

論文内容の要旨

論文題目 アセチルコリンによる老齢マウス海馬神経幹細胞の
増殖制御に関する研究

氏名 伊藤 佳絵

【序論】

高齢動物の認知機能を向上させる要因の一つとして、海馬ニューロン新生の促進が注目されている。哺乳類脳の花馬歯状回では成熟後もニューロンが新生する (Eriksson ら、1998 ; van Praag ら、2002 年)。この新生されたニューロンは既存のニューロンに比べて高い可塑性を持ち、認知機能に貢献すると考えられている。実際に、げっ歯類においてニューロン新生を増強すると海馬依存的学習の成績が向上し、反対にニューロン新生を遺伝子操作や X 線などにより減衰させると海馬依存的学習能力が低下すると報告されている。しかし、老齢動物では成体動物と比較して新生ニューロン数が減少することが分かっている (Drapeau ら、2003 年 ; Abrous ら、2005 年)。この原因の一つとしてニューロン新生過程の出発点に位置する神経幹細胞の増殖低下が挙げる。そのため、特に老齢動物において神経幹細胞の増殖能制御に関わる因子の特定が望まれている。

成体マウスにおいてニューロン新生を増強する事として、運動と学習行動が知られている。これらの行動中には、海馬においてアセチルコリンという神経伝達物質が放出される。中隔野に存在するコリン性のニューロンからの投射線維が海馬へアセチルコリンを放出し、運動や学習に関わりが深い海馬シータ波の制御に関わっていると言われている。しかし、海馬におけるアセチルコリン分泌量は加齢に伴い低下することが微小透析研究などから指摘されている (Ikegami、1994 年)。そこで、「神経幹細胞の増殖能制御をアセチルコリンが行っており、老齢動物における神経新生の低下はアセチルコリンの分泌量低下によるものではないか」と考えた。本研究では、特に老齢マウスの花馬神経幹細胞がアセチルコリンに対して応答性を有するか、また有するならば増殖能の制御に関わっているのか調べることを目的とした。

【結果と考察】

1. 老齢マウス海馬神経幹細胞のアセチルコリンに対する応答性を調べるための細胞標識法開発

老齢マウスでアセチルコリンに対するカルシウム応答性を調べるにあたり、老齢マウスの幹細胞は膜の特性が変化しており、パッチクランプ法を応用したシングルセル・カルシウムイメージング法が非常に困難という問題点があった。他のカルシウム・イメージング手法として膜貫通性のカルシウム蛍光指示薬を用いて細胞外から組織全体に蛍光指示薬を入れる手法がある。しかし、これらの色素もほぼ緑蛍光で、神経幹細胞の判別に Nestin-GFP マウス (Nestin プロモータにより GFP を発現するマウス) を用いる従来の方法では色が被ってしまうため、適応できない。そこで、赤などの別色の色素によって海馬神経幹細胞を標識する手法が開発できないか考えた。海馬の神経幹細胞がグリア様の性質を持つことに注目し、大脳皮質などでグリアの標識に使用されている赤い蛍光色素 Sulforhodamine101 (SR101; Nimmerjahn ら、2004 年) を幹細胞の標識に使用できないかと考え、検証した。

色素の浸透性の高さを利用し海馬に隣接する側脳室へ色素を打ち込むことで、幹細胞を標識できないか試みた。Nestin-GFP マウス側脳室へ色素を注入した結果、SR101・GFP が共局在することを老齢および成体マウスで確認した (n = 726 細胞; 99.4%)。さらに SR101 陽性細胞が神経幹細胞を特異的に標識しているかを詳細に調べるため、成体マウスを用いて電気生理学的 (ホールセルクランプ法) および免疫組織学的 (免疫染色) 見地から調べた。

まず、当研究室の先行研究から神経幹細胞は 500M Ω 以下の入力抵抗値を示すことが分かっている。そのため、Nestin-GFP マウスの歯状回 subgranular zone に存在する SR101 陽性細胞にホールセルクランプを行い、その入力抵抗値を計測した (図 1)。その結果、全ての SR101 陽性細胞は GFP 陽性であり、かつ 500 M Ω 以下の入力抵抗値を有していた (n = 28)。

次に、免疫組織化学的染色によって SR101 によるラベルの妥当性を検証した。SR101 を打ち込んだマウスから脳スライスを作成し、神経幹細胞マーカーである GFAP および Nestin-GFP に対する抗体を用いて SR101 陽性細胞との共染を調べた。結果、SR101 陽性細胞の 100% が GFAP および Nestin-GFP の両方と共染していることを確認した。以上より、SR101 は老齢マウス海馬神経幹細胞の標識として使用できると考えられる。

2. アセチルコリンに対する成体および老齢マウスの海馬神経幹細胞の応答性

急性海馬スライスにカルシウム指示薬 OregonGreen 488 BAPTA-1 を取り込ませ、細胞内のカルシウム濃度の変動をモニターできる系を用いて、SR101 標識された老齢マウス海馬神経幹細胞の各種薬剤への応答性を調べた。

アセチルコリン (2 mM) を局所投与した結果、急性なカルシウム濃度の上昇が海馬神経幹細胞内に観測された (図 2; 次頁)。この応答はムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) のアンタゴニストであるスコポラミン (10 μ M) やアトロピン (0.3 μ M) によって消失した。このことから、海馬神経幹細胞は mAChR を介してアセチルコリンに応答していることが示唆された。そこで、mAChR のアゴニストであるムスカリン (2 mM) を局所投与したところ、海馬神経幹

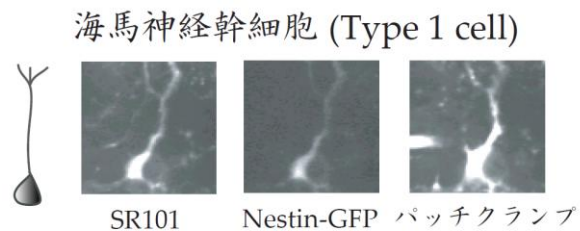


図1 SR101による海馬神経幹細胞の標識
SR101陽性細胞は神経幹細胞マーカーである Nestin-GFP を発現していた。さらに、この細胞にホールセルクランプを行いその電気的な性質を調べたところ、神経幹細胞特有の性質 (入力抵抗値 < 500M Ω) を有していた。

細胞はアセチルコリンと同様な応答性を示した。

次に mAChR サブタイプ M1~M5 のいずれを介してアセチルコリンに反応するのか調べた。M1・M3・M5 は内在性カルシウムを動員する。そこで、小胞体からのカルシウム放出を行っている IP₃ 受容体に対する阻害剤 2-aminoethoxydephenyl borate を細胞外液に投与したところ、ムスカリンに対するカルシウム応答が消失した。さらに、細胞外カルシウムを無くした状態でムスカリンを局所投与しても、カルシウム応答を生じた。次に、M1 受容体の阻害剤であるピレンゼピン (10 μM) を外液に添加したところ、ムスカリンに対するカルシウム応答が消失した。また、免疫染色にて海馬神経幹細胞の突起や細胞体に mAChR M1 が発現していることを確認した (図 3)。以上から、海馬神経幹細胞は mAChR M1 を介してアセチルコリンに反応していると示唆された。

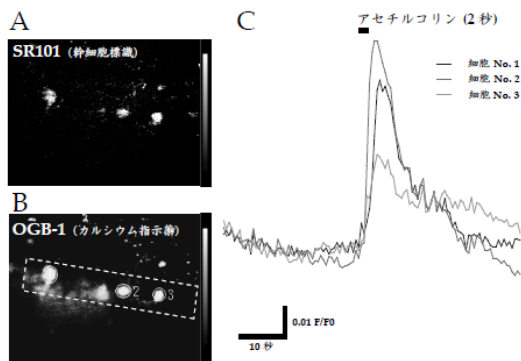


図2 アセチルコリンに対する老齢マウス海馬神経幹細胞の応答
SR101によって標識された海馬神経幹細胞 (A) 中の細胞内カルシウム濃度の経時変化をカルシウム指示薬 OGB-1 (B) の蛍光強度の変化によってモニターした。Cの細胞1~3はBに選択された細胞1~3に対応している。2秒間のアセチルコリン (2 mM) 投与に対し、幹細胞は急性のカルシウム応答を示した。

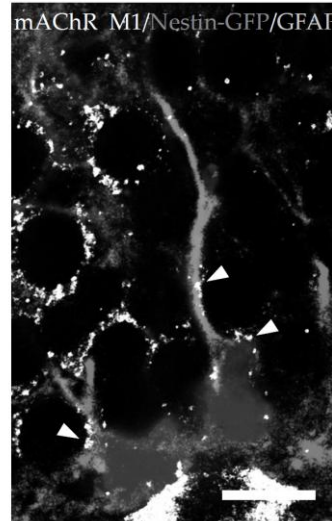


図3 老齢マウス海馬神経幹細胞におけるM1受容体の発現
免疫組織化学的手法で老齢マウスの海馬に存在する mAChR M1、Nestin-GFP (神経幹細胞マーカー)、GFAP (神経幹細胞マーカー) を染めた染色写真。Nestin-GFPとGFAP両陽性の細胞上にM1受容体が発現している (矢頭)。
図中のscale barは10 μmを表している。

3. 海馬アセチルコリン濃度の低下が老齢マウスの海馬神経幹細胞の増殖能に及ぼす影響

免疫毒によって海馬へのコリン性投射を破壊した上で、アセチルコリン放出を促進する随意運動をさせた場合に神経幹細胞の増殖がどのように変化するかを調べた。

最初に、マウスを活動時間(暗期)中に2時間回し車で自由に走らせた場合の走行距離を測った。これらの内、平均以上 (> 363 m/2hrs) のマウスを選抜し以下の実験で使用した。これは、あまり動くことのないマウスでは運動によるニューロン新生への影響が評価できないと考えたためである。中隔野に免疫毒もしくは生理食塩水を打ち込み、6日

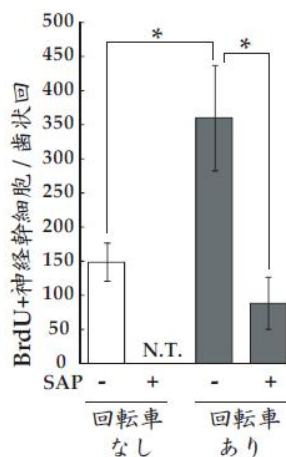
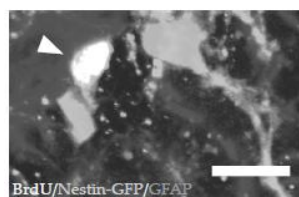


図4 海馬アセチルコリン濃度低下が神経幹細胞の増殖に与える影響
免疫毒を中隔野へ投与し、6日間作用させて、海馬へのアセチルコリン投射元である中隔野コリン性ニューロンを破壊した。その後、3日間回し車のあるケージとないケージに分けて飼育し、3日目に還流固定を行った。BrdUは2日目に腹腔内投与した。老齢マウスの運動能力は個体差が激しかったため、事前に2時間あたりの走行距離を測り、良く走る動物 (平均以上; >363 m/2 hrs) のみを使用した。免疫組織化学的手法でBrdU (細胞増殖マーカー)、Nestin-GFP (神経幹細胞マーカー)、GFAP (神経幹細胞マーカー) を染め、BrdU陽性の海馬神経幹細胞数を数えた。図中のscale barは10 μmを表している。データは平均値±標準誤差で示した。統計には Student's t-test for unpaired samplesを使用した。*P < 0.05。

後から回し車のあるケージとないケージに分けて飼育した。飼育 2 日目に分裂細胞マーカーである BrdU を腹腔内投与し、3 日目に還流固定して免疫染色を行った。コリン性ニューロンの破壊は、コリンアセチルコリンアセチルトランスフェラーゼに対する免疫染色で確認した。増殖した神経幹細胞 (BrdU+/GFAP+/GFP+) 数および増殖した神経幹細胞の割合 (BrdU+幹細胞/全幹細胞数) 両方において、運動により誘導された増殖能の高まりがコリン性投射の破壊によって消失した (n=5; 図 4; 前頁)。以上から、海馬アセチルコリン濃度の低下は運動によって誘導される海馬神経幹細胞の増殖を抑制すると示唆された。

4. 脳内アセチルコリン濃度上昇が老齢マウスの海馬神経幹細胞の増殖能に及ぼす影響

アセチルコリンエステラーゼ阻害薬は神経末端におけるアセチルコリンの分解を阻害することで脳内のアセチルコリン濃度を上げる薬剤類である。本実験では、2 種類のアセチルコリンエステラーゼ阻害薬、エゼリンおよびアルツハイマー病治療薬のドネペジルを用いて脳内アセチルコリン濃度の上昇が海馬神経幹細胞に与える影響を評価した。

エゼリンは老齢 Nestin-GFP マウスにポンプを用いて 3 日間継続投与し、ドネペジルは 3 日間腹腔内に注射し、コントロール群は生理食塩水を投与した。投与 2 日目に BrdU を注射し、3 日目に還流固定した。脳切片作成後、BrdU・GFAP・GFP 抗体で免疫染色した。その結果、増殖神経幹細胞数がコントロール群 (n=6) に比べてエゼリン・ドネペジル両群において 3 倍以上に増えた (それぞれ n=8, n=5; 図 5)。さらに、増殖する神経幹細胞の割合もエゼリン・ドネペジル両群ともに顕著な増加がみられた。以上から、脳内アセチルコリン濃度の上昇は海馬神経幹細胞の増殖を促進させると示唆された。

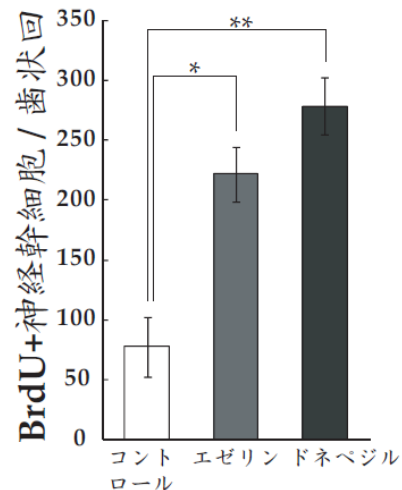


図5 薬剤による脳内アセチルコリン濃度上昇が神経幹細胞の増殖に与える影響

老齢マウスに3日間継続的にエゼリンを投与し、3日目に還流固定した。ドネペジルは3日の間、一日一回ドネペジンを腹腔内投与し、3日目に還流固定した。両者ともにBrdUは2日目に腹腔内投与した。コントロール群 (生理食塩水投与群) に対し、エゼリン投与群およびドネペジル投与群では増殖神経幹細胞数が優位に増加した。データは平均値±標準誤差で示した。統計にはStudent's t-test for unpaired samplesを使用した。

*P<0.05, P<0.01。

【結論】

一連の結果から、アセチルコリンはムスカリン性アセチルコリン受容体 M1 を介して、老齢マウスの海馬神経幹細胞の増殖を制御していると示唆される。老齢動物のニューロン新生が低下する要因の一つとして、神経幹細胞がアセチルコリンへの応答性を有しているにも関わらず、周囲のアセチルコリン濃度が減るために増殖が制限されていることが考えられる。老齢動物において、運動や薬剤投与により海馬神経幹細胞の増殖を促すことで認知機能や記憶力の低下を防止できる可能性が示唆された。