

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700311
 研究課題名(和文) 既存回路網への統合様式の可視化による成体新生ニューロンの海馬情報との関連性の検討
 研究課題名(英文) Investigation of relationship between information acquirement and integration pattern of adult-born neurons into preexisting circuit in hippocampus
 研究代表者
 大川 宜昭 (OHKAWA NORIAKI)
 富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教
 研究者番号：80416651

研究成果の概要(和文)：近年、成体脳内海馬歯状回においてニューロンの新生が起きており、既存回路網へ機能的に組み込まれることが示されてきている。長期増強(LTP)は、神経細胞間の連絡を担うシナプスにおける、記憶・学習のモデル現象であるとともに、スパインは、興奮性シナプス後部の構造体として機能する。我々は、レトロウイルス標識法を用いた新生ニューロンのスパインの可視化と歯状回分子層へのLTP誘導技術の両立を確立した。この技術を用いてLTP誘導による新生ニューロンのスパイン形成様式の変化を観察することで、海馬での情報獲得が、新生ニューロンの回路網への組み込み様式に与える影響を検討した。この結果、海馬の情報獲得が各発達時期の新生ニューロンの既存回路網への統合様式に異なる影響を与えることが明らかとなり、また、各発達時期の新生ニューロンが、獲得情報に対して異なる役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Newly born neurons are continually being generated in the adult brain. In dentate gyrus of hippocampus, the newborn neurons are functionally integrated into existing circuit. Long-term potentiation (LTP) is a model of the activity-dependent synaptic plasticity which plays a central role in the establishment of memories. We constructed a compatible system of the retrovirus-mediated spine labeling of adult-born neurons and *in vivo* LTP induction in dentate gyrus to investigate the relationship between the LTP induction and spine formation pattern. Then, our results indicated information acquirement in dentate gyrus differentially regulates the integration of each new neurons progressing in different developmental stages. In addition, the each new neurons progressing in different developmental stages may differentially affect on the acquired information in dentate gyrus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：ニューロン新生（神経新生）、新生ニューロン、海馬、歯状回、スパイン、長期増強（LTP）、レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) 成体海馬内において、神経幹細胞や神経前駆細胞が歯状回顆粒細胞層の内側に存在することが、核酸アナログやレトロウイルス等の分裂細胞を標識する手法により明らかとなった。

(2) 齧歯類において、これらの神経前駆細胞から新生したニューロンは、成体海馬歯状回内で既存の回路網へ機能的に統合されていることが、新生ニューロンの電気生理学的特性の研究により示された。

(3) 海馬内ニューロン新生の効率は、学習行動、エクササイズ、抗うつ薬投与等で促進されることから、神経活動に依存したニューロン新生のメカニズムが示唆されており、これを裏付けるものとして、*in vivo* LTP 誘導による新生ニューロン数の増加が報告された。

(4) しかし、神経活動・可塑性誘導にともなう、新生ニューロンの既存回路網への統合様式の変化については未知であったとともに、未だに不明である。

2. 研究の目的

新生ニューロンの既存回路網への統合様式が、記憶学習等の神経可塑性誘導によりどのように影響を受けるのか、また、蓄えられた記憶学習情報に対しどのような影響を与えるのかは不明であった。現在までに、この疑問に答えるような解析を行う手段は、遺伝学的、もしくはウイルスを用いて標識をした新生ニューロンの電気生理学的解析が一般的と考えられるが、この方法では新生ニューロンの、可塑性誘導にともなう既存回路網への統合様式の時空間的变化の観察は困難である。本研究では、新生ニューロンと既存回路間のシナプス連絡の可視化技術の開発を行い、構築した技術と当研究室で確立されている *in vivo* LTP 誘導技術を駆使し、可塑性誘導と成体海馬歯状回内新生ニューロンの既存回路網への統合様式との関連性を検討することで、海馬の情報獲得が新生ニューロンへ与える影響、そして、新生ニューロンが既存の海馬内情報へ与える影響を明らかにすることを目的とした。

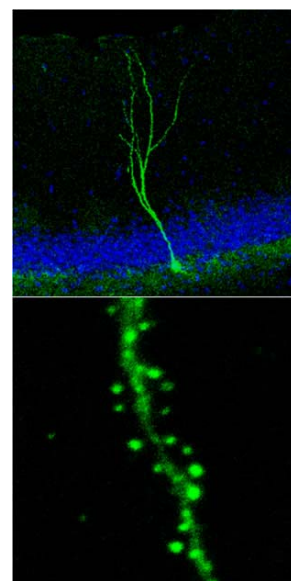
3. 研究の方法

レトロウイルスは、感染標的細胞に吸着しウイルス内にパッケージされている一本鎖 RNA を脱殻後、逆転写により二本鎖 DNA に変

換しその DNA を宿主染色体に組み込む（インテグレーション反応）ことで感染を樹立させる。このインテグレーション反応は、細胞分裂時の核膜消失が必要であることから、レトロウイルスは分裂細胞にのみ感染する特性を示す。成体海馬歯状回において分裂細胞は神経幹・前駆細胞が主であるため、海馬内へのレトロウイルス導入により新生ニューロン特異的な標識が可能であるとともに、感染時を誕生時として評価することができる。レトロウイルスを用いて、神経幹・前駆細胞に順行性・逆行性シナプティックトレーサー（tWGA・IGFP-TTC）、もしくは GFP-actin cDNA を導入・発現し、トレーサー移動の発現様式、もしくは、GFP-actin により可視化される新生ニューロンのスパイン発現様式を時空間的に解析することで、新生ニューロンの既存回路網への統合パターンへの可視化を試みる。また、レトロウイルス標識法と慢性電極設置技術の両立を確立する。慢性電極の刺激電極は、海馬歯状回分子層に投射する貫通線維を刺激するように、記録電極は歯状回分子層からのフィールド応答を記録するように設置し、自由行動下での刺激・応答記録を可能とする。この技術を用い、様々な時期での神経活動・可塑性誘導が、新生ニューロンの既存回路網への統合過程に変化を与えるかの検討を行った。

4. 研究成果

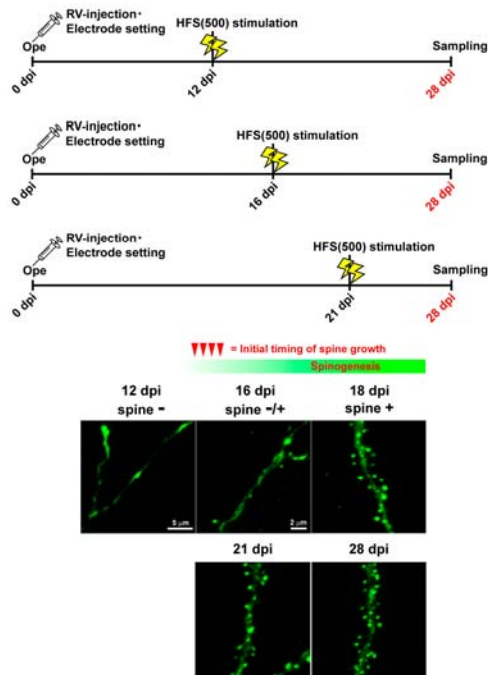
レトロウイルスでの順行性・逆行性シナプティックトレーサー・GFP- β -actin の発現を成体海馬新生ニューロンに誘導し、その検出を種々試みたが、順行性・逆行性シナプティックトレーサーの発現を検出することはできなかった。一方、GFP-actin 発現と抗 GFP 抗体による免疫染色により、新生ニューロンの



図①

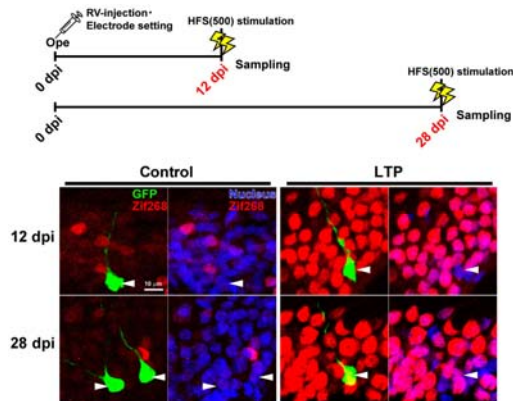
スパインは高効率で標識・検出することが可能となった (図①)。

このGFP-actin標識により、新生ニューロンのスパイン発達を検討したところ、感染 14 日後 (14 dpi) ~16 dpi でスパインの形成が開始すること、16~18 dpi にかけて劇的にスパイン数が増加することが明らかとなった。これを基に、スパインが未発現の 12 dpi、スパインが発現開始する 16 dpi、スパイン発達中・発達後の 21 dpi にそれぞれ LTP を片側の歯状回分子層中層に誘導し、28 dpi でのスパイン発現様式を観察・定量解析を行った (図②)。28 dpi 付近は、新生ニューロンの



図②

初期の劇的なスパイン発達が終了時期である。また、LTP 誘導にともない発現誘導されることが知られる最初期遺伝子、Zif268 の発現が、GFP 標識された新生ニューロン内で、LTP 誘導依存的に上昇することを確認した (図③)。12 dpi での LTP 誘導により、誘導



図③

層特異的なスパイン数とスパイン断面積の増加を観察した。16 dpi での LTP 誘導は、誘

導層特異的なスパイン数の減少を引き起こした。また、21 dpi での LTP 誘導により、反対側と比べ、誘導層である分子層中層におけるスパイン断面積の増加と、分子層外層でのスパイン断面積の減少が観察され、上記は全て、統計的にも有意なものであることが示された。これらの結果は、海馬の情報獲得が発達時期毎の新生ニューロンの既存回路網への統合様式に異なる影響を与えることを示している。また、発達時期毎の新生ニューロンが獲得情報に対して異なる役割を果たすことを示唆している。

今後は、上記のように経験依存的にスパイン発現様式を変化させた新生ニューロンが、海馬における新たな獲得情報に対して関与の仕方を変えるのかを検討する予定である。

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 Ohkawa N., Sugisaki S., Fujitani K., Tokunaga E., Hayasaka T., Setou M., Inokuchi K.
N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development.
Genes to Cells (査読有り), Vol. 13, 2008, pp. 1171-1183.

[学会発表] (計 5 件)

- ① LTP 誘導にともなう成体海馬新生ニューロンのスパイン形成様式の変化
大川 宜昭、齋藤 喜人、徳永 絵理、北村 俊雄、井ノ口 馨
第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日~12 日, パンフィコ横浜
- ② Spine formation pattern of new neurons is modulated by induction of long-term potentiation (LTP) in adult dentate gyrus
Noriaki Ohkawa, Yoshito Saitoh, Eri Tokunaga, Toshio Kitamura, Kaoru Inokuchi

39th Annual Meeting of The Society for
Neuroscience

October 17-21, 2009, Chicago, Ill.

- ③ LTP 誘導にともなう成体海馬新生ニュー
ロンのスパイン形成様式の変化
大川 宜昭、 斎藤 喜人、徳永 絵理、
北村 俊雄、井ノ口 馨
第 32 回日本神経科学大会, 2009 年 9 月 16
日~18 日, 名古屋国際会議

- ④ Spine formation pattern of new neurons
is modulated by induction of long-term
potentiation (LTP) in adult dentate
gyrus
Noriaki Ohkawa, Yoshito Saitoh, Eri
Tokunaga, Toshio Kitamura, Kaoru
Inokuchi
Neurogenesis 2009, CREST Neuroscience
international Symposium
June 2-3, 2009, Awaji Yumebutai
International Conference Center

- ⑤ 歯状回長期増強 (LTP) の時空間的な誘導
制御下での成体海馬新生ニューロンのス
パイン形成様式の検討 (一般口頭発表・
採択)
大川 宜昭、 斎藤 喜人、徳永 絵理、
北村 俊雄、井ノ口 馨
BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・
第 81 回日本生化学会大会合同大会)
2008 年 12 月 9 日~12 日, 神戸ポートア
일랜드

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大川 宜昭 (OHKAWA NORIAKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
助教

研究者番号 : 80416651

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :