

脳回路の自己再生：大豆たん白質による増強

久恒辰博*

東京大学大学院新領域創成科学研究科

Regeneration of Neural Circuit: Role of Soy-Protein

Tatsuhiro HISATSUNE

Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Chiba 277-8562

ABSTRACT

We studied the effect of dietary soy protein on brain circuit regeneration in nestin-enhanced green fluorescent protein (nestin-GFP) mice. The mice were fed either a control (MF) or a soy protein-rich (SPR) diet for 14 days, and were supplied with bromodeoxyuridine (BrdU) during the last 10 days. The mice were killed and their brains dissected. Cerebral slices (40 micron) were cut by cryostat, and each slice was stained with both anti-GFP and anti-BrdU. The numbers of nestin-positive cells per 1 mm³ in the cerebral cortices of the MF and SP groups were 503 ± 70 and 569 ± 90, respectively. In addition, the frequencies for nestin-positive dividing cells per total dividing cells were 50% and 66% in the MF and SP groups, respectively. These results suggest that soy protein promotes the generation of neural precursor cells in the cerebral neocortex, thought to be the center of intelligence, and enhances the regeneration of neural circuits in the murine cerebral cortex. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 100-103, 2003.

Key words : soyprotein, regeneration, neural circuit, cerebral cortex

高齢社会を迎え、中高年齢者の心と体の健康を如何に維持するかが大事な問題となってきた。これまでは、発達期を過ぎると脳内で新たにニューロンが作られることはないと考えられてきた。しかし、近年のマウスやラットを用いた研究で、記憶の形成を担う海馬と匂いの情報を統合している嗅球では、発達期を過ぎてもニューロンの新生が起こっていることがわかってき

た。最近ではサルとヒトの海馬でもニューロン新生が起こっていることが判明し、大きな話題になっている。さらに、加齢などにより脳回路が傷んだ状態にあるとき、脳内にある神経幹細胞よりニューロンが再生し、脳機能が再生することも報告されている。本研究では、脳回路の再生を促す食事成分として大豆たん白質に注目し、成体脳の再生能力についてマウスを用いて検討を行った。

*〒277-8562 千葉県柏市柏の葉5-1-5

研究に使用したnestin-GFP Tgマウスは神経幹細胞に特異的に発現する中間径フィラメントであるnestinにGFP (Green Fluorescent protein; 緑色蛍光たん白質) が結合した遺伝子導入マウスである。つまり、緑色蛍光により、脳内において、簡便に神経幹細胞の所在を確認することができる。このマウスは、理化学研究所脳総合機能研究室の山口正洋博士によって樹立され、供与されたものである。

マウスへのbromodeoxy uridineの投与方法は以下のとおりである。bromodeoxy uridine (BrdU) はチミジンの類似分子で、DNA複製の際にチミジンの代わりにアデニンと塩基対を形成し、DNA二重鎖に取り込まれる。そこで、投与時に増殖中の細胞と、その細胞から分裂した細胞のマーカーとして一般的に用いられている。本研究では、それぞれの飼料で飼育された6週齢のnestin-GFP TgマウスにBrdU (Wako) を1日あたり200 mg/kg body weightとなるように飲み水に溶解して、10日間投与した。

BrdU投与終了3日後、灌流固定して脳を摘出し、先に記載した方法で凍結切片を作製し保存した。染色はすべて浮遊法で行った。まずTBS (135 M NaCl, 2.68 M KCl, 25 mM Tris) で切片を3回洗浄し、10 mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中に入れ90℃で5分間加熱した。室温に下がるまで放置し、TBSで洗浄した。次に1 M HClで37℃で30分加熱し、ホウ酸緩衝液 (pH8.4) とTBSで洗浄して中和させた。そしてblocking solution (5% NGS, 0.3% TritonX-100 in TBS) に入れて常温で30分間穏やかに振盪させた。blocking solutionで希釈した一次抗体に入れ、4℃で一晩穏やかに振盪させた。一次抗体は、anti-BrdU rat IgGモノクローナル抗体を1/200希釈で、anti-GFP rabbit ポリクローナル抗体を1/1000希釈で用いた。BrdUとGFPの二重染色を行うため、2種類の抗体を混合した。翌日TBSで3回洗浄し、blocking solutionで1/200希釈したRRX-conjugated anti-rat IgGモノクローナル抗体溶液および1/1000希釈したALEXA488-conjugated anti-rabbit IgGモノクローナル抗体溶液中で、室温で2時間穏やかに振盪させ、二次抗体反応を行った。その後TBSで3回洗浄し、二重染色の場合はTBSで1/1000希釈したDAPI溶液中で、室温で15分間静置した。TBS中でスライドグラスに貼り付け、2% DABCO/Immu-mount (Shandon) で封入した。共焦点レーザー顕微鏡で観察し、得られた画像データを三次元に再構築した。

コントロール食 (MF食) および大豆たん白質を強化した飼料 (全たん白質源としてフジプロたん白質を使用) を生後6ヶ月のnestin-GFPマウスに2週間投与した。そして、このマウスから脳を取り出し、脳内における分裂細胞の挙動を免疫組織染色により評価した。共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、両群ともにBrdU陽性細胞が数多く存在した。側脳室の周りの層であるsubventricular zone (SVZ) と海馬歯状回の一番内側の層であるsubgranular zone (SGZ) で新生細胞が非常に多いことがわかる (Fig. 1)。

本研究においては、脳の高次機能にもっとも関連がある大脳新皮質に焦点を絞り細胞数の計測を進めた。Fig. 2に神経幹細胞のマーカーをもちつつ分裂像を示す細胞の様子を示す。神経幹細胞のマーカーであるnestinを持つ細胞の割合は、コントロール食では1 mm³あたり503±70個であったのに対し、大豆たん白質食では569±90個と有意に増加していた (Fig. 3)。さらに、全分裂細胞に対する神経幹細胞マーカーを持つ細胞の割合は、コントロール食では50%であるのに対し、大豆たん白質食では66%と顕著に増加していることが確認された (Fig. 4)。大豆たん白質食を摂取したマウスにおいては、神経再生の指標となる神経幹細胞の分裂が促進されていることが示された。

一般に、健康な動物の大脳新皮質においてはニューロンに傷みはなく、新しいニューロンと置き換わることはまれである¹⁾。ただし、成体マウスの大脳新皮質の一部を人為的に一時的虚血状態にすると、その部位を中心にニューロン新生が起きたという報告や^{2, 3)}、成体マウスの大脳新皮質でレーザー光によりアポトーシスを誘導すると、その部位でニューロン新生が起きたという報告⁴⁾などもあり、加齢などにより脳がやや傷んでくるとニューロン再生が誘導されていることが予測される。本研究で得られた知見より、大豆たん白質により神経再生の誘導が加速されることが推察された。

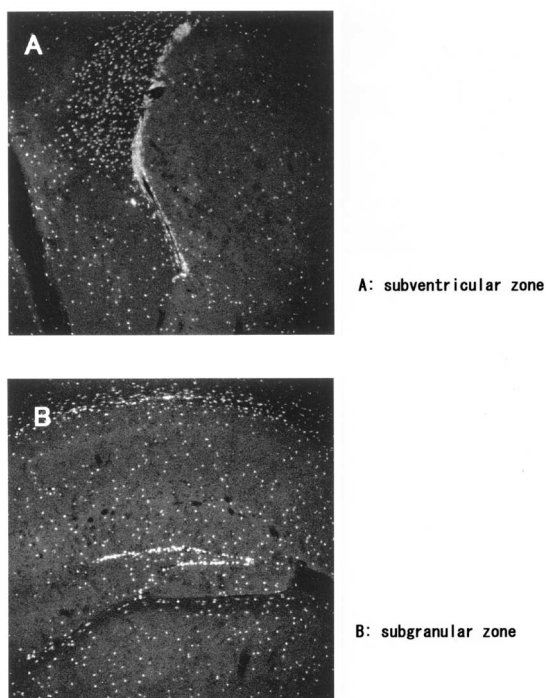


Fig. 1. Cell proliferation in adult mouse brain.

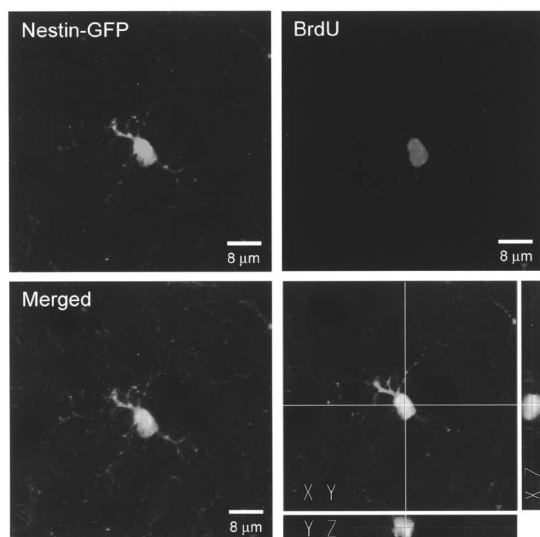


Fig. 2. Dividing neural progenitor cells in adult mouse cerebral cortex.

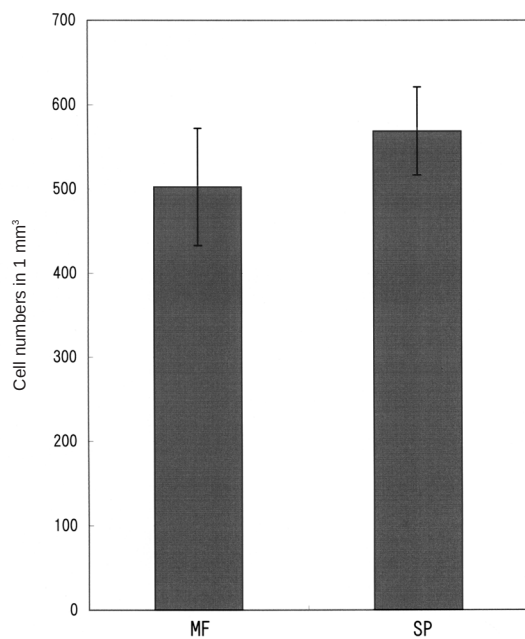


Fig. 3. Number of nestin-GFP positive progenitors in adult mouse cerebral cortex. MF, control diet; SP, soy-protein diet.

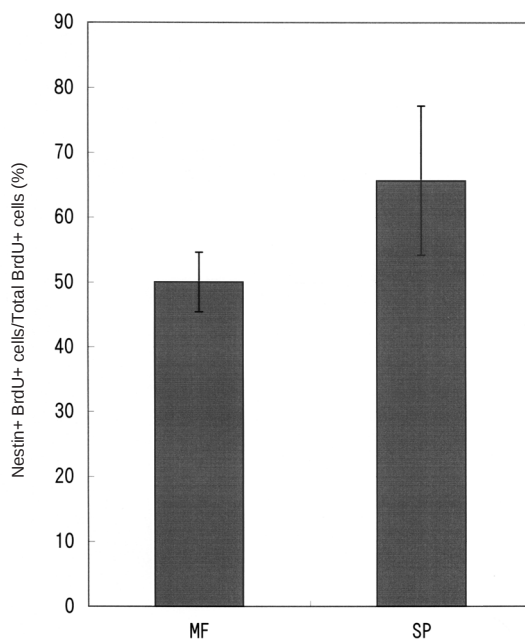


Fig. 4. Increase in the number of dividing neural progenitors in soy-protein rich diet. MF, control diet; SP, soy-protein diet.

要 約

これまでは、発達期を過ぎると脳内で新たにニューロンが作られることはないと考えられてきた。しかし、近年のマウスやラットを用いた研究で、記憶の形成を担う海馬と匂いの情報を統合している嗅球では、発達期を過ぎてもニューロンの新生が起こっていることがわかってきた。最近ではサルとヒトの海馬でもニューロン新生が起こっていることが判明し、大きな話題になっている。本研究においては、脳の高次機能にもっとも関連がある大脳新皮質に焦点を絞り研究を進めた。神経幹細胞のマーカーであるnestinを持つ細胞の割合は、コントロール食では1 mm³あたり503個であったのに対し、大豆たん白質食では569個と有意に増加していた。さらに、全分裂細胞に対する神経幹細胞マーカーを持つ細胞の割合は、コントロール食では50%であるのに対し、大豆たん白質食では66%と顕著に増加していた。マウスを用いた本研究により、大豆たん白質は、脳神経系の再生能力を高めることが示唆された。

文 献

- 1) Koketsu D, Mikami A, Miyamoto Y and Hisatsune T (2003): Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys, *J Neuroscience*, **23**, 937-942.
- 2) Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z and Lindvall O (2002): Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke, *Nat Med*, **9**, 963-970.
- 3) Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N and Ferriero DM (2002): Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke, *Ann Neurol*, **52**, 802-813.
- 4) Magavi SS, Leavitt BR and Macklis JD (2000): Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice, *Nature*, **405**, 951-955.