

令和元年6月21日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06726

研究課題名(和文)海馬のニューロン新生を制御する新たな分子メカニズム

研究課題名(英文) New molecular mechanisms regulating the adult hippocampal neurogenesis in mammal.

研究代表者

杉谷 善信 (Sugitani, Yoshinobu)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80360569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生後海馬におけるニューロン新生制御機構のメカニズムの解明を目的として、以下の3研究項目を実施した。1)胎生期～成体マウスの海馬歯状回におけるBrn因子の発現パターン解析：Brn因子は、海馬の神経幹細胞及び新生ニューロン特異的に発現していることを明らかにした。2)Brn欠損ホモマウス海馬歯状回の解析：ニューロン産生障害メカニズムを解明した。3)Brn conditional KOマウス作製：ノックアウトマウスの出生後の死亡を回避して成体海馬でのBrn因子の役割を解明すべく、Brn因子のconditional KOマウスを樹立し、成体海馬の神経幹細胞でのBrn因子のノックアウトを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成体における海馬のニューロン新生を制御メカニズムは、未だその全貌の多くは不明である。本研究ではこれまで海馬のニューロン新生に関与することが全く知られていないPOU転写因子(Brn転写因子)についての詳細な解析を行い、海馬のニューロン新生に必須な因子であることを明らかにした。本研究で得られた知見によって、現在進行中の解析結果と合わせて、成体における海馬のニューロン新生の分子メカニズムの理解が大きくすすむことが期待される。また海馬のニューロン新生異常は、記憶障害やうつ病等に関与することから、脳発達障害あるいは精神疾患の発症メカニズムの解明にも繋がる医学的にも重要な知見が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To unveil the new mechanisms how Brn factor govern the adult hippocampal neurogenesis, we first examined the expression patterns of Brn factor in hippocampus. The immunohistochemical analyses showed that Brn factor was expressed in adult neural stem cells (type cells), TA cells (type cells) and newborn neurons in hippocampus. We next assessed the role of Brn factor in hippocampal neurogenesis to analyze the hippocampal phenotypes of Brn K.O. mice that died within 36hrs after birth, and we revealed that Brn factor may govern the neurogenesis in neonatal hippocampus. To elucidate the functional role of Brn factor in adult hippocampal neurogenesis, we made Brn conditional K.O. mice with support of Comprehensive Brain Science Network. Using Nestin-CreERT2 mice, we performed Brn conditional K.O. in adult neural stem cell in hippocampus. Their phenotypes are currently under investigation.

研究分野：分子神経発生学

キーワード：POU転写因子 Brn転写因子 海馬 ニューロン新生 神経幹細胞 神経分化 ジーンターゲットング
コンディショナルジーンターゲットング

1. 研究開始当初の背景

成体脳においてニューロン新生がおきるのはごく一部の成体脳すなわち海馬と嗅球に限られており、それ以外の脳の大部分ではニューロンが再生されることはない。海馬は、主に錐体細胞層と顆粒細胞層からなり、唯一ニューロン新生が起こる顆粒細胞層内側の顆粒細胞下帯 (subgranular zone: SGZ) におけるニューロン新生の分子メカニズムの解明は脳の再生医療、記憶障害さらには精神疾患への応用等、その医学生理学的な重要性から世界中で注目されている。

近年の海外に置ける研究により、胎生期において様々なニューロンの分化に必須な働きを担う bHLH 転写因子 (Ngn2, Ascl1) が胎生期と成体の海馬ニューロンの申請にも重要な役割を果たしていることが示された (Roybon L. ら *ProsOne* 2009, Anderson J. ら *Neuron* 2014)。しかし、この成体海馬 SGZ におけるニューロン新生の研究の歴史は浅く、胎生期と成体におけるニューロン新生のメカニズムは同様なのか？それとも成体に特異的な制御機構が存在するのか？等その制御メカニズムについては不明な点が多い。

またそのニューロン新生の生理的意義については様々な議論があり、「新生ニューロンは新しい記憶の形成に重要である」とする報告が多数ある一方で、新生ニューロンにより既存の神経回路が再編されることからその神経回路に保存されていた記憶が消去される、すなわち「ニューロン新生はむしろ記憶の忘却に働く」と指摘する報告もある。加えて海馬の新生ニューロンは歯状回の顆粒細胞として機能するが、成体において外側顆粒細胞にまで成熟分化する新生ニューロンの数は少ないとして記憶形成における生理的重要性を疑問視する報告や、新生ニューロンと既存ニューロンには電気生理学的特性に違いがあり、それぞれが記憶において異なる役割 (新生：類似記憶の差別化、既存：記憶構成要素による全体早期) を果たしている等の報告があり、その結論は未だ出ていない。

一方、本研究代表者は Brn 転写因子の生体機能の研究に長年取り組んでおり、Brn 転写因子の一つが海馬の神経幹細胞で発現し、ノックアウトマウス (新生仔) の海馬においてニューロン新生に障害があることを発見した。

2. 研究の目的

本研究では、生後の海馬におけるニューロン新生に不可欠でありながらも、これまで人跡未踏であった Brn 因子による成体海馬におけるニューロン新生制御のメカニズムの解明を目的とした。これを実現するために新生児致死の表現型を回避して成体で Brn 因子をノックアウトできる成体神経幹細胞コンディショナルノックアウトマウスを樹立し、成体海馬のニューロン新生における Brn 因子の役割を分子レベルで解明するとともに、Brn 因子の欠損によって成体海馬のニューロン新生が損なわれるマウスの高次脳機能を解析することによって、記憶学習における海馬のニューロン新生の生理的意義ならびに精神疾患との関連性の解明を目指した。

3. 研究の方法

Brn 転写因子によるニューロン新生制御機構のメカニズムを解明し、さらにその制御機構を利用して成体海馬のニューロン新生の生理的意義を明らかにする目的達成のために以下の3項目を実施した。

1) 胎生期～成体マウスの海馬歯状回における Brn 因子の発現パターン解析：

Brn 因子に対する特異抗体および増殖、各種細胞マーカーを用いた蛍光多重染色により胎生期～成体マウスの海馬歯状回における Brn 因子の発現パターンを共焦点レーザー顕微鏡下で詳細に解析した。

2) Brn 因子ノックアウトマウス海馬歯状回の組織異常解析：

Brn 因子欠損ホモマウス海馬歯状回のニューロン産生障害が生じるメカニズムを細胞レベルで明らかにすべく、ホモマウスが死亡する生後2日までに組織学的解析を行った。また Brn 因子欠損ホモマウス海馬歯状回における既知のニューロン新生制御因子の発現解析を行った。

3) Brn 因子 conditional K0 マウスの作製と解析：

上述の知見をもとに、出生後の死亡を回避して成体海馬での Brn 因子の役割を解明すべく包括型脳科学研究支援を頂き、脳高次機能を調べるための行動解析に適した Genetic Background である B6N の ES 細胞を用いて conditional K0 マウスの作製を実施した。また作製した conditional allele について各種検証を行った後、成体海馬の神経幹細胞に発現する Nestin プロモーター下に CreERT2 を導入したトランスジェニックマウスを導入し、作製した Conditional K.O. マウスとの交配により成体海馬特異的な Brn 因子の Conditional K.O. マウスを樹立し、各種解析を行った。

4. 研究成果

1) 胎生期～成体マウスの海馬歯状回における Brn 因子の発現パターン解析：

各分化段階のマーカー(神経幹細胞(type cell)のマーカーとして Sox2 及び GFAP, 神経前駆細胞(type cell)マーカーとして Ngn2, Tbr2, 幼弱新生ニューロンマーカーとして Tbr1, Dcx, PSA-NCAM, 成熟新生ニューロンマーカーとして NeuN 等)との蛍光多重染色によって、Brn 転写因子は成体海馬において神経幹細胞(type cell)、神経前駆細胞(type cell)及び新生ニューロンの一部で発現しており、成体海馬のニューロン新生の初期段階を制御する因子である可能性が示めされた。

2) Brn 因子ノックアウトマウス海馬歯状回の解析：

生後 0-1 日目の Brn 因子欠損ホモマウスの海馬について組織学的解析を行った結果、海馬歯状回におけるニューロン新生の初期段階に異常を来していることが明らかとなった。またこの発生段階の各種制御因子の発現解析を行った結果、発現異常を示す遺伝子を複数同定することに成功した。

3) Brn 因子 conditional K0 マウスの作製と解析：

高次脳機能の解析を行うことを視野にいれ、行動解析に適した Black6/N より樹立された ES 細胞を用いて Brn 因子のコンディショナルノックアウトの樹立を試み、包括型脳科学研究支援のもと、新潟大学崎村研究室との共同研究によって期待通りの相同組換え ES 細胞が 5line 得られ、そのうち 2line からコンディショナルノックアウトマウスを樹立することに成功した。しかしながら、コンディショナルアレル(flox, neo+)をホモにもつ個体は新生児致死を回避し成体まで生存することは確認されたものの、いずれも同腹の野生型マウスに比べて身体が小さく、Weak allele である可能性が示唆された。そこで次に CAG-Flp トランスジェニックマウスを導入、交配し、Neo カセットの除去したコンディショナルアレル(flox, Neo-)をもつマウスを作製した。現在そのホモ接合体(flox, neo-/flox, neo-)について、コンディショナルノックアウトホモ接合体(flox, neo+/flox, neo+)および combined ホモ接合体(flox, neo+/-)で認められた体重の減少等の異常がないかの解析を行っている。また、Nestin-CreERT2 マウスとの交配することで、成体海馬の神経幹細胞において Brn 因子のコンディショナルノックアウトを行うことができるマウスの樹立に成功しており、現在、成体海馬のニューロン新生における Brn 因子の生体機能についての解析を進めている。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計6件)

Sugitani Y.

The temporal-codes of neural stem cells underlying the cell diversity and the tumorigenesis in mice. (招待講演)

第48回日本発生生物学会年会 シンポジウム(2015.6)(国際学会)

杉谷善信、杉谷-吉田玲子、中井茂康、伏島美汐、美野輪治、小川正晴、野田哲生
Brn 転写因子は異なる作用様式によって大脳新皮質の細胞多様性形成に機能する。
第10回神経発生討論会(2017.3)

杉谷善信

脳細胞の多様性形成と脳腫瘍発生における脳発生時計の分子機構 (招待講演)
順天堂大学細胞生物学セミナー(2017.3)

Sugitani Y., Sugitani-Yoshida R., Nakai S., Fusejima M, Minowa O, Ogawa M, Noda T.
Different functional mode of Brn factors in temporally coordinated production of
neocortical cell diversity.

第50回日本発生生物学会 (2017.5) (国際学会)

Nishikawa K., Kobayashi T., **Sugitani Y.**, Doan NM, Kitano T., Hino O.
Aberrant histone methylation and altered gene expression in Tsc2-deficient Eker rat ES
cell.

International TSC Research Conference (2018.9) (国際学会)

西川 桂子、小林 敏之、**杉谷 善信**、Nguyen MinhThien Doan、北野 隆之、樋野 興夫
Tsc2 欠損 Eker ラット ES 細胞にみられるヒストンのメチル化異常及び遺伝子発現異常
第41回日本分子生物学会年会(2018.12)

杉谷善信

ヒト脳発達障害原因遺伝子の変異と自閉症リスク環境因子によって誘発される脳発生異常に
関する研究 (優秀ポスター賞受賞)

2019年順天堂大学環境医学研究所プロジェクト研究報告会(2019.5)

[その他]

ホームページ等

順天堂大学大学院 分子病理病態学 (病理・腫瘍学講座)

https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/bunshi_byori/

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。