

200706001B

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 17 年度～平成 19 年度

総合研究報告書

主任研究者 高坂 新一

平成 20 年 (2008 年) 3 月

# 目 次

## I . 総合研究報告書

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)	

(資料 1) 成体神経幹細胞の賦活化を指標とした NMDA 受容体阻害剤の .....	8
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)	

(資料 2) 成体脳神経幹細胞の増殖、分化、シナプス新生に関する .....	12
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)	

(資料 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 .....	16
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)	

II . 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	19
---------------------------	----

III . 研究成果の刊行物・別刷 .....	25
-------------------------	----

# I . 総合研究報告書

## 生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 (GPCR) 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、NMDA 受容体阻害剤による神経幹細胞賦活化の分子基盤として、神経幹細胞の分化に深く関わる Notch シグナル系の関与が示唆された。一方、脳室周囲から単離した神経幹細胞における GPCR の網羅的発現解析を行った結果、神経幹細胞間の接着シグナルに関わる分子としてエンドセリン B 型受容体 (ETB-R) を見出した。さらに、偏側大脳皮質切除マウスに対して、ETB-R 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、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

### 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新たな治療手段として、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。

### 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

##### (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効果の検討

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。

##### (2) NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞賦

## 活化の分子基盤の解明

マウス胎仔の大脳皮質において、3mg/kg のセレスタット（非競合的 NMDA 受容体阻害剤）を投与することで発現が上昇する分子として、Notch リガンドである delta-like1 および deltex3 を見出した。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

### (1) NMDA 受容体阻害剤がもたらすニューロンの新生促進効果の検討

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。

### (2) 海馬新生ニューロンによる回路形成の形態学的解析手法の開発

成体マウス海馬歯状回の新生顆粒細胞が神経回路形成に関与することを解析する手法を開発した。脳切片を用いて DiI を CA3 に注入することにより、海馬歯状回顆粒細胞下層に分布する新生ニューロンを逆行性に標識することができた。また、歯状回-CA3 投射の形成につき、CA3 における PSA-NCAM 陽性の苔状線維終末によるシナプス形成が免疫電顕的に標識可能となった。さらに、新生シナプスの微細構築をより詳細に解析するための新たな手法として電子線トモグラフィ法を確立した。

### (3) 神経幹細胞分化ならびに神経損傷修復の制御にかかわる分子機構の解析

神経幹細胞のマーカーの 1 つである Lewis X 抗原の合成に関わる糖転移酵素の遺伝子、神経損傷時に発現増加する keratan sulfate の合成に関わる硫酸基転移酵素の遺伝子につき、各々のノックアウトマウスを作製して、これらの表現型を解析した。また、不飽和脂肪酸結合蛋白の 1 つ FABP7 が生後海馬神経新生において神経幹細胞/神経前駆細胞の維持に必要であることを明らかにした。

## 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

成体脳の組織スライスから調製した培養神経幹細胞を用いて、284 種類の GPCR 遺伝子の発現を網羅的に解析した結果、神経幹細胞において高発現している GPCR 遺伝子を 34 種同定した。それらのうち 20 種類の GPCR 作用薬剤を入手し、神経幹細胞培養系にて分化、増殖、運動性に対する薬理作用を検討したところ、エンドセリン B 型受容体（ETB-R）のリガンドであるエンドセリンが神経幹細胞の接着制御に関与することが判明した。さらに、大脳皮質の一次運動野損傷による脳障害モデルを作製し、ETB-R 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 週間持続投与した結果、損傷側の脳室周囲の新生神経幹細胞数が対照群に比べて 2 倍以上増加した。また、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 $\mu$ 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を促し、さらに新生細胞を移動・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。これらの知見から、大脳皮質の損傷と脳室周囲の神経幹細胞局在領域には皮質損傷応答性の幹細胞制御機構が内在していることが考えられた。さらに、今回用いた ERB-R ブロッカーである BQ788 は、その空間拘束性を解除し神経幹細胞を増加・分散させる薬理活性を有することが判明した。

#### 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、損傷時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。

以上、本研究の知見は、低分子化合物による内在性神経幹細胞の賦活化を支持する極めて重要な知見と考えられる。

#### 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)

Kamitori, K., Tanaka, M., Okuno-Hirasawa, T., and Kohsaka, S.: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (2005) 446-453

Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S. and Kohsaka, S.: Visualization of microglia in living tissues by using Iba1-EGFP transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 81 (2005) 357-362

Yogoyama, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K I., Miyoshi, H., Kohsaka, S. and Akazawa, C.: Ubiquitylation and degradation of serum-inducible kinase by hVPS18, a RING-H2 type ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 41619-41627

Hattori, K., Uchino, S., Isosaka, T., Maekawa, M., Iyo, M., Sato, T., Kohsaka, S., Yagi, T. and Yuasa, S.: Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 7129-7135

Uchino, S., Wada, H., Honda, S., Nakamura, Y., Ondo, Y., Uchiyama, T., Tsutsumi, M., Hirasawa, T., and Kohsaka, S.: Direct interaction of PDZ domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 AMPA receptor. *J. Neurochem.* 97 (2006) 1203-1214

Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglia chemotaxis. *Glia* 55 (2007) 604-616

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, BV., Jacobson, KA., 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)

Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S. and Osumi, N.: Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes to Cells* 10 (2005) 1001-1014

Nakahira, E. and Yuasa, S.: Neuronal generation, migration and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by in utero electroporation. *J. Comp. Neurol.* 483 (2005) 329-340

Kai, N., Iwase, K., Imai, K., Nakahira, E., Soma, M., Ohtsuka, S., Yagi, T., Kobayashi, K., Koga, H., Takiguchi, M. and Yuasa, S.: Altered gene expression in the subdivisions of the amygdala of Fyn-deficient mice as revealed by laser capture microdissection and mKIAA cDNA array analysis. *Brain Res.* 1073 (2006) 60-70

Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. and Kusumi, A.: Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.* 174 (2006) 851-862

Zhang, H., Muramatsu, T., Murase, A., Yuasa, S., Uchimura, K. and Kadomatsu, K.: N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 is required for brain keratan sulfate biosynthesis and glial scar formation after brain injury. *Glycobiology* 16 (2006) 702-710

Kudo, T., Fujii, T., Ikegami, S., Inokuchi, K., Takayama, Y., Ikehara, Y., Nishihara, S., Togayachi, A., Takahashi, S., Tachibana, K., Yuasa, S. and Narimatsu, H.: Mice lacking  $\alpha$ 1, 3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis X structure

in brain and increased anxiety-like behaviors. *Glycobiology* 17 (2007) 1-9

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

(和田圭司)

Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Hara, Y., Ohashi, H., Nishimoto, M., Abe, T., Kudo, Y., Sekiguchi, M., Sato, Y., Aoki, S. and Wada, K.: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. *J. Cell Sci.* 119 (2006) 162-171

Fukazawa, N., Ayukawa, K., Nishikawa, K., Ohashi, H., Ichihara, N., Hikawa, Y., Abe, T., Kudo, Y., Kiyama, H., Wada, K. and Aoki, S.: Identification and functional characterization of mouse TPO1 as a myelin membrane protein. *Brain Res.* 1070 (2006) 1-14

Sun, Y. J., Nishikawa, K., Yuda, H., Wang, Y. L., Osaka, H., Fukazawa, N., Naito, A., Kudo, Y., Wada, K. and Aoki, S.: Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation. *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 6923-6935

Tomita, S., Sekiguchi, M., Wada, K., Nicoll, R.A. and Brecht, D.S.: Stargazin controls the pharmacology

of AMPA receptor potentiators. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 10064-10067

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

Nishimoto, M., Furuta, A., Aoki, S., Kudo, Y., Miyakawa, H. and Wada, K.: PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. Glia 55 (2007) 317-327

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)

Kohsaka, S.: Response of microglia in model of motorneuron pathology. The 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, 11.30, 2006

Maekawa, M., Yuasa, S., Osumi, N.: Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. Society for Neuroscience Meeting 35th, Washington, USA, Nov. 2005.

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Yuasa, S., Osumi, N.: FABP7/B-FABP/BLBP is required for maintenance of neural stem/progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. British Society for Developmental Biology, York, Mar. 2006.

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Kondo, H., Yuasa, S. and Osumi, N.: FABP7 is required for

maintenance of neural stem/progenitor cells in the postnatal hippocampus. Society for Neuroscience Meeting 36th, Atlanta, 10.15, 2006

Wada, K., Yamauchi, R., Sakurai, M., Furuta, A., Wada, E., Sekiguchi, M. and Aoki, S.: Novel therapeutic targets in glia-neuron interaction: G-Protein coupled receptors and deubiquitinating enzymes. International Society for Neurochemistry jointly with the European Society for Neurochemistry. 20<sup>th</sup> Biennial Meeting, 8.22, 2005

Aoki, S., Sun, Y., Nishikawa, K., Yuda, H., Osaka, H., Wang, Y., Fukazawa, N. and Wada, K.: Solo/trio8, A Membrane-associated Short Isoform of Trio, Modulates Endosome Dynamics and Neurite Elongation, ASCB 45th annual meeting, San Diego, CA, 12.11, 2006

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 37<sup>th</sup> annual meeting, San Diego, 11.6, 2007

## (国内学会)

平澤孝枝、松村直人、内野茂夫、高坂新一: NMDA 受容体を介した神経幹細胞増殖制御の解析. 第 20 回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会、大阪、5.28, 2005

内野茂夫、堤も絵、平澤孝枝、伊藤雅之、後藤雄一、高坂新一: マウス中枢神経系における MeCP2 の発現解析. 第 28 回日本神経科学大会、横浜、7.26, 2005

赤澤智宏、都築早美、内山孝由、中村泰子、高坂新一: 活性型 SOX10 を用いた損傷神経の再生修復. 第 28 回日本神経科学大会、横浜、7.27, 2005

星雅人、赤澤智宏、高坂新一: Abnormal development of enteric neural crest cells in the nerve



growth factor receptor, p75, knockout mice. 第 48 回  
日本神経化学会大会、福岡、9. 29, 2005

平澤孝枝、田端秀典、仲嶋一範、久保田健夫、内  
野茂夫、高坂新一: MND A receptors participate in  
neuronal migration in the early stage of mouse  
cortical development. 第 28 回日本生物学的精神  
医学会・第 36 回日本神経精神薬理学会・第 49 回日  
本神経化学会大会 合同年会、ワークショップ「神経  
回路形成・発達分化・神経突起伸張」名古屋、9.14,  
2006

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 NMD A 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

Maekawa, M., Yuasa, S., Osumi, N.: Pax6 is required  
for maintenance and differentiation of progenitor  
cells in postnatal hippocampal neurogenesis. 第 28  
回日本神経科学大会、横浜、7.26, 2005

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Yuasa, S.  
and Osumi, N.: FABP7 is required for maintenance  
of neural stem/progenitor cells in the postnatal  
hippocampus. 第 29 回日本神経科学大会、京都、  
7.21, 2006

前川素子、相馬美歩、山崎信幸、遠山桂子、宮  
川剛、湯浅茂樹: 生後海馬神経新生領域におけ  
る CaMKII の機能解析. 成体脳ニューロン新生懇  
談会、東京、2. 24, 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

大橋洋輝、君和田友美、西川香里、青木俊介、  
和田圭司: 成熟個体脳由来の神経系前駆細胞に  
おける G 蛋白質共役型受容体の発現解析. 第 28  
回日本分子生物学会年会、福岡、12. 9, 2005

北村悠輔、君和田友美、松本 隆、和田圭司: 交換  
モンテカルロ法を用いた遺伝子制御ネットワーク推  
定による核内受容体ネットワークの解析. 日本バイ  
オインフォマティクス学会、第 10 回システムバイ  
オロジー研究会、3. 30, 2006

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

1. 特許取得

【名称】マクロファージ系細胞の活性化抑制物質の  
スクリーニング方法

【国際出願日】2005 年 2 月 21 日

【国際公開日】2005 年 9 月 29 日

【国際公開番号】WO 2005/090561 A1

【出願人】(財)ヒューマンサイエンス振興財団

【発明者】 高坂 新一

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

(資料 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

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：進行性の神経脱落を主徴とする神経変性疾患の根本的治療法の開発にあたり、成体に内在する神経幹細胞を賦活化させ新たな神経回路網を再構築させる再生医療のコンセプトに基づき、NMDA 受容体阻害剤の神経幹細胞賦活化における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）のマウスにおいて、本剤の腹腔内単回投与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。その分子基盤の解明のため、神経幹細胞からニューロン新生が盛んに行われている発達中の胎仔の大脳皮質を用いて、NMDA 受容体阻害剤投与により特異的に発現が上昇する分子を探索した結果、神経幹細胞の分化に関わる Notch シグナル系分子である *delta-like1* および *deltex3* を見出した。さらに、成体の神経幹／前駆細胞に対する NMDA 受容体阻害剤の増殖促進作用の分子基盤の解明のため、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た。

### 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。さらに、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効果の検討

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 $\mu$ 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細胞賦活化の分子基盤の解明

##### (1) 脳発達期における NMDA 受容体阻害剤の神経幹細胞賦活化の分子基盤の解明

妊娠 15 日齢のマウスに NMDA 受容体阻害剤であるセレストアット (CNS-1102) を 3mg/kg 腹腔内に単回投与し、3 日後胎仔の大脳皮質より全 RNA を抽出した。この RNA からプローブを調製し、マイクロアレイを用いてセレストアット投与群で特異的に発現が変動する分子を探索した。

##### (2) 成体海馬歯状回における NMDA 受容体の神経幹／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)

本研究における動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会の承認を得た上で動物愛護の観点に配慮して行った。

## C. 研究結果

### 1. NMDA 受容体阻害剤がもたらす成体神経幹／前駆細胞の増殖亢進効果の検討

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

#### (1) 発達期における NMDA 受容体阻害剤の神経幹細胞賦活化の分子基盤の解明

セレスタットを投与することでマウス胎仔の大脳皮質で発現が上昇する分子として Notch リガンドである delta-like1 および deltex3 を見出した。

#### (2) 成体海馬歯状回における NMDA 受容体の神経幹／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、脳発達期における NMDA 受容体の神経幹細胞の増殖制御の分子基盤として、これまでに我々が見出した Notch 受容体の下流に位置する Hes 分子の発現亢進に加え、Notch 受容体のリガンドである delta-like1 および deltex3 の発現の上昇が見られたことから、神経幹細胞の維持・分化に関わる Notch シグナル系の関与が示唆された。また、成体海馬における NMDA 受容体阻害剤の神経幹／前駆細胞の増殖促進作用の分子基盤の解明のため、FACS を用いて分化段階の異なる神経前駆細胞の分離・取得に成功した。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 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。

## 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。NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞賦活化の分子基盤に関して、神経幹細胞の分化に深く関わる Notch シグナル系の関与が示唆された。また、成体海馬において、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

Kamitori, K., Tanaka, M., Okuno-Hirasawa, T., and

- Kohsaka, S.: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (2005) 446-453
- Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S. and Kohsaka, S.: Visualization of microglia in living tissues by using Iba1-EGFP transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 81 (2005) 357-362
- Yogoyama, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K I., Miyoshi, H., Kohsaka, S. and Akazawa, C.: Ubiquitylation and degradation of serum-inducible kinase by hVPS18, a RING-H2 type ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 41619-41627
- Hattori, K., Uchino, S., Isosaka, T., Maekawa, M., Iyo, M., Sato, T., Kohsaka, S., Yagi, T. and Yuasa, S.: Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 7129-7135
- Uchino, S., Wada, H., Honda, S., Nakamura, Y., Ondo, Y., Uchiyama, T., Tsutsumi, M., Hirasawa, T., and Kohsaka, S.: Direct interaction of PDZ domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 AMPA receptor. *J. Neurochem.* 97 (2006) 1203-1214
- Ohsawa, K., Irino, Y. Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglia chemotaxis. *Glia* 55 (2007) 604-616
- 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  
(国際学会)
- Kohsaka, S.: Response of microglia in model of motoneuron pathology. The 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, 11.30, 2006
- (国内学会)
- 平澤孝枝、松村直人、内野茂夫、高坂新一: NMDA受容体を介した神経幹細胞増殖制御の解析. 第20回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会、大阪、5.28, 2005
- 内野茂夫、堤も絵、平澤孝枝、伊藤雅之、後藤雄一、高坂新一: マウス中枢神経系におけるMeCP2の発現解析. 第28回日本神経科学大会、横浜、7.26, 2005
- 赤澤智宏、都築早美、内山孝由、中村泰子、高坂新一: 活性型 SOX10 を用いた損傷神経の再生修復. 第28回日本神経科学大会、横浜、7.27, 2005
- 星雅人、赤澤智宏、高坂新一: Abnormal development of enteric neural crest cells in the nerve growth factor receptor, p75, knockout mice. 第48回日本神経化学会大会、福岡、9.29, 2005
- 平澤孝枝、田端秀典、仲嶋一範、久保田健夫、内野茂夫、高坂新一: NMDA receptors participate

in neuronal migration in the early stage of mouse cortical development. 第 28 回日本生物学的精神医学会・第 36 回日本神経精神薬理学会・第 49 回日本神経化学学会大会 合同年会、ワークショップ「神経回路形成・発達分化・神経突起伸張」名古屋、9.14, 2006

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 P2Y<sub>12</sub> 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 P2Y<sub>12</sub> 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

##### 1. 特許取得

【名称】マクロファージ系細胞の活性化抑制物質のスクリーニング方法

【国際出願日】2005 年 2 月 21 日

【国際公開日】2005 年 9 月 29 日

【国際公開番号】WO 2005/090561 A1

【出願人】(財)ヒューマンサイエンス振興財団

【発明者】高坂 新一

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

(資料 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

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にお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。さらに、これらの新生ニューロンが回路形成に関わることを検討するため、電顕的に新生顆粒細胞ニューロンの形成する苔状線維と新生シナプスを同定し解析するための手法を開発した。

### A. 研究目的

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ためには、成体脳内の内在性神経幹細胞を活性化して新たな機能性神経回路を形成する手段を開発することがアプローチの1つと考えられる。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ことが知られているが、臨床応用するためには、これらの薬物のうち毒性が低く副作用が少ない薬物を使用することが必要である。従って、候補となる薬物を選択する上で、すでに臨床適用となっている薬物の中から神経新生誘導能を有する可能性があるものについて詳細な検討を行うことは、創薬上妥当な戦略とされる。

本研究では、アルツハイマー病の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、成体神経新生が起こっている海馬歯状回における神経幹細胞の増殖と分化の動態に対する効果を中心に解析した。

### 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 を用い、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。

#### (4) メマンチン投与により増殖した新生神経細胞の回路形成への関与に関する解析

歯状回の新生顆粒細胞が苔状線維を伸展して CA3 へ向かう新たな投射を形成することを検討するために、海馬切片の CA3 に蛍光色素 DiI を注入し、逆行性に歯状回を標識した。また、新

生神経細胞の指標として PSA-NCAM をマーカーとし、CA3 における新生神経細胞に由来する PSA-NCAM 陽性の苔状線維終末のシナプス構造を免疫電顕的に観察した。これらの知見をもとにして、歯状回新生ニューロンによる苔状線維系の投射形成について解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会の承認を得た上で動物愛護の観点に配慮して行った。

### 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。

(4) 海馬新生ニューロンによる回路形成の形態学的解析手法の開発

成体マウス海馬歯状回の新生顆粒細胞が神経

回路形成に関与することを解析する手法を開発した。脳切片を用いて Dil を CA3 に注入することにより、歯状回 SGZ に分布する新生ニューロンを逆行性に標識することができた。また、歯状回- CA3 投射の形成につき、CA3 における PSA-NCAM 陽性の苔状線維終末によるシナプス形成が免疫電顕的に標識可能となった。さらに、新生シナプスの微細構築をより詳細に解析するための新たな手法として電子線トモグラフィ法を確立した。

(5) 神経幹細胞分化ならびに神経損傷修復の制御にかかわる分子機構の解析

神経幹細胞のマーカーの 1 つである Lewis X 抗原の合成に関わる糖転移酵素の遺伝子、神経損傷時に発現増加する keratan sulfate の合成に関わる硫酸基転移酵素の遺伝子につき、各々のノックアウトマウスを作製して、これらの表現型を解析した。また、不飽和脂肪酸結合蛋白の 1 つ FABP7 が生後海馬神経新生において神経幹細胞/神経前駆細胞の維持に必要であることを明らかにした。

### 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 受容体阻害剤メマンチンは、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

Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S. and Osumi, N.: Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes to Cells* 10 (2005) 1001-1014

Nakahira, E. and Yuasa, S.: Neuronal generation, migration and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by in utero electroporation. *J. Comp. Neurol.* 483 (2005) 329-340

Kai, N., Iwase, K., Imai, K., Nakahira, E., Soma, M., Ohtsuka, S., Yagi, T., Kobayashi, K., Koga, H., Takiguchi, M. and Yuasa, S.: Altered gene expression in the subdivisions of the amygdala of Fyn-deficient mice as revealed by laser capture microdissection and mKIAA cDNA array analysis. *Brain Res.* 1073 (2006) 60-70

Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. and Kusumi, A.: Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.* 174 (2006) 851-862

Zhang, H., Muramatsu, T., Murase, A., Yuasa, S., Uchimura, K. and Kadomatsu, K.: N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 is required for brain keratan sulfate biosynthesis and glial scar formation after brain injury. *Glycobiology* 16 (2006) 702-710

Kudo, T., Fujii, T., Ikegami, S., Inokuchi, K.,

Takayama, Y., Ikehara, Y., Nishihara, S., Togayachi, A., Takahashi, S., Tachibana, K., Yuasa, S. and Narimatsu, H.: Mice lacking  $\alpha 1$ , 3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis X structure in brain and increased anxiety-like behaviors. *Glycobiology* 17 (2007) 1-9

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., Yuasa, S. and Osumi, N.: Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. Society for Neuroscience Meeting 35th, Washington, USA, Nov. 2005.

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Yuasa, S. and Osumi, N.: FABP7/B-FABP/BLBP is required for maintenance of neural stem/progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. British Society for Developmental Biology, York, Mar. 2006.

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Kondo, H., Yuasa, S. and Osumi, N.: FABP7 is required for maintenance of neural stem/progenitor cells in the postnatal hippocampus. Society for Neuroscience Meeting 36th, Atlanta, 10.15, 2006

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 37<sup>th</sup> annual meeting, San Diego, 11.6, 2007

特になし

2. 実用新案登録  
特になし

3. その他  
特になし

(国内学会)

Maekawa, M., Yuasa, S. and Osumi, N.: Pax6 is required for maintenance and differentiation of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. 第 28 回日本神経科学大会、横浜、7.26, 2005

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Yuasa, S. and Osumi, N.: FABP7 is required for maintenance of neural stem/progenitor cells in the postnatal hippocampus. 第 29 回日本神経科学大会、京都、7.21, 2006

前川素子、相馬美歩、山崎信幸、遠山桂子、宮川剛、湯浅茂樹：生後海馬神経新生領域における CaMKII の機能解析. 成体脳ニューロン新生懇談会、東京、2. 24, 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

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

(資料 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

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脳内幹細胞賦活化の鍵となる。本研究では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)を見いだした。また偏側大脳皮質切除マウスへの BQ788 の持続投与実験を行い、BQ788 によって脳内の神経幹細胞由来の新生細胞が脳損傷に応答して増加、移動・分散する事を明らかにした。これらの研究結果は脳損傷後の神経幹細胞制御メカニズムに ETB-R シグナルが関与し、ETB-R シグナルを遮断する事で神経幹細胞由来の新生細胞の数と脳内空間における分布を制御する事が可能であることを示唆している。

### A. 研究目的

パーキンソン病やアルツハイマー病などの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新たな治療法として期待されている。本研究では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分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新規薬剤の開発を目指して研究を進めた。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、医療に用いられる薬剤の半分以上が GPCR を標的としている事からも治療薬を同定する上で重要なターゲット分子群である。本研究では成体神経幹細胞における GPCR 遺伝子発現のプロファイルを決定し、その特異的リガンドの中から細胞生物学的な実験による絞り込み、ならびに動物への投与による薬理効果検証実験を行うことで、神経幹細胞制御による再生医療に利用可能な薬剤候補の同定を目指した。

### B. 研究方法

成体マウス脳のスライス切片から微細外科手術によって側脳室周囲組織を顕微鏡下で切り出し、ニューロスフェア法によって神経幹細胞を単離・培養した。培養神経幹細胞における GPCR 遺伝子 284 個の発現レベルを定量的 PCR 法によって解析し発現プロファイルを決定した。神経幹細胞に高レベルで発現する GPCR を抽出しそれらの中から入手可能な GPCR リガンドを培養系へ

順次添加して生理活性をスクリーニングする事で細胞間接着性制御に関わる ETB-R とそのリガンドであるエンドセリンを同定した。次に ETB-R に対する特異的抗体を用いて免疫組織学的手法により脳内局在を解析した。さらに Balasingam らによって確立された大脳皮質切除術を行い偏側大脳皮質損傷モデル動物を確立した。大脳皮質に損傷を与えたマウスに対して ETB-R ブロッカー BQ788 を浸透圧ポンプにより脳室へ 7 日間持続投与を行った。2 週間の経過観察の後に各種神経幹細胞マーカー分子を蛍光免疫染色する事で脳内空間における幹細胞由来の新生細胞群の局在ならびに偏在性の変化を定量解析した。

### (倫理面への配慮)

本研究ではヒトサンプル等は取り扱っておらず倫理上問題となる事項は無い。また、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

本研究ではマウス成体脳の組織スライスからピンポイントで神経幹細胞を採取し培養する技術を確立した。その培養神経幹細胞において 284 種類の GPCR 遺伝子の網羅的発現解析を行うことで神経幹細胞において高レベルで発現する GPCR 遺伝子を 34 個同定した。これらの GPCR のうち入手可能であった 20 種類の GPCR 作用薬剤を神

神経幹細胞培養系に添加し、分化、増殖、運動性に対する薬理効果を検討したところ、ETB-Rのリガンドであるエンドセリンが神経幹細胞間の接着性制御に関わることが明らかになった。一方、免疫組織学的手法により成体マウスの ETB-R の脳内局在を調べたところ、幹細胞局在領域である脳室周囲と海馬歯状回において特異的な局在が認められ、特に脳室周囲においては GFAP 陽性の B 型神経幹細胞ならびに Dcx 陽性の C 型幹細胞で発現している事が明らかになった。さらに、大脳皮質の一次運動野損傷による脳障害モデルを作製し、ETB-R ブロッカーである BQ788 を投与したところ BrdU によってプレラベルされた新生神経幹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。陰性コントロールでは有意な BrdU 陽性細胞の増加は観察されなかった。また、脳室内壁からの BrdU 陽性細胞の移動距離を定量した結果 150  $\mu\text{m}$  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 は脳室周囲と海馬歯状回に比較的特異的に発現し、ETB-R 作用薬剤ブロッカー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反応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は皮質損傷応答性の幹細胞制御システムが内在していることを示唆しており、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ために働いていることが示唆される。また本研究結果から 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

神経幹細胞における網羅的 GPCR 発現解析から ETB-R を同定し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 を見いだした。BQ788 の大脳皮質損傷時の薬効に関してマウスを用いた脳の障害モデル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

Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Hara, Y., Ohashi, H., Nishimoto, M., Abe, T., Kudo, Y., Sekiguchi, M., Sato, Y, Aoki, S. and Wada, K.: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. *J. Cell Sci.*119 (2006) 162-171

Fukazawa, N., Ayukawa, K., Nishikawa, K., Ohashi, H., Ichihara, N., Hikawa, Y., Abe, T., Kudo, Y., Kiyama, H., Wada, K. and Aoki, S.: Identification and functional characterization of mouse TPO1 as a myelin membrane protein. *Brain Res.* 1070 (2006) 1-14

Sun, Y. J., Nishikawa, K., Yuda, H., Wang, Y. L., Osaka, H., Fukazawa, N., Naito, A., Kudo, Y., Wada, K. and Aoki, S.: Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation. *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 6923-6935

Tomita, S., Sekiguchi, M., Wada, K., Nicoll, R.A. and Brecht, D.S.: Stargazin controls the pharmacology of AMPA receptor potentiators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 10064-10067

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