

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430077

研究課題名(和文)ハイスループットアッセイ系を活用した神経細胞の成熟度の双方向性変化の解析と制御

研究課題名(英文) Analysis and regulation of bi-directional changes in maturation status of brain cells utilising in vitro highthroughput assay system

研究代表者

小清水 久嗣 (KOSHIMIZU, Hisatsugu)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：10610842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、培養マウス海馬神経細胞をハイスループットアッセイ系として用い、インフォーマティクス的手法とあわせ、神経細胞成熟度の双方向性変化の分子機構について探索した。さらに神経細胞の成熟度を効率的に変化させる薬物や遺伝子のスクリーニングを行い、歯状回神経細胞の成熟度を制御する方法の確立をめざした。成熟度変化に關与する候補シグナル分子や、成熟度変化を誘導する候補物質について複数を同定した。さらにGR過剰発現などの遺伝子改変やPDE阻害剤などの薬剤投与によりマウス海馬において「過成熟」状態が誘導される可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We sought to determine the molecular basis of the bi-directional changes in maturation status of brain cells, utilising primary mouse hippocampal (dentate gyrus) cultures as the in vitro highthroughput assay system. Bioinformatics was also applied for the analysis and we identified several signal molecules that can be involved in the bi-directional changes. We next screened for biological conditions that are able to lead to the changes in cellular maturation status, identifying treatments of several chemicals that may induce the maturation status changes.

研究分野：神経科学

キーワード：細胞成熟度 海馬 歯状回 統合失調症 うつ病

1. 研究開始当初の背景

代表者の所属する研究室で同定された顕著な精神疾患様の行動異常パターンを示す複数系統の遺伝子改変マウスの脳において、海馬歯状回の神経細胞が未成熟な状態に留まる「非成熟歯状回」という異常が見出された。この「非成熟歯状回」は、抗うつ薬投与や拘束ストレス負荷などの環境的要因でも、いったん成熟した神経細胞が「脱成熟」して誘導されるほか、抗てんかん薬や抗炎症薬投与などにより正常化することが明らかとなってきた。さらに統合失調症患者、双極性気分障害患者の死後脳においても「非成熟歯状回」様の脳内の異常が確認された。歯状回神経細胞の成熟度が双方向性に变化し、成熟度の異常が精神疾患に関連することが示唆されている。しかしながら、そのメカニズムは未だほとんど明らかとなっていない。

2. 研究の目的

神経細胞成熟度の双方向性変化の分子機構について探索し、さらに神経細胞の成熟度を効率的に変化させる薬物や遺伝子のスクリーニングを行う。歯状回神経細胞の成熟度を制御する方法の確立をめざす。

3. 研究の方法

脳細胞の成熟度変化がみられるマウスやヒトの遺伝子発現データについて、インフォマティクスの手法により成熟度の変化を誘導する候補物質の絞り込みを行った。

In vivo 条件では一度に検討できる条件が限られるため、多穴プレートで調製した初代培養ニューロンを *in vitro* のハイスループットアッセイ系として活用し、これらの候補物質について評価をおこなった。また、脳細胞の成熟度変化がみられるマウスから海馬ニューロンを培養し、各種シグナル分子の動態変化を調べ、成熟度変化について分子機序の探索を行った。

具体的な研究手法としては、qPCR 法による各種マーカー遺伝子の発現レベルの定量、生化学的手法によるシグナル分子の動態解析、ジーンチップによる網羅的遺伝子発現情報の取得、バイオインフォマティクスの手法 (米イリノイ大学のインフォマティクスツール・NextBio/BaseSpace や The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, NIH) を使用) によるパスウェイ解析などの方法を用い、これらの研究を実施した。

4. 研究成果

・歯状回ニューロンの成熟度異常 (非成熟歯状回) を示す *schunurri-2* (*Shn2*) KO マウスの海馬歯状回において、シグナル分子の動態を、

リン酸化抗体アレイや免疫細胞染色法などを用いて解析した。同マウスの歯状回では、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor ; BDNF) の下流で活性化するシグナル分子の複数においてリン酸化状態が亢進している可能性があることを見いだした (投稿準備中)。

・研究代表者の所属する研究室では、これまでに *Shn2* KO マウス歯状回において RNA-Seq により miRNA の発現解析を実施している。この解析結果について、*Shn2* KO マウスの歯状回におけるジーンチップを用いたトランスクリプトーム解析の結果 (研究代表者の所属する研究室で得られた成果) や、ヒト統合失調症患者の死後脳の miRNA 発現量の情報などとあわせ、バイオインフォマティクスツール・NextBio を用いインフォマティクスの解析を行った。モデルマウスや患者死後脳で共通して発現変化が変化している遺伝子の発現を制御する miRNA を複数特定した。

・グルココルチコイド受容体 (GR) の過剰発現をはじめとした複数の遺伝子改変や PDE 阻害剤など薬剤の投与によりマウスの海馬において「過成熟」が誘導される可能性を突き止めたほか、「過成熟」を正常化できる可能性のある薬剤・天然化合物の候補を絞り込んだ (投稿準備中)。さらに「過成熟」海馬で発現が変化している遺伝子には、炎症関連のものも多く、炎症が生じている可能性を明らかにした (投稿準備中)。「過成熟」を誘導できる薬剤は、「未成熟歯状回」をレスキューできる可能性がある (複数の薬剤についてすでに取得済みであり、「未成熟歯状回」を示すマウスにおいて検討する予定)。

・これまでの研究から、BDNF 経路が神経細胞の成熟度変化において鍵となるパスウェイである可能性が高いと考えられる。BDNF 欠損海馬 (歯状回) カルチャーを得るため (BDNF 全欠損マウスは胎性致死)、POMC-CRE マウス、*floxed*-BDNF マウスを交配し、歯状回特異的 BDNF 欠損マウスの作製を進めている。*pomc-cre* マウスおよび BDNF-*floxed* (*fBDNF*) マウスを交配し、歯状回ニューロン特異的 BDNF KO マウスの作成を行い、最終遺伝型の個体を複数得た。しかし、繁殖効率が低く、現時点ではカルチャーに用いるのに十分な匹数は得られていない (引き続き繁殖を行い、BDNF 欠損海馬カルチャーを用いて、BDNF 経路が成熟度変化において果たす役割について検討を行う予定)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Comprehensive Behavioral Analysis of Cluster of Differentiation 47 Knockout

Mice Koshimizu H., Takao K, Matozaki T, Ohnishi H, Miyakawa T, *PLoS ONE*, 9(2) e89584, 2014, 査読あり

②ENU-mutagenesis mice with a non-synonymous mutation in Grin1 exhibit abnormal anxiety-like behaviors, impaired fear memory, and decreased acoustic startle response Umemori J, Takao K, Koshimizu H., Hattori S, Furuse T, Wakana S, Miyakawa T, *BMC Research Notes*, 6 203, 2013, 査読あり

③ Deficiency of Schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Shoji H, Hattori S, Koshimizu H., Umemori J, Toyama K, Nakamura HK, Kuroiwa M, Maeda J, Atsuzawa K, Esaki K, Yamaguchi S, Furuya S, Takagi T, Walton NM, Hayashi N, Suzuki H, Higuchi M, Usuda N, Sahara T, Nishi A, Matsumoto M, Ishii S, Miyakawa T, *Neuropsychopharmacology*, 38(8) 1409-1425, 2013, 査読あり

[学会発表] (計 11 件)

① Transcriptomic “hyper-maturity” of the hippocampus in mice, Koshimizu H., Hagihara H., Ohira K., Takao T., Miyakawa T., Society for Neuroscience 45th Annual Meeting, 米国 Chicago, 2015 年

② Transcriptomic “hyper-maturity” of the hippocampus in mice, Koshimizu H., Hagihara H., Ohira K., Takao T., Miyakawa T., Annual Molecular and Cellular Cognition Society Meeting, 米国 Chicago, 2015 年

③ マウス海馬における「過成熟」現象, Koshimizu H., Hagihara H., Ohira K., Takao T., Miyakawa, 第 38 回日本神経科学大会, 神戸, 2015 年

④ Contrasting expression patterns for immaturity and maturity marker genes in the dentate gyrus between mouse lines with ‘immature dentate gyrus’ and mice overexpressing glucocorticoid receptor, Koshimizu H., Hagihara H., Takao T., Miyakawa T., Society for Neuroscience 44th Annual Meeting, 米国 Washington DC, 2014 年

⑤ Contrasting expression patterns for

immaturity and maturity marker genes in the dentate gyrus between mouse lines with ‘immature dentate gyrus’ and mice overexpressing glucocorticoid receptor, Koshimizu H., Hagihara H., Takao T., Miyakawa T., Annual Molecular and Cellular Cognition Society Meeting, 米国 Washington DC, 2014 年

⑥ Transcriptomic Effects of Antidepressant Treatment and Glucocorticoid Receptor-overexpression on the Maturation Status of Brain Cells in Mice, Miyakawa T., Koshimizu H., Ohira K., Hagihara H., Takeuchi R., Takao T., American College of Neuropsychopharmacology (ACNP) 53rd Annual Meeting, 米国 Phoenix, 2014 年

⑦ Contrasting expression patterns for immaturity and maturity marker genes in the dentate gyrus between mouse lines with ‘immature dentate gyrus’ and mice overexpressing glucocorticoid receptor, Koshimizu H., Hagihara H., Takao T., Miyakawa T., 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム, 東京, 2014 年

⑧ 「非成熟歯状回」を示すマウスおよびグルココルチコイドレセプター過剰発現マウスの歯状回における対照的な成熟関連遺伝子群の発現パターン, Koshimizu H., Hagihara H., Takao T., Miyakawa T., 第 37 回日本神経科学大会, 横浜, 2014 年

⑨ Dysregulation of BDNF signaling pathway in the hippocampus of mice with “immature dentate gyrus”, Koshimizu H., Ohira K., Hagihara H., Takao K., Takagi T., Kataoka M., Ishii S., Takahashi M., Miyakawa T., Society for Neuroscience 43rd Annual Meeting, 米国 San Diego, 2013 年

⑩ Dysregulation of BDNF signaling pathway in the hippocampus of mice with “immature dentate gyrus”, Koshimizu H., Ohira K., Hagihara H., Takao K., Takagi T., Kataoka M., Ishii S., Takahashi M., Miyakawa T., Annual Molecular and Cellular Cognition Society Meeting, 米国 San Diego, 2013 年

⑪ 歯状回ニューロンの成熟異常を示すマウスの海馬における BDNF-MAPK シグナル経路の調節異常, Koshimizu H., Ohira K., Hagihara H., Takao K., Takagi T., Kataoka M., Ishii S., Takahashi M., Miyakawa T., 第 36 回日本神経科学大会, 京都, 2013 年

〔図書〕(計 1 件)
行動テストバッテリー, 高雄 啓三, 小清水久嗣, 宮川 剛, 脳科学辞典
10.14931/bsd.4058, 2013 年 7 月

〔産業財産権〕
○出願状況 (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 :

○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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小清水久嗣 (KOSHIMIZU, Hisatsugu)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所
・助教
研究者番号 : 10610842

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

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