

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461563

研究課題名(和文) 神経可塑性における細胞接着分子Arcadlinの役割

研究課題名(英文) Role of Arcadlin on synaptic plasticity

研究代表者

竹宮 孝子 (Takemiya, Takako)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70297547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：痙攣発作や学習記憶におけるArcadlinの作用を調べた。arcadlinノックアウトマウス(ko)の扁桃体キンドリングでは、koは発作波の進展が早く5日連続全身痙攣までの日数が少なかった。Open field testではkoの歩行速度が速く、Light-dark testでは初めて明所に出るまでの時間が短かった。Water mazeでは、若いkoに学習記憶の遅延が認められた。以上から、Arcadlinは、痙攣発作の進展を抑制し、若年期の記憶学習機能を促進するとともに、attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)に関係する可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of Arcadlin on synaptic plasticity such as epileptic seizure or learning and memory. We found that the development of amygdala kindling was facilitated in arcadlin knockout mice (ko) compared to wild type mice (wt). In addition, the day until 5 repetitive general convulsion was significantly less in ko. The walking velocity was significantly higher and the distance was significantly longer in ko compared to wt in open field test. The latency to enter the light area first from the dark area was significantly shorter in ko compared to wt in dark-light test. In Morris water maze test there was a significant delay in the latency to reach the goal platform in young ko compared to wt. Our study revealed that Arcadlin suppresses development of epileptic seizure and facilitates learning and memory in an age-dependent manner. Furthermore, Arcadlin might have a role on attention deficit hyperactivity disorder (ADHD).

研究分野：脳科学

キーワード：脳・神経 行動学 神経科学 Arcadlin arcadlin knockout mice epileptic seizure Morris water maze kindling

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでに、著者らの共同研究グループは、神経細胞の樹状突起スパインの発達とともに発現が増加し神経活動依存的に制御される遺伝子産物を多数発見し、これらの遺伝子産物と異常な神経活動であるてんかん痙攣発作との関連に注目してきた。その遺伝子産物の1つである細胞接着分子プロトカドヘリン arcadlin/PCDH8 (Arcadlin) については、てんかん動物モデルにおいて、けいれん発作後の海馬、扁桃核、大脳皮質等において著しい誘導が認められることがわかっている¹⁾。

(2) Arcadlin が同種結合することにより細胞内情報伝達系である TAO2-MEK3-p38 MAPK が活性化されて、arcadlin-N-cadherin 複合体が細胞内へ移行し、それがシナプスの形態変化に関与することが明らかとなった^{2) 3)}。つまり、Arcadlin はシナプス構築に必須な N-cadherin のエンドサイトーシスを促進することでスパイン密度を減少させるということが判明した²⁾。

(3) 一方、神経細胞に Arcadlin を過剰発現させるとスパイン密度は極端に減少し、また、arcadlin ノックアウトマウス ($acad^{-/-}$) のニューロンは、野生型マウス (wt) に比べスパイン密度が増加していることもわかった²⁾。

(4) これらの結果から、Arcadlin はスパイン密度の制御には不可欠なタンパクであると考えられる。そのスパイン密度はてんかん痙攣発作や海馬の重要な機能である学習・記憶に深く関与すると考えられるが、Arcadlin によるスパイン密度の制御が、実際にてんかん痙攣発作や学習記憶に関与するかどうか、さらに、関与するならばどのように関与するのかについては全くわかっていなかった。

2. 研究の目的

(1) Arcadlin によるスパイン密度の制御作用が病的な神経可塑性であるてんかん痙攣発作に及ぼす効果について、 $acad^{-/-}$ の扁桃核慢

性キンドリング実験を用いて調べる。

(2) 行動実験のスクリーニング実験から $acad^{-/-}$ の行動学的特徴を調べる。

(3) 学習記憶という生理的な神経可塑性に及ぼす Arcadlin の効果を、 $acad^{-/-}$ を用いた Morris water maze (MWM) から検証する。

(4) 一部の $acad^{-/-}$ を対象に、脳の magnetic resonance imaging (MRI) 画像を取得し、その変化と脳機能との関連を調べる。

(5) Arcadlin の細胞内情報伝達で重要な役割を果たしている Tao2 のノックアウトマウス ($Tao2^{-/-}$) を用いた行動解析実験から、その役割を検証する。

以上の研究結果から、脳の神経可塑性における Arcadlin の *in vivo* 作用を明らかにし、今後のてんかん治療や学習記憶障害治療の糸口とすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) てんかん原性獲得や発作の進展に対する Arcadlin の作用を調べるために、 $acad^{-/-}$ 5匹と wt 7匹を用いて扁桃核慢性キンドリング実験を行い、両群の発作脳波やけいれん関連行動を比較検討した。キンドリングは1日1回、閾値+50uA の刺激強度で実施し、脳波と行動を同時に記録した。

(2) 海馬の生理的な神経可塑性における Arcadlin の役割を調べる前に、スクリーニングとして Open field test、Light-dark test、Social interaction test を行った。

(3) MWM で空間学習記憶を調べた。マウスは12~16週齢の $acad^{-/-}$ 10匹と wt 12匹を用いたが、MWM については予備実験でマウスの週齢による差が観察されたため、20週齢の $acad^{-/-}$ 8匹と wt 8匹においても実施し、結果は分散分析を用いて $acad^{-/-}$ と wt を比較した。

(4) 20週齢の $acad^{-/-}$ と wt に対しては、小動物用 MRI を用いて脳の各部位の面積測定を実施した。各マウスについて、MRI 画像を6枚ずつ取得し、脳全体、大脳皮質、線条体、海

馬の面積を測定し、それぞれの部位ごとに面積を合算し、それを各個体の部位ごとの値として両群を比較した。

(5) Arcadlin の細胞内情報伝達に重要な役割を果たしている Tao2 の関与を検討するために、Tao2^{-/-}9 匹と wt9 匹を用いて行動解析を行い、Arcadlin の細胞内 signaling pathway の関連についても調べた。

4. 研究成果

(1) 扁桃体慢性キンドリング実験では、両群に閾値強度に差はなかったが、発作波の進展においては acad^{-/-}が有意に早く進展し、観察期間全体での発作波の総合計時間も acad^{-/-}が有意に長かった。また、全身発作が5日間連続で発現するようになるまでに要した日数は、acad^{-/-}が有意に少なかった。以上の結果から、Arcadlin はてんかん発作の進展を抑制することがわかった。また、痙攣発作は Arcadlin の誘導に深く関わっているため、痙攣発作が繰り返されれば、新たに誘導された Arcadlin は次の発作を抑制させるという自衛的な脳保護作用につながると考えられた。

(2) acad^{-/-}、wt とも別のマウス群を用いて行った行動実験では、Open field test において acad^{-/-}が wt より有意に速いスピードで移動し、一定時間内の歩行距離は有意に長かった。Light-dark test では、暗所と明所を分けるドアを開けてから暗所においたマウスが明所に初めて出るまでの時間を測定したところ、acad^{-/-}が有意に短かった。また、acad^{-/-}は1回の明所滞在時間は有意に短く、暗所から明所への移動回数は多い傾向を示した。つまり、Open field test、Light-dark test の結果から、acad^{-/-}は新しい環境下において行動量が増え、衝動的な行動も見られることがわかった。次に、社会性評価のために wt 同士、acad^{-/-}同士のペアで Box に入れて互いの干渉を見る Social Interaction を観察

したが、2匹間の鼻先の接触回数や時間には有意な差は認められなかった。しかし、社会性については、他の解析方法も含めさらに詳細な解析が必要と考えられた。

(3) MWM 実験では、学習記憶過程において acad^{-/-}に有意な遅延が認められた。MWM については、予備実験により、マウスの週令による差が観察されたため、さらに20週齢マウスの追加実験を行ったところ、20週齢のマウスはコントロールの wt と比較し有意差は認められなかった。以上の結果から、Arcadlin は若年期の学習記憶に関わることがわかった。また、痛みを伴う記憶への Arcadlin の作用を見るために passive avoidance test を行ったが、12~16週齢マウス、20週齢マウスともに有意差は認められなかった。

(4) 小動物用 MRI 実験は、20週齢の acad^{-/-}と wt を対象に、MRI 画像において脳全体、大脳皮質、線条体、海馬の面積を測定し両群を比較した。その結果、脳全体は acad^{-/-}が有意に小さかったにも関わらず、大脳皮質は acad^{-/-}が有意に大きかった。そのため、脳全体における大脳皮質の割合は、acad^{-/-}が有意に高かった。一方、線条体と海馬の面積については、両群間に有意差は認められなかった。MRI で観察された20週齢の acad^{-/-}の大脳皮質が wt に比べて有意に大きかったことが、12~16週齢の acad^{-/-}で見られた学習記憶過程の遅延が20週齢の acad^{-/-}では消失したことによりにどのように関係するかどうかについては、今後さらに検討する必要があると考えられた。

(5) Tao2^{-/-}と wt を用いて行動変化を観察し両群を比較検討した。acad^{-/-}で認められた Open field test での行動量の増加や Light-dark test での明所暗所移動回数増加、明所滞在時間短縮など、多動傾向を示す行動異常は Tao2^{-/-}では認められなかった。しかし、暗所

から明所に最初に出るまでの潜時は acad^{-/-} 同様に Tao2^{-/-}で有意に短く、Tao2^{-/-}に衝動性があることが示された。また、MWMにおいて acad^{-/-}で認められた学習記憶過程の遅延は、Tao2^{-/-}では認められなかった。また、Social interaction にも有意差は認められなかった。以上の結果から、acad^{-/-}に認められた多動傾向と衝動性のうち、衝動性は Tao2^{-/-}にも認められたものの、多動生については確認することができなかった。これらの結果をふまえ、行動異常に関係する Arcadlin の細胞内情報伝達メカニズムについては、再検討する必要があると考えられた。

(6) 以上の結果から、acad^{-/-}は wt に比べ、てんかん痙攣発作の進展が早く、新しい環境におかれた場合に総行動量と衝撃的行動が増え、若年期の学習記憶機能は低下していることがわかった。つまり、Arcadlin は、てんかん痙攣発作の進展を抑制するとともに生理的な学習記憶機能は年齢依存的に促進する作用を持つことがわかった。さらに、Arcadlin が、多動や衝動性を特徴とする attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) に関係する可能性も示唆された。

<引用文献>

- 1) Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*. 11(2): 1993, 371-86.
- 2) Yasuda S, Tanaka H, Sugiura H, Okamura K, Sakaguchi T, Tran U, Takemiya T, Mizoguchi A, Yagita Y, Sakurai T, De Robertis EM, Yamagata K. Activity-induced protocadherin arcadlin regulates dendritic spine number by triggering

N-cadherin endocytosis via TA02beta and p38 MAP kinases. *Neuron*. 56(3): 2007, 456-71.

- 3) Sugiura H, Tanaka H, Yasuda S, Takemiya T, Yamagata K. Transducing neuronal activity into dendritic spine morphology: new roles for p38 MAP kinase and N-cadherin. *Neuroscientist*. 15(1): 2009, 90-104. doi: 10.1177/1073858408324024.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1) Hosotani R, Inoue W, Takemiya T, Yamagata K, Kobayashi S, Matsumura K. Prostaglandin transporter in the rat brain: its localization and induction by lipopolysaccharide. *Temperature* 査読有 2:3, 2015, 425-434.
- 2) Shimada T, Takemiya T, Hiroko Sugiura and Yamagata K. Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Epilepsy. *Mediators Inflamm*. 査読有 Volume 2014, article ID 901902, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/901902>
- 3) Takeuchi C, Matsumoto Y, Kohyama K, Uematsu S, Akira S, Yamagata K and Takemiya T. Microsomal prostaglandin E synthase-1 aggravates inflammation and demyelination in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurochem Int*. 査読有 62, 2013, 271-280.
- 4) Takemiya T and Takeuchi C. Traveled distance is a sensitive and accurate marker of motor dysfunction in a mouse model of multiple sclerosis. *ISRN Neurosci*. 2013 査読有 2013, 1-4.
- 5) Takeuchi C, Yamagata K and Takemiya T. Variation in EAE scores in a mouse

model of multiple sclerosis. *Wr. J. Neurol.* 査読有 3(3), 2013, 56-61.

- 6) Takemiya T and Kanato Yamagata K.
Intercellular signaling pathway among endothelia, astrocytes, and neurons in the excitatory neuronal damage. *Int. J. Mol. Sci.* 査読有 14, 2013, 8345-8357.

[学会発表] (計 3 件)

- 1) Takako Takemiya, Marumi Kawakami, Kanato Yamagata, Kumiko Fumizawa. Role of arcadlin in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 7 月 22 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 2) Takako Takemiya, Kumiko Fumizawa, Kanato Yamagata and Marumi Kawakami. Age-dependent effects of Interleukin-1 on learning and memory in mice. 第 38 回日本神経科学大会 2015 年 7 月 30 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- 3) Takako Takemiya, Chisen Takeuchi, Kanato Yamagata. Microsomal prostaglandin E synthase-1 aggravates inflammation and demyelination in mouse model of multiple sclerosis. 第 56 回日本神経化学会大会、第 36 回日本神経科学大会、第 23 回日本神経回路学会大会合同大会 Neuro2013 2013 年 6 月 21 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹宮 孝子 (TAKEMIYA, Takako)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 70297547