

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16896

研究課題名（和文）神経炎症に起因する統合失調症霊長類モデルの妥当性評価および画像マーカーの確立

研究課題名（英文）Validation of a neuroinflammation-induced schizophrenia model in primates and establishment of Neuroimaging biomarkers

研究代表者

鴻池 菜保（Konoike, Naho）

京都大学・ヒト行動進化研究センター・特定助教

研究者番号：80645169

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：胎生期から生後早期にかけての神経炎症が、発達障害や統合失調症など精神神経疾患を引き起こす要因になっているのではないかと近年考えられるようになってきている。我々の研究室では新生児期に神経炎症を誘発する方法により、非ヒト霊長類において神経炎症仮説に基づく疾患モデルを作出してきた。本研究ではこれまでに、これら疾患モデルのアカゲザル、コモンマーモセットにおいて行動評価および非侵襲脳波計測を継続してきた。そのなかで、疾患モデル個体では統合失調症患者と似た脳波異常を呈することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
精神疾患、とくに統合失調症や発達障害の霊長類モデルは開発途上にある。現在、作出している霊長類モデルの妥当性および有用性が確認されれば、統合失調症や発達障害の病態解明や新しい治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Neuroinflammation during the embryonic period and early postnatal period has recently been postulated to be a factor in neuropsychiatric disorders such as developmental disorders and schizophrenia. In our laboratory, we have developed a disease model based on the neuroinflammation hypothesis in non-human primates. In this study, we have continued behavioral assessment and noninvasive EEG measurements in these models, rhesus macaques and common marmosets. We found that the disease models exhibit EEG abnormalities similar to those of schizophrenia patients. In the final year of the project, noninvasively recorded EEG data from humans, macaque monkeys, and marmosets were used to evaluate the bio-markers of schizophrenia, namely auditory steady-state responses.

研究分野：認知神経科学

キーワード：霊長類 脳波 聴性定常反応 統合失調症 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、遺伝要因と環境要因の両者の関与によって発症すると考えられている精神疾患である。近年、胎生期・新生児期の炎症は統合失調症のリスクを高めることが知られてきている。ウイルス感染、新生児酸素欠乏などはサイトカインを誘導し、炎症反応を引き起こす。また、統合失調症患者の末梢血や脳ではサイトカイン発現の異常が見られることが報告されている (Trépanier et al., 2016)。このことから、脳血液関門が確立する前にサイトカインに晒されると、未熟な脳がサイトカインの影響を受け、統合失調症の発症に繋がると考えられている。しかし、胎生期・新生児期の炎症が神経のネットワークの発達、機能にどのような影響を与え、その機能・構造的な異常がどのように臨床症状と結びついているのかについてはまだ未解明なところが大きい。これまでに神経炎症仮説に基づいて作出されたげっ歯類モデルが報告され、行動異常やドーパミン代謝の異常など病態の一部が解明されてきている (Futamura et al., 2003, Inaba et al., 2021)。一方で、統合失調症の症状は前頭葉機能が強く関与していると考えられているため、精神症状および社会性、認知機能の評価を評価するには、前頭葉の発達した霊長類モデルの作出が必要であると考えられる。

研究代表者らはげっ歯類モデルの作出方法に倣い、新生児サル (アカゲザルおよびコモンマーモセット) に中脳ドーパミン神経に対する栄養因子としての作用を持ち、炎症性サイトカインを誘発する上皮成長因子 (Epidermal growth factor: EGF) を全身投与し、神経炎症に起因する精神疾患モデル霊長類を作出した。これらのサルの中で、生後数年経って異常行動を示す個体が複数出現している。具体的には、多動の傾向や本来性の対象ではないものに対する過剰な性行動、家族に対する適切な社会的行動の低下などである。本研究は、現在開発中の神経炎症仮説に基づいた統合失調症霊長類モデルの妥当性を評価し、ヒトとサルの種を超えたトランスレータブルな統合失調症のバイオマーカーの確立を目指す。



図 1. 何も無い床に向かって盛んに鳴く疾患モデルマーモセット

2. 研究の目的

聴覚定常反応 (ASSR) は、聴覚回路が反復的な外部刺激に应答して特定の周波数で同期活動を生成する能力を調べるために使用される基本的な神経反応である。統合失調症患者では、パワーまたは位相同期におけるガンマ域 ASSR の低下が繰り返し観察されており、特に 40Hz において顕著である (図 2, Known et al., 1999, Hamm et al., 2012)。また、統合失調症のげっ歯類モデルにおいて ASSR の異常が報告されている研究もいくつかある (Sivarao et al., 2015)。しかし、我々の知る限り、非ヒ

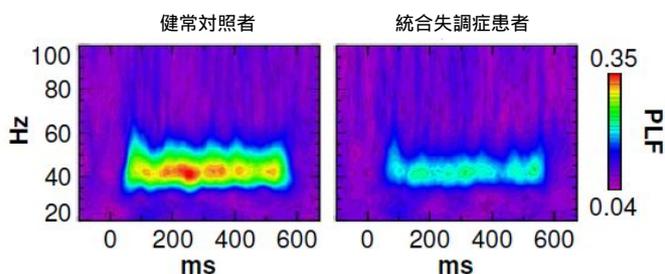


図 2. 統合失調症患者で見られる ASSR 異常 (Spencer et al., 2009 より)

ト霊長類における ASSR に関する実験データはない。

そこで、健常マーモセット、アカゲザル、ヒトで ASSR を比べて、評価に適した聴覚刺激のパラメータを模索する。また、疾患モデルマーモセット、アカゲザルで ASSR を計測し比較検討する。

3. 研究の方法

健常個体の脳波実験では、コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*、メス 2 頭、オス 3 頭、5~8 歳、体重 272~342g) 5 頭とアカゲザル (*Macaca mulatta*、雌 5 頭、6~12 歳、5.2~7.2kg) 5 頭を用いた。脳波記録に先立ち、麻酔下でサルの頭部を剃毛し、各個体の頭部に合ったマスクを作成した。実験中、サルは防音室内のモンキーチェアに座らせ、頭部はマスクで固定した。アカゲザルには直径 10mm の銀電極 (NE-136A、日本光電) マーモセットには直径 4mm の電極 (UL-3010、Unique Medical) を使用した。電極は国際 10-20 システムに従い、6 箇所 (Fz、Cz、Pz、Oz、A1、A2) に設置した。C3 または C4 電極はグランド電極として使用した。電極のインピーダンスは 5k

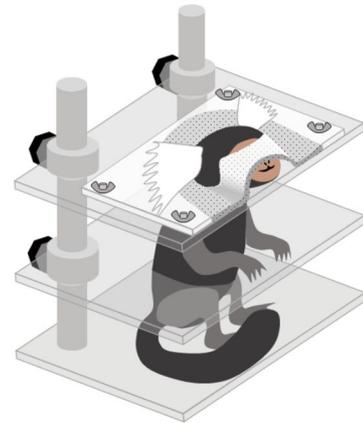


図 3. マーモセットの実験時の様子

以下に保った。脳波は、BrainAmp (Brain Products) を用いて増幅し 1000Hz でサンプリングした。聴覚刺激は、スピーカーから被験体に 65-75dB の音量にて呈示した。1 ms のクリックからなる 500 ms のトレインを刺激として用いた。周波数は 20 から 120 Hz を 10ms ごと、11 種類の周波数をランダムに呈示した。各トレインの間隔 (inter-train interval: ITI) は 600ms とした。脳波データの後処理は、MATLAB および EEGLAB /ERPLAB を用いて行った。脳波データは、両耳朶連結で再リファレンス処理をし、ハイパスフィルター (2Hz) をかけた。また刺激前の 100ms の平均値でベースライン補正し、 $\pm 150 \mu V$ 基準でアーチファクトとみなして除去した。

時間-周波数解析により事象関連スペクトラム摂動 (event-related spectral perturbation: ERSP) と試行間位相固定性 (inter-trial coherence: ITC) を計算した。ITC は、試行間の位相の一貫性を示す指標で 0 から 1 の間の値をとり、0 に近い ITC 値は試行間の位相角の高い変動を反映し、1 に近い値は試行間の脳波データとタイムロックされたイベント (ここでは聴覚刺激のオンセット) の完全な同期を示す。さらに、各周波数条件において、刺激提示期間 400ms (刺激開始より 101~500ms) と ITI 期間 400ms (刺激開始より 601~1000ms) における平均 ITC 値 (mITC) を算出した。

4. 研究成果

健常アカゲザル、コモンマーモセット各 5 頭から頭皮脳波を記録した。事象関連電位 (event-related potential: ERP) ではすべての種で提示した聴覚刺激と同じ周波数の周期的な波が見られた (図 3)。とくに、マーモセットでは高周波刺激に対する同期が顕著にみられ、Fz 電極における ERP は、80Hz のトレイン刺激に完全に同期していた。聴覚刺激のオンセットに対する反応は、アカゲザルではとくに Fz と Cz では顕著であったが、マーモセットの場合、最初の反応は弱く、潜時は非常に短かった。第一反応のピーク潜時は、マーモセットで最も短く ($11.1 \pm 0.7ms$) アカゲザルで中間 ($24.8 \pm 1.8ms$)、ヒトで最長 ($81.6 \pm 11.6ms$) であった。最初の反応のピーク潜時については、種による有意な主効果が認められたが (二元配置分散分析、 $F(2,10) = 3.49$ 、 $p < 0.001$)、刺激周波数による効果は認められなかった ($F(2,10) = 2.35$ 、 $p = 0.49$)。

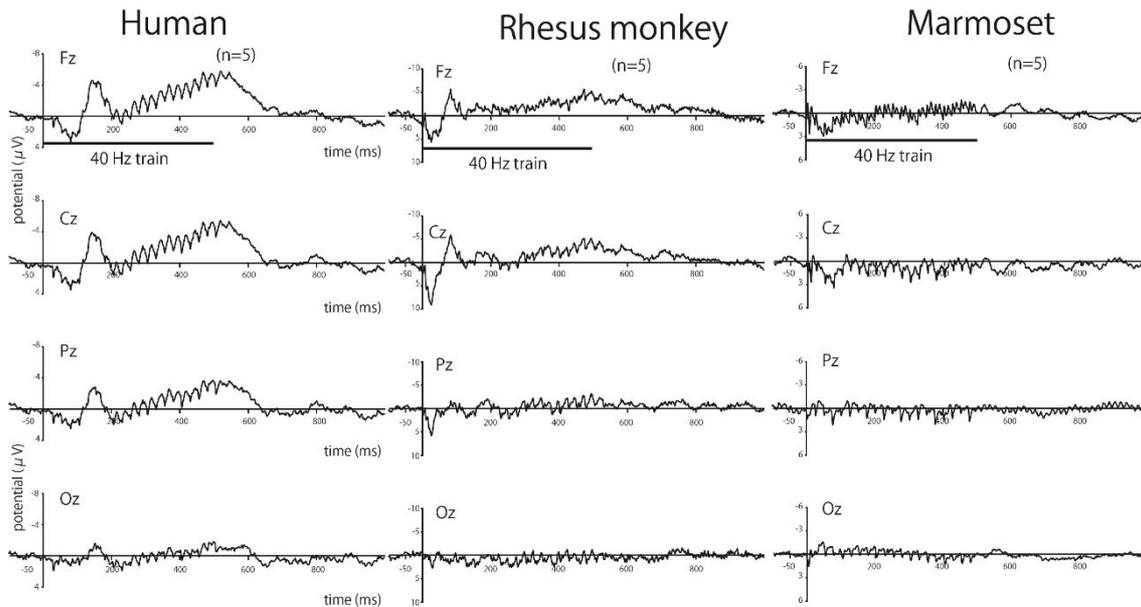


図 4. 40 Hz の刺激に対するヒト、健常アカゲザル、マーモセットの事象関連電位

また、Cz 電極から記録した 40Hz 刺激に対する ERSP と ITC の時間周波数マップを描画した (図 5、各種での 1 例を示す)。ERSP マップは、ヒトの場合 40Hz の刺激提示中に 40Hz のスペクトルパワーの顕著な増加がみられた。同様に、ITC マップでは、刺激への高い同期性を示す 40Hz の水平バンドが顕著にみられた。このバンドは刺激開始後 500ms で刺激の呈示が終わると、速やかに消えた。刺激提示中のスペクトルパワーの増大と 40Hz での高い同期性は、アカゲザルやマーモセットでも観察された。ヒトと異なり、アカゲザルおよびマーモセットの ITC マップでは、40Hz に加えて 80Hz と 120Hz での同期が明確に観察された。

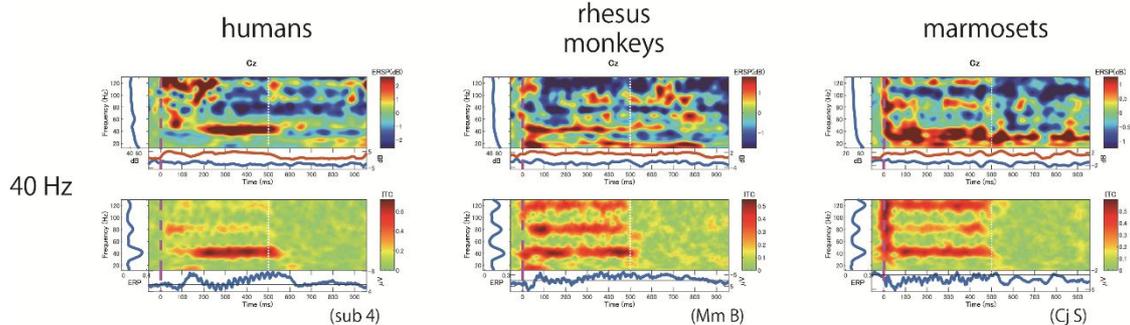


図 5. 40 Hz の刺激に対するヒト、健常アカゲザル、マーモセットの ERSP・ITC マップの例

呈示刺激に同期した位相同期活動を評価するため、刺激提示時と ITI の平均 ITC 値 (mITC) を算出し比較した。Cz 電極から各刺激の周波数ごとに算出した mITC では、ヒトでは 20Hz と 60Hz を除くほぼすべての周波数で、刺激提示中の ITC 値が ITI に比較して有意に大きかった。また、90Hz にもうひとつのピークが観察され、二峰性の高い同期性を示した。一方、アカゲザルの場合、刺激提示中の ITC 値は、すべての周波数で ITI 中のものよりも有意に大きく、特定の周波数に対する選好性は見られなかった。マーモセットでは、60Hz と 70Hz の刺激を除くほぼすべての周波数で、刺激呈示中の ITC 値が ITI より有意に大きかった。また、40Hz に 1 つのピーク、100Hz にもう 1 つのピークを持つ mITC の二峰性パターンはヒトと同様であったが、マーモセットではガンマ周波数が高い (80Hz 以上) ほど高い同期を示した。これらのデータから、コモンマーモセットとアカゲザルでは、ヒトと同様に 20-120Hz の刺激に対する ASSR が明確に観察された。一方で、低ガンマ周波数から高ガンマ周波数にかけて異なるパターンの ASSR

が観察された。

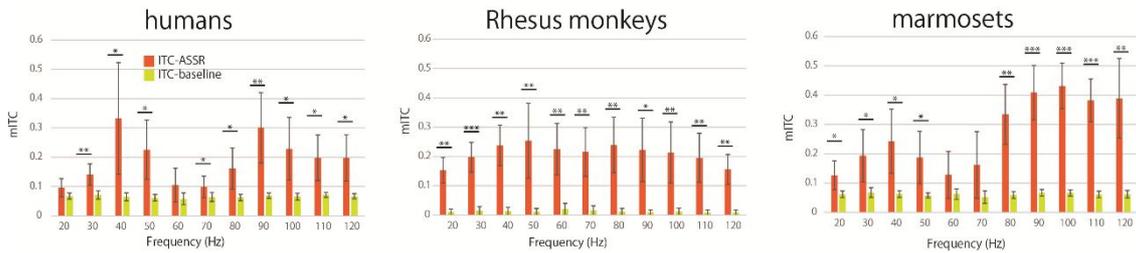


図 6. 刺激の各周波数ごとの平均 ITC 値 (ヒト、アカゲザル、マーモセット)

この実験とは別に、疾患モデル個体での脳波計測実験も進めた。6頭の疾患モデルマーモセットとその同腹仔である5頭の健常マーモセット、また2頭の疾患モデルアカゲザルを用いて、同様の方法で非侵襲的に頭皮上から ASSR を計測した。

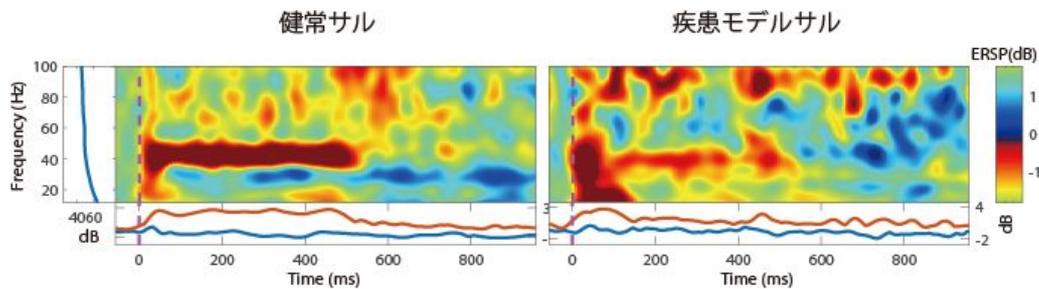


図 7. アカゲザルにおける健常個体および疾患モデル個体 ERSP マップの例

その結果、マーモセットでは明らかな ASSR の低下はみられなかったものの、疾患モデルアカゲザル 1 頭で 40 Hz ASSR における ERSP および ITC 値の低下をみとめた。症状の発症時期との関係もあり、今後、継続的に計測していく予定である。

今回の研究から、マーモセットやアカゲザルにおいてもヒト同様に非侵襲的な方法で聴性定常反応 (ASSR) が評価できること、新生児期神経炎症モデルの一部の個体にて、ヒト統合失調症患者でみられる 40 Hz の ASSR のパワーと同期の異常がみられることが確認できた。これらのことから、ASSR がヒトとサルの種を越えたバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

引用文献：

Konoike, N., Iwaoki, H., Miwa, M. *et al.* Comparison of non-invasive, scalp-recorded auditory steady-state responses in humans, rhesus monkeys, and common marmosets. *Sci Rep* 12, 9210 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13228-8>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Konoike Naho, Iwaoki Haruhiko, Miwa Miki, Sakata Honami, Itoh Kosuke, Nakamura Katsuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparison of non-invasive, scalp-recorded auditory steady-state responses in humans, rhesus monkeys, and common marmosets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-13228-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Kosuke, Konoike Naho, Iwaoki Haruhiko, Igarashi Hironaka, Nakamura Katsuki	4. 巻 2
2. 論文標題 A novel “dip-in electrode” method for electrode application to record noninvasive scalp electroencephalograms and evoked potentials in an awake common marmoset	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroimage: Reports	6. 最初と最後の頁 100116 ~ 100116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ynirp.2022.100116	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鴻池 菜保、岩沖 晴彦、三輪 美樹、酒多 穂波、伊藤 浩介、中村 克樹
2. 発表標題 コモンマーモセット、アカゲザル、ヒトにおける非侵襲頭皮上脳波記録による聴性定常反応の比較
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会、第1回CJK国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naho Konoike, Haruhiko Iwaoki, Miki Miwa, Honami Sakata, Kosuke Itoh, Katsuki Nakamura
2. 発表標題 Comparison of ASSRs (auditory steady-state responses) among humans, rhesus monkeys, and common marmosets
3. 学会等名 The 11th NIPS-PRI-BRINU Joint Symposium
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------