

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580321

研究課題名（和文）脊椎動物成体脳における神経発生機構についての系統発生的知見からの解明

研究課題名（英文）Phylogenic and histological study of the neurogenesis in vertebrate adult brain.

研究代表者

齋藤 正一郎 (SAITO SHOICHIRO)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：60325371

研究成果の概要（和文）：哺乳類の成体脳では、嗅球および海馬において活発な神経新生が生じている一方で、無尾両生類においては海馬と密接な神経連絡を有する外側中隔において神経新生が強く示唆されたことから、系統発生的に下位の脊椎動物においては成体脳における活発な神経新生部位は外側中隔であり、脳の進化に伴い神経新生部位は外側中隔から嗅球及び海馬へ移行したのではないかという新たな知見が得られた。また有尾両生類及び爬虫類の中枢神経系における研究を進めるための形態学的土台についても、新たな知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Although the neurogenesis is reported to be mainly observed in the olfactory bulb and the hippocampus in mammalian adult brain, this study revealed that the neurogenesis could be observed in the lateral septum, which seemed to be closely related to the hippocampus, in the adult brain of phylogenically lower animal like in amphibian. In addition, some morphological bases for further study of the neurogenesis in the adult brain of urodela and reptiles were obtained by this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経解剖学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：神経発生、系統発生、中枢神経系、嗅球、海馬、脳室上衣層、解剖学、形態学

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の新生 (Neurogenesis) は、発生期のみならず成体の脳組織においても生じている。ほ乳類の正常な成体脳において neurogenesis が生じている領域、neurogenic region は海馬と嗅球である。

海馬では、歯状回顆粒細胞層の最内層に神経細胞前駆細胞が存在し、直上の顆粒層へ神経細胞を供給している。嗅球については、側脳室吻部の脳室下層に神経細胞前駆細胞が

存在し、新生された未熟なニューロンは脳室下層と嗅球を結ぶアストロサイトによるトンネル (rostral migratory stream; RMS) により隔離・保護されて嗅球へ遊走する。なぜ海馬と嗅球でのみ、このような神経細胞の新生が観察されるのであろうか。高位脊椎動物において得られた形質なのだろうか、もしくは脊椎動物の進化に伴う何らかの圧力によるものなのだろうか。

魚類の成体脳では、多くの脳領域において

神経細胞の新生が生じていることが報告されており、脳の損傷に対しても神経細胞の新生・供給による補償機能がよく働いていることが報告されている。しかしながら、脊椎動物の成体脳における神経新生の系統発生学的変化様式は未だ不明である。理由は、両生類・爬虫類の特に終脳における詳細な神経細胞の新生様式は不明な点にある。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は大きく2つに分けることができる。目的1は上述の状況をふまえ、「両生類・爬虫類の成体脳における神経新生様式の詳細を解明する」ことで、脊椎動物の成体脳における神経新生を系統発生学的知見から検討することである。目的2は、両生類・爬虫類の成体脳の神経新生部位の形態学的・組織学的特徴を解明する」ことで、神経新生を容認する組織内微小環境の基本となる事項を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 無尾両生類アフリカツメガエルの成体脳における新生細胞の分布について。

アフリカツメガエル成体に、細胞分裂時に核内へ取り込まれるBrdUを3日間連続で腹腔内投与し、最終投与日から一週間後に動物に麻酔し、4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定し、脳を採材する。その後パラフィンに包埋して連続切片を作製し、マイクロウェーブ処理後、抗BrdU抗体と神経細胞マーカー(抗NeuN抗体)による2重免疫染色を施し、新生細胞における神経細胞の発生比率について解明する。加えて細胞増殖期に合成される蛋白質であり細胞増殖マーカーとして利用されているPCNAに対する抗体を用いた免疫組織化学的染色により、無尾両生類アフリカツメガエルの成体脳における細胞発生について検討する。

(2) 有尾両生類アカハライモリの成体脳における新生細胞の分布について。

アカハライモリ成体脳について、まずその形態学的特徴を一般染色、免疫組織化学的染色およびレクチン組織化学的染色により明らかにする。その後、(1)と同様の手法により、成体脳における新生細胞について検討する。

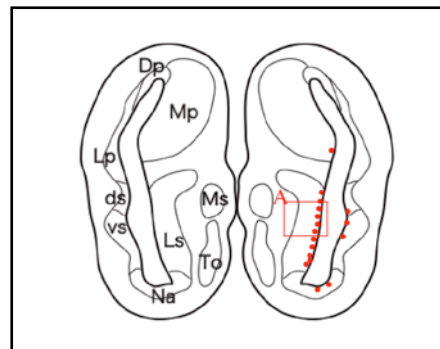
(3) 爬虫類ニホンカナヘビの成体脳における新生細胞の分布について。

ニホンカナヘビの成体脳について、まずその形態学的特徴を一般染色、免疫組織化学的染色および電子顕微鏡学的手法により明らかにする。その後、(1)と同様の手法により、成体脳における新生細胞について検討する。

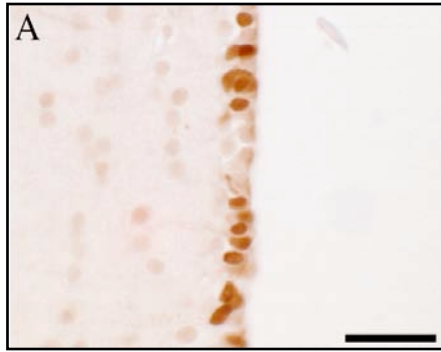
4. 研究成果

(1) 無尾両生類アフリカツメガエルの成体脳における新生細胞の分布について。

哺乳類の脳において、系統発生学的に古い皮質に属する嗅球と海馬では、発生期のみならず成体においても神経発生が恒常的に生じている。一方、成体脳における神経発生のメカニズム、ならびに脊椎動物の進化に伴う成体脳における神経発生の変遷については不明である。本研究では、細胞分裂の際に核内に取り込まれるBrdUを投与し、抗BrdU抗体により取り込んだ細胞を組織化学的に視覚化する方法と、増殖細胞のマーカーの一つである核内蛋白質PCNAに対する抗体を用いた免疫組織化学的方法により、アフリカツメガエル成体脳における神経発生について検討した。結果、PCNA陽性細胞は脳室を裏打ちしている上皮細胞層内に散在していた。終脳においては、外側中隔近傍の上皮細胞層内に多くの陽性細胞が観察されたが、その他領域の上皮細胞層内ではその数は非常に少数であった。間脳においては、視交叉上核に近接する上皮細胞層内に若干の陽性細胞が観察されたが、その他領域では非常に稀であった。中脳、小脳および延髄においても、陽性細胞は非常に稀であった。中隔領域における細胞分裂の可能性は、BrdU投与による実験でも示唆され、アフリカツメガエル成体脳における神経発生を検討する上で本領域が特に重要であることが明らかとなった。哺乳類の成体脳では、嗅球および海馬において活発な神経新生が生じている一方で、アフリカツメガエルでは相当する領域において活発な神経新生が認められず、アフリカツメガエルにおいて海馬と密接な神経連絡を有する外側中隔において神経新生が強く示唆されたことから、系統発生学的に下位の脊椎動物においては成体脳における活発な神経新生部位は外側中隔であり、脳の進化に伴い神経新生部位は外側中隔から嗅球及び海馬へ移行したのではないかと考えられた。以上の成果について現在投稿準備中であり、一部はJournal of Veterinary Medical Scienceに掲載された。



付図説明：アフリカツメガエル終脳における新生細胞の分布様式(赤点が新生細胞を示す)。



付図説明：外側中隔の脳室上衣層における PCNA 陽性細胞の分布。

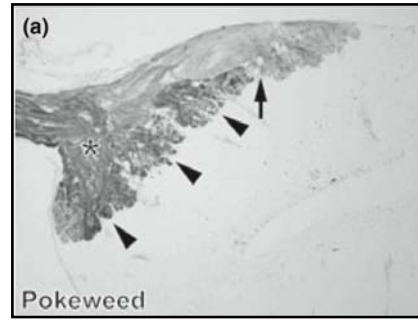
Distribution pattern of PCNA-positive cells in <i>Xenopus</i> brain			
		Total number	Number per section
Ventral region of telencephalon	olfactory bulb granule cell layer	42	2.1
	postolfactory eminence	9	1
	dorsal striatum	18	1
	ventral striatum	27	1.5
	nucleus accumbens	30	1.9
	lateral septum	189	13.5
	suprachiasmatic nucleus	18	2
	ventral hypothalamic nucleus	19	1.9

付図説明：新生細胞が観察された終脳の主な領域と、各領域における陽性細胞数。

(2) 有尾両生類アカハライモリの成体脳における新生細胞の分布について。

無尾両生類アフリカツメガエル成体脳における新生細胞分布を明らかにしたことから、次に、無尾両生類より系統発生的に一つ下位に位置する有尾両生類について検討を行った。有尾両生類については終脳の詳細な組織学的特徴や脳アトラスが不明なため、まず、哺乳類において新生細胞が多数観察される嗅覚系を中心に、その組織学的特徴について検討した。22 種類のレクチンを用いたレクチン組織学的染色では、WGA, pokeweed および PNA の 3 種類のみではあるが、主嗅球と副嗅球に対して異なる染色性を有していた。このことから、系統発生的に下位にあたる有尾両生類においても、嗅球が哺乳類に観察されるような主嗅球と副嗅球に機能的に分離していることが強く示唆された。また、他の種の有尾両生類と比較すると、レクチンの染色性は種ごとに非常に異なることが示唆され、生息域、行動、遺伝的背景により有尾両生類間ではレクチンのターゲットである細胞膜の糖鎖が非常に異なることも示唆された。有尾両生類の中樞神経系は未だ不明な点が多く、成体脳における神経発生を検討する上でその正常構造をまず明らかにしていかなければならないが、本研究結果は今後の

研究のための必要不可欠な土台となる。本成果の一部は、*Anatomia, Histologia Embryologia* に掲載された。



付図説明：アカハライモリの前脳におけるレクチン pokeweed の染色像。主嗅球に当たるとされる領域 (*) を強く染色された一方、副嗅球に当たるとされる領域は弱度に染色された。

Table 2. Lectin binding patterns in the olfactory bulb of the Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*

Lectin	MOB		AOB	
	ONL	GL	VNL	GL
WGA	+	+	±	±
s-WGA	+	+	+	+
LEL	++	++	++	++
STL	++	++	++	++
Pokeweed	+++	+++	+	+
DSL	-	-	-	-
BSL-II	-	-	-	-
SBA	-	-	-	-
DBA	-	-	-	-
VVA	-	-	-	-
BSL-I	+++	+++	+++	+++
SJA	+++	+++	+++	+++
RCA-I	±	±	±	±
Jacalin	-	-	-	-
PNA	++	++	±	+
ECL	-	-	-	-
UEA-I	-	-	-	-
Con A	-	-	-	-
PSA	-	-	-	-
LCA	-	-	-	-
PHA-E	+	+	+	+
PHA-L	±	++	±	++

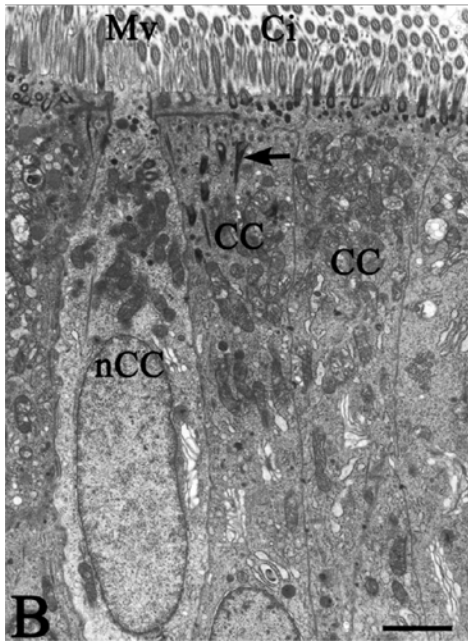
-, negative staining; ±, faint staining; +, weak staining; ++, moderate staining; +++, intense staining. MOB, main olfactory bulb; AOB, accessory olfactory bulb; ONL, olfactory nerve layer; VNL, vomeronasal nerve layer; GL, glomeruli.

付図説明：アカハライモリの嗅球における 22 種類のレクチンの染色結果。3 種類のレクチンのみが、主嗅球と副嗅球間で異なる染色性を示した。

(3) 爬虫類ニホンカナヘビの成体脳における新生細胞の分布について。

脊椎動物成体脳における新生細胞について系統発生的に検討することを目的として、これまでに得られた両生類における結果と比較検討するために、爬虫類の成体脳について研究を行った。爬虫類においても終脳の詳細な組織学的特徴や脳アトラスが不明なため、やはりまず哺乳類において新生細胞が

多数観察される嗅覚系を中心に、その組織学的特徴について検討した。電子顕微鏡を用いて得られた成果の一つとして、嗅球へと軸索を投射している鼻腔の嗅上皮において、新たなタイプの上皮細胞が発見された。この細胞は上皮中に散在しており、管腔側の細胞質が非常に細くくびれており、微絨毛に覆われていた。本研究により、新生細胞の分布の検討において、爬虫類においても種間における神経系の変異について視野に入れながら検討していかなければならないことが明らかとなった。本研究結果は今後の研究のための必要不可欠な土台となる。本成果の一部は、Tissue and Cell に掲載された。



付図説明：上皮内に、管腔側の細胞質が細くくびれ、微絨毛(Mv)に覆われた新規の細胞(nCC)が観察された。

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3件)

①T. Matsui, S. Saito, Y. Kobayashi, K. Taniguchi. Lectin histochemical study on the olfactory bulb of the newts, *Cynops pyrrhogaster*. Anat. Histol. Embryol. In press. (査読有り)

②S. Saito, T. Oikawa, K. Taniguchi, K. Taniguchi. Fine structure of the vomeronasal organ in the grass lizard, *Takydromus tachydromoides*. Tissue. Cell. 42, 322-327, 2010. (査読有り)

③K. Taniguchi, S. Saito, K. Taniguchi. Phylogenic outline of the olfactory system in vertebrates. J. Vet. Med. Sci. 73, 139-147, 2011. (査読有り)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 正一郎 (SAITO SHOICHIRO)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：60325371

(2) 研究分担者

阿閉 泰郎 (ATOJI YASURO)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：90151084