

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「成体脳に内在する神経幹細胞の賦活化に関する開発的研究」

平成 18 年度

総括・分担研究報告書

主任研究者 高坂 新一

平成 19 年 (2007 年) 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 成体脳に内在する神経幹細胞の賦活化に関する開発的研究 1
高坂 新一（国立精神・神経センター神経研究所）

II. 分担研究報告書

1. 成体神経幹細胞の賦活化を指標としたNMDA受容体阻害剤 5
の探索ならびにその分子基盤の解明
高坂 新一（国立精神・神経センター神経研究所）
2. 成体脳神経幹細胞の増殖、分化、シナプス新生に関する 7
形態学的基盤の解析
湯浅 茂樹（国立精神・神経センター神経研究所）
3. 成体脳神経幹細胞の分化増殖を制御するG蛋白共役型受容体 10
リガンドの探索
和田 圭司（国立精神・神経センター神経研究所）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 13

IV. 研究成果の刊行物・別刷 17

1. 総括研究報告書

成体脳に内在する神経幹細胞の賦活化に関する開発的研究

主任研究者 高坂 新一 国立精神・神経センター神経研究所 所長

研究要旨：本研究では、再生医療に基づいた新たな治療手段として、内在性神経幹細胞を賦活化させる低分子化合物の薬剤開発を目的としている。そのため、神経幹細胞の分裂や増殖、移動、分化に関わるとされる NMDA 受容体や神経幹細胞に特異的に発現している G 蛋白質共役型受容体に焦点をあて、そのリガンドにおける薬理効果を検討した。その結果、NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンが、海馬歯状回顆粒細胞下層における内在性の神経幹細胞の増殖を亢進させるとともに、増殖した前駆細胞の幼若神経細胞への分化を促進させることが判明した。また、エンドセリン B 型受容体のブロッカーである BQ788 が、脳室周囲に存在する神経幹細胞の移動・分散を促進させることを確認した。

（分担研究者）

湯浅茂樹： 国立精神神経センター神経研究所
微細構造研究部 部長

和田圭司： 国立精神神経センター神経研究所
疾病研究第四部 部長

A. 研究目的

パーキンソン病を代表とする神経変性疾患では、脳内の特定の部位におけるニューロンが変性脱落することにより重篤な機能障害が生じることが知られている。これら神経難病とも言える神経変性疾患の治療としては、主に薬剤を中心とした対象療法が行われているが、治療効果には限界があるのが現状である。こゝで、本研究では、再生医療に基づいた新たな治療手段として、より効率的かつ安全性の高い内在性神経幹細胞を賦活化させる低分子化合物の薬剤開発を目的とする。そのため、成体脳内在性の神経幹細胞の分裂や増殖、移動、分化に関わる分子（例えば、NMDA 受容体やその関連分子、G 蛋白質共役型受容体等）に着目し、その分子基盤を解明するとともに、これらの分子を標的とする薬剤の開発を行う。

B. 研究方法

個々の研究方法に関しては、添付した分担研究報告書を参照されたい。

C. 研究結果および考察

1. 成体脳神経幹細胞の賦活化を指標とした NMDA 受容体阻害剤の探索ならびにその分子基盤の解明

欧米でアルツハイマー型認知症の治療薬として市販されているメマンチン（非競合的 NMDA 受容体阻害剤）を成体のマウスに投与することで、海馬歯状回顆粒細胞下層に内在する性神経幹細胞の増殖が亢進することを確認した。また、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析から、マウス胎仔の大脳皮質で NMDA 受容体阻害剤の投与により発現が亢進する分子として、Notch のリガンドである Delta-like1 および Deltex3 を見出した。この結果は、脳発達期の NMDA 受容体は Notch シグナル系を介して神経幹細胞の増殖を制御している可能性を示唆する。

2. 成体脳神経幹細胞の増殖、分化、シナプス新生に関する形態学的基盤の解析

メマンチン投与により、海馬歯状回顆粒細胞下層に PSA-NCAM（神経前駆細胞マーカー）陽性細胞および calretinin（幼若顆粒細胞マーカー）陽性細胞数の増加が認められたことから、メマンチンはニューロンへの分化を亢進することが示唆された。さらに、これらの新生した幼弱ニューロンのシナプスの形成をならびに詳細

な微細構造を解析するための新たな手法として、電子線トモグラフィ法を確立した。

3. 成体脳神経幹細胞の分化増殖を制御する G 蛋白質共役型受容体リガンドの探索

G 蛋白質共役型受容体であるエンドセリン B 型受容体が、成体脳において神経幹細胞が存在する脳室周囲および海馬歯状回に特異的に発現することを見出した。そこで、そのブロッカーである BQ788 を浸透圧ポンプによって成体マウスの脳室内に持続的に投与した結果、GFAP 陽性ならびに Dcx 陽性の神経幹細胞の脳室周囲からの移動・分散が誘導された。今後、BQ788 を神経幹細胞の脳内空間制御薬として利用できる可能性が考えられる。

D. 結論

NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンを成体マウスに投与することで、海馬歯状回顆粒細胞下層における内在性の神経幹細胞の増殖、ならびにニューロンへの分化が亢進することを確認した。また、脳発達期において、NMDA 受容体は Notch シグナル系を介して神経幹細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。一方、エンドセリン B 型受容体のブロッカーである BQ788 を成体マウスの脳室内に持続的に投与することで、脳室周囲の神経幹細胞の移動・分散が誘導された。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

(高坂新一)

Hattori, K., Uchino, S., Isosaka, T., Maekawa, M., Iyo, M., Sato, T., Kohsaka, S., Yagi, T. and Yuasa, S.: Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 7129-7135

Uchino, S., Wada, H., Honda, S., Nakamura, Y., Ondo, Y., Uchiyama, T., Tsutsumi, M., Hirasawa, T., and Kohsaka, S.: Direct interaction of PDZ domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 AMPA receptor. *J. Neurochem.* 97 (2006) 1203-1214

Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglia chemotaxis. *Glia* 55 (2007) 604-616

(湯浅茂樹)

Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. and Kusumi, A.: Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.* 174 (2006) 851-862

Zhang, H., Muramatsu, T., Murase, A., Yuasa, S., Uchimura, K. and Kadomatsu, K.: N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 is required for brain keratan sulfate biosynthesis and glial scar formation after brain injury. *Glycobiology* 16 (2006) 702-710

Kudo, T., Fujii, T., Ikegami, S., Inokuchi, K., Takayama, Y., Ikehara, Y., Nishihara, S., Togayachi, A., Takahashi, S., Tachibana, K., Yuasa, S. and Narimatsu, H.: Mice lacking $\alpha 1, 3$ -fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis X structure in brain and increased anxiety-like behaviors. *Glycobiology* 17 (2007) 1-9

(和田圭司)

Sun, Y. J., Nishikawa, K., Yuda, H., Wang, Y. L., Osaka, H., Fukazawa, N., Naito, A., Kudo, Y., Wada, K. and Aoki, S.: Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation. *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 6923-6935

Tomita, S., Sekiguchi, M., Wada, K., Nicoll, R.A. and Bredt, D.S.: Stargazin controls the pharmacology of AMPA receptor potentiators, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 10064-10067

Nishimoto, M., Furuta, A., Aoki, S., Kudo, Y., Miyakawa, H. and Wada, K.: PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and

astrogenesis in neural progenitor cells. *Glia*. 55 (2007) 317-327

2. 学会発表
(国際学会)

Kohsaka, S.: Response of microglia in model of motorneuron pathology. The 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, 11.30, 2006

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Kondo, H., Yuasa, S. and Osumi, N.: FABP7 is required for maintenance of neural stem/progenitor cells in the postnatal hippocampus. Society for Neuroscience Meeting 36th, Atlanta, 10.15, 2006

Aoki, S., Sun, Y., Nishikawa, K., Yuda, H., Osaka, H., Wang, Y., Fukazawa, N. and Wada, K.: Solo/trio8, A Membrane-associated Short Isoform of Trio, Modulates Endosome Dynamics and Neurite Elongation, ASCB 45th annual meeting, San Diego, CA, Dec 11, 2006

(国内学会)

平澤孝枝、田端秀典、仲嶋一範、久保田健夫、内野茂夫、高坂新一：MND A receptors participate in neuronal migration in the early stage of mouse cortical development. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会 合同年会、ワークショップ「神経回路形成・発達分化・神経突起伸張」名古屋、9.14, 2006

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Yuasa, S. and Osumi, N.: FABP7 is required for maintenance of neural stem/progenitor cells in the postnatal hippocampus. 日本神経科学学会第29回大会、京都、7.21, 2006

前川素子、相馬美歩、山崎信幸、遠山桂子、宮川剛、湯浅茂樹：生後海馬神経新生領域における CaMKII の機能解析. 成体脳ニューロン新生懇談会、東京、2.24, 2007

北村悠輔、君和田友美、松本 隆、和田圭司：交換モンテカルロ法を用いた遺伝子制御ネットワーク推定による核内受容体ネットワークの解析. 日本バイオインフォマティクス学会、第10回システムバイオロジー研究会、3.30, 2006

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

II. 分担研究報告書

成体脳神経幹細胞の賦活化を指標とした NMDA 受容体阻害剤の探索ならびにその分子基盤の解明

分担研究者 高坂新一 国立精神・神経センター神経研究所 所長

研究要旨： パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の新規治療薬の開発にあたり、成体の内在性神経幹細胞を賦活化させる再生医療のコンセプトに基づき、NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンの薬理効果を検討した。その結果、12週齢の C57B6 マウスに対して本剤の単回腹腔内投与により海馬歯状回顆粒細胞下層に内在する神経幹細胞の増殖が亢進することを確認した。一方、マイクロアレイ解析から、NMDA 受容体阻害剤投与によりマウス胎仔の大脳皮質において発現が亢進する Notch シグナル系分子として、新たに Deltex3 を見出した。この結果は、NMDA 受容体が Notch シグナル系を介して神経幹細胞の分化・増殖を制御していることを示唆する。

A. 研究目的

近年、有効な治療法が確立されていない神経変性疾患に対して、成体脳に内在する神経幹細胞を賦活化させることで、変性部位に神経回路網を再構築させる再生医療に基づいた新たな治療法が開発が期待されている。

NMDA 受容体は、中枢神経系における主要な興奮性情報伝達を担い、記憶・学習等高次脳機能に深く関わっているイオンチャネル型受容体である。これまでに我々は、NMDA 受容体阻害剤が脳発達期の神経幹細胞の増殖を亢進させることを見出した。そこで、本研究では、成体脳に内在する神経幹細胞の増殖促進を指標に、既存の NMDA 受容体阻害剤の神経幹細胞賦活化に対する薬理効果を検討し、神経変性疾患の治療薬としての有効性を検証することを目的とする。また、マイクロアレイ等を用いて、NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞賦活化の分子基盤を解明することも目指す。

B. 研究方法

1. NMDA 受容体阻害剤がもたらす成体神経幹細胞の増殖亢進効果の検討

12週齢の C57B6 マウスに NMDA 受容体阻害剤であるメマンチン (10mg/kg) またはコントロールとして PBS を腹腔内投与し3日間飼育後、BrdU (75mg/kg) を数時間おきに3回腹腔内投与し、さらに1日、1週間または4週間飼育した。

これらのマウスを麻酔下で還流固定し脳を摘出後、クリオスタットを用いて 14 μ m の脳切片を作製した。神経幹細胞の増殖の定量的解析は、抗 BrdU 抗体を用いた組織染色を行い、成体神経幹細胞が内在する海馬歯状回顆粒細胞下層における BrdU 陽性細胞数を計測した。

2. NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞賦活化の分子基盤の解明

妊娠マウスの15日目および16日目の両日に NMDA 受容体阻害剤である Cerestat (CNS-1102) (3 mg/kg) を腹腔内投与 (1回/日) し、妊娠17日目に胎仔を取り出しクリオスタットを用いて 14 μ m の脳切片を作製した。標的分子について、DIG でラベルした RNA プローブを作製し、常法に従い in situ hybridization 法にて mRNA の発現を解析した。コントロールとしては、PBS を投与したマウス胎仔の脳切片を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、国立精神・神経センター動物実験委員会の承認を得た上で動物愛護の観点に配慮して行った。

C. 研究結果

1. NMDA 受容体阻害剤がもたらす成体神経幹細胞の増殖亢進効果の検討

メマンチンを投与することで、BrdU 投与後 1 日目から海馬歯状回顆粒細胞下層の内在性神経幹細胞の増殖が亢進することを確認した。さらに BrdU 投与後 1 週間および 4 週間飼育後のマウスの脳においても、成体神経幹細胞の増殖の亢進が観察された（湯浅の報告書参照）。

2. NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞賦活化の分子基盤の解明

昨年度行ったマイクロアレイ解析をさらに継続し、Cerestat を投与することでマウス胎仔の大脳皮質において発現が亢進する分子として Notch リガンドである Deltex3 を見出した。現在、in situ hybridization 法を用いて詳細な発現を解析中である。

D. 考察

メマンチンは興奮毒性の抑制を薬効として、既に欧米でアルツハイマー型認知症の治療薬として市販されている。本研究より、メマンチンには興奮毒性の抑制以外に、神経幹細胞の増殖を亢進させる薬効を有することが確認できた。この結果、現在神経疼痛や脳血管障害の治療薬として開発されつつある NMDA 受容体阻害剤が神経変性疾患の治療薬としても有効であることが期待できる。一方、脳発達期における NMDA 受容体阻害剤の神経幹細胞の賦活化の分子基盤として、昨年度の Delta-like1 に引き続き、Notch のリガンドである Deltex3 の発現の亢進がみられたことから、神経幹細胞の維持・分化に深く関わる Notch シグナル系の関与が示唆される。今後、これらの分子の発現細胞の同定等、詳細な検討を進める予定である。

E. 結論

NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンを成体のマウスに投与することで、海馬歯状回顆粒細胞下層に内在する神経幹細胞の増殖が亢進することを確認した。また、脳発達期において、NMDA 受容体は Notch シグナル系を介して神経幹細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hattori, K., Uchino, S., Isosaka, T., Maekawa, M., Iyo, M., Sato, T., Kohsaka, S., Yagi, T. and Yuasa, S.: Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 7129-7135

Uchino, S., Wada, H., Honda, S., Nakamura, Y., Ondo, Y., Uchiyama, T., Tsutsumi, M., Hirasawa, T., and Kohsaka, S.: Direct interaction of PDZ domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 AMPA receptor. *J. Neurochem.* 97 (2006) 1203-1214

Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglia chemotaxis. *Glia* 55 (2007) 604-616

2. 学会発表

(国際学会)

Kohsaka, S.: Response of microglia in model of motoneuron pathology. The 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, 11.30, 2006

(国内学会)

平澤孝枝、田端秀典、仲嶋一範、久保田健夫、内野茂夫、高坂新一：MND receptors participate in neuronal migration in the early stage of mouse cortical development. 第 28 回日本生物学的精神医学会・第 36 回日本神経精神薬理学会・第 49 回日本神経化学会大会 合同年会、ワークショップ「神経回路形成・発達分化・神経突起伸張」名古屋、9.14, 2006

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

成体脳神経幹細胞の増殖、分化、シナプス新生に関する形態学的基盤の解析

分担研究者 湯浅茂樹 国立精神・神経センター神経研究所 微細構造研究部 部長

研究要旨：成体脳内の内在性神経幹細胞を活性化して増殖、分化を誘導し、変性疾患や損傷により脱落した神経細胞を代償して機能を回復する治療法を開発する基盤を確立するため、成体マウスに対して薬物投与を行い、海馬における神経新生について機能形態学的に解析した。特に幹細胞の増殖動態と、そのニューロンへの分化について検討した結果、副作用が少ない NMDA 受容体阻害剤メマンチン投与により、海馬歯状回顆粒細胞下層(SGZ)における神経前駆細胞増殖が亢進するとともに、増殖した前駆細胞の一部は幼若な顆粒細胞への分化が促進されることが明らかになった。さらに、これらの新生ニューロンが新たな回路形成に関わることを検討するため、電顕的に新生顆粒細胞ニューロンの形成する苔状線維と新生シナプスを同定し解析するための手法を開発した。

A. 研究目的

変性疾患や損傷により脱落した神経細胞を代償して機能を回復する治療法を開発するためには成体脳内の内在性神経幹細胞を活性化して、新たな機能性神経回路を形成する手段を開発することがアプローチの1つと考えられる。従来、NMDA 受容体阻害剤や phosphodiesterase 阻害剤が、げっ歯類海馬の神経新生を促進することが知られているが、臨床応用するためには、これらの薬物のうち、毒性が低く副作用が少ない薬物を使用することが必要である。従って、候補となる薬物を選択する上で、すでに臨床適用となっている薬物のなかから神経新生誘導能を有する可能性があるものについて詳細な検討を行うことは、創薬上妥当なストラテジーと考えられる。

本研究では、アルツハイマー病の治療薬として細胞死抑制効果を指標として開発された NMDA 受容体阻害剤のメマンチンについて、成体神経新生が起こっている海馬歯状回における神経幹細胞の増殖と分化の動態に対する効果を解析した。

B. 研究方法

(1) メマンチン投与による神経新生動態の変化に関する解析

メマンチン投与マウス（詳細は高坂の報告書

参照）より脳切片を作製し、抗 BrdU 抗体を用いた蛍光抗体法により免疫染色を行った。海馬歯状回顆粒細胞下層(SGZ)における BrdU 標識細胞を定量的に解析することにより、神経幹細胞の増殖動態について、メマンチン非投与の対照群と比較した。また、PSA-NCAM を後期神経前駆細胞のマーカーとして用い、SGZ 神経幹細胞の前駆細胞への分化動態について検討した。さらに、細胞増殖の指標としての BrdU 取り込みと、ニューロンへの分化の指標としての幼若歯状回顆粒細胞マーカーである calretinin (CR) 発現について2重標識をおこない、SGZ 増殖細胞のニューロンへの分化について検討した。

(2) メマンチン投与により増殖した新生神経細胞の回路形成への関与に関する解析

歯状回の新生顆粒細胞が苔状線維を伸展して CA3 へ向かう新たな投射を形成することを検討するために、海馬切片の CA3 に蛍光色素 DiI を注入し、逆行性に歯状回を標識した。また、新生神経細胞の指標として PSA-NCAM をマーカーとし、CA3 における新生神経細胞に由来する PSA-NCAM 陽性の苔状線維終末のシナプス構造を免疫電顕的に観察した。これらの知見をもとにして、歯状回新生ニューロンによる苔状線維系の投射形成について解析した。

(倫理面への配慮)

神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会

で研究計画の審査をうけ許可された。

C. 研究結果

(1) NMDA 受容体阻害剤投与による海馬神経幹細胞の増殖促進と分化誘導

メマンチン投与群において、BrdU 標識細胞数が非投与対照群に比べて有意に増加した。また、神経前駆細胞マーカーである PSA-NCAM の発現もメマンチン投与群で1週後に増加することを明らかにした。さらに、BrdU 標識細胞のニューロンへの分化を、幼若歯状回顆粒細胞のマーカーである calretinin (CR)の発現を指標として調べたところ、1週後にはメマンチン投与群で BrdU(+)/CR(+)細胞の増加が認められた。

(2) 海馬新生ニューロンによる回路形成の形態学的解析手法の開発

成体マウス海馬歯状回の新生顆粒細胞が神経回路形成に関与することを解析する手法を開発した。脳切片を用いて DiI を CA3 に注入することにより、歯状回 SGZ に分布する新生ニューロンを逆行性に標識することができた。また、歯状回- CA3 投射の形成につき、CA3 における PSA-NCAM 陽性の苔状線維終末によるシナプス形成が免疫電顕的に標識可能となった。さらに、新生シナプスの微細構築をより詳細に解析するための新たな手法として電子線トモグラフィ法を確立した。

(3) 神経幹細胞分化ならびに神経損傷修復の制御にかかわる分子機構の解析

神経幹細胞のマーカーの1つである Lewis X 抗原の合成に関わる糖転移酵素の遺伝子、神経損傷時に発現増加する keratan sulfate の合成に関わる硫酸基転移酵素の遺伝子につき、各々のノックアウトマウスを作製して、これらの表現型を解析した。また、不飽和脂肪酸結合蛋白の1つ FABP7 が生後海馬神経新生において神経幹細胞/神経前駆細胞の維持に必要であることを明らかにした。

D. 考察

NMDA 受容体阻害剤の1つであるメマンチンは、海馬歯状回 SGZ の神経幹細胞の増殖促進作用があり、さらに増殖細胞の少なくとも一部は幼若顆粒細胞に分化しうることが明らかになった。今後、増殖し分化した幼若顆粒細胞が長期

間生存して成熟し、神経回路を形成しうるか否かを明らかにする必要がある。また、投与方法を検討して、幹細胞の増殖を更に促進しかつ毒性、副作用を抑える条件検討が必要である。更に、NMDA 受容体阻害により神経幹細胞の増殖と分化が誘導される分子機構の解明が必要で、これらの知見を基盤としてより有効な神経新生促進作用を有する薬物の開発が可能になると考えられる。

E. 結論

NMDA 受容体阻害剤の1つであるメマンチンは、海馬歯状回 SGZ の神経幹細胞の増殖促進と幼若神経細胞への分化を誘導する作用があり、神経幹細胞による再生医療に応用しうる可能性があることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. and Kusumi, A.: Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.* 174 (2006) 851-862

Zhang, H., Muramatsu, T., Murase, A., Yuasa, S., Uchimura, K. and Kadomatsu, K.: N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 is required for brain keratan sulfate biosynthesis and glial scar formation after brain injury. *Glycobiology* 16 (2006) 702-710

Kudo, T., Fujii, T., Ikegami, S., Inokuchi, K., Takayama, Y., Ikehara, Y., Nishihara, S., Togayachi, A., Takahashi, S., Tachibana, K., Yuasa, S., and Narimatsu, H.: Mice lacking α 1, 3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis X structure in brain and increased anxiety-like behaviors. *Glycobiology* 17 (2007) 1-9

2. 学会発表

(国際学会)

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Kondo, H., Yuasa, S. and Osumi, N.: FABP7 is required for maintenance of neural stem/progenitor cells in the postnatal hippocampus. Society for Neuroscience Meeting 36th, Atlanta, 10.15, 2006

(国内学会)

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Yuasa, S. and Osumi, N.: FABP7 is required for maintenance of neural stem/progenitor cells in the postnatal hippocampus. 日本神経科学学会第 29 回大会、京都、7.21, 2006

前川素子、相馬美歩、山崎信幸、遠山桂子、宮川剛、湯浅茂樹：生後海馬神経新生領域における CaMKII の機能解析。成体脳ニューロン新生懇談会、東京、2.24, 2007

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

（成体脳神経幹細胞の分化増殖を制御する G 蛋白質共役型受容体リガンドの探索）

分担研究者 和田圭司 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第四部 部長

研究要旨： 脳内の脳室周囲には神経幹細胞が局在している。この領域には幹細胞を維持し育むシステムが存在し、その分子の実体を解明し制御することは幹細胞賦活化の鍵となる。これまでに脳室周囲から単離した神経幹細胞における G 蛋白質共役型受容体（GPCR）の網羅的発現解析を進め神経幹細胞で発現が高い GPCR と作用薬剤を複数同定した。本年度はその中から神経幹細胞間の接着シグナル制御に関わるエンドセリン B 型受容体(ETB-R)に着目し研究を進めた。ETB-R のブロッカーとして知られる薬剤である BQ788 を浸透圧ポンプによって脳室内へ持続投与することで、GFAP 陽性ならびに Dcx 陽性の神経幹細胞を脳室周囲から移動・分散が誘導され、今後 BQ788 を神経幹細胞の脳内空間制御薬として利用できる可能性が考えられた。

A. 研究目的

難治性神経疾患に対する有効な治療法は現在確立されておらず、神経幹細胞を用いた神経再生医療は新たな治療法として期待されている。我々は成体脳内の神経幹細胞に着目し、神経幹細胞とその局在領域における環境因子の実体を解明することで内在性神経幹細胞の賦活化による新規薬剤の創成を目指す。G 蛋白質共役型受容体(GPCR)はヒトゲノムにコードされた最大の受容体ファミリーであり、医療に用いられる薬剤の半分以上が GPCR を標的とし、治療薬を同定する上で重要なターゲット分子群である。成体神経幹細胞に発現する GPCR 遺伝子発現プロファイルを決定し、その特異的リガンドの中から神経幹細胞制御に利用可能な薬剤の探索を行うことを目的とした。

B. 研究方法

ETB-R に対する特異的抗体を用いて免疫組織学的手法よりの脳内局在を解析した。また、ETB-R のブロッカーである BQ788 を体内埋め込み型浸透圧ポンプによって C57BL/6J マウスの脳室内へ 7 日間持続投与し、神経幹細胞の増殖や分化、運動性に与える影響を神経幹細胞の種々の分子マーカーを用いて検討した。

（倫理面への配慮）動物実験は国立精神・神経

センター、動物実験委員会の承認を得た上で動物愛護の観点に配慮して行った。

C. 研究結果

これまでに成体神経幹細胞における GPCR 遺伝子発現プロファイルを決定し、その増殖や運動性に対して効果を有する作用薬を複数見いだした。その中から神経幹細胞の運動性制御に関わるエンドセリン B 型受容体(ETB-R)に着目した。免疫組織学的手法により成体マウスの ETB-R の脳内局在を調べたところ、幹細胞局在領域である脳室周囲と海馬歯状回において特異的な発現が認められた。また、ETB-R は GFAP ならびに Dcx 陽性の神経幹細胞・前駆細胞に主として強い発現が認められ、PSA-NCAM 陽性の神経前駆細胞には一部発現が認められた。ETB-R の特異的ブロッカーである BQ788 を浸透圧ポンプによって 7 週齢オスマウスの脳室内へ 7 日間持続投与したところ、GFAP 陽性ならびに Dcx 陽性の神経幹細胞を脳室周囲から移動・分散する事が明らかとなった。一方、BQ788 投与による副作用等は観察されなかった。

D. 考察

通常、GFAP 陽性ならびに Dcx 陽性の神経幹細胞は脳室周囲と海馬歯状回に局在しており、

その領域から通常分散移動する事はない。ETB-R は脳室周囲と海馬歯状回に特異的に発現し、ETB-R ブロッカーBQ788 は GFAP 陽性ならびに Dcx 陽性の神経幹細胞を脳室周囲から移動・分散させる事が明らかになった。この事から ETB-R とそのリガンドであるエンドセリンが担う脳内シグナルは神経幹細胞を脳内の特定領域に空間的に拘束するために働いていることが示唆された。また ETB-R のブロッカーである BQ788 投与によってその空間拘束性を解除し神経幹細胞を分散させることが可能であることが示唆された。これらの結果は内在性神経幹細胞を賦活化し、脳内の損傷領域へ移動させ再生に寄与させる治療法を考える上で重要であると考えられた。

E. 結論

脳内神経幹細胞の空間移動制御薬の候補として ETB-R ブロッカーである BQ788 を同定し、その薬効をマウスを用いた動物実験で実証した。また BQ788 の副作用等は観察されなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sun, Y. J., Nishikawa, K., Yuda, H., Wang, Y. L., Osaka, H., Fukazawa, N., Naito, A., Kudo, Y., Wada, K. and Aoki, S.: Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation. *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 6923-6935

Tomita, S., Sekiguchi, M., Wada, K., Nicoll, R.A. and Brecht, D.S.: Stargazin controls the pharmacology of AMPA receptor potentiators, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 10064-10067

Nishimoto, M., Furuta, A., Aoki, S., Kudo, Y., Miyakawa, H. and Wada, K.: PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. *Glia.* 55 (2007) 317-327

2. 学会発表

(国際学会)

Aoki, S., Sun, Y., Nishikawa, K., Yuda, H., Osaka, H., Wang, Y., Fukazawa, N. and Wada, K.: Solo/trio8, A Membrane-associated Short Isoform of Trio, Modulates Endosome Dynamics and Neurite Elongation, ASCB 45th annual meeting, San Diego, CA, Dec 11, 2006

(国内学会)

北村悠輔、君和田友美、松本 隆、和田圭司 : 交換モンテカルロ法を用いた遺伝子制御ネットワーク推定による核内受容体ネットワークの解析. 日本バイオインフォマティクス学会、第 10 回システムバイオロジー研究会、3.30, 2006

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
特になし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏 名 高坂 新一

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hattori, K. Uchino, S. Isosaka, T. Maekawa, M. Iyo, M. Sato, T. Kohsaka, S. Yagi, T. Yuasa, S.	Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice.	J. Biol. Chem.	281	7129-7135	2006
Uchino, S. Wada, H. Honda, S. Nakamura, Y. Ondo, Y. Uchiyama, T. Tsutsumi, M. Hirasawa, T. Kohsaka, S.	Direct interaction of PDZ domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 AMPA receptor.	J. Neurochem.	97	1203-1214	2006
Ohsawa, K. Irino, Y. Nakamura, Y. Akazawa, C. Inoue, K. Kohsaka, S.	Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglia chemotaxis.	Glia	55	604-616	2007

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏 名 湯浅 茂樹

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morone, N. Fujiwara, T. Murase, K. Kasai, R.S. Ike, H. Yuasa, S. Usukura, J. Kusumi, A.	Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography.	J. Cell Biol	174 (6)	851-862	2006
Zhang, H. Muramatsu, T. Murase, A. Yuasa, S. Uchimura, K. Kadomatsu, K.	N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 is required for brain keratan sulfate biosynthesis and glial scar formation after brain injury.	Glycobiology	16 (8)	702-710	2006
Kudo, T. Fujii, T. Ikegami, S. Inokuchi, K. Takayama, Y. Ikehara, Y. Nishihara, S. Togayachi, A. Takahashi, S. Tachibana, K. Yuasa, S. Narimatsu, H.	Mice lacking $\alpha 1$, 3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis X structure in brain and increased anxiety-like behaviors.	Glycobiology	17(1)	1-9	2007

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏 名 和田 圭司

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sun, Y. J. Nishikawa, K. Yuda, H. Wang, Y. L. Osaka, H. Fukazawa, N. Naito, A. Kudo, Y. Wada, K. Aoki, S.	Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation.	Mol. Cell. Biol.	26	6923-6935	2006
Tomita, S. Sekiguchi, M. Wada, K. Nicoll, R.A. Bredt, D.S.	Stargazin controls the pharmacology of AMPA receptor potentiators.	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	103	10064-10067	2006
Nishimoto, M. Furuta, A. Aoki, S. Kudo, Y. Miyakawa, H. Wada, K.	PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells.	Glia	55	317-327	2007

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Fyn Is Required for Haloperidol-induced Catalepsy in Mice^{*[S]}

Received for publication, October 26, 2005, and in revised form, December 21, 2005. Published, JBC Papers in Press, January 10, 2006, DOI 10.1074/jbc.M511608200

Kotaro Hattori^{‡§¶**1}, Shigeo Uchino^{‡‡}, Tomoko Isosaka^{‡||**}, Mamiko Maekawa[§], Masaomi Iyo[¶], Toshio Sato[¶], Shinichi Kohsaka^{‡‡}, Takeshi Yagi^{||**§§}, and Shigeki Yuasa^{‡§}

From the [‡]Department of Ultrastructural Research and the ^{‡‡}Department of Neurochemistry, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo 187-8502, the [§]Department of Anatomy and Developmental Biology and the [¶]Department of Psychiatry, University Graduate School of Medicine, Chiba 260-8670, ^{||}KOKORO Biology Group, FBS, Osaka University, Suita 565-0871, ^{**}CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi-shi 332-0012, and ^{§§}Laboratory of Neurobiology and Behavioral Genetics, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki 444-8585, Japan

Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits has been implicated in various brain functions, including ethanol tolerance, learning, and seizure susceptibility. In this study, we explored the role of Fyn in haloperidol-induced catalepsy, an animal model of the extrapyramidal side effects of antipsychotics. Haloperidol induced catalepsy and muscle rigidity in the control mice, but these responses were significantly reduced in Fyn-deficient mice. Expression of the striatal dopamine D₂ receptor, the main site of haloperidol action, did not differ between the two genotypes. Fyn activation and enhanced tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor NR2B subunit, as measured by Western blotting, were induced after haloperidol injection of the control mice, but both responses were significantly reduced in Fyn-deficient mice. Dopamine D₂ receptor blockade was shown to increase both NR2B phosphorylation and the NMDA-induced calcium responses in control cultured striatal neurons but not in Fyn-deficient neurons. Based on these findings, we proposed a new molecular mechanism underlying haloperidol-induced catalepsy, in which the dopamine D₂ receptor antagonist induces striatal Fyn activation and the subsequent tyrosine phosphorylation of NR2B alters striatal neuronal activity, thereby inducing the behavioral changes that are manifested as a cataleptic response.

Typical antipsychotic agents, such as haloperidol and chlorpromazine, have extrapyramidal side effects (EPS)² that resemble Parkinson disease. Drug-induced catalepsy, the impairment of movement initiation, in rodents is an animal model of EPS and is mainly caused by blockade of the dopamine D₂ receptor (D₂-R) (1, 2).

Haloperidol-induced responses are also dependent on *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R) activity, because prior administration of the NMDA-R antagonist MK-801 attenuates haloperidol-induced cat-

alepsy (3, 4). D₂-R and NMDA-R are co-expressed in close proximity along the dendrites of medium spiny neurons in the striatum, and they are functionally coupled in terms of controlling extrapyramidal functions (5).

The NMDA-Rs are hetero-oligomeric ligand-gated ion channels composed of a single NR1 subunit and one type of NR2 (A–D) subunit (6). The most abundant receptor subunits in the striatum are NR1, NR2A, and NR2B (7, 8). These three subunits are involved in extrapyramidal functions (5), and we have found that an NR2B-selective antagonist attenuates haloperidol-induced catalepsy (9).

Phosphorylation of tyrosine residues on the NMDA-R has been reported to modulate its channel characteristics (10, 11). Depriving the striatum of dopaminergic input increases the tyrosine phosphorylation of the striatal NMDA-R and the motor response (12, 13), but infusing the striatum with a tyrosine kinase inhibitor, genistein, attenuates both the tyrosine phosphorylation and the motor response induced by dopaminergic deprivation (13).

Fyn is a member of the Src family kinases (SFKs) and is associated with the NMDA-R at postsynaptic densities. Fyn phosphorylates NMDA-R subunits and modifies their channel activity (14). One of the NMDA-R subunits, NR2B, is preferentially phosphorylated by Fyn, and its phosphorylation has been implicated in several brain functions, including ethanol tolerance, long term potentiation, and seizure susceptibility (15–18). The Tyr-1472 of NR2B is a particularly key site for Fyn-mediated phosphorylation (17, 19).

To investigate the role of Fyn in the cataleptic behavior induced by haloperidol, we studied these haloperidol effects in Fyn-deficient mice and biochemically analyzed the Fyn-mediated signal transduction initiated by haloperidol. Based on our results, we discuss the significance of Fyn activation in haloperidol-induced catalepsy within the scope of signal transduction from D₂-R inhibition to modulation of the extrapyramidal system.

MATERIALS AND METHODS

Animals—Fyn tyrosine kinase-deficient mice were generated by inserting the β -galactosidase gene (*lacZ*) into the reading frame of the *fyn* gene as described previously (20). Because the *lacZ* introduced is expressed in both heterozygous (+/*fyn*^Z) and homozygous (*fyn*^Z/*fyn*^Z) mice, heterozygous mice were mainly used as the controls instead of wild-type mice to compensate for the possible effect of *lacZ* expression as a foreign gene. The background of this mutant's strain is C57BL/6J. Genotypes were analyzed by the PCR. All animals were maintained under standard laboratory conditions as described previously (15). All experimental procedures were in accordance with the 1996 National Institutes of Health guidelines and were approved by the Animal Care Committee of the Chiba University Graduate School of Medicine,

* This work was supported in part by Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan Research Grants 9B-4 and 15B-3 for Nervous and Mental Disorders, the Futaba Electronics Memorial Foundation, the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation Grant 05-32, and Long Range Research Initiative by Japan Chemical Industry Association (to S. Y.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains Figs. S1 to S5.

¹ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Ultrastructural Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo 187-8502, Japan. Tel.: 81-42-346-1719; Fax: 81-42-346-1749; E-mail: hattori@ncnp.go.jp.

² The abbreviations used are: EPS, extrapyramidal side effects; BSS, balanced salt solution; D₂-R, dopamine D₂-receptor; HAL, Haloperidol; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NMDA-R, *N*-methyl-D-aspartate receptor; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; SFKs, Src family kinases; TBS, Tris-buffered saline; TH, tyrosine hydroxylase.