

「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」

平成 16 年度採択研究代表者

大隅 典子

(東北大学大学院医学系研究科 教授)

「ニューロン新生の分子基盤と精神機能への影響の解明」

1. 研究実施の概要

生後脳におけるニューロン新生の分子機構を解明するために、野生型ラットとニューロン新生に低下が見られる *Pax6* 遺伝子変異ラット (*rSey*²/+ラット) を用いて、生後 4 週齢の海馬歯状回における FABP7 発現細胞の性質を調べた。FABP7 は、胎生期の終脳において *Pax6* の標的遺伝子であり、神経幹細胞を未分化状態に維持するために必要であることを昨年度明らかにしている (Arai et al., 2005)。野生型ラットの生後海馬歯状回において FABP7 と *Pax6* は同一細胞内に存在し、*rSey*²/+ラットでは FABP7 の発現が減少することから、FABP7 は生後の海馬歯状回においても *Pax6* の標的遺伝子である可能性が考えられた。また、免疫組織化学的データから、生後海馬歯状回において FABP7 発現細胞が神経幹細胞/前駆細胞様の性質を示すことが示唆された。これらの結果を考え合わせると、*Pax6*-FABP7 という遺伝子ネットワークは、生後ニューロン新生の制御に関わっている可能性が考えられた。また、吉川らにより、FABP7 遺伝子が統合失調症発症に関わる可能性が見いだされた。

2. 研究実施内容

生後脳におけるニューロン新生の分子機構を解明するために、野生型ラットと *Pax6* 遺伝子変異ラット (*rSey*²/+ラット) を用いて、生後 4 週齢の海馬歯状回における FABP7 発現細胞の性質を調べた。野生型ラット海馬歯状回では、FABP7 発現細胞のほとんどが、とくに放射状グリアの形態を示す神経幹細胞様の細胞において *Pax6* を共発現していた。また、昨年度ニューロン新生に低下が見られることを見いだした *rSey*²/+ラット (Maekawa et al., 2005) では、FABP7 発現細胞数が顕著に減少していた。野生型ラット海馬歯状回において神経前駆細胞/成熟神経細胞等のマーカーを用いて免疫染色を行うと (図 1)、FABP7 発現細胞の 62.9%がアストロサイトまたは早期神経前駆細胞のマーカーである GFAP を、27.5%が後期神経前駆細胞の PSA-NCAM を共発現していた。また、一部はアストロサイトのマーカーとして GFAP だけでなく S100 β も共発現した。これに対して、成熟ニューロンのマーカーである NeuN を共発現する細胞は存在していなかった。BrdU 標識法を用いて FABP7 発現細胞の増殖能を調べると、BrdU 標識 30 分後のサンプルでは BrdU 標識細胞の 88.8%が

FABP7 を発現していた。FABP7 発現細胞のうち BrdU を取り込んだものは、BrdU 標識 30 分後のサンプルにおいて 4.7%であったが、BrdU を 2 週間投与し、ゆっくりとした細胞周期の神経幹細胞も標識すると、36.3%のものが標識された。したがって、海馬歯状回において FABP7 を発現する細胞は、Pax6 発現細胞と同様に、神経幹細胞/前駆細胞様の性質を示すことが分かった。

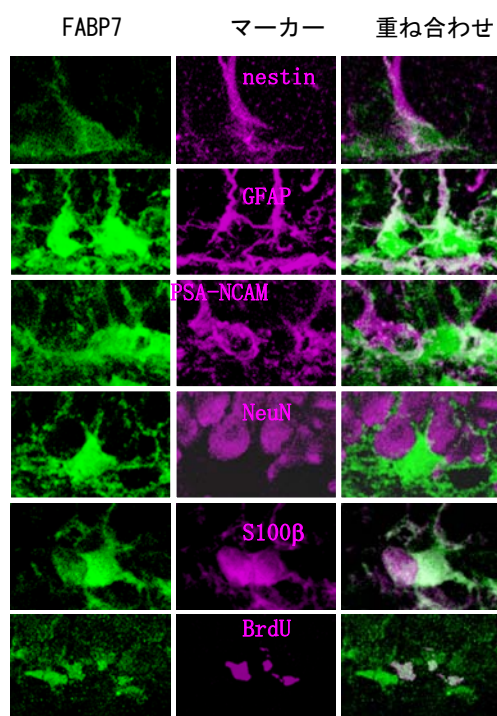


図 1 : FABP7 発現細胞の性質。FABP7 発現細胞は神経幹細胞/前駆細胞のマーカー (GFAP, nestin, PSA-NCAM) やアストロサイトのマーカー (GFAP, S100 β) を発現するが、ニューロンのマーカーである NeuN は発現しない。

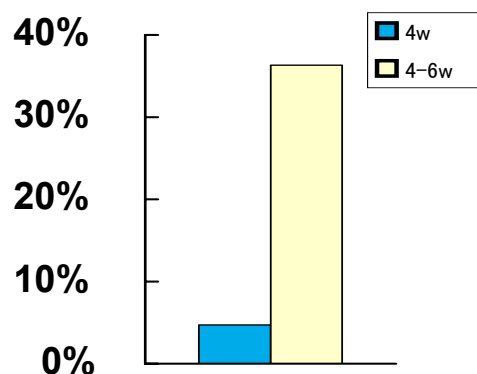


図 2 : FABP7 発現細胞は神経幹細胞を含む。FABP7 発現細胞のうち、BrdU30 分標識 (青) では 4.7%のものが BrdU を取り込むが、2 週間投与 (クリーム) では 36.3%の細胞が標識される。

FABP7 は、胎生期の終脳において Pax6 の標的遺伝子であり、神経幹細胞を未分化状態に維持するために必要であることを昨年度明らかにしている (Arai et al., 2005)。野生型ラットの生後海馬歯状回において FABP7 と Pax6 は同一細胞内に存在し、rSey2/+ラットでは FABP7 の発現が減少することから、FABP7 は生後の海馬歯状回においても Pax6 の標的遺伝子である可能性が考えられた。また、免疫組織化学的データから、生後海馬歯状回において FABP7 発現細胞が神経前駆細胞様の性質を示すことが示唆された。これらの結果を考え合わせると、FABP7 は、生後海馬においても Pax6 の標的遺伝子として、生後ニューロン新生の制御に関わっている可能性が考えられた。

吉川らは、統合失調症の原因遺伝子を解明する目的で、マウス・ラット等においてモデル化されるプレパルス抑制 (PPI) という指標をもとに、PPI の値に差のある 2 系統のマウスを用いて QTL 解析を行ったところ、責任遺伝子の候補として FABP7 が浮上した。大隅

および井ノ口はすでに、rSey2/+ラットが PPI の低下を示すことを見いだしている（論文未発表）ことを合わせて考えると、Pax6-FABP7 という遺伝子ネットワークの破綻が齧歯類において統合失調症様の行動異常につながる可能性は高いと考えられる。

真鍋らは rSey2/+ラットの海馬歯状回において、新生ニューロンの電気生理学的性質を明らかにするための方法論の確立を行いつつある。

3. 研究実施体制

「大隅」グループ

- ①研究分担グループ長：大隅 典子（東北大学大学院・医学系研究科、教授）
- ②研究項目：遺伝学および分子生物学的アプローチによるニューロン新生の分子機構の解析

「吉川」グループ

- ①研究分担グループ長：吉川 武男（独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター・分子精神科学研究チーム、チームリーダー）
- ②研究項目：ニューロン新生因子と精神疾患の関連解析

「真鍋」グループ

- ①研究分担グループ長：真鍋 俊也（東京大学 医科学研究所 神経ネットワーク分野、教授）
- ②研究項目：ニューロン新生と神経機能の関わりについての解析

4. 主な研究成果の発表

（1）論文（原著論文）発表

研究代表者 大隅 典子

- Fushimi K, **Osumi N**, Tsukahara T. NSSRs/TASRs/SRp38s function as splicing modulators via binding to pre-mRNAs. *Genes Cells* 2005;**10**, 531-541.
- Kohwi, M., **Osumi, N**, Rubenstein, JLR, and Alvarez-Buylla, A. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 2005;**25(30)**, 6997-7003.
- Maekawa, M., Takashima, N. Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S. and **Osumi, N**. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis *Genes Cells* 2005;**10**, 1001-1014.
- Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., **Osumi, N.**, Okano, H. and Fukuda, K. Cardiac neural crest cells as dormant multipotential stem cells in the mammalian heart. *J*

Cell Biol. 2005;**170(7)**, 1135–1146.

- Arai, Y., Funatsu, N., Numayama-Tsuruta, K., Nomura, T., Nakamura, S. and **Osumi, N.** Role of Fabp7, a downstream gene of Pax6, in maintenance of neuroepithelial cells during early embryonic development of the rat cortex. *J. Neurosci.* 2005;**25(42)**, 9752–9761.
- Ogawa, Y., Takebayashi, H., Takahashi, M., **Osumi, N.**, Iwasaki, Y. and Ikenaka, K. Gliogenic radial glial cells show heterogeneity in the developing mouse spinal cord. *Dev Neurosci.* 2005;**27(6)**, 364–377.
- Nomura, T., Holmberg, J., Frisen, J. and **Osumi, N.** Pax6-dependent boundary defines alignment of migrating olfactory cortex neurons via the repulsive activity of ephrin-A5. *Development* 2006;**133**, 1335–1345.

共同研究者

井ノ口 馨

- Inoue, K., Fukazawa, Y., Ogura, A., and **Inokuchi, K.** (2005). Two-dimensional neural activity mapping of the entire population of hippocampal CA1 pyramidal cells responding to fear conditioning. *NeurosciRes* **51**, 417–425

吉川 武男

- Kakiuchi C, Ishiwata M, Nanko S, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, Mori N, Fujii K, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Yamada K, **Yoshikawa T**, Kato T: Functional polymorphisms of HSPA5: possible association with bipolar disorder. *Biochem Biophys Res Commun* **336**: 1136–43, 2005.
- Yamada K, **Yoshikawa T**: Genome-wide SNP Genotyping Strategies for Complex Traits. *J. Brain Sci.* **31**: 17–21, 2005
- Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, **Yoshikawa T**, Sakurada A, Sato M, Horii A, Kato A, Tsujimoto A, Matsubara K, Ushijima T, Sasaki H: Genome-wide profiling of promoter methylation in humans. *Oncogene*. (in press)
- Yoshitsugu K, Yamada K, Toyota T, Aoki-Suzuki M, Minabe Y, Nakamura K, Sekine Y, Suzuki K, Takei N, Itokawa M, Mori M, **Yoshikawa T**: Novel scale including strabismus and 'cuspidal ear' for distinguishing schizophrenia patients from controls using minor physical anomalies. *Psychiatry Research*. (in press)

真鍋 俊也

- Shinoue, T., Matsui, M., Taketo, M. M. and **Manabe, T.** 2006. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* **25**:11194–11200

- Honda T, Sakisaka T, Yamada T, Kumazawa N, Hoshino T, Kajita M, Kayahara T, Ishizaki H, Tanaka-Okamoto M, Mizoguchi A, **Manabe T**, Miyoshi J, Takai Y. 2005. Involvement of nectins in the formation of puncta adherentia junctions and the mossy fiber trajectory in the mouse hippocampus. *Molecular and Cellular Neuroscience*.**31**:315–325
- Oki, T., Takagi, Y., Inagaki, S., Taketo, M. M., **Manabe, T.**, Matsui, M., and Yamada, S. (2005). Quantitative analysis of binding parameters of [3H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res* **133**, 6–11.
- Niisato, K., Fujikawa, A., Komai, S., Shintani, T., Watanabe, E., Sakaguchi, G., Katsuura, G., **Manabe, T.**, and Noda, M. (2005). Age-dependent enhancement of hippocampal long-term potentiation and impairment of spatial learning through the Rho-associated kinase pathway in protein tyrosine phosphatase receptor type Z-deficient mice. *J Neurosci* **25**, 1081–1088.
- Ehlert, F. J., Griffin, M. T., Abe, D. M., Vo, T. H., Taketo, M. M., **Manabe, T.**, and Matsui, M. 2005. The M2 muscarinic receptor mediates contraction through indirect mechanisms in mouse urinary bladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**. 368–378.
- Takeuchi, T., Fujinami, K., Goto, H., Fujita, A., Taketo, M. M., **Manabe, T.**, Matsui, M. and Hata, F. (2005). Roles of M2 and M4 muscarinic receptors in regulating acetylcholine release from myenteric neurons of mouse ileum. *J. Neurophysiol.* **93**. 2841–2848.
- Bando, T., Sekine, K., Kobayashi, S., Watabe, A. M., Rump, A., Tanaka, M., Suda, Y., Kato, S., Morikawa, Y., **Manabe, T.** and Miyajima, A. 2005. Neuronal leucine-rich repeat protein 4 functions in hippocampus-dependent long-lasting memory. *Mol. Cell. Biol.* **25**. 4166–4175.