

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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：33919
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590195
 研究課題名（和文）脳内ホメオスターシスにおけるミクログリア内セマフォリン信号伝達機構の役割解明
 研究課題名（英文）Clarification on the role of semaphorin in signal transduction mechanism regulating microglial function in brain homeostasis
 研究代表者
 湯川 和典（YUKAWA KAZUNORI）
 名城大学・薬学部・教授
 研究者番号：20301434

研究成果の概要（和文）：セマフォリン受容体の plexin-A1 を欠損するマウスは、精神疾患で異常となる驚愕反射のプレパルス抑制(PPI)試験において、14 週齢以上のマウスで障害が顕著となった。また自発活動量増加と毛繕い行動亢進、加齢進行性のミクログリア過剰活性化と脱髄所見を認めた。したがって plexin-A1 欠損マウスは、ミクログリア関与の示唆はあるが未だ本態不明の精神疾患の発症機構解明に繋がる新規知見を得るための有用なモデルと判明した。

研究成果の概要（英文）：Plexin-A1 is a receptor of semaphorins originally found as repulsive axon guidance molecules. Plexin-A1 deficient mice over 14-week-old were revealed to have significant deficits in prepulse inhibition of auditory startle reflex which can be also observed in psychiatric disease such as schizophrenia. Plexin-A1 deficient mice also displayed significant increase in locomotion activity and grooming behavior and age-dependent microglial overactivation and demyelination. Thus, plexin-A1 deficient mice is an animal model useful to obtain a novel finding which helps us clarify the pathogenic mechanism of psychiatric diseases recently suggested to be related to abnormal microglia, but still concealing essentially unknown factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：発生学・形態形成学・セマフォリン・ミクログリア・脳内ホメオスターシス

1. 研究開始当初の背景

(1)セマフォリン(Semas)は、神経成長円錐の伸長方向を決める軸索ガイダンス分子であり、免疫や血管新生など多彩な機能を発揮する。セマフォリン受容体の plexin-A1 は、破骨細胞膜表面で Trem2 受容体および DAP12 アダプターと情報伝達複合体を形成し破骨細胞機能を調節する。そのため plexin-A1 欠損マウスは破骨細胞機能低下から骨が硬化

し大理石病を発症する。ヒトで Trem2 受容体あるいは DAP12 アダプターの機能変異が生じると骨病変と総合失調症から認知症を併発する那須—ハコラ病を発症する。マウスで DAP12 が欠損しても大理石病と統合失調症様行動異常やシナプス変性が認められた。那須—ハコラ病の精神症状の発症にはミクログリア異常の関与が示唆されている。

(2)以上の事実より、plexin-A1 と DAP12 と

Trem2 が共に発達期脳内のミクログリアに発現し、これら3分子複合体がミクログリア細胞膜上でセマフォリン信号を受け取りミクログリアの分化と機能を調節することが考えられた。そのため plexin-A1 欠損マウスにおいて那須-ハコラ病や DAP12 欠損マウスと同様の行動異常とシナプス変性等の脳内炎症所見が予想された。

2. 研究の目的

(1) 遺伝子変異による機能欠損で精神疾患発症に繋がる DAP12 および Trem2 と plexin-A1 はミクログリア細胞膜上で信号伝達複合体を形成すると考えられる。そのため plexin-A1 欠損マウスが統合失調症や認知症類似の行動異常を示し精神疾患解明の有用な病態モデルとなることを証明する。

(2) plexin-A1 欠損マウス脳内でミクログリアの過剰活性化や炎症所見および脱髄が行動異常の出現に同期して起こるかどうかを解析し、plexin-A1 欠損マウスの行動異常の原因がミクログリア過剰活性化に起因することを証明する。

(3) 野生型マウスと plexin-A1 欠損マウスに由来するミクログリア初代培養系を用いて、plexin-A1 受容体を介するセマフォリンのミクログリア機能調節作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) plexin-A1 欠損マウスの作製：ES細胞を用いる相同組換え法によりキメラ・マウスを得て野生型 Balb/c マウスと10代の戻し交配を行いヘテロ・マウス間の交配により野生型と plexin-A1 欠損マウスを得た。

(2) 行動解析：野生型と plexin-A1 欠損マウスについて、2カ月齢、6カ月齢、12カ月齢、18カ月齢における行動解析を行い野生型と plexin-A1 欠損マウス間での比較解析を行った。行動解析試験として、オープンフィールド試験、明暗試験、高架式十字迷路試験、Y迷路試験、新規物体認知試験、社会行動試験 (social interaction test)、音響驚反射 (プレパルス抑制試験を含む)、恐怖条件付け試験 (Fear conditioning test) を行い、自発活動量と記憶や不安、および社会行動等の評価を行った。さらに骨病変の運動機能への影響を評価するために pole test やロータ・ロッド (rota rod test) などの運動機能試験を行った。

(3) 免疫組織化学：2カ月齢、6カ月齢、10カ月齢、12カ月齢、14カ月齢、18カ月齢の野生型マウスと plexin-A1 欠損マウスの凍結脳切片を用いて免疫組織化学を行いミクログリアの過剰活性化、脳内炎症の進行度、脱髄およびシナプス変性と反応性グリオシスについて解析を行った。Iba1 (ミクログリア・マーカー)、IL-1 β 、IL-6、iNOS、COX-2、MBP、synaptophysin、GFAP、S100 β に対する抗体を一次抗体として用い peroxidase

標識の二次抗体による DAB の発色反応により陽性シグナルの解析を HS オールインワン蛍光顕微鏡によるデータの採取と Image-J ソフトウェアにより解析を行った。

(4) ミクログリア初代培養による plexin-A1 機能の評価：1日齢の野生型マウスと plexin-A1 欠損マウスの脳より磁気細胞分離法 (MACS) を用いてミクログリアを分離しミクログリア培養専用培地の中でミクログリア初代培養を行った。リポ多糖 (LPS) と各種セマフォリン添加に対する両ミクログリア細胞の応答として、NO を検出する Griess 反応により NO 産生能を評価した。さらに野生型と plexin-A1 欠損ミクログリアの食食能を比較するため、ビーズとアポトース・ニューロンの食食能力の比較を行った。また活性酸素種産生能力の比較も行った。

4. 研究成果

(1) plexin-A1 欠損マウスの毛繕い行動亢進：オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、Y 迷路試験、新規物体認知試験の全てにおいて、6カ月齢以上の plexin-A1 欠損マウスが野生型マウスと比較して毛繕い行動の有意な亢進を示した。2カ月齢の plexin-A1 欠損マウスの毛繕い行動は野生型と有意な違いを認めなかった。Hoxb8 欠損マウスや Slitrk 欠損マウスなど毛繕い行動亢進マウスに特徴的な眼瞼皮膚のただれが6カ月齢以上の plexin-A1 欠損マウスにも認められたため、行動解析時以外の home cage 内の日常生活においても毛繕い行動亢進の存在が示唆された。そのため、plexin-A1 欠損マウスは6カ月齢以降に、統合失調症の陽性症状の常同症、あるいは強迫神経症として毛繕い行動の亢進を示すことが示唆された。

(2) plexin-A1 欠損マウスの自発運動量増加：オープンフィールド試験において6カ月齢の plexin-A1 欠損マウスが同齢野生型マウスと比較して有意な自発運動量の増加を示し統合失調症の陽性症状が示唆された。2カ月齢、12カ月齢、18カ月齢では野生型との間に有意差は認めなかった。

(3) plexin-A1 欠損マウスのプレパルス抑制減弱：音響驚愕反射の強度については、野生型マウスと plexin-A1 欠損マウスの間に有意差を認めなかった。音響驚愕反射のプレパルス抑制 (PPI) 試験は、14週齢以上の plexin-A1 欠損マウスで障害が顕著となり野生型との間に有意差を認めた。そのため plexin-A1 欠損マウスは、14週齢以降に統合失調症の陰性症状としてのプレパルス抑制の障害を示すことが示唆された。

(4) plexin-A1 欠損マウスの恐怖条件付け応答の亢進：ブザー音と電気ショックを連合学習する恐怖条件付け試験において、12カ月齢の plexin-A1 欠損マウスは同齢野生型マウスと比較し、恐怖条件付けの24時間後のフリ

ーシング応答が有意に増加することが判明した。12カ月齢の plexin-A1 欠損マウスでは、自閉症や強迫神経症において認められる恐怖記憶の増強の存在が示唆された。

(5) plexin-A1 欠損マウスにおけるミクログリアの増加：2カ月齢以降の全月齢において plexin-A1 欠損マウス脳各部位で Iba1 陽性細胞数の増加を認め plexin-A1 欠損マウスにおけるミクログリアの増加が示唆された。1～4日齢の新生児期の海馬では plexin-A1 欠損マウスのミクログリア数の減少を認めアポトーシス・ニューロン数の減少を認めており、成熟期から老齢期におけるミクログリアの病態と発達期におけるミクログリア異常の存在が示唆された。

(6) plexin-A1 欠損マウスにおけるミクログリア過剰活性化：6カ月齢以降の plexin-A1 欠損マウス脳各部位において、ミクログリア過剰活性化を示唆する所見として iNOS、COX2、IL-1 β 、IL-6 が増加傾向を示した。また astrogliosis を示唆する所見として GFAP と S100 β が増加傾向を示した。

(7) plexin-A1 欠損マウスにおける脱髄とシナプス変性：14カ月齢以降の plexin-A1 欠損マウスの皮質、視床と線条体において脱髄を示唆する所見として、MBP の減少傾向を認めた。また 14カ月齢の plexin-A1 欠損マウスの海馬 CA3 領域では同月齢野生型海馬 CA3 領域と比較し有意に synaptophysin 量が減少し、シナプス変性の進行が示唆された。

(8) plexin-A1 欠損ミクログリアの機能異常：1日齢の野生型マウスと plexin-A1 欠損マウス脳由来ミクログリアの初代培養において、NO 産生能は plexin-A1 欠損マウスで有意な減少を示した。LPS 添加で NO 産生能は両マウス由来ミクログリアで上昇するが、野生型に比し plexin-A1 欠損マウス由来ミクログリアで有意な低下を認めた。LPS とリコンビナント・セマフォリンの同時添加で NO 産生能はさらに上昇するが、plexin-A1 欠損マウス由来ミクログリアでは有意な上昇を認めなかった。ピーズとアポトーシス・ニューロンの貪食能力の比較においては、plexin-A1 欠損マウス由来ミクログリアで貪食能力の有意な低下を認めた。また活性酸素種の産生能力も有意な低下を示した。この結果は、plexin-A1 欠損マウスでは過剰活性化したミクログリアが加齢とともに増加するが、生後1日目のミクログリアは野生型と比較して機能的に未発達であることを示している。機能的に未発達のミクログリアから過剰活性化ミクログリアを生じるメカニズムについて今後の解析が必要である。

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14件)

①Stefan Freigang, Elise Landais, Victoria Zadorozhny, Lisa Kain, Kenji Yoshida, Yang Liu, Shenglou Deng, Wulf Palinski, Paul B. Savage, Albert Bendelac, Luc Teyton: Scavenger receptors target glycolipids for natural killer T cell activation. *J. Clin. Invest.*, **122**, 3943-3954 (2012)

②Tetsuji Tanaka, Tao Bai, Saori Toujima, Tomoko Utsunomiya, Hirotohi Utsunomiya, Kazunori Yukawa, Junko Tanaka: Impaired death-associated protein kinase-mediated survival signals in 5-fluorouracil-resistant human endometrial adenocarcinoma cells. *Oncol. Rep.*, **28**, 330-336(2012)

③Noriaki Nagai, Yoshimasa Ito and Noriko Takeuchi: Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the anti-cataract effect of eye drops containing disulfiram and low-substituted methylcellulose using ICR/f rats as a hereditary cataract model. *Biol Pharm Bull.*, **35**:239-245 (2012)

④Tetsuji Tanaka, Tao Bai and Kazunori Yukawa: Specific downregulation of death-associated protein kinase enhances Fas-mediated apoptosis in the human differentiated endometrial adenocarcinoma cell line, HHUA. *Eur J Gynaecol Oncol.*, **32**(3), 293-296 (2011)

⑤Tetsuji Tanaka, Tao Bai, Saori Toujima, Tomoko Utsunomiya, Toshihide Matsuoka, Aya Kobayashi, Madoka Yamamoto, Noriyuki Sasaki, Yuko Tanizaki, Hirotohi Utsunomiya, Junko Tanaka and Kazunori Yukawa: Demethylation restores SN38 sensitivity in cells with acquired resistance to SN38 derived from human cervical squamous cancer cells. *Oncol Rep.*, **27**(4), 1292-1298 (2011)

⑥Noriaki Nagai, Yoshimasa Ito and Noriko Takeuchi: Correlation between hyper-sensitivity to hydrogen peroxide and low defense against Ca²⁺ influx in cataractogenic lens of Ihara cataract rats. *Biol Pharm Bull.*, **34**:1005-1010 (2011)

⑦Hideaki Yamaguchi, Tao Yu, Yumi Kidachi, Tatsuo Akitaya, Kenji Yoshida, Katsuyoshi Kamie, Toshiro Noshita, Hironori Umetsu and Kazuo Ryoyama: Selective toxicity of glycyrrhetic acid against tumorigenic *r/m* HM-SFME-1 cells is potentially attributed to downregulation of glutathione. *Biochimie.*, **93**:1172-1178

(2011)

⑧ Hideaki Yamaguchi, Tao Yu, Toshiro Noshita, Yumi Kidachi, Katsuyoshi Kamie, Kenji Yoshida, Tatsuo Akitaya, Hironori Umetsu and Kazuo Ryoyama : Ligand-receptor interaction between triterpenoids and the 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11bHSD2) enzyme predicts their toxic effects against tumorigenic *r/m* HM-SFME-1 cells. *J Biol Chem.*, **286**(42):36888-36897 (2011)

⑨ Tetsuji Tanaka, Tao Bai, Hirotohi Utsunomiya, Takahiro Fukumoto and Kazunori Yukawa : STAT3 enhances intracellular Fas-mediated apoptotic signals in HHUA human endometrial epithelial cells. *Mol. Med. Rep.*, **4**(2), 307-312(2011)

⑩ Kenji Yoshida, Adam L. Corper, Rana Herro, Bana Jabri, Ian A. Wilson, and Luc Teyton : The diabetogenic mouse MHC class II molecule I-A^{g7} is endowed with a switch that modulates TCR affinity. *J. Clin. Invest.*, **120** (5), 1578-1590 (2010)

⑪ Kazunori Yukawa, Tetsuji Tanaka, Masanori Kishino, Kenji Yoshida, Noriko Takeuchi, Takuji Ito, Hyota Takamatsu, Hitoshi Kikutani, and Atsushi Kumanogoh : Deletion of *Sema4D* gene reduces intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.*, **26** (1), 39-44 (2010)

⑫ Tao Bai, Tetsuji Tanaka and Kazunori Yukawa : Targeted knockdown of death-associated protein kinase expression induces TRAIL-mediated apoptosis in human endometrial adenocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.*, **37** (1), 203-210(2010)

⑬ Tetsuji Tanaka, Tao Bai and Kazunori Yukawa : Death-associated protein kinase is essential for the survival of various types of uterine cancer cells. *Int. J. Oncol.*, **37** (4), 1017-1022(2010)

⑭ Tetsuji Tanaka, Tao Bai and Kazunori Yukawa : Suppressed protein expression of the death-associated protein kinase enhances 5-fluorouracil-sensitivity but not etoposide-sensitivity in human endometrial adenocarcinoma cells. *Oncol. Rep.*, **24**(5), 1401-1405(2010)

[学会発表] (計 12 件)

① Takuji Ito, Tao Bai, Tetsuji Tanaka, Takashi Ueyama, Kenji Yoshida, Noriko Takeuchi, Hyota Takamatsu, Hitoshi Kikutani, Atsushi Kumanogoh, and

Kazunori Yukawa : *Sema4D* controls mouse postnatal vaginal development by inducing epithelial cell apoptosis through estrogen-dependent *Sema4D* and Plexin-B1 receptor activation. 第 34 回日本分子生物学会 (横浜) 平成 23 年 12 月 13 日

② Takuji Ito, Kenji Yoshida, Noriko Takeuchi, and Kazunori Yukawa : *Sema4D/CD100* deficiency leads to superior performance in mouse motor behavior. Neuroscience 2011 (Washington, DC, 米国) 平成 23 年 11 月 16 日

③ Noriko Takeuchi, Takuji Ito, Kenji Yoshida, and Kazunori Yukawa : Molecular pathogenesis of central diabetes insipidus in a rat strain. Neuroscience 2011 (Washington, DC, 米国) 平成 23 年 11 月 15 日

④ Takuji Ito, Tao Bai, Kenji Yoshida, Noriko Takeuchi, Hyota Takamatsu, Hitoshi Kikutani, Atsushi Kumanogoh, and Kazunori Yukawa : Molecular mechanism of semaphorin-induced cell death in postnatal tissue remodeling. 第 88 回日本生理学学会 (横浜) 平成 23 年 3 月 30 日

⑤ 青山栄里子、平川奈津美、松本信香、城 正士、伊藤卓治、竹内典子、吉田謙二、湯川和典 : 新規尿崩症モデルにおけるバソプレシン刺激応答性. 日本薬学会第131年会 (静岡) 平成23年3月29日

⑥ Takuji Ito, Tao Bai, Tetsuji Tanaka, Takashi Ueyama, Kenji Yoshida, Noriko Takeuchi, Hyota Takamatsu, Hitoshi Kikutani, Atsushi Kumanogoh, and Kazunori Yukawa : Novel mode of action of semaphorin 4D in tissue remodeling of mouse female genital organ. 第 33 回日本分子生物学会 (神戸) 平成 22 年 12 月 10 日

⑦ Takuji Ito, Tao Bai, Tetsuji Tanaka, Kenji Yoshida, Noriko Takeuchi, Hitoshi Kikutani, Atsushi Kumanogoh, and Kazunori Yukawa : *Sema4D/CD100* deficiency leads to superior performance in mouse motor behavior. 第 33 回日本神経科学会 (神戸) 平成 22 年 9 月 2 日

⑧ Kenji Yoshida, Adam L. Corper, Bana Jabri, Ian A. Wilson and Luc Teyton: Effect of position beta57 of the diabetogenic MHC Class II molecule I-A^{g7} on T cell repertoire and function. 14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan) 平成 22 年 8 月 23 日

⑨ 田中哲二、福元隆浩、宇都宮智子、松岡俊英、宇都宮洋才、湯川和典 : 抗癌剤塩酸イリノテカンによる急性卵巣機能障害の発症機

序. 第 19 回日本 Cell Death 学会 (名古屋)
平成 22 年 8 月 1 日

⑩田中哲二、湯川和典：進行期婦人科悪性腫瘍にともなう尿管閉塞性水腎症の分子機構解析. 第 19 回日本 Cell Death 学会 (名古屋)
平成 22 年 8 月 1 日

⑪田中哲二、福元隆浩、宇都宮洋才、湯川和典：ヒト子宮内膜組織の月経周期的再構築現象における Fas 抗原の抗アポトーシスシグナルの意義. 第 19 回日本 Cell Death 学会 (名古屋) 平成 22 年 7 月 31 日

⑫ Takuji Ito, Tao Bai, Tetsuji Tanaka, Takashi Ueyama, Kenji Yoshida, Noriko Takeuchi, Hyota Takamatsu, Hitoshi Kikutani, Atsushi Kumanogoh, and Kazunori Yukawa: Mechanism of postnatal tissue remodeling induced by Sema4D/CD100 in mice. 第 87 回日本生理学会 (盛岡) 平成 22 年 5 月 19 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯川 和典 (YUKAWA KAZUNORI)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号：20301434

(2) 研究分担者

吉田 謙二 (YOSHIDA KENJI)
名城大学・薬学部・助教
研究者番号：80294122

竹内 典子 (TAKEUCHI NORIKO)
名城大学・薬学部・助手
研究者番号：80076728

(3) 連携研究者

()

研究者番号：