

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670155

研究課題名(和文) Grid2シグナル制御におけるBDNFの役割解明と応用

研究課題名(英文) Grid2 dependent regulation of BDNF

研究代表者

竹森 洋 (Takemori, Hiroshi)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：90273672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： NMDA受容体に由来するCa²⁺シグナルによる神経毒性は認知症等の様々な病因と考えられている。我々は、飼育中のマウス集団に遺伝性の歩行失調マウスを見出し系統化に成功した(系統名：TS3)。そして、原因がグルタミン酸受容体D2(Grid2)遺伝子の全長欠損による新規変異であることが示唆された。Grid2変異マウスはNMDA-R阻害剤に対する感受性が亢進していた。動態視力および動き順応の解析から、Grid2変異マウスは運動記憶の構築に異常があることが示唆された。BDNFの発現異常も観察されたことから、Grid2変異マウスはNMDA受容体に依存した記憶構築に重要であると示唆された。

研究成果の概要(英文)： We identified a mouse strain with a naturally occurring mutation and an ataxic phenotype that presents with severe leg cramps. To investigate the phenotypes of these mutant mice, we screened several phenotype-modulating drugs and found that memantine (10 mg/kg) disrupted the sense of balance in the mutants. Moreover, the mutant mice showed an attenuated optokinetic response (OKR) and impaired OKR learning, which was also observed in wild-type mice treated with memantine. Microsatellite analyses indicated that the Grid2 gene-deletion is responsible for these phenotypes. Patch-clamp analysis showed a relatively small change in NMDA-dependent current in cultured granule cells from Grid2 gene-deleted mice, suggesting that GRID2 is important for correct NMDA receptor function. In addition, Grid2 mutant mice expressed abnormal BDNF protein, suggesting that Grid2 mutant mice is helpful to analyze NMDA-R related memory.

研究分野：遺伝学

キーワード：Grid2 BDNF 運動記憶 遺伝学 マイクロサテライト解析

1. 研究開始当初の背景

65 歳以上の寝たきりの原因の約半数は神経疾患に分類される脳卒中や認知症である。患者数はこの 10 年で 5 倍の 250 万人まで達し、2025 年では 300 万人近くに達すると予想され、患者や家族のみならず支える社会の負担も限界に近づきつつある。

TS3 マウスは、マウス集団に偶然出現した小脳変性マウスで、マイクロサテライト解析の結果、グルタミン酸受容体 D2 (Grid2) の遺伝子のほぼ全長が欠損していることが明らかとなった。さらに、小脳のマイクロアレイ解析を行うと、CaMK1 発現低下による BDNF 発現低下と分布異常が同時に起こることを突き止めた。そこで、SIK2-KO マウスに交配し BDNF の発現回復を試みたところ、予想に反して病態が悪化した。このことは、TS3 の病態は BDNF の発現量に依存しなかった。さらに、薬理的解析から、TS3 マウスは NMDA 受容体の機能低下示唆されており記憶構築との関連が示唆された。

2. 研究の目的

NMDA 受容体に由来する Ca²⁺シグナルによる神経毒性は認知症等の様々な病因と考えられている。我々は、飼育中のマウス集団に遺伝性の歩行失調マウスを見出し系統化に成功した (系統名: TS3)。そして、原因がグルタミン酸受容体 D2 (Grid2) 遺伝子の全長欠損による新規変異であることが示唆された。また、TS3 マウス小脳では、NMDA 受容体機能低下とその下流の GABA 受容体機能不全が予想され、根本原因の 1 つとして神経栄養因子 (BDNF) の分泌不全が示唆された。

認知症薬の 1 種の NMDA 受容体阻害剤投与で、TS3 マウスは BDNF 分泌不全がより顕著になり完全に歩行不能に陥った。一方、脳梗塞などの物理的脳損傷において、Grid2 が小脳以外でも損傷部位で誘導され BDNF

誘導との相関も観察されたが、TS3 マウスでは BDNF が分泌されていなかった。

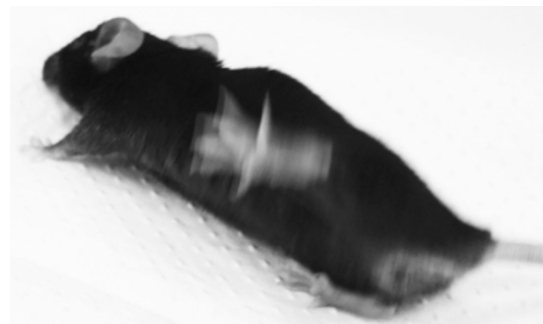
本研究では、新たな Grid2/BDNF 機能調節機構解明と関連疾患制御法の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

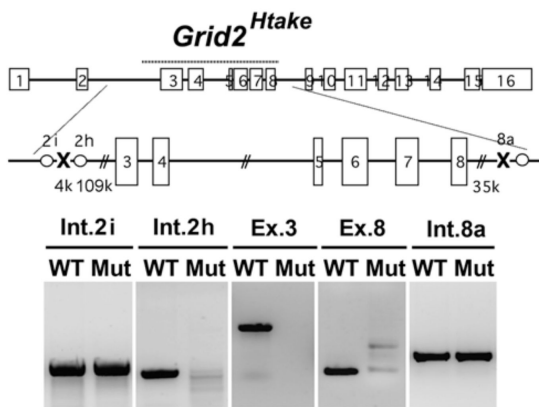
まず、Grid2 のイントロン内の欠損部位を確定させるために、5 kb ごとに、PCR にて欠損部位を絞り込んだ。これにより、ヘテロマウスを同定できるようになり、変異マウスの作成に役立った。また、NMDA 受容体機能低下に関しては、動態視力評価を行い確認した。さらに、小脳顆粒細胞の培養細胞で NMDA 受容体の機能評価と阻害剤メマンチンでの有効性の判定を行った。

BDNF の異常は、免疫染色を行うと伴に、NMDA 受容体の活性化状態の違いでの小脳の発現変動を評価した。BDNF の局在異常評価には、Nano-Luc タグ-BDNF 融合タンパクを作成し、pro-BDNF の切断に伴う Nano-Luc 活性の細胞-培地間の移行を検討することにより、Grid2 の BDNF 分泌不全への関与を検討した。

4. 研究成果



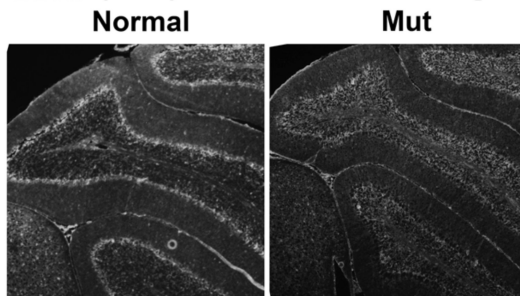
TS3 マウスの特徴は、後脚の麻痺による転倒である。責任遺伝子が Grid2 であることは、マイクロサテライト解析の後の Grid2-mRNA の全長 RT-PCR で容易に予想できたが、欠損箇所が割り出せなかったため、マウスの生産に苦労した。そこで、まずは欠損しているイントロの場所を決定した。



最終的にエクソン3の110kbの部分からエクソン8の35kb下流が欠損していることが明らかとなり、ゲノムPCRでヘテロマウスを検出することに成功した。

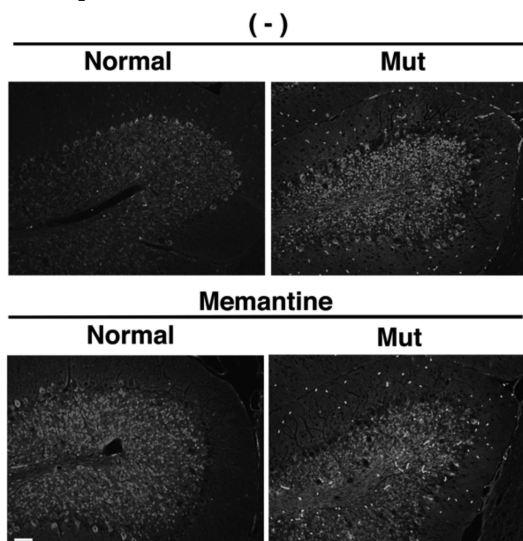
次に、ホモ欠損の小脳のBDNF発現異常を検討した。

BDNF (16W)



正常マウスはBDNF陽性細胞が小脳のプルキンエ細胞の下端に位置する顆粒細胞であるのに対し、TS3マウスでは顆粒細胞全体に位置していた。

Caspase3



BDNFと反対の挙動を示す因子を検索したところ、Caspase3が挙げられた。ただし、Caspase3も顆粒細胞の内部集団での発現が高かった。

TS3マウスが、NMDA-R阻害剤であるメマンチンに高感受性であることから、メマンチン投与後のBDNFの発現を比較した。その結果、BDNFは変動せず、Caspase3は増加した。BDNFが神経の生存に、Caspase3が神経細胞死に繋がると考えられるが、発現レベルでは相関しないことが示唆された。そこで、BDNFのプロセッシングに着目した。TS3マウスでは、BDNFはプロ体が多いことが示唆された。293細胞にGrid2を強制発現させ、Nano-Luc融合BDNFの挙動を観察したところ、Grid2はpro-BDNFを切断しやすくする働きがあることが示唆された。

Grid2は運動記憶に重要な役割を示すことから、動態視力を測定した。その結果、目物を追いかける能力と順応に異常があることが明らかとなった。マウスを収納したケージを緩やかに回転させた後の、BDNFの発現挙動を検討した結果、WTでは先に示した像がより鮮明になるのに対して、TS3マウスでは変化しなかった。この結果、体の回転に順応する際にBDNFが重要であること予想する。一方、Caspase3はメマンチン処理同様な挙動を示したことから、BDNFとCaspase3の変動は連動していないと結論した。

TS3マウスはGrid2の研究のみならず、めまいの研究に役立つと期待される。TS3マウスがよく転倒するのは、後脚の痙攣のみが原因ではなく、記憶構築(順応)の異常も原因の1つと予想する。

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2件)

- 1) Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, Sasaki T, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, Tabata T, **Takemori H**
Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line.
Genes (2014) 5: 1095-1114.
- 2) Sanosaka M, Fujimoto M, Ohkawara T, Nagatake T, Itoh Y, Kagawa M, Kumagai A, Fuchino H, Kunisawa J, Naka T, **Takemori H**
SIK3 deficiency exacerbates LPS-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of proinflammatory molecules in mice.
Immunology (2015) 145: 268-278

〔学会発表〕(計9件)

- 1) Kawamura T, Momozane T, Funaki S, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Sugimura K, Fuchino H, Kawahara N, **Takemori H**, Okumura M.
Carnosol and Derivatives have Potential as Novel OrganProtective Agents
asc-abstracts.org 62.04 Academic Surgical Congress (2015) Feb 3 Las Vegas
- 2) Alfredi A, Zhang Z, Mao W, Wang Y, **Takemori H**, Lu Z, Bast RC, Vankayalapati H
Highly potent and orally available SIK2 inhibitors block growth of human ovarian cancer cells in culture and xenografts.
Cancer Res (2014) 74(19 Suppl): Abstract nr 749
AACR 2014 April 5 San Diego
- 3) 熊谷彩子、伊東祐美、賀川舞、松田潤一郎、佐々木勉、田端俊英、**竹森 洋**
GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である
第51回日本臨床分子医学会 (東京) 2014年4月11日
- 4) 佐々木勉、**竹森 洋**、渡辺彰弘、由上登志郎、北川一夫、望月秀樹
脳虚血における CRTCI-PGC-1 α シグナルの動態についての検討

第51回日本臨床分子医学会 (東京)

2014年4月11日

- 5) 熊谷 彩子、伊東 祐美、賀川 舞、松田 潤一郎、佐々木 勉、田端 俊英、**竹森 洋**
GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である
第87回日本生化学会 2014年10月18日
- 6) 伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、淵野裕之、川原信夫、**竹森 洋**
肝糖新生における LKB1 下流因子 AMPK と SIK3 の重要性について
第87回日本生化学会 2014年10月18日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計2件)

- 1) 名称：メラニン生成抑制剤、化粧品、医薬組成物、及びメラニン生成抑制剤の製造方法
発明者：竹森 洋、熊谷彩子、賀川舞、伊東祐美、川原信夫、淵野裕之、杉村康司、黒井梓
権利者：独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社桃谷順天館
種類：特願
番号：2014-234698
出願年月日：平成26年11月23日
国内外の別：国内
- 2) 名称：プテロシン誘導体を含む軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤
発明者：妻木範行、
竹森 洋、淵野裕之、川原信夫
権利者：独立行政法人医薬基盤研究所、国立大学法人京都大学
種類：特願
番号：2014-130876
出願年月日：平成26年6月24日
国内外の別：国内・米国

取得状況(計0件)

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
竹森 洋 (TAKEMORI Hiroshi)
医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー
研究者番号：90273672