

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18983

研究課題名(和文) 成体期海馬神経幹細胞の起源探索および海馬歯状回顆粒細胞層形成メカニズムの解析

研究課題名(英文) Search for the origin of adult neural stem cell and analysis of granule cell layer formation in the dentate gyrus

研究代表者

篠原 広志 (Shinohara, Hiroshi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10455793

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)：海馬は記憶・学習に極めて重要な脳領域である。この海馬歯状回の顆粒細胞層下帯では、成体期までニューロンの新生が続く特徴がある。成体期神経幹細胞の起源、さらに顆粒細胞層の形成パターンについて明らかにするための解析を行った結果、発生初期に標識された細胞が顆粒細胞層下帯において神経幹細胞として存在することが認められた。また顆粒細胞層は発生初期では分子層側に分布することが明らかとなった。これらの結果から海馬歯状回に存在する神経幹細胞はより初期のステージで誕生しており、顆粒細胞層はoutside-inの形成パターンによることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬歯状回の成体期ニューロン新生を引き起こす神経幹細胞の起源および顆粒細胞の形成過程を明らかにすることは、研究が盛んな成体脳ニューロン新生の研究分野と胎生期のニューロン新生研究とを結び合わせることを可能とし、まさに『ゆりかごから墓場まで』の海馬形成の理解が深まり、新たな研究分野創成といった面でも非常に意義がある。

さらに本研究を通じた、他の脳領域と異なり海馬が成体までニューロン新生を継続できるメカニズムが解明は、成体ではニューロン新生が生じない他の神経領域において、ニューロン新生を意図的に生じさせることが可能となる。これを活用すれば、失われた中枢神経系を復活させる再生医療への発展にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：In general, neurogenesis occurs during embryonic and early postnatal stages, and ceases at adult stage. However, the dentate gyrus (DG) continues neurogenesis from embryonic to adult stages.

We focused on the origin of adult neural stem cells and the forming pattern of granule cell layer in the dentate gyrus. In the early stage, we found that adult neural stem cells born in dorsal dentate notch. Moreover, it is observed that granule cells are distributed at the molecular layer side.

These data indicate that dorsal origin adult neural stem cells born at the early stage and granule cell accumulate in an outside-in sequence.

研究分野：神経科学

キーワード：神経幹細胞 海馬 歯状回 顆粒細胞層 電気穿孔法 ニューロン新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海馬歯状回は成体期になっても神経幹細胞が顆粒細胞層下帯に存在し、顆粒細胞というニューロンの新生が生じるユニークな特徴をもち、記憶や学習に重要なことから最も研究されている脳領域である。しかし成体期でのニューロン新生を引き起こす神経幹細胞がいつ・どこから産生されるかは不明のままであった。成体期海馬ニューロン新生は、海馬腹側の Sonic Hedgehog に制御される神経幹細胞によって生み出されるとの報告(Li et al., Neuron 78, 658-672, 2013)があるのだが、不十分な知見であると考えられる。根拠としては、研究代表者らが既に明らかにしているように、海馬背側部の脳室から生まれるグリア繊維性酸性タンパク(Gfap)-GFP 陽性神経幹細胞が成体期に存在する歯状回の神経幹細胞や顆粒細胞を産生しているからである(Seki et al., 2014)。したがって成体期にニューロン新生を引き起こす神経幹細胞は、少なくとも海馬の腹側由来だけでなく、背側に由来するもの存在が強く示唆された。

本研究では様々な発生過程の背側の歯状回形成細胞を標識することによって、海馬歯状回の成体期神経幹細胞の存在が観察できると推測した。この手法によって成体期にニューロン新生を生じる神経幹細胞を胎生期～成体期を通じて連続的に追跡できるので、電気穿孔法による神経幹細胞の起源を解明検討の着想を得た。

また海馬歯状回は、顆粒細胞というニューロンが幾層に積み重なって形成されており、脳内の知覚情報を海馬が受け取る入口として機能している。大脳新皮質は6層構造をしており、いわゆる inside-out の形成パターンによって層形成が行われることが知られているが、顆粒細胞層の形成機序については不明のままであった。海馬に特徴的な成体期まで続くニューロン新生のメカニズムを理解するためにも、ニューロン新生が生じる場である顆粒細胞層の形成機構を解明することは肝要である。また脳が正常な機能を行うには、胎生期・生後初期にニューロンが適切に移動し、正しい位置へと配置されることが必要である。もしも正しい移動が行われないと異所的な顆粒細胞増加が生じ、統合失調症やてんかん発症に関与することがわかっている(Tomita et al., 2011; Koyama et al., 2012)。このことから脳疾患研究を語る上でも顆粒細胞層形成メカニズムの研究は重要である。顆粒細胞層の形成パターンは、例えば大脳新皮質同様の inside-out、あるいは逆の outside-in、それらのいずれとも異なるパターン等が予想される。様々な発生過程の海馬神経幹細胞を標識することによって、この顆粒細胞層の形成パターンを解明する着想を得た。

2. 研究の目的

研究代表者は子宮内電気穿孔法の装置に改良を加えることで、胎生期および新生仔の様々なステージの海馬歯状回原基の神経幹細胞を標識することを実現した。さらにスライス培養系でのタイムラプス観察との組み合わせによって、胎生期～成体期にかけて海馬神経幹細胞やニューロンの移動を連続的に観察することを初めて可能とした。

したがって上記手法によって、成体期ニューロン新生を産生する神経幹細胞あるいは顆粒細胞が誕生する時期を明らかにすることが可能となった。その結果、本研究では海馬歯状回の胎生期～成体期の連続的な神経幹細胞の産生および顆粒細胞層形成メカニズムの研究基盤の確立がなされた。また得られた結果は、これまで形成メカニズム研究が詳細に解析され続けている大脳新皮質や小脳などの他の脳研究領域の研究分野に対しても重要な情報を提供し得るものと考えられる。以上の研究計画は着想ならびにその遂行の両面で研究代表者にしかなし得ない非常に特色のある研究であると思われる。

具体的には、はじめに様々なステージの背側の海馬歯状回原基へ細胞標識を行い、生後の歯状回顆粒細胞層下帯において成体型神経幹細胞として維持される細胞が存在するか検討する。

さらに顆粒細胞へと分化した細胞が顆粒細胞層のいずれの領域へ分布しているかを検討する。

以上、研究代表者は標識細胞のその後の動態から神経幹細胞の産生および維持あるいは顆粒細胞分化について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

胎生 11.5～18.5 日目および生後 2 日目、4 日目のマウスに対して、青色蛍光タンパク質プラスミド(pCAGGS-BFP)およびトランスポゾンによりゲノムに組み込まれる赤色蛍光タンパク質プラスミド (Tol2-mCherry)を共に子宮内電気穿孔法によって導入し、P15でサンプリングする実験を試みた。ゲノムに組み込まれた mCherry は発現し続けるが、プラスミドとして核内に存在する BFP は細胞が速やかに分化したり、細胞分裂をあまり行わなかった場合は、そのシグナルが確認される。一方、盛んに細胞分裂を行った細胞では BFP シグナルは減退あるいは消失する。したがって本研究では、BFP のシグナル強度によって、細胞の分裂能を評価することができる。

得られた P15 試料の切片に対し、神経幹細胞のマーカーである GFAP, Sox2, BLBP 抗体や顆粒細胞のマーカーである Prox1 による免疫組織化学を行った。

また Tbr2 プロモーターの活性による顆粒細胞サブタイプ解析については、Tbr2 プロモーター下に Cre をつないだ pTbr2-Cre を pCAGGS-loxP-Stop-loxP-RFP とともに胎生 14.5～

16.5 日目に子宮内電気穿孔法を行い、数日後にサンプリングを行った。

4. 研究成果

歯状回の顆粒細胞層の層形成のパターンを観察するために、胎生 11.5 日目、12.5 日目、14.5 日目、16.5 日目、18.5 日目、生後 2 日目、4 日目に電気穿孔法を行い、生後 15 日目にサンプリングを行い Prox1 の免疫組織化学による観察を行った。取得画像の顆粒細胞層を 3 等分し、歯状回門側から分子層側までを Area 1, 2, 3 と区分した。その結果、胎生 11.5 日目から 16.5 日目に標識された顆粒細胞の約 6 割は Area 3 に分布しており、約 2 割が Area 1 に分布していた。一方、胎生 18.5 日目、生後 2 日目、4 日目に標識された顆粒細胞では、Area 3 には 2 割未満の分布を示すのに対して、Area 1 には 4 割以上の分布が認められた。

この結果は、顆粒細胞層は発生段階初期では外側(分子層側)を形成し、その後内側(歯状回門側)を形成していくという、outside-in の形成パターンによることを示唆している。

さらに顆粒細胞のサブタイプについての研究としては、大脳新皮質等の研究で、ニューロン前駆細胞に発現することが知られる転写因子 Tbr2 に注目した。その結果、顆粒細胞へと分化する細胞のなかに Tbr2 プロモーターが活性化する細胞と活性化しない細胞の存在が認められた。今後は、これらサブタイプが歯状回形成に構造的および機能的にどのように寄与しているのかについて迫りたい。

成体型神経幹細胞の産生時期は、胎生 12.5 日目、14.5 日目、16.5 日目、18.5 日目、生後 2 日目、4 日目に電気穿孔法を行い、生後 15 日目にサンプリングを行い、観察を試みた。その結果、胎生 12.5 日目および 14.5 日目に標識された細胞からは神経幹細胞の存在が顆粒細胞層下帯において確認された。一方、胎生 16.5 日目を以降に標識された細胞からは神経幹細胞は確認されなかった。

観察された成体型神経幹細胞は、いずれも BFP のシグナルが観察されなかったことから高分裂能の細胞である可能性が示唆された。

これらの結果は、海馬背側に由来する成体型神経幹細胞の存在を示唆しており、なおかつこの背側由来の神経幹細胞は、より発生初期に産生されることが明らかになった。さらに、これまでの成体型神経幹細胞は低分裂能の細胞から産生されるという知見とは異なった結果であることから、成体型神経幹細胞の形成機構に新たな問題を提起している。

今回の研究によって、海馬歯状回の成体型神経幹細胞は背側および腹側双方より産生されると考えられる。今後は両者の性質や機能の違いについて検証を行っていきたい。

以上の結果は、これまで解析が困難で知見が乏しかった海馬歯状回の形成機構に焦点を当てたものであり、今後、背側・腹側両方の性質上の違いなどを産み出す因子を明らかにすることが出来れば、神経発生および神経再生について更なる知見を得ることが出来ると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Natsu Sasaki-Takahashi, Hiroshi Shinohara, Seiji Shioda, Tatsunori Seki | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 The polarity and properties of radial glia-like neural stem cells are altered by seizures with status epilepticus: Study using an improved mouse pilocarpine model of epilepsy | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Hippocampus | 6. 最初と最後の頁 250-262 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/hipo.23153. Epub 2019 Sep 5. | 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 Takashi Namba, Hiroshi Shinohara, Tatsunori Seki | 4. 巻 1705 |
| 2. 論文標題 Non-radial tortuous migration with cell polarity alterations of newly generated granule neurons in the neonatal rat dentate gyrus | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Brain Structure and Function | 6. 最初と最後の頁 95-103 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s00429-019-01971-0 | 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 Takako Kikkawa, Cristine R. Casingal, Seung Hee Chun, Hiroshi Shinohara, Kotaro Hiraoka, Noriko Osumi | 4. 巻 1075 |
| 2. 論文標題 The role of Pax6 in brain development and its impact on pathogenesis of autism spectrum disorder | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Brain Research | 6. 最初と最後の頁 95-103 |
| 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.brainres.2018.02.041 | 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 篠原広志 | 4. 巻 55 |
| 2. 論文標題 1次繊毛形成の正常化はダウン症候群の治療標的に成り得るか？ | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 ファルマシア | 6. 最初と最後の頁 703 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.14894/faruawpsj.55.7_703 | 査読の有無 無 |
| 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 Yuka Mimura-Yamamoto, Hiroshi Shinohara, Taichi Kashiwagi, Toru Sato, Seiji Shioda, Tatsunori Seki | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Dynamics and function of CXCR4 in formation of the granule cell layer during hippocampal development | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 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) 10.1038/s41598-017-05738-7 | 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 - |

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 篠原広志、石龍徳 |
| 2. 発表標題 Tbr2依存/非依存性ニューロン解析から紐解く時空間的な海馬の形成メカニズム |
| 3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会(誌上開催) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 篠原広志、石龍徳 |
| 2. 発表標題 顆粒細胞形成におけるTbr2の機能および顆粒細胞サブタイプ解析 |
| 3. 学会等名 第16回 成体脳ニューロン新生懇談会・「個性」創発脳共催研究会in仙台2020 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 篠原広志、石龍徳 |
| 2. 発表標題 成体期海馬神経幹細胞の起源探索および海馬歯状回顆粒細胞層形成メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名 第42回 日本神経科学大会(新潟・朱鷺メッセ) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 篠原広志、石龍徳 |
| 2. 発表標題 海馬齒状回顆粒細胞層は背側と腹側の異なる2つの経路によって形成される |
| 3. 学会等名 第124回 日本解剖学会総会・全国学術集会（新潟・朱鷺メッセ） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 篠原広志、石龍徳 |
| 2. 発表標題 Gfap-GFPマウスを用いた発生過程における海馬齒状回形成細胞の移動解析 |
| 3. 学会等名 第41回 日本神経科学大会（神戸コンベンションセンター） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 篠原広志、石龍徳 |
| 2. 発表標題 海馬齒状回顆粒細胞形成の分子メカニズム解析 |
| 3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会（武蔵境） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 篠原広志 |
| 2. 発表標題 海馬齒状回をつくられ方：神経前駆細胞の発生過程に依存した移動パターン変化 |
| 3. 学会等名 第2回 春の神経発生研究会（東北大学） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 篠原広志、石龍徳 |
| 2. 発表標題 海馬顆粒細胞は発生時期に応じて異なる経路に依存したタイプの異なる細胞によって形成される |
| 3. 学会等名 第40回 日本神経科学大会（幕張メッセ） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 篠原広志、石龍徳 |
| 2. 発表標題 子宮内電気穿孔法による海馬歯状回メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名 第39回神経組織培養研究会・企業セミナー（名古屋） |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |