九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

fosB欠損マウスは成体海馬の神経新生の異常とてんかんの自然発症・うつ様行動を示す

湯通堂, 紀子

https://doi.org/10.15017/462641

出版情報:九州大学, 2012, 博士(医学), 課程博士 バージョン: 権利関係:(C) 2013 American College of Neuropsychopharmacology

fosB欠損マウスは成体海馬の神経新生の異常とてんかんの 自然発症・うつ様行動を示す

掲載雜誌:Neuropsychopharmacology. 2013 Apr;38(5):895-906

提出者:九州大学大学院医学系学府(博士課程)

分子常態医学専攻

湯通堂 紀子

指導教官:中別府 雄作

要旨

てんかん患者はうつを発症するリスクが高く、また、てんかん・うつともに成体海 馬における神経新生の異常が報告されているが、詳しいメカニズムは明らかにされ ていない。最初期遺伝子の1つである fosB 遺伝子は、選択的スプライシングと翻訳 開始により FosB とΔFosB,Δ2ΔFosB をコードする。ラット脳においては一過性の前 脳虚血後に側脳室下帯や海馬顆粒細胞下層に存在する神経前駆細胞で fosB 産物の 発現が誘導される。また、アデノウイルスベクターを用いた fosB 産物の強制発現は 神経幹細胞の増殖を促進する。最近、我々は fosB 完全欠損マウスがうつ様行動を 示すことを明らかにし、この fosB 完全欠損マウスでは神経新生に異常がある可能 性を指摘していた。本論文では、fosB 完全欠損マウスとΔFosB とΔ2ΔFosB のみを発 現し FosB を発現しない fosB^{d/d}マウスにおける海馬歯状回の神経新生、神経病理、 行動そして遺伝子発現を野生型マウスと比較して解析した。fosB 完全欠損マウス は成体海馬神経新生の異常とてんかんを自然発症したが、fosB^{d/d}マウスではこのよ うな異常は認められなかった。マイクロアレイ解析により、fosB 完全欠損マウス の成体海馬では、神経新生・てんかん・うつに関与する複数の遺伝子の発現が変 化していることが明らかになった。以上より、fosB 完全欠損マウスは、一遺伝子 の欠損により神経新生の異常を伴いてんかんとうつを併発することから、てんか ん患者における高頻度のうつ病併発に対して遺伝学および分子生物学的な根拠を 与える最初のマウスモデルであると結論できる。

$\neq - \neg - ee$: Immediate early gene, Alternative splicing, Adult neurogenesis, Neural progenitor, Proliferation, Epilepsy

緒言

神経・精神疾患は全人口の中で高い罹患率を示す。てんかん患者はそれ以外の人々 と比較して、うつ病のリスクが5-20倍高いことが知られている。しかしながら、て んかん患者のうつ病は診断と治療が難しい場合が多い(Danzer, 2012)。これまでに、 成体海馬における神経新生の低下が不安やうつに影響しているという報告がある (Snyder et al., 2011)。また、成体海馬の神経新生は抗うつ薬や電気刺激療法 (electroconvulsive therapy, ECT) が行動的な効果をもたらす際に必要であることが 知られている(Danzer, 2012)。

げっ歯類の成体海馬では、カイニン酸 (kainic acid, KA) のような薬物刺激 により引き起こされるけいれん発作や ECT の動物モデルである電気刺激発作 (electroconvulsive seizures, ECS) や前脳虚血によって、神経新生と最初期遺伝子 fosB (Fosb) の発現が誘導される (Kurushima et al., 2005; Mandelzys et al., 1997; Morris et al., 2000; Nakabeppu and Nathans, 1991; Ohnishi et al., 2011)。Fosファミ リー遺伝子の中で、fosB遺伝子のみがalternative splicingとalternative translation initiationによりFosB、ΔFosB、Δ2ΔFosBという複数の産物を生じる(Chen et al., 1997; Nakabeppu and Nathans, 1991; Ohnishi et al., 2008; Sabatakos et al., 2008). AFosB は alternative splicing により生じる ΔfosB mRNA の翻訳産物で、全長の FosB タ ンパク質の転写活性化ドメインを含む C 末端 101 アミノ酸を欠損している (Nakabeppu and Nathans, 1991). $\Delta 2\Delta$ FosB は $\Delta fosB$ mRNA \mathcal{O} Met79 から alternative initiation の翻訳により生じる AFosB のN末端欠損型アイソフォームで、 N末端Fosホモロジードメインと C 末端転写活性化ドメインを欠損している (Sabatakos et al., 2008)。 FosB と △FosB は Jun 転写活性化に対して反対の作用 を持つが、どちらも細胞増殖、分化、細胞死を制御する(Kurushima et al., 2005; Nakabeppu et al., 1993; Tahara et al., 2003)。 △FosB は転写活性化因子もしくは転 写抑制因子として作用するが、Δ2ΔFosB にはそのような作用は無いと考えられてい る(McClung and Nestler, 2003; Renthal et al., 2008; Sabatakos et al., 2008)。

我々は、最近 fosB 欠損マウス がロコモーションの低下、強制水泳テスト での不動の増加、不安様反応の増加のようなうつ様行動を示すことを明らかにした (Ohnishi et al., 2011)。興味深いことに、 Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB タンパク質のみをコ ードする fosB^d アレルを有する fosB^{d/d} マウスはうつ様行動を示さなかった。これ らのことから、 Δ FosB/ $\Delta 2\Delta$ FosB がうつ様行動の発現を部分的に押さえていると考 えられた。更に、一過性の前脳虚血後のラット脳の、側脳室下帯や海馬歯状回 (dentate gyrus, DG)の顆粒細胞下層 (subgranular zone, SGZ) に存在する神経前駆細 胞で、 Δ FosB とそれよりも弱い FosB の発現が誘導されることを発見した。更に、 アデノウイルスベクターを用いて Δ FosB とそれより弱い FosB を強制発現させ ると、神経幹細胞の増殖が促進された。一方、ラットの胎生期皮質培養細胞で FosB と Δ FosB の発現を抑制すると、神経細胞に分化した (Kurushima et al., 2005)。

我々はこれらの発見に基づき、fosB 産物である FosB、ΔFosB、Δ2ΔFosB

が、成体海馬の basal レベル及び傷害によって誘導される神経新生を促進し、うつ やてんかんに関与しているという仮説を立てた。この仮説を検証するために、我々 は fosB 完全欠損マウスと fosB^{d/d} マウスの海馬歯状回 (DG) における神経新生、 神経病理、行動を解析した。その結果、fosB 完全欠損マウスが神経新生の異常とて んかんの自然発症とうつ様行動を示すが、fosB^{d/d} マウスはこれらを示さないことを 明らかにした。

材料と方法

動物

 Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB はコードするが、FosB はコードしない変異型 fosB^d アレルを 持つ fosB^{+/d} マウスと、欠損変異アレル fosB^G を持つ fosB^{+/G} マウスを確立した。 ヘテロ変異 (fosB^{+/d} 及び fosB^{+/G}) マウスを C57BL/6J (Clea Japan Inc, Tokyo, Japan) オスマウスにバッククロスし、更に 1 回以上 C57BL/6J メスマウスにも かけあわせて種を維持した(Ohnishi et al., 2011)。fosB^{d/d} と fosB 完全欠損 (fosB^{G/G}) のホモ変異マウスを得るために、fosB^{+/d} (N17 世代) もしくは fosB^{+/G} (N12 世代) のマウスをそれぞれ同種間で交配した。ホモ変異型 fosB^{d/d} マウス及 び fosB 完全欠損 (fosB^{G/G}) マウスラインは同系交配によって維持した。3世代目と 4世代目を実験に用いた。全ての実験で、C57BL/6J マウスを野生型コントロールと して用いた。変異型アレルのジェノタイピングと動物の飼育環境については補足実 験法に記載した。

カイニン酸処理

8 週齢から 10 週齢のオスマウスを実験に用いた。マウスに生理食塩水(未処理コ ントロール) もしくは 25 mg/kg の カイニン酸 (Wako, Osaka, Japan) を 腹腔内投与した。 その後、1 日 2 回、3 日間、 50 mg/kg BrdU (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) を腹腔内投与した。てんかん性けいれんの強度を定量するた め、カイニン酸投与後 2 時間、マウスを観察し、前述のクライテリア(Kajitani et al., 2006)に従って、けいれん発作を点数化した(補足の実験法)。

抗体

本実験で用いた全ての抗体については、補足の実験法に記載した。

組織処理法及び免疫組織化学

脳組織からクリオスタットにて 40 μm の厚さの連続冠状断の脳切片を作製し、 PBS 中に浮遊切片として回収した。組織処理法及び免疫組織化学の詳細な方法は補 足の実験法に記載した。

ウェスタンブロッティング

核抽出物を調製し、ウェスタンブロッティングに用いた(補足の実験法)。

レーザー走査共焦点顕微鏡

浮遊切片を、補足実験法に記載したように、顕微鏡による免疫蛍光の解析に用いた。 共 焦 点 画 像 は LSM510 META Confocal Microscope System (Carl Zeiss Microimaging Japan, Tokyo, Japan)を用いて取得した。各実験動物の全ての切片は 比較のため、並行して処理を行った。

自然発症てんかんの観察

毎週1回のケージ交換の間の約20-30分間、マウスの行動的なけいれん発作を観察し、以前報告されている方法で点数化した(Kajitani et al., 2006)。ステージ1-2の発作は正常な行動との区別が難しかったため、ステージ3-5の発作のみをけいれん履歴として記録した。

マイクロアレイハイブリダイゼーションとデータ解析

野生型マウス、*fosB^{d/d}* マウス、 *fosB* 完全欠損マウスの海馬由来 total RNA は ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) と RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いて調製した。DNA マイクロアレイ実験のために、total RNA (100 ng) を、 poly-A コントロールに加えて、WT Expression Kit (Ambion, Austin, TX, USA) で処 理した。cDNA を WT terminal labeling kit (Affymetrix Japan, Tokyo, Japan) で標識 し、GeneChip Mouse Gene 1.0 ST array (Affymetrix)にハイブリダイズした。発現 したプローブの結果のリストを GeneSpring GX 10.0 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) に取り込んで解析した。本論文で検討したマイクロアレイデータは NCBI's Gene Expression Omnibus に保管しており、GEO Series accession number, GSE37056 を通じてアクセスできる。

リアルタイム RT-PCR 解析

Total RNA は ISOGEN を用いて、マウスの海馬から調製した。一本鎖 cDNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan) を用いて、取扱説明書に従って合成した。*Vgf、Smad3、Galanin、Trh、* and *Sema3e* mRNA の定量的リアルタイム RT-PCR のために、補足の材料と方法に記載した通りに反応を行った。

統計解析

ステレオロジーを用いたカウントは分散分析による比較、線形最小二乗モデル当て はめによる検証後、Tukey's honestly significant difference (HSD) 検定により比較し た。マイクロアレイデータは、対応のない t 検定もしくは二元配置分散分析により 比較した。P 値は false discovery のために Benjamini-Hochberg 方法(Benjamini and Hochberg, 1995)を用いて調整した。その他のデータは Kaplan–Meier 法とログ ランク検定、もしくはフィッシャーの正確確率検定を用いて比較した。 p 値 0.05 未満を統計的に有意と判断した。マイクロアレイ解析のデータ以外は、全ての統計 解析を JMP 9.02 software (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いて行った。 カイニン酸投与は海馬歯状回の活性化神経前駆細胞、未成熟神経細胞、成熟神経細胞で fosB 産物の発現を誘導する

全ての fosB 産物 (FosB、 Δ FosB、 Δ 2 Δ FosB) を認識する抗 FosB (5G4)抗体を用い た海馬核抽出物のウェスタンブロッティング解析では、野生型マウスでのみ、全長 の FosB タンパク質を示す 43-kDa のポリペプチドを検出した。それぞれ Δ FosB と Δ 2 Δ FosB タンパク質を示す 32/36-kDa と 24-kDa のポリペプチドは、野生型マウス と fosB^{d/d}マウスで検出された(図 1a)。fosB 完全欠損マウスでは fosB タンパク質は 検出されなかった。

Basal レベルの Δ FosB と Δ 2 Δ FosB タンパク質は、野生型マウスと比較して fosB^{d/d}マウスでわずかに高かった。カイニン酸投与から6時間後には、野生型マウ スで FosB 発現が一過的に増加した。 Δ FosB と Δ 2 Δ FosB の発現レベルは、野生型マ ウス、fosB^{d/d}マウス共に、カイニン酸投与24時間以内は増加が安定していた(補 足図 1a)。

カイニン酸未処理の野生型マウス海馬における抗 FosB(N)抗体もしくは抗 FosB(5G4)抗体を用いた免疫組織化学では、大部分の海馬のニューロンで fosB 産物 の低密度な発現が検出された。fosB 産物のレベルはカイニン酸投与後に増加してい た(図 1b、補足図 1b)。野生型マウスでは、海馬の全ての小領域の中で、歯状回の顆 粒細胞における抗体反応性 (IR) が最も高く、カイニン酸投与6時間後に最も高か った (図 1b,補足図 1b-d)。同様の増加は fosB^{d/d} マウスの海馬でも見られ、カイニ ン酸投与後 6 時間から24 時間後の IR が高かった。fosB 完全欠損マウスの海馬で は、FosB(N)の抗体反応は検出されなかった(図 1b)。

野生型マウスの海馬における FosB とΔFosB/Δ2ΔFosB の発現を区別する 為に、3種類の異なる fosB 産物抗体である抗 FosB (5G4)抗体、抗 FosB (C)抗体、 抗ΔFosB 抗体を用いて、レーザー共焦点顕微鏡による免疫蛍光の解析(LSCIM) を行 った。抗 FosB (C)抗体と抗ΔFosB 抗体はそれぞれ FosB とΔFosB/Δ2ΔFosB を認識 する(図 1c)。抗 FosB(C)抗体反応性は、未処理の海馬ではかろうじて検出できる程 度に弱かったが、カイニン酸投与6時間後に、一過性に検出された。カイニン酸投 与 72 時間後には、抗 FosB (C)抗体反応性は basal レベルに戻っていた。逆に、抗 ΔFosB 抗体反応性は未処理の海馬の大部分の神経細胞で強く検出され、更にカイニ ン酸投与6時間から 72 時間後には、海馬の神経細胞で顕著に発現が増加した。更 に、カイニン酸投与6時間後の海馬歯状回の顆粒細胞層下層において、いくつかの 抗 FosB (C) 抗体反応陽性細胞及び抗ΔFosB 抗体反応陽性細胞が SOX2 陽性細胞で あることを発見した。このことから、FosB とΔFosB/Δ2ΔFosB が、神経前駆細胞に おいて一過性に誘導されていることが示唆された(Lugert et al., 2010)。

また、カイニン酸投与 72 時間後に、海馬全体の大部分の NeuN 陽性細胞 で、強い抗 FosB (5G4)抗体反応性が検出されたことから (補足図 2)、 増加した ΔFosB/Δ2ΔFosB の発現がカイニン酸投与後の大部分の海馬神経細胞で慢性的に維 持されていることが示唆された。カイニン酸投与後、歯状回の hilus において少数 の星形のグリア線維酸性タンパク質(GFAP) 陽性アストロサイトで検出されたが (補足図3中の矢頭、左パネル)、放射状の突起をGCL全体に広げて分子層の内側で 分枝する放射状グリア様GFAP 陽性細胞では検出されなかった。抗FosB (5G4)抗 体反応性は、SGZのKi67 陽性細胞では、カイニン酸未処理、処理後共に検出され なかった(補足図3、中パネル)。GCL に軸索様の突起を持つ doublecortin (DCX)陽 性細胞は未成熟な神経細胞であるが (Lugert et al., 2010)、その一部はカイニン酸投 与72時間後に比較的弱い抗FosB (5G4)抗体反応性を示した(補足図3中の矢印、右 パネル)。

以上の結果から、興奮毒性は海馬の成熟神経細胞と同様に、歯状回の SOX2 陽性/非増殖神経前駆細胞で、一過性に FosB 発現を誘導することを明らかにした。 更に、ΔFosB/Δ2ΔFosB の発現は、SOX2 陽性神経前駆細胞中では一過性に誘導さ れるが、海馬の成熟神経細胞や、歯状回の未成熟新生神経細胞では慢性的に誘導さ れることを明らかにした(補足図 4)。

fosB完全欠損マウスでは成体海馬における神経前駆細胞の増殖が低下し、異常な移動が増加する

fosB 産物が成体海馬における神経前駆細胞の増殖に影響を与えるか調べる為に、野 生型マウス、fosB^{d/d} マウス、fosB 完全欠損マウスに、カイニン酸または生理食塩 水投与後、1日2回、3日間 BrdU を投与した。脳切片は、その一日後に作製した (図 2a)。 BrdU 陽性細胞は、主に SGZ に分布していた(図 2b)。BrdU 陽性細胞が新 生神経細胞であることを確認する為に、抗 BrdU 抗体、抗 DCX 抗体、抗 NeuN 抗体 を用いた LSCIM を行った(図 2c, 補足図 5)。カイニン酸投与やジェノタイプとは無 関係に、歯状回の BrdU 陽性細胞の 70%以上が DCX と NeuN の両方を発現してい た(図 2d, e)。それ以外の BrdU 陽性細胞は DCX と NeuN のどちらか片方のみを発 現していた。従って、検出された歯状回の BrdU 陽性細胞(図 2b)の大部分が新生神 経細胞であることが示された。

次に、歯状回の BrdU 陽性細胞の密度をステレオロジーカウント法によっ て算出した(図 2f)。カイニン酸未処理のコントロール群の BrdU 陽性細胞密度は、 野生型マウスに比べて、fosB 完全欠損マウスで有意に減少していた(p = 0.0066, Tukey-Kramer HSD post hoc comparison)。一方、fosB^{d/d} マウスでは有意差は見ら れなかったものの、わずかに増加していた(図 2f、左)。3つのジェノタイプ全てに おいて、カイニン酸投与によりそれぞれのカイニン酸未処理コントロールに比べて、 BrdU 陽性細胞密度が有意に増加していた(野生型, p = 0.0006; fosB^{d/d}, p = 0.0006; fosB 完全欠損, p = 0.0015, t-test)。また、カイニン酸投与後の fosB 完全欠損マウス の BrdU 陽性細胞密度が、野生型マウスと比較して有意に低かった (p = 0.002, Tukey-Kramer HSD post hoc comparison) (図 2f、右)。

LSCIM によって hilus の BrdU 陽性細胞の大部分が、DCX と NeuN の両方 もしくはどちらか片方のみを発現している新生神経細胞であることが明らかになっ た(図 3a)。 hilus の BrdU 陽性細胞密度を比較したところ、カイニン酸未処理の fosB 完全欠損マウスでは、野生型マウスと fosB^{d/d} マウスよりも、BrdU 陽性細胞密度が わずかに高いことが明らかになった。カイニン酸投与後、fosB^{d/d} マウスと fosB 完 全欠損マウスの両方で BrdU 陽性細胞密度がわずかに増加したが、野生型マウスよりは少なかった (図 3b)。hilus の BrdU 陽性細胞の割合 (DG 全体の総 BrdU 陽性細胞から算出)は、カイニン酸投与の有無にかかわらず、fosB 完全欠損マウスで最も高く、fosB^{d/d}マウスで最も低かった。この結果から、fosB 完全欠損マウスの新生神経細胞では野生型マウスと比較して hilus への異常な移動が増加しているが、fosB^{d/d}マウスでは増加していないということが示唆された(図 3c)。

次に我々は、DG における新生神経細胞の生存について調べた。生理食塩 水を投与後、BrdU を1日2回、3日間、野生型マウスと fosB 完全欠損マウスに投 与した(補足図 6a)。DG の BrdU 陽性細胞密度を最後の BrdU 投与から1日後と70 日後に定量した。70 日後の BrdU 陽性細胞の生存に、有意差は見られなかった(野 生型: 19.47 ± 3.50%; fosB 完全欠損: 14.85 ± 0.66%) (補足図 6b)。どちらのマウス ラインにおいても、GCL/SGZ と hilus で検出された全ての BrdU 陽性細胞が NeuN 陽性であった(補足図 6c)。このことから、fosB 産物は新生神経細胞の生存と分化に 影響しないことが示唆された。

次に、我々はカイニン酸投与後の野生型マウス、fosB^{d/d} マウス、fosB 完 全欠損マウスにおける seizure score と海馬の傷害を比較した。カイニン酸投与後か ら2時間のけいれん発作反応、及びカイニン酸投与から6日目の海馬の傷害に有意 な差は見られなかった (補足図 7)。

fosB完全欠損マウスはてんかんを自然発症する

fosB 完全欠損マウスは、行動の静止や前肢のクローヌスを伴うけいれん発作を示した(データ示さず)。発作は 13 週齢から観察され、週齢を重ねる毎に未発症率は減少した。約 80%の fosB 完全欠損マウスが 80 週齢までにけいれん発作を示した(図 4a)。けいれん発作は側頭葉てんかんモデルとして広く用いられているカイニン酸誘発のけいれん発作に類似していた(Ben-Ari and Cossart, 2000)。野生型マウスと fosB^{d/d}マウスではけいれん発作は見られなかった。

fosB 完全欠損マウスにおけるてんかんの電気生理学的な変化を確認する 為に、50-70 週齢の野生型マウス、fosB^{d/d}マウス、fosB 完全欠損マウスを用いて脳 波を記録した(補足図 8, 図 4b)。野生型マウスと fosB^{d/d}マウスは全観察時間で baseline の低い振幅のみ示した(図 4b の上、中パネル)。一方、fosB 完全欠損マウ スは、海馬から始まるてんかん性放電が二次的に皮質へと広がる典型的なてんかん 脳波が自然発症している様子を電気生理学的に観察した (図 4b の下パネル)。自然 発症のてんかん脳波は、調べた fosB 完全欠損マウスのうちの 27.3%で確認された。 自然発症のてんかん発作は最大 47 秒まで持続した。記録した発作の大部分は海馬 から生じ、皮質に広がる全般強直間代性けいれんを伴う強い発作であった。以上か ら、fosB 完全欠損マウスは二次的な全般強間代性けいれんを伴う海馬由来のてんか ん発作を起こすと結論づけた。

fosB 完全欠損マウスでは、行動的な発作の有無にかかわらず、DG の GCL の層が薄いことや、海馬の細胞の配置が異常なため海馬構造が異常になるといった 特徴が見られた(図 4c)。野生型マウスと fosB^{d/d} マウスでは病理学的な異常は見ら れなかった。DG の parvalbumin 陽性介在神経細胞の密度を調べたところ、野生型

マウスに比べて fosB^{d/d}マウスと fosB 完全欠損マウスで有意差はないが、わずかに 減少していることを発見した(補足図 9)。以上のように、野生型マウスと fosB^{d/d} マ ウスの成体脳では自然発症のてんかん発作、てんかん脳波、異常な DG 構造が見ら れないことから、ΔFosB/Δ2ΔFosB のみの発現でも自然発症のてんかんを抑制する のに十分であることが示唆された。

fosB 産物は神経新生、うつ、移動、てんかんに関与する様々な遺伝子の発現を制御している

fosB の神経新生、うつ、てんかん制御を調べる為に、野生型マウス、fosB^{d/d} マウス、fosB 完全欠損マウスの遺伝子発現プロファイルを比較した。Total RNA を生理 食塩水またはカイニン酸投与後 24 時間の野生型、fosB^{d/d}、fosB 欠損マウスの海馬 から抽出し、マイクロアレイ解析に用いた。

63 遺伝子の発現レベルがカイニン酸未処理もしくは処理後の野生型マウスに比較して fosB 完全欠損マウスで有意に変化していた (補足表 1)。young マウスのコントロールグループでは、23 遺伝子が fosB^{d/d}マウスもしくは 野生型マウスと比較して fosB 完全欠損マウスで有意にダウンレギュレートされており、1 遺伝子が有意にアップレギュレートされていた。young マウスでのカイニン酸投与 24 時間後では、29 遺伝子が fosB^{d/d}マウスもしくは 野生型マウスと比較して fosB 完全欠損マウスで有意にダウンレギュレートされており、12 遺伝子が有意にアップレギュレートされていた。Aged の未処理マウスでは、2 遺伝子の発現が野生型マウスと比較して fosB 完全欠損マウスで有意に高かった。Vgf、Smad3、Gal、Trh、Sema3eの発現レベルは定量的 RT-PCR 解析で確認した (補足表 2、補足図 10)。

我々の実験結果から、fosB は特にカイニン酸投与後に、いくつかの遺伝子 の発現に対し異なる制御を行っていることが示唆された。その中の 10 遺伝子(Vgf、 Dlk1、Smad3、Gal、Trh、Islr2、Penk、Srxn1、Serinc2、Car12; 表 1)が後述のよ うに、神経新生、うつ、移動、てんかんに関与していることが報告されている遺伝 子だった。 これら 10 遺伝子のうち、Vgf、Gal、Trh、Penk、Srxn1、Smad3 は activator protein-1 (AP-1) 複合体によって制御されることが知られている。Vgf、Gal、 Trh、Penk、Srxn1 はプロモーター領域中に AP-1 部位を有しており、一方 SMAD3 は AP-1 複合体(FOS、JUN、JUNB)と相互作用して TGF-β シグナリングを制御す る(Zhang et al., 1998) (表 1) (補足図 11)。

fosB 完全欠損マウスは成体海馬の神経新生の異常、うつ様行動の増加、てんかんの自然発症を示す

本研究で、我々は fosB 完全欠損マウスが成体海馬における basal レベル及びカイニ ン酸誘発レベルの神経新生中に、神経前駆細胞の増殖の低下、新生ニューロンの異 常な移動の増加、成体期以降のてんかん自然発症、異常な海馬構造を示すことを明 らかにした。一方で、野生型マウスと比較して、fosB^{d/d}マウスの海馬では神経前駆 細胞の basal レベルの増殖は同程度で、カイニン酸誘発の増殖は減少しており、新 生神経細胞の異常な移動は減少していた。また、重要なことに、fosB^{d/d}マウスはて んかんの自然発症、てんかん脳波、異常な海馬構造を示さなかった。

本実験で、我々は fosB^{d/d} と fosB^{G/G} 変異(fosB 完全欠損)マウスの様々なフ エノタイプを、野生型とした C57BL/6J マウスのフェノタイプと比較した。変異マ ウスのラインは C57BL/6J マウスと 12 世代以上バッククロスした。しかし、それ でもなお、C57BL/6J マウスと変異マウスでは、7番染色体上の変異 fosB 遺伝子座 の近くに、かなりの量のアレルの違いが予想された(Flaherty and Bolivar, 2007)。自 然発症のてんかん、うつ様行動、海馬の成体神経新生の程度に関して、fosB 完全欠 損マウスは C57BL/6J マウスと fosB^{d/d} マウスと比較してかなり異なるフェノタイ プを示したが、C57BL/6J マウスと fosB^{d/d} マウスはむしろ類似したフェノタイプを 示した。また、これらのフェノタイプはバッククロスの世代を通じて維持された(N = 4 から N = 12 もしくは 17) (データ示さず)。7番染色体におけるアレルの違いが フェノタイプを変えている可能性は依然否定できないが、我々の結果は、今回報告 したフェノタイプが少なくとも部分的には fosB 遺伝子座によって決定されている ことを示している。

我々は以前、fosB 完全欠損マウスがうつ様行動を増加し、一方で FosB の 発現が減少し、ΔFosB とΔ2ΔFosB の発現が増加している fosB^{+/d}マウスでは抗うつ 様行動を示すことを発見した(Ohnishi et al., 2011)。これらのデータは fosB 産物の うち、特にΔFosB とΔ2ΔFosB が成体海馬の正常な神経新生を促進及び維持してい ることと、うつとてんかんの自然発症を抑制していることを示唆している。また、 以前の研究は、ECS を繰り返すと前頭前野皮質で fosB 産物の発現が誘導されるこ とと、ECS の繰り返しに対する耐性が fosB 完全欠損マウスでは有意に減弱するこ とを示している(Hiroi et al., 1998)。以上から、fosB 産物は脳の多様な領域において けいれん発作に対して多様な効果を持っていることが示唆された。

fosB は特定の遺伝子を制御して、正常な神経新生を維持し、てんかん自然発症を 抑制している

遺伝子発現プロファイルにより Vgf、Gal、Trh、Penk、Srxn1 の発現は FosB によって制御されており、また程度は弱いが Δ FosB/ Δ 2 Δ FosB によっても制御されている可能性が示された。これらの遺伝子のうち、Vgf と Gal は神経新生とけいれん発作に関与していることが報告されており(Abbosh et al., 2011; Mazarati et al., 2000;

Newton et al., 2003; Thakker-Varia et al., 2007)、それらの発現は FosB と ΔFosB/Δ2ΔFosB によってアップレギュレートされていると推測された(補足図 10)。 これらの結果は、fosB^{d/d}ではなく fosB 完全欠損マウスのみが神経新生の重度の低 下とてんかんの自然発症を示す理由を説明できるかもしれない(図 2f, 4)。

GABA 作動性の介在神経細胞はてんかんの抑制において重要な働きを担う ことがよく知られている(Perucca and Mula, 2012)。この実験で、我々は fosB^{d/d} マ ウスと fosB 完全欠損マウスの両方の DG で parvalbumin 陽性の介在神経細胞の密度 がわずかに減少しているにも関わらず(補足図 9)、fosB 完全欠損マウスのみがてん かんを自然発症することを発見した。しかしながら、カイニン酸投与後は、fosB 完 全欠損マウスで GABA の放出を促進する TRH(Deng et al., 2006)の mRNA の発現が 最も低く、一方カイニン酸未処理の状態では、fosB^{d/d} マウスで TRH mRNA の発現 が最も高いことが分かった(補足図 10)。このことも同様に、fosB 完全欠損マウスで てんかんが自然発症することに寄与しているかもしれない。注目すべきことに、炭 酸脱水酵素 12 をコードしている Car12 mRNA の発現レベルは aged の fosB 完全欠 損マウスでのみ 2 倍以上増加していた(表 1)。炭酸脱水酵素の阻害剤であるトピラ マート1 は広範囲に使用される抗てんかん薬である(Winum et al., 2009)。FosB と 同様に、ΔFosB とΔ2ΔFosB も Car12 の発現を抑制しており、このことがてんかん の抑制につながっていると推測された。

△FosB と△2△FosB は正常な成体海馬の構造を維持する

fosB 完全欠損マウスはてんかんのげっ歯類モデルやヒトのてんかん患者の脳で見 られる海馬の構造異常によく似た異常を示す (Fahrner et al., 2007)。fosB 完全欠損 マウスで、DG の GCL が波状もしくは層が薄いという異常が観察されたが、それら は海馬の神経新生の減少と新生神経細胞の移動異常によるものかもしれない。以前、 チロシンキナーゼ fyn の欠損マウスが類似した波状の層構造の DG を示し(Grant et al., 1992)、聴原発作に対する感受性が高いことが報告されている(Miyakawa et al., 1995)。fosB^{d/d}マウスはこれらの構造異常を示さないことから、ΔFosB とΔ2ΔFosB が存在すれば、DG の構造異常を抑制するのに十分であることが示唆された。

fosB が制御している 10 遺伝子のうち、ロイシンリピート2 を含むイムノ グロブリンスーパーファミリーをコードしている *Islr2* は、ヒトの神経細胞移動異常 のマウスモデルでダウンレギュレートされており、またてんかん患者では変異が報 告されている(Pramparo et al., 2011)。SMAD3 と DLK1 は細胞の移動に関与するこ とも報告されている(Wang and Symes, 2010; Yin et al., 2006)。我々は以前、マウ スの胚性幹細胞で、ΔFosB/Δ2ΔFosB が positive に、FosB が negative に、細胞基質 間接着と TGF-β1 シグナル経路を制御していることを報告した(Ohnishi et al., 2008)。 更に、成体マウスの線条体と海馬で、重要な細胞-細胞接着分子である E-カドヘリ ンが *fosB* 遺伝子の間接的なターゲットであることも明らかにしている(Ohnishi et al., 2011)。以上のことから、*fosB* 産物は間接的に細胞移動を制御しており、海馬の 構造の維持を制御していることが示唆された。

fosB は神経新生を促進する遺伝子の制御を通じて、うつ様行動を抑制しているか

もしれない

最近、成体で新生した海馬の顆粒細胞は、内分泌レベルと行動レベルの両方でスト レス活性を動的に制御していることが報告された(Snyder et al., 2011)。VGF と GAL は海馬の神経新生の促進あるいはその他の作用によって抗うつ作用を及ぼすと考え られている。Vgf はうつ病の動物モデルやヒトの双極性障害患者の死後脳でダウン レギュレートされている(Thakker-Varia et al., 2010; Thakker-Varia et al., 2007)。 GAL はヒトのうつ病患者で抗うつ作用を示すが(Murck et al., 2004)、その作用の一 部は、GAL が海馬の神経新生に直接作用してもたらされている可能性がある (Abbosh et al., 2011)。更に、海馬で TRH が誘導されると、同様に抗うつ作用をも たらす可能性が指摘されている(Sattin et al., 1994)。以上から、我々の今回の発見は fosB がこれらの遺伝子を通じてうつ様行動を抑制していることを示唆している(補 足図 11)。

fosB ターゲットはオートクライン/パラクラインの様式で作用している可能性がある

fosB 産物の発現はカイニン酸処理後に、海馬の成熟神経細胞、SOX2 陽性/GFAP 陰 性神経前駆細胞、未成熟神経細胞中で有意に増加していた。Ki67 陽性の増殖細胞は fosB 産物を発現していなかった。静止状態の神経芽細胞と胚性皮質細胞では、内在 性の FosB またはΔFosB の発現が増殖を誘導する(Kurushima et al., 2005; Nakabeppu et al., 1993)。従って、カイニン酸処理や虚血などの脳への刺激は、直 後に且つ一過性に神経幹細胞での fosB 発現を誘導し、それによって神経幹細胞自身 の増殖が刺激されるのではないかと推測される。

Table 1, 10 にリスト化された遺伝子は、Allen Institute for Brain Science に より提供されている *in situ* hybridization (ISH) images (http://mouse.brain-map.org/) で 確認できるように、海馬の神経細胞で発現している。VGF、TRH、GAL、PENK は 分泌性分子なので、*fosB* が発現している海馬の神経細胞自身で発現・機能している 可能性はあるが、同様にオートクラインパラクラインの様式で隣接した前駆細胞を 制御する作用もあるかもしれない。

結論

本実験では fosB 完全欠損マウスが、一遺伝子の欠損により、神経新生の異常を伴 うてんかんとうつを併発することから、てんかん患者における高頻度のうつ病併 発に対して遺伝学および分子生物学的な根拠を与える最初のマウスモデルである ことを示した。うつとてんかんは同様の遺伝子基盤を持つことが知られているので (Hesdorffer et al., 2012)、今後 fosB 遺伝子の変化とその発現がヒトのうつ病とてん かんに関与しているかどうか調べることが重要であろうと思われる。このような変 化を同定できれば、これらの複雑な疾患の診断と治療への洞察が得られるだろう。

謝辞

本研究の完遂のため御指導していただきました九州大学生体防御医学研究所脳機能 制御学分野、中別府雄作教授に深く感謝いたします。本研究に際し、共に実験を行 ってくださった九州大学生体防御医学研究所、脳機能制御学分野の梶谷康介博士、 能丸寛子氏、加藤木敦央氏、大西陽子氏、大西克典博士、作見邦彦准教授、及び九 州大学大学院医学研究院神経内科の鎌田崇嗣博士、高瀬敬一郎博士、重藤寛史講師 に深く感謝いたします。また、本研究に際し、免疫組織化学に関して有意義な助言 をしていただきました東北大学医学研究科、大隅典子教授と理化学研究所、松股美 穂博士には深く御礼申し上げます。本研究に関し有意義な助言を頂きました土本大 介助教、盛子敬特任助教、技術的補助をしていただきました北村節子氏、松山朱美 氏、中別府薫氏、麻川和美氏には厚く御礼申し上げます。本研究は文部科学省(研 究課題番号:18300124,22221004,23657116)及び九州大学グローバル COE プロ グラム(個体恒常性を担う細胞運命の決定とその破綻)からの助成金によって行わ れました。

引用文献

- 1. Abbosh C, Lawkowski A, Zaben M, Gray W. (2011). GalR2/3 mediates proliferative and trophic effects of galanin on postnatal hippocampal precursors. *J Neurochem* **117**, 425-436.
- Anouar Y, Lee HW, Eiden LE. (1999). Both inducible and constitutive activator protein-1-like transcription factors are used for transcriptional activation of the galanin gene by different first and second messenger pathways. *Mol Pharmacol* 56, 162-169.
- 3. Ben-Ari Y, Cossart R. (2000). Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* **23**, 580-587.
- 4. Benjamini Y, Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practica and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* **57**, 289-300.
- 5. Canu N, Possenti R, Rinaldi AM, Trani E, Levi A. (1997). Molecular cloning and characterization of the human VGF promoter region. *J Neurochem* **68**, 1390-1399.
- Chen J, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ. (1997). Chronic Fos-related antigens: stable variants of ∆FosB induced in brain by chronic treatments. *J Neurosci* 17, 4933-4941.
- Cote-Velez A, Perez-Martinez L, Diaz-Gallardo MY, Perez-Monter C, Carreon-Rodriguez A, Charli JL, Joseph-Bravo P. (2005). Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of *TRH* gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in *TRH* promoter. *J Mol Endocrinol* **34**, 177-197.
- 8. Danzer SC. (2012). Depression, stress, epilepsy and adult neurogenesis. *Exp Neurol* **233**, 22-32.
- 9. Deng PY, Porter JE, Shin HS, Lei S. (2006). Thyrotropin-releasing hormone increases GABA release in rat hippocampus. *J Physiol* **577**, 497-511.
- Fahrner A, Kann G, Flubacher A, Heinrich C, Freiman TM, Zentner J, Frotscher M, Haas CA. (2007). Granule cell dispersion is not accompanied by enhanced neurogenesis in temporal lobe epilepsy patients. *Exp Neurol* **203**, 320-332.
- Flaherty L, Bolivar V. (2007). Congenic and consomic strains. In: Jones, BC, Mormede, P (Eds.) *Neurobehavioral Genetics* (pp. pp. 115-127) New York, NY: Taylor & Francis.
- 12. Grant SG, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER. (1992). Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science* **258**, 1903-1910.
- 13. Halmi P, Parkkila S, Honkaniemi J. (2006). Expression of carbonic anhydrases II, IV, VII, VIII and XII in rat brain after kainic acid induced status epilepticus.

Neurochem Int **48**, 24-30.

- Hesdorffer DC, Caplan R, Berg AT. (2012). Familial clustering of epilepsy and behavioral disorders: Evidence for a shared genetic basis. *Epilepsia* 53, 301-307.
- Hiroi N, Marek GJ, Brown JR, Ye H, Saudou F, Vaidya VA, Duman RS, Greenberg ME, Nestler EJ. (1998). Essential role of the *fosB* gene in molecular, cellular, and behavioral actions of chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci* 18, 6952-6962.
- Hyman SE, Comb M, Lin YS, Pearlberg J, Green MR, Goodman HM. (1988). A common trans-acting factor is involved in transcriptional regulation of neurotransmitter genes by cyclic AMP. *Mol Cell Biol* 8, 4225-4233.
- 17. Inuzuka M, Hayakawa M, Ingi T. (2005). Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. *J Biol Chem* **280**, 35776-35783.
- Kajitani K, Yamaguchi H, Dan Y, Furuichi M, Kang D, Nakabeppu Y. (2006). MTH1, an oxidized purine nucleoside triphosphatase, suppresses the accumulation of oxidative damage of nucleic acids in the hippocampal microglia during kainate-induced excitotoxicity. *J Neurosci* 26, 1688-1698.
- Kurushima H, Ohno M, Miura T, Nakamura TY, Horie H, Kadoya T, Ooboshi H, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M, Nakabeppu Y. (2005). Selective induction of ∆FosB in the brain after transient forebrain ischemia accompanied by an increased expression of galectin-1, and the implication of ∆FosB and galectin-1 in neuroprotection and neurogenesis. *Cell Death Differ* **12**, 1078-1096.
- 20. Lason W, Przewlocka B, Van Luijtelaar G, Coenen A. (1994). Proenkephalin and prodynorphin mRNA level in brain of rats with absence epilepsy. *Neuropeptides* **27**, 343-347.
- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6, 445-456.
- 22. Mandelzys A, Gruda MA, Bravo R, Morgan JI. (1997). Absence of a persistently elevated 37 kDa *fos*-related antigen and AP-1-like DNA-binding activity in the brains of kainic acid-treated *fosB* null mice. *J Neurosci* **17**, 5407-5415.
- Mazarati AM, Hohmann JG, Bacon A, Liu H, Sankar R, Steiner RA, Wynick D, Wasterlain CG. (2000). Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin. *J Neurosci* 20, 6276-6281.
- 24. McClung CA, Nestler EJ. (2003). Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and ∆FosB. *Nat Neurosci* **6**, 1208-1215.
- Miyakawa T, Yagi T, Taniguchi M, Matsuura H, Tateishi K, Niki H. (1995). Enhanced susceptibility of audiogenic seizures in Fyn-kinase deficient mice. *Brain Res Mol Brain Res* 28, 349-352.

- 26. Morris TA, Jafari N, DeLorenzo RJ. (2000). Chronic ∆FosB expression and increased AP-1 transcription factor binding are associated with the long term plasticity changes in epilepsy. *Mol Brain Res* **79**, 138-149.
- 27. Murck H, Held K, Ziegenbein M, Kunzel H, Holsboer F, Steiger A. (2004). Intravenous administration of the neuropeptide galanin has fast antidepressant efficacy and affects the sleep EEG. *Psychoneuroendocrinology* **29**, 1205-1211.
- 28. Nakabeppu Y, Nathans D. (1991). A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell* **64**, 751-759.
- 29. Nakabeppu Y, Oda S, Sekiguchi M. (1993). Proliferative activation of quiescent Rat-1A cells by ∆FosB. *Mol Cell Biol* **13**, 4157-4166.
- Newton SS, Collier EF, Hunsberger J, Adams D, Terwilliger R, Selvanayagam E, Duman RS. (2003). Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors. *J Neurosci* 23, 10841-10851.
- Ogden CA, Rich ME, Schork NJ, Paulus MP, Geyer MA, Lohr JB, Kuczenski R, Niculescu AB. (2004). Candidate genes, pathways and mechanisms for bipolar (manic-depressive) and related disorders: an expanded convergent functional genomics approach. *Mol Psychiatry* 9, 1007-1029.
- 32. Ohnishi YN, Ohnishi YH, Hokama M, Nomaru H, Yamazaki K, Tominaga Y, Sakumi K, Nestler EJ, Nakabeppu Y. (2011). FosB is essential for the enhancement of stress tolerance and antagonizes locomotor sensitization by ΔFosB. *Biol Psychiatry* **70**, 487-495.
- Ohnishi YN, Sakumi K, Yamazaki K, Ohnishi YH, Miura T, Tominaga Y, Nakabeppu Y. (2008). Antagonistic regulation of cell-matrix adhesion by FosB and ΔFosB/Δ2ΔFosB encoded by alternatively spliced forms of *fosB* transcripts. *Mol Biol Cell* **19**, 4717-4729.
- 34. Perucca P, Mula M. (2012). Antiepileptic drug effects on mood and behavior: Molecular targets. *Epilepsy Behav*.
- 35. Pramparo T, Libiger O, Jain S, Li H, Youn YH, Hirotsune S, Schork NJ, Wynshaw-Boris A. (2011). Global developmental gene expression and pathway analysis of normal brain development and mouse models of human neuronal migration defects. *PLoS Genet* 7, e1001331.
- Renthal W, Carle TL, Maze I, Covington HE, 3rd, Truong HT, Alibhai I, Kumar A, Montgomery RL, Olson EN, Nestler EJ. (2008). ∆FosB mediates epigenetic desensitization of the *c-fos* gene after chronic amphetamine exposure. *J Neurosci* 28, 7344-7349.
- 37. Sabatakos G, Rowe GC, Kveiborg M, Wu M, Neff L, Chiusaroli R, Philbrick WM, Baron R. (2008). Doubly truncated FosB isoform (Δ2ΔFosB) induces osteosclerosis in transgenic mice and modulates expression and phosphorylation of Smads in osteoblasts independent of intrinsic AP-1 activity. *J Bone Miner Res* 23, 584-595.
- 38. Sattin A, Pekary AE, Lloyd RL. (1994). TRH gene products are implicated in the

antidepressant mechanisms of seizures. Ann N Y Acad Sci 739, 135-153.

- 39. Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* **476**, 458-461.
- Soriano FX, Leveille F, Papadia S, Higgins LG, Varley J, Baxter P, Hayes JD, Hardingham GE. (2008). Induction of sulfiredoxin expression and reduction of peroxiredoxin hyperoxidation by the neuroprotective Nrf2 activator 3H-1,2-dithiole-3-thione. *J Neurochem* **107**, 533-543.
- Surmacz B, Noisa P, Risner-Janiczek JR, Hui K, Ungless M, Cui W, Li M. (2011). DLK1 Promotes Neurogenesis of Human and Mouse Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitors Via Modulating Notch and BMP Signalling. *Stem Cell Rev.*
- 42. Tahara K, Tsuchimoto D, Tominaga Y, Asoh S, Ohta S, Kitagawa M, Horie H, Kadoya T, Nakabeppu Y. (2003). △FosB, but not FosB, induces delayed apoptosis independent of cell proliferation in the Rat1a embryo cell line. *Cell Death Differ* **10**, 496-507.
- 43. Thakker-Varia S, Jean YY, Parikh P, Sizer CF, Jernstedt Ayer J, Parikh A, Hyde TM, Buyske S, Alder J. (2010). The neuropeptide VGF is reduced in human bipolar postmortem brain and contributes to some of the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci* **30**, 9368-9380.
- Thakker-Varia S, Krol JJ, Nettleton J, Bilimoria PM, Bangasser DA, Shors TJ, Black IB, Alder J. (2007). The neuropeptide VGF produces antidepressant-like behavioral effects and enhances proliferation in the hippocampus. *J Neurosci* 27, 12156-12167.
- Verrecchia F, Vindevoghel L, Lechleider RJ, Uitto J, Roberts AB, Mauviel A. (2001). Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF-β in a promoter-specific manner. *Oncogene* **20**, 3332-3340.
- Wang Y, Symes AJ. (2010). Smad3 deficiency reduces neurogenesis in adult mice. *J Mol Neurosci* 41, 383-396.
- 47. Wang YY, Smith P, Murphy M, Cook M. (2010). Global expression profiling in epileptogenesis: does it add to the confusion? *Brain Pathol* **20**, 1-16.
- 48. Winum JY, Poulsen SA, Supuran CT. (2009). Therapeutic applications of glycosidic carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev* **29**, 419-435.
- Yin D, Xie D, Sakajiri S, Miller CW, Zhu H, Popoviciu ML, Said JW, Black KL, Koeffler HP. (2006). DLK1: increased expression in gliomas and associated with oncogenic activities. *Oncogene* 25, 1852-1861.
- 50. Zhang Y, Feng XH, Derynck R. (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-β-induced transcription. *Nature* **394**, 909-913.

図表及び説明

図 1. 野生型、*fosB* 完全欠損、*fosB*^{t/d} マウスの成体海馬では、FosB・△FosB・△2△FosB の発現が異なる

(a)海馬核抽出物中の fosB 産物のウェスタンブロッティング。核抽出物 (1 レーン あたり 12.5 µg タンパク質) は生理食塩水(C)またはカイニン酸(6 h, 24 h)投与後の 海馬から調製し、抗 FosB (5G4)抗体を用いたウェスタンブロッティングに用いた (上パネル)。fosB 産物は以下の通りに強調した:太い黒矢頭(FosB), 白矢頭(ΔFosB), 細い黒矢頭(Δ2ΔFosB)。転写後の膜は Ponceau S 染色した(下パネル)。定量結果は 補足図 1a に示した。(b)カイニン酸投与後 0 h (control), 6 h, 24 h の野生型マウス、 fosBd/d マウス、fosB 完全欠損マウスの海馬における、fosB 産物の免疫組織化学結 果。抗 FosB (N) 抗体を fosB 産物 (FosB、 Δ FosB、 Δ 2 Δ FosB)検出のために用いた。 スケールバー: 500 µm。(c) カイニン酸投与後 0 h (control)、6 h、72h の野生型マウ スの DG における、レーザー共焦点顕微鏡による fosB 産物免疫蛍光の解析。fosB 産物の検出(赤)のために、3種類の異なる fosB 産物抗体として抗 FosB (5G4)抗 体、抗 FosB (C)抗体、抗∆FosB 抗体を用いた。神経前駆細胞マーカーの SOX2 タ ンパク質(緑)は主に DG の SGZ で検出された。矢印は fosB 産物と SOX2 の両方を 発現している細胞を示す。 細胞全体の Orthogonal projections 画像を示した。スケ ールバー: 50 µm。SOX2 陽性細胞集団中の抗 FosB 抗体陽性細胞の割合を括弧内に SEM と共に示した。各動物中に(N=3)、100 個以上の SOX2 陽性細胞-positive cells が観察された。*p = 0.0421 (カイニン酸投与後 6h 後のΔFosB 抗体反応陽性細胞集 団に対する抗 FosB (C)抗体反応性, Fisher's exact test).

図 2. fosB完全欠損マウスは成体海馬の神経前駆細胞の増殖が basal レベル及びカ イニン酸誘導後共に減少する

(a) 実験デザイン。マウスに生理食塩水(control)またはカイニン酸投与後3日間、1 日2回 BrdU を投与した。 脳切片は6日目に調製し、BrdU 陽性細胞を検出した。 (b) 野生型(control)、fosB^{d/d}、fosB 欠損マウスの成体 DG における BrdU 免疫組織化 学。スケールバー: 200 µm。(c) レーザー共焦点顕微鏡による神経系譜マーカーDCX (緑)と NeuN (青)、及び BrdU (赤) の免疫蛍光の解析。スケールバー: 50 µm。(d) DG の BrdU 陽性細胞のフェノタイプ。三重ラベル細胞 (白色の矢頭で示した BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁺)と二重ラベル細胞 (マゼンタ色の矢頭で示した BrdU⁺/NeuN⁺) を示すために細胞全体の Orthogonal projection 画像を示した。BrdU⁺のみでラベル された細胞、もしくは BrdU⁺/DCX⁺二重ラベルされた細胞はこのパネルの中では見 つからなかった。スケールバー: 50 µm。(e) fosB 産物は新生神経細胞の分化に影響 しない。BrdU 陽性細胞のフェノタイプを決定する為に、各グループから2 匹ずつ、 各動物の免疫染色切片から 100 個ずつの BrdU 陽性細胞を解析した。全てのジェノ タイプで、BrdU 陽性細胞の大部分が DCX と NeuN の両方もしくはどちらか片方を 発現していた。棒グラフは BrdU⁺/DCX⁻/NeuN⁻ (黒色), BrdU⁺/DCX⁻/NeuN⁺ (灰色), BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁻ (斜線) and BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁺ (白色)細胞の割合を示している。 (f) DG の BrdU 陽性細胞密度を定量した。各グループ N = 5; エラーバー, 平均値 ± SEM; 黒色の棒グラフ, 野生型; 灰色の棒グラフ, *fosB^{d/d}*; 白色の棒グラフ, *fosB* 完 全欠損。One-way ANOVA (control, $F_{2,12}$ = 9.56, *p* = 0.0033; KA, $F_{2,12}$ = 10.08, *p* = 0.0027)。*P* 値(Tukey–Kramer HSD post hoc comparison)を示した。

図3. 成体 fosB完全欠損マウスでは海馬の神経前駆細胞の異常な移動が増加する 図2aに示すように、マウスに生理食塩水(control)もしくはカイニン酸投与後3日間、 1日2回 BrdU を投与した。6日目に脳切片を調製し、BrdU 陽性細胞を検出した。 (a) fosB^{G/G}マウスの hilus における BrdU(赤)、DCX(緑)、NeuN(青)の免疫蛍光 の共焦点顕微鏡による解析。矢頭は異所性の神経芽細胞または未成熟な神経細胞 (BrdU+/DCX+/NeuN+)を示している。細胞全体の orthogonal projections 画像を示し た。スケールバー: 50 µm. (b) hilus における BrdU 陽性細胞の密度。各グループ N = 5; エラーバー,平均値 ± SEM; 黒色の棒グラフ,野生型; 灰色の棒グラフ, fosB^{d/d}; 白色の棒グラフ, fosB 完全欠損。One-way ANOVA (control: F_{2,12} = 2.53, p = 0.121; KA: F_{2,12} = 8.58, p = 0.0049). P 値(Tukey–Kramer HSD post hoc comparison) を示 した。(c) DG 全体の BrdU 陽性細胞総数から算出した hilus に存在する BrdU 陽性細 胞の割合。各グループ N = 5; error bars,平均値 ± SEM; 黒色の棒グラフ, fosB^{d/d}; 白色の棒グラフ, fosB^{d/d}; 白色の棒グラフ, fosB完全欠損。One-way ANOVA (control: F_{2,12} = 14.53, p = 0.0006; KA: F_{2,12} = 20.17, p = 0.0001). P 値(Tukey–Kramer HSD post hoc comparison)を示した。

図 4. Aged の fosB 完全欠損マウスは、海馬に焦点を持つてんかん性放電脳波と異常な DG 構造を示す

(a) 自然発症てんかんの未発症率。野生型マウスと $fosB^{d/d}$ マウス, N = 10; fosB 完 全欠損マウス, N = 40. *p < 0.0001, Kaplan–Meier method and log-rank test (χ^2 = 40.94, df = 2)。(b) 50-70 週齢の野生型マウス(上パネル), $fosB^{d/d}$ マウス(中パネル) と fosB完全欠損マウス(下パネル) の、同時に測定した海馬と皮質の脳波。Lt cortex, 左皮質; Rt cortex, 右皮質; Lt hipp,左海馬; Rt hipp, 右海馬。 各グループ N = 5。 スケールバー: X 軸, 4 秒; Y 軸, 0.5 mV。(c) 野生型, $fosB^{d/d}$, fosB 完全欠損マウスの Nissl 染色した海馬の冠状断切片。fosB 完全欠損マウスでは、けいれん発作の有無 にかかわらず、特徴的な異常な細胞配置 (矢頭)と GCL の薄層化(双方向矢印) が観 察された。Seizure–,けいれん発作の履歴無し; Seizure+, けいれん発作の履歴有り。 スケールバー: 500 µm。 図 1



(0±0%)

(0±0%)

(0±0%)

図2









b

wild-type	
Lt cortex	
Rt cortex	
Lthipp	
Rt hipp	

fosBaid

		 	_
Rt cortex		 	
Lt hipp		 	
Rt hipp	-	 	

fosB-null (seizure +)

LI COMEX	
Rt cortes	MIN AN AN
	halad have a literate
Lt hipp	Shirt have been
	المناقل المنفقة المالي ومنها المناسب
Rt hipp	and the state of the second
	in the second
	A second second fragment fragment



表1. fosB産物によって制御される神経新生、うつ、てんかんの候補遺伝子

				Fold	change					Literature [#]		
Symbol	Gene name	Untreated		24 h after KA			FCS		Doproceion	Epilepsy or		
		null/wt	dd/wt	null/dd	null/wt	dd/wt	null/dd	AP-1	ECS	neurogenesis	Depression	seizures
Young												
Vgf	VGF nerve growth factor inducible			-1.29	-1.42		-1.23	(Canu et al., 1997)	↑ (Wang et al., 2010)	(Thakker-Varia et al., 2007)	(Thakker-Vari a et al., 2007)	(Newton et al., 2003)
Dlk1	delta-like 1 homolog (Drosophila)	-1.22								(Surmacz et al., 2011)		
Smad3	MAD homolog 3 (Drosophila)				-1.67			(Verrecchia et al., 2001)		(Wang and Symes, 2010)		
Gal	galanin prepropeptide				-2.30*	-1.86	-1.24	(Anouar et al., 1999)	↑ (Wang et al., 2010)	(Abbosh et al., 2011)	(Abbosh et al., 2011)	(Mazarati et al., 2000)
Trh	thyrotropin-releasing hormone				-3.26*	-2.50*	-1.30	(Cote-Velez et al., 2005)	↑ (Wang et al., 2010)		(Sattin et al., 1994)	(Deng et al., 2006)
Islr2	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat 2				-1.33							(Pramparo et al., 2011)
Penk	preproenkephalin 1				-2.17*	-1.51	-1.44	(Hyman et al., 1988)			(Ogden et al., 2004)	(Lason et al., 1994)
Srxn1	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)			-1.21				(Soriano et al., 2008)				(Soriano et al., 2008)
Serinc2	serine incorporator 2						-1.38					(Inuzuka et al., 2005)
aged												
Ca12	carbonic anhydrase XII	2.21			ND	ND	ND					(Halmi et al., 2006; Winum et al., 2009)

fosB 完全欠損マウスの海馬で変化していた 63 遺伝子のうち、10 遺伝子が神経新生、うつ、てんかんに関与する遺伝子だった。 倍率変化(null/wt, fosB 完全欠損対野生型; dd/wt, fosB^{dd} 対野生型; null/dd, fosB 完全欠損対 fosB^{dd}). 太字は倍率変化が 1.2 より大きい、もしくは-1.2 より小さく、且つ unpaired t-test で p 値が 0.05 未満のものを示している。アスタリスク付きの数字は倍率変化が 2.0 より大きい、もしくは-2.0 より小さく、且つ ANOVA でp値が 0.05 未満のものを示している。P値の計算; Asymptotic Multiple Testing Correction; Benjamini Hochberg FDR (Benjamini and Hochberg, 1995). #文献のカラムは以下のカテゴリーに対する以前のエビデンスを示している。AP-1: プロモーター領域中の AP-1 部位の存在もしくは AP-1 転写因子との相互作用の報告(+); ECS:ECS によってアップレギュレートされるエビデンス (↑); NG: 神経新生への関与; DP: うつへの関与; E/S: けいれん発作が 関与する制御もしくはてんかんが関与する制御. ND, 解析を行っていない。

補足実験法

実験動物の飼育環境

全ての動物は空調設備下、光照射時間制御下、特定病原体無しの状態で維持した。 全ての動物の取り扱いは国際ガイドラインを遵守し、九州大学動物実験委員会の承認を得て行った。

fosb 及び fosb のジェノタイピング

fosB^Gアレルのジェノタイピングは LGFFB-1 (5'-CTCGTTTAGGACACAGG CACAGT-3') プライマーと FBEX2U (5'-ACGGTCACCGCAATCACAAC-3') プライ マーを用いた genomic polymerase chain reaction (PCR) で行った。fosB^d アレルの ジェノタイピングは UIP (5'-CAATGCCCCCTTCTGCCCTTTA-3') プライマーと LIP (5'-TGCTACTTGTGCCTCGGTTTCC-3') プライマーを用いた genomic PCR で行い、導入された変異を既に報告されている方法に従って (Ohnishi et al., 2008) 、 genomic PCR 産物の DNA 配列決定により確認した。

Seizure scoring

てんかん様発作の程度を比較するため、カイニン酸投与後 2 時間観察し、既に報告されている以下の基準に従って (Kajitani et al., 2006)、発作を点数化し記録した。 0, no reaction; 1, arret of motion; 2, myoclonic jerks of the head and neck, with brief twitching movements; 3, unilateral clonic activity; 4, bilateral forelimb tonic and cloinic activity; 5, generalized tonic-clonic activity with loss of postural tone including death from continuous convulsion。最後の BrdU 投与から 1 日後に、マウスを殺 処理した。

抗体

ウサギ抗 FosB (N) 抗体は fosB 産物の N 末端 79-130 アミノ酸を認識するため、 fosB 産物全て (FosB, Δ FosB and $\Delta 2\Delta$ FosB) を認識する(Nakabeppu and Nathans, 1991)。ウサギ抗 FosB (C) 抗体は FosB の C 末端 245-315 アミノ酸に対して作 製しているため、 Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB は認識せず、FosB のみ認識する(Nakabeppu and Nathans, 1991)。FosB は認識せず Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB のみ認識するウサギ抗 Δ FosB ポリクローナル抗体 (#9890, 1:100) と、fosB 産物全て(FosB, Δ FosB and $\Delta 2\Delta$ FosB) を認識するウサギ抗 FosB モノクローナル抗体 (5G4) (1:1000 for western blotting; 1:500 for immunohistochemistry) は、Cell Signaling Technology Japan KK (Tokyo, Japan)より購入した。マウス抗 BrdU モノクローナル抗体 (1170376, 1:800) は、Roche Diagnostics Japan (Tokyo, Japan) より購入した。ラ ット抗 BrdU モノクローナル抗体 (ab6326, 1:1000) は、Abcam KK (Tokyo, Japan) より購入した。アストロサイトと神経幹細胞のマーカーである GFAP を認識するマ ウス抗 GFAP モノクローナル抗体 (G3893, 1:1500) は Sigma-Aldrich Japan KK (Tokyo, Japan) より購入した。成熟神経細胞のマーカーである NeuN を認識する マウス抗 NeuN 抗体 (MAB377, 1:400) は、Chemicon (Temecula, CA, USA) より 購入した。神経前駆細胞のマーカーである SOX2 を認識するヤギ抗 SOX2 抗体 (Y-17, sc-17320, 1:500) と、神経前駆細胞と未成熟な神経細胞のマーカーである DCX (Lugert et al., 2010)を認識するヤギ抗 DCX 抗体 (sc-8066, 1:100)は、Santa Cruz Technology (Santa Cruz, USA) より購入した。 Alexa 蛍光ラベル二次抗体は Invitrogen Japan (Tokyo, Japan) より購入した。ウサギ抗 Ki67 ポリクローナル抗 体 (NCL-Ki67p) は Leica Microsystems (Tokyo Japan) から購入した。介在神経細胞のマーカーである parvalbumin を認識するマウス抗 parvalbumin 抗体 (MAB1572, 1:5000) は、Millipore (Temecula, CA, USA) より購入した。

組織処理法及び免疫組織化学

マウスはペントバルビタール(100 mg/kg 腹腔内投与)により深麻酔し、生理食塩水 を心臓から灌流後、0.1M PBS に調整した 4% パラフォルムアルデヒド(PFA)によ り灌流固定した。摘出した脳は 4℃にて 4% PFA 中で 12 時間固定した後、凍結保 護のために 20%及び 30%スクロース溶液に 4℃にて 48 時間浸漬した。脳は凍結後、 使用するまで-80℃に保存した。クリオスタットにて 40 μ m の厚さの連続冠状断の 脳切片を作製し、PBS 中に浮遊切片として回収し、既に報告されている方法に従っ て (Kajitani et al., 2000)、免疫組織化学(IHC)を行った。デジタル画像は AxioCam CCD カメラを装備した Axioskop2 Plus 顕微鏡 (Carl Zeiss Microimaging Japan, Tokyo, Japan)を用いて取得した。

ウェスタンブロッティング

マウス脳より単離した海馬を、氷冷した 1 ml の溶解バッファー(10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.32 M sucrose、protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を添加)に懸濁後、4°C にてポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。細胞溶解 液を 1000 × g で 10 分間遠心分離後、沈殿物を 1 ml の抽出溶液(10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.32 M sucrose、1 mM EDTA-NaOH (pH 8.0)、1 mM EGTA-NaOH (pH 8.0)、5 mM DTT、protease inhibitor cocktail、0.5% NP-40) に懸濁した。氷上で 5 分間 静置後、1,000×g で 10 分間遠心分離した。沈殿物を 120 μ l の抽出バッファー(50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10% glycerol、400 mM NaCl、1 mM EDTA-NaOH (pH 8.0)、1 mM EGTA-NaOH (pH 8.0)、5 mM DTT、0.5% NP-40、protease inhibitor cocktail) に溶解し、氷上に 30 分静置後、17,500 × g で 7 分間遠心分離した。回収した上 清を海馬核抽出物として使用した。核抽出物を SDS-PAGE (12.5%) で泳動分離し、抗 FosB 抗体を用いて既述 (Kajitani et al., 2000, Nakabeppu et al., 1993; Ohnishi et al., 2011) の方法に従いウェスタンブロッティングをおこなった。各タンパク質 量は Image J 1.46r (National Institute of Health, MD, USA)によって定量した。

レーザー走査共焦点顕微鏡

適切な一次抗体と Alexa 蛍光ラベル二次抗体と反応させた浮遊切片を 0.05 μg/ml の DAPI (Sigma-Aldrich Japan KK)を含む溶液で 10 分間室温にて反応させ、 Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)でスライドグラス上にマウ ントした。共焦点画像は LSM510 META Confocal Microscope System (Carl Zeiss Microimaging Japan)を用いて取得した。比較実験の切片は、全て同時に処理した。

免疫組織化学における免疫反応性の定量

グレースケールの画像を Adobe Photoshop CS5 (Adobe System, San Jose, CA, USA)を用いて反転し、Imaje J 1.46r を用いて、示した領域の抗体反応性の強度を定量した。

Unbiased stereological counting 法を用いた BrdU 陽性細胞と parvalbumin 陽性 細胞のカウント

カイニン酸投与後の海馬の増殖細胞を標識するために、マウスに1日2回、3日間、 50 mg/kgの BrdU を投与し、最後の BrdU 投与の1日後に殺処理した(Tashiro et al., 2007)。

浮遊切片を 50% ホルムアルデヒドを含む 2×SSC 中で 65°Cで 2 時間インキュベートした。切片を PBS-T (0.3% TRIRON X-100 を含む PBS)で洗浄し、H₂O に 10 分間浸漬した。次に切片を 2M HCI で室温 30 分間処理し、BrdU 抗体を用いて免疫染色した。歯状回の GCL 及び hilus の BrdU 陽性細胞の数を、1 動物個体から 8 - 9 枚の両側海馬冠状断切片を 240 μ m おきに(bregma-1.35 ~ -3.51 mm) (Franklin and Paxions, 1997)、半自動的ステレオロジーシステム(Stereo Investigator, MBF Bioscience, Williston, VT)の fractionator program を用いて定量した。軸の距離 60-125- μ m ごとに、カウント基準に合う細胞を optical dissector の原理に従ってカウントした(Kempermann et al., 1998)。対応する体積も同様に定量した。GCL または hilus の体積は、切片サンプル間の距離と各切片のトレースした領域の合計によって定量した。

Aged マウスの DG における、parvalbumin 陽性の介在神経細胞数をカウン トするために、浮遊切片を抗 parvalbumin 抗体を用いた免疫組織化学法で処理し、 上で述べた unbiased ステレオロジーにより解析した。対応する DG の体積も定量 した。

自然発症けいれん発作の脳波(EEG)記録

脳波 (EEG) 記録を用いて自然発症の電気的な発作を記録する為に、マウスを以下 のグループに分けた: 臨床的な発作が観察された fosB 完全欠損マウス(N=11); 臨床 的な発作が観察されなかった fosB 完全欠損マウス(N=6); fosB^{d/d}マウス(N=6) と野 生型マウス(N=6)。脳波モニタリングの為の電極は、マウスの両側の大脳皮質と海 馬に設置した。プロトコールは 3 グループ全てで独立して行った。ペントバルビ タール (50 mg/kg、腹腔内投与)で深麻酔後、動物を定位固定の枠に固定し、頭皮を 切って、頭蓋を露出した。ステンレススチールの頭蓋ねじ (長さ 3 mm、直径 1.4 mm)を、左前外側の位置 (bregma に対し 1 mm 前側、正中線から 2 mm 左)と右 前外側の位置 (bregma に対し 1 mm 前側、正中線から 2 mm 右)に設置した。ね じったニクロムの針金で作製した深部記録電極 (直径 0.02 mm)を定位的に両側 海馬の CA1 領域に挿入した (bregma から 3 mm 後方、正中線から 3 mm 外側、 皮質表面から 3 mm 深部)。基準ねじは前頭骨に設置した。全ての電極は、8 チャ ネルの標準増幅器に連結した(MEG-6168; Nihon Kohden, Tokyo, Japan)。脳波記録 は マウス毎に 24 時間連続監視し、自然発症の電気的発作を調べた。皮質のスクリ ュー電極と海馬の深部電極によって記録された脳波は、PowerLab/8SP data acquisition system(AD Instruments, Bella Vista, Australia)とソフトウェア(NB75H; Fujitsu, Tokyo, Japan)によって回収し解析した。皮質と海馬からのてんかん性放電 は、明らかに高い増幅の棘波と徐波、もしくは多棘として特定した。電極の位置は 病理学的に確認した(補足図 5)。

リアルタイム RT-PCR 解析

Total RNA は ISOGEN を用いて、マウスの海馬から調製した。一本鎖 cDNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan)を用いて、取扱説明書に従って合成した。Vgf、Smad3、Galanin、Trh、Sema3e mRNA の定量的リアルタイム RT-PCR は、Thunderbird™ SYBR® Green qPCR MIX (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan)で、3段階の反応で行った。プライマー リストを補足 Table 3 に示す。発現レベルは Gapdh mRNA に対して標準化し、カ イニン酸未処理の野生型海馬における発現レベルに対して、各グループにおける Vgf、Smad3、Galanin、Trh、Sema3e、Trh、Sema3e mRNA の相対的なレベルを 算出した。

補足の引用文献

- 1. Franklin KBJ, Paxinos G (1997). *The mouse brain in stereotaxic coodinates.* San Diego: Academic Press.
- Kajitani K, Yamaguchi H, Dan Y, Furuichi M, Kang D, Nakabeppu Y (2006). MTH1, an oxidized purine nucleoside triphosphatase, suppresses the accumulation of oxidative damage of nucleic acids in the hippocampal microglia during kainate-induced excitotoxicity. *J Neurosci*, **26**: 1688-1698.
- 3. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*, **18**: 3206-3212.
- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, et al. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, 6: 445-456.
- 5. Nakabeppu Y, Nathans D (1991). A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell*, **64**: 751-759.
- Nakabeppu Y, Oda S, Sekiguchi M (1993). Proliferative activation of quiescent Rat-1A cells by ΔFosB. *Mol Cell Biol*, **13**: 4157-4166.
- Ohnishi YN, Ohnishi YH, Hokama M, Nomaru H, Yamazaki K, Tominaga Y, *et al.* (2011). FosB is essential for the enhancement of stress tolerance and antagonizes locomotor sensitization by ΔFosB. *Biol Psychiatry*, **70**: 487-495.
- Ohnishi YN, Sakumi K, Yamazaki K, Ohnishi YH, Miura T, Tominaga Y, *et al.* (2008). Antagonistic regulation of cell-matrix adhesion by FosB and ΔFosB/Δ2ΔFosB encoded by alternatively spliced forms of *fosB* transcripts. *Mol Biol Cell*, **19**: 4717-4729.
- Tashiro A, Makino H, Gage FH (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci*, **27**: 3252-3259.

補足の図表及び説明

補足図 1. fosB 産物の発現レベルの定量的な解析

(a)図 1a に示した海馬核抽出物中の抗 FosB(5G4)抗体を用いたウェスタンブロッ ティングで検出された FosB、 Δ FosB、 Δ 2 Δ FosB のバンドの定量。野生型マウス(0 h) 中の FosB バンドの強度に対する相対値を示した(N=3, 平均値±SEM)。黒い棒グラ フ,野生型;灰色の棒グラフ,fosB^{d/d};白い棒グラフ,fosB完全欠損。ジェノタイプ、 時間、時間とジェノタイプ間の相互作用の効果の P 値を示した(two-way ANOVA, FosB: F_{8.18} = 330.43, *p* < 0.0001; ∆FosB: F_{8.18} = 24.42, *p* < 0.0001; ∆□∆FosB: F_{8.18} = 16.49, p < 0.0001)。 同じ文字(A から D)でつながっていないものは有意に異なる(p < 0.05, Tukey-Kramer HSD post-hoc comparison)。 (b) カイニン酸投与後 0 h (control)、6 h、24 h の野生型、fosB^{d/d}、fosB 完全欠損マウスの成体海馬における fosB 産物の免疫組織化学。fosB 産物(FosB, ΔFosB, Δ2ΔFosB)検出の為に抗 FosB (5G4) 抗体を使用した。スケールバー: 500 µm。抗体反応性(IR)の強度の定量に用いた、 グレイスケールを反転した画像を示す。(c)海馬の様々な領域の抗 FosB(5G4)抗体反 応性の定量。抗体反応性の強度を測定した CA1、CA2 (CA1/CA2)、CA3、DG、hilus の領域を示す。(d) カイニン酸投与後の野生型海馬の様々な領域における fosB 産物 の発現。CA1/CA2、CA3、DG、hilus における抗 FosB(5G4) 抗体反応性の平均強 度を示した(N=4, 平均値 ±SEM)。時間、領域、時間と領域の相互作用の効果のP値 を示した(two-way ANOVA, F_{17,198} = 124.49, p < 0.0001)。同じ文字(A から F)でつな がっていないレベルは有意に異なる(p < 0.05, Tukey-Kramer HSD post-hoc comparison).

補足図 2. カイニン酸投与後の海馬の神経細胞における fosB 産物の発現

(a)カイニン酸投与後 72 時間の野生型海馬における NeuN 陽性成熟神経細胞中の fosB 産物発現。抗 FosB (5G4) (緑)抗体と抗 NeuN (赤)抗体を用いた。重ね合わせ画 像を示した。スケールバー: 50 μm。(b) カイニン酸投与後 72 時間の野生型マウス の CA1-3 領域の錐体細胞は fosB 産物を発現していた。抗 FosB 抗体(5G4) (緑)と 抗 NeuN 抗体(赤)を用いた。重ね合わせた orthogonal projection 画像を示した。ス ケールバー: 50 μm。

補足図 3. カイニン酸投与後の DG の未成熟神経細胞における fosB 産物の発現

抗 FosB (5G4) 抗体(赤)、抗 GFAP 抗体 (緑, 左パネル)、抗 Ki67 抗体(緑, 中央パネ ル)、抗 DCX 抗体(緑, 右パネル) を用いた。矢頭はカイニン酸投与後 6 時間と 72 時間に fosB 産物を発現している星形アストロサイトを示す。放射状の突起を GCL 全体に広げて、DG の分子層内部で分枝している放射状グリア様の GFAP 陽性細胞 は fosB 産物を発現していなかった。fosB 産物を発現している Ki67 陽性細胞は観察 されなかった。矢印はカイニン酸投与後 72 時間後に fosB 産物を発現していた、長 い突起を持った doublecortin(DCX)陽性の未成熟新生神経細胞を示す。軸索様の突起 を持たない DCX 陽性細胞は fosB 産物を発現していなかった。細胞全体の orthogonal projections 画像を示した。スケールバー: 50 µm。

補足図 4. カイニン酸投与後の DG の神経前駆細胞における fosB 産物の発現

カイニン酸投与後に FosB、ΔFosB/Δ2ΔFosB の両方が、活性化 SOX2 陽性細胞中で 一過性の発現が誘導されていた(Lugert et al., 2010)。静止期の GFAP 陽性神経幹/ 前駆細胞と、Ki67 陽性の増殖神経前駆細胞/神経芽細胞は fosB 産物を発現していな かった。カイニン酸投与後数日の DG 中の DCX 陽性の新生未成熟神経細胞は ΔFosB/Δ2ΔFosB を弱く発現していた。

補足図 5. DCX、NeuN、BrdU 免疫蛍光のレーザー走査共焦点顕微鏡による解析

マウスに生理食塩水(control)またはカイニン酸投与後に3日間、1日2回 BrdU を投 与し、脳切片を作製した。神経系マーカーDCX (緑)と NeuN (青)、及び BrdU (赤) の免疫蛍光をレーザー走査共焦点顕微鏡により取得した画像と、図 2c に示したそ れらの重ね合わせ画像をそれぞれ示している。スケールバー: 50 μm.

補足図 6. fosB 産物は新生神経細胞の生存には影響しない

(a) BrdU 投与後、1 日目と 70 日目の、野生型マウスと fosB 完全欠損マウスの DG における BrdU の免疫組織化学。スケールバー, 200 µm。(b) BrdU 投与後 70 日目の DG における BrdU 陽性細胞の生存率。DG の BrdU 陽性細胞密度をステレオロジー により定量した。70 日目の BrdU 陽性細胞の生存率は、野生型マウスと fosB 完全 欠損マウスで違いは見られなかった(Student *t*-test, *p*=0.7386)。エラーバー:平均値 ± SEM; 1 日目 N=5、70 日目 N=3。(c) BrdU 投与後 70 日目の野生型(上)と fosB 完 全欠損(下)マウスの DG における、BrdU (赤)と NeuN(緑)の免疫標識の重ね合わせ画 像。BrdU 投与後 70 日目の野生型と fosB 完全欠損マウスの DG における BrdU 陽性 細胞は顕著に減少していたが、生存していた BrdU 陽性細胞は NeuN 陽性の神経細胞に成熟していた。スケールバー: 50 µm。

補足図 7. カイニン酸投与後の fosB^{d/d}、fosB 完全欠損、野生型マウスのけいれん発作 反応

(a) Seizure score。カイニン酸投与(25 mg/kg,腹腔内投与)後の2時間、5分毎に、 材料と方法に記載した通りの方法でけいれん発作を観察し、各時間の平均値を SEM とともにプロットした。40 匹の野生型マウスを観察し、点数化したが、2 時間の観 察後に9 匹が死亡した。一方、各 20 匹の fosB^{d/d} と fosB 完全欠損マウスを観察、点 数化したところ、2 時間の観察後に、それぞれ 6 匹と2 匹が死亡した。白い丸,野 生型マウス;白い三角, fosB^{d/d}マウス;黒い四角, fosB 完全欠損マウス。3つのマウ スグループ間に有意な違いはなかった(ジェノタイプ, p=0.6145;時間, p<0.0001;相 互作用, *p*=0.0759, ordinal logistic fit, effect likelihood ratio tests)。(b) 野生型、*fosB^{d/d}*、 *fosB* 完全欠損マウスの海馬の Nissl 染色した冠状切片。カイニン酸投与後6日では、 全てのマウスラインで顕著な海馬の傷害は見られなかった。スケールバー, 500 μm。

補足図 8. 電極の設置場所の確認

電極は CA1-DG (a 中の矢印)と冠状縫合皮質(a 中の矢頭)に定位的に移植した。正し く移植されていることを記録後に確認した(b と c)。

補足図 9. 海馬の parvalbumin 陽性細胞の密度は、aged の野生型、fosB^{t/d}、fosB完 全欠損マウス間で、有意な変化は見られなかった

(a) parvalbumin 陽性介在神経細胞の免疫組織化学的検出。スケールバー: 200 μm. WT, 野生型, d/d, *fosB^{d/d}*, Null, *fosB* 完全欠損。(b) parvalbumin 陽性介在神経細胞の 密度を定量した。各グループ N=4;エラーバー, 平均± SEM; 黒色の棒グラフ, 野生 型; 灰色の棒グラフ, *fosB^{d/d}*; 白色の棒グラフ, *fosB* 完全欠損。NS, 有意差無し (one-way ANOVA, F_{2,9} = 1.69, *p* = 0.2389)。全ての *fosB*-null mice 完全欠損マウスは けいれん発作発症履歴を持っており(Figure 4a)、脳切片は 70 から 95 週齢の時点で 作製した。

補足図 10. 海馬における *Vgf、Smad3、Ga1、Trh、Sema3*発現の定量的 RT-PCR 解析 fosB^{d/d} と fosB 完全欠損マウスの海馬における各遺伝子の、野生型マウスに対する 相対的 mRNA レベルを示す(平均値 ± SEM.; N = 3)。Control,生理食塩水投与; KA, カイニン酸投与後 24. 黒い棒グラフ,野生型; 灰色の棒グラフ, fosB^{d/d}; 白い棒グラ フ, fosB 完全欠損マウス. One-way ANOVA, *Vgf* [control: F_{2,6} = 3.87, p = 0.0834; KA: F_{2,6} = 1.47, p = 0.3023]; *Smad3* [control: F_{2,6} = 5.11, p = 0.0506; KA: F_{2,6} = 4.39, p = 0.0668]; *Gal* [control: F_{2,6} = 10.72, p = 0.0105; KA: F_{2,6} = 11.2912, p = 0.0093]; *Trh* [control: F_{2,6} = 0.98, p = 0.4297; KA: F_{2,6} = 72.35, p < 0.0001]; *Sema3e* [control: F_{2,6} = 1.91, p = 0.2281; KA: F_{2,6} = 2.59, p = 0.1548]. P 値(*, Student's *t*-test post-hoc comparison; #, Tukey-Kramer HSD post-hoc comparison)を示す。

補足図 11. fosB 産物による神経新生、うつ、てんかん制御のモデル

Basal レベル及び刺激誘導後の FosB, ΔFosB, Δ2ΔFosB は Vgf, Trh, Gal, Dlk1, Srxn1, Serinc2, Penkのプロモーター領域中の AP-1 部位に結合しそれらの遺伝子の 転写を活性化する、もしくは Smad3 タンパク質と直接相互作用する。FosB ではな く ⊗FosB もしくは ⊗2⊗FosB は同様に, Car12 のプロモーター中の AP-1 部位にも 結合し、その転写を抑制する。結果的に、誘導された VGF, DLK1, GAL, TRH, SMAD3 が神経新生を促進し、一方、PENK の誘導がうつを抑制する。GAL, TRH, VGF, SRXN1, SERINC2 の誘導と CAR12 の低下がてんかんもしくはてんかん原性を阻害 する。





d











Anti-FosB(5G4)/anti-GFAP

Anti-FosB(5G4)/anti-Ki67

Anti-FosB(5G4)/anti-DCX

FosB				
∆FosB/∆2∆FosB				
GFAP				
	SOX2			
			DCX	
				NeuN
Neura	l Progenitors		Neuroblasts	Newborn neurons
Type-1	Type-2a	Type-2b	Type-3	



39













補足図 9



d/d

Null

b









補足表1. 野生型マ	'ウス, fosB ^{d/d} ,	fosB完全欠損マウス	の海馬間で有意な変	を化が見られた発現の	トランスクリプト	ームクラスターリスト
------------	----------------------------	-------------	-----------	------------	----------	------------

					fold c	hange		
Transcripts	Symbol	Gene name		Untrea	ated	24 h	after	KA
Cluster Id			null/wt	dd/wt	null/dd	null/wt d	ld/wt	null/dd
Young								
10560481	Fosb	FBJ osteosarcoma oncogene B			-1.66			
10526553	Vgf	VGF nerve growth factor inducible			-1.29	-1.42		-1.23
10398319	DIk1	delta-like 1 homolog (Drosophila)	-1.22					
10594404	Smad3	SMAD family member 3				-1.67		
10464471	Gal	galanin prepropeptide				-2.30* -	-1.86*	-1.24*
10546417	Trh	thyrotropin-releasing hormone				-3.26* -	-2.50*	-1.30*
10519747	Sema3e LOC100044162	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E hypothetical protein LOC100044162				-1.39		
10511363	Penk1	preproenkephalin 1				-2.17* -	-1.51*	-1.44*
10400304	EgIn3	egl nine homolog 3 (C. elegans)				-2.03* -	-1.86*	-1.10*
10594048	Isir2	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat 2				-1.33		
10552516	Klk6	kallikrein-related peptidase 6				-1.58* -	-2.02*	1.28*
10375608	Scgb3a1	secretoglobin, family 3A, member 1				-1.84* -	-2.69*	1.47*
10386076	Glra1	glycine receptor, alpha 1				-1.82* -	-2.01*	1.10*
10411082	Thbs4	thrombospondin 4				-2.03* -	-2.21*	1.09*
10467508	Blnk	B-cell linker				-1.21		
10550674	Ercc2	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2		-1.51		-1.46		
10560304	Calm3 Calm1 Calm2	calmodulin 3 calmodulin 1 calmodulin 2		-1.21				
10381096	lgfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4				1.33		
10555570	Phox2a	paired-like homeobox 2a				_	1.49	
10564805	Pex11a	peroxisomal biogenesis factor 11 alpha	-1.2					
10376320	Mrpl22	mitochondrial ribosomal protein L22	-1.27					
10550509	Pglyrp1	peptidoglycan recognition protein 1	-1.41	-1.54		-1.65		
10560826	Zfp109	zinc finger protein 109	-1.42	-1.39		-1.44		
10550833	Zfp180	zinc finger protein 180				-1.41		
10477061	Srxn1	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)			-1.21			
10498921	Tdo2	tryptophan 2,3-dioxygenase			1.47			
10388254	Aspa	aspartoacylase		-1.24		1.52		
10583887	Npsr1	neuropeptide S receptor 1		-1.26				
10482766	Rprm	reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate				-2.05* -	-1.37*	-1.50*
10516765	Serinc2 LOC100044221	serine incorporator 2 hypothetical protein LOC100044221						-1.38
10438189	SIc7a4	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 4				-1.39		
10462702	Hectd2	HECT domain containing 2				1.24		

10498302	Gm410	gene model 410, (NCBI)			1.27		
10498620	Trim59 LOC630539	tripartite motif-containing 59 similar to mouse RING finger 1			1.40		
10551319	Adck4	aarF domain containing kinase 4			-1.20		
10552557	Klk1b8	kallikrein 1-related peptidase b8			-1.50		
10554655	Mex3b	mex3 homolog B (C. elegans)			-1.34		
10574033	Nup93	nucleoporin 93			-1.24		
10585610	Ptpn9	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9			-1.23		
10605493	Prrg1	proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 1			1.28		
10433172	Glycam1	glycosylation dependent cell adhesion molecule 1			-1.5	58	
10408928	Hspb1	heat shock protein 1			-2.26* -2.	78* 1.	23*
10526410	Hspb1	heat shock protein 1			-2.28* -2.	74* 1.	20*
10527332	Nptx2	neuronal pentraxin 2			-2.09* -1.	75* -1	.20*
10559837	Vmn2r29	vomeronasal 2, receptor 29		-1.59			
		vomeronasal 2, receptor 37 vomeronasal 2, receptor 42 vomeronasal					
	Vmn2r37 Vmn2r42 Vmn2r30 Vmn2	2, receptor 30 vomeronasal 2, receptor 48 vomeronasal 2, receptor					
10549923	r48 Vmn2r51 Vmn2r45 Vmn2r38 V	51 vomeronasal 2, receptor 45 vomeronasal 2, receptor 38	-1.48				
	mn2r32 Vmn2r49 LOC100042688	vomeronasal 2, receptor 32 vomeronasal 2, receptor 49 similar to					
		vomeronasal 2, receptor, 15					
	\/mn2r27 \/mn2r20 \/mn2r42 \/mn2	vomeronasal 2, receptor 37 vomeronasal 2, receptor 29 vomeronasal					
10550028	r48 Vmn2r51 Vmn2r45 Vmn2r31 V	2, receptor 43 vomeronasal 2, receptor 48 vomeronasal 2, receptor	1 52				
10559920		51 vomeronasal 2, receptor 45 vomeronasal 2, receptor 31	-1.52				
	11112139	vomeronasal 2, receptor 39					
		vomeronasal 2, receptor 37 vomeronasal 2, receptor 29 vomeronasal					
	Vmn2r37 Vmn2r29 Vmn2r43 Vmn2	2, receptor 43 vomeronasal 2, receptor 42 vomeronasal 2, receptor					
10540004	r42 Vmn2r45 Vmn2r38 Vmn2r51 V	45 vomeronasal 2, receptor 38 vomeronasal 2, receptor 51		1 2 2			
10549904	mn2r31 Vmn2r35 Vmn2r48 Vmn2r	vomeronasal 2, receptor 31 vomeronasal 2, receptor 35 vomeronasal		-1.52			
	50 Vmn2r39 Vmn2r32 Vmn2r49	2, receptor 48 vomeronasal 2, receptor 50 vomeronasal 2, receptor					
		39 vomeronasal 2, receptor 32 vomeronasal 2, receptor 49					
	\/mn2r42 \/mn2r2E \/mn2r21 \/mn2	vomeronasal 2, receptor 43 vomeronasal 2, receptor 35 vomeronasal					
10549921	v11112143 v11112133 v11112131 v11112 r2011/mp2rE0	2, receptor 31 vomeronasal 2, receptor 39 vomeronasal 2, receptor		-1.49			
	139/1111/2130	50					
		vomeronasal 2, receptor 37 vomeronasal 2, receptor 42 vomeronasal					
	Vmn2r37 Vmn2r42 Vmn2r30 Vmn2	2, receptor 30 vomeronasal 2, receptor 48 vomeronasal 2, receptor					
10549923	r48 Vmn2r51 Vmn2r45 Vmn2r38 V	51 vomeronasal 2, receptor 45 vomeronasal 2, receptor 38		-1.45			
	mn2r32 Vmn2r49 LOC100042688	vomeronasal 2, receptor 32 vomeronasal 2, receptor 49 similar to					
		vomeronasal 2, receptor, 15					
	$\sqrt{mn}2r27\sqrt{mn}2r42\sqrt{mn}2r45\sqrt{mn}2r45}$	vomeronasal 2, receptor 37 vomeronasal 2, receptor 42 vomeronasal					
10550992	r51\/mn2r25\/mn2r22\/mn2r20\/mn2r40\/	2, receptor 45 vomeronasal 2, receptor 51 vomeronasal 2, receptor		1 21			
10009000	mp2r50	35 vomeronasal 2, receptor 32 vomeronasal 2, receptor 49		-1.21			
	mn2rou	vomeronasal 2, receptor 50					

10559901	Vmn2r42 Vmn2r45 Vmn2r51 Vmn2 r31 Vmn2r38 Vmn2r32 Vmn2r49	vomeronasal 2, receptor 42 vomeronasal 2, receptor 45 vomeronasal 2, receptor 51 vomeronasal 2, receptor 31 vomeronasal 2, receptor 38 vomeronasal 2, receptor 32 vomeronasal 2, receptor 49	-1.22			
10559880	Vmn2r29 Vmn2r43 Vmn2r31 Vmn2 r38 Vmn2r35 Vmn2r39 Vmn2r50	vomeronasal 2, receptor 29 vomeronasal 2, receptor 43 vomeronasal 2, receptor 31 vomeronasal 2, receptor 38 vomeronasal 2, receptor 35 vomeronasal 2, receptor 39 vomeronasal 2, receptor 50	-1.42			
10559928	Vmn2r37 Vmn2r29 Vmn2r43 Vmn2 r48 Vmn2r51 Vmn2r45 Vmn2r31 V mn2r39	vomeronasal 2, receptor 37 vomeronasal 2, receptor 29 vomeronasal 2, receptor 43 vomeronasal 2, receptor 48 vomeronasal 2, receptor 51 vomeronasal 2, receptor 45 vomeronasal 2, receptor 31 vomeronasal 2, receptor 39	-1.52			
10559931	Vmn2r43 Vmn2r35 Vmn2r38 Vmn2 r31 Vmn2r50 Vmn2r39	vomeronasal 2, receptor 43 vomeronasal 2, receptor 35 vomeronasal 2, receptor 38 vomeronasal 2, receptor 31 vomeronasal 2, receptor 50 vomeronasal 2, receptor 39	-1.41			
10559919	2810047C21Rik BC023179 EG665 577	RIKEN cDNA 2810047C21 gene cDNA sequence BC023179 predicted gene, EG665577	-1.39			
10549932	2810047C21Rik EG665577	RIKEN cDNA 2810047C21 gene predicted gene, EG665577	-1.39			
10595094	2310046A06Rik	RIKEN cDNA 2310046A06 gene	-1.24			
10365104	F630110N24Rik	RIKEN cDNA F630110N24 gene		-1.26		-1.21
10545886	1700019G17Rik	RIKEN cDNA 1700019G17 gene			1.45	
10447429	EG225058	predicted gene 4832	-1.21			

Aged

10586591	Car12	carbonic anhydrase XII	2.21	ND	ND	ND
10548879	Мдр	matrix Gla protein	2.07	ND	ND	ND

null/wt, fosB完全欠損 対 野生型; dd/wt, fosB^{dd} 対 野生型; null/dd, fosB完全欠損 対 fosB^{dd}。太字は、倍率変化 >1.2 または <-1.2 で且つ unpaired t-test で p<0.05 を示す。アス タリスク付きの数字は、倍率変化 >2.0 または <-2.0で、且つANOVAで p<0.05 を示す。p値の計算; Asymptotic Multiple Testing Correction; Benjamini-Hochberg FDR. ND, 解析して いない。

Gene	Forward	Reverse
Vgf	5'-GGCGCCCCGATGTTTTTCC-3'	5'-GACCTCTGGTACGCCGTCA-3'
Smad3	5'-CACGCAGAACGTGAACACC-3'	5'-GGCAGTAGATAACGTGAGGGA-3'
Gal	5'-GAGAGGTTGGACCCTGAACA-3'	5'-GGTCTCCTTTCCTCCACCTC-3'
Trh	5'-GATTCTGGAGCCTTGCAGAC-3'	5'-AAAGCCAGAGCCATCATCAG-3'
Sema3e	5'-AGGCTACGCCTGTCACATAAA-3'	5'-GAGCCGTTCTTGATACTCATCC-3'
Gapdh	5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'	5'-TGAAGGGGTCGTTGATGG-3'

補足表 2. リアルタイム PCR に使用したプライマーのリスト

略称: *Vgf*, VGF nerve growth factor inducible; *Smad3*, MAD homolog 3 (Drosophila); *Gal*, Galanin; *Trh*, Thyrotropin-releasing hormone; *Sema3e*, Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E.