

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657116

研究課題名（和文）*fosB* 遺伝子の選択的スプライシング産物による脳機能制御機構の解明研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of brain function by alternative splicing products of *fosB* gene

研究代表者

中別府 雄作 (NAKABEPPU YUSAKU)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30180350

研究成果の概要（和文）：

様々な脳ストレスを受けたマウスでは海馬において AP-1 転写因子のサブユニットをコードする *fosB* 遺伝子の発現が顕著に誘導される。*fosB* 遺伝子は選択的なスプライシングにより 2 つの成熟 mRNA (*fosB* と Δ *fosB*) を産生し、様々な脳ストレスに対する応答に関与している。*fosB* 遺伝子を完全に欠損するマウスと 2 つの mRNA の一方のみを発現するマウスを用いた解析から 2 つの *fosB* mRNA 産物が多様な遺伝子の発現制御を介して海馬歯状回における成体脳神経新生を制御し、てんかんやうつ様行動を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Under various brain stress, expression of *fosB* gene which encodes subunits of AP-1 transcription factor is highly induced in the hippocampus of mouse brain. The *fosB* gene produces two mature mRNAs (*fosB* and Δ *fosB*) by alternative splicing, and whose products differentially regulate the response to various brain stress. Our analyses of *fosB*-null mice and mutant mice which produce only one of the two mRNAs revealed that both of the two *fosB* mRNA products play distinct roles in control of the adult neurogenesis in hippocampal dentate gyrus through regulating expression of various genes, and thus suppressing epilepsy and depressive behavior.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写、選択的スプライシング、成体脳神経新生、てんかん、うつ

1. 研究開始当初の背景

fosB 遺伝子は 4 つの *c-fos* ファミリー遺伝子群 (*c-fos*, *fosB*, *fra-1*, *fra-2*) の中で選択的なスプライシングにより複数の AP-1 サブユニット蛋白質 (FosB, Δ FosB など) をコードする唯一の遺伝子で、脳・神経組織で種々の刺激により発現が誘導される。FosB, Δ FosB とともに Jun 蛋白質とヘテロダイマーを形成し、AP-1 結合配列に結合するが、FosB は Jun の転写活性を促進し、 Δ FosB は抑制することで AP-1 転写調節活性を拮抗的に制御する

(Nakabeppu & Nathans, Cell 64:751,1991)。

fosB 遺伝子は、カニン酸やコカインなどの投与により、海馬や大脳皮質、線条体で発現が誘導される。 Δ FosB トランスジェニックマウスの解析から、 Δ FosB がコカイン依存性に関与することが明らかにされている (McClung & Nestler, Nat Neurosci. 6:1208, 2003)。一方、成体脳におけるてんかん発作と神経新生については、カニン酸投与後に両者ともに顕著に促進されることが明らかになっているが、同時に発現が誘導される

fosB 遺伝子の関与についてはこれまでに報告がない。また、成体脳における神経新生の低下が関与するうつ病の発症に *fosB* 遺伝子が関与する可能性についても未解明のままであった。

研究代表者はこれまでに、 Δ FosB 強制発現により静止期の線維芽細胞や神経前駆細胞の増殖が再開することを報告してきた (Cell Death Differ, 10:496, 2003, ibid,12:1078,2005)。この数年間にわたる *fosB* 遺伝子改変マウスの観察から、*fosB* 遺伝子を完全に欠損したマウスが週齢を重ねるにつれて高頻度に自然発生的なミオクローニー発作、點頭発作などのてんかん発作を繰り返すことを見出していた。さらに、*fosB* 遺伝子完全欠損マウスでは興奮毒性を誘発するカイニン酸投与後に BrdU で標識される神経前駆細胞の増殖誘導がほとんど認められず、強制水泳試験で顕著な遊泳時間の短縮を認め、うつ様行動を示す可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

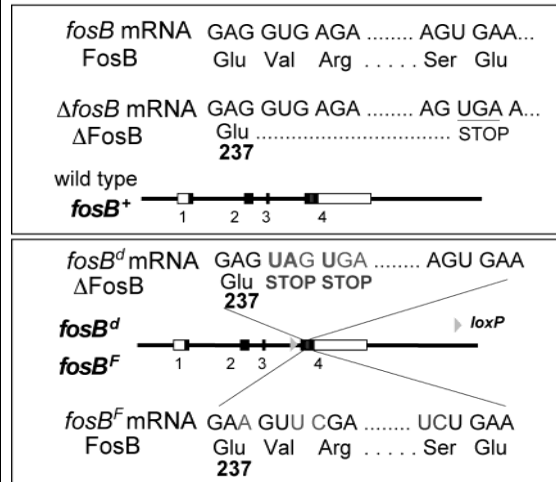
本研究の目的は、*fosB* 遺伝子の選択的スプライシング産物の脳機能制御における役割をその欠損がもたらす神経幹細胞の増殖・分化の異常とうつ様行動及びてんかんの発症機序に注目して以下の6つの観点から明らかにすることである。

- (1) うつ様行動及びてんかん発症の原因となる *fosB* 遺伝子産物の欠損を明らかにする。
- (2) てんかん発作を起こしたマウスの海馬構造の異常を病理学的に明らかにする。
- (3) カイニン酸誘発神経新生の低下の原因となる *fosB* 遺伝子産物の欠損を明らかにする。
- (4) FosB と Δ FosB が成体脳における神経幹細胞の増殖・分化の制御にどのように関わっているかを遺伝子改変マウスの比較解析から明らかにする。
- (5) FosB と Δ FosB が関与する神経新生の制御ステップに注目し、FosB あるいは Δ FosB の下流で発現が制御される遺伝子群を網羅的にスクリーニングし、神経新生に関わる FosB および Δ FosB の標的遺伝子を同定する。
- (6) うつ様行動及びてんかん発症と神経新生低下の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) うつ様行動及びてんかん発症の原因が FosB 欠損もしくは Δ FosB 欠損、あるいは両者の欠損に依存するかを以下の4系統のマウスを用いて解析する。C57BL/6J 系統の遺伝的バックグラウンドに純化した、① *fosB* 遺伝子完全欠損マウス、② FosB タンパク質欠損マウス (*fosB^{dd}*)、③ Δ FosB 欠損マウス (*fosB^{F/F}*) の3系統を樹立し、④ 野生型 C57BL/6J マウス (*fosB^{+/+}*) を含む4系統のマウスのうつ様行動及びてんかん発症に注目し、長期観察を

実施し、比較解析する (下図)。



- (2) *fosB* 遺伝子完全欠損マウスにおけるてんかん発作の誘因を解析する。

- (3) *fosB* 遺伝子完全欠損マウスの海馬構造の病理学的異常をてんかん発作の有無により比較し、明らかにする。

- (4) カイニン酸 (KA) 誘発神経新生の欠損が、FosB 欠損、 Δ FosB 欠損、あるいは両者の欠損に依存するかを、① *fosB* 遺伝子完全欠損マウス、② FosB タンパク質欠損マウス (*fosB^{dd}*)、③ Δ FosB 欠損マウス (*fosB^{F/F}*)、④ 野生型マウス (*fosB^{+/+}*) の4系統のマウスの比較解析から明らかにする。

- (5) FosB と Δ FosB が成体脳における神経幹細胞の増殖・分化の制御にどのように関わっているかを以下の3つのステップに注目し、遺伝子改変マウスの比較解析から明らかにする。① 神経幹細胞の増殖活性化、② 神経細胞への分化、③ 新生神経細胞の長期生存率。
- (6) FosB と Δ FosB が関与する神経新生の制御ステップに注目し、FosB あるいは Δ FosB により下流で制御される遺伝子群をマイクロアレイ解析により網羅的にスクリーニングし、神経新生に関わる FosB および Δ FosB の標的遺伝子を同定する。

- (7) 抗うつ薬への応答を野生型及び遺伝子改変マウスを用いて比較解析する。

4. 研究成果

我々は、脳における *fosB* 遺伝子産物の機能解明を目的として、*fosB* 完全欠損アリル (*fosB^G*) と Δ *fosB* mRNA にコードされる Δ FosB/ Δ 2 Δ FosB は発現するが *fosB* mRNA にコードされる FosB は発現しない *fosB^d* アリルを遺伝子改変によって作製し、それぞれの変異アリルをヘテロ、ホモに持つマウスを樹立し、C57BL/6Jバックグラウンドに純化した。野生型マウス、*fosB^{dd}*、*fosB^{G/G}*マウスの全脳における *fosB* 遺伝子産物の発現を確認したところ、*fosB^{G/G}*マウスでは期待通りに *fosB* 遺伝子産物は全く検出されず、*fosB* 完全欠損マウスであることを確認した。一方、*fosB^{dd}*

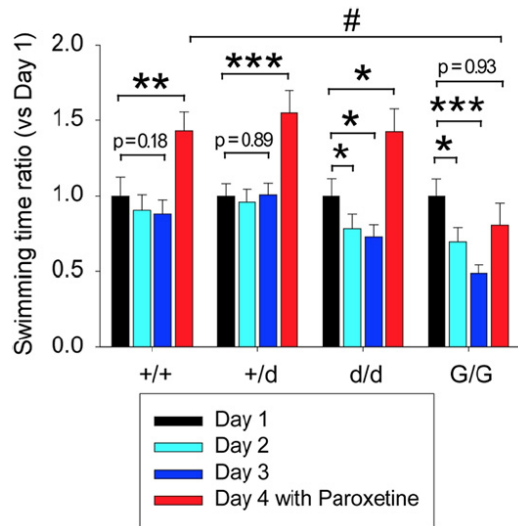
マウスでは線条体、海馬、大脳皮質において Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB の発現が野生型マウスに比べて顕著に増加しており、FosB の発現は検出されなかった。 Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB の発現亢進は $fos^{+/d}$ マウスでも顕著であったが、このヘテロマウスでは低いレベルながら FosB の発現が認められた。

野生型マウス、 $fosB^{dd}$ 、 $fosB$ 完全欠損マウスのホームケージにおける行動量を赤外線ビームでモニターしたところ、 $fosB^{dd}$ > 野生型 > $fosB$ 完全欠損マウスの順に行動量が減少した。同様の傾向は、オープンフィールドにおける新規探索行動においても観察された。高架十字迷路でも $fosB^{dd}$ > 野生型 > $fosB$ 完全欠損マウスの順にオープンアームへの滞在時間が減少したことから、不安や恐怖感が亢進して $fosB$ 完全欠損マウスの行動が低下している可能性が示唆された。しかしながら、明暗箱における暗箱滞在時間は3群のマウス間で有意差は認められず、 $fosB^{dd}$ マウスにおける活動性の亢進と $fosB$ 完全欠損マウスにおける活動性の低下はいずれも不安や恐怖感とは無関係と考えられた。

$fosB^{dd}$ と $fosB$ 完全欠損マウスで見られた活動性の亢進と抑制にドパミンが関与している可能性を検討する目的で、コカインと同様にドパミントランスポーターを阻害し、ドパミン応答性の活動を亢進するメチルフェニデートを投与したところ、 $fosB^{dd}$ > 野生型 > $fosB$ 完全欠損マウスの順に活動性が亢進する事が明らかになった。D1受容体のアゴニストでも同様の結果が得られたことから、線条体におけるD1ニューロンにおいて発現している Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB が活動性の亢進に関わる可能性が示唆された。一方、D2受容体のアンタゴニストのハロペリドールによる行動量の抑制は $fosB^{dd}$ マウスでは全く認められなかったことから、D2ニューロンにおける Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB の発現亢進はハロペリドールによる行動抑制に対して拮抗的に作用すると考えられる。

次に空間認識の記憶学習能力の比較を目的として1日1回の試行で10日連続のモリスの水迷路を用いた実験を行ったところ、オープンフィールド等における結果とは異なり、プラットフォーム到達までの時間は $fosB^{G/G}$ > $fosB^{dd}$ = 野生型 > $fosB^{+/d}$ マウスの順となっていた。この結果は $fosB^{+/d}$ マウスが他のマウスよりも空間認識の記憶学習能力に優れている事を示唆するが、実験データを詳細に解析したところ、 $fosB$ 完全欠損 > $fosB^{dd}$ = 野生型 > $fosB^{+/d}$ マウスの順に遊泳しない無動時間を呈する事が明らかになった。連日の水迷路テストはマウスにとってストレスとなっている事が示唆され、 $fosB$ 完全欠損と $fosB^{+/d}$ マウスが異なるストレス耐性を示すと考えられた。そこで、ストレスによるうつ

誘発試験に用いられる強制水泳テストを3日連続で行った。その結果、 $fosB^{+/d}$ > 野生型 > $fosB^{dd}$ > $fosB$ 完全欠損マウスの順に遊泳時間が短縮し、 $fosB$ 完全欠損が著しくストレス感受性を示すのに対して、 $fosB^{+/d}$ マウスは野生型マウスよりもストレス耐性である事が明らかになった。抗うつ剤 (Paroxetine) に対する応答を観察したところ、 $fosB$ 完全欠損マウスでは全く投与効果が認められず、抗うつ剤耐性であった (下図)。

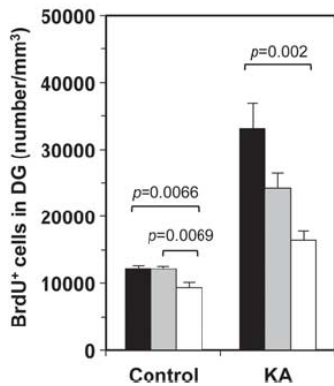


以上の結果は、FosB と Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB がともにストレス応答性の制御に関与する事を意味し、さらに FosB の存在下で Δ FosB/ $\Delta 2\Delta$ FosB の発現量が増加することがストレス耐性の獲得に重要であることを初めて示したものである。

成体海馬においては、比較的高いレベルの $fosB$ 遺伝子産物の発現が成熟神経細胞でみられた。一方、アストロサイトと休止期の神経幹細胞・前駆細胞ではその発現はほとんど見られず、分化過程の幼若な神経細胞で低いレベルではあるが認められた。増殖中の神経前駆細胞ではその発現は認められず、神経分化に伴い発現が上昇する事が明らかになった。このような $fosB$ 遺伝子産物の成熟神経細胞における発現は興奮毒性を發揮するカインニン酸投与後数時間で顕著に増加し、FosB の発現レベルは 24 時間後には定常レベルにまで低下したが、 Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB の発現量はピーク時のレベルを維持していた。カインニン酸投与 6 時間後には一部の Sox2 陽性神経前駆細胞に $fosB$ 産物の発現が認められ、活性化された神経幹細胞あるいは前駆細胞において一過性に $fosB$ の発現が誘導されることが明らかになった。

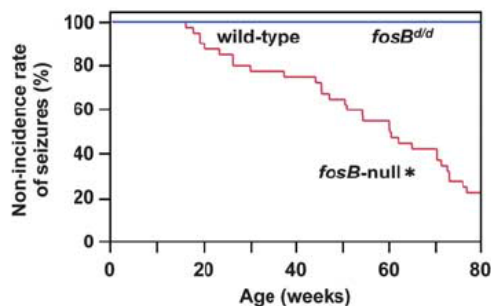
$fosB$ 完全欠損マウスの海馬歯状回では定常状態で BrdU 陽性細胞として検出できる新生神経細胞数が野生型の 80% レベルに低下していたが、 $fosB^{dd}$ マウスでは逆に増加する傾向が認められた。カインニン酸投与後のストレ

ス誘発神経新生は *fosB* 完全欠損マウスでは野生型の 50%以下であった。興味深い事に *fosB^{dd}* マウスでは野生型の 70%レベルの神経新生が観察された(下図■, 野生型; ■, *fosB^{dd}*, □, *fosB* 完全欠損)。



以上より、*fosB* 遺伝子産物は成体マウス海馬における神経幹細胞・前駆細胞の増殖を促進的に制御し、少なくとも定常状態の神経新生は Δ FosB/ Δ 2 Δ FosB のみで十分維持できることが明らかになった。さらに我々は、*fosB* 完全欠損マウスでは海馬歯状回の顆粒層下層で増殖分化した幼若神経細胞の顆粒層へ移動する割合が野生型および *fosB^{dd}* マウスと比べて低下し、逆に海馬門への移動が亢進する事を見出した。一方、新生神経細胞の 10 週間にわたる生存率はマウス系統間で有意差は認められなかった

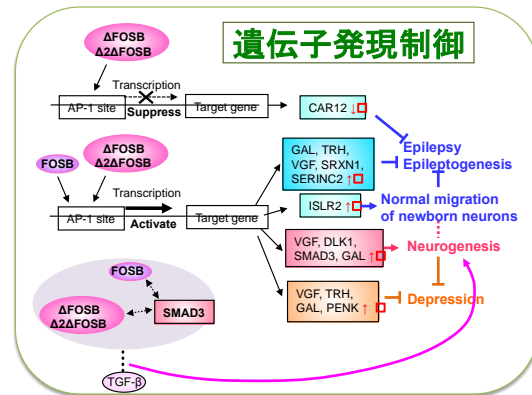
fosB 完全欠損マウスでは、生後 13 週以降から海馬に焦点を持つ自然発症てんかんが観察され、80 週齢までに少なくとも 80% のマウスにおいててんかん発作が認められた(下図, *fosB*-null: *fosB* 完全欠損マウス)。



50-70 週令の *fosB* 完全欠損マウスではてんかん患者で観察される海馬硬化に相当する海馬の構造異常や萎縮が認められた。*fosB^{dd}* マウスではてんかんと海馬の構造異常や萎縮いずれもが全く認められず、 Δ FosB/ Δ 2 Δ FosB のみでもてんかんや海馬の構造異常を抑制できる事が明らかになった。

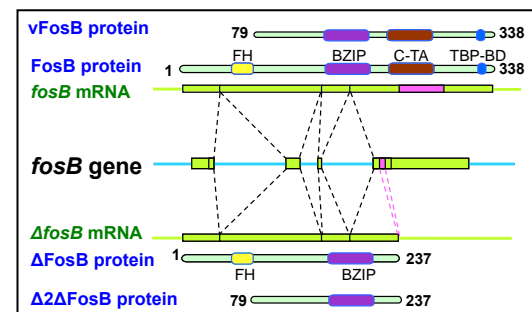
海馬 RNA のマイクロアレイ解析から *fosB* 完全欠損マウスでは神経新生の促進、うつとてんかんの抑制に関わる遺伝子 (*Gal*, *Trh*, *Vgf* など) の発現が有意に減少している事が明らかになった。これらの遺伝子はプロモ-

ーターに AP-1 結合部位を有し、Jun/Fos 複合体によって発現が制御されることから、FosB、 Δ FosB/ Δ 2 Δ FosB がその発現制御を介して神経新生を促進的に制御することで、てんかんとうつ病の発症を抑制している可能性が示唆された(下図)。



てんかん患者においては 30%から 50%の割合でうつ病を併発する事が明らかになっており、その分子機序の解明が求められている。うつ病とてんかんはいずれも海馬神経新生の異常と相関することが知られている。*fosB* 完全欠損マウスは、一遺伝子の欠損が海馬神経新生の低下、うつ病とてんかん発症の原因となることを示した初めての動物モデルであり、今後このモデルマウスを用いてうつ病とてんかんの発症機序の解明が進むことが期待される。また、うつ病およびてんかんは特定の遺伝的背景で発症頻度が上昇することが知られていることから、ヒトにおいてこれらの疾患感受性に関与する *FOSB* 遺伝子の変異、あるいはその発現の変化をもたらす他の遺伝子の変異などをスクリーニングすることで、これらの複雑な疾患の診断と治療への新しい分子標的が提供できると考えられる。

本研究において、*ΔfosB* mRNA を選択的に欠損する *fosB^{FF}* マウスを樹立し、*fosB* mRNA から 2 つの翻訳産物、FosB と vFosB が産生されることを個体レベルで証明した(下図)。現在、*fosB* 完全欠損および *fosB^{dd}* マウスで観察された表現型の解析を進めている。



本研究では、神経細胞以外の脳細胞における *fosB* 遺伝子の機能解析を進めるために、それぞれの変異マウスの脳から単離したミク

ログリア、アストロサイト、神経細胞から RNA を調整し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、ミクログリアにおいて神経細胞と同程度の *fosB* mRNA の発現を認め、さらに FosB/vFosB が補体レセプターの発現制御を介して、脳内免疫の制御に関わる可能性を示すデータが得られており、現在詳細な解析を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Yutsudo N, Kamada T, Kajitani K, Nomaru H, Katogi A, Ohnishi YH, Ohnishi YN, Takase K, Sakumi K, Shigeto H, Nakabeppu Y. *fosB*-Null Mice Display Impaired Adult Hippocampal Neurogenesis and Spontaneous Epilepsy with Depressive Behavior. **Neuropsychopharmacology**: 38(5), 895-906, 2013, doi:10.1038/npp.2012.260.
2. Ohnishi YN, Ohnishi YH, Hokama M, Nomaru H, Yamazaki K, Tominaga Y, Sakumi K, Nestler EJ, Nakabeppu Y. FosB is essential for the enhancement of stress tolerance and antagonizes locomotor sensitization by Δ FosB. **Biol Psychiatry**: 70(5), 487-495, 2011, doi: 10.1016/j.biopsych.2011.04.021.

[学会発表] (計 10 件)

1. 能丸 寛子, 作見 邦彦, 土本 大介, 中別府 雄作, *fosB* 遺伝子産物によるアナフィラトキシン C5a 走化性受容体遺伝子 *C5ar* と *Gpr77* の発現制御機構の解析, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012/12/12, 福岡.
2. 能丸 寛子, 作見 邦彦, 土本 大介, 中別府 雄作, *fosB* 遺伝子産物によるアナフィラトキシン C5a 走化性受容体遺伝子 *C5ar* と *Gpr77* の発現制御機構の解析, 日本遺伝学会第 84 回大会, 2012/09/25, 福岡.
3. Hiroko Nomaru, Noriko Yutsudo, Yusaku Nakabeppu, Comprehensive analysis of gene expression regulated by *fosB* gene in neuron and glia, 第 35 回日本神経科学大会, 2012/09/18, 名古屋.
4. Nomaru H, Yutsudo N, Hokoma M, Nakabeppu Y, Comprehensive analysis of gene expression regulated by *fosB* gene in neuron and glia, The Munich Life Science Symposium for Young Scientist 2012, 2012/03/30, Munich, Germany.
5. Noriko Yutsudo, Takashi Kamada, Hiroko Nomaru, Yoko H. Ohnishi, Yoshinori N. Ohnishi, Kosuke Kajitani, Kunihiko Sakumi, Hiroshi Shigeto, Yusaku Nakabeppu, Mice

lacking *fosB* display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy, The 21st Hot spring Harbor Symposium jointly with 8th Global COE International Symposium, Young Investigators Presentation, 2012/01/21, Fukuoka.

6. H. Nomaru, N. Yutsudo, M. Hokoma, Y. Nakabeppu, Comprehensive analysis of gene expression regulated by *fosB* gene in neuron and glia, 41st Annual meeting of Society for Neuroscience, 2011/11/15, Washington, DC, USA.
7. 湯通堂 紀子, 鎌田 崇嗣, 能丸 寛子, 大西 (本田) 陽子, 大西 克典, 梶谷 康介, 作見 邦彦, 重藤 寛史, 中別府 雄作, Δ FosB/ Δ 2 Δ FosB は成体海馬神経前駆細胞の増殖制御とてんかん自然発症の抑制に働く, 第 34 回日本神経科学大会, 2011/09/16, 横浜.
8. 能丸 寛子, 大西 克典, 外間 政朗, 湯通堂 紀子, 中別府 雄作, 脳内細胞における *fosB* による遺伝子プロファイルの網羅的解析, 第 34 回日本神経科学大会, 2011/09/15, 横浜.
9. Noriko Yutsudo, Takashi Kamada, Hiroko Nomaru, Yoko H. Ohnishi, Yoshinori N. Ohnishi, Kosuke Kajitani, Kunihiko Sakumi, Hiroshi Shigeto, Yusaku Nakabeppu, FosB products regulate proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells and suppress spontaneous epileptic seizures, 2011 International Summer Conference for Neurons and Brain Disease, 2011/08/04, Toyama.
10. Noriko Yutsudo, Takashi Kamada, Hiroko Nomaru, Yoko H. Ohnishi, Yoshinori N. Ohnishi, Kosuke Kajitani, Kunihiko Sakumi, Hiroshi Shigeto, Yusaku Nakabeppu, Δ FosB and/or Δ 2 Δ FosB regulate proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells and suppress spontaneous epileptic seizures, Neurogenesis 2011, 2011/06/02, Kobe.

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/nfg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中別府 雄作 (Nakabeppu Yusaku)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号: 30180350