

発生期ラット終脳外套の Neuroepithelial Cell における 糖蛋白テネシンの発現

新潟大学脳研究所実験神経病理学部門（主任：生田房弘教授）

柿 田 明 美

Expression of Tenascin in Neuroepithelial Cells
in Developing Rat Telencephalic Pallium

Akiyoshi KAKITA

*Department of Pathology,
Brain Research Institute, Niigata University
(Director: Prof. Fusahiro IKUTA)*

Developmental expression of tenascin in the rat telencephalic pallium was examined immunohistochemically. By the 12th day of gestation (E12), immunoreactivity showing a fine granular pattern had already appeared within the cytoplasm of neuroepithelial cells, being accentuated in their external segments. Accumulation of labelling was also evident in the cytoplasm of mitotic neuroepithelial cells lining the central canal. On E13, fine granular labelling was also distinct in the internal segments of the cytoplasm of neuroepithelial cells. From E14 onwards, labelling became more intense and increased the number, and accumulating in the entire length of cytoplasm of all cells constituting the neuroepithelium. Accordingly, labelling produced a linear appearance, and was present radially through the neuroepithelium and primordial plexiform layer, i.e., throughout the entire width of the telencephalic pallium. On E16, the linear labelling became more clearly. Especially, the majority of the intensely labelled cytoplasm of neuroepithelial cells coursed perpendicularly in bundles through the internal region of the neuroepithelium, and terminated along the ventricular surface. Immunoreactivity was also present within the radial fibers which extended in the subventricular and intermediate zones and reached the external limiting membrane. From E18 onwards, labelling rapidly less intense and was limited to the cell processes in the neuroepithelium and subventricular zone. After E22, no further labelling was observed.

The present study demonstrated that in the rat telencephalic pallium tenascin was

Reprint requests to: Akiyoshi KAKITA,
Department of Pathology, Brain Research
Institute, Niigata University, 1
Asahimachi-dori, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所実験神経病理学部門

柿 田 明 美

expressed in the cytoplasm of neuroepithelial cells from E12 to E17. On the other hand, tenascin was also expressed in the radial fibers on E16 and E17. It was unclear whether the linear labelling in the neuroepithelium continued to the radial fibers. However, all the cells constituting the neuroepithelium were equally immunoreactive for tenascin.

It has been previously reported that tenascin is involved in migration and adhesion. However, in the telencephalon, the labelling becomes rapidly less intense after E18, although the neuroblasts still migrate furiously with keeping adhesion to radial fibers. In the course of cerebral cortical development, the stage from E14 to E17 is the most active period of neurogenesis. It may be possible to consider that tenascin play a role in certain mechanism during the active period of neurogenesis.

Key words: tenascin, neuroepithelial cell, telencephalic pallium, radial fiber, rat

テネイシン, 神経上皮細胞, 終脳外套, ラジアルファイバー, ラット

はじめに

テネイシンは、組織発生過程および細胞の腫瘍化あるいは組織修復時において、多くの場合一過性に発現する細胞外基質糖蛋白であり¹⁾、細胞の接着、移動、増殖あるいは血球凝集などさまざまな機能活性を有すると考えられてきた²⁾。神経組織を用いた主に *in vitro* の研究では、テネイシンは、ニューロンとグリアの接着³⁾⁴⁾、及び神経堤細胞や小脳顆粒細胞の移動⁵⁾⁶⁾ に重要な分子と考えられてきた。

発生期神経組織における免疫組織化学や *in situ* hybridization の研究では、全中枢神経系の細胞外基質に広範にテネイシンの発現を認めたとの報告⁷⁾⁸⁾ がある。他方、特定の細胞あるいは構造物については、神経堤細胞移動路⁵⁾ や脊索⁷⁾ について、また中枢神経系においては小脳のパーグマンガリア³⁾、外顆粒細胞⁶⁾ や小脳のラジアルグリアの突起⁹⁾ や平行線維¹⁰⁾ について、更に大脳の体性感覚野パレル構造¹¹⁾ にその発現を認めたとの報告がある。

しかし、これまで、終脳外套の組織発生過程におけるテネイシン発現の経時的変化を詳細に観察した報告はみられない。

胎生期の終脳外套では、ニューロンやグリアの母細胞である neuroepithelial cell が増殖し、その neuroepithelial cell から産生された神経芽細胞はラジアルファイバーとの接着を保ちつつ移動し、整然とした大脳皮質構造を形成することが知られてきた¹²⁾。ただ、ラジアルファイバーについては、neuroepithelial cell 自身の突起であるという考え¹³⁾ と、neuroepithelial cell と

は別の特殊な分化を示した細胞(ラジアルグリア)の突起から構成されている^{14)~16)} という二つの考えがあり、なお不明確な点が極めて多い。本研究は、終脳におけるラジアルファイバーの成り立ち、ラジアルファイバーと神経芽細胞の産生、移動との関連性などを知る目的から、発生期ラット終脳外套におけるテネイシンの発現を経時的に免疫組織化学的に検索した。

材料と方法

生後3~5カ月の Wistar 系ラット(体重250~300 g)を用いた。午後10時から翌朝午前6時まで雌雄ラットをつがいにし、その後ただちに膣スメアを採取し、光顕下に精子を認めた日を胎生第1日(E1)とした。出生日を生後第1日(P1)とした。

妊娠12~22日のラットをエーテル麻酔し、毎日午前10時に胎仔を取り出した。P1-P21 ラットも同様にエーテル麻酔した。4%パラホルムアルデヒド、0.1 M 磷酸緩衝液、pH 7.4 で E12-E14 の胎児は浸潤固定し、E15-E22 の胎仔及び P1-P21 の新生仔は経心的に灌流固定した。終脳外套の冠状断 4 μ m 厚のパラフィン包埋切片を作製、hematoxylin and eosin または Klüber-Barrera 染色を施し光顕的に観察した。

テネイシンの免疫組織化学染色には上記パラフィン切片を用いた。脱パラフィン後、0.3% H₂O₂-メタノール及び正常 horse 血清で各々1時間室温で処置した後、更にテネイシンの抗原性を賦活化させるため、0.4% pepsin in 0.01 N HCl¹⁷⁾ で1時間室温で前処置した。抗 fibroblast テネイシン mouse monoclonal 抗体 (Biohit, 1:100) と Vectastain ABC マウス IgG キット (Vector, USA)

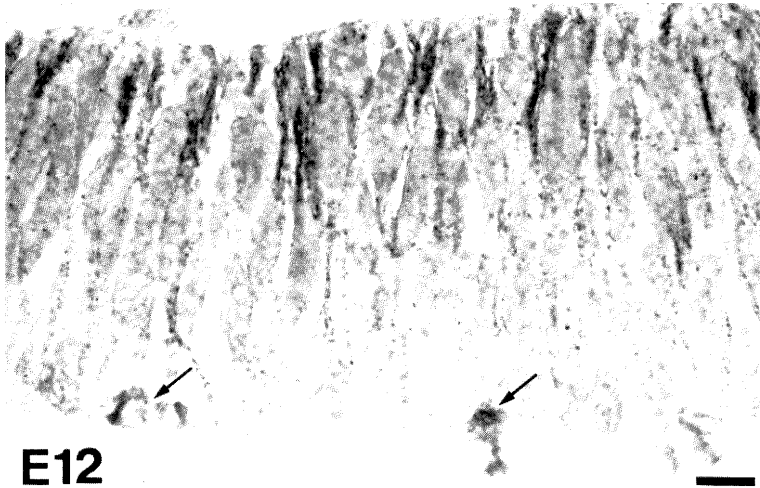


Fig. 1 Tenascin immunoreactivity in the rostral portion of the rat neural tube on day 12 of gestation (E12). Fine granular labelling is present within the cytoplasm of neuroepithelial cells, being accentuated in their external segments. Accumulation of labelling also evident in the cytoplasm of mitotic neuroepithelial cells (arrow) lining the lumen of the central canal. Scale bar=6 μ m.

を用い、avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法¹⁸⁾にて免疫染色した。一次反応は4℃, over night, 二次および三次反応は室温, 30分とした。Peroxidase 反応は、0.02% 3, 3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) および 0.005% H_2O_2 を含む 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 にて10分間行なった。

陰性対照には、一次抗体を除くか、一次抗体の代わりに正常マウス血清を乗せた切片を用いた。

結 果

E12 (Fig. 1) では、終脳原基である吻側部の神経管は既に形成され、偽重層の単層円柱上皮 (neuroepithelial cell) からなっていた。テネインの免疫反応をみると、長い円柱状の neuroepithelial cell の細胞質内と思われる部に既に長軸方向に並ぶ微細顆粒状の陽性物質が認められた。この時期では神経管の外周側で陽性の染色性がより強いが、中心管周囲の分裂中の neuroepithelial cell の胞体内にも陽性物質が明らかに認められた。

E13 では、neuroepithelium は高さを増し、neuroepithelial cell の胞体内の微細顆粒状の陽性物質は neuroepithelium の中心管側でも明瞭に認められた。

E14 (Fig. 2) では、終脳外套は厚さを増し、neuro-

epithelium の外側に primordial plexiform layer が形成された。この時期から、全ての neuroepithelial cell の胞体突起全体に認められるに至った免疫反応陽性物質は、更にその数と濃度を増した。それらは、neuroepithelium の全層を貫く垂直な線状の構造を示し、更にその線状の陽性物質は primordial plexiform layer 中にも伸びているため、終脳外套全層にわたる垂直な fiber として認められた。

E15 では、neuroepithelium の厚さがより増したが、その陽性物質の存在は基本的に E14 と同様であった。

E16 (Fig. 3) では、neuroepithelium と primordial plexiform layer の間に subventricular-intermediate zone が形成されてきた。neuroepithelium 内では、垂直な fiber として認められた強い免疫反応陽性物質がより明瞭に認められた。特に neuroepithelium の脳室周辺では、この陽性 fiber はより太く数も多くみられ、垂直に伸びる束状の陽性物質が脳室壁に連続しているのが認められた。

また、neuroepithelium から放射状に伸び外境界膜に達する線状の構造物、いわゆるラジアルファイバーも明らかに陽性であった。しかしながら今回、E12 以降、neuroepithelium 内に認められてきた垂直な fiber 状

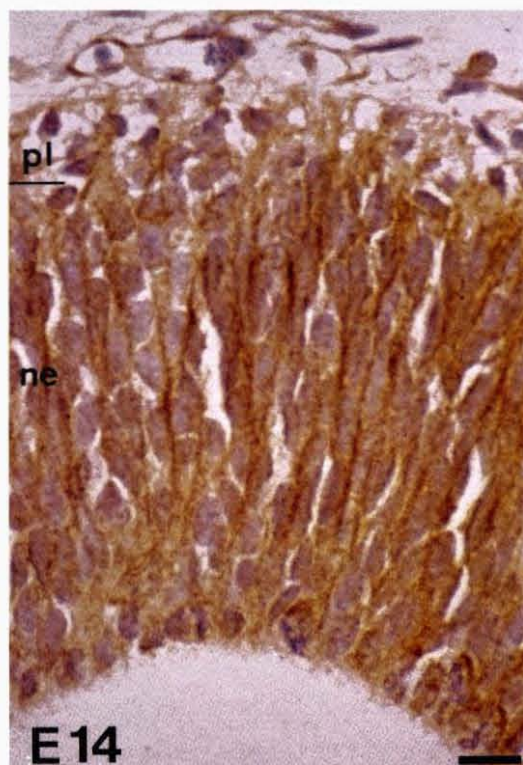


Fig. 2 Tenascin immunoreactivity in the dorso-medial part of the coronally sectioned telencephalic pallium on E14. ne, neuroepithelium; pl, primordial plexiform layer. Linear labelling is present radially through the neuroepithelium and primordial plexiform layer, i.e., throughout the entire width of the telencephalic pallium. Scale bar=10 μ m.

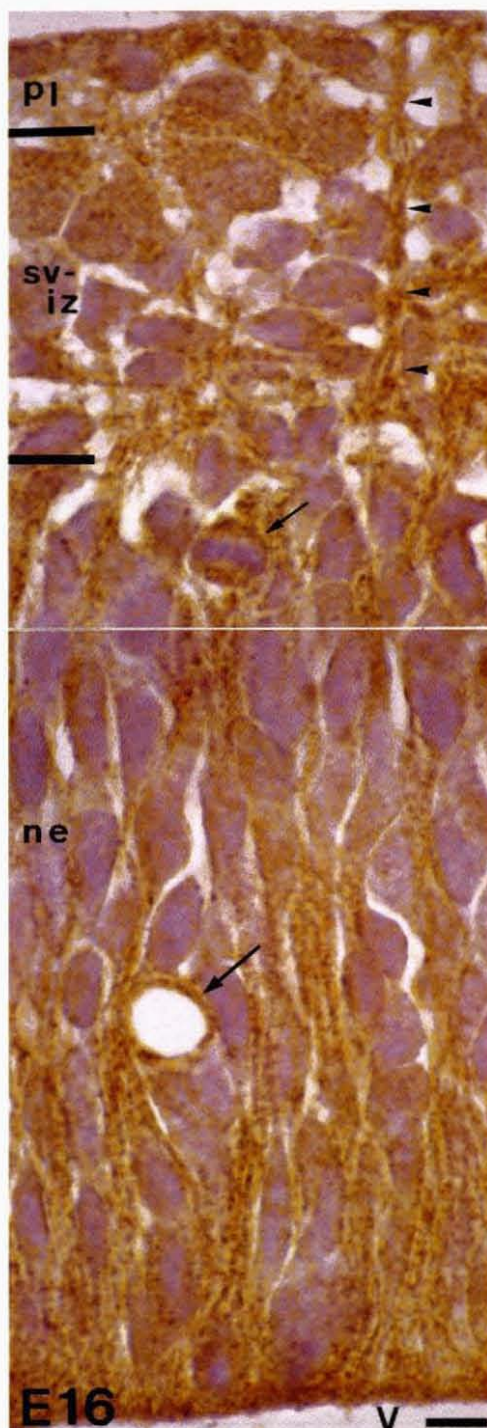


Fig. 3 Tenascin immunoreactivity in the dorso-medial part of the coronally sectioned telencephalic pallium on E16. sv-iz, subventricular-intermediate zones. Intense and linear labelling is evident in the cytoplasm of neuroepithelial cells which run perpendicular in bundles and terminate along the ventricular surface (V). Immunoreactivity is also present within the radial fibers (arrow heads) which extend in the subventricular and intermedial zones, and reaches the external limiting membrane. Labelling is also present in a mitotic cell (arrow) located closer to the external border of the neuroepithelium, and a vessel wall (large arrow) in the neuroepithelium is also positive. Scale bar=4.8 μ m.

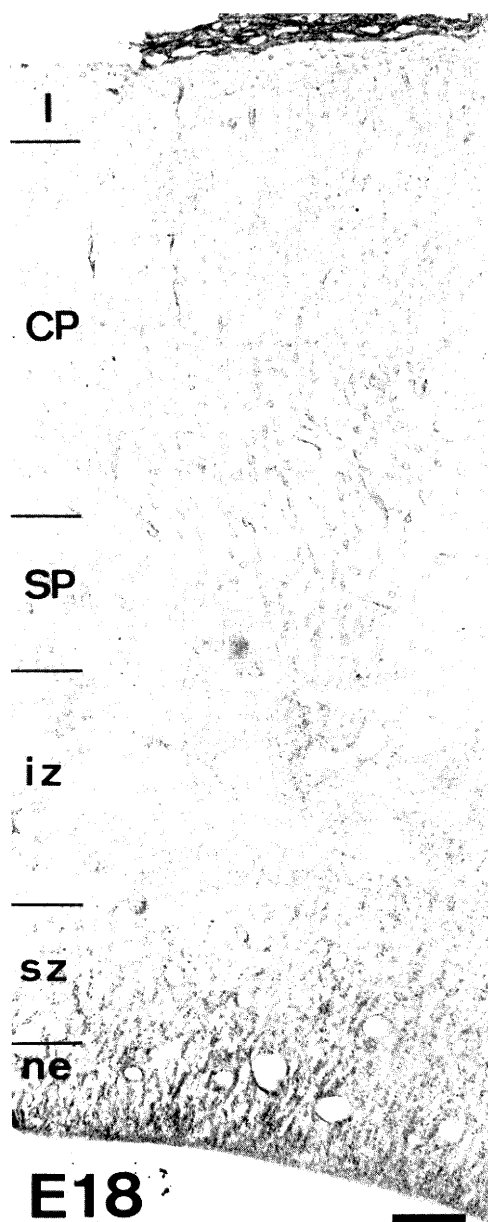


Fig. 4 Tenascin immunoreactivity in the dorso-medial part of the coronally sectioned telencephalic pallium on E18. SP, subplate; CP, cortical plate; I, layer I of neocortex. Labelling is limited to the cell processes in the neuroepithelium and subventricular zone. The vessel wall in the subarachnoid space is still positive. Scale bar=47 μ m.

の陽性物質が、このラジアルファイバーに明らかに連続している像を確認することはできなかった。

subventricular-intermediate zone 中に、おそらく移動しつつある、neuroblast の胞体内にも、テネインの明らかな陽性の染色性が認められた。

E17 では、neuroepithelium は最も厚くなり、他方、移動した neuroblast によって cortical plate が形成されつつあり、subventricular zone と intermediate zone が明瞭に区別されるに至った。テネインに対する陽性物質は、基本的に E16 と同様の像を示していたが、全体に染色性はやや減弱する傾向を示した。

E18 (Fig. 4) では、neuroepithelium は厚さを減じ始め、一方 subventricular zone, intermediate zone 及び cortical plate の各層は著しく厚さを増した。テネインに対する反応性は著しく減弱し、neuroepithelium と subventricular zone の細胞胞体にごくわずかに顆粒状の染色性が認められるだけであった。

E22 以降、終脳外套にはテネイン陽性の染色性は全く認められなかった。

なお、終脳外套におけるテネインの免疫組織化学では、E12 から E17 までのいずれの時期においても、neuroepithelium に存在する全ての細胞の胞体に染色性が認められた。

考 察

本研究で、テネインはラット E12 からおよそ E17 までの終脳外套の neuroepithelial cell の胞体にも経時的な消長を示しつつ発現していることが明らかとなった。一方、E16 及び E17 の終脳では neuroepithelium から放射状に伸び外境界膜に達する線状の陽性像が認められたが (Fig. 3)、この陽性構造物は、神経芽細胞が移動する際ガイドワイヤー的な役割を考えると考えられている、いわゆるラジアルファイバー¹³⁾⁻¹⁶⁾に一致していると考えられた。ラジアルファイバーについては、neuroepithelial cell 自身の突起の束であるという考え¹³⁾と、neuroepithelial cell とは別の特殊な分化を示した細胞 (ラジアルグリア) の突起から構成されているという考え¹⁴⁾⁻¹⁶⁾の二つの説がある。ところで、本研究でのテネインによる免疫組織化学でみる限り、このラジアルファイバーが neuroepithelial cell 自身の突起の束¹³⁾か、それともラジアルグリアの突起¹⁴⁾⁻¹⁶⁾なのか、残念ながら neuroepithelium 内の垂直な fiber 状の陽性物質とラジアルファイバーとの連続性を直接は確認できなかった。しかし、E12 から E17 までのいずれの時

期においても, neuroepithelium を構成している全ての細胞の胞体には皆同様にテネシンの染色性が認められ, neuroepithelial cell 以外の細胞と考えられる細胞は認められなかった。

ところで, テネシンは, 主に in vitro の研究から, さまざまな細胞の接着や移動に関与する分子と考えられている²⁾。小脳原基では, 外顆粒細胞⁶⁾ 及びバグマングリア³⁾, 更にプルキンエ細胞が移動する時期のラジアルファイバー⁹⁾ にテネシンの発現が認められることから, 神経芽細胞の移動やそれをガイドすると考えられる構造物との接着にテネシンが密接に関与しているものと指摘されてきた。

E16 及び E17 は, 神経芽細胞が移動し, neuroepithelium 層の外側に cortical plate を形成しつつある時期 (Fig. 3) であり, 確かにこの時期の染色性だけからは, 小脳原基と同様, 終脳の神経芽細胞の移動やラジアルファイバーとの接着にもテネシンが関与している可能性を伺わせる。しかし, 終脳では E18 以降, 即ちラジアルファイバーが未だ存続し, 神経芽細胞はラジアルファイバーとの接着を保ちつつ, まだ盛んに移動しているはずの時期¹⁶⁾ にもかかわらず, テネシンの発現は急速に減弱した (Fig. 4)。即ち, ラジアルファイバーにおけるテネシンの発現は, 大脳と小脳では異なる様式で規定されている可能性もあるが, 少なくとも終脳外套においては, 神経芽細胞の移動やラジアルファイバーとの接着にはテネシンの関与は否定的と考えられた。

発生期のラット終脳では, 神経芽細胞は E13 から E21 までの neuroepithelium 層で産生され, 一方グリア細胞は主にその後の胎生後期に始まることが知られている¹²⁾。本研究で, テネシンが終脳外套の neuroepithelial cell に強く発現していること, しかも E17 までにはほぼ限られて発現していることが示された。 [³H]-thymidine を用いた研究から, 終脳における神経芽細胞の産生は, E14 から E17 までの期間が最も盛んであることが知られており¹²⁾, テネシンの発現時期はこの時期とよく合うように思われた。こうした特定の時期にテネシンの発現がほぼ限られていることは, 神経芽細胞産生過程 (neurogenesis) にテネシンが何らかの機能的関わりを有する分子である可能性を示唆していると考えられた。一方, in vitro の研究でもテネシンが上皮性細胞の増殖に関与する¹⁹⁾ との報告があり, 本研究の結果に見合うものと考えられた。

発生初期には, neuroepithelium 層は偽重層円柱上皮からなり, この細胞の核は, cell cycle に併せて胞体

内を上下に移動する運動, 即ちエレベーター運動をすることが知られている^{20) 21)}。 [³H]-thymidine を用いた細胞動態の研究から, 終脳外套では, neuroepithelial cell の核は E17 までは互いに同調してエレベーター運動を行ないつつ盛んに分裂し, neuroepithelial cell 自身の増殖及び神経芽細胞の産生を行なっているが, E18 以降はエレベーター運動の同調性が失われ, 次第に増殖能も減退することが知られている¹²⁾。 テネシンの発現は, エレベーター運動が同調して行なわれている E17 までの neuroepithelial cell にはほぼ限られて認められた。これらの事実は, テネシンの機能を将来さらに特定してゆく上で重要な知見となるものと考えたい。

稿を終えるにあたり, 終始変わらぬ温かい御指導を戴きました恩師 生田房弘教授に深く感謝致します。また, 山田光則, 林森太郎, 小柳清光, 高橋均の各先生には適切な御助言を戴きました。さらに, 市川富夫, 江川重公, 小林一雄, 村山佳代子, 大田裕子, 貝沼素子の諸兄姉には多くの技術的援助を受けました。有難うございました。

参 考 文 献

- 1) Erickson, H.P. and Bourdon, M.A.: Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 5: 71~92, 1989.
- 2) Erickson, H.P. and Lightner, V.A.: Hexabrachion protein (tenascin, cytostatin, brachionection) in connective tissues, embryonic brain, and tumors, In: Miller, K.R. (ed.) *Advances in Cell Biology*, Vol. 2, London J.A.I., p 55~90, 1988.
- 3) Grumet, M., Hoffman, S., Crossin, K.L. and Edelman, G.M.: Cytostatin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 8075~8079, 1985.
- 4) Kruse, J., Keilhauer, G., Faissner, A., Timpl, R. and Schachner, M.: The J1 glycoprotein-a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family, *Nature*, 316: 146~148, 1985.
- 5) Mackie, E.J., Tucker, R.P., Halfter, W., Chiquet-Ehrismann, R. and Epperlein, H.H.: The distribution of tenascin coincides with

- pathways of neural crest cell migration, *Development*, **102**: 237~250, 1988.
- 6) **Chuong, C.-M., Crossin, K.L. and Edelman, G.M.**: Sequential expression and differential function of multiple adhesion molecules during the formation of cerebellar cortical layers, *J. Cell Biol.*, **104**: 331~342, 1987.
 - 7) **Crossin, K.L., Hoffman, S., Grumet, M., Thierry J.-P. and Edelman, G.M.**: Site-restricted expression of cytactin during development of the chicken embryo, *J. Cell Biol.*, **102**: 1917~1930, 1986.
 - 8) **Prieto, A.L., Jones, F.S., Cunningham, B.A., Crossin, K.L. and Edelman, G.M.**: Localization during development of alternatively spliced forms of cytactin mRNA by in situ hybridization, *J. Cell Biol.*, **111**: 685~698, 1990.
 - 9) **Yuasa, S., Kawamura, K., Ono, K., Yamakuni, T. and Takahashi, Y.**: Development and migration of Purkinje cells in the mouse cerebellar primordium, *Anat. Embryol.*, **184**: 195~212, 1991.
 - 10) **Bartsch, S., Bartsch, U., Dörries, U., Faissner, A., Weller, A., Ekblom, P. and Schachner, M.**: Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex, *J. Neurosci.*, **12**: 736~749, 1992.
 - 11) **Steindler, D.A., Cooper, N.G.F., Faissner, A. and Schachner, M.**: Boundaries defined by adhesion molecules during development of the cerebral cortex: the J1/tenascin glycoprotein in the mouse somatosensory cortical barrel field, *Dev. Biol.*, **131**: 243~260, 1989.
 - 12) **Bayer, S.A. and Altman, J.**: *Neocortical development*, Raven Press, New York, 1991
 - 13) 藤田哲也, 服部隆則, 北村忠久: SEM によるニューロン発生の研究, *細胞*, **7**: 19~29, 1975.
 - 14) **Rakic, P.**: Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex, *J. Comp. Neurol.*, **145**: 61~84, 1972.
 - 15) **Gadisseux, J.-F., Kadhim, H.J., van den Bosch de Aguilar, P., Caviness, V.S. and Evrard, P.**: Neuron migration within the radial glial fiber system of the developing murine cerebrum: an electron microscopic autoradiographic analysis, *Dev. Brain Res.*, **52**: 39~56, 1990.
 - 16) **Misson, J.-P., Edwards, M.A., Yamamoto, M. and Caviness, V.S., Jr.**: Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker, *Dev. Brain Res.*, **44**: 95~108, 1988.
 - 17) **Mauro, A., Bertolotto, A., Germano, I., Giaccone, G., Giordana, M.T., Migheli, A. and Schiffer, D.**: Collagenase in the immunohistochemical demonstration of laminin, fibronectin and factor VIII/Rag in nervous tissue after fixation, *Histochemistry*, **80**: 157~163, 1984.
 - 18) **Hsu, S.-M., Raine, L. and Fanger, H.**: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, *J. Histochem. Cytochem.*, **29**: 577~580, 1981.
 - 19) **Chiquet-Ehrismann, R., Mackie, E.J., Pearson, C.A. and Sakakura, T.**: Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis, *Cell*, **47**: 131~139, 1986.
 - 20) **Sauer, F.C.**: Mitosis in the neural tube, *J. Comp. Neurol.*, **62**: 377~405, 1935.
 - 21) **Fujita, S.**: Kinetics of cellular proliferation, *Exp. Cell Res.*, **28**: 52~60, 1962.

(平成5年7月14日受付)