

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 2 日現在

機関番号：32408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21500366

研究課題名（和文）NMDA 型グルタミン酸受容体による海馬歯状回神経新生の制御機構の解明

研究課題名（英文）Glutamate receptor-dependent regulation in hippocampal neurogenesis focused on NMDA receptor

研究代表者

都筑 馨介（TSUZUKI KEISUKE）

文教大学・健康栄養学部・教授

研究者番号：60222139

研究成果の概要（和文）：海馬歯状回の神経新生は情動発現と関わり、その神経回路機構は NMDA 型ならびに AMPA 型のグルタミン酸受容体を介する。NMDA 型受容体の阻害と、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体の活性化は神経新生を促進した。Ca²⁺透過性 AMPA 受容体を発現する GRIA2 欠損マウスで高架式十字迷路において、不安の低下がみられたが、X 線照射を行い神経新生を阻害しても不安の増加は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：Glutamate receptors of NMDA and AMPA type control emotional expressions by regulating hippocampal neurogenesis in the dentate gyrus. Blockings of NMDA receptors and activations of Ca²⁺-permeable AMPA receptors facilitated neurogenesis. Reduced anxiety was observed in GRIA2 disrupted mice, which lack GluA2 subunit of the AMPA receptor, in elevated plus maze task. Blocking of neurogenesis by X-ray irradiation did not increase the degrees of anxiety in these mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路

1. 研究開始当初の背景

成体ではニューロンは増殖しないと考えられていたが、近年、ヒト・サル・ラット・マウスなどで、脳室周囲および海馬歯状回には神経幹細胞が存在し生涯にわたって神経新生は続いていることが明らかになった。特に海馬歯状回における神経新生は、2003 年に抗うつ薬である SSRI（選択的セロトニン再取り込み阻害薬）が作用する部位であることが明らかになって以来、活発に研究が進められている。

3 ヶ月齢のネズミにおいては海馬歯状回全体で毎日 1000 個ほどの細胞が誕生している。歯状回の深い層にある神経幹細胞は数日間分裂を繰り返した後、アストロサイトやオリゴデンドロサイトに分化する細胞を生じながら、多くは顆粒細胞へと分化していく。顆粒細胞に分化する細胞は誕生後 2 週間までシナプス入力を受けはじめ、3 週間後には NMDA 受容体を介した長期増強を生じることができるまで発達し、4 週間目に成熟した顆粒細胞の形質をもつようになる。さらに時間

をかけて顆粒細胞層の中間部から外側部へと移動していく。顆粒細胞の出力の約半分は興奮性ニューロンである CA3野の錐体細胞に、約半分は介在ニューロンに送られる。新生した細胞の全てが成熟細胞まで分化するわけではなく、誕生した細胞の半分以上は4週間でアポトーシスにより除去されている。この海馬の神経新生は環境刺激によって激しく影響を受ける。マウスの実験では、感覚刺激が豊富な環境(enriched environment)で飼育すると新生した細胞の生存数が増加する。逆に強いストレスによって神経新生は減少する。ヒトでも大うつ病を繰り返す場合に海馬容積の減少が見られている。

抗うつ薬 SSRI の主要な作用は海馬神経新生を増加させるためであることは Santarelli らによって2003年に報告された。分裂期にある細胞は放射線感受性が高く、マウスに少量の X 線を海馬を含む狭い領域のみに照射すると分裂期にある細胞は完全に除かれる。抗うつ薬の評価に用いられる novelty suppressed feeding テストでは、健康マウスでは SSRI である fluoxetine を投与すると時間の短縮が見られるが、海馬の分裂期にある細胞を除くと SSRI の効果はみられなくなった。その後の研究で SSRI は quiescent neural progenitor の時期の新生細胞に働き、新生細胞の誕生を増やしていることが明らかになった。抗うつ治療として用いられる電気痙攣刺激をマウスにあたえると新生細胞の誕生も生存も増加させる。

拘束ストレスによって神経新生は減少する。ストレスによって副腎皮質ステロイドホルモンは増加するが、糖質ステロイドをラットに投与すると新生細胞の誕生数は1/3以下に減少する。これはステロイドホルモンの遺伝子発現を伴わない non-genomic な作用による。逆に、副腎の摘出によって神経新生は3倍以上に増加させる。ステロイドホルモンによる神経新生の抑制効果は NMDA 型グルタミン酸受容体を阻害しておくで見られない。直接 NMDA 自体を腹腔投与しても新生細胞の誕生数は1/3に減少し、逆に NMDA 受容体の阻害薬は誕生細胞数を3倍に増加する。すなわち NMDA 受容体は9倍もの著しく大きなレンジで神経新生を制御する。海馬歯状回へは内嗅野皮質から貫通線維(perforant path)としてグルタミン酸作動性の神経入力を送られているが、内嗅野皮質を破壊すると、グルタミン酸作動性入力を遮断すると神経新生は増加する。内嗅野皮質は感覚入力統合化される部位であり、そこから海馬への出力が神経新生を負に制御している。このことから、過剰で不適切な感覚入力海馬の神経新生を抑制し、抑うつの原因となっているという仮説が考えられる。これは、抗うつ薬ばかりでなく、精神療法によっても抑うつ症状が改

善されるという生物学的基盤となっていると考えられる。

2. 研究の目的

NMDA 受容体の活性化がどのようにして神経新生を制御するのかはほとんど明らかになっていない。課題を列挙すると、【① 直接作用か間接作用か?】 NMDA および NMDA 受容体阻害薬が神経幹細胞や新生細胞に直接作用しているのか、近傍の成熟ニューロンの NMDA 受容体に作用して間接的に細胞間シグナルを受けて制御されているか。誕生後2週間を経過すれば新生細胞は機能的 NMDA 受容体をもつのは明らかであるが、分裂期では NMDA 受容体が機能しているかどうかは不明である。【② 下流シグナルは何か?】 NMDA 受容体は多種類の下流シグナルを活性化する。NO シグナルや CaMKII シグナルなどが知られるが、阻害薬や遺伝子導入を用いたそれらの下流シグナルの解析は行われていない。

【③ 抗うつ薬との相互作用は?】 NMDA 受容体と SSRI をはじめとする抗うつ薬による神経新生とクロストークがあるのか、あるとすればどのステップであるかは研究されていない。【④ 新生細胞の生存に対する作用は?】 NMDA 受容体は新生細胞の生存には必要である。レトロウイルスを用いた新生細胞特異的 NMDA 受容体サブユニット NR1 ノックアウトマウスの実験では、新生細胞の生存数は誕生2週目までは変わらないがそれ以降では1/4に減少する。新生細胞は3週間目に以降に NMDA 受容体依存性の長期増強を生ずる。この長期増強は成熟した顆粒細胞の長期増強と異なり NMDA 受容体サブユニット NMDAR2B 特異的阻害薬によってのみ阻害される。ネズミの状況恐怖条件付け反応は、この新生細胞の長期増強によって担われている。これら先に新生した細胞の、新たな新生細胞の誕生に対する制御があるかどうかは研究されていない。

一方、NMDA 受容体と並んで主要なグルタミン酸受容体である AMPA 受容体は、NMDA 受容体の活性化によって細胞膜での発現量が制御されている。ニューロンでは NMDA 受容体を弱く活性化すると AMPA 受容体のインターナリゼーションが起こり、強く活性化すると細胞膜での発現が増加する。AMPA 受容体の活性増強薬が神経新生を低濃度で増加させ高濃度で抑制する。遺伝子改変マウスの行動学的に高架式十字迷路による評価では AMPA 受容体サブユニット GluR2 のノックアウトマウスでは抗うつ薬を投与された場合に似て不安が減少しているが、GluR1 のノックアウトマウスでは不安が昂進している。

3. 研究の方法

(1) 海馬の新生細胞の同定

新生細胞の同定は、原則的に細胞分裂中の染色体 DNA を標識することにより行なった。核膜孔を通過できないレトロウィルスも核膜が消失する分裂期には染色体 DNA に到達できるため、緑色蛍光たんぱく質の遺伝子を組み換えたレトロウィルスの作成を試みたが、脳内に摂取可能な高力価のものは得られなかった。代替として、DNA を構成する核酸であるチミンの代わりに染色体 DNA に取り込まれる臭化デオキシウリジン (bromo deoxy uridine, BrdU) をトレーサとした標識を行った。また、分裂期にある細胞に特異的に発現する細胞マーカーで細胞周期関連核タンパク質である Ki-67 に対する抗体を用いた免疫染色を併用した。

(2) 海馬の神経新生の抑制

海馬の神経新生の抑制は、群馬大学動物実験施設内の動物用 X 線照射装置を用いて行った。前脳以外を鉛で遮蔽し、10Gy の 1 回照射を行った。照射後、3 週間以上の回復期間をおいて、実験を行った。

(3) AMPA 受容体サブユニット GluA2 のノックアウトマウスの機能移動

研究代表者は本研究の 2 年目より文教大学に異動となった。AMPA 受容体の重要なサブユニットである GluA2 (遺伝子名 GRIA2) のノックアウトマウスは群馬大学で飼育していたが、本マウスを文教大学に移動するために、文教大学動物実験規程ならびに文教大学遺伝子組換え実験安全管理規程を起草した。これは、文教大学大学審議会の議を経て制定され、それまで文教大学に設置されていなかった動物実験委員会と遺伝子実験安全委員会が学長の元に設置された。GluA2 のノックアウトマウスは群馬大学で凍結精子を作製した後、人工授精により SPF 化したマウスを得て、このマウスの文教大学への譲渡を行った。

(4) 情動に関わる行動実験

海馬の神経新生の障害は SSRI による抑うつ剤の効果を失わせることから、感情障害に密接に関連する。そこで情動に関わる行動実験として高架式十字迷路試験 (Elevated Plus Maze, EPM) を行った。

4. 研究成果

グルタミン酸神経伝達により、カルシウム透過性 AMPA 受容体を介して、海馬歯状回の神経新生において、神経細胞の誕生数は増えること見出したので、この誕生数の増加が、個体の行動に影響を及ぼすかどうかを検討した。飼育中の GluA2 のノックアウトマウス (GRIA2KO) は、EPM においてオープンアームでの存在時間が長い。この理由として、GRIA2KO では海馬新生細胞の誕生が増加して

いるために、内在的な抑うつが減少して、防御的なクローズドアームに存在するよりも、より探索的なオープンアームに存在する時間が長くなったということが考えられる。もしそうであるならば、海馬の神経新生を抑制しておけば、GRIA2KO とコントロール群の間に見られた差はなくなる、もしくは小さくなると考えられる。そこで、飼育中の GRIA2KO マウスと同腹の野生型マウスを、文教大学と群馬大学の両者の手続きを経て、群馬大学動物実験施設にて海馬を中心に 10Gy の X 線照射を行って 1 か月間の回復期間ののち EPM を行った。

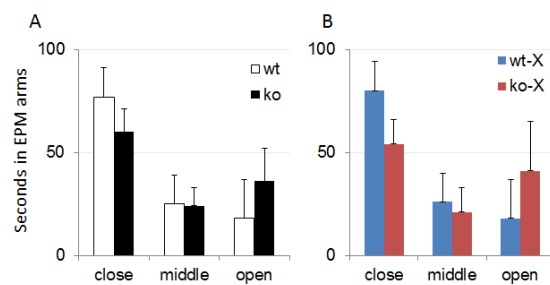


図 1 高架式十字迷路における各アームでの滞在時間。滞在時間は秒で表されている。右の A は X 線照射を行わなかったもの、左の B は X 線照射を行って、海馬神経新生を阻害したもの。野生型のコントロール群は wt、実験群の GRIA2KO は ko と表記。

しかし、その結果は予想に反して、X 線照射を行わなかった場合と変わらなかった。この結果から、高架式十字迷路に見られた GRIA2KO マウスの探索的行動の増加は、EPM 実験を行うまでの保育期からの長い時間をかけて形成されているか、もしくは、海馬神経新生を介さない GRIA2KO マウスがもつ性質であることが示唆された。

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 4 件)

① 石内勝吾 特集良性腫瘍の診断と治療

「粒子線治療の脳腫瘍への臨床応用と将来展望」Japanese Journal of Neurosurgery Vol. 22, no. 2 February 2013 査読無

② Enhanced antitumor effect of YM872 and AG1296 combination treatment on human glioblastoma xenograft models. Watanabe T, Ohtani T, Aihara M, Ishiuchi S. J Neurosurg. 2013 Jan 11. 査読有

③ Transoral carotid ultrasonography using a micro convex probe with b-flow imaging for extracranial internal carotid

artery dissection. Sakima H, Isa K, Ane-gawa T, Kokuba K, Nakachi K, Goya Y, Tokashiki T, Ishiuchi S, Ohya Y.

J Stroke Cerebrovasc Dis. 2012 Jan 12. 査読有

④ Hyperperfusion syndrome after stent placement for subclavian artery stenosis. Ito K, Yonaha H, Kai Y, Hokama Y, Nagamine H, Miyagi T, Watanabe T, Ishiuchi S. Neurol Med Chir (Tokyo). 2012;52(12):902-5. 査読有

〔学会発表〕(計12件)

① 加藤起運、笠岡誠一、都筑馨介

「おいしい」の多階層的分析 ? マズローの欲求階層説からの一考察 第77回日本心理学会大会(北海道医療大学)

平成25年9月19-21日(発表19日)(予定)

② 井上節子、都筑馨介 ラット脳におけるDNA損傷へのヒスチジン摂取による影響 第24回日本微量元素学会学術集会(関西大学) 平成25年6月29-30日(発表30日)

③ 都筑馨介、井上節子 甘味条件付けに伴うマウス脳の脂質過酸化物量の変化 第67回日本栄養・食糧学会(名古屋大学) 講演要旨集 pp178

平成25年5月24-26日(発表26日)

④ 石内勝吾 「脳科学に基づいた脳腫瘍・脳血管障害の治療戦略」第27回熊本脳神経外科懇話会 平成24年11月17日 熊本テルサ

⑤ 石内勝吾 「傑出脳と疾患脳の神経幹細胞分子イメージング」社団法人日本脳神経外科学会第71回学術総会 平成24年10月18日 大阪リーガロイヤルホテル

⑥ 横川潤、都筑馨介、笠岡誠一 食文化へのインターディプリナリー・アプローチ 日本国際文化学会第11回全国大会(青山学院大学)

平成24年7月7-8日(発表7日)

⑦ 石内勝吾 「細胞生物学に基づいた脳腫瘍の外科治療」第58回千葉脳神経外科研究会 平成24年6月8日 千葉

⑧ 石内勝吾 「粒子線治療の脳腫瘍への臨床応用と将来展望」第32回日本脳神経外科コンgres総会 平成24年5月11日 横浜

⑨ 石内勝吾 「脳科学を基盤とする脳神経外科学教室の発展をめざして」第3回国際放射線神経生物学学会大会 名護市 万国津梁館

平成24年1月26日

⑩ 吉田由香里、石内勝吾、高橋昭久、大野達也、中野隆史 神経膠芽腫細胞におけるX線誘導遊走能の分子機構. 日本放射線影響学会第54回大会. (京都大学原子炉研・神戸)

平成23年11月17-19日

⑪ 井上節子、中島 滋、都筑馨介

ヒスチジン摂取ラットへのDEDG+Cu投与による、脳、血清中の微量元素と過酸化脂質濃度変化 Concentration change of trace metal and lipid peroxide in serum and brain of histidin intake rat caused by DEDG+Cu injection to the rat abdomen 第22回日本微量元素学会学術集会(京都大学)、Biomed Rs Trace Elements 22 (2) 0-21, 2011.

平成23年7月1-2日(発表1日)

⑫ 吉田由香里、石内勝吾、鈴木義行、中野隆史. AMPA型グルタミン酸受容体を標的とした神経膠芽腫細胞の遊走能抑制効果の検討. 第17回癌治療増感研究会(東北大学)

平成23年6月24-25日

〔図書〕(計1件)

① 石内勝吾 脳腫瘍の治療 病理診断の治療 癌診断指針のための病理診断プラクティス 脳腫瘍 中山書店 91頁-100頁 2012年12月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都筑 馨介 (TSUZUKI KEISUKE)
文教大学・健康栄養学部・教授
研究者番号: 60222139

(2) 研究分担者

石内 勝吾 (ISHIUCHI SHOGO)
琉球大学・医学研究科・教授
研究者番号: 10312878

吉田 由香里 (YOSHIDA YUKARI)
群馬大学・重粒子線医学センター・助教
研究者番号: 90431717