

神経系前駆細胞における機能的グルタミン酸シグナリング

中道 範隆

Functional Glutamate Signaling in Neural Progenitor Cells

Noritaka NAKAMICHI

Laboratory of Molecular Pharmacology, Division of Pharmaceutical Sciences,
Kanazawa University Graduate School of Natural Science and Technology,
Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan

(Received May 31, 2011)

In this review, we have summarized our recent studies on the functionality of ionotropic (iGluR) and metabotropic (mGluR) glutamate receptors expressed by undifferentiated neural progenitor cells (NPC) isolated from embryonic rat and mouse brains. NPC are primitive cells with the self-renewal capacity as well as the multipotentiality to generate different neural lineages including neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. Isolated cells were cultured in the presence of growth factors for the formation of round spheres by clustered cells so-called 'neurospheres' under floating conditions. Reverse transcription polymerase chain reaction analyses revealed expression of mRNA for particular iGluR and mGluR subtypes in NPC. Moreover, sustained exposure to an agonist for the *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) not only inhibited the formation of neurospheres but also promoted differentiation of NPC into cells immunoreactive to a neuronal marker protein on immunocytochemistry and western blot analyses. On the other hand, sustained exposure to an agonist for the group III mGluR subtype led to suppression of proliferation activity in these neurospheres along with facilitation of the subsequent differentiation into astrocytes. Accordingly, glutamate could play a pivotal role in the mechanisms underlying proliferation for self-replication, together with determination of the subsequent differentiation fate toward particular progeny lineages through activation of NMDAR and group III mGluR subtypes in NPC.

Key words—neural progenitor cell; glutamate; neurogenesis; neurodegenerative disorder; regenerative medicine

1. はじめに

アルツハイマー病やパーキンソン病等の難治性中枢神経変性疾患を発症することにより大量の神経細胞死が引き起こされるため、このような病態罹患時には患者が病気の進行とともに社会生活から脱落するという由々しき事態に陥ってしまう。また、患者が社会生活から脱落するに従い近親者による介護が必要不可欠となり、患者及び介護者の quality of life は著しく低下する。しかしながら、このような疾患の治療は対症療法がほとんどであり、根本的治療法はいまだ確立されていないのが現状である。その一因として、「哺乳動物成体の中枢神経は一度損

傷を受けると再生しない」ことが挙げられる (Fig. 1)。一方、近年ヒトを含む哺乳動物成体脳においても、海馬歯状回や側脳室下帯に神経系前駆細胞 (neural progenitor cells; NPC) が存在し、さらに神経新生が起きていることが明らかとなってきた。¹⁻³⁾ 実際にわれわれの検討においてもラットの海馬歯状回や側脳室下帯において、増殖性細胞の指標となる bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みを示す細胞や NPC に特異的なマーカータンパク質である nestin を発現する細胞が多数観察された。NPC は、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの 3 種類の中枢神経系構成細胞に分化することができる多分化能を有しており、この多分化能を保持しながら増殖を繰り返すことのできる自己複製能を有する未分化な細胞として定義される。したがって、哺乳動物成体脳に存在する NPC から神経細胞への分化を促進すること、あるいは NPC か

金沢大学医薬保健研究域薬学系薬物学研究室 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)

現所属：同分子薬物治療学研究室

e-mail: nakamiti@p.kanazawa-u.ac.jp

本総説は、平成 22 年度日本薬学会北陸支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

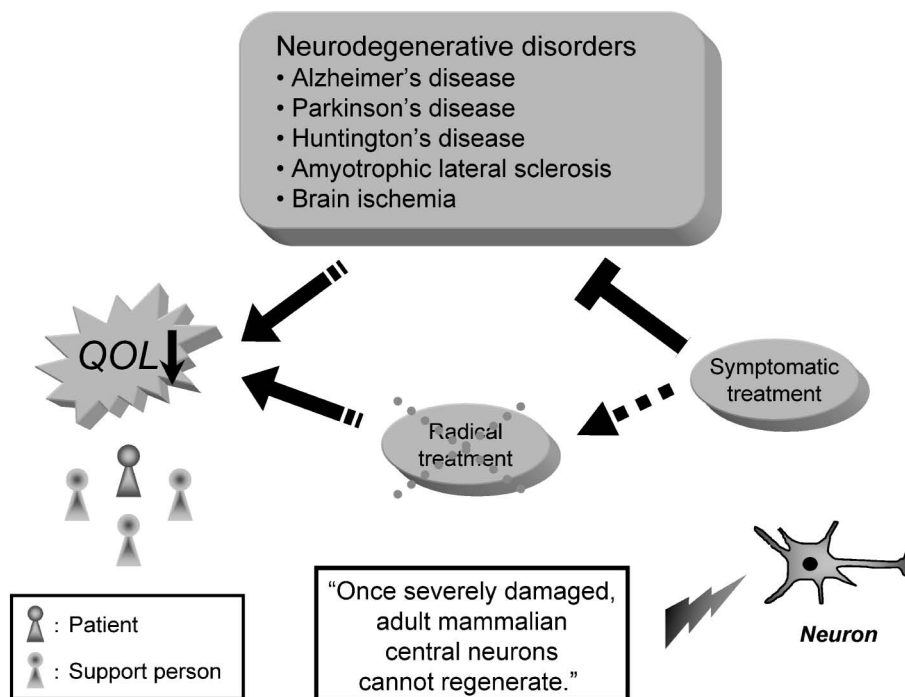


Fig. 1. Circumstances of the Patients Suffering from Neurodegenerative Disorders

ら分化させた神経細胞を移植することができれば、中枢神経変性疾患の根本的治療法の確立につながると考えられる。

グルタミン酸 (Glu) は哺乳動物中枢神経系において、アミノ酸代謝やエネルギー産生あるいはタンパク質合成など細胞の普遍的現象に関与しているだけでなく、興奮性神経情報伝達物質及び内因性エキサイトトキシンとしての特異的機能も有する。^{4,5)} Glu による細胞外興奮性シグナルは、細胞膜上に存在する Glu 受容体 (GluR) により細胞内シグナルに変換され、細胞核へと伝達される。GluR は特定イオンの細胞膜透過性を調節するイオノトロピック型 (iGluR)、及び細胞内の特定リン脂質加水分解や細胞内環状ヌクレオチド代謝を制御する guanosine-5'-triphosphate タンパク共役メタボトロピック型 (mGluR) に大別される。⁴⁻⁶⁾ iGluR はさらに外因性アゴニストに対する感受性の相違などにより、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 感受性受容体 (NMDAR) と NMDA 非感受性受容体 (non-NMDAR) に分類される。NMDAR にはサブユニットとして NR1 サブユニットと NR2A-D, 3A, 3B サブユニットが見い出されており、機能的な NMDAR の発現には NR1 が必須である。^{7,8)} NR1 は NR2A-D, 3A, 3B 中の 1 種あるいは数種のサブユニットとヘテロ

メリックな複合体を形成し、様々なチャネル機能の調節を行う。また、non-NMDAR には、その薬理的性質の差異により、GluR1-4 サブユニットから構成される DL- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionateic acid 受容体 (AMPA) 及び GluR5-7, KA1, 2 から構成されるカイニン酸受容体 (KAR) が存在する。一方、mGluR には、現在のところ 8 種類のサブユニット (mGluR1-8) の存在が知られているが、そのアゴニスト感受性の相違、アミノ酸配列の相同性、あるいは共役する細胞内セカンドメッセンジャーの違いなどから、さらに 3 種類のサブタイプに分類される。すなわち、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸とジアシルグリセロールの生成を促進するグループ I (mGluR1, 5) と、いずれも cAMP の生成を抑制するグループ II (mGluR2, 3) 及びグループ III (mGluR4, 6, 7, 8) である。^{7,8)}

GluR を介するシグナル入力が神経細胞において重要な役割を果たすことは周知の事実であるが、近年神経細胞ばかりでなく他の中枢神経系構成細胞、アストロサイトにおいても Glu シグナルが重要な役割を担っている可能性が報告されている。^{9,10)} そこでわれわれは機能的な GluR が NPC にも発現しており、増殖能及び分化能を制御している可能性について検討を加えた。¹¹⁻¹³⁾ 本総説では、哺乳動物中

中枢神経において重要な役割を果たしている Glu シグナル入力が NPC においても重要な役割を果たしている可能性について、ラットあるいはマウス大脳皮質より単離した培養 NPC を用いて検討したわれわれの研究成果を中心に報告したい。

2. イオノトロピック型グルタミン酸受容体シグナル

ラット大脳皮質より単離直後の NPC には、NMDAR 及び AMPAR を構成するいずれのサブユニットの mRNA 発現も確認された。KAR 構成サブユニットに関しては、GluR6 のみ発現が認められなかった。iGluR の 3 種類のサブタイプである NMDAR, AMPAR, KAR に特異性の高い各アゴニスト NMDA, AMPA, KA を NPC に持続的に曝露したところ、NMDA のみが有意にミトコンドリア活性を低下させた。一方、いずれの iGluR アゴニスト曝露も、細胞死の指標となる lactate dehydrogenase (LDH) の細胞外への放出には顕著な影響を及ぼさなかった。NMDA の持続的曝露は、NPC が *in vitro* 培養条件下で示す特徴の 1 つである神経塊 (neurospheres) の形成や BrdU の取り込み活性を有意に阻害した。この NMDA による阻害は、NMDAR の特異的アンタゴニストである MK-801 の同時添加により、いずれも NMDA 非曝露群と同程度にまで回復した。NMDA 曝露が細胞生存率には影響せずにミトコンドリア活性、神経塊形成あるいは BrdU 取り込みといった細胞増殖能の指標を阻害したことから、NPC には機能的な NMDAR が発現しており、NMDAR シグナル入力が細胞の増殖能を負に制御している可能性が考えられる。^{11,13)}

次に、NMDAR シグナル入力が NPC の分化能に及ぼす影響について考察する。NMDA を持続的に曝露した NPC を細胞増殖因子非存在下で接着培養を行うことにより、細胞分化を誘導した。分化誘導前に NMDA を持続的に曝露した細胞群では対照群と比較して、神経細胞マーカーとして用いた microtubule-associated protein 2 (MAP-2) 抗体陽性細胞数が増加し、アストロサイトマーカーとして使用した glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体陽性細胞数が減少した。また、同抗体を使用したウェスタンブロット法による解析でも、NMDA 曝露群では MAP-2 抗体陽性タンパクの発現量が増加し、GFAP の発現量は減少した。また、NPC 培

養時に NMDA 存在下で培養を行うと、分化誘導後に NMDA 応答性に細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇を示す細胞数が倍程度に増加した。したがって、NMDAR シグナル入力は NPC の神経細胞への分化能を促進する可能性が考えられる。^{11,13)}

3. メタボトロピック型グルタミン酸受容体シグナル

マウス大脳皮質より単離直後の NPC には、グループ I 及びグループ II を構成するいずれの mGluR サブユニットの mRNA 発現も確認された。グループ III mGluR 構成サブユニットに関しては、mGluR4 及び 8 の発現は確認できたが、mGluR6 及び 7 の発現は認められなかった。mGluR の 3 種類のサブタイプであるグループ I, グループ II, グループ III に特異性の高い各アゴニスト DHPG, DCG-IV, L-AP4 を NPC に持続的に曝露したところ、L-AP4 のみが有意にミトコンドリア活性を低下させた。一方、いずれの mGluR アゴニスト曝露も、LDH の培地中への放出に著明な変化を与えなかった。L-AP4 の持続的曝露は、ミトコンドリア活性だけでなく神経塊の形成や BrdU の取り込み活性も有意に阻害したが、グループ III mGluR の特異的アンタゴニストである CPPG の同時添加により、いずれも L-AP4 非曝露群と同程度にまで回復した。グループ III mGluR シグナル入力が分化能に及ぼす影響についても検討したところ、L-AP4 を持続的に曝露した細胞群では、MAP-2 抗体陽性細胞数が減少し、GFAP 抗体陽性細胞数が増加した。したがって、NPC には機能的なグループ III mGluR が発現しており、同受容体を介するシグナル入力が細胞の増殖能を負に制御する可能性及びアストロサイトへの分化能を促進する可能性が考えられる (Fig. 2)。^{12,13)}

グループ III mGluR の活性化に伴い、細胞内の cAMP 生成が抑制される。cAMP は細胞内セカンドメッセンジャーとして広く知られており、その下流シグナルカスケードとして protein kinase A (PKA) の活性化、cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化を介し、CRE 配列をプロモーター領域に有する遺伝子の発現を調節することによって種々の生理的变化を引き起こす。中枢神経系においても cAMP を介するシグナル伝達が、神経細胞の生存や神経突起の伸長、神経保護因子の

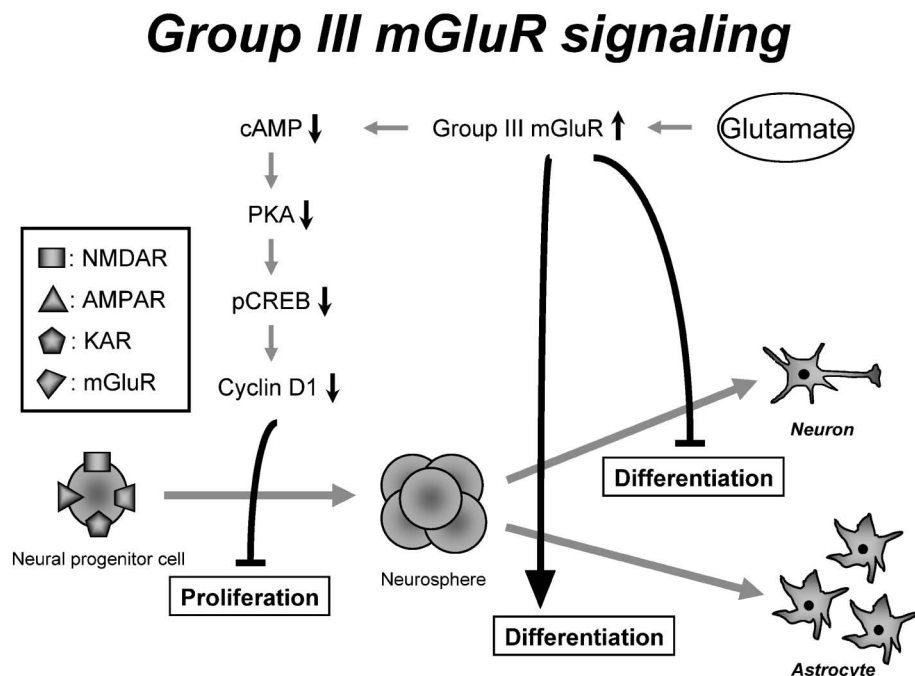


Fig. 2. Signaling Mechanisms Mediated by Group III mGluR in NPC

分泌や学習・記憶の形成等に深く係わることが報告されている。¹⁴⁻¹⁷⁾ そこでこれら cAMP シグナルが NPC の増殖能及び分化能に及ぼす影響についても検討を加えた。細胞内の cAMP 濃度を上昇させる forskolin (FK), dibutyl-cAMP あるいは下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) を NPC に曝露することにより、ミトコンドリア活性の有意な上昇及び神経塊の形成促進が認められた。FK による増殖能の増大は、L-AP4 あるいは PKA 阻害剤である H89 を同時曝露することにより有意に抑制された。さらに、細胞周期制御タンパク質であり細胞増殖時に発現が誘導される Cyclin D1 の関与についても検討を加えたところ、L-AP4 曝露群では対照群と比較して Cyclin D1 の mRNA 発現量及びプロモーター活性の有意な減少が認められたのに対して、FK 曝露群では mRNA 発現量及びプロモーター活性の有意な増加が認められた。また、CRE 配列の下流にレポーター遺伝子を組み込んだコンストラクトを用いた解析により、L-AP4 は CRE 配列下流の転写を抑制するが、FK は逆に促進することが明らかとなった。一方、分化能に対する影響についても検討したところ、FK 曝露群では L-AP4 曝露群とは逆に、MAP-2 陽性細胞数が増加し、GFAP 陽性細胞数は減少した。以上の結果より、

cAMP シグナルは PKA の活性化、CRE 配列を介した遺伝子転写制御、Cyclin D1 の転写活性化を介して、NPC の増殖能及び神経細胞への分化能を促進する可能性が示された。また、グループ III mGluR はこの cAMP シグナル伝達経路を抑制することにより、NPC の増殖能を負に制御あるいはアストロサイトへの分化能を促進しているものと推察される (Fig. 2)。^{12,13)}

4. おわりに

2010 年 10 月、米国において世界で初めてヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来のオリゴデンドロサイト前駆細胞を用いた脊髄損傷患者に対する臨床試験が開始された。幹細胞の移植による難治性疾患の治療はもはや夢物語ではなく、今後急速に臨床使用に向けて進展することが予測される。幹細胞の移植療法が実現化すれば、移植に必要な細胞を効率よく作製する方法が必要となる。また、移植における大きな問題点として、移植細胞に対する拒絶反応が挙げられる。この問題を回避するための方法の 1 つとして、目的とする細胞の前駆細胞を移植し、生体内で薬物投与により増殖させた後、目的細胞へと分化させるアプローチが有効となるかもしれない。移植療法だけでなく、哺乳動物の中樞神経系が形成される胎生期において、NPC の正常な増殖や分化が重要

であることは言うまでもない。したがって、NPCの増殖・分化を制御するシグナル異常が、発達障害の一因となる可能性は十分に考えられる。また、成体脳においても、強烈なトラウマ体験後に一過性にNPCの数が減少することが、心的外傷後ストレス障害(PTSD)の発症に関与している可能性が報告されている。¹⁸⁾ 以上のように、本総説で紹介したNPCの増殖や分化を制御するシグナルの解明研究は、種々の神経変性疾患の発症機構解明及び治療の両面において非常に重要な意義を持つ。

われわれの研究グループは、ラットあるいはマウス大脳皮質由来NPCに機能的なNMDARあるいはグループIII mGluRが発現しており、細胞の増殖能及び分化能を制御している可能性を示した。¹¹⁻¹³⁾ 今後はヒトES細胞あるいは人工多能性幹細胞(iPS細胞)由来のNPCでもGluRシグナル入力によって増殖・分化能が調節されているのかを検討する必要がある。また、より効率的に細胞を増殖・分化させるためには、Gluシグナルだけでなく、他のNPC増殖・分化調節シグナルとの相互作用を調べることも重要である。われわれは既にNPCの増殖・分化能が、抑制性神経情報伝達物質である γ -amino butyric acid (GABA)あるいは静的磁場曝露によっても調節されることを報告している。¹⁹⁻²¹⁾ 今後、NPCの増殖・分化に関する基礎的メカニズム解明研究をさらに発展させることにより、各種中枢神経変性疾患に対する根本的治療法の確立が期待される。

謝辞 本研究を遂行する上において終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました、金沢大学医薬保健研究域薬学系・米田幸雄教授及び加藤将夫教授に厚く御礼申し上げます。また、多大なるご協力とご援助を頂きました金沢大学医薬保健研究域薬学系・薬物学研究室及び分子薬物治療学研究室の皆様へ深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Gage F. H., Kempermann G., Palmer T. D., Peterson D. A., Ray J., *J. Neurobiol.*, **36**, 249–266 (1998).
- 2) Garcia-Verdugo J. M., Doetsch F., Wichterle H., Lim D. A., Alvarez-Buylla A., *J. Neu-*

- robiol.*, **36**, 234–248 (1998).
- 3) Johansson C. B., Momma S., Clarke D. L., Risling M., Lendahl U., Frisen J., *Cell*, **96**, 25–34 (1999).
- 4) Hollmann M., O'Shea-Greenfield A., Rogers S. W., Heinemann S., *Nature*, **342**, 643–648 (1989).
- 5) Yoneda Y., *Yakugaku Zasshi*, **113**, 469–488 (1993).
- 6) Nakanishi N., Shneider N. A., Axel R., *Neuron*, **5**, 569–581 (1990).
- 7) Hollmann M., Heinemann S., *Annu. Rev. Neurosci.*, **17**, 31–108 (1994).
- 8) Yoneda Y., Kuramoto N., Kitayama T., Hinoi E., *Prog. Neurobiol.*, **63**, 697–719 (2001).
- 9) Lee M. C., Ting K. K., Adams S., Brew B. J., Chung R., Guillemain G. J., *PLoS One*, **5**, e14123 (2010).
- 10) Xi Q., Tcheranova D., Basuroy S., Parfenova H., Jaggar J. H., Leffler C. W., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2011. (in press)
- 11) Yoneyama M., Nakamichi N., Fukui M., Kitayama T., Georgiev D. D., Makanga J. O., Nakamura N., Taniura H., Yoneda Y., *J. Neurosci. Res.*, **86**, 2392–2402 (2008).
- 12) Nakamichi N., Yoshida K., Ishioka Y., Makanga J. O., Fukui M., Yoneyama M., Kitayama T., Nakamura N., Taniura H., Yoneda Y., *J. Neurochem.*, **105**, 1996–2012 (2008).
- 13) Nakamichi N., Takarada T., Yoneda Y., *J. Pharmacol. Sci.*, **110**, 133–149 (2009).
- 14) Kandel E. R., *Science*, **294**, 1030–1038 (2001).
- 15) Mabuchi T., Kitagawa K., Kuwabara K., Takasawa K., Ohtsuki T., Xia Z., Storm D., Yanagihara T., Hori M., Matsumoto M., *J. Neurosci.*, **21**, 9204–9213 (2001).
- 16) Reppert S. M., Weaver D. R., *Annu. Rev. Physiol.*, **63**, 647–676 (2001).
- 17) Kida S., Josselyn S. A., Pena de Ortiz S., Kogan J. H., Chevere I., Masushige S., Silva A. J., *Nat. Neurosci.*, **5**, 348–355 (2002).
- 18) Tamaki K., Yamada K., Nakamichi N., Taniura H., Yoneda Y., *J. Neurochem.*, **105**, 1642–1655 (2008).
- 19) Fukui M., Nakamichi N., Yoneyama M., Yoshida K., Ozawa S., Kitayama T., Nakamura N., Taniura H., Yoneda Y., *J. Neurosci. Res.*, **86**, 2615–2623 (2008).

-
- 20) Fukui M., Nakamichi N., Yoneyama M., Ozawa S., Fujimori S., Takahata Y., Nakamura N., Taniura H., Yoneda Y., *J. Cell. Physiol.*, **216**, 507–519 (2008).
- 21) Nakamichi N., Ishioka Y., Hirai T., Ozawa S., Tachibana M., Nakamura N., Takarada T., Yoneda Y., *J. Neurosci. Res.*, **87**, 2406–2417 (2009).