

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300107

研究課題名（和文）

神経栄養因子による GABA 抑制神経の発達調節と機能制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Functional and Phenotypic Regulation of GABAergic Development with Neurotrophic Factors

研究代表者

那波 宏之（NAWA HIROYUKI）

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：50183083

研究成果の概要（和文）：

GABA 神経細胞は、神経伝達の抑制、活動パターン発生、発達可塑性（臨界期）の制御など脳神経回路機能において根幹的機能を果たす。近年、研究代表者らの研究から、この EGF ファミリー栄養因子は脳発達障害（自閉症・統合失調症）と関連していることが判明し、その重要性が明らかとなった。本課題では大脳皮質や基底核の GABA 神経やその各サブタイプに対する EGF ファミリー神経因子の生理活性、細胞内シグナル、病態貢献を明らかにすることを計画した。大脳皮質の GABA 神経細胞は 5 種くらいに大別されるがパルアルブミン含有タイプの細胞は ErbB4 を発現し、ニューレグリンに反応した。また AMPA 型グルタミン酸受容体の発現量を上昇させた結果 GABA 放出量を増加させ、ポストに強い抑制を発揮した。一方、同じ細胞は ErbB1 も発現、EGF に反応した。しかし、反応は真逆であった。つまり、AMPA 型グルタミン酸受容体の発現量を低下させ、GABA 合成も低下させ、結果、ポストにより弱い抑制をするようになった。対照的に基底核（淡蒼球）の GABA 神経細胞は、同じ EGF に反応して、その興奮性を高め、ポストに強い抑制を与えた。本研究から、脳内 GABA 神経細胞の発達はきわめて可塑的で、その細胞タイプ特異的に神経栄養因子に対する反応性とその反応方向が異なっていることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

GABAergic neurons play crucial roles in the brain functions, attenuating excitatory neurotransmission, generating oscillation activity patterns, and regulating developmental plasticity and critical periods. Recently, we implicate neurotrophic factors of the EGF family in the brain diseases of developmental origin such as autism and schizophrenia. In the present project, we planned to explore the physiological activity, cellular signaling, and pathologic contribution of EGF-like factors' actions on GABAergic neurons and their subtype(s). Among various subtypes of cortical GABAergic neurons, parvalbumin-positive GABA neurons carried ErbB4 and reacted with neuregulin-1. This factor elevated the expression of AMPA-type glutamate receptors, more efficiently derived GABA release, and produced stronger postsynaptic inhibition. The same type of GABAergic neurons expressed ErbB1 and responded to EGF as well, although the direction of the reaction was totally opposite; EGF down-regulated the glutamate receptor levels and glutamate acid decarboxylase expression, provoking more modest inhibition in postsynaptic neurons. In contrast, the same factor, EGF, exerted a distinct action on pallidal GABA neurons; it elevated the excitability of these neurons and enabled those to release more amounts of GABA in the target region. Therefore, these findings suggest that GABAergic neurons in the brain harbor dynamic plasticity to react with EGF-like factors but the direction and magnitude of the phenotypic responses differ significantly depending on individual subtypes of GABAergic neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
23年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
24年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：GABA、神経栄養因子、脳発達、大脳皮質、基底核、上皮成長因子、ニューレグリン、

1. 研究開始当初の背景

GABA 神経細胞は、神経伝達の抑制、活動パターン発生、発達可塑性（臨界期）の制御など脳神経回路機能において根幹的機能を果たす。これら GABA 神経細胞は、上皮成長因子（EGF）はニューレグリン(NRG)の受容体（ErbB1-4）を強く発現するが、脳由来神経栄養因子（BDNF）などとは異なり、その作用はほとんど判っていない。近年、申請者らの研究から、この EGF ファミリー栄養因子は脳発達障害（自閉症・統合失調症）と関連していることが判明し、その重要性が明らかとなった。本課題では大脳皮質や基底核の GABA 神経各サブタイプに対する EGF ファミリー神経因子の生理活性、細胞内シグナル、病態貢献を明らかにすることを計画した。本課題は立ち遅れていた EGF ファミリーの脳神経研究を先駆するとともに、GABA 神経機能調節の重要性を検証するものである。

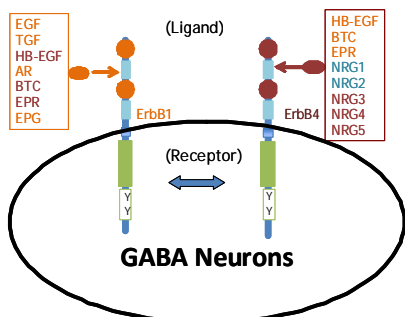


図1)GABA 神経細胞に発現する EGF ファミリーの栄養因子とニューレグリンファミリーの栄養因子の相互作用

2. 研究の目的

GABA 神経細胞は、前脳でシャンデリア細胞、バスケット細胞、ダブルブーケ細胞、メデイウムスパイニー細胞などに区分され、特有の Ca 結合蛋白発現や神経興奮性を示す。これらの GABA 神経細胞の発達・可塑性は、神経活動や神経栄養因子 BDNF によって調節されていることが知られている。しかし、シャンデリア細胞などの GABA 神経細胞は EGF や NRG 1 に対する受容体(ErbB1、ErbB4)も強く発現している。最近の申請者の実験から、GABA 神経細胞はこれらの受容体を介して NRG 1 や EGF に反応しうるということが判明していた。

神経栄養因子 EGF と NRG1 は、同じ分子ファミリーに属し、これまで癌細胞の増殖、分化において深い研究がなされてきた。同分子ファミリーには、TGF や HB-EGF、Amphiregulin、NRG2-5 など多種の因子が存在する(図1)。これらの神経栄養因子は、細胞膜表面にアンカーする膜結合型前駆体から、神経興奮などにより活性化された ADAM プロテアーゼにより切断、放出されるため、神経活動依存的可塑性に寄与しうる。また、ヒト精神疾患やモデル動物の研究からは EGF や NRG 1 と統合失調症の関連が指摘されているものの、その生理活性や脳神経病理には不明な部分が多い。本計画では前脳 GABA 神経細胞とそのサブタイプに焦点を当て、神経栄養因子 EGF や NRG1 の慢性・急性な神経栄養作用やシナプス生理活性を解析することで、これら因子の生理機能とそのメカニズムを探求した。

3. 研究の方法

前脳 GABA 神経細胞は、シャンデリア細胞、バスケット細胞、ダブルブーケ細胞等の介在神経（5種）に加え、基底核では投射神経で

あるメデイウムスパイニー細胞なども加わる。これら GABA 神経は、パルアルブミン (PV)、カルレチニン、カルピンチンなど特有の Ca 結合蛋白を含有し、独特の神経興奮性を示す。本計画では、これら神経化学的実験や生理学的計測により各 GABA 神経細胞種を同定した上で、EGF と NRG1 に対する各種生理反応を分析した。実験系としては、細胞環境を操作しやすい培養系 (in vitro) とより生理的な栄養因子投与された動物 (in vivo) を用いた。加えて EGF や NRG1 の過剰発現 TG マウス、受容体 ErbB のノックアウトマウスを活用し、内在性活性と外来性活性を弁別して、下記の疑問に迫った。

4. 研究成果

< 課題 1 >

各 GABA 神経細胞種における ErbB1、ErbB4 受容体の活性化度とシグナル経路の違いは？

我々の in situ ハイブリダイゼーションの解析では大脳皮質 4 - 6 層を中心としてシャンデリア型 PV ポジティブな細胞はほとんど NRG1 受容体 ErbB4 mRNA を発現している (図 2)。

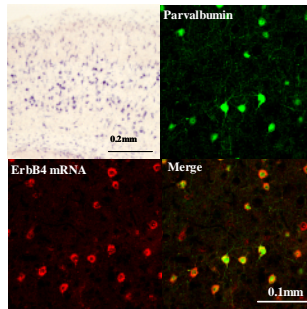


図 2) 大脳皮質におけるパルアルブミンと ErbB4 mRNA の共存

また、旧来の論文によると、このタイプの GABA 神経細胞は EGF 受容体 ErbB1 も含有していることが報告されている。

がん細胞における EGF と NRG1 のシグナルの研究から、EGF は強くカルシウム系のシグナルを駆動すると

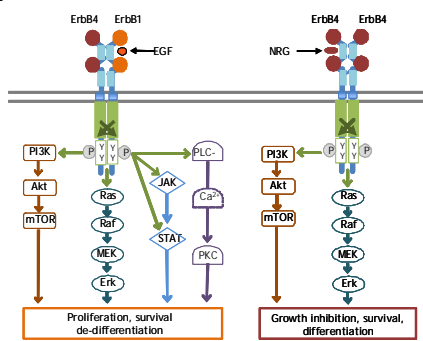


図 3) 受容体 ErbB1 と ErbB4 の細胞内シグナル伝達経路の違いとそれらの相互干渉

もに、ストレス系のシグナル (JAK/STAT) も惹起させる。一方、ErbB4 の活性化では、このような現象は起きないとされている (図 3)。つまり、癌細胞では EGF は脱分化、細胞増殖、移動が誘発されるのに対し、NRG1 では分化、細胞接着が強化されると

一般的に言われている。つまり、この両方の栄養因子は、相反する生理活性を有すると考えられる。このような活性が脳神経、とくに ErbB1、ErbB4 受容体を発現している GABA 神経細胞でも観察されるかがおおきな疑問であった。

予想に反し、今回、培養した大脳皮質の神経細胞を EGF と NRG1 で刺激しても、Akt, Erk のリン酸化やカルシウム動態で見限り、大きな差異は観察されなかった。

< 課題 2 >

各 GABA 神経細胞群で EGF や NRG1 蛋白の神経栄養活性の質とその強度はどう異なるのか？

シャンデリア型 PV ポジティブな GABA 神経細胞は、上記のように EGF と NRG1 の両受容体を発現しているため、これらの栄養因子は協調的、もしくは競合的な反応を誘発することが予想される。EGF と NRG1 のタンパクを新生児ラット・マウスに投与して、PV ポジティブな GABA 神経細胞の反応を神経化学的な表現型変化から推定した。

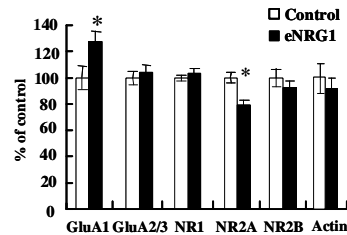


図 4) NRG1 による大脳皮質神経細胞のグルタミン酸受容体形質の変化

NRG1 のコアタンパク (eNRG1) を約 10 日間 in vivo 投与すると、AMPA 型グルタミン酸受容体 (GluA1) の上昇と NMDA 型グルタミン酸受容体 (NR2A) の低下が観察された (図 4)。これまでの大脳皮質培養系の実験結果から、これらの表現型変化はシャンデリア型 PV ポジティブな GABA 神経細胞の反応を反映するものと推定された。

続いて、EGF タンパクを約 10 日間 in vivo 投与すると、AMPA 型グルタミン酸受容体 (GluA1) の低下に引き続き、GABA の合成酵素

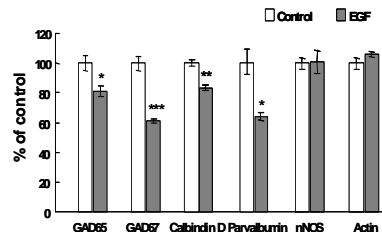


図 5) EGF による大脳皮質 GABA 神経細胞形質の変化

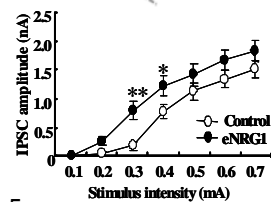
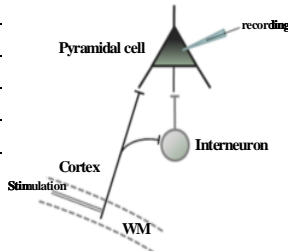
GAD65/67 の低下、加えて顕著なパルアルブミン PV 量の減少が観察された (図 5)。カル

ピンジンや一酸化窒素合成酵素(nNOS)への影響は、弱く、これらのマーカーを含有する籠型 GABA 細胞など別種 GABA 神経細胞群の反応性は低いことが推定された。この実験結果から、EGF と NRG1 は、同じパルアルブミン陽性 GABA 神経細胞を標的として、全く逆の反応を引き起こしうることが判明した。

< 課題 3 >

EGF と NRG1 過剰・欠損シグナルは、GABA 神経の入出力シナプスと興奮性をどう変化させるのか?

NRG1 タンパクを in vivo 投与された新生児マウスから、スライス標本作製し、大脳皮質 GABA 神経細胞の抑制機能、入力感受性をフィールド記録にて、測定した。5



層の錐体細胞で IPSP を測定したところ、N

図 6) NRG1 による大脳皮質 GABA 神経由来 IPSP の増強

RG1 投与群では、顕著な IPSP の増強が観察された(図 6)。

それに引き続く、シャンデリア型 PV ポジティブな GABA 神経細胞からのミニアチュア IPSP の解析から、この細胞の AMPA 型グルタミン酸感受性が亢進することで、結果、駆動力が増し、より強い抑制出力が発揮されたことが判明している。この事実は、図 4 にある NRG1 による大脳皮質神経細胞のグルタミン酸受容体 GluA1 の上昇との矛盾しない。なぜなら、シャンデリア型 PV ポジティブな GABA 神経細胞の GluA1 発現量は極めて高く、ウエスタンの結果は、この細胞群のグルタミン酸受容体 GluA1 の上昇を反映しうると解釈できるからである。

同様に EGF タンパクを in vivo 投与された新生児マウスから、スライス標本作製し、シャンデリア型 PV ポジティブな GABA 神経細胞の抑制機能をパッチクランプ記録にて、測定した。図 5 にあるように、EGF は AMPA 型グルタミン酸受容体 (GluA1) の低下を引き起こすため、ミニアチュア EPSP は低下することが予想された。なお、この細胞群は、電流注入で細胞膜は高頻度発火するので、その他の GABA 神経細胞とは区別できる。高頻度発火細胞、つまりシャンデリア型 PV ポジティブ細胞では、ミニアチュア EPSP の強度、頻度ともに弱化していた(図 7)。その他の低頻度

発火型の GABA 神経細胞では、このような現象は観察されなかった。

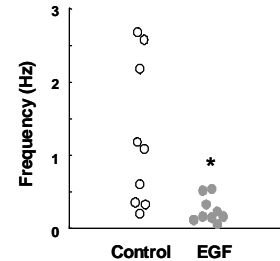
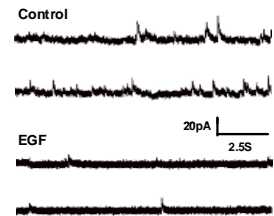


図 7) EGF による大脳皮質 GABA 神経のミニ EPSP の低下

これらの実験は全て、外来性に栄養因子を投与して起きた現象である。内在性の EGF と NRG1 過剰・欠損シグナルの及ぼす大脳皮質 GABA 神経細胞への影響も調べてみた。

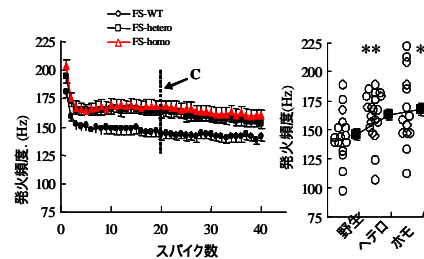


図 7) EGF 受容体のシャンデリア型 PV ポジティブ GABA 神経細胞 (FS) での特異的欠損と膜興奮性

EGF 受容体 (ErbB1) のコンディショナル LOX マウスとシャンデリア型 PV ポジティブ GABA 神経細胞 (FS) に CRE 組み換え酵素を発現する 2 系統のマウスを交配させて、当該細胞群だけ EGF 受容体を欠損させた。そこからスライス標本作製し、電流注入による膜興奮性の変化を測定したところ、ホモの EGF 受容体欠損マウスでは、膜興奮性が高く、より GABA 神経発達が亢進していることが判明した。上記の投与実験の結果と一致して、EGF シグナルはシャンデリア型 GABA 神経細胞の発達と機能を抑制していることが明らかとなった。

< 課題 4 >

EGF や NRG1 蛋白に対する各種 GABA 神経細胞群の生理学的反応差の検討

GABA 神経細胞が存在するのは大脳皮質だけではない。大脳基底核には様々な GABA 神経細胞が高密度に存在している。ここでは淡蒼球 GABA 神経細胞に着目して、EGF の高価を抑制性シナプス出力や自発発火頻度に及ぼす影響を評価した。EGF の in vivo 投与モデルを使って、ユニット記録とパッチク

ランプで解析を行った。新生児期の EGF 投与は、淡蒼球外周部での発火頻度を増大させた (図 8)。

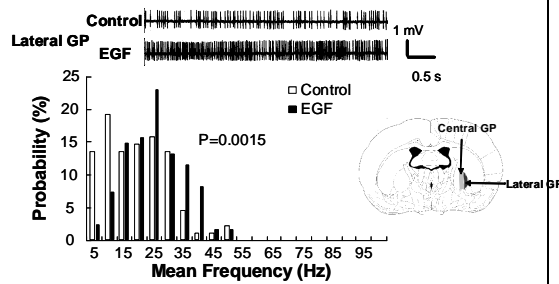


図 8) EGF による淡蒼球外周部 GABA 神経の発火頻度の亢進

加えて、*in vivo* ダイアリシス法により、淡蒼球外周部 GABA 神経の出力先(黒質)における GABA 放出量をモニターしたところ、定常状態での低下を観察した (図 9)。この GABA 機能低下現象は、大脳皮質 GABA 神経細胞の反応とは、逆で対照的である。

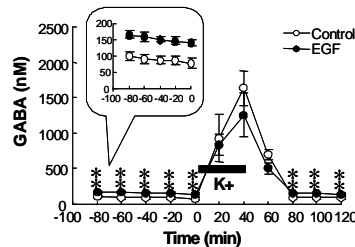


図 9) EGF 刺激による黒質 GABA 濃度の定常的上昇

以上の実験結果から、大脳皮質や淡蒼球の PV ポジティブ GABA 神経は、EGF や NRG1 に反応し、興奮性、GABA 放出能を可塑的に変換する能力を有するが、その方向性、強度は、個々の GABA 神経のサブタイプに依存することが判明した。

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 5 件)

Iwakura Y, Nawa H, ErbB1-4-dependent EGF/neuregulin signals and their cross talk in the central nervous system: pathological implications in schizophrenia and Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:4

Sotoyama H, Namba H, Chiken S, Nambu A, Nawa H. Exposure to the cytokine EGF leads to abnormal hyperactivity of pallidal GABA neurons: implications for schizophrenia and its modeling. *J Neurochem.* 2013 Feb 25.

Nawa H, Yamada K. Experimental schizophrenia models in rodents established with inflammatory agents and cytokines. *Methods Mol Biol.* 2012;829:445-451.

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 Apr 13;31(15):5699-5709.

Wang R, Iwakura Y, Araki K, Sotoyama H, Takei N, Nawa H. In vitro production of an active neurotrophic factor, neuregulin-1: qualitative comparison of different cell-free translation systems. *Neurosci Lett.* 2011 Jun 22;497(2):90-93

[学会発表](計 6 件)

Nawa H, Namba H, Iwakura Y, Takei N, Sotoyama H. Pallidal hyperdopaminergic innervation induced by neonatal exposure to epidermal growth factor; implication in schizophrenia. The 11th Biennial Meeting of APSN. Spt29-Oct 2, 2012, Kobe JAPAN.

Nawa H, Iwakura Y. Neurotrophic interaction of midbrain dopaminergic neurons with EGF and neuregulin-1; implication in schizophrenia. The Bit's 3rd Annual World Congree of NeuroTalk-2012. May 18-20, 2012, Beijin CHINA.

Sotoyama H, Zheng Y, Mizuno M, Aizawa Y, Abe Y, Ishizuka R, Wang R, Iwakura Y, Nawa H. Pallidal hyperdopaminergic states and PPI deficits induced by peripheral challenge of epidermal growth factor to rat neonates. The 41st Annual Meeting of Society for Neuroscience. Nov. 12-16, 2011, Washington DC, USA.

武井延之、石塚佑太、那波宏之：神経細胞では AMPK が成長因子による mTORC シグナル活性化と蛋白合成促進をドミナントに制御する。第 33 回日本分子神経生物学会・第 83 回日本生化学会大会・合同大会、平成 22 年 12 月 7 日～10 日、神戸

Nawa H. Neurotrophic contribution of EGF and neuregulin-1 to Parkinson's disease and schizophrenia. Japan-Korea Joint Conference on Brain Aging and

Neurodegeneration. Nov 21-22, 2010.
Nagasaki JAPAN.

王 再、岩倉百合子、武井延之、石塚佑太、
鄭英君、加藤泰介、東山繁樹、那波宏之：ニ
ューレグリン1亜型の示す ErbB 受容体親和
性差とシグナル変化。第 53 回日本神経化学
会、平成 22 年 9 月 2～4 日、神戸

〔図書〕(計 0 件)

特記すべきもの無し

〔産業財産権〕

特記すべきもの無し

〔その他〕

特記すべきもの無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那波 宏之 (NAWA HIROYUKI)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：50183083

(2) 研究分担者

難波 寿明 (NAMBA HISAAKI)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号：90332650

(3) 連携研究者

尾崎美和子 (OZAKI MIWAKO)
早稲田大学・生命医療工学研究所・教授
研究者番号：30291058