

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500385

研究課題名(和文) 嗅球の神経回路新生を支える血管 - 神経相互作用の解析

研究課題名(英文) Characterization of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb

## 研究代表者

高橋 弘雄 (Takahashi, Hiroo)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20390685

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)：匂いの情報処理を行う嗅球の介在ニューロンは、成体の脳内でも新生することが知られる。新たに生まれたニューロンが、生涯を通じて組み込まれることにより、嗅球の神経回路は維持されている。本研究は、周囲の血管や他の介在ニューロンとの関係に着目し、神経回路再編を支える新生介在ニューロンの移動制御メカニズムを解析した。その結果、新生介在ニューロンの嗅球内での移動の足場や、目的地の決定には、周囲の血管や他の介在ニューロンとの相互作用が重要な役割を果たすことが明らかとなった。新生介在ニューロン同士の相互作用において、Epシグナルの関与を見出した。

研究成果の概要(英文)：Olfactory bulb (OB) interneurons, such as periglomerular cells and granule cells, are generated in the subventricular zone of lateral ventricle and integrated into the pre-existing neural circuit throughout the life. However, it remains unknown how the interneurons migrate and are integrated into the pre-existing neural circuit within the OB.

To study the migration process of interneurons in the OB, we performed the time-lapse imaging of slice cultures. Although it was previously reported that blood vessels act as a scaffold for the interneurons, we found that some interneurons moved along blood vessels, but others utilized another interneuron as a scaffold to migrate radially within the OB. These results suggest that cell-cell interactions between interneurons play an important role of the neuronal migration in the OB.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅球 新生ニューロン

## 1. 研究開始当初の背景

匂いの情報処理を行う嗅球の介在ニューロンは、神経細胞としては例外的に成体の脳内でも新生する。新たに生まれたニューロンが、生涯を通じて嗅球の神経回路へと組み込まれ、失われたニューロンを補うことで、嗅球の神経回路は維持されている (*Nat. Neurosci.*, 10, 1153, 2008)。脳室周囲で生まれた嗅球の介在ニューロンは、RMS (rostral migratory stream) と呼ばれるルートを通り、嗅球へと移動する (図1)。RMS 内では、周囲のアストロサイトや血管が、介在ニューロンの移動をサポートすることが報告されている (*Neuron* 67, 213, 2010; *J. Comp. Neurol.* 516, 94, 2009)。嗅球に到達すると、介在ニューロン (顆粒細胞・傍系球細胞) は移動の方向を変え、細胞ごとに異なる場所の神経回路へと組み込まれる (図1)。

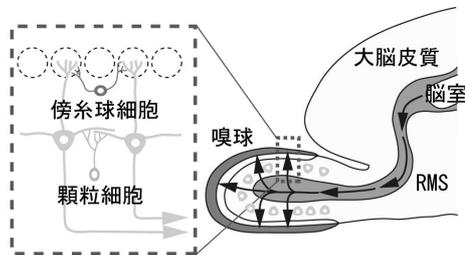


図1 嗅球介在ニューロン (顆粒・傍系球細胞) は胎生期だけでなく、成体の脳室周辺でも産生され、嗅球の神経回路に組み込まれる。

興味深いことに、マウスの脳梗塞モデルを用いた実験では、脳室周囲で生まれた新生ニューロンが、本来の目的地の嗅球ではなく、梗塞に伴う損傷部位へと血管に沿って移動することが澤本らにより報告されている (*Stem Cells*, 28, 545, 2010)。しかしながら、このような損傷部位への新生ニューロンの移動は限定的であり、神経回路に取り込まれて機能するまでに至る神経細胞の数も多くはないため、残念ながら脳機能の回復には不十分である。生涯を通じて神経回路の再編成が起こる嗅球には、細胞が失われた際に、的確に新生ニューロンを取り込んで神経回路を維持するための特別な仕組みが備わっていると予想される。嗅球の神経回路再編メカニズムを研究することは、再生医療への応用に繋がることも期待され、近年大きな注目を集めている。

## 2. 研究の目的

本研究は、嗅球のニューロンと血管との関係に注目し、成体の脳内でも神経回路の再編成が起こる嗅球の“場のメカニズム”の解明を目的として行った。

これまでに申請者らは、嗅球の発達・維持に、血管と神経との相互作用が重要な役割を果たすことを示す複数の知見を得ている。そこで本研究は、移動中の新生介在ニューロンと、周囲の血管や他の介在ニューロンとの関係に着目し、神経回路再編の基盤となる介在ニューロンの移動制御メカニズムを解析した。

## 3. 研究の方法

嗅球内での新生介在ニューロンの移動過程を調べるため、エレクトロポレーション法により、新生ニューロンを蛍光ラベルして、嗅球スライス培養によるタイムラプスイメージングを行った。また、新生介在ニューロンの移動を制御する遺伝子の候補として、Eph レセプターファミリーに着目し、*in vivo* エレクトロポレーション法による過剰発現を行った場合の影響を検討した。

## 4. 研究成果

嗅球スライス培養において、タイムラプスイメージングを行った結果、介在ニューロンには、嗅球内の血管に沿って移動する細胞と、血管から離れて移動する細胞という2つのタイプが存在することを見出した (図2)。嗅球の凍結切片で抗体染色を行い、移動中の形態を示す介在ニューロンを観察したところ、血管についた介在ニューロンに加えて、介在ニューロン同士が互いに結合し合っている様子が観察された (図3)。この結果から、移動中の新生介在ニューロンにとって、周囲の血管や、他の介在ニューロンが、移動の足場として重要な役割を果たすことが示唆された。そこで、新生介在ニューロンにおいて、細胞移動の制御に関わることが知られる Eph レセプターの発現を検討した。

興味深いことに、嗅球の内側で移動を止めるタイプの介在ニューロンは EphA4 を発現するが、嗅球外側まで移動するニューロンは EphA4 を発現していないことが明らかとなった (図4)。*in vivo* エレクトロポレーション法により新生介在ニューロンに EphA4 を過剰発現すると、新生ニューロンの移動が乱れ、嗅球外側 (糸球層) まで移動する細胞の数は有意に減少した (図4)。一方、リガンドの ephrinA2 は、嗅球のほぼすべてのニューロンが発現している。これらの結果から、EphA4 を持たないタイプの新生介在ニューロンは、周囲のニューロンが出す ephrinA2 の反発性シグナルを受けない為、他の新生ニューロンとの相互作用により、嗅球外側まで移動するというモデルが想定される (図4)。

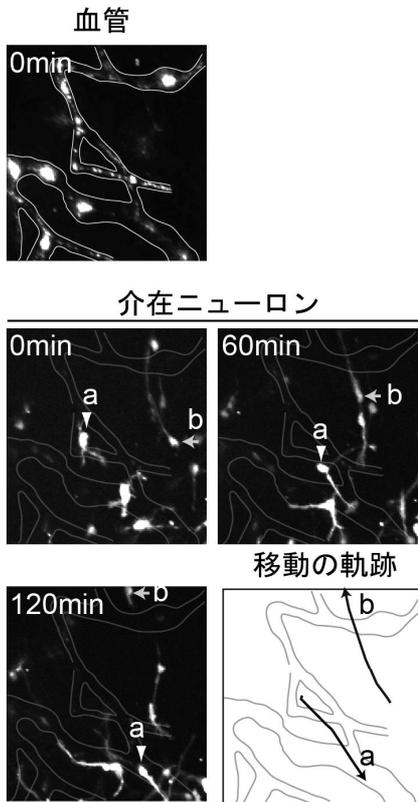


図2 嗅球スライス培養による血管と介在ニューロンのイメージング 新生介在ニューロンは嗅球内を様々な方向へと移動する。複数の神経突起を伸ばしながら血管に沿って移動するニューロン(a: 矢頭)と、血管から離れて移動するニューロン(b: 矢印)が見られる。

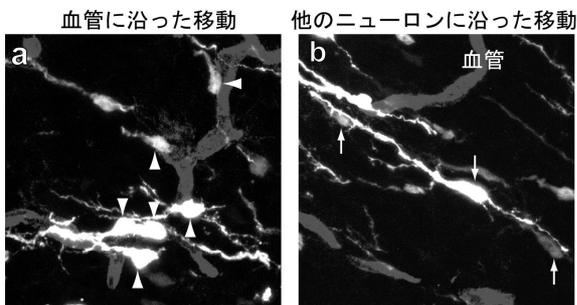


図3 血管に沿って移動する新生介在ニューロン(a: 矢頭)と、他のニューロンに沿って移動する介在ニューロン(b: 矢印)。血管は薄いグレーで表している。

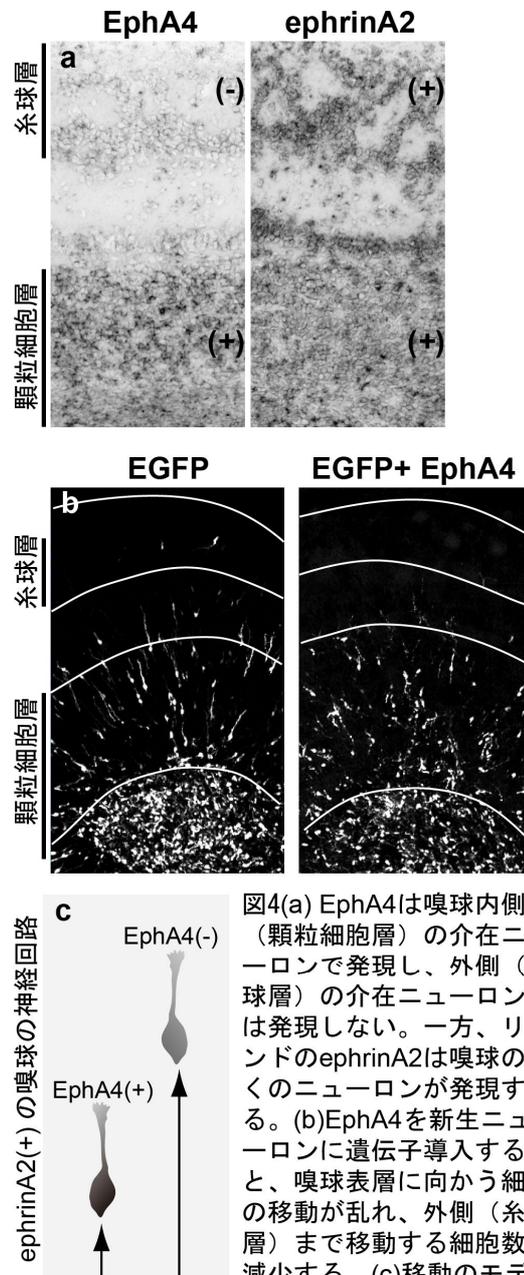


図4(a) EphA4は嗅球内側（顆粒細胞層）の介在ニューロンで発現し、外側（糸球層）の介在ニューロンでは発現しない。一方、リガンドのephrinA2は嗅球の多くのニューロンが発現する。(b) EphA4を新生ニューロンに遺伝子導入すると、嗅球表層に向かう細胞の移動が乱れ、外側（糸球層）まで移動する細胞数が減少する。(c) 移動のモデル EphA4を発現しない新生ニューロンは、周囲の場からのephrinA2による影響を受けないため、嗅球外側の層まで移動する。

以上の研究により、新生介在ニューロンの嗅球内での移動の足場や、目的地の決定には、周囲の血管や他の介在ニューロンとの相互作用が重要な役割を果たすことが明らかとなった。このような新生ニューロンの移動を制御するメカニズムは、適切に神経回路を再編するための基盤となっていると考えられる。嗅球で観察された新生ニューロンの移動を制御するメカニズムが、成体ではニューロン新生の起こらない大脳皮質などの他の脳領域でも働き得るのか？という点は、再生医療への応用を想定した場合に生じる大きな疑問点である。今後、嗅球において、新生ニューロンの移動メカニズムの研究を推進す

ることにより、他の脳領域との相違点や、再生治療のためのヒントとなる知見が得られるものとする。

#### 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 2件)

Takahashi H, Yoshihara S, Asahina R, Tamada Y, and Tsuboi A: Characterization of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb using postnatal electroporation. *Electroporation Methods in Neuroscience*, 査読有, Vol.102, pp.93-103, 2015.  
[http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-2459-2\\_7#page-1](http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-2459-2_7#page-1)

Yoshihara S\*, Takahashi H\*, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Kitsuki M, Tatsumi K, Furukawa-Hibi Y, Hirai H, Nagai T, Yamada K, and Tsuboi A (\* These authors contributed equally to this work): Npas4 regulates Mdm2 and thus Dcx in experience-dependent olfactory bulb interneuron dendritic spine development. *Cell Reports*, 査読有, Vol.8, pp.843-857, 2014.  
doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.056.

[学会発表](計 3件)

高橋弘雄 他、Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons、The 12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception、2014年11月3日、九州大学

高橋弘雄 他、Time-lapse imaging of neuronal migration in the mouse olfactory bulb、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド

高橋弘雄 他、Time-lapse imaging of neuronal migration in the mouse olfactory bulb、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡国際会議場

-----  
[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

<http://www.naramed-u.ac.jp/~amrc-lab1/tsuboi%20Lab3.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 弘雄 (TAKAHASHI HIROO)

研究者番号: 20390685

(2)研究分担者

吉原 誠一 (YOSHIHARA SEI-ICHI)

研究者番号: 90360669

(3)連携研究者 なし