

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06930

研究課題名(和文) ヒトとマーモセットの成体海馬ニューロン新生の再検討

研究課題名(英文) Reexamination of adult neurogenesis in the marmoset and human hippocampus

研究代表者

石 龍徳 (Seki, Tatsunori)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20175417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：成体でも海馬の顆粒細胞層ではニューロンの新生が起こっており、海馬の記憶・学習や病理に関わっていることは、齧歯類の研究から証明されている。しかし、ヒトの海馬でどの程度成体脳ニューロン新生が起こっているのかについてはまだ論争の最中である。この問題の解決のために、我々はヒトとマーモセットの海馬における未熟ニューロンマーカー陽性細胞(INM+)と増殖性神経前駆細胞について解析を行った。その結果、ヒトの海馬に豊富に存在するINM+細胞の大部分は、新生ニューロンではないことが示唆された。ヒトではINM+細胞が新生ニューロンの代わりに海馬の可塑性を補償している可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒトの海馬のニューロン新生は低い、未熟な性質のニューロンは豊富に存在することを示している。この未熟な性質のニューロンは、海馬の可塑性(記憶・学習の基盤)や神経再生に関与している可能性がある、学術的にも社会的にも意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Studies in rodents have demonstrated that adult neurogenesis occurs in the granule cell layer (GCL) of the hippocampus, and is involved in various hippocampal functions, such as memory and learning, and pathological conditions. However, it remains controversial as to what extent adult neurogenesis actually occurs in the adult human hippocampus. To address this question, we analyzed immature neuronal marker-positive (INM+) cells and proliferating neuronal progenitor cells in humans and marmosets. The present study shows that marmosets and humans harbor abundant INM+ cells not only in the GCL, but also in the hilus, unlike rodents. Although in marmosets, newly generated neurons were always detected in the GCL, but in humans, there were few proliferating neuronal progenitors. These results suggest that the INM+ cells in the adult human hippocampus are not newly generated neurons, and may compensate for the decline in plasticity by a low level of neurogenesis.

研究分野：神経発生学

キーワード：成体脳ニューロン新生 海馬 ヒト マーモセット 未熟ニューロン 可塑性

1. 研究開始当初の背景

脳の大部分では、成体になるとニューロンは新生しないが、海馬の顆粒細胞層内側の顆粒細胞層下帯では成体になってもニューロン(顆粒細胞)の新生が続いている(図1)。顆粒細胞下帯には神経幹細胞が存在し、増殖性神経前駆細胞→未熟ニューロンを経て、最終的に成熟ニューロンになる。この「成体脳のニューロン新生」は1960年代に齧歯類で発見され、現在再生医療、記憶・学習機構、精神疾患など様々な分野で精力的に研究されている。ヒトでも成体脳ニューロン新生が起こることは1998年に初めて報告されたが、この論文では、どの程度成人の海馬でニューロンが新生されているのかは報告されなかった。2018年に、ヒト海馬のニューロン新生レベルについて、全く異なる結論の論文が出版され話題になっている。一つの論文では、ニューロン新生レベルは、生後急速に低下し、成人では検出できないほど低いことが示され(Sorrells et al., 2018)、もう一つの論文では、ニューロン新生レベルは、成体でも維持されていることが示された(Boldrini et al., 2018)。このような矛盾した結果が解決されない理由の一つは、齧歯類で新生細胞を検出するときに使われるブロモデオキシウリジン(BrdU)をヒトでは投与できないことによる。BrdUはDNAの構成要素の一つであるチミジンの類似物質で、DNAを複製する分裂細胞に取り込まれる。したがって、取り込まれたBrdUを、BrdU抗体を用いて免疫染色することにより、分裂・増殖した細胞を追跡できる。このようなBrdU投与実験がヒトではできないので、未熟ニューロンマーカー分子に対する抗体を使って、成人のニューロン新生を評価してきた。しかし、未熟ニューロンマーカーを発現する細胞は、ニューロン新生部位以外にも存在することから(Bonfanti and Seki, 2021)、未熟ニューロンマーカー発現細胞の存在は、かならずしも新生ニューロンの存在を示す訳ではない。このような状況から、成人のニューロン新生については議論が続いている。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトとヒトに近縁の霊長類のマーマセットのニューロン新生を解析・比較することによって、ヒトのニューロン新生について再検討することが目的である。そのために、まず、ヒトとマーマセットの未熟ニューロンマーカー発現細胞の分布を調べ、両者の分布の類似性やマウス/ラットとの違いを検討する。つぎに、両者の未熟ニューロンマーカー発現細胞の性質を調べる。マーマセットでは、BrdUを投与して増殖細胞を標識し、新生ニューロンを検出する。ヒトではBrdUが投与できないので、そのかわりとして、増殖性神経前駆細胞の存在を調べる。

3. 研究の方法

(1) ヒト海馬

ヒト海馬のニューロン新生は、以前に取得したヒト海馬切片の免疫染色画像を解析することにより調べられた。解析に使用した画像は以下のようにして得られた。ヒトの手術摘出後の海馬(てんかん患者, 9-43歳; 対照群のグリオーマ患者, 16-49歳)は、堀智勝先生(前東京女子医大、現東京神経センター病院)より提供された。4%パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝食塩水(PBS)で固定後、クリオスタットによって薄切したヒト海馬切片を次の抗体によって蛍光免疫染色及びDAB免疫染色をした: PSA-NCAM(ポリシアル化神経細胞接着分子)抗体、DCX(doublecortin)抗体、Ki67抗体、HuB抗体(表1)。画像の解析はZEN(Zeiss)およびImageJ(NIH)によって行った。本実験は順天堂大学および東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得ている。

(2) マーマセット海馬

新生細胞を標識するために、マーマセット(1年3ヶ月～2年9ヶ月齢)にBrdUを毎日1回10日間投与し、1ヶ月後に4%パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝食塩水で固定した海馬ブロックは、名古屋市立大学大学院医学研究科再生医学分野の澤本和延先生より提供された。また、無処理のマーマセット(4年3ヶ月齢)の固定した海馬ブロックは、筑波大学医学医療系生命医科学域解剖学・神経科学研究室の佐々木哲也先生より提供された。クリオスタットによって薄切した海馬切片は次の抗体によって蛍光免疫染色した: PSA-NCAM抗体、DCX抗体、Prox1抗体、BrdU抗体、NeuN抗体(表1)。本実験は、名古屋市立大学、筑波大学、東京医科大学の動物実験倫理委員会の承認を得ている。

表1 抗体が標識する細胞

抗体	標識細胞
PSA-NCAM	未熟な性質のニューロン
DCX	未熟な性質のニューロン
Prox1	顆粒細胞
HuB	未熟および成熟ニューロン
NeuN	成熟ニューロン
BrdU	新生細胞
Ki67	増殖中の細胞

4. 研究成果

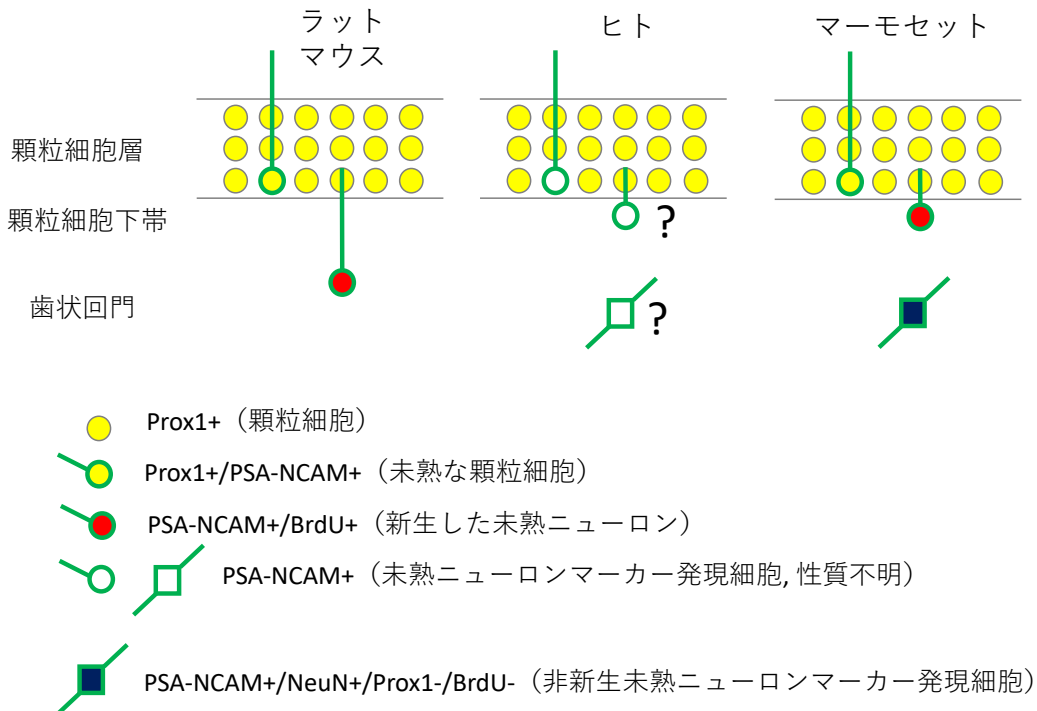
(1) ヒト (対照群患者) 海馬の実験結果

未熟ニューロンマーカーの PSA-NCAM に陽性 (PSA-NCAM+) の細胞は、歯状回の顆粒細胞層、顆粒細胞層下帯、歯状回門に分布していた (図 1) (Seki et al., 2019)。PSA-NCAM+細胞は、顆粒細胞層下帯に密に分布し、その細胞密度は、2-3 ヶ月齢のラットやマウスよりもやや少ない程度に見えた。歯状回門の PSA-NCAM 陽性細胞は、ラットやマウスではみられないが、ヒトでは顆粒細胞層下帯の 1/3 程度の密度で存在していた。その形態はさまざまだが、顆粒細胞層や顆粒細胞層下帯の PSA-NCAM+細胞よりも大きく、多極性の細胞が多くみられた。また、顆粒細胞層下帯に存在する DCX+/Ki67+/HuB+増殖性神経前駆細胞数を調べたところ、その数は、ラットやマウスと比べて非常に少なく、10 枚の海馬切片を観察して 1-2 個程度であった。このことから、顆粒細胞層下帯や歯状回門の PSA-NCAM+細胞は新生ニューロンに由来するののかという問題が浮かび上がってくる。

(2) マーモセット海馬の実験結果

マーモセットの海馬における未熟ニューロンマーカー PSA-NCAM の発現を調べたところ、顆粒細胞層、顆粒細胞層下帯、歯状回門に分布が見られた (図 1)。この分布は、ヒトと同様であり、マウス/ラットとは異なる。顆粒細胞層と顆粒細胞層下帯の PSA-NCAM+細胞は、もう 1 つの未熟ニューロンマーカーである DCX や顆粒細胞マーカーの Prox1 に陽性であった。歯状回門に存在する PSA-NCAM+細胞は、ヒトと同様に、多極性の細胞が多くみられた。その性質を調べたところ、DCX や Prox1 に陰性で、NeuN 陽性であった。また、マーモセットに BrdU を毎日 1 回 10 日間投与し、一ヶ月後に固定した海馬では、PSA-NCAM+/BrdU+新生未熟ニューロンが顆粒細胞層と顆粒細胞層下帯に見られたが、歯状回門には見られなかった。したがって、顆粒細胞層や顆粒細胞層下帯の PSA-NCAM+細胞は、新生した未熟ニューロンであるが、歯状回門の PSA-NCAM+細胞は、顆粒細胞でも、新生ニューロンでもない結論できる。

図 1. 齧歯類・ヒト・マーモセットにおける未熟ニューロンマーカー陽性細胞の分布



(3) 考察

① 顆粒細胞層下帯に存在する PSA-NCAM+細胞について

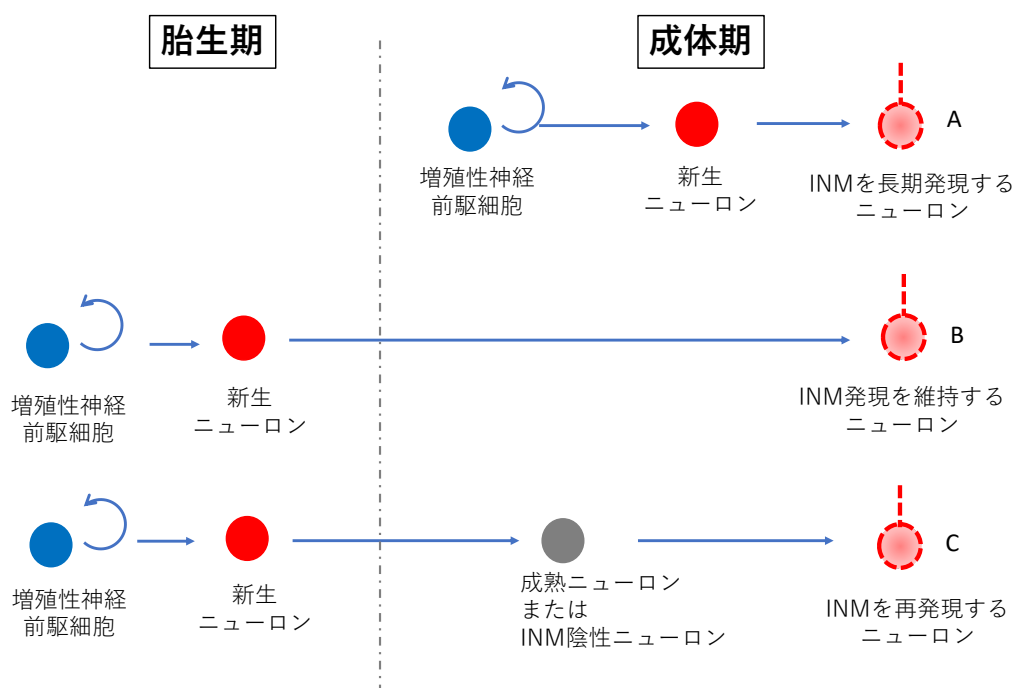
ヒト、マーモセットでは、顆粒細胞層、顆粒細胞層下帯、歯状回門に PSA-NCAM+細胞が存在する。マーモセットの顆粒細胞層、顆粒細胞層下帯に存在する PSA-NCAM+細胞には、BrdU 陽性のあるものがあることから、新生ニューロンであると考えられる。同様の結果の論文は、過去にもいくつか出版されているので、顆粒細胞層、顆粒細胞層下帯に存在する PSA-NCAM+細胞が新生ニューロンであることはほぼ確実であろう。

しかしながら、このマーモセットの結果は、ヒトの顆粒細胞層や顆粒細胞層下帯の PSA-NCAM+細胞が新生ニューロンであることを示唆しているとは思えない。なぜならば、ヒトでは顆粒細胞層下帯の DCX+/HuB+/Ki67+増殖性神経前駆細胞は非常に少ないからで

ある。では、ヒトの顆粒細胞層や顆粒細胞層下帯に存在する PSA-NCAM+細胞は、どのような細胞であろうか。これに関しては、次のような3つの可能性を考えている (図2) (Seki, 2020) : A) 成体期に新生され、長期にわたって未熟ニューロンマーカーを発現し続けるニューロン、B) 胎生期に新生され、成体になっても未熟ニューロンマーカーを発現し続けているニューロン、C) 成体期のある時期に、未熟ニューロンマーカーを発現するようになったニューロン。この仮説の是非は、将来の研究にゆだねられるが、重要なことは、新生ニューロンがどの程度あるかということではなく、未熟ニューロンマーカーを発現しているニューロンが存在することである。未熟ニューロンマーカーを発現しているニューロンは通常のニューロンと比較して、可塑性が高いことが報告されている。ヒトでは、これらの未熟ニューロンマーカー発現ニューロンが、ニューロン新生の低下による可塑性の低下を補っているのかもしれない。

図 2

成人海馬における未熟ニューロンマーカー (INM) 発現細胞の起源



② 歯状回門の PSA-NCAM+細胞について

ヒトやマーモセットで見られた歯状回門の PSA-NCAM+細胞は、ラット/マウスでは存在しない。ヒトやマーモセットの歯状回門に存在する PSA-NCAM+細胞の形態は、顆粒細胞層、顆粒細胞層下帯の小型の PSA-NCAM+細胞とは異なり、大型で多極性の細胞が多い。マーモセットでは、歯状回門の PSA-NCAM+細胞は、Prox1 陰性、BrdU 陰性、NeuN 陽性であることから、顆粒細胞とは性質が異なる非新生ニューロンであると考えられる。このことから、ヒトの歯状回門に存在する PSA-NCAM+細胞も、非新生ニューロンである可能性があると考えられる。歯状回門に存在する PSA-NCAM+細胞は、ヒトやマーモセットなどの霊長類に存在する細胞かもしれない。しかし、大きな脳を持つ動物には、ニューロン新生部位以外の PSA-NCAM+細胞や DCX+細胞が、小さな脳を持つ動物よりも多く存在するとの報告があるので (Bonfanti and Seki, 2021)、大きな脳を持つ動物の歯状回についても将来検討する必要がある。

<参考文献>

Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., et al. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22, 589-599. doi:10.1016/j.stem.2018.03.015.

Bonfanti, L., and Seki, T. (2021). The psa-ncam-positive “immature” neurons: An old discovery providing new vistas on brain structural plasticity. *Cells* 10. doi:10.3390/cells10102542.

- Seki, T. (2020). Understanding the real state of human adult hippocampal neurogenesis from studies of rodents and non-human primates. *Front. Neurosci.* 14, 839. doi:10.3389/fnins.2020.00839.
- Seki, T., Hori, T., Miyata, H., Maehara, M., and Namba, T. (2019). Analysis of proliferating neuronal progenitors and immature neurons in the human hippocampus surgically removed from control and epileptic patients. *Sci. Rep.* 9. doi:10.1038/s41598-019-54684-z.
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., et al. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555, 377-381. doi:10.1038/nature25975.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Luca Bonfanti, Tatsunori Seki	4. 巻 10
2. 論文標題 The PSA-NCAM-positive "immature" neurons: An old discovery providing new vistas on brain structural plasticity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2542 (1-16)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10102542	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 該当する
1. 著者名 Masanobu Ito, Tomoya Kinjo, Tatsunori Seki, Junko Horie, Toshihito Suzuki	4. 巻 41
2. 論文標題 The long-term prognosis of hippocampal neurogenesis and behavioral changes of offspring from rats exposed to valproic acid during pregnancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacol Rep	6. 最初と最後の頁 260-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2.12181	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 石龍徳	4. 巻 79
2. 論文標題 成人海馬のニューロン新生: 研究は一周して出発点に戻る	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 東京医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 197-207
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 Seki Tatsunori	4. 巻 14
2. 論文標題 Understanding the Real State of Human Adult Hippocampal Neurogenesis From Studies of Rodents and Non-human Primates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00839	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 石龍徳	4. 巻 38
2. 論文標題 海馬の顆粒細胞の発生-その発生は胎生-成体期まで続く	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1523-1525
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 無
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 Namba T, Shinohara H, Seki T	4. 巻 224
2. 論文標題 Non-radial tortuous migration with cell polarity alterations of newly generated granule neurons in the neonatal rat dentate gyrus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Struct Funct	6. 最初と最後の頁 3247-3262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00429-019-01971-0	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 Seki T, Hori T, Miyata H, Maehara M, Namba T	4. 巻 9
2. 論文標題 Analysis of proliferating neuronal progenitors and immature neurons in the human hippocampus surgically removed from control and epileptic patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54684-z	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 Sasaki-Takahashi N, Shinohara H, Shioda S, Seki T.	4. 巻 30
2. 論文標題 The polarity and properties of radial glia-like neural stem cells are altered by seizures with status epilepticus: Study using an improved mouse pilocarpine model of epilepsy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hippocampus	6. 最初と最後の頁 250-262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hipo.23153	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石龍徳
2. 発表標題 てんかん患者とてんかんモデル動物における成体海馬ニューロン新生
3. 学会等名 第54回てんかん学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石龍徳
2. 発表標題 ヒトの海馬ではどの程度成体脳ニューロン新生が起こっているのか？
3. 学会等名 第43回日本神経科学学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠原 広志, 石 龍徳
2. 発表標題 背側および腹側の異なる経路によって海馬歯状回顆粒細胞層は形成される
3. 学会等名 第43回日本神経科学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石龍徳
2. 発表標題 ヒト海馬の成体脳ニューロン新生
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠原 広志, 石 龍徳
2. 発表標題 海馬歯状回顆粒細胞は2つの異なる経路を移動する前駆細胞によって形成される
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柏木 太一, 塩田 清二, 石 龍徳
2. 発表標題 発生期海馬における神経幹細胞の特性に関与する因子の発現解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsunori Seki
2. 発表標題 Adult hippocampal neurogenesis and immature neuronal marker-expressing neurons
3. 学会等名 The 17th Adult-neurogenesis conference in Japan (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinohara H, Seki T
2. 発表標題 Analysis of cellular migration in developmental dentate gyrus
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石龍徳
2. 発表標題 ヒト海馬のニューロン新生；その進化学的考察
3. 学会等名 海馬と高次脳機能学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

石 龍徳の研究ページ https://sekitatsulab.jimdofree.com

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
研究分担者	柏木 太一 (Kashiwagi Taichi) (10398232)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	
研究分担者	篠原 広志 (Shinohara Hiroshi) (10455793)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	権田 裕子 (Gonta Yuko) (60424181)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	

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
---------	---------