

博士論文番号：0981003

外来性移植神経幹細胞の細胞系譜

荒井 光徳

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 神経機能科学研究室

(稲垣 直之 教授)

平成 29 年 1 月 5 日提出

Introduction (序論)

古くはカハールの時代から脳神経系は再生しないとわれてきたが、近年嗅球、海馬歯状回、脳室下帯といった領域で成体の神経新生が確認されており、記憶や学習といった脳の高次機能に新生した神経細胞が寄与していること (Gage, 2000; Clelland et al., 2009; Deng et al., 2010) が明らかになっている。神経新生は豊かな環境下における運動や血管閉塞性の損傷によって引き起こされること (Ohira et al., 2010) が報告されている。しかし脳神経系は神経新生や神経可塑性といった性質を有しているにもかかわらず、加齢や傷害により神経細胞が脱落し、発生段階で大脳皮質や海馬の神経回路網が不完全になり、パーキンソン病や認知症、自閉症などの神経変性疾患が誘発される。このような神経回路網が破綻した神経変性疾患に対して、神経回路網を適切に回復させることが重要である。そのためには内因性の神経新生による神経幹細胞のみでは不十分であり、細胞移植によって適切に補完する必要性がある。細胞移植によって機能不全に陥った神経回路網を補完することは、失われた脳機能を回復させるための有効な手段である (Lindvall and Kokaia, 2006; Conti and Cattaneo, 2010)。基礎研究として脊髄損傷や認知症などの神経変性疾患モデル動物への細胞移植によって下肢機能や空間認知機能を回復させた例もあり (Hofstetter et al., 2005; Yamasaki et al., 2007; Hicks et al., 2009)、すでにパーキンソン病や脊髄損傷など、臨床応用に発展しているケースもある。

細胞移植の効果は確認されているが、移植された個々の細胞がどのような作用機序により脳機能不全の回復に寄与しているのかは不明な点が多い。これは機能回復と神経回路網の補完との関係性についても未解明な点が多いからである。神経回路網の異常によって引き起こされる高次脳機能不全の一例として、自閉症スペクトラム障害が挙げられる。自閉症スペクトラム障害とは社会行動に差異が見られるもので、この疾患モデルマウスにおいて大脳皮質の第 2/3 層から第 5 層へのシナプス結合の異常によって社会行動や認知過程の破綻につながることや、皮質の過剰な神経活動によって感覚入力に過敏に反応してしまうとの報告がある (Qiu et al., 2011; Rinaldi et al., 2007, 2008)。また大脳皮質の興奮性及び抑制性のバランスがくずれることにより他個体との接触回数が減少し、社会行動が破綻してしまうという報告 (Yizharet et al., 2011) もある。つまり大脳皮質の微小な神経回路網の破綻によって、高次脳機能である社会行動の破綻が示唆されている。このような社会行動の破綻に対して神経

幹細胞を用いた再生医療が効果を発揮するためには、移植した神経幹細胞が近隣の神経細胞と適切なシナプス結合を形成するような神経細胞へと成熟し、破綻した神経回路網や神経活動を制御する必要がある。

異所的に移植された神経幹細胞がげっ歯類の成体の大脳皮質において機能的な神経細胞へと分化し、内因性の神経回路網に組み込まれ、周辺の神経細胞と同様に機能しているのかは未だ不明である。本研究では大脳皮質の形成過程に必須である環境的要因や遺伝子を操作し、どの要因が生体内での神経幹細胞の分化、成熟過程において作用するかを検討することで、外来性の移植神経幹細胞の細胞系譜を明らかにする。自閉症スペクトラム障害において、知覚、認知過程に障害がみられることから、知覚、認知過程に対して最初の情報処理が行われる一次体性感覚野に注目した。既に発生、発達を終えた正常な一次体性感覚野に神経幹細胞を移植し、外来性の移植神経幹細胞が分化、成熟していく様子を観察し、近隣の神経細胞群からどのような影響を受けるのかを検討し、移植神経幹細胞が異所的な神経回路網に組み込まれる条件を明らかにする。また上記の自閉症スペクトラム障害における興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の均衡の破綻に対して、興奮性及び抑制性神経細胞をそれぞれ移植分けが可能となるような条件を探索した。このように移植神経幹細胞を介して微小な神経回路網を形成させることで、知覚、認知過程を回復させ、精神疾患に対して幹細胞治療を用いた根本治療に貢献できると考えられる。

げっ歯類の大脳皮質の形成は胎生期から出生直後にかけて、内因性の遺伝子要因として転写因子群の発現や細胞外分子などによって影響を受け、外因性の環境的要因として感覚器からの入力やそれに伴う視床、皮質における神経活動によって神経回路網が成熟していく。この経験活動依存的神経可塑性と呼ばれる現象において、一次体性感覚野では生後の臨界期に適切な感覚入力を受けることによってバレル構造といわれる洞毛（ヒゲ）一本一本に対しての受容野が形成されることが明らかになっている（Feldman and Brecht, 2005; Feldman, 2009; Holtmaat et al., 2006; Holtmaat et al., 2009）。豊かな環境下によって成熟したげっ歯類の視覚野や体性感覚野においてもシナプス結合が可塑的に変化し、適切に情報を処理することのできる神経回路網を変化させると考えられている（Yang et al., 2009）。さらに豊かな環境は神経新生を促進させ、興奮性の刺激によって神経細胞の生産を促進しており、最近では豊かな環境によって成体マウスの海馬における内因性神経幹細胞の細胞系譜に影響を及ぼすことが明らかとなっている（Kempermann et al., 1997; Deisseroth et al., 2004; Dranovsky et al., 2011）。これら豊かな環境の効果は、ストレスの軽

減、運動による体温上昇、それに伴う血流の増加により神経活動が亢進されることにより引き起こされる。その神経活動の亢進により Ca シグナルや神経栄養因子の放出が活性化され、神経幹細胞の分化が促進されることが明らかとなっている (Vicario-Abejón et al., 2000)。また線条体へ細胞移植した後に豊かな環境下にて飼育することで移植細胞に変化があるとする報告もある (Döbrössy and Dunnett, 2008)。上記のような感覚入力移植神経幹細胞の分化、成熟にどのような影響を及ぼすのかは未解明であり、本研究では豊かな環境による神経活動の亢進の効果が移植神経幹細胞に対してどのように作用するかを確認する。またげっ歯類における体性感覚野は他の視覚や聴覚といった感覚入力と比較して感覚遮断等の操作が容易であり、移植神経幹細胞に対しても感覚遮断の効果を確認する。

これまでの先行研究により大脳皮質の神経回路網の胎生期の発達過程においては、様々な遺伝子群の発現によって複雑な回路網が形成されることが知られている。Neurogenin2 (Ngn2)、Mammalian achaete-scute complex homolog1 (Mash1) と呼ばれる塩基性ヘリックスループヘリックス (bHLH) 型転写因子が胎生期の大脳皮質の発達に必要不可欠であることが示されている (Johnson et al., 1990)。Ngn2 は胎生中期に一過的に終脳背側の神経前駆細胞に発現し、その下流にある NeuroD や T-brain gene-2 (Tbr2) といった転写因子を活性化させ、同時に Mash1 の発現を抑制することにより間接的に興奮性神経細胞への分化を促進させる。Mash1 は胎生中期に一過的に終脳腹側の基底核原基と呼ばれる領域に特異的に発現し、抑制性神経細胞のマーカである GAD を発現させることにより直接的に抑制性神経細胞への分化を制御している (Roybon et al., 2008; Roybon et al., 2010)。このような転写因子を *in vitro* の条件で異所的に発現させることにより神経幹細胞から生理学的機能を持つ神経細胞へと分化誘導することが示されている (Berninger et al., 2007)。またグリア細胞の一種であるアストロサイトに Ngn2、Mash1 をそれぞれ発現させることによりリプログラミングが起こり、興奮性、抑制性の神経細胞へと分化することが明らかになっている (Blum et al., 2011)。このように培養細胞に対して遺伝子操作を行うことで神経幹細胞が神経細胞へと分化し、生理的な神経細胞へと成熟することが明らかとなっているものの、生体内で他の神経細胞群と同様の形態や生理的機能を持ちうるかは定かではない。さらに成体の大脳皮質は約 20% が抑制性神経細胞といわれており (Kawaguchi and Kubota, 1997; Markram et al., 2004)、興奮性及び抑制性神経細胞が秩序だった神経回路網を形成することにより高度な感覚情報処理を行っている (Hofer et al., 2011)。そのため、適切な脳機能を回復させるためには興奮性及び抑制性神経細胞の適切な数的割

合やシナプス結合を誘導する必要性がある。本研究では移植神経幹細胞に対して、上記の転写因子を作用させた際の分化、成熟過程を観察し、成体の大脳皮質における移植神経幹細胞に対する Ngn2 及び Mash-1 の効果を明らかにする。

以上より、大脳皮質の神経回路網は様々な内因性の遺伝子群と外因性の環境的要因によって発生、発達し、神経細胞同士がシナプス結合により回路網を形成し、一次体性感覚野では第 2/3 層と第 4 層間で密な結合がみられるなど、秩序だった構造を有することで高度な感覚情報処理が可能となり、物体の位置や質感を感知し、高度な弁別学習や社会行動の際の他個体とのコミュニケーションを行っている。近年マウス胎仔や出生直後の大脳皮質に細胞移植を行い、その細胞の性質を特徴づける研究があるが、細胞移植を行うだけでは、神経細胞同士のシナプス結合や脳領域間の投射にまだ改善点が見られ (Gaspard et al., 2008; Ideguchi et al., 2010)、発達段階の大脳皮質に細胞移植を行うと移植先の領域の細胞運命に影響を受けるとの報告もある (Wernig et al., 2009)。従って本来の正常な神経回路網を形成するためには細胞移植を行うだけでは不十分であり、上記の要因の制御による移植神経幹細胞の神経細胞への分化誘導し、また適切なシナプス結合を形成し、神経回路網の一部として成熟することが脳機能の回復にとって非常に重要である。本研究課題から得られた知見を応用することにより、幹細胞移植によって適切な神経回路網を再生、形成することが可能となり、社会行動等が破綻した精神疾患に対する治療の一助となりうると考える。

Materials and Methods (材料と方法)

実験動物

本研究では、4 週齢から 5 週齢の C57BL/6NCr (Japan SLC) マウスを用い、12 hr Light/Dark サイクルの下、自由給餌で飼育した。本研究で行ったすべての研究において実験動物の取り扱い、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学「動物実験等の実施に関する規程」および日本学術会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に従って行った。

神経幹細胞の培養

以下の HBSS (HanK' s Balanced Salt Solution)、N2 含有培地、神経幹細胞継代用培地を調整した。

・ HBSS

滅菌水に HBSS (SIGMA #H2387-1L) を 9.5 g 溶解し、NaHCO₃ を 0.35 g 添加後、2N HCl で pH 7.2 に調整し、1 L にメスアップした。その後、0.22 μm 孔のフィルターで濾過し、4° C で保存した。

・ N2 含有培地

滅菌水に以下の組成の試薬を加え、よく懸濁した後、10 M NaOH で pH 7.2 に調整し、1 L にメスアップした。その後、0.22 μm 孔のフィルターで濾過し、4° C で保存した。

DMEM/F12 (GIBCO) 15.6 g、NaHCO₃ (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) 1.27 g、insulin (SIGMA) 25 mg、apo-transferrin (SIGMA) 100 mg、putrescine (SIGMA) 16 mg、5 mM sodium selenite (SIGMA) 6μL、1 mM progesterone (SIGMA) 20μL

・ 神経幹細胞継代用培地

以下の組成で調整し、0.22 μm 孔のフィルターで濾過した。その後、PSF (Penicilline Streptomycin Fungizone; GIBCO) 10 mL と L-Glutamine (GIBCO) 10 mL を加え、よく混合し 4° C で保存した。

Euro-med (Euroclone, Milan, Italy) 1 L、insulin (SIGMA) 25 mg、apo-transferrin (SIGMA) 100 mg、putrescine (SIGMA) 16 mg、5 mM sodium selenite (SIGMA) 6μL、1 mM progesterone (SIGMA) 20μL、BSA (Bovine serum albumin; GIBCO) 670 μL

未分化状態を維持した均一な神経幹細胞は、胎生 14.5 日目のマウス胎仔から神経上皮細胞を採取し、10 回以上継代したものを神経幹細胞として移植実験に使用した (Glaser et al., 2007; Conti et al., 2005; Abematsu et al., 2010)。まず妊娠 14.5 日目の C57BL/6Ncr のメスマウスを頸椎脱臼後、子宮からマウス胎仔を取り出し、神経上皮細胞の採取を行った。マウス胎仔の上皮と頭蓋骨を剥離し、目的の終脳を含む脳全体を取り出した。取り出した脳全体から終脳部分を採取し、嗅球と大脳基底核の一部を切除した後に軟膜を除去し、3 mL の HBSS でピペッティングによって分散させた。その後、1,300 rpm で 3 分間遠心分離を行い、上清を捨て、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF; Fibroblast Growth Factor; PERO TECH) を添加した N2 含有培地に懸濁した。細胞は poly-L-ornithine (Sigma) および fibronectin (Sigma) でコーティングした 10 cm dish 上にて 4 日間培養した。採取した神経上皮細胞を、採取から 4 日目に継代を行い、bFGF (10 ng/mL) と上皮成長因子 (EGF; Epidermal Growth Factor; PERO TECH) (10 ng/mL) を添加した神経幹細胞継代用培地 (Euroclone, Milan, Italy) を用いて 37° C にて CO₂ インキュベーター内で培養した。また、その翌日以後、2 日毎に細胞が増殖した後、bFGF (10 ng/mL) と EGF (10 ng/mL) を添加した NS 継代用培地を用いて継代し、3×10⁶ cells/10 cm dish になるように播種し、10 回以上継代を行うことで均一な神経幹細胞を調整した。

レトロウイルスベクターの精製と濃縮

レトロウイルスは奈良先端科学技術大学院大学の中島研究室から分与していただき、以前の報告と同様に作成した (Jessberger et al., 2008; Tsujimura, 2009)。パッケージの細胞株として HEK293 を調製し、Trans-IT293 (Mirus, Madison, WI, USA) を用いて一過的に遺伝子導入した。上清を回収し、遠心 (RT, 2000 rpm, 5 min) して細胞塊などを取り除いた後、50 mL Disposable Vacuum Filtration System (MILLIPORE) を用いて精製した。精製したウイルス溶液を超遠心 (4° C, 39,000 rpm, 90 min) することによってレトロウイルスを沈殿させた。上清を取り除き、PBS を加えて 4° C にて一晩静置した後、ピペッティングでよく混和させて分注し、-80° C のフリーザーで保存した。Ngn2 または Mash1 を発現させるために、神経幹細胞にウイルスを感染させ、GFP の蛍光によりウイルスの感染とターゲットの遺伝子発現を確認し、培養皿上で神経幹細胞数と GFP 陽性細胞数からそれぞれのウイルスの titer を算出した。移植実験では multiplicity of infection (MOI) = 2 で神経幹細胞にレトロウイルスを感染させた。

大脳皮質への神経幹細胞の移植

細胞移植の手順は、以前のウイルスベクターを個体動物の脳組織に注入する手法から、注入するガラスニードル（先端直径 45-60 μm ）を改良することで行った (Cetin et al., 2006)。生後 4 から 6 週齢の C57BL/6NCr マウスの腹腔内にケタミン (100 mg / kg) およびキシラジン (10 mg / kg) を注入することにより麻酔した。定位固定装置 (Narishige, Tokyo, Japan) によりマウス頭部を固定し、一次体性感覚野 (bregma から 1 mm 後方、3 mm 側方、0.5 mm の深さ) に細胞懸濁液 500 nl (10^4 個の神経幹細胞) をゆっくりと注入し、5 分程度静置し、術部を縫合した。細胞移植後、標準的なケージ (縦 203 mm、横 107 mm、高さ 141 mm) にて 1 ケージ 1 匹で 2 週間飼育した。豊かな環境下ではトンネル、ランニングホイール、イグルー (Bio-serve, Frenchtown, NJ, USA) を 1 つずつ含むケージ (縦 263 mm、横 159 mm、高さ 125 mm) にて 1 ケージ 1 匹で 2 週間飼育した。拒絶反応を防ぐために免疫抑制剤シクロスポリン (10 mg / kg) と抗生物質ゲンタマイシンを (8 mg / kg) を移植後 2 週間投与した。

電気生理学的記録

細胞移植 2 週間後にパッチクランプ法により移植細胞から電気生理学的記録を計測した。断頭後すばやく脳を摘出し、 1°C 以下、95%の O_2 と 5%の CO_2 にて飽和させた人工脳脊髄液 (ACSF) にて保持した。使用した ACSF の組成は以下である。

・ ACSF

125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 25mM NaHCO_3 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , and 25 mM D-glucose

スライサー (VT1200S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて移植部位周辺の厚さ 250 μm の脳スライスを作成し、以下の高濃度グルコース ACSF に保持した。少なくとも 1 時間室温にて培養してからパッチクランプ法にてよる電氣的記録を行った。

・ 高濃度グルコース ACSF

75 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 26 mM NaHCO_3 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 0.7 mM CaCl_2 , 2.1 mM MgCl_2 , and 100 mM D-glucose

ホールセル記録

培養していた脳スライスを記録チャンバーに移し、顕微鏡 (Eclipse E600FN; Nikon Corporation, Tokyo, Japan) にて観察し、ACSF を 1 mL / min の流速でペリスタポンプ (SJ-1220; ATTO Corporation, Tokyo, Japan) で循環させながら、GFP 陽性の移植細胞から記録を行った。電流固定記録は 500 ms の脱分極及び過分極電流を記録細胞に導入し、活動電位を誘発させた。電圧固定記録はマイナス 60 mV に固定し、興奮性シナプス後電流を記録した。

組織固定と免疫抗体染色

細胞移植を行ったマウスに 10%カルバミド酸エチル (Wako pure chemical Co. Tokyo, Japan) (10 mg / kg) を腹腔内投与し、ペリスタポンプを用いて 8.5% 生理食塩水で脱血後、4%パラホルムアルデヒド溶液によって灌流固定を行った。取り出した脳全体を 4%パラホルムアルデヒド溶液に一晩浸透させた。その後、30%スクロース溶液の中に移し、4° C で二晩浸透させた。その後、小脳と嗅球を切断し、木片の上に tissue tek により接着させ、ドライアイスにより凍結させた。脳組織をクリオスタット内で厚さ 30 μ m の冠状断切片にし、移植部位の前後 2 mm 程度をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に浮遊させた。その後 PBS で 3 回洗浄し、0.1%triton-X/3%FBS を含む blocking 溶液で 1 時間ブロッキングを行い、下記に示す各一次抗体を入れた blocking 溶液と置換し、4° C で一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄し、下記に示す各二次抗体を入れた blocking 溶液を加え、3 時間反応させた。その後、PBS で 3 回洗浄し、さらに細胞の核を Hoechst 33258 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) で染色した後に、ガラススライド (Matsunami, Japan) に貼り付け、モビオールにて封入し、共焦点蛍光顕微鏡 (LSM710、ZEISS) で観察し、画像を取得した。

一次抗体は以下を用いた。

Rat anti-GFP (1:1000, Nacalai Tesque), mouse anti-NeuN (1:500, Millipore), rabbit anti-GAD (1:500, Millipore), guinea pig anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:1000, Advanced Immunochemical)

二次抗体は以下を用いた。

Alexa 488-conjugated donkey anti-rat IgG, Alexa 546-conjugated goat anti-mouse IgG, Alexa 647-conjugated donkey anti-rabbit IgG (all used at 1:500; Invitrogen), Cy5-conjugated donkey anti-guinea pig IgG (1:500, Jackson Immunoresearch)

移植神経幹細胞数の計測

取得した画像から移植神経幹細胞数を計測した。移植神経幹細胞は Hoechst のシグナルの周りに移植細胞のマーカーである GFP を発現している細胞として同定した。それぞれの移植したマウスの個体毎に移植神経幹細胞数を計測し、移植神経幹細胞の生存率と、特定の細胞種のマーカーを発現している細胞数を移植した個体毎に算出した。

データ解析

図のデータは平均値±SEM で表示した。図 3 における検定は Tukey's HSD test を用いた (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, n.s., not significant)。図 4、5 における検定は Mann-Whitney U test を用いた (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, n.s., not significant)。

Results (結果)

外来性移植神経幹細胞の成体の一次体性感覚野における形態及び生理学的特徴

移植前にレトロウイルスにより GFP を発現させることで移植神経幹細胞を標識し、移植後 2 週間免疫組織学的に移植神経幹細胞の生体内での形態を観察し、細胞体や神経突起の有無を明らかにした (図 1A、B)。その結果、GFP 陽性の移植神経幹細胞由来の細胞は多数の神経突起をもち、一次体性感覚野の第 2/3 層から第 4 層に生着 (図 1C) していた。その移植神経幹細胞由来の細胞の中には先端樹状突起や基底樹状突起を伸長し、スパインと呼ばれる後シナプス構造を持つ細胞が観察された。その形態は内在性の脳皮質第 2/3 層の神経細胞に非常に類似しており、このような形態をした移植細胞は、定性的ではあるが豊かな環境下にて 2 週間飼育した個体に多く観察された。次に一次体性感覚野の第 2/3 層から第 4 層に観察された移植神経幹細胞由来の細胞を、GFP 陽性細胞数を計測することにより定量した。その結果、移植後 2 週間の時点では、遺伝子操作もしくは環境的要因を制御することにより移植神経幹細胞由来の細胞の生存率に変化はみられなかった (図 1D)。また生理学的特徴を調べるために、パッチクランプ法によりホールセル記録を行った。その結果、移植神経幹細胞は成熟した神経細胞へと分化しており、典型的な活動電位を示し、内在性の脳皮質第 2/3 層と同様の生理学的特徴を有していた (図 1E)。また GABA 受容体の選択的拮抗剤である 10 μ M の bicuculline を作用させると興奮性シナプス後電流 (Excitatory Post Synaptic Current; EPSC) が計測された (図 1F)。移植神経幹細胞由来の神経細胞は、内在性の神経細胞群から興奮性のシナプス入力を受けていることが確認された。

外来性移植神経幹細胞の生体内での分化能

今回用いた胎生 14.5 日齢由来の神経幹細胞は *in vitro* の実験系において 100 回以上継代を行って場合でも神経細胞やアストロサイト、オリゴデンドロサイト等へ分化する多分化能を有している。またそのような多分化能は Leukemia Inhibitory Factor (LIF) や Bone morphogenetic proteins (BMPs) といった細胞シグナルによって分化誘導を受けることにより発揮される (Nakashima et al., 1999; Conti et al., 2005)。そこで、特定の細胞種のマーカーを用いて多重免疫蛍光染色を行うことにより移植神経幹細胞が生体内の脳皮質において神経細胞もしくはグリア細胞といった特定の細胞種へと分化しているのかを確認し、移植神経幹細胞の生体内での分化能について検討した。その結果、GFP 陽性の移植神経幹細胞由来の細胞は NeuN 陽性の神経細胞、もし

くは GFAP 陽性のアストロサイトへと分化していた (図 2A、B)。さらに GFP、NeuN、双方ともに陽性の移植神経幹細胞由来の神経細胞は、GAD 陽性の抑制性神経細胞へと分化していた (図 2C)。さらに移植神経幹細胞がどの程度の割合で特定の神経細胞、グリア細胞へと分化しているのかを組織学的に定量し、環境的要因を変化させたり、遺伝子操作を行った際に細胞運命にどのように変化が起こるのかを検証した。

環境的要因による分化能の変化

まず環境的要因として豊かな環境下で飼育することにより内在性の神経幹細胞の細胞系譜が神経新生へと誘導されることが明らかとなっているので、多様な感覚入力を与えた際に外来性の移植神経幹細胞の細胞系譜にどのような変化が現れるのかを検証した。その結果、移植神経幹細胞由来の NeuN 陽性の成熟した神経細胞に分化した割合が有意に増加していた (EE, $44.1 \pm 11.0\%$ (合計では 108 個中 38 個陽性), Control, $9.5 \pm 3.9\%$ (合計では 313 個中 91 個陽性), $P < 0.05$; 図 3)。また移植神経幹細胞由来の GFAP 陽性のアストロサイトに分化した細胞の割合が有意に減少していた (EE, $9.3 \pm 4.7\%$ (合計では 73 個中 13 個陽性), Control, $40.1 \pm 7.8\%$ (合計では 164 個中 69 個陽性), $P < 0.05$; 図 3)。またこの神経新生の効果はヒゲをトリミングすることによる感覚遮断によって阻害されず、コントロール群 (標準的なケージで飼育した群) と比較して有意な差が見られ、EE 群 (豊かな環境下で飼育した群) と比較して有意な差が見られなかった。グリア新生に対しては減少傾向はみられるものの、コントロール群と有意な差はみられず、EE 群とも有意な差が見られなかった (NeuN, $43.4 \pm 8.4\%$ (合計では 100 個中 46 個陽性), $P < 0.05$, ; GFAP, $20.4 \pm 4.6\%$ (合計では 100 個中 22 個陽性), $P > 0.05$; 図 3)。移植後のマウスの飼育状況を観察すると、イグルーに入って睡眠をとったり、ランニングホイールで自発的な運動を積極的に行う様子が観察された。このような環境的要因によって神経活動が亢進され、移植神経幹細胞の神経新生が活性化されたと考えられる。このような神経新生の効果は神経前駆細胞に見られる転写因子の活性化によって引き起こされた可能性が考えられる。そこで次に遺伝子操作による移植神経幹細胞の細胞系譜への影響を検討した。

遺伝子操作による分化能の変化

神経細胞への分化を発生初期に制御している転写因子である Ngn2、Mash1 は *in vitro* の実験系において神経細胞への分化のみならず、成熟過程も制御しているといわれており (Berninger et al., 2007)、これらの転写因子を移植前に神経幹細胞に導入することにより、外来性の神経幹細胞がどのような細胞種

へと分化するのかを検証した。その結果、Ngn2、Mash1 を強制発現させると移植神経幹細胞由来の細胞群の中で、NeuN 陽性の成熟した神経細胞へと分化した細胞の割合が有意に増加した (Ngn2, $40.3 \pm 8.2\%$ (合計では 260 個中 82 個陽性), $P < 0.05$; Mash1, $66.3 \pm 4.6\%$ (合計では 166 個中 116 個陽性), $P < 0.001$; Control, $9.5 \pm 3.9\%$; 図 4A)。また移植神経幹細胞由来の GFAP 陽性のアストロサイトに分化した割合は Ngn2、Mash1 を強制発現させると、双方ともに有意に減少していた (Ngn2, $13.9 \pm 6.9\%$ (合計では 390 個中 60 個陽性), $P < 0.05$; Mash1, $4.2 \pm 2.4\%$ (合計では 301 個中 13 個陽性), $P < 0.05$; Control, $40.1 \pm 7.8\%$; 図 4B)。このように転写因子の導入により、環境的要因を変化させることなしに、神経新生の促進とグリア新生の抑制が活性化された。

各要因が成熟した神経細胞種へと分化する過程に与える影響

上記のように活性化された神経新生の中で、環境的要因や遺伝子操作が及ぼす特定の神経細胞種の分化への影響を検証し、移植神経幹細胞の成熟過程を定量した。その結果、豊かな環境下で飼育することにより GAD 陽性の抑制性神経細胞の割合が有意に減少した (EE, $7.8 \pm 5.1\%$ (合計では 44 個中 3 個陽性), Control, $44.3 \pm 11.5\%$ (合計では 101 個中 55 個陽性), $P < 0.05$; 図 5A、B)。Ngn2 を作用させることにより GAD 陽性の抑制性神経細胞の割合に有意な変化は見られなかった。また Mash1 を作用させることにより GAD 陽性の抑制性神経細胞の割合が有意に増加していることが明らかになった (Ngn2, $60.6 \pm 10.9\%$ (合計では 84 個中 51 個陽性), $P > 0.05$; Mash1, $81.4 \pm 3.6\%$ (合計では 117 個中 97 個陽性), $P < 0.05$; Control, $44.3 \pm 11.5\%$; 図 5C、D)。このように大脳皮質の形成にとって重要な要因を作用させることにより、生体内での神経幹細胞の分化過程のみならず、成熟過程も変化していることが明らかとなった。

Discussion (考察)

本研究では、神経幹細胞の分化過程と成熟過程に関わる要因として、多様な感覚入力もしくは転写因子を作用させ、移植神経幹細胞の細胞系譜にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

胎生 14.5 日の終脳由来の神経幹細胞が、異所的に移植された大脳皮質の一次体性感覚野においても成熟した神経細胞、グリア細胞への分化能を有していることを示した (図 2A、B)。この結果は、胎生 14.5 日の終脳由来の神経幹細胞を胎生期や出生後のマウスの海馬、線条体に移植すると GFAP 陽性のグリア細胞または MAP2 陽性の神経細胞へと分化することからも支持される (Conti et al., 2005)。移植神経幹細胞由来の神経細胞へと分化した細胞の中には抑制性神経細胞に分化している細胞や多くの神経突起上にスパインと呼ばれる後シナプス構造をもつ細胞が観察され、大脳皮質第 2/3 層に存在している内在性の錐体細胞と非常によく似た構造を有しており、神経幹細胞が生体内で分化、成熟している事を確認した (図 1C)。また移植神経細胞において活動電位や EPSC が計測され、電気生理学的特徴も内在性の大脳皮質第 2/3 層の錐体細胞と類似していた (図 1E 及び 1F)。このことから移植先の非神経新生領域と考えられている大脳皮質において外来性の神経幹細胞を用いて異所的に興奮性錐体細胞を生み出すことができたと考えられる。またスパインは成熟したマウスの大脳皮質においても非常に高い可塑性を保持し、記憶や学習、感覚情報処理に関与していると考えられていることから (Yang et al., 2009)、移植神経幹細胞由来の細胞が内在性の神経細胞からシナプス入力を受け、一次体性感覚野での感覚入力に関する情報処理を行っている可能性が示された。さらに移植細胞が微小な神経回路網に取り込まれたことから、大脳皮質のシナプス結合の異常によって社会行動の破綻につながると考えられている (Qiu et al., 2011; Rinaldi et al., 2007, 2008) 自閉症スペクトラム障害等に対する幹細胞治療への第一歩が踏み出せたものと考えられる。

本研究で用いたランニングホイール、トンネル、イグルーを含むマウス 1 匹で飼育する環境は、先行研究で頻繁にみられる豊かな環境下 (群飼いによる社会行動や強制的な歩行運動など) と比較すると、豊かな環境としての要因が多くはない (Nithianantharajah et al., 2006; van Praag et al., 2000)。しかしながら、本研究での豊かな環境によって神経新生の亢進、グリア新生の抑制が見られたのに対し、ヒゲのトリミングによる感覚遮断を行った場合には、

これらの効果は阻害されなかったことから（図 3）、感覚入力以外の豊かな環境下での要因が神経新生を活性化した可能性が考えられる。げっ歯類は閉所や暗所を好む性質があり（Lister, 1987）、トンネルやイグルーを含む環境下ではストレスが軽減され、自発的に自由に運動や探索を行うことができ、それに伴う体温の上昇や血流量の増加などによって神経活動が亢進し、Ca シグナルや神経栄養因子の分泌が促進することにより生み出されたと考えられる。一方でヒゲからの感覚入力情報を処理するためのネットワーク形成にはヒゲからの入力が必要であると考えられるが（Wu et al., 2011）今回はその効果が観察されなかった。適切なネットワークを構築するためには臨界期と呼ばれる時間窓が設定されていることが知られている（Sehara et al., 2010）。本研究で検討した発達段階での細胞系譜の決定には感覚入力はさほど重要でなかったのかもしれない。これまでの Fred Gage らの精力的な研究により、海馬における神経新生はランニングホイールによる生体活動の亢進によって増加することが報告されており（Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 2000）、本研究では外来性の神経幹細胞が脳新皮質においてもその神経新生を示し、遺伝子操作や外部刺激によって細胞系譜に影響を与えられることが世界で初めて確認された。

豊かな環境の効果として Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の分泌が促進されることが知られており、豊かな環境下で Mash1 陽性の神経幹細胞が増殖すること（Uda et al., 2007）、BDNF により Mash1 の発現が上昇し、神経細胞への分化が促進されること（Ito et al., 2003）、および BDNF によって抑制性神経細胞のシナプス結合を修飾することで成熟過程を制御していることが報告されている（Jiao et al., 2011）。また BDNF ノックアウトマウスに関する研究によると、ホモでは生後 2 週間ほどで死亡し、ヘテロノックアウトマウスでは運動機能の障害、知覚神経節の欠損による聴覚機能不全等が確認されている（Ernfors et al., 1994）が成体になるにつれて生存する個体が減少するがゆえに神経新生に関する詳細な検討はない。コンディショナルノックアウトマウスの条件では、BDNF が神経新生の成熟に関与しているとの報告がある（Emily G et al., 2012）。これらの知見を踏まえると、豊かな環境による神経新生の効果は、移植先の脳皮質の BDNF の放出が活性化され、移植神経幹細胞に Mash1 が発現することにより外来性神経幹細胞の神経新生が促進され、興奮性神経細胞へと成熟した可能性が考えられ、そのシナプス結合も適切に形成されていると推察される。

先行研究により示されている Ngn2 や Mash1 といった bHLH 型転写因子の働き

によって、内在性の神経新生のみならず、外来性の移植神経幹細胞の神経新生を促進することができた (図 4)。以前の報告から (Blum et al., 2011) Ngn2 を発現させた場合には神経新生の促進、グリア新生の抑制の効果は見られたものの、神経細胞が成熟していく過程として、抑制性神経細胞の割合が減少することが予想されたが、神経細胞種への分化誘導の効果は観察できなかった (図 5C、D)。これは Ngn2 が、NeuroD や Tbr2 などを通して間接的に細胞分化を制御しており、外来性の移植神経幹細胞の成熟過程に影響を及ぼすことはなかったと考えられる。Mash1 は直接的に GAD の発現を制御しており (Roybon et al., 2008; Roybon et al., 2010)、Mash1 の発現により外来性移植神経幹細胞を抑制性神経細胞へと分化誘導することができたと考えられる。近年 Mash1 はオリゴデンドロサイトへの分化誘導を制御しているとされ、海馬歯状回に Mash1 を強制発現させると 4 週間後に NG2 や Olig2 といったオリゴデンドロサイトのマーカーを発現するという報告があり (Jessberger et al., 2008)、本研究で観察された神経新生の効果は経時的に観察すると一過的な変化であり、より長期に観察することによりオリゴデンドロサイトへ分化する可能性が挙げられる。このように興奮性神経細胞及び抑制性神経細胞を移植分けすることが可能となり、そのバランスが破綻している自閉症スペクトラム障害等の治療への応用が期待される。

本研究は、外来性の異所的な移植神経幹細胞に対して Mash1 を強制発現させることにより、抑制性神経細胞への細胞運命を制御できる可能性を示した (図 5)。発生段階において大脳皮質が形成される際に、発生時期や領域が抑制性神経細胞の生理学的な特徴を反映していること (Butt et al., 2005)、また皮質のプルブアルブミン陽性の抑制性神経細胞は特定の錐体細胞へ投射をしているわけではなく、不特定の錐体細胞へと投射していることから (Packer and Yuste, 2011)、移植神経幹細胞由来の抑制性神経細胞が機能するためには特定の結合を形成する必要はなく、周辺の興奮性神経細胞に対して不特定の神経活動の抑制を行うことで機能する可能性がある。また豊かな環境下で飼育することにより、GAD 陽性の抑制性神経細胞の割合が有意に減少していることから、興奮性神経細胞の割合が相対的に増加しており (図 5C、D)、第 2/3 層にある興奮性神経細胞として、従来的一次体性感覚野の神経細胞と類似したシナプス結合 (Petreanu et al., 2009) を形成している可能性がある。以上のように外来性移植神経幹細胞が、異所的な移植先である大脳皮質においても興奮性、抑制性神経細胞へと成熟していることを明らかにした。近年マウス胎仔や出生直後の大脳皮質に細胞移植を行い、その細胞の性質を特徴づける研究があるが、細胞移植を行うだけでは、神経細胞同士のシナプス結合や脳領域間の投射にま

だ改善点が見られる (Gaspard et al., 2008; Ideguchi et al., 2010)。これを克服するためには移植前の細胞培養法の改善や本研究のように移植後に様々な条件を改良することにより、神経新生や神経細胞の成熟を誘導する事で正常な神経細胞群と同様に移植細胞群が内在性の神経回路網に組み込むことが可能であると考えられる。

本研究にて外来性の移植神経幹細胞が大腦皮質の内在性神経細胞と非常によく似た形態及び生理学的特徴を持つ神経細胞へと成熟し、環境的要因や遺伝子操作によって外来性移植神経幹細胞にも神経新生の亢進の効果が得られ、その成熟過程を観察することができた。さらに今後、移植神経幹細胞由来の神経細胞から電気生理学的な応答や感覚器からの応答を計測することにより (Komai et al., 2006; Opitz et al., 2007) 一次体性感覚野において周辺の神経細胞群と同様の感覚情報処理を行える神経細胞へと成熟しているのかを検討することで、移植神経細胞によるより詳細な感覚情報処理機構が解明できると考えられる。近年の報告では視覚野に移植した幼弱な神経細胞が移植後に方位選択性及び方向選択性を示し、感覚情報処理を行っていることが明らかとなった (Falkner et al., 2016)。このことから本研究で見られた移植神経幹細胞が成熟した神経細胞も感覚情報処理を行っていることが想定される。さらに一次体性感覚野の神経細胞群は知覚、認知過程の最初の情報処理の責任領域であり、この領域の神経活動によってヒゲによる弁別学習が実行可能であり (Huber et al., 2008)、知覚、認知行動の破綻による社会行動に異常がみられる精神疾患に対して、移植神経幹細胞を用いて大腦皮質の層間のシナプス結合を適切に補い、知覚、認知過程を回復させる事で再生医療による根本治療に貢献できる研究が期待される。

Acknowledgements (謝辞)

研究活動を行う大変素晴らしい環境を提供して下さいました塩坂貞夫教授、稲垣直之教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究を行う素晴らしい機会と自らを成長させていただける環境を与えて下さり、研究への取り組み方を熱心にご指導頂きました駒井章治准教授に心より深く感謝御礼申し上げます。

本研究の共同研究者であった分子神経分化制御研究室の中島欽一教授には、本研究の遂行にあたり、常に充実した実験環境と的確なアドバイスを与えて頂き、心より感謝申し上げます。

また、神経幹細胞の調整やウイルスベクターの作成に関して様々なアドバイス、物資の提供をして頂いた、楠松昌彦博士、ならびに辻村啓太博士に心から厚く御礼申し上げます。

暖かい気遣いのご助言で研究生生活を支えて下さった神経機能科学研究室の皆様、そして駒井グループの先輩、同期、後輩の皆様にお礼申し上げます。

研究の犠牲となり、研究の遂行を助けて頂いた実験動物に、哀悼の意を表すると共に感謝致します。

長年にわたる学生生活を支えて下さり、叱咤激励して頂きました父、母、姉に、また今は亡き、父方の祖父、祖母、母方の祖父、祖母に心から深く感謝致します。

References (参考文献)

- Abematsu M, Tsujimura K, Yamano M, Saito M, Kohno K, Kohyama J, Namiyama M, Komiya S, Nakashima K (2010) Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. *J Clin Invest* 120:3255-3266.
- Berninger B, Guillemot F, Götz M. (2007) Directing neurotransmitter identity of neurones derived from expanded adult neural stem cells. *Eur J Neurosci* 25:2581-2590.
- Blum R, Heinrich C, Sánchez R, Lepier A, Gundelfinger ED, Berninger B, Götz M (2011) Neuronal network formation from reprogrammed early postnatal rat cortical glial cells. *Cereb Cortex* 2:413-424.
- Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G (2005) The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48:591-604.
- Cetin A, Komai S, Eliava M, Seeburg PH, Osten P (2006) Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nat Protoc* 1:3166-3173.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD Jr, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ (2009) A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325:210-213.
- Conti L, Cattaneo E (2010) Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nat Rev Neurosci* 11:176-187.
- Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M, Biella G, Sun Y, Sanzone S, Ying QL, Cattaneo E, Smith A (2005) Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 3:e283.

Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, Malenka RC (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42:535-552.

Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339-350.

Döbrössy MD, Dunnett SB (2008) Environmental housing and duration of exposure affect striatal graft morphology in a rodent model of Huntington's disease. *Cell Transplant* 17:1125-1134.

Dranovsky A, Picchini AM, Moadel T, Sisti AC, Yamada A, Kimura S, Leonardo ED, Hen R (2011) Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus. *Neuron* 70:908-923.

Emily G. Waterhouse, Juan Ji An, Lauren L. Orefice, Maryna Baydyuk, Guey-Ying Liao, Kang Zheng, Bai Lu, and Baoji Xu (2012) Brain-derived Neurotrophic Factor Promotes Differentiation and Maturation of Adult-born Neurons Through GABAergic Transmission. *J Neurosci* 32:14318-14330.

Ernfors, P, Lee, K. F, Jaenisch, R (1994) Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368:147-150.

Falkner S, Grade S, Dimou L, Conzelmann KK, Bonhoeffer T, Götz M, Hübener M. (2016) Transplanted embryonic neurons integrate into adult neocortical circuits. *Nature* 539:248-253.

Feldman DE (2009) Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu Rev Neurosci* 32:33-55.

Feldman DE, Brecht M (2005) Map plasticity in somatosensory cortex. *Science* 310:810-815.

Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.

Gaspard N, Bouschet T, Hourez R, Dimidschstein J, Naeije G, van den Aemele J, Espuny-Camacho I, Herpoel A, Passante L, Schiffmann SN, Gaillard A, Vanderhaeghen P (2008) An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 7211:351-357.

Glaser T, Pollard SM, Smith A, Brüstle O (2007) Tripotential Differentiation of Adherently Expandable Neural Stem (NS) Cells. *PLoS One* 2:e298.

Hicks AU, Lappalainen RS, Narkilahti S, Suuronen R, Corbett D, Sivenius J, Hovatta O, Jolkkonen J (2009) Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural precursor cells and enriched environment after cortical stroke in rats: cell survival and functional recovery. *Eur J Neurosci* 29:562-574.

Hofer SB, Ko H, Pichler B, Vogelstein J, Ros H, Zeng H, Lein E, Lesica NA, Mrcic-Flogel TD (2011) Differential connectivity and response dynamics of excitatory and inhibitory neurons in visual cortex. *Nat Neurosci* 14:1045-1052.

Hofstetter CP, Holmström NA, Lilja JA, Schweinhardt P, Hao J, Spenger C, Wiesenfeld-Hallin Z, Kurpad SN, Frisén J, Olson L (2005) Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* 8:346-353.

Holtmaat A, Svoboda K (2009) Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10:647-658.

Holtmaat A, Wilbrecht L, Knott GW, Welker E, Svoboda K (2006) Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* 441:979-983.

Huber D, Petreanu L, Ghitani N, Ranade S, Hromádka T, Mainen Z, Svoboda K (2008) Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature* 7174:61-64.

Ideguchi M, Palmer TD, Recht LD, Weimann JM (2010) Murine embryonic stem cell-derived pyramidal neurons integrate into the cerebral cortex and appropriately project axons to subcortical targets. *J Neurosci* 30:894–904.

Ito H, Nakajima A, Nomoto H, Furukawa S (2003) Neurotrophins facilitate neuronal differentiation of cultured neural stem cells via induction of mRNA expression of basic helix-loop-helix transcription factors Mash1 and Math1. *J Neurosci Res* 71:648–658.

Jessberger S, Toni N, Clemenson GD Jr, Ray J, Gage FH (2008) Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 11:888–893.

Jiao Y, Zhang Z, Zhang C, Wang X, Sakata K, Lu B, Sun QQ (2011) A key mechanism underlying sensory experience-dependent maturation of neocortical GABAergic circuits in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:12131–12136.

Johnson JE, Birren SJ, Anderson DJ (1990) Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346:858–861.

Kawaguchi Y, Kubota Y. (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476–486.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493–495.

Komai S, Denk W, Osten P, Brecht M, Margrie TW (2006) Two-photon targeted patching (TPTP) in vivo. *Nat Protoc* 1:647–652.

Lindvall O, Kokaia Z (2006) Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 441:1094–1096.

Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 2:180–185.

- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793–807.
- Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsune T, Kawabata M, Miyazono K, Taga T (1999) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3–Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284:479–482.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7:697–709.
- Ohira K, Furuta T, Hioki H, Nakamura KC, Kuramoto E, Tanaka Y, Funatsu N, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M, Miyakawa T, Kaneko T, Nakamura S (2010) Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nat Neurosci* 13:173–179.
- Opitz T, Scheffler B, Steinfarz B, Schmandt T, Brüstle O (2007) Electrophysiological evaluation of engrafted stem cell-derived neurons. *Nat Protoc* 7:1603–1613.
- Packer AM, Yuste R (2011) Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition? *J Neurosci* 31:13260–13271.
- Petreaanu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K (2009) The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature* 457:1142–1145.
- Qiu S, Anderson CT, Levitt P, Shepherd GM (2011) Circuit-specific intracortical hyperconnectivity in mice with deletion of the autism-associated met receptor tyrosine kinase. *J Neurosci* 31:5855–5864.
- Rinaldi T, Kulangara K, Antoniello K, Markram H (2007) Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation

induced by prenatal exposure to valproic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13501–13506.

Rinaldi T, Silberberg G, Markram H (2008) Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid. *Cereb Cortex* 18:763–770.

Roybon L, Hjalt T, Christophersen NS, Li JY, Brundin P (2008) Effects on differentiation of embryonic ventral midbrain progenitors by *Lmx1a*, *Msx1*, *Ng2*, and *Pitx3*. *J Neurosci* 28:3644–3656.

Roybon L, Mastracci TL, Ribeiro D, Sussel L, Brundin P, Li JY (2010) GABAergic differentiation induced by *Mash1* is compromised by the bHLH proteins *Neurogenin2*, *NeuroD1*, and *NeuroD2*. *Cereb Cortex* 20:1234–1244.

Sehara K, Toda T, Iwai L, Wakimoto M, Tanno K, Matsubayashi Y, Kawasaki H. (2010) Whisker-related axonal patterns and plasticity of layer 2/3 neurons in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 30:3082–3092.

Tsujimura K, Abematsu M, Kohyama J, Namihira M, Nakashima K (2009) Neuronal differentiation of neural precursor cells is promoted by the methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Exp Neurol* 219:104–111.

Uda M, Ishido M, Kami K (2007) Features and a possible role of *Mash1*-immunoreactive cells in the dentate gyrus of the hippocampus in the adult rat. *Brain Res* 1171:9–17.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 3:191–198.

Vicario-Abejón C, Collin C, Tsoulfas P, McKay RD (2000) Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. *Eur J Neurosci* 12:677–688.

Wernig M, Benninger F, Schmandt T, Rade M, Tucker KL, Büssow H, Beck H, Brüstle O (2004) Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo. *J Neurosci* 24:5258–5268.

Wu CS, Ballester Rosado CJ, Lu HC. (2011) What can we get from 'barrels': the rodent barrel cortex as a model for studying the establishment of neural circuits. *Eur J Neurosci.* 34:1663-1676.

Yang G, Pan F, Gan WB (2009) Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462:920-924.

Yamasaki TR, Blurton-Jones M, Morrisette DA, Kitazawa M, Oddo S, LaFerla FM (2007) Neural stem cells improve memory in an inducible mouse model of neuronal loss. *J Neurosci* 27:11925-11933.

Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'Shea DJ, Sohal VS, Goshen I, Finkelstein J, Paz JT, Stehfest K, Fudim R, Ramakrishnan C, Huguenard JR, Hegemann P, Deisseroth K (2011) Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477:171-178.

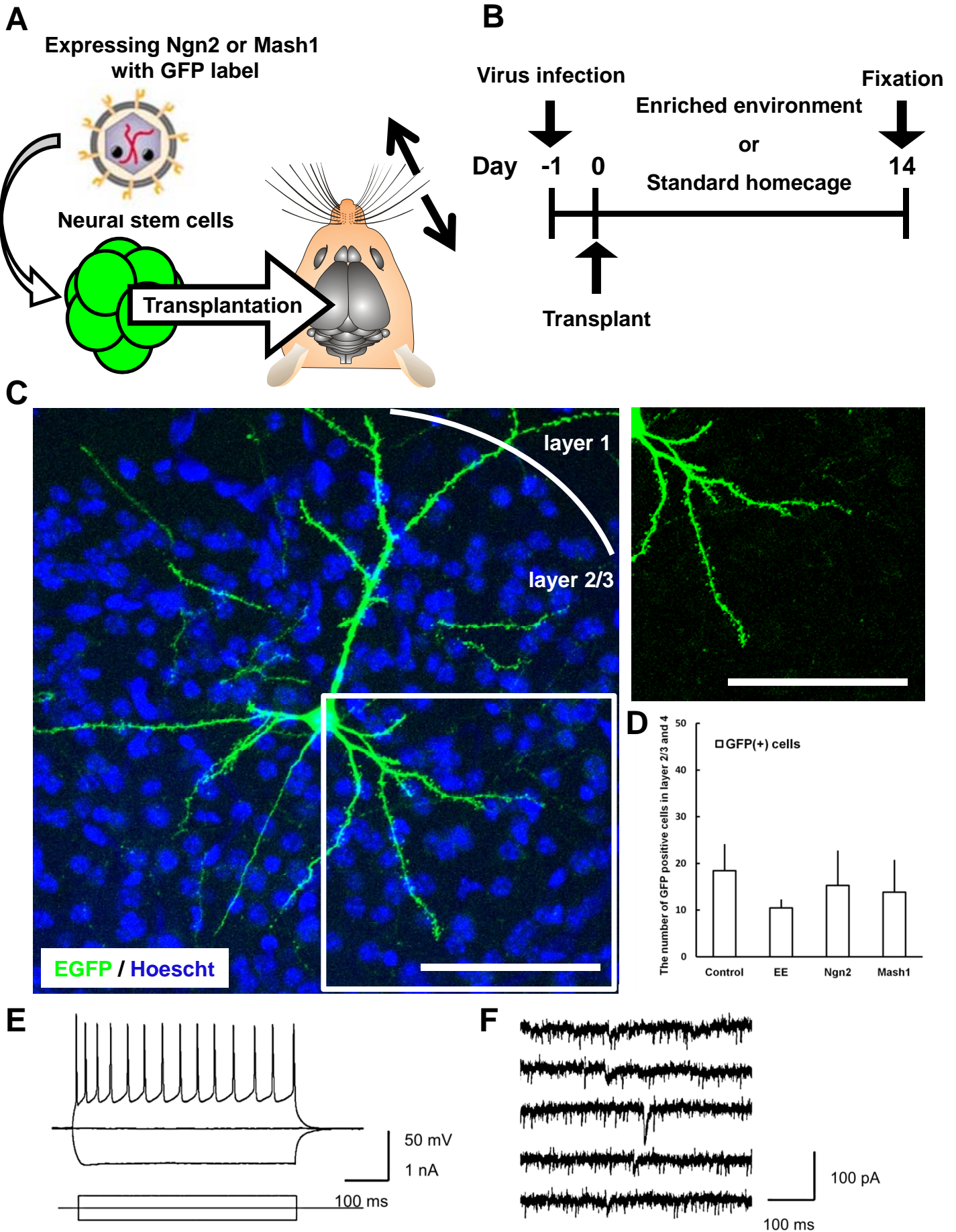


図1. 実験スケジュールと移植神経幹細胞の形態

A, 実験概略図 B, 実験スケジュール

C, 免疫蛍光染色による移植神経幹細胞の形態と拡大図、scale barは50 μ m

D, 環境的要因や遺伝子を制御した際の第2/3層から第4層にある移植神経幹細胞数を計測した。

E, 移植神経細胞の活動電位

F, 移植神経細胞の興奮性シナプス後電流

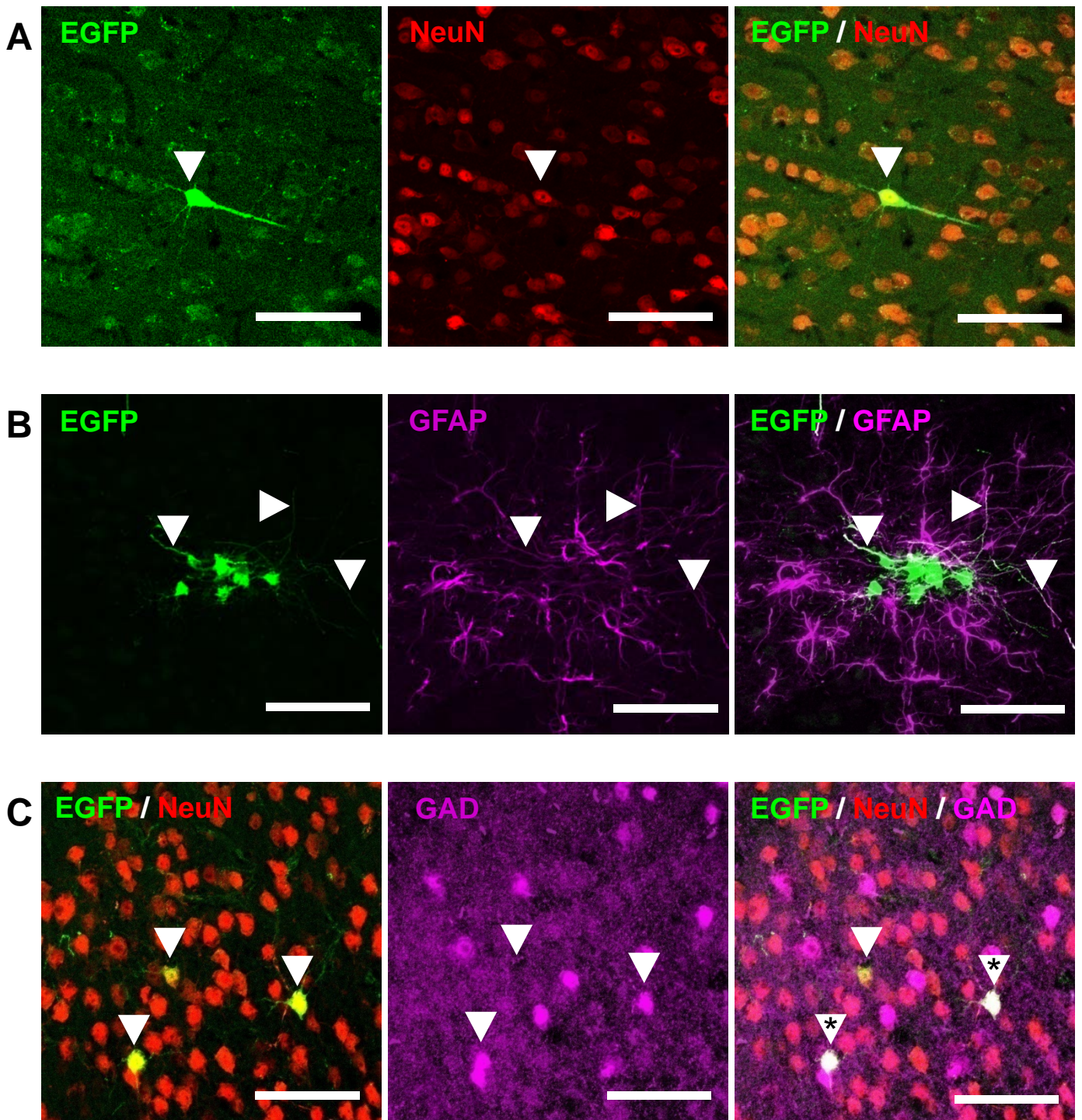


図2. 移植神経幹細胞の特定の細胞種への分化

A, NeuN陽性の成熟した神経細胞へと分化していた。

B, GFAP陽性のアストロサイトへと分化していた。

C, NeuN陽性の移植神経細胞はGAD陽性の抑制性神経細胞へと分化していた。 scale barは50 μ m

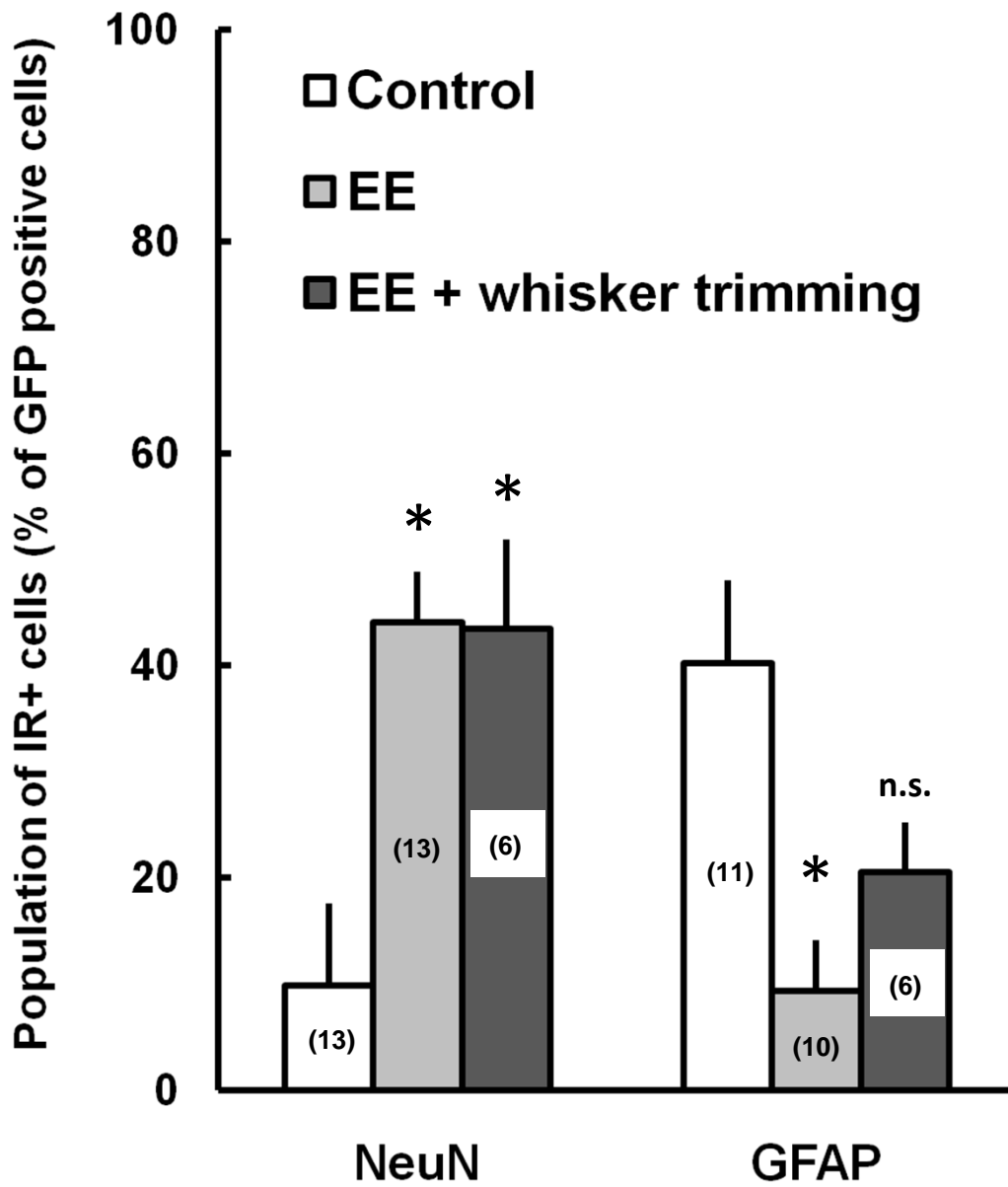


図3. 環境的要因が移植神経幹細胞の分化能に与える影響
 細胞移植後に2週間豊かな環境下で飼育した結果、細胞系譜に変化が見られた。縦軸は移植神経幹細胞に対する各マーカーの発現している細胞の割合を示している。

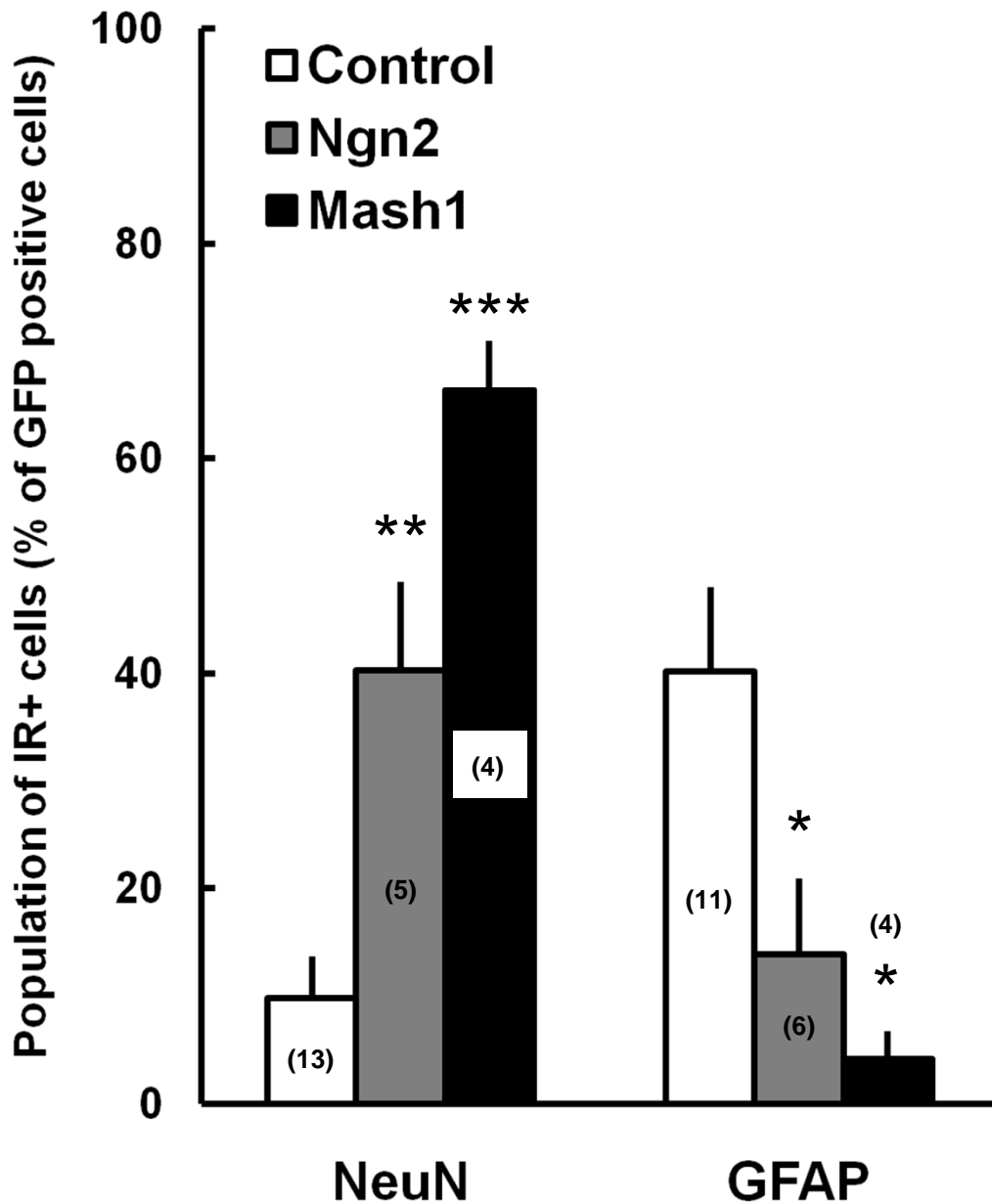


図4. 遺伝子操作が移植神経幹細胞の分化能に与える影響
 移植前に各転写因子をレトロウイルスにより発現させ、細胞移植を行い、2週間後細胞系譜に変化が見られた。縦軸は移植神経幹細胞に対する各マーカーの発現している細胞の割合を示している。

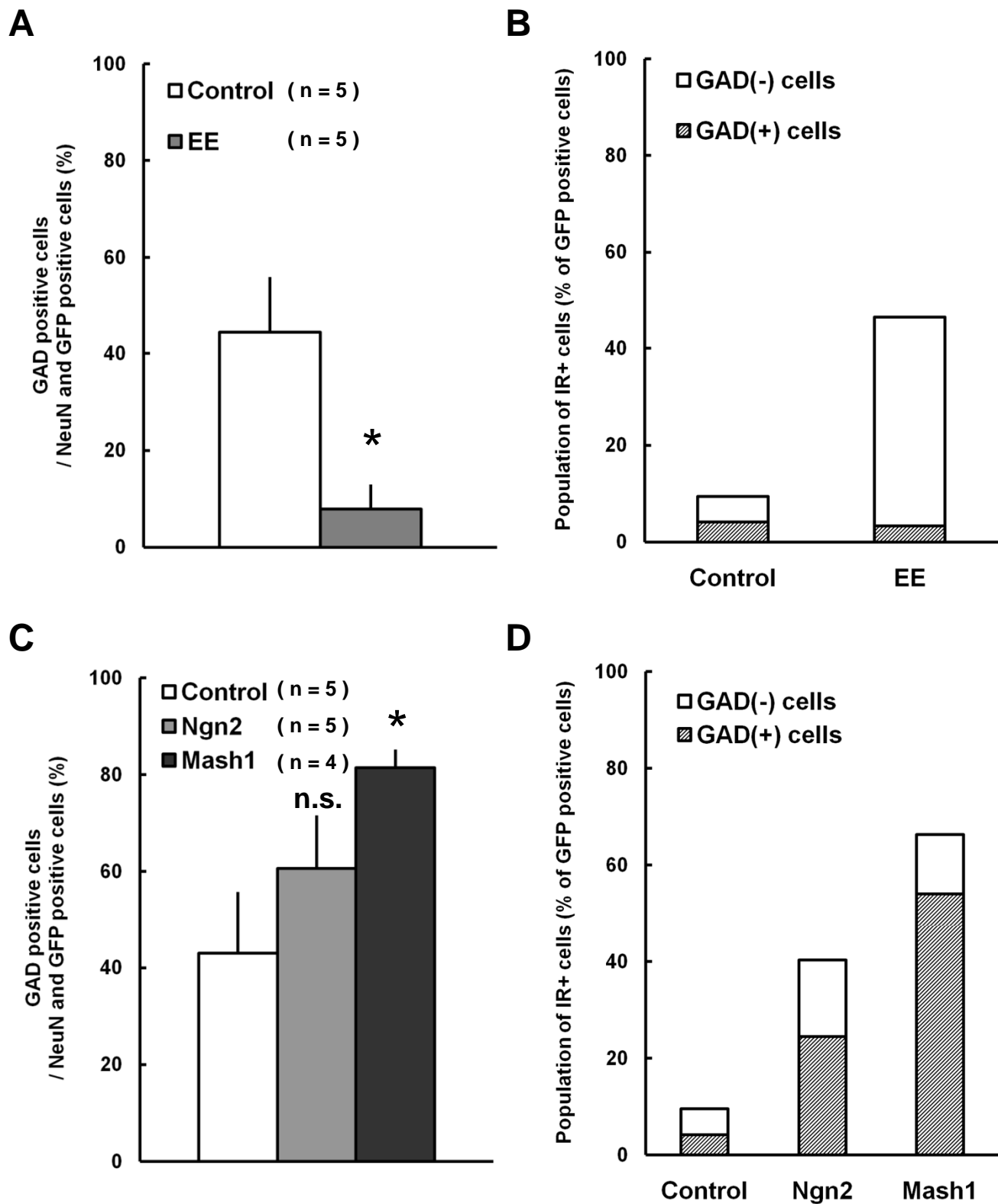


図5 移植神経幹細胞の神経細胞種の成熟傾向

- A, 豊かな環境によって移植神経細胞に対するGAD陽性細胞の割合が減少した。
 B, 環境的要因を作用させた際の全体の移植神経幹細胞に対する抑制性神経細胞の割合を示した。
 C, Mash1によって移植神経細胞に対するGAD陽性細胞の割合が増加した。
 D, 遺伝子操作の際の移植神経幹細胞に対する抑制性神経細胞の割合を示した。