

審査の結果の要旨

氏名 金 貞娥

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・学習に必要な神経回路を形成している。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。一本の軸索を dentate hilus(DH)を通過して CA3 側に、樹状突起を反対側の分子層に伸展させている。この明瞭な分極化は分散培養した顆粒細胞では失われるので、周囲の環境因子の関与が示唆される。しかし、詳しいメカニズムは不明である。

本研究では 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、そのメカニズムを解析した。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。

cell-incorporated culture 法では海馬歯状回の顆粒細胞は軸索である苔状線維 (mossy fiber) を DH 経路で CA3 野透明層に伸ばし、樹状突起は正反対の分子層に向かって伸びた。顆粒細胞層上に並んだ移植 GFP(+)細胞のうち、94.5%がその軸索を本来伸長するべき方向である DH 側に伸ばした。一方、細胞体の位置が本来の位置ではない細胞層や錐体細胞層にある細胞について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。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、軸索の方向指向性は観察されなかった。この移植された場所特異的な顆粒細胞の極性は興奮性を抑制しても観察されたので、移植された細胞の細胞体の位置が重要な決定因子であることが示唆された。

GFP(+)細胞を一定の密度で海馬切片上に播種しておいても、培養時間の経過に伴って歯状回上における GFP(+)細胞密度がアンモン角より有意に高くなった。GFP(+)細胞の生存率が歯状回上で高いか、GFP(+)細胞が顆粒細胞層へ移動したことが原因と考えられた。そこで、micro-explant culture 法を用いて解析した。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接種した。その結果、移植切片から細胞が移動し、顆粒細胞層に多数の GFP(+)細胞が観察された。この細胞移動は用いたラットの日齢にかかわらず

一定であった。host 海馬切片の DG を半分切断し、その部分に GFP(+)ラット由来 DG を移植した場合、移植された顆粒細胞は DH を経由して顆粒細胞層に整然と並んだ。次に移植片の置く場所を host 切片の分子層側に変えても同様に顆粒細胞層への移動が観察された。つまり、発生段階の経路とは無関係に、DH 側からも分子層側からも顆粒細胞層に移動して整列した。あたかも予め決められていた場所に移動する現象なので、帰巢 (homing) であると考えられた。この homing の特徴は歯状回顆粒細胞に限られており、歯状回の組織を錐体細胞層に移植しても細胞の移動は全く観察されなかった。また、錐体細胞層の組織を錐体細胞層及び顆粒細胞層に移植しても細胞は移動しなかった。また、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 によって抑制された。

移動した細胞は神経細胞のマーカーである MAP2 と TuJ1 に陽性、かつグリア細胞のマーカーである GFAP と S100 に陰性であり、神経細胞であると結論された。さらに移動した神経細胞の性質を電気生理学的に解析した。通電により通常の歯状回顆粒細胞と同様の発火パターンを示し、入力抵抗は新生顆粒細胞と同様に高かった。さらに voltage-clamp 法を適用したところ、自発的なシナプス後電流が観察された。移動した神経細胞はその場所でシナプスを形成し、神経細胞として機能していると結論された。

要約すると、海馬切片培養を用いた cell-incorporated culture 法と micro-explant culture 法の実験系を確立させ、神経細胞の特異的な形態形成を解析し、(1)顆粒細胞の生存、極性形成及び神経突起誘導には、細胞体の位置(=細胞体周囲の環境)が決定的な役割をすること、(2)移植した顆粒細胞は適切な位置へ帰還する homing 能力を持っており、その場所で成熟し、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。

将来の脳神経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。また、本実験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。このように本研究は細胞生物学、医療薬学への貢献が顕著であり、博士(薬学)の学位に値すると判定した。