

平成22年 5 月 27日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2007 ~ 2009
 課題番号： 19300136
 研究課題名 (和文) 気分・情動に対する成体脳神経細胞新生の役割の解析
 研究課題名 (英文) Roles of adult neurogenesis in mood and emotion
 研究代表者
 等 誠司 (HITOSHI SEIJI)
 生理学研究所・分子生理研究系・准教授
 研究者番号：70300895

研究成果の概要 (和文) : 脳室下層や海馬における神経幹/前駆細胞から産生される細胞と気分・情動との連関の有無を検討するとともに、細胞新生を調節することによって気分や情動を制御することが可能かどうかを検証することを目的として本研究を行った。その結果、① 慢性ストレス下の成体マウスの脳では神経幹細胞数が減少し、抗うつ薬の投与によって回復すること、② 気分安定薬が神経幹細胞においてを活性化し、自己複製能を高めることを明らかにし、③ テトラサイクリン誘導システムを用いて神経幹細胞の数を制御できるシステムを開発した。これらの成果は、精神神経疾患の病態解明や治療法開発に寄与できると考えられる。

研究成果の概要 (英文) : In this study, we aimed to clarify a possible causative link between NSCs and neurogenesis in the adult brain and mood/emotion and to explore a possibility to alter the mood or other brain functions by modification of the number of NSCs. First, we demonstrated that chronic stress decreases the number of NSCs in the adult brain and that this reduction can be restored by antidepressant treatment. Second, we found that mood stabilizing drugs, which are used to treat patients with bipolar disorder, enhance the self-renewal capability of mouse NSCs and that this pharmacological effects are mediated by the activation of Notch signaling in the NSC. Third, we developed a transgenic mouse system, in which numbers of NSCs can be manipulated by administration of doxycyclin. Our results could contribute to the understanding of pathogenesis of mood affective disorders and to the development of new therapeutic strategy for neuro-psychiatric diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経機能の可塑性，成体脳神経細胞新生

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳動物の脳では、成体になっても神経細胞の新生があることが証明され、脳の高次機能や可塑性と何らかの関係がある可能性が指摘されている。マウスの成体脳では、neurogenic region と呼ばれる海馬や嗅球で神経細胞新生が観察されるが、新生神経細胞が既存の神経ネットワークに組み込まれ、機能し得るのかどうかについては不明な点が多い。海馬における神経細胞の新生には情動や学習も関与しているとされ、変化に富む環境での飼育や学習によって新生神経細胞（すなわち核酸類似物質である 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 取り込みで評価した、分裂後に神経細胞に分化した細胞）の数が増加し、一方ストレス環境下では新生神経細胞は減少する。また、ストレスモデルマウスに対する抗うつ薬の効果が発揮されるには、海馬における神経細胞新生が必須であることが報告され(Santarelli *et al.*, *Science* 301; 805-809, 2003)、神経細胞新生と気分(障害)との関係が示唆される。しかし、このような状況下で神経幹細胞の動態を解析した研究は従来少なかった。

成体脳では、神経幹細胞は側脳室周囲の組織(脳室下層)に存在し、非常にゆっくりと分裂して神経幹細胞自身と神経前駆細胞を産生する。活発に分裂する神経前駆細胞は数回の分裂の後に分化し、移動して新生神経細胞もしくはグリア細胞となる。神経幹細胞を *in vitro* で培養する技術(Neurosphere 法)は確立されており、この手法を用いることで、成体脳に存在する神経幹細胞の数を計算することができる(Hitoshi *et al.*, *Genes & Dev.* 18: 1806-1811, 2004)。成体脳の神経幹細胞数は通常は安定に維持されている(脳室下層に 2,500-3,000 細胞/脳)が、平成 18 年度までに研究代表者が行った研究により、慢性的な強制水泳ストレスによって神経幹細胞数が減少することが分かった。一方、特定領域研究(病態脳)で研究代表者が行っている研究により、躁うつ病患者に用いられる気分安定薬が、神経幹細胞の自己複製能を亢進させ、成体脳における神経幹細胞数を増加させることを見出している。

神経幹細胞が維持される分子機構には未だ不明な点が多いが、Notch シグナルの活性化が重要な因子の 1 つであることを、研究代表者は明らかにした(Hitoshi *et al.*, *Genes & Dev.* 16: 846-858, 2002)。実際、気分安定薬による神経幹細胞の自己複製能の亢進も、Notch シグナルの活性化を介するものであることが示唆された。これらの研究成果を基に、成体脳の神経幹細胞の動態と(神経)細胞新生との関係を詳らかにし、神経幹細胞の動態変化が高次脳機能、特に気分や情動に与える影

響を解明することを目的として、本研究を計画した。

2. 研究の目的

これまでの研究代表者の研究により、慢性ストレス負荷や気分障害に用いられる薬の多くが神経幹細胞の動態を修飾することが分かった。そこで本研究では、これらの処置による神経幹細胞の動態変化が、(神経)細胞新生を増減させるかどうかを調べる。特に、神経幹細胞の自己複製能に密接に関与する Notch シグナルの活性化に焦点をあて、気分障害治療薬と Notch シグナル活性化との因果関係を解明する。また、正常あるいは薬物投与時の成体脳における細胞新生が、どの領域でどの程度生じているのか明らかにする。これまで、少なくとも齧歯類においては嗅球や海馬で神経細胞新生が起きていることは確立されているが、その他の脳領域においても少量の神経細胞新生があることが示唆されている(例えば Kokoeva *et al.*, *Science* 310: 679-683, 2005)。そこで、情動に関与する辺縁系なども含めて、細胞新生の変化を明らかにする。これには、我々の研究室で樹立した Olig2-CreER, GFAP-CreER, Nestin-CreER などの遺伝子改変マウスを用いた細胞標識と、BrdU による分裂細胞標識を組み合わせ用いている。

一方、齧歯類と霊長類とでは成体脳での神経細胞新生に質的量的な相違があるといわれている。実際、齧歯類では脳室下層から嗅球への神経細胞供給が明瞭に観察されるのに対し、ヒトでは無いという報告がある。そこで本研究では、マウスで得られた知見が霊長類でも観察されるかどうかを、サルやヒトの脳を用いて明らかにする。

神経細胞新生と気分や情動との関係を解明するには、神経細胞新生を経時的にコントロールできるシステムの開発が必要である。研究代表者のこれまでの研究により、神経幹細胞における Notch シグナルの活性化が、神経幹細胞の自己複製能を高めてその維持に重要であるという知見を得ている(Hitoshi *et al.*, *Genes & Dev.* 16: 846-858, 2002)。そこで、Cre-loxP システムとテトラサイクリン制御システムを組み合わせたトランスジェニックマウスを作製し、Notch シグナル活性化と成体脳の神経幹細胞および神経細胞新生との因果関係を明らかにした上で、神経細胞新生を操作したマウスの行動の変化を解明する。

以上の研究により、(神経)細胞新生と動物の情動・行動との関係を明らかにし、成体脳で神経幹細胞が維持される生理的意義を解明する。さらに、神経幹細胞の数が変動する状況、例えばストレス負荷や気分障害などにおける病態の理解を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 慢性ストレスモデルマウスおよび、気分障害治療薬を慢性投与したマウスを用い、成体脳内での神経幹細胞の動態を解析した。これには、神経幹細胞の培養法(Neurosphere assay)や、BrdUによる分裂細胞の標識法を利用した。さらに、このようなマウスの脳や培養した神経幹細胞を用いて、気分障害治療薬が神経幹細胞に与える影響を、生化学的・分子細胞生物学的に検討した。

(2) 研究室で既に報告している Olig2-CreER ノックインマウスや、最近樹立した GFAP promoter-CreER, Nestin promoter-CreER トランスジェニックマウスを用いて、神経前駆細胞の標識を行った。CreER は組換え酵素遺伝子 Cre に変異エストロゲン受容体遺伝子の融合タンパク質をコードするもので、エストロゲン誘導体のタモキシフェン投与により融合タンパク質が核内に移行し、loxP サイトに働く。例えばレポーターマウスの Z/EG では、組換えが起こることによって GFP が発現するようになる。Olig2 遺伝子は発生期のオリゴデンドロサイト前駆細胞に特異的と言われていたが、成体脳では神経前駆細胞の一部にも発現している。GFAP はアストロサイトのマーカー遺伝子だが、最近神経幹細胞のマーカーとしても使われている。Nestin は神経幹/前駆細胞のマーカー遺伝子である。これらのマウスを駆使することにより、異なる分化段階にある神経幹/前駆細胞を標識することができると考えられる。最初に GFAP promoter-CreER, Nestin promoter-CreER トランスジェニックマウスにおける CreER 遺伝子の胎仔脳および成体脳での発現細胞特異性を詳細に調べ、同時に成体脳で組換えを起こすための至適条件を決定した。次いで、上記の標識方法を組み合わせることにより、成体脳の(例えば)脳室下層を起源とする分裂細胞(神経前駆細胞)の最終的な移動部位や分化した細胞種を明らかにした。さらに、ストレス負荷や薬剤投与によって、神経幹/前駆細胞の動態の変化を解析した。

(3) 成体脳の神経幹/前駆細胞の数を人為的に変化させることを目的として、Notch シグナルの活性を制御できるトランスジェニックマウスシステムを樹立した。具体的には図1の2系統のマウスを作製し、交配させてダブルトランスジェニックマウスとして実験に供した。第1系統は、神経幹/前駆細胞特異的な Nestin promoter/enhancer 下でテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) および CreER を発現するラインである。第2系統は、テトラサイクリン応答因子 (TRE Tight) promoter の下流に、2つの loxP 配列にはさま

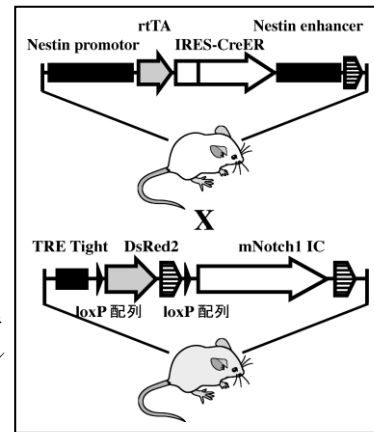


図1：テトラサイクリンシステムの概要

れた DsRed2 遺伝子と、活性型 Notch1 遺伝子を配置する。この2系統のダブルトランスジェニックマウスでは、タモキシフェン投与によって神経幹/前駆細胞において DsRed2 遺伝子がはずれ、テトラサイクリン類似物質である Doxycyclin 投与によって活性型 Notch1 遺伝子が発現する。このことにより、成体脳において神経幹細胞の数の制御を試みた。

(4) サルおよびヒトの成体脳における細胞新生を解析した。サルについては、研究分担者(伊佐 正)が実験に使用したサルの脳を用いた。健常サルおよび脊髄損傷から機能回復したサルや大脳皮質一次運動野損傷から機能回復したサルについて、灌流固定する直前から数ヶ月前に BrdU (100 mg/kg 体重 i.p. 1日1回5日間)を投与し、脳における分裂細胞を標識した。灌流固定後に免疫染色および *in situ* hybridization 法を用い、分裂細胞自体の同定や、分裂細胞がどの場所でのような細胞に分化しているのか調べた。

ヒトの剖検脳は、連携研究者(村山繁雄)が構築しているブレインバンクを利用した。齧歯類とサルでの結果を基に、成人の脳における細胞新生の有無や、もし細胞新生が存在するならば部位や細胞種を明らかにする。これまでに、パラフィン切片での免疫染色や凍結切片での *in situ* hybridization、凍結脳を用いた western blotting などについて、至適条件を決定し、新生細胞の定量的な検討を試みた。

4. 研究成果

(1) 慢性ストレスマウスにおいて、神経幹細胞数が減少していることは既に報告した。この減少は、ストレス負荷を中止しても長期間回復しないが、抗うつ薬の投与によって回復することが判明した。しかしながら、抗うつ薬には神経幹細胞に対する直接的な効果はなく、抗うつ薬投与マウスにおける神経幹細胞数の回復はセロトニンの作用を介しているものと考えられた。

一方、双極性気分障害の治療薬である気分安定薬を慢性投与した成体マウスにおいて、

脳室下層に存在する神経幹細胞の自己複製能が亢進し、その数が増加していることを示した。気分安定薬は神経幹細胞に直接的に働き、生体内で Notch シグナルを活性化すること、その結果として Notch シグナルの標的遺伝子である *Hes5* の発現が増強することを示した (図 2)。

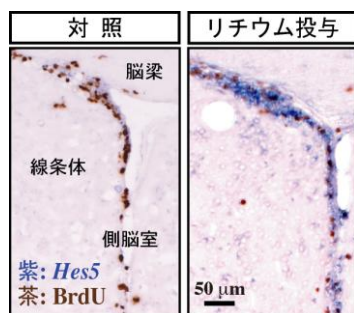


図 2 : 対照および気分安定薬 (リチウム) を 3 週間投与したマウス大脳の冠状断

これらの結果は、これまで気分安定薬に共通する薬理作用として提唱されてきたモデル (GSK3 β 抑制モデルとイノシトール枯渇モデル) の再考を促すものであり、双極性気分障害の病態の理解に役立つのみならず、新規の気分安定薬開発にもつながる成果と考えられる。

(2) Nestin-CreER, Olig2-CreER, GFAP-CreER トランスジェニックマウスを樹立した。これらの遺伝子改変マウスを用い、タモキシフェン投与による細胞標識と BrdU による分裂細胞標識、さらに神経幹細胞などの細胞培養などを組み合わせることにより、神経幹/前駆細胞から神経細胞・オリゴデンドロサイト・アストロサイトが分化していくタイミングやその部位を詳細に解析した。その結果、Nestin 陽性 (成体脳では GFAP 陽性) の神経幹細胞から分化する Olig2 陽性細胞が多能性を維持しつつも、終生にわたって維持されるという幹細胞特有の性質を喪失していることを明らかにした。また、子宮内電気穿孔法による細胞標識も駆使することにより、成体大脳皮質に豊富に存在するオリゴデンドロサイトが、胎生後期から新生仔期の極く限られた期間に、背側および腹側終脳の境界部という非常に限局した部位から発生することを明らかにした。また、気分や情動を司る辺縁系を構成する、海馬歯状回・大脳嗅外野・扁桃体などに存在する細胞群 (神経細胞のみならずグリア細胞や、NG2 陽性細胞など) の発生時期や発生部位を明らかにした。特に、NG2 陽性細胞はこれまでオリゴデンドロサイトの前駆細胞と考えられていたが、近年より多彩な機能が知られるようになり、注目を集めている。本研究で、NG2 陽性細胞が胎生期のみならず成体脳においても分裂し、新生細胞を産生していることがわかり、辺縁系における細胞新生が、気分や情動に関係する可能性が示唆された。

(3) 研究方法の項で述べた、テトラサイクリンシステムを構成する 2 系統のトランスジェニックマウスを作製し、実際に機能することを確認した。若年期のマウスで、Doxycyclin を餌に混じて投与することにより、活性型 Notch1 の発現が認められ、その結果として神経幹/前駆細胞の数の上昇がみられた。また、この効果はより高齢のマウスでも認められたが、若年期のマウスに比べて効果が低いことが判明した。しかしながら、Doxycyclin 投与によって神経幹/前駆細胞の数を増加させた際の、マウスの行動に対する影響の解析までには至らず、現在解析中である。野生型マウスだけでなく、ストレス負荷によって神経幹/前駆細胞数が減少したマウスにおいて、上記の処置が神経幹/前駆細胞の数を正常に回復させ得るかどうかが、また、その結果としてストレス関連行動を防止できるのか、などは今後の課題として残された。

(3) 脊髄損傷および大脳皮質一次運動野損傷から機能回復したサルにおいて、BrdU 標識細胞を観察したところ、病変部には非常に多数の BrdU 陽性細胞が観察された。しかし、これらの細胞で神経細胞・オリゴデンドロサイト・アストロサイトのマーカーを発現するものは皆無で、そのほとんどが Iba1 陽性のミクログリア細胞であった。大脳皮質一次運動野損傷モデルサルにおいて、神経幹細胞が存在する脳室下層にも BrdU 陽性細胞は観察されたものの、その数は少なく、健常サルと比較して顕著な差は観察されなかった。マウスでは病変による神経幹細胞の活性化や分裂細胞の誘導が報告されているが、今回検討した限りでは、サルにおいてはそのような効果は限定的だと考えられた。

ヒト死後脳を用いた検討では、脳室下層において分裂細胞のマーカーである Ki67 を発現する細胞が確認されたが、齧歯類に比べてその数は非常に少なかった。精神・神経疾患を有する患者脳で、あるいは薬物治療を受けた患者脳で、神経幹/前駆細胞の数の増減を検討するには大量の検体が必要だと推定され、今後の課題として残された。対象とする部位や細胞種について、より焦点を絞った研究が必要だと考えられた。

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 16 件)

- ① Espinosa-Jeffrey A, Hitoshi S, *et al.* (他 11 名, 2 番目) Functional central nervous system myelin repair in an adult mouse model of demyelination caused by

- proteolipid protein overexpression. **J Neurosci Res** 88: 1682-1694, 2010 査読有
- ② Nishimura Y, Morichika Y, Isa T. A subcortical oscillatory network contributes to recovery of hand dexterity after spinal cord injury. **Brain** 132: 709-721, 2009 査読有
- ③ Higo N, Isa T, *et al.* (他 6 名, 8 番目) Increased expression of the growth-associated protein 43 gene in the sensorimotor cortex of the macaque monkey after lesioning the lateral corticospinal tract. **J Comp Neurol** 516: 493-506, 2009 査読有
- ④ Higashi M, Maruta N, Bernstein A, Ikenaka K, Hitoshi S. Mood stabilizing drugs expand the neural stem cell pool in the adult brain through activation of Notch signaling. **Stem Cells** 26: 1758-1767, 2008 査読有
- ⑤ Ema M, Hitoshi S, *et al.* (他 17 名, 6 番目) *Krüppel-like factor 5* is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ES cells. **Cell Stem Cell** 3: 555-567, 2008 査読有
- ⑥ Sasaki N, Hitoshi S, *et al.* (他 11 名, 11 番目) Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. **J Biol Chem** 283: 3594-3606, 2008 査読有
- ⑦ Yoshida M, Takaura K, Kato R, Ikeda T, Isa T. Striate cortical lesions affect deliberate decision and control of saccade: implication for blindsight. **J Neurosci** 28: 10517-10530, 2008 査読有
- ⑧ Sengoku R, Murayama S, *et al.* (他 10 名, 12 番目) Incidence and extent of Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging human olfactory bulb. **J Neuropathol Exp Neurol** 67: 1072-1083, 2008 査読有
- ⑨ Ikemura M, Murayama S, *et al.* (他 10 名, 12 番目) Lewy body pathology involves cutaneous nerves. **J Neuropathol Exp Neurol** 67: 945-953, 2008 査読有
- ⑩ Hitoshi S, Maruta N, Higashi M, Kumar A, Kato N, Ikenaka K. Antidepressant drugs reverse the loss of adult neural stem cells following chronic stress. **J Neurosci Res** 85: 3574-3585, 2007 査読有
- ⑪ Karpowicz P, Hitoshi S, *et al.* (他 11 名, 10 番目) Adhesion is prerequisite, but alone insufficient, to elicit stem cell pluripotency. **J Neurosci** 27: 5437-5447, 2007 査読有
- ⑫ Ishii A, Ikeda T, Hitoshi S, Fujimoto I, Torii T, Sakuma K, Nakakita S, Hase S,

Ikenaka K. Developmental changes in the expression of glycogenes and the content of N-glycans in the mouse cerebral cortex. **Glycobiology** 17: 261-276, 2007 査読有

- ⑬ Hasegawa A, Naruse M, Iwasaki Y, Hitoshi S, Takebayashi H, Ikenaka K. Regulation of glial development by cystatin C. **J Neurochem** 100: 12-22, 2007 査読有
- ⑭ 東 幹人, 等 誠司. パーキンソン病の神経幹細胞治療. **Cognition & Dementia** 6: 45-50, 2007 査読無
- ⑮ Nishimura Y, Onoe H, Morichika Y, Perfiliev S, Tsukada H, Isa T. Time-dependent central compensatory mechanisms of finger dexterity after spinal cord injury. **Science** 318: 1150-1155, 2007 査読有
- ⑯ Fumimura Y, Murayama S, *et al.* (他 10 名, 12 番目) Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in lewy body disease. **J Neuropathol Exp Neurol** 66: 354-362, 2007 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Hitoshi S. (Invited Speaker) Neural stem cells in the adult brain: implications for the pathogenesis of mood affective disorders. Neurogenesis2009 (淡路島) 2009 年 6 月 2-3 日
- ② Hitoshi S. (Symposium Speaker) Neural stem cells in the adult brain: implications for the pathogenesis of mood affective disorders. 第 51 回日本神経化学会/第 2 回アジア・太平洋生物学的精神医学会/第 30 回日本生物学的精神医学会合同年会 (富山) 2008 年 9 月 11-13 日
- ③ 等 誠司 (Invited Speaker) 気分障害の病態解明を目指した神経幹細胞研究. 第 45 回脳の医学生物学研究会 (名古屋) 2008 年 8 月 2 日
- ④ 等 誠司, 東 幹人, 岡田洋平, 岡野栄之, 池田一裕. 抗てんかん薬による神経新生. 第 49 回日本神経学会総会 (横浜) 2008 年 5 月 15-17 日

[その他]

ホームページ等
生理学研究所分子神経生理部門ホームページ: <http://www.nips.ac.jp/ninfo/>

(1)研究代表者

等 誠司 (HITOSHI SEIJI)
生理学研究所・分子生理研究系・准教授
研究者番号：70300895

(2)研究分担者

伊佐 正 (ISA TADASHI)
生理学研究所・発達生理学系・教授
研究者番号：20212805

村山繁雄 (MURAYAMA SHIGEO)
(財)東京都高齢者研究・福祉振興財団・東
京都老人総合研究所・研究部長
研究者番号：50183653
(H20→H21：連携研究者)