

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06784

研究課題名(和文) PTSD治療に向けたパルプアルブミン陽性細胞の状態操作手法の確立

研究課題名(英文) Manipulation of the activity of parvalbumin-expressing interneurons against post-traumatic stress disorder

研究代表者

田村 英紀 (Tamura, Hideki)

星薬科大学・先端生命科学研究所・特任准教授

研究者番号：80437516

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)：コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを主成分とする特殊化した細胞外マトリックスであるペリニューロナルネット(PNN)は、主に抑制性神経細胞周囲に存在し、臨界期の決定やシナプス可塑性に寄与している。しかしながら、本研究において、扁桃体を含めた情動記憶に関係する脳領域では、PNNは主に興奮性神経細胞周囲に形成されていることが明らかとなった。このPNN形成興奮性細胞は、手がかり恐怖条件づけ学習や恐怖記憶の想起時において、PNNを形成していない細胞と比較して、活性化する割合が高かった。また、PNN形成興奮性細胞の活性化レベルは、恐怖記憶の強度と正の相関を示した。

研究成果の概要(英文)：Perineuronal nets (PNNs), proteoglycan-rich extracellular matrix structures, are thought to be expressed around inhibitory neurons and contribute to critical periods of brain function and synaptic plasticity. However, in some specific brain regions such as the amygdala, PNNs were predominantly expressed around excitatory neurons. These neurons were recruited during auditory fear conditioning and memory retrieval. Indeed, the activation of PNN-expressing excitatory neurons predicted cognitive performance.

研究分野：神経科学

キーワード：ペリニューロナルネット パルプアルブミン 扁桃体 cFos 恐怖条件づけ 記憶痕跡

1. 研究開始当初の背景

特定の神経細胞の細胞体および樹状突起を取り巻いている細胞外マトリックスであるペリニューロナルネット (PNN) は、臨界期の決定や恐怖記憶の固定、薬物依存などに関与している。PNN は、コンドロチン硫酸プロテオグリカンを主成分とし、その特徴的な糖鎖構造が、細胞周囲のイオン濃度の制御やシグナル分子に対する足場として役立ち、また、PNN の密な網目状構造は、シナプス結合やイオンチャネル、受容体の可動性に影響を与える。それによって、PNN で覆われた細胞の特性は、PNN が形成されていない細胞とは顕著に異なっていると考えられるが、これまでその性質の差異が起因となる特徴的な細胞機能について詳細に検討されてこなかった。

これまで PNN は、100 以上の脳領域で認められる一方で、各脳領域内では、少数の特定細胞にしか形成されていないことが認められている。特に、パルプアルブミン陽性 (PV) 抑制性細胞周囲には、高密度な PNN が形成されており、PV 細胞の成熟や神経活動を制御している。そのため、PV 細胞周囲の PNN を分解除去すると、局所神経ネットワーク内の抑制性活動が著しく低下する。一方、大脳皮質領域における錐体細胞周囲にも PNN が存在することが報告されているが、その形成細胞数および細胞周囲の存在量が少ないため、PNN は、興奮性細胞の機能にはほとんど関与していないと考えられている。

こうした背景を踏まえ、本研究では、PNN が関わる細胞機能及び分子シグナルを明らかにするために、全脳領域内において PNN が形成している細胞を同定し、PNN 形成細胞と個別脳領域の機能との関係性を探ることを目的とした。また、PNN が PV 細胞の神経活動を制御していることから、PV 細胞における神経活動依存的な分子シグナルのはたらきも検討した。

2. 研究の目的

PNN が関わる特徴的な細胞機能を抽出し、高次機能との関係性を明らかにする。特に、大脳辺縁系が重要な役割を果たしている連合記憶やてんかん重積について検討する。

3. 研究の方法

PNN 染色法

PNN を検出するために、コンドロイチン硫酸鎖を特異的に認識する植物由来のレクチン (*Wisteria floribunda* agglutinin, WFA) を用いた。ピオチン標識した WFA を作製したマウス脳スライスと反応させた後、Alexa 594-conjugated streptavidin によって可視化した。

手がかり恐怖条件づけ学習試験

マウスをテストチャンバーに入れ、30 秒間のホワイトノイズ (65 dB, 1 Hz) を呈示後、0.3 mA の電気ショックを 1 秒間与えた。この音と電気ショックの操作は、合計 5 回行った。翌日、テストチャンバーとは異なる箱にマウスを入れ、ホワイトノイズを 1 回呈示した際のすくみ行動を測定し、恐怖記憶の想起レベルを評価した。すくみ行動は、呼吸動作を除いたマウスの動きが 2 秒間停止した状態とし、ホワイトノイズ呈示中の 30 秒間マウスが停止した場合を 100% として算出した。

興奮/抑制バランスの解析

マウスの腹腔内にカイニン酸を投与 4 時間後に、マウスを灌流固定し脳スライスを作製した。抗 cFos 抗体を用いた免疫組織化学的染色後、cFos 陽性抑制性細胞数に対する cFos 陽性錐体細胞数との割合を解析し、興奮/抑制バランスを評価した。

4. 研究成果

PNN 形成興奮性神経細胞の同定

まず全脳領域で PNN が認められる細胞種を WFA 染色によって調べた。この際、抑制性細胞と興奮性細胞を区別して PNN を検出するために、GAD67 遺伝子に GFP をノックインした遺伝子改変マウスを用いた。視覚野や前帯状回、側坐核、中隔核、黒質、海馬 (CA1, CA3, 歯状回) などの領域では、WFA の陽性反応は、全て GFP 陽性の抑制性細胞周囲に認められた。一方、扁桃体や視床下部、海馬 CA2 領域、嗅内皮質、梨状皮質、ectothalamic cortex、temporal association cortex などの情動記憶に関わる脳領域では、WFA 陽性反応は、ほとんど GFP 陰性の細胞周囲に認められた。この GFP 陰性の細胞には、CaMKII が発現していた。従って、情動記憶に関係する脳領域における一部の興奮性細胞には、PNN が集積していることが明らかになった。

PNN 形成興奮性神経細胞は記憶獲得および想起時に優先的に活性化される

次に、音と電気ショックによる手がかり恐怖条件づけ学習で活性化される細胞を抗 cFos 抗体によって検出し、PNN 陽性細胞が記憶痕跡にリクルートされるか否かを検討した。その結果、WFA 陽性興奮性細胞では WFA 陰性興奮性細胞と比較して、cFos の発現確率が約 6 倍も高かった。一方で、PV 細胞では、PNN 形成の有無によって cFos 発現の選択性に有意な違いは認められなかった。また、音と電気ショックをランダムに与えて連合記憶を形成させなかったマウスでは、連合記憶を形成させたマウスに比べて WFA 陽性興奮性細胞における cFos の発現確率が有意に低かった。従って、連合学習時に PNN

形成興奮性細胞は、優先的に活性化することが明らかとなった。また興味深いことに、WFA 陽性興奮性細胞における cFos の発現確率は、恐怖記憶の想起レベルと正の相関を示した(図 1)。以上のことから、PNN 形成興奮性細胞の活性化が認知能力を決定していることが明らかとなった。

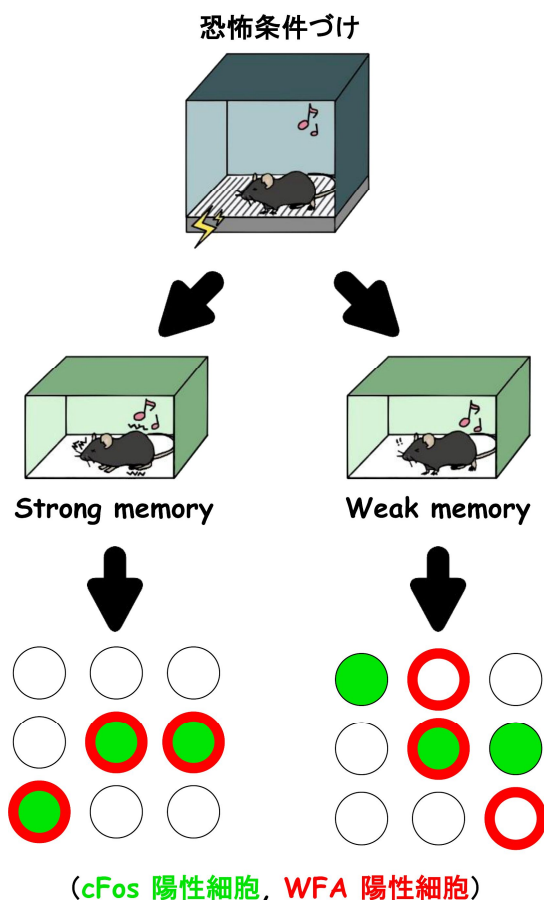


図 1. PNN 形成興奮性細胞における cFos の発現割合が高いマウスでは、強い恐怖記憶を示し、cFos の発現割合が低いマウスでは、記憶レベルが低い。

神経活動依存的な PV 細胞の活動制御分子メカニズムの解明

細胞外プロテアーゼであるニューロプシンは、Neuregulin-1 (NRG1)-ErbB4 シグナルを介して PV 細胞の神経活動を制御する。そこで、ニューロプシンが海馬 CA1 領域の興奮/抑制バランスを制御しているか検討した。その結果、ニューロプシン遺伝子欠損マウスでは、PV 細胞の活動低下による興奮/抑制バランスの増大を示すことが明らかとなった。また、この神経ネットワーク異常が易てんかん性を引き起こす要因となっていた。こうしたネットワーク異常や易てんかん性は、ニューロプシンによって切断された NRG1 ペプチドの投与によって回復した。このように、ニューロプシンによる PV 細胞の状態操作によって海馬機能を修飾できることが明らかになった。

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)

Tamura H, Shiosaka S, and Morikawa S. (2017) Trophic modulation of gamma oscillations: The key role of processing for Neuregulin-1 and BDNF precursors. *Neurochem Int.*, 17, 30461-30468. doi: 10.1016/j.neuint.2017.12.002. (査読有)

Morikawa S, Ikegaya Y, Narita M, and Tamura H. (2017) Activation of perineuronal net-expressing excitatory neurons during associative memory encoding and retrieval. *Sci Rep.*, 7, 46024. doi: 10.1038/srep46024. (査読有)

Kawata M, Morikawa S, Shiosaka S, Tamura H. (2017) Ablation of neuropsin-neuregulin 1 signaling imbalances ErbB4 inhibitory networks and disrupts hippocampal gamma oscillation. *Transl Psychiatry*, 7, e1052. doi: 10.1038/tp.2017.20. (査読有)

田村英紀, 塩坂貞夫 (2016) ニューロプシンによる海馬認知機能の制御. *脳* 21, 19, 20-25. (査読無)

田村英紀 (2015) ニューロプシンによる統合失調症脆弱因子 Neuregulin-1 のプロセッシングを介した抑制性ニューロンの制御機構. *日本生物学的精神医学会誌*, 26, 187-191. (査読無)

[学会発表](計 3 件)

森川勝太、池谷裕二、成田年、田村英紀 「Activation of perineuronal net-positive excitatory neurons during associative memory learning」第 60 回日本神経化学学会大会、口頭発表(優秀口頭発表賞受賞)、仙台、2017 年。

河田美穂、田村英紀、葛巻直子、成田道子、塩坂貞夫、成田年「統合失調症に關与する新しい抑制性神経ネットワーク制御機構」第 89 回日本薬理学会年会、口頭発表、横浜、2016 年。

森川勝太、河田美穂、塩坂貞夫、田村英紀 「Ablation of neuropsin-neuregulin 1 signaling imbalances ErbB4 inhibitory networks and disrupts hippocampal gamma oscillation」第 58 回日本神経化学学会大会、ポスター発表、大宮、2015 年。

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田村 英紀 (TAMURA, Hideki)
星薬科大学・先端生命科学研究所・特任准
教授
研究者番号 : 80437516