

平成24年度名古屋市立大学医学会賞

受賞論文

感覚入力による成体嗅球ニューロンのターンオーバーの制御機構

澤田 雅人

名古屋市立大学大学院医学研究科 再生医学分野

Sensory-input-dependent spatiotemporal regulation of neuronal turnover in the adult brain

MASATO SAWADA

*Department of Developmental and Regenerative Biology,
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences*

Summary

The adult brain shows remarkable experience-dependent plasticity. Recent studies have revealed that sensory experience-dependent synaptic changes cause remodeling of the neuronal circuits, leading to functional changes in the adult cerebral cortex. Much more extensive remodeling of neuronal circuits by the replacement of cells takes place in the adult olfactory bulb (OB), the processing center for odor information. Olfactory interneurons, generated from neural stem cells in the ventricular-subventricular zone, are continuously replaced in the OB, which is important for various olfactory functions. Previous studies suggested that olfactory experience controls the process by which new neurons are integrated into mature circuits. However, very little is known about the relationship between lost and replaced neurons in the OB. Using *in vivo* two-photon laser scanning microscopy, we demonstrated that the turnover of olfactory interneurons is spatiotemporally regulated by olfactory input in a neuronal subtype-specific manner. The olfactory-input-dependent mechanism of neuronal turnover enables both active remodeling of the neuronal circuitry and the maintenance of the brain structure, providing new insight for experience-dependent plasticity in the adult brain.

1. はじめに

ヒトを含む哺乳類の脳は、胎生期に神経幹細胞からニューロンが産生され、生後にそれらが適切にシナプスを形成することで成体では完成された神経回路網を獲得し、感覚入力に応じて機能を発現する。しかし近年、嗅球及び海馬歯状回では、成体においてもニューロン新生が持続していることが明らかになり、その可塑的な性質に注目が集まっている。本稿では、嗅球のニューロン新生と嗅覚入力の関係に着目し、成

体脳という安定な構造の中でニューロン新生が可塑性を発現するメカニズムについて述べる。

2. 感覚入力依存的な可塑性のモデルとしての成体嗅球ニューロン新生

成体脳は感覚入力を受け取ると、神経回路を再編成することで機能を発現する。この現象は感覚入力依存的な可塑性と呼ばれ、記憶形成や学習を始めとして、成体脳の高次機能をつかさどる重要な性質である。この性質の解明には、

最近の二光子顕微鏡を用いた生体イメージング法の発展が大きく寄与している。二光子顕微鏡は可視光レーザーの約2倍の波長の超短パルスレーザーを用いることで、観察試料へのダメージなしに深部観察が可能な顕微鏡であり、生きたまま同一個体の脳神経構造を繰り返し観察できる。実際に、マウス大脳皮質視覚野や体性感覚野において、視覚入力や感覚入力を変化させた際のスパイン（後シナプス構造）の動的变化を経時的に観察することで、感覚入力依存的な可塑性の本質がシナプスレベルでの変化であることが報告されている¹⁾。

しかし近年、成体脳でも新たなニューロンが産生され続けている領域が存在し、シナプスレベルに加えて細胞レベルでの神経回路の再編成が生じていることが明らかになってきた。嗅覚入力を制御する嗅球および学習・記憶をつかさどる海馬歯状回の2カ所は、ニューロン新生が継続している非常に可塑的な領域である²⁻⁴⁾。このうち、嗅球の新生ニューロンは、側脳室外側壁に面した脳室下帯で産生されている（図1）。脳室下帯には、アストロサイトの形態を持つ神経幹細胞が存在し、一過性増殖細胞を経て新生ニューロンを産生する。産生された新生ニューロンは、吻側移動経路と呼ばれる経路を通して嗅球まで高速で移動する⁵⁾。筆者の所属

する再生医学分野では、脳室下帯から嗅球へ至る新生ニューロンの移動メカニズムについて分泌性ガイダンス分子 Slit や細胞骨格制御タンパク質 CDK5 の役割を明らかにしてきた⁶⁻⁸⁾。

嗅球に到着した新生ニューロンの多くは、顆粒細胞層で顆粒細胞へと分化する。一方、一部の新生ニューロンは嗅球表層の糸球細胞層まで移動を続けて傍糸球細胞へと分化する（図1）。嗅球に到着した新生ニューロンは、投射ニューロンである僧帽細胞に対して抑制性のシナプスを形成し、その活動を制御している。近年、放射線照射や遺伝学的手法を用いてニューロン新生を抑制したり活性化したりしたマウスが詳細に解析されており、嗅球新生ニューロンが嗅覚機能に重要な役割を果たしていることが示唆されている⁹⁻¹²⁾。

嗅球では、新生ニューロンが神経回路網へ継続的に追加されている一方で、古いニューロンが細胞死を起こしており、ニューロンが活発に入れ替わることで嗅球神経回路を細胞レベルで再編成していると考えられている。嗅覚入力を遮断したマウスでは、嗅球に到着した新生ニューロンの生存率が減少することから、嗅球ニューロンのターンオーバーが嗅覚入力の制御を受けていることが示唆されている^{13,14)}。このように非常に可塑的な側面を持つ一方で、嗅球では非常に秩序だった層構造が形成されている

（図1）。このことから、嗅球の層構造及び嗅覚機能を維持しつつニューロンが入れ替わるためには、細胞死を起こすニューロンとその後に加わる新生ニューロンの種類や位置関係が極めて重要であると考えられる。嗅球ニューロン的一种である傍糸球細胞は嗅球表層に存在することから、二光子顕微鏡を用いて生きたまま観察するのに適している^{15,16)}。そこで我々は、この技術を用いて同一のニューロンを繰り返し観察することで、入れ替わる嗅球ニューロンの種類と位置関係、さらには嗅覚入力との関与について解析した¹⁷⁾。本稿では、既に報告したその結果の概要を紹介する。

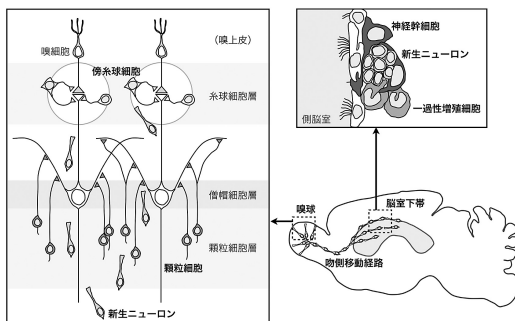


図1：成体脳のニューロン新生

側脳室外側壁の脳室下帯には成体脳でも神経幹細胞が存在し、一過性増殖細胞を経て新生ニューロンを産生している。新生ニューロンは吻側移動経路を通して嗅球へ到達し、顆粒細胞および傍糸球細胞の2種類の介在ニューロンのいずれかに分化する。

3. 嗅覚入力による嗅球ニューロンのターンオーバーの時空間制御

生きた動物で傍糸球細胞のターンオーバーを観察するため、二光子顕微鏡を用いた生体イメージング法を確立した(図2A)¹⁷⁾。傍糸球細胞ほぼ全てを蛍光標識するために、vesicular GABA transporter (VGAT) プロモーター下でVenusを発現するマウス(VGAT-Venusマウス)を用いた。麻酔下のVGAT-Venusマウス嗅球表層の頭蓋骨を薄く削ることで観察窓を作製し、28日おきに約2ヶ月間、同一のニューロンを繰り返し観察することに成功した。その結果、同じニューロンが28日後、56日後にも同じ場所に観察される一方で、28日間で消失するニューロン及び新たに出現するニューロンも観察された(図2B)。これらがそれぞれ、ニューロンの細胞死及び新生ニューロンであり、生理的条件下では1ヶ月に傍糸球細胞全体の4%が

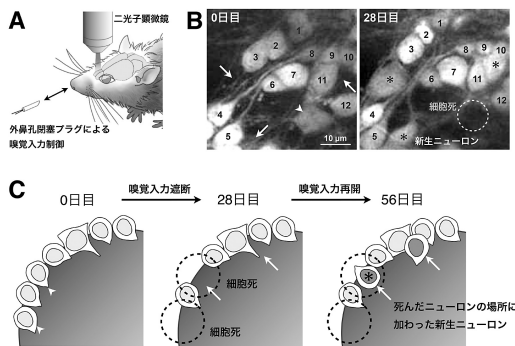


図2：嗅球ニューロンのターンオーバーの生体イメージング

A, B) 二光子顕微鏡で生きたまま嗅球ニューロンのターンオーバーを観察する。嗅覚入力の制御には外鼻孔閉塞プラグを用いることで、嗅覚入力の遮断および再開過程を同一個体で観察できる。28日間の間隔で同一領域を観察すると、同じ場所に同じニューロンが観察される(B, 番号)。一方、28日間で細胞死を起こすニューロン(B, 矢頭と点線丸)や新たに加わるニューロン(矢印とアスタリスク)も観察される。

C) 同じ場所でのニューロンのターンオーバーは嗅覚入力によって制御される。嗅覚入力の遮断で細胞死を起こしたニューロンの場所は、嗅覚入力を再開することで、新生ニューロンで埋まる(アスタリスク)。文献17より改変。

細胞死を起こし、6%が新生ニューロンとして神経回路に組み込まれることを明らかにした。

二光子顕微鏡を用いた生体イメージング法の最大の長所は、細胞死を起こしたニューロンと新生ニューロンの位置関係を解析できる点にある。この点について解析したところ、興味深いことに、嗅覚入力遮断で細胞死を起こしたニューロンの場所に新生ニューロンが加わる現象を見いだした(図2C)。この現象は、嗅覚入力を遮断した状態ではほとんど観察されず、嗅覚入力を再開させたあとで顕著に観察された。以上の結果より、失われたニューロンの場所が嗅覚入力依存的に新生ニューロンで埋まるメカニズムの存在を明らかにした。

4. 嗅覚入力制御する嗅球ニューロンのターンオーバーのサブタイプ特異性

傍糸球細胞は免疫組織化学的にいくつかのサブタイプに分類されている¹⁸⁾。ドパミン産生酵素であるtyrosine hydroxylase (TH) 陽性細胞や、カルシウム結合タンパク質であるcalbindin (CB), calretinin (CR) 陽性細胞はその代表的なサブタイプであり、TH 陽性細胞はドパミンを嗅細胞軸索末端に放出することで嗅覚入力を抑制することが知られているが、CB 陽性細胞及びCR 陽性細胞についてはその機能は不明である。嗅覚入力制御する傍糸球細胞のターンオーバーを制御することから、どのサブタイプのターンオーバーが嗅覚入力の影響を受けているのかを解析することとした。嗅覚入力を遮断すると、3種類の傍糸球細胞のうち、TH 陽性のドパミン作動性ニューロンのアポトーシスが顕著に増加し、嗅覚入力を再開させると新生ドパミン作動性ニューロンが増加した。他の2種類のサブタイプには影響がなかったことから、嗅覚入力はドパミン作動性ニューロンのターンオーバーを制御していることが明らかとなった。

5. 嗅覚入力によるドパミン作動性ニューロンのターンオーバーの時空間制御

嗅覚入力制御する傍糸球細胞のターンオーバーの場

所を制御していること、傍系球細胞の中でもドパミン作動性ニューロンのターンオーバーを調節していることから、嗅覚入力にはドパミン作動性ニューロンのターンオーバーを時空間的に制御している可能性が考えられる。この点を明らかにするためには、ドパミン作動性ニューロンを特異的に標識するマウス (*TH-GFP* マウス) を用いて、失われたドパミン作動性ニューロンの場所に新生ドパミン作動性ニューロンが加わるかどうかを明らかにする必要がある。そこで、狙ったドパミン作動性ニューロンのみを選択的に殺す方法として二光子レーザー焼灼法を用い、除去されたニューロンの場所が28日後に新生ニューロンで埋まるかどうかを解析した (図3 A)。

レーザーで選択的にニューロンを除去してから28日後に同じ領域を観察すると、新生ドパミン作動性ニューロンが観察された。このうち約20%は除去されたニューロンの場所に加わっていることが明らかとなったことから、ドパミン作動性ニューロン同士が同じ場所に入れ替わっ

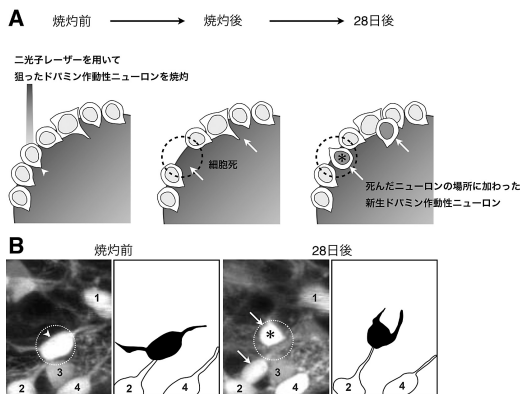


図3：二光子レーザー焼灼法を用いたドパミン作動性ニューロンのターンオーバーの解析

A) 二光子レーザーで狙ったドパミン作動性ニューロンのみを選択的に焼灼すると、その場所は嗅覚入力依存的に新生ドパミン作動性ニューロンで埋まる (アスタリスク)。

B) 焼灼されたニューロンと新生ニューロンの樹状突起パターンは異なる。28日間に入れ替わらないニューロン (2番, 4番の細胞) の樹状突起の方向は保存されているのに対し、同じ場所に入れ替わったニューロンの突起方向は異なっている (黒細胞)。文献17より改変。

ていることが示された。興味深いことに、除去されたニューロンとその場所に加わった新生ニューロンの樹状突起の進展方向は全く異なっていたことから、同じ場所に入れ替わるニューロンの樹状突起パターンが可塑的な側面を維持していることが示唆される (図3 B)。

最後に、ドパミン作動性ニューロンのターンオーバーの時空間制御が感覚入力の影響を受ける可能性について、外鼻孔閉塞プラグを用いて嗅覚入力を遮断して解析した。その結果、二光子レーザーでニューロンを除去したあと嗅覚入力を遮断すると、28日後にその場所が新生ニューロンで埋まる頻度は著しく低下した。以上の結果より、ドパミン作動性ニューロン同士が同じ場所で嗅覚入力依存的に入れ替わることが明らかになった。

6. 終わりに

近年、成体脳でもニューロンのターンオーバーによる細胞レベルでの神経回路再編成が生じ、機能的に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。本研究では、成体脳の構

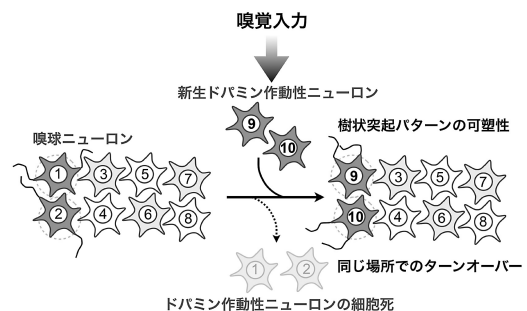


図4：感覚入力依存的な嗅覚ニューロンのターンオーバーの時空間制御

ドパミン作動性ニューロンが細胞死を起こした後 (1番及び2番), 新生ドパミン作動性ニューロンは同じ場所を繰り返し使用することで (9番及び10番), 成体脳という安定した構造の中で効率的に入れ替わっている。このターンオーバーは嗅覚入力によって制御されている。一方、同じ場所に入れ替わるニューロンの樹状突起パターンは異なっており、神経回路の可塑性維持に貢献している可能性がある。感覚入力によるニューロンのターンオーバーの時空間制御は、成体脳の安定性と可塑性を両立させているメカニズムかもしれない。

造的な安定性を保ちつつ、感覚入力の変化に応じてニューロンを効率よく入れ替える新たな可塑性のメカニズムを提唱した(図4)¹⁷⁾。今後、感覚入力によるニューロンのターンオーバーの時空間的な制御がどのようなメカニズムで維持されているのかを明らかにすることで、感覚入力依存的な可塑性におけるニューロン新生の役割を解明し、その意義を明らかにしたいと考えている。

7. 謝 辞

平成24年度名古屋市立大学医学会賞選考委員の先生方並びに関係者の方々にこの場をお借りして深く感謝の意を表します。本研究に関して終始ご指導ご高配を賜りました、本学大学院医学研究科再生医学分野の澤本和延教授に感謝の意を表します。また、研究遂行にあたり様々な助言を頂きました再生医学分野の金子奈穂子助教および加藤康子研究員、ならびに教室員の皆様に深く感謝致します。二光子顕微鏡の技術をご指導下さいました、生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門の鍋倉淳一先生、稲田浩之先生、和氣弘明先生、北海道大学電子科学研究所光細胞生理研究分野の根本知己先生に、この場をお借りしてお礼を申し上げます。さらに、遺伝子改変マウスを供与して頂きました、群馬大学大学院医学系研究科遺伝発達行動学の柳川右千夫先生、福島医科大学医学部附属生体情報伝達研究所生体機能研究部門の小林和人先生に感謝致します。

参考文献

- 1) Holtmaat A & Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*, 10: 647-658, 2009
- 2) Ihrie RA & Alvarez-Buylla A. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*, 70: 674-686, 2011
- 3) Lledo PM, Alonso M & Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*, 7: 179-193, 2006
- 4) Zhao C, Deng W & Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132: 645-660, 2008
- 5) Sawada M, Huang S, Hirota Y, Kaneko N & Sawamoto K: Neuronal Migration in the Adult Brain. In: T. Seki, K. Sawamoto, J. M. Parent, & A. Alvarez-Buylla, eds, *Neurogenesis in the Adult Brain I*, Neurobiology, Tokyo, Springer, 2011, 337-355.
- 6) Hirota Y, Ohshima T, Kaneko N et al. Cyclin-dependent kinase 5 is required for control of neuroblast migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci*, 27: 12829-12838, 2007
- 7) Kaneko N, Marin O, Koike M et al. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron*, 67: 213-223, 2010
- 8) Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*, 311: 629-632, 2006
- 9) Alonso M, Lepousez G, Sebastien W, Bardy C, Gabellec MM, Torquet N & Lledo PM. Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. *Nat Neurosci*, 15: 897-904, 2012
- 10) Breton-Provencher V, Lemasson M, Peralta MR, 3rd & Saghatelian A. Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *J Neurosci*, 29: 15245-15257, 2009
- 11) Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD & Lledo PM. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 1823-1828, 2000
- 12) Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K & Kageyama R. Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 8479-8484, 2011

- 13) Petreanu L & Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci*, 22: 6106-6113, 2002
- 14) Yamaguchi M & Mori K. Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 9697-9702, 2005
- 15) Adam Y & Mizrahi A. Long-term imaging reveals dynamic changes in the neuronal composition of the glomerular layer. *J Neurosci*, 31: 7967-7973, 2011
- 16) Mizrahi A, Lu J, Irving R, Feng G & Katz LC. In vivo imaging of juxtglomerular neuron turnover in the mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 1912-1917, 2006
- 17) Sawada M, Kaneko N, Inada H et al. Sensory input regulates spatial and subtype-specific patterns of neuronal turnover in the adult olfactory bulb. *J Neurosci*, 31: 11587-11596, 2011
- 18) Kosaka K & Kosaka T. Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res*, 1167: 42-55, 2007