

令和元年5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04267

研究課題名(和文)自由行動下マウスを用いた海馬神経新生現象への統合的アプローチ

研究課題名(英文)A multidisciplinary approach to adult hippocampal neurogenesis in mice

研究代表者

神野 尚三 (Jinno, Shozo)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10325524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：成体海馬神経新生の制御機序に関し、マウスを用いて組織化学的、分子生物学的、行動薬理学的な手法を組み合わせる集学的研究を展開した。主な成果は以下のとおりである。(1) 植物由来エストロゲン類縁体の作用を検討し、大豆イソフラボンの一種であるダイゼインが背側海馬の神経新生を促進することを発見した。(2) 細胞外マトリックスの一種であるコンドロイチン硫酸の作用について検討し、「豊かな環境」による成体海馬神経新生の促進は、コンドロイチン硫酸の増加を介することを発見した。(3) 腸内細菌叢の作用を検討し、乳酸菌の一種であるラクトバチルス・アシドフィルスが背側海馬の神経新生を促進することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬で生涯続く新たなニューロンの産生は成体海馬神経新生現象と呼ばれ、脳機能の重要な発現基盤の一つであると考えられている。近年、新たなニューロンの産生がストレスや加齢によって抑制され、抗うつ薬や運動、刺激の豊かな環境によって促進されるメカニズムに注目が集まっている。これは、新生ニューロンの産生を増加させることができれば、アルツハイマー病やうつ病の新たな治療起点となる可能性があるためである。一連の研究成果は、成体海馬神経新生現象の制御メカニズムの解明につながる基礎研究としての学術的な意義を有するだけでなく、同現象をターゲットとする新たな治療戦略を創出するという社会的意義を有するものである。

研究成果の概要(英文)：We have engaged in the multidisciplinary analysis on the regulatory mechanisms underlying adult hippocampal neurogenesis using mice. Main findings can be summarized as follows: (1) Administration of a plant-derived estrogen daidzein promoted the production of new granule cells in the dorsal hippocampus of middle-aged female mice. (2) Digestion of chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) in the dentate gyrus impaired the adult hippocampal neurogenesis and cognitive memory in adult male mice. Enriched environment (EE) increased the expression of CSPG in the dentate gyrus, and CSPG was required for the promotion of production of new granule cells by EE. (3) Administration of lactobacillus acidophilus promoted the production of new granule cells in dorsal hippocampus of middle-aged male mice, but not in young adult mice.

研究分野：神経解剖学

キーワード：成体海馬神経新生 背側海馬・腹側海馬 植物由来エストロゲン類縁体 腸内細菌叢 コンドロイチン硫酸 豊かな環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1960年代にAltmanは、トリチウムサイミジンを用いた一連の先駆的な研究によって、齧歯類の大脳皮質や海馬では発達後も神経新生が続いている可能性があることを明らかにした(Altman and Das, 1967)。その後約30年間、成体神経新生の分野はあまり顧みられることがなかったが、1990年代に新たな免疫組織化学的手法が開発され、新生ニューロンの検出が容易になったことを契機に(Cameron et al., 1993)、研究は再び活性化する。その後、成体海馬神経新生現象は認知や情動の制御に重要な役割を果たしていることが明らかにされ、現在に至るまで盛んに研究が行われている。

海馬は大脳辺縁系に属し、記憶や学習、情動などを担う高次脳機能の中核の一つである。近年の海馬研究のトピックスの一つに、海馬の長軸に沿った構造的・機能的分化が挙げられる。齧歯類では主として、記憶や学習に関わる神経回路は背側海馬に、情動に関わる神経回路は腹側海馬にそれぞれ形成されている(Strange et al., 2014)。申請者はマウス海馬の長軸に沿った構造的分化に関する研究で多くの実績がある。特に、海馬のGABAニューロンの細胞構築が背側海馬と腹側海馬で異なることを示した研究や(Jinno and Kosaka, 2006)、錐体細胞の空間分布様式の長軸方向に沿った差異を示した研究は(Jinno and Kosaka, 2010)、海馬の神経回路の長軸方向に沿った構造的分化に関する基盤的知見を与えるものである。

成体神経新生についても、背側海馬と腹側海馬で異なる制御を受け、海馬の機能的な分化に関与している可能性が示唆されている(Sahay and Hen, 2007)。我々は、背側海馬の方が腹側海馬よりも神経幹細胞の分裂が活発であり(Jinno, 2011a)、加齢による低下も少ない(Jinno, 2011b) ことなどを報告している。しかしながら、長軸に沿って分布する海馬の各神経回路に新生ニューロンがどのように組み込まれ、高次脳機能の制御にどのように関与するのか、その詳細は分かっていない。

2. 研究の目的

近年の成体海馬神経新生現象に関する研究を牽引しているのは、主に行動レベルと遺伝子レベルの実験であるが、両者の間には大きなギャップが存在する。一方で、多様な実験から得られるモダリティの異なる知見を結び付けることを可能にする神経回路レベルの知見は決定的に不足している。このため我々は、神経回路の形態学的解析を軸にし、行動学薬理的解析と生化学的解析を組み合わせる新たな成体海馬神経新生研究を提案する。実験では、海馬の長軸に沿って記憶や学習、情動などに関わる神経回路が独立して分布していることに着目し、異なる機能を担う海馬の神経回路に新生ニューロンが組み込まれるメカニズムと行動発現との関連を具体的に明らかにする。本研究の目的は、高次脳機能の発現基盤としての成体海馬神経新生の制御機序の統合的な解明である。

3. 研究の方法

- (1) マウス海馬の神経新生の成熟ステージを分子マーカーに基づいて同定し、成体海馬神経新生の形態学的評価系を確立する。
- (2) トレーサーを用いて海馬の広域神経回路を標識し、海馬の長軸方向に沿って分布する認知と情動を担う神経回路への新生ニューロンの組み込み様式の違いを明らかにする。
- (3) 新生ニューロンの樹状突起と細胞体の三次元再構築を行い、抑うつモデルや加齢モデル、各種の試薬の投与などによる新生ニューロンの成熟様式の変化を明らかにする。
- (4) 抗うつ薬や抗がん剤、植物由来エストロゲン類縁体や腸内細菌叢中間代謝産物など各種の試薬をマウスに投与し、成体海馬神経新生とマウスの行動に生じる変化を明らかにする。
- (5) ビデオトラッキングシステムを用いて自由行動下のマウスを記録し、神経新生の抑制や促進に伴う認知・情動機能の変化を明らかにする。
- (6) 上記のマルチモーダルなデータを統合的に解析し、成体海馬神経新生の制御機序を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 初老期メスマウス (10 カ月齢) に大豆イソフラボン的一种であるダイゼイン (30mg/kg) を 28 日間連続で腹腔内投与し、海馬の新生神経新生現象に対する作用について、免疫組織化学的な検討を行った。実験には 7 種類の神経新生現象関連分子マーカーを使用し、認知や記憶を担う背側海馬と、情動を担う腹側海馬の比較・検討を行った。ステレオロジー定量解析の結果、神経幹細胞や前期一過性増幅前駆細胞の空間分布密度は、ダイゼイン投与によって変化しないことが明らかになった。一方で、後期一過性増幅前駆細胞や神経前駆細胞、新生ニューロンの空間分布密度はダイゼイン投与によって有意に増加した。また、分裂細胞の空間分布密度がダイゼイン投与によって増加したのに対して、アポトーシス細胞に変化は認められなかった。これらから、ダイゼインは初老期メスマウスの海馬において、神経新生現象の後期の細胞の分裂を促進し、密度を増加させる可能性が示唆された。次に我々は、新生ニューロンの成熟に対するダイゼインの作用について形態学的な検討を行った。新生ニューロンを三次元トレーシングした結果、分枝の数や樹状突起の全長の伸展が認められた。また、背側海馬と腹側海馬に対するダイゼインの作用を比較した結果、新生ニューロンの密度増加効果や成熟促進効果などについては、腹側海馬より背側海馬の方が大きいことが示された。これらの結果は、植物由来エストロゲン類縁体が初老期メスマウスの海馬神経新生現象を時期・領域特異的に促進する作用を有することを示すものである (Yamada et al., 2016)。

(2) 海馬歯状回に発現している細胞外マトリックスの一種であるコンドロイチン硫酸に着目し、組織化学的・行動学的な解析を行った。実験には、chondroitinase ABC (chABC) によるコンドロイチン硫酸の分解、コンドロイチン硫酸の HPLC による定量、行動実験、コンドロイチン硫酸合成酵素の一部を欠損させた T1KO マウスなどを組み合わせた。海馬歯状回に chABC を局所注入すると、レクチン染色によるコンドロイチン硫酸の染色性が消失し、神経前駆細胞の数や新生ニューロン、分裂期の細胞の数が減少する一方で、神経幹細胞の数やアストロサイトの数に変化はなかった。新生ニューロンを三次元トレーシングした結果、樹状突起の伸長や分岐が chABC 処理によって減少することが示された。Western blotting では、chABC の局所注入を行った海馬歯状回では Wnt-3 の発現量に変化はないが、 β -catenin の発現が減少していた。新規物体認知試験では、chABC 処理によって記憶保持が低下することが示された。HPLC による解析では、豊かな環境 (enriched environment, EE) で飼育されたマウスでは海馬歯状回のコンドロイチン硫酸 (CS-4) の発現量が増加し、拘束ストレスを与えたマウスでは CS-4 の発現量が減少することが明らかになった。コンドロイチン硫酸合成酵素の一部を遺伝的に欠損させたマウス (T1KO マウス) では、海馬歯状回におけるコンドロイチン硫酸の染色性が低下し、EE による成体海馬神経新生の促進効果が抑制されていた。これらの結果は、海馬歯状回の細胞外マトリックスを構成しているコンドロイチン硫酸は成体海馬神経新生の制御因子であり、EE やストレスによる成体海馬神経新生の促進や抑制に関わっていることを示唆している (Yamada et al., 2018)。

(3) 腸内細菌叢の加齢変化に着目し、成体海馬神経新生現象に与える影響について、免疫組織化学的・行動学的な検討を進めている。若年マウス (2 カ月齢) と初老期マウス (12 カ月齢) に、ラクトバチルス・アシドフィルスを 28 日間投与し、海馬の新生神経新生現象の変化について、免疫組織化学的・行動学的な解析を行った。実験には神経新生現象関連分子マーカーを使用し、認知や記憶を担う背側海馬と、情動を担う腹側海馬の比較・検討を行った。ステレオロジー定量解析の結果、ラクトバチルス・アシドフィルスの投与によって、成体海馬神経新生現象は初老期マウスで促進されるが、若年マウスでは有意な変化は認められないことを見出した。具体的には、ラクトバチルス・アシドフィルスを投与された初老期マウスでは、分裂期の細胞や後期一過性増幅前駆細胞、神経前駆細胞、新生ニューロンの空間分布密度が有意に増加していた。

また、新生ニューロンを三次元トレーシングした結果、樹状突起の分枝数が増加し、全長が伸展していることが示された。これらから、ラクトバチルス・アシドフィルスの投与による腸内細菌叢の改変は、初老期マウスの海馬において、神経新生現象の後期の細胞の分裂を促進し、密度を増加させる可能性が示唆された。さらに、ラクトバチルス・アシドフィルスの投与によって初老期マウスの認知機能が改善すること、腸内細菌叢の中間代謝産物である短鎖脂肪酸を投与した初老期マウスの神経新生が促進されるという結果も得られている。これらの知見は、ラクトバチルス・アシドフィルスの投与による腸内細菌叢の改変は、中間代謝産物を介して初老期マウスの成体海馬神経新生現象を時期・領域特異的に促進する可能性を示唆している。

<引用文献>

- Altman J, Das GD (1967) Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214:1098-1101.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.
- Jinno S (2011a) Regional and laminar differences in antigen profiles and spatial distributions of astrocytes in the mouse hippocampus, with reference to aging. *Neuroscience* 180:41-52.
- Jinno S (2011b) Decline in adult neurogenesis during aging follows a topographic pattern in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 519:451-466.
- Jinno S, Kosaka T (2006) Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci Res* 56:229-245.
- Jinno S, Kosaka T (2010) Stereological estimation of numerical densities of glutamatergic principal neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus* 20:829-840.
- Sahay A, Hen R (2007) Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci* 10:1110-1115.
- Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI (2014) Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci* 15:655-669.
- Yamada J, Hatabe J, Tankyo K, Jinno S (2016) Cell type- and region-specific enhancement of adult hippocampal neurogenesis by daidzein in middle-aged female mice. *Neuropharmacology* 111:92-106.
- Yamada J, Nadanaka S, Kitagawa H, Takeuchi K, Jinno S (2018) Increased Synthesis of Chondroitin Sulfate Proteoglycan Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis in Response to Enriched Environment. *J Neurosci* 38:8496-8513.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

- (1) Ohgomori T, Jinno S. Cuprizone-induced demyelination in the mouse hippocampus is alleviated by phytoestrogen genistein. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019 Jan 15;363:98-110. doi: 10.1016/j.taap.2018.11.009.
- (2) Yamada J, Nadanaka S, Kitagawa H, Takeuchi K, Jinno S. Increased Synthesis of Chondroitin Sulfate Proteoglycan Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis in Response to Enriched Environment. *J Neurosci*. 2018 Sep 26;38(39):8496-8513. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0632-18.2018.
- (3) Mishima T, Deshimaru M, Watanabe T, Kubota K, Kinoshita-Kawada M, Yuasa-Kawada J, Takasaki K, Uehara Y, Jinno S, Iwasaki K, Tsuboi Y. Behavioral defects in a DCTN1(G71A) transgenic mouse model of Perry syndrome. *Neurosci Lett*. 2018 Feb

14;666:98-103. doi: 10.1016/j.neulet.2017.12.038.

- (4) Ohgomori T, Yamasaki R, Kira JI, Jinno S. Upregulation of Vesicular Glutamate Transporter 2 and STAT3 Activation in the Spinal Cord of Mice Receiving 3,3'-Iminodipropionitrile. *Neurotox Res.* 2018 May;33(4):768-780. doi: 10.1007/s12640-017-9822-x.
- (5) Ohgomori T, Yamasaki R, Takeuchi H, Kadomatsu K, Kira JI, Jinno S. Differential activation of neuronal and glial STAT3 in the spinal cord of the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci.* 2017 Aug;46(4):2001-2014. doi: 10.1111/ejn.13650.
- (6) Ohgomori T, Yamasaki R, Takeuchi H, Kadomatsu K, Kira JI, Jinno S. Differential involvement of vesicular and glial glutamate transporters around spinal α -motoneurons in the pathogenesis of SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience.* 2017 Jul 25;356:114-124. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.014.
- (7) Yamada J, Ohgomori T, Jinno S. Alterations in expression of Cat-315 epitope of perineuronal nets during normal ageing, and its modulation by an open-channel NMDA receptor blocker, memantine. *J Comp Neurol.* 2017 Jun 15;525(9):2035-2049. doi: 10.1002/cne.24198.
- (8) Yamada J, Jinno S. Molecular heterogeneity of aggrecan-based perineuronal nets around five subclasses of parvalbumin-expressing neurons in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol.* 2017 Apr 1;525(5):1234-1249. doi: 10.1002/cne.24132.
- (9) Yamada J, Jinno S. Aging of hippocampal neurogenesis and soy isoflavone. *Oncotarget.* 2016 Dec 20;7(51):83835-83836. doi: 10.18632/oncotarget.13534.
- (10) Yamada J, Hatabe J, Tankyo K, Jinno S. Cell type- and region-specific enhancement of adult hippocampal neurogenesis by daidzein in middle-aged female mice. *Neuropharmacology.* 2016 Dec;111:92-106. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.036.
- (11) Fujimoto H, Konno K, Watanabe M, Jinno S. Late postnatal shifts of parvalbumin and nitric oxide synthase expression within the GABAergic and glutamatergic phenotypes of inferior colliculus neurons. *J Comp Neurol.* 2017 Mar 1;525(4):868-884. doi: 10.1002/cne.24104.
- (12) Ohgomori T, Yamada J, Takeuchi H, Kadomatsu K, Jinno S. Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1(G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci.* 2016 May;43(10):1340-51. doi: 10.1111/ejn.13227.
- (13) Jinno S. Aging affects new cell production in the adult hippocampus: A quantitative anatomic review. *J Chem Neuroanat.* 2016 Oct;76(Pt B):64-72. doi: 10.1016/j.jchemneu.2015.10.009.
- (14) Fujimoto H, Ohgomori T, Abe K, Uchimura K, Kadomatsu K, Jinno S. Time-dependent localization of high- and low-sulfated keratan sulfates in the song nuclei of developing zebra finches. *Eur J Neurosci.* 2015 Nov;42(9):2716-25. doi: 10.1111/ejn.13073.
- (15) Kubo K, Jinno S, Nariyama K, Komune S. Stability of the synaptic structure in the hippocampus of BALB/c mice with allergic rhinitis. *J Laryngol Otol.* 2015 Mar;129 Suppl 2:S56-61. doi: 10.1017/S0022215114002400.
- (16) Yamada J, Jinno S. Subclass-specific formation of perineuronal nets around parvalbumin-expressing GABAergic neurons in Ammon's horn of the mouse hippocampus. *J Comp Neurol.* 2015 Apr 1;523(5):790-804. doi: 10.1002/cne.23712. Epub 2015 Jan 14.

〔学会発表〕(計9件)

- (1) Shozo Jinno, Structural and functional aspects of perineuronal net formation around GABAergic neurons in a subclass-specific manner, The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2018, 7, 28 (Kobe).
- (2) 神野尚三, 形態学的手法による脳研究の新展開 – カタチから始めるサイエンス –, 第19回ブレインサイエンス研究会, 2018, 6, 2 (嬉野).
- (3) 神野尚三, 統計学的手法を導入した画像解析による脳研究の新展開, 日本顕微鏡学会 第74回学術講演会, 2018, 5, 31 (久留米).
- (4) 神野尚三, 形態学的プロトコールによるグリア・ニューロン研究の新展開, 第45回関東機能的脳外科カンファレンス, 2018, 4, 7 (東京).
- (5) 神野尚三, 回路選択性と分子多様性に基づくペリニューロナルネットの新たな理解, 第39回日本組織培養研究会, 2017, 10, 8 (名古屋).
- (6) 神野尚三, 海馬ペリニューロナルネット研究の新展開, 第60回日本神経化学大会, 2017, 9, 8 (仙台).
- (7) 神野尚三, 統計学的手法を導入した細胞形態計測解析による新たな脳研究, 第48回日本臨床分子形態学会学術集会, 2016, 9, 23 (熊本).
- (8) 神野尚三, 成体海馬神経新生促進を介した大豆イソフラボンによる脳機能改善の可能性, 日本農芸化学会 2016年度大会, 2016, 3, 28 (札幌).
- (9) Shozo Jinno, New insights into the relationship between perineuronal nets and subclasses of GABAergic neurons in the hippocampus, The 3rd International Symposium on Glyco-Neuroscience, 2016, 1, 15 (Awajishima).

〔図書〕(計2件)

- (1) 神野尚三 (分担翻訳), 水野昇・野村 嶺 (監修), イラストレイテッドカラーテキスト 神経解剖学 原著第5版. 三輪書店, 東京, 2017.
- (2) Shozo Jinno, Insights into Aging of the Hippocampus: A View from the Topographic Differentiation. In: Mori N., Mook-Jung I. (eds) Aging Mechanisms. Springer, Tokyo, 2015.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ana2.med.kyushu-u.ac.jp/>

プレスリリース

<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/281>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

古江 秀昌 (Furue Hidemasa)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号(8桁): 20304884

(2) 研究協力者

山田 純 (Yamada Jun)
大籠 友博 (Ohgomori Tomohiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。