様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　５ 月 １７ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０４６６４

研究課題名（和文）成体新生ニューロンによる神経活動依存的な回路再編機構とその生理的意義の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying activity-dependent reorganization of neural circuits in the olfactory bulb on the basis of adult neurogenesis

研究代表者
坪井　昭夫（Tsuboi, Akio）

大阪大学・生命機能研究科・特任教授

研究者番号：２０１６３８６８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　12,900,000円

研究成果の概要（和文）：　申請者らはこれまでに、匂い情報を処理している嗅球介在ニューロン（傍糸球細胞と顆粒細胞）の中でも、顆粒細胞のサブタイプが発達する際に、１回膜貫通型糖蛋白質5T4を匂い刺激に応じて産生することにより、樹状突起の枝分れを促進して、匂いを感じる度合いを高めていることを明らかにした（J Neurosci 36, 8210, 2016）。そこで本研究では、5T4遺伝子を欠損した顆粒細胞のサブタイプでは、他の神経細胞と間のシナプス結合が減少しており、その結果、匂いの検出感度が100倍も低下し、２種類の全く異なる匂いを識別できないことを明らかにした（J Neurosci 36, 8210, 2016）。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　今後、5T4以外の顆粒細胞やその産生時期、及び、それが接続する投射ニューロンに関して研究する事により、多種類の顆粒細胞が存在する生理的な意義や、成体期でのニューロン新生の必要性が明らかになると期待される。
　匂いの検出や識別に必須の役割を果たす5T4顆粒細胞は、成体期ではあまり産生されず補填されにくいので、その機能不全が加齢や疾病に伴う嗅覚障害を引き起こす可能性も示唆される。今後、5T4顆粒細胞が匂いの検出や識別に果たす機能的な役割が更に解明されれば、「5T4顆粒細胞の機能を人為的に活性化する事で、嗅覚機能の低下を食い止め回復させる」という嗅覚障害に対する新規治療法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Sensory experience regulates development in a variety of species and in various structures, including the retina, hippocampus and olfactory bulb (OB). Within the mammalian OB, the development of dendrites in excitatory projection neurons such as mitral/tufted cells is well known to be odor experience-dependent. Odor experience is also involved in development of the other OB population, inhibitory interneurons, which are generated in the subventricular zone throughout life and differentiate into granule cells (GCs) and periglomerular cells. However, the roles that each type of interneurons play in the control of olfactory behaviors remain unknown. We found that a subtype of GCs expressing the oncofetal trophoblast glycoprotein 5T4 is required for odor detection and discrimination behaviors. Our results suggest that embryonic-born OB interneurons including 5T4-positive GCs play a crucial role in fundamental olfactory responses such as simple odor detection and discrimination behaviors.

研究分野：分子生物学、神経科学

キーワード：成体神経新生　嗅球介在ニューロン　嗅覚系　神経回路形成　神経活動依存性　神経可塑性　匂いの検出感度　匂いの識別

※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。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

嗅細胞で受容された匂いの情報は，まず嗅覚の一次中枢である嗅球に伝達･処理され，そののち嗅皮質に伝達･処理されることにより，匂いとして認識される。嗅球の神経回路においては，抑制性の介在ニューロン（顆粒細胞や傍糸球細胞）が，興奮性の投射ニューロン（外房飾細胞や僧帽細胞など）の活動を調節することにより，匂い情報の処理が行われている。嗅球介在ニューロンは，哺乳類では例外的に胎生期のみならず成体期においても，側脳室で常に新生されて，既存の神経回路に付け加えられるというユニークな特徴を持つことから，再生医療の分野からも注目されている。また，嗅球介在ニューロンの大多数をしめる顆粒細胞は，樹状突起の形態や産生されるタンパク質の相違などにより，複数のサブタイプに分類されることがわかっている[1]。しかしながら，嗅球で匂い情報を処理する際に，それぞれの顆粒細胞のサブタイプがどのような役割を果たしているのかについては，ほとんど明らかにされていなかった。そこで申請者らは，本研究において「匂いの検出と識別に関与する嗅球介在ニューロンのサブセット」を解析した。

２．研究の目的

5T4（Oncofetal glycoprotein 5T4，別名 Trophoblast glycoprotein: TPBG）は，N 末端に7つのロイシンリピートを持つ1回膜貫通型の糖タンパク質で，当初，胎盤の栄養芽細胞で同定されたが[2]，多くのがん細胞で発現していることが明らかにされた[3]。5T4 は細胞増殖の抑制や，細胞間接着を阻害することで，細胞の移動を促進する働きを持つことから[4,5]，がん細胞の増殖や転移に関わる分子として注目されている。また、正常な組織では，卵巣や脳での発現は報告されているものの[6]，正常組織での機能はほとんど明らかにされていなかった。興味深いことに，嗅球において *5T4* 遺伝子は特定の顆粒細胞サブタイプ（以下，5T4 顆粒細胞）で発現していることが報告された[7]。また，申請者らの研究により，通常の顆粒細胞と比較して，5T4 顆粒細胞は枝分かれがより多く、高度に発達した樹状突起を持つことが分かった[8]。更に，申請者らの gain-of-function 及び loss-of-function 実験により，5T4 が 5T4 顆粒細胞での樹状突起の枝分れの発達に，必要かつ十分な因子であることが明らかになった[8]。

３．研究の方法、及び、研究の成果

上述したように，申請者らは，5T4 タンパク質が顆粒細胞の中の特定のサブタイプ（5T4 顆粒細胞）において，匂い刺激に応じて産生されて，樹状突起の枝分かれを制御していることを見出した[8]。そこで申請者らは，5T4 顆粒細胞が，嗅球神経回路において匂い情報を処理する際に果たす役割を明らかにするため，その接続先である投射ニューロンについて検討した。嗅球における興奮性の投射ニューロンには，主として外房飾細胞と僧帽細胞が存在する。申請者らは嗅球スライスを用いて電気生理学的に解析することにより，外房飾細胞が，自発発火を盛んに起こす bursting タイプと，ほとんど起こさない non-bursting タイプに大別されることを見出した[9]。次に，5T4 顆粒細胞にチャネルロドプシンを発現させて光刺激で活性化し，接続先の投射ニューロンで生じる抑制性のシナプス後電流を記録した。その結果，5T4 顆粒細胞は，bursting と non-bursting タイプの外房飾細胞や僧帽細胞との間で，$GABA_A$（gamma-aminobutyric acid A）受容体を介した抑制性シナプスを形成していることがわかった[9]。そこで，5T4 顆粒細胞の樹状突起の枝分かれが減少している 5T4 欠損マウスから嗅球スライスを作製して，顆粒細胞の樹状突起を電気刺激で活性化し，投射ニューロンで生じる抑制性シナプス後電流の変化を測定した。興味深いことに，5T4 欠損マウスでは野生型と比べて，non-bursting タイプの外房飾細胞のみにおいて，顆粒細胞からの $GABA_A$ 受容体を介した抑制性の入力が顕著に減少していた。顆粒細胞は，樹状突起間シナプス（dendro-dendritic synapse）を介して投射ニューロンと接続しており，投射ニューロンから興奮性の入力を受けた顆粒細胞は，投射ニューロンへ抑制性の出力を返すことが知られている。そこで，投射ニューロンから 5T4 顆粒細胞への興奮性のシナプス後電流を測定したところ，5T4 欠損マウスでは野生型と比べて，5T4 顆粒細胞への興奮性の入力も顕著に減少していることがわかった。これらの結果から，5T4 欠損マウスでは，5T4 顆粒細胞の樹状突起の枝分かれが減少することに伴って，non-

bursting タイプの外房飾細胞との，樹状突起を介した神経接続も減少していることが明らかになった[9]（図1）。

次に，5T4 顆粒細胞が，嗅球神経回路で匂い情報を処理する際に果たす生理学的な役割を明らかにするため，5T4 欠損マウスを用いた嗅覚行動の実験を行った。匂い物質を 10 倍ずつ希釈してマウスに提示して，探索を行う匂いの検出感度を調べたところ，5T4 欠損マウスでは野生型と比較して，約 100 倍低下していることが明らかになった[9]（図1）。また，匂いの識別能について，2つの匂い分子 A と B に対する学習行動の実験を行った。匂い分子が単独で存在する場合には，野生型と 5T4 欠損マウスは共に，それぞれを識別できた。しかしながら，匂い分子が共存する場合には，野生型マウスは A と B を識別できたのに対して，5T4 欠損マウスはできなかった。そこで，匂いの識別能に関する別の実験を行った。床敷きの下にエサを埋めて，マウスがエサを見つけるまでの時間を測定したところ，通常の条件下では，野生型と 5T4 欠損マウスとの間で顕著な差は見られなかった。ところが，バックグラウウンドの匂いとして酢酸アミルが存在する条件で同様な実験を行うと，5T4 欠損マウスは野生型と比べて，エサを見つけるまでの時間が有意に長くなった。これらの結果から，他の匂いが高い濃度で存在する場合には，5T4 欠損マウスでは，目的の匂いを嗅ぎ分ける能力が低下していると考えられる[9]。

申請者らの研究より，5T4 顆粒細胞という嗅球介在ニューロンのサブタイプが，匂いの検出と識別に必須な役割を果たすことが明らかになった[9]（図1）。興味深いことに，成体のマウスで新生ニューロンの働きを促進した，及び，阻害した実験では，5T4 欠損マウスのように，匂いの検出感度や単純な識別能に異常が見られないので，成体期に新生されるニューロンは，より複雑な匂いの識別学習に必須であると報告されている[10)11]。また，成体期に新生される顆粒細胞は一般的に，嗅球における顆粒細胞層の中の深層に位置づけられるのに対して[11]，5T4 顆粒細胞は，主として胎生期や新生仔期に産生され，成体期には一部しか新生されないので，顆粒細胞層の表層や僧帽細胞層に局在していると考えられる[9]。これらの知見から，顆粒細胞はサブタイプによって，側脳室で生まれる時期（胎生期や成体期など）や生まれる場所（背腹側部や内外側部）が異なることで，嗅球において配置される層（顆粒細胞層の表層･深層や僧帽細胞層など）がおおまかに規定され[1]，その結果，接続先の投射ニューロン（外房飾細胞や僧帽細胞など）が異なり，匂いの情報処理において果たす役割も違ってくると推測される。注目すべきことに，5T4 顆粒細胞は bursting･

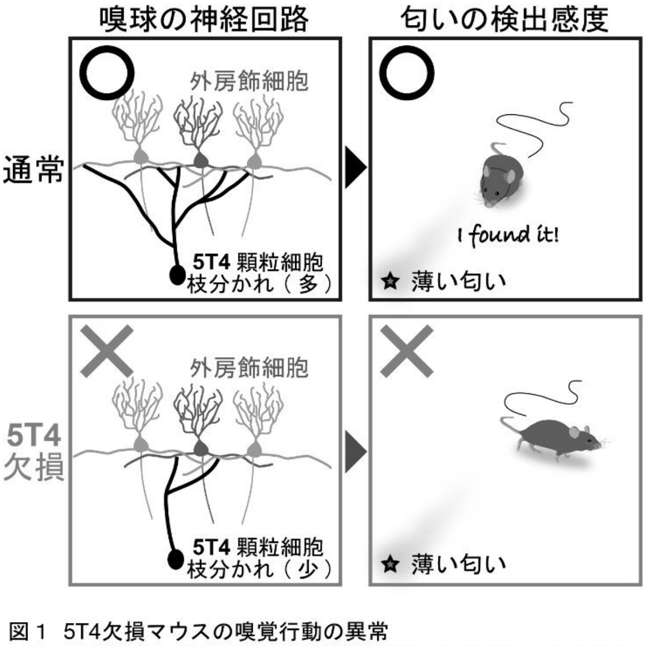

図１　5T4欠損マウスの嗅覚行動の異常
（左）5T4欠損マウスでは，5T4顆粒細胞の樹状突起の枝分かれが減るので，外房飾細胞との神経接続も減少する。
（右）5T4欠損マウスでは，5T4顆粒細胞から外房飾細胞への抑制性の入力が減少するので，匂いの検出感度も低下すると考えられる。

non-bursting タイプの外房飾細胞や僧帽細胞といった投射ニューロンと抑制性シナプスを形成しているが，5T4 欠損マウスでは，non-bursting タイプの外房飾細胞への入力にのみ影響が見られることから[9]，このニューロンの機能が匂いの検出と識別に重要であることが示唆される。今後，5T4 顆粒細胞の他のサブタイプについても同様な解析を行うことにより，嗅球介在ニューロンを介した匂い情報処理のメカニズムが更に明らかになると考えられる。

４．参考論文

1) Fuentealba, L.C. *et al*.: *Cell* 161, 1644–1655 (2015).
2) Hole, N. & Stern, P.L.: *Int J Cancer* 45, 179–184 (1990).
3) Southall, P.J. *et al*.: *Br J Cancer* 61, 89–95 (1990).
4) Carsberg, C.J. *et al*.: *Int J Cancer* 68, 84–92 (1996).
5) Carsberg, C.J. *et al*.: *J Cell Sci* 108, 2905–2916 (1995).
6) King, K.W. *et al*.: *Biochim Biophys Acta* 1445, 257–270 (1999).
7) Imamura, F. *et al*.: *J Comp Neurol* 495, 754–768 (2006).
8) Yoshihara, S. *et al*.: *J Neurosci* 32, 2217–2226 (2012).
9) Takahashi, H. *et al*.: *J Neurosci* 36, 8210–8227 (2016).
10) Alonso, M. *et al*.: *Nat Neurosci* 15, 897–904 (2012).
11) Sakamoto, M. *et al*.: *J Neurosci* 34, 5788–5799 (2014).

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計10件（うち査読付論文　10件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　5件）

1．著者名	4．巻
Takahashi Hiroo、Yoshihara Seiichi、Tsuboi Akio	11
2．論文標題	5．発行年
The Functional Role of Olfactory Bulb Granule Cell Subtypes Derived From Embryonic and Postnatal Neurogenesis	2018年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Frontiers in Molecular Neuroscience	-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.3389/fnmol.2018.00229	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	-

1．著者名	4．巻
Takahashi Hiroo、Tsuboi Akio	7
2．論文標題	5．発行年
Olfactory Habituation-dishabituation Test (Mouse)	2017年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
BIO-PROTOCOL	-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2154	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	-

1．著者名	4．巻
Takahashi Hiroo、Tsuboi Akio	7
2．論文標題	5．発行年
Olfactory Avoidance Test (Mouse)	2017年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
BIO-PROTOCOL	-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2153	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	-

1．著者名	4．巻
Takahashi H.、Ogawa Y.、Yoshihara S.-i.、Asahina R.、Kinoshita M.、Kitano T.、Kitsuki M.、Tatsumi K.、Okuda M.、Tatsumi K.、Wanaka A.、Hirai H.、Stern P. L.、Tsuboi A.	36
2．論文標題	5．発行年
A Subtype of Olfactory Bulb Interneurons Is Required for Odor Detection and Discrimination Behaviors	2016年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Journal of Neuroscience	8210～8227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2783-15.2016	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	該当する

1．著者名 Yoshihara Sei-ichi、Takahashi Hiroo、Tsuboi Akio	4．巻 9
2．論文標題 Molecular Mechanisms Regulating the Dendritic Development of Newborn Olfactory Bulb Interneurons in a Sensory Experience-Dependent Manner	5．発行年 2016年
3．雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Murai Aya、Iwata Ryo、Fujimoto Satoshi、Aihara Shuhei、Tsuboi Akio、Muroyama Yuko、Saito Tetsuichiro、Nishizaki Kazunori、Imai Takeshi	4．巻 3
2．論文標題 Distorted Coarse Axon Targeting and Reduced Dendrite Connectivity Underlie Dysosmia after Olfactory Axon Injury	5．発行年 2016年
3．雑誌名 eNeuro	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1523/ENEURO.0242-16.2016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Muroi Carl、Kashiwagi Yuto、Rokugawa Takemi、Tonomura Misato、Obata Atsushi、Nevzati Edin、Tsuboi Akio、Okuchi Kazuo、Mishima Kenichi、Abe Kohji、Fujioka Masayuki	4．巻 28
2．論文標題 Evaluation of a filament perforation model for mouse subarachnoid hemorrhage using 7.0 Tesla MRI	5．発行年 2016年
3．雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6．最初と最後の頁 141～147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.10.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1．著者名 Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itohara S, Kawasaki T, Tsuboi A, Matsumura H	4．巻 3
2．論文標題 Supersensitive odor discrimination is controlled in part by initial transient interactions between the most sensitive dorsal olfactory receptors and G-proteins	5．発行年 2016年
3．雑誌名 Receptors & Clinical Investigation	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14800/rci.1117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 吉原 誠一、坪井 昭夫	4．巻 88
2．論文標題 転写因子Npas4による神経活動依存的なシナプス形成の制御機構	5．発行年 2016年
3．雑誌名 生化学（日本生化学会誌）	6．最初と最後の頁 220-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 高橋 弘雄、坪井 昭夫	4．巻 17
2．論文標題 嗅球介在ニューロンのサブタイプが匂いの検出と識別という嗅覚行動に必須な役割を果たす	5．発行年 2016年
3．雑誌名 AROMA RESEARCH	6．最初と最後の頁 336-337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計15件（うち招待講演　3件／うち国際学会　7件）

1．発表者名 坪井 昭夫
2．発表標題 Neural activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal survival after ischemic stroke
3．学会等名 第15回成体脳ニューロン新生懇談会（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Takahashi H, Asahina R, Fujioka M, Tsuboi A
2．発表標題 Transcription factor Npas4 regulates neural function in the normal and disease brain
3．学会等名 第61回日本神経化学会大会（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Takahashi H, Asahina R, Fujioka M, Tsuboi A
2．発表標題 Neural activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal survival after ischemic stroke
3．学会等名 第41回日本神経科学会大会
4．発表年 2018年

1．発表者名 Tsuboi A, Asahina R, Fujioka M, Takahashi H
2．発表標題 Neural activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal survival after ischemic stroke
3．学会等名 Gordon Research Conference on Molecular and Cellular Neurobiology（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Tsuboi A, Asahina R, Fujioka M, Takahashi H
2．発表標題 Neural activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal survival after ischemic stroke
3．学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN 2018)（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Takahashi H, Asahina R, Yoshihara S and Tsuboi A
2．発表標題 Neural activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal survival after ischemic stroke
3．学会等名 Keystone Symposia: State of the Brain - Genetic Dissection of Brain Circuits and Behavior in Health and Disease（国際学会）
4．発表年 2018年

１．発表者名 Tsuboi A, Asahina R, Yoshihara S, Fujioka M and Takahashi H
２．発表標題 Neural activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal protection and survival after ischemic stroke
３．学会等名 Cortical Development Conference: Neural Stem Cells to Neural Circuits（国際学会）
４．発表年 2017年

１．発表者名 Takahashi H, Asahina R, Yoshihara S and Tsuboi A
２．発表標題 Neural activity-dependent transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke
３．学会等名 第40回日本分子生物学会大会
４．発表年 2017年

１．発表者名 Takahashi H, Asahina R, Yoshihara S, Fujioka M and Tsuboi A
２．発表標題 Neural activity-dependent transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke
３．学会等名 第40回日本神経科学会大会
４．発表年 2017年

１．発表者名 高橋 弘雄、高橋 佑佳、桐田 忠昭、坪井 昭夫
２．発表標題 Oncofetal trophoblast glycoprotein 5T4 is involved in the maintenance of mouse taste bud cells
３．学会等名 第51回日本味と匂学会大会
４．発表年 2017年

１．発表者名
Tsuboi A, Asahina R, Yoshihara S and Takahashi H

２．発表標題
Neural activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuroprotection and survival after ischemic stroke

３．学会等名
Cortical Development Conference 2017（国際学会）

４．発表年
2017年

１．発表者名
Takahashi H, Asahina R, Kitano T, Yoshihara S and Tsuboi A

２．発表標題
Neural activity-induced transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke

３．学会等名
Keystone Symposia: Neurogenesis during Development and in the Adult Brain（国際学会）

４．発表年
2017年

１．発表者名
Takahashi H, Yoshihara S, Ogawa Y, Asahina R, Kitano T and Tsuboi A

２．発表標題
A specific subtype of olfactory bulb interneurons is necessary for odor detection and odor-background segregation

３．学会等名
The 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT XVII)（国際学会）

４．発表年
2016年

１．発表者名
Takahashi H, Asahina R, Kitano T, Yoshihara S and Tsuboi A

２．発表標題
Neural activity-induced transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke

３．学会等名
第39回日本分子生物学会年会

４．発表年
2016年

１．発表者名 Takahashi H, Yoshihara S, Ogawa Y, Asahina R, Kitano T and Tsuboi A
２．発表標題 A specific subtype of newborn olfactory bulb interneurons is required for behaviors on odor detection and discrimination
３．学会等名 第39回日本神経科学会大会
４．発表年 2016年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

奈良県立医科大学 脳神経システム医科学HP
http://www.naramed-u.ac.jp/~amrc-lab1/

奈良県立医科大学 > 先端医学研究機構 > 脳神経システム医科学
http://www.naramed-u.ac.jp/university/subject_and_department_j/advanced_medical_research_center/noushinkei.html

お知らせ　「 においを感じる度合いを調節する神経メカニズムを世界で初めて解明！」
http://www.naramed-u.ac.jp/university/kanrenshisetsu/sangakukan/oshirase.html

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	高橋　弘雄 (Takahashi Hiroo) (20390685)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	
研究分担者	吉原　誠一 (Yoshihara Sei-ichi) (90360669)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	削除：平成30年2月7日