

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 5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700331

研究課題名（和文） 新生ニューロンのスパイン発現様式の変化と新たな記憶獲得回路への参加様式との相関

研究課題名（英文） Relationship between change of spine expression pattern and integration pattern into an information acquired circuit of adult born neurons

研究代表者

大川 宜昭（OHKAWA NORIAKI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教

研究者番号：80416651

研究成果の概要（和文）：

近年、成体脳の海馬歯状回でもニューロン新生が起きていることが定説となっている。しかし、新生ニューロンの既存回路網への組み込みと、記憶学習時に認められる神経細胞間伝達効率の可塑的变化の関連は不明であった。スパインは、シナプス後部の機能的構造体であり、回路網への組み込みの指標となる。研究代表者らは、神経可塑性の一つであるLTPの12日齢時での誘導が、後の新生ニューロンスパインの発現頻度を上昇させることを観察した。そこで、情報獲得時の新生ニューロンのスパイン発現様式と新たな情報獲得回路への参加様式との相関を、可塑性関連蛋白質の発現を指標に検討した。この結果、12日齢時と28日齢時の両日にLTP誘導を行うと、12日齢時と28日齢時のそれぞれでだけLTP誘導を行った場合と比べ、海馬新生細胞中のZif268陽性率が優位に上昇した。また、免疫電子顕微鏡法により、約80%の28日齢の新生ニューロンのスパインが、機能的シナプスを形成していることが明らかとなった。これらの結果は、神経可塑性誘導によりスパイン発現頻度が上昇している新生ニューロンは、新たなLTP誘導回路への機能的参加効率が上昇していることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：

In the adult hippocampus, newly born neurons are functionally integrated into existing circuits and play important roles in hippocampus-dependent memory. However, it remains unclear how neural plasticity regulates the integration pattern of new neurons into preexisting circuits. We had observed that LTP induction at 12-day after birth of new neurons increased later spinogenesis of their neurons. We then investigated the rate of circuit activity-dependent Zif268 expression, as indicator of the functional integration, in BrdU-labeled new born cells. When we induced LTP at 12-day after birth of new neurons, induction ratio of activity-dependent Zif268 expression in their neurons was significantly increased at 16-day after the LTP induction. This data strongly suggests that LTP induction at approximately 1-2-week after birth of new neurons enhances later functional integration of their neuron into activated circuits.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経科学、神経新生、スパイン、長期増強 (LTP)、海馬

1. 研究開始当初の背景

成体海馬内において、神経幹細胞や神経前駆細胞が歯状回顆粒細胞層の内側に存在することが、核酸アナログやレトロウイルス等の分裂細胞を標識する手法により明らかとなった。齧歯類において、これらの神経前駆細胞から新生したニューロンは、成体海馬歯状回内で既存の回路網へ機能的に統合されていることが、新生ニューロンの電気生理学的特性の研究により示されていた。しかし、神経回路の機能発現の基盤である神経活動・可塑性誘導が、いかに新生ニューロンの発達を制御し、さらには、既存回路網への統合に影響を与えるかは不明であった。

私は、レトロウイルス標識法を用いた新生ニューロン特異的なスパイン標識と、慢性電極設置による時空間的に制御可能な *in vivo* LTP 誘導技術の両立を確立した。LTP は神経可塑性の一つであり、高頻度刺激 (HFS) により誘導される。また、スパインは興奮性シナプスにおいてシナプス後部の構造体であることから、スパインの発現パターンは新生ニューロンの既存回路網への組み込み様式を反映すると予測され、この技術を用いて、LTP 誘導による新生ニューロンの最終的なスパイン形成様式の変化を観察することで、海馬での神経活動・可塑性誘導が新生ニューロンの既存回路網への組み込み様式へ与える影響を検討した。レトロウイルスは、歯状回内において神経前駆細胞にほぼ特異的に感染し、感染日を最終分裂期すなわち新生ニューロンの誕生日として同定できる。まず新生ニューロンのスパイン発現の時間経過を観察し、感染 14 日後 (14 dpi) ~16 dpi でスパインの形成が開始すること、16~18 dpi にかけて劇的にスパイン数が増加することが明らかにした。これはマウスでの知見⁵と一致するものであった。これを基に、スパインが未発現の 12 dpi、スパインが発現開始する 16 dpi、スパイン発達中・発達後の 21 dpi にそれぞれ LTP を片側の歯状回分子層中層特異的に誘導し、28 dpi でのスパイン発現様式を観察した。28 dpi は初期の劇的なスパイン発達が終末を迎える時期である⁵。12 dpi

での LTP 誘導により、誘導層特異的なスパイン数とスパイン断面積の上昇を観察した。16 dpi での LTP 誘導は、誘導層特異的なスパイン数の減少を引き起こした。また、21 dpi での LTP 誘導により、反対側と比べ、誘導層である分子層中層におけるスパイン断面積の増加と、分子層外層でのスパイン断面積の減少が観察された。

2. 研究の目的

私は、海馬の神経可塑性誘導による情報獲得が、発達時期毎の新生ニューロンの既存回路網への統合様式に異なる影響を与えることを明らかにした。これは、新生ニューロンスパインの発現の促進・抑制が人為的に制御可能であることを意味する。一方で、この観察されたスパイン発現様式が、実際のシナプス形成を反映しているのかどうかを検討することは重要な課題となった。本研究課題では、時空間的に制御した LTP 誘導が、新生ニューロンの最終的なスパイン発現様式を変化させることを観察したことから、このような条件下での新生ニューロンが、新たな情報獲得回路へどのように統合されるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

BrdU 標識は、海馬歯状回において神経前駆細胞の分裂時に起こることから、標識日を新生細胞の誕生日として同定できる。我々は、標識後特異的な時期に *in vivo* LTP 誘導を行い、機能的に既存回路網へ組み込まれることが知られる生後 4 週目での新生ニューロンのスパイン発現様式を変化させることを可能にした。この変化がシナプス形成を反映したものかを検討するとともに、その条件下で新たな情報獲得誘導のために、2 度目の LTP 誘導を行い、神経可塑性誘導時に発現誘導されることが知られる、可塑性関連蛋白質 Zif268 (Egr-1) の新生ニューロン内での発現効率を定量化した (図 1)。また、生後 4 週の新成体の機能的シナプス形成を検討するために、レトロウイルス標識法を用いて同定した新生ニューロンのスパインを免疫電子顕微鏡法により観察を行った。

4. 研究成果

スパインは、ニューロン間の信号伝達の間であるシナプスにおいて、シナプス後部の機能的構造体である。私は、神経可塑性の一つであるLTPの、新生後12日齢時での誘導が、28日齢時の新生ニューロンスパインの発現頻度を誘導依存的に上昇させることを観察した。これをもとに、可塑性関連蛋白質の新生ニューロン内での発現を指標とし、情報獲得時の新生ニューロンのスパイン発現様式と、新たな学習・記憶痕跡への参加様式との関連の検討を行った。

細胞の分裂時に起こる BrdU 標識は、海馬歯状回において新生ニューロンの標識を可能とするとともに、標識日を誕生日として同定できる。LTP 誘導を行った歯状回内で、Zif268、c-Fos、Arc といった可塑性関連蛋白質の発現誘導と検出感度を検討し、Zif268 が最も発現誘導の検出感度が高いことを確認した。そこで、100 mg/kg 量の BrdU を一日あたり 6 時間の間隔を置いて 2 回ラットに腹腔内投与 (i.p.) を行うことで新生細胞の標識を行い、BrdU 標識の中日から 12 日後 (HFS 12d)、28 日後 (HFS 28d) それぞれ、もしくは両時点 (HFS/HFS) での LTP 誘導による 28 日齢新生ニューロン内での Zif268 の陽性率を検討した (図 1)。LTP は、ラットの片側海馬歯状回に誘導し、もう片側の海馬はコントロールとした。

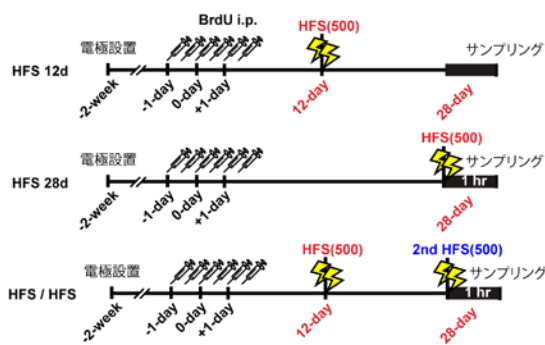


図 1

上記 3 条件において、それぞれの LTP 誘導のための高頻度刺激 (HFS (500)) によって、海馬歯状回の刺激に対する興奮性スパイク強度の上昇が誘導されたことから、この刺激により、興奮性シナプスを介した歯状回神経細胞への神経可塑性誘導を確認した (図 2)。

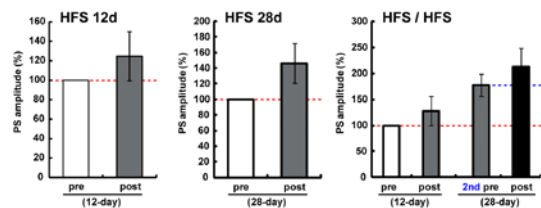


図 2

この条件下で、標識中日から 28 日目にラット脳のサンプリングを行ったが、Zif268 の LTP 誘導刺激後の発現は、誘導 1 時間後でピ

ークを迎えることから、HFS 28d と HFS/HFS 条件では、LTP 誘導刺激後 1 時間でサンプリングを行った。この脳から切片を作製し、BrdU、Zif268、そして神経細胞のマーカーである NeuN に対する抗体を用いて、3 重組織染色を行った (図 3)。この結果、BrdU/Zif268

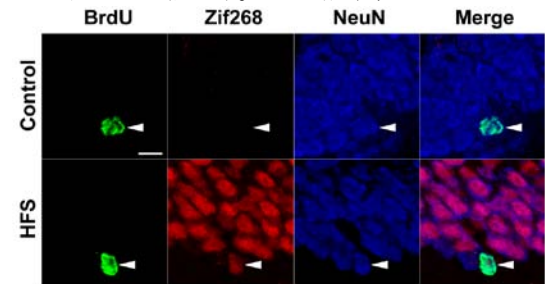


図 3

陽性細胞は、全て NeuN 陽性の細胞であることが分かった。また、LTP 誘導を行った歯状回では新生細胞数が増加することが報告されているが、神経細胞への分化率は変化しないことが報告されている。

そこで、BrdU 陽性細胞内での LTP 誘導における Zif268 の陽性率を計測することで、各 3 条件下の新生ニューロンの機能的な回路網への統合様式を検討した。

“HFS 12d”では、コントロールと HFS を行った 4 週齢細胞内での Zif268 の発現率に優位な差は認められなかった (コントロール歯状回, 11.3% ± 3.3; HFS 誘導歯状回, 15.2% ± 2.9, $P > 0.42$, Student's t-test)。一方、“HFS 28d”と “HFS/HFS” 条件下では、コントロールと比べ HFS を行った歯状回内で 4 週齢細胞における優位な Zif268 の発現率の増加が認められた (HFS 28d: コントロール歯状回, 12.3% ± 1.5; HFS 誘導歯状回, 23.6% ± 1.3, $P < 0.005$, Student's t-test; HFS/HFS: control side, 9.3% ± 1.1; ipsilateral side, 28.4% ± 2.3, $P < 0.002$, Student's t-test)

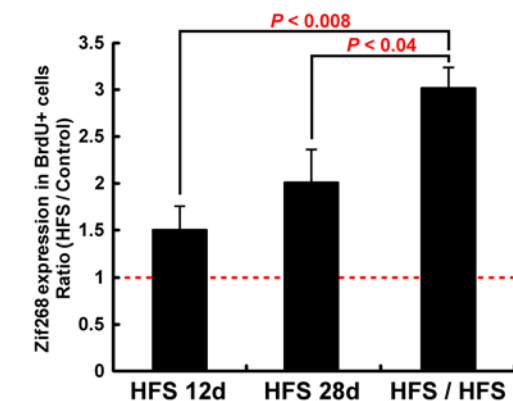


図 4

これらの 3 条件下でのコントロールと HFS 誘導歯状回での Zif268 の発現率の比 (HFS / Control) を計算したところ、12 日目と 28 日目の両日に LTP 誘導を行うと、12 日目と 28

日目のそれぞれにだけ LTP 誘導を行った場合と比べ、BrdU 陽性細胞中の Zif268 陽性率が優位に上昇した(HFS 誘導歯状回 / コントロール: HFS 12d, 1.5 ± 0.4 ; HFS 28d, 2.0 ± 0.4 ; HFS/HFS, 3.0 ± 0.2 , $P < 0.02$, ANOVA; HFS 12d vs. HFS/HFS, $P < 0.008$; HFS 28d vs. HFS/HFS, $P < 0.04$; post-hoc Fisher's test) (図 4)。

この結果は、12 日齢時の LTP 誘導によりスパイン発現頻度が上昇している新生ニューロンでは、28 日齢時点での情報獲得効率が上昇していることを示唆する。

我々の研究により観察された 28 日齢の新生ニューロンのスパイン (図 5) が、歯状回

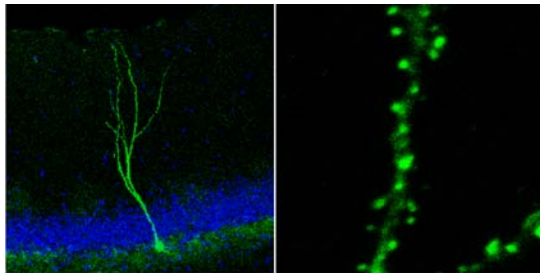


図 5

の神経細胞に投射する貫通線維とのシナプス形成を反映するか検討した。

レトロウイルス感染により新生ニューロンに GFP- β -actin を発現させ、抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行なった。透過型電子顕微鏡による観察により、約 80% の新生ニューロンシナプスが、シナプス小胞を含むシナプス前終末と接するとともに、シナプス後肥厚を持った機能的な興奮性シナプスの要件を満たしていることを明らかにした (図 6)。

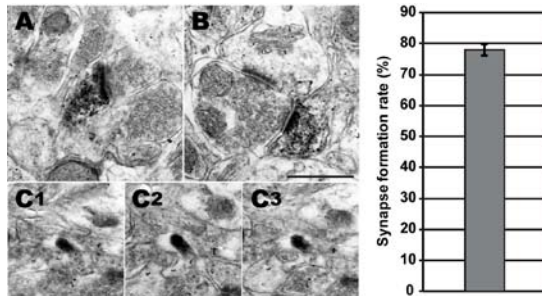


図 6

これらの結果は、神経回路の機能発現の基盤である神経活動・可塑性誘導が、新生後 1-2 週目の新生ニューロンの後の発達、さらには、後の既存回路網への機能的統合を上昇させることを、“スパイン発現様式”、“神経可塑性誘導時に発現するマーカー分子の発現”に加え、“電子顕微鏡レベルでの観察”により示したものである。現在、これらの結果を含む論文を国際学術雑誌に投稿し、掲載のための審査を受けている。

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 6 件)

① 各発達時期での LTP 誘導は成体海馬新生ニューロンのスパイン形成様式に誘導層特異的な異なる影響を与える

大川 宜昭、 斎藤 喜人、徳永 絵理、二本松 伊都子、小澤 史子、村山 明子、北村 俊雄、井ノ口 馨

第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日~16 日, パシフィコ横浜

② 各発達時期での LTP 誘導は成体海馬新生ニューロンのスパイン形成様式に誘導層特異的な異なる影響を与える

大川 宜昭、斎藤 喜人、徳永 絵理、小澤 史子、村山 明子、北村 俊雄、井ノ口 馨

第 34 回神経科学大会・Neuroscience 2011, 2011 年 9 月 14 日~17 日, パシフィコ横浜

③ 新生ニューロンの海馬情報獲得依存的な神経回路網への組み込み

大川 宜昭

北陸実験動物研究会 第 41 回研究会, 2011 年 9 月 10 日, 富山

④ Integration pattern of adult-born neurons into preexisting circuit is modulated by the hippocampal plasticity

Noriaki Ohkawa and Kaoru Inokuchi

The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases

August 3-5, 2011, Toyama

⑤ Spine formation pattern of new neurons is differentially modulated by the timing of LTP induction in adult dentate gyrus

Noriaki Ohkawa, Yoshito Saitoh1, Eri

Tokunaga, Fumiko Ozawa, Akiko Murayama,
Toshio Kitamura, Kaoru Inokuchi
40th Annual Meeting of The Society for
Neuroscience
November 13-17, 2010, San Diego, CA.

⑥各発達時期での LTP 誘導は成体海馬新生ニューロンのスパイン形成様式に異なる影響を与える

大川 宜昭、斎藤 喜人、徳永 絵理、小澤史、村山 明子、北村 俊雄、井ノ口 馨
Neuro 2010 (第 33 回神経科学大会・第 53 回神経化学学会大会・第 20 回神経回路学会大会合同大会), 2010 年 9 月 2 日~4 日, 神戸コンベンションセンター

[図書] (計 1 件)

新生ニューロンの経験依存的な海馬神経回路網への組み込み

Experience-dependent integration of adult-born neurons into hippocampal circuits.

大川 宜昭、井ノ口 馨

学研メディカル秀潤社、細胞工学 2011 年 5 月号・特集：記憶を分子・細胞の言葉で理解する, (2011), 30: pp521-527 .

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/bmb/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大川 宜昭 (OHKAWA NORIAKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学) ・
助教

研究者番号：80416651