

—平成 16 年度 岐阜薬科大学特別研究費 (奨励) —

## 中脳—大脳皮質路の形成に対する BDNF の関与 ～統合失調症病態解明へのアプローチ

福光秀文

### 1. 緒言

統合失調症 (精神分裂症とよばれていた) とは、思考や行動、感情を 1 つの目的に沿ってまとめる能力が長期に渡って低下し、その経過中にある種の幻想、妄想、ひどくまとまりのない行動 (陽性症状) と、うつ病的な精神的抑圧状態 (陰性症状) をくり返す病態である。発症率は、国内外を問わず 1% 程度であり、日本全国では 67 万人が治療を受けている。その発症原因は明らかにされておらず、抜本的治療法の開発は遅々としている。

抗精神薬の有効性から、ドーパミンを含む神経伝達物質の機能障害が病因として考えられてきた。しかし、伝達物質受容体の数的変化や遺伝子多型の解析からは統一した見解が得られていない。近年、統合失調症患者の脳において、ドーパミン神経の投射領域 (大脳皮質と辺縁系) での神経細胞層の乱れ、脳室拡大、皮質体積の減少といった胎生期の形成過程での障害に基づく所見が相次いで報告され、神経発達障害仮説が提唱された。つまり、何らかの遺伝子的背景から生じた中脳—大脳皮質、一辺縁系を構成する神経細胞の機能的発達障害がリスクとなり、環境的負荷により誘発されるという仮説である。

そのような中、当教室では大脳皮質の神経細胞層が構築される過程で、発症のリスクファクターの 1 つである脳由来神経栄養因子 (BDNF) を強制発現すると、統合失調症患者の脳に類似の神経細胞層の乱れを生じることを見出した。本研究では BDNF 遺伝子導入が大脳皮質に及ぼす影響を観察することで、統合失調症病態解明の糸口を探る。

### 2. 実験方法

妊娠 13.5 日齢のマウス子宮を露出し、GFP および BDNF の発現ベクターを混合し、胎仔の脳室内に 2  $\mu$ l ずつ注入した。注入後、電極で胎仔の頭部を挟み、電気パルス を 50ms パルス ON、150ms パルス OFF で 10 回のパルスを負荷した。その後、子宮を腹腔内に戻し、腹部を縫合した後、解析に用いるまで飼育し、その後、通常分娩させ、飼育を続けた。

このようにして作製した動物を各種解析に供与した。

### 3. 実験結果・考察

大脳皮質体性感覚野においては胎生 13.5 日齢に発生した GFP 陽性の神経細胞は生後 3 週において第 IV 層に位置取りをする (Fig. 1A)。BDNF 遺伝子を導入した皮質では、胎生 13.5 日目に発生した GFP 陽性細胞は第 II ~ V 層の間で波状に分布していた (Fig. 1B)。また、この層の乱れは遺伝子が導入された全領域の中央部に近いほど顕著で、前後軸に沿って中央部から遠ざかるほど、層の乱れは比較的小さくなった。層の乱れが穏やかな大脳皮質前方あるいは後方の領域では GFP 陽性細胞は対照群と同様に第 IV 層に存在していた (結果は示さず)。波状分布の乱れは遺伝子が導入された細胞に対する外因的な作用ではなく、細胞自身が分泌した BDNF が皮質内の環境を変化させた結果、細胞の挙動が変化したと考えられた。

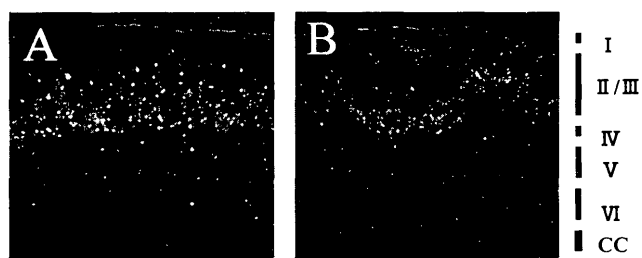


Fig. 1 GFP- and/or BDNF-expression vector was transfected into ventricular cells of E13.5 mice. Brain sections of those mice were prepared at 3 weeks old (P3W). In the P3W control cortex (A), the majority of GFP-positive cells was distributed in the layer IV. In contrast, in the P3W cortex transfected with BDNF-gene at E13.5 (B), GFP positive cells were distributed in wavy line from layer II to V, and the layer structure was observed to be abnormal. Scale bar : 300  $\mu$ m

各皮質神経細胞層に特異的に発現する分子マーカーの発現分布：次に、BDNF 遺伝子導入が大脳皮質神経細胞の層特異的性質に与える影響を明らかにす

るために、生後6日齢のマウス大脳皮質における、層特異的な分子マーカーの発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織染色法を用いて検討した。対照群では、胎生13.5日に発生した GFP 陽性の神経細胞は第IV層に存在しており、その層に特異的な RZR- $\beta$  遺伝子 mRNA の発現が観察された。一方、BDNF 遺伝子を導入した大脳皮質 (BDNF-EP) では、層の乱れの著しい中央部ばかりでなく、前後左右に離れた層の乱れが穏やかな領域でも、RZR- $\beta$  mRNA の発現は観察されなかった (Fig. 2B, D)。

また、第II～IV層細胞に特異的な mSorLA 遺伝子 (Fig. 2A, C) および、第II/III層細胞に特異的な Brn-1 遺伝子 (結果は示さず) の発現分布を検討した。対照群では2つの分子マーカーはそれぞれ予想される層に特異的に発現していた。一方、BDNF 遺伝子導入群では、2つの分子マーカーも波状に分布しており、その乱れは GFP 陽性細胞の分布と相関があり、GFP 陽性細胞の位置を最下層としてそれよりも髄膜側に発現が認められた。このことから、遺伝子導入細胞だけでなく皮質全体の層構造に乱れを生じていることが明らかとなった。これに加えて、第V～VI層の一部にもかなりの数の Brn-1、および mSorLA 陽性細胞が集積していることが分かった。

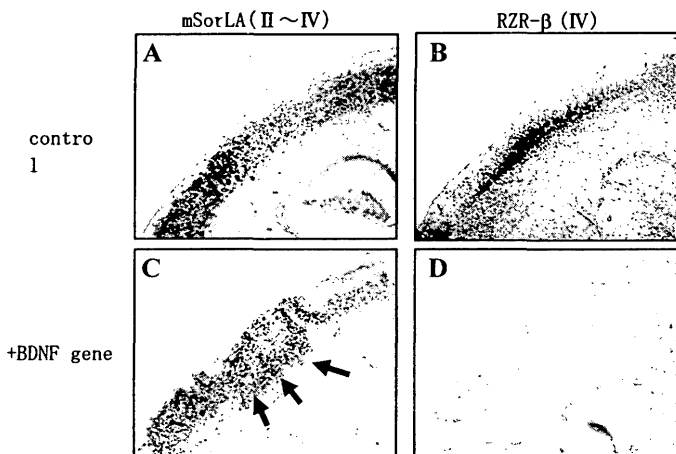


Fig. 2 The layers were characterized by the specific marker expression of mSorLA (layer II～IV) (A, C) or RZR- $\beta$  (layer IV) (B, D). The disrupted laminar structures of the cortex were recognized by a disorder of the pattern of marker expression (C). No expression of RZR- $\beta$  in the cortex transfected with BDNF gene (D). Scale bar: 300 $\mu$ m

さらに、層形成が完了する生後3週齢の大脳皮質において、異所性に下層で Brn-1 あるいは mSorLA を発現する細胞が本来の第II-III層の性質を持つかどうかを調べるために、カルシウム結合タンパク質であるカルビンジン D-28kDa の発現を検討した。すなわち、カルビンジン D-28kDa は大脳皮質第II/III層に定着する抑制性神経細胞の一部とそのシナプスに発現するタンパク質である。したがって、錐体細胞を除いて II/III 層一面に発現が認められる。対照群では実際に第II/III層一面に発現が認められた。一方、BDNF 遺伝子導入群では Brn-1、mSorLA の発現はカルビンジン D-28kDa の発現と一致して、上層

に加え、異所性の第V～VI層にも発現が観察された (Fig. 3)。したがって、BDNF 遺伝子が導入された細胞から BDNF が分泌され、皮質内に拡散して作用を及ぼした結果、この後に生み出される第II/III層細胞の定着位置が変化し、それに付随して II/III 層に特異的な抑制性神経細胞の定着およびシナプス形成が起こったと考えられた。

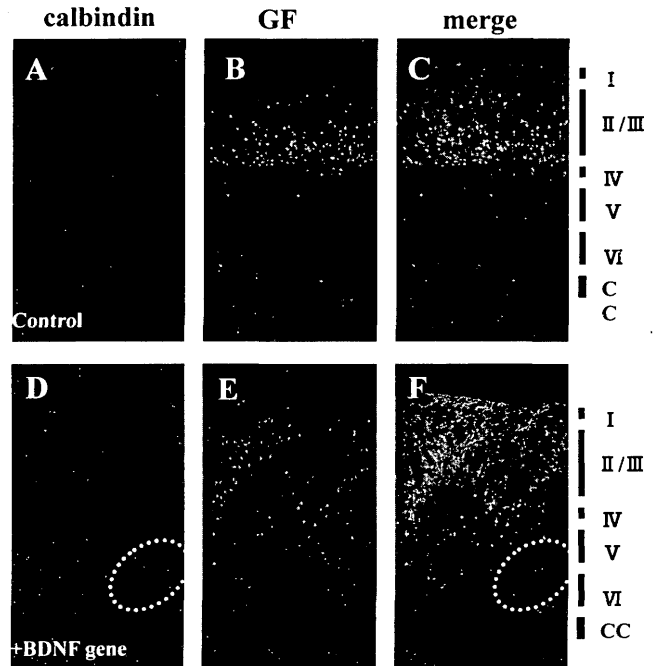


Fig. 3. GFP- and/or BDNF-expression vector was transfected into ventricular zone cells of E13.5 mice cortex. Brain sections were prepared from those mice when they grew up to be 3 weeks old, and stained with anti-calbindin D-28kDa antibody. In the control cortex, calbindin D-28kDa positive cells were seen in layer II/III. However, in the cortex transfected BDNF expression vector, those cells were also detected at deeper layer (circled with white line), and disordered laminar was observed in the cortex. Scale bar: 200 $\mu$ m

#### 4. 結論

これまでの BDNF とその受容体の遺伝子欠損マウスでは、胎生期の脳構築異常により誘導されたと考えられる表現型は認められておらず、胎生脳の発達における BDNF 作用の重要性は見過ごされてきた。しかし、近年いくつかの遺伝子においてすでに報告されているように、完全欠損型の遺伝子発現の欠損は代償的な機構を誘導するため、必ずしもその時点での機能を反映していない可能性がある。

また、ヒトの遺伝子疾患を考えると多くの場合、疾患の原因は遺伝子の完全欠損ではなくその調節障害や機能不全である。さらに、近年、ヒトを取り巻く地球環境の汚染から、遺伝的疾患でなくとも内分泌かく乱物質の影響によって疾患に至るケースは多分にある。この観点から、筆者が本研究で使用した遺伝子導入法は時期依存的、局所的な生体内分子の影響を知る上で有効であると考えられる。