

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21390334

研究課題名（和文）神経回路発達障害は小児期の認知・行動異常を説明するか
—精神機能と神経幹細胞移植—

研究課題名（英文）Neural network development disorder as a cause of cognitive/behavioral impairment in childhood – mental function and neural stem cell transplantation-

研究代表者：齋藤 利和 (SAITO TOSHIKAZU)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50128518

研究成果の概要（和文）：

胎生期のアルコール暴露によって胎児性アルコールスペクトラム障害 (FASD) モデルラットを作成した。モデルラット群は、新奇物体探索試験における記憶・認知機能、社会相互作用試験における社会コミュニケーションの各機能に異常を示した。これに対し、モデル動物に神経幹細胞を経静脈的に移植した群では、その異常が正常対象群に近いレベルへ改善されることが分かった。また、モデル動物では、社会機能関連領域（前部帯状回、扁桃体）において、ポストシナプス蛋白 PSD95 の発現が低下し、それらが、細胞移植群では対象群のレベルに発現増加していることを認めた。また、FASD モデルでは、同領域において GABA 系 interneuron の subtype である parvalbumin 陽性細胞が有意に減少し、それらが神経幹細胞移植によって改善することが示された。加えて、移植する神経幹細胞を RI 標識し、移植後に RI スキャンによって脳内での分布を解析した結果、移植神経幹細胞が、信頼・愛情に基づく社会性行動に関係すると考えられているオキシトシン・バソプレッシン作用部位（視床下部室傍核・視索上核）に強く集積していることを見出し、神経幹細胞移植による社会性機能回復の機序にオキシトシン・バソプレッシン神経機構の増強効果が関連する可能性が推察された。

研究成果の概要（英文）：

We constructed fetal alcohol spectrum disorder (FASD) model rat by exposure of ethanol in the maternal period. Animals in the ethanol treatment group showed a significant memory/cognitive impairment and social dysfunction in each behavioral test and intravenous neural stem cell (NSC) transplantation suppressed these behavioral abnormalities toward control levels. In the brain samples of social function-related regions (anterior cingulate cortex and amygdala), the post synaptic density protein 95 (PSD95) was decreased in the model rat which was suppressed in the NSC transplantation group. In these regions, GABAergic interneuron subtype, parvalbumin-positive cells were also decreased and they were recovered by NSC transplantation. Furthermore, the transplanted RI-labeled NSCs were found strongly accumulating in the hypothalamic areas of paraventricular/supraoptic nucleus where social neuropeptides (Oxytocin (OXT) and arginine vasopressin (AVP)) are synthesized in magnocellular neurons, suggesting the possible relation between the social recovery effect of NSC transplantation and OXT/AVP neuron system potentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医師薬学

科研ひの分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学

1. 研究開始当初の背景

胎児性アルコール症候群のみならず、(小児)統合失調症、自閉症等の疾患は、いずれも胎児期～幼年期の何らかのストレス因によるその後の脳神経発達の異常が深く関与すると考えられている。これらの疾患では、衝動性の亢進、強迫症状、不安症状の問題に加え、社会的な認知に関する障害がみられ、これらが対人関係に大きく影響を及ぼし、子供の学校・社会生活を困難にしていることが指摘されている。近年の画像学的研究から、社会認知については①他者の意図を読み取り行動を予測すること、②他者の表情から他者の情動を理解すること、の2つの能力の障害にそれぞれ脳の特定の部位(前頭前野皮質、および扁桃体)の神経回路異常(萎縮)が密接に関わっていることが明らかとなってきた。また、強迫症状の強い子供の側脳室、海馬に体積減少が認められることも報告されている。しかしながら、これらの脳の形態学的変化や神経新生能の変化が脳神経発達障害にどのように影響し、病態にどのように関わっているかについてはまだほとんど解明ができておらず、現状においてこれらの障害に対する根治的な治療法は未だ確立されていない。

これらの背景を踏まえ、本研究は、神経発達障害の脳における特定領域の脳破壊(萎縮)を、障害領域特異的に移行する性質をもった神経幹細胞で修復する“細胞療法”を実践的な臨床応用に近づけようとする試みである。

2. 研究の目的

これまでに我々は、精神疾患の認知・行動異常を改善させる脳内メカニズムとして、神経回路網維持・修復効果の重要性の観点から研究を進め、神経保護効果および神経新生促進効果を有する薬剤が、栄養因子シグナル伝達系の増強と小胞体機能変化を介して脳の神経回路維持・修復能を促進することを明らかにした。また、一方、成熟神経細胞の生存に影響を及ぼさない低濃度のアルコールが、神経分化や新生神経細胞の発達を阻害し、逆にグリア分化を増強することを示すとともに、その細胞内転写因子変化と生化学的変化の一端を明らかとしてきた。

本研究は、胎児性アルコール症候群モデル動物を作成し、経静脈的神経幹細胞移植を行なった際の脳諸領域の神経回路障害の変化と、モデル動物の認知・行動異常の変化を解析し、神経発達障害の衝動性・社会認知異常に対する新たな治療法としての細胞移植療法の可能性について検討を進めるものである。そして、現在十分に有効な治療法が無く、予後も不良な(小児)統合失調症や胎児性ア

ルコール症候群の認知・行動異常に対して、脳の再構築という観点から、新たな(細胞)治療法の可能性についての知見を得ようとするものである。

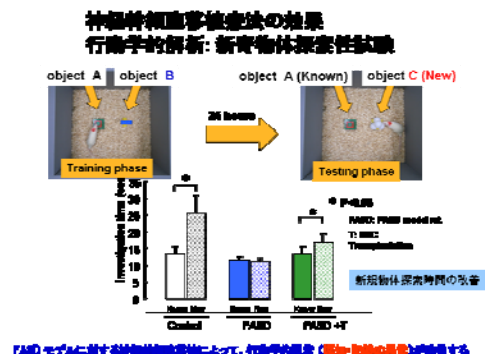
3. 研究の方法

胎生期にアルコールを暴露することによって胎児性アルコールスペクトラム障害モデル動物を作成した。すなわち、妊娠ラットにアルコールを(妊娠10-13日の)4日間6g/kg/dayの用量で強制経口投与した。①コントロール群、および作成した病態モデル群の一部に、蛍光、および $[^{35}\text{S}]$ methionineによって二重標識した標識神経幹細胞(胎児脳由来)を経静脈的に移植した。細胞移植による行動障害の変化について、認知・記憶機能、社会的コミュニケーション機能、および自閉症モデルが顕著な異常を示すことが分かっている、オスメス interaction 課題を用いた社会記憶に関する行動薬理的解析を実施した。また、②移植細胞の脳内分布動態について、特にGABAergic neuronへの分化について解析を行った。さらに、③細胞移植によって脳の神経回路が機能的に修復・再生していることについて、社会性機能に関連が深いと考えられている領域(前部帯状回、扁桃体)で、ポストシナプスに特異的に発現する蛋白、PSD95の量的変化をwestern blotting法で調べて解析した。加えて、④社会機能関連領域におけるGABAergic interneuron数の変化について、subtypeの1つparvalbumin陽性細胞数について、その特異的抗体を用いて解析を実施した。

4. 研究成果

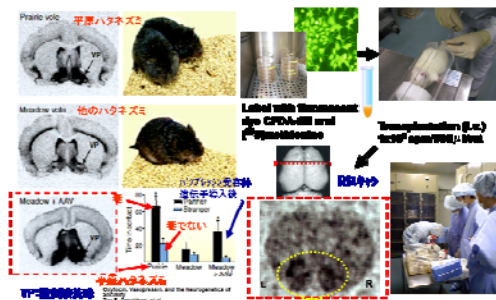
(1) 神経幹細胞移植による行動学的変化について行動薬理的解析を実施した。新奇物体探索性試験において、FASDモデル群は、正常ラットが示す新奇物体へのより長い探索性を示さなかった。これに対して、細胞移植群では、既知物体に比べ優位に長い新奇物体への探索行動を示した(図1)。

【図1】



ある、視床下部領域やその近傍に強く集積していることが判明し、この領域の神経機構の

移植神経幹細胞は、オキシトシン/バソプレッシン作用部位に障害を有している？

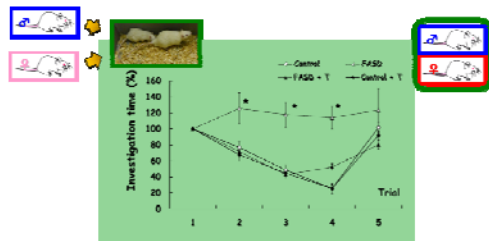


増強効果が、動物の行動学的変化と関係している可能性が推察された (図 7)。

【図 7】

(6) そこで我々は、これらの神経機能が強く反映していると言われている社会的記憶に関する行動学的解析を実施した。雄ラットは、初めて会った雌ラットに対して探索的行動を示す。その後、会う回数が増えるごとに、雄ラットのその雌ラットに対する探索行動は減っていく。そして、改めて別の雌ラットと出会った場合、1 回目と同程度の多さの探索行動を示す。これらの行動は社会的記憶機能を表していると考えられており、自閉症モ

神経幹細胞移植は FASD ラットの社会的記憶の障害を改善する



Control 群、および Control+細胞移植群では、2 回目以降、同じ雌ラットに対する探索行動時間は徐々に減少していくのに対して、FASD 群では、同じ雌ラットに再度会っても探索時間は変化しなかった。
一方、FASD+細胞移植群は、Control 群と同様に探索時間の減少が認められた。

デルではこの行動様式に異常が認められると報告されている。Control 群、および Control+細胞移植群では、2 回目以降、同じ雌ラットに対する探索行動時間は徐々に減少していくのに対して、FASD 群では、同じ雌ラットに何度会っても探索時間は変化しなかった。一方、FASD+細胞移植群は、Control 群と同様に探索時間の減少が認められ、神経幹細胞移植は FASD ラットの社会的記憶の障害を改善することが示された (図 8)。

【図 8】

(考察)

本研究で我々は、アルコールによる認知・行動異常の病態に脳の神経回路の形成・発達・維持機能の異常の関与を示し、それを修復・再生する新たな治療手段としての、神経幹細胞移植療法の可能性について検討・開発

を進めた。すなわち、妊娠期のラットにエタノールを強制経口投与し、生まれた新生仔 (胎児性アルコールスペクトラム障害 (FASD) モデル) に対して標識した神経幹細胞を尾静脈内に投与する方法で、その後の標識神経幹細胞の脳内分布・細胞分化動態等について可視化した形で解析を進めた。

経静脈から移植神経幹細胞は、移植から 1 ヶ月後も経過すると、脳の広い領域で検出でき、特に、側脳室、海馬、嗅球、そして、近年“社会認知”に関わる脳領域として認識されるようになった前部帯状回や扁桃体等に多く認められ、その一部は GABAergic neuron として同定されることを明らかとした。また、各種行動薬理学的な指標を用いた検討によって、FASD モデルラットでは、不安、認知、社会的コミュニケーション機能に異常が示唆されたが、一方で、神経幹細胞移植を実施した FASD 群ではそれらの行動異常が正常群に近いレベルへ改善することが判明した。さらに、モデル動物の行動学的異常の回復に、脳神経回路の修復・再生が関係することを明らかにする目的で、関連領域のシナプス機能の変化について、PSD95 蛋白発現を指標に解析を実施し、社会的コミュニケーションの低下とその回復に前部帯状回、および扁桃体のシナプス形成変化が関係する可能性を示した。加えて、社会機能関連領域では PV 陽性の GABA interneuron が減少し、それらが細胞移植によって回復していることが見出されたため、FASD モデルラットの認知機能障害の改善効果のメカニズムとしての重要性に興味をもたれた。さらに、標識神経細胞の脳内分布の解析で、移植細胞が、視床下部・扁桃体等のオキシトシン、バソプレッシン作用部位の領域に強く集積することが分かり、移植細胞がオキシトシン、バソプレッシンシステムを増強することによって、行動学的改善効果を発揮している可能性が明らかとなり、今後、これらの知見を踏まえながら、アルコール誘発脳障害に対する細胞療法の臨床への適応についてさらに検討を進めていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 20 件)

- 1) Ahmed EU, Ahmed S, Ukai W, Matsumoto I, Kemp A, McGregor IS, Kashem MA. Antipsychotic Induced Alteration of Growth and Proteome of Rat Neural Stem Cells. Neurochem Res. 2012. [Epub ahead of print] (有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528831>
- 2) Iwai T, Saitoh A, Yamada M, Takahashi K, Hashimoto E, Ukai W, Saito T, Yamada M. Rhotekin modulates differentiation of cultured neural stem cells to neurons. J Neurosci Res. 2012;90(7):1359-66. (有)

- doi: 10.1002/jnr.23029.
- 3) Liu Y, Sakamoto H, Adachi M, Zhao S, Ukai W, Hashimoto E, Hareyama M, Ishida T, Imai K, Shinomura Y. Heat stress activates ER stress signals which suppress the heat shock response, an effect occurring preferentially in the cortex in rats. *Mol Biol Rep*. 2012;39(4):3987-93. (有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779805>
 - 4) Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Oldham MC, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Geschwind DH, Kato T. Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons. *Genome Res*. 2011;21(5):688-96. (有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21467265>
 - 5) Watanabe K, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Yoshinaga T, Ono T, Tateno M, Watanabe I, Shirasaka T, Saito S, Saito T. Effect of antidepressants on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release from platelets in the rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(8):1450-4. (有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20708057>
 - 6) Ono T, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Saito T. The role of neural stem cells for in vitro models of schizophrenia: neuroprotection via Akt/ERK signal regulation. *Schizophr Res*. 2010;122(1-3):239-47. (有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627457>
 - 7) Yamada M, Takahashi K, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Yamada M. Neuroserpin is expressed in early stage of neurogenesis in adult rat hippocampus. *Neuroreport*. 2010;21(2):138-42. (有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010310>
 - 8) Yamaguchi M, Kokai Y, Imai S, Utsumi K, Matsumoto K, Honda H, Mizue Y, Momma M, Maeda T, Toyomasu S, Ito YM, Kobayashi S, Hashimoto E, Saito T, Sohma H. Investigation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease using neuronal cell culture and mouse model. *J Neurosci Res*. 2010;88(12):2682-92. (有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20648654>
 - 9) Kashem MA, Ummehany R, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, McGregor IS, Matsumoto I. Effects of typical (haloperidol) and atypical (risperidone) antipsychotic agents on protein expression in rat neural stem cells. *Neurochem Int*. 2009;55(7):558-65.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19463880>
 - 10) Hashimoto E, Yoshinaga T, Ishii T, Saito S, Ukai W, Saito T. Possible approach of regenerative medicine to treat alcohol-induced brain damage. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*. 2009;44(6):674-679
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20183943>

[学会発表] (計 41 件)

- 1) Ukai W, Shirasaka T, Hashimoto E. Cell-based therapy for alcohol-induced brain damage (Symposium) Asia-Pacific Society for Alcohol and Addiction Research, February 6-8, 2012, Bangkok, Thai
- 2) Saito T, Hashimoto E, Ukai W et al. Neurogenesis of alcohol related problems and depression (Symposium) 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (招待講演), September 23-24, 2011, Seoul, Korea
- 3) Watanabe K, Shirasaka T, Ukai W et al., Serum BDNF as a Potential Biomarker for Fetal Alcohol Effects. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, September 23-24, 2011, Seoul, Korea
- 4) Hashimoto E, Ukai W, Yoshinaga T et al. The possible therapeutic approach for amelioration of alcohol-induced brain damage (Symposium) 13th Congress of European Society for Biomedical Research on Alcoholism, Sep 4-7, 2011, Vienna, Austria
- 5) Ukai W, Shirasaka T, Hashimoto E et al., Promotion of interneurogenesis by neural stem cell transplantation in FASD model, 13th Congress of European Society for Biomedical Research on Alcoholism, Sep 4-7, 2011, Vienna, Austria
- 6) 白坂知彦, 鶴飼渉, 吉永敏弘他, 神経幹細胞移植による社会認識行動の再生: 胎児期アルコール暴露モデルを用いた考察 (シンポジウム) 第 20 回日本意識障害学会, 2011 年 9 月 2-3 日, 札幌
- 7) Saito T, Shirasaka T, Hashimoto E et al. Stem cell therapy: A novel treatment strategy for fetal alcohol spectrum disorder. 34th Annual Scientific Meeting of the Research Society on Alcoholism June 25-29, 2011, Atlanta, Georgia
- 8) Hashimoto E, Ukai W, Yoshinaga T et al. Potential regulation of neurogenesis by antidepressant/stem cell transplantation in alcohol-induced brain damage. (Symposium) 10th World Congress of Biological Psychiatry, May 29- June 2, 2011, Prague, Czech Republic
- 9) Ukai W, Hashimoto E, Yoshinaga T et al. Stem cell therapy: Social function recovery in fetal alcohol spectrum disorder model 10th World Congress of Biological Psychiatry, May 29- June 2, 2011, Prague, Czech Republic
- 10) Saito T, Hashimoto E, Ukai W et al. Biological markers in psychiatric disorders: Alcoholism / depression (Symposium) 10th World Congress of Biological Psychiatry (招待講演) May 29- June 2, 2011, Prague, Czech Republic
- 11) Ukai W, Hashimoto E, Ishii T et al. Ethanol-induced growth factor dysfunctions in neural stem

- cells: Implication to Stress. (Symposium) Alcoholism and Stress: A Framework for Future Treatment Strategies May 3-6, 2011, Volterra, Italy
- 12) 吉永敏弘, 齋藤利和 他. 胎児性アルコール・スペクトラム障害と cell therapy の可能性 日本アルコール精神医学会, 2010 年 10 月 7 日, 小倉
 - 13) 白坂知彦, 齋藤利和 他. 神経幹細胞移植による FASD モデルラットの「社会脳」の再生 日本アルコール・薬物医学会, 2010 年 10 月 7 日, 小倉
 - 14) Ukai W, Saito T et al. Epigenetic basis of alcoholic organ damage. International Society for Biomedical Research on Alcoholism, Sep 13-16, 2010, Paris
 - 15) Saito T et al. Alcohol and neuropsychiatric disorders, International Society for Biomedical Research on Alcoholism. Sep 13-16, 2010, Paris
 - 16) Shirasaka T, Saito T et al., Stem cell therapy-social function recovery in FASD model. International Society for Biomedical Research on Alcoholism. Sep 13-16, 2010, Paris
 - 17) Saito T., Stem cell therapy as new treatment strategy for alcohol-induced brain damage. 33rd Annual Scientific Meeting of Research Society on Alcoholism, June 26-30, 2010, Texas
 - 18) Hashimoto E, Saito T et al. Stem cell therapy functional recovery in a neurodevelopmental model of schizophrenia. Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, June 6-10, 2010 Hong Kong
 - 19) Watanabe K, Saito T et al. The change of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase B (TrkB) receptor on platelet in depression Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, June 6-10, 2010, Hong Kong
 - 20) Hashimoto E, Ishii T, Ukai W et al. (Symposium) Dysregulation of neurogenesis in alcoholism and depression The 1st Congress of Asia-Pacific Society of Alcohol and Addiction Research (招待講演), Nov12-14, 2009, Korea
 - 21) Ukai W, Yoshinaga T, Shirasaka T et al. The stem cell therapy as a possible new treatment for alcohol induced brain damage The 1st Congress of Asia-Pacific Society of Alcohol and Addiction Research, Nov12-14, 2009, Korea
 - 22) Tateno M, Ukai W, Ishii T et al. Molecular mechanisms of alcohol-induced neuronal damage to the developing brain :The role of neuron-restrictive silencer factor(NRSF/REST) The 1st Congress of Asia-Pacific Society of Alcohol and Addiction Research, Nov12-14, 2009, Korea
 - 23) Ukai W, Ono T, Hashimoto E et al. Stem cell therapy as a new treatment strategy for

schizophrenia The 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience Oct 17-21, 2009, Chicago, USA

- 24) 鶴飼渉, 橋本恵理, 石井貴男 他. (シンポジウム) アルコールによる脳神経ネットワークの変異: 行動変化と分子メカニズムの解析から 第 44 回日本アルコール・薬物医学会, 第 21 回日本アルコール精神医学会, 第 12 回ニコチン・薬物依存症フォーラム, 合同学術総会, 2009 年 9 月 7-9 日, 横浜

〔図書〕 (計 4 件)

- 1) 齋藤利和, 橋本恵理. 脳科学エッセンシャル—精神疾患の生物学的理解のために. 専門医のための精神科臨床レビュー 16, 中山書店, 198-200, 2010
- 2) 橋本恵理, 齋藤利和 他. アルコール依存の基礎. 依存. 脳とこころのプライマリ・ケア 8, 中山書店 122-132, 2010

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 利和 (Saito Toshikazu)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50128518

(2) 研究分担者

相馬 仁 (Sohma Hitoshi)
札幌医科大学・医療人育成センター・教授
研究者番号: 70226702
松山 清治 (Matsuyama Kiyoji)
研究者番号: 40209664
橋本 恵理 (Hashimoto Eri)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30301401
鶴飼 渉 (Ukai Wataru)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40381256
加藤 忠史 (Kato Tadafumi)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー
研究者番号: 30214381

(1) 連携代表者

須原 哲也 (Suhara Tetsuya)
放射線医学総合研究所・分子神経イメージンググループ・グループディレクター
研究者番号: 90216490