

「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」

平成 17 年度採択研究代表者

和田 圭司

(国立精神・神経センター神経研究所 部長)

「脳発達を支える母子間バイオコミュニケーション」

## 1. 研究実施の概要

本研究では、母体由来の生理活性物質を介した母子間のコミュニケーションが胎児・乳児の脳に作用してその健やかな発達を促し、生後の適正な行動の獲得などに寄与するという新しい仮説について、まず母子間の物質的コミュニケーションの存在をほ乳類で実証し、さらに母体側因子の変動が子供の脳発達に与える影響を解明することを目指す。これらの成果は、脳発達障害の病因の解明やその予防法の開発に繋がることが期待される。平成17年10月の研究スタート後これまでに、マウス母体を通常ケージでなく遊具などが使用できる恵まれた環境(EE)においた場合、逆に、マウス母体に身体的ストレスを加えた場合のマウス胎仔の脳内 G 蛋白質共役型受容体(GPCR)約300個の遺伝子発現を解析した。その結果解析した大脳皮質、海馬、扁桃体の各領域で mRNA 発現が増減する GPCR を複数同定した。その中の1種の GPCR に対する内在性リガンドを母体側に投与した場合、胎仔脳内リガンド量が母胎投与量に相関して増加することを ELISA で確認した。また同リガンドを投与された母体から出生した仔の成長後の行動科学的解析を行ったところ高架式十字迷路試験などにおいて対照マウスとの間で差を検出した。また、EE が胎仔の生後発達に及ぼす影響を同様に行動科学的に解析したところ、hole board 試験、明暗箱試験などにおいて妊娠中の EE での飼育、あるいは EE にあった母体の授乳行為による影響と思われる差を検出した。他方、牛乳β-ラクトグロブリンの酵素消化によって派生するβ-ラクトテンシンについても解析を継続し、マウスへの経口投与により受動的回避学習試験における記憶学習能が促進することを見出した。その作用はドーパミン D<sub>2</sub> アンタゴニストである raclopride によりブロックされることから、ドーパミン系の関与が示唆された。事実、β-ラクトグロブリンは線条体、および側座核からのドーパミンの遊離を促進することがマイクロダイアリス実験により確認できた。これらの研究結果は母子間の物質的コミュニケーションの存在を支持するものでその分子的な実体を今後証明する基盤となる。

## 2. 研究実施内容

研究目的

全体構想における目的は以下の通りである。

1. 母体由来の生理活性物質が胎児、乳幼児の脳に作用し、その発達を支えるという新たな仮説

を齧歯類、霊長類等を用いた実験系において検証する。

2. このような生理活性物質を母子伝達物質として位置づけその同定を図り、母子伝達物質の概念を確立する。
3. 胎児・乳児脳における母子伝達の受容機構を明らかにし、母体側因子の変動が胎児・乳児脳の機能発達に与える影響を解明する。
4. 以上の成果をヒトに還元する。

今年度は以下の4項目に関する研究を行った。

1. マウス母体の飼育条件を変動させた場合の胎仔脳内遺伝子変動の解析と母子伝達受容体候補の同定
2. 母子伝達受容体候補作用物質がマウス産仔生後行動発達に及ぼす影響の解析
3. マウス母体の飼育条件の変動と産仔生後行動発達の関連性の解析
4. マウス脳内ドーパミン遊離に対する牛乳タンパク質由来のニューロテンシンアゴニストペプチド  $\beta$ -lactotensin の影響の解析

#### 方法

- 1) マウス母体の飼育条件を変動させた場合の胎仔脳内遺伝子変動の解析と母子伝達受容体候補の同定

G-Protein Coupled Receptors (GPCRs)は胎児期の脳の発達において重要な役割を担うと考えられる。昨年度妊娠後期 (E12~16) に拘束ストレスを負荷した母体マウスの胎仔 (E18.5)、妊娠中の飼育を遊具などが存在する enriched 環境 (EE) 下、あるいは照明を落とし床敷きの品質・量を改善した comfortable 環境 (CE) 下で行った母体マウスの胎仔 (E18.5) について、海馬、扁桃核、大脳皮質における約 350 種類の GPCR mRNA の発現をリアルタイム PCR で解析し通常飼育の妊娠個体から得られた胎仔脳の各領域における mRNA 発現と比較した。その結果変動が認められた GPCR mRNA について順次再現性を確認し GPCR を母子伝達受容体候補を選別した。

- 2) 母子伝達受容体候補作用物質がマウス産仔生後行動発達に及ぼす影響の解析

前項で同定された複数の GPCR のうち特にマウス母体が妊娠中の一定期間ストレス環境下にあった場合に胎仔で mRNA 発現が上昇した GPCR に着目し、その内在性リガンドをマウス母体に投与した際の母体、胎仔血中リガンド濃度の変化をELISA法にて解析した。さらにリガンドを投与されたマウス母体から出生した仔の離乳後の行動を生後8週で高架式十字迷路試験などにおいて対照マウス母体から出生した同週齢の仔と比較した。

- 3) マウス母体の飼育条件の変動と産仔生後行動発達の関連性の解析

妊娠中通常飼育環境下にあったマウスから出生し EE 下にあった雌マウスから授乳を受けた仔、妊娠中に EE で一時期飼育されたマウスから出生し通常飼育環境下にあった雌マウスから授乳を受けた仔、通常飼育環境下にあった妊娠マウスから出生し通常飼育環境下にあった雌マウスから授

乳を受けた仔の離乳後の行動を生後8週、21週で各々hole board 試験、明暗箱試験において比較した。

#### 4) マウス脳内ドーパミン遊離に対する牛乳タンパク質由来のニューロテンシンアゴニストペプチド $\beta$ -lactotensin の影響の解析

マイクロダイアリス法により、ddyマウスの線条体および側座核に $\beta$ -lactotensin を還流した際のドーパミンレベルの変動を検討した。

### 結果

#### 1) マウス母体の飼育条件を変動させた場合の胎仔脳内遺伝子変動の解析と母子伝達受容体候補の同定

妊娠中の一定期間に EE 下にあったマウス胎仔の皮質、海馬、扁桃体のいずれかもしくは2カ所以上の領域で mRNA の発現上昇が再現性を持って確認された GPCR が2種、発現が低下した GPCR が4種同定された。妊娠中の一定期間に CE 下にあったマウス胎仔の皮質、海馬、扁桃体のいずれかもしくは2カ所以上の領域で mRNA の発現上昇が同じく再現性を持って確認された GPCR が2種、発現が低下した GPCR が2種同定された。また妊娠中の一定期間にストレス環境下にあったマウス胎仔脳で mRNA の発現上昇が再現性を持って確認された GPCR 1種を同定した。なお、前年度報告した残りの GPCR についても再現性の解析を継続中である。

#### 2) 母子伝達受容体候補作用物質がマウス産仔生後行動発達に及ぼす影響の解析

マウス母体が妊娠の一定期間ストレス環境下にあった場合に胎仔で mRNA 発現が上昇した GPCR の内在性リガンドを母体側に投与した場合、胎仔脳内リガンド量が母胎投与量に相関して増加することを確認した。また同リガンドを投与された母体から出生した仔の成長後の行動科学的解析を行ったところ高架式十字迷路試験において対照マウスとの間で差を検出した。

#### 3) マウス母体の飼育条件の変動と産仔生後行動発達の関連性の解析

妊娠中の EE ならびに妊娠中に EE を経験した雌マウスの保育行動が胎仔の生後発達に及ぼす影響を hole board 試験にて解析したところ、EE 環境にあった雌マウスの授乳行為による影響と思われる差を検出した。

#### 4) マウス脳内ドーパミン遊離に対する牛乳タンパク質由来のニューロテンシンアゴニストペプチド $\beta$ -lactotensin の影響の解析

step through 装置を用いた受動的回避実験において $\beta$ -lactotensin D1D2 は記憶増強作用を示し、その作用はドーパミン  $D_2$  アンタゴニストによりブロックされることから、ドーパミン系の関与が示唆された。そこで、マイクロダイアリス法を用いて検討したところ、 $\beta$ -lactotensin の還流により、線条体および側座核からのドーパミンの遊離著しく促進されることがわかった。

### 結論

1) 母体側因子を変動させた場合に mRNA 発現が変動する GPCR を同定した。

2) 前項 GPCR の一種について内在性リガンドを投与されたマウス母体から出生した仔、妊娠中の

環境要因を変化させた雌マウスから生まれ同様の变化を受けた雌マウスに保育された仔は対照マウス仔と比較して解析した行動科学試験の一部において変動を認めた。

3) 牛乳β-ラクトグロブリンの酵素消化により派生するニューロテンシンアゴニストペプチドβ-lactotensin は線条体および側座核からのドーパミンの遊離を促進することが判明した。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「神経研究所」グループ

##### ①研究者名

和田 圭司(疾病研究第四部 部長)

##### ②研究項目

- ・胎児・乳児脳の母子伝達受容機構解明、母子伝達物質の同定と解析(ヒト母乳、大型動物乳腺分泌物の解析は除く)、ヒトでの実用化に向けた脳機能発達における母子伝達の機能解明

#### (2)「京都大学」グループ

##### ①研究者名

吉川 正明(京都大学 教授)

##### ②研究項目

- ・母子伝達物質の同定と解析(ヒト母乳、大型動物乳腺分泌物の解析)

### 4. 研究成果の発表等

#### (1)論文発表(原著論文)

(神経研究所グループ)

- Sun, Y.J., Nishikawa, K., Yuda, H., Wang, Y.L., Osaka, H., Fukazawa, N., Naito, A., Kudo, Y., Wada, K., Aoki, S: Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 6923-6935, 2006.
- Yamauchi, R., Wada, E., Yamada, D., Yoshikawa, M. Wada, K: Effect of b-lactotensin on acute stress and fear memory. *Peptides*, 27, 3176-3182, 2006 Sep 23; [Epub ahead of print]
- Nishimoto, M., Furuta, A., Aoki, S., Kudo, Y., Miyakawa, H. Wada, K: PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. *Glia*, 55, 317-327, 2007, 2006 Nov 17; [Epub ahead of print]
- Zushida, K., Sakurai, M., Wada, K., Sekiguchi, M: Facilitation of extinction learning for contextual fear memory by PEPA-a potentiator of AMPA receptors. *J. Neurosci.*; Jan 3 2007. 27(1): 158 – 166. [Epub ahead of print]