

令和 3 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：2018～2020

課題番号：18K06868

研究課題名(和文)げっ歯類統合失調症モデルの行動課題に伴う黒質ドパミン神経活動

研究課題名(英文) Basal activity and sensory responses of nigral dopamine neuron in awake state of rodent model for schizophrenia

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 上皮成長因子は中脳黒質ドパミン神経に対して栄養性作用を持つ。この因子を新生仔期に投与したげっ歯類動物は統合失調症に特有の行動異常を示すため有用な疾患モデルとなる。統合失調症では古くから「ドパミン仮説」として知られるように、その病態にはドパミン系の伝達異常が関連すると唱えられているものの疾患症状との関わりに関しては不明な点が多い。本研究では、成熟モデル動物の覚醒時のドパミン活動レベルと感覚応答特性を評価することで、疾患に伴うドパミン伝達異常の実態解明を試みた。研究の実施により、覚醒状態におけるドパミン神経の過剰な活動性と聴覚性応答が、モデル動物の脳機能異常となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症は、幻覚や妄想などが伴う重篤な精神疾患であり、いまだ根治するための有効な治療法は見いだされていない。そのため疾患脳病態や発症のメカニズムの解明は、新たな治療薬開発のための治療標的の発見にもつながるものと考えられる。本研究は、疾患モデル動物のサイトカイン異常によって障害されるドパミン機能に着目して解析することで、疾患症状に関連する脳病態を明らかにしようとしたものであり、その成果は、疾患症状にかかわる神経回路機能異常やそれを引き起こす分子機序の解明につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Epidermal growth factor (EGF) has neurotrophic effects on the developing dopaminergic neurons. Administered animals with EGF as neonate exhibit behavioral abnormalities related with schizophrenia in adulthood. As “dopamine hypothesis” is so far proposed as a hypothesis of schizophrenia, abnormal dopaminergic transmission could be related with pathophysiology. However, actual dopaminergic activity in awake state were not so far determined in this model animals, which might be related with symptoms, such as auditory hallucination. Analyses of basal activity in awake state reveal marked enhancement in the mice model. In addition, this enhancement affects auditory responses evoked by pure tone stimulation with rather higher frequency. Especially, the level of transient increase in the frequency during offset period was markedly enhanced in EGF-treated mice. Thus, these aberrant activity of dopamine neurons could be pathophysiology of this animal model.

研究分野：神経生理学

キーワード：ドパミン モデル動物 覚醒記録 聴覚応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

中脳ドパミン神経は、報酬を予測する条件付け刺激や嫌悪刺激などの外部刺激に対して活動応答することで、外界の刺激に対する適切な応答を獲得し認知、学習などに寄与すると考えられている。またドパミン伝達の異常は、統合失調症の「ドパミン仮説」として唱えられているように、疾患の発症と関連するものと考えられている。この疾患に著明である幻覚や妄想などの陽性症状は青年期以降に出現する。しかしながら、これら疾患症状に関わる脳回路機能異常や、ドパミン活動異常がどう関与するのかといった点については不明な点が多い。上皮成長因子を新生仔期に投与したげっ歯類動物は、統合失調症様の行動異常が青年期以降に出現し、疾患モデル動物となることが知られる。本研究では当該モデルを利用して覚醒状態でのドパミン神経活動を解析することで疾患脳病態の解明を目指すものである。

これまでの研究経過から、麻酔条件下のモデル動物ではドパミン神経の自発発火活動やチャネル特性に異常が見いだされている。すなわち、モデル動物の自発発火活動において、パースト活動の亢進が認められ、その異常にはカルシウム活性型カリウムチャネル機能の異常が関与することが示された。またこのような発火特性の異常は成熟動物のみにおいて検出され、青年期前では認めることができなかった。従ってこのようなドパミン神経の生理特性変化も疾患が青年期以降に発症する際の一つの要因となる可能性が示されている。

### 2. 研究の目的

当該モデルにおいて、ドパミン神経活動亢進が認められてきているもののその評価は麻酔条件下のみであり、覚醒状態での活動評価がほとんどなされてきていなかった。また過剰なドパミン活動は幻覚や妄想などの疾患の陽性症状に影響を及ぼす可能性があるが、外界の刺激に対しモデル動物のドパミン系がどう応答するのかといった点に関してはほとんど評価されていない。本研究では疾患モデル動物を利用して覚醒下でのドパミン活動や感覚性の応答について検討する。そのため実施期間において、覚醒状態動物で神経活動計測系を実施するための条件検討を行い、麻酔条件下で得られた結果との相互比較を行った。さらに感覚刺激に対する応答性として聴覚刺激を中心に評価することで、過剰な神経活動が感覚応答特性に対してどのような影響を及ぼすのかを考察した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

新生仔マウス (C57BL6/NCr) の生後 2 日より 10 日までにヒト組み換え上皮成長因子 (EGF: ヒゲタ醤油 (株)) (0.875  $\mu\text{g/g}$ ) を皮下投与することでモデルマウスを作成した (発表論文 1)。これら因子投与マウスが成熟に至った段階で (12 週齢以降) 実験を行った。

#### (2) 慢性電極留置と装置馴化

3 本のタンゲステンワイヤー (直径 50  $\mu\text{m}$ ) からなるワイヤー電極を作成し、三種混合麻酔下で右側の黒質緻密部に慢性的に埋め込み、2 週間以上回復させた後に活動計測を行った。手術後の動物は逆転した 12 時間の明暗サイクル (8:00 OFF/20:00 ON) に馴化させた。また手術 1 週間後より実験装置への馴化も行った。

#### (3) 神経活動の計測と解析

覚醒状態で神経活動計測を行うため、12 時間の明暗サイクルの暗期に実験を実施した。上部にスピーカーと照明を備えた実験用チャンバーにホームケージを設置し、有線、フリームービング下で活動計測した。少なくとも 45 分以上実験装置に馴化させた際の自発活動、並びに聴覚刺激として 80dB、1 秒間のトーン刺激 (5K Hz あるいは 20K Hz)、あるいは視覚刺激として 1 秒間の白色光パルス (90 Lux) を 50 回提示した際の応答を記録した。得られたマルチユニットからなるスパイク活動は、Spike2 ソフトウェアを用いて単一ユニットに分離し、自発発火の発火頻度、パースト率の解析と刺激前後時間ヒストグラム (PSTH) を作成した。

#### (4) DREADD システム構築のためのドパミン活動計測

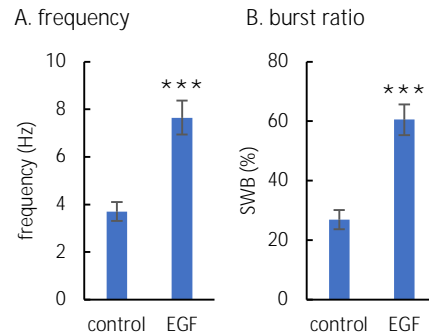
チロシン水酸化酵素プロモーター制御下で cre 組み換え酵素を発現する TH-cre トランスジェニックラットにアデノ随伴ウイルス (AAV5) を片側性に黒質緻密部に感染させることで、Gq 共役型 DREADD (hm3Dq) をドパミン神経特異的に発現させた (引用文献 1)。感染後 4 週間後に上記と同様に、麻酔下で慢性ワイヤー電極を両側性に埋め込み、2 週間の回復と 1 週間のハンドリングを実施した後に神経活動の計測を行った。人工リガンドである酸化クロザピンの投与は皮下投与 (0.3 mg/kg) にて実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 覚醒状態におけるドパミン神経活動と EGF 投与の影響

本課題では、慢性ワイヤー電極を用いて黒質緻密部のドパミン神経からの覚醒フリームービーング下で活動計測を行うことで、これまで明らかとなっているドパミン神経の生理特性変化が、ホームケージでの活動レベルや感覚刺激を提示した際にどのような影響をもたらすのかといった点について検討した。

ホームケージ内での自発発火活動に関しては発火頻度、バースト発火する割合とも、EGF 投与モデルマウスで有意に増加していることが明らかとなった。このことは、これまでの研究経過を通して明らかになった麻醉条件下での計測と概ね一致したものとなっており(発表論文 1)、しかも麻醉条件下と比較しコントロール動物との違いがより著明なものとなっていた。またこの結果は、EGF 投与ラット腹側被蓋野に関して、当研究室より発表された論文報告の結果とも概ね一致するものとなった(発表論文 2)。こうして EGF 投与モデルの、覚醒状態でのベースラインにおける活動レベルは頻度、バースト活動ともにコントロール群に対して亢進した状態にあることが判明した。

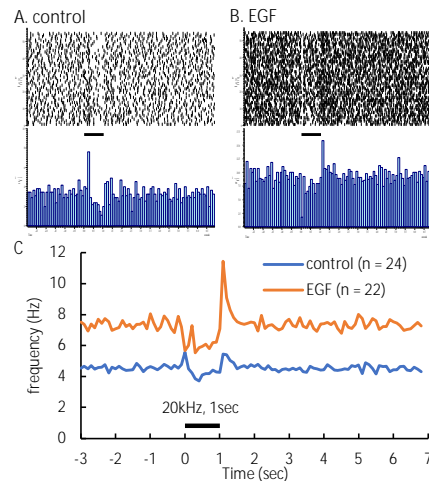


(図1) 覚醒状態における EGF モデルのドパミン神経では、ベースラインでの発火頻度(A)、バースト率(B)ともに著明な亢進を認めることができた。

##### (2) 覚醒時ドパミン神経の感覚応答特性と EGF 投与の影響

上記で認められた覚醒状態における神経活動レベルの亢進が、感覚刺激に対する応答特性にどのような影響をもたらすのかといった点に着目して解析するため、モデルマウスを用い、聴覚刺激(20K Hz または 5K Hz のトーン)や視覚刺激(白色光パルス、1 秒間)を提示した際の応答を検討した。

聴覚刺激に対する応答に関しては、実験群を問わず、5K Hz よりも 20K Hz のトーン刺激でより強い反応性を示した。また 20K Hz のトーン刺激に対し多くのドパミン神経は、刺激開始時に一過的な興奮性応答あるいは抑制性応答を示した後、刺激終了直後に一過的な頻度増加を示すことが判明した。標準化した PSTH を解析することにより、この刺激終了後の頻度増加のレベルが EGF 投与群で有意に増加していることが明らかになった(図 2)。こうして音刺激の周波数やタイミングに依存して異常な応答性がモデル動物のドパミン神経に生じていることが判明した。



(図2) EGF モデルのドパミン神経ではトーン刺激(20KHz, 1 秒間)直後の一過的な頻度増加が著明となっていた。代表的な刺激前後時間ヒストグラム(A, B)と全細胞のヒストグラムの平均(C)。

暗条件下で光パルス刺激を与えることにより、多くのドパミン神経はその開始時に一過的な頻度増加を示し、刺激終了直後の反応性は認められなかった。標準化した PSTH を解析したところ、刺激開始時の反応レベルにグループ間差を認めることができなかった。こうして、ドパミン神経における神経活動レベルの亢進は、視覚応答よりもむしろ聴覚性応答に著明に影響を及ぼすことが判明した。研究成果(1)(2)について第44回日本神経科学学会で報告した。

##### (3) 選択的ドパミン神経活動操作のための実験系の構築

モデル動物にみられる持続的なドパミン活動の亢進が統合失調症様行動や脳機能異常に及ぼす影響を検討するため、計画当初の段階では、光遺伝学的な実験手法を用いる計画であった。しかしながら、本計画実施においては動物の行動や計測系に技術的に制約がより少ない DREADD システムを選択し、実験系を構築するために覚醒ドパミン神経の活動性に対する人工リガンドの影響を検討した。

TH-cre トランスジェニックラットを用いて、AAV ウィルスを用いて Gq 共役型 DREADD( hM3Dq ) をドパミン神経特異的に片側性に発現させた(引用文献 1)。この動物の両側の黒質緻密部に慢性ワイヤー電極を留置し、覚醒状態でドパミン神経活動を計測した。さらに人工リガンドである酸化クロザピン(CNO)あるいは vehicle を全身性に投与した際の活動変化を計測し、対照となる非感染側から得られる活動あるいは vehicle 投与に対する活動と比較した。その結果、DREADD を発現させた側のドパミン神経において、CNO(0.3mg/kg, 皮下投与)を投与した際には、1時間以上にわたって1.5~2倍程度の頻度、バースト活動の亢進を確認することができた。一方で、そのような活動亢進は、非感染側でのCNO投与に対する応答、あるいは感染側の vehicle 投与に対する応答では認めることができなかった。こうして、DREADD システムにより、感染細胞に対して持続的な活動亢進を引き起こすことが確認された。

(成果のまとめ)

(1) 新生仔期 EGF を投与したモデル動物は、覚醒状態でより著明なベースラインレベルでの活動亢進を示しており、これまでの研究経過から明らかになっている麻酔条件下での計測結果や生理性変化を反映するものとなっていた。またラットモデルを用いた論文報告とも概ね一致するものとなっていた(発表論文 2)。このような覚醒状態でのドパミン神経活動の亢進やチャンネル機能異常は、統合失調症様の行動異常にも関与することが考えられる。実際、ドパミン神経に発現するチャンネル機能を遺伝的に機能障害させた遺伝子改変マウスや、思春期以降に慢性的にドパミン活性を亢進した動物においても、統合失調症に特有の行動異常が引き起こされることが報告されている(引用文献 2、3)。

(2) モデル動物が示すベースラインレベルの活動亢進は、聴覚刺激(特に高周波領域)に対する応答性に対して、著明に影響を及ぼしうることも明らかになった。このような高周波音刺激に対する応答性亢進は、モデル動物が示す行動特性、特に忌避性の超音波感受性亢進とも関連付けられる可能性がある。また、DREADD システムによりドパミン神経選択的な持続的な活動亢進を引き起こすことが可能となった。これまでに、腹側被蓋野でのベースラインのドパミン活動亢進が疾患の陰性症状の指標となる社会性行動の低下にも関与することが明らかとなっている(発表論文 2)。今後、モデル動物を利用しドパミン系と聴覚系の相互作用や行動評価法を検討することで、幻覚や妄想などの疾患症状とドパミン活動の関わりが明らかになるものと思われる(引用文献 4)。

<引用文献>

- Boekhoudt L, Omrani A, Luijendijk MC, Wolterink-Donselaar IG, Wijbrans EC, van der Plasse G, Adan RA. (2016) Chemogenetic activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area, but not substantia nigra, induces hyperactivity in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 26: 1784-1793.
- Soden ME, Jones GL, Sanford CA, Chung AS, Guler AD, Chavkin C, Lujan R, Zweifel LS. (2019) Disruption of dopamine neuron activity pattern regulation through selective expression of a human KCNN3 mutation. *Neuron.* 80: 997-1009.
- Petty A, Cui X, Tesiram Y, Kirik D, Howes O, Eyles D. (2019) Enhanced Dopamine in Prodromal Schizophrenia (EDiPS): a new animal model of relevance to schizophrenia. *NPJ Schizophr.* 5: 6.
- Schmack K, Bosc M, Ott T, Sturgill JF, Kepecs A. (2021) Striatal dopamine mediates hallucination-like perception in mice. *Science.* 372: eabf4740.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Namba H, Nawa H	4. 巻 441
2. 論文標題 Post-pubertal Difference in Nigral Dopaminergic Cells Firing in the Schizophrenia Model Prepared by Perinatal Challenges of a Cytokine, EGF	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 22-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.06.003	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Sotoyama H, Namba H, Kobayashi Y, Hasegawa T, Watanabe D, Nakatsukasa E, Sakimura K, Furuyashiki T, Nawa H	4. 巻 11
2. 論文標題 Resting-state dopaminergic cell firing in the ventral tegmental area negatively regulates affiliative social interactions in a developmental animal model of schizophrenia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transl Psychiatry	6. 最初と最後の頁 236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-021-01346-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 難波寿明
2. 発表標題 サイトカイン投与統合失調症モデルにおけるドパミン機能異常
3. 学会等名 新潟脳神経研究会第318回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 難波寿明、那波宏之
2. 発表標題 サイトカイン投与統合失調症モデルにおける覚醒状態でのドパミン神経自発発火活動と音刺激反応性
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------