

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18300103  
 研究課題名（和文） 神経細胞の選択的除去法を用いた嗅球新生神経細胞による  
 神経回路再構成の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of reorganization of neuronal circuitry with  
 newly generated neurons in the olfactory bulb by selective ablation  
 of preexisting neurons  
 研究代表者  
 山口 正洋（YAMAGUCHI MASAHIRO）  
 東京大学・大学院医学系研究科・講師  
 研究者番号：60313102

## 研究成果の概要：

成体嗅球では新しい神経細胞が神経回路に組み込まれているが、これが既存の神経細胞にどの様に影響されるかは不明である。遺伝子操作マウスを用いて嗅球の既存の神経細胞のサブタイプ（mGluR2 陽性細胞）を選択的に除去したところ、新生 mGluR2 陽性顆粒細胞が優先的に組み込まれ、2 ヶ月後には mGluR2 陽性顆粒細胞がほぼ元通りに回復した。新生神経細胞は、不足した既存の神経細胞サブタイプを補って、神経回路を修復する能力を持つことが明らかとなった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経科学・再生医学・嗅球・神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路は一旦形成されても構造的に固定されたものではなく、状況に応じて可塑的变化を起こしうることが明らかとなってきた。

興味深いことに、成体脳においても嗅球や海馬歯状回では、新しく生まれた神経細胞が常に神経回路に組み込まれている。このことは、中枢神経系が既存の神経細胞の構造変化だけでなく、新しい神経細胞を受け入れて、神

経回路の再構成を行う能力をも有していることを示している。

成体脳の神経新生の特色は、すでに機能的な神経回路が形成されており、そこに更に新しい神経細胞が組み込まれるという点である。したがって、新生神経細胞の機能や組み込みのメカニズムを考える場合、既存の神経回路、神経細胞との関連を考えていく必要がある。しかしながら、新生神経細胞は、既存の神経細胞とどのような関係にあるのか、それは協力関係か、競争関係か、あるいはお互い無関係か、などの点については全く不明であった。

## 2. 研究の目的

嗅球で新生している神経細胞は、傍糸球細胞や顆粒細胞といった抑制性介在神経細胞である。マウスの場合、嗅球には数百万個の顆粒細胞が存在し、1日あたり約数万個の新生顆粒細胞が嗅球に入り、既存の神経回路に組み込まれている。つまり毎日1パーセント程度の顆粒細胞が新生していることになり、これは極めて高い割合と言える。

顆粒細胞は、均一な細胞集団ではなく、複数のサブタイプによって構成されている。それぞれのサブタイプの中で、既存の顆粒細胞と新生顆粒細胞がどのような比率をとっているかはよく分かっていない。我々は、この顆粒細胞サブタイプに着目し、新生顆粒細胞の組み込みがサブタイプごとの調節を受けており、顆粒細胞サブタイプごとに、既存の顆粒細胞と新生顆粒細胞の関連性が存在するのではないかと想定した。

この仮説を調べるため、既存の顆粒細胞のあるサブタイプを特異的に除去した場合に、新生顆粒細胞のサブタイプごとの組み込みがどのように影響されるかを検討すること

にした。新生顆粒細胞は、不足したサブタイプを特異的に補うことができるのか、それともサブタイプにかかわらず組み込みが促進するのか、あるいはどのサブタイプの組み込みも影響を受けないのか、という点を調べることにより、既存の顆粒細胞と新生顆粒細胞の関係性を探ることが本研究の主要な目的である。新生顆粒細胞のサブタイプを区別し、各サブタイプの増殖・移動・神経突起の発達とシナプス形成・細胞の生死決定、などのステップを比較検討する。

また、本研究では嗅球の一部の領域に薬剤を投与することで、その領域の既存の顆粒細胞を除去する実験系を用いる。これによって、既存の顆粒細胞と新生顆粒細胞の関連が、嗅球の局所で成り立つものか、あるいは嗅球全体で成り立つものかを検討する。近年、嗅球は機能的な領域構造に分かれていることが明らかになってきている。既存の顆粒細胞と新生顆粒細胞が関わる神経回路の組み換えが、そのような領域単位でおこり得るのかどうかという点に迫りたい。

近年、内在性の神経幹細胞の活性化や神経移植による再生医療が注目を集めている。今後、新しい神経細胞が回路にどのように組み込まれ、回路の機能をどのように回復させるかという点を、形態的、分子的、機能的に解明していくことが重要であると考えられる。本研究で得た知見を、将来的にこの問題に繋げていく。

## 3. 研究の方法

本研究では、細胞種特異的な細胞除去の手法を用いて、マウス嗅球の既存の顆粒細胞サブタイプを除去し、その後の新生顆粒細胞による神経回路の修復過程を解析する。細菌由来の毒素とモノクローナル抗体の融合蛋白

(イムノトキシン)は、その抗体が認識する抗原を発現する細胞に選択的に結合し、その細胞に細胞死を誘導する。イムノトキシンの認識抗原を嗅球の mGluR2 陽性顆粒細胞に発現するトランスジェニックマウスを用い、嗅球局所へのイムノトキシン投与によって既存の mGluR2 陽性顆粒細胞を選択的に除去する系を利用する。この細胞除去の方法は、mGluR2 陰性顆粒細胞には影響を与えない。また、イムノトキシンを嗅球の局所に投与して局所での顆粒細胞除去を行えるため、除去部とそれ以外の健常部を、比較検討できるという利点がある。

新生顆粒細胞は、増殖細胞を標識する DNA analog 投与や、蛍光標識された細胞移植などの方法で追跡し、mGluR2 陽性・陰性細胞ごとの動態を比較する。

#### 4. 研究成果

上記の実験系を用いて、既存の mGluR2 陽性顆粒細胞を嗅球の局所領域で選択的に除去できることを確かめた。除去後に新生する顆粒細胞を DNA analog で標識したところ、その新生顆粒細胞は、除去領域に数多く集まってくるのが分かった。また、除去領域では新生 mGluR2 陽性顆粒細胞が、新生 mGluR2 陰性顆粒細胞よりも優先的に組み込まれていた。これらの変化は、除去領域特異的におこり、mGluR2 陽性顆粒細胞を除去しなかった領域では観察されなかった。これらのことから、

- ・不足した顆粒細胞サブタイプを、新生顆粒細胞が優先的に補う機構が存在すること、つまり、新生細胞の組み込みが既存の顆粒細胞によって影響され、この関係はサブタイプごとに成り立っていること

- ・この関連性は嗅球全体ではなく嗅球の中

の局所領域で起こりえることが判明した。つまり、新生顆粒細胞の組み込みは、嗅球局所領域の状態に応じて変化し、神経細胞の欠損をサブタイプ特異的に補って、正常な神経回路を再構成する能力があることが理解できた。実際、新生顆粒細胞の組み込みによって、細胞除去の2ヶ月後には除去された mGluR2 陽性顆粒細胞がほぼ元のレベルまで回復することが判明した。

既存の mGluR2 陽性顆粒細胞を除去した後、蛍光標識された新生細胞を移植したところ、新生細胞は除去部で数多くの樹上突起を発達させ、シナプスを形成している様子が観察された。このことから、新生顆粒細胞は確かに機能的な神経回路を修復していることが示唆された。

#### 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 2 件)

1) Naritsuka H, Sakai K, Hashikawa T, Mori K, Yamaguchi M. Perisomatic targeting granule cells in the mouse olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 515: 409-426 (2009) 査読有

2) Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience* 11: 1153-1161 (2008) 査読有

[学会発表](計 8 件)

1) Murata K, Nakanishi S, Kobayashi K, Mori K, Yamaguchi M. Compensatory incorporation of newborn granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Neuroscience* 2008 2008.11.17 Washington DC, USA

2) 山口 正洋 成体マウス嗅球における介在神経細胞の入れ替わり 第31回日本神経科学大会 2008.7.11 東京・東京国際フ

## オーラム

3) 成塚 裕美、境 和久、端川 勉、森 憲作、山口 正洋 投射ニューロンの細胞体に限局して抑制性シナプスを形成するマウス嗅球介在ニューロンの解析 第31回日本神経科学大会 2008.7.10 東京・東京国際フォーラム

4) 村田 航志、中西 重忠、小林和人、森 憲作、山口 正洋 マウス嗅球におけるイムノトキシンによる細胞除去後のmGluR2陽性顆粒細胞サブタイプの優先的組み込み 第31回日本神経科学大会 2008.7.9 東京・東京国際フォーラム

5) 村田 航志、中西 重忠、小林 和人、森 憲作、山口 正洋 マウス嗅球顆粒細胞サブタイプ除去後の新生顆粒細胞の補償的組み込み 第30回日本神経科学大会 2007.9.12 横浜・パシフィコ横浜

6) Murata K, Nakanishi S, Mori K, and Yamaguchi M. Compensatory regeneration of ablated subtype of granule cells after immunotoxin-mediated cell ablation in the mouse olfactory bulb. 7 th IBRO World congress of neuroscience 2007.7.14 Melbourne, Australia

7) Murata K, Nakanishi S, Mori K, and Yamaguchi M. Increased incorporation of ablated subtype of newborn granule cells following immunotoxin-mediated cell ablation in the adult mouse olfactory bulb. Neurogenesis 2007 2007.5.16 Tokyo, Nihon Mirai kan

8) 成塚裕美、境和久、端川勉、森憲作、山口正洋 投射ニューロンの細胞体に抑制性シナプスを形成するマウス嗅球顆粒細胞の解析 第29回日本神経科学大会 2006.7.21 京都・国立京都国際会館

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山口 正洋 (YAMAGUCHI MASAHIRO)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：60313102

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし