

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月24日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500299

研究課題名（和文）海馬スライス培養を用いた生後ニューロン新生過程の系譜解析

研究課題名（英文）Lineage analysis of postnatal neurogenesis in organotypic culture of hippocampus

研究代表者

石塚 徹 (ISHIZUKA TORU)

東北大学・大学院生命科学研究所・講師

研究者番号：10344714

研究成果の概要（和文）：

海馬スライス培養とレトロウイルスによる新生細胞標識法を組み合わせ、1個の神経幹細胞・神経前駆細胞がニューロンに分化していくまでの生後のニューロン新生過程を系譜解析した結果、2～14日の臨界期が存在することを明らかにした。この期間を乗り越えたものだけが成熟ニューロンへと成熟し、既存のニューロンネットワークに組み込まれていくことが示唆される。また、この過程にはアクティビティに依存したアポトーシスが関わっていることが示唆されており、その機構解明のための新しいタンパク質プローブを作製した。アクティビティに依存したニューロン新生過程の解析に有用なツールになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Using the retrovirus vectors encoding EGFP, we labeled proliferating cells in an organotypic slice culture of the postnatal rat hippocampus and tracked an EGFP-labeled single progenitor cell and its descendants as a lineage over a long period. We found that the newly generated neurons became frequently untraceable and this critical traceability period was 2-14 days. It is suggested that the newly generated neurons differentiate into mature dentate granule neurons once they have survived over the critical period. We also created novel genetic probes, which consist of an optogenetic or chemical actuator and an apoptosis detecting reporter. They would help us to reveal the processes that determine the fate of newly generated neurons in an activity-dependent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：神経新生，海馬，レトロウイルス，スライス培養，オプトジェネティクス，細胞系譜

## 1. 研究開始当初の背景

長い間、ニューロン（神経細胞）は出生後には新たに作り出されることはなく、加齢に伴い減少していくのみと考えられてきた。しかし、脳の一部では生後においてもニューロンが作り出され続けている。この過程を胎生期のニューロン形成過程と区別して、生後あるいは成体ニューロン新生と呼ぶ。海馬歯状回顆粒細胞層は生後ニューロン新生が起こる場所の一つで、マウスなどの実験動物を用いた研究から、豊かな環境による生育、空間学習トレーニング、自発的な運動などによってニューロン新生が促進されることが明らかにされており、生後のニューロン新生が海馬依存的な学習・記憶機能に寄与していることが示唆されている。生理的な活動やてんかんなどのある種の病的な活動は、成体におけるニューロン新生過程（神経幹細胞・神経前駆細胞の増殖、ニューロンへの分化促進、新生したニューロンが生き残り、既存の神経ネットワークに組み込まれる割合など）に様々な影響を与えているが、どのようなメカニズムでどの過程に影響を与えているのか、その詳細は明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、生後のニューロン新生過程を途中で途切れさせることなく一貫して解析できる新たな系として、海馬スライス培養とレトロウイルスによる分裂細胞標識法を組み合わせた標識細胞の系譜解析系を行う。1個の神経幹細胞・神経前駆細胞がニューロンやグリアに分化していくまでの過程を詳細に解析するとともに、標識細胞自身のアクティビティを変化させた場合に系譜上に起こる変化を解析することで、ニューロンが生まれやすい環境とはどのような環境なのか、新しく生まれてきたニューロンが既存の神経ネットワークに組み込まれて機能するためにはどのような条件が必要なのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

生後7日齢のWistarラットから、厚さ350  $\mu\text{m}$  の海馬スライスを作製してカルチャーインサート上で培養を行う。培養14日目(14 DIV)に緑色蛍光タンパク質(EGFP)を組み込んだ組換えレトロウイルスを歯状回顆粒細胞層と歯状回門の境界領域である顆粒細胞層下部に注入して、分裂している細胞のみを特異的に標識する。その後、毎日蛍光顕微鏡下で観察を行い、最初の1個(1対)のEGFP標識細胞を確認したら、以後1日おきに標識細胞の写真を撮り、その過程を記録する。ウイルス注入から28日後(28 dpi)に1個の標識細胞に由来する子孫細胞の表現型を抗

EGFP抗体、抗ニューロンマーカー抗体、抗グリアマーカー抗体を用いた三重染色により免疫組織化学的に同定し、ニューロンへの分化過程の系譜を詳細に解析する。さらに標識細胞のアクティビティを人為的に変化させるためにチャンネルロドプシンなどを応用した光学機能プローブを発現させる組換えレトロウイルスを作製する。これらを系譜解析に応用し、様々なパターンで光学機能プローブ発現細胞を刺激した時に見られる系譜上の変化を解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 海馬スライス培養を用いた生後ニューロン新生過程の系譜解析

本研究では、合計87個の細胞系譜を作成することができた。これらの系譜から生じた新生細胞のうち、28 dpiまで生き残った細胞の表現型をHuC/D(ニューロンマーカー)とGFAP(アストロサイトマーカー)で同定すると、30系譜(34%)で全てあるいは一部の細胞がHuC/D陽性(以下Hu+とする、図1)、15系譜(17%)で全ての細胞がGFAP陽性(以下GFAP+)であった。一つの系譜に由来する新生細胞の一方がHu+で、他方がGFAP+となる系譜は一例も得られなかった。また、Hu+系譜30個のうち、一例でHu+細胞とHuC/D陰性

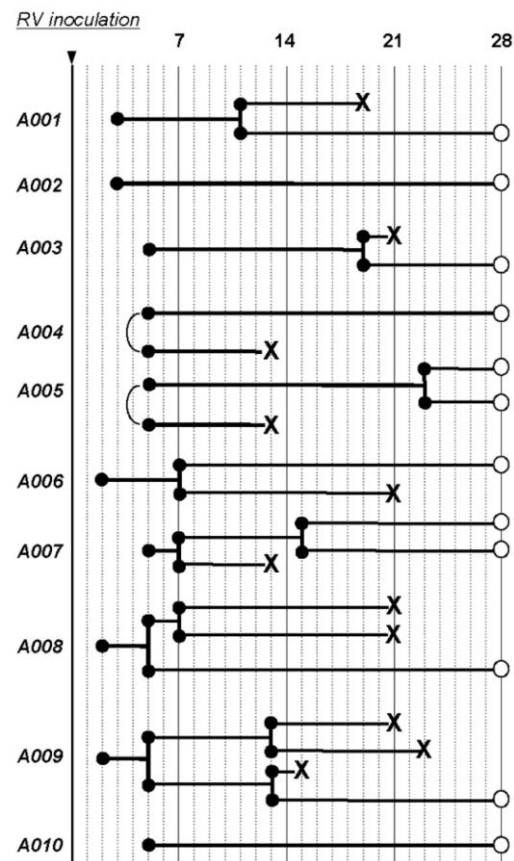


図1 HuC/D陽性系譜の一例

かつ GFAP 陰性 (Hu-/GFAP-) という表現型を有する子孫細胞が得られた。残りの 49 系譜の内訳は、21 系譜 (24.5%) で全ての子孫細胞が 28 dpi まで生き残れず途中で消失してしまったもの、21 系譜 (24.5%) では子孫細胞の表現型が全て Hu-/GFAP- となった。これらの結果から、Hu+細胞が得られた系譜をニューロン系譜、GFAP+細胞が得られた系譜を非ニューロン系譜として定量的な解析を進めた。

ニューロン系譜 (Hu+) においては、細胞分裂直後にどちらか一方あるいは両方の細胞が消失する例が顕著に観察され、観察期間中に見られた細胞分裂の頻度から予想される子孫細胞の数と実際に生き残った細胞の数との間に有意な差が認められた (図 2)。細胞の消失は分裂後 2 ~ 14 日の間で起こり、Prox1 (顆粒細胞マーカー) 陽性細胞系譜、NeuN (成熟ニューロンマーカー) 陽性細胞系譜の他のニューロンマーカー系譜においても同様に認められた。一方、非ニューロン系譜 (GFAP+) においては、このような現象は認められなかった (図 3)。このことからニューロン新生過程において、最後の細胞分裂から 1 ~ 2 週間に臨界期が存在し、この臨界期を乗り越えたものだけが成熟ニューロンへと成熟し、海馬ニューロンネットワークに組み込まれていくことが示唆された。

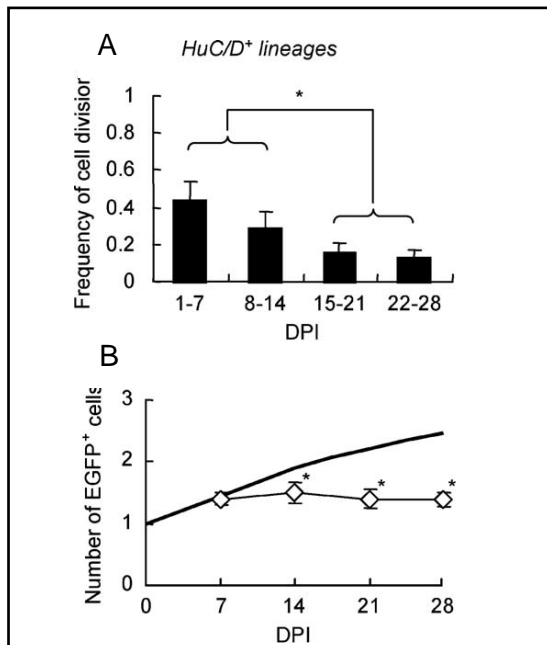


図 2 HuC/D 陽性細胞系譜 (ニューロン系譜) における新生細胞の増加. (A) 各期間における細胞分裂頻度 (B) 細胞増加曲線 太線は A の分裂頻度から計算される細胞増加曲線を、細線は実際の細胞増加曲線を表す。

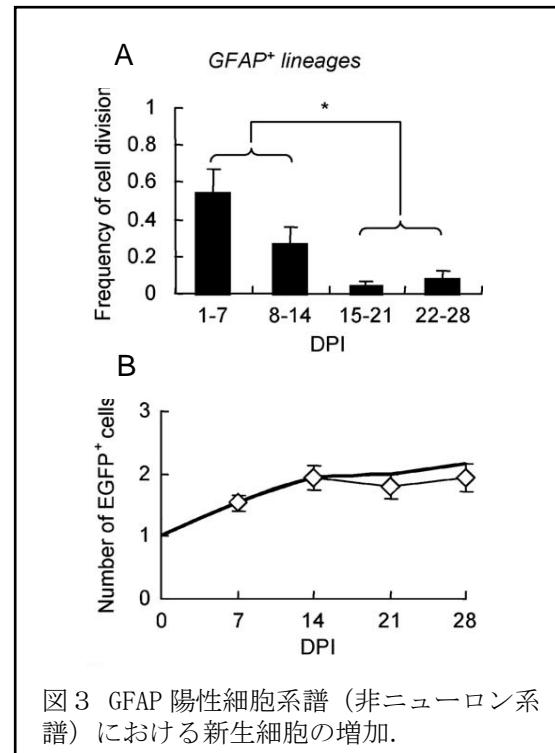


図 3 GFAP 陽性細胞系譜 (非ニューロン系譜) における新生細胞の増加。

## (2) 新規光学機能プローブの開発

海馬歯状回顆粒細胞層において見られる生後のニューロン新生過程において、最後の細胞分裂から 1 ~ 2 週間の間に顕著に新生細胞が消失する現象が観察された。この時期 (臨界期) を乗り越えた新生細胞は、その後成熟ニューロンへと成熟し、既存のニューロンネットワークに組み込まれていくと考えられる。この現象は非ニューロン系譜では認められず、ニューロン系譜にのみ見られる特徴で、おそらくアクティビティーに依存したアポトーシスによる細胞選抜が行われているものと推察される。この可能性を検討するため、細胞のアクティビティーを制御するタンパク質性機能プローブとアポトーシスによる細胞死同定のためのレポーター分子を直列に配置した新たな機能プローブを作製し、生後ニューロン新生過程の系譜解析への応用に向けた性能評価を行った。具体的には、細胞のアクティビティー制御には、改変型チャンネルロドプシンの一つ、チャンネルロドプシンワイドレシーバー (ChRWR) を用いた光による細胞膜の脱分極 (活性化) とショウジョウバエのアラトスタチン受容体 (AlstR) とそのリガンドを用いた細胞膜の過分極 (抑制化) を用い、アポトーシスプローブについては、カスパーゼ 3 の活性化によりレポーター分子の細胞内局在が変化する新規に開発したプローブ (Apojudge) と、従来より用いられている FRET プローブを選択し、これらを直列に配置した 2 種類の機能プローブ (ChRWR-Apojudge と AlstR-FRET) を作製し

た。これらの機能プローブをHEK293やNIH3T3で発現させ、光パルス刺激や特異的リガンドの投与による機能プローブ発現細胞のアクティビティー制御能やアポトーシス検出能を検証・評価し、実用化の目途をつけた。さらに、チャンネルロドプシンなどのオプトジェネティクス分子を用いた光によるアクティビティー制御のための新たな光刺激装置の開発・作製に成功した。

#### 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2件)

- ① Seiichiro Sakai, Kenichi Ueno, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, “Parallel and patterned optogenetic manipulation of neurons in the brain slice using a DMD-based projector”, Neuroscience Research (in press) (DOI: 10.1016/j.neures.2012.03.009), 査読有
- ② Jun Yokose, Toru Ishizuka, Takeshi Yoshida, Jun Aoki, Yoshio Koyanagi, Hiromu Yawo, “Lineage analysis of newly generated neurons in organotypic culture of rat hippocampus”, Neuroscience Research 69(3), 223-233, 2011 (DOI: 10.1016/j.neures.2010.11.010), 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 横瀬淳, 石塚徹, 八尾寛, 「海馬スライス培養における新生ニューロンの活動依存的生存評価のための新規光遺伝学プローブ」, 第34回日本神経科学大会, 2011年9月17日, 横浜
- ② Daniel BL Teh, 横瀬淳, 王紅霞, 酒井誠一郎, 石塚徹, 八尾寛, “APACOP, a FRET apoptosis probe with manipulation of neuronal activity”, 第34回日本神経科学大会, 2011年9月16日, 横浜
- ③ Jun Yokose, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, “Simultaneous monitoring the caspase-activity under optogenetic actuation: a versatile probe for the study of activity-dependent neurogenesis”, 8th International Brain Research Organization (IBRO) World Congress of Neuroscience, 2011年7月14-18日, フィレンツェ (イタリア)
- ④ Jun Yokose, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, “The fate-determinants of

adult newborn neurons: monitoring the caspase activities and optogenetic control at single-cell level”, 1st Tohoku International Symposium on Multidisciplinary Neuroscience, 2011年1月21日, 仙台

- ⑤ Jun Yokose, Takeshi Yoshida, Jun Aoki, Toru Ishizuka, Yoshio Koyanagi, Hiromu Yawo, “Tracking the fate of a newly generated cell and lineage construction in organotypic hippocampal slice culture”, Adult Neurogenesis: Structure and Function, 2010年5月29日, フラウエンキームゼー (ドイツ)
- ⑥ 横瀬淳, 八尾寛, 石塚徹, 「海馬スライス培養系における新生ニューロンの単一細胞追跡と系譜解析」, 第32回日本神経科学大会, 2009年9月17日, 名古屋
- ⑦ Jun Yokose, Hiromu Yawo, Toru Ishizuka, “Lineage analysis of postnatal neurogenesis in the slice culture of hippocampus”, 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS)/86th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2009年7月30日, 京都

[その他]

ホームページ等

[http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/field\\_list/neurosciences](http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/field_list/neurosciences)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石塚 徹 (ISHIZUKA TORU)

東北大学・大学院生命科学研究所・講師  
研究者番号: 10344714

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: