

令和元年6月18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18379

研究課題名(和文) 生体海馬新生ニューロンによる記憶情報処理とその加齢変容

研究課題名(英文) Age-related alterations of adult neurogenesis and its modulation by chondroitin sulfate

研究代表者

山田 純 (Yamada, Jun)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：70582708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：海馬の新生ニューロンは、記憶や認知、情動などの脳機能の制御に重要な役割を果たしている。また加齢に伴う新生ニューロンの減少は、高齢者の記憶低下や情動の変容に関わっていると考えられている。本研究では、加齢による新生ニューロンの減少に関わる因子の同定を試みた。その結果、細胞外基質であるコンドロイチン硫酸とCat-315糖鎖の関与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含めて、海馬では新しいニューロンが常に産生され、これらの新生ニューロンは記憶や情動に重要な役割を果たしている。また、加齢に伴う新生ニューロンの減少は、高齢者の認知機能の低下に関わると考えられている。本研究では、海馬のニューロン新生に重要な因子として、細胞外基質としての糖鎖の存在を同定し、そのメカニズムについて明らかにした。細胞外基質の生産を制御する物質は、認知機能の改善につながる可能性があることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Throughout life, production of new neurons continues in the hippocampus of mammals including humans. Adult-generated granule cells play an important role in regulation of hippocampus-dependent cognitive functions and emotional behavior. In this study, we found the age related molecular changes of chondroitin sulfate proteoglycan and Cat-315 epitope in the mouse hippocampus. Our observations provide a new insight into how to counteract age-related cognitive decline via enhancement of adult hippocampal neurogenesis.

研究分野：神経解剖学

キーワード：海馬 神経新生 コンドロイチン硫酸 加齢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海馬は大脳辺縁系に属しており、記憶や学習、情動などの高次脳機能の中核の一つである。これまでの研究によって、ヒトを含む哺乳類の海馬の歯状回では、成体においても持続的に神経細胞が産み出されることが報告されている (神経新生)。海馬における神経新生については、行動発現との関係で多くの注目を集めてきた。多くの論文によって、運動や刺激の豊かな成育環境によって成体マウスの海馬神経新生が増強されると、空間記憶が向上することが示されている (van Praag et al., *PNAS*, 1999)。また、薬剤や放射線照射によって神経新生を実験的に抑制すると、認知面に障害が出るということが報告されている。近年の研究では、光刺激によって新生ニューロンの活動を抑制すると、空間記憶の想起が障害されることも報告されている (Gu et al., *Nat Neurosci*, 2012)。さらに、加齢に伴う新生ニューロンの減少は、高齢者の記憶・学習の低下をきたす。このように、神経新生顆粒細胞が海馬の神経可塑性に関わり、記憶・学習などの行動とその加齢変容に重要な役割を果たすことは、数多く報告されている (Deng et al., *Nat Rev Neurosci*, 2010)。

糖鎖はタンパク質・核酸に次ぐ第三の生命鎖として知られ、多様な生命活動を制御している。癌や感染症などの分野においては、生化学的研究や構造解析によって成果が上がり、癌細胞の糖鎖を認識する腫瘍マーカーの普及やタミフルなどの医薬品開発といった産業的な応用も進んでいる。一方で、非常に多様な糖鎖構造と遺伝子に依存しない発現機構、複雑な脳構造のために、糖鎖による脳機能制御に関してはいまだ十分に分かっていない。これまでの研究によって、糖鎖を中心とした細胞外基質が神経可塑性を制御することがわかってきたが、糖鎖と神経新の関係についての詳細は不明であった。そこで本研究では、糖鎖や細胞外基質による神経新生の制御機構とその加齢変容を明らかにすることを目指すことにした。

2. 研究の目的

糖鎖や細胞外基質による神経新生の制御機構とその加齢変容を明らかにするために、具体的には以下の二点に焦点を当てて解析することにした。1. 加齢による糖鎖の動的変動を明らかにする。2. 糖鎖が加齢による新生の減少に関わっているかどうかを明らかにする。本研究の目的は、神経系の糖鎖が高次脳機能を制御するメカニズムの一端を明らかにし、その加齢変容の詳細を解析することで、細胞外基質をターゲットとした治療・診断・創薬の可能性を提示することである。また、細胞外基質の発現を抑制する化合物やペリニューロナルネットの分解を促進する化合物は、認知症などの治療において応用が期待されることとなる。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

C57BL/6J 系統の雄マウス (2 カ月齢または 12 カ月齢) を使用。全てのマウスは、深麻酔下に 4% パラホルムアルデヒドと 0.05% グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液を用いて灌流固定した。2 時間後に脳を取り出し、30% スクロースで置換した。OCT Compound で包埋後、ドライアイスで急速凍結し、 -80°C で保存した。その後、クライオスタットで $40\ \mu\text{m}$ 厚の切片を製作した。

(2) コンドロイチナーゼ ABC の投与

マウスを麻酔下に脳定位装置に固定し、コンドロイチナーゼ ABC (chABC, 30U/mL) 海馬 CA1 領域にガラス電極から注入した。

(3) 免疫組織化学

脳切片は 1% 牛血清アルブミンと 0.3% Triton、0.05% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液によってブロッキングを行った。その後、一次抗体・WFA レクチンに、蛍光色素標識二次抗体を組み合わせて免疫蛍光四重染色を行い、神経新生の評価を行った。

(4) オプティカルダイセクター解析

5 頭のマウスの海馬から 4 枚の切片をランダムに選択し、上記の免疫蛍光染色を行った。中等倍の対物レンズ ($\times 20$, NA 0.8) を装着したセクション顕微鏡 (Apotome.2, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて、海馬歯状回の光学切片の Z スタックを取り込んだ。画像解析アプリケーション ImageJ (NIMH, Bethesda, MD) とオリジナルのマクロプログラムを用いて、オプティカルダイセクター法により、ペリニューロナルネットを有するニューロン群や新生ニューロンの空間分布密度を求めた。各段階の細胞の空間分布密度 (Numerical density; ND) は以下の式で算出した。

$$\text{ND} = \Sigma Q^{-} / (h \times a(\text{fra}) / \text{SV})$$

ΣQ^{-} : ダイセクター法によってカウントされた細胞数

h: サンプルングに使用する切片内の領域。本研究では、切片作成時の物理的ダメージを考慮して $40\ \mu\text{m}$ 厚の切片の表面から $2\ \mu\text{m}$ までをサンプルングから除外し、内部の $36\ \mu\text{m}$ 厚だけを使用した。

a(fra): フレームカウンティング法によって算出される歯状回の面積

SV: 切片の縮小率 (0.65)

(5) ウェスタンブロット

組織を PBS で溶解し、電気泳動ゲルのウェルに $1\ \mu\text{g}$ のタンパク質を添加した。泳動後は PVDF 膜に転写を行い、ブロッキング後に抗体と反応させ、化学発光反応を行い、検出を行った。

(6) 新奇物体認識試験

マウスを馴化箱内に入れ、その中に置いた二個の同一物体を自由に探索させた。24 時間後、片方の物体を新奇の物体に変え、その探索時間を計測した。

(7) 統計解析と画像処理

統計解析には Origin8.5 (OriginLab, Northampton, MA) を使用した。 $p < 0.05$ の場合に有意とした。画像処理には Photoshop CS4 (Adobe Systems, Mountain View, CA) を使用した。

4. 研究成果

(1) Cat-315 糖鎖の加齢変容とメマンチンによる制御

ペリニューロナルネットは、細胞体や樹状突起近位部を取り囲む網目状の糖鎖構造である。ペリニューロナルネットはコンドロイチン硫酸プロテオグリカンや Cat-315 糖鎖から構成され、神経可塑性の制御やその加齢変化に関わっていると考えられる。はじめに、Cat-315 糖鎖に着目し、その加齢変容について解析した。ウエスタンブロットによりマウス海馬における Cat-315 糖鎖の発現変化を確認したところ、12 カ月齢の加齢マウスにおいて、Cat-315 糖鎖の上昇を認めた。免疫組織化学とオプティカルダイセクター解析を用いて、Cat-315 糖鎖陽性ニューロンの密度を計測したところ、加齢によって Cat-315 糖鎖陽性ニューロンの数の変動は見られなかったが、Cat-315 糖鎖陽性ペリニューロナルネットの蛍光強度の上昇が認められた。さらに、抗認知症薬として用いられているメマンチンをマウスに投与したところ、Cat-315 糖鎖の発現減少がみられた。さらに、メマンチンの投与によって、Cat-315 糖鎖によって包囲される GABA 終末やグルタミン酸作動性終末の減少が見られた。これらの結果は、糖鎖が加齢によって動的変動を生じていること、またメマンチンは細胞外基質の制御を介して抗認知症効果をもたらす可能性があることを示唆している (雑誌論文)。

(2) 細胞外基質による神経新生の制御とその加齢変容

細胞外基質の一つであるコンドロイチン硫酸は、脳内に広く分布する代表的な神経糖鎖である。続いて、コンドロイチン硫酸による神経新生の制御とその加齢変容を解析した。成獣マウスの海馬歯状回は、コンドロイチン硫酸と特異的に結合する WFA レクチンによって広範に染色されていた。WFA レクチンは、神経幹細胞や新生ニューロンの周囲を取り囲むように分布し、神経新生の細胞外微小環境を構成し、神経新生に関わる可能性が示唆された。そこで、コンドロイチン硫酸の分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC を海馬に注入し、神経新生に与える影響を免疫組織化学とオプティカルダイセクター解析で評価した。その結果、コンドロイチナーゼの投与により神経前駆細胞の分裂と新生ニューロンへの分化が抑制された。さらに、コンドロイチナーゼ ABC の投与は、マウスの新奇物体認識試験を指標とした記憶・学習行動の障害をきたした。一方で、加齢マウスにおいては、神経新生の減少を認めるとともに、新生ニューロンと神経幹細胞周囲のコンドロイチン硫酸の減少、記憶・学習行動の低下が見られたことから、コンドロイチン硫酸が、新生ニューロンの細胞外微小環境を構成する重要な因子であることが分かった。

また、海馬に注入したマウスを刺激の多い豊かな環境で飼育した場合、新生ニューロン周囲のコンドロイチン硫酸の増加と新生の増大が生じていた。一方で、コンドロイチナーゼ ABC を投与したマウスを豊かな環境下で飼育しても、神経新生の増加や新奇物体認識試験を指標とした学習の向上が見られなかった。さらに、コンドロイチン硫酸合成に関わる酵素である CSGalNacT1 欠損マウスは、新生ニューロンの減少を認めるとともに、同マウスを刺激の多い豊かな環境下で飼育しても、神経新生の増加がみられなかった。これらの結果は、コンドロイチン硫酸が海馬神経新生のニッチの役割を有し、生体海馬神経新生に関わる可能性を示唆している。以上の結果より、海馬新生ニューロンによる記憶情報処理とその加齢変容には、糖鎖の一つであるコンドロイチン硫酸が関与していることが明らかとなった (雑誌論文)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Jun Yamada, Satomi Nadanaka, Hiroshi Kitagawa, Kosei Takeuchi, Shozo Jinno (2018) Increased synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan promotes adult hippocampal neurogenesis in response to enriched environment. *Journal of Neuroscience*, 38, 8496-8513.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0632-18.2018.

Jun Yamada, Shozo Jinno (2017) Alterations in expression of Cat-315 epitope of perineuronal nets during normal ageing, and its modulation by an open-channel NMDA receptor blocker, memantine. *Journal of Comparative Neurology*, 525, 2035-2049

doi: 10.1002/cne.24198.

Jun Yamada, Shozo Jinno (2017) Molecular heterogeneity of aggrecan-based perineuronal nets around five subclasses of parvalbumin-expressing neurons in the mouse hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 525, 1234-1249.

doi: 10.1002/cne.24132.

Jun Yamada, Jun Hatabe, Kaori Tankyo, Shozo Jinno (2016) Cell type- and

region-specific enhancement of adult hippocampal neurogenesis by daidzein in middle-aged female mice. *Neuropharmacology*, 111, 92-106.

doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.036.

Jun Yamada, Shozo Jinno (2016) Aging of hippocampal neurogenesis and soy isoflavone. *Oncotarget*, 7(51):83835-83836.

doi: 10.18632/oncotarget.13534.

〔学会発表〕(計 10 件)

山田純、神野尚三、海馬のペリニューロナルネット様 PSA-NCAM は CCK ニューロン周囲に形成され、セロトニン伝達に関与する、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019 年

山田純、神野尚三、ケタミンの単回投与は腹側海馬における神経新生を促進する、第 74 回日本解剖学会九州支部学術集会、2018 年

Jun Yamada, Shozo Jinno, Short-term ketamine administration increases the adult neurogenesis in the ventral hippocampus of mouse models for depression, 第 41 回日本神経科学大会 (Neuro2018)、2018 年

山田純、吉田史章、神野尚三、腸内細菌叢の改変による成体海馬神経新生の制御、第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018 年

山田純、神野尚三、PSA-NCAM 付加 PNN はマウス海馬の CCK ニューロンにサブクラス選択的に形成され、抗うつ薬の作用機転に関与する、第 73 回日本解剖学会九州支部学術集会、2017 年

山田純、神野尚三、海馬神経新生ニッチとしてのコンドロイチン硫酸、第 39 回神経組織培養研究会、2017 年

Jun Yamada, Shozo Jinno, Role of perineuronal nets in the maturation of the septohippocampal pathway, 第 40 回日本神経科学大会、2017 年

山田純、今野幸太郎、渡辺雅彦、神野尚三、マウス海馬のコレシストキニン陽性 GABA ニューロンにおける PSA-NCAM 付加 PNN の選択的形成、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017 年

山田純、神野尚三、海馬新生ニッチとしてのコンドロイチン硫酸の可能性、第 72 回日本解剖学会九州支部学術集会、2016 年

Jun Yamada, Shozo Jinno, Alterations in aggrecan expression in the mouse hippocampus by aging and memantine, 第 39 回日本神経科学大会、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

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。