

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830044

研究課題名(和文)セロトニン神経路の発達・成熟に対する栄養因子の作用機序の解明

研究課題名(英文)Differential neurotrophic signals for the development of serotonergic neurons.

研究代表者

岩倉 百合子(Iwakura, Yuriko)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：40452081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：モノアミン神経系は脳の広範な領域に投射し、脳の発達や機能調節を担っている。そのため、脳の発達期におけるモノアミン神経系の発達・機能異常は、自閉症などを始めとする種々の神経精神疾患の病態に寄与すると考えられている。しかし分化終了後のモノアミン神経細胞の発達や生存に対して、個々の栄養因子の作用差や、セロトニン神経路の形態的・機能的な発達や成熟への関与については不明な点が多い。本研究では栄養因子群によるセロトニン神経の発達成熟に対する制御機構に着目し、この疑問に迫った。

研究成果の概要(英文)：Monoamine such as serotonin (5HT) and dopamine (DA) is a key modulator of brain development and functions. Recent studies also indicate the implication in the etiology or neuropathology of various brain diseases such as schizophrenia and autism. In early developmental stage, progenitors of both 5HT and DA neurons are located in the mid-hindbrain boundary. Of note, neurotrophic factors such as BDNF, GDNF and FGF2 show distinct trophic activities on 5HT and DA neuronal populations. However, the selectivity and the strength of each neurotrophic factor remains to be characterized for 5HT and DA neurons. Here we examined trophic features of growth factors in rat rhombencephalon cultures.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：セロトニン神経細胞 縫線核 栄養因子 サリドマイド

1. 研究開始当初の背景

セロトニン神経とドパミン神経は、共に菱脳領域に存在する前駆細胞より分化する。このようなセロトニン神経の発生過程には、線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーやBDNF等の栄養因子群が必要であることが知られている(参考文献1)。通常、これらの栄養因子群は分化完了後にも神経細胞の発達や維持、機能制御に大きく関与すると考えられる。しかし分化後のセロトニン神経の発達や生存に対して、個々の栄養因子がどのような作用差を示すのか、また、そのことがセロトニン神経路の形態的・機能的な発達や成熟、ひいては精神神経疾患の発症や病態と関与するのか、未だ不明な点が多い。

申請者はこれまでに、分化完了後のドパミン神経に対する神経栄養因子の作用について、EGFは中脳ドパミン神経の生存・発達、神経活動を制御する(文献2、3)、ドパミン神経路の発達過程におけるEGFシグナルの変調は、成長後の動物の認知行動を障害する(文献4、5)ことを報告している。これらの研究結果から、申請者は、同じ発生起源を持つ縫線核セロトニン神経細胞も、その分化完了後の発達過程で、種々の栄養因子の制御を受けると仮定した。また、この時期の神経栄養因子シグナルの変調は、セロトニン神経路の形態的・機能的発達だけではなく、行動・認知等の高次脳機能に持続的に影響する事も推定された。

また、催眠鎮静薬であるサリドマイドの副作用として、胎児の催奇形性の他に自閉症誘発が知られている。近年、神経病理学的にこのサリドマイド誘発性自閉症とセロトニン神経の発達抑制の関連が提唱されている(文献6)。セレブロンは軽度精神遅滞の原因遺伝子産物でもあることから、サリドマイドがセロトニン神経特異的に生存や発達を阻害する可能性が高い。従って、サリドマイドの作用機序を明らかにする事で、セロトニン神経路の発達と自閉症のような発達障害の関連性を検証する事が可能かもしれない。

2. 研究の目的

セロトニンやドパミンを含むモノアミン神経路は、脳の広範な領域に投射し、脳の発達や機能の調節を行っている。そのため、その発達障害や機能障害は種々の神経精神疾患の病態に寄与すると考えられている。申請者はこれまで、上皮成長因子(EGF)や脳由来神経栄養因子(BDNF)受容体(TrkB)シグナルの、ドパミン神経路に対する栄養作用を明らかにした(文献2、3、7)。それを踏まえ、本研究では「縫線核セロトニン神経」に焦点をあて、脳の発達期における神経栄養因子のセロトニン神経に対する栄養作用の実

態の解明を目指した。具体的な研究目標としてBDNF、FGF、GDNF等を中心に、セロトニン神経を標的とする各栄養因子の発達・成熟作用の形態的・機能的差異、サリドマイドによるセロトニン神経の発達阻害と各栄養因子との関連、の2点を設定した。

3. 研究の方法

(1) 各栄養因子の生存・発達への影響とその差異

ラット菱脳神経細胞初代培養系を用いた予備実験では、個々の栄養因子毎に、セロトニン神経の生存や形態的発達に対する作用の違いが見られた。そこで、免疫化学的手法やHPLCによるモノアミン測定法を用いて、細胞の生存や形態的・機能的発達を比較する。使用する栄養因子に関しては、FGFファミリー(FGF2・FGF4・FGF8)等を中心に用い、個々の作用比較も行った。

(2) サリドマイド及びその誘導体による、生存・発達抑制効果の検証：

サリドマイドとその誘導体(レナリドマイド・ポマリドマイド)処理によるセロトニン神経への発達抑制作用を、免疫化学的手法にて評価する。サリドマイドの催奇形性にはFGFシグナルが関与することが報告されていることから、FGF2などの栄養因子シグナルとの関連も合わせて検討した。

(3) セロトニン神経細胞の生存・発達障害に対する、ユビキチン-プロテオソーム系の関与の検証：

サリドマイドの標的分子の一つにセレブロン(ユビキチンリガーゼE3構成分子)がある。申請者の所属研究室では、セレブロンが縫線核セロトニン神経に存在し(文献8)、サリドマイド投与が発達終了後の動物の認知行動に影響を与える事を報告している(文献9)。セレブロンは軽度精神遅滞の原因遺伝子産物でもあることから、サリドマイドのセロトニン神経に対する発達阻害作用に関与する可能性が推定される。そこで、セレブロンノックアウトマウスやユビキチン-プロテオソーム系阻害剤を用いて、セロトニン神経に対する影響を検討した。

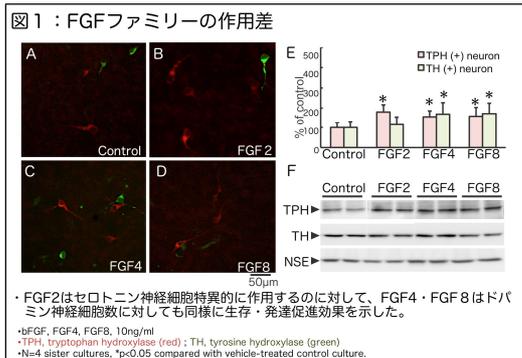
4. 研究成果

(1) 各栄養因子はセロトニン神経細胞の生存・発達に対して、異なる作用を示す

予備実験では、BDNF、FGF2、GDNFなどの栄養因子毎に、セロトニン神経の生存や形態的発達に対する作用の違いが見られた。そこで、免疫化学的手法を用いて、細胞の生存や形態的・機能的発達を比較した。FGFファミリー(FGF2・FGF4・FGF8)については、

いずれもトリプトファン水酸化酵素 (TPH, セロトニン神経マーカー) 陽性細胞の生存・発達に促進作用を示した。これらの栄養因子は、同じ発生源であるドパミン神経に対しても増殖因子として作用する。初代培養細胞では、微量のチロシン水酸化酵素 (TH, ドパミン神経マーカー) 陽性細胞の混入がみられる。しかしながら、FGF2 は 2 重染色性に対する変化を示さなかった (図 1)。
また、これまでドパミン神経細胞に対する栄養効果を報告している EGF については、セ

図 1 : FGFファミリーの作用差



ロトニン神経細胞に対する栄養効果は認められなかったものの、同じファミリーの栄養因子である NRG1 は生存・発達に促進作用を示した。

(2) TPH/TH 2 重陽性細胞は、発達段階初期に存在する

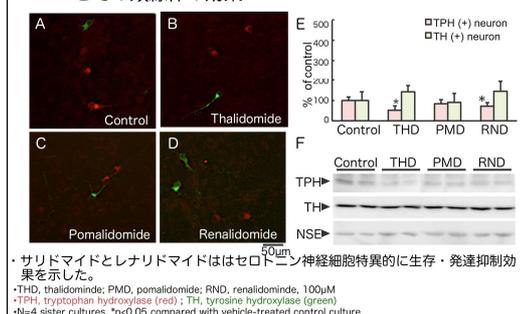
今回使用した初代培養系では、セロトニン神経細胞、ドパミン神経細胞以外にも、TPH/TH の 2 重陽性を示す細胞が認められた。BDNF や GDNF は、セロトニン細胞の生存・発達促進効果に加え、この 2 重陽性細胞に対しても生存・発達促進効果を示した。しかしながら、FGF2 や NRG1 は 2 重陽性細胞に対する影響は示さなかった。また、この 2 重陽性細胞は培養日数とともにその数が減少する。In vivo においても、この 2 重陽性細胞は、発達初期 (胎児期) にはセロトニン神経核である縫線核周囲に点在している。しかし、生後になるとその数は減少する。これは、セロトニン神経細胞が生後飛躍的な発達を遂げることに反比例する。このことから、この 2 重陽性細胞は発達初期に見られる分化・発達度が低い神経細胞であることが示唆される。

(3) サリドマイドはセロトニン神経細胞に対して生存・発達抑制効果を示す

予備実験では、サリドマイドはセロトニン神経の生存・発達に抑制作用を示した。そこで、サリドマイドとその誘導体 (レナリドマイド・ポマリドマイド) 処理によるセロトニン神経への発達抑制作用を、免疫化学的手法にて評価した。その結果、レナリドマイドは、サリドマイド同様の抑制効果を示した。然しながらポマリドマイドは、サリドマイドのような生存・発達抑制効果は見られなかった

(図 2)

図 2 : セロトニン神経の生存・発達に対する、サリドマイドとその類縁体の効果



・サリドマイドとレナリドマイドはセロトニン神経細胞特異的に生存・発達抑制効果を示した。

・THD, thalidomide; PMD, pomalidomide; RND, renalidomide, 100μM

・TPH, tryptophan hydroxylase (red); TH, tyrosine hydroxylase (green)

・N=4 sister cultures. *p<0.05 compared with vehicle-treated control culture.

この阻害効果は、TPH/TH 2 重陽性細胞に対しても認められたが、ドパミン神経細胞に対しては阻害効果が認められなかった。また、サリドマイドの添加後に washout してもセロトニン神経細胞に対する生存・発達阻害効果は変わらなかったことから、この阻害は一過性のものではないと考えられる。

このようなサリドマイドの生存・発達阻害機序を明らかにするため、これまでの実験でセロトニン神経細胞への生存・発達促進作用が認められた FGF2 や、BDNF などとの共投与を行った。その結果、サリドマイド添加による効果は、FGF2 や BDNF, NRG1 の共投与により阻害された。しかし、TPH/TH 2 重陽性細胞への生存・発達阻害に対しては、FGF2 と NRG1 は阻害効果を示さなかった。

(4) サリドマイドの生存・発達抑制効果はプロテアソーム経路とは独立している可能性がある

上記のようなサリドマイドのセロトニン神経細胞に対する発達抑制作用に、ユビキチン-プロテアソーム系が関与する可能性を検討した。サリドマイドを添加した培養細胞では、セロトニン神経細胞の生存・発達阻害と並行してウェスタンブロットによりユビキチン化されたタンパクの蓄積が認められる。ブロードなプロテアソームインヒビターである MG132 を培養細胞に添加すると、サリドマイド同様のユビキチン化タンパクの蓄積が見られるが、セロトニン神経細胞の生存・発達阻害は認められなかった。また、セレブロンノックアウトマウスの縫線核では、セロトニン神経細胞の数や分布に変化は見られなかった。これらのことから、サリドマイドのセロトニン神経細胞に対する発達抑制作用機序は、プロテアソーム系とは独立している可能性が示唆された。

(5) 考察と今後の展望

上記の成果により、これまでの報告されてきた BDNF や FGF2 に加え、NRG1 もセロトニン神経細胞の生存や発達に対して促進作用を持つことが明らかになった。これらの神経栄養因子は同じモノアミン神経細胞の系譜である中脳ドパミン神経細胞に栄養作用を示すことが知られているが、今回菱脳

培養細胞に存在するドパミン神経細胞に対しては、BDNF と異なり、FGF2 と NRG1 はそういった促進作用は示さない。また、培養初期に見られる TPH/TH2 重陽性細胞にも影響を及ぼさなかった。このことから、

FGF2 や NRG1 は特にセロトニン神経細胞としての性質（発達）を増強する効果が強い、 菱脳領域に存在するドパミン神経細胞は、中脳ドパミン神経細胞とは栄養因子に対する感受性が異なる、ことが示唆される。セロトニンとドパミン活動等の他の神経活動は互いに相互作用することも知られている。栄養因子群のドパミン神経路やセロトニン神経路の発達に対する個別作用、並びに相互作用の一端が明らかになることで、今後のモノアミン神経系全体の発達の理解に貢献することが想定される。

サリドマイドが示した生存発達抑制効果に関しては、セロトニン神経細胞だけでなく、TPH/TH2 重陽性細胞のようなより未熟な細胞についても阻害効果を示した。サリドマイドのターゲット分子がセレブロンであることから、ユビキチン-プロテアソーム経路がその作用機序に関連している可能性を想定したが、今回の実験結果からはその積極的な関与は認められなかった。むしろ、栄養因子の共投与実験で見られたように、栄養因子シグナル系の阻害が主な経路であることが示唆された。自閉症等の神経精神疾患の原因の1つとして、神経発達障害仮説が注目されている。それらの治療薬としては、セロトニントランスポーターやセロトニン代謝酵素の阻害薬、セロトニン受容体の拮抗薬も実際に多く用いられている。神経精神疾患の病態研究においてセロトニン神経系の発達・成熟機構の解明は、その発症メカニズムの理解等、病態基盤の理解にもつながると考えられる。

<参考文献>

- 1) Alenina N et al. (2006) Stem Cell Rev. 2, 5-10
- 2) Iwakura Y et al. (2011) J. Neurochem. 118, 45-56
- 3) Iwakura Y et al. (2011) J. Neurochem. 118, 57-68
- 4) Eda T et al. (2015) Neuroscience Lett. 547, 21-25
- 5) Iwakura Y et al. (2013) Front. Cell. Neurosci. 7:4. eCollection 2013.
- 6) Miyazaki K et al. (2005) Int J Dev neurosci. 23, 287-297.
- 7) Iwakura Y et al. (2008) J. Biol. Chem. 283: 15799-15806
- 8) Aizawa M et al. (2011) Neurosci Res. 69, 343-347
- 9) 那波宏之, 特開 2010-111650 (2010.05.20)

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)

Hama Y, Yabe I, Wakabayashi K, Kano T, Hirotsu M, Iwakura Y, Utsumi J, Sasaki H. Level of plasma neuregulin-1 SMDF is reduced in patients with idiopathic Parkinson's disease. (2015) Neurosci Lett. 2015 Feb 5;587:17-21.

Kato T, Abe Y, Hirokawa S, Iwakura Y, Mizuno M, Namba H, Nawa H. Neurobehavioral Differences Between Mice Receiving Distinct Neuregulin Variants as Neonates; Impact on Sensitivity to MK-801. (2015) Curr Mol Med. 2015;15(3):222-36.

[学会発表](計1件)

岩倉百合子、小林祐太郎、齋藤摩美、那波宏之、「セロトニン神経細胞の発達・成熟に対する選択的な栄養因子シグナルの作用機序の解明」(2015)BMB2015(第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会)、2015年12月1日-4日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

[その他]

研究室ホームページにて研究成果の一部を公開(現在更新中)

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~molecular/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩倉 百合子 (IWAKURA, Yuriko)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号：40452081

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：