

微小管結合タンパク質機能不全を起因とする育児放棄とその薬理的治療

宮坂知宏

同志社大学 生命医科学部 医生命システム学科

【研究の背景】

Tau および Tau のパラログである Microtubule Associated Protein 2 (MAP2) は、ともに微小管結合タンパク質の一種であり、それぞれ軸索または樹状突起において微小管の重合促進と安定化に寄与している¹⁾。Tau および MAP2 はそれぞれ独立して機能していると考えられてきたが、互いに相補する未知の機能がある可能性が考えられる。この検証として Tau/MAP2 double knockout (DKO) マウスを作成し解析した。その結果、DKO ♀ マウスは産後哺育をしないことを見出した。この行動異常は Tau のみを欠損させた Tau knockout (TKO) マウス、MAP2 のみを欠損させた MAP2 knockout (MKO) マウスでは現れないため、両者が相補的に働いている機能と考えられる。先行研究により、網羅的発現解析から育児放棄の原因として Oxytocin (Oxt) の低下が想定された。

【目的】

DKO マウスにおける育児放棄の原因として、Oxt 産生神経の機能障害による Oxt の不足であるとの仮説を唱えた。この検証として、本研究では出産時における Oxt 投与が DKO マウスの育児行動障害を改善するかを検証した。また、Oxt 機能低下のメカニズムについて、組織学的手法による解析を試みた。

【方法】

TKO マウス、および MKO マウスの交配により、DKO ♀ マウスを作出した。これらのマウスについて3か月飼育した後に野性型 B6 ♂ と交配させた。プラグチェックにより交配を確認した後、E18.5 日より出産3日目まで Oxt (1 µg/µL in 0.5% CMC) 10 µL を経鼻投与した。出産後の母マウスの哺育行動について、巣から外れた子を巣に連れ戻す行動 (retrieving)、巣作り行動 (nest building)、授乳行動 (nursing) の3項目の有無について評価した。また、新生児の生育期間について最長28日まで観察した。さらに、Oxt 産生細胞の興奮および細胞内の Oxt 動態を解析する目的で、野性型未出産 ♀ マウス、および出産直後の ♀ マウスについて4% paraformaldehyde で灌流固定した。脳摘出後、100 µm 厚のビブラトーム切片を作成し、抗 Oxt 抗体および抗 c-fos 抗体を用いた蛍光免疫二重染色を行った。室傍核のオキシトシン陽性細胞について共焦点顕微鏡で撮影し、蛍光強度について Image J を用いて定量解析した。

【結果】

はじめに、DKO ♀ マウス育児行動に対する Oxt の効果について検証した。DKO ♀ マウスは産後の育児行動をほとんど示さないのに対し、Oxt 投与群では retrieving, nest building, nursing のいずれの評価項目においても有意に改善が認められた (data not shown)。さらに平均哺育日数についても有意な延長効果が認められた (図1)。

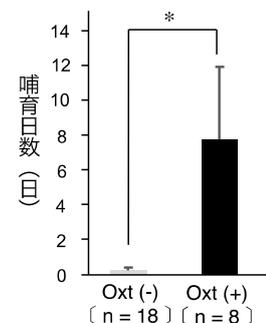


図1 Oxt 投与による DKO マウス哺育日数の延長 (*, $p < 0.01$; Mann-Whitney U test)

次に、DKO マウスにおける Oxt 機能低下のメカニズムを同定する目的で、組織学的解析法の確立を目指した。Tau は軸索に局在する微小管結合タンパク質であることから、その機能障害として軸索輸送への影響が想定される²⁾。一方、MAP2 は樹状突起に局在し、先行研究からその欠損により神経活動が低下する可能性を見出している (data not shown)。したがって、DKO マウスにおける Oxt 機能障害はこれらの複合的な障害による可能性が考えられた。はじめに野性型未出産マウス脳より連続冠状切片を作成し、抗 Oxt 抗体による組織染色を行った。その結果、Bregma-1.0mm 前後において室傍核 Oxt 神経が安定・定量的に解析出来る事を確認した。さらに、この領域の Oxt 産生神経細胞において抗 Oxt 抗体、抗 c-fos 抗体による二重線色を行い、c-fos の発現と Oxt 産生について定量化した結果、正の相関となることを見出した (図2)。現在、さらに出産による Oxt 神経細胞の活動および Oxt の動態について解析中である。

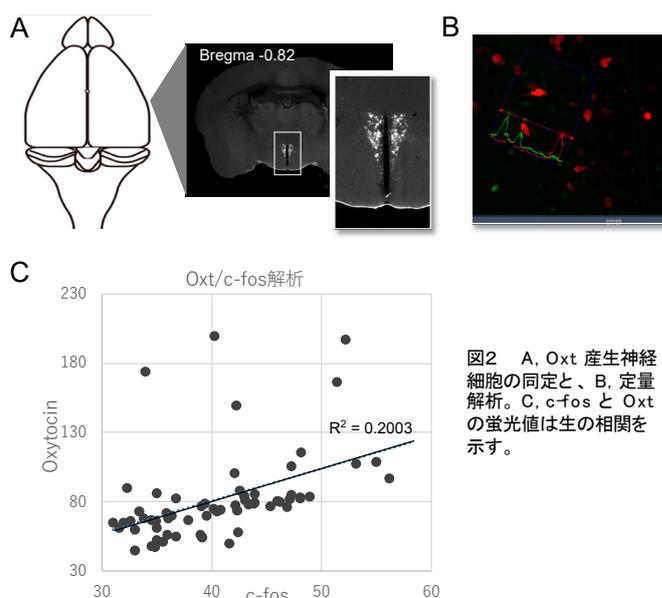


図2 A. Oxt 産生神経細胞の同定と、B. 定量解析。C. c-fos と Oxt の蛍光値は生の相関を示す。

【考 察】

本研究結果から、tau および MAP2 機能損失に起因する育児行動障害が、Oxt の経鼻投与により改善される可能性が示された。さらに、Oxt/c-fos の共染色および強度解析により、Oxt 神経細胞の興奮と Oxt 産生の関係についての解析基盤が確立できたと考えている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

報告されたゲノムバリエーションデータから、希少なタウのナンセンス変異が同定されている。また、一部の神経変性疾患ではそのメカニズムとしてタウの機能損失が想定されている³⁾。さらに別途国内ゲノムデータ解析から、複数の MAP2 バリエーションが同定されている。これより、ある確率で tau, MAP2 双方が機能低下となる可能性、そのような方が育児で悩まれる可能性は十分に考えられる。この場合、薬物療法として Oxt の経鼻投与が救いとなる可能性を示すことが出来たと考えている。

【参考・引用文献】

- 1) Dehmelt L and Halpain S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6:204.
- 2) Kubo A, et al. (2019) Distribution of endogenous normal tau in the mouse brain. *J Comp. Neurol.* 527, 985
- 3) Hutton M, et al. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702