

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16668

研究課題名（和文）統合失調症の認知機能障害とパルプアルブミンニューロンにおけるKCNS3発現低下

研究課題名（英文）Effect of lower KCNS3 voltage-gated potassium channel subunit expression in cortical parvalbumin neurons on the activity of cortical circuitry in schizophrenia

研究代表者

川端 梨加（Kawabata, Rika）

金沢大学・医学系・研究員

研究者番号：70726207

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：統合失調症の大脳皮質において、パルプアルブミン陽性の抑制性ニューロンにおけるカリウムチャネルサブユニット遺伝子KCNS3の発現低下が、大脳皮質神経回路の活動性に影響を及ぼし神経活動依存性遺伝子EGR1、EGR2、BDNF、NPTX2、PVALBの低下を起こしている可能性を評価するために、Kcns3の発現を低下させた遺伝子改変マウスの大脳皮質にてこれらの遺伝子の発現を調べた。その結果、いずれの遺伝子においても有意な発現変化は認められなかった。統合失調症では、パルプアルブミン陽性細胞におけるKCNS3の発現低下は、大脳皮質神経回路の活動性変化の上流メカニズムでないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、パルプアルブミン陽性ニューロンにおけるKCNS3の発現低下は皮質神経回路の活動性には影響しないことが示唆された。本研究と並行して行われた共同研究では、PVニューロンにおけるKcns3の発現低下が、PVニューロンによる40Hz-80Hzの周波数帯域（帯域）における律動的な発火パターンに乱れを生じさせることを明らかにした。PVニューロンは帯域における律動的神経活動の形成を担っているため、本研究の結果と合わせて、Kcns3の発現低下は、ニューロンの活動量ではなく活動パターンに影響を与えることで、統合失調症患者で多く報告されている帯域の神経活動の異常に関与していることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：Subjects with schizophrenia (SZ) have lower expression levels of KCNS3, the gene encoding voltage-gated potassium channel subunit selectively expressed in the subset of cortical GABA neurons that express parvalbumin (PV), compared with unaffected comparison subjects. As voltage-gated potassium channels affect neuronal excitability, we hypothesized that the deficits in KCNS3 expression contribute to lower expression levels of neural activity-dependent genes, such as EGR1, EGR2, BDNF, NPTX2 and PVALB, in the cerebral cortex of SZ subjects. To test this hypothesis, we evaluated the expression of Egr1, Egr2, Bdnf, Nptx2, and Pvalb by real-time PCR in the cortex of mice with genetically introduced lower Kcns3 expression in PV neurons. However, none of these genes exhibited a significantly altered expression in these mice, indicating that lower KCNS3 expression in PV neurons does not affect activity levels of cortical circuitries in schizophrenia.

研究分野：精神神経科学

キーワード：遺伝子改変マウス 神経活動依存性遺伝子 電位依存性カリウムチャネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症では作業記憶などの広汎な認知機能に障害を認めるが、有効な治療法は未確立である。大脳皮質の抑制性ニューロン的一种であるパルブアルブミン(PV)陽性ニューロン(PVニューロン)は、高頻度で律動的に発火(興奮)し、周囲の多くの錐体ニューロンの活動を同期させる能力により、大脳皮質における情報処理の効率化を担う帯域の神経律動(オシレーション)の形成に中心的な役割を有する(Gonzalez-Burgos et al. 2015)。

ニューロンの興奮性を調節する電位依存性カリウムチャンネルには、発現するニューロン種や機能が異なる40種類以上が存在し(Trimmer 2014)、それぞれが発現するニューロン種に固有の興奮性に貢献している。例えば、PVニューロンに特異的に発現するKcns3サブユニットは、多くのニューロンに普遍的に発現するKcnb1サブユニットに結合することでカリウムチャンネルを構成する(Georgiev et al. 2012)。Kcns3/Kcnb1複合体チャンネルはPVニューロンの樹状突起に発現し、PVニューロンの高頻度で律動的な発火に貢献し、オシレーションの形成を担っていると考えられる。

統合失調症では、大脳皮質のPVニューロンにおいてKcns3の発現低下が認められ(Georgiev et al. 2014, Enwright et al. 2018)、これによりPVニューロンの高頻度の律動的発火に変化が生じることで患者で多く報告されているオシレーションの異常(Uhlhaas and Singer, 2012, Senkowski et al. 2015)を介して、認知機能障害に結び付いていると考えられる。

また、Kcns3の発現低下によるPVニューロンの興奮性の変化は、錐体ニューロンなど他の大脳皮質ニューロンの興奮性に影響を与え、統合失調症で発現低下が報告されているニューロンの活動性により制御を受ける遺伝子の発現に影響を及ぼしている可能性がある。

2. 研究の目的

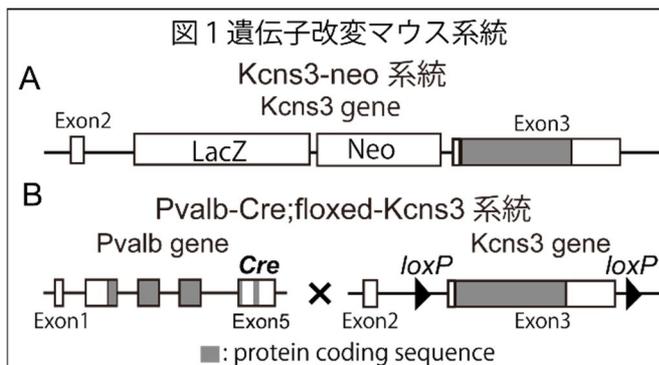
本研究では、統合失調症の認知機能障害におけるPVニューロンにおけるKcns3発現低下の機能的意味を解明するために、統合失調症と同様のPVニューロンにおいてKcns3発現を低下させた遺伝子改変マウスを用いて、1)Kcns3と結合してカリウムチャンネルと形成するKcnb1のPVニューロンにおける発現、2)統合失調症で発現低下が報告されている皮質ニューロンの活動により発現制御を受ける遺伝子の発現、3)PVニューロンに発現が報告されている他の電位依存性カリウムチャンネルサブユニット遺伝子の発現をそれぞれmRNAレベルで解析した。

3. 研究の方法

1) 遺伝子操作マウス

統合失調症の大脳皮質PVニューロンにKcns3遺伝子の発現低下を2系統の遺伝子改変マウス(Kcns3-neo, Pvalb-Cre; flox-Kcns3)を用いた。Kcns3-neo系統(図1A)では、Kcns3遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子が挿入され不活化されている。Kcns3-neoマウスの大脳皮質PVニューロンでは、ヘテロ型(neo/+)およびホモ型(neo/neo)において、野生型に比べKcns3の発現が21%および53%低下していることを確認した(Miyamae et al. 2021)。

Pvalb-Cre; floxed-Kcns3系統(図1B)では、PVをコードするPvalb遺伝子の支配下で組み換え酵素Creが発現し、Kcns3遺伝子にCre認識配列loxPが挿入されている。Kcns3の遺伝子型がヘテロ型(flox/+)およびホモ型(flox/flox)のマウスのPVニューロンにおいてKcns3の発現は48%および85%低下していることを確認した。解析には、それぞれの系列より野生型、ヘテロ型、ホモ型(各5匹)の8週マウスを用いた。



2) 二重標識 in situ hybridization (ISH)

Kcns3はKcnb1と結合して機能的なカリウムチャンネルを形成するので、人為的にもたらされたKcns3の発現低下が二次的にKcnb1の発現変化を引き起こす可能性がある。Kcnb1は大脳皮質のニューロンに幅広く発現するので、PVニューロンにおけるKcnb1の発現を評価するために、PV mRNAはdigoxigenin標識プローブで検出し、Kcnb1 mRNAは放射性同位元素³⁵Sで標識したプローブにより検出し(図2)、digoxigenin標識プローブで染色されるPVニューロンにおけるKcnb1 mRNAの発現をプローブの放射活性が形成する銀粒子の集積度として定量した。PVニューロンの計数は前頭部皮質全体をカバーする格子の交点において200 × 140 μmのフレーム内で行った。各マウスで解析されたPVニューロンの平均(SD)個数は、Kcns3-neo系統で+/+:79(18), neo/+:85(18), neo/neo:81(16)で、Pvalb-Cre; floxed-Kcns3系統で+/+:68(7.8), flox/+:59 ± 13, flox/flox:65 ± 7.6であり、遺伝子型の間で差は無かった。

3) Real-time PCR

神経活動により発現制御を受ける遺伝子として *Bdnf*, *Egr1*, *Egr2*, *Nptx2*, PV ニューロンに発現し PV をコードする *Pvalb* 遺伝子および電位依存性カリウムチャネルサブユニットとして *Kcna1*, *Kcnab3*, *Kcnc1*, *Kcnc2*, *Kcnk1*, *Kcnk3* の各遺伝子の mRNA (cDNA) に対する特異的なプライマーセットを設計した。転写産物に alternative splicing による複数の variant が存在する場合は、生物学的活性を有する全ての variant に共通のエクソンを増幅するプライマーセットを設計した。定量に用いた全てのプライマーセットについて、96%以上の効率で予測される塩基対数を有する単一の cDNA 断片を増幅することを確認した。各マウスの前頭部皮質より抽出した RNA を cDNA に逆転写し、設計した特異プライマーを用いて SYBR Green アッセイによる real-time PCR を行った。各遺伝子の mRNA の発現は内部標準遺伝子 *Actb*, *Gapdh*, *Ppia* の発現の平均値に対する比として求めた。

4) 統計

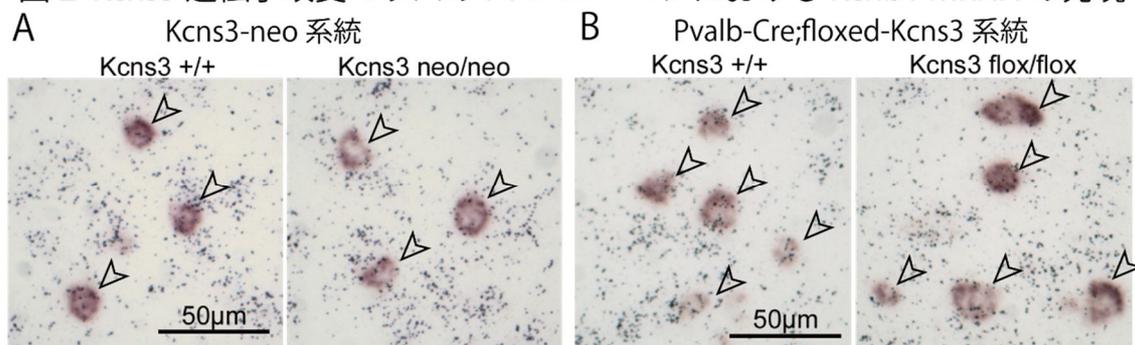
Kcns3-neo マウス系統および *Pvalb-Cre; floxed-kcns3* マウス系統のそれぞれにおいて、遺伝子型の違いが遺伝子発現に及ぼす影響を一元配置分散分析により解析した。遺伝子型の違いに有意性 (<0.05) が検出された場合は、post hoc 解析を行い異なる遺伝子型の間で発現を比較した。

4. 研究成果

1) *Kcns3* 遺伝子操作マウス的大脑皮質 PV ニューロンにおける *Kcnc1* の発現

二重標識 ISH では、*Kcnc1* mRNA の発現を示す銀粒子の集積が大脑皮質全体に広く分布しており、DIG 標識プローブによる染色反応で検出される PV ニューロンにおいても認められた。*Kcnc1* mRNA の発現パターンには *Kcns3-neo* マウスの野生型 (+/+), ヘテロ型 (neo/+), ホモ型 (neo/neo) の間で明らかな質的变化は認められなかった (図 2A)。PV-Cre; floxed-*Kcns3* マウスの各遺伝子型 (+/+, flox/+, flox/flox) の間でも発現パターンに質的变化は認められなかった (図 2B)。

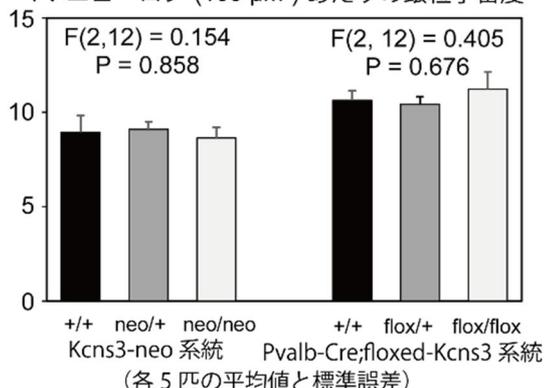
図 2 *Kcns3* 遺伝子改変マウス的大脑皮質 PV ニューロンにおける *Kcnc1* mRNA の発現



△ PV mRNA に対する digoxigenin 標識プローブによる染色 (PV ニューロン)

さらに、*Kcns3* 遺伝子改変マウスの各系統において、PV ニューロンにおける *Kcnc1* mRNA の発現レベルを、digoxigenin 標識プローブにより可視化された PV ニューロンにおいて *Kcnc1* mRNA の発現を、その存在を検出している銀粒子の密度を計測することにより評価した。*Kcns3-neo* 系統では、*Kcnc1* mRNA の発現レベルに遺伝子型 (+/+, neo/+, neo/neo) (各遺伝子型で n=5) の間で有意差は無かった (図 3 左)。また、*Pvalb-Cre; floxed-Kcns3* 系統においても、遺伝子型 (+/+, flox/+, flox/flox) (各遺伝子型で n=5) で遺伝子型の有意な影響は無かった (図 3 右)。

図 3 PV ニューロンにおける *Kcnc1* mRNA PV ニューロン (100 μm²) あたりの銀粒子密度



2) *Kcns3* 遺伝子操作マウス的大脑皮質における神経活動のマーカー遺伝子の発現

転写因子 *Egr1* および *Egr2* や神経栄養因子である *Bdnf* や *Nptx2* は、主に皮質ニューロンの 7-8 割をしめる錐体ニューロンに発現し (Hodge et al. 2019)、その発現量は錐体ニューロンの活動レベルを反映している。統合失調症的大脑皮質ではこれらの遺伝子の発現の低下が報告されている (Hashimoto et al. 2005, Yamada et al. 2007, Kimoto et al. 2014, Kimoto et al. 2015)。PV ニューロンは錐体ニューロンの細胞体に強力な抑制性シナプスを形成しその活動に強い影響を及ぼしている。よって PV ニューロンにおいて、その興奮性に影響を及ぼす *Kcns3* の発現低下は、錐体ニューロンの活動性に影響を与える可能性が高い。よってまずこれらの遺伝子の

発現を 2 系統の *Kcns3* 遺伝子改変マウスで解析した。その結果、*Kcns3-neo* 系統および *Pvalb-Cre; floxed-Kcns3* 系統のいずれでも、転写因子 *Egr1*, *Egr2* および神経栄養因子 *Bdnf*, *Nptx2* の発現にたいして、野生型、ヘテロ型、ホモ型の遺伝子型の違いによる有意な影響は認められなかった(図 4)。

以上の結果は、PV ニューロンにおける *Kcns3* の発現低下が錐体ニューロンの活動性に影響を及ぼしていないことを示している。そこで、*Kcns3* の発現低下が生じても PV ニューロンの活動には影響がない可能性が考えられた。これを検証するために、PV ニューロンの活動性により発現制御をうける *Pvalb* mRNA の発現を *Kcns3-neo* 系統で評価した。その結果 *Pvalb* の発現は遺伝子型の間で有意な変化が認められないことが判明した。すなわち、PV ニューロンにおいても *Kcns3* の発現低下は、その活動性に影響を及ぼしていないことが考えられた(図 5)。

3) *Kcns3* 遺伝子操作マウスの大脳皮質における電位依存性カリウムチャンネルサブユニット

以上の神経活動性により発現制御をうける遺伝子について、いずれの系統においても、野生型、ヘテロ型、ホモ型の遺伝子型の違いによる発現量に有意差が認められなかったことから、PV ニューロンにおける *Kcns3* の発現低下は、PV ニューロンおよび錐体ニューロンの活動性に影響を及ぼしていないことが考えられた。*Kcns3* は電位依存性カリウムチャンネルを構成し PV ニューロンの興奮性に影響を及ぼしていると考えられるので、その発現低下により PV ニューロンの活動性に影響がない理由として、他の電位依存性カリウムチャンネルの発現が代償性に増加している可能性が考えられた。この可能性を検証するために、マウスの大脳皮質の PV ニューロンに発現が報告されている電位依存性カリウムチャンネル(Yao et al. 2021)を構成するサブユニットとして *Kcna1*, *Kcnab3*, *Kcnc1*, *Kcnc2*, *Kcnk1*, *Kcnk3* の各遺伝子の発現を、*Kcns3-neo* および *Pvalb-Cre; floxed-Kcns3* の各系統の野生型、ヘテロ型、ホモ型で比較した。その結果、*Kcns3-neo* 系統では、*Kcna1* の発現に遺伝子型による有意な効果を検出され($F(2,12)=5.994$, $P=0.016$)、発現量は野生型とホモ型に比べヘテロ型で優位に低かった(図 6)。他の遺伝子の発現には遺伝子型による影響は認められなかった。*Pvalb-Cre; floxed-Kcns3* 系統では、いずれの遺伝子についても、遺伝子型による有意な影響は認められなかった。

図 6 PV ニューロンに発現する電位依存性 K^+ チャンネルサブユニット遺伝子の発現

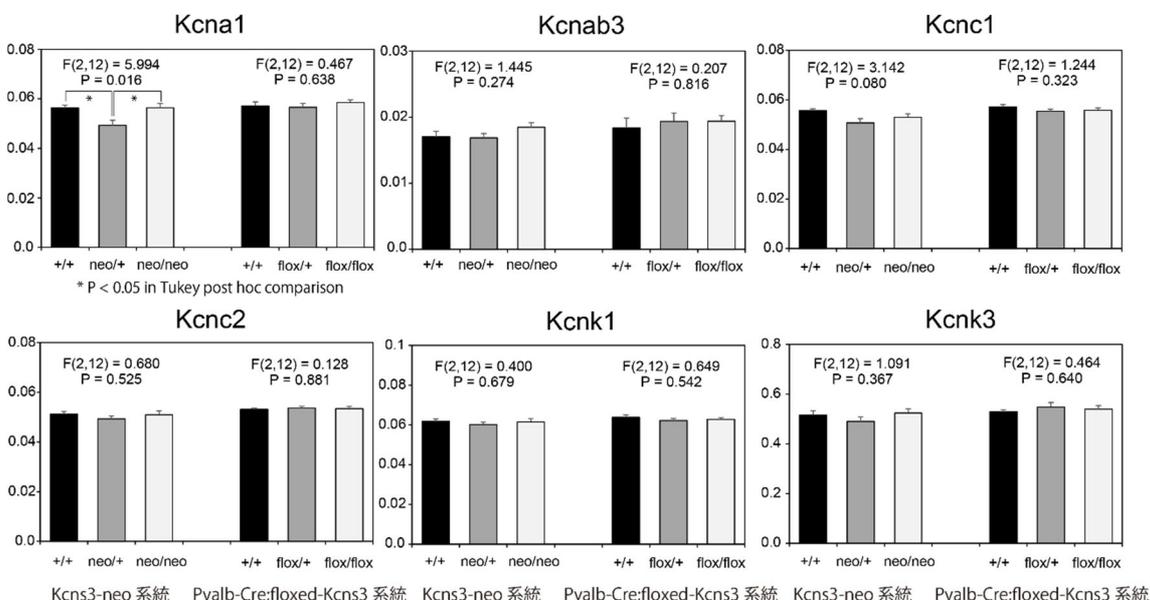


図 4 神経活動により制御を受ける遺伝子の発現

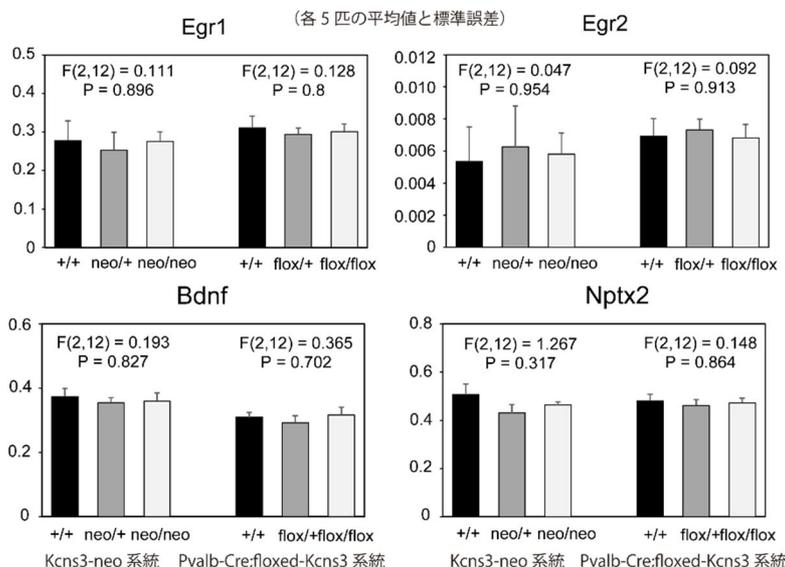
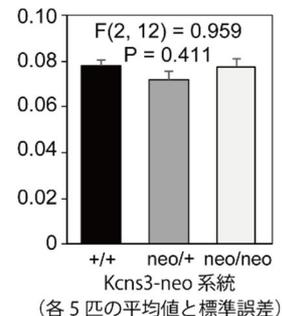


図 5 *Pvalb* mRNA



4) 研究成果のまとめと考察

EGR1, EGR2, BDNF, NPTX2 は主に錐体ニューロンに発現し、PVALB は PV ニューロンに特異的に発現する。これらの遺伝子はいずれもそれが発現しているニューロンの活動により制御を受けている。統合失調症患者では、大脳皮質の PV ニューロンにこれらの遺伝子の発現低下が認められており、錐体ニューロンおよび PV ニューロンの活動性が低下していることが考えられる。電位依存性カリウムチャンネルはニューロンの興奮性に影響を有するので、その低下は神経活動依存性の遺伝子発現に影響を及ぼすことが予測された。そこで本研究では、統合失調症の大脳皮質 PV ニューロンにおける電位依存性カリウムチャンネルサブユニット KCNS3 の発現低下を遺伝子改変において再現したマウスの大脳皮質において、Egr1, Egr2, Bdnf, Nptx2, Pvalb の発現を評価したが、いずれにも有意な変化は認められなかった。この結果は、PV ニューロンにおける KCNS3 の発現低下が、EGR1, EGR2, BDNF, NPTX2, PVALB の発現低下を引き起こす上流メカニズムではないことを示している。本研究と並行して共同研究先で行われた電気生理学的解析では Kcns3-neo 系統のホモ型マウスでは、野生型マウスにくらべ、PV ニューロンの 40Hz-80Hz の周波数帯域（帯域）における律動的な発火パターンに乱れが生じていることが判明した(Miyamae et al. 2021)。PV ニューロンは帯域における律動的な神経活動の形成を担っているので、Kcns3 の発現低下は、統合失調症患者で多く報告されている帯域の異常に関与していると考えられるが、ニューロンの活動量には影響がないことが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyamae Takeaki, Hashimoto Takanori, Abraham Monica, Kawabata Rika, Koshikizawa Sho, Bian Yufan, Nishihata Yosuke, Kikuchi Mitsuru, Ermentrout G. Bard, Lewis David A., Gonzalez-Burgos Guillermo	4. 巻 155
2. 論文標題 Kcns3 deficiency disrupts Parvalbumin neuron physiology in mouse prefrontal cortex: Implications for the pathophysiology of schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105382 ~ 105382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2021.105382	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------