

成体マウス大脳皮質への GABA 作動性ニューロンの移植

学生証番号： 37527

分野名：細胞応答化学

氏名： 村松 大

序論

ここに 19 世紀の偉大なる神経解剖学者 Santiago Ramon y Cajal から、我々に送られた一つのメッセージがある。「成体哺乳類の中樞神経は一度損傷すれば、二度と再生させる事は出来ないだろう。この考えを変えることが可能であるとするなら、それは将来の科学である。」

大脳皮質は脳各部位より得られた情報を基に、思考・推理・決断を行う部位である。端的に言えば、「個体のキャラクター」を司る部位で、人間で言うところの人格を司る部位と言える。大脳皮質はグルタミン酸作動性ニューロンと GABA 作動性ニューロンで構成されている。グルタミン酸作動性ニューロンは投射型ニューロンともいわれ、脳の各領域へ投射し回路網を形成している。GABA 作動性ニューロンはグルタミン酸作動性ニューロンの活性制御を行うニューロンであり、この活性制御を介し脳の活動を制御している。この GABA 作動性ニューロンが脱落すると脳内での情報処理に障害が生じ、統合失調症などの病状を引き起こすことになる。その結果、幻覚症や認知症、人格障害に陥り、その後の生活に多大な影響を及ぼすことになる。その為、移植療法など、再生医療による大脳皮質での GABA 作動性ニューロンの再生に期待が集まっている。

しかし、これまで神経幹細胞や ES 細胞等の移植実験がなされているが、大脳皮質において明確にニューロンが再生したという報告はごく僅かである。また、その報告も非常に特殊な環境下で行われたものであり、再生医療への応用は非常に困難であると考えられる。ではなぜ、大脳皮質でのニューロン再生は困難であるのか。その理由は非常に簡単である。大脳皮質は脳内において最もニューロン分化に抑制的な環境だからである。

そこで、我々はこの抑制環境を打破すべく遺伝子の利用を考えた。ニューロン分化に重要な役割を果たすニューラル bHLH 転写因子を神経幹細胞に遺伝子導入し、強力的に GABA 作動性ニューロンへの分化誘導を促進、これを移植する事で、成体大脳皮質における GABA 作動性ニューロンの再生を試みた。

最も困難とされる成体大脳皮質でのニューロンの再生、それは Cajal のメッセージを借りるとすれば、まさに将来の科学への挑戦とも言えるだろう。

結果

1. ニューラル bHLH 転写因子によるニューロン分化誘導能の解析

ニューラル bHLH 転写因子 Neurogenin1 (Ngn1), Mash1 は、発生期マウス脳内において神経発生期に発現の見られる遺伝子であり、神経幹細胞がニューロンへ分化する際の運命決定に関与すると言われている。そこでまず我々は、Ngn1 と Mash1 のどちら

らがニューロン分化誘導能において優れているのかを *in vitro* において解析した。P53 ノックアウトマウスより樹立された神経幹細胞株 Mouse Striatal Precursor -1 (MSP-1) 細胞へ、レトロウイルスベクターを用い Ngn1-IRES-EGFP, Mash1-IRES-EGFP, Control-EGFP をそれぞれ遺伝子導入した。10 ng/ml bFGF を添加した N2-S 培地において4日間培養後、成熟ニューロンマーカーである NeuN により免疫抗体染色を行った。その結果、Ngn1 が Mash1 に比べ遥かにニューロン分化誘導能が高い事が示された。よって、我々は移植に用いるには、Ngn1 の方が Mash1 よりも適していると考え、さらに Ngn1 遺伝子によって誘導されたニューロンに関して、*in vitro* での解析を行った。電気生理学的解析から、Ngn1 によって誘導されたニューロンには、ニューロン特異的な電位依存性 Na⁺チャネルの発現が確認された。また、免疫抗体染色による解析から、誘導されたニューロンは Glutamic acid decarboxylase (Gad67)や γ -aminobutyric acid (GABA)を発現することから、GABA 作動性ニューロンである事が示された。

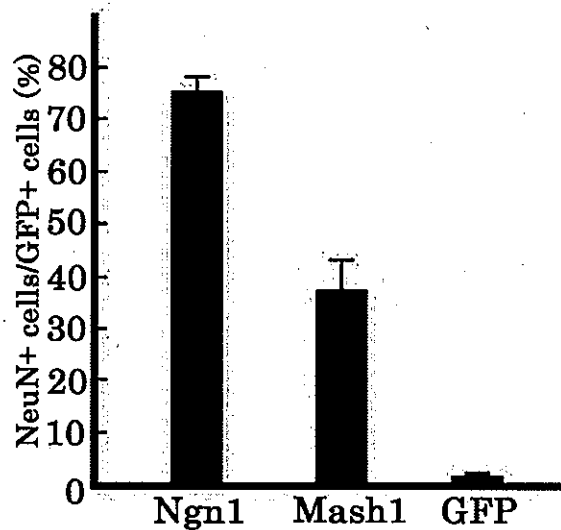


図1 Ngn1, Mash1のニューロン分化誘導能の比較

Ngn1-IRES-EGFP, Mash1-IRES-EGFP, Control-EGFP をレトロウイルスベクターにより、MSP-1細胞に遺伝子導入し N2s+10 ng/ml bFGF で培養、4日後固定し、免疫抗体染色により、NeuNを発現した細胞をカウントした。

2. integrin $\alpha 5$ を指標にした細胞移植に適した時期の選定

一般に、脳組織への細胞移植の際、神経幹細胞の状態では生着率が高いがニューロンへの分化率は低く、一方、ニューロンに分化した状態では生着率が低いとされている。そこで我々は、移植に用いるにはニューロンへ分化する直前の細胞が良いと考え、細胞接着分子である integrin $\alpha 5$ の発現解析を行った。Integrin $\alpha 5$ は発生期マウス大脳皮

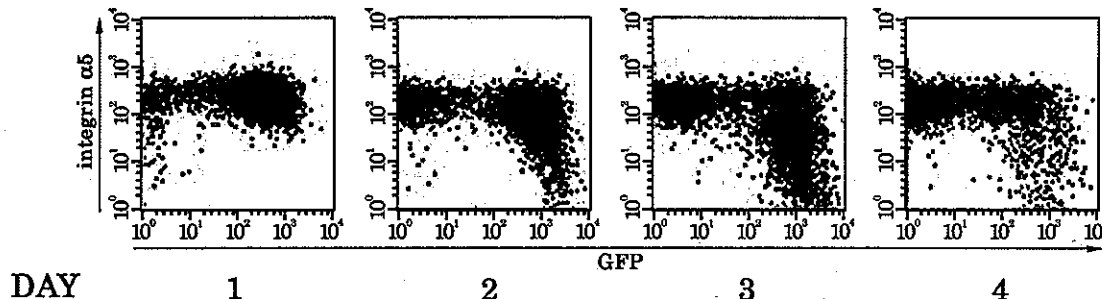


図2 Ngn1 遺伝子導入による integrin $\alpha 5$ 発現の減少

Ngn1-IRES-EGFP をレトロウイルスベクターにより、MSP-1細胞に遺伝子導入し N2s+10 ng/ml bFGF で培養、FACSを用い1-4日での integrin $\alpha 5$ の発現を解析した。Ngn1 導入2日後より integrin $\alpha 5$ の発現低下が見られた。

質における研究から、神経幹細胞がニューロンへ分化する際に、その発現が減少することが、当研究室の吉田真子により報告されている。FACSを用いた解析から、Ngn1 遺伝子導入後 2 日目より、integrin $\alpha 5$ の発現低下した細胞が増加してくることが確認された。よって我々は、ニューロンへ分化する直前の細胞が増加し始めるこの時期が、最も移植に適していると判断し、成体マウス大脳皮質への移植実験を行った。

3. 成体マウス大脳皮質への GABA 作動性ニューロンの移植

Ngn1 遺伝子導入 2 日後の MSP-1 細胞を、4 週齢の ICR マウス大脳皮質へ移植した。細胞移植 5 日後に固定し免疫抗体染色による解析を行った。その結果、移植された細胞の中に成熟ニューロンマーカー NeuN を発現しているものが見られた。また、移植され、NeuN を発現する成熟ニューロンは GABA を発現しており、形態的に見ても GABA 作動性ニューロン様の放射状樹状突起を持つことから、GABA 作動性ニューロンへ分化したことが示された。さらに、その樹状突起には、他のニューロンとシナプス形成をする際に見られるとされる、スパイン構造が見られた。このことから、移植された GABA 作動性ニューロンはドナーのニューロン回路網に組み込まれたことが予測される。以上の結果から、成体マウス大脳皮質へ移植された細胞は、わずか 5 日という短期間で GABA 作動性ニューロンへ分化したことが明確に示された。

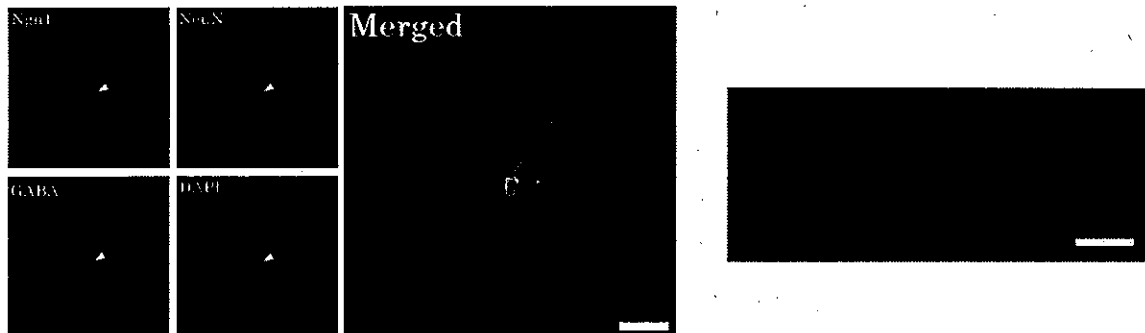


図3 移植された成熟ニューロン

左図:移植5日後における免疫抗体染色による写真。NeuNを発現する成熟ニューロンはGABAを発現する事から、GABA作動性ニューロンである事が示された。Scale bar=40 μ m 右図:移植された成熟ニューロンの樹状突起には、他のニューロンとのシナプス形成の際に見られる、スパイン構造といわれるコブ状の構造が多数見られた。Scale bar=4 μ m

次に、細胞移植を行った切片をカウントした結果、NeuN を発現するものは全体の約 1 割であり、他の多くの移植細胞も未成熟ニューロンマーカーである double-cortin (Dcx)を発現していた。また、観察の結果 NeuN を発現する移植細胞は、その分布に局在性を持つ事が伺えた。移植はニードルによるインジェクションで行われるが、この際、ニードルによる損傷でドナーのニューロンは脱落する。NeuN を発現する移植細胞は常

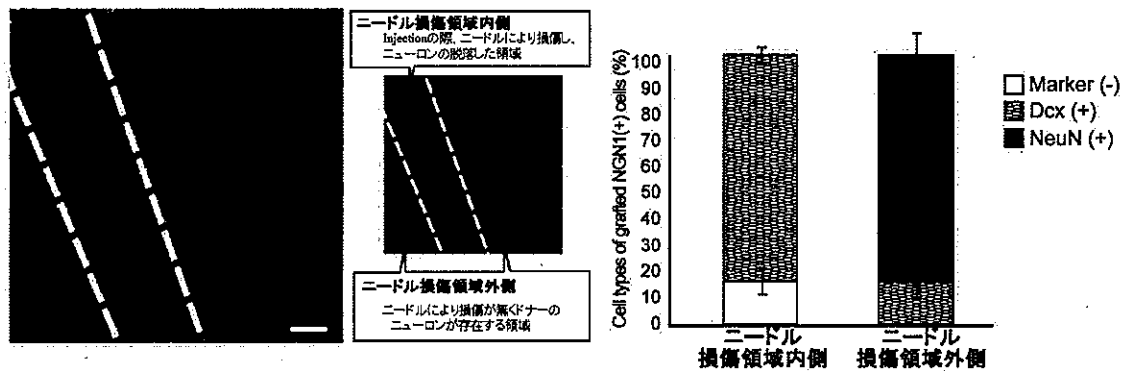


図3 移植細胞の局在に対するカウント

移植されたNeuNを発現するニューロンは、ニードル損傷領域の外側に局在していた。この局在を元にかウントを行った結果、移植細胞はニードル損傷領域外側において成熟ニューロンへと分化することが示唆された。Scale bar=40µm

に、ニードル損傷領域外側に見られた。この局在性を反映してカウントを行った結果、ニードル損傷領域外側に存在する多くの移植細胞が NeuN を発現し、成熟ニューロンへと分化しているという事が見出された。一方、ニードル損傷領域内側に存在する移植細胞は Dcx を発現するものがほとんどで、NeuN を発現するものは見られなかった。この結果は、ニードル損傷領域外側、つまり、ニードル損傷が無くドナーのニューロンが生存する領域においてのみ、移植細胞は成熟ニューロンへ分化するというを示唆していると考えられる。

結論

- 1 : ニューラル bHLH 転写因子の導入により、神経幹細胞のニューロン分化率は飛躍的に上昇した。また、このニューロン分化誘導能は Mash1 と比べ Ngn1 の方がより効果的であった。
- 2 : Integrin $\alpha 5$ の発現低下を指標にし、効率的に神経幹細胞がニューロンへ分化する直前の時期を選定し、移植を行う事が可能となった。
- 3 : 移植された細胞は5日という短期間でニューロンへ分化した。また、成熟ニューロンへ分化したものは GABA 作動性ニューロンであった。また、移植された細胞はドナーのニューロンが存在する領域において、成熟したニューロンへ分化した。

発表論文

- 1) Muramatsu D, Sato Y, Hishiyama S, Miyamoto Y, Hisatsune H Transplantation of GABAergic neurons into adult mouse neocortex
Experimental Neurology., 2005; 194: 1-11