

令和元年6月28日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07989

研究課題名(和文) 認知行動障害を誘発するドパミン神経修飾の経時的解析

研究課題名(英文) Analysis of cognitive behavioral disorders induced by neurotrophic factor in developmental dopaminergic neuron

研究代表者

水野 誠 (MIZUNO, MAKOTO)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・主任研究員

研究者番号：20345515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：上皮成長因子はドパミン作動性神経系の分化発達ならびにその機能維持に働くことが示唆されている神経栄養因子であり、細胞間の相互作用を担う拡散性のタンパク質因子である。今回、上皮成長因子による神経炎症に対する働きを調べるために、マウスに投与し炎症誘発と行動との関係を解析した。その結果、動物の社会性行動の障害は発達段階でのシクロオキシゲナーゼの発現誘導が関わっていることを見いだした。その障害はドパミン神経系の発達段階において、妊娠14日目前後に影響を受けることが判明した。これらことから、出生前の前頭皮質における炎症誘発がドパミン神経に作用し社会性行動異常を誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内炎症はこれまで多くの場合、変性疾患において神経細胞死との関係で研究がなされてきたが脳内炎症が神経変性を伴うことなくプロスタグランジンが脳神経機能を修飾し、結果として社会性行動変化をもたらした研究結果は、神経変性疾患にともなう伴う認知行動障害は神経細胞の数的変化だけではなく、機能変化で一部は説明できる可能性を示唆した。社会性障害に対するシクロオキシゲナーゼの脳内で発現が変化し、それに伴い行動障害が見られる時期が明らかになり起因時期から障害発症期までに対処法を考える可能性が出来る。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor (EGF) is protein factors which enhance survival, maintenance and neurite outgrowth of midbrain dopaminergic neurons. To evaluate a potential neuroinflammatory role of the EGF, we examined the neurobehavioral consequences of EGF administration as well as its effects on inducible prostaglandin synthetase (cyclooxygenase 2; Cox-2) expression in mice. Neuroinflammation is also implicated in a number of developmental disorders. Inducing of EGF to mice showed social behavioral abnormalities which are related with enhances of the expression of Cox-2. However mice with social behavioral dysfunction exhibited normal locomotor and learning activities and normal expression levels of dopaminergic neuron related proteins and dopamine metabolism. We conclude this EGF-triggered neuroinflammatory process is mediated in part by Cox-2 activity in developmental stages of around postnatal day14 to generate neurobehavioral abnormalities.

研究分野：薬理学

キーワード：発達障害

1．研究開始当初の背景

上皮成長因子（EGF）や脳由来神経栄養因子（BDNF）はドパミン作動性神経系の分化発達ならびにその機能維持に働くことが示唆されている神経栄養因子であり、細胞間の相互作用を担う拡散性のタンパク質因子である。一方、プロスタグランジン（PG）は、アラキドン酸から代謝合成される PGD₂、PGE₂、PGF₂、PGH₂、PGI₂、TXA₂ などからなり、炎症や損傷修復など多くの生体反応を仲介する脂質メディエーターである。なかでも、EGF による炎症シグナルは、プロスタグランドの初期合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ 2（COX2）を活性化し、同時にその基質となるアラキドン酸の産生も促進させ、その結果、プロスタグランドの合成を促す。しかし脳での受容体レベルが他臓器に比べ低いことから、その脳研究は比較的遅れている。これまでの知見から、脳内プロスタグランドは何らかの機序で社会性行動や情動行動を制御していることが推察されていた。申請者はサイトカインを投与した動物の行動異常は、COX2 の誘導とそのプロスタグランド産生に依存していることを発見した。このモデルでは、サイトカインとして EGF を線条体内に持続注入したところ線条体を中心に COX2 の誘導が観察され、ラテント学習障害やプレパルスインヒビションなどの認知行動に障害が現れることを見出したものである。EGF はドパミン作動性神経系を刺激することが知られているので、同時にドパミン代謝との関係も検討した。それらを行った結果、確かに EGF 投与でドパミンの合成と放出が亢進していることを示唆するデータが得られた。ここで重要なことは、COX2 阻害剤の投与でドパミン代謝の亢進が抑制され、認知行動変化が回復したことである。さらに認知機能障害モデル動物で見られる行動障害は、EGF 受容体阻害剤の投与で改善することが認められた。つまり、EGF の作用からのシグナルは、プロスタグランドを介してドパミン神経活動を刺激することで、一連の行動障害を引き起こしていたのである。

2．研究の目的

近年、脳内変性疾患だけでなく、一部の自閉性疾患や精神疾患では、脳内で炎症シグナル活性化、プロスタグランド産生、ドパミン神経の活性化がその病態に関与すると提唱されている。本研究では、発達期での大脳皮質のどの時期で、上皮成長因子により脳内で誘導され、合成されたプロスタグランドによる炎症シグナルが、その後の社会性行動障害をもたらしているのか明らかにすることを本研究の目的とした。マウスを用いて、炎症を誘発する EGF の注入時期を変えて、発達時期での COX2 発現と、ドパミン神経系の活動と代謝を比較し検討することで、発達後の社会性行動との関与について解明する。

3．研究の方法

社会性行動の障害を有するマウスの作製とそれらを用いた行動学的解析を行った。

（1）妊娠マウスの発達段階（妊娠 1 日、妊娠 7 日、妊娠 14 日、生後 1 日）において、上皮成長因子を投与し、発達段階における炎症誘発の影響をシクロオキシゲナーゼ（COX2）の発現

量変化で測定する。

(2) 妊娠マウスの発達段階(妊娠1日、妊娠7日、妊娠14日、生後1日)において、上皮成長因子を投与し、投与群のマウスを用いて成熟後に行動解析(自発運動量、社会性行動、不安様行動、学習)を行う。

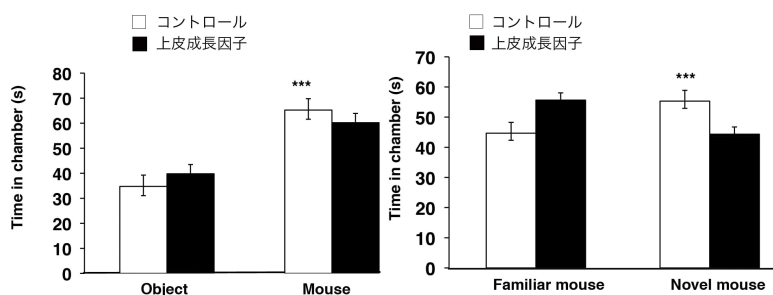
(3) 上皮成長因子を妊娠マウスの発達段階(妊娠7日、妊娠14日)投与した時に、社会性障害を有するマウスが現れたので、それを用いて生後にCOX2阻害剤を大脳皮質内に投与した。一方で、妊娠14日に上皮成長因子とCOX2阻害剤同時に投与し、阻害剤の影響を観察する。

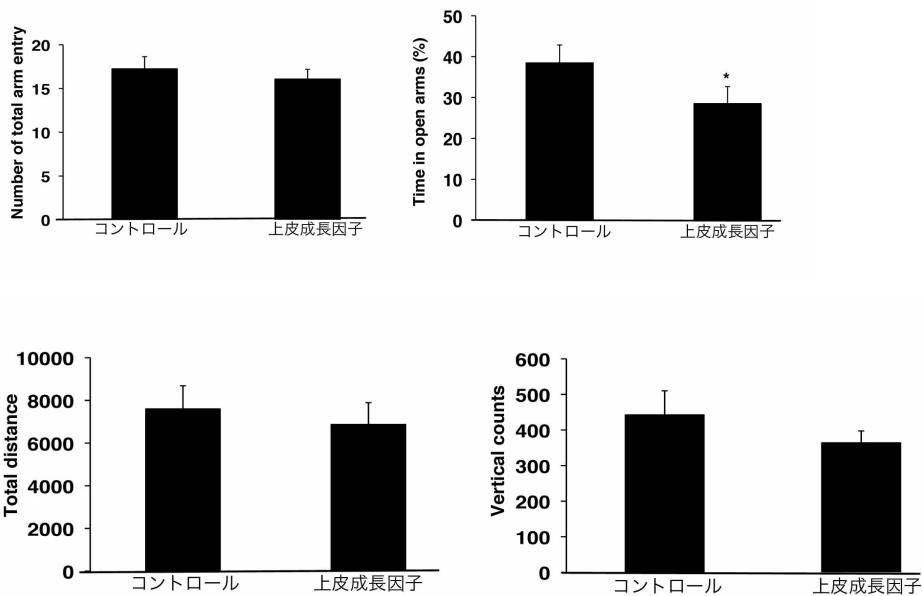
(4) 社会性障害を有するマウスが現れたので、成熟後に免疫組織学的にドパミン関連たんぱく質の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 妊娠マウスの発達段階(妊娠1日、妊娠7日、妊娠14日、生後1日)において、上皮成長因子を投与した14日目の投与群のマウスにおいて、ウエスタンブロッティング法で解析したところ、前頭皮質におけるシクロオキシゲナーゼ(COX2)の発現誘導が増加した。一方で、海馬と線条体では増加が見られなかった。

(2) 妊娠マウスの発達段階(妊娠1日、妊娠7日、妊娠14日、生後1日)において、上皮成長因子を投与したところ、妊娠14日に投与したマウスにおいて、社会性障害が認められたが、妊娠1日、生後1日に投与したマウスでは社会性障害が見られなかった。妊娠7日に投与したマウスにおいて、不安様行動が認められた。各発達段階(妊娠1日、妊娠7日、妊娠14日、生後1日)において投与し、運動量を測定したところ、違いは見られなかった(下図)。学習記憶に関しても変わらなかった。





(3) 妊娠14日に投与したマウスにおいて、成熟後の時期にシクロオキシゲナーゼ阻害剤を大脳皮質内に浸透圧ポンプを用いて持続注入し、行動を解析したところ、改善の効果は認められなかった。妊娠14日に上皮成長因子とシクロオキシゲナーゼ阻害剤を同時に投与した場合、有意はないが回復する傾向が認められた。

(4) 免疫組織学的にドパミン関連たんぱく質の発現を解析したが、大脳皮質内では発現に変化は認められなかった。TH (チロシンヒドロキシラーゼ) も大脳皮質内での変化はなかった。さらに大脳皮質の形状を観察したが、違いは確認されなかった。

以上のように、妊娠7日から14日目からの外部刺激による炎症誘発が、その成熟後での社会性行動の障害を惹起することが認められた。しかし、大脳皮質内への阻害剤投与でも改善しなかったが、炎症が起きている時期に阻害剤の採用は有効であった。社会性障害が発生しているマウスを用いてドパミン関連たんぱく質の発現量解析でも変化はなかったことから、炎症による社会性障害は他のモノアミンやシグナル経路が関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

2018年

Ito H, Morishita R, Mizuno M, Tabata H, Nagata KI. Rho family GTPases, Rac and Cdc42 control the localization of neonatal dentate granule cells during brain development. Hippocampus 2018 Nov 2

Ito H, Morishita R, Mizuno M, Kawamura N, Tabata H, Nagata KI. Biochemical and Morphological Characterization of a Neurodevelopmental Disorder-Related Mono-ADP-Ribosylhydrolase, MACRO Domain Containing 2. *Dev Neurosci*. 2018;40:278-287.

Ibaraki K, Mizuno M, Aoki H, Niwa A, Iwamoto I, Hara A, Tabata H, Ito H, Nagata KI. Biochemical and Morphological Characterization of a Guanine Nucleotide Exchange Factor ARHGEF9 in Mouse Tissues. *Acta Histochem Cytochem*. 2018;51:119-128.

Hamada N, Mizuno M, Tomita H, Iwamoto I, Hara A, Nagata KI. Expression analyses of Dusp22 (Dual-specificity phosphatase 22) in mouse tissues. *Med Mol Morphol*. 2018;51:111-117.

Ito H, Mizuno M, Noguchi K, Morishita R, Iwamoto I, Hara A, Nagata KI. Expression analyses of Phactr1 (phosphatase and actin regulator1) during mouse brain development. *Neurosci Res*. 2018;128:50-57.

2017 年

Goto M, Mizuno M, Matsumoto A, Yang Z, Jimbo EF, Tabata H, Yamagata T, Nagata KI. Role of a circadian-relevant gene NR1D1 in brain development: possible involvement in the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Sci Rep*. 2017;7:43945.

Hamada N, Negishi Y, Mizuno M, Miya F, Hattori A, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Tabata H, Saitoh S, Nagata KI. Role of a heterotrimeric G-protein, Gi2, in the corticogenesis: possible involvement in periventricular nodular heterotopia and intellectual disability. *J Neurochem*. 2017;140:82-95.

Giridharan VV, Thandavarayan RA, Arumugam S, Mizuno M, Nawa H, Suzuki K, Ko KM, Krishnamurthy P, Watanabe K, Konishi T. Schisandrin B Ameliorates ICV-Infused Amyloid Induced Oxidative Stress and Neuronal Dysfunction through Inhibiting RAGE/NF- κ B/MAPK and Up-Regulating HSP/Beclin Expression. *PLoS One*. 2015;10:e0142483.

Nagano T, Mizuno M, Morita K, Nawa H. Pathological Implications of Oxidative Stress in Patients and Animal Models with Schizophrenia: The Role of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling.

Curr Top Behav Neurosci. 2015;17:1-18.

[学会発表]

なし

[図書]

なし

[産業財産権（特許権、実用新案権、意匠権）]

なし

[その他]

なし