

20070600/A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療等研究事業

「成体脳に内在する神経幹細胞の賦活化に関する開発的研究」

平成 19年度

総括・分担研究報告書

主任研究者 高坂 新一

平成 20 年 (2008 年) 3 月

目 次

I . 総括研究報告書

成体脳に内在する神経幹細胞の賦活化に関する開発的研究	1
高坂 新一(国立精神・神経センター神経研究所)	

II . 分担研究報告書

1. 成体神経幹細胞の賦活化を指標とした NMDA 受容体阻害剤	5
の探索ならびにその分子基盤の解明	
高坂 新一(国立精神・神経センター神経研究所)	
2. 成体脳神経幹細胞の増殖、分化、シナプス新生に関する	8
形態学的基盤の解析	
湯浅 茂樹(国立精神・神経センター神経研究所)	
3. 成体脳神経幹細胞の分化増殖を制御するG蛋白共役型受容体	11
リガンドの探索	
和田 圭司(国立精神・神経センター神経研究所)	

III . 研究成果の刊行に関する一覧表	13
----------------------------	----

IV . 研究成果の刊行物・別刷	16
------------------------	----

I . 総括研究報告書

成体脳に内在する神経幹細胞の賦活化に関する開発的研究

主任研究者 高坂新一 国立精神・神経センター神経研究所 所長

研究要旨：本研究は、神経変性疾患や脳損傷により脱落した神経回路網を成体脳に内在する神経幹細胞を用いて修復・再構築させる再生医療のコンセプトに基づき、内在性神経幹細胞を賦活化させる薬剤を開発することを目的としている。そこで、神経幹細胞の分裂や増殖、移動、分化に関わる NMDA 受容体や神経幹細胞に特異的に発現している G 蛋白質共役型受容体に焦点をあて、そのリガンドにおける神経幹細胞賦活化の効果を検討した。その結果、NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンを成体マウスに単回投与することで、海馬歯状回顆粒細胞下層における内在性の神経幹／前駆細胞の増殖が亢進すること、さらにその新生細胞が成熟神経細胞へと正常に分化することが判明した。また、偏側大脳皮質切除マウスにおいて、神経幹細胞間の接着シグナル制御に関わるエンドセリン B 型受容体のブロッカーである BQ788 を脳室内に持続的に投与することで、損傷に応じて脳室周囲に存在する神経幹細胞由来の新生細胞が、増殖、移動・分散することが明らかとなった。

(分担研究者)

湯浅茂樹： 国立精神神経センター神経研究所
微細構造研究部 部長
和田圭司： 国立精神神経センター神経研究所
疾病研究第四部 部長

するとともに、これらの分子を標的とする薬剤の開発を行う。

B. 研究方法

個々の研究方法に関しては、添付した分担研究報告書を参照されたい。

A. 研究目的

アルツハイマー病を代表とする神経変性疾患では、脳内の特定の部位におけるニューロンが変性脱落することにより重篤な機能障害が生じることが知られている。これら神経難病とも言える神経変性疾患の治療としては、主に薬剤を中心とした対象療法が行われているが、治療効果には限界があるのが現状である。そこで、本研究では、成体脳に内在する神経幹細胞を用いて、変性脱落した神経細胞を代償し新たな神経回路網を構築させる再生医療のコンセプトに基づいた治療手段として、より効率的かつ安全性の高い内在性神経幹細胞を賦活化させる低分子化合物の薬剤を開発することを目的とする。そのため、内在性神経幹細胞の分裂や増殖、移動、分化に関わる分子（例えば、NMDA 受容体やその関連分子、G 蛋白質共役型受容体等）に着目し、内在性神経幹細胞賦活化の分子基盤を解明

C. 研究結果および考察

1. 成体脳神経幹細胞の賦活化を指標とした NMDA 受容体阻害剤の探索ならびにその分子基盤の解明

欧米でアルツハイマー型認知症の治療薬として使用されているメマンチン（非競合的 NMDA 受容体阻害剤）を成体（12 週齢および 12 ヶ月齢）のマウスに単回、腹腔内投与（50mg/kg）することで、海馬歯状回顆粒細胞下層に内在する神経幹／前駆細胞の増殖が有意（12 週齢、2.3 倍；12 ヶ月齢、3.7 倍）に亢進することを確認した。また、成体海馬における NMDA 受容体阻害剤の海馬神経幹／前駆細胞の増殖促進効果の分子基盤を解明するため、抗 PSA-NCAM 抗体を用いた FACS により成体海馬歯状回より神経前駆細胞を分離、取得した。RT-PCR からこれらの細胞は幼弱ニューロンのマーカー遺伝子である

NeuroD および Prox1 を発現していることが確認でき、本実験系の有効性が示された。さらに、本法を nestin-GFP マウス（神経前駆細胞特異的に GFP が発現するトランスジェニックマウス）で行うことにより、神経前駆細胞をアストロサイト様神経前駆細胞（GFP 陽性/PSA-NCAM 陰性）、中間前駆細胞（GFP 陽性/PSA-NCAM 陽性）、幼弱ニューロン（GFP 陰性/PSA-NCAM 陽性）と、分化段階の異なる 3 種類の細胞に分離できることが確認できた。今後、各細胞群において、マイクロアレイ等を用いて NMDA 受容体阻害剤投与により発現が変動する遺伝子を網羅的に解析することで、NMDA 受容体阻害剤が有する神経幹/前駆細胞の増殖促進効果の分子基盤を解明できる可能性がある。

2. 成体脳神経幹細胞の増殖、分化、シナプス新生に関する形態学的基盤の解析

50gm/kg のメマンチンを単回、腹腔内投与したマウスにおいて、BrdU 投与後 7 日後、28 日後のいずれの時点においても対照群と比較して BrdU 標識細胞数が有意（7 日後、3.4 倍；28 日後、6.8 倍）に増加していたことから、メマンチン投与により増殖した神経幹/前駆細胞の生存は維持されることが判明した。さらに、未熟および成熟ニューロンの両者に発現する NeuN、分化成熟した顆粒細胞に発現する Prox1、calbindin に対する抗体を用いた組織染色の結果、増殖した神経幹/前駆細胞は成熟神経細胞に正常に分化することが明らかとなった。また、メマンチンを投与したマウスの海馬歯状回について、いずれの時点においても形態学的に異常な所見は認められなかった。以上の結果は、内在性神経幹/前駆細胞を再生医療に応用しうることを強く支持すると考えられる。

3. 成体脳神経幹細胞の分化増殖を制御する G 蛋白質共役型受容体リガンドの探索

大脳皮質左側一次運動野に損傷を与えたマウスにおいて、エンドセリン B 型受容体のブロッカーである BQ788 を浸透圧ポンプを用いて脳室内に 1 週間持続投与することにより、損傷側の脳室周囲における神経幹細胞由来の新生細胞数が対照群に比べて 2 倍以上増加した。さらに新生細胞について脳室内壁からの移動距離を測定

した結果、150 μ m 以上離れた距離まで移動分散した新生細胞が対照群と比較し 6 倍以上増加した。以上の結果から、BQ788 は脳損傷時に神経幹細胞の増殖を促し新生細胞を移動・分散させる薬理活性を有していることが明らかとなった。また、BQ788 投与による副作用等は観察されなかった。

D. 結論

NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンを成体マウスに投与することで、海馬歯状回顆粒細胞下層における内在性の神経幹/前駆細胞の増殖が亢進すること、また、新生細胞は成熟神経細胞へと正常に分化することが判明した。一方、エンドセリン B 型受容体のブロッカーである BQ788 を成体マウスの脳室内に持続的に投与することで、損傷に応じて脳室周囲に存在する神経幹細胞由来の新生細胞の増殖、移動・分散が誘導されることが明らかとなった。

E. 健康危険情報 特になし

F. 研究発表

1. 論文発表 (高坂新一)

Yamakawa, H., Oyama, S., Mitsuhashi, H., Sasagawa, N., Uchino, S., Kohsaka, S. and Ishiura, S.: Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin- γ 2, and the interactions are affected by autism-related mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355 (2007) 41-46

Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S. and Inoue, K.: UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446 (2007) 1091-1095

Okamoto, N., Kubota, T., Nakamura, Y., Murakami, R., Nishikubo, T., Tanaka, I., Takahashi, Y., Hayashi, S., Imoto, I., Inazawa, J., Hosokai, N., Kohsaka, S. and Uchino, S.: 22q13 microduplication in two patients with common clinical manifestations: A recognizable syndrome? *Am. J. Med. Genet. A.*

143A (2007) 2804-2809

Irino, Y., Nakamura, Y., Inoue, K and Kohsaka, S. and Ohsawa, K.: Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. J. Neurosci. Res. (2008) in press

(湯浅茂樹)

Ikeshima-Kataoka, H., Saito, S. and Yuasa, S.: Tenascin-C is required for proliferation of astrocytes in primary culture. IN VIVO 21 (2007) 629-633

Yao, I., Takagi, H., Ageta, H., Kahyo, T., Sato, S., Hatanaka, K., Fukuda, Y., Chiba, T., Morone, N., Yuasa, S., Inokuchi, K., Ohtsuka, T., Macgregor, GR., Tanaka, K. and Setou, M.: Scrapper-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release. Cell 130 (2007) 943-957

Mimura, N., Yuasa, S., Soma, M., Jin, H., Kimura, K., Goto, S., Koseki, H. and Aoe, T.: Altered quality control in the endoplasmic reticulum causes cortical dysplasia in knock-in mice expressing a mutant BiP. Mol. Cell. Biol. 28 (2008) 293-301

(和田圭司)

Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kwon, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M. and Wada, K.: Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. Neurochem Int. 50 (2007) 119-129

Ohashi, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Nishimoto, M., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S. and Wada, K.: Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells. Eur. J. Pharmacol. 573 (2007) 20-28

2. 学会発表

(国際学会)

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Kontani, M., Hara, Y., Kawashima, H., Kiso, Y., Yuasa, S. and

Osumi, N.: Polyunsaturated fatty acids promote proliferation of neural progenitor cells in the hippocampal dentate gyrus. The Society of Neuroscience 37th annual meeting, San Diego, 11.6, 2007

(国内学会)

内野茂夫、福村怜子、田畑秀典、平澤孝枝、服部功太郎、湯浅茂樹、仲嶋一範、高坂新一：大脳皮質形成過程におけるNMDA受容体を介した細胞移動の分子基盤。第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会・合同大会、横浜、9.10, 2007

大澤圭子、中村泰子、鈴木恵理、井上和秀、高坂新一：細胞外ATP受容体P2Y12を介したミクログリアの突起伸展調節機構の解析。第12回グリア研究会、名古屋、11.17, 2007

大澤圭子、中村泰子、鈴木恵理、井上和秀、高坂新一：細胞外ATP受容体P2Y12を介したミクログリアの突起伸展調節機構の解析。第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、12.12, 2007

前川素子、松股美穂、大和田祐二、紺谷昌仙、原芳伸、河島洋、木曾良信、湯浅茂樹、大隅典子：不飽和脂肪酸は海馬神経前駆細胞の増殖を促進する。第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会・合同大会、横浜、9.11, 2007

前川素子、松股美穂、大和田祐二、湯浅茂樹、大隅典子：生後海馬神経新生を制御する脂肪酸結合タンパク質の解析。第28回日本炎症・再生医学会、東京、8.2, 2007

前川素子、松股美穂、大和田祐二、紺谷昌仙、木曾良信、湯浅茂樹、大隅典子：生後海馬神経新生を制御する高度不飽和脂肪酸および脂肪酸結合タンパク質の解析。第5回幹細胞シンポジウム、淡路島、5.18, 2007

君和田友美、桜井省花子、大橋洋輝、青木俊介、富永悌二、和田圭司：培養神経幹/前駆細胞の神

経分化における時計遺伝子の関与. 第30回日本
神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第
17回日本神経回路学会大会・合同大会、横浜、
9.11, 2007

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

II. 分担研究報告書

成体脳神経幹細胞の賦活化を指標とした NMDA 受容体阻害剤の探索ならびにその分子基盤の解明

分担研究者 高坂新一 国立精神・神経センター神経研究所 所長

研究要旨：アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の根本的治療法の開発にあたり、成体の内在性神経幹細胞を賦活化させる再生医療のコンセプトに基づき、NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンの薬理効果を検討した。その結果、若齢（12 週齢）ならびに高齢（12 ヶ月齢）の C57BL/6J マウスにおいて、本剤を腹腔内に単回投与することにより海馬歯状回顆粒細胞下層に内在する神経幹／前駆細胞の増殖が有意に亢進することを確認した。一方、成体海馬から FACS を用いてニューロンに至る各分化段階の神経前細胞を分離・取得する方法を構築し、RT-PCR 法による細胞種マーカー遺伝子の発現解析から、その有効性を示した。今後、各細胞における遺伝子発現を詳細に検討することにより、メマンチンが有する神経前駆細胞の増殖促進作用について分子基盤の解明が期待できる。

A. 研究目的

近年、有効な治療法が確立されていない神経変性疾患に対して、成体脳に内在する神経幹細胞を賦活化させることで、変性部位に神経回路網を再構築させる再生医療に基づいた新たな治療法の開発が期待されている。

中枢神経系における主要な興奮性情報伝達を担う NMDA 受容体は、記憶・学習等高次脳機能のみならずニューロンの分化・成熟に深く関わっているイオンチャネル型受容体である。これまでに我々は、NMDA 受容体阻害剤が脳発達期の神経幹細胞の増殖を亢進させることを見出した。そこで、本研究は、成体脳に内在する神経幹細胞の増殖促進を指標に、既存の NMDA 受容体阻害剤の神経幹細胞賦活化に対する薬理効果を検討し、神経変性疾患の治療薬としての有効性を検証することを目的とする。NMDA 受容体を介した神経幹細胞賦活化の分子基盤の解明も目指す。

B. 研究方法

1. NMDA 受容体阻害剤がもたらす成体神経幹／前駆細胞の増殖促進作用の検討

12 週齢および 12 ヶ月齢の C57BL/6J マウスにメマンチン（0, 10, 30, 50 mg/kg）を腹腔内に単回投与し 3 日間飼育後、BrdU（75mg/kg）を腹腔内

に数時間おきに 3 回投与した。翌日、深麻酔下で還流固定し脳を摘出後、クリオスタットを用いて 14 μ m の脳切片を作製した。神経幹細胞の増殖の定量的解析は、抗 BrdU 抗体を用いた組織染色を行い、成体神経幹細胞が内在する海馬歯状回顆粒細胞下層における BrdU 陽性細胞数を計測した。

2. NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹／前駆細胞増殖促進作用の分子基盤の解明

12 週齢の C57BL/6J マウスの海馬歯状回を切り出し、リベラーゼ（ディスパーゼ／コラゲナーゼカクテル）処理により細胞を分散させた。その後、抗 PSA-NCAM 抗体を用いて Fluorescence activated cell sorter（FACS）により神経前駆細胞を分離・濃縮した。取得した神経前駆細胞から全 RNA を抽出後、常法に従い RT-PCR を行い各種細胞種マーカー遺伝子の発現を解析した。

（倫理面への配慮）

動物実験は国立精神・神経センター、動物実験委員会の承認を得た上で動物愛護の観点に十分に配慮して行った。

C. 研究結果

1. NMDA 受容体阻害剤がもたらす成体神経幹

／前駆細胞の増殖促進作用の検討

10mg/kg および 30mg/kg のメマンチンを投与した 12 週齢の成体マウスにおいては、対照群と比較し有意な BrdU 陽性細胞数の増加が観察されなかったが、50mg/kg メマンチン投与群においては、海馬歯状回顆粒細胞下層の BrdU 陽性細胞数が 2.3 倍増加した。また、12 ヶ月齢のマウスにおいても、50mg/kg のメマンチン投与により、対照群と比較して BrdU 陽性細胞数が 3.7 倍増加した。

2. NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹／前駆細胞賦活化の分子基盤の解明

抗 PSA-NCAM 抗体を用いた FACS により、成体海馬歯状回より神経前駆細胞を分離、取得した。RT-PCR からこれらの細胞は幼弱ニューロンのマーカー遺伝子である NeuroD および Prox1 を発現していることが確認でき、本実験系の有効性が示された。さらに、本法を nestin-GFP マウス（神経前駆細胞特異的に GFP が発現するトランスジェニックマウス）で行うことにより、神経前駆細胞を GFP 陽性／PSA-NCAM 陰性、GFP 陽性／PSA-NCAM 陽性、GFP 陰性／PSA-NCAM 陽性と、分化段階の異なる 3 種類の細胞に分離できることが確認できた。

D. 考察

12 ヶ月齢のマウスは 12 週齢のマウスに比べ新生ニューロン数が 10 分の 1 以下に低下していると考えられている。メマンチンが、若齢のマウスのみならずニューロン新生能が低下しつつある高齢のマウスにおいても有意に神経幹／前駆細胞の増殖を促進させることは、高齢者に患者が多い神経変性疾患の根治療法を考える上で非常に意義深い。一方、FACS を用いて分離した 3 種の分化段階の細胞は、新生ニューロンの分化過程にあるアストロサイト様神経前駆細胞（GFP 陽性／PSA-NCAM 陰性）、中間前駆細胞（GFP 陽性／PSA-NCAM 陽性）、幼弱ニューロン（GFP 陰性／PSA-NCAM 陽性）と考えられる。今後、各細胞群において、マイクロアレイ等を用いてメマンチン投与により発現が変動する遺伝子を網羅的に解析することで、メマンチンが有する神経幹／前駆細胞の増殖促進作用の分子基盤を解明できる可能性がある。

E. 結論

NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンを成体のマウスに投与することで、海馬歯状回顆粒細胞下層に内在する神経幹／前駆細胞の増殖が有意に亢進することを確認した。また、ニューロンに至る各分化段階の神経前駆細胞を効率的に分離・取得する方法を確立したことで、今後の分子基盤の解明に有用な手法が開発できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamakawa, H., Oyama, S., Mitsuhashi, H., Sasagawa, N., Uchino, S., Kohsaka, S. and Ishiura, S.: Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin-γ2, and the interactions are affected by autism-related mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355 (2007) 41-46

Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S. and Inoue, K.: UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446 (2007) 1091-1095

Okamoto, N., Kubota, T., Nakamura, Y., Murakami, R., Nishikubo, T., Tanaka, I., Takahashi, Y., Hayashi, S., Imoto, I., Inazawa, J., Hosokai, N., Kohsaka, S. and Uchino, S.: 22q13 microduplication in two patients with common clinical manifestations: A recognizable syndrome? *Am. J. Med. Genet. A.* 143A (2007) 2804-2809

Irino, Y., Nakamura, Y., Inoue, K. and Kohsaka, S. and Ohsawa, K.: Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. *J. Neurosci. Res.* (2008) in press

2. 学会発表

(国内学会)

内野茂夫、福村怜子、田畑秀典、平澤孝枝、服部功太郎、湯浅茂樹、仲嶋一範、高坂新一：

大脳皮質形成過程におけるNMDA受容体を介した細胞移動の分子基盤. 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会・合同大会、横浜、9.10, 2007

大澤圭子、中村泰子、鈴木恵理、井上和秀、高坂新一：細胞外ATP受容体P2Y₁₂を介したミクログリアの突起伸展調節機構の解析. 第12回グリア研究会、名古屋、11.17, 2007

大澤圭子、中村泰子、鈴木恵理、井上和秀、高坂新一：細胞外ATP受容体P2Y₁₂を介したミクログリアの突起伸展調節機構の解析. 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、12.12, 2007

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

成体脳神経幹細胞の増殖、分化、シナプス新生に関する形態学的基盤の解析

分担研究者 湯浅茂樹 国立精神・神経センター神経研究所 微細構造研究部 部長

研究要旨：成体脳内の内在性神経幹細胞を活性化して増殖、分化を誘導し、変性疾患や損傷により脱落した神経細胞を代償して機能を回復する治療法を開発する基盤を確立するため、成体脳の内在性神経幹/前駆細胞を賦活化してその増殖および分化を制御できる低分子化合物の薬剤開発を目的として研究を行った。候補の薬剤として、欧米で既に細胞死抑制作用に基盤を置いてアルツハイマー病治療薬として使用されている NMDA 受容体阻害剤メマンチンを選び、マウス海馬神経幹/前駆細胞の増殖および分化に対する薬理効果を解析した。その結果、メマンチン投与により海馬歯状回顆粒細胞下層(SGZ)における内在性神経幹/前駆細胞の増殖が促進されると共に、増殖した神経幹/前駆細胞は成熟神経細胞に正常に分化することを明らかにした。

A. 研究目的

神経細胞の変性、脱落による脳機能障害の修復のための治療法として、現在のところ根本的な手段はなく、患者の機能回復、社会復帰は極めて困難な状況である。我々は、脱落した神経細胞を代償してその機能を回復するために、成体脳内の内在性神経幹/前駆細胞を賦活化し、その増殖と分化をコントロールして新たな機能性神経回路を形成する方法を開発することを計画した。

従来、phosphodiesterase 阻害剤や Lithium などが、げっ歯類海馬の神経新生を促進する事が知られているが、これらの既知の薬剤は毒性が高くヒトに応用することは困難と考えられる。そこで、既に臨床適応となっている毒性の少ない薬物の中から神経新生誘導作用を有する可能性のある薬剤を選び出し、神経新生に対する薬理作用を検討することにした。本研究では、アルツハイマー病治療薬として細胞死抑制効果を指標として開発された NMDA 受容体阻害剤のメマンチンについて、新たな作用として成体海馬歯状回における神経幹/前駆細胞の増殖と分化に対する効果を機能形態学的に解析した。

B. 研究方法

(1) メマンチン投与による海馬神経幹/前駆細胞の増殖に関する解析

メマンチン投与マウス (0, 10, 30, 50mg/kg; 詳細は高坂の報告書参照) を用いて脳切片を作製し、抗 BrdU 抗体を用いた蛍光抗体法により免疫染色を行った。海馬歯状回顆粒細胞下層 (SGZ) に存在する BrdU 標識細胞数を定量的に解析し、メマンチン投与群とメマンチン非投与群の結果を比較して、メマンチン投与による海馬神経幹/前駆細胞の増殖動態の変化について検討した。

(2) メマンチン投与により増殖が促進された海馬神経幹/前駆細胞の生存維持に関する解析

メマンチン投与マウス (0, 10, 50mg/kg) において、BrdU 投与から 7 日後、28 日後の海馬組織を用いて BrdU 標識細胞数を定量的に解析し、それぞれの時点での BrdU 標識細胞の生存数を検討した。

(3) メマンチン投与により増殖した海馬神経幹/前駆細胞の分化に関する解析

メマンチン投与マウス (50mg/kg) において、未熟ニューロンのマーカーとして PSA-NCAM、未熟および成熟ニューロンの両者に発現するマーカーとして NeuN、分化成熟した顆粒細胞のマーカーとして Prox1、calbindin を使い、BrdU 標識細胞における発現を二重免疫標識によって調べて、SGZ に局在する増殖性細胞のニューロンへの分化について検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立精神・神経センター、動物実験委員会の承認を得た上で動物愛護の観点に十分に配慮して行った。

C. 研究結果

(1)メマンチン投与により海馬神経幹/前駆細胞の増殖が促進される

メマンチン投与群 (50mg/kg) において、対照群に比較してBrdU 標識細胞数が有意に増加(2.3倍)した。また、メマンチン投与群の海馬歯状回において、異常な細胞の出現は認められなかった。

(2)メマンチン投与により増殖した海馬神経幹/前駆細胞の生存は維持される

メマンチン投与群において、BrdU 投与から7日後、28日後のいずれの時点においてもBrdU 標識細胞は対照群と比較して著しく増加していた(7日後; 3.4倍、28日後; 6.8倍)。また、メマンチン投与群の海馬歯状回において、いずれの時点においても形態学的に異常な所見は認められなかった。

(3)メマンチン投与により増殖が促進された神経幹/前駆細胞は成熟神経細胞へ正常に分化する

メマンチン投与群において、BrdU 標識細胞のニューロンへの分化を幼若ニューロンのマーカーであるPSA-NCAMを用いて調べたところ、BrdU 投与7日後、28日後いずれの時点においても共発現率に有意な差は認められなかった。また、未熟および成熟ニューロン両者に発現するマーカーNeuN、分化成熟した顆粒細胞のマーカーProx1、calbindinを用いて同様の解析を行った場合も、メマンチン投与群と対照群の間で共発現率に有意な差は認められなかった。

D. 考察

欧米で細胞死抑制作用に基づいてアルツハイマー病治療薬として使用されているNMDA受容体阻害薬メマンチンに、海馬歯状回SGZの神経幹/前駆細胞の増殖促進作用があること、増殖が促進された神経幹/前駆細胞は少なくとも28日後までは生存すること、成熟ニューロンに正常に分化しうることが明らかになった。今後、分化した顆粒細胞が神経回路を形成しうるか否かを明らかにする必要がある。また、臨床応用に向けて、マウスを用いて神経幹/前駆細胞の増殖

を促進しつつ毒性および副作用を抑えるメマンチン投与条件を詳細に検討し、さらにその結果を霊長類に適用することについても検討を行う必要がある。これらの知見を基盤としてより有効な神経新生促進作用を有する薬物の開発が可能になると考えられる。

E. 結論

欧米で細胞死抑制作用に基づいてアルツハイマー病治療薬として既に使用されているNMDA受容体阻害薬メマンチンは、成体海馬歯状回SGZの神経幹/前駆細胞の増殖を促進し、さらに正常な分化が進行して成熟神経細胞の産生を増加させる作用があることを明らかにした。この成果は内在性神経幹/前駆細胞を再生医療に応用しうることを強く支持する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ikeshima-Kataoka, H., Saito, S. and Yuasa, S.: Tenascin-C is required for proliferation of astrocytes in primary culture. *IN VIVO* 21 (2007) 629-633

Yao, I., Takagi, H., Ageta, H., Kahyo, T., Sato, S., Hatanaka, K., Fukuda, Y., Chiba, T., Morone, N., Yuasa, S., Inokuchi, K., Ohtsuka, T., Macgregor, G.R., Tanaka, K. and Setou, M.: Scrapper-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release. *Cell* 130 (2007) 943-957

Mimura, N., Yuasa, S., Soma, M., Jin, H., Kimura, K., Goto, S., Koseki, H. and Aoe, T.: Altered quality control in the endoplasmic reticulum causes cortical dysplasia in knock-in mice expressing a mutant BiP. *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 293-301

2. 学会発表

(国際学会)

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Kontani, M., Hara, Y., Kawashima, H., Kiso, Y., Yuasa, S. and Osumi, N.: Polyunsaturated fatty acids promote proliferation of neural progenitor cells in the

hippocampal dentate gyrus. The Society of Neuroscience 37th annual meeting, San Diego, 11.6, 2007

(国内学会)

前川素子、松股美穂、大和田祐二、紺谷昌仙、原芳伸、河島洋、木曾良信、湯浅茂樹、大隅典子：不飽和脂肪酸は海馬神経前駆細胞の増殖を促進する。第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会・合同大会、横浜、9.11, 2007

前川素子、松股美穂、大和田祐二、湯浅茂樹、大隅典子：生後海馬神経新生を制御する脂肪酸結合タンパク質の解析。第28回日本炎症・再生医学会、東京、8.2, 2007

前川素子、松股美穂、大和田祐二、紺谷昌仙、木曾良信、湯浅茂樹、大隅典子：生後海馬神経新生を制御する高度不飽和脂肪酸および脂肪酸結合タンパク質の解析。第5回幹細胞シンポジウム、淡路島、5.18, 2007

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
特になし

成体脳神経幹細胞の分化増殖を制御する G 蛋白質共役型受容体リガンドの探索

分担研究者 和田圭司 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第四部 部長

研究要旨：脳内の脳室周囲には神経幹細胞が局在している。この領域には幹細胞を維持し育む生体システムが存在し、その分子の実体を解明し制御することは幹細胞賦活化の鍵となる。これまでに脳室周囲から単離した神経幹細胞における G 蛋白質共役型受容体（GPCR）の網羅的発現解析を進め神経幹細胞で発現が高い GPCR を複数同定し神経幹細胞間の接着シグナル制御に関わるエンドセリン B 型受容体(ETB-R)に着目し研究を進めた。昨年度は ETB-R 拮抗薬剤である BQ788 を浸透圧ポンプによって脳室内へ持続投与することで、GFAP 陽性ならびに Dcx 陽性の神経幹細胞が脳室周囲から移動促進される事を示唆する結果を得ていた。本年度は偏側大脳皮質切除モデルマウスへの BQ788 の持続投与実験を行い、BQ788 投与によって脳内の BrdU 陽性の神経幹細胞由来の新生細胞が大脳皮質損傷に应答して増加、移動分散する事が明らかになった。この結果から脳損傷後の神経幹細胞制御における生体システムに ETB-R シグナルが関与し、ET-BR シグナルを遮断する事で幹細胞由来新生細胞の数と脳内空間における位置を制御する事が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

難治性神経疾患に対する有効な治療法は現在確立されておらず、神経幹細胞を用いた神経再生医療は次世代の治療法として期待されている。我々は成体脳内の神経幹細胞に着目し、神経幹細胞とその局在領域における環境因子の実体を解明することで内在性神経幹細胞の賦活化による再生療法を開発する為の手掛かりを得る事を目指している。G 蛋白質共役型受容体(GPCR)はヒトゲノムにコードされた最大の受容体ファミリーであり、医療用薬剤の半数以上が GPCR を標的とし、治療薬を同定する上で重要なターゲット分子群である。昨年度までに成体神経幹細胞に発現する GPCR 遺伝子の発現プロファイルを決定し、その特異リガンドの中から神経幹細胞制御に応用可能な薬剤候補の絞り込みによってエンドセリン拮抗薬 BQ778 を同定し脳内投与の為の前段階実験を行っていた。最終年度である本年度は実際に脳損傷モデル動物への BQ778 投与実験により薬理効果を明らかにする事を目的に研究を進めた。

B. 研究方法

Balasingam らによって確立された吸引ポンプを

用いた大脳皮質切除術を行い、マウス大脳皮質左側一次運動野の部分切除術を行った。皮質切除 24 時間前にあらかじめ BrdU を腹腔内投与する事で脳内の神経幹細胞をパルスラベルした。大脳皮質切除術後に ETB-R ブロッカー BQ788 を充填した浸透圧ポンプと陰性コントロールの溶剤のみが充填された同型のポンプを埋め込み脳室へ 7 日間持続投与を行った。2 週間後に大脳皮質一次運動野近傍の脳切片を作製し神経幹細胞由来の新生細胞を BrdU 染色(プレパルスラベルされた神経幹細胞)により蛍光で可視化する事で脳内空間における局在ならびに偏在性の変化に関して定量解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立精神・神経センター、動物実験委員会の承認を得た上で動物愛護の観点に十分に配慮して行った。

C. 研究結果

昨年度までの研究によって ETB-R ブロッカー BQ788 は側脳室近傍における神経幹細胞の細胞間接着性を減弱し神経幹細胞を脳室周囲から移動・分散させる薬効がある事が示唆されていた。

また、BQ788 投与による副作用等は観察されていなかった。今回、左側一次運動野に対する損傷を与え、ETB-R ブロッカーBQ788 を投与したマウスにおいては BrdU によってプレラベルされた神経幹細胞由来の新生細胞が損傷側の脳室周囲において 2 倍以上増加することが明らかになった。また、脳室内壁からの BrdU 陽性細胞の移動距離を測定した結果 150 μ m 以上離れた距離まで移動分散した新生細胞群が陰性コントロールと比較して 6 倍以上に増加している事が明らかになった。このことから、BQ788 は脳損傷時に神経幹細胞由来の新生細胞群を増加させて脳内で分散させる薬理活性を有していることが明らかになった。また、BQ788 投与による副作用等は観察されなかった。

D. 考察

ETB-R ブロッカーBQ788 は BrdU 陽性の神経幹細胞由来の新生細胞を大脳皮質の損傷にตอบสนองして脳室周囲で増加・分散させる薬理活性を有している事が明らかになった。この事は大脳皮質の損傷と脳室周囲の神経幹細胞局在領域においては皮質損傷応答性の再生制御システムが働いていることを示唆しており、エンドセリンとその受容体である ETB-R は神経幹細胞を脳内の特定領域に空間的に拘束する役割を担っていることが示唆される。また本研究結果から ETB-R のブロッカーである BQ788 投与によってその空間拘束性を解除し神経幹細胞を増加・分散させることが可能であることが示唆された。これらの結果は内在性神経幹細胞を賦活化し、脳内の損傷領域へ移動させ再生に寄与させる治療法を考える上で重要であると考えられた。

E. 結論

脳内神経幹細胞の空間移動制御薬の候補として ETB-R ブロッカーである BQ788 を同定し、その大脳皮質損傷時の薬効に関してマウスを用いた動物実験で実証した。また BQ788 の副作用等は観察されなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kwon, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M. and Wada, K.: Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem Int.* 50 (2007) 119-129

Ohashi, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Nishimoto, M., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S. and Wada, K.: Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells. *Eur. J. Pharmacol.* 573 (2007) 20-28

2. 学会発表

(国内学会)

君和田友美、桜井省花子、大橋洋輝、青木俊介、富永悌二、和田圭司：培養神経幹/前駆細胞の神経分化における時計遺伝子の関与。第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会・合同大会、横浜、9.11, 2007

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏 名 高坂 新一

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamakawa, H. Oyama, S. Mitsubishi, H. Sasagawa, N. Uchino, S. <u>Kohsaka, S.</u> Ishiura, S.	Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin- γ 2, and the interactions are affected by autism-related mutations.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	355	41-46	2007
Koizumi, S. Shigemoto-Mogami, Y. Nasu-Tada, K. Shinozaki, Y. Ohsawa, K. Tsuda, M. Joshi, BV. Jacobson, KA. <u>Kohsaka, S.</u> Inoue, K	UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis.	Nature	446	1091-1095	2007
Okamoto, N. Kubota, T. Nakamura, Y. Murakami, R. Nishikubo, T. Tanaka, I. Takahashi, Y. Hayashi, S. Imoto, I. Inazawa, J. Hosokai, N. <u>Kohsaka, S.</u> Uchino, S.	22q13 microduplication in two patients with common clinical manifestations: A Recognizable Syndrome?	Am. J. Med. Genet. A	143A	2804-2809	2007
Irino, Y. Nakamura, Y. Inoue, K. <u>Kohsaka, S.</u> Ohsawa, K.	Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia.	J. Neurosci. Res.		in press	2008

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏名 湯浅 茂樹

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikeshima-Kataoka, H. Saito, S. <u>Yuasa, S.</u>	Tenascin-C is required for proliferation of astrocytes in primary culture.	IN VIVO	21	629-633	2007
Yao, I. Takagi, H. Ageta, H. Kahyo, T. Sato, S. Hatanaka, K. Fukuda, Y. Chiba, T. Morone, N. <u>Yuasa, S.</u> Inokuchi, K. Ohtsuka, T. Macgregor, GR. Tanaka, K. Setou, M.	Scrapper-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release.	Cell	130	943-957	2007
Mimura, N. <u>Yuasa, S.</u> Soma, M. Jin, H. Kimura, K. Goto, S. Koseki, H. Aoe, T.	Altered quality control in the endoplasmic reticulum causes cortical dysplasia in knock-in mice expressing a mutant BiP.	Mol. Cell. Biol.	28	293-301	2008

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏名 和田 圭司

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Setsuie, R. Wang, Y.L. Mochizuki, H. Osaka, H. Hayakawa, H. Ichihara, N. Li, H. Furuta, A. Sano, Y. Sun, Y.J. Kwon, J. Kabuta, T. Yoshimi, K. Aoki, S. Mizuno, Y. Noda, M. <u>Wada, K.</u>	Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant.	Neurochem Int.	50	119-129	2007
Ohashi, H. Nishikawa, K. Ayukawa, K. Hara, Y. Nishimoto, M. Kudo, Y. Abe, T. Aoki, S. <u>Wada, K.</u>	Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells.	Eur. J. Pharmacol.	573	20-28	2007