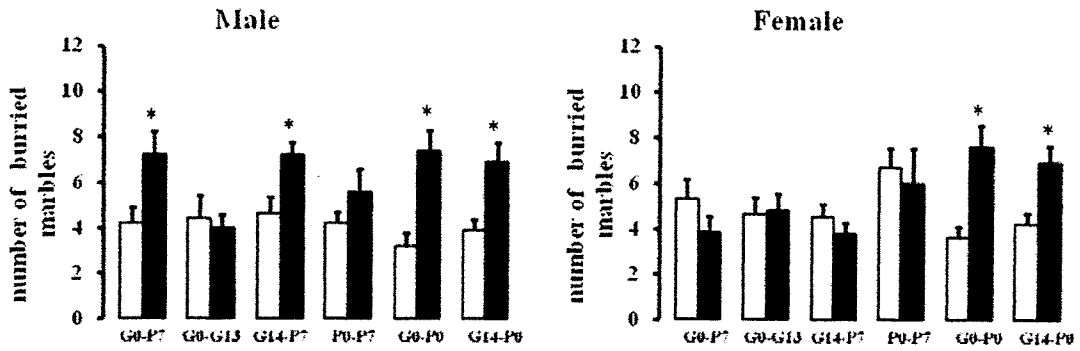
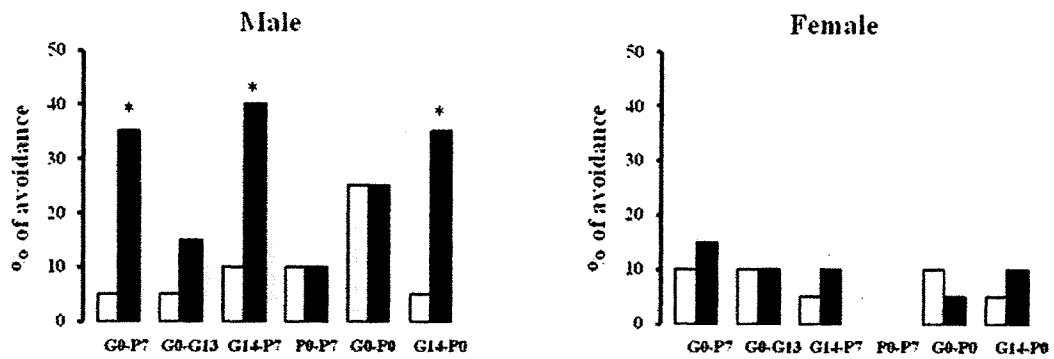


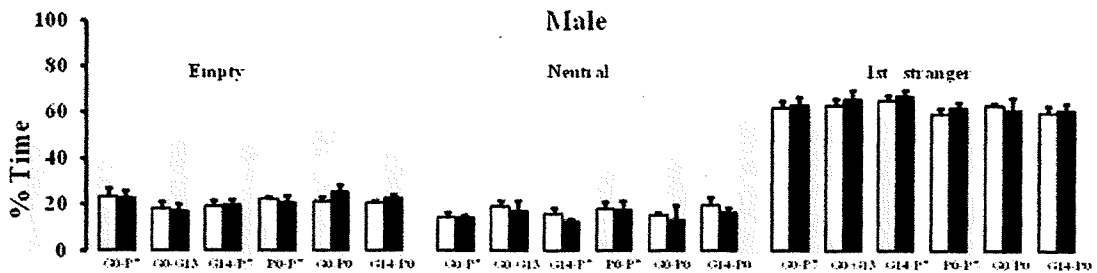
Marble burying test



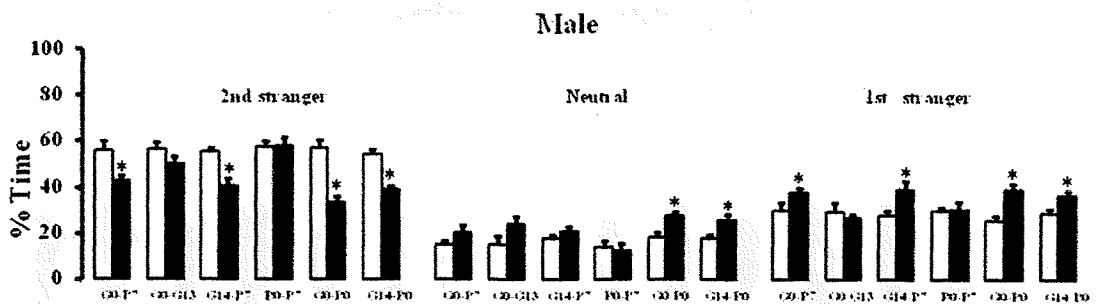
Social avoidance tube test



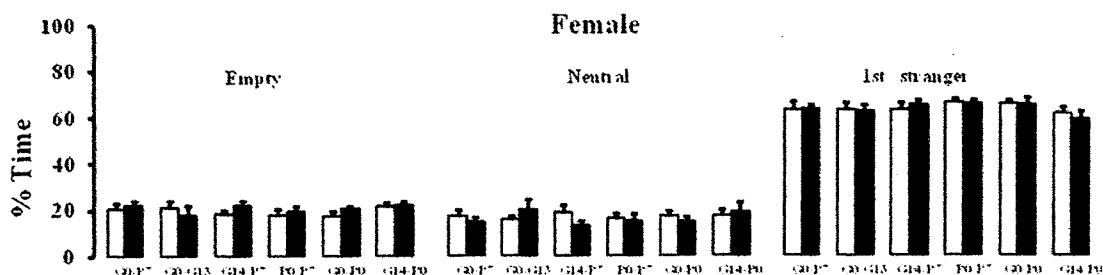
Sociability test



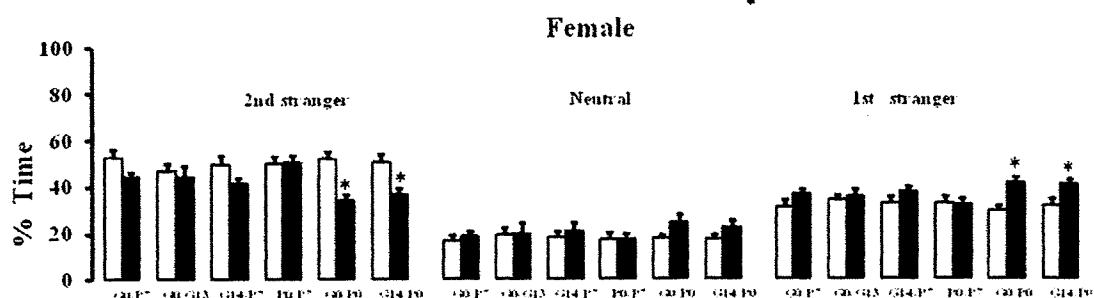
Preference for social novelty test



Sociability test



Preference for social novelty test



Elevated plus maze test

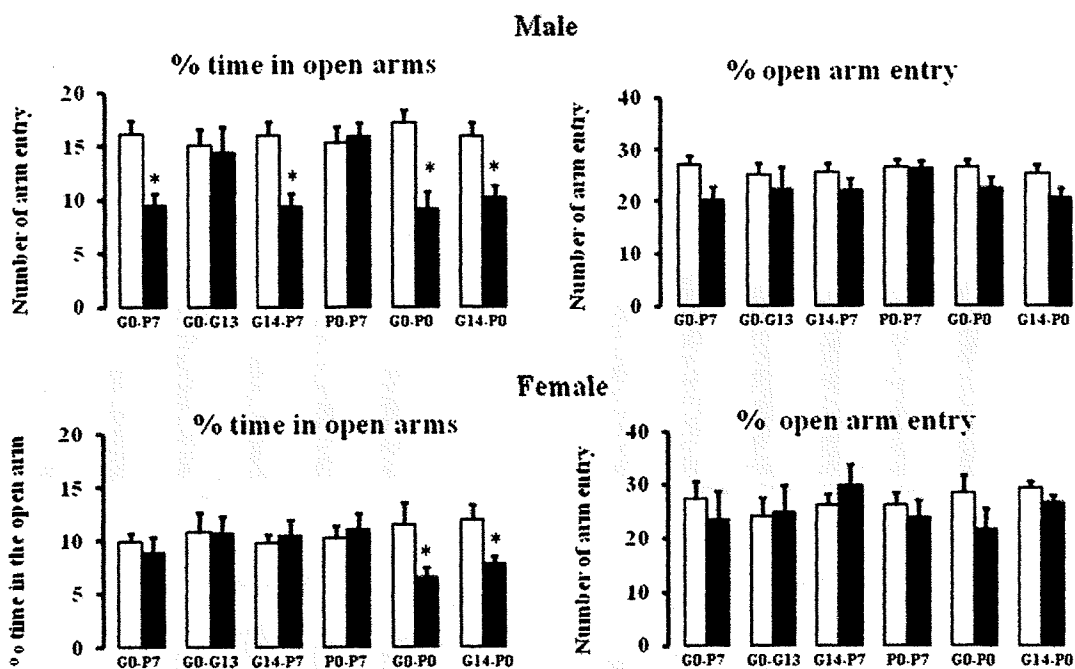


Figure 2. PNE impaired emotional behaviors of offspring. White column is sucrose treated control groups, black column is nicotine treated PNE groups. Data were presented as the mean \pm S.E. $n = 10$;

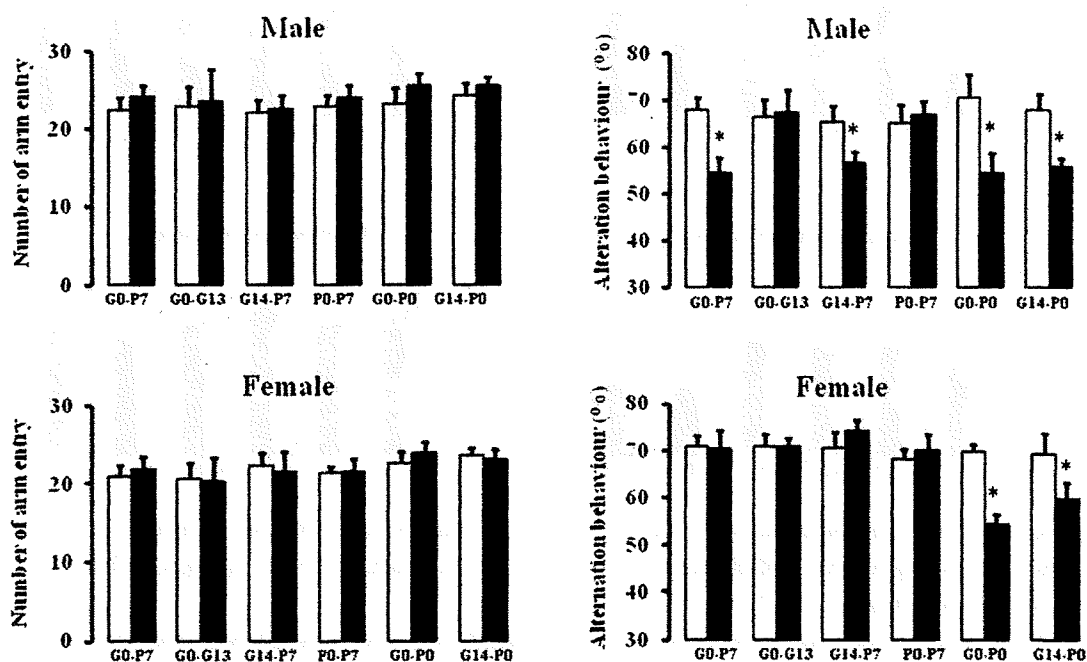
PNE -induced cognitive defects are dependent on time-windows of exposure

In Y-maze test, all male mice, except the mice with nicotine exposure in G0-G13 and P0-P7, showed significantly decreased spontaneous alternation behaviors compared

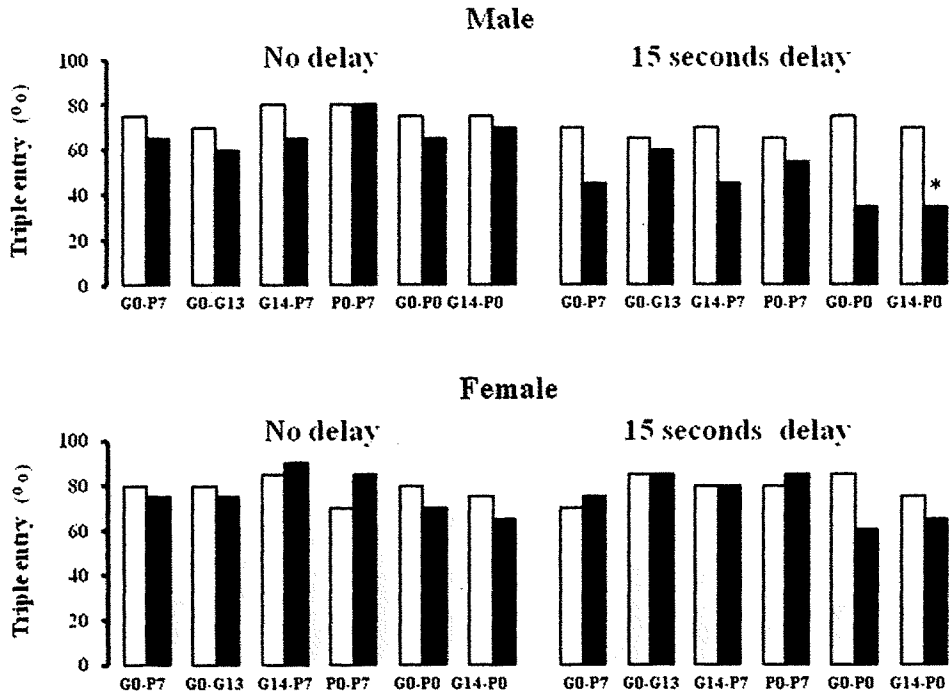
with the counterparts in control groups. All female mice, except the mice with nicotine exposure in G0-P0 and G14-P0, showed unimpaired spontaneous alternation behaviors as the counterparts in control groups. The number of arm entries between groups was the same for male or female mice. In acquisition phase of NORT, the time spent on object exploration was similar between groups. During retention phase, both male and female mice in the PNE and control groups for all time-windows unmistakably discriminated the novel and familiar objects by showing a significantly increased exploration to the new object in an incomparable manner. In the 3-min acquisition phase of object-based attention, male and female mice in both control and nicotine groups spent approximately equal amount time on two randomly examined objects among the five objects to be explored. During the 3-min retention phase, all male mice, except the mice with nicotine exposure in G0-G13 and P0-P7, showed significantly decreased preference to the novel object compared with the control group mice. Only the female mice with nicotine exposure in G0-P0 and G14-P0 did not show preferential exploration on the novel object compared with the control group mice, while female mice with nicotine exposure in other time windows explored the novel object as much as the control group mice did. In PPI test, male mice with PNE during all time windows demonstrated significantly reduced PPI in PP4 and startle amplitude in comparison with their counterparts in control groups. All female mice, except the mice with nicotine exposure in G0-P0 and G14-P0, showed unimpaired PPI as the counterparts did in control groups.

Summarizing all of the figures, PNE at different time windows impaired emotional and cognitive behaviors in both male and female offspring to different extents. The emotional abnormalities are mostly accompanied by the attentional difficulties while the effects of PNE are stronger on male than female (Table 1 and 2).

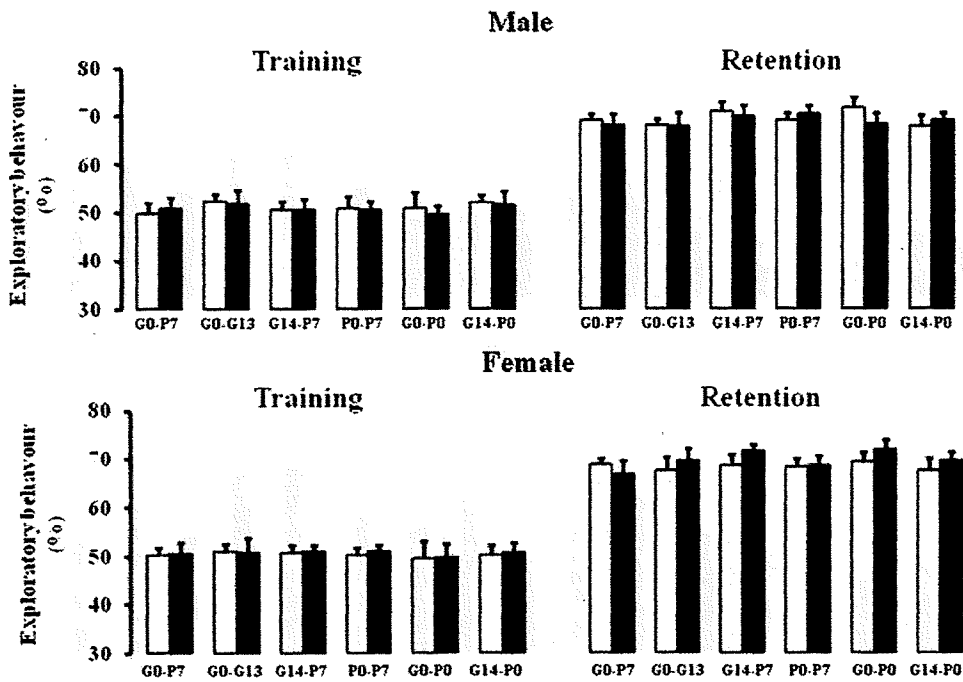
Y-maze test



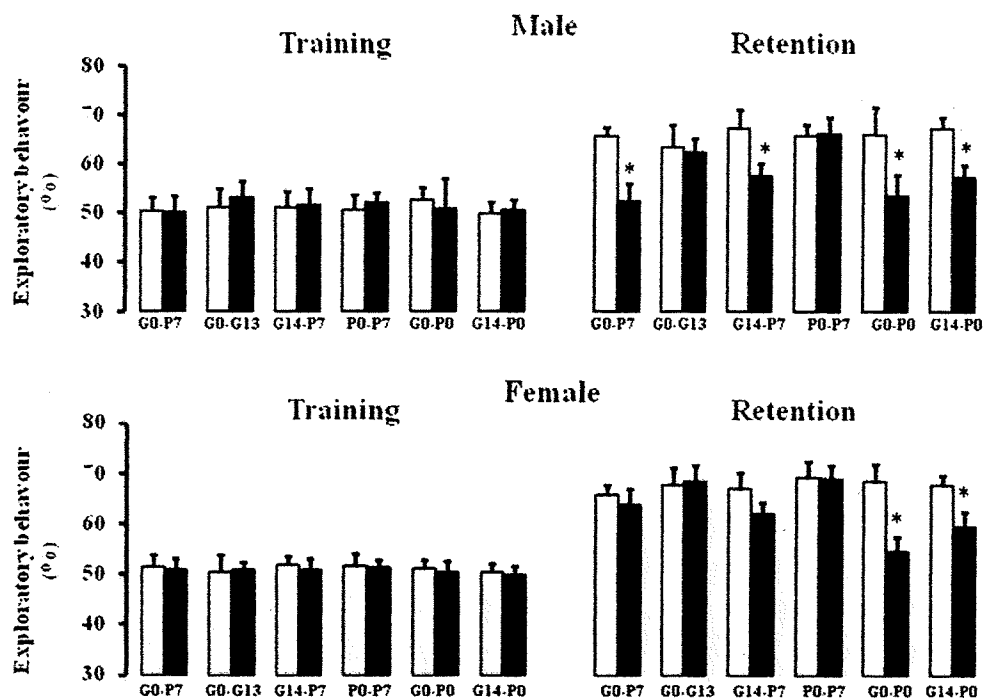
One-trial delayed alternation in T-maze



Novel-object recognition test



Object-based attention



Pre-pulse inhibition test

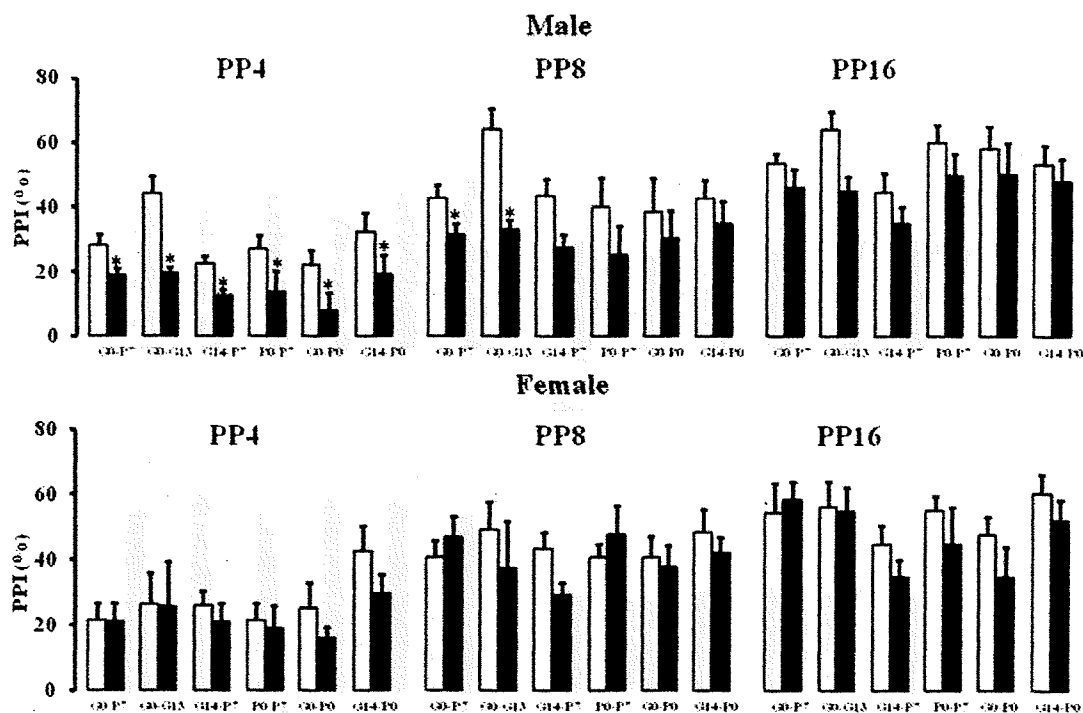


Figure 3. PNE impaired cognitive behaviors of offspring. White column is sucrose treated control groups, black column is nicotine-treated PNE groups. Data were presented as the mean \pm S.E. $n = 10$;

Table 1. Effects of PNE on the emotional and cognitive behaviors of male offspring

Behavioral tests	Time-windows					
	G0 - P7	G0-G13	G14 - P7	P0 - P7	G0-P0	G14-P0
Light and dark box test	=	=	=	=	+	+
Marble burying behavior test	+	+	+	=	+	+
Novelty-suppressed feeding test	+	=	+	=	+	+
Social avoidance tube test	+	=	+	=	=	+
Sociability test	+	=	+	=	+	+
Preference for social novelty test	+	=	+	=	+	+
Y maze test	+	=	+	=	+	+
One-trial delayed alternation	+	=	+	=	+	+
Novel object recognition test	=	=	=	=	=	=
Object-based attention	+	=	+	=	+	+
Elevated plus maze test	+	=	+	=	+	+
Pre-pulse inhibition test	+	+	+	+	+	+

+ : significantly impaired; = : not significantly impaired;

Table 2. Effects of PNE on the emotional and cognitive behaviors of male offspring

Behavioral tests	Time-windows					
	G0 - P7	G0-G13	G14 - P7	P0 - P7	G0-P0	G14-P0
Light and dark box test	=	=	=	=	+	+
Marble burying behavior test	=	=	=	=	+	+
Novelty-suppressed feeding test	=	=	=	=	+	+
Social avoidance tube test	=	=	=	=	=	=
Sociability test	=	=	=	=	+	+
Preference for social novelty test	=	=	=	=	+	+
Y maze test	=	=	=	=	+	+
One-trial delayed alternation	=	=	=	=	=	=
Novel object recognition test	=	=	=	=	=	=
Object-based attention	=	=	=	=	+	+
Elevated plus maze test	=	=	=	=	+	+
Pre-pulse inhibition test	=	=	=	=	=	=

+ : significantly impaired; = : not significantly impaired;

The effects of PNE during G14-P0 are strongest both in male and female offspring. Neither anti-oxidant treatment during G14-P0 nor cross-fostering (from P0) of the offspring born after PNE during G14-P0 under no-nicotine received dams ameliorated the abnormalities in emotional and cognitive behavior (Table 3), indicating that effects of PNE are not due the maternal nicotine withdrawal-related stress and are not due to the fetal cerebral oxidative stress induced by nicotine.

5. Discussion

The present study was designed to investigate abnormalities in emotional and cognitive behavior of mice offspring that experienced non-forced PNE during the

Table 3. Effects of cross-fostering and antioxidant vitamin C on the PNE-induced emotional and cognitive abnormalities of male offspring

Behavioral tests	PNE		
		Prenatal Vitamin C	Cross-fostering
Light and dark box test	+	+	+
Object-based attention	+	+	+
Novel object recognition test	=	=	+

+ : significantly impaired; = : not significantly impaired;

different time-windows of pregnancy and peri-natal period. The majority of studies on the effects of gestational nicotine are done in mouse whose embryonic development shares many similarities to that of humans while there are some important differences. The whole gestational period of the mouse is developmentally equivalent to only the first two trimesters of human gestation. Many critical cerebral developmental events, such as the birth of most neuronal cell groups and early synaptogenesis, occur during the second trimester following the appearance of nAChRs in the end of the first trimester. The first 2 weeks of postnatal development of the mouse is equivalent to the third trimester of human development, while brain reaches structurally mature stage in the first week. Depending on the nature of research questions, some research groups have opted to administer nicotine during both gestational and neonatal periods of mouse in an effort to model nicotine exposure in the entire human pregnancy. Others have chosen to look only at nicotine exposure during the early postnatal period, in which the expression of nAChRs reaches its peak, in an effort to examine the effects of nicotine on brain development. Nicotine acts on nAChRs, which are made up of homomeric or heteromeric subunit combinations and are widely distributed throughout the fetal nervous system. These receptors play a critical role in many aspects of brain development, depending on their regional expression and the pharmacology of their subunit composition. The complexity of the subunit expression profiles and the resulting range properties of nAChR during development suggest that gestational nicotine exposure could conceivably alter brain development via distinct mechanisms depending on the timing, the amount, and the duration of exposure. Thus, to elucidate the mechanism and prevention strategy of behavioral abnormalities induced by PNE, the choices of nicotine dose, the route of administration, and the onset and the length of exposure must be consistent in an appropriate animal model. When evaluating the effects of prenatal nicotine, it is necessary to consider the developmental context in which the exposure occurs, as well as the scope of the research question being asked. When the aim is simply to characterize the phenotype resulting from continuous fetal nicotine exposure, a longer treatment may be appropriate. When the goal is to determine the specific mechanisms behind nicotine's effects on an outcome, it may be beneficial to use a more limited window of exposure to pinpoint critical developmental events whose disruption is responsible for subsequent behavioral changes.

When animal models of developmental nicotine exposure are evaluated, additional factors to consider are the route of administration and dose of nicotine used. Animal studies of gestational nicotine exposure applied maternal multi-time injections during active hours of the day or subcutaneously implanted osmotic minipump during whole 24 hours of the day. Maternal multi-time injections induce maternal stress and result in the release of maternal hormone glucocorticoids which can readily cross the placenta to

the fetus, or produce transient high plasma nicotine concentrations that cause vasoconstriction-related hypoxia in fetus. Hypoxia has known detrimental effects on fetal development and adds complexity to the interpretation of the findings. Though subcutaneously implanted osmotic minipump releases a slow and constant infusion of nicotine, and eliminates the stress and hypoxia induced by the injection model, it does not mimic the pharmacokinetics of smoking which generally occurs during active hours, but not entire 24-hours, of the day. A more popular model of nicotine delivery in recent studies is to administer nicotine through the drinking water in non-forced manner during active hours of the day. This paradigm eliminates the stress and hypoxia induced by the injection model, and mimics the pharmacokinetics of smoking.

In the current study, we considered the dose, the onset, and the duration of nicotine exposure in the context of developmental events to provide a systematic behavioral evaluation on the neurotoxicity of PNE. The results provide systematic evidence for irreversible behavioral neurotoxicity of PNE and suggested certain time-windows, among which G14-P0 is most critical, to further examine molecular changes induced by PNE in the brain of offspring. In the future study, identification of the molecular changes that can explain these abnormal emotional and cognitive behaviors would surely provide pharmacological targets for therapeutic interventions.

新生仔期に polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を投与したマウスの海馬におけるタンパク発現の変化

分担研究者：永井拓

（名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部）

[研究要旨]

化学物質には、生体に対してホルモン様の作用を有する物質や、逆にホルモン作用を阻害する物質、すなわち内分泌攪乱物質がある。生体内には内分泌系の他にも免疫系と呼ばれる生体恒常性を維持する機構が存在し、感染症によって異常免疫応答が惹起される。特に、周産期・発育期におけるウイルス感染症は脳発達異常を引き起こすことがある。したがって、生体内に取り込まれた化学物質が免疫系の異常を引き起こし、中枢神経系に対して障害をもたらす可能性を考える必要がある。本研究では、自然免疫機構を活性化する合成 2 本鎖 RNA アナログである polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を新生仔期に投与し、成長したマウスの脳内におけるタンパク発現変化を網羅的に解析した。

ICR 系の新生仔マウスに polyI:C を生後 2 日目から 6 日目まで連続皮下投与した。10 週齢に成長したマウスの海馬から細胞質分画タンパクを抽出し、fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis 法よりスポットの発現量を比較した。コントロールマウスに比べて polyI:C を投与したマウスで発現が 2 倍以上の増減を示すスポットが 29 個存在した。さらに、個々のスポットについて解析した結果、スポット番号 SSP3707 および SSP7512 の 2 個のスポットに有意な発現変化が認められた。SSP3707 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群に比べて 1.6 倍増加した。逆に、SSP7512 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群に比べて 0.6 倍減少した。発現変化が認められたスポットについて peptide mass fingerprinting 法によりタンパク同定を行った結果、SSP3707 は aldehyde dehydrogenase family 1 member L1 (ALDH1L1) および SSP7512 は collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) であると同定された。同定されたタンパクが ALDH1L1 および CRMP5 であるかどうかを調べるため、それぞれのタンパクに対する特異的抗体を用いてイムノブロッティングを行った。PolyI:C 投与群において ALDH1L1 のタンパク発現がコントロール群に比べて 1.6 倍増加した。逆に、CRMP5 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群に比べて 0.7 倍減少していた。さらに、polyI:C 最終投与 24 時間後の新生仔マウスの海馬においても、ALDH1L1 のタンパク発現が増加し、CRMP5 のタンパク発現は減少していた。初代培養神経細胞において、CRMP5 タンパクは細胞体および神経突起の先端部分に高発現していた。以上の結果から、新生仔期に polyI:C を投与したマウスにおいて発現が変化するタンパク群が存在することが明らかとなった。今後は ALDH1L1 および CRMP5 の機能解析を行うとともに新生仔期の免疫異常によって惹起される精神発達異常との関連について検討する予定である。

A. 研究目的

化学物質には、生体に対してホルモン様の作用を有する物質や、逆にホルモン作用を阻害する物質、すなわち内分泌攪乱物質がある。生体内には内分泌系の他にも免疫系と呼ばれる生体恒常性を維持する機構が存在し、感染症によって異常免疫応答が惹起される。特に、周産期・発育期におけるウイルス感染症は脳発達異常を引き起こすことがある。これら脳発達に影響するウイルスとしてサイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ボルナ病ウイルスおよびヒト免疫不全ウイルス1型などが報告されている¹⁻⁴⁾。さらに、周産期におけるウイルス感染により引き起こされる脳発達異常が、統合失調症、双極性障害および広汎性発達障害の発症に関与していることが示唆されている^{5,6)}。したがって、生体内に取り込まれた化学物質が免疫系の異常を引き起こし、中枢神経系に対して障害をもたらす可能性を考える必要がある。本年度は、自然免疫機構を活性化する合成2本鎖RNAアナログであるpolyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C)を新生仔期に投与し、成長したマウスの脳内におけるタンパク発現の変化を網羅的に解析した。また、培養細胞を用いて変化が認められたタンパクの遺伝子発現変化についても検討した。

B. 研究方法

1. polyI:C 処置マウスの作製

実験にはICR系マウスを使用した。生後2日目から6日目までの5日間、マウスに合成2本鎖RNAアナログであるpolyI:Cを5 mg/kgの用量で1日1回皮下投与し、周産期擬似ウイルス感染モデルを作製した。コントロール群には溶媒として用いた生理食塩液を投与した。なお、本実験計画は名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、名古屋大学医学部実験動物指針に準じて行った。

2. サンプル調製

10週齢に成長したマウスから脳を摘出し、氷冷下で海馬を分割した。脳サンプルは使用直前まで-80℃で凍結保存した。脳サンプルはproteoextract subcellular proteome extraction kitを用いて細胞質分画を抽出し、以下の実験に使用した。

3. Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) 法

PolyI:C投与マウスおよびコントロールマウスから抽出したタンパクをCy3またはCy5で蛍光ラベルした。内部標準として各サンプルの混合物をCy2で蛍光ラベルした。これらCy2、Cy3またはCy5で標識したサンプルを混合して同一ゲル内で等電点電気泳動および二次元電気泳動を行った。泳動後のゲルは蛍光スキャナー (Typhoon trio) にて可視化し、画像解析ソフト (PD Quest) を使用してデータの解析を行った。

4. Peptide mass fingerprinting 法

2D-DIGE法により発現に変化が認められたタンパクをゲルから切り出し、trypsinにより消化した。トリプシン処理後のペプチド断片のアミノ酸配列を質量分析装置 (LC-MS/MS) により決定し、データベース (Mascot) 検索によりタンパクの同定を行った。

5. イムノプロットティング法

各sampleにsample buffer [0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 10% sucrose, 0.006% bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol] を加え95℃で5分間加熱し、10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。PVDF membrane にプロットティングを行った後、メンブレンをblocking solution [3% BSA, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20] を用い室温で1時間インキュベーションした後、blocking solution で1:2000倍に希釈し

た mouse anti-ALDH1L1 (Abnova)、rat anti-CRMP5 (Abcam) 抗体あるいは goat anti-actin (Santa cruz) をインキュベーションした (4°C、一晚)。反応後、TBS-Tween [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20] で 10 分間 3 回洗浄し、blocking solution で 1:2000 倍に希釈した house-rabbit peroxidase 標識 anti-mouse IgG、anti-rat IgG あるいは anti-goat IgG 抗体で室温に 1 時間インキュベーションした。TBS-Tween で 10 分間 3 回洗浄した後、ECL Western Blotting Detection System を用い、LumiViewer (AISIN) でバンドの検出を行った。

6. 初代培養神経細胞の調製

妊娠 16 日目の ICR マウス (日本エスエルシー) より胎児の海馬を実体顕微鏡下で取り出し、trypsin および DNase を用いて酵素処理をした後、ポリリジンでコーティングをしたシャーレに播いた。PolyI:C (10 µg/mL) またはアストログリア培養細胞培地の処置は培養開始 2 日目に行い、培養 3 日目に解析を行なった。免疫細胞化学解析では 24 well プレートに 1×10^4 個/well で播いた。

7. アストログリア培養細胞の調製

生後 0~2 日の新生児 ICR マウス (日本エスエルシー) から大脳皮質を取り出し、dispase および DNase を用いて酵素処理をした後、初代培養としてフラスコに播いた。90~95%コンフルエントになった時点で二次培養を行った。

実験を開始する 5 日前に培地を血清入り DMEM 培地から B27 サプリメントおよびグルタミンを添加した Neurobasal 培地に換え、polyI:C (10 µg/mL) 添加後 24 時間後の培地を初代神経細胞に処置した。

8. 免疫細胞化学

4%パラホルムアルデヒドで固定した後、抗

CRMP5、MAP2 および tau 抗体を用いて免疫染色を行った。

9. リアルタイム PCR 法

細胞から抽出した RNA を Superscript III (Invitrogen, Eugene, OR) を用いて cDNA に変換した後、7300 real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて ALDH1L1 および CRMP5 の mRNA 量を定量した。

β-actin primer

Forward: CGATGCCCTGAGGCTCTTT

Reverse: TGGATGCCACAGGATTCCA

CRMP5 primer

Forward: GCGGTGTACAGGATCGAATGA

Reverse: CATCCATCTTTCTCCAACCA

ALDH1L1 primer

Forward: GGTCTGTGGTGGGAACCAAGT

Reverse: TGAAAACGGTTGGCTGAAAGA

C. 研究結果

1. 2D-DIGE 法を用いたタンパク発現差異解析

二次元電気泳動によってタンパクを分離した結果、約 1000 個のスポットが検出された (Fig. 1A)。各群の検出されたスポット数の平均はコントロール群が 1065.3 ± 0.2 個、polyI:C 群が 1065.8 ± 0.2 個であった。Scatter plot 解析の結果では、コントロールマウスに比べて polyI:C を投与したマウスで発現が 2 倍以上の増減を示すスポットが 29 個存在した (Fig. 1B) さらに、個々のスポットについて解析した結果、スポット番号 SSP3707 および SSP7512 の 2 個のスポットに有意な発現変化が認められた (Fig. 1C)。SSP3707 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群に比べて 1.6 倍増加した ($p < 0.05$, Table 1)。逆に、SSP7512 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群に比べて 0.6 倍減少した ($p < 0.01$, Table 1)。

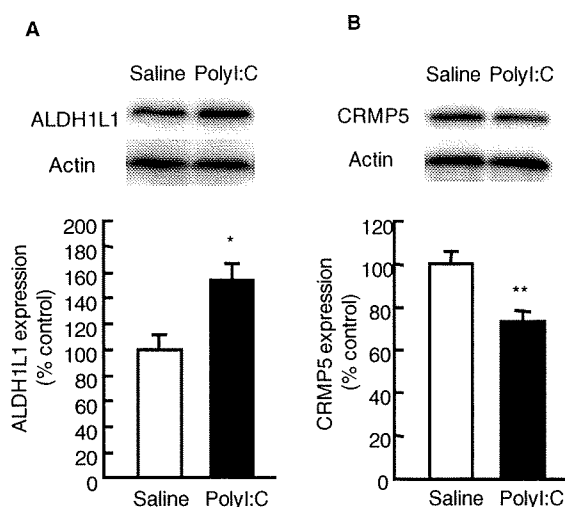


Fig. 2. Expression of ALDH1L1 and CRMP5 in the hippocampus of polyI:C-treated mice at the age of 10 weeks

From PD 2 to 6, mice were injected s.c. daily with either pyrogen-free saline or polyI:C at a dose of 5 mg/kg. Mice were sacrificed at the age of 10 weeks. Values indicate the mean±SE (n=6). *P < 0.05 and **P < 0.01 vs saline

4. 初代培養細胞を用いた ALDH1L1 および CRMP5 の発現解析

中枢神経系において ALDH1L1 はアストロサイトに発現し、CRMP5 は神経細胞に発現していることが報告されている^{7, 8)}。そこで、初代培養細胞を用いて、polyI:C 処置により ALDH1L1 および CRMP5 mRNA 発現が変化するかどうかを検討した。皮質由来初代培養アストロサイトにおいて、polyI:C を処置しても ALDH1L1 mRNA 発現に有意な発現変化は認められなかった (Fig. 4)。また、海馬由来初代培養神経細胞に polyI:C を処置しても CRMP5 mRNA 発現に有意な発現変化は認められなかった (Fig. 5)。

5. PolyI:C による神経—グリア相互作用解析

PolyI:C を処置したアストロサイトの培養上清を初代培養神経細胞に添加すると神経突起の伸展が抑制されることが山田清文教授らのグループから報告されている⁹⁾。また、CRMP5 は神経細胞において軸索の伸展に関与していることが報告されている。そこで、polyI:C を処置したアスト

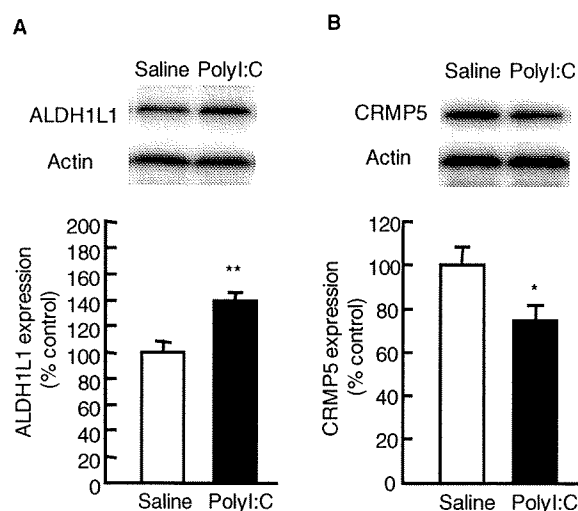


Fig. 3. Expression of ALDH1L1 and CRMP5 in the hippocampus of polyI:C-treated mice at the age of 7 days

From PD 2 to 6, mice were injected s.c. daily with either pyrogen-free saline or polyI:C at a dose of 5 mg/kg. Neonatal mice were sacrificed 24 h after final treatment with polyI:C. Values indicate the mean±SE (n=6). *P < 0.05 and **P < 0.01 vs saline

ロサイトの培養上清 (polyI:C-ACM) を初代培養神経細胞に添加した後の CRMP5 の発現を免疫染色法により調べた。CRMP5 の免疫活性は神経細胞の細胞体および軸索に認められた。コントロール細胞と比較して、polyI:C-ACM を処置した神経細胞では神経突起の抑制が認められ、軸索における CRMP5 の免疫活性も減弱していた (Fig. 6)。

D. 考察

Toll-like receptor 3 を介して自然免疫機構を活性化化する合成 2 本鎖 RNA アナログである polyI:C を新生仔期に投与されたマウスでは、正常なマウスと比較して学習・記憶の障害、感覚情報処理の障害、不安関連行動の増加、社会性行動の異常などが認められる⁹⁾。さらに、学習・記憶との関連性が示唆されている海馬におけるグルタミン酸放出の異常も確認されている⁹⁾。本年度は、新生児期の異常な免疫応答が学習・記憶や情動の発達に影響をおよぼす因子を調べるために、polyI:C を新生仔期に投与し、成長したマウスの脳内におけるタンパク発現変化を網羅的に解析した。

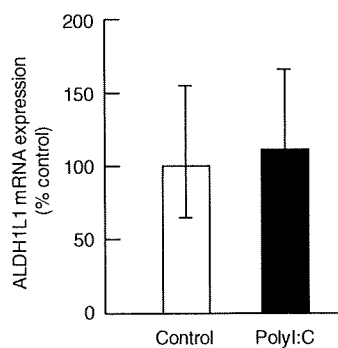


Fig. 4. Effect of polyI:C treatment on the expression level of ALDH1L1 mRNA in primary cultured astrocyte
Values indicate the mean \pm SE (n=4).

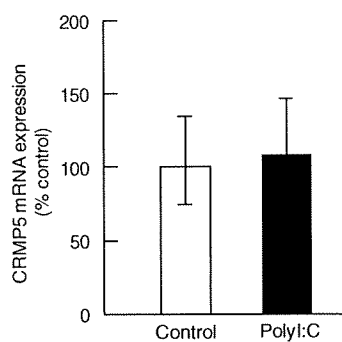


Fig. 5. Effect of polyI:C treatment on the expression levels of CRMP5 mRNA in primary cultured hippocampal neurons
Values indicate the mean \pm SE of three independent experiments (n=3).

2D-DIGE 法を行った結果、約 1000 個のスポットが検出され、その中で有意な発現変化を示したスポットは 2 個であった。Scatter plot 解析の結果では、コントロールマウスに比べて polyI:C を投与したマウスで発現が 2 倍以上の増減を示すスポットが 29 個存在したことから、サンプル数を増やして解析する必要があると考えられる。

有意な発現変化が認められたスポットについて質量分析およびデータベース検索を行った結果、ALDH1L1 および CRMP5 を同定した。ALDH1L1 は 10-formyltetrahydrofolate、NADP⁺ および H₂O から tetrahydrofolate、CO₂ および NADPH へ変換する酵素であり、細胞質に存在する。ALDH1L1 の強制発現は細胞の増殖を抑制し、逆にガン細胞においては ALDH1L1 の発現が減少していることが報告されている^{10, 11)}。また、中枢神経系においては発生時期の神経管の正中部の放射状グリア細胞に特異的に発現すること¹²⁾、成体脳ではアストロサイトに発現していることが報告されている⁷⁾。興味深いことに統合失調症患者の脳内で ALDH1L1 mRNA 発現が健常者に比べて増加していることが示されている¹³⁾。したがって、新生仔期の polyI:C 処置によって誘導される ALDH1L1 タンパクの増加が発達段階におけるアストロサイトの機能に影響を及ぼしている可能性がある。本研究では培養アストロサイトに polyI:C

を処置しても ALDH1L1 mRNA 発現に有意な変化は認められなかったことから、polyI:C は間接的に ALDH1L1 の発現を調節していると考えられる。

一方、CRMP5 は神経細胞の分化および軸索の伸長に関与している分子である⁹⁾。CRMP5 は主に脳に発現しており、胎生期から新生児期に最も高い mRNA 発現が認められる¹⁴⁾。PolyI:C が作用する Toll-like receptor 3 は神経細胞の軸索形成に重要な役割を果たしている成長円錐に存在し、polyI:C は軸索形成を阻害することが報告されている¹⁵⁾。したがって、新生仔期の polyI:C 投与による CRMP5 の発現低下が神経発達に影響をおよぼしている可能性がある。本研究では培養神経細胞に polyI:C を処置しても CRMP5 mRNA 発現に有意な変化は認められなかったことから、polyI:C は間接的に CRMP5 の発現を調節していると考えられる。さらに、polyI:C を処置したアストロサイトの培養上清を初代培養神経細胞に添加すると神経突起の伸長が抑制され、軸索における CRMP5 の免疫活性も減弱していた。この結果は polyI:C によりアストロサイトから遊離された液性因子が神経突起の伸長を抑制し、そのメカニズムに CRMP5 が関与している可能性を示唆している。

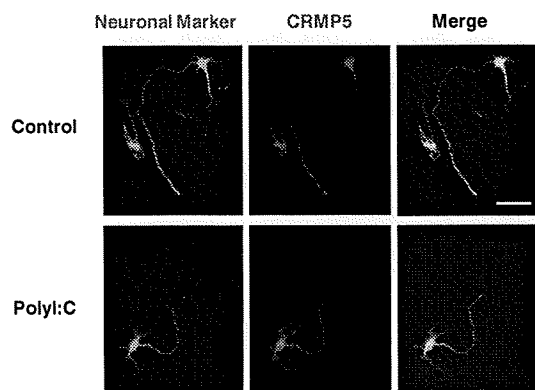


Fig. 6. Effect of polyI:C treatment on the expression of CRMP5-immunoreactivity in primary cultured hippocampal neurons
Scale bar: 100mm

今後は ALDH1L1 および CRMP5 の機能解析を行い、新生仔期の免疫異常によって惹起される精神発達障害との関連について検討する予定である。

E. 結論

新生仔期に polyI:C を投与し、成長したマウスの脳内におけるタンパク発現を 2D-DIGE 法により解析した結果、発現が変化する分子として ALDH1L1 および CRMP5 を同定した。PolyI:C は間接的に ALDH1L1 および CRMP5 の発現を調節していた。以上の結果から新生仔期の異常な免疫応答が学習・記憶や情動の発達障害の発現機序として ALDH1L1 および CRMP5 が関与している可能性が推測された。

[参考文献]

1. Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H, et al. Roles of neural stem progenitor cells in cytomegalovirus infection of the brain in mouse models. *Pathol Int.* 58: 257-267, 2008.
2. Patterson PH. Neuroscience. Maternal effects on schizophrenia risk. *Science* 318: 576-577, 2007.
3. Gonzalez-Dunia D, Volmer R, Mayer D, et al. Borna disease virus interference with neuronal plasticity. *Virus Res.* 111: 224-234, 2005.
4. Lawrence DM, Durham LC, Schwartz L, et al. Human immunodeficiency virus type 1 infection of human brain-derived progenitor cells. *J Virol.* 78: 7319-7328, 2004.
5. Ross CA, Margolis RL, Reading SA, et al. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 52: 139-153, 2006.
6. Meyer U, Murray PJ, Urwyler A, et al. Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Mol Psychiatr.* 13: 208-221, 2008.
7. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 28: 264-278, 2008.
8. Hou ST, Jiang SX, Smith RA. Permissive and repulsive cues and signalling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 267: 125-181, 2008.
9. 山田清文ら. 周産期における異常免疫応答による神経精神毒性に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク総合研究事業)分担研究報告書, 2010.
10. Krupenko SA and Oleinik NV. 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase, one of the major folate enzymes, is down-regulated in tumor tissues and possesses suppressor effects on cancer cells. *Cell Growth. Differ.* 13: 227-236, 2002.
11. Oleinik NV and Krupenko SA. Ectopic expression of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in A549 cells induces G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Mol. Cancer Res.* 1: 577-588, 2003.
12. Anthony TE and Heintz N. The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects. *J. Comp. Neurol.* 500: 368-383, 2007.
13. Barley K, Dracheva S, Byne W. et al. Subcortical oligodendrocyte- and astrocyte-associated gene expression in subjects with schizophrenia, major depression and bipolar disorder. *Schizophr. Res.* 112: 54-64, 2009.
14. Fukada M., Watakabe I., Yuasa-Kawada J, et al. Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. *J. Biol. Chem.* 275: 37957-37965, 2000.
15. Cameron JS, Alexopoulou L, Sloane JA, et al. Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator

of axonal growth in mammals. *J. Neurosci.* 27: 13033-13041, 2007.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagai, T., Murai, R., Matsui, K., Kamei, H., Noda, Y., Furukawa, H. and Nabeshima, T. Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D1 and serotonin 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology* 202: 315-328, 2009.
- 2) Lu, L., Mamiya, T., Lu, P., Niwa, M., Mouri, A., Zou, L. B., Nagai, T., Hiramatsu, M. and Nabeshima, T. The long-lasting effects of cross-fostering on the emotional behavior in ICR mice. *Behav. Brain Res.* 198: 172-178, 2009.
- 3) Arai, S., Takuma, K., Mizoguchi, H., Ibi, D., Nagai, T., Kamei, H., Kim, H.C. and Yamada, K. GABA_B receptor agonist baclofen improves methamphetamine-induced cognitive deficit in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 602: 101-104, 2009.
- 4) Ibi, D., Nagai, T., Kitahara, Y., Mizoguchi, H., Koike, H., Shiraki, A., Takuma, K., Kamei, H., Noda, Y., Nitta, A., Nabeshima, T., Yoneda, Y. and Yamada, K. Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci. Res.* 64: 297-305, 2009.
- 5) Koike, H., Ibi, D., Mizoguchi, H., Nagai, T., Nitta, A., Takuma, K., Nabeshima, T., Yoneda, Y. and Yamada, K. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav. Brain Res.* 202: 114-121, 2009.
- 6) Lu, P., Mamiya, T., Lu, L., Mouri, A., Zou, L., Nagai, T., Hiramatsu, M., Ikejima, T. and Nabeshima, T. Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *Br. J. Pharmacol.* 157: 1270-1277, 2009.
- 7) Lu, P., Mamiya, T., Lu, L., Mouri, A., Niwa, M., Hiramatsu, M., Zou, L., Ikejima, T., Nagai, T. and Nabeshima, T. Silibinin attenuates amyloid 25-35 peptide-induced memory impairments: Implication of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331: 319-326, 2009.
- 8) Ibi, D., Nagai, T., Koike, H., Kitahara, Y., Mizoguchi, H., Niwa, M., Jaaro-Peled, H., Nitta, A., Yoneda, Y., Nabeshima, T., Sawa, A. and Yamada, K. Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. *Behav. Brain Res.* 206: 32-37, 2010.
- 9) Lu, L., Mamiya, T., Lu, P., Toriumi, K., Mouri, A., Hiramatsu, M., Kim, H.C., Zou, L.B., Nagai, T. and Nabeshima, T. Prenatal exposure to phencyclidine produces abnormal behaviour and NMDA receptor expression in postpubertal mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19: 1-13, 2009.
- 10) Takuma, K., Fang, F., Zhang, W., Yan, S., Fukuzaki, E., Du, H., Sosunov, A., McKhann, G., Funatsu, Y., Nakamichi, N., Nagai, T., Mizoguchi, H., Ibi, D., Hori, O., Ogawa, S., Stern, D. M., Yamada, K. and Yan, S.S. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid- β and neuronal dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 20021-20026, 2009.
- 11) Lu, P., Mamiya, T., Lu, L., Mouri, A., Niwa, M., Kim, H.C., Zou, L.B., Nagai, T., Yamada, K., Ikejima, T. and Nabeshima, T. Silibinin attenuates cognitive deficits and decreases of dopamine and serotonin induced by repeated methamphetamine treatment. *Behav Brain Res.* 207: 387-393, 2010.
- 12) Nagai, T., Kitahara, Y., Shiraki, A., Hikita, T., Taya, S., Kaibuchi, K. and Yamada, K. Dysfunction of

dopamine release in the prefrontal cortex of dysbindin deficient sandy mice: an in vivo microdialysis study. *Neurosci. Lett.* 470: 134-138, 2010.

2. 学会発表

- 1) 尹在錫, 永井拓, 日比陽子, 小池宏幸, 新田敦美, 山田清文. マウス脳内における neuronal PAS domain 4 (NPAS4) の発現に対するメタンフェタミン慢性投与の影響. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜), (2009, 3. 16-18).
- 2) 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 北原裕子, 小池宏幸, 新田敦美, 米田幸雄, 澤明, 鍋島俊隆, 山田清文. 新生児期 polyI:C 投与がドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスの情動・認知機能に及ぼす影響. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜), (2009, 3. 16-18).
- 3) 北原裕子, 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 小池宏幸, Yu Jinghua, 新田敦美, 米田幸雄, 鍋島俊隆, 山田清文. 周産期ウイルス感染により誘発される統合失調症の神経発達モデルにおける行動およびグルタミン酸神経伝達異常. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜), (2009, 3. 16-18).
- 4) Alkam Tursun, 新田敦美, 溝口博之, 伊東亜紀雄, 村井里奈, 永井拓, 山田清文, 鍋島俊隆. Aβ の i.c.v. 投与により引き起こされる記憶障害マウスの海馬におけるニューロフィラメント L の機能的変化. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜), (2009, 3. 16-18).
- 5) 鳥海和也, 毛利彰宏, 成澤志穂, 青山雄紀, 井川夏実, 陸玲玲, 永井拓, 鍋島俊隆. 胎生期におけるフェンサイクリジンの投与は神経発達障害を惹起し、長期持続する行動障害をもたらす. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜), (2009, 3. 16-18).
- 6) 永井拓, 鍋島俊隆, 山田清文. ニコチンの報酬効果における組織プラスミノーゲン活性化因子の関与 (シンポジウム). 第 44 回日本アル

コール・薬物医学会、第 21 回日本アルコール精神医学会、第 12 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成 21 年度合同学術総会 (横浜), (2009, 9. 7-9).

- 7) Nagai, T., Ibi, D., Koike, H., Kitahara, Y., Nabeshima, T., Sawa, A., Yamada, K. Synergistic impacts of DISC1 mutation and neonatal polyI:C treatment on adult phenotypes in mice: a novel mouse model of schizophrenia with gene-environment interactions. 9th World Congress of Biological Psychiatry. (Paris, France), (2009, 6. 28-7, 2).
- 8) Yamada, K., Ibi, D., Kitahara, Y., Nabeshima, T., Nagai, T. Perinatal immune activation impairs emotional and cognitive functions with altered hippocampal glutamatergic neurotransmission in adult mice. 9th World Congress of Biological Psychiatry. (Paris, France), (2009, 6. 28-7, 2).
- 9) Nagai, T., Ibi, D., Mizoguchi, H., Nabeshima, T., Yamada, K. Neonatal polyI:C treatment in mice induces schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. Neuroscience 2009, the 39th annual meeting of the Society for Neuroscience. (Chicago, USA), (2009, 10. 17-21).

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成 21 年度 刊行物一覧および論文紹介

名城大学大学院薬学研究科 教授	鍋島俊隆 アルカムトルソ (リサーチレジデント)
著者氏名・発表タイトル・誌名、巻号、掲載ページ 及び 掲載年	
<p>Alkam T, Nitta A, Furukawa-Hibi Y, Niwa M, Mizoguchi H, Yamada K, Nabeshima T. Oral supplementation with Leu-Ile, a hydrophobic dipeptide, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of extracellular signal-regulated kinase. <i>Behav Brain Res.</i> In press</p>	
<p>Noda Y, Mouri A, Ando Y, Waki Y, Yamada SN, Yoshimi A, Yamada K, Ozaki N, Wang D, Nabeshima T. Galantamine ameliorates the impairment of recognition memory in mice repeatedly treated with methamphetamine: involvement of allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors and dopaminergic-ERK1/2 systems. <i>Int J Neuropsychopharmacol.</i>, 11. 1-12. (2010) 別刷 No.⑧</p>	
<p>Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Kim HC, Zou LB, Nagai T, Nabeshima T. Prenatal exposure to phencyclidine produces abnormal behaviour and NMDA receptor expression in postpubertal mice. <i>Int J Neuropsychopharmacol.</i>, 19. 1-13 (2009) 別刷 No.⑨</p>	
<p>Mouri A, Noda Y, Shimizu S, Tsujimoto Y, Nabeshima T. The Role of Cyclophilin D in Learning and Memory. <i>Hippocampus</i>, 20, 293-304 (2010). 別刷 No.⑦</p>	
<p>Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo KI, Gruber AJ, Tomita K, Lu L, Tomisato S, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Hiyama H, Huang B, Kohda K, Noda Y, O'Donnell P, Nakajima K, Sawa A, Nabeshima T. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. <i>Neuron</i> 65, 480-489 (2010) 別刷 No.⑬</p>	
<p>Tomida S, Mamiya T, Sakamaki H, Miura M, Aosaki T, Masuda M, Niwa M, Kameyama T, Kobayashi J, Iwaki Y, Imai S, Ishikawa A, Abe K, Yoshimura T, Nabeshima T, Ebihara S. Usp46 is a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension and forced swimming tests. <i>Nat Genet.</i> 41. 688-695 (2009) 別刷 No.⑫</p>	
<p>Tursun Alkam, 鍋島俊隆 禁煙補助薬の効果(2)—バレンクリンによる治療法— <i>The LUNG perspectives</i>, Vol.18 No.1 (2010) 別刷 No.⑭</p>	

名城大学薬学部 助教	間宮 隆吉
<p>Lu P, Mamiya T, Lu L, Mouri A, Niwa M, Kim HC, Zou LB, Nagai T, Yamada K, Ikejima T, Nabeshima T. Silibinin attenuates cognitive deficits and decreases of dopamine and serotonin induced by repeated methamphetamine treatment. <i>Behav Brain Res.</i> 207. 387-393 (2010) 別刷 No.④</p>	
<p>Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Zou L, Nagai T, Hiramatsu M, Ikejima T, Nabeshima T. Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. <i>Br J Pharmacol.</i> 157. 1270-1277. (2009) 別刷 No.⑤</p>	
<p>Im HI, Nakajima A, Gong B, Xiong X, Mamiya T, Gershon ES, Zhuo M, Tang YP. Post-training dephosphorylation of eEF-2 promotes protein synthesis for memory consolidation. <i>PLoS One.</i> 4(10):e7424. (2009) 別刷 No.⑥</p>	
<p>Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Kim HC, Zou LB, Nagai T, Nabeshima T. Prenatal exposure to phencyclidine produces abnormal behaviour and NMDA receptor expression in postpubertal mice. <i>Int J Neuropsychopharmacol.</i>, 19. 1-13 (2009) 別刷 No.⑨</p>	
<p>Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Niwa M, Hiramatsu M, Zou LB, Nagai T, Ikejima T, Nabeshima T. Silibinin attenuates amyloid beta(25-35) peptide-induced memory impairments: implication of inducible nitric-oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in mice. <i>J Pharmacol Exp Ther.</i> 331. 319-326 (2010) 別刷 No.⑩</p>	
<p>Tomida S, Mamiya T, Sakamaki H, Miura M, Aosaki T, Masuda M, Niwa M, Kameyama T, Kobayashi J, Iwaki Y, Imai S, Ishikawa A, Abe K, Yoshimura T, Nabeshima T, Ebihara S. Usp46 is a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension and forced swimming tests. <i>Nat Genet.</i> 41. 688-695 (2009) 別刷 No.⑫</p>	
<p>間宮隆吉 鶴飼良(著書) 実験薬理学 実践行動薬理学 第二編 簡便な器具を用いた学習記憶改善物質のスクリーニング—食品および食品成分の薬理学的作用の評価— 日本薬理学会 編、(株)金芳堂、東京、pp.198-205 (2010) (著書)</p>	
名城大学薬学部・教授	野田幸裕