

# 研究報告書

## 「成体脳ニューロン新生の機能的意義」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 今吉 格

### 1. 研究のねらい

従来、ニューロンの産生は発生期においてしか行われないと考えられていたが、ヒトを含めた哺乳類の生後脳・成体脳においても神経幹細胞が存在し、側脳室周囲の脳室下帯や海馬・歯状回といった特定の領域では、ニューロンの新生が一生涯続いている事が解ってきた。生後脳において新たに産出される多くの新生ニューロンは既存の神経回路に組み込まれるが、このようなニューロン新生が個体にとってどのような生理的意義を持っているのかはほとんど明らかになっていない。本研究プロジェクトでは、遺伝子改変マウス技術を駆使して新生ニューロンを特異的に遺伝子操作し、生後脳・成体脳ニューロン新生が、脳神経回路の形成・修飾や維持に果たす役割を解明する事を目標としている。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本プロジェクト研究において、生後脳の海馬と嗅球における、ニューロン新生の機能的意義の一端が明らかになった。海馬の生後ニューロン新生の破綻が精神疾患や発達障害の病態に関与している可能性がある事や、嗅球の生後ニューロン新生が嗅覚神経回路可塑性に積極的に関与している事が明らかになった。今後は、ニューロン新生の発達障害や神経回路可塑性との関与について、神経回路レベルでのより詳細な理解に繋がりたいと考えている。

#### (2) 詳細

これまで、マウス成体脳の海馬・歯状回と側脳室周囲・嗅球で起きているニューロン新生の全体像と機能的意義の解明を目指して研究を行ってきた(Imayoshi et al., Nature Neuroscience 2008)。成体脳の新生ニューロンだけに特異的に遺伝子操作を行うためには、非常に洗練された遺伝学技術と戦略が必要であり、これまでノックイン(KI)マウスやトランスジェニック(Tg)マウスなどの遺伝子改変マウス技術を駆使して、新生ニューロンの選択的操作を実現してきた(Imayoshi et al., Frontiers in Neuroscience 2011)。成体脳の新生ニューロンだけを選択的に蛍光たんぱく質で標識し、既存の神経回路への組み込み様式を解明した。また、新生ニューロンにジフテリア毒素を発現させて選択的に除去し、新生ニューロン除去マウスの行動学解析を行う事で、ニューロン新生の機能的意義の一端を解明した(Imayoshi et al., Nature Neuroscience 2008; Imayoshi et al., Development, Growth & Differentiation 2009)。しかし、これまでの遺伝子改変マウスモデルでは、海馬と嗅球の両方の新生ニューロンに影響を与えてしまうという技術的な問題があった。本研究プロジェクトにおいて、海馬・歯状回と嗅球の生後脳新生ニューロンを、それぞれ選択的に遺伝子操作

する事が可能になった。さらに、海馬・歯状回と嗅球のニューロン新生をそれぞれ阻害したマウスについて、行動学的解析・生理学的解析を行う事で、生後脳ニューロン新生の機能的意義の一端が明らかになった。

### (1) 生後脳海馬ニューロン新生の破綻と発達障害・精神疾患

注意欠陥・多動性障害(ADHD: Attention-Deficit-Hyperactivity Disorder)は「不注意」、「多動性」、「衝動性」を症状の特徴とする発達障害の一種である。ADHDの原因は、注意や抑制・自制に関与する脳の神経回路が発達過程で損なわれているという点までは確からしいが、それらの脳部位や脳機能が損なわれるメカニズムは全く明らかになっていない。ADHDを含めて、発達障害や精神疾患は、遺伝的な要因に加えて、生育環境や妊娠中の母親の体内環境、出産前後に生じる様々な事情(周産期障害)によっても、その発症の有無や病態の深刻度合いが左右される。マウス新生児が強いストレスを受けると、海馬のニューロン新生が減少する事が知られているなど、先天的な遺伝子変異に加えて、周産期障害や後天的な環境要因の変化も海馬のニューロン新生に大きく影響する。この様な背景から、発達障害や精神疾患については、ニューロン新生の破綻がその病状の神経基盤の一端を担っている可能性があるが、上記のような疾患の臨床例や動物モデルにおいて、海馬のニューロン新生の破綻の有無について体系的に研究された例は極めて少数である。

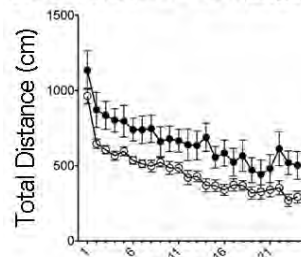
海馬・歯状回の新成ニューロンは VGLUT1 を発現するグルタミン酸作動性ニューロンである。VGLUT1 の遺伝子座から、Cre による組み換え依存的に、シナプス放出を阻害するテタヌス毒素(TeNT)が発現するようなノックインマウスを作製した。これらのマウスと mGFAP-Cre マウスとのダブル Tg マウスを作製する事で、海馬・歯状回の新成ニューロンを選択的に阻害する事が可能になる。なぜなら、生後脳・成体脳での嗅球の新成ニューロンは GABA 作動性であり、VGLUT1 を発現していないからである。

このモデルマウスの行動学的解析を行い、マウスの出生後すぐから海馬・歯状回の新成ニューロンを特異的に機能阻害すると、

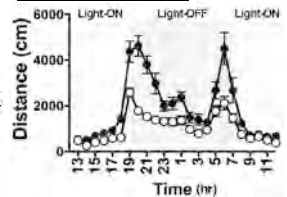
発達障害や精神疾患とニューロン新生の破綻の関係を示唆するような実験結果が得られた。例えば、自発活動性を評価するオープンフィールドテストやホームケージ観察において、生後脳ニューロン新生阻害マウスは、コントロールマウスに比べて、顕著に活動性の増加が観察された。行動テストバッテリーのほとんどのテストにおいて、ニューロン新生阻害マウスは活動性の亢進を示している。また、Cliff-avoidance テストの結果から、ニューロン新生阻害マウスでは、衝動性が亢進している事が確認された。さらには、8方向放射状迷路を用いたテストにおいて、ワーキングメモリーの障害が確認された。興味深

#### オープンフィールド

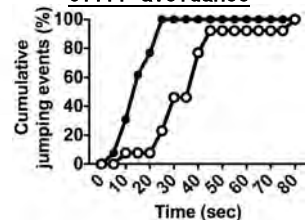
- : コントロールマウス
- : 海馬特異的ニューロン新生阻害マウス



#### ホームケージ観察

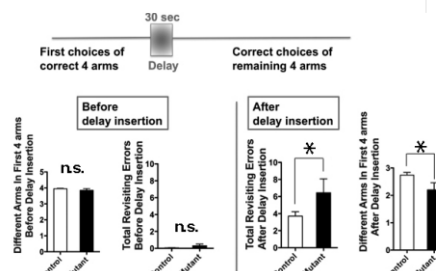


#### Cliff-avoidance



8方向放射状迷路テストにおいて、試行途中のdelay挿入特異的にスコアの低下が見られた。

い事に、試行途中で delay を挿入し、課題を強制的に一定時間中断させた後に、顕著なフェノタイプが見られた事から、注意や集中の持続に障害がある事が示唆された。これらの実験結果から、生後脳・海馬のニューロン新生を阻害したマウスは、ADHD 様の異常行動を示している事が明らかになった。

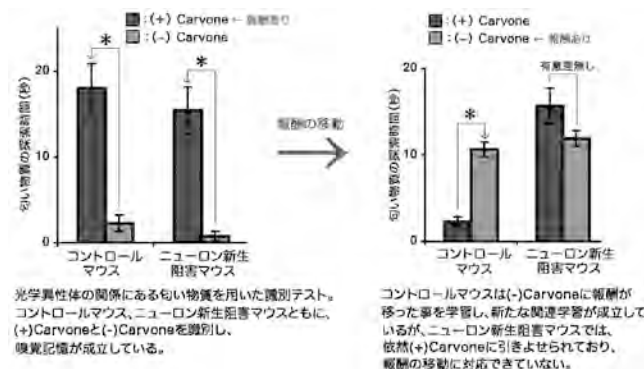
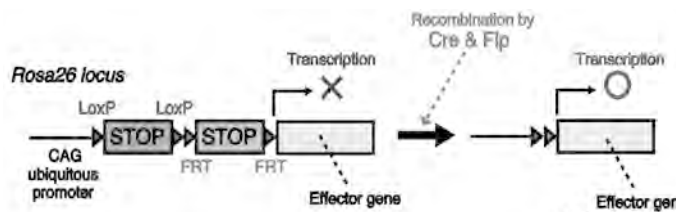


今後は、生後脳海馬ニューロン新生阻害マウスの行動学的・生理学的解析を継続し、ADHD の他のエンドフェノタイプについて解析を進めるとともに、ドーパミン作動系の発達との関与など、ADHD の発症の根本原因に生後脳海馬ニューロン新生がどのように関与しているのかについて、神経回路レベルでの詳細な解析が必要である。

## (2) 生後脳の継続的なニューロン新生は、嗅球の機能的な神経回路の構築と維持に必須である

嗅球においても、生後脳・成体脳ニューロン新生が継続しているが、嗅球新生ニューロン特異的に遺伝子操作を行うために、Cre/LoxP と Flp/FRT システムを併用した intersectoral genetics を採用した。

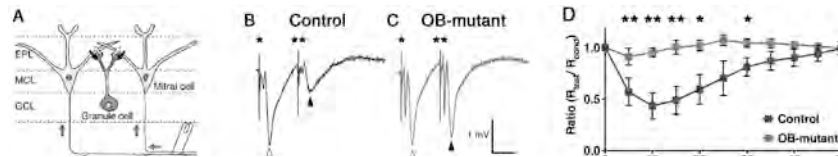
すでに、Cre/LoxP システムを利用し、Rosa26 遺伝子座などから様々なエフェクターたんぱく質を発現するマウスが広く利用されている。しかしながら、Cre/LoxP システムだけでは、細胞種特異性に限界があり、意図しない神経細胞集団でも組換えが起こり、エフェクターたんぱく質が発現してしまう。このため、本プロジェクトにおいて、Cre の組換えに加えて、Flp 組換え酵素の組換えを必要とする、ダブルストップカセットを持つ Rosa26 ノックインマウスを開発した (Imayoshi et al., Neuroscience Research 2012a; 2012b; 2012c)。



Intersectional genetics を適応して、嗅球の生後脳・新生ニューロンを特異的に阻害したマウスでは、柔軟な嗅覚関連学習が損なわれている事が明らかになった。コントロールマウスと嗅球ニューロン新生阻害マウスともに、光学異性体の関係にある匂い物質を識別し、学習する事ができる。しかしながら、初めに報酬(砂糖)と関連させて記憶させた匂い物質から、他方の匂い物質に報酬を変化させると、コントロールマウスでは初めとは違う匂い物質に報酬が移った事を学習し対応することができた

が、ニューロン新生阻害マウスでは、以前のすでに報酬のない匂い物質に引き寄せられ続けて、報酬の移動に対応できなかった。

また、嗅球の生後脳新生ニューロンを特異的に阻害したマウスでは、嗅球の主要な投射



ニューロンである、Mitral cell の反回／側方抑制が形成されていない事が明らかになった。さらに興味深い事に、成体脳のニューロン新生を阻害したマウスでも柔軟な嗅覚関連学習の障害や、Mitral cell の反回／側方抑制の減弱が観察された。成体脳において新生ニューロンが継続的に供給される事で、嗅球 GABA 抑制性の微小回路の維持・再編が可能になり、匂い情報処理や匂い情報の価値判断の至適化が可能になると考えられる。

### 3. 今後の展開

本プロジェクトにおいて、生後脳の海馬と嗅球における、ニューロン新生の機能的意義の一端が明らかになった。今後は、ニューロン新生の発達障害や神経回路可塑性との関与について、神経回路レベルでのより詳細な理解に繋がたいと考えている。ニューロン新生の理解を深めることで、脳血管障害などによる脳損傷や神経変性疾患に対する、新規創薬や細胞移植医療の実現に向けた重要な基礎知識が得られるものと期待される。

### 4. 自己評価

マウスの生後脳・成体脳のニューロン新生を、遺伝学技術を駆使する事で、選択的に操作する事や機能阻害する事に成功した。研究期間の前半に様々な遺伝学的手法を検討する事で、新生ニューロンを特異的に遺伝子操作するモデルマウスの開発に成功した。研究期間の後半には、これらのモデルマウスの行動学的解析や電気生理学的解析を行う事で、生後脳・成体脳ニューロン新生が、脳神経回路の形成・修飾や維持に果たす役割の一旦を解明する事に成功した。研究計画の骨子である新生ニューロン特異的な遺伝子操作法の開発と、行動学的解析については、予定通り遂行する事ができた。今後は、さきがけ研究で見いだされた、ニューロン新生が関与する脳機能や神経回路可塑性について、神経回路レベルにてより詳細な解析を行う必要があると考えられる。また、生後発達期の海馬のニューロン新生が発達障害や神経疾患へ関与している事も示唆された。今後、ニューロン新生の修飾や活性化を利用した創薬研究や再生医療研究の発展が期待される。

### 5. 研究総括の見解

生後脳の神経幹細胞から新生するニューロンがどのように既存の神経回路に組み込まれどのような生理的機能に関わるのかが不明であった。本研究ではマウスの遺伝子改変技術を駆使して脳部位特異的に新生ニューロンに特異的な遺伝子操作を仕組むことにより、その解明にアプローチした。海馬歯状回では出生後すぐに新生ニューロンの機能を阻害すると、多数の行動テスト解析の結果、活動性と衝動性の亢進、作動記憶と注意集中持続の障害など、ADHD(注意欠陥多動性障害)に特徴的な症状が生じることを見出した。さらにダブルストップ

カセットを組み込んで嗅球新生ニューロンへの特異性を高めたマウス系統では、生後脳・成体脳の両方において、嗅覚関連学習の障害と嗅球神経回路の電気生理学的異常を見出した。新規なトランスジェニックマウスの作成によってえられたこれらの結果は新生ニューロンの既存神経回路への組み込みとその生理的意義の解明に近づいた重要な成果であり高く評価される。今後さらに解析を深めることで発達障害との関係の解明や、海馬と嗅球における神経回路の可塑性の細胞レベルでの仕組みの解明につながる事が期待できる。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

\*Imayoshi, I., Tabuchi, S., Hirano, K., Sakamoto, M., Kitano, S., Miyachi, H., Yamataka, A and Kageyama, R. (2012) Light-induced silencing of neural activity in Rosa26 knock-in mice conditionally expressing the microbial halorhodopsin eNpHR2.0. *75*: 53-58.

\*Imayoshi, I., Hirano, K., Kitano, S., Miyachi, H. and \*Kageyama R. (2011) In vivo evaluation of PhiC31 recombinase activity in transgenic mice. *Neuroscience Research* 73: 106-114.

\*Imayoshi, I., Hirano, K., Sakamoto, M., Miyoshi, G., Imura, T., Kitano, S., Miyachi, H and Kageyama, R. (2012) A multifunctional teal-fluorescent Rosa26 reporter mouse line for Cre- and Flp-mediated recombination. *Neuroscience Research* 73: 85-91.

\*Imayoshi, I., Shimojo, H. (equal contribution), Sakamoto, M., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2012) Genetic visualization of Notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cell Mol Life Sci. in press*

Sakamoto, M., Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Yamaguchi, M., Mori, K. and \*Kageyama, R. (2011) Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *PNAS* 108: 8479-8484.

\*Imayoshi, I., Sakamoto, S. and \*Kageyama, R. (2011) Genetic methods identify and manipulate newborn neurons in the adult brain. *Frontiers in Neuroscience* May 2;15:64.

\*Kageyama, R., Imayoshi, I., and Sakamoto, M. (2011) The role of neurogenesis in olfactory-dependent behaviors. *Behavioral Brain Research* 227:459-463.

\*Imayoshi, I. and \*Kageyama, R. (2011) The role of Notch signaling in adult neurogenesis. *Molecular Neurobiology* 44: 7-12.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K. and \*Kageyama, R. (2010) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in the developing and adult brains. *The Journal of Neuroscience* 30: 3489-3498.

\*Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2009) Continuous neurogenesis in the adult brain. *Development, Growth & Differentiation* 51: 379-386.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1:「神経幹細胞における bHLH 型転写因子の振動発現」

第 35 回日本分子生物学会年会シンポジウム

福岡国際会議場

2012 年 12 月 12 日

口頭発表

2:「生後脳・成体脳におけるニューロン新生」

第 52 回脳の医学・生物学研究会

名城大学名駅サテライト会議室

2012 年 3 月 10 日

口頭発表

3:「Regulatory Mechanism of Adult Neural Stem Cell Activation」

第34回日本神経科学大会シンポジウム

パシフィコ横浜

2011 年 9 月 16 日

口頭発表

4:「Regulatory Mechanism of Adult Neural Stem Cell Activation」

Neurogenesis 2011

理研 CDB

2011 年 6 月 2 日

口頭発表

5: NHK 教育テレビ番組「サイエンス ZERO」<こころを動かす 嗅覚>(2010 年 6 月 26 日放送)

NHK ワールドにても放送。