

論文の内容の要旨

論文題目 Environmental Control of the Survival, Migration and Differentiation of Dentate Granule Neurons

(移植された海馬顆粒細胞の宿主部位依存的な成長)

氏名 金 貞娥

【序】

海馬歯状回にもっとも豊富に存在する興奮性神経細胞は顆粒細胞であり、記憶・学習に必須な神経回路を形成している。また、てんかん発症にも深く関与していることが知られている。また、神経細胞としては例外的に成体になっても新生するなど際だった特徴を備えていることから最近脳研究の中で注目されている。

胎仔・幼児期だけではなく、成体で新生した顆粒細胞も、神経突起を規則的に分極化させている。すなわち、顆粒細胞層から一本の軸索を dentate hilus(DH)を通して CA3 側に、樹状突起は反対側の分子層に伸展している。こうした明瞭な解剖学的特徴を備えていることから神経細胞の形態形成研究のよい標本としてしばしば使われているが、その詳しいメカニズムは不明である。

ここで私は green fluorescent protein (GFP)を全細胞に発現させた transgenic ラットと、野生型ラット由来の海馬組織を組み合わせて培養することによって in vitro での細胞移植実験系を確立させることに成功した。今回使用した実験系は主に二つであり、一つは培養した野生型の海馬切片上に GFP 陽性 (GFP(+)) 顆粒細胞を分散してから播種 (移植) して共培養する方法 (cell-incorporated culture)で、もう一つは野生型海馬切片に GFP(+)歯状回の組織を隣接させて共培養する (micro-explant culture)方法である。

この二種の実験系を用いることによって宿主 (host) 海馬切片に移植された顆粒細胞の生存、神経突起の極性形成や分化、細胞移動の観察が可能になった。

【方法・結果】

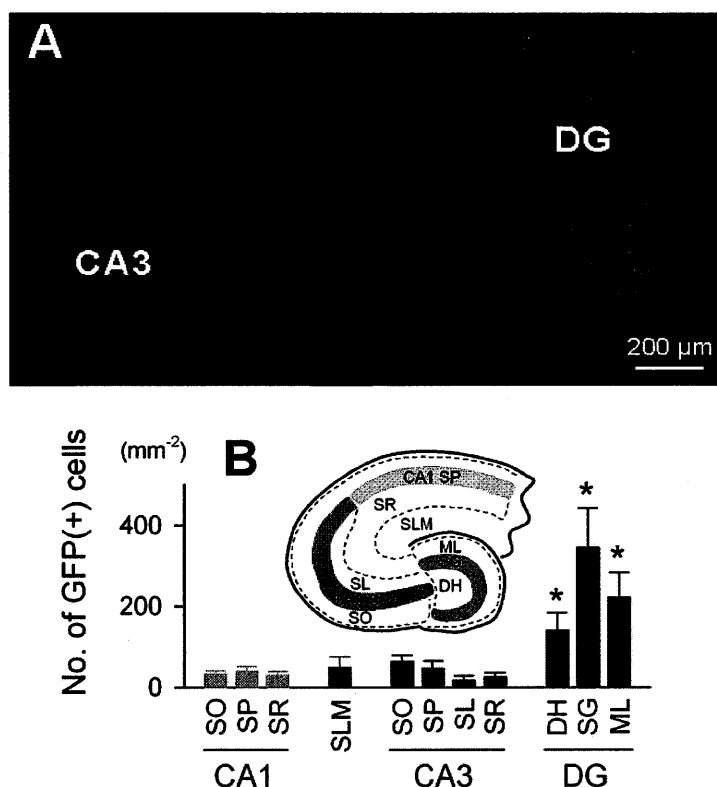
1. 顆粒細胞の細胞体の移植位置に依存した神経突起の分極性の変化

生後3日目の GFP(+) SD rat から取り出した歯状回顆粒細胞を、生後6日目の wild SD rat 由来の培養海馬切片の上に撒いた (cell-incorporated culture)。4日間培養して観察した結果、GFP(+)細胞が観察された(図1)。GFP(+)細胞は神経細胞マーカーである MAP2 に陽性で、グリア細胞マーカーである S100 に陰性であった。また、顆粒細胞の特徴である細くて長い一本の軸索と比較的に太い数本の樹状突起を発達させていた。

海馬歯状回の顆粒細胞は軸索である苔状線維 (mossy fiber) を dentate hilus(DH)を経由して CA3 野透明層に伸ばし、一方、樹状突起は正反対の分子層に向かって伸ばしている。移植された GFP(+)細胞中のうち、顆粒細胞層上に並んだ細胞の 94.5%がその軸索を本来伸長すべき方向である DH 側に伸ばしていった(図 2,C)。一方、細胞体の位置が本来の位置ではない細胞層、錐体細胞層にある細胞はその軸索の伸び方に有意な方向性は観察されなかった(図 2,D)。意外なことに、顆粒細胞層のすぐ近傍である DH 及び分子層にある GFP(+)細胞、また、顆粒細胞の軸索の最終到達地である CA3 野透明層に移植された細胞は、CA3 野の透明層に向かう軸索の方向指向性は観察されなかった。

図2に示す極性は tetrodotoxin や picrotoxin の処理によっても変わらなかったため、神経細胞の電気的興奮に依存したものではないと考えられた。以上の結果から、顆粒細胞の軸索と樹状突起の極性は細胞体の場所が重要な決定因子であることが結論づけられる。また、てんかん状態で歯状回から生まれる顆粒細胞が異所化すること、そして同時にその軸索を正しい方向に伸ばせず、これがてんかんの慢性化に関与しているという報告があるが、本研究で観察された異所細胞

図1. Cell-incorporated 培養法で生存した顆粒細胞の密度。A. 共培養した培養海馬切片の共焦点画像。培養海馬切片上に GFP(+)顆粒細胞を撒いて4日間培養した後観察した。赤は Nissl 蛍光。 B. 4DiV で培養海馬切片で各部位別に GFP(+)顆粒細胞の密度を調べた。歯状回の細胞密度が著しく高い。stratum oriens (SO), pyramidale (SP), radiatum (SR), lacunosum-moleculare (SLM) and lucidum (SL). The dentate gyrus (DG) includes dentate hilus (DH), stratum granulosum (SG) and molecular layer (ML).



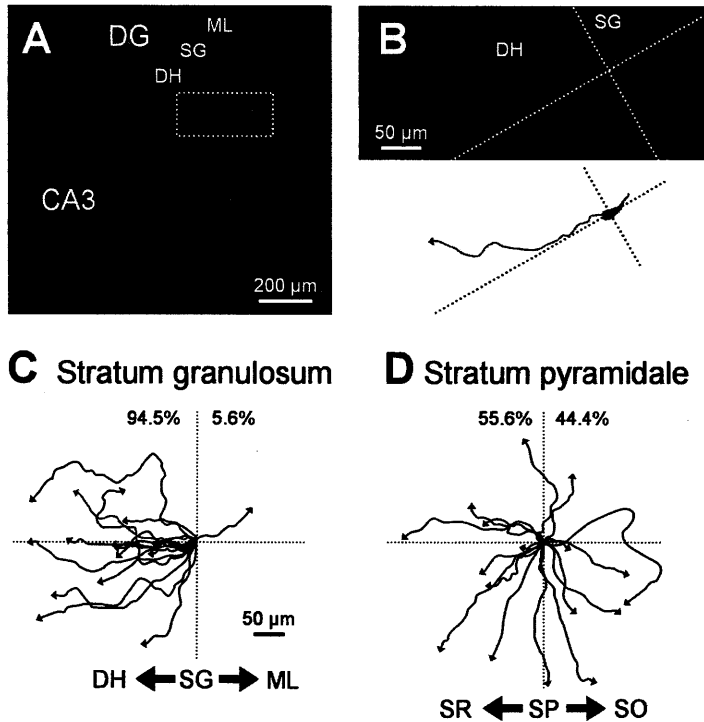


図 2. 培養海馬切片上に移植した顆粒細胞の軸索方向。A. 共培養切片の共集点画像。赤は Nissl 蛍光。B. A の四角点線内の拡大。GFP(+)細胞体を中心に顆粒細胞層 (SG) の垂線およびその直角の方向に点線をひいて軸索の方向を調べた。歯状回の顆粒細胞層にある GFP(+)細胞の軸索は 94.5%が本来の方向である dentate hilus(DH)側に伸びた(C; 94.5% χ^2 test n=163, $p<0.01$) 反面、錐体細胞層にある細胞は一定な方向性がなかった(D; 55.6% χ^2 test n=55, $p>0.1$)。

の異常投射は、てんかんで観察される異常発芽と類似しており、本実験系はてんかんの *in vitro* モデルに応用できる可能性がある。

2. 顆粒細胞は本来の位置に移動する

最初一定の密度(300~500 cells/mm²)で撒いた培養海馬切片上の GFP(+)細胞は培養時間の経過に伴って歯状回での密度がアンモン角より有意に高くなった(図 1)。上記の実験では培養海馬切

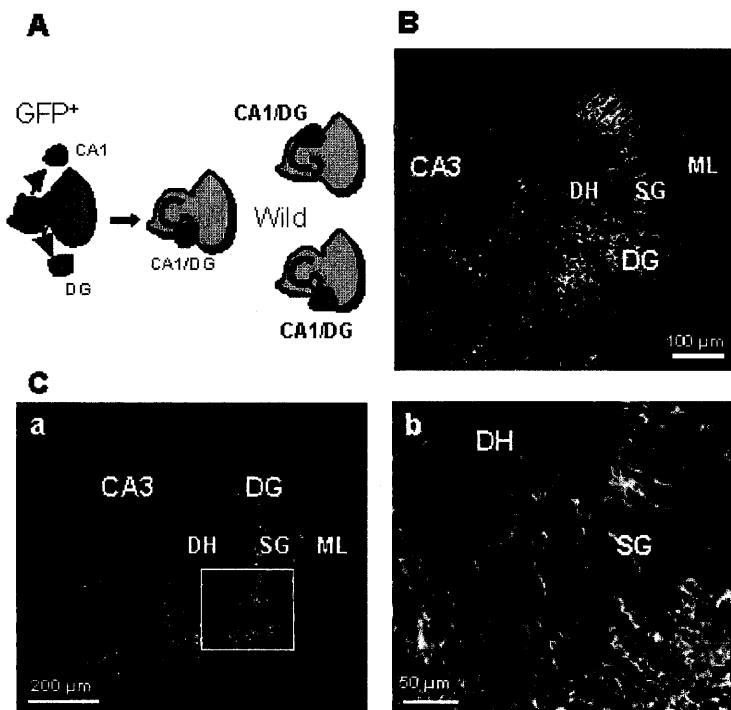


図 3. 組織共培養法 (micro-explant culture) で野生形ラット由来の海馬切片に移植した GFP(+)歯状回組織。移植組織から出て顆粒細胞が host 側の顆粒細胞層に並んだ。赤は Nissl 蛍光。A. 組織共培養法の模式図。B. host 側の歯状回一部を除去してから GFP(+)歯状回組織一部を移植した(A の a)。細胞が DH を通って顆粒細胞層に並んだ。C. 分子層(ML)側から移植しても(A の a)、同様に GFP(+)歯状回から出た顆粒細胞が host の顆粒細胞層(写真で Nissl 染色で濃く染まる部分)に並んだ。b は a の四角の拡大。

片に撒いた細胞の生存率が歯状回で高いからなのか、顆粒細胞が正しい場所である顆粒細胞層へ移動（帰巢：homing）したのかは決定できない。そこで、GFP(+)海馬切片から歯状回組織一部を取り出し、wild ラット由来の海馬切片のわきに移植した(micro-explant culture; 図 3,A)。結果、移植切片から顆粒細胞が host 側の顆粒細胞層に移動して生存していることが観察された(図 3,B,C)。細胞移動能は生後 1~13 日齢のラットで調べたが大きな差は観察されなかった。図 3、A の a のように host 海馬切片を半分切って移植した場合、移植された顆粒細胞は DH を経由して顆粒細胞層に並ぶのが観察された。次に移植片の置き場所を変えて共培養してみた(図 3,A b)。結果、細胞の移動は host 切片への移植片の方向には関係なく、DH 側からも分子層からも正常に顆粒細胞層に移動し並列した。この場合の細胞の移動方向は発生段階の経路とは全く逆方向である。この正しい部位へ移動する homing 能の特徴は歯状回の顆粒細胞に限られている現象であり、歯状回の組織を錐体細胞層に移植しても細胞の移動は観察されなかったし、錐体細胞層の組織を錐体細胞層及び顆粒細胞層に移植させても細胞は移動しなかった(図 3,A)。

移動した細胞は免疫染色と電気生理学的な実験によって神経細胞であり、移動した場所で機能していることが証明できた。神経細胞のマーカーである MAP2 と TuJ1 に陽性であり、グリア細胞のマーカーである GFAP と S100 に陰性であった。そして、組織共培養を 14 日間続けた標本を用いて current-clamp 法と voltage-clamp 法で記録を行った(図 4)。その結果、GFP(+)細胞は control の顆粒細胞と同様の発火パターンを示した。また、GFP(+)細胞は膜抵抗が control の場合に比べ高く、新生顆粒細胞と同様の性質を示した(図 4B)。そして、自発的なシナプス後電流の測定によって GFP(+)細胞は host 海馬切片の顆粒細胞と同様に入力を受けていることが証明出来た。

このような顆粒細胞の homing 能力は脳由来神経栄養分子(BDNF)の受容体 TrkB の阻害剤である K252a によって細胞の移動が用量依存的に有意に減少した。

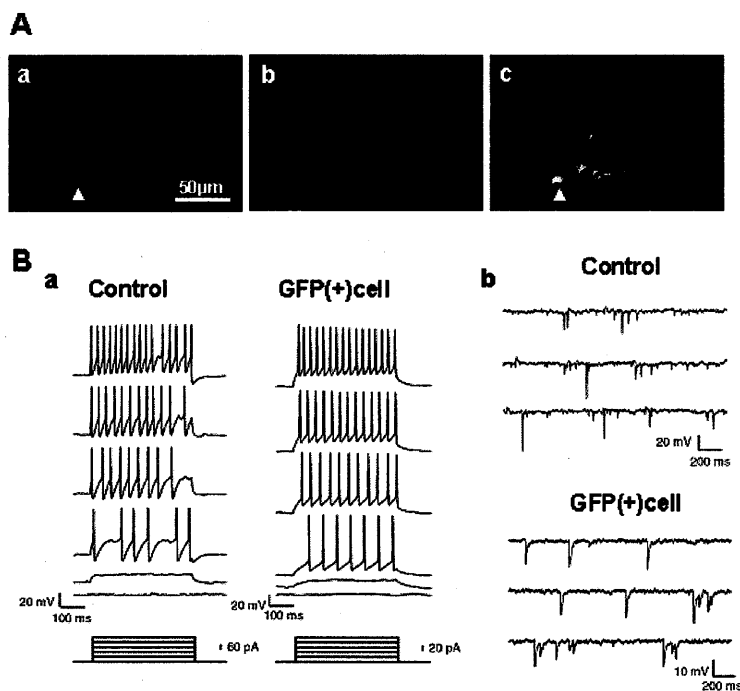


図 4. 共培養して host 側に移動した GFP(+)細胞の電気生理学的性質。A. patch-clamp した細胞の確認は biocytin を注入して、Texas red で染色した(赤 b)。c は a(GFP(+))と b を合せた画像。B.a. 脱分極電流(400ms, control: 0-300pA, GFP(+): 0-100 pA)を注入したときの細胞の膜電位活動。記録は current-clamp 法により行った。Control と移植細胞の発火パターンが同様である。b. 自発的なシナプス後電流。記録は voltage-clamp 法 ($V_m = -60\text{mV}$) で行った。GFP(+)細胞は、control の顆粒細胞と同様に、シナプス入力を受けている。

【まとめと考察】

今回の研究で GFP(+)ラットを用いた海馬切片培養系において、**cell-incorporated culture** 法と **micro-explant culture** 法の実験系を確立させた。その結果、①顆粒細胞の生存、極性形成及び神経突起誘導に細胞体の位置は決定的な役割をすることが分かった。②移植した顆粒細胞は正しい位置へ帰還する **homing** 能力を持っており、移植された場所で成熟し、宿主の顆粒細胞と同様な機能を発揮することを明らかにした。

未来の脳細胞移植療法を考えたとき、本実験系の確立によって宿主-移植片の相性を探ることが容易になった意義は非常に大きい。本系を用いることで移植神経細胞の接着と細胞移動に関わるメカニズムがさらに解明されることが期待される。