

—総説—

前脳選択的 HB-EGF 欠損マウスを用いた、 中枢神経系の高次脳機能における HB-EGF の役割

大八木篤, 原英彰*

要約：ヘパリン結合性上皮成長因子 (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: HB-EGF)は EGF ファミリーの主要な増殖因子の一つである。これまでの研究で、HB-EGF は生体内で細胞の癌化、正常な心臓機能の発現、表皮の創傷治癒、目蓋の形成などに関与していることが報告されている。一方、HB-EGF は海馬や大脳皮質、小脳など中枢神経系で高い発現を示すことから、神経細胞のネットワーク回路の構築や高次脳機能への関与が示唆される。そこで、前脳選択的に HB-EGF 欠損させたマウスを作製し、中枢神経系の高次脳機能における HB-EGF の役割について検討した。前脳選択的 HB-EGF 欠損マウスは自発運動量の増加や社会性行動の低下、プレパルスインヒビションの低下、記憶の低下などの諸種の行動変化を示した。また、HB-EGF KO マウスではドパミンやセロトニンなどの脳内モノアミン含量の変化や、大脳皮質第三層のスパイン密度の低下、海馬における長期増強(LTP)の低下などの機能的・器質的变化を示した。以上より HB-EGF は、精神行動や記憶などの中枢神経系の高次脳機能の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに HB-EGF シグナルの制御が複雑な神経疾患の病態機序解明、新規治療法並びに治療薬の開発の糸口になることが期待できる。

索引用語：高次脳機能、長期増強、ヘパリン結合性上皮成長因子、KO マウス

Roles of Heparin-binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF) in the Higher Brain Functions: Analysis of Ventral Forebrain Specific HB-EGF KO Mice

Atsushi OYAGI, Hideaki HARA*

Abstract: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) is a member of the EGF family of growth factors. Previously, HB-EGF has been reported to be involved in diverse biological processes, including tumor formation, heart function, wound healing, and eyelid formation. On the other hand, HB-EGF is widely expressed in the central nervous system, including the hippocampus, cerebral cortex and cerebellum, and is considered to play pivotal roles in the development of the adult nervous system and higher brain function. We generated mice in which HB-EGF activity is disrupted specifically in the ventral forebrain and investigated the roles of HB-EGF in higher brain function. These knockout mice showed behavioral abnormalities such as an increase in locomotor activity, decreased social interaction, a deficit of prepulse inhibition, and memory impairment. HB-EGF KO mice also showed altered monoamine factors such as dopamine and serotonin, decreased spine density in neurons of the prefrontal cortex, and impaired long-term potentiation (LTP) in the hippocampus. These results suggest that HB-EGF exerts significant influence in higher brain functions, such as psychomotor behavior and memory formation and careful regulation of its activity will be an important goal for treating a number of neurological diseases of the central nervous system.

Key phrases: HB-EGF, higher brain function, KO mice, LTP

1. 緒言

ヘパリン結合性上皮成長因子 (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: HB-EGF)は EGF

ファミリーの主要な増殖因子であり、構造内に EGF ドメインに加えヘパリン結合ドメインを有する。HB-EGF は前駆体の膜貫通型タンパク質 (pro-HB-EGF) として細胞膜表面に発現し、a disintegrin and metalloprotease (ADAM) の作用により分泌型タンパク質 (HB-EGF) と膜結合型タンパク質に分かれる。分泌型タンパク質 (HB-EGF-N) は EGF 受容体および ErbB4 受容体に結合し mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路などを介して、さらに膜結合型 (HB-EGF-C) は核内に移行しシグナルの脱抑制により、共に細胞の分化増殖を促進する¹⁾。これまでの研究で、HB-EGF は生体内で細胞の癌化²⁾、正常な心臓機能の発現³⁾、表皮の創傷治癒⁴⁾、目蓋の形成⁵⁾などに関与していることが報告されている。一方中枢神経系において、HB-EGF は神経細胞やグリア細胞に高発現している。とくに海馬や大脳皮質、小脳などで高い発現を示すことから、神経細胞のネットワーク回路の構築や高次脳機能への関与が示唆される⁶⁾。これまで HB-EGF はドパミン作動性神経に対する保護作用⁷⁾ や神経新生促進作用⁸⁾ が報告されているが、情動、記憶および感覚機能などの高次脳機能に関する報告は見当たらない。

一方、HB-EGF 遺伝子を全身で欠損 (KO) させたマウスは心肥大を引き起こし、その多くが胎児期に死亡する³⁾。このことから、筆者らは Cre-LoxP 法を用いて、前脳選択

的に HB-EGF を欠損させたマウスを作製し、中枢神経系の高次脳機能における HB-EGF の機能の解明を目的として研究を行った⁹⁾ (Fig. 1)。

2. 前脳選択的 HB-EGF KO マウスの包括的な行動解析

2-1. 自発運動試験 (Locomotor activity test) を用いた活動量の検討

自発運動量は赤外ビーム式センサー (NS-AS01; Neuroscience, Tokyo, Japan) を飼育ケージに装着し、データ収録解析システム (NS-DAS-32; Neuroscience) を用いて測定した。HB-EGF KO マウスは野生型マウスと比べて 24 時間における自発運動量の著しい増加が認められた。また、HB-EGF KO マウスの自発運動量の増加は日中 (午前 8:00 ~ 午後 8:00) および夜間 (午後 8:00 ~ 午前 8:00) において共に認められた (Fig. 2a, b)。さらに定型抗精神病薬の haloperidol (0.1 mg/kg, i.p.) の 9 日間投与により HB-EGF KO マウスの自発運動量は野生型マウスと同程度まで有意に低下した (Fig. 2a, b)。一方、非定型抗精神病薬の clozapine (1 mg/kg, i.p.) の 9 日間投与により、HB-EGF KO マウスの日中の自発運動量のみ低下したが、24 時間全体の自発運動量に影響を及ぼさなかった⁹⁾ (Fig. 2a)

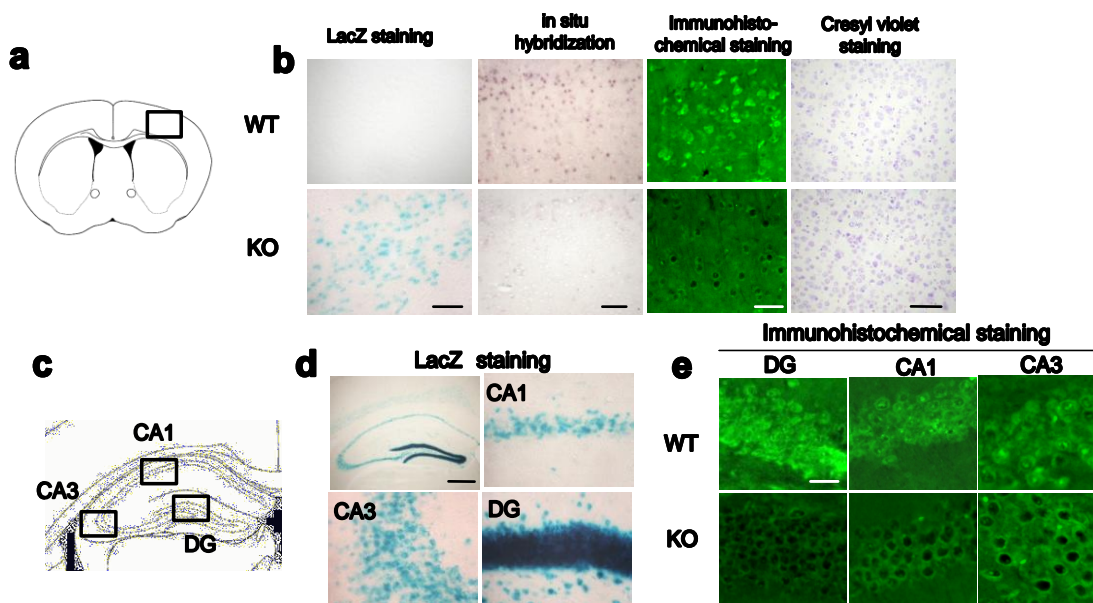


Fig. 1. Histological evaluation in HB-EGF KO and WT mice.

(a) Coronal section through the cortex region; square indicates area shown in the photomicrographs. (b) Histological analysis of cortex from WT (upper) and HB-EGF KO (lower) adult mice. LacZ staining, scale bar=50 μm. *In situ* hybridization using an *Hb-egf* probe, scale bar=100 μm. Immunohistochemical staining with anti-HB-EGF antibody, scale bar=20 μm. Cresyl violet staining, scale bar=500 μm. (c) Coronal section through the hippocampus; square indicates area shown in the photomicrographs (CA1, CA3, and DG). (d) LacZ staining of whole and individual hippocampal region in HB-EGF KO mice, scale bar=500 μm. (e) Immunohistochemical analysis of individual hippocampal region from WT (upper) and HB-EGF KO (lower) adult mice, scale bar=20 μm. The results were cited from ref 9.

2-2. プレパルスインヒビション (PPI)試験による知覚フィルター機能の評価

試験は小動物用驚愕反応測定装置 (SR-LAB; San Diego Instruments, CA, USA)を用いて行った。HB-EGF KO マウスは野生型マウスと比べて 73 dB および 76 dB の prepulse に対して PPI の著しい障害が認められた (Fig. 2c)。さらに、測定 30 分前に非定型抗精神病薬の clozapine (1 mg/kg, i.p.) および risperidone (0.1 mg/kg, i.p.)を投与することにより、HB-EGF KO マウスに認められた PPI 障害は有意に改善された (Fig. 2c)。一方、定型抗精神病薬の haloperidol (0.1 mg/kg, i.p.)の投与によって、KO マウスにおける PPI 障害に変化は認められなかった (Fig. 2c)。また、120 dB に対する驚愕反応の大きさを示す startle amplitude は、KO マウスと野生型マウスおよび薬物投与群で明らかな変化は認められなかった⁹⁾ [野生型マウス-vehicle 投与; 263.7 ±

33.56 (mean ± S.E.M, n=25), KO マウス-vehicle 投与; 205.8 ± 35.25 (n=24), KO マウス-haloperidol 投与; 230.2 ± 60.6 (n=15), KO マウス-risperidone 投与; 212.5 ± 43.78 (n=14), and KO マウス-clozapine 投与; 225.2 ± 35.03 (n=12)]。

2-3. 社会性行動 (Social interaction)の評価

別ケージで飼育されたマウス 2 匹を新規プラスチックケージ(175×245×125 mm)内で遭遇させ、マウスの 10 分間における社会性行動を測定した。単位回数あたりの接触時間(時間/回)は、HB-EGF KO マウスでは野生型マウスと比べて有意に低下していた (Fig. 2 d)。さらに非定型抗精神病薬の clozapine (1 mg/kg, i.p.)の 7 日間投与によって HB-EGF KO マウスの社会性行動の低下が野生型と同程度まで改善された (Fig. 2d)。一方、定型抗精神病薬

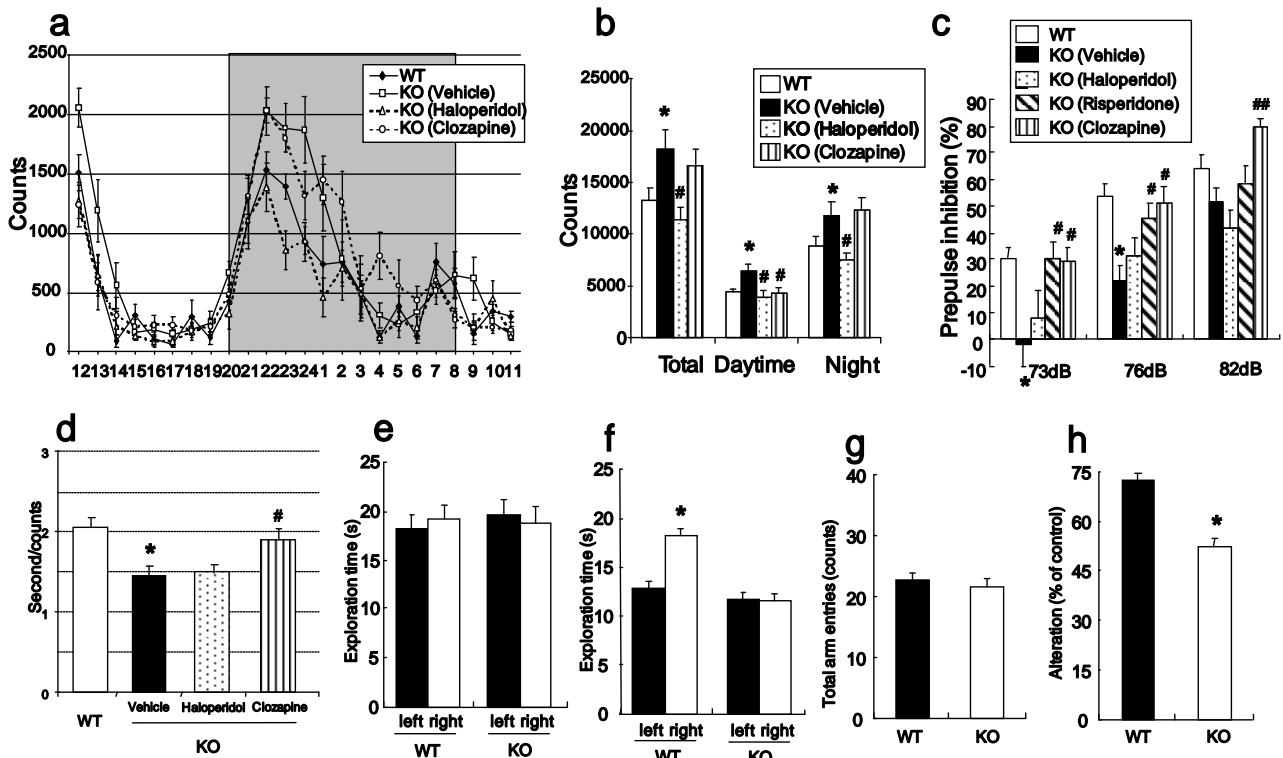


Fig. 2. Behavioral analysis of HB-EGF KO mice and WT mice.

Mice were placed into individual cages, and their locomotion was assessed every hour for 1 day. WT (n=8), KO mice with treatment of vehicle (n=7), haloperidol (n=8), and clozapine (n=8). (a) Locomotor activity throughout the 24-hr period, and (b) locomotor activity analyzed separately during day and night periods. (c) PPI of the acoustic startle response in WT (n=24), KO mice with treatment of vehicle (n=24), haloperidol (n=15), risperidone (n=14), and clozapine (n=12). (d) Social interaction test in a novel environment in WT (n=8) and KO mice with treatment of vehicle (n=7), haloperidol (n=9), and clozapine (n=9). Two genetically identical mice that had been housed separately were placed in the same cage. Their social interaction was then monitored for 10 min. Values are means ± SEM. (e and f) Novel-object recognition task. (e) In the training trial (5 min), two circles were placed in symmetrical left and right positions. (f) In the test trial 1 hr later (5 min), one circle (left) and one triangle (right) were placed in the same positions. The amount of time the WT (n=6) and KO (n=6) mice spent exploring each object during training trial and test trial was recorded. * p < 0.05 vs. left object. (g and h) Y-maze task. Each mouse was placed at the end of one fixed arm of the maze and allowed to move freely through the maze for 8 min. The sequence of arm entries was recorded manually. (g) Total number of arms entered during the session. (h) % of alternation was calculated as (actual alternations/maximum alternations) × 100. WT (n=6), KO (n=6). Values are means ± SEM. * p < 0.05 vs. WT mice. # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. vehicle-treated HB-EGF KO mice. The results were cited from ref 9.

haloperidol (0.1 mg/kg, i.p.)の投与ではHB-EGF KO マウスの社会性行動に変化は認められなかった⁹⁾ (Fig. 2d)。

2-4. 新奇物質探索試験を用いた物体認知記憶の検討

試験はオープンフィールドを用いて行った。初回の獲得試行 (acquisition trial)ではオープンフィールドの中央に二つの同じ物体 (球状物質: 半径 3 cm)を設置し、マウスを 5 分間自由に探索行動させた。1 時間後の保持試行 (retention trial)では片方の物体を別の新奇の物体 (三角柱: 3 × 3 × 3 cm)に交換し、同様に 5 分間マウスを自由に探索させた。初回に行った獲得試行においては野生型マウスおよび HB-EGF KO マウス共に左右の物体に対して同程度の探索時間を費やした (Fig. 2e)。一方、獲得試行の 1 時間後に行った保持試行において、野生型マウスは新奇物質 (右)に対する探索時間が増加したが、KO マウスでは新奇物質に対する探索時間の増加は認められず、左右の物質に対し同程度の探索時間を示した⁹⁾ (Fig. 2f)。

2-5. Y 字型迷路試験を用いた短期記憶の検討

試験はプラスチック製の 3 つのアームを持つ Y 字型迷路 (16×50×2 cm)を用いて行った。測定はあらかじめ決めた 1 本のアームにマウスを置き、8 分間自由に探索させた。通常、マウスを Y 字型の迷路の一端に置くとマウスは元来たアームに戻ることなく 3 つのアームを順番に探索行動していく習性がある。しかし、短期記憶の障害を示すマウスは、直前にいたアームにもう一度戻る行動 (短期記憶の障害)を多く示す。8 分間の探索行動の測定において、HB-EGF KO マウスは正常なアームの選択率を示す alteration rate が野生型マウスと比べ有意に低下していた (Fig. 2h)。一方、8 分間の試験におけるアームの選択数は野生型マウスと KO マウス間に明らかな変化は認められなかった⁹⁾ (Fig. 2g)。

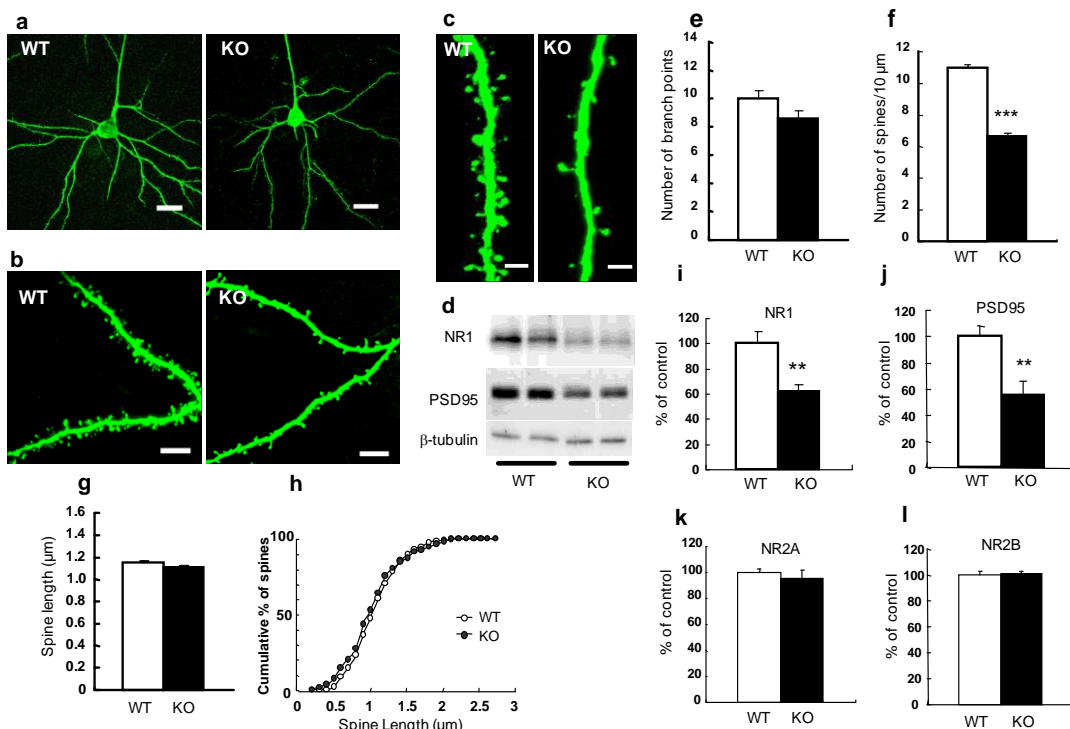


Fig. 3. Morphological changes in the prefrontal cortex.

(a) Representative photomicrographs showing morphology of pyramidal neurons in cortical layer III of the prefrontal cortex from WT (left) and KO (right) mice. Scale bar=20 μm. (b) Representative photomicrographs of apical dendritic segments from WT (left) and KO (right) mice. Scale bar=8 μm. (c) High-magnification images of apical dendritic segments from adult WT (left) and KO (right) mice. Scale bar=2 μm. (d) Representative images of immunoblots showing NR1 and PSD-95 protein levels. (e) Quantification of the number of basal dendritic branch-points. (f) Spine density on primary apical dendrites of layer III pyramidal neurons of the prefrontal cortex from WT (white bar) and KO (black bar) mice. (g) Quantification of spine length. WT (n=700 spines) and KO (n=592 spines) mice (n=4 mice, 25 neurons each). (h) Cumulative distribution of spine length. WT (white circle) and KO (black circle) mice (n=4 mice, 25 neurons each). (i, j, k, and l) Quantitative analysis of NR1, PSD-95, NR2A, and NR2B by densitometric scanning of immunoreactive bands. The results were cited from ref 9.

3. 大脳皮質第3層の神経細胞の形態評価

つぎに HB-EGF KO マウスの精神行動異常のメカニズムを検討するために、前頭前野皮質第3層の錐体細胞の形態を評価した。評価は Lucifer Yellow 標識法を用いて大脳皮質第3層の神経細胞を染色した。Fig. 3a-c は LY 染色による野生型および HB-EGF KO マウスの神経細胞の染色像を示している。基底樹状突起の分岐点の数に野生型と HB-EGF KO マウス間に変化は認められなかった (Fig. 3a, e)。先端樹状突起のスパン密度は、HB-EGF KO マウスでは野生型マウスに比べて有意に低下していた。(Fig. 3b, c, f)。一方、スパンの長さや樹状突起におけるスパンの分布は、野生型マウスおよび HB-EGF KO マウスで変化は認められなかった (Fig. 3g, h)。さらに前頭前野皮質のスパン関連タンパク質をウェスタンブロッティングによって評価した。Fig. 3d は N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体サブユニットの NR1 および post synaptic density protein 95 (PSD-95) タンパク質のバンドを示している。NR1 および PSD-95 は、野生型マウスと比べて HB-EGF KO マウスの前頭前野皮質において有意に低下していた (Fig. 3i, j)。一方、NR2A および NR2B タンパク質の発現は、野生型マウスおよび HB-EGF KO マウスで明らかな変化は認められなかった⁹⁾ (Fig. 3k, l)。

4. 海馬依存的な記憶形成における HB-EGF の関与

4-1. モリス水迷路試験を用いた空間認知記憶の検討

海馬依存的な空間認知記憶に及ぼす HB-EGF の関与を検討するために、モリス水迷路試験を行った。装置は円形のプール (直径 120×高さ 45 cm) に水深が 31 cm になるように水 (22 ± 1° C) を入れた。試験は5日間の訓練試行およびその3日後のプロープ試行に分けて行った。5日間の訓練試行では、HB-EGF KO マウスは野生型マウスと比べてプラットホームへの到達時間に減少傾向が認められたが、有意な変化は認められなかった (Fig. 4b)。この結果は、記憶の形成速度は両群間では変化がないことを示唆している。さらに訓練試行から3日後に行ったプロープ試験は、野生型マウスはプラットホームが存在していた target 領域での滞在時間が有意に増加していた (Fig. 4a, c)。一方、HB-EGF KO マウスはそのような増加は認められず、さらに target 領域での滞在時間は野生型マウスと比べて有意に低下していた (Fig. 4a, c)。一方、水泳能力を反映する水泳速度は、野生型マウスおよび HB-EGF KO マウスの何れにおいても変化は認められなかった¹⁰⁾。[野生型マウス; 18.4 ± 0.82 cm/sec (n=13)、HB-EGF KO マウス; 17.6 ± 1.47 cm/sec (n=8)]。

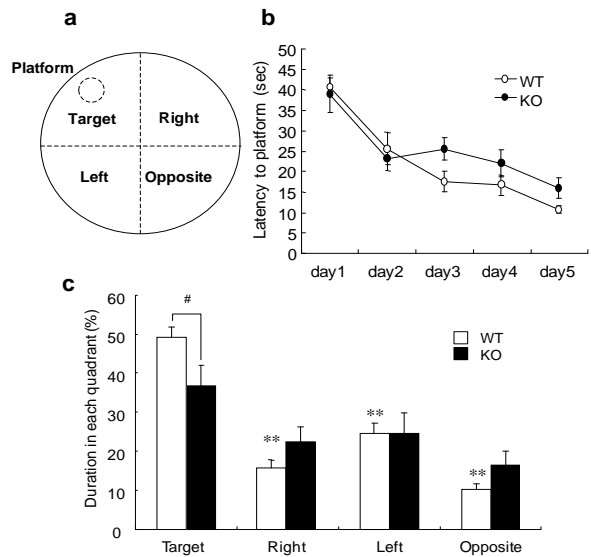


Fig. 4. Morris water maze test for HB-EGF KO mice.

(a) Diagrammatic illustration shows the positions of the platform and each quadrant. (b) Latency to escape to the hidden platform in WT (n=13) and HB-EGF KO (n=8) mice in the training test. (c) Duration in each quadrant of HB-EGF WT (n=13) and KO (n=8) mice in the probe test. Values are means ± SEM. ** p < 0.01 vs. target quadrant. # p < 0.05 vs. WT in target quadrant. The results were cited from ref 10.

4-2. 受動回避試験を用いた HB-EGF KO マウスの恐怖記憶の検討

受動回避試験は、動物が暗い所を好む習性を利用し、動物が経験した電気的嫌悪刺激に対する回避行動を記憶の指標としている。実験装置は白色光で照明した明室 (15.5×9.6×18.0 cm) と床にグリッドを取り付けた暗室 (32×32×27 cm) からなり、2室の間はプラスチック製のドアで仕切られている。訓練試行において、野生型マウスと HB-EGF KO マウスでは暗室への進入時間に変化は認められなかった (Fig. 5a)。電気刺激を与えてから24時間後に行った保持試行において、HB-EGF KO マウスは野生型マウスと比べて暗室への侵入時間が有意に低下していた (Fig. 5a)。一方、ADAMs による HB-EGF のシェディングは、HB-EGF がその生理作用を発揮するために必要不可欠である。このことから次に、ADAMs 阻害薬である KB-R7785 のマウスの記憶形成に対する作用を受動回避試験で検討した。訓練試行において、溶媒投与群と KB-R7785 投与群は、暗室への進入時間に変化は認められなかった (Fig. 5b)。しかし、電気刺激を与えてから24時間後に行った保持試行において、KB-R7785 (100 mg/kg, s.c.) 投与群は溶媒投与群と比べて、暗室への進入時間が有意に低下した (Fig. 5b)。同様に陽性対照薬として用いた抗コリン作用を有するスコポラミン (3.0 mg/kg, i.p.) 投与群は、溶媒投与群と比べて暗室への進入潜時が有意に低下し

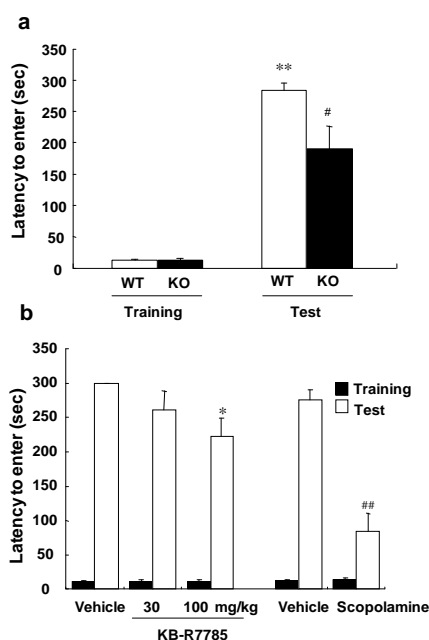


Fig. 5. Passive avoidance test.

(a) Passive avoidance test results for HB-EGF KO mice. Latency to enter dark compartment was recorded in HB-EGF WT (n=14) and KO (n=12) mice at training and test sessions. Values are means ± SEM. ** p < 0.01 vs. WT in training session. # p < 0.05 vs. WT in test session. (b) Effect of an ADAMs inhibitor on behavior in a passive avoidance test. KB-R7785 (30 and 100 mg/kg) and vehicle (0.5% CMC) were subcutaneously administrated to mice once a day for 4 days. The passive avoidance test was conducted on the third to fourth days, 30 min after vehicle, KB-R7785, or scopolamine administration. Latency to enter a dark compartment was recorded in KB-R7785 and vehicle-treated mice during training and test sessions. Values are means ± SEM. * p < 0.05, ## p < 0.01, vs. vehicle (test trial). Vehicle (n=16 or 8), KB-R7785 30 mg/kg (n=10), 100 mg/kg (n=16), and scopolamine (n=6). The results were cited from ref 10.

た¹⁰⁾ (Fig. 5b)。

4-3. 海馬 CA1 野の神経細胞における長期増強 (LTP) の測定

記憶能力の低下により HB-EGF KO マウスでは海馬におけるシナプス可塑性が変化していることが示唆されたため、つぎに高頻度刺激 (HFS) によって誘発される海馬 CA1 野の神経細胞の長期増強 (LTP) を測定した。測定に使用した海馬のスライスは過去の報告に従って作製した¹¹⁾。

野生型マウスの脳スライスは Schaffer 側枝領域への HFS (100 Hz) の負荷によって、海馬 CA1 野に LTP が誘発され、それは 60 分以上持続した (Fig. 6a, b, c, d)。一方、HB-EGF KO マウスは、著しい LTP の低下が HFS 負荷後 1 分と 60 分で認められた (Fig. 6b, c, d)。これらの結果は、HB-EGF が海馬の CA1 野における LTP の形成に重要な役割を果たしていることを示唆している¹⁰⁾。

4-4. 海馬における諸種リン酸化酵素タンパク質の発現

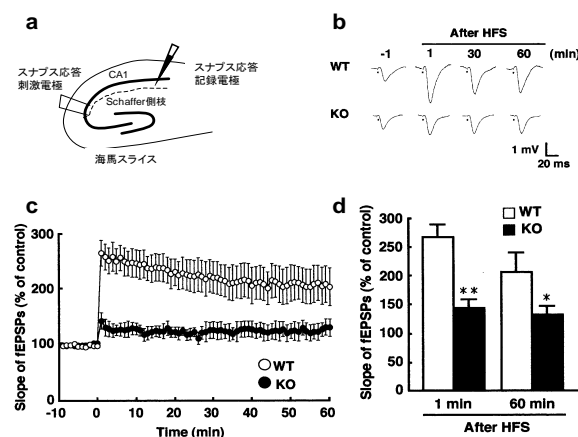


Fig. 6. Long-term potentiation (LTP) in HB-EGF KO mice.

(a) Illustration showing LTP measurement. (b) Representative field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) recorded from the CA1 region. (c) Changes in slopes of fEPSPs following high frequency stimulation (HFS) in the CA1 region from WT (n=5) and HB-EGF KO (n=5) mice. (d) Level of LTP potentiation at 1 and 60 min after HFS in the CA1 region from WT and HB-EGF KO mice. Values are means ± SEM. * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. WT. The results were cited from ref 10.

変動の検討

高頻度刺激 (HFS) によって誘発される諸種リン酸化酵素の活性化は海馬 LTP 誘導に必要不可欠である^{12), 13)}。そこでまず、HFS 負荷前後で海馬 CA1 野における CaMKII α のリン酸化を検討した結果、HB-EGF KO マウスにおいて基底状態での CaMKII α のリン酸化レベルが野生型マウスと比べて有意に低下していた (Fig. 7a, c)。一方、HFS によって、CaMKII α のリン酸化レベルが野生型マウスおよび HB-EGF KO マウス共に有意に増加していた (Fig. 7a, c)。HB-EGF KO マウスは、野生型マウスと比べて CaMKII α のリン酸化レベルは減少傾向が見られたが、両群間に有意な差は認められなかった。同様に α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid hydro bromide (AMPA) タイプグルタミン酸受容体サブユニット 1 (GluR1) のリン酸化 (Ser-831) は、HB-EGF KO マウスでは野生型マウスと比べて有意に低下していた (Fig. 7b, d)。さらに、HFS によって、GluR1 および synapsin I のリン酸化レベルは、野生型マウスおよび HB-EGF KO マウスで共に有意に増加していたが、両群間に差は認められなかった (Fig. 7b, d)。また、PKC α および ERK1/2 のリン酸化は、野生型マウスと HB-EGF KO マウス間で明らかな変化は認められなかった¹⁰⁾ (Fig. 7a, c)。

5. 脳内モノアミン測

測定は HPLC-ECD システム (Eicom, Kyoto, Japan) を用いて行った。前頭前野皮質における脳内モノアミンの測定

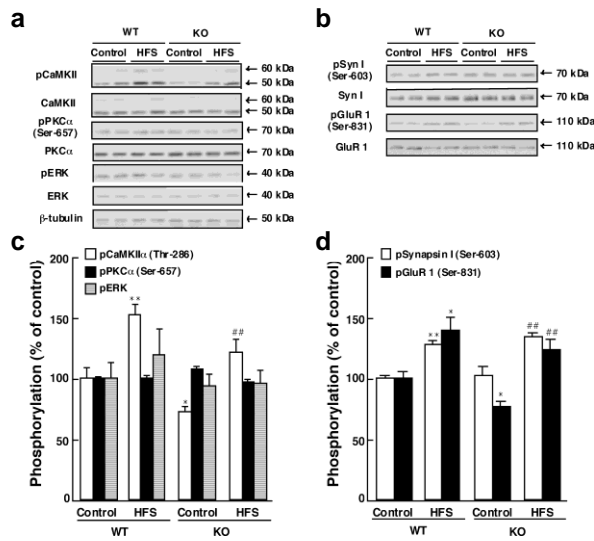


Fig. 7. Phosphorylation of various protein kinases in the hippocampus of HB-EGF KO mice.

(a) Representative images of immunoblots using antibodies against autophosphorylated CaMKII (pCaMKII), CaMKII, phosphorylated PKC α (Ser675) (pPKC α), PKC α , phosphorylated ERK (pERK), ERK, and β -tubulin. (b) Representative images of immunoblots using antibodies against phosphorylated synapsin (pSyn 1), synapsin 1 (Syn 1), phosphorylated GluR1 (Ser831) (pGluR1), and GluR1. (c) Quantitative analyses of pCaMKII α , CaMKII α , pPKC α , PKC α , pERK, ERK, and β -tubulin. (d) Quantitative analyses of pSyn 1, Syn 1, pGluR1 (Ser831), and GluR1. Values are means \pm SEM., WT (n=4 or 5), KO (n=5). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. WT (Control), ## $p < 0.01$ vs. HB-EGF KO (Control). The results were cited from ref 10

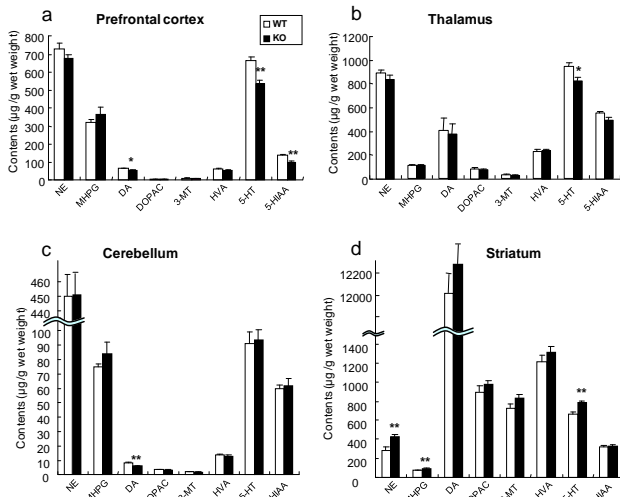


Fig. 8. Monoamine contents in HB-EGF KO and WT mice.

Monoamine contents in (A) prefrontal cortex, (B) striatum, (C) thalamus, and (D) Cerebellum. Each column and bar represent mean \pm S.E.M. (n = 10 or 11), *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ vs. WT. NE: norepinephrine, MHPG: 3-methoxy 4-hydroxy phenethyleneglycol, DA: dopamine, DOPAC: 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid, 3-MT: 3-methoxytyramine, HVA: homovanilic acid, 5-HT: serotonin, 5-HIAA: 5-hydroxyindol acetic acid. The results were cited from ref 9.

の結果、HB-EGF KO マウスは野生型マウスと比べドパミン (DA)、セロトニン (5-HT) および 5-HT 代謝物の 5-HIAA 含量が有意に低下した (Fig. 8a)。また、視床において 5-HT 含量の有意な低下が認められた (Fig. 8b)。さらに、小脳では DA 含量の有意な低下が認められた (Fig. 8c)。一方、線条体においてはノルエピネフリン (NE) とその代謝物である MHPG および 5-HT の含量が、HB-EGF KO マウスでは野生型マウスと比べ有意に増加していた⁹⁾ (Fig. 8d)。

6. 考察

HB-EGF の精神行動に及ぼす影響を検討するために、本誌説では前脳選択的 HB-EGF KO マウスの包括的な行動薬理学的解析の結果をまとめた。HB-EGF KO マウスは、24 時間における自発運動量が増加していた。Phencyclidine (PCP) を含めた中枢刺激薬の投与によって誘発される自発運動量の増加は、統合失調症における幻覚・妄想などの陽性症状様の症状と類似していることが報告されている¹⁴⁾。また、HB-EGF KO マウスに認められた自発運動の増加は、haloperidol の投与によって改善、また clozapine の投与によって一部改善した。こうした動物実験における結果は、臨床において定型および非定型抗精神病薬が陽性症状に対してともに有効であることと一致している。さらに、HB-EGF KO マウスに認められた prepulse inhibition (PPI) の障害は、統合失調症患者において特異的に見られる現象である¹⁵⁾。PPI の障害は情報処理能力、伝達能力の障害に起因すると言われており、統合失調症の認知障害様の症状を示している。また、PPI の障害は DA 作動薬や NMDA 受容体遮断薬 (PCP, ketamine および dizocilpine)、両側側坐核破壊、隔離飼育および出生後の両側海馬破壊などにより認められ、それらは PPI の障害を指標とした統合失調症の病態モデルの研究並びに薬物の評価系に汎用されている^{16), 17), 18)}。本研究においても、HB-EGF KO マウスの PPI 障害が非定型抗精神病薬の clozapine および risperidone を投与することにより改善した。この結果は、統合失調症患者の知覚フィルター異常に対して非定型抗精神病薬が改善作用を示すという臨床的知見と一致した。さらに、HB-EGF KO マウスでは社会性行動の低下も認められた。げっ歯類の社会性行動試験は抗精神病薬の効果と臨床における効果が類

似していることから、意欲の低下、感情の平板化および引きこもりなどに代表される統合失調症の陰性症状の指標として Sams-Dodd らによって提唱された¹⁹⁾。HB-EGF KO マウスの社会性行動の障害に対しては、定型抗精神病薬 haloperidol は改善効果を示さず、非定型抗精神病薬の clozapine が改善作用を示した。これらの知見から、HB-EGF KO マウスに認められた社会性行動の低下は、統

合失調症の陰性症状様の症状と類似することが示唆された。

さらに注目すべきは、HB-EGF KO マウスでは前頭皮質第3層のスパイン密度が野生型マウスと比べて約40%程度低下していたことである。樹状突起スパインは中枢神経系における興奮性神経伝達の中心的な役割を担う部位であり、スパインの大きさや密度は神経機能回路の調節に影響を及ぼす。アルツハイマー病などの変性疾患や脆弱性X症候群、ダウン症候群、その他認知障害を示すような精神神経疾患の多くは、スパインの形態異常を伴うことが報告されており²⁰⁾、樹状突起スパインの形態はこれらの神経疾患の病態と密接に関連していると考えられる。実際、統合失調症患者では、46野3層の錐体細胞における基底樹状突起の総距離および基底樹状突起上におけるスパイン密度が減少していることが報告されている²¹⁾。

また、HB-EGF KO マウスは、スパインの維持形成に必要なポストシナプスの足場タンパク質である PSD-95 および NMDA 受容体サブユニットの NR1 タンパク質の発現低下、さらには神経細胞におけるタンパク質機能を調節し、シナプス伝達の可塑性、学習・記憶をはじめとする高次脳機能に重要な役割を果たす CaMKII やその下流シグナルの PAK のリン酸化レベルが有意に低下していた⁹⁾。これらの結果は HB-EGF KO マウスは、スパインの低下によるシナプスの神経ネットワークの形態変化とその内部のシグナルタンパク質の機能低下が認められることが示唆された。

一方、新奇物質探索試験および Y 字型迷路の結果から、HB-EGF KO マウスでは記憶力の低下が認められた。両試験は他の多くの学習記憶試験と異なり、人為的な強化因子を用いないことを特徴としており、動物のより潜在的な学習・記憶能力を測定することが可能である^{22) 23) 24)}。さらに HB-EGF KO マウスは、モリス水迷路試験による空間認知記憶の低下と受動回避試験による恐怖記憶の低下が認められた。モリス水迷路試験は、海馬依存的な学習能力、すなわち空間認知および長期記憶の獲得を評価する上で用いられる試験である^{25) 26)}。今回の検討では、HB-EGF KO マウスは保持試行において空間認知記憶の低下が認められた。一方、訓練試行において HB-EGF KO マウスは、野生型マウスと比べて3日目から5日目にかけてプラットフォームへの到達時間が増加傾向を示したが、有意な差は認められなかった。これらの結果は、HB-EGF の欠損が記憶の獲得能力より記憶の保持に深く関与していることを示唆している。同様に、受動回避試験において、HB-EGF KO マウスは獲得試行の24時間後に行った保持試行において恐怖記憶の保持が低下していた。

学習・記憶の素過程はシナプスの伝達効率の変化(シナプス可塑性)にあると考えられている。海馬 CA1 野神経細胞シナプスの長期増強(LTP)は記憶学習の細胞モデル

として確立されており、LTPの誘導にはNMDA受容体を介したCa²⁺の流入が必要不可欠である²⁷⁾。さらにその後のグルタミン酸のAMPA受容体の発現変化やスパインの形態変化がLTPの発現に重要であると考えられている^{28) 29) 30)}。HB-EGF KO マウスでは、海馬CA1野における高頻度刺激(HFS)誘発のLTPが野生型マウスと比べて有意に低下していた。さらにHB-EGF KO マウスの海馬において基底状態のCaMKII α とGluR1のリン酸化が野生型マウスと比べて低下していた。CaMKIIの活性化は、LTPやシナプスの可塑性に重要な役割を果たしている³¹⁾。HFSにより、後シナプス上のNMDA受容体からの大量のCa²⁺が流入するとCaMKII α が活性化する³²⁾。このキナーゼは、AMPA受容体サブユニットのGluR1の831番目のセリン残基をリン酸化し、ポストシナプスへの受容体の挿入を引き起こす³³⁾。HFS後のCaMKII α とGluR1のリン酸化レベルに変化は認められなかったが、基底状態でのCaMKII α とGluR1のリン酸化レベルの低下していたことから、HB-EGF KO マウスにおけるシナプス可塑性の低下や認知機能の低下に、後シナプスにおける興奮性のシグナル伝達の変化が関与していることが示唆される。

さらにHB-EGF KO マウスの精神行動や認知機能の変化は神経回路の微細な形成変化に基づくことが考えられる。実際、神経の機能変化を示唆する脳内モノアミン含量の検討においても著しい変化が認められた。つまり前頭前野皮質においてDA、5-HTおよび5-HIAAの減少が、線条体においてはNE、MHPGおよび5-HTの増加が認められた。さらに視床においては5-HT、小脳においてはDAの低下が認められた。HB-EGFはDA作動性神経に対して保護的に働くことが報告されており⁷⁾、前頭前野でのDA含量の低下は前脳選択的にHB-EGFを欠損させたことによるDA作動性神経の機能低下によって誘発された可能性が考えられる。このような脳内のDAおよび5-HTの変化がHB-EGF KO マウスにおける一連の精神行動および記憶障害様の症状を引き起こした一因と考えられる。

7. 結論

これらの結果より、HB-EGF KO マウスで認められた一連の精神行動異常や抗精神病薬の効果、前頭前野のDAレベルの低下などの症状が、統合失調症患者の臨床症状と類似していたことから、HB-EGFシグナルの変化が統合失調症の病態に関与する可能性が考えられる。また、HB-EGF KO マウスの精神行動異常の基盤には脳内モノアミン含量の変化や大脳皮質におけるスパイン密度の低下が関与していることが示唆された。さらに、海馬におけるLTPおよびCaMKII α などのリン酸化酵素の活性化の低下が認められたことから、HB-EGFがシナプスにおける神経回路

の形成および神経情報の伝達と処理に関与していることが考えられる。以上、HB-EGF シグナルは、中枢神経系の高次脳機能の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに HB-EGF シグナルの制御が複雑な神経疾患の病態機序解明、新規治療法並びに治療薬の開発の糸口になることが期待できる。

8. 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に際し、終始御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤 雅光先生並びに同助教 鶴間一寛先生に深謝致します。また、諸種の御協力を頂きました薬効解析学研究室の諸氏に感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、御指導ならびに御支援を賜りました愛媛大学大学院医学系研究科生化学遺伝子分野教授 東山繁樹博士および難波大輔博士、東北大学大学院薬学研究科薬理学教室教授 福永浩司博士、講師 森口茂樹博士および助教 塩田倫史博士、岐阜大学医学部附属病院薬剤部副薬剤部長 北市清幸博士、富山大学医学部薬学研究部薬物治療学研究室教授 新田淳美博士、テキサス大学生物化学分子生物分野准教授 古田泰秀博士、日本バイオリサーチセンター故山口和政博士に心からの感謝の意を表します。

9. 参考文献

- Nanba D., Mammot A., Hashimoto K., Higashiyama S., *J Cell Biol*, **163**, 489-502. (2003)
- Miyamoto S., Yagi H., Yotsumoto F., Kawarabayashi T., Mekada E., *Cancer Sci*, **97**, 341-347(2006).
- Iwamoto R., Yamazaki S., Asakura M., Takashima S., Hasuwa H., Miyado K., Adachi S., Kitakaze M., Hashimoto K., Raab G., Nanba D., Higashiyama S., Hori M., Klagsbrun M., Mekada E., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3221-3226(2003).
- Tokumar S., Higashiyama S., Endo T., Nakagawa T., Miyagawa J.I., Yamamori K., Hanakawa Y., Ohmoto H., Yoshino K., Shirakata Y., Matsuzawa Y., Hashimoto K., Taniguchi N., *J Cell Biol*, **151**, 209-220. (2000).
- Mine N., Iwamoto R., Mekada E., *Development*, **132**, 4317-4326 (2005).
- Mishima K., Higashiyama S., Nagashima Y., Miyagi Y., Tamura A., Kawahara N., Taniguchi N., Asai A., Kuchino Y., Kirino T., *Neurosci Lett*, **213**, 153-156 (1996).
- Farkas L.M., Kriegstein K., *J Neural Transm*, **109**, 267-277 (2002).
- Jin K., Sun Y., Xie L., Batteur S., Mao X.O., Smelick C., Logvinova A., Greenberg D.A., *Aging Cell*, **2**, 175-183 (2003).
- Oyagi A., Oida Y., Kakefuda K., Shimazawa M., Shioda N., Moriguchi S., Kitaichi K., Nanba D., Yamaguchi K., Furuta Y., Fukunag K., Higashiyama S., Hara H., *PLoS One*, **4**, e7461 (2009).
- Oyagi A., Moriguchi S., Nitta A., Murata K., Oida Y., Tsuruma K., Shimazawa M., Fukunaga K., Hara H., *Brain Res*, **1419**, 97-104 (2011).
- Moriguchi S., Shioda N., Han F., Narahashi T., Fukunaga K., *J Neurochem*, **106**, 1092-1103 (2008).
- Silva A.J., Paylor R., Wehner J.M., Tonegawa S., *Science*, **257**, 206-211 (1992).
- Fukunaga K., Stoppini L., Miyamoto E., Muller D., *J Biol Chem*, **268**, 7863-7867 (1993).
- Noda Y., Nabeshima T., Mouri A., *Nihon Yakurigaku Zasshi*, **130**, 117-123 (2007).
- Braff D., Stone C., Callaway E., Geyer M., Glick I., Bali L., *Psychophysiology*, **15**, 339-343 (1978).
- Yamada S., *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, **20**, 131-139 (2000).
- Andersen M.P., Pouzet B., *Psychopharmacology (Berl)*, **156**, 291-304 (2001).
- Linn G.S., Negi S.S., Gerum S.V., Javitt D.C., *Psychopharmacology (Berl)*, **169**, 234-239 (2003).
- Sams-Dodd F., *J Neurosci Methods*, **59**, 157-167 (1995).
- Fiala J.C., Spacek J., Harris K.M., *Brain Res Brain Res Rev*, **39**, 29-54 (2002).
- Glantz L.A., Lewis D.A., *Arch Gen Psychiatry*, **57**, 65-73 (2000).
- Sarter M., Bodewitz G., Stephens D.N., *Psychopharmacology (Berl)*, **94**, 491-495 (1988).
- Parada-Turska J., Turski W.A., *Neuropharmacology*, **29**, 1111-1116 (1990).
- Dodart J.C., Mathis C., Ungerer A., *Neuroreport*, **8**, 1173-1178 (1997).
- Peters M., Mizuno K., Ris L., Angelo M., Godaux E., Giese K.P., *J Neurosci*, **23**, 9752-9760 (2003).
- Denayer E., Ahmed T., Brems H., Van Woerden G., Borgesius N.Z., Callaerts-Vegh Z., Yoshimura A., Hartmann D., Elgersma Y., D'Hooge R., Legius E., Balschun D., *J Neurosci*, **28**, 14443-14449 (2008).
- Bliss T.V., Collingridge G.L., *Nature*, **361**, 31-39 (1993).
- Shi S.H., Hayashi Y., Petralia R.S., Zaman S.H., Wenthold R.J., Svoboda K., Malinow R., *Science*, **284**, 1811-1816 (1999).
- Matsuzaki M., Honkura N., Ellis-Davies G.C., Kasai H., *Nature*, **429**, 761-766 (2004).
- Derkach V.A., Oh M.C., Guire E.S., Soderling T.R., *Nat Rev Neurosci*, **8**, 101-113 (2007).
- Lisman J., Schulman H., Cline H., *Nat Rev Neurosci*, **3**, 175-190 (2002).
- Lisman J., *Trends Neurosci*, **17**, 406-412 (1994).

-
- 33) Hayashi Y., Shi S.H., Esteban J.A., Piccini A., Poncer, J.C., Malinow R., *Science*, **287**, 2262-2267 (2000).

10. 特記事項

本総説は、岐阜薬科大学博士論文（甲 129 号）の内容を中心にまとめたものである。