

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21602003

研究課題名(和文) PETを用いた神経新生の in vivo イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Development of PET imaging system to visualize adult neurogenesis

研究代表者

植木 孝俊 (UEKI TAKATOSHI)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60317328

研究成果の概要(和文)：近年、パーキンソン病等の神経変性疾患、及び、大うつ病や統合失調症等の精神疾患の罹患脳にて神経幹細胞障害が確認され、神経幹細胞は、それら疾患の診断・治療のための分子標的として関心を集めている。そこで本研究では初めに、神経幹細胞特異的に PET トレーサー<sup>[18F]FMT</sup> を取り込ませることができる、レンチウイルスによる中性アミノ酸トランスポーターLAT4 遺伝子発現系を構築することで、PET を用い、ほ乳動物にて神経幹細胞の成体脳内動態をリアルタイムに画像化するための動物評価系を創出した。そして、ラットにて移植神経幹細胞の脳内動態を PET により画像化するとともに、ラットの脳室下帯(SVZ)と海馬歯状回(SGZ)に脳定位装置を用いてレンチウイルスを感染させ、それらに内在する神経幹細胞を PET により画像化した。ここでは、また、培養神経幹細胞で増殖因子活性を呈する医薬候補化合物について、その成体脳神経新生に及ぼす影響を PET で定量的に解析した。次に、本研究では、大うつ病及び統合失調症の病態モデルマウスにて、SVZ と SGZ の神経幹細胞にレンチウイルスを感染させることで、それら精神疾患罹患脳における神経幹細胞の脳内動態、並びに成体脳神経新生障害の惹起の経過を in vivo で解析した。そして、当該マウスに抗うつ薬や向精神薬等を投与することで、大うつ病や統合失調症等の精神疾患の病態生理に神経幹細胞が与る仕組みを探究した。

研究成果の概要(英文)： An accumulating body of evidence point to the involvement of dysfunction of adult neurogenesis in the pathophysiology of neurological and psychiatric disorders such like Parkinson's disease, major depression and schizophrenia. Recently neural stem cell is recognized as a therapeutic target of diagnosis and treatment for those diseases. In the present study, therefore, at first animal system to visualize and evaluate adult neurogenesis was established, where lentivirally infected neural stem cell expresses exogenously neutral amino acid transporter LAT4 and uptake PET tracer <sup>[18F]FMT</sup>. In the adult rat brain transplanted or endogenous neural stem cells were infected with lentivirus and their behavioral dynamics was analyzed in vivo under PET. In addition the effects of drug candidate chemical compounds, which act as a mitogen in vitro for neural stem cell, on adult neurogenesis were quantitatively evaluated by PET. At second, in this study the established imaging technology was applied to disease model mice of major depression or schizophrenia, in which neural stem cells in the SVZ and SGZ were infected with lentivirus to express LAT4, and subsequently the mice were subjected to in vivo analysis of motility of neural stem cells in the diseased brain and study of the onset process of adult neurogenesis dysfunction. Antidepressant or psychoactive drug were administered to those animals, and the involvement of neural stem cell in the adult brain in the pathophysiology of psychiatric disorders was investigated.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：幹細胞医・生物学

キーワード：神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

20世紀を通じて、ヒトを含むほ乳動物の中枢神経系では、成長後も新たにニューロンを生じる神経幹細胞(NSC)が存在することが明らかにされた。NSCは成体脳では主に脳室下帯(SVZ)と海馬歯状回(SGZ)に局在する。’90年代にカナダのSamuel Weiss博士らによりNSCの培養法が確立されたのを契機に、NSCの分化や自己複製等に与る転写因子群並びに細胞内情報伝達系が多く同定され、また、NSC特異的マーカーとしてnestinやMusashi-1、Prominin-1等が見出されたことで、免疫組織化学による形態学的解析も盛んに行われるようになった。研究開始当初までに、knockoutマウスの作製、あるいはSVZ、SGZでの遺伝子knockdown及び過剰発現等により、NSCの増殖・分化に種々の遺伝子が働くことが報告されていたが、それらの研究では剖出脳でSVZ、SGZにおけるnestin等のNSC特異的マーカー陽性細胞を定量解析するに留まり、in vivoで非侵襲的にNSCの脳内動態を画像化することができる技術の開発が俟たれていた。また最近、パーキンソン病を初めとする神経変性疾患、及び、大うつ病や統合失調症等の精神疾患の患者死後脳にてNSCの障害が報告されていることから、それら疾患の病態生理にNSCが与る仕組みを解明することが、喫緊の課題となっていた。

2. 研究の目的

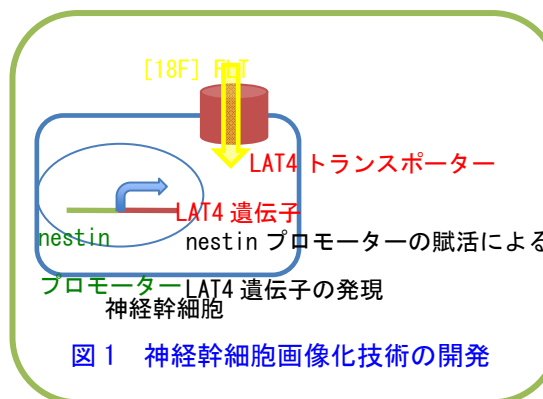
本研究では、PETを用いた新規のin vivoイメージングシステムを開発することにより、ヒトを含むほ乳動物の脳内にあるNSCを可視化するとともに、神経変性疾患や精神疾患等の病態脳におけるNSCの動態をin vivoで可視化することで、それら疾患の病態生理と成体脳神経新生障害の関係を解明し、NSCを治療標的とする医薬の開発や幹細胞療法等への応用を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、培養神経幹細胞をPETトレーサーで特異的に標識する技術を創出し、それを内因性神経幹細胞に導入することで、成体

脳神経新生をin vivoでPETによりモニタリングすることができる神経新生の動物評価系を構築した。

ここでは初めに、神経幹細胞特異的nestinプロモーターの下流に中性アミノ酸トランスポーターLAT4遺伝子を配置したレンチウイルス・ベクターを作製し、それより調製したウイルス粒子を、培養神経細胞に感染させLAT4を発現させた。そして、汎用PETトレーサー<sup>[18F]</sup>FMTを培地に添加し神経幹細胞を標識した(図1)。ここでは、発現する遺伝子の構成についての至適化を行い、<sup>[18F]</sup>FMT取り込みの高効率化を図った。次に、成体ラット脳に脳定位装置を用いて海馬歯状回及び脳室下帯に、至適化したレンチウイルス粒子を感染させ、神経幹細胞を<sup>[18F]</sup>FMTで特異的に標識して、PETによりin vivoで神経新生を定量的に解析できる、神経新生の動物評価系を創出した。



本研究では次に、この動物評価系の、神経幹細胞障害が病態生理に与るとされる大うつ病や統合失調症等の精神疾患の神経幹細胞を標的とした診断・治療への応用を図るために、母子分離ストレスを負荷し作製した、大うつ病病態モデルマウス(Depマウス)、及び、統合失調症の脆弱性因子DISC1変異体を発現する統合失調症病態モデルマウス(Schizoマウス)にて、脳定位装置によりSVZとSGZにレンチウイルス粒子を顕微注入した後、<sup>[18F]</sup>FMTをマウスに静注し、PETを用い

て神経幹細胞の脳内動態と成体脳神経新生障害の惹起を経時的にモニタリングした。ここでは、さらに抗うつ薬や向精神薬等を Dep マウスあるいは Schizo マウスに投与し、成体脳神経新生障害が大うつ病や統合失調症等の精神疾患の病態生理に与る仕組みを探究するとともに、神経幹細胞を治療標的とした、それら疾患の医薬候補化合物の探索を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 成体脳神経新生動物評価系の創出

本研究の結果、ラット等のほ乳動物において神経幹細胞の成体脳内動態を、in vivo で PET を用いて画像化するための分子イメージング技術が創出された。即ち、nestin プロモーターにより神経幹細胞特異的に中性アミノ酸トランスポーターである LAT4 を発現するレンチウイルス遺伝子発現系を新たに構築することで、ウイルス感染脳にて移植神経幹細胞、及び、脳室下帯 (SVZ)、海馬歯状回 (SGZ) の内因性神経幹細胞をリアルタイムに in vivo で画像化した (図 2)。

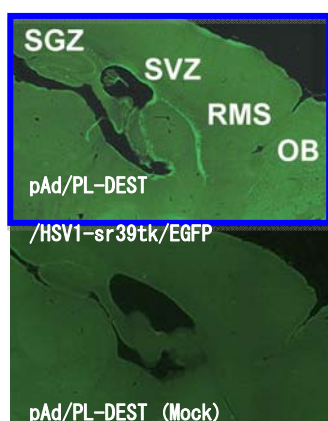


図 2 神経幹細胞特異的遺伝子発現系の構築

nestin プロモーターにより蛍光タンパク質 EGFP を発現させるためのウイルス遺伝子発現系を構築し、ラット成体脳 SVZ の神経幹細胞に当該ウイルス粒子を感染させた。

##### (2) 病態脳での神経幹細胞の脳内動態解析

母子分離による大うつ病病態モデルマウス (Dep マウス)、及び、DISC1 遺伝子変異による統合失調症病態モデルマウス (Schizo マウス) にて、成体脳 SVZ と SGZ に組換えレンチウイルスを感染させ、nestin プロモーターにより LAT4 遺伝子を神経幹細胞特異的に発現させた。Dep マウスでは、行動学的解析により定量的に評価されたうつ症状の重篤化に従い、 $[^{18}\text{F}]$ FMT の当該組織への集積が低減することが PET で観察され、うつ症状が神経幹細胞障害を惹起することが確認された。また、Schizo マウスでは、成体脳 SVZ から嗅球への神経幹細胞の遊走 (RMS) の障害が、PET による神経幹細胞の in vivo 動態解析により確

認された。これら罹患脳における神経幹細胞障害は、精神疾患の病態生理に成体脳神経障害が与ることを示唆しており、今後は、マカクサル等の高等霊長類で、大うつ病や統合失調症等の精神疾患病態モデルを作製し、本研究による画像化技術を適用することで、ヒトでの神経幹細胞を治療標的とする、それら疾患の診断・治療への応用を図ることが望まれる。

本研究では、ついで、Dep マウスあるいは Schizo マウスに抗うつ薬や向精神薬等を投与し、それら医薬の薬効機序に成体脳神経新生賦活が与る仕組みを解析した。その結果、Dep マウスで抗うつ薬の投与後、 $[^{18}\text{F}]$ FMT の集積の増加が PET を用い観察され、SGZ での神経幹細胞増殖が賦活されたことが確認された。一方、Schizo マウスについては、向精神薬による SVZ と SGZ での成体脳神経新生の賦活は確認されなかった。これらの結果は、抗うつ薬の薬効機序に成体脳神経新生が与るとともに、神経幹細胞障害が、特に大うつ病の病態生理の分子的基礎を介して惹起することを示唆している。今後は、本研究による分子イメージング技術を種々の精神・神経疾患病態モデルサル等に適用することで、薬剤の成体脳神経新生賦活効果を評価しながら、神経症状を改善する医薬候補化合物のスクリーニングを行うことが俟たれている。

成体脳神経新生の動態を in vivo でリアルタイムに解析することができる技術は、これまでになく、nestin、Musashi-1 等を初め、神経幹細胞で特異的に機能するタンパク質について、剖出脳切片で免疫組織化学的染色を施すことで神経幹細胞の賦活あるいは障害を定量的に解析するのみであった。特に、ヒトでの神経幹細胞を標的とする精神・神経疾患の早期診断・治療への応用を図る上で重要であるマカクサル等の高等霊長類での神経幹細胞の成体脳内動態解析を行うことを、本研究による PET を用いた分子イメージング技術は可能にする他、創出された画像化技術を改変することにより、それを他の遺伝子発現の in vivo 動態解析に適用することができることは、本技術の重要性を一層高めている。

#### 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 5 件)

- ① Thanseem I, Anitha A, Nakamura K, Suda S, Iwata K, Matsuzaki H, Ohtsubo M, Ueki T, Katayama T, Iwata Y, Suzuki K, Minoshima S, Mori N. Elevated transcription factor specificity protein 1 in autistic brains alters the expression of autism candidate

- genes. *Biol Psychiatry* 71, 410-418 (2011). 査読有.
- ② Kikuchi M, Hirose T, Yokokura M, Yagi S, Mori N, Yoshikawa E, Yoshihara Y, Sugihara G, Takebayashi K, Iwata Y, Suzuki K, Nakamura K, Ueki T, Minabe Y, Ouchi Y. Effects of brain amyloid deposition and reduced glucose metabolism on the default mode of brain function in normal aging. *J Neurosci* 31, 11193-11199 (2011). 査読有.
- ③ Ito T, Ueki T, Furukawa H, Sato K. The identification of novel protein, brain-derived integrin factor-1 (BDIF1), which interacts with astrocytic gap junctional protein. *Neurosci Res* 70, 330-333 (2011). 査読有.
- ④ Yokokura M, Mori N, Yagi S, Yoshikawa E, Kikuchi M, Yoshihara Y, Wakuda T, Sugihara G, Takebayashi K, Suda S, Iwata Y, Ueki T, Tsuchiya KJ, Suzuki K, Nakamura K, Ouchi Y. In vivo changes in microglial activation and amyloid deposits in brain regions with hypometabolism in Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38, 343-351 (2011). 査読有.
- ⑤ Ouchi Y, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Yagi S, Ueki T, Nakamura K. Altered brain serotonin transporter and associated glucose metabolism in Alzheimer disease. *J Nucl Med* 50, 1260-1266 (2009). 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 植木孝俊. NG2 細胞における CD44 プロセシングの画像化技術の創出と、その多発性硬化症の幹細胞療法への応用. 第 16 回グリア研究会. 2011 年 10 月 22 日. 名古屋.
- ② 植木孝俊. NG2 細胞における CD44 プロセシングの画像化技術の創出と、その多発性硬化症のための幹細胞療法への応用. 第 34 回日本神経科学大会. 2011 年 9 月 15 日. 横浜.
- ③ 植木孝俊. Development of functional molecular probe and its application for diagnosis of Alzheimer's disease. 第 53 回日本神経化学学会大会. 2010 年 9 月 3 日. 神戸.
- ④ Takatoshi Ueki. Development of molecular imaging system to visualize the processing of CD44 in NG2 cell, and its contribution to understanding of the role of CD44 in the CNS. The

29th Naito conference on glia world.  
2010 年 10 月 6 日. Hayama.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

植木 孝俊 (UEKI TAKATOSHI)  
浜松医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60317328

### (2) 研究分担者

古川 弘 (FURUKAWA HIROMU)  
研究者番号：20209167  
浜松医科大学・医学部・助教  
(H23)

### (3) 連携研究者

なし