

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19780

研究課題名(和文) 臨界期でのニューレグリン1過剰シグナルがGABAニューロン発達へ与える影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of neuregulin 1 excess signaling on the development of GABA neuron in the critical period

研究代表者

山内 崇平 (Yamauchi, Takahira)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20550817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：精神疾患の発症に神経発達期における異常が指摘されているが詳細不明である。これまでに、ミクログリアでニューレグリン1(NRG1)が発現していること、自閉スペクトラム症(ASD)モデルマウスにおいてミクログリア由来NRG1が増加しているという我々が観察した知見から、発達期における過剰なNRG1シグナルが、その後のASD症状に影響しているのではないかと考えた。認知機能や臨界期の誘導に抑制性神経回路の重要性が報告されていることから、発達期における過剰なNRG1シグナルが抑制性ニューロンの発達へ与える影響および社会性や認知機能などに与える影響に検討した。

研究成果の概要(英文)：An abnormality in the neurodevelopment period has been pointed out in the onset of mental illness, but it is unknown in detail. From the findings we observed that the neuregulin 1 (NRG1) is expressed in microglia and the microglia-derived NRG1 is increased in the mouse model of autism spectrum disorder (ASD), we assumed that excessive NRG1 signal might affect the subsequent ASD symptoms. Since the importance of inhibitory neural circuits is reported in the cognitive function and the induction of the critical period, we investigated the influence of excessive NRG1 signal on the development of inhibitory neurons on social interaction and cognitive function.

研究分野：精神神経科学

キーワード：neuregulin ASD microglia

## 1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorders : ASD) と統合失調症は共に発症以前の神経発達段階における異常が大きな危険因子となることが指摘されており、また遺伝的脆弱性に関しても重複していることが報告されている (Caroll LS et al., Genome Medicine 2009)。ニューレグリン 1 (NRG1) は、神経発達に大きく関わる神経栄養因子であり、ガンマアミノ酪酸 (GABA) ニューロンの分化・発達、シナプス形成、ミエリン形成、NMDA 型グルタミン酸受容体の発現制御などに関っており、神経活動依存的に発現が変化し、上記精神疾患への関連が注目されている。

新潟大学的那波等は統合失調症の神経発達仮説に基づき、過剰な NRG1 シグナルと同疾患との関係について検証しており、新生仔期 (P2 ~ P10) に NRG1 を投与したマウスは、成人期において社会性の障害や同疾患のエンドフェノタイプであるプレパルスインヒビション (PPI) の低下を認めることを報告している (Kato et al., Molecular Psychiatry 2011)。

遺伝的脆弱性に関して、ASD と NRG1 については、ASD 家族の社会性に対する関連解析で遺伝的な関連性が報告されている (Yoo HJ et al., Psychiatry Reserch 2015)。また、統合失調症と NRG1 に関しては、2002 年に統合失調症との遺伝的な関連が報告されて以来、多くの追試が行われてきているが否定的な結果が多いようである。

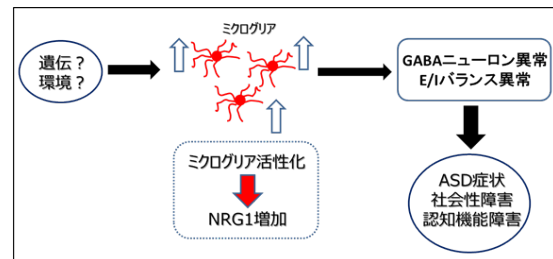
次に、認知機能について、大脳皮質の前頭前野の介在ニューロンの一つであるパルブアルブミン陽性ニューロン (PV ニューロン) による抑制性伝達が重要であり、抑制性神経回路の異常と認知機能障害の関連が注目されている。また、発達期における PV ニューロンの成熟が臨界期を誘導することも報告されている (Hensch TK et al., Nature Reviews Neuroscience 2005)。さらには、認知機能を含めた脳神経活動には興奮性と抑制性の神経伝達の調和 Excitatory/Inhibitory balance (E/I バランス) が重要であるとされ、この E/I バランスを保つような神経可塑性は神経活動依存的に発現される遺伝子により調節されることが知られている。同講座の紀本等は、統合失調症を含めた精神疾患で神経活動依存的に発現される遺伝子の解析を行い、抑制性神経回路の可塑性に重要な遺伝子 neuronal activity related genes (NARP) の発現が低下していることを報告している (Kimoto et al., JAMA Psychiatry 2015)。

申請者の研究室では、ASD や統合失調症を念頭に置いて、臨界期における神経活動の変化がその後の持続した認知機能へ与える影響について注目して研究を行ってきている。磁気細胞分離 (MACS) による細胞分離方法を用いて、ミクログリアを分離し、ミクログ

リアで NRG1 が発現していること、LPS でミクログリアを活性化させると NRG1 の発現量が増加することを確認している。また、ASD モデルマウスでミクログリアが増加していると報告されている BTBR T+tf/J (BTBR) マウス (Heo Y et al., PLoS One 2011) の生後 8 日目 (P8) においてミクログリア由来 NRG1 が増加していることを確認している。

臨床的にも PET を用いた研究で、ASD 患者ではミクログリアが活性化していることが報告されており (Suzuki K et al., JAMA Psychiatry 2013)、我々は ASD 患者でミクログリアを用いることが出来ないため、単核球を用いた実験で、ASD 患者において NRG1 の発現上昇を確認している (未発表データ)。

これらのことから、神経発達期におけるミクログリア由来のニューレグリン 1 過剰シグナルが、成人期において GABA ニューロンの持続した異常を引き起こし、ASD や統合失調症に認められる認知機能障害や社会性の障害を引き起こしているのではないかと考えた。



## 2. 研究の目的

(1) NRG1 過剰シグナルの GABA ニューロンへ与える影響について in vivo での検討

GAD67 GFP マウス、MACS 手技を用いて NRG1 の影響を GABA ニューロン特異的に解析する。NRG1 に暴露する時期を発達期と発達期以降に分けて、成人期における GABA ニューロンのシナプスについて中心に検討し、社会性・ワーキングメモリに注目して行動評価する。また、電気生理学的解析も行い評価する。

(2) NRG1 過剰シグナルが GABA ニューロンへ与える影響について in vitro での検討

GAD67 GFP マウスを用いることにより、NRG1 シグナルの影響を GABA ニューロン特異的に in vitro でも検討する。また ASD モデルマウスである BTBR マウスを用いて同様の検討を行う。

神経発達期における NRG1 シグナルと GABA ニューロンのシナプス形成について継続的に検討した報告は少なく、これらの一連の実験により、in vitro、in vivo で明らかにできる。また、これまでに我々が得ている ASD 患者及びモデルマウスにおいて、ミクログリア由来の NRG1 が増加しているという知見を発展させ、認知機能に重要である GABA ニューロンについて検討していくこ

とを目的としている。

予想される結果としては、1. 発達期における NRG1 暴露が、GABA ニューロン異常及びシナプス形成異常を引き起こし、それらは成人期においても異常が持続している。2. 持続した GABA ニューロン異常が、ASD 様の行動障害（社会性の障害、ワーキングメモリの障害）を引き起こし、電気生理学的にも異常を伴う。以上のことを想定しているが、これらが実証されたら神経発達期において NRG1 を増加させない、つまりミクログリアを活性化させないような介入が重要と考えられ、精神疾患の予防及び治療につながる可能性があると考えている。

### 3. 研究の方法

(1)NRG1 過剰シグナルの GABA ニューロンへ与える影響について in vivo での検討。(A)発達期での NRG1 過剰暴露 (P2~P10) GABA ニューロンを特異的に単離するために、glutamic acid decarboxylase-green fluorescence protein knock-in mice (GAD67 GFP マウス) を用い、組み換えヒト NRG1 をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて希釈し、生後 2 日 (P2) から P10 までの 9 日間、1.0 µg/kg 体重で皮下投与する。対照群として同様の方法で同量の PBS を投与する。その後、各時期で脳を摘出し、GFP 陽性細胞を磁気標識し (Miltenyi Biotec)、磁気細胞分離 (MACS) により GABA ニューロンを特異的に単離し実験に使用する。NRG1 過剰シグナル暴露直後 (P12) での検討。P12 で脳を摘出し、MACS により GABA ニューロンを単離し NRG1 の受容体であり、GABA ニューロンに発現している ErbB4、前述した GABA ニューロンの可塑性に重要である neuronal activity related genes (NARP)、シナプス可塑性に重要でその裏打ち構造であるシナプス後肥厚 post synaptic density (PSD95) について real-time PCR (RT-PCR) にて測定する。NRG1 過剰シグナル暴露後、成人期 (P65) での検討。P56~P63 に行動実験を行い、行動実験は社会性について resident-intruder test、ワーキングメモリに対して T 字水迷路テスト (Makinodan et al., Science 2012)、恐怖記憶消去に関してはパッシブアボイダンステストを行う。行動実験を終えたマウスを P65 で脳を摘出し同様に ErbB4、NARP、PSD95 について RT-PCR にて測定する

(B)発達期以降での NRG1 過剰暴露 (P35~P43) 同様に GAD67 GFP マウスを用い、組み換えヒト NRG1 を P35 から P43 までの 9 日間同様の方法で投与し、MACS により GABA ニューロンを単離する。上記と同様に行動実験を行い、P65 で脳を摘出し同様に生化学的解析を行う。

(2)NRG1 過剰シグナルが GABA ニューロンへ与える影響について in vitro での検討

スライス培養を行い in vitro での検討を

行う。GAD67 GFP マウスを用いて、P6 で脳を摘出し、ピプラトームで 400 µm 前頭葉の脳スライスを作成する。その後、培養 4 日目に NRG1 を加えてシナプス形成について観察する。解析は培養 5 日目に前シナプスマーカーである synapsin1、後シナプスマーカーである PSD95 とそれぞれ GFP の共免疫組織学的染色により測定する。これにより GABA ニューロンのシナプス形成について NRG1 の効果を評価する。

### 4. 研究成果

NRG1 投与の効果を確認するために、C57BL/6 マウスに組み換えヒト NRG1 をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて希釈し、生後 2 日 (P2) から P10 までの 9 日間、1.0 µg/kg 体重で皮下投与し、対照群として同様の方法で同量の PBS を投与した。P11 で脳を摘出し、MACS 磁気細胞分離にてミクログリアを単離し発現量を測定した。しかし、予想と反して NRG (NRG1 type , NRG1 type , NRG1 type , NRG2, NRG3) は両群において有意差を認めなかった。また、同様に炎症性サイトカイン (IL-1b, TNFa, IL-6) などは両群においても有意差を認めなかった。次に、脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、NRG と相互に作用すると報告 (Lundgaard et al., PLoS Biol 2013) されており、海馬の GABA 作動性抑制性神経回路発達に重要であることから、臨界期における BDNF 過剰シグナルが、抑制性ニューロンの発達へ与える影響について検討することとし、ミクログリア特異的に BDNF を高発現したトランスジェニックマウスを用いて解析を継続した。

### 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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

NEUROSCIENCE 2017, Washington, DC, USA, 2017.

Microglia-derived neuregulin expression in psychiatric disorders

Ikawa D, Makinodan M, Yamauchi T, Yamashita Y, Komori T, Kishimoto T.

第 39 回日本生物学的精神医学界・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会、札幌、2017

精神疾患におけるマイクログリア由来ニューレグリン発現  
井川大輔、牧之段学、山内崇平、小森崇史、岸本年史

World Congress of Biological Psychiatry 2016, Lima, Peru, 2016.

MICROGLIA-DERIVED NEUREGULIN EXPRESSION IN AUTISM MODEL MICE

Ikawa D, Makinodan M, Yamashita Y, Okumura K, Yamauchi T, Tanaka T,

Nishihata Y, Komori T, Yamaguchi Y,  
Kishimoto T.

30th CINP WORLD CONGRESS OF  
NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY,  
Seoul, Republic of Korea, 2016.

Microglia-derived neuregulin expression in  
psychiatric disorders

Ikawa D, Makinodan M, Yamauchi T,  
Yamashita Y, Komori T, Kishimoto T.

〔図書〕(計0件)

〔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

<http://www.naramed-u.ac.jp/~psy/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山内 崇平 (YAMAUCHI. Takahira)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20550817

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

山下 泰徳 (YAMASHITA. Yasunori)