

主論文の要旨

**Pharmacological and proteomic analyses of neonatal
polyI:C-treated adult mice**

〔 新生仔期 polyI:C 処置マウスにおける
薬理的およびプロテオーム解析 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻

臨床医薬学講座 医療薬学分野

(指導：山田 清文 教授)

北川 佳奈子

【背景と目的】

これまでの疫学的調査より、周産期のウイルス感染が成熟期の脳機能発達に影響を及ぼすことが示されている。自然免疫を活性化する toll-like receptor 3 (TLR3) のリガンドである polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) の処置は、擬似ウイルス感染を引き起こす。すでに新生仔期に polyI:C を投与されたマウスにおいて、成熟期に情動および認知機能障害を呈することが報告されている。これらの障害はニコチンおよび D-セリンを成熟期に投与することで一部改善することが示されているが、既存の抗精神病薬の投与で改善するかは不明である。一方、polyI:C 処置マウスの脳内で、interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) の発現がアストロサイト特異的に増加すること、polyI:C を処置したアストロサイトで、metalloproteinase-3 および follistatin-related protein 1 の発現が上昇することが先行研究で明らかにされている。しかしながら、新生仔期 polyI:C 処置マウスの行動障害が観察される成熟期の脳内におけるタンパク質の発現変化は不明である。本研究では、新生仔期 polyI:C 処置マウスの行動障害に対する定型および非定型抗精神病薬の効果を調べた。さらに、精神発達障害のメカニズムを解明するため、タンパク質の発現変化をプロテオミクス解析により調べた。

【方法】

1. 新生仔期 polyI:C 処置による成熟期の行動障害に対する抗精神病薬の効果の解析

ICR マウスに polyI:C (5 mg/kg) を生後 2 日目から 6 日目まで 1 日 1 回皮下投与した。PolyI:C 投与から 10-12 週間後にプレパルス抑制試験、オープンフィールド試験、新奇物体認知試験および社会性行動試験を行った。ハロペリドール (0.3 mg/kg) またはクロザピン (5 mg/kg) は各試験の 1 時間前に経口投与した。

2. 新生仔期 polyI:C 処置による成熟期マウス脳内のタンパク発現変化の網羅的解析

ICR マウスに polyI:C (5 mg/kg) を生後 2 日目から 6 日目まで 1 日 1 回皮下投与し、polyI:C 投与 10 週間後、海馬を摘出し、抽出したタンパクの二次元電気泳動 (2D-DIGE 法) を行った。

3. 新生仔期 polyI:C 処置を行った成熟期マウス脳内で変化が見られたタンパク質の同定

2D-DIGE 法により発現変化が見られたスポットを切り出し、アミノ酸配列を質量分析装置により決定し、データベース検索でタンパク質を同定した。同定したタンパク質の確認には、各々の特異的抗体を用いてイムノブロットング法を行った。

【結果】

1. 新生仔期 polyI:C 処置による成熟期の行動障害に対する抗精神病薬の効果の解析

新生仔期 polyI:C 投与により、成熟期での感覚情報処理機能の障害、不安様行動、認

知記憶および社会性行動の障害が見られた (Fig.1-4)。また、polyI:C 処置による感覚情報処理機能の障害はクロザピンおよびハロペリドールで改善した。一方、不安様行動、認知記憶および社会性行動はクロザピンにより改善したが、ハロペリドールでは改善しなかった (Fig.1-4)。

2. 新生仔期 polyI:C 処置による成熟期マウス脳内のタンパク発現変化の網羅的解析

新生仔期に polyI:C を処置した成熟マウスの海馬を用いて、二次元電気泳動を行った結果、約 1000 個のスポットが検出された。スポットを解析したところ、スポット番号 SSP3707 および SSP7512 に有意な発現変化が見られた (Fig.5)。

3. 新生仔期 polyI:C 処置による成熟期マウス脳内で変化が見られたタンパク質の発現解析

二次元電気泳動で有意差が認められた SP3707 および SSP7512 をゲルから切り出し、質量分析によるペプチド配列の解析およびデータベースによるタンパク質の検索を行った。その結果、SSP3707 は aldehyde dehydrogenase family 1 member L1 (ALDH1L1)、SSP7512 は collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) であると同定された (Table 1)。また、ALDH1L1 および CRMP5 のイムノブロッティングを行った。ALDH1L1 のタンパク発現はコントロール群に比べて polyI:C 投与群では 1.6 倍に増加し、CRMP5 は 0.7 倍に減少した (Fig.6)。

【考察】

新生仔期 polyI:C 投与マウスは、成熟期において情動および認知機能障害を示し、この結果は先行研究と一致していた。これらの行動異常に対する抗精神病薬の効果を調べたところ、感覚情報処理の障害は、クロザピンおよびハロペリドールの投与により改善した。一方で、不安様行動、認知記憶および社会性行動の障害は、クロザピンの投与により改善したが、ハロペリドールでは改善しなかった。これらの結果は、統合失調症患者の認知機能障害に対して、ハロペリドールは無効であるが、クロザピンは有効性を示すとの報告と一致した。ハロペリドールはドパミン D₂ 受容体を遮断して陽性症状を改善するが、陰性症状の改善効果が乏しいことが報告されている。クロザピンはドパミン神経系に対して中脳辺縁系を抑制し、逆に中脳皮質系を亢進させることで陽性症状および陰性症状の両方を改善する。また、クロザピンの行動障害の改善にはセロトニン 5HT_{2A} 受容体やドパミン D₄ 受容体も関与すると報告されている。これまでに、polyI:C 投与 24 時間後の新生仔の海馬において、IFITM3 の mRNA 発現が上昇することや成熟後の polyI:C 処置マウスの海馬におけるグルタミン酸神経伝達低下することが報告されている。今回、新生仔期に polyI:C を投与した成熟期マウスの海馬では、ALDH1L1 および CRMP5 タンパク質の発現変化が見られた。ALDH1L1 は 10-formyltetrahydrofolate から tetrahydrofolate へ変換する酵素であり、アストロサイトに発現する。新生仔期 polyI:C 処置による ALDH1L1 タンパクの増加は成熟後の同

マウス海馬におけるアストロサイトの増殖あるいは機能変化を示唆していると考えられる。また、CRMP5は成長円錐に存在し、神経細胞の分化および軸索の伸長に関与する。PolyI:Cの作用するTLR3も成長円錐に発現し、polyI:Cが軸索形成を阻害することが報告されている。また、CRMP5欠損マウスでは軸索-シュワン細胞の相互作用異常、プルキンエ細胞の萎縮を示すことから、海馬におけるCRMP5の発現低下はpolyI:Cによる行動学的および神経病理学的異常に関係している可能性がある。

【結論】

新生仔期 polyI:C 投与マウスは抗精神病薬の効果を評価する上で有用な動物モデルであり、クロザピンはハロペリドールと比較して優れた抗精神病作用を有することが示唆された。また、polyI:C 処置による免疫活性化による神経発達障害の病態解明に繋がる分子として ALDH1L1 および CRMP5 を同定した。