

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012 年度

課題番号：22591274

研究課題名(和文) 海馬部位特異的遺伝子改変動物を用いた認知機能におけるグルタミン酸神経系の機能解明

研究課題名(英文) Studies on the role of hippocampal glutamatergic system in cognitive function using hippocampal subregion-specific NMDA receptor knockout mice

研究代表者

神出 誠一郎 (JINDE SEIICHIRO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30376454

研究成果の概要(和文)：

本研究では海馬苔状細胞特異的 NMDA 受容体欠損マウスを用いて組織学的、行動学的研究を行った。行動面では不安関連行動の増加や、刺激に対する認知や情動の反応異常を認め、組織学的には歯状回での神経新生の低下が有意であった。以上の結果から、海馬苔状細胞 NMDA 受容体欠損が歯状回顆粒細胞下層の神経新生を抑制することで情動の異常を呈すると考えられ、情動に関する精神症状の発症機序の一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：

In this study, a conditional NMDA receptor subunit 1 (NR1) knockout mouse strain, in which NR1 is selectively ablated in the hippocampal mossy cells by 12 week of age, were subjected to histological and behavioral analyses to elucidate the functional role of mossy cells on cognition or emotion. This strain showed the reduced emotional reactivity and the decreased hippocampal neurogenesis. These results implicate the crucial role of mossy cell NR1 in the maturation of newly generated dentate granule cells, which may regulate emotional behavior.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
23 年度	800,000 円	240,000 円	1,040,000 円
24 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
年度			
年度			
総計	2,900,000 円	870,000 円	3,770,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神生理学

1. 研究開始当初の背景

統合失調症やうつ病といった精神疾患では記憶・学習・判断といった認知機能に障害きたすことが臨床的にも文献的にも広く知られてきたが、この認知機能障害によって精神障害患者の社会参加に困難をきたすことから、そのメカニズムの解明と治療方法の開発

が強く求められてきた。現在までに、患者や健常者を用いた臨床研究や、動物モデルを用いた基礎研究が数多く行われ、これに関わる重要な部位、あるいは神経伝達物質が同定されてきたが、なお十分な解明と治療には至っていない。

これまでの研究で、ヒトの認知機能には大脳

皮質と同様に海馬の重要性が指摘されてきた。特に空間的な記憶・学習や情動について海馬の果たす役割は非常に大きいことが明らかになり、以後は歯状回・CA1-3 領域といった海馬のそれぞれの部位がいかに相互に関連しながら機能しているかに関心が移ってきている。

海馬歯状回は海馬に入力される情報のゲート的な役割を担っていることから特にその役割が注目されている。ほとんどの研究はいわゆる主要細胞である顆粒細胞に注目したものであったが、顆粒細胞は歯状回に位置する他の細胞と相互にネットワークを形成しながら機能しており、歯状回の機能を解明するにはこれらのネットワーク全体の機能解明が必須である。

中でも歯状回門部に存在する苔状細胞は顆粒細胞との間で密なネットワークを形成していることが知られている。歯状回顆粒細胞は軸索である苔状繊維により苔状細胞に入力するが、苔状細胞は1)直接顆粒細胞に入力する経路、2)苔状細胞から抑制性の介在細胞に入力し、そこから顆粒細胞に抑制性のシナプスを形成する、といった二つの回路を形成していることが知られているが、この相反する二つの入力についてどちらが優位かは知られていない。また苔状細胞はCA3から逆行性に入力を受け、顆粒細胞にシグナルを送る役割を担っており、その機能の解明が待たれている。

しかしながら、長軸にそって細長く湾曲した構造をとる海馬の、さらに門部という非常に狭い部位に対して、神経毒等を用いた従来の薬理学的手法で選択的に操作することには限界があり、他の方法を用いた研究でもこれまでに一致した見解はみられていない。現在の技術ではウイルスの導入か、あるいは遺伝子改変動物を用いた、部位特異的に操作したモデルを用いた研究がもっとも効率のよい方法と考えられている。

本研究者は、これまで脳内の部位特異的グルタミン受容体欠損マウスを用いた記憶・学習の研究に従事してきた。中でも、近年完成させた海馬歯状回苔状細胞選択的 NMDA 受容体欠損マウスは、外からの操作が不可能なためこれまでほとんど不明であった苔状細胞の機能を解明できる画期的な動物であるとされ、これを用いた研究により海馬歯状回の機能がさらに明らかにされると期待されている。またすでに CA3 特異的 NMDA 受容体ノックアウトマウスは存在しており、両者の比較から海馬各部位の機能がより明らかにされることも期待される。

2. 研究の目的

本研究では、海馬部位特異的遺伝子改変動物を用い、記憶・学習等の認知機能におけるそ

れぞれの部位のグルタミン酸神経系の役割について、行動実験や組織学的研究を中心に解明する。独創的な遺伝子改変動物を使うことによって、薬理実験や脳部位破壊実験のように強い侵襲を加えることなく自然な形で研究を施行できるため、より正確な結果を得られることが特徴である。本研究で得られた結果から、ヒトの認知機能について、特に統合失調症等のグルタミン酸神経系異常が示唆される精神疾患に伴う認知機能異常のメカニズムの解明につながることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では CA3・歯状回といった海馬各部位で選択的に NMDA 受容体を欠損させたノックアウトマウスを用いて認知機能に関する研究を行い、それぞれの部位でのグルタミン酸神経系の果たす役割について明らかにする。具体的には、①海馬歯状回苔状細胞選択的 NMDA 受容体欠損マウス、②海馬 CA3 錐体細胞選択的 NMDA 受容体欠損マウスを用い、それぞれについて a) 記憶・学習についての行動実験、b) それぞれのモデルにおける受容体欠損後の組織学的変化の解明を行う。海馬内で隣接する部位それぞれで NMDA 受容体を欠損させた二種類のマウスを用いて比較検討することで、それぞれの部位の特異的な機能をより明らかにすることができる。

①NMDA 受容体と記憶学習に関する行動学的研究

a) 連想記憶に関する研究

これまでの研究から CA3 領域は連想記憶のパターン分離・パターン完成に強く関わるということが知られており、また CA3 と強い連絡を有する歯状回も同様にこれらの機能と関連することが予想される。主に文脈の恐怖条件付け実験を用いて、パターン分離に関する研究を行う。具体的には、音刺激は使用せずに電撃刺激を与えることで条件付けしたマウスを、一定時間後に電撃刺激と同一の環境あるいは類似するが同一ではない環境に置き、すみ行動の差を測定する。加えて回避実験も行うことで記憶学習についての表現型を確認する。

b) 新奇性に関する研究

海馬、特に歯状回は情報入力の窓口として機能することから、新奇性との関連が注目されている。また臨床的に、統合失調症患者などでは新奇性追求の低下を認めることが広く知られていることから海馬歯状回機能の低下がその背景にあるのではないかと考えられている。さらに、新奇性について、これまでの研究からドーパミンと共にグルタミン

酸神経系の強い関与が指摘されていることから、本研究では上記二系統のマウスを用いて、新奇オープンフィールドでの行動量の経時的变化を測定し、対照との相違を明らかにする。

c) 空間作業記憶に関する研究

海馬は前頭葉と同様に空間作業記憶に強くかかわることが知られている。また NMDA 受容体については、その遮断で作業記憶の悪化、活性化で向上が報告されており、作業記憶に密接に関与することが示唆されているが、海馬の各部位がいかに機能するかについてはこれまでに十分な知見が得られていない。以上から、T 字迷路等を用いて空間作業記憶の変化について明らかにする。

②NMDA 受容体欠損後の組織学的変化の解明
苔状細胞は興奮性の細胞であるが、近隣の抑制性介在ニューロンを刺激して、フィードバック的に歯状回顆粒細胞に抑制的に作用するという仮説が代表的である。CA3 錐体細胞もこれまでの報告から NMDA 受容体の欠損後に CA1 領域での介在ニューロン機能が障害されると報告されている。また海馬歯状回は神経新生の生じる個所として知られており、これらの部位での NMDA 受容体の欠損で、海馬全体の興奮性のバランスが変化する可能性が考えられる。各遺伝子欠損マウスの認知機能における表現型の機序をあきらかにするため、NMDA 受容体の欠損後の組織学的変化について詳細に検討する必要がある。具体的には GABA 関連物質の発現変化や苔状繊維の走行等を観察し、CA3 および歯状回の NMDA 受容体が各領域の神経ネットワークにいかなる役割を果たしているかを解明する。

4. 研究成果

①記憶学習に関する研究

文脈の恐怖条件づけ実験では、入力刺激による微細な違いに対する反応の違いを検討するためのパターン分離試験を行ったところ対照より障害される傾向にあったが、むしろ比較的弱い電撃刺激後のすくみ行動の有意な低下が目立った。このすくみ行動の低下については電撃を繰り返すことで次第にすくみ行動が増加することが分かった。他の痛みや感覚刺激に対する検討から、この表現型は痛み閾値の異常によるものではなく、刺激に対する認知や情動の反応異常であることが示唆された。弱い電撃刺激を用いた恐怖回避試験でも同様な結果が得られたことから、特に比較的弱い刺激に対する反応性の低下が特徴的であった。この結果は CA3 特異的 NMDA 欠損マウスとは大きく異なることも特徴である。

また T 迷路等を用いた認知機能の検討では異

常を示さなかったものの、これとは対照的に、オープンフィールド試験では特に立ち上がり行動が顕著に低下していた。この低下は二日目でも持続しており、不安関連の異常行動と考えられる。この結果は CA3 特異的 NMDA 受容体欠損マウスとは大きく異なり、歯状回に特徴的な所見と考えられる。

②組織学的研究

海馬苔状細胞 NR1 欠損マウスでは Nissl 染色や Timm 染色等でも明らかな異常ネットワーク構築は認められなかった。次に神経新生の変化を組織学的に検討した。このマウスでは海馬歯状回顆粒細胞下帯 (subgranular zone) において Ki67 や PCNA といった分裂期細胞のマーカー陽性細胞数の有意な減少を認め、またダブルコルチンや NeuroD といった神経前駆細胞マーカーの陽性細胞数の減少も認めた。以上から、海馬苔状細胞は NMDA 受容体を介して神経新生の促進あるいは維持に関連することが明らかとなった。この結果も CA3 特異的 NMDA 受容体欠損マウスでは認めておらず、歯状回内部での情報伝達と神経新生の強い関連を示唆することになった。

これらの神経新生に関する結果について作用機序を調べるため、さらに同マウスを用いて GABA 合成酵素の一つである GAD67 で免疫染色したところ、対照と比較して海馬歯状回において染色濃度の有意な減少を認めた。またパルプアルブミン免疫染色では、歯状回顆粒細胞パルプアルブミン陽性細胞数の減少を認めた。近年、GABA 介在ニューロンが特に初期の神経新生に大きく影響することが知られており、また海馬歯状回苔状細胞は GABA 介在ニューロンに軸索を送り、その活動性の維持に関与していることが知られている。これらの結果を総合すると、このマウスでは海馬歯状回苔状細胞の NMDA 受容体の欠損により、歯状回のパルプアルブミン陽性細胞を含む GABA 介在ニューロンの活動性が低下し、結果として顆粒細胞下帯の神経新生の減少に至った可能性が考えられる。

これまでの報告から、海馬歯状回での神経新生の低下がげっ歯類で統合失調症様の表現型を呈することは Yamasaki らの報告により広く知られていること、歯状回と不安との関連が示唆されていることと合わせて考えると、本マウスから得られた結果は海馬苔状細胞 NMDA 受容体欠損が歯状回顆粒細胞下層の神経新生を抑制することで情動に関する精神症状の発症機序の一部を再現しうることを示したと考えられる。

また、いわゆるレスキュー実験として、BDNF 発現増強を介して神経新生を増加させることで知られている RS67333 を投与することにより、上記の情動関連行動異常に対していかに変化を生じるかを検討したが、残念ながら

有意に行動学的な変化を呈するには至らなかった。薬理的に歯状回門部と言った非常に限定された部位のみで GABA を増加させることは非常に困難であり、これまでに得られた組織学的・行動学的変化のメカニズムを明らかにすることは今後の課題である。

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 1 件)

Jinde S, Zsiros V, Nakazawa K.
Hilar mossy cell circuitry controlling dentate granule cell excitability. Front Neural Circuits. 2013;7:14. doi: 10.3389/fncir.2013.00014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神出誠一郎 (JINDE SEIICHIRO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30376454

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：