

## 論文の内容の要旨

論文題目    **Function analysis of adult neurogenesis within the white matter  
beneath the rodent temporal neocortex**  
成体げっ歯類側頭葉白質におけるニューロン新生の機能解析

指導教員    加藤進昌教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成 15 年 4 月進学  
医学博士課程  
脳神経医学専攻  
氏名    竹村典子

哺乳類中枢神経回路網への機能ニューロンの付加は個体の誕生後間もなく終了し、成熟した脳では決して起こらないと考えられてきた。ところが実験・顕微鏡技術の発展にともない、神経幹細胞・前駆細胞の存在とそのニューロン分化、既存神経回路網への組み込みなどが証明され、近年では成体ニューロン新生(**adult neurogenesis**)は広く認められる事実となった。現在はこの成体脳の構造的可塑性(機能素子ニューロンの代謝回転)の生物学的意義解明を目指して活発な研究活動が展開されており、これまでに学習・記憶、うつ病との機能関連が示唆されている。

生理条件下にある c として現在広く認められているのは、海馬歯状回顆粒細胞層下層部および前脳の側脳室周辺から嗅球へと続く 2 領域のみである。しかし脊髄や白質を含むさまざまな領域に神経前駆細胞・幹細胞の存在が確認されており、未知の成体ニューロン新生が推測されてきた。そこで私は修士課程の研究において、免疫組織化学二重染色法を用いた成体ラット脳のスクリーニングを行いその検索を行った。そして側頭葉新皮質下を走行する外包の一部に新規ニューロン新生領域側頭胚層(**the temporal germinal layer: TGL**)を同定した(**Takemura, 2005**)。解剖学的にこの領域は扁桃体、海馬、および側頭葉新皮質(内嗅領皮質および嗅周囲皮質)の 3 つの灰白質領域に囲まれた白質(ニューロン軸索の束)の一部にあたる。この領域には持続的に分裂している **Pax6** 陽性および **Olig2** 陽性の異系統の未分化細胞が内在し、それらが分裂後 2~3 日で **Doublecortin (DCX)** 陽性ニューロンに分化していることが示唆された。またこれら新生ニューロンのなかにはプログラム細胞死で死滅するものがある一方、白質内を脳の前方向へと移動して海馬采に至る新生細胞の存在も明らかになった。

**TGL** が情動機能に深く関与する扁桃体外側核(**lateral nucleus of the amygdala: LA**)に接する白質である所見から、本研究ではその情動機能との関連を検討した。私はまず成体マウス脳で、ラット **TGL** と解剖学的、組織学的性質の類似したニューロン新生の持続を明らかにした。続いて成体脳への低線量のガンマ線照射(**irradiation: IR**)が成熟細胞には機能障害を与えずに

分裂細胞と幼若なニューロンを選択的に死滅できることに着目し、全脳にガンマ線を照射したマウス(IR マウス)を作製し、動物モデルにおける恐怖および不安の行動指標を用いて個体レベルでの情動変化を検討した。IR/対照群間の基本行動および不安行動に変化はなく、音刺激を2恐怖記憶の定量化指標として用いられる動物の防御行動にはすくみ(freezing)と逃避(flight)があるが、このときの IR マウスの恐怖記憶は逃避行動と思われる水平方向への速動頻度の増大で現われた。さらにその頻度と TGL に存在する新生ニューロン数との間に個体レベルで有意な負の相関関係が認められたことから、TGL ニューロン新生による恐怖記憶形成あるいは固定化の抑制が示唆された。

続いてこの行動変化が構造的基盤に基づいて説明可能かを検討した。私は扁桃体部で前額半切断したラットの後脳部 LA に脂質親和性のトレーサーDiI を注入し、LA 後方の求心・遠心性神経回路網の *in vitro* での可視化を試みた。LA をラベルした DiI は細胞膜上を隣接する外包へと拡散した後、TGL の背側領域を経て大脳新皮質聴覚連合野(Te3)の最下層部に終わった。これにより TGL ニューロン新生が Te3-LA 聴神経回路網の一部で持続していることが明らかになるとともに、その扁桃体依存性の音連合学習・記憶への機能関与の可能性が解剖学的に支持された。

次に我々はガンマナイフ(gamma knife: GK)を用いて TGL 領域特異的に細胞分裂を抑制した動物(GK ラット)を作製し、IR マウスで得られた結果をさらに詳細に検討した。ラット両側 TGL に各 10Gy 線量のガンマ線照射を行った6週間後、GK ラット TGL に存在する分裂細胞数は対照群に比べ 85%有意に低下していた。一方、同動物群の海馬歯状回ニューロン新生に変化は認められず、GK ラットにおける TGL 領域特異的な細胞新生の抑制が示された。ガンマ線照射2週間後のオープンフィールドテストにおける基本行動に GK/対照群間で変化は認められなかった。ところがそれに続いてげっ歯類に生得的恐怖を誘起する 20 KHz の超音波刺激を与えると、音刺激直後の GK ラットの自発行動量が対照群に比べて有意に亢進した。これにより TGL ニューロン新生の持続が個体の注意・覚醒度を抑制している可能性が示唆された。さらにその恐怖音体験の長期記憶が GK ラットで亢進しており、それが逃避行動の有意な増大として現われた。またここでも個体レベルでの逃避行動の発現頻度と TGL 新生ニューロン数との間に負の相関傾向( $P=0.05$ )が認められた。以上の結果から TGL 新生ニューロンが扁桃体への聴覚入力を抑制することで動物の注意・覚醒度の低減に働き、恐怖記憶固定化および逃避行動発現の抑制に関与している可能性が示唆された。

次に我々は電気生理学的な手法を用いて、TGL ニューロン新生の抑制が外包-LA 神経回路網の入出力特性に変化を与えるかを検討した。ここではラット脳の水平断・急性スライス切片を用いて電位感受性色素による光学測定(optical imaging)と局所電位の同時記録を行った。生理的条件下にある動物脳スライスの LA より後方遠位の外包に 0.6 mA の単発刺激を与えると、その脱分極応答が白質に沿って脳の前方向へと伝播し、TGL 領域を通過した後に LA に到達することが光学計測法によって可視化された。またこのとき光応答と同期した LA 局所電位変化が記録され、我々の用いた水平断脳切片に外包-LA 回路が保存されており、光学計測法を用い

たその時空間応答の解析可能が示された。この手法を用いて次に我々は、片側脳半球のみ TGL ニューロン新生を抑制した GK ラットの外包-LA 回路の興奮性を両半球間で比較検討した。LA 遠位外包への 1.5 mA 以下の単発刺激は LA ニューロン応答に変化を与えなかった。ところがより強い 6 mA 刺激は、ガンマ線照射半球 LA ニューロンの有意な応答亢進を誘発した。一方、LA 近位外包への 6 mA 刺激はその応答に変化を与えなかった。これらの所見から、TGL 新生ニューロンが外包を介する LA への強い求心性入力に対し抑制性のゲーティング機能を果たしている可能性が示唆された。本研究結果を総括すると、外包-LA 聴覚神経回路を介する強い興奮性入力 TGL ニューロン新生領域を通過することで減衰して LA ニューロンに伝播し、このときの LA ニューロン応答の相対的低下が動物の注意・覚醒度の低減に働くことで恐怖記憶の固定化が抑制される可能性が示唆された。

本研究結果の臨床的意義のひとつとして、恐怖記憶の亢進、過覚醒、過活動を主徴とする心的外傷後ストレス障害(posttraumatic stress disorder: PTSD)との関連示唆があげられる。PTSD は個体の生死に関わるような事件・災害あるいは虐待などの急性・慢性的な強い情動体験が心的外傷(trauma)として長期記憶固定化され、その侵入的な再現現象(flash back)や過覚醒によって当時の心的・生理的苦痛の再体験を繰り返す精神疾患である。ヒトの側頭葉において、もしも扁桃体機能に関連するニューロン新生が起こっていれば、その異常が PTSD をはじめとする情動記憶の亢進、過覚醒、過活動を主徴とする精神疾患発症の内在的脆弱因子のひとつである可能性も推測できる。成体サルでの扁桃体ニューロンの持続産生の報告なども含め、本研究結果はさらに多角的な側頭葉ニューロン新生の検討を行うことの重要性を示唆しているように思われる。

文献：

Takemura NU. (2005). Evidence for neurogenesis within the white matter beneath the temporal neocortex of the adult rat brain. *Neuroscience* 134, 121-32.