

「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。17年度、18年度において、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、その中の1種の GPCR に対する内在性リガンドが母体側から胎仔に移行する可能性を見出した。今年度は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い、オープンフィールド試験で新規場面への反応性が対照マウスと異なることを見出した。また内分泌学的解析から視床下部～下垂体～副腎系が変化している可能性を示唆する結果を得た。また、神経系前駆細胞に高レベルで発現する GPCR を同定・解析し、母子間の物質的コミュニケーションに関わると考えられる物質を同定した。さらに、GPCR 以外の物質についても解析を加え、母子移行が想定される新たな生理活性物質を1種同定した。また、授乳期の母体マウスに対して 70%の食事制限を与えた際の出生仔の成長を比較したところ、8週までは対照に比べて仔の体重は低下が認められるものの 13 週にはその差が消失することを見出した。

他方、牛乳  $\beta$ -lactoglobulin 由来の NT<sub>2</sub> アゴニストペプチドである  $\beta$ -lactotensin (His-Ile-Arg-Leu) の学習促進作用が Dopamine D<sub>2</sub> アンタゴストである Raclopride によりブロックされることを見出したが、今年度はマウス海馬に  $\beta$ -lactotensin を灌流した際のモノアミン遊離の変化を、in vivo マイクロダイアリス法により解析するとともに、その結果に基づいて、学習促進機構を検討した。

## 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成長後の行動変容の有無の解析
4. 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 の作用解析

### 方法

- 1) 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

昨年度までに、妊娠後期に拘束ストレスを負荷した母体マウスの胎仔、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について、海馬、扁桃体、大脳皮質における GPCR 遺伝子発現を RT-PCR 法で解析した。その結果母子伝達受容体候補として同定された受容体に作用する物質をマウス母体に投与した。出生した仔の離乳後の行動を生後 15、16 週でオープンフィールド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。

- 2) 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物質候補の同定

EE 環境下で飼育した母体マウスから出生した胎仔について、海馬、扁桃体、大脳皮質における遺伝子発現を DNA チップ法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。また胎仔神経系前駆細胞で発現レベルが高い GPCR を RT-PCR 法で同定し、その作用機序を培養神経系前駆細胞を用いて解析した。

- 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

授乳期に食事制限 (70%) を行った場合の仔の成長を通常飼育で授乳された仔と比較した。

#### 4) 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

マイクロダイアリシス法などにより $\beta$ -lactotensin を還流した際のモノアミンレベルの変動を齧歯類個体で検討した。

#### 結果

##### 1) 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

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。これまで妊娠後期に拘束ストレスを負荷した母体マウスの胎仔、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について、海馬、扁桃体、大脳皮質における遺伝子発現を RT-PCR 法で解析し母子伝達受容体候補を同定した。今年度はその中の1種の受容体に作用する物質を投与した母体から出生した仔の成長後の行動科学的解析を行いオープンフィールド試験で新規場面への順応性が対照マウスと異なることを見出した。また内分泌学的解析から視床下部～下垂体～副腎系が変化している可能性を示唆する結果を得た。

##### 2) 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物質候補の同定

妊娠中の一定期間に EE 下にあった母胎から出生したマウス胎仔の海馬における遺伝子発現解析を DNA チップ法にて行い、バイオインフォマティクス解析を加えたところ、代謝・内分泌機能の変動を示唆する結果を得た。また胎仔の神経系前駆細胞に高レベルで発現する GPCR1種に着目し、神経系前駆細胞における作用機序の解析から母子間の物質的コミュニケーションに関わる可能性を示唆する結果を得た。さらに、GPCR 以外の物質についても解析を加え、母子移行が想定される新たな生理活性物質を遺伝子操作動物の解析から1種同定した。

##### 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

授乳期の母体マウスに対して 70%の食事制限を与えた際の仔の成長を比較したところ、8週までは対照に比べて仔の体重は低下が認められるものの15週にはその差が消失することを見出した。現在体重以外の要素について行動科学的評価を行っている。

#### 4) 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

$\beta$ -lactotensin の灌流により、マウス海馬からの Dopamine および Serotonin の放出が増加することを新たに見出した。さらに、 $\beta$ -lactotensin の学習促進作用は Dopamine D<sub>2</sub> アンタゴストだけでなく 5-HT<sub>1A</sub> アンタゴストで阻害されることが判明した。 $\beta$ -lactotensin の Dopamine 放出促進作用は NT<sub>2</sub> ノックアウトマウスでは低下したが、Serotonin 放出促進作用は低下しなかった。この結果は、 $\beta$ -lactotensin の Dopamine 放出促進作用は NT<sub>2</sub> レセプターを介するのに対し、Serotonin 放出促進作用は別のレセプターを介することを示唆する。

## 結論

- 1) 母子間の物質的コミュニケーションに関わると考えられる物質を3種同定した。
- 2) 牛乳 $\beta$ -ラクトグロブリンの酵素消化により派生する $\beta$ -lactotensin がモノアミンの遊離を制御することが見出した。

## 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 (国立精神・神経センター 神経研究所)

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)

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)

- ・Yamauchi, R., Wada, E., Kamichi, S., Yamada, D., Maeno, H., Delawary, M., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Wada, K. Neurotensin type2 receptor is involved in fear memory in mice. **J. Neurochem.**, 102, 1669-1676, 2007
- ・Ohashi, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Nishimoto, M., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S., Wada, K. Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 573, 20-28, 2007
- ・Oliveira, K.J., Cabanelas, A., Veiga, M.A., Paula, G.S., Ortiga-Carvalho, T.M., Wada, E., Wada, K., Pazos-Moura, C.C. Impaired serum thyrotropin response to hypothyroidism in mice with disruption of neuromedin B receptor. **Regul Pept.** 146, 213-217, 2008
- ・Sakurai, M., Sekiguchi, M., Zushida, K., Yamada, K., Nagamine, S., Kabuta, T. Wada, K. Reduction of memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene.

**Eur. J. Neurosci.** 27, 691–701, 2008

- Amano, T., Wada, E., Yamada, D., Zushida, K., Maeno, H., Noda, M., Wada, K., Sekiguchi, M. Heightened Amygdala Long-Term Potentiation in Neurotensin Receptor Type-1 knockout Mice. **Neuropsychopharmacology**. 19 Mar 2008; [Epub ahead of print]
- Ohinata, K., Sonoda, S., Inoue, N., Yamauchi, R., Wada, K., Yoshikawa, M. beta-Lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from bovine beta-lactoglobulin, enhances memory consolidation in mice. **Peptides**. 28, 1470–1474, 2007