

海馬顆粒細胞肥大化モデルを用いた
中枢神経細胞可塑性増強遺伝子の検索

〔研究課題番号 10671295〕

平成 10 年度～平成 11 年度科学研究費補助金

(基盤研究 C(2))研究成果報告書

平成 12 年 3 月

研究代表者

鈴木文夫

(滋賀医科大学医学部講師)

研究組織

| | | |
|-------|--------|---------------|
| 研究代表者 | 鈴木 文夫 | (滋賀医科大学医学部講師) |
| 研究分担者 | 牧浦 弥恵子 | (滋賀医科大学医学部助手) |
| 研究協力者 | 平井 久雄 | (滋賀医科大学大学院生) |

研究経費

| | |
|--------|----------|
| 平成10年度 | 2, 200千円 |
| 平成11年度 | 1, 000千円 |
| 計 | 3, 200千円 |



研究発表

(1) 学会誌など

Fumio Suzuki, Takuro Inoe, Hisao Hirai, Kiyoshi Kurokawa: Chronological changes of BDNF and TrkB and their proteins in enlarged granule cells of mouse hippocampus after KA injection. Restorative Neurology and Neuroscience.13:221,1998.

Yaeko Makiura, Fumio Suzuki, Elisabeth Chevalier, Brigitte Onteniente: Excitatory granule cells of the dentate gyrus exhibit a double inhibitory neurochemical content after intrahippocampal administration of kainate in adult mice. Experimental Neurology 159: 73-83, 1999

平井久雄、井上卓郎、黒川清、鈴木文夫：海馬歯状回顆粒細胞の進行性肥大化の際に発現する mRNA の検討。滋賀医科大学雑誌 14、46-48、1999

(2) 口頭発表

鈴木文夫、井上卓郎、平井久雄、黒川清：カイニン酸投与により生じる海馬顆粒細胞進行性肥大化の際の BDNF, trkB の経時的変化について。第13回神経組織の成

長・再生・移植研究会学術集会、1998、6、6

鈴木文夫、平井久雄、井上卓郎、三矢幸一、松田昌之：カイニン酸投与により生じるマウス海馬顆粒細胞肥大化の際の AMPA 型グルタミン酸受容体の発現変化について。第 58 回日本脳神経外科学会総会、1999、10、28

(3) 出版物

研究成果

目的

本研究は、高度な中枢神経細胞形態変化を生じるモデルを用い、神経可塑の新たな知見、あるいは新たな神経可塑増強因子の発見を目的とするものである。正常ではマウスの海馬歯状回顆粒細胞は小型で細胞質に乏しく、また各細胞間の神経網が少なく密接している。KA を成獣マウス海馬内に一回投与することにより、投与後4日目より進行性に顆粒細胞層が拡大し、その後数カ月間にわたり徐々に海馬歯状回顆粒細胞が肥大化する。最終的には顆粒細胞は直径にて元の3倍近くの大きさとなり、核細胞比も拡大しあたかも錐体細胞のような形態になり、かつ、高度な神経萌芽を生じる。この肥大化の際に発現の増加、あるいは減少するメッセンジャー RNA(mRNA)を DD 法で調べ、その配列検索を行い、神経細胞の肥大化に伴い発現の変化する因子を検出する。検出された物質のうち、特にこれまで中枢神経細胞の可塑性に重要であると指摘されていないものについて、プローブを作成し時間的な経過を *in situ hybridization* で調べ、顆粒細胞の肥大化を制御する因子であるかを検討する。また、その因子についてはこのモデル以外のけいれんモデルなどで発現を調べ、神経可塑性を全般に増加させるものであるかを検討する。

このモデルの特殊性より、これまでには見いだされていない新たな栄養因子、あるいは神経可塑に重要な細胞外基質や酵素などが発見される可能性がある。その場合には遺伝子ライブラリーより、その mRNA 配列の全長を調べ、ペプチド配列も決定する。上記のように、この研究の主目的は肥大化モデルを用いて神経可塑性を高める物質を探究、発見することである。

前記の研究目的を実行するため下記の研究計画を作成した。

（全体計画）

- ①一側マウス海馬内へ KA を局所投与し実験動物を作成。
- ②肥大化した顆粒細胞を含む海馬歯状回を摘出し mRNA を抽出。
- ③この mRNA を用いて以下の如く DD 法を施行する。まず取り出した mRNA を cDNA に変換後、通常用いられるよりやや長い 20 塩基のプライマーを上流に、下流には 13 塩基の各種プライマーを使用し PCR を施行し無作為に cDNA を増幅する。対照側、肥大化側の PCR 増幅 cDNA を同じゲルで電気泳動し、両者の間で異なったバンドを探し、発現の異なる cDNA を取り出す。
- ④取り出した cDNA をクローニング後、塩基配列解析器を用いて配列を調べ、Gene bank より既知のものと照合する。
- ⑤この cDNA を用い RNA probe を作成し、In situ ハイブリダイゼーションにて組織上での発現を確認し分布を調べる。
- ⑥発現の増加した mRNA が、けいれん後の歯状回顆粒細胞の苔状線維の神経萌芽の際にも認められるものかを In situ ハイブリダイゼーションにて調べる。
- ⑦これらの結果より肥大化に特有の遺伝子があるのか、あるいは、神経細胞の形態を維持しようとする遺伝子があり、その発現低下があるのかを検討する。また、それらが苔状線維の神経萌芽など他の神経可塑性モデルでも認められるものかを検討し、神経可塑性を増強あるいは制限する物質の同定を行う。

方法と結果（番号は全体計画の番号に一致）

①：実験動物の作成

抱水クロラル（350mg/Kg）投与にて麻酔後、定位的（coordinates from bregma 1; AP:

-2.0mm, L: 2.0mm, V: 2.0mm, 2; AP: -2.4mm, L: 3.2mm, V: 2.4mm) に、歯状回背側に KA(200ng/50nl saline)を 2 カ所に投与し、実験モデルを作成した。KA 投与後 2 週目(subacute phase)、8 週目(chronic phase)にハロセン吸入麻酔後断頭し、両側の海馬を取り出し、-80 度で凍結保存した。また対照として、同齢の正常マウスからも海馬を摘出した。

肥大化の確認のため、各群の一部の海馬の形態変化をクレシル・バイオレット染色にて検討した(図 1)。KA 投与側ではアンモン角(CA)錐体細胞、歯状回門部神経細胞は変性脱落し、KA 投与後の時間経過に相関し、歯状回顆粒細胞は細胞間隙の拡大が増強(granule cell dispersion)し、個々の細胞の肥大化を認めた。対側の海馬では、CA1 の錐体細胞の脱落を時に認めることがあったが、顆粒細胞には変化は認められなかった。

②肥大化した顆粒細胞を含む海馬歯状回を摘出し mRNA を抽出。

上記①で摘出した海馬より歯状回のみを分離後ホモゲナイズし、total RNA を抽出した。しかし、KA 投与側ではほぼ顆粒細胞以外の神経細胞は脱落しており、この方法では抽出に時間がかかり、RNA の収量が非常に少なくなった。そのため、実験には海馬全体を材料とした。マウスの海馬は小さいため、海馬全体でも一匹の片側海馬より得られる total RNA では RT-PCR を施行するには不十分であり、数匹分の total RNA が一回の実験に必要であった。

③DD 法の施行。

上記②で抽出した対照の海馬と KA 投与後 2 週、投与後 8 週の肥大化海馬の total RNA 1 μ g を T12VN primer : Anc1, Anc2 (図 2)を用い、Superscript II reverse transcriptase(GIBCO)で逆転写し cDNA とした。この cDNA を鋳型としてアンカープライマー (Anc1, Anc2)と任意プライマー (Arb1, Arb2, Arb3 : 図 2)を用い、PCR を行い、断

片として増幅した。

この PCR 増幅された cDNA 断片を変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。ゲルを Plus-one DNA staining kit (Amersham 社製)にて染色し、可視化した (図 3)。対照では認められない多数のバンドが KA 投与側で認められたが、このうち KA 投与後 2 週後、8 週後肥大化海馬の両者で増幅の明らかな 300-600bp の 5 つのバンドを切り出し、cDNA 断片を回収した。

④クローニングと配列解析。

上記③にて回収した cDNA を精製後、pGEM-T easy vector system II cloning kit (Promega)を用いクローニングした。dRhodamine 標識で ABI PRISMで配列を調べた。得られた 5 つのクローンの配列を GenBank, EMBL database と照合し、これまでの既知の DNA 配列と相同性を検索した。結果は図 4 に示すが、4 つのクローンでは既報の配列に相同性の高いものはなかった。残りの 1 つのクローンで Nagase らが報告している KIAA0279 と 60 % 以上の相同性が認められた (total window: 67%, alignment window: 72%, analyzed by DANASIS) (図 5)。

⑤検証

上記④で相同性が比較的高かったクローンについて以後の検討を行った。

まず、この cDNA に相当する mRNA が実際に肥大化海馬で発現増強しているのかを調べるため in situ hybridization を行った。上記の cDNA を取り込んだプラスミドを antisense 用には PstI, sense 用には SphI の制限酵素で処理後、³³P-UTP あるいは Digoxigenin(Dig) で標識された UTP を用い、in vitro transcription により RNA probe を作成した。クリオスタットにて一側 KA 投与後脳の海馬を含む 20 μ m の冠状断凍結切片を作成、APS コート

したスライドガラスへ貼付後、4%パラホルムアルデヒドにて固定した。プロテインース K 処理後、prehybridization し、42℃で 72 時間 hybridization した。RNase 処理をし、最終的には 0.1x SSPE で洗浄し、autoradiogram あるいは Digoxigeni(DIG)免疫組織化学にて可視化した。autoradiogram については画像解析(NIH Image, version 1.61)を行い、各群 4 匹で肥大化側と対照側間の差について有意差検定 (student *t* test) を行った。空間分解能については DIG 標識法が優れており、これを用い検討した。

肥大化側で染色性の増強を認めた (図 6)。染色の陽性であったものはその形態より神経細胞で、肥大化した顆粒細胞の細胞質が最も強く染色され、KA 投与対側の顆粒細胞、歯状回門部の神経細胞やアンモン角の錐体細胞も中等度染色された。脳全体の分布を調べるため矢状断の切片でも検討したが、海馬以外に大脳皮質に中等度、小脳の顆粒細胞層に強い発現が認められた。画像解析の結果では KA 投与後 2 週目、8 週目とも肥大化側で発現の増強を認めたが、検定では 2 週目のみで有意差が認められた (図 7)。

次に Northern blot による検討も行った。得られた cDNA は断片であり、mRNA として実際にはどの程度の長さであるのかを調べた。in situ hybridization の結果では脳全体に発現が認められており、全脳より mRNA を抽出し、脳外の組織として肝臓からも mRNA を抽出した。電気泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーし、 ^{32}P -UTP 標識した RNA プローブで hybridization した。両組織とも 2kb あたりに一本のバンドを認めた (図 8)。

⑥⑦他のけいれんモデルでの検討

上記⑤での結果より、この cDNA を含む mRNA の分布は、脳以外の部分にもあり、脳内では比較的広範に分布していることがわかった。この mRNA の機能的解析には、当初予定したけいれんモデルでの検討も有用であると考えられたが、発達との関連で調べることにより、より普遍的に神経可塑に関与するものであるかが推測しやすいと考えられた。そこで、生後

早期の脳の in situ hybridization を施行した。

⑧生後発達期脳での検討

まずマウスで開始した。技術的な問題であるが、出生後早期のマウス脳はスライドグラス状での切片の形態保持が不良で、処理を重ねるごとに切片自体の形態が不良になってしまった。そこで、動物種間による mRNA の差の影響はあるかもしれないが、発達期についての検討ならラットでも可能ではないかと考え、生後早期のラットの脳を用いて検討した(図 9)。

生後当日のラット脳では、ほぼ脳全体に発現を認めたが、特に皮質板の下端、海馬で高い発現を認めた。まだ発達で盛んでない小脳はこの時期にはほとんど発現が認められなかった。生後 7 日目には海馬での発現が増強し、小脳の顆粒細胞層にも発現が増強し始めていた。しかし、皮質を含めその他の部位では生後当日と比較しその発現は低下していた。全体の分布は生後 14 日目には安定化し、マウスの成獣で見られた分布とほぼ同様になっていた。

(結果のまとめと考察)

今回の研究では、カイニン酸投与によって進行性に肥大化する海馬顆粒細胞の進行に際し発現の上昇する mRNA を DD 法によって無作為に検出した。DD 法に用いる primer については 20 塩基長のものを用いた。その結果いくつか発現増加の見られたものの内の一つが肥大化海馬で発現が上昇していることが検証された。他のものについては、これまでに登録された塩基配列とほとんど関連性のないもので False positive の可能性も高く検証は行っていない。この発現の確認された cDNA の分布について検討したところ、肥大化海馬より発現は低いものの、対側の海馬歯状回顆粒細胞やアンモン角錐体細胞、小脳顆粒細胞、皮質錐体細胞なども陽性に染まった。また神経系以外で肝臓のみ検索したが、脳よりも却って

強い発現が Northern blot で認められている。このことから、今回見出された cDNA は肥大化のみに特異的に発現されるものではなく、元々、海馬顆粒細胞はもちろんのこと、脳以外の組織でも発現のある広範な分布を示すものと考えられた。神経系においては脳発達期には皮質板、海馬で発現が強く、脳発達終了後では海馬や小脳顆粒細胞など発現が高く認められた。すなわち、この結果より今回見出された cDNA の塩基配列は発達期の分化の強い部分と発達終了後脳では可塑性の高い部分に発現上昇が認められる mRNA の断片であったことになる。肥大化海馬での発現上昇と考えあわせてもこの cDNA は神経可塑性の増強と関連する神経栄養因子的な働きを持つものと推測された。配列の全長が判明すれば、その解析より、栄養因子のようなものであるのか、その受容体であるのか、あるいはセカンドメッセンジャー様のものなのかななどの知見も得られるものと期待される。

今回検証された配列は、人の脳の cDNA library の研究から見出された KIAA0279 というものに相同性が認められた。しかしながら、KIAA0279 は 8.9kb であり、われわれのものは約 2kb であった。この長さの違いについては truncated form になっているためなども推測されるが、現時点では十分に説明できる資料はない。しかし、72%と高い相同性であり、両者には何らかの関連が示唆される。KIAA0279 は cDNA library から見出されたものであり、その生理的意義についてはわかっていない。これまで報告されている塩基配列の中で相同性の最も高かったものは Human FAT (cadherin-like tumor suppressor gene, homology: 26.5%)であった。Human FAT は、Drosophila tumor suppressor gene の human homologue であり、眼球、腹部臓器などに広く分布し、その相同物である rat FAT は中枢神経系での発現の報告が認められる。rat FAT は脳室上衣下組織、海馬歯状回や小脳の顆粒細胞層に多く認められ、生後早期には皮質板や歯状回顆粒細胞層に多く発現していると報告されている。この生後早期、発達後脳での分布はわれわれの in situ hybridization の結果に非常に似かよっていた。この FAT tumor suppressor gene は細胞増殖の制御や、神

経系の発達や可塑性に重要であるとされる。今回検出されたものは、未だ配列解析が不十分であるが、rat FAT のような生理的意義を持つものではないかと推測された。前述したように全長の塩基配列の決定とその解析が重要であると考えられた。

今後の研究の展開に関する計画

1：まず、今回報告した mRNA の全長の塩基配列を決定し、再度遺伝子検索を行う。

けいれんモデルでの検討や、その発展系として脳虚血などでの発現を調べる。

2：塩基配列全長よりアミノ酸配列を決め、抗原性の高い部分を選定し、ペプチドを作成。

これに対する抗体を生成し、蛋白発現について検討する。

3：今回用いたプライマーは 20bp で、行った組み合わせ数は 6 種類であった。異なったプライマー設計により、より多くの組み合わせを用い DD 法を繰り返し行い、より肥大化に特有な遺伝子の検索を行う。また、今回は肥大化側で増強したもののみ検索したが、肥大化に伴い欠失したものの検索も重要と考えられる。

上記の方法よりこの特殊なモデルより神経可塑性増強因子を探求する。現在全長の配列解析、わかっている配列からのペプチド合成、新たに当施設に導入されたより感度の高い蛍光検出の電気泳動装置を用い検索を続けている。

(参考文献)

Bouilleret V., Ridoux V., Depaulis A., Marescaux C., Nehlig A., Le Gal La Salle G.: Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic re-organization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 89: 717-729, 1999.

Dunne, J., Hanby, A. M., Poulson, R., Jones, T. A., Sheer, D., Chin, W. G., Da, S. M., Zhao, Q., Beverley, P. C. L. and Owen, M. J. (1995) Molecular cloning and tissue expression of FAT, the human homologue of the *Drosophila fat* gene that is located on chromosome 4q34-q35 and encodes a putative adhesion molecule. *Genomics*, 30: 207-233.

Guilhem D., Dreyfus P.A., Makiura Y., Suzuki F., Onteniente B.: Short increase of BDNF messenger RNA triggers kainic acid-induced neuronal hypertrophy in adult mice. *Neuroscience* 72, 923-931, 1996. Mahoney, P. A., Weber, U., Onofrechuk, P., Biessmann, H., Bryant, P. J. and Goodman, C. S. (1991) The *fat* tumor suppressor gene In *Drosophila* encodes a novel member of cadherin gene superfamily. *Cell.*, 67' 853-868.

Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Ohira, M., Kawarabayasi, Y., Ohara, O., Tanaka, A., Kotani, H., Miyajima, N. and Nomura, N. (1996) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA cloned from cell line KG-1 and brain. *DNA Res.*, 3: 321-329.

Pazman, C., Bengzon, J., McKay, R.D.G. and Somogyi, R. (1997) Novel differentially expressed genes induced by kainic acid in hippocampus: Putative molecular effectors of plasticity and injury. *Exp. Neurol.*, 146: 502-512.

Ponassi, M., Jacques, T. S., Ciani, L. and French-Constant, C. (1999) Expression of the rat homologue of the *Drosophila fat* tumor suppressor gene. *Mechanisms of Development*, 80: 207-212.

Suzuki, F., Junior, M.-P., Guilhem, D., Sorensen, J.-C. and Onteniente, B., (1995) Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*, 64: 665-674.

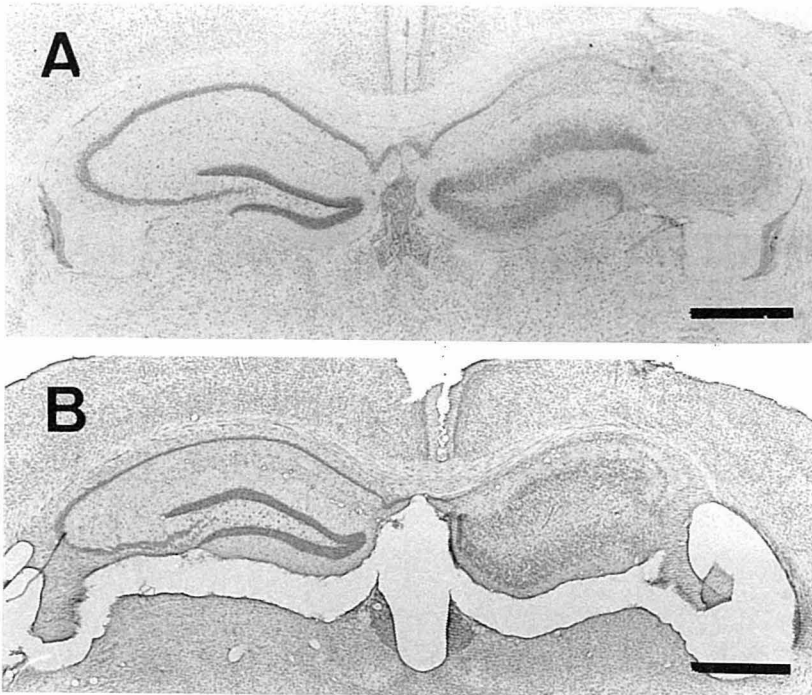


図1：クレシルバイオレット染色。カイニン酸投与後2週（A）と投与後8週（B）。対側の線上に細胞の集積した顆粒細胞層と比べ、カイニン酸投与側では海馬顆粒細胞が肥大化し、分散し細胞層が厚くなっている。2週目でも既に対側の数倍の暑さとなっているが、8週目においては拡大した顆粒細胞層にて海馬の全域が占められている。アンモン角錐体細胞は一部を除き既に脱落している。bar:100 μ m

Anc1 5'-AGCGACTTTTTTTTTTTTGC-3'
Anc2 5'-AGCGACTTTTTTTTTTTTGG-3'

Arb1 5'-GTTATCGCTTGGCAATCAGG-3'
Arb2 5'-CAGCAAGCCATACAGGTCGT-3'
Arb3 5'-CAGAACAGTGAGCAAGCGTC-3'

図 2 : 分別増殖法に使用したアンカープライマー(Anc 1, 2) と 任意プライマー (Arb1, 2, 3) の配列。塩基数はそれぞれ 20。

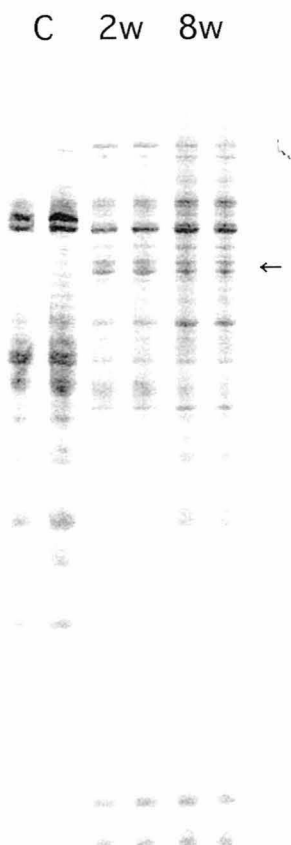


図3：変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動の結果。カイニン酸投与側と対照間に異なったバンドの増幅が認められる。

| Clone No. | Database files | Identity (%) |
|-----------|---|--------------|
| 1 | Mouse mRNA for initiation factor eIF-4AI | 33 |
| 2 | Rat mRNA for prechromogranin A | 26 |
| 3 | Mus musculus mcp-1 receptor mRNA | 23 |
| 4 | Human mRNA for KIAA0279 | 72 |
| 5 | Chicken mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) mRNA | 25 |

図 4：カイニン酸投与側で増幅されたバンドをクローニングし、GenBank と EMBL の database と照合した。それぞれのクローン番号と照合された塩基配列名と一致率を示す。4 番のクローンで高い一致が認められた。

```

GCCAAGCTATTTGTNGACCTATAGAATACTCAAGCTAAGCATCCAACGCG
...4801 | | | | | | | | | | | | | | | | |
...A---G-GGTC--ATAG--T--T-A---T--G-A-----G-G

TTGTGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCATA
      | | | | | | | | | | | | | | | | |
-----C-----A--G-T--A---GC---C--C-G-G----C-C-A

GTGATTGAGCAAGCCATACAGGTCGTNGGTAGATGATGACACTGGCCACT
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
G-G-----G-----T---G--CG-G--TAGATGATGACGCTGGCCACA

GCCTCTCCCTGACTCAGTTCTGGGTGCC-TCCGCTGCCGCCGGGCCAGCT
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
GCCTCACCTGGCTCAGCTCCGGGTGCCGTC-GCTGTCGCCGTGCCAGCT

CCTCCGTCTCCTGG-CTTCACCAGGTCCTGCAGACCTCACCATGGAGGGC
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
CCTCTGGCTCCTGGGCCTCTCCGGGGCCTGCGGGCCTGACCACGGGGGGC

ATCTCTCTGAAGACAGATTCTGGCAAATGACTGTGGTCTCAAGATCTGG
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
GTCTCTCTGAAGACAGACTCAGGCAGAATGACTGTTGTCTCAAGGTCCGG

GGGGC-GCTCCCCACGTAATGCCTCATAACGGGGCAGCTTGGTCCCAGCA
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
GGG-CTGCTCCCCACGCAGGGCCTCGTAGCGGGCAGCTTGGCCCCAGCA

AAGTTCCCCTTATCCAGGCGCACTACAGAGATGACAATGTTGGGTGTGAC
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AAGTTCCCTTTGTCCAAGCGCACTACGGAGATGACAATGTTGGGCGTGAC

GATGGTGAAGGGGCTTAGGTAGGTGTGCCGCATATTCTGGGCAAGGGCGC
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
GATGGTGAAGGGGCTTAGGTAGGTGTGCCGCATGTTCTGGGCCAGGGCAC

TGGGCGTAAGCCTCATAGTGCTGGAGCAACCAAGCGGTGCCACC-TCTGT
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
TGG-CGTAGGCCTCATAGTGCTGGAGCAGCCAGGCGGTGCCACCCTCTGT

CTGCTGGNN.....
| | | | |
CTGCTGGATCAGCTCCCAGTGCCGCTTGTTGGCTGTGTCCAG.....

```

図 5 : クローン No.4 (上段)、KIAA 0279 (下段) の配列。垂線は両者の一致する塩基配列部分を示す。DANASIS では両者間の一致率は 72%であった。

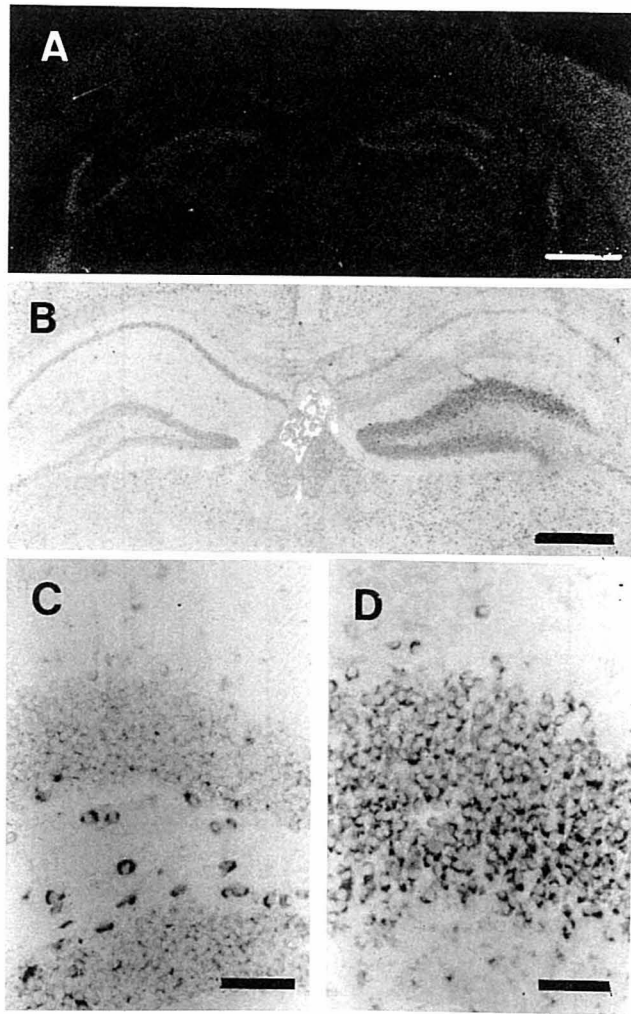


図6：カイニン酸投与後2週目。A： ^{33}P 標識 RNA プローブ、B, C, D：DIG 標識 RNA プローブによる in situ hybridization の結果。対側 (C) と比較し、カイニン酸投与側 (D) で顆粒細胞の肥大化が明らかであり、細胞質内の発現も増強している。対側では門部の神経細胞に強い発現を認める。弱拡大では歯状回のみではなく、アンモン角の錐体細胞や皮質の神経細胞にも発現が認められる。(A) に示すオートラジオグラムを画像解析に使用した。

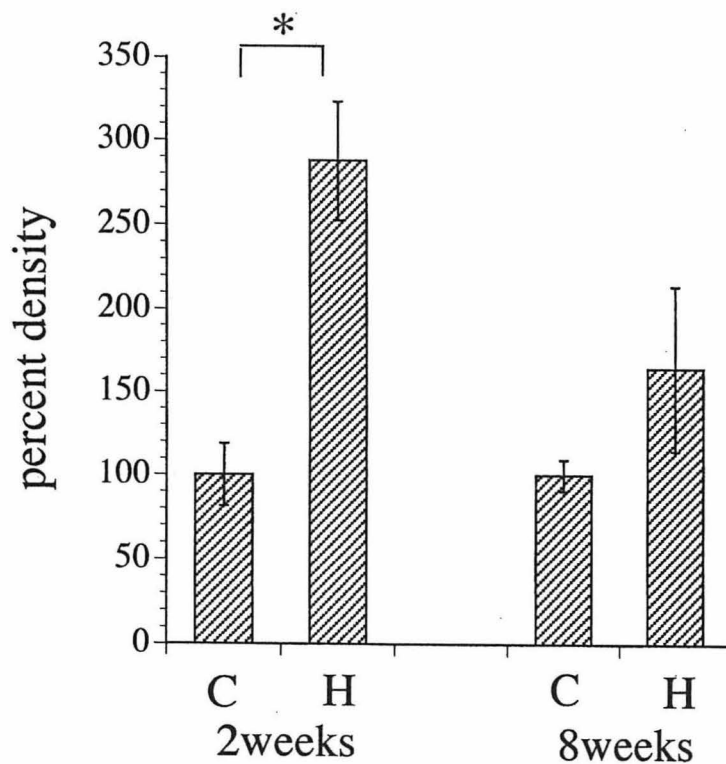


図7：カイニン酸投与後2週目、8週目の画像解析の結果。各群4匹にて解析した。2週目では有意差が認められたが、8週目ではカイニン酸投与側で増加は認められるものの、有意な差ではなかった。

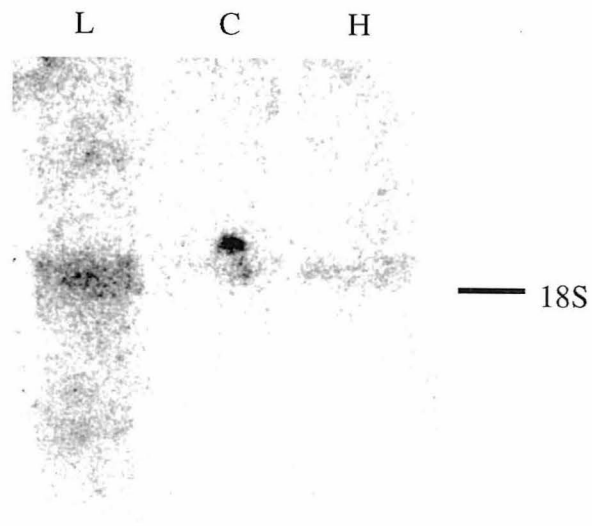


図 8 : Northern blot の結果。各レーン 5 μ g の poly(A)RNA を用いた。L : 肝臓、C : 正常マウス的大脑半球、H : カイニン酸投与側的大脑半球。脳以外に肝臓でも長さよく 2 kb のバンドが認められた。

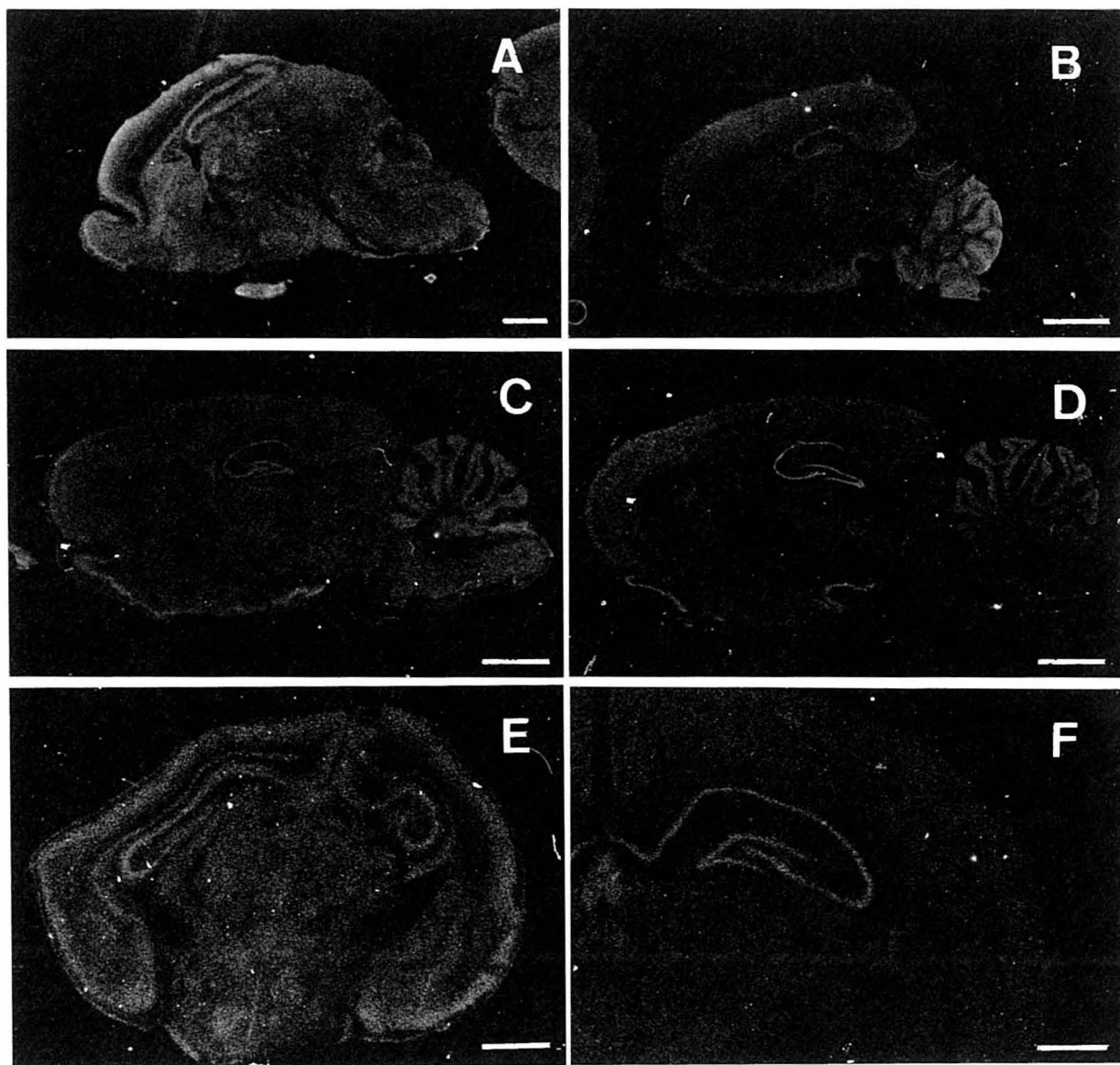


図9：ラット脳発達期と終了後の in situ hybridization の結果。生後0日目（A、E）では大脳皮質の皮質板と海馬に発現が強く認められた。生後7日目（B）では皮質の発現は低下し、生後0日目では認められなかった。小脳に発現の増強が認められた。生後28日目（C）には生後8週目（D、F）のものと同ほとんど変化は認められず、小脳と海馬に強い発現が認められた。