

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06924

研究課題名(和文) 外界情報が神経新生を制御する海馬広域神経回路の同定

研究課題名(英文) Improvement of cognitive function via promotion of adult hippocampal neurogenesis in middle-aged mice

研究代表者

山田 純 (Yamada, Jun)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：70582708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：海馬歯状回では発達後も顆粒細胞が産生され、神経回路の再編が行われている。生体海馬神経新生といわれるこの現象は、環境やストレス、薬物などの外界(外部)情報の影響を受けることが知られている。本研究では、抗認知症薬メマンチンに着目した研究を行い、メマンチンの認知機能改善作用には、コンドロイチン硫酸量の増加を作用機転とする海馬神経新生の促進が関与している可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬神経新生の増加は、認知症・うつ病などの治療に応用できる。本研究の結果は、神経新生の視点からメマンチンの作用機序を明らかにしたものであり、超高齢化社会において社会生活を営む上で必要な脳機能の維持やメンタルヘルス向上のための基礎的な知見となりうる。

研究成果の概要(英文)：Chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) constitutes the neurogenic niche in the adult hippocampus. Newborn granule cells have been shown to be involved in aging-related cognitive decline and Alzheimer's disease. The purpose of this study was to define the effects of memantine (MEM), a therapeutic agent for Alzheimer's disease, on CSPG and adult neurogenesis in the hippocampus. MEM regulates the genes related to CSPG, which may underlie the improvement of cognitive function and reduction of anxiety-related behavior via promotion of adult hippocampal neurogenesis. These results imply that CSPG may be a novel target for the anti-dementia drug.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経新生 海馬 メマンチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海馬歯状回では発達後も顆粒細胞が産生され、神経回路の再編が行われている。成体海馬神経新生といわれるこの現象は、環境やストレスなどの外界情報の影響を受けることも知られている。これまで、網羅的遺伝子解析やプロテオミクス研究が多数進められ、細胞レベルや分子レベル、遺伝子レベルの研究には、一定の進展が見られる。一方で、神経回路レベルでの研究は少なく、ストレスや豊かな環境、抗認知症薬の投与など外界（外部）からのシグナルによって神経新生が制御される機構の詳細についての多くは明らかとなっていない。本研究では、抗認知症薬メマンチンに着目し、メマンチンが海馬神経新生を促進する未知の作用機転として、コンドロイチン硫酸に着目した集学的解析に取り組むことにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経新生を神経伝達物質や神経回路の観点から制御し、超高齢化社会において社会生活を営むために必要な脳機能の維持やメンタルヘルス向上のための基礎的知見を得ることである。海馬神経新生の増加は、認知症・うつ病などの治療に応用できることから、将来的な技術開発を見据えた基礎的な知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には C57BL/6J 系統の雄マウス（12-14 ヶ月齢）を使用した。免疫組織化学に用いたマウスは、深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドと 0.05%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液を用いて灌流固定した。その後、ビブラトームで 40 μm 厚の冠状断切片を作製した。

(2) メマンチンの投与

メマンチン投与群には、メマンチン塩酸塩（20 mg/kg）を 1 日 1 回 18 日間連続で腹腔投与した。コントロール群には、生理食塩水を 1 日 1 回 18 日間連続で腹腔投与した。

(3) 行動試験

オープンフィールド試験

マウスを角型オープンフィールドチャンバー（50 × 50 × 50 cm）に入れ、10 分間の探索行動を評価した。中心の明るさは 100 ルクスに設定した。中心領域のサイズは 30 × 30 cm と設定し、総走行距離、中心領域への滞在時間、外側領域への滞在時間について、ビデオトラッキングシステム ANY-maze を用いて自動的に測定した。

Y 迷路試験

マウスを 3 本の走路からなる Y 迷路（30 × 30 × 30 cm）に入れ、8 分間の探索行動を交替率で評価した。中心の明るさは 100 ルクスに設定した。各走路に侵入した回数をビデオトラッキングシステム ANY-maze を用いて自動的に測定した。動物が測定時間内に各アームに進入した回数（総アーム進入回数）および連続して異なる 3 本のアームに進入した組み合わせの数（交替行動数）を自動的に計測し、下記の式より交替行動率（%）を算出した。

$$\text{交替率} = \text{交替行動数} \div (\text{総アーム進入回数} - 2) \times 100$$

高架式十字迷路試験

オープンアーム（30 × 6 × 15 cm）とクローズアーム（30 × 6 cm）の付いた、床からの高さ 40cm の高架式十字迷路にマウスを入れ、10 分間の行動を解析した。中心の明るさは 100 ルクスに設定した。各アームへの滞在時間を ANY-maze を用いて自動的に測定した。

恐怖条件付け試験

床に電線を敷いた四角チャンバー（文脈 A, 18 × 18 × 40 cm）の中に入れ、電気ショック（0.5 mA, 1sec）を 3 回、60 秒の間隔で与えた。電気ショックによる条件付けの成立を確認するために、電気ショックを与えてから 5 日後に、同じチャンバー（文脈 A）にマウスを戻し、6 分間におけるすくみ反応を測定した。また、電気ショックを与えてから 6 日後に三角のチャンバー（文脈 B, 18 × 18 × 18 cm）に入れ、6 分間におけるすくみ反応を測定した。チャンバー内におけるすくみ反応は、ANY-maze を用いて自動的に測定した。

(4) 免疫組織化学

脳切片は、1% 牛血清アルブミン、0.3% トリトン X-100、0.05% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液によってブロッキングを行った。その後、以下に示す一次抗体・レクチンと蛍光色素標識二次抗体を組み合わせる免疫蛍光染色を行った。

一次抗体は、以下のものを使用した。

ヤギモノクローナル抗 Sex determining region Y-box 2 (Sox2) 抗体 (1:5,000, Santa Cruz Biotechnology)

マウスモノクローナル抗 S100 抗体 (1:10,000, Sigma-Aldrich)

モルモットモノクローナル抗 Doublecortin (DCX) 抗体 (1:5,000, Millipore)

ウサギモノクローナル抗 Calretinin (CR) 抗体 (1:5,000, Swant)
Wisteria-floribunda agglutinin (WFA) レクチン (1:5,000, Vector Biolabs)

(5) オプティカルダイセクター解析

すべての免疫組織化学を行ったすべてのサンプルについて、厳密な定量解析を可能にするオプティカルダイセクター解析を行った。マウスの海馬から4枚の切片をランダムに選択し、免疫蛍光染色を行った。中等倍の対物レンズ (×20, NA 0.8) を装着したセクション顕微鏡 (Apotome.2, Carl Zeiss) を用いて、海馬歯状回の光学切片のZスタックを取り込んだ。画像解析アプリケーション ImageJ を用いて、オプティカルダイセクター法により、新生ニューロンについて空間分布密度を求めた。歯状回の面積は、グリッドカウンティング法によって算出した。また、細胞の空間分布密度 (Numerical density; ND) は以下の式で算出した。

$$ND = Q / (h \times a(fra) / SV)$$

Q: ダイセクター法によってカウントされた細胞数

h: サンプルングに使用する切片内の領域。本研究では、切片作成時の物理的ダメージを考慮して40 μm 厚の切片の表面から2 μm までをサンプルングから除外し、36 μm を使用

a(fra): グリッドの総面積

SV: 切片の縮小率

(6) リアルタイム RT-PCR

マウスは、深麻酔下にリン酸緩衝液 (30 ml) を用いて灌流し、脳を取り出した。その後、ピプラーームで 200 μm 厚の冠状断切片を作製し、CA1/3 領域と歯状回を切り出した。続いて、FastGene RNA Basic Kit (日本ジエネティクス) を用いて、mRNA を抽出し、cDNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて合成した。リアルタイム PCR は ABI7500 (Applied Biosystems) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) メマンチン投与群とコントロール群における自発運動量、短期記憶と不安様行動の解析

本研究の実験スケジュールを図 1A に示す。12-14 カ月齢の C57BL/6J マウスに、メマンチン (20 mg/kg) を 18 日間腹腔投与した。11 日目にオープンフィールド試験と Y 迷路試験、12 日目に高架式十字迷路試験、13-18 日目に恐怖条件付け試験を行った (図 1A)。オープンフィールド試験を行い、探索行動・自発運動量を評価したところ、コントロール群とメマンチン投与群で、総移動距離とオープンフィールドの中心領域への滞在時間に有意な変化は認められなかった (図 1B-D)。また Y

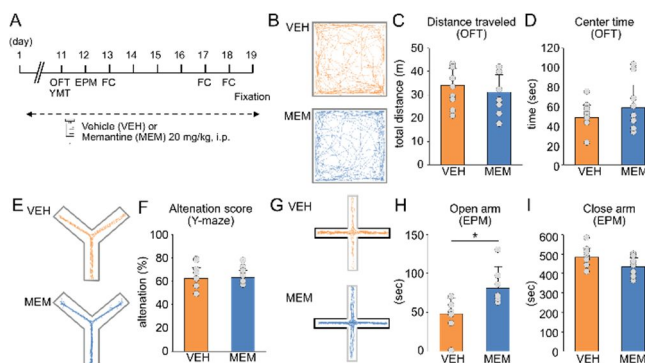


図 1: メマンチン投与とマウスの行動変化

迷路試験を行い、短期記憶を評価したところ、コントロール群とメマンチン投与群で交替率に差は認められなかった (図 1E, F)。さらに、高架式十字迷路を行い、不安様行動を評価したところ、メマンチン投与群は、コントロール群と比べて、オープンアームへの滞在時間が有意に増加していた (図 1G-I)。

(2) メマンチン投与群とコントロール群における恐怖条件付け記憶の解析

続いて、恐怖条件付け試験を行い、長期記憶の評価を行った。条件付けでは、床に電線を入れた四角いチャンバー (文脈 A) にマウスを入れ、キュー音の提示と同時にマウスに電気ショックを与えた。恐怖条件付けの成立については、コントロール群とメマンチン投与群ともに3回の電気ショックによりすくみ反応が増大し、両者の間で有意な差は認められなかった。恐怖条件付けから4日後に、マウスを再び四角いチャンバーに戻し、海馬依存的な文脈記憶を評価した。その結果、コントロール群と比べてメマンチン投与群ではすくみ時間の有意な増加が認められた。一方で、三角のチャンバー (文脈 B) におけるすくみ反応時間については、コントロール群とメマンチン投与群で差は認められなかった。また、扁桃体依存的な記憶を評価するために、音刺激によるすくみ反応時間について解析したところ、コントロール群とメマンチン投与群で有意な差は認められなかった。これらの結果より、メマンチン投与加齢マウスは、長期記憶の保持が向上している可能性が示唆された。

(3) メマンチン投与群とコントロール群における海馬歯状回での神経新生の解析

続いて、Sox2/S100 /DCX/CR の免疫蛍光四重染色を行い、海馬歯状回での神経新生マーカーの発現様式について定性的な観察を行った (図 2)。本実験では、以下の分子マーカーの発現様式に基づき、アストロサイト、神経幹細胞、神経前駆細胞、新生ニューロンの同定を行った (図

2A,B)。

- Sox2⁺/S100⁻/DCX⁻/CR⁻ アストロサイト
- Sox2⁺/S100⁻/DCX⁻/CR⁺ 神経幹細胞
- Sox2⁻/S100⁻/DCX⁺/CR⁻ 神経前駆細胞
- Sox2⁻/S100⁻/DCX⁺/CR⁺ 新生ニューロン

続いて、オプティカルダイセクター法を用いて各細胞の定量的評価を行った(図2C-F)。アストロサイトと神経幹細胞の空間密度は、コントロール群とメマンチン投与群で有意な差は認められなかった(図2C,D)。一方で、DCXを発現する神経前駆細胞と新生ニューロンについては、コントロール群と比べてメマンチン投与群において、有意に増加していた(図2E,F)。これらの結果から、メマンチン投与加齢マウスは神経新生の増加が認められることが示唆された。

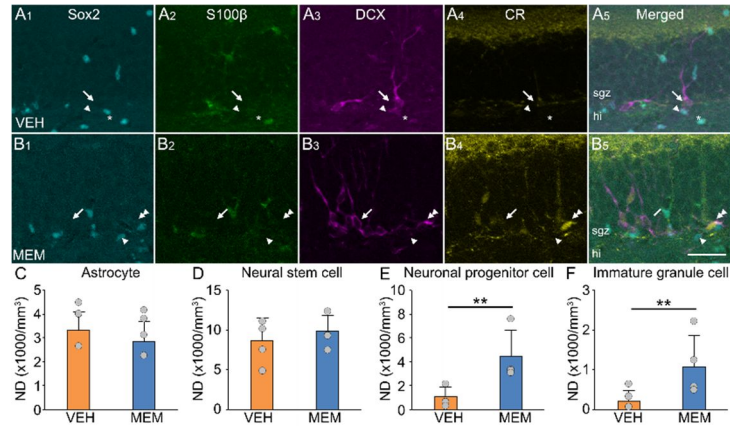


図2: メマンチン投与マウスにおける神経新生の変化

(4) メマンチン投与群とコントロール群における海馬歯状回のWFAの蛍光強度解析

我々はこれまでに、海馬におけるコンドロイチン硫酸が成体海馬神経新生を促進することを報告している。そこで、コンドロイチン硫酸と結合するWFAレクチンを用いて、海馬におけるコンドロイチン硫酸の発現を解析した。WFAはPV⁺ニューロンの細胞体や樹状突起近位部を取り囲むペリニューロナルネット様の染色パターンと、それ以外の細胞外マトリックス様の染色パターンを示すことが知られている。アンモン角(CA1/3領域)においては、錐体細胞層にペリニューロナルネット様の染色パターンを示した。また、メマンチン投与群においては、歯状回における細胞外マトリックス様のパターンが顕著に増加していた。そこで、歯状回におけるWFA蛍光強度の計測を行ったところ、分子層、顆粒細胞層の両方において、コントロール群と比べてメマンチン投与群において、蛍光強度の有意な増加が認められた。

(5) メマンチン投与群とコントロール群におけるコンドロイチン硫酸合成と分解に関わる酵素群の発現解析

メマンチンがコンドロイチン硫酸の発現調節にどのように関与しているのかを調べるために、コンドロイチン硫酸の合成や分解に関わる酵素群の遺伝子発現について定量的RT-PCRを行った。コンドロイチン硫酸の分解酵素としては、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-2、MMP-3、MMP-9)やADAMTSファミリー(ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5)が知られている。また、コンドロイチン硫酸合成酵素としては、CSGαINAcT1、CSGαINAcT2(コンドロイチン硫酸GalNAc転移酵素)が報告されている。これらの酵素について、CA1/3領域においては、コントロール群とメマンチン投与群で発現変化は認められなかった。一方で、歯状回においては、コントロール群に比べてメマンチン投与群で、コンドロイチン硫酸の分解酵素であるMMP-9の発現低下が認められた。

以上の結果からは、メマンチンの抗認知症作用には、細胞外プロテアーゼの発現低下による海馬のコンドロイチン硫酸量の増加を作用機転とする海馬神経新生の促進が関与している可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Risako Fujikawa, Jun Yamada, Shozo Jinno	4. 巻 229
2. 論文標題 Subclass imbalance of parvalbumin-expressing GABAergic neurons in the hippocampus of a mouse ketamine model for schizophrenia, with reference to perineuronal nets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Schizophr Res	6. 最初と最後の頁 80-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.schres.2020.11.016.	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 Risako Fujikawa, Jun Yamada, Kyoko M Iinuma, Shozo Jinno	4. 巻 206
2. 論文標題 Phytoestrogen genistein modulates neuron-microglia signaling in a mouse model of chronic social defeat stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2021.108941.	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 Jun Yamada, Shozo Jinno	4. 巻 158
2. 論文標題 Potential link between antidepressant-like effects of ketamine and promotion of adult neurogenesis in the ventral hippocampus of mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 107710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2019.107710.	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 Jun Yamada, Chihiro Sato, Kotarou Konno, Masahiko Watanabe, Shozo Jinno.	4. 巻 40
2. 論文標題 PSA-NCAM colocalized with cholecystokinin-expressing cells in the hippocampus is involved in mediating antidepressant efficacy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 825-842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1779-19.2019.	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 Jun Yamada, Shozo Jinno	4. 巻 7
2. 論文標題 Promotion of synaptogenesis and neural circuit development by exosomes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Translationl Medicine	6. 最初と最後の頁 S323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/atm.2019.09.154	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Jun Yamada, Shoichiro Maeda, Kyoko Inuma, Shozo Jinno
2. 発表標題 Therapeutic effects of ketamine for cocaine addiction and promotion of adult hippocampal neurogenesis.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 (Neuro2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田純、前田祥一郎、飯沼今日子、神野尚三
2. 発表標題 メマンチンによるコンドロイチン硫酸量の増加を介した成体海馬神経新生の促進
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jun Yamada, Shozo Jinno
2. 発表標題 Potential therapeutic effects of ketamine for cocaine addiction via promotion of adult hippocampal neurogenesis
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会 (Neuro2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田純、神野尚三
2. 発表標題 マウスのコカイン誘発性場所嗜好性がケタミンによって抑制されるメカニズムの基礎検討
3. 学会等名 第76回日本解剖学会九州州支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jun Yamada, Shozo Jinno
2. 発表標題 Myelination of the axons derived from parvalbumin-expressing GABAergic neurons in the mouse hippocampus: time course, topography, and functional implications
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 (Neuro2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田純、神野尚三
2. 発表標題 プロバイオティクスによる加齢マウスの腸内細菌叢の改変と成体海馬神経新生の制御
3. 学会等名 第75回日本解剖学会九州州支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田純、神野尚三
2. 発表標題 海馬のパーシカン陽性ペリニューロナルネットはneurogliaform cellの周囲に選択的に形成されている
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------