

## 第 1 章

興奮性 GABA 入力成体海馬神経系前駆細胞のニューロン分化を促進する

## 序論

これまで神経回路形成が完了した成体脳内においては、ニューロンは新生しないと長らく考えられてきた。しかし、我々ヒトを含む哺乳類において、記憶に関わる海馬ではどんなに歳をとっても新しくニューロンが生まれていることが明らかとなった (Altman et al., 1965; Seki and Arai, 1991; 1993; Cameron et al., 1993; Eriksson et al., 1998; Kornack and Rakic, 1999; Palmer et al., 2000)。海馬新生ニューロンは既存のニューロンと同様に神経入力を受け、活動電位も発生させることから、機能的に神経回路に組み込まれていることが示されている (van Praag et al., 2002)。また興味深いことに、新生ニューロンは古くからあるニューロンに比べ、外界からの神経刺激に対して高い反応性を示すことや、記憶形成の素過程と考えられている LTP (long-term potentiation: 長期増強) が長時間に渡り持続することから、非常に可塑性に富んだ細胞である (Schmidt-Hieber et al., 2004)。この新生ニューロンのもつ高い可塑性が海馬神経回路に可塑性をもたらしているのではないかと、また、新生ニューロンそのものが新しい記憶の形成に直接関わっているのではないかとということが示唆されてきた (Shors et al., 2001; Feng et al., 2001; Drapeau et al., 2003)。そのため成体の脳において、いかに新生ニューロンの数を増やし、海馬の機能を高めることができるかについて、これまで精力的に研究がなされてきた。また、効率良く海馬の新生ニューロンの数を増やすことで、老化に伴う記憶機能の低下を克服できるのではないかと期待の下、どのような条件がニューロンの新生を亢進させられるかという研究が盛んに行われてきた。そうした中で、学習行動、癲癇状態、および神経伝達物質の投与等により、海馬神経回路の活動が高まることで新生ニューロンの数が増加することが示唆されてきた (Cameron et al., 1995; Bengzon et al., 1997; Parent et al., 1997; Malberg et al., 2000; Blumcke et al., 2001; Nacher et al., 2001; Shors et al., 2001; Drapeau et al., 2003)。このことは、海馬神経回路の活動が、直接的ある

いは間接的に成体海馬神経系前駆細胞に働きかけることにより、ニューロンの新生を促すことが考えられた。しかしこれまで、新生ニューロンの数を増やす諸条件に関しては多くの研究がなされてきたが、成体海馬神経系前駆細胞が周囲の神経回路網とどのような相互関係を構築しているのか、つまり神経系前駆細胞への具体的な入力に関する知見が得られていなかった。そのため、新生ニューロンが生まれる過程に海馬神経回路の活動がどう関わっているかが全く不明であった。また、なぜ学習行動により、新生ニューロンが増えるのかといったことも全く不明であった。そこで神経回路の活動に依存したニューロンの新生メカニズムを解明するには、成体海馬神経系前駆細胞が神経回路からいかなる神経入力を受け取り、またその入力が神経系前駆細胞のニューロン分化を促すかを解析することが重要であると考えた。

それでは、成体海馬において、新生ニューロンはどのような細胞からどういった過程を経て生み出されているのであろうか？これまでに、分裂細胞を調べるために核酸アナログであるブロモデオキシウリジン (BrdU) やレトロウイルスを用いた研究が展開されてきた。その結果、グリア細胞様の性質を持つタイプ 1 細胞 (神経幹細胞) からニューロンとしての性質を一部獲得したタイプ 2 細胞 (ニューロン前駆細胞) が分化し、この細胞より新生ニューロンが生み出されていることがわかってきた (Seri et al., 2001; 2004; Fukuda et al., 2003; Kronenberg et al., 2003; Steiner et al., 2004) (図 8)。このタイプ 1 細胞およびタイプ 2 細胞が、成体海馬における神経系前駆細胞であると広く認識されている。(当研究室の井出により、確かにネスチン陽性細胞から新たなニューロンが生み出されていることが確認されている (井出修士論文)。) タイプ 1 細胞の特徴としては、近年神経幹細胞として認知された胎生期の放射状グリア細胞 (ラジアルグリア細胞) (Noctor et al., 2001; Miyata et al., 2001) と形態、膜電流特性、および発現マーカーが非常に類似しており、成体海馬における神経幹細胞と考えられている。一方タイプ 2 細胞の特性は、非常に高い膜抵抗値およびニ

ニューロン様の膜興奮性を示すと共に、盛んに分裂を繰り返す前駆細胞である。この性質は、胎生期の放射状グリア細胞から生み出されたニューロン前駆細胞 (Noctor et al., 2004) と非常に類似したものである。成体海馬歯状回における主な分裂細胞は、この2種類の前駆細胞であり、神経回路網からの神経伝達物質を介した神経刺激がこれらの前駆細胞に働きかけることで、ニューロンの新生が促されていると考えた。

神経伝達物質によるニューロン新生の制御という考え方は、胎生期脳内におけるニューロン分化制御システムに関する知見に基づいたものである。成熟した神経回路網において、神経伝達物質はその名の通り、情報を通信するためのメッセンジャーとして機能しているが、胎生期の回路形成においては、GABA やグルタミン酸といった神経伝達物質が、神経系前駆細胞の増殖やニューロン分化を促進している (LoTurco et al., 1995; Antonopoulos et al., 1997; Hayder et al., 2000; Nguyen et al., 2003)。興味深いことは、通常成熟したニューロンにおいて GABA は抑制性の神経伝達物質として作用しているが、胎生期の神経系前駆細胞においては、GABA が興奮性に作用している。これは、ニューロンの成熟に伴う細胞内 $[Cl^-]$ の変化によるもので、神経系前駆細胞では細胞内 $[Cl^-]$ が高い状態に保たれているため、GABA が興奮性に作用する (Owens and Kriegstein, 2002; Ben-Ari, 2002)。胎生期脳内における神経系前駆細胞には、GABA やグルタミン酸が興奮性に作用することで、前駆細胞の細胞分裂を停止させ、ニューロンへの分化を促している (LoTurco et al., 1995)。また、成体海馬神経系前駆細胞の培養系における解析結果から、神経系前駆細胞の電気的な興奮が新生ニューロンを生み出すシグナルとして働いているとの報告もある (Deisseroth et al., 2004)。これらの知見から、成体海馬においても神経回路の活動に応じて放出される GABA やグルタミン酸が神経系前駆細胞に興奮性に作用することで、ニューロン分化を促しているのではないかと考えられた。

神経系前駆細胞の電気的な興奮がニューロン分化にどれほど重要なことなのか。膜

の脱分極は引き続き電位依存性カルシウムチャンネルを開口させ、細胞内へのカルシウム流入を誘起する (LoTurco et al., 1995; Deisseroth et al., 2004)。興味深いことに、このカルシウムの流入が引き金となり、神経系前駆細胞においてニューロン分化を促す転写因子 (NeuroD) の発現を誘導する (Deisseroth et al., 2004)。NeuroD は海馬歯状回の発生過程においても顆粒細胞の分化に必要な不可欠な転写因子であり、NeuroD 欠損動物では正常な海馬歯状回が形成されない (Miyata et al., 1999; Schwab et al., 2000)。また成体海馬においても新生未成熟ニューロンへの初期分化に関わっていることが示唆されている (Seki, 2002a; 2002b)。これらのことから、成体海馬歯状回の神経系前駆細胞において、NeuroD は前駆細胞からニューロンへの分化を強力に誘導する重要な転写因子であることが考えられる。

海馬神経回路網の組織および回路構造を考えた場合、嗅内皮質からのグルタミン酸作動性の貫通繊維 (メインインプット) が歯状回へ投射しており、分子層において顆粒細胞や GABA 作動性ニューロンとシナプスを形成している。2 種類の神経系前駆細胞 (タイプ 1 及びタイプ 2 細胞) は顆粒細胞下帯に局在する。タイプ 1 細胞は分子層側に放射状突起を伸ばしており、一方タイプ 2 細胞は突起を伸ばしていない。歯状回には、顆粒細胞層とハイラス部の境界付近において GABA 作動性ニューロンが存在し、顆粒細胞下帯に広く投射している (Freund and Buzsaki, 1996; Mott et al., 1997)。これらのことは、成体海馬前駆細胞に対し、神経回路網からの GABA 性およびグルタミン酸性の投射があり得ることを強く示唆するものである。

本研究では、成体海馬において神経回路の活動がニューロンの新生過程にどのように関わっているかを明らかにするものである。海馬神経ネットワークにおけるニューロン新生過程を解析するため、主に電気生理学的な研究手法を用いて解析を行った。その結果、成体海馬における神経系前駆細胞 (タイプ 2 細胞) は周囲の神経回路からの GABA 入力を受け取っていることが明らかとなった。この GABA 入力は神経系前

駆細胞に興奮性に作用することで、ニューロン分化を誘導する NeuroD の発現量を増加させ、ニューロン分化を誘導することがわかった。神経系前駆細胞への興奮性 GABA 入力、ニューロン分化を促す非常に重要なシグナルとして働いていることが結論付けられた。これらの結果から、海馬神経回路の活動に依存したニューロン新生メカニズムの一端が解明されたと考えられる。

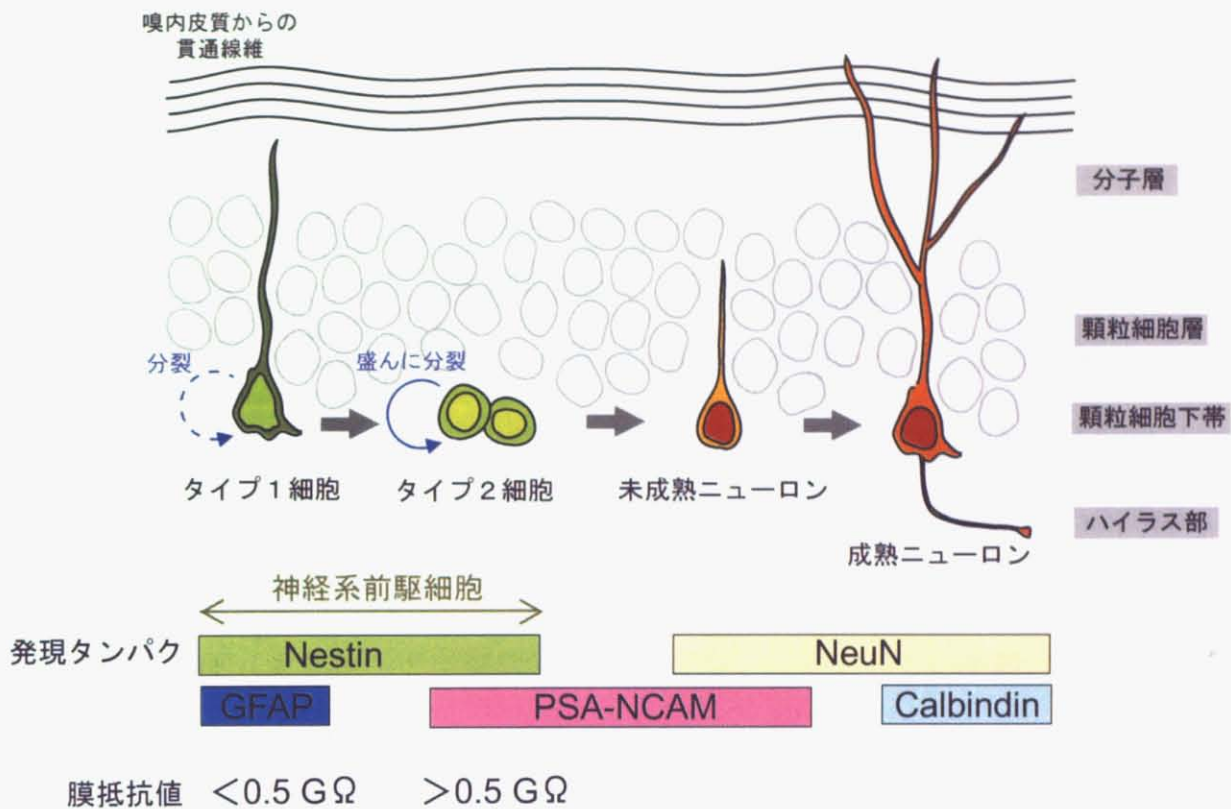


図8: 成体海馬におけるニューロン新生過程と各細胞の主な発現マーカー。

神経幹細胞としての性質を強く保有するラジアルグリア様のタイプ1細胞から、ニューロンとしての性質を一部獲得し盛んに分裂を繰り返すタイプ2細胞が発生する。この細胞から、分裂能を持たない未成熟ニューロンへと分化し、やがて成熟したニューロンへと成長する。タイプ1細胞はnestin+/GFAP+、タイプ2細胞はnestin+/PSA-NCAM+、未成熟新生ニューロンはNeuN+/PSA-NCAM+、成熟新生ニューロンはNeuN+/calbindin+。タイプ1細胞から成熟したニューロンへの分化は、約1ヶ月かかると見積もられている。NestinP-GFPマウスでは、このタイプ1細胞およびタイプ2細胞がGFP蛍光によって可視可される。タイプ1細胞とタイプ2細胞は膜抵抗値が大きく異なり、タイプ1細胞は $0.5 \text{ G}\Omega$ 以下で、タイプ2細胞は $0.5 \text{ G}\Omega$ 以上である(Fukuda et al., 2003)。

## 実験方法

### 1. 動物

東京大学大学院医学系研究科細胞分子生理学教室の山口正洋博士より樹立、供与された nestin<sup>P</sup>-GFP マウス (Yamaguchi et al., 2000) を三協ラボサービス株式会社より購入した ICR 系統マウスと掛け合わせ、さらに GFP 遺伝子がホモを作成し、継代を行った。このトランスジェニックマウスでは、GFP 遺伝子がネスチン遺伝子の第 2 イントロン部位に組み込まれており、ネスチンのプロモーター活性のある神経系前駆細胞が GFP を発現するようになっている (図 2)。本研究における全ての実験系において、成体と見なせる生後 6 週齢以上の個体を使用した。飼育では、滅菌脱イオン水と固形飼料 MF (オリエンタル酵母社) を与えた。以下すべての実験は、東京大学新領域創成科学研究科動物実験ガイドラインに準じて行った。

### 2. 電気生理学実験

#### 2-1 急性脳スライスの作成

6 週齢以上の成体 nestin<sup>P</sup>-GFP マウス (雌雄両方) をジエチルエーテルで十分に麻酔し、断頭後すみやかに脳を取り出した。取り出した脳は、氷冷した低カルシウム高マグネシウム ACSF (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 mM L-ascorbic acid, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 12.5 mM D-glucose (95% O<sub>2</sub>・5% CO<sub>2</sub> バブリング)) 内で整形した。整形後の脳は、接着剤で台に取り付け、氷冷した低カルシウム高マグネシウム ACSF 内でビブラトーム (DTK-1000; 堂阪イーエム社) で、厚さ 400 μm のコロナル切片 (冠状切片) を作成した (図 9A)。切片は線中線で二等分し、これを急性脳スライスとした。

脳スライスは、スタンダード ACSF (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3



mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 mM L-ascorbic acid, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 12.5 mM D-glucose (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> バブリング)) 内で、37°Cで 30 分インキュベートし、その後実験に用いるまで室温で静置した。本研究では、実験中は全て室温で行った。

## 2-2 GFP 陽性細胞の同定

パッチクランプ法による海馬歯状回のネスチン陽性神経系前駆細胞の同定および電流記録に関しては、当研究室の福田により確立された GFP-guided targeted recording 法 (Fukuda et al., 2003) を適応した。スライスは記録チャンバー (RC26-GLP; WPI 社) に U 字型の白金にナイロン線を渡したウェイトで固定し、スタンダード ACSF を灌流した。正立微分干渉顕微鏡 (BX50WI; OLYMPUS 社)、chilled CCD ビデオカメラ (c5985; 浜松ホトニクス社)、画像処理システム (Argus20; 浜松ホトニクス社) を用いて観察した。40 倍対物レンズを用いて海馬歯状回を観察し、最初に GFP 蛍光を確認した。次に同じ部位を赤外線微分干渉 (infrared DIC) で観察した。蛍光像も赤外線微分干渉像も共にビデオモニターで確認した。細胞記録時には、各種パッチ内液中に Alexa Fluor 568 hydrazide sodium salt (Molecular Probes 社) を 0.5% で溶解し、記録後、蛍光色素が注入された細胞の形態が元の GFP 陽性細胞と同じであることを確認した (図 9B-F)。

## 2-3 パッチクランプ法による細胞記録

パッチ電極はボロシリケート管 (1B120F-4; WPI 社) を用い、プラー (P87; Shutter 社) で電極抵抗が 5-10 MΩ になるように電極を作成した。

ホールセルパッチクランプ法でのパッチ内液は、K-gluconate 内液 (120 mM K-gluconate, 6 mM NaCl, 6 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MgATP, 0.3 mM

NaGTP, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES; pH7.2に KOH で調整)、もしくは CsCl 内液 (140 mM CsCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgATP, 0.3 mM NaGTP, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES; pH7.2に CsOH で調整) を用いた。ホールセルクランプになった状態で膜抵抗値および膜電位を測定し、電流記録を行った。

グラミシジン穿孔パッチ法でのパッチ内液は、KCl 内液 (130 mM KCl, 5 mM NaCl, 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.1 mM EGTA, 10 mM HEPES; pH7.2に KOH で調整) を用いた。グラミシジンは、まず 2 mg/ml で DMSO (dimethylsulfoxide) に溶かしたものをストックしておき、5 μg/ml になるよう KCl 内液に溶かした。グラミシジンを含む内液は 1 時間ごとに新しいものを調製した。パッチ電極を細胞に押し当て、細胞膜と電極先端との間に緊密なシールを形成させた状態を維持し、細胞膜上にグラミシジンの小孔が形成されるまで、10-15 分静置した。グラミシジン穿孔パッチが成功したかどうかは、Cl<sup>-</sup>の反転電位で評価した (Yoshida et al., 2004)。

電気刺激には、単極性刺激電極 (ユニークメディカル社)、電気刺激装置 (SEN-3301; 日本光電社)、アイソレーター (SS-402J; 日本光電社) を用いて、スライスの電気刺激を行った。パッチ内液は、CsCl 内液を用いた。刺激電極は、貫通繊維あるいはハイラス部に置いた。貫通繊維のシート波刺激では、100 msec の間に 100 Hz で 10 回の刺激をシート波リズム (5 Hz) で 10 回 (計 2000 msec 間刺激) を行った。このシート波プロトコルは、Schmidt-Hieber らによって考案されたもの (Schmidt-Hieber et al., 2004) を本研究において適応した。

単一細胞カルシウムイメージングでのパッチ内液は、Ca<sup>2+</sup>フリー内液 (120 mM K-gluconate, 19 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES; pH7.2に KOH で調製) を用い、カルシウム蛍光指示薬として 50 μM Fluo-4 を内液に溶解して用いた。GFP 陽性細胞に対してホールセルパッチを行い、電流記録と並行して細胞内カルシウム濃度変化を AQUACOSMOS system (浜松ホトニクス

社) (Okada et al., 2003; Imura et al., 2005) を用いて蛍光強度の測定を行った。

記録電流は、パッチクランプ用増幅器 (CEZ-2400; 日本光電社) または AxoClamp200b (Axon Instrument 社) を 2 kHz のフィルターをかけた状態で計測した。計測結果は Power Lab/400 (AD Instrument 社) によって 4 kHz のサンプリングレートでパソコン内に記録 (Char Ver4.0; AD Instrument 社) した。ホールセルクランプしている細胞への瞬間的なボルテージクランプには、pClamp6 (Axon Instrument 社) を使用した。

## 2-4 薬物投与方法

各種受容体に対するアゴニストは、記録する細胞の近傍にマイクロプレッシャー (PV820; WPI 社) を用いて局所投与を行った。GABA の濃度依存性応答に関する実験では、薬剤を Y-tube system (Yoshida et al., 2004) により、同一の細胞に対して異なる濃度の GABA を投与し、その反応を調べた。

各種阻害剤は、灌流させているスタンダード ACSF を、阻害剤を溶かした ACSF に切り替えること (bath-application) で行った。使用した各種受容体アゴニストおよび阻害剤を以下に示した。

GABA (GABA 受容体アゴニスト; Sigma)

NMDA (NMDA 型グルタミン酸受容体アゴニスト; Sigma)

AMPA (AMPA 型グルタミン酸受容体アゴニスト; Sigma)

glycine (グリシン受容体アゴニスト; Sigma)

carbachol (ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニスト; Wako)

bicuculline (GABA<sub>A</sub> 受容体阻害剤; Sigma)

4-AP (カリウムチャンネル阻害剤。神経伝達物質の放出を高める。; Sigma)

TTX (電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤; Wako)

### 3. 免疫染色法

#### 3-1 灌流固定

マウスをジエチルエーテルで十分に麻酔し、開腹後、心臓を露出させた。翼状針を左心室に刺し、約 20 ml の PBS を灌流した。右心耳より流れ出る灌流液が透明になったのを確認してから、固定液（4%パラホルムアルデヒド/PBS（137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>））に切り替え、約 30 ml 灌流した。その後、脳を取り出し、同組成の固定液に入れて、4°Cで一晩後固定を行った。

#### 3-2 凍結切片の作成

固定した脳を、15%次いで 30%スクロース/PBS に、それぞれ 4°Cで一晩ずつ浸漬させた。その後、脳をコンパウンド（Tissue Tek O.C.T. Compound; SAKURA 社）に入れて包埋し、-80°Cで凍結保存した。凍結した脳は、クライオスタット（Carl Zeiss 社）で厚さ 40 μm のコロナル切片にした。スライスされた切片は PBS 内にて解凍させ、以下に示した免疫組織化学染色を行った。また脳切片は、クライオプロテクタント溶液（0.02 M リン酸緩衝液、30%エチレングリコール、30%グリセロール）に入れ、-30°Cで長期保存を行った。これらの切片は再び使用する直前に、PBS で洗浄し染色に用いた。

#### 3-3 免疫組織化学染色

以下に記載する染色は全て浮遊法で行った。切片を TBS（137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 25 mM Tris）で 10 分×2 回洗浄した後、ブロッキングバッファー（1% NGS/0.1% Triton/TBS）で 60~90 分間室温にてブロッキングを行った。その後、一次抗体をブロッキングバッファーで希釈し、4°Cで 1~3 日間反応させた。切片を 0.1% Triton/TBS で 10 分×3 回洗浄した後、二次抗体をブロッキングバッファーで希釈し、2 時間室温

にて反応を行った。切片を 0.1% Triton/TBS で 10 分×3 回洗浄した。そして切片をスライドガラスに乗せ、封入剤 (Immunomount; Shandon 社) で封入した。

一次抗体に抗 PSA-NCAM 抗体を用いる場合は、ブロッキングの前にプレトリートとして、100%メタノールに 30 分間浸漬させ、TBS で 10 分×2 回洗浄した。その後のブロッキング、一次抗体反応、二次抗体反応は上述したものと同様の方法で行った。一次抗体に抗 BrdU 抗体を用いる場合は、ブロッキングの前にプレトリートとして、塩酸賦活法を行った。まず、10 mM クエン酸緩衝液 (1.8 mM クエン酸、8.2 mM クエン酸ナトリウム) 中で 5 分間 90°C にて反応させ、その後 30 分間室温にて静置させた。TBS で 10 分間洗浄した後、抗 BrdU 抗体を DNA 鎖中の BrdU に結合させるため、1 M HCl で 30 分間 37°C にて反応させることで DNA を変性させた後、0.1 M ホウ酸緩衝液 (50 mM boric acid, 12.5 mM borax) で組織の pH を中性に戻し、再び TBS で 10 分間洗浄した。その後のブロッキング、一次抗体反応、二次抗体反応は上述したものと同様の方法で行った。一次抗体に抗 NeuroD 抗体を用いる場合は、二次抗体としてビオチン化抗 goat IgG 抗体を室温で 2 時間反応させた後、三次試薬として、Cy5-conjugated streptavidin を室温で 2 時間反応させた。

使用した一次抗体、二次抗体、および三次試薬の種類と希釈は表 1 に示した。

### 3-4 電気生理学実験後の組織化学染色

電気生理実験で用いた急性脳スライスを実験後に 4%パラホルムアルデヒド/PBS 固定液で一晩固定した。TBS で 10 分×2 回洗浄し、その後のブロッキング、一次抗体反応、二次抗体反応を行った。

### 3-5 観察および画像解析

免疫染色した切片は、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP2; Leica 社) 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 社) および Photoshop (Ver6.0; Adobe 社) で処理し、3次元画像に再構成した。

#### 4. 海馬組織培養

これまで成体脳の組織培養は不可能とされてきた。本研究では、胎生期脳の組織培養法 (Hayder et al., 2000; Weissmann et al., 2004; Kamada et al., 2004) を改良し、新たな成体脳の組織培養法を開発した。6~8 週齢の nestin<sup>P</sup>-GFP マウス個体から、2-1 で記載した方法で厚さ 400  $\mu\text{m}$  の急性脳スライスを作成した。このスライスを組織培養用メンブレン (Millicell-CM culture inserts; Millipore 社) に 2 枚ずつ乗せて、6 穴プラスチックシャーレ (Corning 社) に 1 ml の培地 (25% HBSS, 25% normal horse serum, 50% DMEM (1.32% glucose 含む)) を注いだものに浮かべた。これらを 20 時間 32°C にてインキュベートした。インキュベータ内は 95% CO<sub>2</sub> - 5% O<sub>2</sub> を充填させた。培地には、100  $\mu\text{M}$  GABA、あるいは 100  $\mu\text{M}$  GABA と 100  $\mu\text{M}$  Ni<sup>2+</sup> の両方を含む培地を使用した。培養後、4% パラホルムアルデヒド/PBS で一晩固定した。次に固定したスライスを 5% アガロースゲル内に包埋し、ビブラトームで厚さ 50  $\mu\text{m}$  のスライス切片を作成した。急性脳スライスの表面近くはスライス作成時における組織の損傷が大きいため、培養した脳組織のほぼ真ん中に相当する 3 枚の切片を用いて、免疫染色を行った。免疫染色は 3-3 で記載した方法と同じ方法で行った。

#### 5. 共焦点レーザー顕微鏡による NeuroD 発現強度の定量化

組織培養した GFP 陽性細胞における NeuroD 発現強度を測定するため、NeuroD に対する抗体を用いて免疫染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡下にて、海馬歯状回

に局在する任意の 150 個の GFP 陽性細胞を観察した。NeuroD の蛍光強度は、Durand らによって報告された以下の方法に準じて定量化を行った。顕微鏡のレーザーパワーとピンホールサイズを一定にした条件下で、細胞の輪郭を囲み、その中における NeuroD の平均蛍光強度を 256 階調で表示した (Durand et al., 1997)。

## 6. GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニスト/アンタゴニストのニューロン分化に及ぼす効果の評価

この実験系では、全て 8 週齢の nestin<sup>P</sup>-GFP マウスを使用した。(海馬のニューロン新生は加齢と共に減少するため、ここでは週齢を統一した。)

GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニスト/アンタゴニストの海馬神経系前駆細胞の増殖に対する効果を調べるために、マウス個体に 24 時間ごとに 3 日間 (計 3 回)、80 mg/kg phenobarbital (生理食塩水に溶解：4 個体に投与)、50 mg/kg pentobarbital (生理食塩水に溶解：4 個体に投与)、40 mg/kg pentylenetetrazole (生理食塩水に溶解：4 個体に投与)、5 mg/kg picrotoxin (生理食塩水に溶解：4 個体に投与)、あるいは生理食塩水のみ (4 個体に投与) を腹腔内に投与した。4 日目に、それぞれのマウス個体に 100 mg/kg BrdU (0.007 M NaOH/PBS に溶解) を腹腔内に投与し、その 24 時間後にマウスを灌流固定し、脳を免疫染色にまわした。

GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニスト/アンタゴニストの海馬神経系前駆細胞のニューロン分化に対する効果を調べるために、マウス個体に 100 mg/kg BrdU を腹腔内に投与し、前駆細胞をラベルした。その 24 時間後から、7 日間に渡り、24 時間ごとに 7 回、マウス個体に 80 mg/kg phenobarbital (4 個体に投与)、50 mg/kg pentobarbital (4 個体に投与)、40 mg/kg pentylenetetrazole (4 個体に投与)、5 mg/kg picrotoxin (4 個体に投与)、あるいは生理食塩水のみ (4 個体に投与) を腹腔内に投与した。BrdU を投与してから 4 週間後 (28 日後) にマウスを灌流固定し、脳を免疫染色にまわした。

海馬歯状回における BrdU でラベルされた細胞の個数は、West ら、および Malberg らによって確立された計測方法 (West et al., 1999; Malberg et al., 2000) を基に行った。前後軸に沿って全海馬領域を 40  $\mu\text{m}$  の連続切片を作成し、6 枚ごとに切片をサンプリングし、免疫染色を行った。歯状回顆粒細胞層 (granule cell layer) および顆粒細胞層下帯 (subgranular zone) に存在する全ての BrdU 陽性細胞を計測した。1 個体から 8 枚の切片を観察し、計測した細胞の総数を 6 倍することで、海馬全体における総 BrdU 陽性細胞数を見積もった。特に BrdU 陽性細胞がクラスターを形成している場合は、注意深くクラスター内の個数を計測した。尚、BrdU 陽性細胞数を計測するときは、どのマウスにどの薬剤を投与したかがわからないように、ブラインド条件下にて計測を行った。これは、投与した薬剤の効果に対する先入観を排除するためである。

## 7. 計数值データの検定

各実験において得られた数値データは、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。独立 2 群間における統計学的有意差は、二標本 t 検定を行い、有意水準が 0.05 未満 ( $P < 0.05$ ) のものを示した。

## 8. 免疫電顕

マウスを 0.1% グルタルアルデヒド/4% パラホルムアルデヒド/PBS で灌流固定した後、脳を取り出し、同様の固定液で一晩 4°C にて後固定を行った。脳組織を 5% アガロースゲルに包埋し、ビブラトームで厚さ 50  $\mu\text{m}$  のコロナル切片を作成した。

浮遊法 (3-3 に記載) にて、免疫染色を行った。一次抗体には anti-GFP rabbit IgG



抗体を、二次抗体反応には biotinylated goat anti-rabbit IgG をそれぞれ使用した。次に、ABC reagent (PK-4000; フナコシ社) で 1 時間室温にて反応させた。次に 0.02% DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (D-5905; Sigma 社) / 0.05 M Tris-HCl で 15 分間 4°Cにて反応させた後、0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で発色が見られるまで反応させた。各反応の間では、PBS で 10 分間×3 回の洗浄を行った。

1% OsO<sub>4</sub>/0.1 M PB で 60 分間 4°Cにて反応させた後、50%→70%→90%→95%→100%エタノールに順次変えて脱水を行った。次に 50%エタノール/50% QY-1→100% QY-1→50% QY-1/50% EPON 樹脂→100% EPON 樹脂に順次変えて樹脂による置換を行った。十分に樹脂置換を行った組織を、50°Cで 12 時間、次いで 60°Cで 72 時間恒温槽に入れて樹脂の重合を行った。

EPON 樹脂に包埋した切片は、ミクロトームで厚さ 80 nm の超薄切片を作成し、電子染色として 3%酢酸ウランで 2 時間、次いで鉛染色液 (1.33 g 硝酸鉛、1.76 g クエン酸ナトリウム、8 ml 1N 水酸化ナトリウムを混ぜて、milli Q 水で 50 ml に調製) で 5 分間染色を行った後、電子顕微鏡 (JEM-1230; JEOL 社、H7600; 日立社) にて観察を行った。

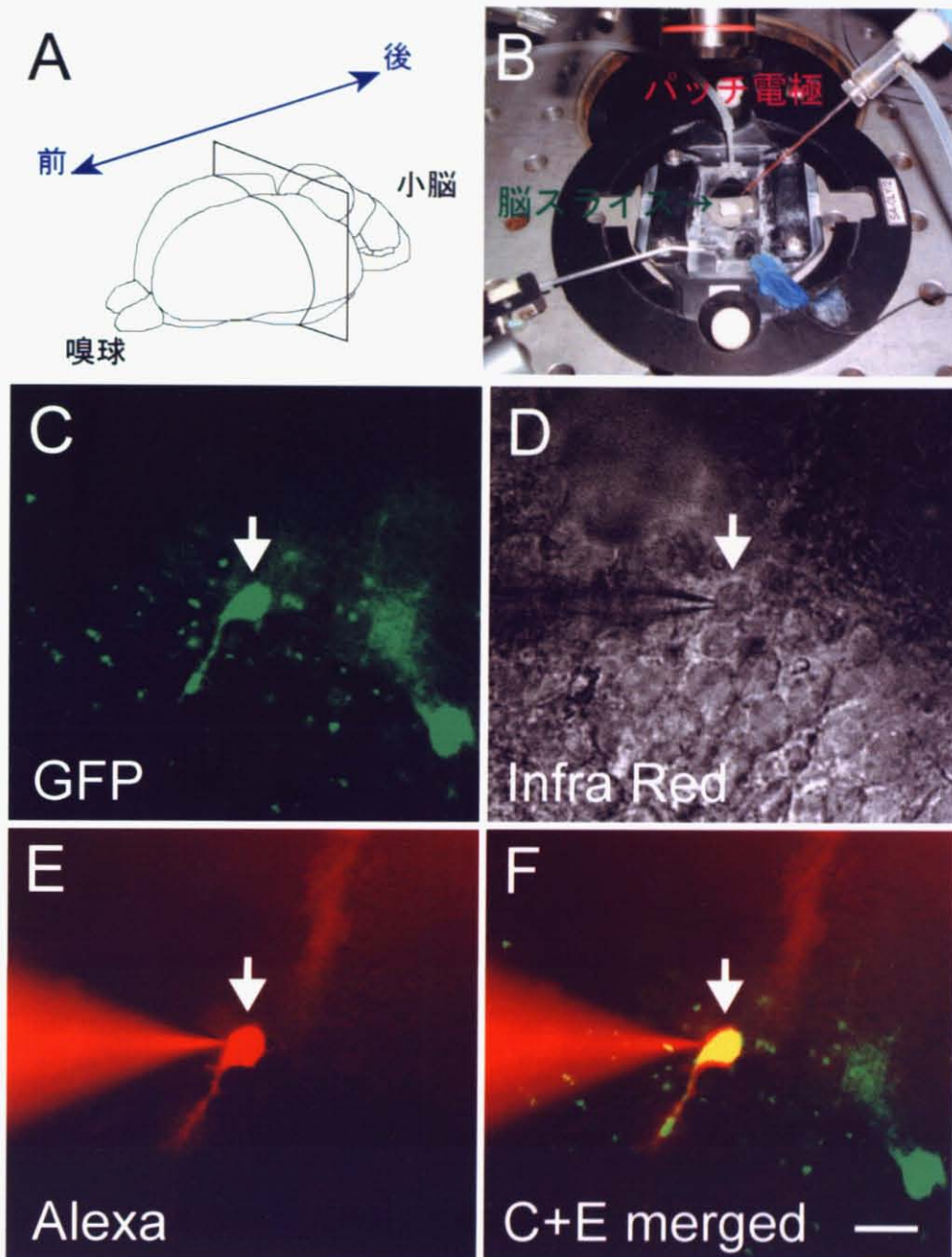


図9: NestinP-GFP蛍光を指標にした神経系前駆細胞からの電流応答記録。

(A) マウス脳を coronal 方向に 400  $\mu\text{m}$  の厚さに切る様子。

(B) 電気生理学実験用に組み立てられた装置に、急性脳スライスを置き、顕微鏡下にてガラス電極を近づける様子。マニピュレーターにガラス電極が装着されている。

(C-F) NestinP-GFP 蛍光を指標にした神経系前駆細胞からの電流応答記録。(C) GFP 蛍光により可視化されたネスチン陽性神経系前駆細胞の蛍光像。(D) 赤外微分干渉顕微鏡下で細胞にガラス電極を押し当てている様子。(E) パッチ内液には Alexa という蛍光指示薬が溶けており、パッチした際に細胞内に Alexa が充填され、細胞の形態が確認できる。(F) (C)+(E) の重ね合わせ像。GFP で光っている細胞から確かに電流記録を行ったことが確認できる。Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ 。図 C-F は Fukuda et al., 2003 の文献から改変。

表1. 免疫組織化学染色に用いた抗体

マーカー	アイソタイプ	標識	希釈倍率	入手元
一次抗体				
BrdU	rat IgG	-	1:200	Harlan
Calbindin	rabbit IgG	-	1:500	Chemicon
GFP	rat IgG	-	1:1000	Nakarai Tesque
GFP	rabbit IgG	-	1:1000	Molecular probes
Ki67	mouse IgG	-	1:200	Novocastra
MAP-2	mouse IgG	-	1:500	Sigma
NeuN	mouse IgG	-	1:1000	Chemicon
NeuroD	goat IgG	-	1:200	Santa Cruz Biochemistry
NKCC1	rabbit IgG	-	1:500	Chemicon
VGAT	rabbit IgG	-	1:500	Synaptic Systems
PSA-NCAM	mouse IgM	-	1:500	Gifted from Dr. Seki
二次抗体				
mouse IgG	donkey IgG	Cy5	1:200	ICN
mouse IgM	goat IgG	rhodamine	1:200	Jackson Immunoresearch
mouse IgM	goat IgG	Cy5	1:200	Jackson Immunoresearch
rabbit IgG	goat IgG	Alexa 488	1:1000	Molecular Probes
rabbit IgG	donkey IgG	rhodamine	1:200	Chemicon
rabbit IgG	donkey IgG	Cy5	1:200	Chemicon
rat IgG	goat IgG	Alexa 488	1:1000	Molecular Probes
rat IgG	donkey IgG	rhodamine	1:200	Jackson Immunoresearch
goat IgG	horse IgG	biotin	1:200	Vector Laboratories
三次試薬				
boitin	-	streptoavidin-Cy5	1:200	Jackson Immunoresearch

## 結果

### 1. 成体海馬の神経系前駆細胞（タイプ 2 細胞）は GABA に応答する。

本研究は、成体海馬の神経系前駆細胞（タイプ 1 細胞およびタイプ 2 細胞）が既存神経回路網との間に、機能的つながりがあるかを明らかにするものである。まず nestin<sup>P</sup>-GFP マウスから急性脳スライスを作成し、蛍光顕微鏡下にてこれらの神経系前駆細胞を同定した。タイプ 1 細胞は GFP 蛍光が強く、放射状の突起を分子層側に伸ばしているのに対して（図 10A）、タイプ 2 細胞は GFP 蛍光が非常に薄く、ほとんど突起は無く、丸い形状をしている（図 10C）。まず GFP 蛍光の強さと形態的な違いから、2 種類の細胞群を大まかに区別した。次に、これら GFP 陽性細胞のホールセル記録により膜抵抗値を測定し、その値が 0.5 GΩ 以下の細胞をタイプ 1 細胞、0.5 GΩ 以上の細胞をタイプ 2 細胞とした。この膜抵抗値の違いによる 2 細胞群の識別は、当研究室の福田によって報告された識別方法である（Fukuda et al., 2003）。

これまで成体海馬の神経系前駆細胞と既存神経回路網との機能的つながりに関する知見は得られていなかった。そもそも神経系前駆細胞が神経伝達物質に対して応答するかどうかという知見すら得られていなかった。そこで本研究では、まず初めにタイプ 1 細胞およびタイプ 2 細胞が、各種神経伝達物質に対して応答するかを、それぞれの受容体アゴニストを局所投与することで調べた。本研究では、主な神経伝達物質の受容体アゴニストとして、GABA（GABA 受容体アゴニスト）、NMDA（NMDA 型グルタミン酸受容体アゴニスト）、AMPA（AMPA 型グルタミン酸受容体アゴニスト）、グリシン（グリシン受容体アゴニスト）を用いた。各種薬剤に対する反応は、細胞を -60 mV に電位固定した状態でおこなった。NMDA 投与は受容体の活性化が見られる -30 mV の電位固定で行った。その結果、タイプ 1 細胞では、GABA（0%, n = 0/12）、NMDA（0%, n = 0/11）、AMPA（0%, n = 0/11）、グリシン（0%, n = 0/11）の各種薬剤局所投与に対してどれも反応が見られず、これらの神経伝達物質を介した

神経入力には応答しないと考えられた (図 10B)。しかし驚くべきことに、ほぼ全てのタイプ 2 細胞において、GABA の局所投与により顕著な電流応答が観察された (90.5%, n = 38/42) (図 10D(1))。しかし NMDA (0%, n = 0/14)、AMPA (0%, n = 0/10)、グリシン (0%, n = 0/11) では応答は見られなかった (図 10D(2)・(4))。

この GABA により誘起された電流は、ビククリン (GABA<sub>A</sub> 受容体阻害剤) により完全に消失する (GABA で反応した細胞 : 100%, n = 10) ことから、タイプ 2 細胞で見られた GABA 応答は、GABA<sub>A</sub> 受容体を介した反応であると言える。この反応は GABA の濃度依存的に変化し、EC<sub>50</sub> 値は 230.6 μM であった (図 11)。これらのことから、タイプ 2 細胞は GABA に反応することが明らかとなり、タイプ 2 細胞への GABA 入力の生理学的役割を解析することが、神経回路の活動に依存したニューロン新生メカニズムの解明の突破口になるであろうと考えられた。

膜抵抗値の違いに基づく電気生理学的に異なるタイプ 1 細胞とタイプ 2 細胞が適切なマーカーを発現しているかを調べるために、パッチクランプ後に記録された細胞の免疫染色を行った。多くの場合、パッチクランプ後に細胞からガラス電極を外す際に、細胞体がガラス電極から離れず脳切片から引き剥がされてしまうため、免疫染色できた細胞は限られた数になってしまう。パッチクランプの際に、蛍光色素 (Alexa 568) が注入された細胞を各種抗体により染色した結果、タイプ 1 細胞は GFAP 陽性であり (100%, n = 3/3) (図 12B)、タイプ 2 細胞は PSA-NCAM 陽性であること (100%, n = 7/7) が確認でき (図 12A)、パッチクランプ法による電流記録は確かにタイプ 1 およびタイプ 2 細胞から行われたことが示された。また電流記録後の顆粒細胞はニューロンマーカーである MAP-2 陽性であった (100%, n = 4/4) (図 12C)。

これまでの先行研究から、タイプ 2 細胞は盛んに分裂を繰り返す前駆細胞であることが示されてきた (Filippov et al., 2003; Fukuda et al., 2003; Kempermann et al., 2004)。分裂能を有することが前駆細胞としての重要な性質でもある。そこで本研究

においても、タイプ 2 細胞の分裂能を評価した。細胞周期の G1 後期から M 期の間  
に発現する Ki67 (Scholzen and Gerds, 2000) に対する抗体を用いた免疫染色によ  
り、タイプ 2 細胞の分裂能を評価した。その結果、 $76.4 \pm 01.30\%$  のタイプ 2 細胞が  
Ki67 陽性であることから、タイプ 2 細胞は盛んに分裂している細胞であることが確  
認された。またパッチクランプ後の細胞においても、Ki67 抗体で染色されることが  
確認された (図 13A, B, C)。一方タイプ 1 細胞は、 $25.12 \pm 0.20\%$  が Ki67 陽性であり、  
G1 期が長くゆっくりと分裂をする細胞であると考えられた (図 13B)。

以上の結果から、タイプ 2 細胞は盛んに分裂を繰り返す前駆細胞であり、また電気  
生理学的な解析から、その細胞膜上に GABA<sub>A</sub> 受容体を発現していることが明らかと  
なった。タイプ 1 細胞からタイプ 2 細胞に分化することで、GABA に対する反応性  
を獲得するのではないかと考えられる。そして分裂中の神経系前駆細胞に対して、周  
囲の神経回路からの GABA 入力が存在するのではないか、またこの GABA 入力が神  
経系前駆細胞のニューロン分化に深い関わりを持っているのではないかという非常  
に興味深い可能性を示唆する結果となった。

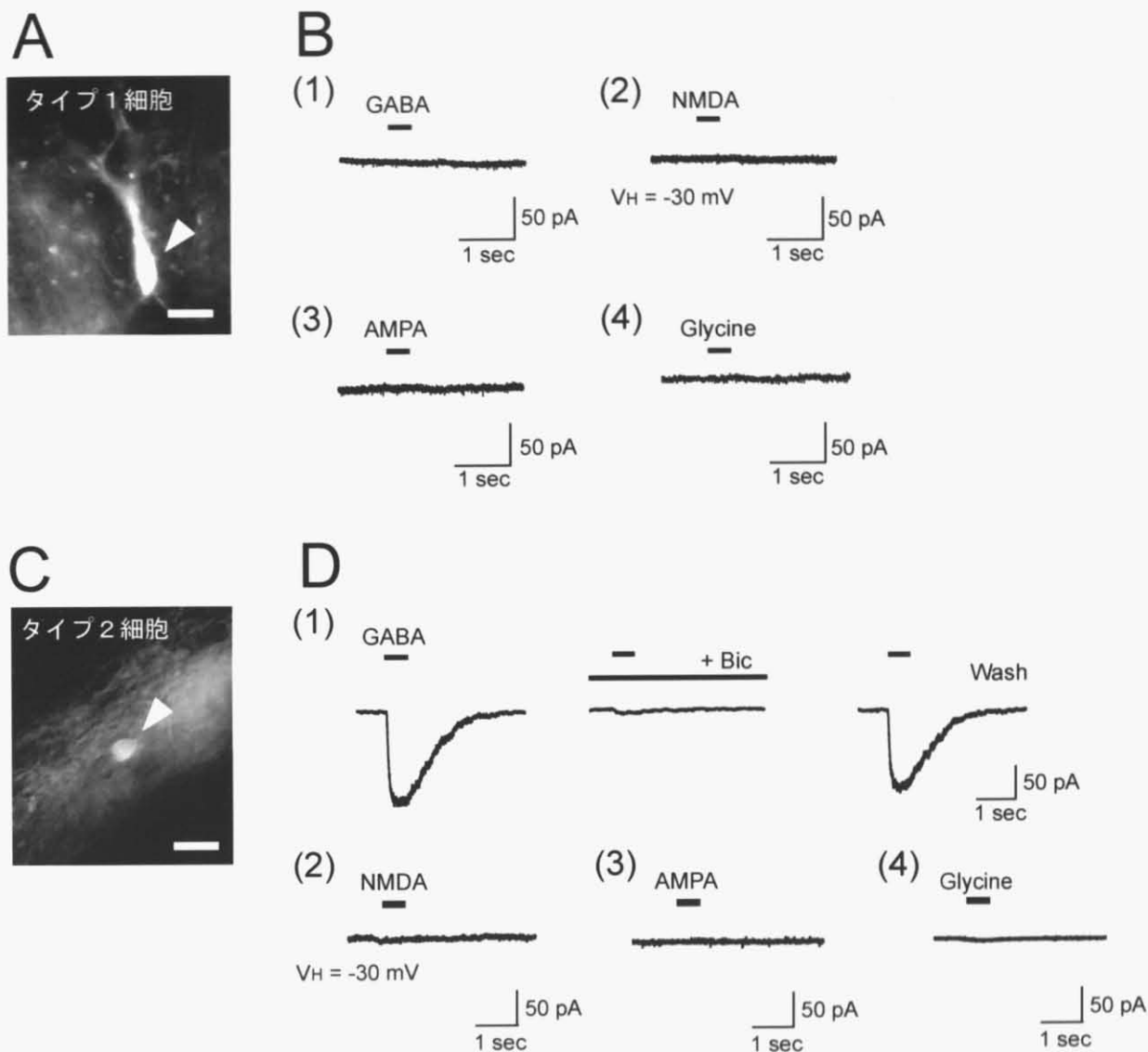


図10:タイプ1細胞およびタイプ2細胞の神経伝達物質受容体アゴニストに対する反応。

(A) 蛍光顕微鏡下にて観察されたタイプ1細胞。GFP蛍光が強く、長い突起を有する。Scale bar: 10  $\mu$ m

(B) タイプ1細胞のGABA (1 mM: (1))、NMDA (1 mM: (2))、AMPA (1 mM: (3))、glycine (1 mM: (4))に対する反応。各反応における固定電位は、-60 mVで行った。NMDAの反応は、固定電位-30 mVで行った。

(C) 蛍光顕微鏡下にて観察されたタイプ2細胞。GFP蛍光は弱く、長い突起は持たない。Scale bar: 10  $\mu$ m

(D) タイプ2細胞のGABA (200  $\mu$ M: (1))、NMDA (1 mM: (2))、AMPA (1 mM: (3))、glycine (1 mM: (4))に対する反応。タイプ2細胞はGABAにのみ反応し、この反応はbicuculline (Bic; 50  $\mu$ M)によって阻害された。各反応における固定電位は、-60 mVで行った。NMDAの反応は、固定電位-30 mVで行った。

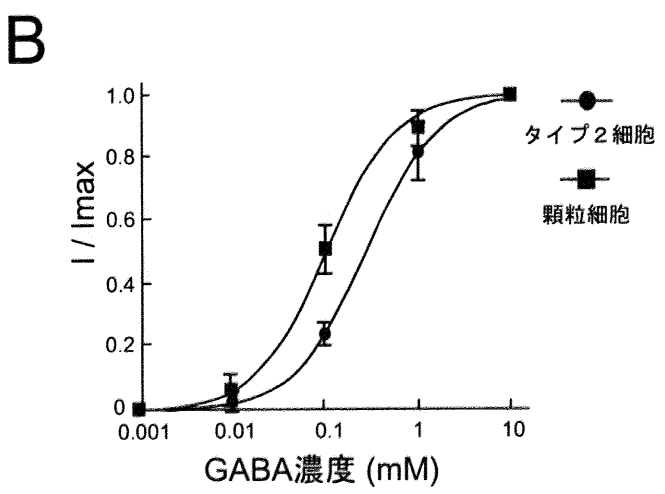
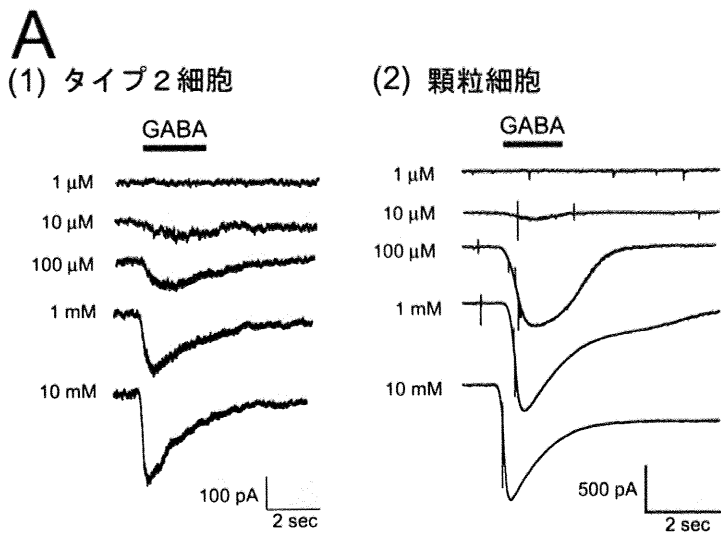


図11: GABAの濃度依存的な反応。

(A)タイプ2細胞および顆粒細胞(成熟ニューロン)にけるGABAの濃度依存的反応。(1)タイプ2細胞に対して、1  $\mu$ M~10 mM GABAを投与した時の電流応答。(2)顆粒細胞に対して、1  $\mu$ M~10 mM GABAを投与した時の電流応答。どちらも固定電位は-60 mVで行った。

(B)タイプ2細胞および顆粒細胞のGABAの濃度依存的反応曲線。タイプ2細胞におけるGABAのEC50値は230.6  $\mu$ M (n = 4)。顆粒細胞におけるGABAのEC50値は106.5  $\mu$ M (n = 5)であった。各濃度のGABAを投与した時の最大電流応答値をHillの式に当てはめて曲線を作成した。



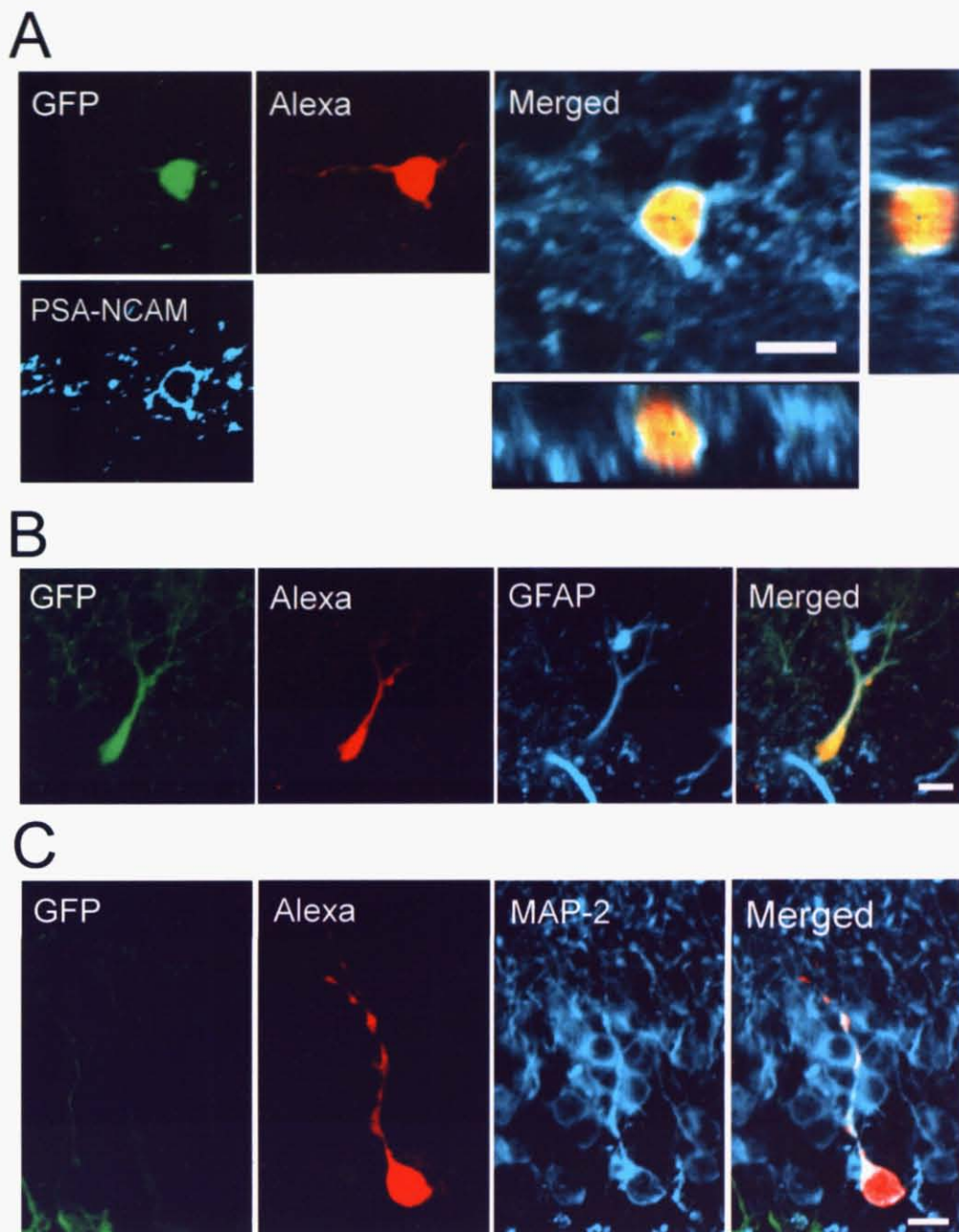


図12: 電流記録後の各種細胞の免疫染色像。

電流記録した細胞を免疫染色により適切なマーカーを発現しているかを調べたもの。記録された細胞には、蛍光色素Alexaが注入されている。(A)電流記録後のタイプ2細胞。GFPおよびPSA-NCAMの発現が確認できる。(B)電流記録後のタイプ1細胞。GFPおよびGFAPの発現が確認できる。(C)電流記録後の顆粒細胞。GFP蛍光は無く、ニューロンマーカーであるMAP-2を発現していることが確認できる。Scale bar: 10  $\mu\text{m}$  (A), (B), (C)

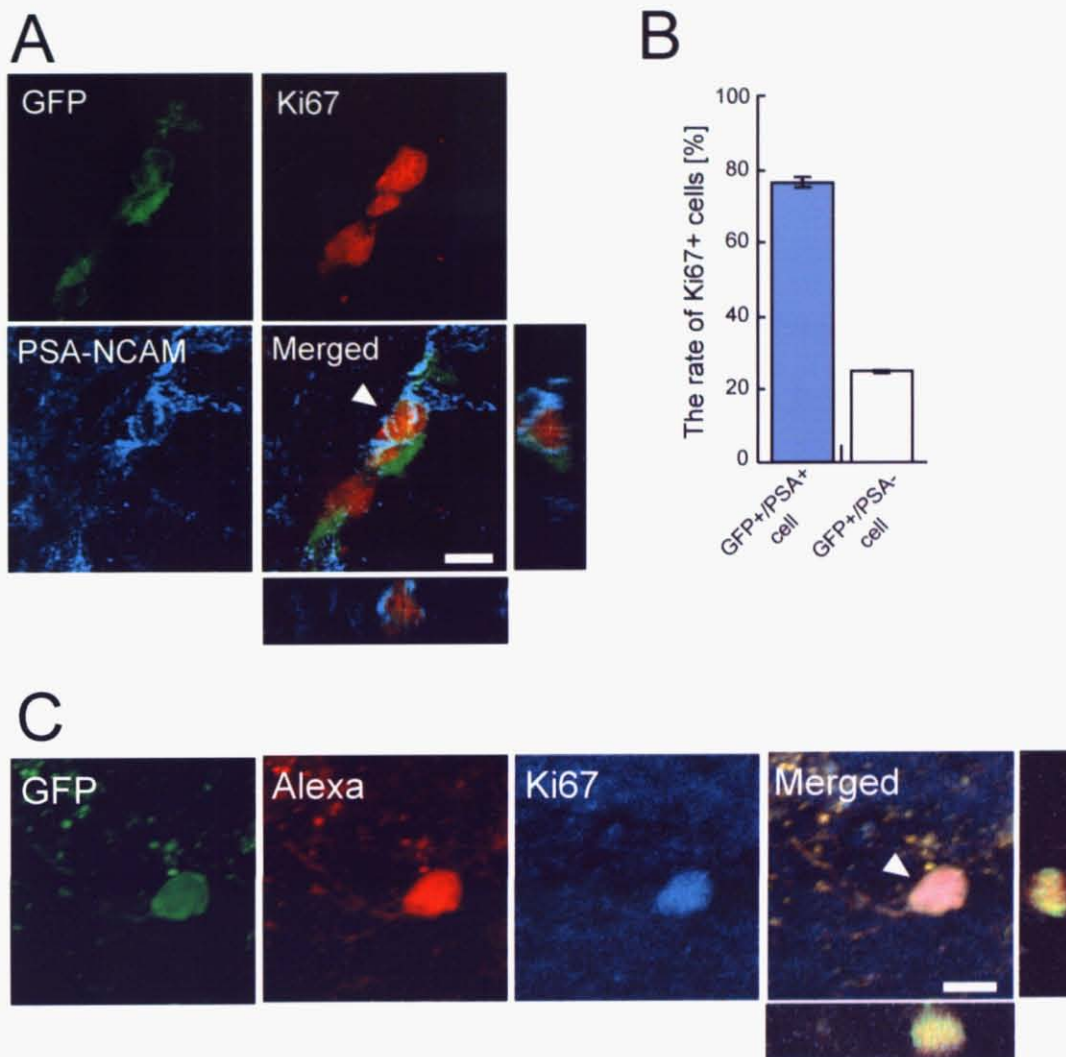


図13:タイプ2細胞の分裂能の評価。

(A)免疫組織化学染色によるタイプ2細胞の分裂能の評価。Ki67を発現しているタイプ2細胞。Scale bar: 10  $\mu$ m

(B)タイプ2細胞とタイプ1細胞の細胞周期に入っている割合。600個のタイプ1細胞及びタイプ2細胞(1個体当たり200個の細胞を計測。3個体分の平均値を示す)においてKi67を発現している細胞の割合を示したグラフ。タイプ2細胞の方がより盛んに分裂を行っていることを示している。

(C)電流記録されたタイプ2細胞は分裂段階にあった細胞であることを示す像。記録されたタイプ2細胞は細胞周期マーカーであるKi67を発現している。Scale bar: 10  $\mu$ m

## 2. タイプ 2 細胞へのシナプス性 GABA 入力。

では、タイプ 2 細胞は周囲の神経回路からの GABA 入力を受け取っているのか。これまでの胎生期における先行研究から、分裂を繰り返す神経系前駆細胞は周囲の回路との間に決してシナプス結合を形成することはないとされていたため (LoTurco et al., 1995; Demarque et al., 2002)、タイプ 2 細胞が周囲の神経回路から直接シナプスを介して入力を受け取っているかが大きな問題となった。そこでタイプ 2 細胞に対する周囲の神経回路からのシナプス性の GABA 入力があるかを調べた。その結果、タイプ 2 細胞の長時間のレコーディング中に、自発的なシナプス入力と考えられるシナプス性内向き電流が観察された (図 14A)。しかしこのシナプス性入力は、常に観察されるものではなく、急性脳スライスの状態が良い時や、また長時間のレコーディング中に 1~2 回見られる非常に頻度の低い入力であった。脳スライスを作成することで多くの繊維が切断されていることでスライス表面近くの回路の活性は落ちていると考えられた。特にタイプ 2 細胞は突起を伸ばしていないため、スライス上では *in vivo* に比べて限られた入力しか受け取れていないと考えられた。そのため、これらの自発的シナプス入力が GABA 受容体を介した神経入力であるかを解析することは非常に困難であり、薬理的な解析を行うためには、これらの入力の頻度を高める必要があった。そこで、スライス全体の神経活動を高める (神経伝達物質の放出を高める (Hennou et al., 2002)) 薬剤である 4-AP を灌流することでタイプ 2 細胞への神経入力を促し、薬理的な解析を行うことを試みた。4-AP を灌流した結果、タイプ 2 細胞における自発的シナプス入力の頻度が顕著に増加し、タイプ 2 細胞が神経回路から確かにシナプス性の入力を受け取っていることが示された。これらの自発的シナプス入力は、TTX (電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤) (図 14B, C) やビククリン (GABA<sub>A</sub> 受容体阻害剤) (図 14D, E) によって消失することから、周囲のニューロンの活動に伴うタイプ 2 細胞への GABA 入力であることが示された。本研究とは

独立に、Wang らの研究グループも、成体海馬のタイプ 2 細胞がシナプス性 GABA 入力を受け取っているとの報告をしており (Wang et al., 2005)、独立した 2 つの研究室から並列した結果が得られている。タイプ 2 細胞がシナプス性の GABA 入力を受け取っていることはより確かなことと言える。

胎生期の神経回路網形成時期における脳内においても、分裂中の神経系前駆細胞は GABA 入力を受け取っていることが報告されている (LoTurco et al., 1995; Demarque et al., 2002)。しかしこの入力は、tonic currents と呼ばれるシナプスを介さない細胞外の GABA が、前駆細胞へシグナルを伝えているというものである (図 15A)。しかし本研究で観察されたタイプ 2 細胞への GABA 入力は tonic currents とは異なり (図 15B)、シナプスを介した入力であることが強く示唆された。このことは、胎生期脳内と成体期脳内における情報伝達システムの違いを示唆するものであり、神経系前駆細胞がシナプスを介して神経入力を受け取ることは、成体脳ニューロン新生過程における特異的な現象の一面を示しているのかも知れない。

次に海馬の局所神経回路を電気刺激 (単発刺激) することで、タイプ 2 細胞へ神経刺激が伝わるかを調べた。海馬歯状回へのメインインプットである貫通繊維を電気刺激した場合には、タイプ 2 細胞において神経入力は観察されなかったが (図 16A, B)、ハイラス部を電気刺激した際に、顕著な内向き電流が観察された (図 16C, D)。この内向き電流はビククリンにより阻害されたことから、GABA 入力であることが示された (図 16E, F)。ハイラス部、およびハイラス部と顆粒細胞層の境界付近には多種多様の GABA 作動性ニューロンが存在し、顆粒細胞層および顆粒細胞下帯に広く投射している (Freund and Buzsaki, 1996; Mott et al., 1997)。貫通繊維の単発刺激では、タイプ 2 細胞まで刺激が伝わらなかったが、タイプ 2 細胞が局在する近傍であるハイラス部の電気刺激によりこれらの GABA 作動性ニューロンが興奮し、タイプ 2 細胞へ刺激が伝達されたと考えられる。

では、歯状回ハイラス部の GABA 作動性ニューロンはどういった生理条件下にて興奮するのか。やはり海馬神経回路の活動に応じてその活動が制御されていると考えられた。ここで非常に興味深いことに、動物が学習行動（探索行動）をしている時、GABA 作動性ニューロンが特殊なパターン（シータ波リズム、またはシータオシレーション）で同期発火することが知られている。これは海馬回路に挿入した深部電極から記録されるシータリズム（4-8 Hz）でガンマスパイク（30-100 Hz）が繰り返し現れる特徴的な脳波であり（図 17A）、このシータ波が記憶の形成に非常に深く関わっていると考えられている（Buzsaki et al., 2002）。そして学習行動を行うことで、海馬のニューロン新生が亢進することから、シータ波と同じ刺激を海馬回路に施すことで、タイプ 2 細胞への GABA 性刺激が伝わるのではないかと考えた。そこで、実験的にシータ波と同じ刺激を貫通繊維に加えることでタイプ 2 細胞へ GABA 性刺激が伝わるかを調べた。まず、貫通繊維のシータ波刺激を行った。貫通繊維の単発刺激ではタイプ 2 細胞において内向き電流は誘起されなかったが、シータ波刺激では顕著な内向き電流が誘起された（図 17B, C）。この内向き電流は、ピククリンで消失することから、貫通繊維のシータ波刺激により、GABA ニューロンが興奮し、タイプ 2 細胞へ GABA の供給が行われたと考えられる。また、ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストであるカルバコールを灌流させることでも、海馬スライスにおいてシータ波を実験的に誘起できることが報告されている（Fisahn et al., 1998; Fellous and Sejnowski et al., 2000）。これは、中隔核（septum）からのアセチルコリン作動性の繊維が歯状回 GABA 作動性ニューロンに投射しており、GABA 作動性ニューロンの活動を調節することで、海馬におけるシータ波の発生に大きく関与していると考えられている。そこで本研究においても、海馬スライスにカルバコールを灌流させることで、タイプ 2 細胞へ GABA 入力が伝わるかを調べた。その結果、貫通繊維のシータ波刺激と同様に、カルバコールを灌流することによって、タイプ 2 細胞へ GABA 入

力が伝わることが明らかとなった (図 17D)。貫通繊維のシータ波刺激やアセチルコリン性の刺激を施すことで海馬 GABA ニューロンが興奮し、タイプ 2 細胞へ GABA の供給が行われることが示された (図 17E)。これらの結果から、成体海馬の神経系前駆細胞 (タイプ 2 細胞) は、シナプスを介して周囲の神経回路と一体となり、海馬の活動に応じた神経入力を受け取っていることが初めて明確に示された。特に学習行動時に見られる特徴的な脳波であるシータ波刺激により、GABA 作動性ニューロンが興奮し、タイプ 2 細胞へシグナルが伝わることが明らかとなった。

次に電子顕微鏡および共焦点顕微鏡観察による解剖学的な解析により、タイプ 2 細胞に GABA 性シナプスが投射しているかを調べた。これまでに、Seri らは成体海馬神経系前駆細胞の電顕観察による解析から、成体海馬におけるニューロン新生は、GFAP 陽性の放射状突起を持ち明るい核を有する神経系前駆細胞 (B cell) から PSA-NCAM 陽性で突起を持たず暗い核を有する神経系前駆細胞 (D cell) が分化し、この細胞からニューロンへと分化することを報告している (Seri et al., 2000; 2004)。これらのことから、タイプ 1 細胞は B cell に、一方タイプ 2 細胞は D cell に一致している判断できた。この判断に基づき、GFP に対する免疫電顕による観察では、放射状突起を持ち明るい核の GFP 陽性細胞をタイプ 1 細胞 (図 18A)、一方突起を持たず暗い核の GFP 陽性細胞をタイプ 2 細胞 (図 18B) と判断して観察を行った。その結果、タイプ 2 細胞の細胞膜表面の近傍に、顆粒を持つシナプス様の構造物が近接していることが観察された (図 18B')。また GABA 作動性ニューロンのシナプス末端のマーカーである VGAT に対する抗体を用いた免疫組織染色でも、タイプ 2 細胞の細胞膜表面上に GABA 性シナプス末端が近接していることが確認された (図 18C-G)。では、タイプ 2 細胞へ投射している GABA 作動性ニューロンの実体は何であろうか。GABA 作動性ニューロンのシナプス結合の特異性に関連して、最近、同じタイプの GABA 作動性ニューロン (例えばパルブアルブミン陽性細胞) の間に電氣的結合 (ギ

ヤップジャンクション) があることがわかってきた (Meyer et al., 2002)。この電氣的結合により、GABA 作動性ニューロン同士は同期発火できると考えられている。特にパルブアルブミン陽性の GABA 作動性ニューロンは非常に高頻度に発火する特徴を持っており、ガンマスパイクの発生に関与していることが示唆されている (Meyer et al., 2002; Bartos et al., 2002)。これらの知見から、海馬におけるシータ波の発生には少なくともパルブアルブミン陽性の GABA 作動性ニューロンの関与が考えられ、タイプ 2 細胞へ投射しているのではないかと推察できる。

本研究により、電気生理学的にも解剖学的にもタイプ 2 細胞は GABA 入力を受け取っていることが初めて明らかとなった。分裂中の神経系前駆細胞にシナプスがあるという報告はこれまでに無く、きわめて新規性の高い発見となった。

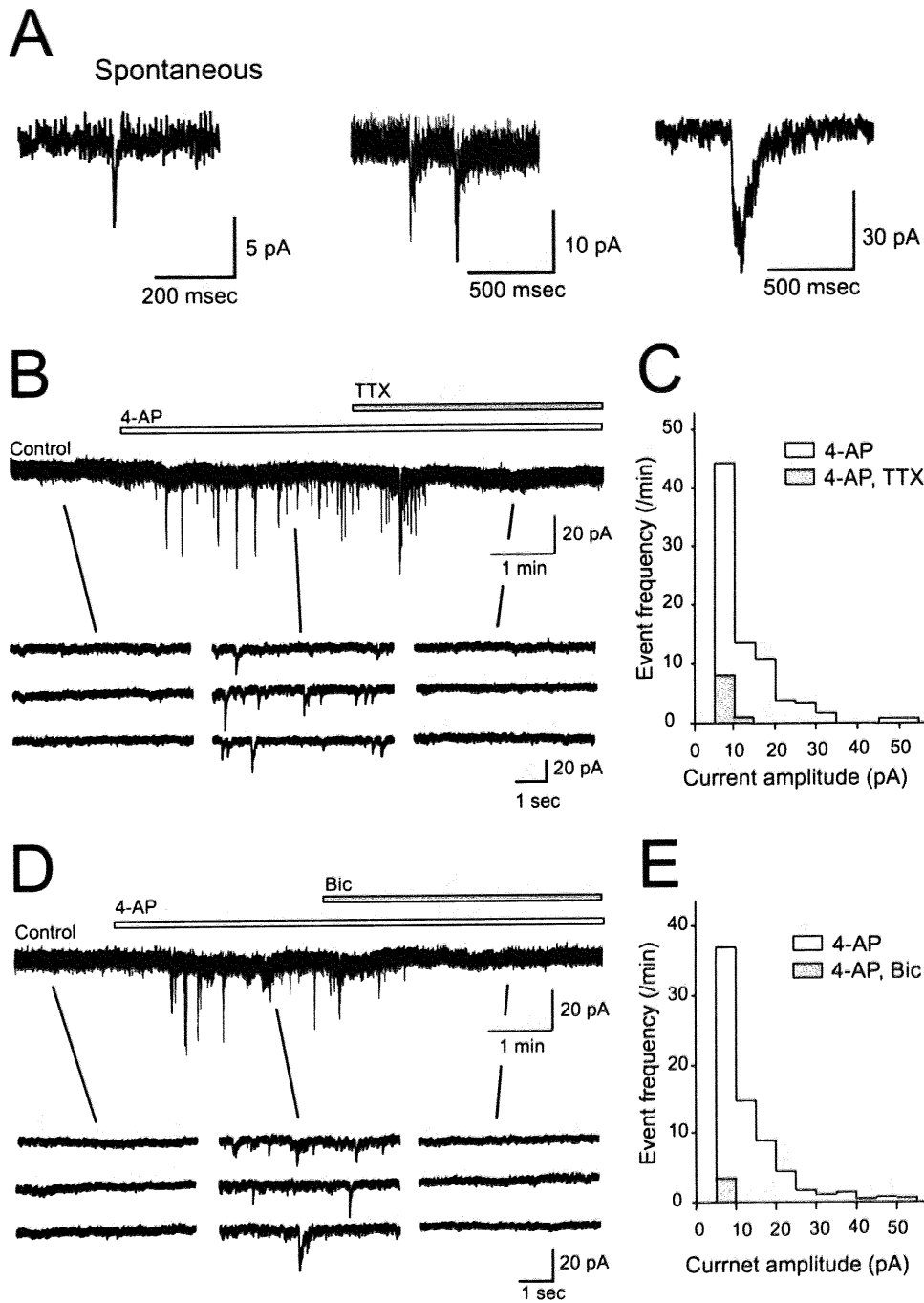


図14:タイプ2細胞への自発的GABA入力。

(A)タイプ2細胞において観察された自発的シナプス入力。3つの例を示した。

(B)タイプ2細胞における自発的シナプス入力は、4-APにより増幅された。この反応はTTXにより阻害された。  
-60 mVの固定電位。

(C)単位時間(1分間)あたりの自発的シナプス入力の大きさと頻度を示したヒストグラム。TTXを加える前後での4-APにより増幅されたシナプス入力を表したものの。3個の細胞から記録された入力の平均値を示してある。

(D)4-APにより増幅されたシナプス入力はbicuculline (Bic) によっても阻害された。-60 mVの固定電位。

(E)単位時間(1分間)あたりの自発的シナプス入力の大きさと頻度を示したヒストグラム。Bicuculline (Bic) を加える前後での4-APにより増幅されたシナプス入力を表したものの。4個の細胞から記録された入力の平均値を示してある。



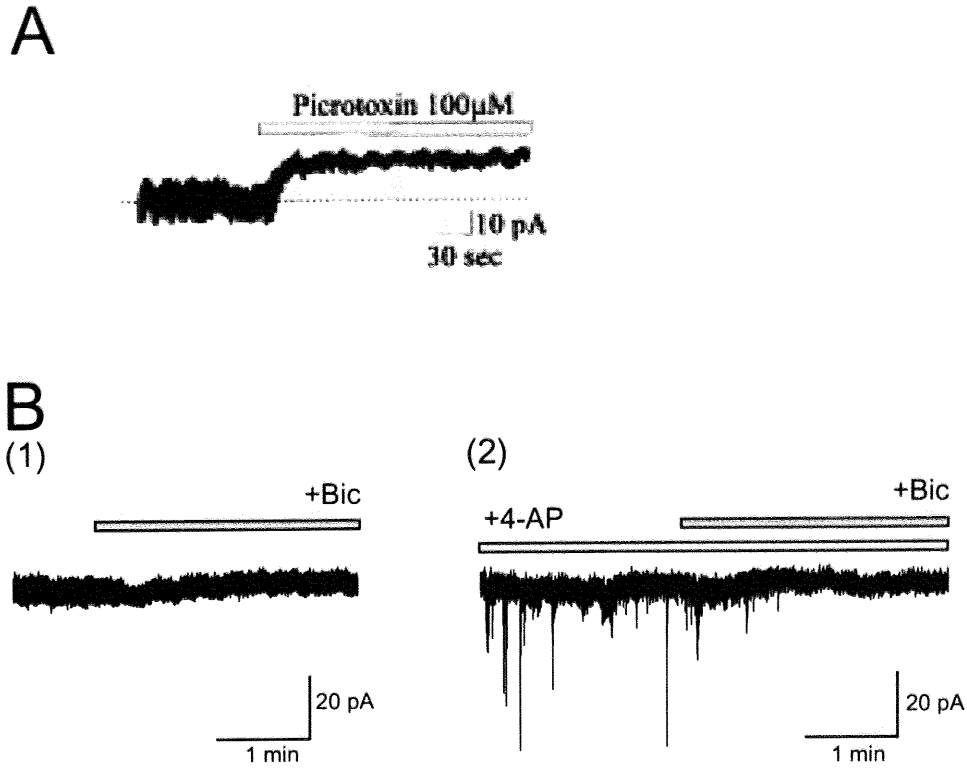


図15:タイプ2細胞へのGABA入力はシナプス性入力である。

(A)発達期海馬のニューロン前駆細胞で観察されるトニック性のGABA入力。細胞はシナプスを形成しておらず、軸索末端から持続的に放出される神経伝達物質が前駆細胞膜上の受容体に働きかける。Picrotoxin (GABA<sub>A</sub>受容体阻害剤)を加えることで反応が阻害され、ベースラインが変化する。図はDemarque et al., 2002の文献から改変。

(B)(1)タイプ2細胞でのGABA入力。ビククリンを投与しても電流のベースラインは変化しない。軸索末端から漏れ出るGABAに反応しているわけではないことがわかる。(2)4-AP還流時に観察された入力に関しても、同様のことが言える。-60 mVに電位固定した時の反応。

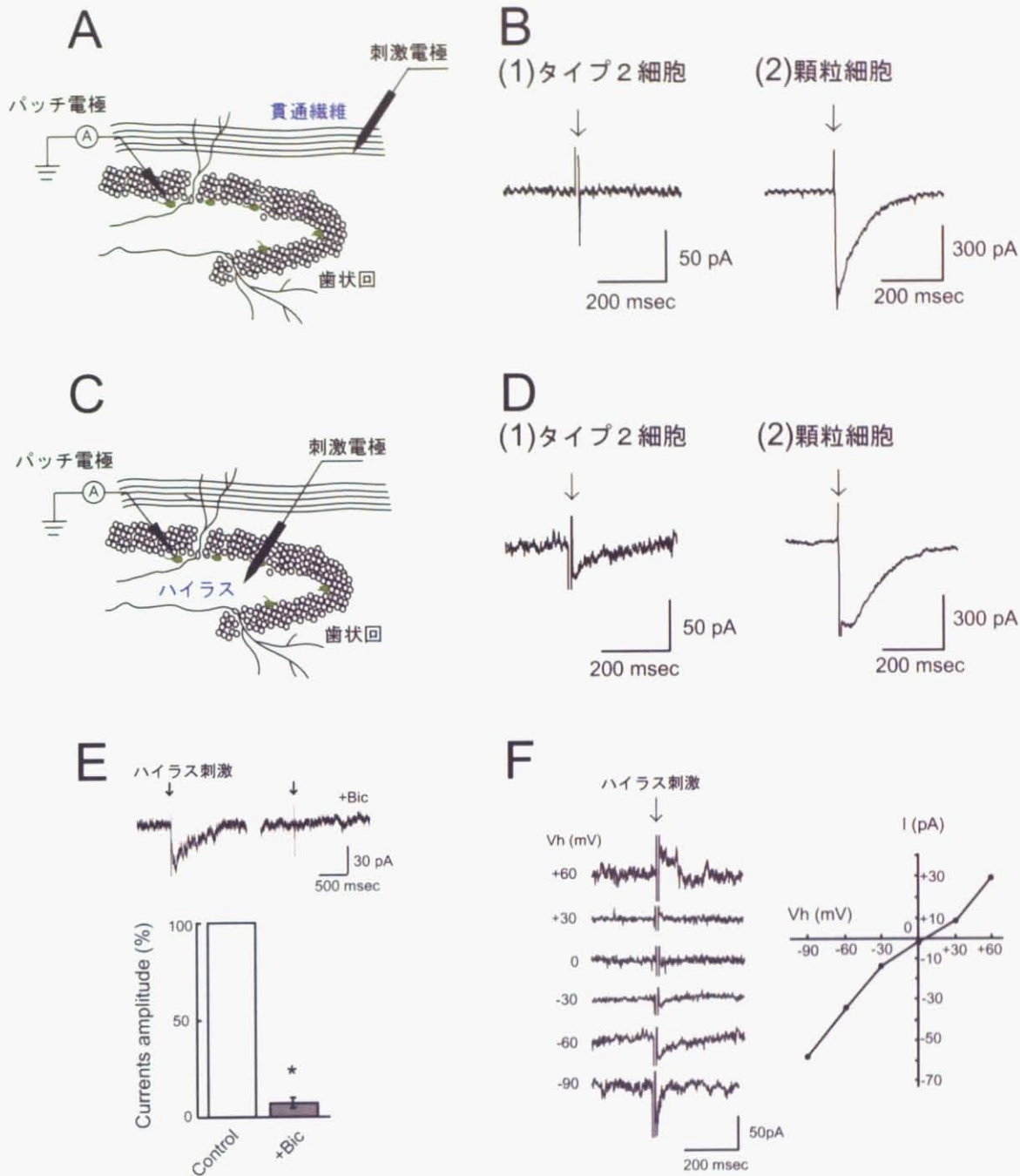


図16: 電気刺激により惹起されたタイプ2細胞へのGABA入力。

(A)貫通繊維を電気刺激し、タイプ2細胞で電流応答を記録する模式図。

(B)貫通繊維を電気刺激したときのタイプ2細胞および顆粒細胞における電流応答。(1)タイプ2細胞では電流応答は観察されなかった。(2)顆粒細胞における顕著な内向き電流。どちらの場合も、固定電位は-60 mV。

(C)ハイラス部を電気刺激したとき、タイプ2細胞で電流応答を記録する模式図。

(D)ハイラス部を電気刺激したときのタイプ2細胞および顆粒細胞における電流応答。(1)タイプ2細胞における顕著な内向き電流。(2)顆粒細胞における顕著な内向き電流。どちらの場合も、固定電位は-60 mV。

(E)タイプ2細胞において、ハイラス部の電気刺激により惹起された内向き電流はbicuculline (Bic)で阻害されるGABA入力である。ヒストグラムはコントロールを100%とした時のbicuculline存在下での電流応答値の比を表す。5個のタイプ2細胞から記録されたデータである。固定電位は-60 mV。

(F)ハイラス部の電気刺激により惹起された電流の電位依存的な変化。(1)各固定電位における電流応答。(2)電気刺激により惹起された電流の反転電位。細胞内Cl<sup>-</sup>の反転電位とほぼ一致している。

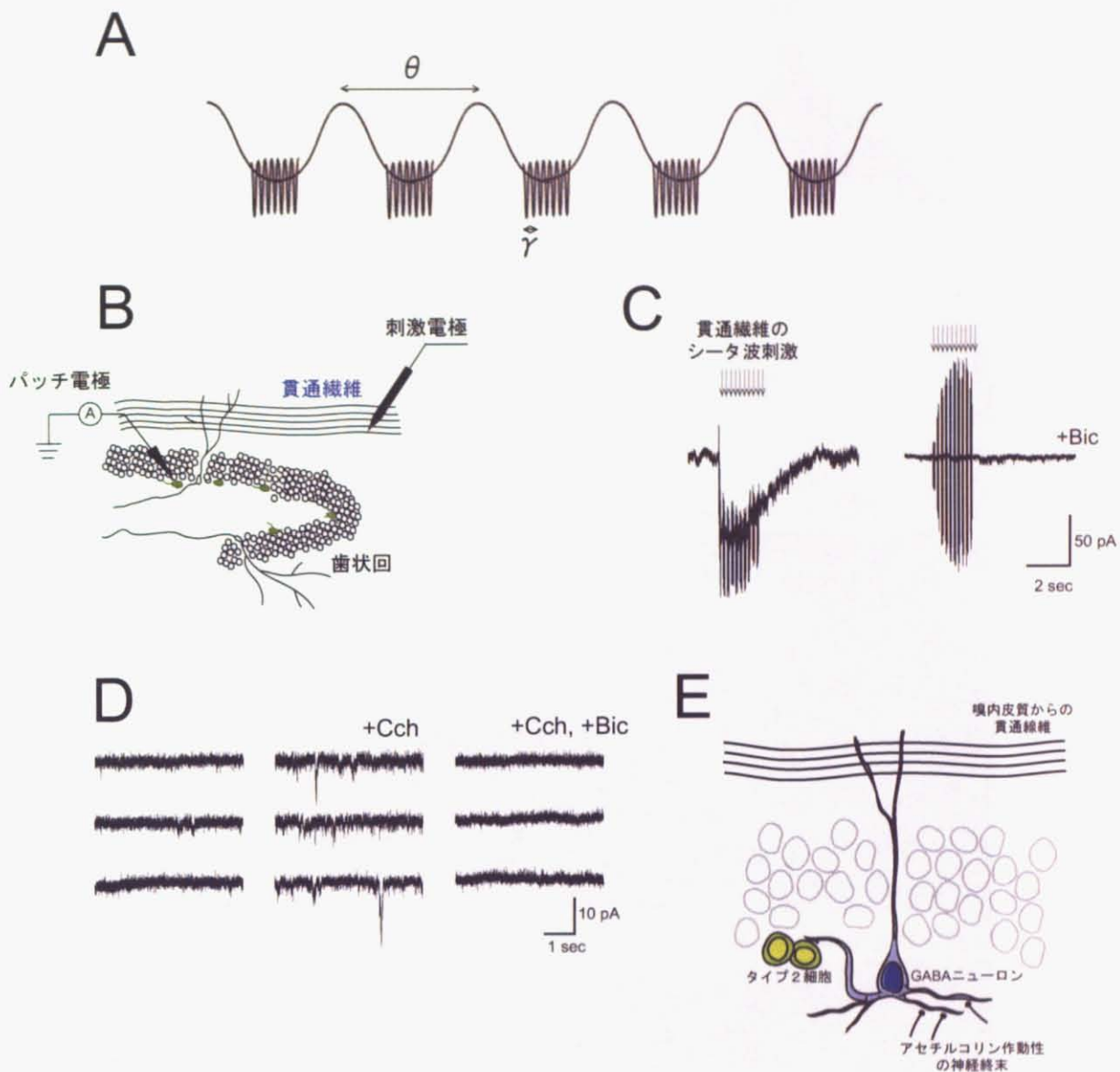


図17:シータ波刺激でタイプ2細胞にGABA入力伝わる。

(A)シータ波(シータ・ガンマ波)の模式図。学習行動中に海馬歯状回では、ガンマ波がシータリズムで観察される。GABA作動性ニューロンがリズムを刻むことで発生すると考えられている。

(B)貫通繊維を電気刺激(シータ波刺激)したとき、タイプ2細胞で電流応答を記録する模式図。

(C)貫通繊維をシータ波刺激したときの、タイプ2細胞における内向き電流。この反応はbicuculline(Bic)によって阻害される。固定電位は-60 mV。

(D)ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストであるカルバコールを灌流した場合でのタイプ2細胞における電流記録。カルバコールによりタイプ2細胞にGABA入力伝わる。固定電位は-60 mV。

(E)タイプ2細胞とGABA作動性ニューロンとの関わりを示す模式図。貫通繊維からの刺激を受けたGABA作動性ニューロンはタイプ2細胞へ刺激を伝える。またGABA作動性ニューロンはアセチルコリン作動性の投射を受けることで興奮し、タイプ2細胞へ刺激を伝える。

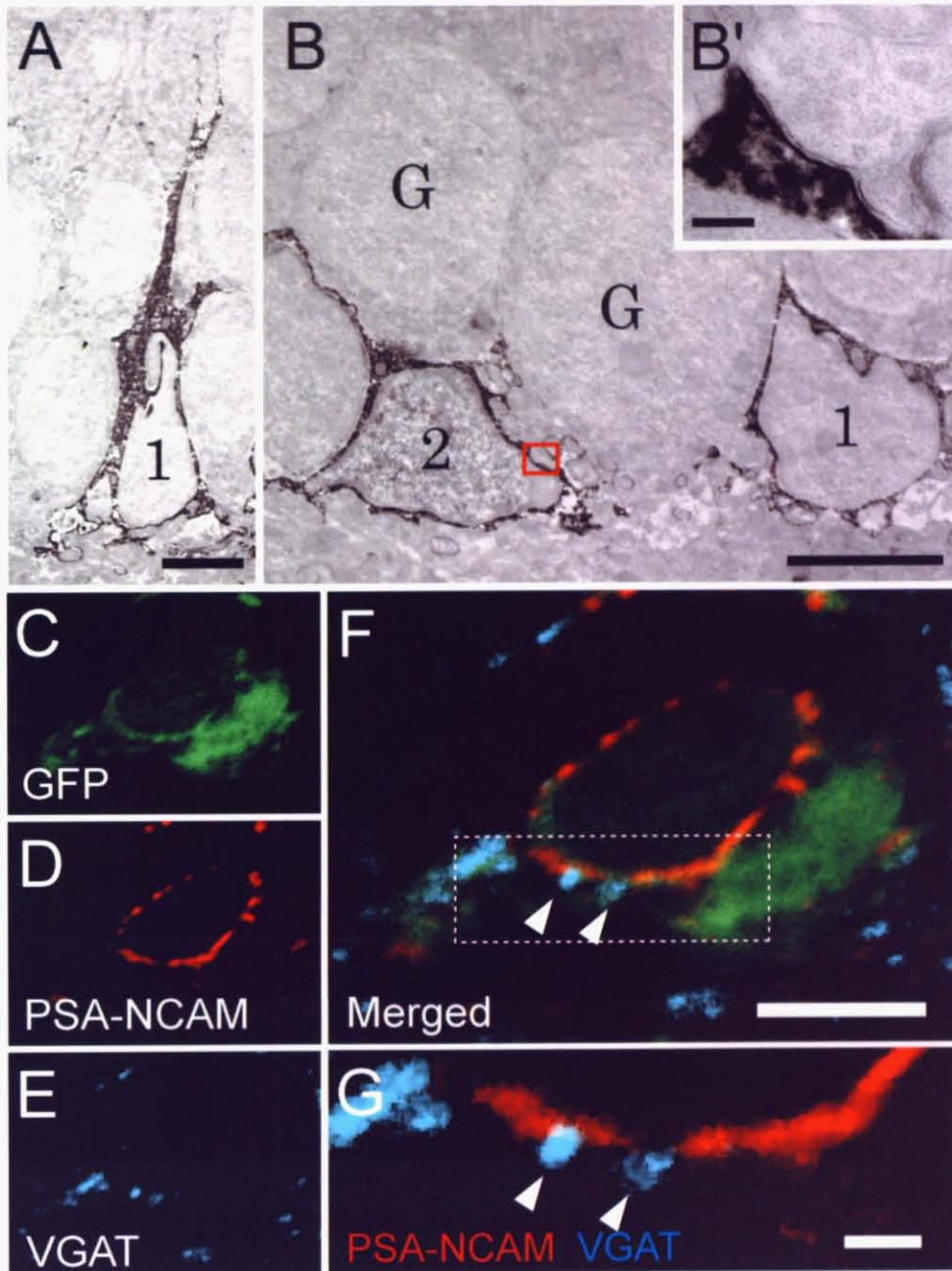


図18:組織化学的解析によるタイプ2細胞へのGABA入力。

(A, B)GFPに対する免疫電顕像。(A)はタイプ1細胞を表す。放射状の突起と明るい核により特徴付けられる。(B)はタイプ2細胞を表す。ほぼ丸い形態と、暗い核により特徴付けられる。(B')は(B)中の赤枠の拡大図である。タイプ2細胞の膜表面近傍に顆粒を持ったシナプス末端が近接していることがわかる。1: タイプ1細胞、2: タイプ2細胞、G: 顆粒細胞。Scale bar: 4  $\mu\text{m}$  (A) & (B), 200 nm (B')

(C-G)タイプ2細胞膜上にGABA性シナプス末端が直接コンタクトしていることを示す蛍光像。(C)GFP蛍光。(D)PSA-NCAM染色像。(E)VGAT (vesicular GABA transporter) 染色像。VGATはGABA性シナプス末端を表す。(F)は(C)~(E)の重ね合わせ像。(G)は(F)中の破線で囲った領域の拡大図。PSA-NCAMはタイプ2細胞の膜表面を表し、そこにVGAT陽性のGABA性シナプス末端がコンタクトしている様子を表している。Scale bar: 5  $\mu\text{m}$  (F), 1  $\mu\text{m}$  (G)

### 3. GABA 入力タイプ 2 細胞を脱分極させ、NeuroD の発現を誘導する。

では分裂を繰り返すタイプ 2 細胞への GABA 入力はどのような生理的効果をもたらすのか？通常、成体脳内において GABA は抑制性の神経伝達物質として働いている。しかし発達期脳内では、GABA は興奮性の神経伝達物質として働いている。この GABA による興奮性作用が神経系前駆細胞の細胞分裂を停止させ、ニューロン分化を促すことが報告されている (LoTurco et al., 1995; Antonopoulos et al., 1997; Hayder et al., 2000; Nguyen et al., 2001; 2003)。つまり未成熟な前駆細胞において、GABA は情報伝達のための分子としてではなく、ニューロン分化促進因子として作用するというものである。そこで本研究においても、タイプ 2 細胞に GABA が興奮性に作用しニューロン分化を促進するかを調べた。

まずグラミシジン穿孔パッチ法によりタイプ 2 細胞への GABA の生理作用を調べた。(グラミシジン穿孔パッチ法は、細胞本来の $[Cl^-]$ を保ったまま GABA の応答を調べることができる。) その結果、GABA 刺激によりタイプ 2 細胞は脱分極することがわかった (図 19A(1))。これはタイプ 2 細胞が周囲のニューロンとは異なり、細胞内塩化物イオン濃度 ( $[Cl^-]$ ) が高く、GABA 受容体が活性化することで細胞内からの  $Cl^-$  の流出が起こり、膜の脱分極が起こると考えられる。タイプ 2 細胞における細胞内 $[Cl^-]$ が  $30.83 \pm 2.93 \text{ mM}$  ( $n = 13$ ) であった (図 19B, C)。この細胞内 $[Cl^-]$ は、グラミシジンパッチにより  $Cl^-$  の反転電位を求め、ネルンストの式を用いて算出した。一方、成熟ニューロンである顆粒細胞においては、従来から報告がある通り、GABA 刺激で膜は過分極した (図 19A(2))。細胞内 $[Cl^-]$ は  $5.38 \pm 0.04 \text{ mM}$  ( $n = 10$ ) であった (図 19B, C)。

細胞内 $[Cl^-]$ が高い状態に保たれているのは、NKCC1 (細胞内へ  $Cl^-$  を取り入れるトランスポーター) の発現による。未成熟な神経系前駆細胞では、NKCC1 の発現量が多いため細胞内 $[Cl^-]$ が高い状態に保たれている。ニューロンの成熟に伴い NKCC1

の発現量は低下し、対照的に KCC2 (細胞外へ  $\text{Cl}^-$  を排出するトランスポーター) の発現量が高くなるため、細胞内  $[\text{Cl}^-]$  が低い状態に保たれている。このことにより、GABA の生理作用が興奮性から抑制性へと変化するのである (Ben-Ari, 2002)。タイプ 2 細胞においても、NKCC1 の発現が観察され (図 19D)、このトランスポーターの働きにより、発達期の前駆細胞と同様に細胞内  $[\text{Cl}^-]$  が高い状態に保たれていると考えられた。細胞内  $[\text{Cl}^-]$  が高く、GABA が興奮性に作用することや、細胞内  $[\text{Cl}^-]$  が高い状態に保たれているメカニズムは、発達期の神経系前駆細胞と同様であり、前駆細胞自体は発達期と成体期で非常に類似した特性を持っていると考えられる。

では GABA により膜が脱分極することで、次にどういった反応につながるのか。通常、膜が脱分極すると、同じく膜上に存在する電位依存性カルシウムチャンネルが開口し、細胞内への一過的なカルシウム流入が起こる。特に神経系前駆細胞においては、カルシウムの流入がニューロンへの分化を促すシグナルとして作用するため、この細胞内へのカルシウム流入が非常に大きな意味を持つ。そこでタイプ 2 細胞においても、GABA が興奮性に作用することで、細胞内へのカルシウム流入が起こるかを調べた。タイプ 2 細胞におけるカルシウムの動態を観察するために、パッチクランプ法とカルシウムイメージング法との融合を図り、パッチ内液にカルシウム蛍光指示薬である Fluo-4 を溶解したものをを用いて、単一細胞レベルでのカルシウムイメージングを行った。またタイプ 2 細胞の本来の細胞内  $[\text{Cl}^-]$  を再現させるため、パッチ内液の  $[\text{Cl}^-]$  は 31 mM で行った (図 20A)。その結果、GABA 刺激により、細胞内での一過的なカルシウム上昇が観察された。この反応は、電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤である  $\text{Ni}^{2+}$  により阻害された (図 20B)。以上の結果から、GABA による膜の脱分極は、引き続き電位依存性カルシウムチャンネルを開口させ、細胞内への一過的なカルシウム流入を誘起したことが結論付けられた。そして細胞内において、種々のカルシウムカスケード (カルシウムに依存したシグナル伝達経路) が活性化されることで、

タイプ 2 細胞のニューロン分化が促されることが推察された。

次に、興奮性 GABA 入力を介したカルシウム流入がタイプ 2 細胞のニューロン分化を促すかどうかについての解析を行った。通常、脳科学分野における細胞分化を解析する場合、*in vivo* における神経回路構造を保つために、組織培養法が用いられる。しかしこれまで、胎生期脳の組織培養成功例に関しては報告されてきたが、成体脳の長期組織培養の成功例はなく不可能と考えられてきた。本研究においても海馬スライスを用いて、長期間組織培養し GABA 性刺激を行うことで前駆細胞からのニューロン分化を追跡しようと試みたが、成功には至らなかった。そこで本研究では、短期間であれば組織培養が可能であろうと考え、試行錯誤の末、20 時間という短時間の組織培養法を新たに確立した。この培養法を用いて、興奮性 GABA 入力によって海馬スライス内におけるタイプ 2 細胞のニューロン分化が促進されるかを評価した。この短時間組織培養システムにおいて、海馬歯状回の組織構造は十分に保たれていると考えられたので (図 21A)、評価法としては十分であると考えた。しかしこの系においては、短期間の培養であるため、タイプ 2 細胞から成熟ニューロンへの分化や形態的な変化を追跡することは困難であった。そこでニューロン分化を促進する転写因子である NeuroD の発現に着目した。NeuroD は発達期海馬において顆粒細胞の終末分化およびニューロン分化を促す bHLH (basic Herix-Loop-Herix) 転写因子であり、NeuroD 遺伝子をノックアウトすることで正常な海馬歯状回が形成されないことも報告されている (Liu et al., 2000; Schwab et al., 2000)。成体海馬歯状回においても新生ニューロンの初期分化過程においてその発現が認められている (Seki, 2002a; 2002b)。また NeuroD の発現には、膜の脱分極に伴う細胞内への一過的なカルシウム流入が必要であり、ニューロン分化過程において、前駆細胞が興奮性の刺激を受けた後、数時間後から NeuroD の発現量が増加してくることが示されている (Diesseroth et al., 2004)。そこで本研究では、組織培養後タイプ 2 細胞における

NeuroD の発現量を免疫染色により、その蛍光強度を測定することで定量した。その結果、GABA 刺激を行ったものでは、NeuroD を高発現するタイプ 2 細胞の数が刺激を行わなかったものに比べて増加していることがわかった (図 21B, C)。また、この NeuroD の発現は電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤である  $\text{Ni}^{2+}$  を加えることにより抑えられた。(この培養システムにおいては、GFP 陽性細胞の PSA-NCAM 染色が十分に行うことができなかつたため、GFP 蛍光の弱い細胞 (おそらくタイプ 2 細胞) における NeuroD の発現量を定量化した。) これらの結果から、GABA による脱分極が引き続き細胞内へのカルシウム流入を誘起し、このカルシウム流入が引き金となり、ニューロン分化を誘導する転写因子 (NeuroD) の発現量が増加することが示され、興奮性 GABA 入力によりタイプ 2 細胞のニューロン分化が促進されたことが示された (図 22)。



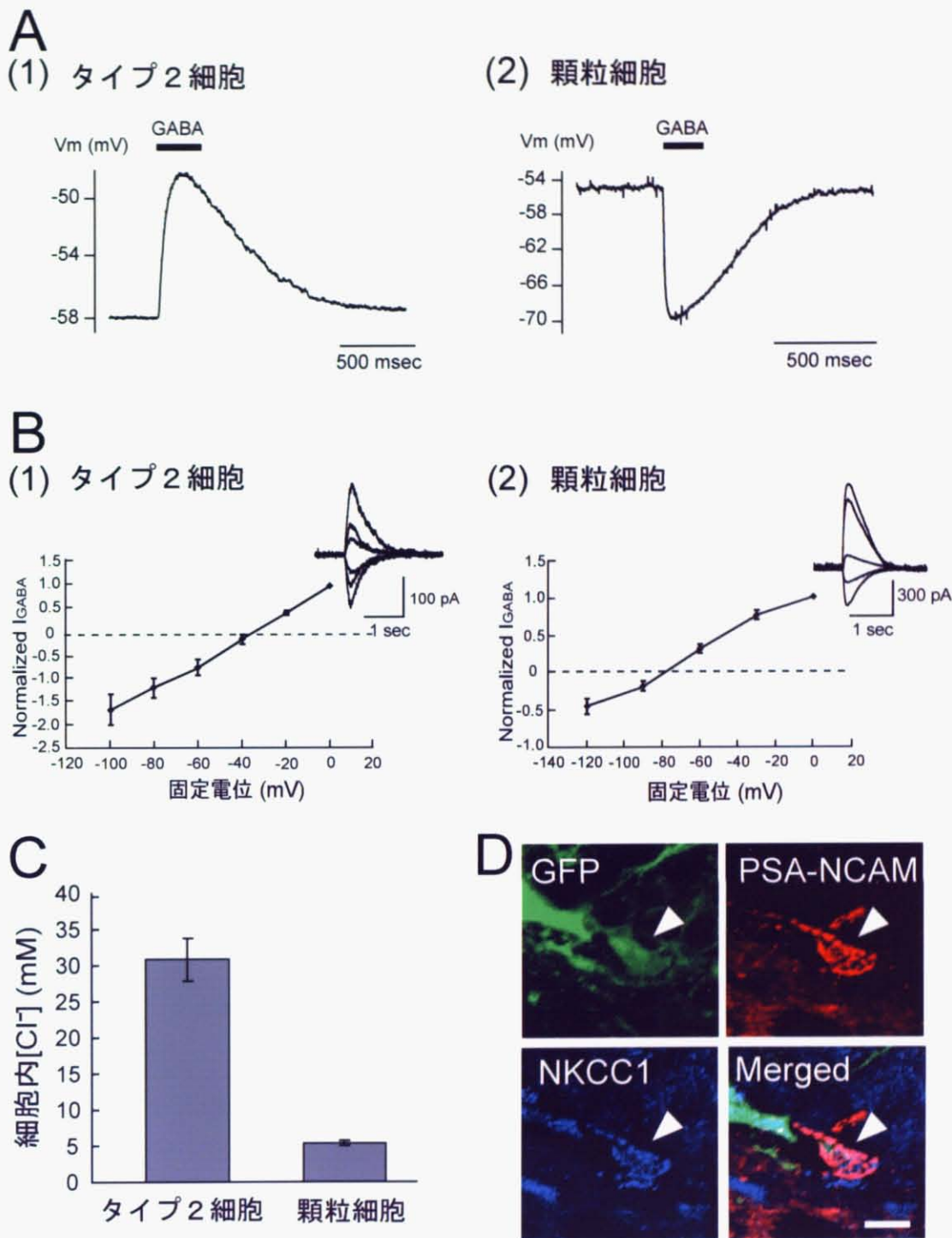


図19:タイプ2細胞は細胞内[Cl<sup>-</sup>]が高く、GABAが興奮性に作用する。

(A)タイプ2細胞と顆粒細胞の膜電位に対するGABAの効果。グラミシジン穿孔パッチ記録下での応答を示している。(1)タイプ2細胞へGABAを投与することで膜が脱分極する。(2)顆粒細胞へGABAを投与することで膜が過分極する。

(B)タイプ2細胞と顆粒細胞のCl<sup>-</sup>の反転電位。グラミシジン穿孔パッチ記録下での応答を示している。(1)はタイプ2細胞におけるCl<sup>-</sup>の反転電位。(2)は顆粒細胞におけるCl<sup>-</sup>の反転電位。挿入図は各固定電位におけるGABA投与による電流応答の変化の例を示す。タイプ2細胞は13個の細胞から、顆粒細胞は10個の細胞から得られたデータである。

(C)Cl<sup>-</sup>の反転電位からネルンストの式を用いて算出されたタイプ2細胞および顆粒細胞の細胞内[Cl<sup>-</sup>]。

(D)タイプ2細胞では、細胞内にCl<sup>-</sup>を組み入れるトランスポーターであるNKCC1の発現が見られた。このトランスポーターの働きにより、細胞内[Cl<sup>-</sup>]が高い状態に保たれていると考えられる。Scale bar: 10 μm

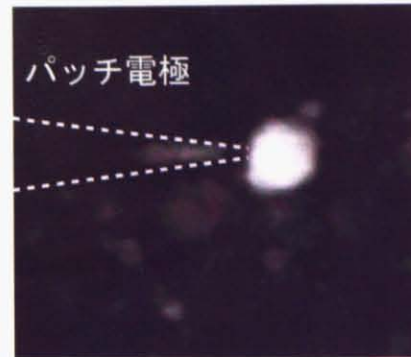
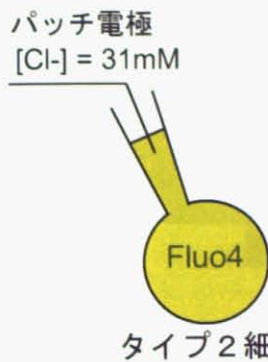
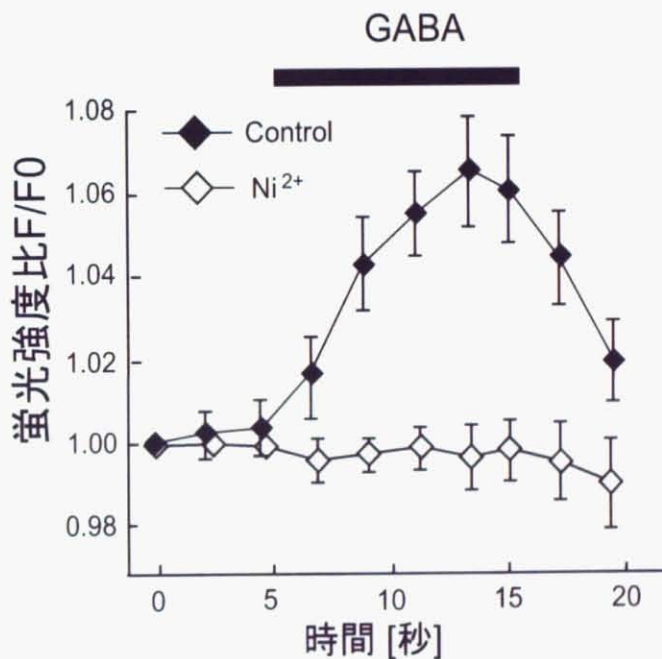
**A**(1) 単一細胞Ca<sup>2+</sup> イメージング (2)**B**

図20:興奮性GABA入力は細胞内への一過的なCa<sup>2+</sup>流入につながる。

(A)単一細胞カルシウムイメージング。(1) カルシウムイメージングの模式図。タイプ2胞における本来の細胞内[Cl<sup>-</sup>]を再現するため、31 mM Cl<sup>-</sup>を含むパッチ内液にカルシウム蛍光指示薬であるFluo-4を溶かした内液を用いた。(2)タイプ2細胞にパッチした実際の様子。

(B)GABA投与により、膜の脱分極が起こり、電位依存性カルシウムチャンネルが開くことで、細胞内への一過的なCa<sup>2+</sup>の流入が起きた。この反応は電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤であるNi<sup>2+</sup>によって阻害された。カルシウム流入反応は、蛍光強度比(F/F<sub>0</sub>)で示してある。

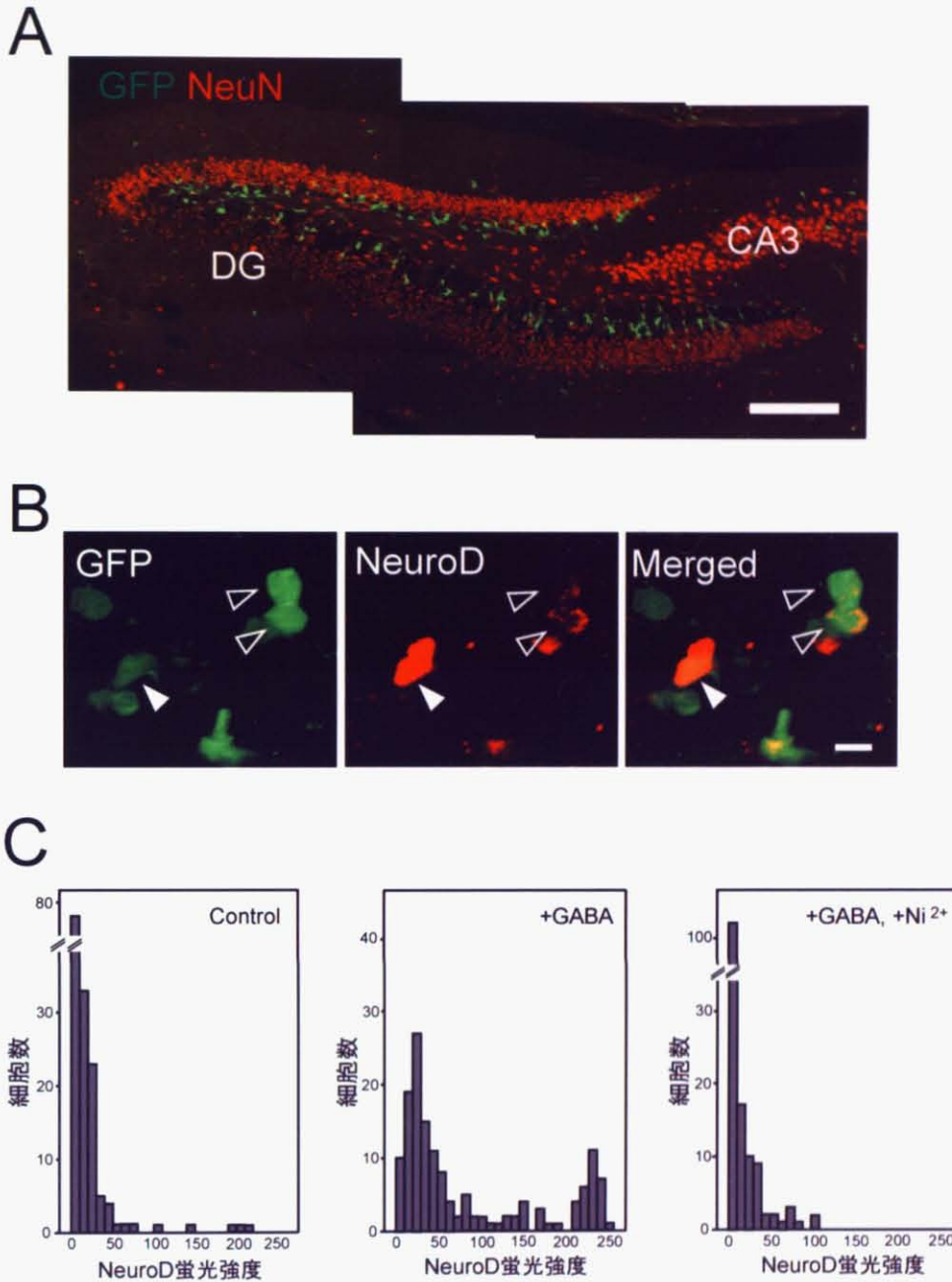


図21:興奮性GABA入力によるCa<sup>2+</sup>流入がニューロン分化を促すNeuroDの発現量を高める。

(A)20時間組織培養した後の海馬の蛍光像。緑はGFP蛍光、赤はNeuN(ニューロン)を示す。海馬歯状回の組織構造は保たれていることがわかる。Scale bar: 200  $\mu$ m

(B)20時間組織培養後のネスチン陽性細胞におけるNeuroDの発現。白塗りの矢頭はNeuroDを強発現するネスチン陽性細胞を示す。中抜き矢頭はNeuroDの発現が低いネスチン陽性細胞を示す。Scale bar: 10  $\mu$ m

(C)コントロール、200  $\mu$ M GABA含培地、200  $\mu$ M GABA + 100  $\mu$ M Ni<sup>2+</sup>含培地でそれぞれ20時間海馬の組織培養を行った後の、ネスチン陽性細胞におけるNeuroDの発現強度の分布を示すヒストグラム。GABA含培地で培養することで、NeuroDを強発現する細胞の割合が増加する。そしてこの増加は、Ni<sup>2+</sup>により阻害される。グラフは任意の150個のネスチン陽性細胞におけるNeuroDの発現強度を測定したものを示してある。

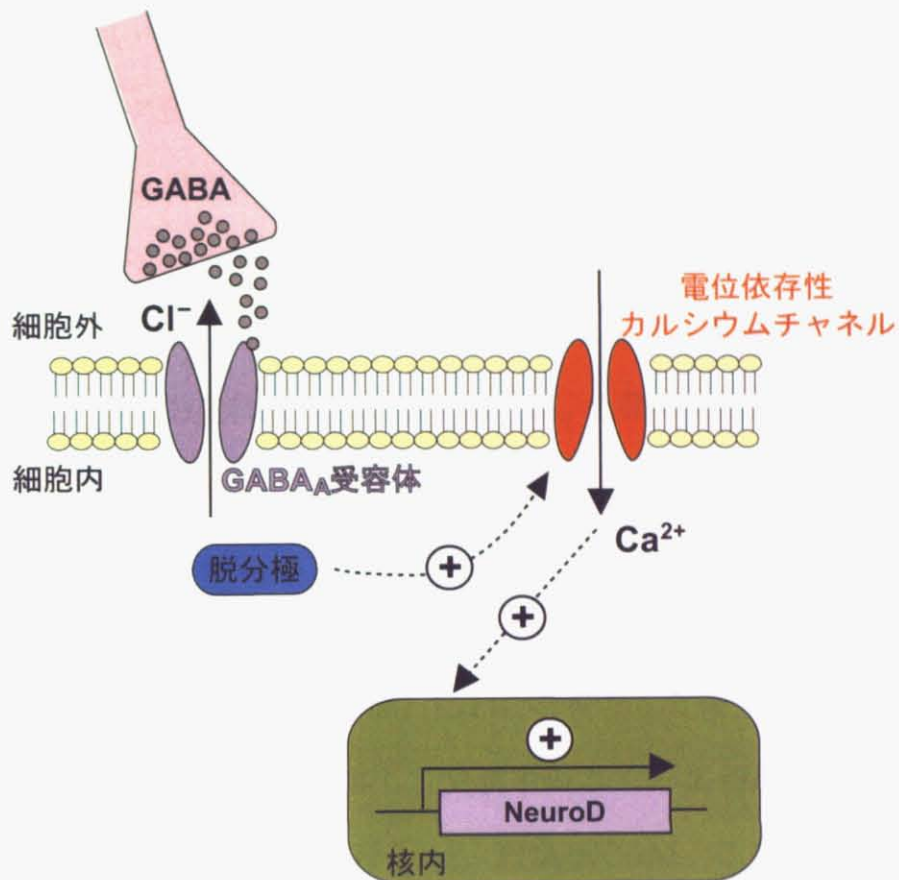


図22:興奮性GABA入力によるニューロン分化メカニズム。

タイプ2細胞は、細胞内[Cl<sup>-</sup>]が高いため、GABA受容体が活性化すると、Cl<sup>-</sup>の流出による膜の脱分極が起こる。そして、電位依存性カルシウムチャネルを介して一過的なCa<sup>2+</sup>が流入する。この反応が引き金となり、ニューロン分化に関わる転写因子NeuroDの発現量が増加し、ニューロン分化が誘導される。VDCC:電位依存性カルシウムチャネル。

#### 4. 興奮性 GABA 入力が成体海馬前駆細胞のニューロン分化を促進させる。

次に *in vivo* においても興奮性 GABA 入力がタイプ 2 細胞のニューロン分化を促進するかについてマウス個体を用いた評価系において検討した。そこで、GABA 性刺激を高める薬剤 (GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニスト) として phenobarbital および pentobarbital、GABA 性刺激を阻害する薬剤 (GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニスト) として picrotoxin および pentylenetetrazone をマウス個体に投与することで、興奮性 GABA 入力がタイプ 2 細胞のニューロン分化に及ぼす影響を調べた。各種薬剤投与によるタイプ 2 細胞への GABA 性刺激の影響は、タイプ 2 細胞の増殖と新生ニューロン数を計測することで評価した。

まず、薬剤投与による GABA 性刺激がタイプ 2 細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。各種薬剤を 3 日間 (1 日 1 回を 3 日間) にわたり投与した後、その 24 時間後に増殖細胞をラベルするため BrdU を投与し、分裂中のタイプ 2 細胞の数を計測した (図 23A)。タイプ 2 細胞は、GFP と PSA-NCAM で共染色される細胞 (GFP<sup>+</sup>/PSA-NCAM<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> 細胞) とした (図 23D)。その結果、GABA 性刺激を高める薬剤を投与した個体群においては、BrdU で標識されたタイプ 2 細胞数がコントロール群に比べ有意に減少していた (phenobarbital, 402 ± 10 cells; pentobarbital, 385 ± 31 cells; control, 509 ± 14 cells, \*P < 0.05)。対照的に、GABA 性刺激を阻害した群においては、BrdU で標識されたタイプ 2 細胞数は有意に増加していた (picrotoxin, 1687 ± 252 cells; pentylenetetrazole, 1457 ± 194 cells, \*P < 0.05) (図 23E)。しかし、各群における BrdU で標識されたタイプ 1 細胞 (GFP<sup>+</sup>/PSA-NCAM<sup>-</sup>/BrdU<sup>+</sup> 細胞) の数には有意差は認められなかった (図 23B, C)。これらの結果から、薬剤投与による GABA 性刺激はタイプ 1 細胞の増殖には影響を与えず、タイプ 2 細胞に特異的に作用し、その増殖を抑えることが強く示唆された。

次にこの興奮性 GABA 刺激がタイプ 2 細胞のニューロン分化を促進させるかを調

べた。BrdU を投与した後、1 日 1 回ずつ計 7 日間にわたり各種 GABA 系薬剤投与を行った。Kempermann らは BrdU を用いた解析から、前駆細胞がニューロンへと分化するまでの期間がおおよそ 5~7 日間であると見積もられているため (Kempermann et al., 2004)、上記の実験系を組み立てた。そして BrdU を投与してから、ニューロンとして十分に成熟したと考えられる 4 週間 (28 日) 後において、新生ニューロン数を計測した (図 24A)。新生ニューロンは、成熟顆粒細胞マーカーである calbindin (Kempermann et al., 2004; Abrous et al., 2005) と BrdU との共染色により同定した (図 24B)。その結果、GABA 性刺激を高めた群は、コントロール群に比べ新生ニューロン数が有意に増加していた。(phenobarbital,  $435 \pm 42$  cells; pentobarbital,  $443 \pm 49$  cells; control,  $296 \pm 35$  cells,  $*P < 0.05$ ) しかし、GABA 性刺激を阻害した群では、新生ニューロン数に有意な差は認められなかった (picrotoxin,  $227 \pm 42$  cells; pentylenetetrazole,  $302 \pm 60$  cells) (図 24C)。

これらの結果から、タイプ 2 細胞への興奮性 GABA 入力伝わることで、ニューロン分化が促され、結果として歯状回における新生ニューロン数が増加したと考えられる。本研究により、成体海馬における神経系前駆細胞のニューロン分化には興奮性 GABA 入力が非常に重要であることが結論付けられた (図 25)。

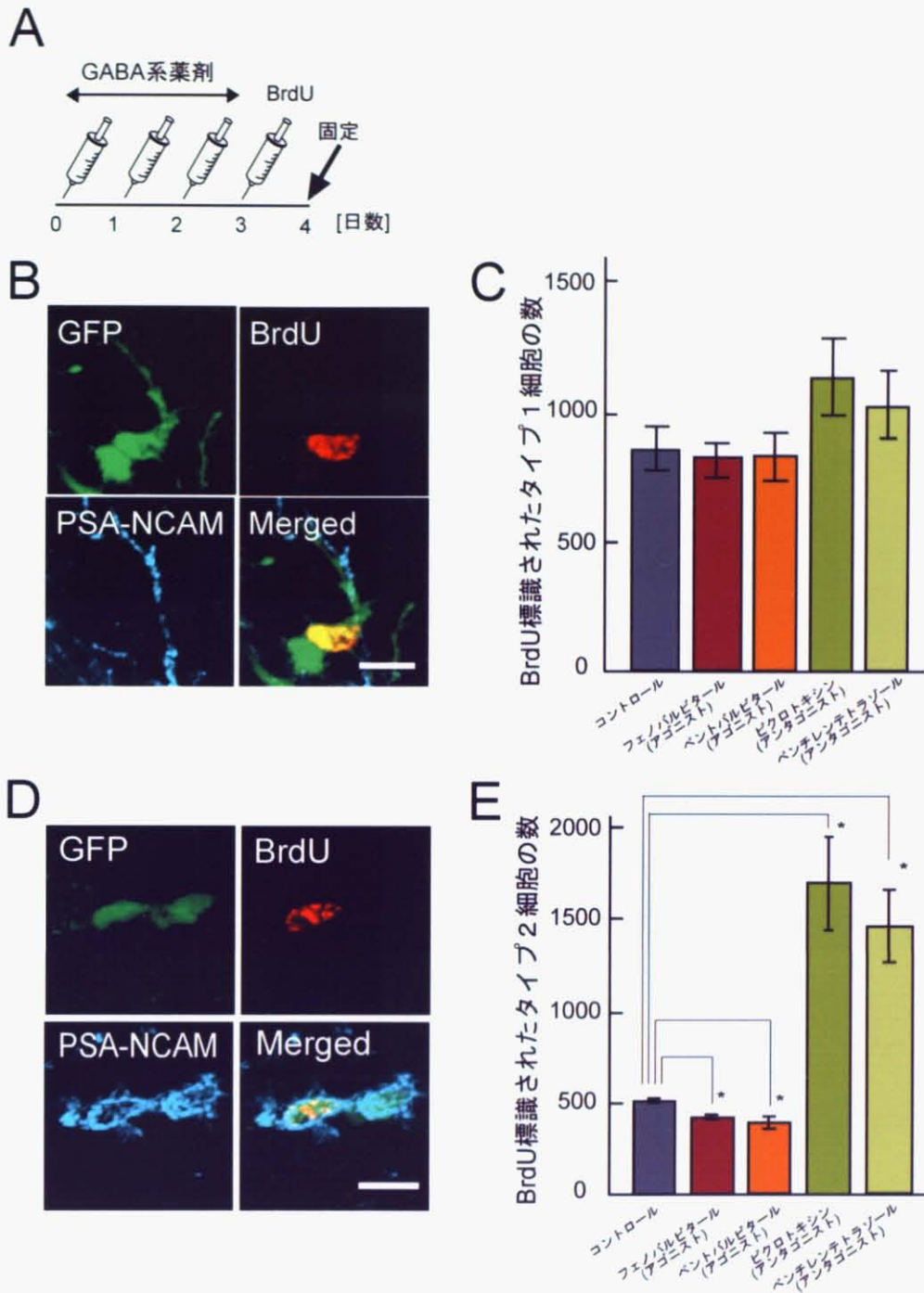


図23: GABA系薬剤をマウス個体に投与した場合のタイプ1細胞およびタイプ2細胞の増殖の変化。

(A) BrdUおよび各種薬剤投与のスケジュール。24時間おきに計3日間GABA系薬剤を投与した。その後、分裂細胞をラベルするためBrdUを投与した。その24時間後に固定した。

(B) BrdUによりラベルされたタイプ1細胞の蛍光像。GFP陽性、PSA-NCAM陰性の細胞をタイプ1細胞とみなした。Scale bar: 10  $\mu$ m

(C) 各種薬剤投与に対するタイプ1細胞の増殖の変化。GABA系薬剤投与に対するタイプ1細胞の増殖には有意な差は見られなかった。

(D) BrdUによりラベルされたタイプ2細胞の蛍光像。GFP陽性、PSA-NCAM陽性の細胞をタイプ2細胞とみなした。Scale bar: 100  $\mu$ m

(E) 各種薬剤投与に対するタイプ2細胞の分裂能の変化。GABAA受容体アゴニストを投与した群では、BrdU標識されたタイプ2細胞数の顕著な減少が見られた。増殖が抑えられたと考えられる。対照的に、GABAA受容体アンタゴニストを投与した群では、BrdU標識されたタイプ2細胞数の顕著な増加が見られた。増殖が促進されたと考えられる。(\* $P < 0.05$ )

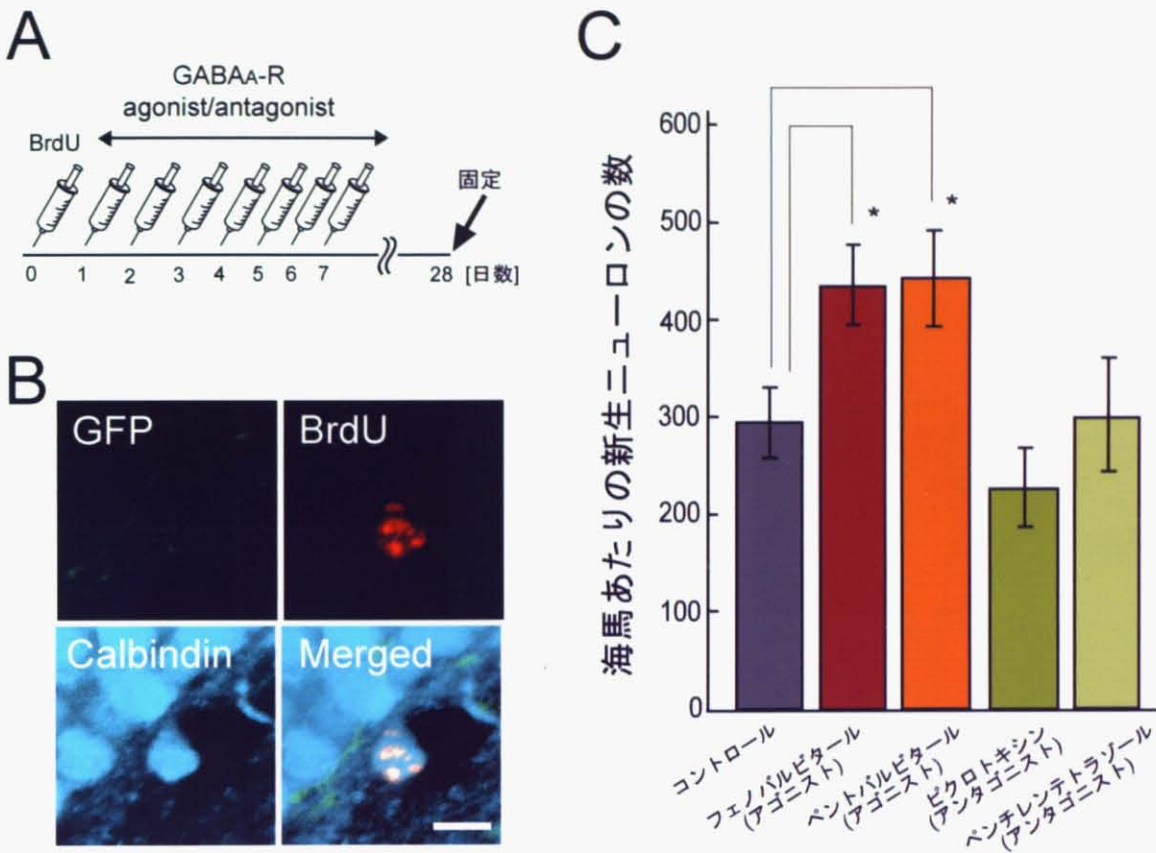


図24: GABA<sub>A</sub>受容体に対する薬剤をマウス個体に投与した場合の海馬における新生ニューロン数の変化。

(A) BrdUおよび各種薬剤投与のスケジュール。BrdUを投与した24時間後から、7日間にわたり各種GABA系薬剤をマウス個体に投与した。BrdUを投与してから28日後(1ヵ月後)にマウスを固定した。

(B) BrdUによりラベルされた新生ニューロン。成熟顆粒細胞マーカーであるcalbindinを発現している。Scale bar: 10  $\mu$ m

(C) 各種薬剤に対する海馬あたりの新生ニューロン数の変化。GABA<sub>A</sub>受容体アゴニストを投与した群では、新生ニューロン数の顕著な増加が見られた。GABA<sub>A</sub>受容体アンタゴニストを投与した群では、新生ニューロン数の変化は見られなかった。



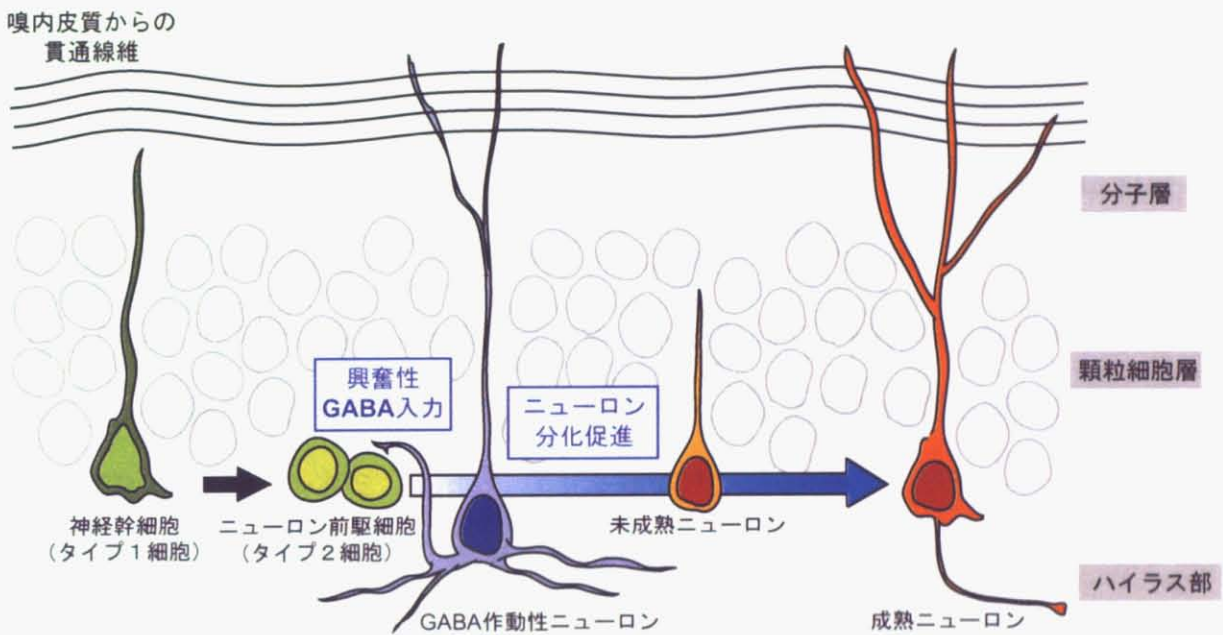


図25:成体海馬において新しくニューロンが生まれるまで。

タイプ1細胞から、タイプ2細胞が発生する。このタイプ2細胞に周囲のGABA作動性ニューロンからシナプス様入力があることがわかった。貫通繊維にシータ波が伝わると、GABA作動性ニューロンが興奮し、タイプ2細胞はGABA作動性ニューロンから興奮性GABA入力を受け取る。この入力により、タイプ2細胞のニューロン分化が促進され、新生ニューロンへと成熟し、海馬神経回路に機能的に組み込まれる。

## 考察

### 1. 成体海馬神経系前駆細胞へのシナプス性 GABA 入力

本研究において驚くべき結果だったのは、成体海馬の神経系前駆細胞（タイプ 2 細胞）が周囲の神経回路網からシナプス性の入力を受け取っていたということである。興味深いことに、この入力は興奮性の GABA 入力であった。これまでも成体海馬のニューロン新生過程において、神経系前駆細胞への興奮性シグナルがニューロン分化を促すことが示唆されてきた（Deisseroth et al., 2004）。通常、成体脳内における主な興奮性シナプス伝達はグルタミン酸を介したシナプスによる。そのため、神経回路からのグルタミン酸（特に NMDA 受容体を介した入力）が神経系前駆細胞に作用し、ニューロン新生を促していると考えられてきた。また記憶の素過程であると考えられる LTP 現象もグルタミン酸性入力によって誘導されることが明らかとなっている（Malenka and Nicoll, 1999）。海馬が記憶中枢であること、また新生ニューロンが新しい記憶形成に関与しているであろうことから、グルタミン酸による興奮性入力がニューロン新生を促していると考えられてきたのであろう。しかし本研究から、神経系前駆細胞は GABA 入力を受け取っており、グルタミン酸を介した入力（NMDA 受容体および AMPA 受容体を介した入力）は受け取っていなかった。そして神経系前駆細胞への GABA 入力は興奮性であったことも驚くべき結果であった。また本研究とは独立に、Wang らのグループも nestin<sup>P</sup>-GFP マウスを用いた解析で、タイプ 2 細胞が GABA 入力を受け取っていることを報告している（Wang et al., 2005）。以上の結果より、タイプ 2 細胞がシナプス性の GABA 入力を受け取っていたことはより確かなものと言え、分裂中の神経系前駆細胞にシナプスがあるという極めて新規性の高い発見となった。

しかし神経系前駆細胞が分化段階初期において GABA 入力を受け取っていたことは、決して奇妙なことではないと考えられる。大脳皮質や海馬の初期発生過程におい

て、神経系前駆細胞は GABA 性入力を受け取っている。(LoTurco et al., 1995; Khazipov et al., 2001)。成体嗅球におけるニューロン新生過程においても、神経系前駆細胞への最初の神経入力は GABA 性の入力であり、次いでグルタミン酸性入力を受け取ることが報告されている (Wang et al., 2003; Carleton et al., 2003)。これらのことから、ニューロン分化過程において、神経系前駆細胞の GABA への反応性の獲得は非常に早い時期から始まることが考えられる。しかしタイプ 2 細胞よりも分化段階の早い細胞であるタイプ 1 細胞は GABA への応答を示さなかった。タイプ 1 細胞からタイプ 2 細胞へ分化することで、神経刺激に対する反応性 (GABA 受容体の発現と膜興奮性) を獲得するのかも知れない。

一方、成体海馬の新生ニューロンがグルタミン酸の入力を受け取るのは、新生後 2 週目程度からであることが、レトロウイルス標識法を用いた新生ニューロンの分化を経時変化により解析した研究から明らかとなった。しかもこの段階では、AMPA 受容体を介した入力であり、NMDA 受容体を介した入力はさらに分化が進んでからである (Esposito et al., 2005; Ge et al., 2005)。ニューロン新生過程初期において、神経系前駆細胞が GABA 性入力を受け取っていることは発達期と成体期で共通の現象と考えられるが、これら神経系前駆細胞を取り囲む環境は大きく異なる。発達期海馬においては GABA 性神経回路が形成された後、グルタミン酸性神経回路が形成される (Ben-Ari, 2002)。しかし成体海馬においては、GABA 性神経回路もグルタミン酸性神経回路もすでに機能を持った神経回路として存在しているが、神経系前駆細胞が GABA 性入力から受け取るとは興味深い現象である。また発達期とは異なり、神経系前駆細胞はシナプスを介して入力を受け取っていたことも興味深い現象であった。このことは、神経回路の活動がニューロン新生過程に直接的に働きかけていることを示す重要な知見であると考えられる。

## 2. GABA で興奮：成体海馬においてニューロン分化を促す仕組み

発達期において、GABA は神経系前駆細胞や未成熟ニューロンに対して興奮性に作用することで、細胞内への一過的なカルシウムの流入を引き起こす。この興奮性 GABA 入力に伴うカルシウム流入が、神経系前駆細胞の細胞分裂を停止させニューロン分化を促すことが報告されてきた (LoTurco et al., 1995)。本研究においても、タイプ 2 細胞は GABA 刺激で脱分極することが明らかとなった。GABA による脱分極は、引き続き細胞内へのカルシウム流入を誘起させ、ニューロン分化を誘導する転写因子 (NeuroD) の発現量を上昇させることで、ニューロン分化を促すことが強く示唆された。Deisseroth とも、成体海馬から樹立された神経系前駆細胞を用いた解析の中で、神経系前駆細胞が電氣的に興奮することで一過的なカルシウム流入が起こり、ニューロンへの分化が促されることを示し、前駆細胞からニューロンへの分化には膜の脱分極が重要であることを主張している (Deisseroth et al., 2004)。また彼らは、神経系前駆細胞への興奮性シグナルは、神経系前駆細胞の維持やニューロン分化の抑制に関わる *Hes1* および *Id2* といった bHLH 転写因子の発現量を下げ、対照的にニューロンへの分化を促す *NeuroD* の発現を誘導することを示している。

Ge らの研究から、RNAi を用いて成体海馬の新生細胞 (神経系前駆細胞～未成熟ニューロン) は新生後 2～3 週目までは、GABA が興奮性に作用すると報告している (Ge et al., 2005)。その中で、新生ニューロンへの興奮性 GABA 入力を阻害することで、樹状突起の発達や神経回路網への組み込みが著しく害されることを示しており、興奮性 GABA 入力は、神経系前駆細胞のニューロン分化のみならず、新生ニューロンが回路網へ機能的に組み込まれるためにも非常に重要であると考えられる。

GABA による興奮性入力は NeuroD 遺伝子の他に、細胞の分化やシナプス形成を促進する転写因子である CREB の活性化 (リン酸化) にもつながることが示唆されている (Overstreet-Wadiche et al., 2006)。また、リン酸化 CREB は新生ニューロ

ンの樹状突起の発達を促していることも報告されている (Fujioka et al., 2004)。神経系前駆細胞への興奮性 GABA 入力も CREB のリン酸化につながり、ニューロン分化を促すことが十分に考えられる。

これまで、成体海馬のニューロン新生過程における GABA 系の関与は注目されてこなかった。通常成体脳内において GABA は抑制性神経伝達物質として働いているため、神経系前駆細胞にも抑制的に働いていると考えられていたのかもしれない。その一方で、神経活動が高まることで回路網からのグルタミン酸が神経系前駆細胞への興奮性作用をもたらすことで、ニューロン新生を促していると考えられてきた。しかし本研究から、神経系前駆細胞への興奮性 GABA 入力がニューロン分化を促す重要なシグナルとして働いていることが明らかとなった。

### 3. 海馬神経回路の活動によるニューロン新生の制御機構

成体海馬におけるニューロンの新生は、神経伝達物質の投与や癲癇による神経回路の過剰興奮によって亢進することが示されてきた (Bengzon et al., 1997; Parent et al., 1997; Nakagawa et al., 2000)。特に側頭葉癲癇を被った場合においては、海馬の GABA 作動性ニューロンの脱落が報告されている (de Lanerolle et al., 1989; Mathern et al., 1995)。動物に薬剤を投与した実験的な癲癇モデルにおいても、同様に海馬の GABA 作動性ニューロンの脱落が見られ (Obenaus et al., 1993; Houser and Esclapez, 1996)、海馬歯状回顆粒細胞の抑制が低下している (Kobayashi and Buckmaster, 2003)。癲癇状態においては、GABA 作動性ニューロンが脱落することにより、神経系前駆細胞への GABA 入力も減少していることが十分に考えられる。そして本研究で GABA 受容体阻害剤を投与した場合と同様に、神経系前駆細胞の増殖が亢進していることが考えられる。

これまでに、NMDA 受容体阻害剤を投与した動物においても、成体海馬神経系前駆細胞の増殖が亢進することが示されてきた (Cameron et al., 1995; Nacher et al., 2001)。このことから、成体海馬神経系前駆細胞は NMDA 受容体を介したグルタミン酸の入力を受け取っており、この入力が神経系前駆細胞の増殖や分化に関わっていると考えられてきた。しかし、本研究および同一の動物を用いた Wang らのグループ (Wang et al., 2005) から、タイプ 1 細胞およびタイプ 2 細胞のいずれにおいても、NMDA 受容体を介した入力は確認されていない。NMDA 受容体を介した神経入力を受け取るのは、3-4 週以降であることが示唆されている (Esposito et al., 2005; Ge et al., 2006; Tashiro et al., 2006)。

海馬 GABA ニューロンからの GABA の放出には、NMDA 受容体の活性化が必要であり (Matsuyama et al., 1997)、GABA 作動性ニューロンの軸作末端からの GABA 放出は NMDA 受容体阻害剤によって阻害されることが示されている (Rosenblum et al., 1999)。これらのことを考慮すると、これまで報告されてきた NMDA 受容体阻害剤の投与により海馬ニューロン新生が影響を受けた例は、NMDA 受容体阻害剤の神経系前駆細胞への直接的な効果ではなく、GABA 作動性ニューロンへ作用することで神経系前駆細胞への GABA 入力が増加した結果なのかも知れない。また神経回路の活動の変化に伴う何らかの影響であると考えられる。

また海馬 GABA 作動性ニューロンからの GABA 放出は、セロトニン系伝達システムやカンナビノイドといった神経活動修飾物質等によっても制御されることが報告されている (Matsuyama et al., 1997; Katona et al., 1999)。これまでも、成体海馬のニューロン新生は、セロトニン系神経伝達により促進されること (Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003; Radley and Jacobs, 2003) や、CB1 カンナビノイド受容体ノックアウト動物において減少している (Jin et al., 2004)。しかし、依然としてこれらの情報伝達系が、どのようにして海馬ニューロン新生過程に働きかけて

いるかについての詳しいメカニズムはわかっていない。神経系前駆細胞がこれらの刺激に対して反応することで増殖や分化が促されるのかも知れない。また、GABA 作動性ニューロンの発火を調節することで、間接的に神経系前駆細胞に働きかけるのかも知れない。今後、それらの神経伝達の修飾に関わる物質と、ニューロン新生との関わりについての明らかにしていくことが大きな課題であろう。

本研究において、興味深いことに海馬スライスにムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストであるカルバコールを還流することで、タイプ 2 細胞への GABA 入力 が伝達された。海馬歯状回へは、中隔核 (septum) からのアセチルコリンの投射があり、このアセチルコリンの投射が海馬におけるシータ波の発生に関わっていることが示唆されている (Lee et al., 1994)。げっ歯類において、学習行動 (特に探索行動) 中には、海馬でシータ波が観察され、このシータ波が新しい記憶の形成に深く関わっていることが示唆されている (Bragin et al., 1995; Chrobak et and Buzsaki, 1998; Buzsaki, 2002; Csicsvari et al., 2003)。シータ波は、GABA 作動性ニューロン同士がリズムを刻む (周期的に発火) ことによって発生すると考えられている (Bragin et al., 1995)。多種ある GABA 作動性ニューロンの中でも、パルブアルブミン陽性のニューロンは高頻度で発火する特性を持つと同時に、互いにギャップジャンクションで結合しており、同期発火に適していると考えられている (Meyer et al., 2002)。急性脳スライスにおいても、ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストであるカルバコールを投与することで、実験的にこれらのニューロンの同期発火が観察されており、スライスレベルでの海馬学習モデルとして研究がなされてきた (Fisahn et al., 1998; Fellous and Sejnowski, 2000)。本研究からも、タイプ 2 細胞に対してパルブアルブミン陽性ニューロンが投射していることを示唆する結果が得られた。学習行動時にこの GABA 作動性ニューロンの活動が高まることで、タイプ 2 細胞への GABA の供給が行われ、ニューロンへの分化を促しているのかも知れない。今後、これら両者の直

接的な関係を明らかにする必要がある。

また本研究において、海馬へのメインインプットである貫通繊維を実験的にシータ波刺激することでもタイプ2細胞へGABA性刺激が伝わることが示された。シータ波刺激によりGABA作動性ニューロンが興奮し、タイプ2細胞へのGABAの供給が行われたと考えられる。このことより、動物が学習行動時や記憶の形成時にシータ波が発生することで、タイプ2細胞へGABA入力が伝わるということが十分に考えられ、その結果、ニューロン分化が促されるのではないかと考えられる。実際これまでに、動物に海馬依存的な学習行動を行わせることで、成体海馬における神経系前駆細胞の増殖が抑えられるとの報告もある (Dobrossy et al., 2003)。学習行動により、海馬回路の活動が高まることで、神経系前駆細胞へのGABA入力が増加し、終末分化を促してのではないかと考えられる。また、豊かな環境 (回転車や遊び道具が豊富にある広い飼育環境) においてニューロン新生が促されることが示されており (Kempermann et al., 1997)、動物を豊かな環境におくことが、神経系前駆細胞のニューロンへ分化を促進する効果があることが示されてきた (Kronenberg et al., 2003)。本研究および先行研究から得られた知見から、動物が豊かな環境に置かれることで探索行動を行い、シータ波が発生することで神経系前駆細胞にGABA入力が伝わり、ニューロン分化が促進されるのではないかと考えられる。

#### 4. 海馬ニューロン新生現象における今後の課題

「成体海馬におけるニューロン新生」はヒトを含む成体哺乳類において保存されている脳のユニークな性質である。海馬は記憶機能に始まり、抑うつ防止などの感情面に至るまで、幅広い働きをしている。そして、新生ニューロンそのものが新しい記憶の形成や感情の統制に関与していることが示唆されてきたが、まだ新生ニューロンの



もつ詳細な機能は明らかにされていない。今後は、新生ニューロンが海馬回路に果たす役割について明らかにしていくことが大きな課題であろう。また大脳皮質を含め、成体脳内には神経系前駆細胞としての性質を保持した細胞が広く分布している。しかし現在のところ、ニューロンの新生が起きているのは海馬と側脳室周辺部（ヒトでは海馬のみ）に限られている。なぜこの限られた領域においてのみ生涯に渡りニューロンが新生しているのか。換言すれば、他の領域では何故神経系前駆細胞が存在するのに、ニューロンの新生は起きていないのか。この問題は、本研究分野における最大とも言える大問題であるが、今後明らかにしなければならない重要な課題である。

本研究では、ニューロン新生過程における神経系前駆細胞と海馬神経回路との機能的関わりについての解析を行った。その結果、回路網からの興奮性 GABA 入力が神経系前駆細胞に働きかけることで、ニューロンの新生を促進していることを突き止めた。そして、学習行動時に特徴的に見られる脳波であるシータ波と同じ刺激を加えることで、前駆細胞への GABA 入力が伝わることを示された。このことは、学習行動により、海馬ニューロン新生が促進されるメカニズムの一つであると考えられる。今後、詳細に成体海馬におけるニューロン分化メカニズムや新生ニューロンの生理機能が詳細に解明されることで、海馬機能の解明や記憶のメカニズムの理解につながることを期待できる。