

---脳の発生・発達に必要な事象---

1. 配置：細胞の増殖・分化・移動
2. 配線：神経突起の伸長
3. 接続：スパイン形成
4. 起動：シナプス完成
5. 調整：神経回路の選別（軸索剪定・シナプス淘汰等）

グリア細胞による支持機構

【結果】

幼若期にイボテン酸を単回強制経口投与したマウスは

- ① 成熟後に、不安関連行動の逸脱、
記憶能の低下、脳内情報処理異常が認められた。
統合失調症関連遺伝子改変マウスの表現型を包括する。
- ② 投与後の初期遺伝子発現変動解析から、
神経回路形成時における微細構造の構築異常が疑われた。

【結論】

本研究結果から、
幼若期個体におけるイボテン酸摂取による、
未知の遅発神経影響の危険性が示され、
それは、神経回路形成異常を起点とした
重篤な脳高次機能障害と考えられた。

神経幹細胞分化様式かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明に関する研究

研究分担者 中島 欽一

奈良先端科学技術大学院大学 教授

本年度の研究では、マウスを胎仔期にバルプロ酸に暴露し、神経幹細胞の増殖と出生・成長後の行動様式における影響を検討した。その結果、胎仔期バルプロ酸暴露マウスでは、成長した成体脳海馬においても神経幹細胞の増殖が減少していることが分かった。またこれらのマウスにおいて記憶学習障害も観察された。

A. 研究目的

脳・神経系は主要な3つの細胞種、ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトによって構成されるが、これらは共通の神経幹細胞から産生され、互いに密接に連携しながら高度な情報処理機能を発揮する。そのためには胎児期から成体における神経幹細胞から各種細胞への分化・成熟が時空間的に精妙に制御される必要がある。これが破綻した場合、これまでも重度な神経疾患や機能障害に至ることが数多く示されているがその原因の詳細については不明な点が多い。そこで本研究では神経幹細胞分化制御に影響を及ぼす可能性が考えられる化学物質のいくつかに焦点を絞り、その分子基盤と遅発性中枢毒性発現機序の解明を目指す。

B. 研究方法

本年度の研究では、胎生12.5～14.5日に妊娠マウスへバルプロ酸を経口投与(300 mg/kg、1回/日)することで、バルプロ酸を経胎盤的に暴露した産仔マウスにおける、神経幹細胞の増殖ととも

に、暴露の結果、成熟期に至るまで残存する脳高次機能への影響の有無を検討する目的で、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、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験、尾懸垂試験からなる行動解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は奈良先端科学技術大学院大学の動物倫理委員会の規定に基づき行うものである。

C. 研究結果

胎生12.5～14.5日にバルプロ酸に暴露されたマウスの出生・成長を待ち、生後12週から1週間、1日1回BrdU(150 mg/kg)を腹腔内に投与し、増殖細胞をラベルした。投与終了翌日に脳を固定し、海馬における増殖細胞を抗BrdU抗体を用いた免疫染色により検出したところ、胎生期バルプロ酸暴露マウスにおいては、対照群と比較して、顕著な減少が見られた。生後12週齢の雄マウスの行動解析から、胎生期バルプロ酸暴露マウスは、対照群と比較し、オープンフィールド試験、明暗

往來試験、高架式十字迷路試験において、不安関連行動の逸脱はほとんど認められないものの、活動性が低い傾向を示すとともに、条件付け学習記憶試験から、記憶学習行動に障害が生じていることが明らかになった。さらにプレパルス驚愕反応抑制試験から、軽度の驚愕反応抑制不全が示唆された。また低活動性を示すことから鬱モデルに頻用される尾懸垂試験を行ったが、異常は認められなかった (Table.1、種村班員との共同研究)。

Table.1

Open field test (10 min)		
Total distance traveled		decreased (p<0.05)
Time spent in center area		ns
Number of movement		ns
Distance per movement		decreased (p<0.05)
Light/dark transition test (5 min)		
Time spent in light area		ns
Time spent in dark area		ns
Distance traveled in light area		ns
Distance traveled in dark area		decreased (p<0.01)
Number of transition		decreased (p<0.05)
Latency for light area		ns
Elevated plus maze test (10min)		
Total distance traveled		decreased (p<0.05)
Time spent in open arms		ns
Time spent in closed arms		ns
Number of entry into open arm		ns
Number of entry into closed arm		decreased (p<0.05)
Contextual/bued fear conditioning test (6 min x 3 days)		
Contextual freezing		decreased (p<0.01)
Cued freezing		decreased (p<0.01)
Prepulse inhibition test (30 min)		
Prepulse85db/120db		ns
Prepulse90db/120db		ns
Prepulse95db/120db		decreased (p<0.05)
Prepulse100db/120db		ns
Tail suspension test (3 min)		ns

ns; no significant difference

D. 考察

今回、バルプロ酸曝露は胎生期の3日間だけであるのに、成体になったマウスの海馬においてもその影響がみられ、神経幹細胞の増殖が減少していた。この原因として、神経幹細胞自身の増殖能が低くなったこと、あるいは神経幹細胞を取巻く微少環境が変化してしまったことなどが考えられるが、それを明らかにすることが今後の課題の一つである。また、海馬でのニューロン新生は記憶学習と強く相関することが示唆されており、今回海馬における神経幹細胞の増殖減少がみられたことは、行動解析で明らかになった胎生期バルプロ酸曝露マウス成体での記憶学習障害の原因である可能性が高いと思われる。

E. 結論

以上のようにマウス胎子がバルプロ酸に暴露された場合、その成体マウスにおいて海馬での神経幹細胞の増殖減少と記憶障害が引き起こされることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

1. Juliandi B., Abematsu M., Nakashima K. Epigenetics, Stem cells and Cellular differentiation. in Handbook of epigenetics: The new molecular and medical genetics (ed. Tollefsbol T.O.) (Elsevier) in press.

2. Suzuki A., Raya A., Kawakami Y., Morita M.,

Matsui T., Nakashima K., Gage F.H., Rodriguez-Esteban C., Izpisua Belmonte J.C. Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-mediated dedifferentiation of committed mesoderm progenitors. in Regulatory networks in stem cells (eds. Rajasekhar, V.K. & Vemuri, M.C.) 37-53 (Humana Press, New York, 2009).

2) 雑誌

1. Asano H., Aonuma M., Sanosaka T., Kohyama J., Namihira M., Nakashima K. Astrocyte Differentiation of Neural Precursor Cells is Enhanced by Retinoic Acid Through a Change in Epigenetic Modification. *Stem Cells* 27, 2744-2752 (2009).

2. Kuwabara T., Hsieh J., Muotri A., Yeo G., Warashina M., Lie D.C., Moore L., Nakashima K., Asashima M., Gage F.H. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 12, 1097-1105 (2009).

3. Tsujimura K., Abematsu M., Kohyama J., Namihira M., Nakashima K. Neuronal differentiation of neural precursor cells is promoted by the methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Exp Neurol* 219, 104-111 (2009).

2. 学会発表

〈国内学会〉

1. 辻村啓太、鈴木暁也、中島欽一：Rett 症候群原因遺伝子産物 MeCP2 の機能解析、第 4 回神経発生討論会、岡崎コンファレンスセンター、2010 年 3 月 19-20 日

2. 高木美智、滝沢琢己、笹岡寛敏、中島欽一：ニューロン活動依存的に発現する遺伝子の核内空間配置解析、第 32 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009 年 12 月 9-12 日

3. Sasaoka, H., Takizawa, T., Kimura, H., Nakashima, K. : Analysis of chromatin modifications and transcriptional regulations of activity-dependent genes in post-mitotic neurons、第 32 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009 年 12 月 9-12 日

4. Urayama, S., Takizawa, T., Hori, Y., Kohyama, J., Nakashima, K. : Analysis of DNA methylation-independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression、第 32 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009 年 12 月 9-12 日

5. Sanosaka, T., Inubushi, H., Kohyama, J., Takizawa, T., Nakashima, K. : A source of astrocyte-inducing cytokines in the developing mouse brain、第 32 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009 年 12 月 9-12 日

6. Berry, J., Tsujimura, K., Abematsu, M., Kohyama, J., Nakashima, K. : The Role of Histone Acetylation on Cortical Development、第 32 回日本分子生物学会年

会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

7. 浅野弘嗣、青沼真、佐野坂司、神山淳、波平昌一、中島欽一：レチノイン酸誘導性ヒストンアセチル化による神経幹細胞のアストロサイト分化促進機構、第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

8. 畑田出穂、波平昌一、森田純代、堀居拓郎、木村美香、中島欽一：Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation.、第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

9. 中島欽一：脊髄損傷に対するエピジェネティック治療、第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日（シンポジウム、口頭）

10. 精松昌彦、辻村啓太、山野真利子、斉藤美知子、河野憲二、神山淳、波平昌一、小宮節郎、中島欽一：移植神経幹細胞のエピジェネティック制御による損傷脊髄再生治療、第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日

11. 佐野坂司、波平昌一、神山淳、蟬克憲、田賀哲也、中島欽一：神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得を制御するエピジェネティクス機構、第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日（シンポジウム、口頭）

12. 中島欽一：メチル化DNA結合タンパク質による神経系細胞の分化・可塑性制御、神経化学会-GRT研究会連携オープンシンポジウム、伊香保温泉 ホテル天坊、2009年6月21日（シンポジウム、口頭）

13. 滝沢琢己、中島欽一：アストロサイト特異的遺伝子GFAP発現制御に関するDNAメチル化と遺伝子座核内配置、第52回日本神経化学会大会、伊香保温泉 ホテル天坊、2009年6月21-24日（シンポジウム、口頭）

14. 中島欽一：神経幹細胞が生み出す細胞の順番付けの仕組み、第52回日本神経化学会大会、伊香保温泉 ホテル天坊、2009年6月21-24日（シンポジウム、口頭）

15. 滝沢琢己、Tom Misteli、中島欽一：アストロサイト特異的遺伝子GFAPの核内配置と転写活性、第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日

16. 辻村啓太、精松昌彦、神山淳、波平昌一、中島欽一：メチル化DNA結合タンパク質MeCP2によるニューロン分化誘導機構と中枢神経系再生医療への応用、第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日

17. 笹岡寛敏、滝沢琢己、中島欽一：ニューロンでの遺伝子発現におけるエピジェネティック修飾の解析、第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日

18. 蟬克憲、波平昌一、神山淳、佐野坂司、中島欽一：第7回幹細胞シンポジウム、Committed neuronal precursors confer astrocyte-differentiation potential on neural stem cells through Notch-signal mediated DNA demethylation during mouse brain development、泉ガーデンギャラリー、2009年5月

15-16 日 (シンポジウム、口頭)

〈国際学会〉

1. Nakashima, K. Mechanism in sequential differentiation of neural stem cells mediated by neuron-stem cell interaction. The 1st International Global COE Symposium. Gonyo Hall, Sendai, Japan. December7-8, 2009 (oral)

2. Takizawa, T., Sasaoka, H., Takagi, M., Kimura, H., Nakashima, K. The spatio-temporal regulation of activity- dependent genes in post-mitotic neurons. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. OIST Seaside House. Okinawa, Japan. November29-December 3, 2009

3. Nakashima, K. Mechanism for sequential acquisition of differentiation potential of neural stem cells. The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APS N 2009. Busan, Korea. August 23-25, 2009 (Symposium oral)

4. Nakashima, K. Epigenetic Regulations for Neural Cell Differentiation and Plasticity. Lasker/IRRF Initiative for Innovation in Vision Research, J.Erik Jonsson Center, Woods Hole, Massachusetts. July13-15, 2009 (oral)

5. Sanosaka, T., Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Benjamin, D., Taga, T., Nakashima, K. COMMITTED NEURONAL PRECURSORS CONFER ASTROCYTE-DIFFERENTIATION POTENTIAL ON NEURAL STEM CELLS THROUGH NOTCH SIGNAL MEDIATED DNA DEMETHYLATION DURING MOUSE BRAIN

DEVELOPMENT.ISSCR 7th Annual Meeting. Barcelona, Spain. July8-11, 2009

6. Asano, H., Namihira, M., Kohyama, J., Aonuma, M., Sanosaka, T., Nakashima, K. RETINOIC ACID-INDUCED CHROMATIN REMODELING PROMOTES ASTROCYTE DIFFERENTIATION OF NEURAL STEM CELLS. ISSCR 7th Annual Meeting. Barcelona, Spain. July8-11, 2009

7. Kohyama, J., Tsujimura, K., Kirikae, I., Abematsu, M., Takebayashi, H., Nakashima, K. REGULATION OF NEURAL CELL DIFFERENTIATION PLASTICITY IN ADULT CENTRAL NERVOUS SYSTEM.ISSCR 7th Annual Meeting,Barcelona. Spain. July8-11,2009

8. Takizawa, T., Taga, T., Misteli, T., Nakashima, K. DYNAMIC CHANGES IN DNA METHYLATION AND SPATIAL POSITIONING OF AN ASTROCYTE SPECIFIC GENE,GFAP DURING ASTROCYTE DIFFERENTIATION.ISSCR 7th Annual Meeting. Barcelona, Spain. July8-11, 2009

9. Nakashima, K. Neuro-to-gliogenic switch triggered by Notch-induced demethylation in neural stem cells.CREST Neuroscience International Symposium. Awaji Yumebutai International Conference Center. June2-3, 2009 (oral)

G. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

該当なし。

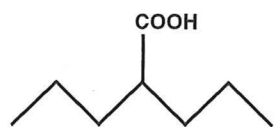
2. 実用新案登録

該当しない。

3. その他

特になし

バルプロ酸 (VPA, 2-propylpentanoic acid)



Chemical structure of VPA

- てんかんの治療薬として既に利用
- よく使用されるtrichostatin A (TSA)より少ない細胞毒性でヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)阻害活性を示す

1

バルプロ酸の作用は良いものばかりではない

バルプロ酸の副作用

- 消化器症状、肝機能異常、動作時振戦、失調、眠気・鎮静、体重増加(20%)、脱毛(4%)

バルプロ酸の催奇形性

- 神経管欠損(1-2%)、二分脊椎、心室中隔欠損等の心奇形、多指症、口蓋裂等外表奇形、特有の顔貌(前頭部突出、両眼離開、鼻根扁平、浅く長い人中溝、薄い口唇等)

バルプロ酸と行動異常

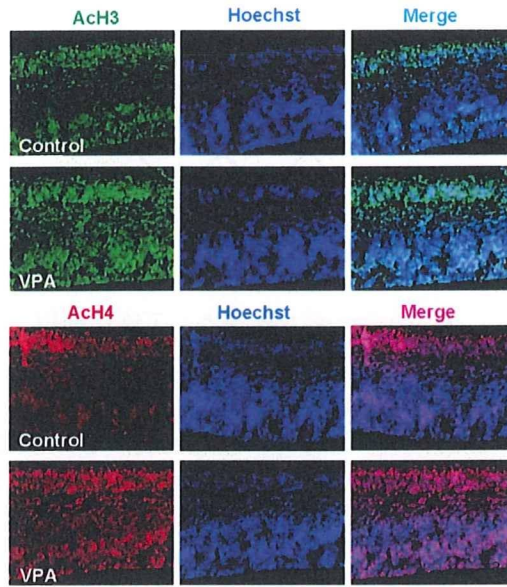
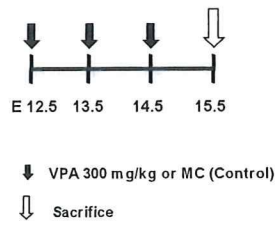
- 妊娠中にバルプロ酸を服用した母から生まれた子供の中に自閉症を発症する確立が高い。
- 妊娠中バルプロ酸曝露によるその他の行動異常(種村)



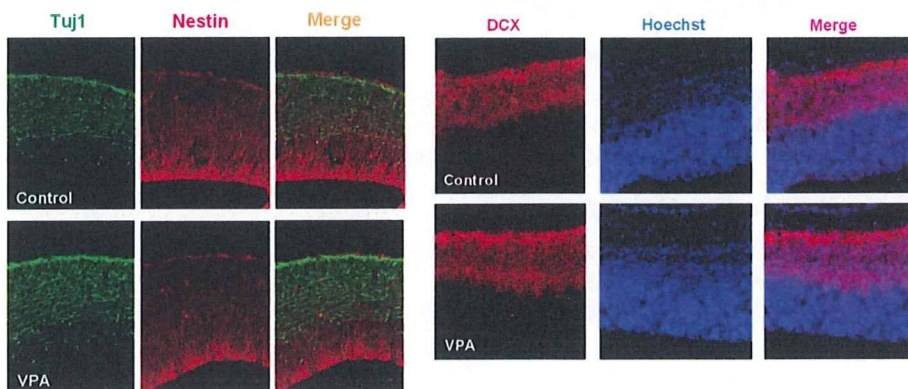
神経幹細胞の分化制御かく乱の観点から解析

2

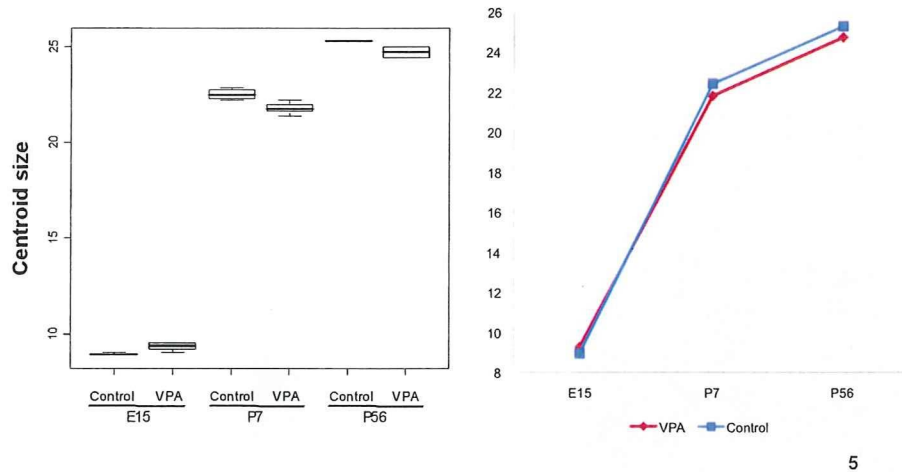
Histone acetylation is upregulated by VPA treatment



VPA enhances neurogenesis

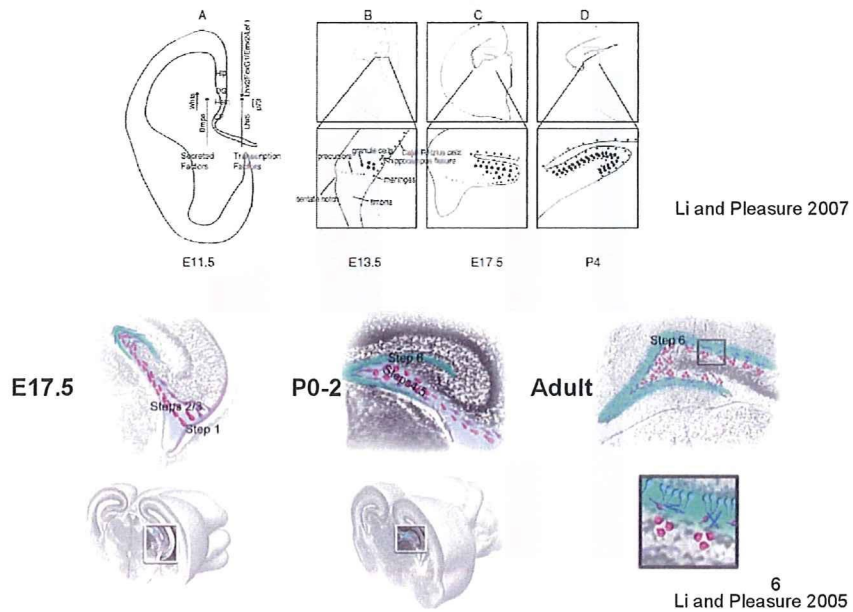


Comparison of brain size



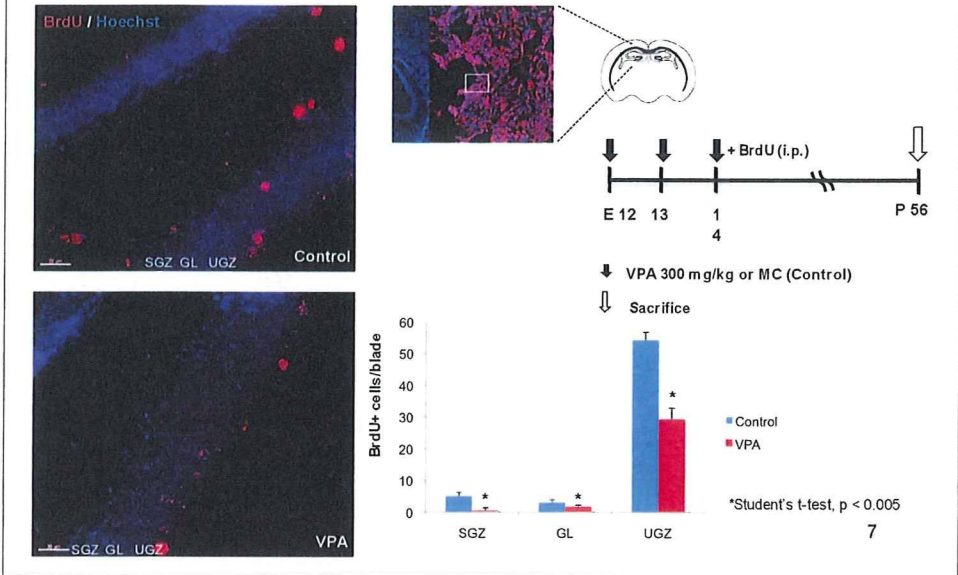
5

Development of mouse dentate gyrus (DG)

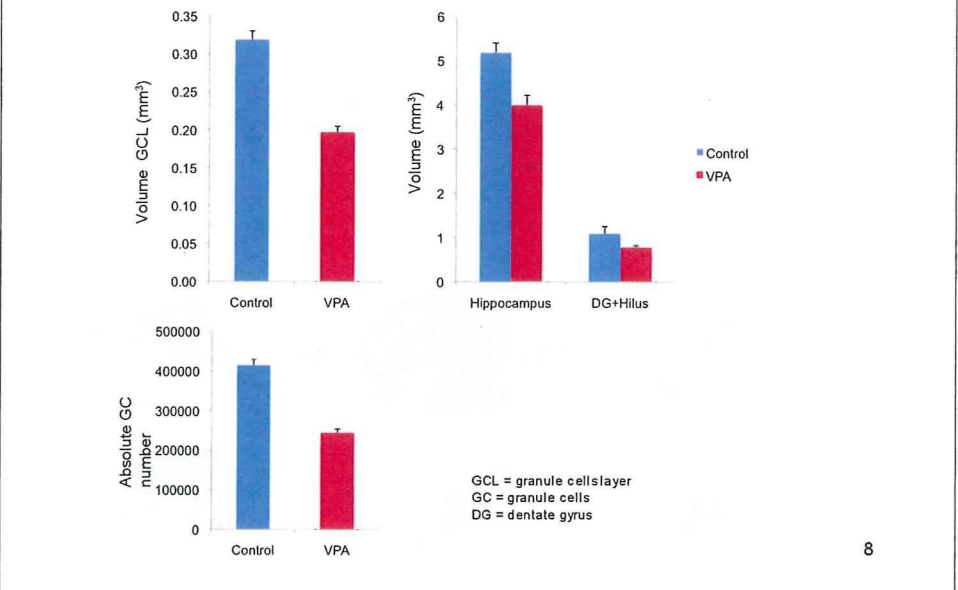


6

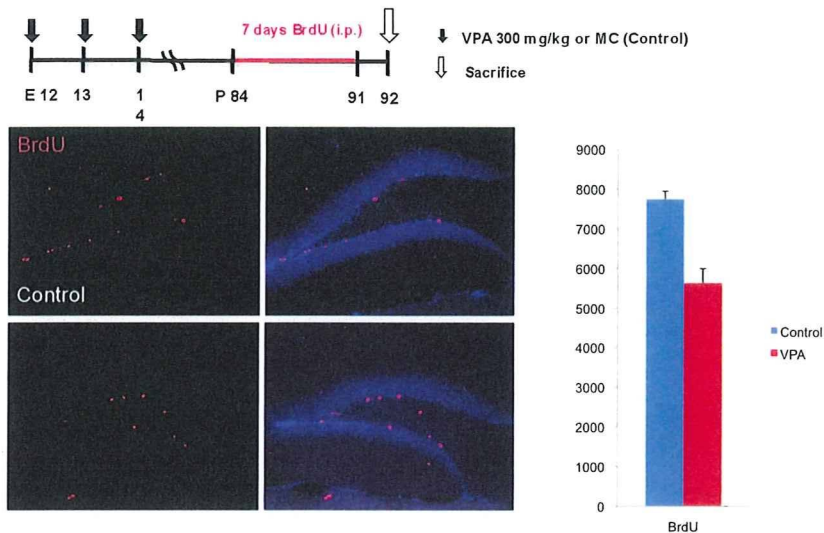
VPA exhausted NSCs at SGZ which were born at E14



VPA mice shows reduction of hippocampal volume and granule cells number



Embryonic VPA treatment leads to the reduction of NSC/NPC proliferation in the adult hippocampus



9

まとめ

<行動解析>

- ・胎仔期バルプロ酸曝露マウスにおいては動き（移動量）に若干の減少が見られたものの、不安関連行動や社会行動には大きな影響は見られなかった。
- ・胎仔期バルプロ酸曝露マウスでは記憶学習障害が観察された。

<解剖学的・細胞生物学的解析>

- ・胎仔期のバルプロ酸曝露の結果、神経幹細胞の増殖抑制とニューロン分化促進が見られた。おそらくその結果成体脳のサイズの減少が観察された。
- ・海馬についても同様に、海馬自体および歯状回体積の減少が認められた。
- ・胎仔期のみでのバルプロ酸曝露にも関わらず、成体海馬においても神経幹細胞増殖の減少が持続していた。

10

中枢作動性物質による遅発性の情動・認知毒性発現の分子メカニズムの解明

分担研究者 北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部 室長

化学物質による遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤を明らかにすることを目的として、モデル中枢作動性物質としてキノコ毒のイボテン酸を選択し、「成熟期」・「幼若期」・「胎生期」各暴露時の情動・認知行動解析ならびに「成熟期」・「幼若期」各暴露時の網羅的遺伝子発現変動解析を比較検討した結果、1) イボテン酸(1 mg/kg)経口投与により、幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり、情動認知行動異常が誘発されることが明らかとなった。2) このイボテン酸による遅発性の情動認知行動影響の分子メカニズムを探索するために、投与後経時的(2、4、8 および 24 時間後)に採取した、成熟期ならびに幼若期の海馬サンプルを用いて網羅的遺伝子発現変動解析を検討し、変動した遺伝子プロファイルを、成熟期および幼若期投与群の間で比較検討したところ、両者間で発現変動を示す遺伝子プロファイルがかなり異なることが明らかとなった。加えて、遅発行動異常を示した幼若期投与群のみに変動が認められた遺伝子の中で細胞障害に関連するシグナルとして、アポトーシス、膜の過分極、糖質コルチコイド、GABA-A受容体を介したシグナル、neuropilin・semaphorin分子を介する神経ガイダンスならびに、Npas4分子を介するシナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持、等を見いだした。特にNpas4分子は、シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持を司るマスター-遺伝子であると近年報告され、これまで、化学物質による遅発性神経毒性との関連は示唆されていないため、本実験によりこの分子を遅発性影響誘発に関与する候補遺伝子として見いだしたことは、新規性の高い発見と考えられる。今後、特にこのNpas4分子に着目した検討により、遅発性神経毒性誘発の分子機序に迫れるものとする。引き続き、モデル中枢作動性物質を用いて同様な検討を行う予定である。

A. 研究目的

本研究班では、化学物質の中枢神経系に対する遅発性の影響を科学的に明らかにし、特に子どもの特性に配慮した毒性評価法を確立することを目的とする。この確立を通して、今までに評価法が定まらず看過されてきた化学物質も含めた「遅発性」・「中枢性」神経毒性の同定と、高感受性集団としての子どもの反応特性を解明する。その際、胎児期、幼若期暴露と成熟期暴露との毒性の差異について、脳の発生、発達及び成熟との関係をも明らかにする。

「本分担研究の目的」は、モデル中枢作動性物質を用いて「成熟期」暴露時の情動・認知行動解析、先端的な形態機能解析ならびに網羅的遺伝子発現変動解析を検討し、他の分担研究である「胎生・幼若期暴露」時の解析結果と比較しつつ、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤を明らかにすることである。今年度は、モデル中枢作動性物質として、毒キノコ（テングダケ類）に含まれるアミノ酸であるイボテン酸 [C₅H₆N₂O₄、分子量:158.1、CAS No.:2552-55-8]を選択した。イボテン酸はグルタミン酸と類似の構造を持ち、グルタミン酸のアゴニストとして働くものと考えられている（名称は、イボテングタケから初めて抽出されたことに由来する）。イボテン酸の文献上の半数致死量（マウス、経口）は38 mg/kgである。

イボテン酸を選択した理由は、アミノ酸系神経伝達物質受容体に作用し、発達期での情動・認知障害を引き起こす可能性が示唆されるためであるが、これとは別に、すでに種村研究分担者との共同研究により、成熟期、幼若期、胎生期（経胎盤投与）のマウスに同一用量のイボテン酸を単回経口投与し、それぞれ成熟後のマウスの情動認知行動を解析した結果、行動異常が幼若期においてのみ認め

られたという情報を得たためである。

下記にイボテン酸の構造式を記載する。

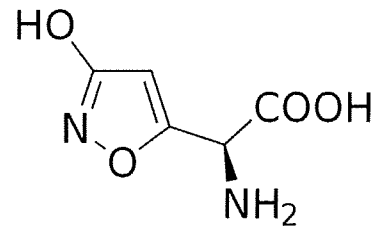


図1 イボテン酸の構造式

B. 研究方法

妊娠マウスを含め C57BL/6CrSlc マウス(日本エスエルシー)を実験に用いた。イボテン酸 (Tocris 社) の投与経路は経口投与、投与容量は 10 (mL/kgBW)、溶媒は 0.5%メチルセルロース (WAKO) とし、メノウ鉢を用いて懸濁液を作製し用事調整にて投与液を作製した。投与時期は、本プロジェクトに則したかたちで、以下の3種、すなわち妊娠 14.5 日 (胎生期投与)、生後 2 週齢 (幼若期投与)、生後 11 週齢 (成熟期投与) とした。胎生期投与は妊娠マウスへの経胎盤暴露である。

イボテン酸の用量設定は、先ず各群 3 匹の雄性幼若期マウスに各種濃度(0, 1, 3, 5, 10 mg/kg)のイボテン酸を単回経口投与し、一般状態の観察および投与 24 時間後の剖検による肉眼的所見を指標に検討した。全てのイボテン酸投与群で投与 2~8 時間後に沈静が認められた。投与 24 時間後、1 mg/kg 投与群では一般状態の変化は回復したが、3 mg/kg 以上の投与群では全例で死亡が認められた。他方、成熟期雄性マウス (11 週齢) および妊娠マウス (妊娠 14.5 日) に 1 mg/kg のイボテン酸を投与したところ、一般状態の変化は認められなかった。そこで、以上の予備実験の結果ならびに、

同一用量のイボテン酸を投与した際の成熟期、胎生期および幼若期の各投与群間の比較・検討を考慮し、イボテン酸の最高用量を1 mg/kgと設定した。

遺伝子発現変動解析に際しては先ず、成熟期(生後11週齢)及び幼若期(生後2週齢)の雄性マウスに3用量のイボテン酸(0, 0.1, 0.3及び1 mg/kg)を単回強制経口投与し、投与後2, 4, 8, 24時間後に海馬をサンプリングし、Percellome法による網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて検討した。解析に際し、我々が独自に開発した「RSort」を用いて網羅的に解析した。このソフトは、各遺伝子(probe set: ps)につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした3次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全てのpsを生物学的に有意な順に並び替えるソフトである。また、シグナルネットワークの探索は、市販のソフトであるIngenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)を用いて検討した。

情動・認知行動解析では、胎生期(妊娠14.5日)、幼若期(生後2週齢)、成熟期(生後11週齢)のマウスに1用量のイボテン酸(0及び1 mg/kg)を単回強制経口投与し、生後12-13週齢時に、各群8匹について、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、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験を組み合わせた情動・認知行動バッテリー解析を行った。

有意差の検定は、Studentのt検定によりおこない、P値が0.05未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差(SD)にて示した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及

び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程(平成19年4月版)」。

C. 研究結果

C-1: 成熟期、幼若期および胎生期にイボテン酸を単回経口投与した際の、成熟後の情動・認知行動の比較解析:

情動・認知行動解析では、イボテン酸(1 mg/kg)を成熟期、幼若期、胎生期に単回経口投与し、各投与群につき、生後12-13週齢のマウスにつき検討したところ(n=8)、幼若期投与群では、溶媒対照群と比較し有意な変化が認められ、行動異常の誘発が示唆されたが、成熟期ならびに胎生期投与群では有意な変化が認められなかった。有意な変化が認められた検索項目は、条件付け学習記憶試験における音-連想記憶度の低下、オープンフィールド試験における中央部滞在時間の延長、明暗往来試験における総移動数の減少と初移動潜在時間の延長、プレパルス驚愕反応抑制試験におけるオーブプレパルス90db/120db驚愕反応抑制とプレパルス95db/120db驚愕反応抑制の低下、であった。以上のことから、イボテン酸(1 mg/kg)の単回経口投与により、幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり、①不安関連行動逸脱と②記憶異常及び③情報処理能低下が誘発されたものと考えられた。

C-2: 成熟期および幼若期にイボテン酸を単回経口投与した際の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析の比較

次いで、この幼若期投与群のみで誘発されたイボテン酸投与による遅発性行動影響の分子メカニズムを明らかにする目的で、先ず、成熟期および

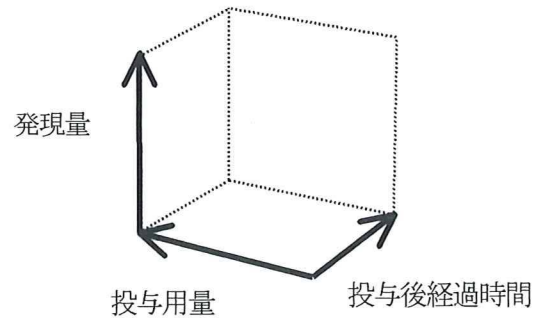
幼若期投与群について、海馬サンプルについて Percellome 法（遺伝子発現値の絶対化手法）

（Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006）による網羅的遺伝子発現変動解析を比較・検討した。

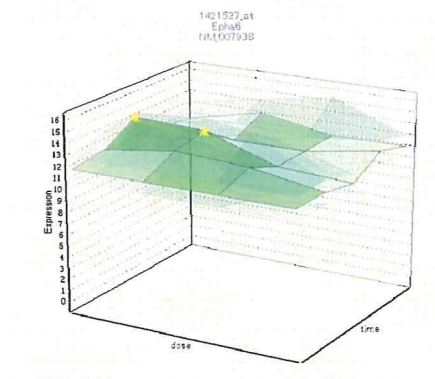
C-2-I：成熟期にイボテン酸を単回経口投与した際
の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析：

C-2-I-A：成熟期マウスの海馬において、発現が有意に増加するものとして 1,708 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 107 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。また酸化的ストレス、アポトーシス、細胞増殖に関連する遺伝子の顕著な変動も認められなかった。神経伝達関連遺伝子では、Epha6（Eph receptor A6）（投与 4 時間後、中・高用量）遺伝子の発現増加が認められた。投与初期（2 時間後）に顕著に発現が増加した遺伝子として、海馬あるいは神経系における機能は不明であるが、Aldh16a1（aldehyde dehydrogenase 16 family, member A1）（投与 2 時間後、高用量）、Gpr137b（G protein-coupled receptor 137B）（投与 2 時間後、中・高用量）遺伝子が認められた。Aldh は一般的に、アセトアルデヒドをカルボン酸に変換する酵素であることから Aldh16a1 はイボテン酸の代謝に関係する可能性が示唆された。Gpr137b は内因性リガンドが不明な G タンパク質共役受容体であり、投与初期に発現が増加していることから、イボテン酸がこの受容体に作用している可能性が示唆された。なお、増加が認められた遺伝子のほとんどが、神経系での機能が不明であった。

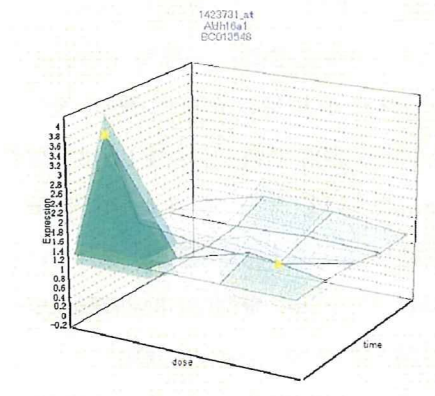
以下に、Epha6、Aldh16a1 および Gpr137b 遺伝子の変動を示す（図 2）。図はすべて下記のように濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量について、標準偏差平面とともに 3 次元グラフとして示す。



A) Epha6 遺伝子



B) Aldh16a1 遺伝子



C) Gpr137b 遺伝子

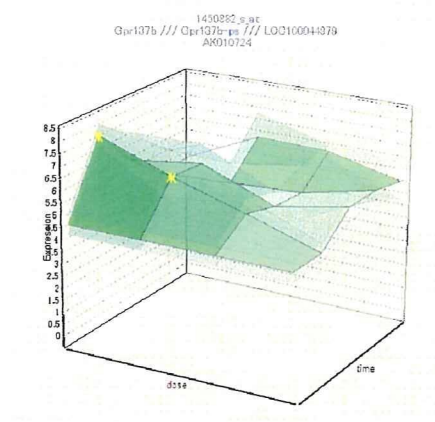


図 2 成熟期マウスの海馬において、イボテン酸投与により発現が有意に増加した遺伝子のうち、Epha6(A)、Al1dh16a1(B)、Gpr137b(C) 遺伝子の発現変動

C-2-I-B: 成熟期マウスの海馬において、発現が有意に減少するものとして 260 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 4 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。また酸化的ストレス、アポトーシス、細胞増殖に関連する遺伝子の顕著な変動も認められなかった。

したがって現時点では、成熟期マウスの海馬において、発現が有意に増加あるいは減少する遺伝子リストの中に、細胞障害に関連するシグナルネットワークは抽出されてこなかった。

C-2-II: 幼若期にイボテン酸を単回経口投与した際の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析:

C-2-II-A: 幼若期マウスの海馬において、発現が有意に増加するものとして 511 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆された

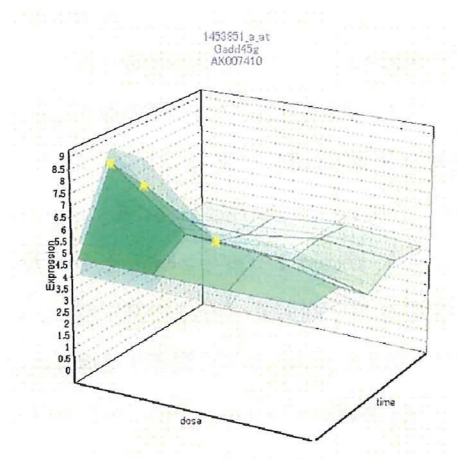
ものとして 136 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。

アポトーシスに関係する遺伝子として、Gadd45g (growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma) (投与 2 時間後、高用量; 投与 4 時間後、中・高用量)、Ddit4 (DNA-damage-inducible transcript 4) (投与 2 時間後、中・高用量)、Trp53inp1 (transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1) (投与 4 時間後、高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。酸化的ストレス、細胞増殖に関連する遺伝子の顕著な変動は認められなかった。他方、膜電位に影響を与える多くの K チャネル遺伝子、具体的には Kcnk6 (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily K, member 6) (投与 2・24 時間後、高用量)、Kcne11 (potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1-like) (投与 2 時間後、中・高用量)、Kcna1 (potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1) (投与 4 時間後、高用量)、Kcna5 (potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5) (投与 2・4 時間後、高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。K チャネル遺伝子の発現増加は、K チャネルの活性化の可能性が考えられ、この活性化は膜の過分極を引き起こすことから、神経における興奮伝達の抑制が引き起されている可能性が示唆された。また、インスリン非依存性にブドウ糖の取り込みを担う糖輸送担体 (GLUT1) である Slc2a1 (solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1) (投与 2 時間後、高用量; 投与 4 時間後、中・高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。加えて、ストレスに関連する糖質コルチコイドの関連遺伝子 Nfkb1a (nuclear factor

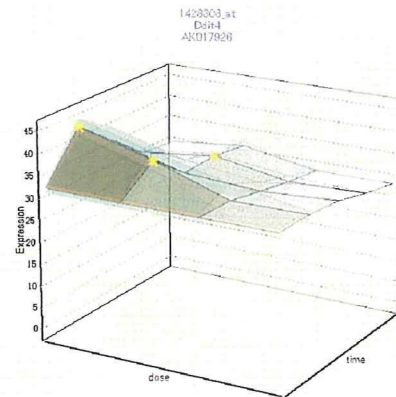
of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) (投与 2・4 時間後、高用量) およびその標的遺伝子 Sgk1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1) (投与 2・4 時間後、高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。その他、海馬あるいは神経系における機能は不明であるが、G タンパク質共役受容体である Gpr1 (G protein-coupled receptor 1) (投与 24 時間後、高用量) および Gpr146 (G protein-coupled receptor 146) (投与 2 時間後、高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。

以上のことから現時点では、幼若期マウスの海馬において、発現が有意に増加する遺伝子リストの中に、細胞障害に関するシグナルとして、アポトーシス、膜の過分極を通した神経伝達の抑制および糖質コルチコイドを介した細胞障害が引き起こされる可能性が示唆された。糖取り込みの増加は、糖質コルチコイドによる影響と関連する可能性が示唆された。なお、増加が認められた多くの遺伝子の神経系機能の詳細が不明であることから、今後、神経系における遺伝子機能の基礎研究をさらに推進する必要があるものと考えられた。以下に、上述した遺伝子の中で、Gadd45g、Ddit4、Kcna5、Slc2a1 および Sgk1 遺伝子の変動を示す (図 3)。

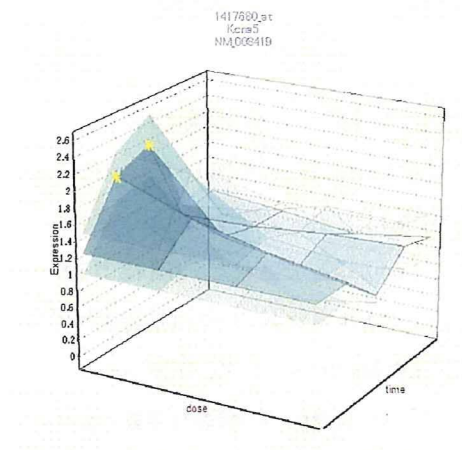
A) Gadd45g 遺伝子



B) Ddit4 遺伝子



C) Kcna5 遺伝子



D) Slc2a1 遺伝子

