

「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であろうという新しい視点に立って、母子間の物質的コミュニケーションの存在を動物・ヒトで実証し、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半年間に、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遺伝子の発現を G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) 約300個に焦点を当て解析した。その結果解析した大脳皮質、海馬、扁桃体の各領域でそれぞれ発現が増減する GPCR を複数検出することが出来た。また、牛乳消化産物であるβラクトテンシンを身体的ストレスを加えた成体マウスに投与したところ hole board テストにおいてストレスで誘導される行動変化を改善することが示された。さらにβラクトテンシンは受動的回避学習試験においてマウスの記憶学習能を促進することが示された。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。

今年度は項目3について齧歯類を用いた研究を行った。

方法

1) 母体側因子を変動させた場合のマウス胎仔脳における G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の発現解析

G-Protein Coupled Receptors (GPCRs)は受容体ファミリーを形成しており、創薬のターゲットとして注目される他、神経幹細胞の増殖への関与も指摘されている。そこで胎児期の脳の発達においても重要な役割を持つ可能性が考えられることから、約 350 種類の GPCR について母体側因子の変動に伴って発現が変化するものをマウス胎仔脳でスクリーニングした。妊娠後期 (E12~16) に拘束ストレスを負荷した母体マウス、あるいは妊娠中の飼育を遊具などが存在する Environmental enrichment 環境下で行った母体マウスからそれぞれ E19 で胎仔を取り出し、脳を海馬、扁桃体、大脳皮質にわけて調製し RNA を得た。対照群には通常飼育の妊娠個体から得られた胎仔脳の各領域を用いた。各部位から得られた RNA を用いてリアルタイム PCR で GPCR の発現量を比較した。

2) 牛乳消化産物由来生理活性物質βラクトテンシン投与による脳機能変化の行動科学的解析

a. Hole-board 試験

C57BL/6J マウス (8-9 週令雄、日本クレア) を用い、マウスがボード上の穴に対して不安様行動をとることを指標とする Hole-board 試験を行った。Hole-board 試験は、50cm 四方の板に直径 3cm の穴が 4 つ空いた Hole Board System (小原医科産業) を用いて行った。マウスを非ストレス群・ストレス群に分け、ストレス群については 50mL Corning Tube を用いて 1 時間の拘束ストレスをかけた。1 時間後、マウスに生食またはβラクトテンシン (10, 30 mg/kg) を腹腔内投与し、5 分間の Hole-board Test での Head dip 回数、Head dip latency、移動距離および hole board の中心部分で活動している割合 (% center) を計測した。2 型ニューロテンシン受容体 (NTR2) 拮抗薬である levocabastine の投与実験では、1 時間拘束後のマウスに生食またはβラクトテンシン (30 mg/kg) を投与した 10 分後に levocabastine (0.05 mg/kg) を腹腔内投与し、上記と同様に Hole-board Test を行った。

b. 受動的回避学習試験

明室と暗室からなるステップスルー型受動的回避学習実験装置を用いて、βラクトテンシンの学習能に及ぼす影響をマウスで検討した。雄性 ddY マウス (20-25 g) を用い、訓練直後にβラクトテンシンを投与し、24 時間後に明室に滞在する時間 (600 秒以上をカットオフ) を測定した。

結果

(1) 母体側因子を変動させた場合にマウス胎仔脳において発現が変動する GPCR の同定

拘束ストレスを負荷した母体から得られた胎仔脳の各領域で対照に比べて 4 倍以上に発現量に変化する遺伝子が計数十個同定された。その中には、神経ペプチド、ケモカイン等のサイトカインに対する GPCR が多数含まれていた。また、解析を行った 3 領域間では海馬で発現量が増加している遺伝子が多かった。Environmental enrichment 群由来の胎仔脳については現在解析中である。

(2) 牛乳消化産物由来生理活性物質βラクトテンシン投与による行動変化の改善

a. Hole-board 試験

1 時間の拘束ストレス群では、非ストレス群に対して hole board test での head dip 回数は有意に減少し、head dip latency は有意に延長した。βラクトテンシン (10, 30 mg/kg) を腹腔内投与したストレス群では、この傾向は改善され、head dip 回数および head dip latency は、非ストレス群と同じレベルまで回復した。総移動距離およびhole boardの center での活動の割合(% center)に対しては、βラクトテンシンの影響および拘束ストレスの影響は認められなかった。NTR2 antagonist である levocabastine (0.05 mg/kg) は、βラクトテンシンによるストレス群での head dip 回数および head dip latency 改善効果を抑制した。Levocabastine 単独で投与した際には、これらの行動には影響はなかった。

b. 受動的回避学習試験

βラクトテンシン (60 nmol/mouse)を脳室内投与したマウスは明室の滞在時間が増加した。同様に経口投与した場合にも、用量依存的な明室の滞在時間の増加が認められ、300 mg/kg の投与量では有意な増加を示した。したがって、βラクトテンシンは、脳室内投与および経口投与により記憶学習能を促進することが明らかとなった。次に、βラクトテンシンの学習促進作用におけるニューロテンシン受容体の下流の作用機構について検討した。中枢神経系ではニューロテンシンがドパミンの放出を促進することが知られている。そこで、βラクトテンシンによる学習促進作用がドパミン D1 および D2 受容体を介しているかを選択的アンタゴニストを用いて検討した。βラクトテンシンの学習促進作用は、D1 受容体アンタゴニストの SCH23390 では阻害されなかったが、D2 受容体アンタゴニストの raclopride で阻害されたことから、βラクトテンシンの学習促進作用は D2 受容体を介していること明らかとなった。

結論

- 1) 母体側因子を変動させた場合に発現が変動する GPCR を大脳皮質、海馬、扁桃体の各領域で複数検出することが出来た。
- 2) βラクトテンシンの抗ストレス作用が hole board 試験により示唆された。βラクトテンシンの抗ストレス作用は NTR2 を介している可能性が示された。また、βラクトテンシンの経口投与および脳室内投与により学習が促進されることを見出した。βラクトテンシンの学習促進作用はドパミン D2 受容体を介することが示された。

3. 研究実施体制

「神経研究所」グループ

- ①研究分担グループ長：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

「京都大学」グループ

①研究分担グループ長：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)