

令和元年6月13日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08421

研究課題名(和文) 神経発達障害に伴う精神疾患の脳層構造異常とPGE2-EP1シグナル伝達系の関与

研究課題名(英文) Association between brain malformations of neurodevelopmental psychiatric disorders and PGE2-EP1 signaling

研究代表者

野田 幸裕 (NODA, Yukihiro)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：90397464

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)：本研究では、神経発達障害仮説に基づいた精神疾患の発症機序の解明を目的として、精神疾患発症や病態に関与する環境的要因を負荷した精神疾患モデルマウスにおける神経機能を検討した。精神行動異常の脆弱性因子のプロスタグランジンE2を新生仔期マウスに投与すると、35日齢ではなく、70日齢において情動・認知機能の障害が認められた。35日齢では、前頭前皮質高カリウム誘発性グルタミン酸遊離能低下が認められた。70日齢の前頭前皮質や海馬において、細胞骨格や樹状突起発達、恐怖反応などに関連する遺伝子の発現が変化していた。この様に神経発達期の発症脆弱性因子の曝露は、神経機能と行動の異常を来すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者由来末梢サンプル(LCL)において、中枢神経機能と関連のある遺伝子の発現変化が認められ、疾患モデルであるPCP投与マウスの末梢および中枢サンプル(血液とPFC)において、共通して発現変化を示す遺伝子が同定された。したがって、精神疾患の中枢における分子病態像が末梢に反映されている可能性があり、発症や治療反応性の予測に有用な生物学的指標となりうる。加えて、ストレスなどの外来環境因子の曝露により生じるエピジェネティック制御機構を明らかにすることで、精神疾患の発症脆弱性の形成や発症のメカニズム解明の一助になると考える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenesis of psychiatric disorders based on the neurodevelopmental hypothesis, we examined psychiatric functions in psychiatric disorder-like model mice exposed to environmental factors, which related to the onset of psychiatric disorders and pathological conditions. In mice neonatally injected prostaglandin E2 as a susceptibility factor for psychobehavioral abnormalities, emotional and cognitive dysfunctions were observed at postnatal day (PD)70, but not PD35. Mice at PD35 showed a decrease in hyperpotassium-induced glutamate release in the prefrontal cortex. In the prefrontal cortex and hippocampus of mice at PD35 or PD70, the changes in gene expression related to regulation of cytoskeleton, dendrite development, behavioral fear response, etc. were observed. It was revealed that the exposure of susceptibility factors related to bio-psycho-social conditions in early stage of neurodevelopment caused neurofunctional and psychobehavioral abnormalities.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：統合失調症 神経発達障害仮説 プロスタグランジンE2 フェンシクリジン リンパ芽球様細胞株 行動解析 遺伝子発現解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

精神疾患の発症仮説として神経発達障害仮説が提唱されている( )。神経発達段階において遺伝的要因 (DISC1 や COMT など) や環境的要因 (母体ウイルス感染、出産時低酸素や育児放棄など) によって大脳皮質の層構造異常が形成される。その結果、中枢神経系異常に伴う精神疾患 (統合失調症など) が発症すると推察されている。しかし、遺伝的要因による脳層構造異常に関する形態学的な検討は行われているが( ) 高次機能との関連性や環境的要因による検討などはほとんどされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、神経発達障害仮説に基づいた精神疾患の発症機序の解明を目的とする。すなわち、精神疾患、特に統合失調症の発症には、遺伝的要因や胎生期 / 周産期の環境的要因によって神経 - グリア細胞や神経回路網の発達障害が関与している。発症脆弱性の形成機序に關与する共通因子として見出したプロスタグランジン (PG) E<sub>2</sub>-EP1 受容体シグナル伝達系 ( ) に注目し、大脳皮質の層構造形成・神経 - グリア細胞相互作用および成体期の精神機能に与える影響とその機序を解明する。本研究の知見から得られた成果に基づいて、従来の治療薬 (抗精神病薬など) とは作用機序が異なる因子を標的とした新しい診断・予防や治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

C57BL/6J と 6N 系および ICR 系マウスを使用した。本研究は、名城大学薬学部と名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、各機関の動物実験指針や Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication - 8th edition, 2011) を遵守して実施した。

1) 新生仔期 (生後 2 日齢) の C57BL/6J 系マウスの脳内にグルタミン酸トランスポーター阻害薬である DL-threo-β-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) (5 nmol/side) を脳内に隔日 5 日間投与し、成体期 (70 日齢) において行動学的、神経化学的および組織学的解析を行った。成体期 (48 日齢) のマウスにも同様に処置し、最終投与の翌日と 8 週後に行動学的、神経化学的および組織学的解析を行った。

2) 新生仔期 (生後 2 日齢) の C57BL/6J 系マウスに免疫異常を惹起させる合成二本鎖 RNA アナログのポリリボイノジン酸 ポリリボシチジル酸 (poly I:C : 10 mg/kg s.c.) を 5 日間連続投与したモデル (周産期ウイルス感染モデル)、生後 2 日齢に二酸化炭素を 20 分間曝露させたモデル (周産期低酸素脳症モデル) および生後 1 から 21 日齢に母体と隔離飼育を施したモデル (周産期・幼若期の育児放棄モデル) を作製した。これらのモデルマウスの成体期 (35 日齢と 70 日齢) において行動学的、神経化学的および組織学的解析を行った。

3) 新生仔期 (生後 2 日齢) の C57BL/6N 系マウスに PGE<sub>2</sub> (10 mg/kg s.c.) を 5 日間連続投与し、成体期 (35 日齢と 70 日齢) において行動学的、神経化学的および組織学的解析を行った。

4) 成体期 (42 日齢) の ICR 系マウスにフェンシクリジン (PCP : 10 mg/kg s.c.) を 14 日間連続投与し、成体期 (56 日齢) に脳と血液サンプルを採取した。

#### (2) 行動学的解析

1) 認知機能試験：新奇物体認識試験にて探索嗜好率 (exploratory preference : %) を算出して認知機能の指標とした( )。また、情報処理機能を調べるため、プレパルスインヒビション (PPI) 試験を行った。PPI (%) は定法にしたがって計算した( )。

2) 社会性試験：社会性行動試験を用いて、テストマウスの未知マウスへの匂いを嗅ぐ、追いかける、上に乗りかかる、下に潜る行動を社会性行動とし、5 あるいは 10 分間測定した( )。

#### (3) 神経化学的解析

1) プレシナプス (シナプトフィジン)、ポストシナプス (PSD-95)、グルタミン酸作動性神経 (GLAST と GLT-1)、あるいはアストロサイト (S100) のマーカータンパク質の発現は、ウエスタンブロッティング法にて測定した( )。また、脳内炎症性メディエーター [PGE<sub>2</sub>、インターロイキン-6 (IL-6)、腫瘍壊死因子-α (TNF-α)] は ELISA 法あるいは real-time RT-PCR 法にて測定した。

2) グルタミン酸の細胞外遊離量は、マイクロダイアリシス法にて高感度の電気化学検出器 高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。グルタミン酸遊離能は、高カリウム刺激による脱分極誘発性グルタミン酸遊離量にて評価した( )。

#### (4) 組織学的解析

1) ニッスル染色により神経細胞を可視化し、大脳皮質の細胞密度と細胞面積および海馬の CA1、CA と歯状回の細胞層の厚さを解析した( )。

2) ゴルジ染色により神経細胞の微細構造を可視化し、前頭前皮質の樹状突起のスパイン密度を解析した( )。

#### (5) RNA 抽出

マウスを断頭屠殺後、頸部から採血した血液サンプルは速やかに total RNA を抽出し、同時に摘出した脳サンプルは-80 で保存した後、total RNA を抽出した。統合失調症患者(30名)および健常者(32名)より末梢血液を採取し、エプスタイン バール(EB)ウイルスに感染させてヒト LCL を作製した( )。ヒト LCL は細胞株樹立後に3週間継代培養して-80 で保存した後、total RNA を抽出した。

#### (6) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

Total RNA を増幅・蛍光標識し、生成した cRNA を断片化した。マイクロアレイに封入して反応させ、マイクロアレイを洗浄後、画像データを取得した。発現量を比較し、危険率 5%未満の場合( $p < 0.05$ )を有意差ありと判定した。有意な発現変化が認められた遺伝子はパスウェイ解析し、 $p < 0.05$ を有意な関連ありと判定した。

### 4. 研究成果

(1) 新生仔期マウスの脳内に DL-TBOA を投与すると、成体期において社会性や認知機能の低下が認められたが(図1)、成体期のマウスに DL-TBOA を投与してもその様な行動障害は認められなかった。行動障害を示したマウスの神経細胞の形態的变化を解析したところ、皮質の神経細胞と海馬 CA1 領域の錐体細胞層が萎縮しており、スパイン密度も減少していた。また、シナプス前(シナプトフィジン)、シナプス後

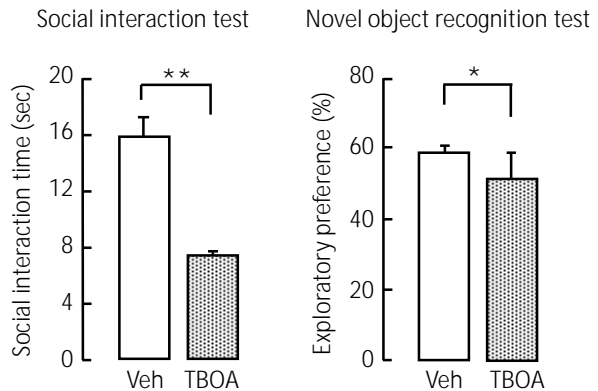


図1. Early postnatal DL-TBOA injection impairs emotional and cognitive behaviors

Veh: vehicle. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs vehicle-injected mice.

(PSD-95)、グルタミン酸作動性神経(GLAST と GLT-1)やアストロサイト(S100)のマーカートンパク質の発現およびグルタミン酸の遊離能が低下していた。以上の様に、脳発達期における GLAST の機能異常は、成体期のグルタミン酸作動性神経の機能異常や神経細胞の形態異常を伴った高次脳機能(情動・認知機能)障害を惹起させることが明らかとなった。

(2) 周産期に polyI:C を投与すると成体期において社会性、認知機能や情報処理機能の低下が認められた。周産期や幼若期の二酸化炭素曝露と隔離飼育により成体期において情報処理機能の低下が認められた。これらの環境的要因を曝露した直後の脳内炎症性メディエーター(PGE<sub>2</sub>、IL-6、TNF- $\alpha$ )量を測定したところ、PGE<sub>2</sub> が共通して上昇していた。PolyI:C 投与マウスにおける行動障害は PGE<sub>2</sub>-EP1 受容体拮抗薬によって緩解された。次に、周産期の生後2から6日齢のマウスに PGE<sub>2</sub> を投与すると35日齢ではなく、polyI:C 投与と同様に成体期の70日齢において、社会性や認知機能の低下が認められ、一部の行動障害は PGE<sub>2</sub>-EP1 受容体拮抗薬によって緩解された。行動障害を示さなかった35日齢のマウスにおいて、グルタミン酸遊離能の低下が認められたが、グルタミン酸作動性神経(GLAST、GLT-1)やアストロサイト(S100)のマーカートンパク質の発現、神経細胞の面積の縮小は認められなかった。以上の様に、周産期や幼若期の様々な環境的要因の曝露は成体期にお

いて精神行動異常を惹起し、その発現には共通して神経発達期における脳内 PGE<sub>2</sub> の上昇が関与していることが明らかとなった。新生仔期マウスにおける脳内 PGE<sub>2</sub> の上昇は、PGE<sub>2</sub>-EP1 受容体シグナル伝達系を介して神経細胞の発達を障害し、グルタミン酸作動性神経の異常が成体期における精神行動異常の発現に少なくとも一部、関与しているものと示唆される。

(3) 新生仔期 PGE<sub>2</sub> 投与マウスの前頭前皮質と海馬の網羅的遺伝子発現解析において、35 日齢では細胞骨格や樹状突起発達の調節など、70 日齢では恐怖反応および細胞接着などに関連

表 1. Differentially expressed genes associated with "regulation of gene expression, epigenetic (GO:0040029)."

Sample	Regulation	Gene symbol
Blood	Up	Chrac1, Cctf, Drosha, Eif6, Exosc10, Mecp2, Slc50a1, Zc3h7b, Rbm3
	Down	Hdac5, Lin28a, Tet1
PFC	Up	Epc1, Rbm3
	Down	Ncor1, Nfkb1, Uty
LCL	Down	Mbd3, Pum2, Rbm15

Blood: trunk bloods collected from mice repeatedly treated with saline (SAL) or phencyclidine (PCP)  
PFC: prefrontal cortexes collected from mice repeatedly treated with SAL or PCP  
LCL: lymphoblastoid cell lines established from healthy control subjects and schizophrenic patients

する遺伝子の発現変化が認められた。一方、統合失調症の LCL と統合失調症様行動障害を示す PCP 投与マウスの血液および前頭前皮質の網羅的遺伝子発現解析において、中枢神経機能や遺伝子発現・エピジェネティック制御に関連する遺伝子の発現変化が認められた(表 1)。以上の様に、中枢神経系の発達早期に精神疾患の発症脆弱性因子を曝露することにより、神経可塑性に関連する遺伝子やタンパク質の発現変化が生じること、グルタミン酸作動性神経伝達の異常を来することが明らかとなった。これらはエピジェネティックな遺伝子発現制御を受けている可能性があり、脳形態変化や脳成熟後の精神行動異常の発現に寄与することが示唆される。

#### < 引用文献 >

- Arch Gen Psychiatry, 66(9), 2009, 947 - 956
- Trends Neurosci, 31, 2008, 154 - 162
- J Pharmacol Sci, 121, 2013, 185 - 191
- Behav Brain Res, 180, 2007, 152 - 160
- Int J Neuropsychopharmacol, 14, 2011, 459 - 477
- Neuroreport, 12, 2001, 11 - 15
- Mol Pharmacol, 71, 2007, 1598 - 1609
- Behav Brain Res, 180, 2007, 152 - 160
- Glia, 61, 2013, 679 - 93
- Transl Psychiatry, 9, 2019, 126

#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 ) 総件数 22 件

- Sho Hasegawa, Akira Yoshimi, Akihiro Mouri, Yoji Uchida, Hirotake Hida, Masayoshi Mishina, Kiyofumi Yamada, Norio Ozaki, Toshitaka Nabeshima, Yukihiro Noda: Acute administration of ketamine attenuates the impairment of social behaviors induced by social defeat stress exposure as juveniles via activation of -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. *Neuropharmacology*, 査読有, 148, 2019, 107 - 116  
DOI : 10.1016/j.neuropharm.2018.12.020
- Akihiro Mouri, Mayu Ukai, Mizuki Uchida, Sho Hasegawa, Masayuki Taniguchi, Takahiro Ito, Hirotake Hida, Akira Yoshimi, Kiyofumi Yamada, Shohko Kunimoto, Norio Ozaki, Toshitaka Nabeshima, Yukihiro Noda: Juvenile social defeat stress exposure persistently impairs social behaviors and neurogenesis. *Neuropharmacology*, 査読有, 133, 2018, 23 - 37  
DOI : 10.1016/j.neuropharm.2018.01.016

Sho Hasegawa, Yuriko Miyake, Akira Yoshimi, Akihiro Mouri, Hirotake Hida, Kiyofumi Yamada, Norio Ozaki, Toshitaka Nabeshima, Yukihiro Noda: Dysfunction of serotonergic and dopaminergic neuronal systems in the antidepressant-resistant impairment of social behaviors induced by social defeat stress exposure as juveniles. *Int J Neuropsychopharmacol*, 査読有, 21, 2018, 837 - 846

DOI : 10.1093/ijnp/pyy038

Itaru Kushima, Branko Aleksic, Masahiro Nakatochi, Teppei Shimamura, Takashi Okada, Yota Uno, Mako Morikawa, Kanako Ishizuka, Tomoko Shiino, Hiroki Kimura, Yuko Arioka, Akira Yoshimi, Norio Ozaki, et al.: Comparative analyses of copy-number variation in autism spectrum disorder and schizophrenia reveal etiological overlap and biological insights. *Cell Rep*, 査読有, 24, 2018, 2838 - 2856

DOI : 10.1016/j.celrep.2018.08.022

Akihiro Mouri, Yukihiro Noda, Minae Niwa, Yurie Matsumoto, Takayoshi Mamiya, Atsumi Nitta, Kiyofumi Yamada, Shoei Furukawa, Tatsunori Iwamura, Toshitaka Nabeshima: The involvement of brain-derived neurotrophic factor in 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced place preference and behavioral sensitization. *Behav Brain Res*, 査読有, 329, 2017, 157 - 165

DOI : 10.1016/j.bbr.2017.04.052

Itaru Kushima, Branko Aleksic, Masahiro Nakatochi, Teppei Shimamura, Tomoko Shiino, Akira Yoshimi, Norio Ozaki, et al.: High-resolution copy number variation analysis of schizophrenia in Japan. *Mol Psychiatry*, 査読有, 22, 2017, 430 - 440

DOI : 10.1038/mp.2016.88

Aya Goto, Akihiro Mouri, Tomoko Nagai, Akira Yoshimi, Mako Ukigai, Tomomi Tsubai, Hirotake Hida, Norio Ozaki, Yukihiro Noda: Involvement of the histamine H<sub>4</sub> receptor in clozapine-induced hematopoietic toxicity: vulnerability under granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 査読有, 306, 2016, 8 - 16

DOI : 10.1016/j.taap.2016.06.028

Jingrui Xing, Hiroki Kimura, Chenyao Wang, Kanako Ishizuka, Itaru Kushima, Yuko Arioka, Akira Yoshimi, Norio Ozaki, et al.: Resequencing and association analysis of six PSD-95-related genes as possible susceptibility genes for schizophrenia and autism spectrum disorders. *Sci Rep*, 査読有, 6, 2016, 27491

DOI : 10.1038/srep27491

[学会発表](計 13 件) 総件数 54 件

Yukihiro Noda : Developmental mechanism of psychiatric disorders: psychobehavioral impairment according to neurodevelopmental abnormalities .第 92 回日本薬理学会年会、2019

高須光平、肥田裕丈、武藤利奈、山田清文、尾崎紀夫、吉見 陽、野田幸裕 : 周産期や幼若期の環境的要因暴露により惹起される精神行動異常における prostaglandin E<sub>2</sub> の関与 . 第 134 回日本薬理学会 近畿部会、2018

吉見 陽、山田清文、尾崎紀夫、野田幸裕 : プロテオーム解析による統合失調症の末梢バイオマーカーの探索と臨床応用性の検証 . 第 2 回日本精神薬学会総会・学術集会、2018

Hirotake Hida, Akihiro Mouri, Kentaro Mori, Saori Takeuchi, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada, Norio Ozaki, Tomoyuki Furuyashiki, Shuh Narumiya, Yukihiro Noda : The perinatal mice administered prostaglandin E<sub>2</sub> develop psychobehavioral and neuronal impairments in adults . 第 91 回日本薬理学会年会・第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議 : The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology: WCP2018, 2018

村川依代、吉見 陽、長谷川章、内田美月、肥田裕丈、野田幸裕 : 治療抵抗性ストレスモデルマウスの脳と血液を用いた網羅的遺伝子発現解析による診断・治療ターゲット分子の探索 . 第 64 回日本薬学会東海支部総会・大会、2018

岩城圭一郎、吉見 陽、村川依代、久保緋紗子、谷 郁孝、野田幸裕、尾崎紀夫、今西 進 : SWATH 測定による統合失調症患者リンパ芽球様細胞株膜タンパク質の定量リン酸化プロテオミクス . 日本薬学会第 138 年会、2018

竹内佐織、肥田裕丈、毛利彰宏、吉見 陽、森健太郎、山田清文、尾崎紀夫、古屋敷智之、

成宮 周、野田幸裕：神経発達脆弱性因子による成体期の精神機能への影響：PGE<sub>2</sub>の関与．日本薬学会第138年会、2018

野田幸裕、内田美月、長谷川章、北垣伸治、尾崎紀夫、田中光一、吉見 陽：認知機能におけるグルタミン酸トランスポーター（GLAST）の役割．第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会、2017

Saori Takeuchi, Hirotake Hida, Kentaro Mori, Shinji Kitagaki, Akira Yoshimi, Yukihiro Noda：Psychobehavioral abnormalities developed by combined administration of a neonatal prostaglandin E<sub>2</sub> with an adolescent phencyclidine．第90回日本薬理学会年会、2017

野田幸裕、肥田裕丈、吉見 陽：神経精神疾患関連因子の機能解析と臨床応用：基礎・臨床研究からのアプローチ．第18回応用薬理シンポジウム、2016

竹内佐織、肥田裕丈、森健太郎、北垣伸治、吉見 陽、野田幸裕：新生仔期の炎症性メディエーターと若齢期の乱用薬物の複合負荷が精神機能に与える影響．第18回応用薬理シンポジウム、2016

吉見 陽、野田幸裕、尾崎紀夫：精神疾患の発症脆弱性に関わるバイオマーカーの探索．第18回応用薬理シンポジウム、2016

Yukihiro Noda, Akihiro Mouri, Akira Yoshimi, Sho Hasegawa, Takahiro Ito, Hirotake Hida, Kiyofumi Yamada, Toshitaka Nabeshima, Norio Ozaki：Social defeat stress as juveniles impairs persistent social behaviors and neurogenesis．30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, 2016

〔その他〕

ホームページ等

[http://www1.meijo-u.ac.jp/~ynoda/cms\\_new/](http://www1.meijo-u.ac.jp/~ynoda/cms_new/)

## 6．研究組織

### （1）研究分担者

研究分担者氏名：吉見 陽

ローマ字氏名：YOSHIMI, Akira

所属研究機関名：名城大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：00637671

### （2）研究協力者

研究協力者氏名：尾崎 紀夫

ローマ字氏名：OZAKI, Norio

研究協力者氏名：毛利 彰宏

ローマ字氏名：MOURI, Akihiro

研究協力者氏名：肥田 裕丈

ローマ字氏名：HIDA, Hirotake

研究協力者氏名：内田 美月

ローマ字氏名：UCHIDA, Mizuki

研究協力者氏名：武藤 利奈

ローマ字氏名：MUTO, Rina

研究協力者氏名：高須 光平

ローマ字氏名：TAKASU, Mitsuhira

研究協力者氏名：北垣 伸治

ローマ字氏名：KITAGAKI, Shinji

研究協力者氏名：平松 正行

ローマ字氏名：HIRAMATSU, Masayuki

研究協力者氏名：間宮 隆吉

ローマ字氏名：MAMIYA, Takayoshi