

海馬齒状回ニューロン障害動物を用いた  
ニューロン新生促進薬の探索に関する研究

著者名 菊田 真穂

提出年月 平成 25 年 9 月

# 博士論文

海馬歯状回ニューロン障害動物を用いた  
ニューロン新生促進薬の探索に関する研究

金沢大学大学院自然科学研究科

生命科学専攻

分子作用学講座

学 籍 番 号 1023032530

氏 名 菊田真穂

主任指導教員名 檜井栄一

# 目次

第1章	はじめに	1
1.1.	緒言	1
1.2.	使用薬物	11
1.3.	略語	12
1.4.	動物実験指針	13
第2章	海馬歯状回ニューロン脱落後のニューロン新生に対する edaravone の効果	14
2.1.	序文	14
2.2.	方法	16
2.2.1.	動物飼育	16
2.2.2.	薬物投与	16
2.2.2.1.	TMT 投与	16
2.2.2.2.	Edaravone 投与	16
2.2.2.3.	5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 投与	16
2.2.3.	組織の固定と包埋	17
2.2.4.	免疫組織化学法	17
2.2.4.1.	Neuronal nuclei (NeuN)	17
2.2.4.2.	Nestin	17
2.2.4.3.	BrdU	18
2.2.5.	培養ディッシュの前処置	18
2.2.6.	成体マウス海馬歯状回由来神経系幹/前駆細胞 の培養	19
2.2.6.1.	成体マウス海馬歯状回由来神経系幹/前駆細胞 の単離	19
2.2.6.2.	Neurosphere 法	20
2.2.6.3.	Mono-layer 法	21
2.2.7.	薬物処理	21
2.2.8.	Neurosphere assay	21
2.2.9.	免疫細胞化学法	21
2.2.9.1.	Nestin/glial fibrillary acidic protein (GFAP)	21
2.2.9.2.	Nestin/BrdU	22
2.2.9.3.	Nestin	22
2.2.10.	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	22

2.2.11. データ解析	23
2.3. 結果	24
2.3.1. 成体マウス海馬歯状回由来神経系幹/前駆細胞 の単離・培養	24
2.3.2. 海馬歯状回の培養神経系幹/前駆細胞の増殖に対する edaravone の <i>in vitro</i> 曝露の効果	30
2.3.3. 海馬歯状回の培養神経系幹/前駆細胞の増殖に対する edaravone の <i>in vivo</i> 処置の効果	32
2.4. 考察	36

### 第3章 海馬歯状回ニューロン脱落后のニューロン新生に対する

aripiprazole の効果	40
3.1. 序文	40
3.2. 方法	42
3.2.1. 動物飼育	42
3.2.2. 薬物投与	42
3.2.2.1. TMT 投与	42
3.2.2.2. aripiprazole および haloperidol 投与	42
3.2.2.3. BrdU 投与	42
3.2.3. 組織の固定と包埋	43
3.2.4. 免疫組織化学法	44
3.2.4.1. Nestin/BrdU	44
3.2.4.2. NeuN/BrdU	44
3.2.4.3. GFAP/BrdU	45
3.2.4.4. Iba1/BrdU	45
3.2.4.5. DCX/BrdU	45
3.2.5. 行動解析：強制水泳実験	46
3.2.6. 培養ディッシュ前処置	46
3.2.7. 成体マウス海馬歯状回由来神経系幹/前駆細胞 の単離・培養	46
3.2.8. 薬物処理	47
3.2.9. MTT assay	47
3.2.10. データ解析	48
3.3. 結果	49
3.3.1. 海馬歯状回ニューロン脱落后の BrdU 陽性細胞の発現 に対する aripiprazole 急性投与の効果	49

3.3.2.	海馬歯状回ニューロン脱落后に発現した BrdU 陽性細胞の生存に対する aripiprazole 長期投与の効果 ……	52
3.3.3.	海馬歯状回ニューロン脱落后に発現した BrdU 陽性細胞の分化に対する aripiprazole 長期投与の効果 ……	54
3.3.4.	海馬歯状回ニューロン脱落后の BrdU 陽性細胞の発現に対する haloperidol 急性投与の効果 ……	57
3.3.5.	海馬歯状回ニューロン脱落后のうつ様行動に対する aripiprazole および haloperidol の長期投与の効果 ……	58
3.3.6.	海馬歯状回由来神経系幹/前駆細胞の増殖に対する dopamine および aripiprazole の <i>in vitro</i> 曝露の影響	60
3.4.	考察 ……	62
第 4 章	終わりに ……	66
第 5 章	結語 ……	67
	謝辞 ……	69
	引用文献 ……	70

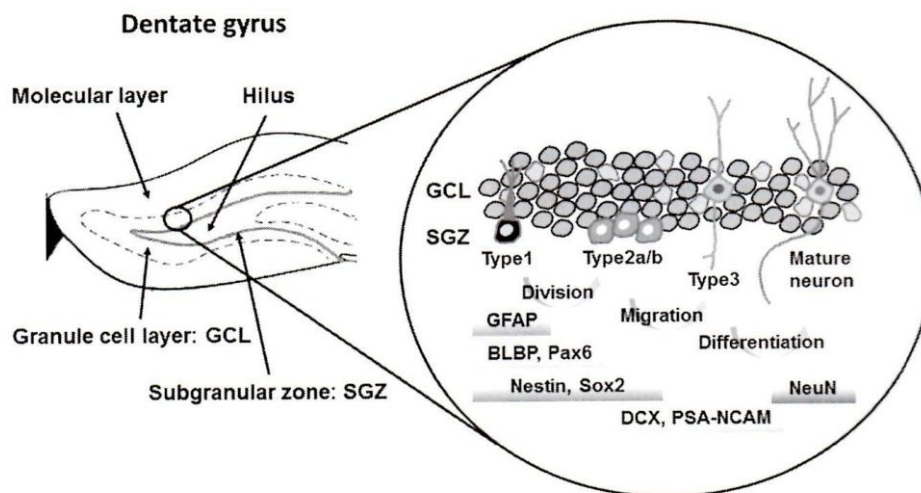
# 第 1 章

## はじめに

### 1.1. 緒言

成体哺乳動物の中樞神経系が自己修復/再生ができないという概念は、成体脳において自己複製能および中樞神経系のニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの 3 つの主要細胞に分化する能力が特徴である神経系幹/前駆細胞 (neural stem/progenitor cells, NPCs) の発見後に再評価された (Taupin et al., 2002)。ヒトを含む哺乳動物の成体脳には、限られた領域ではあるが、神経系幹/前駆細胞が存在し、生涯にわたり絶えずニューロン新生が起きていることが明らかとなり、その代表的な部位が側脳室の側脳室下帯 (subventricular zone, SVZ) と海馬歯状回 (dentate gyrus, DG) の顆粒細胞層下帯 (subgranular zone, SGZ) である (Kuhn et al., 1996)。側脳室下帯で増殖した神経系幹/前駆細胞は、側脳室下帯と嗅球を結ぶ経路である rostral migratory stream (RMS) と呼ばれる構造を経て嗅球へと移動し、嗅球の顆粒細胞や傍糸球体細胞の介在ニューロン細胞へと分化する。また、海馬歯状回の顆粒細胞と歯状回門の境界領域である顆粒細胞層下帯で増殖した神経系幹/前駆細胞は、海馬の CA3 領域に軸索を伸ばし、歯状回の顆粒細胞層 (granule cell layer, GCL) へと移動し、歯状回を構成する顆粒細胞へと分化する (Hastings et al., 1999)。顆粒細胞層下帯の神経系幹/前駆細胞は、グリア細胞繊維性酸性蛋白質 (glial fibrillary acidic protein, GFAP, アストロサイトのマーカー) が発現していることから、顆粒細胞層下帯には通常のアストロサイトとは異なる GFAP 陽性細胞が存在し、顆粒細胞層に新たなニューロンを供給する神経系幹/前駆細胞として働いていることが明らかとなった (Seri et al., 2001)。顆粒細胞層下帯における神経系幹/前駆細胞の実態については未だ議論の余地は残されているが、ニューロンへの分化過程における形態学的特徴や発現分子の相違等から Type 1 細胞、Type 2 細胞、Type 3 細胞に分類される (Fig.1)。Type 1 細胞は、顆粒細胞層下帯に分布した GFAP 陽性の放射状の突起をもつ細胞で、分裂能が低く、放射様グリア細胞 (radial glia-like cells) と呼ばれており、幹細胞に近い細胞と考え

られる。また、Type 1 細胞は、脳脂質結合蛋白質 (brain lipid binding protein, BLBP, 放射状グリアのマーカー) 、nestin、SOX2 (幹細胞のマーカー) を発現している。これらの細胞は、顆粒細胞層を横断し、まれに細胞周期に取り込まれる。Type 2 細胞は、丸型または水平な短い突起をもつ形状で、分裂能の高い一過性増殖細胞と考えられている。Type 2 細胞は GFAP 陰性で、nestin および SOX2 に陽性を示し、Type 2a 細胞 (前期) および Type 2b 細胞 (後期) に分けられる。Type 2a 細胞は、Type 1 細胞に由来するとされており、細胞周期により多く取り込まれる。Type 3 細胞は、移動能をもつニューロブラストで、顆粒細胞層へ移動中の分裂能を失った未熟ニューロンであり、移動後に成熟ニューロンへと分化する (Duan et al., 2008; Garcia et al., 2004; Seri et al., 2001; Steiner et al., 2006) 。



**Fig. 1. Adult neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus.**

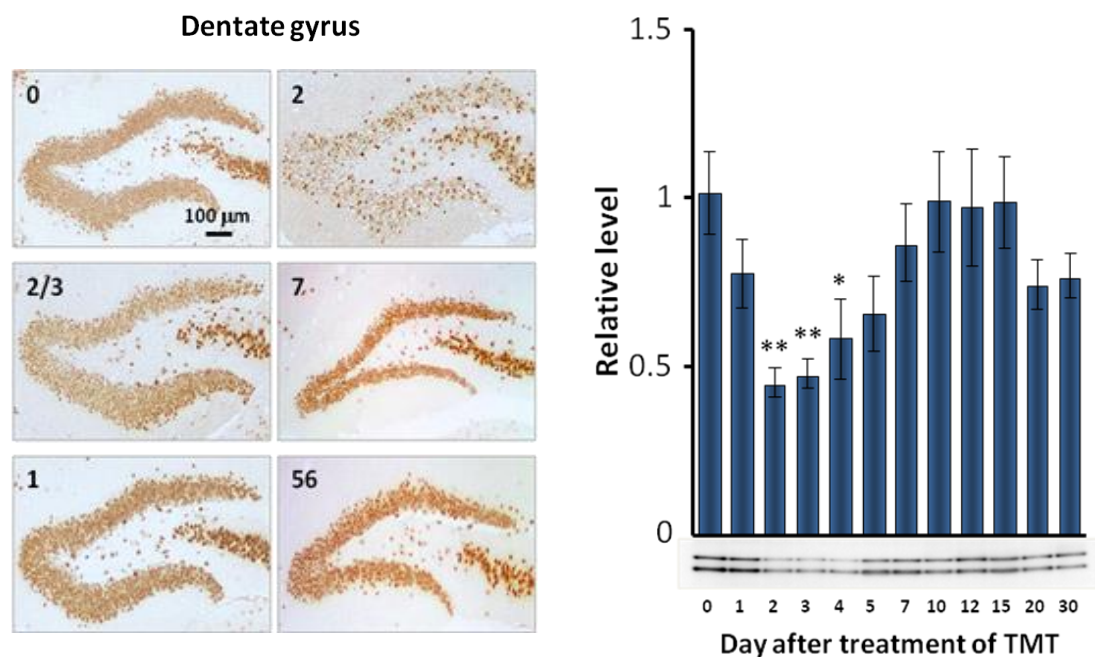
In the subgranular zone, neural stem/progenitor cells (NPCs) are generally classified into 2 different cell populations. One is the radial glia-like cell (type 1 cell), which expresses fibrillary acidic protein (GFAP), nestin, brain lipid-binding protein, and the SRY-related high mobility group box transcription factor SOX2. The other is the amplifying progenitor (type 2a cell), which expresses nestin and SOX2 but not GFAP. The type 2a cells are proposed to be derived from the type 1 ones.

哺乳動物における成体海馬のニューロン新生は、運動など刺激の多い環境や (van Praag et al., 1999; Kempermann et al., 1997; Brown et al., 2003) 加齢 (Brown, 2003; Kempermann et al., 2002) といった条件で変化する神経系幹/前駆細胞の増殖によって制御されている。これらの研究結果は、中枢神経系においてニューロン新生が複雑な外部入力刺激に対して順応し制御されていることを示している。また、生理学的条件変化に加えて、例えば心理的ストレス (Gould

et al., 1997; Jacobs et al., 2000) 、発作 (Parent, 2007) および海馬のニューロン変性 (Bingham et al., 2005; Ogita et al., 2005) といった病理学的条件の変化が、海馬歯状回におけるニューロン新生に影響を及ぼすことも知られている。

有機スズ化合物の一種である塩化トリメチルスズ (trimethyltin chloride, TMT) は、ヒトおよびげっ歯類において海馬や梨状葉、新皮質、扁桃体、脳幹などの中枢神経系にニューロン変性を誘発することが知られている (Balaban et al., 1988; Chang et al., 1982; Reuhl et al., 1983) 。加えて、マウスへの TMT 処置により、TMT シンドロームと呼ばれる多動、振戦、尾の自傷および攻撃性の亢進などの行動変化が起こることも報告されている (Ogita et al., 2004) 。さらに、TMT の単回曝露によるニューロン変性の形態は、ラットとマウス間で相違がある。ラットにおいては、TMT による損傷が歯状回の顆粒細胞および CA1、CA3c/CA4 領域の錐体細胞 (Oderfeld-Nowak et al., 1998) であるのに対し、マウスにおいてその損傷は、歯状回の顆粒細胞に限局している (Fiedorowicz et al., 2001; Ogita et al., 2004; Nagashima et al., 2010; Nguyen et al., 2011) 。マウスに TMT を投与すると海馬歯状回において、TMT 投与後 1-2 日目に顆粒細胞層の脱落が認められるが、その後 TMT 未処置マウスと同程度にまで回復し、顆粒細胞層の再生が明らかとなった (Fig.2) 。また、マウスに TMT を投与すると神経系幹/前駆細胞のマーカー蛋白質である nestin に陽性な細胞が歯状回で増加し、TMT 投与後 3 日間で増殖した細胞が 2 週間後に成熟ニューロンのマーカータンパク質である neuronal nuclei (NeuN) を発現することが報告されており (Harry et al., 2004) 、TMT 処置が顆粒細胞層の再生のために歯状回におけるニューロン新生の促進を著しく引き起こすことも証明されている (Ogita et al., 2005) 。これら過去の研究結果は、TMT 曝露マウスモデルが、歯状回におけるニューロン変性後のニューロン再生に関する研究にとって非常に魅力のあるモデルであるということを示唆している。





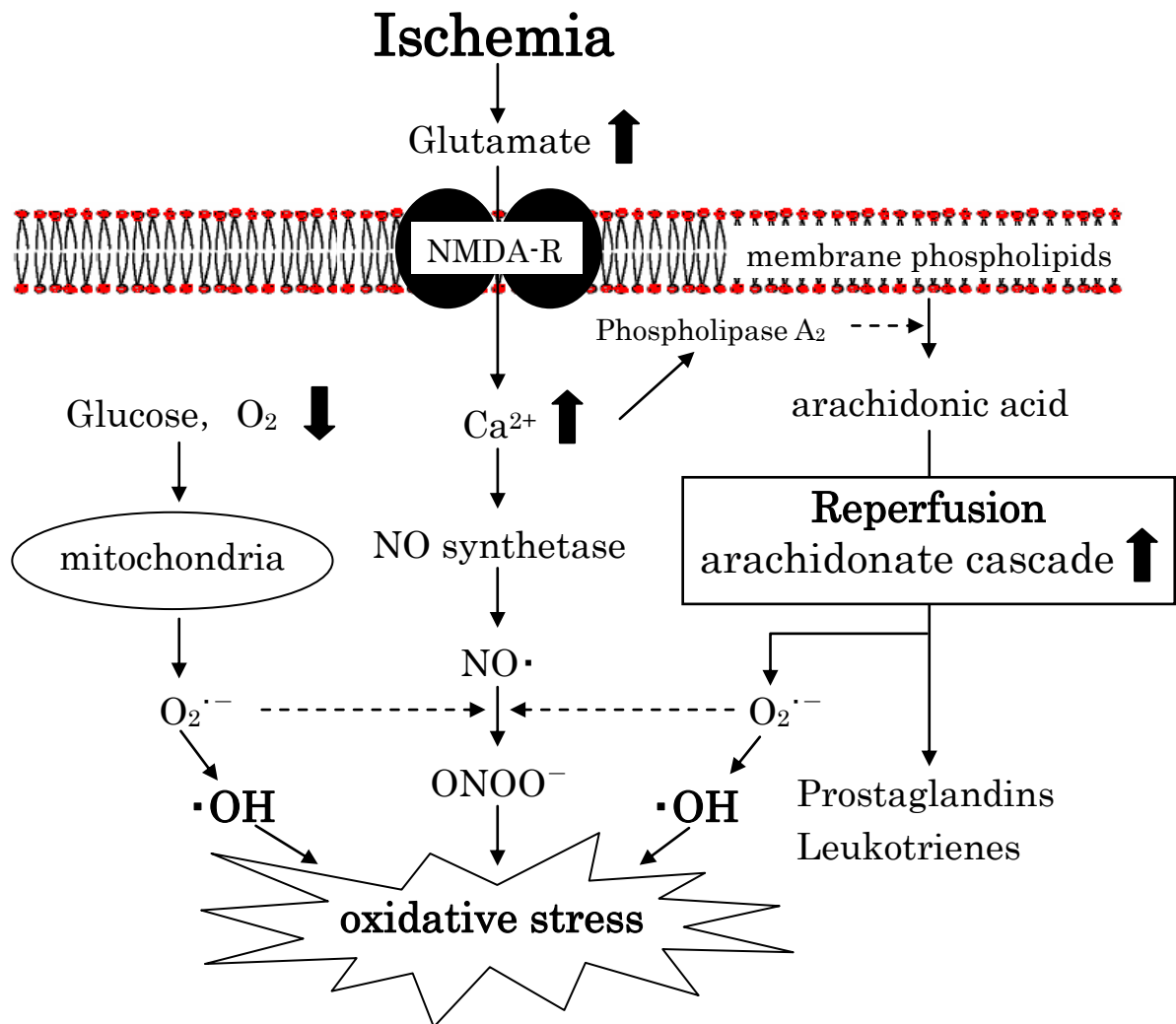
**Fig. 2. Neuronal loss and regeneration in the dentate gyrus following TMT treatment.**

Animals were given PBS or TMT (2.8 mg/kg, i.p.), and then fixed for preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains at various times after the treatment. Immunohistochemical analysis using an anti-NeuN antibody was carried out at indicated times after an injection of PBS and TMT. Scale bar = 100  $\mu$ m. Animals were injected with PBS or TMT (2.8 mg/kg, i.p.), and then prepared homogenates from hippocampus at various time points indicated, in order to test the level of NeuN by means of Western blot analysis. Values are the mean  $\pm$  S.E. from 4-5 separate animals. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, significantly different from the control value obtained for PBS-treated animals (Day=0).

アルツハイマー病 (Alzheimer disease, AD)、パーキンソン病 (Parkinson disease, PD)、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) などのニューロン変性疾患は、現時点では薬物療法などにより、一時的に進行を遅らせることしかできず、ニューロン変性の進行に伴い運動機能や認知機能の低下をもたらし、患者の生活の質 (quality of life, QOL) を低下させる。このような疾患において、脱落したニューロンの再生を促すあるいは補充し組織を再生させることができれば、患者の QOL を向上する可能性が考えられ、現在様々な視点から研究が盛んに行われている。

ニューロン変性疾患と同様に、中枢神経系に大きな損傷を与える疾患に、脳出血および脳梗塞などの脳卒中が挙げられる。脳卒中は、悪性腫瘍、心疾患とともに 3 大成人病に数えられ、その死亡率は国内で第 4 位である (平成 23 年厚生労働省人口動態統計)。また、寝たきりや介護が必要となった主な原因疾患の

第 1 位となっており、高齢化社会を迎え医療費の増加が大きな問題となっている今日において、要介護者の増加も医療経済への負担となりうる。脳卒中の後遺症による運動麻痺などの神経症候は慢性期になってからは改善が難しく、患者の QOL に直結する症状である。したがって、急性期における神経症候などの治療が最も重要とされている (Tanaka et al., 2002)。脳梗塞などで血流が途絶えると、フリーラジカルが発生し、脳細胞に障害を与える。フリーラジカルは生体膜の脂質過酸化障害を引き起こすことにより、虚血性脳損傷へ関与していることが知られている (Flamm et al., 1978)。脳内にはアラキドン酸 (AA) 代謝系や一酸化窒素 (nitric oxide, NO) 合成酵素 (nitric oxide synthase, NOS) などのフリーラジカル産生系が存在し、これらが脳虚血あるいは再開通後に活性化し、フリーラジカルを産生することで酸化障害が引き起こされることが明らかとなってきた (Fig. 3) (Lewen et al., 2000)。近年、このような脳内フリーラジカル量を増大させてニューロン障害を引き起こす外傷性脳損傷 (Dash. et al., 2001) や脳虚血 (Jialing et al., 1998; Kee et al., 2001; Gu et al., 2000; Jin et al., 2001) によって、歯状回において神経系幹/前駆細胞が一過性に増加することが明らかとなってきた。しかしながら、脳虚血において発生する神経系幹/前駆細胞は短命であり、機能的なニューロンには分化し難いと考えられる。このような脳虚血後に増加する神経系幹/前駆細胞の増殖をさらに促進あるいは生存を維持できれば、虚血による手足の麻痺や言語障害を防ぐことができる可能性がある。



**Fig. 3. Major Pathway of Free Radical Production in Ischemic Brain**

NMDA-R, N-methyl-D-aspartate receptor;  $\cdot\text{O}_2^-$ , superoxide anion;  $\cdot\text{NO}$ , nitric oxide  
 $\cdot\text{HO}$ , hydroxyl radical;  $\text{ONOO}^-$ , peroxynitrite .

Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) は、血液脳関門を容易に通過する低分子量 (分子量 174.20) のフリーラジカルスカベンジャーであり (Yoshida et al., 2006; Watanabe et al., 2008) 、有害なラジカルを消去無害化することで、脳虚血後のニューロンや血管内皮細胞の酸化障害を防ぐ世界初の脳保護剤として、2001年4月にわが国で承認された。脳梗塞急性期に適用され、脳血栓症のみならず脳塞栓症にも使用できることから本疾患における治療法の選択肢が広がることが期待されている (Watanabe et al., 2004) 。Edaravone は脳卒中治療ガイドライン2009において、グレードB(行うよう勧められる) にランクされ、脳梗塞発症後24時間以内に投与を開始し、1回30mgの用量を1日2回30分間で点滴静注し、投与期間は14日間までとされている。また、国内の脳梗塞急性期治療の現場では脳保護療法に用いる薬剤として定着しており、

脳梗塞の中核症状である神経症候、日常生活動作障害および機能障害を改善する。

Edaravone の抗脳浮腫作用については、虚血中はもとより酸化障害が主因と考えられる虚血再開通に伴う浮腫の増悪を防止する特性が示唆されている。すなわち、脳虚血とりわけ再開通部位においてアラキドン酸代謝系活性化などにより増加するフリーラジカルの攻撃から血液脳関門 (blood brain barrier, BBB) を構築する内皮細胞を守ることで、血液脳関門の透過性亢進を防ぎ脳浮腫悪化を防止すると考えられている。また、脳梗塞において、虚血中心部と正常脳部位の中間 (虚血周辺部) に存在するペナンプラ領域では、梗塞に至るまで時間的猶予があり、早期薬物治療あるいは再開通療法によって救済可能であるのに対し、虚血部位によっては再開通後に血流や脳エネルギーがほぼ正常に回復したにもかかわらず、その後徐々に死滅する細胞群の存在が以前から知られている (Kirino, 1984)。この種の細胞死は虚血あるいは再開通早期に増加するフリーラジカルによってあらかじめプログラムされており、その代表的なものとして一過性脳虚血後に海馬で生じる錐体細胞の遅発性細胞死が挙げられる。Edaravone (3 mg/kg, i.v.) はラット前脳 10 分間の虚血再開通後投与で海馬領域での  $\cdot\text{OH}$  の増加を抑制し、さらに 72 時間後で遅発性細胞死も抑制することが報告されている (Yamamoto et al., 1997)。以上のような、脳虚血あるいは再開通によって引き起こされる様々な有害イベントに対して edaravone の保護効果が示されているが、これらはすべてフリーラジカル消去作用に基づくものと現時点では考えられている。

Edaravone のフリーラジカル消去機構としては、edaravone 自身がフリーラジカルと結合する補足型ではなく、生理条件下で edaravone の約 50% がアニオンとして存在し、種々のラジカルに電子を供与する電子供与型であり、電子供与後において生成する edaravone 由来ラジカル種は酸化力を持たず、最終的に 2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid (OBP) になるものと推定されている。このような機構により、edaravone はスーパーオキシドアニオンラジカル ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) やヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) を消去し、脂質ペルオキシラジカル ( $\text{LOO}\cdot$ ) の産生を直接的または間接的に抑制する。また、一酸化窒素合成酵素 (NOS) を抑制することで一酸化窒素合成を抑制してペルオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^-$ ) の産生も抑制するなど、幅広い抗酸化活性を有する (Fig.4)。

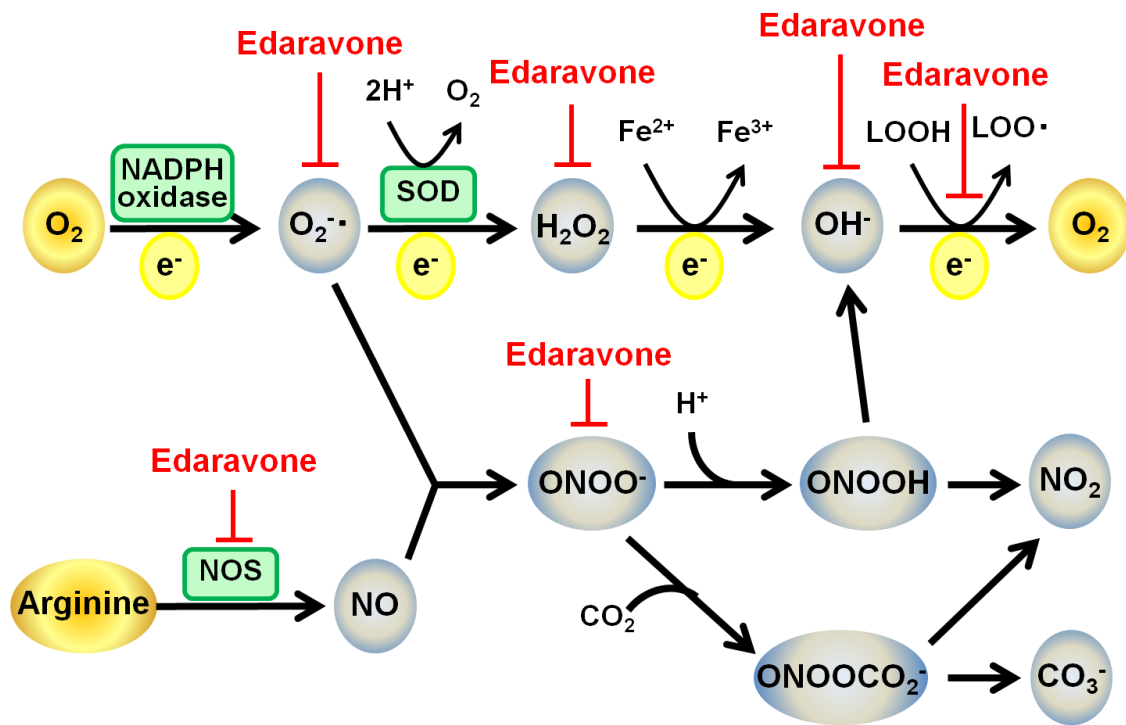


Fig. 4. Targets of edaravone in the generation process of free radicals.

Free radicals include superoxide anion ( $\cdot O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical ( $\cdot HO$ ), nitric oxide ( $\cdot NO$ ), and peroxynitrite ( $ONOO^-$ ). Ederavone is capable of scavenging most of these free radicals. Ederavone provides the desirable features in NOS expression. That is, edaravone increases the expression of NOS3 (beneficial NOS for rescuing from ischemic stroke) and decreases NOS1 and NOS2 (detrimental NOS). LOOH, fatty acids;  $LOO\cdot$ , lipid peroxides.

さらに、ペルオキシラジカル ( $LOO\cdot$ ) による人工リン脂質リポソーム膜の過酸化反応に対する edaravone の抑制活性は水溶性あるいは脂溶性いずれの系でもほぼ同じであり、この特性はそれぞれの過酸化反応において選択的な抑制作用を示す vitamineC や vitamineE とは明らかに異なることが報告されている (Watanabe et al., 2004)。このように、edaravone は幅広いフリーラジカルを消去することから、脂質過酸化反応に対してその開始から連鎖反応における複数の点で抑制作用を示すと推定できる。加えて、edaravone の脂質過酸化抑制活性は水溶性あるいは脂溶性いずれの環境下でも減弱することなく、vitamineC および vitamineE の両性質を有するフリーラジカル消去剤と言える。

先述したように、動物モデルにおいて edaravone は虚血性損傷から海馬および大脳皮質のニューロンを保護することが報告されている (Yamamoto et al., 1997; Mizuno et al., 1998)。また、中大脳動脈の閉塞/再灌流処置ラットにおいて、edaravone は活性酸素種の減少を通して虚血性損傷からニューロンを保護

する能力を持っているのと同様に、側脳室下帯において細胞増殖や神経系幹/前駆細胞を減少する能力も持っている (Zhang et al., 2012)。 *in vivo* 実験のデータに加えて、マウス胎児海馬由来の培養神経幹細胞を用いた *in vitro* 実験において、50  $\mu$ M edaravone の直接添加が、内因的に生じたフリーラジカルを消去することによって、神経系幹/前駆細胞の増殖を抑える (Yoneyama et al., 2010a) という報告は、ニューロン損傷後に高められたニューロン新生を抑制する可能性があるため、edaravone が有益ではないかもしれないことを示唆している。しかしながら、海馬歯状回におけるニューロン損傷後のニューロン新生促進に対する edaravone の *in vivo* 効果に関する研究報告は少ない。

患者の QOL を低下させる疾患として、統合失調症や躁うつ病などが近年増加傾向にある。統合失調症は、生涯罹病危険率が人口の 0.75～1% を占める代表的な精神疾患であり、中枢のドパミン作動性神経の過剰活動にその主な原因があると考えられている (ドパミン過剰仮説)。過去には、定型抗精神病薬として chlorpromazin を始めとして haloperidol などのドパミン D<sub>2</sub> 受容体アンタゴニスト作用を有する薬剤が数多く開発された。しかし、これらの薬剤は統合失調症の症状の中で、幻覚、妄想および精神運動性興奮などの陽性症状に対しては効果がある反面、情動の平板化、感情的引きこもりおよび運動減退などのいわゆる陰性症状に対しては効果が弱い。また、安全性の面では、アカシジア、ジストニア、パーキンソン様運動障害などの錐体外路系副作用が多く、高プロラクチン血症が問題になっていた。1990 年代に入って、非定型抗精神病薬の概念を確立させた clozapine に続く olanzapine の開発、risperidone を始めとする serotonin-dopamine antagonist (SDA) の開発などで、先述した定型抗精神病薬の欠点の中で特に錐体外路系副作用を軽減することができた。しかし、非定型抗精神病薬の残る副作用として、体重増加、脂質代謝異常、過鎮静作用、心臓 QT 間隔延長などがクローズアップされ、より安全性と効果の面で優れた次世代の抗精神病薬の登場が待たれていた。

Aripiprazole は、統合失調症のドパミン過剰仮説にのっとり開発されたドパミン D<sub>2</sub> 受容体部分アゴニストとして世界で初めての抗精神病薬である。既存薬とは異なりドパミン作動神経伝達に対して過剰活動状態の場合には、ドパミン D<sub>2</sub> 受容体のアンタゴニストとして作用し、ドパミン作動性神経伝達が低下している場合には、ドパミン D<sub>2</sub> 受容体のアゴニストとして作用するドパミン・システムスタビライザー (dopamine system stabilizer, DSS) として働くことより次世代の抗精神病薬として注目されている。Aripiprazole は、2006 年 1 月に統

合失調症の治療薬として、その後、躁病エピソードまたは混合性エピソードを呈した双極 I 型障害患者に対して有用性が確認され、2012 年 1 月には双極性障害における躁症状の改善薬として承認された非定型抗精神病薬である。また、子供の自閉症における興奮症状の補助的治療として用いられる。

Aripiprazole は、Table.1 (Kikuchi et al., 2005) に示したようにドパミン D<sub>2</sub> および D<sub>3</sub> 受容体、5-hydroxytryptamine (5-HT) 5-HT<sub>1A</sub> および 5-HT<sub>2A</sub> 受容体に高い親和性を有し、ドパミン D<sub>4</sub> 受容体、セロトニン 5-HT<sub>2C</sub> 受容体、α<sub>1</sub> アドレナリン受容体、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体に中等度の親和性を示す (Shapiro et al., 2003)。加えて、aripiprazole はドパミン D<sub>2</sub> 受容体およびセロトニン 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の部分アゴニストとして、またセロトニン 5-HT<sub>2A</sub> 受容体のアンタゴニストとして機能する。しかし、既存の SDA 系抗精神病薬が有するセロトニン 5-HT<sub>2A</sub> 受容体に対する親和性がドパミン D<sub>2</sub> 受容体のそれよりも高いという特徴は有していない。

**Table.1. Receptor binding ability of an antipsychotic**

Receptor	Aripiprazole	Clozapine	Risperidone	Olanzapine	Haloperidol
D <sub>1</sub>	265	290	580	52	120
D <sub>2</sub>	0.34	130	2.2	20	1.4
D <sub>3</sub>	0.8	240	9.6	50	2.5
D <sub>4</sub>	44	47	8.5	50	3.3
5-HT <sub>1A</sub>	1.7	140	210	2,100	3,600
5-HT <sub>2A</sub>	3.4	8.9	0.29	3.3	120
5-HT <sub>2C</sub>	15	17	10	10	4,700
5-HT <sub>6</sub>	214	11	2,000	10	6,000
5-HT <sub>7</sub>	39	66	3.0	250	1,100
α <sub>1</sub>	57(rat)	4.0	1.4	54	4.7
α <sub>2</sub>	791(rat)	33	5.1	170	1,200
H <sub>1</sub>	61	1.8	19	2.8	440
M <sub>1</sub>	>10 μM (IC50,bovine)	1.8	2,800	4.7	1,600

特記しない限り、ヒト発現系受容体における Ki 値 (nM) を示す。

Kikuchi T et al. Jpn J Clin Psychiatry 34(4), 461-468, 2005 (一部改変)

抗精神病薬のニューロン新生に対する作用については、ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬である haloperidol に関して一定の結論が出ているわけではないが、多くの報告がみられる (Malberg et al., 2000; Wang et al., 2004; Wakade et al., 2002; Keilhoff et al., 2010)。しかしながら、aripiprazole のニューロン新生に対する効果についての報告は少ない。

そこで本研究では、海馬歯状回におけるニューロン損傷後のニューロン新生に対する edaravone および aripiprazole の効果を明らかにするために、損傷を受けていない歯状回におけるニューロン新生および歯状回ニューロン脱落/再生モデルマウスを用いて歯状回ニューロン脱落後のニューロン再生に対する edaravone および aripiprazole の影響について検討した。

## 1.2. 使用薬物

Edaravone は田辺三菱製薬株式会社 (大阪) から快く提供して頂いた。Aripiprazole は、大塚製薬株式会社 (徳島) から快く提供して頂いた。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) : Nutrient Mixture F12 (1 : 1, DMEM/F-12)は Invitrogen Co. (Eugene, OR, USA) より購入した。上皮細胞増殖因子 (EGF) と塩基性線維芽細胞成長(増殖)因子 (bFGF) は Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) より購入した。ウシ胎仔血清 (FCS) は JRH Biosciences (Lenexa, KS, USA) より購入した。Poly-L-ornithine、マウス抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) モノクローナル抗体およびウサギ抗 GFAP ポリクローナル抗体は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。ラット抗 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) モノクローナル抗体は Abcam Ltd. (Cambridge, UK) より購入した。マウス抗 nestin モノクローナル抗体は Millipore Co. (Boston, MA, USA) より購入した。マウス抗  $\beta$ -tubulin III 抗体およびマウス抗 neuronal nuclei (NeuN) モノクローナル抗体は Chemicon International (Temecula, CA, U.S.A.) より購入した。ヤギ抗 doublecortin (DCX) ポリクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) より購入した。FITC 標識ヤギ抗マウス IgG は Molecular Probes (Eugene, OR, USA) より購入した。FITC 標識ウマ抗ヤギ IgG は Jackson ImmunoResearch Laboratories より購入した。Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ラット IgG、Texas Red 標識ヤギ抗ウサギ IgG、Alexa-Fluor 488 標識ヤギ抗ウサ



ギ IgG および Alexa-Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG は Molecular Probes (Eugene, OR, USA) より購入した。VECTASHIELD Mounting Medium およびヤギ正常血清は Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, U.S.A.) より購入した。3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)、penicillin、progesterone、streptomycin および Hoechst33342 はナカライテクス株式会社 (京都) より購入した。ウサギ抗 ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) ポリクローナル抗体、carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC)、trimethyltin (TMT) および Protein Assay Rapid kit は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。その他の化合物は、市販の特級品を使用した。

### 1.3. 略語

本論文に使用した略語は以下の通りである。

**bFGF**: basic fiboblast growth factor

**β-Tubulin III**: beta-III isoform of tubulin

**BLBP**: brain lipid binding protein

**BrdU**: 5'-bromo-2'-deoxyuridine

**CA**: cornu ammonis

**DCX**: doublecortin

**DG**: dentate gyrus

**DIV**: day in vitro

**DMEM/F12**: Dalbecco's modified eagle medium: Nutrient mixture F-12 (1: 1)

**Edaravone**: 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one

**EGF**: epidermal growth factor

**ELISA**: enzyme-linked immunosorbent assay

**FCS**: fetal calf serum

**FITC**: fluorescein isothiocyanate

**GCL**: granule cell layer

**GFAP**: glial fibrillary acidic protein

**Hoechst 33342**: bisbenzimidazole H33342 Fluorochrome Trihydrochloride

**Iba-1**: ionized calcium binding adaptor molecule 1

**ML:** molecular layer  
**NeuN:** neuronal nuclei  
**NO:** nitric oxide  
**NOS:** nitric oxide synthase  
**NPCs:** neural stem/progenitor cells  
**PBS:** phosphate buffered saline  
**PFA:** paraformaldehyde  
**ROS:** reactive oxygen species  
**SGZ:** subgranular zone  
**SOX2:** SRY-box containing gene 2  
**SVZ:** subventricular zone  
**TB:** Tris buffer  
**TBST:** 0.03% Tween 20 in Tris-buffered saline  
**TMT:** trimethyltin chloride

## 1.4. 動物実験指針

本研究における実験動物の取り扱い、すべて日本薬理学会動物実験指針に則り、摂南大学動物実験に関する規定に基づき、承認のもと、規定を遵守し行った。使用する動物は最小限にとどめ、動物に苦痛を与えないよう最大限努力し、*in vivo* 手法に代わる方法を利用するようにした。すべての実験動物は自由摂食・摂水下、気温  $23.0 \pm 2$  °C および湿度 55% で、12 時間の明暗サイクル下で飼育した。

## 第 2 章

# 海馬歯状回ニューロン脱落後のニューロン新生に対する edaravone の効果

### 2.1. 序文

ヒトを含む哺乳動物の成体脳には、限られた領域ではあるが、神経系幹/前駆細胞が存在し、生涯にわたり絶えずニューロン新生が起きていることが明らかとなっている。その代表的な部位が側脳室の側脳室下帯 (SVZ) と海馬歯状回の顆粒細胞層下帯 (SGZ) である (Kuhn et al., 1996)。側脳室下帯で増殖した神経系幹/前駆細胞は、側脳室下帯と嗅球を結ぶ経路である rostral migratory stream (RMS) と呼ばれる構造を経て嗅球へと移動し、嗅球の顆粒細胞や傍糸球体細胞の介在ニューロン細胞へと分化する。また、海馬歯状回の顆粒細胞と歯状回門の境界領域である顆粒細胞層下帯で増殖した神経系幹/前駆細胞は、海馬の CA3 領域に軸索を伸ばし、歯状回の顆粒細胞層 (GCL) へと移動し、歯状回を構成する顆粒細胞へと分化する (Hastings et al., 1999)。哺乳動物における成体海馬のニューロン新生は、運動など刺激の多い環境や(van Praag et al., 1999; Kempermann et al., 1997; Brown et al., 2003) 加齢 (Brown, 2003; Kempermann et al., 2002) といった条件で変化する神経系幹/前駆細胞の増殖によって制御されている。これらの研究結果は、中枢神経系においてニューロン新生が複雑な外部入力刺激に対して順応し制御されていることを示している。また、生理学的条件変化に加えて、例えば心理的ストレス (Gould et al., 1997; Jacobs et al., 2000)、発作 (Parent, 2007) および海馬のニューロン変性 (Bingham et al., 2005; Ogita et al., 2005) といった病理学的条件の変化が海馬歯状回におけるニューロン新生に影響を及ぼすことも知られている。

有機スズ化合物の一種である塩化トリメチルスズ (trimethyltin chloride、TMT) は、ヒトおよびげっ歯類において海馬や梨状葉、新皮質、扁桃核、脳幹などの中枢神経系にニューロン変性を誘発することが知られている (Balaban CD., et al., 1988; Chang et al., 1982; Reuhl et al., 1983)。TMT の単回曝露に

よるニューロン変性の形態は、ラットとマウス間で相違があり、マウスにおいてその損傷は、歯状回の顆粒細胞に限局している (Fiedorowicz et al., 2001; Ogita et al., 2004; Nagashima et al., 2010; Nguyen et al., 2011)。また、マウスに TMT を投与すると神経系幹/前駆細胞のマーカー蛋白質である nestin に陽性な細胞が歯状回に増加し、TMT 投与後 3 日間で増殖した細胞が 2 週間後に成熟ニューロンのマーカータンパク質である NeuN を発現することが報告されており (Harry et al., 2004)、TMT 処置が顆粒細胞層の再生のために歯状回におけるニューロン新生の促進を著しく引き起こすことも証明されている (Ogita et al., 2005)。これら過去の研究結果は、TMT 曝露マウスモデルが、歯状回におけるニューロン変性後のニューロン再生に関する研究にとって非常に魅力のあるモデルであるということを示唆している。

アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などのニューロン変性疾患と同様に、中枢神経系に大きな損傷を与える疾患に、脳出血および脳梗塞などの脳卒中が挙げられる。脳梗塞などで血流が途絶えると、不対電子を持つ反応性の強いフリーラジカルが発生し、細胞膜を構成するリン脂質中の不飽和脂肪酸を過酸化して膜の障害を引き起こし、この障害が連鎖的に進行して、浮腫、梗塞、ニューロン障害に代表される脳虚血障害を招くとされている (Chan et al., 1985)。

Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) は、血液脳関門を容易に通過する低分子量のフリーラジカルスカベンジャーであり (Yoshida et al., 2006; Watanabe et al., 2008)、有害なラジカルを消去無害化することで、脳虚血後のニューロンや血管内皮細胞の酸化障害を防ぐ世界初の脳保護剤として、2001 年 4 月にわが国で承認された。脳梗塞急性期に適用され、脳血栓症のみならず脳塞栓症にも使用できることから本疾患における治療法の選択肢が広がるのが期待されている (Watanabe et al., 2004)。近年、このような脳内フリーラジカル量を増大させてニューロン障害を引き起こす外傷性脳損傷 (Dash et al., 2001) や脳虚血 (Liu et al., 1998; Kee et al., 2001; Gu et al., 2000; Jin et al., 2001) によって、歯状回において神経系幹/前駆細胞が一過性に増加することが明らかとなってきた。しかしながら、脳虚血において発生する神経系幹/前駆細胞は短命であり、機能的なニューロンには分化し難いと考えられる。このような脳虚血後に増加する神経系幹/前駆細胞の増殖をさらに促進あるいは生存を維持できれば、虚血による手足の麻痺や言語障害を防ぐことができる可能性がある。そこで、海馬歯状回におけるニューロン損傷後のニューロン新生に対

する edaravone の効果を明らかにするために、TMT 誘発性ニューロン脱落后に一過性に増加する成体マウス歯状回由来神経系幹/前駆細胞を用いて、edaravone の *in vitro* および *in vivo* 処置の影響について検討した。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 動物飼育

実験動物の取り扱い、摂南大学動物実験に関する規定に基づき、承認のもと、規定を遵守して行った。5 週齢の ddY 系雄性マウス (Std-ddY) (26-28 g) を、自由摂取および摂水下、気温  $23 \pm 2$  °C および湿度 55% で、7 時から 19 時までの明期および 19 時から翌朝 7 時までの暗期をもつ明暗サイクル下で飼育した。

### 2.2.2. 薬物投与

#### 2.2.2.1. TMT 投与

TMT は 2.8 mg/kg の用量でマウスに腹腔内投与した。使用当日に phosphate buffered saline (PBS) に溶解した後、体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で腹腔内投与した。

#### 2.2.2.2. Edaravone 投与

Edaravone を 1 M NaOH に溶解させ、pH 7 になるよう 1 M HCl で滴定した。調製液を 3 mg/mL になるように PBS で希釈した。TMT を 2.8 mg/kg の用量でマウスに腹腔内投与し、その 48 時間後から PBS または edaravone (30 mg/kg) を 12 時間ごとに 4 回もしくは 14 回連続で腹腔内投与した。全ての薬物は体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で腹腔内投与した。

#### 2.2.2.3. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 投与

BrdU (50 mg/kg) は TMT 投与後 72 時間後から 12 時間ごとに 2 回連続で腹腔内投与した。全ての薬物は体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で腹腔内投与した。

### 2.2.3. 組織の固定と包埋

2.2.2.に準じて薬物投与を行ったマウスに抱水クロラール (500 mg/kg) を腹腔内投与し、全身麻酔を施した。動物を開胸し、右心耳を切開後に心尖やや左から左心室に挿入した注射針から、ペリスタポンプを用いて生理食塩水を流速約 8 mL/min で灌流させた。脱血後、灌流液を 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) で溶解した 4% paraformaldehyde (PFA) に交換し、体重 10 g 当たり 15 mL の割合で灌流した。動物から全脳を摘出し、摘出脳を再度 4% PFA に浸し 4°C で一晩、後固定を行った。組織標本を細切し、流水洗浄を 1 時間行った後、アセトンに室温で一晩浸し、脱脂処理を行った。細切した組織標本は次いで、エタノール脱水系列 (70-100%) を通し、キシレンで透徹後、パラフィンに浸透させ包埋処理を行った。パラフィン包埋組織は大型滑走式ミクロトームを用い、3-5  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切した。切片は伸展後に親水性シランコーティングスライドガラス (松浪硝子工業株式会社、大阪) に貼り付け、40°C で一晩乾燥させた。

### 2.2.4. 免疫組織化学法

#### 2.2.4.1. Neuronal nuclei (NeuN)

2.2.3.に準じて作製した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列 (100-50%) に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却後、0.03% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBST) で洗浄し、TBST で希釈した 5% ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行い、マウス抗 NeuN モノクローナル抗体 (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を混合して、4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を TBST で希釈し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、TBST で洗浄し、VECTASHIELD mounting medium を用いて封入を行った。

#### 2.2.4.2. Nestin

2.2.3.に準じて作製した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列 (100-50%) に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化

処理を行った。室温まで冷却後、TBST で洗浄し、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行い、マウス抗 nestin モノクローナル抗体 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を混合して、4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を TBST で希釈し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、TBST で洗浄し、VECTASHIELD mounting medium を用いて封入を行った。

#### 2.2.4.3. BrdU

2.2.3.に準じて作製した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列 (100~50%) に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、2 M HCl に 35°C で 30 分間反応させた後に、0.1 M ホウ酸 (pH 8.5) で洗浄・中和した。さらに、TBST で洗浄後、0.03%過酸化水素水を含む 100% メタノールで内在性ペルオキシダーゼに対するブロッキングを行った。TBST で洗浄後、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行い、antibody diluent で希釈したラット抗 BrdU モノクローナル抗体 (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、TBST で希釈したビオチン化ヤギ抗ラット IgG (H+L) を室温で 30 分間反応させ、次いで、streptavidin-biotinylated peroxidase complex kit を室温で 1 時間反応させた。切片を TBST で洗浄した後、simple stain DAB solution を用いて発色した。蒸留水で洗浄後に、ヘマトキシリンにて対比染色を行い、エタノール脱水系列 (70~100%) による脱水後、キシレンによる透徹および ENTELLAN new を用いて封入を行った。

#### 2.2.5. 培養ディッシュの前処置

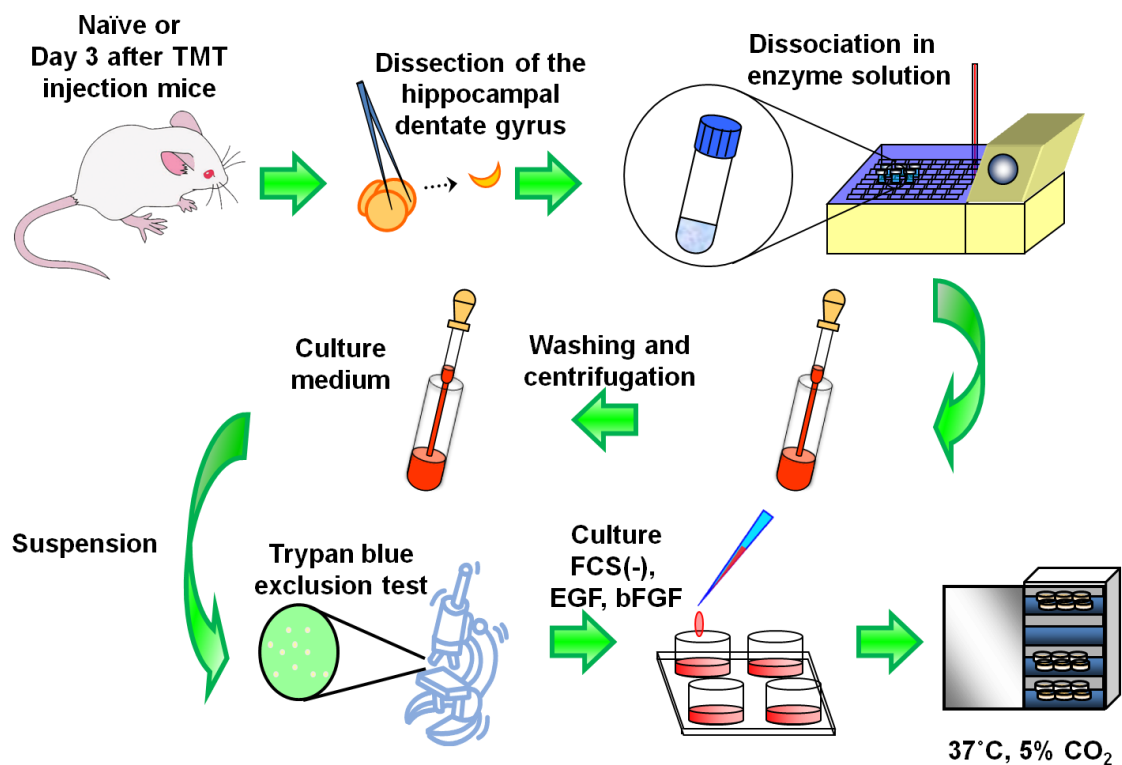
培養ディッシュ (24-well dish, Nunc, Denmark) の各 well に poly-L-ornithine を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター (SANYO 社、MC0-17AIC 型) 内で少なくとも 2 時間静置した。poly-L-ornithine コーティング後、液を取り除き、滅菌精製水で 1 回洗浄し、medium with serum [Dalbecco's modified eagle medium: F-12 nutrient mixture (1: 1) (DMEM/F-12) containing 10% fetal calf serum (FCS), 0.12 % sodium bicarbonate, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin, 16.5 mM glucose and 250  $\mu\text{M}$  N-acetyl-L-cystein] で置換し、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4 時間以上静置した。

## 2.2.6. 成体マウス海馬歯状回由来神経系幹/前駆細胞の培養

### 2.2.6.1. 成体マウス海馬歯状回由来神経系幹/前駆細胞の単離

概要を Fig. 5 に示した。TMT 未処置マウスあるいは 2.2.2.1. に準じて TMT を投与したマウスについて、TMT 投与後 3 日目もしくは 4 日目に脳を切り出し、2°C の生理食塩液に浸した。その後、顕微鏡下で歯状回を単離するため、0.5 mm の脳切片を調製した。単離した歯状回を medium with serum 内で 1,000  $\mu$ L のピペットマンにより破砕し、1,100 rpm、5 分間遠心した。上清を吸引後、2  $\mu$ g/mL papain, 500  $\mu$ g/mL DNase および 180  $\mu$ g/mL neutral protease を PBS-special (Dulbecco's phosphate-buffered saline containing 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin and 33 mM glucose) に溶解した酵素処理液で 37 °C、5 分間、激しく振動させながらインキュベートし、細胞間の結合を緩和した。これらの組織小片について、1,000  $\mu$ L のピペットマンにより 50 回ピペッティングし、酵素処理液と同量の medium with serum を加え、再度分散し、1,100 rpm、5 分間遠心した。上清を吸引後、medium with serum を加え、懸濁し、1,100 rpm、5 分間遠心した。上清を吸引後、growth medium [DMEM/F-12 containing 0.12% sodium bicarbonate, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 16.5 mM glucose, 20 nM progesterone, 30 nM sodium selenite, 60  $\mu$ M putrescine, 25  $\mu$ g/mL insulin, 100  $\mu$ g/mL apo-transferrin, 20 ng/mL basic fiboblast growth factor (bFGF) and 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF)] を加え、懸濁し、1,100 rpm、5 分間遠心した。これらの細胞について、trypan blue 染色を用いて生細胞の割合を算出した。





**Fig. 5. Experimental procedure for the culture of neural progenitors in the hippocampal dentate gyrus of adult mice.**

Cells were prepared from the hippocampal dentate gyrus (DG) of naïve or TMT-treated mice on day 3 post-treatment. Hippocampal DG were isolated from mice after TMT injection and then suspended in enzyme solution by a 5-min treatment. Cells obtained were washed with DMEM/F-12 supplemented with 10% fetal cow serum (FCS) and subsequently centrifuged at 1,100 rpm for 5 min. The cells were plated at a density 30,000 or 100,000 cells/mL and maintained in the growth medium containing 20 ng/mL EGF and 20 ng/mL bFGF. Cultures were always maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub>/95% air-humidified incubator.

## 2.2.6.2. Neurosphere 法

2.2.6.1.に準じて単離した細胞について、培養ディッシュ上に 30,000 cells/mL で細胞を播種し、growth medium 中で浮遊培養系により培養し、neurosphere を形成させた。これらの細胞は、実験に用いるまで 37°C 、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した。また、medium の交換は 4 日置きに、半量を新しい growth medium と交換して行った。細胞は、growth medium 中で 1-30 日間培養を行った。

### 2.2.6.3. Mono-layer 法

2.2.6.1.に準じて単離した細胞について、2.2.5.に準じて作製した培養ディッシュに 100,000 cells/mL で細胞を播種し、growth medium 中で接着培養系により単層培養を行った。これらの細胞は、実験に用いるまで 37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した。また、medium の交換は 4 日置きに、半量を新しい growth medium と交換して行った。細胞は、growth medium 中で 1-28 日間培養を行った。

### 2.2.7. 薬物処理

2.2.6.1.に準じて単離した細胞について、2.2.5.に準じて作製した培養ディッシュに 30,000 cells/mL で細胞を播種し、growth medium 中で接着培養系により単層培養を行った。薬物は、播種直後に edaravone を 10 pM あるいは 10 nM の濃度になるよう growth medium 中の培養細胞に曝露した。これらの細胞は、実験に用いるまで 37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した。また、薬物処理は、medium の交換と同時に新たに行った。medium の交換は 4 日置きに、半量を新しい growth medium と交換して行った。細胞は、growth medium 中で 1-14 日間培養を行った。

### 2.2.8. Neurosphere assay

2.2.6.2.に準じて 5、9、18 および 30 日間培養した細胞において、1 枚のディッシュ内の真ん中の 2 well について 50 μm 以上の neurosphere を顕微鏡下で計測し、その平均値を 1 例とした。また、本実験において、細胞 1 個の大きさが約 10 μm であることを考慮した上で、neurosphere は複数の細胞が塊をなしていることより、50 μm 以上の細胞塊を neurosphere として定義した。

### 2.2.9. 免疫細胞化学法

#### 2.2.9.1. Nestin/glial fibrillary acidic protein (GFAP)

2.2.6.1.に準じて単離した細胞を 2.2.5.に準じて作製した培養ディッシュに回収し、その 2 時間後の細胞を用いた。あるいは 2.2.6.3.に準じて 1、7、14 および 28 日間培養した細胞を用いた。4%PFA を用いて、20 分間、4°C で細胞を固定した後、TBST で洗浄し、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、マウス抗 nestin モノクローナル抗

体 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびウサギ抗 GFAP ポリクローナル抗体を混合して antibody diluent で希釈し、4°Cで一晩反応させた。TBST で洗浄後、TBST で希釈した FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) および Texas RED 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を混合し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、Hoechst 33342 を TBST で希釈し、室温・遮光で 20 分間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、VECTASHIELD mounting medium (Hard set) を用いて封入を行った。

### 2.2.9.2. Nestin/BrdU

2.2.6.3.に準じて 12 日間培養した細胞に BrdU を 10  $\mu\text{M}$  曝露し、その 48 時間後に 4% PFA を用いて、20 分間、4°C で固定した。その後 TBST で洗浄し、TBST で希釈した 5% ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、マウス抗 nestin モノクローナル抗体 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびラット抗 BrdU モノクローナル抗体 (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を混合して、4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、TBST で希釈した FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) および Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ラット IgG (H+L) (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を混合し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、VECTASHIELD mounting medium (Hard set) を用いて封入を行った。

### 2.2.9.3. Nestin

2.2.6.2.に準じて 30 日間培養して得られた neurosphere を 4% PFA を用いて、20 分間、4°C で固定した。その後 TBST で洗浄し、TBST で希釈した 5% ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、マウス抗 nestin モノクローナル抗体 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を TBST で希釈し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、Tris buffer (TB) で置換した。

## 2.2.10. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

細胞増殖の評価は、ELISA 法により BrdU の取り込みを測定することで判定した。2.2.6.3.に準じて調製した培養細胞について、分散直後から 0.1  $\mu\text{M}$  BrdU を添加した。1、14 および 28 日間培養後、300 x g、10 分間の遠心分離した後、上清を除去後、60°C で 1 時間乾燥させた。乾燥させた細胞は、Cell

Proliferation ELISA, BrdU (Roche Diagnostics, Germany) の 200  $\mu\text{L}/\text{well}$  の Fix Denat で、室温、30 分間細胞を固定させた。Fix Denat を除去後、200  $\mu\text{L}/\text{well}$  の anti-BrdU-POD 反応液を添加し、室温で 1 時間反応させた。Anti-BrdU-POD 反応液を除去後、300  $\mu\text{L}/\text{well}$  の洗浄用緩衝液で室温、5 分間の洗浄を 3 回行った。洗浄液を除去後、200  $\mu\text{L}/\text{well}$  の基質液を加えて、室温で 10 分間反応させた後に、25  $\mu\text{L}$  の反応停止液 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) を添加し、1 分間攪拌した。その後、5 分以内に 96-well プレートに 150  $\mu\text{L}$  移し、enzyme-linked immunosorbent assay reader により、405 nm の吸収波長を測定した。

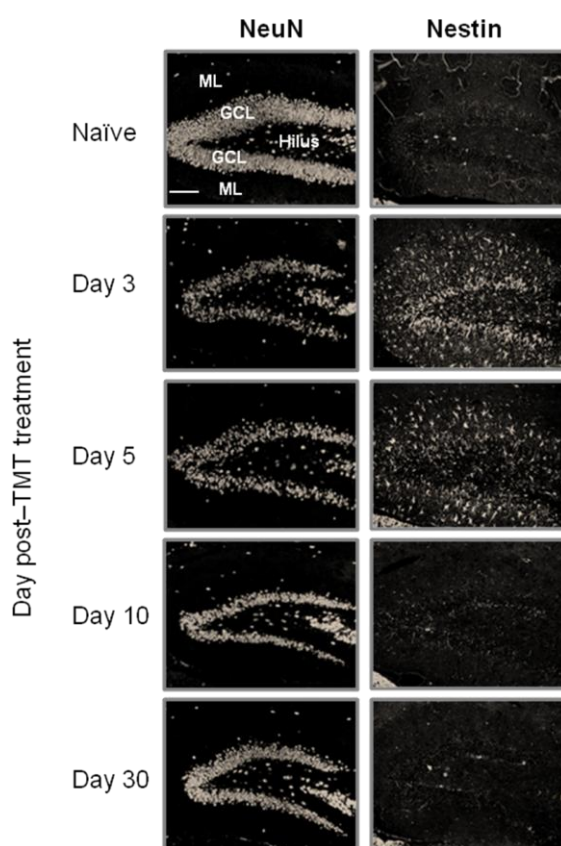
### 2.2.11. データ解析

結果は全て平均値 $\pm$ 標準誤差で表示し、統計学的有意差は Welch's  $t$ -test および Dunnett's test で判定した。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. 成体マウス海馬歯状回由来神経系幹/前駆細胞の単離・培養

TMT 投与後のマウス海馬歯状回でニューロン脱落后に発現する nestin 陽性細胞の経時的変化を確認するため、TMT (2.8 mg/kg, i.p.) を投与したマウスの脳について、各日数経過後に組織の固定および包埋を行い、海馬の矢状切片を作製した。その標本をそれぞれ nestin に対する抗体を用いて蛍光免疫染色することにより、TMT 投与後の歯状回における nestin 発現の経時的変化を測定した (Fig.6)。



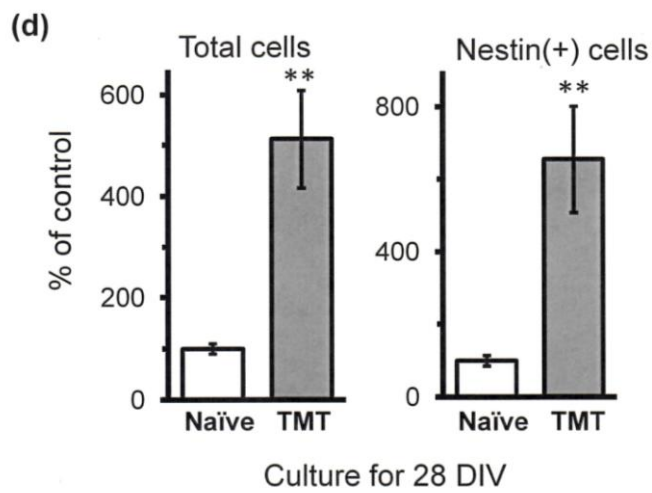
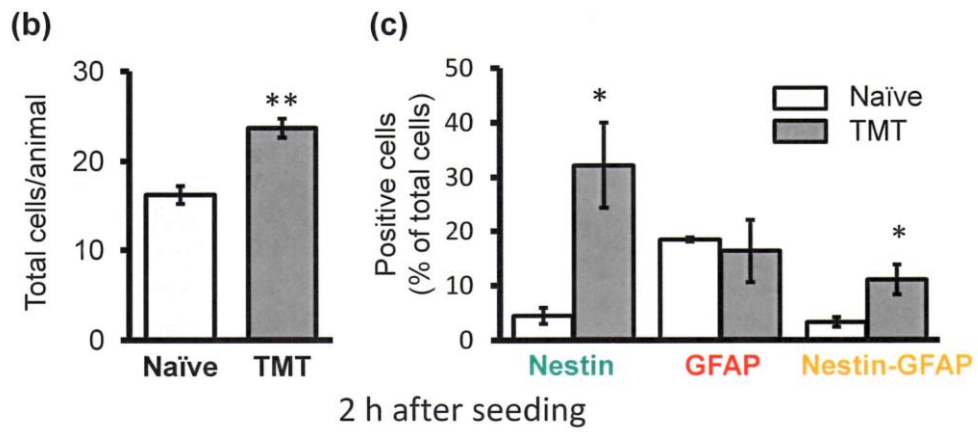
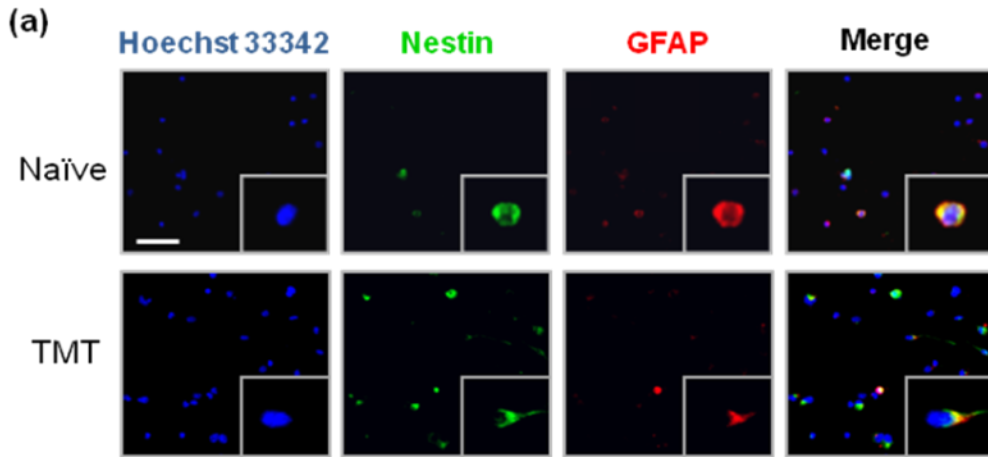
**Fig. 6. Dramatic increase in nestin (+) cell number during neuronal degeneration and regeneration in the dentate gyrus following acute treatment with TMT *in vivo*.**

Animals were given TMT (2.8 mg/kg, i.p.) and then killed on the indicated days post-treatment for preparation of hippocampal sagittal sections, which were used for immunostaining for NeuN and nestin. These experiments were carried out at least 4 times with similar results obtained under the same experimental conditions. *GCL*, dentate granule cell layer; *Hilus*, dentate hilus; *ML*, dentate molecular layer. Scale bar = 200  $\mu$ m

その結果、TMT 投与後 3-5 日目の歯状回において著明な nestin の発現がみられ、その発現は、TMT 投与後 10 日目以降で TMT 未処置 (naïve 群) レベルまでに戻った。また、NeuN に対する抗体を用いた免疫染色では、TMT 投与後 3-5 日目で歯状回顆粒細胞層において劇的なニューロン脱落が起こり、TMT 投与後 30 日目では顆粒細胞層の著明な回復がみられることが明らかとなった。

Fig.6 に示したデータに基づいて、TMT 未処置および TMT (2.8 mg/kg, i.p.) を投与したマウスから処置後 3 日目に歯状回を単離し、poly-L-ornithine で前処理した培養ディッシュに回収し、その 2 時間後に Hoechst33342 を用いて対比染色するとともに、nestin および GFAP に対する抗体を用いて蛍光二重染色を行った。また、生存細胞数を集計するため、細胞を trypan blue を用いて染色した。その結果 naïve 群のマウスから調製した細胞では、nestin 陰性/GFAP 陽性細胞および nestin/GFAP 陽性細胞が主に観察されることが明らかとなった (Fig.7a)。TMT を投与したマウスから調製した細胞では、nestin/GFAP 陽性細胞に加えて、nestin 陽性/GFAP 陰性細胞がみられた。歯状回から得られた生存細胞の総数は、naïve 群に比べ TMT 投与群で有意に多くみられた (Fig.7b)。さらに、TMT 投与群は、naïve 群と比較して nestin 陽性/GFAP 陰性細胞数および nestin/GFAP 陽性細胞数が著明に増加していた [Fig.7c, nestin (+) /GFAP (-) cells (% of total cells) : naïve ( $n = 4$ ),  $1.17 \pm 0.06$ ; TMT ( $n = 5$ ),  $21.1 \pm 6.0$  ( $P < 0.05$ ) : nestin (+) /GFAP (+) cells (% of total cells) : naïve ( $n = 4$ ),  $3.35 \pm 1.18$ ; TMT ( $n = 5$ ),  $13.2 \pm 3.2$  ( $P < 0.05$ )]。また、GFAP 陽性の総細胞数では、naïve 群と TMT 投与群間で著明な変化はみられなかったが、総細胞数に対する nestin 陰性/GFAP 陽性の割合は、TMT 投与群において減少していた [nestin (-) /GFAP (+) cells (% of total cells) : naïve ( $n = 4$ ),  $18.4. \pm 3.1$ ; TMT ( $n = 5$ ),  $6.73 \pm 2.74$  ( $P < 0.05$ )]。

次に、naïve 群と TMT 投与群の歯状回由来神経系幹/前駆細胞を調製するための実験として、2.2.6.3.に準じて bFGF および EGF を含む成長因子の存在下、*in vitro* 単層培養系にて両群のマウス歯状回から得られた細胞を 28 日間培養した。その後、細胞を trypan blue 染色および nestin に対する抗体を用いて免疫染色し、生存細胞および nestin 陽性細胞の総数を測定した。その結果、培養 28 日目における TMT 投与群の生存細胞および nestin 陽性細胞の総数は、naïve 群の 5-6 倍を超えて増加していた (Fig.7d)。また、培養 14 日目では、それらは 3 倍に増加していた (data not shown)。



**Fig. 7. Cell preparation from the dentate gyrus of naïve or TMT-treated mice.**

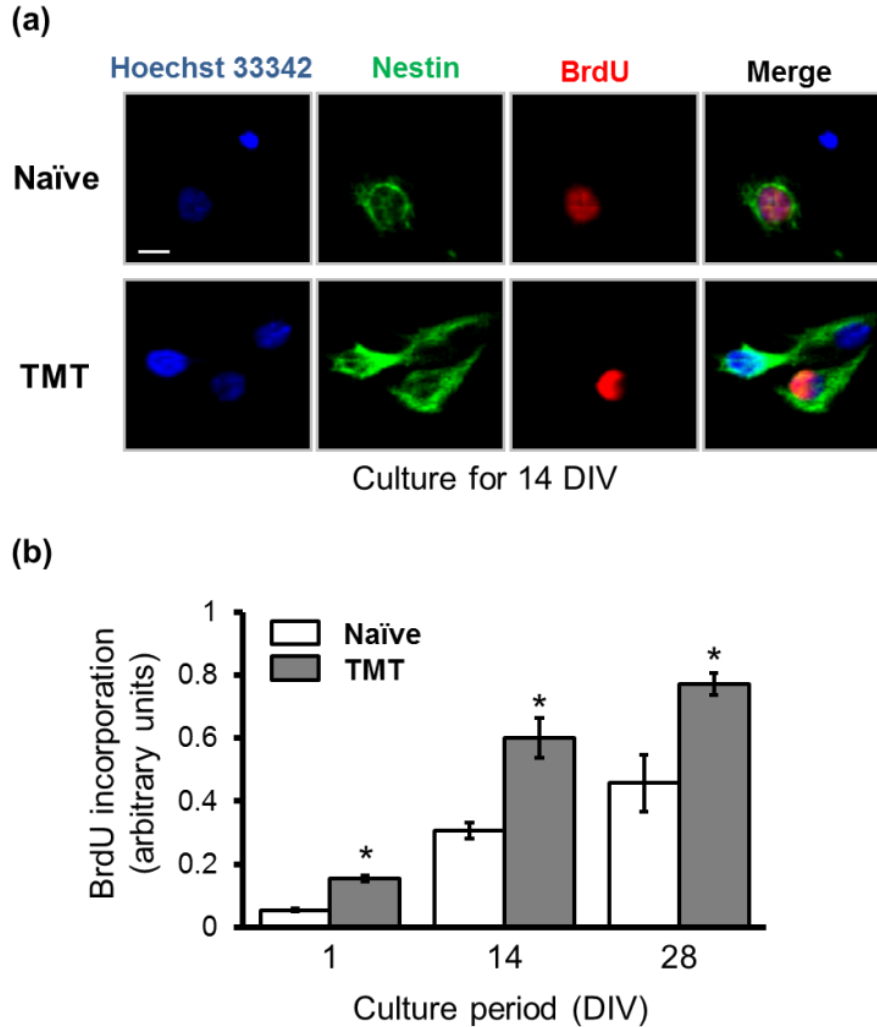
Animals were given TMT (2.8 mg/kg, i.p.) or not (naïve) and decapitated on day 3 post-treatment for dissection of the hippocampal dentate gyrus. Cells were then prepared from the dentate gyrus dissected from the 10 animals of the naïve and TMT-treated groups. The cells were seeded into dishes that had been previously coated with poly-L-ornithine. (a) The cells were fixed at 2 h after seeding for double-immunostaining for nestin (*green*) and GFAP (*red*) with counterstaining by use of Hoechst 33342 (*blue*). The panels show typical confocal laser scanning micrographs of the stained cells. The inserts in the lower right corner of each panel show cells at higher magnification. Scale bar = 50  $\mu$ m. (b) Total number of cells obtained from the dentate gyrus of naïve or TMT-treated animals. The cells were stained with trypan blue for counting the number of total surviving cells. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. per 1 animal from 13-19 separate experiments. (c) Percentage of cells positive for nestin, GFAP or nestin and GFAP (Nestin-GFAP) in the dentate gyrus obtained from naïve or TMT-treated animals. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. calculated from the percentage of total cells from 4-5 separate experiments. (d) The cells were cultured in DMEM/F-12 medium containing bFGF and EGF for 28 DIV, and then fixed for immunostaining for nestin or stained with trypan blue for counting the total number of surviving cells. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. from 4-7 separate experiments. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, significantly different from the control value obtained for naïve animals.

これら培養により増殖している細胞がどのような細胞であるか確認するため、両群の歯状回から単離した細胞を poly-L-ornithine で前処理した培養ディッシュに播種後、2.2.6.3.に準じて 12 日間培養した細胞に BrdU を 10  $\mu$ M の濃度で曝露し、その 48 時間後に固定し、Hoechst33342 を用いて対比染色するとともに、nestin および BrdU に対する抗体を用いて蛍光二重染色を行った。また、これら培養細胞の増殖能を測定するため、分散直後から BrdU を 0.1  $\mu$ M 曝露し、1、14 および 28 日間培養した細胞について、2.2.10.に準じて ELISA 法により培養細胞への BrdU 取り込み能を調べた。その結果、naïve 群と TMT 投与群ともに BrdU の大部分は、nestin 陽性細胞へ取り込まれていた (Fig.8a)。また、BrdU の取り込みは、培養期間を通して naïve 群の細胞と比較して、TMT 投与群の細胞で明らかな増加がみられた (Fig.8b)。

神経系幹/前駆細胞の特徴の 1 つとして、浮遊培養系において自己増殖を繰り返し、neurosphere を形成することが知られている。そこで neurosphere assay を行うため、2.2.6.2.に準じて浮遊培養系で両群の歯状回から単離した細胞を 30 日目まで培養した。その結果、naïve 群と TMT 投与群ともに極めて丸い sphere を形成し、培養 30 日目まで経時的に大きな neurosphere に成長し、増殖し続けた (Fig.9a)。また、直径 50  $\mu$ m を超える neurosphere 数は、培養 5 日目から 30 日目の期間を通して、naïve 群より TMT 投与群で著明な増加がみられた (Fig.9b)。続いて、培養 30 日目の neurosphere について、2.2.9.3.に準じて nestin

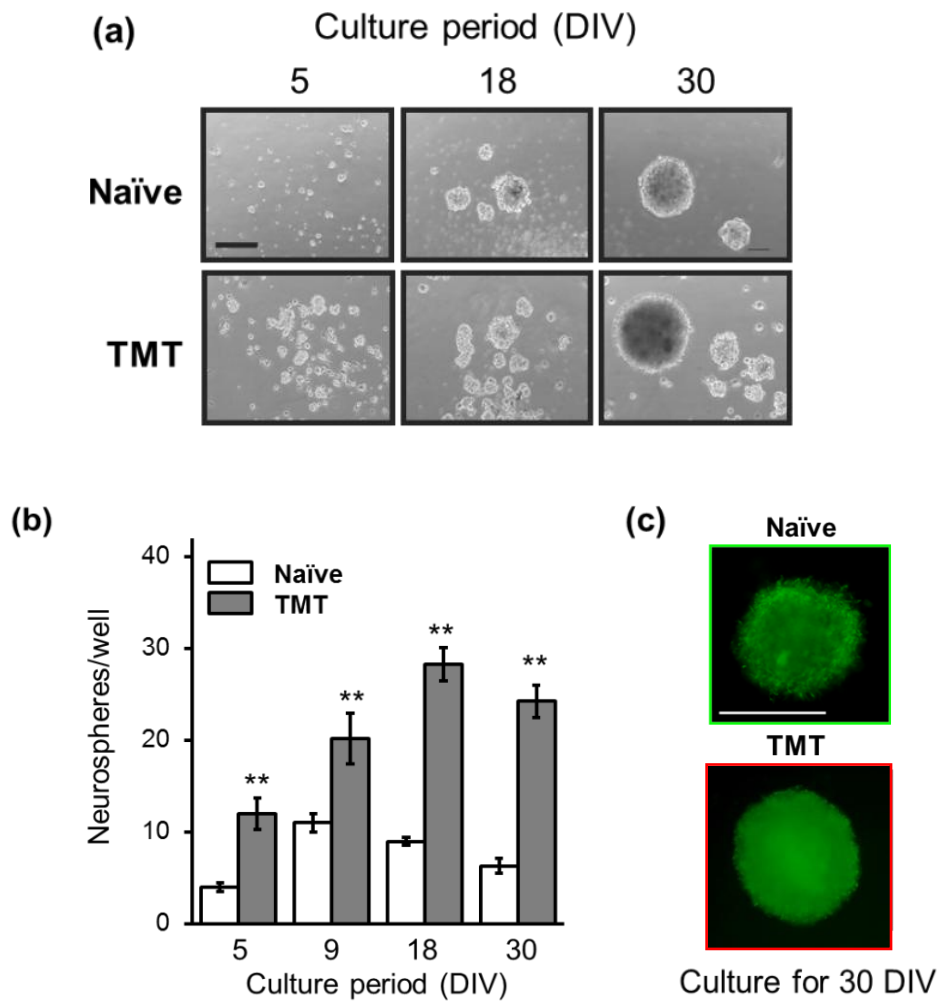


に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、両群の歯状回由来細胞が形成した neurosphere はともに nestin 陽性細胞で構成されていた (Fig.9c)。



**Fig. 8. BrdU incorporation into cells prepared from the dentate gyrus of naïve or TMT-treat mice.**

Animals were given TMT (2.8 mg/kg, i.p.) or not (naïve) and decapitated on day 3 post-treatment for dissection of their hippocampal dentate gyrus. Cells were prepared from the dentate gyrus dissected from the 10 animals of each group, seeded into dishes that had been previously coated with poly-L-ornithine, and then cultured in DMEM/F-12 medium containing bFGF and EGF in the presence of BrdU (0.1  $\mu$ M) for 1, 14 or 28 DIV. (a) After having been cultured for 14 DIV, the cells fixed were subjected to double-immunostaining for nestin (*green*) and BrdU (*red*) with counterstaining by use of Hoechst 33342 (*blue*). The panels show typical confocal laser scanning micrographs of the cells stained. Scale bar = 20  $\mu$ m. (b) For determination of the proliferative activity, BrdU incorporated into the cells was measured by ELISA at the indicated times. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. from 4-7 separate experiments. \* $P$ <0.05, significantly different from the control value obtained for naïve animals.

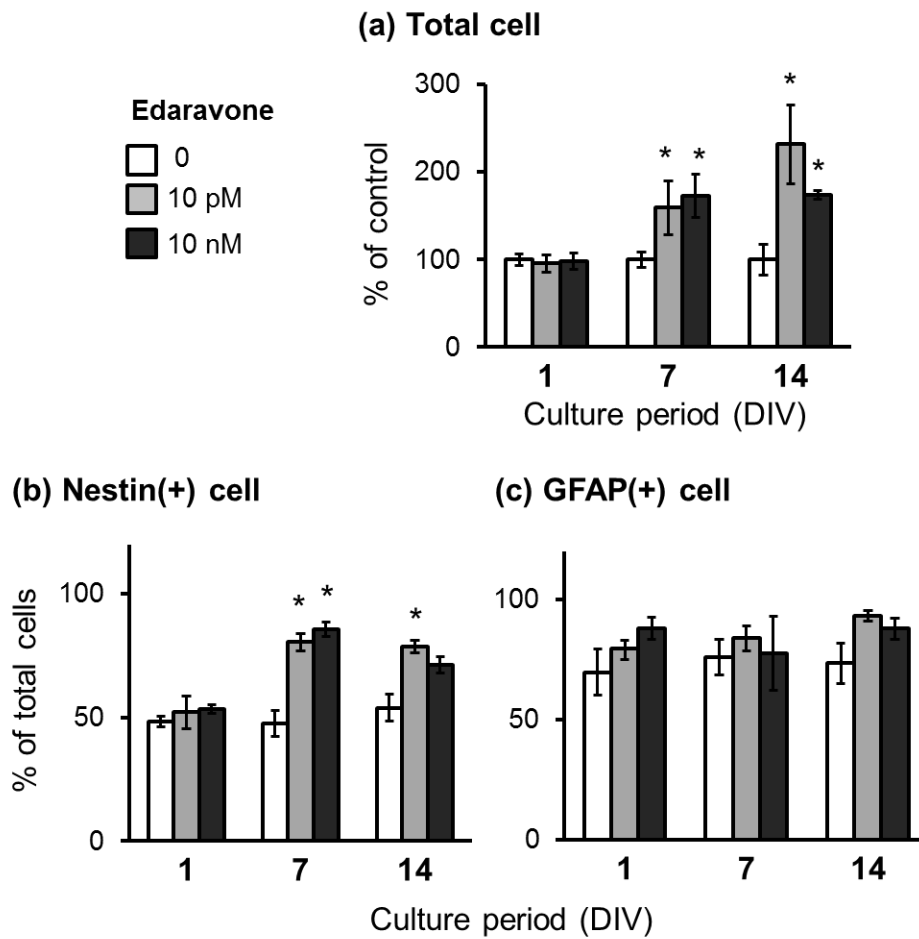


**Fig. 9. Formation of neurospheres by cells prepared from the dentate gyrus of naïve and TMT-treated mice.**

Animals were given TMT (2.8 mg/kg, i.p.) or not (naïve) and decapitated on day 3 post-treatment for dissection of their hippocampal dentate gyrus. Cells prepared from the dentate gyrus dissected from the 10 animals of each group, seeded into uncoated dishes, and then cultured as floaters for the indicated time periods in DMEM/F-12 medium containing bFGF and EGF. (a) The panels show typical light micrographs of neurospheres cultured for the time periods indicated. Scale bar = 200  $\mu$ m. (b) As neurosphere assay, the number of neurospheres at over 50  $\mu$ m in diameter was counted in each well of the dishes. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. from 5-8 separate experiments. \*\* $P$ <0.01, significantly different from the control value obtained for naïve animals. (c) After having been cultured for 30 DIV, the neurospheres were subjected to immunostaining for nestin. The panels show typical confocal laser scanning micrographs of a neurosphere. Scale bar = 200  $\mu$ m.

### 2.3.2. 海馬歯状回の培養神経系幹/前駆細胞の増殖に対する edaravone の *in vitro* 曝露の効果

前節で、TMT 投与後 3 日目の歯状回には、神経系幹/前駆細胞が大量に存在することを *in vitro* でも明らかにした。そこで、ニューロン変性後の歯状回における神経系幹/前駆細胞の増殖に対する edaravone の影響を解析するため、培養細胞に edaravone を曝露した。マウスに TMT (2.8 mg/kg, i.p.) を投与後 3 日目に歯状回を単離し、poly-L-ornithine で前処理した培養ディッシュに播種した。播種と同時に edaravone を 10 pM あるいは 10 nM の濃度で曝露し、2.2.6.3. に準じて単層培養系で細胞を 1、7 および 14 日間培養した。各日数培養した細胞の総細胞数を集計するため、Hoechst33342 を用いて対比染色するとともに、2.2.9.1. に準じて nestin および GFAP に対する抗体を用いて蛍光二重染色を行った。その結果、10 pM あるいは 10 nM の edaravone 曝露は、培養 1 日目の総細胞数に影響を与えなかったが、培養 7 および 14 日目の総細胞数の著明な増加を示した (Fig.10a)。総細胞数に加えて、10 pM の edaravone 曝露により、培養 7 および 14 日目に、10 nM の edaravone 曝露では、培養 7 日目に nestin 陽性細胞の割合が有意に増加した (Fig.10b)。さらに、培養期間を通して、GFAP 陽性細胞の割合は edaravone 曝露によって著変がみられなかった (Fig.10c)。また、edaravone の持続曝露が細胞を障害するか否かを測定するため、edaravone 曝露後に細胞の Hoechst 33342 染色を行った。その結果、少なくとも今回用いた濃度の edaravone 曝露によって、観察された核凝縮を伴う障害を受けた細胞に変化はみられなかった (data not shown)。

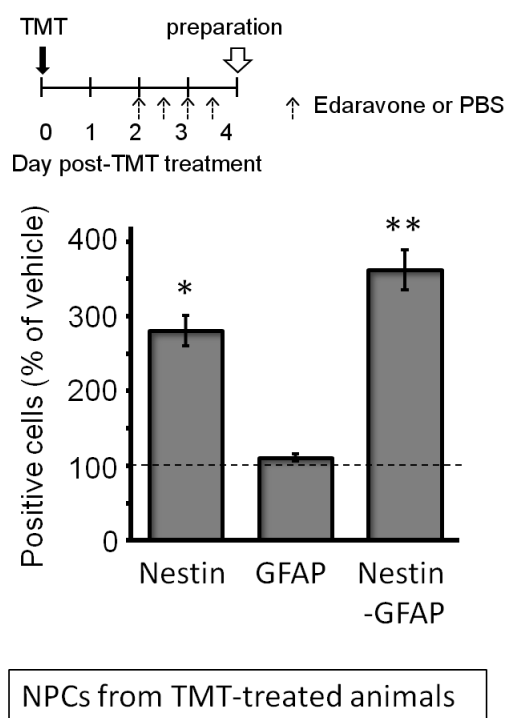


**Fig. 10. Effect of sustained *in vitro* exposure to edaravone on proliferation of the cells prepared from the dentate gyrus of TMT-treated mice.**

Animals were given TMT (2.8 mg/kg, i.p.) and decapitated on day 3 post-treatment for dissection of their hippocampal dentate gyrus. Cells prepared from the dentate gyrus were seeded into dishes that had been previously coated with poly-L-ornithine and were then cultured in DMEM/F-12 medium containing bFGF and EGF for the indicated times in the absence or presence of edaravone at either concentration indicated. The cells were then double-immunostained for nestin (b) and GFAP (c) with counterstaining with Hoechst 33342 for counting total cells (a). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. from 5-9 separate experiments. \* $P < 0.05$ , significantly different from the control value obtained for the cells treated with vehicle alone (Edaravone = 0).

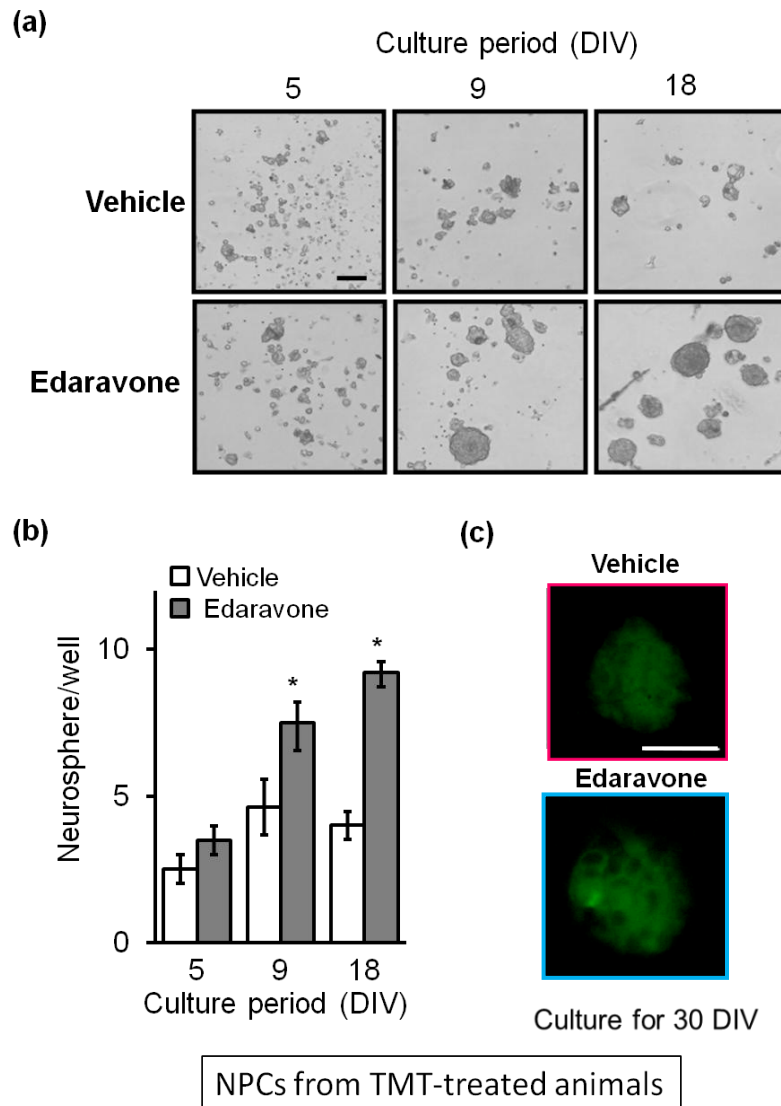
### 2.3.3. 海馬歯状回の培養神経系幹/前駆細胞の増殖に対する edaravone の *in vivo* 処置の効果

Edaravone 存在の培養条件下において、nestin 陽性細胞の割合が増加したが、GFAP 陽性細胞の割合に変化がみられなかったという前節の結果を受け、*in vivo* において、edaravone 投与が TMT 投与マウス歯状回における nestin 陽性細胞数増加に対して影響を与えるかどうかを解析した。以前に、*in vivo* において、TMT による成体マウス歯状回ニューロン脱落が 1-2 日目頃をピークに惹起されること、その後、神経系幹/前駆細胞の増加が 2-4 日目をピークに引き起こされることが報告されている (Ogita et al., 2005)。このため、今回は、TMT によるニューロン脱落に影響を与えにくく、神経系幹/前駆細胞の増殖期にのみ影響を与えると考えられる TMT (2.8 mg/kg, i.p.) 投与後 2 日目から 4 日目にかけて 12 時間ごとに計 4 回 edaravone (30 mg/kg, i.p.) もしくは PBS (vehicle 群) を腹腔内投与した。TMT 投与後 4 日目に 2.2.6.1. に準じて歯状回から細胞を採取し、poly-L-ornithine で前処理した培養ディッシュに回収し、その 2 時間後に 2.2.9.1. に準じて nestin および GFAP に対する抗体を用いて蛍光二重染色を行った。その結果、edaravone 投与群において、vehicle 群に対する nestin 陽性および nestin/GFAP 陽性細胞の割合が顕著に増加していることが明らかとなった (Fig.11)。しかしながら、GFAP 陽性細胞の割合は vehicle 群と edaravone 投与群間で明らかな変化は認められなかった。また、両群の歯状回から単離した細胞を 2.2.6.2. に準じて浮遊培養系で 5、9 および 18 日間培養し、neurosphere assay を行った。これらの neurosphere を 30 日間培養後に 2.2.9.3. に準じて nestin に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、培養 9 および 18 日目において、形成された neurosphere 数は vehicle 群に比べ、edaravone 投与群で顕著に増加していた (Fig.12a, 12b)。また、両群から得られた細胞が形成した neurosphere はともに nestin 陽性細胞で構成されていた (Fig.12c)。さらに nestin 陽性細胞に加えて、TMT 投与後 2 から 9 日目まで edaravone を 14 回連続投与したマウスの歯状回から得られた細胞で未成熟ニューロンのマーカータンパク質である  $\beta$ -tubulin III 陽性細胞数の増加がみられた [ $\beta$ -tubulin III (+) cells (% of total cells) : vehicle (n=6),  $15 \pm 5$ ; edaravone (n=6),  $43 \pm 6$  ( $P < 0.05$ ) ]。



**Fig. 11. Effect of *in vivo* treatment with edaravone on the number of nestin(+) and GFAP(+) cells prepared from the dentate gyrus of TMT-treated mice.**

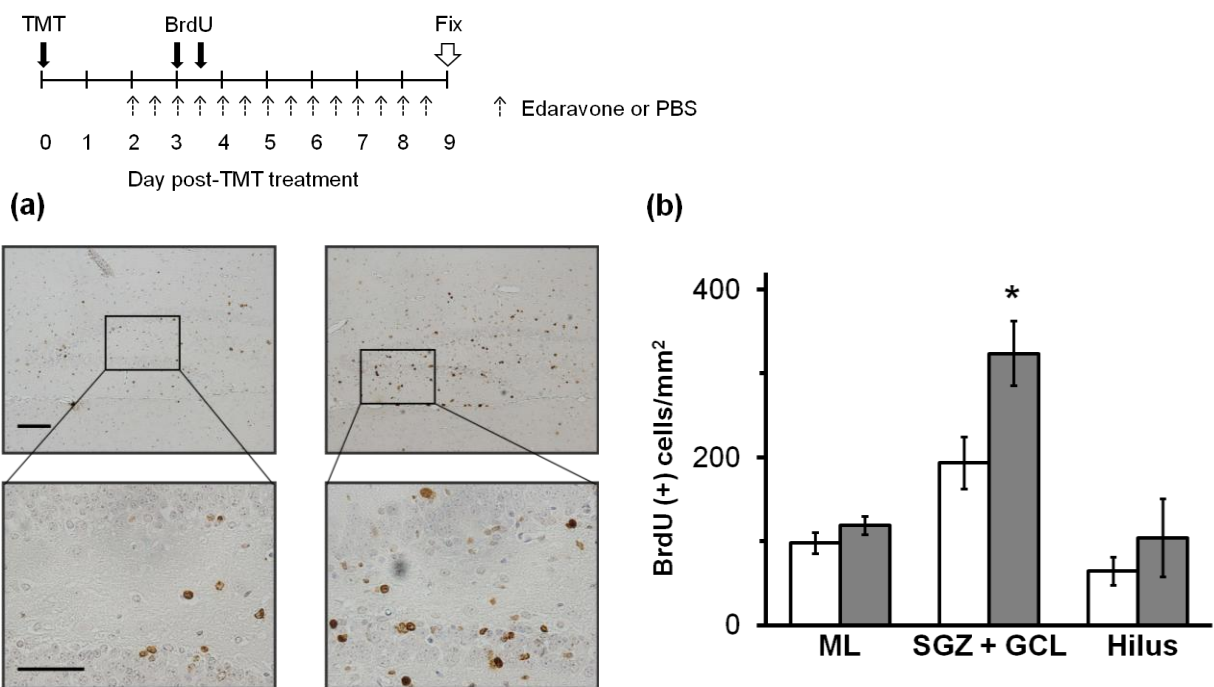
Animals were given TMT (2.8 mg/kg, i.p.) and then injected with either PBS or edaravone (30 mg/kg, i.p.) every 12 h for consecutive 2 days starting from day 2 post-TMT treatment. On day 4 post-TMT treatment, the dentate gyrus was dissected from the 10 animals of PBS- or edaravone-treated group for preparation of cells, which were then double-immunostained for nestin and GFAP. The data for antigen-positive cells in the edaravone-treated group are presented as the percentage of those in the PBS-treated group as the control. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. from 5-6 separate experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the value obtained for PBS-treated animals. In the PBS-treated group, the percentages of nestin(+) cells, GFAP(+) cells, and nestin(+) GFAP(+) cells to total cells were 22%, 73%, and 20%, respectively.



**Fig. 12. Effect of *in vivo* treatment with edaravone on formation of neurospheres by cells prepared from the dentate gyrus of TMT-treated mice.**

Animals were given TMT (2.8 mg/kg, i.p.) and then treated with either PBS or edaravone (30 mg/kg, i.p.) every 12 h for consecutive 2 days starting from day 2 post-TMT treatment. On day 4 post-TMT treatment, the dentate gyrus was dissected from the 10 animals of each group for preparation of cells, which were then cultured for the indicated time periods in floating fashion in uncoated dishes containing DMEM/F-12 medium supplemented bFGF and EGF. (a) The panels show typical light micrographs of neurospheres cultured for the time periods indicated. Scale bar = 50  $\mu$ m. (b) The number of neurospheres over 50  $\mu$ m in diameter was counted in each well of the dishes. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. from 5-9 separate experiments. \* $P$ <0.05, significantly different from the control value obtained for PBS-treated animals. (c) After having been cultured for 30 DIV, the neurospheres were immunostained for nestin. Typical confocal laser scanning micrographs of a neurosphere from each group are shown. Scale bar = 100  $\mu$ m.

Edaravone 急性投与により海馬歯状回ニューロン脱落后に一過性に増加する神経系幹/前駆細胞がさらに増加することが明らかとなった (Fig.11)。そこで、次に海馬歯状回ニューロン脱落后に新生する細胞に対する edaravone 長期投与の影響について解析した。TMT (2.8 mg/kg, i.p.) 投与後 2 日目から edaravone (30 mg/kg, i.p.) もしくは PBS (vehicle 群) を 12 時間ごとに 14 回連続して腹腔内投与した。また、BrdU (50 mg/kg, i.p.) は TMT 投与後 3 日目から 12 時間ごとに 2 回投与した。Edaravone の最終投与の 12 時間後に 2.2.3. に準じて組織の固定および包埋を行い、海馬の矢状切片を作成した。それぞれの切片を BrdU に対する抗体を用いて免疫染色を行い、BrdU 陽性細胞数を計測した。その結果、顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層に存在する BrdU 陽性細胞数は、edaravone 投与群において vehicle 群に比べ有意に増加していた。しかしながら、分子細胞層および歯状回門における BrdU 陽性細胞数は、edaravone 投与群と vehicle 群間で明らかな差が認められなかった (Fig.13)。



**Fig. 13. Effect of edaravone treatment for 7 days on BrdU incorporation in the dentate gyrus of TMT-treated mice.**

Animals were given TMT (2.8 mg/kg, i.p.) and then treated with either PBS or edaravone (30 mg/kg, i.p.) every 12 h for consecutive 7 days starting from day 2 post-TMT treatment for preparation of sagittal hippocampal sections, which were then stained with anti-BrdU antibody. BrdU was injected on day 3 post-TMT treatment. (a) The panels show typical light micrographs of the dentate gyrus. (b) Quantitative data for BrdU (+) cells in granule cell layer (GCL) + subgranular zone (SGZ), molecular layer (ML), and hilus. Values are expressed mean  $\pm$  S.E. \* $P < 0.05$ , significantly different from each value obtained for animals treated with saline. Scale bar = 100  $\mu$ m.



## 2.4. 考察

本研究における重要な結論としては、edaravone が海馬歯状回のニューロン脱落后に引き続いて起きる神経系幹/前駆細胞の増殖を促進することである。この結論は以下の結果に基づいている。*in vitro* での edaravone の持続曝露が、TMT により障害された歯状回由来の培養神経系幹/前駆細胞のうち nestin 陽性細胞の増殖を促進したこと (Fig. 10)。マウスへの edaravone の全身投与が、TMT 投与により障害された歯状回において、nestin に陽性を示す神経系幹/前駆細胞および  $\beta$ -tubulin III に陽性を示す未熟なニューロンの生成も促進したこと (2.3.3)。これらの結果は、edaravone が海馬損傷後に高められるニューロン新生に有益な効果を示すことを示唆している。また、edaravone が外傷性大脳皮質損傷領域で nestin 陽性の神経系幹/前駆細胞を保護するという過去のデータからも、edaravone の有益な効果が裏付けられている (Itou et al., 2009)。加えて、本データでは、EGF および bFGF 存在下において、培養した神経系幹/前駆細胞への edaravone 曝露によって、培養期間中に nestin 陽性細胞数が増加することを初めて示した (Fig. 10)。このことは edaravone が神経系幹/前駆細胞の増殖を促進する能力を持つという可能性を示している。一方、*in vivo* で観察された edaravone の効果は、歯状回のニューロン脱落后に生成した神経系幹/前駆細胞の保護および増殖に起因するものと考えられる。

様々な物理的脳障害 [cryoinjury (Moon et al., 2004)、ablation injury (Douen et al., 2004) もしくは controlled cortical impact (Chen et al., 2003)] を受けた大脳皮質の周囲において、nestin 陽性細胞が増殖することが知られている。本研究では、海馬歯状回のニューロン変性/再生モデルとして、TMT 投与マウスを用いた。このモデルは、TMT 投与後 2 日目に歯状回の顆粒細胞層において顕著なニューロン脱落が見られ、それらのニューロン脱落后に顆粒細胞層を再生するため歯状回においてニューロン新生が促進される。また、このモデルを用いた組織学的な評価において、以前、TMT 投与後 7 日目までの再生段階初期に nestin および BrdU を取り込んだ細胞数が、歯状回において劇的に増加することが明らかにされており、本章でも TMT が投与後 3-5 日目の歯状回において、nestin 陽性細胞数を大幅に増加させるということが明らかとなった (Fig.6)。このことは、組織学的な以前の研究成果と一致しているものである。

組織学的評価に加えて、TMT 投与後 3 日目の海馬歯状回から分離された細胞を用いた *in vitro* の結果では、nestin 陽性/GFAP 陰性細胞数および nestin/GFAP

陽性細胞数が未処置動物の場合に比べて大幅に増加したが、nestin 陰性 GFAP 陽性細胞数（アストロサイト）はむしろ減少していた（Fig.7c）。これは、TMT 投与動物の再生段階初期に歯状回において GFAP および nestin を発現する放射状グリア様細胞（type1 細胞）と nestin 陽性/GFAP 陰性な増殖性前駆細胞（type2a 細胞）の両方の数を増加させることを示唆している。したがって、TMT 投与マウスは歯状回ニューロン脱落后に生成する type1 および type2 を含む神経系幹/前駆細胞の評価に有用なモデルであると考えられる。また、TMT 投与および未処置（naïve）マウスの歯状回から単離した細胞を長期にわたって培養した結果、TMT 投与群で総細胞数および nestin 陽性細胞数の著明な増加が認められた（Fig.7d）。さらに BrdU を用いて、培養細胞の増殖能および TMT による増殖能に対する影響について解析した。その結果、BrdU は nestin 陽性細胞に取り込まれており（Fig.8a）、BrdU の取り込みは培養日数の経過に伴い増加していくことが明らかとなった（Fig.8b）。また、BrdU の取り込みは、naïve 群に比べ TMT 投与群において有意に増加していた。これらの結果より、成体マウス歯状回に存在する神経系幹/前駆細胞は恒常的に増殖していること、および TMT 投与 3 日後の歯状回では神経系幹/前駆細胞の増殖が活発となり、ニューロン新生が促進することが推察される。

神経系幹/前駆細胞は浮遊培養系において、自己増殖を繰り返し、neurosphere を形成することが知られており、本研究においても神経系幹/前駆細胞の浮遊培養を行い neurosphere を形成させた。その結果、TMT 投与群および naïve 群ともに培養日数の経過に伴い neurosphere は成長し続けたが、nestin に陽性な neurosphere は、naïve 群よりむしろ TMT 投与群の歯状回から単離された細胞から多数形成されることを確認した（Fig.9）。これは、TMT 誘発性の歯状回ニューロン脱落后に神経系幹/前駆細胞が多数生存するというを示唆している。

さらに興味深いのは、本研究において、*in vitro* での持続的な edaravone 曝露が、単層培養系で培養された TMT 投与マウスの歯状回由来の nestin 陽性細胞の増殖を促進したことである（Fig.10）。以前の報告で、胎児の海馬由来の神経系幹/前駆細胞の培養において、*in vitro* での持続的な edaravone (50  $\mu$ M) もしくは tempol (200  $\mu$ M) の曝露が、神経系幹/前駆細胞における内因性の活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) のレベルを減少させ、neurosphere 形成および神経系幹/前駆細胞への BrdU の取り込みの大幅な抑制を引き起すことが証明され、内因性 ROS が胎児の神経系幹/前駆細胞の増殖能を促進することが報告されている (Yoneyama et al., 2010a)。また、10  $\mu$ M より高濃度の edaravone では、

同実験条件下で細胞増殖を抑制する能力もあり、edaravone は、その濃度によって神経系幹/前駆細胞の増殖に正反対の影響を及ぼす可能性がある。edaravone のスカベンジャー効果に対する 50%阻止濃度 (IC<sub>50</sub>) 値の観点からすると、高濃度の edaravone によって神経系幹/前駆細胞の増殖が阻害されているのは、フリーラジカルの消去作用に起因するというのが、最も有力な見方である (ヒドロキシラジカルに起因するリノール酸抱合体 dienes の形成, 32.0 μM ; ラット脳ホモジネートおよびミトコンドリアホノジネートにおける鉄依存型過酸化, 各々15.0 および 2.3 μM ; ミトコンドリア膜の分解鉄依存型過酸化, 39.0 μM) 。しかしながら、本章の研究結果では、非常に低濃度 (10 pM および 10 nM) の edaravone によって神経系幹/前駆細胞の増殖が高められたことが明らかとなった。そこで、edaravone の神経系幹/前駆細胞の増殖促進効果がフリーラジカルの消去以外の何らかの機序に起因しているという見解を考慮に入れば、実際に、edaravone がフリーラジカルを消去する効果に加えて、炎症過程、マトリクスメタロプロテイナーゼレベルおよび一酸化窒素 (NO) の生成を調節することを示唆する報告がある (Kikuchi et al., 2011) 。具体的には、edaravone が、末梢微細血管における急性の内皮障害後に NO の合成/放出を促進することを裏付けるエビデンスが最近の報告によってなされ、そこで edaravone がいくつかのニューロン変性疾患において有益な効果をもたらすことを示唆している。加えて、内因性および外因性の NO が胎児マウスの海馬由来の神経系幹/前駆細胞の増殖を促進するという過去の報告 (Yoneyama et al., 2010a; Yoneyama et al., 2011) と同様のことが、成体マウスの歯状回由来の神経系幹/前駆細胞でも示唆された (data not shown) 。したがって、神経系幹/前駆細胞の増殖に対する edaravone の促進効果は、NO の合成/放出を高めることによって引き起こされるとも考えられる。

次に、本章の結果では TMT 誘発性ニューロン脱落后、一過性に神経系幹/前駆細胞が増加する期間に edaravone を腹腔内投与することで、TMT 投与後 4 日目の歯状回における nestin/GFAP 陽性細胞数を増加することが明らかとなった。これは、edaravone が歯状回ニューロン脱落后の再生段階初期に type1 細胞の増殖を促進することを示唆している (Fig.11) 。また、浮遊培養において、得られた neurosphere が nestin 陽性細胞構成されていること、edaravone の腹腔内投与により neurosphere 数が培養日数の経過とともに増加し、培養 9 および 18 日目において、vehicle 群に比べて著明に増加することが明らかとなった。このことから、edaravone が TMT 誘発性ニューロン脱落后に一過性に増殖する

神経系幹/前駆細胞の生存を維持している可能性があることを示唆している (Fig.12)。Edaravone が障害後に一過性に増殖する神経系幹/前駆細胞の生存を維持しているのであれば、edaravone を長期投与することで、その神経系幹/前駆細胞を長期的に生存させる可能性がある。そこで次に、edaravone の長期投与による影響について検討した。その結果、分子細胞層および歯状回門では著変は見られなかったが、顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層の BrdU 陽性細胞数は edaravone 長期投与で著明に増加することが明らかとなった (Fig. 13)。したがって、edaravone による顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層での BrdU 陽性細胞数の増加は、神経系幹/前駆細胞の生存を保護した結果として得られたものと考えられる。さらに興味深いことに、TMT 障害後に未成熟ニューロンのマーカータンパク質である  $\beta$ -tubulin III 陽性細胞数も、edaravone の *in vivo* 処置により歯状回において増加がみられた (data not shown)。この結果は、edaravone がニューロンへの分化を強める可能性を示しているかもしれない。この edaravone のニューロン分化促進効果が、ニューロン脱落後のニューロン新生の増強に重要な役割を果たすことが推察される。

次章では、TMT 誘発性ニューロン脱落後のニューロン新生に対する統合失調症治療薬である aripiprazole の有用性について解析する。

## 第3章

# 海馬歯状回ニューロン脱落後のニューロン新生に対する aripiprazole の効果

### 3.1. 序文

成体哺乳動物の脳に内因性の神経系幹/前駆細胞が存在するという概念は広く認識されている (Reynolds and Weiss, 1992; Richards et al., 1992)。成体脳におけるニューロン新生は脳内の2つの特定な領域、すなわち側脳室の側脳室下帯や海馬歯状回の顆粒細胞層下帯で基本的に起こる (Kuhn et al., 1996; Taupin et al., 2002)。神経系幹/前駆細胞は新生ニューロンを生成するため、増殖、移動、分化および生存の過程を経て、脳の既存の電気回路網に組み込まれる。さらに、通常の生理学的条件下、成体において、神経系幹/前駆細胞は主にニューロンを生成する。すなわち、側脳室下帯由来の神経系幹/前駆細胞は嗅球の介在ニューロンとなり、顆粒細胞層下帯由来の神経系幹/前駆細胞は歯状回のニューロンとなる。これらの神経系幹/前駆細胞は損傷に対して反応し、ニューロン損傷後にニューロン、アストロサイトおよびオリゴデントロサイトを含む神経系細胞を生成する (Christie and Turnley, 2012)。神経系幹/前駆細胞は増殖、移動、分化および生存というニューロン修復過程の増強を介して、新生ニューロンおよびグリア細胞を生成し、ニューロン損傷後の細胞損傷/脱落を修復することができる。実際に、脳虚血は側脳室下帯および顆粒細胞層下帯でのニューロン新生促進を引き起こすことが報告されている (Arvidsson et al., 2002; Tonchev et al., 2003; Wojcik-Stanaszek et al., 2011)。虚血によって引き起こされる細胞増殖およびニューロン新生はニューロン脱落の代償機構とみなされている。ニューロン脱落の修復過程代償機構の増強は、ニューロン損傷もしくはニューロン変性疾患に起因するニューロン損傷後のニューロン修復に必要である。それ故、ニューロン修復過程を増強させる治療はニューロン変性疾患にとって有用な治療であることが推測される。

TMTはヒトおよびげっ歯類の中樞神経においてニューロン変性を引き起こす

神経毒である (Fiedorowicz et al., 2001)。マウスへの TMT 単回投与は歯状回、嗅球、前嗅核および前大脳皮質を含む脳の限られた領域においてニューロン脱落を引き起こす (Ogita et al., 2004; Kawada et al., 2008; Shuto et al., 2009b; Nguyen et al., 2011)。マウスを用いた過去の研究において、TMT 処置が脳のどの領域で神経系幹/前駆細胞を増殖させ、歯状回および嗅球におけるニューロン新生の増強を引き起こすのかも証明された (Ogita et al., 2005; Yoneyama et al., 2010b; Kikuta et al., 2013)。これら過去の研究結果は TMT 処置マウスがニューロン脱落/再生モデルとして、歯状回ニューロン脱落後のニューロン再生に関する研究にとって非常に魅力的であることを示唆するものである。

Aripiprazole は統合失調症、双極性障害における躁症状の改善の治療薬として承認された非定型抗精神病薬である。Aripiprazole はドパミン D<sub>2</sub> および D<sub>3</sub> 受容体、5-hydroxytryptamine (5-HT) 5-HT<sub>1A</sub> および 5-HT<sub>2A</sub> 受容体に高い親和性を有し、ドパミン D<sub>4</sub> 受容体、セロトニン 5-HT<sub>2C</sub> 受容体、 $\alpha_1$  アドレナリン受容体、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体に中等度の親和性を示す (Shapiro et al., 2003)。加えて、aripiprazole はドパミン D<sub>2</sub> および セロトニン 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の部分アゴニストおよびセロトニン 5-HT<sub>2A</sub> 受容体のアンタゴニストとして機能する。

過去の報告では、ドパミントランスポーターを持つドパミン作動性神経が顆粒細胞層下帯において BrdU 取り込み細胞に近接して存在しており、顆粒細胞層下帯の BrdU 取り込み細胞が黒質線条体のドパミンニューロンの損傷を減少することが明らかにされた (Hoglinger et al., 2004)。これらの研究成果は、ドパミンやその受容体シグナリングが海馬におけるニューロン新生を促進させることを支持している。しかしながら、ドパミン受容体アンタゴニストである haloperidol 処置は、顆粒細胞層下帯における神経系幹/前駆細胞の増殖に対して影響を及ぼさない (Malberg et al., 2000; Wang et al., 2004)、減少する (Wakade et al., 2002) もしくは増加する (Keilhoff et al., 2010a) など様々な報告があり、その効果は一致しない。さらに、haloperidol は顆粒細胞層下帯における神経系幹/前駆細胞の生存および分化に影響しないもしくは増強を引き起こすという報告もある (Wang et al., 2004; Halim et al., 2004; Keilhoff et al., 2010b)。それ故、抗精神病薬が歯状回のニューロン新生およびニューロン再生を正もしくは負に制御するかどうかは不明である。そこで本章では、正常海馬歯状回におけるニューロン新生および歯状回ニューロン脱落/再生モデルマウスを用いて歯状回ニューロン脱落後のニューロン再生に対する aripiprazole の影響について検討した。

## 3.2. 方法

### 3.2.1. 動物飼育

5週齢の ddY 系雄性マウス (Std-ddY) (26-28 g) を、2.2.1.に準じた方法で飼育した。

### 3.2.2. 薬物投与

概要を Fig.14 に示した。

#### 3.2.2.1. TMT 投与

投与薬物である TMT は 2.9 mg/kg の用量でマウスに腹腔内投与した。使用当日に phosphate buffered saline (PBS) に溶解した後、体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で腹腔内投与した。

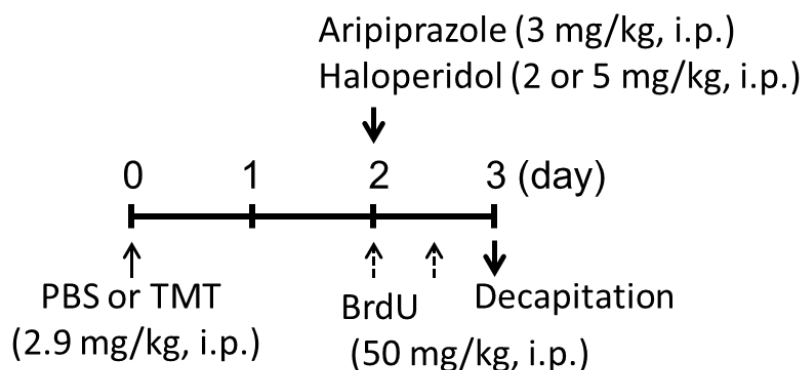
#### 3.2.2.2. aripiprazole および haloperidol 投与

aripiprazole 0.3 mg/mL および haloperidol 0.2 mg/mL もしくは 0.5 mg/mL になるように 0.5% carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC) に懸濁した。PBS もしくは TMT を 2.9 mg/kg の用量でマウスに腹腔内投与し、その 48 時間後から 0.5% CMC または aripiprazole (3 mg/kg) もしくは haloperidol (2 or 5 mg/kg) を 24 時間ごとに 1 回もしくは 14 回連続で腹腔内投与した。全ての薬物は体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で腹腔内投与した。

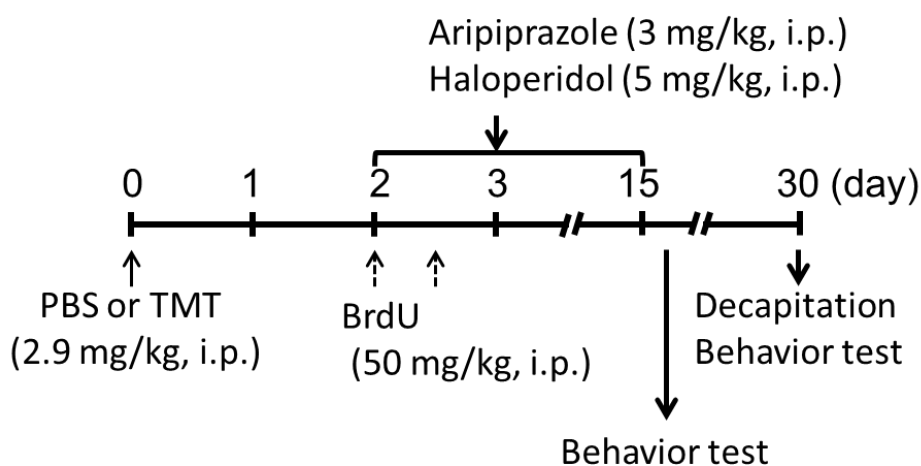
#### 3.2.2.3. BrdU 投与

BrdU (50 mg/kg) は TMT 投与後 48 時間後から 12 時間ごとに 2 回連続で腹腔内投与した。全ての薬物は体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で腹腔内投与した。

### Schedule 1 (acute treatment)



### Schedule 2 (chronic treatment)



**Fig.14. Experimental schedules.**

In both “Schedule 1” and “Schedule 2”, animals were given either PBS or TMT (2.9 mg/kg, i.p.), and then received 2 consecutive injections of BrdU (50 mg/kg, i.p.) every 12 h on day 2 post-TMT treatment for labeling mitotic cells in the dentate gyrus. To examine the effect of an acute treatment with aripiprazole and haloperidol on proliferation of neural progenitor cells at early time window following neuronal loss in the dentate gyrus of the TMT-treated animals, we carried out experiment under the condition of “Schedule 1”. To examine the effect of a chronic treatment with aripiprazole on survival and differentiation of the newly-generated cells in the dentate gyrus of the TMT-treated animals, we carried out experiment under the condition of “Schedule 2”.

### 3.2.3. 組織の固定と包埋

3.2.2.に準じて薬物投与を行ったマウスの脳を、2.2.3.に準じて組織の固定と包埋を行った。

パラフィン包埋組織は大型滑走式マイクロームを用い、側面から 0.9 mm-1.6



mm の範囲を 100  $\mu\text{m}$  間隔で 3-5  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切りした。切片は伸展後に親水性シランコーティングスライドガラス（松浪硝子工業株式会社、大阪）に貼り付け、40°C で一晩乾燥させた。

### 3.2.4. 免疫組織化学法

#### 3.2.4.1. Nestin/BrdU

3.2.3. に準じて作製した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列（100-50%）に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液（pH 7.0）中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却後、TBST で洗浄し、TBST で希釈した 5% ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行い、マウス抗 nestin モノクローナル抗体（1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）およびラット抗 BrdU モノクローナル抗体（3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を混合して、4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L)（5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）および Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ラット IgG (H+L)（5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を混合して TBST で希釈し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、TBST で洗浄し、VECTASHIELD mounting medium を用いて封入を行った。

#### 3.2.4.2. NeuN/BrdU

3.2.3. に準じて作製した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列（100-50%）に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液（pH 7.0）中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却後、TBST で洗浄し、TBST で希釈した 5% ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行い、マウス抗 NeuN モノクローナル抗体（3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）およびラット抗 BrdU モノクローナル抗体（3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を混合して、4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L)（5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）および Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ラット IgG (H+L)（5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を混合して TBST で希釈し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、TBST で洗浄し、VECTASHIELD mounting medium を用いて封入を行った。

#### 3.2.4.3. GFAP/BrdU

3.2.3.に準じて作製した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列（100-50%）に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液（pH 7.0）中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却後、TBST で洗浄し、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行い、マウス抗 GFAP モノクローナル抗体およびラット抗 BrdU モノクローナル抗体（3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を混合して、4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L)（5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）および Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ラット IgG (H+L)（5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を混合して TBST で希釈し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、TBST で洗浄し、VECTASHIELD mounting medium を用いて封入を行った。

#### 3.2.4.4. Iba1/BrdU

3.2.3.に準じて作製した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列（100-50%）に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液（pH 7.0）中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却後、TBST で洗浄し、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行い、ウサギ抗 Iba1 ポリクローナル抗体（1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）およびラット抗 BrdU モノクローナル抗体（3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を混合して、4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L)（4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）および Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ラット IgG (H+L)（5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を混合して TBST で希釈し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、TBST で洗浄し、VECTASHIELD mounting medium を用いて封入を行った。

#### 3.2.4.5. DCX/BrdU

3.2.3.に準じて作製した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列（100-50%）に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液（pH 7.0）中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却後、TBST で洗浄し、TBST で希釈した 5%ウマ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行い、ヤギ抗 DCX ポリクローナル抗体（0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）およびラット抗 BrdU モノクローナル抗体（3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を混

合して、4°Cで一晩反応させた。TBSTで洗浄後、FITC標識ウマ抗ヤギIgG (H+L) (3 µg/mL)を室温・遮光で2時間反応させた。TBSTで洗浄後、TBSTで希釈した5%ヤギ正常血清で室温20分間のブロッキングを行い、Alexa Fluor 594標識ヤギ抗ラットIgG (H+L) (5 µg/mL)を混合してTBSTで希釈し、室温・遮光で2時間反応させた。その後、TBSTで洗浄し、VECTASHIELD mounting mediumを用いて封入を行った。

### 3.2.5. 行動解析：強制水泳実験

直径18 cm、高さ26 cmのプラスチック製のTPXビーカー (SANPLATEC) に25°Cの水を高さ18 cmまで入れ、3.2.2.に準じて薬物投与を行ったマウス一匹を5分間泳がせ、水泳中の無動時間を測定した。

### 3.2.6. 培養ディッシュの前処置

培養ディッシュ (6-well dishes, Greiner bio-one, Germany) の各wellに15 µg/mL poly-L-ornithine および5 µg/mL Laminin (Invitrogen) を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub>インキュベーター (SANYO 社、MC0-17AIC型) 内で少なくとも2時間静置した。コーティング後、液を取り除き、滅菌精製水で1回洗浄し、Neurobasal A mediumで置換し、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で4時間以上静置した。

### 3.2.7. 成体マウス海馬歯状回由来神経系幹/前駆細胞の単離・培養

TMT未処置マウスあるいは3.2.2.1.に準じてTMTを投与したマウスについて、TMT投与後3日目に脳を切り出し、2°Cの生理食塩液に浸した。その後、顕微鏡下で歯状回を単離するため、0.5 mmの脳切片を調製した。単離した歯状回をNeurobasal A medium内で1,000 µLのピペットマンにより破砕し、200 x g、5分間遠心した。上清を吸引後、得られたペレットを2 µg/mL papain、500 µg/mL DNase および180 µg/mL neutral protease を含む4 mL Neurobasal A mediumで懸濁し、37°C、5分間、激しく振動させながらインキュベートし、酵素的に細胞間の結合を緩和した。これらの組織小片について、1,000 µLのピペットマンにより50回ピペッティングし、酵素処理液と同量のNeurobasal A mediumを混合し、200 x gで5分間遠心分離した。上清を吸引後、得られたペレットを5 mL Percoll 緩衝液 (3.9 mL Neurobasal A、990 µL Percoll, 110 µL 10xPBS) で懸濁し、400 x gで15分間遠心分離し、その後Neurobasal A mediumで3

回洗浄した。最後に、growth medium (Neurobasal A medium containing B27 supplement, 2 mM Glutamax, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 20 ng/mL bFGF and 20 ng/mL EGF) 内で細胞を懸濁した。これらの細胞を trypan blue 染色にて生細胞数を測定した後、3.2.6.に準じて作成した培養ディッシュに 100,000 cells/mL の細胞密度で播種した。medium 交換は、細胞播種の翌日に全量を新しい medium と交換し、growth medium 中で 24 時間培養した。その後は 2 日置きに、75%を新しい growth medium と交換した。これらの細胞は、実験に用いるまで 37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した。細胞は、初代培養として growth medium 中で 12-14 日間培養し、得られた細胞をピペッティングにより回収した。再分散し、得られた細胞を 3.2.6. に準じて作成した培養ディッシュに 30,000 cells/mL の細胞密度で播種し、継代培養を行った（継代培養 1 回目）。これらの細胞を培養 6-8 日目にピペッティングにより回収し、再び再分散して 3.2.6. に準じて作成した培養ディッシュに 30,000 cells/mL の細胞密度で播種した（継代培養 2 回目）。本研究では、特に指定がない場合、2 回目に継代培養した細胞を用いて実験を行った。

### 3.2.8. 薬物処理

3.2.7. に準じて単離した細胞について、3.2.6. に準じて作製した培養ディッシュに 30,000 cells/mL で細胞を播種し、growth medium 中で接着培養系により単層培養を行った。薬物は、aripiprazole を 1 μM、2.5 μM および 5 μM もしくは dopamine を 1 μM、10 μM および 100 μM の濃度になるよう growth medium 中の培養細胞に曝露した。これらの細胞は、実験に用いるまで 37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した。また、薬物処理は、medium の交換と同時に新たに行った。medium の交換は 2 日置きに 75%を新しい growth medium と交換して行った。細胞は、growth medium 中で 6 日間培養を行った。

### 3.2.9. MTT assay

細胞増殖を評価するため、MTT assay を用いて生存細胞の測定を行った。3.2.8. に準じて薬物処理した培養細胞を 6 日間培養し、各 well に MTT 溶液 (0.5 mg/mL MTT 3-[4,5-dimethyl-2-thiazol]-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide in PBS) を加え、37 °C、5% CO<sub>2</sub>/95% air、2 時間インキュベートした。この間、生細胞による MTT の還元および MTT 還元によるホルマザンの生成を誘引した。

次に、MTT 溶液と同量の可溶化溶液 (0.4M HCl in isopropanol) を加え、Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories、東京) により溶解液中のホルマザンの 570 nm の吸収波長を測定した。

### 3.2.10. データ解析

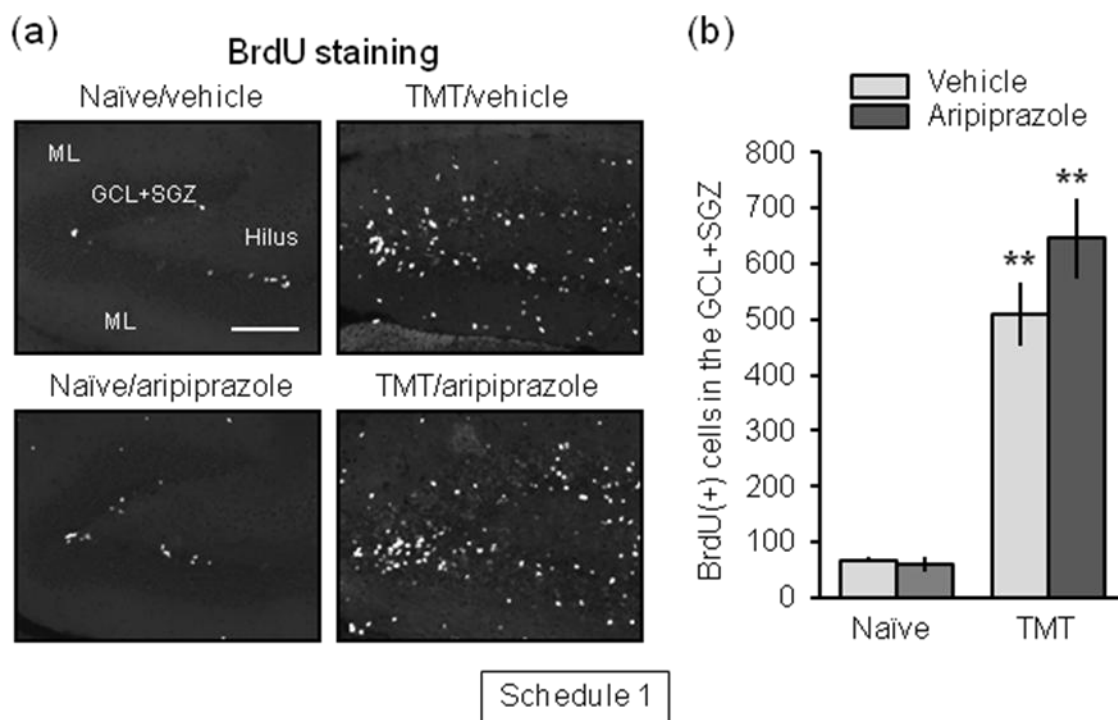
結果は全て平均値±標準誤差で表示し、両側検定 Student *t*-test、one-way ANOVA with Bonferroni/Dunnett *post hoc* test および two-way repeated measure ANOVA で判定した。

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. 海馬歯状回ニューロン脱落後の BrdU 陽性細胞の発現に対する aripiprazole 急性投与の効果

マウスにおいて TMT の急性投与が処置後 2 日目で歯状回顆粒細胞の劇的なニューロン脱落と認知機能障害を引き起こすこと、また、TMT が誘発した歯状回ニューロン脱落に引き続き、BrdU 取り込み細胞数およびニューロン新生に関連したマーカーである nestin、NeuroD もしくは DCX 陽性細胞数の著しい増加が歯状回でみられることが報告されている (Ogita et al., 2005)。そこで、TMT 誘発性の歯状回ニューロン変性/再生モデルを用いて、ニューロン変性後のニューロン再生に対する aripiprazole の影響を評価することとした。

まず、TMT 未処置および TMT を投与したマウスの歯状回での BrdU 取り込み細胞の発現に対する aripiprazole 急性投与の影響を評価するため、Fig.14 の Schedule1 に準じて、マウスに PBS (naïve 群) もしくは TMT (2.9 mg/kg, i.p.) を投与した 2 日後に BrdU (50 mg/kg, i.p.) を 12 時間ごとに計 2 回連続で投与し、BrdU 投与 1 回目と同時に 0.5%CMC (vehicle 群) もしくは aripiprazole (3 mg/kg, i.p.) を 1 回投与した。TMT 投与後 3 日目に脳を取りだし、3.2.3.に準じて組織の固定および包埋を行い、海馬の矢状切片を作成し、それぞれの切片を BrdU に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った (Fig.15)。その結果、BrdU 陽性細胞数は、TMT 投与群において顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層で多くみられた。しかし、aripiprazole 急性投与は naïve 群および TMT 投与群の両群での顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層における BrdU 陽性細胞の発現を著変させなかった (Fig.15a, 15b) [(relative level to naïve) : vehicle,  $8.61 \pm 1.10$ ; aripiprazole,  $9.80 \pm 0.75$  (not significant)]。

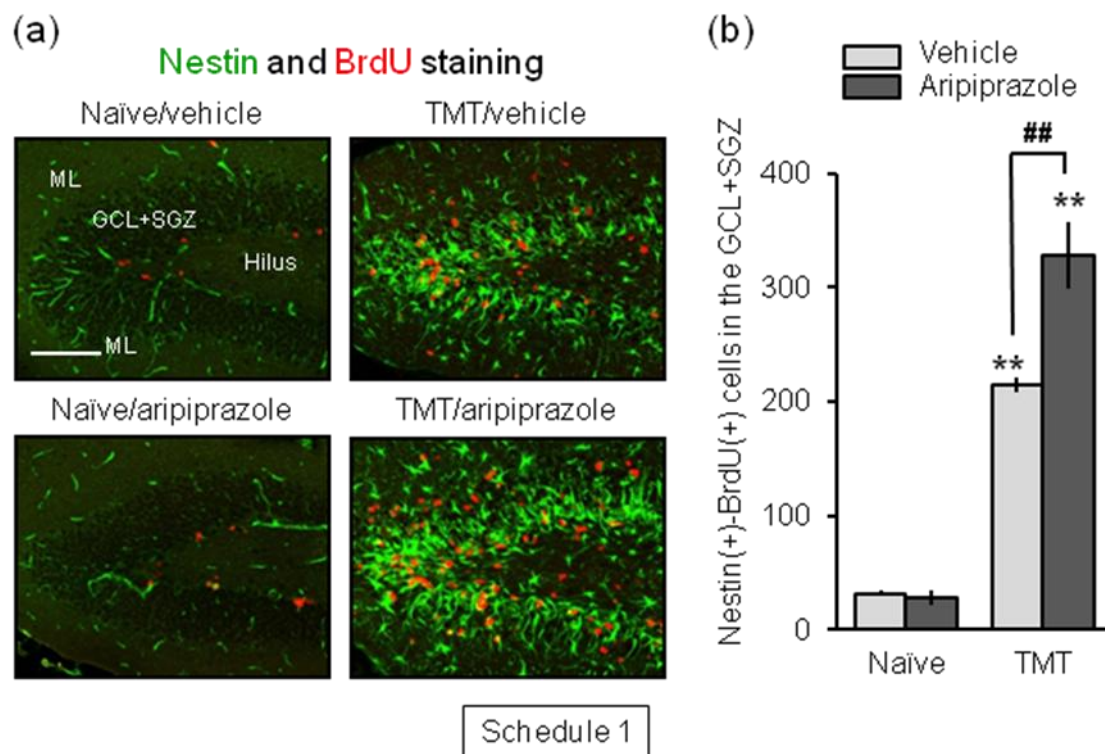


**Fig.15. Effect of aripiprazole on BrdU incorporation following neuronal loss in the dentate gyrus.**

Animals were given either aripiprazole (3 mg/kg, i.p.) or vehicle with BrdU on day 2 post-treatment with PBS or TMT, and then decapitated on day 3 post-treatment for preparation of sagittal hippocampal sections, which were then stained with anti-BrdU antibody (Schedule 1). (a) Fluorescence micrographs show BrdU(+) cells in the dentate gyrus of the 4 groups (naïve/vehicle, naïve/aripiprazole, TMT/vehicle, TMT/aripiprazole). Scale bar = 200  $\mu$ m (b) The graph denotes the number of BrdU(+) cells in the GCL+SGZ of the 4 groups. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. calculated from 4-11 separate experiments. \*\* $P$ <0.01, significantly different from each value obtained for naïve animals. *GCL*, dentate granule cell layer; *SGZ*, dentate subgranular zone; *Hilus*, dentate hilus; *ML*, dentate molecular layer.

次に、naïve 群および TMT 投与群の歯状回神経前駆細胞の発現に対する aripiprazole 急性投与の影響を評価するために、PBS および TMT を投与したマウスの歯状回における nestin/BrdU 陽性細胞数を測定した (Fig.16)。Fig.14 の Schedule1 に準じて、マウスに PBS もしくは TMT (2.9 mg/kg, i.p.) を投与した 2 日後に BrdU (50 mg/kg, i.p.) を 12 時間ごとに計 2 回連続で投与し、BrdU 投与 1 回目と同時に 0.5%CMC もしくは aripiprazole (3 mg/kg, i.p.) を 1 回投与した。TMT 投与後 3 日目に脳を取りだし、3.2.3.に準じて組織の固定および包埋を行い、海馬の矢状切片を作成し、それぞれの切片を nestin および BrdU に対する抗体を用いて蛍光二重染色を行った。その結果、naïve 群において、aripiprazole 急性投与は顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層での nestin/BrdU 陽

性細胞数に影響を与えないことが明らかとなった。しかしながら、TMT 投与群において、aripiprazole 急性投与は顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層での nestin/BrdU 陽性細胞数を有意に増加させた (Fig.16a, 16b)。また、TMT 投与群の nestin/BrdU 陽性細胞数の増加割合は、vehicle 群に比べ aripiprazole 投与群で高くなっていた [nestin (+) /BrdU (+) cells in the TMT-treated animals (relative level to naïve): vehicle,  $8.71 \pm 0.79$ ; aripiprazole,  $14.2 \pm 1.01$  ( $P < 0.01$  vs. vehicle)]。



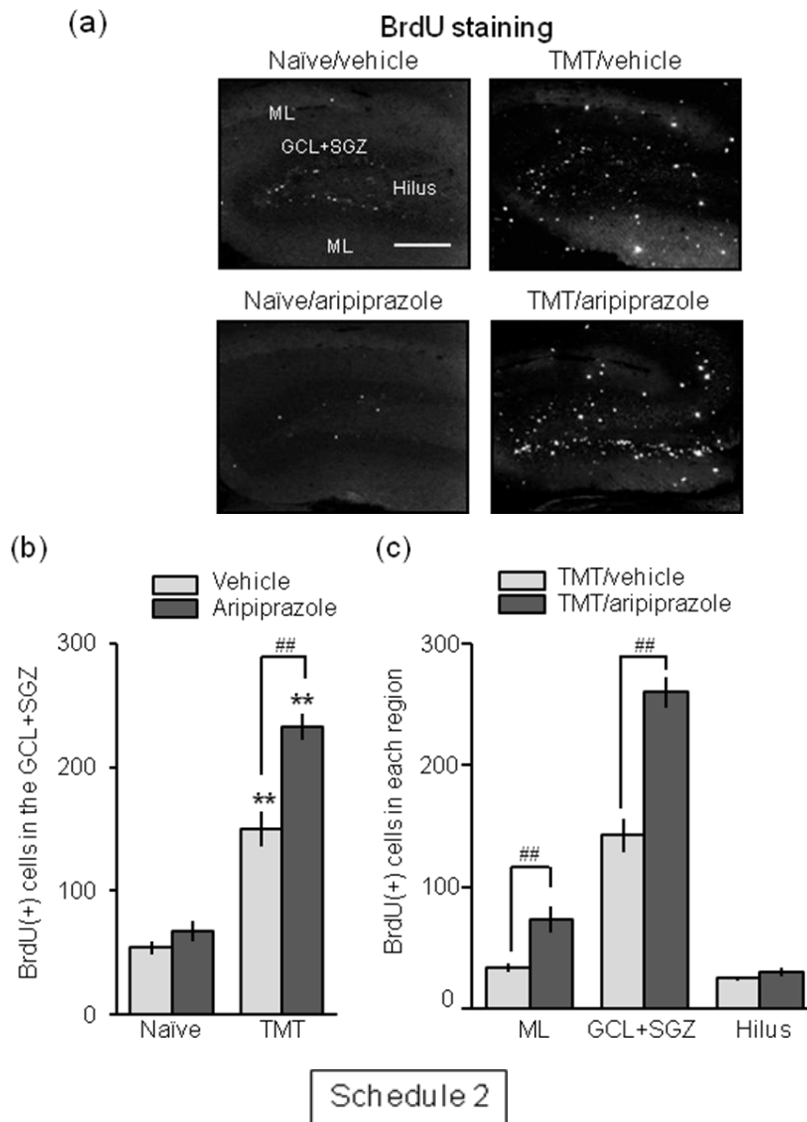
**Fig.16. Effect of aripiprazole on proliferation of nestin(+) cells following dentate neuronal loss in the dentate gyrus.**

Animals were given either aripiprazole (3 mg/kg, i.p.) or vehicle with BrdU on day 2 post-treatment with PBS or TMT, and then decapitated on day 3 post-treatment for preparation of sagittal hippocampal sections, which were then stained with antibodies against nestin and BrdU (Schedule 1). (a) Fluorescence micrographs show nestin(+) cells (green) and BrdU(+) cells (red) in the dentate gyrus of the 4 groups (naïve/vehicle, naïve/aripiprazole, TMT/vehicle, TMT/aripiprazole). Scale bar = 200  $\mu$ m (b) The graphs denote the number of nestin(+)BrdU(+) cells in the GCL+SGZ of 4 experimental groups. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. calculated from 6-12 separate experiments. \*\* $P < 0.01$ , significantly different from each value obtained for the naïve animals. ## $P < 0.01$ , significantly different between the values obtained in vehicle and aripiprazole groups of the TMT-treated animals. GCL, dentate granule cell layer; SGZ, dentate subgranular zone; Hilus, dentate hilus; ML, dentate molecular layer.



### 3.3.2. 海馬歯状回ニューロン脱落后に発現した BrdU 陽性細胞の生存に対する aripiprazole 長期投与の効果

前節で TMT 投与による歯状回ニューロン脱落后に歯状回の顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層において、BrdU を取り込む細胞が増加すること、さらに aripiprazole 急性投与が TMT 投与群の歯状回における nestin/BrdU 陽性細胞数を著明に増加させることを明らかにした。これら新生した神経前駆細胞の生存を増強することはニューロン変性後のニューロン再生に重要であると考えられる。この見解に基づいて、次に naïve 群および TMT 投与群の歯状回における BrdU 陽性細胞の生存に対する aripiprazole の長期投与の影響を調査した。細胞の生存性は PBS もしくは TMT 投与後 30 日目の歯状回に残存する BrdU 陽性細胞数に近似している。Fig.14 の Schedule2 に準じて、マウスに PBS もしくは TMT (2.9 mg/kg, i.p.) を投与した 2 日後に BrdU (50 mg/kg, i.p.) を 12 時間ごとに計 2 回連続で投与し、TMT 投与後 2-15 日目まで 0.5%CMC もしくは aripiprazole (3 mg/kg, i.p.) を 1 日 1 回、合計 14 回腹腔内投与した。TMT 投与後 30 日目に脳を取りだし、3.2.3.に準じて組織の固定および包埋を行い、海馬の矢状切片を作成し、それぞれの切片を BrdU に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った (Fig.17)。その結果、この時点における顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層に生存する BrdU 陽性細胞は naïve 群と比較して TMT 投与群で多数みられた (Fig.17a)。予想通り、2-15 日目までの aripiprazole 長期投与が、TMT 投与群の顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層における BrdU 陽性細胞数を著明に増加させることを確認できた。また、TMT 投与群の BrdU 陽性細胞数の増加割合は、vehicle 群より aripiprazole 投与群で著明に高くなることが明らかとなった (Fig.17b) [BrdU (+) cells in the TMT-treated animals (relative level to naïve): vehicle,  $2.61 \pm 0.27$ ; aripiprazole,  $3.83 \pm 0.20$  ( $P < 0.01$  vs. vehicle)]。生存している BrdU 陽性細胞数は TMT 投与群の顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層に加え、分子細胞層においても vehicle 群と比較して aripiprazole 投与群で著明な増加がみられた (Fig.17c)。しかしながら、歯状回門では BrdU 陽性細胞数は vehicle 群と aripiprazole 投与群間に著変はみられなかった。



**Fig.17. Effect of aripiprazole on survival of BrdU(+) cells generated following neuronal loss in the dentate gyrus.**

Animals were given either aripiprazole (3 mg/kg, i.p.) or vehicle with BrdU on day 2 post-treatment with PBS or TMT, subsequently given either aripiprazole or vehicle up to day 15, and then decapitated on day 30 post-treatment for preparation of sagittal hippocampal sections, which were then stained with anti-BrdU antibody (Schedule 2). (a) Fluorescence micrographs show BrdU(+) cells in the dentate gyrus of the 4 groups (naïve/vehicle, naïve/aripiprazole, TMT/vehicle, TMT/aripiprazole). Scale bar = 200  $\mu$ m (b) The graph denotes the number of BrdU(+) cells in the GCL+SGZ of the 4 groups.  $**P < 0.01$ , significantly different from each value obtained for the naïve animals.  $##P < 0.01$ , significantly different between the values obtained in vehicle and aripiprazole groups of the TMT-treated animals. (c) The graph denotes the number of BrdU(+) cells in 3 subregions including the GCL+SGZ, molecular layer (ML), and hilus of vehicle- and aripiprazole-treated TMT-treated animals. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. calculated from 4-6 separate experiments.  $**P < 0.01$ , significantly different from each value obtained in vehicle group of the TMT-treated animals. *GCL*, dentate granule cell layer; *SGZ*, dentate subgranular zone; *Hilus*, dentate hilus; *ML*, dentate molecular layer.

### 3.3.3. 海馬歯状回ニューロン脱落后に発現した BrdU 陽性細胞の分化に対する aripiprazole 長期投与の効果

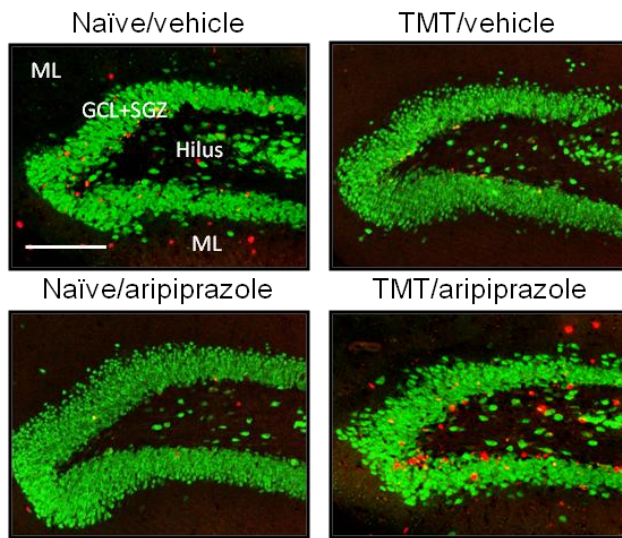
ニューロン脱落后の歯状回において新生した細胞の宿命を評価するため、マウスに PBS もしくは TMT を投与した後 30 日目の歯状回について BrdU というつかのニューロンマーカーを二重標識した。Fig.14 の Schedule2 に準じて、マウスに PBS もしくは TMT (2.9 mg/kg, i.p.) を投与した 2 日後に BrdU (50 mg/kg, i.p.) を 12 時間ごとに計 2 回連続で投与し、TMT 投与後 2-15 日目まで 0.5%CMC もしくは aripiprazole (3 mg/kg, i.p.) を 1 日 1 回、合計 14 回腹腔内投与した。TMT 投与後 30 日目に脳を取りだし、3.2.3.に準じて組織の固定および包埋を行い、海馬の矢状切片を作成し、それぞれの切片を BrdU と各種ニューロンマーカー NeuN (成熟ニューロン)、DCX (未成熟ニューロン)、GFAP (アストロサイト) および Iba1 (ミクログリア) に対する抗体を用いて蛍光二重染色を行った (Fig.18)。その結果、vehicle 処置の naïve 群および TMT 投与群間で NeuN/BrdU 陽性細胞数を比較すると、予想外に顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層で観察されるこれらの細胞に明らかな変化はみられなかった。一方、aripiprazole 長期投与は TMT 投与群の顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層において NeuN/BrdU 陽性細胞数を著しく増加させた (Fig.18a, 18b)。しかしながら、aripiprazole 長期投与は naïve 群の顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層における NeuN/BrdU 陽性細胞数の変化には影響を与えなかった。

次に、歯状回ニューロン脱落后のニューロン新生をみるため、TMT 投与群の歯状回の各部位における NeuN/BrdU 陽性および DCX/BrdU 陽性細胞を計測した。その結果、aripiprazole 長期投与による NeuN/BrdU 陽性細胞数の増加は、顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層に選択的にみられ、分子細胞層および歯状回門では NeuN/BrdU 陽性細胞がみられないことが明らかになった (Fig.18c, 18d)。同様に、aripiprazole 誘発性の DCX/BrdU 陽性細胞数の増加が TMT 投与群の顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層において選択的にみられた。

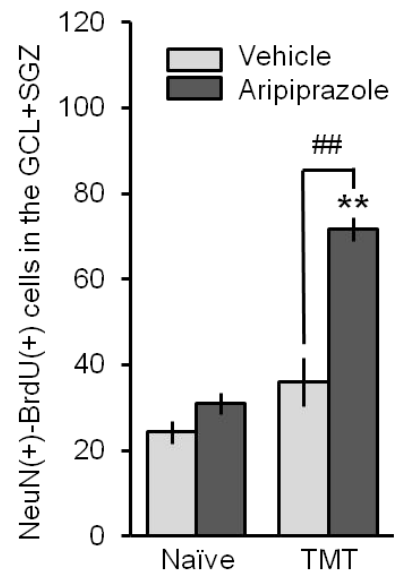
さらに、歯状回ニューロン脱落后のアストロサイトおよびミクログリア細胞の新生をみるため、TMT 投与の歯状回における GFAP/BrdU 陽性および Iba1/BrdU 陽性細胞を測定した (Fig.18c, 18d)。その結果、GFAP/BrdU 陽性細胞数は分子細胞層および顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層の両方において、vehicle 群に比べて aripiprazole 投与群で有意な増加が認められた。また、Iba1/BrdU 陽性細胞は歯状回の 3 領域すべてにおいて、aripiprazole 長期投与により著明に増加した。

(a)

NeuN and BrdU staining

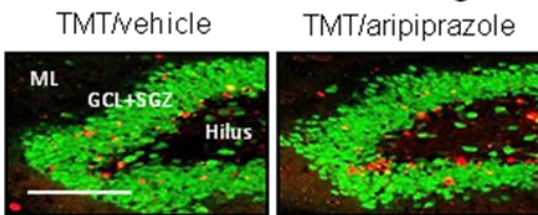


(b)

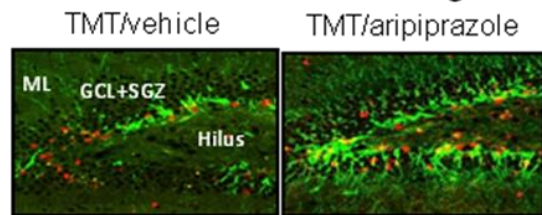


(c)

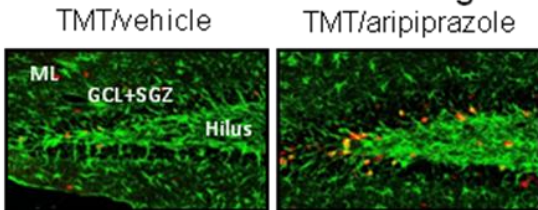
NeuN and BrdU staining



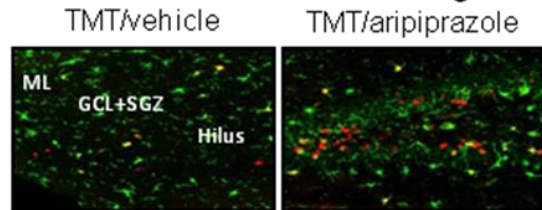
DCX and BrdU staining

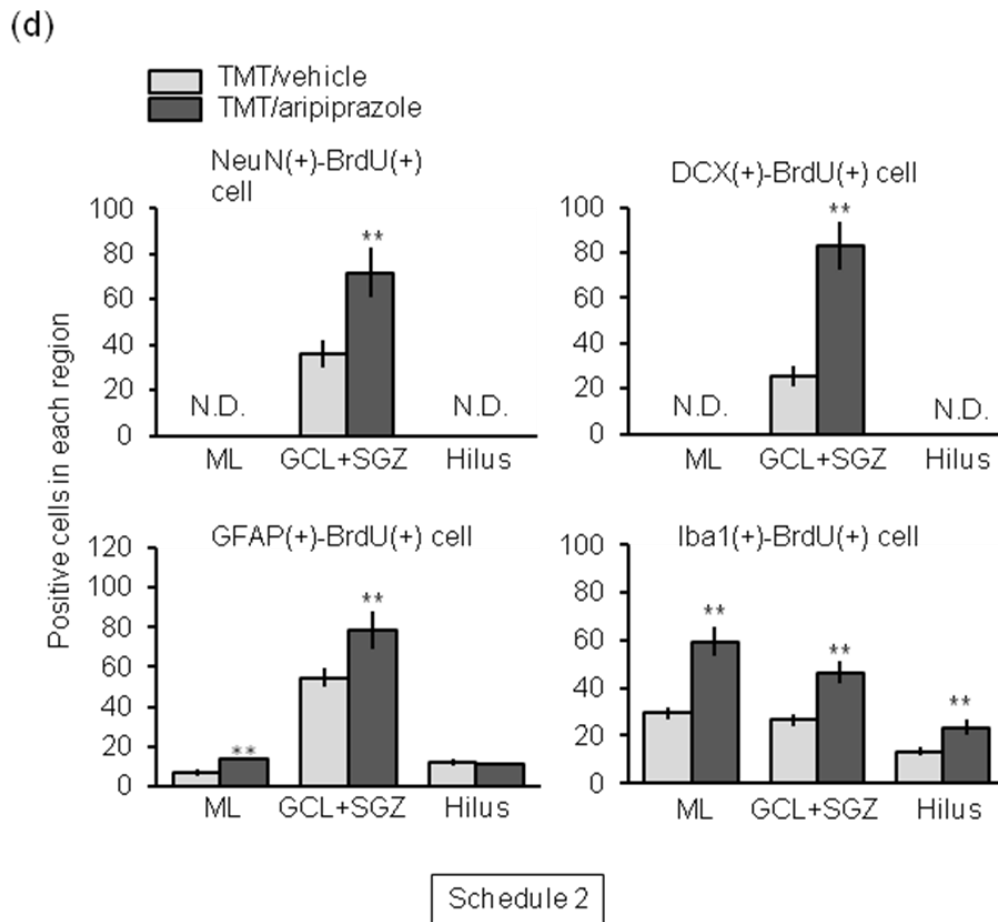


GFAP and BrdU staining



Iba1 and BrdU staining



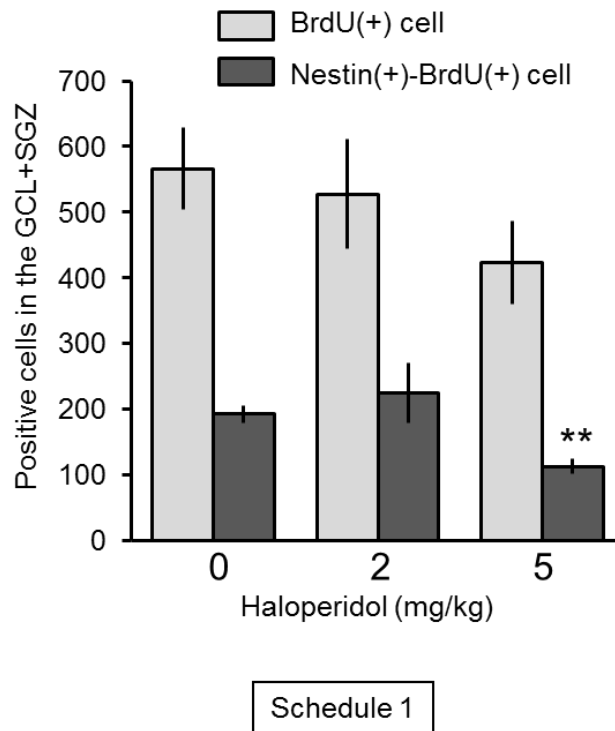


**Fig.18. Effect of aripiprazole on neuronal and glial differentiation of BrdU(+) cells generated following neuronal loss in the dentate gyrus.**

Animals were given either aripiprazole (3 mg/kg, i.p.) or vehicle with BrdU on day 2 post-treatment with PBS or TMT, subsequently given once a day either aripiprazole or vehicle up to day 15, and then decapitated on day 30 post-treatment for preparation of sagittal hippocampal sections, which were then stained with antibodies against NeuN, DCX, GFAP, Iba1, and BrdU (Schedule 2). (a) Fluorescence micrographs show NeuN(+) cells (*green*) and BrdU(+) cells (*red*) in the dentate gyrus of the 4 groups (naïve/vehicle, naïve/aripiprazole, TMT/vehicle, TMT/aripiprazole). Scale bar = 200  $\mu$ m (b) The graphs show the number of NeuN(+)-BrdU(+) cells in the GCL+SGZ of the 4 groups. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. calculated from 6-12 separate experiments. \*\* $P$ <0.01, significantly different from each value obtained for the naïve animals. ## $P$ <0.01, significantly different between the values obtained in vehicle and aripiprazole groups of the TMT-treated animals. (c) Fluorescence micrographs show BrdU(+) cells (*red*) with NeuN(+) cells, DCX(+) cells, GFAP(+) cells or Iba1(+) cells (*green*) in the dentate gyrus of the 4 groups. Scale bar = 200  $\mu$ m (d) The graph denotes the number of double positive cells in 3 subregions including the GCL+SGZ, molecular layer (ML), and hilus of vehicle- and aripiprazole-treated TMT-treated animals. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. calculated from 4-6 separate experiments. \*\* $P$ <0.01, significantly different from each value obtained in vehicle group of the TMT-treated animals. N.D., not detectable GCL, dentate granule cell layer; SGZ, dentate subgranular zone; Hilus, dentate hilus; ML, dentate molecular layer.

### 3.3.4. 海馬歯状回ニューロン脱落後の BrdU 陽性細胞の発現 に対する haloperidol 急性投与の効果

Aripiprazole と同様に統合失調症の治療薬として用いられ、強力なドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断作用を有する haloperidol の急性投与が TMT 投与群の顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層における BrdU 取り込み細胞の発現に対してどのような影響を及ぼすのかを評価した。Fig.14 の Schedule1 に準じて、マウスに PBS もしくは TMT (2.9 mg/kg, i.p.) を投与した 2 日後に BrdU (50 mg/kg, i.p.) を 12 時間ごとに計 2 回連続で投与し、BrdU 投与 1 回目と同時に 0.5%CMC もしくは haloperidol (2 および 5 mg/kg, i.p.) を 1 回投与した。TMT 投与後 3 日目に脳を取りだし、3.2.3.に準じて組織の固定および包埋を行い、海馬の矢状切片を作成した。それぞれの切片を nestin および BrdU に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層の BrdU 陽性および nestin/BrdU 陽性細胞数を計測した。その結果、2 および 5 mg/kg どちらの用量の haloperidol も BrdU 陽性細胞数に影響を与えなかったが、高濃度 haloperidol (5 mg/kg) は nestin/BrdU 陽性細胞数を著明に減少させた (Fig.19) [BrdU (+) cells (% of control): 2 mg/kg, 93.2 ± 14.9; 5 mg/kg, 74.6 ± 11.1; nestin (+) -BrdU (+) cells (% of control): 2 mg/kg, 116.9 ± 23.5; 5 mg/kg, 58.7 ± 6.1 (P<0.01)] 。



**Fig.19. Effect of haloperidol on proliferation of nestin(+) cells in the dentate gyrus following dentate neuronal damage induced by TMT.**

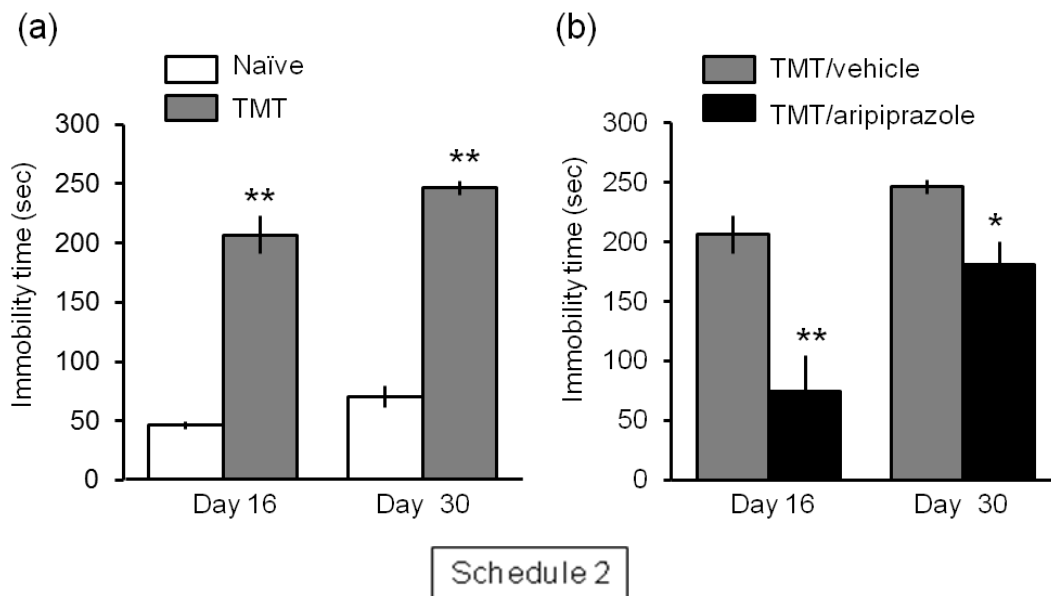
Animals were given either haloperidol (2 or 5 mg/kg, i.p.) or vehicle with BrdU on day 2 post-treatment with PBS or TMT, and then decapitated on day 3 post-treatment for preparation of sagittal hippocampal sections, which were then stained with antibodies against nestin and BrdU (Schedule 1). The graph denotes the number of BrdU(+) cells and nestin(+)-BrdU(+) cells in the GCL+SGZ of vehicle- and haloperidol-treated TMT-treated animals. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. calculated from 4 separate experiments. \*\* $P < 0.01$ , significantly different from control value obtained in vehicle groups (Haloperidol = 0)

### 3.3.5. 海馬齒状回ニューロン脱落後のうつ様行動に対する aripiprazole および haloperidol の長期投与の効果

以前に、マウスに TMT (2.8 mg/kg) を投与すると、投与後 24 時間で約 70% のマウスに「全身性の振戦」がみられ、この振戦は投与後 3 日間にわたり持続することが報告されている。残り 30% のマウスは「後肢の運動麻痺」を伴う深刻な振戦に発展すること、さらに TMT 投与によりすべてのマウスが攻撃的になることも知られている。しかしながら、TMT 投与に起因した上記の行動変化は TMT 投与後 4 日目で消失した (Kawada et al., 2008; Ogita et al., 2004; Shuto et al., 2009a)。これらの行動異常に加えて、TMT 投与後 4 日目に明らかな視

覚認知記憶障害がみられるが、14日以降には改善がみられる (Ogita et al., 2005)。

その他の異常行動として、TMT投与による歯状回ニューロン脱落后における遅発性のうつ様行動に焦点を当て、マウスにPBSもしくはTMT (2.9 mg/kg, i.p.)を投与した後、16および30日目に強制水泳試験を行った。また、歯状回ニューロン脱落后のうつ様行動に対するaripiprazoleもしくはhaloperidolの長期投与の影響を評価するため、TMT (2.9 mg/kg, i.p.)を投与した後2-15日目まで0.5%CMC、aripiprazole (3 mg/kg, i.p.)もしくはhaloperidol (5 mg/kg, i.p.)を1日1回、合計14回腹腔内投与し、16および30日目に強制水泳試験を行った。その結果、TMT投与群ではTMT投与後16および30日目ともに無動時間が著しく延長した (Fig.20a)。しかしながら、同時期におけるTMT投与群の無動時間の延長はaripiprazole長期投与により著明な改善が認められた (Fig.20b)。しかしながら、aripiprazole投与群と同様の実験条件下、haloperidol (5 mg/kg)長期投与はTMT投与群のうつ様行動を改善できなかった [Immobility time (% of vehicle) : day 16, 82.1 ± 20.5; day 30, 87.7 ± 22.2]。



**Fig.20. Effect of aripiprazole on TMT-induced behavioral abnormality in the forced swimming test.**

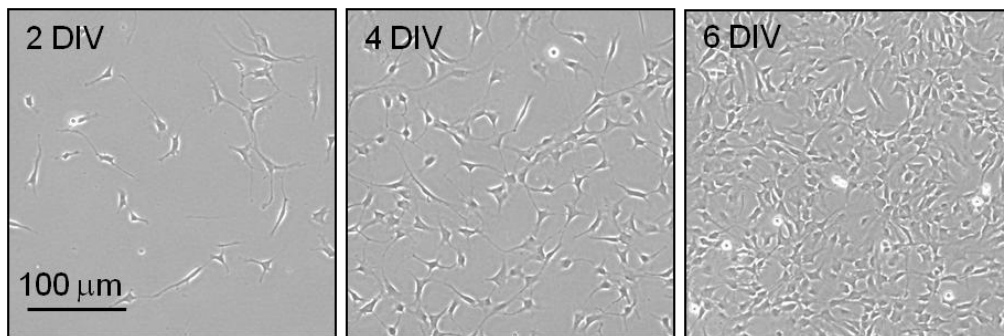
(a) Animals were given either PBS or TMT (2.9 mg/kg, i.p.) for forced swimming test on days 16 and 30 post-treatment. \*\* $P < 0.01$ , significantly different from each value obtained for naïve animals. (b) Animals were given either aripiprazole (3 mg/kg, i.p.) or vehicle on days 2 to 15 post-TMT treatment for forced swimming test on days 16 and 30 post-TMT treatment (Schedule 2). \*\* $P < 0.01$ , significantly different from control value obtained in vehicle group of the TMT-treated animals. Values are expressed as the mean ± S.E. calculated from 4-6 separate experiments.



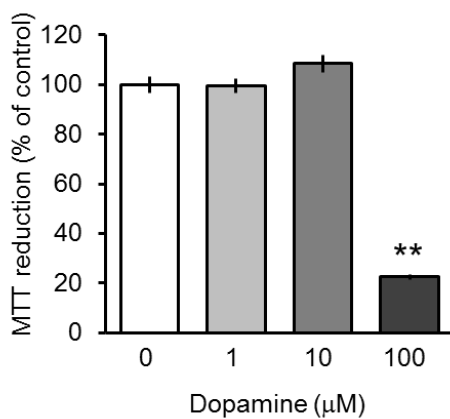
### 3.3.6. 海馬歯状回由来神経系幹/前駆細胞の増殖に対する dopamine および aripiprazole の *in vitro* 曝露の影響

海馬歯状回由来の高純度な神経系幹/前駆細胞を調製するため、歯状回から単離した細胞を 3.2.7. に準じて継代培養を行った。継代した神経系幹/前駆細胞を growth medium 中で vehicle 処置あるいは 1  $\mu$ M、10  $\mu$ M および 100  $\mu$ M dopamine もしくは 1  $\mu$ M、2.5  $\mu$ M および 5  $\mu$ M aripiprazole と共に、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> でインキュベートし、6 日間培養した。その後、培養細胞は細胞増殖を測定するため、MTT assay を行った (Fig.21)。その結果、継代した細胞は成長因子を含む growth medium 中で強力な増殖活性を示した (Fig.21a)。すべての細胞で nestin が発現しているのに対し、GFAP は細胞の約 7% にしか発現していなかった (data not shown)。MTT assay の結果では、極めて高濃度 dopamine (100  $\mu$ M) の細胞への曝露は、神経系幹/前駆細胞の増殖活性を著しく弱める能力が認められた (Fig.21b)。しかしながら、低濃度 dopamine (1 もしくは 10  $\mu$ M) は同条件下、神経系幹/前駆細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。また、aripiprazole (1-5  $\mu$ M) の曝露は、使用したどの濃度においても神経系幹/前駆細胞の増殖活性を有意に阻害した (Fig.21c)。

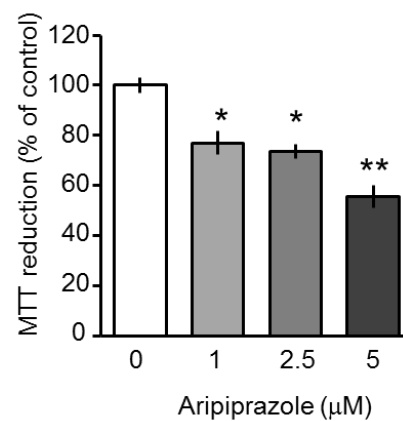
(a)



(b)



(c)



**Fig. 21. Effect of *in vitro* exposure to aripiprazole and dopamine on proliferation of neural progenitor cells derived from the dentate gyrus.**

(a) Cells were cultured for the indicated periods in the growth medium. Scale bar = 100 μm (b) Cells were cultured for 6 DIV in the presence of vehicle, dopamine or aripiprazole at the different concentrations indicated in the growth medium, and then subjected to MTT reduction to determine cell proliferation. Values are expressed as the mean ± S.E. calculated from the percentage of each control value from 4-5 separate experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from each control value obtained in the presence of vehicle alone (0).

### 3.4. 考察

本研究において、aripiprazole は海馬歯状回のニューロン脱落后に引き続いて起きるニューロン新生の促進を介して神経系再構築を促進する可能性が示唆された。

様々な物理的障害[cryoinjury (Moon C et al., 2004)、ablation injury (Douen AG et al., 2004) もしくは controlled cortical impact (Chen S et al., 2003)]を受けた大脳皮質の周囲において、nestin 陽性細胞が増殖することが知られている。本研究では、海馬歯状回のニューロン変性/再生モデル動物として TMT 投与マウスを用いた。TMT 投与マウスでは、TMT 投与後 2 日目で海馬歯状回顆粒細胞層において著明なニューロン脱落がみられ、TMT 投与後 30 日目では見かけ上の顆粒細胞層の再生がみられる (Ogita et al., 2005)。そのニューロン脱落后 (再生期) には、海馬歯状回において BrdU 取り込み細胞、nestin 陽性細胞、DCX 陽性細胞の著明な発現増強がみられる。また、TMT 投与後 30 日目では、NeuN/BrdU 陽性細胞が顆粒細胞層に見出され、ニューロン脱落后に新生した神経系幹/前駆細胞がニューロンに分化していることが推察される。

さらに、本モデルマウスの認知機能について解析したところ、TMT 投与直後では認知機能の低下がみられたが、その後に認知機能の明らかな回復が観察された (Ogita et al., 2005; Shuto et al., 2009a)。しかしながら、本章で示されたように、うつ様行動については海馬歯状回ニューロン脱落の直後のみならず顆粒細胞層再構築後も観察されることから、本モデルにおけるニューロン再生が十分ではないことが推察される。本章において、aripiprazole がうつ様行動を抑制した事実 (Fig.20) は、aripiprazole が障害後の神経系再構築を促進するということを支持する証拠である。

本章では、ニューロン新生過程における aripiprazole の効果も解析した。ニューロン新生過程には、海馬歯状回顆粒細胞層下帯の神経系幹/前駆細胞の増殖、生存およびニューロンへの分化がある。そのニューロン新生過程に対する aripiprazole の効果を解析するために、本章では 2 種類の実験スケジュールを用いた。すなわち、神経系幹/前駆細胞の増殖に対する aripiprazole の影響を解析するために、海馬歯状回ニューロン障害直後に BrdU を取り込んだ細胞での nestin 陽性細胞の発現に対する aripiprazole の効果を解析した (Schedule 1)。新生細胞の生存とニューロンへの分化に対する効果を解析するために、TMT 投与後 30 日目での NeuN/BrdU 陽性細胞数および DCX/BrdU 陽性細胞数に対す

る aripiprazole 長期投与の効果について解析した (Schedule 2)。これらの両実験スケジュールにおいて、aripiprazole が促進効果を示すことから、本薬物はニューロン新生のすべての過程に対して有益な効果をもたらす可能性が示唆される。

正常動物の顆粒細胞層下帯における神経系幹/前駆細胞は、ニューロンへの分化過程における形態学的特徴や発現分子の相違等から Type 1 細胞、Type 2 細胞、Type 3 細胞に分類される (Fig.1)。すなわち、Type 1 細胞 (radial glia-like cells) は、顆粒細胞層下帯に分布した nestin/GFAP 陽性の放射状の突起をもつ細胞で、分裂能が低い幹細胞に近い細胞、Type 2 細胞は、nestin 陽性/GFAP 陰性の分裂能の高い一過性増殖細胞、Type 3 細胞は、移動能をもつニューロblastで、顆粒細胞層へ移動中の分裂能を失った未熟ニューロンであり、移動後に成熟ニューロンへと分化する (Garcia AD. et al., 2004; Seri B. et al., 2001; Steiner B. et al., 2006)。2章において、TMT 投与後 3 日目の海馬歯状回から分離された細胞は、nestin 陽性/GFAP 陰性細胞数および nestin/GFAP 陽性細胞数が未処置動物の場合に比べて大幅な増加がみられた [Fig.7c, nestin (+) /GFAP (-) cells (% of total cells) : naïve, 1.2; TMT, 21.1; nestin (+) /GFAP (+) cells (% of total cells) : naïve, 3.4; TMT, 13.2]。一方、nestin 陰性/GFAP 陽性細胞 (アストロサイト) は TMT 投与群で減少していた [nestin (-) /GFAP (+) cells (% of total cells) : naïve, 18.4; TMT, 6.73]。これらの事実は、TMT 投与動物の再生段階初期には、海馬歯状回においてアストロサイトには影響を与えることなく Type 1 細胞 (nestin/GFAP 陽性細胞) と増殖性前駆細胞 Type2 細胞 (nestin 陽性/GFAP 陰性細胞) を増加させることを示している。また、TMT 投与群での増加率は後者の方が顕著である。本章においては、nestin/GFAP/BrdU の同時染色は行っていないが、BrdU 取り込みが増殖能を示すことおよび細胞増殖能が Type 1 細胞よりも Type 2 細胞が高いことから、nestin/BrdU 陽性細胞は、Type 2 を反映していると考えられる。したがって、aripiprazole は海馬歯状回ニューロン脱落後の回復過程において Type 2 細胞の増殖を促進することが示唆される。一方、aripiprazole は未処置動物における海馬歯状回顆粒細胞層の BrdU 取り込みには著変を示さなかった。2章における未処置動物の海馬歯状回から分離された細胞には Type 2 細胞よりも Type 1 細胞が多いという事実 [nestin (+) /GFAP (-) cells (% of total cells) : 1.2; nestin (+) /GFAP (+) cells (% of total cells) : 3.4] から aripiprazole が Type 2 細胞の増殖能を選択的に活性化させることが支持される。

TMT 投与動物において、海馬歯状回ニューロン脱落直後の顆粒細胞層の BrdU 取り込みは aripiprazole により有意な変化が認められなかったが (Fig.15)、TMT 投与後 30 日目の BrdU 取り込み細胞数は aripiprazole により増加した (Fig.17)。これらの事実は、aripiprazole は顆粒細胞層の BrdU 取り込み細胞の生存を促進することが推察される。さらに、aripiprazole は、海馬歯状回ニューロン脱落後に顆粒細胞層に新生した細胞の未成熟ニューロン (DCX 陽性細胞)、成熟ニューロン (NeuN 陽性細胞)、アストロサイト (GFAP 陽性細胞)、ミクログリア (Iba1 陽性細胞) への分化を促進することが判明した (Fig.18)。特に、未成熟・成熟ニューロンの新生細胞 (DCX/BrdU 陽性細胞、NeuN/BrdU 陽性細胞) が顆粒細胞層に選択的に見出されたことは、新生ニューロンがすべて顆粒細胞層に組み込まれることを示している。また、aripiprazole 未投与動物において新生ニューロン (NeuN/BrdU 陽性細胞) が naïve 群と TMT 投与群で著変がみられなかった事実は、aripiprazole 未投与動物では神経系再構築が不十分であることを示すものである。事実、aripiprazole 未投与動物は持続的なうつ様行動がみられており、その抑うつ様行動が aripiprazole により抑制されることも aripiprazole が神経系再構築に有効であることを示す重要な証拠であろう。

Aripiprazole あるいはドパミン受容体刺激薬の海馬歯状回のニューロン新生に対する効果についての報告は以前にはほとんどみられないが、haloperidol の海馬ニューロン新生に対する作用については多くの報告がみられる (Malberg et al., 2000; Wang et al., 2004; Wakade et al., 2002; Keilhoff et al., 2010)。しかしながら、それらの報告には一定の結論がでていないわけではない。本章でも海馬歯状回ニューロン脱落後の BrdU 取り込みに対する haloperidol 急性投与の効果解析したところ、本実験条件では海馬歯状回顆粒細胞層の神経系幹/前駆細胞の増殖が抑制されることが示唆された。Aripiprazole がドパミン D<sub>2</sub> 受容体の部分刺激作用をもつことから、aripiprazole のニューロン新生促進効果はドパミン D<sub>2</sub> 受容体刺激作用によるかもしれない。一方、aripiprazole はセロトニン 5-HT<sub>1A</sub> 受容体刺激作用およびセロトニン 5-HT<sub>2A</sub> 受容体遮断作用も持っている。以前の報告では、セロトニン 5-HT<sub>1A</sub> 受容体刺激薬 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin を投与すると、海馬歯状回の BrdU 取り込み細胞が増加することが明らかとなっている (Arnold and Hagg, 2012)。また、セロトニン 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>1B</sub> 受容体のノックアウトマウスにおいて、海馬歯状回のニューロン新生が抑制される (Xia et al., 2012)。さらに、神経系幹細

胞の培養系を用いた研究において、トリプトファン水酸化酵素阻害薬 *p*-chlorophenylalanine によるセロトニン合成阻害は、その細胞増殖を抑制し、同条件下でセロトニンはその抑制を回復する (Benninghoff et al., 2010)。これらの事実は、本章の aripiprazole の効果がドパミン D<sub>2</sub> 受容体を介した反応ではなく、むしろセロトニン 5-HT<sub>1A</sub> 受容体刺激作用に起因するかもしれないことを支持するものである。

本章では、aripiprazole の神経系幹/前駆細胞への直接作用を解析する目的で、TMT 投与マウス海馬歯状回から分離した神経系幹/前駆細胞の培養系を用いた。本培養細胞は極めて高い増殖能をもち、nestin 陽性細胞であった。また、分化誘導によりニューロンおよびアストロサイトに分化することを確認している (data not shown)。本培養細胞に aripiprazole あるいは dopamine を添加したところ、明らかな増殖抑制が観察された (Fig.21)。これらの実験事実は aripiprazole 投与動物を用いた *in vivo* 実験系と矛盾するものであり、この矛盾には次の2つの解釈ができると考えられる。一つは、培養細胞系を用いた *in vitro* 実験系と *in vivo* 実験系との違いによるかもしれない。他方では、aripiprazole の神経系再構築の促進効果が神経系幹/前駆細胞への直接作用ではない可能性がある。最終的な結論を得るためには今後の更なる解析が必要である。

## 第4章

### おわりに

近年、高齢化に伴いアルツハイマー病 (Alzheimer disease, AD)、パーキンソン病(Parkinson disease, PD)などのニューロン変性疾患および脳卒中罹患患者が増加している。また、統合失調症や躁うつ病などの精神疾患もニューロン変性疾患と同様に患者数が増加し続けている。しかしながら、これらの疾患は現時点では薬物療法などにより、一時的に進行を遅らせることしかできず、ニューロン変性の進行に伴う運動機能や認知機能の低下に対する根本的な治療法の開発が望まれている。これら中枢神経疾患において、内在性の神経系幹/前駆細胞の増殖およびニューロン新生を促進することにより障害されたニューロンを補うことができれば、移植治療と比べはるかに安全性の高い治療方法になり得る。

本研究では、edaravone がニューロン障害後に一過性に増殖する神経系幹/前駆細胞の増殖を促進する可能性を示した。加えて、それらの細胞の生存を維持し、さらにニューロンへの分化を促進している可能性が示唆された。同様に aripiprazole がニューロン障害後に神経系幹/前駆細胞の増殖、生存および分化に促進効果を示すことから、ニューロン新生のすべての過程に対して有益な効果をもたらす可能性が示唆された。本研究で明らかにしたニューロン障害後に起こるニューロン新生に対する edaravone および aripiprazole の促進効果は、ニューロン変性疾患の治療に有益である可能性が高い。しかしながら、どのような作用でニューロン新生を促進しているのかは未だ不明であり、今後も更なる解析が必要である。これらの解析が進むことで、edaravone および aripiprazole のニューロン変性疾患におけるニューロン障害後のニューロン新生促進作用がより明らかとなり、画期的なニューロン新生促進薬の開発につながることを期待する。

## 第5章

### 結語

- TMT 投与後 3 日目の海馬歯状回から分離した細胞において、nestin/ GFAP 陽性 (Type1) 細胞数および nestin 陽性/GFAP 陰性 (Type2) 細胞数が著明に増加する。
- TMT 投与後 3 日目の海馬歯状回から分離した細胞の長期間培養において、総細胞数および nestin 陽性細胞数が著明に増加する。
- TMT 投与後 3 日目の海馬歯状回から分離した細胞において、BrdU は nestin 陽性細胞に取り込まれ、培養日数の経過とともに BrdU の取り込みが著明に増加する。
- TMT 投与後 3 日目の海馬歯状回から分離した細胞において、培養日数の経過に伴って、形成される neurosphere 数が著明に増加する。
- 歯状回ニューロン脱落後の歯状回由来の培養神経系幹/前駆細胞への edaravone 直接曝露は、nestin 陽性細胞数を著明に増加させる。
- Edaravone 急性投与は、歯状回ニューロン脱落後の歯状回由来の神経系幹/前駆細胞において nestin/GFAP 陽性 (Type1) 細胞数を著明に増加させる。
- Edaravone 急性投与は、歯状回ニューロン脱落後の歯状回由来の培養神経系幹/前駆細胞において、培養日数の経過に伴って、形成される neurosphere 数を著明に増加させる。
- Edaravone 長期投与は、歯状回ニューロン脱落後の顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層において BrdU 陽性細胞数を著明に増加させる。
- Aripiprazole 急性投与は、歯状回ニューロン脱落後の歯状回において BrdU 陽性細胞数に影響しない。
- Aripiprazole 急性投与は、歯状回ニューロン脱落後の歯状回において nestin/BrdU 陽性細胞数を著明に増加させる。
- Aripiprazole 長期投与は、歯状回ニューロン脱落後の歯状回において生存する BrdU 陽性細胞数を著明に増加させる。
- Aripiprazole 長期投与は、歯状回ニューロン脱落後の歯状回において、NeuN/BrdU 陽性、DCX/BrdU 陽性、GFAP/BrdU 陽性および Iba1/BrdU 陽性の細胞数を著明に増加させる。また、NeuN/BrdU 陽性、DCX/BrdU 陽性の細胞数の増加は、顆粒細胞層下帯を含む顆粒細胞層に選択的にみられる。



- Haloperidol 急性投与は、歯状回ニューロン脱落后の歯状回において、BrdU 陽細胞数に影響しないが、高濃度 (5 mg/kg) では nestin/ BrdU 陽細胞数を著明に減少させる。
- Aripiprazole 長期投与は、歯状回ニューロン脱落后のマウスにおける強制水泳試験の無働時間の延長を著明に改善した。
- dopamine の直接曝露は、高濃度 (100  $\mu$ M) で歯状回ニューロン脱落后の歯状回由来の培養神経系幹/細胞の増殖活性を著明に抑制する。
- Aripiprazole の直接曝露は、使用したすべての濃度 (1、2.5 および 5  $\mu$ M) で歯状回ニューロン脱落后の歯状回由来の培養神経系幹/前駆細胞の増殖活性を著明に抑制する。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を遂行するうえにおいて終始御懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました、摂南大学薬学部・荻田喜代一教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり御懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました金沢大学大学院自然科学研究科・米田幸雄教授ならびに檜井栄一准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり多大なるご協力とご援助を頂きました摂南大学薬学部・米山雅紀講師ならびに芝達雄助教に深謝いたします。さらに、本研究遂行にあたりご協力頂きました摂南大学薬学部薬理学研究室の皆様感謝いたします。

## 引用文献

Arnold SA, Hagg T. Serotonin 1A receptor agonist increases species- and region-selective adult CNS proliferation, but not through CNTF. *Neuropharmacology* 2012; **63(7)**: 1238-1247.

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Medicine* 2002; **8**: 963-970.

Balaban CD, O'Callaghan JP, Billingsley ML. Trimethyltin-induced neuronal damage in the rat brain: comparative studies using silver degeneration stains, immunocytochemistry and immunoassay for neuronotypic and gliotypic proteins. *Neuroscience*. 1988; **26**: 337-361.

Benninghoff J, Gritti A, Rizzi M, Lamorte G, Schloesser RJ, Schmitt A, Robel S, Genius J, Moessner R, Riederer P, Manji HK, Grunze H, Rujescu D, Moeller HJ, Lesch KP, Vescovi AL. Serotonin depletion hampers survival and proliferation in neurospheres derived from adult neural stem cells. *Neuropsychopharmacology* 2010; **35**: 893-903.

Bingham B, Liu D, Wood A, Cho S. Ischemia-stimulated neurogenesis is regulated by proliferation, migration, differentiation and caspase activation of hippocampal precursor cells. *Brain Res*. 2005; **1058**: 167-177.

Brown J, Cooper-Kuhn C, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2003; **17**: 2042-2046.

Chan PH, Fishman RA, Longer S, Chan S and Yu A: Cellular and molecular effects of polyunsaturated fatty acids in brain ischemia and injury. *Prog Brain Res* 1985; **63**: 227-235.

Chang LW, Tiemeyer T M, Wenger GR, McMillan DE. Neuropathology of mouse hippocampus in acute trimethyltin intoxication. *Neurobehavioral toxicology and teratology* 1982; **4**: 149-156.

Chen S, Pickard JD, Harris NG. Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. *Exp Neurol*. 2003; **182**: 87-102.

Christie KJ, Turnley AM. Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain. *Front Cell Neurosci*. 2012; **6**: 70

Dash PK, Mach SA, Moore AN. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. *The Journal of neuroscience Research* 2001; **63**: 313-319.

Douen AG, Dong L, Vanance S, Munger R, Hogan MJ, Thompson CS, Hakim AM. Regulation of nestin expression after cortical ablation in adult rat brain. *Brain Res*. 2004; **1008**: 139-146.

Erickson CA, Stigler KA, Posey DJ, McDougale CJ. Aripiprazole in autism spectrum disorders and fragile X syndrome. *Neurotherapeutics* 2010; **7**: 258-263.

Fiedorowicz A, Figiel I, Kaminska B, Zaremba M, Wilk S, Oderfeld-Nowak B. Dentate granule neuron apoptosis and glia activation in murine hippocampus induced by trimethyltin exposure. *Brain Res*. 2001; **912**: 116-27.

Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Poser RG, Ransohoff J. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* 1978; **9**(5): 445-447.

Fountoulakis KN, Vieta E, Schmidt F. Aripiprazole monotherapy in the treatment of bipolar disorder: a meta-analysis. *Journal of Affective Disorders* 2011; **133**: 361-370.

Franklin KBJ, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. 1977

Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci.* 2004; **7**: 1233-1241.

Goodnick PJ, Jerry JM. Aripiprazole: profile on efficacy and safety. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2002; **3**: 1773-1781.

Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 1997; **17**: 2492-2498.

Gu W, Brännström T, Wester P. Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2000; **20**: 1166-1173.

Halim ND, Weickert CS, McClintock BW, Weinberger DR, Lipska BK. Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 2004; **29**: 1063-1069.

Harry GJ, McPherson CA, Wine RN, Atkinson K, Lefebvre d'Hellencourt C. Trimethyltin-induced neurogenesis in the murine hippocampus. *Neurotoxicity Research* 2004; **5**: 623-627.

Hastings NB, Gould E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol.* 1999; **413**: 146-154.

Hirose T, Mamiya N, Yamada S, Taguti M, Kameyama T, Kikuti T. The antipsychotic drug aripiprazole (ABILIFY®) *Folia Pharmacol. Jpn.* 2006 ; **128**: 331-345.

Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in parkinson disease. *Nature Neuroscience* 2004; **7**: 726-735.

Itoh T, Satou T, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito H. The novel free radical scavenger, edaravone, increases neural stem cell number around the area of damage following rat traumatic brain injury. *Neurotox Res.* 2009; **16**: 378-389.

Jacobs BL, van Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry.* 2000; **5**: 262-269.

Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America* 2001; **98**: 4710-4715.

Kawada K, Yoneyama M, Nagashima R, Ogita K. In vivo acute treatment with trimethyltin chloride causes neuronal degeneration in the murine olfactory bulb and anterior olfactory nucleus by different cascades in each region. *Journal of Neuroscience Research* 2008; **86**:1635-1646.

Keck PE, McElroy SL. Aripiprazole: a partial dopamine D2 receptor agonist antipsychotic. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2003; **12**: 655–662.

Kee NJ, Preston E, Wojtowicz JM. Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Exp Brain research* 2001; **136**: 313-320.

Keilhoff G, Grecksch G, Becker A. Haloperidol normalized prenatal vitamin D depletion-induced reduction of hippocampal cell proliferation in adult rats. *Neuroscience Letters* 2010a; **476**: 94-98.

Keilhoff G, Grecksch G, Bernstein HG, Roskoden T, Becker A. Risperidone and haloperidol promote survival of stem cells in the rat hippocampus. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 2010b; **260**: 151-162.

Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol.* 2002; **52**: 135-143.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 1997; **386**: 493–495.

Kikuchi K, Uchikado H, Miyagi N, Morimoto Y, Ito T, Tancharoen S, Miura N, Miyata K, Sakamoto R, Kikuchi C, Iida N, Shiomi N, Kuramoto T, Kawahara K. Beyond neurological disease: new targets for edaravone. *Int J Mol Med.* 2011; **28**: 899-906.

Kikuchi T, Hirose T, Nakai T. Aripiprazole dopamine D2 receptor partialagonist antipsychotic schizophrenia. *Jpn J Clin Psychiatry* 2005; **34(4)**: 461-468

Kikuta M, Shiba T, Yoneyama M, Kawada K, Yamaguchi T, Hinoi E, Yoneda Y, Ogita K. In vivo and in vitro treatment with edaravone promotes proliferation of neural progenitor cells generated following neuronal loss in the mouse dentate gyrus. *Journal of Pharmacological Sciences* 2013; **121**: 74-83.

Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1984; **62**: 209-218.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.* 1996; **16**: 2027-2033.

Lewén A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *Journal of Neurotrauma* 2000; **17**: 879-890.

Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. Increased Neurogenesis in the Dentate Gyrus After Transient Global Ischemia in Gerbils. *The Journal of neuroscience* 1998; **18**: 7768-7778.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 2000; **20**: 9104-9110.

Mizuno A, Umemura K, Nakashima M. Inhibitory effect of MCI-186, a free radical scavenger, on cerebral ischemia following rat middle cerebral artery occlusion. *Gen Pharmacol.* 1998; **30**: 575-578.

Moon C, Ahn M, Kim S, Jin JK, Sim KB, Kim HM, Lee MY, Shin T. Temporal patterns of the embryonic intermediate filaments nestin and vimentin expression in the cerebral cortex of adult rats after cryoinjury. *Brain Res.* 2004; **1028**: 238-242.



Nagashima R, Sano S, Nguyen QH, Shiba T, Ogita K. Enhanced expression of glutathione S-transferase in the hippocampus following acute treatment with TMT in vivo. *J Pharmacol Sci.* 2010; **113**: 267-270.

Nguyen QH, Nakamura Y, Kuramoto N, Yoneyama M, Nagashima R, Shiba T, Yamaguchi T, Hasebe S, Ogita K. Indomethacin ameliorates trimethyltin-induced neuronal damage in vivo by attenuating oxidative stress in the dentate gyrus of mice. *Biol Pharm Bull.* 2011; **34**: 1856-1863.

Oderfeld-Nowak B, Zaremba M. GM1 ganglioside potentiates trimethyltin-induced expression of interleukin-1 beta and the nerve growth factor in reactive astrocytes in the rat hippocampus: an immunocytochemical study. *Neurochem Res.* 1998; **23**: 443-453.

Ogita K, Nitta Y, Watanabe M, Nakatani Y, Nishiyama N, Sugiyama C, Yoneda Y. In vivo activation of c-Jun N-terminal kinase signaling cascade prior to granule cell death induced by trimethyltin in the dentate gyrus of mice. *Neuropharmacology* 2004; **47**: 619-630.

Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C, Higuchi K, Yoneyama M, Yoneda Y. Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model. *J Neurosci Res.* 2005; **82**: 609-621

Owen R, Kamen L, Manos G, McQuade RD, Carson WH, Aman MG. A placebo-controlled, fixed-dose study of aripiprazole in children and adolescents with irritability associated with autistic disorder. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 2009; **48**:1110-1119.

Parent JM. Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog Brain Res.* 2007; **163**: 529-540.

Reuhl KR, Smallridge EA, Chang LW, Mackenzie BA. Developmental effects of trimethyltin intoxication in the neonatal mouse. I. Light microscopic studies. *Neurotoxicology* 1983; **4**: 19-28.

Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; **255**: 1707-1710.

Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A.* 1992; **89**: 8591-8595.

Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci.* 2001; **21**: 7153-7160.

Shapiro DA, Renock S, Arrington E, Chiodo LA, Liu LX, Sibley DR, Roth BL, Mailman R. Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. *Neuropsychopharmacology* 2003; **28**:1400-1411.

Shintani N, Ogita K, Hashimoto H, Baba A. Recent Studies on the Trimethyltin Actions in Central Nervous System. *Yakugaku Zasshi* 2007; **127**: 451-461.

Shuto M, Higuchi K, Sugiyama C, Yoneyama M, Kuramoto N, Nagashima R, Kawada K, Ogita K. Endogenous and exogenous glucocorticoids prevent trimethyltin from causing neuronal degeneration of the mouse brain in vivo: involvement of oxidative stress pathways. *Journal of Pharmacological Sciences* 2009a; **110**: 424-436.

Shuto M, Seko K, Kuramoto N, Sugiyama C, Kawada K, Yoneyama M, Nagashima R, Ogita K. Activation of c-Jun N-terminal kinase cascades is involved in part of the neuronal degeneration induced by trimethyltin in cortical neurons of mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 2009b; **109**: 60-70.

Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 2006; **54**: 805-814.

Taupin P, Gage FH. Adult neurogenesis and neuronal stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res.* 2002; **69**: 745-749.

Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ, Okano H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2003; **23**: 292-301.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999; **2**: 266-270

Wakade CG, Mahadik SP, Waller JL, Chiu FC. Atypical neuroleptics stimulate neurogenesis in adult rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 2002; **69**:72-79.

Wang HD, Dunnavant FD, Jarman T, Deutch AY. Effects of antipsychotic drugs on neurogenesis in the forebrain of the adult rat. *Neuropsychopharmacology* 2004; **29**:1230-1238.

Watanabe T, Tanaka M, Watanabe K, Takamatu Y, Tobe A. Research and Development of the Free Radical Scavenger Edaravone as a Neuroprotectant. *Yakugaku Zasshi* . 2004; **124**: 99-111

Watanabe T, Tahara M, Toda S. The novel antioxidant edaravone: from bench to bedside. *Cardiovasc Ther.* 2008; **26**: 101-114.

Wojcik-Stanaszek L, Sypecka J, Szymczak P, Ziemka-Nalecz M, Khrestchatisky M, Rivera S, Zalewska T. The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global fore-brain ischemia. *PLoS One* 2011; **6**: e22465.

Xia L, Deloménie C, David I, Rainer Q, Marouard M, Delacroix H, David DJ, Gardier AM, Guilloux JP. Ventral hippocampal molecular pathways and impaired neurogenesis associated with 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors disruption in mice. *Neuroscience Letters* 2012; **521**:20-25.

Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, Mitsuka M, Saito KI, Kogure K. Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 1997; **762**: 240-242.

Yamashita T, Shoge M, Oda E, Yamamoto Y, Giddings JC, Kashiwagi S, Suematsu M, Yamamoto J. The free-radical scavenger, edaravone, augments NO release from vascular cells and platelets after laser-induced, acute endothelial injury in vivo. *Platelets.* 2006; **17**: 201-206.

Yildiz A, Vieta E, Leucht S, Baldessarini RJ. Efficacy of antimanic treatments: meta-analysis of randomized, controlled trials. *Neuropsychopharmacology* 2011; **36**:375-389.

Yoneyama M, Kawada K, Gotoh Y, Shiba T, Ogita K. Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochemistry International* 2010a; **56**: 740-746.

Yoneyama M, Kawada K, Ogita K. Enhanced neurogenesis in the olfactory bulb in adult mice after injury induced by acute treatment with trimethyltin. *Journal of Neuroscience Research* 2010b; **88**: 1242-1251.

Yoneyama M, Kawada K, Gotoh Y, Shiba T, Ogita K. Endogenous nitric oxide generation linked to ryanodine receptors activates cyclic GMP/protein kinase G pathway for cell proliferation of neural stem/progenitor cells derived from embryonic hippocampus. *J Pharmacol Sci.* 2011; **115**: 182-195.

Yoshida H, Yanai H, Namiki Y, Fukatsu-Sasaki K, Furutani N, Tada N. Neuroprotective effects of edaravone: a novel free radical scavenger in cerebrovascular injury. *CNS Drug rev.* 2006; **12**: 9-20.

Zhang P, Li W, Li L, Wang N, Li X, Gao M, Zheng J, Lei S, Chen X, Lu H, Lui Y. Treatment with edaravone attenuates ischemic brain injury and inhibits neurogenesis in the subventricular zone of adult rats after focal cerebral ischemic and reperfusion injury. *Neuroscience* 2012; **201**: 297-306.