

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2009

課題番号：18390392

研究課題名（和文） 霊長類に特異的なニューロン新生の制御機構

研究課題名（英文） Mechanism of adult neurogenesis specific for primates

研究代表者

山嶋 哲盛 (YAMASHIMA TETSUMORI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：60135077

研究成果の概要（和文）：

多価不飽和脂肪酸のシグナルを受け臍臓でインスリン分泌に関わる GPR40 が脳でも発現していることに注目し、成体脳ニューロン新生の研究を進めた。その結果、1) gpr40 遺伝子を導入した PC12 細胞はアラキドン酸に対して興奮する。2) 虚血サル海馬において、ニューロン新生がピークとなる時期に GPR40 は発現を増幅し、新生ニッチに局在する。さらに、3) GPR40 を持つ骨髄幹細胞が、DHA でその発現を増幅しつつ神経細胞へと分化する。同様に、4) ラット神経幹細胞に gpr40 遺伝子を導入すると、DHA によって神経細胞に分化することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

G protein-coupled receptor 40 (GPR40), which is preferentially expressed in pancreatic  $\beta$ -cells, mediates the majority of the effects of free fatty acids on the insulin secretion from rodents to humans. However, its role in another abundant organ 'brain' still remains grossly unknown. The present project focusing primate adult monkey brains after transient global ischemia disclosed that GPR40 may be one of the candidates that can explain the effects of PUFA upon neuronal differentiation and synaptogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2007 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：霊長類、成体脳、海馬、ニューロン新生、GPR40、多価不飽和脂肪酸

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの研究でサル脳に 20 分間の虚血負荷をかけると、成体海馬において、実験 9

日目をピークに神経幹細胞が増加し、実験 2 週目に新生ニューロンが活発に誕生することがわかっていた。しかも、これらの神

神経幹細胞や新生ニューロンは虚血後1週目をピークに歯状回に新生する毛細血管の外膜に由来していた。海馬の神経幹細胞の発生母地としては従来、血管の関与が疑われていたが、研究代表者は毛細血管の外膜に集積する神経幹細胞は、実は、血流に乗って運ばれて来た骨髄の間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells : MSC) ではないかと推測した。

## 2. 研究の目的

脳再生療法を開発するためのツールとして、現在、神経系前駆細胞(neural progenitor cells : NPCs)は世界的に注目され多数の研究がなされているが、霊長類の脳を対象とした研究は少ない。研究代表者の従来からの研究からは霊長類と下等哺乳類との間にはかなりの差異があった。GPR40 に着目し、霊長類に特異的な成体脳ニューロン新生のメカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

- 1) ヒトの GPR40 蛋白に対するポリクローナル抗体を作成し、ウエスタンブロットと免疫組織化学による検索を行う。
- 2) PC12 細胞に gpr40 遺伝子を導入し、Argus カメラで Ca<sup>2+</sup>イメージングを行う。
- 3) 正常および脳虚血サルを用いて、成体脳でもニューロン新生がみられる海馬における GPR40 の発現について、海馬切片を免疫蛍光染色し共焦点顕微鏡で観察する。

## 4. 研究成果

研究代表者のサル脳虚血モデルにおいては、同じ海馬内にありながら CA1 では虚血後1週目に神経細胞死が生じる一方、隣接する歯状回では2週目にニューロン新生がみられる。この新生ニューロンは、記憶や情動の機序を解明し高次機能障害から脳を再生させるツールとして注目されている。

最近の網羅的解析でサル海馬の神経幹細胞に DSCAM や MMP2/9、GPR40 などを見つけた。ことに、海馬の新生ニューロンにおける GPR40 の発見は世界初であったため、昨年 Prog Neurobiol の表紙に紹介された。成体脳に起きるニューロン新生は、記憶や情動の分子機構を解明する上で注目されているが、その詳細は不明である。研究代表者は、高次脳機能障害患者に PUFA (poly unsaturated fatty acids) を服用させると、記憶力が改善することを見出した。そこで、PUFA のシグナルを受け隣臓でインスリン

分泌に関わる G-protein coupled receptor 40 (GPR40) の遺伝子が脳でも発現していることに注目し、ニューロン新生の研究を進めた。

その結果、1) gpr40 遺伝子を導入した PC12 細胞は PUFA に対して興奮すること。また、2) 虚血サル海馬において、ニューロン新生がピークとなる時期に GPR40 の発現が増加し、新生ニッチに局在することを発見した (Hippocampus, 18:326, '08; Prog Neurobiol 84:105, '08)。さらに、3) GPR40 を持つ骨髄の多機能幹細胞 (MSC) が、PUFA 含有培養液でその発現を増幅しつつ神経細胞へと分化したしかも、4) 通常の培養液に微量の PUFA (DHA) を添加することで、骨髄 MSC は GPR40 の発現増加と同期して神経細胞に分化してゆくこともわかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

- 1) The role of lysosomal rupture in neuronal death. Yamashima T, Oikawa S. Prog Neurobiol. 89:343-358, 2009. (査読有)
- 2) Expression of fatty acid binding proteins in adult hippocampal neurogenic niche of postischemic monkeys. Boneva NB, Kaplamadzhiiev DB, Sahara S, Kikuchi H, Pyko IV, Kikuchi M, Tonchev AB, Yamashima T. Hippocampus. 2009. [Epub ahead of print] (査読有)
- 3) Caspase Inhibitor, ZVAD-fmk, facilitates engraftment of donor hematopoietic stem cells in intra-bone marrow transplantation. Imai Y, Adachi Y, Shi M, Shima C, Yanai S, Okigaki M, Yamashima T, Kaneko K, Ikehara S. Stem Cells Dev. 19:461-468, 2009. (査読有)
- 4) Cellular localization of epidermal-type and brain-type fatty acid-binding proteins in adult hippocampus and their response to cerebral ischemia. Ma D, Zhang M, Mori Y, Yao C, Larsen CP, Yamashima T, Zhou L. Hippocampus. 2009. PMID: 19623607 [Epub ahead of print] (査読有)
- 5) Anomaly in aortic arch alters pathological outcome of transient global ischemia in rhesus macaques. Hara K, Yasuhara T, Maki M, Matsukawa N, Yu G, Xu L, Tambrallo L, Rodriguez NA, Stern DM, Yamashima T, Buccafusco JJ,

- Kawase T, Hess DC, Borlongan CV. *Brain Res.* 1286:185-191, 2009. (査読有)
- 6) Morphological changes in the visual pathway induced by experimental glaucoma in Japanese monkeys.  
Ito Y, Shimazawa M, Chen YN, Tsuruma K, Yamashima T, Araie M, Hara H. *Exp Eye Res.* 89(2):246-255, 2009. (査読有)
  - 7) Proteomic identification of carbonylated proteins in the monkey hippocampus after ischemia-reperfusion.  
Oikawa S, Yamada T, Minohata T, Kobayashi H, Furukawa A, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Murata M, Kikuchi M, Yamashima T. *Free Radic Biol Med.*, 46(11):1472-7, 2009. (査読有)
  - 8) Expression of neurotrophin receptors by proliferating glia in postischemic hippocampal CA1 sector of adult monkeys.  
Tonchev AB, Boneva NB, Kaplamadzhiev DB, Kikuchi M, Mori Y, Sahara S, Yamashima T. *J Neuroimmunol*, 205(1-2):20-24, 2008. (査読有)
  - 9) Expression of matrix metalloproteinases in the neurogenic niche of the adult monkey hippocampus after ischemia. Lu L, Tonchev AB, Kaplamadzhiev DB, Boneva NB, Mori Y, Sahara S, Ma D, Nakaya MA, Kikuchi M, Yamashima T. *Hippocampus.* 18(10):1074-1084, 2008. (査読有)
  - 10) A putative link of PUFA, GPR40 and adult-born hippocampal neurons for memory., Yamashima T. *Prog Neurobiol.*, 84(2):105-115, 2008. (査読有)
  - 11) Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the neurogenic niche of adult monkey hippocampus. Ma D, Lu L, Boneva NB, Warashina S, Kaplamadzhiev DB, Mori Y, Nakaya MA, Kikuchi M, Tonchev AB, Okano H, Yamashima T. *Hippocampus.* 18(3):326-333, 2008. (査読有)
  - 12) Hippocampal CA1 cell loss in a non-human primate model of transient global ischemia: a pilot study., Hara K, Yasuhara T, Matsukawa N, Maki M, Masuda T, Yu G, Xu L, Tambrallo L, Rodriguez NA, Stern DM, Kawase T, Yamashima T, Buccafusco JJ, Hess DC, Borlongan CV., *Brain Res Bull.* 74(1-3):164-171, 2007. (査読有)
  - 13) Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the CNS of adult monkeys., Ma D, Tao B, Warashina S, Kotani S, Lu L, Kaplamadzhiev DB, Mori Y, Tonchev AB, Yamashima T. *Neurosci Res.* 58(4):394-401, 2007. (査読有)
  - 14) "Transcribing" postischemic neurogenesis: a tale revealing hopes of adult brain repair., Tonchev AB, Yamashima T. *J Mol Med.* 85(6):539-542, 2007. (査読有)
  - 15) Inhibition of axonal outgrowth in the tumor environment: involvement of class 3 semaphorins., Vachkov H, Huang X, Yamada Y, Tonchev A, Yamashima T, Kato S, Takakura N., *Cancer Sci.* 98(8):1192-1197, 2007. (査読有)
  - 16) Distribution and phenotype of proliferating cells in the forebrain of adult macaque monkeys after transient global cerebral ischemia., Tonchev AB, Yamashima T, Chaldakov GN., *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 191:1-106, 2007. (査読有)
  - 17) Adult hippocampal neurogenesis in rodents and primates: endogenous, enhanced, and engrafted., Yamashima T, Tonchev AB, Yukie M., *Rev Neurosci.* 18(1):67-82, 2007. (査読有)
  - 18) Differential response to ischemia in adjacent hippocampal sectors: neuronal death in CA1 versus neurogenesis in dentate gyrus., Yamashima T, Tonchev A, Borlongan CV., *Biotech J.* 2(5):596-607, 2007. (査読有)
  - 19) Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the progenitor cell niche of adult monkey subventricular zone. Tonchev AB, Yamashima T, Guo J, Chaldakov GN, Takakura N., *Neuroscience.* 144(4):1425-1435, 2007. (査読有)
  - 20) Implication of "Down syndrome cell adhesion molecule" in the hippocampal neurogenesis of ischemic monkeys., Yamashima T, Popivanova BK, Guo J, Kotani S, Wakayama T, Iseki S, Sawamoto K, Okano H, Fujii C, Mukaida N, Tonchev AB., *Hippocampus.* 16(11):924-935, 2006. (査読有)
  - 21) Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction., Kotani S, Sakaguchi E, Warashina S, Matsukawa N, Ishikura Y, Kiso Y, Sakakibara M, Yoshimoto T, Guo J, Yamashima T. *Neurosci Res.* 56(2):159-164, 2006. (査読有)
  - 22) Impairments in recognition memory for object and for location after transient brain ischemia in monkeys., Yukie M, Yamaguchi K, Yamashima T. *Rev Neurosci.* 17(1):201-214, 2006. (査読有)
  - 23) Transcription factor protein expression patterns by neural or neuronal progenitor cells of adult monkey subventricular zone., Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H., *Neuroscience.* 139(4):1355-1367, 2006. (査読有)
  - 24) Differential neurogenic potential of

progenitor cells in dentate gyrus and CA1 sector of the postischemic adult monkey hippocampus., Tonchev AB, Yamashima T., Exp Neurol. 198(1):101-113, 2006. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 山嶋哲盛、及川伸二、小林 果 第32回日本神経科学会 2009年9月16日 虚血性神経細胞死におけるリソソーム膜の破裂機構—新カルパイン-カテプシン仮説の提唱— 名古屋 国際会議場 愛知県
- 2) 山嶋哲盛 第36回 日本脳科学会 成体サル海馬におけるニューロン新生とGPR40 2009年6月12日 金沢 金沢大学医学部記念館 石川県
- 3) 山嶋哲盛 第17回海馬と高次脳機能学会 「霊長類に特異的な神経細胞の生と死」—20年間のサル研究から— 2008年11月23日 金沢 創作の森交流研修棟 石川県
- 4) 原 晃一、安原隆雄、松川則之、Nancy A. Rodrigue、山嶋哲盛、Jerry J. Buccafusco、河瀬 文武、David C Hess、Cesario V. Borlongan リーサスモンキーを用いた一過性全脳虚血モデルの作製第31回日本神経科学大会 2008年7月11日 東京 東京フォーラム 東京都
- 5) 小林 果、山田智子、山嶋哲盛、及川伸二 第31回日本神経科学大会 プロテオミクス解析を用いた虚血再灌流後のサル海馬におけるカルボニル化蛋白質の同定 2008年7月11日 東京 東京フォーラム 東京都
- 6) 山嶋哲盛 PUFAはGPR40を介して霊長類のニューロン新生に役立つ 第31回日本神経科学大会シンポジウムSY3A-G「多価不飽和脂肪酸とニューロン機能」 2008年7月11日 東京 東京フォーラム 東京都
- 7) 陸 莉、山嶋哲盛 第31回日本神経科学大会 虚血サル海馬におけるニューロン新生とマトリックスメタロプロテアーゼ 2008年7月9日 東京 東京フォーラム 東京都
- 8) 山嶋哲盛 第7回成体脳のニューロン新生懇談会 「サル海馬の新生細胞は遊離脂肪酸レセプターのGPR40を発現する：何故？」 2008年3月22日 東京 東京大学医学部 東京都
- 9) 山嶋哲盛 虚血サル海馬におけるニューロンの生と死 科学研究費補助金基盤研究(A) 研究集会「海馬における時間空間情報統合の比較心理学的研究」および「海馬の異なる情報統合機能に関する比較 心理学的研究」2008年2月1日 東

京 慶應大学文学部 東京都

- 10) 山嶋哲盛、Popivanova B.、Guo J. 向田直史 虚血サル海馬のニューロン新生とDSCAM 第16回海馬と高次脳機能学会 2007年11月24日 奈良 奈良県文化会館 奈良県
- 11) 山嶋哲盛 虚血サル海馬のニューロン新生とDSCAM 第30回日本神経科学大会 2007年9月11日 横浜 パシフィコ横浜 神奈川県

[図書] (計 1 件)

Role of  $\mu$ -calpain and lysosomal cathepsins in hippocampal neuronal necrosis after transient global ischemia in primates. Tonchev AB, Yamashima T., In Acute Neuronal Injury. Edited by D. Fujikawa. Springer Science Business Media, LLC, pages. 145-153, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：GPR40 陽性骨髄幹細胞  
発明者：山嶋哲盛  
権利者：金沢大学  
種類：実用新案特許  
番号：2010-000736  
出願年月日：2010. 1. 5  
国内外の別：国内

名称：GPR40 を利用した脳機能改善薬の評価方法  
発明者：山嶋哲盛  
権利者：金沢大学  
種類：実用新案特許  
番号：2007-320976  
出願年月日：2007. 12. 12  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等  
<http://web.kanazawa-u.ac.jp/%7Emed66/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山嶋 哲盛(Yamashima Tetsumori)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：60135077

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし