

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18791031  
 研究課題名（和文） 高頻度電気刺激による成体神経新生の誘導と再生医療への応用  
 研究課題名（英文） The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation  
 研究代表者  
 戸田弘紀（TODA HIROKI）  
 財団法人田附興風会・医学研究所 第5研究部・研究員  
 研究者番号：80414118

## 研究成果の概要：

本研究は成体神経新生の制御機構における神経活動の重要性に着目し、また深部脳刺激の可変性を利用して、成体ラットを対象に定位的に視床前核を高頻度電気刺激すると海馬神経新生が増加することを示した。また海馬神経新生抑制モデルに応用すると、コルチコステロン投与により正常の約30%程度に抑制された神経新生が視床前核の高頻度電気刺激により正常の約80%まで回復することを示した。成長因子や栄養因子に頼らない神経新生を増加させる方法を開発した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	180,000	3,680,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：成体神経新生 海馬 視床前核 脳深部刺激療法 (adult neurogenesis, hippocampus, anterior thalamic nucleus, deep brain stimulation)

## 1. 研究開始当初の背景

成体脳海馬における海馬新生はその機能の解明とともに今後臨床神経学における重要性が指摘されている研究分野である。

成体神経新生の生物学的意義を示す研究として、これまでに、ヒト脳海馬での神経新生およびヒト脳からの神経前駆細胞の単離が報告され、また前駆細胞由来の新生ニューロンによるネットワーク形成、さらには成体神経新生と海馬機能の関連が指摘されてい

る。さらに疾患との関係では、アルツハイマー病、側頭葉てんかん、難知性うつ病など海馬の病変を呈する神経疾患における成体神経新生の役割が注目されている。

また、成体神経新生の制御機構もこの分野における大きな問題のひとつである。これまでにさまざまな成長因子や栄養因子が、前駆細胞の増殖とニューロン・グリア細胞への分化を影響する要因として研究が進められている。また生体内で成体神経前駆細胞を取り

囲む細胞および細胞外基質の果たす役割についても解明がすすんでいる。その中で興味深い制御機構として、近年着目されているのが神経活動による神経前駆細胞の制御機構である。成体神経前駆細胞にはニューロンへ分化し神経細胞とシナプスを形成する能力があることがこれまで実験的に示されているが、神経前駆細胞が未分化な状態でも脱分極やカルシウムイオン濃度の変化、あるいは神経伝達物質に反応することが近年明らかになった。すなわち、成体神経前駆細胞はその存在する部位の神経回路の活動に応じて、増殖・分化の段階がコントロールされている可能性が示唆されている。

以上の結果をふまえて、我々は、成体神経新生が神経回路の活動により新生ニューロンを提供する仕組みであるとすれば、神経回路の変調により成体神経新生を制御できることになるのではないかという仮説を立案した。

この仮説を検討するため、我々は神経回路の変調に、現在臨床で脳深部刺激療法としてパーキンソン病やその他の不随意運動あるいは難治性疼痛の治療に用いられているニューロモデュレーションの手法を用いることとした。このパルス波による電気刺激は条件を様々に変えることができるため、刺激の部位と条件の組み合わせにより神経新生を誘導する条件の検索が可能と考えた。

以上が近年の成体神経新生研究の背景であり、また「脳深部刺激により成体神経新生を誘導させる」という本研究の着想に至る経過である。

## 2. 研究の目的

本研究は、成体ラットを対象にして、海馬神経新生へ影響を与える神経群の同定、さらに神経新生を増加させる電気刺激条件の同定を目的とした。また神経新生抑制ラットを病理モデルとして、電気刺激による神経新生の回復について検討を行い、脳深部刺激による神経新生誘導の臨床応用の可能性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

成体雄Sprague-Dawleyラット(体重180g)を対象として用いた。ラット用定位脳手術装置を用いて、海馬への投射および海馬からの投射をうける特定脳領域にバイポーラ電極を留置した。1時間の低頻度あるいは高頻度電気刺激を加えた。コントロール群は電極挿入の

みのSham刺激として、刺激群は10, 50, 130Hz, 90  $\mu$  sec, 2.5Vの刺激を行った。刺激後に、サイミジンアナログであるBromodeoxyuridine (BrdU)を体重換算で50mg/kg腹腔内投与し3時間毎に計4回投与した。投与日は刺激後1、3、5、7日目のいずれかを選び、刺激による効果が現れる時期の決定に用いた。神経前駆細胞の増殖およびニューロン・グリアへの分化を検討するため、BrdU投与後24時間および28日後にそれぞれ4%パラホルムアルデヒドによる還流固定を行った。還流固定後脳組織は40  $\mu$  m厚で凍結切片を作り、その後の染色操作は240  $\mu$  m毎のサンプルを対象にして行った。

標識された増殖細胞を免疫組織学的手法により同定した。使用した抗体は抗BrdU抗体、抗doublecortin抗体、抗NeuN抗体、抗GFAP抗体と抗Zif/268抗体である。免疫化学染色法によりBrdU陽性細胞を同定し、またBrdU陽性細胞の細胞型を確認するため、doublecortin、NeuNとGFAPの発現を多重蛍光染色法と共焦点顕微鏡を用いて検討し、前駆細胞の増殖および神経細胞への分化の定量的評価にはStereology手法を用いた。これにより電気刺激が海馬神経新生に与える影響を検討した。

神経新生誘導の条件を同定した後、そのメカニズムの検討として、刺激直後の海馬試乗会におけるimmediate early geneであるzif/268の発現パターンを検討した。Zif/268の発現に関しては刺激後3時間に還流固定を行い検討した。また各種神経伝達物質拮抗薬の投与後に電気刺激を行い、関与する神経伝達物質の同定を試みた。

なお刺激による神経細胞のアポトーシスを検討するため、TUNEL染色を行った。

さらに海馬神経新生抑制モデルのためにコルチコステロンを体重換算で40mg/kg、5日間皮下投与し、上記同様の高頻度電気刺激あるいはシャム刺激を行いさらに3日間コルチコステロン投与した後、BrdUを上記の通り投与し、24時間後および48週間後の免疫組織学的評価を行った。これにより神経新生誘導条件による電気刺激がコルチコステロンによる神経新生の抑制を回復させるか検討した。

統計学的検討にはunpaired, two-tailed Student t-testを用いて行った。

## 4. 研究成果

### 4-1 視床前核刺激によるラット海馬神経新生の増加

定位脳手術により視床前核に留置されたバイポーラ電極を通じて50-130 Hz, 60  $\mu$  sec, 1-3 mAで1時間電気刺激を行うと、刺激後3日目あ

るいは5日目にBrdUを投与した群において、海馬歯状回の顆粒細胞下に存在するBrdU陽性細胞数が約2.5倍に増加していることを認めた(3日目;  $p < 0.01$ , 5日目;  $p = 0.02$ )。この増加現象の評価対象は刺激電極挿入のみであるとは時間軸も同様に扱ったsham刺激群である。なお刺激後1日目および7日目にBrdUを投与した群ではBrdU陽性細胞の数はコントロール群と比べて有意差がなかった。したがって高頻度電気刺激の影響を受けた前駆細胞の増殖は刺激後3日から5日目に起きていると推察された。

また刺激周波数に関しては50, 130Hz刺激群において約2.2倍のBrdU陽性細胞数を認めたのに対し( $p < 0.01$ )、10Hzの低頻度刺激群ではBrdU陽性細胞の増加は認めなかった。

アポトーシスを評価するためTUNEL染色を行ったが、刺激群でスライス毎に2.2個の陽性細胞を認め、コントロール群が1.9個であり有意差を認めなかった( $p = 0.25$ )。

なおimmediate early gene Zif/268は刺激後3時間で海馬歯状回での発現が上昇していることが確認された。高頻度刺激後に海馬歯状回ニューロンの活動が高まっていることが示唆された。

増加したBrdU陽性細胞は刺激4週間後でもコントロール群に比べ約2倍のと有意に多い細胞数であり( $p = 0.02$ )、刺激による前駆細胞の増殖が誘導された後もしばらく海馬内に生存していることが示唆された。

次いでBrdU陽性細胞の細胞型を確認するため、多重傾向染色によりニューロン・グリア細胞の鑑別を行った。投与翌日には80%以上がdoublecortin陽性となっていた。またBrdU投与後30日目には約50%がNeuN陽性でGFAP陽性細胞は2%程度であった。ニューロンへの分化の割合が刺激により有意に高まる傾向は確認されず、刺激によって神経前駆細胞の増殖が誘導され、また神経への分化も妨げられないことが示唆された。

以上から視床前核の短時間高頻度刺激により成体海馬での神経新生を促されると考えられた。この結果をふまえてまたコルチコステロン投与による海馬神経新生抑制モデルに対して同様の視床前核刺激を行った。

#### 4-2 視床前核刺激による抑制された海馬神経新生の回復効果

8日間のコルチコステロン投与により海馬歯状回のBrdU陽性細胞数は正常の32%程度に低下した。このモデルに対して1時間の130Hz視床前核刺激を行った。コルチコステロン投

与5日目に刺激を行い、その後もコルチコステロンを投与続け、刺激後3日目にBrdUを投与し、BrdU投与後24時間でBrdU陽性細胞数を検討するとコルチコステロン投与・刺激群ではコルチコステロン非投与群に比べBrdU陽性細胞数の低下は23%にとどまった。投与・非刺激群の低下は68%であった。BrdU陽性細胞数に関して非投与群と投与・非刺激群の比較では有意差( $p = 0.001$ )を認めたが、非投与群と投与・刺激群との比較では有意差を認めなかった( $p = 0.12$ )。さらに刺激後28日を経過するとコルチコステロン投与・刺激群のBrdU細胞数の低下は32%でこれは非投与群との間に有意差を認める程度( $p = 0.013$ )であったがコルチコステロン投与・非刺激群ではBrdU陽性細胞数は69%減少しており、視床前核刺激には、コルチコステロン投与による海馬成体神経新生の抑制からの回復効果を認めた。

以上より成体ラットモデルを用いて視床前核の定位的電極留置による高頻度電気刺激が海馬歯状回の神経新生を増加させ、また抑制された神経新生を回復させる効果があることを示唆する成果が得られた。

またこの研究により以下の課題が明らかとなった。

第一に、高頻度刺激による神経活動の変調を明らかにすることである。本研究では視床前核の刺激がどのように海馬歯状回の前駆細胞に働きかけるのかを解明するまでにはいたらなかった。今後投射経路を含めた解剖学のおよび電気生理学的検討が課題である。

次に増殖した神経前駆細胞の生体内で果たす役割である。特に病理モデルにおいて抑制された神経新生が電気刺激により回復されているが、この結果が正常な神経新生として海馬機能の維持に働いているのか、解剖学的検討および行動実験学的検討が必要である。

本研究は、海馬機能低下・海馬萎縮による神経疾患に対してその早期に神経新生の低下を防ぐことが治療戦略のひとつとなりうる可能性を示した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

H. Toda, et. al The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation. Journal of

Neurosurgery108(1) 132-138, 2008 査読  
有

[学会発表] (計3件)

(1) 戸田弘紀: 視床前核高頻度刺激による成  
体ラット海馬神経新生の亢進 第47回日本  
定位・機能神経外科学会 2008.1.25 浜松

(2) H.Toda: High frequency stimulation of  
the anterior thalamic nucleus increases  
adult hippocampal neurogenesis in rats.  
2007 Society for Neuroscience Annual  
Meeting, 2007.11.5 San Diego, U.S.A.

(3) H.Toda : Neuromodulation restores  
suppressed adult hippocampal neurogenesis.  
2006 American Association of Neurological  
Surgeons, Annual Meeting, 2006. 4. 25  
San Francisco, U.S.A.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

戸田 弘紀 (TODA HIROKI)

財団法人田附興風会・医学研究所 第5研  
究部・研究員

研究者番号: 80414118