

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500464

研究課題名(和文) 神経栄養因子を介する中脳ドパミン神経活動調節の異常に関与するチャネル機構の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological alterations of intrinsic properties and neural activity in the midbrain dopaminergic neurons mediated by neurotrophic factors

研究代表者

難波 寿明(NAMBA, Hisaaki)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：90332650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：中脳ドパミン神経に対する栄養因子としての作用を持つニューレグリン(NRG)や上皮成長因子(EGF)は、統合失調症の発症要因としての可能性が提唱されている。また、新生仔期NRG/EGF投与動物や因子過剰発現マウスがその病態生理機構を解明する上での有用な動物モデルとなっている。当該動物モデルの生体内でのドパミン活動とその生理特性変化を解析することで、スパイク発火活動の亢進とそれを引き起こす可能性のあるチャネル特性異常やシナプス入力変化が見出された。このような活動異常は、ドパミン伝達異常に関わる統合失調症様の行動特性に寄与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Neuregulin (NRG) and epidermal growth factor (EGF) have neurotrophic activities on the midbrain dopaminergic neurons. These factors are implicated with the etiology of neuropsychiatric diseases, such as schizophrenia. NRG/EGF administered rodents during neonatal period exhibit behavioral abnormalities related with schizophrenia. Therefore, these animals are useful models to analyze the neuronal mechanisms underlying the pathophysiology. Slice patch-clamp analyzes of the dopaminergic neurons reveal that NRG or EGF attenuated synaptic inhibition or spike after-hyperpolarization mediated by a certain potassium current, respectively, both of which potentially enhance neural activity. In support of this, in vivo burst firing activity was enhanced under anesthetic condition in NRG or EGF administered animals. Thus, pathophysiological alterations of neuronal properties might participate in abnormal dopaminergic transmission and behavioral traits in the animal models for schizophrenia.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経・筋肉生理学

キーワード：ドパミン 神経栄養因子 ニューレグリン 上皮成長因子 スパイク発火特性 動物モデル 統合失調症

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子 (EGF) やニューレグリン (NRG) は分化・増殖因子として中枢神経系の発達に対して広範な役割を持つ。またこれらは、統合失調症の病因との関連性が提唱されている。即ち、統合失調症には遺伝的要因と環境要因がその病因として関与するが、後者には胎児期でのこれらサイトカインの異常や、それに伴う中枢発達障害が重要であると考えられている。実際、新生仔期での栄養因子投与動物は、成熟した段階で認知機能や社会性の低下、精神刺激薬感受性亢進などの統合失調症様の行動特性を示す。従ってこれら投与動物は、疾患発症に関わる中枢メカニズムを解明する上での有用な動物モデルとなっている。

EGF や NRG は、中脳ドパミン神経に対して、神経栄養因子として作用することが知られる。即ち、培養系などを含め発達期のドパミン神経に対し、突起伸張などの発達促進作用や生存維持作用を持つ。また、新生仔期に末梢より投与することで、線条体などの終末領域での軸索投射やドパミン合成が促進され、起始核でのシナプス発達が促進される。これら因子による栄養性作用は、発達期のみならず成熟後のドパミン神経の生理機能に対しても何らかの影響をもたらすことで、動物モデルの行動特性にも影響を及ぼす可能性がある。従って、ドパミン神経の生理特性の異常を検討することは、疾患の病態生理学的な基盤として、発症機構の解明に重要な知見となる可能性がある。

統合失調症の発症仮説として、精神刺激薬や抗精神病薬などの作用に基づき、「ドパミン仮説」が古くから唱えられ、ドパミン伝達の異常がその病態に関与する。当該動物モデルにおいてもドパミン代謝や軸索投射の異常が明らかになっている。特に EGF 投与モデルでは、淡蒼球外節でのドパミン投射が増加し、認知行動機能の異常とも関連付けられている。しかしながら、ドパミン伝達異常の生理学的実態やそれを引き起こす脳内回路変化、あるいはドパミン神経自体がもつチャネル特性などの生理機能への影響は、ほとんど解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、発達期での EGF や NRG による栄養性作用が、成熟ドパミン神経の生理機能にどのような影響をもたらすのか、スライス実験により電気生理学的に検討する。それにより、ドパミン伝達に異常を引き起こす可能性のあるチャネル特性やシナプス特性への影響を検討する。

また、スライス実験で認められたドパミン神経の生理特性の異常が、生体内での活動に

影響を及ぼす可能性を検討するために、自発発火活動を麻酔下で計測する。それにより動物モデルに見られるドパミン伝達異常に関わる生理学的実態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

EGF あるいは NRG を生後 2 日より 10 日まで皮下投与することで因子投与動物モデルを作成した。幼若期あるいは成熟に至った動物を実験に用いた。EGF 遺伝子を過剰に発現するトランスジェニックマウス (EGF-Tg) は香港大学 Chan 博士が作成したものを連携研究者 (那波) の協力により入手した。

(2) スライス実験

ドパミン神経の生理特性の解析は中脳水平断スライス標本作製し、ホールセルパッチクランプ記録を行うことで実施した。チャネル特性に関しては、スパイク発火頻度や発火パターンに関わる電流成分として、カリウムチャネルに由来するものを中心に評価した。即ち、脱分極電流注入時の発火頻度を電流固定法により計測し、さらに活動電位発生後の後過分極成分や膜脱分極後のテール電流を膜電位固定法により計測した。シナプス特性に対する影響は、自発性シナプス電流や微小シナプス電流等を解析することにより評価した。

(3) 麻酔動物からのドパミン活動記録

生体内でのドパミン神経活動記録は、抱水クロラル麻酔下で実施した。微小ガラス電極をドパミン核に刺入することで、単一ドパミン神経由来の発火活動を、細胞外的にシングルユニットとして単離して記録した。計測パラメーターは、平均発火頻度とバースト発火率を中心に解析した。実験後に、記録電極より色素注入することで、記録部位を組織学的に決定した。

4. 研究成果

(1) NRG 投与マウスのスライス標本では、ドパミン神経の自発発火活動の亢進が認められた。またこの影響は、抑制性シナプス入力を遮断することにより消失した。こうしてドパミン活動の亢進には、GABA シナプス抑制の低下が関与することが示唆された。

ホールセル記録によるシナプス入力解析の結果、抑制性シナプス入力頻度や微小シナプス電流の振幅低下が、NRG 投与の影響として認められた。このことは、ドパミン神経の GABA 抑制に対する感受性が低下していることを示唆している。その一方で、ペースメーカー自発発火頻度の調節を担う過分極活性型陽イオン電流には、著明な影響が検出できなかった。これらの結果により、NRG 投与マウスでは、GABA 抑制の低下によってドパミン活動の亢進が生じているものと結論付

けられた。

(2) EGF 投与マウスのスライスパッチクランプ解析の結果、ドパミン神経のスパイク発火特性に EGF 投与の影響が検出された。即ち、脱分極電流を注入した際の発火頻度が亢進し、また同時に活動電位発生後の後過分極成分の低下を認めることができた。この影響は、幼若期より成熟に至るまで比較的長期にわたって検出された。

膜電位固定法により持続性脱分極後の Ca^{2+} 活性型 K^+ 電流由来のテール電流を検討し、同様の振幅低下が認められた。こうして EGF は、ドパミン神経のチャネル特性を変化させ、興奮性を増加させる作用を持つことが見出された。特に、このような後過分極成分の低下は、スパイク間隔を短縮させることでバースト発火活動を促進する作用を持つ。従って、生体内において、バースト発火率が亢進されているものと推察された。

(3) 上記(1)、(2)で明らかになった生理特性変化が、麻酔下でのスパイク発火活動に反映されるか検討した。その結果 NRG 投与動物の黒質緻密部では、発火頻度には影響が認められなかったものの、バースト発火率が亢進していることが判明した。

EGF 投与動物では、NRG 投与と比較してより著明な影響を認めることができた。即ち、黒質緻密部並びに腹側被蓋野の両領域で活動性の増加を認めることができた。また NRG 投与動物と同様に、黒質緻密部でのバースト発火率の亢進が著明であることも判明した。こうして、生理特性変化から推察された自発発火活動の亢進が、生体内で生じていることが判明した。

(4) EGF-Tg マウスを用いて上記(3)と同様の活動記録を実施した。その結果、黒質緻密部でのバースト発火率が亢進していた。こうして、外来性の因子刺激のみならず、恒常的な内因性刺激によっても、EGF が同様の作用を持つ可能性が示された。

(成果のまとめ)

上記の成果により、新生仔期の栄養因子刺激は、成熟ドパミン神経の生理特性に永続的な影響をもたらすことが判明した。その影響は、EGF と NRG では異なっていたものの、共にドパミン神経の活動性を増加させる作用となっていた。また、これらの生理特性変化が、生体内のドパミン活動に対しても促進的な影響を与えることが麻酔下での活動記録により示された。

これまでの知見として、EGF 投与動物では淡蒼球外節でのドパミン含有量が増加しており、認知機能低下といった行動特性と関連

付けられている。また、EGF、NRG モデル共に何らかの精神刺激薬に対する感受性の亢進を示す。従って、当該動物モデルで見出されたドパミン神経の生理特性変化やバースト発火に対する促進的な影響は、これらの行動特性を引き起こす要因の一つとなる可能性がある。こうして、栄養因子を介した生理特性変化に関わる作用機序の解明が、長期的には疾患発症メカニズムの分子的基盤につながるものと考えられ、今後さらに検討されるものと思われる。

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 2 件)

(1) Mizuno M, Sotoyama H, Namba H, Shibuya M, Eda T, Wang R, Okubo T, Nagata K, Iwakura Y, Nawa H. ErbB inhibitors ameliorate behavioral impairments of an animal model for schizophrenia: implication of their dopamine-modulatory actions. *Transl Psychiatry*. 査読有, 2013, 3, e252. doi: 10.1038/tp.

(2) Sotoyama H, Namba H, Chiken S, Nambu A, Nawa H. Exposure to the cytokine EGF leads to abnormal hyperactivity of pallidal GABA neurons: implications for schizophrenia and its modeling. *J Neurochem*. 査読有, 2013, 126, 518-28. doi: 10.1111/jnc.12223.

[学会発表](計 3 件)

(1) 難波寿明、大久保猛司、那波宏之
2 種の幼若期栄養因子投与マウスの *in vivo* 麻酔下での中脳ドパミン神経活動変化 (Abnormal firing activities of the midbrain dopaminergic neurons in the mice treated with EGF and neuregulin-1 as neonate.)

第 36 回日本神経科学大会 (Neuro2013)
(2013.6.22) 京都

(2) 外山英和、難波寿明、那波宏之
上皮成長因子によって確立された統合失調症動物モデルにおける腹側被蓋野 前頭皮質経路の機能異常

(Abnormal ventral tegmental area - medial prefrontal cortex dopaminergic pathway of the schizophrenia animal model established by epidermal growth factor)
第 36 回日本神経科学大会 (Neuro2013)
(2013.6.22) 京都

(3) 難波寿明、竹田悠亮、那波宏之
幼若期ニューレグリン投与マウスにおける
中脳ドパミン神経の生理特性
(Electrophysiological properties of
adult midbrain dopaminergic neurons of the
mice treated with neuregulin-1 as
neonates.)
第 34 回日本神経科学大会 (2011.9.16) 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者
難波 寿明 (NAMBA, Hisaaki)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号：90332650

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
那波 宏之 (NAWA, Hiroyuki)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：50183083