

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：23701
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791188
 研究課題名（和文） 発達障害モデル動物大脳皮質における細胞内シグナル伝達異常とその病態形成への関与
 研究課題名（英文） Abnormalities of intracellular signaling in the cerebral cortex of neurodevelopmental disorder model mice.
 研究代表者
 宗宮 仁美（SOUJIYA HITOMI）
 岐阜薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：20548713

研究成果の概要（和文）：

妊娠期にウイルス二本鎖 RNA に類似した構造をもつ PolyI:C を投与されたマウスから誕生した仔マウス（妊娠期感染症モデル動物）は、外界からの情報をもとにエサの位置を記憶する手掛かり学習の学習効率が低下していた。その学習タスク試行時の大脳皮質内では、神経栄養因子シグナル分子であるリン酸化 ERK1/2 の発現が低下していた。この ERK1/2 のリン酸化の低下が学習効率の低下につながることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The neurodeveloping disorder model mice were made by injection Poly I:C, a synthetic analog of double-stranded RNA, to pregnant mice. The Poly I:C- treated mice offspring didn't learn cue-guided radial maze task efficiently. The number of pERK1/2 positive cells was significantly decreased in the cerebral cortex of Poly I:C-treated mice after the last task. The results obtained in this study suggest that the alterations of pERK1/2 expression in the cerebral cortex might cause the learning defect in the Poly I:C-treated mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：大脳皮質、神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

近年、疫学調査により妊娠期のインフルエンザウイルスなどの感染症が自閉症や統合失調症の発症リスクを高める環境因子であることが明らかにされている。これらの調査に基づき動物モデルが確立されており、妊娠期マウスにインフルエンザウイルスあるいはウイルス二本鎖 RNA と類似構造をもつ polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (Poly I:C) を投与すると、誕生した仔に社会行動性、自発行動などのヒトの精神疾患と類似した行動障害が生じることが報告されている。この

ような行動障害は、外界からの情報入力を知覚・認知を果たすと考えられる大脳皮質機能異常であると考えられる。実際に、自閉症患者の剖検脳の解析により大脳皮質の神経層の委縮および神経連絡不全等、発達過程の異常に基づく所見が多数報告されている。申請者らは、妊娠マウスに PolyI:C を投与して作成した妊娠期感染症モデル動物の大脳皮質構築過程の解析を行い、（1）神経発生タイミングの遅延、（2）大脳皮質神経細胞の機能的特性を左右する転写因子 Cux1、Brn1 の発現プロファイルの異常、（3）シナプス形成不全、（4）培養神経細胞において脳

由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)の刺激によるRas/MAPキナーゼ(ERK1/2)の活性化伝達の低下などを明らかにした。BDNFを含むニューロトロフィン(NTs)ファミリーは、(1)神経細胞層構築、(2)神経連絡の形成、(3)シナプス結合の選択という大脳皮質神経回路形成過程において必須分子である。それゆえ、NTsシグナル経路の不調は、神経回路網形成に重大な欠陥を生む危険性がある。また、自閉症や精神疾患の発症リスクを高める責任遺伝子の中には、MECP2やCADPSなどのBDNF発現に関与するものがあり、実際に自閉症患者の血清中においてBDNF含有量が変動しているという報告もある。従って、ERK1/2のリン酸化などNTsシグナルが発達障害の病態形成の鍵を握る分子であると考えられる。

2. 研究の目的

申請者らは疫学調査に基づく精神疾患モデル動物(妊娠期感染症モデル動物)の大脳皮質神経細胞において、上述のとおり(1)神経回路の形成に不可欠な神経栄養因子シグナル(NTs)不調、(2)神経細胞の機能的特性を左右する転写因子の発現プロファイルの変化を見出している。本研究では、(1)と(2)の事象の関連を調べることにより、病態脳の形成メカニズムを考察することを目的とし、(1)大脳皮質祖特異的遺伝子の発現変化が神経栄養因子シグナル伝達に与える影響、(2)妊娠期感染症モデル動物における外界からの入力情報伝達プロセスに与える変化を検討した。

3. 研究の方法

(1) 大脳皮質特異的遺伝子の発現抑制ベクターの作製

大脳皮質の第II-IV層に特異的に発現するCux1あるいはBrn1に対するshRNAをそれぞれ3種類ずつ設計した。そのshRNAをレンチウイルスベクターへ挿入し、293FT細胞を用いてウイルスを産生させた。ウイルスの力価は293細胞に感染させ、レンチウイルスベクターに組み込んであるGFPの陽性細胞数を計測することで同定した。

(2) 神経細胞の培養

胎生16日目のd/dYマウスの胎仔の大脳皮質を単離し、神経細胞を分散培養した。

(3) 妊娠期感染症モデルマウスの作製

妊娠9日目のddYマウスにPoly I:Cを20mg/kgの用量で腹腔内投与した。その後、誕生した仔を妊娠期感染症モデルマウスとし、8週齢になるまで通常飼育した。

(4) 妊娠期感染症モデル動物の手掛かり学習タスク

妊娠期感染症モデルマウスを食餌制限し、頬ひげからの情報をもとにエサ(報酬)の位置を覚えるように改良した8方向放射迷路を課した。エサのあるアームを正解(エサは4カ所設置)とし、最初の4選択のうちエサのあるアームに入った数およびエサを取り終えるまでの時間(試行時間)、同じアームに入った数等を計測した。

(5) 組織化学的解析

(4)の学習終了後、脳を摘出し、薄切切片を作製した。作製した切片を過酸化水素処理した後、2%ブロッカーにてブロッキングを行い、一次抗体(c-fosあるいはリン酸化ERK1/2;pERK1/2)と一晚反応させた。その後、二次抗体(ビオチン化抗ウサギ抗体)を反応させ、ABC溶液で切片を浸し、DAB-ニッケルにて発色した。その後、それぞれの陽性細胞数を計数した。評価した脳領域は図1に示した。また、全細胞数は、ニッスル染色した切片を用い、計数した。

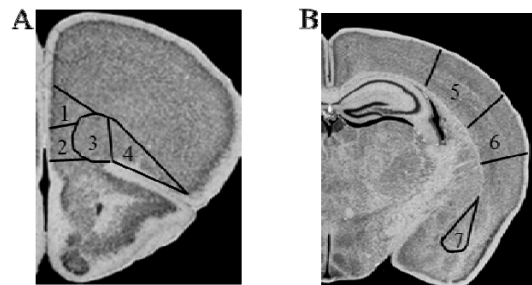


図1 組織化学的評価に用いた脳領域

A マウス前頭皮質部の脳切片

- 1 前辺縁皮質辺縁部(PrL)
- 2 眼窩前頭皮質内側部(MO)
- 3 眼窩前頭皮質腹側部(VO)
- 4 眼窩前頭皮質外側部(LO)

B マウス体性感覚野の脳切片

- 5 第一次体性感覚野、barrel field (S1BF)
- 6 第二次体性感覚野 (S2)
- 7 扁桃核

4. 研究成果

(1) 大脳層特異的遺伝子の発現変化が神経栄養因子シグナル伝達効率に与える影響

まず大脳皮質特異的遺伝子 Cux1、Brn1 の

発現抑制ベクターを3種類ずつshRNAの配列を設計し、レンチウイルスベクターを作製した。作製したベクターの遺伝子発現抑制効率を確認するため、蛍光タンパク質に大脳皮質特異的遺伝子Cux1、Brn1をつなげ、293-Flp細胞へ導入した。蛍光タンパク質の蛍光強度をもとに遺伝子の発現抑制効率を評価するシステムを構築した。この結果をもとに、ベクターを選別した。また、神経細胞への遺伝子導入をするためには高力価なウイルスが必要である。高力価を得るために様々な条件設定を行い、遺伝子導入への最適化ができた。さらに、培養下の神経細胞に神経栄養因子であるBDNFを添加した際に神経活動最初期遺伝子であるc-Fosや、活動依存的に変動する大脳皮質層特異的遺伝子がどのように発現変動するのかをリアルタイムPCRにて検討した。現在、作製した高力価の大脳皮質層特異的遺伝子発現抑制ウイルスを神経細胞へ感染させ、これらの発現が抑制されたとき、BDNFに対してどのように応答するのかを検討しているところである。

(2) 妊娠感染症モデル動物における外界からの入力情報伝達プロセス変化

① 手がかり学習行動評価

妊娠感染症モデル動物に頬ひげからの情報すなわち体性感覚情報を手がかりとしてエサの位置を覚えるという改良型8方向放射迷路を1日1回課した。なお、エサを報酬として用いるため、給餌制限を行った。妊娠感染症モデル動物も対照群のマウスも経時的に最初の4選択でエサのあるアームを選択する割合が試行を重ねるごとに上昇し、どちらの群も頬ひげからの情報とエサの位置を関連付けて学習できていると考えられた。しかし、妊娠感染症モデル動物では、全試行期間を通じて対照群に比して試行時間が延長していた。従って、妊娠感染症モデル動物では、頬ひげからの感覚入力と報酬であるエサの位置を結びつけることは可能ではあるが、その結びつけを効率よく行うことができないことが示唆された。

② 組織化学的解析

学習試行中における神経活動の変化を検討するため、①の学習タスク12日目のタスク終了後2時間後に脳を摘出し、神経活動最初期遺伝子であるc-Fosの発現分布および神経栄養因子シグナル分子であるpERK1/2の発現変化を解析した。この学習タスクには、報酬系を司る扁桃体、前頭皮質(前辺縁皮質辺縁部; PrL、眼窩前頭皮質外側部; L0、眼窩

前頭皮質腹側部; V0、眼窩前頭皮質内側部; MO)、頬ひげからの情報を受け取る体性感覚野(第1次体性感覚野; S1BF、第2次体性感覚野; S2)、が関与していると考えられるため、これらの脳領域に着目し、陽性細胞数の分布および数を検討した。c-Fos陽性細胞数は、妊娠感染症モデル動物と対照群でS1BF、扁桃体、前頭皮質のどの領域においても陽性細胞数、分布ともに有意な変化が認められなかった。しかし、S2領域では、妊娠感染症モデル動物では、c-Fos陽性細胞数が有意に減少していた。S2は体性感覚情報処理の副経路であるが、報酬系の情報処理に関与する脳領域との神経連絡が報告されていることから、妊娠感染症モデル動物では、体性感覚情報とエサという報酬が効率よく伝達することができていないと考えられる。

次に①の学習タスク終了後30分後に脳を摘出し、pERK1/2陽性細胞の計数と分布を検討した。その結果、前頭葉の全ての領域(PrL、MO、V0、L0)およびS2領域でpERK1/2陽性細胞密度が減少していた。一方、S1BFや扁桃体では変化が認められなかった。注意や情統合に関与する前頭葉では、学習時の神経活動を反映するc-Fosの発現には変化がないが、神経活動に伴いシナプス関連タンパク質の発現や機能を変化させる重要な分子のひとつであるpERK1/2が変化していた。このpERK1/2の発現変化が妊娠感染症モデル動物で認められた学習効率の低下に寄与するのではないかと考えている。今後、この学習におけるERK1/2の活性化が神経機能に対しどのような影響を与えているのか検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa S. Prenatal immune challenge compromises development of upper-layer but not deeper-layer neurons of the mouse cerebral cortex. *J Neurosci Res.* 89 1342-1350 (2011) 査読有
- ② Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa S. Prenatal immune challenge compromises the normal course of neurogenesis during development of the mouse cerebral cortex. *J Neurosci Res.* 89, 1575-1585 (2011) 査読有
- ③ Ito S, Nitta Y, Fukumitsu H, Soumiya H, Ikeno K, Nakamura T, Furukawa S. Antidepressant-like activity of

10-hydroxy-trans-2-decenoic Acid, a unique unsaturated Fatty Acid of royal jelly, in stress-inducibile depression-like mouse model. Evid Based Complement Alternat Med. 2012, 139140 (2012) 査読有

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗宮 仁美 (SOU MIYA HITOMI)
岐阜薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20548713

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 研究協力者

該当なし