

論文の内容の要旨

## Compensatory integration of depleted subsets of granule cells in the local area of the adult mouse olfactory bulb

成体マウス嗅球局所領域における除去された顆粒細胞サブタイプの補償的組み込み

指導教員 森憲作教授

東京大学大学院医学系研究科

平成19年4月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

村田 航志

哺乳類の脳では、一般的にはニューロンが産生される時期は胎生期と新生児期の一部に限られるが、嗅球と海馬では生涯にわたってニューロンが新生する。嗅覚系の一次中枢である嗅球では、抑制性インターニューロンである顆粒細胞が成体でも新たに生まれる。これら顆粒細胞群は均一ではなく、発現する分子や嗅球投射ニューロンとのシナプス形成部位が異なる複数のサブタイプに分化している。また、成体で新生する顆粒細胞群にも多様なサブタイプが存在する。しかし、多様なサブタイプに分化している新生顆粒細胞群が、既存の嗅球神経回路への組み込まれる際にどのような制御を受けているかは十分には解明されていない。新生顆粒細胞の組み込みは既存の嗅球神経回路によってサブタイプごとに制御されているのか、あるいはサブタイプ間でランダムに起こるのかは不明であった。

最近の研究で、遺伝子操作により成体になってからニューロンが新たに生まれないようにしたマウスでは、嗅球の顆粒細胞の総数が徐々に減少することが報告された。この知見から、新生顆粒細胞の組み込みは、自然に脱落しうる性質をもつ既存の顆粒細胞の不足を補い、嗅球の神経回路構造を維持するために重要であることが示唆されている。これらの知見より、私は、成体マウス嗅球

での新生顆粒細胞の組み込みは、組み込み先の嗅球神経回路によってサブタイプごとに制御されており、不足したサブタイプの新生顆粒細胞が優先的に組み込まれることにより、先行する顆粒細胞群の脱落が補われるという仮説を着想した。

この仮説を検証するために、私は、既存の顆粒細胞のうちある特定のサブタイプだけを嗅球局所領域で大規模に除去し、その後の新生顆粒細胞の組み込み様式をサブタイプごとに観察した。本研究では、代謝型グルタミン酸受容体 2 (mGluR2)の発現の有無によって顆粒細胞のサブタイプを区別した。サブタイプ特異的かつ領域特異的に顆粒細胞を除去するために、イムノトキシン細胞標的法を用いて、mGluR2 を発現する顆粒細胞サブタイプを選択的に除去した (図 1)。

まず私は、イムノトキシン細胞標的法で、mGluR2 陽性サブタイプの顆粒細胞が投与領域だけで選択的に除去されるかどうかを検証した。その結果、投与領域では mGluR2 陽性顆粒細胞の密度は、投与から 2 週間後で健常時の約 36%に減少し、また投与から 8 週間後で健常時の約 71%まで回復した。mGluR2 陰性顆粒細胞の数は、イムノトキシンを投与しても変化しなかった。また、非投与領域では、イムノトキシン投与により顆粒細胞の密度は変化しなかった (図 2)。この結果は、イムノトキシンが mGluR2 陽性サブタイプを選択的に除去すること、細胞除去は投与領域に局限して起こることを示し、除去領域に mGluR2 陽性な新生顆粒細胞が組み込まれ回復に寄与することを示唆する。

次に、mGluR2 陽性顆粒細胞を除去した領域で、mGluR2 陽性新生顆粒細胞の組み込みが増加するかどうかを検証した。新生顆粒細胞の可視化には IdU による新生細胞の標識、およびレトロウイルスベクターによる赤色蛍光タンパク質 mPlum の発現誘導による新生細胞の標識を用いた。その結果、いずれの標識方法でも細胞除去領域では健常領域に比べて、mGluR2 陽性新生顆粒細胞の数、および、新生顆粒細胞の中で mGluR2 陽性サブタイプが占める割合が有意に増加した (図 3, 図 4)。また、mPlum で標識された細胞の形態観察より、細胞除去領域に存在する mGluR2 陽性新生顆粒細胞は嗅球神経回路とシナプス形成することが示唆された (図 5)。

さらに、新規に組み込まれた顆粒細胞の形態を観察するために、赤色蛍光タンパク質 DsRed2 を強発現する顆粒細胞の移植実験を行った。まず、これら移植した顆粒細胞でも細胞除去領域では mGluR2 陽性サブタイプが優先的に組み込まれることが確認された (図 6)。細胞除去領域に存在する mGluR2 陽性移植細胞では、顆粒細胞層でスパイン頭部の大きさが増大した (図 7)。一方、mGluR2 陰性移植細胞では、細胞除去領域におけるスパイン頭部の大きさの増大は見ら

れなかった (図7)。

以上の結果より、既存の嗅球神経回路の局所領域における mGluR2 陽性顆粒細胞の除去は新生顆粒細胞の組み込みに影響を与え、mGluR2 陽性サブタイプの新生顆粒細胞が mGluR2 陰性サブタイプよりも優先的に組み込まれることが示された。本研究は、成体マウス嗅球における新生顆粒細胞の組み込みは、サブタイプ間でランダムに起こるのではなく、組み込み先の嗅球神経回路でサブタイプごとに制御され、不足したサブタイプの新生顆粒細胞が補償的に組み込まれるという現象を見出した。

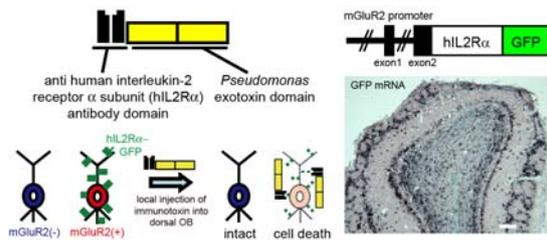


図1 イムノトキシン細胞標的による mGluR2 陽性顆粒細胞の除去  
イムノトキシンは抗ヒトインターロイキン2 受容体抗体ドメインと緑膿菌由来毒素ドメインからなる融合タンパク質である。イムノトキシンはヒトインターロイキン2 受容体を発現する細胞種選択的に細胞死を誘導する。本研究では mGluR2 プロモータ下でヒトインターロイキン2 受容体を発現するトランスジェニックマウスを用いた。イムノトキシンをトランスジェニックマウスの嗅球背側部に局所投与すると、投与領域でヒトインターロイキン2 受容体を発現する細胞が除去された。

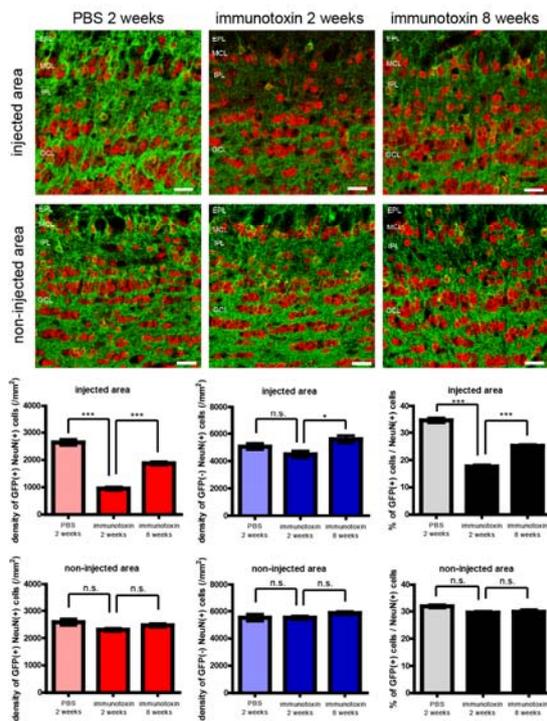


図2 イムノトキシンによる細胞種特異的・領域特異的な mGluR2 陽性顆粒細胞サブタイプの除去と回復

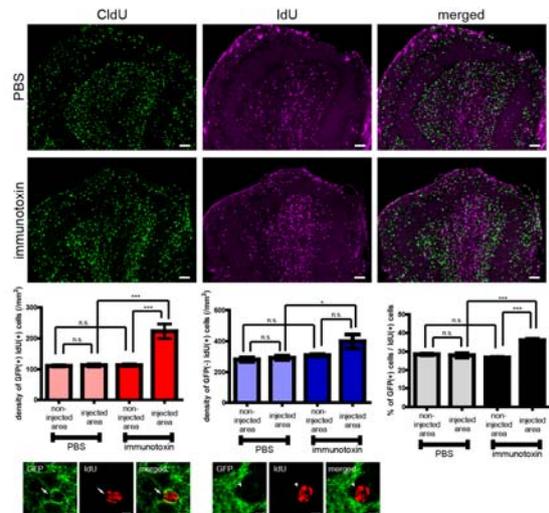


図3 IdU による新生顆粒細胞の標識実験

イムノトキシンは既存顆粒細胞のサブタイプを除去し (CldU 緑)、除去領域では新生顆粒細胞の組み込みが増加した (IdU マゼンタ)。mGluR2 陽性の新生顆粒細胞サブタイプ (赤) が mGluR2 陰性の新生顆粒細胞サブタイプ (青) よりも優先的に組み込まれた。

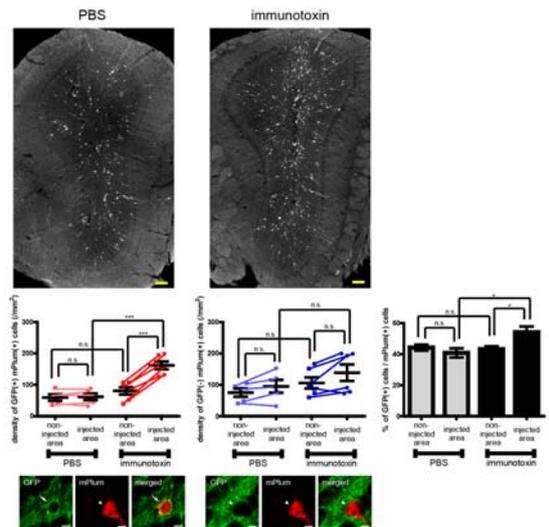


図4 レトロウイルスベクターによる新生顆粒細胞の標識実験

IdU による標識実験と同様、細胞除去領域では mGluR2 陽性の新生顆粒細胞サブタイプ (赤) が mGluR2 陰性の新生顆粒細胞サブタイプ (青) よりも優先的に組み込まれた。

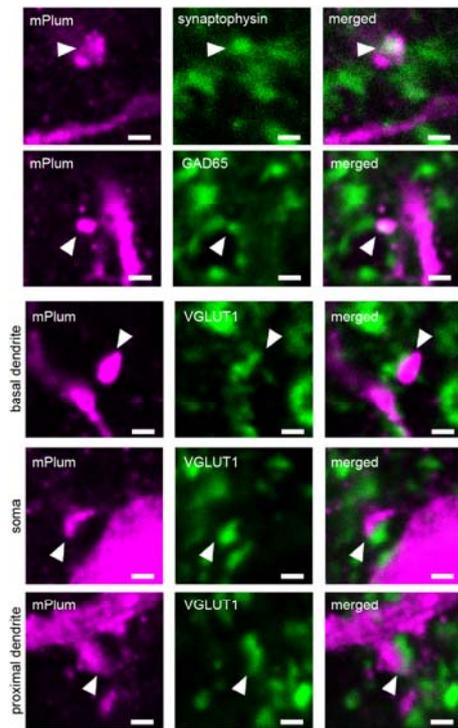


図 5 mPlum で標識された細胞除去領域に存在する mGluR2 陽性新生顆粒細胞のシナプス形成  
 新生顆粒細胞のシナプス形成  
 顆粒細胞は外巻状層で抑制性前シナプス構造を形成する。細胞除去領域の mGluR2 陽性新生顆粒細胞の外巻状層にある樹状突起スパイン上に synaptophysin および GAD65 が共発現していた。顆粒細胞は顆粒細胞層で興奮性後シナプス構造を形成する。細胞除去領域の mGluR2 陽性新生顆粒細胞の顆粒細胞層にあるスパイン上に VGLUT1 のシグナルが近接していた。

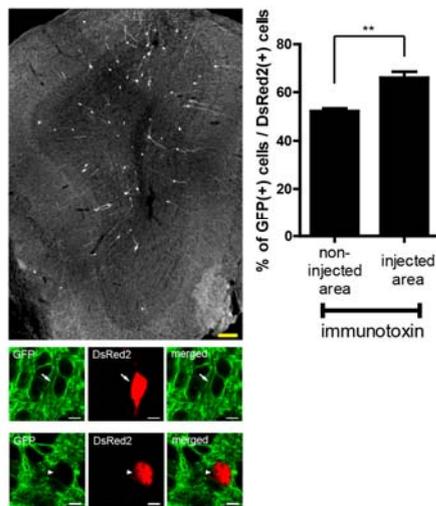


図 6 DsRed2 を発現する顆粒細胞の移植実験  
 新生児期の動物から未成熟顆粒細胞を回収し、イムノトキシンを投与した動物へ移植した。移植細胞でも mGluR2 陽性サブタイプが mGluR2 陰性サブタイプよりも優先的に組み込まれた。

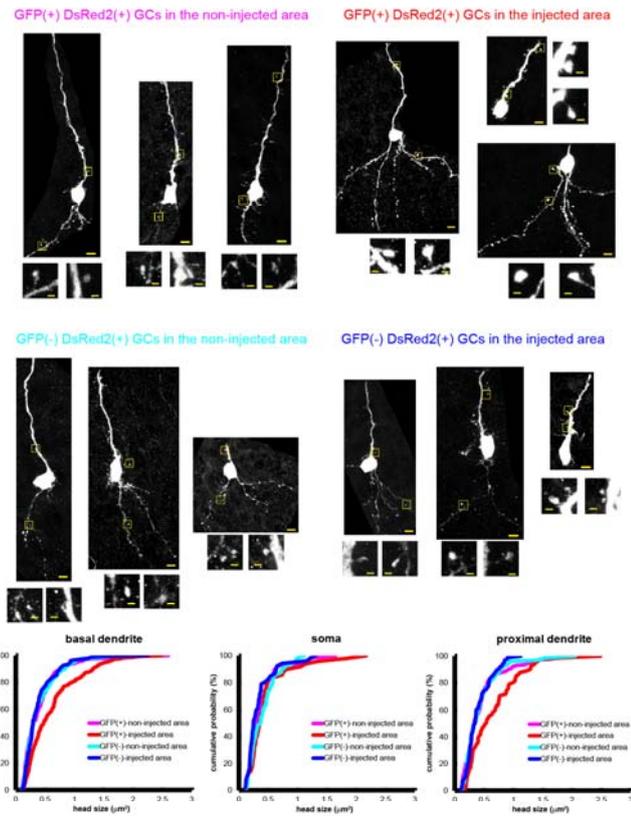


図 7 移植顆粒細胞の顆粒細胞層にある樹状突起スパイン頭部の大きさの増大  
 細胞除去領域の mGluR2 陽性移植細胞ではスパイン頭部の大きさが増大した。mGluR2 陰性移植細胞ではそのような増大は見られなかった。