

平成21年5月10日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390097

研究課題名 (和文)

認知行動障害における脳内サイトカインシグナル異常

研究課題名 (英文)

Abnormal brain cytokine signaling in neurobehavioral impairments

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

研究成果の概要：

上皮成長因子やニューレグリン1の受容体が胎児のGABA神経細胞や中脳ドーパミン神経に発現していることから、これらの神経細胞への影響を培養系と動物で調べ、認知行動発達障害との関係を研究した。上皮成長因子とニューレグリン1は、共に中脳ドーパミン神経の発達、もしくは神経活動を促進したのに対し、もう一方の標的細胞であるGABA神経細胞では全く逆の生理活性を発揮した。新生仔動物への上皮成長因子やニューレグリン1投与は、当該シグナルを感化させ、in vivoのドーパミン発達をかく乱し、その後の認知行動異常を誘発した。これらのドーパミン神経栄養因子は脳血液関門が完成していない時期、血中から中脳に透過し、ドーパミン発達を障害することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：サイトカイン, 統合失調症, 自閉症, 上皮成長因子, ニューレグリン, 脳発達, プレパルスインヒビション

1. 研究開始当初の背景

統合失調症や自閉症は人口の約0.3～1%が罹患する発達性の脳疾患であるが、その原因はほとんど判っていない。生育環境と遺伝が関与すると考えられていて、環境因子としては母体のウイルス感染や周産障害、出産時虚血、幼児ストレスなどが要因として挙げられている。それらの環境因子に共通する媒介分

子として炎症性サイトカインが疑われていた。サイトカインの多くは神経栄養因子としても作用するものの、申請者らがこれまでに検討したところ、末梢性に投与・誘導されたサイトカインは脳血液関門を通過して神経栄養因子として、また、その拮抗薬として脳発達を障害して認知行動障害を誘発している可能性が高かった。そこで本計画では、サ

イトカインによる「脳発達の障害」の実態を分子・細胞レベルで解析し、そのメカニズムを明らかにしようとした。

2. 研究の目的

これまで研究代表者はラットやマウスに対して種々のサイトカイン・栄養因子を新生仔投与し、その後の認知行動発達への影響を調べた。12種類の神経栄養因子やサイトカインを調べた結果、もっとも著しい慢性の認知障害を誘発したものは、ニューレグリン1 (NRG1) と上皮成長因子 (EGF) であった。これらのサイトカインへの反応は、社会性行動の低下やプレパルスインヒビション (PPI) の低下など認知行動異常のパターンが酷似していた。これまでの論文や研究代表者らの研究から、この2つのサイトカインに共通する脳内神経細胞への活性・シグナルは、次の3つであることが推定された。そこで本実験計画では、この3つの活性の実態を解明し、どの活性が上記の認知行動障害の形成に寄与をしているかを判定することを目標とした。

- ① 炎症性シグナルを介してシナプスの形成・成熟を阻害する。
- ② 神経栄養シグナルと介してドーパミン神経の過剰発達を誘発する。
- ③ 細胞増殖シグナルを介して、GABA抑制神経の機能を低下させる。

3. 研究の方法

上記の研究目標を達成するために、初代培養系 (in vitro) と動物 (in vivo) といった異なるレベルの実験系を相互にうまく組み合わせることで総合的に分析した。

<初代培養神経細胞>

ラット胎児から調整したニューロンの初代培養系を利用して、当該サイトカインの神経形質への影響、その生理活性を中心に解析した。胎生18日齢のラット胎児の大脳皮質、線条体、中脳等の組織をパパイんで消化し、N2添加剤を加えた無血清培地で各脳領域の培養を5-7日間実施した。細胞は低密度に保ち、グリア細胞の増殖を抑制した。EGFやNRG1を毎日1~20ng/mLの濃度で添加し、免疫染色、ウエスタンブロット、RT-PCR法でGABA神経、ドーパミン神経の機能分子への影響を調べた。

<新生仔へのサイトカイン投与>

動物は、SDラット (日本SLC) 生後2日齢より使用した。試薬は、組替えEGF、組み換えNRG1、コントロールとしてチトクローム-C (Sigma) を生理食塩水に溶解させた。生後2日目より毎日計9回 (生後10日目まで)、頸部にラット体重1g当たり0.5マイクログ

ラム皮下投与した。

<脳室内投与、線条体投与>

ErbB1阻害剤としてPD153035、ZD1835、OSI-774をDMSOに溶解させ生理食塩水で10倍に希釈した。また、コントロールには同濃度のDMSO溶液を使用した。ラットは麻酔下で28ゲージのカニューレをブレグマの0.3mm前方、1.2mm側方に歯科用ドリルで頭蓋骨に開けた穴に、深さ4.5mmで埋め込み、歯科用セメント等を用いて固定した。脳室に埋め込んだカニューレの端には、プラスチックチューブを接続し、浸透圧ポンプ (AZLETモデル2002) に連結させ、そのポンプ自身は、ラットの背中下の皮下に挿入した。また、同様に浸透圧ポンプより、組み換えEGFの線条体慢性投与も実施した。

<認知行動テスト>

8週齢に達した段階で、フォトビームセンターを装着したMEDアソシエーツ社の運動量測定用チャンバー (51cmX51cmX60cm) を用いて水平運動量、垂直運動量を測定した。プレパルスインヒビションは小動物驚愕反応測定装置 (San Diego Instruments) にて測定した。また、学習能力は、電気ショックと組み合わせたコンテキスト課題にて、すみ反応として定量化した。

(倫理面への配慮)

これらの動物実験は、新潟大学動物実験倫理委員会からその実験法についての承認を得て実施した。

<電気生理学的測定>

主にはEGFやNRG1を投与した幼若ラットより脳スライス切片を急性に作成し、大脳皮質のGABA神経細胞、中脳のドーパミン神経細胞を細胞膜の興奮性を指標に当該細胞を同定した。パッチクランプ法により、自発発火、ミニチュアシナプス電流、刺激応答性変化、ペアパルス電流などを計測した。

4. 研究成果

①炎症性シグナルを介してシナプスの形成・成熟を阻害する。

血中インターロンキン1 (IL-1) は、ラット生後直後において帯状回、臭内皮質を中心に未熟な脳血液関門を数時間かけて通過し、脳内マイクログリアの活性化、アストロサイトの増殖を引き起こしうる事が判明した。また、この炎症反応により、ドーパミン合成が上昇し、ドーパミン受容体のダウンレギュレーションが生ずることがわかった。

②神経栄養シグナルと介してドーパミン神経の過剰発達を誘発する。

胎児からの培養中脳ドーパミンニューロンや生後のその細胞は、上皮成長因子に反応してAMPA型グルタミン酸受容体の発現量とその膜興奮性を上昇させることで、ドーパミン神経のシナプス出力を増大させることが

判明した。この事実は、統合失調症のドーパミンの過剰活動仮説と矛盾しない。

③細胞増殖シグナルを介して、GABA 抑制神経の機能が低下する。

上皮成長因子ファミリーによる ErbB1 受容体の活性化は、発達中の大脳皮質の GABA 神経に作用し、その AMPA 型グルタミン酸受容体の発現量や GAD67 酵素を低下させ、さらに GABA 含量とその興奮性を抑制することが判明した。

④脳内の上皮成長因子シグナルは、プロスタグランジンを介してドーパミン神経活動を調節する。

EGF を成熟したラットの脳内（線条体）に慢性投与してやると、ドーパミンの合成と代謝が亢進するとともに、プレパルスインヒビションやラテント学習などの行動異常が誘発されることを見出した。プロスタグランジン合成酵素（COX-2）の選択的阻害剤であるセレコキシブを経口投与したところ、プレパルスインヒビション、ラテント学習能ともに、正常方向に大きく改善が見られた。

⑤上皮成長因子シグナルの遮断活性を有するキアノゾリン化合物やエモジンには、抗精神病薬の活性がある。

統合失調症モデルである新生仔海馬障害ラットと新生仔 EGF 投与ラットは、多様な認知行動変化を示す。EGF 阻害活性を有するといわれている漢方薬成分のエモジンの抗精神病薬活性について、本モデルを用いて評価した。これらモデルはプレパルスインヒビションの低下を示すが、エモジンの5日以上の慢性投与は、この指標を改善した。また、PD153035、ZD1835、OSI-774 といった特異的なキアノゾリン系 ErbB1 阻害剤の脳室内投与も、プレパルスインヒビションの低下とラテント学習障害を改善した。これらの事実は、新生仔期の EGF 投与が当該シグナルを慢性的に感化させていることを示すものである。

⑥ニューレグリン1は、脳発達過においてGABA 抑制神経の機能発達を促進させる。

ニューレグリン1の新生仔投与による ErbB4 受容体の活性化は、発達中の大脳皮質の GABA 神経でおきる。さらにその GABA 神経細胞の AMPA 型グルタミン酸受容体の感受性を上昇させ、その興奮性を亢進させることが判明した。

⑦脳部位特異的ノックアウトマウスの解析
EGF 受容体 (ErbB1) 遺伝子の LOXP ノックアウトマウスとドーパミントランスポーター遺伝子で駆動する CRE マウスを交配させ、脳内ドーパミン神経特異的なノックアウトマウスを作製した。まだ動物数が少ないので確定的なことは現段階ではいえないが、ドーパミン神経発達影響が期待される。本計画は予想以上に時間がかかり、期間内に予定を

完了できなかった点が反省点である。

⑧サイトカインのシグナル阻害剤の効果とその解析

フタルイミド系化合物は IKK 活性化を抑制し、炎症シグナルを低下させるといわれている。サリドマイドの PPI 行動異常に対する効果については、いずれのモデルでも極めて微弱であったが、それらの社会行動指標は有意に改善させた。この実験結果は EGF モデルや新生仔海馬障害モデルにおいて炎症性シグナルが永続的に脳内で更新していることを示唆する。

⑨GABA、ドーパミン、シナプスへのサイトカインの効果の統合的理解

GABA 神経における ErbB1、ErbB4 受容体の遺伝子発現は良く理解されているのに、ドーパミン神経でのそれは不明な点が多い。今回、ヒト、サル、マウスの中脳領域で ErbB1、ErbB4 mRNA 発現を *in situ* ハイブリにより解析したところ、ドーパミン神経での選択的な発現が観察された。実際にも EGF やニューレグリン投与は発達中の中脳ドーパミン神経を活性化し、チロシン水酸化酵素のリン酸化を誘発しドーパミン合成を促進した。

(考察)

この回の一連の研究で EGF や NRG の受容体が胎児中脳ドーパミン神経に発現していること、また実際にこれら因子は中脳ドーパミン神経に栄養活性を発揮してすることが確認された。今回わかった EGF 投与モデルの D2 感受性の亢進も、EGF 投与による生後のドーパミン神経の発達異常と関係していると推察される。一方、もう一方の標的細胞である GABA 神経のシナプス機能への影響も確認されたが、行動異常との関係は証明できなかった。

新生仔動物への EGF 投与後、行動異常を発揮するオトナになるまで、内在性の当該シグナルはどのように変化し続けているのだろうか？ EGF モデルの成熟後の脳内で起こっているシグナル変化を解析してみたところ、ErbB1 の恒常的なリン酸化亢進が観察され、これが行動異常の1つの原因になっていることが推察された。この仮説は ErbB1 の阻害剤投与実験と、成熟ラットへの脳内 EGF 投与実験で証明された。このように脳血液関門が完成していない発達期での末梢炎症は、血中サイトカインを上昇させ、新生仔脳のドーパミン発達とその機能を障害することがこの研究で明らかになった。

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 11 件)

- ① Zheng Y, Watakabe A, Takada M, Kakita A, Namba H, Takahashi H, Yamamori T, Nawa H. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Jun 15;33(4):701-706.
- ② Abe Y, Namba H, Zheng Y, Nawa H: In situ hybridization reveals developmental regulation of ErbB1-4 mRNA expression in mouse midbrain: implication of ErbB receptors for dopaminergic neurons. *Neuroscience*. 2009 in press.
- ③ Namba H, Zheng Y, Abe Y, Nawa H: Epidermal growth factor administered in the periphery influences excitatory synaptic inputs onto midbrain dopaminergic neurons in postnatal mice. *Neuroscience*. 2009 Feb 18;158(4):1731-1741.
- ④ Tsuda N, Mizuno M, Yamanaka T, Komurasaki T, Yoshimoto M, Nawa H: Common behavioral influences of the ErbB1 ligands transforming growth factor alpha and epiregulin administered to mouse neonates. *Brain Dev*. 2008 Sep;30(8):533-543.
- ⑤ Mizuno M, Kawamura H, Takei N, Nawa H: The anthraquinone derivative Emodin ameliorates neurobehavioral deficits of a rodent model for schizophrenia. *J Neural Transm*. 2008;115(3):521-530.
- ⑥ Tohmi M, Tsuda N, Zheng Y, Mizuno M, Sotoyama H, Shibuya M, Kawamura M, Kakita A, Takahashi H, Nawa H: The cellular and behavioral consequences of interleukin-1 alpha penetration through the blood-brain barrier of neonatal rats: a critical period for efficacy. *Neuroscience*. 2007 Nov 30;150(1):234-250.
- ⑦ Mizuno M, Sotoyama H, Narita E, Kawamura H, Namba H, Zheng Y, Eda T, Nawa H: A cyclooxygenase-2 inhibitor ameliorates behavioral impairments induced by striatal administration of epidermal growth factor. *J Neurosci*. 2007 Sep 19;27(38):10116-10127.
- ⑧ Nagano T, Namba H, Abe Y, Aoki H, Takei N, Nawa H: In vivo administration of epidermal growth factor and its homologue attenuates developmental maturation of functional excitatory synapses in cortical GABAergic neurons. *Eur J Neurosci*. 2007 Jan;25(2):380-390.
- ⑨ Sotoyama H, Namba H, Takei N, Nawa H: Neonatal exposure to epidermal growth factor induces dopamine D2-like receptor supersensitivity in adult sensorimotor gating. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007 Apr;191(3):783-792.
- ⑩ Shishido Y, Tanaka T, Piao YS, Araki K, Takei N, Higashiyama S, Nawa H: Activity-dependent shedding of heparin-binding EGF-like growth factor in brain neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Sep 29;348(3):963-970.
- ⑪ Nawa H, Takei: Recent progress in animal modeling of immune inflammatory processes in schizophrenia: implication of specific cytokines. *Neurosci Res*. 2006 Sep;56(1):2-13.
- [学会発表] (計 25 件)
- ① Nawa H; Molecular and behavioral analyses of a non-human primate model for schizophrenia. 第 31 回日本分子生物学会年会/第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008 年 12 月 12 日神戸.
- ② Nawa H; Epidermal Growth Factor Challenge to A Cynomolgus Monkey Neonate and Its Behavioral Consequences. The 2nd WFSBP Asia-Pacific Congress. 2008 年 7 月 11 日 富山.
- ③ 那波宏之、加藤泰介、阿部祐一、外山英和、難波寿明、水野 誠: ニューレグリン・EGF シグナル阻害剤が有する抗精神病性、第 51 回日本神経化学学会大会、2008 年 9 月 12 日、富山.
- ④ 那波宏之: 脳発達障害のモデル研究; サイトカインの関与、第 38 回新潟神経学夏季セミナー、2008 年 8 月 29 日、新潟.
- ⑤ 那波宏之、武井延之、柿田明美、高橋 均、横幕大作: ErbB1 受容体リガンドは大脳皮質ニューロンの前シナプス発達を阻害する。第 31 回日本神経科学学会、2008 年 7 月 10 日、東京.
- ⑥ 加藤泰介、水野 誠、那波宏之: 新生仔期ニューレグリン 1-β 暴露は成熟後の MK 801 感受性を増強する、第 51 回日本神経化学学会大会、2008 年 9 月 12 日、富山.
- ⑦ 外山英和、那波宏之: 新生期上皮成長因子によるドーパミン D2 受容体感受性の亢進と大脳基底核 GABA 作動性路に対する影響、第 51 回日本神経化学学会大会、2008 年 9 月 12 日、富山.
- ⑧ 水野 誠、鄭 英君、川村宏樹、渋谷雅子、朴 英善、外山英和、江田岳誉、那波宏之: イボテン酸投与統合失調症モデルラットにおけるチロシン受容体阻害剤の

- 効果、第51回日本神経化学学会大会、2008年9月13日、富山。
- ⑨ 阿部祐一、難波寿明、尾崎美和子、那波宏之：ニューレグリン-1・ErbB4慢性刺激による皮質パルアルブミン陽性細胞のグルタミン作動性シナプスに及ぼす影響。第31回日本神経科学学会、2008年7月、東京。
- ⑩ Mizuno M, Kawamura H, Nawa H： Effects of emodijn for behavioral impairment in models of schizophrenia. 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2007 November, Washington DC.
- ⑪ Abe Y., Namba H, Takei N, Nawa H： Neuregulin-1 enhances glutamatergic synapse maturation of GABAergic interneuron in developing neocortex. 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2008 November, Washington DC.
- ⑫ 那波宏之；統合失調症の網羅的分子病態にみられた脳内炎症以上を分子標的とする創薬への試み。第15回日本精神行動遺伝医学会 2007年11月17日国立精神神経センター、小平。
- ⑬ Nawa H, Kato T, Abe Y, Mizuno M, Araki K, Takei N, Ozaki M. Neonatal exposure to neuregulin-1 results in distinct behavioral abnormalities in mice; Comparison with other cytokine treatments. Int Schizophrenia Congress 2007, 4. Colorado Springs.
- ⑭ Tsuda N, Eda T, Mizuno M, Sotoyama H, Nawa H： Minocycline improves cognitive and behavioral impairments resulted from neonatal exposure to interleukin-1. The 37th Society for Neuroscience Meeting, 2007. 11. San Diego.
- ⑮ Zheng Y, Iwakura Y, Takada M, Namba H, Takei N, Kakita A, Takahashi H, Nawa H： EGF receptor expression of nigral dopamine neurons in human and monkey; impact on Parkinsonism. The 37th Society for Neuroscience Meeting, 2007. 11. San Diego.
- ⑯ 川村宏樹、水野誠、那波宏之：統合失調症モデルの認知行動機能障害に対するエモジンの効果。第50回日本神経化学学会 2007年9月10-12日 横浜。
- ⑰ 今野公博、熊谷春乃、荒木一明、糸原重美、那波宏之：ErbB1遺伝子改変動物の作製および行動解析。第50回日本神経化学学会 2007年9月10-12日 横浜。
- ⑱ 難波寿明、阿部祐一、那波宏之：幼若期上皮成長因子投与マウスの前頭皮質、海馬におけるGABA抑制機能の低下、第30回日本神経科学学会 2007年9月10-12日 横浜。
- ⑲ Nawa H, Kato T, Tsuda N, Mizuno M, Takei N, Ozaki M, Yokomaku D. In vivo Action of ErbB ligands on synaptic development and neurobehavioral consequences; Implication in schizophrenia. APSN, July 2006 Singapore.
- ⑳ Namba H, Zheng Y, Nawa H： Postnatal ErbB1 stimulation potentiates excitatory synaptic inputs to midbrain dopaminergic neurons. Soc. Neurosci. Abstr. 341.7 Nov 2006 Atlanta.
- ㉑ Mizuno M, Narita E, Kawamura H, Eda T, Nawa H： Striatal epidermal growth factor signals influences dopamine metabolism and functions. Soc. Neurosci. Abstr. 589.7 Nov 2006 Atlanta.
- ㉒ Tsuda N, Mizuno M, Nawa H： Neonatal administration of ErbB1 ligands commonly induce postpubertal cognitive behavioral changes. Soc. Neurosci. Abstr. 687.5 Nov 2006 Atlanta.
- ㉓ Narita E, Mizuno M, Eda T, Kakita A, Nawa H： Striatal infusion of EGF promotes proliferation of neural stem cells and affects behavioral traits. The 49th Japan Neurochemistry Society Annual Meeting, Sept 2006、名古屋。
- ㉔ Mizuno M, Narita E, Kawamura H, Eda T, Nawa H： Striatal epidermal growth factor receptor activation on dopamine metabolism and functions. The 49th Japan Neurochemistry Society Annual Meeting, Sept 2006、名古屋。
- ㉕ Tsuda N, Mizuno M, Komurasaki T, Yoshimoto M, Nawa H： Neonatal exposure to EGF receptor ligands commonly produces later behavioral impairments in mice. The 49th Japan Neurochemistry Society Annual Meeting, Sept 2006、名古屋。

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) 研究分担者

難波 寿明 (NAMBA HISAAKI)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号：90332650

(3) 連携研究者

なし