

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06460

研究課題名(和文) ペリニューロナルネット調節を介したGABA神経への脳内栄養因子の作用機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of Epidermal growth factor on GABAergic neuronal development via the regulation of perineuronal net

研究代表者

岩倉 百合子 (IWAKURA, Yuriko)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：40452081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：上皮成長因子(EGF)は古典的な栄養因子であり、その受容体と共に脳でも広く発現する。我々はEGFが脳皮質の抑制性神経細胞(PV陽性神経細胞)の発達や機能を抑制することを明らかにしてきた。PV陽性神経細胞は発達に伴い特徴的な細胞外構造(ペリニューロナルネット、PNN)を形成する。本研究では、EGFのPV陽性神経細胞に対する発達・機能抑制効果の一因として、EGFシグナルによるPNN形成調節の可能性を検討した。その結果、発達期の過剰なEGFシグナルは、蛋白分解酵素(MMP)活性を亢進することでPNNの主要な構成要素であるCSPGの切断を促し、正常なPNN構築を阻害することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発達期の抑制性神経細胞の異常は、発達障害や精神疾患の一因となる可能性が議論されている。例えば統合失調症患者の死後脳では、PNNs構造の変化が報告されている。自閉症の発症や病態にもPNNsや細胞外マトリクス調節因子との関連が示唆される。これらの疾患は、発症機序や病態、分子マーカーなど未解明の点が多い。PNNのような細胞外環境とEGFのような栄養因子シグナルの関連性が明らかになることで、このような複雑な疾患の研究に新たな展開をもたらす一端となると考える。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor (EGF) is a classical growth factor widely expressed in the brain with its receptor. We previously reported that EGF inhibits the morphological/functional development of parvalbumin (PV)-positive gamma-aminobutyric acid interneurons in the cortex. PV-positive neurons (PV neurons) are a major subtype of interneurons that often form perineuronal nets (PNNs), which are extracellular matrix structures that cover the cell body and dendrites with the development of PV neurons. In the present study, we investigated the possibility that EGF regulates PNN formation as a contributing factor to EGF's developmental and functional suppressive effects on PV-positive neurons. The results showed that excessive EGF signaling during development promotes cleavage of CSPG, a major component of PNNs, by increasing proteolytic enzyme (MMP) activity, thereby inhibiting normal PNN construction.

研究分野：分子神経生物学、神経生化学

キーワード：上皮成長因子 抑制性神経細胞 ペリニューロナルネット コンドロイチン硫酸プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

PNN は、成熟した GABA 神経(パルブアルブミン陽性)の細胞体や樹状突起を取り囲む細胞外マトリクスである。PNN は GABA 神経発達の指標となるだけでなく、シナプス可塑性調節等の多様な役割を持つ(Sorg BA, 2016 J. Neurosci.). さらに、短期・長期的なシナプス可塑性や神経活動に応じて、PNNs の構造にも変化が生じる(Sunayana BB, 2017 Neuron)。他方、神経活動の変化は EGF の放出や受容体活性化を行い(業績 3, 11, 12, 14, 18)、それによるシグナル調節は神経細胞の発達や機能調節を担う(業績 11-13, 20)。GABA 神経活動にもそういった脳内栄養因子との相互作用が想定されるが、そこには PNNs のような GABA 神経特異的な細胞外環境も密接に関与する可能性が考えられた。PNN の主要な構成成分の一つに、コンドロイチン硫酸(CS)がコアタンパクに結合したコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)がある。EGF はアストロサイトからの CSPG の産生・放出を増加させることが報告されている(Smith GM, 2005 Glia)。これより EGF は短期的には PNNs 形成を促進すると予想されるが、申請者らがこれまで明らかにしてきた GABA 神経への発達抑制作用とは矛盾することから、EGF は、脳内では CSPG の産生・放出と PNNs 形成を異なるメカニズムで調節する可能性が高い。

統合失調症や自閉スペクトラム症などは GABA 神経発達や機能調節に関連する疾患として知られている。例えば統合失調症患者の死後脳では、PNNs 構造の変化が報告されている(Berretta S, 2015 Schizophr Res.)。自閉症の発症や病態にも PNNs や細胞外マトリクス調節因子との関連が示唆される(Burket JA, 2017 Clin Neuropharmacol.)。幼若期 EGF 投与動物では青年期以降で統合失調症に関連する行動異常や GABA 神経細胞の発達阻害が見られる(Namba H, 2017 J Neurochem, Iwakura Y 2022 Neurochem Res)。これらの報告から、EGF が PNN 形成調節を行うことは、GABA 神経細胞の形態的・機能的発達調節に関与し、ひいては前述の疾患の病態メカニズムの一端を担う可能性も想起される。

2. 研究の目的

本研究は、GABA 神経機能や発達調節の理解をさらに深めるべく、EGF が PNNs 形成・成熟を抑制するメカニズムを細胞レベルと個体レベルで解明することを目的とした。これまでの GABA 神経系に対する栄養因子作用の研究は、細胞の発達や機能調節解析が主であった。本研究では加えて、脳内栄養因子の作用が、細胞局所的・一時的な影響から、PNNs のような細胞外構造を介して GABA 神経回路全域的・継続的な影響に及ぶことを明らかにする。また、脳内 EGF は短期的・長期的に神経可塑性を調節する。他方、PNNs の構成分子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)は神経回路再編を阻害し、回路の安定性に寄与することから(Gogolla N, 2009 Science)、本研究の実施により脳内 EGF と PNNs の相互作用が GABA 神経伝達の可塑性と安定性のバランサーとしても機能する可能性も提示できる。本研究は EGF による PNNs 形成調節メカニズムを細胞レベルで解明するだけでなく、認知行動や発達・精神疾患等、脳の発達終了後の脳機能や疾患病態との関連を提示することで、将来的に疾患研究にも貢献するものと位置付けることができる。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

野生型および EGF-Tg マウスはアクリル製ケージ(200×300×140 mm)で個別に飼育を行なった。12時間:12時間の明暗サイクル(明期は午前8時 午後8時)、室温は一定(22±1)、餌と水は自由に摂取可能である。本研究は新潟大学動物実験委員会の承認を得ており、記載されたすべての動物実験を、所属機関のガイドライン、米国国立衛生研究所の Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No.80-23)、ARRIVE ガイドライン、1986年英国動物(科学的手順)法、およびその他の関連ガイドラインに従って実施した。

(2) 大脳皮質初代培養

Sprague Dawley ラット胎児(胎生 19 日)の大脳皮質組織より、神経細胞およびグリア細胞の分散培養を行なった。神経細胞の初代培養では、10%ウシ胎児血清(FBS)入りのダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で1時間の培養後、無血清培地に交換し、15日間培養を行った。培養2日目と4日目に10 ng/mL EGFを加えた。また、100 μM PD153035(EGF 受容体キナーゼの阻害剤)も併用した。グリア培養細胞も同様に、10% FBS -DMEM で80%-90%コンフルエントになるまで培養した。剥離して再懸濁の後、再度10% FBS -DMEM と無血清培地で培養後、培養神経細胞同様にEGF及びPD153035を添加した。

(3)免疫染色

マウス脳組織(4週齢)は、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で灌流固定後、脳梁から800µm以内の前方に位置する前頭皮質の冠状切片(25µm厚)を凍結切片とした。切片を抗パルプアルブミン(PV)抗体、wisteria floribunda agglutinin (WFA)-ビオチンで反応させ、それらの免疫反応性は、Alexa Fluor 555 標識抗マウス免疫グロブリンおよび Alexa Fluor 488 標識ストレプトアビジンを用いて可視化した。前頭皮質の一次運動野の第2/3層と第5層(それぞれ400×400µm)のPV陽性細胞とWFA陽性細胞を確認し、デジタル顕微鏡により画像化した。初代培養神経細胞は4%PFAで固定後、マウス切片と同様に抗PV抗体、WFA-ビオチンで反応させ、可視化した。一部の培養細胞は、アミノ基結合蛍光ナノ粒子と反応させた後、固定と抗体反応を行なった。姉妹培養から4視野(0.04mm²)を無作為に選択し、デジタル顕微鏡を用いて画像化した。

(4)ウェスタンブロット及びドットブロット

マウス大脳皮質(4週齢)及び初代培養細胞は、CS検出のためコンドロイチナーゼABC末端酵素で消化した。SDS-PAGEの後、タンパクを転写したPVDFを抗C4S抗体、抗C6S抗体、抗ニューロカン抗体、抗ホスファカン抗体、抗アクチン抗体、抗GAPDH抗体と反応させた。免疫複合体は化学発光反応により検出し、ImageJソフトウェアを用いて定量解析を行った。

ドットブロット用に作成した4週齢マウスの大脳皮質サンプルは、ニトロセルロース膜に滴下結合させた。膜はWFA-ビオチンと反応させ、ストレプトアビジンとの複合体は化学発光反応により検出し、ImageJソフトウェアを用いて定量解析を行った。

(5)MMP 酵素活性測定

マウス大脳皮質(4週齢)及び初代培養細胞サンプルは、MMP用蛍光基質アッセイキット(MMP-1、-2、-3、-7、-8、-9、-12、-13に対応)または腫瘍壊死因子変換酵素(TACE)用蛍光基質(ADAM-9、-10、-17に対応)と混合した。基質切断による蛍光は、励起波長を490nm、発光波長を530nmで測定した。

4. 研究成果

(1) 青年期のEGF-Tgマウス大脳皮質ではPV神経細胞数とPNN陽性神経細胞数が減少した

野生型マウスとEGF-Tgマウス4週齢の大脳皮質において、PV神経細胞でのPNN発現を調べた。WFAはCSPGと結合するため、PNN検出に用いられる(Celio MR, 1998 Trends Neurosci)。EGF-Tgマウスでは、大脳皮質2-3層でPV陽性細胞数及びWFA陽性細胞数が有意に減少し、5層ではWFA陽性細胞数が減少傾向を示した(図1a)。PNN形成に必要なCSPGなどの凝集は出生後に始まり、臨界期にはその形成が完了する。過剰なEGFシグナルによるPNN形成低下の発達依存性を評価するために、幼若期(2週齢)青年期(4週齢)および(若年)成体期(8週齢)のマウス大脳皮質における総WFAレベルを比較した。その結果、EGF-TgマウスのWFA量は4週齢と8週齢のEGF-Tgマウスで有意に低下した(図1b)。

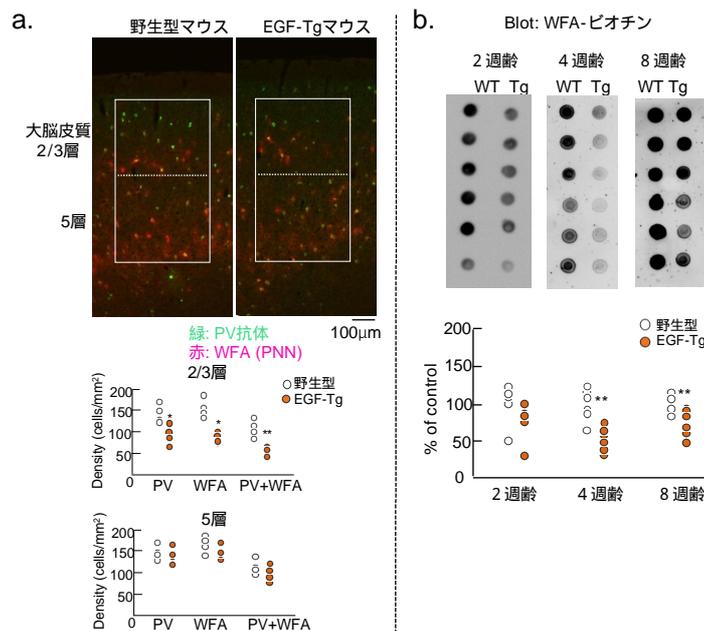


図1a. 野生型マウスとEGF-Tgマウスの大脳皮質におけるWFA陽性PV神経細胞の分布
b. 野生型マウス(WT)とEGF-Tgマウス(Tg) 大脳皮質の、CS量の比較

(2) EGF-Tgマウスの大脳皮質ではCSとニューロカンレベルが変化した

CSは硫酸基の配位によってC4SやC6S等に分類される。我々は以前、統合失調症患者の死後海馬におけるC6S高分子バンド(>171kDa)の発現変化を報告した(Yukawa T, 2018 Psychiatry Res)。マウス大脳皮質では、抗C4S抗体と抗C6S抗体を用いたウェスタンブロットティングにより高分子量域(>170kDa)に9本のシグナルを認めた(図2a)。これらのC4S免疫活性のシグナル強度のうち、B、E、G、Hの4本は、Tgマウスで野生型マウスと比較して有意に減少していた。シグナルA、D、Iの3本は、そのレベルが有意に増加した。C6Sの5本のシグナルレベルは(A、

B、E、G、H) Tg マウスでは野生型マウスに比べて有意に減少した。一方、シグナル2本のレベル(DとF)は有意に増加した。CSPG コアタンパク質の一つであるニューロカンレベルは、Tg 群で有意に低下した。別のコアタンパク質であるホスファカンに変化が見られなかった(図 2b)。これらの結果は、EGF-Tg マウスの大脳皮質では、PNNの量が減少し、CSPG と CS のレベルが変化していることを示している。

(3) EGF/ErbB1 シグナルは、ラット大脳皮質初代培養において PNN 形成を減少させた。次に、EGF-Tg マウスで観察された PNN 数の減少と CS レベルの変化が、EGF/ErbB1 シグナル伝達を介するを調べるため、初代神経細胞培養を用いた実験を行なった。EGF-Tg マウスと同様に、培養神経細胞に EGF 処理をした群では PNN 陽性 PV 神経細胞数が優位に減少した(図 3a)。ErbB1 キナーゼ特異的阻害剤である PD135035 で前処置した群では、EGF による WFA および PV 陽性細胞数の減少が阻害された。このことから、過剰な外因性 EGF シグナルが PNN 形成を阻害することが推察された。いくつかの C4S および C6S シグナルも EGF 処理によって変化した。PD153035 の前処置は、EGF 誘導性の C4S および C6S レベルの減少を阻害した(図 3b)。ニューロカンレベルも同様に EGF 処理群で有意に減少し、それは PD153035 前処置により阻害された。

(4) EGF は大脳皮質の MMP 活性を亢進し、PNN 形成を調節する

CSPG は主にアストロサイトから産生されるため(Rossner S, 2005 J Neurochem)、はじめに EGF 処理後の初代培養グリア細胞の培地中の CS レベルを比較した(図 3c)。EGF 処理によってグリア培養細胞中の C4S と C6S のレベルは有意に上昇したが、これはマウスの大脳皮質や初代培養神経細胞での結果とは矛盾していた。増殖している細胞では、EGF が MMP と ADAM(disintegrating and metalloproteinase)を活性化し、細胞外マトリックスを切断する(Burch ML, 2013 J Biol Chem, Nikitovic D, 2013 Curr Med Chem)。そこで脳に発現するいくつかの MMP(2、3、7、8、9、13)や ADAM(ADAM9、10、17)の蛍光基質を用い、その酵素活性を測定した。EGF を添加した大脳皮質初代培養神経細胞と EGF-Tg マウス大脳皮質の両方で MMP と ADAM 活性の有意な増加が見られた(図 4a, 4b)。MMPs と ADAMs の阻害剤である GM6001 で前処理すると、EGF による酵素活性の亢進が消失した。GM6001 はまた、大脳皮質初代培養における PNN 陽性 PV ニューロン数の EGF による減少を抑制した(図 4c)。これらの結果から、EGF は MMP や ADAM の切断活性を促進し、CSPG などの細胞外基質を切断することで PV 細胞における PNN の形成を阻害することが示唆された。

CSPG は硫酸基を持つため、強い負電荷を帯びている(Tewari BP and Sontheimer H, 2019 Bio Protoc)。そのため、正に帯電したナノ粒子を培養液に加えると、蛍光粒子は細胞体の輪郭をなぞるように凝集して見える(図 4d)。対照的に、EGF 処理培養では、蛍光粒子はニューロ

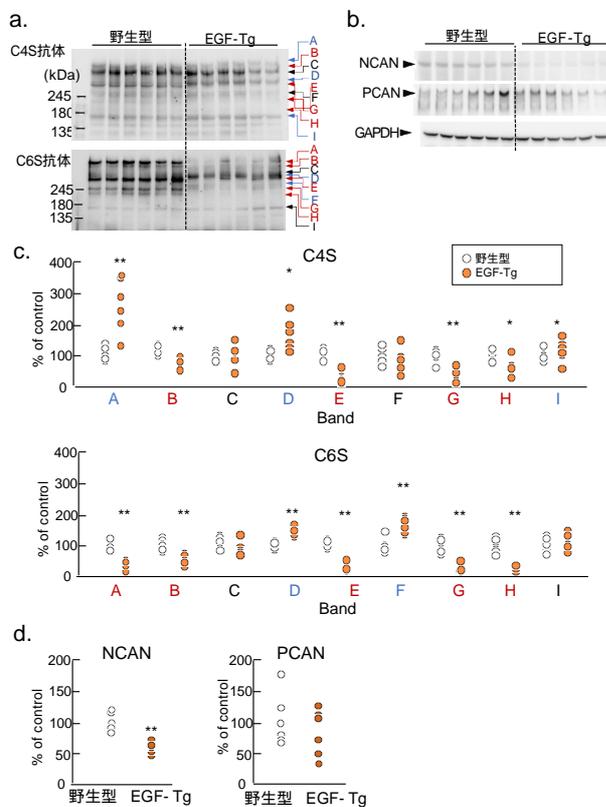


図2a. 野生型マウスとEGF-Tgマウスの大脳皮質におけるC4S(上)、C6S(下)レベルの比較。赤字はEGF-Tgで低下傾向、青字は増加傾向を示したバンド
b. 同じくニューロカン(NCAN)、フォスファカン(PCSN)レベルの比較
c. C4S(上)、C6S(下)レベルを定量化した比較
d. ニューロカン(NCAN, 左)、フォスファカン(PCSN, 右)レベルを定量化して比較

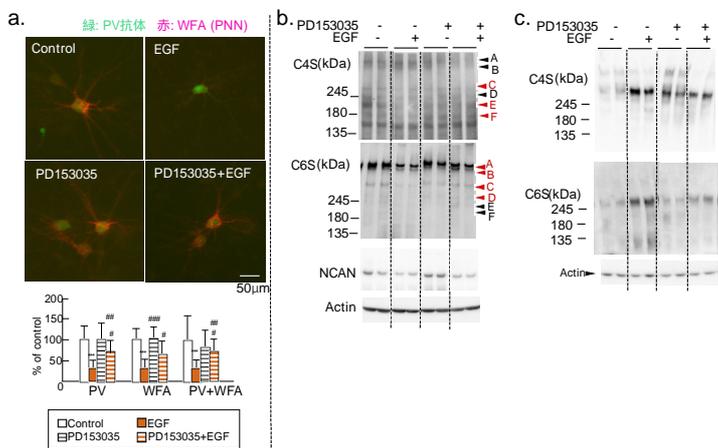


図3a. ラット胎児大脳皮質初代培養神経細胞における、EGFのPV神経細胞とPNNに対する影響
b. 同じくC4S(上)、C6S(下)レベルの比較。赤字はコントロール(-/-)群と比較して低下傾向、青字は増加傾向を示したバンド
c. ラット胎児大脳皮質初代培養グリア細胞における、EGFのCS産生に対する影響。青字はコントロール(-/-)群と比較して増加傾向を示したバンド

ンの輪郭だけでなく、培養領域全体に散らばって見える。PD153035 はこのような粒子集積の減少を防いだ。無処理群では、PNN に豊富に存在する CSPG の負電荷が蛍光粒子を引き寄せ、PNN だけでなく細胞体や突起の外側にも蛍光粒子を凝集させたと考えられる。一方、EGF 処理培養では、PNN そのものや PNN に含まれる CSPG が減少しているため、培養上清に添加された蛍光粒子は PNN に引き寄せられず、培養皿全体に広がっているように見えると推測される。培養グリア細胞では EGF による CS 産生が増加しているにもかかわらず (図 3c)、培養 PV 神経細胞では PNN の形成が減少している。EGF 処理後の CS レベルと MMP 活性の変化と合わせて考えると、EGF/ErbB1 シグナルは CSPG のような PNN 成分の分解を促進している可能性が高い。

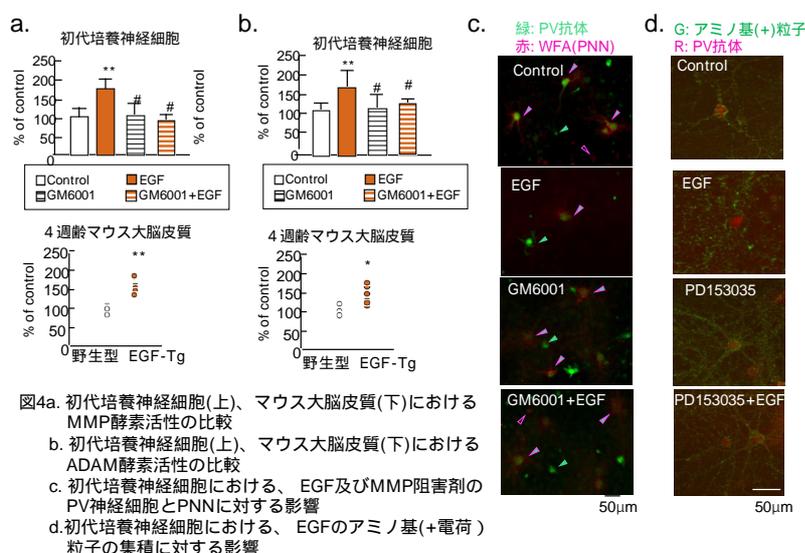


図4a. 初代培養神経細胞(上)、マウス大脳皮質(下)における MMP 酵素活性の比較
 b. 初代培養神経細胞(上)、マウス大脳皮質(下)における ADAM 酵素活性の比較
 c. 初代培養神経細胞における、EGF 及び MMP 阻害剤の PV 神経細胞と PNN に対する影響
 d. 初代培養神経細胞における、EGF のアミノ基 (+電荷) 粒子の集積に対する影響

(5) まとめと考察

本研究では、PV 陽性の抑制性 GABA 神経細胞の発達と成熟の指標である PNN 形成に対する EGF の影響を調べた。まず、EGF-Tg マウスの大脳皮質において、WFA-PV 陽性神経細胞数と CS 発現レベルの有意な減少を示した。次に、EGF によって誘導された PNN 陽性細胞数の減少と CS レベルの発現が、初代培養神経細胞でも再現されることを観察した。これらの変化は、EGF/EGF 受容体シグナルを介して起こった。さらに、EGF が MMP や ADAM などの切断酵素を活性化し、PV 神経細胞周囲の PNN 形成を減少させることが示された。これらの観察結果は、EGF が PV 神経細胞周囲に蓄積する CSPG などの PNN 成分の切断と分解を促進し、PNN 形成と発達を阻害することを示唆している。

我々はこれまでに、幼若期の EGF/EGF 受容体シグナル伝達が一過性に増加すると、成体における PV 陽性神経細胞の発達が抑制されることを報告している。EGF-Tg マウスの解析結果からも、発生初期における EGF/EGF 受容体シグナルの一過性の増加が、PNN 形成抑制を引き起こすことによって、GABA 神経細胞の機能的成熟に長期的な影響を及ぼすことが示唆される。統合失調症患者の死後脳の解析から、GABA 作動性神経伝達が統合失調症の病態に関与するという仮説が提唱されているが、実際に EGF-Tg マウスや幼若期 EGF 投与ラットは、成体で統合失調症に関連する行動異常を呈する。統合失調症患者では、前頭前皮質や嗅内皮質を含むいくつかの脳領域で、PN 形成レベルが低下することも報告されている (Enwright JF 2016, Neuropsychopharmacology, Mauney SA, 2013, Biol Psychiatry)。したがって、GABA 神経細胞の成熟や PNNs の形成抑制が神経活動の興奮 抑制バランスを崩し、統合失調症に関連した病理学的変化をもたらすことが示唆される。EGF の PNN に対する形成抑制作用は、GABA 神経細胞の成熟や統合失調症などの精神疾患の病理機構に関与している可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yukawa T, Iwakura Y, Takei N, Saito M, Watanabe Y, Toyooka K, Igarashi M, Niizato K, Oshima K, Kunii Y, Yabe H, Matsumoto J, Wada A, Hino M, Iritani S, Niwa SI, Takeuchi R, Takahashi H, Kakita A, Someya T, Nawa H	4. 巻 270
2. 論文標題 Pathological alterations of chondroitin sulfate moiety in postmortem hippocampus of patients with schizophrenia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Psychiatry Research	6. 最初と最後の頁 940 ~ 946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psychres.2018.10.062	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩倉百合子、小林雄太郎、難波寿明、那波宏之、武井延之
2. 発表標題 Epidermal growth factor (EGF) signal modulates perineuronal net formations in the neocortex of developing rodent brains
3. 学会等名 第12回国際放射線神経生物学会大会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩倉百合子、小林雄太郎、難波寿明、那波宏之
2. 発表標題 上皮成長因子（EGF）はペリニューロナルネット（PNNs）の形成調節を介してGABA神経細胞の発達抑制に関与する
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩倉百合子、原範和、川原玲香、外山英和、稲葉洋芳、小林雄太郎、北山栄子、柿田明美、高橋均、國井泰人、日野瑞城、矢部博興、池内健、喜田聡、那波宏之
2. 発表標題 統合失調症とそのモデル動物における聴覚皮質過活動の分子プロファイル
3. 学会等名 Neuro2019（第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会 合同大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩倉百合子、小林雄太郎、難波寿明、渡部雄一郎、染矢俊幸、那波宏之、湯川尊之
2. 発表標題 上皮成長因子によるGABA神経細胞の発達制御には、ペリニューロナルネットの形成調節が関与する
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	武井 延之 (Takei Nobuyuki)		
研究協力者	小林 雄太郎 (Kobayashi Yutaro)		
研究協力者	難波 寿明 (Namba Hisaaki)		
研究協力者	那波 宏之 (Nawa Hiroyuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------