

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22500313

研究課題名(和文) GFAP陽性神経幹細胞に由来する海馬新生ニューロンのストレス脆弱性の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis for stress vulnerability of hippocampal newborn neurons derived from GFAP-expressing stem cells

研究代表者

井村 徹也 (Imura, Tetsuya)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00405276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：成体脳における神経新生はGFAP陽性神経幹細胞によって行われている。海馬歯状回においてGFAP陽性神経幹細胞により生成される顆粒細胞の性質・動態を、老化・ストレス感受性に着目して解析を行った。マウスGFAP陽性神経幹細胞により生成されるニューロンの全顆粒細胞層に占める割合は、若年期に大きく増えその後高齢期にかけて微増していたが、空間的部位・性別によって違いがみられた。また、新生ニューロンはストレスに脆弱であったが、このストレス感受性には分化段階で臨界期がみられた。さらに歯状回顆粒細胞層の分子発現網羅解析を行い、成体生成ニューロンの特性に関わる幾つかの新規候補分子を見出した。

研究成果の概要(英文)：New neurons in the adult brain are originated from GFAP-expressing neural stem cells (GFAP+NSCs). In the present study, we analyzed the dynamic properties of GFAP+NSC-derived new granule cells (GCs) in the hippocampal dentate gyrus with reference to aging and stress vulnerability.

The contribution of GFAP+NSC-derived GCs to the whole GC layer in mice sharply increased during the juvenile period followed by a subtle addition by old age, which was variable depending on spatial positioning and sex. The survival of newborn neurons was deteriorated by the chronic environmental stress, but there was a critical period of vulnerability for the stress during their differentiation. We also performed a comprehensive analysis of the gene expression profiles in the GC layer and found several candidate molecules implicated in the regulation of adult-born GCs.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学/神経病理学

キーワード：神経幹細胞 神経新生 老化 ストレス

1. 研究開始当初の背景

成体脳内における神経幹細胞は近年積極的に研究されている領域であり、特に海馬歯状回顆粒細胞層における神経幹細胞よりの神経新生は、記憶・学習等の高次機能との関連で注目されている。また、歯状回における成体神経新生の異常が、てんかんや気分障害といった神経疾患の病態に關与することも示されている(Eisch AJ et al., *J Neurosci*, 2008)。こうした問題を考える上で、成体歯状回で新生されるニューロンに何らかの特異性があるかという点は重要であるが、発達期に形成されるニューロンとの明らかな性質の違いは現在まで見出されておらず、このため成体神経新生は既存顆粒細胞への単純な付加あるいは補償であるとされることが多い。ただ、成体新生ニューロンは成熟により長い期間が必要とされるため、未熟な性質をもつ顆粒細胞の存在が時系列に關連した記憶形成に寄与するとの仮説が提唱されている(Aimone JB et al., *Nat Neurosci*, 2006)。成体脳内神経幹細胞はアストロサイトマーカー - Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) を発現している(Imura T et al., *J Neurosci*, 2003; Garcia AD et al., *Nat Neurosci*, 2004; Imura T et al., *Glia*, 2006)。海馬歯状回における成体神経新生はほぼ100%この GFAP 陽性神経幹細胞に由来し、GFAP 陽性神経幹細胞に由来する顆粒細胞集団(以下、GFAP-GC population)は遅くとも生後発達期には形成され始めると考えられるが、GFAP-GC population の脱落と供給は成体期にはバランスされており non GFAP-GC population とは独立した cycling population を形成している可能性が示唆されている。さらに、マウスてんかん誘発モデルにおいては、神経新生が一過性に増加するにも関わらず歯状回における GFAP-GC population は長期的には逆に減少することも見出している(井村徹也他、てんかん治療

研究振興財団研究年報 20, 2009)。以上のことから、GFAP-GC population は老化・てんかん侵襲といったストレスへの脆弱性をもつことが示唆される。成体歯状回において細胞死と神経新生が coupling していることは広く知られており、神経新生は GFAP-GC population の脆弱性に対する一種の補償であるとも考えられる(Eisch AJ et al., *J Neurosci*, 2008)。また、もし GFAP-GC population に選択的脆弱性を規定するような何らかの特性が存在するならば、それは歯状回の生理的な機能に關連していることが想定される。

実際、成体神経新生で成熟マーカーである NeuN を発現する段階を超えて成熟した顆粒細胞の多くは長寿命(>6 ヶ月)である一方、発達期に生成された顆粒細胞は成体期にも持続的に脱落しているとの報告がある(Dayer AG et al., *J Comp Neurol*, 2003)。一方で、細胞単位では NeuN を発現してから安定した長寿命形質に至るあいだに臨界期(critical period)が存在する可能性も考えられる。NeuN の発現が始まってから最終的な成熟に至る間も分子発現や電気生理学的形質が変化することは知られており、この期間は種や年齢によって異なるとされる(Kempermann G et al., *Trends Neurosci*, 2004; Overstreet-Wadiche LS et al., *J Neurosci*, 2006)。

2. 研究の目的

本研究では、GFAP-GC population がストレス脆弱性を有する可能性に着目し、その形成維持機構とストレス感受性について詳細な解析を行うとともに、そのストレス脆弱性に関わる分子基盤を明らかとすることで、GFAP 陽性神経幹細胞に由来する顆粒細胞集団の特異性の解明を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

a) 動物モデル

mGFAP-Cre トランスジェニックマウス (Garcia AD et al., *Nat Neurosci*, 2004), Nestin-CreERT2 トランスジェニックマウス (Imayoshi I et al., *Nat Neurosci*, 2008), CAG-CAT-EGFP トランスジェニックマウス (Kawamoto S et al., *FEBS Lett*, 2000)、を交配し、mGFAP-Cre Flox-reporter トランスジェニックマウス、Nestin-CreTM2 Flox-reporter トランスジェニックマウスを作製した。動物モデルの作製・繁殖維持は、京都府立医科大学・実験動物センターの SPF 室にて施行し、以下のすべての実験は京都府立医科大学動物実験委員会・遺伝子組み換え実験委員会の審査・承認を得た上で、米国立衛生研究所「実験動物の管理と使用に関する指針」に準拠して行なった。

B) 慢性拘束ストレス侵襲

長期的な軽度ストレス侵襲を目的として、拘束負荷 (8 時間/日) を行った。また神経新生の評価を目的に、bromodeoxyuridine (BrdU, 100 mg/kg x 6 回) の投与を同時に行った。

C) 組織学的解析

深麻酔下に灌流固定を行った脳組織を用いて、各種抗体による免疫染色を行い、レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus 社) にて撮影・解析を行った。

D) マイクロアレイ

8-10 週齢あるいは 18-22 ヶ月齢雌マウス (n=8) 海馬歯状回よりレーザーマイクロダイセクション (MMI CellCut) にて分離した組織を回収し、RNA 分離及び増幅 (WT-Ovation™ Pico RNA Amplification System, Nugen 社) を行った後、Whole Mouse Genome 4x44K (Agilent 社) にて解析を行った (DNA チップ研究所に委託)。

E) リアルタイム RT-PCR

D) と同様の条件で得た RNA を鋳型として逆転社にて cDNA 合成を行い、sybr green 法によるリアルタイム RT-PCR を行った (StepOnePlus, Life Technologies 社)。

4. 研究成果

A) 老化に伴う神経新生の変化と GFAP-GC population の動態

まず老化による一般的な神経新生の変化の組織学的解析を行った。若齢 (8-10 週齢、Young) と老齢 (16-20 ヶ月齢) マウスの BrdU 投与後 4 週において評価を行ったところ、従来の報告に合致して BrdU 陽性の新生細胞数は著明に減少していた (図 1 A)。同時に新生細胞の分化形質の解析を行ったが、老齢マウス

では新生細胞の中でニューロン系に分化する細胞の割合の減少傾向はみられたが、ニューロン系の中での成熟度には大きな違いはみられなかった (図 1 B)。

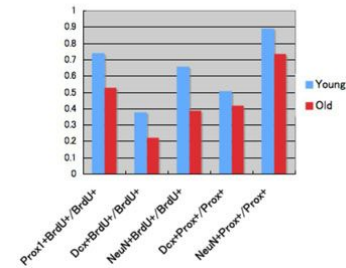
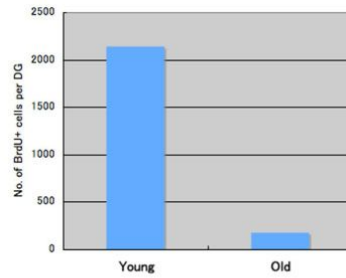
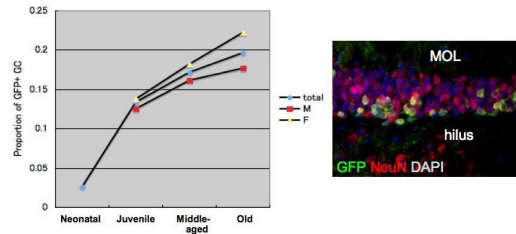
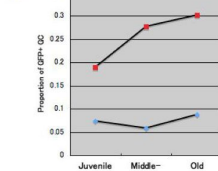


図 1 : 老化に伴う神経新生の評価

A



B



C

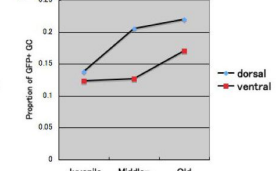


図 2 : 年齢に伴う GFAP-GC population の変動

次に、年齢による GFAP-GC population の動態を明らかとするため、mGFAP-Cre Flox-reporter マウスを用いて歯状回におけるリポーター蛋白陽性の顆粒細胞の割合の変化を解析した (図 2 B)。新生児期 (8 日齢) から若年期 (4 週齢) にかけて GFAP-GC population の割合は大きく増加し、成体期には顆粒細胞の約 20% が GFAP-GC population で占められていた (図 2 A)。神経新生が減少していく中年期 (6 ヶ月齢) 以降も GFAP-GC population の割合は微増がみられ、このことから当初の仮説に反して成体神経新生が付加あるいは non GFAP-GC を含む既存ニューロンの代償として働いていることを示唆するものであった。

さらに性別・部位に関して詳細な解析を行ったところ、以下の興味深い知見が得られた。

1) 雌は雄に比して GFAP-GC population の割合が高く、特にこの差は老齢期で顕著であった。2) GFAP-GC population は顆粒細胞層の門(hilus)側 1/2 に偏在して存在していた。3) GFAP-GC population の割合は背側海馬で高い傾向がみられた。

B) ストレス負荷による新生ニューロンの生存への影響

成体新生ニューロンがストレスに対する脆弱性を有するかを、慢性拘束ストレス (RS) モデルを用いて検討した。BrdU 投与により新生細胞を標識した後、第 1~2 週及び第 3~4 週に RS 負荷を行い、4 週終了後に組織学的評価を行った。その結果、第 1~2 週に RS 負荷を受けた群では対照群に比して差はみられなかった一方で、第 3~4 週に RS 負荷を受けた群では有意に新生細胞の生存が阻害された(図 3A)。一方で、RS による分化・成熟傾向には大きな変化はみられなかった(図 3B)。このことから、海馬成体神経新生において細胞がストレス脆弱性を獲得する臨界期が存在することが示された。

次に、新生細胞の生存に関わる因子としてグルタミン酸を介したシグナル伝達に着目し評価を行った。BrdU 標識後 NMDA 受容体 CPP の投与を受けた群では、対照群に比して 4 週後の生存細胞数が有意に増加していた(図 3A)。分化・成熟に関しては、CPP 投与群では未熟ニューロンマーカーである Dcx の発現は低下する一方で成熟マーカーの NeuN は増加していた(図 3B)。以上から、新生細胞の生存はグルタミン酸を介したシグナル伝達により調節されており、その阻害によりニューロンの成熟が促進されることが示唆された。

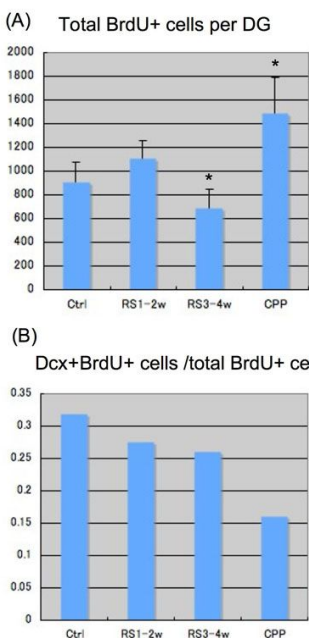


図 3 : 新生細胞のストレス感受性 A: RS 負荷による新生細胞の生存数 B: RS 負荷による新生細胞の分化・成熟

C) GFAP-GC population の分子発現網羅解析 神経新生の加齢による変化及び GFAP-GC population の分子レベルでの特異性を明ら

かとするため、マイクロアレイによる発現網羅解析を行った。このため最初に、mGFAP-Cre Flox-reporter 及び Nestin-CreERT2 Flox-reporter マウスよりリポーター蛋白質を利用した FACS による細胞分離を試みた。しかし顆粒細胞層は互いに強固に接着しており、各種酵素 (trypsin・papain・collagenase) による条件設定を試みたが、単一細胞分離の可能な条件では細胞生存や遺伝子発現に大きな影響がみられ、その後の解析には不適であった。そこで、前述の解析により明らかとなった GFAP-GC population が門側に偏在していることを利用し、顆粒層門側・分子層側に分けてレーザーマイクロダイセクション法により新鮮組織の採取を行い、良質の RNA を回収することができた(図 4A)。この方法を用いて、若年 (8 週齢)・老齢 (16-20 ヶ月齢) マウスより組織を回収し、マイクロアレイ解析を行った (Whole Mouse Genome 4x44K、図 4B)。

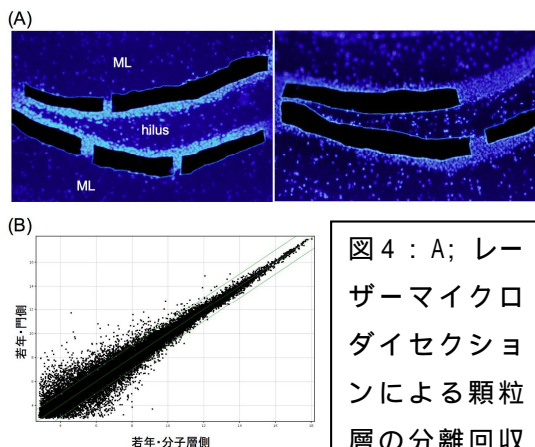
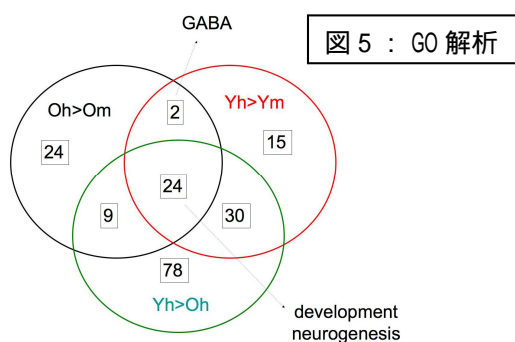


図 4 : A; レーザーマイクロダイセクションによる顆粒層の分離回収 B: マイクロアレイ・スキャッタープロット

2-fold change をカットオフとして、若年 (Y)・老齢 (O)・門側 (h)・分子層側 (m) の比較で変動遺伝子群を抽出すると、Yh>Ym 1592 遺伝子・7160 ターム、Ym>Yh 1003 遺伝子・160 ターム、Oh>Om 1139 遺伝子・5960 ターム、Om>Oh 960 遺伝子・960 ターム、Yh>Oh 1443 遺伝子・14160 ターム、Yh<Oh 1076 遺伝子・960 ターム、という結果であった。このうち、Yh>Ym・Oh>Om・Yh>Oh の 3 群の GO タームを比較すると(図 5)、3 群に共通するタームが 24 個存在し、その多くは development/neurogenesis に関するものであり、Yh>Ym・Oh>Om に共通し Yh>Oh に当てはまらない 2 個のタームは GABA に関するものであった。

Yh>Ym・Oh>Om・Yh>Oh の 3 群に共通する遺伝子群には幹細胞維持や神経新生に関わることが既に知られている遺伝子群(e.g. Sox2, Dcx, NeuroD)が含まれており、神経新生の活

性を反映していると考えられた。



次に、神経新生の制御及び GFAP-GC population の機能の評価に使用可能な新規マーカーの探索を目的に、マイクロアレイの結果から幾つかの遺伝子について qRT-PCR による検証を行った。その結果、門側で高く年齢により低下する遺伝子群（幹細胞・神経新生に positive に働く遺伝子群）・門側で高く年齢により上昇する遺伝子群（幹細胞・神経新生に negative に働く遺伝子群）・年齢に関わらず門側と分子層側で発現の異なる遺伝子群（GFAP-GC population のマーカーに成りうる遺伝子群）それぞれについて幾つかの候補遺伝子の同定に成功した（図 6）。

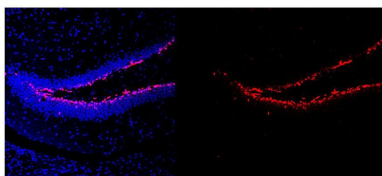
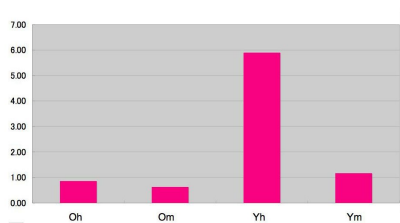


図 6 : マイクロアレイにより同定した新規神経新生マーカー候補の発現評価

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小林靖幸、井村徹也他。成体神経幹細胞における HMGB ファミリーの発現と機能解析、日本病理学会総会 2014

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/home/p2/sub3.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

井村 徹也 (Imura, Tetsuya)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00405276

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：