

「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、我々が転写因子 Pax6 によって発現が制御されていることを証明し、吉川グループとの共同研究により海馬ニューロン新生に必須であること、および統合失調症発症に関わる可能性を明らかにした (Arai et al., 2005; Watanabe et al., 2007) 脂肪酸結合タンパク質 FABP7 と類縁の FABP5 に関しても、免疫組織化学的データおよび FABP5 ノックアウト (KO) マウスを用いた解析により、ニューロン新生に関わることを見出した (投稿準備中)。脂肪酸結合タンパク質の重要性を鑑み、ドコサヘキサエン酸 (DHA) およびアラキドン酸 (ARA) のニューロン新生への影響について解析し、昨年度までに、ARA に関して約 30% のニューロン新生向上効果があることを明らかにしたが (一昨年度特許出願、Maekawa et al., PLoS ONE, in press)、今年度は *in vitro* の実験系においてもその効果を確認した (未公開)。さらに、ephrinA5 の KO マウスを用いた研究から、ニューロン新生と脳血流の関係について明らかにしつつある (未公開)。

2. 研究実施内容

脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid binding protein: FABP) は、14-15 kDa の低分子タンパク質で、細胞質において脂肪酸の取り込みや輸送に関わることが知られている。FABP ファミリーの中では、特に FABP7 および FABP5 が胎生期から生後の脳に発現するが、脳における機能は未知であった。FABP7 は胎生期の神経幹細胞もしくは神経新生領域に発現することから、これまでに我々のグループでは胎生期終脳の神経上皮細胞で FABP7 の機能を阻害すると BrdU 標識細胞の数が減少することを見だし、FABP7 が神経幹細胞の増殖に必要であることを報告している (Arai et al., 2005)。昨年度から、FABP7 と同じ分子ファミリーに属する FABP5 の神経新生への関与についての解析に着手し、生後4週齢のマウス海馬を用いて詳細な解析を行ったところ、FABP7 陽性細胞はより未分化である神経幹細胞・神経前駆細胞であるのに対し、FABP5 陽性細胞は分化段階が分化の方向にシフトし主に神経前駆細胞の状態であることが示された。生後海

馬歯状回に存在する神経幹細胞・神経前駆細胞は、その分化段階にあわせて FABP の発現を FABP7 から FABP5 へと切り替えているのではないかと推測される。

そこで今年度は、*Fabp7* 遺伝子の KO マウスと共に、*Fabp5* 遺伝子の KO マウスにおける神経新生の様態についても詳細に解析した。生後4週齢マウスの海馬を神経幹細胞／神経前駆細胞の分化マーカーである GFAP／DCX によって染色し、野生型マウス、*Fabp7* 遺伝子 KO マウス及び *Fabp5* 遺伝子 KO マウスの三者で比較した。その結果、*Fabp7* KO マウス、*Fabp5* KO マウスでは、野生型マウスと比較して、GFAP 陽性細胞／DCX 陽性細胞が減少しているような像が観察され、また細胞における GFAP／DCX の発現レベルも低下していることが推測された。さらに、*Fabp7* KO マウスでは GFAP 陽性細胞数及び GFAP の発現に、*Fabp5* KO マウスでは DCX 陽性細胞数及び DCX の発現に、より大きく影響が出ていたことから、FABP7 及び FABP5 はそれぞれ神経幹細胞及び神経前駆細胞でより強く役割を担っていることが示唆された。このことは、上記で述べたように神経幹細胞の分化に従って FABP7 から FABP5 へ発現が切り替わることを支持する証拠として考えることができる。

また *Fabp7* KO マウス及び *Fabp5* KO マウスの神経幹細胞・神経前駆細胞の増殖能力について、BrdU パルスラベル法を用いて解析した。生後4週齢のマウスに1日3回4時間おきに体重 1g あたり $50 \mu\text{g}$ になるように BrdU を投与し、投与開始から 24 時間後での BrdU 取り込み細胞数を数えた。野生型と比較すると、BrdU 取り込み細胞数は *Fabp7* KO マウスで約 80%に、*Fabp5* KO マウスで約 90%に低下していた。また、生後4週齢で BrdU を投与し8週齢で BrdU と神経細胞マーカーである NeuN との共免疫染色を行い、両方に陽性である細胞数を数えることにより、これらの細胞が1ヶ月後にどれだけ顆粒神経細胞に分化するかを評価した。その結果、これらの KO マウスでは野生型マウスと比べ共染色される細胞数が約 70%に低下していたことから、新しく新生される顆粒神経細胞が減少していることがわかった。*Fabp7* KO マウス、*Fabp5* KO マウスでは神経幹細胞・神経前駆細胞が減少しており、その結果そこから生み出される顆粒神経細胞が減少していると考えられた。

一方、昨年度吉川らは、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 (Watanabe et al., 2007)。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等の精神疾患発症につながる可能性は高いと考えられた。文献的には *Dvl1*、*NPAS3*、*Neuregulin1* などの KO マウスにおいて、ニューロン新生の低下と PPI の低下という現象が共通して見られるという報告がこの仮説を支持している。実際、井ノ口らは生後の幼弱期ラットに細胞増殖阻害剤 MAM を投与することにより一過性にニューロン新生を低下させ、高頻度に PPI の低下を誘導しうる実験系を確立できた (Maekawa et al., PLoS ONE, in Press)。

上記のように、脂肪酸結合タンパク質がニューロン新生に深く関わることから、我々はドコサヘキサエン酸 (DHA) およびアラキドン酸 (ARA) という高度不飽和脂肪酸 (PUFA) を高濃度に含有した餌を生後2日目から母獣に投与することにより、母乳を介して脳の発達期のラットに PUFA を与えて、神経新生に対する効果について解析したところ、ARA 投与群において有意な細胞増殖亢進を認めた。ARA 投与によって神経幹細胞および早期前駆細胞のマーカーである GFAP および後

期神経前駆細胞のマーカである PSA-NCAM のどちらも発現量が増加したことから、ARA は神経幹細胞の増殖を亢進することが示唆された (Maekawa et., PLoS ONE, in press)。

さらにマウスにおいても、DHA 及び ARA が生後海馬におけるニューロン新生に影響を与えるかどうか、野生型マウスにこれらの脂肪酸を高濃度に含有する餌を与えて解析した。このマウスの実験ではなるべく他のパラメータの影響を省きたいと考え、母乳を介さず直接マウスが食餌できる生後4週齢から8週齢にかけて給餌を行った。このマウスでの海馬歯状回における細胞増殖について BrdU パルスラベル法を用いて解析中であるが、現在のところ高 DHA 餌及び高 ARA 餌の影響は見られていない。脂肪酸を給餌している週齢の違いによるものなのか、またはラットで細胞増殖の亢進効果を示す PUFA 濃度がマウスには不適切であるなど、ラットとマウスの種間の違いによるものか、手技的な問題を含めて現在検討中である。

3. 研究実施体制

(1)「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 教授)
井ノ口 馨(三菱化学生命科学研究所 主任研究員)
湯浅 茂樹(国立精神神経センター 部長)

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

(2)「吉川」グループ

- ①研究分担グループ長:吉川 武男((独)理化学研究所 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

(3)「真鍋」グループ

- ①研究分担グループ長:真鍋 俊也(東京大学 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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

大隅グループ

1. Sakurai, K., Osumi, N. The neurogenesis-controlling factor, Pax6, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes *J. Neurosci.* **28(18)**, 4604-4612, 2008.
2. Takahashi, M. and Osumi, N. Expression study of cadherin 7 and cadherin 20 in the

- embryonic and adult rat central nervous system. *BMC.Dev. Biol.* **8(1)**, 87 , 2008.
3. Yumoto, N., Wakatsuki, S., Kurisaki, T., Hara, Y., Osumi, N., Frisen, J. and Sehara-Fujisawa, A.
 4. Meltrin beta/ADAM19 interacting with EphA4 in developing neural cells participates in formation of the neuromuscular junction. *PLoS ONE.* **3(10)** , e3322-e3322, 2008.
 5. Soma M, Aizawa H, Ito Y, Maekawa M, Osumi N, Nakahira E, Okamoto H, Tanaka K, Yuasa S.
 6. Development of the mouse amygdala as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. *J Comp Neurol.* **513(1)** , 113-128 , 2008.
 7. Maekawa M., Takashima N., Matsumata M., Ikegami S., Kontani M., Hara Y., Kawashima H., Owada Y., Kiso Y., Yoshikawa T., Inokuchi K., and Osumi N. : "Arachidonic acid drives postnatal neurogenesis and elicits a beneficial effect on prepulse inhibition, a biological trait of psychiatric illnesses", *PLoS ONE*, in press

井ノ口グループ

8. Ageta, H., Murayama, A., Migishima, R., Kida, S., Tsuchida, K., Yokoyama, M. & Inokuchi, K. Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PLoS. ONE.* **3**, e1869 , 2008.
9. Okubo-Suzuki, R., Okada, D., Sekiguchi, M. & Inokuchi, K. Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons. *Mol. Cell Neurosci.* **38**, 266-276, 2008.
10. Ohkawa, N., Sugisaki, S., Tokunaga, E., Fujitani, K., Hayasaka, T., Setou, M. & Inokuchi, K. N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes.Cells.* **13**, 1171-1183, 2008.
11. Hayashi, F., Takashima, N., Murayama, A. & Inokuchi, K. Decreased postnatal neurogenesis in the hippocampus combined with stress experience during adolescence is accompanied by an enhanced incidence of behavioral pathologies in adult mice. *Mol. Brain* **1**, **22**, 2008.

吉川グループ

12. Takeshita M, Yamada K, Hattori E, Iwayama Y, Toyota T, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Hashimoto K, Watanabe H, Iyo M, Kikuchi M, Okazaki Y, Yoshikawa T: Genetic examination of the *PLXNA2* gene in Japanese and Chinese schizophrenics. *Schizophrenia Res.* **99**, 359-364, 2008.
13. Amano K, Yamada K, Iwayama Y, Watanabe A, Detera-Wadleigh SD, Hattori E, Toyota T, Tokunaga K, Yoshikawa T, Yamakawa K: Association between the Down syndrome cell adhesion molecule (*DSCAM*) gene and bipolar disorder. *Psychiatric Genetics* **18**, 1-10, 2008.

14. Lepagnol-Bestel A-M, Maussion G, Boda B, Cardona A, Iwayama Y, Delezoide A-L, Moalic J-M, Muller D, Dean B, Yoshikawa T, Gorwood P, Buxbaum JD, Ramez N, Simonneau M: *SLC25A12* expression is associated with neurite outgrowth and is upregulated in the prefrontal cortex of autistic subjects. *Mol. Psychiatry* **13**, 385-397, 2008.
15. Anitha A, Nakamura K, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Takei N, Iwata Y, Suzuki K, Sekine Y, Matsuzaki H, Kawai M, Miyoshi K, Katayama T, Matsuzaki S, Baba K, Honda A, Hattori T, Shimizu S, Kumamoto N, Tohyama M, Yoshikawa T, Mori N: Gene and expression analyses reveal enhanced expression of pericentrin 2 (PCNT2) in bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* **63**, 678-685, 2008.
16. Yoshimi A, Takahashi N, Saito S, Ito Y, Aleksic B, Usui H, Yukiko Kawamura a, Waki Y, Yoshikawa T, Kato T, Iwata N, Inada T, Noda Y, Ozaki N: Genetic analysis of the gene coding for DARPP-32 (*PPP1R1B*) in Japanese patients with schizophrenia or bipolar disorder. *Schizophrenia Res.* **100**, 334-341, 2008.
17. Ikeda Y, Yahata N, Ito I, Nagano M, Toyota T, Yoshikawa T, Okubo Y, Suzuki H: Low serum levels of brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor in patients with chronic schizophrenia. *Schizophrenia Res.* **101**, 58-66, 2008.
18. Anitha A, Nakamura K, Yamada K, Suda S, Thanseem I, Tsujii M, Iwayama Y, Hattori E, Toyota T, Miyachi T, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Kawai M, Sekine Y, Tsuchiya K, Sugihara G, Ouchi Y, Sugiyama T, Koizumi K, Higashida H, Takei N, Yoshikawa T, Mori N: Genetic analyses of Roundabout (ROBO) axon guidance receptors in autism. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr Genet.* **147B**, 1019-1027, 2008.
19. Nakamura K, Anitha A, Yamada K, Tsujii M, Iwayama Y, Hattori E, Toyota T, Suda S, Takei N, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Kawai M, Sekine Y, Tsuchiya K, Sugihara G, Ouchi Y, Sugihara T, Yoshikawa T, Mori N: Genetic and expression analyses revealed elevated expression of *syntaxin 1A (STX1A)* in high functioning autism. *The International Journal of Neuropsychopharmacology.* **11**, 1073-1084, 2008.
20. Yamada K, Hattori E, Iwayama Y, Toyota T, Ohnishi T, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Kikuchi M, Okazaki Y, Yoshikawa T: Failure to confirm genetic association of the *CHI3L1* gene with schizophrenia in Japanese and Chinese populations. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr Genet.* in press.
21. Kazuno A, Munakata K, Mori K, Nanko S, Kunugi H, Nakamura K, Mori N, Yamada K, Yoshikawa T, Kato N, Kato T: Analysis of mitochondrial DNA polymorphisms and haplogroups in bipolar disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr Genet.* in press.
22. Hayashi A, Kasahara T, Kametani M, Toyota T, Yoshikawa T, Kato T: Aberrant endoplasmic reticulum stress response by lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *The International Journal of Neuropsychopharmacology.* in press.
23. Hattori E, Nakajima M, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Saitou N, Yoshikawa T: Variable number of tandem repeat polymorphisms of DRD4: re-evaluation of selection

- hypothesis and analysis of association with schizophrenia. *Eur. J. Hum. Genet.* in press.
24. Anitha, A, Nakamura K, Yamada K, Iwayama Y, Toyota, T, Takei N, Iwata Y, Suzuki K, Sekine Y, Matsuzaki H, Kawai M, Thanseem I, Miyoshi, K, Taiichi Katayama T, Matsuzaki S, Baba K, Honda A, Hattori T, Shimizu S, Kumamoto N, Kikuchi M, Tohyama M, Yoshikawa T, Mori N: Association studies and gene expression analyses of the DISC1-interacting molecules, pericentrin 2 (PCNT2) and DISC1-binding zinc finger protein (DBZ), with schizophrenia and with bipolar disorder. *Neuropsychiatr Genet.* in press.
 25. Hattori E. ,Toyota T. ,Ishitsuka Y. ,Iwayama Y. ,Yamada K. ,Ujike h. ,Morita Y. ,Kodama M. ,Nakata K. ,Minabe Y. ,Nakamura K. ,Iwata Y. ,Takei N. ,Mori N. ,Naitoh H. ,Yamanouchi Y. ,Iwata N. ,Ozaki N. ,Kato T. ,Nishikawa T. ,Kashiwa A. ,Suzuki M. ,Shioe K. ,Shinohara M. ,Hirano M. ,Nanko S. ,Akahane A. ,Ueno M. ,Kaneko N. ,Watanabe Y. ,Someya T. ,Hashimoto k. ,Iyo M. ,Itokawa M. ,Arai M. ,Nankai M. ,Inada T. ,Yoshida S. ,Kunugi H. ,Nakamura M. ,Iijima Y. ,Okazaki Y. ,Higuchi T. ,and Yoshikawa T. : "Preliminary Genome-wide Association Study of Bipolar Disorder in the Japanese Population", *Neuropsychiatric Genetics* , in press
 26. Maekawa M ,Namba T. ,Suzuki E. ,Yuasa S. ,Kohsaka S. ,Uchino S. : "NMDA receptor antagonist memantine promotes cell proliferation and production of mature granule neurons in the adult hippocampus", *Neuroscience Research* , in press

真鍋グループ

27. Miwa, H., Fukaya, M., Watabe, A. M., Watanabe, M. and Manabe, T.: Functional contributions of synaptically localized NR2B subunits of the NMDA receptor to synaptic transmission and LTP induction in the adult mouse CNS. *J. Physiol. (Lond.)* **586**, 2539-2550, 2008.
28. Shimizu H., Fukaya, M., Yamasaki, M., Watanabe, M., Manabe, T. and Kamiya, H.: Use-dependent amplification of presynaptic Ca²⁺ signaling by axonal ryanodine receptors at the hippocampal mossy fiber synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 11998-12003, 2008.
29. Sakisaka, T., Yamamoto, Y., Mochida, S., Nakamura, M., Nishikawa, K., Ishizaki, H., Okamoto-Tanaka, M., Miyoshi, J., Fujiyoshi, Y., Manabe, T. and Takai, Y.: Dual inhibition of SNARE complex formation by tomosyn ensures controlled neurotransmitter release. *J. Cell. Biol.* **183**, 323-337, 2008.
30. Fukushima, F., Nakao, K., Shinoe, T., Fukaya, M., Marumatsu, S.-i., Sakimura, K. Kataoka, H., Mori, H., Watanabe, M, Manabe, M. and Mishina, M.: NMDA receptors enhances the excitability of hippocampal CA3 neurons. *PLoS. ONE.* **4**, e3993, 2009.
31. Inoue, N., Nakao, H., Migishima, R., Hino, T., Matsui, M., Hayashi, F., Nakao, K., Manabe, T., Aiba, A. and Inokuchi, K. Requirement of the immediate early gene vesl-1S/homer-1a for fear memory formation. *Mol. Brain* **2**, 7, 2009.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：3 件）