

機関番号：23903

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20509005

研究課題名 (和文) 成魚脳における神経細胞の産生・移動の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of the neuronal production and migration in the adult zebrafish brain

研究代表者

岸本 憲人 (KISHIMOTO NORIHITO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50508299

研究成果の概要 (和文)：本研究は、ゼブラフィッシュの遺伝子改変技術を駆使して、成体脳内における神経細胞の産生・移動メカニズムの解明を目指し、以下の結果を得た。(1)ゼブラフィッシュ成魚の脳室帯において神経幹細胞ニッチが存在し、幼若ニューロンが産生される。(2)成魚脳室帯で産生された幼若ニューロンは血管を足場にして嗅球内へと移動する。(3)ゼブラフィッシュ成魚傷害脳モデルにおいて、脳傷害により失われたニューロンが活発に再生される。

研究成果の概要 (英文)：To provide new insights into the cellular and molecular mechanisms of adult neurogenesis and neuronal migration, we have studied neuronal production and migration in the adult zebrafish telencephalon. (1)Using systematic immunohistochemical and ultrastructural studies, we defined the cellular composition of the ventricular zone (VZ) in the adult zebrafish telencephalon. (2)We provided direct evidence that neuronal precursors migrate from the telencephalic VZ to the olfactory bulb in the adult zebrafish brain using a transgenic zebrafish line that expresses GFP in neuronal precursors. (3)We established a novel zebrafish model to study injury-induced neurogenesis in the adult brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	0	1,200,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：分子・細胞神経科学

キーワード：再生医学、神経科学、脳・神経、脳神経疾患、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来、脳を構成する神経細胞 (ニューロン) は胎生期および生後の初期にのみ産生されるものであると信じられてきたが、近年の研究により、ヒトを含む様々な脊椎動物の成体脳でも神

経幹細胞が存在し、継続的に神経細胞が産生されることが明らかになった。マウスなどの齧歯類の成体脳室下帯では神経幹細胞から前駆細胞を経て嗅球へと移動し、成熟したニューロンへと分化することが明らかにされてきたが、その

制御機構については十分に理解されていない。申請者らは、2001年より脳室下帯に注目した研究を開始し、その様々なメカニズムを明らかにしてきた（総説：Okano and Sawamoto, *J. Neurochem.*, 102: 1459-1465, 2007など）。

(2) 近年、申請者らは、脳室下帯の新生神経細胞の移動機構に着目し、正常脳内では繊毛運動によって引き起こされる細胞外環境である脳脊髄液中の Slit タンパク質の濃度勾配

(Sawamoto *et al.*, *Science*, 311: 629-632, 2006) と、動く神経細胞内で機能するタンパク質リン酸化酵素 Cdk5 (Hirota *et al.*, *J. Neurosci.*, 27:12829-12838, 2007) が重要な機能を有することを明らかにした。また、ゼブラフィッシュを用いて繊毛が Wnt シグナル伝達経路を介して、上皮細胞の増殖・極性形成に関与していることを明らかにした (Kishimoto *et al.*, *Dev. Cell*, 14: 954-961, 2008)。さらに、神経再生機構を解析するためマウス中大脳動脈閉塞モデルを独自に確立し、虚血後に脳室下帯で生まれる神経細胞が血管に沿って梗塞部位へ移動することを初めて報告した (Yamashita *et al.*, *J. Neurosci.*, 26: 6627-6636, 2006)。その後、海外の複数のグループからラットやヒトにおける同様の現象が報告されたが、その分子メカニズムは不明のままである。

(3) 申請者らのこれまでの研究により、損傷脳における神経細胞の再生において、脳室下帯の神経幹細胞の活性化が重要であることを示してきた。特に、脳室下帯における神経細胞新生に関して、①増殖・生存・移動などの異なるステップで多段階の調節を受けており、その過程には神経発生に関与する分子群が働いていること、②脳梗塞などの脳が傷害を受けた場合には、新たなメカニズムによって失われた神経細胞を部分的に再生させることが明らかになった。とこ

ろが、その分子機構については未解明の点が多いのが現状である。

2. 研究の目的

われわれは、分子・遺伝子レベルで成体脳内における新生ニューロンの産生・移動のメカニズムを解明するために、従来のマウスを用いたアプローチに加え、個体レベルの遺伝学的スクリーニングが可能であり、脳内の神経細胞を観察することができる新たなモデル動物を用いた実験系を確立するという着想に至った。この目的には、哺乳類成体脳と共通した構造を持つ脊椎動物としてゼブラフィッシュが適している。ゼブラフィッシュは、哺乳類成体脳と類似した脳構成パーツを有し、疾患モデルとしても広く使われはじめている。

本研究は、ゼブラフィッシュ成魚を成体脳研究の新たなモデルとして確立することを目的とし、ゼブラフィッシュの特徴である簡便な遺伝子改変技術を駆使して、成魚脳内におけるニューロンの移動をイメージングすることによって神経細胞の産生・移動メカニズムの解明を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 使用動物：ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 野生型およびトランスジェニックフィッシュ *Tg(ng1:GFP)*, *Tg(bv:RFP)*, *Tg(gfap:GFP)*.

(2) BrdU 標識：ゼブラフィッシュ成魚を BrdU を含む飼育水で遊泳させることにより増殖中の細胞を標識した。

(3) 免疫染色法：ピプラトームによりゼブラフィッシュ成魚脳切片を作成後、マウスを用いた解析で確立された細胞タイプ特異的マーカー（一次抗体）および蛍光標識された二次抗体を用いて各種細胞タイプを同定した。共焦点レー

ザー顕微鏡により観察した。

(4) 電子顕微鏡観察：成魚脳の超薄切片を各種処理後、電子顕微鏡下で観察を行った。

(5) 脳半球培養法：ゼブラフィッシュ成魚から全脳を単離後、嗅球を含む終脳を半球ずつに分離し、各脳半球を培養皿（培養液を含む）上で培養した。

(6) 二光子顕微鏡観察：2-Color Fish 成魚から全脳を単離し、二光子顕微鏡下におき、新生ニューロンと血管の画像を取得し、画像解析ソフト Imaris で三次元画像を構築した。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ成魚の脳室帯を構成する

細胞構造の解明：BrdU 標識により成魚の脳室壁付近で細胞増殖部位が存在することを確認し、さらに、脳室壁付近で BrdU ラベルされた新生細胞が嗅球内部へ移動していることを示唆する結果を得た。細胞タイプ特異的マーカーの発現解析から、成魚脳室壁は、神経幹細胞マーカーを発現し、一本の繊毛をもつ放射状グリア細胞で構成され、その近傍に移動中のニューロンのマーカーでラベルされる細胞塊が存在することを明らかにした。電子顕微鏡下で成魚脳室帯の細胞構築の微細形態を観察したところ、マーカー発現解析の結果と一致した。他の脊椎動物の成体脳と同様に、ゼブラフィッシュ成魚の脳室帯においても神経幹細胞ニッチの存在することを明らかにした。

(2) ゼブラフィッシュ成魚脳におけるニュー

ロン移動の実証：プロニューラル遺伝子の一つである *neurogenin1* のプロモーター下で GFP を発現するトランスジェニックフィッシュ

(*Tg(ngn1:GFP)*) 成魚脳において、GFP が新生ニューロンで特異的に発現していることを見出した。*Tg(ngn1:GFP)* 成魚から脳を取り出し、独

自に開発した脳半球培養条件下でタイムラプス解析を行ったところ、成魚脳室壁付近で産生された新生ニューロンが嗅球内へ移動している様子を捉えることに成功した。本結果は、非哺乳類動物において初めてである。

(3) 成魚脳内のニューロン移動のメカニズム

の解明：新生ニューロンの移動に血管が関与しているかどうかを調べるために、新生ニューロンで GFP を発現している *Tg(ngn1:GFP)* を血管で RFP を発現するトランスジェニックフィッシュを交配し、同一個体内で新生ニューロンと血管を二重ラベルした ”2-Color Fish” を作成した。2-Color Fish 成魚から脳を取出し、脳半球培養条件下でタイムラプス解析を行ったところ、血管に沿った新生ニューロンの移動を観察することができた。

また、2-Color Fish 成魚脳を丸ごと（脳切片を作成することなく）二光子顕微鏡下で観察し、得られた画像を重ね合わせることにより、成魚脳内の血管パターンニングと新生ニューロンの配置を三次元構築し、血管に沿った新生ニューロンの移動の流れを三次元的に確認することができた。

マウス成体脳内で血管の近傍に存在することが報告されており、血管のガイドによる新生ニューロンの移動は、進化上保存されたメカニズムであることが示唆された。

(4) ゼブラフィッシュ成魚傷害脳モデルの構築

の構築：傷害脳における神経再生のメカニズムを解明するために、ゼブラフィッシュ成魚傷害脳モデルの構築を行った。ゼブラフィッシュ成魚の終脳表層部位に針を刺すことによって脳傷害を作成した。脳傷害後 1 週間以内に、傷害脳半球の脳室壁付近で新生ニューロンの産生が促進される。脳傷害によって、脳室壁を構成するグリア細胞内で Notch シグナリングを介して増殖制

御を行っていることを明らかにした。脳室壁付近で産生されたニューロンは、その後、傷害部に移動し、傷害部位に到着した新生ニューロンは成熟ニューロン（特に、失われたニューロンサブタイプ）へと分化することを明らかにした。このように、ゼブラフィッシュ成魚は傷害脳において積極的にニューロン再生を行うことを明らかにした。

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 1 件)

- ① Kishimoto N., Cao Y., Park A., Sun Z.
Cystic kidney gene *seahorse* regulates cilia-mediated processes and Wnt pathway
Developmental Cell, 査読有, Vol. 14, No. 6, 2008, pp. 954-961.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Kishimoto N., Shimizu K., Sawamoto K.
BMB2010, 2010年12月7日, 神戸ポートアイランド
A Zebrafish Model to Study Adult Brain Injury and Regeneration.
- ② Kishimoto N., Shimizu K., Sawamoto K.
Neuroscience 2010, 2010年9月4日, 神戸コンベンションセンター
Injury-induced Activation of Cell Proliferation in the Adult Zebrafish Telencephalon.
- ③ Kishimoto N., Alfaro Cervello C., Shimizu K., Manuel Garcia-Verdugo J., Sawamoto K.
第43回 日本発生生物学会, 2010年6月22日, 京都国際会議場
The Cellular Composition of the Ventricular Zone and Neuronal Migration in the Adult Zebrafish Telencephalon.

- ④ Kishimoto K., Alfaro Cervello C., Shimizu K., Manuel Garcia-Verdugo J., Sawamoto K.
第32回 日本分子生物学会, 2009年12月11日, パシフィコ横浜
The Cellular Composition and Morphological Organization of the Ventricular Zone in the Adult Zebrafish Telencephalon.
- ⑤ Shimizu K., Kishimoto N., Nonaka S., Sawamoto K.
第32回 日本分子生物学会, 2009年12月11日, パシフィコ横浜
Migration of Neuronal Progenitors in the Adult Zebrafish Telencephalon.
- ⑥ Kishimoto N., Alfaro Cervello C., Shimizu K., Manuel Garcia-Verdugo J., Sawamoto K.
Neuroscience 2009, 2009年9月7日, 名古屋国際会議場
The Cellular Composition and Morphological Organization of the Ventricular Zone in the Adult Zebrafish Telencephalon.
- ⑦ 清水耕平、岸本憲人、澤本和延
第15回 小型魚類研究会, 2009年9月5日, 名古屋大学
ゼブラフィッシュ成魚脳における新生ニューロンの移動
- ⑧ Shimizu K., Kishimoto N., Sawamoto K.
生体機能と創薬シンポジウム 2008, 2008年9月5日, 星薬科大学
Neuronal production and migration in the post-embryonic zebrafish brain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 憲人 (KISHIMOTO NORIHITO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：50508299

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

澤本 和延 (SAWAMOTO KAZUNOBU)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90282350

川上 浩一 (KAWAKAMI KOICHI)

国立遺伝学研究所・教授
研究者番号：70195048

野中 茂紀 (NONAKA SHIGENORI)

基礎生物学研究所・准教授
研究者番号：90435529