

論文内容の要旨

論文題目

マウス成体海馬における新生ニューロンの成熟過程に関する研究

氏名 井出 陽子

[序論]

生物の情報処理を担うニューロンは、成体になると神経幹細胞が消失することで、その増殖能力を失うと考えられていた。しかし、およそ20年前、海馬歯状回と側脳室下帯という2つの脳部位では成体でも神経幹細胞が存在し、ニューロンが生まれ続けることが発見された。その後、成体における神経幹細胞の増殖・分化機構、新生したニューロンの特性等が解明されてきた。特に海馬は空間記憶を中心とした記憶・学習の中核であることから、これらのニューロン新生が成体の行動に及ぼす影響は大きいと考えられおり、現在までに、生理学・行動学等多方面から海馬の神経幹細胞の研究が行われ、記憶学習課題に重要な役割を担うことが解明されつつある。

海馬の神経幹細胞は、歯状回顆粒細胞下層という特定領域にのみ存在し、タイプ1、タイプ2細胞を経て分化後、徐々に顆粒細胞と呼ばれるニューロンに成熟することが知られている。成熟した顆粒細胞は多くのスパインを持つ樹状突起を貫通線維へ伸ばし、そこから興奮性の入力を受容する。新生後1-2週目の顆粒細胞ではこれらの形態は未発達で、グルタミン酸による興奮性入力は新生後2週以降であることが特定された。また、成熟した顆粒細胞は苔状線維と呼ばれる特殊な軸索をハイラスやCA3領域に伸ばし、large bouton や small terminal と呼ばれる2種類の軸索終末がハイラスの介在ニューロン、CA3の錐体細胞や介在ニューロンと接続し、情報を伝達する。新生後間もない顆粒細胞は、成熟した顆粒細胞のようにグルタミン酸を受容しないにも拘らず、痕跡条件付けや食嗜好に対する社会的伝達 (social transmission of food preference) といった特定の海馬依存性学習行動に関わっているということが知られている。そこで本研究では、特にこの時期の樹状突起や軸索終末に着目し、既存の回路網にどのように統合されているのか形態的に解析することで、新生顆粒細胞特有の情報伝達の有無を考察した。

[結果と考察]

1. 方法

本研究では、新生した細胞を標識する手法として、Nestin-Cre トランスジェニック マウス (C57BL/6) の海馬に LoxP 配列が導入された GFP 遺伝子配列を持つアデノウイルス (コンストラクト: CAG-LoxP-CAT(stop cassette)-LoxP-GFP) を注入し、感染させた。Nestin とは、神経幹細胞マーカーの一つであり、Nestin 陽性細胞に GFP を発現させることで神経幹細胞を選択的に標識した(図 1A)。また、Cre-LoxP システムにより組み換えを起こし、CAG プロモーター下で GFP を発現させているので、Nestin の発現が制御された分化後の動態を追跡することが可能となった。さらに、GAP-43 膜輸送シグナルをもつ GFP を用いたことから、特に細胞突起 (軸索や樹状突起) の観察が容易となった。

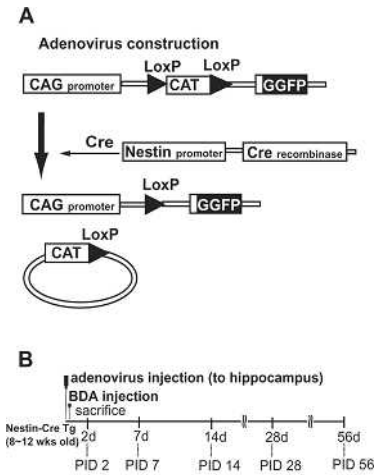


図1. Nestin陽性細胞のラベル

2. 新生顆粒細胞の軸索に関する解析

アデノウイルスをインジェクションした日を 0 日目として、GFP ラベルされた細胞を経時的に観察した (図 1B)。7 日目 (PID 7) の段階では、GFP 標識された細胞の樹状突起は未発達で、スパインはほとんど形成されなかった (図 2)。ところが、軸索の方はこの早い時期から CA3 方向へ伸長し、large bouton (>2 μ m) や small terminal (0.5~2 μ m) 様の構造を形成していることが観察された。この軸索終末の large bouton 及び small terminal を定量するために、伸長領域を区分けし、各領域における体積当たりの軸索終末数を算出した(図 3A-C)。PID 7 から両方の形態が確認されたものの、その総数は PID 14 で約 2 倍に増加した (図 3D)。特に large bouton は PID 7 から PID 14 の間で増加することが解かり、この間に回路網への統合が活発に行われていると考えられる。一方、PID 56 では軸索終末の総量が減少していることから、PID 14 から PID 56 の間で細胞自身の生死の運命決定が行われていることが考えられる。PID 7 から PID 56 を通して、軸索終末の多くが Vesicular glutamate transporter 1 (VGluT1) 陽性であったことから、グルタミン酸作動性であることが示された。一方、発生期での苔状線維軸索終末では GABA(-アミノ酪酸)とグルタミン酸の両方が混在していると言われているが、そのような特徴は見られなかったので、軸索の発生段階は成体期と発生期では異なることが考えられる。small terminal は抑制性介在ニューロンに、large bouton はハイラスでは興奮性介在ニューロンである苔状細胞と接続し、CA3 では錐体細胞と接続することが知られている。新生した顆粒細胞が両者の軸索終末を持つことは、様々な細胞との接続が示唆され、海馬回路網に及ぼし得る影響の大きさが期待される。

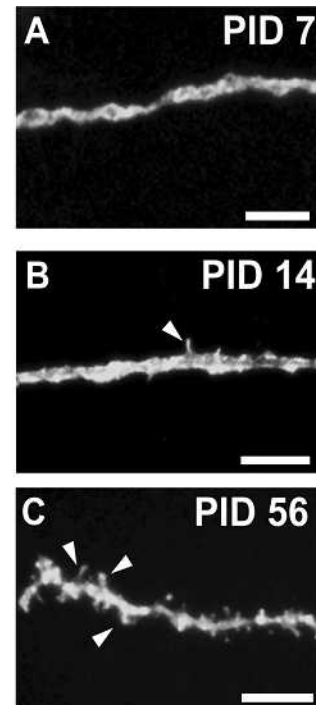


図2. GFP陽性細胞の樹状突起の発達

(A) 新生後7日目の樹状突起。スパイン構造はほとんど見られない。(B) 新生後14日目。スパインが形成されつつある(矢頭)。(C) 新生後56日目の樹状突起。多くのスパインが観察される。scale bar= 5 μ m

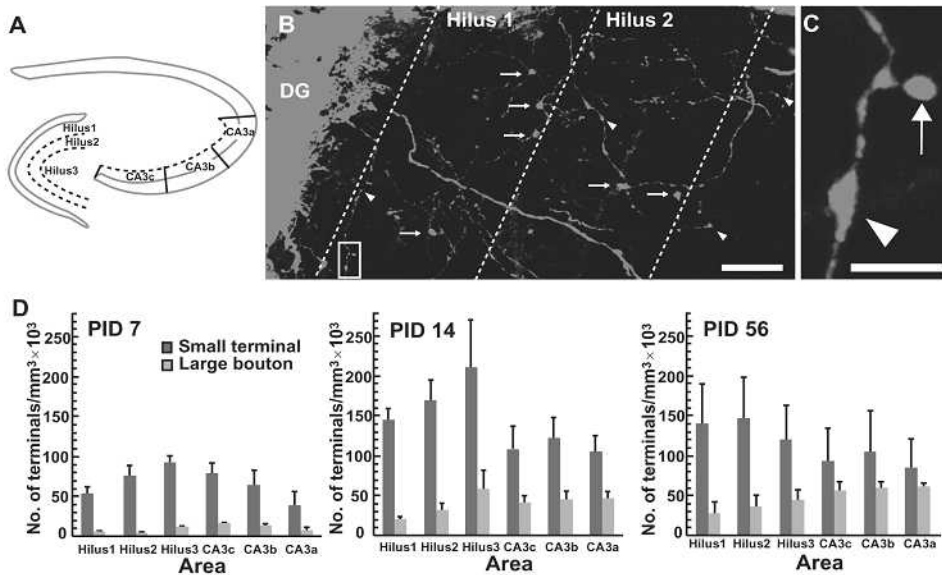


図3. GFP陽性細胞の軸索末端の成長過程

(A) 顆粒細胞軸索の伸長領域とその区分。(B) 新生後7日目の軸索伸長。成熟した顆粒細胞同様、large bouton(矢印)とsmall terminal(矢頭)の両方が観察された。(C) (B)の白枠の拡大図。drumstick様(矢印)と en passant varicosity(矢頭)両方の形態が観察された。(D) 新生後7日目、14日目、56日目の軸索末端数の変化。large boutonの数がCA3に向かって徐々に増加しているのがわかる。scale bar= 20 μ m(B), 5 μ m(C)

ニューロンが伝達する情報は、情報の受け取り手とシナプスという構造を介して伝達される。軸索終末がグルタミン酸作動性の特徴を有していても、新生顆粒細胞がニューロンとして情報伝達の一端を担うには、隣接するニューロンとシナプスを形成することが必要である。それには、新生顆粒細胞がどの段階で情報を受け取っているのか(細胞体や樹状突起で後シナプスの構造をもつか) また、情報を送信できるのか(軸索終末がシナプス前構造をもつか)を解析する必要がある。そこで透過型電子顕微鏡技術を用い、新生顆粒細胞を形態学的に確認した(図4)。PID 7の small terminal と large bouton の数は、PID 14以降と比較して少ないが、多くのシナプス小胞を蓄え、CA3透明層に存在するスパインと非対称性シナプス(興奮性シナプス)を形成していることが解かった。1つの large bouton がシナプスを形成するスパインの数はPID 7以降に増加するものの、これらの構造から、有糸分裂後1週間以内に、新生した顆粒細胞が海馬回路網に組み込まれており、機能的な情報伝達を担っていることが明らかとなった。

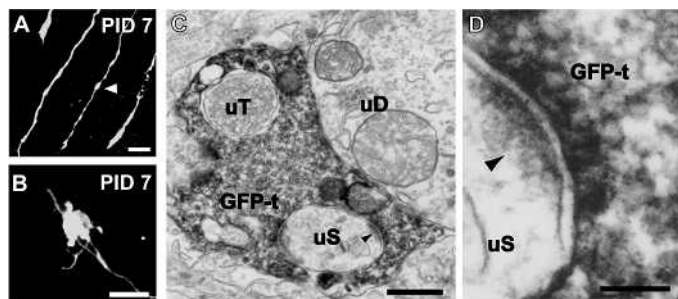


図4. 新生後7日目のGFP陽性細胞軸索末端 (A)small terminal(矢頭) (B)large bouton (C,D)large boutonの電子顕微鏡写真。スパインに対して非対称性シナプス(矢頭)を形成する。(D)は(C)の拡大図。scale bar=5 μ m(A, B), 500nm(C), 100nm(D)

3. 新生ニューロンの入力に関する解析

しかしこの時点では、樹状突起のスパインが未発達であることから、新生した顆粒細胞は伝達するための情報を他細胞から受け取っていないようである。ところが、タイプ 2 神経前駆細胞の段階からすでに、GABA による応答性を示すことが発見されている。また、PSA-NCAM (未成熟ニューロンマ

一カー) 陽性細胞がその細胞体で様々なアセチルコリン受容体を発現することから、未成熟な新生顆粒細胞は GABA またはアセチルコリン作動性の入力を受け取ることが考えられた。そこで、PID 7 における新生顆粒細胞が、細胞体から GABA またはアセチルコリンの入力を受け得るか確かめることとした。免疫染色による結果から、GABA 作動性ニューロンの前シナプスに特異的に発現する VGAT (小胞性 GABA トランスポーター) とアセチルコリン作動性ニューロンのマーカーである ChAT (コリンアセチルトランスフェラーゼ) を発現する軸索終末が PID 7 の PSA-NCAM+ / GFP+細胞と近接することを確認した。また、これらの投射は中隔核に由来するものもあることが解かった。これらのことから、PSA-NCAM+ / GFP+ 新生顆粒細胞は中隔核から GABA やアセチルコリンの入力を受ける可能性が示された。中隔核からの投射は海馬の記憶形成を亢進させる働きがあることから、新生顆粒細胞が記憶形成に関与していることが推測される。ところが、ChAT 陽性の軸索に関して、新生顆粒細胞と直接的な接続があるという証拠はこれまで示されてこなかった。本研究では、透過型電子顕微鏡技術により、シナプス小胞を含む ChAT 陽性軸索終末と GFP 標識された細胞の接触 (apposition) を数多く確認することができた。そのうち対称性シナプスを形成しているものを発見したことから、新生顆粒細胞が新生後 1 週の時点ですでにアセチルコリン作動性ニューロンの直接的な入力を受けていることが明らかとなった (図 5)。

以上のことから、新生顆粒細胞は PID 7 という非常に早い段階から、少なくともアセチルコリンや GABA 入力を受け取り、それに応じてハイラスや CA3 に存在するニューロンにグルタミン酸を介して情報を伝達していることがわかった。しかし、通常ニューロンは GABA に対して抑制性の応答を示すのに対し、タイプ 2 細胞から分化した直後の未成熟な顆粒細胞にかけては細胞内が高い Cl⁻濃度を保っているため、GABA に対して興奮性の応答を示すことが知られている。このことから新生した顆粒細胞は、接続する GABA またはアセチルコリン作動性ニューロンからの入力に対する応答は成熟した顆粒細胞とは異なることが考えられ、未成熟な顆粒細胞特有の情報伝達を行っていることが考えられる。

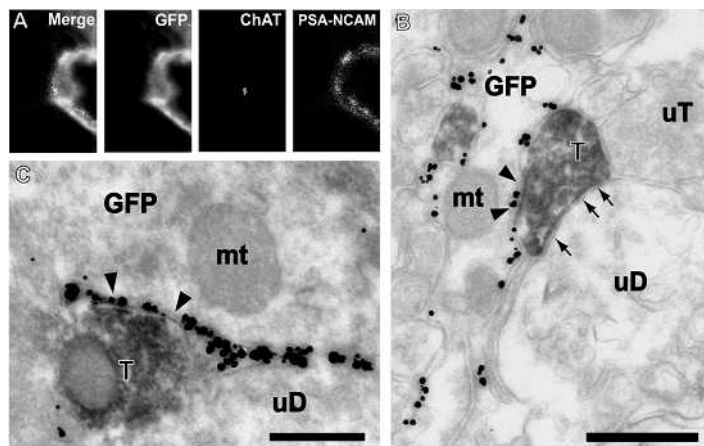


図5. アセチルコリン作動性ニューロンの投射を受ける新生後7日目のGFP陽性細胞 (A) ChAT陽性の軸索末端の投射を受けるGFPラベルされた未成熟ニューロン。(B, C) GFPラベルされた細胞 (GFP; 金コロイド) に対称性シナプスを形成するChAT陽性軸索末端(T; DAB)。scale bar= 500nm (B, C)

【結論】

海馬で新生した顆粒細胞は、その成熟する前の早い段階である新生後 1 週から既存の海馬回路網に組み込まれていることが判明した。ただし、新生顆粒細胞のスパインは未成熟であり、入力は軸索細胞体間、または軸索 樹状突起幹のみで行われること等から、未成熟の新生顆粒細胞は、成熟した顆粒細胞とは異なる情報処理を行い、CA3 に伝達している可能性が示唆された。この接続の違いが、新生後 1-2 週の顆粒細胞が関わっている特定の学習行動に重要であるのかもしれない。また、新生顆粒細胞が海馬回路網に統合される時期と新生後の運命決定が行われる時期が重なることから、この早期の統合がこれらの運命決定に影響を及ぼしていることが考えられる。