

E. 結論

前年度までに、胎生期における PCP 暴露が成体期でのグルタミン作動性酸神経系の機能障害により統合失調症様の行動異常を惹起することを報告している。本年度は、さらに、PCP 暴露マウスの前頭前皮質においてグリア細胞上グルタミン酸トランスポーターGLAST 発現量の有意な増加、また、グルタミン酸基礎遊離量の減少及び高カリウム刺激後の遊離量の減少を見出した。本結果は、胎生期における PCP の暴露は、成体期の前頭前皮質において、グリア細胞上のグルタミン酸トランスポーターの発現量増加のような神経化学的な変化を一因とするグルタミン酸機能障害を惹起することが明らかとなった。

また、前年度までに、GD14-P0 の期間にニコチン暴露された雄マウスにおいて不安などの情動障害および注意機能障害が顕著に認められることから、本年度はさらなる評価系として、水探索試験、断崖回避試験についても検討を行った。その結果、両試験系においてニコチン暴露群に障害が認められた。また、それら行動異常の原因を明らかにするため、HPLC を用いた脳内モノアミン含量の測定を行ったところニコチン暴露群の P28 および P56 の前頭皮質においてノルアドレナリン代謝産物である MHPG と代謝回転の低下が認められた。しかしながら、海馬ではこのような変化は認められなかった。以上より、胎生期におけるニコチンの暴露は前頭皮質での脳内ノルアドレナリン作動性神経系の機能の変化を生じさせ、出生後も持続する不安などの情動障害および注意機能障害を生じることが明らかとなった。

[参考文献]

1. Mouri A, Noda Y, Enomoto T, Nabeshima T. Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochem Int*, 51: 173-184 (2007).
2. Enomoto T, Noda Y, Nabeshima T. Phencyclidine and genetic animal models of schizophrenia developed in relation to the glutamate hypothesis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 29: 291-301 (2007).
3. Wang C, McInnis J, Ross-Sanchez M, Shinnick-Gallagher P, Wiley JL, Johnson KM. Long-term behavioral and neurodegenerative effects of perinatal phencyclidine administration: implications for schizophrenia. *Neuroscience*, 107: 535-550 (2001).
4. Cao YJ, Surowy CS, Puttfarcken PS. Nicotinic Andersen JD, Pouzet B. Spatial memory deficits induced by perinatal treatment of rats with PCP and reversal effect of D-serine. *Neuropsychopharmacology*, 29: 1080-1090 (2004).
5. Levin ED, Rose JE. Anticholinergic sensitivity following chronic nicotine administration as measured by radial-arm maze performance in rats. *Behav Pharmacol*. 1: 511-520 (1990).
6. Semenova S, Stolerman IP, Markou A. Chronic nicotine administration improves attention while nicotine withdrawal induces performance deficits in the 5-choice serial reaction time task in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 87: 360-368 (2007).
7. Dracheva S, Marras SA, Elhakem SL, Kramer FR, Davis KL, Haroutunian V. N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 158:1400-1410 (2001).
8. Simpson MD, Slater P, Deakin JF. Comparison of glutamate and gammaaminobutyric acid uptake binding sites in frontal and temporal lobes in

- schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44:423–427 (1998).
9. Aoshima H. Effects of alcohols and food additives on glutamate receptors expressed in xenopus oocytes: Specificity in the inhibition of the receptors. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60: 434-438 (1996).
 10. Chisolm MS, Tuten M, Brigham EC, Strain EC, Jones HE. Relationship between cigarette use and mood/anxiety disorders among pregnant methadone-maintained patients. *Am J Addict.* 18:422-429 (2009).
 11. Langley K, Rice F, van den Bree MB, Thapar A. Maternal smoking during pregnancy as an environmental risk factor for attention deficit hyperactivity disorder behaviour. *Minerva Pediatr.* 57: 359-371 (2005).
 12. Fried PA, Watkinson B, Gray R. Differential effects on cognitive functioning in 13- to 16-year-olds prenatally exposed to cigarettes and marihuana. *Neurotoxicol Teratol.* 25: 427-436 (2003).
 13. Lv J, Mao C, Zhu L, Zhang H, Pengpeng H, Xu F, Liu Y, Zhang L, Xu Z. The effect of prenatal nicotine on expression of nicotine receptor subunits in the fetal brain. *Neurotoxicology.* 29: 722-726 (2008).
 14. Eppolito AK, Bachus SE, McDonald CG, Meador-Woodruff JH, Smith RF. Late emerging effects of prenatal and early postnatal nicotine exposure on the cholinergic system and anxiety-like behavior. *Neurotoxicol Teratol.* 32: 336-345 (2010).
 15. Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther.* 122: 125-139 (2009).
 16. Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM. Nicotine and brain development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 84: 30-44 (2008).
 17. Azam L, Chen Y, Leslie FM. Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors within midbrain dopamine neurons. *Neuroscience.* 144: 1347-1360 (2007).
- F. 研究発表**
1. 論文発表
 1. Noda Y, Wang D, Ando Y, Waki Y, Yamada S, Yoshimi A, Yamada K, Ozaki N, Mouri A, 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. *Int J Neuropsychopharmacol*, 13, 1343-1354 (2010).
 2. 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. *Int J Neuropsychopharmacol*, 13, 877-889 (2010).
 3. 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. *Neuron* 65, 480-489 (2010).
 4. Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Zou LB, Nabeshima T. Prenatal exposure to PCP produces behavioral deficits

accompanied by the overexpression of GLAST in the prefrontal cortex of postpubertal mice. *Behav Brain Res.* 220:132-139 (2011).

5. Alkam T, Hiramatsu M, Mamiya T, Aoyama Y, Nitta A, Yamada K, Kim HC, Nabeshima T. Evaluation of object-based attention in mice. *Behav Brain Res.* 220: 185-193 (2011).

2. 学会発表

1. Nabeshima T, Niwa M, Kamiya A, Kubo K, O'Donnell P, Nakajima K, Kohda K, Noda Y, Sawa A. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. CINP 2010 WORLD CONGRESS, 香港 (2010.6.7)
2. Nitta A, Alkam T, Furukawa-Hibi Y, Niwa M, Yamada K, Nabeshima T. CINP 2010 WORLD CONGRESS, 香港 (2010.6.7)
3. Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K. Effect of antipsychotics on the behavioral deficits in human dominant-negative DISC1 transgenic mice with neonatal polyI:C treatment. International Behavioral Neuroscience Society, サルディニア, (2010.6.10)
4. Mouri A, Noda Y, Wang D, Ando Y, Waki Y, Yamada S, Nabeshima T. The College on Problem of Drug Dependence (CPDD) 72nd Annual Meeting, アリゾナ (H2010.6.14)
5. Nabeshima T, Niwa M, Kamiya A, Kubo K, O'Donnell P, Nakajima K, Kohda K, Noda Y, Sawa A. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer impaired postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and adult behaviors. コペンハーゲン (H2010.7.20)
6. 鍋島俊隆、間宮隆吉、毛利彰宏、野田幸裕: ニコチン性コリン受容体の細胞内情報伝達系を介する認機能の調節機構 喫煙科学財団報告会、東京 (2010.7.28)
7. 永井拓、衣斐大祐、鍋島俊隆、澤明、山田清文: 周産期の免疫異常が神経精神発達におよぼす影響 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経学会大会・第20回日本神経回路学会大会 Neuro2010、神戸 (2010.9.2)
8. 肥田裕丈、毛利彰宏、安藤雄、鍋島俊隆、野田幸裕: 新生仔期の免疫異常は若年期フェンシクリジン投与による情動・認知機能の障害を増強する 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経学会大会・第20回日本神経回路学会大会 Neuro2010、神戸 (2010.9.2)
9. 山田清文、衣斐大祐、中島晶、鍋島俊隆、永井拓: Poly:C 誘発性神経発達障害モデル: 統合失調症動物モデルとしての有用性と発症機構 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会 合同年会、仙台(2010.9.15)
10. 衣斐大祐、永井拓、中島晶、鍋島俊隆、山田清文: 発達期疑似ウイルス感染モデル動物の神経発達障害における Ifitm3 の役割 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会 合同年会、仙台 (2010.9.15)
11. 野田幸裕、毛利彰宏、肥田裕丈、安藤雄、間宮隆吉、山田清文、鍋島俊隆: 新生期の Poly:C 投与は若年期フェンサイクリジン投与による情動・認知機能の障害を増強する 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会 合同年会、仙台 (2010.9.15)

12. Nabeshima T, Niwa M, Kamiya A, Kubo K, O'Donnell P, Nakajima K, Kohda K, Noda Y, Sawa A. Impairment of postnatal dopaminergic maturation and adult behavior in disc1 knockdown mice by utero gene transfer. The International Symposium of Pharmacology-The 3rd Mainland, Taiwan and Hongkong Symposium of Pharmacology, 瀋陽 (2010.9.25)
13. 毛利彰宏、鍋島俊隆: ガランタミンは覚せい剤連続投与マウスに認められる認知障害を緩解する 平成 22 年度アルコール薬物依存関連学会合同学術総会、小倉 (2010.10.8)
14. 鍋島俊隆: 遺伝子とストレスの関わりによる精神障害モデル動物 フォーラム富山「創薬」第 32 回研究会、富山 (2010.10.14)
15. 鍋島俊隆: 薬物依存抑制遺伝子の発見とその機能 日本薬学会北陸支部特別講演会、富山 (2010.10.15)
16. 永井拓, 于静華, 北原裕子, 衣斐大祐, 鍋島俊隆, 山田清文: 新生仔期 polyI:C 処置によって誘発される不安様行動および学習記憶障害 第 20 回日本医療薬学会年会、千葉 (2010.11.13)
17. 衣斐 大祐、永井 拓、中島 晶、鍋島 俊隆、山田 清文: 神経発達期の免疫応答誘発性脳機能障害における IFITM3 の役割 第 84 回日本薬理学会年会、横浜 (2011.3.22)
18. 毛利 彰宏、肥田 裕丈、安藤 雄、間宮 隆吉、永井 拓、山田 清文、鍋島 俊隆、野田 幸裕: 新生児期の PolyI:C 投与はフェンシクリジン投与によるグルタミン酸作動性神経伝達を障害し、異常行動を増悪させる 第 84 回日本薬理学会年会、横浜 (2011.3.24)
19. 安藤 雄、毛利 彰宏、肥田 裕丈、脇 由香里、吉見 陽、鍋島 俊隆、尾崎 紀夫、野田 幸裕: 幼若期における社会敗北ストレスは、脳内モノアミン量変化を伴う社会性行動の障害を

惹起する 第 84 回日本薬理学会年会、横浜 (2011.3.24)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 1. 発明の名称: 「新規ステロイド誘導体及びその製造方法」出願番号: 特願 2009-039770 ※現在 PCT 出願準備中 発明者: 小鹿一、間宮隆吉、鍋島俊隆
2. 実用新案登録

なし
3. その他

なし

妊娠期におけるコレシストキニン受容体関連化合物暴露が 学習および情動機能に及ぼす影響

分担研究者：間宮隆吉

研究協力者：古関竹直

（名城大学薬学部薬品作用学）

[研究要旨]

【目的】コレシストキニンは膵臓や胆のうなど消化管だけでなく脳内にも広く分布するペプチドで、作用する受容体も同様に分布している。コレシストキニン受容体リガンドは成熟ラットやマウスで、膵炎やパニック障害を誘発することから、この受容体に作用する化合物は末梢から中枢まで大きな影響を及ぼす可能性がある。そこで本年度は、コレシストキニン受容体拮抗薬の CI-988 について、マウス胎生 6 日目から出生前日まで 1 日 1 回処置し、生まれたマウスが 5、7 および 20 週齢になった時に行動薬理学的解析を行った。

【方法】C57BL/6J 系雌性マウス（15 週齢）を 12 週齢の雄性マウスと交配させ、妊娠 6 日目から出産前日まで（CI-988 0.1 および 1 mg/kg）を処置した。薬物処置された母マウスから生まれたマウスについて生後 5、7 週および 20 週目にオープンフィールド試験、新奇物体認知試験、高架式十字迷路試験、社会的相互反応試験、強制水泳試験および性行動試験を行った。また、行動実験実施後に血液採取および脳摘出を行い、それぞれサンプル調整を行った。

【結果】CI-988 (0.1 mg/kg) を胎児期に暴露しても成熟後の情動および認知行動はなんら影響を受けなかったが、1 mg/kg では 7 週齢時でのみ新奇物体認知試験において溶媒投与群と比較して有意な障害が観察された。行動実験後、血中コレシストキニン濃度を測定したところ、このマウスではわずかであるが溶媒投与群と比較して有意に高かった。一方、ウェスタンプロットティング法にて脳内の CCK2 受容体発現量を比較したが各群間に有意な変化は認められなかった。

【まとめ】コレシストキニン受容体関連化合物は胎児の脳高次機能の発達に影響を与え、学習記憶機能を障害することが分かった。また、その障害作用には血中コレシストキニン濃度の上昇が関与している可能性が示唆された。

妊娠期における化学物質暴露による学習および情動障害

分担研究者：間宮隆吉

研究協力者：古関竹直

(名城大学薬学部薬品作用学)

A. 研究目的

発達段階の脳は成熟した大人の脳と比べて外的刺激の影響を受けやすく、その結果、思春期・青年期を経て精神発達障害が発症することが多い。外的刺激には身体的および心理的ストレスなどのほか、日常生活で受ける化学物質による刺激があげられる。日本の歴史上最悪とも言われるサリドマイド薬害事件は、サリドマイドを服用した妊婦から生まれた胎児の四肢に発達不全が見られた。このように特に、妊娠中には化学物質暴露によって極めて深刻な事態を引き起こすこともありうる。

現在、我々をとりまく化学物質は無数に存在し、生物に対してどのように影響するかは一つ一つ調べなければ分からない。しかし、化学物質がどの神経系や受容体に関連するかによって分類することは、構造活性相関などから判断すれば比較的容易である。従って、どの神経系や受容体に作用する化学物質であるかを手がかりにして、それらの生物に対する影響を予測することは十分可能と考えられる。

本研究課題では、平成 20 年および 21 年度にグルタミン酸作動性神経系の N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体とコリン作動性神経系のニコチン受容体に着目した。これらは学習記憶機能や情動機能に大きな役割を果たしており、発達成長にも欠くことのできない重要な神経および受容体の一つである。NMDA 受容体に作用する化合物にはフェンシクリジン (PCP) のように毒性が強く、麻薬指定されているものもある。また他にも (+)

MK801 (ジソシルピン) のような選択的リガンドがある。ニコチン受容体に作用するニコチンは、煙草に含まれる代表的な成分である。妊婦が喫煙すれば胎児は受動的に煙草の成分を摂取することとなり、何らかの影響を及ぼすことは極めて明白である。本プロジェクトでは、妊娠マウスがジソシルピンおよびニコチンに暴露されたとき、胎児にどのような影響を及ぼすかについて成熟後行動学的に検討してきた。その結果、ニコチン (0.5, 1 mg/kg) によっては認知及び情動機能は影響を受けなかった。一方、ジソシルピン (0.02, 0.2 mg/kg) は一部の認知及び情動機能を障害することを明らかにした。また、別のグループの研究結果と合わせて、NMDA 受容体の障害は認知及び情動機能を障害することを見出した。

2 年間の経過を踏まえ、平成 22 年度はグルタミン酸受容体の機能とも関連しているコレスistキニン受容体に着目した。コレスistキニンは膵臓や胆のうなど消化管だけでなく脳内にも広く分布するペプチドで、作用する受容体も同様に分布している。コレスistキニン受容体リガンドは成熟ラットやマウスで、膵炎やパニック障害を誘発することから、この受容体に作用する化合物は末梢から中枢まで大きな影響を及ぼす可能性がある。そこで本年度は、コレスistキニン受容体拮抗薬の CI-988 について、マウス胎生 6 日目から出生前日まで 1 日 1 回処置し、生まれたマウスが 5、7 および 20 週齢になった時に行動薬理学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験には ICR 系 10 週齢の雌性マウスに Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG; シグマ; 50 IU/mL) および human Chorionic Gonadotropin (hCG; シグマ; 50 IU/mL) を ICR 系 8 週齢の雄性マウスとの交配の 52 時間および 4 時間前に 0.1

mL ずつ腹腔内に投与した。交配翌朝のプラグチェックによって交配を確認したマウスを実験に使用した。

CI-988 (トクリスバイオサイエンス; 0.1 および 1mg/kg) を 0.9%生理食塩液に溶解し、マウス体重 10 g あたり 0.1 mL の割合でそれぞれ皮下あるいは腹腔内投与した。4 週齢で離乳させ、5 週齢および 7 週齢になるまでは 1 ケージあたり 4~5 匹で飼育し、給餌給水は自由にさせた。マウスへのストレス負荷が少ない試験から順に自発行動量の測定、オープンフィールド試験、新奇物体認識試験、社会性行動試験、高架式十字迷路試験、強制水泳試験を行った。すべての実験は名城大学薬学部動物実験指針および日本薬理学会動物実験指針に従って行った。

2. 各種行動実験

自発運動量測定：マウスを装置 (W50 x L50 x H20 cm) に入れ、その直後からマウスの行動量を赤外線センサーで自動的に測定した。

オープンフィールド試験：新規環境となるオープンフィールド内にマウスを入れ、10 分間マウスの運動量、身繕い、脱糞や排尿などの回数を測定して、マウスの一般行動に変化があるかどうか、また新規環境への適応性について検討した。

新奇物体認識試験：実験装置にはプレキシグラス製のオープンフィールド箱 (W50 x L50 x H20 cm) を用い、装置の底には木屑を敷いた。NORT は馴化試行、訓練試行および保持試行からなり、1 日目の馴化試行では、実験装置にオブジェクトを設置せず、装置に 10 分間マウスを慣らした。2 日目の訓練試行では、装置内に 2 つのオブジェクトを設置し、マウスを 10 分間自由に探索させた。3 日目の保持試行では、いずれか片方のオブジェクトを新奇オブジェクトに置換し、訓練試行 24 時間後に、再びマウスを装置内に入れ、10 分間自由に探索させた。各オブジェクトの探索時間および 2 つのオブジェクトを探索している総探索時間

を測定した。訓練試行においては総探索時間に対するいずれかのオブジェクトへの探索時間の割合 (%) を、保持試行においては探索時間に対する新奇オブジェクトに対する探索時間の割合 (%) を探索嗜好率として算出し、認知機能の指標とした。

社会性行動試験：1 日目に装置に対して 10 分間の馴化を行い、2 日後に社会性行動試験を行った。それぞれ異なるケージ内で飼育していた同系統の 2 匹のマウスを同時に装置中央に入れ、その直後から 10 分間、社会性行動として、お互いに嗅ぎ合う行動 (sniffing)、相手の動物を追いかける行動 (following)、相手の動物の上に乗るかかる行動 (mounting)、相手の動物の下に潜ろうとする行動 (scrawling) のいずれかを示している時間を測定した。

高架式十字迷路試験：2 つのオープンアーム (W8 x L20 cm) と同じ面積の 2 つのクローズドアームからなり、クローズドアームは高さ 20 cm の壁に覆われている実験装置を床から高さ 50 cm に設置した。マウスを静かに中央に置き、5 分間オープンアームあるいはクローズドアームに入る回数及びその滞在時間を測定し、全体に占めるオープンアームに入る回数及びその滞在時間の割合を不安の指標として示した。

強制水泳試験：φ 20 cm x H20 cm のアクリル製円筒容器に水 (25℃) を張り、その中にマウスを入れ 5 分間観察し、無動時間を記録した。

血中コレステロキニン濃度の測定：行動実験終了後、断首により血液を採取し、EDTA 入りチューブに入れて 1600 x g で 15 分間遠心し上清を得た。抽出および測定は Protocol for CCK (26-33) EIA kit (EK-069-04; Phoenix Pharmaceuticals, INC, USA) に従って行った。

3. 統計解析

実験結果は平均値 ± 標準誤差として示した。得られた結果は、one-way による分散分析を行い、

各群間比較には、Tukey の多重比較検定法を用いた。また 2 群間の比較には Student t 検定を用いた。なお、危険率が 5% 以下の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

自発行動量：装置に入れてから 5 分ごとの自発行動量を 60 分まで測定したが、5 週齢および 7 週齢の両時点において、生理食塩液投与群と比較して CI-988 投与群間に有意な差は認められなかった。

オープンフィールド試験：装置に入れてから 10 分間の運動量、身繕い回数、脱糞数および排尿数は 5 週齢および 7 週齢の両時点において、生理食塩液投与群と比較して CI-988 投与群間に有意な差は認められなかった。

たが、CI-988 (1 mg/kg) 投与群においては 7 週齢の探索嗜好率が有意に低下した (図 1)。

社会性行動試験：10 分間相手に対する追尾、身繕い時間を観察したところ、生理食塩液投与群と比較してニコチンあるいは CI-988 投与群ではなから影響は観察されなかったが、ジゾシルピン投与群ではそれらの行動時間が有意に減少した。この減少は 7 週齢でのみ観察され、5 週齢では観察されなかった。

高架式十字迷路試験：オープンアームでの滞在時間の割合は、生理食塩液投与群および CI-988 投与群では特に差は認められなかった。オープンアームへの侵入回数はいずれの週齢でも投与群間で有意な変化は認められなかった。

強制水泳試験：装置に入れてから 5 分間の無動時間を測定したが、5 週齢および 7 週齢の両時点において、生理食塩液投与群と比較して CI-988 投与群間に有意な差は認められなかった。

なお、20 週齢では何ら行動変化は認められなかった。

血中コレシストキニン濃度：7 週齢マウスの行動実験後、血中コレシストキニン濃度を測定したところ、このマウスではわずかであるが溶媒投与群と比較して有意に高かった (図 2)。一方、ウェスタンブロット法にて脳内の CCK2 受容体発現量を比較したが各群間に有意な変化は認められなかった (データ示さず)。

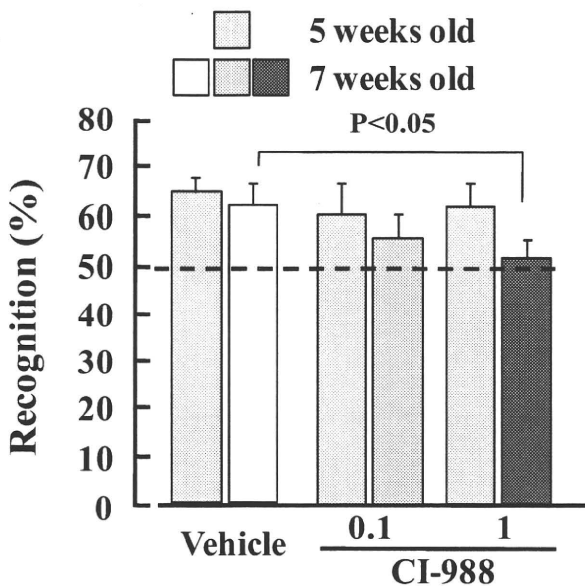


図 1 5 および 7 週齢時における CI-988 投与による新奇物体認識課題の障害 (N=6-8)。母マウスの妊娠 6 日目から出生時まで CI-988 を投与した。

新奇物体認識試験：訓練試行時の探索嗜好率は 5 週齢および 7 週齢の両時点において、生理食塩液投与群と比較して CI-988 の各投与群間に有意な差は認められなかった。一方、保持試行時では生理食塩液投与群、CI-988 (0.1 mg/kg) 投与群では新奇物体に対する探索行動が有意に増加してい

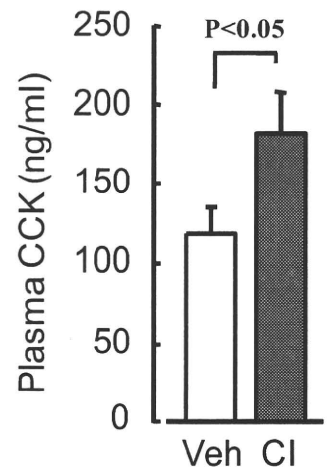


図 2 7 週齢時における CI-988 (CI 1 mg/kg) 投与による血漿コレシストキニン濃度 (N=4)。母マウスの妊娠 6 日目から出生時まで CI-988 を投与した。

D. 考察

今回一連の行動学的試験を行った結果、コレシストキニン受容体関連化合物は胎児の脳高次機能の発達に影響を与え、学習記憶機能を障害することが分かった。薬理的にコレシストキニンの投与によって学習記憶障害が誘発されることも報告されている¹⁾。このことはコレシストキニン2受容体拮抗薬暴露によって内因性コレシストキニン濃度が上昇した結果、認知機能が低下した可能性を示唆している。一方、認知機能以外の行動は特に影響を受けなかった。今回観察された濃度上昇の程度では特に影響を受けなかったと考えられる(表1)。

受容体	コレシストキニン	
	CI-988	1
試験方法 (観察項目)	(mg/kg) 0.1	1
オープンフィールド試験 (全般的評価)	障害なし	障害なし
新奇物体認識試験 (認知機能)	障害なし	障害あり (7週齢)
高架式十字迷路試験 (不安感受性)	障害なし	障害なし
社会的相互反応試験 (相手との関わりあい)	障害なし	障害なし
強制水泳試験 (うつ様状態)	障害なし	障害なし
性行動試験(雄性)	障害なし	障害なし

20週齢では障害は全く観察されなかった。

E. 結論

コレシストキニン受容体阻害薬は胎児に影響を与え、生後の認知機能を障害する可能性があることが明らかとなった。また化学物質の情動・認知行動に対する毒性を体系的に評価(スクリーニング)する一連の行動実験方法について確立できた。

【参考文献】

1) Daugé V, Léna I. CCK in anxiety and cognitive

processes. *Neurosci Biobehav Rev.* 22(6):815-25, 1998.

- 2) Chen Q, Nakajima A, Meacham C, Tang YP. Elevated cholecystokinergic tone constitutes an important molecular/neuronal mechanism for the expression of anxiety in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(10):3881-6, 2006.
- 3) Chen Q, Tang M, Mamiya T, Im HI, Xiong X, Joseph A, Tang YP. Bi-directional effect of cholecystokinin receptor-2 overexpression on stress-triggered fear memory and anxiety in the mouse. *PLoS One.* 5(12):e15999, 2010.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Zou LB, Nabeshima T. Prenatal exposure to PCP produces behavioral deficits accompanied by the overexpression of GLAST in the prefrontal cortex of postpubertal mice. *Behav Brain Res.* 220(1):132-139, 2011.
2. Alkam T, Hiramatsu M, Mamiya T, Aoyama Y, Nitta A, Yamada K, Kim HC, Nabeshima T. Evaluation of object-based attention in mice. *Behav Brain Res.* 220(1):185-193, 2011.
3. Chen Q, Tang M, Mamiya T, Im HI, Xiong X, Joseph A, Tang YP. Bi-directional effect of cholecystokinin receptor-2 overexpression on stress-triggered fear memory and anxiety in the mouse. *PLoS One.* 5(12):e15999, 2010.

学会発表

1. 渡辺裕之、鳥海和也、宋梓瑜、葛丹、本莊龍輝、毛利彰宏、古関竹直、間宮隆吉、宮本嘉明、新田淳美、福島健、鍋島俊隆：薬物依存

関連分子 shati 遺伝子欠損マウスにおける行動異常と脳内の生化学的な変化 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H23.3.23)

2. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンシクリジンによる異常行動に対するクロザピンのエピジェネティックな作用と GABA 関連遺伝子発現 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H23.3.23)
3. 毛利彰宏、肥田裕丈、安藤雄、間宮隆吉、永井拓、山田清文、鍋島俊隆、野田幸裕：新生児期の PolyI:C 投与はフェンシクリジン投与によるグルタミン酸作動性神経伝達を障害し、異常行動を増悪させる 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H23.3.23)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：「新規ステロイド誘導体及びその製造方法、並びにその新規ステロイド誘導体を含むする医薬」

出願番号：PCT/JP2010/052656

発明者：小鹿一、間宮隆吉、鍋島俊隆

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究者：山田清文¹

研究協力者：衣斐大祐^{1,2}、永井 拓¹、鍋島俊隆²

(¹名古屋大学大学院医学系研究科・附属病院薬剤部、²名城大学薬学部)

[研究要旨]

化学物質の精神毒性には、物理化学的な性質に基づくそれぞれの化学物質に固有の毒性と化学物質と生体との相互作用に基づく化学物質全般に共通する影響があると考えられる。また、周産期における化学物質への暴露は免疫毒性や異常免疫応答を誘発することが知られている。本研究では、生体との相互作用を介した化学物質による神経発達障害の機構解明を目的として、周産期における異常免疫応答が脳神経発達および成長後の脳機能に及ぼす影響について新たに動物モデルを作製して研究した。昨年度までに、合成二本鎖 RNA アナログである polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を新生仔期に処置したマウスは、(1) 成熟後に不安様行動の増加、学習記憶、感覚情報処理および社会性行動の異常を示すこと、(2) 海馬における脱分極性グルタミン酸遊離に障害があること、(3) polyI:C 処置マウスの行動異常にはドーパミン、アセチルコリンおよびグルタミン酸などの神経伝達物質の異常が関与していること、(4) polyI:C 処置による脳神経発達障害にはアストログリア細胞の異常応答と神経細胞-アストログリア細胞間の相互作用の異常が関与していることを明らかにした。本年度は、polyI:C により誘発される神経発達障害における interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) の役割について検討した。

マウス大脳由来培養アストログリア細胞に polyI:C を添加して 24 時間培養した培養上清 (polyI:C-ACM) を初代培養海馬神経細胞に添加すると、神経細胞の MAP2 陽性樹状突起の伸展および PSD95 陽性スパイン形成が有意に抑制された。一方、IFITM3 遺伝子欠損 (*ifitm3^{-/-}*) マウスから調製した polyI:C-ACM には神経樹状突起およびスパイン形成の障害効果は認められなかった。さらに、野生型 (WT) マウスにおいては、polyI:C 処置により前頭葉皮質 MAP2 タンパクが減少し、12 週齢では認知記憶障害が観察されたが、*ifitm3^{-/-}* マウスでは polyI:C 処置によるこれらの異常は認められなかった。

以上の結果より、polyI:C 誘発性異常免疫応答に伴う神経発達障害にはアストログリア細胞で誘導される IFITM3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、神経発達期における化学物質暴露により脳内アストログリア細胞で IFITM3 が誘発されるかどうか、また、脳発達期における化学物質への暴露により誘発される学習記憶や情動行動の異常に IFITM3 が関与しているかどうか、更に検討する必要がある。

A. 研究目的

化学物質の精神毒性には、物理化学的な性質に基づくそれぞれの化学物質に固有の毒性と化学

物質と生体との相互作用に基づく化学物質全般に共通する影響があると考えられる。また、周産期（神経発達期）に暴露された様々な化学物質が

免疫毒性や異常免疫応答を誘発することが知られている¹⁻³⁾。これまでに我々は、生体との相互作用を介した化学物質による精神発達障害の機構解明を目的として、周産期における異常免疫応答が脳神経発達および成長後の脳機能に及ぼす影響について動物モデルを用いて検討した。本年度は、新生仔期 polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) により誘発される神経発達障害のメカニズムについて、マウス由来培養アストログリア細胞および培養神経細胞を用いて検討するとともに、interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) の役割について検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には ICR 系マウス (日本エスエルシー、静岡)、IFITM3 遺伝子欠損 (*ifitm3*^{-/-}) マウスおよびその野生型 (WT) マウス (C57/BL6 系) を使用した。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. マウス脳由来培養細胞を用いた *in vitro* 実験 初代培養神経細胞

妊娠 16 日目のマウスより胎児を摘出し、実体顕微鏡下で胎児の海馬を取り出し、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セルデスクに採取した初代培養神経細胞を播いた。PolyI:C (3-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) またはアストログリア細胞培養上清 (ACM) の処置は培養開始 2 日目に行い、培養 3 日目または 7 日目に解析を行なった。免疫細胞化学を用いての解析では 24 well プレートに 1×10^4 個/well、MTT アッセイでは 96 well プレートに 3×10^4 個/well で初代培養神経細胞を播いた。

培養アストログリア細胞とアストログリア細胞培養上清 (ACM) の調製

生後 0~2 日の新生仔マウスから海馬および大脳皮質を取り出した。髄膜を剥がし 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。すべての実験には二次培養アストログリア細胞を用いた。ただし、*ifitm3*^{-/-}マウス由来の *ifitm3*^{-/-}アストログリア細胞は他の細胞が混入していないことを確認し、一次培養で実験に用いた。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 処置後 24 時間後の培養上清 (polyI:C-ACM) を初代培養神経細胞に処置した。

免疫細胞化学

4%パラホルムアルデヒドで固定した後、抗 toll-like receptor3 (TLR3)、MAP2、tau および PSD95 抗体を用いて免疫染色を行った。神経突起の長さの測定には Neurolucida ニューロントレーシングプログラム (Brainscience Idea Co. Ltd.) を用いた。

PCR アレイを用いた遺伝子発現解析

PolyI:C 処置したアストログリア培養細胞から抽出した 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 *ifitm3* およびサイトカインの mRNA 量を定量した。

3. 周産期異常免疫応答モデルの作製

生後 2 日目から 6 日目までの 5 日間、マウスに polyI:C (5 mg/kg) を 1 日 1 回皮下投与して動物モデルを作製した。

ウエスタンブロット解析

PolyI:C 処置したマウスの海馬および前頭葉皮質を摘出し、ウエスタンブロット法により MAP2 タンパクを定量した。実験には神経樹状突起のマーカーとして rabbit anti-MAP2 antibody (1:5000, Millipore)と anti- β -actin antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いた。

新奇物体認知試験

Nagai らの方法 (2007) に従って、新奇物体探索試験を用いて認知記憶を調べた⁴⁾。実験装置はアクリル製のオープンフィールドを用いた (30×30×35 cm)。マウスを実験装置に 3 日間 (10 分間/日) 慣らした後、訓練試行を行った。訓練試行では装置内に異なる 2 つの物体を置き、装置内を 10 分間自由に探索させた。訓練試行の 24 時間後に保持試行を行った。保持試行では訓練試行時に用いた 2 つの物体の片方を新奇物体と置き換え、動物を装置内に入れ 5 分間自由に探索させた。訓練試行および保持試行における 2 つの物体に対するそれぞれの探索 (接触, 臭い嗅ぎなど) 時間を測定した。訓練試行においては、2 つの物体のいずれかを探索した時間と総探索時間との比を、保持試行においては新奇物体を探索した時間と総探索時間との比を探索嗜好性 (exploratory preference; EP) として示した。

4. 統計解析

データは平均±標準誤差で示した。独立多群間の比較には一元配置分散分析 (analysis of variance, ANOVA)を用い、有意差が認められた場合には Bonnferroni/Dunn の検定を行った。いずれの検定においても、危険率 5% 以下の場合を有意差ありと判定した。2 群間の比較は Student's t-test を用いて行った。

C. 研究結果

1. PolyI:C 処置アストログリア細胞由来液性因子が神経細胞の突起伸展および細胞生存に及ぼす影響

低濃度 (3 および 10 μ g/mL) の polyI:C を培養 2 日目の海馬由来初代培養神経細胞に直接添加しても神経突起の伸展および細胞生存率に影響を与えなかった。一方、培養アストログリア細胞に polyI:C (10 μ g/mL) を処置し、24 時間後の条件培地 (polyI:C-ACM) を培養 2 日目の神経細胞に処置すると、control-ACM を処置した神経細胞と比較して、神経突起の伸展が有意に抑制されたが、その生存率には変化は認められなかった (Fig. 1)。さらに、polyI:C-ACM で 5 日間培養すると、濃度依存的な MAP2 陽性樹状突起の伸展抑制と PSD95 陽性スパイン数の減少が認められた (Fig. 2)。

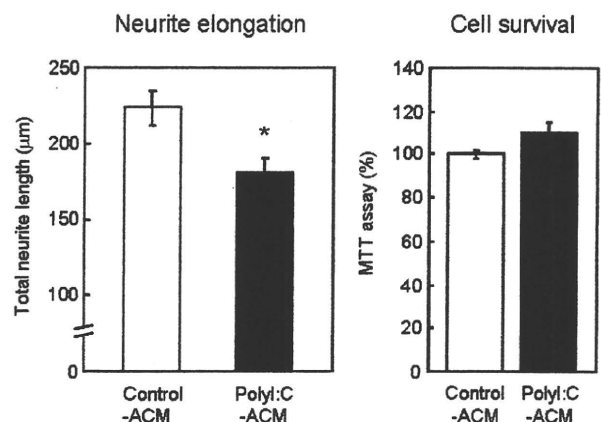


Fig. 1. Effect of polyI:C-ACM on the total neurite elongation and cell viability in primary cultured hippocampal neurons. Numbers of cells used for each calculation are 72-75 (Control-ACM: 75, PolyI:C-ACM: 72). Values are means \pm SE of three independent experiments. * P <0.05 vs. control-ACM (Student's t-test).

2. PolyI:C 処置アストログリア細胞由来液性因子により誘発される培養神経細胞の発達障害における IFITM3 の関与

PolyI:C-ACMによる培養神経細胞の神経発達障害における IFITM3 の関与を調べるために、*ifitm3*^{-/-}マウスおよび WT マウスからそれぞれ polyI:C-ACM を調製し、培養海馬神経細胞の MAP2陽性樹状突起の伸展および PSD95 陽性スパイン数に及ぼす影響を比較した。その結果、何れバイオマーカーも WT マウス由来 polyI:C-ACM で低下したが、*ifitm3*^{-/-}マウス由来 polyI:C-ACM では変化は認められなかった (Fig. 2)。

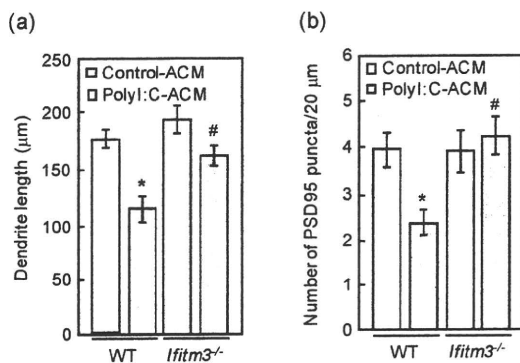


Fig. 2. Role of IFITM3 in the polyI:C-ACM-induced defect of MAP2-positive dendrite and spine formation (PSD95 puncta per 20 μm along dendrites) of primary cultured neurons *in vitro*. Number of cells used for each calculation are 17-20, and the values are the means ± S.E. of three independent experiments. **p*<0.05 vs. wt/control-ACM, #*p*<0.05 vs. wt/polyI:C-ACM.

3. PolyI:C 処置マウスの前頭葉皮質における MAP2 タンパクの発現変化と IFITM3 の役割

培養神経細胞の神経発達に対する polyI:C-ACM の抑制効果と IFITM3 の関与を *in vivo* で確認するため、新生仔 WT マウスと *ifitm3*^{-/-}マウスにそれぞれ polyI:C を 5 日間連続投与し、前頭葉皮質および海馬の MAP2 タンパク発現量をウエスタンブロット法で調べた。その結果、生後 7 日および 14 日目の WT マウス前頭葉皮質において polyI:C 処置による MAP2 タンパクの減少が認められた。一方、polyI:C 処置による MAP2 発現量の低下は

ifitm3^{-/-}マウスでは認められなかった (Fig. 3)。

4. PolyI:C 処置マウスの認知記憶障害における IFITM3 の関与

最後に、新生仔期 polyI:C 処置により誘発される認知記憶障害における IFITM3 の関与を行動学的に解析した。WT マウスにおいては、新生仔期 polyI:C 処置により新奇物体認知試験において記憶障害が確認された。一方、*ifitm3*^{-/-}マウスの場合には、polyI:C 処置による認知記憶障害は観察されなかった (Fig. 4)。

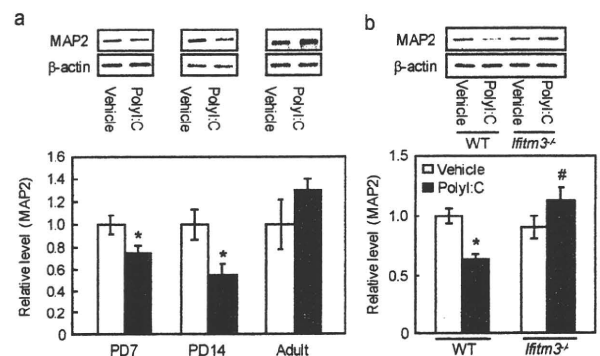


Fig. 3. Role of IFITM3 in abnormal MAP2 expression in the frontal cortex of polyI:C-treated mice. Neonatal wt and *ifitm3*^{-/-} mice were treated with polyI:C (5 mg/kg) or vehicle for 5 days from PD2 to PD7. (a) Time-course changes in MAP2 protein expression in the frontal cortex of polyI:C-treated wt mice. Values are the means ± S.E. (n=3-5). **p*<0.05 vs. vehicle-treated control mice (Student's t-test). (b) MAP2 expression in the frontal cortex in vehicle- or polyI:C-treated wt or *ifitm3*^{-/-} mice on PD14. Values indicate the means ± S.E. (n=9-17). **P*<0.05, vs. vehicle-treated wt mice, #*P*<0.05, vs. polyI:C-treated wt mice.

D. 考察

本研究では、胎児期に化学物質に暴露されると異常免疫応答により脳神経発達が障害され、学習

記憶や情動行動に異常が生じるという仮説を立て、polyI:C 処置モデルを用いて検証した。これまでに我々は、polyI:C 処置後の海馬における遺伝子発現の網羅的解析により、サイトカイン関連遺伝子 *IFITM3* の発現増加を見出している。

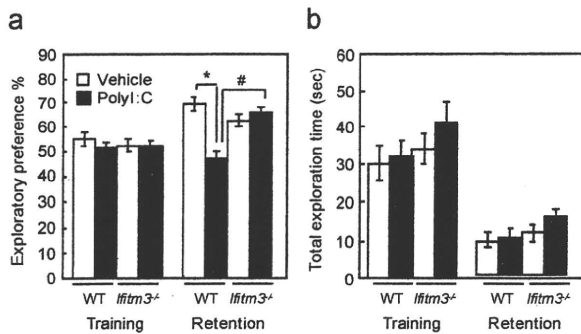


Fig. 4. Role of IFITM3 in polyI:C-induced cognitive impairment of mice in adulthood. Neonatal wt and *ifitm3*^{-/-} mice were treated with polyI:C (5 mg/kg) or vehicle for 5 days from PD2 to PD7. They were subjected to the novel object recognition test at 12 weeks old. (a) Exploratory preference. (b) Total exploration time. Values indicate the means \pm S.E. (n=8-11). *P<0.05, vs. vehicle-treated wt mice, #P<0.05, vs. polyI:C-treated wt mice.

IFITM3 は、自閉症、双極性障害あるいは統合失調症患者死後脳で増加しており⁵⁻⁷⁾、神経発達障害との関連性が示唆された。そこで本年度は、培養アストログリア細胞および神経細胞を用いて polyI:C により誘発される神経発達障害における *IFITM3* の役割を解析した。その結果、(1) *IFITM3* は polyI:C 処置によりアストログリア細胞に特異的に誘導されること、(2) PolyI:C の受容体である TLR3 は神経細胞に比較してアストログリア細胞で高発現しており、polyI:C 処置によりアストログリア細胞が活性化されること、(3) 活性化されたアストログリア細胞から分泌されるグリア因子により培養神経細胞の発達障害が誘発されるこ

とが明らかになった。さらに、*ifitm3*^{-/-}マウスを用いた *in vitro* および *in vivo* 試験により、(4) 新生仔期 polyI:C 処置により誘発される前頭葉皮質の神経発達障害と認知機能障害に *IFITM3* が関与していることも示唆された。

以上の結果より、polyI:C 誘発性異常免疫応答に伴う神経発達障害にはアストログリア細胞で誘導される *IFITM3* が重要な役割を果たしていると思われる。今後、神経発達期における化学物質暴露により脳内アストログリア細胞で *IFITM3* が誘発されるかどうか、また、脳発達期における化学物質への暴露により誘発される学習記憶や情動行動の異常に *IFITM3* が関与しているかどうか、更に検討する必要がある。

E. 結論

PolyI:C 処置による異常免疫応答により誘発される神経発達障害にはアストログリア細胞の活性化と神経細胞-アストログリア細胞間の相互作用の異常が関与していることが示唆された。さらに、新生仔期 polyI:C 処置によりアストログリア細胞で誘導される *IFITM3* はマウス前頭葉皮質の発達障害およびその後の認知機能障害に関与していることが示唆された。

今後、化学物質暴露により脳内アストログリア細胞で *IFITM3* が誘発されるかどうか、また、発達期における化学物質への暴露により誘発される学習記憶や情動行動の異常に *IFITM3* が関与しているかどうか、更に検討する必要がある。

[参考文献]

- Holladay SD, Smialowicz RJ: Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environ Health Perspect.*, Suppl 3:463-73, 2000.
- Yusuf N, Timares L, Seibert MD, et al.: Acquired

and innate immunity to polyaromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 224: 308-312, 2007.

3. Esser C, Rannug A, Stockinger B.: The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol.*, 30: 447-454, 2009.
4. Nagai T, Takuma K, Kamei H, et al.: Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex. *Learn. Mem.*, 14:117-125, 2007.
5. Arion, D., Unger, T., Lewis, D.A., Levitt, P., & Mirmics, K. Molecular evidence for increased expression of genes related to immune and chaperone function in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 62:711-721 2007.
6. Iwamoto, K., Kakiuchi, C., Bundo, M., Ikeda, K. & Kato, T. Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. *Mol. Psychiatry*, 9:406-416, 2004.
7. Garbett, K., Ebert, P.J., Mitchell, A., Lintas, C., Manzi, B., Mirmics, K. & Persico, A.M. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol. Dis.*, 30: 303-311, 2008.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.*, 470:134-8. 2010.
 2. Ibi D, Nagai T, Koike H, Kitahara Y, Mizoguchi H, Niwa M, Hanna Jaaro-Peled, Nitta A, Yoneda Y, Nabeshima T, Sawa A, and Yamada Y: Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. *Behav Brain Res.* 206:32-37, 2010.
3. Noda Y, Mouri A, Ando Y, Waki Y, Yamada SN, Yoshimi A, Yamada K, Ozaki N, Wang D, and 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. *Int J Neuropsychopharmacol.* 13:1343-1354, 2010.
 4. Yu J, Nagai T, Ibi D, Kitahara Y, Nabeshima T and Yamada K: Nicotine ameliorates emotional and cognitive impairments induced by neonatal polyI:C treatment in mice. *The Open Behavioral Science Journal.* 4:9-18, 2010.
 5. Mizoguchi H, Ibi D, Takuma K, Toth E, Sato J, Itohara S, Nabeshima N and Yamada K: Alterations of emotional and cognitive behaviors in matrix metalloproteinase-2 and -9-deficient mice. *The Open Behavioral Science Journal.* 4:19-25, 2010.
 6. Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, and Yamada K: Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J. Neurochem.* 114:1840-1851, 2010.
 7. Shin EJ, Whang WK, Kim S, Bach JH, Kim JM, Nguyen XK, Nguyen TT, Jung BD, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC: Parishin C Attenuates phencyclidine-induced schizophrenia-like psychosis in mice: Involvements of 5-HT(1A) receptor. *J. Pharmacol Sci.* 113:404-8, 2010.
 8. Mizoguchi H, Ibi D, Takase F, Nagai T, Kamei H, Toth E, Sato J, Takuma K, Yamada K. Nicotine ameliorates impairment of working memory in methamphetamine-treated rats. *Behav Brain Res*, in press.

2. 学会発表

1. Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K: Effect of antipsychotics on the

- behavioral deficits in human dominant-negative disc1 transgenic mice with neonatal polyI:C treatment. International Behavioral Neuroscience Society (IBNS) Annual Meeting (Sardinia, Italy, June 8-13 2010)
2. Yamada K: Role of pallidotegmental GABAergic neurons in PPI of the acoustic startle reflex. International Behavioral Neuroscience Society (IBNS) Annual Meeting (Sardinia, Italy, June 8-13, 2010)
 3. Yamada K: A role of the pallidotegmental GABAergic neurons in sensorimotor gating. The International Conference of Pharmacology- 3rd Mainland, Taiwan and HongKong Symposium of Pharmacology (Shenyang, China, September 24-27, 2010)
 4. Yu J, Ikejima T, Yu X, Zhang W, Nagai T, Nabeshima T, Yamada K: The NMDA receptor co-agonist D-serine ameliorates emotional and cognitive impairment in polyI:C-treated mice. The International Conference of Pharmacology- 3rd Mainland, Taiwan and HongKong Symposium of Pharmacology (Shenyang, China, September 24-27, 2010)
 5. Yamada K, Yun J, Koike H, Ibi D, T. Nagai T: Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent contextual memory in mice: a possible role of NPAS4. APSN 2010 (Phuket, Thailand, October 17-20, 2010)
 6. 山田清文、Yu Jinghua、北原裕子、衣斐大祐、鍋島俊隆、永井拓：新生仔期 polyI:C 処置によって誘発される不安様行動および学習記憶障害に対するニコチンの効果 第 117 回日本薬理学会近畿部会、徳島 2010,7,8
 7. 衣斐大祐、永井拓、中島晶、鍋島俊隆、山田清文：発達期疑似ウイルス感染モデル動物の神経発達障害における Ifitm3 の役割. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会 第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会、仙台、2010. 9.15-17.
 8. 山田清文、衣斐大祐、中島晶、鍋島俊隆、永井拓：PolyI:C 誘発性神経発達障害モデル：結合失調症動物モデルとしての有用性と発症機構. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会 第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会、仙台、2010. 9.15-17.
 9. 野田幸裕、毛利彰宏、肥田裕丈、安藤雄、間宮隆吉、山田清文、鍋島俊隆：新生仔期の PolyI:C 投与は若年期フェサイクリジン投与による情動・認知機能の生涯を増強する. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会 第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会、仙台 2010 9,15~17
 10. 永井拓、于静華、北原裕子、衣斐大祐、鍋島俊隆、山田清文：新生仔期 polyI:C 処置によって誘発される不安様行動および学習記憶障害 2010.11.19. 第 20 回日本医療薬学会年会、千葉 2010 11,13~14 第 20 回日本医療薬学会年会、千葉 2010 11,13~14
 11. 衣斐大祐、永井拓、中島晶、鍋島俊隆、山田清文：PolyI:C：誘発性神経発達障害における interferon-induced transmembrane protein 3 の役割. 第 118 回日本薬理学会近畿部会、大阪、2010 11 19
 12. 衣斐大祐、永井拓、中島晶、鍋島俊隆、山田清文：神経発達期の免疫応答誘発性脳機能障害における IFITM3 の役割. 第 84 回日本薬理学会年会、2011.3.22~24.
- G. 知的所有権の取得状況**
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

神経発生・発達過程における化学物質・環境ストレス負荷 による高次精神機能の変容

分担研究者：野田幸裕¹

研究協力者：安藤 雄¹，肥田裕丈¹，山田清文²，毛利彰宏^{1,2,3}，鍋島俊隆³

¹名城大学 薬学部・大学院薬学研究科 病態解析学 I，²名古屋大学 大学院医学系研究科 医療薬学，
³名城大学 薬学部・大学院薬学研究科 薬品作用学研究室

[研究要旨]

本研究では、実験動物の発達過程である新生仔期および青年期に、環境的要因としての化学物質（免疫異常発現薬・精神異常発現薬など）を単独もしくは複合的に負荷し、その後に惹起される情動・認知障害の作用機序およびそれらに対する治療薬について検討した。新生仔期（生後2日齢から5日間）における免疫異常発現薬である polyI:C の投与と青年期（生後4週齢以降）における精神異常発現薬である フェンシクリジン（PCP）連続投与（7日間）の複合負荷により、前頭前皮質においてグルタミン酸トランスポーター（GLAST）の発現増加が認められ、GLAST 阻害薬の前頭前皮質への注入により複合負荷による認知障害は改善した。そこで、GLAST の生理機能について検討するため、GLAST 遺伝子欠損マウスを用いて行動解析を行ったところ、情動行動の変化は認められなかったが、ホモ GLAST 遺伝子欠損マウスにおいて物体認知記憶ならびに連合学習に障害が認められた。また、生理機能に変化が認められなかったヘテロ GLAST 遺伝子欠損マウスにおいて、14日間 PCP 連続投与により認められる行動障害は認められなかった。本研究から、化学物質の単独および複合負荷による高次精神機能の変容の一部にはグルタミン酸作動性神経系の機能異常が関与しており、その因子の一つとして GLAST が同定された。本知見を精神疾患の発症機序や病態生理の解明および病態生理に基づいた治療法や予防法の開発につなげていきたい。

A. 研究目的

統合失調症や気分障害などの精神疾患は、神経発生・発達過程における環境的要因（母体のウイルス感染などの物理化学的因子と養育環境などの心理社会的因子の双方）と生得的に持っていた脆弱性因子（遺伝的要因）が相互に作用して発症に至ると考えられている（Bayer et al., 1999; Belmaker, 2004; Freedman, 2003; Maynard et al.,

2001; McCarley et al., 1999）。すなわち、胎生期・周産期・生後発達期において遺伝的要因を含めた何らかの原因によって脳発達障害に伴う精神障害に対する脆弱性が形成され、思春期以降における薬物摂取や社会的なストレスにより精神疾患を発症するもので、2回打撃仮説（two-hit 仮説）と呼ばれる。近年、社会問題になっている幼少児に対する親の教育放棄や家庭内暴力および教師

や同級生によるいじめ、薬物乱用の低学年化などは、精神疾患の発症に関与している神経発生・発達過程における環境的要因として考えられている (Heim et al., 2008)。これまで本研究では、実験動物の神経発生・発達過程に、環境的要因としての化学物質 (免疫異常発現薬・精神異常発現薬) もしくはストレス (社会性敗北ストレス) を複合的に負荷することで、障害が増悪することを明らかにしてきた。本研究では環境的要因としての化学物質を単独もしくは複合的に負荷により惹起される情動・認知障害の作用機序およびそれらに対する治療薬について検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物

C57BL/6J 系妊娠マウスを使用した。グリア型グルタミン酸トランスポーター (GLAST) 遺伝子欠損マウスは東京医科歯科大学田中幸一教授から供与された。なお、倫理面への配慮として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、名古屋大学医学部動物実験指針および Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985) に準じて行った。

2. 薬物

フェンシクリジン塩酸塩 (phencyclidine hydrochloride; PCP) は Maddox ら (1965) の方法にしたがって名城大学薬学部 名誉教授 古川宏先生および薬品作用学教室教授 鍋島俊隆先生が合成したものをを使用した。Polyriboinosinic-polyribocytidylic acid (Poly I:C, SIGMA 社, 米国), および dl-threo- β -Benzyloxy-aspartate (TBOA, Tocris Bioscience 社, 米国) を使用した。

3. 行動薬理的解析

3.1. 高架式十字迷路試験

壁の高さが 20cm, 長さ 25 cm, 幅 8 cm のアーム (closed arm) と同様の長さを持つ、壁のないアーム (open arm) を十字に組み合わせ、高さ 50 cm の位置に設置した装置を用いた。マウスをアームの交差する位置に置き、その後 5 分間隔で 10 分間にわたって装置内を自由に散策させ、open arm での滞在時間の割合、arm に入った回数、および移動距離を測定した。

3.2. 強制水泳試験

マウスを水 (22~23°C) が入ったプラスチック製シリンダー (直径 15 cm, 高さ 20 cm) に入れ、Scanet MV-10 AQ 装置 (ブレインサイエンス・イデア社) により 3 分間の泳動時間を測定した。無動時間を 180 (秒) - 泳動時間 (秒) により算出した。

3.3. 新奇環境下自発運動量測定

マウスを側面が透明、床面が黒色つや消しで構成されたアクリルケース (45 x 26 x 40 cm) に入れ、Scanet SV-10 (ブレインサイエンス・イデア社) によって自発運動量を 30 分間隔で 90 分測定した。

3.4. 社会性行動試験

実験装置・手順: 壁の高さ 25 cm の 25 x 30 cm 四方のフィールドを使用した。それぞれ異なるケージ内で飼育していた同系統の 2 匹のマウスを同時に装置中央に入れ、その直後から 5 分間隔で 10 分間、社会性行動として、お互いに嗅ぎ合う行動 (sniffing), 相手の動物を追いかける行動 (following), 相手の動物の上に乗る行動 (mounting), 相手の動物の下に潜ろうとする行動 (scrawling), 立ち上がり、相手の動物と接触する行動 (fighting) のいずれかを示している時間を測定した。

3.5. 新奇物体認知試験

マウスを open-field box (40×40×29 high cm) に入れ、10 分間の馴化を 3 日間行った。馴化 3 日目の翌日に、2 種類の異なった object を box 内に離して設置し、マウスを入れ、各 object に対する探索嗜好行動を 10 分間測定した (訓練試行)。訓練試行の 24 時間後に、2 種類の object のうち片方の object を全く異なった新奇 object と置換し、各 object に対する探索嗜好行動を 10 分間測定した (テスト試行)。それぞれの object に対する探索嗜好行動の割合を、object へのアプローチ時間より算出した。

3.6. 恐怖条件付け学習試験

実験装置・手順：マウスを訓練時に用いる測定ケージとは異なるケージ (ニュートラルケージ) に入れ、1 分間無動時間を測定した。その後床がグリッドからなる装置 (訓練ケージ) に入れ、2 分間無動時間を測定した。その後、80 dB の音刺激を 15 秒間呈示し、その最後の 5 秒間に 0.6 mA の電気刺激を与える作業を、連続して 4 回行った。24 時間後、ニュートラルケージに入れ、1 分間の音刺激 (80 dB) を与えている間の無動時間を測定した。その後、訓練ケージに入れ、2 分間の無動時間を測定した (電気および音刺激なし)。本実験に用いていないマウスを使用し、電気刺激 0.1-1.0 mA に対する応答性 (Flinching, Vocalizing, Jumping) の閾値を求めた。

4. 生化学的解析

4.1. ウェスタンブロッティング法

マウスを断頭し、氷冷下で前頭前皮質を摘出した。脳サンプルは溶解バッファー中で超音波破碎し、ホモジナイズした。ホモジナイズサンプルを遠心分離し、得られた上清にサンプルバッファーを加え、煮沸した。サンプルをポリアクリルアミドゲルにより電気泳動を行い、ポリビニリデンジフル

オリド (PVDF) 膜へタンパク質を転写し、ブロッキングした。PVDF 膜に 1 次抗体 (GLAST, GLT-1, Serine racemase: SR, glutamate synthetase: GLS, vesicle glutamate transporter-1: VGLUT-1, GFAP) を加え、インキュベーションした後、horseradish peroxidase を結合させた 2 次抗体を加え、インキュベーションした。ECL を用いて免疫複合体を検出し、タンパク質の発現量を画像解析により算出した。

5. 統計学的解析

得られた結果は全て平均値±標準誤差として示した。統計学的解析には、一元配置分散分析あるいは繰り返しのある二元配置分散分析を用い、各群間の比較には Bonferroni の多重比較検定を行った。また、2 群間の比較の場合には、“対応のある”あるいは“対応のない”Student の t 検定を用いた。全ての統計解析において有意水準を 5% と設定し、危険率 5% 未満の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

1. 新生仔期 PolyI:C 処置マウスへのフェンシクリジン (PCP) 連続投与による行動変化における関連分子の探索・同定

新生仔期 Poly I:C 処置群に PCP (10 mg/kg/day s.c.) を 7 日間連続投与し、前頭前皮質グルタミン酸作動性神経系関連タンパクの発現変化から関連分子を探索するとともに、その関連分子の関与について検討した。

1.1. 新生仔期 PolyI:C 処置マウスにおけるフェンシクリジン (PCP) 連続投与によるグルタミン酸作動性神経系関連タンパク質発現への影響

PCP 休薬 7 日後に前頭前皮質を摘出し、脳サンプルを調製した。新生仔期 Poly I:C 単独処置および 7 日間の PCP 連続投与単独では有意な発現変化が認められなかったが、新生仔期 Poly I:C 処置群に 7 日間 PCP を連続投与するとグルタミン酸トラン