

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06830

研究課題名(和文) 成体脳室下帯における未知なる成熟ニューロンの機能 ニューロン新生に注目して

研究課題名(英文) Analysis of mature neurons locating in the mouse subventricular zone.

研究代表者

森 徹自 (MORI, Tetsuji)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：30285043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：成体マウスの脳室下帯(subventricular zone: SVZ)では、生涯を通じてニューロン新生が起きている。申請者は、脳室下帯に少数の成熟ニューロンが存在することを発見し、SVZ-N (Neuron)と命名し、それらの形態学的な解析を通じて、成体ニューロン新生に対する機能解析を行った。SVZ-Nは、隣接する線条体ニューロンと近縁ではあるが、異なる形態学的特徴を有していた。発生学的解析から、SVZ-Nは細胞死により脱落する可能性が示唆された。本研究の副次的な成果として、ニューロンの細胞死を特異的に検出するFluoro-Jade C染色の染色プロトコルを改良することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、新規のニューロン群であるSVZ-Nを発見し、その形態学的解析から、成体ニューロン新生との関連を明らかにしたことにある。成体ニューロン新生は、脳の活動状態に左右され、特に神経伝達物質による調節機構が注目されている。本研究から、SVZ-Nが、成体ニューロン新生に深く関与する可能性を示唆している。本研究は、成体ニューロン新生の調節メカニズムの研究に、大きく寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the adult mouse subventricular zone (SVZ), neurogenesis occurs throughout life. We identified small number of mature neurons in the SVZ and named them SVZ-Ns (Neurons). In this study, we characterized and analyzed SVZ-Ns from the morphological aspects. SVZ-Ns were similar to neurons of the striatum residing next to the SVZ in expression pattern of marker proteins. But, the SVZ-Ns had characteristic morphology. The SVZ-Ns were mainly generated at embryonic day 13 and postnatal day 1. Moreover, some of the SVZ-Ns could be eliminated during postnatal period. FluoroJade C staining is widely used to specifically detect degenerating neurons. During analysis of degeneration of SVZ-Ns, we established a new protocol of double staining of Fluoro-Jade C and immunostaining. This is an unexpected effect of this research project.

研究分野：神経発生学

キーワード：成体ニューロン新生 組織学 脳室下帯

1. 研究開始当初の背景

(1) 齧歯類に代表される哺乳類の脳では、生涯を通じて新しいニューロンが産生される場所があり、海馬と側脳室に隣接する脳室下帯(subventricular zone: SVZ)の二か所である。これは、成体ニューロン新生として広く知られる現象であるが、神経幹/前駆細胞の未分化性維持、分裂・増殖能、そして移動能の制御について、多くの研究がなされてきたが、未だ全容の解明には至っていない。

成体ニューロン新生を調節する因子の一つとして、ニューロンの興奮、つまり神経伝達物質が重要であることが近年知られるようになってきた。従来の研究は、SVZ 以外のニューロン由来の神経伝達物質と、成体ニューロン新生を解析するものであった。申請者のそれまでの研究から、SVZ の中にも、ごく少数ではあるが成熟ニューロンが存在していることを発見し、SVZ-N (Neuron)と名付けていた(図1)。

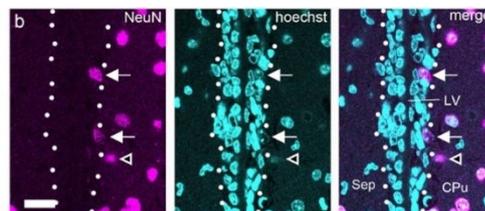


図1 SVZ-Nは成熟ニューロンマーカーのNeuN陽性である。

(2) また、下位中枢神経系には、脳脊髄液接触ニューロンと呼ばれる特殊なニューロンが、脳室系の壁面に存在している。脳脊髄液接触ニューロンの細胞体は、脳室系の壁をなす上皮細胞に接して脳実質側に存在するが、1本の樹状突起を上皮細胞の間から脳室へ伸ばしている。脳脊髄液接触ニューロンの存在は、古くから知られているが、側脳室における存在は議論がある。SVZ-Nは、脳脊髄液接触ニューロンの一種である可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、新規のニューロン群である SVZ-N は、その特異な存在部位から推測して、成体ニューロン新生の調節に中心的役割を担うものであると仮説を立てた。そこで、形態学的・組織学的解析を行い、ニューロン種のカテゴリ、投射先、発生学的な産生時期の解析を通じて、SVZ-N の機能解析を行うことを目的とした。

(2) また、SVZ-N が脳脊髄液接触ニューロンの一種である可能性を、電子顕微鏡レベルで解析し、検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SVZ-N の組織学的解析

SVZ-N の分類

SVZ は線条体と隣接しているため、SVZ-N は線条体ニューロンと類似のニューロン群であると予想される。線条体ニューロンの約 95% は GABA 作動性ニューロンで、残りのニューロンは、それぞれ nNOS、Calretinin、Parvalbumin、ChAT 陽性のニューロンである。これらのマーカー分子に対する抗体と、成熟ニューロンのマーカーである NeuN 抗体を用いた多重免疫染色により、SVZ-N の分類を行う。

SVZ-N の突起、投射先の解析

SVZ-N の形態を明らかにするために、固定した厚い脳切片を用いて蛍光色素の Lucifer Yellow を電氣的に注入することで、樹状突起の形態を可視化する。SVZ-N の投射先について、予想される投射先の神経核に逆行性トレーサーを注入する。

発生学的解析

SVZ-N の発生学的側面として、産生時期を解析する。妊娠マウスの各時期に BrdU を注入した後、成体(生後 6 週齢)において BrdU と NeuN の二重染色を行い、二重陽性細胞数を計測する。

(2) 脳脊髄液接触ニューロンとの関係

SVZ-N が脳脊髄液接触ニューロンの一種である可能性を検討するため、電子顕微鏡を用いた解析を行う。

4. 研究成果

(1) SVZ-N の組織学的解析

マーカー分子に対する抗体を用いた解析により、SVZ-N の分類を行ったところ、約 94% が GABA 作動性ニューロンのマーカーである GAD67 陽性であった。しかも、GAD67 陽性細胞のほとんどが、ドーパミンのシグナル伝達に重要な DARPP-32 を発現していた。その他は、nNOS、Calretinin、Parvalbumin、ChAT 陽性細胞が数% ずつであり、この比率は線条体ニューロンとほぼ等しかった(図 2)。

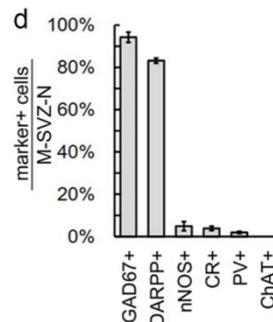


図2 分子マーカーを用いたSVZ-Nの分類。

SVZ-N は、成熟ニューロンの典型的な特徴である、丸く大きな核を持つ。一方、SVZ 中の神経幹/前駆細胞の核は小さい。そのため、核染色剤の Hoechst33258 染色を施すと、SVZ-N を識別することができる。核の形態を手掛かりに、蛍光色素の Lucifer Yellow を注入することになることができる。この手技により、SVZ-N と線条体ニューロンとの間で形態、特に樹状突起の伸長の様子を比較した。線条体ニューロンは、典型的な多極の形態で、樹状突起が球状に四方に伸長していた。一方、SVZ-N の樹状突起の多くは、側脳室の壁に平行に伸長し、しかも SVZ 内で長い距離を走行するものが観察された(図 3)。

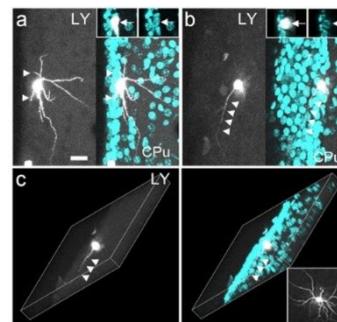


図3 SVZ-Nの形態は、線条体ニューロン(右下挿入図)と異なる。SVZ-Nの樹状突起はSVZ内を走る。

上記の解析から、線条体ニューロンとの高い類似性を有する SVZ-N の投射先は、線条体ニューロンと共通していると予想された。そこで、線条体ニューロンの投射先の一つである黒質に、逆行性トレーサーの Fluoro Gold を注入したところ、Fluoro Gold 陽性となる SVZ-N が検出された。SVZ-N は、線条体ニューロンと投射先の一つを共有することが分かった、

妊娠マウスあるいは生直後の各段階で、分裂細胞の DNA に取り込まれてトレーサーとして使用される BrdU を単回投与し、成体期の生後 6 週齢で解析した。その結果、SVZ-N の産生時期は、胎性 13 日と生後 1 日で、二峰性の産生ピークがあることが分かった。線条体ニューロンの圧倒的多数は、胎生期に産生され、生直後はほとんど産生されないことが示されている。産生時期という点でも、両者には大きな違いがみられた。

(2) 脳脊髄液接触ニューロンとの関係

SVZ-N は、成熟ニューロンのマーカーの NueN 陽性である。また、NeuN は、電子顕微鏡解析で必須のグルタルアルデヒド固定された組織切片でも適用可能である。DAB 発色した厚切り組織切片を、超薄切して電子顕微鏡による SVZ-N の微細形態を解析した。その結果、SVZ-N は、上衣細胞によって完全に脳脊髄液と隔離され、樹状突起と脳脊髄液との接触は観察されなかった。よって SVZ-N は、脳脊髄液接触ニューロンとは異なる細胞集団であることが示された(図 4)。

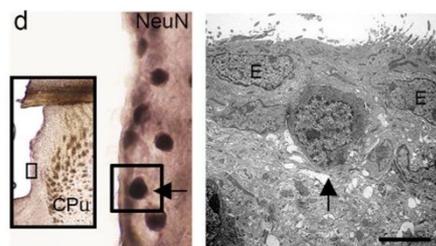


図4 SVZ-Nは、上衣細胞によって脳脊髄液から隔離されている。

(3) 副次的な研究成果

SVZ-N の発生学的側面を検討する中で、その一部が成熟段階で脱落してゆく可能性を示唆するデータを得た。この点を詳細に検討するため、Fluoro-Jade C (FJC) 染色を用いて検討した。FJC 染色は、変性ニューロンに対して、簡便で高い特異性をもつ染色法として汎用されているが、最大の欠点として、組織切片の酸化処理など特殊な前処理が必要であるため、マーカー分子に対する蛍光免疫染色と組み合わせた場合に、蛍光色素の顕著な褪色が問題になる場合がある。本研究を遂行する上でも、FJC 染色と免疫染色の二重染色を多用する必要があった。そこで、avidin-biotin システムを用いた新たな二重染色プロトコルを確立し、この問題を解決することができた(図 5)。

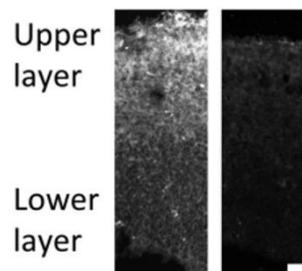


図5 (右) 従来プロトコルの処理では、FJC 染色の前処理によって免疫染色の蛍光シグナルが減弱するが、(左) 改良プロトコルでは大幅に改善される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takuya Ikenari, Hirofumi Kurata, Takemasa Satoh, Yoshio Hata, Tetsuji Mori	4. 巻 425
2. 論文標題 Evaluation of Fluoro-Jade C Staining: Specificity and Application to Damaged Immature Neuronal Cells in the Normal and Injured Mouse Brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 146-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2019.11.029	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 Kurata Hirofumi, Saito Kengo, Kawashima Fumiaki, Ikenari Takuya, Oguri Masayoshi, Saito Yoshiaki, Maegaki Yoshihiro, Mori Tetsuji	4. 巻 244
2. 論文標題 Developing a mouse model of acute encephalopathy using low-dose lipopolysaccharide injection and hyperthermia treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 743 ~ 751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1535370219846497	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 Saito Kengo, Koike Taro, Kawashima Fumiaki, Kurata Hirofumi, Shibuya Taku, Satoh Takemasa, Hata Yoshio, Yamada Hisao, Mori Tetsuji	4. 巻 526
2. 論文標題 Identification of NeuN immunopositive cells in the adult mouse subventricular zone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 1927 ~ 1942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.24463	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 Takamori Yasuharu, Hirahara Yukie, Wakabayashi Taketoshi, Mori Tetsuji, Koike Taro, Kataoka Yosky, Tamura Yasuhisa, Kurebayashi Shuji, Kurokawa Kiyoshi, Yamada Hisao	4. 巻 5
2. 論文標題 Differential expression of nuclear lamin subtypes in the neural cells of the adult rat cerebral cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 IBRO Reports	6. 最初と最後の頁 99 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibror.2018.11.001	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 Takuya Ikenari , Tatsuya Kawaguchi, Rei Ota, Miki Matsui, Ryota Yoshida, Tetsuji Mori	4. 巻 69
2. 論文標題 Improvement in Double Staining With Fluoro-Jade C and Fluorescent Immunostaining: FJC Staining Is Not Specific to Degenerating Mature Neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 597-610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/00221554211043340.	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8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hirofumi Kurata, Kengo Saito, Fumiaki Kawashima, Takuya Ikenari, Masayoshi Oguri, Yoshiaki Saito, Yoshihiro Maegaki, Tetsuji Mori
2. 発表標題 Developing mice model of acute encephalopathy using low-dose lipopolysaccharide injection and hyperthermia treatment: a simple and convenient method
3. 学会等名 The 20th Annual Meeting of Infantile Seizure Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Ikenari, Hirofumi Kurata, Tetsuji Mori
2. 発表標題 Fluoro-Jade C can detect degenerating neuronal progenitors in tissue sections
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池成 拓哉、藏田 洋文、佐藤 武正、畠 義郎、森 徹自
2. 発表標題 変性未熟ニューロンの検出に対するFluoro-Jade C染色の有用性
3. 学会等名 第14回臨床検査教育学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池成 拓哉、藏田 洋文、佐藤 武正、畠 義郎、森 徹自
2. 発表標題 Fluoro-Jade Cによる変性神経系細胞の組織学的検出-神経幹/前駆細胞から成熟ニューロンまで-
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池成 拓哉、藏田 洋文、佐藤 武正、畠 義郎、森 徹自
2. 発表標題 Fluoro-Jade C染色は変性成熟ニューロン特異的な検出方法か？
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池成 拓哉、森 徹自、藏田 洋文
2. 発表標題 過剰ニューロン興奮による成体ニューロン新生の亢進と一酸化窒素
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大田麗、池成拓哉、川口達也、森 徹自
2. 発表標題 Fluoro-Jade C染色と蛍光免疫染色の改良：FJC染色は、変性ニューロン以外の変性細胞も染色する
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大田麗、池成拓哉、川口達也、森 徹自
2. 発表標題 Fluoro-Jade C (FJC) 染色と蛍光免疫染色の二重染色法の改良と、変性ニューロン特異的とされるFJC染色の限界
3. 学会等名 第62回 日本組織細胞化学会 学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

発表論文は、鳥取大学研究成果リポジトリ（下記URL）にて公開。
https://repository.lib.tottori-u.ac.jp/ja/search/p/5/item/6572?sort=updated_at%3Ar

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	岡田 誠剛	倉敷芸術科学大学・生命科学部・教授	
	(OKADA Masayoshi) (40334677)	(35311)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------