

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500306

研究課題名（和文） 胎生期～生後の海馬ニューロン新生の包括的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of hippocampal neurogenesis from embryonic to postnatal stages

研究代表者

石 龍徳（SEKI TATSUNORI）

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：20175417

研究成果の概要（和文）：海馬では、成体になってもニューロン（顆粒細胞）が例外的に新生されている。ここでは、成体型神経幹細胞が存在しているが、一般の胎生期の神経幹細胞とは異なり、グリア線維性酸性タンパク（GFAP）を発現している。本研究では、GFAP 発現細胞を可視化できる遺伝子改変マウスを用いて、胎生期～生後初期に、顆粒細胞を産生する神経幹細胞/前駆細胞がどのようにして発達してくるのかを調べた。その結果、この神経幹細胞は、その最初の産生時期から GFAP を発現している特殊な神経幹細胞であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In the hippocampus, neurons (granule cells) exceptionally continue to be generated into adulthood. There are adult type neural stem cells that express glial fibrillary acidic protein (GFAP), unlike usual embryonic ones. In this study, we explored the developmental process of neural stem cells producing granule cells from embryonic to early postnatal stages using transgenic mice to visualize GFAP expressing cells. The present results demonstrate that these embryonic neural stem cells express GFAP from the beginning of granule cell production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：成体期、胎生期、ニューロン新生、海馬、神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

（1）およそ 100 年間、成体の脳ではニューロンは新生しないと信じられてきた。1965 年に米国のアルトマンは、成体海馬の歯状回顆粒細胞層で起こるニューロン新生をラットで発見したが、学会に広く認められることはなかった。1990 年代初めに、我々は、神経接

着分子（NCAM）の糖鎖であるポリシアル酸（PSA）が、成体海馬の歯状回で新生するニューロン（顆粒細胞）の特異的なマーカーになることを発見し、以後 20 年に渡って、成体脳のニューロン新生機構を詳細に解析してきた。

（2）2001 年には、成体海馬歯状回でニュー

ロンを新生する神経幹細胞は、グリア線維性酸性タンパク (GFAP) を発現することが明らかになった。胎生期にニューロンを新生する神経幹細胞は通常 GFAP 陰性なので、成体の神経幹細胞は特殊な幹細胞であると考えられた。2005 年には、我々は、生後初期の海馬歯状回で研究を行い、生後初期でも、GFAP 陽性神経幹細胞からニューロンが産生されることを明らかにした。

この結果から、海馬歯状回では、大脳新皮質とは異なり、胎生期でも、GFAP 陽性神経幹細胞からニューロンが新生しているとの予想を立てた。

2. 研究の目的

海馬では、成体になってもニューロンの新生が続いている。現在、成体海馬のニューロン新生は、再生医療、記憶・学習機構、精神疾患など様々な分野で注目され、精力的に研究されている。しかし、今までの研究では、胎生期の海馬のニューロン新生が、どのようにして生後～成体期のニューロン新生に引き継がれていくのかといった視点がまったく欠けている。本研究では、このニューロン新生の連続性に着目し、胎生期から成体期の海馬で起こるニューロン新生を包括的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) GFAP 陽性神経幹細胞及びその子孫の神経前駆細胞の発現部位、分布の変化を調べるために、GFAP プロモータ制御下に緑色蛍光タンパク (GFP) を発現する遺伝子改変マウス (GFAP-GFP マウス) の胎生 13.5 (E13), 14.5, 17.5 日目、および 生後 0, 5, 14 日目の脳を 4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、OTC コンパウンドに包埋した。

(2) クリオスタットを使って、包埋した脳の連続切片を作製した。抗-GFP によって、蛍光抗体染色をするとともに、幹細胞マーカー抗体 (Sox2)、グリアマーカー抗体 (GFAP)、ニューロンマーカー抗体 (Neurogenin2, Tbr2, NeuroD)、顆粒細胞マーカー抗体 (Prox1) によって、GFP 陽性細胞の性質を詳細に検討した。染色後は、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss 510 Meta) および光学顕微鏡によって観察し、画像を解析した。

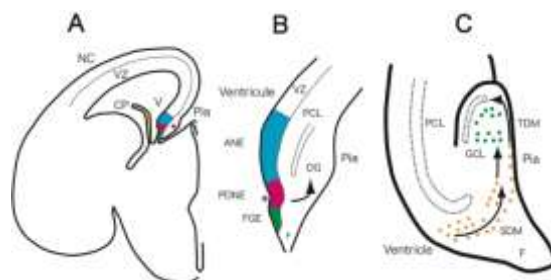
これらの手法で、GFAP 陽性細胞が海馬領域のどの部分にいつ頃発生するのか、またそれがどのような神経前駆細胞に変化するのかを検討した。また、分布の変化から、おおよその移動経路を推測した。

4. 研究成果

(1) 海馬歯状回の顆粒細胞の発生に関して今まで得られている知見を図 1 にまとめた。海馬歯状回の顆粒細胞は、大脳皮質の内腹側

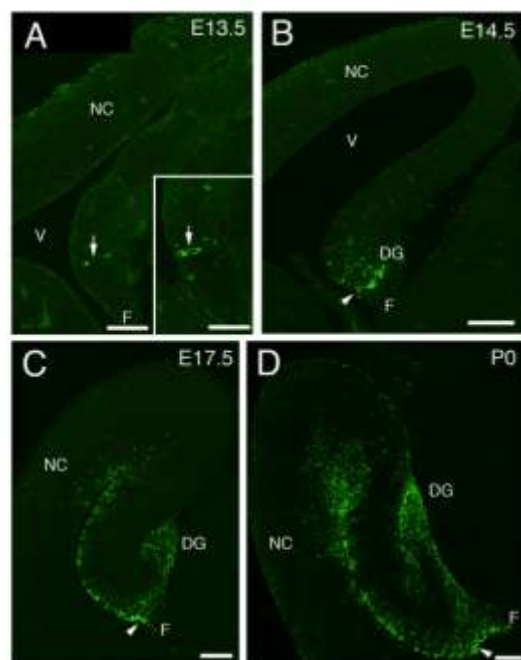
部の脈絡叢 (CP) 付着部位付近の歯状回切痕 (A, E14; B, E16, 星印, Notch) の脳室層 (VZ) から発生する。これに対し大脳新皮質の錐体細胞は外側及び背側から発生する。海馬の顆粒細胞の神経幹細胞、神経前駆細胞は、この歯状回切痕付近から海馬采 (F) 上部、軟膜 (P) 直下に移動して、増殖部位 (SDM) を形成する (C, E19)。この増殖部位の移動細胞のうち、軟膜 (Pia) 側を移動したものは、顆粒細胞層 (GCL) を形成する。また、歯状回門に移動したものは、ここで新しい増殖部位 (TDM) を作る考えられている。しかし、これらの細胞がどのような性質を持っているのかは知られていない。

図 1 顆粒細胞の出現部位と移動



(2) 今回の研究では、GFAP-GFP 遺伝子改変動物を用いて、これらの顆粒細胞の発達過程において、いつ、どこで GFAP 発現細胞が出現するのかを検討した。

図 2 胎生 14 日目から生後 0 日目における GFAP 発現細胞の分布



E13.5 の大脳皮質を調べたところ、海馬采

近傍の脳室層に GFP 陽性細胞が検出された (図 2A, 矢印)。この時期には、大脳新皮質 (NC) に GFP 陽性細胞はまったく検出されなかった。この結果は、歯状回切痕付近から発生する神経前駆細胞は、大脳新皮質の細胞とは異なり、その最初から GFAP を発現する特殊な細胞であることを示している。

胎生 15.5 日目では、GFP 陽性細胞が脳室層の歯状回切痕付近にクラスターを作っていた (図 2B, 矢印)。GFP 陽性細胞は、そこから歯状回原基 (DG) に向かってが移動しているように見えた。

胎生 17.5 日目では、GFP 陽性細胞は、海馬の脳室層 (図 2C, 矢印)、歯状回原基 (DG) に多く分布していた。大脳新皮質 (NC) にはごく少数しか存在しなかった。脳室層から歯状回原基へ向かう移動細胞 (矢頭) にも GFP 陽性細胞が見られた。歯状回原基には多数の GFP 陽性細胞が蓄積されていた。

生後 1 日目では、歯状回切痕から歯状回に掛けて存在する GFP 陽性細胞の数は益々増加した (図 2D)。

生後 5 日目になると、歯状回切痕から海馬采上部、軟膜直下の GFP 陽性細胞は減少した。この時期には、歯状回にはまだ多数の GFP 陽性細胞が残っていた。このことは、生後 5 日目には、歯状回切痕から移動する細胞は減少するが、歯状回では、GFP 陽性細胞から顆粒細胞が産生されていることを示唆している。

生後 12 日目になると、GFP 陽性細胞は、顆粒細胞層内側の顆粒細胞層下帯 (SGZ) に見られた。この GFP 陽性細胞は、放射状の突起をもっていたので、成体型の神経幹細胞であると考えられる。その他、海馬全体にも GFP 陽性細胞は存在したが、それらは星状形をしているのでアストロサイトであると考えられる。

(3) つぎに、GFP 陽性細胞がニューロンに分化するかどうかを検討した。

胎生 14.5 日目の歯状回切痕付近に見られる GFP 陽性細胞は、幹細胞マーカーの Sox2 に陽性であった。また、一部は GFAP に陽性であった。歯状回原基に存在する GFP 陽性細胞は、初期神経前駆細胞のマーカーである Tbr2 に陽性であった。したがって、GFAP を発現する細胞が、歯状回原基に移動すると、神経細胞に分化し始めると考えられる。

胎生 17.5 日目になると、GFP 陽性細胞は、脳室層 (VZ)、海馬采 (F) 上部、軟膜直下を通過して歯状回に移動しているように見えた (図 3)。この移動経路にある GFP 陽性細胞のうち、VZ に存在するものは、ニューロン分化に関係する分子である、プロニューラルプロテインの Neurogenin2 に陽性であった (図 3A)。VZ に存在する GFP 陽性細胞には Tbr2 や NeuroD はほとんど発現していなかったが、海

馬采上部、軟膜直下、歯状回に存在する GFP 陽性細胞は、Tbr2 や NeuroD を発現していた (図 3B, C)。一方、顆粒細胞のマーカータンパクである Prox1 は、海馬采上部、軟膜直下には発現していなかったが、歯状回では発現していた (図 3D)。これらの結果を総合すると、VZ に存在する GFP 陽性細胞は、ニューロンに分化直後の細胞で、その後移動中に次第に神経前駆細胞の段階をへて、歯状回に到着し、顆粒細胞に分化すると考えられる

図 3 胎生 17.5 日目の海馬でみられる GFP 陽性細胞の性質

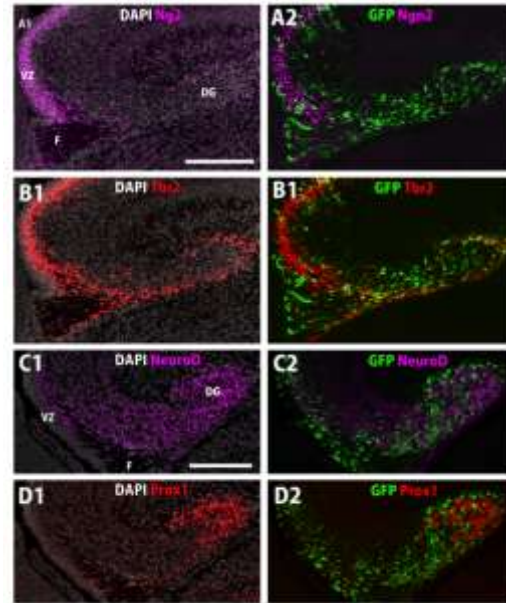
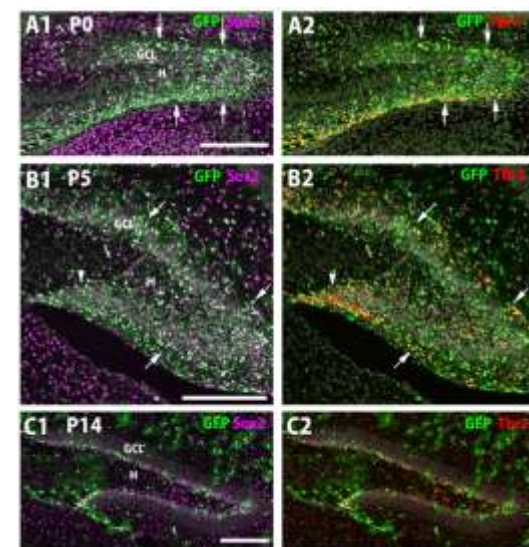


図 4 生後 0, 5, 14 日目の歯状回で見られる GFP 陽性細胞の性質。



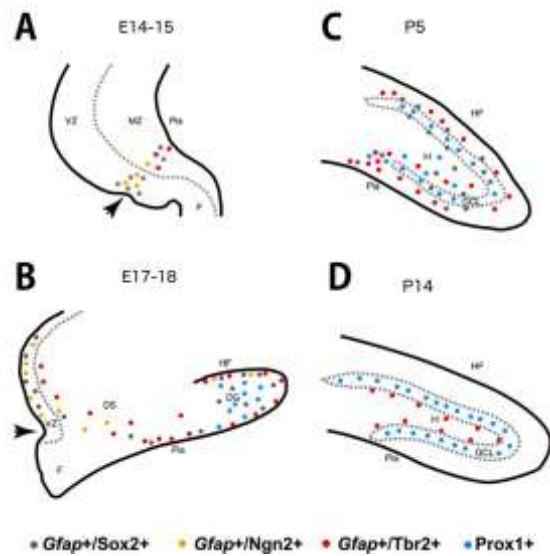
生後 0-5 日目になると、顆粒細胞層が形成さ

れ始める。その時期では GFP 陽性細胞は、顆粒細胞層の外側（分子層に相当する）と内側（歯状回門に相当する）に多数見られた（図 4）。

生後 14 日目では、顆粒細胞層はほぼ成体と同じような形態になる。この時期では、放射状の突起をもっている GFP 陽性細胞が顆粒細胞層内側の顆粒細胞層下帯（SGZ）に見られた。この GFP 陽性細胞は、Sox2 に陽性なので、成体型の神経幹細胞であると考えられる。その他、放射状の突起をもたない GFP 陽性細胞も SGZ に存在したが、これらの多くは Tbr2 に陽性なので、神経前駆細胞であると考えられる。

(4) 以上の結果を図 5 にまとめた。

図 5 生後 14 日目から生後 14 日目までの海馬における GFP 陽性細胞の分布と性質



GFP は、GFAP プロモータによってその発現が制御されているので、GFP 陽性細胞は、少なくとも遺伝子レベルで *Gfap* を発現している細胞と考えられる。免疫組織化学の結果では、すべての GFP 陽性細胞が GFAP を発現しているわけではないが、ここでは GFP 陽性細胞を *Gfap* 発現細胞として記述する。

胎生 14-15 日目では、*Gfap* 発現神経幹細胞/前駆細胞は歯状回切痕付近で生まれ、軟膜側に移動する。軟膜直下には歯状回原基が形成されるが、そこに到達した *Gfap* 発現細胞は、*Ngn2* や *Tbr2* を発現する神経前駆細胞となる。また、この中には *Sox2* を発現する幹細胞様の神経前駆細胞も存在している。

胎生 17-18 日目では、歯状回切痕から歯状回に掛けて移動細胞がみられる。これらの細胞は、*Ngn2* や *Tbr2* に陽性の神経前駆細胞で、この細胞が歯状回に達すると *Prox1* 陽性の顆粒細胞になる。したがって、移動しながら次

第にニューロンに分化すると考えられる。この移動経路には、*Sox2* 陽性細胞が存在することから、神経幹細胞様の細胞も存在すると考えられる。

生後になると顆粒細胞層が形成され、ニューロン産生は、顆粒細胞層の外側（分子層）と内側（歯状回門）で行われるようになる。しかし、次第に、神経産生は、外側では消失し、内側では顆粒細胞層下帯に限られてくる。この状態は、成体のニューロン新生に近い。これらの結果は、顆粒細胞は、その産生初期の胎生期から成体期まで、一貫してグリア様の *Gfap* 発現神経幹細胞から産生されることを示している。

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 6 件)

(1) Nakamura K, Ito M, Liu Y, Seki T, Suzuki T, Arai H (2013) Effects of single and repeated electroconvulsive stimulation on hippocampal cell proliferation and spontaneous behaviors in the rat. *Brain Res.* 1491:88-97. doi:10.1016/j.brainres.2012.10.052. 査読有

(2) Namba T, Mochizuki H, Suzuki R, Onodera M, Yamaguchi M, Namiki H, Shioda S, Seki T (2011) Time-Lapse imaging reveals symmetric neurogenic cell division of GFAP-Expressing progenitors for expansion of postnatal dentate granule neurons. *PLoS One* 6:e25303. doi:10.1371/journal.pone.0025303. 査読有

(3) 石龍徳 (2011) 成体海馬のニューロン新生 そのルーツを探る *東京医科大学雑誌* 69: 433-449. 査読無

(4) Liu, Y Namba T, Liu J, Suzuki R, Shioda S, Seki T (2010) GFAP-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both GFAP and neuronal markers in the adult hippocampus. *Neuroscience* 166:241-251. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.026. 査読有

(5) Ito M, Seki T, Liu J, Nakamura K, Namba T, Matsubara Y, Suzuki T, Arai H (2010) Effects of repeated electroconvulsive seizure on cell proliferation in the rat hippocampus. *Synapse* 64:814-821. doi:10.1002/syn.20796. 査読有

(6) 石龍徳 (2010) ニューロン新生の分子マーカー Clinical Neuroscience 28: 1344-1347. 査読無

[学会発表] (計 18 件)

- ① 石龍徳, 佐藤亨, 戸田景子, 皆川史織, 岩室祥一, 塩田清二: 胎生期の海馬歯状回顆粒細胞は脳新皮質とは異なる GFAP+/BLBP-神経前駆細胞から形成される. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013 年 3 月 28 日.
- ② 篠原広志, 佐藤亨, 戸田景子, 塩田清二, 石龍徳: 胎生期海馬神経幹細胞の移動解析. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013 年 3 月 28 日.
- ③ 柏木太一, 塩田清二, 石龍徳: 胎生期海馬神経幹細胞の特性における BMP シグナルの役割. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013 年 3 月 29 日.
- ④ 石龍徳: 胎生期～成体期の海馬に存続する神経幹細胞の起源について. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 山梨, 2012 年 3 月 27 日.
- ⑤ 篠原広志, 佐藤亨, 戸田景子, 塩田清二, 石龍徳: 胎生期海馬神経前駆細胞の移動解析. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 山梨, 2012 年 3 月 26 日.
- ⑥ 石龍徳, 佐藤亨, 戸田景子, 井村徹也, 大隅典子, 塩田清二: 胎生期の歯状回では GFAP 陽性神経前駆細胞集団が移動して顆粒細胞層を形成する. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 2012 年 9 月 18 日.
- ⑦ 篠原広志, 佐藤亨, 戸田景子, 塩田清二, 石龍徳: 胎生期海馬神経前駆細胞の移動解析. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 2012 年 9 月 21 日.
- ⑧ Seki T: Organotypic hippocampal slice cultures for studies of postnatal neurogenesis, The 2nd Japan-Korea Neural Tissue Culture Seminar, 東京 Tokyo, 2012 年 6 月 16 日.
- ⑨ 石龍徳: 海馬の発生を研究する: これが Adult neurogenesis の研究に大切な訳は? 第 21 回「海馬と高次機能」学会, 金沢, 2012 年 10 月 6 日.
- ⑩ Seki T: From adult to embryonic neurogenesis in the hippocampus. Commemorative Symposium of the 28th International Prize for Biology “Neurogenesis throughout Life” 神戸, 2012 年 11 月 28 日.
- ⑪ Seki T, Sato T, Toda K, Shioda S: Progenitors that contribute to the embryonic development of dentate granule cell layer have an astrocytic feature. 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 横浜,

2012 年 3 月 28 日.

- ⑫ Seki T: The origin and cell division pattern of GFAP-expressing neural progenitors that produce dentate granule cells. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011 年, 9 月 17 日.
- ⑬ Shinohara H, Sakayori N, Takahashi M, Seki T, Osumi N: Ninein is essential for the interkinetic nuclear migration of cortical progenitor cells anchoring the centrosome to microtubules. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011 年, 9 月 17 日.
- ⑭ 石龍徳, 大隅典子, 井村徹也, 塩田清二: 海馬歯状回原基の GFAP 発現神経幹細胞のニューロン分化について. 第 115 回日本解剖学会全国大会, 岩手, 2010 年 3 月 29 日.
- ⑮ Seki T: Cell division and neuronal differentiation of GFAP-expressing neural progenitors in the postnatal hippocampus. Adult Neurogenesis: Structure and Function, Abstract 14, organized by Dr. Kempermann and Abcam ドイツ, 2010 年 5 月 28 日.
- ⑯ Seki T: How do GFAP-expressing neural progenitors divide and generate neuron-committed progeny in the postnatal hippocampus. The first international conference of neural cell culture, Abstract S4-1 韓国, 2010 年 6 月 25 日.
- ⑰ Seki T, Osumi N, Imura T, Shioda S: Embryonic neural stem cells of the dentate granule cells express GFAP. 第 33 回日本神経科学大会, 神戸, 2010 年, 9 月 4 日.
- ⑱ Miyakawa M, Seki T, Uchiyama Y (2010) Origin of PSA-NCAM expressing blood vessels in the developing forebrain of avian embryo. 第 33 回日本神経科学大会, 神戸, 2010 年, 9 月 4 日.

[図書] (計 1 件)

- (1) Seki T (2011) From embryonic to adult neurogenesis in the dentate gyrus. In: “Neurogenesis in the adult brain I” (eds. Seki T et al), Springer, pp193-216.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/Histology-Neuroanatomy/Histology-Neuroanatomy/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石龍徳 (SEKI TATSUNORI)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20175417