

機関番号 : 13201
研究種目 : 若手研究 (B)
研究期間 : 平成 21 年度～平成 22 年度
課題番号 : 21700379
研究課題名 (和文) 深部脳刺激による内在性神経前駆細胞の分化制御と神経再生誘導療法の開発
研究課題名 (英文) Regeneration of hippocampal cells by recruitment of endogenous progenitors with deep brain stimulation
研究代表者
杉森 道也 (SUGIMORI MICHIIYA)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教
研究者番号 : 20464026

研究成果の概要 (和文) : 本研究は、内在性神経前駆細胞を活用した神経再生誘導療法を目指す。その開発において、細胞分化に関わる生物学的メカニズムを制御する手法の確立を進めることが極めて重要であると考え、本研究において深部脳刺激による神経前駆細胞の分化制御を試みた。深部脳刺激は、海馬歯状回に内在する神経幹細胞の活性化と増殖を促進し、神経幹細胞の活性化制御が極めて重要である事を示唆した。深部脳刺激は、内在性神経前駆細胞の分化を制御し得る方法の一つであると考えられた。

研究成果の概要 (英文) : The adult central nervous system is extremely vulnerable to injuries and diseases, and has difficulty repairing itself. The discoveries of endogenous neural stem/progenitor cells in the adult brain raise the possibility of repairing injured tissue and of promoting recovery in brain function with manipulating and recruitment of the progenitors. However, there are no well-established methods to manipulate and/or recruit endogenous progenitors in vivo. Here we addressed the possibility of whether endogenous progenitors can be recruited by manipulating neural activity with deep brain stimulation. When we electrically stimulated the rat perforant path with high frequency stimulation (HFS) to induce long-term plasticity in the dentate gyrus, a well-known neurogenic region in the adult brain, we found an increase in the number of BrdU incorporated cells after HFS, indicating that neural progenitor proliferation was enhanced with HFS. We also found an increase in the number of clones of neural progenitors, which corresponds to the neural stem/progenitor cell activation. Thus, we conclude that HFS enhanced neural progenitor activation and proliferation. Our results suggest the possibilities for deep brain stimulation becoming a cell regeneration therapy for neurological diseases.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野 : 神経科学

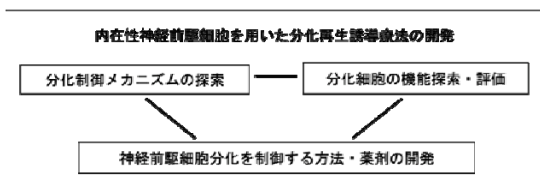
科研費の分科・細目 : 神経解剖学、神経病理学

キーワード : 神経再生・神経可塑性、神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ほ乳動物の器官の多くは、成体でも組織を新生・再生させる能力を維持しており、組織の傷害に対して細胞を新生し補うことによって修復する。しかしながら成体神経組織は、新たに神経細胞を生み出す能力を喪失していると長らく信じられ、神経新生を介した組織修復による神経疾患の治療は極めて困難であると考えられていた。ところが 1990 年代に入り成体中枢神経組織から、培養下で神経細胞を生み出す前駆細胞が単離された (Reynold ら、1992)。後に、げっ歯類動物では成体脳内で神経新生を行っている領域として脳室周囲下層および海馬歯状回の顆粒細胞層近傍の下顆粒細胞層が同定され、ヒトに於いてもその存在が示唆されるに至り (Magnus ら、2007; Curtis ら、2007) 神経前駆細胞を用いた再生医療への期待がされている。しかしながら中枢神経組織の障害に対しての再生医療は、未だ有効な手段を確立していないのも現実である。

成体に内在する神経前駆細胞を利用した神経再生誘導療法の開発には、i) 発生期の神経前駆細胞と成体に内在する神経前駆細胞の分化に関わる生物学的メカニズムの探索、ii) 分化した神経細胞により精密に構築された海馬の神経回路の機能的意義の探索、および、iii) 分化に関わる生物学的メカニズムと新生神経細胞の機能を制御し活用する方法の開発 (下図) という三者を念頭に置き、プロジェクトを進めることが極めて重要であると考え、iii) 分化に関わる生物学的メカニズムと新生神経細胞の機能を制御し



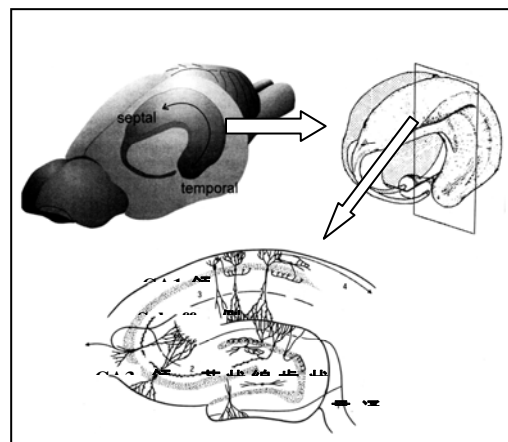
活用する方法として、今回、DBS による神経前駆細胞の分化制御を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、神経活動を電気生理学的に制御する深部脳刺激法 (deep brain stimulation: DBS)を用い、刺激の部位、強度、持続時間、頻度等を調節することにより、海馬歯状回における神経前駆細胞の領域特異的活性化・分化段階の制御、さらには新生神経細胞の誘導とその量の制御につなげるための基盤となる研究である。本研究から得られる知見を基盤として、うつ病などの精神・神経疾患に対する、内在性神経前駆細胞を活用した神経再生誘導療法を目指す。

3. 研究の方法

① ラットの海馬における DBS (LTP の誘導) :



図：海馬の位置、各領域及び神経経路

ネンブタール麻酔下 (40 mg/kg, 腹腔内投与) でラット (Wistar、♂、8 週齢) の頭部を脳定位固定装置に固定し、誘発電位波形をガイドにして、刺激電極と記録電極を目的脳領域 (刺激電極：貫通路線維、苔状線維または Schaffer 側枝線維；記録電極：歯状回、CA3 領域または CA1 領域；右図を参照) に両側性に慢性埋め込みした。この電極埋め込み手術からの回復期間 (1 週間) の後、覚醒行動下のラットで両側の刺激電極を、刺激強度

を系統的に変えながら、10 秒間隔で交互に刺激し、各目的領域から誘発電位を記録した。このデータから刺激強度-反応関係を求め、以後の実験に用いる刺激強度（最大誘発電位の 1/2 の反応が起こる電流量）を決定した。次に、この刺激強度を用い、各ラットで 1 日 30 分間の誘発電位記録を 3 日間行った（LTP 誘導前のベースライン記録。刺激条件は刺激強度を変えないこと以外は上述の“刺激強度-反応関係”実験の条件と同じ）。4 日目に、一側の刺激電極を介して入力線維に高頻度反復刺激を与え LTP を誘導する[刺激条件：400Hz で 10 発刺激からなる刺激列を 1 秒間隔で 5 回反復し（1 刺激ブロック）、これを 1 分間隔で 10 ブロック行った]。なお対側は、高頻度反復刺激は行わずに、高頻度反復刺激（LTP 誘導）側に対する対照として用いた。高頻度反復刺激後はベースライン記録と同じ条件で誘発電位記録を 1 時間行い、LTP が誘導されていることを確認した。さらに、LTP の持続を確認する実験では、高頻度反復刺激を行った翌日からベースライン記録と同じ方法で誘発電位記録実験を継続して行った（約 1 週間）。

② 神経前駆細胞の活性化への DBS の影響：

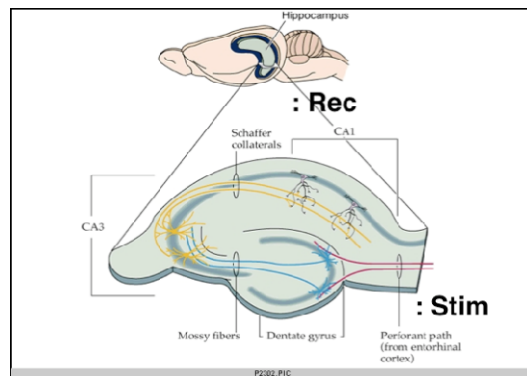
BrdU 投与の時期を高頻度反復刺激後 1、2、7-8 日目と変化させた。BrdU 投与後 1 日目に動物を灌流固定し脳切片標本を作製した。BrdU 陽性細胞の数を定量し、活性化神経前駆細胞が最も多い時点と部位を決定した。これにより神経前駆細胞の活性化領域、活性化される時期および活性化細胞の量への DBS の影響が明らかになった。

③ 前駆細胞の生物学的特性の探索：神経前駆細胞の分子生物学的特徴を解析する。本研究では発生期の神経前駆細胞に発現する遺伝子群に着目した。神経前駆細胞の運命決定と cell cycle exit を含めた分化の段階を制

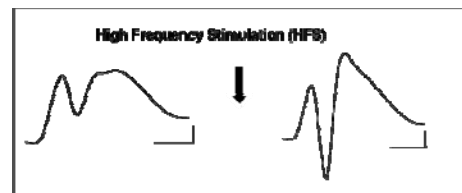
御する分子として知られる転写因子群を用いた。特に、げっ歯類の歯状回で発現している Pax6、Emx2、Neurogenin2、Ascl1、NeuroD、Prox-1、Hes1、Olig2 等の発現解析を行った。

4. 研究成果

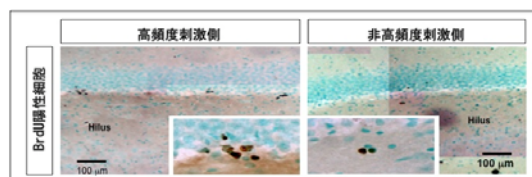
①ラット海馬における DBS と神経前駆細胞活性化への影響：



ラット海馬を主な関心脳領域とし（上図）、そこでの神経前駆細胞の活性化と新生神経細胞の分化が DBS（本実験においては高頻度刺激：HFS を用いた、下図）により影響され得るかを検討した。

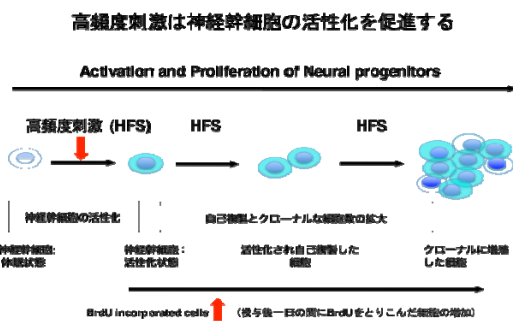


海馬歯状回における顆粒細胞層に入力する内嗅野からの貫通線維に直接高頻度刺激を行うと、海馬歯状回における電気活動の亢進が認められた（Abraham ら、2002）。それにともない海馬歯状回における下顆粒細胞層に存在する神経前駆細胞（BrdU を投与されて 1 日後までに BrdU を取り込んだ細胞）の増加が認められた（下図）。



本実験で認められた細胞の増加は、a) 電

気刺激されない状態では分化を開始していなかった細胞の活性化・増殖の開始と、b) 電気刺激されない状態において既に増殖していた細胞の増殖速度の亢進という2つの現象によってなされていると考えられる。すなわち「神経幹細胞の活性化」と「神経前駆細胞のクローナルな細胞数の拡大」が、電気刺激によりどちらかまたは両方同時に促進された事を示唆する。それらを区別するために、BrdU 陽性細胞の局在するコロニーの数（活性化されたクローナルな神経前駆細胞を反映する）と1コロニーあたりの BrdU 陽性細胞数（クローナルな細胞数の拡大を反映する）を、DBS 側と非 DBS 側（反対側をコントロールとした）とで定量した。DBS 側では非 DBS 側に比べてコロニー数が増加しており、神経幹細胞の活性化が促進された事を強く示唆した。一方で、コロニーあたりの細胞数は変化せず、DBS による神経前駆細胞の増加は、主に神経幹細胞の活性化により達成されたと考えられた（下図）。これらの知見より、DBS は神経幹細胞の活性化を制御し得る方法の一つであると考えられた。現在、高頻度刺激の強さ・刺激により生じる影響の期間とタイミング・神経活動変化の程度と神経幹細胞・神経前駆細胞の分化との関係などを明らかにし、DBS による神経細胞分化誘導の最適な条件を見出すことにアプローチしたいと考えている。



②活性化神経前駆細胞の分子生物学的特性：
Pax6、Emx2、Neurogenin2、Ascl1、NeuroD、

Prox-1、Hes1、Olig2 の発現解析を行った。BrdU 陽性細胞において、Olig2 の発現を認めた。Olig2 は、オリゴデンドロサイト前駆細胞に発現している転写因子である。すなわち DBS によりオリゴデンドロサイトの新生・再生が促進された可能性を示唆する。

本研究開始時は、精神・神経疾患に対する神経再生誘導療法の開発を目的として、うつ病モデルを用いるなど広範囲な解析を予定していた。しかしながら現在のところ疾患モデルを用いた DBS の効果の検討には至っていない。理由として挙げられる事の一つとして、今回用いた DBS モデルのラット海馬貫通路刺激に対する高頻度刺激の習得に多くの時間を要した事が上げられる。別の理由として in vivo 慢性電極埋め込みを行なっているため、埋め込み術後のラットの行動などにより、安定して海馬内で誘発電位を記録できるラットが当初多くなかった事が挙げられる。そのため多くのラットに慢性電極埋め込み手術を試行し、それらのラットから約 1/2-1/3 の確率で高頻度刺激を行なう事ができる動物を確保せざるを得なかった。このような事は実験計画当初ある程度予想されていたが、見通しが甘かったことは率直に反省しなくてはならない。

しかし、本研究を通じた新たな知見として、海馬貫通路高頻度刺激が海馬歯状回に内在する神経幹細胞の活性化を促進し、その活性化が神経前駆細胞の増加量に最も貢献している要素である事を見出した。それは過去に報告されていた、高頻度刺激による新生神経細胞および神経前駆細胞の増加に貢献するメカニズムの一つとして、分化開始ステップである神経幹細胞の活性化制御が極めて重要である事を示唆している。本研究の基本的な方針は、神経活動の量的変化・神経細胞分化のそれぞれのステップに

関わる量の制御・具体的な再生スケジュールなどを明らかにする事を通じて、DBS を用いた神経再生という現象論にとどまらない臨床応用という現実へのアプローチを行うことである。そのような観点から本研究を継続し、DBS を用いた神経再生誘導療法を確立させたいと考えている。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 杉森道也。深部脳刺激による神経再生誘導療法の開発。文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ。2010年7月27日-30日。札幌
- ② 杉森道也。高頻度刺激の海馬歯状回神経新生への影響。平成21年度 特定領域研究「統合脳」5 領域 冬の公開シンポジウム 合同領域班会議。2009年12月17-19日。東京
- ③ 小座野紘子, 杉森道也, 上野照子, 永福智志, 田村了以。歯状回の成体神経新生に対する貫通路高頻度刺激の影響。第18回「海馬と高次脳機能」学会。2009年11月21-22日。金沢
- ④ 小座野紘子, 杉森道也, Woomi, Y., 上野照子, 永福智志, 田村了以。ラット歯状回における神経新生への反復刺激後長期増強誘導の影響。第32回日本神経科学大会。2009年9月16-18日。名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者 杉森 道也

(SUGIMORI MICHIIYA)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
助教

研究者番号：20464026

(2) 研究分担者 該当無し

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 該当無し

()

研究者番号：