

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25242078

研究課題名(和文) 双方向性神経成熟度変化のメカニズム解明とその制御

研究課題名(英文) Elucidation and regulation of bi-directional changes in neuronal maturation status

研究代表者

宮川 剛 (Miyakawa, Tsuyoshi)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：10301780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに顕著な行動異常のプロファイルを示す遺伝子改変マウスに共通する脳内表現型として「非成熟歯状回」を見出している。本研究では、神経成熟度の双方向性変化が生じるメカニズム解明とその制御法の開発を目的として、各種の先端的手法を用いて検討を行った。インフォマティクスの解析により「非成熟歯状回」が生じる過程で変動している遺伝子群について新規の知見を得たほか、光遺伝学的手法より脱成熟が固定化する条件を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Previously we identified the “immature dentate gyrus (iDG),” a brain endophenotype shared in animal models of several psychiatric disorder, including schizophrenia and bipolar disorder. In this study, we sought to elucidate the mechanism of bi-directional changes in neuronal maturation status, and to develop the method for manipulation of maturation status, by using various cutting-edge technologies. We identified gene sets potentially involved in the development of iDG, by informatics analysis. Using optogenetics, we detected the condition under which temporal de-maturation status alters to permanent de-maturation status.

研究分野：神経科学

キーワード：非成熟歯状回 バイオインフォマティクス 網羅的行動解析

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに190系統以上の遺伝子改変マウスに対して「網羅的行動テストバッテリー」を行うことによって、多数の精神・神経疾患モデルマウスを同定してきた。この中でもとりわけ顕著な行動異常のプロファイルを示す CaMKII のヘテロノックアウトマウスにおいて、成体の脳にもかかわらず、海馬歯状回のはばすべての神経細胞が未成熟な状態にあるという「未成熟歯状回」という現象を世界で初めて見出した。この「未成熟歯状回」という現象はやはり顕著な行動異常を示す Schnurri-2 (Shn2) ノックアウトマウス、変異体 SNAP-25 ノックイン (mSNAP-25 KI) マウス、さらには我々が統合失調症モデルとして過去に提唱した前脳特異的カルシニューリンノックアウトマウスなどでも見られることがわかってきた。さらに驚くべきことに、薬物やけいれん発作などによって成熟した歯状回が擬似的な未成熟状態に戻る「脱成熟歯状回」という現象も発見し、未成熟歯状回、脱成熟歯状回をあわせて「非成熟歯状回 (immature Dentate Gyrus; iDG)」と名付けた。我々はこの成果に基づき、この「非成熟歯状回」がヒトの統合失調症患者と双極性気分障害患者の死後脳でも見られることを確認し、精神疾患の有力な中間表現型として提唱している。これらの発見に刺激され、情動を司る扁桃体においても「脱成熟」が生じること、統合失調症患者の大脳皮質のパーバルブミン陽性抑制性介在細胞が擬似未成熟状態にあることなども最近報告されており、神経細胞の成熟度の異常が海馬歯状回のみならず、脳の様々な細胞で起こりうるということがわかってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経の成熟度が双方向性に変化する機序を、モデルマウスにおいて各種の先端的手法を活用することによって解明する。さらに、神経成熟度を薬物や各種刺激により自在に制御する方法を確立し、これによりモデルマウスが示す行動異常も回復・誘導させることも試みつつ、神経の双方向性成熟度変化の行動レベルでの意義を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経の双方向性の成熟度変化の分子機序の解明

バイオフィォマティクスの解析により、複数の「非成熟歯状回」を示すマウス (iDG マウス) で共通して生じている分子変化を同定することを目的とする。解析には、バイオフィォマティクスツール・BaseSpace (イルミナ) を用いた。これにより、公的リソースに収納されているライフサイエンスに関する情報 (遺伝子配列、タンパク質配列、遺伝子発現、分子パスウェイ、関連疾患の情報

など) を複合検索し、我々が有するデータとこれらを網羅的に比較・解析することが可能である。

(2) 神経成熟度を薬物や各種刺激により自在に制御する方法の探索と確立: (1) で得られる知見を活用しつつ、神経成熟度を薬物や各種刺激により自在に制御する方法を探索・確立する。

神経活動操作による神経成熟度の制御: 薬物によるけいれん発作や、電気けいれんショックにより脱成熟が持続的に誘導される条件を、明らかにする。

部位特異的遺伝子改変による神経成熟度の制御: iDG 化を引き起こすことが知られている遺伝子について各種の部位特異的ノックアウトマウスを作成し、これらの神経の成熟度に影響を及ぼす脳部位を特定し、神経成熟度を部位特異的に変化させることを試みる。

(3) 神経細胞の双方向性成熟度変化の機能的意義の解明: 我々が有する iDG マウスは、「非成熟歯状回」をはじめとして、抑制性神経細胞の低下や軽度の慢性炎症など共通した多様な脳内の異常をもつほか、精神疾患様の行動異常パターンを示す。「非成熟歯状回」がこれらの異常のうちどの原因になっているのか、またどのようにそれらの異常を引き起こすのかを明らかにする。

成熟度の変化が神経細胞の形態に及ぼす効果の解析: 「非成熟歯状回」では、遺伝子発現や神経細胞の電気生理学的興奮性が大きく変化していることから、シナプス、スパイン、樹状突起などの形態的变化も生じていることが予測される。iDG マウスの脳について、3D 電顕コネクトーム解析により神経細胞の形態的变化を詳細に調べる。

神経成熟度の変化が各種行動に及ぼす効果の解析: 部位特異的遺伝子改変マウスによって神経成熟度の制御を部位特異的にを行い、これが行動レベルでどのような効果を持つか、行動テストバッテリーを用いて網羅的に調べる。これにより、歯状回の神経成熟度が行動レベルでも機能的意義を解明する。

## 4. 研究成果

(1) 神経の双方向性の成熟度変化の分子機序の解明: 「非成熟歯状回」を引き起こす必須のコモンパスウェイの検討のため、バイオフィォマティクス解析により複数の iDG マウスで共通して生じている分子変化の絞り込みをインフォマティクスツール・BaseSpace (イルミナ) を用い進めた。iDG マウスで共通して生じている分子変化の候補 (炎症関連パスウェイなど) を複数見出し、「非成熟歯状回」が生じる過程で変動している遺伝子群について新規の知見を得た。

(2) 神経成熟度を薬物や各種刺激により自在に制御する方法の探索と確立

神経活動操作による神経成熟度の制御：歯状回特異的な光遺伝学的手法を用いて、刺激の強度・頻度を体系的に操作することにより、脱成熟が一過性に終わる段階から長期的に持続する段階へ移行する際のパラメータを探索し、脱成熟が固定化する条件を明らかにした。

部位特異的遺伝子改変による神経成熟度の制御：部位特異的遺伝子改変による神経成熟度の制御：iDG 化を引き起こすことが知られている遺伝子(Shn2、カルシニューリン、CaMKII など)について部位・細胞種特異的(歯状回、前脳、アストログリアなど)ノックアウトマウスの作製を行った。各種脳領域・細胞種特異的 Cre マウスと各種 floxed マウスの掛け合わせと繁殖を進め、(3) の網羅的行動解析を行った。

(3) 神経細胞の双方向性成熟度変化の機能的意義の解明

成熟度の変化が神経細胞の形態に及ぼす効果の解析：「非成熟歯状回」では、遺伝子発現や神経細胞の電気生理学的興奮性が大きく変化していることから、シナプス、スパイン、樹状突起などの形態的变化も生じていることが予測された。Shn2 ノックアウトマウスの歯状回ニューロンについて、3D 電子顕微鏡解析により神経細胞の形態的变化を詳細に調べた。その結果、同マウスでは、樹状突起や核、ミトコンドリアに形態異常が認められた。こうした形態変化が、「非成熟歯状回」に特異的かどうかを調べるため、「非成熟歯状回」を呈する他の系統でも同様な異常が認められるかについて、検討を行っている。

神経成熟度の変化が各種行動に及ぼす効果の解析：部位特異的遺伝子改変による神経成熟度の制御方法の探索のため、iDG 化を引き起こすことが知られている Shn2 遺伝子について各種脳領域・細胞種特異的 Cre マウスの掛け合わせたマウスについて繁殖を進め、部位特異性を検証した。線条体特異的ノックアウトマウスについては部位特異性が得られなかった。部位・細胞種ごとの神経成熟度が行動レベルでどのような効果を持つかを明らかにするために、前脳および歯状回特異的 Shn2 ノックアウトマウスについて網羅的行動解析を行い、各部位特異的遺伝子改変の行動レベルでの影響の検討などを行ったところ、全身でノックアウトした表現型を部分的に再現した。加えて、前脳および歯状回特異的ノックアウトマウスについて歯状回の成熟度を検討したが、顕著な iDG 化は認められなかった。

## 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 52 件)

- (1) Shoji H, Irino Y, Yoshida M, \*Miyakawa T. Behavioral effects of long-term oral administration of aluminum ammonium sulfate in male and female C57BL/6J mice. *Neuropsychopharmacology Reports*. 38, 査読有 . 2018. 1. doi: 10.1002/npr2.12002
- (2) Hagihara H, Catts VS, Katayama Y, Shoji H, Takagi T, Huang FL, Nakao A, Mori Y, Huang KP, Ishii S, Graef IA, Nakayama KI, Shannon Weickert C, \*Miyakawa T. Decreased brain pH as a shared endophenotype of psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*. 43. 査読有 . 2018. 459 - 468. doi: 10.1038/npp.2017.167
- (3) Hattori S, Takao K, Funakoshi H, \*Miyakawa T. Comprehensive behavioral analysis of tryptophan 2,3-dioxygenase (Tdo2) knockout mice. *Neuropsychopharmacology Reports*. 査読有 . 2018. doi: 10.1002/npr2.12006
- (4) Nakao A, Miyazaki N, Ohira K, Hagihara H, Takagi T, Usuda N, Ishii S, Murata K, \*Miyakawa T. Immature morphological properties in subcellular-scale structures in the dentate gyrus of Schnurri-2 knockout mice: a model for schizophrenia and intellectual disability. *Molecular Brain*. 10. 査読有 . 2017. (1):60. doi: 10.1186/s13041-017-0339-2
- (5) Murano T, Koshimizu H, Hagihara H, \*Miyakawa T. Transcriptomic immaturity of the hippocampus and prefrontal cortex in patients with alcoholism. *Scientific Reports*. 7. 査読有 . 2017. 44531. doi: 10.1038/srep44531
- (6) Hagihara H, Shoji H, \*Miyakawa T. Immaturity of brain as an endophenotype of neuropsychiatric disorders. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 148(4). 査読有 . 2016. 168-175. doi: 10.1254/fpj.148.168
- (7) Hagihara H, Horikawa T, Nakamura HK, Umemori J, Shoji H, Kamitani Y, \*Miyakawa T. Circadian gene circuitry predicts hyperactive behavior in a mood disorder mouse model. *Cell Reports*. 14(12). 査読有 . 2016. 2784-96. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.067
- (8) Shoji H, Takao K, Hattori S, \*Miyakawa T. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Molecular Brain*. 9(1). 査

- 読有 . 2016. 11. doi: 10.1186/s13041-016-0191-9
- (9) Nakao A, Miki T, Shoji H, Nishi M, Takeshita H, \*Miyakawa T, \*Mori Y. Comprehensive behavioral analysis of voltage-gated calcium channel beta anchoring and -regulatory protein knockout mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 9. 査読有. 2015. 141. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00141
- (10) Hagihara H, Ohira K, Takao K, \*Miyakawa T. Transcriptomic evidence for immaturity of the prefrontal cortex in patients with schizophrenia. *Molecular Brain*. 7. 査読有. 2014. 41. doi: 10.1186/1756-6606-7-41
- (11) Shoji H, Takao K, Hattori S, \*Miyakawa T. Contextual and cued fear conditioning test using a video analyzing system in mice. *Journal of visualized experiments*. (85). 査読有. 2014. 50871. doi: 10.3791/50871
- (12) Koshimizu H, Takao K, Matozaki T, \*Ohnishi H, \*Miyakawa T. Comprehensive behavioral analysis of cluster of differentiation 47 knockout mice. *PLoS One*. 9(24). 査読有 . 2014. e89584. doi: 10.1371/journal.pone.0089584
- (13) Hattori S, Hagihara H, Ohira K, Aoki I, Saga T, Suhara T, \*Higuchi M, \*Miyakawa T. In vivo evaluation of cellular activity in CaMKII heterozygous knockout mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 7. 査読有 . 2013. 76. doi: 10.3389/fnint.2013.00076
- (14) \*Ohira K, Takeuchi R, Iwanaga T, \*Miyakawa T. Chronic fluoxetine treatment reduces parvalbumin expression and perineuronal nets in gamma-aminobutyric acidergic interneurons of the frontal cortex in adult mice. *Molecular Brain*. 6. 査読有 . 2013. 43. doi: 10.1186/1756-6606-6-43

〔学会発表〕(計 126 件)

- (1) Miyakawa T. Endophenotype in the brain: A key concept for understanding the relationships between genes and behavior. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease (招待講演)
- (2) Miyakawa T. Bidirectional change of maturation status of cells in the

brain: Relevance to neuropsychiatric disorders. *Frontier International Symposium for Neuron and Disease* (招待講演)

- (3) Miyakawa T. Immature dentate gyrus as a candidate endophenotype of neuropsychiatric disorders. *ACNP 52nd Annual Meeting* (招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

田中三佳、服部聡子、昌子浩孝、宮川剛 羊土社、行動解析 遺伝子の脳機能における役割を探索するための網羅的行動テストバッテリー、マウス表現型解析スタンダード 2016、150-158

〔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.fujita-hu.ac.jp/~smedsci/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮川 剛 (MIYAKAWA, Tsuyoshi)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：10301780

### (2) 研究分担者

#### (3) 連携研究者

高雄 啓三 (TAKAO, Keizo)

生理学研究所・行動代謝分子解析センター・特任准教授

研究者番号：80420397

大平 耕司 (Ohira, Koji)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師

研究者番号：80402832

萩原 英雄 (Hagihara, Hideo)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：80514504

小清水 久嗣 (Koshimizu, Hisatsugu)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：10610842

梅森 十三 (UMEMORI, Juzoh)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：20462913

### (4) 研究協力者