortex (200µm width of the circumference and 100-150 µm height) was selected, and the number of the BrdU-positive cells in objective layers were counted. The average value of serial three sections was considered as the value of each animal. The cell density (cells/10⁵µm³) was calculated, and expressed as M±SE of three animals. Significance: *P<0.005.

うため、通常 E13 に生じた神経細胞は大部分が第 IV-V 層に、E14 に生じた神経細胞は第 II/III 層に移動する。McConnell ら⁷¹⁾ は、将来第 VI 層を形成する神経幹細胞を第 II/III 層を形成する時期の脳室内に移植したところ、大部分は第 VI 層を構築したが、一部は第 II/III 層に移動することを観察している。しかし将来第 II/III 層を形成する細胞群を取り出し大脳皮質発達初期の脳室内へと移植してもこれらの細胞はもとどおり第 II/III 層を形成する⁷²⁾。つまり第 II/III 層を形成する神経幹細胞は周囲の環境に影響されにくい性質をもつと考えられ、本研究結果をうまく説明できる。すなわち、E14 で BrdU 標識される神経幹細胞は将来第 II/III 層を形成する細胞であり、外的に BDNF を注入してもその影響を受けることなく所定の位置に移動したと考えられる。この E13, E14 での BDNF に対する反応性の違いは BDNF レセプター、TrkB、の発現量の違いを反映するのかもしれない。Fukumitsu ら⁴⁰⁾ は、ラットの VZ での TrkB の発現は E13 で最も高く、その後 E20 にかけて徐々に減少してゆくことを観察している。マウスでも発現パターンが同様に変化する可能性がある。一方、将来第 VI 層を形成する神経幹細胞は既述したように環境の変化を受けることがある。McConnell ら⁷¹⁾ はこの細胞を細胞周期ごとに分離し、第 II/III 層を形成する時期の脳室内に移植すると S 期の細胞のみが周りの環境に同調し第 II/III 層へ移動したと報告している。つまり、S 期のあとの G2 期、M 期に細胞の運命が決定されるのではないかと考えられる。本研究の結果からも、脳室内に注入

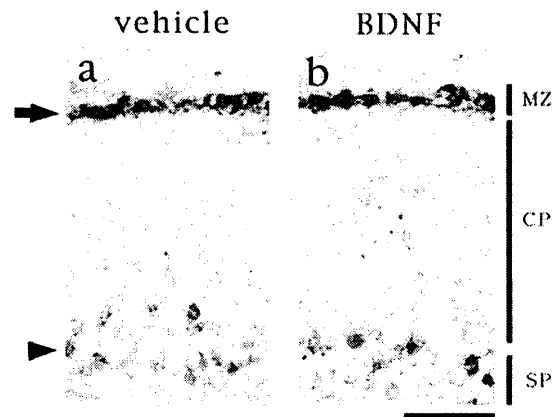


Fig.11 Morphology of CR neurons after BDNF administration. Vehicle (a) or BDNF (700ng) (b) was injected into the ventricular space of E13 embryos. CR neurons and subplate neurons in the brain sections of P1 mice were identified by staining with anti-calretinin antibody (swant). Arrow indicates a layer of calretinin-positive CR neurons, and arrowhead, a layer of calretinin-positive subplate neurons. Abbreviations used were shown in the legend of Fig.1

した BDNF は DNA 合成を終えた細胞にだけ作用し、その細胞移動を変化させると考えられた。

以上の結果から、BDNF は E13 で生じた神経細胞の移動には影響を及ぼすが、E14 で生じた神経細胞への影響は小さいと考えられた。

CR 細胞の形態

Ringstedt ら⁷⁰⁾ は E13.5 の BDNF トランスジェニックマウスを BrdU 標識し、P18 で細胞の移動を観察したところ、野生型マウスでは大部分が大脳皮質下層に移動したのに対し、BDNF トランスジェニックマウスではそれよりも上層へ移動する細胞を認め、層構造異常が引き起こされていることを報告している。彼らは BDNF が CR 細胞に作用しリーリンの発現を抑制した結果、inside-out の法則が乱れたためであると考えている。また CR 細胞が大脳皮質外縁部 (第 I 層) に凝集塊を形成するなどの形態異常も見だしている⁷⁰⁾。そこで CR 細胞に選択的に発現するカルシウム結合タンパク質、カルレチニンについて免疫組織染色を行ったところ、BDNF を脳室内投与しても CR 細胞の形態変化は観察されず、本実験系では BDNF は CR 細胞の機能に影響を与えないと考えられた (Fig. 11 a, b)。

本研究で認められた BDNF による細胞移動の変化は 1) BDNF 投与後も CR 細胞の形態異常は認められないこと (Fig. 11), 2) 第 II/III 層の移動には BDNF の影響が認められなかったこと (Fig. 10 c, d), 3) BDNF 投与 2 日後に細胞移動が影響を受けており CR 細胞を介する反応としては迅速過ぎる (Fig. 9 b) こと、などから CR 細胞を介するものではないと考えられた。

BDNF が神経幹細胞の分化誘導作用をもつことは多くの

報告によって明らかにされており^{37, 73, 74)}, 直接脳室内へ投与すると大脳皮質神経細胞の MAP2 発現を著明に亢進することが知られている⁷⁵⁾. これらの報告と Fig. 9 c の結果から, BDNF は TrkB を発現している VZ の細胞に作用して分化を早め, その結果, VZ から皮質板へと移動を開始する時期を早める働きをしているのではないかと考えられた. この考えによれば, E13 の神経幹細胞は BDNF によって早期に VZ から皮質板へと移動し, E15 の観察ではより多くの移動細胞が検出されるという結果をもたらした (Fig. 9 c), 早期に移動を開始した分, inside-out の法則に基づき, 本来の位置より下層に位置を占めた (Fig. 10 b) と推定される. つまり Fig. 10 の結果はこの考えを支持していると考えている.

本研究結果から, 大脳皮質構築過程で起こる細胞の移動に BDNF が何らかの形で関与していると考えられた.

5. 総括

本研究結果から, 神経栄養因子は大脳皮質構築過程において重要な役割を果たしていることが示唆された. 同時に, 秩序だった神経栄養因子の発現が乱されることは水頭症をはじめとする先天性の脳形成異常を招く可能性があることも示唆している. 成熟脳にも神経幹細胞が見いだされ, その臨床応用が視野に入った現在, 本研究をさらに発展させ神経幹細胞から神経細胞へと至る道筋に神経栄養因子がどのような役割を果たすのかを解明することは今後の再生医療の発展の観点からも大きな意義があると考えている.

6. 謝辞

本総説に記述した研究は岐阜薬科大学分子生物学教室で行われたものであり, 研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました恩師古川昭栄教授ならびに同教室の各位に深甚なる謝意を表します.

7. 引用文献

- 1) Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K, *Neuron* 1995 14 : 899-912.
- 2) Yoneshima H, Nagata E, Matsumoto M, Yamada M, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, *Neurosci. Res.* 1997 29 : 217-223.
- 3) de Bergeyck V, Nakajima K, Lambert de Rouvroit C, Naerhuyzen B, Goffinet AM, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997 50: 85-90.
- 4) Thoenen H, Brade YA, *Physiol Rev.* 1980 60 : 1284-1235. Review.
- 5) Korsching S, Thoenen H, *Neurosci Lett.* 1985 54 : 201-205.
- 6) Levi-Montalcini R, *EMBO J.* 1987 6 : 1145-1154. Review.
- 7) Barde YA, Davis AM, Johnson JE, Lindsay RM, Thoenen H, *Prog Brain Res.* 1987 71 : 185-189.
- 8) Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Brade YA, *Nature.* 1989 341 : 149-152.
- 9) Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA, *Nature.* 1990 344 : 339-341.
- 10) Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, *Neuron* 1990 5: 501-509.
- 11) Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A, *Neuron.* 1991 7 : 857-866.
- 12) Ghosh A, Greenberg ME, *Neuron* 1995 15:89-103.
- 13) Knusel B, Winslow JW, Rosenthal A, Burton LE, Seid DP, Nikolics K, Hefti F, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 88 : 961-965.
- 14) Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM, *Nature.* 1991 350 : 230-232.
- 15) Kaisho Y, Yoshimura K, Nakahama K, *FEBS Lett.* 1990 266 : 187-191.
- 16) Nawa H, Bessho Y, Carnahan J, Nakanishi S, Mizuno K, *J Neurochem.* 1993 60 : 772-775.
- 17) Nawa H, Pellemounter MA, Carnahan J, *J Neurosci.* 1994 14 : 3751-3765.
- 18) Icaro-Abejon C, Johe KK, Hazel TG, Collazo D, McKay RD, *Neuron.* 1995 15 : 105-114.
- 19) Collazo D, Takahashi H, McKay RD. *Neuron.* 1992 9 : 643-656.
- 20) Segal RA, Takahashi H, McKay RD, *Neuron.* 1992 9 : 1041-1052.
- 21) Hama T, Miyamoto M, Tsukui H, Nishio C, Hatanaka H, *Neurosci Lett.* 1989 104 : 340-344.
- 22) Hama T, Kushima Y, Miyamoto M, Kubota M, Takei N, Hatanaka H, *Neuroscience.* 1991 40 : 445-452.
- 23) Yamada M, Hatanaka H, *Brain Res.* 1994 643 : 173-180.
- 24) Kamegai M, Konishi Y, Tabira T, *Brain Res.* 1990 532 : 323-325.
- 25) Kohn DF, Chinookoswong N, Chou SM, *Acta Neuropathol (Berl).* 1981 54:211-218.
- 26) Kohn DF, Chinookoswong N, Chou SM, *Am J Pathol.* 1984 114: 184-185.

- 27) Jones HC and Bucknall RM, *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1988 14:263-274.
- 28) Jones HC and Lopman BA, *Eur J Pediatr Surg.* 1998 8 : 55-58.
- 29) Miyazawa T and Sato K, *Childs Nerv Syst.* 1991 7:121-128
- 30) Nojima Y, Enzan H, Hayashi Y, Nakayama H, Kiyoku H, Hiroi M, Mori K, *Pathol Int.* 1998 48: 115-125.
- 31) Suda K, Sato K, Miyazawa T, Arai H, *Pediatr Neurosurg.* 1994 20: 50-56.
- 32) Yoshida Y, Koya G, Tamayama K, Kumanishi T, Abe S, *Neurol, Med Chir (Tokyo).* 1990 30: 445-450.
- 33) Brunstrom JE, Gray-Swain MR, Osborne PA, Pearlman AL, *Neuron* 1997 18: 505-517.
- 34) Mima T, Ohuchi H, Noji S, Mikawa T, *Dev Biol.* 1995 167 : 617-620.
- 35) Pearce RK, Collins P, Jenner P, Emmett C, Marsden CD, *Synapse* 1996 23: 192-200.
- 36) Caceres A, Banker GA, Binder L. *J Neurosci.* 1986 6: 714-722.
- 37) Pappas IS, Parnavelas JG, *Exp Neurol.* 1997 144: 302-314.
- 38) Miyazawa T, Nishiye H, Sato K, Kobayashi R, Hattori S, Shirai T, Obata K, *Brain Dev.* 1992 14: 75-79.
- 39) Miyajima M, Sato K, Arai H, *Pediatr Neurosurg.* 1996 24:1-4.
- 40) Fukumitsu H, Furukawa Y, Tsusaka M, Kinukawa H, Nitta A, Nomoto H, Mima T, Furukawa S, *Neuroscience* 1998 84: 115-27.
- 41) Cavanagh JF, Mione MC, Pappas IS, Parnavelas JG, *Cereb Cortex* 1997 7: 293-302.
- 42) Petroski RE, Grierson JP, Choi-Kwon S, Geller HM, *Dev Biol.* 1991 147: 1-13.
- 43) Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 90: 3602-3606.
- 44) Qian X, Davis AA, Goderie SK, Temple S, *Neuron* 1997 18: 81-93.
- 45) Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R, *EMBO J.* 1998 17: 4213-4225.
- 46) Miyan JA, Khan MI, Kawarada Y, Sugiyama T, Bannister CM, *Eur J Pediatr Surg.* 1998 1:43-48.
- 47) Gospodarowicz D., Bialecki H., Greenberg G, *J. Biol. Chem.* 1987 ; 253: 3736-3743.
- 48) Thomas K.A., Rios Candelore M. and Fitzpatrick S, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984 481: 357-361.
- 49) Esch F., Baird A., Ling N., Ueno N., Hill F., Denoroy L., Klepper R. and Gospodarowicz., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985 ; 82 : 6507-6511.
- 50) Imamura T., Mitui Y, *Exp. Cell. Res.* 1987 172 : 92-100.
- 51) Majack R.A., Majesky M.W. and Goodman L.V, *J. Cell. Biol.* 1990 111 : 239-247.
- 52) Richman J.M. and Crosby Z, *Development* 1990 109 : 341-348.
- 53) Noff D., Pitaru S. and Savion N, *FEBS Lett.* 1989 250 : 619-621.
- 54) Wilkie A O., Morris Kay GM., Jones EY. and Heath JK, *Curr. Biol.* 1996 5 : 500-507.
- 55) Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, Nilsen J, Rhee J, *Nat Neurosci.* 1999 2: 246-253.
- 56) Temple S, Qian X, *Neuron* 1995 15: 249-52. Review.
- 57) Coffin JD, Florkiewicz RZ, Neumann J, Mort-Hopkins T, *Mol. Biol. Cell.* 1995 6: 1861-1873.
- 58) Pickel VM, Joh TH, Field PM, Becker CG, Reis DJ, *J Histochem Cytochem.* 1975 23: 1-12.
- 59) Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD, *Cell* 1990 60: 585-595.
- 60) Zafra F, Castren E, Thoenen H, Lindholm D, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 88: 10037-10041.
- 61) Johanson CE, Szmydynger-Chodobska J, Chodobski A, Baird A, McMillan P, Stopa EG, *Neuroscience* 1998 84 : 115-127.
- 62) Kwon YK. *Molecules & Cells.* 1997 7: 320-325,.
- 63) Ostergaard K, Jones SA, Hyman C, Zimmer. J. *Exp Neurol.* 1996 142 : 340-350.
- 64) Zhou J, Bradford HF, Stern GM. *Eur J Neurosci.* 1996 8 : 2328-2339.
- 65) Zhou J, Pliego-Rivero B, Bradford HF, Stern GM, Jauniaux ER. *Neurosci Lett.* 1998 252 : 215-217.
- 66) Roy NS, Benraiss A, Wang S, Fraster RA, Goodman R, Couldwell WT, Nedergaard M, Kawaguchi A, Okano H, Goldman SA. *J Neurosci Res.* 2000 59 : 321-331.
- 67) Sahin-Kaya S, Mahmood A, Li-Y, Yavuz E, Chopp M. *Brain Res.* 1999 840 : 153-157.
- 68) Li Y, Chopp M. *Brain Res.* 1999 838:1-10.
- 69) Curran T, D'Arcangelo G. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1998 26: 285-294. Review.
- 70) Ringstedt T, Linnarsson S, Wagner J, Lendahl U, Kokaia Z, Arenas E, Ernfors P, Ibanez CF. *Neuron* 1998 21: 305-315.

- 71) McConnell SK. *Neuron*. 1995 15: 761-768. Review.
- 72) Frantz GD, McConnell SK. *Neuron* 1996 7:55-61.
- 73) Rubio F, Kokaia Z, Arco A, Garcia-Simon M, Snyder E, Lindvall O, Satrustegui J, Martinez-Serrano A. *Gene Ther.* 1999 6: 1851-1866.
- 74) Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. *J Neurobiol.* 1999 38: 65-81.
- 75) Fukumitsu H, Ohashi A, Nitta A, Nomoto H, Furukawa S. *Neurosci Lett.* 1997 238: 107-110.

* 本総説は岐阜薬科大学博士論文（甲 第 83 号）の内容
を中心にまとめたものである。