

平成 11 年度厚生科学研究費補助金脳科学研究事業

発達機能障害における神経伝達機構の  
解析とその治療研究

研究報告書

主任研究者

国立精神・神経センター

桜川 宣 男

## 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 疾病研究第5部 部長

研究要旨 発達期脳障害の神経伝達機構の解明にあたり、主たる研究テーマは「羊膜細胞の機能と発達期脳障害に果たす役割」に絞り、細胞生物学的、分子生物学的に研究を行った。分担研究者はニューロンの分化、脳発達障害に関する遺伝子の解析と役割について研究を行った。羊膜機能の研究では、羊水中の神経栄養因子、神経伝達物質の測定値が生化学的マーカーとして有用であると示唆された。またラット神経培養神経細胞を用いた実験より、羊膜細胞からは神経栄養作用をもつ未知の物質が分泌されており、同定中である。そして発生初期に発現している神経誘導因子遺伝子が羊膜細胞に発現しており、シグナル伝達系の存在を証明した。羊膜細胞は各種の蛋白を分泌し、胚芽、胎芽の発育に積極的な役割を果たしている可能性が考えられる。脳内ニューロンの位置決定する分子解析では、リーリンとディスエイブルドが重要な遺伝子として働いていることが判明した。大脳皮質の層構造の異形成の原因遺伝子である filamin 1 の機能を解析では、細胞移動に重要なフィロポディアの形成に必須であることが明らかとなった。福山型筋ジストロフィーの遺伝子蛋白 fukutin の機能が皮質形成に関与していることが示唆された。PC12D 細胞によるムスカリン性アセチルコリン受容体が細胞外カルシウムイオンの流入を2種類の異なったチャンネルで活性化していることを証明した。治療法については羊膜細胞の脳内移植法の研究を行った。ラット培養羊膜細胞の実験的虚血動物脳への移植により、長期間の脳内に生着とシンケイ細胞様への分化が観察された。ヒト羊膜のパーキンソンモデルラットへの脳移植により一過性ではあるが、明瞭な改善を認めた。以上より羊膜細胞は多能性の機能を保有している細胞であり、未熟な細胞の存在とその応用が期待される。

## 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

リン、カテコールアミン)、神経栄養因子(BDNF, NT-3)の遺伝子、蛋白レベルの発現を確認した。培養液への分泌についてHPLCにて解析を行い、存在を確認した。妊娠ラットの子宮血管を一時的にクリップする胎児仮死のモデル実験により、虚血側の羊水中では神経伝達物質、神経栄養因子の濃度が有為に上昇していた。

培養羊膜細胞上清にラット培養神経細胞の栄養作用を有する物質の存在が判明した。従来の神経栄養因子と比較検討したところ、新規の物質である可能性が示唆されており、現在同定中である。

発生初期に発現する中胚葉誘導因子であるアクチビンが羊膜より分泌されていることを発見した。その下流の遺伝子である神経誘導因子(chordin, noggin, follistatin)mRNA 発現を確認し、アクチビン添加による noggin 誘導作用を見出した。

## 2. 脳内神経細胞の位置決定メカニズムの解明 (御子柴):

脳内ニューロンの位置決定をする分子の解析を進めた結果、リーリンとディスエイブルドが重要な遺伝子として働いていることが明らかとなった。また、それぞれの変異マウスが、各々リーラマウス、ヨタリマウスとして行動異常をおこす。リーリンとディスエイブルドは、同じ情報伝達系のカスケードの上下関係を示すことが明らかとなった。

## A. 研究目的

発達期脳障害の神経伝達機構の解析にあたり、羊膜細胞の果たす生理的役割および発達期脳障害に対する病理学的意義の解明を主たる目的として研究を行った。分担研究者は基礎的研究の側面より本研究をサポートした(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った。このような研究班構成を基盤として、発達期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. 羊膜細胞の神経伝達物質・栄養因子の合成・分泌能と神経誘導因子の遺伝子発現について(桜川):  
 培養羊膜細胞における神経伝達物質(アセチルコ

### 3. 中枢神経系における細胞の多様性の発生機構(中村):

大脳皮質の層構造の異形成を引き起こす X 染色体に連鎖した脳室周囲結節状異所性灰白質症の原因遺伝子である filamin 1 の機能を細胞レベルで解析し、これが低分子 G 蛋白質 RalA に制御され、フィロポディアの形成に必須であることを明らかにした。また、中枢性グルタミン酸作動性シナプスの発達には神経活動とニューロトロフィンの機能が必要であることを脳由来神経栄養因子 BDNF 遺伝子のノックアウトマウスから作製した脳スライスを用いて明らかにした。

### 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):

神経性 PC12D 細胞のムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)が 2 種類の異なったチャンネル(蓄積作動性または受容体作動性  $Ca^{2+}$ チャンネル)を介して、細胞外  $Ca^{2+}$ の流入を活性化する。これらの 2 チャンネルはイオンチャンネル、開閉キネティックス、protein kinase C(PKC)の制御などに関して異なっている。我々はクローン技術を用いて、受容体作動性チャンネルは TRP6 subtype of non-voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel を必要としていることを証明した。

### 5. 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(岡野):

フェニルケトン尿症ミュータントマウス(PKU)を用いて生後の発達に伴う変化を調べた。生後 4 週まで PKU ホモマウスはワイルドに比べて体重、脳重量ともに軽かった。脳内セロトニンとノルアドレナリン濃度はワイルドマウスでは発達に伴い、急激に増加するが、ホモマウスではわずかに増加するだけであった。海馬 CA3 領域のシナプス濃度を定量化すると、ホモはワイルドに比べ 25% 低下していた。

### 6. ラット羊膜細胞による脳移植治療研究(新井):

ラット培養羊膜細胞は、神経幹細胞としての分化能を有している可能性があり、これらの細胞を実験虚血動物脳に移植すると、長機関にわたり脳内に生着することが確認された。

### 7. 羊胎仔における PVL 発症モデルの開発 (武谷):

脳室周囲白質壊死 (PVL) の実験モデルを、ヒツジ胎仔の反復臍帯圧迫負荷により作製した。そして病変を呈した胎仔では、臍帯圧迫前より他の群に比して血圧が高く、過酸化脂質が高値を示すことが明らかとなり、PVL 発生胎仔は圧迫開始前に何らかの負荷を受けていることが示唆された。

### 8. 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 (高嶋):

福山型筋ジストロフィーの遺伝子蛋白 fukutin の脳における発現の発達の变化を調べ、fukutin は在胎 12

から 19 週の胎児大脳皮質の神経細胞に最も強く認められ、成熟と共に減弱した。胎生期の脳における fukutin 蛋白発現の時間的・空間的变化から、この蛋白の機能が皮質形成に関与し、神経伝達異常をきたすと考えられた。

### 9. 脳の発達障害に関する遺伝子群を解明するための研究 (難波):

自閉症や精神遅滞の遺伝的背景を検討した。日本人自閉症に関連する遺伝子の候補として、serotonin transporter 遺伝子の解析を行ってきたが、本疾患との関連はないとの結論を得た。

## C. 考察

羊膜細胞が神経栄養因子、神経伝達物質、中胚葉誘導因子、神経誘導因子などの遺伝子を発現しており、多機能を有する細胞であることが判明した。羊膜組織は胎生初期に形成され、その分泌蛋白は発生の時期により、胚芽、胎芽、胎児などの発達に影響を及ぼしていることが推測できる。今後羊膜細胞の機能解析が更に進むことにより、その重要性は益々判明してくるだろう (桜川)。

ヒト脳の構築のうえで、最も重要な課題である神経細胞の位置決定メカニズムの解明を進めて、リーリンとディスアブルの二つの重要な分子を明らかにし、これらの異常によりニューロンの位置異常がおきることが明らかとなったことは大きな成果である。今後、これらをプローブとして、ヒト疾患のスクリーニングも可能となると考える (御子柴)。

神経上皮組織にはお互いに異なる位置情報を持つ多能性神経幹細胞が存在し、まず胚の体軸に沿った位置情報にしたがって神経系のことなる系譜に分化する。誕生しつつある神経細胞の運動性は高く、移動の障壁、停止のシグナルを受け取るまで移動すると思われる (中村)。

生体アミンによるシナプスの形成維持機能の低下による精神遅滞の発生機構仮説が正しいことが、PKU マウスにおけるシナプス密度の低下より確認された (岡戸)。

在胎 20 週前後の FCMD 脳では、皮質神経細胞が脳表の limiting membrane を穿通し、表層に神経細胞が不規則に配列した表層皮質を形成している過程が分かる。その神経細胞穿通機序は、limiting membrane の欠損が原因であると考えられているが、未だ明確にされていない。今回の fukutin による免疫組織化学的染色では、免疫化学的に神経細胞の方に異常が認められ、limiting membrane は Cajal-Retzius 細胞、subpial granular layer、皮質内神経細胞など、神経細胞の働きと関係深いと考えられる (高嶋)。

#### D. 結論

羊膜細胞から種々の蛋白質が分泌されるが、発達のステージにより胚芽、胎芽、胎児などへの発育に重要な役割を果たしていると考えられる。特に神経誘導因子、神経栄養因子、神経伝達物質などの分泌機能は今後重要な課題となると考える。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Takahashi T, Ohsugi K, Naganawa Y, Yamamoto T, Shiomi M, Sakuragawa N: A novel approach to ex vivo gene therapy for familial hypercholesterolemia using human amniotic epithelial cells as a transgene carrier. Submitted.

2) Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, Tashiro T, Okuyama T, Suzuki S.: Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers of allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Gen* In press.

3) Kosuga M, Okuyama T, Takahashi S, Sasaki K, Enosawa S, Li X-K, Okuyama S, Jujino M, Suzuki S, correction in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of human amniotic epithelial cells after adenovirus mediated gene transfer. *Cell Transpl*. In press.

4) Terada S, Matsuura K, Enosawa S, Miki M, Hoshika A, Suzuki S, Sakuragawa N.: Inducing proliferation of human amniotic epithelial cells for cell therapy. *Cell Transpl*. In press.

5) Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N: Human amniotic epithelial cells Produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: A potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol* In press.

6) Ohsugi K, Kobayashi K, Itoh K, Sakuraba H, Sakuragawa N: Enzymatic corrections for cells derived from Fabry disease patients by a recombinant adenovirus vector. *J Hum Genet* 45:1-5, 2000

7) Elwan MA, Sakuragawa N: Characterization of [<sup>3</sup>H]mazindol binding sites in cultured monkey amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 279:37-40, 2000

8) Ishii T, et al. Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using *Neurosci Lett* 268:131-134, 1999

9) Elwan MA, et al. Detection of dopamine D2 receptor mRNA and binding sites in monkey amniotic

epithelial cells. *J Neurosci Res* 56:316-322, 1999

10) 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

11) Sakuragawa N, Uchida S, Inanaga Y, et al. Synthesis and release of Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human amniotic epithelial cells. (Abstract) *Ann Neurol* 46:538, 1999

12) Sakuragawa N et al. Possible dynamic neurotransmitter metabolism surrounding the fetus. *J Child Neurol* 14: 265-266, 1999

13) 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

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

15) Kabayama H et al.: Functional involvement of synaptotagmin I/II C2A domain in neurite outgrowth of chick dorsal root ganglion neuron. *Neurosci* 88: 999-1003, 1999

16) Zhu C et al. : Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor down-regulation is activated directly by inositol 1,4,5-trisphosphate binding. *J Bio Chem* 274: 3476-3484, 1999

17) Tamura H et al. Molecular cloning expression and characterization of a phenol sulfotransferase cDNA from mouse intestine. *Biol Pharm Bull* 22: 234-239, 1999

18) Yoshikawa F et al.: High efficient expression of the functional ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 257:792-797, 1999

19) Ohmori H et al. Developmental neurotoxicity of phenytoin on granule cells and Purkinje cells in mouse cerebellum. *J Neurochem* 72:1479-1506, 1999

20) Yoshiyuki K et al.: transcriptional regulation of mouse type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene by neuroD-related factor. *J Neurochem* 72: 1717-1724, 1999

21) Ohkawa N et al.: Activation of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 promoter by AP-2. *Gene* 229: 11-19, 1999

22) Mikoshiba K, et al. Role of synaptotagmin, a Ca<sup>2+</sup> and inositol polyphosphate binding protein,

in neurotransmitter release and neurite outgrowth. *Chemistry and Physics of Lipids* 98: 59-67, 1999

23) Hamada T et al.: The role of inositol trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release from IP<sub>3</sub>-receptor in the rat supra-chiasmatic nucleus on circadian entrainment mechanism. *Neuroscience Lett* 263:125-128, 1999

24) Natsume T et al. Real time analysis of interaction between inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 and its ligand. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 527-533, 1999.

25) Koga C et al.: Characterization of a novel member of the FGF family, XFGF-20, in *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res Commun* 261:756-765, 1999

26) Michikawa T et al.: Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of the cerebellar type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 23: 799-808, 1999

27) Hirota J et al.: Calmodulin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate induced calcium release through the purified and reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *FEBS Letter* 456: 322-326, 1999

28) Nagata E et al.: Selective inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca<sup>2+</sup> release in the CA1 region of the hippocampus in the ischemic gerbil. *Neurosci* 93: 995- 1001,1999.

29) Ishii T et al.: Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type specific expression system. *Neurosci Lett* 268: 131-134, 1999.

30) Mitsuyama F et al.: Microinjection of Ca<sup>2+</sup> store-enriched microsome fractions to diving newt eggs induces extra-cleavage furrows via inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca<sup>2+</sup> release. *Developmental Biol* 214:160-167, 1999.

31) Hayashi M et al. Intracellular calcium concentration in the inositol trisphosphate receptor type 1 knockout mouse. *J Am Soc Nephrol* 10: 2094-2101, 1999.

32) Shiraishi Y, et al.: Cupidin, an isoform of homer/vesel, interacts with the actin cytoskeleton and activated Rho family small GTPase and is expressed in developing mouse cerebellar granule cells. *J Neurosci* 19:8389-8400, 1999

33) Fukuda M et al. A novel alternatively spliced variant of synaptotagmin VI lacking a transmembrane domain; implications for distinct functions of the two isoforms. *J Biol Chem* 274: 31428-31434, 1999.

34) Fukuda M et al.: Conserved N-terminal cysteine motif is essential for homo and heterodimer formation

of synaptotagmins III, V, VI and X. *J Biol Chem* 274: 31421-31427, 1999.

35) Boulay G et al.: Modulation of Ca<sup>2+</sup> entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor (IP<sub>3</sub>R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP<sub>3</sub>R in store depletion activated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14955- 14960, 1999.

36) Sugiyama T et al.: Alteration of the increase in intracellular [Ca<sup>2+</sup>] in proliferating smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264:774-776,1999.

37) Futatsugi A. et al: Facilitation of NMDA receptor- independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *Neuron* 24: 701-713, 1999.

38) Hirota J et al.: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is a substrate for caspase-3 and is cleaved during apoptosis in a caspase-3-dependent manner. *J Biol Chem* 274:34433- 34437, 1999.

39) Baylis HA et al.: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are strongly expressed in the nervous system, pharynx, intestine, gonad and excretory cell of *Caenorhabditis elegans* and are encoded by a single gene (*itr-1*). *J Mol Biol* 294:467-476, 1999.

40) Ohta Y et al. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia; *Proc Natl Acad. Sci USA*. 96:2122-2128, 1999.

41) Maeshima T et al.: The central distribution pattern of primary afferent fibers innervating the thigh muscle posterior iliotibialis in the chicken. *J Brain Res*. 39: 383-390, 1999.

42) Ohyu J et al.: Early axonal and glial pathology in fetal sheep brains with leukomalacia induced by repeated umbilical cord occlusion. *Brain Dev* 21: 248-252, 1999.

43) Oka A et al.: The up-regulation of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in Down syndrome brains. *Act Neuropath (Berlin)* 97: 275-278, 1999.

44) Sohma O et al.: Expression of protective protein in human tissue. *Pediatr Neurol* 20: 210-214, 1999.

45) Saito Y et al.: Dopamine receptor upregulation in Lesch-Nyhan syndrome: a post-mortem study. *Neuropediatr* 30: 1-6, 1999.

46) Meng SZ et al.: Developmental expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the human cerebellum and brainstem. *Brain and*

Dev 21: 30-35, 1999.

47) Iai M et al.: Thalamocortical development of parvalbumin neurons in normal and periventricular leukomalacia brains. *Neuropediatr* 30: 14-18, 1999.

48) Deguchi K et al. Periventricular leukomalacia: relation to gestational age and axonal injury. *Pediatr Neurol* 20: 370-374, 1999.

49) Ozawa Y et al.: Catecholaminergic neurons in the diencephalon and basal ganglia of SIDS. *Pediatr Neurol* 21: 471-475, 1999.

50) Arai N et al.: Developmental of telencephalin in the human cerebrum. *Microscopy Research and Technique* 46: 18-23, 1999.

51) Meng SZ et al.: Expression of transforming growth factor-beta1 in periventricular leukomalacia. *J Child Neurol* 14: 377-381, 1999.

52) Itoh M et al.: A novel peroxisomal enzyme, D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein: its expression in the developing human brain. *Microscopy Research and Technique* 45: 383-388, 1999.

53) Saito Y et al.: Changes of neurotransmitters in the brainstem of patients with respiratory-pattern disorders during childhood. *Neuropediatrics* 30: 133-140, 1999

54) Zhang H et al.: Mutational analysis of TSC1; and TSC2 genes in Japanese patients with tuberous sclerosis complex. *J Hum Genet* 44: 391- 396, 1999.

55) Kono Y et al.: Analysis of the CAG repeat number in patient with Huntington's disease. *Internal Medicine* 38: 407-411, 1999.

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

## 羊膜細胞の神経伝達物質・栄養因子の合成・分泌能と 神経誘導因子の遺伝子発現について：

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** 我々は昨年度までの研究において、羊膜細胞における神経伝達物質、神経栄養因子の合成・分泌能について報告した。そこで本年度は羊膜細胞の *in vivo* での役割を検討した。初めに羊水中の神経伝達物質、神経栄養因子、アクチピンを測定し、その存在を確認した。次にラット胎児仮死ラットモデルにおいて、神経伝達物質、神経栄養因子、アクチピン濃度は虚血側の羊水では有為に上昇していた。以上より、羊膜が上記の生物活性物質を羊水中に分泌し、子宮環境の変化（虚血）による胎児仮死モデルにおいて、これらの物質が有為に上昇することが判明した。そしてヒト胎児仮死において *α*-コルミンと同様に神経栄養因子及びアクチピンは生化学的変動のマーカーになると考える。つぎに羊膜が胎生初期に発生することより、神経誘導因子 (*chordin*, *noggin*, *follistatin*) について検索した。RT-PCR により mRNA レベルでの発現を確認し、アクチピンの培養液への添加実験により、*noggin* mRNA の増強を Northern blot で確認した。これより羊膜には、胎生初期の遺伝子も発現していて、シグナル伝達系も存在することが判明した。

### A. 研究目的

胎児環境をめぐる神経伝達物質など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、神経伝達物質および神経栄養因子を合成・分泌する細胞であり、羊水中にもこれら物質が存在することを証明した。そしてアセチルコリン、カテコールアミン受容体が存在し、機能している証拠を提示した。そこで本年度はラット胎児仮死モデルを作製し、羊水中の上記生体活性物質の変動を調べた。そして、その濃度の有為なる上昇を認めただけで報告し、その意義について検討した。

一方羊膜細胞が胎生初期に形成されることより、神経誘導因子の存在について検討した。そして分泌の確認されているアクチピンを培養系に添加する実験系により、アクチピンシグナル伝達系についても検索した。この実験により、羊膜細胞には胎生初期に発現する遺伝子が発現していたので、その意義について検討した。

### B. 研究方法

羊膜細胞および羊水はインフォームドコンセントを施行後に、帝王切開分娩時に入手した。そして既報のごとくに羊膜細胞を分離、培養した。

(1)ラットおよびヒト羊水中の神経栄養因子、神経伝達物質およびアクチピンを既報のごとく測定した。ラットの胎児仮死モデルは妊娠ラット(E18)の一側子宮血管を1時間クリップし、血流再開後

1-2日に羊水を採取した。そして上記の生物活性物質を測定し、健康側と比較した。

(2)神経誘導物質の遺伝子発現については、羊膜組織と培養羊膜細胞の *chordin*, *noggin*, *follistatin* 遺伝子の発現を RT-PCR で検討した。つぎにアクチピンを培養羊膜細胞に添加し、細胞内の上記神経誘導因子の増強の有無を northern blot で調べた。

### C. 研究結果

(1) 羊水中には神経栄養因子(BDNF, NT-3)、神経伝達物質(ACh, CA)及びアクチピンが測定できた。妊娠ラット (E18) の子宮血管を一過性 (1時間) クランプしてから、血流を再開した。そして1または2日後に、羊水を採取して上記の生物活性物質を測定した。その結果、NT-3 は 1.36→3.46 pg/ml (24 hr), アクチピンは 1.58→2.16 ng/ml (48 hr) であり、虚血羊水では有為に上昇していた。カテコールアミンは (NE; 174.1→260.1, DA; 22.0→31.7, DOPAC; 12.9→20.9 (ng/ml) (48 hr) と同様に有為に上昇していた。

(2) 神経誘導因子である *chordin*, *noggin*, *follistatin* の遺伝子発現は、RT-PCR にて確認された。アクチピンを培養液に添加したところ、*noggin* mRNA の増強が northern blot にて証明された。

### D. 考察

(1)羊水中の神経栄養因子、神経伝達物質の存在と胎児仮死モデルにおける上昇について：

・胎児仮死の羊水における生化学的指標として $\beta$ -endorphinが有用であると報告されていた。そして胎児由来のカテコールアミンが、胎児へのストレスにより分泌されて羊水中に上昇すると考えられている。我々は羊膜細胞が神経栄養因子、神経伝達物質を合成・分泌し、羊水中に供給している可能性を示した。すると胎児仮死などのストレスによるこれらの物質の羊水中の上昇は、羊膜からの分泌が亢進するか、再吸収が阻害されるかいずれかと考えられる。胎児仮死の羊水マーカーが実用化されていない現在、今後の臨床での追試が望まれる。

(2) (1)神経誘導因子の遺伝子発現とアクチビンシグナル伝達系の存在について：

羊膜細胞は胎生8日目に外胚葉盤が2分し、栄養胚盤側が羊膜組織となる。他側から神経板などの胚組織が形成されて胎児となる。従って、早期の遺伝子、即ち神経誘導因子などが発現している可能性が予測される。我々はRT-PCRにてchordin, noggin, follistatin mRNAの発現を確認した。そして、アクチピンを細胞培養液に添加してこれらの遺伝子発現の変化を検討したところ、noggin遺伝子の発現増強が観察された。ヒトの生体材料において胎生初期の遺伝子が発現しており、かつそのシグナル伝達系が存在していることは、重要な意味をもっている。即ち羊膜細胞から分泌される神経誘導因子が、胚性外胚葉へ作用している可能性が示唆される。

E. 結論

羊水中に神経栄養因子、神経伝達物質が存在すること証明し、胎児仮死モデルにおいて上昇することを明らかにした。そして羊膜細胞には、神経誘導因子の遺伝子発現し、アクチビンシグナル伝達系が存在することを証明した。

1)Takahashi T, Ohsugi K, Naganawa Y, Yamamoto T, Shiomi M, Sakuragawa N: A novel approach to ex vivo gene therapy for familial hypercholesterolemia using human amniotic epithelial cells as a transgene carrier. Submitted.

2) Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, Tashiro T, Okuyama T, Suzuki S.: Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers of allogeneic cell transplantation into liver. J Hum Gen In press.

3) Kosuga M, Okuyama T, Takahashi S, Sasaki K, Enosawa S, Li X-K, Okuyama S, Jujino M, Suzuki S,

Yamada M, Matsuo N, Sakuragawa N: Phenotype correction in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of human amniotic epithelial cells after adenovirus mediated gene transfer. Cell Transpl. In press.

4) Terada S, Matsuura K, Enosawa S, Miki M, Hoshika A, Suzuki S, Sakuragawa N.: Inducing proliferation of human amniotic epithelial cells for cell therapy. Cell Transpl. In press.

5) Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N: Human amniotic epithelial cells Produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: A potential source of donor for transplantation therapy. Exp Neurol In press.

6) Ohsugi K, Kobayashi K, Itoh K, Sakuraba H, Sakuragawa N: Enzymatic corrections for cells derived from Fabry disease patients by a recombinant adenovirus vector. J Hum Genet 45:1-5, 2000

7) Elwan MA, Sakuragawa N: Characterization of [ $^3$ H]mazindol binding sites in cultured monkey amniotic epithelial cells. Neurosci Lett 279:37-40,2000

8)Ishii T, et al. Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using Lett 268:131-134,1999

9) Elwan MA, et al. Detection of dopamine D2 receptor mRNA and binding sites in monkey amniotic epithelial cells. J Neurosci Res 56:316-322,1999

10) 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

11) Sakuragawa N, Uchida S, Inanaga Y, et al. Synthesis and release of Brain-derived Neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human amniotic epithelial cells.(Abstract) Ann Neurol 46:538,1999

12) Sakuragawa N et al.Possible dynamic neurotransmitter metabolism surrounding the fetus. J Child Neurol 14: 265-266, 1999



厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

## 脳内神経細胞の位置決定メカニズムの解明

分担研究者

御子柴克彦

東京大学医科学研究所

研究要旨 脳内ニューロンの位置決定をする分子の解析を進めた結果、リーリンとディスエイブルドが重要な遺伝子として働いていることが明らかとなった。また、それぞれの変異マウスが、各々リーラーマウス、ヨタリマウスとして行動異常をおこす。リーリンとディスエイブルドは、同じ情報伝達系のカスケードの上下関係を示すことが明らかとなった。

### A. 研究目的

脳神経細胞の移動・配置決定機構の解明

脳内の神経細胞に位置異常が見られる様々な突然変異マウスを利用し、発生過程で各神経細胞がいかんしてそれぞれ特異的に配置されるのかを分子生物学・細胞生物学・形態学・構造生物学的手法を駆使して明らかにする。

### B. 研究方法

脳内ニューロンの位置決定のための細胞生物学的アッセイ系の確立を行った。また、遺伝子工学的手法を導入することにより、リーリンやdisabled-1,cdk-5などの構造解析や発現実験を行った。

### C. 研究結果

脳内の神経細胞の配置決定に重要な役割を担う各種分子の解析を、主としてそれらの変異マウスを利用して行っている。まず、リーリン/CR-50抗原については、その機能阻害抗体CR-50の認識部位は有するものの、リーリンを特徴づけている"リーリンリピート領域"（全体の85%を占める）を完全に欠損する新規分子をゼノパス及びマウスより複数発見した。これらの新規分子は、現在報告されているリーリン受容体と結合する領域を持たないことから、その機能が何か興味深い。これらの発現パターンを全長リーリンと比較したところ、発現量は低いものの同様な組織分布を示すことが明らかになった。また、全長リーリン同士がCR-50認識部位を介してホモポリマーを作ることとも明らかになった。このポリマー形成は、機能阻害可能な濃度でのCR-50抗体の処理により完全に阻害されることから、機能上の重要性が示唆された。また、神経細胞移動の人為的制御を可能とする培養系として、胎生期の小脳原基の器官培養とリーリン強制発現細胞とを共培養することにより、外来性のリーリンが、リーリンを欠損したミュータントマウスであるリーラーのプルキンエ細胞の異常な移動を改善するということが明らかになった。現在更に各種変異体リーリンを作成し、影響を調べている。更に、リーリンシグナルを受け取る側の細胞内分子Disabled-1の異常であるヨタリマウスの解析も行った。ヨタリマウスは我々の研究室で単離された突然変異マウスであり、その表現型は、大脳皮質層構造逆転等、リーラーマウスと同様である。本年度は、ヨタリのDisabled-1遺伝子断片を単離し、そのゲノム解析をPCRを用いて行った。その結果、機能的に重要なPTBドメイン付近の遺伝子構造を明らかにするとともに、ヨタリにおいては、disabled-1遺伝子にL1レトロトランスポゾンの挿入があり、ゲノムの一部を欠損していることが分かった。この結果を基に、PCRを用いたヨタリ変異の簡便な同定法も開発した。また、Cdk5, p35も神経細胞の配置決定に重要な役割をする細胞内分子であるが、両欠損マウス及びCdk5<sup>-/-</sup>キメラマウスの解析により、Cdk5/p35キナーゼ活性自体が、大脳皮質細胞のみならず、プルキンエ細胞、小脳顆粒細胞の移動・位置決定に必須である事を明らかにした。

#### D. 考察

ヒト脳の構築のうえで、最も重要な課題である神経細胞の位置決定メカニズムの解明を進めて、リーリンとDiab1の二つの重要な分子を明らかにすることができ、これらの異常によりニューロンの位置異常がおきることが明らかとなったことは大きな成果である。今後、これらをプローブとして、ヒト疾患のスクリーニングも可能となると考える。

#### E. 結論

脳内情報処理機能の基盤となるニューロンの位置決定構築が、リーリンとdiab1という二つの分子が大きく、関わっていることが明らかとなった。しかも、両分子は一つの情報伝達系の上流、下流を占めており、両者が正常に発現することが脳内ニューロンの位置決定に必須であることを明らかにした。

#### F. 研究発表

1. 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)
2. 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)
3. Kabayama,H.,Takei,K.,Fukuda,M.,Ibata,K. and Mikoshiba,K.: Functional involvement of synaptotagmin I/II C2A domain in neurite outgrowth of chick dorsal root ganglion neuron. **Neuroscience**, 88 999-1003 (1999)
4. Zhu,C., Furuichi,T., Mikoshiba,K. and Wojcikiewicz,R.J.H.: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor down-regulation is activated directly by inositol 1,4,5-trisphosphate binding. **J.Biol.Chem.** 274 3476-3484 (1999)
5. Tamura,H., Miyawaki,A., Yoneshima,H., Mikoshiba,K. and Matsui,M.: Molecular cloning, expression and characterization of a phenol sulfotransferase cDNA from mouse intestine. **Biol. Pharm. Bull.** 22 234 - 239 (1999)
6. Yoshikawa,F., Uchiyama,T., Iwasaki,H., Tomomori-Satoh,C., Tanaka,T., Furuichi,T. and Mikoshiba,K.: High efficient expression of the functional ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in Escherichia coli **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 257 792-797 (1999)
7. Ohmori,H., Ogura, H., Yasuda,M., Nakamura,S., Hatta,T., Kawano,K., Michikawa,T., Yamashita,K. and Mikoshiba,K. : Developmental neurotoxicity of phenytoin on granule cells and Purkinje cells in mouse cerebellum. **J. Neurochem.**, 72 1497 - 1506 (1999)
8. Yoshiyuki,K., Ohkawa,N., Makino,Y., Ohkubo,H., Kageyama,R.,Furuichi,T., Mikoshiba,K.and Tamura,T.: Transcriptional regulation of mouse type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene by neuroD-related factor. **J.Neurochem.**, 72 1717-1724 (1999)
9. Ohkawa,N.,Konishi,Y.,Shimada,M.,Makino,Y.,Yoshikawa,S.,Mikoshiba,K. and Tamura,T.: Activation of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 promoter by AP-2. **Gene**, 229 11-19 (1999)
10. Mikoshiba,K., Fukuda,M.,Ibata,K.,Kabayama,H. and Mizutani,A.: Role of synaptotagmin , a Ca<sup>2+</sup> and inositol polyphosphate binding protein, in neurotransmitter release and neurite outgrowth **Chemistry and Physics of Lipids**, 98 59-67 (1999)
11. Hamada,T.,Liou.S.Y.,Fukushima,T.,Maruyama,T.,Watanabe,S.,Mikoshiba,K. and Ishida,N.: The role of inositol trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release from IP<sub>3</sub>-receptor in the rat suprachiasmatic nucleus on circadian entrainment mechanism. **Neuroscience. Letters**, 263 125-128 (1999)
12. Natsume,T.,Hirota,J.,Yoshikawa,F.,Furuichi,T. and Mikoshiba,K.: Real time analysis of interaction between inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 and its ligand. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 260 527-533 (1999)
- 13.Koga,C.,Adati,N.,Nakata,K.,Mikoshiba,K.,Furuhata,Y.,Sato,S.,Tei,H.,Sakaki,Y.,Kurokawa,T.,Shiokawa,K. and Yokoyama,K.: Characterization of a novel member of the FGF family, XFGF-20, in Xenopus laevis.**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 261 756-765 (1999)

14. Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiraoka, M., Yamada, M., Furuichi, T. and Mikoshiba, K.: Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of the cerebellar type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. **Neuron**, 23 799-808 (1999)
15. Hirota, J., Michikawa, T., Natsume, T., Furuichi, T. and Mikoshiba, K.: Calmodulin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release through the purified and reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. **FEBS Letters**, 456 322-326 (1999)
16. Nagata, E., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., Fukuuchi, Y., Futatsugi, A. and Mikoshiba, K.: Selective inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release in the CA1 region of the hippocampus in the ischemic gerbil. **Neuroscience**, 93 995-1001 (1999)
17. Ishii, T., Ohsugi, K., Nakamura, S., Sato, K., Hashimoto, M., Mikoshiba, K. and Sakuragawa, N.: Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type-specific expression system. **Neuroscience Letters**, 268 131-134 (1999)
18. Mitsuyama, F., Sawai, T., Carafoli, E., Furuichi, T. and Mikoshiba Katsuhiko.: Microinjection of Ca<sup>2+</sup> store-enriched microsome fractions to diving newt eggs induces extra-cleavage furrows via inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release. **Developmental Biology**, 214 160-167 (1999)
19. Hayashi, M., Monkawa, T., Yoshida, T., Sasamura, H., Matsumoto, M., Inoue, T., Mikoshiba, K. and Saruta, T.: Intracellular calcium concentration in the inositol trisphosphate receptor type 1 knockout mouse. **J Am Soc Nephrol**, 10 2094-2101 (1999)
20. Shiraishi, Y., Mizutani, A., Bito, H., Fujisawa, K., Narumiya, S., Mikoshiba, K. and Furuichi, T.: Cupidin, an isoform of homer/vesel, interacts with the actin cytoskeleton and activated Rho family small GTPases and is expressed in developing mouse cerebellar granule cells. **J. Neurosci.**, 19 8389-8400 (1999)
21. Fukuda, M. and Mikoshiba, K.: A novel alternatively spliced variant of synaptotagmin VI lacking a transmembrane domain ; implications for distinct functions of the two isoforms. **J. Biol. Chem.** 274 31428-31434 (1999)
22. Fukuda, M., Kanno, E. and Mikoshiba, K.: Conserved N-terminal cysteine motif is essential for homo and heterodimer formation of synaptotagmins III, V, VI and X. **J. Biol. Chem.**, 274 31421-31427 (1999)
23. Boulay, G., Brown, D.M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M.X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K. and Birnbaumer, L.: Modulation of Ca<sup>2+</sup> entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion activated Ca<sup>2+</sup> entry. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96 14955-14960 (1999)
24. Sugiyama, T., Hasegawa, K., Yanai, N., Mikoshiba, K., Obinata, M. and Matsuda, Y.: Alteration of the increase in intracellular [Ca<sup>2+</sup>] in proliferating smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 264 774-776 (1999)
25. Futatsugi, A., Kato, K., Ogura, H., Li, S-T., Nagata, E., Kuwajima, G., Tanaka, T., Itoharu, S. and Mikoshiba, K.: Facilitation of NMDA Receptor-Independent LTP and Spatial Learning in Mutant Mice Lacking Ryanodine Receptor Type 3. **Neuron** 24 701-713 (1999)
26. Hirota, J., Furuichi, T. and Mikoshiba, K.: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is a substrate for caspase-3 and is cleaved during apoptosis in a caspase-3-dependent manner. **J. Biol. Chem.** 274 34433-34437 (1999)
27. Baylis, H.A., Furuichi, T., Yoshikawa, F., Mikoshiba, K. and Sattelle, D.B.: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are strongly expressed in the nervous system, pharynx, intestine, gonad and excretory cell of *caenorhabditis elegans* and are encoded by a single gene (*itr-1*). **J. Mol. Biol.** 294 467-476 (1999)

## 中枢性神経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 大脳皮質の層構造の異形成を引き起こす X 染色体に連鎖した脳室周囲結節状異所性灰白質症の原因遺伝子である filamin 1 の機能を細胞レベルで解析し、これが低分子量 G 蛋白質 RalA に制御され、フィロポディアの形成に必須であることを明らかにした。また、中枢性グルタミン酸作動性シナプスの発達には神経活動とニューロトロフィンの機能が必要であることを脳由来神経栄養因子 BDNF 遺伝子のノックアウトマウスから作製した脳スライスを用いて明らかにした。

### A. 研究目的

神経細胞の多様性は神経上皮組織を構成する神経幹細胞の増殖と分化の過程で獲得される。神経系細胞はニューロン、グリアに分化するに先立ち、体幹上の前後軸、背腹軸にそった位置情報を付与されていて、この情報はニューロンの最終的な表現型である神経伝達物質合成能、大脳皮質内の機能領野特性、さらに回路形成の特異性を規定する。この一連の過程を制御している分子機構の研究は近年急速に発展しているが哺乳動物に関してはなお多くの点が不明である。神経系の多様性の発生で重要なことは、この過程が遺伝子プログラムに従って進行するのみならず、神経の活動によってその最終的な表現型が規定されていることである。神経細胞の結合性が神経活動によって調節されることは神経の可塑性と呼ばれている。我々は神経細胞の多様性の分子機構を遺伝子プログラムと可塑性の両面から解明する。

### B. 研究方法

我々はすでに神経上皮組織からニューロンおよびマクログリアに分化しうる多能性幹細胞株を樹立しているが、この培養細胞系を用いて位置情報が神経細胞の多様性を規定する仕組みを解析する。さらに個体にたいする移植実験を行って細胞の固有の情報と細胞外の環境因子との相互作用について解析をすすめる。ついで、胚に対する遺伝子導入技術を確認し、特定の遺伝子が脳の形態形成、回路形成に及ぼす影響を解析する。一方、可塑性を解析する目的で、脳スライスを用いて神経結合の発達を電気生理学的に解析するとともに、回路形成を視覚化するために神経活動の光学的計測法を確立する。神経可塑性における遺伝子機能を解明するためにはノックアウトマウスを用い、また脳スライスに対して特異抗体を用いるなどして可塑性に関わる細胞内情報伝達過程を解析する。

### C. 研究成果

1) 大脳皮質は神経上皮細胞の周期的な分裂と移動によって層構造を形成していることが知られているが皮質形成の異常により高次脳機能傷害が生ずることが知られている。我々は脳室周囲に皮質ニューロ

ンの異形成を生ずる疾患の原因遺伝子として同定されたフィラミンが培養細胞のレベルでは細胞移動に重要なフィロポディアの形成に必須であることを明らかにした。

2) 神経回路形成過程を解析するために脳スライスを用いて神経活動を光学的に計測する実験系を確立した。この方法を用い、中枢性グルタミン酸作動シナプスの発達には神経活動とニューロトロフィンの機能が必要であることを明らかにした。

### D. 考察

複雑な形態と回路からなる脳は神経上皮組織に存在する多能性神経幹細胞の増殖と分化をへて形成されたものであるが、まず、胚の体軸にそった位置情報に従って神経系の異なる系譜に分化する。誕生しつつある神経細胞の運動性は高く、移動の障壁、停止のシグナルを受け取るまで移動すると思われる。ついで、移動を停止した部位で軸索を伸ばし、標的にシナプス結合を形成する。この過程は特に神経活動への依存性が高い。我々はこれまでの研究により、これらの諸過程を解析する新規な方法を確認し、重要な知見を得ることができた。今後は高次脳機能の基盤である大脳皮質の特定の機能領野の形成に焦点を絞り、多様な方法を統合して解析を進める。

### E. 結論

神経上皮組織には互いに異なる位置情報をもつ多能性神経幹細胞が存在し、細胞自律的機構および環境因子の作用で分化、移動を行い神経回路を形成する。さらに神経結合は神経活動に依存した可塑的機構で彫琢され高次脳機能を担う複雑な回路が形成される。

### F. 研究発表

1. Ohta Y, Suzuki N, Nakamura S, Hartwig JH, Stossel TP. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96, 2122-2128.
2. Itami C, Mizuno K, Kohno T, Nakamura S. Brain-derived neurotrophic factor requirement for activity-dependent maturation of glutamatergic synapse in developing mouse somatosensory cortex; Brain Res. in press.

厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

発達障害に関する研究

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 used pharmacologic techniques to show that muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) in neuronal PC12D cells activate the influx of extracellular  $Ca^{2+}$  via two distinct pathways: store-operated  $Ca^{2+}$  channels and receptor-operated  $Ca^{2+}$  channels. These two channels differ with respect to ion permeability, kinetics of opening and closing, and regulation by protein kinase C (PKC). Using molecular cloning techniques we showed that the receptor-operated channel requires expression of the TRP6 subtype of non-voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel.

**A. 研究目的**

The object of our research was to determine the molecular mechanisms underlying the activation of  $Ca^{2+}$  influx mediated by mAChR in the cell line PC12D.

**B. 研究方法**

Intracellular  $Ca^{2+}$  levels were determined using a Jasco fluorospectro-photometer or a Hamamatsu Photonics Argus-50  $Ca^{2+}$  imaging system to measure  $Ca^{2+}$ -dependent changes in fluorescence in PC12D cells preloaded with the  $Ca^{2+}$ -sensitive dye fura-2-AM. In addition, activation of  $Ca^{2+}$ -permeable channels in the cellular membrane was assessed using  $Mn^{2+}$  or  $Ba^{2+}$  in place of  $Ca^{2+}$ .  $Mn^{2+}$  and  $Ba^{2+}$  enter the cells through many types of  $Ca^{2+}$  channels and are useful tools for observing the opening and closing of  $Ca^{2+}$  channel.  $Mn^{2+}$  quenches fura-2 fluorescence upon entering the cell, allowing the opening of the channels to be detected as an increase in the rate of quenching of intracellular fura-2.  $Ba^{2+}$ , on the other hand, increases fura-2 fluorescence, but unlike  $Ca^{2+}$  cannot be expelled from the cell once it has entered.  $Ba^{2+}$  is therefore useful for assessing at the influx component of  $Ca^{2+}$  intracellular levels. Rat homologs of the mouse TRP6  $Ca^{2+}$  channel cDNAs were isolated using a RT-PCR-based cloning strategy. These cDNAs were sequenced using an ABI Prism™ 377-18 DNA sequencer, and subcloned in the mammalian expression vector pBOS, and transfected into PC12D cells using standard techniques. Antibodies were prepared by immunizing rabbits with a synthetic 17-mer oligopeptide with a sequence corresponding to that of the carboxyterminal segment of rat TRP6

**C. 研究成果**

Using  $Ba^{2+}$  as a tracer for  $Ca^{2+}$ , we were able to identify a  $Ca^{2+}$  channel that specifically opens following activation of mAChR in PC12D cells. This  $Ca^{2+}$  channel is not significantly activated following depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores by thapsigargin, however, suggesting that it is a receptor-activated  $Ca^{2+}$  channel (ROCC) and not a store-operated  $Ca^{2+}$  channel (SOCC). Pharmacologic studies of this ROCC showed it to have the following properties: 1) It rapidly opens in following stimulation of mAChR with carbachol and rapidly closes following the inactivation of mAChR with atropine. 2) It closes within 2 or 3 minutes in the continued presence of carbachol. 3) It is strongly inhibited following activation of PKC with phorbol ester. 4) It is permeable to  $Ba^{2+}$  and  $Na^{+}$  in the absence of extracellular  $Ca^{2+}$ , but does not significantly pass these ions in the presence of extracellular  $Ca^{2+}$ ; it is relatively impermeable to  $Mn^{2+}$ . 5) It is activated by the diacylglycerol (DAG) analogs 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) and 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol (SAG). By contrast, the SOCC channel in PC12D cells have the following properties: 1) it is slow to open following stimulation of mAChR with carbachol and closes only after a lag of 60 to 90 sec following the inactivation of mAChR with atropine. 2) It remains open for at least for 30 min or more in the continued presence of carbachol. 3) It is not inhibited by phorbol ester. 4) It is relatively impermeable to  $Ba^{2+}$  and  $Na^{+}$ , but is permeable to  $Mn^{2+}$ , even in the presence of extracellular  $Ca^{2+}$ . Expression of rat TRP6  $Ca^{2+}$  channel antisense RNA or mRNA encoding the N-terminal cytoplasmic domain of TRP6 specifically blocks mAChR- and OAG-stimulated influx of  $Ba^{2+}$  through the ROCC

channel, suggesting that the TRP6 channel is required for the assembly of functional ROCC channels in PC12D cells.

#### D. 考察

Receptor-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  entry has been proposed to play important roles in neuronal cells including the regulation of cell shape and axonal growth, cell survival and growth, gene expression and synaptic plasticity. This and other studies have shown that receptor-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  influx involves multiple  $\text{Ca}^{2+}$  channels that have distinct molecular and pharmacologic properties and which are regulated by distinct mechanisms. The identification of TRP6 as a component of the mAChR-regulated ROCC in PC12D cells should provide a secure point of departure for future studies on the physiologic role of these channels and possibly the development of novel drugs that modulate their activity.

#### E. 結論

Activation of mAChR in neuronal PC12D cells stimulates the influx of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  through distinct SOCC and ROCC. SOCC are regulated by the state of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores, and ROCC are regulated by a distinct mechanism, possibly by directly binding DAG. Expression of TRP6  $\text{Ca}^{2+}$  channel is required for the assembly of functional ROCC channels.

#### F. 研究発表:

none to date

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: none
2. 実用新案登録: none
3. その他: none

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

（分担）研究報告書

生体アミンによるシナプス形成維持機構から解明できる精神遅滞の成因と修復

（分担）研究者 岡戸 信男 筑波大学基礎医学系・教授

研究要旨 フェニールケトン尿症ミュータント (PKU) マウスを用いて生後の発達に伴う変化を調べた。生後4週まで PKU ホモマウスはワイルドに比べて体重、脳重量ともに軽かった。脳内セロトニンとノルアドレナリン濃度はワイルドマウスでは発達に伴い急激に増加するが、ホモマウスではわずかに増加するだけであった。海馬 CA3 領域のシナプス密度を定量化すると、ホモはワイルドに比べ25%低下していた。

A. 研究目的

精神遅滞を伴う小児神経疾患の多くでは脳内生体アミン濃度が低下することが知られている。一方、生体アミンが生体アミン以外の一般的なシナプスの数を調節する働きのあることをこれまでに明らかにしてきた。従って、生後シナプスが急激に形成される臨界期に脳内生体アミンが低下した結果、シナプスが十分に作られないことが精神遅滞をもたらすと考えられた。この生体アミン-シナプス仮説が正しいかを PKU マウスで検証するために研究を行った。

B. 研究方法

PKU マウスは出生直後に遺伝子診断によりホモ、ヘテロ、ワイルドに判別した。生後1、2、3、4週令のオス4匹を用いて以下の実験を行った。血液を少量採取して、血中フ

ェニールアラニン濃度を測定した。深麻酔下で断頭して脳を取り出し、一側を2%パラフォルムアルデヒドで浸潤固定した。他側は直ちに液体窒素で凍結し、測定までの間-80℃で保存した。固定した脳から海馬を取り出して、電子顕微鏡用エポキシ包埋ブロックを作成した。CA3 領域の放射線維層のシナプス密度を電子顕微鏡写真より定量化した。凍結した脳は電気検出器付高速液体クロマトグラフィーでセロトニン、ノルアドレナリン、ドーパミンとそれぞれの代謝産物についての濃度測定に用いた。

C. 研究結果

ホモマウスではワイルド、ヘテロに比べてくに生後1と2週で体重と脳重の低下が見られた。血中フェニールアラニン濃度はホモではワイル

ドに比べ15倍以上も高い値を示した。セロトニンとノルアドレナリン濃度は発達に伴いワイルド、ヘテロでは同様に急激に上昇するが、ホモマウスではそれが見られなかった。ドーパミンはワイルド・ヘテロに比べわずかに低いがホモでも発達に伴い増加した。生後4週での海馬CA3領域でのシナプス密度はホモではヘテロに比べ25%減少していた。

#### D. 考察

PKUマウスはヒトPKUと同様に血中フェニールアラニン濃度がワイルドではヘテロに比べ極めて高く、ヒトと同様の病態を持つと考えられる。モノアミンの発達に伴う変化はセロトニンとノルアドレナリンに関しては当初予想されたとおり、ホモで濃度の上昇が見られなかった。しかしドーパミンは発達に伴いホモでも増加した。このドーパミンの変動は大脳皮質より大脳基底核・脳幹の動きを反映したものと考えられる。シナプス密度は25%の低下が見られたが、低下率は予想されたよりも低く、海馬における生体アミンによるシナプスの形成維持機構への関与が低いと考えられた。しかし、全体的には生体アミンによるシナプスの形成維持機能の低下による精神遅

滞の発生機構は正しいと考えられる。

#### E. 結論

精神遅滞の成因となると考えられる機構として、各種の要因による生体アミンによるシナプス形成維持機能の破綻が正しいことがPKUマウスによって確認された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Maeshima, T., Ito, R., Matsukawa, M., Usuba, M., Okado, N. The central distribution pattern of primary afferent fibers innervating the thigh muscle posterior iliotibialis in the chicken. *J. Brain Res.*, 39(1999)383-390

Ikemoto, K., Nishimura, A., Okado, N., Mikuni, M., Nishi, K., Nagatsu, I. Human midbrain dopamine neurons express serotonin 2A receptor: an immunohistochemical demonstration. *Brain Res.* in press.



厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

羊胎仔におけるPVL発症モデルの開発

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** 我々はヒツジ胎仔に対して反復臍帯圧迫負荷を加えることにより、脳室周囲白質の壊死を含む多彩な脳病変が発生することを報告してきた。本研究においては、まず第1に、脳病変の発生にかかわる要因を明らかにするために、脳病変の有無や主病変の存在部位により全体を3群に分類し、実験中の各種生理学的変量を3群間でretrospectiveに比較した。その結果、PVL様の病変を示したヒツジ胎仔では、臍帯圧迫前より他の群に比し血圧が高く、過酸化脂質が高値を示すことが明らかとなり、PVL発生胎仔は圧迫開始前に何らかの負荷を受けていることが示唆された。この結果に基づき、部分臍帯圧迫の反復がその一因であるとの仮説を立て、以下の実験を企画し開始した。すなわち、部分臍帯圧迫を一定時間加えた後に従来の臍帯圧迫を負荷することによりPVL様病変が選択的に出現するか否かを検討するものである。

A. 研究目的

脳室周囲白質軟化症（PVL）の発生メカニズムを解明し、その予防法を開発するためには、実験動物によるPVL発症モデルを作成することが重要である。これまで我々はヒツジ胎仔に対して反復臍帯圧迫負荷を加えることにより、脳室周囲白質の壊死を含む多彩な脳病変が発生することを報告してきた。本研究の目的はPVL様病変がより選択的に発生する実験法を確立することである。

B. 研究方法

(1) これまでに行ってきた実験データを用いて、脳病変の有無や主病変の存在部位より3群に分類し、実験中の各種生理学的変量（血圧、心拍数、血液ガス、血中過酸化脂質、組織血流量）を群間で比較検討することにより脳室周囲白質の病変発生に関わる生理機能上の特徴を明らかにする。

(2) (1) で得られた結果に基づき、新たな負荷法を考案し、その方法を用いることにより脳室周囲白質病変が選択的に発生するかどうかをヒツジ胎仔慢性実験モデルを用いて検討する。

C. 研究結果

(1) 前回行った臍帯圧迫実験において得られたヒツジ胎仔脳の組織学的所見に基づき以下の3群に分類した。第I群は脳室周囲白質

を主要病変とする5例であり、第II群は大脳皮質・視床を中心に病変を認め、いずれも皮質下白質の病変を伴っていた4例、第III群は残りの5例で、大脳皮質・白質に病変を認めなかった。

胎齡、血液ガス所見、心拍数変化については3群間に差を認めなかった。血圧は第I群が圧迫開始前より高値を示した。圧迫中の血圧低下に関しては、I群・II群ともにIII群より高度であったが、I群・II群間には差がなかった。血中過酸化脂質はI群で圧迫開始前より高値を示したが、各群ともに圧迫中には有意の変化は認められなかった。

(2) (1) の検討により、脳室周囲白質病変群では圧迫開始前に血圧と血中過酸化脂質の高値が認められており、圧迫開始以前に何らかの負荷が加わっていたことが示唆された。我々は部分臍帯圧迫の反復が前負荷になっているという仮説を立て、以下の実験を考案した。

妊娠120日前後の羊を用い、胎仔慢性実験モデルを作成する。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、超音波血流量計測プローベを頸動脈及び臍帯動脈に装着、さらに胎仔前胸部に心電電極、臍帯に圧迫用のoccluderを装着し閉腹する。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、臍帯動脈血流を50%

減少させるような臍帯部分圧迫を一定量加え、暫く時間をおいた後に3分間の臍帯完全圧迫を5分間隔で5回行う。圧迫実験中には、胎児頸動脈血血液ガス、頸動脈圧、心拍数、頸動脈・臍帯動脈血流を測定する。24時間後に帝王切開にて胎児を娩出し、病理学的検索のため脳各部位を採取する。現在進行中である。

#### D. 考察

ヒツジ胎児を用いた臍帯圧迫実験は既に数多く報告され、圧迫法により病変発生部位が異なることが知られている。10分間の完全圧迫では海馬に、5分間圧迫では線状体に、1-2分間の完全圧迫を反復することにより大脳皮質・視床に、部分圧迫の持続では大脳皮質・皮質下白質に、部分圧迫の反復では皮質下白質に特異的に病変が生じると報告されている。大脳白質の病変は部分圧迫により誘発可能であるが、いずれの報告においても脳室周囲白質の病変は認められていない。本研究においては、脳室周囲白質に明らかな虚血性病変を認めており、臍帯圧迫が脳室周囲白質軟化症の原因となる可能性があることが示唆される。

脳室周囲白質病変の原因としては、臍帯圧迫(3分間を5回)以外の要因も関与している可能性がある。脳室周囲白質病変群では圧迫開始前に血圧と血中過酸化脂質の高値が認められており、これは圧迫開始以前に何らかの負荷が加わっていたことを示唆する所見である。大脳皮質の病変を主体とする群では明らかな血圧低下が認められ、病変と臍帯圧迫との間には直接的な因果関係が想定された。一方、脳室周囲白質群では圧迫前に血圧が高く、皮質群と同程度の血圧下降が認められたにもかかわらず明らかな低血圧には至らなかったため、両群間における組織学的変化に差異が生じたものと考えられた。

脳室周囲白質群における圧迫開始前の負荷の原因としては部分臍帯圧迫の反復が考えられる。従来用いてきた臍帯オクルーダは臍帯そのものに装着するタイプのものであり、胎動に伴い臍帯が圧迫される可能性があった。そこで、今回は臍輪周囲の腹壁に固定するタイプのオクルーダを用いて、部分臍帯圧迫を一定量加えた後に、本来の臍帯圧迫実験を行

うこととした。

非致死的な低酸素虚血負荷が加わると、その後の虚血負荷に対して耐性を示すようになる現象が ischemic preconditioning として知られている。本実験においても部分臍帯圧迫があらかじめ加わることにより、同様なメカニズムが作動して大脳皮質の障害が起らなかった可能性があり、そうであるとすると、そのメカニズムが脳室周囲白質の病変発生にも関与している可能性がある。

#### E. 結論

臍帯圧迫は脳室周囲白質の病変発生に関与するが、それには胎児におけるある種の準備状態が必要であると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ohyu J, Marumo G, Ozawa H, Takashima S, Nakajima K, Kohsaka S, Hamai Y, Machida Y, Kobayashi K, Ryo E, Baba K, Kozuma S, Okai T, Taketani Y. Early axonal and glial pathology in fetal sheep brains with leukomalacia induced by repeated umbilical cord occlusion. *Brain Dev* 21:248-252 1999

##### 2. 学会発表

上妻志郎、武谷雄二：臍帯圧迫によるPV L発症モデルの開発。新生児学会シンポジウム、1999 香川

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

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 同上

水口 雅 自治医科大学小児科

岡 明 鳥取大学脳神経小児科

研究要旨：福山型筋ジストロフィーの遺伝子蛋白fukutinの脳における発現の発達的变化を調べ、fukutin は在胎12から19週の胎児大脳皮質の神経細胞に最も強く認められ、成熟と共に減弱した。胎生期の脳におけるfukutin蛋白発現の時間的・空間的变化から、この蛋白の機能が皮質形成に関与し、神経伝達異常をきたすと考えられた。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は筋にジストロフィーと脳に不規則な多小脳回を認める遺伝性の疾患であり、原因遺伝子が同定され、fukutin と命名された。その蛋白のヒト脳における発達的变化を観察し、同疾患に見られる皮質形成異常におけるfukutinの関与につき検討する。

B. 対象及び方法

FCMD 3例(胎生23週、15歳、22歳)と対照22例(胎生12週-50歳)の前頭葉・小脳を、抗fukutin抗体を用いて免疫染色を施行した。また、FCMD 4例(胎生19、20週、15歳、22歳)、対照5例(胎生19、23、40週、1歳、11歳)の前頭葉を用いてウェスタンブロットを施行した。

C. 結果

1. ウェスタンブロットでは、対照の胎児例3例で60kDaのバンドが検出されたが、1歳、11歳の2例およびFCMD2例では検出されなかった。分画に関しては、40週胎児で細胞質分画、膜分画の両方にバンドが認められた。

2. 対照大脳の抗fukutin免疫組織化学では、胎生12-19週に Cajal-Retzius細胞, sub-pial granular layer, 皮質内神経細胞, germinal matrix, 上衣細胞に、また胎生20-33 週の分子層の外側半分にも免疫反応性が認められた。これらは以後週数とともに減退し、1歳以後は消失した。全検体いずれもradial glia に免疫反応性は認められなかった。小脳では外顆粒層、Purkinje細胞、内顆粒層の神経細胞に、また胎生23-37 週の分子層内側半分に免疫反応性が見られた。Purkinje細胞、分子層の反応性は乳児期も残存したが成人期には消失した。

3. FCMD胎児例の大脳では、Western blot における60kDa のバンドが対照に比べ著明に減弱し、fukutin 免疫反応性は著明に低下していた。対照と同様、FCMD成人 2例の大脳・小脳では免疫反応性は見られなかった。

D. 考察

在胎20週前後のFCMD脳では、皮質神経細胞が脳表のlimiting membraneを穿通し、表層に神経細胞が不規則に配列した表層皮

質を形成している過程が分かる。その神経細胞穿通の機序は、limiting membrane の欠損が原因であると考えられるが、未だ明確にされていない。今回のfukutinによる免疫組織化学的染色では、免疫化学的に神経細胞の方に異常が認められ、limiting membraneはCajal-Retzius細胞, subpial granular layer, 皮質内神経細胞など、神経細胞の働きと関係深いと考えられる。

#### E. 結論

胎生期の脳におけるfukutin 蛋白発現は神経細胞にあり、fukutin の時間的・空間的变化から、この蛋白の機能が皮質形成に関与していると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Oka A, Takashima S:  
The up-regulation of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in Down syndrome brains.  
*Acta Neuropath(Berlin)* 97:275-278, 1999
- 2) Sohma O, Mizuguchi M, Takashima S, Satake A, Itoh K, Sakuraba H, Suzuki Y, Oyanagi K:  
Expression of protective protein in human tissue.  
*Pediatric Neurology* 20:210-214, 1999
- 3) Saito Y, Ito M, Hanaoka S, Ohama E, Akaboshi S, Takashima S:  
Dopamine receptor upregulation in Lesch-Nyhan syndrome: a postmortem study.  
*Neuropediatrics* 30:1-6, 1999
- 4) Meng SZ, Oka A, Takashima S:  
Developmental expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the human cerebellum and brainstem.  
*Brain and Dev* 21:30-35, 1999
- 5) Ohyu J, Marumo G, Ozawa H, Takashima S, Nakajima K, Kohsaka S, Hamai Y, Machida Y, Kobayashi K, Ryo E, Baba K, Kozuma S, Okai T, Taketani Y:  
Early axonal and glial pathology in fetal sheep brains with leukomalacia induced by repeated umbilical cord occlusion.  
*Brain Dev* 21:248-252, 1999
- 6) Iai M, Takashima S:  
Thalamocortical development of parvalbumin neurons in normal and periventricular leukomalacia brains.  
*Neuropediatrics* 30:14-18, 1999
- 7) Deguchi K, Oguchi K, Matsuura N, Armstrong DD, Takashima S:  
Periventricular Leukomalacia: relation to gestational age and axonal injury.  
*Pediatr Neurol* 20:370-374, 1999
- 8) Ozawa Y, Obonai T, Itoh M, Aoki Y, Funayama M, Takashima S:  
Catecholaminergic neurons in the diencephalon and basal ganglia of SIDS.  
*Pediatr Neurol* 21:471-475, 1999
- 9) Arii N, Mizuguchi M, Mori K, Takashima S:  
Developmental of telencephalin in the human cerebrum.  
*Microscopy Research and Technique* 46:18-23, 1999
- 10) Meng SZ, Takashima S:  
Expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 in periventricular leukomalacia.  
*J Child Neurol* 14:377-381, 1999