

氏名	北山友也
生年月日	
本籍	京都府
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第552号
学位授与の日付	2003年3月25日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	NMDA シグナルによる成熟脳内神経系前駆細胞の成長制御に関する神経薬理学的研究
論文審査委員(主査)	米田 幸雄(研究科・教授)
論文審査委員(副査)	辻 彰(薬学部・教授) 横井 毅(医学系研究科・教授) 山田 清文(薬学部・教授) 谷浦 秀夫(研究科・助教授)

学位論文要旨

In this paper, we have attempted to evaluate the possible modulation by activation of NMDA receptors of mechanisms associated with proliferation and differentiation in the neural progenitor cells. Progenitor cells were prepared from adult murine hippocampus by the percoll density gradient method. In vitro culture of progenitor cells resulted in formation of spheres not immunoreactive to either MAP-2 or GFAP within 12 day in vitro (DIV) in the presence of basic fibroblast growth factor (bFGF). An RT-PCR analysis revealed constitutive expression of NMDA receptor subunits required for assembly of functional heteromeric NMDA receptor channels in neurospheres cultured for 12 DIV. Sustained exposure to NMDA not only led to marked inhibition of formation of spheres on 12 DIV when exposed from 4 to 12 DIV, but also resulted in facilitation of differentiation of neurospheres exposed to all-trans retinoic acid in the absence of bFGF to cells immunoreactive to MAP-2. By contrast, neurosphere formation was not markedly affected by sustained exposure to NMDA from 8 to 12 DIV. These results suggest that NMDA signals may play a role crucial for commitment of neural progenitor cells to neurons in adult murine hippocampus.

哺乳動物中枢神経系において、神経幹細胞をはじめとする神経系前駆細胞は、分化能と増殖能を有する未成熟な前駆細胞である。これら神経系前駆細胞は、動物の生涯を通して増殖を繰り返し神経細胞およびグリア細胞を再生する。しかしながら、実際に神経細胞の再生をおこなう領域は限定されている。すなわち、副脳室下帯および海馬歯状回

である。特に海馬歯状回に存在する神経系前駆細胞は、外部の刺激に応答性を示すことが報告されている。例えば、遊び道具を多く取り入れた良い環境で飼育されたマウスの海馬歯状回では、通常環境で飼育されたマウスよりも多くの細胞増殖が認められる。同様の細胞増殖の活性化は、虚血負荷後に誘発される海馬 CA1 領域の遅発性神経細胞死が認められる条件下でも観察される。この条件下では、歯状回で未分化細胞の増殖が活性化される。一方、神経細胞、グリア細胞、あるいは脳内血管からの過剰な glutamate の放出が、神経細胞死を引き起こす一因になることは周知の事実である。実際、glutamate レセプターアンタゴニストの投与により、虚血負荷誘発性の神経細胞死は抑制される。また、イオン透過型 glutamate レセプターである Kainic acid(KA)型レセプターのアゴニストである KA の投与により、海馬 CA1 領域の神経細胞は、遅発性神経細胞死を起こす。この条件でも、歯状回の未分化細胞の増殖能が活性化される。これに対して、同じイオン透過型 glutamate レセプターである N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)型レセプターのアゴニストである NMDA を投与した場合には、海馬 CA1 領域の神経細胞は脱落することなく、しかも歯状回の細胞増殖は抑制される。このとき、転写制御因子である Activator protein-1(AP1)の DNA 結合能は、海馬内では歯状回にのみ限局して増強される。以上の報告は、DNA 新規合成の指標となる BrdU を用いておこなわれている。本研究においても、BrdU を用いて同様の研究成績を得た。さらに、神経系前駆細胞のマーカー蛋白質である Nestin に対する抗体と増殖細胞のマーカー蛋白質である proliferating cell nuclear antigen に対する抗体を用いて、成熟脳内神経系前駆細胞の増殖能が NMDA シグナルにより抑制されることを確認した。さらに、成熟脳海馬由来の神経幹細胞と思われる神経系前駆細胞の単離培養法を確立し、同細胞の増殖能および分化能が NMDA シグナルにより制御される可能性について検討をおこなった。

ddY 系成熟マウスより全脳を摘出し、無菌条件下で海馬を切り出した。海馬小片を酵素処理後、ピペットマンを用いて分散した。この懸濁液について、percoll を使用した密度勾配法により細胞を分取後培養した。この percoll を用いた密度勾配法により、今まで困難であった成熟脳海馬由来神経系前駆細胞の単離培養法を確立した。さらに、これらの細胞に対して NMDA 曝露をおこなったのち、各種検出方法を用いて検討を加えた。

神経幹細胞は、培養条件下では増殖能を活性化され Neurosphere と呼ばれる細胞塊を形成することが知られている。我々の実験系においても神経系前駆細胞は Neurosphere を呼ばれる細胞塊を形成するので、この細胞塊の形成各段階における NMDA レセプターの発現を、NR1、NR2A および NR2B サブユニットに対する抗体を用いて検討した。その結果、検討した全てのサブユニットで、少なくとも培養 4 日目から 12 日目までは著明な発現が認められた。培養 12 日目の Neurosphere に対して、NMDA の短期曝露実験をおこない、転写制御因子 AP1 ファミリー蛋白質の発現につい

て検討した。その結果、NMDA 5分間曝露により、曝露後2時間目には c-Fos および c-Jun 両蛋白質の発現増強が認められたが、これらの増強はアンタゴニスト MK801 の前処置により完全に拮抗された。また FosB および Fra2 についても、NMDA 曝露により顕著な発現の増強が観察された。しかしながら、これら NMDA の短期曝露実験をおこなった細胞では増殖能に著変は認められなかった。さらに、同実験後に分化実験をおこなった場合でも、神経系前駆細胞の分化能に著変は認められなかった。

次に我々は、Neurosphere 形成段階に NMDA 曝露をおこなった。すなわち、Neurosphere 形成の各段階から分化実験をおこなう培養 12 日目まで NMDA 曝露をおこない続けた。その結果、培養 4、6 および 8 日目から 12 日目まで NMDA 曝露をおこなった例で、Neurosphere の形成阻害が認められた。また、この形成阻害効果は、MK801 の前処置により完全に拮抗された。さらに、培養 4 日目から 12 日目までの 8 日間 NMDA 曝露をおこなった例と、Neurosphere 形成阻害が認められなかった培養 10 日目から 12 日目までの 2 日間 NMDA 曝露をおこなった例について分化実験をおこなった。その結果、神経細胞系譜への分化を誘導する All-trans retinoic acid(ATRA)存在下で分化実験をおこなった場合では有意な変化が認められた。すなわち、神経細胞のマーカー蛋白質である MAP-2、神経細胞核のマーカー蛋白質である NeuN、神経細胞質に特異的に存在する NSE、および神経細胞に特異的に発現する NMDA レセプターのサブユニット NR1、NR2A および NR2B に対する特異的な抗体を用いた検討の結果、2 日間 NMDA 曝露をおこなった例に比べ、8 日間 NMDA 曝露をおこなった例の方が、明らかに抗体陽性蛋白質の発現が増強していた。また、アストロサイトのマーカー蛋白質である GFAP に対する抗体を用いた場合では、2 日間 NMDA 曝露をおこなった例に比べ、8 日間 NMDA 曝露をおこなった例の方が、明らかに抗体陽性蛋白質の発現が減少していた。つまり、培養 4 日目から 12 日目までの 8 日間 NMDA 曝露をおこなうことにより、神

Protein expression at 20 DIV

		NR1	NR2A	NR2B	Nestin	MAP-2	GFAP	NeuN	PCNA	NSE
Control	ATRA	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	CNTF	-	-	-	-	-	++	-	-	-
NMDA exposure for 10-12 DIV	ATRA	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	CNTF	-	-	-	-	-	++	-	-	-
NMDA exposure for 4-12 DIV	ATRA	++	++	++	-	++	±	++	-	++
	CNTF	-	-	-	-	-	++	-	-	-

Fig. 1. Expression of Marker proteins in differentiated neurospheres.

神経細胞に分化する神経系前駆細胞が増加したことになる。しかしながら、グリア細胞系譜に分化誘導する Ciliary neurotrophic factor(CNTF) 存在下では著変は認められなかった(Fig. 1)。

したがって、これら培養 4 日目と 10 日目の細胞では NMDA シグナルに対する応答性が異なっていると示唆される。

神経系前駆細胞の分化過程のモデルには二つの説がある。すなわち、selective 説と instructive 説である。

selective 説とは、神経系前駆細胞が環境に非依存的に確立的に、様々な細胞系譜へ運命決定されることである。これら運命決定された細胞は、環境に応じて特定の系譜の細胞のみが選択的に生き残る、あるいは増殖すると考えられる。例えば、本研究では成熟脳海馬由来の神経系前駆細胞は、bFGF の除去により成熟した細胞に分化した。このとき、神経系前駆細胞は半数以上遅発性細胞死をおこし、一部の細胞のみが分化する。しかしながら、ATRA 存在下で分化誘導をした場合では、細胞の生存率はわずかに上昇し神経細胞とアストロサイトに分化する細胞数の比率が変化した。したがって、ATRA の存在は神経細胞に分化するように運命決定された系譜の細胞にとって、容易に生存出来る環境であると推察される。

instructive 説とは、成長因子などの環境因子の作用により神経系前駆細胞が特定の系譜に分化するように運命決定されることである。事実、この説を裏付けるような報告がされている。例えば、bFGF 存在下に CNTF あるいは、白血球阻害因子(LIF)を 2 日間培地に加え、その後無血清培地で bFGF 非存在下で培養すると、ほぼすべての細胞がアストロサイトに分化する。また、甲状腺ホルモン T3 は、神経系前駆細胞に instructive に働きかけ、オリゴデンドロサイトの発生を促すことが示された。したがって、本研究

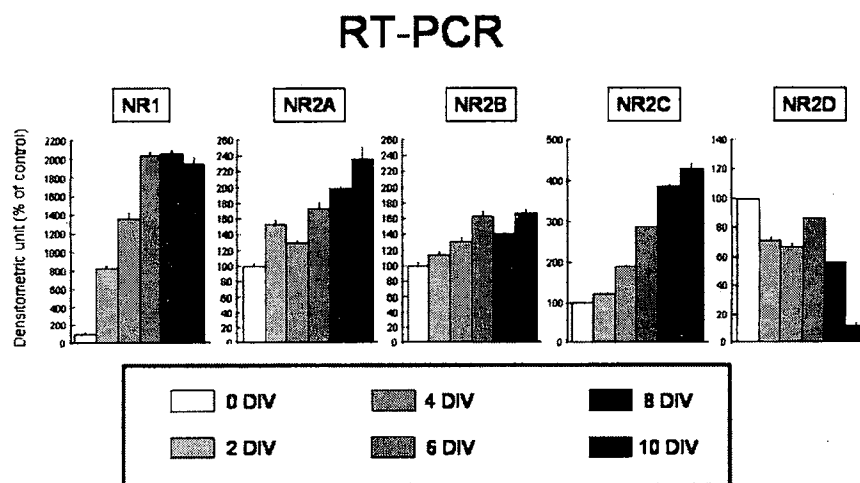


Fig. 2. Quantification of NMDA receptor subunits in progenitor cells. Cells were collected from lower cell layer obtained after percoll centrifugation, followed by culturing in DMEM/F12 for 0, 2, 4, 6, 8 and 10 DIV. Cells were extracted RNA with sonication for 4 sec, followed by RT-PCR. Values are from 4 separate experiments.

でおこなった NMDA の長期曝露は神経系前駆細胞に *instructive* に作用したと推察される。

神経系前駆細胞の分化過程において、この二つのモデルは相反する概念である。しかしながら、生体内において神経系前駆細胞から多様な成熟細胞が産生される際には、*selective* 説と *instructive* 説の両モデルが関与する可能性は十分に考えられる。また、我々の確立した神経系前駆細胞の単離培養法では、分化抑制因子として bFGF を添加している。しかしながら、bFGF では分化を抑制することは可能であるが、神経前駆細胞あるいはグリア前駆細胞への運命決定を抑制することは困難と考えられる。

したがって、本研究において分化能に影響が認められた培養 4 日目から 12 日目の 8 日間 NMDA 曝露は、神経系前駆細胞の運命決定に関与している可能性が示唆される。また、これら神経細胞への運命決定された細胞は ATRA 存在下という神経細胞の分化、生存により適した環境下でより顕著に観察されたものと推察される。

次に、NMDA レセプターサブユニットの発現を Neurosphere 形成の各段階において RT-PCR 法を用いて半定量した結果、特に NR2D の発現に著明な相違が認められた。つまり、培養 4 日目で認められる NR2D の発現が培養 10 日目では、ほとんど認められないのである (Fig. 2)。

また、NMDA シグナルにより招来される AP1 ファミリー蛋白質の発現についても明確な相違が認められた。すなわち、培養 4 日目の細胞では、FosB の発現が NMDA 曝露により約 2 倍に増強されるのに対して、培養 10 日目では約 6 倍に増強されるのである (Fig. 3)。

Immunoblot

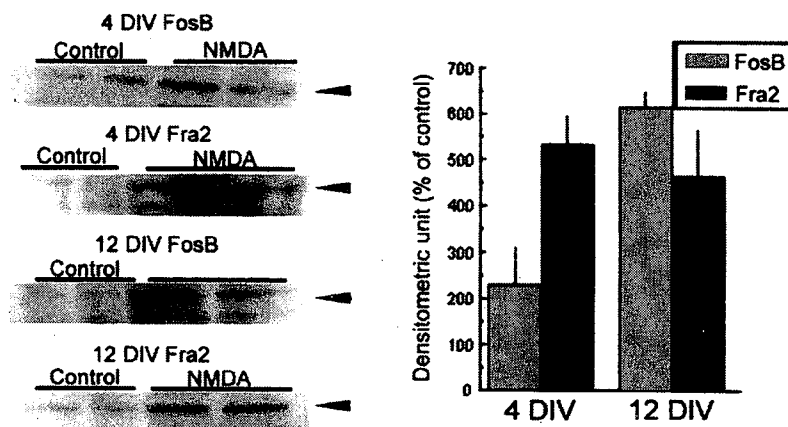


Fig. 3. Quantification of FosB and Fra2 in progenitor cells. Cells were collected from lower cell layer obtained after percoll centrifugation, followed by culturing in growth medium for 4 or 10 DIV. The cells were replaced KRB from growth medium. Progenitor cells were exposed to NMDA at 30 μ M for 5 min. Cells were harvested at 120 min later, followed by homogenization and subsequent SDS-PAGE for immunoblotting using an antibody against FosB or Fra2. Values are from 4 separate experiments.

本研究により、NMDA シグナルは、成熟マウス海馬内に存在する神経系前駆細胞の接着因子を制御し Neurosphere 形成を阻害するだけではなく、同前駆細胞の運命決定に影響を与え神経細胞系譜に誘導することが明らかとなった。また、NMDA シグナルによる神経細胞への分化誘導は、NMDA レセプターの構成蛋白質および転写制御因子 AP1 の構成蛋白質の相違により調節される可能性が示された。このことは、AP1 組成の相違により標的遺伝子が異なり、異なる機能蛋白質の生合成が制御される可能性を示唆するものと考えられる。

学位論文審査結果の要旨

本研究においては、成熟マウス海馬歯状回に存在する神経系前駆細胞の増殖能が、イオン透過型 glutamate レセプターの一つである N-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターの活性化により抑制されることを確認するとともに、成熟脳海馬由来の神経幹細胞と思われる神経系前駆細胞の単離培養法を確立し、同細胞の増殖能および分化能が NMDA シグナルにより制御される可能性について検討をおこなった。

成熟動物海馬から密度勾配遠心分離法により分離した神経系前駆細胞は、培養に伴い Neurosphere を形成したが、この細胞塊には培養日数にかかわらず、NR1, NR2A および NR2B サブユニットの著明な発現が認められた。培養 12 日目の Neurosphere を短時間 NMDA に曝露すると、c-Fos および c-Jun 両蛋白質の発現増強が認められた。次に、Neurosphere 形成の各段階から、分化誘導因子添加をおこなう培養 12 日目まで、NMDA 曝露を持続したところ、培養 4, 6 および 8 日目から 12 日目までそれぞれ NMDA 曝露をおこなった例で、Neurosphere の形成阻害が認められた。培養 4 日目から 12 日目までの 8 日間 NMDA 曝露例と、Neurosphere 形成阻害が認められなかった培養 10 日目から 12 日目までの 2 日間 NMDA 曝露例について分化誘導をおこなうと、形成阻害の見られない 2 日間 NMDA 曝露例に比べて、形成阻害の顕著な 8 日間 NMDA 曝露例の方が、神経誘導因子 All-trans retinoic acid の添加に伴い、MAP-2, NeuN, NSE, NR1, NR2A および NR2B 各抗体陽性蛋白質の発現が増加した。一方、GFAP 抗体を用いた場合では、2 日間 NMDA 曝露例に比べ、8 日間 NMDA 曝露例の方が、明らかに抗体陽性蛋白質の発現が減少した。したがって、NMDA 曝露により Neurosphere 形成阻害の見られる前駆細胞では、神経誘導因子による神経細胞への分化が促進される可能性が示唆される。すなわち、成熟脳海馬では NMDA レセプターは、接着能、増殖能および分化能制御を通じて、神経系前駆細胞を神経細胞に誘導する活性を有すると推察される。

以上の研究成績は、成熟脳海馬から増殖能と多分化能を示す神経系前駆細胞を単離した最初の先駆的報告であるとともに、NMDA シグナルによる神経細胞再生あるいは修復の可能性を示唆する点で高く評価されるので、本論文は博士（薬学）に値すると判断する。