

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390046

研究課題名（和文）

神経発達障害におけるインターフェロン誘導性膜タンパク質 IFITM3 の機能解明

研究課題名（英文）

Functional analysis of IFITM3 in neurodevelopmental impairments

研究代表者

山田 清文 (YAMADA KIYOFUMI)

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30303639

研究成果の概要（和文）：

妊婦のウイルス感染は胎児の脳・神経発達に影響し、統合失調症の発症リスクを高めるが、その分子機構はほとんどわかっていない。本研究では、新生仔マウスに合成二本鎖ポリヌクレオチド (polyI:C) を投与した周産期擬似ウイルス感染モデルを用いて、その神経発達障害の分子機構をインターフェロン誘導性膜タンパク質 (IFITM3) の役割を中心に解析した。その結果、polyI:C 処置によりアストログリア細胞の初期エンドソームに IFITM3 が誘導され、神経グリア細胞相互作用を介して神経発達を障害することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The role of interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) in the CNS is largely unknown, despite the fact that its expression is increased in the brains of patients with neurologic and neuropsychiatric diseases. In the present study we show the role of IFITM3 in long-lasting neuronal impairments in mice following polyI:C-induced immune challenge during the early stages of development. Our findings suggest that the induction of IFITM3 expression in astrocytes by the activation of the innate immune system during the early stages of development has non-cell autonomous effects that affect subsequent neurodevelopment, leading to neuropathological impairments and brain dysfunction, by impairing endocytosis in astrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2010 年度 | 7,700,000  | 2,310,000 | 10,010,000 |
| 2011 年度 | 3,400,000  | 1,020,000 | 4,420,000  |
| 2012 年度 | 3,400,000  | 1,020,000 | 4,420,000  |
| 総計      | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：神経発達障害、統合失調症、アストログリア細胞、神経グリア相互作用、polyI:C、IFITM3、エンドサイトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症などの精神疾患は、複数の発症脆弱性遺伝子と周産期のウイルス感染、思春期の社会的・心理的ストレスなどの環境因子が加わることにより発症すると考えられて

いる。例えば、インフルエンザなどのウイルスに妊婦が感染すると、胎児の脳発達に影響し、思春期以降に統合失調症を発症するリスクが高くなることが示されている。しかし、周産期のウイルス感染による神経発達障害

の分子機構は不明な点が多く、有効な予防・治療法はない。我々は、新生仔マウスに合成二本鎖ポリヌクレオチド (polyI:C) を投与した擬似周産期ウイルス感染モデルを作製した。本モデルマウスは学習記憶障害と情動行動異常を示し、海馬のグルタミン酸神経伝達に障害がある神経発達障害モデルである (Ibi et al., *Neurosci. Res.* 2009)。さらに、本モデルマウスの脳内遺伝子発現の変化を網羅的に解析した結果、統合失調症などの神経発達障害患者脳で報告されている interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) 遺伝子の発現増加を見出した (Ibi et al., *Neurosci. Res.* 2009)。IFITM3 はウイルスに対する感染防御に関与する重要な分子であるが (Brass et al., *Cell* 2009; Everitt et al., *Nature* 2012)、神経発達障害における病態生理学的意義はほとんどわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、polyI:C 誘発性神経発達障害モデルマウスの脳機能障害の分子機構を解明し、統合失調症の環境因子としての周産期ウイルス感染による脳神経発達障害のメカニズムを明らかにすることである。特に、神経発達障害における IFITM3 の機能解明に焦点を絞り、以下の4項目について、それぞれ到達目標を決めて研究を進めた。

### (1) IFITM3 のインビトロ機能解析

PolyI:C 処置によるアストログリア細胞の異常応答、神経細胞-グリア細胞間相互作用、IFITM3 の下流シグナル解析等を行った。

### (2) IFITM3 遺伝子欠損 (IFITM3-KO) マウスの行動薬理的解析

PolyI:C 処置モデルマウスの脳機能障害に IFITM3 が関与しているかどうか行動薬理的に検討した。

### (3) IFITM3-KO マウスの神経化学的および病理学的解析

PolyI:C を投与した IFITM3-KO マウスと野生型 (WT) マウスの脳神経病理学的変化を比較検討した。また、IFITM3-KO マウスおよび WT マウスから培養アストログリア細胞を調製し、神経細胞-グリア細胞間相互作用の変化について解析した。

### (4) 発達障害仮説に基づく新しい抗精神病薬の創製

PolyI:C 誘発性神経発達障害モデルマウスを用いて新しい抗精神病薬の候補分子の効果を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) IFITM3 のインビトロ機能解析

培養アストログリア細胞に polyI:C (5 µg/ml) を添加後、誘導されるサイトカインや神経栄養因子等を PCR-アレイにより解析し

た。さらに、polyI:C 処置したグリア細胞の培養液 (polyI:C-ACM) を海馬由来初代培養神経細胞に添加し、神経細胞の生存率・形態変化をコンピュータ解析した。また、グリア細胞由来液性因子の産生における IFITM3 の役割を明らかにするために、IFITM3-KO マウス由来グリア細胞を用いて検討した。PolyI:C 処置したアストログリア細胞あるいは IFITM3 を過剰発現させた COS7 細胞のエンドサイトーシス活性の測定には、蛍光標識したトランスフェリン (AF555-Tf) と EGF (AF555-EGF) を用いた。

### (2) IFITM3-KO マウスの行動薬理的解析

英国ケンブリッジ大学 Surai 教授より供与を受けた IFITM3-KO マウス (*Mol. Cell. Biol.* 2008) を用いて、polyI:C 処置モデルマウスの行動異常に IFITM3 が関与しているかどうか、新奇物体認知試験で検討した。

### (3) IFITM3-KO マウスの神経化学的および病理学的解析

polyI:C 誘発性神経発達障害モデルマウスの脳病理学的変化を免疫染色、Golgi 染色で解析した。また、グルタミン酸関連分子の変化を *in vivo dialysis* などの手法を駆使して解析した。

### (4) 発達障害仮説に基づく新しい抗精神病薬の創製

PolyI:C 誘発性神経発達障害モデルマウス脳における D-セリン分解酵素 DAAO の発現変化をリアルタイム PCR 法により、D-セリンの治療効果効果を行動薬理的に検討した。

## 4. 研究成果

### (1) IFITM3 のインビトロ機能解析

生後2日目から5日間連続で polyI:C 処置 (5 mg/kg) した新生仔マウスにおける脳内 IFITM3 タンパク発現を免疫組織化学法で調べた結果、IFITM3 タンパクは GFAP 陽性アストログリア細胞に限局していた。そこで、培養アストログリア細胞と培養海馬神経細胞を調製し、polyI:C の効果を調べた。PolyI:C の受容体である toll-like receptor 3 (TLR3) と関連センサーである RIG-1, MDA-5 および IFITM-3 の発現レベルはアストログリア細胞の方が神経細胞に比較して100倍以上高く、しかも polyI:C 処置によりこれらの分子の遺伝子発現はアストログリア細胞においてのみ顕著に誘導を受けた。一方、初代培養神経細胞に polyI:C を添加しても、神経細胞の生存率や神経突起の伸長に全く変化は認められなかった。以上より、polyI:C が主に作用する標的細胞は脳内ではアストログリア細胞であると考えられた。

アストログリア細胞における IFITM3 の役割を明らかにするために、polyI:C 処理アストログリア細胞および IFITM3 過剰発現

COS7 細胞における IFITM3 タンパクの細胞内局在を免疫細胞染色法により詳細に解析した。その結果、IFITM3 は初期エンドソームに限局して発現していることが明らかになった。そこで次に、polyI:C 処理アストログリア細胞および IFITM3 過剰発現 COS7 細胞におけるエンドサイトーシス活性を AF555-Tf と AF555-EGF を用いて解析した。その結果、IFITM3 過剰発現細胞においては、Mock 細胞に比較してクラスリン依存性およびクラスリン非依存性エンドサイトーシスが著明に低下していることが示唆された (Fig. 1)。

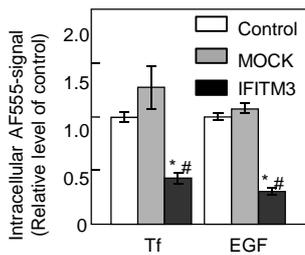


Fig. 1. Endocytic activity in IFITM3-transfected COS7 cells.

次に、polyI:C 誘発性神経発達障害における神経グリア細胞間相互作用を仮定し、polyI:C 処置アストログリア細胞の条件培地 (polyI:C-ACM) を調製し、初代培養神経細胞の神経発達に及ぼす影響を検討した。

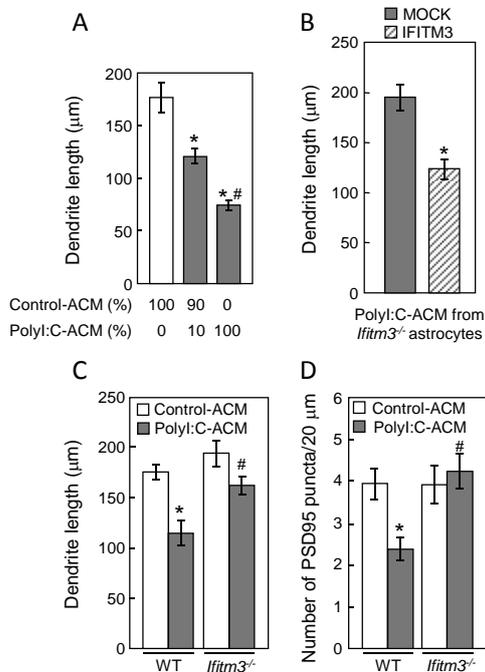


Fig. 2. Role of IFITM3 in the polyI:C-ACM-induced defect of dendrite and spine formation in cultured neurons. (A-C) MAP2-positive dendrite length. (D) Number of spines on neurons (PSD95 puncta per 20 μm along dendrites).

PolyI:C-ACM は濃度依存的に培養海馬神経細胞の樹状突起の伸長を抑制し、スパイン数を減少させた (Fig. 2A)。IFITM3-KO マウス由来のアストログリア細胞から polyI:C-ACM を調製した場合、その神経発達阻害活性は顕著に減弱あるいは消失した (Fig. 2C, D)。一方、IFITM3-KO アストログリア細胞に IFITM3 を強制発現してレスキュー実験を行ったところ、神経発達阻害活性が回復した (Fig. 2B)。

最後に、polyI:C 処置による IFITM3 誘導シグナルについて培養アストログリア細胞を用いて検討した。PolyI:C 処置による IFITM3 mRNA の増加に先行して INF-β mRNA およびタンパクが増加した。アストログリア細胞に INF-β を添加すると IFITM3 mRNA の顕著な増加が起こり、逆に polyI:C 処置と同時に抗 INF-β 抗体を添加すると IFITM3 の誘導は完全に遮断された。したがって、polyI:C 処置によるアストログリア細胞での IFITM3 の発現増加には INF-β シグナルが重要な役割を果たしていると思われる。

## (2) IFITM3-KO マウスの行動薬理的解析

PolyI:C 処置マウスの脳機能障害における IFITM3 の役割を検討した。ICR 系マウスを使用した場合、新生仔期に polyI:C を投与したマウスでは、成熟後に顕著な学習記憶障害と情動行動障害が認められる。しかし、IFITM3-KO マウスの系統である C57BL/6 マウスでは polyI:C による行動障害は比較的軽微であり、新奇物体認知試験においてのみ記憶障害が認められた。一方、polyI:C 処置 IFITM3-KO マウスにおいては、polyI:C 処置 WT マウスで認められるような記憶障害は観察されなかった (Fig. 3A, B)。

## (3) IFITM3-KO マウスの神経化学的、病理学的解析

新生仔期の polyI:C 処置により誘発される脳病理学的変化について IFITM3-KO マウスと WT マウスで比較検討した。Western blotting 法により前頭葉皮質の MAP2 タンパクレベルを解析すると、WT マウスにおいては、polyI:C 最終投与 1 日後 (PD7) あるいは 7 日後 (PD14) に有意な MAP2 タンパクの低下が認められた。一方、IFITM3-KO マウスにおいては、polyI:C 最終投与 7 日後 (PD14) における MAP2 タンパクの低下は認められなかった (Fig. 3C, D)。

PolyI:C 処置マウス前頭葉皮質の錐体神経細胞の微細構造変化について、Golgi 染色のコンピュータ解析により調べた。神経細胞の細胞体の大きさに顕著な変化は認められなかったが、樹状突起のスパイン数はコントロールに比較して polyI:C 処置 WT マウスで

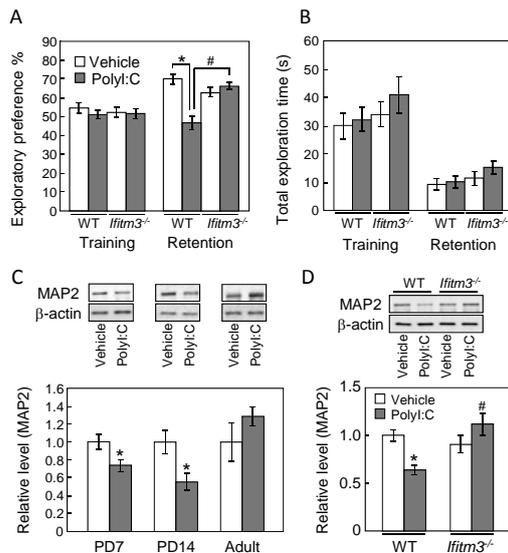


Fig. 3. Role of IFITM3 in the polyI:C-induced neurodevelopmental impairments in the frontal cortex. (A, B) Novel object recognition test. (C, D) MAP2 protein levels in the frontal cortex of polyI:C-treated mice.

意に減少した。一方、polyI:C 処置 IFITM3-KO マウスではスパイン数の減少は認められなかった。さらに、sholl 解析により調べた樹状突起の複雑性についても、スパイン数の変化と同様の変化が認められた。

以上の結果より、新生仔期に投与した polyI:C により誘発される記憶障害と脳病理学的変化にはアストログリア細胞で誘導される IFITM3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。Fig.4 に polyI:C 誘発性脳神経発達障害における IFITM3 の役割に関する作業仮説を示した。IFITM3 はアストログリア細胞に発現する TLR3 の活性化あるいは IFN- $\beta$  の刺激によりグリア細胞の初期エンドソームに誘導され、クラスリン依存性および非依存性エンドサイトーシスを抑制する。

その結果、アストログリア細胞で合成・分泌されるグリア因子の組成、濃度に影響を及ぼし、周囲の神経細胞の神経発達や成熟を阻害すると考えられる。今後、IFITM3 によるエンドサイトーシスの障害の分子機構を解明し、神経発達障害に関与するグリア因子を同定する必要がある (Ibi et al. *Glia*, in press)。

#### (4) 発達障害仮説に基づく新しい抗精神病薬の創製

PolyI:C 処置モデルマウスの学習記憶障害と情動行動の異常は海馬のグルタミン酸遊離の障害と関連していることを明らかにしている (Ibi et al., *Neurosci. Res.* 2009)。そこで、グルタミン酸の co-activator として機能する D-serine の効果と D-serine の生合成に関与する分子の発現変化を調べた。

D-serine は polyI:C 処置マウスの認知記憶障害、社会性行動の減少および不安様行動の増加に対して用量依存的な改善効果を示した。また、D-serine の効果は NMDA 受容体アンタゴニストである MK801 により完全に拮抗された。さらに、polyI:C 処置モデルマウスの海馬において、D-serine 合成酵素 serine racemase の発現に変化はなかったが、同分解酵素 D-amino acid oxidase (DAAO) mRNA の発現増加が認められた。

以上の結果より、グルタミン酸神経伝達の調節機能を有する D-serine 系は抗精神病薬の新しい創薬標的になりうると思われる (Nagai et al., *J. Pharmacol. Sci.*, 2012; Mouri et al., *Neurobiol Dis*, 2013)。

#### 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 13 件)

- ① Ibi D, Nagai T, Nakajima A, Mizoguchi H, Kawase T, Tsuboi D, Kano S, Sato Y, Hayakawa M, Lange UC, Adams DJ, Surani MA, Satoh T, Sawa A, Kaibuchi K, Nabeshima T and Yamada K: Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. *Glia* in press. doi: 10.1002/glia.22461. 査読有
- ② Mouri A, Nagai T, Ibi D and Yamada K: Animal models of schizophrenia for molecular and pharmacological intervention and potential candidate molecules. *Neurobiol. Dis.* 53: 61-74, 2013. doi: 10.1016/j.nbd.2012.10.025. 査読有
- ③ Yun J, Nagai T, Furukawa-Hibi Y, Kuroda K, Kaibuchi K, Greenberg ME, and Yamada K: Neuronal PAS domain domain protein 4 (Npas4) regulates neurite outgrowth and phosphorylation of synapsin I. *J. Biol. Chem.* 288: 2655-2664, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.413310. 査読有
- ④ Nagai T, Yu J, Kitahara Y, Nabeshima T and Yamada K: D-serine ameliorates neonatal PolyI:C treatment-induced emotional and cognitive impairments in adult mice. *J. Pharmacol. Sci.* 120: 213-227, 2012. doi: 10.1254/jphs.12142FP. 査読有
- ⑤ Furukawa-Hibi Y, Yun J, Nagai T, and Yamada K: Transcriptional suppression of the neuronal PAS

domain 4 (Npas4) gene by stress via the binding of agonist-bound glucocorticoid receptor to its promoter. **J Neurochem.** 123: 866-875, 2012. doi: 10.1111/jnc.12034. 査読有

- ⑥ Nagai T, Kitahara Y, Ibi D, Nabeshima T, Sawa A and Yamada K: Effects of antipsychotics on the behavioral deficits in human dominant-negative DISC1 transgenic mice with neonatal polyI:C treatment. **Behav Brain Res.** 225: 305-310, 2011. doi: 10.1016/j.bbr.2011.07.049. 査読有

[学会発表] (計 38 件)

- ① Yamada K, Ibi D, Nakajima A, Yamada S, Mizoguchi H, Nabeshima T and Nagai T. 8<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience (Barcelona International Convention Center 2012.7.14-18)
- ② 山田清文. 第 86 回日本薬理学会年会 (福岡 福岡国際会議場 2012.3.21-23)
- ③ Yamada K. Society of Biological Psychiatry 66<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting & Convention. (San Francisco Hyatt Regency, Embarcadero Center 2011.5.12-14)
- ④ 衣斐大祐、永井拓、中島晶、鍋島俊隆、山田清文. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会 第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会 (仙台 仙台国際センター 2010.9.15-17)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/pharmacy/0>

2/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 清文 (YAMADA KIYOFUMI)  
名古屋大学・医学部附属病院 教授  
研究者番号：30303639

(2)研究分担者

溝口 博之 (MIZOGUCHI HIROYUKI)  
名古屋大学・環境医学研究所 助教  
研究者番号：70402568

(3)連携研究者

永井 拓 (NAGAI TAKU)  
名古屋大学・医学部附属病院 准教授  
研究者番号：10377426

日比 陽子 (HIBI YOKO)  
名古屋大学・医学部附属病院 特任助教  
研究者番号：70295616

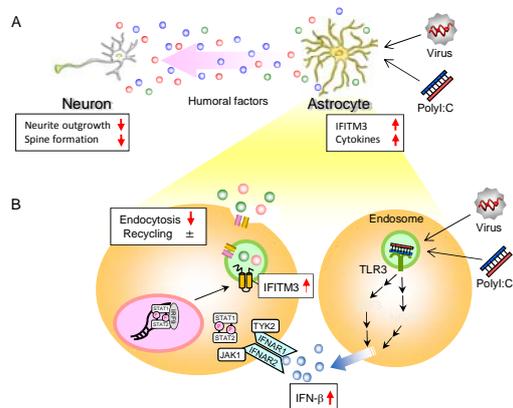


Fig. 4. Proposed model for neurodevelopmental impairments after polyI:C treatment. (A) The impairment of neuron-glia interactions via the abnormalities of humoral factors caused by polyI:C-treated astrocytes. (B) PolyI:C induces IFN- $\beta$  expression in astrocytes; subsequently, the IFN- $\beta$  released by polyI:C-treated astrocytes induces IFITM3 expression in an autocrine and/or paracrine manner.