

論文審査の結果の要旨

氏名 伊藤 佳絵

本論文は老齢マウス海馬神経幹細胞のアセチルコリンを介した増殖制御について述べられている。

本論文は、3章構成になっており、1章においては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の開発について述べられており、2章においては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が、そして3章においては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について調べられている。

高齢動物の認知機能低下の一つの要因として、海馬ニューロン新生の低下があげられている。そのため、高齢動物の認知機能を維持していくために、海馬のニューロン新生を増強する方法について研究が重ねられ、運動によってニューロン新生が高められることがわかってきた。運動中には、海馬において神経伝達物質のひとつであるアセチルコリンが放出されることが知られている。中隔野に存在するコリン性ニューロンが海馬に投射し、そこでアセチルコリンを放出する。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わかっている。そこで、本研究では、「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。特に老齢マウスの海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にした。

まず、第1章において、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の解決を行った。具体的には、色素によって海馬神経幹細胞を標識する手法を開発できないかと考えた。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** を神経幹細胞の標識に使用できることを見出した。そして、カルシウム指示薬 **Oregon Green 488 BAPTA-1 (OGB-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構築した。

第2章においては、**Sulforhodamine101** と **OGB-1** で標識した老齢マウスの海馬スライスを用いてアセチルコリンに対する応答性を調べた。このスライスにアセチルコリンを投与し、カルシウムイメージングを行いアセチルコリン (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。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、老齢マウスの海馬神経幹細胞は 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、海馬神経幹細胞はアセチルコリンと同様な応答性を示した。この反応は、M1 受容体の阻害剤であるピレンゼピンを外液に添加したところ、完全に消失した。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。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応答していると示唆された。

そして、第3章において、老齢マウスの海馬神経幹細胞の増殖能に及ぼすアセチルコリンの影響を調べた。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/2 hrs) 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 BrdU (100 mg/kg) 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。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。

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 (78.0 ± 24.9 個; $n = 6$) 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 222 ± 22.7 個、 $n = 8$; 78 ± 23.5 個、 $n = 5$)。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

本研究により、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ことが示された。そして、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。

なお、本論文は、当研究室に所属していた大学院生 能智禄弥氏、栗林寛氏、斎藤悠氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。