

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670536

研究課題名(和文)統合失調症の大脳皮質抑制性介在ニューロン変化におけるGABA受容体遺伝子の役割

研究課題名(英文)Relationship between altered PV neuron function and reduced GABA-A receptor alpha1 subunit expression in the cortex of subjects with schizophrenia

研究代表者

橋本 隆紀 (Hashimoto, Takanori)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：40249959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の大脳皮質におけるパルブアルブミン(PV)陽性ニューロンの変化とGABA-A受容体 $\alpha 1$ サブユニット(GABA-A $\alpha 1$)の発現低下の因果関係を明らかにするために、それぞれの変化を再現した遺伝子操作マウスの大脳皮質を解析した。GABA-A $\alpha 1$ ノックアウトマウスでは、GABA合成酵素GAD67やPVの発現に変化は認められなかった。PVニューロン特異的GAD67ノックアウトマウスでも、GABA-A $\alpha 1$ の発現に有意な変化は認められなかった。統合失調症におけるPVニューロンの変化とGABA-A $\alpha 1$ の発現低下の間の因果関係は支持されず、両者は他の上流メカニズムにより生じていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In schizophrenia, alterations in the subset of cortical inhibitory neurons that express parvalbumin (PV) have been indicated by reduced expression of PV and GAD67, an enzyme for GABA synthesis, in these neurons. These alterations were accompanied by reduced expression of GABA-A receptor $\alpha 1$ (GABA-A $\alpha 1$) subunit that mediates inhibitory neurotransmission by PV neurons. We tested a causal relationship between the changes in PV neurons and GABA-A $\alpha 1$ expression through analyzing cortical gene expression in genetically engineered mice. In GABA-A $\alpha 1$ knockout mice, we did not detect a significant change in GAD67 or PV mRNAs. Conversely, in mice with a conditional knockout of GAD67 in PV neurons, GABA-A $\alpha 1$ mRNA expression was unaltered. These results did not support a relationship between the changes in PV neurons and GABA-A $\alpha 1$ expression in the cortex of subjects with schizophrenia. There might be a common upstream mechanism that drives both changes in cortical inhibition in schizophrenia.

研究分野：精神神経科学

キーワード：モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

統合失調症では、各種の知覚情報処理から記憶までの広汎な認知機能に障害が認められるが、効果的な治療法が確立されておらず、患者の予後を悪化させる最大の要因となっている。

ヒトの認知機能を司る大脳皮質のネットワークは、興奮性の錐体ニューロンと抑制性の介在ニューロンによって構成されている。統合失調症では、この介在ニューロンのなかでもカルシウム結合蛋白質 parvalbumin(PV)を発現するサブタイプ(PVニューロン)において、抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素である GAD67 をはじめとした GABA 神経伝達を司る遺伝子発現の変化が報告されている(Lewis et al. *Nat Rev Neurosci* 2005, Hashimoto et al. *Mol Psychiatry* 2008, Georgiev et al. *Am J Psychiatry* 2014)。

PVニューロンは、ネットワークにおける情報処理を促進する周期性皮質活動(オシレーション)の形成や可塑性の発現を調節することで、認知機能を促進している(Sohal et al. *Nature* 2009, Trachtenberg, *Neuron* 2015)。つまり、PVニューロンの変化は患者にて多く報告されているオシレーションや可塑性の異常を介して、認知機能障害の病態生理に関与していると考えられる(Uhlihaas et al. *Nat Rev Neurosci* 2010)。

このようなPVニューロンの変化の上流メカニズムに関与すると考えられたのが GABA-A 受容体 1 サブユニットの変化である。統合失調症の大脳皮質では、1 サブユニットの発現に顕著な低下が認められた(Hashimoto et al. *Am J Psychiatry* 2008, Glausier et al. *Neuropsychopharmacol* 2011)。動物実験では、発達期における 1 サブユニットを介した GABA 神経伝達が PVニューロンの成熟を促すことが示されている(Chattopadhyaya et al. *Neuron* 2007)。さらに、1 サブユニットをコードする遺伝子 GABRA1 の変異は統合失調症の発症リスクに寄与することが報告されている(Petryshen et al. *Mol Psychiatry* 2005)。

2. 研究の目的

本研究では、統合失調症の大脳皮質で認められる PVニューロン変化の上流メカニズムにおける GABA-A 受容体 1 (GABRA1) サブユニットの役割を、遺伝子操作マウスにおいて統合失調症と同様の遺伝子発現変化を再現することで検証することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 時期特異的遺伝子ノックアウトの確立
時期特異的に遺伝子不活化を誘導する系を確立するため GABA 合成酵素である GAD67 をコードする GAD1 遺伝子の一部が遺伝子組み換え酵素 Cre の認識する loxP 配列で挟まれた floxed-GAD1 マウスと、プロゲステロン受

容体と Cre 酵素の複合蛋白質をコードする遺伝子を発現する Cre-PR マウスを交配し、Cre-PR および floxed-GAD1 遺伝子を有するマウスおよび同性同腹で Cre-PR 遺伝子を発現しないマウスを作成した。これらのマウスに、生後 28-32 日の間、プロゲステロンアナログ RU486 (0.5mg/g body weight/day) を 4 日間連続で投与した。そして、生後 56 日の時点でマウスより脳組織を摘出し凍結した。凍結脳組織より前頭前野皮質を含む切片を作成した。これらの切片を、GAD67 mRNA に対して相補的で 35-S 放射活性を有する RNA プローブと一晩反応させ、余分なプローブを取り除いた後、切片を放射能感受性フィルムに露光し、GAD67 mRNA の発現を放射活性として検出し、前辺縁皮質および帯状回皮質を含む前頭前野において定量し、Cre-PR 遺伝子を発現するマウスとそうでない同性同腹のマウス(各 5 匹)の間で比較した。

2) 発達早期からの GABRA1 遺伝子ノックアウトマウス解析

GABA-A 受容体 1 をコードする GABRA1 遺伝子の塩基配列 1307 番から 1509 番までのエクソンが loxP 配列で挟まれたマウスと全ての細胞で普遍的に発現する Actin のプロモーターの支配下に Cre を発現するマウスを交配し、受精後より GABRA1 遺伝子が両方の遺伝子で不活化された GABRA1(-/-)マウスと同腹の野生型 GABRA1(+/+)マウスから成る 8 組のオスマウスを用いた。

GABRA1(-/-)マウスの大脳皮質では、GABA-A 受容体 1 サブユニットの蛋白質レベルが、野生型マウスに比べ 95%以上低下していることが、既に Western blotting で確認されている。

これらのマウスが 8-9 週に到達後、脳より前頭前野を含む切片を作成し、統合失調症の大脳皮質 PVニューロンで発現低下が報告されている GAD67 および PV の mRNA の発現を、35-S でラベルされた RNA プローブを用いた in situ hybridization(ISH) 法で 1)と同様に検出し、前頭前野ならびに運動野で定量し、GABRA1(+/+)と GABRA1(-/-)マウスの間で比較した(各 8 匹)。

3) PVニューロン特異的 GAD67 ノックアウト

統合失調症の大脳皮質 PVニューロンにおける GABA 合成酵素 GAD67 の発現低下が、GABRA1 遺伝子発現低下の上流にある可能性を評価するため、PVプロモーターの支配下に Cre を発現する PV-Cre マウスと GAD67 をコードする GAD1 遺伝子のエクソンが loxP 配列で挟まれた floxed-GAD1 マウスを交配し、PVニューロン特異的に GAD67 をノックアウトした。PV-Cre 遺伝子を有し、GAD1 遺伝子変異についてホモ(floxed/floxed)、ヘテロ(floxed/+),野生型(-/-)の同性同腹のマウスをトライアドと定義した。マウスが 8 週齢に到達した段階で、脳組織を取り出し、前頭

前野および運動野を含む切片を作成した。

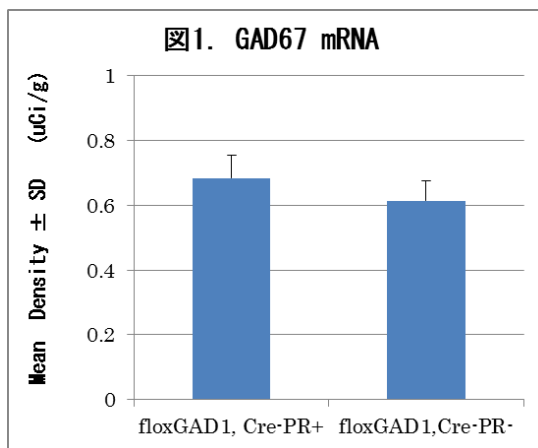
GAD67の発現がPVニューロンに特異的に低下していることを確かめるために、35-Sで標識されたGAD67 mRNAに相補的なRNAプローブとDigoxigeninで標識されたPV mRNAに対するRNAプローブを用いる2重標識ISH法を行い、GAD67 mRNAは放射活性が乳剤を感光させることで生じる銀粒子の集積、PV mRNAは抗Digoxigenin抗体に結合している酵素による発色反応による染色で検出した。最終的に、PVニューロンにおいてGAD67 mRNAの発現を銀粒子の密度として計測し、floxed/floxed, floxed/+, +/+の遺伝子型のグループ間で比較した。

さらに、これらのマウスの大脳皮質切片を用い、GABRA1 mRNAの発現を、35-Sで放射標識されたRNAプローブにより検出し、前頭前野および運動野で定量し、3つの遺伝子型間で比較した。

4. 研究成果

1) 思春期における時期特異的遺伝子ノックアウトシステム の確立

RU486は水溶性が低いことから、界面活性剤を含む生理食塩水に懸濁して、効果が発現することが報告されている量を腹腔投与した。しかし体重あたりの投与量が多く、投与後にマウスが死亡することもあった。このような高容量を用いたが、前頭前野皮質におけるGAD67 mRNAの発現量は、Cre-PRを発現するマウスで 0.68 ± 0.07 (uCi/g)でCre-PRを発現しないマウスで 0.61 ± 0.06 (uCi/g)であり、有意な差は検出されなかった ($t_4=2.8$, $P=0.19$) (図1)。

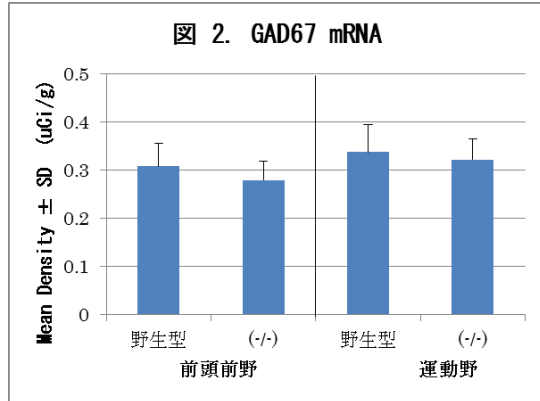


2) 発生初期からの GABRA1 遺伝子ノックアウトの影響

2-i) GAD67 mRNA 発現レベル (図2参照)

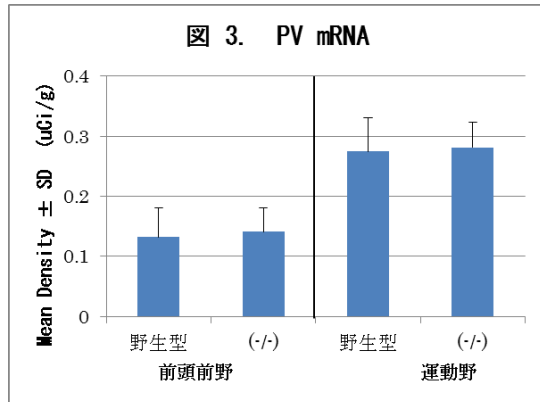
前頭前野では野生型 (GABRA1+/+) マウス (0.31 ± 0.05 uCi/g) とノックアウト (GABRA1-/-) マウス (0.28 ± 0.04 uCi/g) の間で有意な差はなかった ($t_{14}=1.28$, $P=0.22$)。運動野においても野生型 (GABRA1+/+) マウス (0.34 ± 0.06 uCi/g) とノックアウト

(GABRA1-/-) マウス (0.32 ± 0.04 uCi/g) の間で有意な差はなかった ($t_{14}=0.62$, $P=0.54$)。



2-ii) PV mRNA 発現レベル (図3参照)

前頭前野では野生型 (GABRA1+/+) マウス (0.13 ± 0.05 uCi/g) とノックアウト (GABRA1-/-) マウス (0.14 ± 0.07 uCi/g) の間で有意な差はなかった ($t_{14}=0.26$, $P=0.80$)。運動野においても野生型 (GABRA1+/+) マウス (0.27 ± 0.08 uCi/g) とノックアウト (GABRA1-/-) マウス (0.28 ± 0.08 uCi/g) の間で有意な差はなかった ($t_{14}=0.17$, $P=0.86$)。



3) PVニューロン特異的 GAD67 ノックアウトによる GABRA1 遺伝子発現への影響

3-i) PVニューロンにおける GAD67 mRNA 発現

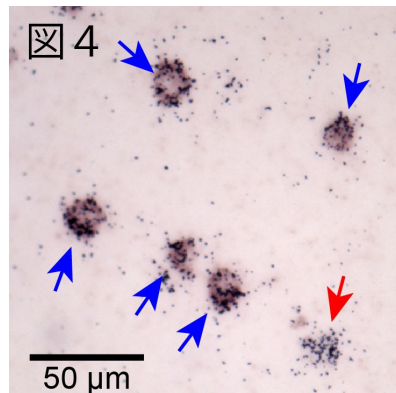
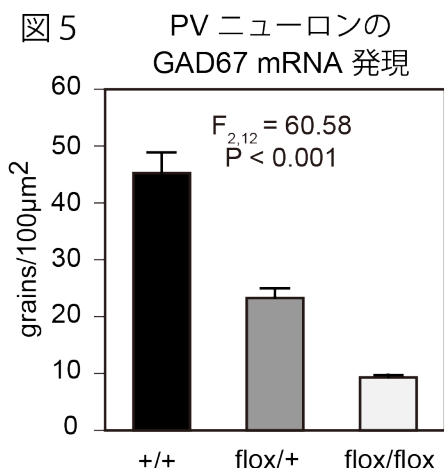
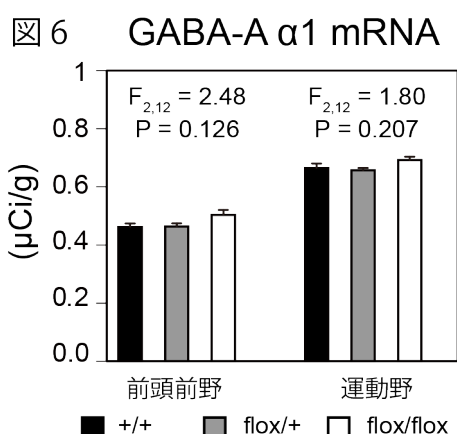


図4は、野生型マウスの前頭前野におけるPV mRNA(染色)及びGAD67 mRNA(銀粒子)の2重ISH法による同時検出を示す。GAD67 mRNA発現はPVニューロン(青矢印)と非PVニューロン(赤矢印)に認められる。

運動野の PV ニューロンにおける GAD67 mRNA 発現を反映する銀粒子の平均 \pm SD 密度 (/100 μm^2) は、GAD1 遺伝子の変異が flox/flox、flox/+、野生型マウス(+/+)で、それぞれ 45.2 ± 8.1 、 23.3 ± 3.8 、 9.3 ± 1.0 であり、一元 ANOVA で遺伝子型の違いの有意な影響が検出され ($F_{2,12} = 60.58$, $P < 0.001$)、多重検定でも各遺伝子型間の有意差が確認された。(図 5)



3-ii) GABA-A 1サブユニット mRNA の発現 PV ニューロン特異的に GAD67 のノックアウトが確認された +/+, flox/+, flox/flox の遺伝子型のマウスにおける GABA-A 受容体 1サブユニットの mRNA の発現レベルは、前頭前野でそれぞれ 0.46 ± 0.03 、 0.46 ± 0.02 、 0.50 ± 0.04 で、運動野では 0.67 ± 0.04 、 0.66 ± 0.02 、 0.69 ± 0.03 であり、両領域において遺伝子型の違いは発現レベルに有意な影響を有さなかった(前頭前野: $F_{2,12} = 2.48$, $P = 0.126$, 運動野: $F_{2,12} = 1.80$, $P = 0.207$) (図 6)。



4) まとめ

本研究の結果は、統合失調症の大脳皮質で認められる GABA-A 受容体 1サブユニットの発現低下が、皮質 PV ニューロンに認められる GAD67 ならびに PV の発現低下を引き起こしているという仮説を支持しない。また、PV ニューロンにおける GAD67 の発現低下が、GABA-A

受容体 1サブユニットの発現低下に関与している可能性も支持しない。PV ニューロンの変化と GABA-A 受容体 1サブユニットの発現低下は、別の上流メカニズムによりもたらされている可能性が考えられた。

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 1 件)

Georgiev D, Yoshihara T, Kawabata R, Matsubara T, Tsubomoto M, Minabe Y, Lewis DA, Hashimoto T. Cortical gene expression after a conditional knockout of 67 kDa glutamic acid decarboxylase in parvalbumin neurons. Schizophrenia Bulletin, in press

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 「統合失調症における大脳皮質パルプアルブミンニューロン選択的遺伝子発現」国際シンポジウム「皮質 GABA 細胞の異常と精神神経疾患」(座長)第 38 回日本神経科学大会 2015.7.30 (神戸国際会議場)

〔図書〕(計 0 件)

〔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:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 隆紀 (HASHIMOTO, Takanori)

金沢大学院・医学系・准教授

研究者番号: 40249959

(2)連携研究者

川端 梨加 (KAWABATA, Rika)

金沢大学・医学系・研究員

研究者番号: 70726207