

氏 名 なかむら ともや
中村 友也

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富生命博甲第 56 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 21 日

専攻名 認知・情動脳科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

学位論文題目 Correlation among parvalbumin-immunoreactive neuron density,
phase-locked gamma oscillations and autistic/schizophrenic
symptoms in PDGFR- β knock-out mice
(PDGFR- β knock-out マウスにおける自閉症/統合失調症様
症状、パルブアルブミン陽性ニューロンおよび同期性ガンマオシレ
ーション間の相関)

論文審査委員

(主査)	教授	井ノ口 馨
(副査)	教授	森 寿
(副査)	教授	鈴木 道雄
(副査)	教授	田中 耕太郎

指導教員 教授 西条 寿夫

【学位論文内容の要旨】

〔目的〕

統合失調症や自閉症における認知障害および陰性症状（社会行動の障害、情動表出の低下、モチベーションの低下など）に対しては、これまで有効な薬剤がなく、抗精神病薬開発における重要なターゲットとなっている。一方、臨床的研究により、統合失調症や自閉症患者では、パルブアルブミン陽性（GABA 作動性）ニューロンの減少および同期性ガンマオシレーションの障害が認められることから、これらの障害が認知障害や陰性症状の基盤となっていることが示唆されている。しかし、これまでこれら症状と神経生理学的ならびに組織学的所見との間の相関関係については検討されていない。

本研究では、神経栄養作用が期待される新規合成治療薬 T-817MA を、統合失調症/自閉症様病態を呈する血小板由来成長因子（Platelet-Derived Growth Factor） β 受容体遺伝子ノックアウト（PDGFR- β KO）マウスに投与し、上記データ間の相関関係を解析した。

〔方法〕

1) T-817MA の経口投与、ガンマオシレーションの測定

コントロールおよび PDGFR- β KO マウスに脳波用記録電極を埋め込み、コントロールマウス蒸留水投与群、コントロールマウス T-817MA 投与群、PDGFR- β KO マウス蒸留水投与群、および PDGFR- β KO マウス T-817MA 投与群の計 4 群に分けた。手術回復（1 週間）後、T-817MA（10 mg/kg/day）あるいは蒸留水（10 ml/kg/day）をこれらのマウスに 4 週間経口投与した。ついで、これらのマウスにクリック音（9 kHz, 500 ms, 100 回）を呈示し、聴覚誘発電位を増幅器および A/D コンバータを用いて記録した。記録した誘発電位は、フィルター処理後、刺激同期性ガンマオシレーションを反映する intertrial coherence (ITC) を 6-120 Hz で算出し、ガンマ帯域（26~70Hz）における平均 ITC を解析した。

2) プレパルス抑制テスト（PPI）

プレパルス抑制は、主音響刺激の前に弱い先行刺激（プレパルス）を呈示することにより、主音響刺激に対する驚愕反応（四肢筋肉の収縮）が抑制される現象（感覚ゲーティングとも呼ぶ）である。本テストでは、身体反応を加速度センサーで測定し、プレパルスによる抑制率を各群で比較した。

3) 社会行動テスト

同じ群の 2 匹のマウスを小さなケージに入れて、30 分間 CCD カメラで撮影し、社会行動（近接行動、接近行動、離脱行動、追跡行動、匂い嗅ぎ、能動的、受動的コンタクト）の合計時間を行動解析プログラムで自動解析した。

4) 神経組織学的解析

脳凍結切片作成後、パルブアルブミン陽性ニューロンの免疫組織化学的染色ならびにニッスル染色を行なった。ニッスル染色により脳領域を同定後、CCD カメラおよび Z 軸方向のマイクロケータを有する光学的顕微鏡により、内側前頭前野、扁桃核、海馬体および

上丘におけるパルブアルブミン陽性ニューロンの3次元画像情報を取得し、ステレオロジー解析（脳切片に含まれる細胞総数、細胞密度）を行なった。

5) 統計解析

各群の測定データを、遺伝子型および薬剤投与を要因とする 2-way ANOVA により、比較解析した。各測定データ間の相関は、Pearson の相関係数を用いて解析した。

〔結果〕

1) 薬物介入の効果

PDGFR- β KO マウスでは、統合失調症/自閉症様症状である社会行動の障害、感覚ゲーティング障害、情動行動や社会行動に関係する脳領域である内側前頭前野、扁桃体、海馬体および上丘のパルブアルブミン陽性ニューロンの細胞密度の低下、同期性ガンマオシレーションの低下などの障害が認められた。さらに、T-817MA を 4 週間経口投与することにより、ノックアウトマウスにおけるこれらの障害が有意に改善された。

2) 各測定データ間の相関

各測定データ間の相関を算出した結果、1) 同期性ガンマオシレーションと内側前頭前野におけるパルブアルブミン陽性ニューロン密度間に、2) 内側前頭前野におけるパルブアルブミン陽性ニューロン密度と社会行動（近接行動）間、および海馬体におけるパルブアルブミン陽性ニューロン密度と社会行動（近接行動）間に、および3) 内側前頭前野におけるパルブアルブミン陽性ニューロン密度とプレパルス抑制テストにおける抑制率間に有意な相関が認められた。

〔総括〕

本研究では、薬物介入によるパルブアルブミン陽性ニューロン密度の回復により、同期性ガンマオシレーション、プレパルス抑制、および社会行動の障害が改善した。さらに、同期性ガンマオシレーション、パルブアルブミン陽性ニューロン密度、認知障害、および社会行動障害間に有意な相関性が認められた。本研究は、これらデータ間の相関性を明らかにした初めての研究である。以上から、同期性ガンマオシレーションは、統合失調症や自閉症における病態（パルブアルブミン陽性ニューロンの障害）および症状（認知障害や陰性症状）に関する人畜共通の生理学的バイオマーカーとして有用であり、さらに薬物介入における効果判定のバイオマーカーとしても有用であることが示唆された。

【論文審査の結果の要旨】

【目的】

統合失調症や自閉症における認知障害および陰性症状（社会行動の障害、情動表出の低下、モチベーションの低下など）に対しては、これまで十分に有効な薬剤がなく、抗精神病薬開発における重要なターゲットとなっている。一方、臨床的研究により、統合失調症や自閉症患者では、パルブアルブミン陽性（GABA 作動性）ニューロンの減少および同期性ガンマオシレーションの障害が認められることから、これらの障害が認知障害や陰性症状の基盤となっていることが示唆されている。しかし、これまでこれら症状と神経生理学的ならびに組織学的所見との間の相関関係については検討されていない。

本研究で中村友也君は、神経栄養作用が期待される新規合成治療薬 T-817MA を、統合失調症/自閉症様病態を呈する血小板由来成長因子（Platelet-Derived Growth Factor） β 受容体遺伝子ノックアウト（PDGFR- β KO）マウスに投与し、上記データ間の相関関係を解析した。

【方法】

1) T-817MA の経口投与、ガンマオシレーションの測定

コントロールおよび PDGFR- β KO マウスに脳波用記録電極を埋め込み、コントロールマウス蒸留水投与群、コントロールマウス T-817MA 投与群、PDGFR- β KO マウス蒸留水投与群、および PDGFR- β KO マウス T-817MA 投与群の計 4 群に分けた。手術回復（1 週間）後、T-817MA（10 mg/kg/day）あるいは蒸留水（10 ml/kg/day）をこれらのマウスに 4 週間経口投与した。ついで、これらのマウスにクリック音（9 kHz, 500 ms, 100 回）を呈示し、聴覚誘発電位を増幅器および A/D コンバータを用いて記録した。記録した誘発電位は、フィルター処理後、刺激同期性ガンマオシレーションを反映する intertrial coherence (ITC) を 6-120 Hz で算出し、ガンマ帯域（26~70Hz）における平均 ITC を解析した。

2) プレパルス抑制テスト (PPI)

プレパルス抑制は、主音響刺激の前に弱い先行刺激（プレパルス）を呈示することにより、主音響刺激に対する驚愕反応（四肢筋肉の収縮）が抑制される現象（感覚ゲーティングとも呼ぶ）である。本テストでは、身体反応を加速度センサーで測定し、プレパルスによる抑制率を各群で比較した。

3) 社会行動テスト

同じ群の 2 匹のマウスを小さなケージに入れて、30 分間 CCD カメラで撮影し、社会行動（近接行動、接近行動、離脱行動、追跡行動、匂い嗅ぎ、能動的、受動的コンタクト）の合計時間を行動解析プログラムで自動解析した。

4) 神経組織学的解析

脳凍結切片作成後、パルブアルブミン陽性ニューロンの免疫組織化学的染色ならびにニ

ニッスル染色を行なった。ニッスル染色により脳領域を同定後、CCD カメラおよび Z 軸方向のマイクロケータを有する光学的顕微鏡により、内側前頭前野、扁桃体、海馬体および上丘におけるパルブアルブミン陽性ニューロンの 3 次元画像情報を取得し、ステレオロジー解析（脳切片に含まれる細胞総数、細胞密度）を行なった。

5) 統計解析

各群の測定データを、遺伝子型および薬剤投与を要因とする 2-way ANOVA により、比較解析した。各測定データ間の相関は、Pearson の相関係数を用いて解析した。

【結果】

1) 薬物介入の効果

PDGFR- β KO マウスでは、統合失調症/自閉症様症状である社会行動の障害、感覚ゲーティング障害、情動行動や社会行動に関する脳領域である内側前頭前野、扁桃体、海馬体および上丘のパルブアルブミン陽性ニューロンの細胞密度の低下、同期性ガンマオシレーションの低下などの障害が認められた。さらに、T-817MA を 4 週間経口投与することにより、ノックアウトマウスにおけるこれらの障害が有意に改善された。

2) 各測定データ間の相関

各測定データ間の相関を算出した結果、1) 同期性ガンマオシレーションと内側前頭前野におけるパルブアルブミン陽性ニューロン密度間、2) 内側前頭前野におけるパルブアルブミン陽性ニューロン密度と社会行動（近接行動）間、および海馬体におけるパルブアルブミン陽性ニューロン密度と社会行動（近接行動）間、および 3) 内側前頭前野におけるパルブアルブミン陽性ニューロン密度とプレパルス抑制テストにおける抑制率間に、それぞれ有意な相関が認められた。

【総括】

本研究では、薬物介入によるノックアウトマウスのパルブアルブミン陽性ニューロン密度の回復、同期性ガンマオシレーション、プレパルス抑制、および社会行動の障害改善が認められた。さらに、同期性ガンマオシレーション、パルブアルブミン陽性ニューロン密度、認知障害、および社会行動障害間に有意な相関性が認められた。以上から、本研究は、これらデータ間の相関性を始めて明らかにした点で新規性がある。また、同期性ガンマオシレーションが統合失調症や自閉症における病態（パルブアルブミン陽性ニューロンの障害）および症状（認知障害や陰性症状）に関する人畜共通の生理学的バイオマーカーとして有用であり、さらに薬物介入における効果判定のバイオマーカーとしても有用であることを示唆した点で、医学における学術的重要性も高い。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。