



## Regulation by commensal bacteria of neurogenesis in the subventricular zone of adult mouse brain

Sawada, Naoki

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7249号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007249>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

Regulation by commensal bacteria of neurogenesis in the subventricular zone of adult mouse brain

成体マウス脳の脳室下帯における神経新生の常在細菌による制御

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
耳鼻咽喉科頭頸部外科学  
(指導教員: 丹生健一教授)

澤田 直樹

(目的)

成体マウスにおいて、嗅球の神経回路を構成する介在神経細胞（顆粒細胞や傍系球体細胞）は、側脳室に面した脳室下帯（subventricular zone, SVZ）から供給される新生神経細胞と常に入れ替わりが起きていることが知られる。SVZにはtype B1 cellと呼ばれる神経幹細胞が存在しており、この神経幹細胞はSVZにおいて一過性増殖細胞（type C cell）、さらには神経芽細胞（type A cell）へと分化していく。このようにして産生された神経芽細胞は吻側移動経路（rostral migratory stream）に沿って分化しながら嗅球に向かって移動し、最終的には新生神経細胞として嗅球の神経回路へと取り込まれて行く。

近年、常在細菌は中枢神経系の機能制御において重要な役割を担っている可能性が指摘されており、成体での神経新生における常在細菌の役割についても注目されている。実際、これまでにも海馬の歯状回の顆粒細胞下層においては、常在細菌が神経新生を制御している可能性が報告されている。しかしながら、現時点においてSVZでの神経新生と常在細菌の関係性については解明されていない。

そこで本研究ではSVZでの神経新生における常在細菌の関与を明らかにすべく検討を行った。

(方法及び結果)

本研究ではアンピシリン（ABPC）、バンコマイシン（VCM）、メトロニダゾール（MNZ）、ネオマイシン（NM）を混合（Abx）または単剤で投与した抗生素投与マウス、無菌（germ-free, GF）マウス、特定病原体除去（specific pathogen-free, SPF）マウスと同じケージで飼育されたGFマウス（co-housed GF, co-GF）を作製し解析に用いた。コントロール（Ctrl）マウスにはSPFマ

ウスを使用した。抗生素投与マウスは4週齢から9週齢まで抗生素を飲水に溶解し経口投与した。co-GFマウスは4週齢から9週齢までGFマウスをSPF環境下にてSPFマウスと同ケージで飼育した。

本研究ではまず、抗生素の投与がSVZにおける神経新生にどのような影響を与えるかについて明らかにすることを目的とした解析を行った。チミジンのアナログであるプロモデオキシウリジン(BrdU)は細胞周期のS期においてDNAに取り込まれ、新しく増殖した細胞を標識する目的で広く用いられる。そこでBrdUをCtrlマウスおよびAbxマウスに腹腔内投与(IP)し、4時間、8時間、24時間後にSVZのBrdU陽性細胞数を免疫組織化学染色法により評価した。その結果、CtrlマウスおよびAbxマウスのどちらにおいてもSVZにおけるBrdU陽性細胞数は時間経過とともに増加していることが明らかとなった。しかし、AbxマウスのSVZにおけるBrdU陽性細胞数はCtrlマウスと比較しBrdU IP 4時間後および8時間後で有意に減少していた。このことから、マウスへの抗生素投与はSVZにおける神経前駆細胞の増殖活性を抑制する可能性が明らかとなった。

しかし、この抗生素投与によるSVZへのBrdU取り込みの減少は、SVZにおいて分裂する神経前駆細胞の構成が抗生素投与によって変化したことによる可能性も考えられた。そこでSVZにおいて神経幹細胞のマーカーとして知られるglial fibrillary acidic protein (GFAP)、一過性増殖細胞のマーカーとして知られるmammalian achaete-scute homolog 1 (Mash1)、神経芽細胞のマーカーとして知られるdoublecortin (DCX)に対する抗体を用いた免疫組織化学染色による評価を行った。その結果、GFAP陽性細胞数、Mash1陽性細胞数およびDCX陽性細胞数はいずれもCtrlマウスとAbxマウスのSVZにおいて有意な違

いを認めなかった。従って抗生素の投与はSVZにおける神経前駆細胞の構成に影響を与えないことが明らかとなった。

抗生素の投与による神経前駆細胞の増殖活性の抑制は、嗅球への新生神経細胞の供給を減少させている可能性がある。そこで、その点についても確認することを目的として、7週齢の時点でBrdUをIPし、その後14日間BrdUを飲水に混ぜ経口投与したマウスを用い、嗅球の新生神経細胞数を評価した。神経細胞のマーカーであるneuronal nuclear antigen (NeuN)とBrdUの二重染色で評価したところ、嗅球切片における単位面積あたりのNeuN陽性細胞数はCtrlマウスとAbxマウスとで違いを認めなかった。しかしその一方で、BrdU陽性かつNeuN陽性である細胞数はCtrlマウスと比較しAbxマウスで有意に減少していた。この結果はマウスの嗅球において、新しく生まれた神経細胞の供給が抗生素の投与により減少したことを示している。

以上の実験結果から、マウスへの抗生素投与はSVZにおける神経新生を抑制し、嗅球への新生神経細胞の供給を減少させている可能性が考えられた。しかし、これらの結果は常在細菌の有無だけではなく、抗生素のside-effectによる可能性も考えられる。そこで、常在細菌の有無がSVZにおけるBrdUの取り込みを制御するか否かについて明らかにすることを目的として、GFマウスを用い、BrdU IP 4時間後のSVZにおけるBrdU陽性細胞数を評価した。その結果、SVZのBrdU陽性細胞数はCtrlマウスと比較しGFマウスで有意に減少していることが明らかとなった。続いて、GFマウスをSPFマウス(Ctrl)と同じケージで飼育することによりGFマウスにSPFマウス(Ctrl)の細菌を移行させたco-GFマウスを用い評価した。BrdU IP 4時間後にco-GFマウスのSVZについて観察を行ったところ、BrdU陽性細胞数はCtrlマウスと同程度まで戻る事が判明した。これらの結果から、常在細菌はSVZにおけるBrdUの取り込みを促進すると考

えられた。つまり、常在細菌が SVZ における神経前駆細胞の増殖を促進させる可能性が明らかとなった。

最後に、混合投与された抗生素のうち、どの抗生素が SVZ における神経前駆細胞の増殖活性を抑制しているかを調べるために、各抗生素を単剤投与したマウスを用いた評価を行った。各マウスへの BrdU IP 4 時間後に評価を行ったところ、Ctrl マウスと比較し、ABPC 投与マウスの SVZ における BrdU 陽性細胞数は有意に減少していた。また、VCM 投与マウスでは有意とは言えないまでも減少傾向であった。MNZ 投与マウスおよび NM 投与マウスでは SVZ における BrdU 陽性細胞数は Ctrl マウスと同程度であった。以上のことから、ABPC に感受性のある常在細菌が SVZ における BrdU の取り込みを促進させていることが示唆された。

#### (結論)

本研究では、抗生素投与マウスや GF マウスを用いた検討より、常在細菌が SVZ における神経新生を促進させるが、神経前駆細胞の構成には影響を与えない可能性を示した。また、抗生素の中でも ABPC 投与により SVZ における神経新生が抑制されることを示した。以上のことから、ABPC 感受性の常在細菌が成体マウス脳の SVZ における神経新生を促進させる可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2794 号	氏名	澤田 直樹
論文題目 Title of Dissertation	<p>Regulation by commensal bacteria of neurogenesis in the subventricular zone of adult mouse brain</p> <p>成体マウス脳の脳室下帯における神経新生の常在細菌による制御</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 古屋 敦介</p> <p>副査 Vice-examiner 今木 琢一</p> <p>副査 Vice-examiner 古森 孝美</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

### 【目的】

成体マウスにおいて、嗅球の神経回路を構成する介在神経細胞（顆粒細胞や傍系球体細胞）は、脳室下帯 (subventricular zone, SVZ) から供給される神経細胞と常に入れ替わりが起きている。近年、常在細菌は中枢神経系の機能制御において重要な役割を担っている可能性が指摘されているが、SVZ での神経新生における常在細菌の役割については解明されていない。そこで本研究では、SVZ での神経新生における常在細菌の関与について解明を目指した。

### 【方法及び結果】

アンピシリン (ABPC)、バンコマイシン (VCM)、メトロニダゾール (MNZ)、ネオマイシン (NM) を混合 (Abx) または単剤で投与した抗生剤投与マウス、無菌 (germ-free, GF) マウス、特定病原体除去 (specific pathogen-free, SPF) マウスと同じケージで飼育した GF マウス (co-housed GF, co-GF) を解析に用いた。コントロール (Ctrl) マウスは SPF マウスを用いた。

まず、抗生剤投与が SVZ での神経新生に与える影響について解析した。プロモデオキシウリジン (BrdU) を Ctrl マウスおよび Abx マウスに腹腔内投与 (IP) し、4~24 時間後に SVZ の BrdU 陽性細胞数を免疫染色により評価した。その結果、Ctrl マウスと Abx マウスの SVZ における BrdU 陽性細胞数は時間経過とともに増加していたが、BrdU IP 4 時間後および 8 時間後では Abx マウスの BrdU 陽性細胞数は Ctrl マウスに比べ有意に減少していた。この結果は抗生剤投与が SVZ における神経前駆細胞の増殖活性を抑制する可能性を示している。しかし、抗生剤投与による BrdU 陽性細胞数の減少は、SVZ に存在する各分化段階の神経前駆細胞数の変化による可能性もある。そこで SVZ を神経幹細胞、神経幹細胞から分化した一過性増殖細胞、さらに分化の進んだ神経芽細胞をそれぞれのマーカーで免疫染色し、評価した。その結果、各細胞の数は Ctrl マウスと Abx マウスとで有意な違いを認めず、抗生剤投与は SVZ に存在する各分化段階の神経前駆細胞の数に影響しないことが判明した。

抗生剤投与による神経前駆細胞の増殖活性の抑制は、嗅球への新生神経細胞の供給を減少させている可能性がある。そこで BrdU を IP し、その後 14 日間 BrdU を経口投与させたマウスを用い、嗅球での新生神経細胞数を評価した。その結果、神経細胞のマーカーである neuronal nuclear antigen (NeuN) の陽性細胞数は Ctrl マウスと Abx マウスとで違いを認めなかったが、BrdU 陽性かつ NeuN 陽性である細胞数は Ctrl マウスと比較し Abx マウスで有意に減少していた。このことから抗生剤投与は嗅球への新生神経細胞の供給を減少させることが明らかとなった。

以上の結果は常在細菌の有無だけではなく、抗生素の side-effect による可能性も考えられる。そこで GF マウスを用いた評価を行った。その結果、BrdU IP 4 時間後の SVZ における BrdU 陽性細胞数は、Ctrl マウスと比較し GF マウスでは有意に減少していた。一方で、SPF マウスの常在細菌が移行するといわれる co-GF マウスでは BrdU IP 4 時間後の SVZ における BrdU 陽性細胞数が Ctrl マウスと同程度まで戻っていた。従って、常在細菌が SVZ における神経前駆細胞の増殖を促進させることが確認できた。

最後に、抗生素を単剤投与し評価を行った。BrdU IP 4 時間後に評価を行ったところ、Ctrl マウスと比較し、ABPC 投与マウスの SVZ における BrdU 陽性細胞数は有意に減少していた。また、VCM 投与マウスでは有意とは言えないまでも減少傾向であった。MNZ 投与マウスおよび NM 投与マウスでは SVZ における BrdU 陽性細胞数は Ctrl マウスと同程度であった。以上より、ABPC に感受性のある常在細菌が SVZ における BrdU の取り込みを促進させていることが示唆された。

#### 【結論】

本研究では、抗生素投与マウスや GF マウスを用いた検討より、常在細菌が SVZ における神経新生を促進させるが、神経前駆細胞の構成には影響しないことを示した。また、抗生素の中でも ABPC 投与により SVZ における神経新生が抑制されることを示した。以上のことから、ABPC 感受性の常在細菌が成体マウス脳の SVZ における神経新生を促進させることが示唆された。

以上、本研究は、常在細菌が SVZ における神経新生を促進させることを明らかにしたものであり、成体脳における神経新生の制御メカニズムを理解する上で重要な貢献をしたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。