

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 江田 岳誉
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 556 号
学位授与の日付 平成 25 年 9 月 20 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Neurobehavioral Deficits of Epidermal Growth Factor-Overexpressing Transgenic Mice; Impact on Dopamine Metabolism
(上皮成長因子を過剰発現するトランスジェニックマウスの神経行動学的な異常 ; ドパミン代謝の影響から)
論文審査委員 主査 崎村 建司
副査 那波 宏之
副査 笹岡 俊邦

博士論文の要旨

【背景と目的】

上皮成長因子(EGF)とその類縁体であるニューレグリン(NRG1)は、統合失調症の発症・病態において重要視されている分子のひとつである。EGF や NRG1 遺伝子の遺伝連鎖研究では、遺伝子多型と統合失調症の発症との関連性が報告されている。これらのタンパクは、その受容体である ErbB を介して、ドパミン神経や GABA 作動性神経の発達、グリア細胞の発育やグルタミン酸神経伝達に影響を及ぼすことが明らかになっている。

統合失調症は現在、多因子複雑疾患であると想定されている。その発症仮説のひとつとして、胎生期あるいは新生児期の神経発達の障害が発症の脆弱性を形成するという「神経発達障害仮説」が提唱されている。この仮説に基づいて、申請者らの研究室では新生児期ラットへEGFタンパクの大量投与を行い、ドパミン神経発達障害を有する疾患モデル動物を作製してきた。このモデル動物は、その成熟後にプレパルスインヒビション (PPI) や恐怖条件付けラテント学習能の低下といった認知行動障害を示すこと、その行動異常は抗精神病薬の投与により改善することなどが判明している。しかし、新生児期大量EGF投与によって、生体内でEGFに対する中和抗体が産生され、内在性のEGFシグナルが抑制されたという可能性をこれまで否定できなかった。実際、抗精神病薬を服用していない統合失調症患者の血清中では、有意にEGF量が減少しているということも気がかりであった。そこで本研究では、EGFを全身で恒常的にかつ過剰に発現するトランスジェニック(EGF-Tg)マウスを作製し、その疾患モデルとしての妥当性を検証した。本研究では、とくにその受容体を発現するドパミン神経系に着目して実験を進めた。その結果を踏まえ、新生児期EGF投与ラットとEGF-Tgマウスにおける行動上の類似性や相違点についても考察を行った。

【方法】

実験には 8 週から 12 週齢のマウスを用いた。EGF-Tg マウスは、FVB/N バックグラウンドで作製、維持された。トランスジーンは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターからマウス EGF 遺伝子を全身で持

続的に転写発現するベクターを用いた。このマウスに対して、自発運動量や音驚愕反応、PPIの測定、恐怖条件付け学習能テストといった一連の行動実験を行った。その後、脳を組織毎に取り分け、タンパクやRNA抽出を行い、各組織におけるドパミン神経系マーカーの発現量やEGFトランスジーン mRNAレベルを定量した。また、当該組織からドパミンとその代謝産物も抽出し、その脳内含量をHPLCによる電気化学的分析で測定した。脳組織は還流固定後、免疫組織染色を行い、神経病理学的な検討も加えた。EGF-Tgマウスのコカインに対する感受性評価は、反復投与実験(20mg/kg：腹腔内投与)で実施し、各回の投与直後の自発運動量の上昇度を群間比較することで検討した。

【結果】

成熟期 EGF-Tg マウスでは、全身でトランスジーン由来 EGF mRNA の発現が確認された。その発現レベルは比較的緩和であったが、内在性 EGF mRNA の低い組織（脳など）では、相対的なトランスジーン由来 EGF mRNA は大過剰になっていた。一方、内在性 EGF mRNA レベルの高い組織（皮膚など）では、トータル EGF mRNA 発現上昇率はわずかであった。マウス行動解析の結果、成熟期 EGF-Tg マウスは、PPI の有意な低下を示した。この低下した PPI については、リスペリドン(0.3mg/kg/day)の慢性処置により上昇する傾向（改善）が認められた。また、恐怖条件付け学習テストにおいて、EGF-Tg 群は、記憶・学習能のわずかな低下を示した。この EGF-Tg マウスは、コカイン連投実験において、その投与回数の増加に応じて、その感受性を亢進させた。EGF シグナルの 1 つの脳内細胞標的であるドパミン神経系への影響を調べたところ、線条体を含む大脳基底核部でドパミン代謝が異常を呈するとともに、ドパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素の発現低下や、ドパミン代謝酵素である DDC、COMT の発現上昇なども観察された。なお、本 EGF-Tg マウスは対照群の野生型マウスと比較して、自発運動量、音刺激に対する驚愕反応において有意差がなかった。また、その脳の構造にも 顕著な神経病理学的異常を認めなかった。

【考察】

本研究では、EGF-Tg マウスを用いて、持続的かつ過剰な EGF シグナルが惹起する神経行動学的影響を調べた。CMV プロモーターにより EGF 遺伝子を全身で広範囲に発現する EGF-Tg マウスは、過剰なシグナルによって、毛嚢が欠如され、発毛が少なく、全身の皮膚が薄い。成熟 EGF-Tg マウスは、線条体など大脳基底核においてドパミン関連分子の発現量に異常を呈した。実際、これら EGF-Tg マウスでは PPI の低下や恐怖条件付け学習能の低下といった異常が確認できた。以上のように、EGF-Tg マウスは統合失調症関連性の行動障害を呈することが判明した。この現象は過剰な EGF シグナルが正常なドパミン神経発達を阻害した結果を反映しているものと申請者は推察している。

申請者らのこれまでの実験において、新生児期あるいは成熟ラットへ一過性に EGF を投与した場合においても、同様の行動異常が再現されることが判明している。その意味で、本 EGF-Tg マウスの実験は、新生児期 EGF 投与ラットを使った先行実験の結果をほぼ再現することになった。よって、本実験結果は、中和 EGF 抗体産生が従来の EGF 投与モデルの行動障害に関与するかもしれないという仮説を否定する。加えて、本実験結果は、発達期の EGF シグナル過剰がドパミン神経系発達障害を引き起こしうるという説を支持するものとなった。

審査結果の要旨

本論文は、統合失調症発症仮説のひとつである「神経発達障害仮説」の根拠を検証するものである。この仮説の根拠となる実験、新生児期動物へ上皮成長因子(EGF)の大量投与によるドパミン神経発達障害疾

患モデル動物には、中和抗体産生による内在性の EGF シグナルの抑制が疑義として提唱されてきた。このために、EGF を全身で恒常的にかつ過剰に発現するトランスジェニック(EGF-Tg)マウスを作製し、その疾患モデルとしての妥当性を検証している。EGF-Tg マウスは、全身でトランスジーン由来 EGF mRNA の発現が確認された。この持続的かつ過剰な EGF シグナルが惹起する神経行動学的影響を調べた結果、このマウスでは、PPI の有意な低下やある種の記憶・学習能の低下など統合失調症関連性の行動障害を呈することが判明した。本実験結果は、中和 EGF 抗体産生が従来の EGF 投与モデルの行動障害に関与するかもしれないという疑義を否定する。加えて、本実験結果は、発達期の EGF シグナル過剰がドパミン神経系発達障害を引き起こしうるという説を支持するものである。

これらの結果を示した本論文は、学位論文としての価値があると認められる。