

審査の結果の要旨

氏名 中富浩文

本研究では、ラットの一過性前脳虚血モデルを用いて、成体神経前駆細胞による海馬錐体ニューロンの再生誘導と脳機能回復を目指した基礎的研究を行い、下記の結果を得ている。

1. 一過性前脳虚血損傷後の海馬CA1領域では、虚血損傷後7日後（以下DAI7と略記）には、ほとんどすべてのNeuN陽性CA1ニューロンが変性・脱落した。一方、DAI28では、NeuN陽性細胞の数がDAI7と比較して有意に増加していた（正常個体同一部位の全NeuN陽性錐体ニューロンの約9%）。
2. 損傷CA1においてDAI28/56に観察される錐体ニューロンが前駆細胞から新たに再生された可能性を考え、内在性の神経前駆細胞の増殖促進を試みた。fibroblast growth factor-2 (FGF-2) 並びにepidermal growth factor (EGF)を、DAI2-5の3日間、ミニポンプを用いて側脳室内に持続投与した。DAI28の個体群では、CA1領域錐体細胞層におけるNeuN陽性細胞の数が、虚血未処理群（以下、未処理群）と比較して約4.2倍に増加していた。この数は、虚血損傷により失われた全NeuN陽性ニューロンの約40%に相当した。
3. 神経前駆細胞の増殖によるニューロン新生を確認するため、虚血脳内の分裂細胞を5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)の腹腔内投与により標識した。DAI28で観察したところ、CA1錐体細胞層にニューロン特異的マーカーである β -tubulin type III (TuJ1)、Hu、NeuN等を発現する多数のBrdU陽性細胞を認めた。このことから、虚血損傷後の錐体細胞層に観察されるニューロンの多くは、内在性神経前駆細胞の分化により生み出されたことが確認された。
4. pPVに存在する神経前駆細胞が海馬CA1領域の錐体ニューロンの新生に関与するか否かを明らかにする目的で、蛍光標識式薬Diiを、DAI2に虚血誘導個体の側脳室に投与した。Dii陽性細胞はDAI4においては側脳室近傍に留まっていたが、DAI28では多くの標識細胞が海馬実質、特にCA1領域に移動していた。この際、CA1錐体細胞層のNeuN陽性細胞の88%がDii陽性であった。また、増殖性前駆細胞の特異的な標識法として、green fluorescent protein (GFP)発現レトロウイルスを側脳室内に投与した。DAI5において増殖因子投与し、投与2日後ではGFP陽性細胞は側脳室近傍にのみ認められた。一方、DAI28においては多くのGFP陽性細胞が海馬内に認められ、CA1錐体細胞層のGFP陽性細胞の59%がHu陽性

[別紙 2]

ニューロンへと分化していた。

5. 次に、虚血脳内で新生されたニューロンが既存の神経回路へ組み込まれるか否かを形態学的に解析した。増殖因子投与群では、正常個体群と比較して低密度ながら樹状突起の回復が認められた。さらに、電子顕微鏡を用いた微細構造の解析から、この樹状突起上には明瞭な形態を保持したシナプス構造が観察された。

次に、増殖因子投与個体において観察される新生ニューロンの神経結合を、逆行性標識法(FluoroGold)により解析した。DAI56において、CA1領域NeuN陽性ニューロンの42%がFluoroGoldにより標識された。このことから、再生ニューロンがCA1-海馬台間の軸索投射の再構築に関与していることが明らかとなった。

6. 続いて、新生海馬ニューロンのシナプス応答について、電気生理学的な解析を行った。DAI90-120での虚血後未処理群では、このシナプス後電位は非常に減弱していたが、増殖因子投与群では有意なfEPSP振幅の回復が観られた。続いて、高頻度テタヌス刺激に対するfEPSPsの増強、いわゆる長期増強long-term potentiation (LTP)を調べた。対照群では刺激後60分で平均69%の増強が観察されたのに対し、虚血後に増殖因子を投与した群では平均58%の増強が認められた。また、この反応は、刺激後5-20分間の短期的な増強を欠く点で、対照群で見られるシナプス応答と異なっていた。

7. 続いて、これらの新生ニューロンが虚血後の脳機能回復に寄与しているかを、海馬依存性の空間認知記憶を反映するとされるモリス水迷路試験を用いて検討した。まずCA1錐体ニューロンの脱落が終了するDAI7-11の期間に、一日2回のテストを5日間連続、計10回おこなった。この期間では、虚血後未処理群、増殖因子投与群ともに、最初の3日間のテストで、対照個体群と比較して有意な空間認知記憶の低下が認められた。

次に、新生ニューロンの機能評価の目的で、DAI49-53の期間に再び10回の学習課題を設定した。虚血後未処理群は重度の記憶学習障害を示したが、増殖因子投与群は、未処理群と比較して有為な記憶学習能の回復が認められた。

以上、本研究により、虚血損傷後の海馬において、内在性神経前駆細胞からのCA1錐体ニューロンの新生が起こっていることが初めて明らかとなった。EGF並びにFGF-2の脳室内投与により内在性神経前駆細胞の増殖を促進することで、その再生能を亢進し得ることを示した。さらに、新生海馬ニューロンは既存の神経回路に組み込まれ、脳機能の改善に何らかの形で寄与し得ることも明らかになった。本研究の結果は、内在性神経前駆細胞を用いた新たな神経再生誘導療法の可能性を大きく広げるものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。