

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461745

研究課題名(和文) 不安行動惹起遺伝子の特定と治療法開発

研究課題名(英文) Identification of anxiety induced gene and therapeutic approach

研究代表者

稲垣 真澄 (Inagaki, Masumi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所知的障害研究部・部長

研究者番号：70203198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：不安障害、パニック障害の原因は今のところ不明である。本研究は、行動学的に不安様症状を呈するミュータントマウス(bv)の原因遺伝子を明らかにすること、不安障害に至る分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、bvの原因遺伝子は神経細胞だけに発現する選択的スプライシング調節因子であるSrrm4であることが判明した。成体マウスにおいてGABA A受容体 2サブユニット(Gabrg2)のスプライシングバリエーションの発現比率が対象群とは異なることが確認され、本遺伝子がヒトGABA神経系機能調節に関わることがうかがわれた。さらに、初代培養ニューロンにSrrm4ノックダウンを行う実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：The cause of anxiety disorders and the panic disorder has been unknown. We aimed to determine the gene responsible for mutant mice (bv) exhibiting behaviorally anxiety-like symptoms, and aimed to reveal the molecular mechanisms leading to anxiety disorders. As a result, the cause gene of bv mouse was proved to be Srrm4, which was an alternative splicing controlling element to develop only in neurons. It was confirmed that expression ratio of splicing variants of GABA A receptor 2 subunit (Gabrg2) in adult mice are different from in the control group, and it was indicated that this gene was associated with human GABA nervous system function adjustment. Furthermore, we made the experiment system that we knocked down Srrm4 in a primary culture neuron.

研究分野：小児神経学

キーワード：不安 GABA神経系

1. 研究開始当初の背景

Bronx waltzer mouse (bv マウス) は常染色体劣性形式をとる自然発生型の難聴モデルとして報告 (Deol et al, Nature. 1979, 278:251-53) され、内耳コルチ器の内有毛細胞のみの変性・細胞死が特徴である。研究代表者らのグループは、bv マウスのもう一つの表現型の特徴である幼若期からの強い不安行動に着目し、bv 遺伝子の特定と bv 遺伝子の脳神経ネットワーク形成制御の解明を目指して研究を進めてきた。その結果、bv マウスにおいては、生後6週より高架式十字迷路で open arm 滞在時間が減少するという不安様行動が顕著になることと、成体マウスの大脳皮質において GABAergic interneuron (parvalbumin 含有タイプ) が減少することを見いだした。

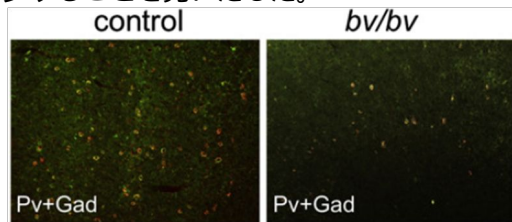


図1 大脳皮質 GABAergic interneuron

さらに脳波解析により大脳皮質 interneuron の特性を示す高周波領域が減弱すること (Matsuda et al, Brain Res. 2011, 1373:202-10) が明らかになり、bv 原因遺伝子が脳内の GABAergic 神経系の構築・機能に關与している可能性を確認した。

2. 研究の目的

本研究では、bv 候補遺伝子の遺伝子解析・機能解析を進めることにより、「不安惹起遺伝子」である bv 遺伝子を特定し、発達過程において bv 遺伝子が不安にかかわる脳のネットワーク構築および制御にどのように関わっているか解明する。今回の bv 遺伝子の研究を通して、幼若「脳」における不安形成機構の遺伝学的な個人差を明らかにし、不安・パニック症候群の病態解明およびその治療法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 候補遺伝子の正常および bv マウス蝸牛での発現の有無の解析による候補遺伝子絞り込みと同定
正常蝸牛で高発現されており、bv で明らかな発現量の変化(特に低下)している遺伝子は、有力な bv 候補遺伝子となると考えられる。そこで、生後7日の蝸牛組織から作成した cDNA を用いて、正常および bv 蝸牛組織における全 bv 候補遺伝子の発現レベルを定量的 RT-PCR にて解析する。現在、全 bv 候補遺伝子について、専用ソフトウェア(ABI Primer Express)を用いて定量 PCR 用のプライマーを設計し、予備実験にて、すべての候補遺伝子が正常蝸牛で発現されていること(うち14遺伝子が中程度以上に発現)、一部の遺伝

子の発現量が bv にて上昇していることが示唆されていた。より正確な定量的検討にて詳細な発現量の解析を行った結果、2 候補に絞ることができた。

(2) bv 責任遺伝子の発現および機能解析：特に GABAergic 神経系に注目して

bv 遺伝子にコードされる蛋白の生理学的な機能や発現様式を明らかにするため、同定された bv 遺伝子とコードされている蛋白の脳全体・内耳蝸牛における発現様式を明らかにする。発現解析は in situ ハイブリダイゼーション法 (mRNA 解析～一部を既に施行) 及び特異的抗体を用いた免疫染色にて行う。胎生期から出生後の発達の過程を追って脳全体・内耳蝸牛組織における発現様式を明らかにする。

遺伝子変異が GABAergic neuron の構築・制御に影響するのか検討

電気生理学的検討(パッチクランプ法)にて、bv マウスの大脳皮質・海馬における GABAergic neuron におけるチャンネル特性に異常が生じているか確認する。

4. 研究成果

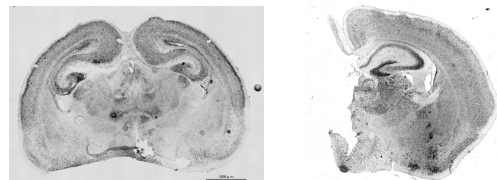
(1) bv 遺伝子の絞り込みと同定

本マウスの遺伝子の解析を進めていたところ、海外の研究者から bv 原因遺伝子として選択的スプライシングに關与する遺伝子である Srrm4 が特定された (Nakano et al, Plos Genet. 2012;8(10):e1002966)。すなわち、bv マウスは内耳における選択的スプライシング調節異常の結果、内有毛細胞特異的な細胞変性～難聴が生じることが明確に示された。

(2) 責任遺伝子の発現と機能解析

上記により、Srrm4 異常が GABA 作動性介在ニューロンの構築、機能異常をきたして、不安障害につながっている可能性が示されたため、本遺伝子 mRNA 発現パターンを発達的に検討した。

生後1日齢、7日齢、21日齢の対照マウス (C57BL/6J) の Srrm4 mRNA 発現を in situ hybridization により観察した。その結果、全日齢と通して、特に海馬、小脳の顆粒細胞層、嗅球の mitral cell layer にて Srrm4 mRNA の強い発現が確認された。また、皮質領域においては全体的に広く Srrm4 mRNA の発現が見られる中で発達が進むにつれて比較的強い発現が見られる層が移動していることが明らかになった。この結果は Srrm4 mRNA はむしろ興奮性ニューロンにおける発現が強



いのではないかと予測された。

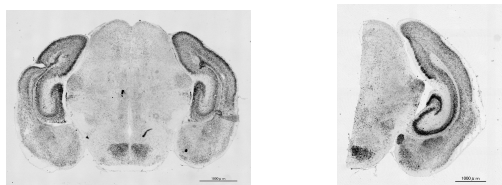


図2 Srrm4 日齢1 日齢7

生後1日齢、7日齢、21~30日齢のC57BL/6J(対照)およびbvマウスのGAD67, パルプアルブミン(PV)タンパクについて免疫蛍光染色を行った。その結果、生後1日齢、7日齢の皮質においては、パルプアルブミン陽性GABAergic interneuron(G-IN)の発現はWT、bvともに認められず。GAD67陽性細胞においても2群間の差は認められなかった。生後21~30日齢条件において、bvマウス帯状回皮質のPV陽性interneuronの有意な減少が認められた($p=0.05$, 各群 $N=5$)。

また、帯状回皮質、聴覚皮質、視覚皮質においても有意な差は認められなかったが、bvマウス群でのPV陽性INの減少傾向が確認されている。つまり、生後21~30日齢の時点で既に皮質領域におけるPV陽性INの減少が確認されたことから、生後7日齢以降のIN成熟段階において異常が生じていることが考えられる。

以上のことから、bvマウスの原因遺伝子であるSrrm4の異常は、PV陽性GABAergic interneuronの成熟に間接的に関与していることが示された。

Srrm4調節のターゲット遺伝子について発現解析を検討

対照マウスbvマウスの皮質サンプルを用いて、GABA A受容体2サブユニット(Gabrg2)mRNA発現解析を実施した。すなわち、Ct法によるmRNA発現量解析を行った。その結果、exon9の挿入が起こるisoform(Gabrg2-L)の発現がbvマウスでは低下していた。一方、exon9をスキップするisoformでは2群間の差が認められなかった。この点から、bvではGABA A受容体2サブユニットのスプライシング調節に影響している可能性を見出した。

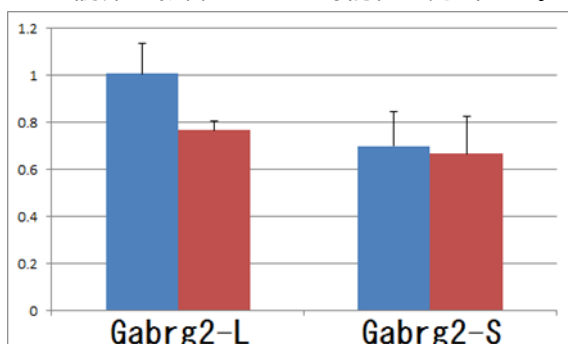


図3 Gabrg2 mRNA発現量比較(赤バーがbv)

さらに、GABA A受容体2サブユニットの機能的異常を解明するため、初代培養ニューロ

ンにSrrm4ノックダウンを行う実験系を作成した。まずSrrm4shRNA発現ベクター作成、レンチウイルスへのパッケージ、導入後のSrrm4発現およびGABA A受容体2サブユニット発現の関連性を検討した。

皮質ニューロンのパッチクランプ

bvマウスおよび対照マウスの皮質、扁桃体において、whole cell法でGABAergic spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs)、GABAergic miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs)を記録したところ、対照群と比べてbv群はGABAergic synaptic currents形状に変化がみられ未熟であった。そして、synaptic currentsが生後6週にかけて減少する傾向があった。また、前帯状皮質、外側扁桃体における錐体細胞のGABA膜電流頻度が減っていた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Gunji A, Inagaki M: Noninvasive detection of face perception specificities in children with autism spectrum disorders. Japanese Psychological Research. 56: 91-102, 2014. (査読有) doi: 10.1111/jpr.12038

[学会発表](計3件)

李コウ, 太田英伸, 泉仁美, 松田芳樹, 関美佳, 戸田宜子, 秋山美沙紀, 松島由紀子, 加我牧子, 稲垣真澄: 不安様行動におけるCCKA、CCKB受容体の異なる役割. Neuro2013, 京都, 2013.6.21.

Inagaki M: Progress in "Brain & Mind" study of the field of developmental disorder research. シンポジウム2脳とこころの研究の進歩, (独)国立精神・神経医療研究センター(NCNP)・メルボルン大学精神医学部門合同シンポジウム, 東京, 2013.6.28.

Shirakawa Y, Izumi H, Nakamura S, Inoue K, Goto Y, Inagaki M: The Brain expression pattern of Srrm4, the gene mutated in bronx waltzer mice, and its effect on GABAergic interneuron. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Yokohama, 2014.09.11-13.

[図書](計1件)

稲垣真澄: 第1章 発達障害の概念. 有馬正高(監修), 有馬正高, 熊谷公明, 加我牧子(編集): 発達障害 基礎と臨床. 日本文化科学社, 東京, pp2-13, 2014.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲垣 真澄 (INAGAKI, Masumi)

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・知的障害研究
部・部長

研究者番号：70203198

(2)研究分担者

加我 牧子 (KAGA, Makiko)

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・知的障害研究
部・客員研究員

研究者番号：20142250

刑部 仁美 (OSAKABE, Hitomi)

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・知的障害研究
部・研究補助員

研究者番号：30625520

李 コウ (LI, Heng)

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・知的障害研究
部・流動研究員

研究者番号：70621994

太田 英伸 (OHTA, Hidenobu)

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・知的障害研究
部・診断研究室長

研究者番号：80422103

杉浦(白川) 由佳 (SUGIURA(SHIRAKAWA),
Yuka)

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・知的障害研究
部・流動研究員

研究者番号：50750402

(3)連携研究者

井上 健 (INOUE, Ken)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究
センター・神経研究所・疾病研究第二部・
室長

研究者番号：30392418