

ラット個体発生における Nerve Growth Factor - induced Gene B - β の発現

李 英 敏

新潟大学大学院医歯学総合研究科細胞機能講座

分子細胞病理学分野 (病理学第二講座)

(主任: 内藤 眞教授)

Expression of Nerve Growth Factor - induced Gene B - β in Rat Ontogeny

Yingmin Li

Division of Cellular and Molecular Pathology,

Department of Cellular Function,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Makoto NARITO)

要 旨

Nerve growth factor - induced gene B - β (NGFIB - β) は核内受容体スーパーファミリーの一員で, 主に中枢神経系に発現する. 本研究では新たに作製された抗ヒト NGFIB - β 抗体を用いて免疫組織化学染色 (以下 [免疫染色]) を行い, ヒトおよびラットの副腎皮質, 網膜細胞, 中枢神経系の神経細胞における発現を観察した. さらに神経細胞分化における NGFIB - β の意義を明らかにするため, ラット発生過程の中枢神経系における NGFIB - β 蛋白の発現の状況を検討した. NGFIB - β はまず胎生早期のラット中脳の神経細胞に発現し, 胎生日数の経過につれてさらに大脳皮質, 前障, 視床, 視床下部の神経細胞へと発現が拡大した. NGFIB - β 陽性細胞は網膜では胎生 18 日に発現し, 生後 0.5 日では内顆粒層と神経節細胞層に発現していた. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 免疫染色を行った結果, NGFIB - β 陽性細胞は増殖細胞ではないことが示された. この成績から, NGFIB - β は脳や網膜の神経細胞の分裂後の最終分化に重要な因子であることが示唆された.

キーワード: 神経細胞, 脳, 網膜, 核内受容体, nerve growth factor induced gene - B (NGFIB - β), 分化

緒 言

核内受容体は steroid/thyroid hormone 受容体ファミリーの一員であり¹⁾ 転写因子として細胞

分化に重要な役割を果たしている¹⁾²⁾. その中で nerve growth factor induced gene - B は 4 つのオーファン受容体を含んでいる (NR4A1, NR4A2, NR4A3, NR4A4). NR4A1, NR4A2³⁾⁻⁶⁾ は retinoid

Reprint requests to: Makoto NARITO
Department of Cellular Function
Division of Cellular and Molecular Pathology
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先: 〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学大学院医歯学総合研究科細胞機能講座分子
細胞病理学分野 内藤 眞

X receptor (RXR: NR2B) をパートナーとして、2量体を形成している。NR4A2 の別名はヒトでは NOT, NGFIB- β , TINUR, NURR1 であり、遺伝子は 2 番染色体 (2q22-q23) に位置する⁷⁾。この遺伝子座は種々のタイプの悪性リンパ腫で欠損や転座を示すことが知られているが、リンパ腫との関連はまだ明らかでない。この受容体は血清中の増殖因子によって誘導され、細胞内シグナル伝達に関与し、内分泌や神経による制御を受けるが、リガンド不明のオーファン受容体である³⁾⁴⁾。マウスの NR4A2 は NURR1 や NGFIB- β と称され、ラットでは NGFIB- β , NURR1, HZF-3 と呼称されている。NGFIB- β はほとんど脳に局限して発現し、中脳のドパミン作動性神経細胞の発生に必須な役割を果たす⁸⁾⁻¹⁰⁾。NGFIB- β のノックアウトマウスは中脳のドパミン作動性神経細胞を作ることができず、NGFIB- β は中脳の発生過程において神経細胞の成熟、移動、生存に必須であると考えられている⁸⁾¹¹⁾。Zetterström らは *in situ hybridization* によって NGFIB- β mRNA が胎児および成熟マウスやラットの中樞神経系に発現することを報告している¹²⁾。しかし、これまで NGFIB- β に対するよい抗体がなかったため、NGFIB- β 発現細胞の詳細な分布や形態は報告されていない。本研究では、新規に作成された抗体を用い、NGFIB- β の発現を蛋白レベルで検討した結果、中樞神経系にほぼ特異的に発現すること、および脳と網膜の神経細胞の分化において重要であることを観察したので報告する。

材料と方法

1. 組織

ヒト組織は新潟大学分子細胞病理学講座において病理診断を行った手術例と、死後 5 時間以内の剖検例から組織を採取し、ホルマリン固定によるパラフィン切片を用いた。胃、小腸、大腸、脾、肝、腎、副腎、甲状腺、肺、子宮、卵巣、乳腺、大脳組織について検索した。なお、ヒト組織の本研究への使用については新潟大学倫理委員会の承認を得ている。

動物には Wistar ラット (Charles River Breeding Laboratories, Chiba, Japan) を用い、新潟大学動物実験施設において通常通りに飼育した。ラットを diethyl ether (Wako Pure Chemical Industries, Japan) を吸入させて深麻酔し、頸椎脱臼を行った。成熟ラット 5 匹、胎生 10 日から 19 日の胎児ラット (各日 5 匹)、生後 0.5 日から 17.5 日の新生児ラット (各日 5 匹) を用いた。組織は 10% ホルマリンで 1 日固定し、エタノール系列を介してパラフィン包埋した。なお、本実験は新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得ている。

2. 免疫組織化学染色

4 μ m 厚のパラフィン切片を 0.3% 過酸化水素加メタノールで 30 分間、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。10% 羊血清 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) でブロッキングした後、抗ヒト NGFIB- β 抗体 (1:100, N1404, Perseus Proteomics, Tokyo, Japan) を 1:100 の希釈倍率で 4 $^{\circ}$ C、一晚反応させた。2 次抗体には HRP 標識抗マウス IgG (Vector, CA) を用いて室温 30 分間反応し、発色基質には 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Dojindo Laboratories, 熊本, 日本) を用い、ヘマトキシリンで核染色を行った。免疫 2 重染色には avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法を用いた。第一抗体には抗 NGFIB- β 抗体、第二抗体にはマウス抗ラット PCNA 抗体 (1:100, Dakopatts, Carpinteria, CA) を用いた。パラフィン切片を脱パラフィン後、オートクレーブ処理によって抗原の賦活化を行い (0.1M citrate buffer solution, PH 6.0, 30min, 98 $^{\circ}$ C), 1% BSA/PBS に 30 分間浸して非特異的反応を阻害した。第一抗体を 4 $^{\circ}$ C で一晚反応させ、次に horseradish peroxidase (HRP) - conjugated secondary antibody (Nichirei, Tokyo, Japan) と室温で 40 分間反応させ、Diaminobenzidine (DAB) で発色した。その後、その標本を microwave で 20 分間処理し (0.1M citrate buffer solution, PH 6.0), 抗 PCNA 抗体で 1 晩反応させ、次いで HRP 標識 2 次抗体を反応させ、4-chloro-1-naphthol で可視化した。

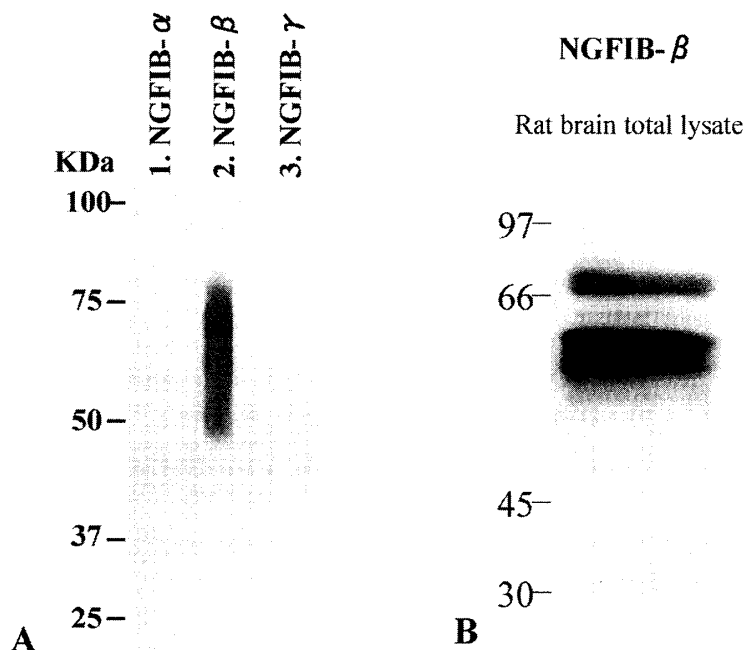


図 1 抗 NGFIB- β 抗体 (N1404) を用いたウエスタンブロット

A. 抗ヒト NGFIB- β 抗体は CHO 細胞に強制発現させたヒト NGFIB- α (1) と NGFIB- γ (3) 蛋白には反応せず、NGFIB- β (2) にのみ反応する。強制発現のため発現量が多く、広い範囲にバンドが認められる。

B. ラット脳組織から抽出した蛋白のウエスタンブロットでは約 66 kDa と 59 kDa にバンドが検出される。

3. ウエスタンブロット

ヒト NGFIB- α , NGFIB- β , NGFIB- γ の発現ベクターを導入した CHO 細胞およびラットの脳から抽出した蛋白に 300mM の Tris-HCl (pH6.8), 10% glycerol, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 25% mercaptoethanol を含む混合液を添加し, 100°C 3 分間加温した。各蛋白 60 μ g を SDS-polyacrylamide gel で泳動後, polyvinylidene difluoride membrane (Amersham, Beckinghamshire, UK) に転写した。membrane は 5% スキムミルクで一晩ブロッキングした。一次抗体としてマウス抗ヒト NGFIB- β モノクローナル抗体 (Perseus) (1:100 希釈), 二次抗体として抗マウス IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody (Amersham, 1:2000 希釈) を室温で 30 分間反応させた。enhanced chemilumi-

nescence (ECL) 法 (ECL plus western blotting detection system, Amersham) によってバンドを検出した。

結 果

1. 抗 NGFIB- β 抗体のヒト, ラットに対する反応性の特異性

抗ヒト NGFIB- β 抗体は CHO 細胞に強制発現させた NGFIB- α と NGFIB- γ には反応せず、NGFIB- β にのみ反応し、55-75 kDa にかけてバンドが観察された (図 1A)。想定サイズより幅が広がったが、これは強制発現による蛋白量が多すぎたためと考えられる。ラット脳組織の蛋白を用いたウエスタンブロットでも約 66 kDa と 59 kDa にバンドが検出された (図 1B)。Mages らは

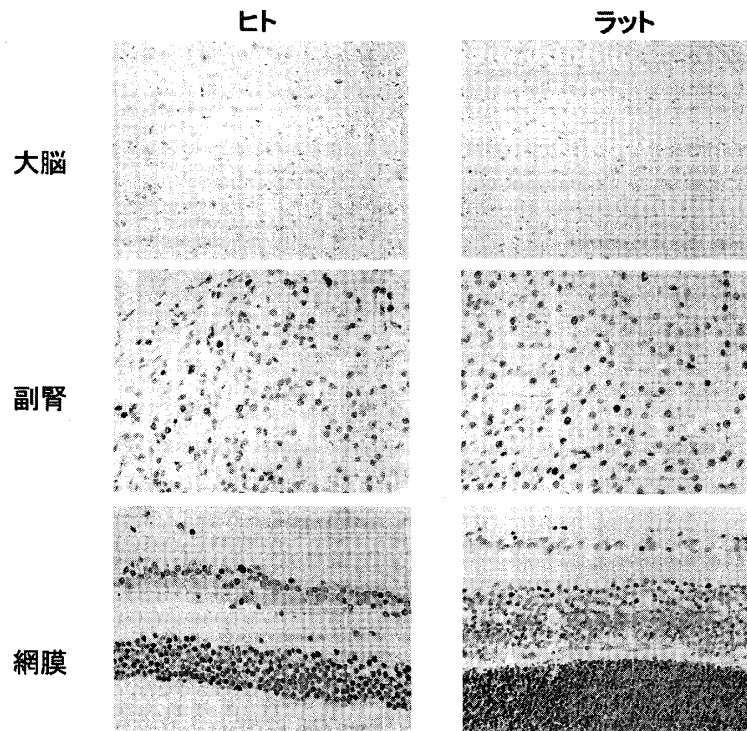


図2 ヒトおよびラット組織における NGFIB- β の発現

ヒト、ラット組織の免疫染色では NGFIB- β の発現は大脳 ($\times 400$ 倍)、副腎皮質 ($\times 400$ 倍)、網膜の神経細胞 ($\times 400$ 倍) の核内に観察される。網膜では NGFIB- β 陽性細胞は網膜の内顆粒層と神経細胞層に認められる。

NGFIB- β 蛋白の想定サイズは 66 kDa であるが、59 kDa のアイソフォームもあることを報告しており⁷⁾、この抗 NGFIB- β 抗体はヒトおよびラットの NGFIB- β 蛋白を特異的に検出していると判断された。

2. ヒトおよびラット組織における NGFIB- β の発現

ヒト組織の免疫染色では NGFIB- β の発現は大脳、網膜の神経細胞、副腎皮質の細胞の核内に観察された (図2)。脳内の NGFIB- β 陽性細胞は大脳、中脳、視床、視床下部に分布したが、小脳には見られなかった。大脳では、前障、大脳皮質の VI 層の神経細胞に発現が認められた。網膜では神経細胞層と内顆粒層の細胞に陽性像が認められた。胸腺の皮質と髄質の星芒状細胞にも発現が散在していたが、これら細胞は CD68 陰性で、細

網細胞とみなされた。

ラットでも NGFIB- β 発現細胞の分布はヒト組織と同様であり (図2)、NGFIB- β 陽性像は大脳皮質 VI 層と前障の神経細胞に認められた。陽性細胞は内梨状核 (endopiriform nucleus)、嗅内皮質 (entorhinal cortex)、海馬支脚 (subiculum) そして中脳に認められた。脊髄には陽性細胞は観察されなかった。これらの所見は NGFIB- β の mRNA の発現と近似していた¹²⁾。ヒトと同様、NGFIB- β 陽性細胞は網膜の内顆粒層と神経細胞層にも認められた。表1にヒトとラットの成績を示す。

3. 胎生期および新生児期ラットにおける NGFIB- β の発現

胎生 12 日のラット胎児では NGFIB- β の発現が神経管の少数の神経細胞にはじめて認められ

表 1 ヒトおよびラット組織における NGFIB- β の発現

Tissues		Human	Rat
Lung		-	-
Kidney		-	-
Adrenal gland	Cortex	+	+
	Medulla	-	-
Liver		-	-
Heart		-	-
Pancreas		-	-
Spleen		-	-
large intestine		-	-
Small intestine		-	-
Stomach		-	-
Testis		-	-
Uterus		-	-
Ovary		-	-
Bladder		-	-
Prostate		-	-
Skeletal muscle		-	-
Breast		-	-
Trachea		-	-
Thyroid gland		-	-
Thymus	Cortex	±	±
	Medulla	±	±
Esophagus		-	-
Retina	GCL	±	±
	INL	±	±
	ONL	-	-
Cerebellum		-	-
Cerebral cortex	I-V layer	-	-
	VI layer	±	±

網膜, 大脳皮質の各層の表記. GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outside nuclear layer, I: molecular layer, II: external granular layer, III: external pyramidal layer, IV: internal granular layer, V: internal pyramidal layer, VI:multiform layer

0: (-), 10%以下: (±), 10%-25%: (+)

た. 胎生 14 日には NGFIB- β 陽性細胞は中脳, 視床, 視床下部, 橋, 延髄, 脊髄にも観察された. しかし, 大脳皮質, 海馬や末梢の神経節細胞には見られなかった. 胎生 16 日には NGFIB- β 発現細胞数は中脳や延髄で増加し, 大脳の前頭部新皮質にも認められた. その後, NGFIB- β の発現は新皮質の深層部の神経細胞にもみとめられるようになったが, 海馬には見られなかった (図 3, 4). 胎生 18 日には中脳腹側被蓋野 (ventral tegmental area) や脳幹部神経細胞にも強い発現が認められ, 生育するにつれて, 大脳皮質の中層から上層にかけて NGFIB- β 発現が著明になった. 生後 1 日で大脳皮質全体に陽性細胞が見られるようになったが, 陽性神経細胞は II-III 層と IV-VI 層に分布するようになり, 生後 7 日までに VI 層に局限し, 発現量も減少したが, 成熟しても維持していた

(図 5, 6). 前障には胎生後期から成長後も強い発現細胞が認められた. このように大脳皮質における NGFIB- β の発現細胞は生育とともに深い層に局限されてきた. NGFIB- β 発現細胞は視床下部, 黒質, 中脳腹側被蓋野にも存在し, 第 4 脳室近辺にも認められた. 新生児期に NGFIB- β の発現は脊髄灰白質中心部に見られたが, 生後 9 日以降はみられなくなった.

網膜においては, 胎生 18 日に少数の NGFIB- β 陽性細胞が内顆粒層に出現し, 生後 3.5 日から顆粒層は内顆粒層と外顆粒層に分離した. NGFIB- β 陽性細胞は生後 5-7 日に最多となり, 徐々に減少した. 神経細胞層では少数の NGFIB- β 陽性細胞が生後 0.5 日から出現し, 成熟期まで観察された (図 7).

4. 神経細胞の増殖と NGFIB- β の発現

ラット網膜と脳における神経細胞の増殖を PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 免疫染色で観察し, NGFIB- β の発現との関係について検討した.

前述のように, NGFIB- β 陽性細胞は網膜の内顆粒層に胎生 18 日から, 神経細胞層には生後に出現した. 一方, PCNA 陽性像は胎生期には顆粒層のほとんどの神経細胞に認められ, 生後内・外顆粒層に分かれても生後 7 日までは PCNA 陽性であったが, PCNA 陽性細胞は徐々に減少し, 15 日には完全にみられなくなった. 免疫 2 重染色による観察では, NGFIB- β 陽性細胞はすべて PCNA 陰性であった (図 7, 表 2).

脳では, 胎生早期に PCNA 陽性細胞は主に神経管の内層に多数分布した. 一方, NGFIB- β 発現細胞は前述のように中脳などに分布したが, PCNA 陰性であった (図 3). 生後 PCNA 陽性細胞は大脳皮質に見られなくなったが, NGFIB- β 陽性細胞は大脳皮質の II-III 層と IV-VI 層に多数観察され, 生後 9 日には IV-VI 層に局限していった (図 5). これらの所見から, NGFIB- β 発現と細胞増殖は網膜と大脳の発育過程においてダイナミックに変化することが明らかにされた.

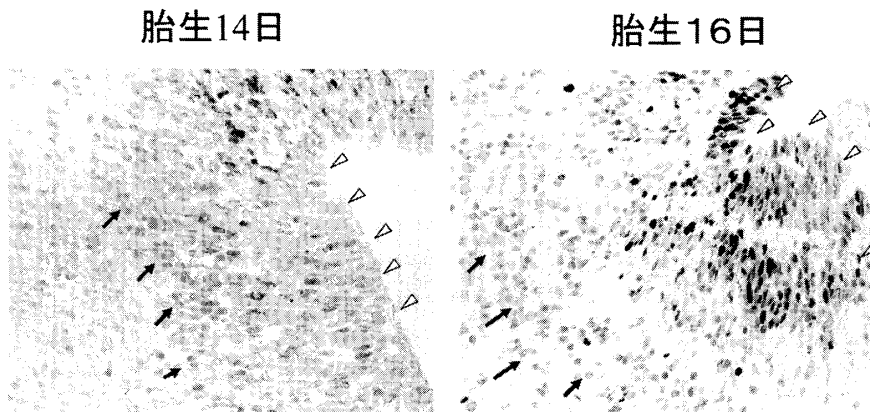
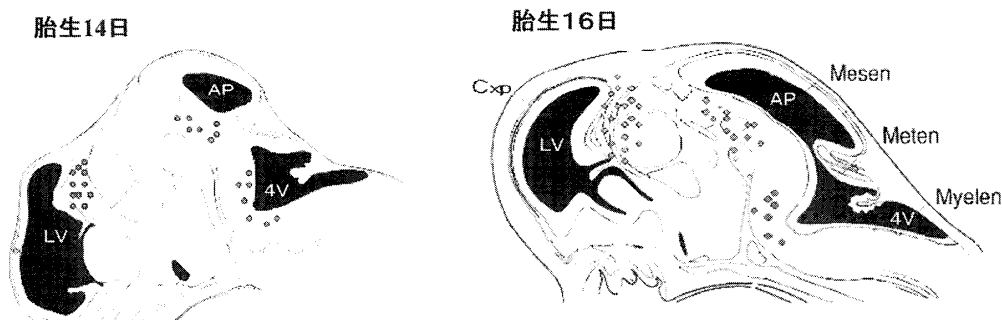


図3 胎生期ラット脳組織における NGFIB- β の発現と細胞増殖

胎生 14 日および胎生 16 日の大脳の脳室周囲の神経細胞は NGFIB- β を発現 (↑) する。しかし、脳室内壁部の神経細胞は PCNA 陽性 (Δ) 細胞として観察され、増殖能を発揮する。両細胞には重なりがみられない。NGFIB- β と PCNA の 2 重染色 ($\times 400$ 倍)。



Cxp: cortical plate, lv: lateral ventricle, Mesen: mesencephalon,
Meten: metencephalon, Myelen: myelencephalon, A: aqueduct, 4v: fourth ventricle

図4 胎生期ラット脳組織における NGFIB- β の発現細胞の分布

胎生 14 日には NGFIB- β 陽性細胞は視床、視床下部、橋、延髄、脊髄に観察され、脳室周囲に多い。胎生 16 日にはそれに加え、大脳前頭部新皮質にも認められた。その後、NGFIB- β の発現は新皮質の深層部の神経細胞にもみとめられる。

考 案

新規に作成された抗ヒト NGFIB- β 抗体を用いたウエスタンブロットでは CHO 細胞に発現させたヒト NGFIB- β 蛋白が認識され、さらにラッ

ト脳組織抽出蛋白でも同様のバンドが検出された。免疫組織化学染色でもヒト、ラットともに同じ成績を得たことから、本抗体はヒトのみならずラットについても蛋白レベルで NGFIB- β を検出できる抗体であることが示された。しかも、本

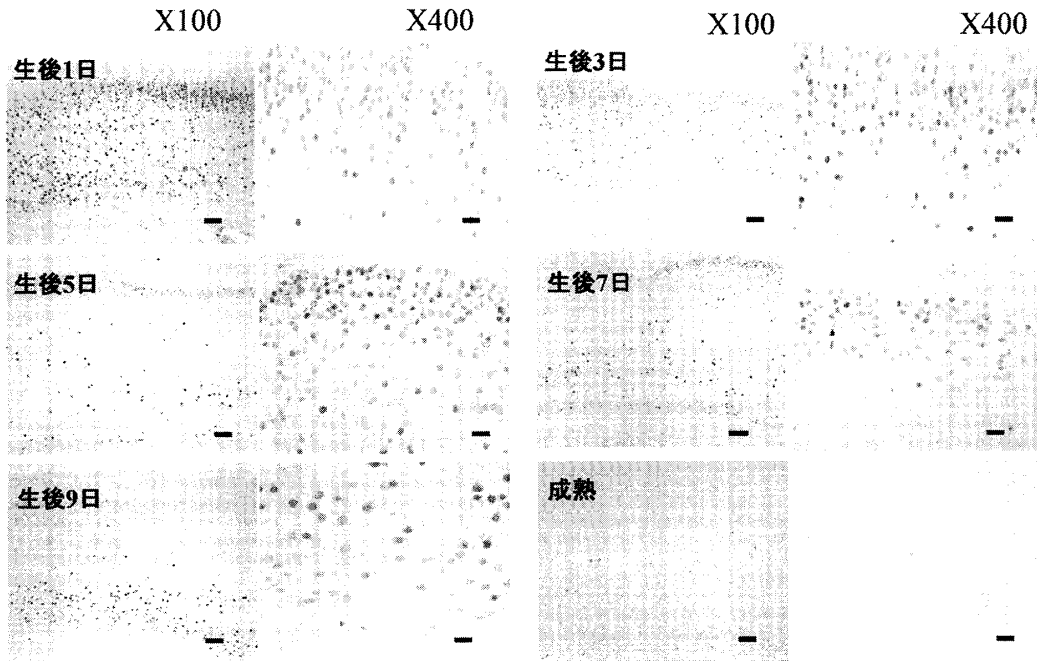


図5 生後のラット大脳皮質における NGFIB- β の発現

大脳皮質においては、NGFIB- β 陽性細胞は生後7日まで多く、広い範囲に存在するが、徐々に減少する。成熟期まで観察されるが発現はやや低下し、第VI層に局限してくる (×100, bar = 100 μ , ×400, bar = 25 μ)。

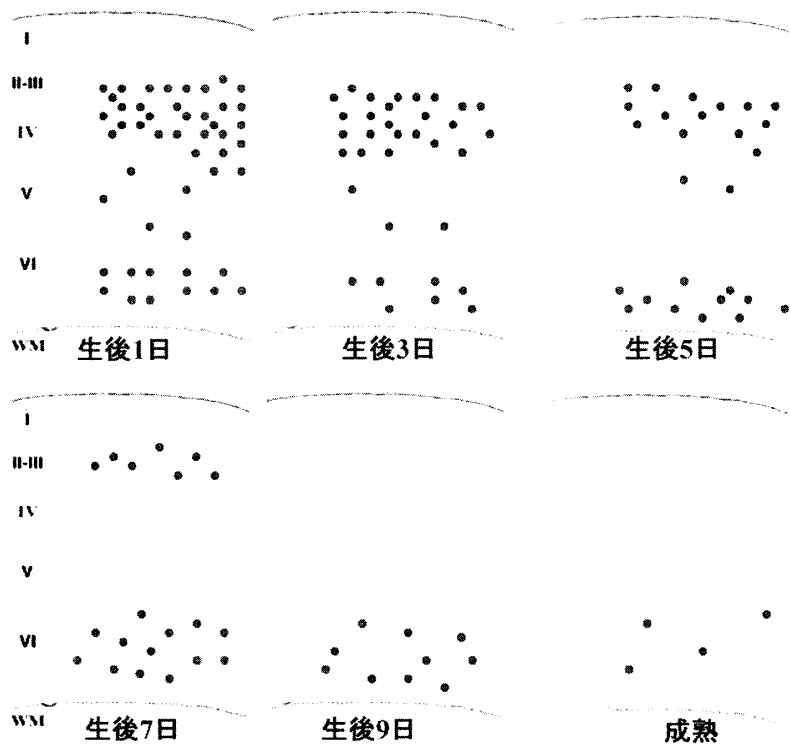


図6 生後のラット大脳皮質における NGFIB- β の発現細胞の局在の変化

NGFIB- β 陽性細胞は大脳皮質II-III層とIV-VI層に多数観察されるが、生後9日以降はIV-VI層に局限する。

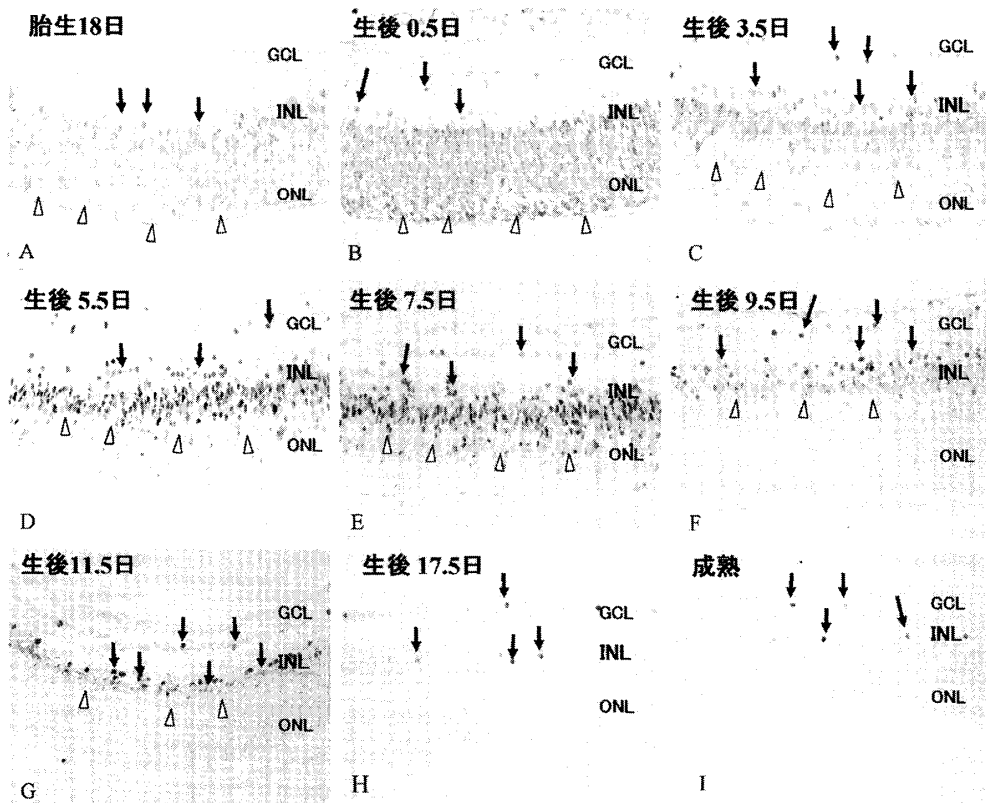


図7 ラット網膜における NGFIB- β の発現と細胞増殖

網膜では胎生 18 日から NGFIB- β 陽性細胞 (↑) は顆粒層に、生後は内顆粒層と神経細胞層に出現。生後 5-7 日に最多となり、後減少。PCNA 陽性像 (Δ) は胎生期には顆粒層のほとんどの神経細胞に認められ、生後 3 日に内・外顆粒層に分離した後は内顆粒層に見られるが、徐々に減少し、生後 15 日には完全に消失する。免疫 2 重染色 (× 400 倍)。

抗体はホルマリン固定パラフィン切片の免疫組織化学染色にも使用できることが明らかにされた。

1. 中脳ドパミン産生性神経細胞の分化と維持における NGFIB- β の役割

NGFIB- β が中脳のドパミン産生細胞の分化に重要な役割を果たしていることが NGFIB- β ノックアウトマウス (Nurr1^{-/-}) の研究で明らかになっている。ノックアウトマウスでは中脳のドパミン性細胞は胎生 15.5 日に分化出現するが、分布が異常で、中脳腹側部でアポトーシスに陥り、神経細胞の軸索の伸長もみられない⁹⁾¹¹⁾。また、ノックアウトマウスではドパミン合成、輸送、貯蔵、分泌に関する遺伝子 (TH, vesicle monoamine

transporter 2, DAT など) の発現が欠損している¹³⁾。黒質、中脳腹側被蓋野のドパミン性神経細胞は運動や行動を制御し、その変性はパーキンソン病の原因となることが知られ、NGFIB- β は中脳ドパミン性細胞の分化に必須の分子とみなされる。ドパミン細胞を作ることのできないノックアウトマウスは活動が低下しており、生後すぐ死亡する⁸⁾。NGFIB- β の発現は成熟するまで続き、ヘテロのマウスはドパミン量が少ないものの健康である。これらの所見は NGFIB- β のリガンド投与がパーキンソン病やその他の中脳ドパミン関連疾患に有効であることを示唆する。NGFIB- β に対する抗体は NGFIB- β 蛋白の検出に加え、NGFIB- β のリガンドを解析するために有用と思われる。

表 2 ラット網膜における NGFIB- β と PCNA の発現

	NGFIB- β			PCNA		
	GCL	NL		GCL	NL	
胎生14日	-	-		-	++	
胎生16日	-	-		-	+++	
胎生18日	-	±		-	+++	
生後0.5日	±	+		-	+++	
生後1.5日	±	+		-	+++	
生後3.5日	±	++		±	+++	
	GCL	INL	ONL	GCL	INL	ONL
生後5.5日	±	++	-	±	+++	++
生後7.5日	±	++	-	±	+++	+
生後9.5日	±	+	-	±	+	-
生後11.5日	±	+	-	-	+	-
生後13.5日	±	+	-	-	±	-
生後15.5日	±	±	-	-	±	-
生後17.5日	±	±	-	-	-	-
成熟	±	±	-	-	-	-

0: (-), 10%以下: (±), 10%-25%:
(+), 25%以上: (++) , 50%以上:
(+++) と表記.

GCL: ganglion cell layer; INL: inner nuclear
layer; ONL: outside nuclear layer, NL: nuclear
layer

2. 網膜における NGFIB- β の機能的意義

網膜においてドパミン性神経細胞はアマクリン細胞と考えられている¹⁴⁾. ドパミン性細胞はドパミン生合成の律速酵素である tyrosine hydroxylase (TH) を含んでいる¹⁵⁾¹⁶⁾. しかし, 網膜における NGFIB- β の発現についての報告はない. NGFIB- β がドパミン性細胞の分化に必須であることを考慮すると, アマクリン細胞が NGFIB- β を発現することが示唆される. 本研究では NGFIB- β の発現は内顆粒層と神経細胞層に存在する神経細胞に認められた. アマクリン細胞は同様に内顆粒層と神経細胞層に存在する. Eglen らは両層に存在するアマクリン細胞は機能的に同一であるとみなしている¹⁴⁾. 本研究では厳密な細胞同定をおこなっておらず, 今後網膜の内顆粒層と神経細胞層に存在する NGFIB- β 発現細胞に

ついて検討が必要である.

3. 大脳皮質における NGFIB- β の機能

NGFIB- β の発現は中脳, 視床, 視床下部, 橋, 延髄などに確認されたが, さらに大脳皮質の神経細胞にも認められた. NGFIB- β のドパミン性細胞における役割は理解されているが, 大脳皮質における NGFIB- β の機能的役割は不明である. 本研究では NGFIB- β 陽性細胞数が生後大脳皮質で増加し, 皮質の第 VI に発現細胞が限局することを観察した. 網膜では NGFIB- β 陽性細胞は胎生 18 日から発現し, 新生児期に最多となり, 成熟すると減少した. このように NGFIB- β 発現細胞の大脳皮質と網膜での変化は極めて類似している. このことは NGFIB- β が中枢神経系でドパミン産生以外にも特異的に高次機能にかかわることを示唆している.

4. 神経細胞の分化における NGFIB- β の役割

最近, NGFIB- β は細胞回転を停止できないがゆえに神経細胞の幹細胞または前駆細胞から成熟した高度に分化したドパミン性細胞への分化を誘導できないという報告がある¹⁷⁾⁻¹⁹⁾. ドパミン産生性 MN9D 細胞の NGFIB- β の欠損細胞は未分化な形態を示し, NGFIB- β 発現細胞は分化した形態を示す²⁰⁾. 本研究では NGFIB- β 発現細胞が増殖細胞ではないことが明らかにされた. 脳や網膜における著明な NGFIB- β の発現は神経細胞の増殖を抑制するとともに, 細胞の分化成熟を誘導することが示唆される. もし, NGFIB- β の増殖抑制作用が in vivo で機能すれば, NGFIB- β の機能低下は神経細胞の増殖を促し, 小型で樹状突起の未発達な神経細胞の増加をきたすかもしれない. 実際に, 統合失調症 (精神分裂病) では, 小型神経細胞の増加と大型の成熟神経細胞の減少が知られている²¹⁾⁻²⁴⁾. さらに, Xing et al は統合失調症の患者において, NGFI-B の発現の低下があることを報告している²⁵⁾. NGFIB- β がどのようにして, ドパミン産生や大脳, 網膜機能に関与するかに関しては, さらに今後の研究が必要である.

謝 辞

懇切なご指導を頂いた新潟大学大学院医歯学総合研究科細胞機能講座分子細胞病理学分野 内藤 眞教授に御礼申し上げます。また、多くの点でご協力をいただいた教室員の皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) The Nuclear Receptor Nomenclature Committee. *Cell* 97, 161 - 163, 1999.
- 2) Hazel TG, Nathans D and Lau LF: A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci* 85: 8444 - 8448, 1988.
- 3) Williams GT and Lau LF: Activation of the inducible orphan receptor gene Nur77 by serum growth factor: dissociation of immediate - early responses. *Mol Cell Biol* 13: 6124 - 6136, 1993.
- 4) Davis IJ and Lau LF: Endocrine and neurogenic regulation of the orphan receptors Nur77 and Nurr - 1 in the adrenal glands. *Mol Cell Biol* 14: 3469 - 3483, 1994.
- 5) Lee SL, Wesselschmidt RL, Linette GP, Kanagawa O, Russell JH and Milbrandt J: Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGF - IB (Nur 77). *Science* 269: 532 - 535, 1995.
- 6) Woronicz JD, Calnan B, Ngo V and Winoto A: Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T cell hybridomas. *Nature* 367: 277 - 281, 1994.
- 7) Mages HW, Rilke O, Bravo R, Senger G and Kroczeck RA: NOT, A human immediate - early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Molec Endocr* 8: 1583 - 1591, 1994.
- 8) Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L and Perlmann T: Dopamine neuron agenesis in Nurr1 - deficient mice. *Science* 276: 248 - 250, 1997.
- 9) Saucedo - Cardenas O, Quintana - Hau JD, Le WD, Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, Burbach JP and Conneely OM: Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4013 - 4018, 1998.
- 10) Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel S H, Smith RG and Vassilatis DK: Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* 33: 85 - 89, 2003.
- 11) Wallen A, Zetterstrom RH, Solomin L, Arvidsson M, Olson L and Perlmann T: Fate of mesencephalic AHD2 - expressing dopamine progenitor cells in NURR1 mutant mice. *Exp Cell Res* 253:737 - 746,1999.
- 12) Zetterstrom RH, Williams R, Perlmann T and Olson L: Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI - B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res Mol Brain Res* 41:111 - 120, 1996.
- 13) Smits SM, Ponnio T, Conneely OM, Burbach JP and Smidt MP: Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral mid - brain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 18: 1731 - 1738, 2003.
- 14) Eglen SJ, Raven MA, Tamrazian E and Reese BE: Dopaminergic amacrine cells in the inner nuclear layer and ganglion cell layer comprise a single functional retinal mosaic. *J Comp Neurol* 466: 343 - 355, 2003.
- 15) Crawford PA, Sadovsky Y, Woodson K, Lee SL and Milbrandt J: Adrenocortical function and regulation of the steroid 21 - hydroxylase gene in NGF - IB - deficient mice. *Mol Cell Biol* 15: 4331 - 4336, 1995.
- 16) Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J and Parker KL: The orphan receptor NGFI - B regulates expression of the gene encoding steroid 21 - hydroxylase. *Mol Cell Biol* 13: 861 - 868, 1993.
- 17) Chung S, Sonntag KC and Andersson T: Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 16:

- 1829 - 1838, 2002.
- 18) Haas SJ and Wree A: Dopaminergic differentiation of the Nurr1 - expressing immortalized mesencephalic cell line CSM14. 1 in vitro. *J Anat* 201: 61 - 69, 2002.
- 19) Kim JY, Koh HC and Lee JY: Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem* 85: 1443 - 1454, 2003.
- 20) Castro DS, Hermanson E and Joseph B: Induction of cell cycle arrest and morphological differentiation by Nurr1 and retinoids in dopamine MN9D cells. *J Biol Chem* 276: 43277 - 43284, 2001.
- 21) Rajkowska G, Selemon LD and Goldman - Rakic PS: Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch Gen Psychiatry* 55: 215 - 224, 1998.
- 22) Selemon LD, Rajkowska G and Goldman - Rakic PS: Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch Gen Psychiatry* 52: 805 - 820, 1995.
- 23) Selemon LD, Rajkowska G and Goldman - Rakic PS: Elevated neuronal density in prefrontal area 46 in brains from schizophrenic patients: application of a three - dimensional, stereologic counting method. *J Comp Neurol* 392: 402 - 412, 1998.
- 24) Selemon LD, J. Mrzljak J, Kleinman E, Herman MM and Goldman - Rakic PS: Regional specificity in the neuropathologic substrates of schizophrenia: a morphometric analysis of Broca's area 44 and area 9. *Arch Gen Psychiatry* 60: 69 - 77, 2003.
- 25) Xing G, Zhang L, Russell S and Post R: Reduction of dopamine - related transcription factors Nurr1 and NGFI - B in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophr Res* 84: 36 - 56, 2006.

(平成19年12月19日受付)