

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22468

研究課題名(和文)統合失調症の視床網様核機能異常仮説の検討

研究課題名(英文) Examination of the thalamic reticular nucleus dysfunction hypothesis of schizophrenia

研究代表者

少作 隆子 (Ohno-Shosaku, Takako)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：60179025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：GABA作動性抑制性ニューロンからなる視床網様核の役割を明らかにするために、AVP-VGAT-/-マウスを用い電気生理実験および行動実験を行った。視床網様核から視床ニューロンへの抑制性シナプス後電流の大きさは野生型に比べAVP-VGAT-/-マウス(4～10ヶ月齢)では大きく低下していた。3レバーオペラント学習課題で行動実験を行ったところ、AVP-VGAT-/-マウスでは運動順序学習に障害がみられた。以上より、運動順序学習において視床網様核が重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症は頻度の高い精神疾患であるが、説得力のある発症仮説はまだ提唱されていない。最近になり、視床網様核の機能異常が発症に関与するとの仮説が提唱された。この仮説を検証するためには、視床網様核の機能のみを低下させる必要がある。本研究は、AVP-VGAT-/-マウスが視床網様核機能低下のモデルマウスとなりうる可能性を示した。よって、今後はこのマウスを用いて、統合失調症における視床網様核の機能異常仮説、および、視床網様核の役割についての「サーチライト仮説」などについて検討することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of the thalamic reticular nucleus consisting of GABAergic inhibitory neurons, electrophysiological and behavioral experiments were performed using AVP-VGAT-/- mice. The inhibitory input from thalamic reticular neurons to thalamic neurons was markedly reduced in AVP-VGAT-/- mice (4-10 months old) compared to their wild-type age-matched counterparts. A behavioral experiment with a 3-lever operant task revealed that motor sequence learning was impaired in AVP-VGAT-/- mice. These results suggest that the thalamic reticular nucleus plays an important role in motor sequence learning.

研究分野：神経生理学

キーワード：視床網様核 運動順序学習

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

眼や耳などからの感覚情報は脳皮質へと送られ、感覚(視覚、聴覚など)として認知されるが、情報はそのまま伝達されるのではなく、その中継地点である「視床」において選別されている。この情報の選別(ゲーティング機構)において、脳皮質と視床の間に位置する「視床網様核」が重要な役割を担っていると考えられている(サーチライト仮説)。また、統合失調症では感覚ゲーティング機構に異常がみられることから、統合失調症の発症における視床網様核機能異常の重要性を指摘する仮説が提唱されている。これらの仮説を検証するためには視床網様核の機能のみを低下させる必要がある。

視床網様核の機能を低下させる方法としては、TTXなどの神経活動を阻害する薬剤あるいはイボテン酸などのニューロンを傷害する薬剤を局所投与する方法、電極を挿入し電的に脳部位を破壊する方法などが用いられてきたが、視床網様核が視床を囲む薄い層構造であることを考えると、影響が周りの脳部位にまで広がっている可能性がある。近年は遺伝子操作技術が使われるようになり、種々のCreマウスあるいはfloxedマウスにウイルスベクターの局所投与を組み合わせたもの、さらにオプトジェネティックスの手法も使用されるようになってきた。しかし、煩雑な局所投与の方法を使わずに、視床網様核の機能が選択的に低下したマウス、というものは知られていない。

最近になり、アルギニンバソプレシン(AVP)が、視床下部以外では視床網様核に特異的に発現していることが報告され、AVP発現細胞特異的に小胞型GABAトランスポーター(VGAT)を欠損したマウス(AVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウス)が、視床網様核機能低下マウスである可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、AVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスでは、(1)視床網様核から視床への抑制性入力低下しているかどうか、(2)統合失調症でみられるプレパルス・インヒビション(PPI)の低下がみられるかどうか、(3)行動選択や運動順序学習に異常がみられるかどうか、を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスの作成

AVP産生ニューロン特異的にtdTomatoを発現するマウス(AVP-tdTomatoマウス)および、AVP産生ニューロン特異的にVGATを欠損するマウス(AVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウス)を使用した。AVP-tdTomatoマウスは、AVP産生ニューロン特異的に組換え酵素Creを発現させた遺伝子操作マウス(AVP-Creマウス)と、Cre存在下で赤色蛍光タンパク質(tdTomato)を発現するマウスとを交配し作成した。AVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスは、さらに、GABA作動性シナプス伝達に必要なVGATのfloxedマウスと交配し作成した。

#### (2) 蛍光観察

AVP-tdTomatoマウスの脳切片を用い、蛍光顕微鏡下にてtdTomatoの赤色蛍光の観察を行った。

#### (3) 組織学的実験

AVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスの脳切片を用い、VGAT mRNAのin situ hybridizationを行った。

#### (4) 電気生理学的実験

野生型およびAVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスの脳スライス切片(水平断)を用い、体性感覚視床VPMニューロンのホール・セル記録を行い、活動電位、静止膜電位、T型カルシウム電流、rebound burst発火などの基本的な性質を調べた後に、記録細胞の近くに挿入した刺激電極より刺激し、誘発されるIPSCの振幅を測定した。EPSCを阻害するために、外液には10 μM DNQXと50 μM AVPを加えた。刺激部位は複数箇所とし、最も大きな反応が現れたものを採用した。また、刺激強度は5段階とした。

#### (5) 神経生理学検査

統合失調症のエンドフェノタイプとして知られる神経生理指標としてPPIを使用し、野生型マウスとAVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスで比較した。PPIは、聴覚性驚愕刺激による瞬目反射を使用し、音の強さは驚愕音120 dB、プレパルス70, 75, 80, 85 dBで行った。

#### (6) 行動解析実験

3つのレバー(A,B,C)を用いた運動順序学習課題「3レバーオペラント課題」を使用し、1レバー課題、3レバー課題、リバース3レバー課題を行い、課題成績を野生型マウスとAVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスとで比較した。60分を1セッションとし、1日に1セッション、週に5セッション行った。

1レバー課題は、有効レバーを1回押すと強化子(餌)が得られる課題で、有効レバーの数は成績に応じて3つから、2つ、1つと順に減少させた。解析データは、各学習レベルに要したセッション数、レバー総数(A,B,Cレバーのそれぞれを押した回数の総和)、non-preference index(レバーの偏り)、win-stay割合、lose-shift割合、とした。

3レバー課題は、3つのレバーをA B Cの順で制限時間内に押すと餌が得られる課題で、成績に応じて制限時間を99.9秒、3秒、2秒、1秒と順に短くした。解析データは、各学習レベルに要したセッション数、レバー押し総数、効率(強化数×3/レバー押し総数)とした。

リバー3レバー課題は、3レバー課題終了後に、レバーを押す順を逆(C B A)にして行った。方法および解析データは、3レバー課題と同様である。

#### 4. 研究成果

##### (1) 蛍光観察および in situ hybridization

AVP-tdTomato マウスの脳切片の蛍光観察により、生後10日前後より tdTomato が視床網様核ニューロン特異的に発現することを確認した。また、生後4-5カ月齢 AVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスの脳切片を用いた in situ hybridization 法により、視床網様核で VGAT mRNA の発現が消失していることを確認した(図1)。

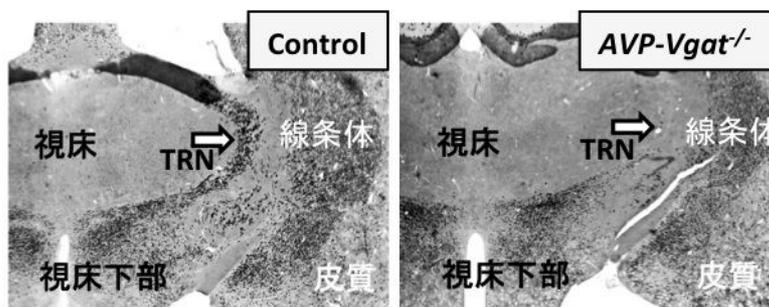


図1 VGAT mRNA

##### (2) 電気生理実験

視床VPMニューロンの静止膜電位、活動電位幅、閾値、発火パターンなどの電気生理学的性質については、野生型マウスとAVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスとの間で大きな差はみられなかった。evoked IPSCについては、VPMでは抑制性介在ニューロンはほとんど存在せず、外部からの抑制性入力もないことから、視床網様核由来と推定される。そこで、AVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスのIPSCの大きさを野生型のものと比較したところ、20-30日齢では差はみられなかったが(図2)、4ヶ月齢では約半分になり(図3)、10ヶ月齢ではさらに大きく減少する(図4)ことが確認された。但し、10ヶ月齢では、野生型においてもIPSCの振幅は小さく、スライス標本内のニューロンの状態が良くない可能性がある。今後は、スライス作成条件を改善した上で、結果が再現できるかどうかを確かめる必要がある。

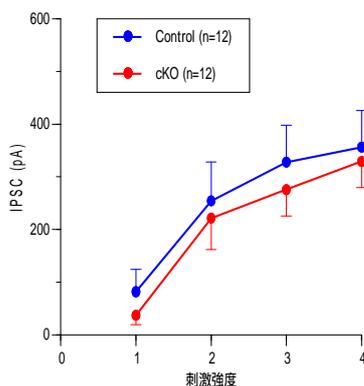


図2 20~30日齢マウス

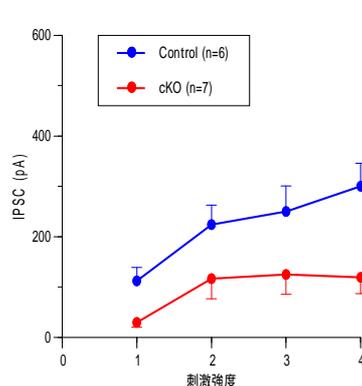


図3 4か月齢マウス

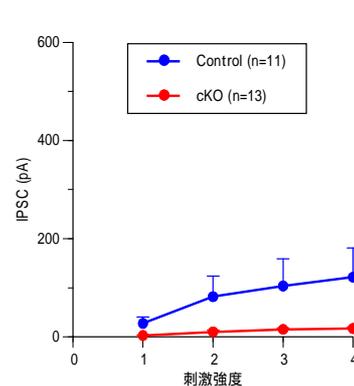


図4 10か月齢マウス

##### (3) 神経生理学検査

生後3-4カ月齢 AVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスのPPIを野生型マウスのもものと比較したところ、70, 75, 80 dBのプレパルス音でPPIが有意に亢進していた。聴覚や驚愕反応そのものには差がなかった。

#### (4) 行動実験

視床網様核の機能が低下している4ヶ月齢および10ヶ月齢のマウスを用いて行動実験を行い、野生型とAVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスとの比較を行った。

1レバー課題(1L)の成績の中で差がみられたものは、有効レバー数3つの時の non-preference index (図5)と有効レバー数1つの時の lose-shift 割合(図6)であった。non-preference indexはAVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウス(赤)で低下しており、レバー押しがより偏る傾向が示された。lose-shift 割合(無効レバーを押して餌が得られなかった場合に、次に押すレバーを変える割合)はAVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウス(赤)で低く、行動選択に差がみられることが示された。

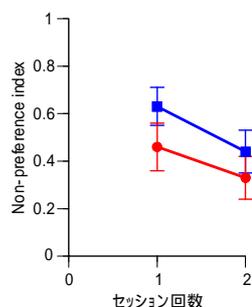


図5 レバーの偏り(1L)

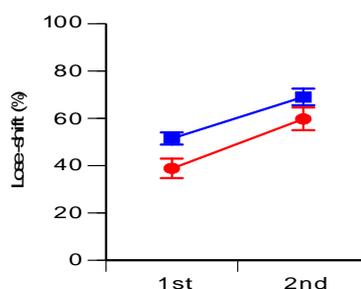


図6 lose-shift 割合(1L)

3レバー課題(3L)の成績の中で差がみられたものは、レバー総数(図7)と効率(図8)であった。AVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウス(赤)ではレバー押し総数が多いにもかかわらず、効率は低く、運動順序学習が低下していることが示唆された。リバー3レバー課題(r3L)では、AVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスはレバー押し総数は変わらないが、効率は低く、運動順序学習の低下(図9)が確認された。

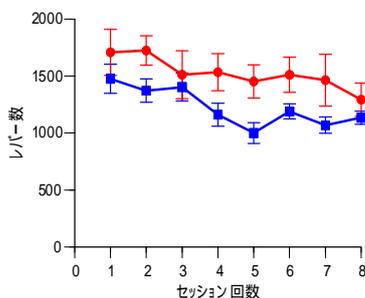


図7 レバー総数(3L)

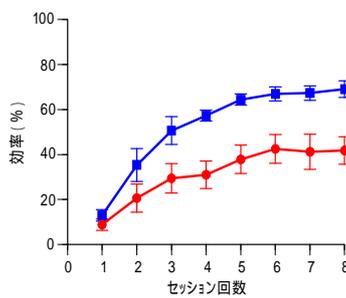


図8 効率(3L)

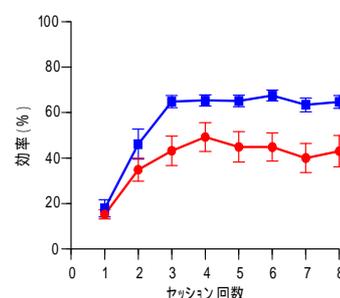


図9 効率(r3L)

(5) 以上の結果より、4~10ヶ月齢のAVP-VGAT<sup>-/-</sup>マウスでは、視床網様核から視床への抑制性入力が低下しており、視床網様核機能低下マウスであることが示された。このマウスでは、プレパルス・インヒビション(PPI)の亢進がみられ、統合失調症でみられる症状は再現されなかった。また、行動選択や運動順序学習に異常がみられたことから、これらの学習に視床網様核が重要な役割を担っている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)              | 備考 |
|-------|--|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 三枝 理博<br><br>(Mieda Michihiro)<br><br>(20296552) | 金沢大学・医学系・教授<br><br><br><br>(13301) |    |

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 米田 貢<br><br>(Yoneda Mitsugu) |                       |    |
| 研究協力者 | 吉原 亨<br><br>(Yoshihara Toru) |                       |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |