

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15554

研究課題名(和文)ASIC1aノックアウトマウスを用いた育児障害の研究

研究課題名(英文)Maternal behavior impairments in ASIC1a knockout female mice

研究代表者

若林 健二郎(Wakabayashi, Kenjiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20418867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：酸感受性イオンチャンネル1a;Acid-sensing ion channels (ASIC1a)は存在するシナプスにおいて信号伝達機能を担っている。ASIC1aのノックアウトマウスにはDATの発現の低下をはじめとするmedial preoptic area (MPOA)からventral tegmental area(VTA) さらにNucleus Accumbens (NA)の領域に投射しているモチベーション回路のドーパミンニューロンの信号伝達機能の低下があり、ASIC1aノックアウトマウスは母性行動異常のモデルマウスとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The acid-sensing ion channel (ASIC) family is a major branch of the mechanosensory degenerin/epithelial Na⁺ channel superfamily. Here, we report that acid-sensing ion channels (ASICs) type 1a knockout (KO) female mice exhibit the impairment in maternal behavior. The ASIC 1a KO female mice also show the downregulation of the dopamine transporter (DAT). While the function of these interactions is not well understood, it might be possible that the interactions between coexisting plural channels and transporters play some crucial roles to maintain the synaptic action. In this paper, we propose that the ASIC 1a KO female mice express the impairment in maternal behavior from the downregulation of the DAT.

研究分野：小児整形外科

キーワード：育児障害 酸感受性イオンチャンネル ドーパミン トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

我々は整形外科医として主に小児整形外科の領域で診療を行い、リーメンビューゲルによる先股脱治療の全国調査 (Journal of orthopaedic science, 2013, 18(5):749-53. PMID:23812768)等について発表をしてきた。そんな我々にとって、病院を訪れる「親子」というと「子供とその母親」のペアが大半であり、母子の温かい触れ合いに出会うと明日からの臨床活動に意欲の高まりを感じている。しかし、近年、子育てに困難を感じる母親が多いことが、メディアで盛んに取り上げられるようになっており、それと同時に子育て拒否からの児童虐待といった事件も盛んに報道されるようになっており、母親から子供への愛着形成そして育児障害のメカニズムには社会から高い関心が寄せられている。

2. 研究の目的

酸感受性イオンチャンネル 1a; Acid-sensing ion channels (ASIC1a)はその阻害薬が整形外科領域では、組織の酸性環境における知覚過敏性の強度の疼痛に対する特効薬として注目を集め始めている。今回我々は、ASIC1aのノックアウトマウスの雌に高度の育児障害と放置虐待が発生する事を発見し、ASIC1aが育児障害の原因因子の1つとして証明されれば、近年社会問題となっている育児障害の発生機構の基礎医学的な解明において大きな発展が期待されると考えた。本研究の目的は新しい育児障害の因子としての ASIC1aの重要性を確認し、近年社会から高い関心が寄せられている母親の愛着形成そして育児障害のメカニズムの解明、治療法確立への分子生物学的アプローチの開発に貢献するものである。

3. 研究の方法

日齢をマッチした ASIC1a ノックアウトマウスの wild-type (+/+), mutant homozygote (-/-), heterozygote (+/-)の雌のマウスを用いて、仔を巣に集める; 巣作り動作; 仔の上にもたがって保温、授乳するといった項目について行動生理学的検査を行った。

ASIC1a ノックアウトマウスは129マウス由来の ES 細胞を用いて ASIC1a 遺伝子の約 400 bp 上流に焦点を当ててネオマイシンカセット; (PGK)-neo を導入している。これを C57-BL6J 系統のマウスに挿入してキメラ作成し F11 までバッククロスし系統を確立してある。遺伝子型の確認にはマウスの尾部を先端約 1 cm 切除し抽出キット: Maxwell® 16 Instrument* & Mouse Tail DNA Purification Kit* (Promega Co, Madison, USA)を用いて抽出し、これを AmpliTaq Polymerases (Ambion, Austin, USA) を用いてプライマーとして GCCTACCGGTGGATGTGGAATGTGT and GAGCGGCAGGTTTAAAGGAATGCTA を用いて Gene Amp PCR Systems 2700 (Applied Biosystems; USA)で RT-PCR を 30 サイクル

かけ、ゲル電気泳動して発色し確認した。

出産後雌マウスの育児行動テストとして、妊娠後期になったマウスは一匹ずつ別個のケージへ移動して飼育し、行動生理学検査は出産後厳密に14から27時間の間に開始している。行動生理学検査は飼育舎が消灯してから2時間後に開始し22:00から23:30に限定して行う。検査中はテスト室内を調光装置に接続した赤色のライトで照明し、照度計 (T-10 digital illuminance meter, Konica Minolta, Tokyo, Japan) にて測定、ケージ内が全て0.28-0.35 lux.になるように調節している。巣作りの材料として与えた3個の滅菌したコットン塊はケージの中央に集めて、3匹の実験用の仔は巣のある場所から離れた位置にある3箇所のコーナーに静置する。観察用ケージの中に分離して安静にさせておいた親マウスを投入して行動生理学的検査を開始する。観察時間は30分とし、暗視条件下で撮影可能な高感度デジタルカメラ (WAT-502B; Watec Co, Yamagata, Japan) に接続したHDビデオ記録装置 (DMR-E500H-S, Panasonic, Japan)を用いて、ビデオ記録する。実験観察は出産後3日間に渡って行い統計的に検討した。

仔マウスの体重測定としては、出産当日に出生児数を確認し、当日から出生後14日目まで毎日10:00に一匹ずつ分析用電子天秤 (CH-252; A&D Engineering INC., Tokyo)を用いて体重を記録する。出世後19日で離乳し、19,24,29,34,39,44,49,54日に同じく体重を測定した。

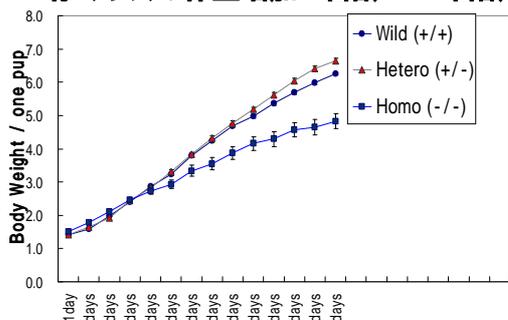
我々は今回の育児障害は所謂モチベーション回路として機能しているドーパミンニューロン自体の信号伝達機能が低下している事に起因しており、同時に発生するドーパミントランスポーター (DAT)の機能低下を生じている事を見出した。そこで、in situ hybridization, Western BlotによるDATの発現の比較定量を行った。

In Situ Hybridizationとしては、RNAプローブをDATのnucleotides 865-1838 (DDBJ/EMBL/Gen Bank access number AF109398)に対して作成し、[35S] UTP (NEG-039H; Perkin Elmer, Yokohama, Japan)でラベルする。この際、アンチセンスプローブはSacII+T4/SP6で処理し末端の平坦化も加えている一方センスプローブはSalI+T7にて処理している。一方、マウス脳を麻酔下に無痛状態で摘出しこれをドライアイスのパウダーで急速凍結する。このマウス全脳の凍結切片をクライオスタット (CM1850; Leica Microsystems; Wetzlar, Germany)を用いて10ミクロン厚にて連続切片として作成し、これに対して先程のRNAプローブを用いてIn Situ Hybridizationを行う。反応終了後プレパラート上の反応産物の局在を確認するためBio Max XAR films (XAR-2 165 1678; Kodak, New York, USA)でFilm auto radiographyを7日間行い現像して結果を確認した。

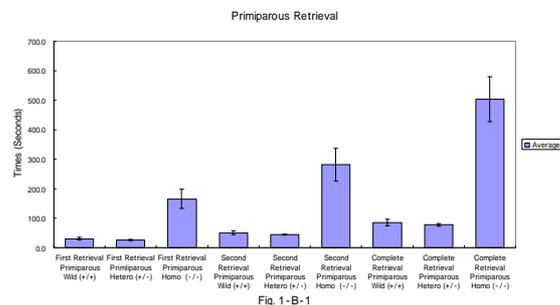
Western Blot としては、マウス脳を麻酔下に無痛状態で摘出し、嗅球と小脳を除去したマウスの大脳に対して機械式ホモジナイザーを用いて温度上昇に注意してホモジナイズする、遠心分離処理を加えて可溶性の抽出タンパクを得る。これに対して SDS/PAGE 法に準じて、ミニリアルスラブ (BE-220; Bio-Craft, Tokyo) とリアルパワー (BP-3; Bio-Craft, Tokyo, Japan) を使用しポリアクリルアミドゲル中で電気泳動する。ゲル中の分離蛋白を Immobilon-P ポリビニルメンブレン (Millipore; Massachusetts, USA) に Power Station 1000VC (AE-8450; ATTO, Tokyo, Japan) と Transblot SD Cell (Bio-Rad; Hercules, USA) を用いてセミドライプロットしてトランスファーする。一次抗体は DAT モノクローナル抗体 (MAB 369; Chemicon, Millipore; Massachusetts, USA)、蛋白量の指標に β -Actin モノクローナル抗体 (A-4700; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を使用、二次抗体は Anti-Rat IgG HRP (sc-2006; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) と Anti Mouse IgG HRP (W402B; Promega, Wisconsin, USA) を使用する。これに ECL PLUS Western Blotting Detection System (Amersham Bioscience; Amersham, UK) で発光反応をかけ Amersham Hyper Film TM ECL (GE Health care; 28-9068-37; Size 18 X 24 cm; GE Health Care, Fairfield, USA) を用いて反応を検出、現像して結果を得た。

4. 研究成果

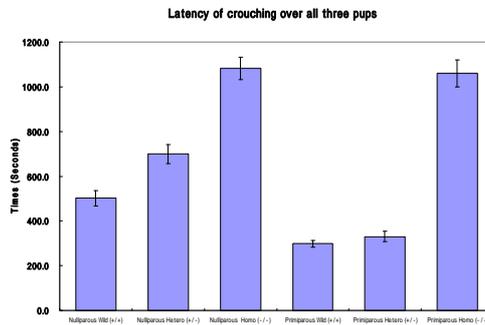
仔マウスの体重増加: 0日齢 ~ 14日齢



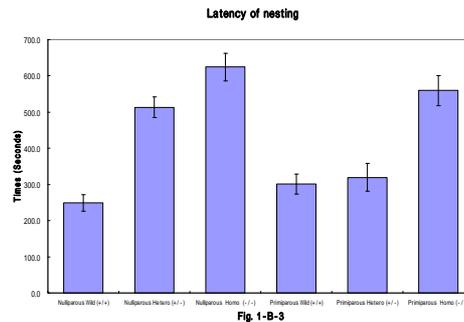
各グループ仔マウス約 300 匹について検査した、Mann-Whitney U test で $P < 0.01$ の有意差をもって、ホモのノックアウトマウスの仔マウスの体重がワイルドより軽かった。



ホモのノックアウトマウスは仔マウスを集める能力が低い。



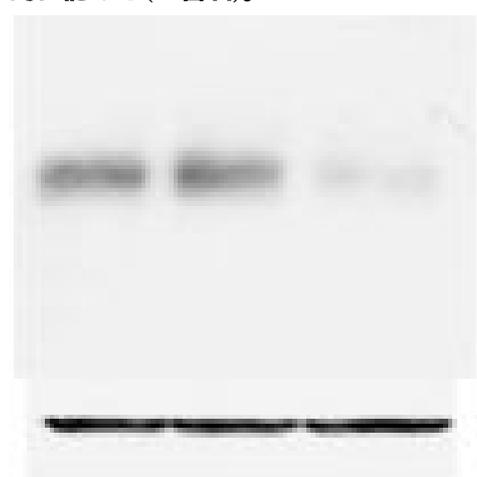
ホモのノックアウトマウスは仔マウスの上にまたがって育児行動をしない。



ホモのノックアウトマウスは巣の材料を集めるのが遅い。



In Situ Hybridization のフィルムオートラジオグラフィーで -/- の場合に DAT の遺伝子レベルでの発現低下を ventral tegmental area (VTA) の部位に +/+ や +/- と比較して特異的に認める (一番右)。



Western Blot で DAT タンパクの産生低下が -/- の場合に +/+ や +/- と比較し確認できた。

以上から、遺伝子レベルとタンパクレベルの両方から DAT の発現の抑制が証明された。

結果と考察：

以上の研究結果から、酸感受性イオンチャンネル 1a; Acid-sensing ion channels (ASIC1a) は存在するシナプスにおいて信号伝達機能を担っている。ASIC1a のノックアウトマウスには DAT の発現の低下をはじめとする medial preoptic area (MPOA) から ventral tegmental area (VTA) さらに Nucleus Accumbens (NA) の領域に投射しているモチベーション回路のドーパミンニューロンの信号伝達機能の低下があり、これが、育児障害と放置虐待のおもな原因になっている事が証明された。また、ASIC1a ノックアウトマウスは母性行動異常のモデルマウスとして有用であることが示唆された。

(第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会にて発表)

さらに我々は、母性行動異常の ASIC1a ノックアウトマウスの脳内のミクログリアの増加：つまり、脳内の炎症反応の上昇を発見している。そこで、中枢神経内で炎症反応を起こすミクログリアについて、培養細胞を用いて、ミクログリアの活性調節における SGK1 を含む SGK のはたらきを検討した。

SGK：

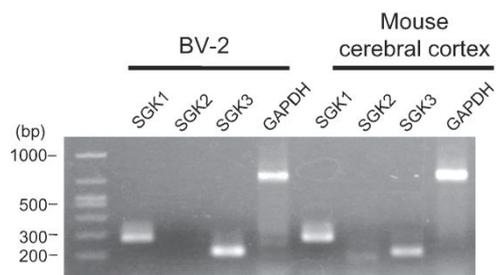
Serum- and Glucocorticoid-inducible Kinase 1 (SGK1) は血清などにより発現誘導されるリン酸化酵素で、腎臓での Na⁺再吸収の促進を含め種々の組織で多くの役割を持っていることが報告されている。さらに、近年 SGK の免疫系細胞における重要性が次々に明らかになってきている。

血清や糖質コルチコイドなどにより誘導されるリン酸化酵素として SGK1 が同定された (Webster et al 1993) のち、ファミリー分子として SGK2、SGK3 が発見された (Kobayashi et al 1999)。SGK2/3 は血清などには誘導されない。いずれも脳に発現することが報告されているが脳・神経における役割はいまだ不明な点が多い。基質としては GSK3 や Nedd4-2 等が知られている。gsk650394 は SGK 特異的な阻害剤として報告され (Sherk et al 2008)、SGK1、SGK2 に対する IC₅₀ はそれぞれ 62 nM、103 nM である。

ミクログリア：

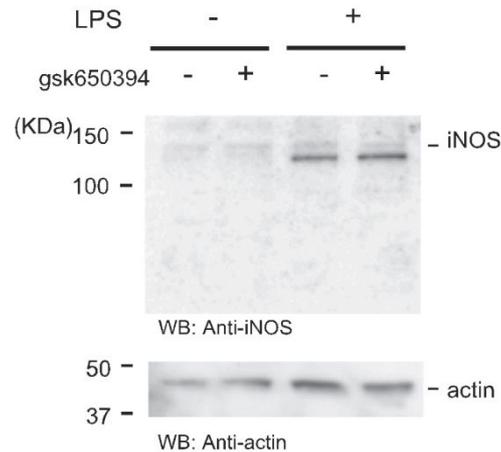
中枢神経系のグリア細胞の一種であるミクログリアは骨髄由来の細胞で、主に脳内の免疫機能を担っているとされる。ミクログリアは細菌感染時や脳梗塞後の炎症に非常に重要な役割を持つばかりでなく、最近ではうつ病等の精神疾患においてもその関与が指摘されてきている。そのため、ミクログリアの活性調節機構を明らかにすることは種々の精神神経疾患の発症メカニズムの解明やその治療にとって有益となる。

PCR

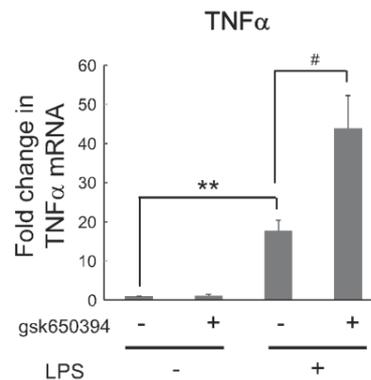


ミクログリア由来細胞株 BV-2 細胞に SGK1 と SGK3 が発現しているのを PCR で確認。

Western Blot

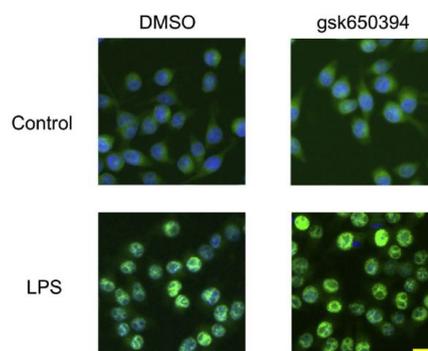


gsk650394 投与で、iNOS 蛋白が増加
Fold change in TNF mRNA



gsk650394 投与で TNF の発現レベル上昇

NF- B の核への移行



SGK 阻害で NF- B の核への移行が促進

結果と考察：

ミクログリア由来細胞株 BV-2 細胞を LPS 投与によりミクログリアを活性化したところ、刺激誘導型の一酸化窒素(NO)合成酵素 iNOS や炎症反応を惹起するサイトカイン TNF の mRNA が増加した。炎症を引き起こすリポ多糖 (LPS) と共に SGK 阻害剤である gsk650394 を投与したところ、iNOS と TNF の発現レベルはさらに上昇した。SGK 阻害剤による iNOS 蛋白の増加はウェスタンブロット法によっても確認され、また、NO の産生も SGK 阻害剤の投与により増強した。さらに、SGK の阻害により炎症に関する転写因子 NF- B の核への移行が促進された。これらのことから、SGK の活性は炎症刺激に対するミクログリアの活性を抑制する可能性が示唆される。

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: Increased ghrelin signaling prolongs survival in mouse models of human aging through activation of sirtuin1.
Fujitsuka N, Asakawa A, Morinaga A, Amitani MS, Amitani H, Katsuura G, Sawada Y, Sudo Y, Uezono Y, Mochiki E, Sakata I, Sakai T, Hanazaki K, Yada T, Yakabi K, Sakuma E, Ueki T, Nijima A, Nakagawa K, Okubo N, Takeda H, Asaka M, Inui A. Mol Psychiatry. 査読あり
2016 21(11):1613-1623.
doi: 10.1038/mp.2015.220. PMID: 26830139

2: Serum- and glucocorticoid-inducible kinases in microglia.
Inoue K, Sakuma E, Morimoto H, Asai H, Koide Y, Leng T, Wada I, Xiong ZG, Ueki T Biochem Biophys Res Commun. 査読あり
2016 478(1):p.53-9.
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.094.

[学会発表](計 3 件)

1: 2017/11/13
Society for Neuroscience 2017, Washington DC, Washington Convention Center
CRISPR/Cas9-mediated disruption of SGK1 enhances potential inflammatory activity of microglial BV-2 cells.
Hayato Asai, Koichi Inoue, Eisuke Sakuma, Takatoshi Ueki

2: 2016 年 10 月 14 日
第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会(福岡)
ASIC1a ノックアウトマウスの育児障害
若林健二郎, 佐久間英輔, 植木孝俊, 井上浩一, 大塚隆信, 和田郁雄, 水谷潤, 植木美乃,

村上里奈, 青山公紀, 井上浩一, 河命守, 白井康裕, 森本浩之, 小出益徳, 浅井友詞

3: 2016 年 3 月 28 日
第 121 回 日本解剖学会全国学術集会 (福島・パレット福島)
リン酸化酵素 SGK によるミクログリア活性の調節
井上浩一, 佐久間英輔, 森本浩之, 和田郁雄, 植木孝俊

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/w3med/la bo/rehabilitation.dir/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

若林 健二郎 (WAKABAYASHI, Kenjiro)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
助教
研究者番号：20418867

(2)研究分担者

和田 郁雄 (WADA, Ikuo)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
教授
研究者番号：70182970

佐久間 英輔 (SAKUMA, Eisuke)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
講師
研究者番号：90295585

村上 里奈 (MURAKAMI, Satona)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
助教
研究者番号：10535818

青山 公紀 (AOYAMA, Kiminori)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
助教
研究者番号：10597818

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし