

課題番号	LS116
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 23 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	成体大脳新皮質に存在する新規神経前駆細胞 (L1-INP 細胞) の培養技術の確立と生理的機能の解明
研究機関・部局・職名	藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師
氏名	大平 耕司

1. 当該年度の研究目的

<p>(1) <u>L1-INP 細胞の遺伝子解析</u>: 前年度から引き続き、L1-INP 細胞の遺伝子発現解析を行い L1-INP 細胞に特異的に発現している遺伝子の同定を試みる。L1-INP 細胞に特異的に発現する遺伝子プロモーターを利用して、GFP、Cre リコンビナーゼ、tTA を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作出し、マウスの選択を行い目的の系統を得る。また、L1-INP 細胞から産生された神経細胞の生理的機能解析を行うため、VGAT-loxP-Stop-loxP-tTA-mCherry Tg マウスの作製を行う。</p> <p>(2) <u>L1-INP 細胞の培養法の検討</u>: これまで生後 1 ヶ月の大脳新皮質から Neurosphere の形成に成功していたが、前年度に生後 2 ヶ月の大脳新皮質からわずかではあるが Neurosphere が形成される条件を見出した。さらに、Neurosphere の形成効率を上げるために、L1-INP 細胞の培養条件について検討を行う。</p> <p>(3) <u>L1-INP 細胞の神経新生の機能的意義の解明</u>: 抗うつ薬の一つであるフルオキセチンをマウスに長期投与すると、L1-INP 細胞の増殖・分化が促進されることが明らかとなった。これまで、虚血でのみ L1-INP 細胞の増殖・分化が促進されることがわかっていたが、この知見により、薬剤により L1-INP 細胞の増殖・分化を制御することができる可能性を示すことができた。さらに、蛍光タンパク質とのフュージョンタンパクの発現で細胞周期 (S/G2/M 期が緑色、G1 期が赤色) を検出することができる Fucci マウスを利用することにより、<i>in vivo</i>での L1-INP 細胞の増殖・分化について知見を得ることができるので、フルオキセチンによる L1-INP 細胞の増殖・分化の機能について明らかにする予定である。</p>

2. 研究の実施状況

<p>(1) <u>L1-INP 細胞の遺伝子解析</u> Venus を発現するウイルスベクターを使用することにより、免疫染色をせずに L1-INP 細胞(矢頭)を観察することができるようになった。現在 Venus で標識した細胞について、抗 GAD67 抗体で免疫染色を行い、L1-INP 細胞を同定できる条件を検討中である。この条件が見つかり次第、セルソーターやレーザーマイクロディセクション法を使用して、遺伝子解析を行う。</p> <p>(2) <u>L1-INP 細胞の培養法の検討</u> 生後2ヶ月の大脳新皮質から調整した Neurosphere の形成効率を上げるために、L1-INP 細胞の培養条</p>

件について検討を行い、若干であるが効率を上げることのできる培養液組成や成長因子などの組み合わせを見出すことができた。今後、この培養系と Venus 発現レトロウイルスを用いて L1-INP 細胞が培養できるかどうか検討する。

(3) L1-INP 細胞の神経新生の機能的意義の解明

マウスにフルオキセチンを長期投与すると、解析したどの皮質領域(前頭前野、運動野、体性感覚野、視覚野)でも、L1-INP 細胞の数が有意に増加することを明らかにした。フルオキセチン濃度が、5-25mg/kg/dayまでは、L1-INP 細胞の増殖について濃度依存性が見られた。さらに、フルオキセチンによって、L1-INP 細胞から産生された細胞のほとんどは、抑制性神経細胞であることが明らかとなった。これらの新しく産生されてきた神経細胞の機能について解析したところ、前脳虚血による神経細胞のアポトーシスを有意に低下させることを見出した。これまで、国内外のヒト・実験動物の研究から、フルオキセチンが、神経保護作用を有するという報告は多数あったが、そのメカニズムについて不明であった。このような中で、フルオキセチンによる L1-INP 細胞の神経新生促進が、神経保護に有効であることを示すことができた。同時に、今回の我々の研究により、世界で初めて、成体大脳新皮質神経新生の生理的機能について明らかにすることができた。本研究内容は、現在、論文としてまとめ、投稿中である。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 2 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 1 件 1. <u>Koji Ohira</u>. Injury-induced neurogenesis in the mammalian forebrain. Cellular and Molecular Life Sciences (2011) 68(10): 1645-1656.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件 1. <u>大平耕司</u>、<u>宮川 剛</u>. 大脳皮質の新しい前駆細胞. Clinical Neuroscience (2011) 29(12): 1434-1435.</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 5 件</p>	<p>専門家向け 計 5 件 1. <u>大平耕司</u>、<u>宮川 剛</u>. 選択的セロトニン再取り込み阻害薬の 6 週間以上の長期投与は成体マウスの脳室下帯における神経新生を低下させる. 第 34 回日本神経科学大会. 横浜. 2011. 9. 14-17.</p> <p>2. <u>萩原英雄</u>、<u>大平耕司</u>、<u>遠山桂子</u>、<u>宮川剛</u>. AMPA 受容体 GluR1 サブユニットは海馬歯状回において成熟顆粒細胞に発現する. 第 34 回日本神経科学大会. 横浜. 2011. 9. 14-17.</p> <p>3. <u>高雄啓三</u>、<u>萩原英雄</u>、<u>小林克典</u>、<u>大平耕司</u>、<u>遠山桂子</u>、<u>高木豪</u>、<u>石井俊輔</u>、<u>宮川剛</u>. Schnurri-2 ノックアウトマウスにおける統合失調症に関連した大脳皮質の異常. 第 34 回日本神経科学大会. 横浜. 2011. 9. 14-17.</p> <p>4. <u>Koji Ohira</u>, <u>Keiko Toyama</u>, <u>Hironori K Nakamura</u>, <u>Hiroataka Shoji</u>, <u>Masakazu Kataoka</u>, <u>Masami Takahashi</u>, <u>Tsuyoshi Miyakawa</u>. The SNAP-25-PKC site mutation causes immaturity of the</p>

様式19 別紙1

	<p>dentate granule cells in adult mice. Neuroscience 2011, Society for Neuroscience. Washington, DC. 2011. 10. 13-17. Presenter: Hironori K Nakamura.</p> <p>5. Keizo Takao, Hideo Hagihara, <u>Koji Ohira</u>, Keiko Toyama, Tsuyoshi Takagi, Shunsuke Ishii, Tsuyoshi Miyakawa. Mice lacking Schnurri-2 displayed cortical abnormalities related to schizophrenia. Neuroscience 2011, Society for Neuroscience. Washington, DC. 2011. 10. 13-17.</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>該当なし</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	50,000,000	23,200,000	0	26,800,000	0
間接経費	15,000,000	6,960,000	0	8,040,000	0
合計	65,000,000	30,160,000	0	34,840,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	22,924,478	0	0	22,924,478	10,914,894	12,009,584	0
間接経費	6,840,000	0	0	6,840,000	6,840,000	0	0
合計	29,764,478	0	0	29,764,478	17,754,894	12,009,584	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	8,096,629	マイクロピペットプラー、実験試薬
旅費	112,840	研究成果発表旅費等
謝金・人件費等	2,616,160	研究補助員人件費
その他	89,265	英文校正費等
直接経費計	10,914,894	
間接経費計	6,840,000	
合計	17,754,894	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
マイクロピペットプラー	Sutter社・P-97/IVF	1	1,496,250	1,496,250	2012/3/30	藤田保健衛生大学
				0		
				0		