

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24年3月30日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590111

研究課題名（和文）神経変性疾患治療を目指した神経新生シグナル制御の解明
に関する薬理学的研究研究課題名（英文）Evaluation of neurogenesis signal regulation as therapy for
neurodegenerative disorders

研究代表者

荻田 喜代一（OGITA KIYOKAZU）

研究者番号：90169219

研究成果の概要（和文）：哺乳動物脳における神経系幹細胞の増殖・分化は種々の内因性及び外因性因子により制御されることが知られる。神経変性疾患治療を目指した本研究では、成体マウス海馬歯状回障害及び再生モデルの開発に挑戦し、トリメチルスズ処置マウスの開発に成功した。本モデル動物による解析により、海馬歯状回障害後の神経新生に、①NMDA 受容体シグナル、②活性酸素・活性窒素、③炎症性サイトカイン、④ミクログリアが関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In adult brain, neural stem cells is known to proliferate and differentiate with regulation by endogenous and exogenous factors. Developing model animals for neuronal degeneration and regeneration, we found trimethyltin-treated mice as a model. Using the model, we evaluated that NMDA signals, reactive oxygen and nitrogen species, inflammatory cytokines, and microglia contribute to neurogenesis following neuronal loss in the hippocampal dentate gyrus.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：海馬、神経障害、神経新生、神経系幹細胞、ミクログリア、活性酸素、活性窒素

1. 研究開始当初の背景

従来、“神経細胞は、胎生期に産生され、成体脳では新しく産生されることはない”また、“中枢神経系では、神経細胞の変性・脱落後に新たな神経細胞の誕生と神経組織の再生はみられない”という考えが一般的であった。しかしながら、1990年代後半からヒトを含む哺乳動物の成体脳における神経細胞数の維持システムの存在が次々と報告され

た。すなわち、神経細胞の生存に関わる様々な自己保護機能の存在及び成体脳における神経前駆細胞（神経幹細胞）の存在である。事実、成体脳内特定領域では神経前駆細胞が存在し、中枢神経系の再生、再構築など、神経変性疾患の治療につながる可能性が期待されるようになってきた。また、海馬歯状回の神経前駆細胞は、学習や豊かな飼育環境下でその増殖能が促進し、逆にストレス負荷や

加齢によって低下する。さらに、神経前駆細胞の増殖がけいれん発作、脳虚血、外傷性脳損傷、神経毒誘発性神経細胞脱落などによって一過性に増加することが報告されている。しかしながら、これら神経細胞変性後に誕生する神経前駆細胞は短命であり、機能的な神経細胞へ分化して新しいシナプスを形成するとは考えにくい。さらに、機能的な神経細胞への分化を促進する画期的な薬物も現在のところ見出されていない。すなわち、

2. 研究の目的

神経前駆細胞を用いた再生医療を神経疾患に応用していくためには神経新生メカニズムを解明していくとともに、これまでの手法を組み合わせた新たな戦略を展開するため、本研究では神経細胞変性後の神経新生促進メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

ddY 系雄性マウス (5-6 週齢) にトリメチルスズ (TMT, 2.8 mg/kg) を腹腔内投与した。TMT 投与 2 日後から各種薬物を 2 日間あるいは 7 日間投与した。また、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg) を TMT 投与 2 日後から 12 時間毎に 4 回投与した。各処置動物の脳から矢状切片を作成し、海馬歯状回の BrdU 陽性細胞および proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞、nestin 等の発現変化を免疫組織化学法及びウエスタンブロット法により解析した。また、海馬歯状回での活性化ミクログリア関連因子およびそのシグナル分子の遺伝子あるいは蛋白質の発現変化を解析した。

培養神経系幹・前駆細胞の調整のために、TMT 処置 3 日目に単離した細胞懸濁液を細胞増殖因子 (bFGF、EGF) 含有 DMEM/F12 の無血清培地で培養した。得られた neurosphere の増殖に対する各種薬物の影響を解析した。

4. 研究成果

成体マウスに TMT (2.8 mg/kg) を投与すると、全身性の振戦、後肢麻痺などの行動異常が観察される。さらに、TMT 処置動物の全脳について、神経細胞障害の指標となる抗一本鎖 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 抗体陽性細胞を免疫組織化学法により解析したところ、嗅球顆粒細胞、海馬歯状回顆粒細胞、前大脳皮質および前嗅核に ssDNA 陽性細胞の著明な発現が認められた。特に、海馬歯状回では、TMT 処置後 2 日で最も著しい顆粒細胞層の脱落が認められると共に、成熟神経細胞のマーカー蛋白質である neuronal nuclei (NueN) 陽性細胞の著明な減少が認められた。しかしながら、驚くべきことに TMT 処置後 28 日では NeuN 陽性細胞

が TMT 未処置動物と同程度にまで回復し、顆粒細胞層の再生が明らかとなった。本海馬歯状回顆粒細胞層脱落・再生モデル動物を用いて、海馬歯状回顆粒細胞障害後の神経再生メカニズムの解明を試みた。ddY 系雄性マウスに TMT を腹腔内投与し、顆粒細胞脱落后に増殖した新生細胞をにより標識したところ、顆粒細胞脱落后 (TMT 処置後 2-4 日) 海馬歯状回に BrdU 陽性細胞の著しい増加が認められた。さらに、GFAP・BrdU 陽性細胞あるいは nestin・BrdU 陽性細胞を解析した。その結果、顆粒細胞層および顆粒細胞層下帯の GFAP・BrdU 陽性細胞および nestin・BrdU 陽性細胞は、TMT 処置により未処置動物のそれぞれ約 10 倍および約 28 倍に増加した。すなわち、BrdU 陽性細胞 (新生細胞) の大部分は、GFAP 陰性・nestin 陽性であることから TMT による歯状回顆粒細胞脱落后に出現する新生細胞の多くは Type 2a/b 細胞であることが示唆される。

本モデル動物の海馬歯状回障害後の神経新生に対する活性酸素消去薬 edaravone の効果を解析した。edaravone 未処置群 (対照群) と edaravone 処置群の間で著変は認められなかった。しかしながら、TMT 投与 9 日目の BrdU 陽性細胞を観察したところ、対照群で著しい減少が観察されたのに対して、edaravone 処置群では TMT 投与 4 日目の場合と著変が認められなかった。一方、PCNA 陽性細胞はいずれの場合でも対照群と edaravone 処置群との間に差異はみられなかった。以上の結果より、活性酸素消去薬が神経細胞傷害後の誘発される神経系前駆細胞の増殖に影響しないことが示された。しかしながら、新生細胞の生存を著明に促進するが明らかとなった。したがって、活性酸素消去は神経細胞傷害後の神経新生を促進することから、活性酸素消去薬が神経新生を介する神経変性疾患治療に有用である可能性が推察される。

本モデル動物の海馬歯状回障害後の神経新生に対する NMDA 受容体遮断薬の効果解析したところ、未処置動物海馬の BrdU 取り込みを抑制することなく、TMT 処置動物で増加した BrdU 取り込みを有意に抑制した。未処置あるいは TMT 処置動物から歯状回の細胞を neurosphere 法により培養したところ、いずれも nestin 陽性の neurosphere 形成が認められたが、neurosphere 数は未処置動物よりも TMT 処置動物で明らかな増加が観察された。TMT 処置動物歯状回由来の neurosphere の増殖は NMDA 受容体遮断薬により有意に抑制された。歯状回傷害後の神経新生の促進には NMDA 受容体シグナルの活性化が関与することは示唆される。

本モデル動物における神経新生に対するミクログリア活性化抑制薬 (minocycline)

の影響について解析した。minocycline 処置は、歯状回顆粒細胞脱落后に出現する Iba-1 陽性細胞の増加を有意に減少させ、それと相関して TNF α の発現増強を抑制した。また、ミクログリア活性化のメカニズムは、本モデル動物における著しい神経細胞死に起因するものと考えられるが、minocycline 処置は顆粒細胞層の脱落による NeuN 陽性細胞の減少に影響しなかったことから、minocycline 処置が神経細胞死に影響することなくミクログリアの活性化を抑制することが明らかとなった。さらに、minocycline は、nestin、BLBP および GFAP 陽性細胞での NF- κ B の核移行を抑制したことから、顆粒細胞脱落后に出現する新生細胞の増殖に活性化ミクログリアから放出された TNF α が関与することが示唆される。また、本モデル動物海馬歯状回顆粒細胞層再生期において inducible NO 合成酵素 (iNOS) の発現増強が認められ、この増強は minocycline 処置により抑制されることを見出した。NF- κ B は iNOS 遺伝子の転写を活性化して、NO 産生を亢進する (Ghosh et al., 1998) ことから、ミクログリア由来 NO 産生も神経前駆細胞の増殖メカニズムに密接に関与する可能性が推察される。事実、我々は胎生期マウス海馬由来の培養神経幹細胞の増殖に NO が関与する事実を見出している。

以上の事実から、ミクログリアの活性化は海馬歯状回顆粒細胞脱落后の神経前駆細胞の増殖を促進することが示唆される。本制御メカニズムは活性化ミクログリアから放出される TNF α による NF- κ B シグナルを介するものと考えられるが、NO 等の制御分子およびそのメカニズムの解明するためには、今後のさらなる詳細な解析が重要であろう。

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 20 件)

- ① rOgita K, Sugiyama C, (6 名) (2012) Opposing roles of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor in trimethyltin-induced cytotoxicity in the mouse hippocampus. *Neurosci. Lett.* 511, 116-119. (査読有)
- ② rHuong NQ, Nakamura Y, Kuramoto N, (9 名、9 番目) (2011) Indomethacin ameliorates trimethyltin-induced neuronal damage *in vivo* by attenuating oxidative stress in the dentate gyrus of mice. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1856-1863. (査読有)
- ③ rNakamura Y, Nakamichi N, Takarada T, (5 名、4 番目) (2011) Transferrin receptor-1 suppresses neurite outgrowth in neuroblastoma Neuro2A cells. *Neurochem. Int.* 60, 448-457. (査読有)
- ④ rNagashima R, Yamaguchi T, Kuramoto N, Ogita K (2011) Acoustic overstimulation activates 5'-AMP-activated protein kinase through a temporary decrease in ATP level in the cochlear spiral ligament prior to permanent hearing loss in mice. *Neurochem. Int.* 59, 812-820. (査読有)
- ⑤ rAgo Y, Yoneyama M, Ishihama T, (12 名、7 番目) (2011) Role of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, 172, 554-561. (査読有)
- ⑥ rKuramoto N, Seko K, Sugiyama C, Shuto M, Ogita K (2011) Trimethyltin initially activates the caspase 8/caspase 3 pathway for damaging the primary-cultured cortical neurons derived from embryonic mice. *J. Neurosci. Res.* 89, 552-561. (査読有)
- ⑦ rYoneyama M, Kawada K, Shiba T, Ogita K (2011) Endogenous nitric oxide generation linked to ryanodine receptors activates cyclic GMP/protein kinase G pathway for cell proliferation of neural stem/progenitor cells derived from embryonic hippocampus. *J. Pharmacol. Sci.* 115, 182-195. (査読有)
- ⑧ rNagashima R, Sano S, Nguyen QH, Shiba T, Ogita K (2010) Enhanced expression of glutathione S-transferase in the hippocampus following acute treatment with TMT *in vivo*. *J. Pharmacol. Sci.* 113, 267-270. (査読有)
- ⑨ rNagashima R, Yamaguchi T, Tanaka H, Ogita K (2010) Mechanism underlying the protective effect of tempol and N^ω-nitro-L-arginine methyl ester on acoustic injury: Possible involvement of c-Jun N-terminal kinase pathway and connexin26 in the cochlear spiral ligament. *J. Pharmacol. Sci.* 114, 50-62. (査読有)
- ⑩ rYun J, Koike H, Ibi D, Toth E, (12 名、8 番目) (2010) Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: Possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J. Neurochem.* 114, 1840-1851. (査読有)

- ⑪ Yoda T, Funakoshi E, Ozaki K, Ogita K, (6名) (2010) High-level expression of Golsyn/Syntabulin in glandular epithelium and its role in the secretory process. *J. Epithelial Biological & Pharmacology*, 3, 49-60. (査読有)
- ⑫ Yoneyama M, Kawada K, Ogita K (2010) Enhanced neurogenesis in the olfactory bulb in adult mice after injury induced by acute treatment with trimethyltin. *J. Neurosci. Res.* 88, 1242-1251. (査読有)
- ⑬ Yoneyama M, Kawada K, Gotoh Y, Shiba T, Ogita K (2010) Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochem. Int.* 56, 470-476. (査読有)
- ⑭ Shuto M, Higuchi H, Sugiyama C, Yoneyama M, (8名、8番目) (2009) Endogenous and exogenous glucocorticoids prevent trimethyltin from causing neuronal degeneration of the mouse brain in vivo: involvement of oxidative stress pathways. *J. Pharmacol. Sci.* 110, 424-436. (査読有)
- ⑮ Shuto M, Seko K, Kuramoto N, (8名、8番目) (2009) Activation of c-Jun N-terminal kinase cascades is involved in part of the neuronal degeneration induced by trimethyltin in cortical neurons of mice. *J. Pharmacol. Sci.* 109, 60-70. (査読有)
- ⑯ Yoneyama M, Seko K, Kawada K, (5名、5番目) (2009) High susceptibility of cortical neural progenitor cells to trimethyltin toxicity: involvement of both caspases and calpain in cell death. *Neurochem. Int.* 55, 257-264. (査読有)

他4件

[学会発表] (計156件)

- ① 米山雅紀、長谷部茂、長嶋玲子、荻田喜代二 (2012) 海馬歯状回ニューロン脱落後のニューロン再生に対するドパミンシステムスタビライザー・アリピプラゾールの影響。日本薬学会第132年会、2012年3月28-31日、札幌
- ② 長谷部茂、米山雅紀、荻田喜代二 (2012) 一酸化窒素合成酵素は海馬歯状回の神経系幹・前駆細胞の増殖を促進する。日本薬学会第132年会、2012年3月28-31日、札幌
- ③ 芝達雄、米山雅紀、荻田喜代二 (2012) 側脳室下帯神経系前駆細胞の増殖は小胞体Ca²⁺チャネルにより制御される。日本薬学会第132年会、2012年3月28-31日、札幌
- ④ 古賀正人、中村有加里、米山雅紀、米田幸雄、荻田喜代二 (2012) ニューロンの成熟における鉄の役割。日本薬学会第132年会、2012年3月28-31日、札幌
- ⑤ 芝達雄、米山雅紀、荻田喜代二 (2012) 成体マウス側脳室下帯由来神経系幹/前駆細胞の細胞内カルシウムチャネルによる増殖制御。第85回日本薬理学会年会、2012年3月14-16日、京都
- ⑥ 米山雅紀、長谷部茂、芝達雄、荻田喜代二 (2011) 海馬歯状回神経細胞変性後の神経新生における活性化ミクログリアの関与。日本薬学会131回年会、2011年3月28-30日、静岡
- ⑦ Nguyen Quynh Huong、中村有加里、田中鉄也、石本愛、荻田喜代二 (2011) トリメチルスズ誘発性神経細胞障害に対するインドメタシンの二重効果。日本薬学会131回年会、2011年3月28-30日、静岡
- ⑧ Nakamura Y, Tokuda M, Yokoi A, Okamoto S, Yoneyama M, Ogita K (2011) Behavioral changes and neural regeneration after hippocampal dentate granule cell loss in mice. 第84回日本薬理学会年会、2011年3月22-25日、横浜
- ⑨ Yoneyama M, Shiba T, Ogita K (2011) Useful culture system for neural stem/progenitor cells derived from adult hippocampal dentate gyrus prepared from mice treated with trimethyltin. 第84回日本薬理学会年会、2011年3月22-25日、横浜
- ⑩ Hasebe S, Shiba T, Yoneyama M, Ogita K (2011) Activated microglia is involved in neuroregeneration after neuronal degeneration in the hippocampal dentate gyrus. 第84回日本薬理学会年会、2011年3月22-25日、横浜
- ⑪ 田中鉄也、米山雅紀、芝達雄、川田浩一、荻田喜代二 (2010) 胎児海馬由来神経系幹・前駆細胞におけるグリシントランスポーターによる増殖制御。日本薬学会第130回年会、3月28-30日、岡山
- ⑫ 保坂恵利、米山雅紀、芝達雄、川田浩一、荻田喜代二 (2010) NMDA受容体は海馬歯状回神経細胞傷害後に出現する神経系前駆細胞の増殖を促進する。日本薬学会第130回年会、3月28-30日、岡山
- ⑬ 米山雅紀、田中始、川田浩一、長嶋玲子、荻田喜代二 (2010) 胎児脳大脳皮質由来培養神経系幹・前駆細胞の増殖におけるカスパーゼの役割。日本薬学会第130回年会、3月28-30日、岡山
- ⑭ 芝達雄、米山雅紀、川田浩一、荻田喜代二 (2010) 海馬歯状回神経細胞障害後の神経新生制御機構に対するエダラボンの影響。

日本薬学会第130会年会、3月28-30日、岡山

- ⑮ 川田浩一、米山雅紀、荻田喜代一 (2010) 神経系幹・前駆細胞の増殖における一酸化窒素の関与。日本薬学会第130会年会、3月28-30日、岡山
- ⑯ Shiba T, Tanaka T, Kawada K, Yoneyama M, Ogita K (2010) Role of glycine transporter in the proliferation of neural stem/progenitor cells derived from the embryonic hippocampus. 第83回日本薬理学会年会、3月16-18日、大阪
- ⑰ Ishimoto A, Sano S, Nguyen QH, Nagashima R, Ogita K (2010) Change in nitrotyrosine production during regeneration and degeneration of granule cells in the hippocampal dentate gyrus. 第83回日本薬理学会年会、3月16-18日、大阪
- ⑱ Kawada K, Yoneyama M, Ogita K (2010) Role of endogenous NO/cGMP pathway on the proliferation of neural stem/progenitor cells derived from the embryonic hippocampus. 第83回日本薬理学会年会、3月16-18日、大阪

他138件

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻田 喜代一 (OGITA KIYOKAZU)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：90169219

(2) 研究分担者

倉本 展行 (KURAMOTO NOBUYUKI)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：60324092

(3) 研究分担者

米山 雅紀 (YONEYAMA MASANORI)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：00411710