

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07084

研究課題名(和文)成人の大脳新皮質における神経前駆細胞の存在：精神疾患との相関性について

研究課題名(英文)Neural progenitor cells in the cerebral cortex of adult humans, and its relationship to neuropsychiatric disorders

研究代表者

大平 耕司(Ohira, Koji)

武庫川女子大学・生活環境学部・准教授

研究者番号：80402832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、成体げっ歯類とマーモセットの大脳新皮質に神経前駆細胞(L1-INP細胞)を見出している。今回、ヒトの大脳新皮質にL1-INP細胞が存在するのかどうか調べた。死後脳は、東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンクから供与を受けた。健常者の大脳皮質をサンプルとして、L1-INP細胞の存在について調べたところ(n=2)、これら2例において、L1-INP細胞を見出した。今後、例数を増やしつつ、抗体染色の条件など、慎重に検討していく。さらに、神経精神疾患患者の死後脳についても同様の解析を加えて、疾患と大脳新皮質の神経新生との相関性について明らかにしていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究において、げっ歯類やマーモセットなどの実験動物でのみ、L1-INP細胞の存在がわかっていたが、今回の研究によって、ヒトの大脳新皮質にもL1-INP細胞が存在する可能性が非常に高くなった。成体大脳新皮質の抑制性神経細胞の脱落や興奮抑制バランスの欠如は、様々な脳疾患と関係していることがわかっていることから、L1-INP細胞が脳疾患の細胞治療法に将来結びつく可能性がある。今後、健常者の死後脳とともに、認知症、特にアルツハイマー病患者の死後脳について注目して解析を継続していく予定である。

研究成果の概要(英文)： We have found the neural progenitor cells, L1-INP cells, in the neocortex of adult rodents and marmosets. In this study, we investigated if L1-INP cells exist in the neocortex of adult humans.

The postmortem brains were provided by the Brain Bank for Aging Research (BBAR) at Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology. Using the neocortical areas from healthy persons, we examined the presence of L1-INP cells (n = 2), and found L1-INP cells in these 2 cases. To ensure the presence of the cells, in the future, it is necessary to continue to increase the number of cases. In addition, a similar analysis of the postmortem brains of patients with neuropsychiatric disorders will be added to clarify the correlation between neocortical neurogenesis and the diseases.

研究分野：神経科学

キーワード：成体神経新生 大脳新皮質 神経前駆細胞 精神疾患 免疫染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大人の脳は、非常に再生しにくいことが昔からよく知られている。そのため、事故や疾病による脳の損傷により、多くの人たちが後遺症を抱えたまま一生を過ごさなければならず、患者の QOL (生活の質) の低下や家族の負担は甚大なものとなっており、一刻も早い治療法の確立が望まれている。

現在、脳損傷や精神・脳疾患の治療法として、外因性の ES 細胞、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 神経幹細胞を増殖、分化させて、脳へ移植する細胞治療法が模索されている。しかし、移植した細胞のがん化、脳の移植領域に存在する神経細胞の多様な種類へ分化させる技術、倫理的問題などが大きな障壁として立ちはだかっている。一方、細胞を使ったもう一つの治療法として、内因性神経幹細胞/前駆細胞を利用する方法が考案されている。この方法を用いることによって、将来、薬剤などで神経細胞を産生させることができれば、上記の問題をクリアできることになる。しかし、内因性神経幹細胞/前駆細胞を利用する方法を実現するためには、神経幹細胞/前駆細胞が、治療の対象となる脳領域に存在することが前提となる。成体の中枢神経系において、海馬歯状回と側脳室下帯の 2 領域では、神経幹細胞/前駆細胞が存在することは知られているが、それら以外の脳領域、特に大脳皮質の神経幹細胞/前駆細胞が存在するのかわかるとは、長い間不明であった。このような中で、申請者らは、成体大脳新皮質 1 層に、脳虚血を起こすと抑制性神経細胞を産生する内因性神経前駆細胞を発見し、L1-INP 細胞と名付けた (Ohira et al., *Nature Neurosci.*, 2010)。さらに、マウスに抗うつ薬を投与することにより、L1-INP 細胞から新しい神経細胞の産生が促進されること (成体神経新生) 新しく産生された神経細胞が脳虚血によって生じる神経細胞死を抑える働きを持っていることを見出した (Ohira et al., *Neuropsychopharmacology* 2013)。この結果は、L1-INP 細胞の増殖や分化を薬剤によって人為的に制御することが可能であることを示唆している。

これらの発見より、成体大脳新皮質においても、神経精神疾患に対して、神経前駆細胞を用いた神経再生や保護が実現できる可能性があることが示唆される。もし薬剤や食事で L1-INP 細胞の神経新生の制御が実現できれば、元々自分の脳内に存在する細胞であるため、倫理的、経済的側面からも有用であることが考えられる。しかしながら、L1-INP 細胞は、近年、申請者らによって発見された神経前駆細胞であるため、世界的にほとんど研究は行われておらず、基礎研究の端緒に着いたばかりである。

これまで、L1-INP 細胞に関する研究は、ラットやマウスなどのげっ歯類の実験動物を用いて行われてきた。将来、L1-INP 細胞を用いた、脳疾患に対する予防、治療法に結びつけるには、どうしても成熟したヒトの大脳新皮質に L1-INP 細胞が存在するのかわかるとはすることが必須である。これまでの国内外の研究を鑑みても、申請者らが、霊長類であるマーモセット (Ohira et al., 2019) や被検体数は少ないもののアカゲザル (2 頭; Ohira et al., 未発表データ) の成体大脳新皮質において、L1-INP 細胞を同定しているのみである。

本研究は、ヒトの大脳新皮質において、L1-INP 細胞が存在するのかわかるとはすることを目的としている。以下に具体的な研究項目を示す。

(1) ヒト大脳新皮質における L1-INP 細胞の存在

ヒトの脳サンプルを入手し、L1-INP 細胞の分子マーカーに対する抗体を用いた免疫染色を行うことで、ヒトの大脳新皮質における L1-INP 細胞の存在を明らかにする。

(2) 精神疾患死後脳の大脳新皮質における L1-INP 細胞の密度変化

(1)の研究により、ヒト大脳新皮質に L1-INP 細胞の存在が確認されたならば、次に、ヒトの精神疾患死後脳サンプルを使用して、対象群と精神疾患群を比較することにより L1-INP 細胞の密度変化を調べる。この研究により、L1-INP 細胞密度と精神疾患との相関関係を明らかにする。

2. 研究の目的

成体大脳皮質で神経新生が起こるかどうかわかるとは、100 年以上も議論の続く問題であったが、申請者らは、げっ歯類の成体大脳新皮質 1 層に神経前駆細胞 (Layer 1 Inhibitory Neuronal Progenitor Cells: L1-INP 細胞) が存在し、虚血依存的に抑制性神経細胞の成体神経新生が起こることを明らかにした (Ohira et al., *Nature Neurosci.*, 2010)。しかし、これまで、L1-INP 細胞は、げっ歯類や一部の霊長類でのみその存在が確認されているが、ヒトに存在するのかわかるとは全く不明である。本研究では、組織学的手法を用いて、ヒトの大脳新皮質に L1-INP 細胞が存在するのかわかるとはを明らかにする。さらに、L1-INP 細胞の存在を確認できたならば、精神疾患患者の死後脳を用いて、L1-INP 細胞数と精神疾患との相関関係について調べることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究は、ヒト大脳新皮質をサンプルとし、L1-INP 細胞の分子マーカーに対する抗体を利用して免疫蛍光染色を行い、L1-INP 細胞が存在するのかわかるとはを明らかにする。

初年度は、ヒト脳サンプルを企業より入手し、L1-INP 細胞に対する免疫蛍光染色を行うことによりその存在を明らかにする。もし L1-INP 細胞が存在するのであれば、その密度を計測する。次年度以降は、L1-INP 細胞の数と精神疾患との相関関係について明らかにするために、本研究ではうつ病に焦点をあて、うつ病患者死後脳サンプルを同企業より入手し、対照群と疾患群で、

L1-INP 細胞密度を比較検討する。これらの研究により、ヒトの大脳新皮質での神経新生を担う内因性前駆細胞(L1-INP 細胞)の存在とともに、L1-INP 細胞と精神疾患との関係について明らかにする。

(1) ヒト大脳新皮質を用いた L1-INP 細胞の免疫蛍光染色

ヒトの大脳新皮質組織サンプルは、東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンクから供与を受けた(n = 2)。対象とする皮質領域は、前頭極、前帯状回、側頭極、海馬、頭頂葉、後頭極などである。L1-INP 細胞を可視化するために、分子マーカー(GAD67 と Ki67)の抗体を用いる(Ohira et al., *Nature Neurosci.*, 2010; Ohira et al., *Neuropsychopharmacology* 2013)。これらの抗体を一次抗体として使用した蛍光二重免疫染色を行う。観察は、L1-INP 細胞について二重染色性の偽陽性を除くために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて実施する。ヒト大脳新皮質においてL1-INP 細胞の存在が認められたならば、その密度を算出し、すでにL1-INP 細胞密度が明らかとなっているげっ歯類やマーモセットの数値と比較する。

(2) ヒト大脳新皮質を用いた L1-INP 細胞の免疫蛍光染色

うつ病患者死後脳より前部帯状回領域の大脳新皮質をサンプルとして準備し、(1)の研究と同じ検出方法を用いて、L1-INP 細胞の密度を計測する。健常群のサンプルと比較できるように、性別、年齢などを考慮してバランスのとれた疾患群とする。また、この時、抗うつ薬の投与歴についても注意し、投与歴あり(N=8)と投与歴なし(N=8)でサンプルをそろえる。これにより、健常群、うつ病群(抗うつ薬投与あり)、うつ病群(抗うつ薬投与なし)の3群で比較する。

マーモセットに抗うつ薬であるフルオキセチンを3 mg/kg/day の濃度で4週間投与すると、前部帯状回領域で、L1-INP 細胞が増加傾向にあり、なおかつ新しく産生された抑制性神経細胞が有意に増加することを見出している(Ohira et al., *Mol Brain* 2019)。この結果は、マウスと同じであった(Ohira et al., *Neuropsychopharmacology* 2013)。これまで、海馬の神経新生が抗うつ効果を担うとされてきたが、マーモセットでは有意な海馬での神経新生の上昇が見られなかった(Ohira et al., 2019)。さらに、生後すぐから、海馬の神経新生は指数関数的減衰が始まり、抗うつ薬で促進できても、成体期海馬で新しく産生される神経細胞数はごくわずかである。それに対し、マウスのL1-INP 細胞の神経新生は、生後1年半まで維持されることがわかっている。これは、ヒトでは60歳に相当する。以上のことより、抗うつ薬で大脳新皮質の神経新生が促進することが、抗うつ効果を発揮するためのげっ歯類から霊長類まで共通してみられる細胞基盤であると考えられる。

4. 研究成果

本研究で明らかになったこととして、ヒトの大脳新皮質において、L1-INP 細胞様の細胞を見出したことである(図1)。まだ予備的検討段階ではあるが、今後、例数を増やしつつ、抗体染色の条件など、確固たる証拠となるよう慎重に検討していく予定である。

さらに、アルツハイマー病患者の大脳新皮質サンプルにおいても(2例) L1-INP 細胞を確認しており、現在、領域や年齢、病気の進行度との関係性などについて解析を進めているところである。

当初、うつ病をメインのターゲットにおいていたが、残念なことに、どの脳バンク(海外の企業も含)もうつ病患者の死後脳をほとんど保存していないか、かなり例数が少ないため、断念をせざるを得なかった。しかし、アルツハイマー病患者死後脳の場合、例数は最も豊富であり、今後、認知症と大脳新皮質の神経新生との関係について研究を行うことに支障はないと考える。

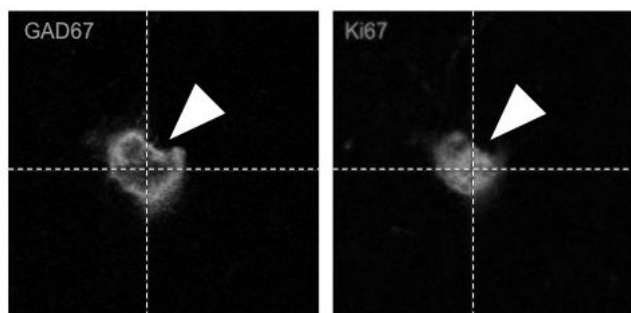


図4. ヒト大脳皮質で観察されたL1-INP細胞。写真は、L1-INP細胞の分子マーカーである、GAD67とKi67で共染色された大脳皮質1層の細胞を示す(矢頭)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Koji Ohira	4. 巻 3
2. 論文標題 Regulation of adult neurogenesis in the cerebral cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurology and Neuromedicine	6. 最初と最後の頁 59-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hagihara Hideo, Ohira Koji, Miyakawa Tsuyoshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Transcriptomic evidence for immaturity induced by antidepressant fluoxetine in the hippocampus and prefrontal cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr2.12048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Koji Ohira	4. 巻 512
2. 論文標題 Dopamine stimulates differentiation and migration of cortical interneurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 577 ~ 583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizui T, Ohira K, Kojima M	4. 巻 12
2. 論文標題 BDNF pro-peptide: a novel synaptic modulator generated as an N-terminal fragment from the BDNF precursor by proteolytic processing.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 1024-1027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okada Y, Ohira K	4. 巻 493
2. 論文標題 Population dynamics of neural progenitor cells during aging in the cerebral cortex.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications 493: 182-187, 2017	6. 最初と最後の頁 182-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakao A, Miyazaki N, Ohira K, Hagihara H, Takagi T, Usuda N, Ishii S, Murata K, Miyakawa T	4. 巻 10
2. 論文標題 Immature morphological properties in sub cellular-scale structures in the dentate gyrus of Schnurri-1 knockout mice: a model for schizophrenia and intellectual disability.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡本 彩希、間部 由佳理、柴田 歩乃佳、大平 耕司
2. 発表標題 大脳皮質における神経幹細胞/神経前駆細胞培養条件検討
3. 学会等名 Neuroscience2018、日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中尾 章人、高雄 啓三、大平 耕司、宮崎 直幸、村田 和義、宮川 剛
2. 発表標題 統合失調症モデルSchnurri-2ノックアウトマウスの歯状回顆粒細胞における三次元電子顕微鏡解析
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大平 耕司、高田 千嘉、浅井 優希、角野 風子
2. 発表標題 抗うつ薬投与による視床下部神経新生の調節
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大平 耕司、間部 由佳理、柴田 歩乃佳、岡本 彩希.
2. 発表標題 成体大脳新皮質に存在する神経幹細胞前駆細胞の培養法の確立
3. 学会等名 NEURO2019 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 彩希、間部 由佳理、柴田 歩乃佳、大平 耕司
2. 発表標題 大脳皮質における神経幹細胞/神経前駆細胞培養条件の検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Koji Ohira	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Nova Science Pub Inc	5. 総ページ数 169
3. 書名 New Research on Cell Aging and Death	

1. 著者名 大平耕司、小島正己.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北大路書房	5. 総ページ数 176
3. 書名 神経・生理心理学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p> 大脳皮質抑制性神経細胞の発生機構の一部を解明 https://kohira1.wixsite.com/nutbrainsci/blank-7 脳情報栄養学研究室HP http://www.mukogawa-u.ac.jp/~nbrain/ 武庫川女子大学食物栄養学科 教員紹介 http://www.mukogawa-u.ac.jp/~shokumt/kyouin/kyouin_ns.html </p>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----