

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659562

研究課題名(和文) 精神疾患等のための創薬に有用な細胞動態 *in vivo* モニタリング・システムの開発

研究課題名(英文) Development of a monitoring system of *in vivo* cell dynamics for therapeutic evaluation of psychiatric disorders

研究代表者

尾内 康臣 (Ouchi, Yasuomi)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授

研究者番号：40436978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：精神神経疾患では神経の発育や変性などに神経幹細胞が変化していると報告されているが、各種疾患における神経幹細胞の関与についてよく知られていなかったため、*in vivo*で神経幹細胞の挙動をモニタリングできるシステムを開発することを試みた。その結果、新規遺伝子発現レポーターシステムとアミノ酸トランスポーターを導入することでPETを用いて、神経幹細胞を特異的に描出するシステムを構築することができた。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that neural stem cells are variously changed in the process of not only normal neural growth but also neuronal degeneration occurring in neuropsychiatric disorders. Despite these findings, there was no study about the contribution of neural stem cells to the physiological and pathophysiological significance. Hence we tried to develop an *in vivo* monitoring system with which the dynamics of the stem cells can be visualized. Using positron emission tomography with a new gene-reporter system and amino acid transporter, we were able to make a new *in vivo* system for measuring live neural stem cells *in vivo* specifically.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：臨床精神分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

20世紀を通じて、ヒトを含むほ乳動物の中樞神経系では、成長後も新たにニューロンを生じる神経幹細胞(NSC)が存在することが明らかにされた。NSCは成体脳では主に脳室下帯(SVZ)と海馬歯状回(SGZ)に局在する。'90年代にカナダのSamuel Weiss博士らによりNSCの培養法が確立されたのを契機に、NSCの分化や自己複製等に与る転写因子群並びに細胞内情報伝達系が多く同定され、また、NSC特異的のマーカ―としてnestinやMusashi-1, Prominin-1等が見出されたことで、免疫組織化学による形態学的解析も盛んに行われるようになった。研究開始当初までに、knockoutマウスの作製、あるいはSVZ、SGZでの遺伝子knockdown及び過剰発現等により、NSCの増殖・分化に種々の遺伝子が働くことが報告されていたが、それらの研究では剖出脳でSVZ、SGZにおけるnestin等のNSC特異的のマーカ―陽性細胞を定量解析するに留まり、in vivoで非侵襲的にNSCの脳内動態を画像化することができる技術の開発が俟たれていた。また最近、パーキンソン病を初めとする神経変性疾患、及び、大うつ病や統合失調症等の精神疾患の患者死後脳にてNSCの障害が報告されていることから、それら疾患の病態生理にNSCが与る仕組みを解明することが、喫緊の課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、PETを用いた新規のin vivoイメージングシステムを開発することにより、ヒトを含むほ乳動物の脳内にあるNSCを可視化するとともに、神経変性疾患や精神疾患等の病態脳におけるNSCの動態をin vivoで可視化することで、それら疾患の病態生理と成体脳神経新生障害の関係を解明し、NSCを治療標的とする医薬の開発や幹細胞療法等への応用を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、培養神経幹細胞をPETトレーサーで特異的に標識する技術を創出し、それを内因性神経幹細胞に導入することで、成体脳神経新生をin vivoでPETによりモニタリングすることができる神経新生の動物評価系を構築した。

ここでは初めに、神経幹細胞特異的nestinプロモーターの下流に中性アミノ酸トランスポーターLAT4遺伝子を配置したレンチウイルス・ベクターを作製し、それより調製したウイルス粒子を、培養神経細胞に感染させLAT4を発現させた。そして、汎用PETトレーサー $[^{18}\text{F}]$ FMTを培地に添加し神経幹細胞を標識した(図1)。ここでは、発現する遺伝子の構成についての至適化を行い、 $[^{18}\text{F}]$ FMT取り込みの高効率化を図った。次に、成体ラット脳に脳定位装置を用いて海馬歯状回及び脳室下帯に、至適化したレンチウイルス粒子を感染させ、神経幹細胞を $[^{18}\text{F}]$ FMTで特異的に標識して、PETによりin vivoで神経新生を定量的に解析できる、神経新生の動物評価系を創出した。

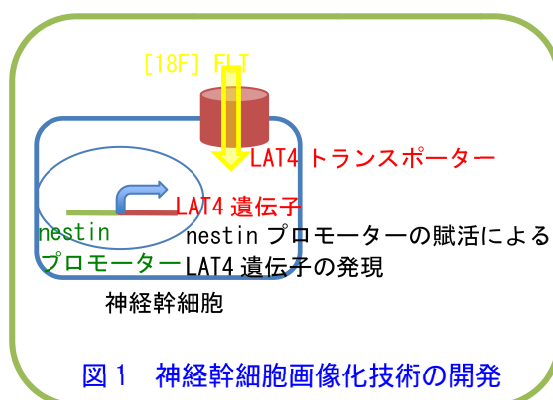


図1 神経幹細胞画像化技術の開発

本研究では次に、この動物評価系の、神経幹細胞障害が病態生理に与るとされる大うつ病や統合失調症等の精神疾患の神経幹細胞を標的とした診断・治療への応用を図るために、母子分離ストレスを負荷し作製した、大うつ病病態モデルマウス(Depマウス)、及び、統合失調症の脆弱性因子DISC1変異体を発現する統合失調症病態モデルマウス(Schizoマウス)にて、脳定位装置によりSVZとSGZにレンチウイルス粒子を顕微注入した後、 $[^{18}\text{F}]$ FMTをマウスに静注し、PETを用いて神経幹細胞の脳内動態と成体脳神経新生障害の惹起を経時的にモニタリングした。ここでは、さらに抗うつ薬や向精神薬等をDepマウスあるいはSchizoマウスに投与し、成体脳神経新生障害が大うつ病や統合失調症等の精神疾患の病態生理に与る仕組みを探究するとともに、神経幹細胞を治療標的とした、それら疾患の医薬候補化合物の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 成体脳神経新生動物評価系の創出 23年度

本研究の結果、ラット等のほ乳動物において神経幹細胞の成体脳内動態を、in vivoでPETを用いて画像化するための分子イメージング技術が創出され

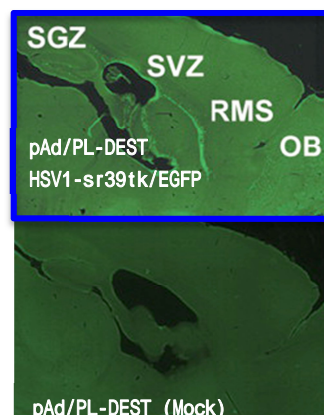


図2 神経幹細胞特異的の遺伝子発現系の構築
nestinプロモーターにより蛍光タンパク質EGFPを発現させるためのウイルス遺伝子発現系を構築し、ラット成体脳SVZの神経幹細胞に当該ウイルス粒子を感染させた。

た。即ち、nestin プロモーターにより神経幹細胞特異的に中性アミノ酸トランスポーターである LAT4 を発現するレンチウイルス遺伝子発現系を新たに構築することで、ウイルス感染脳にて移植神経幹細胞、及び、脳室下帯(SVZ)、海馬歯状回(SGZ)の内因性神経幹細胞をリアルタイムに in vivo で画像化した(図 2)。

(2) 病態脳での神経幹細胞の脳内動態解析 24 年度

母子分離による大うつ病病態モデルマウス(Dep マウス)、及び、DISC1 遺伝子変異による統合失調症病態モデルマウス(Schizo マウス)にて、成体脳 SVZ と SGZ に組換えレンチウイルスを感染させ、nestin プロモーターにより LAT4 遺伝子を神経幹細胞特異的に発現させた。Dep マウスでは、行動学的解析により定量的に評価されたうつ症状の重篤化に従い、¹⁸F]FMT の当該組織への集積が低減することが PET で観察され、うつ症状が神経幹細胞障害を惹起することが確認された。また、Schizo マウスでは、成体脳 SVZ から嗅球への神経幹細胞の遊走(RMS)の障害が、PET による神経幹細胞の in vivo 動態解析により確認された。これら罹患脳における神経幹細胞障害は、精神疾患の病態生理に成体脳神経障害が与えることを示唆しており、今後は、マカクサル等の高等霊長類で、大うつ病や統合失調症等の精神疾患病態モデルを作製し、本研究による画像化技術を適用することで、ヒトでの神経幹細胞を治療標的とする、それら疾患の診断・治療への応用を図ることが望まれる。

25 年度

本研究では、ついで、Dep マウスあるいは Schizo マウスに抗うつ薬や向精神薬等を投与し、それら医薬の薬効機序に成体脳神経新生賦活が与える仕組みを解析した。その結果、Dep マウスで抗うつ薬の投与後、¹⁸F]FMT の集積の増加が PET を用い観察され、SGZ での神経幹細胞増殖が賦活されたことが確認された。一方、Schizo マウスについては、向精神薬による SVZ と SGZ での成体脳神経新生の賦活は確認されなかった。これらの結果は、抗うつ薬の薬効機序に成体脳神経新生が与るとともに、神経幹細胞障害が、特に大うつ病の病態生理の分子的基礎を介して惹起することを示唆している。今後は、本研究による分子イメージング技術を種々の精神・神経疾患病態モデルサル等に適用することで、薬剤の成体脳神経新生賦活効果を評価しながら、神経症状を改善する医薬候補化合物のスクリーニングを行うことが俟たれている。

成体脳神経新生の動態を in vivo でリアルタイムに解析することができる技術は、これまでになく、nestin、Musashi-1 等を初め、神経幹細胞で特異的に機能するタンパク質について、剖出脳切片で免疫組織化学的染色を施すことで神経幹細胞の賦活あるいは障害を定量的に解析するのみであった。特に、ヒトでの神経幹細胞を標的とする精神・神経疾患の早期診断・治療への応用を図る上で重要であるマカクサル等の高等霊長類での神経幹細胞の成体脳内動態解析を行うことを、本研究による PET を用いた分子イメージング技術は可能にする他、創出された画

像化技術を改変することにより、それを他の遺伝子発現の in vivo 動態解析に適用することができることは、本技術の重要性を一層高めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- Yokokura M, 他 9 人, Ueki T, Ouchi Y. In vivo changes in microglial activation and amyloid deposits in brain regions with hypometabolism in Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38(2):343-51, 2011
doi: 10.1007/s00259-010-1612-0
- Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, 他 15 人 Reduced acetylcholinesterase activity in the fusiform gyrus in adults with autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry*.2011 68:306-13.
doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.4
- Kikuchi M, 他 10 人, Ueki T, Ouchi Y. Effects of brain amyloid deposition and reduced glucose metabolism on the default mode of brain function in normal aging. *J Neurosci*. 2011 31(31):11193-9
doi: 10.1523/JNEUROSCI.2535-11.2011
- Kakimoto A, Kamekawa Y, 他 5 人 Ouchi Y. New computer-aided diagnosis of dementia using positron emission tomography: brain regional sensitivity-mapping method. *PLoS One*.2011;6(9):e25033.
doi: 10.1371/journal.pone.0025033
- Ouchi Y, Kikuchi M. A review of the default mode network in aging and dementia based on molecular imaging. *Rev Neurosci*. 2012 23(3):263-8
doi: 10.1515/revneuro-2012-0029
- Oboshi Y, Ouchi Y, Yagi S, 他 7 人. In vivo mesolimbic D2/3 receptor binding predicts posttherapeutic clinical responses in restless legs syndrome: a positron emission tomography study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012, 32(4):654-62
doi: 10.1038/jcbfm.2011.201
- Terada T, Kono S, Ouchi Y, 他 4 人 H.SPG3A-linked hereditary spastic paraplegia associated with cerebral glucose hypometabolism. *Ann Nucl Med*. 2013, 27(3):303-8
doi: 10.1007/s12149-012-0673-5
- Nozaki T, 他 8 人, Ouchi Y. Effect of subthalamic nucleus stimulation during exercise on the mesolimbocortical dopaminergic region in Parkinson's disease: A positron Emission Tomography Study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013,33:415-421
doi: 10.1038/jcbfm.2012.183

Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, 他 11 人.
Microglial activation in young adults with
autism spectrum disorder. JAMA Psychiatry.
2013 Jan;70(1):49-58
doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.272
Okada H, Ouchi Y, Ueki T, 他 10 人. Alterations
in $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic receptors in cognitive
decline in Alzheimer ' s etiopathology. Brain.
2013 Oct;136(Pt 10):3004-17
doi: 10.1093/brain/awt195

〔学会発表〕(計 5 件)

植木孝俊. NG2 細胞の CD44 を分子標的とする分子イメージング技術の創出と、その多発性硬化症治療への応用. 第 53 回日本神経学会学術大会 平成 24 年 5 月 24 日 (東京)
植木孝俊. NMR による多発性硬化症治療標的分子の生細胞内動態解析技術の創出. 第 54 回日本神経学会学術大会 平成 25 年 5 月 31 日 (東京)
植木孝俊. ミクログリアを治療標的とした神経変性疾患治療戦略の構築. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム 平成 26 年 3 月 29 日 (下野)
Yokokura M, Ouchi Y, 他 4 人. In vivo imaging of neuroinflammation using a new PET tracer [11C]-DPA713. 第 36 回日本神経科学大会 平成 25 年 6 月 21 日 (京都)
Ouchi Y, Terada T, Ueki T, 他 7 人. Effect of amyloid deposition on $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic cholinergic system in Alzheimer ' s disease. 第 36 回日本神経科学大会 平成 25 年 6 月 22 日 (京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

尾内 康臣 (OUCHI, Yasuomi)
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授
研究者番号 : 40436978

(2)研究分担者

植木 孝俊 (UEKI, Takatoshi)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 60317328

(3)連携研究者

なし