総説

培養脳スライスにおいても ニューロンの発芽は起こるか？

塩野義製薬(株) 創薬第二研究所 坂口卓也

Axonal sprouting is a form of morphological plastic change of the neurons. It is proposed to underlie long-term changes in brain function and take place even in mature brain. Electrophysiological analysis revealed that chronic stress and antidepressants induce axonal degeneration and sprouting of locus coeruleus noradrenergic neurons in adult rat brain, respectively. Sprouting of hippocampal neurons was represented in the slice cultures of the hippocampus from 1-week old rat. This phenomenon was found to be specific for CA3 pyramidal neurons. Possible molecular mechanisms for neuron-specific morphological plasticity are discussed, referring to results from other laboratories.

brain, hippocampus, locus coeruleus, neuron, slice culture, sprouting

ヒトをはじめ動物には、学習することにより新たな知識を獲得したり、変化する環境に次々と適応して行く能力が備わっている。そのプロセスでは、脳に存在するニューロン〔神経細胞〕をつなぐシナプスで、神経情報伝達効率の変化が生じると考えられている。シナプスは、神経伝達物質を放出するシナプス前膜、伝達物質に感受性を持つ受容体が存在するシナプス後膜、そして両者間の間隙という3つのコンパートメントから成立する。シナプス伝達効率の変化は、伝達物質放出量、および受容体の感受性の変化の結果起こるものであり、その基盤にはこれらのファクターを制御する分子の機能が関与している。

ニューロン構成分子がダイナミックに変化するという概念は、脳の機能を理解する上でスムーズに受け容れられているものである。しかし、これよりマクロな、ニューロンの形態となると、容易には変化しないという見方が一般的である。特に、哺乳動物脳の構造は個体が成熟すると固定されてしまい、損傷でも受けない限り決して変化しないと信じられて来た。この古典的な概念に対抗し、脳とはその構造がダイナミックに変化し得る器官であり、ニューロンの形態は日常茶飯事に変化しているとする考え方が存在する。

この仮説を実証しようと、まず末梢神経系を材料に実験を試みたのが、Purvesである。彼は、生きているニューロンを染色する方法を用い、マウスの単一ニューロンを支配するシナプスの結合様式が週単位で経時的に変化していることを、リアルタイム像としてとらえることに成功した。さらに、脳においても、ニューロンの樹状突起の形態が常に変化していることを示唆する報告を行っている〔文献1を参照〕。

本総説ではまず、ニューロンの突起である軸索に新たな側枝が形成される“発芽”と呼ばれる現象が、成熟脳で起こることを示した研究を紹介する。後半では、発芽の分子機構を解析する手段としての、脳のスライスを培養した標本とその応用について述べてい

1. 環境変化と青斑核ノルアドレナリン・ニューロンの形態変化

ノルアドレナリン〔NA〕は自律神経系である交感神経系を司る伝達物質で、放出されると、心拍数の増大、瞳孔散大、発汗促進など、身体を賦活化する現象を促す。一方、脳には脳そのものを賦活化するNAシステムがある。脳幹に存在する青斑核は、ラットではおよそ1600個〔ヒトではその10倍〕のNAニューロンの集合である。出力ケーブルにあたる軸索は広範に脳を支配し、青斑核ニューロンが活動すると、その終末から脳全体にNAが放出されると考えられる。この青斑核ニューロンが脳へ軸索を送る、言い換えれば“投射”する様式は、外界からの刺激によりダイナミックに変化する。

Application of brain slice cultures for investigating neuronal sprouting

Takuya SAKAGUCHI

Discovery Research Laboratories II, Shionogi & Co., Ltd.

未熟な哺乳類の脳のニューロンは、それ自身の活動に依存し、あるいは損傷に反応して形態を変化させる。形態は元に戻ることなく維持され続けるので、この現象は“弾性”の逆概念である“可塑性”に基づく“可塑的变化”と呼ばれる。脳が成熟すると、一般的にニューロンの可塑性が著しく低下するが、青斑核ニューロンには高い可塑性が観察される。我々は、電気生理学的手法を用いることにより、ニューロンの形態変化である発芽を定量化することを試みた(図1)。まず、成熟ラットの脳が損傷された場合に惹起される青斑核ニューロンの発芽を定量化することに成功した我々は²⁾、環境変化により青斑核ニューロンに発芽が起こり得るかという問題を検討した。

動物にストレスを与え続けると、大脳皮質におけるNA受容体、中でも β 受容体数に変化が生ずる。この β 受容体は、NAニューロンの軸索終末が減少した脳部位において数が増加することが知られていた。両現象を考え併せ、ストレスは皮質の青斑核ニューロン軸索数の変化を介し β 受容体の数に影響を与えているのではないかと仮説を立て、検討を行った³⁾。まず適応できるとされる弱いストレス、1日に1時間づつラットを拘束し37℃の水に浸けるというストレスを2週間にわたり負荷すると、青斑核ニューロンが発芽を起こし皮質への投射が増大することを示唆する結果が得られた。

ところが、適応の限界を超えと思われる6時間拘束ストレスを2週間続けると、皮質へのNA投射は逆に減少した⁴⁾。しかも、やはり強烈な強制走行ストレスの負荷により惹起された皮質NA線維の減少は、動物の行動と対応するものであった。NAニューロンの皮質投射量が減少したラットでは運動量の低下が観察されたのに対し、投射量が正常域を超えなかった動物では、運動異常も弱かったのである⁵⁾。

Nakamuraは、ストレスを慢性的に負荷され運動量が顕著に低下した動物が、うつ病モデルとして用いられている点に着目した。そして、抗うつ薬の慢性投与により病態が改善されて行くプロセスで、青斑核から皮質へのNA投射が増大しつつあるのではないかとこの予測を立てたのである。彼は、最終的に、抗うつ薬は大脳皮質においてNAニューロンの軸索を発芽させることを形態学的に証明することに成功した^{6)・7)}。続いてKitayamaらはストレス負荷による皮質NA線維の変性を形態学的に確認している⁸⁾。

上述した一連の結果をまとめたものが、図1である。実際、痴呆症とうつ病を併発した患者で青斑核ニューロンが多く変性しているという症例報告があり⁹⁾、図

図1 ストレス負荷と抗うつ薬投与が惹起する青斑核ニューロンの形態変化。上、ストレスを長期間負荷すると、大脳皮質に投射する青斑核ニューロンの軸索が崩壊、あるいは退縮して行く。下、抗うつ薬を慢性投与すると、ニューロンが発芽を起こし、大脳皮質への投射が増大する。

発芽の定量化には、電気生理学的手法を用いた。興奮性細胞であるニューロンの膜の一部を電的に刺激すると“活動電位”が発生し、細胞全体に伝導する。大脳皮質に青斑核ニューロンが投射している場合、皮質を刺激すると青斑核ニューロンの軸索膜に発生した電位は、通常の神経伝導とは逆方向に細胞体膜へと伝導する。細胞体の近傍に記録電極の先端があれば“逆方向性活動電位”が観察される。1個の青斑核から50個のニューロンの活動を次々と記録し、逆方向性電位を発生したニューロンの割合を算出すれば、皮質への投射を定量化できる訳である。上から下への変化が起こった場合には、逆方向性電位を発生するニューロンの割合が1/3から2/3へと増加する。

1の概念との一致は興味深い。

このように、ニューロンの発芽は脳機能と密接に関係する現象と考えられ、その分子機構の解明が期待される^{10)・11)}。上記研究はすべて*in vivo*系で行われたものであるが、発芽の機構を詳細に解析するには細胞外環境を自在に制御できる*in vitro*でのアプローチが望ましい。この目的に適する実験系の一つとして、脳のスライスを培養した標本が挙げられる。

2. 培養スライスにおける海馬ニューロンの発芽

酵素でニューロンを分散させ培養した標本には、細胞の形態を直接観察できるという利点はあるが、細胞種を特定することが極めて困難である。これに対し、神経組織の培養標本では細胞構築が維持されているので、特定種の細胞を簡単に判定できる。

嚙歯類の胎生脳組織をコラーゲン・ゲルに包埋すると、3～4日間程度なら培養することができ、神経発生プロセスにおける回路形成機構の研究に応用されている¹²⁾。ところが、ニューロンの生存には酸素が必要で、成熟するに従い酸素への依存が高まることから、この方法で長期培養を行うのは困難である。

培養脳組織を成熟脳の *in vitro* モデルとして用いる場合、ニューロンが成熟するまで標本を維持しなければならない。これを実現するには、脳スライスを培養メディアウムとともに試験管に入れて回転させ、周期的に大気に曝せばよい。1981年に開発されたこの方法を用いると、生後1週齢の脳スライスを、数週間にわたり培養することができる¹³⁾。しかも、培養スライスで成

長したニューロンには成熟脳のニューロンに近い特徴が数多く見出され、非常に有用な標本となる¹⁴⁾。ただ、高度な技術と熟練が要求されるこの方法は広く普及するには至らず、現在では、1990年前後に開発されたフィルター膜上に脳スライスを静置させ大気とメディアウムの界面で培養する方法が多用されている^{15) - 17)}。

我々はこの方法を応用し、海馬のスライスにおけるニューロン発芽の研究に用いた。発芽の研究に海馬を用いた理由は、これまで対象として来た青斑核は直径が1mm程しかなく、1個の脳から限られた数の標本しか作製できないからである。海馬なら350 μ m厚のスライスを切り出せば20～30の標本を得ることができる。

海馬には、高い可塑性を持つニューロンが存在する。中でもシナプス伝達効率に関する可塑性は、海馬が司るとされる短期記憶の形成プロセスを支える細胞現象と考えられ、その解析には急性スライスが多用されて来た。一方、ニューロンの形態変化としてとらえられる可塑性は、損傷後の機能回復に重要な役割を担うと考えられ、長時間を費やすものである。したがって、その解析には、長く生存し得る培養スライスを用いる

図2 培養海馬スライスにおけるニューロンの発芽。図は海馬の基本的神経回路を示し、ニューロンの細胞体が構成する層構造を破線で表している。上段、海馬をスライスとして単離すると、歯状回 [DG] を支配するシナプスが脱落する [左～中]。生直後のラットから嗅内皮質を除去した場合にもこの現象が起こり²⁰⁾、海馬ニューロンが発芽し、DG を支配するようになる [中～右]。下、培養スライスでも発芽が起こり得るかを電気生理学的に検討した。図1で単一ニューロンから電位を記録したが、ここでは多くのニューロンの活動をひとまとめに集合電位として記録した。逆向性電位の発生には神経伝達物質の放出が必要とされないで、放出に必要な細胞外カルシウム・イオンを除去した場合にも、残存成分として確認される。CA3ニューロンのDGへの発芽は、DG刺激によりCA3に惹起される逆向性集合電位に反映される。電位は、培養開始時 [左] では観察されないが、1週間後 [右] に確認され、発芽の起こったことが示唆された²¹⁾。キャリブレーション、1mV, 5 msec. [文献21より図を改変]

ことが適当である。

培養スライス作製プロセスで、標本には多様な損傷が惹起される。まず組織をスライスすることによる直接的なニューロンの変性である¹⁸⁾。残存ニューロンも軸索が切断され、同時にスライスの外部に起始するニューロンによる支配が消失する。これらの現象は、ニューロンに発芽を惹起する要因となり得る¹⁹⁾。例えば、生直後のラットから嗅内皮質を摘出すると、皮質ニューロンが支配していた海馬の歯状回領域でシナプスが脱落し、続いて海馬ニューロンが発芽を起こしこの部位を支配するようになる²⁰⁾ (図2左～中)。

我々は、海馬スライスを作製した場合にも、必然的にシナプスの脱落が起こることに着目した。培養スライスにおける海馬ニューロンの投射様式を解析した結果、培養1週目でニューロンの発芽が確認された (図2中～右)。しかも、発芽し歯状回に投射した軸索は、標的ニューロンとの間に興奮性アミノ酸受容体を介するシナプスを形成した。さらに、発芽はあらゆる海馬ニューロンに起こるのではなく、CA3と呼ばれる領域に存在する錐体細胞に特異的に起こるという新たな知見を得ることができた²¹⁾。

発芽が特定ニューロンにしか起こらないという現象には、2つの物質的基盤が考えられる。一つは、ニューロンが所有する軸索発芽を制御する分子である。Liらは、日齢の異なる嗅内皮質と海馬のスライスを共培養した実験から、発芽する軸索自体の性質が重要との結論を導いている²²⁾ (図3A)。生後8日目までのニューロンは標的の日齢に関係なく標的に侵入することができる。ところが、より成熟したラットに由来するニューロンは、標的が未熟であっても侵入することができない。視覚神経系のスライス共培養標本においても、同じ現象が観察されている²³⁾。未熟なニューロンには、特異的に発芽制御分子が発現していると考えられ、GAP-43をはじめ幾つかの候補が挙げられている。

もう一つは、ニューロンが支配する標的に由来する分子である。Kellerらは中隔核と海馬のスライスを共培養し、海馬を含む大脳辺縁系に特異的に発現するLAMP [limbic system membrane associated protein] を抗体により不活化すると中隔から海馬への投射形成が阻害されることを確認した²⁴⁾ (図3B)。しかも、LAMP抗体は中隔ニューロンの発芽能自体には影響を与えず、海馬への投射だけを選択的に抑制したのである。

図3 ニューロン発芽の規定因子。A：海馬と嗅内皮質の間には本来、相互の神経支配が存在する。日齢の異なる嗅内皮質と海馬のスライスを共培養すると、生後8日目までのニューロンは標的の日齢に関係なく標的に侵入するが、成熟したニューロンは標的が未熟であっても侵入することができない。この実験系における発芽は、ニューロン自体が発現するが、成長にしたがって減衰する分子に規定されると結論される²²⁾。B：スライス共培養系で、中隔核ニューロンは海馬へ投射する [破線]。ところが、LAMPを抗体により不活化すると投射形成が阻害される [実線]。海馬由来のLAMPが中隔ニューロンの投射様式を規定していることが結論される²⁴⁾。[ともに、元文献の図を改変]

また、標的由来物質には、ニューロンの軸索を反発するものがあることに留意すべきである¹²⁾。Yamamotoらはスライス共培養系を用いた実験から、視蓋が視覚表層のニューロンを反発し²⁵⁾、軸索に崩壊[collapsing]を惹起することを観察している²⁶⁾。この現象は、下等動物で見出された collapsin [あるいは semaphorin] など軸索崩壊を惹起する物質が哺乳動物の高次中枢でも機能していることを想像させる¹²⁾。さらに、特定種のニューロンを反発する物質の中には他種ニューロンを引きつけるものがあり¹²⁾、上記実験においても皮質深層に起始する軸索は視蓋に誘導されることが確認されている²⁵⁾。海馬スライスで観察された選択的なCA3ニューロンの発芽も、歯状回由来物質とニューロンにおけるその受容体の研究から、機構解明がなされると期待される。

現時点で、培養脳スライスを用いた発芽機構の研究は、成長期の神経回路形成に焦点を合わせたものがほとんどである。ただ、結果的に神経再生プロセスを解析していたというケースもあることから²²⁾、将来的には青斑核ニューロンに観察されるような成熟脳における発芽のモデル系にも十分なり得るであろう。すでにMullerのグループは、*in vitro*で成熟させた海馬のスライスを切断し、ニューロンの発芽により神経回路網が再構築されるプロセスを解析する系を確立し、薬物作用の検討にも応用している²⁷⁾、²⁸⁾。さらに、クラゲ由来の蛍光色素 green fluorescence protein の遺伝子をスライス中のニューロンに導入することにより、軸索の動態を観察する試みも行なわれている²⁹⁾。未熟神経系と成熟神経系における発芽の物質的基盤の相違も、このようなアプローチを積み重ねることから、明確になることが期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究を共同で行った岡田誠剛、川崎和夫、中村彰治、ならびに貴重な助言を頂いた久野宗、各博士に深謝する。

文 献

- 1) デール・バーヴェス著、「体が神経を支配するートロフィック説と脳の可塑性」(1990) 羊土社。
- 2) Sakaguchi, T., Shirokawa, T. and Nakamura, S. (1984) *Brain Res.* **321**, 319-322.
- 3) Nakamura, S., Sakaguchi, T. and Aoki, F. (1989) *Neurosci. Lett.* **100**, 147-152.
- 4) Sakaguchi, T. and Nakamura, S. (1990) *Neurosci. Lett.* **118**, 193-196.
- 5) Nakamura, S., Kitayama, I. and Murase S. (1991) *Brain Res. Bull.* **26**, 759-763.
- 6) Nakamura, S. (1990) *Neurosci. Lett.* **111**, 64-68.
- 7) Nakamura, S. (1991) *NeuroReport* **2**, 525-528.
- 8) Kitayama, I., Nakamura, S., Yaga, T., Murase, S., Nomura, J., Kayahara, T. and Nakano, K. (1994) *Brain Res. Bull.* **35**, 573-580.
- 9) Chan-Palay, V. and Asen, E. (1989) *J. Comp. Neurol.* **287**, 357-372.
- 10) Nakamura, S. (1994) *Restr. Neurol. Neurosci.* **6**, 297-300.
- 11) Nakamura, S. (1993) *NeuroReport* **4**, 371-374.
- 12) Marx, J. (1995) *Science* **268**, 971-973.
- 13) Gahwiler, B.H. (1981) *J. Neurosci. Methods* **4**, 329-342.
- 14) 坂口卓也, 岡田誠剛, 川崎和夫 (1994) *ブレインサイエンス* **3**, 225-236.
- 15) Yamamoto, N., Yamada, K., Kurotani, T. and Toyama, K. (1992) *Neuron* **9**, 217-228.
- 16) Stoppini, L., Buchs, P.-A. and Muller, D. (1991) *J. Neurosci. Methods* **37**, 173-182.
- 17) Tanaka, M., Tomita, A., Yoshida, S., Yano, M. and Shimizu, H. (1994) *Brain Res.* **641**, 319-327.
- 18) Okada, M., Sakaguchi, T. and Kawasaki, K. (1995) *Neurosci. Res.* **22**, 359-366.
- 19) Steward, O. (1989) *J. Neurotrauma* **6**, 99-152.
- 20) Zimmer, J. (1973) *Brain Res.* **64**, 293-311.
- 21) Sakaguchi, T., Okada, M. and Kawasaki, K. (1994) *Neurosci. Res.* **20**, 157-164.
- 22) Li, D., Field, P.M. and Raisman, G. (1995) *Eur. J. Neurosci.* **7**, 1164-1171.
- 23) Chen, D.F., Jhaveri, S. and Schneider, G.E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7287-7291.
- 24) Keller, F., Rinvall, K., Barde, M.F. and Levitt, P. (1989) *Neuron* **3**, 551-561.
- 25) Yamamoto, N. and Toyama K. (1995) *NeuroReport* **6**, 1517-1520.
- 26) Yamamoto, N., Matsuyama, Y., Kashiwadani, H., Nakamura, K. and Sonoda, R. (1995) *Soc. Neurosci. Abstr.* **21**, 293.
- 27) Stoppini, L., Buchs, P.-A. and Muller, D. (1993) *Neuroscience* **57**, 985-994.
- 28) Muller, D., Stoppini, L., Wang, C. and Kiss, J.K. (1994) *Neuroscience* **61**, 441-445.
- 29) Moriyoshi, K., Richards, L.J., Akazawa, C., O'Leary, D.M. and Nakanishi, S. (1996) *Neuron* **16**, 255-260.