

博士論文

# 活動依存的な神経幹細胞の増殖に関する研究

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

細胞応答化学研究室

能智 禄弥

指導教官 久恒辰博 准教授

## ～ 目次 ～

要旨	3
はじめに	8
第 1 章 脳梗塞後の特異的な海馬神経活動の高まりによる神経幹細胞増殖の制御	
1.1 序論	17
1.2 実験方法	20
1.3 結果	36
1.4 考察	51
第 2 章 脳梗塞後の神経活動の高まりによるグルタミン酸放出が誘導する神経幹細胞の増殖	
2.1 序論	57
2.2 実験方法	61
2.3 結果	79
2.4 考察	97
第 3 章 シーター波による神経幹細胞の増殖制御	
3.1 序論	104
3.2 実験方法	107
3.3 結果	113
3.4 考察	119
第 4 章 総括	121
略語	126
補助資料	129
参考文献	132
謝辞	146

## 要旨

論文題目： 活動依存的な神経幹細胞の増殖に関する研究

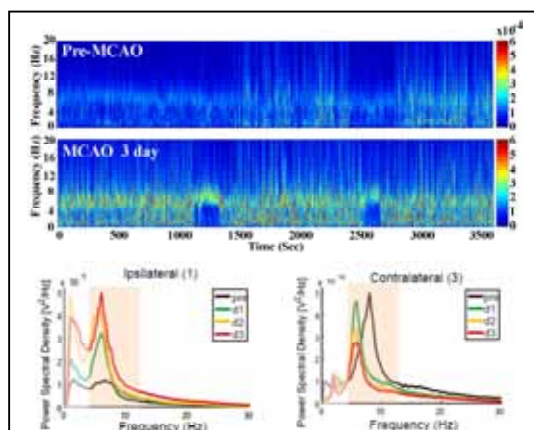
氏名：能智 禄弥

### 【序論】

我々大人の脳では、新しく神経細胞が生まれてくる事はないと信じられてきた。しかしながら、この通説は近年の研究によって否定され、成体の脳でも海馬歯状回（dentate gyrus : DG）では日常的に新しく神経細胞が生み出され、既存の神経回路に組み込まれる事が分かってきた。更に、新生神経細胞は、脳が担う記憶や学習などの高次機能に対して貢献している事が示されている。これら新生神経は、様々な環境要因によって細胞増殖が促進される事が知られている。例えば、“自発運動”や“豊かな刺激の多い環境”などの生理学的な環境や、“脳梗塞”や“癲癇”などの病態学的な状況により、海馬で生み出される神経細胞数は増加する。しかしながら、これらの環境要因による成体での神経新生の増加がどのように制御されているかは明確にはなっていない。また、上記とは別に海馬における神経新生は、海馬神経活動の高まりにより促進される事が認められている。神経活動の高まりと神経新生の関連性については、依然その制御機構について更なる研究が必要であるが、神経新生と神経活動によるシナプスより放出される各神経伝達物質による神経新生の調整機構が示されている。この海馬における神経新生は、海馬に存在する神経幹細胞及び神経前駆細胞により制御されている。初期段階では神経幹細胞から神経前駆細胞が生み出され、その後成熟神経細胞へと分化していく事が示されている。

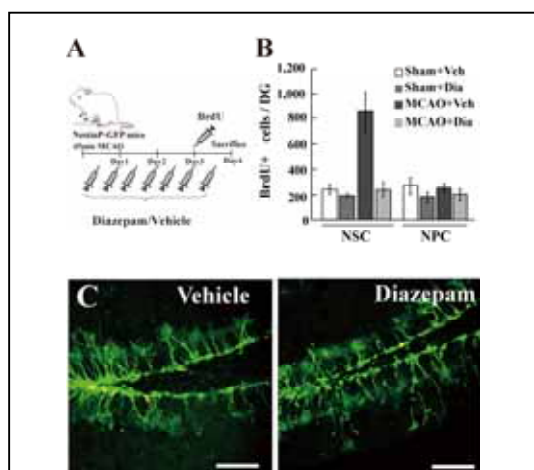
本研究では、海馬神経活動と神経新生の関係性を解明する為、神経新生の初期段階に着目し神経新生の細胞を生み出す元となる神経幹細胞について、海馬神経回路が活性化した場合に受け取るシグナルの特定を行い、神経活動依存的な神経幹細胞の増殖機構の解明を目的とした。また、本研究でも確認されたシーター波と呼ばれる海馬で見られる特徴的な神経活動パターンについて、その神経幹細胞の増殖との関連性を解析する事も目的とした。

## 結果



**図1:MCAO 後の神経活動の高まり**

脳梗塞後、梗塞半球側で特異的に活動が高まった。また、その活動パターンは 4-12Hz 帯のシーター波が特異的に増強していた。



**図2:Diazepam による MCAO 後 NSC 増殖抑制**

脳梗塞後、Diazepam を投与する事で活動の高まりを抑制でき、NSC 増殖を抑制できた。Scale bar: 75μm

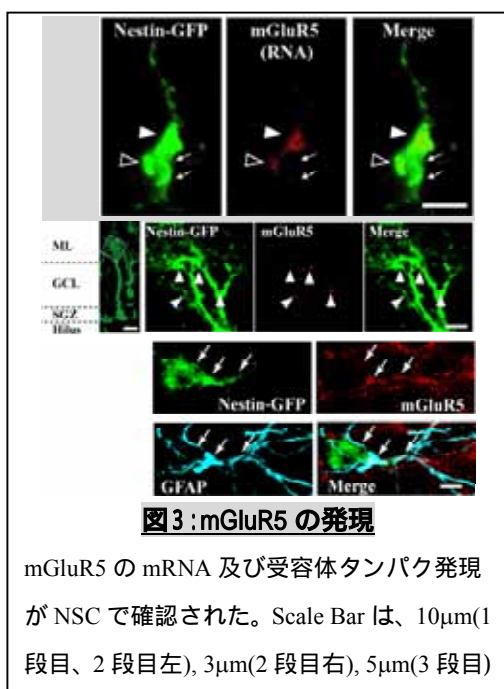
## 第1章:脳梗塞後の特異的な神経活動の高まりによる幹細胞増殖の制御

本研究では、脳梗塞モデルを選択し研究を実施した。選択した理由として、脳梗塞後の新生神経細胞数の増加が傷害を受けた半球の海馬でのみ強く起こる事が分かっており、反対半球との比較をする事で海馬環境と新生神経細胞数の増加との関連性を確認できる良いモデルと考えられる事があげられる。そこで、本実験では *in vivo* 条件下で海馬 DG に神経活動を記録する電極を埋め込み、脳梗塞後の海馬神経活動の変化を測定した。その結果、梗塞半球側の海馬での特異的な海馬神経活動の高まりが確認できた(図1)。この高まりは、GABA 受容体の Active Modulator である Diazepam を投与する事で抑制する事ができた。脳梗塞モデルマウスへ分裂中の細胞をラベルする事ができる BrdU を投与し細胞種の解析をしたところ、脳梗塞後初期の段階で神経幹細胞(Neural Stem Cell: NSC)が特異的に分裂している事が確かめられた。この NSC の特異的な増殖は、GABA 受容体の Active Modulator である Diazepam を投与する事で抑制すると見られなかった(図2)。この事から、脳梗塞後の NSC の増殖は海馬神経活動により引き起こされている事が示唆された。

## 第2章:脳梗塞後の神経活動の高まりによるグルタミン酸放出が誘導する神経神経幹細胞の増殖

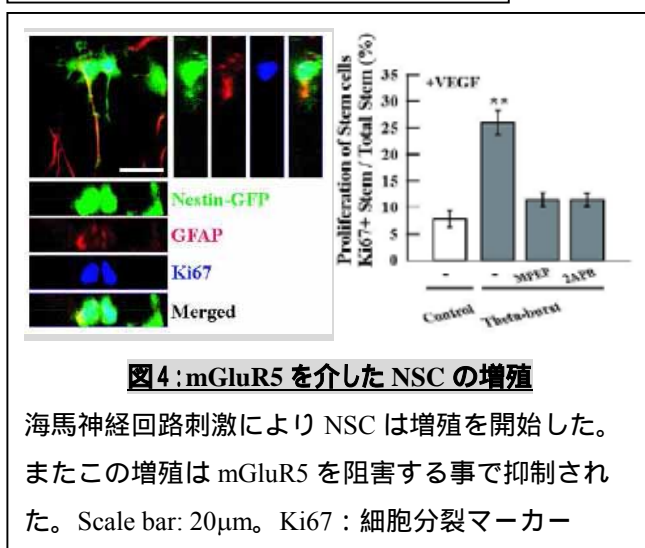
次に、脳梗塞後の神経活動が誘導する神経幹細胞の増殖が、こういった機構で制御されているか解析を行った。神経幹細胞の特定は、NestinP-GFP トラ

ンスジェニックマウスを用いて、当研究室の報告の通り、海馬 DG に存在する GFP 陽性細胞の内、海馬顆粒細胞層へ突起を有する特徴的な形態及びグリア細胞マーカーである GFAP タンパク及び Nestin の発現により NSC を特定した。この NSC に対して免疫染色法及び *in situ* hybridization 法を用いて解析した結果、代謝型グルタミン酸受容体の一種である metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)の発現が認められた(図3)。この NSC が発現している mGluR5 が機能的に細胞内へのシグナル伝達がされているかを確認する為、細胞内カルシウムイメージ

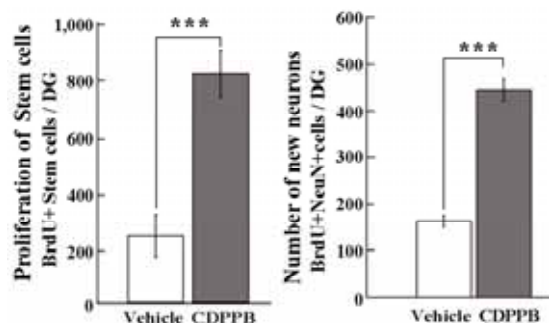


ング法にて mGluR5 刺激後のカルシウム濃度の変化を測定した。その結果、NSC は mGluR5 のリガンドであるグルタミン酸及びアゴニストである CHPG 刺激により細胞内のカルシウム濃度の上昇が確認され、mGluR5 シグナルは確かに NSC 内でシグナル伝達が行われる事が確認された。

次に、mGluR5 シグナルにより、海馬神経回路活動の高まりによって NSC を活性化させるかを検証した。まず初めに急性スライス条件下で人工的に海馬回路へ刺激を与えたところ、NSC での細胞内カルシウム上昇が確認された。また、この人工的な刺激により NSC 内での c-Fos タンパク(細胞が活性化(遺伝子転写が開始し始める状態))した際に発現されるタンパク)の発現、及び細胞分裂のマーカである Ki-67 タンパクの発現が確認された。この c-Fos

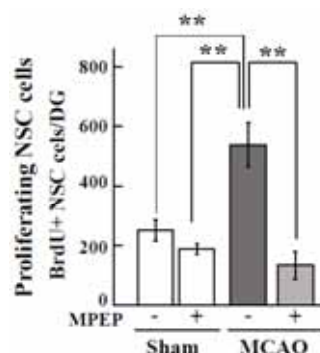


及び Ki-67 タンパクの発現については、mGluR5 のアンタゴニストである MPEP 及び mGluR5 の下流シグナルの阻害剤である 2APB により抑制された(図4)。このことから、海馬神経活動が高まった状況下において、NSC は神経回路から mGluR5 を介した刺激を受け取り、活性化及び細胞分裂の上昇が起こる事が示唆された。また、mGluR5 の Positive modulator である CDPPB をマウスへ投与したところ、NSC の増殖及び成熟神経細胞の増加が確認された(図5)。そこで、この神経活動に依存した NSC の増殖が mGluR5 を介して誘導されているかを確認する為、脳梗塞マウスに mGluR5 の阻害薬 MPEP を投与し解析したところ、脳梗塞後の NSC の増殖は阻害されていた。このことから、NSC は海馬神経活動の高まりに応じて mGluR5 を介して活性化し細胞増殖が上昇する事が確認された(図6)。



**図 5 : mGluR5 刺激による神経新生**

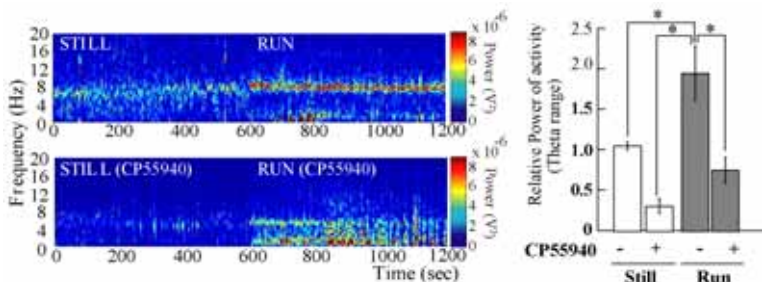
mGluR5 刺激により NSC は増殖を開始し、更に 28 日後には成熟神経細胞へ分化していた。BrdU:分裂細胞指標物質、NeuN:成熟神経細胞マーカー



**図 6 : mGluR5 シグナル阻害による MCAO 後 NSC 増殖抑制**

脳梗塞後、mGluR5 阻害薬である MPEP を投与する事で NSC 増殖を抑制できた。

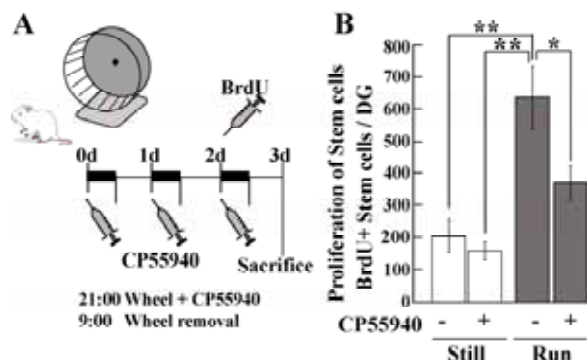
### 第 3 章 : シーター波による神経幹細胞の増殖制御



**図 7 : 自発運動時の海馬活動**

自発運動時の海馬のシーター波はカンナビノイド受容体のアゴニスト CP55940 でリズムが乱れる事が確認された。

最後に、海馬で高まる神経活動の活動パターンについて注目し、活動パターンと神経幹細胞の増殖との関連性を確認した。シーター波は海馬神経活動が高まる学習や自発運動などで見られる特徴的なパターンである。第 1 章の結果においても、このシ



**図 8 : CP55940 による自発運動時の NSC 増殖の抑制**

CP55940 投与後、自発運動をさせたところ、自発運動により誘導される NSC の増殖が抑制された。

ーター波の高まりが確認されている。そこで、神経幹細胞のこの活動パターンが重要ではないかと考えた。実験として、自発運動中のマウスにシーター波のリズムを乱す事が知られているカンナビノイド受容体のアゴニストである CP55940 を投与し、神経幹細胞の増殖への影響を確認した。その結果、CP55940 投与によりシーター波のリズムを乱す事が確認された(図 7)。また、CP55940 投与により、自発運動が誘導する神経幹細胞

の増殖が抑制された（図 8）。この事は、活動依存的な神経幹細胞の増殖に関して、海馬活動が無秩序に高まるのではなく、シーター波が増強する事が必要である事が確認された。

## **結論**

本研究により、海馬に存在する神経幹細胞は mGluR5 を介して海馬神経活動の高まりを感知し、それに応じて活性化し細胞増殖が上昇する事が確かめられた。また、この機構は脳梗塞後の海馬でも確認された。脳梗塞後の新生神経細胞の増加については、この新しい機構の発見により、これまで謎であった梗塞半球側のみに特異的に増加が見られるという事象に対しても明確な回答を与えている。また、海馬神経新生を誘導するには、特徴的な海馬神経回路の活動パターンが必要である事が確認された。

海馬新生神経細胞は、記憶などの重要な機能に関与しており、鬱病や統合失調症などの精神疾患との関与も指摘されている。また、脳梗塞後においても海馬依存的な記憶に障害が出る事も報告されており、mGluR5 シグナルを制御する事により精神疾患や脳障害後の脳機能の修復に対して有用な治療法の開発にも繋がると考えられる。

## **【内容を発表した論文】**

平成 24 年 8 月 European Journal of Neuroscience, Vol.36, issue3, P 2273 ~ 2283

“Involvement of metabotropic glutamate receptor 5 signaling in activity-related proliferation of adult hippocampal neural stem cells” (能智禄弥、加藤智将、金子順、伊藤佳絵、栗林寛、福田諭、寺園泰、眞溪 歩、金谷繁明、仲嶋一範、久恒辰博)

## はじめに

我々大人の脳では、新しく神経細胞が生まれてくる事はないと信じられてきた(Altman & Das, 1965; 1967; Kaplan & Hinds, 1977)。しかしながら、この通説は近年の研究によって否定され、成体の脳でも海馬歯状回 (dentate gyrus : DG) では日常的に新しく神経細胞が生み出され、既存の神経回路に組み込まれる事が分かってきた(Altman & Das, 1965; 1967; Kaplan & Hinds, 1977; Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Eriksson *et al.*, 1998; Kornack & Rakic, 1999; van Praag *et al.*, 2002; Abrous *et al.*, 2005; Aimone *et al.*, 2006; Toni *et al.*, 2007)。更に、新生神経細胞は、脳が担う記憶や学習などの高次機能に対して貢献している事が示されている(Shors *et al.*, 2001; Saxe *et al.*, 2006; Dupret *et al.*, 2007; Dupret *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008)。

これら新生神経は、様々な環境要因によって細胞増殖が促進される事が知られている。例えば、“自発運動”や“豊かな刺激の多い環境”などの生理学的な環境や、“脳梗塞”や“癲癇”などの病態学的な状況により、海馬で生み出される神経細胞数は増加する(Parent *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Gould *et al.*, 1999; van Praag *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2001; Trejo *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Kronenberg *et al.*, 2006; Kee *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007)。しかしながら、これらの環境要因による成体での神経新生の増加がどのように制御されているかは明確にはなっていない。

また、上記とは別に海馬における神経新生は、海馬神経活動の高まりにより促進される事が認められている(Cameron *et al.*, 1995; Deisseroth *et al.*, 2004; Tozuka *et al.*, 2005; Bruel-Jungerman *et al.*, 2006; Chun *et al.*, 2006)。神経活動の高まりと神経新生の関連性については、依然その制御機構について更なる研究が必要であるが、神経新生と神経活動によるシナプスより放出される各神経伝達物



質による神経新生の調整機構が示されている(Cameron *et al.*, 1995; Santarelli *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005; Itou *et al.*, 2011)。この中には、大きく分けて -aminobutyric acid (GABA)作動性経路、コリン作動性経路、そしてグルタミン酸作動性経路が含まれ、海馬における神経新生の初期段階を制御していると考えられている。

この海馬における神経新生は、海馬に存在する神経幹細胞及び神経前駆細胞により誘導・制御されている(Seri *et al.*, 2001; Filippov *et al.*, 2003; Fukuda *et al.*, 2003; Kempermann *et al.*, 2004)。それぞれの神経幹細胞及び前駆細胞の特徴についてはこれまで報告されており、当研究室の福田諭博士及び戸塚祐介博士が、初期段階では神経幹細胞から神経前駆細胞が生み出され、その後成熟神経細胞へと分化していく事を示されている(Fukuda *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005) (図 1、図 2 参照)。

本研究では、海馬神経活動と神経新生の関係性を解明する為、神経新生の初期段階に着目し、神経新生の細胞を生み出す元となる神経幹細胞について、海馬神経回路が活性化した場合に受け取るシグナルの特定を行い、神経活動依存的な神経幹細胞の増殖機構の解明を目的とした。

本論文は 3 章からなり、まず第 1 章では、上記で示した神経新生が促進される環境要因の一つである、局所脳梗塞モデルでの海馬の環境変化や細胞の変化を観察する事とした。このモデルを選択した理由として、脳梗塞が誘導する海馬での神経新生の増加は、脳梗塞により傷害が及んだ半球の海馬のみで見られ、梗塞反対側の海馬では増加は見られない事にある(Liu *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Kee *et al.*, 2007)。つまり、同一個体の中で神経新生が起こる環境と起こらない環境が存在している事になる。よって、両者の環境の違い、増殖細胞の特定及び活性化シグナルを調査す

る事で、同一個体の中で新生神経細胞がどの様に誘導されるのかを知る事ができる。更には、これまで局所脳梗塞後の新生神経細胞の増加が何故片側のみで有意に誘導されるかという未解明である現象に対しても解答をする事ができる。本章の結果として、脳梗塞後の海馬神経活動を測定したところ、梗塞半球側の海馬でのみ神経活動が特異的に高まる事が確認できた。そこで、この神経活動が高まった環境下で増殖する細胞の特定を行ったところ、海馬神経活動が高まった状況下では、神経幹細胞が特異的に増殖する事が確認できた。この事から局所脳梗塞モデルは、海馬神経活動と神経新生の関連性を解明する非常に有用なモデルである事が確認された。本実験では更に、GABA 受容体の active modulator である Diazepam を投与し、脳梗塞後の神経活動の高まりが抑制できる事を確認した。次に、Diazepam 投与により脳梗塞後の神経活動を抑制する事で神経幹細胞の増殖が抑制できるか確認したところ、Diazepam 投与により脳梗塞後の神経幹細胞の分裂増強は抑制されている事が確認された。Diazepam 自身は、これまでの研究で神経幹細胞及び前駆細胞の増力へ影響を与えない事から（第1章序文参照）、神経活動の高まりが神経幹細胞の増殖を誘導している事を強く示唆する結果である。

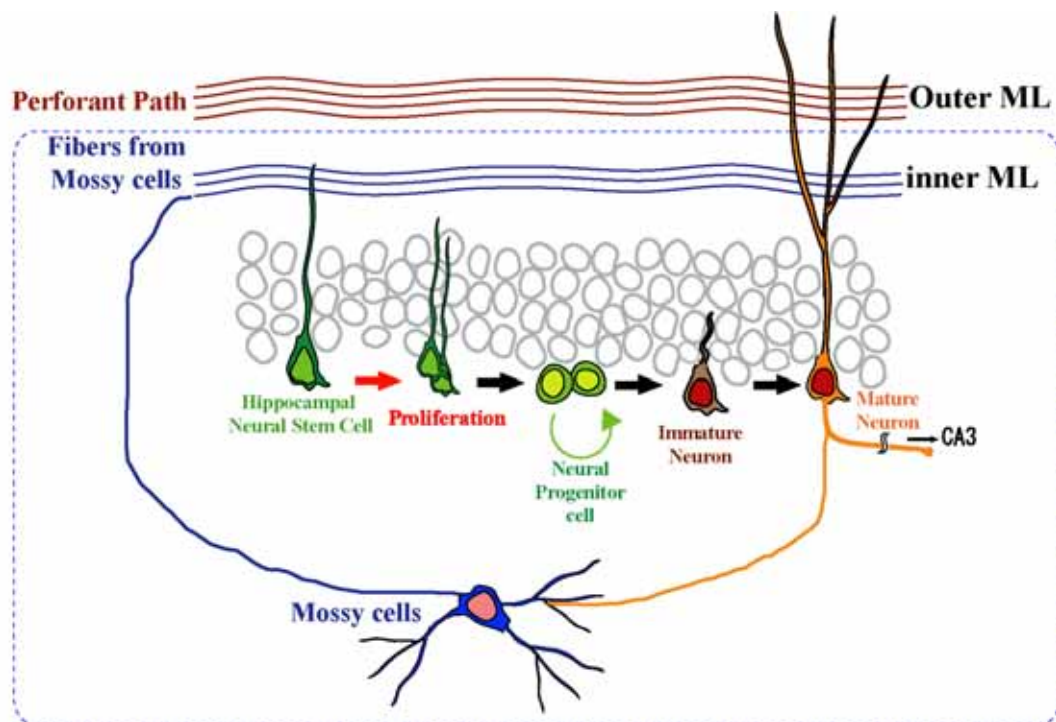
第2章では、海馬神経活動が高まった際に受け取るシグナル経路について解析した。神経幹細胞は海馬神経活動が高まった場合、グルタミン酸が放出される事が知られている(Okubo *et al.*, 2010)。更に、これまでの研究により、神経幹細胞は、グルタミン酸受容体である NMDA 受容体、AMPA 受容体は発現していない事が報告されている(Tozuka *et al.*, 2005)。また、当研究室の福田諭博士の博士論文にて、神経幹細胞はグルタミン酸の入力を受け細胞内カルシウム応答を示す事が示されている。このカルシウム応答は、細胞外にカルシウムが存在しない状況下でも見られる事から、G タンパクを介した細胞内 Calcium Store から

のカルシウム放出により引き起こされていると考えられる。そこで、本研究では細胞内 Calcium store からのカルシウム放出を誘導する事が知られている、代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor: mGluR) によるグルタミン酸シグナルの受け取り機構を考えた。各種グルタミン酸の種類及び性質について、表 1 にまとめた(Swanson *et al.*, 2005; Kullmann, 2007)。代謝型グルタミン酸受容体以外のグルタミン酸受容体については、細胞外のカルシウムを細胞内へ通過させる事で細胞内カルシウム濃度を上昇させるが、代謝型グルタミン酸受容体の内、Group I に属する代謝型グルタミン酸受容体 1 型及び 5 型 (mGluR1 及び mGluR5) は、G タンパクを介して細胞内 Calcium Store よりカルシウムを放出させ、細胞内カルシウム濃度を上昇させる。Group II, III に属する受容体は、inhibitory Gi/Go シグナルが下流シグナルである為、カルシウム応答は誘導されない。よって、神経幹細胞で発現が予想される受容体は、Group I に属する受容体であると予想される。第 1 章の結果から、神経幹細胞は mGluR1 の発現は無く、mGluR5 の発現が確認された。更には、カルシウムイメージングの結果からも mGluR5 を介して神経幹細胞はグルタミン酸シグナルを受け取る事が明らかになった。更に、神経幹細胞は、mGluR5 を人工的に刺激する事で細胞分裂が促進する事が確認された。この事から、神経活動の高まりにより放出されるグルタミン酸が、神経幹細胞が発現している mGluR5 を刺激し、神経幹細胞の細胞増殖が誘導している事が示された。

第 3 章では海馬神経活動の活動パターンと神経新生との関連性を解析した。海馬神経回路は、各細胞が無秩序に活動しているわけではなく、シーター波 (シーターオシレーション) と呼ばれる 4-12Hz の周期で集合的に活動している事が知られている(Bragin *et al.*, 1995; Buzsaki, 2002)。更に、先に述べた神経新生が促進されるような生理学的環境下 (学習や自発運動など) では、このシーター波

が増強される事が知られている(Buzsaki, 2002)。また、本研究第 1 章において見られた局所脳梗塞後の海馬神経活動の高まりについても、シーター波が増強されている事が確認された。そこで、海馬神経活動依存的な神経幹細胞増殖を説明するには、この活動リズムの影響についても解析をする必要がある。そこで本章の研究では、マウスに自発運動をさせ海馬神経活動が高まる状況にした。このマウスに、シーター波のリズムを乱す事が知られているマリファナの成分であるカンナビノイド受容体のアゴニストを投与し(Robbe *et al.*, 2006)、海馬神経活動が高まるが、シーター波のリズムが乱れた海馬環境にしたところ、海馬活動依存的な神経幹細胞の増殖が阻害された。このことから、神経活動の高まりと神経幹細胞増殖については、神経活動のパターン（シーター波）も重要である事が示された。

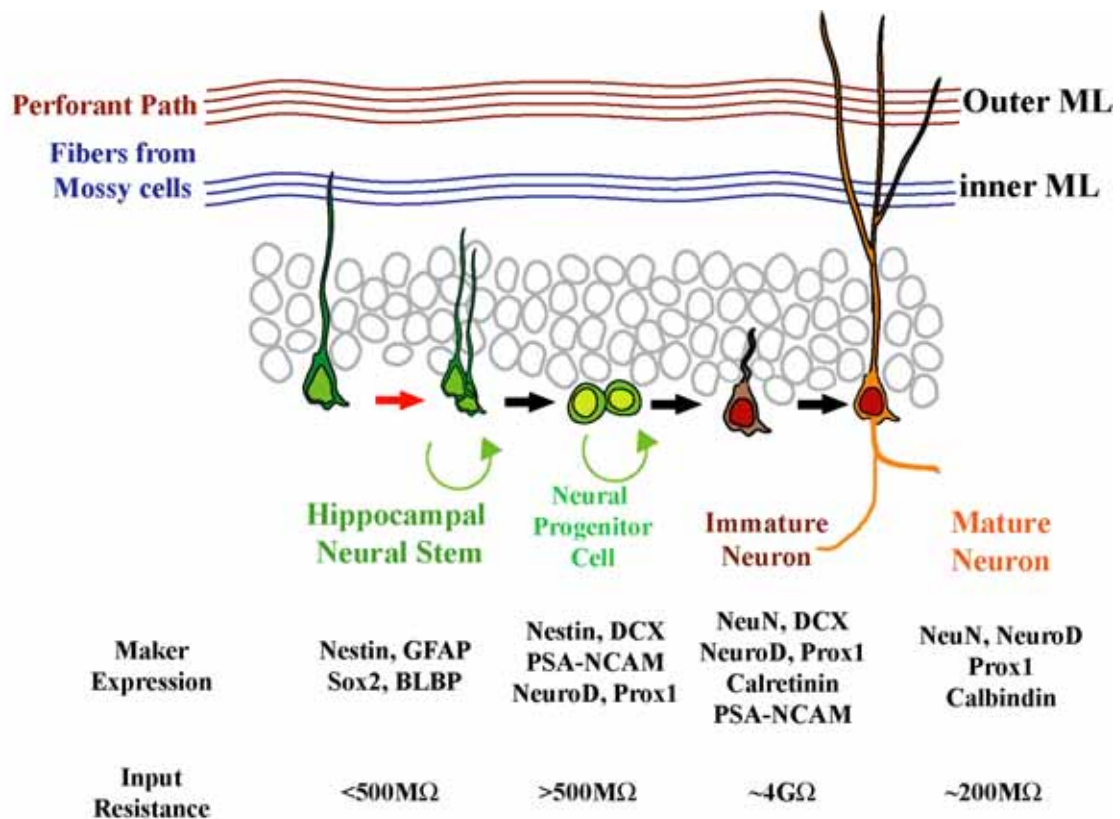
まとめとして、これら第 1 章～第 3 章までの結果により、神経活動依存的な神経幹細胞の増殖は、神経活動により放出されるグルタミン酸を mGluR5 により感知し誘導され、更に海馬回路の神経活動の活動パターンも神経幹細胞増殖を制御している因子である事が確認された。



**図1:海馬での神経幹細胞から成熟新生神経細胞ができるまで**

神経幹細胞(Neural stem cell)及び神経前駆細胞(Neural progenitor cell)はそれぞれ分裂能を有する。また、それぞれ対称分裂により自己複製または、非対称分裂で神経前駆細胞または未成熟神経細胞を生み出す。神経幹細胞及び神経前駆細胞から各分化段階を経て、未成熟神経細胞から成熟神経細胞へと分化をし、最終的には既存の海馬回路へ組み込まれていく。

また、構造的に神経幹細胞は Inner ML(molecular layer)まで突起を伸ばしており、成熟神経細胞は Outer ML まで突起を伸ばしている。Inner ML 及び Outer ML へはそれぞれ Mossy cell からの投射、嗅内皮質からの投射が走っており両者ともに主にグルタミン酸を放出するシナプスを形成している回路である。



**図2：各神経幹細胞・前駆細胞・未成熟神経細胞・成熟神経細胞の特徴**

神経幹細胞・神経前駆細胞・未成熟神経細胞・成熟神経細胞はそれぞれ段階に応じて発現マーカータンパクが異なる。また、細胞膜抵抗も各段階に応じて異なり、これら特徴により成体内で各細胞は特定できる。

**表1: グルタミン酸受容体の種類及び特性について**

Ionotropic Glutamate Receptors			
Receptor Type	Agonists	Subunits	Permeant Ions
<b>AMPA</b> ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)	Glutamate AMPA, Kainate	GluR1-4 (GluRA-D)	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> (Ca <sup>2+</sup> )
<b>Kainate</b>	Glutamate Kainate	GluR5-7, KA1,2	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> (Ca <sup>2+</sup> )
<b>NMDA</b> (N-methyl-D-aspartic acid)	Glutamate, glycine, D-serine, NMDA	NR1, NR2A-D	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup>
Metabotropic Glutamate Receptors			
Group	Subtypes	Agonists	Transduction mechanisms
<b>I</b>	mGluR1, 5	-Glutamate -(S)-3,5-dihydroxyphenylglycine(DHPG), 1S,3R-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (1S,3R-ACPD)	<u>Excitatory Gq-coupled</u> PhospholipaseC Inositol trisphosphate, IP <sub>3</sub> Ca <sup>2+</sup> -release from intracellular calcium store
<b>II</b>	mGluR2, 3	-Glutamate -1S,3R-ACPD -(2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG-IV)	<u>Inhibitory Gi/Go-coupled</u>
<b>III</b>	mGluR4, 6-8	-Glutamate -L-Amino-phosphonobutyrate (L-AP4)	<u>Inhibitory Gi/Go-coupled</u>

## 第 1 章

# 脳梗塞後の特異的な海馬神経活動の高まりによる神経幹細胞増殖の 制御



## 1.1 序論

海馬で新生される神経細胞数は、動物が置かれる環境に応じて変化する事がわかっている。例えば、運動・学習や新しい環境下での探索や行動など、刺激が多い環境で生活をした場合には、新生される神経細胞数が増加する(Gould *et al.*, 1999; van Praag *et al.*, 1999; Trejo *et al.*, 2001; Kronenberg *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2007)。また、脳梗塞や(Liu *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Kee *et al.*, 2007)、癲癇(Parent *et al.*, 1997; Scharfman *et al.*, 2000)などによっても神経細胞数が増加する。更に、海馬神経新生は、海馬神経活動依存的に増加する事も示されている(Cameron *et al.*, 1995; Deisseroth *et al.*, 2004; Tozuka *et al.*, 2005; Bruel-Jungerman *et al.*, 2006; Chun *et al.*, 2006)。また、海馬神経活動自体は、環境依存的に変化する事も報告されている(Buzsaki, 2002; Buzsaki *et al.*, 2003)。しかしながら、環境に応答した神経新生と環境依存的な神経活動の変化との関係性については未だ多くは未知であり、更なる研究が必要である。

そこで本研究では、新生神経細胞が増加する事が知られている、局所脳梗塞モデルを用いて海馬神経活動の変化や細胞の変化（神経幹細胞の増殖）を観察する事とした。このモデルを選択した理由として、脳梗塞が誘導する海馬での神経新生の増加は、脳梗塞により傷害が及んだ半球の海馬のみで見られ、梗塞反対側の海馬では増加は見られない事にある(Liu *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Kee *et al.*, 2007)。つまり、同一個体の中で神経新生が起こる環境と起こらない環境が存在している事になり、両者の環境の違い・増殖細胞の特定及び活性化シグナルを調査する事で、新生神経細胞がどの様に誘導されるのかを知る事ができる。この事は、これまで局所脳梗塞後の新生神経細胞の増加が何故片側のみで有意に誘導されるかと

いう、学術的な疑問に対しても解答をする事ができる。更に、成体での新生神経細胞の役割は、数々の研究によって海馬依存的な機能に關与している事が示されている(Shors *et al.*, 2001; Drapeau *et al.*, 2003; van Praag *et al.*, 2005; Saxe *et al.*, 2006; Dupret *et al.*, 2007; Kempermann, 2008; Zhang *et al.*, 2008)。また一方で、脳梗塞後には海馬依存的な機能が低下する事が示されている(Yonemori *et al.*, 1999; Bouet *et al.*, 2007)。最近の研究報告により、脳梗塞後の新生神経細胞は、細胞体から通常では見られない軸索が伸びている異常な形態をとっており、近傍の神経細胞と局所的な異常神経回路を形成しているという報告がある(Niv *et al.*, 2012)。この形態異常は、癲癇でも見られる異常であり、癲癇の症状悪化を引き起こす要因である事も報告されている(Parent *et al.*, 1997; Scharfman *et al.*, 2000)。以上の報告から、脳梗塞後の神経新生の増加は、脳梗塞後の海馬依存的機能の低下を引き起こす原因因子である可能性が考えられる。そこで、脳梗塞後の海馬新生神経細胞の増加機構を解明する事で、脳梗塞後の海馬依存的機能低下に対する治療法の開発などにも応用ができる内容となる可能性がある。

本章では、まず脳梗塞後の海馬神経活動を測定し、神経活動の状況を確認した。その結果、脳梗塞後の神経活動は、脳梗塞後 3 日目において傷害半球側海馬で特異的に高まっている事が確認された。この神経活動の高まりが確認される時期において、海馬歯状回での分裂細胞数を確認したところ、傷害半球側において増加していた。この分裂細胞について、細胞種の特定を行った結果、神経幹細胞が特異的に増加している事が分かった。この事から、脳梗塞後の海馬では、神経活動が高まる事で神経幹細胞の増殖が誘導される事が推測された。そこで、脳梗塞後の神経活動の高まりを抑える方法を確認する為、GABA-A 受容体の active modulator である Diazepam を投与し神経活動の高まりが抑制できるか確認した。その結果、Diazepam を投与する事で脳梗塞後に見られる神経活動

の高まりが抑制できる事を確認した。そこで、脳梗塞後のマウスに Diazepam を投与し、海馬歯状回での細胞分裂細胞が変化するか確認したところ、Diazepam 投与により、脳梗塞後に見られる神経幹細胞の特異的な増殖が見られなかった。Diazepam については、当研究室の岡田夏美氏の平成 19 年度修士論文にて Diazepam Binding Inhibitor (DBI)と呼ばれる特徴的なタンパクが神経幹細胞及び前駆細胞での発現しており、Diazepam 投与によっては神経幹細胞・前駆細胞の細胞増殖には影響が出ない事が示されている。DBI は、Benzodiazepine 系化合物が GABA-A 受容体へ結合する事を阻害する内在性タンパク質である(Guidotti *et al.*, 1983)。また、DBI は、海馬歯状回においても発現しており、神経幹細胞でも発現している事も報告されている(Yanase *et al.*, 2002)。

以上の結果より、本章では、脳梗塞後の海馬では梗塞側の海馬で特異的に神経活動が高まり、この活動の高まりにより神経幹細胞は細胞分裂を促進している事が確認された。

## 1.2 実験方法

- 使用動物：

東京大学山口正弘先生より提供頂いた ICR マウス血統の NestinP-GFP トランスジェニックマウス(Yamaguchi *et al.*, 2000) (8~14 週齢、雄) 及び ICR マウス (三共ラボ) (8~12 週齢、雄) を用いて実験を行った。これら実験動物は、研究室内にあるクリーンルームにて飼育用のケージに入れられ、室内気温  $24 \pm 1$  °C、12 時間周期で昼夜を切り替える (午前 8 時に飼育室の電気を点灯し、午後 8 時に消灯するサイクル) 環境で飼育した。また、実験動物の取り扱いについては、東京大学規定の “Experimentation protocols approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Tokyo” に則って実施され、使用実験動物数を最小限にするように努めた。

- マウス局所脳梗塞モデル(MCAO モデル)：

今回実験に用いたマウス中大脳動脈閉塞 (Middle Cerebral Artery Occlusion : MCAO) 脳梗塞モデルは、小泉らによって確立され人の脳梗塞の発症形態に近いモデルで、Li 氏により改良されたモデルを使用した(Koizumi *et al.*, 1986; Li *et al.*, 2006)。 (図 3 参照)

詳細な方法として、まず滅菌済黒 8-0 ナイロン糸 (松田医科工業株式会社) を用いて、先端 0.3mm 程度を火であぶり径を大きくした栓子を作製した。マウスに Ketamine (50 mg/kg, 筋肉注射), Xylazine (5 mg/kg, 筋肉注射)、及び Atropine (0.01 mg/kg、皮下注射)にて麻酔をかけ、右外頸動脈から右内頸動脈へと栓子を通し、両頸動脈の分岐点より 9-10mm 奥まで栓子を挿入した。これにより内頸動脈の先にある、中大脳動脈を閉塞する事が出来る。この状態で 45 分間栓子を留置した後に抜き取り、血流を再開させた。実験中のマウ

スの体温については、マウスが手術後麻酔より回復するまで、動物用体温保持装置 BMT-100 heating pad (Bio Research Center Co. Ltd)にて、 $37 \pm 0.5$  °C に保持した。本実験で使用したコントロール群については、上記の栓子を入れる操作以外について同様の手術を行った Sham 手術群を使用した。また、今回の実験では、手術後に脳梗塞の傷害により引き起こされる右前脚の麻痺が見られないマウスについては、MCAO 手術不成立として実験から除外した。

また、GABA 受容体 positive modulator である Diazepam (7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one, Sigma) (10mg/kg, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma), 40% propylene glycol (Sigma), 50%DDW)を MCAO 手術後から腹腔内に 1 日 2 回、4 日間投与した群も合わせて作製した。

- BrdU 投与：

本実験では、MCAO 手術 4 日目に分裂細胞をラベルする為 BrdU (100 mg/kg)を腹腔内投与した。BrdU ラベルされる細胞周期期間については図 4 に示す。その後、マウスを手術後 4 日目(BrdU 投与後 24 時間後)、7 日目( BrdU 投与 4 日後 ) に BrdU 陽性細胞の解析を行った。本実験でも前述と同様に、BrdU 投与されたマウスは、各タイムラインにてエチルエーテルにて麻酔をかけた後、PBS にて還流し、その後 4% PFA にて還流固定した。脳を取出し、4%PFA にて 4 で一晩後固定を行った。次に、4 でそれぞれ 15%及び 30% Sucrose in PBS で一晩ずつ置換を行い、その後、免疫染色用切片として、クライオスタット(Micron)を用いて 40- $\mu$ m 厚の冠状スライスを作製した。

- Nissl 染色：

上記で作製したスライスを、Poly-L-Lysine solution (SIGMA, ST. LOUIS, USA) コートしたスライドガラスに貼り付け、以下の手順で Nissl 染色を行った。方法として、42℃ に温めておいた Nissl 溶液に、切片を 10 分間浸し染色した。その後 70%エタノールに 4 分間浸す事を 2 回、85%、95%エタノールに 4 分間を 1 回ずつ、100%エタノールに 4 分間を 2 回行った。次にキシレンに 2 分間ずつ 2 回浸し、ENTELLAN neu (Merck, Darmstadt, Germany) で封入した。

- 免疫染色：

本実験は、盲検下での細胞のカウント及び評価を行った。切片を TBS で 10 分間 3 回洗った後、100%メタノール (Wako, Osaka, Japan) で室温下 30 分間処理をした。TBS で 10 分間洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液で 90℃、5 分間インキュベーションした。室温まで放置し、TBS で 10 分間洗浄した。1M の塩酸で 37℃、30 分間処理し、その後 0.1 M ホウ酸緩衝液で 10 分間中和し、TBS で 10 分間、2 回洗浄した。この切片を、ブロッッキング溶液 (0.1 % Triton X-100 及び 5 % Normal Donkey Serum (NDS)を含む Tris Buffer Saline (TBS)) で、室温下で 30 分間保持し、その後、1st 抗体(anti-GFP, anti-BrdU, anti-GFAP 及び anti-PSA-NCAM)をブロッッキング液中加入し 4℃ で 3 日間反応させた。その後 TBS にて 10 分間 3 回洗浄し、その後 2nd 抗体を含むブロッッキング液で室温 2 時間反応させた。この切片を TBS で 10 分間 3 回洗浄した。TBS で 10 分間 1 回、15 分間で 2 回洗浄した後、スライドガラスにのせ、ImmuMount (Shandon, Pittsburgh, PA) で封入した。

本実験で使用した抗体について、表 2 にまとめる。

**表2 : 使用した 1st 抗体及び 2nd 抗体**

抗体名	会社	由来	希釈率
<b>1st 抗体</b>			
Anti-GFP	Molecular Probes	rabbit IgG	1:250
Anti-GFAP	Sigma	mouse IgG	1:200
Anti-BrdU	Oxford Biotechnology	rat IgG	1:200
anti-PSA-NCAM	順天堂大学医学部 石先生より提供	mouse IgM	1:500
<b>2nd 抗体(蛍光)</b>	<b>会社</b>	<b>Anti-X</b>	<b>希釈率</b>
Alexa 488	Molecular Probes	anti-rabbit IgG <sub>1</sub>	1:1000
Rhodamine	Jackson ImmunoResearch	anti-rat IgG	1:200
Cy5	Jackson ImmunoResearch	anti-mouse IgG	1:200
	Jackson ImmunoResearch	anti-mouse IgM	1:200
Alexa 350	Molecular Probes	anti-mouse IgG	1:1000

● 神経幹細胞の突起分岐点測定 :

本実験も、盲検下での突起分岐点の測定を行った。測定は、1 個体から 480 $\mu$ m ずつ離れた 4 枚の切片を取出し、各切片に含まれる神経幹細胞を無作為に 10 個ずつ選択し、分岐が明確に判断できるグリアマーカーGFAP の細胞体から突起の枝分かれまでの距離を測定した。

● BrdU 染色陽性細胞のカウント方法 :

本カウントは、1 個体から 12 枚毎に計 4 枚の切片を取出し免疫染色した後に BrdU 陽性細胞数をカウントし、一個体あたりの総個数を算出する為、

12 倍しその総数を計算した。この方法はこれまで世界的に認められた手法であり、これまでの当研究室からの発表でも受け入れられている手法である (Fukuda *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Itou *et al.*, 2011)。

具体的な方法を次に記載すると、全ての個体は左半球側の淵に切り込みを加え、切片中で右半球・左半球が特定できる様にした状態で免疫染色を実施した。染色後、切片をスライドガラス及びカバーガラスで封をした後、実験に応じた番号を用意し、全スライドへ油性ペン (product code MO-120-MC-BK, Zebra Co. Ltd.)を用いて番号付けを行った。次に、このスライドに対して、サンプルの割り付け情報を知らない別の実験者(久恒辰博准教授、若しくは他の久恒研究室学生：以後 2nd 実験者と呼ぶ)が、同じ油性ペンにて元の番号が見えないように塗りつぶし確認した後、別の新しい番号を割り付けた。この方法により、カウントを実施する実験者は元の番号を認識できなくなり、盲検下にてカウントが実施できる。

また、切片と元の割り付け番号については、切片と合わせて 2nd 実験者へ割り付け表として提出し、2nd 実験者にて新しい割り付け番号を割り付け表に記載後、実験が終了するまで封筒に入れ開封できない様に糊付けをした状態で、2nd 実験者はカウント実施者が分からない場所で保管をし、盲検性を担保した。

染色切片の染色画像については、共焦点蛍光顕微鏡(TCS SP2; Leica)を用いて取得し、設定は 1024 x 1024 ピクセル、63x oil-immersion レンズにてデジタルズームを 2x 若しくは 4x をかけてスキャンした。得られた画像は、画像の切り抜き等必要最低限の処理を Adobe Photoshop 7.0.1 にて実施した。

- *in vivo* 海馬神経活動のレコーディング：



本実験では、成体 ICR マウス（8～12 週齢、雄）を用いて、海馬神経活動を生きたままレコーディングを実施した。用いた手法は、本レコーディングをご教授頂いた現玉川大学医学部教授、磯村宜和先生の方法及び過去論文に則り実施した(Isomura *et al.*, 2006)。試験スケジュールは図 5 にまとめた。

まず、片側半球海馬 DG のみに神経活動レコーディング用の電極を埋め込んだ。使用した電極は、Teflon コートされ直径 0.003 インチのステンレスチール(200 k $\Omega$ ; A-M Systems, Inc.)を使用し、このレコーディング電極を、片側半球海馬 DG (A: -2.54 mm, L(右又は左): 1.80 mm, V: 1.9 mm)へ埋め込んだ。その後、リファレンス及びグラウンド電極としてステンレスのネジを頭蓋骨の Lambda より後ろ側へねじ込み、歯科用セメントにて頭蓋骨と全ての電極を一緒に固め、動かない様に固定した。3 日～5 日間の回復期間を置き、電極を埋め込まれたマウスに対して、前述の MCAO または Sham 手術を実施した。

海馬神経活動の測定は、MCAO または Sham 手術をする直前、手術後 1 日後、2 日後、3 日後にそれぞれ最低 1 時間ずつ電磁シールドされたケージの中で覚醒している状態でレコーディングをした。本レコーディングでは、当研究室にてマルチチャンネルアンプ(MEG-6108 multichannel amplifier, Nihon Kohden)、PowerLab ML870 (AD Instruments)、レコーディングソフト Chart version 5.2 (AD Instruments)及びノートパソコン(Dell)を組み合わせ立ち上げたレコーディングシステムを用いて実施した。レコーディングの設定として、Sampling rate として 1kHz、ノイズフィルターとして 0.5-Hz 以下の波形及び 300-Hz 以上の波形についてはノイズとしてカットした。

次に、海馬神経活動を抑制する為、GABA 受容体 active modulator である Diazepam (7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-

benzodiazepin-2-one, Sigma) (10mg/kg, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma), 40% propylene glycol (Sigma), 50%DDW)を、MCAO 手術後から腹腔内に 1 日 2 回 4 日間投与した。また、MCAO 後の海馬神経活動のパターンと比較する為、電極を埋め込んだマウスを Running Wheel の中で走らせ、その前後の海馬神経活動も合わせて取得した。

最後に、全てのオリジナルのレコーディングデータ(MCAO-Ipsilateral (#1-4), MCAO-Contralateral (#1-4), Sham-Ipsilateral (#1-4), MCAO (Diazepam)-Ipsilateral (#1-4), and Run (#1-4)) については、世界中からアクセスができる様に、“NeuroImaging-platform”  
( URL:[http://nimg.neuroinf.jp/modules/xoonips/itemselect.php?op=itemtypesearch&search\\_itemtype=xnpdata](http://nimg.neuroinf.jp/modules/xoonips/itemselect.php?op=itemtypesearch&search_itemtype=xnpdata) ) に公開した ( 図 6 )。

- 海馬神経活動レコーディングデータの解析：

本データ解析については、東京大学大学院新領域創成科学科複雑理工学専攻 眞溪歩 准教授及び寺園泰博士の共同研究の元、Matlab (MathWorks) ベースで作製頂いた解析ソフトにより解析を実施した。

まず初めに、1 時間のレコーディングデータ中で神経活動が “ といった周波数帯 ” で “ どれ位の強さ ” で記録されているかを解析する為、“Power Spectrum Density”を Welch’s method (6 秒間のセグメント、50%のセグメント Overlap、そして  $\alpha=2.5$  Kaiser window として計算)を用いて解析をした。また併せて、海馬神経活動についての MCAO 手術前後及び比較対照として Running Wheel 走行前後の”Auto correlations ( 自己相関 )”について、MCAO 群及び Running Wheel 群それぞれ n=4 ずつのデータの平均を取り解析を実施した。Auto correlations 解析とは、自己相関つまり神経活動が一定の規則を

持って活動しているかどうかを解析する手法である。つまり、同一のパターンを持って活動し、測定時間内で継続的に続いている神経活動データは、異なる個体から取られた場合でも同じ自己相関係数を示す。

更に、経時的に変化している海馬神経活動の Spectrum の解析及び表示の為、Wavelet 解析を行った。Wavelet 係数は、Matlab Wavelet Toolbox ( complex Morlet wavelet : bandwidth parameter  $f_b=1$ , Center frequency parameter  $f_c=1$  ) を用いて、連続的な Wavelet 変換を行う事で算出した。また、Scale は 0.5-Hz 刻みで 0.5Hz から 20 Hz までとした。Wavelet 解析の解釈については、図 7 に説明を加えたが、経時的に “ どの周波数 ” で、 “ どれ位の強さ ” で活動しているかを視覚的に分かり易く解析できる手法である。

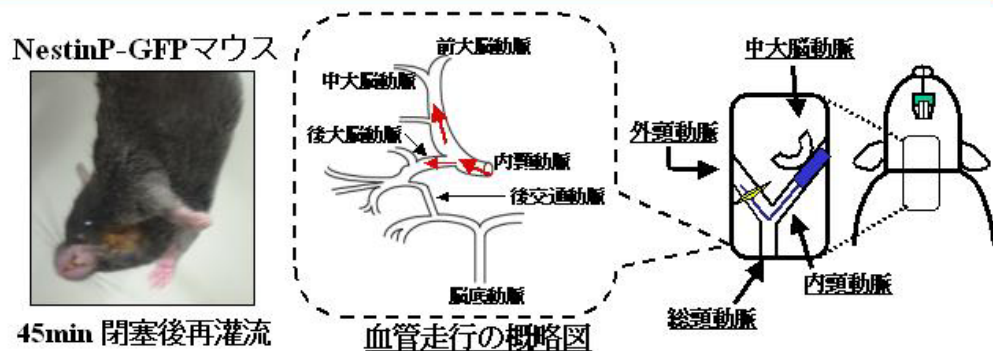
次に、脳の電気活動電位の経時変化を評価する為、次に示す計算式にて “short time period” に含まれる海馬神経活動電位 power を解析した。

[計算式] : (short time power of the bin) =  $(1/T) \times \sum_t [\text{amplitude}(t) - (\text{mean amplitude in the bin})]^2$

( T, t の意味 : T= the number of time points in the bin、t= the time point )

今回の実験では、神経活動のレコーディングが 1 kHz の Sampling rate でとられている為、T=1000 となり、それぞれの time bin は 1 秒の長さを持っており、0.5 秒間ずつの重なり(0-1 s, 0.5-1.5 s, 1-2 s, ..., 3598.5-3599.5 s, 3599-3600 s)がある事になる。よって、1 時間の記録時間は 3600 秒である為、7199 の short-time powers が算出される。また、今回これらの short time power は、Histogram を用いて表示した。今回の解析では、評価対象のデータ中の short-time power が、 “ 平均値 + 5 × ( 事前レコーディングデータ中の short-time power 標準偏差 ) ” より大きい場合を “hyper activity “ と定義した。各マウスに対して、上記の計算により求めた hyper activity の数を経時的に

比較し、変化の有無を解析した。hyper activity 解析の理解を容易にする為、  
図 8 に図による説明を記載した。



**図3:MCAO 手術**

（左）MCAO 後のマウス写真。左前足の障害が生じている。

（中央） マウスの血管走行図（詳細）。脳への主な血流は、内頸動脈より供給されている。その中でも、内頸動脈の先端にある中大脳動脈から、線条体領域、皮質領域など脳の大部分への血流が確保されている。人の脳梗塞においても、この中大脳動脈が閉塞する事で発症する事が多い。

（右）人の脳梗塞に近い形でモデルを作成する為、中大脳動脈を人工的に血管を閉塞する栓子を挿入し、一時的に血流を遮断する。45 分後に栓子を抜き取り、血流を再開させる。この操作により、人の脳梗塞に近い疾患モデルが作成される。

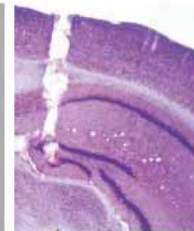
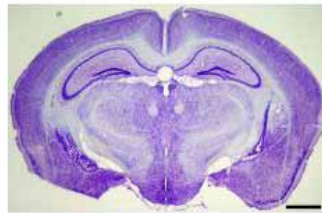


**図4： BrdU 取り込み期間(細胞周期内の取り込み時期)**

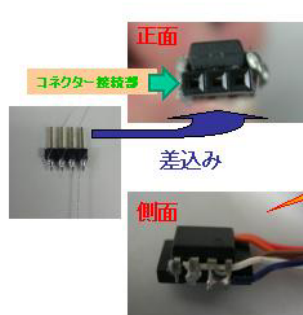
BrdU は、チミジン類似体であり、S 期の DNA 合成の際に細胞へ取り込みが行われラベルされる。よって、BrdU を取り込んだ細胞は、S 期に入っていた細胞であると特定できる。また、一度 BrdU を取り込んだ細胞は、その後、再分裂した際にも DNA 内に残る為、子孫細胞についてもラベルすることができる。



電極埋め込み



海馬歯状回 近傍のField Recording



**図5: *in vivo* 海馬神経活動のレコーディング**

(上段)海馬神経活動の測定を行うにあたり、記録電極埋め込みを行った。その後、3～5日間の回復期間を置いた。(下段)本実験では、無麻酔下での活動記録を行った。そこで、オペアンプと呼ばれる記録シグナルのみを記録装置まで送る事ができるアンプを測定装置に組み込み測定を行った。(注1：オペアンプにより、動物が運動しても神経活動のみが測定装置まで転送されるようになる。)

NeuroImaging Platform<URL>

[http://nimaging.neuroinf.jp/modules/xoonips/itemselect.php?op=itemtypesearch&search\\_itemtype=xnpdata](http://nimaging.neuroinf.jp/modules/xoonips/itemselect.php?op=itemtypesearch&search_itemtype=xnpdata)

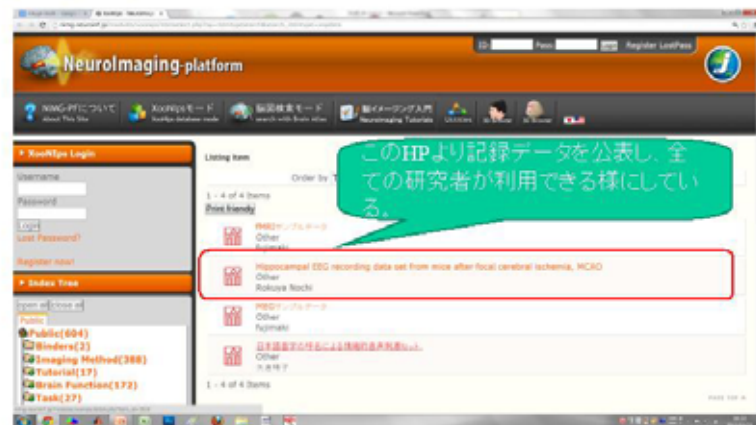
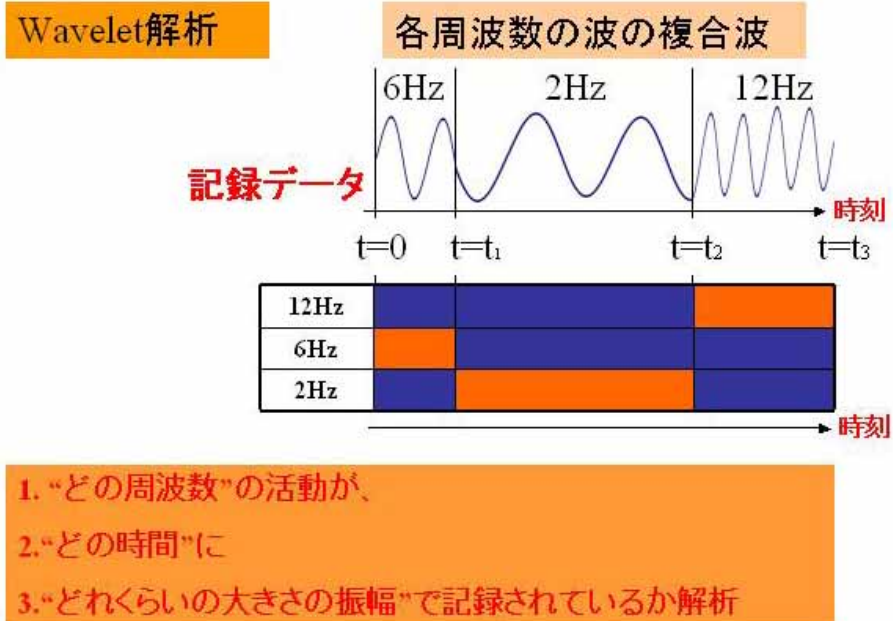


図6： 海馬神経活動レコーディングデータの公開



記録された前データは、世界中の研究者がいつでも無償で使えるよう NeuroImagening Platform に公開している。よって、本データを用いて解析の再現性や、新規の解析を行う事ができる。



**図7： 海馬神経活動の Wavelet 解析**

記録されたデータの Wavelet 解析により、各時刻における神経活動が“ どの周波数 ”で“ どれ位の強度 ”で活動しているのが解析できる。情報として、時刻、周波数及び強度を含み、横軸に時刻、縦軸に周波数、強度をカラーマップで色を用いて示す解析である。

## Hyper activity解析

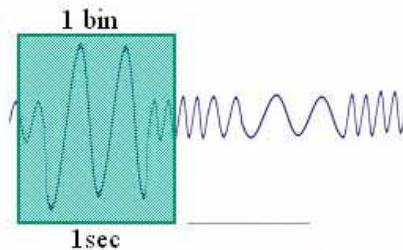
⇒大きな振幅がどれくらい発生しているか解析

“(Short time power of bin)”

$$=1/T \times (\sum t[\text{amplitude}(t) - (\text{mean amplitude in the bin})]^2)$$

各定数: T: Time pointsの数/bin  
t: Time point

実験条件: 1 bin = 1 sec、1kHzで記録⇒**T=1000**  
(⇒1secデータは、1000個のdigitalデータの集まり)  
t=1binを0.5sずつ重ねて移動の為、  
0-1s, 0.5-1.5s,,,3599-3600sの7199個。



⇒各time pointでの1bin中に含まれるエネルギーの大きさを上記の式にて計算する。

## Hyper activityの定義

\*1 = Pre recordingデータのShort time power of bin

“Hyper Activity”(比較するデータのあるtime pointで)

Short time power of bin(t) ≥ (mean of \*1) + 5 x (\*1の標準誤差)

## 図8: 海馬神経活動の Hyper activity 解析

記録されたデータの Hyper activity 解析により、記録された神経活動データの中に、強い強度で活動しているポイントがどれ位あるのか、ポイント数を解析する手法である。これにより、強い活動が測定時間中に “ 何回 “ 確認されるのかを確認できる。

## 1.3 結果

### 1.3.1 局所脳梗塞による障害半球特異的な海馬神経回路活動の高まり

この実験では、脳梗塞モデルである MCAO マウスを用いて実験を行い、脳梗塞後の海馬神経活動の測定を行った。スケジュールは図 9 A に示す。まず、本実験で使用したモデルでは、線条体及び皮質領域への傷害の広がりが確認されたが、海馬領域への傷害は見られなかった（図 9 B）。次に、この MCAO マウスを用いて、脳梗塞半球側及び反対の半球側海馬の神経活動を測定した。その結果、脳梗塞半球の海馬で特異的に、神経活動が活性化することが確認された（図 10）。

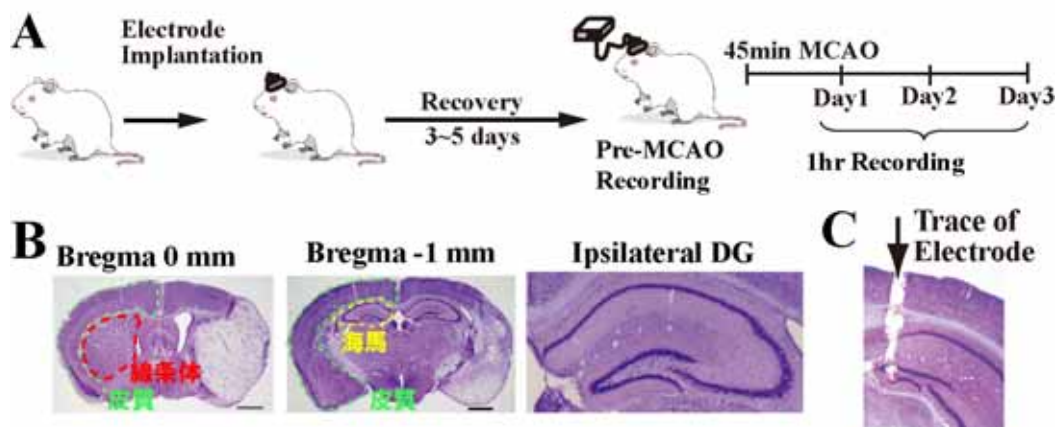
この神経活動の高まりについて、活動高まりがこういった特徴を有しているかを確認する為、Wavelet 解析及び Power spectrum Density 解析を行った。まず、Wavelet 解析を行った結果、4～12Hz のシーター帯で経時的に強く高まっていることが確認された（図 11 A）。次に、神経活動の強度密度（Power Spectrum Density）を解析したところ、図 11 B で示す通り、MCAO 後のマウスでシーター帯での強度密度が顕著に高まっていることが分かった。更にシーター帯の強度密度の積算値について解析した結果、シーター帯での MCAO 群が有意差を持って大きくなっていった（4-12 Hz: MCAO Ipsi vs Sham and MCAO Ipsi vs Contra (Day1:  $P=0.06$ ,  $P=0.47$ , Day2:  $P=0.001$ ,  $P=0.02$ , Day3:  $P=0.004$ ,  $P=0.005$ , Student's  $t$ -test for unpaired samples)（図 11 C）。次に、MCAO の神経活動がどういったパターンを持って活動しているのかを確認する為、自己相関係数解析を行った。この解析は、測定されたシグナルの中に、一定規則を持ったシグナルがどういった規則で繰り返されているかを評価できる。つまり、元のシグナルを時間軸方向へずらし重ね合わせた場合、一定規則で活動するシグナルであれば、周波数分のみ移動し

た場合は、位相差がなくなり、元のシグナルと時間軸方向へずらしたシグナルは一致し、自己相関係数は大きくなる。図 1 1 D で示す通り、自発運動である Running 時の神経活動は、シーター波 (4-12Hz) の活動が一定リズムで見られる事が知られている為、時間軸方向へデーターをずらしていった場合、周波数に応じて位相差があった場合に自己相関係数が高くなっている事が分かる。しかし、MCAO 後の神経活動の高まりについては、図 1 1 D で示す通り、時間軸方向への移動によって、位相差に応じた自己相関係数の変化は見られない事が分かった。つまり、自発運動時の様に、シーター帯の活動の高まりが一定のリズムを持って起こっているのではなく、無秩序に起こっている事がわかった。言い換えれば、通常の神経活動パターンの強度 (活動振幅) のみが大きくなっている結果と言える。

次に、MCAO 後の海馬神経活動で、hyper activity に分類される活動の 1 時間当たりの発生数を検証した。図 1 2 B で、各活動の大きさ毎の発生数をヒストグラムで表示した。実際の測定波形からでも、hyper activity の発生回数が多くなっている事が確認できる (図 1 2 C)。一方、Diazepam を投与し、活動を抑えたマウスにおいては、MCAO 後に見られる hyper activity の著しい増加が見られなかった (図 1 2 D)。MCAO 後の hyper activity 発生回数について、Diazepam 投与群と非投与群の比較を容易にする為、図 1 2 E 及び F に今回得られた全個体から得られた hyper activity 回数、及び各群間の比較を行った。その結果、図 1 2 E より、MCAO 後において hyper activity は著しく増加し、Diazepam 投与で抑制できる事が分かった。また、hyper activity の増加は、MCAO 後の傷害半球側のみで起こっている事も確認された。

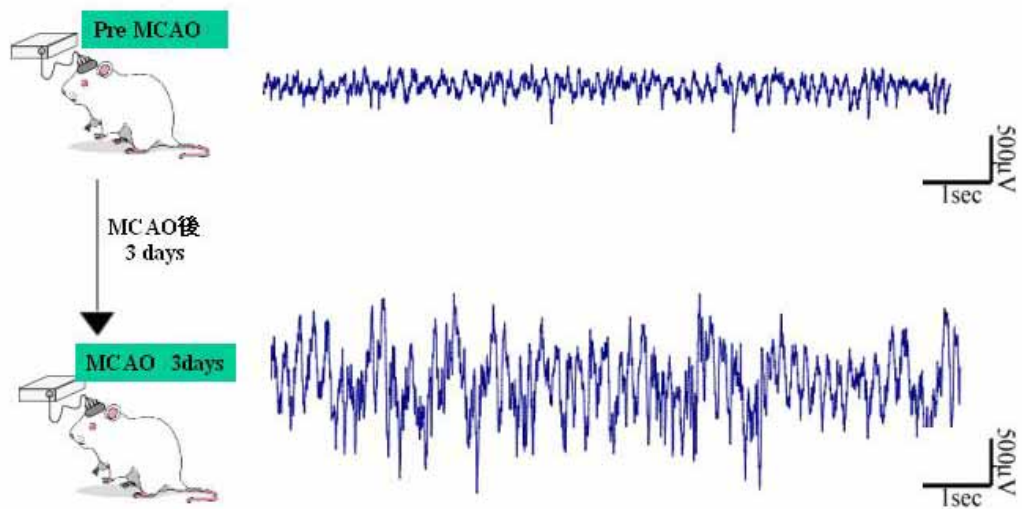
更に、Wavelet 解析及び Power spectrum Density 解析によって、Diazepam 投与後の海馬神経活動がどの様に変化しているかも確認した。まず、Wavelet 解析に

よって、MCAO 後に見られるシーター帯での神経活動の高まりが、Diazepam を投与する事で抑制できる事が分かった（図 1 3 A、B）。この変化は Power Spectrum Density 解析でも確認でき、図 1 3 C で示す通り、MCAO 後に見られる、シーター帯での活動密度の上昇が、Diazepam 投与によって抑制されている事が確認された。



**図9:MCAO 手術後の傷害の広がり及び記録電極位置**

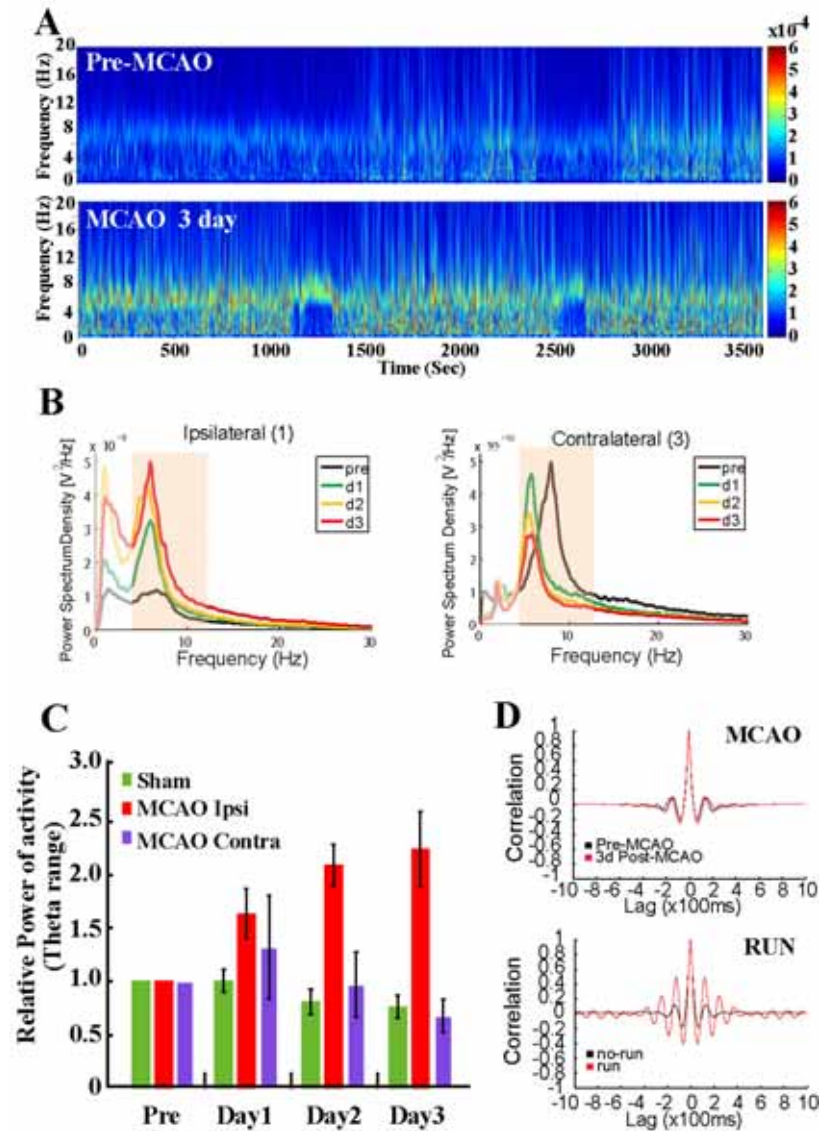
A, 試験デザイン。B, MCAO 手術後 3 日目の脳梗塞障害の広がりを Nissl 染色により確認した。傷害領域は線条体及び皮質に限られ、海馬領域は Nissl 染色では無傷である事が確認された。C, 海馬神経活動測定用の電極は、海馬 DG 領域へ埋め込まれている事が確認された。Scale Bar = 1mm (B)



**図10:MCAO手術後の海馬神経活動の高まり**

脳梗塞(MCAO)前及び手術後の海馬での神経活動を測定した。その結果、MCAO後に傷害半球側海馬で神経活動が著しく高まる事が分かった。





**図 11 : MCAO 手術後の海馬神経活動の高まり**

A, MCAO 後に傷害半球側で活動が高まる事が分かった(Wavelet 解析)。B,C, MCAO 後 3 日目までの経時的変化は、主に 4 ~ 12Hz 帯のシーター波と呼ばれる周波数帯で高まっていた(Power Spectrum Density 解析) (n=4 each)。D, 自己相関は、海馬神経活動が高まる事が知られる Running Wheel で走行時に見られるシーターオシレーションと呼ばれる特徴的な活動のパターンとは異なり、通常の高まりが大きい事が分かった (Auto correlation 解析)。

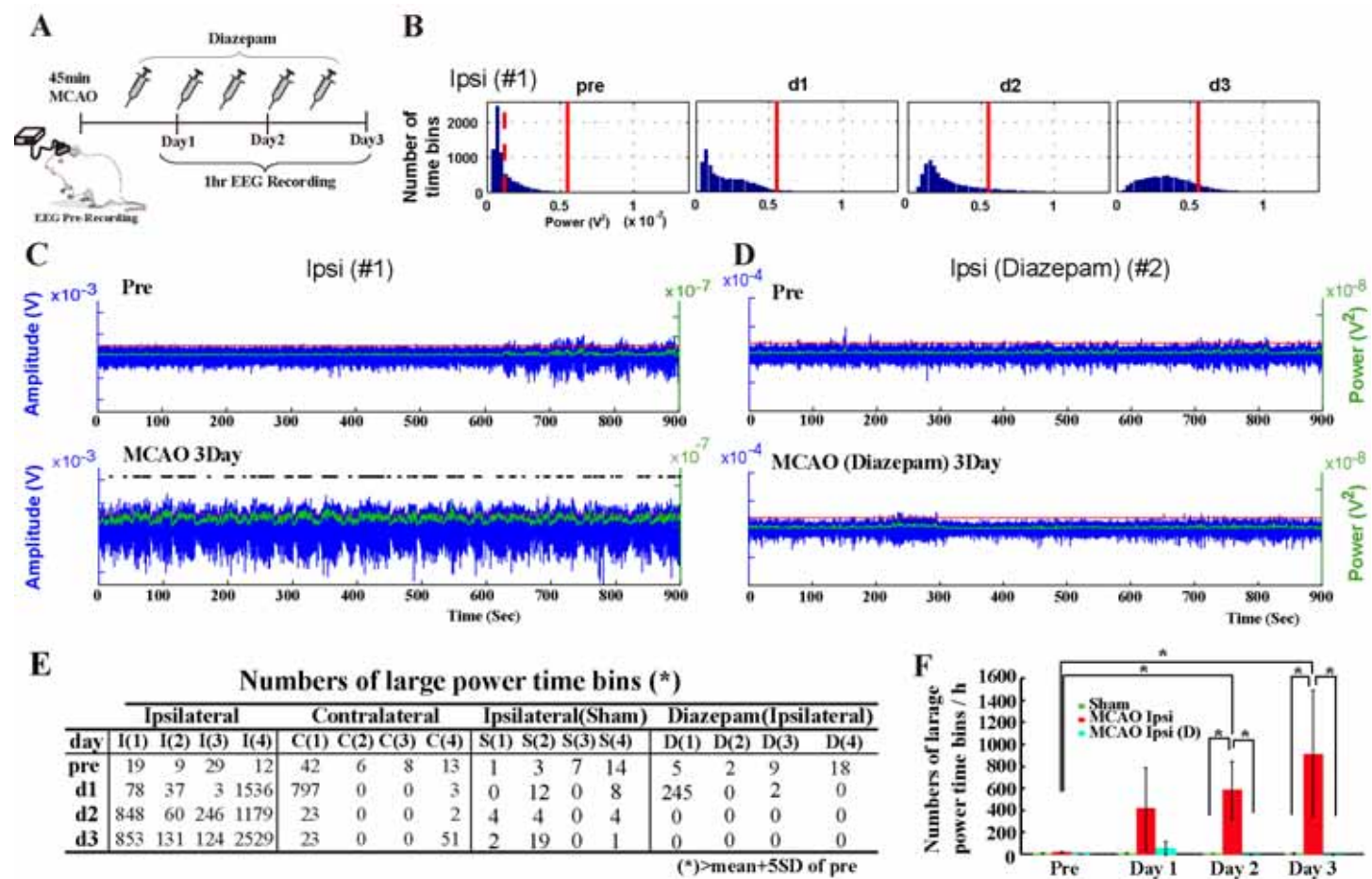
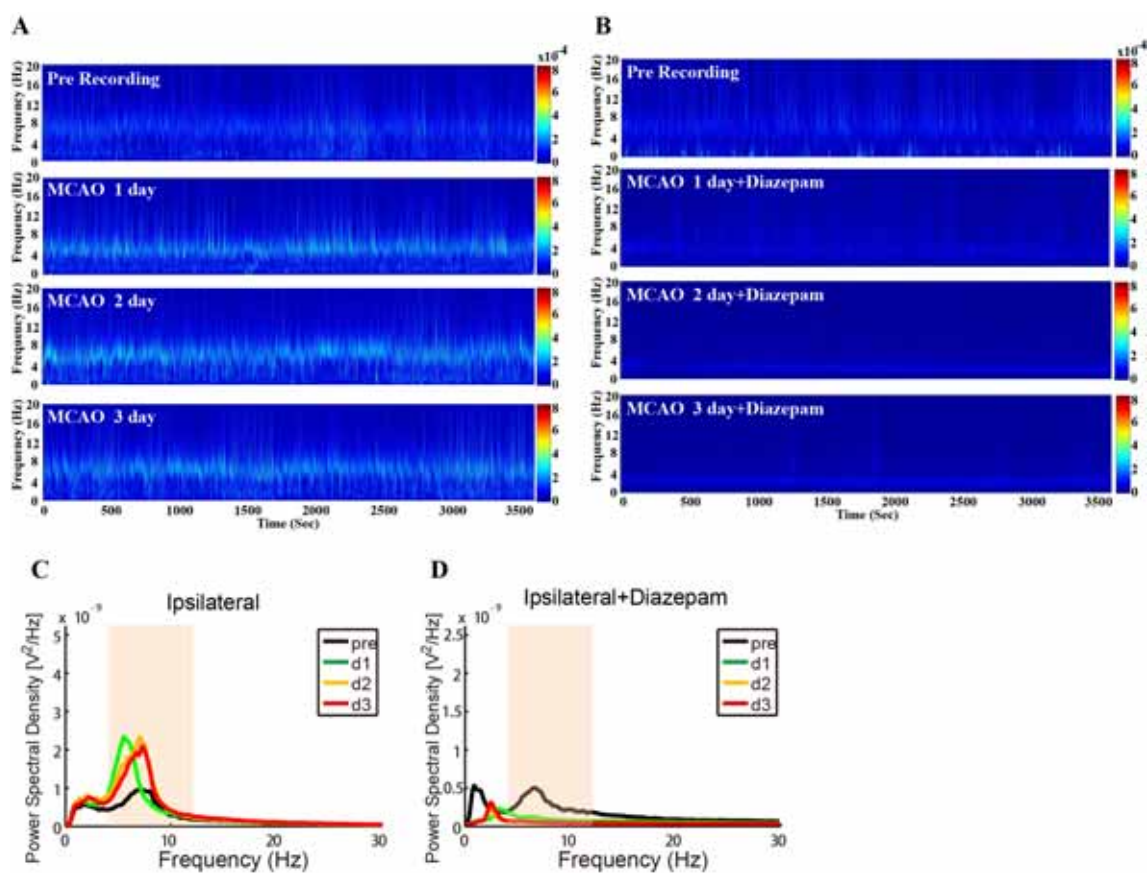


図12:MCAO 手術後の海馬神経活動の高まり

*A*, 試験デザイン。*B*, MCAO 後 3 日目までの Short-time power のヒストグラムを示す。赤の点線は平均値を示し、赤の実線は平均値から標準偏差の 5 倍離れた位置を示す。*C,D*, MCAO 手術前及び手術後 3 日目での測定生波形を示す。緑の実線は平均値、赤の実線は平均値から手術前測定データでの標準偏差の 5 倍の値分だけ離れた位置を示す。MCAO 後では、赤の実線を超える hyper activity が多く見られた。この hyper activity は、Diazepam を投与する事で活動が抑制された。*E,F*, 1 時間中に含まれる hyper activity の検出数を表した。顕著に MCAO 後において海馬での hyper activity の検出数が増加している事が示されている。(  $n=4$  each,  $*p<0.05$ , Student's  $t$ -test for unpaired samples )



**図 13 : Diazepam 投与による活動抑制**

A,B, MCAO 後に傷害半球側での活動の高まりは、Diazepam 投与で抑制される事が分かった(Wavelet 解析)。 C,D, MCAO 後 3 日目までの 4~12Hz 帯のシーター波の増強も、Diazepam 投与により抑制された(Power Spectrum Density 解析)。

### 1.3.2 局所脳梗塞後の海馬幹細胞特異的な増殖

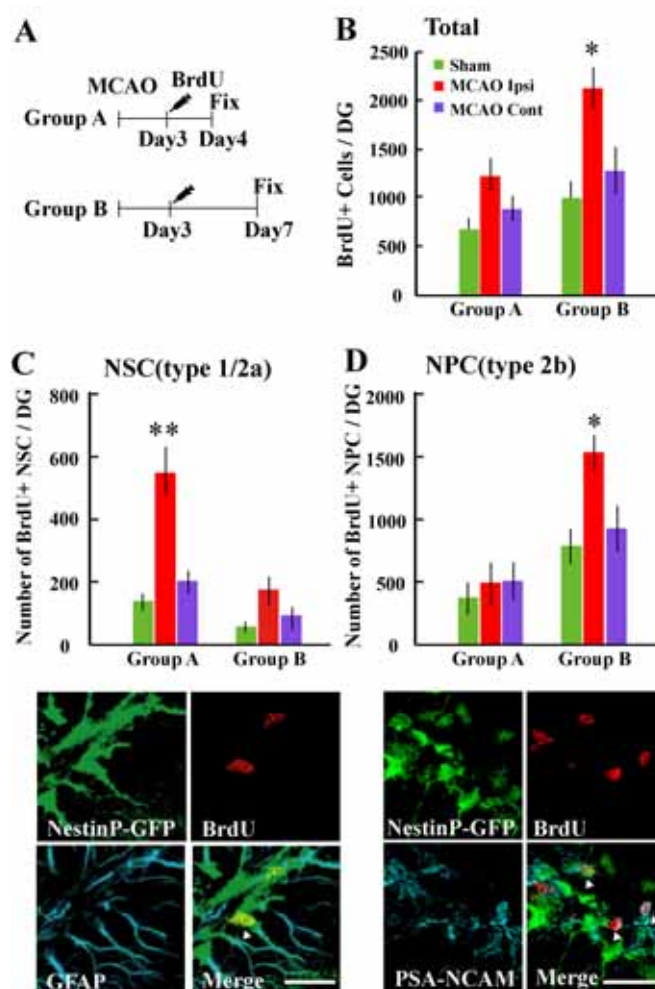
ここまでの実験により、MCAO 後の海馬 DG では、梗塞半球側の海馬 DG で神経活動が特異的に高まる事が確認された。そこで、MCAO 後の海馬神経回路活動の高まりによって、*in vivo* でも神経幹細胞の増殖が促されるのかを検証した。解析方法としては、MCAO 後 3 日目に BrdU を投与する事で、どの細胞種の細胞が分裂しているのかを確認した。また、BrdU 投与タイミングについては、MCAO 後に海馬神経回路の活動が高まる MCAO 後 3 日目を選択した。

まず初めに、今回の BrdU 投与及び BrdU 陽性細胞の評価ポイントについては図 1 4 A に示した。結果として、BrdU 投与 24 時間後において、24 時間後において、BrdU 陽性細胞の総数を確認した。その結果、傷害半球側海馬において BrdU 陽性細胞数が増加している事が分かった (図 1 4 B)。また、この時期の BrdU 陽性細胞について細胞種の特定制を行ったところ、BrdU 投与 24 時間後には、MCAO 群において有意に NestinP-GFP/GFAP 陽性で BrdU 陽性の神経幹細胞が増加している事が確認できた (図 1 4 C)。しかし、NestinP-GFP/PSA-NCAM 陽性で BrdU 陽性の海馬神経前駆細胞の増加はこの時期には見られなかった (図 1 4 D)。更に、BrdU 投与 4 日後には、BrdU 陽性細胞は更に増加し、BrdU 陽性細胞の総数はコントロール群及び MCAO 後の傷害反対側海馬と比較して著しく増加している事が分かった (図 1 4 B)。また、この時期においては、BrdU 陽性の神経幹細胞数は減少しており (図 1 4 C)、変わりに、BrdU 陽性の海馬神経前駆細胞が有意に増加している事が確認できた (図 1 4 D)。

BrdU 陽性神経幹細胞の細胞数の変化から、MCAO 後 3 日目において神経幹細胞

細胞に何らかの変化が生じているのではないかと考えた。そこで、MCAO 後 3 日目において、神経幹細胞の形態学的な変化がないかを検証した。その結果、図 1 5 で示す通り神経幹細胞の突起先端部が広がった形態が確認された。更に神経幹細胞の細胞体から突起の枝分かれ点までの距離を測定したところ、この時期では分岐点の位置が細胞体側へ引き寄せられ、突起が短くなっている事が確認された。先行研究(Fukuda *et al.*, 2003)にて、分裂中の神経幹細胞は突起が短くなっている場合が多い事が示されており、この事は、神経幹細胞が分裂の準備を開始している事を示唆している。以上の事から、MCAO 後 3 日目から神経幹細胞は、海馬神経回路活動の高まりを感知し細胞増殖を開始、その 4 日後には前駆細胞まで分化している事が確認された。

そこで、本章 1.3.2 で得られた結果を元に、Diazepam を投与し MCAO 後の海馬神経回路活動の高まりを抑える事で、神経幹細胞の増殖が抑制できるかを検証した。この実験により、神経活動の高まりと神経幹細胞の増殖の関係が明らかにできると考えられる。実験として、図 1 6 A に示すスケジュールで実験を行い、MCAO 後に Diazepam を投与した個体で、MCAO 後の神経幹細胞の増殖がどの様に変化するかを検証した。図 1 6 B、C に示す通り、MCAO 後に Diazepam を投与し海馬神経回路活動の高まりを抑える事で、神経幹細胞の増殖が抑えられる事が確認された。この事から、MCAO 後の神経幹細胞の増殖については、海馬神経回路活動の高まりにより誘導されている事が確認された。

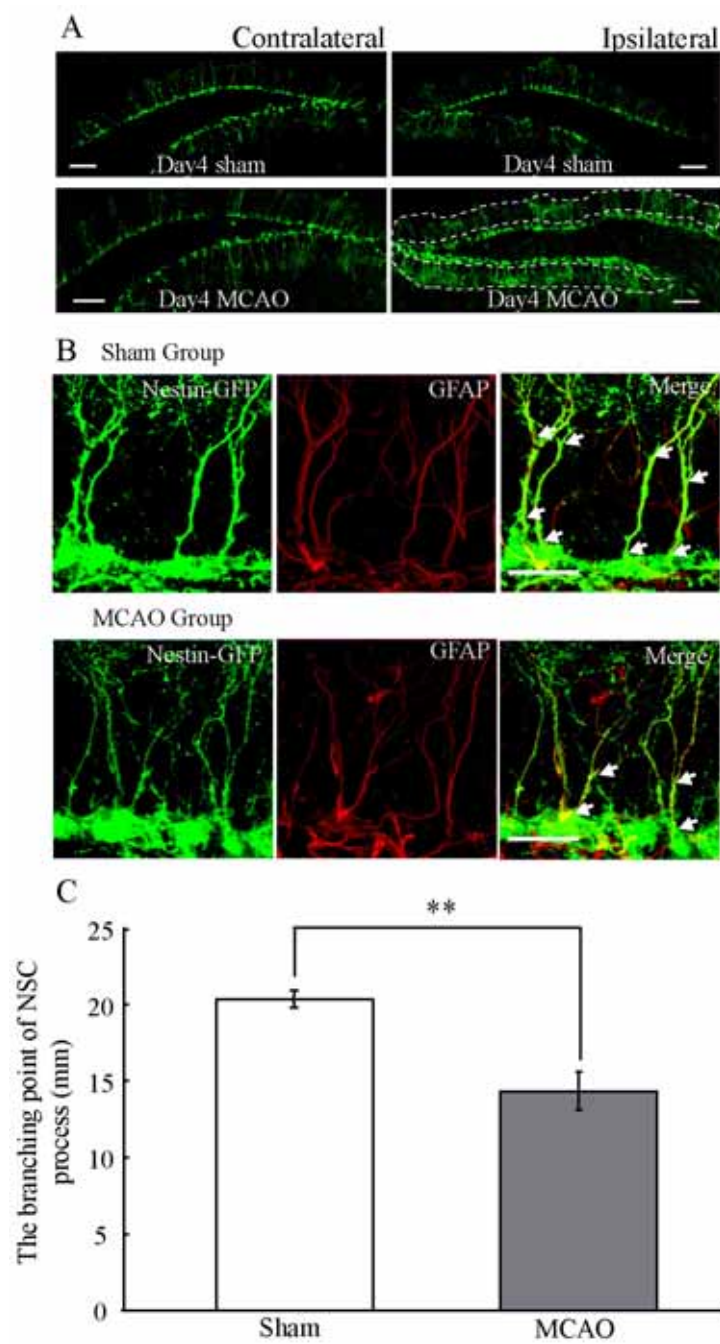


**図14:MCAO 後の神経幹細胞の増殖**

A, 試験デザイン。B, MCAO 後の BrdU 陽性細胞の総計を示した。MCAO 後 4 日目から BrdU 陽性細胞総数が増え始め、7 日目には有意に増加していた。C,D, また 4 日目に BrdU 陽性となっている細胞は主に神経幹細胞(Neural Stem Cell: NSC)であり、7 日目には神経前駆細胞(Neural Progenitor Cell : NPC)へと分裂・分化していた。Scale Bar: 20  $\mu$ m (C); 30  $\mu$ m (D)。データは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

n=5 each, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test for unpaired samples.





**図15:MCAO 後の神経幹細胞の形態変化**

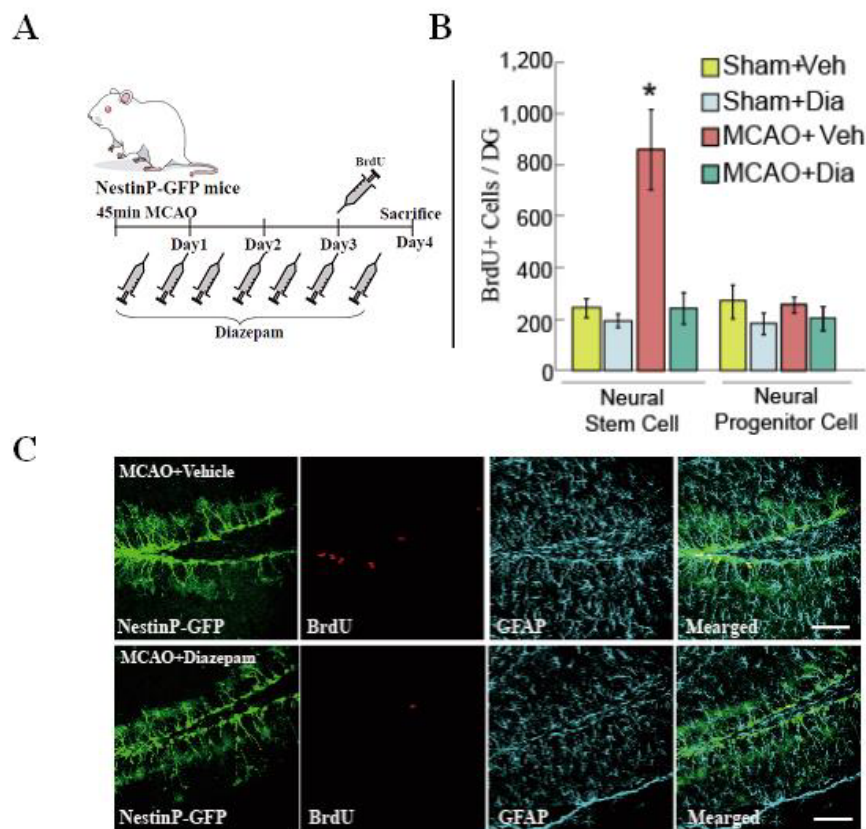
A, MCAO 後 4 日後の海馬 DG の NestinP-GFP 染色図。MCAO 梗塞半球(Ipsilateral)



DG 側で、神経幹細胞の突起先端部が広がった特徴的な形態変化が確認された(A, 右下：点線囲み部分)。B,C, MCAO 後の Ipsilateral 側の神経幹細胞の突起分岐点を観察したところ、分岐点が細胞体側へ近づいており、突起の長さが短くなっている事が観察された。(矢印は、測定した突起長の細胞体側始点及び分岐点を示す。)

Scale Bar: 75  $\mu\text{m}$  (A); 20  $\mu\text{m}$  (B)。データは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

(n=5 each,  $**p < 0.01$ , Student's *t*-test for unpaired samples)



**図16 : Diazepam 投与による MCAO 後の神経幹細胞の増殖抑制**

A, 試験デザイン。B,C, MCAO 後の神経幹細胞の増殖は、Diazepam 投与によりその増殖が阻害された。(n=5 each, \* $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test for unpaired samples)。全てのデータは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。緑 : NestinP-GFP, シアン : GFAP, 赤 : anti-BrdU 染色を示す。Scale Bar: 75  $\mu$ m (C) Neural stem cell は、NestinP-GFP+/GFAP+として、Neural progenitor cell は、NestinP-GFP+/GFAP-として観察した。

## 1.4 考察

脳梗塞により傷害を受けた脳では、障害を受けてから数日遅れての遅延したニューロン新生の増加が、海馬歯状回において確認されている(Jin *et al.*, 2001; Koketsu *et al.*, 2006)。しかしながら、どの様にして脳梗塞後の遅延したニューロン新生の増加が誘導されているかについて未だ不明である。これまでの報告により、脳梗塞後のニューロン新生は、様々な神経栄養因子(bFGFやVEGFなど)による制御機構が報告されている(Yoshimura *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007)。本論文でも、この結果を支持する予備実験結果として、神経幹細胞自身がbFGF及びbFGF受容体を発現している事を確認した(図17)。しかし、この神経栄養因子による制御系だけでは、傷害後の遅延した増殖増加及び傷害半球同側でのニューロン新生の高まりを説明できない。

本章の結果から、脳梗塞後において海馬神経活動が傷害半球特異的に高まり、ニューロン新生の増加(特に神経幹細胞の増殖)を促進する事が分かった。この結果は、これまでの神経栄養因子説により説明が出来ていなかった“遅延した増殖”及び“傷害半球同側での増殖”という疑問について一つの解答ができていると考えられる。再度結果をみると、脳梗塞後3日目に、海馬において神経活動が高まり、同時に神経幹細胞の増殖が確認された(図11、12、14)。次に、選択的なGABA-A受容体のactive potentiatorであるDiazepamの投与により、脳梗塞後の海馬で見られる海馬神経活動の高まりが抑制される事が確認された。更に、Diazepam投与により脳梗塞後の神経幹細胞の増殖についても抑制する事ができた(図12、13、16)。本実験で得られた結果は、脳梗塞後の海馬

神経活動の高まりをDiazepamが抑制する事で、神経幹細胞の増殖が抑制されている事を示している。

神経活動と神経幹細胞の増殖の関係については、これまでの報告により、神経活動の高まりが神経幹細胞の増殖を促す事が報告されている(Huttmann *et al.*, 2003; Deisseroth *et al.*, 2004; Bruel-Jungerman *et al.*, 2006; Kokaia, 2011)。この章で得られた結果でも、神経活動の高まりによる神経幹細胞増殖が誘導されている事を、脳梗塞モデル(MCAOモデル)を用いて明確に示している。

本論文では先に述べた通り、神経活動の高まりによる神経幹細胞の増殖機構を示す為、Diazepamを使用した。しかし、Diazepamの神経幹細胞及び前駆細胞への直接的な影響を考慮する必要がある。この点について、当研究室の岡田夏美氏の平成19年度修士論文にてDiazepam Binding Inhibitor (DBI)と呼ばれる特徴的なタンパクが神経幹細胞及び前駆細胞で発現しており、Diazepam投与によっては神経幹細胞・前駆細胞の細胞増殖には影響しない事が示されている。DBIは、Benzodiazepine系化合物がGABA-A受容体へ結合する事を阻害する内在性タンパク質である(Guidotti *et al.*, 1983)。また、DBIは、海馬歯状回においても発現しており、神経幹細胞でも発現している事も報告されている(Yanase *et al.*, 2002)。また、岡田氏の修士論文で、DBIは神経幹細胞の細胞膜および細胞体に発現している事が示されている。よって、これらの事から、脳梗塞後のDiazepam投与による神経活動の抑制及び神経幹細胞の増殖抑制は、神経活動の高まりが神経幹細胞の増殖を誘導している事を強く示すものと考えられる。しかし、DBIの機能など不明な点も多い為、更なる研究が必要である。

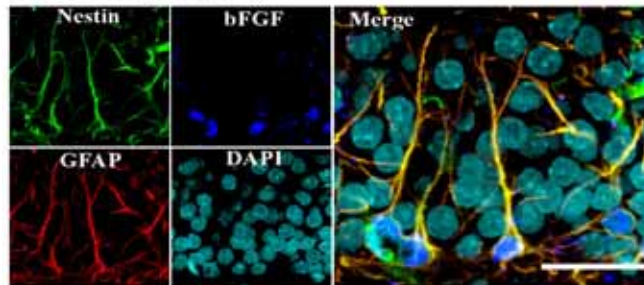
次に、今回得られた脳梗塞後の神経活動の高まりは、Wavelet解析及びPower spectrum解析により、シーター帯（4-12Hz）での活動の高まりである事が確認された（図11）。しかし、自己相関係数の解析により、脳梗塞後の神経活動のパターンは健常マウスの定常状態での海馬神経活動と同じであり、通常の神経活動がそのまま高まった状態である事が分かった。自発運動により誘導される海馬神経活動パターンの高まりと比較すると、自己相関係数の結果は大きく異なり（図11D）、脳梗塞後の海馬神経活動の高まりと自発運動時の海馬神経活動の高まりは、質的に異なる活動である事が分かった。脳梗塞後の神経活動の高まりは、これまでに報告されている大きな神経活動(Buzsaki *et al.*, 1991; Bragin *et al.*, 2009; Engel *et al.*, 2009)がシーター帯で増加する事で誘導されており、自発運動時のシーター波(Vanderwolf, 1969; Lee *et al.*, 1994; Buzsaki, 2002)とは違った機構により神経活動が高まっていると考えられる。

最後に、脳梗塞後のニューロン新生について、脳梗塞後の脳機能障害の改善に働くのか、機能を悪化させるのか未だ不明である。この点について、最新の報告から、脳梗塞後に生まれてきた新生ニューロンは、通常では見られない異常な軸索が伸びており、局所的な異常回路を形成している事が報告された(Niv *et al.*, 2012)。癲癇の脳では、同様な異常形態を持った新生ニューロンが、癲癇症状の悪化をもたらす要因であると考えられている(Parent *et al.*, 1997; Scharfman *et al.*, 2000)。この事から、脳梗塞後に生まれてくる新生ニューロンは、脳梗塞後に見られる学習や認知機能の低下をもたらす因子となる可能性があると考えられる。また、図15で示した通り、脳梗塞後の初期の段階で、神経幹細胞の形態

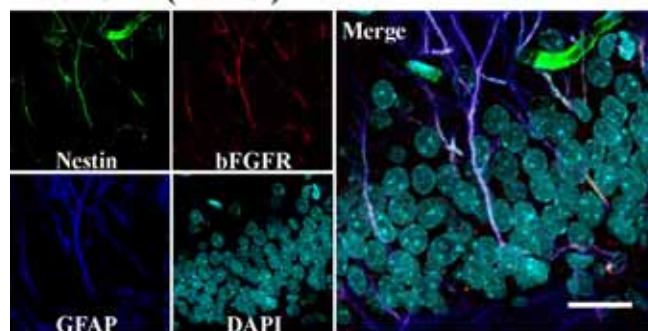
変化が見られている。本章では、神経幹細胞が細胞分裂を積極的にしようとする根拠として解釈したが、もし脳梗塞後のニューロン新生が海馬依存的機能の低下要因となるのであれば、神経幹細胞段階での形態変化は、既に海馬回路へ悪影響を及ぼす原因となっている可能性も考えられる。

本論文では、脳梗塞後のニューロン新生の抑制による海馬依存的な機能の変化については解析をしていない。今回この章で確かめられたDiazepam投与により脳梗塞後のニューロン新生の増強を抑制する事で、脳梗塞後のニューロン新生の意義にもアプローチできるかもしれない。今後の更なる研究が望まれる。

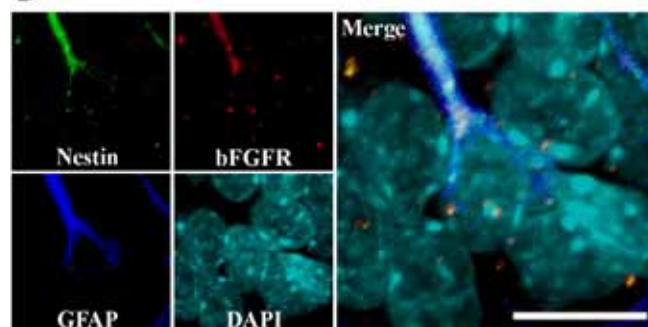
**A : bFGF (control)**



**B : bFGFR (control)**



**C**



**図17:神経幹細胞での bFGF 及び bFGF-R の発現**

SD-ラット(8 週齢、雄：三共ラボ)を本実験の免疫染色方法でサンプルを作成し、anti-Nestin, anti-GFAP と anti-bFGF 若しくは anti-bFGFR にて免疫染色を行ったところ、神経幹細胞は bFGF 及びその受容体 bFGFR を発現している事が確認された。神経幹細胞は、Nestin+/GFAP+として確認した。

## 第 2 章

### 脳梗塞後の神経活動の高まりによるグルタミン酸放出が誘導する 神経幹細胞の増殖



## 2.1 序論

我々大人の脳では、成体の脳でも海馬歯状回（dentate gyrus : DG）では日常的に新しく神経細胞が生み出され、既存の神経回路に組み込まれる事が分かってきた(Altman & Das, 1965; 1967; Kaplan & Hinds, 1977; Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Eriksson *et al.*, 1998; Kornack & Rakic, 1999; van Praag *et al.*, 2002; Abrous *et al.*, 2005; Aimone *et al.*, 2006; Toni *et al.*, 2007)。第 1 章序論でも記載したが、海馬で新生される神経細胞数は、動物が置かれる環境に応じて変化する事がわかっている。例えば、運動・学習や新しい環境下での探索や行動など、刺激が多い環境で生活をした場合には、新生される神経細胞数が増加する(Gould *et al.*, 1999; van Praag *et al.*, 1999; Trejo *et al.*, 2001; Kronenberg *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2007)。また、脳梗塞や(Liu *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Kee *et al.*, 2007)、癲癇(Parent *et al.*, 1997)などによっても神経細胞数が増加する。この海馬における神経新生は、海馬に存在する神経幹細胞及び神経前駆細胞により制御されている(Seri *et al.*, 2001; Filippov *et al.*, 2003; Fukuda *et al.*, 2003; Kempermann *et al.*, 2004)。それぞれの神経幹細胞及び前駆細胞の特徴についてはこれまでの先行研究により報告されており、初期段階では神経幹細胞から神経前駆細胞が生み出され、その後成熟神経細胞へと分化していく事が示されている(Fukuda *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005)。

また、第 1 章で記述の通り海馬における神経新生は、海馬神経活動の高まりにより促進される事が認められており(Cameron *et al.*, 1995; Deisseroth *et al.*, 2004; Tozuka *et al.*, 2005; Bruel-Jungerman *et al.*, 2006; Chun *et al.*, 2006)、更に、神

経活動に伴いシナプスより放出される各神経伝達物質による調整機構（大別して、 $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)作動性経路、コリン作動性経路、グルタミン酸作動性経路）が、海馬における神経新生の初期段階を制御していると考えられている。(Cameron *et al.*, 1995; Santarelli *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005; Itou *et al.*, 2011)。

海馬での分裂能を有する細胞である神経幹細胞及び神経前駆細胞については、当研究室の戸塚祐介博士により、神経前駆細胞はグルタミン酸受容体である NMDA 受容体、AMPA 受容体、及び Glycine 受容体は発現しておらず、GABA 入力を受け取る事で神経細胞への分化が促進する事が知られている(Tozuka *et al.*, 2005)。また、神経幹細胞については、GABA 受容体、グルタミン酸受容体である NMDA 受容体、AMPA 受容体は発現していない事が報告されている(Tozuka *et al.*, 2005)。また、当研究室の福田諭博士の博士論文にて、神経幹細胞はグルタミン酸の入力を受け細胞内カルシウム応答を示す事が示されている。この時、カルシウム応答は、細胞外カルシウムフリーの状況下でも見られる事から、G タンパクを介した細胞内 Calcium Store からのカルシウム放出により引き起こされている可能性が考えられる。また、神経幹細胞は海馬神経活動が高まった場合、神経回路内にグルタミン酸が放出される事が知られている(Okubo *et al.*, 2010)。そこで、本研究では、海馬神経活動が高まった場合、神経回路からグルタミン酸が放出され、そのシグナルを代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor: mGluR) を介して神経幹細胞が受け取り、細胞内 Calcium store からのカルシウム放出が誘導されるのではないかと考えた。各

種グルタミン酸の種類及び性質について、表 1 ( P 1 5 ) にまとめる(Swanson *et al.*, 2005; Kullmann, 2007)。代謝型グルタミン酸受容体以外のグルタミン酸受容体については、細胞外のカルシウムを細胞内へ通過させる事で細胞内カルシウム濃度を上昇させる。つまり、細胞外にカルシウムイオンがない場合には、細胞内カルシウム濃度の上昇が起こらない。また、代謝型グルタミン酸受容体の内、Group I に属する mGluR1, 5 は、G タンパクを介して細胞内 Calcium Store よりカルシウムを放出させ細胞内カルシウム濃度を上昇させ。他の Group II 及び Group III の mGluRs についてはカルシウム濃度を上昇させる下流シグナルがない。これにより、Group I の受容体である、mGluR1 及び mGluR5 を候補受容体と仮説を立て、神経幹細胞での発現を確認した。

まず、mGluR1 の発現は、免疫染色法で神経幹細胞は確認できなかった。次に mGluR5 について、免疫染色により神経幹細胞での発現が確認できた。更に、mGluR5 の発現は、*in situ* hybridization でも確認された。また、カルシウムイメージング法によって、mGluR5 を介して神経幹細胞はカルシウム応答を示す事も確認できた。更に、神経幹細胞は、海馬神経回路を人工的に電気刺激を与え、神経活動を高めた場合でも細胞内カルシウム応答を示し、その後、神経幹細胞の活性化（遺伝子転写の開始）や細胞分裂の促進が確認された。この細胞の活性化や細胞分裂の増加は、選択的 mGluR5 の阻害薬で阻害された。また、これとは反対に mGluR5 を人工的に刺激する事で、神経幹細胞の細胞分裂が促進された。この事から、神経活動の高まりにより放出されるグルタミン酸が、神経幹細胞が発現している mGluR5 を刺激し、神経幹細胞の細胞増殖が誘導してい

る事が示された。

## 2.2 実験方法

- 実験動物：

東京大学山口正弘先生より提供頂いた ICR マウス血統の NestinP-GFP トランスジェニックマウス(Tozuka *et al.*, 2005) (6 ~ 14 週齢、雄) 及び ICR マウス (三共ラボ) (8 ~ 12 週齢、雄) を用いて実験を行った。これら実験動物は、研究室内にあるクリーンルームにて飼育用のケージに入れられ、室内気温  $24 \pm 1$  °C、12 時間周期で昼夜を切り替える (午前 8 時に飼育室の電気を点灯し、午後 8 時に消灯するサイクル) 環境で飼育した。また、実験動物の取り扱いについては、東京大学規定の “ Experimentation protocols approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Tokyo ” に則って実施され、使用実験動物数を最小限にするように努めた。

- in situ hybridization：

本実験は、慶應義塾大学医学部 仲嶋一範教授及び金谷繁明氏の指導の下、中嶋研究室で確立され国際的に認められた手法により実施した(Sasaki *et al.*, 2008)。mGluR5 cDNA は「FANTOM clone set」内の「AK032422」から作製した。「RIKEN FANTOM cDNA clones」とは RIKEN GSC、the Genome Exploration Research Group によって作製され販売されている clone キットである(Sasaki *et al.*, 2008)。

まず初めに、Digoxigenin (DIG)ラベルされた antisense 及び sense riboprobe を DIG RNA labeling kit (Boehringer Mannheim)を用いて合成した。使用する

海馬スライスについては、NestinP-GFP トランスジェニックマウスを PBS にて還流し、その後 4% PFA にて還流固定をした。次に脳を取出し 4 °C にて 4% PFA による後固定を一晩実施した。この固定した脳は、その後、4 °C に一定冷却された 15%及び 30%スクロース(PBS)中で各 1 日ずつ浸し、スクロース置換をさせた。この脳を用いて、*in situ* hybridization に必要である 20- $\mu$ m の冠状スライスをクライオスタット(Leica) を用いて作製した。このスライスを用いて以後の下処理及びその後の手順を進めた。

準備したスライスを 1  $\mu$ g/ml proteinase K にて 7.5 分間処理した。その後、mGluR5 に対する riboprobe を含む Hybridizations 溶液 ( 50% formamide, 5X SSC, 500  $\mu$ g/ml Heparin 及び 200  $\mu$ g/ml yeast tRNA ) にスライスを 55 °C で一晩保持した。この Hybridization 処理後、スライスを 50 °C の 2X SSC 及び 0.2X SSC にて洗浄した。最後に、mGluR5 RNA 及び GFP シグナルの検出は、alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG F (ab')<sub>2</sub> antibody 及び anti-GFP antibody を用いて確認した。GFP シグナルの検出については、biotinylated secondary antibody にてシグナルを増幅後、TSA Fluorescence systems Tyramide signal amplification (NEL701A; Perkin Elmer)にて染色し検出した。mGluR5 については、HNPP Fluorescent Detection set (Roche Diagnostics)を用いてシグナルを検出した。上記染色した各 mGluR5 及び GFP については、共焦点蛍光顕微鏡 (TCS SP2; Leica)を用いて確認した。染色切片の染色画像については、共焦点蛍光顕微鏡を用いて取得し、設定は 1024 x 1024 ピクセル、63x oil-immersion レンズにてデジタルズームを 2x 若しくは 4x をかけてスキャ

ンした。得られた画像は、画像の切り抜き等必要最低限の処理を Adobe Photoshop 7.0.1 にて実施した。

- 免疫電子顕微鏡法：

免疫電子顕微鏡画像は、久恒研究室で確立された方法を用いて実施した (Tozuka *et al.*, 2005; Ide *et al.*, 2008)。成体の NestinP-GFP トランスジェニックマウスを 4% PFA/0.4% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) にて還流固定した。その後、取り出した脳を 4% PFA にて 4 時間後固定し、Vibratome を用いて 50- $\mu$ m の厚さにスライスした。得られた切片は、4°C で 0.02% sodium azide を含む PBS 中で保存した。次に、20% normal donkey serum (NDS) を含む PBS/0.02% sodium azide でブロッキングした後、anti-GFP (1:2000, rat IgG, Nakarai Tesque) で一晩反応させた。この切片を biotinylated anti-rat IgG (1:500, Chemicon) で反応させた後、ABC reagent kit (Vector) で処理した。この切片を 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Nacalai Tesque) 溶液中で 10 ~ 15 分間保持した。最後に、上記の処理が完了した切片を 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) を含む PB にて後固定し、1% 酢酸ウラン溶液で室温 40 分間染色し、その後 50%, 70%, 90%, 95%, 100% エタノールにて脱水処理をした。このウラン染色後の切片は Luveak 812 に包埋し、電子顕微鏡観察用の超薄切片 (70 nm) をミクロトームを用いて作成した。超薄切片は、Formvar-coated copper grids の上に乗せ電子顕微鏡 (H7600, Hitachi) にて観察した。

- カルシウムイメージング法：

健常成体 ICR マウス（8～12 週齢、雄）を用いて実施した。方法は当研究室で報告済みの手法を用いた(Okada *et al.*, 2003; Imura *et al.*, 2005; Tozuka *et al.*, 2005; Itou *et al.*, 2011)。まず Ketamine (50 mg/kg, 筋肉注射), Xylazine (5 mg/kg, 筋肉注射)及び Atropine (0.01 mg/kg、皮下投与)麻酔下において、海馬幹細胞を標識する為、Standard artificial cerebrospinal fluid (ACSF) (in mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.3MgCl<sub>2</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4L-ascorbic acid, 25 NaHCO<sub>3</sub>, and 12.5 d-glucose)中に最終濃度 400 μM となるように溶解した Sulforhodamine 101 (SR101; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を Nanoject-II (Drummond Scientific Company, PA)を用いて側脳室へ注入した (69.0 nl を左右側脳室へ 44 回ずつ注入した。注入部位座標：A -0.22 mm, L ± 1.0 mm, V -2.4 mm)。その後、カルシウム濃度に応答して蛍光強度が変化する試薬である Oregon Green 488 BAPTA-1, AM (OGB-1; Invitrogen, CA) を海馬領域の細胞へ取り込ませる為、マウス海馬へ Nanoject-II を用いて OGB-1 溶液 (10 mM OGB-1、4%の 20% pluronic F-127 及び 96%の Dimethyl Sulfoxide)を注入した (69.0 nl を各エリアに 4 回ずつ注入。注入部位座標：A -1.5 mm, L ± 0.5 mm, V -2.0 mm, A -2.3 mm, L ± 1.5 mm, V -1.5 mm)。SR101 及び OGB-1 注入後、マウスを 37°C の保温パット上で 150 分間保温した。

次に、カルシウムイメージング用のスライスを作製する為、マウスをエチルエーテルにて深く麻酔をかけた後、即座に脳を取出し、氷冷下にて



DTK-1000 vibratome (Dosaka)を用いて 400  $\mu\text{m}$  厚の冠状スライスを作製し、37  $^{\circ}\text{C}$  に保温された standard p-ACSF (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.4 mM L-ascorbic acid, 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , and 12.5 mM d-glucose)にて 30 分間保持し、スライスを安定させ、その後実験に使用するまで室温にて保持した。各 OGB-1 及び SR101 の蛍光の検出は、それぞれの蛍光波長である 488 及び 568 nm の蛍光波長を、冷却 CCD camera (HiSCA; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)を搭載した Nipkow disk type Confocal Laser-Scanning unit (CSU-21; Yokogawa, Tokyo, Japan)及び Argon/Krypton laser (Model 643-YOKO-A02; Melles Griot, Carlsbad, CA), を用いて測定した。測定・解析用のソフトとしては、AQUACOSMOS imaging interface system (Hamamatsu Photonics)を用いて行った。本イメージング設備は久恒研究室にて確立されたものであり、過去の報告でも使用された信用ある設備である (Okada *et al.*, 2003; Imura *et al.*, 2005; Tozuka *et al.*, 2005; Itou *et al.*, 2011)。神経幹細胞については、海馬 DG に存在する SR101 陽性の神経幹細胞特有の突起を有する細胞として特定した。

イメージング中に使用したアゴニストについては、PV820 pneumatic pico-pump (World Precision Instruments, Inc.) を用いて、神経幹細胞の細胞体周辺に各薬剤を 2 秒間 4 psi で噴射し細胞のカルシウム応答を確認した(Itou *et al.*, 2011)。本実験で使用したアゴニストは、Glutamate (1 mM; L-Glutamic Acid, Wako), mGluR5 の特異的アゴニストである CHPG (10mM; (RS)-2-Chloro-5-hydroxyphenylglycine, TOCRIS)、また、阻害剤に

については、G 蛋白質の内 Gq シグナルを介したカルシウム応答を阻害する 2APB (100 $\mu$ M; 2-Aminoethyldiphenylborinate, Sigma-Aldrich) を用いた。これらのアゴニスト及びアンタゴニストについては、上記の p-ACSF に溶解し使用した。

- スライス刺激法：

NestinP-GFP トランスジェニックマウスを用い、カルシウムイメージングで記載した同じ手法により 400  $\mu$ m 厚のスライスを作製した。この実験では、マウスの側脳室及び海馬への SR101 及び OGB-1 注入はしていない。本スライスを室温の p-ACSF で保持し、人工的に海馬神経回路を刺激する為、電気刺激用の電極を海馬回路の貫通繊維が走る領域へ埋め込み、シーターバースト刺激と呼ばれる自然の状況で海馬回路が活性化した際にみられる活動パターンに似せた刺激を与えた (40  $\mu$ A の強さで、100 Hz の 10 回刺激するパターンを 5Hz の頻度で 2 秒間与える。これを 10 秒間隔で 3 回刺激を与える。)

刺激 2 時間後にスライスを 4%PFA で一晩固定し、その後 15%及び 30% sucrose (in PBS)にて置換をした。このスライスを DTK-1000 vibratome (Dosaka)を用いて 50  $\mu$ m 厚のスライスへ re-section をし、神経幹細胞での c-Fos 発現について解析した。本解析では、各刺激群に対して 3 枚のスライスで刺激を与え、それぞれのスライスから更に 3 枚の re-section スライスを作製し解析した(計 9 枚)。本実験での神経幹細胞の特定は、GFP 及び GFAP

免疫染色を実施し、NestinP-GFP 陽性及び GFAP 陽性の細胞を神経幹細胞として特定した。各 re-section スライス上で、神経幹細胞を上記の方法で特定し、無作為に 1 スライスあたり 20 個の神経幹細胞を選び、計 180 個細胞を解析対象の細胞とした。この解析対象とした神経幹細胞の細胞体を共焦点蛍光顕微鏡でマニュアル選択し、その細胞体で発現している c-Fos の蛍光強度 (0-255) を共焦点蛍光顕微鏡 (TCS, SP2; Leica) で測定した。mGluR5 の阻害実験では、電気刺激を与える際に mGluR5 の選択的阻害薬である MPEP (10  $\mu$ M; 2-methyl-6-(phenylethynyl) pyridine, Sigma) を加え実験を行った。

- スライスカルチャー法：

スライスカルチャーとは、生きている海馬冠状スライスを培養液中で長時間培養できる手法である。これまで当研究室の戸塚祐介博士によりこれまで難しかった成体での海馬スライスカルチャーが可能となっていた (Tozuka *et al.*, 2005)。しかしながら、今回研究の対象となる神経幹細胞については、従来のスライスカルチャー法では長時間の培養が難しく、本研究にて神経幹細胞を長時間スライス状態で培養できる新しいシステムを構築した。この新しい方法にて、神経幹細胞の分裂を追跡する事ができる 9 時間以上の培養が可能となった。まず、NestinP-GFP トランスジェニックマウス (6 週齢以上、雄) にエーテル麻酔をかけた後、4℃ 以下に冷却した modified Gey's balanced salt solution (mGBSS;  $\text{CaCl}_2$ : 1.5 mM, KCl: 4.9 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0.2

mM,  $\text{MgCl}_2$ : 11 mM,  $\text{MgSO}_4$ : 0.3 mM, NaCl: 130 mM,  $\text{NaH}_2\text{CO}_3$ : 2.7 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 0.8 mM, NaHEPES: 22 mM, Glucose: 5 mM, pH: 7.34) 中へ取出した。この温度はスライスへのダメージ軽減に対して非常に重要であり、全ての作業は氷上にて実施した。この脳から、DTK-1000 vibratome (Dosaka)を用いて 400  $\mu\text{m}$  厚の冠状スライスを切り出し、海馬以外の余分な領域を切り取った後、培養用の膜である Millicell-CM culture inserts (Millipore, Bedford, MA)の上に海馬スライスを保持し、培養用 medium( 25% Hank's balanced salt solution, 25% normal horse serum, and 50% DMEM supplemented with 1.32% glucose ) に栄養因子の一種である Vascular endothelial growth factor (VEGF) (30 ng/ml; Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を加えた培地を入れた 6-well culture trays の上に培養膜を浮かべ、32°C で 9 時間培養を行った。従来の方では VEGF を加えての培養はしておらず、VEGF を加える事で長時間の培養でも神経幹細胞が生存できるようになった。この点が改良点により、スライス中の神経幹細胞へのダメージを軽減出来たものと考えられ、重要なポイントである。培養後のスライスは、4%PFA で一晩固定し、その後 15%及び 30% Sucrose (PBS)にて置換し、先述の方法と同じく DTK-1000 vibratome (Dosaka)を用いて 50  $\mu\text{m}$  厚のスライスへ re-section をし、re-section スライスを作製した。

スライスカルチャー実験で使用した海馬への電気刺激は、”スライス刺激法”で記載した方法で実施した。ただし、本実験では、p-ACSF の代わりに mGBSS 液中で実施した。

また、各種阻害剤として、mGluR5 阻害剤 MPEP (10  $\mu$ M), G-protein Gq-mediated calcium signal 阻害剤 2APB (100  $\mu$ M)及び栄養因子 BDNF シグナル阻害剤 TrkB-Fc (1  $\mu$ g/mL, R&D systems, Inc.)を mGBSS に溶解し使用した。

- 免疫染色法：

海馬切片での免疫染色についてはこれまでの久恒研究室で使用した標準的な手法を用いた(Fukuda *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Itou *et al.*, 2011)。

< mGluR5 染色 > < c-Fos 染色 >

切片を TBS で 10 分間 3 回洗った後、ブロッキング溶液( 0.1 % Triton X-100 及び 10% NGS (normal goat serum, Sigma) (mGluR5 に対して)または又は 3% NDS(normal donkey serum, Sigma) (c-Fos に対して)を含む TBS )にて 90 分間室温にて保持し、その後、1st 抗体(anti-GFP 及び anti-GFAP と anti-mGluR5 又は anti-c-Fos)をブロッキング液中に加え 4 で 24 時間反応させた。その後 TBS にて 10 分間 3 回洗浄し、その後 2nd 抗体を含むブロッキング液で室温 2 時間反応させた。この切片を TBS で 10 分間 3 回洗浄した。染色が完了した切片をスライドガラスにのせ、ImmuMount (Shandon, Pittsburgh, PA) で封入した。この切片を、共焦点蛍光顕微鏡 (TCS SP2; Leica)を用いて観測した。染色切片の染色画像については、共焦点蛍光顕微鏡を用いて取得し、

設定は 1024 x 1024 ピクセル、63x oil-immersion レンズにてデジタルズームを 2x 若しくは 4x をかけてスキャンした。得られた画像は、画像の切り抜き等必要最低限の処理を Adobe Photoshop 7.0.1 にて実施した。

#### < Ki67 染色 >

Ki67 とは、細胞分裂期に入っている細胞が発現するタンパク質である（図 18）。切片を PBS で 10 分間 3 回洗った後、ブロッキング溶液（0.3 % Triton X-100 及び 3 % NGS を含む PBS）にて 90 分間室温にて保持し、その後、1st 抗体（anti-Ki67、anti-GFP 及び anti-GFAP）をブロッキング液に加え 4℃ で 48 時間反応させた。その後 PBS にて 10 分間 3 回洗浄し、その後 2nd 抗体を含むブロッキング液で室温 2 時間反応させた。この切片を PBS で 10 分間 3 回洗浄した。染色が完了した切片をスライドガラスにのせ、ImmuMount (Shandon, Pittsburgh, PA) で封入した。この切片を、共焦点蛍光顕微鏡（TCS SP2; Leica）を用いて観測した。Ki67 陽性な神経幹細胞数の解析については、スライス中に存在する全ての神経幹細胞について Ki67 の発現を調べ、全神経幹細胞中の Ki67 陽性神経幹細胞の割合として解析を行った。また、上記で使用した抗体については表 3 にまとめる。



**図18： 細胞周期マーカーKi67 の発現期間**

Ki67 は、G1 後期から M 期までの間で発現するタンパク質であり、細胞周期マーカーとして使用されている。図4で示した BrdU とは異なり、取り込まれた BrdU を特定するのではない為、現在細胞周期に入っている細胞を特定できる。

**表3 : 使用した 1st 抗体及び 2nd 抗体**

抗体名	会社	由来	希釈率
<b>1st 抗体</b>			
Anti-GFP	Molecular Probes	rabbit IgG	1:250
	Nakalai Tesque	mouse IgG	1:500
	Nakalai Tesque	rat IgG	1:500
Anti-GFAP	Sigma	mouse IgG	1:200
Anti-Ki67	Novocastra	rabbit IgG	1:500
Anti-mGluR5	Neuromics	rabbit IgG	1:2500
Anti-c-Fos	Santa Cruz Biotechnology	goat IgG	1:200
<b>2nd 抗体(蛍光)</b>	<b>会社</b>	<b>Anti-X</b>	<b>希釈率</b>
Alexa 488	Molecular Probes	anti-rabbit IgG	1:1000
	Molecular Probes	anti-mouse IgG	1:1000
	Molecular Probes	anti-rat IgG	1:1000
Rhodamine	Jackson ImmunoResearch	anti-rat IgG	1:200
	Jackson ImmunoResearch	anti-mouse IgG	1:200
	Jackson ImmunoResearch	anti-goat IgG	1:200
	Chemicon	anti-rabbit IgG	1:200
Cy5	Jackson ImmunoResearch	anti-mouse IgG	1:200
	Jackson ImmunoResearch	anti-rabbit IgG	1:200



- c-Fos 発現強度解析及び Ki67 陽性細胞カウント：

本実験は、盲検下での評価を行った。染色後、切片をスライドガラス及びカバーガラスで封をした後、実験に応じた番号を用意し、全スライドへ油性ペン (product code MO-120-MC-BK, Zebra Co. Ltd.)を用いて番号付けを行った。次に、このスライドに対して、サンプルの割り付け情報を知らない別の実験者（久恒辰博准教授、若しくは他の久恒研究室学生：以後 2nd 実験者と呼ぶ）が、同じ油性ペンにて元の番号が見えないように塗りつぶし確認した後、別の新しい番号を割り付けた。この方法により、カウントを実施する実験者は元の番号を認識できなくなり、盲検下にてカウントが実施できる。また、切片と元の割り付け番号については、切片と合わせて 2nd 実験者へ割り付け表として提出し、2nd 実験者にて新しい割り付け番号を割り付け表に記載後、実験が終了するまで封筒に入れ開封できない様に糊付けをした状態で、2nd 実験者はカウント実施者が分からない場所で保管をし、盲検性を担保した。

- 染色画像取得：

染色切片の染色画像については、共焦点蛍光顕微鏡(TCS SP2; Leica)を用いて取得し、設定は 1024 x 1024 ピクセル、63x oil-immersion レンズにてデジタルズームを 2x 若しくは 4x をかけてスキャンした。得られた画像は、画像の切り抜き等必要最低限の処理を Adobe Photoshop 7.0.1 にて実施した。

- CDPPB 及び BrdU 投与：

NestinP-GFP トランスジェニックマウス（8～12 週齢、雄）に Allosteric positive mGluR5 modulator である CDPPB (3-cyano-N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamide, Calbiochem)を dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma)に溶解し、3 日間毎日 1 回マウスの行動が活発になっている午後 10 時に 10 mg/kg の投与量で皮下投与した。コントロールマウス群へは溶媒である DMSO のみを皮下投与した。

3 日目の CDPPB 投与に合わせて、分裂細胞をラベルする為の試薬であるチミジン類似体である BrdU (100 mg/kg、5-bromo-2-deoxyuridine, Wako)を腹腔内投与した。その後、マウスを 24 時間後及び、BrdU 投与 28 日後に BrdU 陽性細胞の解析を行った。本実験で投与されたマウスは、各タイムラインにてエチルエーテルにて麻酔をかけた後、PBS にて還流し、その後 4% PFA にて還流固定した。脳を取出し、4%PFA にて 4℃で一晩後固定を行った。次に、4℃でそれぞれ 15%及び 30% Sucrose in PBS で一晩ずつ置換を行い、その後、免疫染色用切片として、クライオスタット(Micron)を用いて 40- $\mu$ m 厚の冠状スライスを作製した。

- MCAO マウスへの MPEP 及び BrdU 投与：

NestinP-GFP トランスジェニックマウス（8～12 週齢、雄）に、第 1 章で記載した同じ方法により 45 分間の MCAO を導入した。mGluR5 阻害剤 MPEP (1mg/kg/day in saline) の投与は、脳梗塞前 2 日前から浸透圧ポンプ

(Alzet)を用いて開始した(図2-5参照)。分裂細胞をラベルする為の試薬であるチミジン類似体である BrdU (100 mg/kg、5-bromo-2-deoxyuridine, Wako) の腹腔内への投与は、MCAO 後 3 日目に実施し、その後、24 時間後に BrdU 陽性細胞の解析を行った。本実験で投与されたマウスは、エチルエーテルにて麻酔をかけた後、PBS にて還流し、その後 4% PFA にて還流固定した。脳を取出し、4%PFA にて 4℃で一晩後固定を行った。次に、4℃でそれぞれ 15%及び 30% Sucrose in PBS で一晩ずつ置換を行い、その後、免疫染色用切片として、クライオスタット(Micron)を用いて 40- $\mu$ m 厚の冠状スライスを作製した。

- BrdU 免疫染色：

前述の通り、海馬切片での免疫染色についてはこれまでの久恒研究室で使用した標準的な手法を用いた(Fukuda *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Itou *et al.*, 2011)。

切片を TBS で 10 分間 3 回洗った後、2M の塩酸にて 37℃で 30 分間塩酸処理を実施し、その後 0.1M のホウ酸緩衝液(pH 8.4)で 10 分間洗浄した。この切片を TBS にて 10 分間洗浄し、ブロッキング溶液 (0.1 % triton X-100 及び 3 %NGS を含む TBS ) にて 60 分間室温にて保持し、その後、1st 抗体 (anti-GFP, anti-BrdU 及び anti-GFAP(24 時間後還流サンプル)または anti-NeuN(BrdU 投与 28 日後還流サンプル))をブロッキング液に加え 4

で 24 時間反応させた。その後 TBS にて 10 分間 3 回洗浄し、その後 2nd 抗体を含むブロッキング液で室温 2 時間反応させた。この切片を TBS で 10 分間 3 回洗浄した。染色が完了した切片をスライドガラスにのせ、ImmuMount (Shandon, Pittsburgh, PA) で封入した。この切片を、共焦点蛍光顕微鏡(TCS SP2; Leica)を用いて観測した。本実験で使用した抗体について、表 4 にまとめる。

**表4：使用した 1st 抗体及び 2nd 抗体**

抗体名	会社	由来	希釈率
<b>1st 抗体</b>			
Anti-GFP	Molecular Probes	rabbit IgG	1:250
Anti-GFAP	Sigma	mouse IgG	1:200
Anti-BrdU	Oxford Biotechnology	rat IgG	1:200
Anti-NeuN	Molecular Probes	mouse IgG	1:1000
<b>2nd 抗体(蛍光)</b>	<b>会社</b>	<b>Anti-X</b>	<b>希釈率</b>
Alexa 488	Molecular Probes	anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG	1:1000 1:1000
Rhodamine	Jackson ImmunoResearch	anti-rat IgG	1:200
Cy5	Jackson ImmunoResearch	anti-mouse IgG	1:200

- BrdU 染色陽性細胞のカウント方法：

本実験も、盲検下での細胞のカウント及び評価を行った。第 1 章同様、本カウントは、一頭体から 12 枚毎に計 4 枚の切片を取出し免疫染色した後に BrdU 陽性細胞数をカウントし、一頭体あたりの総個数を算出する為、12 倍しその総数を計算した。この方法はこれまで世界的に認められた手法であり、これまでの当研究室からの発表でも受け入れられている手法である (Fukuda *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Itou *et al.*, 2011)。

具体的な方法についても第 1 章同様に、全ての個体は左半球側の淵に切り込みを加え、切片中で右半球・左半球が特定できる様にした状態で免疫染色を実施した。染色後、切片をスライドガラス及びカバーガラスで封をした後、実験に応じた番号を用意し、全スライドへ油性ペン (product code MO-120-MC-BK, Zebra Co. Ltd.)を用いて番号付けを行った。次に、このスライドに対して、サンプルの割り付け情報を知らない別の実験者 (久恒辰博准教授、若しくは他の久恒研究室学生：以後 2nd 実験者と呼ぶ) が、同じ油性ペンにて元の番号が見えないように塗りつぶし確認した後、別の新しい番号を割り付けた。この方法により、カウントを実施する実験者は元の番号を認識できなくなり、盲検下にてカウントが実施できる。

また、切片と元の割り付け番号については、切片と合わせて 2nd 実験者へ割り付け表として提出し、2nd 実験者にて新しい割り付け番号を割り付け表に記載後、実験が終了するまで封筒に入れ開封できない様に糊付けをした状態で、2nd 実験者はカウント実施者が分からない場所で保管をし、盲検

性を担保した。

染色切片の染色画像については、共焦点蛍光顕微鏡(TCS SP2; Leica)を用いて取得し、設定は 1024 x 1024 ピクセル、63x oil-immersion レンズにてデジタルズームを 2x 若しくは 4x をかけてスキャンした。得られた画像は、画像の切り抜き等必要最低限の処理を Adobe Photoshop 7.0.1 にて実施した。

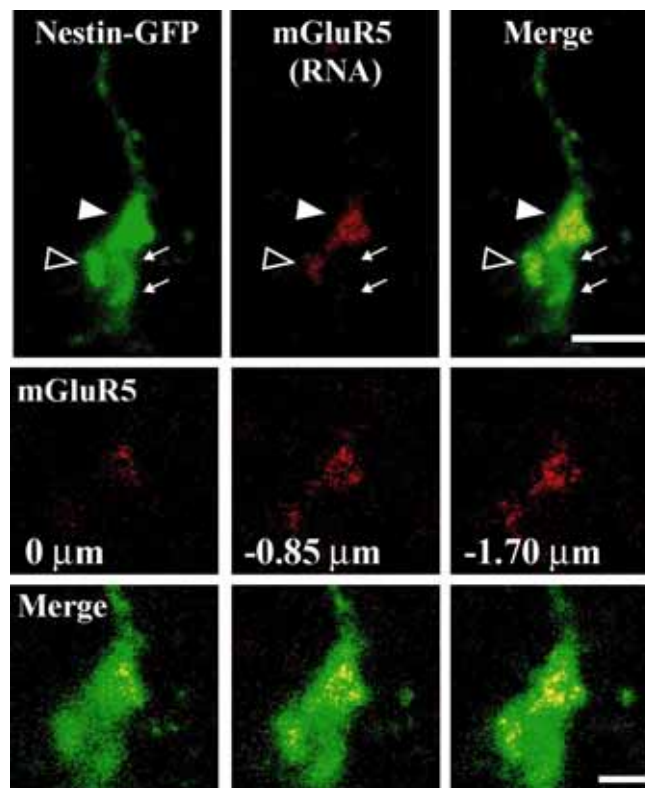
## 2.3 結果

### 2.3.1 神経幹細胞での mGluR5 の発現

まず初めに、神経幹細胞での mGluR5 の発現を確認する為、*in situ* hybridization により mGluR5 mRNA の発現の有無を確認した。この実験では海馬 DG に存在する NestinP-GFP 陽性細胞の内、顆粒細胞層へ太い突起を有する形態学的に神経幹細胞と特定できる細胞について検討した(Fukuda *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005; Itou *et al.*, 2011)。その結果、海馬に存在する神経幹細胞は mGluR5 mRNA を発現している事が確かめられた(図 19)。しかしながら、形態学的に海馬神経前駆細胞と考えられる細胞では(Fukuda *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005; Itou *et al.*, 2011)、mGluR5 mRNA の検出はできなかった。

次に、mGluR5 タンパクが神経幹細胞表面に発現しているかどうかを確かめる為、免疫染色により確認したところ、神経幹細胞の細胞表面に受容体が発現している事が確認された(図 20)。mGluR5 の発現は、細胞体の表面及び細胞突起先端部位で確認された。以上の結果から、神経幹細胞は mGluR5 を mRNA レベル及びタンパクレベルで発現している事が確かめられた。

更に、免疫電子顕微鏡法により神経幹細胞の突起部位について詳細に観察したところ、図 21 に示す通り興奮性シナプスに隣接する形で存在している事が示された。この結果、神経幹細胞は興奮性シナプスから放出される Neurotransmitter (特にグルタミン酸) のシグナルを受け取る事が出来る事が示唆された。



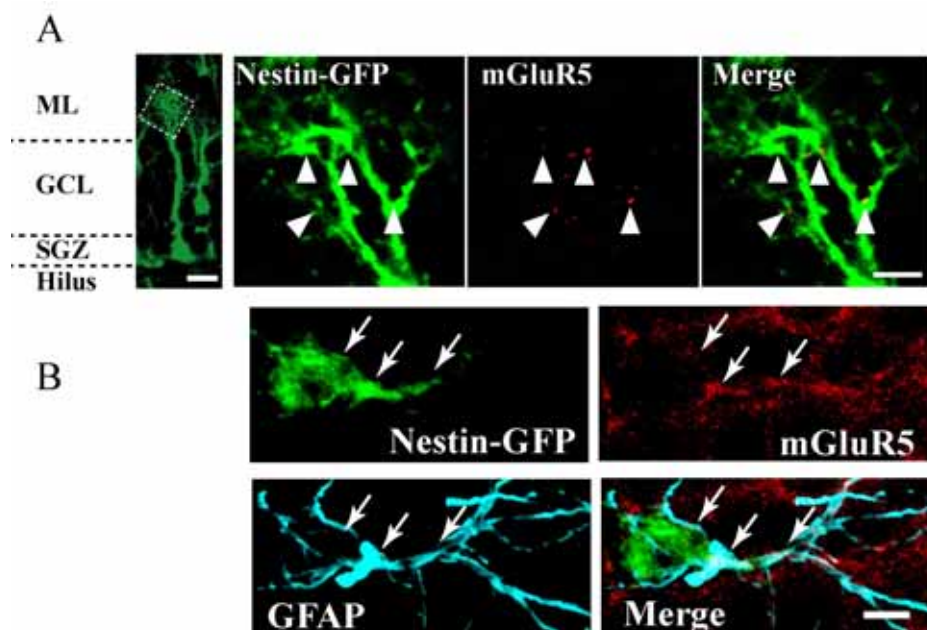
**図19:神経幹細胞での mGluR5 mRNA の発現(*in situ* hybridization)**

mGluR5 RNA の発現が、海馬 DG に存在する NestinP-GFP 陽性細胞で確認された。(白尻及び中抜き白尻)。この染色図から、NestinP-GFP 陽性の長い放射状の突起を有する神経幹細胞で mGluR5 の発現が確認できる(白尻)。白抜き矢尻の細胞は、分裂中の神経幹細胞と推察される。他の二つの小さな NestinP-GFP 陽性細胞については、細胞の局在位置及び大きさ、NestinP-GFP の発現レベルから、神経前駆細胞と推察されるが、mGluR5 の発現は見られなかった(白矢尻)。緑：anti-GFP 染色、赤：antisense-mGluR5 probe *in situ* hybridization をそれぞれ示



す。下 2 行の画像は、図中の位置での Z 軸で撮影した 4 つの NestinP-GFP 陽性細胞の像である。この実験では、sense-probe を用いて *in situ* hybridization を実施した際には、mGluR5 のシグナルを検出は出来なかった (data not shown)。

Scale Bar = 10  $\mu\text{m}$  (最上段), 5  $\mu\text{m}$  (下段)

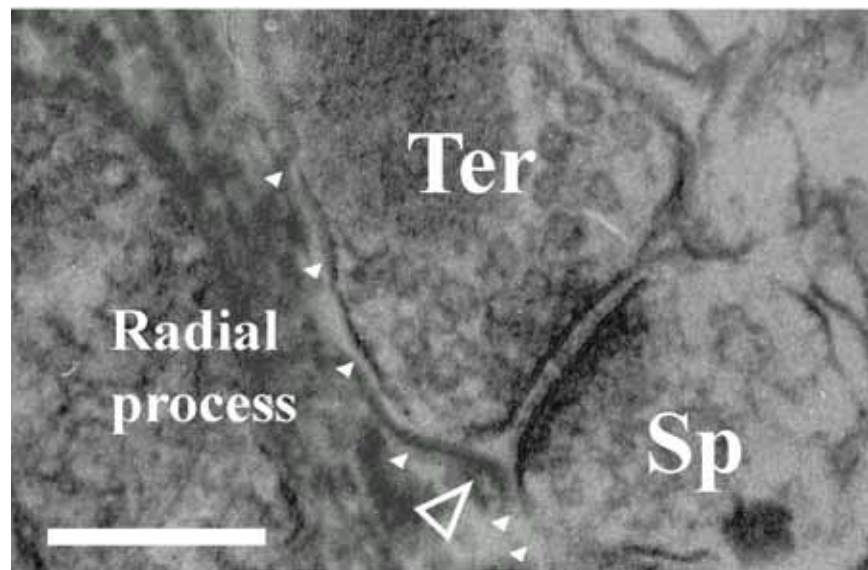


**図20 : mGluR5 の神経幹細胞での発現 (細胞体表面及び細胞突起)**

A, mGluR5 の発現が、神経幹細胞の先端部分で確認できた。B, 神経幹細胞の細胞体周辺でも mGluR5 の発現が確認できた。

緑：anti-GFP 染色、赤：anti-mGluR5 染色、シアン：anti-GFAP 染色をそれぞれ示す。Scale Bar = 10  $\mu\text{m}$ (A：左), 3  $\mu\text{m}$ (A：右), 5  $\mu\text{m}$ (B)

(略語：ML: Molecular Layer, GCL: Granule cell Layer, SGZ: Subgranular Zone)



**図21:シナプス間隙へ隣接し存在する神経幹細胞**

NestinP-GFP トランスジェニックマウスを用いて神経幹細胞の突起部分の電子顕微鏡画像を取得した。電子顕微鏡サンプルの作成方法については当研究室の過去論文の通り実施した(Ide *et al.*, 2008)。

海馬 Inner molecular layer に伸ばしている神経幹細胞の突起 ( Radial Process ) (白矢尻)は、興奮性のシナプス(Ter: excitatory axonal terminals, Sp: spines)(白抜き矢尻)を覆うように近接して存在している事が確認された。Scale Bar: 200 nm

### 2.3.2 mGluR5 を介した神経幹細胞内でのカルシウム応答

次に、神経幹細胞で発現が確認された mGluR5 が機能的に細胞内へのシグナル伝達をしているのかを確認する為、カルシウムイメージング法を用いて mGluR5 刺激後の細胞応答を測定した。本実験は、久恒研究室 加藤智将氏との共同研究で得られた結果である。その為、実験結果については、補助資料として補助資料 1 に示す。補助資料 1 で示す通り、神経幹細胞は Glutamate 及び mGluR5 の選択的アゴニストである CHPG を細胞体付近へ噴きかけたところ、細胞内でのカルシウムイオンの上昇が確認された。この結果から、神経幹細胞が mGluR5 を介して受け取ったシグナルが細胞内へ伝わり機能している事が示された。

更に、この mGluR5 を介した細胞内カルシウムイオン濃度の上昇については、mGluR5 の下流シグナルである G タンパク Gq-IP3 を介したシグナルのアンタゴニストである 2APB により阻害される事が確認された。

### 2.3.3 海馬回路刺激後の神経幹細胞の活性化

mGluR5 シグナルを刺激する事で神経幹細胞はカルシウム応答を示す事が確認されたが、次に、海馬神経活動が高まった際に神経幹細胞が応答するかについて検討を行った。まず、カルシウムイメージング法を用いて、人工的に海馬 DG 貫通繊維を電気刺激し海馬回路を活性化させた際の神経幹細胞の応答性を確認した。こちらは久恒研究室 栗林寛氏との共同研究である為、補助資料 2 として記載する。補助資料 2 に示す通り、人工的に海馬回路を刺激し活性化さ

せる事で、神経幹細胞は細胞内カルシウムイオンの上昇を示した。この事は、海馬神経活動が高まった際には、神経幹細胞はシグナルを受け取り応答する事を示唆している。

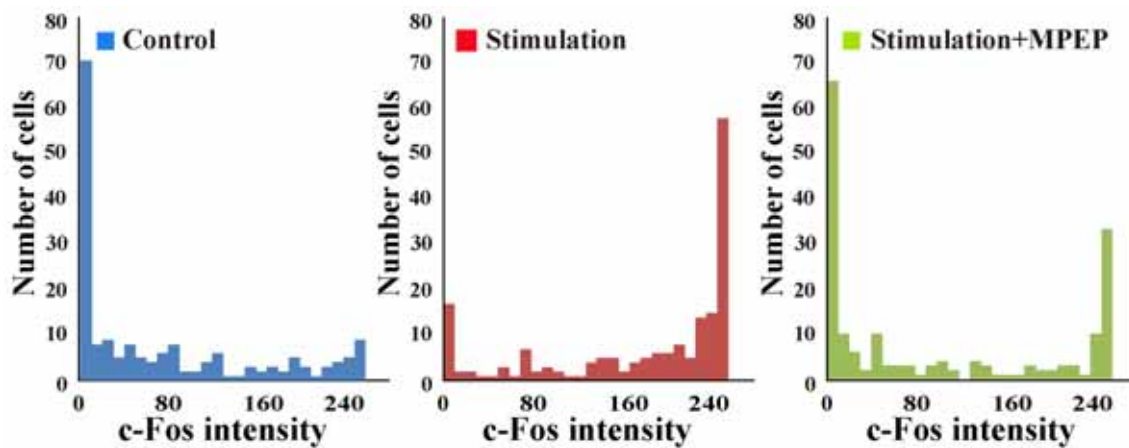
次に、電気刺激後のカルシウム応答で、神経幹細胞の細胞内で何らかの変化が起こるのか確認を行った。その結果、細胞が活性化（細胞内での遺伝子転写の開始）した事を示す c-Fos タンパクの発現が神経幹細胞で見られた（図 2 2）。序論でも記載したが、電気刺激や神経活動時には、グルタミン酸のシナプスより放出される事が知られている（Okubo *et al.*, 2010）。そこで、今回の解析対応である mGluR5 がこの c-Fos の発現に関与しているのではないかと考え、mGluR5 の阻害実験を行った。まず初めに、c-Fos の発現については、免疫染色及び共焦点蛍光顕微鏡によって発現強度を測定したところ、コントロール群では強い強度で発現している神経幹細胞は見られなかったが、電気刺激後により、強い強度の発現が見られる神経幹細胞数が著しく増加した（図 2 2）。同様の実験を、mGluR5 の選択的阻害剤である MPEP 存在下で実施したところ、MPEP により強い発現強度を示す細胞数が減少する事が確認された。この事から、神経幹細胞は、海馬神経回路が活性化した際には、mGluR5 シグナルを介して活性化している事が示唆された。

この海馬神経回路の活性化による神経幹細胞の活性化が、細胞分裂まで繋がるのかを検討した。実験系として、まず初めに当研究室で確立された従来の成体海馬スライスカルチャー法により実験を行った。その結果、9 時間培養後の神経幹細胞数は、切片作成後に見られる切片中に存在する神経幹細胞数と比較

して非常に少なく、生存している神経幹細胞についても細胞分裂期に入っている事を示すタンパク質である Ki67 陽性細胞の割合についてはコントロール群と差がなかった(図 2 3 C)。しかしながら、この図 2 3 Cの結果は、神経回路活性化によっては神経幹細胞の細胞分裂が誘導されないのか、刺激を受け取った神経幹細胞が生き残れない状況になっているのか明確ではない。そこで、海馬回路刺激後の神経幹細胞の分裂について評価する為には、スライス内で生存する神経幹細胞数を多くし、神経幹細胞が死なない状況にて実験をする必要がある。よって、本研究では実験方法で記載した、改良した成体海馬のスライスカルチャー法(低温でのスライス作成及びカルチャー時の VEGF 投与)を用いて、海馬への電気刺激後に細胞分裂期へ入る神経幹細胞数の割合を評価した。その結果、海馬神経回路を刺激した 9 時間後において分裂期に入っている神経幹細胞の割合は有意に増えている事が確認された(図 2 3 D)。これにより、神経幹細胞は海馬回路活動の高まりに応じて活性化し、細胞分裂を開始する事が示された。また、この細胞分裂の活性化については、mGluR5 の選択的阻害薬 MPEP 及び mGluR5 の下流シグナルである G タンパク Gq シグナル阻害剤である 2APB により著しく阻害される事が分かった(図 2 3 D)。以上の結果から、海馬回路活動の高まりによって誘導される神経幹細胞の細胞分裂の増加は、mGluR5 を介して誘導されている事が分かった。

最後に海馬での神経幹細胞や神経前駆細胞の細胞分裂の促進に関与している事が分かっている栄養因子の一つ Brain Derived Neurotrophic Factor(BDNF)を阻害する為、BDNF 受容体タンパクである TrkB-Fc 存在下で実施したところ、海

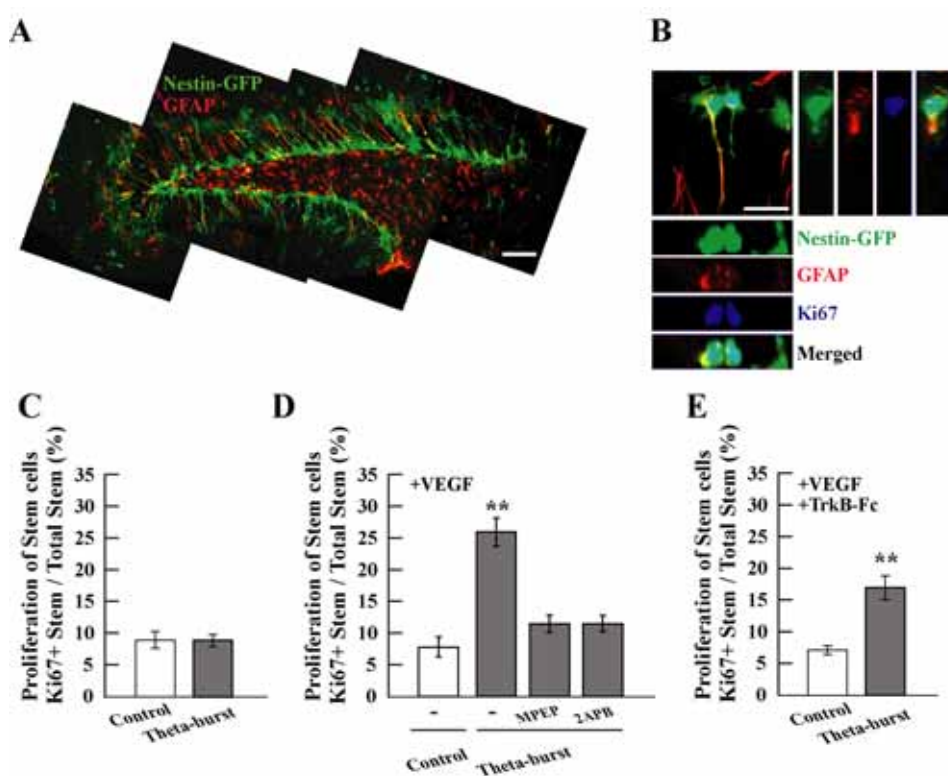
馬回路刺激による神経幹細胞の細胞分裂期へ入る割合は有意に増加しており、TrkB-Fc では阻害されていなかった（図 2 3 E）。このことから、この細胞分裂の増加を引き起こす機構として、mGluR5 が機能している事が示された。



**図22:シーターバースト刺激後の神経幹細胞での c-Fos 発現**

スライス条件下で海馬 DG ヘシーターバースト刺激を与えた 2 時間後の神経幹細胞での c-Fos 発現強度を測定した。電気刺激後、コントロール群では見られなかった高 intensity を示す細胞数が増加する事が示された。この高 intensity 細胞数は、mGluR5 の阻害剤である MPEP を作用させる事で顕著に減少した。この事から、シーターバースト刺激後の神経幹細胞の活性化は mGluR5 を介して調整されている事が確認された。( n=180 cells (from 9 slices) per group )





**図23:シーターバースト刺激が誘導する mGluR5 依存的**

### **神経幹細胞の分裂**

A, 実験に用いたスライスの状況。 B, Ki67 陽性の神経幹細胞については、NestinP-GFP/GFAP/Ki67 の3つを発現している細胞として評価した。C, 従来のスライスカルチャー法では、分裂中の神経幹細胞割合に差が見られなかった。培養後の神経幹細胞数が少なく、刺激後に細胞分裂が誘導されないのか、刺激を受け取った神経幹細胞が死滅したのか判断できない為、改良型スライスカル

チャーでの評価が必要となった。 *D*, 改良型スライスカルチャー法を用いた実験系では、以前のカルチャー法と比較して多くの神経幹細胞がスライス上に存在し、スライス条件下でのシーターバースト刺激により、神経幹細胞の細胞分裂割合が増加した。本刺激で誘導された細胞増殖は、mGluR5 阻害剤である MPEP、若しくは G-protein Gq-IP<sub>3</sub> シグナルの阻害剤である 2APB により抑制された(each group;  $n = 5$ )。 *E*, BDNF の阻害薬である TrkB-Fc により BDNF シグナルを阻害し解析をしたが、この阻害によっては、神経幹細胞の細胞分裂を抑制しなかった。 ( $n=5$  each,  $**p<0.01$ , Student's *t*-test for unpaired samples)

解析データは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。 Scale Bar = 75  $\mu\text{m}$  (**A**) or 20  $\mu\text{m}$  (**B**).

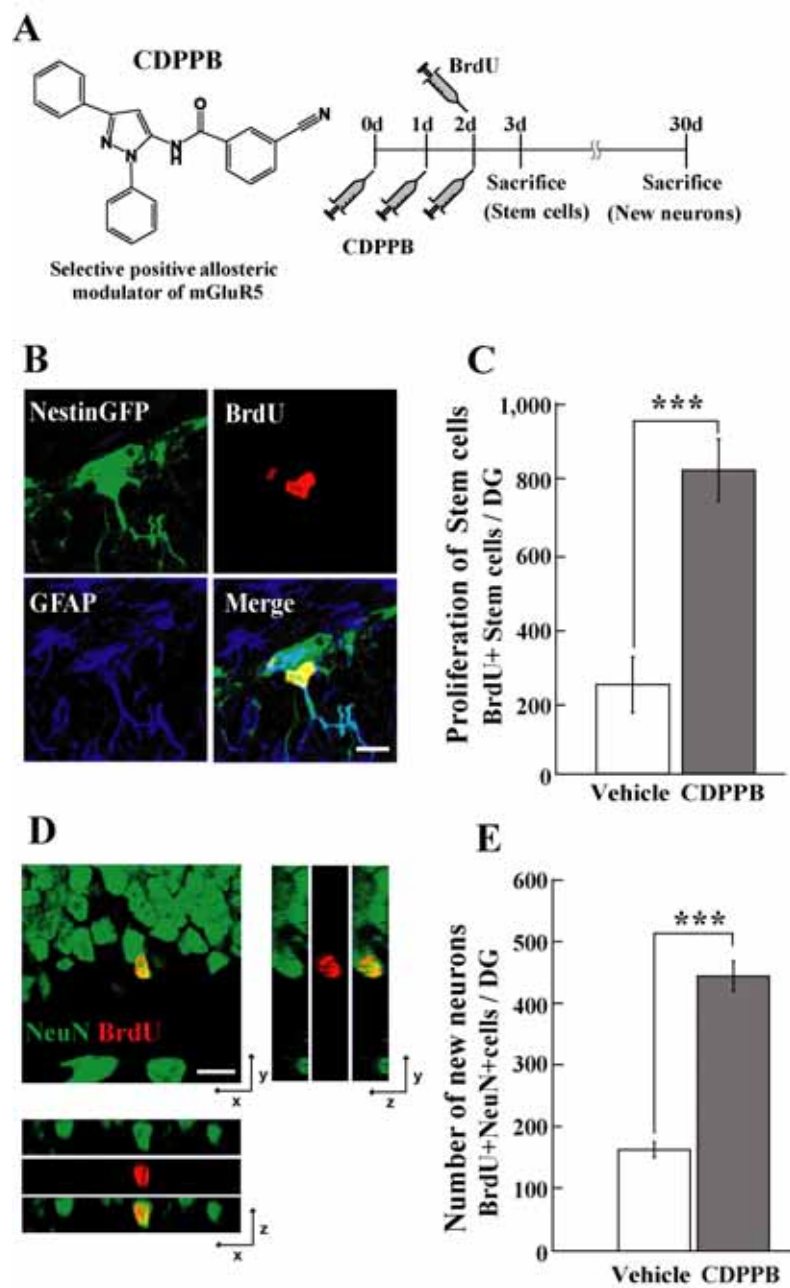
#### 2.3.4. mGluR5 刺激による神経幹細胞の増殖

この実験に先立ち、本研究の共同研究者である伊藤佳絵博士により、*in vivo* にて海馬回路をスライス条件下で用いた同様のシーターバースト刺激にて刺激をしたところ、*in vivo* 条件下でも刺激後 24 時間後に分裂期に入る神経幹細胞の割合が増加する事が示されている（補助資料 3 参照）。このことから、スライス条件下で確認された海馬神経回路の活動に応じた神経幹細胞の細胞分裂の高まりは、*in vivo* 条件下でも再現される事が確かめられた。そこで、*in vivo* でも mGluR5 を介した神経幹細胞は細胞増殖しているのかを確認する為、ここでの実験では、Allosteric positive mGluR5 modulator である CDPPB を *in vivo* で投与し mGluR5 を刺激する事で mGluR5 を介した神経幹細胞の増殖が誘導されるのかを検証した。CDPPB については、*in vivo* で投与した際にも脳血管関門を通過する事が出来る試薬である。

図 2 4 B、C の結果から、分裂細胞をラベルする BrdU を投与し 24 時間後の状況では、BrdU 標識された細胞は、主に NestinP-GFP/GFAP 陽性の神経幹細胞である事が確認された。この結果は、*in vivo* においても mGluR5 シグナルを刺激する事で神経幹細胞の増殖を誘導できる事を示唆している。また、BrdU 投与後 28 日目における BrdU 陽性細胞についても解析を行った。神経幹細胞及び神経前駆細胞は、細胞分裂後 28 日目には大半の細胞が既に成熟神経細胞へ分化している事が知られている為(Fukuda *et al.*, 2003)、mGluR5 刺激で細胞分裂が誘導された細胞が、神経細胞へ分化しているかどうかを成熟神経細胞のマーカーである NeuN との共染色を用いて確認した(Takatsuki *et al.*, 2005)。結果として、海

馬 DG で観察される BrdU 陽性細胞については NeuN との共染色が見られた。  
そして、この BrdU 陽性、NeuN 陽性の細胞については、mGluR5 刺激を与えた  
マウス群において有意に増加している事も確認できた（図 2 4 D , E ）。

以上の事から、*in vivo* においても mGluR5 を活性化する事で神経幹細胞の増  
殖を促す事ができ、また最終的に海馬神経細胞への分化もする事が分かった。



**図24:mGluR5 刺激による神経幹細胞の細胞分裂の増加**

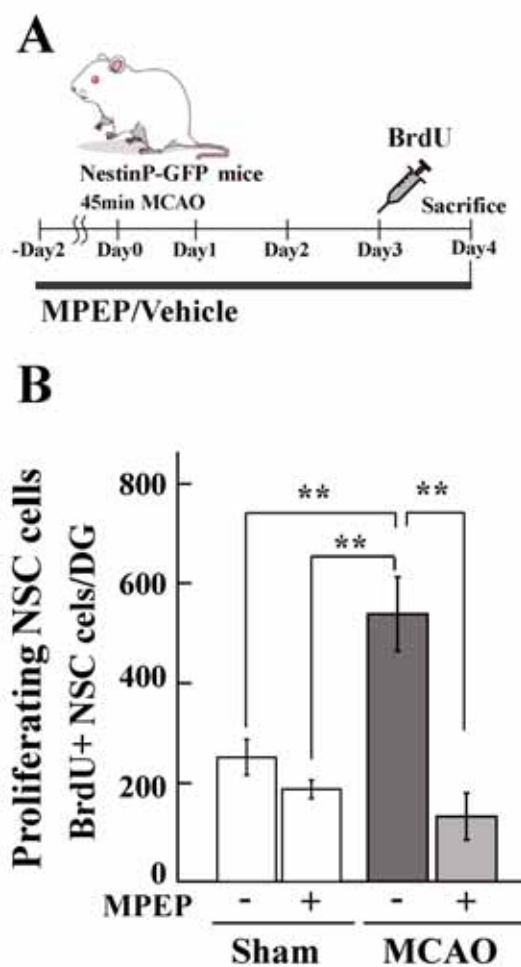
A, 試験デザイン。CDPPB は、mGluR5 の選択的 positive allosteric modulator であ

る。*B,C*, Day3 での BrdU 陽性である神経幹細胞の総数を示す (each group: n=5)。*D-F*, Day30 での BrdU 陽性/NeuN 陽性細胞の総数を示す (each group: n=6)。新生成熟神経細胞 (BrdU+/NeuN+) の X-Z cross-section 及び Y-Z cross section 画像を示す。全てのデータは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

Scale Bar = 10  $\mu$ m (**B**) and 20  $\mu$ m (**F**). ( \*\*\* $p < 0.001$ , Student's  $t$ -test for unpaired samples )

### 2.3.5 mGluR5 阻害による局所脳梗塞後の神経幹細胞特異的増殖の抑制

ここまでの結果で、海馬において神経幹細胞は、神経活動が高まった場合には、自身が発現している mGluR5 を介してシグナルを受け取り、細胞分裂が促進される事がわかった。そこで本章最後の実験として、MCAO 後の海馬神経活動の高まりが誘導する神経幹細胞の増殖についても、mGluR5 を介して誘導されているかを検証した。その結果、図 2 5 で示す通り、MCAO によって傷害半球側海馬において神経幹細胞の特異的な増加が見られた。そこで、MCAO マウスへ、mGluR5 の阻害剤である MPEP を皮下投与し、BrdU 陽性の神経幹細胞数を測定したところ、MCAO 後に見られる神経幹細胞の特異的な増殖は、MPEP 投与で阻害される事がわかった。この結果から、MCAO 後の神経幹細胞の増殖も、神経幹細胞が海馬神経回路活動の高まりを mGluR5 を介して感知し、誘導される事が確認された。sham 群に vehicle 及び MPEP を投与した群間では、神経幹細胞の細胞増殖数は減少傾向は見られたが統計的有意差はなかった。



**図 25 :mGluR5 阻害による MCAO 後の神経幹細胞の増殖抑制**

A, 試験デザイン。B, MCAO 後の神経幹細胞の特異的な増殖がみられたが、mGluR5 の阻害薬である MPEP 投与により阻害された。(n=5 each, \*\* $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test for unpaired samples)

全てのデータは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。



## 2.4 考察

本章では、*in situ* hybridization 及び免疫染色により、神経幹細胞が mGluR5 を発現している事を示した（図 19、20）。更に、補助資料 1 から、神経幹細胞は mGluR5 刺激により、細胞内カルシウム応答を示す事がわかった。つまり、神経幹細胞に発現している mGluR5 は、発現しているだけでは無く、受容体として機能している事が分かった。また、先行研究により、神経活動が高まった場合や電気刺激によりグルタミン酸が放出される事が確認されている (Okubo *et al.*, 2010)。加えて、補助資料 2 で示した通り、スライス状態の海馬神経回路を電気刺激する事で神経幹細胞は細胞内カルシウム応答を示す。よって、スライス状態の海馬スライスに人工的な海馬回路刺激を加える事で、実際の海馬神経活動が高まった状態を模倣できる事ができる事が、先行研究と合わせて言えると考えられる (Tozuka *et al.*, 2005; Itou *et al.*, 2011)。このスライス実験系により、海馬スライスへ電気刺激を加えると、神経幹細胞が活性化（細胞内で遺伝子転写が開始）する事が確認された。また、この神経幹細胞の活性化は mGluR5 の選択的阻害薬である MPEP により抑制される事が示された（図 22）。次に、この神経幹細胞の活性化が細胞分裂を誘導するのか確認したところ、神経幹細胞

胞は電気刺激による海馬神経回路の活動の高まりを受け、細胞分裂も促進する事が確認された(図2-3)。この神経幹細胞の細胞増殖の促進についても MPEP により抑制された。*in vivo* 状態で同様の刺激を加えた場合においても、電気刺激によって神経幹細胞の細胞増殖を高められる事を確認した(補助資料3)。以上の結果を合わせて考えると、*in vivo* においても神経幹細胞は、神経活動の高まりを mGluR5 を介して感知し、細胞分裂を促進している事が示唆された。この理論を補足する為、*in vivo* において mGluR5 の positive allosteric potentiator である CDPPB を投与すると、神経幹細胞の増殖を誘導する事ができた(図2-4)。よって、この補足データからも、*in vivo* においても神経幹細胞は mGluR5 シグナルを受け取る事で、細胞分裂を促進出来る事が示された。そこで、第1章でも用いた脳梗塞モデルを用いてこの仮説の確認を行った。脳梗塞を導入したマウスに mGluR5 の選択的阻害薬である MPEP を投与し、神経幹細胞の増殖を評価した結果、脳梗塞後に誘導される神経幹細胞の増殖が、MPEP 投与により通常状態まで抑制出来る事が確認された。これらの結果は、第1章の結果と合わせて、成体海馬では神経活動の高まりにより神経幹細胞の増殖が誘導され、その制御機構として、神経活動が高まった際に放出されるグルタミン酸により

神経幹細胞が発現する mGluR5 がその制御を行っている事を示している。

mGluR5 と神経幹細胞の分裂との関係については、これまでの報告により、mGluR5 が神経幹細胞の細胞増殖に関与している事が報告されている(Di Giorgi Gerevini *et al.*, 2004; Di Giorgi-Gerevini *et al.*, 2005; Melchiorri *et al.*, 2007; Gandhi *et al.*, 2008)。しかし、mGluR5 ノックアウトマウスを用いた実験においても、海馬歯状回での分裂細胞は通常のマウスと比較し 50%程度減少するが、完全に分裂細胞は無くなっていない(Di Giorgi-Gerevini *et al.*, 2005)。また、本実験においても、mGluR5 の選択的阻害薬である MPEP を投与する事で、脳梗塞後に見られる神経幹細胞の特異的な増殖のみが阻害されるが、コントロール群の個体では減少傾向は見られたが統計的有差を持った減少は見られない事を示した(図 2 5)。この結果は非常に興味深く、mGluR5 を介した神経幹細胞の増殖は、海馬神経活動により誘導される神経幹細胞の増殖に強く関与しており、通常の神経幹細胞の増殖とは異なる機構の存在を示していると考えられる。

序文でも記載したが、海馬で新生される神経細胞数は、動物が置かれる環境に応じて変化し、脳梗塞や(Liu *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Kee *et al.*, 2007)、癲癇(Parent *et al.*, 1997)など

の病態学的状態によっても神経細胞数が増加する。脳梗塞後のニューロン新生については、その意義は未だ不明である。しかし、脳梗塞後に生まれてきた新生ニューロンは、通常では見られない異常な軸索が伸びており、局所的な異常回路を形成している事が報告された(Niv *et al.*, 2012)。同様の報告が癲癇の脳でもされており、癲癇症状の悪化をもたらす要因であると考えられている(Parent *et al.*, 1997; Scharfman *et al.*, 2000)。この事から、脳梗塞後に生まれてくる新生ニューロンは、脳梗塞後に見られる学習や認知機能の低下をもたらす因子となる可能性があると考えられる。第1章では、GABA-A 受容体の Active modulator である Diazepam により、脳梗塞後の神経幹細胞の増殖が抑制できる事を示した。更に第2章では、神経活動の高まりと神経幹細胞を繋ぐ mGluR5 シグナルの存在を示し、mGluR5 阻害実験で、脳梗塞後の神経幹細胞の増殖が抑制できる事を示した。本論文で示したこれら二つの薬剤及び機構は、脳梗塞後の神経幹細胞の増殖が脳機能低下の悪化因子である場合、脳梗塞後の機能低下を改善する新しい治療法へ繋がる結果であると言える。

また、本章では、mGluR5 の allosteric positive modulator である CDPPB によって神経幹細胞の増殖が促される事を示した(図25)。更に、予備的実験にお

いて CDPPB を投与した群において、第 1 章図 1 5 で見られた様な神経幹細胞の樹状突起先端部の広がりとは確認されなかった (data not shown)。つまり、CDPPB によって神経幹細胞上の GluR5 を刺激する事で、神経幹細胞の増殖を誘導できるが、脳梗塞後に見られる神経幹細胞の形態変化が見られなかった事から、脳梗塞後の脳内では、mGluR5 以外の別のシグナル・環境が神経幹細胞へ加わっている可能性があり、この別のシグナル・環境が形態変化を引き起こしている可能性も考えられる。本研究では、この点については解析を行っていないが、脳梗塞後の神経幹細胞の形態変化が、成熟後の異常形態を示す新生ニューロンが作られる因子となる可能性もある為、mGluR5 以外のシグナルを解明し、取り除く事で、脳梗塞後において正常な新生ニューロンへの分化を導く事ができるかもしれない。この場合には、新生ニューロンは脳梗塞後の海馬依存的な機能低下を改善する細胞となり得る可能性は否定できない。

最後に、ここまで神経活動の高まりと神経幹細胞の増殖について、グルタミン酸及び mGluR5 による制御機構について証明してきた。しかし、神経活動に関連する分子として、Adenosine Triphosphate(ATP)についても考える必要がある (Klaft *et al.*, 2012; Schulz *et al.*, 2012)。この点について、当研究室の岸真代氏の平

成 24 年度の修正論文にて検証がされている。脳梗塞後の神経幹細胞増殖への ATP シグナルの影響については、ATP 受容体である P2Y1 受容体のノックアウトマウスに MCAO を導入して脳梗塞を作成したところ、神経幹細胞の増殖へは影響が無かった事が示されている。

以上の事から、本章の結論として脳梗塞後の神経幹細胞は、mGluR5 を介して海馬神経活動の高まりを感知し、細胞増殖を開始しニューロン新生が増強される事が示されている。

## 第3章

### シーター波による神経幹細胞の増殖制御

### 3.1 序論

海馬神経回路は海馬以外の脳の部位とは異なり、シーター波（シーターオシレーション）と呼ばれる特徴的な神経活動のパターンを示す事が知られている (Bragin *et al.*, 1995; Buzsaki, 2002; Buzsaki *et al.*, 2003)。このシーター波とは、シーター帯(4~12Hz)の活動が、ガンマ帯 (30-100Hz) の活動と合わさった波として現れる活動パターンである (図 2 6) (Bragin *et al.*, 1995)。また、このシーター波は覚醒中の動物の海馬で観測されるが、学習や自発運動によって特異的に高まる事も知られている (Vanderwolf, 1969; Buzsaki *et al.*, 2003)。更には、シーター波は海馬依存的な学習に関与している事が示唆されている (Kahana *et al.*, 1999; Cornwell *et al.*, 2008)。

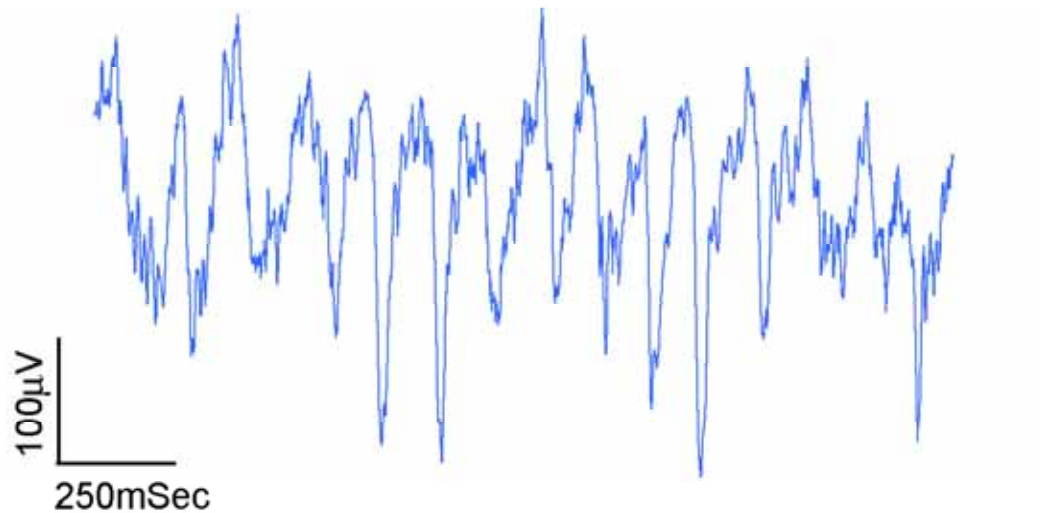
また、第 1 章で示した通り、局所脳梗塞後の海馬においてもシーター帯の活動が特徴的に高まっており、この神経活動の高まりが神経幹細胞の増殖を促進している事が確かめられた。これらの事を合わせて考察すると、神経幹細胞の増殖に対してシーター波が特異的に意味を持つ可能性が示唆される。特に、本論文では神経幹細胞は、mGluR5 を介して海馬神経回路の活動の高まり、グルタミン酸シグナルを受けて細胞増殖を開始する事が示されている。興味深い事に、シーター波とグルタミン酸の脳内濃度は相関関係がある事が報告されている (Gallinat *et al.*, 2006)。

以上の事から、海馬神経活動がシーター波及びシーター帯で高まる事と、神経幹細胞の増殖には密接な関係がある可能性が考えられる。よって、神経幹細胞の増殖が、どのような神経活動の高まりにより誘導されるかを検証する



事は、海馬神経活動依存的な神経幹細胞の増殖機構を解明する上で重要であると考えられる。

本章では、海馬神経活動が高まり、且つ海馬での神経新生が促進される事が示されている自発運動をマウスにさせ解析を行った。自発運動時の海馬シーター波のリズムを崩す為、マリファナに含まれる成分であるカンナビノイド受容体のアゴニストである CP55940 を投与し(Robbe *et al.*, 2006)、自発運動時のシーター波のリズムを崩し、神経幹細胞の増殖への影響を解析した。まず、CP55940 投与の自発運動自体への影響を確認する為、走行距離の測定を行ったところ、自発運動中のマウスに CP55940 を投与した場合でも、走行距離は変化しなかった。次に、自発運動時において図 2 6 で示す典型的なシーター波の発生が確認でき、これまでの報告と同じ結果が得られた(Buzsaki, 2002)。この自発運動時のシーター波は、CP55940 を投与した場合、シーター帯のリズムが崩れ、4Hz 以下の低周波数帯での活動パターンへ変る事がわかった。次に、自発運動によって誘導される分裂細胞種の特定をしたところ、第 1 章、第 2 章と同様に神経幹細胞の特異的な増殖が確認された。この自発運動が誘導する神経幹細胞の増殖は、CP55940 の投与により抑制される事が確認された。この事から、海馬での神経幹細胞の増殖は、神経活動の高まりだけではなく、そのリズム（海馬で特徴的に高められるシーター波）も重要である事が示された。



**図26:シーター波(シーターオシレーション)について**

ガンマ帯 ( 30-100Hz ) の活動がシーター(4~12Hz)のリズムで見られる活動パターンである。本図は、マウスの自発運動時に得られた記録波形を載せた。

## 3.2 実験方法

- 使用動物：

前述の ICR マウス血統の NestinP-GFP トランスジェニックマウス(8~14 週齢、雄) 及び ICR マウス(三共ラボ)(8~12 週齢、雄)を用いて実験を行った。その他の飼育状況等については同じであり、東京大学規定の “Experimentation protocols approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Tokyo” に則って実施され、使用される実験動物数を最小限にするように努めた。

- 回し車での Running 実験：

上記のマウスを直径 13.5cm のプラスチック回し車を飼育ケージ中に入れ、マウスが自由に走る事ができる環境で飼育した。走行距離を測定する際には、走行距離が測定できるカウンター付き直径 21.5cm のケージ付きステンレス製回転車(室町機械株式会社、東京)に入れて飼育をした。回し車のケージ内への設置は、図 2 8 A で示したスケジュールに則り行った。

- BrdU 投与：

本実験では、回し車を入れた飼育ケージで飼育した 3 日目に分裂細胞をラベルする為 BrdU (100 mg/kg)を腹腔内投与した。その後 24 時間後における BrdU 陽性細胞の解析を行った。本実験でも前述と同様に、BrdU 投与されたマウスは、各タイムラインにてエチルエーテルにて麻酔をかけた後、

PBS にて還流し、その後 4% PFA にて還流固定した。脳を取出し、4%PFA にて 4℃ で一晩後固定を行った。次に、4℃ でそれぞれ 15%及び 30% Sucrose in PBS で一晩ずつ置換を行い、その後、免疫染色用切片として、クライオスタット(Micron)を用いて 40- $\mu$ m 厚の冠状スライスを作製した。

#### BrdU 免疫染色：

本実験においても、前述の通り久恒研究室で使用した標準的な手法を用いた(Fukuda *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Itou *et al.*, 2011)。

切片を TBS で 10 分間 3 回洗った後、2M の塩酸にて 37℃ で 30 分間塩酸処理を実施し、その後 0.1M のホウ酸緩衝液(pH 8.4)で 10 分間洗浄した。この切片を TBS にて 10 分間洗浄し、ブロッキング溶液 (0.1 % triton X-100 及び 3 %NGS を含む TBS ) にて 60 分間室温にて保持し、その後、1st 抗体 (anti-GFP, anti-BrdU 及び anti-GFAP)をブロッキング液中に加え 4℃ で 24 時間反応させた。その後 TBS にて 10 分間 3 回洗浄し、その後 2nd 抗体を含むブロッキング液で室温 2 時間反応させた。この切片を TBS で 10 分間 3 回洗浄した。染色が完了した切片をスライドガラスにのせ、ImmuMount (Shandon, Pittsburgh, PA) で封入した。この切片を、共焦点蛍光顕微鏡(TCS SP2; Leica)を用いて観測した。本実験で使用した抗体について、表 5 にまとめる。

**表5 : 使用した 1st 抗体及び 2nd 抗体**

抗体名	会社	由来	希釈率
<b>1st 抗体</b>			
Anti-GFP	Molecular Probes	rabbit IgG	1:250
Anti-GFAP	Sigma	mouse IgG	1:200
Anti-BrdU	Oxford Biotechnology	rat IgG	1:200
<b>2nd 抗体(蛍光)</b>	<b>会社</b>	<b>Anti-X</b>	<b>希釈率</b>
Alexa 488	Molecular Probes	anti-rabbit IgG	1:1000
Rhodamine	Jackson ImmunoResearch	anti-rat IgG	1:200
Cy5	Jackson ImmunoResearch	anti-mouse IgG	1:200

● BrdU 染色陽性細胞のカウント方法 :

本実験も、前述の通り盲検下での細胞のカウント及び評価を行った。

(Fukuda *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2005; Koketsu *et al.*, 2006; Itou *et al.*, 2011)。

具体的な方法を次に記載すると、全ての個体は左半球側の淵に切り込みを加え、切片中で右半球・左半球が特定できる様にした状態で免疫染色を実施した。染色後、切片をスライドガラス及びカバーガラスで封をした後、実験に応じた番号を用意し、全スライドへ油性ペン (product code MO-120-MC-BK, Zebra Co. Ltd.)を用いて番号付けを行った。次に、このスライドに対して、サンプルの割り付け情報を知らない別の実験者 (久恒辰博准教授、若しくは他の久恒研究室学生 : 以後 2nd 実験者と呼ぶ) が、同

じ油性ペンにて元の番号が見えないように塗りつぶし確認した後、別の新しい番号を割り付けた。この方法により、カウントを実施する実験者は元の番号を認識できなくなり、盲検下にてカウントが実施できる。

また、切片と元の割り付け番号については、切片と合わせて 2nd 実験者へ割り付け表として提出し、2nd 実験者にて新しい割り付け番号を割り付け表に記載後、実験が終了するまで封筒に入れ開封できない様に糊付けをした状態で、2nd 実験者はカウント実施者が分からない場所で保管をし、盲検性を担保した。

染色切片の染色画像については、共焦点蛍光顕微鏡(TCS SP2; Leica)を用いて取得し、設定は 1024 x 1024 ピクセル、63x oil-immersion レンズにてデジタルズームを 2x 若しくは 4x をかけてスキャンした。得られた画像は、画像の切り抜き等必要最低限の処理を Adobe Photoshop 7.0.1 にて実施した。

- *in vivo* 海馬神経活動のレコーディング及び解析：

本実験では、前述と同じ方法で成体 ICR マウス（8～12 週齢、雄）を用いて、回し車で走行時の海馬神経活動を生きたままレコーディングを実施し解析を行った。

用いた手法は、前章と同じ手法を用いた。まず、片側半球海馬 DG のみに神経活動レコーディング用の電極を埋め込んだ。使用した電極は、Teflon コートされ直径 0.003 インチのステンレススチール(200 k $\Omega$ ; A-M Systems, Inc.)を使用し、このレコーディング電極を、片側半球海馬 DG (A: -2.54 mm,

L(右又は左): 1.80 mm, V: 1.9 mm)へ埋め込んだ。その後、リファレンス及びグラウンド電極としてステンレスのネジを頭蓋骨の Lambda より後ろ側へねじ込み、歯科用セメントにて頭蓋骨と全ての電極を一緒に固め、動かない様に固定した。3 日～5 日間の回復期間を置き、走行時の神経活動測定を実施した。

海馬神経活動の測定は、電磁シールドされたケージの中で覚醒している状態でレコーディングをした。まず、回し車が無い状態で 10 分間、海馬神経活動を測定し、その後マウスを、カウンター付き直径 21.5cm のケージ付きステンレス製回転車(室町機械株式会社、東京)に入れ、自発運動時の海馬神経活動の測定を 10 分間実施した。本レコーディングでは、当研究室にてマルチチャンネルアンプ(MEG-6108 multichannel amplifier, Nihon Kohden)、PowerLab ML870 (AD Instruments)、レコーディングソフト Chart version 5.2 (AD Instruments)及びノートパソコン(Dell)を組み合わせ立ち上げたレコーディングシステムを用いて実施した。レコーディングの設定として、Sampling rate として 1kHz、ノイズフィルターとして 0.5-Hz 以下の波形及び 300-Hz 以上の波形についてはノイズとしてカットした。

- カンナビノイド受容体アゴニスト投与：

本実験では、カンナビノイド受容体のアゴニストである CP55940 (2-[(1R,2R,5R)-5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl)cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol0.3mg/kg, SIGMA)をマウスへ腹腔内

投与し、投与後 2 時間後にマウスを自発運動させ海馬の神経活動を測定した。また、神経幹細胞の分裂数の解析実験については、CP55940 (0.3mg/kg) を図 2 8 A で示したスケジュールで投与した。



### 3.3 結果

まず初めに、本章では、海馬神経活動が高まり、且つ海馬での神経新生が促進される事が示されている自発運動をマウスにさせ解析を行った。自発運動時の海馬シーター波のリズムを崩す為、マリファナに含まれる成分であるカンナビノイド受容体のアゴニストである CP55940 を投与し(Robbe *et al.*, 2006)、自発運動時のシーター波のリズムを崩した際の、神経幹細胞の増殖への影響を解析する事とした。まず、CP55940 投与の自発運動自体への影響を確認する為、10 分間の自発運動中の走行距離を測定したところ、自発運動中のマウスに CP55940 を投与した場合でも、コントロール群(Vehicle 投与群)と比較して走行距離は変化しなかった(図 2 7 C)。

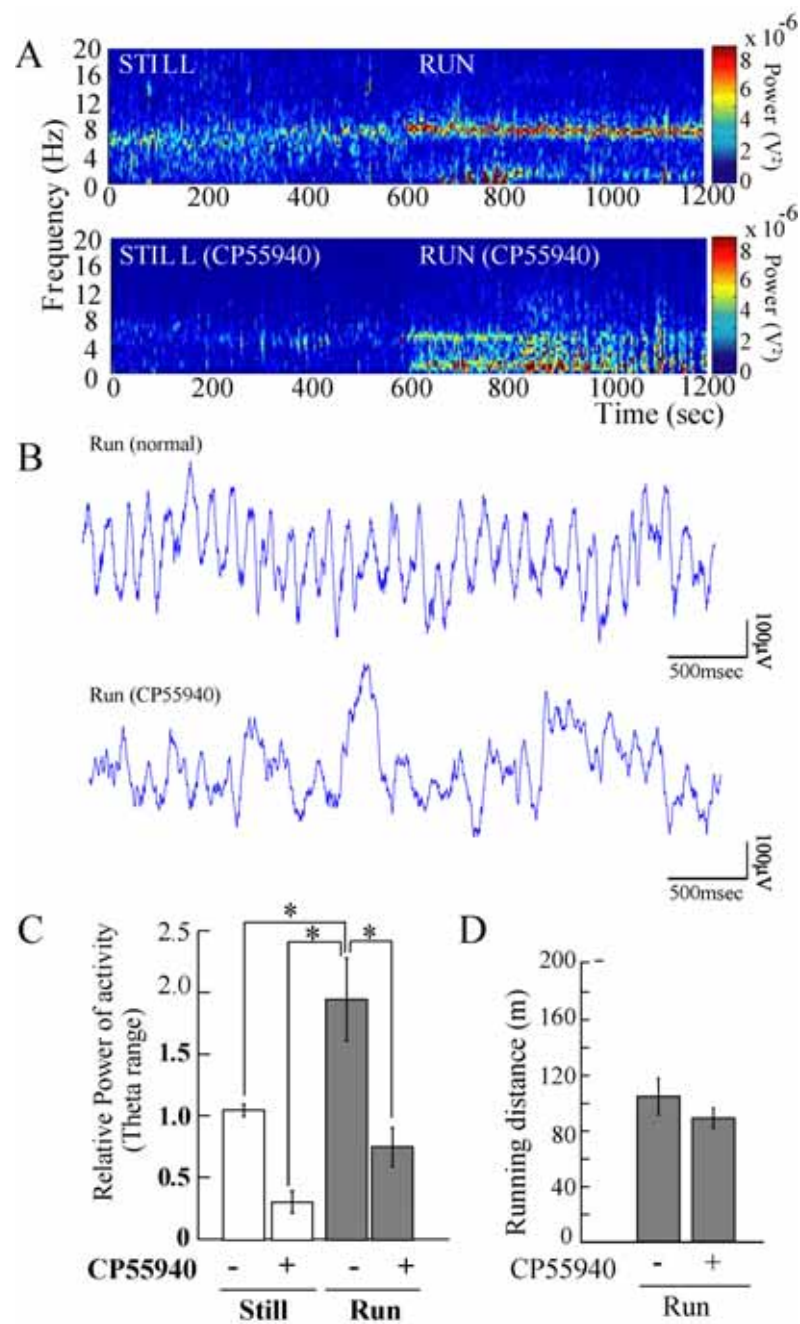
次に、自発運動時における海馬神経活動の測定を行った。まず、予備実験にて、本論文で実施した実験系においても序論図 2 6 で示した典型的なシーター波の発生が確認できた (data not show) (Buzsaki, 2002)。よって、この実験系を用いて、自発運動時のシーター波の測定を実施したところ、CP55940 を投与した場合、シーター帯のリズムが崩れ、4Hz 以下の低周波数帯での活動パターンへ変る事がわかった(図 2 7 A)。また、Power Spectrum Density 解析を用いて、各周波数の活動強度密度を解析し、シーター帯 (4-12Hz) での強度変化を確認したところ、図 2 7 B で示す通り、自発運動時のマウスでも見られるシーター波の強度増加が、CP55940 を投与する事で著しく阻害されている事が確認された。更には、自発運動していない状態においてもシーター波の減少が見られた(図 2 7 B)。この事から、CP55940 を投与する事で、自発運動時に盛られるシ

ーター波の強度増加が、リズムが他周波数へ移行する事でなくなる事が分かった。また、合わせて通常状態のシーター波についても同様に、シーター波の発生が抑えられてしまう事が分かった。

次に、自発運動によって誘導される分裂細胞種の特特定をした。実験スケジュールは図 2 8 A に示す。実験の結果、第 1 章、第 2 章と同様に神経幹細胞の特異的な増殖が確認された(図 2 8 B)。そこで、この神経幹細胞の特異的な増加が、シーター波により誘導されているのかを確認する為、CP55940 を投与し神経幹細胞の増殖について解析した。その結果、この自発運動が誘導する神経幹細胞の増殖は、驚くべき事に、CP55940 の投与により自発運動が誘導する海馬神経活動依存的な神経幹細胞の増殖が抑制される事が確認された(図 2 8 B)。但し、コントロール群のレベルまでは減少していなかったが、シーター波の抑制で、神経幹細胞の増殖が著しく減少する事が示されている。また、図 2 7 で報告したが、CP55940 投与した場合、定常状態でのシーター波の発現も抑えられてしまう事と報告した。しかしながら図 2 8 B で示す通り、自発運動をさせず CP55940 のみを投与した群では、コントロール群と比較しても、神経幹細胞の増殖は統計的有意差を持って減少していなかった。この事から、シーター波による神経幹細胞の増殖は、通常状態での神経幹細胞の増殖を誘導しているのではなく、神経活動の高まり(シーター波の活動の高まり)による神経幹細胞の増殖増加時に大きく関わっているものと考えられる。

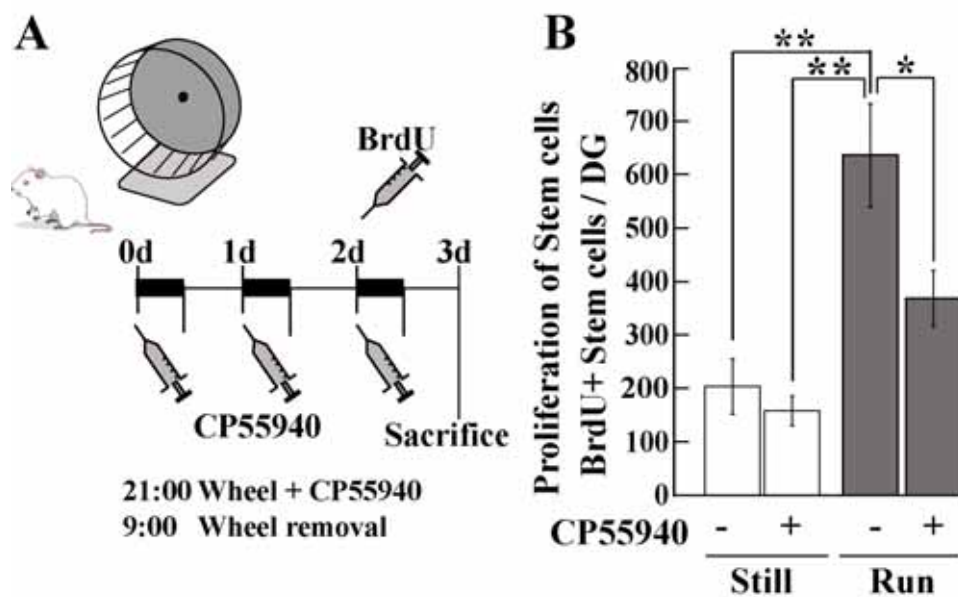
よって、これらの結果は、海馬神経活動依存的な神経幹細胞の増殖は、単に海馬神経活動が高まれば良いという事では無く、生理的に見られるシーター波

のリズムを保った形で活動が高まる事が重要であり、神経幹細胞はシーター波を感知して細胞分裂をしている可能性を示唆している。



**図27: Cannabinoid 受容体アゴニスト CP55940 投与による  
走行時シーター波の消失**

A, 回し車走行時(RUN)及び回し車外での自由行動時(STILL)の海馬神経活動。CP55940 投与により走行時のシーター波帯 (4-12Hz) の活動が抑制された。B, CP55940 投与無しでの自発運動時の海馬神経活動 (上) と、CP55940 投与後 2 時間後の自発運動時の海馬神経活動 (下) を示す。CP55940 投与で自発運動時のシーター波の活動がみられなくなった。C, 各固体における、10 分間の通常状態シーター波の power spectrum density 積算値を”1”として、STILL 及び RUN 時のシーター波の power spectrum density 積算値の相対値を示した。CP55940 投与により、著しく阻害される事が分かった。D, ただし、CP55940 の投与により回し車内での走行距離は本測定時間(10 分間の走行時間)では影響を及ぼさなかった (n = 4 each) 。 (\* $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test for unpaired samples) 全てのデータは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。



**図28: Cannabinoid 受容体アゴニスト CP55940 投与による**

### **神経幹細胞の増殖抑制**

A, 試験デザイン。B, 回し車での走行による神経幹細胞の増殖は、Cannabinoid 受容体アゴニスト CP55940 の投与により阻害された。(n = 5 each)

(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test for unpaired samples) 全てのデータは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

### 3.4 考察

第 1 章で示した通り、局所脳梗塞後の海馬においてもシーター帯の活動が特徴的に高まっており、この神経活動の高まりが神経幹細胞の増殖を促進している事が確かめられた。第 2 章では、神経幹細胞は mGluR5 を介して海馬神経回路の活動の高まり、グルタミン酸シグナルを受けて細胞増殖を開始する事を示した。また、先行研究により、シーター波とグルタミン酸の脳内濃度は相関関係がある事が報告されている(Gallinat *et al.*, 2006)。これらの事から、生理学的に海馬神経回路が個々の神経細胞が無秩序に活動するのではなく、各神経幹細胞が同期して活動して生み出されるシーター波という特徴的な活動パターンが(Bragin *et al.*, 1995; Buzsaki, 2002)、重要な意味を持つのではないかと推察される。

そこで、マウスを自発運動ができる環境に置き、自発運動をさせ、海馬でのシーター波を測定した。結果で示した通り、自発運動時のマウスではシーター波が海馬で測定される事が確認された(図 2 7)。また、同時に自発運動を行ったマウスでは、海馬において神経幹細胞の特異的な増殖が確認された(図 2 8)。次に、CP55940 を投与し、自発運動時のシーター波のリズムを崩し、神経幹細胞の増殖について解析を行った。結果として、シーター波のリズムを崩す事で神経幹細胞の増殖が抑制された(図 2 8)。この結果は、非常に興味深い発見であり、海馬神経活動依存的な神経幹細胞の増殖は、単に神経活動が高まるだけでは誘導されず、シーター波という特徴的な活動が高められる事で誘導される事を示している。

各序論でも記載したが、シーター波は学習や自発運動などで高められるが

(Buzsaki *et al.*, 2003)、これらの行動は動物が新しい環境適応へ適応する為に必要な行動であると考えられる。つまり、新しい環境へ動物が置かれた場合、生命を維持していくには、まずは周りを観察し環境状況を学習（記憶）し、栄養源（餌、食事）を得る為に行動し探していく必要がある。この行動は、動物が持つ本能的な部分であり、動物の脳には上記の様な生命を維持していく為に必要となる行動に対して応答する機構が存在するのかも知れない。分子的な面で考察した場合でも、シーター波とグルタミン酸の脳内濃度は相関関係がある事が報告されている(Gallinat *et al.*, 2006)。また、脳内に存在するグリア細胞についても、シーター波に対して特異的に反応する事が示されている(Wang *et al.*, 2006)。海馬神経回路の活動パターンと神経新生の関連性を解析した発表はこれまでにはされていない。本発表は、この点について解析を行った初めての報告である。ただし、活動パターンと神経新生の関連性については、その機構など更に解析を進める必要があり、今後の解明が期待される。

また、本研究結果ではマリファナの成分であるカンナビノイドの受容体アゴニストを使用する事で、自発運動で誘導される海馬神経新生が阻害された。マリファナについては、これまでの先行研究にて海馬依存的な機能を阻害する事が報告されているが(Robbe *et al.*, 2006)、これまでは、カンナビノイドの投与により海馬シーター波の減少と記憶機能の低下に相関関係がある事が示されているのみであった。本論文での神経幹細胞の増殖抑制という発見は、マリファナ摂取動物の記憶障害が如何に誘導されるかについても、一つの可能性を示す結果となった。



## 第4章 総括

本実験では、脳梗塞モデルマウス (MCAO マウス) における海馬神経回路活動を記録し解析を行った。その結果、梗塞が入っている半球の海馬でのみ神経活動の高まりが確認された。また、同時期に局所脳梗塞後の海馬での分裂細胞数及び分裂細胞の特定を行ったところ、分裂細胞数の増加にくわえて、初期の段階では、神経幹細胞の分裂も確認された。この神経幹細胞の増殖は、Diazepam 投与による、脳梗塞後の神経活動の高まりを抑制する事で見られなくなった。Diazepam 投与によつては、神経幹細胞・前駆細胞は影響を受けない為、この結果から、脳梗塞後の神経活動の高まりが、神経幹細胞の増殖を誘導している事が示された。この結果は、先行研究の神経活動が神経幹細胞の増殖を誘導しているという報告に対して、MCAO モデルを用いて新たに再確認した報告であるとも言える。

これまでの脳梗塞後の神経新生の研究では、梗塞半球側での特異的な神経新生が観察される事が報告されていたが、何故片側のみで増殖が起こるのかについては説明がされていなかった。今回の実験結果から、片側のみで見られる海馬環境の変化が見つかった事で、片側特異的な増殖機構の更なる説明がされていくと思われる。局所脳梗塞後の海馬神経新生については、これまで Vascular endothelial growth factor (VEGF) や basic fibroblast growth factor (bFGF) などの各種栄養因子による機構が報告されていた (Yoshimura *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003)。しかしながら、栄養因子仮説では梗塞半球側での特異的な細胞増殖の説明がつかなかった。この点に関して、今回得られた神経活動の高まりが栄養因子の発

現を誘導し、それによって細胞分裂が開始するという可能性もあり、本実験の予備実験として、海馬での bFGF の発現を確認した。図 17 で示す通り、海馬 DG の神経幹細胞が bFGF 及びその受容体である bFGFR を発現している事が確認された。これは神経幹細胞での栄養因子発現の一例であるが、海馬神経回路活動が高まり、放出されるグルタミン酸を受け取る事で、神経幹細胞自体が栄養因子を発現し、自己作用する事で細胞増殖が引き起こされる可能性が示唆されるが、今後更なる研究が必要である。

また、神経幹細胞が代謝型グルタミン酸受容体 5 型(metabotropic glutamate receptor 5: mGluR5)を発現し、更に mGluR5 を介して細胞内へのシグナル伝達が行われる事を示した。また、本実験で改良したスライスカルチャー法により、海馬神経回路を電気刺激により活性化させたところ、シグナルを受け取った神経幹細胞は細胞分裂を開始する事が確認された。更に、この神経活動の高まりに応答した細胞増殖は、mGluR5 の選択的阻害薬により抑制される事が確認された。この事から、成体海馬では神経幹細胞は mGluR5 を介して海馬回路内で神経活動の高まりを感知し(グルタミン酸シグナルを受け取り)、神経幹細胞の増殖が促進されている事が示された。また、免疫電子顕微鏡法により、神経幹細胞は興奮性シナプスに接する形で突起を延ばしている事が確認され、この先端部分でも mGluR5 を発現している事が確かめられている事から、神経幹細胞は海馬神経活動の強さに応じてグルタミン酸のシグナルを受け取り、活性化及び細胞分裂を開始するのではないかと考えられる。

次に、*in vivo* にて mGluR5 の allosteric positive modulator である、CDPPB を投

与したところ、神経幹細胞の増殖が誘導できた。この事は、通常の神経新生が起きている状況下でも神経幹細胞を活性化し増殖させる事が出来る事を示している。更には、この刺激にて増殖した神経幹細胞は 28 日後には成熟神経細胞へ分化していた。よって、mGluR5 刺激を *in vivo* で加える事により、神経活動の高まりに応じた神経幹細胞の増殖を再現する事ができたと考えられる。また、脳梗塞後の神経幹細胞の増殖は、mGluR5 の選択的阻害剤 MPEP 投与にて阻害される事から、脳梗塞後の神経幹細胞増殖は、mGluR5 を介して誘導されている事が確認された。この事から、局所脳梗塞後の海馬では神経活動が高まり、この神経活動の高まりが神経幹細胞上の mGluR5 を刺激し細胞増殖を刺激している事が示唆された。

ここで先行研究にて、mGluR5 ノックアウトマウスの成体海馬での分裂細胞の数を解析した結果として、mGluR5 ノックアウトマウスでは有意に分裂細胞数が減少する事が示されているが、通常の高まりを維持するだけの分裂細胞は維持されている(Di Giorgi-Gerevini *et al.*, 2005)。また、今回のスライスカルチャーによる細胞分裂割合の解析では、mGluR5 が阻害するのは、神経活動の高まりが誘導する増加分であった。更には、MCAO 後の神経幹細胞の増殖についても、mGluR5 の選択的阻害薬 MPEP で通常状態の数まで抑制されており、MCAO により誘導された神経幹細胞の細胞分裂が主に抑制されていた。よって、以上の結果から、mGluR5 を介した神経幹細胞の細胞増殖機構は、通常の神経新生での関与もあるが、むしろ神経活動が高まった際に誘導される活性化した細胞分裂に対してより機能を有していると考察された。

最後に、第 1 章の結果から梗塞半球側の海馬でシーター帯 (4-12Hz) で特異的な神経活動が高まる事が確認された。シーター帯での神経活動の高まりは自発運動時でも高められるパターンであり、生理学的に海馬神経回路が個々の神経細胞が無秩序に活動するのではなく、各神経幹細胞が同期して活動して生み出される。このシーター波という特徴的な活動パターンが、重要な意味を持つ可能性がある。シーター波のリズムを崩した状態で海馬神経活動を高め、自発運動時の神経幹細胞の増殖について解析を行った結果、シーター波のリズムを崩す事で神経幹細胞の増殖が抑制された。この結果は、神経活動のパターンにも重要な意味がある事を示している。各序論、考察でも記載したが、シーター波は学習や自発運動などで高められるが、これらの行動は動物が新しい環境適応へ適応する為に必要な行動であると考えられる。つまり、新しい環境へ動物が置かれた場合、生命を維持していくには、まずは周りを観察し環境状況を学習 (記憶) し、栄養源 (餌、食事) を得る為に行動し探していく必要がある。この行動は、動物が持つ本能的な部分であり、動物の脳には上記の様な生命を維持していく為に必要となる行動に対して応答する機構が存在するのかも知れない。ただし、活動パターンと神経新生の関連性については、その機構など更に解析を進める必要があり、今後の解明が期待される。

本研究は、成体海馬で神経活動が高まった際に、神経幹細胞がどの様に刺激され細胞分裂が誘導されるかを解明した報告である。脳梗塞後のニューロン新生については、海馬依存的機能の低下を引き起こす因子である可能性があり、本論文の細胞分裂機構を用いる事で新しい脳機能の改善に繋がる治療法の開発

に繋がるかもしれない。また、mGluR5 シグナルを刺激する事により、新生ニューロンを増加させる事ができる事から、神経新生の減少と病態の関連性が指摘されている疾患（鬱病、統合失調症、アルツハイマー病など）(Santarelli *et al.*, 2003; Pieper *et al.*, 2005; Reif *et al.*, 2006; Sahay & Hen, 2007; Verret *et al.*, 2007)や、加齢に伴う神経新生の減少(Kuhn *et al.*, 1996; Kempermann *et al.*, 1998; Cameron & McKay, 1999)に関連した記憶力の低下への脳機能改善方法として活用できる可能性がある。更なる研究が進み、上記の疾患等への治療法の開発に対して本結果が有用になる事を期待する。

## 略語

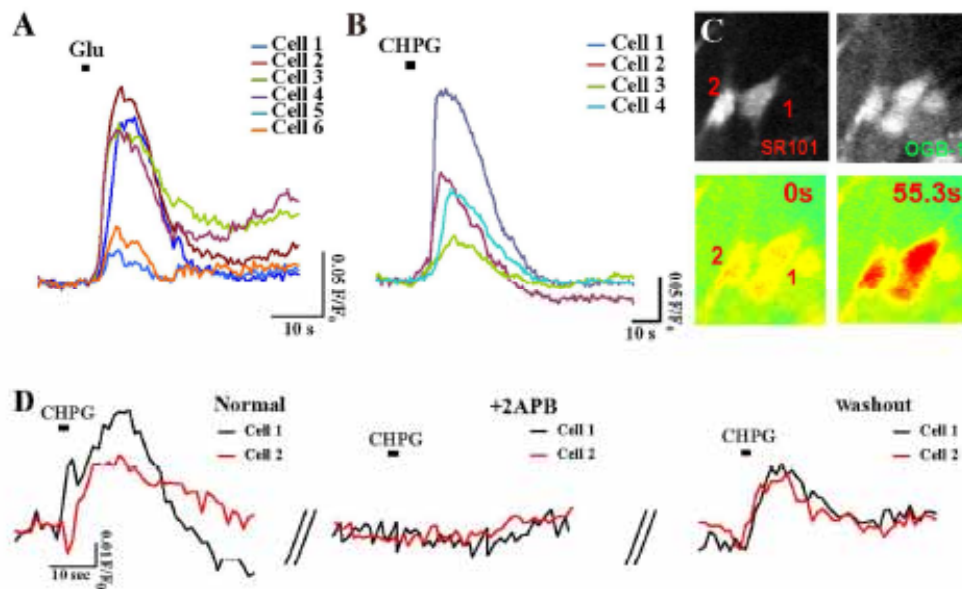
略語	正式名称	解説など
2APB	2-Aminoethyldiphenylborinate	Inositol trisphosphate(IP3) 受容体の阻害剤
AMPA	-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	アミノ酸の一種。AMPA 受容体のリガンド
ATP	Adenosine-5'-Triphosphate	細胞内のエネルギー生産シグナルの一つ。脱リン酸化によりエネルギーを放出する。
bFGF	basic fibroblast growth factor	神経栄養因子の一種
bFGFR	basic fibroblast growth factor receptor	bFGF の受容体
BLBP	Brain lipid-binding protein	神経幹細胞が発現する細胞マーカーの一種
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine	チミジン類似体( 分裂細胞マーカー )
CA	cornu ammonis	海馬アンモン角
CDPPB	3-cyano-N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamide	代謝型グルタミン酸受容体 5 型の選択的 Allosteric modulator
CHPG	(RS)-2-Chloro-5-hydroxyphenylglycine	mGluR5 の特異的アゴニスト
Cont	Contralateral	反体側
CP55940	2-[(1R,2R,5R)-5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl)cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol	カンナビノイド受容体の強力な非選択的アゴニスト
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole	DNA の蛍光染色試薬
DBI	Diazepam Binding Inhibitor	Benzodiazepine 系化合物が GABA-A 受容体へ結合する事を阻害する内在性タンパク質
DCX	Doublecortin	新生ニューロンマーカー
DG	Dentate Gyrus	海馬歯状回

Diazepam	7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one	GABA 受容体の active modulator
DIG	Digoxigenin	ジゴキシンのアグリコン。実験では標識物質
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	多くの有機化合物や無機塩も溶解する優れた非プロトン性極性溶媒
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
GABA	Gamma-aminobutyric acid	-アミノ酪酸
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	グリア細胞線維性酸性タンパク質
GFP	Green Fluorescent Protein	緑色蛍光タンパク質
HNPP	Human peripheral myelin protein	<i>in situ</i> hybridization のシグナル検出で用いるタグタンパク質
IP3	Inositol trisphosphate	イノシトール 3 リン酸
Ipsi	Ipsilateral	同側
MCAO	Middle Cerebral Artery Occlusion	中大脳動脈閉塞
mGluR	Metabotropic glutamate receptor	代謝型グルタミン酸受容体
ML	Molecular layer	分子層
MPEP	2-methyl-6-(phenylethynyl) pyridine	代謝型グルタミン酸受容体 5 型の選択的阻害薬
NDS	Normal Donkey Serum	ロバ血清
NeuN	Neuronal Nuclei	成熟神経細胞のマーカータンパク質
NeuroD	Neurogenic differentiation	神経前駆細胞以降の細胞種マーカー
NGS	Normal Goat Serum	ヤギ血清
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid	グルタミン酸の類似体
NPC	Neural Progenitor Cell	神経前駆細胞
NSC	Neural Stem Cell	神経幹細胞
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水

PFA	Paraformaldehyde	パラホルムアルデヒド
Prox1	Prospero-related homeobox 1	細胞分化マーカー
PSA-NCAM	Polysialic acid-neural cell adhesion molecule	神経前駆細胞及び未成熟ニューロンのマーカー
Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2;Transcription factor	神経幹細胞マーカーの一種
TBS	Tris-Buffered Saline	トリス緩衝生理食塩水
TSA	Tyramide Signal Amplification	免疫染色や in situ Hybridizationでの検出感度を向上させる手法
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮細胞増殖因子
Veh	Vehicle	溶媒



## 補助資料

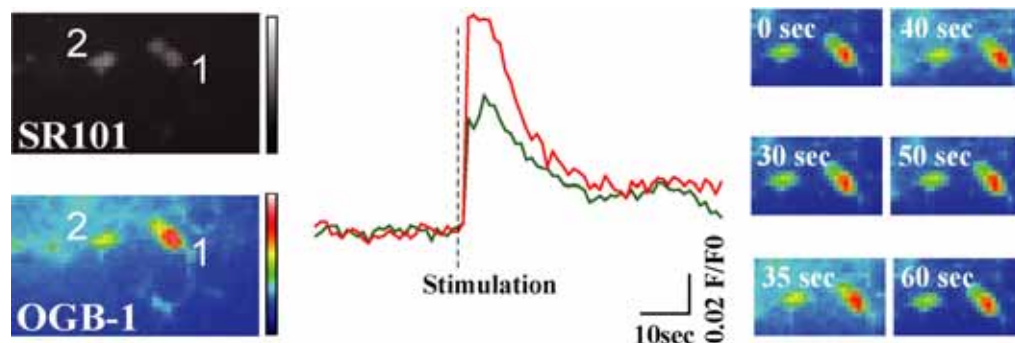


### 補助資料1:mGluR5 刺激に対する神経幹細胞の細胞内カルシウム応答

(細胞応答化学研究室：加藤智将氏より提供。)

A-C, 細胞内カルシウム応答は、peak fluorescence intensity/basal fluorescence intensity ( $F/F_0$ )として解析した。神経幹細胞は、海馬 DG-Subgranular zone(SGZ)に存在する SR101 が取り込まれた細胞として特定した。カルシウム応答は、OGB-1 の蛍光シグナルによって測定した。また、B 中の Cell#2 について、経時的な pseudo-color images を示した(C)。神経幹細胞でのカルシウム応答は、glutamate (A)及び mGluR5 agonist である CHPG により誘導された(B, C)。

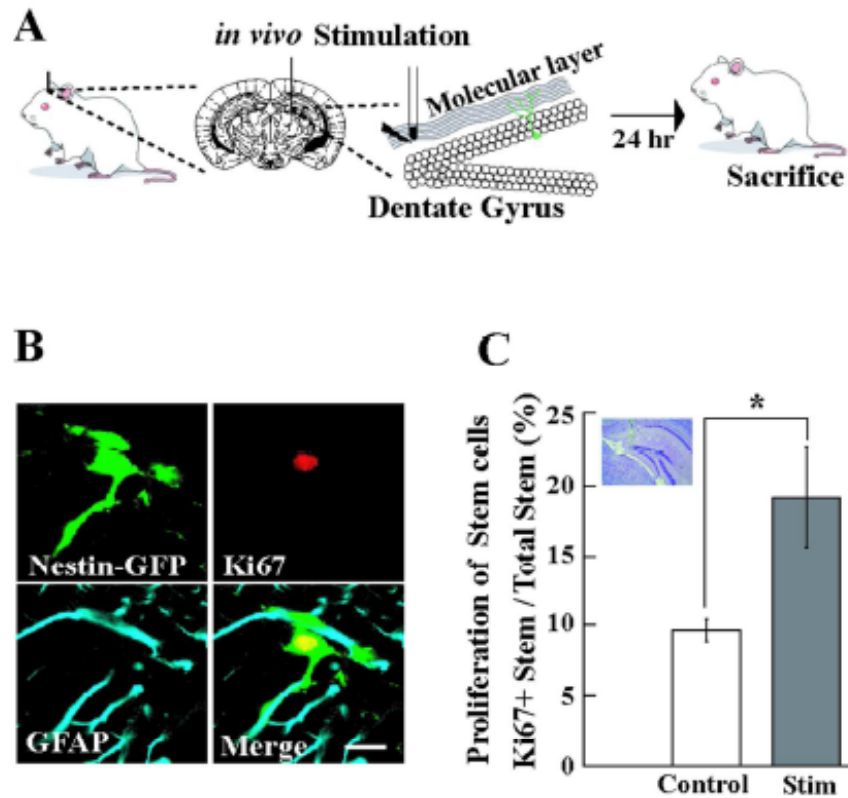
D, また、CHPG が誘導する神経幹細胞のカルシウム応答は G タンパク Gq-IP3 シグナルの阻害剤である 2APB によって阻害された。



## 補助資料2：海馬 DG 回路のシーターバースト刺激後の神経幹細胞の細胞内カルシウム応答

（細胞応答化学研究室：栗林寛氏より提供。）

細胞内カルシウム応答は、peak fluorescence intensity/basal fluorescence intensity ( $F/F_0$ )として解析した。神経幹細胞は、海馬 DG-Subgranular zone(SGZ)に存在する SR101 が取り込まれた細胞として特定した。カルシウム応答は、OGB-1 の蛍光シグナルによって測定した。また、Cell#1 について、経時的な pseudo-color images を示した。神経幹細胞でのカルシウム応答は、海馬 DG を刺激電極を用いてシーターバースト刺激をする事で誘導された。



### 補助資料3 : *In vivo* での海馬回路刺激による神経幹細胞の増殖

(細胞応答化学研究室：伊藤佳絵博士より提供。)

A, 試験デザイン。 B,C, 電気刺激用電極を海馬 DG へ埋め込み (埋め込み位置： A: -2.54 mm, L: 1.80 mm, V: 1.9 mm)、40 $\mu$ A のシーターバースト刺激を 10 秒毎に 3 回加えた。その後、24 時間後にマウスを還流固定し、Nissl 染色にて電極位置を特定し、刺激電極埋め込み位置の前後 4 枚ずつ切片を用いて Ki67 陽性である神経幹細胞の割合を解析した。

## 参考文献

- Abrous, D.N., Koehl, M. & Le Moal, M. (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*, **85**, 523-569.
- Aimone, J.B., Wiles, J. & Gage, F.H. (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci*, **9**, 723-727.
- Altman, J. & Das, G.D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, **124**, 319-335.
- Altman, J. & Das, G.D. (1967) Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature*, **214**, 1098-1101.
- Bouet, V., Freret, T., Toutain, J., Divoux, D., Boulouard, M. & Schumann-Bard, P. (2007) Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol*, **203**, 555-567.
- Bragin, A., Azizyan, A., Almajano, J. & Engel, J., Jr. (2009) The cause of the imbalance in the neuronal network leading to seizure activity can be predicted by the electrographic pattern of the seizure onset. *J Neurosci*, **29**, 3660-3671.
- Bragin, A., Jando, G., Nadasdy, Z., Hetke, J., Wise, K. & Buzsaki, G. (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci*, **15**, 47-60.
- Bruel-Jungerman, E., Davis, S., Rampon, C. & Laroche, S. (2006) Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*, **26**, 5888-5893.

- Buzsaki, G. (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, **33**, 325-340.
- Buzsaki, G., Buhl, D.L., Harris, K.D., Csicsvari, J., Czeh, B. & Morozov, A. (2003) Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience*, **116**, 201-211.
- Buzsaki, G., Hsu, M., Slamka, C., Gage, F.H. & Horvath, Z. (1991) Emergence and propagation of interictal spikes in the subcortically denervated hippocampus. *Hippocampus*, **1**, 163-180.
- Cameron, H.A., McEwen, B.S. & Gould, E. (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci*, **15**, 4687-4692.
- Cameron, H.A. & McKay, R.D. (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci*, **2**, 894-897.
- Chun, S.K., Sun, W., Park, J.J. & Jung, M.W. (2006) Enhanced proliferation of progenitor cells following long-term potentiation induction in the rat dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem*, **86**, 322-329.
- Cornwell, B.R., Johnson, L.L., Holroyd, T., Carver, F.W. & Grillon, C. (2008) Human hippocampal and parahippocampal theta during goal-directed spatial navigation predicts performance on a virtual Morris water maze. *J Neurosci*, **28**, 5983-5990.
- Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T.D. & Malenka, R.C. (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron*,

**42**, 535-552.

- Di Giorgi Gerevini, V.D., Caruso, A., Cappuccio, I., Ricci Vitiani, L., Romeo, S., Della Rocca, C., Gradini, R., Melchiorri, D. & Nicoletti, F. (2004) The mGlu5 metabotropic glutamate receptor is expressed in zones of active neurogenesis of the embryonic and postnatal brain. *Brain Res Dev Brain Res*, **150**, 17-22.
- Di Giorgi-Gerevini, V., Melchiorri, D., Battaglia, G., Ricci-Vitiani, L., Ciceroni, C., Busceti, C.L., Biagioni, F., Iacovelli, L., Canudas, A.M., Parati, E., De Maria, R. & Nicoletti, F. (2005) Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells. *Cell Death Differ*, **12**, 1124-1133.
- Drapeau, E., Mayo, W., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V. & Abrous, D.N. (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14385-14390.
- Dupret, D., Fabre, A., Dobrossy, M.D., Panatier, A., Rodriguez, J.J., Lamarque, S., Lemaire, V., Olier, S.H., Piazza, P.V. & Abrous, D.N. (2007) Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol*, **5**, e214.
- Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N. & Piazza, P.V. (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One*, **3**, e1959.

- Engel, J., Jr., Bragin, A., Staba, R. & Mody, I. (2009) High-frequency oscillations: what is normal and what is not? *Epilepsia*, **50**, 598-604.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A. & Gage, F.H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, **4**, 1313-1317.
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L.P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H. & Kempermann, G. (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci*, **23**, 373-382.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y. & Hisatsune, T. (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci*, **23**, 9357-9366.
- Gallinat, J., Kunz, D., Senkowski, D., Kienast, T., Seifert, F., Schubert, F. & Heinz, A. (2006) Hippocampal glutamate concentration predicts cerebral theta oscillations during cognitive processing. *Psychopharmacology (Berl)*, **187**, 103-111.
- Gandhi, R., Luk, K.C., Rymar, V.V. & Sadikot, A.F. (2008) Group I mGluR5 metabotropic glutamate receptors regulate proliferation of neuronal progenitors in specific forebrain developmental domains. *J Neurochem*, **104**, 155-172.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. & Shors, T.J. (1999) Learning enhances

- adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*, **2**, 260-265.
- Guidotti, A., Forchetti, C.M., Corda, M.G., Konkel, D., Bennett, C.D. & Costa, E. (1983) Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 3531-3535.
- Huttmann, K., Sadgrove, M., Wallraff, A., Hinterkeuser, S., Kirchhoff, F., Steinhauser, C. & Gray, W.P. (2003) Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. *Eur J Neurosci*, **18**, 2769-2778.
- Ide, Y., Fujiyama, F., Okamoto-Furuta, K., Tamamaki, N., Kaneko, T. & Hisatsune, T. (2008) Rapid integration of young newborn dentate gyrus granule cells in the adult hippocampal circuitry. *Eur J Neurosci*, **28**, 2381-2392.
- Imura, T., Kanatani, S., Fukuda, S., Miyamoto, Y. & Hisatsune, T. (2005) Layer-specific production of nitric oxide during cortical circuit formation in postnatal mouse brain. *Cereb Cortex*, **15**, 332-340.
- Isomura, Y., Sirota, A., Ozen, S., Montgomery, S., Mizuseki, K., Henze, D.A. & Buzsaki, G. (2006) Integration and segregation of activity in entorhinal-hippocampal subregions by neocortical slow oscillations. *Neuron*, **52**, 871-882.
- Itou, Y., Nochi, R., Kuribayashi, H., Saito, Y. & Hisatsune, T. (2011) Cholinergic activation of hippocampal neural stem cells in aged dentate gyrus.



*Hippocampus*, **21**, 446-459.

Jin, K., Minami, M., Lan, J.Q., Mao, X.O., Batteur, S., Simon, R.P. & 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.

Kahana, M.J., Sekuler, R., Caplan, J.B., Kirschen, M. & Madsen, J.R. (1999) Human theta oscillations exhibit task dependence during virtual maze navigation.

*Nature*, **399**, 781-784.

Kaplan, M.S. & Hinds, J.W. (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, **197**, 1092-1094.

Kee, N., Teixeira, C.M., Wang, A.H. & Frankland, P.W. (2007) Preferential

incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci*, **10**, 355-362.

Kempermann, G. (2008) The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci*, **31**, 163-169.

Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. & Kronenberg, G. (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, **27**, 447-452.

Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*, **18**, 3206-3212.

Klaft, Z.J., Schulz, S.B., Maslarova, A., Gabriel, S., Heinemann, U. & Gerevich, Z.

(2012) Extracellular ATP differentially affects epileptiform activity via

- purinergic P2X7 and adenosine A1 receptors in naive and chronic epileptic rats. *Epilepsia*, **53**, 1978-1986.
- Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T. & Ooneda, G. (1986) Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke*, **8**, 1-8.
- Kokaia, M. (2011) Seizure-induced neurogenesis in the adult brain. *Eur J Neurosci*, **33**, 1133-1138.
- Koketsu, D., Furuichi, Y., Maeda, M., Matsuoka, N., Miyamoto, Y. & Hisatsune, T. (2006) Increased number of new neurons in the olfactory bulb and hippocampus of adult non-human primates after focal ischemia. *Exp Neurol*, **199**, 92-102.
- Kornack, D.R. & Rakic, P. (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5768-5773.
- Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Bunk, E., Wolf, C., Ehninger, D. & Kempermann, G. (2006) Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging*, **27**, 1505-1513.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F.H. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, **16**, 2027-2033.
- Kullmann, D. (2007) Synaptic Function. In Per Andersen, R.M., David Amaral, Tim

- Bliss, John O'keefe (ed.) *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, Inc., Oxford, New York, Auckland, Cape Town, Dar es Salaam, Hong Kong, Karachi, Kuala Lumpur, Madrid, Melbourne, Mexico City, Nairobi, New Delhi, Shanghai, Taipei, Toronto, pp. 203-241.
- Lee, M.G., Chrobak, J.J., Sik, A., Wiley, R.G. & Buzsaki, G. (1994) Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience*, **62**, 1033-1047.
- Li, J.Y., Furuichi, Y., Matsuoka, N., Mutoh, S. & Yanagihara, T. (2006) Tacrolimus (FK506) attenuates biphasic cytochrome c release and Bad phosphorylation following transient cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*, **142**, 789-797.
- Liu, J., Solway, K., Messing, R.O. & Sharp, F.R. (1998) Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci*, **18**, 7768-7778.
- Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, **264**, 1145-1148.
- Melchiorri, D., Cappuccio, I., Ciceroni, C., Spinsanti, P., Mosillo, P., Sarichelou, I., Sale, P. & Nicoletti, F. (2007) Metabotropic glutamate receptors in stem/progenitor cells. *Neuropharmacology*, **53**, 473-480.
- Niv, F., Keiner, S., Krishna, Witte, O.W., Lie, D.C. & Redecker, C. (2012) Aberrant neurogenesis after stroke: a retroviral cell labeling study. *Stroke*, **43**, 2468-2475.

- Okada, H., Miyakawa, N., Mori, H., Mishina, M., Miyamoto, Y. & Hisatsune, T. (2003) NMDA receptors in cortical development are essential for the generation of coordinated increases in  $[Ca^{2+}]_i$  in "neuronal domains". *Cereb Cortex*, **13**, 749-757.
- Okubo, Y., Sekiya, H., Namiki, S., Sakamoto, H., Iinuma, S., Yamasaki, M., Watanabe, M., Hirose, K. & Iino, M. (2010) Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 6526-6531.
- Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H., Sloviter, R.S. & 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.
- Pereira, A.C., Huddleston, D.E., Brickman, A.M., Sosunov, A.A., Hen, R., McKhann, G.M., Sloan, R., Gage, F.H., Brown, T.R. & Small, S.A. (2007) An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 5638-5643.
- Pieper, A.A., Wu, X., Han, T.W., Estill, S.J., Dang, Q., Wu, L.C., Reece-Fincannon, S., Dudley, C.A., Richardson, J.A., Brat, D.J. & McKnight, S.L. (2005) The neuronal PAS domain protein 3 transcription factor controls FGF-mediated adult hippocampal neurogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 14052-14057.
- Reif, A., Fritzen, S., Finger, M., Strobel, A., Lauer, M., Schmitt, A. & Lesch, K.P.

- (2006) Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry*, **11**, 514-522.
- Robbe, D., Montgomery, S.M., Thome, A., Rueda-Orozco, P.E., McNaughton, B.L. & Buzsaki, G. (2006) Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neurosci*, **9**, 1526-1533.
- Sahay, A. & Hen, R. (2007) Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci*, **10**, 1110-1115.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C. & Hen, R. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, **301**, 805-809.
- Sasaki, S., Tabata, H., Tachikawa, K. & Nakajima, K. (2008) The cortical subventricular zone-specific molecule Svet1 is part of the nuclear RNA coded by the putative Netrin receptor gene Unc5d and is expressed in multipolar migrating cells. *Mol Cell Neurosci*, **38**, 474-483.
- Saxe, M.D., Battaglia, F., Wang, J.W., Malleret, G., David, D.J., Monckton, J.E., Garcia, A.D., Sofroniew, M.V., Kandel, E.R., Santarelli, L., Hen, R. & Drew, M.R. (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 17501-17506.
- Scharfman, H.E., Goodman, J.H. & Sollas, A.L. (2000) Granule-like neurons at the

- hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci*, **20**, 6144-6158.
- Schulz, S.B., Klaft, Z.J., Rosler, A.R., Heinemann, U. & Gerevich, Z. (2012) Purinergic P2X, P2Y and adenosine receptors differentially modulate hippocampal gamma oscillations. *Neuropharmacology*, **62**, 914-924.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S. & Alvarez-Buylla, A. (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, **21**, 7153-7160.
- Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T. & Gould, E. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, **410**, 372-376.
- Sun, Y., Jin, K., Childs, J.T., Xie, L., Mao, X.O. & Greenberg, D.A. (2005) Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab*, **25**, 485-492.
- Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X.O., Logvinova, A. & Greenberg, D.A. (2003) VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*, **111**, 1843-1851.
- Swanson, C.J., Bures, M., Johnson, M.P., Linden, A.M., Monn, J.A. & Schoepp, D.D. (2005) Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov*, **4**, 131-144.

- Takatsuki, K., Kawahara, S., Mishina, M. & Kirino, Y. (2005) Characterization of hippocampal theta rhythm in wild-type mice and glutamate receptor subunit delta2 mutant mice during eyeblink conditioning with a short trace interval. *Brain Res*, **1063**, 159-167.
- Toni, N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H. & Gage, F.H. (2007) Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci*, **10**, 727-734.
- Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T. & Hisatsune, T. (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, **47**, 803-815.
- Trejo, J.L., Carro, E. & Torres-Aleman, I. (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*, **21**, 1628-1634.
- van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F.H. (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, **2**, 266-270.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D. & Gage, F.H. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, **415**, 1030-1034.
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C. & Gage, F.H. (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*, **25**, 8680-8685.

- Vanderwolf, C.H. (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, **26**, 407-418.
- Verret, L., Jankowsky, J.L., Xu, G.M., Borchelt, D.R. & Rampon, C. (2007) Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, **27**, 6771-6780.
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T. & Nedergaard, M. (2006) Astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci*, **9**, 816-823.
- Wang, Y., Jin, K., Mao, X.O., Xie, L., Banwait, S., Marti, H.H. & Greenberg, D.A. (2007) VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res*, **85**, 740-747.
- Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M. & Mori, K. (2000) Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport*, **11**, 1991-1996.
- Yanase, H., Shimizu, H., Yamada, K. & Iwanaga, T. (2002) Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid binding protein. *Arch Histol Cytol*, **65**, 27-36.
- Yonemori, F., Yamaguchi, T., Yamada, H. & Tamura, A. (1999) Spatial cognitive performance after chronic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow*



*Metab*, **19**, 483-494.

- Yoshimura, S., Takagi, Y., Harada, J., Teramoto, T., Thomas, S.S., Waeber, C., Bakowska, J.C., Breakefield, X.O. & 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.
- Zhang, C.L., Zou, Y., He, W., Gage, F.H. & Evans, R.M. (2008) A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature*, **451**, 1004-1007.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、修士課程2年間、博士課程4年間及び退学後現在に至るまで、熱心なご指導を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科 先端生命科学 細胞応答化学研究室 久恒辰博 准教授に心より感謝申し上げます。研究に臨む姿勢から、データーに厳しく向き合う能力など、研究の一から十までご教授頂きました。他の学生の指導がお忙しい中でも、本研究をまとめる最後までご指導頂き、社会人としての姿勢もご指導頂きました。改めて、この場を借りて御礼を申し上げます。

本研究は、非常に多くの共同研究者の方々にも協力頂きまとめた論文です。細胞応答化学研究室卒業生の、瀧澤大輔博士、福田諭博士、村松大博士、戸塚祐介博士、佐藤祐樹さん、井出陽子博士、伊藤佳絵博士、斎藤悠さん、加藤智将さん、陳 陽 博士、金子順さんに心より感謝致します。

各種実験をご教授頂きました慶応義塾大学医学部 仲嶋一範教授および細胞応答化学研究室出身の金谷繁明博士、神経活動データ解析方法についてご教授頂きました東京大学新領域創成科学研究科 眞溪歩 准教授及び寺園泰 助教、には心より御礼を申し上げます。

日頃より、多くのご指導を賜りました、東京大学新領域創成科学研究科 先端生命科学 細胞応答化学研究室の皆様には、本当に感謝しております。本当に有難うございました。

2013 年 5 月 4 日

能智 禄弥