

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430041

研究課題名(和文) 海馬顆粒細胞前駆細胞の胎生型から生後型ニューロン新生への転換機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of embryonic-to-adult transition in neural progenitors of the hippocampal granule cells

研究代表者

石 龍徳 (Seki, Tatsunori)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：20175417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳の大部分では、成体になるとニューロンは新生されないが、海馬では成体になってもニューロンの新生が続いている。この成体ニューロン新生という現象は、傷害された脳組織も再生できるという希望を抱かせる。このいつまでも続くニューロン産生を解明するために、胎生期～生後の海馬ニューロン新生の移行期について研究した。我々は胎生期と生後初期で神経前駆細胞の性質が異なることを見出した。その上、ニューロン新生部位周囲の細胞が重要な働きをすることを明らかにした。これらの結果は、海馬の継続的なニューロン新生には、神経前駆細胞の性質の変化や周囲の細胞から分泌されるシグナル分子が関係していることを示している。

研究成果の概要(英文)：In the hippocampus, neurons continue to be generated even in adults. The phenomenon of adult neurogenesis raises hopes of regenerating injured brain tissue. In order to understand the persistent neuronal production, we investigate the embryonic-to-postnatal transition of neurogenesis in the hippocampus. We found that the property of neural progenitors is different between embryonic and early postnatal stages. Postnatal and adult progenitors express two stem cell-related proteins, GFAP and BLBP, but embryonic ones express GFAP only. Furthermore, cells surrounding the neurogenic region play an important role in the neurogenesis. They secrete a morphogen, CXCL12, while progenitors have the receptor, CXCR4. The inhibition of the signaling affects differentiation and migration of progenitors. These results suggest that the persistent neurogenesis is involved in alteration of the property of progenitors and a signal molecule secreted by supporting cells around the neurogenic region.

研究分野：神経発生学

キーワード：海馬 神経幹細胞 成体脳ニューロン新生 ニューロン分化 移動 シグナル分子

1. 研究開始当初の背景

ニューロンの新生は、脳の大部分では胎生期～生後初期に起こり、成体では起こらない。しかし、海馬歯状回の顆粒細胞層の内側では、成体になっても例外的にニューロンの新生が続いている。成体海馬のニューロン新生は、1960年代に Altman によって発見されたが、その後無視されてしまった。我々は、1990年代初めに、神経接着分子 (NCAM) の糖鎖ポリシアル酸 (PSA) が、成体海馬の歯状回で新生するニューロン (顆粒細胞) の特異的なマーカーになることを発見し、以後 20 年以上、成体脳のニューロン新生機構を詳細に解析してきた。その間、成体脳のニューロン新生は、記憶・学習機構、てんかん、脳虚血、精神神経疾患、再生医療など様々な分野で注目されはじめ、現在世界中で活発に研究が進められている。また、成体海馬歯状回でニューロンを新生する神経幹細胞は、ニューロンを生み出すにもかかわらず、グリア線維性酸性タンパク (GFAP) や脳脂肪結合タンパク (BLBP) を発現することが明らかになっている。このことから、我々はここ 10 年ほど、GFAP-GFP トランスジェニックマウスを用いて海馬のニューロン新生の研究を行っている。生後初期の GFAP-GFP トランスジェニックマウスの海馬の切片培養を行い、タイムラプス観察をした研究では、生後初期でも GFAP 陽性神経幹細胞からニューロンが産生されていることを証明した。その後、「成体海馬のニューロン新生機構を真に理解するためには、胎生期～成体期までのニューロンの連続性を考える必要がある」との考えから、胎生期の GFAP 発現細胞の起源を調べたところ、GFAP 発現神経幹細胞/前駆細胞は、海馬采背側の部位から発生し、歯状回に移動していることが明らかになった。また、海馬の顆粒細胞の神経幹細胞/前駆細胞は BLBP 陰性であり、BLBP 陽性の脳新皮質の神経幹細胞/前駆細胞とは性質が異なることも明らかになった。

2. 研究の目的

現在、成体海馬のニューロン新生は、再生医療、記憶・学習機構、精神疾患など様々な分野で注目され、精力的に研究されている。しかし、成体海馬のニューロン新生機構を真に理解するためには、胎生期のニューロン新生が、脳の大部分では生後に終わるにもかかわらず、海馬ではどのようにして生後～成体期まで継続されるのかといった問題を解決することが重要である。本研究では、海馬のニューロン新生の連続性に着目し、胎生型から生後型へのニューロン新生様式を解析し、その転換機構を探ることを目的としている。このメカニズムが解明できれば、脳の任意の部位にニューロンを新生させることも可能になり、再生医学の研究に大いに貢献することが期待される。

3. 研究の方法

1) 各種分子マーカーにより胎生期と生後の神経前駆細胞に発現する分子の違いを解析した。

海馬歯状回の顆粒細胞前駆細胞は、GFAP を発現するが、BLBP を発現しない。しかし、成体の顆粒細胞前駆細胞は、GFAP と BLBP の両方を発現する。そこで、GFAP-GFP マウスを用い、成体型の GFAP+/BLBP+神経前駆細胞が出現する時期を検討した。E17, P0, P1, P6, P14 の GFAP-GFP マウスの脳を 4% パラフォルムアルデヒドで固定した。PBS で洗浄後、10-20%蔗糖含有 PBS に浸漬し、OCT コンパウンドで凍結包埋した。クリオスタットで 20 μ m の切片を作成後、抗 GFP、抗 BLBP で染色した。

2) 神経幹細胞の起源を知るために BLBP-CreER マウスを使って BLBP 陽性細胞の発生運命を追跡した。

BLBP 陽性細胞の発生運命を知るために、BLBP-CreERT2 マウス (理化学研究所の細谷俊彦先生より入手) と Ai9 レポーターマウスを掛け合わせ、胎生 16-18 日目にタモキシフェンを投与し、生後 2-3 週目の BLBP 陽性細胞を解析した。生後の BLBP 陽性細胞が、神経幹細胞の特徴である放射状の突起をもち、Sox2, nestin, GFAP などを発現しているかどうかを検討した。

3) 海馬歯状回の顆粒細胞層の形成に重要な分子を探索する目的で、DNA マイクロアレイにより、胎生 18 日目のマウスの脳新皮質と海馬で発現している分子を比較した。

妊娠 18 日目のマウスから、胎仔を取り出し、脳を摘出する。その後、新皮質と海馬を切り取り、ドライアイスで凍結する。そのサンプルを共同研究者の昭和大学・解剖の塩田清二先生に送り DNA マイクロアレイによる解析を依頼した。興味のある分子については Allen Brain Atlas で mRNA の発現を調べ、顆粒細胞層の形成に重要な分子かどうかを判断する。

4) DNA マイクロアレイによって、海馬では、CXCL12/CXCR4 が新皮質より多く発現していることが明らかになったので、海馬発生過程における CXCR4 分子の発現と機能を調べた。CXCR4 の発現は抗 CXCR4 抗体を用いた免疫組織化学によって調べた。CXCR4 の機能は、CXCL12 のアンタゴニストである AMD3100 を脳室内に投与することによって調べた。

4. 研究成果

1) 胎生期～生後における GFAP 発現神経前駆細胞の性質を調べる目的で、E17, P0, P1, P6, P14, P60 (2M) の GFAP-GFP マウスの海馬における BLBP の発現を調

べた。

その結果、GFAP-GFP 陽性細胞は生後に BLBP 陽性となり、急速にその割合を増加させていることが明らかになった (図 1)。

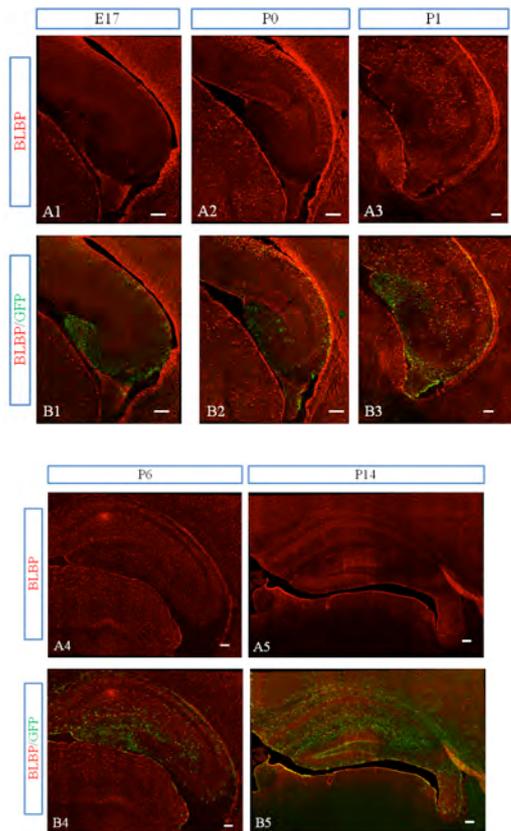


図 1 E17~P14 GFAP-GFP マウスにおける GFP (緑) と BLBP (赤) の発現。

P6 では歯状回門と顆粒細胞層に GFAP-GFP 陽性細胞が分布している。この両者において BLBP 陽性細胞が見られた (図 2)。顆粒細胞層に存在する GFAP-GFP+/BLBP+細胞では、放射状の突起をもつ細胞もみられた。

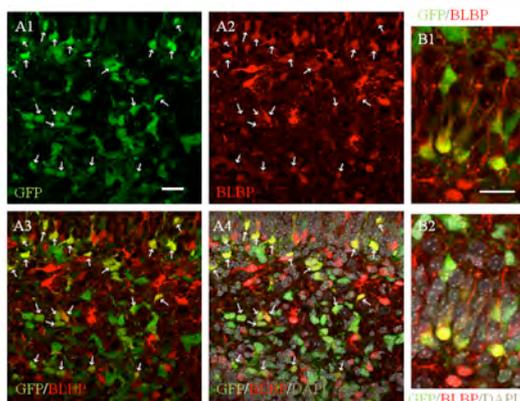


図 2 P6 GFAP-GFP マウスにおける GFP (緑) と BLBP (赤) の発現。顆粒細胞層と歯状回門が示されている (A1-4)。灰色は DAPI による核染色。黄色の細胞は GFAP-GFP と BLBP を共

発現している細胞である。B1, B2 では顆粒細胞層の拡大像が示されている。

P14 では GFAP-GFP 陽性細胞は主に、顆粒細胞層内側の顆粒細胞層下帯に分布していた。顆粒細胞層に存在する放射状型の細胞は P6 よりも多いように見えた。

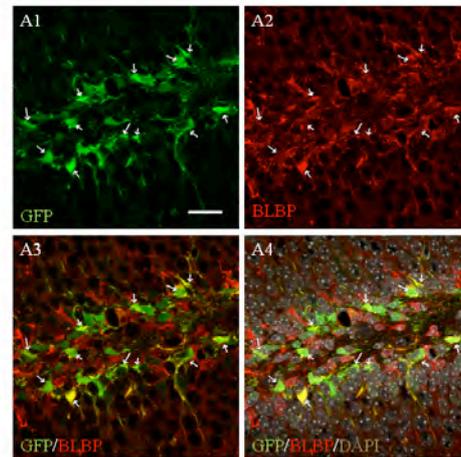


図 3 P14 GFAP-GFP マウスにおける GFP (緑) と BLBP (赤) の発現。顆粒細胞層と歯状回門が示されている。灰色は DAPI による核染色。黄色の細胞は GFAP-GFP と BLBP を共発現している細胞である。

GFAP-GFP 陽性細胞中の BLBP 陽性細胞の割合を定量した結果、生後になって急速に GFAP-GFP+/BLBP+細胞が増えていることが明らかになった (図 4)。GFAP と BLBP は成体の神経幹細胞/前駆細胞に発現している分子である。従って、海馬顆粒細胞の神経幹細胞/前駆細胞は、生後に胎生型から成体型へ急速に変化すると考えられる。

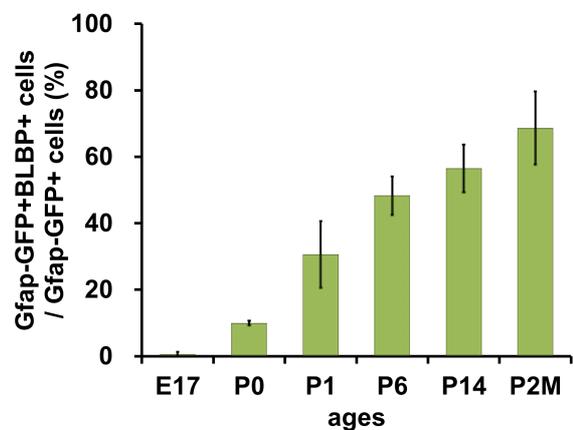


図 4 GFAP-GFP マウスにおける GFAP-GFP 陽性細胞の中の BLBP 陽性細胞の割合。

2) BLBP 陽性細胞の発生運命を知るために、

BLBP-CreERT2 マウスと Ai9 レポーターマウスを掛け合わせ、胎生 16-18 日目にタモキシフェンを投与し、生後 2-3 週目の BLBP 陽性細胞を解析した。その結果、BLBP-CreERT2 マウスのプロモーターが正しく働いていないことが判明した。そのため BLBP 発現細胞の発生運命を追跡できなかつた。このことから、現在、BLBP-CreERT2 による発生運命追跡実験を中止している。これに変わる実験として、現在 GFAP-CreERT2 マウスを作製中である。また、トランスポゾンプラスミド (pT2L-CAG-mCherry:pCAGGsTp) を使って、増殖性の神経前駆細胞を追跡する実験を開始した。このプラスミドでは分裂を続ける細胞の発生運命を追跡できる。これに対し pCAGGs-BFP プラスミドを用いた標識では、増殖性の高いものは標識が消えてしまう。このことから、増殖性活性の高い前駆細胞と増殖活性の低い前駆細胞を区別できる。このシステムを用いて、胎生期と生後の神経幹細胞/前駆細胞の性質を調べている。

3) DNA マイクロアレイを用いて、E18 マウス胎仔における大脳新皮質と海馬の発現分子を比較した。この実験結果から、CXCR4 に着目した。海馬の CXCR4 の発現は、大脳新皮質よりも、3-5 倍多かった。また、Allen Brain Atlas において、CXCR4 の mRNA 発現部位を調べたところ、胎生期において、海馬の顆粒細胞前駆細胞が出現する部位、および移動する部位で強い発現が見られた。また、そのリガンドである CXCL12 分子の mRNA 発現分布を調べたところ、顆粒細胞前駆細胞の移動先である海馬溝や歯状回の髄膜に強い発現が見られることが明らかになった。このことから、CXCR4 は、顆粒細胞前駆細胞の産生や移動に関与する可能性があるかと判断し、CXCR4 に着目して研究を進めることにした。

4) DNA マイクロアレイによって、海馬では、CXCL12/CXCR4 が新皮質より多く発現していることが明らかになったので、海馬発生過程における CXCR4 分子の発現と機能を調べた。免疫組織化学によって海馬における CXCR4 の発現を調べたところ、移動開始地点の脳室層では、細胞質全体に分散して発現していたが、移動中およびその終着点である海馬歯状回では、細胞質で凝集し点状の発現が見られた。免疫系の細胞では、CXCR4 は CXCL12 シグナルによって細胞内に取り込まれ、凝集することが知られているので、この顆粒細胞の前駆細胞においても、CXCR4 が細胞内に取り込まれ、凝集している可能性がある。

また、CXCL12 のアンタゴニストである AMD3100 を胎仔脳室内に投与したところ、GFAP-GFP 発現神経前駆細胞が、海馬溝の外側に異所性に多数存在していた。このこと

から、CXCL12/CXCR4 シグナルは、GFAP 発現神経前駆細胞の移動に関与することが考えられる。また、そのシグナルの作用には、CXCR4 分子の細胞内凝集が関与する可能性があると思われる。

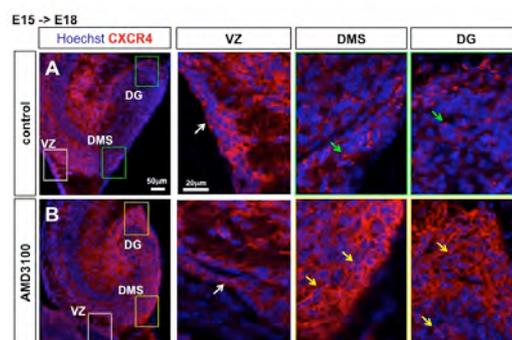


図5 対照群マウス (A) と AMD3100 投与群マウス (B) における CXCR4 の発現。VZ, 脳室層、DMS, dentate migratory stream、DG, 歯状回。

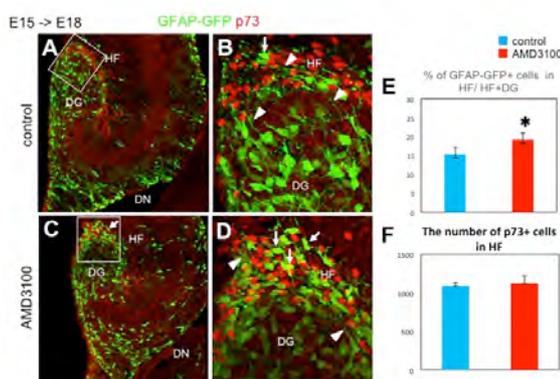


図6 GFAP-GFP マウスに AMD3100 を投与した。対照群マウス (A, B) と AMD3100 投与群における P73 (赤) と GFAP-GFP (緑)

以上の結果から、海馬歯状回の顆粒細胞層を形成する神経幹細胞/神経前駆細胞は、胎生期には GFAP 陽性だが、生後になると GFAP/BLBP 陽性となり、その性質を変え、そして、神経前駆細胞の移動には CXCL12/CXCR4 シグナルが関与することが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Yamaguchi M, Seki T, Imayoshi I, Tamamaki N, Hayashi Y, Tatebayashi Y, Hitoshi S (2015) Neural stem cells and

neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. *J Physiol Sci*. 2015 Nov 17. [Epub ahead of print] (査読有) DOI: 10.1007/s12576-015-0421-4

(2) Seki T, Sato T, Toda K, Osumi N, Imura T, Shioda S (2014) A distinctive population of Gfap-expressing neural progenitors arising around the dentate notch migrate and form the granule cell layer in the developing hippocampus. *J Comp Neurol*, 522: 261-283. (査読有) DOI: 10.1002/cne.23460

(3) 石龍徳 (2013) 成体海馬におけるニューロン新生. *Clinical Neuroscience* 31: 1389-1391 (査読無) <http://www.chugaiigaku.jp/item/detail.php?id=1311>

(4) Shinohara H, Sakayori N, Takahashi M, Osumi N (2013) Ninein is essential for the maintenance of the cortical progenitor character by anchoring the centrosome to microtubules. *Biol Open*. 2: 739-749 (査読有) DOI: 10.1242/bio.20135231

[学会発表] (計 19 件)

(1) Gonda Y, Seki T, Hanashima C: Regulation of apical dendritic patterning of upper-layers neurons in the neocortex. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグパレットふくしま (福島)、講演プログラム・抄録集 p138(30amG-9), 2016. 3. 30

(2) 篠原広志, 塩田清二, 石龍徳: 細胞移動を基軸とする海馬歯状回形成のメカニズム探索. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグパレットふくしま (福島)、講演プログラム・抄録集 p153(1P-87), 2016. 3. 28

(3) 柏木太二, 塩田清二, 石龍徳: 胎生期海馬歯状回形成過程における BMP シグナルの役割. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグパレットふくしま (福島)、講演プログラム・抄録集 p153(AP-88), 2016. 3. 28

(4) Kashiwagi T, Shioda S, Seki T: BMP signaling induce Gfap-expressing NSCs which restrictedly exist in the developing hippocampus. 第 38 回日本神経科学大会、神戸コンベンションセンター (神戸)、プログラム p148 (1P015), 2015. 7. 28

(5) Shinohara H, Shioda S, Seki T: Cell-tracing analysis for progenitor cell migration in the embryonic dentate gyrus. 第 38 回日本神経科学大会、神戸コンベンションセンター (神戸)、プログラム p149 (1P022), 2015. 7. 28

(6) Seki T: From embryonic to adult neurogenesis in the hippocampus. The 120th Annual meeting of the Japanese association of anatomists, Kobe

Convention Center (Kobe), *J Physiol Sci* 35 Suppl 1, S91, 2015. 3. 29

(7) Shinohara H, Shioda S, Seki T: Cell-tracing analysis for progenitor cell migration in the embryonic dentate gyrus. The 120th Annual meeting of the Japanese association of anatomists, Kobe Convention Center (Kobe), *J Physiol Sci* 35 Suppl 1, S179, 2015. 3. 29

(8) Kashiwagi T, Shioda S, Seki T: The role of BMP in the process of the developing dentate gyrus. The 120th Annual meeting of the Japanese association of anatomists, Kobe Convention Center (Kobe), *J Physiol Sci* 35 Suppl 1, S179, 2015. 3. 27

(9) Uemori T, Toda K, Seki T: Selective vulnerability and dispersion of dentate granule cells and their progenitors in pilocarpine-induced status epilepticus rat model. The 37th Annual meeting of the Japan neuroscience society, Pacifico yokohama (Yokohama), Program, p177 (P3-089), 2014. 9. 13

(10) Seki T, Minakawa S, Sato T, Toda K, Iwamuro S, Shioda S: The property of dentate granule cell progenitors is altered immediately after birth. The 37th Annual meeting of the Japan neuroscience society, Pacifico yokohama (Yokohama), Program, p109 (P1-077), 2014. 9. 11

(11) Shinohara H, Sato T, Toda K, Shioda S, Seki T: Cell-tracing analysis for progenitor cell migration in the embryonic dentate gyrus. The 37th Annual meeting of the Japan neuroscience society, Pacifico yokohama (Yokohama), Program, p109 (P1-087), 2014. 9. 11

(12) Kashiwagi T, Shioda S, Seki T: BMP signaling propel production of Gfap-expressing NSCs existed in developing hippocampus. The 37th Annual meeting of the Japan neuroscience society, Pacifico yokohama (Yokohama), Program, p109 (P1-076), 2014. 9. 11

(13) 石龍徳, 皆川史織, 佐藤亨, 戸田景子, 上森健至, 岩室祥一, 塩田清二: 海馬の顆粒細胞の神経幹細胞/前駆細胞は出生直後に性質を変化させる. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、自治医科大学 (栃木)、講演プログラム・抄録集 p164, 2014. 3. 27.

(14) 柏木太二, 塩田清二, 石龍徳: 海馬型神経幹細胞は BMP シグナルによって誘導される. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、自治医科大学 (栃木)、講演プログラム・抄録集 p96, 2014. 3. 27

(15) 篠原広志, 佐藤亨, 戸田景子, 塩田清二, 石龍徳: 細胞移動を基軸とする海馬歯状回形成のメカニズム探索. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、自治医科大学 (栃木)、講演プログラム・抄録集 p165,

2014. 3. 29

- (16) 石龍徳: 大脳皮質と海馬の神経発生は驚くほど異なっている. 日本解剖学会関東支部第 101 回学術集会, 昭和大学 (東京) プログラム・抄録集 特別講演 p15, 2013. 11. 30
- (17) 石龍徳, 皆川史織, 佐藤亨, 戸田景子, 岩室祥一, 塩田清二: 歯状回の顆粒細胞を産生する Gfap 発現神経前駆細胞の性質は周生期に変化する. 第 36 回日本神経科学大会、京都国際会議場 (京都)、プログラム p174 (P1-1-57), 2013. 6. 20
- (18) 柏木太一, 塩田清二, 石龍徳: BMP シグナルは胎生期海馬に存在する GFAP を発現する神経幹細胞の産生に重要である. 第 36 回日本神経科学大会、京都国際会議場 (京都)、プログラム p208 (P1-2-41), 2013. 6. 20
- (19) 篠原広志, 佐藤亨, 戸田景子, 塩田清二, 石龍徳: 胎生期海馬神経前駆細胞の移動解析. 第 36 回日本神経科学大会、京都国際会議場 (京都)、プログラム p208 (P2-2-57), 2013. 6. 21

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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.tokyo-med.ac.jp/Histology-Neuroanatomy/Histology-Neuroanatomy/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石 龍徳 (SEKI TATSUNORI)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20175417

(2) 研究分担者

柏木太一 (Kashiwagi Taichi)

東京医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10398232

篠原広志 (Shinohara Hiroshi)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10455793