

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2012～2016

課題番号：24116010

研究課題名（和文）精神疾患においてサイトカインがもたらす神経エンドフェノタイプの変換と病態

研究課題名（英文）Cytokine-Induced Neuropathologic Endophenotypes of Psychiatric Diseases

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 73,800,000円

研究成果の概要（和文）：サイトカインは、その動物投与により統合失調症に関連する行動変化を呈する。サイトカインのなかでもEGFの投与動物が最も強い行動異常を呈し、霊長類でも再現できている。EGF投与ラットは特にドーパミン神経の回路、活動において異常性が高かった。そのドーパミン神経は異所性の神経終末を形成し、動物の思春期後に過剰興奮を示し、抗精神病薬で正常化する。一方、ノルアドレナリンやセロトニン神経活動は無変化であった。生理実験は、モデル動物の聴覚野異常性を指摘していた。この領域では神経活動マーカーの上昇とともに、聴覚過敏反応や聴覚誘発性脳波異常を呈する。患者死後脳でも類似の分子変化が再現されることも判明した。

研究成果の概要（英文）：The animals that had been exposed to cytokines as neonates later develop the abnormal behaviors relevant to schizophrenia. In the present investigation, we explored the cytokine animal model for schizophrenia, focusing on the monoaminergic pathways. Among various cytokines, epidermal growth factor (EGF) produced the most remarkable impact on animal behaviors. In the EGF model, dopaminergic neurons exhibited abnormal pallidal innervations and a postpubertal firing increase as well as their antipsychotic sensitivity. There were no significant influences on the other monoaminergic neurons in the EGF model. In addition, the EGF model in rats displayed the remarkable deficits particularly in the auditory system. These observations suggest that prenatal or perinatal cytokine exposure results in dopaminergic mal-development and deficits in auditory cognition.

研究分野：神経発達学、分子精神医学

キーワード：統合失調症 幻聴 サイトカイン ドーパミン 上皮成長因子 神経栄養因子 ニューレグリン 脳波

1. 研究開始当初の背景

サイトカインは、免疫系ばかりでなく神経細胞の成長と機能、生死を左右する蛋白性の調節因子である。多くの神経変性疾患や精神疾患において、サイトカインのシグナル異常や発現異常が報告されているものの、その分子病態・作用機序には多くの謎がある。本研究では、精神疾患との関連性が高いサイトカインに着目して、モノアミン神経系に対する解剖学的・生理機能的・分子生物学的な回路変換、いわゆるマイクロエンドフェノタイプの病態を明らかにしようとした。我々は先行研究において、サイトカインのなかでも上皮成長因子 (EGF) や Neuregulin-1 はドパミン機能発達に強い影響を及ぼすこと、統合失調症の患者脳や末梢組織で異常発現していることを見出し、「モノアミン神経回路の発達が最もサイトカイン暴露に影響されやすく脆弱である」ことを提唱している。しかし当該サイトカインの変調が、ドパミンを含むモノアミン神経回路のマイクロエンドフェノタイプに具体的にどのような影響を及ぼしているのか、また当該疾患の脳機能病態にどう関連しているのか、多くの疑問が残されていた。

このようにモノアミン神経種、投射路ごとにサイトカインに対する反応性・脆弱性が異なることが予想されるが、各神経の反応性差や認知行動変化との対応関係、精神疾患病態との関連性は解明されていない。そこで本計画では、ドパミンを中心とするモノアミン神経 (ドーパミン・セロトニン・ノルアドレナリン) に対する *in vivo* におけるサイトカインの生理活性とその機序を明らかにし、精神疾患との病態関連性を探求した。

2. 研究の目的

サイトカインは、その種類によってモノアミン神経細胞種への活性が異なる。初代培養系では GDNF は中脳ドパミン神経細胞とセロトニン神経細胞、両者に栄養性を発揮する。一方 EGF はドパミン神経、特黒質-線条体路のドパミン神経にしか反応しない。本計画では、初代神経培養系でモノアミン神経に対する反応性が確定している GDNF, EGF, Neuregulin-1 などのサイトカインに特に着目し、生体内のモノアミン神経のマイクロエンドフェノタイプに対する生体内反応、以下の3つの疑問を明らかにすることを研究目標として設定した。

(1) *In Vivo* のモノアミン神経回路に対するサイトカインの解剖学的な影響は？

(2) サイトカインが及ぼすモノアミン神経の興奮性変化・シナプス病態は？

(3) モノアミン神経回路変化と精神疾患患者の脳内変化との対応関係は？

この(1)と(2)でサイトカインを用いた精神疾患モデル動物で実施し、最終的に

(3) 我々の所属機関の連携研究者の協力のもと、精神疾患死後脳でその裏付けをとる計画である。下記のように、3種のモノアミン神経回路のうち、当該サイトカインに対してドパミン神経回路に最も顕著な変化があることが判明したことから、(2)(3)は、結果的にドパミン神経が研究対象となった。

3. 研究の方法

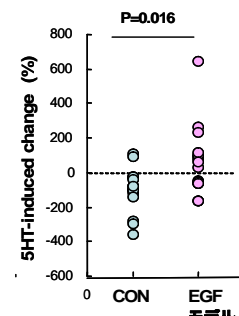
本計画では新生児投与ラットで得られている先行研究の知見を基にして、サイトカインの投与モデルや過剰 EGF 発現モデルを統合失調症モデル動物として活用した。モデル動物のモノアミン神経に対する影響を、形態学、分子生物学、電気生理学、行動薬理学を用いて評価し、各サイトカインの脳機能、認知行動に与えるインパクトとそのメカニズムを比較した。加えて聴覚系の分子病態を深く解析する目的で、次世代シーケンサーを用いた RNA-SEQ を東京農大との共同研究として実施した。関連して、当該モデルの超音波発声コミュニケーションについても、分析を加えた。ここに記載した動物実験、ヒト遺伝子解析実験、組み換え DNA 実験は、いずれも新潟大学の当該倫理委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

<課題1> サイトカインの過剰・欠乏によるモノアミン神経回路変化の解明

(1) EGF 投与ラットは 普通時のドパミン神経活動が上昇していることが判明している。そこで本モデルの脳内セロトニン神経とノルアドレナリン神経活動も麻酔下で測定したが、対照群と差異はみられなかった。つまり、3種のモノアミン神経のなかでは、ドパミン神経が、研究対象としたサイトカインに対し最も高い脆弱性を呈していた。次にドパミン神経自身のセロトニン感受性を比較してみた。すると EGF 投与モデル群ではドパミン神経の多くがセロトニンに反応してどの活動を上昇させるのに対し、むしろ対照群では低下させる細胞が多かった。つまり本モデルではドパミン神経活動のセロトニンへの反応方向が逆転

していたのである。この事実は非定型抗精神病薬の薬効の優位性をも説明しうるものである。図1) EGF 新生児による VTA ドパミン神経発火のセロトニン影響 (スライスのユニット記録)



(2) EGF 統合失調症モデルラットの社会行動低下とドパミン神経活動変化のモデル動

物を用いた解析を実施した。自由行動下で無線システムをつかった脳神経活動記録と In vivo ダイアリシス法を用い、EGF で作製された統合失調症モデルラットの前頭前野からのドパミン放出変化を計測した。無刺激の定常時には EGF モデルのドパミン神経活動、ドパミン放出、ともに亢進していた。しかし、新規ラットに遭遇させた時(社会ストレス負荷時)のドパミン放出・活動上昇率は、対照群に比して弱く、それがストレス脆弱性の原因をなしていると推定された。

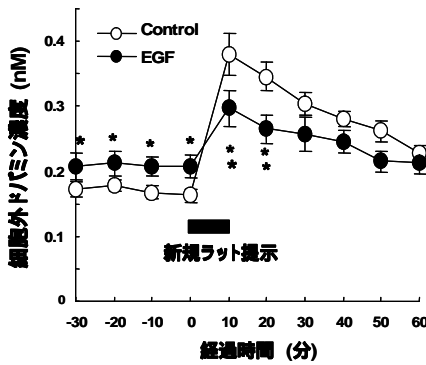


図2) EGF 統合失調症モデルラットの前頭葉でのドパミン放出量変化(定常時 VS 社会ストレス)

<課題2> サイトカインの過剰・欠乏によるモノアミン合成と放出量への影響評価

(1) EGF 過剰発現トランスジェニックマウスはプレパルス抑制や社会行動、コカイン感受性などの行動に障害を与え、統合失調症のモデル動物としての適合性を備えていることが判明した。しかし本トランスジェニックマウスの脳内では、ドパミン合成酵素の低下とドパミン含量の変動が観察され、行動変化の主要因がドパミンの変化である可能性が示唆された。

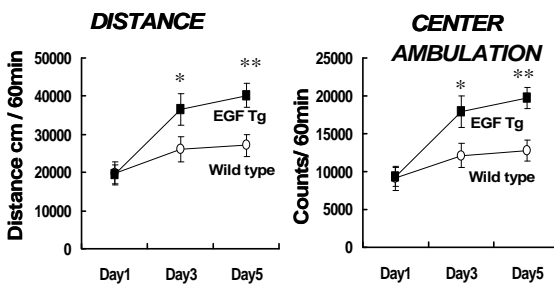


図3) EGF 過剰発現マウスのコカイン連投によるコカイン感受性変化

(2) 抗がん剤に使われている EGFR キナーゼ阻害剤による EGF シグナルの遮断効果と薬理活性を調べた。用いたのは EGF の新生児投与で作製された統合失調症モデルラットである。3種類のキナゾリン系 EGFR キナーゼ阻害剤をモデルラットの脳室内へポンプ投与した。結果、モデル動物の行動異常(プレパルス抑制、ラテント恐怖学習障害)が阻害剤の投与濃度依存的に改善した。平行して

ドパミン神経の自発発火頻度、基底核のドパミン代謝も正常化していた。これらの結果は EGFR キナーゼ阻害剤が抗精神病薬活性を発揮することを示すものである。

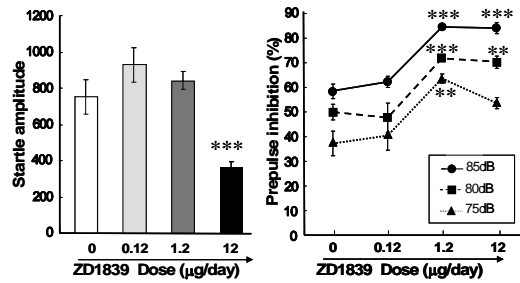


図4) 統合失調症モデルラットに対する抗がん剤 ZD1839 の音驚愕反応改善効果(左)とプレパルス抑制上昇効果(右)

<課題3> サイトカインによるモノアミン神経の膜興奮性変化や自発発火パターン変化と行動相関の分析

(1) 新生児 EGF 投与モデルラットは、生後その日数を重ねるとともに、音驚愕反応強度やそのプレパルス抑制率が徐々に異常になって行く。性成熟を迎える8週齢を超えるまで、このような認知行動変化が増大するのだが、この原因としてドパミン神経の発火変動が仮説として浮かび上がった。そこで、麻酔下で覚醒行動の影響を排除した状態で、黒質ドパミン神経の発火頻度を各週齢ごとに、EGF モデルラットと健常ラットで比較してみた。

結果、EGF モデルラットのドパミン発火頻度は思春期前に健常ラットのそれに下回る傾向にあったものの、思春期後の生後12週齢からは、その関係が逆転し、より高頻度発火を呈した。

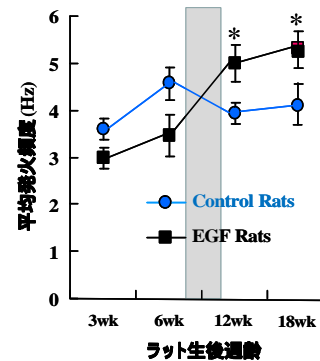


図5) 統合失調症 EGF モデルラット発達過程での黒質ドパミン神経の発火頻度変化

(2) 統合失調症 EGF モデルラットにおける思春期後に見られる黒質ドパミン神経の発火頻度上昇が、どのような分子メカニズムで起きているのかを探索した。統合失調症患者の黒質ではイオンチャンネルの発現変化が際立っていたので(課題4参照)ここでもカチオン電流を中心に解析した。パッチクランプ法を用いた電位パルスとカリウムチャンネルへの作動薬物を活用して計測したところ、自発発火頻度を調節すると言われる過分極活性型カチオン電流 I_h と Ca²⁺活性型カリウムチャンネル(SK)が関与する可能性が示唆され、現在、より詳細に調査中である。

<課題4> 死後脳を用いた当該精神疾患におけるモノアミン神経のマイクロエンドフェノタイプ解析

(1) 統合失調症におけるドパミン神経のマイクロエンドフェノタイプ解析を、研究協力者喜田らと共同で RNA-SEQ 法にて実施した。統合失調症におけるドパミン神経の分子病態・病理が、当該動物モデルと同様に観察されるかどうか、患者死後脳の分子プロファイリングにより比較した。統合失調症の剖検例を用いて黒質ドパミン神経より RNA を抽出し、次世代シーケンサーによるタグ解析により、両者の遺伝子の発現変化を分析したところ、統合失調症の患者黒質では、種々のカリウムチャンネル群は顕著に発現変動しており、による統合失調症モデルラットの黒質ドパミン神経の生理学的変化とマッチすることが判明した。

(2) 患者死後脳の前頭前野と線条体より RNA を抽出し、RNA-SEQ 法により分子プロファイリングを実施した。これらの脳部位は中脳黒質の変化に比べて、その変化遺伝子数は少なく、より緩和な分子病態を示した。なかでもサイトカイン・ケモカイン関連遺伝子群が最も変化率が高く、我々の主張「統合失調症のサイトカイン発症仮説」を裏付ける結果となった。モデルラットの中脳と前頭前野でも同様の解析を行ったところ、ヒト患者で見られたのと同じ遺伝子が 10 ほど発見された。この結果は、EGF 投与モデル動物のモデルの妥当性を示唆するものとして注目される。

<課題5> モデル動物に見られた聴覚系の異常(追加課題)

(1) EGF 投与モデルラットの大脳皮質 8 領域を横断的に、神経活動遺伝子、グルタミン酸受容体分子、グリア関連分子、サイトカイン受容体を中心にウエスタンブロットで定量比較した。結果、聴覚野において選択的に神経活動マーカーの発現上昇が確認された。またマイクログリア関連分子の蛋白発現も上昇していた。この現象は当該脳部位の RNA-SEQ でも追試され、脳組織病理からの所見(脱髄とそれともなうグリオシス)とも合致していた。

(2) 上の結果から、聴覚野になんらかの機能変化が起きている可能性が示唆された。聴覚にかかる生理学的な脳波検査を実施したところ、幾つかの聴覚機能異常を示すデータが得られた。現在、追試中であるが、これらの結果は当該モデル動物の聴覚機能になんらかの異常が存在することを示唆する。

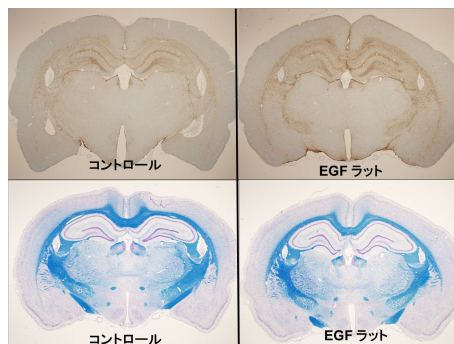


図6) 統合失調症 EGF モデルラット組織染色。(上) 活性化アストロサイトマーカー-GFAP の染色、(下) ミエリンを良く染める KB 染色。

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 15 件)

主なものより抜粋

1. Nagano T, (2 名略), *Nawa H. “Pathological implications of oxidative stress in patients and animal models with schizophrenia: the role of epidermal growth factor receptor signaling.” *Curr Top Behavior Neurosci.* 2017 in press. 査読有
2. Namba H., Okubo T, *Nawa H. “Perinatal exposure to neuregulin-1 results in disinhibition of adult midbrain dopaminergic neurons: Implication in schizophrenia modeling.” *Sci Rep.* 6:22606 (2016). 査読有
3. Sakai M, (6 名略), Kunii Y, (13 名略), Kakita A., Kuwano R, *Nawa H. “Assessment of copy number variations in the brain genome of schizophrenia patients.” *Mol Cytogenet.* 8:46 (2015). 査読有
4. Kato T, (4 名略), Namba H., *Nawa H. “Neurobehavioral differences between mice receiving distinct neuregulin variants as neonates; impact on sensitivity to MK-801.” *Curr Mol Med.* 15:222-236 (2015). 査読有
5. Takei N., (3 名略), *Nawa H. “A possible link between BDNF and mTOR in control of food intake.” *Front Psychol.* 5:1093 (2014). 査読有
6. *Nawa H., (3 名略) “Neuropathologic implication of peripheral neuregulin-1 and EGF signals in dopaminergic dysfunction and behavioral deficits relevant to schizophrenia: their target cells and time window.” *Biomed Res Int.* 2014:697935 (2014). 査読有
7. Takei N., Nawa H., “mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development.” *Front Mol Neurosci.* 7:28 (2014). 査読有
8. *Kunii Y, (5 名略), Nawa H., Kakita A., (3 名略), Yabe H. “Elevated postmortem striatal

t-DARPP expression in schizophrenia and associations with DRD2/ANKK1 polymorphism.” *Prog Neuropsychopharmacol Biol.* 53:123-128 (2014). 査読有

9. ”Mizuno M, Sotoyama H, Namba H. (6 名略), *Nawa H. ErbB inhibitors ameliorate behavioral impairments of an animal model for schizophrenia: implication of their dopamine-modulatory actions. *Transl Psychiatry.* 3:e252 (2013). 査読有
10. Eda T, (3 名略), Namba H., Sotoyama H, Kakita A. (3 名略), *Nawa H. “Neurobehavioral deficits of epidermal growth factor-overexpressing transgenic mice: impact on dopamine metabolism.” *Neurosci Lett.* 547:21-25 (2013). 査読有
11. Wang R, (7 名略), *Nawa H. “ErbB2 dephosphorylation and anti-proliferative effects of neuregulin-1 in ErbB2-overexpressing cells; re-evaluation of their low-affinity interaction.” *Sci Rep.* 3:1402 (2013). 査読有
12. 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.* 7:4 (2013). 査読有
13. Sotoyama H, Namba H. (2 名略), *Nawa H. “Exposure to the cytokine EGF leads to abnormal hyperactivity of pallidal GABA neurons: implications for schizophrenia and its modeling.” *J Neurochem.* 126:518-528 (2013). 査読有
14. *Nawa H., Yamada K. “Experimental schizophrenia models in rodents established with inflammatory agents and cytokines.” *Methods Mol Biol.* 829:445-451 (2012). 査読有
15. Horiuchi Y, (18 名略) Nawa H., Arinami T. “Association of SNPs linked to increased expression of SLC1A1 with schizophrenia.” *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 159B(1):30-37 (2012). 査読有

[学会発表](計14件)

主なものより抜粋

那波宏之: 思春期以降に幻聴・幻覚を発症するかもしれないモデル動物. 第59回日本神経化学学会大会 2016年9月8日~10日福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

Sotoyama H, Nawa H. Abnormal firing activity of midbrain dopaminergic neurons of a schizophrenia animal model established by preinatal EGF treatment. DOPAMINE2016. Sept 5-8, 2016, Vienna Austria.

Namba H., Okuho T, Nawa H. Postpubertal impairments of auditory

processing in a cytokine-induced schizophrenia model. DOPAMINE2016. Sept 5-8, 2016, Vienna Austria.

Nawa H. Postpubertal impairments of auditory processing in a cytokine-induced schizophrenia model. International Symposium on Microendophenotype on Psychiatric Disorders. July 19, 2016, Yokohama World Porters, Yokohama Japan.

那波宏之: 統合失調症のサイトカインモデルにおける大脳基底核間接路の変調. Basal Ganglia in Health and Disease, 平成28年7月19日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

那波宏之, 難波寿明, 外山英和: サイトカインモデルを使った非定型抗精神病薬の作用機序の解明. 応用薬理学学会, 平成27年9月4-5日 新潟大学有王記念会館(新潟県・新潟市).

Nawa H., Tsukano H, Shibuki K, Kakita A., Sotoyama H, Namba H. Neuroinflammatory features of the cytokine-induced animal model for schizophrenia; implication of the regional specificity. 第58回日本神経化学学会シンポジウム, 平成28年9月10-13日, 大宮ソニックシティ, (埼玉県・さいたま市).

Nawa H. Impact of circulating neuregulin-1 and EGF on brain circuit development and maintenance; implication in schizophrenia. 第1回 Neuroscience Network in Kobe. 平成27年2月6日, 神戸大学(兵庫県・神戸市).

那波宏之: サイトカインによる脳神経マイクロエンドフェノクイブ変換; 統合失調症とそのモデル研究より, 包括脳ネットワーク5領域合同シンポジウム, 平成26年12月11-13日 東京医科歯科大学(東京都・文京区).

Nawa H., Sotoyama H, Namba H. Perinatal exposure to the cytokine EGF produces pallidal hyperinnervation of dopaminergic neurons and the indirect pathway dysfunction in the schizophrenia animal model. DOPAMINE2013, May 24-28, Alghero, Italy.

Nawa H., Mizuno M. Animal modeling of schizophrenia with cytokines; its application to drug development. Neuro2013 公開シンポジウム, 平成25年6月20日 京都国際会議場(京都府・京都市).

Nawa H. Impact of circulating neuregulin-1 and EGF on brain circuit development and maintenance; implication in schizophrenia. WFSBP-Neuro2013 Joint Symposium. June 23, 2013, Kyoto International Conference Ctr. Kyoto Japan.

Nawa H., Namba H., Sotoyama H.
Vulnerability of dopaminergic development to cytokines and its implication of the D2 receptor-dependent indirect pathway in schizophrenia. WFSBP2013. Kyoto International Conference Ctr. June 26, 2013, Kyoto Japan.

Nawa H. Pallidal hyper-dopaminergic innervation induced by neonatal exposure to epidermal growth factor; implication in schizophrenia. Asian-Pacific Society of Neurochemistry Meeting, Sept 29-Oct 2, 2012, Kobe International Conference Ctr. Kobe Japan.

〔図書〕(計1件)

那波宏之(分筆): 統合失調症(監修: 日本統合失調症学会、編集: 福田正人、糸川昌成、村井俊哉、笠井清登) 医学書院、2013年発刊。

〔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) 分担研究者

なし

(3) 連携研究者

難波 寿明 (NAMBA, Hisaaki)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号: 90332650
柿田 明美 (KAKITA, Akiyoshi)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 80281012
武井 延之 (TAKEI, Nobuyuki)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 70221372

(4) 研究協力者

喜田 聡 (KIDA, Satoshi)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 80301547