

一過性全脳虚血ラットの帯状回における
doublecortin 陽性細胞: 虚血後急性期から慢性期に
かけての変化 (要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系脳神経外科学専攻

後藤 公聖

修了年 2016 年

指導教員 大島 秀規

【背景】

1990年代に、哺乳類の成熟脳においても一部で神経新生が起こっていることが発見されて以来¹、神経新生に関する研究が盛んに行われてきている。今日では、海馬歯状回の顆粒細胞下帯 (subgranular zone: SGZ) と嗅球の尾側の側脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) において哺乳類の成熟脳における神経新生が確認されている^{2,3,4}。新生されたニューロンは特殊な形態で移動を行い、その一部が成熟化することが知られており⁴、また脳傷害後にはそれらが促進することが報告されている^{5,6,7,8,9}。

Doublecortin (DCX) は中枢神経細胞の成熟過程で出現し、遊走神経細胞に広く発現する微小管結合タンパクであり¹⁰、成熟脳の神経新生および神経細胞の移動に関与している¹¹。そのため、幼弱なニューロンのマーカーとして知られている¹¹。成熟脳における DCX 陽性神経細胞は、そのほとんどが γ -aminobutyric acid (GABA) 作動性介在ニューロンであることも報告されている¹²。

成熟脳における DCX 陽性細胞に関して、これまで海馬における神経新生に関連した報告は多い一方で、海馬以外の皮質における DCX 陽性細胞に関する研究は、その存在が報告されているにも関わらず海馬に比較して僅少である。著者が所属した大学院の研究グループでは、以前よりラット成熟脳の帯状回皮質にも多くの DCX 陽性ニューロンが存在すること¹³、一過性全脳虚血 (transient global brain ischemia; GBI) 後の急性期に、帯状回の DCX 陽性細胞数が

減少することを報告してきた^{14,15}。帯状回は外界からの刺激や情動変化により絶えず修飾を受けており、帯状回の機能障害による症状はその経過の中でダイナミックに変化することが知られており、それには帯状回の機能的・構造的な再構成が関わっているものと考えられている^{16,17}。本研究では、この領域における DCX 陽性細胞の、GBI 後の急性期から慢性期にかけての変化を形態学的に検討した。

【材料と方法】

成熟個体オス Sprague-Dawley (SD) ラット (体重 250~300g) を用いて、4 vessel occlusion model (両側椎骨動脈の電気焼灼と両側総頸動脈の一過性の閉塞) による GBI を作成した。Sham 群は血管の露出のみを行い閉創した。灌流固定を GBI 操作後 7 日後と 90 日後に 4% paraformaldehyde にて行い、脳冠状断切片を作成した。ラットを 6 群:① sham 手術後 7 日で灌流固定した群 (Sham+A 群)、② 3 分間の GBI 負荷後 7 日で灌流固定した群 (GBI 3+A 群)、③ 10 分間の GBI 負荷後 7 日で灌流固定した群 (GBI 10+A 群)、④ sham 手術後 90 日で灌流固定した群 (Sham+C 群)、⑤ 3 分間の GBI 負荷後 90 日で灌流固定した群 (GBI 3+C 群)、⑥ 10 分間の GBI 負荷後 90 日で灌流固定した群 (GBI 10+C 群) に分け DCX 陽性細胞の変化を比較検討した。脳冠状断切片を作成した後、DCX の 3'3-diaminobenzidine (DAB) 発色による免疫組織化学染色を行うとともに、DCX 陽性ニューロンの性質について調べるために

neuron-specific nuclear protein (NeuN) 、 parvalbmin (PV) との共陽性について蛍光免疫組織化学染色を行った。さらに Fluoro-Jade B (FJB) および Iba-1 による免疫組織化学染色を行い、神経細胞死ならびに組織傷害の有無を確認した。

【結果】

帯状回を細胞構築上の違いから吻側の前帯状回皮質 (anterior cingulate cortex: ACC) および尾側の後脳梁膨大部皮質 (retrosplenial cortex: RS) の亜区域に分け、各領域における DCX 陽性ニューロンを DAB 発色による組織切片上で観察し、単位面積当たりの DCX 陽性細胞数を各群間で比較した。

ACC について、虚血後急性期群 (Sham+A, GBI 3+A, GBI 10+A 群) 間で単位面積当たりの DCX 陽性細胞数を統計学的 (一元配置分散分析、および tukey test による post-hoc 検定) に比較した結果、Sham+A と GBI 3+A 群間では有意な差を認めなかった ($p=0.642$) が、Sham+A と GBI 3+A 群に比べて GBI 10+A 群では有意に減少していた。虚血後慢性期群 (Sham+C, GBI 3+C, GBI 10+C 群) 間においても同様の比較を行った結果、Sham+C と GBI 3+C 群間では有意な差を認めなかったが、Sham+C と GBI 3+C 群に比較して GBI 10+C 群では有意に減少していた。

RS においても ACC と同様の比較検討を行った。虚血後急性期群 (Sham+A, GBI 3+A, GBI 10+A 群) 群間で単位面積当たりの

DCX 陽性細胞数を比較した結果、Sham+A と GBI 3+A 群間で有意な差は認めなかった ($p=0.418$) が、Sham+A と GBI 3+A 群に比較して GBI 10+A 群で有意に減少していた。虚血後慢性期群 (Sham+C, GBI 3+C, GBI 10+C 群)間でも同様に比較したところ Sham+C と GBI 3+C 群間で有意な差を認めなかった ($p=0.455$) が、Sham+C と GBI 3+C 群に比べて GBI 10+C 群で有意な減少を認めた。

DCX 陽性ニューロンのなかで、NeuN が共陽性となるものが 70%前後と高率に認められた。ACC、RS 各領域において、その共陽性率は虚血時間、虚血後期間という要因について二元配置分散分析を行った結果は、いずれの要因に関しても有意な差を認めなかった。

DCX 陽性ニューロンのなかで、PV が共陽性となるものが 90%前後と高率に認められた。ACC、RS 各領域において、その共陽性率は虚血時間、虚血後期間という要因について二元配置分散分析を行った結果、いずれも有意な差を認めなかった。

FJB 陽性細胞は、虚血負荷後急性期の GBI 10+A 群の海馬 CA1 領域においてのみ観察され、いずれの群でも ACC および RS 領域では観察されなかった。これに加えて、Iba-1 陽性細胞を ACC および RS 各領域で観察したところ、活性化型ミクログリアは観察されず、全てが非活性化型ミクログリアの形態を保っていた。この結果は、GBI 10+C 群において観察される海馬領域の神経細胞死が、sham+A/C、GBI 3+A/C 群においては惹起されないこと、またその他の皮質領域のうち少なくとも ACC、RS においては GBI 10+A/C

群でも神経細胞死はおこらないことを示している。

【考察】

本研究は、ラットの GBI 3+A/C 群では、ACC および RS における DCX 陽性細胞数に変化はないことを明らかにした。SD ラットによる 3 分間の 4-vessel occlusion モデルは、海馬の遅発性神経細胞死が起こらない程度の軽度な虚血モデルであり、これにより一定期間の虚血耐性 (ischemic tolerance) がもたらされると報告されている¹⁸。今回、この虚血耐性の獲得に関係するような変化は、DCX 陽性細胞の観察では認められなかった。GBI 10+A/C 群では、ACC、RS いずれも急性期、慢性期ともに DCX 陽性細胞数は有意な減少を示した。しかし、ACC、RS において神経細胞死がおこらないことが示されており、これは DCX 陽性細胞数の減少の原因が虚血によるネクロシスやアポトーシスではないことを示している。DCX の機能や性質から、DCX 陽性ニューロンは、成体ラットの皮質の再構築 (remodeling) を担う潜在能力を有するニューロンである可能性がある^{14,15}。したがって本研究の結果は、GBI 10 分により帯状回での DCX 陽性細胞数が有意に減少し、虚血後の慢性期においてもそれは改善されないことから、皮質の再構築に関する潜在能力の低下を引き起こした可能性がある。

NeuN は、成熟脳において分裂活性を失った未熟ニューロン (post-mitotic neuron) 以降に発現し、成熟ニューロンのマーカーとし

て広く知られている^{19,20,21}。本研究結果において DCX 陽性細胞との高い共陽性率をいずれの群でも認めたのは、帯状回で観察される DCX 陽性細胞は、虚血の有無に関係なく、成熟度が進んだ段階で幼若性を保持している神経細胞群であったためと考えられる。本研究で GBI により帯状回での DCX 陽性細胞が減少した理由として、細胞の成熟度が考えられる。帯状回では GBI による神経細胞死を認めないことに加えて、虚血によりニューロンが幼若化するという報告はないことから、DCX 陽性細胞数の減少は、虚血に伴って生じた事象により細胞の成熟が促進された結果、DCX の発現が消失したことが考えられる。

帯状回での DCX / NeuN 共陽性率が変化しないにも関わらず単位面積当たりの DCX 陽性細胞数が減少したもう一つの可能性として、DCX / PV 共陽性ニューロンの機能的変化による DCX の発現の消失が考えられる。PV はカルシウム結合タンパクであり、PV 陽性ニューロンは GABA を神経伝達物質とする抑制性の介在ニューロンである。大脳皮質において、形態学的には籠細胞、シャンデリア細胞に陽性で²²、電気生理学的に fast-spiking 細胞であるという特徴を持っており^{23,24}、PV の機能障害により統合失調症、双極性障害、大うつ病などの脳障害をきたすことが知られており²⁵、皮質の微小神経回路において重要な役割を担っている。一過性の虚血により PV 陽性ニューロンの樹状突起構造が一過性に消失し、樹状突起の形態が回復した後も GABA 作動性シナプス網の活動性の機能障

害は残存したという報告がある²⁶。GBI 10 分による DCX 陽性細胞の減少は、DCX と共陽性を示す PV 陽性ニューロンが幼若性を失い、皮質の再構築を行う潜在能力が低下する可能性に加えて、皮質の PV 陽性ニューロンの機能的変化により、GABA 作動性シナプス網の活動性低下、皮質における微小神経回路の変化、興奮と抑制のバランスの崩れなどを生じて、神経細胞死を認めないにも関わらず、機能的な欠損をもたらす可能性を示している。しかしながら、虚血負荷による PV 陽性細胞の機能的変化に伴い DCX の発現が消失するかは明らかになっておらず今後の研究課題である。

【引用文献】

1. Reynolds BA, Weiss S, (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255 (5052), 1707-1710
2. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22, 629-634
3. Rakic P, (2002) Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22, 614-618
4. Lledo PM, Alonso M, Grubb MS, (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7, 179-193
5. Walter C, Murphy BL, Pun RY, Spieles-Engemann AL, Danzer SC, (2007) Piocarpine-induced seizures cause selective time-dependent change to adult-generated hippocampal dentate granule cells. *J Neurosci* Jul 27(28), 7541-7552
6. Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O, (2007) Long-term neuroblast migration along blood vessels in area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38, 3032-3039
7. Thau-Zuchman O, Schohami E, Alexandrovich AG, Leker RR, (2010) Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 1008-1016
8. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O, (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8, 963-970
9. Yamashita T, Ninomiya M, Acosta PH, Garcia-Verdugo JM, Sunadori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K, (2006) Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci*, Jun 14; 26(24): 6627-6636

10. Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Scaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J, (1999) Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23, 247-256
11. Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brabdt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G, (2003) Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 467, 455-463
12. Cai Y, Xiong K, Chu Y, Luo DW, Luo XG, Yuan XY, Struble RG, Clough RW, Spencer DD, Williamson A, Kordower JH, Patrylo PR, Yan XX, (2009) Doublecortin expression in adult cat and primate cerebral cortex relates to immature neurons that develop into GABAergic subgroups. *Exp Neurol* 216, 342-356
13. Kutsuna N, Suma T, Takada Y, Yamashita A, Oshima H, Sakatani K, Yamamoto T, Katayama Y, (2012) Decrease in doublecortin expression without neural cell death in rat retrosplenial cortex after stress exposure. *Neuroreport* 23, 211-215
14. Kutsuna N, Murata Y, Eriguchi T, Takada Y, Oshima H, Sakatani K, Katayama Y, (2013) DCX-expressing neurons decrease in the retrosplenial cortex after global brain ischemia. *Adv Exp Med Biol* 765, 115-121
15. Kutsuna N, Yamashita A, Eriguchi T, Oshima H, Suma T, Sakatani K, Yamamoto T, Yoshino A, Katayama Y, (2014) Acute stress exposure preceding transient global brain ischemia exacerbates the decrease in cortical remodeling potential in the rat retrosplenial cortex. *Neurosci Res* 78, 65-71

16. Nicholson BD, (2004) Evaluation and treatment of central pain syndromes. *Neurology* 62, S30-S36
17. Tahta K, Cirak B, Pakdemiri E, Suzer T, Tahta F, (2007) Postoperative mutism after removal of an anterior falicine meningioma. *J Clin Neurosci* 14, 793-796
18. Zhou AM, Li WB, Li QJ, Liu HQ, Feng RF, Zhao HG, (2004) A short cerebral ischemic preconditioning up-regulates adenosine receptors in the hippocampal CA1 region of rats. *Neurosci Res* 48, 397-404
19. Zhao C, Deng W, Gage FH, (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660
20. Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H, (2008) Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 18, 108-115
21. Von Bohlen Und Halbach, (2007) Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 329, 409-420
22. DeFelipe J, Lopez-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larranaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, (2013) New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci* 14, 202-216
23. Kawaguchi Y, Kondo S, (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* 31, 277-287
24. Kubota Y, (2014) Untagling GABAergic wiring in the cortical microcircuit. *Curr Opin Neurobiol* 26, 7-14
25. Torrey EF, Barci BM, Webster MJ, Bartko JJ, Meador-Woodruff JH, Knable MB, (2005) Neurochemical markers for schizopherenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biol Psychiatry* 57,

252-260

26. Xie Y, Chen S, Wu Y, Murphy TH, (2014) Prolonged deficits in parvalbumin neuron stimulation-evoked network activity despite recovery of dendritic structure and excitability in the somatosensory cortex following global ischemia in mice. *J Neurosci* 34, 14890-14900