

論文の内容の要旨

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“てんかん”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、海馬に存在する海馬神経幹細胞及び神経前駆細胞により制御されている。初期段階では海馬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ことが示されている。

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海馬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、その海馬神経幹細胞の増殖との関連性を解析することも目的とした。

結果

1) mGluR5 を介した海馬神経幹細胞への入力及び増殖

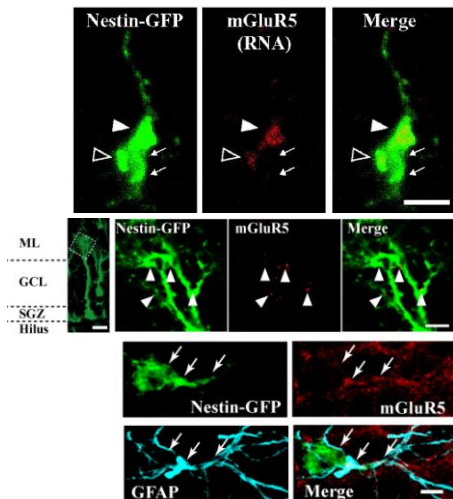


図 1 : mGluR5 の発現
mGluR5 の mRNA 及び受容体タンパク発現が NSC で確認された。Scale Bar は、10µm(1 段目、2 段目左), 3µm(2 段目右), 5µm(3 段目)

NestinP-GFP トランスジェニックマウスを用いることで、当研究室のこれまでの報告の通り、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 蛋白及び Nestin の発現により神経幹細胞(Neural stem cell: NSC)

が特定できることを確認した。この NSC に対して *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 1)。また、mGluR5 に対する免疫染色法により mGluR5 タンパクも発現していることも併せて確認された。最後に、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 内でシグナル伝達される事が確認された。

2) mGluR5 刺激による海馬幹細胞の増殖及びニューロン新生

次に、mGluR5 シグナルが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 1)実験と同様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ーである Ki-67 タンパクの発現上昇が確認された。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 2)。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

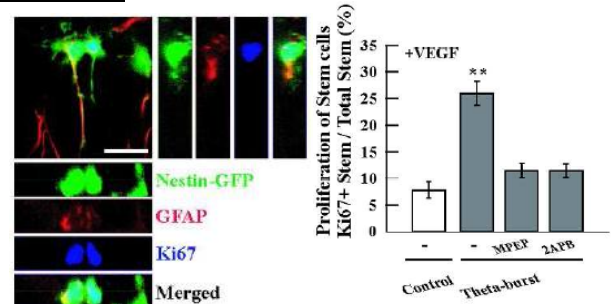


図 2 : mGluR5 を介した NSC の増殖
海馬神経回路刺激により NSC は増殖を開始した。またこの増殖は mGluR5 を阻害する事で抑制された。Scale bar: 20µm. Ki67 : 細胞分裂マーカー

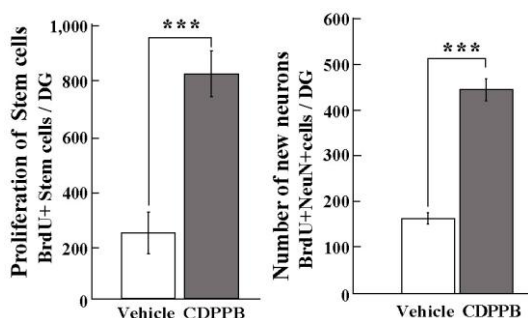


図 3 : mGluR5 刺激による神経新生

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

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新生が確認された (図 3)。

3) mGluR5 が制御する局所脳梗塞 MCAO 後のニューロン新生

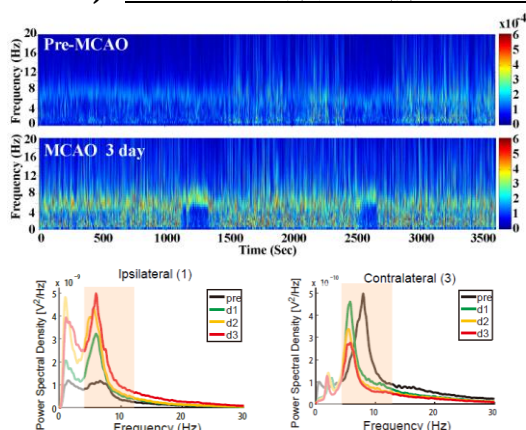


図 4 : MCAO 後の神経活動の高まり

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。

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 4)。

また、この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 NSC が特異的に分裂していることが確かめられた。この NSC の特異的な増殖は、先に記載した海馬神経活動の高まりを 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 5)。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。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

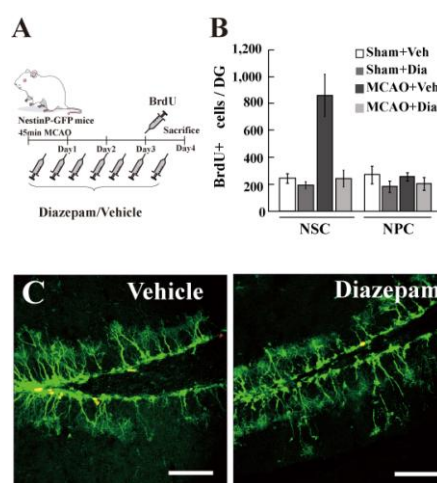


図 5 : Diazepam による MCAO 後

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

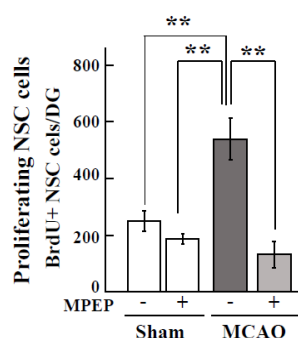


図 6 : mGluR5 シグナル阻害による

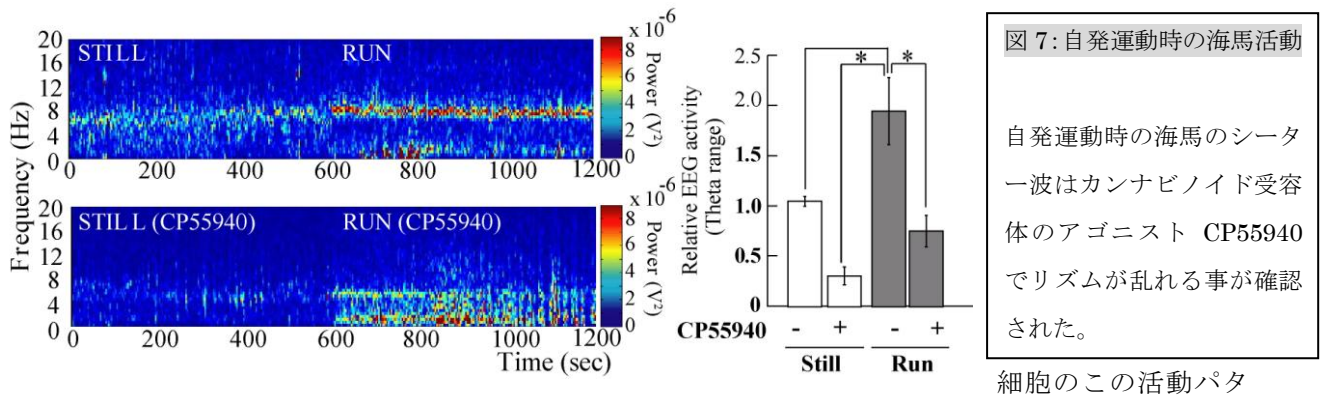
MCAO 後 NSC 増殖抑制

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。

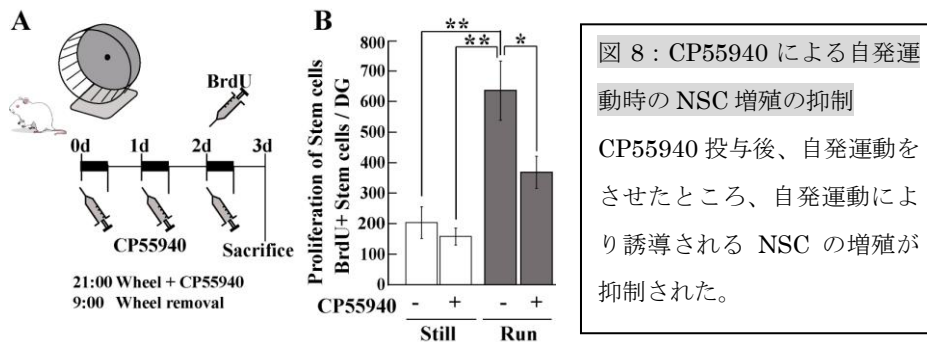
この事から、NSC は海馬神経活動の高まりに応じて mGluR5 を介して活性化し細胞増殖が上昇する事が確認された (図 6)。

4) シーター波による海馬神経幹細胞の増殖制御

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。3)の結果においてもこのシーター波の高まりが確認されている。そこで、海馬神経幹



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ことが確認された (図 7)。また、CP55940 投与により、自発運動が誘導する海馬神経幹細胞の増殖が抑制された (図 8)。この事は、活動依存的な海馬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、海馬に存在する海馬神経幹細胞は 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ことが確認された。

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ことも報告されており、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。