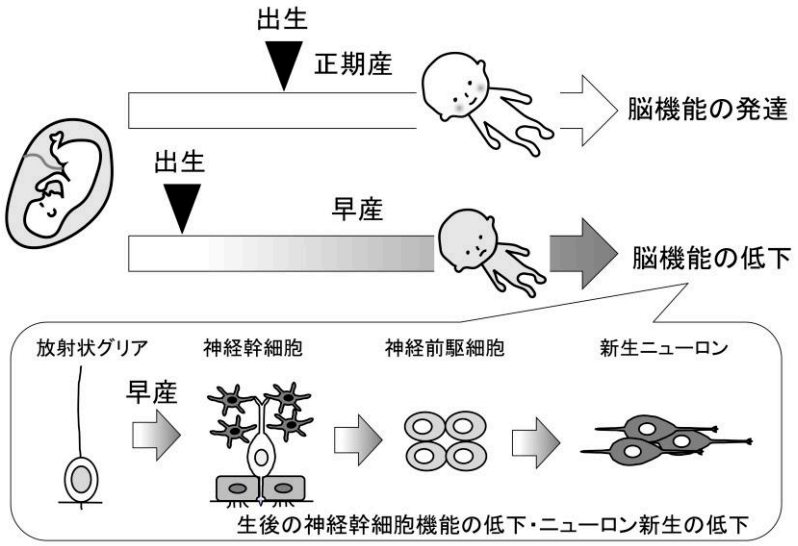
| 38　早産による神経幹細胞機能低下のメカニズム | 澤本　和延 |
|---|---|

**【目的】**早産児では、脳に明らかな傷害がないにもかかわらず、運動・認知機能の発達が障害されるケースが知られている。出生時期が早まることにより、脳発達に悪影響を及ぼしている可能性が示唆されているが、その病態や詳細なメカニズムについては十分に研究されていない。最近の研究で、生後の脳における脳発達や可塑性を調節するメカニズムとして、生後脳のニューロン新生が注目されている。哺乳類の側脳室外側壁に位置する脳室下帯では、生後も神経幹細胞が維持されており、新しいニューロン（新生ニューロン）を産生している。新生ニューロンは脳内の目的地まで移動して成熟し、神経回路に組み込まれることで、正常脳発達および脳機能維持のみならず、脳傷害後の神経再生や機能回復に貢献することが明らかになってきた。生後にニューロンを産生する脳室下帯の微小環境（神経幹細胞ニッチ）は、出生と共に形成されることが明らかになっている。このことから、早産が神経幹細胞ニッチの形成および維持に悪影響を及ぼす可能性があるが、その詳細は不明である。そこで本研究では、早産によるニューロン新生低下のメカニズムを解明し、予防・治療開発に貢献することを目的とする。

**【方法】**早産モデルマウスにおける脳室下帯のニューロン新生について、免疫組織化学染色法を用いて評価した。新生ニューロンの微細形態について、連続ブロック表面走査型電子顕微鏡を用いた連続切片撮像および 3 次元立体再構築により解析を行った。また、新生ニューロンにおける一次繊毛の動態は、Arl13b::Venus を導入した新生ニューロンのタイムラプスイメージングにより評価した。さらに、霊長類における生後のニューロン移動の解析には、コモンマーモセットを用いた。

**【結果】**早産が生後のニューロン新生に与える影響を調べるために、1 日早産モデルマウスの脳を解析した結果、脳室下帯における神経幹細胞の機能が低下したことから、生後のニューロン新生が早産に影響されることが示唆された。神経幹細胞から産生された新生ニューロンの微細形態を 3 次元的に解析した結果、新生ニューロンには一次繊毛が存在すること、その存在は霊長類でも保存されていることが明らかになった。さらに、生後の霊長類脳における新生ニューロンの移動を理解するために、生後コモンマーモセットの脳を解析した結果、脳室下帯から嗅球および大脳皮質へ移動する新生ニューロンが観察され、マウスおよびヒトの両方と共通した特徴を示すことが明らかになった。研究の成果は、早産による神経幹細胞機能の低下メカニズムを解明し、内在性の神経再生能力を利用した早産児の新規治療法開発へと応用するための基盤となるものである。

早産による神経幹細胞機能の低下



# 38. 早産による神経幹細胞機能低下のメカニズム

澤本　和延

*名古屋市立大学 大学院医学研究科 再生医学分野

Key words：脳室下帯，神経幹細胞，ニューロン新生，早産，　ニューロン移動

## 緒　言

近年、早産児の救命率は向上しており、早産で出生する児が増加している。これら早産児においては、しばしば神経発達過程が障害され、さまざまな運動・認知機能障害が生じる。早産児の脳傷害に対するこれまでの研究は、おもに低酸素・虚血・炎症に伴う白質傷害を対象としてきた。しかし近年、白質傷害が存在しない早産児においても、正期産児と比べ脳容量が低下することや、脳機能の発達障害を示すことが明らかとなってきた。以上の知見は、早産そのものが脳の発達に悪影響を及ぼしている可能性を示唆しているが、そのメカニズムは十分に研究されていない。

「生後脳のニューロン新生」は、生後における脳発達や可塑性を調節するメカニズムとして、近年活発に研究されている。胎性期には、神経幹細胞である放射状グリアが活発にニューロンを産生することで脳を構築していくが、生後には消失して新しいニューロンは作られないと考えられてきた。しかし近年の研究で、側脳室外側壁に位置する脳室下帯では、生後も神経幹細胞が維持されており、新しいニューロンを産生する能力を有することが明らかになってきた。脳室下帯で産生された新生ニューロンは、吻側移動流（rostral migratory stream、RMS）を通って嗅覚情報処理の一次中枢である嗅球へと移動し、神経回路へと組み込まれて嗅覚機能の制御に関与する。一方で、脳に傷害が生じると、脳室下帯の神経幹細胞が活性化し、産生された新生ニューロンは傷害部位へと移動して失われたニューロンの一部を再生する。これらのことから、脳室下帯のニューロン新生は、生後脳の発達や可塑性に寄与するだけでなく、脳傷害後の神経再生にも貢献することが示唆されている。

我々はこれまでに、正常脳におけるニューロン移動メカニズムおよび脳傷害後のニューロン再生過程について研究してきた。特に最近、胎性期の神経幹細胞であり通常生後に消失する放射状グリアが、新生児期の脳傷害により維持され、傷害部位へと移動する新生ニューロンの足場としてはたらくことを明らかにした［1］。放射状グリアは出生直後に上衣細胞やアストロサイト､生後の神経幹細胞に分化することで消失していく｡したがって、早産や新生児期の脳傷害といった周産期イベントがこのステップに影響を与えることで、神経幹細胞を維持する特殊な微小環境（神経幹細胞ニッチ）が正常に形成されない可能性が示唆されているが、その詳細なメカニズムは不明である。

最近の研究では、ヒトを含む霊長類でも生後脳のニューロン新生が保存されており、新生ニューロンは嗅球や大脳皮質へと活発に移動していることが明らかになった。このことは、周産期イベントに対して、生後脳のニューロン新生の制御メカニズムを利用した新たな治療戦略が考えられることを示唆する。ヒト新生児の神経再生を見据えた治療法を開発するためには、マウスモデルに加えて霊長類モデルでニューロン新生を理解する必要がある。

そこで本研究では、早産が脳室下帯のニューロン新生に与える影響を明らかにするとともに、産生された新生ニューロンの移動についてマウスおよびサルで評価することを目的とする。本研究の成果は、生後脳のニューロン新生メカニズムを用いた周産期イベントに対する新たな治療法開発の基盤となるものである。

*現在の所属：名古屋市立大学 大学院医学研究科 神経発達・再生医学分野

## 方法および結果

### 1. 早産によるニューロン新生低下機構

早産や新生児期の脳傷害といった周産期イベントでは、胎性期の神経幹細胞である放射状グリアから生後の神経幹細胞への分化が影響を受ける可能性がある。実際に我々は、新生児期の低酸素虚血および脳外傷モデルマウスにおいては、通常生後に消失する放射状グリアが維持されており、脳室下帯で産生された新生ニューロンはその放射状ファイバーを利用して傷害部位へと移動することを見いだした（図 1）［1］。そこで、早産により出生時期が早まった場合にも、脳室下帯における放射状グリアの分化および生後のニューロン新生に影響があるかを解析するため、1 日早産マウスモデルを作製して評価した。その結果、出生のタイミングが生後脳における脳室下帯のニューロン新生の維持および調節に重要であることが示唆された（未発表）。

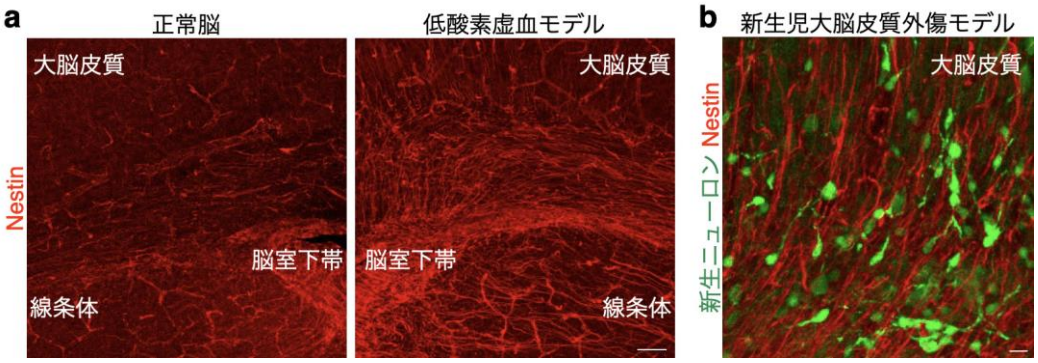



図 1. 周産期イベントが放射状グリアに与える影響

a） 脳室周囲白質軟化症モデルマウスの脳切片を放射状グリアマーカーである Nestin（赤）で免疫染色した像（スケールバー：50 μ m）。生後に消失する Nestin 陽性放射状グリアが、低酸素虚血傷害では維持されてファイバー状に観察される。

b） 新生児大脳皮質外傷モデルマウスの脳切片を Nestin（赤）および新生ニューロンマーカー（緑）で免疫染色した像（スケールバー：10 μ m）。新生ニューロンは放射状グリアのファイバーに沿って傷害を受けた大脳皮質へと移動する。文献［1］より改変。

### 2. 生後マウス脳を移動する新生ニューロンの微細形態

生後の RMS においては、新生ニューロンはお互いに接着し、鎖状の細胞塊を形成しながら高速で嗅球へと移動する。しかし、移動する新生ニューロンの微細形態については多くの点で不明である。そこで、広範な脳領域を 3 次元的に微細形態レベルで観察可能な連続ブロック表面走査型電子顕微鏡（SBF-SEM）を用いて、RMS を移動する新生ニューロンの連続電子顕微鏡写真を撮像し、その微細形態を包括的に解析した。ミトコンドリアやゴルジ体といった細胞内小器官の細胞内分布解析から、これらが移動周期に合わせてその細胞内局在を変化させていることが示唆された（図 2a）。さらに、新生ニューロンの 1 対の中心小体からは、一次繊毛と呼ばれる細胞外シグナルのアンテナが伸長していることを発見した（図 2b）。このように、3 次元微細形態解析から、新生ニューロンの移動に重要な形態的特徴を明らかにすることができた。

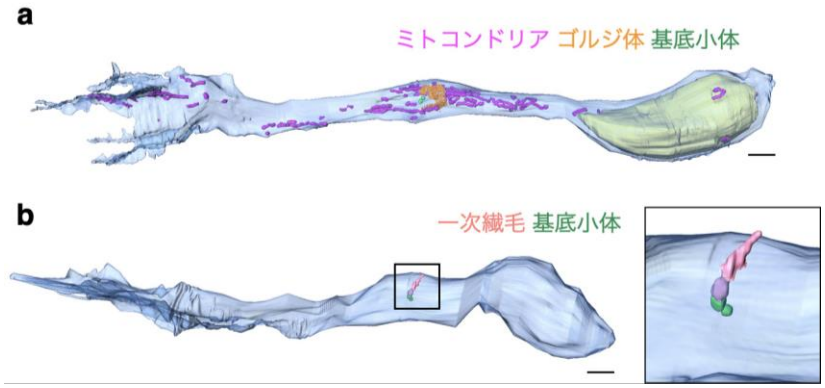



図 2. 生後脳内を移動する新生ニューロンの微細形態

a) 新生ニューロンおよびその細胞内小器官の立体構築像。連続ブロック表面走査型電子顕微鏡を用いた 3 次元電子顕微鏡撮像から立体再構築した新生ニューロン（青）。ミトコンドリア、ゴルジ体、中心小体（基底小体）はそれぞれ紫、橙、緑で示す。核は黄色で示す。

b) 新生ニューロンにおける一次繊毛の立体構築像。新生ニューロンの一次繊毛（桃色）は基底小体から伸長し、細胞体が移動する直前に細胞外に突出する。左の四角内領域を右図で拡大して示している。スケールバー：2μm、a）b）共に文献［2］より改変。

ニューロンの移動における一次繊毛の動態を調べるために、繊毛局在低分子量 G タンパク質である Arl13b に緑色蛍光タンパク質 Venus を融合したプローブを新生ニューロンに導入し、タイムラプスイメージングでその動態を解析した。その結果、一次繊毛は通常、先端が細胞内に埋もれているが、細胞体が移動する直前 に一次的に細胞外へと突出する様子が観察された。これらの結果から、移動周期に合わせて一次繊毛が局在変化を示し、細胞外のシグナル受容に何らかの役割を果たす可能性が示唆された。

生後脳における新生ニューロンの移動は、マウスだけでなく、ヒトを含む霊長類に至るまで進化的に保存されている。そこで、新生ニューロンにおける一次繊毛の存在が霊長類でも保存されているかどうか調べた結果、マカクサルの RMS および嗅球では、鎖状に連なって移動する新生ニューロンが観察され、それらには Arl13b 陽性の一次繊毛が存在することが明らかになった（図 3）。

以上の結果から、げっ歯類から霊長類に至るまで、生後脳を移動する新生ニューロンには一次繊毛が存在し、移動周期に合わせてダイナミックにその局在を変化させていることが明らかになった［2］。

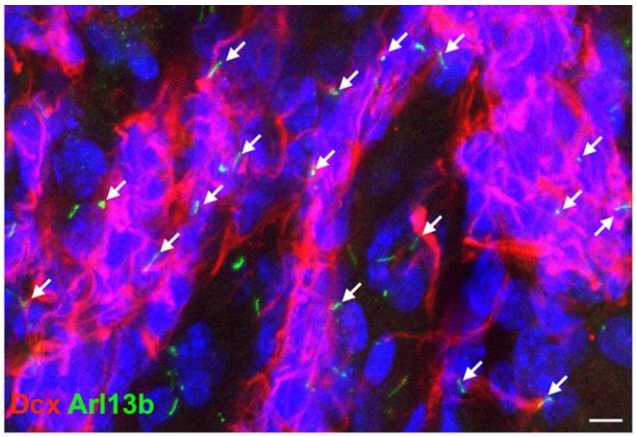



図 3. マカクサルの生後脳内を移動する新生ニューロンと一次繊毛

マカクサルの RMS における新生ニューロン（Dcx、赤）および一次繊毛（Arl13b、緑）の染色像（スケールバー：5μm）。鎖状に連なって移動する新生ニューロンには、一次繊毛が存在している（矢印）。文献［2］より改変。

### 3. 生後サル脳におけるニューロン移動

マウスモデルにおいては、早産により脳室下帯の神経幹細胞機能が低下し、ニューロン移動にも影響が出ることが明らかになった。新世界ザルであるコモンマーモセットは、脳室下帯の細胞構造がヒトのそれと類似していることから、ニューロン新生研究の新たなモデルとして注目されている。

そこで、新生児期のコモンマーモセット脳がヒト早産研究を見据えたモデル動物として有用かどうかを評価するため、新生ニューロンの脳内における移動を評価した。その結果、新生児コモンマーモセット脳では、多くの新生ニューロンが脳室周囲から大脳皮質へと放射状に移動している様子が観察された。一部の新生ニューロンは血管に沿って鎖状の細胞塊を形成していたことから、マウス RMS で観察されるニューロン移動パターンが、新生児コモンマーモセットの大脳皮質でも観察されることが分かった（図 4）。これらの特徴は、ヒト新生児でも観察される共通の特徴であることから、コモンマーモセットが新生児期のニューロン新生研究に有用であることが示唆された［3］。

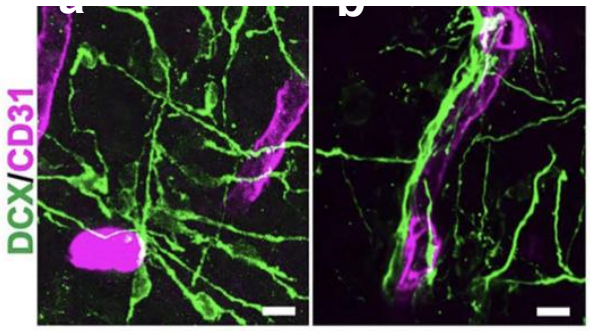



図 4. 生後コモンマーモセット脳内を移動する新生ニューロンと血管

a） 生後 1 ヶ月齢のコモンマーモセット大脳皮質における新生ニューロン（Dcx、緑）および血管（CD31、紫）の染色像（スケールバー : 10 μ m）。移動する新生ニューロンの多くは、血管に沿っていない。

b） 生後 4 ヶ月齢のコモンマーモセット大脳皮質における新生ニューロン（Dcx、緑）および血管（CD31、紫）の染色像（スケールバー : 10 μ m）。移動する新生ニューロンは鎖状の細胞塊を形成して血管に沿って移動する。a）b）共に文献［3］より改変。

## 考　察

本研究では、1. 早産モデルマウスにおける脳室下帯のニューロン新生低下、2. 神経幹細胞から産生された新生ニューロンの微細形態、3. 生後サル脳におけるニューロン移動、の3点を明らかにした。出生は、胎生期の神経幹細胞が生後の神経幹細胞へと変化するタイミングと一致していることから、今後、早産が生後の神経幹細胞ニッチの形成および維持に与える影響およびその分子機構を明らかにする必要がある。

生後の脳内を移動する新生ニューロンには一次繊毛が存在することを明らかにしたが、その役割については依然として不明である。一次繊毛は、細胞外シグナルの受容アンテナとしてはたらく。最近の報告では、マウスやサル、ヒトにおいてセロトニン神経繊維がRMSに沿って伸長していること、セロトニンが新生ニューロンの移動を促進することが示唆されている。脳室下帯の新生ニューロンの一次繊毛にセロトニン受容体が局在しうる［2］ことから、一次繊毛によるニューロン移動の制御にセロトニンが関与する可能性がある。

生後脳における新生ニューロンの移動および一次繊毛の局在は、霊長類でも保存されていることを明らかにした。今後、コモンマーモセットのようにヒトに類似した脳室下帯を有する霊長類モデルを用いて、早産が生後のニューロン新生に与える影響を詳細に解析し、早産が引き起こすさまざまな脳障害の分子細胞生物学的メカニズムを明らかにする必要がある。さらに、マウスモデルで明らかになるメカニズムを利用した治療法に

ついて、コモンマーモセットを用いて評価することにより、ヒトへの応用を見据えた戦略を立てることが可能になると考えられる。本研究の成果は、早産による神経幹細胞機能の低下メカニズムを解明し、内在性の神経再生能力を利用した新規治療へと応用するための基盤となるものである。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋市立大学大学院医学研究科神経発達・再生医学分野の澤田雅人および同大学院医学研究科新生児・小児医学分野の岩田欧介である。

## 文　献

1） Jinnou H, Sawada M, Kawase K, Kaneko N, Herranz-Pérez V, Miyamoto T, Kawaue T, Miyata T, Tabata Y, Akaike T, García-Verdugo JM, Ajioka I, Saitoh S, Sawamoto K. Radial glial fibers promote neuronal migration and functional recovery after neonatal brain injury. Cell Stem Cell. 2018 Jan 4;22(1):128-137.e9. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29276142 DOI: 10.1016/j.stem.2017.11.005.

2） Matsumoto M, Sawada M, García-González D, Herranz-Pérez V, OginoT, Nguyen HB, Thai TQ, Narita K, Kumamoto N, Ugawa S, Saito Y, Takeda S, Kaneko N, Khodosevich K, Monyer H, García-Verdugo JM, Ohno N, Sawamoto K. Dynamic changes in ultrastructure of the primary cilium in migrating neuroblasts in the postnatal brain. J Neurosci. 2019 Dec 11;39(50):9967-9988. Epub 2019 Nov 4. PMID: 31685650 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1503-19.2019.

3） Akter M, Kaneko N, Herranz-Perez V, Nakamura S, Oishi H, Garcia-Verdugo JM, Sawamoto K. Dynamic changes in the neurogenic potential in the ventricular-subventricular zone of common marmoset during postnatal brain development. Cereb Cortex. 2020 Feb 28. pii: bhaa031. [Epub ahead of print] PMID: 32108222 DOI: 10.1093/cercor/bhaa031.