

神経発達期ニューレグリン-1 過剰シグナルが及ぼす 認知行動機能と聴覚機能への影響

加藤 泰介・阿部 佑一・那波 宏之
新潟大学脳研究所分子神経生物学分野

木南 凌・廣川 祥子
新潟大学遺伝子制御講座分子生物学分野

田中 稔
新潟大学動物資源開発研究分野

水野 誠
新潟大学超域研究機構

Behavioral Characterization of Neonatal Neuregulin - 1 Treated Mice and the Effect on Hearing Function

Taisuke KATO, Yuichi ABE and Hiroyuki NAWA

Department of Molecular Neurobiology, Brain Research Institute, Niigata University

Ryo KOMINAMI and Shoko HIROKAWA

Department of Molecular Genetics, Niigata University

Minoru TANAKA

Department of Comparative and Experimental Medicine, Niigata University

Makoto MIZUNO

Center for Transdisciplinary Research, Niigata University

要 旨

ニューレグリン-1 (Neuregulin - 1: NRG1) は統合失調症の感受性遺伝子として報告された神経栄養因子である。これまでに様々な NRG1 遺伝子の遺伝子改変マウスが作られ、統合失調症モデル動物としての評価が行われてきた。NRG1 は細胞移動・軸索誘導・ミエリン形成等の

Reprint requests to: Hiroyuki NAWA, Taisuke KATO
Department of Molecular Neurobiology
Brain Research Institute Niigata University
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先：〒951 - 8585 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学脳研究所分子神経生物学分野
那波宏之, 加藤泰介

中枢神経系発達を制御する機能を担っている。また、NRG1は末梢神経系においても栄養因子として働き、内耳蝸牛神経細胞の生存に関わっている。そして、NRG1と受容体であるErbBシグナルの異常は聴力の低下を引き起こすことが知られている。従って、NRG1シグナルの障害は異常な神経発達を引き起こすと考えられる。遺伝的要因に加えて胎児の低酸素障害などの環境因子も統合失調症のリスク因子と考えられており、これらはNRG1の発現異常も誘導する。よって遺伝的背景・環境要因は共に異常なNRG1シグナルを引き起こすことによって、神経発達障害という統合失調症の原因仮説に結びつくことが予想される。今回私は、神経発達段階での過剰NRG1シグナルと統合失調症発症リスクとの関係を検討した。新生仔マウスに対して組換えNRG1ペプチドを投与した後、認知行動解析による評価を行った。

プレパルスインヒビション (prepulse inhibition: PPI) は不必要な情報を取り除く知覚フィルター機能を評価するものであり、統合失調症で低下が報告されている。動物モデルを用いたPPIの測定は音驚愕反応を用いて行われ、NRG1遺伝子改変マウスにも障害が報告されている。しかしながら、これまでの遺伝子改変マウスは全身性変異でありながら聴覚機能を調べられた例はない。そこで私はNRG1投与マウスの認知機能に加えて聴覚機能の解析も同時に行った。

認知行動解析の結果、NRG1投与マウスは劇的なPPIの低下と、音条件付け学習の低下を示した。加えて、統合失調症の陰性症状を反映すると考えられている社会性行動にも障害が見られた。しかしながら聴性脳幹反応を用いた聴覚機能解析の結果、このマウスには重度の聴力異常があることが分かった。この結果はこれまでに報告されてきたNRG1ミュータントマウスのPPIの低下には聴覚系への影響が関わっているという重要な懸念を示唆するものである。だが、聴覚系が関与しない社会性行動試験の結果は遺伝子改変マウスの異常形質を再現するものであり、神経発達段階でのNRG1シグナルの異常がこの疾患に何らかの関わりを持っている可能性を示している。

キーワード：ニューレグリン-1, 統合失調症, 聴覚

緒 言

統合失調症の臨床的、そして疫学的な研究から統合失調症は発症以前の神経発達段階における異常が大きな危険因子となりうることが示唆されている¹⁾。さらに神経栄養因子であるニューレグリン-1 (Neuregulin-1: NRG1) の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNPs) による遺伝的脆弱性と神経発達異常との関連が注目されている²⁾。最近ではこれら遺伝的要因に加えて、環境要因も関わる多因子性の“神経発達障害仮説”が注目されてきている。遺伝的な関連に加えて統合失調症患者死後脳では、NRG1や受容体であるErbB4のmRNA・タンパク質レベルでの発現上昇が報告されている³⁾⁴⁾。しかしながら、NRG1/ErbB4シグナル過剰の統合失調症発症への寄与は未だに検討されていない。

統合失調症の神経発達障害仮説においては、難産・胎児の低酸素障害などの環境因子が遺伝的リスクと相互作用すると考えられている。例えば、統合失調症で見つかったNRG1のSNPは頻繁にプロモーター領域で見つかり、それらはNRG1遺伝子の発現を正方向に調節していると考えられている⁴⁾。さらにNRG1の発現は統合失調症のリスク環境要因である脳虚血や脳傷害によって強く誘導されることが知られている⁵⁾⁶⁾。つまりNRG1遺伝子のリスクSNPを持った胎児または新生児脳内では、これらの環境障害によってより顕著なNRG1発現誘導が起こりうる。結果、この神経栄養因子の過剰シグナルは重度に脳発達を障害し、統合失調症へのリスクを高めると仮説できるかもしれない。

NRG1は神経発達に深く関わる神経栄養因子の一つである⁷⁾。従って、この因子の機能異常は上

述した神経発達仮説と矛盾しない。これまでに *NRG1* 遺伝子の様々なエクソンのノックアウトマウスが開発され、行動学的な形質異常が解析されてきた。これらのマウスは発達後に統合失調症様の認知行動異常をしばしば示す⁸⁾⁹⁾。しかしながら、これらのノックアウトマウスでは *NRG1* シグナルの低形質が一貫して生涯続く、言いかえれば時間的にコントロールされていないためにこれらのマウスを神経発達生涯仮説にのっとして評価することは困難であった。

今回私は、統合失調症の神経発達仮説に基づき、過剰な *NRG1* シグナルと本疾患との関連を検証する実験を行った。統合失調症において *NRG1* 発現が上昇しているという知見にのっとり、組替え *NRG1* ペプチドの末梢投与によって、新生仔マウス脳内の *NRG1* シグナルを活性化させる手法を取った。マウスの成長後、*NRG1* 投与の影響をプレパルスインヒビション (prepulse - inhibition: PPI)、社会性行動試験、文脈-/音-条件付け記憶学習試験を用いてマウスの行動指標を解析した。加えて、*NRG1*/*ErbB* シグナルは聴覚機能調節にも関わっていることから、*NRG1* 投与マウスの聴性脳幹反応の検討も行った¹⁰⁾。

材料と方法

・動物

妊娠後期 (妊娠 18-19 日齢) の雌 C57BL/6N^{Cr} を日本チャールズリバーより購入した。明暗周期を 12 時間に保ち、水と餌を自由摂取できる環境で飼育した。

・組換え *NRG1* ペプチド投与

組換え *NRG1* は、その活性中心である上皮成長因子ドメインペプチドを PeproTech 社 (London, UK) より購入した。この組換えヒト *NRG1* はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈し、生後 2 日から 10 日目までの 9 日間、 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重 (投与量 $10 \mu\text{l}/\text{g}$ 体重) で頸部に皮下投与した。対照群 (control) として同腹仔に同様の方法で PBS を投与した。

・音刺激驚愕反応及び PPI 測定

全ての行動試験は生後 56-84 日齢に行った。音刺激驚愕反応と PPI は、小動物用驚愕反応測定装置 (SR-LAB systems, 米国サンディエゴ社) を用いて測定した。驚愕強度と PPI 反応への音刺激には、120 dB の音刺激を用いた。未刺激のバックグラウンドノイズを 70 dB とし、プレパルス強度はバックグラウンドノイズより 3, 6, 9, 12 dB 高い刺激 (73, 76, 79, 82 dB) で設定した。測定は次の 5 条件を 1 試行として 8 試行を行った。(i) 120 dB のみの音刺激を 40 ミリ秒、(ii)-(iv) 20 ミリ秒のプレパルス (73, 76, 79, 82 dB) 刺激の 100 ミリ秒後に 120dB で 40 ミリ秒、(v) バックグラウンドノイズ (70 dBa) のみ:未刺激。驚愕強度の PPI パーセンテージは次のように計算した; $100 - [(\text{プレパルス刺激のあるときの驚愕強度} - \text{未刺激時の振動強度}) / (\text{120dB のみの刺激時の驚愕強度} - \text{未刺激時の驚愕強度})] \times 100$ 。また、音刺激驚愕反応は 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120 dB の音刺激を各 8 回与えることによって測定した。

・社会性行動試験 (resident - intruder test)

社会性行動試験は *NRG1* 投与群と control 群の雄マウスを使って resident - intruder test によって評価した。被験雄マウス (resident) はホームケージに 1 匹の状態 で 1 週間飼育し、試験日前日このマウスケージの床敷を交換した。試験日当日、通常条件で集団飼育されていた新規マウス (intruder) を resident マウスのホームケージに入れ、resident マウスの intruder マウスに対する社会性行動の録画 (10 分間) を行った。後日ビデオ録画を再生し、Resident マウスの社会性行動 (後追い・匂い嗅ぎ・毛づくろい・マウンティング) と攻撃性行動 (威嚇・噛付き) への時間・頻度を盲検法によって計測した。

・文脈-/音-条件付け学習試験

条件付け (conditioning): マウスを conditioning chamber (10L × 10W × 10H cm, 小原医科産業社) に入れ、基本運動量/すくみ行動を 2 分間の記録後、30 秒間の条件付け音刺激 (60 dB, 10 kHz)

を与え、その直後に0.8 mA (2秒)の電気ショックを与えた。1日後、マウスを再び同じ conditioning chamberに戻し、文脈依存性の記憶学習能をすくみ行動時間として評価した。すくみ行動は30秒ごとに区切り、計3分間記録した。文脈依存性記憶学習試験から3時間後、マウスを上記 conditioning chamberとは色・素材の異なる chamberに入れ、同じ音刺激のみ提示し、その前後の3分間のすくみ行動を記録した。マウスの30秒あたりのすくみ時間の割合は imaging-software (小原医科産業社)によって算出した。

・聴性脳幹反応

聴性脳幹反応が得られる最も低い音刺激レベル (dB) を NRG1 投与マウス、control マウスで測定した。マウスにケタミン (75 mg/kg) /キシラジン (7.5 mg/kg) を筋肉内注射して麻酔をかけ、そのマウスを密閉された音響シリンダーの中に移した。皮下頭頂部に陽極電極を、耳介後部領域に陰極電極を挿入し0.1 ミリ秒/ (4, 8, 10, 16, 20, 32 kHz) からなる音刺激を呈示した。各波長の音刺激呈示を500回試行し、聴性脳幹反応を測定した。聴性脳幹反応の解析は Neuropac μ (日本光電社)を用いた。

全ての数値は平均値±標準誤差で提示する。データの解析は一元配置分散分析あるいは重複分散分析を用い、その後多重比較のために Fisher's LSD 検定をおこなった。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結 果

身体発達への影響

NRG1 と同じ上皮成長因子群に属する上皮成長因子のマウス新生仔への投与は、眼瞼開口・歯萌出を早め、体重増加を有意に低下させる¹¹⁾。同様に NRG1 の投与も身体発達へ影響を及ぼすかを眼瞼開口・歯萌出日数・体重を指標に観察した。その結果上皮成長因子と同様に NRG1 を投与されたマウス新生仔の眼瞼開口・歯萌出日数は有意

に促進され、投与直後11日齢での体重が低下した。さらに、この体重低下は成熟後56日齢でも持続的に観察された(表1, 2)。

プレパルスインヒビション (PPI)

PPI とは暴音刺激による驚愕運動反射が、それに先立ち与えられた小さな音刺激 (プレパルス) により減衰する現象である。PPI は統合失調症患者で低下することがよく知られ、モデル動物の評価に用いられている¹²⁾。測定の結果 NRG1 投与マウスの PPI レベルは対象群に比べて劇的に低下していた ($P < 0.001$) (図 1A)。また同時に新生仔期に NRG1 ペプチドを投与されたマウスの音驚愕反応は 110, 120 dB の音強度で PBS を投与された対照群と比較して有意に増大していた ($P < 0.01$) (図 1B)。

文脈/音条件付け学習試験

統合失調症では認知機能障害の一つとして長期・短期の記憶の保持の障害が知られている。文脈-/音-条件付け学習試験を用いて、新生仔 NRG1 投与が及ぼす学習記憶機能への影響を検討した。条件付け (電気刺激) の際のすくみ行動時間に NRG1 投与マウスと対象群との間に差異は見られなかった。このことは痛覚感受性に対して NRG1 投与は影響を与えていないことを示している ($P = 0.87$) (図 2A)。試験の結果、NRG1 投与マウスの文脈恐怖条件付けによるすくみ行動時間には変化は見られなかった ($P = 0.59$) (図 2B)。一方、音条件付けに依存したすくみ行動時間が対象群と比較して有意に低下していた ($P < 0.05$) (図 2C)。

社会性行動試験 (social - interaction)

統合失調症では社会性障害・感情平板化などの陰性症状と呼ばれる病態が見られるが、動物モデルにおける社会性行動の低下も、この陰性症状を反映していると考えられている。新生仔期 NRG1 シグナルの異常と陰性症状との関連を考察するために resident-intruder テストを用いた社会性行動試験を行った。測定の結果、新生仔期に NRG1

表1 身体的発達に対する新生仔期 NRG1 投与の影響

	対照群		NRG1投与群		変化率 (%)
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	
眼瞼開口 (出生後日数)	13.1	0.18	10.5	0.17	-19.8 **
萌出 (出生後日数)	10.9	0.18	9.4	0.16	-13.7 **
体重 (g、生後11日齢)	6.1	0.17	5.1	0.22	-16.0 *

NRG1投与の身体発達への影響を検討するために眼瞼開口と歯萌出の日齢、最終投与直後11日齢におけるマウスの体重を調べた。*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$ (vs 対照群) unpaired two-tailed t-test。

表2 成熟後身体発達に対する新生仔期 NRG1 投与の影響

	雄体重 (g)			雌体重 (g)		
	平均値	標準誤差	変化率 (%)	平均値	標準誤差	変化率 (%)
対照群	23.9	0.33	—	20.3	0.42	—
NRG1投与群	21.5	0.50	-9.7 **	17.4	0.74	-14.0 **

NRG1投与の成熟後の身体的発達への影響を検討するために、生後56日齢での体重を測定した。**; $P < 0.01$ (vs 対照群) unpaired two-tailed t-test。

を投与されたマウスは匂い嗅ぎ・マウティング等の社会性行動の時間・頻度が共に対象群よりも有意な低下を示した ($P < 0.05$) (図 3A, B)。しかし、噛み付き・威嚇等の攻撃性行動には差は見られなかった ($P = 0.34$) (図 3C)。よって、神経発達期の NRG1 投与は成熟後の社会性機能を障害することが示唆された。

聴性脳幹反応

NRG1/ErbB シグナルは聴覚機能発達に関わっており、聴覚機能の変化は二次的に PPI や音条件付け学習試験等の行動試験に影響を及ぼす可能性が考えられた。測定の結果 NRG1 投与マウスの聴性脳幹反応の閾値は 4-32 dB の全ての波長域で対象群よりも有意に低下しており、聴力に障害をきたしていることが示された (図 4) ($P < 0.001$)。

考 察

今回、私は神経発達段階における NRG1 シグナ

ルの異常と統合失調症で障害が見られる認知機能との関連について検討を行った。NRG1 投与マウスは、成熟後に PPI の低下、音驚愕反応の増大、そして、音条件付け学習スコアの低下を示した。これらは全て聴覚系に関わる行動学的指標である。統合失調症の感受性遺伝子である NRG1 は、一つの遺伝子から選択的スプライシングによって多数のバリエーションが作られる¹³⁾。これまでに、主要な NRG1 スプライシングバリエーションのノックアウトマウスが作られ熱心な行動学的解析が行われてきた⁸⁾⁹⁾。しかしながら、NRG1/ErbB シグナルの低下はマウス聴力を低下させることが知られていながら、これらマウスの聴覚機能は全く調べられてこなかった。今回の NRG1 投与マウスにも過去のいくつかの NRG1 のノックアウトマウスと同様に PPI の有意な低下を見た。しかしながら、驚くべきことに NRG1 ペプチド投与によるシグナル変化は一過性で、かつ低下ではなく増強シグナルであるにも関わらず、このマウスは重度の聴覚異常を持っていることが分かった。同時に見

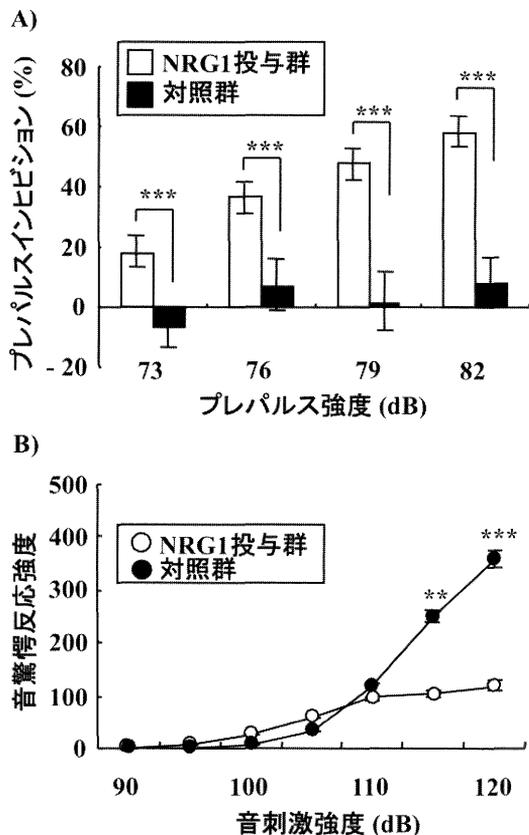


図1 新生仔期 NRG1 投与による成熟後のプレパルスインヒビションと音驚愕反応への影響

A) プレパルス (73, 76, 79, 82 dB) を用いた新生仔期 NRG1 投与マウスのプレパルスインヒビション. B) 同マウスの音驚愕反応強度. **, P < 0.01, ***, P < 0.001 (vs 対照群) Fisher's LSD 検定.

られた音驚愕反応強度の増大や音条件付け学習スコアの低下も、このマウスの聴覚機能の異常を反映するものと推定される。現段階で過度な推測はできないが、一過性の NRG1 シグナルの増強がその後の ErbB 受容体のダウンレギュレーションを引き起こしたとも考えられる。

今回、実験に用いた NRG1 ペプチドは活性部位である上皮成長因子ドメインペプチドである。本

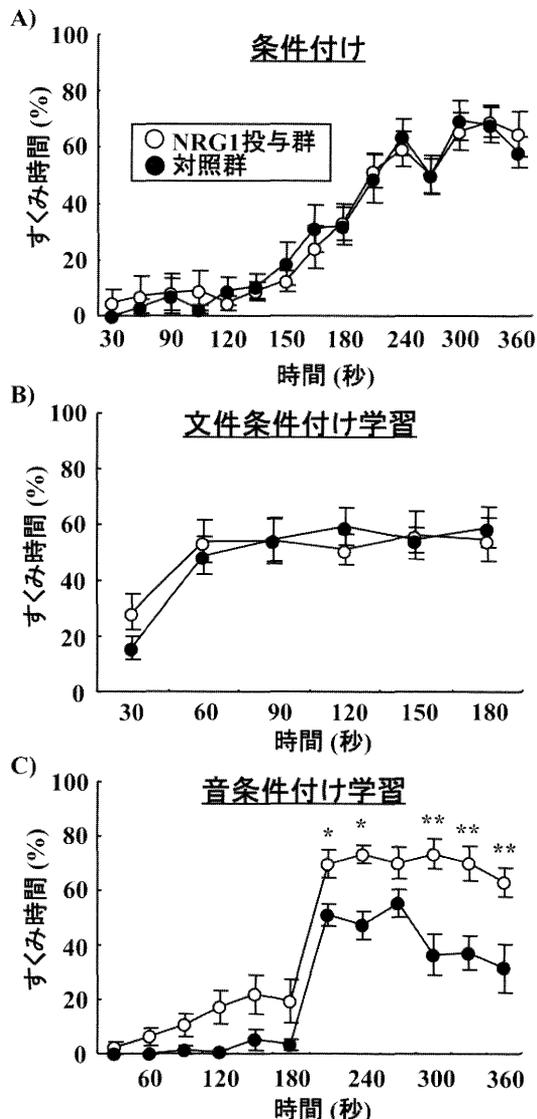


図2 新生仔期 NRG1 投与による文脈-/音-条件付け学習への影響

A) 新生仔期 NRG1 投与マウスの条件付け時のすくみ行動時間 (%). B) 同マウスの文脈条件付け学習, C) 音条件付け学習. **, P < 0.01, ***, P < 0.001 (vs 対照群) Fisher's LSD 検定.

来, NRG1 スプライシングバリエントはそれぞれ異なる N 末端配列を持つ。この N 末端ドメイン

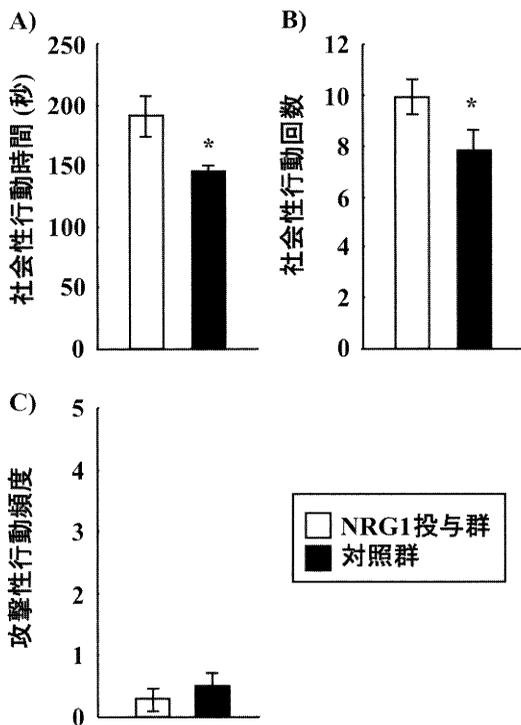


図3 新生仔期 NRG1 投与の社会性行動への影響

A) 新生仔期 NRG1 投与マウスの 10 分間の社会性行動時間. B) 同マウスの社会性行動回数. C) 同マウスの攻撃性行動回数.

*; $P < 0.05$, unpaired two-tailed t-test.

はそれぞれの膜貫通性やヘパリン結合能などによって NRG1 シグナルの様式に大きな差異をもたらす。このペプチドは広く NRG1 研究に用いられているが、各バリエーションの活性を全て反映しているかどうかは不明である。いずれにせよ詳しいメカニズムの説明は今後の課題である。

聴覚系の異常だけではなく、NRG1 投与マウスは社会性行動の異常という統合失調症の陰性症状に関わる機能障害を示した。動物モデルの社会性行動にはドーパミン神経やセロトニン神経伝達など複数の神経回路が関わっていることが示されている。また、最近ドーパミン神経細胞のおよそ 90

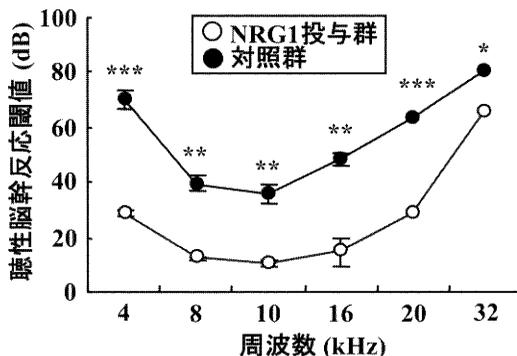


図4 新生仔期 NRG1 投与の聴覚機能への影響

新生仔期 NRG1 投与マウスの 4-32 kHz における聴性脳幹反応閾値 (dB).

*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$ Fisher's LSD 検定.

%は NRG1 受容体である ErbB4 を発現していることも報告されている¹⁴⁾。この ErbB4 の発現は胎生後期から、生後の神経発達期に特に高く、この神経細胞群の発達調節に関わっていることが強く示唆される。

結 論

新生仔期もしくは胎児期における一過的な NRG1 シグナルの障害はその後の知覚神経機能及び、認知行動発達に重大な影響を及ぼすことに明らかとなった。従って本研究は NRG1/ErbB シグナルを用いた動物モデルの末梢神経系機能の検討の重要性を強く示すものである。

謝 辞

聴性脳幹反応の測定を実施していただいた木南 凌教授と廣川 祥子先生に深く感謝申し上げます。なお、本研究は研究指導者である那波 宏之教授への厚生労働科学研究費、新潟大学プロジェクト推進経費、独立行政法人科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業、厚生労働省研究助成金からの研究費の支援を受けて実施された。

文 献

- 1) Lewis DA and Levitt P: Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25: 409 - 432, 2002.
- 2) Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, Gudbjartsson D, Manolescu A, Frigge ML, Gurney ME, Kong A, Gulcher JR, Petursson H and Stefansson K: Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71: 877 - 892, 2002.
- 3) Chong VZ, Thompson M, Beltaifa S, Webster MJ, Law AJ and Weickert CS: Elevated neuregulin - 1 and ErbB4 protein in the prefrontal cortex of schizophrenic patients. *Schizophr Res* 100: 270 - 280, 2008.
- 4) Law AJ, Lipska BK, Weickert CS, Hyde TM, Straub RE, Hashimoto R, Harrison PJ, Kleinman JE and Weinberger DR: Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease. *Proc. Natl Acad Sci USA* 103: 6747 - 6752, 2006.
- 5) Parker MW, Chen Y, Hallenbeck JM and Ford BD: Neuregulin expression after focal stroke in the rat. *Neurosci Lett* 334: 169 - 172, 2002.
- 6) Tokita Y, Keino H, Matsui F, Aono S, Ishiguro H, Higashiyama S and Oohira A: Regulation of neuregulin expression in the injured rat brain and cultured astrocytes. *J Neurosci* 21: 1257 - 1264, 2001.
- 7) Mei L and Xiong WC: Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9: 437 - 452, 2008.
- 8) Chen YJ, Johnson MA, Lieberman MD, Goodchild RE, Schobel S., Lewandowski N, Rosoklija G, Liu RC, Gingrich JA, Small S, Moore H, Dwork AJ, Talmage DA and Role LW: Type III neuregulin - 1 is required for normal sensorimotor gating, memory - related behaviors, and corticostriatal circuit components. *J Neurosci* 28: 6872 - 6883, 2008.
- 9) Rimer M, Barrett DW, Maldonado MA, Vock VM and Gonzalez - Lima F: Neuregulin - 1 immunoglobulin - like domain mutant mice: clozapine sensitivity and impaired latent inhibition. *Neuroreport* 16: 271 - 275, 2005.
- 10) Stankovic K, Rio C, Xia A, Sugawara M, Adams JC, Liberman MC and Corfas G: Survival of adult spiral ganglion neurons requires erbB receptor signaling in the inner ear. *J Neurosci* 24: 8651 - 8661, 2004.
- 11) Tohmi M, Tsuda N, Mizuno M, Takei N, Frankland PW and Nawa H: Distinct influences of neonatal epidermal growth factor challenge on adult neurobehavioral traits in four mouse strains. *Behav Genet* 35: 615 - 629, 2005.
- 12) Swerdlow NR, Braff DL, Taaid N and Geyer MA: Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 51: 139 - 154, 1994.
- 13) Falls FL: Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284: 14 - 30, 2003.
- 14) Abe Y, Namba H, Zheng Y and Nawa H: In situ hybridization reveals developmental regulation of ErbB1 - 4 mRNA expression in mouse midbrain: implication of ErbB receptors for dopaminergic neurons. *Neuroscience* 161: 95 - 110, 2009.

(平成22年1月7日受付)