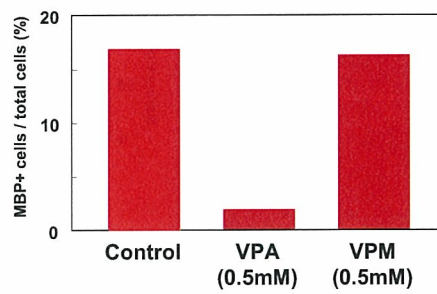
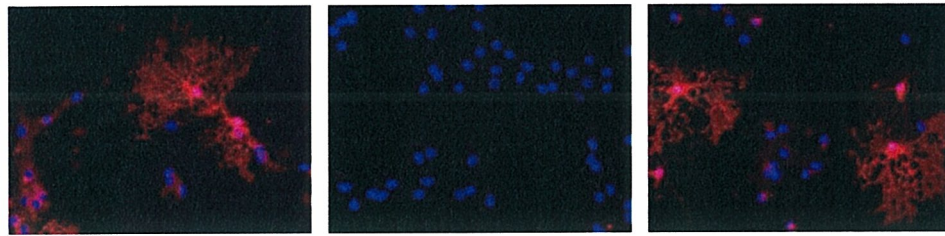


HDAC阻害活性を持たないバルプロミドはオリゴデンドロサイト分化を抑制しない



厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

脳形成・発達過程における神経伝達物質シグナルの外因性かく乱による脳障害に関する研究
—モデル系開発とメカニズム解明—

分担研究者 種村 健太郎 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部 主任研究官

研究要旨

胎生期におけるグルタミン酸受容体過剰刺激による毒性発現の解明を目的として、妊娠母マウスにドーモイ酸の腹腔投与を行い、出生後の雄マウスについて行動解析を行った結果、成体期マウスへのドーモイ酸投与時に確認された記憶障害のみならず、情動行動の変化および情報処理能力の低下が確認された。また脳構造を解析したところ、大脳皮質における神経細胞軸索の発達に障害が認められた。本研究によって、胎生期におけるグルタミン酸受容体の過剰刺激は、脳構造形成異常を引き起こすとともに、脳機能発達障害の一因である可能性が示された。

A. 研究目的

脳機能と構造の形成過程に、神経伝達物質が神経細胞増殖・分化調節因子として働くことが報告されている。よって、大人では一過性の作用をもたらす神経伝達物質や類似構造化学物質の暴露が、胎児期及び子ども期には神経細胞の増殖・分化をかく乱し、不可逆的な影響を招く可能性がある。そこで、グルタミン酸受容体を過剰刺激する化学物質であるドーモイ酸、グルホシネート、及びフタロイル-グルタミン等を用い、マウス胎生期及び幼若期暴露による不可逆的な脳機能発達障害について検討する。これを脳機能発達障害モデルとして確立し、その障害性の詳細を分子レベルで解析し、化学物質による脳機能異常・発達障害の分子基盤を解明することを目的とする。

B. 研究方法

妊娠マウスにドーモイ酸を投与し、得られた新生子(雄マウス)について生後 10 週齢時に

解析を開始した。なお、成体時におけるドーモイ酸投与の影響と比較検討するため、生後 10 週齢の雄マウスについても解析を行う。

神経行動毒性については、主に情動-認知系行動に焦点を合わせて、オープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、恐怖条件付け試験、驚愕反応プレパルス抑制試験、ケージ内活動量測定試験を組み合わせた解析を行い、胎生期におけるドーモイ酸投与の結果に生じる行動の変化およびその障害性の有無について検討した。

脳構造における障害性の有無に関しては、特に終脳における神経細胞突起の発達に焦点を合わせて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。またグルタミン酸が興奮性神経伝達物質であることから、得られた新生子における脳内の興奮-抑制バランス制御に障害が生じている可能性が高い。よって各種受容体および調節因子タンパクの発現パターンについても解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、国立医薬品食品衛生研究所が定める動物実験に関する指針を遵守した上で遂行した。

C. 研究結果

生後 10 週齢の雄マウスにドーモイ酸を投与し、情動-認知系行動について解析を行った結果、恐怖条件付け試験による場所-連想記憶に関して著しい成績低下が確認できた。妊娠マウスにドーモイ酸を投与し、得られたマウス(実験群マウス:胎生期ドーモイ酸曝露-雄マウス)について同様に情動-認知系行動解析を行った結果、オープンフィールド試験における中央部滞在時間の増加、明暗往来試験における明所滞在時間の増加、明暗往来数の増加、高架式十字迷路試験における総移動量増加とアーム選択回数増加等の情動行動に変化が生じていることが確認できた。さらに実験群マウスでは、恐怖条件付け試験からは、場所-連想記憶のみならず学習度および音-連想記憶についても成績低下が確認された。また驚愕反応プレパルス抑制試験によって音-情報処理能力の低下が生じていることが示された。

抗体を用いた免疫組織化学を行い、大脳皮質における神経細胞軸索構成タンパクについて共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した結果、実験群マウスでは、特に神経細胞軸索突起の発達不全が確認できた。こうした神経細胞軸索構成タンパクのリン酸化修飾状態および界面活性剤に対する溶解性についてタンパク解析を行った結果、実験群マウスにおける神経細胞軸索構成タンパクの特性は対照群と異なる状態にあることが示された。

D. 考察

ドーモイ酸は、ヒトにおいて特に海馬を選択的に破壊する記憶毒性を示すことが報告されている。生後 10 週齢雄マウスへのドーモイ酸投与結果から海馬依存的な場所-連想記憶障害が生じていたことから、グルタミン酸受容体過剰刺激による神経行動毒性標的部位はヒトと同様に海馬であると判断できた。しかしながら、妊娠マウスへのドーモイ酸投与の結果に得られた実験群マウスでは、(1)さらに重度の学習-記憶障害が認められるとともに、(2)情動系行動に大きな変化が認められること、(3)海馬だけでなく大脳皮質において神経細胞突起形成不全が生じること、(4)軸索構成タンパクに変化が生じていること、(5)複数種のグルタミン酸受容体発現量に変化が生じていることが確認できた。従って実験群マウスは、胎生期におけるグルタミン酸受容体の一過性過剰刺激を起点とした脳形成不全をともなう脳機能発達障害モデルマウスとして位置づけることが出来ると判断できる。今後、脳形成過程における詳細な解析を行うとともに、他のグルタミン酸様構造化学物質についても各種受容体サブタイプへの親和性に応じて検討する必要があると考えられた。

E. 結論

ドーモイ酸を用いた胎生期におけるグルタミン酸受容体の過剰刺激は、脳構造形成異常を伴う脳機能発達障害の一因である可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

Yamada M, Tanemura K, Okada S, Iwanami

A, Nakamura M, Mizuno H, Ozawa M, Ohyama-Goto R, Kitamura N, Kawano M, Tan-Takeuchi K, Ohtsuka C, Miyawaki A, Takashima A, Ogawa M, Toyama Y, Okano H, Kondo T.

Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells.

Stem Cells. in press.

Araya R, Noguchi T, Yuhki M, Kitamura N, Higuchi M, Saido TC, Seki K, Itohara S, Kawano M, Tanemura K, Takashima A, Yamada K, Kondoh Y, Kanno I, Wess J, Yamada M.

Loss of M5 muscarinic acetylcholine receptors leads to cerebrovascular and neuronal abnormalities and cognitive deficits in mice.

Neurobiol Dis. 24(2): 334-44. 2006.

Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M, Nakatomi R, Yamada K, Kondo T, Ogawa M, Obata K, Watanabe M, Hashikawa T, Tanaka K.

Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development.

Proc Natl Acad Sci USA. 103(32): 12161-6. 2006.

Tanemura K, Chui DH, Fukuda T, Murayama M, Park JM, Akagi T, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Kimura T, Hashikawa T, Nakano Y, Kudo T, Takeda M, Takashima A.

Formation of tau inclusions in knock-in mice with familial Alzheimer disease (FAD) mutation of presenilin 1 (PS1).

J Biol Chem. 281(8):5037-41. 2006

2. 学会発表

社会的環境によるマウス脳エピジェネシス・脳構造・脳機能への影響

第38回 日本発生生物学会

仙台 2005年6月

遺伝子導入による痴呆症モデルマウスの開発とその解析

第50回 発生工学・疾患モデル研究会

東京 2005年5月

成育環境がマウス脳エピジェネシス・脳構造・脳機能への影響

第139回 日本獣医学会

和光市 2005年3月

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許

(1) 特願 2004-186530

(2) 特願 2005-082444

2. 実用新案登録

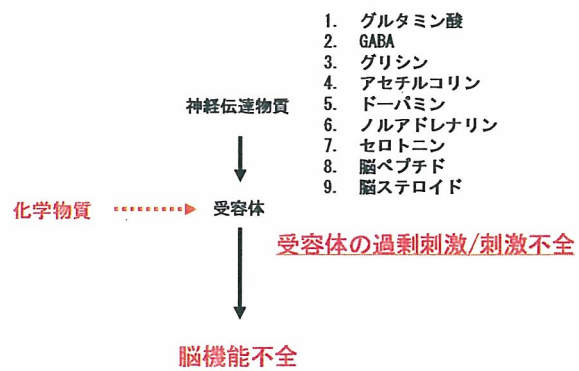
なし

3. その他

日本獣医学会大会長賞(2005年3月)

研究目的

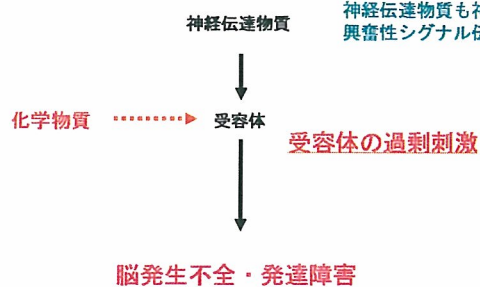
グルタミン酸受容体を過剰刺激する化学物質を用い、
マウス胎生期暴露による不可逆的な脳機能発達障害について検討する。



神経伝達物質は脳の発生・発達過程においても重要である！

軸索投射経路形成、シナプス形成、神経回路構築等を調節する。

胎生期・脳ではグルタミン酸、アセチルコリンのみならず、成体・脳で抑制性シグナル伝達を行うGABA、グリシン等の神経伝達物質も神経細胞を脱分極させる興奮性シグナル伝達を行う。



グルタミン酸トランスポーター
GLAST/GLT1二重欠損マウスでは、
グルタミン酸受容体過剰刺激による
脳構造形成不全を呈する！

過剰な神経伝達物質の除去

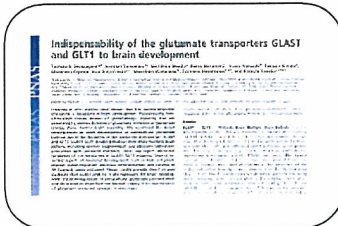
1. 細胞膜トランスポーター
 2. 酵素による分解
- 受容体の過剰刺激を抑制

神経伝達物質

↓
受容体

↓
受容体の過剰刺激

↓
脳発生不全



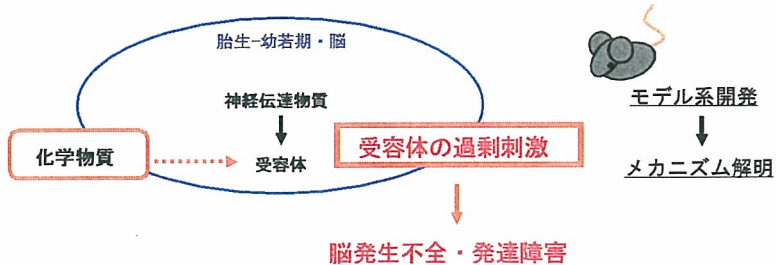
Proc Natl Acad Sci USA
2006, 103 (32) : 12161-12166



Nature Reviews Neuroscience
2006, 7: 756-757

研究目的

グルタミン酸受容体を過剰刺激する化学物質を用い、
マウス胎生期暴露による不可逆的な脳機能発達障害について検討する。



脳構造異常を伴う脳機能不全を呈する危険が考えられる！

グルタミン酸

- 1) 脳高次機能を調整する主要な興奮性神経伝達物質である。
- 2) 過剰なグルタミン酸は神経細胞毒性を示す (グルタミン酸興奮毒性)。

脳におけるグルタミン酸受容体として

NMDA型	NR1-3...
AMPA型	Glur1-4...
カイニン型	Glur5-7...
代謝型	mGlur1-8...

- 3) グルタミン酸トランスポーターは細胞外グルタミン酸濃度を調整するスカベンジャーとしても重要である。

脳における細胞膜型グルタミン酸トランスポーター
EAAT1 (GLAST)、EAAT2 (GLT1)、EAAT3 (EAAG1)、EAAT4、
小胞膜型グルタミン酸トランスポーター
VGLUT1、VGLUT2

- 4) 抑制性神経伝達物質であるGABAはGADによってグルタミン酸から合成される。

(1) グルタミン酸受容体遺伝子改変マウスの特徴

NR1 KO	情報処理障害
NR2A KO	潜在学習障害
Glur1 KO	作業記憶障害
Glur2 KO	情動行動変化
mGlur7 KO	作業記憶障害・情動行動変化

(2) グルタミン酸トランスポーター遺伝子改変マウスの特徴

EAAT1 KO	軽度の協調運動失調
EAAT2 KO	生後3-12週齢に致死性のてんかん発作
EAAT1/EAAT2 WKO	胎生致死 (脳構造形成不全)



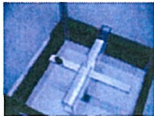
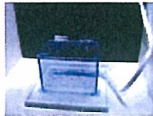
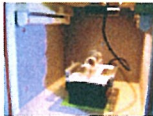
(3) グルタミン酸類似 (構造) 物質

kainic acid	
domoic acid	ドーモイ酸: カイニン酸型受容体を刺激する
quisqualic acid	(グルタミン酸の30-100倍)
ibotenic acid	
glufosinate	
phthalyl glutamine	
phthalyl glutamic acid	

ドーモイ酸：



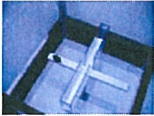
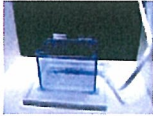
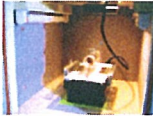
- (1) カイニン酸型受容体を刺激する（グルタミン酸の30-100倍）。
- (2) **記憶喪失性貝毒**であることが判明。
- (3) 重症患者では逆行性健忘を伴う。
- (4) 高位の大脳皮質機能は維持されている（アルツハイマー型認知症との相違点）。
- (5) 特に**海馬を選択的に破壊**する。

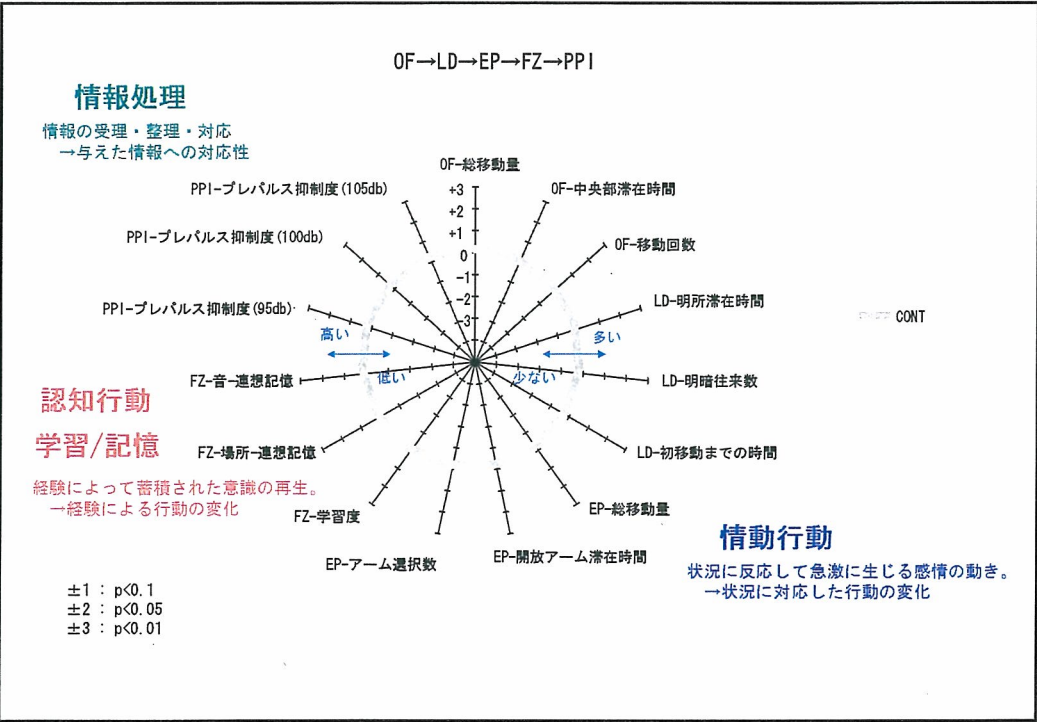
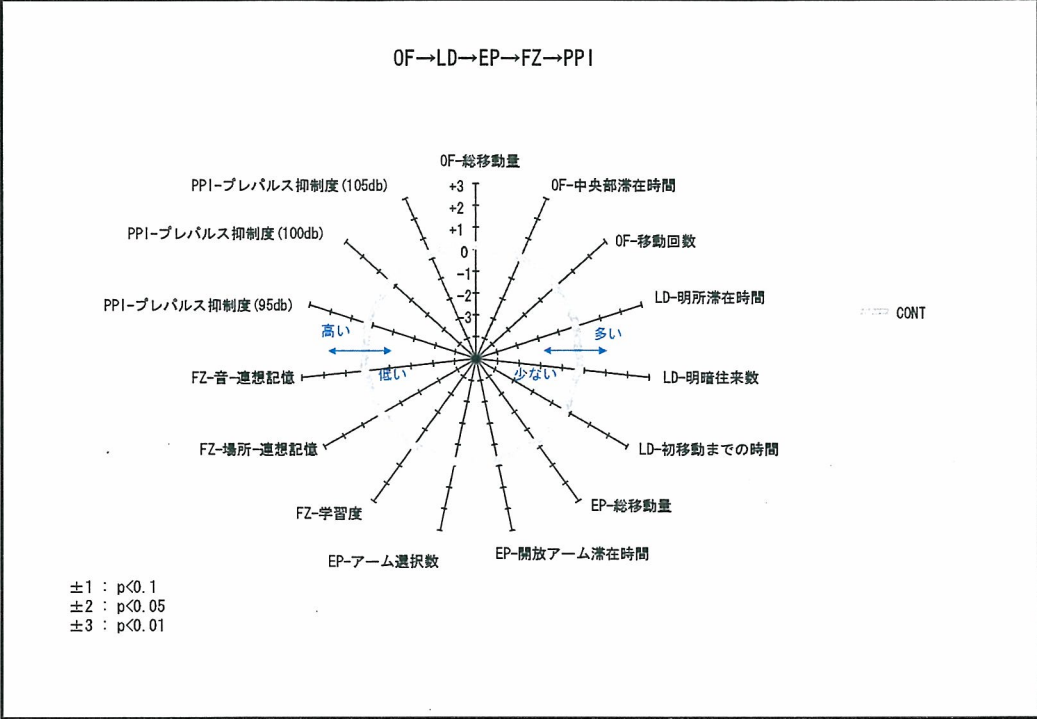
成体♂マウス（10-11週齢）を用いて神経行動毒性試験を試行

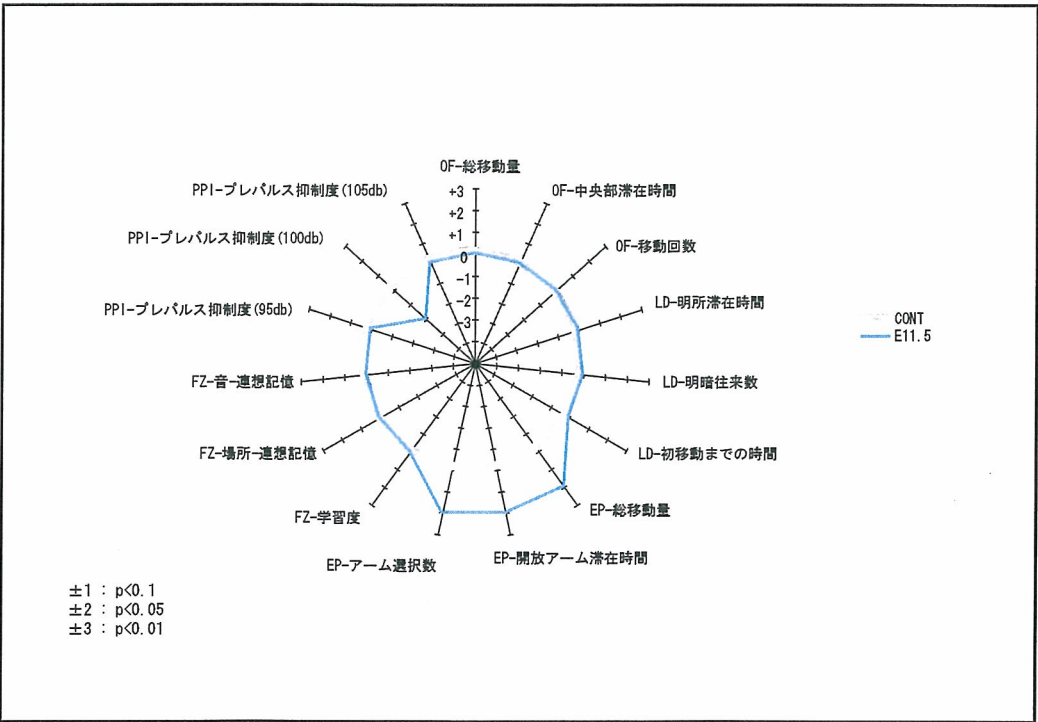
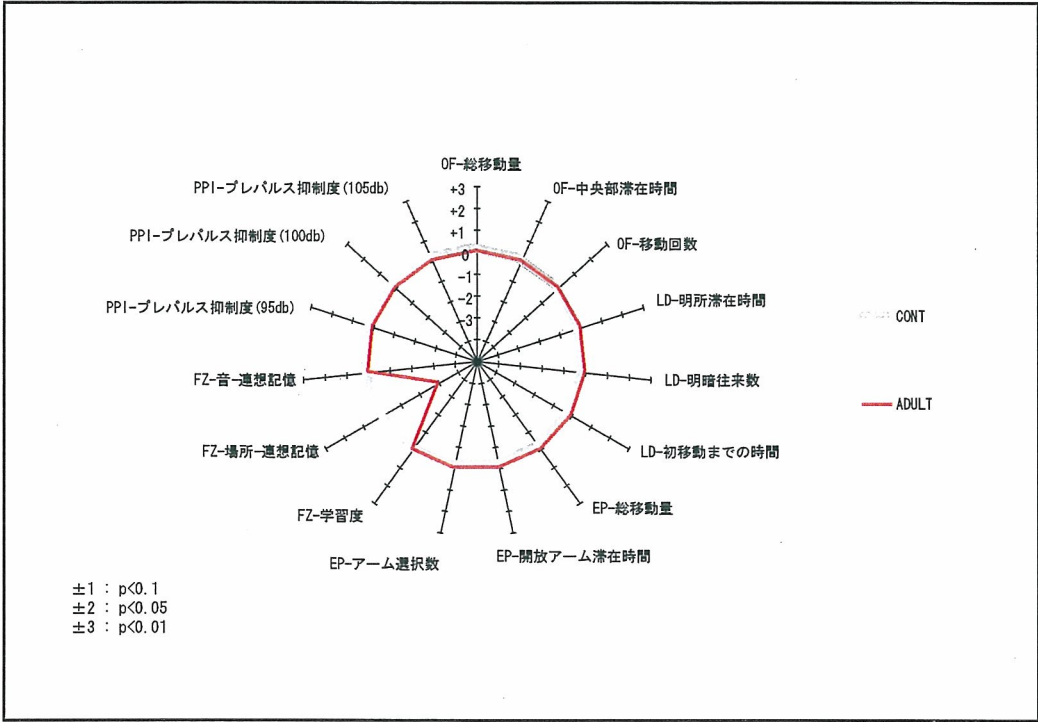
OF	LD	EP	FZ	PPI
				
オープンフィールド試験 10分	明暗往来試験 5分	高架式十字迷路試験 10分	恐怖条件付け試験 6分・3日間	プレハルス驚愕抑制試験 30分
検定項目 総移動量 中央部-滞在時間 移動回数	検定項目 明所滞在時間 明暗往来数 初移動時	検定項目 総移動量 アーム選択数 開放アーム-滞在時間	検定項目 学習度 (1日目) 場所-連想記憶 (2日目) 音-連想記憶 (3日目)	検定項目 プレハルス驚愕抑制度 (80-105db:120db)

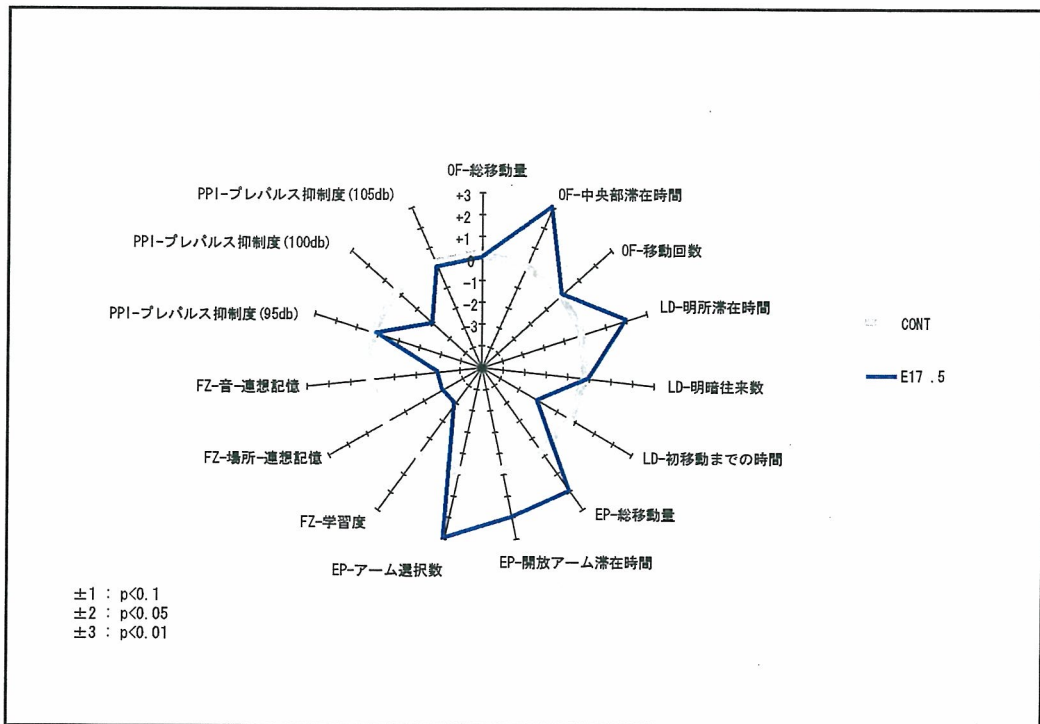
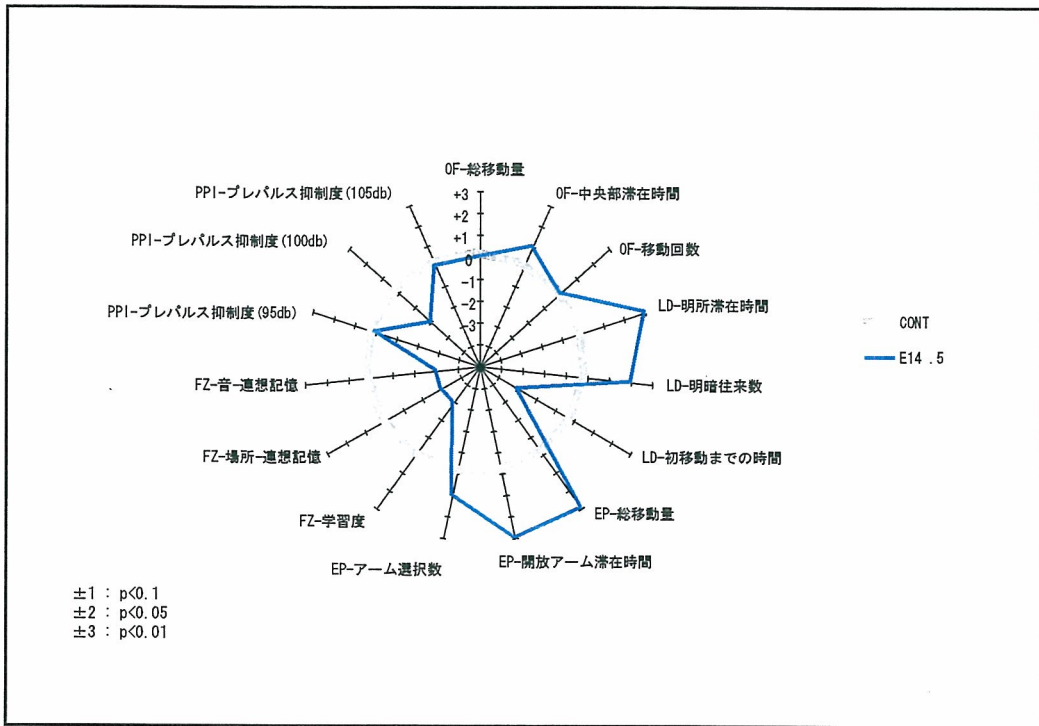
妊娠雌マウス (E11.5、14.5、17.5)
ドーモイ酸 (1.0mg/kg) 腹腔投与
→ 出産
→ 4週齢時に離乳 & 雌雄判別
→ 神経行動毒性試験 (♂マウス: 10-11週齢)

- C: Control (n=8)
- E11: Domoic Acid @ E11.5 (n=8)
- E14: Domoic Acid @ E14.5 (n=8)
- E17: Domoic Acid @ E17.5 (n=8)

OF	LD	EP	FZ	PPI
				
オープンフィールド試験 10分	明暗往来試験 5分	高架式十字迷路試験 10分	恐怖条件付け試験 6分・3日間	プレハルス驚愕抑制試験 30分
検定項目 総移動量 中央部-滞在時間 移動回数	検定項目 明所滞在時間 明暗往来数 初移動時	検定項目 総移動量 アーム選択数 開放アーム-滞在時間	検定項目 学習度 (1日目) 場所-連想記憶 (2日目) 音-連想記憶 (3日目)	検定項目 プレハルス驚愕抑制度 (80-105db:120db)





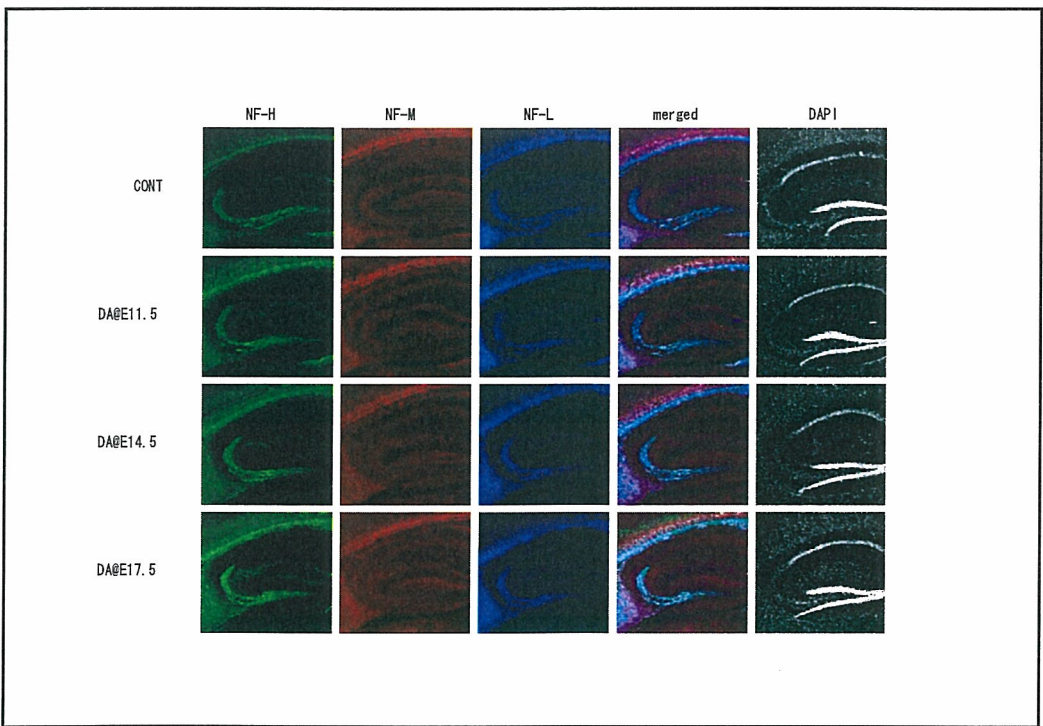
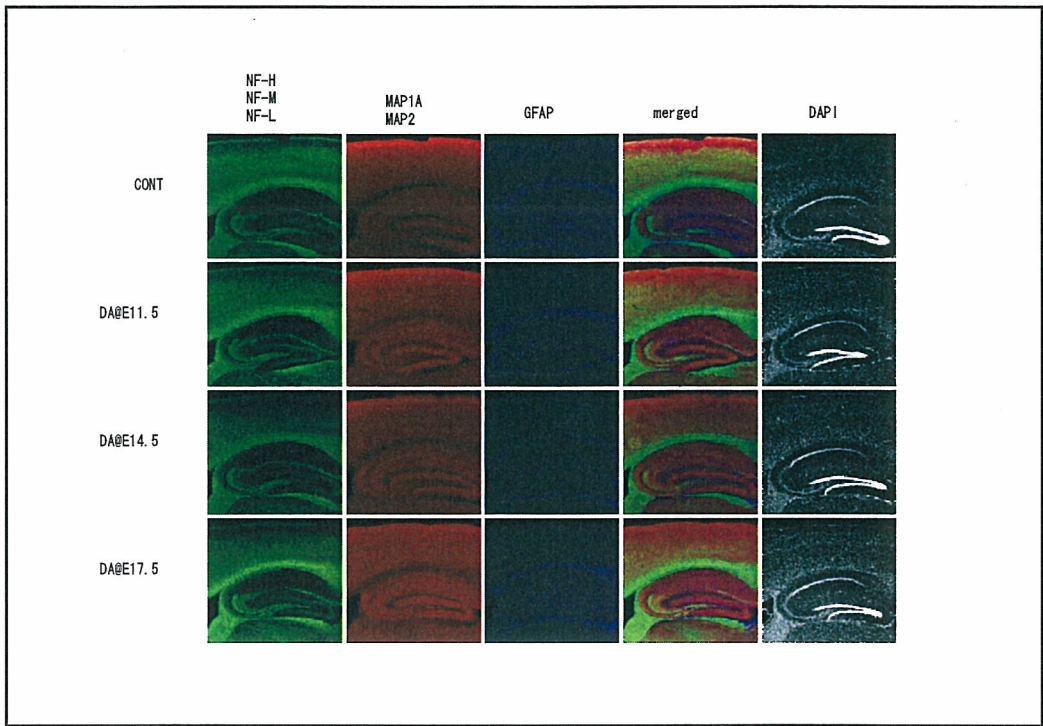


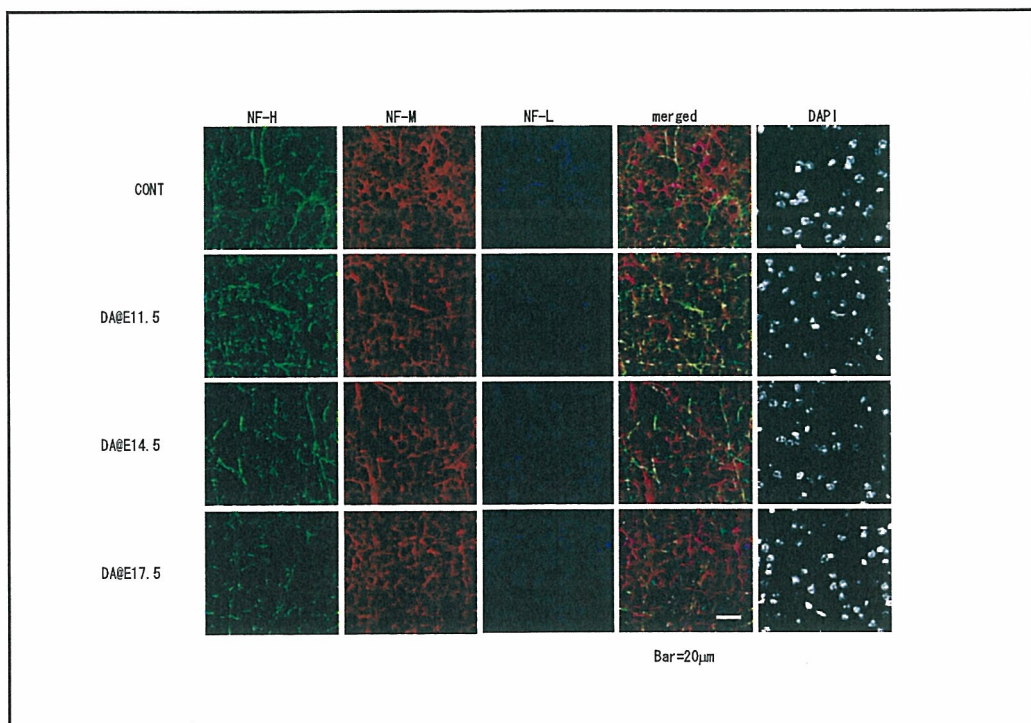
妊娠マウスヘドーマイ酸を投与した結果に得られたマウスでは成体期投与とは異なる情動-認知行動に変化が認められた。

適応行動不全、学習記憶障害、情報処理力低下が生じたと判断できる。

統合失調症モデルとして報告されているマウスの呈する行動様式である。

妊娠マウスヘドーマイ酸を投与した結果に得られたマウスに脳構造・形態変化はあるか？



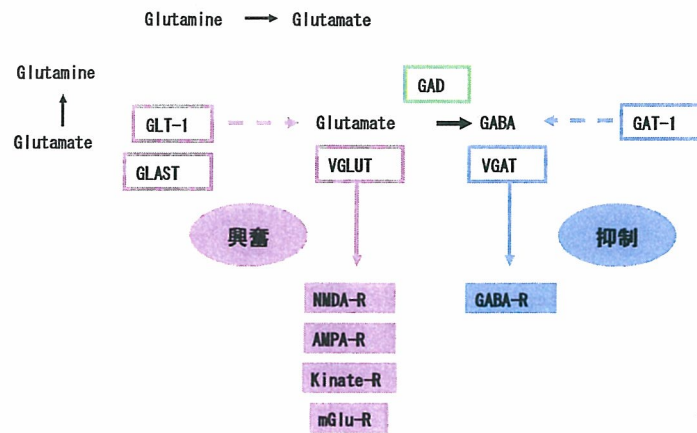


妊娠マウスヘドーマイ酸を投与した結果に得られたマウスでは
神経細胞突起の発達不全が観察された。

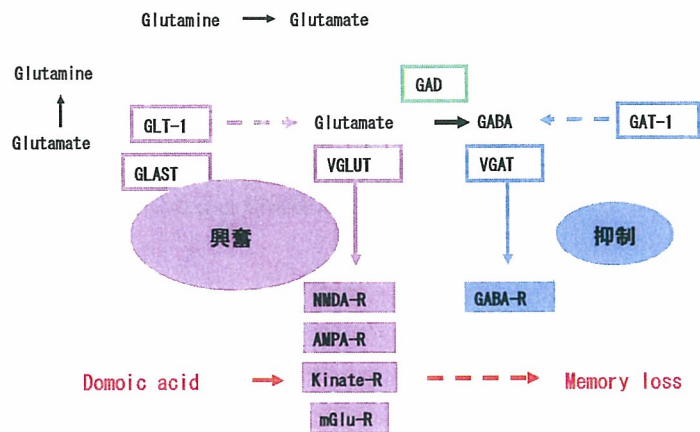
軸索輸送能低下、軸索投射経路異常、神経回路形成不全・・・
 と対応する形態異常と判断できる。

妊娠マウスヘド一モイ酸を投与した結果に得られたマウスに
脳内興奮-抑制バランス異常はあるか？

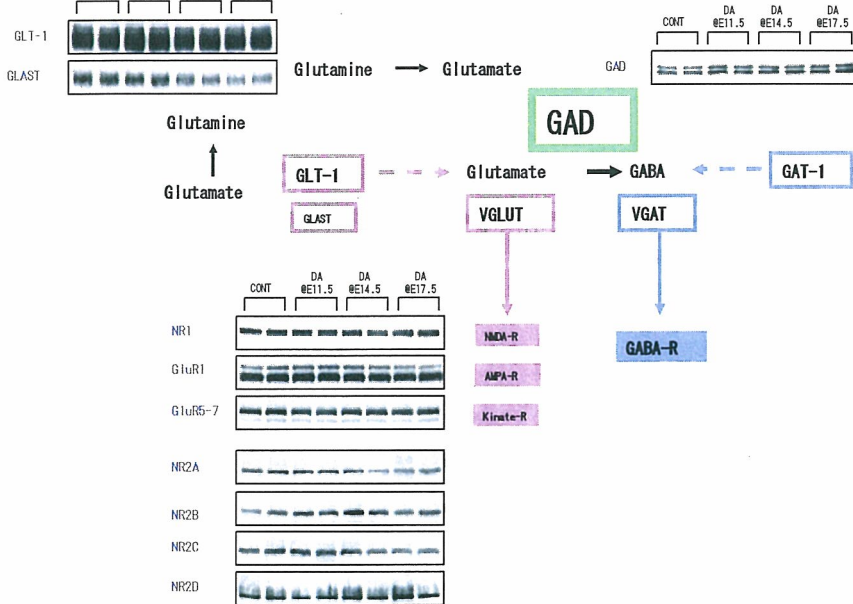
正常な脳機能には、
興奮-抑制バランスの調節が重要である！



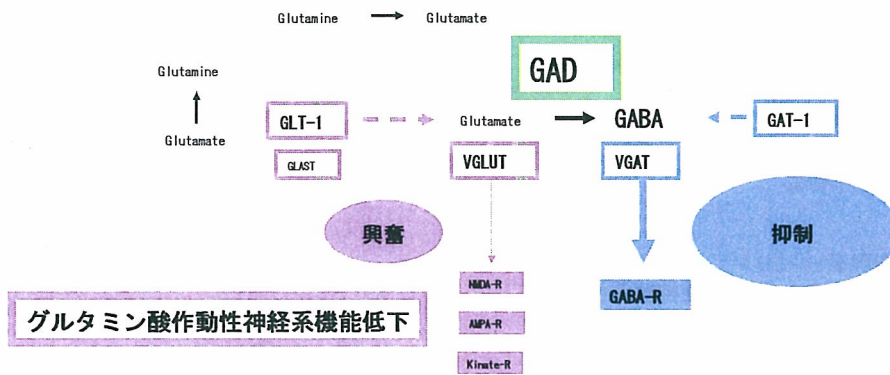
成体時にドーモイ酸を投与



胎生期にドーモイ酸投与→成体時

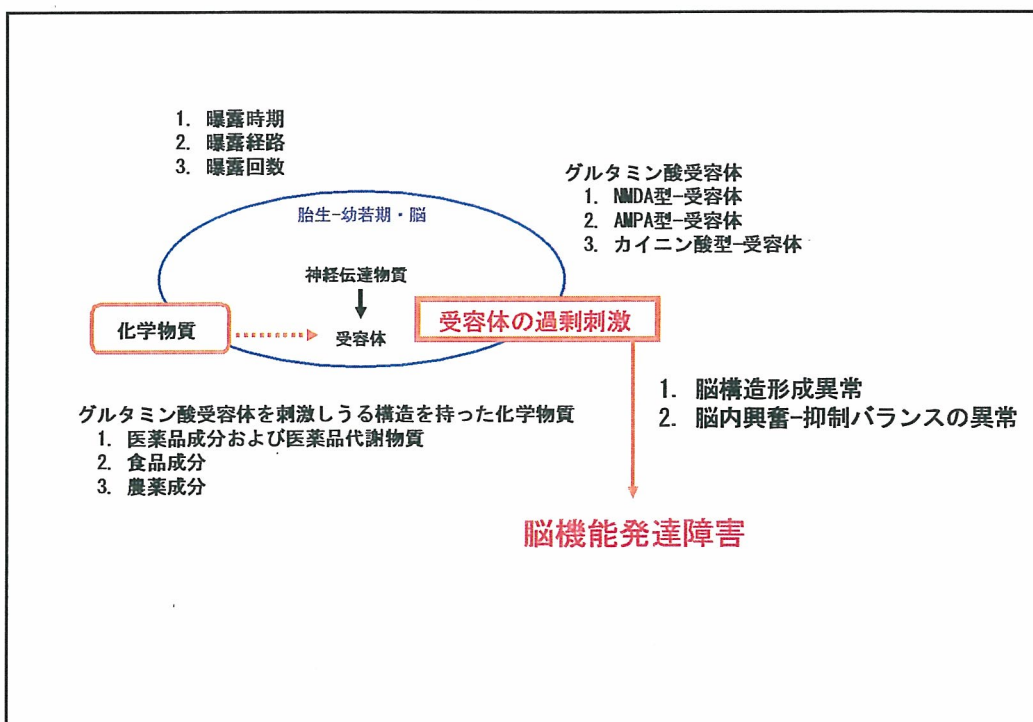
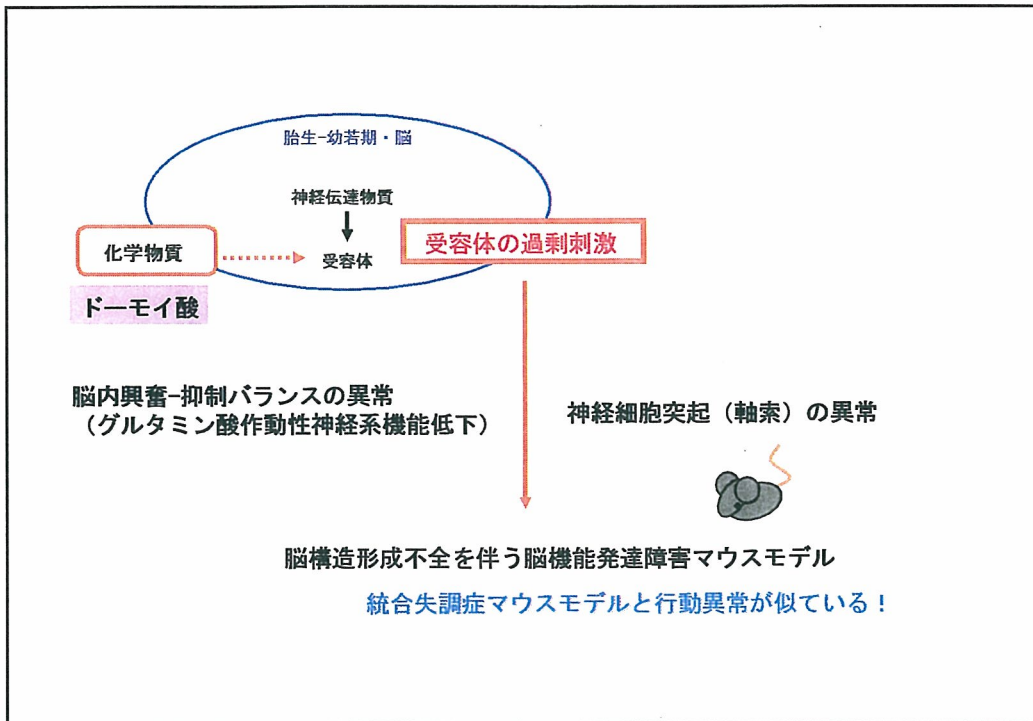


胎生期にドーモイ酸投与→成体時



統合失調症の病態に関する
「グルタミン酸低下仮説」に対応するメカニズムである可能性がある！

結論および考察



自然免疫系の子どもの成長に応じた発達の分子基盤

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所教授

研究要旨

生体の恒常性維持に重要な役割を果たす免疫系で、自然免疫系の活性化機構が近年明らかになった。しかし、自然免疫系の子どもの成長に応じた発達機構についてはまだ不明な点が多い。この自然免疫系の活性制御機構を解析した。その結果、TLR を介した NF- κ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子が存在し、遅期誘導型遺伝子の発現を核に発現する I κ B 分子 I κ BNS が抑制することを見出した。さらに、早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子の発現誘導機構を解析した。早期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が常に開いており転写制御因子が刺激後迅速にアクセスしやすい構造となっている。一方、遅期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激により構造変換を受けて開き、転写制御因子がアクセスできるようになる。このことが、遺伝子発現に時間を要する原因であることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子のプロモーターのクロマチン構造変換に関わる分子として、I κ BNS と同じ I κ B 分子 I κ Bzeta を同定した。

また、子どもの自然免疫系の活性を解析するため、2週齢と8週齢のマウスの腹腔マクロファージの機能を解析した。TLR 刺激によるサイトカイン産生は両週齢のマウス間で差はないが、アポトーシス細胞の貪食能、大腸菌の貪食能が、2週齢のマクロファージで有意に低下していた。自然免疫系の細胞も、獲得免疫系を担当するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達する可能性を示唆している。

A. 研究目的

生体の恒常性維持において、病原体などの外界異物の生体内侵入を非自己として感知し、排除する免疫系が重要な役割を果たしている。この免疫系は、大きく自然免疫系と獲得免疫系から成り立っている。外界異物を抗原として認識するリンパ球を主体とする獲得免疫系の活性化機構がこれまで詳細に解析されてきたのに比して、自然免疫系の活性化機構は永年不明のままであった。しかし、近年、病原体の構成成分を特異的に認識

する Toll-like receptor (TLR)の機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになった。そして、TLR による病原体認識が、自然免疫系の活性化のみならず、抗原特異的な獲得免疫系の活性化をも制御していることが明らかになった。しかし、自然免疫系の子どもの成長に応じた発達機構についてはまだ不明な点が多い。そこで、本研究では、自然免疫系の活性を制御する分子機構を解析し、さらに子どもの成長に応じた自然免疫系の活性の変化を、マウスを用いて解析し、生体