

堀江信貴 論文内容の要旨

主 論 文

Lowered glucose suppressed the proliferation and increased the differentiation
of murine neural stem cells *in vitro*

低グルコースにてマウス神経幹細胞の増殖能が抑制され、分化が亢進する

堀江信貴、守屋孝洋、三留雅人、北川直毅、永田 泉、篠原一之

FEBS Lett. 2004 Jul 30; 571(1-3):237-242.

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
医療科学専攻
(主任指導教員：永田 泉 教授)

緒 言

近年の神経科学の進歩により、ほ乳類の脳組織中にある神経細胞、グリア細胞とともに神経幹細胞 (Neural stem cells: NSCs) とよばれる未熟な前駆細胞から分化することが明らかとなった。NSCs は自己複製能および多分化能を有する細胞と定義され、発達過程の脳だけでなく成熟した脳にも存在することが証明されている。

一方、脳組織は虚血状態に陥ると様々なカスケードを惹起し急性、あるいは遅発性神経細胞死を引き起こす。興味深いことに、一過性の広範囲脳虚血により海馬歯状回や脳室周囲腔に存在する NSCs が活性化され、神経再生が促進されるといった衝撃的な報告が散見されるようになり、脳虚血における再生医療が新たな治療法として期待されている。しかしこの現象におけるメカニズムについては十分には解明されておらず、今後の課題とされている。脳虚血では酸素供給およびグルコース供給の低下が虚血性脳障害を引き起こす大きな要素である。これまでに低酸素状態では培養 NSCs の増殖、分化が亢進することが報告されているが、低グルコース状態における NSCs への影響については報告がない。

我々は虚血の一病態を構成する低グルコース状態が NSCs の増殖能および分化能に影響を及ぼすのではないかと考え、この仮説をマウス *in vitro* モデルを用い検討した。

対象と方法

1. 動物：ICR マウス胎仔 (Embryonal day 15.5)
2. 培養：ICR マウス胎仔の脳から線条体を分離したのち、NSCs をニューロスフェア法にて 5 日間分離培養する。5 日後にコロニーを形成した NSCs を用い検討した。
3. グルコース濃度：下記の 4 群とした
36.4 mM : 通常の細胞培養に用いているグルコース濃度
10mM : 生理的な条件よりも高いグルコース濃度

3mM : 生理的なグルコース濃度
0mM : 脳虚血におけるグルコース濃度

4 . 増殖能の評価

様々なグルコース濃度 (36.4, 10, 3, 0 mM) を含む培養液で NSCs をさらに 5 日間増殖させた。WST-8 assay, BrdU assay およびコロニー形成数にて増殖能を検討した

5 . 分化能の評価

増殖条件下において様々なグルコース濃度 (36.4, 10, 3, 0 mM) で培養した細胞を通常の 36.4mM 濃度で分化誘導 (成長因子を除去したのち 1 %FBS を加える) した。また、様々なグルコース濃度 (36.4, 10, 3, 0 mM) を含む培養液のままで分化誘導を行った。つまり増殖条件および分化条件における低グルコース負荷の差違につきそれぞれ検討した。分化誘導後は 7 日間培養した。蛍光免疫染色法、ELISA 法により分化能を検討した。

結 果

低グルコース状態 (10, 3, 0 mM) は NSCs の増殖能を濃度依存的に抑制し、さらに小さなコロニーの割合を多くした。一方、低グルコース状態はニューロンおよびアストログリアへの分化を劇的に促進することが観察された。またこの分化亢進は分化条件での負荷のみ観察され、増殖条件での負荷では観察されなかった。

考 察

これらの結果により脳虚血における低グルコース状態は濃度依存性に NSCs の増殖を抑制し、分化を劇的に促進することが明らかとなった。つまり低グルコース状態は NSCs の自己複製能、多分化能に大きく影響する因子であることが証明された。NSCs の分化亢進がなぜ増殖条件の負荷でなく分化条件の負荷にて惹起されるのかについては更なる検討が必要である。しかしこれまでの報告では神経細胞が分化する際にグルコース濃度が変化すること、またグルコーストランスポーターのアイソフォームが変化するといった内容が散見され、分化期におけるグルコースの需要と供給の変化が大きく影響していることは十分に考えられる。

一方、低酸素状態も脳虚血の一病態であり、低グルコース及び低酸素が相乗的相加的に作用し急性、遅発性神経細胞死を引き起こす。これまでの低酸素状態における NSCs の検討では、低酸素状態は増殖能、分化能ともに亢進させると報告されている。更に低酸素負荷による分化亢進は増殖条件でのみ観察され分化条件では観察されなかった。よって分化におけるそれぞれの critical period は異なっていることが示唆された。つまり脳虚血における NSCs への効果は単なる energy failure が寄与しているのではなく、低酸素、低グルコースそれぞれの病態が異なった機序で NSCs を活性化しているものと考えられた。

脳虚血に対する再生医療についてまだ克服すべき課題は多い。しかし、in vitro レベルでの検討を更に進めることで再生医療といった新たな視点からの治療法が確立される可能性が十分にあると考えられる。