

学位論文

霊長類における 成体ニューロン新生

額 大輔

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻 細胞応答化学分野

指導教官 久恒 辰博

目次

I. 要旨	2
II. 用語	4
III. 序論	6
IV. 実験方法	1 5
V. 結果	2 2
VI. 考察	3 9
VII. 謝辞	4 7
VIII. 参考文献	4 8

要旨

脳のある部分では大人になってもニューロンは生まれつづけている事が分かっている。この成体における新生ニューロンの研究は主にマウス、ラットなどの齧歯類において行われており、海馬と脳室下帯 (SVZ) から嗅球への2つの領域において新生ニューロンの存在が確認されている。またヒトやサルなどの霊長類においても海馬と嗅球でニューロンが生まれ続けている事が報告されており、1999年に発表された Gould らのサルを用いた実験では、齧歯類では確認されていなかった大脳新皮質で成体でもニューロンが生まれ続けていると報告した。しかし、サルの大脳新皮質では新生ニューロンは見つからなかったという相反する実験結果も報告されており、大脳新皮質において成体でもニューロンが生まれ続けているかどうかは明確に結論が出ておらず、神経科学の分野において解明すべき主要なテーマの1つである。

そこで本研究では成体のサルを用い、大脳新皮質においてニューロンが生まれ続けているのか確認を行った。その結果、ごく少数の BrdU+/NeuN+細胞は観察されたが、これらの細胞の形態や染色パターンはニューロンとは異なるものであった。したがって健全な状態にある成体サルの大脳新皮質のニューロンの数は安定的であるという考えを支持する結果となった。また、成体サルの SVZ と海馬のニューロン新生の数はラットに比べて1~2オーダー程度少ないことが分かった。

また成体新生ニューロンの研究は医療面からも注目をされている。脳の外傷やアルツハイマー病などの神経変性症により、脳にダメージを受けるとその後の生活に重大な影響を及ぼすことになる。そこで脳の再生医療に大きな期待が集まっており、成体新生ニューロンの研究は脳の再生医療の発展に大きく寄与すると考えられている。そこで成体サルの局所脳虚血モデルを用いて、脳虚血がニューロン新生に与える影響

について調べた。その結果、SVZ - 嗅球と海馬ともに脳虚血によってニューロンの新生数が増加した。そして、この絶対数の増加は神経幹細胞の分裂が増加したことによるものであり、ニューロンへの分化促進によるものではないことが分かった。

また、SVZ から隣接する線条体に移動しているような DCX+細胞が多く観察された。これらの DCX+細胞のうち幾つかは BrdU と共染色され、形態的に移動中のニューロンのように見えた。ただ、このような未熟な移動中のニューロンの分布は SVZ からせいぜい 500 μm ほど線条体に入っているだけであり、障害を受けた線条体を全てカバーするような数ではなかった。しかし、将来的にこうした未熟なニューロンを機能を持った成熟したニューロンへと分化誘導できるような技術が開発されれば、脳の外傷や神経変性症に対する治療に大きな寄与を果たすであろう。

用語

神経幹細胞	ニューロンの元になる細胞。 自己増殖能とニューロンへの分化能をもつ。
SVZ	脳室下帯 (subventricular zone)。 脳室の横にある層で神経幹細胞が分布している。
嗅球	嗅覚の第一中枢。 鼻の奥にある臭い受容体から入力した臭い情報はまず嗅球で処理される。
海馬	記憶の形成に関与している脳部位。
歯状回	海馬の中で顆粒細胞 (ニューロン的一种) が密集して集まっている細胞層。 この細胞層の最も内側にも神経幹細胞が存在している。
顆粒細胞層	細胞体の形が顆粒状であるニューロンが集まっている細胞層。
サバイバル・タイム	BrdU を投与した時から灌流固定を行い脳を取り出すまでの期間。 BrdU でラベルした新生細胞が生き残っている期間に相当。

BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine。 チミジンの類似分子であり、細胞分裂の際に複製中の DNA に取り込まれる。 したがって、核内に BrdU をもつ細胞というのは BrdU を投与した後に新しく生まれた細胞であるということを意味している。
NeuN	Neuronal Nuclei。 成熟したニューロンのマーカー・タンパク質。 転写制御因子。
DCX	Doublecortin。 未熟なニューロンのマーカー・タンパク質。 微

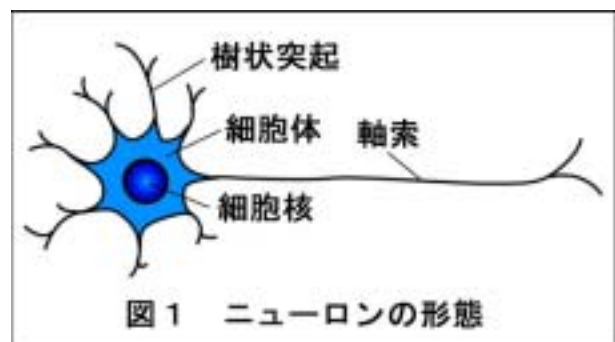
小管結合タンパク質。

GFAP	Glial fibrillary acidic protein アストロサイト（グリア細胞）のマーカー・タンパク質。中間径フィラメント。
S-100 β	アストロサイト（グリア細胞）のマーカー・タンパク質。カルシウム結合タンパク質。
O4	オリゴデンドロサイト（グリア細胞）のマーカー抗体。オリゴデンドロサイトの細胞表面に発現するサルファタイドに対する抗体。
Nestin	神経幹細胞のマーカー・タンパク質。中間径フィラメント。
Iba-1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1。 マイクログリア（グリア細胞）のマーカー・タンパク質。 カルシウム結合タンパク質。

序論

ヒトは進化する過程で脳を高度に発達させ、外界からの情報を受け入れ複雑な処理をする能力を身に付け自然を克服し、更には他者とコミュニケーションすることで社会を形成し、今まさにヒトは地球上で最も繁栄しているように思える。ヒトがこれ程までに繁栄しているのは脳が成せる業であり、それゆえに脳は遠い昔から人間の興味の対象としてあり続けた。古くは紀元前5世紀に科学的な医学の父ヒポクラテスが「脳を通じて、人間はものを考え、見たり聞いたりし、美しいものから醜いものを、善いものから悪いものを、快いものから不快なものを見分けるのである。」と述べており、脳が人間性をもたらす重要な器官であると考えていた。そして科学が発達した現在でも依然として脳は興味の対象であり、医学から生物学、化学、物理学、工学、情報科学、心理学に至るまで多くの分野が脳を研究の対象としており、脳には解決すべき謎が多く残されたままであり、おそらく今後も人間の脳に対する興味が失われることは無いであろう。

脳は外界から受けた情報を処理し、他の各器官に指令を与える器官である。ヒトの脳は数千億個のニューロンからなり、この多数のニューロン間を情報が伝達することによって複雑な情報処理が行われる。ニューロンは特徴的な形態をしており、内部に細胞核を含む細胞体があり、この細胞体から軸索と樹状突起と呼ばれる突起を伸ばしている(図1)。ニューロン内では情報は細胞体から軸索へと一方方向で運ばれる。外界からの情報は光(視覚)、音(聴覚)、化学物質(嗅覚、味覚)、物理的な力(触覚)によってもたらされるが、これらの情報が夫々の受容器で電気的なシグナルに変換される。電気的シグナ



ルはニューロン内を伝搬し、次のニューロンへと情報が伝わるが、ニューロン間の情報伝達は電氣的なものではなく、化学物質（神経伝達物質）を介して行われる。細胞体から電氣的シグナルが軸索の末端に到達すると、軸索末端に貯蔵されていた神経伝達物質が放出され、次のニューロンの細胞膜上にあるレセプターに結合し、最終的に細胞内外にイオンの流入が起こり、次のニューロンに電氣的シグナルとなって情報が伝達される。そして様々なタイプの神経伝達物質が存在しており、これらが情報の伝達を促進したり、抑制したりするなどの異なる形式の情報伝達を行うことでも複雑な情報処理を可能にしている。

また脳は脊椎動物の進化の過程で複雑さを獲得してきた。このことは脊椎動物の脳を観察する事でハッキリと分かる。両生類と爬虫類では大脳は大きな嗅球の付け足しに過ぎず、中脳と間脳は表面に著しく突出している。しかし原始哺乳類（マウ

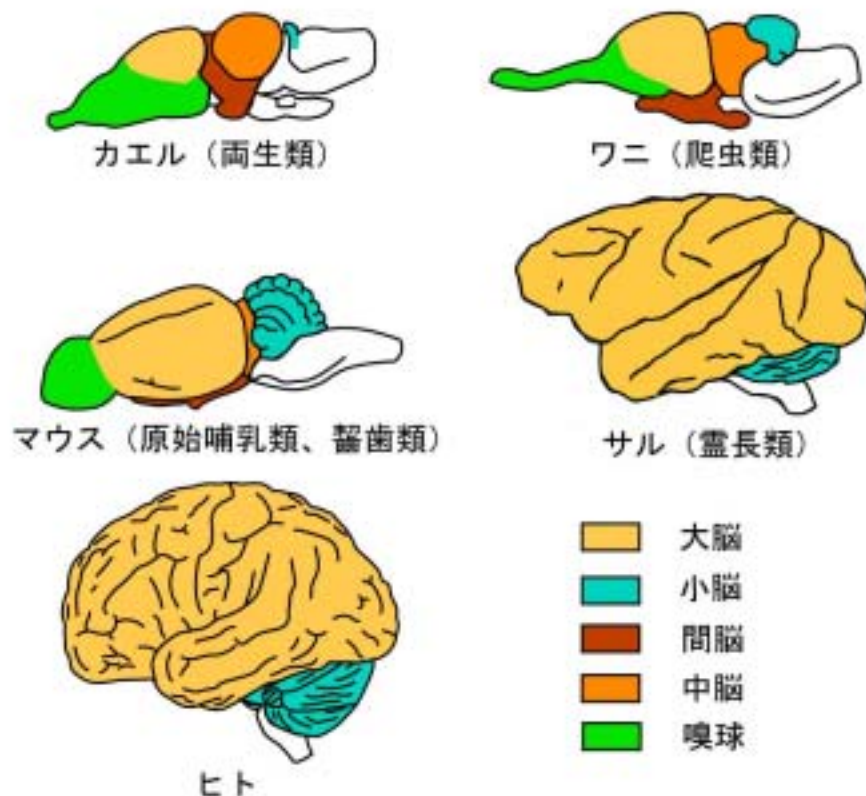


図2 脳の進化

ス)になると大脳は大きくなり、中脳と間脳の前側を覆っている。そして霊長類になると更に大脳は巨大化し、中脳と間脳をほとんど完全に覆っている(図2)。このように脳の進化は大脳が次第に大きくなることで成されている。生きていく上で基本的な機能は進化の初期の段階で完成し中脳や間脳などで処理され、より高度な分化した機能に関係する部位である大脳は霊長類になってから発達した。大脳は発達するにつれて、初期に発生した脳部位を深部へ押しやり、自らは外へ向かい巨大化していった。

脳は幾つかの部位に分けられ、それぞれが機能を分担し全体として複雑な処理をしている。大きく分けると脳幹、小脳、間脳、終脳の4つに分けられる(図3)。脳幹は生きていくための最小限に必要な機能が備わっている部位であり、延髄(呼吸や血管運動、消化の調節の中枢)、橋、中脳(各種の反射の中枢)からなる。小脳は運動の調節機能を担う部位ある。間脳は大脳と末梢神経の中継地点である。そして

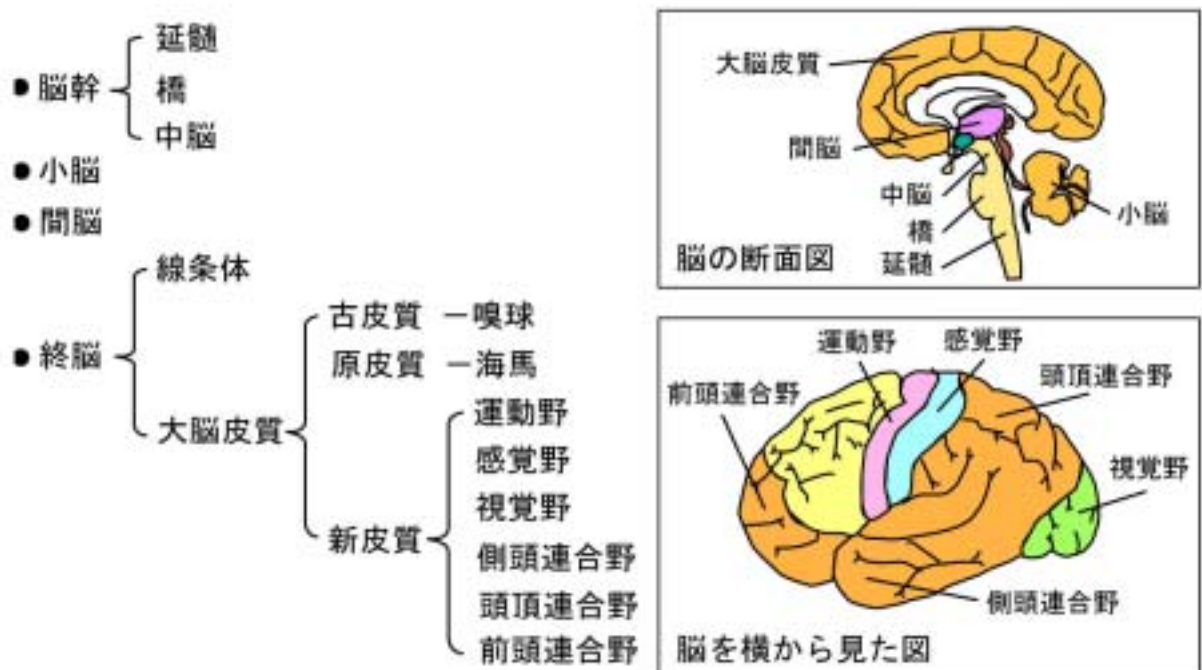


図3 脳部位の分類

終脳は記憶、情動、意思決定などの高次機能を担う部位であり、線条体と大脳皮質からなる。線条体は随意運動の発現と制御に重要な役割を担う高次中枢である。大脳皮質は霊長類で特に発達している部位であり、古皮質、原皮質、新皮質とさらに3つに分類される。古皮質は大脳皮質の最も古い皮質領域であり進化的に魚類で生じたと考えられており、嗅球（嗅覚の第一中枢）がこれに含まれる。原皮質は両生類で発生したと考えられており、海馬（記憶の形成に関与）がこれに含まれる。そして新皮質は爬虫類で進化したものだと考えられており、最も高次の機能を担っている部位である。大脳新皮質の機能分担もかなり詳細に分かってきており、主なものに運動（筋肉）をコントロールする運動野、身体各部の感覚情報を処理する感覚野、視覚情報の処理をする視覚野、物体の形、色の認識などを行う側頭連合野、空間の認識などを行う頭頂連合野、意志や注意などの最高レベルの脳機能を担う前頭連合野に分けられる。

以上のように脳は長い進化の過程を経て複雑化し同時に組織化して、現在ヒトが有する高度な情報処理機能を獲得した。したがって、ラットやマウスなどの齧歯類などの脳を研究する事で得られた情報は非常に有用なものであるが、脳を理解するためにはより脳の複雑化した動物を用いて研究する事も同様に重要なことであり、今回の研究で霊長類であるサルを用いて得られた情報は、今後の神経科学界の発展において貴重なものとなるであろう。

1. 成体サルにおけるニューロン新生

これまでニューロンは脳の発達期においてのみつくられ、その後大人になるとニューロンの数は減るだけだと考えられてきたが、最近の研究によって脳のある部分では一生涯に渡ってニューロンが新しく生まれ続けていることが分かってきた。この成

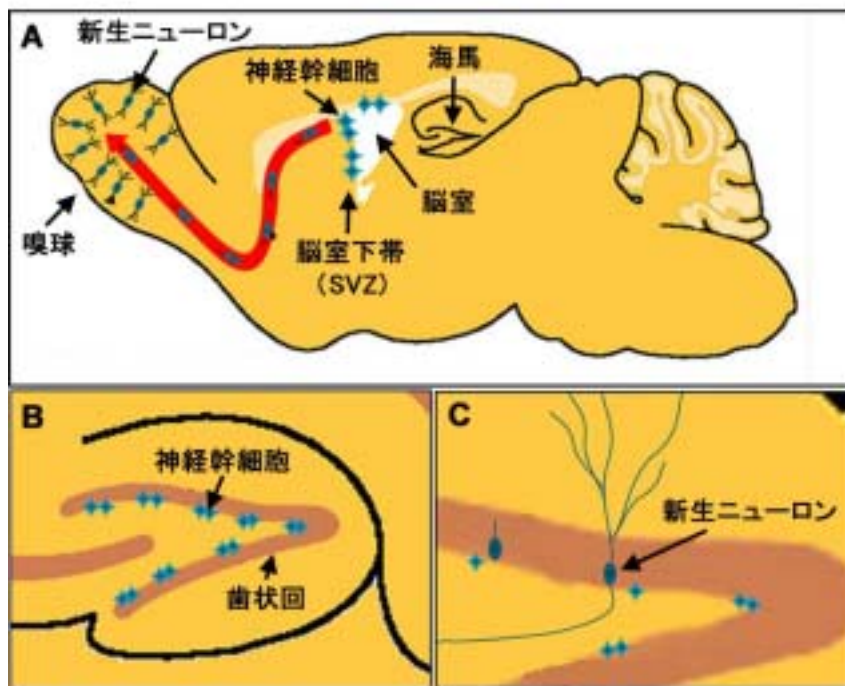


図4 マウスにおけるニューロン新生

(A) 嗅球では脳室下帯 (SVZ) で神経幹細胞が分裂しており、ニューロンに分化しながら前方へ移動し最終的に嗅球に到達し、成熟したニューロンになる。
 (B) 海馬では、歯状回と呼ばれる細胞層の一番内側の層に神経幹細胞が分裂している。(C) そして移動はせずに神経幹細胞は歯状回内でニューロンへと分化する

層の一番内側の層に神経幹細胞が分裂している。(C) そして移動はせずに神経幹細胞は歯状回内でニューロンへと分化する

体ニューロン新生の研究は主にラットやマウスなどの齧歯類を用いて行われており齧歯類では嗅覚の第一中枢である嗅球(Altman and Das, 1966; Altman, 1969; Lois and Alvarez-Buylla, 1993)と記憶の形成に関与している海馬(Altman and Das, 1965; Kaplan and Bell, 1984; Cameron et al., 1993)の2つの領域で成体におけるニューロンの新生が確認されている。 これら齧歯類でのニューロンの新生過程はこれまでに詳細に解析されており、嗅球では脳室の周囲にある脳室下帯 (SVZ ; Subventricular zone) でニューロンの元になる細胞である神経幹細胞が分裂を繰り返しており、この神経幹細胞がニューロンに分化しながら前方へ集団になって移動し、最終的に嗅球に到達し、嗅球内の顆粒細胞層と糸球体層で成熟したニューロンになる(図4A)。 一方、海馬では歯状回と呼ばれる細胞層の最も内側で神経幹細胞が存在しており、海馬の場合はそれ程移動せずにその場でニューロンへと分化することが分かっている(図4B、C)。 そして、これら2つの領域の新生ニューロンがニューロンとしての電気生理学的な性質

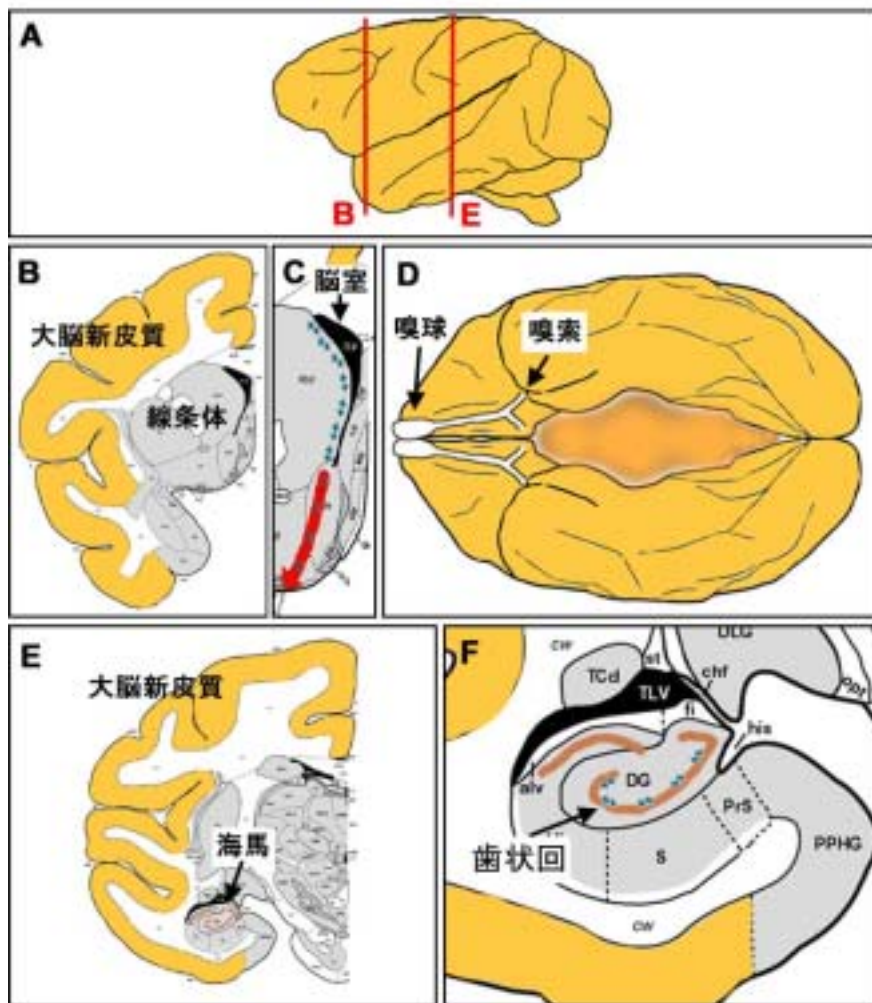


図5 サルの脳の構造とニューロン新生

(A) サルの脳を横から見た図。赤線B、Eの断面図がそれぞれ図B、Eに対応する。

(B) 前頭連合野の大脳新皮質と線条体を含む冠状脳断面。黒い部分が脳室。(C)

Bの脳室周囲の拡大図。脳室の周囲のSVZで神経幹細胞（青い星型で示した細胞）が分裂している。この神経幹細胞が

ニューロンに分化しながらサルの場合は腹側方向に向かって移動し、嗅球へいたる経路である嗅索に入る。(D) 脳を真下から見た図。ニューロンへ分化しながら嗅索を通り最終的に嗅球に到達し、成熟したニューロンになる。(E) 感覚野の大脳新皮質と海馬を含む冠状脳断面。(F) 海馬の拡大図。歯状回の最内層で神経幹細胞が分裂しており、その場でニューロンへと分化する。

をもち(van Praag et al., 2002; Belluzzi et al., 2003)、既存の神経回路網に組み込まれることも分かってきている(Stanfield and Trice, 1988)。更に、それぞれ嗅球での新生ニューロンは臭いの嗅ぎ分けといった臭いの情報処理に関わっており(Gheusi et al., 2000)、海馬の新生ニューロンは記憶の形成に関与しているという報告もなされている(Shors et al., 2001)。

サルやヒトなどの霊長類でのニューロン新生の研究はこれまでに数例ほどしか報告されていないが、齧歯類と同様に嗅球と海馬の2箇所では新生ニューロンの存在は確認されている(Gould et al., 1999b; Kornack and Rakic, 1999; Kornack and Rakic, 2001b)。霊長類と齧歯類では脳の大きさ、構造がかなり異なり、サルではSVZから嗅球への分化途中の新生ニューロンの移動経路が齧歯類と多少異なるものの、それ以外の様式については齧歯類と同じである(図5)。そして1999年にGouldらが免疫組織化学的手法を用いて齧歯類では確認されていなかった成体サルの大脳新皮質でのニューロンの新生を報告した(Gould et al., 1999c)。この大脳新皮質は霊長類で特に発達している領域であり、思考や判断といった最高レベルの脳機能を担っていることからこの報告は非常に注目された。しかしその後、別のグループが同様な実験をしたところ大脳新皮質では新生ニューロンの存在は確認できなかったと報告しており(Kornack and Rakic, 2001a)、実際に成体サルの大脳新皮質においてニューロンの新生が起こっているのかどうかは論争になっており、この問題は神経科学の分野における解決すべき主要なテーマの1つであった。そこで本研究では、成体のサルを用いて作製した脳切片に免疫組織染色を行い、大脳新皮質を共焦点レーザー顕微鏡で観察を行い、得られた画像データをコンピューター上で3次元画像に再構成することで詳しく解析を行い、成体サルの大脳新皮質においてニューロン新生が起こっているのか調査を行った。そして更に、成体サルの嗅球と海馬の新生ニューロンの定量的な解析を行った。得られたデータはこれまでに報告されているラットでの新生ニューロンと比較検討を行い、霊長類と齧歯類での新生ニューロンの数的な関係について考察を行った。

2. 脳虚血による成体サルのニューロン新生への影響

大人になってもニューロンが生まれ続けているという成体ニューロン新生の研究は、医療面への応用も望まれている分野である。 脳の外傷やアルツハイマー病などの神経変性症によって脳にダメージを受けると、その後のヒトとしての生活に重大な影響が生じてしまう。 そこで最近、脳の再生医療がこうした患者に対する「夢の医療」として期待されている。 そして、これまでに齧歯類を用いて成体新生ニューロンに影響を与える因子について様々な研究がなされて来ている。 行動レベルでは学習や運動、更には豊かな住環境にラットを置くと新生ニューロンの数が増えるといった報告があり(Kempermann et al., 1997; Gould et al., 1999a; van Praag et al., 1999)、分子レベルでは FGF や EGF といった神経栄養因子と呼ばれるタンパク質をラットに与えるとニューロンの新生が促進されるという報告がある(Craig et al., 1996; Kuhn et al., 1997)。 更には脳虚血やてんかん発作などの脳の病気によっても新生ニューロンに影響を受けることが報告されている(Parent et al., 1997; Liu et al., 1998; Jin et al., 2001)。

しかし、齧歯類と霊長類の脳の構造や機能はかなり異なるものであり、医療への応用を考えた場合、こうしたラットで報告されている因子がヒトのニューロン新生にも同じような作用を及ぼすのかどうかは非常に重要な点である。 実際に、ラットでは作用が確認された薬がヒトには全く効果が無かったという事はよくある話である。 この問題を解決するためには、ヒトに系統的に近いサルを用いて実験を行い検討することが現実的な解決方法の1つとして考えられる。 そこで本研究では、成体サルの局所脳虚血モデルを用いて、脳虚血によるニューロン新生への影響を調べた。 また今回用いた局所脳虚血モデルでは中大脳動脈を閉塞することにより局所での脳虚血を発症させるが、実際の医療現場で見られる急性虚血性の脳卒中ではこの中大脳動脈の血液供給支配領域でしばしば脳梗塞が生じている。 したがって、今回おこなった

サルの局所脳虚血モデルによって得られたニューロン新生のデータは、脳卒中患者の虚血後の脳機能障害とニューロン新生の関係を考える上で非常に貴重なデータになるであろう。そして、サルの実験で得られたデータはこれまでに報告されているラットでの結果と比較検討を行った。更に、脳虚血後にサルの神経症状にテストを行い、脳虚血後に見られる脳機能の障害とその後に起こる回復とニューロン新生の関係について考察を行った。

実験方法

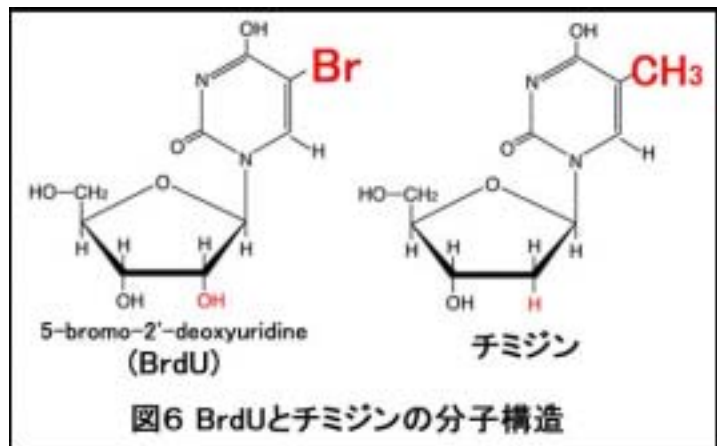
1. 成体サルにおけるニューロン新生

動物：

実験には、5才の成体カニクイザル (*Macaca fascicularis*) を5頭と脳の可塑性がより高いと考えられるやや若い2才のニホンザル (*Macaca fuscata*) 2頭を用いた。カニクイザルとニホンザルは系統的にマカク属に分類され、このマカクザルは一般的に4才で性的に成熟し、6才で体重が最大になり、寿命は30年程であるため、5才のカニクイザルは成体でも若いグループ (young adult) に入り、2才のニホンザルはまだ子供 (juvenile) である。また実験は全て米国 National Institutes of Health による "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" と京都大学 霊長類研究所による "サル類の飼育管理と使用に関する指針" に準じて行った。

BrdU の投与：

新生細胞のマーカーとして BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) を投与した。BrdU はチミジンの類似分子であり (図6)、細胞分裂の際に複製中の DNA に取り込まれる。したがって、核内に



BrdU をもつ細胞というのはサルに BrdU を投与した後に新しく生まれた細胞であるということを意味している。この BrdU を1頭目のカニクイザル (カニクイザルI) に1日1回で3日間投与し、更に6日後にもう1回投与して、その1日後に灌流固定

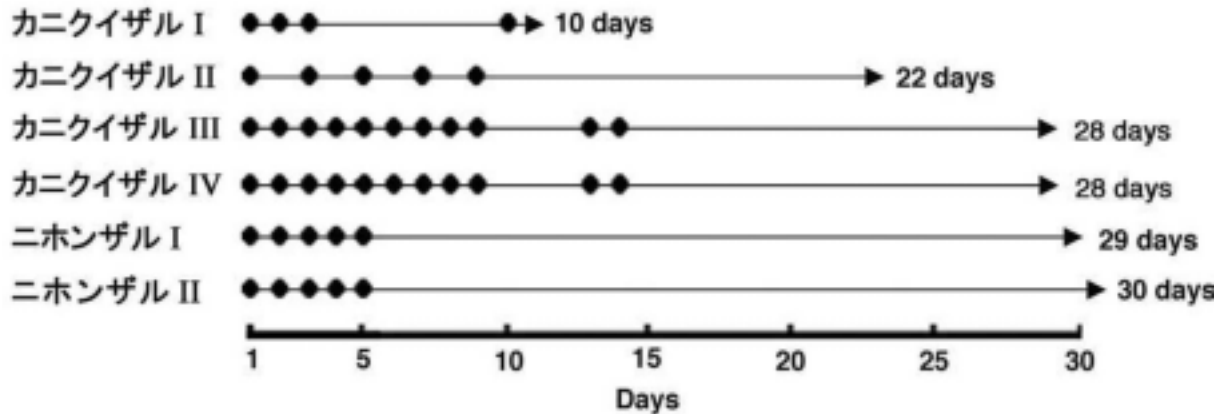


図7 BrdU投与スケジュール

●がBrdUを投与した日、矢印の終点が灌流固定を行い脳を取り出した日を示している。矢印の先にある日数はそれぞれのサルで最初に投与した日から灌流固定を行った日までの期間（サバイバル・タイム）を示している。

を行い脳を取り出した（図7を参照）。2頭目のカニクイザル（カニクイザル II）には1日1回を1日おきに5回投与し、最後のBrdU投与した日から14日後に灌流固定を行った。1頭目のニホンザル（ニホンザル I）には1日1回で5日間連続で投与して、最後にBrdU投与した日から24日後に灌流固定を行った。そして、2頭目のニホンザル（ニホンザル II）は同様に1日1回で5日間連続して投与し、最後にBrdU投与した日から25日後に灌流固定を行った。以上の4頭は大腦新皮質におけるニューロン新生の実験に用いた。そして、嗅球と海馬のニューロン新生の実験は2頭のカニクイザルで行い、これらカニクイザル III と IV では1日1回で9日間連続で投与し、更に4、5日後に投与し、最後にBrdUを投与した日から14日後に灌流固定を行った。

脳切片の作製：

灌流固定した後は脳を2つの半球に分け、それぞれを5mmの厚さに冠状切断し、

これらのブロックは4% パラホルムアルデヒド溶液中に4℃で2日間置いて、更に脳組織の固定を行った。そして、脳のブロックをO.C.T compoundに入れて、-80℃で冷凍保存した。凍らせた脳ブロックはクライオスタットで40µmの厚さに切り、脳切片を作製した。

免疫組織染色：

まず切片をトリス緩衝食塩水(TBS)中に10分間ずつ2回に入れ洗浄した。そして、10mMクエン酸緩衝液中で90分、5分処理し、その後室温に戻るまで放置し、再びTBSで切片を洗浄した。そしてBrdUの抗体がDNA鎖中のBrdUに結合するために1M塩酸で37℃、30分間処理しDNAを変性させ、0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)で組織のpHを中性に戻し、またTBSで洗浄した。そして、ブロッキング溶液(5% normal donkey serum、0.3% triton-xのTBS溶液)に常温で30分入れ脳切片をブロッキングした後に、1次抗体と反応させた。1次抗体は5% normal donkey serum入りのTBSに混ぜ、4℃で1日反応させた。抗体は、モノクローナル・ラット抗BrdU抗体(希釈倍率1/200; Harlan, 英国)とニューロンの抗体としてモノクローナル・マウス抗NeuN抗体(1/1000; Chemicon, 米国)とポリクローナル・ヤギ抗DCX抗体(1/100; Santa Cruze, 米国)そしてアストロサイトの抗体としてポリクローナル・ラット抗GFAP抗体(1/10,000; DAKO, 米国)とポリクローナル・ウサギ抗S-100β抗体(1/5,000; Swant, スイス)そしてオリゴデンドロサイトの抗体として、モノクローナル・マウスIgM抗O4抗体(1/10; Chemicon)そしてマイクログリアの抗体としてポリクローナル・ウサギ抗Iba-1抗体(1/250; 国立神経研究所の高坂新一教授から御好意により与えられた。)を用いた。1次抗体反応の後、切片はTBSで10分間で3回洗浄してから、2次抗体反応を行った。2次抗体にはAlexa 488(1/1000; Molecular probes、

米国)と Rhodamine Red-X(1/200; Jackson ImmunoResearch, アメリカ)を用いた。 2 次抗体は 1 次抗体と同様の反応液に希釈し、常温で 2 時間反応させ、再び TBS で 10 分間、3 回洗浄した。そして切片をスライドガラス上に乗せ、Immuno Mount (Shandon, 米国)で封入した。

共焦点レーザー顕微鏡による観察と 3 次元画像解析：

免疫染色した切片は共焦点レーザー顕微鏡(TCS SP2; Leica, ドイツ)で観察を行い、得られた画像データは画像解析ソフト(LCS; Leica)で処理して 3 次元画像に再構成した。このソフトウェアにより共焦点レーザー顕微鏡で走査した部位の切断面を観察することができ、得られた画像データの詳しい解析が可能となった。

2 . 脳虚血による成体サルのニューロン新生への影響

動物：

実験には 5 才の成体カニクイザルを 5 頭用いた。そのうち 3 頭に局所脳虚血の手術を施し、残りの 2 頭には手術はせずにコントロールとして用いた。

局所脳虚血モデル：

手術はまずサルにケタミン(10 mg/kg)を筋肉注射して軽く麻酔を掛けてから、その後は 0.6 – 1% イソフルレンを含んだ酸化窒素と酸素の混合ガス(酸化窒素：酸素 = 7 : 3)で麻酔状態を保った。そして右側の中大脳動脈の起始部に緑色光(540 nm, 4,000,000 lux)を照射し、同時にローズベンガル(20 mg/kg)を 6 分間静脈投与した。中大脳動脈への光の照射は 20 分間行った。ローズベンガルは光活性物質であり緑色光によって活性化され、周りの酸素にエネルギーを遷移して活性酸素を発生させる。この活性酸素によって、光を照射した中脳大動脈の血管内皮細胞が壊され血栓となり

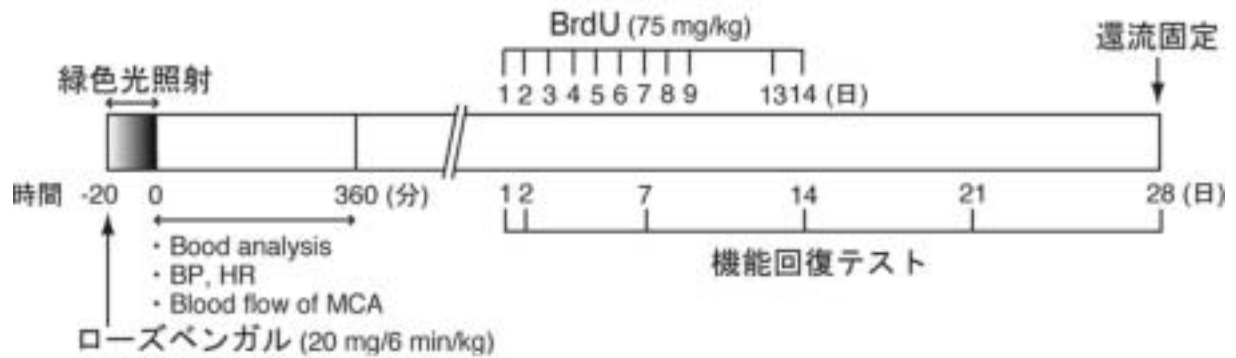


図8 局所脳虚血後のBrdU投与と神経症状テストのスケジュール

血流が止められ、その先にある脳への血液の供給が停止して、脳虚血を発症させる。今回の局所脳虚血モデルではもう一つある左側の中大脳動脈の血流は止めていないため、左の脳への血流は正常に保たれたままである。更に、中大脳動脈は脳の前頭葉と頭頂葉の一部と側頭葉の一部に血液を供給する動脈であり、それ以外の領域にはまた別の動脈が血液を供給するので、今回のモデルで血液の供給がストップして脳虚血による損傷が見られるのは脳の右半球の前頭部に限局される。そして、手術中は中大脳動脈の閉塞を確認するために、中大脳動脈の起始部にセットしたパルス・ドップラー血流計によって血流の低下を6時間に渡って測定した。手術後は塩酸ブプレノルフィン（4 μg/kg）とディファゾリン（25 mg/kg）を筋肉注射して、鎮痛と感染に対する処置を行った。そして、良好な自発呼吸の状態を確認した後に、サルをケージに戻した。

BrdU の投与：

BrdU は脳虚血後 1 ~ 9 日後と 13, 14 日後に 1 日 1 回投与した（図 8 参照）。

神経症状のテスト：

脳虚血の 1、2、7、14、28 日後に神経症状をモニターした。神経症状のテストは意識、運動機能、筋骨格の協応性、感覚系の 4 つのカテゴリーに分かれ、それぞれ表 1 に示したような基準に従って判定していった。

脳切片の作製と免疫組織染色：

脳切片は前述したのと同じように行った。免疫組織染色は前述とほぼ同じであるが、脳虚血のサンプルは組織が破壊されておりボロボロの状態であったので、まず脳切片をスライドガラスに貼り付け、スライドガラス上で免疫染色を行っていった。またこの場合には NeuN と DCX の染色性が落ちるので、2 次抗体としてビオチン化 2 次抗体(Vector, 米国)を用い、これにストレプトアミジンが結合している蛍光物質(Alexa 488)(Molecular probes)を選択的に結合させ、NeuN と DCX のシグナルの増強を行った。それぞれの反応方法は前述と同じであり、ビオチン化 2 次抗体が希釈倍率 1/200 で常温、2 時間反応させ、ストレプトアビジン - Alexa 488 が 1/200、常温、2 時間反応させた。

表 1 局所脳虚血後の神経症状テスト

	Category	Score
Consciousness:	Normal, consistently alert	0
	Conscious and aggressive	4
	Conscious and evasive	6
	Conscious but clouded and tolerant	8
	Drowsiness, aroused with stimulation	10
	Lethargia, eyes open by intense stimulation	16
	Stupor, aroused with persistent stimulation	20
	Light coma, reflex movement only	24
	Deep coma, no movement	28
Motor system:	Upper limb (strength and movement)	(ipsi-/contra)
	Normal	0/0
	Reduced strength and skilled movement	2/2
	Paralyzed and useless	4/4
	Lower limb (strength and movement)	
	Normal	0/0
	Raise with flexion of knee against gravity	2/2
	Movement possible, but not against gravity	4/4
	Paralyzed and useless	6/6
	Upper limb tone	
	Normal	0/0
	Overtly spastic or flaccid	3/3
	Lower limb tone	
	Normal	0/0
Overtly spastic or flaccid	3/3	
Musculoskeletal coordination:	Normal, walks normally	0
	Minimal incoordination, walks with some gait impairment	4
	Incoordinated, but able to climb a wire net	6
	Stands independently, falls within a few steps	10
	Sit, only able to circle	12
	Pose with lateral or dorsal recumbency	16
	No movement	18
Sensory system:	Facial sensation	(ipsi-/contra)
	React consistently to touch in any area of face	0/0
	Absent, does not react to touch in any area of face	3/3
	Pinna reflex	
	Twitch ear in response to outer/inner hair stimulation	0/0
	Absent, does not move ear in response to touch	3/3
	Pain reflex	
	Strong, quick, complete withdrawal from toe pinch	0/0
	Weak, slow, incomplete or inconsistent withdrawal from toe pinch	3/3
Absent, no withdrawal from toe pinch	5/5	

*ipsi-" and "contra" indicate ipsilateral and contralateral to MCA occlusion

結果

1. 成体サルにおけるニューロン新生

A. 大脳新皮質

これまでに報告されているように、大脳新皮質において BrdU 陽性の新生細胞が観察された。序論で述べた成体サルの大脳新皮質でニューロンの新生を報告している論文では前頭連合野でニューロンの新生を報告しており(Gould et al., 1999c)、この前頭連合野にある principal sulcus と呼ばれる脳の皺にあたる部分の BrdU+の新生細胞数をカウントしてみた。また、連合野以外の大脳新皮質の領域として運動野と感覚野の間にある central sulcus の BrdU+ の新生細胞の数もカウントしてみた(表2)。すると、大脳新皮質の BrdU+の新生細胞の数はどちらの領域においても数十個/mm³程度であった。そしてやや前頭葉の方が新生細胞の数が多い傾向が見られた。また、同じような BrdU 投与のスケジュールで実験を行った5才のカニクイザルIIと2才のニホンザルI及びIIで新生細胞の数には差は見られなかった。また、大脳新皮質の下部に相当する白質にも BrdU+細胞が観察されたが、神経幹細胞が存在しているSVZから大脳新皮質への新生ニューロンの移動を示唆するような BrdU+細胞集団の移動の形跡は白質では全く見られなかった。SVZでは4頭全てのサルで BrdU+細胞が観察されたが、BrdU投与後1日後に灌流固定をしているカニクイザルIのSVZで最も多くの BrdU+細胞が見られた。そして大脳新皮質にある BrdU+細胞の内いくつかはグリアや血管内皮細胞であって、グリア細胞のマーカーで共染色をしてみると、アストロサイトのマーカーであるS-100βと共染色している BrdU+細胞(全ての BrdU+細胞の内1%以下)とマイクログリアのマーカーであるIba-1と共染色している BrdU+細胞(<1%)が観察された(図9)。

表2 成体サルの大脳新皮質におけるBrdU+新生細胞の数

	年齢	BrdUの 投与回数	サバイバル タイム	BrdU+細胞の数 (/mm ³)	
				Principal sulcus	Central sulcus
カニクイザル I	5	4	1 - 10 日	28.6	19.3
カニクイザル II	5	5	14 - 22 日	27.2	23.3
ニホンザル I	2	5	25 - 29 日	25.1	18.1
ニホンザル II	2	5	26 - 30 日	48.5	33.9

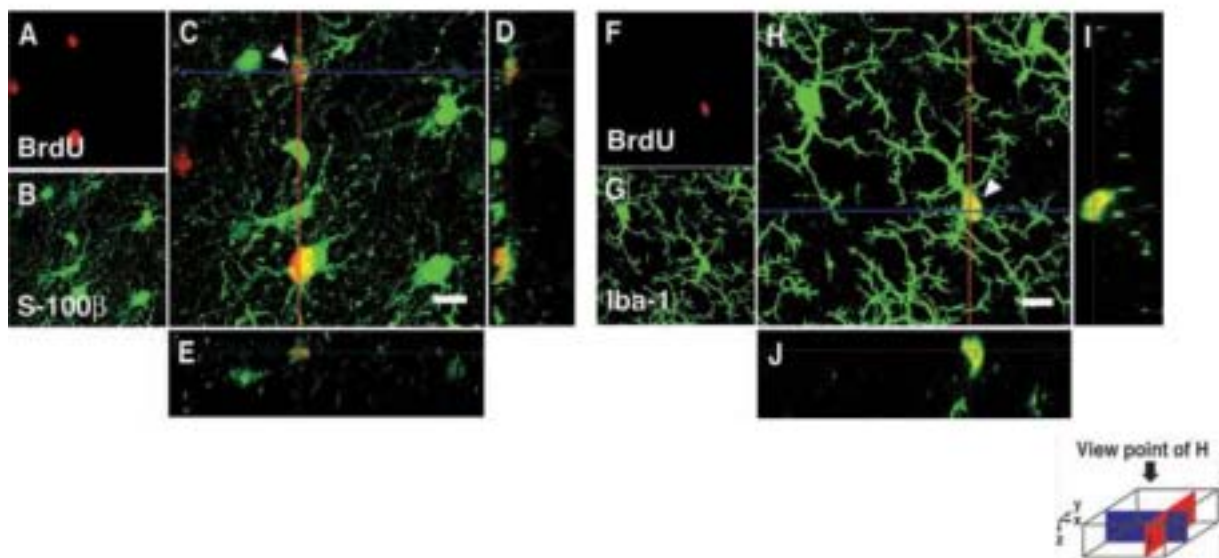
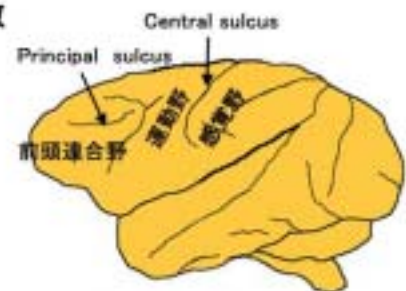


図9 成体サルの大脳新皮質でグリア細胞のマーカを発現しているBrdU+細胞

(A-E) S-100 β (アストロサイトのマーカー) と共染色しているBrdU+細胞 (A) BrdU (赤) (B) S-100 β (緑) (C) AとBを併せた図 (D) C上の赤線でのy-z軸断面図 (E) C 上の青線のx-z軸断面図 (F-J) Iba-1 (マイクログリアのマーカー) と共染色しているBrdU+細胞 (F) BrdU (赤) (G) Iba-1 (緑) (H) FとGを併せた図 (I) H上の赤線でのy-z軸断面図 (J) H上の青線のx-z軸断面図、Scale bars = 8 μ m

そして BrdU+細胞がニューロンのマーカーと共染色している可能性を調べるために、まず BrdU と NeuN (成熟ニューロンのマーカー) で共染色してみた。すると一見すると BrdU と NeuN が共染色していて、新生ニューロンであるように見える細胞が多数観察された(図 10 A - C)。しかし得られた画像データを 3 次元画像に再構成して、この断面図を詳しく見てみると、これは BrdU と NeuN で共染色している細胞ではなかった。実際には、NeuN で染色しているニューロンとは別の BrdU+の新生細胞が張り付いているために共染色している細胞と間違っ観察している事が分かった(図 10 D - F)。このようにニューロンに張り付いている細胞はその形態から解剖学的にサテライトグリアと呼ばれており、今回の研究では大脳新皮質で観察された全ての BrdU+細胞のうち約 35%がこの様なサテライトグリアであった。そして BrdU+のサテライトグリアを GFAP、S-100 β 、O4、Iba-1 などのグリアのマーカーと共染色してみたが、いずれのグリア・マーカーも発現していなかった。

実際に BrdU と NeuN が共染色している細胞(BrdU+/NeuN+細胞)も観察された(図 11 A - C)。しかしその数がごく僅かであり、大脳新皮質にある全ての BrdU+細胞のうち僅か 0.01%以下であった。更にこれら僅かに観察された BrdU+/NeuN+細胞を更に詳しくみていくと周囲のニューロンとは異なっており、NeuN の染色は細胞核だけにしか見られなかった。つまり BrdU+/NeuN+細胞では NeuN タンパク質が核内だけに限局しており、これらが新生ニューロンであるとは結論付けられなかった。今回の実験ではまずカニクイザル I (BrdU 投与から灌流固定までの期間が 1 ~ 9 日間)を用いて実験を行い、以上のような結果となった。そこで、この 1~9 日間という期間では BrdU+細胞がニューロンに分化するには期間が短すぎると考え、BrdU 投与から灌流固定までの期間を長くしてカニクイザル II(14 ~ 22 日間)で実験を行った。しかし結果はカニクイザル I と同様であった。更にまた別の未熟なニューロンのマ

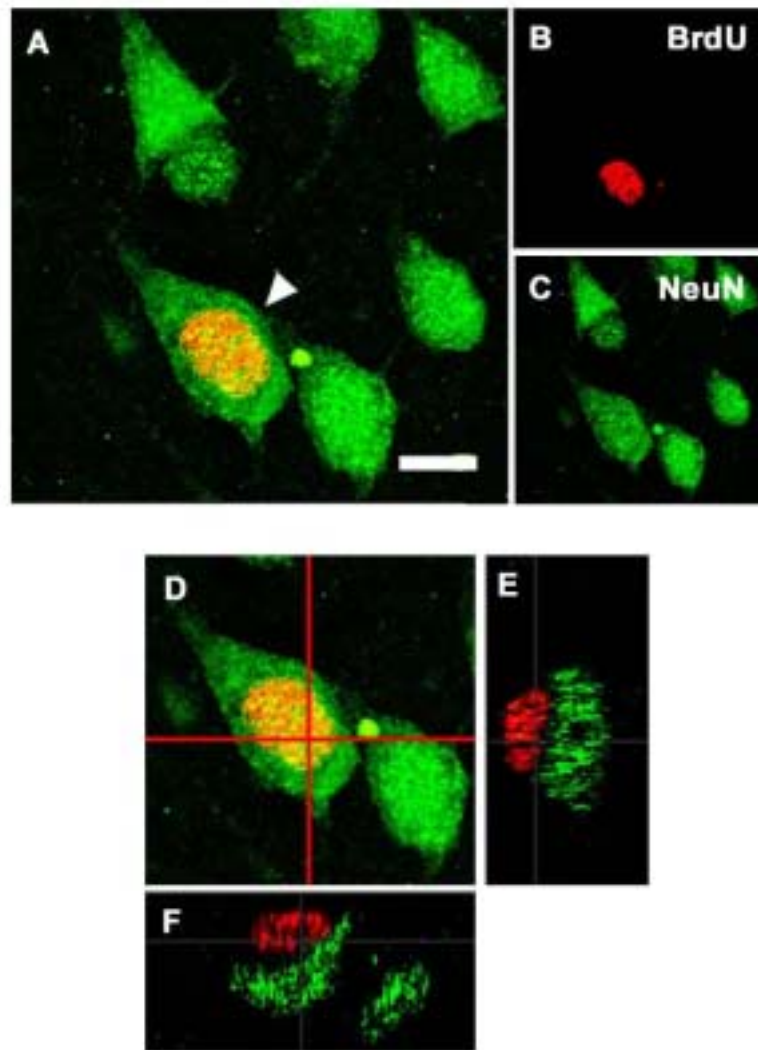
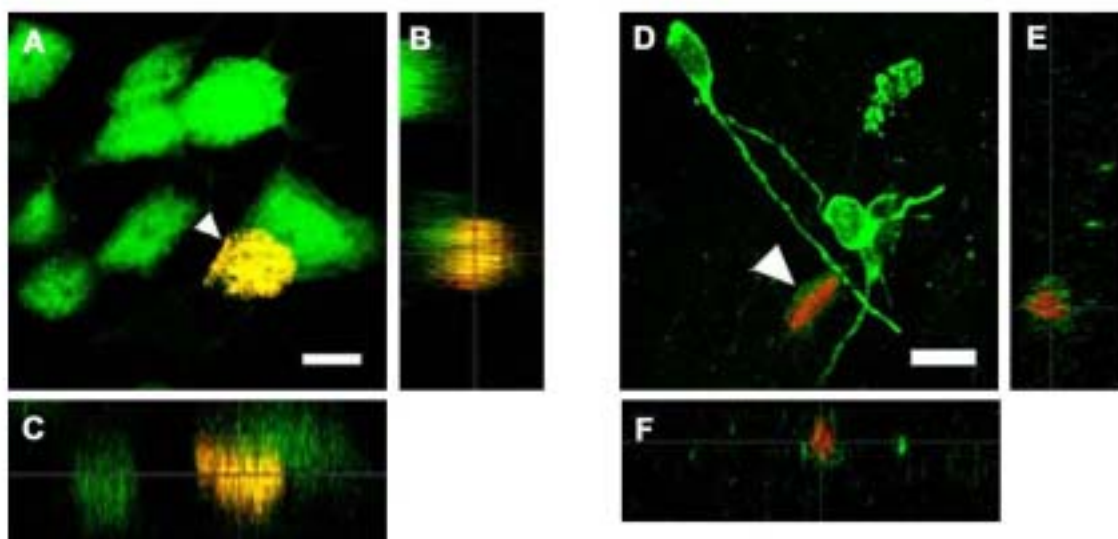


図 10 成体サルの大脳新皮質においてBrdUとNeuNが重なっていない例

(A-C) 一見するとBrdUとNeuNが共染色しているように見える細胞（矢頭）が大脳新皮質で多数観察される。(B) BrdU (赤) (C) NeuN (緑) (D-F) しかし実際には、これは共染色している1つの細胞ではなく、NeuN+のニューロンの上にBrdU+のまた別の細胞が乗っかっていて、張り付いている2つの細胞である。(D) Aの拡大図 (E) D上の縦の赤線でのy-z軸断面図 (F) D上での横の赤線でのx-z軸断面図、Scale bar = 8 μ m



大脳新皮質にある全てのBrdU+細胞のうちNeuNもしくはDCXで共染色していた細胞の割合

BrdU+/NeuN+細胞	BrdU+/DCX+細胞
< 0.01%	< 0.01%

図 1 1 成体サルの大脳新皮質におけるBrdU+/NeuN+細胞とBrdU+/DCX+細胞

(A) 大脳新皮質で見つかったBrdU+/NeuN+細胞。NeuNタンパク質の発現は核内に限局されており、周りのニューロンとは異なっている。BrdU (赤)、NeuN (緑)

(B) Aのy-z断軸面図 (C) Aのx-z軸断面図 (D) 大脳新皮質で見つかった

BrdU+/DCX+細胞。DCXタンパク質の発現量はかなり少ない。BrdU (赤)、DCX (緑) (E) Dのy-z軸断面図 (F) Dのx-z軸断面図、Scale bars = 8 μm

ーカーである DCX を使って実験を行い、大脳新皮質に BrdU+/DCX+細胞は観察されたが(図 1 1 D - F) その数はごく僅か (< 0.01%) であり、DCX の染色性も弱く、DCX タンパク質が非常に弱くしか発現していなかった。したがって、成体サルの大脳新皮質でニューロンが新生していることを示す確固たる証拠は得られなかった。

B . 嗅球と海馬

嗅球と海馬の新生ニューロンの定量的解析実験ではサルに 2 週間 BrdU を投与し、更に 2 週間後に還流固定を行った(サバイバル・タイム = 14 日から 28 日)。そして SVZ で 12400 個/mm³、嗅球で 681 個/mm³、海馬で 1800 個/mm³ の BrdU+の新生細胞が観察された(表 3)。また、ニューロンへの分化の割合を見てみると嗅球では全 BrdU+細胞のうち 76%が NeuN+の新生ニューロンであり、海馬では約 40%が NeuN+であった。また、これまでに報告されているラットの新生ニューロンのについての論文から、サルの 5 才に相当する生後 2 ヶ月のラットの新生ニューロン数を調べ、今回サルで行ったのと同じ条件で実験をしたときに推定される新生ニューロンの数を計算によって求めた(Tanapat et al., 1999; Cameron and McKay, 2001; Winner et al., 2002)。

表3 嗅球と海馬における新生ニューロンの数

	年齢	BrdU 投与回数	サバイバ ル・タイム	嗅球		海馬	
				# of BrdU+	% of BrdU+/NeuN+	# of BrdU	% of BrdU+/NeuN+
カニクイザル	5 才	11	14-28 日	681 ± 46	76.0 ± 5.0%	1,800 ± 200	40.3 ± 0.7%
ラット(推定値)	2 月	-	-	~ 66,000	80-90%	~ 19,000	50-80%

of BrdU+: BrdU+細胞の数(/mm³)

% of BrdU+/NeuN+: 全 BrdU+細胞のうち NeuN と共染色している細胞の割合

ラットの値はこれまでに報告されているデータから計算により求めた推定値。

2. 脳虚血による成体サルのニューロン新生への影響

A. 神経症状テスト

脳虚血を施したサルは虚血 1 日後では重い脳機能の障害が見られた (図 1 2)。主に意識がぼんやりしており、痛覚反射が消失し、手足の麻痺などの症状が見られた。脳虚血後 2 8 日経過しても運動機能、筋骨格の協応性、感覚系の神経症状の自発的な回復は見られなかった。それに対して、意識障害は脳虚血後 1 4 日を過ぎた辺りから顕著に回復傾向が見られた。

B. 脳虚血による損傷

脳切片に対してニッスル染色を行い、脳の損傷範囲を調べた (図 1 3)。虚血半球側である右脳では脳の前の方が酷く損傷を受けており、梗塞は中心前回、上側頭回、島皮質、中側頭回を含む大脳新皮質に見られた。更に線条体はほぼ全体が損傷を受けていた。それに対して、血液が正常に供給されていた左脳 (反対側) では損傷は全く見られなかった。また海馬は中大脳動脈の血液供給領域ではないので、当然のことながらニューロンの脱落などの損傷は全く見られなかった。更に両半球にある海馬歯状回の体積は虚血半球側が $3.2 \pm 1.7 \text{ mm}^3$ に対して、反対側は $3.0 \pm 1.5 \text{ mm}^3$ であり有意な差は見られなかった。したがって、今回のモデルでは海馬は脳虚血による直接的な損傷は受けていないと考えられる。

C. SVZ-嗅球での虚血後のニューロン新生

脳虚血後の脳切片を観察すると虚血半球側の SVZ では BrdU+新生細胞が多く観察された (図 1 4 A)。また虚血半球側で SVZ の隣にある線条体で更に多くの細胞が増殖していた。これは損傷によってリアクティブ・アストロサイトや免疫系の細胞

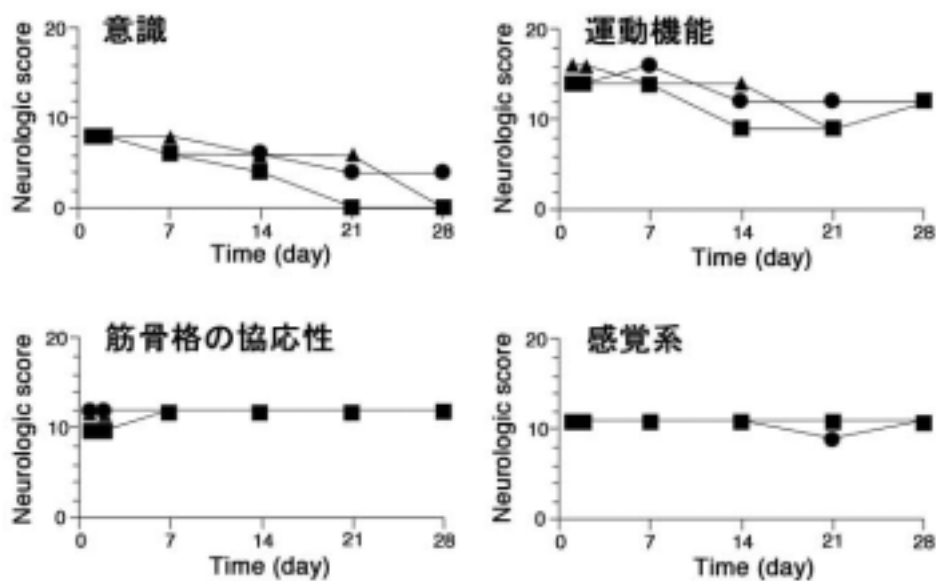


図 1 2 脳虚血後のサルの神経症状テスト

脳虚血後 1、2、7、14、21、28 日目に神経症状をモニターした。1 日目に重い神経症状が見られ、意識障害は 14 日経過辺りから回復が見られたのに対して、それ以外の脳機能の障害は回復が見られなかった。▲、●、■はそれぞれ脳虚血手術を施した 3 頭のサルを示している。

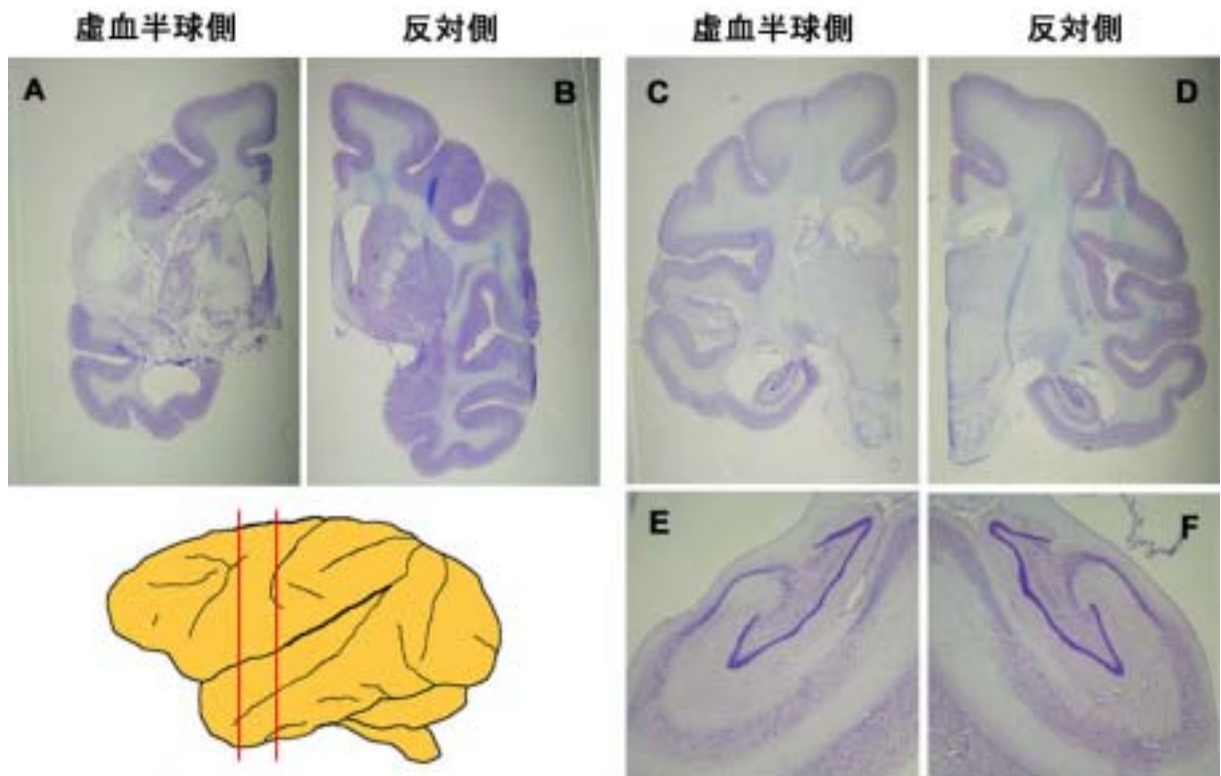


図 1 3 局所脳虚血による脳の損傷範囲

(A、C、E) 脳虚血を発症した脳半球側 (B、D、F) 脳虚血が起こっていない脳半球側。梗塞は前頭葉と頭頂葉の一部と側頭葉の一部と線条体に見られた。(E、F) しかし海馬では損傷は全く見られなかった。左下の脳の全体図の左側の赤線での線条体を通る冠状断面がAとBで、右側の赤線での海馬を通る冠状断面がCとDに相当する。

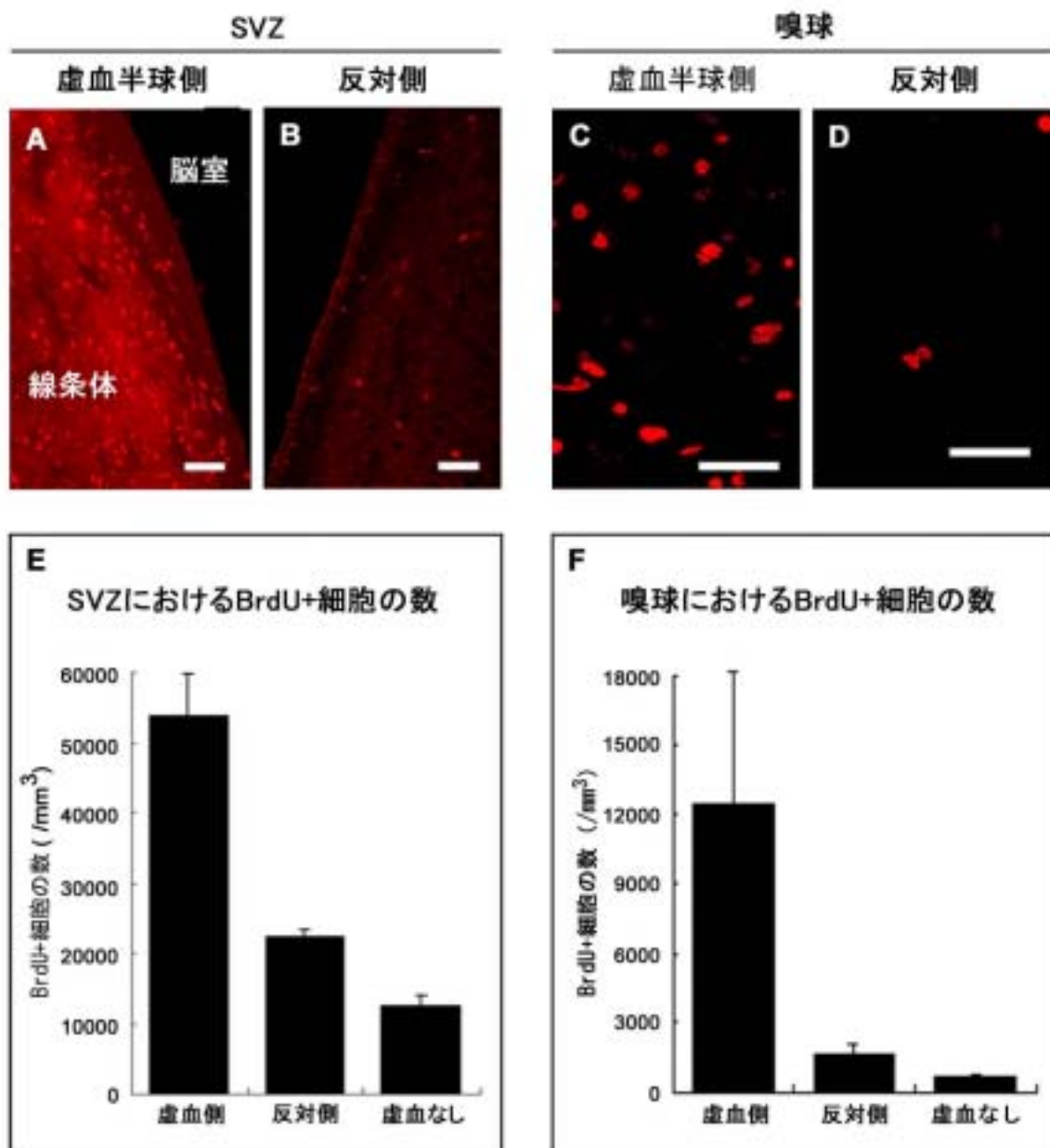


図 14 脳虚血後のSVZ嗅球でのBrdU+細胞

(A) 虚血半球側のSVZでは多くのBrdU+細胞（赤）が観察され、脳虚血によって神経幹細胞の分裂が促進されていた。また脳虚血によって損傷を受けた線条体でも多数のBrdU+細胞が観察された。(B) 虚血されていない反対側のSVZと線条体。

(C) 虚血半球側の嗅球でも多くのBrdU+細胞が観察された。(D) 反対側の嗅球

(E) 脳虚血手術をしていないコントロールに比べて虚血半球側のSVZでは神経幹細胞の増殖が4.3倍増加していた。(F) 嗅球のBrdU+新生細胞は脳虚血によって20倍に増えていた。Scale bars = 40 μ m

などの分裂が促進されたためと考えられる。また嗅球でも同様に虚血半球側で BrdU+細胞が多く観察された(図 1 4 C)。そして SVZ-嗅球における BrdU+新生細胞を定量的に解析してみると、局所脳虚血手術をしていないサルの SVZ(コントロール)に比べると、虚血半球側の SVZ では 4.3 倍も BrdU+細胞が観察され、細胞分裂が促進されていた(図 1 4 E)。そして反対半球側の SVZ でもコントロールに比べて 1.8 倍ほど細胞の新生が増加していた。更に嗅球に至ってはコントロールに比べて虚血半球側で約 20 倍も細胞の新生が増加していた(図 1 4 F)。

次に新生した細胞がどの程度ニューロンに分化するのか調べるために、ニューロンのマーカーである DCX(未熟なニューロン・マーカー)もしくは NeuN(成熟したニューロン・マーカー)と BrdU の二重染色を行った。まず SVZ を見ていくと、BrdU+/DCX+細胞は両側にあり(図 1 5 A、B) 細長い円形の核をもち双極性の神経突起を伸ばしており、これは形態的に見て移動中のニューロンであることを示していた(Kornack and Rakic, 2001b)。そして神経突起は脳室の壁に対して平行に走っていた。また、BrdU+細胞のうち成熟したニューロン・マーカーである NeuN と共染色している細胞は見つからなかった。これは SVZ の神経幹細胞は嗅球まで移動してから成熟したニューロンになることと整合している。そして嗅球では新生ニューロンはかなり分化の程度が進んだ状態にあるので、DCX を発現している BrdU+細胞は少なく、かなりの数の BrdU+細胞が NeuN を発現していた(図 1 5 C、D)。

そして、脳虚血がニューロンへの分化に影響を及ぼすのか調べるために、BrdU とニューロン・マーカーと共染色している細胞の数をカウントした。その結果 SVZ では全ての BrdU+細胞のうち DCX と共染色している細胞の割合は虚血半球側で $4.6 \pm 0.5\%$ 、反対側で $7.5 \pm 3.3\%$ 、コントロールで $8.1 \pm 0.1\%$ であり、3つのグループ間で有意な差はみられなかった(図 1 5 E)。そして嗅球でも DCX と共染色している

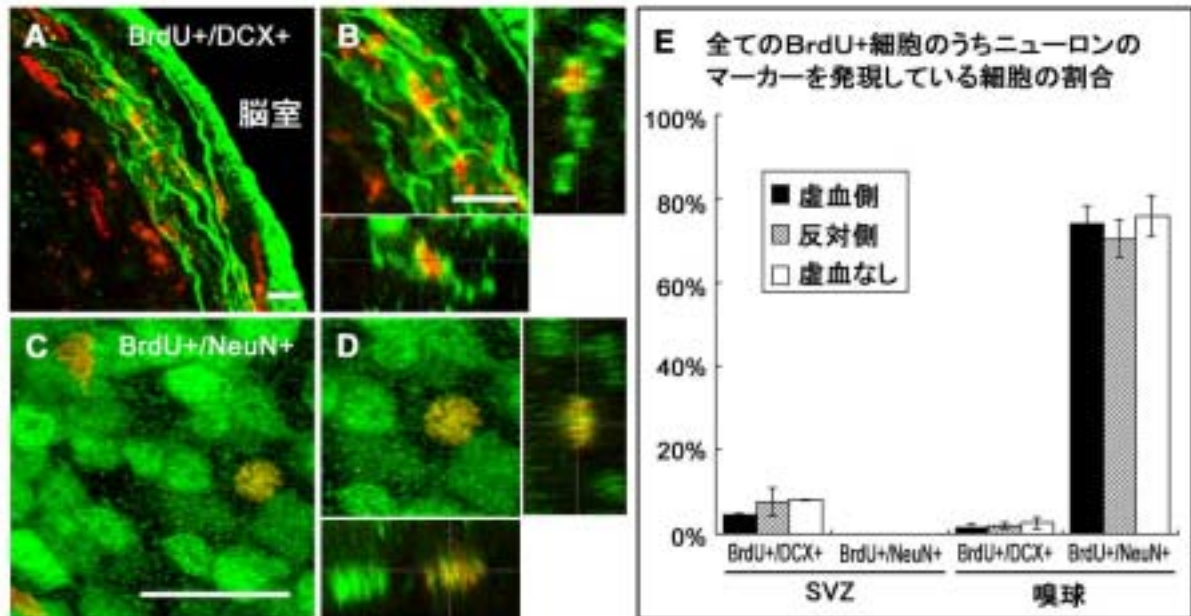


図 15 SVZ-嗅球での局所脳虚血によるニューロン分化への影響

(A) 虚血半球側のSVZ。DCX+の未熟なニューロンが連なって移動しており、いくつかはBrdUと共染色している。BrdU:赤、DCX:緑 (B) AのBrdU+/DCX+細胞を3次元画像に再構成したもの。(C) 虚血半球側の嗅球の顆粒細胞層。BrdU:赤、NeuN:緑 (D) CのBrdU+/NeuN+細胞を3次元画像に再構成したもの。(E) 脳虚血によってニューロンへの分化が促進されることはなく、虚血半球側、反対側、虚血なしの3つのグループ間でBrdU+細胞のうちDCXもしくはNeuNで共染色している細胞の割合に差は見られなかった。

BrdU+細胞の割合に差は見られなかった(虚血半球側: $1.7 \pm 0.5\%$ 、反対側: $1.9 \pm 0.6\%$ 、コントロール: $2.6 \pm 1.4\%$ 、図 1 5 E)。また、BrdU+細胞のうちかなりの数が NeuN と共染色していたが、BrdU+/NeuN+細胞は3つのグループで有意な差はなかった(虚血半球側: $73.8 \pm 4.4\%$ 、反対側: $70.4 \pm 4.4\%$ 、コントロール: $76.0 \pm 5.0\%$ 、図 1 5 E)。

D . 海馬での虚血後のニューロン新生

海馬では脳虚血によって虚血半球側の顆粒細胞層、分子細胞層、多形細胞層を含めた歯状回全体で BrdU+新生細胞の数が増えていた(図 1 6 A)。また顆粒細胞層内でも虚血半球側では顆粒細胞層の内側と外側を含めた全層に渡って BrdU + 細胞が増えているのに対して、反対側やコントロールでは殆どの BrdU+細胞は顆粒細胞層の内側の層に分布していた(図 1 6 B)。そして BrdU+細胞の定量的解析をした結果、BrdU+細胞の数はコントロールに比べて虚血半球側では 4.6 倍に増えており、反対半球側も 1.8 倍に増えていた(図 1 6 C)。

次に海馬での増殖細胞の細胞種を同定するために、まず BrdU と DCX で共染色を行った。全ての BrdU+/DCX+細胞は顆粒細胞層の内側の層に分布しており、細長い円形の細胞核をもち双極性の神経突起を伸ばしていた(図 1 7 A、B)。殆どの BrdU+/DCX+細胞はこの神経突起を顆粒細胞層に対して平行に伸ばしていたが、いくつかは垂直方向にも伸ばしていた。BrdU+/DCX+細胞の形態や分布は3つのグループで同じような結果であった。また、BrdU と NeuN で共染色している細胞も見つかかり、円形もしくは卵形の細胞核であった(図 1 7 C、D)。

そしてこれら2つのニューロン・マーカーと BrdU との共染色の割合を調べてみると、BrdU+/DCX+細胞の割合は虚血半球側で $10.8 \pm 1.3\%$ 、反対側で $12.1 \pm 0.9\%$ 、コントロールで $8.7\% \pm 1.9\%$ で(図 1 7 E)。BrdU+/NeuN+細胞の割合は虚血半球側で

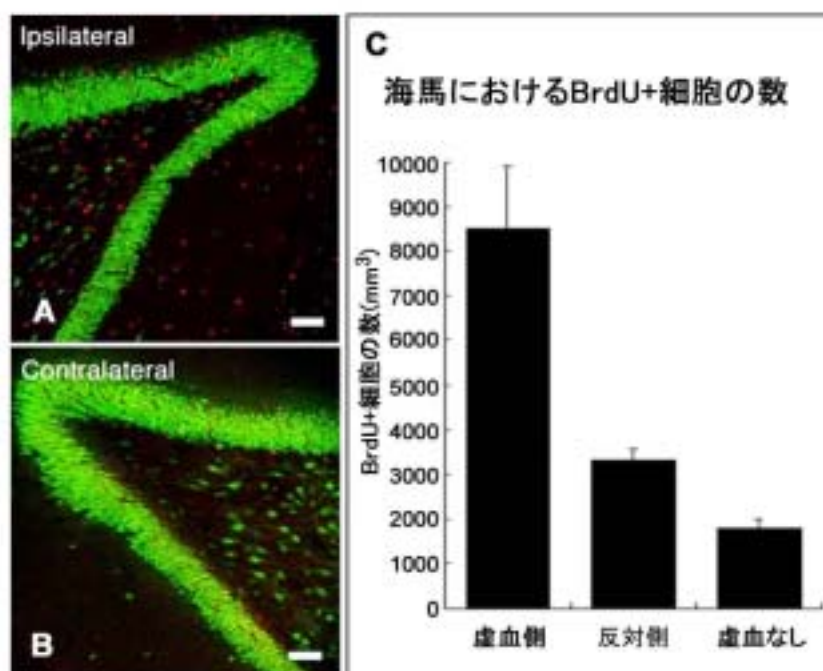


図 16 脳虚血後のSVZ嗅球でのBrdU+細胞

(A) 虚血半球側では多くのBrdU+細胞 (赤) が歯状回全体にわたって分布していた。(B) 反対側の海馬歯状回 (C) 脳虚血側では虚血なしに比べて神経幹細胞の分裂が4.6倍に増加していた。また、反対側の海馬でもコントロールに比べて新生細胞の数が増加していた。Scale bars = 80 μ m

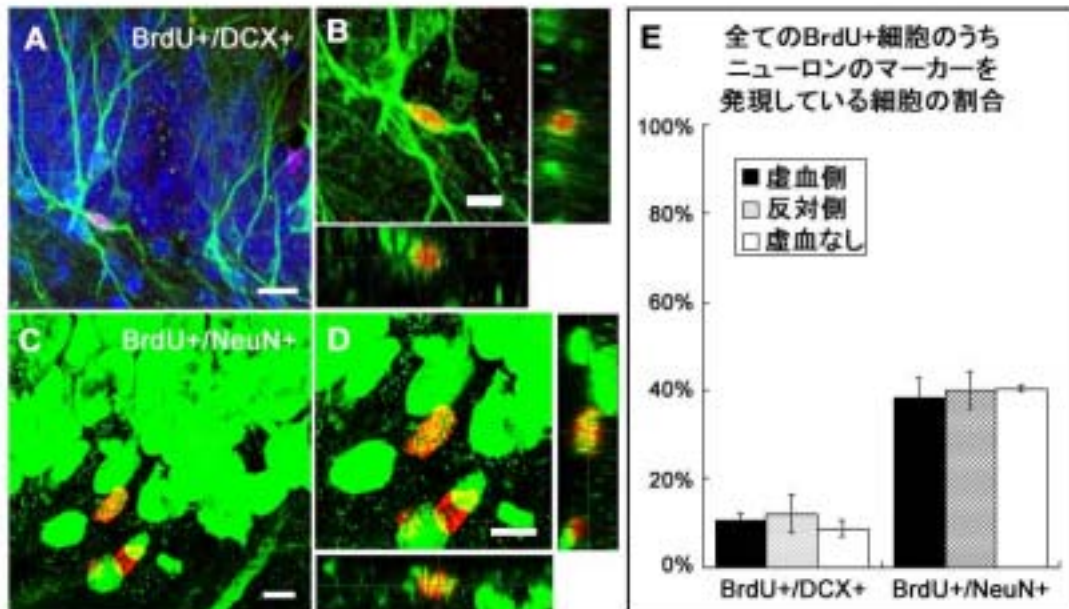


図 17 海馬での局所脳虚血によるニューロン分化への影響

(A) 虚血半球側の海馬。BrdU+/DCX+細胞は細長い円形の細胞核をもち、双極性の神経突起を伸ばしている。青色はDAPIによって核を染めた。(B) AのBrdU+/DCX+細胞を3次元画像に再構成したもの。(C) BrdU+/NeuN+細胞は歯状回の内側の層に分布しており、その核は円形もしくは卵形であった。(D) CのBrdU+/NeuN+細胞を3次元画像に再構成したもの。 Scale bar = 8 μ m。(E) 海馬でもニューロンへの分化率は脳虚血によって影響は受けていなかった。3つのグループでDCXもしくはNeuNと共染色するBrdU+細胞の割合に差は見られなかった。

38.5 ± 4.2%、反対側で 40.0 ± 4.2%、コントロールで 40.3 ± 0.7%であった。したがって、海馬でも脳虚血によってニューロンへの分化スピードが変わるなどの影響は見られなかった。

E . 線条体で見られた DCX+の未熟なニューロン集団

今回脳虚血の手術をした3頭のサルのうち1頭のサルの線条体で非常に多くの DCX+細胞の分布がみられた(図18A、B)。この DCX+未熟ニューロン群は SVZ から線条体へ移動しているようであった。ただし、この線条体への移動距離はせいぜい 500 μm 程度であり、SVZ から少し線条体へ入った程度であった。これら DCX+細胞は楕円形の細胞核をもち、双極性の神経突起もしくは分枝した神経突起を伸ばしていた。神経突起は様々な方向に伸びていたが、多くの DCX+細胞は脳室の壁と平行に伸ばしている傾向が見られた。そして DCX+細胞のうちいくつかは BrdU と共染色していたが(図18C、D)、成熟したニューロンのマーカーである NeuN と BrdU で共染色している細胞は線条体で見つからなかった。

また、側頭皮質、扁桃体や海馬内のその他の領域で虚血後にニューロンの新生が誘導されていないか調べたが、BrdU とニューロンのマーカー・タンパク質で共染色している細胞は見つからなかった。

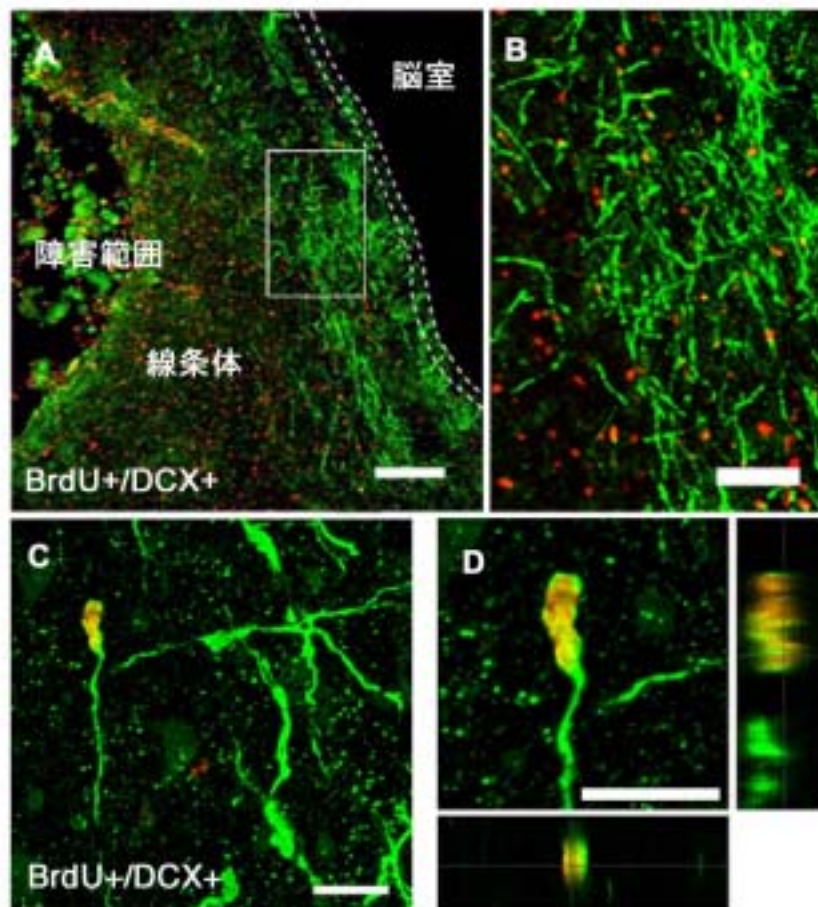


図18 線条体に見られたDCX+の未熟なニューロンの集団

(A) SVZから線条体へ移動するDCX+細胞（緑）の集団。しかしSVZからの分布距離はせいぜい500 μ m程度しかなかった。(B) A中の囲んだ部分の拡大図。DCX+細胞の神経突起は様々な方向へ伸びているが、大部分は脳室壁と平行に伸ばしていた。(C) いくつかのDCX+細胞はBrdUと共染色していた。(D) CのBrdU+/DCX+細胞を3次元画像に再構成したもの。Scale bars = 200 μ m (A、B)、20 μ m (C、D)

考察

1. 成体サルにおけるニューロン新生

本研究ではカニクイザルとニホンザルの 2 種類のマカクザルを用いて実験を行い、成体の脳で新しく生まれている細胞の種類を同定するのに、3次元画像による詳細な解析方法を応用した。その結果、成体サルの大脳新皮質では多くの BrdU+細胞が観察されたが、それらが新たに生まれているニューロンであることを示す確固たる証拠は得られなかった。したがって健康な状態にあり性的に成熟した霊長類における大脳新皮質のニューロンの数というのは安定的であり、ニューロンの新生は起こらないという説を支持する結果となった(Kornack and Rakic, 2001a)。そして大脳新皮質におけるほぼ全ての BrdU+細胞はニューロンのマーカー・タンパク質を発現しておらず、いくつか (<2%) は S-100 β や Iba-1 などのグリアのマーカーで染色された。また約 35% の BrdU+細胞はニューロンに張り付いているサテライト・グリアであったが、これらは今回用いた何れのグリア・マーカー (GFAP、S-100 β 、O4、Iba-1) とを発現していなかった。このようなサテライトグリアは成体ラットの黒質 (脳の中でも中脳に分類される。) で報告がされているが(Lie et al., 2002)、この報告においてもこうしたサテライト・グリアの細胞種は決定できていない。また、残りの BrdU+細胞 (約 60%) の細胞種も同定することは出来なかった。

今回の研究で大脳新皮質においてごく少数であるが、BrdU と NeuN が共染色している細胞が観察された。それではこの BrdU+/NeuN+細胞はどのような細胞に当たるのであろうか？ いくつかの可能性が考えられるが、1つ目の可能性として、これらは死につつあるニューロンと考えられ、これまでにニューロンが紫外線などによってダメージを受けると DNA の合成を始めたり(Sanes and Okun, 1972; Klein et al., 2002)、二

ニューロンのプログラム細胞死の過程で DNA の複製が起こることが報告されている (Yang et al., 2001)。 また 2 つ目として BrdU⁺の血管由来の幹細胞とニューロンの細胞融合も挙げられる(Steindler and Pincus, 2002; Terada et al., 2002; Wurmser and Gage, 2002)。 3 つ目は内在性の増殖能を持った神経幹細胞であり NeuN などのニューロン・マーカータンパク質を発現するが通常の大脳新皮質の環境ではニューロンへの分化が抑制される状態にあることを示しているのかもしれない(Kukekov et al., 1999; Gage, 2000; Laywell et al., 2000)。 そして最後の可能性としては、これらはグリア系の幹細胞であり、癌化したグリア幹細胞が NeuN を発現しているのではないかと考えられる。(Wolf et al., 1997; Teo et al., 1999)。

健全な状態では大人の大脳新皮質ではニューロンが新たに生まれることはないが、最近行われたマウスを用いた実験では、ある特別な方法により大脳新皮質中の投射ニューロンのみに選択的に細胞死を起こすと、その後にこの大脳新皮質の部位にニューロン新生が誘導されることが報告された(Magavi et al., 2000)。 これは大脳新皮質にはニューロンに分化することの出来る神経幹細胞が内在的に存在しているが、通常の状態では大脳皮質内の抑制的な環境によってニューロンへの分化できないことを示していると考えられる(Kirschenbaum et al., 1994; Pincus et al., 1998; Gage, 2000; Laywell et al., 2000; Steindler and Pincus, 2002)。 したがって大脳新皮質でごく僅かに見つかった BrdU⁺/NeuN⁺細胞も前述した 4 つの可能性のうち 3 つ目の内在性の神経幹細胞である可能性も考えられる。 こうした細胞はニューロンへの分化を誘導するような環境であればニューロンへ分化させることは理論的には可能である(Leavitt et al., 1999; Laywell et al., 2000; Song et al., 2002)。 したがって将来的に適切にニューロン分化を誘導できるような技術や神経栄養因子の開発などが進展すれば、大脳新皮質でも人工的にニューロンの新生は可能になり、アルツハイマー病などに代表される神経変性症

などに対する脳の再生医療なども実現可能になるかもしれない。

また SVZ - 嗅球と海馬における新生ニューロンの定量的な解析を行った。サルでは海馬の新生ニューロンの数が嗅球よりも多いのに対して、ラットではその逆で嗅球の方が新生ニューロンの数は多く、その数を両種間で比較して見るとサルの嗅球では新生ニューロンの数はラットに比べて2オーダーも少なかった。嗅球の新生ニューロンは臭い情報の処理に関わっていることが分かっている(Gheusi et al., 2000)。またラットはサルに比べて視覚は発達しておらず、外の世界を認識するのに嗅覚情報の果たす役割は非常に大きい。したがってラットの嗅球の新生ニューロンが果たす役割も当然大きくなると考えられる。そして哺乳類の進化の過程で視覚の発達と嗅覚の退化に伴い、嗅球の新生ニューロンの数は少なくなったのだろう。

また海馬では嗅球程ではなかったが、サルの新生ニューロンの数はラットに比べると1オーダー少なかった。海馬の新生ニューロンが記憶の形成に関与しているらしいことを考えると(Shors et al., 2001)、サルの海馬新生ニューロンの数はラットよりも多くても良い筈である。この矛盾を説明するためには海馬の新生ニューロンが記憶形成のどの過程に関与しているのか更なる研究をしなければならないが、2つの新生ニューロンの種類の違いが関係しているのかもしれない。嗅球の新生ニューロンは抑制性の介在ニューロンであり嗅覚情報の伝達の調節を行っているのに対して、海馬の新生ニューロンは歯状回から CA3 に投射する興奮性のニューロンであり海馬の神経ネットワーク内の主要な情報伝達経路をなしている。したがってニューロンの新生数が多いと神経ネットワークが常に組み変わり逆に不安定になることから、海馬の新生ニューロンの数はそれ程多くなくても良いのかもしれない。

2. 脳虚血による成体サルのニューロン新生への影響

本研究では局所脳虚血によって成体サルの SVZ-嗅球と海馬のニューロン新生は増加されることが示された。嗅球と海馬の BrdU+新生細胞は脳虚血後に有意に増加した。それに対して、虚血半球側と反対側そしてコントロールの間で BrdU + 細胞のうちニューロンのマーカーと共染色していた細胞の割合に差は見られなかった。したがって、虚血による脳損傷によって引き起こされる成体サルの嗅球と海馬での新生ニューロンの絶対数の増加は、ニューロンの元になる細胞である神経幹細胞の分裂が増加したことによるものであって、神経幹細胞からニューロンへの分化が促進されたことによるものではない。つまり、神経幹細胞はニューロンだけではなくグリア細胞としての幹細胞の役割をもつが、脳虚血によってグリア細胞への分化が抑制されて、ニューロン分化の方向へ向かうなどの分化のバランスは変化していない。

これまでにラットやマウスの局所脳虚血モデルを用いて齧歯類での脳虚血とニューロン新生に関する研究は報告されており(Liu et al., 1998; Jin et al., 2001)、脳虚血によって損傷を受けた脳組織の再生を目指して精力的に研究がなされている。そこで本研究では、ヒトに系統的に近いサルの局所脳虚血モデルによって得られたデータとこれまでに報告されている齧歯類でのデータを比較することで、ラットなどを用いた脳虚血とニューロン新生の研究、更には脳の再生治療の研究が、ヒトに応用可能であるのか検討した。

サルの海馬では脳虚血後に虚血半球側の BrdU+新生細胞の数が脳虚血を施していないコントロールに比べると 4.6 倍に増えていた。同じ様な結果がラットでも報告されており(Jin et al., 2001; Yoshimura et al., 2001; Dempsey et al., 2003)、これまで報告されているデータを平均すると、ラットでは脳虚血後 1 週間辺りで神経幹細胞の分裂が 5 倍程度に増加し最大になり、増加傾向は 2 週間後まで続いている(図 19A)。そ

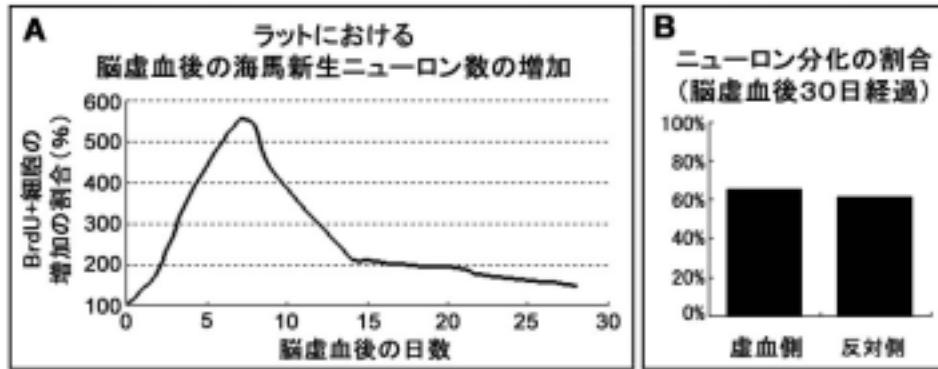


図 19 ラットにおける脳虚血後のニューロン新生

(A) ラットでも脳虚血後 2 週間に渡って BrdU+細胞の数は増加しており、1 週間後に最大になり 5 倍ほど増加する。(B) ニューロンへの分化は脳虚血によって影響は受けていない。

してラットでもニューロンへの分化の割合は脳虚血によって影響は受けていないと報告されている (図 19 B ; (Arvidsson et al., 2001; Yoshimura et al., 2001; Dempsey et al., 2003; Wada et al., 2003)。したがって、局所脳虚血によるニューロン新生への影響はサルでもラットでも同じであり、脳虚血によって新生ニューロン数が増加することが分かった。これは恐らくはラットの研究で得られた新生ニューロンに関するデータがヒトにも応用出来ることを示唆していると考えられる。また、SVZ に関してはラットでも局所脳虚血後にニューロン新生が増加することが報告されているが、その増加の割合は論文によってまちまちであった (Jin et al., 2001; Dempsey et al., 2003; Sun et al., 2003)。嗅球に限っては報告がなく、それぞれ比較検討は行えなかった。

健康な状態はニューロン新生が起こっていない線条体で、脳虚血後に SVZ から線条体に向かって移動する DCX+未熟ニューロンの集団が観察された。しかしこの移動距離は短く、せいぜい 500 μm であった。この 500 μm という距離は線条体に少し入った程度しかない。更に成熟したニューロンのマーカーである NeuN と BrdU で共染色している細胞は線条体で見つからなかった。したがって本来ならば嗅球へ向

かうはずの SVZ にある神経幹細胞からニューロンに分化しつつある細胞が脳虚血による損傷部位で発現する何かしらの誘引因子によって、線条体の方向に移動するように誘導されるが、線条体自体はニューロン分化を抑制するような環境にあるので、最終的に成熟したニューロンになる前に細胞死を起こし、無くなってしまふと考えられる。しかしこの様な未熟なニューロン集団の移動は脳の再生の可能性を示唆するものである。そして脳虚血によって損傷を受けた線条体の再生を考えた場合に、神経栄養因子の投与やその他の技術の開発により適切に成熟したニューロンへ分化誘導することが将来的に可能になれば、こうした未熟なニューロン集団というのは有用なソースになりうると考えられる。

今回のモデルでは中大脳動脈の血流を止めて脳虚血を施した。そして、海馬は中大脳動脈の血液供給支配領域ではないので、海馬ではニューロンの脱落などの損傷は全く見られなかった。それでは正常なはずの海馬でなぜニューロン新生が増加したのであろうか？ ラットの局所脳虚血を用いた研究で、脳虚血後に海馬歯状回で神経栄養因子である bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) タンパク質の発現量が上がっており (Lin et al., 1997)、更には NGF (Nerve Growth Factor) や BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) の mRNA 量の上昇が報告されている (Kokaia et al., 1995)。神経栄養因子は脳保護する因子としても報告されている (Koketsu et al., 1994; Tsukahara et al., 1994; Ren and Finklestein, 1997; Ay et al., 2001)。したがって脳虚血後の大脳新皮質での損傷を保護する目的でこれらの因子 (神経栄養因子の発現を促す因子も含めて) の発現が過剰に発現し、血液もしくは脳組織内の浸透により海馬まで運ばれ、海馬内でタンパク質の発現パターンが変化することで、ニューロン新生が促進されたと考えられる。更には、人為的に神経栄養因子の発現を操作することで脳虚血後のニューロン新生数の変化を調べた報告もなされている。脳室内に bFGF を投与した実験で

は虚血後のニューロン新生が更に増加し (Wada et al., 2003)、更には bFGF のノックアウトマウスの実験では脳虚血後のニューロン新生の増加が抑制されたことが報告されている (Yoshimura et al., 2001)。したがって脳虚血後のニューロン新生の増加メカニズムの1つとして、神経栄養因子の上昇が挙げられる。

更にもう1つの可能性として、神経幹細胞の過剰な興奮による分裂の促進が挙げられる。脳虚血によって大脳新皮質のニューロンは過剰に興奮すると、大脳新皮質と海馬はニューロン・ネットワークで繋がっているため、当然この興奮は海馬にまで伝達される。更に神経幹細胞を興奮状態におくと、その分裂が促進されることが報告されている (Deisseroth et al., 2004)。したがって、大脳新皮質のニューロンによって引き起こされた海馬内での興奮状態により神経幹細胞の分裂が促進し、結果としてニューロン新生が増加することが考えられる。

脳虚血後に損傷の起こっていない海馬でニューロン新生の数が増加するが、このニューロンの増加自体には何か生物学的な意味があるのだろうか？ その可能性について考察する。今回の研究では、脳虚血後のニューロン新生に加えて、神経症状のテストを行っており、脳虚血による脳機能の障害とその後の機能の回復をモニターしている。そして運動機能や筋骨格の協応性そして感覚系の脳機能は脳虚血後28日経過しても回復が見られないのに対して、意識障害は虚血後2週間経過した辺りから顕著に回復傾向を示し、28日後には完全に回復しているサルも見られた。ここで仮に意識というものと定義すると、外界からの情報を受け入れ(ステップ1)、この情報を脳内で処理し(ステップ2)、そして処理した結果を外界に表出する(ステップ3)という3つのステップによって意識活動がなされると考えることが出来る。そして意識障害とはこの認知機能と表出機能が低下した状態である。また海馬は記憶の形成に関与している領域としてよく知られているが(Eichenbaum, 2000)、更に脳の最も高

次な機能であるワーキング・メモリーにも関与していることも報告されている (Friedman and Goldman-Rakic, 1988; Wall and Messier, 2001)。記憶もワーキングメモリーも意識の3ステップのうち2つ目の情報の処理に相当する機能である。したがって、脳虚血後に海馬でニューロン新生を増加することで海馬の機能を強化し、脳虚血によって損傷を受けた大脳新皮質の失われた機能を補完しているのかもしれない。またヒトのアルツハイマー病患者の海馬でもニューロンの新生が増加しているという報告もある (Jin et al., 2004)。

それでは嗅球の場合はどうであろうか、嗅球は前述したように嗅覚は外界の情報を認知する上で非常に重要な情報である。したがってラットにとって嗅球でニューロン新生が増えることは、脳虚血によって低下した脳機能を回復するためにはそれなりに意味があるのであろう。

こうした結果は、脳が自分自身で修復するような機能を本来もっていることを示唆しているのかもしれない。今後の更なる研究によって脳機能の回復とニューロン新生の関係が明らかになれば、脳虚血や神経変性症に対する治療に大きな寄与を果たすであろう。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切かつ適切な、また情熱を持って御指導して頂きました東京大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻細胞応答化学分野の久恒辰博助教授に心から深く感謝いたします。

サルに関する深遠な知識に基づいて様々な御指導、御助言をして頂きました京都大学霊長類研究所の三上 章允教授に深く感謝いたします。

また、実験上の様々な御指導、御助言をして頂きました藤沢薬品工業株式会社の松岡 信也様、古市 泰久様、前田 雅志様にも深く感謝いたします。

本研究において、助言と実験に関して協力をして頂いた、当研究室の福田 諭くん
に心から「ありがとう。」という言葉を送ります。そして研究全般について有益な
助言、協力を頂いた、いつも明るく楽しい当研究室のメンバーに心より感謝いたしま
す。

最後に、これまでの長い学生生活を経済的に援助して頂き、心身共に支え、誰よりも深い愛情を持って支えてくれた家族に心から感謝の意を捧げます。

2005年1月

瀬瀬 大輔

参考文献

1. Altman, J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137, 433-457.
2. Altman, J., and Das, G.D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335.
3. Altman, J., and Das, G.D. 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 126, 337-389.
4. Arvidsson, A., Kokaia, Z., and Lindvall, O. 2001. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci* 14, 10-18.
5. Ay, I., Sugimori, H., and Finklestein, S.P. 2001. Intravenous basic fibroblast growth factor (bFGF) decreases DNA fragmentation and prevents downregulation of Bcl-2 expression in the ischemic brain following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 87, 71-80.
6. Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackman, J., and LoTurco, J.J. 2003. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 23, 10411-10418.
7. Cameron, H.A., and McKay, R.D. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of

- new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435, 406-417.
8. Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., and Gould, E. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337-344.
 9. Craig, C.G., Tropepe, V., Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Weiss, S., and van der Kooy, D. 1996. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16, 2649-2658.
 10. Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T.D., and Malenka, R.C. 2004. Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42, 535-552.
 11. Dempsey, R.J., Sailor, K.A., Bowen, K.K., Tureyen, K., and Vemuganti, R. 2003. Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF. *J Neurochem* 87, 586-597.
 12. Eichenbaum, H. 2000. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci* 1, 41-50.
 13. Friedman, H.R., and Goldman-Rakic, P.S. 1988. Activation of the hippocampus and dentate gyrus by working-memory: a 2-deoxyglucose study of behaving rhesus monkeys. *J Neurosci* 8, 4693-4706.
 14. Gage, F.H. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.
 15. Gheusi, G., Cremer, H., McLean, H., Chazal, G., Vincent, J.D., and Lledo, P.M. 2000. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1823-1828.
 16. Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., and Shors, T.J. 1999a. Learning

- enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2, 260-265.
17. Gould, E., Reeves, A.J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C.G., and Fuchs, E. 1999b. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5263-5267.
 18. Gould, E., Reeves, A.J., Graziano, M.S., and Gross, C.G. 1999c. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286, 548-552.
 19. Jin, K., Minami, M., Lan, J.Q., Mao, X.O., Batteur, S., Simon, R.P., and Greenberg, D.A. 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4710-4715.
 20. Jin, K., Peel, A.L., Mao, X.O., Xie, L., Cottrell, B.A., Henshall, D.C., and Greenberg, D.A. 2004. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 343-347.
 21. Kaplan, M.S., and Bell, D.H. 1984. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 4, 1429-1441.
 22. Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.
 23. Kirschenbaum, B., Nedergaard, M., Preuss, A., Barami, K., Fraser, R.A., and Goldman, S.A. 1994. In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cereb Cortex* 4, 576-589.
 24. Klein, J.A., Longo-Guess, C.M., Rossmann, M.P., Seburn, K.L., Hurd, R.E., Frankel, W.N., Bronson, R.T., and Ackerman, S.L. 2002. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367-374.
 25. Kokaia, Z., Zhao, Q., Kokaia, M., Elmer, E., Metsis, M., Smith, M.L., Siesjo, B.K.,

- and Lindvall, O. 1995. Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp Neurol* 136, 73-88.
26. Koketsu, N., Berlove, D.J., Moskowitz, M.A., Kowall, N.W., Caday, C.G., and Finklestein, S.P. 1994. Pretreatment with intraventricular basic fibroblast growth factor decreases infarct size following focal cerebral ischemia in rats. *Ann Neurol* 35, 451-457.
 27. Kornack, D.R., and Rakic, P. 1999. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5768-5773.
 28. Kornack, D.R., and Rakic, P. 2001a. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 294, 2127-2130.
 29. Kornack, D.R., and Rakic, P. 2001b. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4752-4757.
 30. Kuhn, H.G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L.J., and Gage, F.H. 1997. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17, 5820-5829.
 31. Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L.B., O'Brien, T.F., Kusakabe, M., and Steindler, D.A. 1999. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 156, 333-344.
 32. Laywell, E.D., Rakic, P., Kukekov, V.G., Holland, E.C., and Steindler, D.A. 2000. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13883-13888.

33. Leavitt, B.R., Hearn-Grant, C.S., and Macklis, J.D. 1999. Mature astrocytes transform into transitional radial glia within adult mouse neocortex that supports directed migration of transplanted immature neurons. *Exp Neurol* 157, 43-57.
34. Lie, D.C., Dzieczapolski, G., Willhoite, A.R., Kaspar, B.K., Shults, C.W., and Gage, F.H. 2002. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22, 6639-6649.
35. Lin, T.N., Te, J., Lee, M., Sun, G.Y., and Hsu, C.Y. 1997. Induction of basic fibroblast growth factor (bFGF) expression following focal cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 49, 255-265.
36. Liu, J., Solway, K., Messing, R.O., and Sharp, F.R. 1998. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18, 7768-7778.
37. Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2074-2077.
38. Magavi, S.S., Leavitt, B.R., and Macklis, J.D. 2000. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405, 951-955.
39. Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H., Sloviter, R.S., and Lowenstein, D.H. 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17, 3727-3738.
40. Pincus, D.W., Goodman, R.R., Fraser, R.A., Nedergaard, M., and Goldman, S.A. 1998. Neural stem and progenitor cells: a strategy for gene therapy and brain repair. *Neurosurgery* 42, 858-867; discussion 867-858.

41. Ren, J.M., and Finklestein, S.P. 1997. Time window of infarct reduction by intravenous basic fibroblast growth factor in focal cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 327, 11-16.
42. Sanes, J.R., and Okun, L.M. 1972. Induction of DNA synthesis in cultured neurons by ultraviolet light or methyl methane sulfonate. *J Cell Biol* 53, 587-590.
43. Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., and Gould, E. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372-376.
44. Song, H., Stevens, C.F., and Gage, F.H. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44.
45. Stanfield, B.B., and Trice, J.E. 1988. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res* 72, 399-406.
46. Steindler, D.A., and Pincus, D.W. 2002. Stem cells and neurogenesis in the adult human brain. *Lancet* 359, 1047-1054.
47. Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X.O., Logvinova, A., and Greenberg, D.A. 2003. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 111, 1843-1851.
48. Tanapat, P., Hastings, N.B., Reeves, A.J., and Gould, E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19, 5792-5801.
49. Teo, J.G., Gultekin, S.H., Bilsky, M., Gutin, P., and Rosenblum, M.K. 1999. A distinctive glioneuronal tumor of the adult cerebrum with neuropil- like (including "rosetted") islands: report of 4 cases. *Am J Surg Pathol* 23, 502-510.

50. Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., and Scott, E.W. 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545.
51. Tsukahara, T., Yonekawa, Y., Tanaka, K., Ohara, O., Wantanabe, S., Kimura, T., Nishijima, T., and Taniguchi, T. 1994. The role of brain-derived neurotrophic factor in transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurosurgery* 34, 323-331; discussion 331.
52. van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F.H. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2, 266-270.
53. van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., and Gage, F.H. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
54. Wada, K., Sugimori, H., Bhide, P.G., Moskowitz, M.A., and Finklestein, S.P. 2003. Effect of basic fibroblast growth factor treatment on brain progenitor cells after permanent focal ischemia in rats. *Stroke* 34, 2722-2728.
55. Wall, P.M., and Messier, C. 2001. The hippocampal formation--orbitomedial prefrontal cortex circuit in the attentional control of active memory. *Behav Brain Res* 127, 99-117.
56. Winner, B., Cooper-Kuhn, C.M., Aigner, R., Winkler, J., and Kuhn, H.G. 2002. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16, 1681-1689.
57. Wolf, H.K., Buslei, R., Blumcke, I., Wiestler, O.D., and Pietsch, T. 1997. Neural antigens in oligodendrogliomas and dysembryoplastic neuroepithelial tumors. *Acta*

- Neuropathol (Berl) 94, 436-443.
58. Wurmser, A.E., and Gage, F.H. 2002. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature* 416, 485-487.
 59. Yang, Y., Geldmacher, D.S., and Herrup, K. 2001. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21, 2661-2668.
 60. Yoshimura, S., Takagi, Y., Harada, J., Teramoto, T., Thomas, S.S., Waeber, C., Bakowska, J.C., Breakefield, X.O., and Moskowitz, M.A. 2001. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5874-5879.