

平成22年度名古屋市立大学医学会賞
受賞論文

成体脳におけるニューロン-グリア相互作用と
新生ニューロンの移動制御機構

金子 奈穂子

名古屋市立大学大学院医学研究科 再生医学

Neuron-glia interaction and neuronal migration in the adult brain

NAOKO KANEKO

*Department of Developmental and Regenerative Biology,
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences*

SUMMARY

There is no effective treatment for the marked neuronal damage by various insults such as ischemic stroke, neurondegenerative diseases and traumatic injury, currently. It is partly because neurons are not generated in most region of the adult brain. However, recent studies have revealed that neural stem cells (NSCs), which produce a variety of neural cell types in the developing brain, also reside in the subventricular zone of the adult brain. They continuously generate new neurons, which can migrate rapidly for a long distance in the adult brain. Importantly, after brain injury, a part of the new neurons migrate around the damaged area, where they differentiate into mature neurons. This spontaneous response is thoroughly insufficient to replace neurons lost by diseases. However, these observations offer the possibility of interventions that promote the endogenous regeneration process. We recently found a novel mechanism of neuron-glia interaction that new neurons use to support their long-distance migration in the adult brain. This mechanism could be also important for migration of new neurons toward the injured area through the activated astrocytes in the regeneration process.

Key words : 神経幹細胞・脳室下帯・ニューロン再生・新生ニューロン

1, はじめに

脳は生命維持に不可欠な植物機能から高度な社会生活に必要な思考・学習といった高次機能まで、すべての生命活動の統合を行っている。そのため脳の損傷は、たとえ致命的なものとならなくても多岐にわたる機能障害の原因となる。一方で、脳は再生・修復能が極めて乏しいこともよく知られており、脳血管障害や神経変

性疾患によるニューロンの脱落は不可逆的な神経機能の障害をまねく。

近年、胚性幹細胞（ES細胞）やiPS細胞などの多能性幹細胞を操作する技術の発展により¹⁻⁴⁾、様々な器官や組織を再生する試みが精力的に行われている。これらは、現在は難治性・不可逆性とされている疾患や障害に対し、再生医学的な治療戦略の開発を目指したものであ

る。ES細胞の使用に関する倫理的問題や他個体由来の細胞移植による免疫反応、iPS細胞における腫瘍化の可能性など、解決すべきいくつかの問題点は存在するものの、すでにそのいくつかは臨床応用段階に近づいている。しかし殊に脳疾患に関しては、その構造的・機能的性質から多くの困難な問題が存在し、細胞移植による再生の研究は遅れている。まず、閉鎖空間である頭蓋内では移植細胞の腫瘍性増殖は致命的となり得るため、腫瘍化の可能性については特に慎重な検討が必要である。また、上述のような脳の複雑な機能は、電気的・化学的シグナルを伝達する主体であるニューロンとその活動をサポートする多数のグリアによって構築される緻密な神経回路を基盤としているが、これらの制御メカニズムの多くは未だ明らかになっていない。従って、正常組織を損傷する可能性のある移植手技自体の安全性に加え、移植された細胞が既存の神経回路の機能を阻害することなく傷害領域に定着し協調的に機能することが保証されなければ、医療としては成立しない。これらの問題に対し、現在精力的に研究が行われているが、主な実験動物であるげっ歯類に比して寿命の長いヒトに対してこれらの安全性が示さ

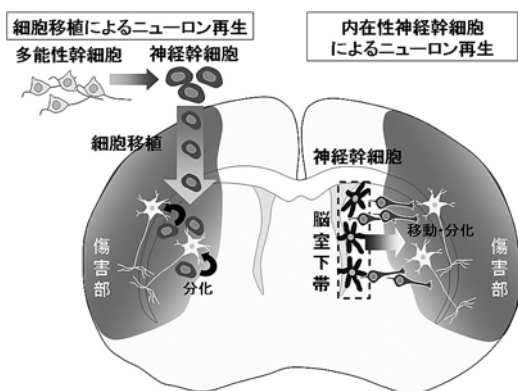


図1：ニューロン再生のアプローチ

ニューロン再生のための手段として、多能性幹細胞などから誘導した神経系細胞を傷害部に移植して定着させる方法（左）、脳室下帯の内在性幹細胞により産生されたニューロンを傷害部位へと誘導してニューロン再生を促進する方法（右）の2種類が存在する。

れるまでにはまだ多くの過程を要する（図1左）。

一方近年の研究から、成体脳にもニューロンを産生する神経幹細胞が存在することが明らかになり、潜在的なニューロン再生システムとして注目されている^{5,6)}。神経幹細胞は、脳形成過程においてニューロン・グリアの産生を担っている細胞であるが、ほとんどの領域ではこの過程の終了とともに分化・消失する。しかし、側脳室壁に存在する細胞層「脳室下帯」や海馬歯状回では、成熟後にも神経幹細胞が維持され、ニューロンを産生し続けている。特に脳室下帯で産生される幼若な新生ニューロンは高い移動能を有しており、脳傷害には損傷部に移動して成熟ニューロンへと分化する（図1右）。再生されるニューロンはごく少数であるため、機能的な再生を誘導するには不十分であるが、内在性の神経幹細胞を用いた再生医学的アプローチでは上述した多能性幹細胞の移植により生じる問題は発生しないため、臨床応用の可能性も十分に考えられる。平成22年度名古屋市立大学医学会賞の受賞対象となった論文は、脳室下帯の内在性幹細胞により産生された新生ニューロンが成体脳を遠くまで高速度で移動するメカニズムに関するものである⁷⁾。本稿では、その研究内容を含め、内在性のニューロン再生システム・脳の再生医療の展望について概説する。

2、内在性の神経幹細胞による傷害後のニューロン再生

脳傷害後のニューロン再生は、脳血管障害モデルや神経変性疾患モデルにおいて報告されているが^{5,6)}、その大部分はげっ歯類を用いた研究である。しかしこれらの疾患の患者死後脳でも同様に傷害部周辺に新生ニューロンが出現することから⁸⁻¹⁰⁾、ヒト脳にも類似のシステムが存在すると考えられている。

脳室下帯は側脳室外側壁に存在する細胞層で、単層の上皮細胞により脳室と隔てられている。ここに神経幹細胞が存在し、活発に増殖する中間的な前駆細胞を経て新生ニューロンが産

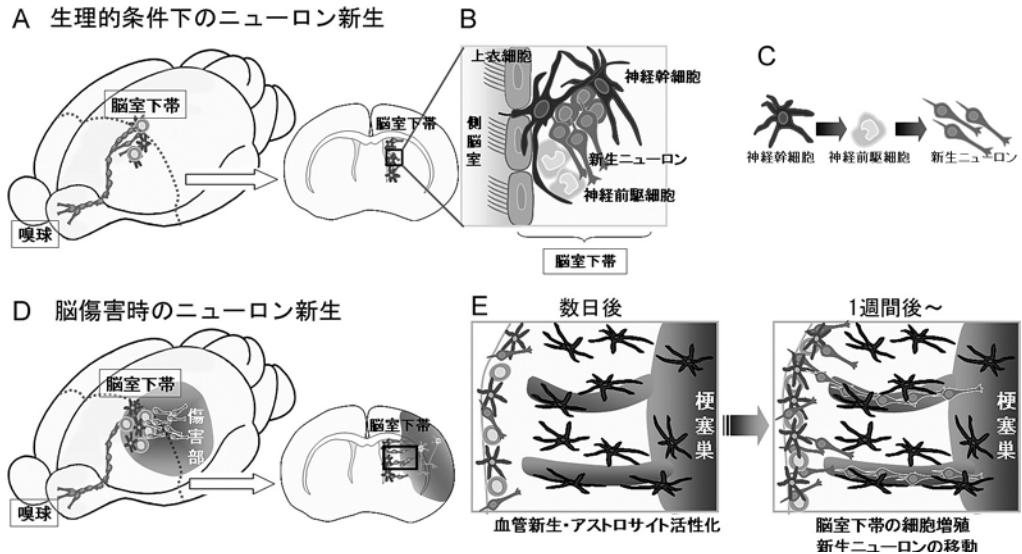


図2：成体脳の脳室下帯におけるニューロン新生・再生

A-C：生理的条件下でのニューロン新生。側脳室周囲に存在する脳室下帯で産生された新生ニューロンは長距離を移動して嗅球の介在ニューロンに分化する（A）。脳室下帯には、神経幹細胞が存在し、神経前駆細胞を経て新生ニューロンが産生されている（B・C）。

D-E：脳傷害時のニューロン新生。脳室下帯で産生された新生ニューロンの一部は、傷害部へと移動してニューロンを再生する（D）。脳梗塞モデルにおいて（E）、傷害数日後までに血管新生やアストロサイトの活性化などが生じ、1週間ほど経過すると脳室下帯での新生ニューロン産生が亢進して一部は血管やアストロサイトに沿って傷害部付近に移動していく。

生される¹¹⁾(図2A-C)。幼若な新生ニューロンは移動能が高く、成体脳内を脳の前端の嗅球までの長距離を高速で移動したのち、分化・成熟して嗅球の介在ニューロンとなる¹²⁻¹⁵⁾。生理的条件下では新生ニューロンの供給先は嗅球へと限定されているが、脳傷害後には新生ニューロンの一部はその移動経路を脱して傷害部へと供給される¹⁶⁻²⁰⁾(図2D)。筆者の所属する再生医学分野では、マウス脳梗塞モデルを用いて、梗塞部周囲のニューロン再生過程の詳細な解析を行ってきた。中大脳動脈を一過性に閉塞すると、この動脈の灌流域である線条体・隣接する大脳皮質では虚血・低酸素により細胞が脱落する。この直後より炎症反応、血管新生、ミクログリアやアストロサイトの活性化・増生が生じるが、1週間ほど経過すると脳室下帯における細胞増殖が亢進して新生ニューロンが増加する。この新生ニューロンの一部が、新生血管や活性化グリアの存在する線条体内を梗塞巣に向

かって移動していく(図2E)。このとき新生ニューロンは血管やアストロサイトに沿って移動するため^{17,21)}、これらの相互作用が新生ニューロンの移動制御に重要であることが示唆されるが、詳細なメカニズムはまだ明らかになっていない。

新生ニューロンの傷害部への移動に関して、脳の低い自己修復・再生能力と関連すると考えられるいくつかの問題点が存在する。脳室下帯で産生された新生ニューロンの大部分は本来の移動経路に沿って嗅球に移動してしまい、傷害部の再生に寄与する細胞はそのごく一部に過ぎない。更に、傷害部に向かう新生ニューロンの大部分は脳室下帯と隣接する線条体の内部に留まり、白質を超えて大脳皮質まで移動する新生ニューロンはごくわずかである。従って、この内在性の再生システムを再生医学的治療戦略として発展させるためには、新生ニューロンの移動制御メカニズムを明らかにし、産生された細

胞を効率よく傷害部に供給する手法の開発が不可欠である。

3, 成体脳における新生ニューロンの高速・長距離移動のメカニズム

生理的条件下では、脳室下帯で産生された新生ニューロンは嗅球へと移動するが、このとき吻側移動経路 (rostral migratory stream, RMS) と呼ばれる神経突起や多数のグリアが密に存在する脳実質から隔離された狭い領域を通っている¹²⁻¹⁴⁾ (図3 A)。RMSでは新生ニューロンは非常に高速で移動することができるため、我々はRMSにおける移動メカニズムが新生ニューロンの効率よい移動法の解明の鍵となると考え、新生ニューロンとRMSの微小環境の相互作用に着目して解析を行った⁷⁾。

RMSにおける新生ニューロンの移動形態には、脳形成過程で大規模に行われるニューロンの移動には見られない2つの顕著な特徴がある^{12-14, 22)}。ひとつは、新生ニューロン同士の独特の相互作用であり、新生ニューロンは鎖状の細長い細胞塊を形成し、互いを足場として乗り越えながら前進する移動方式をとる。もうひとつは、この鎖状の細胞塊を被覆するトンネル構造である。この構造はアストロサイトによって形成され、タンパク質の発現や細胞外タンパク質の取り込みを介して新生ニューロンの移動を制御していることが報告されている²³⁻²⁶⁾。つまりこの成体脳に特異的なトンネル構造が、成体脳内での新生ニューロンの移動制御に重要であることは示唆されていたが、新生ニューロンの周囲を囲むこの形態がどのようにして形成・維持されているかは分かっていなかった。これに対し我々は、新生ニューロン-アストロサイトの相互作用がこのトンネルの形成・新生ニューロンの高速移動の両者を制御するという新規のメカニズムを明らかにした。

この相互作用の分子メカニズムとして、我々は新生ニューロンが発現する分泌性タンパク質 Slit1 に着目した。Slit タンパク質は、脳形成過程において、その受容体 Robo を発現する細胞や軸索に対して反発性に作用し、細胞の移動や

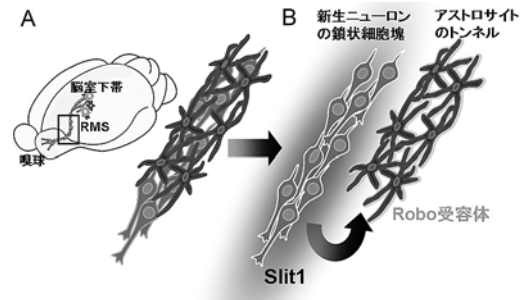


図3：成体脳 RMS における新生ニューロンの移動形態

A：RMS における新生ニューロン・アストロサイトの形態。成体脳を脳室下帯から嗅球まで長距離にわたって移動する新生ニューロンは、鎖状の細長い細胞塊を形成し、アストロサイトによって構成されたトンネルの内部を移動している。

B：RMS における Slit-Robo 発現パターン。RMS では新生ニューロンが分泌性タンパク質 Slit1 を発現し、その移動経路でトンネルを形成するアストロサイトが受容体 Robo を発現している。

軸索伸長の方向を制御する忌避性ガイダンス因子として知られている^{27, 28)}。しかし発達を終えた成体脳でも、RMSでは Slit のサブタイプのひとつである Slit1 が移動する新生ニューロンに発現していることが報告された²⁹⁾。前述の典型的なガイダンスモデルとは異なり、移動細胞自身が Slit を分泌するという興味深い発現パターンから (図3 B)、我々は Slit1 が新生ニューロンと周囲組織との相互作用に関与しているのではないかと考えた。

まず、新生ニューロンの移動における Slit1 の機能を明らかにするため、*Slit1* 遺伝子欠損 (*Slit1*^{-/-}) マウスの新生ニューロンの RMS における移動過程を詳細に解析した (図4 A)。脳室下帯・RMS・嗅球の連続性が保たれた脳スライスを培養し、このスライス中の RMS を連続的に撮影して、個々の新生ニューロンの挙動を経時的に記録したところ *Slit1*^{-/-} マウス脳では新生ニューロンの移動速度が40%ほど低下していた。この現象について生体内でも確認するため、レトロウイルスを局所注入して標識した新生ニューロンの3日後の分布を野生型・*Slit1*^{-/-} マウス間で比較したところ、すでに嗅

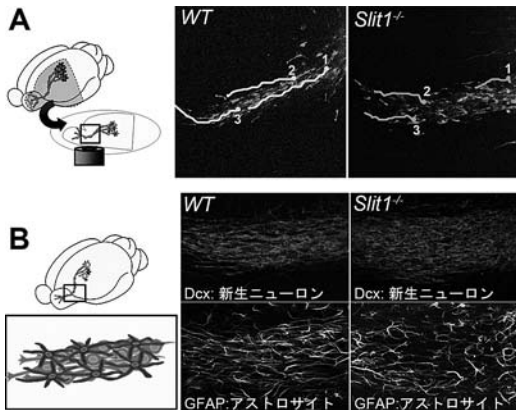


図4：*Slit1*^{-/-}マウス RMSにおける新生ニューロンの移動障害と組織学的異常

A：*Slit1*^{-/-}マウス・野生型 (WT) マウスの培養スライスのタイムラプス撮影。スライスを移動する蛍光標識された新生ニューロンの経路を線で示した。WTスライスでは新生ニューロンは直線的に嗅球側に向けて移動しているが(写真左)、*Slit1*^{-/-}スライスでは移動方向が不規則になり、速度も低下している(写真右)。

B：*Slit1*^{-/-}マウス・野生型 (WT) マウスの RMS の免疫染色像。新生ニューロン (Dcx 染色, 写真上段) の鎖状の細胞塊の形成には顕著な差異は見られないが、WT マウスの RMS において大部分の アストロサイト (GFAP 染色) の突起が鎖状細胞塊に沿って伸長するのに対し(写真左下)、*Slit1*^{-/-} マウスではアストロサイトの突起の分布・配列が不規則である(写真右下)。

球に到着している細胞の割合が *Slit1*^{-/-} マウスでは有意に低下していた。これらの所見から、Slit1 は新生ニューロンの高速移動に必要であると考えられた。

次に、*Slit1*^{-/-} マウスの RMS の形態・細胞構築を、免疫組織染色法や電子顕微鏡観察によって解析した。意外なことに、新生ニューロンは野生型マウスと同様に鎖状細胞塊を形成しており、顕著な異常は見られなかった。しかし、その周囲でトンネルを形成するアストロサイトの突起は、野生型マウスでは大部分が新生ニューロンの鎖に沿って並行に伸長しているのに対し、*Slit1*^{-/-} マウスではこの突起の方向性は不規則で、一部は新生ニューロンの細胞塊の内部に侵入していた(図4B)。これらの結果から、Slit1 は新生ニューロンの鎖状細胞塊の

形成ではなく、アストロサイトのトンネル形成の制御に関与していることが示唆された。

RMS では新生ニューロンが Slit1 を分泌するが、その受容体である Robo が RMS のどの細胞集団に存在するのかは分かっていなかった。脳内で発現している Robo のサブタイプである Robo1, Robo2, Robo3 について、それぞれの特異的抗体を用いて免疫染色を行い RMS における分布を調べたところ、Robo2・Robo3 が検出されたが、これらは特にトンネルを形成しているアストロサイトに強く発現していた。この発現パターンから、新生ニューロンの分泌する Slit1 が、アストロサイト上の受容体 Robo を介して直接的にその挙動を制御していることが推測された(図3B)。この可能性について、培養実験系を用いて Slit の RMS アストロサイトへの作用を検討した。Slit タンパク質を多量に含むゲル塊を培養皿の一部に固定し、脳室下帯・RMS から単離した Robo を発現しているアストロサイトを均一に平面培養したところ、Slit を含まないゲル塊と比べて Slit 含有ゲル上に分布するアストロサイトは明らかに少数であった(図5A)。これは、Slit がアストロサイトに対して反発性の作用を有することを示唆している。

そこで実際に、Slit1 を発現している野生型新生ニューロンと *Slit1*^{-/-} マウスの新生ニューロンがアストロサイトの形態に及ぼす影響を共培養実験にて比較したところ、新生ニューロンの鎖状細胞塊に沿ったアストロサイトの突起は新生ニューロンは発現する Slit1 によって並行に配列されること(図5B)、Slit1 が新生ニューロンと接したアストロサイトの形態をダイナミックに変化させること(図5C)、この形態変化がアストロサイト上の Robo 受容体を介していることが明らかになった。これらのアストロサイトとの相互作用が新生ニューロン由来の Slit1 欠損によって阻害されると、新生ニューロンの移動速度も低下した。これらの結果から、新生ニューロンは Slit1 発現によって周囲のアストロサイトの形態・分布をダイナミックに制御し、移動経路の形成・維持を行ってお

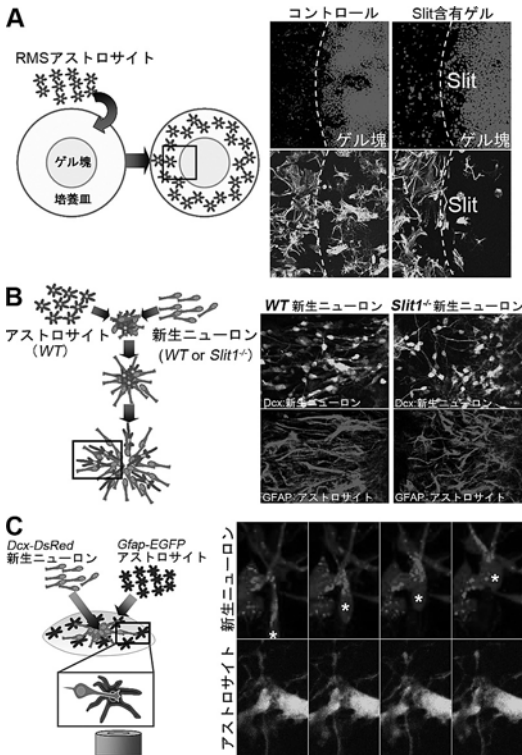


図5：Slitによるアストロサイトの分布・形態制御
A：Slit含有ゲルを用いたアストロサイト培養実験。Slitを含んだゲル上へのアストロサイトの分布は抑制されている。

B：*Slit1*^{-/-}新生ニューロン・野生型 (WT) 新生ニューロンとアストロサイトの共培養実験。Slit1を発現するWTの新生ニューロン (写真左上) の周囲に伸長したアストロサイトの突起は並行に並んでいるのに対し (写真左下), *Slit1*^{-/-}新生ニューロン (写真右上) の周囲のアストロサイトの突起の方向性は不規則である (写真右下)。

C：新生ニューロンの移動に伴うアストロサイトの形態変化。移動する新生ニューロン (上段, *) と接したアストロサイトの形態はダイナミックに変化していく (下段)。

り、この作用が自身の高速移動を可能にするという、新規の新生ニューロン-アストロサイト相互作用が明らかになった (図6)。

傷害部の再生のために新生ニューロンが適切な部位へと移動するには、正常組織が破壊され、炎症反応・グリア増生が生じた組織内を効率よく通過させるメカニズムが重要である。我々は、今回明らかにした新生ニューロンとア

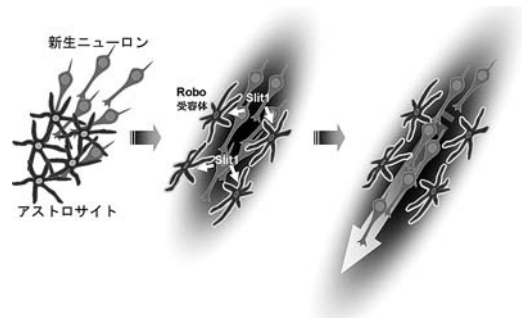


図6：アストロサイトとの相互作用による新生ニューロンの移動制御モデル

新生ニューロンはSlit1を発現することにより、周囲のアストロサイトの分布・形態を制御し、自らが高速で移動するための移動経路の維持を行っている。

アストロサイトの相互作用が、ニューロン再生過程にも重要であると考え、現在研究を進行中である。

4. 終わりに

神経・精神疾患を含む脳疾患には、多くの治療抵抗性の病態が存在する。しかし脳の再生医療の実現に向けて、まだ解決すべき課題は山積している。我々が明らかにした基礎的メカニズムはニューロン再生過程の一端に関わるものであるが、これらの基礎的知見を臨床医療に有用なものとして発展させるために、今後様々な場面を活用して積極的に他分野の基礎研究者や臨床研究者から示唆を頂きたいと考えている。

謝辞

平成22年度名古屋市立大学医学会賞の選考に携わった諸先生方に深く感謝申し上げます。受賞対象となりました論文は、2010年7月のNeuron誌に掲載されました。再生医学分野の開設とともに私が名古屋市立大学で研究を始めてそろそろ4年が経過しますが、この研究に含まれる実験のほとんどは本学で行ったものです。研究室の立ち上げに始まり論文が受理されるまで、学内の多くの皆様にご協力を頂き、大変心強く思いました。特に遺伝子改変マウスを用いた実験に関して、病態モデル医学分野・三

好一郎先生に大変ご尽力を頂きましたことを、この場を借りて御礼申し上げます。また、日頃から厚くご指導頂いております再生医学分野・澤本和延教授、そして多方面から私をサポートして下さっている再生医学分野の皆様改めて深く感謝致します。

文 献

- 1) Gerrard, L. et al.: *Stem Cells*, 23: 1234-41, (2005)
- 2) Takahashi, K. & Yamanaka, S.: *Cell*, 126: 663-76, (2006)
- 3) Yamanaka, S.: *Cell Stem Cell*, 1: 39-49, (2007)
- 4) Zhang, S. C. et al.: *Nat Biotechnol*, 19: 1129-33, (2001)
- 5) Kaneko, N. & Sawamoto, K.: *Brain Nerve*, 60: 319-28, (2008)
- 6) Kaneko, N. & Sawamoto, K.: *Neurosci Res*, 63: 155-64, (2009)
- 7) Kaneko, N. et al.: *Neuron*, 67: 213-23
- 8) Macas, J. et al.: *J Neurosci*, 26: 13114-9, (2006)
- 9) Marti-Fabregas, J. et al.: *Neurology*, 74: 357-65
- 10) Jin, K. et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 13198-202, (2006)
- 11) Doetsch, F. et al.: *Cell*, 97:703-16, (1999)
- 12) Doetsch, F. & Alvarez-Buylla, A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 14895-900, (1996)
- 13) Jankovski, A. & Sotelo, C.: *J Comp Neurol*, 371: 376-96, (1996)
- 14) Lois, C. et al.: *Science*, 271: 978- 81, (1996)
- 15) Petreanu, L. & Alvarez-Buylla, A.: *J Neurosci*, 22: 6106-13, (2002)
- 16) Arvidsson, A. et al.: *Nat Med*, 8: 963-70, (2002)
- 17) Yamashita, T. et al.: *J Neurosci*, 26: 6627-36, (2006)
- 18) Parent, J. M. et al.: *Ann Neurol*, 52: 802-13, (2002)
- 19) Jin, K. et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 4710-5, (2001)
- 20) Thored, P. et al.: *Stem Cells*, 24: 739-47, (2006)
- 21) Kojima, T. et al.: *Stem Cells*, 28: 545-54
- 22) Lois, C. & Alvarez-Buylla, A.: *Science*, 264: 1145-8, (1994)
- 23) Bolteus, A. J. & Bordey, A.: *J Neurosci*, 24:7623-31, (2004)
- 24) Garcia-Marques, J. et al.: *Glia*, (2009)
- 25) Mason, H. A. et al.: *J Neurosci*, 21: 7654-63, (2001)
- 26) Snappyan, M. et al.: *J Neurosci*, 29: 4172-88, (2009)
- 27) Nguyen Ba-Charvet, K. T. et al.: *Neuron*, 22: 463-73, (1999)
- 28) Wu, W. et al.: *Nature*, 400: 331-6, (1999)
- 29) Nguyen-Ba-Charvet, K. T. et al.: *J Neurosci*, 24: 1497-506, (2004)