

令和元年5月8日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18395

研究課題名(和文) スピンドル波発生とその生理的意義

研究課題名(英文) Sleep spindle generation: physiological significance

研究代表者

三輪 秀樹 (MIWA, HIDEKI)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長

研究者番号：80468488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アデノ随伴ウィルスベクター(AAV-CreGFP)をGAD67 floxマウスの視床網様核にインジェクションすることで、視床網様核特異的にGAD67遺伝子欠損マウスを作成し、スピンドル発生への影響を調べた。その結果、AAV-CreGFPをインジェクションした視床網様核特異的GAD67欠損マウスは野生型マウスと比較して、スピンドル波密度の減少が観察された。また、Y迷路を用いた学習実験においても、睡眠依存性学習の障害が観察された。この結果は、統合失調症患者で報告されているノンレム睡眠スピンドル波発生減少と同様の結果であり、統合失調症患者における視床網様核機能異常の可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症モデルマウスにおいて、スピンドル波発生の異常および睡眠依存性記憶固定の異常を観察することができ、視床網様核GABA作動性ニューロンのスピンドル波発生における役割を明らかにできたことが学術的意義である。このことは、精神疾患と睡眠障害の病態の関連性を理解でき、これを拡張して、他の精神疾患と睡眠障害との関連性についても明らかにできる可能性を示唆できた。これらを明らかにすることで、睡眠異常の有無を診断することで発症の予防や、発症後に睡眠障害がある場合は睡眠異常を改善することにより、精神疾患の症状の改善など新たな治療法および回復のメカニズムを提唱できる可能性があることが社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：We selectively deleted GAD67 in the thalamic reticular nucleus (TRN) and tested its effect on sleep spindle generation. For that purpose, we reduced GAD67 levels in TRN neurons by injecting an adeno-associated virus (AAV) constitutively expressing a Cre recombinase-Green fluorescence protein (GFP) fusion protein (AAV-CreGFP) into TRN of heterozygous and homozygous GAD67 floxed mice. EEG activity from frontal cortex and nuchal muscle EMG were recorded and sleep-wake states were analyzed. We found that NREM sleep spindle density at 4 week in virally injected GAD67 flox mice was significantly different from control animals. Those virally injected GAD67 flox mice have also shown abnormal sleep-dependent memory in Y maze test. Our results suggest GAD67 floxed mice are a useful tool to test whether reduced levels of GAD67 levels in TRN results in decreased spindle density, similar to the findings observed in schizophrenia patients.

研究分野：神経科学

キーワード：統合失調症 GABA 睡眠 スピンドル波

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症の病態生理について、ドパミン仮説やグルタミン酸機能低下仮説などが提唱されているが、これらの変化を示す再現性のある死後脳所見は極めて少ない。一方、GABA 作動性ニューロンのサブクラスの一つであるパルプアルブミン(PV)陽性 GABA 作動性ニューロンにおいて、抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素 GAD67 の発現が低下していることを示す死後脳解析結果が高い再現性で報告されている (Lewis DA & Gonzalez-Burgos G 2006)「統合失調症の GABA 仮説」。さらに、DISC1 など統合失調症関連遺伝子を標的にして作製した遺伝子改変マウスやケタミン投与などに薬理学的手法により作製した統合失調症モデルマウスにおいても、PV 陽性ニューロンにおいて GAD67 発現低下が観察されていることから(Belforte JE 2010; Behreans MM 2007; Peleg-Raivstein D 2008; Lodge DJ 2009)、ある患者群では GAD67 発現低下が統合失調症発症の共通因子である可能性が推測される。この病態変化が「統合失調症発症の病因なのか?それとも発症に伴う単なる結果にすぎないのか?」という疑問を検証するために、申請者は PV 陽性細胞特異的に GAD67 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウト(KO)マウスを作製し、生化学的解析・組織化学的解析・電気生理学的解析・行動学的解析による包括的表現型解析を行った。その結果、PV-GAD67 KO マウスは統合失調症様中間表現型を呈することを見出し、上記の分子発現変化は統合失調症発症の病因の一部であることを示唆し、GABA 仮説に基づいた新たな統合失調症モデルマウスの開発を世界に先駆けて行った[(Miwa, Neuropsychopharmacology 2015)。

統合失調症はいくつかの臨床症状により特徴づけられ、認知機能障害は特に重要な症状である(Lewis DA & Moghaddam B 2006)。さらには、統合失調症患者において、高い再現性で睡眠障害が報告されている。その中でも、ノンレム睡眠中に観察されるスピンドル波発生の著しい異常が観察されている(Pinault D 2011)。また、学習課題実行後のノンレム睡眠中のスピンドル波密度および活動が上昇することから(Gais 2002)、睡眠依存性記憶固定の機能を担っていることが推測されている。さらには、学習潜在能力や一般的な認知能力(例えば IQ)との関連性も報告されている(Fogel & Smith 2011)。スピンドル波は、0.2-2 秒間の漸増漸減(waxing & waning)する 12-16Hz 帯域の振動脳波であり、感覚情報ゲーティング(Krause 2003)、睡眠依存性記憶固定化、注意など高次脳機能である認知機能に重要であり、その発生に重要な脳部位として、視床網様核が考えられているが、スピンドル波発生の生理機能は十分には解明されておらず、このような多種多様な高次脳機能が視床網様核という1つの神経核でどのように実行されているかはまったく不明である。

#### 2. 研究の目的

本課題を解決するためには、上記の PV-GAD67 KO マウスでは、脳全体の PV 陽性ニューロンで GAD67 タンパク質の発現が低下しており、スピンドル発生異常が観察されたとしても、それが、視床網様核(PV 陽性 GABA 作動性ニューロン)の異常に由来するのか、大脳皮質に局在する PV 陽性 GABA 作動性ニューロンの異常に由来するのか、区別することができない。そこで本研究では、上記の第1報目の論文で用いた GAD67 flox マウスおよび遺伝子組換えを誘導する CreGFP を組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV-CreGFP)を用いて、局所的に視床網様核の機能を低下させることで、睡眠依存性記憶固定を動物個体での行動および脳波の同時記録により評価し、その情報処理を明らかにし、さらに脳スライス標本を用いて、その情報処理機構の細胞基盤の解明を目的とした。

#### 3. 研究の方法

GAD67 flox マウスの視床網様核に、AAV-CreGFP を脳定位固定下で注入し、視床網様核の機能低下を生じさせた。この動物個体を用いて、(I)基本的な睡眠・覚醒リズムなどの脳波解析、(II)睡眠依存性学習中の脳波測定を行い、スピンドル波発生および動物個体での学習効果を評価し、視床網様核の役割を明らかにすることを目的とした。さらに、視床網様核 視床局所神経回路で生じている分子・細胞機構を明らかにするために、(III)急性脳スライス標本作製し、シナプス伝達・発火特性の性質の変化をパッチクランプ法により評価した。以上により、スピンドル波の動物個体での生理的意義を明らかにすることを試みた。

#### 4. 研究成果

AAV-CreGFPをインジェクションしたGAD67flox/+およびGAD67flox/floxマウスは野生型マウスと比較して、スピンドル波密度の減少が観察された。また、Y迷路を用いた学習実験においても、睡眠依存性学習の障害が観察された。この結果は、統合失調症患者で報告されているノンレム睡眠スピンドル波発生減少と同様の結果であり、統合失調症患者におけるTRN機能異常の可能性が示唆され、今後、ノンレム睡眠スピンドル波の生理的意義の解明が期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. **Hideki Miwa**, Radhika Basheer, James T. McKenna, James M. McNally, Robert W. McCarley, Ritchie E Brown: Roles of GAD67 in the thalamic reticular nucleus for regulating sleep spindle generation. *Sleep* 40 (Suppl.1): A48-A49, 2017.

〔学会発表〕(計2件)

1. 三輪秀樹:視床網様核における GAD67 遺伝子欠損のノンレム睡眠スピンドル波発生への影響 第 28 回日本臨床精神神経薬理学会 第 48 回日本神経精神薬理学会合同年会 (2018)
2. **Hideki Miwa**, Radhika Basheer, Hanan Bouaouda, David S. Uygun, James T. McKenna, James M. McNally, Robert W. McCarley, Ritchie E. Brown: Effect of GAD67 deletion in the thalamic reticular nucleus on sleep spindle regulating activity. The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Nov. 12, 2017, Washington DC, USA).

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/hmiwa/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Robert W. McCarley (Harvard medical school /VA Boston Healthcare System)

ローマ字氏名：Robert W. McCarley

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。