

## 論文の内容の要旨

論文題目：成体海馬に内在する神経幹細胞の膜電流特性に関する研究

氏名：福田諭

### 序論

哺乳類の中樞神経系では成体になってしまうと神経細胞の新生は起きないと従来考えられてきたが、大脳辺縁系の海馬領域では新生していることが近年認められた。そして、神経細胞を産み出す神経幹細胞の性質についての報告がなされたが、分離培養した手技の過程が細胞に影響を与えていることが疑われ、脳内での環境における本来の性質は不明であった。脳内の動態の一部については、ホルモン系に対し神経幹細胞が増減することが示された。しかし、海馬は記憶・学習を担当する領域として重要な働きをしており、神経幹細胞が記憶を担う周囲の神経回路網の活動に直接応答しているかどうかは神経新生現象の生物学的意味に関わる重要な課題として解明が待たれていた。

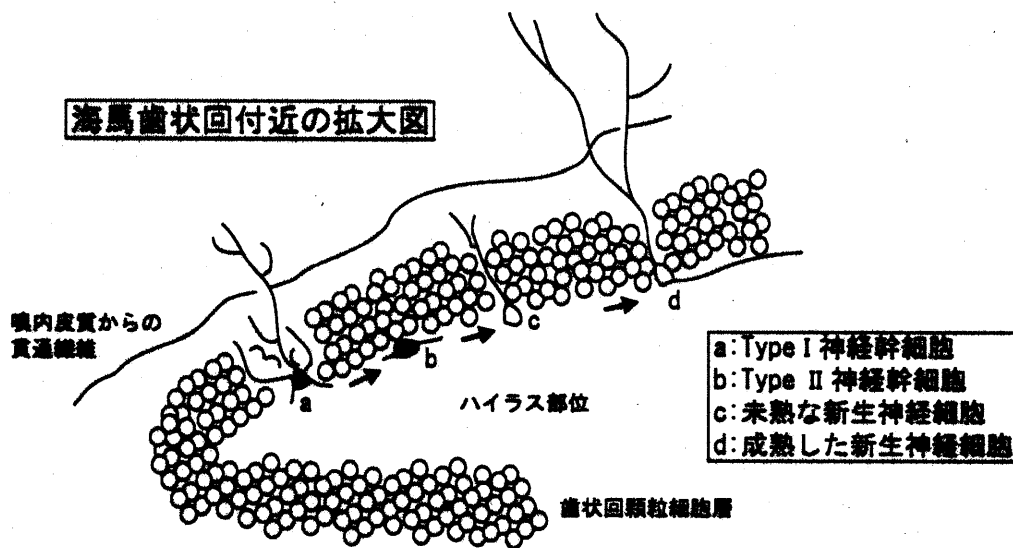
本研究は神経幹細胞を生体に近い状況下でその性質を電気生理学的に測定することで、神経幹細胞の生体内での性質と神経回路網に対する応答性を解明することを目的とした。中間径フィラメント蛋白質である nestin は神経幹細胞のマーカーとして知られており、この nestin 蛋白質の DNA のイントロンに GFP 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いることで、急性脳スライス標本上での神経幹細胞を同定した。パッチクランプ法は微小ガラス管を細胞膜に密着させ細胞膜を破り、目標とする細胞の膜上のイオンの流れを計測することで受容体やチャネルを検出できる技術である。このパッチクランプ法を同定した神経幹細胞に対して用い、生体内での神経幹細胞の性質を明らかにした。さらに、急性スライス上で電気刺激を行うことで神経回路網を活性化し、神経幹細胞の電氣的な反応を計測することで、神経幹細胞の応答性の解析を行った。

## 結果

### 1. 成体海馬神経幹細胞は膜電流特性により 2 種類に大別された

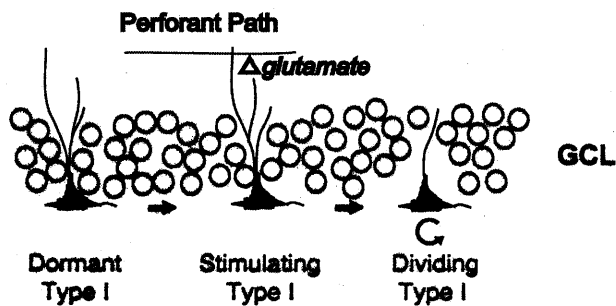
パッチクランプ法により nestin-GFP 陽性細胞は、主に K イオンチャネルによって与えられる入力抵抗値により二群に分かれた。低入力抵抗群は 77.1 M  $\Omega$  を中心とし、高抵抗群は 2110 M  $\Omega$  を中心に分布した。nestin-GFP 陽性細胞は 500 M  $\Omega$  を境に明確に二群に分かれることが示されたことから、我々は 500 M  $\Omega$  より低い細胞を Type I 細胞、500 M  $\Omega$  より高い細胞を Type II 細胞と名付けた。Type I 細胞は、膜電位の強制的な変化に対して passive な電流応答しか示さなかったのに対し、Type II 細胞では、TTX で阻害される電位依存性 Na イオンチャネルの発現が確認された。膜電位変化に対し passive な電流を示し、入力抵抗値が低く K イオンチャネルの発現が多いことは、Type I 細胞がグリア細胞の特性を持つことを示している。これに対し、Type II 細胞では、膜電位を引き下げる働きがある K イオンチャネルが Type I 細胞よりも少なく、電位依存性 Na イオンチャネルの発現があることから、Type II 細胞は Type I 細胞に比べより神経細胞に近い、興奮性を獲得した細胞であると言える。

免疫染色学的には nestin-GFP 陽性細胞は、その GFP の強度と形態によって、①蛍光が強く、多枝状の突起を顆粒細胞側に出す細胞と、②蛍光が弱く、突起を持たない細胞の 2 種類のタイプに分かれた。①のタイプの細胞は、成熟グリア細胞マーカーである繊維状蛋白質、GFAP 陽性であった。②のタイプの細胞は幼弱神経細胞マーカーである細胞間接着分子、PSA-NCAM 陽性であった。どちらのタイプの細胞も nestin 抗体で染色されたため、成体海馬歯状回において GFP 陽性であることは nestin 陽性であることが確認された。細胞分裂時に DNA に取り込まれる BrdU をマウスに投与し、時間軸を追って BrdU 陽性細胞の動態を観察したところ、7日目まで①のタイプの細胞の割合が減り、②のタイプの細胞の割合が増え、また、BrdU 投与後 24 時間の時点では BrdU 陽性細胞のほぼ 100% が GFP 陽性細胞であるのに対し、BrdU 投与後 7 日目の時点では BrdU 陽性細胞のうち約 20% が GFP 陰性で、この GFP 陰性の細胞群は成熟神経細胞マーカーである核内蛋白質、NeuN 陽性であった。この結果は①の細胞群から②の細胞群が生まれ、その後神経細胞に分化することを強く示唆している。また、成熟神経細胞マーカーである MAP-2 と成熟グリア細胞マーカーである s100b とはいずれの型の GFP 陽性細胞も共染しなかった。これらの結果から、nestin-GFP 陽性細胞は成体海馬内で増殖期にある神経幹細胞であり、グリア様神経幹細胞である細胞と、神経細胞へ分化を始め nestin の発現が下がり GFP の蛍光が弱くなっている細胞の二段階の細胞であると判断された。パッチクランプ実験中に注入された色素により、Type II 細胞は細い突起をハイラス部に伸ばしていることが確認された。パッチクランプ実験後の後染色により、Type I 細胞は GFAP を発現しており、Type II 細胞は PSA-NCAM を発現していることが確認され、電気生理学的に 2 群に分けられた細胞が免疫組織化学的に分けられた 2 群にそれぞれ対応していることが示された。



## 2. 海馬回路網 (貫通繊維) は Type I 神経幹細胞の興奮性膜電流応答を誘起した

Type I 細胞において、神経伝達物質放出を促す薬剤 4AP を灌流したところ、オッシレーション的に繰り返す内向きの反応やシナプス入力波形よりやや緩いカーブを描く内向き電流が観察された。(Type II 細胞においても 4AP 投与時に自発的内向き入力が存在することが当研究室の戸塚により確認され、Type I 細胞とは違う反応機構が解明されつつある。)これはシナプス構造はないが、周囲の神経回路網に Type I 細胞が参加していることを示している。歯状回における入力経路である貫通繊維を電気刺激した場合の Type I 細胞の応答を観察したところ、Type I 細胞の静止膜電位に近い細胞膜電位において、内向き電流が計測された。この内向き電流は電位依存的に反転することから、何らかの細胞膜を通過するイオン性のものであることが示され、また細胞内 Ca 流入とカップリングしていることが確認された。貫通繊維は興奮性つまりグルタミン酸作動性として知られているため、Type I 細胞のグルタミン酸に対する応答性を観察したところ、Type I 細胞はグルタミン酸の局所投与に対し、電気刺激した場合と同じ細胞内 Ca 流入とカップリングした内向きの電流を示した。このグルタミン酸局所投与の際の内向き電流は、グルタミン酸受容体阻害剤ではほとんど阻害されなかったのに対し、グルタミン酸トランスポーター阻害剤 trans-2,4-PDC によりほぼ完全に消失し、Type I 細胞は、グルタミン酸トランスポーターを介して周囲の神経回路網に反応していることが示された。通常アストログリア細胞においてグルタミン酸取り込みを行っているのは主に EAAT2 サブタイプのグルタミン酸トランスポーターであるが、EAAT2 阻害薬である DHK では Type I 細胞の内向き電流はほとんど阻害されなかったことから、Type I 細胞の内向き電流はグリア細胞に発現するもう一つのグルタミン酸トランスポーターのサブタイプ、EAAT1 によることが疑われた。そこで、EAAT1 サブタイプに対応する GLAST 抗体による染色を行った結果、成体歯状回の Type I 細胞に極めて特異的に GLAST が強く発現していることが確認された。GLAST は発達期に神経細胞を生み出す神経幹細胞として働く radial glia 細胞系列の細胞に強く発現することが報告されており、Type I 細胞の神経幹細胞としての性質を確認する結果となった。



Type I 細胞は貫通繊維(Perforant Path)刺激をグルタミン酸トランスポーターを介し受け取っている。そして、ある程度以上の刺激入力があった場合、分裂を始めると考えられる。GCL: Granule Cell Layer (顆粒細胞層)

Type I 細胞のグルタミン酸に対する応答能が、どのような生物学的な意味を持つかを検証するため、GLAST ノックアウトマウスを用いて BrdU 投与実験を行った。その結果、BrdU 投与後 2 時間の時点において、GLAST+/+タイプのマウスは、GLAST+/-タイプのノックアウトマウスより BrdU 陽性数が多かった。このことから、Type I 細胞のグルタミン酸反応性は、休止期にあった Type I 細胞を活性化し、分裂能を引き起こしているスイッチング機構の可能性が示唆された。Type I 細胞と Type II 細胞の分類を GLAST ノックアウトマウスにおいて行うことを試みたが、GLAST ノックアウトマウスにおいては、Type I 細胞のものと見なされる突起において GFAP と PSA-NCAM の発現が重なっており、GFP 蛍光もないこともあって Type I 細胞と Type II 細胞の分類は困難であった。

#### 結論

成体海馬歯状回の nestin 陽性細胞は、電気生理学的な計測値により二種類に分けられることを明確に示した。グリア細胞の性質を持ちながら、通常のアストログリア細胞より GLAST の担う役割が強い Type I 細胞、また、神経細胞に近い性質を持ちながら神経細胞より高い入力抵抗値を持つ Type II 細胞と、脳細胞としてこれまでにないユニークな性質を同定できた。Type I 細胞が、グルタミン酸トランスポーターを介し周囲の神経回路網からの神経伝達物質へ応答し得たことは、神経幹細胞が周囲の神経回路網の興奮に対応し、記憶の過程に関係した自己増殖能の可能性を示唆している。また、Type I 細胞のグルタミン酸トランスポーター活性は、生体内で余剰のグルタミン酸を処理しているという、分化とは別の側面の神経幹細胞の生体内での機能を明らかにしたと言える。生体内の神経幹細胞の性質と回路網への参加機構の解明は、成体神経新生現象の生物学的意味の解明という基礎研究に寄与し、今後の神経幹細胞の増殖能を利用した神経機能改善等の応用研究に役立つことが期待される。

#### 内容を発表した論文

Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus

Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T

JOURNAL OF NEUROSCIENCE 23 (28): 9357-9366 OCT 15 2003