

199800378A

厚生科学研究費補助金脳科学研究事業

研究課題名

発達期脳障害における神経伝達機構の解析と
その治療研究

総括・分担研究報告書

国立精神・神経センター
桜川 宣 男

(総括研究報告書)

発達期脳障害における神経伝達機構の解析とその治療研究

主任研究者 桜川宣男 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨 発達期脳障害の神経伝達機構の解明にあたり、胎児をめぐる環境(羊膜、羊水)における神経伝達物質、神経栄養因子の解析を主たる研究テーマとした。そして羊膜細胞による脳移植術の発達期脳障害への応用研究を行った。羊膜細胞がドパミンを合成・分泌する能力を持つ細胞であることを証明したが、今回の研究ではドパミン受容体(D1, D2)の存在を確認した。また神経栄養因子を分析し、BDNF, NT-3の分泌能と細胞内でのBDNF mRNA, NT-3 mRNAの発現を証明した。さらに羊水中にもBDNF, NT-3が測定されたことより、羊膜より分泌される神経栄養因子が胎児発育に及ぼす効果が重要となった。一方羊膜細胞の培養液には、ラット神経細胞の生存や機能を維持する作用を保持することを証明した。このことより、発達期脳障害などにおいて惹起される脳損傷に対して、その保護あるいは機能修復をめざす羊膜細胞の脳移植術がより有望であると考えられる。

分担研究者

御子柴克彦 東京大学医科学研究所 教授
中村 俊 国立精神・神経センター 部長
岡戸 信男 筑波大学基礎医学系 教授
D. サフェン 東京大学医学部 助教授
武谷 雄二 東京大学医学部 教授
高嶋 幸男 国立精神・神経センター 部長
難波 栄二 鳥取大学遺伝子実験施設 助教授
新井 一 順天堂大学医学部 助教授

A. 研究目的

発達期脳障害は、脳性麻痺、精神遅滞、学習障害やてんかんの原因となるが、高次脳機能を司る神経伝達機構はほとんど解析されていない。また発達脳障害など中枢神経症状に対する治療法も確立していない。そこで本研究班は、神経伝達機構の解析により発達期脳障害の発生機序を解明することを目的としている。そしてその治療法の開発のために神経幹細胞による脳移植法の研究を行い、発達期脳障害の治療法として、将来臨床応用を目指している。

この目的の遂行にあたり、主たる研究を羊膜細胞の細胞生物学的特性の研究と、胎児環境における生理的役割・病理的意義の解明に絞った。分担研究者は基礎的研究の側面より本研究をサポートする(分担研究に記載)。また羊膜細胞による脳移植法の開発研究に向けて、動物実験による治療研究の効果判定と方法の確立を行う。このような研究班構成を基盤として、発達脳障害の発生機序の解明と治療法の研究を行った。

B. 研究方法と結果

1. 羊膜細胞の細胞生物学的特性の解析(桜川):
神経系細胞遺伝子マーカーの発現について検討し

た。ヒト羊膜細胞は、NF, MAP2などのmRNAを発現していた。グリアマーカーでは、CNPase, MBP, PLP(PLP/DM-20)遺伝子が発現していた。細胞特異的遺伝子発現システムによる解析したところ、MBP promoter 活性を持つ細胞が約20%存在していることが判明した。しかしGFAP promoter 活性をもつ細胞は少数存在していた。

サル羊膜細胞のD1, D2 receptor, dopamine transporterの解析を行った。Dopamine D1, D2 mRNAの発現が証明され、ヒト、サル脳と高い相同性を示した。D1 receptorを飽和分析法により解析したところ総飽和の57-75%の特異的飽和サイトが認められた。スカッチャードプロットは直線性を示し、飽和点が1点存在していた。Dopamine D2 receptorについても同様の実験を行い、類似の結果を得た。

神経栄養因子の合成・分泌能について検索し、ラット培養神経細胞に対する栄養因子効果を検討した。羊膜細胞を無血清培地に24時間培養した培養液をコンデションメジウムとしその中の神経栄養因子を測定した結果、BDNFは 610 ± 540 pg/ml, NT-3は 600 ± 279 pg/mlであり、NGFは測定されなかった。またBDNFとNT-3のmRNAの発現を検討したところRT-PCRにて当該バンドが検出され、シーケンスにより同定できた。羊水中のBDNFは60.0 pg/ml, NT-3は10.0 pg/mlであった。次にラットE18-E19胎仔の前脳より神経細胞を採取し、コンデションメジウムで培養した。無血清培地で培養したコントロール群と比較したところ、神経細胞の数の増加が顕著に認められた。

2. ニューロンの突起伸展に及ぼすIP3レセプター/
Ca²⁺シグナリングの役割(御子柴):
神経系の発達・成長においてカルシウムイオンが

重要である。細胞内カルシウム貯蔵庫から必要に応じて放出されるカルシウムの存在に注目し、その生理的意義について研究を行った。鶏卵胚の後根神経節細胞には1型IP3受容体が豊富に発現し、伸長中の神経突起先端に存在する特殊な構造体である成長円錐部では、微少管が重合する部位に集約して分布していた。種々の薬理的阻害実験や色素を利用した特異的分子のレーザー不活化法による実験結果から1型P3受容体を介した細胞内Ca²⁺の放出が神経突起の伸長を制御することが判明した。このことは成長円錐部におけるカルシウムを介する情報伝達が神経突起の伸長制御における中心的な役割を演じていることを強く示唆するものである。

羊膜細胞におけるMBP promoter 活性をもつ細胞の分離、解析およびZic遺伝子解析を共同で行っている。

3. 中枢神経系における細胞の多様性の発生機構(中村)： 神経細胞の分化の初期決定に関わるbHLH型の転写因子Mahi-1とこの下流で神経分化を制御していると考えられている転写因子Prox-1のカスケードについてマウス初期胚及びMash-1ノックアウトマウスでの遺伝子発現、さらに神経幹細胞株を用いた解析を行った。この結果から中枢神経系細胞の分化の初期決定においてMash-1およびProx-1が重要な役割を果たしていることが示された。

羊膜細胞におけるMash-1, Prox-1, nestinの遺伝子発現について、共同研究を行っている。

4. ニューロン亜型特異的遺伝子の発現に関する分子生物学的解析(デビッド・サーフェン)：

海馬スライスの長期培養を用いて、神経細胞におけるM4ムスカリン性アセチルコリン遺伝子発現を解析するために、種々の発現/レポーター系を検討した。M4 promoter/Cre adenovirus systemが、神経細胞特異的遺伝子の機能解析に適していることが判明した。

M4 promoter 活性をもつ羊膜細胞の単一集団の分離、培養に共同研究を行う。

5. 生体アミンによるシナプスの形成維持機構の解明(岡野)： ラット海馬のアセチルコリンを除去するとシナプス密度が低下するが、同時にノルアドレナリンを除去するとシナプス密度は上昇することが明らかになった。そしてドパミンD2受容体の拮抗剤によりサル大脳皮質では前頭前野でのシナプス密度が低下することが明らかとなった。

6. ラット羊膜細胞による脳移植治療研究(新井)： ラット羊膜より初代培養細胞を樹立し、本細胞を神経様細胞への分化誘導実験を行った。無血清培地で培養すると、細胞分裂が停止状態となり、神経系細胞マーカーが発現してくることが免疫組織染色に

より判明した。そして一過性脳虚血負荷を加えた成雄砂ねずみの海馬CA1流域に移植し、長期間の生着を観察した。さらに一部移植細胞の神経細胞様に形態変化を確認した。

ヒト羊膜細胞の虚血動物への脳移植実験を共同で行っている。

7. 反復臍帯圧迫のヒツジ胎仔運動機能に及ぼす影響(武谷)： ヒツジ胎仔に対して反復臍帯圧迫負荷を行い、胎仔運動機能の変化を記録し、24時間後の脳組織検査による脳障害発生の有無と運動機能の変化との関連について検討した。臍帯圧迫1時間後の運動機能の差により、脳障害発生の有無を予測できる可能性が示唆された。

このモデル動物における神経伝達物質および神経栄養因子の解析は、予後判定の指標として有用かどうかを検討する必要がある。

8. ダウン症候群特有の細胞接着因子(DSCAM)の発達、加齢的变化と精神遅滞の病態形成の関与：

ダウン症と対照の大脳前頭葉と小脳半球について抗DSCAMによる免疫組織染色を行った。DSCAM蛋白はダウン症では若年では髄鞘に過剰発現し、ダウン症における生後の精神運動発達遅滞やシナプス形成の低下に関与していると考えられた。

サルを用いた羊膜細胞の脳移植研究における病理学的、免疫組織学的検索を担当する。

9. セロトニントランスポーター遺伝子と精神遅滞、自閉症との関連の研究(難波)：

セロトニントランスポーター遺伝子調節領域の解析を行い、新しいポリモルフィズムを発見した。精神遅滞、自閉症におけるポリモルフィズムとの関連性を検討中である。

羊膜中のドパミントランスポーターの存在を確認しているため、セロトニントランスポーターなどの解析に期待される。

C. 考察

羊膜細胞が神経伝達物質(アセチルコリン、ドパミン)および神経栄養因子(BDNF-NT-3)を合成・分泌する細胞であることを証明した。さらに羊水中にもこれらの神経伝達物質および神経栄養因子が測定できたことは、これら物質の羊水中への供給源が羊膜細胞であることを示唆している。ヒト羊膜組織は受精後8日目に外胚盤上葉が二分して、上層が羊膜組織(amnioblast)となり、下層から神経系組織を含むすべての臓器が発生してくる。我々のデータは、満期帝王切開分娩時の胎盤より分離・培養した羊膜細胞についての成績である。Amnioblastの時期の解析は、非常に重要でありかつ興味深い。Amnioblastにおいて、神経栄養因子の分泌能が存在しているな

らば、神経組織を含む胎芽の発育に何らかの役割をしていることは十分に推測できる。さらに現在では同定されていないような、胎芽の発育を促進する因子の存在も否定できない。今後は、このような戦略をもって研究をすすめる予定である。

御子柴らは、Zic 遺伝子が神経堤の発生において初期調節作用をしていることを報告した。上記のごとく羊膜組織が、この直前に形成され始めることより、この Zic gene family の解析をはじめた。

中村らは、神経幹細胞の分化と増殖に関与する遺伝子 (Mashi-1, Prox-1) について解析し、Mash-1 が細胞分化をポジティブに調節していることを報告した。我々は Musashi 1 mRNA が羊膜細胞に発現していることを発見しているため、これらの遺伝子解析を進めている。

サーフェンらは、ムスカリン性アセチルコリン M4 受容体に着目し、そのプロモーター領域をアデノウイルスに構築している。このウイルスベクターを利用し、蛍光発色蛋白の遺伝子導入することにより、羊膜細胞から、本受容体のプロモーター活性をもつ単一細胞集団を分離することが可能である。そして cholinergic neurons の作用をもつ細胞集団を分離できるならば、その細胞脳内移植は障害脳の新規の治療法として有望である。

D. 結論

羊膜細胞の細胞生物学的特性を主体に報告した。本細胞における神経伝達物質と神経栄養因子の合成・分泌能と羊水中におけるこれら物質の存在を証明した。このことより羊膜組織が胎芽、胎児発育に果たす役割が大変重要であることが示唆された。今後は、胎生早期における羊膜組織の解析を戦略にいて研究を進める予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii T, et al. Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type-specific expression system. In press (Neurosci Lett).
- 2) Elwan MA, et al. Detection of dopamine D2 receptor mRNA and binding sites in monkey amniotic epithelial cells. In press (J Neurosci Res)
- 3) Elwan MA, et al. Evidence for the presence of dopamine D1 receptor mRNA and binding sites in monkey amniotic epithelial cell. Neurosci Lett 262: 9-12, 1999
- 4) Elwan MA et al. Synthesis and release of catecholamines by cultured monkey amniotic epithelial cells. J Neurosci Res 53:107-113, 1998.

5) Elwan MA. Synthesis of dopamine from L-3,4-dihydroxyphenylalanine by human amniotic epithelial cells. Europ J Pharmacol 354:R1-R2, 1998.

6) Tsujino S et al. Adenovirus-mediated transfer of human acid maltase gene reduces glycogen accumulation in skeletal muscle of Japanese quail with acid maltase deficiency. Hum Gene Therapy 9:1609-1616, 1998.

7) Kobayashi K et al. Missense mutation (I143T) in a Japanese patient with Canavan disease. Hum Mut 1:S308-S309, 1998

8) Arga J et al. Mouse Zic 1 is involved in cerebellar development. J Neurosci 18:283-293, 1998.

9) Monkawa T et al. Localizatin of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the rat kidney. Kidney Int 53:269-301, 1998.

10) Zhao H, et al. Functional expression of a mammalian odorant receptor. Science 279:237-242, 1998.

11) Sato Y, et al. Adenophostin, a potent agonist of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is useful for fertilization of mouse oocytes injected with round spermatids leading to normal offspring. Biolo Reprod 58:867-873, 1998.

12) Miyamura et al. Metabolic labeling of a subset of glia cells by UDP-galactose: implication for astrocyte lineage diversity. J Neurosci Res 52:173-183, 1998.

13) YamamotoHino M, et al. Apical vesicles bearing inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the Ca²⁺ initiation site of ductal epithelium of submandibular gland. J Cell Biol 141:135-142, 1998.

14) Ibata K, et al. Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate binding activities of neural and non-neural synaptotagmins. J Biol Chem 273:12267-12273, 1998

15) Inoue T, et al. Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required for induction of long-term depression in cerebellar purkinje neurons. J Neurosci 18:5366-5373, 1998.

16) Mathias RS, et al. IP3 receptor blockade fails to prevent intracellular Ca²⁺ release by ET-land a-thrombin. Am J Physiol 274:C1456-1465, 1998.

17) Hirota J et al. T-cell receptor signalling in the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) type-1-deficient mice: is IP3R type 1 essential for T-cell-receptor signalling? Biochem J 333:615-619,1998.

18) Fukuzono s, et al. Overproduction and immunoaffinity purification of myelin proteolipid protein (PLP), an inositol hexakisphosphate binding protein, in a baculovirus expression system. Biochem Biophys Res Commun 249:66-72, 1998.

19) Muto A and Mikoshiba K. Activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors induces transient changes in cell shape of fertilized *Xenopus* eggs. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 39:201-208, 1998.

20) Nakata K, et al. *Xenopus* Zic family and its role in neural and neural crest development. *Mechanisms of Development* 75:43-51, 1998.

21) Nakayama T, et al. Hemizygous deletion of the HPC-1/syntaxin 1A gene (STX1A) in patient with Williams syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 82:49-51, 1998.

22) Yoshida M, et al. Role of two series of Ca²⁺ oscillations in activation of ascidian eggs. *Develop Biology* 203:122-133, 1998

23) Futatsugi A, et al. Muscle-specific mRNA isoform encodes a protein composed mainly of the N-terminal 175 residues of type 2 Ins(1,4,5)P₃ receptor. *Biochem J* 334:559-563, 1998.

24) Hata R et al. Brainstem auditory evoked potentials during brainstem ischemia and reperfusion in gerbils. *Neurosci* 83:201-213, 1998.

25) Takei K et al. Regulation of nerve growth mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in growth cones. *Science* 282:1705-1708, 1998.

26) Yoshikawa F, et al. cooperative formation of the ligand-binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by two separable domains. *J Biol Chem* 274:328-334, 1999.

27) Yoshikawa F, et al. Trypsinized cerebellar inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 274:316-327, 1999.

28) Torii et al. Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the develop into central nervous system. *Develop* 126:443-456, 1999

29) Ohta Y et al. RalA target actin-binding protein-280 to promote filopod formation. *Proc Natl Acad Sci*, In press, 1999.

30) Hayashi A, et al. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int J Dev Neurosci* 16:209-216, 1998.

31) Maeshima T, et al. Serotonin 2A receptor-like immunoreactivity in rat cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett* 252:72-74, 1998.

32) Maeshima T, et al. The cellular localization of 5-HT_{2A} receptors in the spinal cord and spinal ganglia of the adult rat. *Brain Res* 797:118-124, 1998.

33) Hamada S et al. Localization of 5-HT_{2A} receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunohistochemistry using two antibodies raised in

rabbit and chicken. *Mol Brain Res* 54:199-211, 1998.

34) Obonai T et al. Developmental and aging changes of Bak expression in the human brain. *Brain Res* 783:167-170, 1998.

35) Oka A et al. Expression of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2) gene product in human brains. *Neurosci Lett* 256:1-3, 1998.

36) Takashima S et al. Neuronal migration disorder: Expression of gene products in the neocortex. *Neuropath* 18:427-432, 1998.

37) Saji M et al. Tuberous sclerosis 2 gene is expressed at high levels in specific types of neurons in the mouse brain. *Yonago Acta Medica* 41:55-63, 1998

38) Ichisaka S et al. Increased expression of β -hexosaminidase α -chain in cultured skin fibroblasts from patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1. *Brain and Dev* 20:302-306, 1998.

39) Murakami F et al. Anxiety traits associated with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region in the Japanese. *J Hum Genet* 44:15-17, 1999.

40) Zhang H et al. A novel TSC2 mutation in a patient with pulmonary tuberous sclerosis: Lack of LOH in a lung cyst. *Am J Med Genet*. In press.

2. 学会発表

1) Sakuragawa N et al. Active synthesis and release of acetylcholine and catecholamines by human amniotic epithelial cells.: Potential candidate for transplantation of genetically modified cells to treat neurodegenerative disease. 1st annual meeting American Society of Gene Therapy, Seattle, USA, 1998/5/30.

2) Sakuragawa N et al. Human amniotic epithelial cells with active synthesis and release of acetylcholine and catecholamines: Possible gene carrier for intracerebral grafting to treat neurodegenerative diseases. The 4th annual meeting of the Japanese Society of Gene Therapy. Tokyo, Japan. 1998/7/5.

3) Migita M, et al. A novel approach for ex-vivo gene therapy of lysosomal storage diseases using human amniotic epithelial cells as a transgene carrier The 4th annual meeting of the Japanese Society of Gene Therapy. Tokyo, Japan. 1998/7/5

4) Sakuragawa N et al. Presence of acetylcholine and catecholamines in human amniotic fluid and amniotic fluid cells. 27th Annual Meeting of Child Neurology Society (USA). Montoreal, Canada, 1998/10/21-24.

5) Sakuragawa N et al. Cell biology of human amniotic epithelial cells and cellular and molecular treatment of neurological diseases. International workshop; Neuronal precursor cell biology and application for treatment of inborn error of metabolism. Tokyo, Japan. 1999/2/25-26.

6) Sakuragawa N et al. Synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) and Neurotrophin-3 (NT-3) by human amniotic epithelial cells. The 28th Annual Meeting of Child Neurology Society (USA). Nashville, TN, USA, 1999/10/113-16.

7) Nakamura et al. Role of BDNF in development and plasticity of thalamocortical synapses in neonatal mouse barrel field. Satellite Symposium of 28th Annual Meeting of Neuroscience.

8) Sutoh F et al. Monoamine deprived neuronal death during critical period of development in the cerebral cortex of mice. Neurosci Abst 28:22.9, 1998.

9) Yajima T et al. Localization of 5-HT_{2A} receptor and synapse formation in the rat cerebral cortex. Neurosci Abst 28:239.7, 1998.

10) Noda K et al. Fk960, a novel antidementia drug, increases symmetrical synapses in the hippocampus of aged rat. Neurosci Abst 28:286.10, 1998.

羊膜細胞における神経栄養因子の合成、分泌能と in vitro 作用について

分担研究者 桜川宣男 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨 羊膜細胞における神経栄養因子の合成・分泌能について検索し、ラット培養神経細胞に対する栄養因子効果を検討した。羊膜細胞を無血清培地に24時間培養した培養液をコンデションメジウムとしその中の神経栄養因子を測定した結果、BDNFは 610 ± 540 pg/ml, NT-3は 600 ± 279 pg/mlであり、NGFは測定されなかった。またBDNFとNT-3のmRNAの発現を検討したところRT-PCRにて当該バンドが検出され、シーケンスにより同定できた。羊水中のBDNFは60.0 pg/ml、NT-3は10.0 pg/mlであった。次にラットE18-E19胎仔の前脳より神経細胞を採取し、コンデションメジウムで培養した。無血清培地で培養したコントロール群と比較したところ、神経細胞の数の増加が顕著に認められた。以上より羊膜細胞は神経栄養因子を合成・分解する能力があり、羊水中にも分泌している可能性が示唆された。またその培養液には、ラット培養神経細胞に対しても神経栄養作用を持つことが証明できた。羊膜細胞が、胎生早期（神経板の出現する前）に形成されることを考慮するとき、本細胞の胎児発育に果たす役割が大変に重要であることが推測される。

A. 研究目的

胎児環境をめぐる神経伝達物質の生理的役割および発達障害に対する病的意義を解明することを目的とする。昨年までに、ヒト羊膜細胞が、神経伝達物質（アセチルコリンおよびカテコールアミンを合成し分泌する能力を持つことを証明した。また羊水中にもこれら物質が存在することが判明したことより、羊膜細胞の胎児発育果たす役割が重要となった。そこで、本年はさらに神経栄養因子について、その合成・分泌能を検索した。そして本細胞の培養液が、ラット培養神経細胞の生存と機能維持作用を有するかについて検討したので報告する。

B. 研究方法

羊膜細胞は帝王切開分娩より入手し、既報のごとくに分離、培養した。羊膜細胞の神経栄養因子の分泌能を調べる目的で、無血清培地 (Neurobasal +N2, GIBCO)で24時間培養した(以下コンデションメジウム, CM)。そしてCM中のBDNF, NT-3およびNGFをenzyme Immunoassay法 (Nitta et al. 1999)にて測定した。羊膜細胞におけるBDNFおよびNT-3 mRNAの発現をRT-PCRにて検索した。そしてシーケンスにより同定した。一方、ラット胎児 (E18-E19)の前脳より分離した神経細胞をCMで5日間培養し、無血清培地による培養と神経細胞の成長に対する効果を比較した。

羊水を帝王切開分娩時に入手 (インフォームド Consentにより施行) し、遠心上清の神経栄養

因子を測定するまで、冷凍保存した。

C. 研究結果

羊膜細胞のCM中のBDNFは、 600 ± 540 pg/ml (n=6), NT-3は 600 ± 279 pg/ml (n=6)であった。NGFは検出されなかった。なお検出感度は、BDNFは5 pg/ml, NT-3は10 pg/mlである。羊膜細胞中の神経栄養因子のmRNAの発現については、RT-PCRで検討したところ、当該バンドを検出し、さらにシーケンスにより同定できた。

D. 考察

羊膜の膜成分はラミニンを含有し、axonの成長作用を有することが、in vivo and in vitroで証明されていた。羊膜細胞については、成長因子 (EGF, TGF α , TGF β , IGF etc)を産生している可能性が示唆されていた。しかし羊膜細胞の神経栄養因子の合成、分泌機能および培養神経細胞に対するin vitro作用については報告がない。我々は培養羊膜細胞を用いて、培養液中に神経栄養因子 (BDNF, NT-3)が分泌されていることを証明した。そして細胞中にBDNF mRNA, NT-3 mRNAが発現していることを確認した。

そこで羊膜細胞の培養液 (CM)が、ラット培養神経細胞の生存と成長を助長する作用があることを確認中であるが、新規の神経栄養因子である可能性もある

一方、羊水中にもこれらの因子が測定できたことは、羊膜細胞からこれらの神経栄養因子が羊水

中に分泌されている可能性が示唆される。羊膜組織は受精後8日目に形成され、これは神経板の発現する依然であることより、羊膜細胞が持つ神経栄養因子などの分泌能が胎児発育に及ぼす効果は大変重要である。早期胚を用いた羊膜組織における成長因子、神経栄養因子などの発現について検討していく予定である。

E. 結論

羊膜細胞が神経栄養因子(BDNE, NT-3)を合成し、分泌する機能を持つことを証明した。羊水中にもこれら物質が存在していることが判明したことより、胎児発育における羊膜細胞から分泌される神経栄養因子の作用について重要性を考察した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii T, et al. Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type-specific expression system. In press (Neurosci Lett).
- 2) Elwan MA, et al. Detection of dopamine D2 receptor mRNA and binding sites in monkey amniotic epithelial cells. In press (J NeurosciRes)
- 3) Elwan MA, et al. Evidence for the presence of dopamine D1 receptor mRNA and binding sites in monkey amniotic epithelial cell. Neurosci Lett 262: 9-12, 1999
- 4) Elwan MA et al. Synthesis and release of catecholamines by cultured monkey amniotic epithelial cells. J Neurosci Res 53:107-113, 1998.
- 5) Elwan MA. Synthesis of dopamine from L-3,4-dehydroxyphenylalanine by human amniotic epithelial cells. Europ J Pharmacol 354:R1-R2, 1998.
- 6) Tsujino S et al. Adenovirus-mediated transfer of human acid maltase gene reduces glycogen accumulation in skeletal muscle of Japanese quail with acid maltase deficiency. Hum Gene Therapy 9:1609-1616, 1998.
- 7) Kobayashi K et al. Missense mutation (I143T) in a Japanese patient with Canavan disease. Hum Mut 1:S308-S309, 1998

2. 学会発表

- 1) Sakuragawa N et al. Active synthesis and release of acetylcholine and catecholamines by human amniotic epithelial cells.: Potential candidate for transplantation of genetically modified cells to treat neurodegenerative disease. 1st annual meeting American Society of Gene Therapy, Seattle, USA, 1998/5/30.

- 2) Sakuragawa N et al. Presence of acetylcholine and catecholamines in human amniotic fluid and amniotic fluid cells. 27th Annual Meeting of Child Neurology Society (USA). Montreal, Canada, 1998/10/21-24.

- 3) Sakuragawa N et al. Cell biology of human amniotic epithelial cells and cellular and molecular treatment of neurological diseases. International workshop; Neuronal precursor cell biology and application for treatment of inborn error of metabolism. Tokyo, Japan. 1999/2/25-26.

- 4) Sakuragawa N et al. Synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) and Neurotrophin-3 (NT-3) by human amniotic epithelial cells. The 28th Annual Meeting of Child Neurology Society (USA). Nashville, TN, USA, 1999/10/113-16.

- 5) Sakuragawa N et al. Human amniotic epithelial cells with active synthesis and release of acetylcholin and catecholamines: Possible gene carrier for intracerebral grafting to treat neurodegenerative diseases. The 4th annual meeting of the Japanese Society of Gene therapy. Tokyo, Japan. 1998/7/5.

- 6) Migita M, et al. A novel approach for ex-vivo gene therapy of lysosomal storage diseases using human amniotic epithelial cells as a transgene carrier. The 4th annual meeting of the Japanese Society of Gene Therapy. Tokyo, Japan. 1998/7/5.

研究要旨

鶏卵胚の後根神経節細胞には1型IP3受容体が豊富に発現し、伸長中の神経突起先端に存在する特殊な構造体である成長円錐部では、微小管が重合する部位に集約して分布していた。種々の薬理的阻害実験や色素を利用した特異的分子のレーザー不活化法による実験結果から1型IP3受容体を介した細胞内Ca²⁺の放出が神経突起の伸長を制御することが判明した。このことは成長円錐部におけるカルシウムを介する情報伝達が神経突起の伸長制御における中心的な役割を演じていることを強く示唆するものである。

A. 研究目的

神経系の発達・成長においてカルシウムイオンが重要であることは知られていたが、従来、細胞膜上のカルシウムチャネルを通して細胞内に流入する細胞外のカルシウムイオンが重要であると考えられてきた。ところが、細胞外のカルシウムイオンを遮断しても神経成長に影響を受けない細胞種が存在していた。我々はこの点に注目し、細胞内カルシウム貯蔵庫から必要に応じて放出されるカルシウムの生理的意義について研究を始めた。そこで、IP3受容体の神経成長における分子機能を解明するための一連の実験研究を行った。

B. 研究方法

色素を利用した特異的分子のレーザー不活化法 (CALI: chromophore-assisted laser inactivation) の導入

生体分子の生理機能を知る上で、特定分子の欠損あるいは機能的な不活化をおこさせる研究手段は最も有効な方法の一つである。分子機能の研究では、生体分子の機能が実際に発揮される時間と場所で解析を行うことが重要であるが、CALI法は時空間的な特定分子の不活化を実現させる新しい研究方法として近年注目されている。CALI法はDaniel G. Jay教授が1988年にその原理を実証する実験的成果を発表し、その後彼ら自身が技術開発した新規の生理学的研究方法である。抗体ヤリガンドをマラカイトグリーン色素で化学的に標識し、これらの分子の特異的結合によって標的分子を特定し、レーザー光線(620nm)の照射によって生じるフリーラジカルを利用して限られた領域と時間で標識分子の不活化をおこさせ得る新規の研究方法である。

材料として鶏卵胚の後根神経節を培養して用いた。

C. 研究結果

種々の薬理的阻害実験によって、細胞内カルシウム貯蔵庫を枯渇させたり、細胞内IP3の産生を抑制したり、IP3受容体に強く結合する薬剤でIP3受容体のチャネル機能を阻害したりすると、どの場合も後根神経節の神経成長が著しく阻害されることが判明した。1型IP3受容体は、細胞体、神経突起、成長円錐の中心部に広範に分布していたが、どこに分布する1型IP3受容体が実際に神経成長の制御を行うのかは薬理学的手法などでは明らかにすることはできない。そこで、局所的な特定分子の不活化を実現しうるレーザー不活化法を活用した。このレーザー不活化法を活用することで、生きた細胞での機能分子が実際に働く場所を明らかにすることができるものと考えた。この方法で、成長円錐部の1型IP3受容体を不活化すると神経成長は停止し、引き続いて神経突起の退縮が起こった。神経突起部でこの分子を同様に不活化しても成長円錐部で見られた突起伸長の変化は見られなかった。これらの結果は神経突起の伸長制御は成長円錐部における1型IP3受容体を介したカルシウム変動が非常に重要であることを示す。このことは成長円錐部における情報伝達系が神経突起の伸長制御機構における中心的な役割を演じていることを強く示唆している。このように成長円錐内のIP3受容体を介する細胞内のカルシウム貯蔵庫からのCa²⁺放出が神経成長に非常に重要な役割を持つことの実験的証拠が世界ではじめて得られた。

D. 考察

鶏卵胚の後根神経節細胞には1型IP3受容体が豊富に発現することを生化学的に明らかにし、さらに成長円錐（発達や再生時にだけ見られる伸長中の神経突起先端に存在する特殊な構造体）にこの分子が存在し、特に微小管が重合する部位に集約して分布していることが免疫細胞化学的手法によって判明した。今回の発見を契機に、神経成長を担う細胞内情報伝達機構、特にカルシウムイオンをセカンドメッセンジャーとする情報伝達のしくみの詳細が明らかにされると期待される。

E. 結論

鶏卵胚の培養後根神経節を用いて新しい色素存在性特異的分子不活性法を用いて1型IP3受容体からのカルシウム放出がニューロンの突起伸展に関わっているか否かを調べた。その結果、神経成長円錐での1型IP3受容体はニューロンの突起伸展に必須であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aruga, J., Minowa, O., Yaginuma, H., Kuno, J., Nagai, T., Noda, T., Mikoshiba, K.: Mouse *Zic1* is involved in cerebellar development. *J. Neurosci.*, 18 284-293 (1998)
2. Monkawa, T., Hayasi, M., Miyawaki, A., Sugiyama, T., Yamamoto-Hino, M., Hasegawa, M., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Saruta, T.: Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the rat kidney. *Kidney Int.*, 53 296-301 (1998)
3. Zhao, H., Ivic, L., Otaki, J. M., Hashimoto, M., Mikoshiba, K., Firestein, S.: Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science*, 279 237-242 (1998)
4. Sato, Y., Miyazaki, S., Shikano, T., Mitsuhashi, N., Takeuchi, H., Mikoshiba, K., Kuwabara Y.: Adenophostin, a potent agonist of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, is useful for fertilization of mouse oocytes injected with round spermatids leading to normal offspring. *Biology of Reproduction*, 58 867-873 (1998)
5. Miyamura, T., Morita, N., Baba, H., Hase, S., Kajimoto, T., Tsuji, S., Kawata, M., Kato, I., Mikoshiba, K. and Ikenaka, K.: Metabolic labeling of a subset of glia cells by UDP-galactose:

implication for astrocyte lineage diversity.

- J. *Neurosci. Res.*, 52 173-183(1998)
6. Yamamoto-Hino, M., Miyawaki, A., Segawa, A., Adachi, E., Yamashina, S., Fujimoto, T., Sugiyama, T., Furuichi, T., Hasegawa, M. and Mikoshiba, K.: Apical vesicles bearing inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the Ca²⁺ initiation site of ductal epithelium of submandibular gland. *J. Cell. Biol.*, 141 135-142. (1998)
7. Iyata, K., Fukuda, M. and Mikoshiba, K.: Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate binding activities of neural and non-neural synaptotagmins. *J. Biol. Chem.*, 273 12267-12273(1998)
8. Inoue, T., Kato, K., Kohda, K. and Mikoshiba, K.: Type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required for induction of long-term depression in cerebellar purkinje neurons. *J. Neurosci.*, 18 5366-5373 (1998)
9. Mathias, R. S., Mikoshiba, K., Michikawa, T., Miyawaki, A., Ives, H. E.: IP3 receptor blockade fails to prevent intracellular Ca²⁺ release by ET-1 and a-thrombin. *Am. J. Physiol.*, 274 C1456-1465 (1998)
10. Hirota, J., Baba, M., Matsumoto, M., Furuichi, T., Takatsu, K. and Mikoshiba, K.: T-cell receptor signalling in the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) type-1-deficient mice: is IP3R type 1 essential for T-cell-receptor signalling?. *Biochem. J.*, 333 615-619 (1998)
11. Fukuzono, S., Takeshita, T., Sakamoto, T., Hisada, A., Shimizu, N. and Mikoshiba, K.: Overproduction and immuno-affinity purification of myelin proteolipid protein (PLP), an inositol hexakisphosphate binding protein, in a baculovirus expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249 66-72 (1998)
12. Muto, A., Mikoshiba, K.: Activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors induces transient changes in cell shape of fertilized *Xenopus* eggs. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 39 201-208 (1998)
13. Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J., and Mikoshiba, K.: *Xenopus Zic* family and its role in neural and neural crest development. *Mechanisms of Development*, 75 43-51 (1998)

14. Nakayama,T., Matsuoka,R., Kimura,M., Hirota,H., Mikoshiba,K., Shimizu,Y., Shimizu,N., and Akagawa,K.: Hemizygous deletion of the HPC-1/syntaxin 1A gene (STX1A) in patient with Williams syndrome. *Cytogenet Cell Genet.* 82 49-51 (1998)
15. Yoshida,M., Sensui,N., Inoue,T., Morisawa,M., Mikoshiba,K.: Role of two series of Ca²⁺ oscillations in activation of ascidian eggs. *Developmental Biology,* 203 122-133 (1998)
16. Futatsugi,A., Kuwajima,G., and Mikoshiba,K.: Muscle-specific mRNA isoform encodes a protein composed mainly of the N-terminal 175 residues of type 2 Ins(1,4,5)P₃ receptor. *Biochem.J.,* 334 559-563 (1998)
17. Hata,R., Matsumoto,M., Matsuyama,T., Yamamoto,K., Hatakeyama,T., Kubo,T., Mikoshiba,K., Sakaki,S., Sugita,M., and Yanagihara,T.: Brainstem auditory evoked potentials during brainstem ischemia and reperfusion in gerbils. *Neuroscience,* 83 201-213 (1998)
18. Takei, K., Shin, R.-M., Inoue, T., Kato, K., and Mikoshiba, K.: Regulation of nerve growth mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in growth cones. *Science,* 282 1705-1708 (1998)
19. Yoshikawa,F., Iwasaki,H., Michikawa,T., Furuichi,T., and Mikoshiba,K.: Cooperative formation of the ligand-binding site of the inositol 1,4,5- trisphosphate receptor by two separable domains. *J.Biol.Chem.,* 274 328-334 (1999)
20. Yoshikawa,F., Iwasaki,H., Michikawa,T., Furuichi,T and Mikoshiba,K.: Trypsinized cerebellar inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J.Biol.Chem.,* 274 316-327 (1999)

中枢神経系における細胞の多様性の発生機構

分担研究者 中村俊 国立精神・神経センター 神経研究所診断研究部長

研究要旨 神経細胞の分化の初期決定に関わるbHLH型の転写因子Mash-1とこの下流で神経分化を制御していると考えられている転写因子Prox-1のカスケードについてマウス初期胚およびMash-1のノックアウトマウスでの遺伝子発現、さらに神経幹細胞株を用いた解析を行なった。この結果から中枢神経系細胞の分化の初期決定に於いてMash-1およびProx-1が重要な役割を果たしていることが示された。動物個体においては体の前後軸、背腹軸によって規定された位置情報が特定の系譜にコミットした神経前駆体細胞の発生に重要な意義をもっていると考えられるが、今回の研究結果を発展させて、位置情報の差異がいかんにして細胞系譜の多様性を生み出すかについてさらに分子レベルで解析することが求められている。

A. 研究目的

哺乳類中枢神経系における細胞の多様性は自己再生を行なう多能性幹細胞から、特定の細胞系譜にコミットした前駆体細胞をへて最終的な分化形質が獲得されることで達成されることが考えられているが、体の前後軸、背腹軸に沿った位置情報の差異によりどのようにして特定の細胞系譜に分化能を制限された前駆体細胞が生ずるかについてはなお多くの点が不明である。我々は、先に樹立したラットの中枢性神経幹細胞株を用いてこの点を解明することを目的に研究を行っている。

B. 研究方法

ショウジョウバエの神経分化の初期過程において重要な役割を果たしているbHLH型の転写因子の一つ、AS-Cの哺乳動物ホモログであるMash-1と、やはりショウジョウバエでその下流で機能していると考えられるprosperoのホモログであるProx-1の役割についてラットを中枢性神経幹細胞株を用いて解析した。神経幹細胞株にMash-1遺伝子を強制発現しそれに伴う未分化神経細胞のマーカ、神経分化マーカ、およびProx-1の発現をウエスタンブロット法で検討した。さらに、初期発生期の神経系および

Mash-1のノックアウトマウスにおける遺伝子の発現をin situ hybridizationにより調べた。

C. 研究結果

発生初期の神経系においてMash-1とProx-1は発現領域が重なっており、神経分節の境界とその発現領域には対応性が認められた。腹側視床、視床下部、基底核領域では両遺伝子は高発現していたが、基底部ではMash-1は脳室に面した分裂している細胞層に、Prox-1はそれよりは内側の増殖層と分化層に発現が限局していた。初代培養系では、Mash-1, Prox-1陽性細胞は分裂していたが、Prox-1が発現した細胞では未分化な神経上皮細胞のマーカであるネスチンの発現は認められなかった。この観察結果はMash-1は分裂能のあるより未分化な神経前駆体細胞の、Prox-1はより分化の進んだ前駆細胞の段階に対応して発現していることを示唆している。この点を明確にするために、神経幹細胞株にMash-1を強制発現した細胞株を単離した。この細胞は分化誘導にともない、ネスチンの発現が消失し、Prox-1が発現した。これにやや遅れて、ニューロン、アストログリア、ついでオリゴデンドロサイトのマーカが発現した。この結果は神経上皮細胞の分化がMash-1, Prox-1の

カスケードで制御されているという考えを支持する。さらに、Mash-1のノックアウトマウスにおける初期神経管の視床下部ではProx-1の発現が消失し、ニューロンのマーカーが発現しておらず、視床腹側部でも分化層の発達が貧弱であった。

D. 考察

哺乳類の中樞神経系の分化過程に於いても、ショウジョウバエの神経分化の初期過程に必須な遺伝子のホモログが、特定の神経系譜において重要な役割を果たしていることが示された。我々が確立した神経管細胞株は、単一クローンの細胞で遺伝子カスケードの機能を解析できるため極めて有用であった。動物個体においては体の前後軸、背腹軸によって規定された位置情報が特定の系譜にコミットした神経前駆体細胞の発生に重要な意義をもっていると考えられるが、今回の研究結果をさらに発展させて、位置情報の差異がいかんしてことなる細胞系譜を生み出すかについて分子レベルで解析することが求められている。

E. 結論

神経細胞の分化の初期決定に関わるbHLH型の転写因子Mash-1とこの下流で神経分化を制御していると考えられている転写因子Prox-1のカスケードについて神経幹細胞株を用いて解析を行なった。Mash-1の強制発現により神経上皮細胞のマーカーであるネスチンの発現が抑制され、Prox-1の発現が誘導されること、ついでニューロンとグリアのマーカーが発現されることを明らかにした。さらにMash-1のノックアウトマウスの解析からも、視床下部においてProx-1の発現消失とニューロンの分化マーカーの消失が確認された。以上の結果から中樞神経系細胞の分化の初期決定に於いてMash-1およびProx-1が重要な役割を果たしている

ことが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Torii Masa-aki et al., Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development*, in press, 1999

2. Ohta Yasutaka et al., RalA targets actin-binding protein-280 to promote filopod formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press, 1999

2. 学会発表

1. Nakamura et al., Role of BDNF in development and plasticity of thalamocortical synapses in neonatal mouse barrel field. Satellite Symposium of 28th Annual meeting of Neuroscience, Nov. 6, 1998, Los Angeles, USA.

2. 伊丹千晶他、体性感覚野の可塑性におけるBDNFの役割。第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会、東京、平成10年9月23日

3. 井上高良他、哺乳類全胚培養系を用いた神経組織への新しい遺伝子導入法。第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会、東京、平成10年9月21日

3. 大隅典子他、神経管のパターニングと初期神経回路形成におけるPax-6遺伝子の役割。第71回日本生化学会シンポジウム、名古屋、平成10年10月16日

4. 井上高良他、ニューロメア境界維持にカドヘリンが果たす役割。第21回日本分子生物学会、横浜、平成10年12月19日

5. 高嶋記子他、ラット胚菱脳・脊髄におけるNotchシグナリングと介在神経細胞分化。第21回日本分子生物学会、横浜、平成10年12月19日

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

（分担）研究報告書

発達期脳障害における神経伝達機構の解析とその治療研究

（分担）研究者 岡戸 信男 筑波大学基礎医学系・教授

研究要旨 生体アミンによるシナプスの形成維持機構から解明できる精神遅滞の成因と修復に関する研究を行うため、ノルアドレナリン（NA）とドーパミン（DA）の関与について検討した。ラット海馬のアセチルコリン（Ach）を除去するとシナプス密度が低下するが、同時に NA を除去するとシナプス密度は上昇することが明らかになった。また、DAD2 受容体の拮抗薬によりサル大脳皮質では前頭前野でのみシナプス密度が低下することが明らかになった。

A. 研究目的

これまでも我々の研究によって脳内の部位特異的に、また種特異的にシナプスの形成維持に働く生体アミンの組み合わせが大きく異なることが示唆されてきた。本年度は異なる生体アミンどうしの相互作用とサルにおける DA によるシナプスの形成維持機構に関して研究を行うことを目的とした。

B. 研究方法

成体ラットの NA と Ach を別々に、また同時に 1 週間除去して海馬 CA 放射線維層のシナプス密度を定量化した。また水迷路試験で学習記憶機能を調べた。1, 3, 6 歳のサルに D2 受容体拮抗薬を投与して大脳皮質のシナプス密度の変化を調べた。

C. 研究結果

Ach をなくすと Morris 水迷路試験の reference version で明らかに学習・記憶能力が低下した。また CA1 領域の放射線イ層でシナプス密度の低下が見られた。しかし、Ach と NA を同時になくすと学習・記憶能力とシナプス密度はほぼ正常な状態にまで回復した。

D2 受容体を介した DA によるシナプス形成維持機能は 1, 3 歳のサルの前頭前野のみで働いていることが示唆された。運動領野、感覚領野、視覚領野など大脳皮質の他の領野ではシナプス密度に変化は起こらなかった。

D. 考察

生体アミンのうち NA、Ach、DA のいずれもがシナプスの形成維持機

能を果たしていることが一層明確になった。しかし、脳部位や種による違いでのシナプス形成維持機能の相違点をさらに検討する必要がある。このことは精神遅滞の成因と修復を考える上で重要な意味を持つと考えられる。

E. 結論

生体アミンによるシナプスの形成維持機能は脳部位・種の違いによる生体アミンの組み合わせや働きがさまざまである事が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hayashi, A., Nagaoka, M., Yamada, K., Ichitani, Y., Miake, Y., and Okado, N., Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int. J. Dev. Neuroscience*, 16:209-216, 1998

Maeshima, T., Shutoh, F., Hamada, S., Senzaki, K., Hamaguchi-Hamada, K., Ito, R., and Okado, N., Serotonin_{2A} receptor-like immunoreactivity in rat cerebellar Purkinje cells., *Neurosci. Lett.*, 252:72-74, 1998

Maeshima, T., Ito, R., Hamada, S., Senzaki, K., Hamaguchi-Hamada, K., Shutoh, F., and Okado, N., The cellular localization of 5-HT_{2A} receptors in the spinal cord and spinal ganglia of the adult rat., *Brain Res.*, 797:118-124, 1998

Hamada, S., Senzaki, K., Hamaguchi-Hamada, K., Tabuchi, K., Yamamoto, H., Yamamoto, T., Yoshikawa, S., Okano, H., and Okado, N., Localization of 5-HT_{2A} receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunohistochemistry using two antibodies raised in rabbit and chicken. *Mol. Brain Res.*, 54:199-211, 1998

2. 学会発表

Sutoh, F., KamIya, U., and Okado, N., Monoamine deprived neuronal death during critical period of development in the cerebral cortex of mice. *Neurosci. Abst.* 28:224.9, 1988

Yajima, T., Hamada, S., and Okado, N., Localization of 5-HT_{2A} receptor and synapse formation in the rat cerebral cortex., *Neurosci. Abst.* 28:239.7, 1998

Noda, K., Nakano, K., Ohara, K., Yamaguchi, I., and Okado, N., Fk960, a novel antidementia drug, increases symmetrical synapses in the hippocampus of aged rat., *Neurosci. Abstr.*, 28:286.10, 1998

分担者 David Saffen 東京大学医学部 神経生化学教室 助教授

研究要旨 We have tested various expression/reporter systems for use in the analysis of the M₄ muscarinic acetylcholine gene expression in neurons in long-term hippocampal slice cultures. In particular, a two vector adenovirus system developed by I. Saito (University of Tokyo) in which the M₄ promoter is used to direct expression of cre recombinase, which in turn catalyzes the removal of an inhibitory DNA segment separating a beta-galactosidase reporter gene from a strong upstream promoter, promises to be useful for analysis of M₄ promoter function.

A. 研究目的 The object of our research is to identify the genetic regulatory elements in the promoter of the M₄ muscarinic acetylcholine receptor gene that restrict the expression of this gene to specific subsets of neurons in the brain. Specifically, we are attempting to determine whether the neuronal cell restrictive element (NRSE), previously shown to prevent expression of the M₄ gene in non-neuronal cells, also plays a role in restricting the expression of the M₄ gene to specific subsets of neurons.

B. 研究方法 We constructed expression plasmids containing the M₄ promoter linked to beta-galactosidase, green fluorescent protein (EGFP; Clontech) or the destabilized green (dnEGFP; Clontech) and tested these in neuronal (PC12D and NG108-15) and non-neuronal (L6 and 3Y-1B) cell lines. We also constructed a series of recombinant adenoviruses in which various segments of the M₄ promoter are linked to beta-galactosidase reporter genes and used these to infect long-term hippocampal slice cultures. To amplify the M₄ promoter-directed beta-galactosidase gene expression we also constructed recombinant adenoviruses containing various segments of the M₄ promoter linked to a gene encoding the P1 phage-derived cre recombinase gene. These recombinant adenoviruses are used in combination with a reporter adenovirus that strongly expresses beta-galactosidase only if the cre recombinase is expressed. The recombinant adenoviruses

were constructed using materials developed by I. Saito (Medical Sciences Research Institute, Tokyo University). Long-term hippocampal slices cultures were set up with the expert help of A. Ogura and K. Tominaga (Osaka University).

C. 研究成果 1) Non-neuronal cells transfected with M₄ promoter-driven expression vectors containing beta-galactosidase reporter genes showed reduced numbers of beta-galactosidase expressing cells when the NRSE was included in the promoter. However, the level of beta-galactosidase in individual expressing cells seemed to be high. 2) The presence of the NRSE in M₄ promoter/EGFP or dnEGFP did not prevent expression of the GFP reporters in non-neuronal cells. 3) Adenovirus vectors containing various M₄ promoter segments linked directly to the beta-galactosidase reporter gene showed poor selectivity of expression when tested in neuronal and non-neuronal cells. This is in contrast to results obtained in transient transfection assays in which the presence of the NRSE in M₄ promoter constructs largely prevented the expression of luciferase reporters gene in non-neuronal cells. 4) Recombinant adenoviruses containing M₄ promoter segments directly linked to beta-galactosidase reporters did not show detectable beta-galactosidase expression in hippocampal slice cultures. 4) 3Y-1B cells infected with M₄ promoter/Cre recombinant adenoviruses in combination with a Cre

recombinase-dependent reporter adenovirus did show NRSE-dependent inhibition of beta-galactosidase expression.

F. 研究発表 none to date

D. 考察 1) The ability to demonstrate NRSE-dependent restriction of M₄ gene expression seems to critically depend upon the choice of reporter gene. When gene expression using beta-galactosidase as the reporter, inclusion of the NRSE in the M₄ promoter reduces the number of non-neuronal cells that express beta-galactosidase, but cells that do express it seem to express it strongly. This result is consistent with previous studies using beta-galactosidase as a reporter gene, and are consistent with the idea that genetic regulatory elements (enhancers, silencers) influence the probability of transcription initiation rather than directly regulating the level of transcription. For reasons that we do not yet understand, GFP does not faithfully report the regulation of gene expression by the NRSE. 2) The use of adenovirus also presents problems with respect to reporting the activity of the NRSE. In particular, recombinant adenovirus containing M₄ promoter constructs linked directly to beta-galactosidase reporter genes did not give a detectable signal when used to infect hippocampal long-term slice cultures. We reasoned that the failure to detect beta-galactosidase expression may be due to the fact that the M₄ promoter is relatively weak. 3) Using M₄/Cre adenoviruses in combination with a Cre-dependent reporter adenovirus yielded promising results when tested in 3Y-1B cells.

E. 結論 The M₄ promoter/Cre adenovirus system be suitable for analyzing the function of the NRSE and other regulator elements in controlling gene expression in neurons in long-term hippocampal slice cultures. This system may also be an effective model system for converting the weak, cell type-specific gene expression into strong, cell type-specific gene expression.

分担研究報告書

反復臍帯圧迫のヒツジ胎仔運動機能に及ぼす影響

分担研究者 武谷雄二 東京大学産科婦人科学教室教授

研究要旨 ヒツジ胎仔に対して反復臍帯圧迫負荷を行い、胎児運動機能の変化を記録するとともに、24時間後に脳組織検査を行い、脳障害発生の有無と運動機能の変化との関連について検討した。運動機能の指標として、呼吸運動を示す気管内圧変化と項部筋電活動とを用いた。臍帯圧迫に伴い、正常時に認められる呼吸運動・項部筋電活動は速やかに消失し、心拍数低下時には不規則な吸気運動、徐脈となり心拍数が安定した時点で不規則な振幅を示す筋電活動が出現した。その後は持続の短い規則的な吸気運動、筋電活動が認められた。これらの圧迫中における運動機能の変化には、脳障害発生の有無による差異は認められなかった。脳障害を認めなかった胎仔では反復圧迫終了後一時間以内に正常筋電活動が出現するのに対し、脳障害発生例では回復が認められなかった。呼吸運動は両群とも消失したままであった。臍帯圧迫一時間後の運動機能の差により、脳障害発生の有無を予知できる可能性が示唆された。

A.研究目的

脳性麻痺の原因として、脳室周囲白質軟化症(PVL)の重要性が指摘されている。PVLの発生要因として胎児期における臍帯圧迫が重要であるとの報告に注目し、臍帯圧迫によるヒツジ胎仔の脳障害発生メカニズムに関する研究を行ってきた。我々が用いてきた臍帯圧迫法では約半数のヒツジ胎仔に大脳白質を中心とした脳病変が発生し、臍帯圧迫に対する胎仔循環系の代償機能が破綻を来すことにより血圧低下が生じ脳虚血となること、さらに虚血再還流に伴いフリーラジカルが発生することが脳障害発生のメカニズムとして重要であることが明らかになった。

本研究においては同プロトコルを用い、臍帯圧迫による胎児運動機能(呼吸様運動と項部筋電図)の変化について検討し、それらの脳障害発生の有無による相違点を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

胎齢112-132日の妊娠羊を用い、胎仔慢性実験モデルを作成した。すなわち、ハロセン麻酔下に、母獣下腹部正中切開を施行、子宮に小切開を加え胎仔頸動静脈にカテーテルを留置、胎仔前胸部に心電電極、臍帯に圧迫用のoccluderを装着し閉腹した。準備手術より4日後、母獣及び胎仔の状態が安定した時点で、3分間の臍帯完全圧迫を5分間隔で

5回行った。圧迫実験中は、胎仔頸動脈血血液ガス、頸動脈圧、心拍数、項部筋電図、気管内圧を測定した。圧迫後約1日を経て、帝王切開にて胎仔を娩出し、病理学的検索のため脳各部位を採取した。

C.研究結果

(1) 臍帯圧迫に伴う血液ガス、心拍数、血圧の変化

圧迫開始前の血液ガスはpH, pCO₂, pO₂の順に7.374, 49.6mmHg, 17.5mmHgであった。臍帯圧迫中、pCO₂, pO₂はそれぞれ上昇及び低下し、解除により速やかに回復した。5回目でも同様の変化を示した。pHは圧迫により進行性に低下し、5回目圧迫中は6.98となった。心拍数は圧迫により徐脈、解除により回復し頻脈となり、5回圧迫中ほぼ同様のパターンを示した。血圧は初期には上昇したが、圧迫の持続により低下し、解除により回復した。圧迫の反復により同様の変化を示しながら、全体としては低下した。

(2) 脳障害の検討

ヒツジ胎仔5頭中2頭に大脳白質を中心とする脳病変が認められた。

(3) 臍帯圧迫に伴う呼吸様運動及び項部筋電図の変化

(a) 臍帯圧迫開始前の呼吸様運動及び項部筋電図

項部筋電図と呼吸様運動の組み合わせから

3種類のパターンに分類された。(1)規則的な呼吸様運動が認められ、筋電図上は振幅の小さいスパイクが頻発する状態、(2)規則的な呼吸様運動とともに、振幅が不規則で持続の長い筋電活動を認める状態、(3)呼吸様運動が認められず、扇状の筋電バーストが散在する状態であり、それぞれレム睡眠、覚醒、ノンレム睡眠に対応するものと思われた。

(b)臍帯圧迫中の呼吸様運動及び項部筋電図

圧迫前に認められた規則的な呼吸様運動及び扇状の筋電バーストは圧迫開始に伴い速やかに消失した。圧迫開始後心拍数が低下するのにはほぼ一致して、正常時とは異なる吸気運動が頻発し、この傾向は圧迫が反復されるに従い明らかとなった。心拍数が徐脈となり安定した状態になるとそのような吸気運動は消失し、その後は強い吸気運動が10-30秒間隔で出現した。圧迫終了後頻脈になるとともに、同様の強い吸気運動は頻発する傾向があった。

筋電活動は圧迫に伴う心拍数低下時には消失しており、徐脈となり心拍数が安定した時点で振幅の大きい不規則なスパイクの集合が一過性に認められ、その後は振幅が大きく持続の短いスパイクが規則的に出現した。この規則的スパイクには強い吸気運動が伴うこともあった。臍帯圧迫が反復されるに従い規則的スパイクは減少する傾向があった。圧迫終了後心拍数が回復する間は筋電活動は消失していたが、頻脈となって安定した時点で同様のスパイクが頻発した。

呼吸様運動や筋電活動の変化に関しては、脳障害が認められた群と認められなかった群に差はなかった。

(c)反復臍帯圧迫終了後の呼吸様運動及び項部筋電図

圧迫終了後約1時間経過しても、正常の呼吸様運動の回復は認められなかった。脳障害を認めた例で吸気運動の周期的な群発するものがあつた。24時間後に観察を行った一例では、正常の呼吸様運動が回復していた。

筋電活動に関しては、圧迫後しばらくの間は、圧迫中と同様のものか三角状の筋電バーストであつた。脳障害が認められなかった例では、圧迫前に認められた扇状の筋電バーストが認められるまでの時間は5-25分でありその後頻発する傾向にあつたが、脳障害

を認めた例では圧迫終了後一時間経過しても回復しなかった。脳障害のあつた一例では、周期的に出現する振幅の小さい筋電活動を認めた。

D 考察

胎児期においては出生後と異なり、低酸素血症に伴い呼吸様運動や骨格筋の運動が中枢性に抑制されることが知られている。本研究における臍帯圧迫に伴う正常呼吸様運動、筋電活動の消失は、臍帯圧迫により生じた低酸素症によるものと思われる。一方、臍帯圧迫により、正常では認められないような吸気運動や筋電活動が出現することが今回の実験で明らかとなった。このような運動の出現メカニズムとしては、臍帯圧迫では低酸素症以外に高炭酸ガス血症やアシドーシスをもたらすため末梢の化学受容体へのより強い刺激が惹起され、中枢性抑制メカニズムの影響下においても、出生後に現れる反応の一部が顕在化することが考えられる。また、胎児期に存在していると予想される母体からの各種抑制物質(プロスタグランジンE₂やエンドルフィンなど)の供給が一時的に中断されることも何らかの影響を及ぼしている可能性がある。

脳障害が認められなかった群では、30分以内に筋電活動が回復しむしろ昂進する傾向があつたが、脳障害が認められた群では、筋電活動の回復が遅く、また特殊な筋電活動や吸気運動が周期的に現れる傾向があつた。この時点で既に脳障害が発生しているか否かについては不明であるが、臨床的には重要な鑑別点となる可能性がある。

E 結論

ヒツジ胎仔を用いて、反復臍帯圧迫に伴う胎児運動機能の変化について検討し、脳障害発生の有無による相違点を明らかにした。

F.研究発表

丸茂元三、上妻志郎、武谷雄二、他(10):臍帯圧迫による胎児中枢神経細胞傷害1.病態生理学的検討 周産期シンポジウム、1998 16, 37-41

大湯淳功、高島幸男、上妻志郎、武谷雄二、他(4):臍帯圧迫による胎児中枢神経細胞傷害2.病理組織学的検討 周産期シンポジウム、1998 16, 43-48,

脳障害における神経伝達発達異常と発生機序と予防に関する研究

分担研究者 高嶋幸男 国立精神・神経センター神経研究所

研究協力者：斎藤義朗，岡 明，伊藤雅之 同上

水口 雅 自治医科大学小児科

元永耕三，森 裕司 東京大学農学生命科学研究科

研究要旨：Down症候群(DS)では、大脳皮質シナプス密度は少なく、加齢と共に減少するが、その機序は不明である。21番染色体、DS責任領域に遺伝子が確認されたDSCAM 蛋白はダウン症候群では若年では髄鞘に過剰発現し、DSにおける生後の精神運動発達遅滞やシナプス形成の低下に関与していると考えられた。

A. 研究目的

精神遅滞の代表的疾患であるDown症候群(DS)の大脳皮質では、シナプス密度は胎児期には正常であるが、小児期には増加が少なく、成人では20歳を過ぎると、急速に減少する。その機序は不明であるが、原因遺伝子は21番染色体DS責任領域にあると考えられ、この領域の遺伝子機能を観察し、精神遅滞の発生機序を追求してきた。本研究では、最近発見されたDS特有の細胞接着因子(DSCAM) (Yamakawa K, et al. : Hum Mol Genet 7:227-237, 1998)について、ヒト脳における発達と加齢的变化を観察し、同症候群に見られる精神遅滞や早発痴呆の病態形成におけるDSCAMの関与につき検討した。

B. 対象及び方法

対象はDS23例(胎生19週-成人例)と対照18例(胎生35週-70歳)の大脳の前頭葉および小脳半球の組織切片について、抗DSCAM抗体を用いて免疫組織化学的染色を施行した。そのうちDS 1例(2歳)、対照4例の大脳皮質および小脳皮質部を用いてwestern blottingウェスタンブロットを施行した。

C. 結果

1. Western blotting では、ヒトの大脳と小脳で190kDa, 130kDa, 100kDaの3本のバンドが検出された。対照例では190kDaのバンドは胎生30週では見られず、加齢に伴って次第に増強した。2歳DSの大脳および小脳で、190kDa, 130kDaのバンドは対照に比べ強く発現していた。
2. 対照の抗DSCAM免疫組織化学では乳児期以降の大脳および小脳の白質に免疫反応性が見られた。その発現部位の発達的变化は、髄鞘化と強く関係しており、内包、基底核、一次運動野および小脳白質等に新生児期より分布し、乳児期後期には大脳白質にび漫性に発現していた。年長例および成人では、小脳皮質顆粒層および大脳皮質内の線維にも免疫反応性が見られた。円形またはrail road track様の、軸索を縁取る形の免疫反応性が見られた。また、主として乳児期に、Purkinje細胞や大脳皮質錐体神経細胞の一部の胞体に免疫反応性が見られたが、年長例では消失していた。
3. DSでは、前頭葉皮質内のDSCAM免疫反応