

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430044

研究課題名(和文) 大脳皮質の成体神経新生によって新しく産まれた抑制性神経細胞の機能解剖学的解析

研究課題名(英文) Functional neuroanatomical study on cortical adult neurogenesis.

研究代表者

大平 耕司 (Ohira, Koji)

武庫川女子大学・生活環境学部・准教授

研究者番号：80402832

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)：これまでの研究により、我々は成体大脳新皮質において新しい抑制性神経細胞を産生することのできるL1-INP細胞を同定している。本研究では、L1-INP細胞の成体神経新生について機能解剖学的解析を行い、以下の結果を得た。1) 新しい神経細胞の3D-SEM解析を行うにあたり、条件を検討し、マウスの脳固定に0.15Mカゴジル酸、樹脂包埋にDurcupan、リコンストラクトにはFijiとTrakEM2をそれぞれ決定した。2) L1-INP細胞が老化により、マウスの生後12ヶ月から17ヶ月に約90%が減少することを明らかにした。3) L1-INP細胞の増殖分化メカニズムを解析するための抗体を作製した。

研究成果の概要(英文)：We have found the neural progenitor cells, L1-INP cells, in the adult cortex. In this study, we further analyzed L1-INP cells, using neuroanatomical methods. First, we determined the protocols for 3D-SEM analysis of L1-INP cells. Second, we found that the density of L1-INP cells was kept from 5- to 12-month-old, dramatically decreased at 17-month-old, and thereafter maintained the same level until 24-month-old. Additionally, the degrees of decreased densities of NPCs in the cingulate and insular cortices were significantly smaller than those in the primary motor and somatosensory cortices. Finally, we made anti-TrkB-T1, which is useful for studying the mechanism underlying adult neurogenesis of L1-INP cells. We obtained antiserum for TrkB-T1 in one out of three guinea pigs.

研究分野：神経科学

キーワード：成体神経新生 抑制性神経細胞 大脳皮質 神経保護 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

大人の脳は、非常に再生しにくいことが昔からよく知られている。そのため、事故や疾病による脳の損傷により、多くの人たちが後遺症を抱えたまま一生を過ごさなければならず、患者のQOL(生活の質)の低下や家族の負担は甚大なものとなっており、一刻も早い治療法の確立が望まれている。

現在、脳損傷や精神・脳疾患の治療法として、外因性のES細胞、人工多能性幹細胞(iPS細胞)、神経幹細胞を増殖、分化させて、脳へ移植する細胞治療法が模索されている。しかし、移植した細胞のがん化、脳の移植領域に存在する神経細胞の多様な種類へ分化させる技術、倫理的問題などが大きな障壁として立ちだかっている。一方、細胞を使ったもう一つの治療法として、内因性神経幹細胞/前駆細胞を利用する方法が考案されている。この方法を用いることによって、将来、薬剤などで神経細胞を産生させることができれば、上記の問題をクリアできることになる。しかし、内因性神経幹細胞/前駆細胞を利用する方法を実現するためには、神経幹細胞/前駆細胞が、治療の対象となる脳領域に存在することが前提となる。成体の中枢神経系において、海馬歯状回と側脳室下帯の2領域では、神経幹細胞/前駆細胞が存在することは知られているが、それら以外の脳領域、特に大脳皮質の神経幹細胞/前駆細胞が存在するかどうかは、長い間不明であった。このような中で、申請者は、成体大脳皮質1層に、脳虚血を起こすと抑制性神経細胞を産生する内因性神経前駆細胞を発見し、L1-INP細胞と名付けた(Ohira et al., *Nature Neurosci*, 2010)(図1)。さらに、最近、健常なマウスに抗うつ薬を投与することにより、L1-INP細胞の神経新生が促進されること、新しい神経細胞が脳虚血によって生じる神経細胞死を抑える働きを持っていることを見出した(Ohira et al., *Neuropsychopharmacology* 2013)。

これらの発見より、成体大脳皮質においても、神経精神疾患に対して、神経前駆細胞を用いた神経再生や保護が実現できる可能性があることが示唆される。しかしながら、L1-INP細胞は、近年、申請者らによって発見された神経前駆細胞であるため、世界的にほとんど研究は行われておらず、基礎研究の端緒に着いたばかりである。

## 2. 研究の目的

本研究は、L1-INP細胞や産生された新しい抑制性神経細胞に焦点を当て、機能解剖学的解析により、L1-INP細胞の成体神経新生の生物学的基盤を明らかにすることを目指している。以下に具体的な研究項目を示す。

### (1) 新生神経細胞の3次元微細構造解析

走査電子顕微鏡を用いた連続イメージング法により、新しい神経細胞の3次元

再構築を行う。細胞体、樹状突起からシナプスレベルの微小構造に到るまで解析することによって、形態学的な性質について明らかにする。

### (2) L1-INP細胞および新生神経細胞の機能解剖学的解析

L1-INP細胞の成体神経新生に影響を与える因子として、現在、脳虚血と抗うつ薬投与が増殖と分化を促進することが明らかとなっている。しかし、それ以外の因子については全くわかっていない。本研究では、老化がL1-INP細胞の密度にどのような変化をもたらすのかが明らかにする。

### (3) 新生神経細胞を産生するメカニズムに関する解析

L1-INP細胞を初代培養するとき、培地にBDNFを添加すると産生されるニューロソフィアの数や大きさが増大することを明らかにしている(unpublished data)。このことはL1-INP細胞にBDNFの受容体が発現しており、BDNF刺激によって増殖の調節が行われていることを示唆している。そこで、詳細にBDNF受容体であるTrkBの細胞内シグナリング経路を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 新生神経細胞の3次元微細構造解析

走査電子顕微鏡を用いた連続イメージング法により、新しい神経細胞の3次元再構築を行う(FIB-SEM、SBF-SEM)。細胞体、樹状突起からシナプスレベルの微小構造に到るまで解析することによって、形態学的な性質を抽出する。

まず、あらかじめL1-INP細胞を、すでに確立しているGFPを発現することのできるレトロウイルスを用いて標識しておく。その後、マウスに抗うつ薬の一つであるフルオキセチンを3週間毎日投与することにより、L1-INP細胞の神経新生が刺激され、GFP標識された新しい神経細胞が産生されてくる。これらの細胞が含まれた組織切片に対して、前シナプスマーカーであるVGluT1、VGluT2、VGATなどで免疫染色を行う。染色した切片を共焦点顕微鏡で観察し、FIB-SEMで解析する新しい神経細胞を決定する。目的の細胞が入っている切片に対して、GFPはイムノゴールド銀増感法、VGluT1、VGluT2、VGATはHRP-DAB法-オスミウム固定を実施することによって、L1-INP細胞由来の新生神経細胞と他の神経細胞由来の入力繊維との間に形成されたシナプスについて3D再構成することにより解析を行う。

### (2) L1-INP細胞および新生神経細胞の機能解

### 剖学的解析

生後 5、12、17、24 ヶ月齢の雄マウスの大脳皮質に存在する L1-INP 細胞の密度を計測する。L1-INP 細胞マーカーとして、増殖細胞の全細胞周期の核タンパク質である Ki67 と GABA の蛍光二重染色を行う。また、L1-INP 細胞を GFP 発現レトロウイルスベクターでラベルし、脳虚血による刺激を与えて、新しい神経細胞の産生について、生後 5 ヶ月齢と 24 ヶ月齢を比較する。

### (3) 新生神経細胞を産生するメカニズムに関する解析

L1-INP 細胞の増殖・分化のメカニズムについてほとんど分かっていない。一方、L1-INP 細胞を初代培養するとき、脳由来神経栄養因子 (BDNF) が必要である。BDNF を培地に添加することにより、L1-INP 細胞より形成されるニューロソフィアの大きさや数が増大する。この結果は、BDNF が L1-INP 細胞膜上にある特異的受容体 TrkB と結合することで、L1-INP 細胞の増殖を促進させていることが示唆される。そこで、L1-INP 細胞の神経新生における BDNF-TrkB 経路の役割について検討するため、L1-INP 細胞の初代培養やマウス脳を用いて、TrkB の発現パターン、細胞内シグナリング経路について明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 新生神経細胞の 3次元微細構造解析

新生した抑制性神経細胞の 3D-SEM 解析を行うことを目的として、その条件検討を実施した。3D-SEM は、生理学研究所の Sigma を使用した (生理学研究所村田准教授との共同研究)。その結果、マウス脳の固定液は、0.15M カコジル酸バッファーを用いること、Durcupan を用いて樹脂包埋を行うこと、Fiji と TrakEM2 で 3D リコンストラクトを行うことにより、新しい神経細胞の 3D-SEM 解析が可能となることがわかった。

### (2) L1-INP 細胞および新生神経細胞の機能解剖学的解析

L1-INP 細胞の成体神経新生について影響を及ぼす因子の探索として、老化に注目した。マウスをモデル動物として、生後 5 ヶ月、12 ヶ月、17 ヶ月、24 ヶ月齢の大脳皮質における L1-INP 細胞の密度変化について調べた。その結果、生後 5-12 ヶ月まではほとんど密度に変化は現れなかったが、12 ヶ月から 17 ヶ月の間に顕著な L1-INP 細胞の密度の減少を見出した。また、生後 17 ヶ月以降、24 ヶ月までは密度は維持されていた。また、大脳皮質を体性感覚野と運動野などの

1 字領野と、前部帯状回と島皮質の高次領野に分けて密度分布について解析すると、高次領野の方が密度の減少率が優位に低いことがわかった。さらに、5 ヶ月齢と 24 ヶ月齢の大脳皮質に、GFP 発現レトロウイルスベクターを感染させることで、L1-INP 細胞をラベリングし、脳虚血刺激により L1-INP 細胞の神経新生能について調べた。24 ヶ月齢では維持されている L1-INP 細胞密度は低いものの、脳虚血により刺激すると、新生される神経細胞数は、5 ヶ月齢のコントロールより優位に高くなることを発見した。これらの結果は、老化した大脳皮質にも刺激に応じて新しい神経細胞を産生することができる神経前駆細胞が存在することと、高次領野では L1-INP 細胞が維持される傾向があることが明らかとなった。

### (3) 新生神経細胞を産生するメカニズムに関する解析

L1-INP 細胞の増殖と分化は、脳虚血と抗うつ薬投与によって促進されることがわかっている。これらのシグナルを仲介する共通分子として脳由来神経栄養因子 (BDNF) がある。実際に、L1-INP 細胞の初代培養を行うときに、培地に BDNF を添加すると、L1-INP 細胞から形成されるニューロソフィアの数と大きさが増すことが明らかとなっている。そこで、L1-INP 細胞の神経新生における分子メカニズムとして BDNF に注目し、BDNF 特異的受容体である TrkB サブタイプの L1-INP 細胞における発現について明らかにした。まず、TrkB サブタイプの一つである TrkB-T1 特異的抗体の作出を行なった。TrkB-T1 の C 末端から 11 アミノ酸残基の合成ペプチドを抗原として、モルモット 4 匹に免疫した。このうち 1 匹から抗 TrkB-T1 が得られた。この抗体を用いて、L1-INP 細胞における発現を調べたところ、ほぼ全ての L1-INP 細胞に発現していることを見出した。一方、もう一方のサブタイプである TrkB-FL は、およそ 30% の L1-INP 細胞に発現が見られた。

## 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)

[学会発表](計 8 件)

Akito Nakao, Keizo Takao, Koji Ohira, Naoyuki Miyazaki, Kazuyoshi Murata, Tsuyoshi Miyakawa, Three-dimensional analysis of dendritic spines and mitochondria in dentate gyrus granule cells in Schnurri-2 knockout mice, an animal model for schizophrenia,

Neuroscience 2016, Society for Neuroscience annual meeting, San Diego, USA, 2016.11.14.

Hideo Hagihara, Koji Ohira, Tsuyoshi Miyakawa, Transcriptomic evidence for dematuration of the mouse hippocampus and frontal cortex by chronic antidepressant treatment, Neuroscience 2016, Society for Neuroscience annual meeting, San Diego, USA, 2016.11.12.

大平 耕司、岡田 友佳、成体の大脳皮質に存在する神経前駆細胞の老化に伴う減少、第39回日本神経科学大会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）、2016.7.20-22.

萩原 英雄、大平 耕司、宮川 剛、抗うつ薬の長期投与による前頭皮質と海馬の脱成熟現象、第39回日本神経科学大会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）、2016.7.20-22.

Koji Ohira, Rika Takeuchi, Miki Miwa, Katsuki Nakamura, Tsuyoshi Miyakawa, Antidepressant-induced immaturity of hippocampus and cortical adult neurogenesis in the common marmoset, 第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場、（兵庫県神戸市）、2015.7.28-31.

Hisatsugu Koshimizu, Hideo Hagihara, Koji Ohira, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Transcriptomic hyper-maturity of the hippocampal dentate gyrus in mice, 第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場、（兵庫県神戸市）、2015.7.28-31.

Koji Ohira, Hideo Hagihara, Rika Takeuchi, Tsuyoshi Miyakawa, Transcriptomic evidence for the immaturity in the frontal cortex of mice treated with antidepressants, 第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2014.9.11-13.

Hideo Hagihara, Koji Ohira, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Transcriptomic evidence for immaturity of the prefrontal cortex in patients with schizophrenia, 第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2014.9.11-13.

Koji Ohira, NOVA Science Publishers, Fluoxetine and its novel effect on adult neurogenesis, In: Pinna G (ed), Fluoxetine: Pharmacology, Mechanisms of Action and Potential Side Effects, pp97-106, 2015.

大平 耕司、文光堂、神経再生、橋本信夫(監修)、三國信啓、深谷親(編集)、脳神経外科医が知っておくべきニューロサイエンスの知識、pp40-41、2015.

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.mukogawa-u.ac.jp/~nbrain/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大平 耕司 (Koji Ohira)  
武庫川女子大学・生活環境学部・准教授  
研究者番号：80402832

### (2) 連携研究者

宮川 剛 (Tsuyoshi Miyakawa)  
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授  
研究者番号：10301780