

論文内容の要旨

成体の大脳新皮質に存在するネスチン陽性細胞の分化特性に関する研究

氏名 松村 直人

序論

現在、日本が抱える社会問題の1つに、少子高齢化問題があげられる。これからの将来、増えることが予測される老人病には、脳血管障害やアルツハイマー病など、脳回路の傷害を伴う疾患が多く含まれる。障害を受けてしまった脳回路の回復のためにはニューロンの再生が有効な手段となるが、健常時の大人の脳内においてはニューロン新生が起こっている領域は、いくつかの特殊なケースを除けば、海馬歯状回と嗅球に限られている。また、脳血管障害やアルツハイマー病などの神経疾患において、大脳新皮質領域で自然治癒的なニューロンの再生が起こっているかどうかは依然として不明である。このため、現在の神経疾患に対する再生医療の手段としては、神経幹細胞を移植することによって、損傷を受けた中枢神経系の領域のニューロンを補い、治療をすることが一般的な治療手段として試みられている。

しかし、神経幹細胞の移植という治療法には、解決しなければならない多くの問題が存在する。それらの問題とは、移植細胞に対して自己免疫を起こすという点、移植した神経幹細胞のニューロンへの分化誘導が困難であるという点、外科的手術による患者への負担が大きいという点、流産した胎児より神経幹細胞を得る手段に対する倫理面の解決という点、ホストとドナーの細胞が統合し、適した神経回路を形成して、機能することのできるのかという点、などである。このように数多くの問題を抱える移植治療に対し、これらの問題を回避するための治療法を開発する必要がある。我々は、その治療法として、脳組織に内在している神経幹細胞を賦活化することにより、ニューロンを再生させることができれば、上記の問題

を回避することが可能となると考えた。本研究では、移植に対するもう一つの再生医療の手段となるであろう、内在性神経幹細胞の賦活化ということについて、成体の大脳新皮質において可能であるかを検証するための実験を行った。そして最近、当研究室において、この大脳新皮質領域に、神経幹細胞マーカーの一つであるネスチンタンパク質を発現している細胞が存在しているということが示された。ネスチンタンパク質は、成体の側脳室や海馬歯状回に存在する神経幹細胞にも発現している有効な神経幹細胞マーカーである。これは、成体の大脳新皮質領域においても、神経幹細胞としての性質を保持している細胞が存在しているのではないか、ということを示唆させる結果である。このネスチン陽性細胞がニューロンへの分化機構を保持していれば、内在性の神経幹細胞の賦活化による神経疾患の治療に用いることが可能となるのではないかと期待される。

本研究では、ネスチンタンパク質を神経幹細胞のマーカーとして選定し、成体の大脳新皮質領域に内在するネスチン陽性細胞を分離し、培養系においてその性質を調査することで、この細胞がどのような分化特性を有しているかについて検証した。また、将来的に、大脳新皮質に内在する神経幹細胞を活用し、当部位の神経回路の再生を実現するためには、その領域に内在する前駆細胞のニューロンへの分化誘導が必要である。そのため、発達期の脳において発現がみられ、ニューロンの分化に関わる転写因子であるニューラル bHLH を導入することにより、ニューロン分化が誘導されるかを調べた。

第一章 成体マウス大脳皮質の灰白質領域からの神経幹細胞群の分離法の開発

これまで、成体の大脳皮質領域より分離した神経系前駆細胞が、ニューロンへの分化機構を保持していることが示されている (Palmer et al., 1999; Nunes et al., 2003)。しかし、これらの実験系は、どちらも白質を含む実験系であるため、灰白質においてニューロン分化機構を保持している細胞が存在しているのかは不明である。アルツハイマー病や虚血により損傷を受ける領域は、主に表層の灰白質領域であるため、灰白質領域において、ニューロンへの分化機構を保持する細胞の存在を確認することが重要である。そこで、我々は、灰白質領域のみを分離し、その領域に内在する神経系前駆細胞を解析するため、新たな解剖法の開発を試みた。そして、今まで使われていた既存法と、我々が新たに開発した改良法を用い、大脳新皮質領域を分離し、回収された神経系前駆細胞を培養し、細胞の性質を比較することにより、正確性の確認を行った。

その結果、既存法では、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトがそれぞれ多数存在していることから、白質領域の細胞および、側脳室の神経幹細胞が混入している可能性が示唆された。そのため、側脳室より分離した神経幹細胞を、同様の培養法で培養し、分化後の細胞の性質を調査した。この結果、同様に多くのニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが分化誘導されることが確認された。これら結果から、既存法を用いた

実験系に確認されたニューロンやアストロサイトは、白質領域の細胞および、側脳室の神経幹細胞が混入した可能性が考えられる。新たに開発された改良法では、多くの細胞が成熟したオリゴデンドロサイトへと分化していることが確認された。ニューロンとアストロサイトへ分化している細胞はごくわずかしか存在していなかった。この改良法における分化後の細胞の性質は、すでに報告されている成体ラット皮質領域の分裂細胞の性質と同様に(Levinson et al., 1999)、多くの細胞がオリゴデンドロサイトへと分化していることから、正確に灰白質領域が切り取られたと考えられる。

第二章 ネスチン陽性細胞の増殖特性

成体の脳内において、神経幹細胞としての性質である自己増殖能と多分化能を保持している細胞は、側脳室と海馬歯状回のみが存在している。しかし最近、当研究室において、成体の大脳新皮質領域に、神経幹細胞のマーカーであるネスチン陽性細胞が存在していることが明らかとなった。大脳新皮質領域のネスチン陽性細胞が、他の領域の神経幹細胞と同様の性質を保持していることが明らかとなれば、大脳新皮質領域の内在性の細胞を用いた再生医療という点で、有用な結果となる。そのため、本章では、第一章で確立した解剖法を用い、大脳新皮質の灰白質領域に存在する神経幹細胞群を分離、回収し、培養系において、ネスチン陽性細胞の自己増殖能を調査した。

培養中、BrdU を固定前の 3 日間添加し、免疫染色を行った結果、増殖している細胞に対するネスチン陽性細胞の割合は 77%であった。これは、増殖能を保持している細胞の多くがネスチン陽性細胞であることを示す結果となった。さらに、これらのネスチン陽性細胞がどのような細胞的特質を保持しているかを確かめた。その結果、67%のネスチン陽性細胞が NG2 を発現していた。そのため、多くのネスチン陽性細胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞としての性質を保持していることが示された。

第三章 ネスチン陽性細胞の分化特性

健全体における成体の大脳新皮質領域において、ニューロン新生は起こらないとされている。本章では、成体の大脳新皮質の灰白質領域より分離したネスチン陽性細胞が、ニューロンへの分化機構を保持しているかを調査した。

その結果、分化誘導後の各々の細胞の割合は、ニューロンマーカーである Tuj-1 を発現している細胞が 19.3%、MAP2 が 8.6%、アストロサイトマーカーである GFAP が 3.5%、オリゴデンドロサイトマーカーである O1 が 60.5%であり、オリゴデンドロサイトとしての性質を示す細胞が最も高い割合を占めた。また、分化誘導後に生じたニューロンは、確かにネス

チン陽性細胞から分化したのか確かめるため、分化誘導初期の細胞を固定し、ネスチンタンパク質および初期のニューロンマーカーである **Tuj-1** を用いて、免疫染色を行った。その結果、**Tuj-1** を発現しているネスチン陽性細胞を確認することができた。これは、ネスチン陽性細胞よりニューロンへ分化している過程と考えられる。

培養系においてニューロン分化機構を保持している細胞の存在が示された。しかし、現在、成体の大脳新皮質領域において、ニューロン新生は起こらないとされている。このため、組織内では、このニューロン分化機構が、何らかの原因で抑制されていると考えられる。このため、神経幹細胞がニューロンへ分化する際に発現がみられるニューラル **bHLH** 転写因子を導入することによって、ニューロン分化機構を活性化することができるかどうかを調べた。そのため、分離した神経幹細胞群へ、レトロウイルスベクターを用いニューラル **bHLH** である **Mash1**、**NeuroD1**、**Neurogenin1** を導入した。

この結果、**Mash1**、**NeuroD1** を導入した細胞に対して、50%以上の細胞が **MAP2** 陽性であり、細胞内に保持されていたニューロン分化機構が活性化されたと考えられる。これは、発達期におけるニューロン分化機構が、成体脳の細胞にも保存されていることを示唆する結果となった。次に、ニューラル **bHLH** を導入した細胞が、ニューロンとしての電気生理的性質を保持しているかを確かめるため、パッチクランプを行った。

この結果、**NeuroD1** を導入した細胞において、幼若なニューロンにみられるナトリウムカレントがみられ、形態的なニューロン分化だけでなく、電気生理的な性質も獲得している事が示された。これらの結果は、組織内でニューロン分化機構を保持している細胞をターゲットとし、ニューラル **bHLH** 転写因子を活性化させる処置を施すことによって、大脳新皮質領域でのニューロンの再生を実現できる可能性を見出せる結果となった。