

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10846

研究課題名(和文) 一過性全脳虚血後に促進される海馬ニューロン新生の調節機構とその意義

研究課題名(英文) Molecular Mechanisms of Neurogenesis and Roles of Newborn Cells in Gerbil Hippocampus after Transient Global Ischemia

研究代表者

瀬原 吉英 (Sehara, Yoshihide)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50721156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は脳において新生するニューロンの調節因子について研究した。ヒトの脳は幼少期に成長が完了し、以降は神経細胞が脱落していくのみと考えられてきたが、近年になって脳の一部の領域ではニューロンが新しく作られていることが明らかになった。申請者は、この新生ニューロンが疾患との関わりでどのような仕組みで作られ、どのような役割を持つのかを目的に研究を進めた。一般的には、新生ニューロンは脳虚血の後に増加することが明らかになっているが、申請者はスナネズミに一過性全脳虚血の手術を行い、新生ニューロンの増加を確認した後に、ポリコム群タンパク質の発現を抑制することによりこのニューロン新生が抑制されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

げっ歯類の全脳虚血モデルは、ヒトにおける心停止を再現した動物モデルであり、実臨床で問題となる病態を再現したものである。一時的な心停止後の高次脳機能障害は後遺症として社会復帰の障害となる。全脳虚血後にはニューロン(神経細胞)の新生が促進され、機能回復に役割を果たすと考えられるが、現状はその機能が明らかではない。申請者はその点に着目し、スナネズミの全脳虚血モデルを用いてニューロン新生の機序を研究した。具体的には、ポリコム群タンパク質の発現を抑制することによってニューロン新生が抑えられることが明らかになった。今後さらにその機序や役割を明らかにすることが必要と考えた。

研究成果の概要(英文)：We have studied the regulatory factor of newly proliferating neural cells in the brain. It is now generally accepted that neurons are newly generated in the limited regions even in the adult brain. However, the precise mechanisms and the function of those newly-generated neurons remain unclear. In this experiment, we focused on the acceleration of proliferation of neural stem cells after global ischemia of brain. After we confirmed the increase of newly-generated neurons in gerbil hippocampus, we found that knockdown of polycomb group proteins decreased the generation of new neurons after global ischemia. Thus, we concluded that the polycomb group proteins are one of the suppressors of generation of new neurons. In future, we will undergo further research on how the newly-generated neurons function in the hippocampus.

研究分野：神経科学

キーワード：神経細胞新生 スナネズミ 全脳虚血 ポリコム群タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの脳は幼少期に分化を遂げ、成体では新たなニューロンへの増殖・分化は起きないとされてきたが、1998年、ヒトの成体脳においてもニューロン新生が起こることが示された(Eriksson et al., *Nat Med*, 1998)。このニューロン新生が観察される部位は限定されており、側脳室下帯と海馬歯状回であることが明らかになっている。成体脳におけるニューロン新生の発見から20年が経過しているが、なぜニューロンが新しく作られ、どのような役割を果たしているかは明らかになっていない。

一方で、脳虚血、脳外傷、神経変性疾患、てんかんのような病態ではニューロン新生が促進することが報告されてきた。ニューロンが失われる病態においてニューロンの新生が促進することは、脳の修復に何らかの寄与をしていると考えた。申請者はこれまでにげっ歯類による全脳虚血モデルを用い、脳の海馬における神経保護効果について研究してきた実績がある(Sehara et al., *J Neurosci*, 2013)。海馬においては歯状回でニューロン新生が行われており、本研究では虚血後の海馬歯状回に着目することとした。

ここで申請者が着目したのはポリコーン群タンパク質(以下、ポリコーン)であり、これはエピジェネティックに遺伝子発現制御を行うことが明らかにされている。ヒストンメチル化を介して遺伝子の転写抑制を行い、胎生期のニューロン新生、神経回路網形成、癌細胞の増殖等に関わることが報告されてきた(Yadirgi et al., *Stem Cells*, 2013)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「全脳虚血後の海馬歯状回におけるニューロン新生促進の機序とその役割を解明すること」である。全脳虚血後にニューロン新生が促進されることは既知であるが、この新生ニューロンが果たす役割は不明である。そこで、本研究においてはエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わるポリコーンの遺伝子発現を操作し、全脳虚血後のニューロン新生の評価を行う。

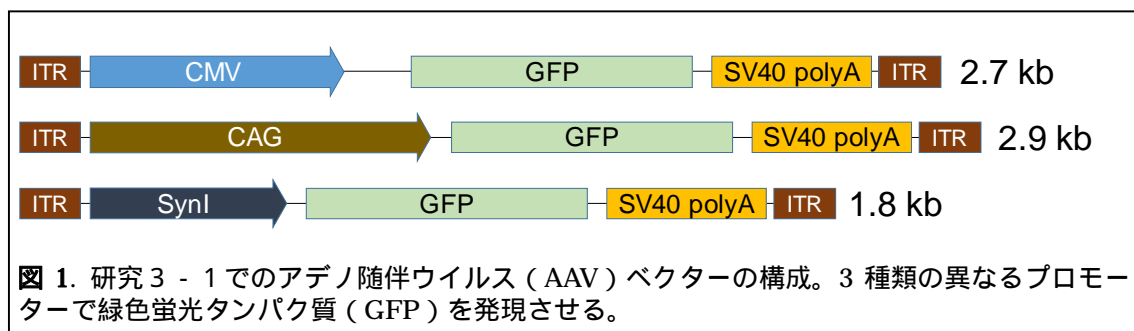
3. 研究の方法

本研究では、遺伝子導入にアデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus, AAV)ベクターを用いた。AAVベクターは長期に安全で有効な導入遺伝子発現を認めるウイルスベクターで(Sehara et al., *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2017)現在広く世界で使われている。

全脳虚血は、スナネズミの両側総頸動脈の一過性閉塞(5分間)によるモデルを用いた。これによって海馬CA1領域のニューロンが脱落し、歯状回ではニューロン新生が促進される。

3 - 1. スナネズミ海馬におけるAAVベクターの発現系の予備検討

AAVを用いたスナネズミ海馬への遺伝子導入に適切な条件を明らかにするため、2種類の血清型(AAV5とAAVrh10)でそれぞれ3種類のプロモーター(cytomegalovirus (CMV), chicken - actin promoter with the CMV immediate-early enhancer (CAG), synapsin-I (SynI))搭載の緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein, GFP)発現AAVを作製した(図1)。4週齢のスナネズミ(オス)の右海馬歯状回に 1×10^{10} viral genomeのAAVを定位脳固定装置下に投与し、3週間後に脳冠状断切片を作製しGFP発現面積を評価した(各群n = 3)。Bregmaより1.7、2.0、2.3 mm尾側の3枚の冠状断切片における平均をそのスナネズミにおけるGFP発現面積とした。



3 - 2. 全脳虚血後のスナネズミ海馬におけるニューロン新生にポリコーン群タンパク質が果たす役割

3 - 1.より海馬における遺伝子導入に優れていることが明らかになったAAVrh10(結果は4にまとめて記載)に低分子干渉RNAを搭載し、ポリコーンをロックダウンし、全脳虚血後における影響を組織学的に評価した。

4週齢のスナネズミ(オス)の右海馬歯状回に 1×10^{10} vgの低分子干渉RNA(shRNA)搭載AAVを投与し、ポリコーンをロックダウンした。対照群として、既知の配列に相補的でないnegative shRNA搭載AAVを投与した。AAV投与から2週間後(6週齢)に5分間の一過性全脳虚血を負荷し、7週齢でethynyl deoxyuridine (EdU)を投与した。9週齢で断頭し、脳冠状断切片の組織学的評価を行った(各群n = 5)。

4. 研究成果

上記の3. 方法の順に分けて以下に記載する。

4 - 1. スナネズミ海馬における AAV ベクターの発現系の予備検討

上記 6 通りの組み合わせについて GFP の発現面積を比較したところ、AAVrh10-CMV と AAVrh10-CAG が最大であった(図 2; AAV-rh10-CMV: $7.1 \pm 1.1 \text{ mm}^2$, AAVrh10-CAG: $6.0 \pm 0.5 \text{ mm}^2$, $p < 0.001$, compared with the control)。次に GFP 発現面積が大きかったのは、AAV-rh10 と AAV5 - CMV であった(AAVrh10-Syn1: $4.2 \pm 0.2 \text{ mm}^2$, AAV5-CMV: $4.2 \pm 0.2 \text{ mm}^2$, $p < 0.05$, compared with the control)。ほとんど発現が見られなかったのは AAV5-synapsin I の群であり(AAV5-Syn1: $0.2 \pm 0.2 \text{ mm}^2$)、原因としては synapsin I がニューロン特異的プロモーターであるため、AAV5 での遺伝子導入に適さなかった可能性がある。AAV5 はニューロンよりもグリアを指向する傾向を過去に当研究室から報告しており、その影響が一因と考えた(Nomoto T. et al., *Neurosci Lett*, 2003)。

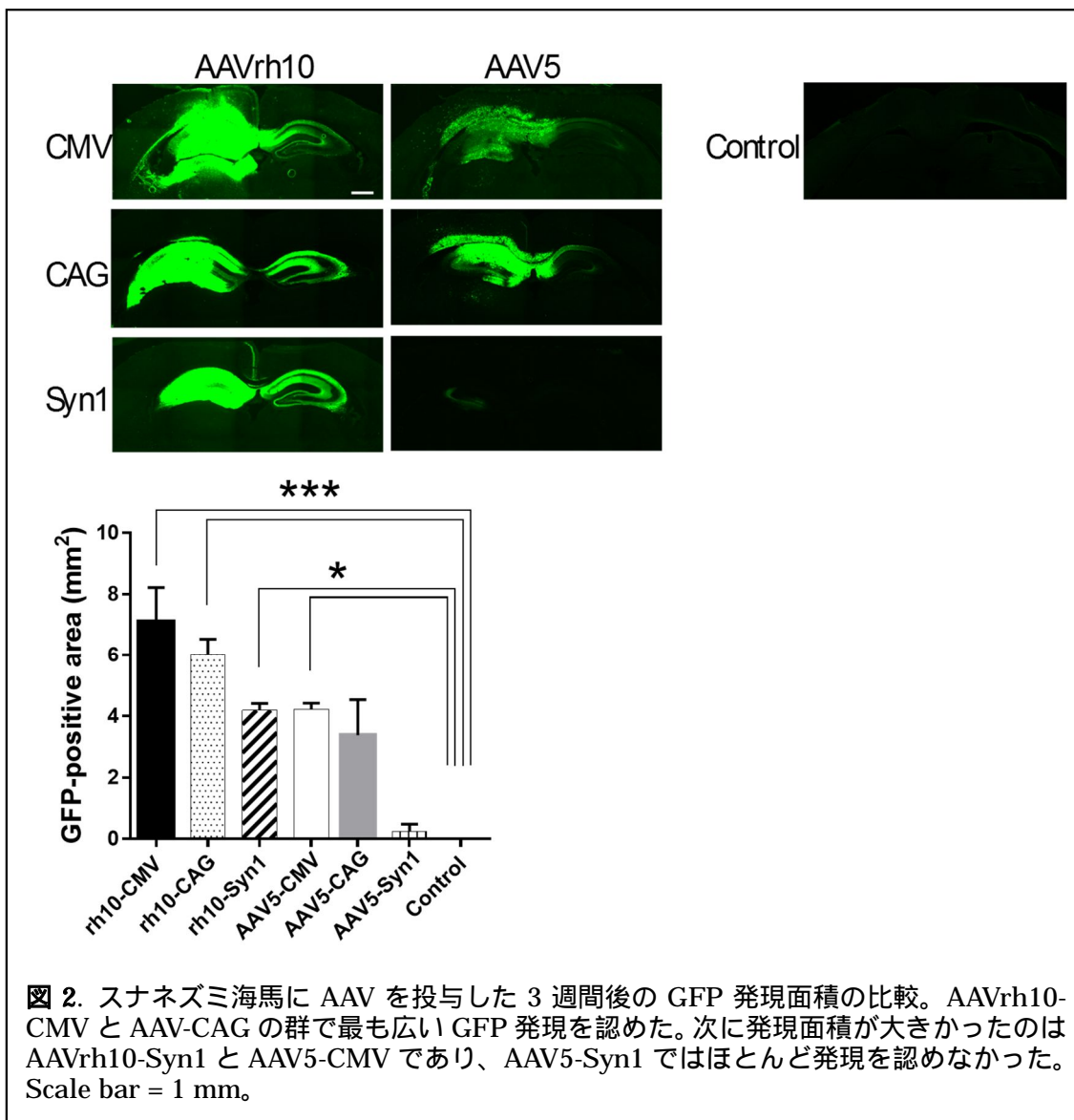


図 2. スナネズミ海馬に AAV を投与した 3 週間後の GFP 発現面積の比較。AAVrh10-CMV と AAV-CAG の群で最も広い GFP 発現を認めた。次に発現面積が大きかったのは AAVrh10-Syn1 と AAV5-CMV であり、AAV5-Syn1 ではほとんど発現を認めなかった。Scale bar = 1 mm。

4 - 2. 全脳虚血後のスナネズミ海馬におけるニューロン新生にポリコームが果たす役割

海馬歯状回における新生ニューロンは EdU で標識されており、EdU 染色による定量を行った。まず、sham 手術群においては negative shRNA 群とポリコーム shRNA 群で対照群と差がなかった。一方で、全脳虚血群においては、negative shRNA 群で EdU 陽性細胞が有意に多く ($p < 0.001$)、ポリコーム shRNA 群では EdU 陽性細胞が次に多かった。このことは、全脳虚血後のニューロン新生促進にポリコームが必要であることを示している。

今後さらに組織学的検討を加えた後、全脳虚血後の新生ニューロンが果たす役割を解明する方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sehara Yoshihide, Shimazaki Kuniko, Kurosaki Fumio, Kaneko Naoki, Uchibori Ryosuke, Urabe Masashi, Kawai Kensuke, Mizukami Hiroaki	4. 巻 682
2. 論文標題 Efficient transduction of adeno-associated virus vectors into gerbil hippocampus with an appropriate combination of viral capsids and promoters	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 27～31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2018.06.009	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 該当する

1. 著者名 Sehara Yoshihide, Inaba Toshiki, Urabe Takao, Kurosaki Fumio, Urabe Masashi, Kaneko Naoki, Shimazaki Kuniko, Kawai Kensuke, Mizukami Hiroaki	4. 巻 48
2. 論文標題 Survivin overexpression via adeno-associated virus vector Rh10 ameliorates ischemic damage after middle cerebral artery occlusion in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3466～3476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.14169	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 該当する

〔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 瀬原吉英、稲葉俊東、卜部貴夫、島崎久仁子、卜部匡司、川合謙介、水上浩明
2. 発表標題 虚血周辺部のsurvivin過剰発現は抗アポトーシス効果により梗塞体積を減少させる。
3. 学会等名 第44回脳卒中学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihide Sehara, Kuniko Shimazaki, Masashi Urabe, Hiroaki Mizukami
2. 発表標題 The comparison of gene transduction of AAV-rh10 to AAV5 in gerbil hippocampus using different promoters.
3. 学会等名 The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀬原吉英、島崎久仁子、卜部匡司、内堀亮介、川合謙介、水上浩明
2. 発表標題 The relationship between promoters and capsid proteins in induction of adeno-associated virus vector.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀬原吉英、稲葉俊東、卜部匡司、内堀亮介、島崎久仁子、卜部貴夫、水上浩明
2. 発表標題 ラットー過性中大脳動脈閉塞モデルにおけるsurvivinの神経保護効果
3. 学会等名 第43回日本脳卒中学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihide Sehara, Kuniko Shimazaki, Masashi Urabe, Hiroaki Mizukami
2. 発表標題 The comparison of gene transduction of AAV-rh10 to AAV5 in gerbil hippocampus using different promoters.
3. 学会等名 The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 下畑享良	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 354
3. 書名 脳卒中病態学のススメ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	橋本谷 祐輝 (Hashimotodani Yuki) (50401906)	同志社大学・脳科学研究科・特任准教授 (34310)	
連携研究者	川合 謙介 (Kawai Kensuke) (70260924)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	