

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430044

研究課題名(和文) SVZ神経前駆細胞の増殖を調節する神経回路

研究課題名(英文) Analysis of neural circuit regulating proliferation of neural precursor cells in the adult SVZ

研究代表者

森 徹自(Mori, Tetsuji)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：30285043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：成体脳におけるニューロン新生領域のひとつ、脳室下帯(subventricular zone; SVZ)には、神経幹/前駆細胞が存在するが、その増殖はニューロンの興奮により促進される。本研究から、ニューロンが過剰興奮すると、SVZ近傍の線条体ニューロンに於いてエピジェネティックな遺伝子発現変化が誘発されることが分かった。その結果、SVZ近傍での微小神経回路が改変され、SVZ神経幹/前駆細胞を取り巻く環境が変化するために、細胞増殖亢進につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：The subventricular zone (SVZ) in the adult mammalian brain contains neural precursor cells. And it is known that excessive neuronal excitation induces proliferation of neuronal precursor cells. In this study, we showed that epigenetic gene expression is induced in the striatal neurons close to the SVZ immediately after induction of status epilepticus in adult mice. It was suggested that the gene expression change in those neurons led to remodeling of micro-neuronal circuit around the neural precursor cells, and neuronal circuit affects proliferation of neural precursor cells.

研究分野：神経解剖学

キーワード：成体ニューロン新生 神経幹細胞 神経回路

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた成体哺乳類の脳には、生涯を通じてニューロン更新が起きる「ニューロン新生領域」が二カ所存在する。そのうちのひとつである脳室下帯 (subventricular zone; SVZ) は、側脳室と線条体に挟まれた狭い領域であり、SVZ に存在する神経幹細胞から産生された神経前駆細胞は、分裂しながら吻側に移動して嗅球ニューロンに分化する。神経幹/前駆細胞 (neural precursor cell; NPC) の増殖は、正常状態では厳密に制御されているが、てんかんや脳梗塞など様々な病態下では、NPC の増殖が亢進する事が知られていた。この NPC の増殖の制御機構や、てんかん等の病態下における制御機構の破綻については未解明の部分が多かった。

NPC の増殖に関する要因の一つとして、EGF、FGF、BDNF などをはじめとする各種栄養因子が知られる。しかしながら、例えば、重積てんかん (Status Epilepticus; SE) 発作後には約 2 日後には既に各種栄養因子の産生亢進が起きるが、実際に SVZ の NPC 増殖が亢進するのは更に後の 1-2 週間後であり、両者に時間的乖離があることから、別の要因が潜んでいる事が示唆される。

これまでに我々は、ニューロンの過剰興奮と神経幹/前駆細胞の増殖との関係について研究を行ってきた。NPC の増殖は、病態下だけでなく正常状態下でも脳の活動状態に大きく影響される。その背景にある因子としては、各種神経伝達物質である。数種類の神経伝達物質については、NPC の増殖に促進的あるいは抑制的に働くことが知られていた。しかし、それらの神経伝達物質がどのように統合されて NPC に入力されているか不明であった。

### 2. 研究の目的

前述の通り、薬剤投与による SE 発作誘発マウスにおいては、SVZ の NPC 増殖亢進時期が栄養因子産生亢進時期よりも大幅に遅れる事から、より長期的で大きな構造上の変化が脳内に起きていると考えられた。そこで、NPC の増殖に関する神経伝達物質に着目し、各種神経伝達物質を介した情報入力に SE 発作誘発後に変化する、つまり SVZ を取り巻く神経回路の改変が、NPC 増殖亢進の背景にあるとする仮説を立てた (図 1)。

本研究では、この仮説を検証する事を目的として、主に以下の 3 点について研究を進めた。

1) SE 発作誘発後、SVZ 近傍の線条体ニューロンで形態学的な変化が起きている可能性の検証。

神経突起の長さ、分岐、および棘突起の形態や密度などの解析を行った。

2) SVZ の NPC に直接、または SVZ 近傍の線条体ニューロンを介して間接的に NPC の

増殖を制御する神経回路の同定。

線条体は多くの部位から多様な神経物質を介した投射を受け、げっ歯類においては大まかな投射特異性があることが知られる。これらの軸索投射が及ぼす NPC の増殖への影響を検討した。

3) SE 発作誘発後、SVZ 近傍の線条体ニューロンで起きている遺伝子発現変化の可能性の検証。

神経回路の改変に対して作用すると想定される遺伝子の発現変化を検討する事で、神経回路改変の分子基盤を解析した。

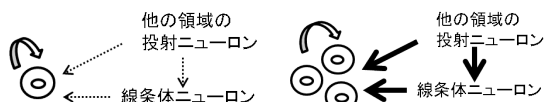


図 1) SVZ - NPC の増殖を制御する神経回路の仮説。神経回路の活性化 (右) により NPC 増殖が亢進する? 左: 正常状態

### 3. 研究の方法

SE 発作誘発モデルマウスとして、成体マウスに対してピロカルピン (アセチルコリン受容体作動薬) を投与した。そして発作誘発 1 時間後に、けいれん止めのジアゼパムを投与した。

1) SE 発作誘発後 7 日目のマウスを用いて、ゴルジ染色を施す事によりニューロンの棘突起を含めた形態の全貌を明らかにする。樹状突起の分枝状態や、棘突起の形や密度などの定量的な解析で、対照群と比較検討した。

2) 過去の文献から明らかになっている、線条体内側部 (SVZ 近傍) へ投射する大脳皮質領域に対して、順行性神経線維トレーサーを注入する。SE 発作誘発 7 日目に於いて、トレーサー陽性線維の走行、線条体ニューロンとのシナプス形成、SVZ 内への侵入などの観点から、対照群と比較検討した。

3) SE 発作誘導による回路改変の初期変化を検討するために、シナプス可塑性に関与するとされる転写調節因子である Zif268 や Ark/Arg3.1 などの最初期遺伝子を中心に、発現パターンの変化について免疫組織化学的方法を用いて対照群と比較した。

### 4. 研究成果

1) SE 誘発後 7 日目の脳を用いてゴルジ染色を施して、SVZ 直近の線条体ニューロンの形態観察を行った。可視化されたニューロンで、棘突起の数が減少している印象を受けたが、解析個体数を増やして統計学的解析を行ったところ、有意差を検出する事は出来なかつ

た。

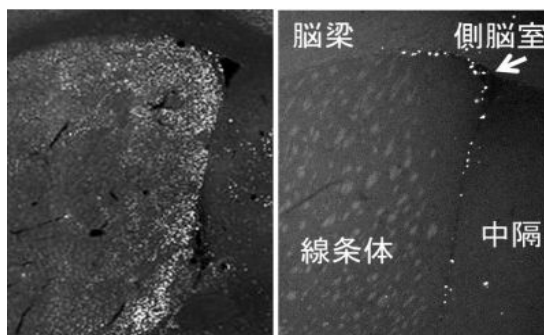
ゴルジ染色は、ニューロンを選択的に可視化する事が出来る染色方法であるが、ごく一部の細胞しか染まらない。また、どのニューロンが染まるか調節する事が不可能である。よって、SE 後の微細な変化を見逃している可能性も否定できない。

2) 成体ラットにおいて内側前頭前野から線条体内側部への投射があることが、過去の文献から明らかになっている。成体マウスにおいても同様の投射経路が存在する事を確認するために、順行性蛍光トレーサーである Fluoro-ruby を内側前頭前野に注入した。その結果、マウスでも前頭前野から線条体内側部へ投射する経路が存在する事が分かった。次に、SE 発作誘発 7 日後のマウスにおいて、同部位に Fluoro-ruby を注入して、線条体への投射を検討したところ、対照群と比較して、あまり大きな変化が検出されなかった。また、SVZ 内への突起の侵入も検出されなかった。

3) SE 後の線条体内側部において、特異的に発現パターンが変化する遺伝子を探索した結果、興味深い現象を発見した。SE 誘発直後 (1-2 時間) に、一過性にヒストン H3 タンパク質のリン酸化 (phosphorylated histone H3; PH3) 上昇が、線条体内側部のニューロンにおいて検出された (図 2)。PH3 陽性反応はニューロン特異的であり、グリア細胞は陰性であった。ヒストン H3 のリン酸化を担うタンパク質である MSK1 の活性も、線条体内側部で有為に上昇していた。

PH3 は、クロマチンの再構築を通じて遺伝子発現を促進する、いわゆる epigenetic な遺伝子発現制御のマーカーとして用いられる。よって、SE 誘発後の SVZ 直近ニューロンにおいて、MSK1-H3 リン酸化の経路を経て epigenetic な遺伝子発現変化が起きている事が示唆された。

図 2) 重積てんかん発作 1 時間後のヒストン



H3 リン酸化の様子 (左) 対照群 (右) と比較して、リン酸化の上昇が有為に更新している。

線条体ニューロンは、神経伝達物質の観点から多様な細胞種に分類される。本研究で用いた SE モデルマウスにおいて、ごく少数の

ニューロンに特異的な変化があった場合、ゴルジ染色では明確な変化を追跡する事は困難である。しかしながら本研究は、epigenetic な遺伝子発現が、少数のニューロンにおける変化を誘発した結果、NPC の増殖亢進に影響を与えた可能性を示唆する結果となった。

## 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 8 件)

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Yamada H. Sox2 promotes survival of satellite glial cell in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Aug 14;464(1):269-74. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.141 (査読有)

Okada M, Andharia N, Matsuda H. Increase in the titer of lentiviral vectors expressing potassium channels by current blockade during viral vector production. *BMC Neuroscience.* 2015 May 5;16:30. doi: 10.1186/s12868-015-0159-1. (査読有)

Okada M, Corzo G, Romero-Perez GA, Coronas F, Matsuda H, Possani LD. A pore forming peptide from spider *Lachesana* sp. venom induced neuronal depolarization and pain. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Apr;1850(4):657-66. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.11.022 (査読有)

Takamori Y, Wakabayashi T, Mori T, Kosaka J, Yamada H. Organization and cellular arrangement of two neurogenic regions in the adult ferret (*Mustela putorius furo*) brain. *J Comp Neurol.* 2014 Jun 1;522(8):1818-38. doi: 10.1002/cne.23503. (査読有)

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Takamori Y, Hirahara Y, Yamada H. Sox2 in the adult rat sensory nervous system. *Histochem Cell Biol.* 2014 Mar;141(3):301-9. doi: 10.1007/s00418-013-1158-x. (査読有)

Iseki K, Hagino S, Mori T, Zhang Y, Sakai N, Yokoya S, Hozumi Y, Goto K, Wanaka A, Tase C. Olig genes are upregulated in oligodendrocyte precursor cells in the injured central nervous system. *Arc. Histol. Cytol.* 2013, 74: 1-7. doi:10.1679/aohc.74.1 (査読有)

Mori T, Wakabayashi T, Ogawa H, Hirahara Y, Koike T, Yamada H. Increased histone H3 phosphorylation in neurons in specific brain structures after induction of status

epilepticus in mice. PLoS One. 2013 Oct 16;8(10):e77710. doi: 10.1371/journal.pone.0077710. (査読有)

Okada M, Kano M, Matsuda H (2013) The degradation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1, depends on the expression level: Examination with fluorescent proteins. Brain Research. 2013 Aug 28;1528:8-19. doi: 10.1016/j.brainres.2013.07.008 (査読有)

[学会発表](計 19 件)

小池太郎、森徹自、平原幸恵、山田久夫、脊髄神経節サテライト細胞の培養方法確立と Sox2 の役割解析、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016.03.29、ビッグパレットふくしま(福島県)

森徹自、若林毅俊、平原幸恵、高森康晴、小池太郎、黒川清、川島史祥、山田久夫、ニューロン過剰興奮が誘発する神経前駆細胞の応答、第 56 回組織細胞化学学会学術集会、2015.10.04、関西医科大学(大阪府)

川島 史祥、森徹自、Dynamic expression and phosphorylation of c-jun in the adult neural stem/precursor cells after excessive neuronal excitation、第 38 回日本神経科学大会、2015.07.28、神戸国際会議場(兵庫県)

平原幸恵、若林毅俊、本家公一、森徹自、小池太郎、高森康晴、小野勝彦、山田久夫、Role of pro-oligodendroblast antigen in oligodendrocyte differentiation、第 120 回日本解剖学会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会、2015.03.23、神戸国際会議場(兵庫県)

小池太郎、若林毅俊、森徹自、平原幸恵、高森康晴、山田久夫、Immunohistochemical study of axonic satellite glial cells in rat DRG、第 120 回日本解剖学会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会、2015.03.23、神戸国際会議場(兵庫県)

森徹自、若林毅俊、平原幸恵、高森康晴、小池太郎、黒川清、山田久夫、Cell cycle analysis of endogenous neural precursors in the adult mouse brain after brief seizures、第 120 回日本解剖学会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会、2015.03.22、神戸国際会議場(兵庫県)

平原幸恵、若林毅俊、森徹自、小池太郎、八尾育子、伊藤誠二、後藤仁志、本家考一、小野勝彦、山田久夫、The sulfatide with short chain fatty acids is dominant in restricted oligodendrogenesis region of the embryonic spinal cord、第 37 回日本神

経科学大会、2014.09.12、パシフィコ横浜(神奈川県)

小池太郎、若林毅俊、森徹自、平原幸恵、高森康晴、山田久夫、Proliferating glial cells in the normal young adult rat DRG、第 37 回日本神経科学大会、2014.09.12、パシフィコ横浜(神奈川県)

若林毅俊、小坂淳、森徹自、山田久夫、ラット網膜発生過程での BH3-only protein の一種 Puma の発現パターン、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014.03.28、自治医科大学(栃木県)

平原幸恵、若林毅俊、森徹自、小池太郎、高森康晴、矢尾育子、伊藤誠二、後藤仁志、本家孝一、小野勝彦、山田久夫、鶏胚脊髄オリゴデンドロサイト 04 抗原の実態解析、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014.03.28、自治医科大学(栃木県)

高森康晴、若林毅俊、森徹自、平原幸恵、小池太郎、小坂淳、山田久夫、食肉目フェレットの側脳室壁・嗅球系および海馬歯状回の組織学的解析、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014.03.28、自治医科大学(栃木県)

Kurebayashi S, Mori T, Wakabayashi T, Koike T, Yamada H, Ascending exercise increases neurogenesis in the dentate gyrus of adult mouse、Society Neuroscience 43rd Annual Meeting、2013.11.13、サンディエゴ(米国)

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Takamori Y, Yamada H, Identification of Sox2-positive cells in somato-sensory nervous system、Society Neuroscience 43rd Annual Meeting、2013.11.12、サンディエゴ(米国)

Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Yamada H, Chromatin remodeling in neurons in the caudate-putamen after excessive neuronal excitation、Society Neuroscience 43rd Annual Meeting、2013.11.10、サンディエゴ(米国)

平原幸恵、若林毅俊、森徹自、小池太郎、高森康晴、矢尾育子、伊藤誠二、後藤仁志、小野勝彦、山田久夫、質量分析イメージングを用いたオリゴデンドロサイト分化マーカー 04 抗原実態解析、第 54 回日本組織細胞化学学会総会・学術集会、2013.09.28、航空会館(東京都)

小池太郎、若林毅俊、森徹自、平原幸恵、高森康晴、山田久夫、脊髄神経節のサテライト細胞における Sox2 の分布とその意義、第 54 回日本組織細胞化学学会総会・学術集会、2013.09.28、航空会館(東京都)

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Takamori Y, Yamada H、

Localization and role of Sox2 in the adult rat DRG, Neuro2013 (第36回日本神経科学大会)、2013/06、京都国際会議場(京都府)

Wakabayashi T, Kosaka J, Mori T, Yamada H、Prolonged expression of Puma in cholinergic amacrine cells during the development of rat retina, Neuro2013 (第36回日本神経科学大会)、2013/06、京都国際会議場(京都府)

Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Yamada H、Effects of dopaminergic system on chromatin remodeling in neurons after status epilepticus, Neuro2013(第36回日本神経科学大会)、2013.06.20、京都国際会議場(京都府)

[図書](計1件)

森 徹自、山田 久夫、細胞系譜追跡の組織化学、日本組織細胞化学会編 組織細胞化学 2014-じっくり学ぶ組織細胞化学の基礎と応用そして未来- 2014、pp. 175-188

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 徹自 (MORI, Tetsuji)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：30285043

(2) 連携研究者

岡田 誠剛 (OKADA, Masayoshi)

倉敷芸術科学大学・生命科学部・教授

研究者番号：40334677