

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 4 月 16 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790094

研究課題名（和文）中枢神経細胞再生システム機能のミクログリアによる制御に関する研究

研究課題名（英文）Regulation of microglia in endogenous neurogenesis

研究代表者

米山 雅紀 (YONEYAMA MASANORI)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：00411710

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経細胞変性後の神経新生過程でのミクログリアの役割を明らかにするため、神経細胞障害後の神経新生過程でのミクログリア関連因子とそのシグナル経路について解析したところ、神経新生過程にミクログリアによる NF-kappa B p65 を介したシグナルが関与することが示唆された。つまり、ミクログリアの制御メカニズム解明が神経変性後の神経新生促進を介した新たな治療法開発の基盤として期待される。

研究成果の概要（英文）：Our results support the possibility that pro-inflammatory cytokines released from activated microglia may be involved in promotion of endogenous neurogenesis through activation of NF-kappa B signaling pathway following the dentate neuronal loss.

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	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：薬理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経細胞機能再生への挑戦

成熟哺乳動物脳内では、数百億個もの神経細胞が相互の複雑なネットワークや神経細胞-グリア間コミュニケーションにより高度な役割を演じていることは周知の事実である。その中心的役割を演じている神経細胞

は、加齢に伴う様々な外来性及び内因性のストレスなどによる障害で脱落・減少し、その再生や生存の活性化メカニズムはほとんどみられないと考えられていた。事実、多くの神経変性疾患や老年性認知症は、神経細胞の著しい脱落に起因して発症することは言うまでもない。しかしながら、近年、成体脳で

の神経細胞数の維持システムの存在が多数報告されている。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ヒトを含む哺乳動物の成体脳における神経系幹細胞（神経系前駆細胞）の存在である。これまで成体脳において、海馬及び側脳室下帯などの脳内特定領域において神経系幹細胞が存在し、中枢神経系の再生、再構築など、治療につながる可能性が期待されるようになった。事実、神経変性疾患に対する治療を目的とした神経系幹細胞の基礎・臨床研究が世界中で猛烈な勢いで進められているが、根本的な再生治療法は確立されていないのが現状である。すなわち、神経系幹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細胞再生システ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していくことが望まれる。

(2) 神経新生促進因子による神経系幹細胞の増殖および分化とその機能制御

神経系幹細胞を臨床応用するためには、内在性神経系幹細胞の利用促進あるいは移植の両面から考えても、神経系幹細胞の増殖及び神経細胞あるいはグリア細胞への分化過程のメカニズムとこれらを促進する因子の同定が重要となる。我々の研究グループは、神経系幹細胞を胎生期のみならず成体脳からも分離培養、増殖させることが出来ており、その増殖過程に細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK1/2) のリン酸化を介した一酸化窒素 (NO) の関与を見出した (論文投稿中、学会発表済)。また、我々は神経系幹細胞の増殖にグルタミン酸、活性酸素種、カスパーゼ、カルパインといった神経細胞死関連因子が関与する可能性を報告しており (論文投稿中；日本薬学会第 125 年会シンポジウム「神経系前駆細胞の機能制御に向けて」；生体機

能と創薬シンポジウム 2007「神経細胞死及び神経細胞新生と創薬」にて発表済み)、“神経細胞の死のメッセージとして神経新生促進因子が存在する”ことを提唱している。

(3) 神経細胞変性・脱落後の神経細胞再生システム機能とミクログリア活性化

以前より、我々の研究グループは有機スズ化合物 (トリメチルスズ、TMT) の神経毒性に関する研究を行っている。すなわち、TMT をマウスに投与すると海馬歯状回選択的に神経細胞死が惹起されるが、歯状回神経細胞障害後に歯状回顆粒細胞下層での神経新生が活性化して歯状回顆粒細胞層が完全に再生することを明らかにしている (Ogita et al., *J. Neurosci. Res.* 82, 609-621, 2005)。また、興味深いことに顆粒細胞層が再生する時期と同調して Iba-1 (ミクログリアのマーカー蛋白質) 陽性細胞の発現増加が認められた。さらに、同じくして tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) の発現増加がみられたこと、*in vitro* 実験系での増殖過程における NO の関与を合わせて考えると、神経細胞の再生過程にミクログリアの機能もしくはミクログリアを介した再生促進因子の制御メカニズムが存在する可能性は高い。しかしながら、そのメカニズムの詳細や意義は不明である。すなわち、ミクログリアと神経新生メカニズムの関連性はほとんど分かっていないのが現状である。ミクログリアは細胞死を起こした神経細胞や脳内の異常代謝産物の除去、NO 等の活性酸素種を介して脳の機能維持に重要な役割果たしていることはよく知られている。このことからミクログリアが神経細胞死後の神経系幹細胞に与える影響、その後の神経細胞再生過程に非常に重要な役割を担っている可能性は高いと考えられる。

2. 研究の目的

神経細胞死後に出現するミクログリアに着目し、成体脳の潜在的神経新生を促進することが神経変性疾患の初期治療として有効であるとの着想から、「成体脳の神経新生の潜在機能を高めるために、神経細胞再生システム機能のミクログリアを介した神経促進因子の探索とその分子メカニズムの解明」を当該研究の第一の目的とした。最終的に、神経細胞障害後に出現するミクログリアを介した神経新生促進因子の発現メカニズム及びその制御分子メカニズムの解明を通して神経変性疾患の治療に貢献することが当該研究の最終目的である。

3. 研究の方法

【神経細胞障害モデル動物からの神経系幹細胞の単離培養とその機能解析】

齧歯類脳内からの神経系幹細胞の単離培養法には *neurosphere* 法があり、我々はこの方法により単離培養方法を既に確立している。一方、神経変性傷害後の動物からの神経系幹細胞の単離培養はほとんど行われていない。また我々は、神経毒トリメチルスズ (TMT) 2.8 mg/kg を ddY 系マウスに投与すると、海馬や嗅球で神経細胞が脱落するが、その後約 1 週間で神経細胞が新生することを見いだした。しかしながら、一度脱落し再び新生した神経細胞が「以前と同じ」神経組織を構築しているのかどうかは不明である。この動物を神経細胞障害モデル動物とし、これより神経系幹細胞の単離培養方法を確立する。すなわち、このモデル動物の海馬や嗅球からは、増殖や分化が活性化した神経系幹細胞が採取できると考えられる。同時により効率の高い神経系幹細胞の採取方法および高度純化培養方法の開発を目指す。

【新経変性傷害モデル動物におけるミクログリア活性化】

神経細胞障害・再生モデル動物の海馬および側脳室下帯を中心に神経細胞再生の経時的変化について組織化学的解析を行う。つまり、神経細胞再生過程で出現するミクログリアおよびそれに伴う機能的蛋白質の発現を解析する。神経新生 (増殖) の分子マーカー (BrdU 取り込み、ネスチン、BLBP、Ki-67、ダブルコルチン) の神経細胞障害後の発現を免疫染色により詳細に解析する。さらに、BrdU 取り込み細胞 (増殖細胞) の分化を解析するために、BrdU 標識細胞の運命を神経細胞マーカー (NeuN や MAP2) 及びグリア細胞マーカー {ミクログリア (Iba-1)、アストロサイト (GFAP, S100 β)、オリゴデンドロサイト (O4)} との蛍光多重免疫染色法により詳細に解析する。また、内在性神経系幹細胞 (BrdU 取り込み細胞) あるいは神経新生の分子マーカー陽性細胞とのミクログリア関連分子 (サイトカイン、NO 合成酵素、ニトロチロシン、HNE) の発現を蛍光多重免疫染色により解析する。

【神経細胞再生期に対するミクログリア活性化抑制の影響】

神経細胞障害・再生モデル動物の神経細胞再生期の海馬歯状回において、神経細胞の再生に対するミクログリア活性化の関与を詳細に検討すると同時にミクログリア依存性に発現増強する遺伝子・蛋白質を探索するために、本モデル動物に対するミクログリア活性化抑制薬であるミノサイクリンの影響について、RT-PCR 法、免疫組織化学法、およびウエスタンブロッティング法により解析した。

4. 研究成果

脳内の免疫担当細胞であるミクログリアは、脳虚血や脳傷害時に速やかに活性化され、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患においても病巣部への蓄積と活性化が認められる。このミクログリアの機能解明は脳疾患の治療およびその創薬研究には必要不可欠である。本研究では、神経細胞変性後の神経新生過程でのミクログリアの役割を明らかにするため、海馬歯状回神経細胞障害後の神経新生における活性化ミクログリア関連因子およびそのシグナル経路について解析を行った。また、神経細胞障害後に出現する神経系幹・前駆細胞の増殖メカニズムを解明する目的で、成熟脳海馬歯状回から単離培養した神経系前駆細胞の増殖メカニズムにおける一酸化窒素合成酵素(NOS)の関与について解析した。

ddY 系雄性マウスに海馬歯状回選択的神経毒性を示すトリメチルスズ(TMT)を腹腔内投与し、ミクログリア活性化抑制薬として知られるミノサイクリンをTMT処置12時間後から12時間毎に5回投与し、海馬歯状回での各種遺伝子および蛋白質の発現変化をRT-PCR法および免疫組織化学法により解析した。また、神経細胞障害・再生モデル動物の海馬歯状回から得られた細胞懸濁液について、細胞増殖因子(bFGF および EGF) を添加したNeurobasalを基本とする無血清培地で30日間培養した。再分散後、Neurobasal A 培地により継代培養して得られた細胞の増殖に対するL-NAME (NOS 阻害薬) の影響についてMTT法により解析した。

海馬歯状回において、活性化ミクログリアが放出するTNF- α の発現をRT-PCRにより解析したところ、未処置群に比べTMT処置3日目で最も著しい発現増強が認められた。また、同時期においてNOS2の有意な発現増

加が認められた。さらに、これらの発現増強はミノサイクリン処置により有意に減少した。一方、Iba-1 陽性細胞の発現を免疫組織化学法により解析したところ、海馬歯状回では未処置群に比べTMT 処置群で著明なIba-1 陽性細胞数の増加が認められたが、このIba-1 陽性細胞数の発現増加はミノサイクリン処置により明らかに減少した。続いて、nestin 抗体とNF- κ B p65 に対する抗体を用いて蛍光二重染色を行ったところ、TMT 処置3日目の歯状回顆粒細胞層下層でnestin 陽性細胞の大部分にNF- κ B p65 の発現が認められ、両陽性細胞の半数以上で核内にNF- κ B p65 の発現が認められた。さらに、ミノサイクリン処置はこのNF- κ B p65 の核内への発現を有意に抑制した。また、神経細胞障害・再生モデル動物の海馬歯状回から得られた細胞を継代培養したところ、細胞は活発な増殖能を示し、培養日数依存的なMTT 還元能の増加が認められた。また、得られた細胞の90%以上がnestin 陽性であった。さらに、L-NAME 暴露は、細胞の増殖に伴うMTT 還元能の増加を有意に抑制した。

以上の結果から、歯状回障害後の神経新生促進メカニズムの一部にミクログリア活性化によるNF- κ B p65 を介したシグナルが関与することが示唆される。また、障害後に出現する神経系幹・前駆細胞の増殖メカニズムにNOS を介したNO シグナルにより制御される可能性が示唆される。つまり、ミクログリアの制御メカニズム解明が神経変性後の神経新生促進を介した新たな治療法開発の基盤として期待される。

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 6 件)

① 米山雅紀、芝達雄、荻田喜代一、

- Edaravoneは海馬歯状回神経細胞障害後の神経系幹・前駆細胞の増殖・生存を促進する、日本神経精神薬理学雑誌、Vol.31、2011、99-100
- ② 米山雅紀、芝達雄、長谷部茂、荻田喜代一、Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration、Journal of Pharmacological Sciences、査読有、Vol.115、2011、425-432、
DOI:10.1254/jphs.11R02CP
- ③ 吾郷由紀夫*、米山雅紀*、他 10 名、Role of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in adult hippocampal neurogenesis、査読有、Vol. 172、2011、554-561、*Equally contributed. DOI:10.1016/j.neuroscience.2010.10.044
- ④ 米山雅紀、川田浩一、芝達雄、荻田喜代一、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、査読有、Vol.115、2011、182-195
DOI:10.1254/jphs.10290FP
- ⑤ 米山雅紀、川田浩一、後藤由佳、荻田喜代一、Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural/stem progenitor cells、査読有、Neurochemistry International、Vol.56、2010、740-746
DOI:10.1016/j.neuint.2009.11.018
- ⑥ 米山雅紀、川田浩一、荻田喜代一、Enhanced Neurogenesis in the Olfactory Bulb in Adult Mice after Injury Induced by Acute Treatment with Trimethyltin、Journal of Neuroscience Research、査読有、Vol.88、2010、1242-1251
DOI:10.1002/jnr.22305

[学会発表] (計 9 件)

- ① 米山雅紀、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、第 132 回日本薬学会年会、2012 年 3 月 29 日、北海道
- ② 長谷部茂 (米山雅紀)、一酸化窒素合成酵素は海馬ニューロン脱落後の神経系幹・前駆細胞の増殖を促進する、第 132 回日本薬学会年会、2012 年 3 月 29 日、北海道
- ③ 米山雅紀、海馬顆粒細胞脱落後のニューロン新生は活性化ミクログリアにより制御される、第 120 回日本薬理学会近畿支部会、2011 年 11 月 11 日、京都

- ④ 荻田喜代一 (米山雅紀)、活性化ミクログリアは海馬歯状回のニューロン新生を促進する—海馬歯状回ニューロン変性動物を用いた解析—、第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会、2011 年 10 月 29 日、東京
- ⑤ 米山雅紀、活性化ミクログリアは海馬歯状回神経細胞変性後新生細胞の増殖を誘発する、第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会、2011 年 10 月 29 日、東京
- ⑥ 米山雅紀、海馬顆粒細胞障害後のニューロン新生における活性化ミクログリアの役割—活性化ミクログリアは海馬内ニューロン新生を促進する—、日本薬学会近畿支部、2011 年 10 月 22 日、神戸
- ⑦ 長谷部茂 (米山雅紀)、海馬内ニューロン新生における NF- κ B シグナルの関与、日本薬学会近畿支部会、2011 年 10 月 22 日、神戸
- ⑧ 長谷部茂 (米山雅紀)、活性化ミクログリアは海馬ニューロン新生を促進する、次世代を担う創薬・医療薬学シンポジウム、2011 年 8 月 31 日、東京
- ⑨ 米山雅紀、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、第 131 回日本薬学会年会、2011 年 3 月 30 日、静岡

[その他]
ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米山 雅紀 (YONEYAMA MASANORI)
摂南大学・薬学部・講師
研究者番号：00411710

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：