

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460093

研究課題名(和文) 脳発達期の自然免疫活性化によって惹起される精神発達障害の発現機序の解明

研究課題名(英文) Study on the neurodevelopmental abnormalities induced by the innate immune activation during perinatal period

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (PolyI:C)は擬似的にウイルス感染惹起する化合物であり、生体内では強力に自然免疫反応を誘導することが知られている。我々は新生仔期のPolyI:Cが成熟期まで続く高次脳機能障害を惹起することを報告している。本研究課題では、アストロサイトからのFstl1の分泌増加が前頭皮質の神経発達を障害すること明らかにした。また、PolyI:Cによる神経発達障害の対処方法としてFstl1を分泌抑制が有効であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) is known to induce strong innate immune responses that mimic immune activation by viral infections. Our previous findings suggest that the induction of interferon-induced transmembrane 3 (Ifitm3) in astrocytes has a crucial role in polyI:C-induced neurodevelopmental abnormalities including impairments of dendrite elongation and spine formation, which lead to behavioral impairments in adulthood. Through a quantitative proteomic screen, we identified the candidate proteins of astroglial factors, matrix metalloproteinase-3 (Mmp3) and follistatin like-1 (Fstl1), and Mmp3 function on neuronal development was reported previously. In this study, we characterized the effect of Fstl1 on neuronal development and relationship of Ifitm3 expression. Our results suggest that astroglial Fstl1 is one of possible mediators for neurodevelopmental impairment and the extracellular levels of Fstl1 may be regulated under the control of Ifitm3.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：神経発達 アストロサイト 免疫

### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、思春期・青年期に発症し、慢性進行性の経過をたどる代表的な精神疾患である。罹患率は1%程度と見積もられ、陽性症状(幻覚・妄想など)、陰性症状(情動反応の平板化、社会的ひきこもりなど)および認知障害の3つの主症状によって特徴づけられる。統合失調症の治療には、新規向精神薬や心理社会的治療が導入されているが、未だ十分な治療効果は得られていない。疾患の病態生理が不明であるため病態に即した治療法が開発されていないことが、治療的介入の遅延、治療抵抗性、難治化などの問題に繋がっている。したがって、本疾患の病態生理を解明し、病態生理に即した効果的な治療法・予防法を確立することが待ち望まれている。

統合失調症の病因は未だ不明であるが、遺伝学的研究から disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) などを含め、多くの発症脆弱性遺伝子が同定されている。また、疫学的調査の結果では、周産期のウイルス感染や出産時の合併症などが統合失調症の発症リスクを高めることが示唆されている。すなわち、統合失調症は単一の遺伝子異常によって生じるのではなく、おそらくは多数の遺伝子と環境因子の相互作用によって発症に至る複雑な多因子疾患であると考えられている。

統合失調症に関する研究は、遺伝要因を基礎にした研究が多く、環境要因による神経発達障害に着目した研究が少ない。本疾患の病態を解明するには、環境要因の機序を解明することも重要である。精神疾患の発症リスクの一つとして、母体のウイルス感染が知られている。我々は、神経発達におけるウイルス感染の影響を解明するため、自然免疫を活性化する二本鎖 RNA 様分子 polyriboinosinic-polyribocytidylic acid (polyI:C) を用いて人工的にウイルス感染状態を再現したモデル動物を作製した。生後2日目のマウスに polyI:C を5日間連続投与したマウスは、成熟期に不安様行動の増加、物体認知記憶障害、社会性行動の低下および感覚情報処理機能の障害などの行動異常を示す。また、polyI:C 処置マウスでは海馬の高カリウム刺激による脱分極性グルタミン酸遊離の低下が認められた (Ibi et al., 2009)。PolyI:C 処置マウスの異常行動は抗精神病薬であるハロペリドールやクロザピンで改善した。この他にもニコチン (Yu et al., 2010) や NMDA 受容体グリシン結合サイトのコアゴニストである D-セリンの投与によって行動異常が改善することから、両薬物が新規治療薬となる可能性を示唆した。このように、新生仔期のマウスに polyI:C を処置することで周産期ウイルス感染に基づいた新たな統合失調症モデル動物の作製に成功し、本モデル動物の有用性を示してきた。

一方、マイクロアレイ法を用いて、polyI:C を連続投与した新生仔マウスの脳内における遺伝子発現を調べた結果、

interferon-induced transmembrane protein 3 (Ifitm3) の発現がアストログリア細胞特異的に上昇することを見いだした。また、polyI:C を処置した培養アストロサイトの条件培地 (polyI:C-ACM) を初代培養神経細胞に処置すると、神経突起伸展の抑制やシナプス形成異常が観察された。Ifitm3 ノックアウト培養アストロサイトでは、これら異常が改善された。PolyI:C を直接神経細胞に添加しても神経突起進伸展などの障害が認められなかったことから、自然免疫活性化に伴う神経発達障害はアストロサイトにおける Ifitm3 の誘導と、それに続く液性因子の放出が関与していると考えられる。我々は、アストロサイトから放出される液性因子を同定することを目的として、蛍光標識二次元ディフレンスゲル電気泳動解析法を用いたプロテオーム解析を行った。PolyI:C-ACM 中に存在するタンパク質の網羅的発現解析を行った結果、follistatin like-1 (Fstl1) が顕著に増加していることを見出した。Fstl1 は、Activin に結合するタンパクとして知られている Follistatin と類似したドメインを持つタンパクとして同定されたが、Follistatin とは別の機能を有することが示されている。近年では Fstl1 は末梢感覚神経系の情報伝達に関与していることが報告されているが、中枢神経系における機能は不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳発達期の自然免疫活性化によって惹起される神経精神発達障害の発現機序を Fstl1 の病態生理学的意義から明らかにするとともに、新規治療標的の可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物

実験には、日本 SLC より購入した C57BL/6J マウスを使用した。本課題は名古屋大学組み換え DNA 実験委員会 (承認番号 09-34) および名古屋大学医学部動物実験委員会において承認済み (承認番号第 24179 号) であり、承認内容にしたがって倫理的配慮のもとで遂行した。

#### (2) 培養アストロサイトと ACM の調製

培養アストロサイトは、生後1-2日目のマウスの海馬と皮質から調製した。培地を Neurobasal Medium (Invitrogen, Eugene, OR) に交換し、6日後に PBS (control) または polyI:C (10 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を処置した。PolyI:C 処置24時間後の培養上清を回収し、アストロサイト条件培地 (ACM) とした。時間依存的な発現解析には、polyI:C 処置6時間後および12時間後の ACM も作製した。RNA 干渉法によるノックダウン解析には、最終培地交換の6時間前に Stealth siRNA for Fstl1 (#1 および #2) または Stealth RNAi siRNA negative

control (control siRNA) を処置した (Invitrogen)。

(3) ウエスタンブロッティング法とリアルタイム PCR 法による発現解析  
回収した ACM を濃縮し、ウエスタンブロッティング用のサンプルとした。また、ACM を回収した後のアストロサイトからタンパク質および total RNA を抽出し、それぞれウエスタンブロッティングおよびリアルタイム PCR 用のサンプルとした。

(4) 初代培養神経細胞の調製と polyI:C-ACM の処置

胎生 15-16 日目のマウスの海馬から初代培養神経細胞を作製した。培養 2 日目に神経細胞の培地を polyI:C-ACM または control-ACM に交換した。siRNA を処置したアストロサイト由来の ACM についても、培養 2 日目に神経細胞の培地として交換した。また、Fstl1 の機能解析のために、最終濃度が 50 nM、100 nM または 300 nM となるように、リコンビナントマウス (rm) Fstl1 を control-ACM に添加し、培養 2 日目に神経細胞の培地として交換した。神経細胞をさらに 5 日間培養し、培養 7 日目に MAP2 (樹状突起マーカー) と tau (軸索マーカー) による免疫染色を行い、MAP2 陽性かつ tau 陰性の樹状突起の長さを測定した。

#### 4. 研究成果

(1) Ifitm3 による細胞外 Fstl1 量の制御

これまでの検討によって、アストロサイトに polyI:C を処置すると Ifitm3 の発現が増加すること、PolyI:C-ACM 中に存在するタンパク質の網羅的発現解析結果から Fstl1 が顕著に増加していることを見出している。はじめに、Ifitm3 の下流で Fstl1 の分泌が変化するかどうかを調べるため、野生型および Ifitm3 KO マウス由来アストロサイトに polyI:C を添加して ACM および細胞内における Fstl1 のタンパク発現量をウエスタンブロッティング法により調べた。野生型アストロサイトでは polyI:C 処置に伴い ACM および細胞内 Fstl1 の発現量が顕著に増加した。一方、Ifitm3 KO マウス由来アストロサイトに polyI:C を処置しても ACM 中の Fstl1 発現量は増加しなかったが、細胞内 Fstl1 発現量は PolyI:C を処置した野生型マウスと同程度であった。また、Fstl1 のみを遺伝子導入した COS7 細胞に比べて Ifitm3 および Fstl1 を共遺伝子導入させた COS7 細胞では、培養液中の Fstl1 の発現量が増加したが、細胞内 Fstl1 発現量の変化は観察されなかった。したがって、PolyI:C はアストロサイトに作用して Ifitm3 を介して Fstl1 の細胞外への分泌を促進すると考えられる。

(2) アストロサイトとマイクログリア細胞における Ifitm3 および Fstl1 発現変化

Fstl1 の分泌に關する PolyI:C の標的細胞がアストロサイト特異的であるかどうかを調べるため、polyI:C 処置後の Fstl1 の細胞外量をアストロサイトとマイクログリア細胞で調べた。PolyI:C 処置による Ifitm3 mRNA の発現増加はアストロサイトおよびマイクログリアで観察された。一方、PolyI:C 処置による Fstl1 mRNA の発現増加はアストロサイトのみで認められ、マイクログリアでは観察されなかった。さらに、polyI:C を処置したアストロサイトでは Fstl1 の細胞外量が著しく増加したが、マイクログリアでは有意な変化は認められなかった。

(3) PolyI:C の神経発達阻害作用に対するアストロサイト由来 Fstl1 の効果

Fstl1 の神経発達に及ぼす影響について検討した。初代培養神経細胞にリコンビナント Fstl1 を添加して培養を行い、樹状突起マーカー分子 Microtubule-associated protein 2 (MAP2) の免疫染色によって神経突起の伸展について測定した結果、リコンビナント Fstl1 の用量に依存した神経突起の進展抑制が認められた。また、PolyI:C を処置したアストロサイト培養上清により惹起される神経突起の進展障害は Fstl1 をノックダウンしたアストロサイト由来の培養上清では認められなかった。さらに、Fstl1 結合タンパクの探索を行い、細胞骨格系や G タンパク質をプロテオミクス解析によって同定し、PolyI:C を処置したアストロサイトにおいて Fstl1 が細胞内で繊維状の構造を呈して Ifitm3 と共局在していた。

(4) 新生仔期 PolyI:C 投与マウスにおける Fstl1 の発現誘導

Fstl1 の高次脳機能への影響を調べるために、新生仔期に PolyI:C を投与したマウスにおける Fstl1 の発現を免疫染色法により調べた。その結果、PolyI:C を投与したマウスの前頭皮質において、Fstl1 陽性細胞の増加が観察された。また、二重免疫染色法により Fstl1 発現細胞の同定を試み、Fstl1 の免疫活性は GFAP 陽性のアストロサイトで確認された。一方、生理食塩水を投与したマウスでは Fstl1 陽性細胞が認められなかった。以上の結果から、新生仔期の polyI:C 処置に伴いアストロサイトから Ifitm3 を介して Fstl1 が分泌され、前頭皮質の神経発達を障害していることが示唆された (図 1)。

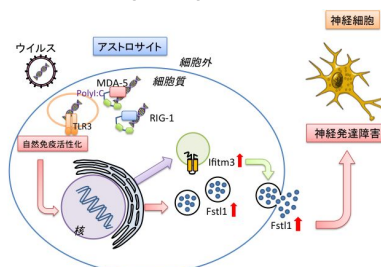


図1. 脳発達期の自然免疫活性化によって惹起される神経精神発達障害の発現機序

## 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. Nagai, T., Nakamuta, S., Kuroda, K., Nakauchi, S., Nishioka, T., Takano, T., Zhang, X., Tsuboi, D., Funahashi, Y., Nakano, T., Yoshimoto, J., Kobayashi, K., Uchigashima, M., Watanabe, M., Miura, M., Nishi, A., Kobayashi, K., Yamada, K., Amano, M., Kaibuchi, K. Phosphoproteomics of the dopamine pathway enables discovery of Rap1 activation as a reward signal in vivo. *Neuron*, 89, 550-565, 2016. doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.019. 査読有
2. Aoyama, Y., Toriumi, K., Mouri, A., Hattori, T., Ueda, E., Shimato, A., Sakakibara, N., Soh, Y., Mamiya, T., Nagai, T., Kim, H.-C., Hiramatsu, M., Nabeshima, T., Yamada, K. Prenatal nicotine exposure impairs the proliferation of neuronal progenitors, leading to fewer glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 41, 578-589, 2016. doi: 10.1038/npp.2015.186. 査読有
3. Hori, K., Nagai, T., Shan, W., Sakamoto, A., Abe, M., Yamazaki, M., Sakimura, K., Yamada, K. and Hoshino, M. Heterozygous disruption of Autism susceptibility candidate 2 causes impaired emotional control and cognitive memory. *PLOS ONE*, 10: e0145979, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0145979. 査読有
4. Hirao K, Eto K, Nakahata Y, Ishibashi H, Nagai, T., Nabekura J. Noradrenergic refinement of glutamatergic neuronal circuits in the lateral superior olivary nucleus before hearing onset. *J. Neurophysiol.* 114, 1974-1986, 2015. doi: 10.1152/jn.00813.2014. 査読有
5. Furukawa-Hibi, Y., Nagai, T., Yun, J., Yamada, K. Stress increases DNA methylation of the neuronal PAS domain 4 (Npas4) gene. *Neuroreport*, 26, 827-832, 2015. doi: 10.1097/WNR.0000000000000430. 査読有
6. Mizoguchi, H., Katahira, K., Inutsuka, A., Fukumoto, K., Wang, T., Nagai, T., Sato, J., Sawada, M., Ohira, H., Yamanaka, A., Yamada, K. The insular neural system controls decision-making in healthy and methamphetamine-treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112, E3930-39309, 2015. doi: 10.1073/pnas.1418014112. 査読有
7. Nakajima, A., Aoyama, Y., Shin, E.J. Nam, Y., Kim, H.C. Nagai, T., Yokosuka, A., Mimaki, Y., Yokoi, T., Ohizumi, Y., Yamada, K. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves cognitive impairment and reduces soluble A $\beta$  levels in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3XTg-AD). *Behav. Brain Res.* 289, 69-77, 2015. doi: 10.1016/j.bbr.2015.04.028. 査読有
8. Udagawa, T., Fujioka, Y., Tanaka, M., Honda, D., Yokoi, S., Riku, Y., Ibi, D., Nagai, T., Yamada, K., Watanabe, H., Katsuno, M., Inada, T., Ohno, K., Sokabe, M., Okado, H., Ishigaki, S., and Sobue, G. FUS regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behavior via GluA1 mRNA stabilization. *Nat. Commun.* 6, 7098, 2015. doi: 10.1038/ncomms8098. 査読有
9. Ishii, K., Nagai, T., Hirota, Y., Noda, M., Nabeshima, T., Yamada, K., Kubo, K., Nakajima, K. Reelin has a preventive effect on phencyclidine-induced cognitive and sensory-motor gating deficits. *Neurosci. Res.*, 96, 30-36, 2015. doi: 10.1016/j.neures.2014.12.013. 査読有
10. Hori, K., Nagai, T., Shan, W., Sakamoto, A., Taya, S., Hashimoto, R., Hayashi, T., Abe, M., Yamazaki, M., Nakao, K., Nishioka, T., Sakimura, K., Yamada, K., Kaibuchi, K., Hoshino, M. Cytoskeletal Regulation by AUTS2 in Neuronal Migration and Neuritogenesis. *Cell Rep.*, 9, 2166-2179, 2014. doi: 10.1016/j.celrep.2014.11.045. 査読有
11. Nakai, T., Nagai, T., Tanaka, M., Itoh, N., Asai, N., Enomoto, A., Asai, M., Yamada, S., Saifullah, A.B., Sokabe, M., Takahashi, M., Yamada, K. Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. *J. Neurosci.*, 34, 14995-15008, 2014. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2228-14.2014. 査読有
12. Nakai, T., Nagai, T., Wang, R., Yamada,

- S., Kuroda, K., Kaibuchi, K., Yamada, K. Alterations of GABAergic and dopaminergic systems in mutant mice with disruption of exons 2 and 3 of the Disc1 gene. *Neurochem. Int.*, 74, 74-83, 2014. doi: 10.1016/j.neuint.2014.06.009. 査読有
13. Yamada, S., Nagai, T., Nakai, T., Ibi, D., Nakajima, A., Yamada, K. Matrix metalloproteinase-3 is a possible mediator of neurodevelopmental impairment due to polyI:C-induced innate immune activation of astrocytes. *Brain Behav. Immun.*, 38, 272-282, 2014. doi: 10.1016/j.bbi.2014.02.014. 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 永井拓, 天野睦紀, 山田清文, 貝淵弘三: "Flex システムを用いた脳内報酬系の解析: ドパミン D1 受容体発現中型有棘細胞の動作メカニズムの解明" 第 89 回日本薬理学会年会, (2016. 3.9-11) 神奈川県横浜市、パシフィコ横浜.
2. 永井拓: "報酬関連行動を制御するシグナル伝達" 蛋白研セミナー・包括脳ネットワーク研究会「第 6 回神経科学と構造生物学の融合研究会」, (20151126-20151127). 愛知県岡崎市、生理学研究所.
3. 永井拓: "薬物依存症の克服を目指した分子基盤研究" 平成 27 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, (20151011-20151013). 兵庫県神戸市、神戸国際会議場.
4. 永井拓: "報酬シグナルの同定と報酬回路の制御機構" 平成 27 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, (20151011-20151013). 兵庫県神戸市、神戸国際会議場.
5. 永井拓: "ドパミン神経伝達を介した報酬シグナルの多面的解析" 平成 27 年度生理学研究所研究会「情動の多次元的理解に基づく行動原理の探求」, (20151007-20151008). 愛知県岡崎市、生理学研究所.
6. 永井拓, 天野睦紀, 山田清文, 貝淵弘三: "リン酸化プロテオミクスによる報酬シグナルの解明" 第 58 回日本神経化学学会大会, (20150911-20150913). 埼玉県さいたま市、大宮ソニックシティ.
7. 永井拓: "Intracellular signal transduction in the brain reward system" 第 88 回日本薬理学会年会, (20150318-20150320). 愛知県名古屋市、名古屋国際会議場.
8. 永井拓, 中井剛, 田中基樹, 浅井直也, 榎本篤, 曾我部正博, 高橋雅英, 山田清文: "リン酸化 Girdin による神経可塑性の制御" 第 24 回神経行動薬理若手研究者の集い, (20150317). 愛知県名古屋市、名城大学名駅サテライトキャンパス.
9. 永井拓, 山田真之亮, 山田清文: "Matrix metalloproteinase-3 mediates neurodevelopmental impairment due to polyI:C-induced innate immune activation" 第 8 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, (20141115-20141116). 熊本県熊本市、熊本大学薬学部多目的ホール.
10. 永井拓, 中井剛, 田中基樹, 浅井直也, 榎本篤, 曾我部正博, 高橋雅英, 山田清文: "リン酸化 Girdin は NMDA 受容体を介して神経可塑性を制御する" 第 24 回日本臨床神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会 合同年会, (20141120-20141122) 愛知県名古屋市、名古屋国際会議場.
11. 永井拓: "脳内報酬系の分子基盤" 第 49 回日本アルコール・薬物医学会、第 36 回日本アルコール関連問題学会、第 26 回日本依存神経精神科学会合同学術総会. (20141003-20141004) 神奈川県横浜市、パシフィコ横浜.
12. 永井拓, 山田真之亮, 山田清文: "Matrix metalloproteinase-3 と polyI:C 誘発性自然免疫活性化により惹起される神経発達障害" 第 37 回日本神経科学大会 (Neuroscience2014) (201409 11-20140913) 神奈川県横浜市、パシフィコ横浜.
13. 永井拓: "PolyI:C 誘発性神経発達障害モデルの有用性 (シンポジウム: 統合失調症失調症の生物学的研究の進歩 - 遺伝子特性 ~ 創薬の種の最前線 - )" 第 8 回日本統合失調症学会. (20130419-20130420). 北海道浦河郡、浦河町総合文化会館、浦河ウエリントン ホテル
14. 永井拓: "精神発達に及ぼす遺伝 環境因子の影響に関する研究" 第 59 回日本薬学会東海支部総会・大会(招待講演). (20130706) 愛知県名古屋市、名城大学
15. 永井拓, 千崎康司, Yu Jinghua, 山田清文: "新生仔期 polyI:C 処置マウスの異常行動に対する抗精神病薬の効果とプロテオーム解析" 第 123 回日本薬理学会近畿部会. (20130712) 愛知県名古屋市、ウインクあいち

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/pharmacy/02/outline.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2)研究分担者  
なし