

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300135

研究課題名(和文) 神経新生を調節するBRINPファミリー遺伝子が関与する精神神経疾患の基盤解明

研究課題名(英文) Physiological roles of BRINP family proteins on neuronal development

研究代表者

松岡 一郎 (MATSUOKA, Ichiro)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：40157269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：BRINPファミリー(BRINP1, 2, 3)は神経系特異的に発現するタンパク質で、細胞周期抑制能を持つ。本研究では、BRINP1欠損マウスが特定のヒトの精神疾患に類似した行動異常を示すことから、BRINP1欠損マウスにおける組織異常と行動異常の関連性を明らかにすることを目的とした。その結果、BRINP1欠損マウスの海馬では、歯状回における神経新生が増加すると共におよび錐体細胞層における抑制性ニューロンの数が増加することが明らかとなった。また、行動異常を併発するてんかんのモデルマウス作成に用いられるピロカルピンにより、BRINP1の発現が海馬の歯状回で一過性に増加することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：BRINP is a unique neuron-specific gene family (BRINP1, 2, 3) which possesses an ability to suppress cell cycle progression. We have recently established BRINP1-KO mice to find their abnormal behaviors that are relevant to certain human psychiatric disorders. In the present study, we searched in BRINP1-KO mice for histological and functional clues which should lead to their abnormal behaviors. As a result, we found that the number of parvalbumin-expressing inhibitory neurons was significantly increased in CA1 area of hippocampus. Furthermore, the expression of BRINP1-mRNA was transiently increased in dentate gyrus of hippocampus in response to an intraperitoneal administration of pilocarpine which is known to induce an epilepsy model in mice. These results suggest alterations in the hippocampal circuitry might be responsible for the development of abnormal behaviors in BRINP1-KO mice.

研究分野：総合分野・脳神経科学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：ノックアウトマウス 神経新生 精神神経疾患 細胞周期 BRINPファミリー 海馬

1. 研究開始当初の背景

(1) BRINP と細胞周期抑制 我々は、骨形成因子とレチノイン酸による神経分化に伴って神経系特異的に発現が誘導される新規細胞周期抑制タンパク質ファミリー、BRINP (BMP/Retinoic acid-Inducible Neural Specific Protein) を同定した (Kawano et al. Mol. Brain Res. (2004))。BRINP はマウスの中枢・末梢神経系で発達期より発現し始め、成体脳においても発現が持続する。強制発現実験により、いずれの BRINP も増殖性の細胞に対して細胞周期抑制能を示した。ES 細胞由来の神経幹細胞 (Neural stem cell, NSC) に対しても同様に細胞周期抑制能を示し、BRINP が神経細胞の終末分化に関与する可能性が示された (Terashima et al. J. Neurosci. Res. (2010))。ES-NSC を培養下で分化させると、神経細胞への分化過程でいずれの BRINP も一過性に発現が誘導された。しかし、ES-NSC に BRINP を強制発現させても、神経細胞への分化は誘導されず、死滅する細胞も多数みられた。これらのことから、神経幹細胞が神経細胞に分化する段階で BRINP は一過的に発現して細胞周期を抑制し、分化シグナルが存在しない状態では細胞死を誘導すると考えられる。

(2) BRINP-欠損マウスの作成 個体レベルで、各 BRINP 遺伝子の果たす生理的役割を明らかにするために、BRINP 遺伝子欠損マウス (BRINP-KO マウス) の作成に取り組んだ。いずれの BRINP 遺伝子についてもコード領域の主要な部分を占めるエクソン 8 をネオマイシン耐性遺伝子で置換することとした。既に、BRINP1-KO マウスおよび BRINP3-KO マウスの表現型解析が進められている。このうち、BRINP1-KO マウスの海馬歯状回において神経新生が亢進していることが明らかとなり、BRINP が成体脳においても細胞周期を抑制することが確かめられた。

(3) 神経活動依存的な BRINP 発現変化 成体マウス脳における BRINP の発現は、BRINP1-mRNA が海馬・大脳皮質・嗅球・小脳などの広範な領域に比較的高いレベルで存在するのに比べ、BRINP2-および BRINP3-mRNA の発現レベルは低く、BRINP2 と BRINP3 は相補的な発現パターンを示した。神経活動依存的な BRINP の発現変化を解析した結果、グルタミン酸受容体アゴニストであるカイニン酸を投与したマウスの海馬において、BRINP1 の発現が特異的に投与後 6 時間をピークに増加することが明らかとなった。海馬の中でも歯状回における発現上昇が顕著であった (Motomiya et al. BBRC (2007))。また BRINP1 の経時的発現増加は、脳由来神経栄養因子 (BDNF) と類似のパターンを示した。

そこで、BRINP1-KO マウスにおいて、カイニン酸投与の影響を評価することとした。その結果、BRINP1 欠損マウスにおいては、カイ

ニン酸による興奮毒性によると考えられる、海馬 CA3 錐体細胞の変性が観察された。これらのことから、神経活動依存的に海馬歯状回で発現が誘導される BRINP1 は、苔状線維を介して CA3 錐体細胞を神経過興奮による細胞死から保護する作用を持つことが示唆された。

(4) BRINP1 欠損マウスが示す行動異常 行動実験の解析により BRINP1 欠損マウスは、野生型マウスに比べて、多動性および、不安様行動が少なく、社会性が低い、作業記憶の低下など、ヒトの統合失調症や ADHD に見られる症状に似た行動異常を示すことが明らかとなった。

2. 研究の目的

(1) 組織解析 BRINP1-KO マウスに見られる行動異常の起因となる脳の器質的変化を明らかにするために、免疫染色法等を用いた組織解析を行うことを目的とした。BRINP1-KO マウスの海馬歯状回において、神経新生が亢進していることを既に明らかにしている。海馬の神経回路網は、嗅内野からの貫通線維が歯状回の顆粒細胞へ、歯状回から苔状線維を通じて CA3 錐体細胞へ、CA3 からシャプアー側枝を通じて CA1 錐体細胞という興奮性の伝導経路と、抑制性の回路を含む複雑な構造を持っている。そこで、BRINP1 の欠損が、歯状回における神経新生の亢進に加えて、これらの神経回路網の構築にどのように影響するかを明らかにするために、歯状回ニューロン以外の神経細胞やグリア細胞の分化について解析することとした。また、通常より多く新生した細胞が成熟した神経細胞に分化するかどうかを解析することとした。

(2) てんかん誘導物質の作用解析 ヒトのてんかん患者の一部には、精神異常、認知障害、行動異常を併発することが知られている。海馬はてんかんの発症にも深く関わっている部位であることから、BRINP1 が行動異常の発現にどのように関与するのかを明らかにする目的で、てんかんモデルマウスを用いた BRINP の機能解析を試みた。てんかんの誘導には、ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストであるピロカルピンの腹腔内投与を行い、BRINP 発現の解析を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) マウス脳の免疫組織的解析 BRINP1 ヘテロ欠損マウス同士の交配により得られたマウスについて PCR 法により遺伝子型を確認した後、BRINP1-KO マウスを解析に用いた。マウスを麻酔下で灌流固定後、脳を摘出し凍結切片を作製した。免疫染色は、各種ニューロンおよびグリア細胞のマーカーに対する一次抗体で反応後、蛍光物質標識二次抗体お

よび DAPI による核染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。

神経新生の指標となる BrdU 取り込み細胞の解析には、BrdU を 30 mg/kg で腹腔内投与し、対象となる時間経過後に灌流固定を行った。BrdU 抗体による免疫染色の際は、クエン酸/スチーム法による抗原賦活を行い、BrdU および各種マーカーに対する一次抗体を反応させた。

(2) ピロカルピン投与てんかんモデルマウスの作成 C57BL/6J 系統マウスにピロカルピンの副次的効果を抑えるために臭化スコポラミンを 0.9 mg/kg で腹腔内に投与した。スコポラミン投与 15 分後に、ピロカルピンを 380 mg/kg で腹腔内投与し、強直性けいれんが確認されたところでジアゼパム 10 mg/kg を腹腔内投与し発作を鎮めた。スコポラミンのみを投与したマウスを対照とした。

定量的 RT-PCR による BRINP-mRNA および BDNF-mRNA の発現解析 ピロカルピンを投与したマウスより海馬を摘出し、トータル RNA を抽出した。DNase 処理後、ランダムプライマーおよび SuperScript®III を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型に、BRINP1, 2, 3 に特異的なプライマーペアと THUNDERBIRD® SYBR qPCR mix を用いて PCR を行った。神経活動の亢進の指標として BDNF の発現量を測定した。各遺伝子の発現量をハウスキープ遺伝子である GAPDH の発現量で割った値を相対的な遺伝子発現量として解析した。

In situ ハイブリダイゼーションによる BRINP 発現部位の解析 ピロカルピン投与マウスを灌流固定後、脳凍結切片を作製した。ジゴキシングニン (DIG) で標識した BRINP1, 2, 3 に対するアンチセンスプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、洗浄後アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体で反応後、NBT/BCIP を基質として発色を行って顕微鏡で明視野観察した。それぞれの BRINP に対するセンスプローブを用いたハイブリダイゼーションを行い、アンチセンスプローブによる発色が特異的であることを確認した。

4. 研究成果

(1) BRINP1 欠損マウス海馬における神経新生の亢進と神経分化 生後 7-10 週齢の BRINP1-KO マウスの海馬における神経新生の亢進の程度を、BrdU 陽性細胞および、増殖性細胞のマーカーである Ki-67 陽性細胞に対する免疫抗体染色により解析した。その結果、7, 8 週齢の BRINP1-KO マウスの海馬歯状回において BrdU 陽性、あるいは Ki-67 陽性細胞の数は、野生型マウスの約 1.7-2 倍である

ことが明らかとなった (図 1)。

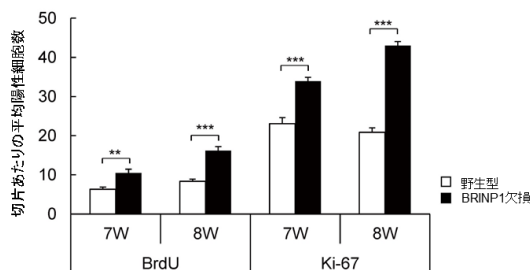


図 1. BRINP1 欠損マウスにおける神経新生の亢進

成体野生型マウスおよび BRINP1 欠損マウスに BrdU を投与し、1-5 週間後の BrdU 取り込み細胞を神経分化・神経細胞マーカーで免疫染色した。BrdU 投与 2 週間後、BRINP1 欠損マウスの海馬歯状回顆粒細胞下層において野生型マウスの約 3 倍の BrdU/ダブルコーチン二重陽性の神経細胞が存在した。一方、BrdU 投与 4, 5 週間後の BRINP1 欠損マウス海馬歯状回における BrdU/カルビンディン二重陽性細胞数は野生型マウスのものと同レベルであった。これらの結果より、BRINP1 欠損マウス海馬歯状回で産生された過剰な新生神経細胞は、ある程度まで分化するが、その後は、分化が進まない、あるいは生存できなくなり脱落すると考えられた。

(2) BRINP1 欠損マウスにおける神経細胞・グリア細胞マーカーの発現 野生型および BRINP1-KO マウスの海馬において、アストロサイトのマーカーである GFAP およびミクログリアのマーカー Iba1 に対する抗体で免疫染色を行った結果、これらのマーカーの発現レベルは、両遺伝子型において違いは見られなかった。また、オリゴデンドロサイトのマーカーである MBP や、抑制性介在ニューロンのマーカーである GAD67 の発現に関しても、両遺伝子型による違いは見られなかった。興味深いことに、BRINP1-KO マウスの海馬 CA1 領域におけるパルブアルブミン陽性の抑制性大型ニューロンの数が、野生型の約 1.7 倍存在することが明らかとなった。一方、CA3、歯状回 (DG) においては違いは見られなかった。これまでに、パルブアルブミン陽性の GABA 作動性ニューロンは CA1 錐体細胞に投射し、グルタミン酸作動性の出力を調節していること、選択的なパルブアルブミン陽性の GABA 作動性ニューロンの除去が空間作業記憶の形成を阻害することが知られている。これらのことから、BRINP1-KO マウスの CA1 錐体細胞に対する抑制性入力が増加が、作業記憶の低下をもたらす可能性が考えられる。

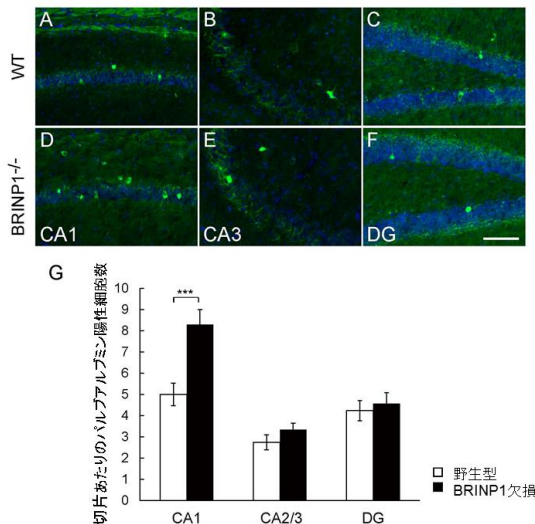


図2. BRINP1欠損マウスにおけるパルブアルブミン陽性抑制性ニューロンの発現

(3) ピロカルピン投与てんかんモデルマウスにおけるBRINP発現変化 ピロカルピン投与6時間後のマウスの海馬における各BRINP-mRNAおよびBDNF-mRNAの発現レベルを定量的RT-PCRにより解析した。その結果、BDNF-mRNAの発現量は、ピロカルピン投与により対照群に比べて約2.5倍に増加していた。一方、BRINP1-mRNAの発現は対照群の約2.3倍に増加するが、BRINP2-, BRINP3-mRNAの発現はピロカルピン投与により変化しなかった。(図3)

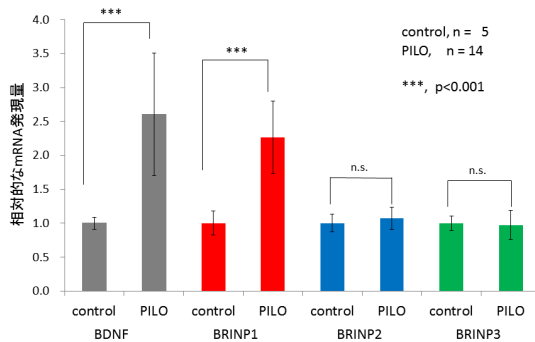


図3. ピロカルピンによるBRINP発現変化

さらに、BRINP1-mRNAの発現増加が海馬のどの領域で起こるのかを明らかにするために、*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。その結果、ピロカルピンを投与したマウスの海馬におけるBRINP1-mRNAの発現増加は歯状回において顕著であることが明らかとなった。RT-PCRの結果と同様に、BRINP2-, BRINP3-mRNAの海馬内での発現パターンについても、ピロカルピン投与による変化はなかった(図4)。

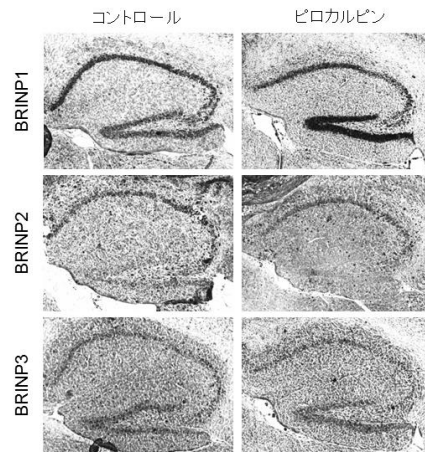


図4. *In situ*ハイブリダイゼーションによる海馬におけるBRINP-mRNAの発現解析

これらの結果はいずれも、BRINP1の有する細胞周期抑制能や活動依存的な誘導によりもたらされる細胞保護機能が、BRINP1-KOでは失われることにより、海馬の神経回路形成に異常が生じて、海馬に関連した行動異常を引き起こしていることを示唆している。各BRINPの欠損によって生じる海馬における組織および機能の異常をさらに詳細に解析することにより、ヒトの精神神経疾患の病因解明の鍵を握ると考えられる中間表現型(endophenotype)を明らかにできると考えられる。

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 1 件)

① Kobayashi, M., Nakatani, T., Koda, T., Matsumoto, K. I., Ozaki, R., Mochida, N., Takao, K., Miyakawa, T., Matsuoka, I. Absence of BRINP1 in mice causes increase of hippocampal neurogenesis and behavioral alterations relevant to human psychiatric disorders, *Molecular brain*, 2014, 7(1):12, DOI: 10.1186/1756-6606-7-12 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

① 小林三和子(代表)、高雄啓三、幸田敏明、宮川剛、松岡一郎 他2名
BRINP1-KOマウスの海馬におけるBDNF遺伝子の発現変化、第34回日本神経科学大会、2011年9月15日、横浜

② 小林三和子(代表)、高雄啓三、幸田敏明、宮川剛、松岡一郎 他3名
BRINP1欠損マウスにおける行動異常と海馬神経新生の異常について、第54回日本神経化学会第、2011年9月26日、金沢

③ 小林三和子 (代表)、高雄啓三、幸田敏明、宮川剛、松岡一郎 他 2 名
BRINP1-K0 マウスの海馬における BDNF 遺伝子の発現変化、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日、札幌

④ 小林三和子 (代表)、高雄啓三、幸田敏明、宮川剛、松岡一郎 他 1 名
神経過興奮による海馬神経変性からの保護における BRINP1 および BDNF の関与、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日、名古屋

⑤ 小林三和子 (代表)、幸田敏明、松岡一郎 他 3 名
A possible role of BDNF in BRINP1-associated neuroprotection in hippocampus、第 55 回日本神経化学会、2012 年 9 月 30 日、神戸

⑥ 小林三和子 (代表)、幸田敏明、松岡一郎 他 2 名
成体マウス海馬神経幹細胞の増殖・分化に対する BRINP1 の機能、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜

⑦ 越智大輔 (代表)、小林三和子、松岡一郎
ピロカルピン誘導生てんかんによる BRINP ファミリーの発現変化
Neuro2013 (第 56 回日本神経化学会、第 36 回日本神経科学大会他合同学会)、2013 年 6 月 20 日、京都

⑧ 越智大輔 (代表)、小林三和子、松岡一郎
ピロカルピン投与てんかんモデルマウスにおける BRINP 発現解析
第 52 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2013 年 10 月 26 日、松山

⑨ 小林三和子 (代表)、越智大輔、松岡一郎
マウス海馬における BRINP の発現に対するピロカルピンの効果
日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 一郎 (MATSUOKA, Ichiro)
松山大学・薬学部・教授
研究者番号： 40157269

(2) 研究分担者

幸田 敏明 (KODA, Toshiaki)
北海道大学・先端生命科学研究院・教授
研究者番号： 20170186

小林 三和子 (KOBAYASHI, Miwako)
松山大学・薬学部・助教
研究者番号： 30396329

(3) 連携研究者

宮川 剛 (MIYAKAWA, Tsuyoshi)
藤田保健衛生大・総合医科学研・教授
研究者番号： 10301780

小倉 明彦 (OGURA, Akihiko)
大阪大学・生命機能研究科・教授
研究者番号： 30260631

富永 (吉野) 恵子 (TOMINAGA (YOSHINO), Keiko)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号： 60256196

高雄 啓三 (TAKAO, Keizo)
生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・准教授
研究者番号： 80420397