

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08173

研究課題名(和文) ErbBシグナルを介する皮質高頻度発火型GABA神経の機能成熟調節作用

研究課題名(英文) Perturbation of ErbB signals as neonate affects functional maturation of fast-spiking property of GABAergic interneurons in frontal cortex

研究代表者

難波 寿明(Namba, Hisaaki)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：90332650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ニューレグリン(NRG)と上皮成長因子(EGF)は、大脳皮質における高頻度発火型GABA神経の機能発達に対して様々な影響を持ち、これらを新生仔期に投与した動物は精神疾患モデルとなる。統合失調症などの精神疾患では、GABA機能の異常が認められているものの、当該モデル動物において行動異常が著明となる成熟時のGABA系に着目した研究はあまりなされていない。本研究では、成熟モデル動物のin vivoでのGABA機能やGABA神経の高頻度発火特性を評価した。研究の実施により、新生仔期の因子シグナルのかく乱が、青年期以降により著明となるGABA機能障害を領域特異的に引き起こすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Neuregulin (NRG) and epidermal growth factor (EGF) have various influences on phenotypic and synaptic development of neocortical GABAergic neurons during postnatal period. Administered animals with these factors as neonate exhibit behavioral abnormalities related with schizophrenia in adulthood. Though many animal models for neuropsychiatric diseases exhibits functional abnormalities of GABAergic function, it is not so far analyzed in adult EGF/NRG-treated animals. Here, in vivo GABAergic function, evaluated with gamma oscillation of electroencephalogram, spike firing and channel properties, and neurochemical property of fast-spiking neurons were analyzed in frontal cortical areas of these models. Results of these analyzes suggest that perturbations of EGF/NRG signaling during neonatal period induce functional impairments of fast-spiking neurons in medial prefrontal cortex, which more prominently appeared in adulthood.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経栄養因子 GABA 発火特性 オシレーション 統合失調症 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子 (EGF) やニューレグリン (NRG) は、それぞれ ErbB1、ErbB4 受容体を介して分化・増殖因子として中枢神経系の発達に対して広範な役割を持つ。また、これらは、統合失調症の病因との関連性が提唱されている。すなわち、統合失調症には、遺伝的要因と環境要因がその病因として関与するが、後者には胎児期でのこれらのサイトカインレベルの増加やそれが関与する中枢発達障害が重要であると考えられている。実際、新生仔期にこれら因子を投与した動物では、成熟した段階で認知機能や社会性の低下、精神刺激薬感受性の亢進などの統合失調症モデルに特有の行動異常を示す。従ってこれらの投与動物は、疾患発症にかかわる中枢メカニズムを解明する上で有用な疾患モデル動物となる。他のモデル動物を用いたこれまでの知見では、発達期、成熟期の二つの段階での GABA 機能障害が疾患脳病態と関連付けられている。

EGF や NRG は、大脳皮質 GABA 神経のシナプス機能や表現型の発達に対し拮抗する作用を持ち、NRG は促進的、EGF は遅延的に働く (引用文献 1、2)。これまでの研究経過より、新生仔期に NRG を投与したマウスでは、高頻度発火型 GABA 神経の AMPA 型グルタミン酸受容体発現が亢進し、NRG がシナプス発達促進作用を持つことが明らかになっている。その一方で、EGF は、GABA 神経のグルタミン酸受容体発現を低下させる作用をもつ。また、GABA 神経に付随する表現型タンパク質 (GABA 合成酵素やカルシウム結合タンパク質) なども低下させる。しかしながら、発達期の影響が、行動異常が著明となる成熟動物の GABA 機能に対してどのような影響を引き起こすか明らかにはなっていないのが現状である。

大脳皮質や海馬に含まれる高頻度発火型 GABA 神経は、脳波や電場電位における高周波数帯域 (30-80 Hz) のオシレーション (γ オシレーション) を発生させる上で重要な働きを持つ。またこのような脳波活動は、認知機能において重要な働きを持ち、社会性や作業記憶などの成熟皮質が担う実行機能に関与するものと考えられている。また統合失調症患者や疾患モデル動物における障害も報告されている。従って、因子の作用により GABA 神経の高頻度発火特性が障害されることで、このような脳波活動に異常が生ずる可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、新生仔期での EGF や NRG の受容体である ErbB シグナルのかく乱が、行動異常が著明となる成熟段階で、大脳皮質 GABA

機能にどのような影響をもたらすのか、前頭前皮質領域に着目して *in vivo* 並びにスライス実験により電気生理学的に評価する。*in vivo* レベルでの解析としては、脳波計測による γ オシレーションを中心に評価する。また並行して、スライス標本を用いた電気生理学的解析により、GABA 神経の高頻度発火特性を評価する。さらに、組織、生化学的解析によりその裏付けを得る。それにより、モデル動物の前頭前皮質では、高頻度発火特性の異常が伴う GABA 神経機能が障害される可能性を示す。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

EGF あるいは NRG を生後 2 日より 10 日まで皮下投与することで、因子投与モデルマウスを作成した。これら因子投与マウスと EGF 過剰発現マウス (引用文献 3) を用いて、青年期前 (4 - 5 週齢) と成熟時 (10 週齢以降) の二つの段階で解析を行った。

(2) 脳波活動の計測と解析

生後 10 週齢以降のマウスの前頭皮質領域の硬膜上に、スクリュー電極を慢性的に埋め込んだ。覚醒時の自発性脳波活動と音刺激誘発性 (100 試行のクリック音刺激: 85 dB, 10 ms) の脳波活動を計測した。覚醒状態での脳波活動を計測するため、計測は 12 時間ずつの明暗サイクルのうち暗期に行った。誘発性脳波の解析は、ウェーブレット解析により、 γ 帯域を含む各周波数帯の平均振幅と刺激試行間の位相の一貫性を解析した。自発性脳波はフーリエ変換により各周波数帯域のパワーを求めた。

(3) 組織、生化学的解析

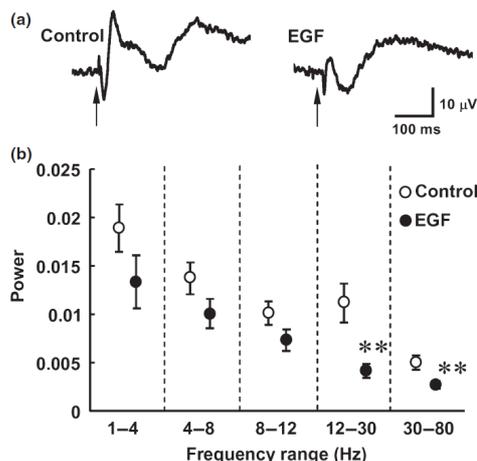
前頭前皮質の冠状断セクション (20 μ m) を作成し、高頻度発火型 GABA 神経が保有するパルプアルブミン (PV) を抗体染色した。抗体染色性を一次運動野、前帯状皮質、内側前頭前野の各領域について解析した。またこれら領域に関して、電位依存性カリウムチャンネル Kv3.1 の発現レベルをウェスタンブロットティングにより定量した。

(4) スライスパッチクランプ解析

高頻度発火型 GABA 神経の発火特性解析は、前頭前皮質の冠状断スライス標本を作製し、ホールセルパッチクランプ記録法により実施した。電流固定法により、脱分極電流注入に対する活動電位発火応答を記録し、スパイク発火数、スパイク後過分極の振幅、持続性高頻度発火の周波数や発火頻度の減衰率を解析した。

4. 研究成果

(1) EGF 投与マウスの脳波活動として、自発性の脳波と音刺激誘発性の脳波を計測した。その結果、自発性脳波の各周波数帯域のパワーには EGF の影響を認めることができなかった。音刺激誘発性電位をウェーブレット解析し、各周波数帯域の振幅と刺激試行間の位相の一貫性を解析した。その結果、 γ 帯域 (30-80Hz) での平均振幅や位相の一貫性の低下を認めることができ、*in vivo* における GABA 神経機能の異常を示唆するものとなった (図1) (学会発表、論文報告)。



(図1) EGF モデルでは、音刺激誘発性電位の β 帯域 (12-30Hz) と γ 帯域 (30-80Hz) の振幅、位相の一貫性が低下していた。

(2) 前頭前皮質の PV 陽性細胞数を一次運動野、前帯状皮質、内側前頭前野の領域でカウントした。その結果、EGF 投与マウスでは、前部帯状回、内側前頭前野において PV 陽性細胞数の低下を認めることができた。その一方で一次運動野では、著明な影響を認めることができなかった (学会発表)。

NRG 投与マウスにおいても同様の組織学的解析を行い、前帯状皮質、内側前頭前野の PV 陽性細胞数の低下を認めた。

(3) 前頭前皮質 GABA 神経における高頻度発火特性の検討として、EGF 投与マウスを用いて、青年期前の 4-5 週齢と成熟後の二つの発達段階で、一次運動野、内側前頭前皮質の 2 領域で高頻度発火特性をホールセル記録により検討した。その結果、成熟 EGF モデルの内側前頭前皮質において著明な高頻度持続発火機能の低下を認めることができ、高レベルの電流注入に対し高頻度発火が維持できなくなっていた。またスパイク後過分極成分の低下も生じていた。このような発火機能障害は、電位依存性 K^+ チャンルのなかでも $Kv3.1$ の発現低下を示唆している。従って、下記(4)において、電位依存性 K^+ チャンルに着目した

生化学的解析を実施した。

青年期前の 4-5 週齢の内側前頭前皮質では、成熟時ほど著明ではなかったが統計的に有意な影響を認めることができた。一方で一次運動野では、統計的な有意性が認められる生理特性のパラメーターがあったものの、二つの発達段階とも内側前頭前皮質ほど EGF の影響が著明ではなかった。

(4) EGF 投与マウスの前頭前皮質の一次運動野、前帯状皮質、内側前頭前野の領域について、電位依存性 K^+ チャンル $Kv3.1$ と PV タンパク量をウェスタンブロッティングにより定量比較した。その結果、内側前頭前野においてこれら蛋白発現の有意な低下を認めることができ、上記(2)、(3)の組織学的、生理学的結果を支持するものとなった。

(5) 成熟 EGF 過剰発現マウスを用いて、上記 EGF モデルと同様に前頭前皮質における脳波活動の計測を実施したところ、自発性、誘発性ともに著明な遺伝子型の影響を検出するには至らなかった。しかしながら青年期前の動物を用いたパッチクランプ解析では、GABA 作動性神経の持続性高頻度発火能の低下を認めた。

(成果のまとめ)

上記の成果により、新生仔期 EGF/NRG 投与は、これまで明らかになっている発達期のみならず、成熟期に至っても GABA 神経に影響をもたらすことが判明した。NRG の作用に関しては、実施期間内でスライス記録の効率改善には至らず、生理学的解析が不十分であるが、組織学的解析結果は、EGF、NRG の両方で疾患様行動異常が著明となる成熟期において、類似した GABA 神経への影響を持つ可能性が示された。

EGF モデルを用いた生理学的な解析によって、因子投与された高頻度発火型 GABA 神経では、興奮性シナプス入力に対するスパイク発火応答のダイナミックレンジが低下することで、脳波活動の同期性が障害されていると考えられる。皮質領域ごとの詳細な解析から、その機能異常は内側前頭前皮質において著明なものとなっていた。電位依存性 K^+ チャンルの発現低下に関しては、患者死後脳においても報告されており (引用文献 4)、ErbB シグナルを介するチャンネル機能調節は、脳病態が引き起こされる作用機序の解明にもつながるものと考えられる。

<引用文献>

1. Abe Y, Namba H, Kato T, Iwakura Y, Nawa H. Neuregulin-1 signals from the periphery regulate AMPA receptor sensitivity and expression in GABAergic interneurons in developing neocortex. *J. Neurosci.* 2011, 31: 5699-5709.
2. Nagano T, Namba H, Abe Y, Aoki H, Takei N, Nawa H. In vivo administration of epidermal growth factor and its homologue attenuates developmental maturation of functional excitatory synapses in cortical GABAergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2007, 25: 380-390.
3. Eda T, Mizuno M, Araki K, Iwakura Y, Namba H, Sotoyama H, Kakita A, Takahashi H, Satoh H, Chan SY, Nawa H. Neuro-behavioral deficits of epidermal growth factor-overexpressing transgenic mice: impact on dopamine metabolism. *Neurosci Lett.* 2013, 547: 21-25.
4. Yanagi M, Joho RH, Southcott SA, Shukla AA, Ghose S, Tamminga CA. Kv3.1-containing K(+) channels are reduced in untreated schizophrenia and normalized with anti-psychotic drugs. *Mol. Psychiatry.* 2014, 19: 573-579.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

- ① Namba H, Nagano T, Jodo E, Eifuku S, Horie M, Takebayashi H, Iwakura Y, Sotoyama H, Takei N, Nawa H. Epidermal growth factor signals attenuate phenotypic and functional development of neocortical GABA neurons. *J. Neurochem.* 査読有, 2017, 142: 886-900. DOI: 10.1111/jnc. 14097.

〔学会発表〕(計 1件)

- ① 難波寿明、浄土英一、永福智志、那波宏之 新生仔期上皮成長因子投与マウス前頭前皮質における GABA 機能成熟異常 (Impaired maturation of cortical GABA function in postnatal mice by epidermal growth factor) 第 40 回日本神経科学大会 (2017. 7. 20) 千葉

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
 難波 寿明 (NAMBA, Hisaaki)
 新潟大学・脳研究所・助教
 研究者番号：90332650

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者