

# 論文内容の要旨

## 論文題目 霊長類における成体ニューロン新生

氏名 纈纈 大輔

ニューロンは脳の発達期においてのみつくられ、その後はニューロンの数は減るのみだと考えられていたが、ここ最近の精力的な研究により、脳のある部分では大人になってもニューロンは生まれつづけている事が分かっている。この成体における新生ニューロンの研究は主にマウス、ラットなどの齧歯類において行われており、海馬と脳室下帯 (SVZ) から嗅球への2つの領域において新生ニューロンの存在が確認されている。また、これらの新生ニューロンの機能についても少しずつ分かり始めており、海馬での新生ニューロンは記憶の形成に関係しており、嗅球での新生ニューロンは臭いの情報の処理に関係している事が報告されている。

ヒトやサルなどの霊長類においても海馬と嗅球でニューロンが生まれ続けている事が報告されている。更に、1999年に発表された Gould 博士らのサルを用いた実験では、齧歯類では確認されていなかった大脳新皮質で成体でもニューロンが生まれ続けていると報告した。しかし、サルの大脳新皮質では新生ニューロンは見つからなかったという相反する実験結果も報告されている。したがって、大脳新皮質において成体でもニューロンが生まれ続けているかどうかはハッキリと結論が出ておらず、神経科学の分野において解明すべき主要なテーマの1つである。

そこで本研究では成体のサルを用い、これまでになく詳細な解析方法を用いる事で、大脳新皮質においてニューロンが生まれ続けているのか確認を行った。また、成体サルの SVZ と海馬においてどの程度のニューロンが生まれ続けているのか定量的な解析も行った。

また成体新生ニューロンの研究は医療面からも注目をされている。脳の外傷やアルツハイマー

病などの神経変性症により、脳にダメージを受けるとその後の生活に重大な影響を及ぼすことになる。そこで脳の再生医療に大きな期待が集まっており、成体新生ニューロンの研究は脳の再生医療の発展に大きく寄与すると考えられている。

これまで、将来的な医療面への貢献を目指して、海馬と嗅球でのニューロンの新生を制御するような条件や因子の研究が行われてきている。齧歯類を用いた様々な実験では、行動レベルでは運動、学習、良い住環境、分子レベルでは神経栄養因子などのタンパク質を与えると新生ニューロンの数が増える事が報告されている。また脳虚血やてんかん発作などによっても新生ニューロンの数が増加することが知られている。

しかし医療への応用を視野に入れるならば、ヒトでも同様な現象が起こるのか調べる事が非常に重要である。それにはヒトに系統的により近いサル（マカク）の脳虚血モデルを用いて研究することが現実的な解決方法の1つであり、本研究では脳虚血が与えるサル（マカク）の SVZ と海馬でのニューロン新生への影響を調べた。

## 1. 成体サルにおけるニューロン新生

### A. 大脳新皮質

カニクイザル（5才）とニホンザル（2才）に新生細胞のマーカであるチミジンの類似物質のブロモデオキシウリジン（BrdU）を投与した。そして、免疫組織化学的手法により新生ニューロンの同定を行った。前頭連合野にある principal sulcus と運動野と感覚野の間にある central sulcus を比べると principal sulcus の方が BrdU 陽性の新生細胞（BrdU+細胞）の数が多かった（表 1）。また、新生ニューロンの生まれる場所である SVZ でも BrdU+細胞は存在したが、SVZ から大脳新皮質への移動するような BrdU+細胞の流れは見られなかった。

次に、BrdU+細胞が神経細胞のマーカータンパク質である NeuN と共染色されるのか調べてみた。すると、一見すると BrdU と NeuN が共染色されているような細胞が見つかった。しかし共焦点レーザー顕微鏡により観察し、得られた画像データをコンピューターにより 3次元に再構成する事

表 1 成体サルにおけるBrdU+新生細胞の数

Animal	Age (yrs)	# of BrdU Injections	Survival Time	# of BrdU+ cells (/mm <sup>3</sup> )			
				Principal sulcus	Central sulcus	嗅球	海馬
<i>M. fascicularis I</i>	5	4	1-10 d	286	193	-	-
<i>M. fascicularis II</i>	5	5	13-21 d	272	233	-	-
<i>M. fuscata I</i>	2	5	24-29 d	251	181	-	-
<i>M. fuscata II</i>	2	5	25-30 d	485	339	-	-
<i>M. fascicularis III</i>	5	11	14-28 d	-	-	659	1470
<i>M. fascicularis IV</i>	5	11	14-28 d	-	-	703	2130

で詳しく解析して見ると、これらは実際には NeuN+のニューロンの細胞体に BrdU+の新生細胞がぴったりと張り付いている事が分かった。大脳新皮質にある全 BrdU+細胞のうち約 37%がこのようなサテライト・グリアと知られるニューロンに張り付いた細胞であった。

しかし BrdU と NeuN が本当に共染色された細胞は僅かながら見つかり、その数は全 BrdU+細胞のうち<0.01%とごく少数であった。また、これらの共染色された細胞の NeuN タンパク質の細胞内の局在を見てみると核内のみに限局しており、更に細胞の形も周りにあるニューロンとは異なっていた。未熟なニューロンのマーカーである doublecortin (DCX) でも調べたところ、BrdU+/DCX+細胞は<0.01%であり、DCX の染色性のごく弱いものであった。以上のように、我々が用いた詳細な解析では大脳新皮質でのニューロン新生の確固たる証拠は見つからなかった。したがって、この結果は健全で成熟したサルにおける大脳新皮質のニューロンの数は安定的であるという説を支持するものである。

しかし、僅かながら見つかった BrdU+/NeuN+細胞はどのような細胞なのであろうか？ 可能性の1つとして、成体の脳が内在的に持つ神経前駆細胞であるが、普通の状態では成熟したニューロンへは分化出来ない細胞が挙げられる。実際にある特殊な条件下では成体マウスの大脳新皮質ではニューロンがつくられることが報告されている。したがって、このような神経前駆細胞をニューロンへと分化誘導する事が可能になれば、神経変性症などの治療の発展に大きく寄与するであろう。

## B. SVZ と海馬

成体サルに 2 週間 BrdU を投与し、さらに 2 週間後に還流固定を行った。嗅球と海馬ではそれぞれ  $681 \text{ 個/mm}^3$  と  $1800 \text{ 個/mm}^3$  のニューロンが新しく生まれていた。また、ニューロンへの分化の割合を見てみると嗅球では全 BrdU+細胞のうち約 70%が DCX+の未熟なニューロンであり、海馬では約 40%が NeuN+の成熟したニューロンであった。これらの値をこれまで報告されている齧歯類での新生ニューロンの数と比べてみると、サルでの成体ニューロン新生の数は齧歯類に比べて 1~2 オーダー程度少ないと推定される。

## 2. 脳虚血後の SVZ-嗅球と海馬における新生ニューロンの増加

カニクイザル (5 才) を用い、右側の中大脳動脈を閉塞する事で局所脳虚血を起こした。この場合、脳の右半球のみに梗塞が見られる。梗塞範囲は大脳新皮質の一部と線条体であり、海馬に梗塞は見られない。まず SVZ における BrdU+細胞の数を見てみると、虚血半球側の SVZ では虚血手術をしていない健全なサルの SVZ よりは 4.3 倍の BrdU+の新生細胞が観察され (図 1)、嗅球

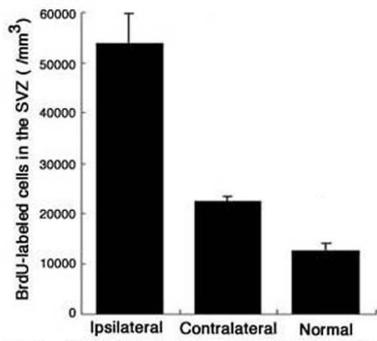


図1 脳虚血後のSVZでのBrdU+新生細胞の増加  
虚血半球側のSVZでは反対側と健全なSVZに比べてBrdU+細胞の数が増加していた。

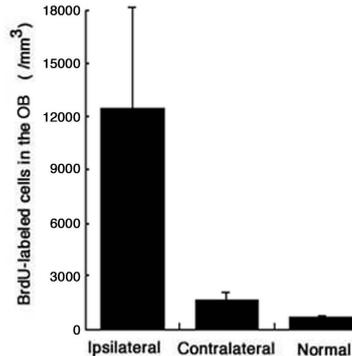


図2 脳虚血後の嗅球でのBrdU+新生細胞の増加  
虚血半球側の嗅球では反対側と健全な嗅球に比べてBrdU+細胞の数が増加していた。

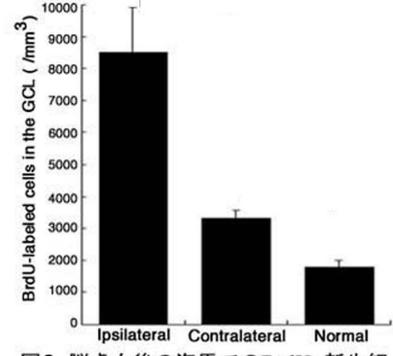


図3 脳虚血後の海馬でのBrdU+新生細胞の増加  
虚血半球側の海馬では反対側と健全な海馬と比べてBrdU+細胞の数が増加していた。

では約20倍も増えていた。そして、BrdUとニューロンのマーカーであるNeuNとDCXの共染色を行い、ニューロンの分化の割合をしてみると、虚血半球側と反対側さらに健全なSVZと嗅球でニューロンへの分化の割合は同じであった(表2)。また、SVZから直ぐ隣の線条体に移動しているようなDCX+細胞が多く観察された。これらのDCX+細胞のうち幾つかはBrdUとも共染色され、形態的に移動中のニューロンのように見えた。ただ、このような未熟な移動中のニューロンの分布はSVZからせいぜい500µmほど線条体に入っているだけであり、障害を受けた線条体を全てカバーするような数ではなかった。しかし将来的にこうした未熟なニューロンを機能を持った成熟したニューロンへと分化誘導できるような技術が開発できれば、脳の外傷や神経変性症に対する治療に大きな寄与を果たすであろう。

また、海馬についても同様にBrdU+の新生細胞の数を比較した。虚血半球側では健全な海馬に比べてそれぞれ4.6倍のBrdU+細胞が観察された(図2)。更に、ニューロンへの分化の割合はSVZと同様に3つの海馬で同じ割合であった(表2)。

以上のように、成体のサルでは局所脳虚血によってSVZと海馬のニューロン新生の数が増加する事が分かった。そして、これら2つの場所では脳虚血後BrdU+細胞の数は有意に増加するが、ニューロンのマーカーと共染色されるBrdU+細胞の割合に変化は見られなかった。したがって、脳虚血による新生ニューロン数の増加は神経前駆細胞の増殖を増やすことによるものであり、ニューロンへの分化促進によるものではない。

表2 SVZ-嗅球と海馬でのBrdU+細胞のニューロンの割合

		BrdU+/DCX+	BrdU+/NeuN+
SVZ	Ipsilateral	4.6 ± 0.5%	No detected
	Contralateral	7.5 ± 3.3%	No detected
	Normal	8.1 ± 0.1%	No detected
嗅球	Ipsilateral	1.7 ± 0.5%	73.8 ± 4.4%
	Contralateral	1.9 ± 0.6%	70.4 ± 4.4%
	Normal	2.6 ± 1.4%	76.0 ± 5.0%
海馬	Ipsilateral	10.8 ± 1.3%	38.5 ± 4.2%
	Contralateral	12.1 ± 0.9%	40.0 ± 4.2%
	Normal	8.7 ± 1.9%	40.3 ± 0.7%