

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790736

研究課題名（和文）免疫系サイトカインの胎児期の脳皮質構築に及ぼす影響

研究課題名（英文）The effect of cytokine on the developing cerebral cortex

研究代表者

福光 秀文（FUKUMITSU HIDEFUMI）

岐阜薬科大・薬学部・講師

研究者番号：00308280

研究成果の概要：

発生過程の脳皮質に SCF を作用させると、学習障害患者や重度てんかん患者の死後脳の解析で頻りにみられる異所性の細胞塊が脳皮質内に形成されることが明らかになった。細胞の構成要素を解析すると内部に多くの脳皮質上層/下層の神経細胞を含み、その外側をアストロサイトが包み込むような細胞塊を形成していた。更なる解析の結果、SCF は Akt 経路の活性化を介して神経幹細胞の移動と分裂を修飾することによって異所性の細胞塊を誘導することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児神経学

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞は免疫応答を行うだけでなく、サイトカインを分泌することで、神経系の活動を調節している。この機構は生態防御反応として重要である。しかし、妊娠中の母体が感染症にかかるとこの生態防御反応が胎児の脳構築に影響を及ぼす可能性がある。実際に、妊娠中の感染症や内分泌かく乱物質への暴露が出生した子の精神疾患発病のリスクを高めることが明らかになっている。

2. 研究の目的

免疫系に関わるサイトカインが脳皮質の構築に及ぼす影響を明らかにするために、サイトカインあるいはその中和抗体を胎児の脳室内に直接投与し、脳皮質の構築に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

妊娠 13 日齢のマウスの腹部を切開し、子宮を露出させ、胎児脳室内にガラスキャピラリーを用いて、サイトカインあるいは

シグナル阻害剤などを顕微鏡下にて注入し、解析に用いるまで分娩も含めて通常通り飼育した。(1) 神経前駆細胞の挙動をあきらかにする研究では特定の胎生日齢にBrdUを投与した。(2) 解析は動物を還流固定し、組織を摘出、薄切片を作成後、特異抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した。

4. 研究成果

免疫系に関わる以下の3種のサイトカインの大脳皮質形成に及ぼす影響を検討した。胎生期の脳皮質では神経細胞を生成する神経幹細胞が脳室帯とよばれる増殖領域において、分裂を繰り返しつつ神経細胞へとその運命付けが行われると将来の神経細胞層である皮質板にむかって移動し、定着する。

(1) 幹細胞因子(stem cell factor: SCF)の大脳皮質形成に及ぼす作用

まず、in situ hybridization 法により皮質構築過程において、SCF および その受容体 c-kit が発現していることを明らかにした。

次に、胎生13.5日胚の側脳室内にSCFを投与し、生後10日目に大脳皮質を観察したところ、異所性の細胞塊の形成、局所的な脳回の形成、および軽度な水頭症などの様々な表現型が認められた。この解剖学的所見は重度てんかん患者や学習障害患者の剖検大脳皮質に見られる二重皮質や異所性の細胞塊に類似していた(図1)。

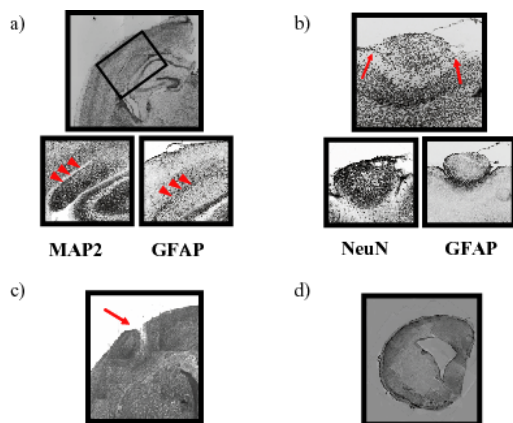


図1 SCF投与によって誘導される典型的な表現型 a) 二重皮質、b) 異所性細胞塊、c) 脳回、d) 軽度な水頭症、MAP2、NeuN: 神経細胞のマーカー、GFAP: アストロサイトのマーカー

詳細な解析の結果、同細胞塊は神経細胞塊の周囲をアストロサイトが包み込むよ

うに形成されていることが明らかとなった。また、SCF投与直後の経時的変化をみると、神経幹細胞の増殖と移動が局所的に変化していることが明らかとなった。なお、この結果の詳細は発表論文に報告した。

(2) 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: PACAP)の大脳皮質神経細胞の層特異的性質獲得に及ぼす影響

以前の報告から、PACAPとその受容体PAC1は構築過程の大脳皮質皮質に発言しており、神経幹細胞の分裂を抑制しつつ、神経発生を誘導することが明らかにされていた。そこで、本研究では、PACAPを処理することにより、神経細胞が獲得する性質を明らかにすることを主眼に置いた。

E13.5の胎仔側脳室にPACAPを注入すると、本来皮質第IV層の神経細胞が発生するタイミングで、第V-VI層の神経細胞が発生することを見出した。

詳細な検討の結果、PACAPはcAMP/PKA/CREB経路を介して、神経細胞の獲得性質を修飾することが明らかになった。なお、この結果の詳細は発表論文に報告した。

(3) ニューロトロフィン-3(neurotrophin-3: NT-3)のERK1/2シグナル活性化による大脳皮質神経前駆細胞の分裂促進

我々は以前に構築過程の大脳皮質において、NT-3とその抗親和性受容体TrkCがタンパク質レベルで発現していることを見出していた。本研究ではNT-3の皮質構築過程の神経発生に及ぼす影響を明らかにすることを主眼に置いた。

E13.5の胎仔側脳室にNT-3を注入しておくとき発生する神経細胞が40%ほど増加することが明らかとなった。神経幹細胞の増加をみると、15%程度であったことから、神経発生の過程を詳細に調べたところ、ひとつの神経幹細胞から発生する神経細胞の率が増加していることが明らかになった(図2)。また、このNT-3により誘導される2つの現象はMAPキナーゼ阻害剤の同時投与によって抑制されたことから、NT-3はMAPキナーゼの活性化を介して、このプロセスを誘導することを明らかにした。なお、この結果の詳細は発表論文に報告した。

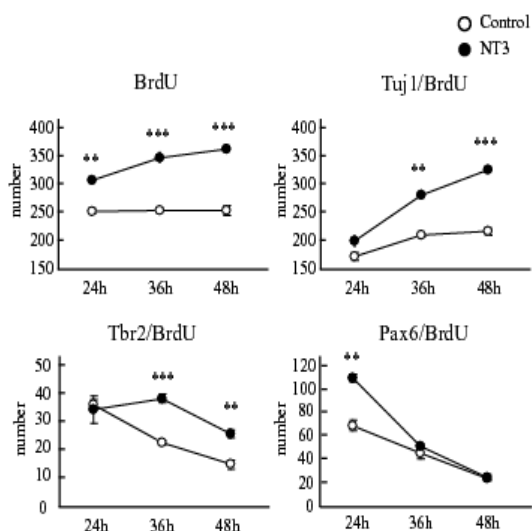


図2 NT-3 投与によって誘導される典型的な神経発生の経時的変化

Pax6: 神経幹細胞のマーカー、Tbr2: 神経前駆細胞のマーカー、Tuj1: 神経細胞のマーカー、Pax6 陽性の幹細胞が一過性に増加した後、神経細胞が加速度的に増加していることに注意。

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9件)

Soumiya H., Fukumitsu H., Furukawa S. Stem cell factor induces heterotopic accumulation of cells (heterotopia) in the mouse cerebral cortex. *Biomed Res* 30 121-128 (2009) 査読有

Hirakawa A., Shimizu K., Fukumitsu H., Furukawa S. Pyrroloquinoline quinine attenuates iNOS gene expression in the injured spinal cord *Biochem Biophys Res Commun* 378 308-312 (2009) 査読有

Ohtshka M., Fukumitsu H., Furukawa S. Neurotrophin-3 stimulates neurogenetic proliferation via the extracellular signal-related kinase pathway. *J Neurosci Res* 87 301-306 (2009) 査読有

Ito Y., Shimazawa M., Inokuchi Y., Fukumitsu H., Furukawa S., Hara H. Degenerative alterations in the visual pathway after NMDA-induced retinal damage in mice. *Brain Res* 1212 89-101 (2008) 査読有

Ohtsuka M., Fukumitsu H., Furukawa S. PACAP decides neuronal laminar fate

via PKA signaling in the developing cerebral cortex. *Biochem Biophys Res Commun* 369 1144-1149 (2008) 査読有

Hattori N., Nomoto H., Fukumitsu H., Mishima S., Furukawa S. AMP N1-oxide potentiates astrogeneis by cultured neural stem/progenitor cells through STAT3 activation. *Biomed Res* 28 295-299 (2007) 査読有

Hattori N., Nomoto H., Fukumitsu H., Mishima S., Furukawa S. Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxytrans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. *Biomed Res* 28 261-266 (2007) 査読有

Hattori N., Nomoto H., Fukumitsu H., Mishima S., Furukawa S. Royal jelly-induced neurite outgrowth from rat pheochromocytoma PC12 cells requires integrin signal independent of activation of extracellular signal-related kinases. *Biomed Res* 28 139-146 (2007) 査読有

Hattori N., Nomoto H., Fukumitsu H., Mishima S., Furukawa S. AMP N1-oxide, a unique compound of royal jelly, induces neurite outgrowth from PC12 cells via signaling by protein kinase A independent of that by mitogene-activated protein kinase. *Evid Based Complement Alternat Med* (2007) Oct 29. [Epub ahead of print] 査読有

[学会発表](計9件)

伊藤光広、福光秀文、大塚正成、古川昭栄 大脳皮質神経細胞の層に固有な性質獲得に及ぼす neurotrophin-3 の作用 日本薬学会第129年会 (京都、2009年)

河西正樹、福光秀文、古川昭栄 脊髄治療を目指した開発的細胞移植療法 日本薬学会第129年会 (京都、2009年)

古川昭栄、牧野晃久、伊藤悟、福光秀文 デセン酸エチルエステルは脳内 MAP キナーゼの活性化を介して、抗うつ効果を示す 第51回日本神経化学学会大会 (富山、2008年)

平川明弘、清水克時、福光秀文、古川昭栄 iNOS mRNA の発現を介したピロロキノリンキノンの脊髄損傷修復効果 第51回日本神経化学学会大会 (富山、2008年)

宗宮仁美、福光秀文、古川昭栄 大脳皮質の神経発生過程に及ぼす妊娠期感染症の影響 第51回日本神経化学学会大会 (富山、2008年)

福光秀文、大塚正成、古川昭栄 PACAP に

よる大脳皮質新駆細胞の層特異的性質の決定 第 51 回日本神経化学会大会 (富山、2008 年)

福光秀文、坂井美香、久戸瀬哲也、古川昭栄 増殖中の神経系前駆細胞の正常に及ぼす脳由来神経栄養因子の作用 日本薬学会第 127 年会 (富山、2007 年)

大塚正成、福光秀文、古川昭栄 マウス大脳皮質形成過程の層形成に及ぼすニューロトロフィンの作用 日本薬学会第 127 年会 (富山、2007 年)

宗宮仁美、福光秀文、古川昭栄 大脳皮質形成過程における幹細胞因子の役割 第 50 回日本神経化学会大会 (横浜、2007 年)

〔図書〕(計 1 件)

Mansouri A., Fukumitsu H., Schindehuetter J., Kriegstein K. Differentiation of embryonic stem cells. Curr Protoc Neurosci Chapter 3 Unit 3.6 (2009).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

福光 秀文 (FUKUMITSU HIDEFUMI)

岐阜薬科大・薬学部・講師

研究者番号：00308280