

図4. GLASTヘテロ遺伝子欠損マウスにおけるフェンシクリジン(PCP)連続投与による認知機能への影響。野生型マウス(+/+)およびGLASTヘテロ遺伝子欠損マウス(+/-)に14日間saline(□)もしくはPCP(■)を連続投与し、5日後に新奇物体認知試験を行った。グラフは平均±標準誤差で示した。\* $p < 0.05$  vs 野生型マウスのsaline投与群、# $p < 0.05$  vs 野生型マウスのPCP投与群(Repeated ANOVA/Bonferroni test)。

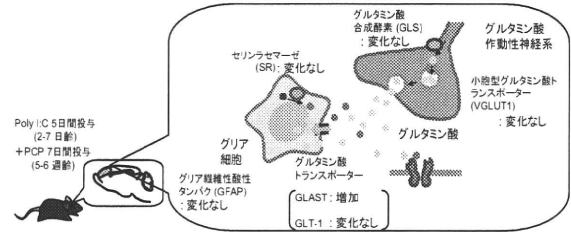


表2. 新生仔期PolyI:C処置マウスにおけるフェンシクリジン(PCP)連続投与によるグルタミン酸作動性神経系関連タンパク質発現への影響

#### 4.2 新生仔期 PolyI:C 処置マウスにおけるフェンシクリジン (PCP) 連続投与による学習障害に対するグルタミン酸トランスポーター阻害薬の効果

新奇物体認識試験において、新生仔期 PolyI:C 処置マウスへの PCP 連続投与による新奇物体に対する探索嗜好率の低下(物体認知記憶の障害)は、グルタミン酸トランスポーター阻害薬 dl-threo-β-Benzyloxyaspartate (TBOA) の前頭前皮質内投与によって有意に改善された(図5)。一方、対照マウスの前頭前皮質内に TBOA を投与しても物体認知記憶に影響を及ぼさなかった(図5)。TBOA は、訓練試行および保持試行における総探索時間に影響を及ぼさなかった(図5)。

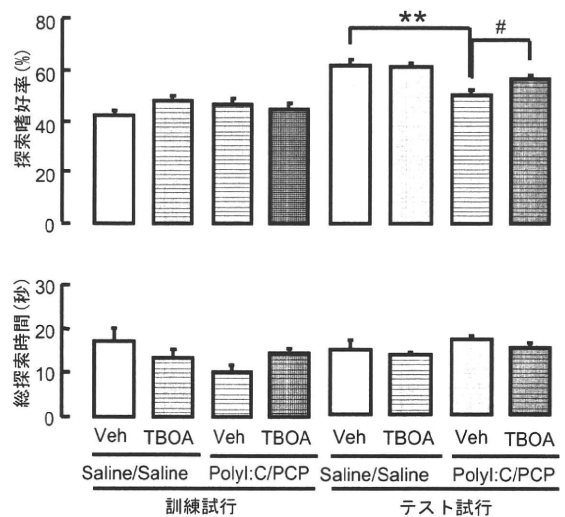


図5. 新生仔期 PolyI:C 処置マウスにおける PCP 連続投与による学習障害に対するグルタミン酸トランスポーター阻害薬(TBOA)の効果。7日間salineあるいはPCPを連続投与し、5日後に新奇物体認知試験を行った。訓練試行30分前に dl-threo-β-Benzyloxyaspartate (TBOA) あるいは vehicle (Veh) を前頭前皮質内に投与した。グラフは平均±標準誤差で示した。\*\* $p < 0.01$  vs saline/saline/vehicle 投与群、# $p < 0.05$  vs Poly I:C/PCP/vehicle 投与群(Repeated ANOVA/Bonferroni test)。

#### 4. 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(平成22年度)

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。

##### 4.1 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 投与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スポーター (GLAST) は前頭前皮質において有意な増加が認められた(表2)。一方、グルタミン酸トランスポーター (GLT-1)、グルタミン酸合成酵素 (GLS)、小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT1)、セリンラセマーゼ (SR)、グリア繊維性酸性タンパク (GFAP) の発現にはいずれの群間においても有意な差は認められなかった(表2)。

#### D. 考察

慢性社会ストレス負荷モデル動物は、種内闘争を利用し、被験動物に繰り返し攻撃を受けさせ作製される。本モデル動物では攻撃を受けた後に不安・抑うつ様症状の現 (Avgustinovich et al., 2005) や社会性行動の障害 (Berton et al., 2006) など、様々な精神行動障害が認められる (Buwalda et al., 2005)。本研究において神経発生・発達過程にある離乳後の幼若期のマウスに慢性社会ストレスを負荷し、成体期に達した時に精神行動障害が認められるかどうか、社会性行動試験を用いて検討した。その結果、stress 群において社会性行動が障害されており、最終ストレス負荷 15 日後においても認められた。これらの結果は、Berton ら (2006) が報告している最終ストレス負荷 28 日後まで社会性行動が障害されることと一致していた。しかし、標的マウスに麻酔薬を処置 (非覚醒下) して社会性行動を検討したところ、stress 群は標的マウスに対して社会性行動を示した。被験マウスは標的マウスと過去に接触したことがあるかどうか、標的マウスがどのような状態にあるのかを認識できるものと推察される。以上の結果から、発達過程のマウスに慢性社会ストレスを負荷したことにより、持続的に社会性行動が障害されたものと示唆される。慢性社会ストレス負荷マウスの海馬における神経細胞の形態学的変化は観察されなかった。このことから幼若期慢性社会ストレスによる社会性行動障害は形態学的変化を伴わないことが示唆される。

一方、PCP は薬物依存者に精神症状 (PCP 精神病) を惹起すること (Javitt and Zukin, 1991) から、統合失調症には NMDA 受容体機能の低下が関係しているという「グルタミン酸低下仮説 (NMDA 受容体機能低下仮説)」が提唱されている。PCP 連続投与は、休薬後も陽性症状に類似した行動変化として自発運動量の増加 (Nagai et al., 2003)、陰性症状の指標となる行動変化として社会性行動

試験における社会性行動の低下 (Qiao et al., 2001) および強制水泳試験における無動状態の増強 (Murai et al., 2007) を示す。認知障害の指標となる行動変化として、水探索試験における潜在学習障害 (Mouri et al., 2007) および新奇物体認識試験における物体認知障害 (Nagai et al., 2009) が知られている。そこで、若年期以降に control 群および stress 群に PCP を連続投与し、神経発生・発達過程における慢性社会ストレス負荷マウスの社会性行動への影響を検討した。PCP/stress 群では、saline/stress 群に比べて社会性行動の障害が増悪していた。これらの結果から、stress 群に認められる社会性行動の障害には、グルタミン酸作動性神経系が関与している可能性が示唆されるが、さらに詳細に検討する必要がある。

統合失調症患者では海馬の体積減少、側脳室の拡大が認められること、死後脳においてグリオーシスが認められないこと、さらにほとんどが思春期以降に発症することから、統合失調症の病態および脳内の構造変化は発達過程や成熟時期を規定する因子の異常が関与すると考えられており (Ashe et al., 2001)、この神経発達障害仮説に基づいたモデル動物が作製されている。統合失調症の発症には、胎生中期のインフルエンザ流行などの初期要因が疫学的に関連していることが報告されている (Brown, 2006)。合成二本鎖 RNA アナログである Poly I:C を妊娠マウスに投与すると、母胎の免疫系が賦活化され、この母体から生まれたマウスは、成体期以降、覚せい剤誘発運動量の増加 (Ozawa et al., 2006)、プレパルス・インヒビション (PPI) 試験での情報処理障害 (Ozawa et al., 2006)、レイテント・インヒビション試験での注意力障害 (Zuckerman et al., 2003)、モリス水迷路試験での作業記憶障害 (Meyer et al., 2005)、新奇物体認識試験における認知障害 (Ozawa et al., 2006) など統合失調症に類似した行動異常を示す。ヒトの妊娠中期に当たるマウスの出生 2 日後から

5 日間に Poly I:C を投与すると、新奇物体認識試験における認知障害、PPI 試験での情報処理障害や社会性行動の低下が認められる (Ibi et al., 2009). 本研究では、two-hit 仮説に基づき新生仔期の PolyI:C 投与が若年期の PCP 連続投与による精神障害の発症脆弱性を高めるかどうかについて検討を行った。PCP 連続投与による運動量増加/行動感作、衝動性の増加、社会性行動の低下および物体認知記憶の障害は PCP 投与期間に依存して認められた。一方、新生仔期 PolyI:C 処置は若年期の PCP 連続投与によるこれら行動変化を増強した。以上の結果から発達期における免疫異常も成体期まで遷延することが示唆された。

14 日間の PCP 連続投与による意欲低下には前頭前皮質における GLAST の発現増加が関与することが報告されている (Murai et al., 2007). 本研究において GLAST ヘテロ遺伝子欠損マウスでは PCP 連続投与マウスに認められる認知障害や意欲低下が認められなかった。PolyI:C 処置マウスへの 7 日間の PCP 連続投与マウスにおける前頭前皮質の GLAST の発現は、有意に増加しており、認知障害は GLAST 阻害薬の前頭前皮質への注入により改善した。したがって遺伝学的に GLAST が PCP 連続投与による行動異常に関与しているだけでなく、新生仔期 PolyI:C 処置による若年期 PCP 連続投与による行動異常の増強においても GLAST の発現増加が関与していることが示唆された。

## E. 結論

本研究において、精神疾患の発症に関与する発達期の環境的要因が高次精神機能へ与える影響について検討した。さらに詳細な神経化学的な解析を行い、環境的要因による脳機能の変化に関与する脆弱性因子を探索し、GLAST を同定した。本研究成果から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たい。

## [参考文献]

- 1) Ashe, P.C., Berry, M.D., and Boulton, A.A.: Schizophrenia, a neurodegenerative disorder with neurodevelopmental antecedents. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 25, 691-707, 2001.
- 2) Avgustinovich, D.F., Kovalenko, I.L. and Kudryavtseva, N.N.: A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 35, 917-924, 2005.
- 3) Bayer, T.A., Falkai, P. and Maier, W.: Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". *J. Psychiatr. Res.*, 33, 543-548, 1999.
- 4) Belmaker, R.H.: Bipolar disorder. *N. Engl. J. Med.*, 351, 476-486, 2004.
- 5) Berton, O., McClung, C.A., Dileone, R.J., et al.: Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, 311, 864-868, 2006.
- 6) Brown, A.S.: Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, 32, 200-202, 2006.
- 7) Buwalda, B., Kole, M.H., Veenema, A.H., et al.: Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29, 83-97, 2005.
- 8) Freedman, R.: Schizophrenia. *N. Engl. J. Med.*, 349, 1738-1749, 2003.
- 9) Heim, C., Newport, D.J., Mletzko, T., et al.: The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 693-710, 2008.
- 10) Ibi, D., Nagai, T., Kitahara, Y., et al: Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci. Res.*, 64,

- 297-305, 2009.
- 11) Javitt, D.C. and Zukin, S.R.: Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 148, 1301-1308, 1991.
  - 12) Maddox, V.H., Godefroi, E.F. and Parcell, R.F.: The synthesis of phencyclidine and other 1-arylcylohexylamines. *J. Med. Chem.*, 8, 230-235, 1965.
  - 13) Maynard, T.M., Sikich, L., Lieberman, J.A., et al.: Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, 27, 457-476, 2001.
  - 14) McCarley, R.W., Wible, C.G., Frumin, M., et al.: MRI anatomy of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 45, 1099-1119, 1999.
  - 15) Meyer, U., Feldon, J., Schedlowski, M., et al.: Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29, 913-947, 2005.
  - 16) Mouri, A., Noda, Y., Noda, A., et al.: Involvement of a dysfunctional dopamine-D1/N-methyl-d-aspartate-NR1 and  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II pathway in the impairment of latent learning in a model of schizophrenia induced by phencyclidine. *Mol. Pharmacol.*, 71, 1598-1609, 2007.
  - 17) Murai, R., Noda, Y., Matsui, K., et al.: Hypofunctional glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex is involved in the emotional deficit induced by repeated treatment with phencyclidine in mice: implications for abnormalities of glutamate release and NMDA-CaMKII signaling. *Behav. Brain Res.*, 180, 152-160, 2007.
  - 18) Nagai, T., Noda, Y., Une, T., et al.: Effect of AD-5423 on animal models of schizophrenia: phencyclidine-induced behavioral changes in mice. *Neuroreport*, 14, 269-272, 2003.
  - 19) Nagai, T., Murai, R., Matsui, K., et al.: Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D1 and serotonin 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 202, 315-328, 2009.
  - 20) Ozawa, K., Hashimoto, K., Kishimoto, T., et al.: Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 59, 546-54, 2006.
  - 21) Qiao, H., Noda, Y., Kamei, H., et al.: Clozapine, but not haloperidol, reverses social behavior deficit in mice during withdrawal from chronic phencyclidine treatment. *Neuroreport*, 12, 11-15, 2001.
  - 22) Zuckerman, L., Rehavi, M., Nachman, R., et al.: Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 28, 1778-1789, 2003.
- F. 研究発表**
- 1. 論文発表**
    1. Ito Y, Yamada S, Takahashi N, Saito S, Yoshimi A, Inada T, Noda Y, and Ozaki N: No Association Between the Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor-Type, Z Polypeptide 1 (PTPRZ1) Gene and Schizophrenia in the Japanese Population. *Am. J. Med. Genet B Neuropsychiatr. Genet.*, 147B, 1013-1018, 2008.
    2. Tsunekawa H, Noda Y, Miyazaki M, Yoneda F, Nabeshima T, and Wang D: Effects of

- (R)-(-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane hydrochloride [(-)-BPAP] in animal models of mood disorders. *Behav. Brain Res.*, 189, 107-116, 2008.
3. Tsunekawa H, Noda Y, Mouri A, Yoneda F, and Nabeshima T: Synergistic effects of selegiline and donepezil on cognitive impairment induced by amyloid beta (25–35). *Behav. Brain Res.*, 190, 224-232, 2008.
  4. Iwamoto K, Takahashi M, Nakamura Y, Kawamura Y, Ishihara R, Uchiyama Y, Ebe K, Noda A, Noda Y, Yoshida K, Iidaka T, and Ozaki N: The effects of acute treatment with paroxetine, amitriptyline, and placebo on driving performance and cognitive function in healthy Japanese subjects: A double-blind crossover trial. *Hum. Psychopharmacol.*, 23, 399-407, 2008.
  5. Nagai T, Murai R, Matsui K, Kamei H, Noda Y, Furukawa F, and Nabeshima T: Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D1 and serotonin 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 202, 315-328, 2009.
  6. Mizoguchi H, Takuma K, Fukuzaki E, Ibi D, Someya E, Akazawa KH, Alkam T, Tsunekawa H, Mouri A, Noda Y, Nabeshima T, Yamada K. Matrix metalloprotease-9 inhibition improves amyloid beta-mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 331: 14-22, 2009.
  7. Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Mizoguchi H, Koike H, Shiraki A, Takuma K, Kamei H, Noda Y, Nitta A, Nabeshima T, Yoneda Y, Yamada K. Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci. Res.*, 64: 297-305, 2009.
  8. Mouri A, Noda Y, Shimizu S, Tsujimoto Y, Nabeshima T. The role of Cyclophilin D in learning and memory. *Hippocampus*, 20: 293-304, 2010.
  9. Noda Y, Mouri A, Ando Y, Waki Y, Yamada S, 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, dopaminergic-extracellular signal-regulated kinase 1/2 systems. *Int. J. Neuropsychopharmacology*, 13, 1343-1354, 2010.
  10. Iritani S, Sekiguchi H, Habuchi C, Torii Y, Yamada S, Waki Y, Noda Y, Furukawa H, Nabeshima T, Ozaki N. Immunohistochemical study of vesicle monoamine transporter 2 in the hippocampal formation of PCP-treated mice. *Neurosci. Res.*, 68, 125-130, 2010.
  11. Yoshimi A, Aleksic B, Kawamura Y, Takahashi N, Yamada S, Usui H, Saito S, Ito Y, Iwata N, Inada T, Noda Y, Yamada K, Ozaki N. Gene-wide association study between the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and schizophrenia in the Japanese population, with an updated meta-analysis on currently available data. *Schizophr. Res.*, 124, 216-222, 2010.
  12. Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo K, 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.
  13. Takahashi M, Iwamoto K, Kawamura Y,

- Nakamura Y, Ishihara R, Uchiyama Y, Ebe K, Noda A, Noda Y, Yoshida K, Iidaka T, Ozaki N  
The effects of acute treatment with tandospirone, diazepam, and placebo on driving performance and cognitive function in healthy volunteers. *Hum. Psychopharmacol.*, 25, 260-267, 2010.
14. Miura H, Ando Y, Noda Y, Isobe K, Ozaki N  
Long-lasting effects of inescapable-predator stress on brain tryptophan metabolism and the behavior of juvenile mice. *Stress*, in press
  15. 玉地亜衣, 吉見 陽, 野田幸裕 : 心の病を治す薬の作用. *こころのりんしょう a・la・carte*, 27, 415-421, 2008.
  16. 吉見 陽, 野田幸裕, 齋藤真一, 尾崎紀夫 : 統合失調症の病態と新薬開発の動向. *脳と精神の医学*, 19, 165-172, 2008.
  17. 野田幸裕, 安藤 雄 : 精神科領域の薬剤開発—抗精神病薬の過去と未来—. *薬事日報*, 第10704号, p. 5, 2009
  18. 野田幸裕: DSフォーラム2009 講演紹介 分科会 1 ドパミン関連セミナー. *臨床精神薬理*, 12, 160-169, 2009
  19. 野田幸裕, 毛利彰宏, 脇由香里, 鍋島俊隆 : 臨床知見に基づいた統合失調症動物モデルを作製するために—統合失調症モデル作成のため, 基礎研究者が臨床医に臨むこと—. *日本神経薬理学雑誌*, 29, 247-53, 2009
  20. 安藤 雄, 野田幸裕, 毛利彰宏, 鍋島俊隆 : 統合失調症モデル動物に認められる行動異常. *アニテックス*. 22, 20-25, 2010
  21. 野田幸裕, 毛利彰宏, 鍋島俊隆 第1編 行動薬理研究における実験技術 10 統合失調症動物モデルとその評価法 *実験薬理学シリーズ 第1巻*, 日本薬理学会編集, 金芳堂, 東京, pp.79-93, 2010
  22. 野田幸裕, 大橋美月 : 臨床に役立つ薬学研究的の進歩. *P-CUBE*. 7, 10, 2010
  23. 山田真之亮, 野田幸裕, 尾崎紀夫 : 神経発達障害・統合失調症関連遺伝子に基づく統合失調症モデルマウス, *モデル動物利用マニュアル*, エル・アイ・シー. 印刷中, 2011
- ## 2. 学会発表
1. 毛利彰宏, 野田幸裕, 村井里菜, 脇由香里, 田中光一, 鍋島俊隆 : 統合失調症モデルマウスに認められる情動障害におけるグルタミン酸トランスポーターの関与について. 第3回トランスポーター研究会年会 (京都, 平成20年6月7日)
  2. 丹羽美苗, 新田淳美, 溝口博之, 伊藤康之, 野田幸裕, 永井拓, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆 : メタンフェタミン依存における“Shati”の生理機能の解明. *Neuroscience2008* (第31回日本神経科学学会大会) (横浜, 平成20年7月11日)
  3. 鍋島俊隆, 間宮隆吉, 毛利彰宏, 野田幸裕, 新田淳美, 溝口博之 : ニコチン性コリン受容体の細胞内伝達系を介する認知機能の調節機構. 財団法人喫煙科学研究財団第23回平成19年度助成研究発表会 (東京, 平成20年7月24日)
  4. 安藤 雄, 野田幸裕, Dayong Wang, 脇由香里, 桑原宏貴, 毛利彰宏, 鍋島俊隆 : メタンフェタミン連続投与マウスにおける認知機能障害に対するガラントミンの改善作用. *生体機能と創薬シンポジウム 2008 —生命システムにおける情報ネットワークの重要性を解く—* (東京, 平成20年9月5日)
  5. Yu Ando, Yukihiko Noda, Dayong Wang, Yukari Waki, Hiroki Kuwahara, Akihiro Mouri and Toshitaka Nabeshima: The ameliorating effect of galantamine on cognitive impairment through nicotin-dopamine-ERK1/2 systems in mice treated with methamphetamine repeatedly. 文部

- 科学省学術フロンティア推進事業  
「International Symposium on Brain  
Development and Neuropsychiatric Disorders」  
(名古屋、平成20年9月24日)
6. Yukihiro Noda, Akihiro Mouri, Rina Murai, Minae Niwa, Hiroshi Furukawa and Toshitaka Nabeshima: Molecular mechanisms of cognitive deficits in schizophrenic animal models and efficacy of antipsychotics. 文部科学省学術フロンティア推進事業「International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders」(名古屋、平成20年9月24日)
  7. Ai Tamaji, Akira Yoshimi, Yukiko Kawamura, Yukari Waki, Keizo Yoshida, Yukihiro Noda and Norio Ozaki: High-performance liquid chromatographic of determination of fluvoxamine in human plasma. 文部科学省学術フロンティア推進事業「International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders」(名古屋、平成20年9月24日)
  8. Yukari Waki, Rina Murai, Akira Yoshimi, Shinnosuke Yamada, Yu Ando, Akihiro Mouri, Norio Ozaki, Kiyofumi Yamada, Kohichi Tanaka, Yukihiro Noda and Toshitaka Nabeshima: The roles of glutamate transporter, GLAST in learning and memory. 文部科学省学術フロンティア推進事業「International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders」(名古屋、平成20年9月24日)
  9. Shinnosuke Yamada, Yoshihito Ito, Nagahide Takahashi, Shinichi Saito, Akira Yoshimi, Toshiya Inada, Yukihiro Noda and Norio Ozaki: No association between the protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1 (PTPRZ1) gene and Schizophrenia in the Japanese population. 文部科学省学術フロンティア推進事業「International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders」(名古屋、平成20年9月24日)
  10. 野田幸裕, 毛利彰宏, 鍋島俊隆: 精神疾患モデルは如何にあるべきか: 基礎と臨床の対話 統合失調症モデル作成のため, 基礎研究者が臨床医に望むこと. 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同年会(東京, 平成20年10月1日)
  11. 安藤 雄, 野田幸裕, Wang Dayong, 山田真之亮, 吉見 陽, 脇由香里, 玉地亜衣, 毛利彰宏, 鍋島俊隆: メタンフェタミン連続投与マウスに認められる認知障害に対するガラントミンの作用: ドパミン- extracellular signal-regulated kinase 1/2系の関与. 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同年会(東京, 平成20年10月2日)
  12. 毛利彰宏, 野田幸裕, 古川 宏, 小林和人, 鍋島俊隆: クロザピンのPCP連続投与による認知障害に対する緩解効果にはドパミン D4 およびセロトニン S2 受容体拮抗作用が関与する. 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同年会(東京, 平成20年10月2日)
  13. Yukihiro Noda, Dayong Wang, Akihiro Mouri and Toshitaka Nabeshima: Study on the molecular mechanism of neuropsychotoxicity induced by psychostimulants Effects of Galantamine, a novel cholinergic agent with a dual mode of action, on cognitive deficits in animal models. Japan-Korea Joint Project (Korea, 平成20年10月6日)
  14. 山田真之亮, 伊藤圭人, 吉見 陽, 野田幸裕, 尾崎紀夫: PTPRZ1 を候補遺伝子とした日本

- 人の統合失調症患者と健常者における遺伝子多型の関連解析. 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (京都, 平成 20 年 12 月 21 日)
15. 野田幸裕, 脇由香里, 吉見 陽, 山田真之亮, 安藤 雄, 玉地亜衣, 永井 拓, 鍋島俊隆, 尾崎紀夫: ストレスと精神障害の発症脆弱性に関する分子の探索: 発達過程における慢性社会敗北ストレス負荷による高次機能への影響. 文部科学省学術フロンティア推進事業研究報告会 (名古屋, 平成 21 年 1 月 9 日)
  16. 永井 拓, 尾崎紀夫, 吉見 陽, 山田真之亮, 野田幸裕, 山田清文, 鍋島俊隆: ストレス関連疾患に関するプロテオーム解析. 文部科学省学術フロンティア推進事業研究報告会 (名古屋, 平成 21 年 1 月 9 日)
  17. 脇由香里, 吉見 陽, 山田真之亮, 安藤 雄, 永井 拓, 鍋島俊隆, 尾崎紀夫, 野田幸裕: マウスの発達過程における慢性社会敗北ストレス負荷による社会性行動への影響. 第 1 回名城大学学術フロンティア推進事業若手研究者シンポジウム「人間社会で感じるストレスと解決への手立て」 (名古屋, 平成 21 年 3 月 2 日)
  18. 脇由香里, 村井里菜, 吉見 陽, 山田真之亮, 安藤 雄, 毛利彰宏, 尾崎紀夫, 山田清文, 田中光一, 野田幸裕, 鍋島俊隆: グルタミン酸トランスポーターGLAST の学習・記憶および情動における役割. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜, 平成 21 年 3 月 16 日)
  19. 山田真之亮, 伊藤圭人, 吉見 陽, 野田幸裕, 尾崎紀夫: 日本人の統合失調症患者と健常者における PTPRZ1 遺伝子多型の関連解析. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜, 平成 21 年 3 月 17 日)
  20. Shinnosuke Yamada, Yoshihito Ito, Branko Aleksic, Akira Yoshimi, Taku Nagai, Yukihiro Noda, Kinji Ohno, Norio Ozaki: Gene expression and splicing variant analysis in schizophrenia. The 6th Nagoya-Nanjing-Shenyang Symposium on Pharmaceutical and Life Sciences (Nagoya, Japan, 2009 年 9 月)
  21. Yoshihito Ito, Shinnosuke Yamada, Branko Aleksic, Itaru Kushima, Yukako Nakamura, Akira Yoshimi, Taku Nagai, Yukihiro Noda, Kinji Ohno, Norio Ozaki: Analyses of gene expression profile and aberrant splicing in schizophrenia using exon array. XVII World Congress of Psychiatric Genetics (San Diego, CA, U.S.A., 2009 年 11 月)
  22. Akira Yoshimi, Taku Nagai, Shinnosuke Yamada, Ryoko Ishihara, Mitsuki Ohashi, Yoshihito Ito, Yukihiro Noda, Kiyofumi Yamada, Norio Ozaki: Proteomic analysis of the lymphoblastoid cell line in the Japanese schizophrenic patients. XVII World Congress of Psychiatric Genetics (San Diego, CA, U.S.A., 2009 年 11 月)
  23. Shinnosuke Yamada, Yoshihito Ito, Branko Aleksic, Itaru Kushima, Yukako Nakamura, Akira Yoshimi, Taku Nagai, Yukihiro Noda, Kinji Ohno, Norio Ozaki: Genome-wide Analysis of Gene Expression Profile and Transcript Isoform Variation in Schizophrenia. The 1st Meeting of the Asian College on Neuropsychopharmacology (Kyoto, Japan, 2009 年 11 月)
  24. Yoshihito Ito, Shinnosuke Yamada, Branko Aleksic, Itaru Kushima, Yukako Nakamura, Akira Yoshimi, Taku Nagai, Yukihiro Noda, Kinji Ohno, Norio Ozaki: Analyses of gene expression profile and gene expression profile and aberrant splicing in schizophrenia using exon



- array. Global COE 2nd International Symposium (Nagoya, Japan, 2009年11月)
25. 丹羽美苗, 神谷篤, 村井里菜, 久保健一郎, Jaaro-Peled Hanna, 陸玲玲, 仲嶋一範, 野田幸裕, 澤明, 鍋島俊隆: 発達期大脳皮質における Disrupted-in-Schizophrenia-1 の役割: ドパミン作動性神経系および精神疾患への関与. 第82回日本薬理学会年会 (横浜 2009年3月)
  26. 山田真之亮, 伊藤圭人, 吉見陽, 野田幸裕, 尾崎紀夫: 日本人の統合失調症患者と健常者における PTPRZ1 遺伝子多型の関連解析. 第82回日本薬理学会年会 (横浜 2009年3月)
  27. 脇由香里, 村井里菜, 吉見陽, 山田真之亮, 安藤雄, 毛利彰宏, 尾崎紀夫, 山田清文, 田中光一, 野田幸裕, 鍋島俊隆: グルタミン酸トランスポーターGLASTの学習・記憶および情動における役割. 第82回日本薬理学会年会 (横浜 2009年3月)
  28. 山田真之亮, 永井拓, 吉見陽, 野田幸裕, 尾崎紀夫: 精神疾患発症脆弱性因子の網羅的解析による病態解明のためのアプローチ. 第55回 (平成21年度) 日本薬学会東海支部総会・大会 (名古屋 2009年7月)
  29. 毛利彰宏, 野田幸裕, Dayong Wang, 安藤雄, 脇由香里, 古関竹直, 間宮隆吉, 鍋島俊隆: 覚せい剤により誘発される精神障害に対するガラントミンの効果: 第12回ニコチン・薬物依存研究フォーラム (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・平成21年度合同学術総会) (横浜 2009年9月)
  30. Shinnosuke Yamada, Yoshihito Ito, Branko Aleksic, Itaru Kushima, Yukako Nakamura, Akira Yoshimi, Taku Nagai, Yukihiko Noda, Kinji Ohno, Norio Ozaki: Genome-wide Analysis of Gene Expression Profile and Transcript Isoform Variation in Schizophrenia. 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会 合同年会 (京都 2009年11月)
  31. 山田真之亮, 永井拓, 吉見陽, 伊藤圭人, 大橋美月, 荒木飛鳥, 野田幸裕, 尾崎紀夫: プロテオーム解析法を用いた統合失調症発症脆弱性因子の同定. 第42回 精神神経系薬物治療研究報告会 (大阪 2009年12月)
  32. 野田幸裕: 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. 厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業) 平成21年度分担研究報告会 (名古屋 2010年1月)
  33. 安藤雄, 脇由香里, 山田真之亮, 毛利彰宏, 鍋島俊隆, 尾崎紀夫, 野田幸裕: 慢性社会ストレス負荷と社会性行動. 名城大学学術フロンティア推進事業 第2回若手研究者シンポジウム (名古屋 2010年1月)
  34. 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, 若年期における精神異常発現薬による情動・認知機能の障害を増強する. 名城大学学術フロンティア推進事業 第2回若手研究者シンポジウム (名古屋 2010年1月)
  35. 山田真之亮, 永井拓, 吉見陽, 伊藤圭人, 大橋美月, 野田幸裕, 尾崎紀夫: 統合失調症関連分子の同定を目的としたプロテオーム解析. 第6回統合失調症研究会 (東京 2010年2月)
  36. 安藤雄, 脇由香里, 山田真之亮, 吉見陽, 毛利彰宏, 鍋島俊隆, 尾崎紀夫, 野田幸裕: 神経発生・発達過程における慢性社会ストレス負荷が高次精神機能に与える影響. 第19回神経行動薬理若手研究者の集い (岡山 2010年3月)
  37. 山田真之亮, 永井拓, 吉見陽, 大橋美月, 伊藤圭人, 野田幸裕, 尾崎紀夫: 統合失調症のバイオマーカの探索のためのプロテオーム

- 解析. 第 83 回日本薬理学会年会 (大阪 2010 年 3 月)
38. 安藤雄, 脇由香里, 山田真之亮, 吉見陽, 毛利彰宏, 鍋島俊隆, 尾崎紀夫, 野田幸裕: 神経発達過程における慢性社会ストレス負荷が社会性行動に及ぼす影響. 第 83 回日本薬理学会年会 (大阪 2010 年 3 月)
39. Toshitaka Nabeshima, Minae Niwa, Atsushi Kamiya, Ken-ichiro Kubo, Patricio O'Donnell, Kazunori Nakajima, Kazuhisa Kohda, Yukihiro Noda, Akira Sawa: Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. CINP WORLD CONGRESS (香港 2010 年 6 月)
40. Akihiro Mouri, Yukihiro Noda, Dayong Wang, Yu Ando, Yukari Waki, Shinnosuke Yamada, Toshitaka Nabeshima: Galantamine ameliorates the impairment of recognition in mice treated with methamphetamine repeatedly. The College on Problem of Drug Dependence 72nd Annual Meeting (アリゾナ 2010 年 6 月)
41. 毛利彰宏, 野田幸裕, 肥田裕丈, 安藤雄, 永井拓, 山田清文, 鍋島俊隆: 新生仔期の免疫異常は若年期における精神異常発現薬による情動・認知機能の障害を増強する. 名古屋大学医学研究科・生理学研究所合同シンポジウム (岡崎 2010 年 8 月)
42. 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, 若年期における精神異常発現薬による情動・認知機能の障害を増強する. Neuro2010 (33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会) (神戸 2010 年 9 月)
43. 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 (仙台 2010 年 9 月)
44. Yukihiro Noda, Akihiro Mouri, Yu Ando, Yukari Waki, Shinnosuke Yamada, Akira Yoshimi, Kiyofumi Yamada, Norio Ozaki, Dayong Wang, Toshitaka Nabeshima: Galantamine, a novel cholinergic agent with a dual mode of action, on cognitive deficits in animal models of Alzheimer's disease and schizophrenia. The International Symposium of Pharmacology—The 3rd Mainland, Taiwan and Hongkong Symposium of Pharmacology (瀋陽 2010 年 9 月)
45. Yukihiro Noda, Akihiro Mouri, Hirotake Hida, Yu Ando, Kiyofumi Yamada, Toshitaka Nabeshima: Immune activation during neonatal exacerbates phencyclidine-induced behavioral phenotypes in adult mice. The International Symposium of Pharmacology—The 3rd Mainland, Taiwan and Hongkong Symposium of Pharmacology (瀋陽 2010 年 9 月)
46. Toshitaka Nabeshima, Minae Niwa, Atsushi Kamiya, Ken-ichiro Kubo, Lingling Lu, Yukihiro Noda, Kazunori Nakajima, Akira Sawa: 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 年 9 月)
47. Akira Yoshimi, Branko Aleksic, Yukiko Kawamura, Nagahide Takahashi, Shinnosuke Yamada, Nakao Iwata, Toshiya Inada, Yukihiro Noda, Kiyofumi Yamada, Norio Ozaki.: Gene-wide association study between the methylenetetrahydrofolate reductase gene

- (MTHFR) and schizophrenia in the Japanese population, with an updated meta-analysis on currently available data. XVIII World Congress on Psychiatric Genetics (アテネ 2010年10月)
48. 山田真之亮、伊藤圭人、Branko Aleksic、吉見陽、永井拓、野田幸裕、大野欽司、尾崎紀夫：統合失調症におけるリンパ芽球様細胞株を用いたトランスクリプトーム解析 第43回精神神経系薬物治療研究報告会（大阪 2010年12月）
  49. 毛利彰宏、佐々木文、渡辺研、布目貴大、十川千春、北山滋雄、宮本嘉明、間宮隆吉、山田清文、野田幸裕、鍋島俊隆：MAGE-D1 遺伝子欠損マウスはセロトニン作動性神経機能低下を伴ったうつ様行動を示す。名城大学学術フロンティア推進事業 第3回若手研究者シンポジウム・第1回研究・大学活性化を目的とした学生フォーラム 合同開催（名古屋 2011年1月）
  50. 肥田裕丈、毛利彰宏、安藤雄、山田清文、鍋島俊隆、野田幸裕：新生仔期の免疫異常は、若年期における精神異常発現薬による情動・認知機能の障害および GLAST の異常発現を増強する。名城大学学術フロンティア推進事業 第3回若手研究者シンポジウム・第1回研究・大学活性化を目的とした学生フォーラム 合同開催（名古屋 2011年1月）
  51. 安藤雄、鶴飼麻由、毛利彰宏、肥田裕丈、鍋島俊隆、尾崎紀夫、野田幸裕：幼若期における慢性的な社会性ストレスが実験動物の社会性行動や脳機能に及ぼす影響。名城大学学術フロンティア推進事業 第3回若手研究者シンポジウム・第1回研究・大学活性化を目的とした学生フォーラム 合同開催（名古屋 2011年1月）
  52. 大橋美月、山田真之亮、吉見陽、石原良子、永井拓、山田清文、野田幸裕、尾崎紀夫：統合失調症および双極性障害の発症脆弱性因子探索のためのプロテオーム解析。名城大学学術フロンティア推進事業 第3回若手研究者シンポジウム・第1回研究・大学活性化を目的とした学生フォーラム 合同開催（名古屋 2011年1月）
  53. 野田幸裕、安藤雄、毛利彰宏、鶴飼麻由、肥田裕丈、山田清文、鍋島俊隆、尾崎紀夫：ストレスと精神障害の発症脆弱性に関する分子の探索。平成22年度名城大学学術フロンティア推進事業研究成果報告会（名古屋 2011年2月）
  54. 野田幸裕、肥田裕丈、毛利彰宏、荻野由里恵、関壮史、鍋島俊隆：第二世代抗精神病薬と認知機能：統合失調症モデル動物を用いたプロナンセリンの薬効の評価。DSフォーラム2011（東京 2011年3月）
  55. 肥田裕丈、毛利彰宏、安藤雄、鶴飼真由、荻野由香里、山田清文、鍋島俊隆、野田幸裕：新生仔期の免疫異常と若年期における精神異常発現薬の複合負荷が情動・認知機能に与える影響。第20回神経行動薬理若手研究者の集い（東京 2011年3月）
  56. 大橋美月、山田真之亮、吉見陽、石原良子、永井拓、山田清文、野田幸裕、尾崎紀夫：統合失調症および双極性障害の発症脆弱性因子探索のためのプロテオーム解析。第84回日本薬理学会年会（横浜 2011年3月）
  57. 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年3月）
  58. 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 年 3 月)

**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

## 化学物質により誘導される分子群の発現解析および機能解析

分担研究者：永井拓

研究協力者：衣斐大祐、山田真之亮、山田清文

（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質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。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 CRMP5 陽性軸索突起の伸展が有意に抑制されたが、全体のタンパク発現に有意な変化は認められなかった。一方、C57BL/6 系新生仔マウスでは polyI:C を処置しても CRMP5 タンパクの発現に有意な変化は認められなかった。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<sup>1-4)</sup>。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<sup>5,6)</sup>。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系およびC57BL/6J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. イムノブロットイング法

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°C 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 にブロッ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、一晩)。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-radish 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

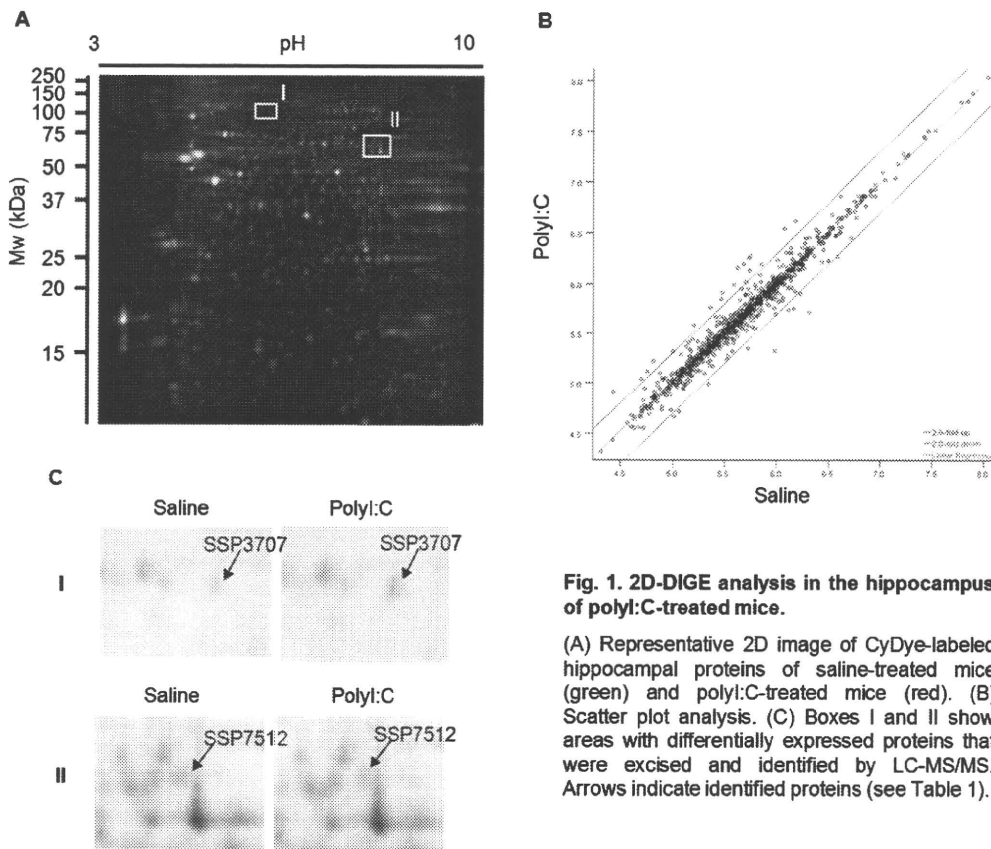
バンドの検出を行った。

## 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  $1 \times 10^4$  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。



**Fig. 1. 2D-DIGE analysis in the hippocampus of polyI:C-treated mice.**

(A) Representative 2D image of CyDye-labeled hippocampal proteins of saline-treated mice (green) and polyI:C-treated mice (red). (B) Scatter plot analysis. (C) Boxes I and II show areas with differentially expressed proteins that were excised and identified by LC-MS/MS. Arrows indicate identified proteins (see Table 1).

**Table 1. List of identified proteins that are differently expressed in the hippocampus of polyI:C-treated mice**

Spot no. <sup>a</sup>	protein name	SW/TR Acc <sup>b</sup>	Fold change <sup>c</sup>	p-value	MASCOT score <sup>d</sup>	Sequence coverage (%) <sup>e</sup>	Mr (kDa) /pI <sup>f</sup>
3707	Aldehyde dehydrogenase family 1 member L1	Q8R0Y6	1.6	<0.05	803	34	99/5.64
7512	Collapsin response mediator protein 5	Q9EQF6	0.6	<0.01	382	42	61/6.62

<sup>a</sup>Spot no. corresponds to those in Fig. 2. <sup>b</sup>Accession number is derived from Swiss-Prot/TrEMBL database.

<sup>c</sup>Fold changes in polyI:C-treated mice. <sup>d</sup>MASCOT score indicated the total of individual peptide scores.

<sup>e</sup>Sequence coverage achieved by MS-Fit search. <sup>f</sup>Theoretical molecular weight (Mr) /isoelectrical point (pI) of the protein.

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: CATCCATCTTTCCTCCAACCA

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)。

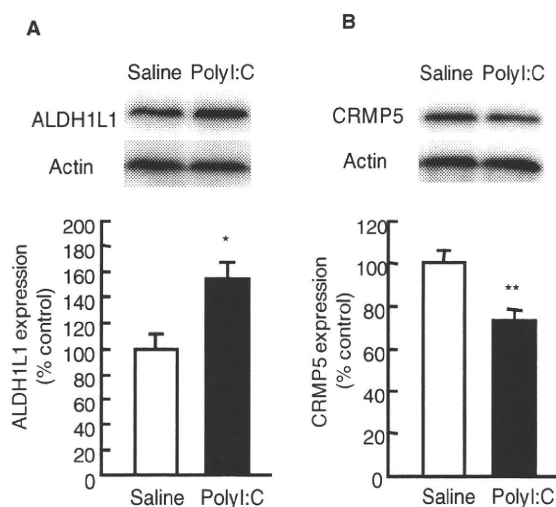
### 2. Peptide mass fingerprinting 法によるタンパク同定

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、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 (Table 1)。

### 3. イムノブロットング法による ALDH1L1 および CRMP5 の発現解析

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トングを行った。PolyI:C 投与群において





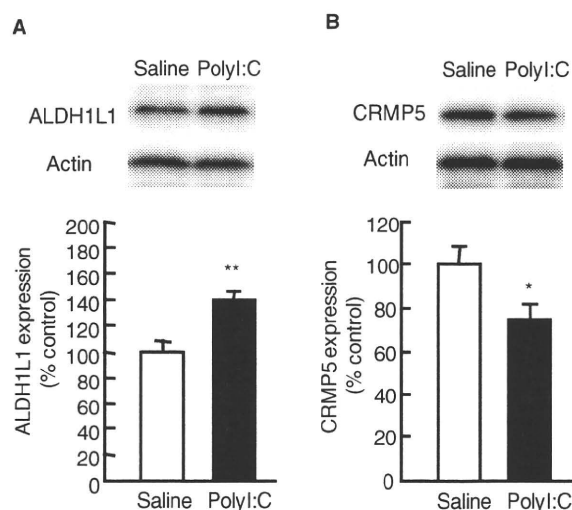
**Fig. 2. Expression of ALDH1L1 and CRMP5 in the hippocampus of polyI:C-treated mice at the age of 10 weeks**

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  $\pm$  SE (n=6). \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 vs saline

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 ( $p < 0.05$ , Fig. 2A)。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 ( $p < 0.01$ , Fig. 2B)。さらに、新生仔期に polyI:C を投与した 10 週齢のマウスに認められた ALDH1L1 および CRMP5 の発現変化が、polyI:C 処置直後から認められるかどうかを調べた。PolyI:C 最終投与 24 時間後のマウスの海馬において、ALDH1L1 のタンパク発現がコントロール群の 1.4 倍に増加した ( $p < 0.01$ , Fig. 3A)。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の 0.8 倍に減少していた ( $p < 0.05$ , Fig. 3B)。

#### 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<sup>7, 8)</sup>。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



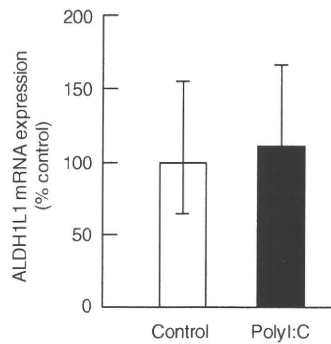
**Fig. 3. Expression of ALDH1L1 and CRMP5 in the hippocampus of polyI:C-treated mice at the age of 7 days**

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  $\pm$  SE (n=6). \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 vs saline

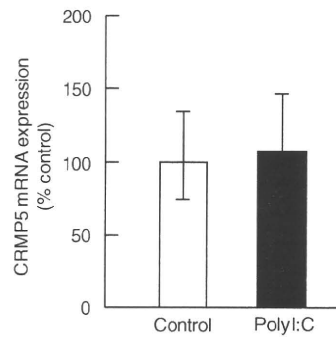
た。皮質由来初代培養アストロサイトにおいて、polyI:C を処置しても ALDH1L1 mRNA 発現に有意な発現変化は認められなかった (Fig. 4)。また、海馬由来初代培養神経細胞に polyI:C を処置しても CRMP5 mRNA 発現に有意な発現変化は認められなかった (Fig. 5)。

#### 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<sup>9)</sup>。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)。



**Fig. 4. Effect of polyI:C treatment on the expression level of ALDH1L1 mRNA in primary cultured astrocyte**  
Values indicate the mean±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±SE of three independent experiments (n=3).

一方、イムノブロットティング法を用いて CRMP5 のタンパク発現を検討したが、polyI:C-ACM を処置した神経細胞では有意な変化が認められなかった。

さらに、polyI:C による神経—グリア相互作用に係る分子を調べるため、polyI:C-ACM 中に含まれるタンパク発現を 2D-DIGE 法を用いて予備検討を行った。神経細胞培養用添加物 B27 含有 control-ACM および polyI:C-ACM では、B27 由来のスポットのみ検出された。一方、B27 を含まない control-ACM および polyI:C-ACM では多数のスポットが認められ、control-ACM および polyI:C-ACM の間に発現変化を示すスポットが複数認められた (Fig. 7)。

## 6. マウス間における polyI:C 処置による CRMP5 の発現変化

マウスの系統間で polyI:C 処置による CRMP5 タンパク発現変化に差があるかどうかを調べるため、CRMP5 に対する特異的抗体を用いてイムノブロットティングを行った。PolyI:C 投与群の海馬における CRMP5 のタンパク発現はコントロール群と比較して有意な差は認められなかった。また、前頭皮質においても両群間で有意な変化は認められなかった。

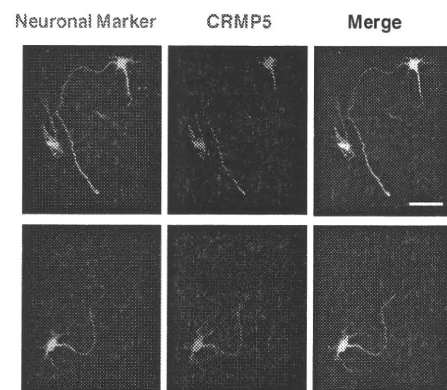
## D. 考察

Toll-like receptor 3 を介して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 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<sup>9)</sup>。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<sup>9)</sup>。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。

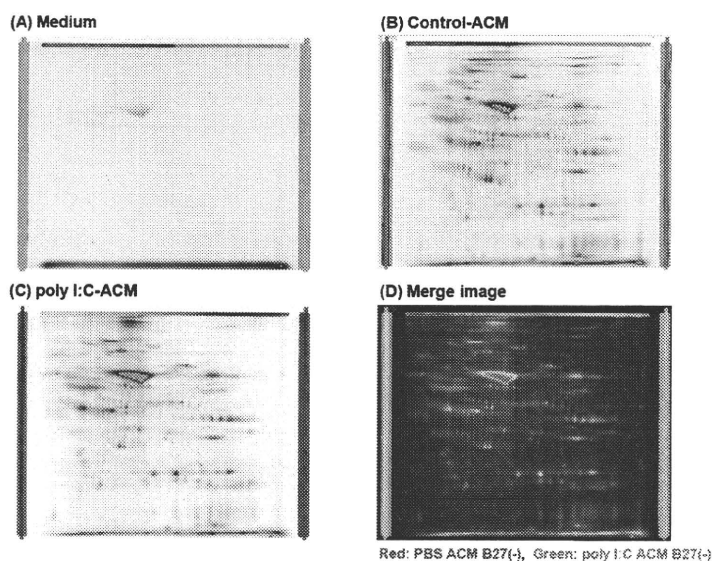
2D-DIGE 法を行った結果、約 1000 個のスポットが検出され、その中で有意な発現変化を示したスポットは 2 個であった。Scatter plot 解析の結果では、コントロールマウスに比べて polyI:C を投与したマウスで発現が 2 倍以上の増減を示すスポットが 29 個存在したことから、サンプル数を増やして解析する必要があると考えられる。

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



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



**Fig. 7. 2D-DIGE analysis in the polyI:C-ACM.**

Representative 2D image of CyDye-labeled culture medium (A), control-ACM (B), polyI:C-ACM (C) and merge image of B and C (D).

果、ALDH1L1 および CRMP5 を同定した。ALDH1L1 は 10-formyltetrahydrofolate、NADP<sup>+</sup> および H<sub>2</sub>O から tetrahydrofolate、CO<sub>2</sub> 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<sup>10,11)</sup>。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<sup>12)</sup>、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<sup>7)</sup>。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<sup>13)</sup>。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、CRMP 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<sup>9)</sup>。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<sup>14)</sup>。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<sup>15)</sup>。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。

一方、新生仔期の polyI:C 投与による行動異常にはマウスの系統によって異なることが示唆されている。そこで、polyI:C を処置した ICR 系マウスでは CRMP5 の発現が減少していたが、C57BL/6 系マウスでは polyI:C を処置しても CRMP5 のタンパク発現に有意な変化は認められなかった。これらの結果は、C57BL/6 系マウスに比較して ICR 系マウスの方が polyI:C による行動異常が発現しやすいということを支持しているのかもしれない。

PolyI:C による神経—グリア相互作用に係る分子を調べるため、polyI:C-ACM 中に含まれるタンパク発現を 2D-DIGE 法を用いて予備検討を行った。B27 を含まない control-ACM および polyI:C-ACM では多数のスポットが認められ、control-ACM および polyI:C-ACM の間に発現変化

を示すスポットが複数認められた。B27 不含 polyI:C-ACM が神経細胞の突起伸長を抑制するかどうかを確認する必要があるが、セクレトーム解析の条件を確立することができた。今後は、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。CRMP5 の発現変化にはマウスの系統差が認められた。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 Psychiat.* 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