

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 4日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590089

研究課題名（和文） 扁桃体による海馬神経新生の調節

研究課題名（英文） Regulation of hippocampal neurogenesis by the amygdala

研究代表者

阿部 和穂 (ABE KAZUHO)

武蔵野大学薬学研究所・教授

研究者番号：60202660

研究成果の概要（和文）：本研究では、「扁桃体が海馬の神経新生を左右する」という仮説の実証を試みた。ラットにおいて脳弓-海馬采の切断は、海馬歯状回における神経幹細胞（ブロモデオキシウリジン陽性細胞）が増加した。一方、扁桃体破壊群の海馬歯状回では神経幹細胞数が減少した。これらの結果は、海馬神経新生に扁桃体が関与することを示唆する。

研究成果の概要（英文）：The present study investigated whether the amygdala plays a role in regulation of neurogenesis in the hippocampus. Transection of the fimbria-fornix in the rat resulted in an increase of the number of neural stem cells (bromodeoxyuridine-positive cells) in the dentate gyrus. Lesion of the amygdala in the rat resulted in a decrease of the number of neural stem cells in the dentate gyrus. These results suggest that hippocampal neurogenesis is regulated by the amygdala.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：海馬、神経新生、扁桃体

1. 研究開始当初の背景

医療の進歩に伴い多くの疾患が克服されてきた一方で、高齢化により発症する疾患が社会問題となってきた。とくにアルツハイマー型認知症の患者数は増加の一途をたどっているが、いまだに確実な治療法はなく、治療薬の開発が急務の課題となっている。

アルツハイマー型認知症の中核症状は記憶障害である。発症のメカニズムは十分解明

されていないが、脳内で記憶形成に関与する部位「海馬」の神経細胞が進行性に脱落するために記憶障害が生じると考えられている。海馬はとくに思い出などの出来事記憶の形成に関与しているため、海馬の神経細胞が死滅すると、新たに体験した出来事が覚えられないという前向き健忘が起こる。研究開始当初の日本で唯一のアルツハイマー型認知症治療薬ドネペジルは、アセチルコリンエステ

ラーゼ阻害により認知・記憶機能を見かけ上改善する対症療法にすぎない。また、研究開発が進む他の治療薬候補のほとんどが、認知症の発症前もしくは初期段階に投与して記憶障害の進行を食い止めることを期待したものであり、残念ながら認知症を発症してしまった患者の認知・記憶機能を回復させることはできない。認知症の患者および家族が期待する真の治療を実現するためには、萎縮した海馬を元に戻すしかないが、これまでの技術では不可能と考えられてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アルツハイマー型認知症患者の脳機能を回復することができる新しい治療法の基盤を提供することである。

完成した大人の脳では神経が新しく生み出されることはないと言われてきたが、その定説は覆された。海馬には神経幹細胞が存在し、新しい神経細胞が絶えず作られていることが発見された [Science 255: 1707-1710 (1992); Nature Med. 4: 1313-1317 (1998)]。しかも、アルツハイマー型認知症患者の海馬にも神経幹細胞があり、神経新生が起きていることが明らかにされた [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 343-347 (2004)]。脳が備えた神経新生の仕組みをうまく促進できれば、萎縮した海馬を部分的でも元に戻すことは可能だろう。

海馬の神経新生を促す方法を見出そうと、世界中で数多くの研究者が神経新生の分子メカニズムの解明に取り組み、CREB、Wntなどのシグナル伝達分子の関与が明らかになりつつある [Nature Neurosci. 12: 1097-1105 (2009)]。また培養した海馬の神経幹細胞を使ったスクリーニングによって、神経幹細胞が増殖・分化して神経細胞になる過程を制御できる薬物の探索が行われている。ただし、神経幹細胞だけを対象にした薬物治療には限界があり、他の研究者とはまったく違う切り口から神経新生を促す革新的方法を提案したいと考えた。

そこで注目したのは、「海馬の神経新生は環境によって左右される」ことである。豊かな環境で育った動物では、海馬の神経新生が活発になると報告されている [J. Neurosci. 18: 3206-3212 (1998)]。ただし過度の刺激はストレスを生じ、海馬神経新生を阻害する [Nature Neurosci. 9: 526-533 (2006)]。同じ環境刺激でも個人によって受容のしかたは異なり、「快」と判断されたときと「不快」と判断されたときでは海馬新生に対する影響が違ふと考えられる。脳の中で感覚情報の価値判断を行うのは「扁桃体」であることから、「扁桃体が海馬の神経新生を左右する」という仮説をたてた。

研究代表者は、これまでに情動と記憶の関

連性を研究し、扁桃体が海馬のシナプス伝達可塑性を調節することを見出している [Review: Abe K, Jpn. J. Pharmacol. 86: 18-22 (2001)]。その技術を活用し、本研究では、「扁桃体が海馬の神経新生を左右する」という仮説の実証を試み、さらにはそのメカニズム解明と認知症治療への応用を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞の培養

生後0~1日齢のWistar系ラットより海馬を摘出し、トリプシン処理とビペッティングで細胞を分離した。2×10⁵ cells/mLとなるよう培地で希釈してフラスコに播き、37°C、5%CO₂条件下で1週間培養した。基本培地は、20 ng/mL EGFと20 ng/mL FGF2を含み、3日おきに全量交換した。継代は、neurosphereの大きさを見ながら、約2週間に1回行った。具体的には、培地中に浮いているneurosphereを培地ごとチューブに回収し3×10⁵ cells/mLの密度で培養を繰り返した。3回継代した細胞を用いて、増殖測定を行った。EGFとFGF2を含まない培地に薬物を溶かし細胞に処置し、2日後にMTTアッセイを行った。

(2) 脳弓-海馬采 (FF) の切断

8~10週齢のSD系雄性ラットにペントバルビタール (50 mg/kg) を腹腔内投与して麻酔し、脳定位固定装置に固定した。頭皮を切開し電気ドリルで頭蓋に穴をあけた。剃刀を6mm幅に整形したものをマニピュレータに固定し、bregmaより後方1.1mmの位置で両側に3mmずつの幅となるように剃刀を置き、深さ5mmまで刺入してFFを切断した。手術後2週間の回復期間をおいた。

(3) 扁桃体の破壊

(2)と同様に、8~10週齢のSD系雄性ラットにペントバルビタール麻酔をかけ、脳定位固定装置に固定した。脳座標をもとにbregmaより後方2.8mm、右側方5.2mm、脳表面より腹側7.6mmの位置に電極を刺入し、リジョン作成装置を用いて通電 (1.5mA、10秒) し、右脳の扁桃体を破壊した。手術後2週間の回復期間をおいた。

(4) in vivo 神経新生の定量

増殖性細胞に取り込まれるプロモデオキシウリジン (BrdU; 75 mg/kg, 10 mL/kg) を2時間間隔で3回ラットに腹腔内注射した。投与24時間後あるいは28日後に、ラットをエーテル麻酔下で経心還流固定した。全脳を摘出し、剃刀で小脳および前頭前野領域を切除した後、4%パラホルムアルデヒドで標本を後処理し、6°Cで一晩post固定を行った。その後10, 20, 30% sucrose溶液に入れて順次

脱水を行い、凍結防止溶液中で標本を保存 (-20°C) した。脳スライス標本はマイクロスライサーを用いて作製した。50 μm 厚さの海馬スライスを切って、8 枚ごと (400 μm ごと) にスライスを取ることによって、ラット 1 匹あたり 14 枚の海馬スライスを得た。

各スライス標本に対して抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色を施した。最終的な発色は ABC 法 (VECTASTAIN Elite ABC Mouse IgG Kit) によって行った。

BrdU 陽性細胞の観察および細胞数の計量は、二重盲検法にて行った。顕微鏡を用いて、低倍率で海馬の形態を観察した後、高倍率にて BrdU 陽性細胞を識別し、細胞数をカウントした。

4. 研究成果

初年度にあたる 2010 年度は、in vivo および in vitro で海馬の神経新生を定量する手法の確立をめざした。増殖性の細胞に取り込まれる BrdU をラットに注射で連投し、一定期間後に動物を還流固定して脳切片を作成し、抗 BrdU 抗体と神経細胞のマーカーである NeuN に対する抗体を用いた免疫染色により神経新生を定量することができた。また、ラット胎児海馬の細胞を分離培養し、既報の手順に従って neurosphere を作成し、神経幹細胞を継代培養することができた。ただし、収率やその特性などが培養ごとに差があり、薬物効果を評価できるように安定供給するには培養条件の再検討が必要と思われた。

2 年目にあたる 2011 年度は、まず in vivo における海馬の神経新生について「増殖」と「分化」を区別して定量解析する手法を確立した。具体的には、マウスまたはラットに BrdU を注射で連投し、24 時間後あるいは 28 日後に還流固定して脳切片を作成し、抗 BrdU 抗体と神経細胞のマーカーである NeuN に対する抗体を用いた免疫染色により増殖細胞および分化した新生細胞数を定量することができた。扁桃体の関与を明らかにするため、扁桃体の刺激あるいは破壊を施す条件決定のための予備試験に着手した。

3 年目にあたる 2012 年度は、これまでに確立した in vivo 海馬神経新生の定量解析法を応用し、海馬の神経幹細胞に対する脳弓-海馬采 (FF) ならびに扁桃体破壊の影響を検討した。ラットを麻酔下で脳定位固定装置に固定し、脳座標に従って両側の FF を切断し、2 週間の回復期間を経た後に実験に供した。BrdU を腹腔内投与した 24 時間後に経心還流固定してから脳を摘出した。脳スライスに抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色を施して顕微鏡観察したところ、海馬歯状回における BrdU 陽性細胞数が FF 切断によって増加する傾向が認められた (図 1)。FF 切断によって海馬が障害された結果、それを補うために代償的

機構が働き、海馬神経新生が促進された可能性が考えられた。

一方、扁桃体については、ラットを麻酔下で脳定位固定装置に固定し、脳座標に従って扁桃体に電極を刺入して通電 (1.5 mA, 10 秒) を行い、破壊した。BrdU を腹腔内投与した 24 時間後に経心環流固定してから脳を摘出し、脳スライスに抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色を施して顕微鏡観察したところ、扁桃体破壊群の海馬歯状回では BrdU 陽性細胞数が減少する傾向が認められた (図 2)。今後さらに解析を進めることで海馬神経新生における扁桃体の関与を明らかにできると期待された。

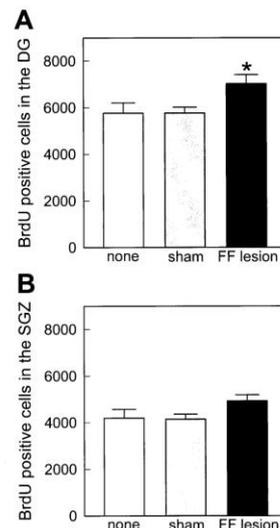


図 1 成体ラット歯状回および歯状回顆粒細胞下層における神経幹細胞の増殖に及ぼすFF切断の影響
成体ラット歯状回におけるBrdU陽性細胞数を定量した。歯状回全体におけるBrdU陽性細胞 (A) と、SGZ (B) におけるBrdU陽性細胞数を解析した (N=9~10)。
(A) 歯状回におけるBrdU陽性細胞数は、無処置群 (none) と偽手術群 (sham) では変化が認められなかったが、無処置群とFF切除群 (FF lesion) では有意な増加が認められた (*P<0.05 vs. none; Dunnett's test)。同様にsham群とFF lesion群間においても有意差が認められた (*P<0.05 vs. sham; Dunnett's test)。(B) SGZにおいては無処置と偽手術群では差がなく、FF切除群ではBrdU陽性細胞の増加傾向が認められたが、有意な変化は認められなかった。全てのデータは平均値±標準誤差で示した。

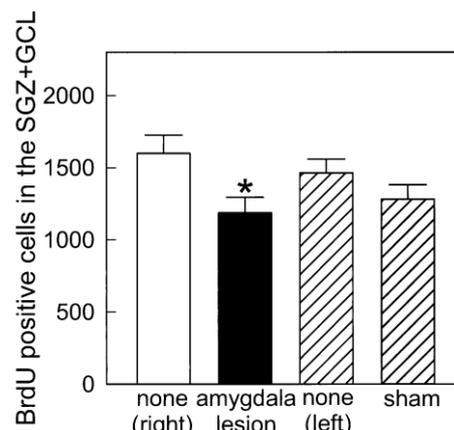


図 2 成体ラットSGZおよびGCLにおける神経幹細胞の増殖に及ぼす扁桃体破壊の影響
成体ラット歯状回において、SGZとGCLの和を算出して、BrdU陽性細胞数を解析したところ、無処置群と扁桃体破壊群間においてのみ、有意な減少が認められた (*P<0.05 vs. none (right); Tukey's test)。データは平均値±標準誤差で示した。

煩雑な実験操作と解析に時間を要したため、当初の計画よりも遅れをとってしまい論文発表等には至らなかったが、今後も同研究を継続して完成させ、アルツハイマー病治療につながる成果をあげたいと考えている。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.musashino-u.ac.jp/yakugaku/yaori/m-yakuri-home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 和穂 (ABE KAZUHO)

武蔵野大学薬学研究所・教授

研究者番号: 60202660

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: