

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05570

研究課題名(和文)ニューロン新生による嗅覚神経回路可塑性の制御機構の解明

研究課題名(英文)Adult-born neurons facilitate olfactory bulb pattern separation during task engagement

研究代表者

今吉 格 (Imayoshi, Itaru)

京都大学・生命科学研究科・特定准教授

研究者番号：60543296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス成体脳におけるニューロン新生の機能的意義を、神経回路レベルで明らかにするために、二光子顕微鏡を用いた覚醒マウスのカルシウムイメージング法により、嗅球のニューロン新生を解析した。新生ニューロンを除去したマウスを用いて、嗅球の主要な出力ニューロンであるMitral cell(僧帽細胞)の可塑的变化について解析を行った。ニューロン新生除去マウスで障害が見られている、匂いと報酬の関連学習課題遂行時における、Mitral cell集団の神経活動パターンの推移を、野生型マウスとニューロン新生除去マウスで比較することで、新生ニューロンがどのように嗅球神経回路の可塑性に貢献しているか明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The rodent olfactory bulb incorporates thousands of newly generated inhibitory neurons daily throughout adulthood. Here we adopted a genetic method to inducibly suppress adult neurogenesis and investigated its effect on behavior and bulbar activity. Mice without young adult-born neurons (ABNs) showed normal ability in discriminating very different odors but were impaired in fine discrimination. Furthermore, two-photon calcium imaging of mitral cells (MCs) revealed that the ensemble odor representations of similar odors were more ambiguous in the ablation animals. This increased ambiguity was primarily due to a decrease in MC suppressive responses. Intriguingly, these deficits in MC encoding were only observed during task engagement but not passive exposure. Our results indicate that young olfactory ABNs are essential for the enhancement of MC pattern separation in a task engagement-dependent manner, potentially functioning as a gateway for top-down modulation.

研究分野：神経科学

キーワード：ニューロン新生 神経幹細胞 嗅球

1. 研究開始当初の背景

従来、ニューロンの産生は胎児発生期においてしか行われないと考えられていたが、ヒトを含めた哺乳類の生後脳・成体脳においても神経幹細胞が存在し、側脳室周囲の脳室下帯や海馬・歯状回といった特定の領域では、ニューロンの新生が継続していることが解ってきた。新たに産出される多くの新生ニューロンは嗅球や海馬の既存の神経回路に組み込まれるが、このようなニューロン新生が個体にとってどのような生理的意義を持っているのかはほとんど明らかになっていない。ヒトの成体脳におけるニューロン新生の様式については、他の種と異なるようであるが、様々な哺乳類動物の脳において、ニューロン新生が起きていることが確認されている。本研究課題では、生後脳・成体脳において、活発にニューロン新生が起きている、げっ歯類マウスをモデル動物として使用して研究を行った。

我々の研究グループはこれまで、ニューロン新生を遺伝的に操作できる遺伝子改変マウスを作成し、ニューロン新生の機能的意義の一端を明らかにしてきた。例えば、海馬のニューロン新生は、空間記憶の長期維持に必要なことや、嗅球のニューロン新生は、先天的忌避臭への応答行動などに関与している事を示してきた。しかし、これらはニューロン新生の機能的意義の一部を明らかにしたに過ぎないと考えられた。また、ニューロン新生は神経回路の可塑的变化に対して、どのような機能を担っているのかは、不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究課題では、遺伝子改変マウス技術を用いて新生ニューロンを特異的に除去し、成体脳ニューロン新生が、脳神経回路の形成・修飾や維持に果たす役割を解明する事を目標としている。特に、新生ニューロンがどのような作用機序で嗅球の神経回路に影響を与えるのかに着目している。哺乳類の脳神経系は、様々なレベルの可塑的变化発揮する機構が存在していることが知られている。その中でも、脳神経回路の素子であるニューロンを置き換える、もしくは、追加するという現象は、脳がもつ可塑的变化を実現する上で、非常に重要なメカニズムのひとつであることが予想される。しかしながら、そのような神経回路が劇的に変化するメカニズムを内包した際にも、神経回路や脳機能ネットワークがどのように一貫性をもって作動するのかは未知の課題であり、検証が必要であると考えられた。また、健常な脳の状態では、ニューロンが入れ換わる、もしくは、追加されるという現象の意義とメカニズムを研究することは、将来的な細胞移植や内性神経幹細胞活性化を利用した、再生医学・再生医療実現のための、基盤的知識の充実につながる

ことが期待される。

3. 研究の方法

実験動物はマウスを用いた。ニューロン新生の研究を実施するためには、既存の脳を構成する細胞には影響がなく、新生ニューロンだけが選択的に除去されたマウスを準備する必要がある。成体脳ニューロン新生を特異的に阻害するモデルマウスとして、GFAP-TK トランスジェニックマウスを用いた。このマウスでは、GFAP 陽性細胞において、HSV-TK 遺伝子を発現している。このマウスにガンシクロビルを投与すると、GFAP 陽性細胞のうち、細胞増殖をおこなっている細胞集団においてのみ細胞死を誘導することができる。成体脳においては、神経幹細胞において GFAP を発現していることが知られている。従って、GFAP-TK トランスジェニックマウスにガンシクロビルを投与することで、活発に細胞分裂をおこなっている神経幹細胞集団に特異的に細胞死を誘導することが可能であり、ニューロン新生を除去することが可能である。組織学的解析をおこない、ガンシクロビルを投与した GFAP-TK トランスジェニックマウスでは新生ニューロンの除去の効率は非常によく、ほぼすべての新生ニューロンを成体脳から除去できていることが確認された。

また、ニューロン新生を除去したマウスとコントロールマウスにおいて、嗅球に Ca²⁺ indicator である GCaMP6f を発現する AAV ウイルスを感染させ、Mitral cell (僧帽細胞) の神経活動を可視化した。匂い分別課題を実施しているマウスの、Mitral cell の神経活動のライブイメージングを実施した。数週間にわたる匂い分別課題遂行中の Mitral cell の神経活動の可塑的变化を解析した。上記の実験を、ニューロン新生を除去したマウスとコントロールマウスにおいて実施することで、ニューロン新生が学習にともなって変化する嗅覚神経回路の可塑的变化にあたる影響を解析した。

4. 研究成果

成体脳におけるニューロン新生の破綻は、様々な脳機能に影響を及ぼすことが報告されている。米国カルフォルニア大学サンディエゴ校の小宮山尚樹博士の研究グループと共同研究として、嗅球のニューロン新生は、嗅覚関連学習の成立に必要な嗅球神経回路の可塑的变化にとって必須の役割を担っていることを明らかにした。

実験マウスが、わずかな匂い物質の構成比を嗅ぎ分け、報酬との関連学習をおこなう認知課題を遂行している過程において、嗅球神経回路の可塑的变化を 2 光子顕微鏡システムを用いて数週間にわたって観察した。新生ニューロンを脳内から除去したマウスでは、嗅覚関連学習と課題遂行中の嗅球神経回路

の可塑的变化に異常がみられた。具体的には、正常マウスでは、嗅覚関連学習の進行とともに、嗅球の主要な投射ニューロンである Mitral cell の発火抑制としての可塑的变化が観察される、しかしながら、新生ニューロン除去マウスでは、嗅覚関連学習に異常が認められるとともに、このような嗅球神経回路の可塑的变化も減少していることが明らかになった。興味深いことに、報酬との関連学習は実施せず、受動的に匂い物質を暴露した場合には、正常マウスと新生ニューロン除去マウスでは、僧帽細胞の発火の可塑的变化に違いは見られなかったことから、匂い物質と報酬等の価値の連合を嗅覚神経回路に付与する過程に、新生ニューロンは貢献していると考えられた。

また、興味深いことに、海馬の生後ニューロン新生を阻害したマウスでは、上記のようなわずかな匂い物質の構成比を嗅ぎ分け、報酬との関連学習をおこなう認知課題への影響は観察されなかった。海馬・歯状回の新生ニューロンはグルタミン酸トランスポーターである VGLUT1 を発現するグルタミン酸作動性ニューロンである。VGLUT1 の遺伝子座から、Cre による組み換え依存的に、シナプス放出を阻害するテタヌス毒素 (TeNT) が発現するようなノックインマウスを作製した。これらのマウスと mGFAP-Cre マウスとのダブル Tg マウスを作製する事で、海馬・歯状回の新生ニューロンを選択的に阻害する事が可能になる。なぜなら、生後脳・成体脳での嗅球の新生ニューロンは GABA 作動性であり、VGLUT1 を発現していないからである。また、mGFAP-Cre マウスは胎児期の神経幹細胞では組換えを誘導せず、生後脳の神経幹細胞から組換えを誘導できることが知られている。このような実験結果から、GFAP-TK トランスジェニックマウスで見られた嗅覚実験課題への影響は、海馬のニューロン新生の阻害の結果ではなく、嗅球のニューロン新生の阻害が主たる要因であると結論した。我々の研究グループは、嗅球での生後脳ニューロン新生が、柔軟な嗅覚と報酬との関連学習に積極的に関与することを示しており、今回の研究成果は、生体脳ニューロン新生も嗅覚学習に重要な役割を担っていることを示し、かつ、その背景にある神経基盤を明らかにしたものと考えられる。

嗅球でのニューロン新生、柔軟な嗅覚関連行動、メスマウスの子育て行動、空間記憶の形成や忘却など、様々な脳機能に成体脳ニューロン新生が関与することが報告されており、ニューロン新生は、脳機能の恒常性の維持に重要な役割を担っていると考えられる。また、ニューロン新生は生後発達期においても、嗅球と海馬において活発に続いている。特に海馬のニューロン新生は、動物個体周囲の環境によって大きく変動することが知られており、生後の脳の発達に様々な影響を与える可能性がある。例えば、実験マウスにお

いては、同じ遺伝的バックグラウンドを持った同腹の個体間においても、行動パターンに様々な個体差が存在する。これらの個体差や個性を創発するメカニズムのひとつの要因として、生後発達期のニューロン新生が関与している可能性があり、今後の詳細な解析が期待される。

また、海馬の生後ニューロン新生の破綻が精神疾患や発達障害の病態に関与している可能性がある事も示唆されており、今後は、ニューロン新生の発達障害や神経回路可塑性との関与について、神経回路レベルでのより詳細な理解に繋がりたいと考えている。

生後脳・成体脳におけるニューロン新生の破綻は、様々な脳機能に影響を及ぼすことが報告されている。実験マウスが、わずかな匂い物質の構成比を嗅ぎ分け、報酬との関連学習をおこなう認知課題を遂行している過程において、嗅球神経回路の可塑的变化を2光子顕微鏡システムを用いて数週間にわたって観察することが可能である。新生ニューロンを脳内から除去したマウスでは、嗅覚関連学習と課題遂行中の嗅球神経回路の可塑的变化に異常がみられた。具体的には、正常マウスでは、嗅覚関連学習の進行とともに、嗅球の主要な投射ニューロンである僧帽細胞 (Mitral cell) の発火抑制としての可塑的变化が観察される、しかしながら、新生ニューロン除去マウスでは、嗅覚関連学習に異常が認められるとともに、このような嗅球神経回路の可塑的变化も減少していることが明らかになった。興味深いことに、報酬との関連学習は実施せず、受動的に匂い物質を暴露した場合には、正常マウスと新生ニューロン除去マウスでは、僧帽細胞の発火の可塑的变化に違いは見られなかったことから、匂い物質と報酬等の価値の連合を嗅覚神経回路に付与する過程に、新生ニューロンは貢献していると考えられた。このほかにも、柔軟な嗅覚関連行動、メスマウスの子育て行動、空間記憶の形成や忘却など、様々な脳機能に成体脳ニューロン新生が関与することが報告されており、ニューロン新生は、脳機能の恒常性の維持に重要な役割を担っていると考えられる。

また、ニューロン新生は生後発達期においても、嗅球と海馬において活発に続いている。特に海馬のニューロン新生は、動物個体周囲の環境によって大きく変動することが知られており、生後の脳の発達に様々な影響を与える可能性がある。例えば、実験マウスにおいては、同じ遺伝的バックグラウンドを持った同腹の個体間においても、行動パターンに様々な個体差が存在する。これらの個体差や個性を創発するメカニズムのひとつの要因として、生後発達期のニューロン新生が関与している可能性があり、今後の詳細な解析が期待される。さらには、生後脳・成体脳において神経幹細胞が長期的に維持され、ニューロン新生が担う生理的意義を明らかにする

ことで、脳神経系の再生医療実現につなげるための、基盤的知識の充実や新規治療戦略の開発につながる事が期待される。

近年、光作動性のイオンチャネルやイオントランスポーターを応用した神経活動の光操作の成功に続いて、様々な細胞機能や生体機能の光操作が可能になってきた。我々の研究グループでは、遺伝子発現の光制御システムの開発や、それらを用いた神経幹細胞の細胞増殖や細胞分化の光操作法の開発を進めている。今後も、光操作できる分子や細胞・生体機能の拡張は継続すると予想される。光を用いた人工的操作の利点は、高い時間分解能・空間分解能が担保できる点と、侵襲性の低さである。現状では、生体組織の応用には、光ファイバーの導入など侵襲的な操作が必要であるが、長波長光を用いたシステムやファイバーレスな光操作システムの新規開発も進んでいる。これらの技術開発が進むことで、脳神経系の発生・発達過程や、成体脳の神経回路の可塑性・恒常性維持の制御過程の研究など、脳神経科学研究のより多くの局面で光操作技術が適応されることが期待されている。このような技術開発が積極的に進められていることから、健常な脳の状態で起きているニューロン新生という現象を研究することで、脳神経系の再生医療実現のための先駆的知識の収集に貢献できると考えられる。

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 1 件)

Li Wankun L, Chu Monica W, Wu An, Suzuki Yusuke, Imayoshi Itaru, Komiyama Takaki. Adult-born neurons facilitate olfactory bulb pattern separation during task engagement. eLife e33006 (2018)

〔学会発表〕(計 3 件)

今吉 格 Regulatory mechanism of neural stem cells revealed by optical manipulation of gene expressions

ConBio2017 シンポジウム(招待講演) 発表年 2017 年~2018 年

今吉 格 Functional significance of neurogenesis in the postnatal and adult brain 第 40 回日本神経科学大会 シンポジウム(招待講演) 発表年 2017 年~2018 年

今吉 格 Neurogenesis in the postnatal and adult brain 第 40 回日本神経科学大会 ジョセフ・アルトマン記念発達神経科学賞受賞記念講演(招待講演) 発表年 2017 年~2018 年

〔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://imayoshi.web.fc2.com/Itaru_Imayoshi_Ph.D./Home.html

<https://brainnetworks.jimdofree.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

今吉 格 (IMAYOSHI, Itaru)

京都大学・生命科学研究科・特定准教授

研究者番号：60543296

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()