

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 7 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500383

研究課題名(和文) 神経新生の人為的誘導による情動と記憶の解析

研究課題名(英文) Analyses of learning and affective behaviors through induction of adult neurogenesis and

研究代表者

有働 洋(Udo, Hiroshi)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70363322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、神経新生を亢進させたマウスで、抗うつ作用、抗不安作用、攻撃性の抑制など情動行動への有益な効果を見出している。本課題では、マウスの神経幹細胞に薬剤誘導型の遺伝子発現システムを導入し、他への影響を避けながら人為的に神経新生のみを促進させることにした。マウスに誘導剤を3週間投与したところ、海馬の顆粒細胞下帯などで顕著な神経新生の増加が見られ、システムが機能していることを確かめた。次に、動物を用いて行動解析を行ったところ、3週間の神経新生の促進では学習・記憶に有意な差は見られなかったが、抗不安様行動が観察された。この結果は、情動行動が神経新生に影響を受け易いことを示している。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that VEGF-mediated enhancement of adult neurogenesis leads to alteration in affective behaviors including antidepressant-/anxiolytic-like effect and reduction of aggressive behaviors in mice. In this study, we used a drug-inducible gene expression system to artificially facilitate cell division of neural stem cells in mice. We found that administration of the inducer enhanced adult neurogenesis in subgranular zone in the hippocampus. Neurogenesis was particularly active around capillaries. Mice were tested in several behavioral paradigms. We found that facilitation of neurogenesis for 3 weeks was not sufficient to improve spatial memory. In contrast, anxiolytic-like behavior was observed in mice, implying that affective behavior may be more susceptible to enhancement of adult neurogenesis.

研究分野：神経科学

キーワード：神経新生 脳機能 学習・記憶 情動 マウス

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞は胎児期に最も盛んに作られ、出生時までにはその大多数が出揃い脳の基本構造も完成する。長い間、神経細胞は生後作られないと思われていたが、その後、神経新生は減少しながらも一生続いていることが明らかになってきた。神経細胞そのものは増殖せず老化や病気などで失われるため、神経新生により新しい神経細胞が供給され続けることは脳機能を好適に維持する上で意義があると考えられる。興味深いことに、生後の神経新生は、運動、ダイエット、学習などで促進され、反対に、病気やストレスなどで抑制されるなど、環境条件に影響され易いことも明らかになった。生後に遺伝的な背景を変えるのは困難であるが、環境条件であればある程度は能動的に変えられたため、上手く働きかければ、脳機能を改善したり、老化や病気による神経細胞の喪失を抑制したりすることができるかもしれない。

研究開始当初、成体脳における神経新生について盛んに研究がなされ、その役割が徐々に明らかにされつつあった。長期記憶の形成に重要な海馬は、生後において神経新生が最も盛んな脳領域の一つとして知られている。これを支持するように、海馬の神経新生が学習や記憶に必要であるという報告がなされた。さらに、それ以外として情動に関わっている可能性が浮上していた。例えば、慢性的なストレスにより海馬での神経新生が低下すること、うつ病患者の海馬で委縮がみられること、さらに抗うつ薬で神経新生が促進されることが判明し、神経新生と海馬と情動の関連性について注目され始めていた。当時、我々はマウスを用いて神経幹細胞の増殖や分化に関わる成長因子についてその影響を解析していたところ、海馬における神経新生の促進とともに、動物の情動行動が顕著に変化していることを見出した。この動物では、野生型と比べて有意に抗うつ様行動や抗不安様行動が見られたほか、攻撃性が顕著に抑制され、さらに概日リズムがより鮮明になった。これらの結果は、海馬における神経新生が学習・記憶だけでなく情動にも関与している可能性を示唆していた。

### 2. 研究の目的

本研究では、神経新生の促進やその効果について調べることにした。具体的には、次の2つの実験を計画した。神経新生を人為的に誘導して、記憶や情動への作用を調べること、および培養細胞を用いて、神経新生を促進させる物質を探索することである。

実験の目的は、成体脳での神経新生の促進が、学習・記憶や情動に寄与しているのかを調べようとするものである。以前、我々は神経幹細胞の分化に関わる成長因子を脳内で発現させて、成体脳における神経新生の程度と脳機能への影響を見たが、それが神経幹細胞だけでなくその他の細胞にも作用する

ものであったため、二次的な影響を排除することができなかった。そこで今回は神経幹細胞のみをターゲットとして神経新生を人為的に促進させ、その影響を調べることにした。手段としては、神経幹細胞において神経新生に関わる成長因子受容体の遺伝子を特定の時期に誘導できるシステムを導入し、個体への影響を解析することにした。

実験の目的は、神経新生に作用する分子を効率的に探索することができるインビトロの系を構築し、実際にそのような物質を探そうとするものである。神経新生は様々な環境要因に影響されることから、その原因となる分子を特定することは、神経新生のシグナル伝達を明らかにする上でも重要である。それまで、神経新生を促進させる因子や物質として、成長因子や抗うつ剤などが知られていたが、その数は限られていた。そのため新規の因子や化合物が見つければ、神経新生のメカニズムを理解する上でも臨床的に利用する上で役に立つであろう。しかし、動物個体を用いて多数の物質を探索するのは甚だ困難であり、より効率的な手法が必要とされていた。神経新生は細胞現象の一種であることから、我々は培養細胞を用いて神経新生を容易に検出できる系を構築しようと試みた。多数の物質を探索して有望な候補因子が見つければ、その後、個体で実際の効果を検証すればよい。

### 3. 研究の方法

神経新生の人為的な誘導と記憶や情動に対する影響：改良型の rtTA (リバース・テトラサイクリン調節性トランス活性化因子) システムを用いて、マウスに誘導剤を投与することで、人為的に神経幹細胞の遺伝子発現を制御して神経新生を促すことにした。ネスチンプロモーターの制御により神経幹細胞で活性化因子を発現する rtTA マウスと、Tet0 (活性化因子が結合して遺伝子発現を制御する領域) の下流に神経新生に関わる成長因子受容体遺伝子 (FGFR1, EGFR) を挿入した Tet0 マウスを作出した。これらのマウスを交配し、rtTA と Tet0 を併せ持つマウスを得た (rtTA や Tet0 単独では機能しない)。遺伝子発現の誘導には、誘導剤であるドキシサイクリン (Dox : 0.1 mg/ml 飲水) を 3 - 4 週間 (神経細胞の成熟に要する期間) 投与することによって行った。動物を 2 グループに分け (各 6 - 10 匹程度) Dox を投与する実験群と、Dox を投与しない対照群を用意した。本実験では様々な手法を用いたが、以下に主な方法を簡単に示す。海馬における神経新生を定量する実験では、核酸類似体であるプロモデオキシウリジンをマウスに投与し (BrdU : 100 mg/kg 体重、腹腔投与) 複製中の細胞を BrdU で標識した。標識 2 時間後もしくは 4 週間後に脳組織を得て、組織切片を BrdU や神経細胞に対する抗体を用いて免疫染色し、海馬歯状回の顆粒細胞下帯における神経新生

の程度を定量した。一方、学習・記憶や情動に対する影響については、各種の行動テストによって評価した。学習・記憶の解析では主にバーンズ迷路テストや条件付けテストを行い、空間情報の記憶や恐怖に関係した記憶を調べた。一方、情動の解析では、主に高架式十字迷路テストや強制水泳テストを用いて、不安様行動やうつ様行動の程度を調べた。

レポーター細胞を用いた神経新生促進因子の探索：細胞レベルで神経新生の評価を行うために、NE4C細胞株を用いることにした。NE4Cはマウスの中枢神経系に由来する細胞株であり、神経幹細胞様の性質を示す。NE4Cは培養しやすく、条件を変えることによって神経細胞やグリア細胞に分化する。そこで、NE4C細胞に各種の化合物を加えて一定期間培養し、神経細胞への分化を観察することにした。従来の免疫化学的手法は、分化した神経細胞を検出するのに時間がかかるため、蛍光や発光で神経新生を容易にしかも高感度で検出できるようにした。NE4C細胞に遺伝子導入を行い、ダブルコルチンプロモーター（未熟な神経細胞で高い活性を有する）の制御下で2種類のレポーター遺伝子（蛍光タンパク質であるVenusと発光酵素であるルシフェラーゼ）を発現するようにした。このようにすることで、NE4C細胞が神経細胞に分化すれば、蛍光によって生きた状態で細胞形態を観察することができるほか、発光によって神経分化の程度を高感度で定量することができる。一定数の培養細胞をマルチウェルプレートに入れ、化合物を一定濃度（終濃度は1または10 $\mu$ M、ユーハ味覚糖株式会社提供）で添加し、6-8日間培養した。蛍光顕微鏡で分化した細胞の観察を行った後、基質であるルシフェリンを添加しルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性を定量した。有効な作用を示す物質が見つかった場合、同様な実験を繰り返して再現性を確かめた。

#### 4. 研究成果

神経新生の人為的な誘導と記憶や情動に対する影響：マウスの神経幹細胞に改良型rtTAシステムを導入した。rtTAマウスにおいて活性化因子の発現をin situハイブリダイゼーション法やRT-PCR法で確認した。また、rtTAおよびTetOを併せ持つマウスに誘導剤のDoxを投与することにより成長因子受容体が発現することを確認した。得られたマウスを2グループに分け、実験群に3週間のDoxの飲水投与を行い6週齢の時点でBrdUを用いた解析を行ったところ、海馬歯状回の顆粒下帯で神経新生がコントロール（Dox無し）と比べて約3割増加していることが分かった。これは運動で促進される神経新生のレベルと同程度であった。また、神経新生は毛細血管近傍で顕著にみられ、血管新生も促進された。BrdU標識4週間後、BrdU陽性細胞の多くが神経細胞（顆粒細胞）に分化しており、樹状突起がよく発達した成熟した細胞形態

を有し、細胞体が顆粒細胞層に見出された。一方、個体のレベルの解析は生後10週齢の時点で行った。学習テスト（バーンズ迷路テスト、条件付けテスト）を行ったところ、空間学習や恐怖関連学習では実験群と対照群の間で僅かな違いはあったが統計的に有意な差が得られなかった。一方、情動に関連したテストでは（高架式十字迷路テスト、強制水泳テスト）では、不安様行動が有意に抑えられていた。また、抗うつ様行動については傾向が見られたものの有意水準には至らなかった。この実験では、人為的な神経新生の誘導を試み、実際に成体脳において神経新生を顕著に促進させることができたが、動物行動に対する影響はそれ程強くなく、抗不安様作用のみが認められた。一つの理由として、誘導期間が3週間と比較的短く、既存の神経細胞に比べて新生した細胞の割合が少なかったため、その影響が限定された可能性がある。興味深いことに、学習行動よりも情動行動への影響が表れ易く、我々が以前得た結果と類似した。今後、より長期間神経新生を誘導することによって、学習・記憶が向上するかどうかについて確かめる必要がある。

レポーター細胞を用いた神経新生促進因子の探索：神経幹細胞様の特徴を持つNE4C細胞を用いて神経新生のためのレポーター細胞株を作製した。神経細胞への分化に伴い、分化した神経細胞を蛍光観察で容易に観察できるようになったほか、ルシフェラーゼによる発光反応により神経分化の程度を高感度で定量できるようになった。神経細胞に分化すると、酵素活性が約700倍上昇した。レポーター細胞に約950種類の精製された天然性の化合物（終濃度1-10 $\mu$ M）を加えて6-8日間培養したところ、高い活性がみられたのはレチノイン酸のみであった。all trans型レチノイン酸は神経分化を誘導する物質として既に知られていたものであり、立体異性体であるcis型も高い活性を示した。また、非常に弱いながらもカロテノイド類の一部に活性が認められた（アスタキサンチン等、コントロールの2-3倍程度の活性）。これらは、レチノイン酸とよく似たイソプレン構造を有する化合物であり、レチノイン酸の核内受容体と相互作用することで神経分化が誘導されたのではないかと推察する。この実験で、高い活性を有する新規物質を見出すことは出来なかったが、少なくとも我々が開発した系が大変有効であることは示された。より規模の大きい化学物質ライブラリを用いることで、新たな物質が見つかる可能性はある。今回開発した系は、化学物質だけでなく生体分子にも応用することが可能であり、分泌性の因子（成長因子など）であれば単に添加するだけで、内在性の因子（シグナル伝達因子など）であれば遺伝子導入によって解析する事ができる。今後、神経新生の分子メカニズムを理解する上で、役に立つ技術であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Udo H, Hamasu K, Furuse M, Sugiyama H. VEGF-induced antidepressant effects involve modulation of norepinephrine and serotonin systems. Behav Brain Res. 275:107-113 (2014)
2. Iura Y, Udo H. Behavioral analysis of visually impaired Crx knockout mice revealed sensory compensation in exploratory activities on elevated platforms. Behav Brain Res, 258:1-7 (2014)
3. Jin I, Udo H, Rayman JB, Puthanveettil S, Kandel ER, Hawkins RD. Spontaneous transmitter release recruits postsynaptic mechanisms of long-term and intermediate-term facilitation in Aplysia. Proc Natl Acad Sci USA, 109:9137-9142 (2012)
4. Jin I, Puthanveettil S, Udo H, Karl K, Kandel ER, Hawkins RD. Spontaneous transmitter release is critical for the induction of long-term and intermediate-term facilitation in Aplysia. Proc Natl Acad Sci USA, 109:9131-9136 (2012)
5. Kakoi C, Udo H, Matshukawa T, Ohnuki K. Effect of collagen peptides on hippocampal neurogenesis and anxiety-related behaviors in mice. Biomed Res, 33:273-279 (2012)

〔学会発表〕(計3件)

1. Udo H, Iura Y. Behavioral study of sensory perception and learning in visually impaired Crx-knockout mice. 国立京都国際会館(京都市) 2013年6月22日
2. Udo H. Characterization of neurogenesis, angiogenesis, and animal behaviors in b-FGF transgenic mice. Society for Neuroscience, New Orleans, USA (2012)
3. 有働 洋「神経新生に関わる成長因子と動物行動に対する影響」日本動物学会、大阪大学(大阪府豊中市) 2012年9月

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: コード領域のクローニング法

発明者: 有働 洋

種類: 特許

番号: 特願 2016-080634

出願年月日: 平成 28 年 3 月 28 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

研究代表者

有働 洋 (UDO, Hiroshi)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号: 7 0 3 6 3 3 2 2