

精神疾患病態における  
**VGF nerve growth factor inducible** の役割に関する研究

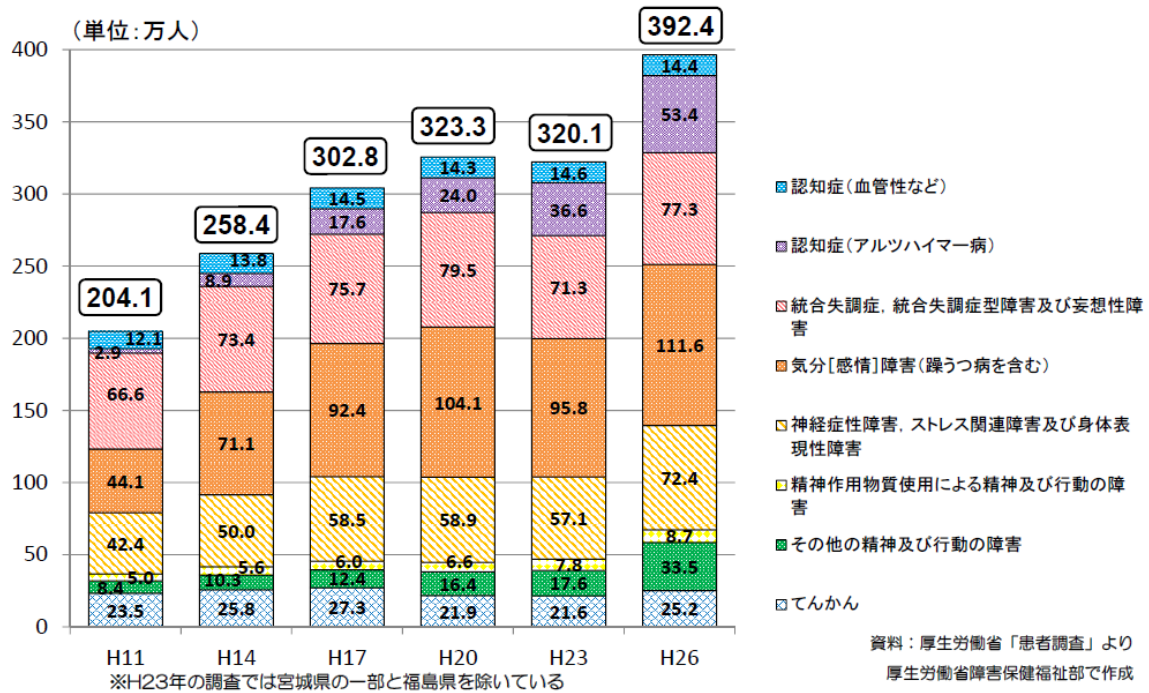
溝口 貴洋

## 目次

序論	1 頁
第 1 章 VGF 発現増加による精神行動及び脳構造に及ぼす影響	7 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 2 章 統合失調症病態における VGF の発現増加の関与	46 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 3 章 神経発生における VGF の発現増加の関与	61 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
総括及び結論	92 頁
謝辞	95 頁
引用文献	96 頁
略語一覧表	113 頁

## 序論

精神疾患とは、精神・行動の異常が症状である疾患の総称である。代表的なものとして、統合失調症、うつ病、自閉症が挙げられる (1)。生涯有病率は約30%と高く、近年精神疾患を有する患者数は急激に増加している (Fig. 1)。



**Fig. 1 The number of patients with mental disorders.**

[https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12201000-Shakaiengokyokushougaihokenfukushibu-Kikakuka/0000108755\\_12.pdf](https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12201000-Shakaiengokyokushougaihokenfukushibu-Kikakuka/0000108755_12.pdf) より引用

そのような背景から世界保健機関 (World Health Organization: WHO) の調べによると、うつ病は本邦において生涯調整生命年 (disability-adjusted life year: DALY) に最も影響を及ぼす疾患と位置付けられている (Table 1)。また、その他の精神疾患である認知症、統合失調症、双極性障害も DALY の上位に位置している。しかし、精神疾患が人類に及ぼす影響は多大であるにも関わらず、これに対する診断方法、治療方法に問題点がある。診断においては、現在は Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) -5

の判断基準を基に問診によって疾患を診断しているが、疾患の中間領域では医

師の判断が分かれて

しまう。したがっ

て、病態を正確に反

映したバイオマーカ

ーを同定することに

よる生化学的な診断

が求められている。

治療においては、

1950 年代にクロルブ

ロマジン等の定型抗

精神病薬やイミプラ

ミン等の三環系抗う

順位	疾患	DALY値 (日本人10万人当たり 2004年)
1.	うつ病	531
2.	脳血管障害	425
3.	自傷	423
4.	喘息	290
5.	虚血性心疾患	274
6.	聴覚障害	264
7.	認知症	247
8.	骨関節症	224
9.	統合失調症	194
10.	双極性障害	187
11.	糖尿病	172
12.	交通事故	172
13.	他の事故	169
14.	胃がん	162
15.	肺がん	162
16.	大腸がん	160
17.	呼吸器感染症	141
18.	閉塞性肺疾患	128
19.	偏頭痛	136
20.	アルコール	118

(WHO 2010年資料より)

つ薬が開発され、電気痙攣

療法やロボットミー等による

**Table 1 Disability-adjusted life year of several diseases.**

日本生物学的精神医学会誌 21 巻 3 号より改変引用

侵襲的治療から、革新的に進歩した。しかし、抗精神病薬においては、統合失調症の三大症状の一つである陰性症状に対する効果が不十分であること、抗うつ薬においては、作用が認められるまで1から2週間を要すること等多くの課題が残されている(2,3)。そのため、正確な診断に基づいた各疾患群における根本的な原因を同定し、正確なバイオマーカーの欠如や薬物治療で奏功しない患者がいるという問題を解決できる薬剤の開発が必要とされている。

上記の課題を克服するために、精神疾患の原因遺伝子を探索するゲノム研究が進められている。精神疾患のゲノム研究は、1980年代に一卵性双生児と二卵性双生児との間で疾患の一致率を比較する「双生児研究」や患者の家族内の発

症率を調べる「家族研究」により始まった。その後、遺伝子マーカーの発見により、精神疾患の原因遺伝子が染色体上のどこにあるかを同定する「遺伝子連鎖解析研究」が開始された。この方法により、デュシャンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子としてジストロフィン、ハンチントン病の原因遺伝子としてハンチンチンが同定された (4-7)。精神疾患においてもこの手法により原因遺伝子が同定されることが期待されたが、なかなか一致した結果が得られなかった。上記の手法に加えて、生物学的な知見を基に選ばれた「候補遺伝子」と疾患との関連を検討する「遺伝子関連解析」が行われた。当時、抗精神病薬の作用点がドパミン D<sub>2</sub> 受容体の阻害であることが分かり、ドパミン D<sub>2</sub> 受容体の遺伝子関連解析が注目された (8)。しかし、解析を行う患者の数が少ないこと、候補遺伝子の選択自体にバイアスが入っていること、偽陽性が出やすいこと等から、確定的な原因遺伝子の同定には至っていない。

この状況を打破する手法としてゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) が提唱された。これは特定の候補遺伝子を決めずゲノム全体をほぼカバーするように一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) の頻度と疾患の関連を厳密な統計によって検討する手法である。精神疾患においては 2007 年に双極性障害に関する検討が行われた (9)。統合失調症に対しても多数の GWAS が行われており (10-13)、2014 年に同手法により 108 個の関連遺伝子座が同定された (14)。更なる実験技術の進歩により DNA マイクロアレイを用いた検討からゲノム中の欠失及び重複の現象を示すコピー数多型が発見された (15)。コピー数多型は、頻度は低いものの疾患の発症リスクを大きく変化させるリスクファクターとして注目されており、また、本邦においても大規模な臨床試験によって統合失調症患者におけるコピー数多型を多数同定した (16)。その中でも、代表的なものとして 22q11.2 領域の部分欠失が挙げられる。

この遺伝子異常は 2,000-4,000 人に一人の割合で認められ、この遺伝子異常を持ったヒトの約 30%が統合失調症を発症することから基礎研究レベルにおいても注目されている (17-22)。このように、精神疾患研究におけるゲノム研究は、精神疾患の原因遺伝子の同定に向かって日々進歩している。

もう一つの手法として、生体試料を用いたオミックス解析によるバイオマーカー探索が挙げられる。疾患の早期発見と治療導入を促進でき、採取の際に侵襲性が少ない血液を用いた検討がなされている。代表的なバイオマーカーとしてうつ病における脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) が挙げられる。BDNF は、①うつ病患者の血清中で減少していること (23, 24)、②抗うつ薬の服薬によってその発現量が回復すること (25)、③電気痙攣療法、経頭蓋的磁気刺激療法を用いた治療によっても発現量が回復すること (26, 27) が報告されている。その他に、白血球中の mRNA に着目した研究から、白血球中のセロトニントランスポーター mRNA 等がバイオマーカーとして注目されている (28-30)。

VGF nerve growth factor inducible (VGF) は、615 (ヒト) または 617 (マウス及びラット) 個のアミノ酸からなる (分子量; 68 kDa) タンパク質であり、N 末端に小胞体移行シグナルを有する。VGF は、細胞内において、有芯小胞内に局在しており、分泌過程を経て、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入に伴う膜電位の上昇により細胞外に放出される (31-33)。分泌過程において VGF は、有芯小胞内でプロホルモンコンバターゼ 1/3 及び 2 によって切断され様々な生理活性を有する TLQP-21、AQEE-30、LQEQ-19、TLQP-62 等のペプチドを生ずる (31, 34-36)。VGF は、神経細胞や神経内分泌細胞に広範に局在し、脳内においても広域に分布しており、大脳皮質、海馬及び視床下部において特に発現が強く認められる (35, 37)。また、神経可塑性促進作用、抗うつ作用、神経突起伸長促進作用を有する

ことが知られている (38-40)。VGF は、1985 年に神経成長因子 (Nerve growth factor: NGF) 刺激によって発現誘導される因子として同定され、NGF に加えて、BDNF、ニューロトロフィン-3 (Neurotrophin-3: NT-3) による刺激によっても発現誘導される (41, 42)。また近年、上記報告とは逆に、VGF は、BDNF の受容体である Tyrosine receptor kinase (Trk) B のリン酸化を促進することが報告され、VGF と神経栄養因子とのポジティブフィードバックループが示唆されている (43)。

臨床的な観点から述べると、VGF は、うつ病患者の白血球及び血清において発現量が減少しており、抗うつ薬の投与により血清中 VGF の発現低下は改善されることが報告されている (44, 45)。一方、統合失調症患者では、脳脊髄液及び前頭前皮質における VGF の発現量増加及び VGF の遺伝子座である 7q22.1 領域の複製型のコピー数多型が認められる (46-48)。また、遺伝子連鎖解析研究によって、統合失調症の発症率が高いフィンランド人の家系において 7q22 領域との関連が知られている (49)。さらに、双極性障害の患者においても海馬及び前頭前皮質ブロードマン第 9 野において VGF の発現量が減少することが報告されている (50)。以上の結果は、VGF の発現量の変化が種々の精神疾患病態に影響を及ぼす可能性を示唆している。

上記の背景から、VGF の機能解析を目的に VGF ヘテロ欠損マウスや前脳特異的 VGF 欠損マウスを用いた検討がされている。VGF ヘテロ欠損マウスでは、抑うつ行動の増加及び記憶障害等の行動異常と海馬の長期増強の低下が認められることから、VGF の発現減少とうつ病病態との関連が示唆されている (38, 39, 43)。このように VGF の発現低下が高次脳機能・精神疾患病態に及ぼす影響については多く研究がなされている。しかし、うつ病や統合失調症患者において認められる VGF の発現増加が高次脳機能・精神疾患病態に及ぼす影響

については、不明な点が多い。

そこで本研究では、VGF の発現増加が精神疾患病態に及ぼす影響を検討することを目的として、第 1 章では、当研究室で作製した VGF 過剰発現マウスを用いて VGF の発現増加が精神行動及び脳の組織学的構造に及ぼす影響を検討した。第 2 章では、発現量の増加及び遺伝子変異が認められ疾患との関連が大きい統合失調症病態における VGF の発現増加の関与を評価した。第 3 章では、精神疾患の原因の一つとして考えられている神経発達における VGF の役割について検討を行った。



## 第1章 VGF 発現増加による精神行動及び脳構造に及ぼす影響

### 第1節 緒言

精神疾患は、序論で述べた通り、生涯有病率は約 30%と罹患する確率が高いにも関わらず、これに対する診断方法、治療方法が十分に確立されていない。したがって、精神疾患を判別できる生化学的な指標の確立及び原因に基づいた根本的な治療法の確立が必要である。

精神疾患を克服するために患者の生物学的試料を用いたバイオマーカー研究や患者のゲノム情報から原因遺伝子を同定するゲノム研究が行われている。これらの研究成果を基に原因遺伝子の病態における関与を検討するために、げっ歯類や霊長類を用いた「モデル動物」の作製が試みられている (51, 52)。モデル動物には、特定の遺伝子を外部から導入した遺伝子改変動物及び薬物投与によるモデル動物が使用される。遺伝子改変動物には、遺伝子をランダムに挿入したトランスジェニックマウス、相同組み換えによって外来遺伝子を特定の位置に挿入し、遺伝子を欠損させるノックアウトマウス、変異型の遺伝子を野生型の遺伝子座に挿入するノックインマウスが挙げられる。これらのモデル動物を用いて、標的遺伝子の脳機能への影響が検討されている。モデル動物を用いた脳病態の解明が進めば、ヒトでの検証を経て、新たな脳病態診断法の確立につながる。以上より、モデル動物は、精神疾患病態の解明並びに生化学的指標の同定に重要である。

精神疾患のモデル動物は、表面妥当性 (face validity)、構成妥当性 (construct validity)、予測妥当性 (predictive validity) の3つの妥当性を満たすことが重要である (Table 2) (53)。表面妥当性は、モデル動物が精神疾患の症状と似た行動異常を示すことであり、構成妥当性は、モデル動物が精神疾患の原因に基づいて作製されていることであり、予測妥当性は精神疾患に有効な治療法がモデル動

物においても同様に効果的であることである。表面妥当性の確保が難しいこと等の理由でこれら 3 つの妥当性を完全に満たすことは難しく、さらなる研究が求められている。

妥当性	
表面妥当性	モデル動物が精神疾患における症状と似た行動異常を示すこと
構成妥当性	モデル動物が精神疾患の原因に基づいて作成されていること
予測妥当性	モデル動物の行動異常が精神疾患において効果的な治療法によって改善すること

**Table 2 Three kinds of validity of animal models of mental disorders.**

脳と精神の医学 第 20 巻 第 3 号 2009 年より改変引用

序論で述べたように、VGF は 615 (ヒト) または 617 (マウス、ラット) 個のアミノ酸からなるタンパク質 (分子量; 68 kDa) であり、脳内の広域に分布しており、特に大脳皮質、海馬及び視床下部で発現が強く認められる (35, 37)。また、神経可塑性促進作用、抗うつ作用、神経突起伸長促進作用を有することから、VGF は中枢神経系において、重要な生理作用を有することが知られている (38-40)。

VGF はうつ病患者及び双極性障害患者において発現が減少する。一方、別のコホート研究では、うつ病患者及び統合失調症患者において発現が増加する。以上より VGF の発現変化が精神疾患病態に寄与していることが示唆されている (44, 45, 47, 48, 50)。上記の背景から、VGF ヘテロ欠損マウスや前脳特異的 VGF 欠損マウスを用いて VGF の機能解析が行われている。VGF 欠損マウスでは、抑うつ行動の増加及び記憶障害等の行動異常と海馬の長期増強の低下が認められる (38, 39, 43)。このように VGF の発現低下が高次脳機能・精神疾患病態に及ぼす影響を検証した研究は多い。しかし、うつ病及び統合失調症患者で認められる VGF の発現増加が高次脳機能・精神疾患病態の及ぼす影響については、十分に検討されていない。

本章では、高次脳機能における VGF の発現増加の影響を検討するために、当研究室で作製した VGF 過剰発現マウスを用いて、種々の行動学的解析及びニッスル染色を用いた脳の組織学的解析を行った。

## 第 2 節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。

塩酸 (HCl)、Tris HCl、エタノール、メタノール、キシレン、パラホルムアルデヒド、Sample Buffer Solution (2ME+) (x4)、イムノスター®LD、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル [SDS polyacrylamide gel]、6-アミノヘキサン酸 (6-aminohexanoic acid)、Agarose S、塩化カリウム (potassium chloride: KCl) は Wako (Osaka, Japan)、リン酸水素二ナトリウム・十二水和物 (sodium hydrogenphosphate 12-water:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、グリシン、2-プロパノールは Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl)、ペントバルビタールは Kishida Chemical (Osaka, Japan)、BCA protein assay kit は Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)、Tris-Buffered Saline (TBS)、Tris Borate EDTA (TBE) は Takara (Shiga, Japan)、EDTA・2Na (disodium ethylenediamine tetraacetate) は同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan)、スキムミルクは Morinaga milk industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より、オイキット (EUKITT) は As One (Osaka, Japan)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II、phosphatase inhibitor cocktail III、cresyl violet、酢酸アンモニウム、Igepal CA-630 は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,

USA)、proteinase K solution は Qiagen (Venlo, Nerthaland)、DNA ladder は Nippon genetics (Tokyo, Japan)、Can get signal solution 1、Can get signal solution 2、Blend Taq<sup>®</sup>-Plus-は東洋紡 (Osaka, Japan)、Tween 20 Solution は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、パラフィン は Sakura Finetek Japan (Tokyo, Japan)よりそれぞれ購入した。

Phosphate buffered saline (PBS) は、KCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O を蒸留水または超純水に溶解し、調製した。Phosphate buffer (PB) は、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O を蒸留水に溶解し調製した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験動物

すべてのマウス (8-18 週齢、雄性) は設定温度: 24°C (範囲: 22-26°C)、設定湿度: 55% (範囲: 40-70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00-午後 8:00) に維持された岐阜大学医学部生命科学棟 4 階または本学 6 階動物飼育室で飼育した。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm、または縦 36.9 × 横 15.6 × 高さ 13.2 cm) を用い、自由給水下に固形飼料 (CE-2; CLEA, Tokyo, Japan) にて飼育した。行動試験は自発運動試験を除きすべて午前 9:00 から午後 8:00 の間に行った。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。また、遺伝子改変動物は、岐阜薬科大学生命倫理・バイオセーフティー委員会に遺伝子組み換え実験申請を行い、許可を得て使用した。

### 2-2-2 VGF 過剰発現マウス作製

#### 2-2-2-1 VGF 過剰発現マウス作製

標的遺伝子の導入は受精卵の前核に調製した DNA をマイクロインジェクションすることで作製した。本試験でマイクロインジェクションした導入遺伝子は *Vgf* 遺伝子上流に CAG プロモーター、下流に mRNA の安定化のためのポリ A 付加シグナルを有している。本試験では上記のように作製した雄性 VGF 過剰発現マウスと日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) から購入した雌性 BDF1 マウスを交配して生まれたマウスを使用した。

#### 2-2-2-2 マウスジェノタイピング

生後 4 週齢以降のマウスの尻尾を先端から 5 mm 切り、Cell Lysis Solution (25 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0、1% SDS) 及び Proteinase K により溶解した。その後 7.5 M 酢酸アンモニウム溶液によりタンパク質を除去し、2-propanol、70% ethanol により DNA を抽出した。CAG プロモーター、ポリ A 付加シグナルの配列を認識するプライマーを用いて PCR を行い、マウス遺伝子型を同定した。VGF (forward); 5'-CCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTT-3'、VGF (reverse); 5'-AGAGGGAAAAAGATCTCAGTGGTAT-3'

増幅反応は TAKARA PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (Takara, Shiga, Japan) を用いて 35 サイクル行った。1 サイクルの構成は DNA 変性: 94°C、20 秒、アニーリング + エクステンション: 66°C、300 秒にて行った。

#### 2-2-3 ウェスタンブロット解析

##### 2-2-3-1 試料採取

マウスを断頭し、脳を摘出した。摘出した脳は、氷冷したガラスシャーレの上に置き、前頭前皮質、大脳皮質、海馬及び線条体に切り分けた。組織は、マイクロチューブに入れ、液体窒素を用いて急速冷凍した。サンプルはタンパク

質抽出時まで-80°C に保存した。タンパク質抽出液には、RIPA buffer [50 mM Tris HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% Igepal CA-630] 1 ml に対し、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II 及び III をそれぞれ 10 µl ずつ混合して用いた。組織は上記のタンパク質抽出液を入れ、ホモジナイザー (Physoctron, Microtec Co., Chiba, Japan) を用いて 30 秒間ホモジナイズした。その後、30 分間氷中に静置させ、10,000 rpm、4°C、20 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質抽出液とした。

#### 2-2-3-2 タンパク質定量

タンパク質定量は BCA protein assay kit を用いて行った。標準曲線の作製のためのサンプルとして、0、12.5、25、50、125、250、500、750、1,000、1,500 及び 2,000 µg/ml の濃度に調製した bovine serum albumin (BSA) を用いた。Working reagent を添加後、サンプルを 37°C のインキュベーター中で 30 分間反応させ、その後 Varioskan Flash (Thermo Scientific) を用いて 532 nm の吸光度で測定した。タンパク質濃度は、Sample Buffer Solution 及び RIPA buffer を用いて調製し、調製後のサンプルは-80°C に保存した。

#### 2-2-3-3 ウェスタンブロット

タンパク質濃度を調製したサンプルを-80°C から取り出し、氷上で融解させた後 100°C で 5 分間煮沸処理し、室温にて軽くスピンドウンした。SDS ポリアクリルアミドゲルを泳動装置にセットし、容器に泳動用緩衝液 (25 mM Tris、190 mM Glycine、3.5 mM SDS) を入れ、ゲルを取り付けた泳動装置に浸した。泳動装置の中にも泳動用緩衝液を入れた。1 ウェル当たりの添加量は、分子量

マーカーを 5  $\mu$ l、各サンプルを 10  $\mu$ l (5  $\mu$ g) とした。サンプルを添加後、ゲル 1 枚当たり 20 mA にて泳動した。泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-aminohexanoic acid、20% methanol) に 15 分間浸した。転写膜はメタノールに 30 秒間浸し、超純水に浸した。その後、anode buffer 2 (25 mM Tris、20% methanol) に浸した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M Tris、20% methanol) に浸したろ紙、anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、2 枚の cathode buffer に浸したろ紙の順に重ね、膜 1 枚当たり 100 mA で 45 分間転写した。転写後、0.05% Tween 20 含有 0.01 M TBS (0.05% Tween TBS) で洗浄し、5% スキムミルクに浸して、それぞれ室温で 1 時間ブロッキングした。その後再び 0.05% Tween TBS で洗浄し、Can get signal solution 1 で希釈した一次抗体に浸し、4°C で一晩静置させた。その後、転写膜は 0.05% Tween TBS で洗浄し、Can get signal solution 2 で希釈した二次抗体に浸し、室温で 1 時間静置させた。0.05% Tween TBS で洗浄した後、イムノスター® LD に 2 分間浸した。その後、LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) 及び Multi Gauge Ver. 3.0 (Fujifilm) を用いて検出した。

一次抗体には、goat anti-VGF antibody [1: 400 dilution; Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)]、mouse anti- $\beta$ -actin antibody (1: 5,000 dilution; Sigma-Aldrich) を用いた。二次抗体には、HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1: 2,000 dilution; Thermo Scientific)、HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG (1: 75,000 dilution; Thermo Scientific) を用いた。

#### 2-2-4 リアルタイム RT-PCR

##### 2-2-4-1 mRNA 抽出及び逆転写

単離した脳組織はマイクロチューブに入れ、液体窒素により急速凍結した。

サンプルは RNA 抽出まで -80°C に保存した。NucleoSpin RNA (Takara) により total RNA を抽出した。抽出した RNA の濃度は NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) で分光測定し求めた。第 1 鎖 cDNA は PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用い 20 µl 合成した。合成後のサンプルは、リアルタイム RT-PCR を行うまでの期間、-20°C で保存した。

#### 2-2-4-2 リアルタイム RT-PCR

リアルタイム PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (Takara) を用いて行った。PCR の反応は 0.4 µM の各 primer、10 µl の SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara) を用い全量 20 µl で行った。PCR 反応は、95°C で 30 秒間反応させた後、95°C; 5 秒間、60°C; 30 秒間を 40 サイクル行った。増幅に用いた primer の配列は、*Vgf* mRNA 5'-CAG GCT CGA ATG TCC GAA AG-3' (sense)、*Vgf* mRNA 5'-CTT GGA TAA GGG TGT CAA AGT CTC A -3' (antisense)、*β-actin* mRNA 5'- CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3' (sense) 及び *β-actin* mRNA 5'- ATGGAGCCACCGATCCACA-3' (antisense) である。

#### 2-2-5 脳の組織学的検討

##### 2-2-5-1 組織切片作成

マウスをペントバルビタール (50 mg/kg) で麻酔し、正向反射の消失を確認したのち、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) を左心室内に注入して灌流固定した。8 分後に脳を取り出し、同液にて少なくとも 24 時間 4°C 放置した。ついで、固定した脳を 70%エタノール、90%エタノール、無水エタノール、キシレン及び融解パラフィンに浸透させ脱水を行った。その後、パラフィンにて脳を包埋し、ミクロトーム (Leica, Tokyo, Japan) を用



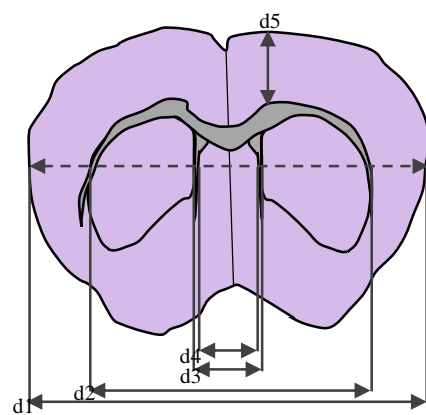
いて 5  $\mu\text{m}$  の薄切切片を作製し、スライドガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に乗せ室温で保存した。

#### 2-2-5-2 クレシルバイオレット染色

パラフィン切片は、キシレンに浸してパラフィンを洗浄した。続いて段階的に濃度を下げたエタノール溶液に浸し、蒸留水に浸透した。切片はその後 10-20 分間 1% クレシルバイオレット液に浸して染色後、蒸留水、70% エタノールで洗浄し、95%、無水エタノールの順に 5 分間浸し脱水した。その後キシレンに 2 回浸したのちに封入した。

#### 2-2-5-3 組織評価

染色像は蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて撮影した。海馬及び小脳の細胞密度の評価を行うために、40 倍の倍率で撮影を行った。全脳、側脳室、線条体、大脳皮質及び海馬の体積評価は 140  $\mu\text{m}$  間隔で脳切片を用意し、Cavalieri's principle (volume =  $s_1d_1 + s_2d_2 + \dots + s_nd_n$ ,  $s$  = area、 $d$  = distance between two sections) によって算出した (54, 55)。体積の評価を行うために 4 倍の倍率で撮影を行った。各脳領域の体積評価を行った範囲は以下の通りである。全脳及び側脳室: bregma + 1.94 ~ 2.18 mm、線条体及び大脳皮質: bregma + 1.70 ~ 0.10 mm、海馬: bregma - 0.94 ~ 4.04 mm。種々の脳領域の幅を測定するために、bregma + 0.50



~ 0.10 mm の範囲の脳切片を用い

て Fig. 2 に示す d1 から d5 の幅を

**Fig. 2** Diagram of the brain section indicates five regions measured for length using cresyl violet.

測定した。測定した幅を用いて以下の領域の幅を算出した。全脳 = d4、線条体 = d4 - d3、頭頂葉 = d5、側頭葉 = d4 - d3、中隔核 = d4。Paxinos, G らのマウス脳アトラスを用いて脳の位置を同定した。細胞密度、体積及び幅の計測には Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いた。

#### 2-2-6 脳内の神経栄養因子の発現量測定

NGF 及び BDNF の発現量は、Mouse NGF 及び BDNF ELISA kit (KA0400, KA0331, and KA0544 respectively, Abnova, Taiwan) を用いてサンドイッチ ELISA 法により評価した。

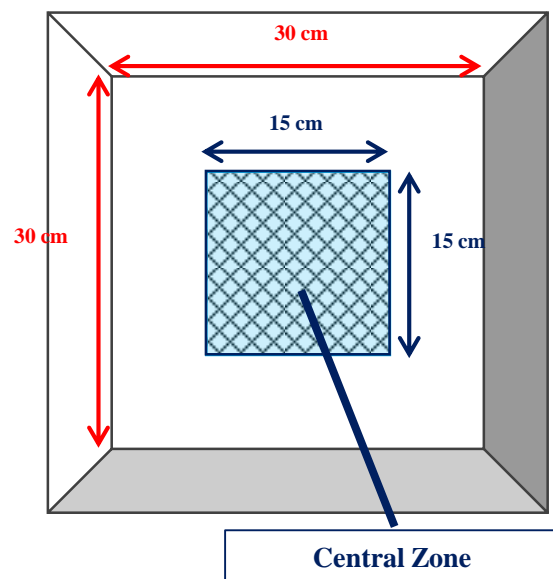
#### 2-2-7 行動試験

##### 2-2-7-1 オープンフィールド試験

試験はプラスチック製の装置 (縦 30 × 横 30 × 高さ 15 × cm) を用いて実験を行った。マウスを装置内に置き、120 分間自由に探索させた。総移動距離を

Ethovision XT (Noldus, Wageningen, The Netherlands) を用いて解析した。また、不安行動の指標となる

中央滞在時間は、Fig. 3 に示す縦 15 × 横 15 cm からなる中央部 (Central Zone) 内での滞在時間を Ethovision XT (Noldus) で算出した。



**Fig. 3 Illustration of open field.**

#### 2-2-7-2 自発運動量試験

自発活動量試験は過去の報告に準じて行った (56)。試験は自発運動データ収録・解析システム装置を用いて行った。赤外ビーム式センサー (NS-AS01; neuroscience, inc., Tokyo, Japan) を飼育ケージに装着し、接続中継ユニット 8 CH (NS-HUB01; neuroscience, inc.) を介して、24 時間の実験環境に対する馴化後、24 時間の自発運動量をデータ収録解析システム (NS-DAS-32; neuroscience, inc.) で測定した。結果は 1 時間毎の運動量としてデータ解析用コンピュータユニット (マルチデジタル 32 ポートカウンタシステム; neuroscience, inc.) を用いて解析した。測定は午後 0 時から翌日の午後 0 時までの 24 時間行った。

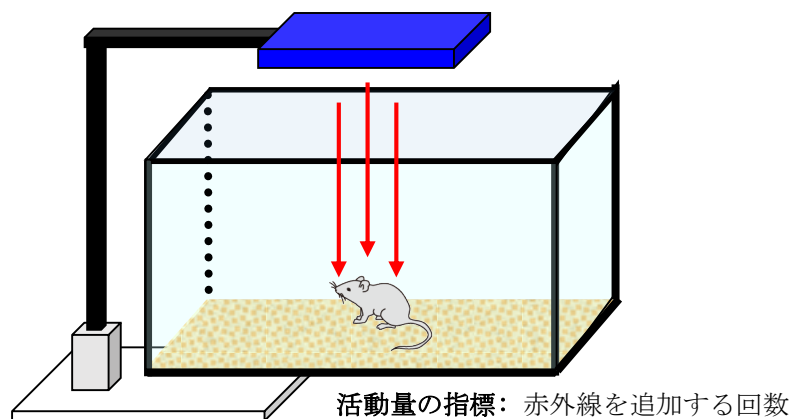


Fig. 4 Illustration of locomotor activity test.

#### 2-2-7-3 Y 字型迷路試験

Y 字型迷路試験は過去の報告を参考にして行った (57)。試験はプラスチック製の異なる 3 つのアームを持つ Y 字型の迷路 (縦 10 × 横 40 × 高さ 12 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。マウスが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した場合を、正常なアームの選択 (alteration) とした。この場合、正常なアームの最大選択数はマウスがアームに入った回数から 2 を引いた数であり、

アームの選択率 (alteration rate) を以下の式により求めた。

Alteration rate = (実際の選択数/最大選択数) × 100。

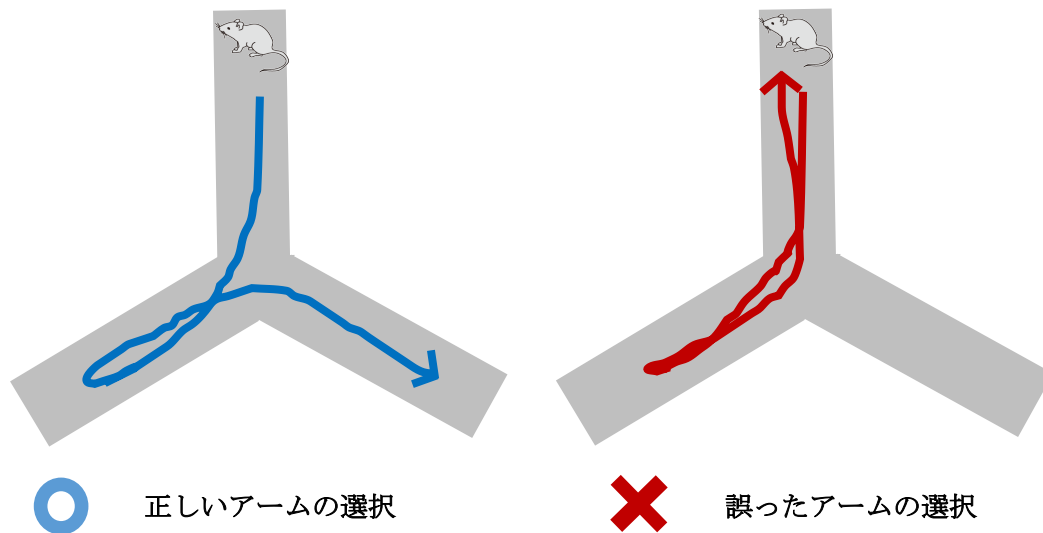
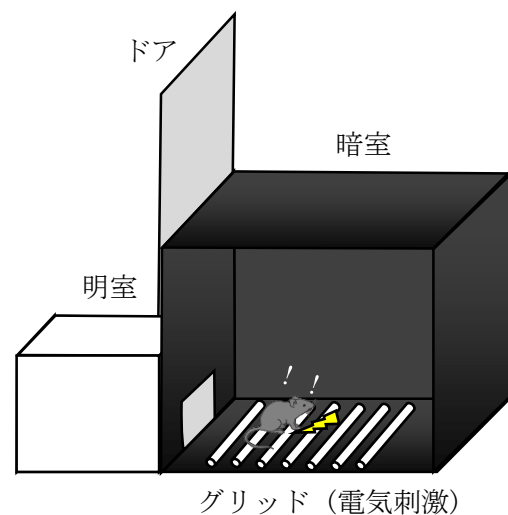


Fig. 5 Illustration of Y-maze test.

#### 2-2-7-4 受動回避試験

本検討は過去の報告に準じて行った (58)。縦 15.5 × 横 9.6 × 高さ 18 cm からなる明箱と縦 32 × 横 32 × 高さ 27 cm からなる暗箱からなる装置を用いた。尚、明箱と暗箱は開閉式のプラスチックのドアによって仕切られており、ドアが開いている際は自由に行き来できる。試験 1 日

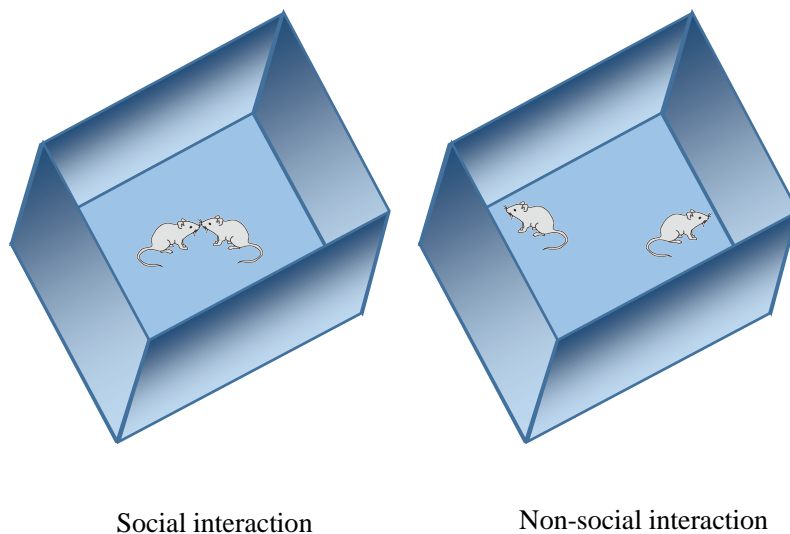


目 (馴化試行) にマウスを明箱に置き 30 秒間、明箱を自由に行動させた。その後ドアを開き、四肢すべてが暗箱に入ったらドアを閉め、暗箱内を 30 秒間自由に行動させた。続いて、試験 2 日目 (訓練試行、試験 1 日目の 24 時間後) は、暗箱に

入った際に電気ショック (0.16 mA, 2 sec) を与える以外は試験 1 日目と同様の  
手続きを行った。さらに、試験 3 日目 (試験試行、試験 2 日目の 24 時間後)  
は、試験 1 日目と同様の手続きを行った。上限を 600 秒とし、マウスが暗箱に  
入るまでの潜時を測定した。

#### 2-2-7-5 社会性行動試験

社会性行動試験は過去の報告を参考にして行った (57)。試験はビデオカメラ  
を設置して行った。2 匹の社会性行動として、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内で 10 分間遭遇させ、2 匹の行動をビデオカメラ  
で撮影した。10 分間の接触時間をカウンターとストップウォッチを用いて測定  
した。解析はマウスの遺伝子型が不明の状態 (盲検下) で行った。



**Fig. 7 Illustration of social interaction test.**

#### 2-2-7-6 尾懸垂試験

尾懸垂試験は、過去の報告を参考にして行った (56)。試験は高さ 50 cm の位  
置に粘着テープを用いてマウスの尾を固定し、マウスを 7 分間つるし、その時

の行動をビデオカメラで撮影した。無動時間は Ethovision XT (Noldus) を用いて解析した。

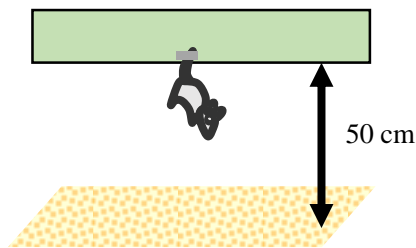


Fig. 8 Illustration of tail suspension test.

#### 2-2-7-7 強制水泳試験

尾懸垂試験は過去の報告を参考にして行った (56)。マウスを水 ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) の入ったシリンダー (直径 14 × 水深 16 cm) に 7 分間浮かべ 3~7 分間の無動時間を測定した。マウスが無抵抗に水に浮かび、水面から顔を出すのに必要な最小限の動き (前肢の動きが停止し、片方の後肢が体勢を保つためにわずかに動いている状態) を「無動」とみなした。解析はマウスの遺伝子型が不明の状態 (盲検下) で行った。

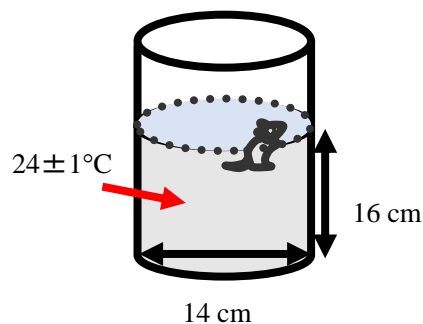


Fig. 9 Illustration of forced swimming test.

#### 2-2-8 統計学的解析

実験成績は平均値  $\pm$  標準誤差 (SEM) で示した。統計学的な比較は、Statistical Package for the Social Sciences 15.0 J for Windows (SPSS Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いて、Student's two-tailed  $t$ -test、paired  $t$ -test 及び Mann–

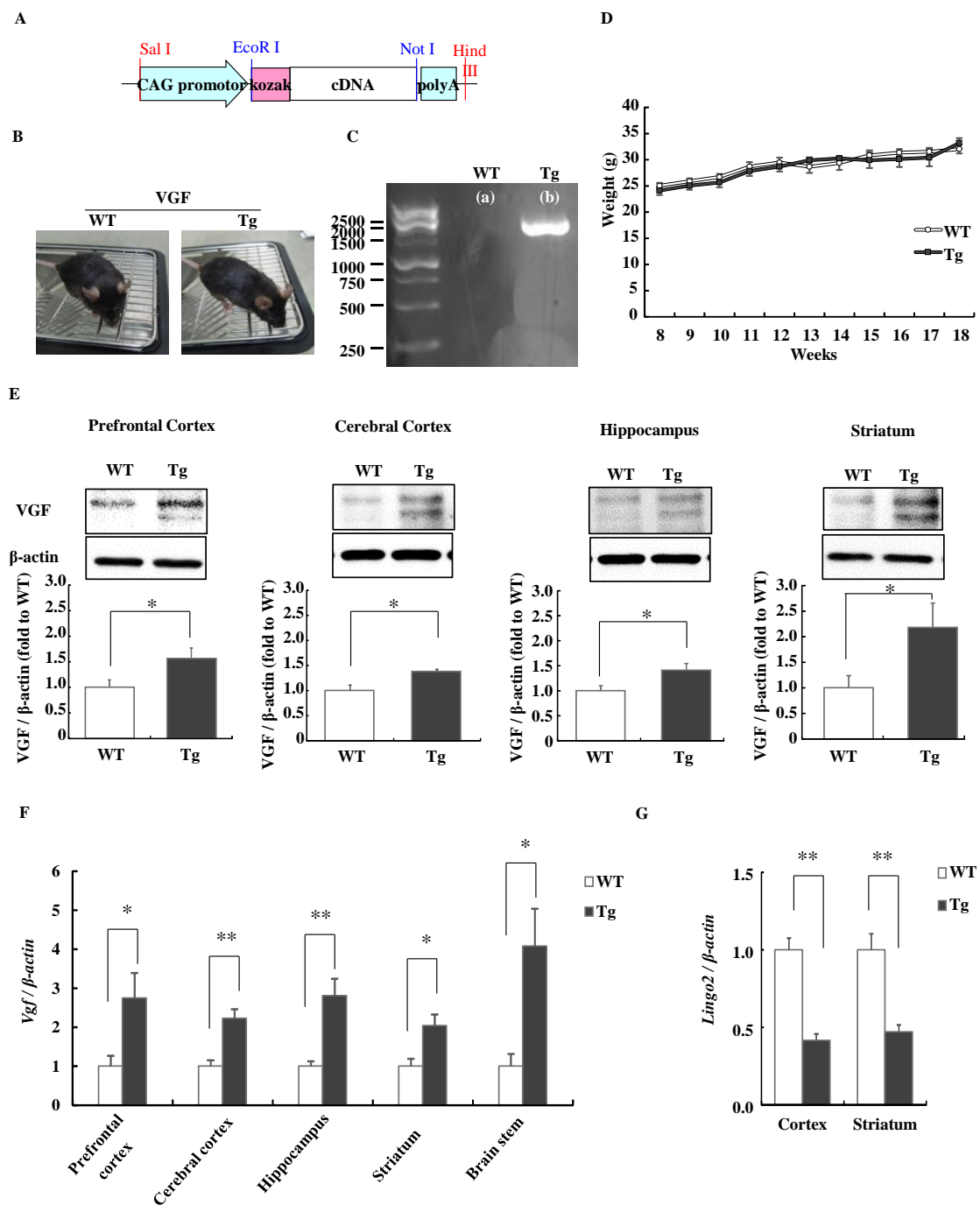
Whitney *U*-test により行った。2 要因の分散分析を Two-way ANOVA with repeated measures を用いて行った。危険率が 5%未満を有意差ありとした。

### 第 3 節 実験成績

#### 3-1 VGF 過剰発現マウスの作製

受精卵前核に導入遺伝子をマイクロインジェクションすることで VGF 過剰発現マウスを作製した (Fig. 10A, B)。導入遺伝子特異的に反応する PCR の結果から VGF 過剰発現マウスの判別を行った (Fig. 10C)。8 から 18 週齢の VGF 過剰発現マウス及び野生型マウスにおいて体重に明らかな差は認められなかった (Fig. 10D)。VGF 過剰発現マウスの VGF タンパク質及び *Vgf* mRNA の発現量を検討するために、ウエスタンブロット及びリアルタイム RT-PCR を行った。

VGF タンパク質及び *Vgf* mRNA の発現量は VGF 過剰発現マウスの種々の脳領域において有意に増加した (Fig. 10E, F)。VGF 過剰発現マウスは 1 つのラインのみの検討である。したがって、本結果に対する導入遺伝子の挿入部位の影響を除外することができない。そこで、導入遺伝子の挿入部位を検討したところ、マウスの 4 番染色体の leucine rich repeat and Ig domain containing 2 (*lingo 2*) の第 2 イントロンであった。VGF 過剰発現マウスにおいて、*Lingo 2* の mRNA の発現量が有意に減少した (Fig. 10G)。



**Fig. 10 Generation of VGF-overexpressing mice.**

(A) Schematic representation of the VGF transgene used to generate VGF-overexpressing mice. (B) Photographs of WT (left) and VGF-overexpressing (right) mice. (C) The VGF transgene is detectable by PCR in only the VGF-overexpressing mice. (D) Comparison of the body weights of WT and VGF-overexpressing mice at 8 to 18 weeks of age. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

Continued on the next page

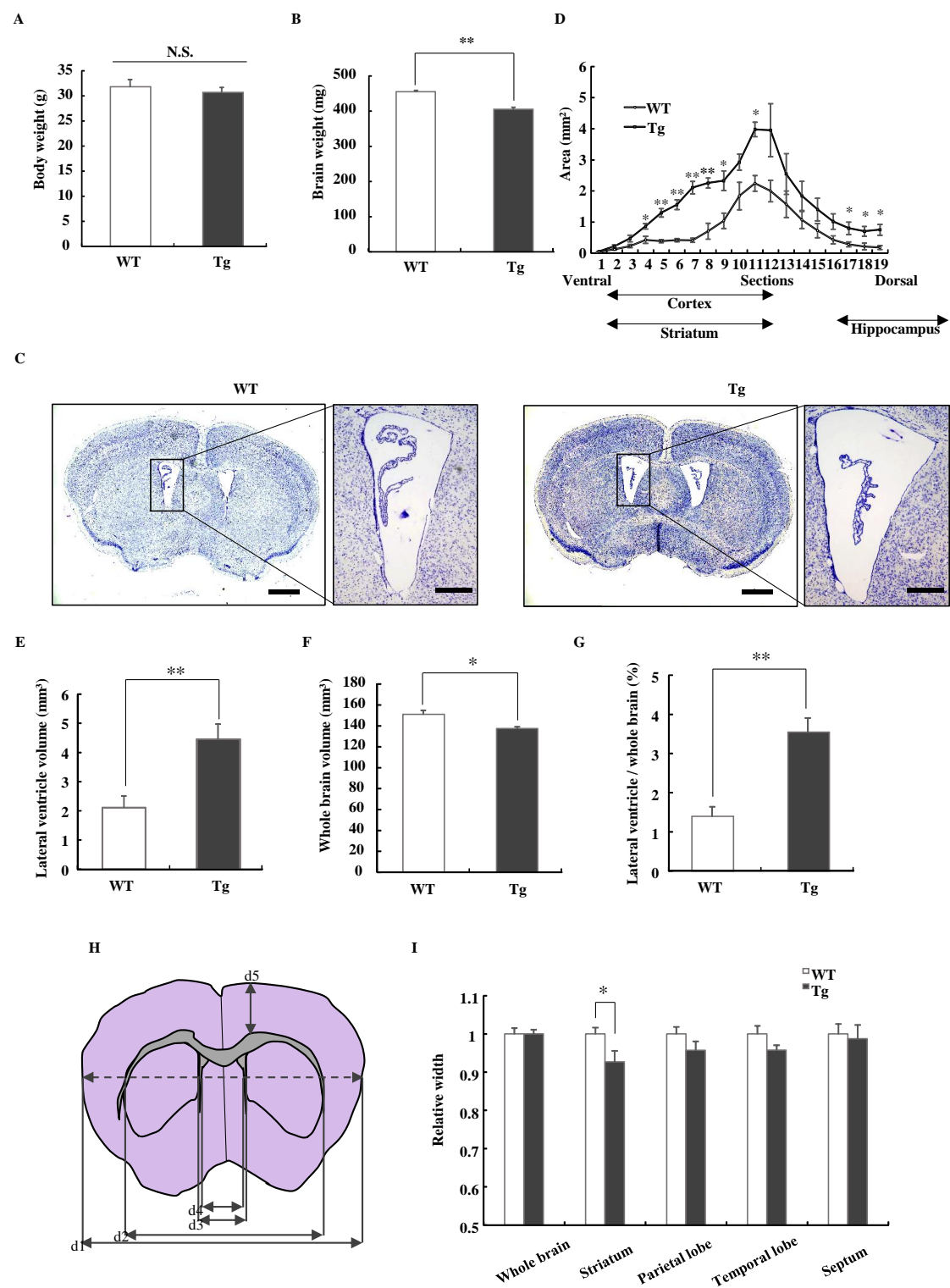


(WT, n = 6; Tg, n = 4). (E) Expression levels of VGF in several brain regions in WT and VGF-overexpressing mice were evaluated by western blotting relative to  $\beta$ -actin levels. Data are expressed as the mean fold difference versus WT mice  $\pm$  SEM. (WT, n = 6; Tg, n = 5). Representative bands from the western blotting of VGF and  $\beta$ -actin are shown at the top. \* $P < 0.05$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). (F) Expression levels of *Vgf* mRNA in several brain regions in WT and VGF-overexpressing mice were evaluated by real-time RT-PCR relative to  $\beta$ -actin levels. Data are expressed as the mean fold difference versus WT mice  $\pm$  SEM. (WT, n = 4; Tg, n = 4). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). (G) Expression levels of *lingo2* mRNA in several brain regions in WT and VGF-overexpressing mice were evaluated by real-time RT-PCR. Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-2 VGF 過剰発現マウスの脳の形態学的変化

本章 3-1 で確立した VGF 過剰発現マウスを用いて脳の組織学的検討を行った。VGF 過剰発現マウスは野生型マウスと比較して、脳重量が有意に低下した (Fig. 11A)。この検討に用いたマウスの体重については、VGF 過剰発現マウス及び野生型マウス間で統計学的な有意差は認められなかった (Fig. 11B)。一方、体重に対する脳重量の比は VGF 過剰発現マウスにおいて減少傾向が認められた ( $P = 0.052$ , data not shown)。さらに、クレシルバイオレット染色を用いて VGF 過剰発現マウスの脳の組織学的評価を行った。野生型マウスと比べ VGF 過剰発現マウスにおいて側脳室体積の有意な増加が認められた (Fig. 11C, D)。また、その拡大は前側の領域において顕著であった (Fig. 11E)。加えて、VGF 過剰発現マウスにおいて全脳の体積の有意な減少及び全脳の体積に対する側脳室の体積の有意な増加が認められた (Fig. 11F, G)。側脳室の拡大は前側の領域において最も顕著であったので、前側に位置する脳領域の組織学的評価を行った。前側の領域において評価を行った部位については Fig. 11H に示している。VGF 過剰発現マウスの線条体の大きさは、野生型マウスと比較して有意に

減少した (Fig. 11I)。一方、皮質と中隔核の大きさに明らかな変化は認められなかった (Fig. 11I)。



**Fig. 11 Histological analysis of WT and VGF-overexpressing mice.**

Body weight (A) and brain weight (B) of adult WT and VGF-overexpressing mice. Data are

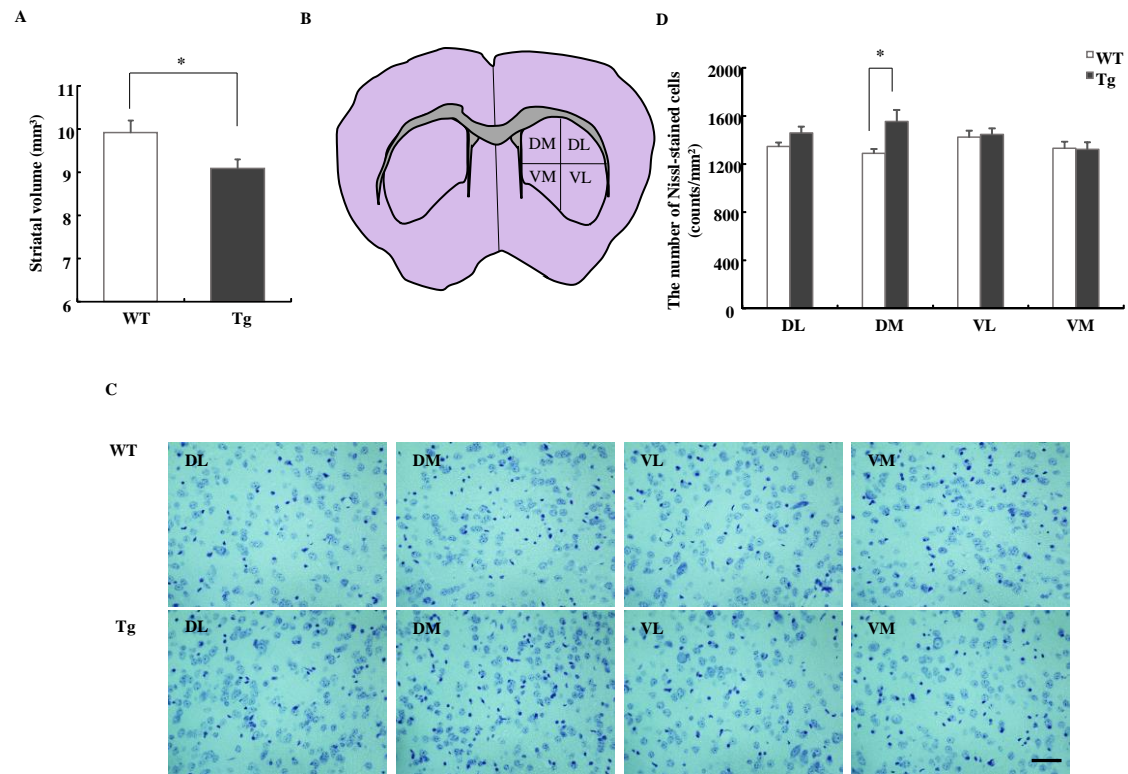
Continued on the next page

expressed as the mean  $\pm$  SEM. (WT,  $n = 10$ ; Tg,  $n = 13$ ),  $^{**}P < 0.01$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). (C) Representative photomicrographs show coronal sections stained with cresyl violet in WT and VGF-overexpressing mice. Scale bar = 1000  $\mu$ m. Right panels show enlargements of the lateral ventricle region. Scale bar = 300  $\mu$ m. (D) The lateral ventricle region in WT and VGF-overexpressing mice is visualized per section in a ventral to dorsal manner. Genotype;  $F(1, 8) = 13.491$ ,  $P < 0.001$ , section;  $F(18, 144) = 32.716$ ,  $P < 0.001$ , genotype  $\times$  section;  $F(18, 144) = 3.223$ ,  $P < 0.001$ , two-way ANOVA with repeated measures. In the same mice as above, the lateral ventricle volume (E), whole brain volume (F), and ratio of lateral ventricle volume to whole brain volume (G) was measured. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (WT,  $n = 5$ ; Tg,  $n = 5$ ),  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). (H) Diagram of the brain section indicates the five regions measured for length using cresyl violet. The width of each brain region was defined as follows: whole brain = d4, striatum = d3 - d2, motor cortex = d5, somatosensory cortex = d4-d3, and septum = d4. (I) Width of the whole brain, striatum, parietal lobe, temporal lobe, and septum of WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (WT,  $n = 11$ ; Tg,  $n = 9$ ),  $^{*}P < 0.05$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-3 VGF 過剰発現マウスの線条体の形態学的変化

本章の 3-2 の結果から、変化が大きく認められた線条体の組織学的評価を詳細に行った。線条体の体積及び細胞密度をクレシルバイオレット染色した脳切片を用いて評価した。VGF 過剰発現マウスにおいて、野生型マウスと比較して線条体の体積が有意に減少した (Fig. 12A)。一方、海馬及び皮質の体積に変化は認められなかった (Fig. 12B, C)。また、線条体の細胞密度の検討においては、線条体は部位毎に別々の皮質に投射していることから、線条体を Fig. 12D のように 4 つの領域に分けて細胞密度の評価を行った (59)。VGF 過剰発現マウスは野生型マウスと比べ、背内側 (dorsal medial: DM) 領域において細胞密度が有意に増加した (Fig. 12D)。その他の領域では変化が認められなかった (Fig. 12D)。また、海馬の CA1、CA3、歯状回 (dentate gyrus: DG) の各領域の細胞密度、海馬及び大脳皮質の体積に変化が認められなかった (Fig. 13)。加えて、線条体のアポトーシスの有無を評価するために、Cleaved-PARP の発現を検討し

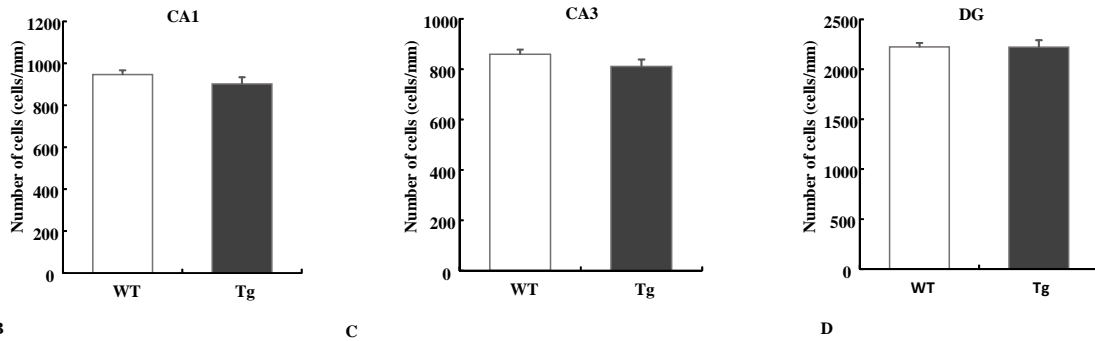
た。VGF 過剰発現マウス及び野生型マウス共に線条体における Cleaved-PARP の発現は認められなかった (Fig. 14)。



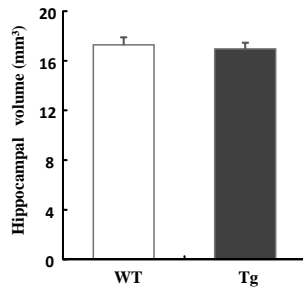
**Fig. 12 Histological analysis of the striatum in WT and VGF-overexpressing mice.**

(A) Striatal volume in WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (WT,  $n = 5$ ; Tg,  $n = 6$ ),  $*P < 0.05$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). (B) Diagram of the striatum indicates the four regions in which cells were counted using cresyl violet. (C) Coronal sections of the striatum were stained with cresyl violet. Representative photomicrographs show coronal sections of four quadrants (DL, DM, VL, and VM) in WT (upper) and VGF-overexpressing (lower) mice. Scale bar = 50  $\mu$ m. (D) The number of Nissl-stained cells was counted for each of the four quadrants. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (WT,  $n = 11$ ; Tg,  $n = 9$ ),  $*P < 0.05$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). DM: dorsal medial, DL: dorsal lateral, Tg: VGF-overexpressing mice, VM: ventral medial, VL: ventral lateral, WT: wild-type.

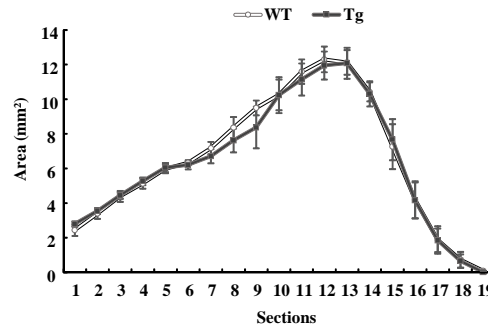
A



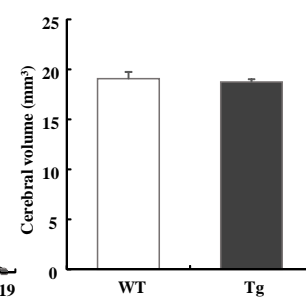
B



C

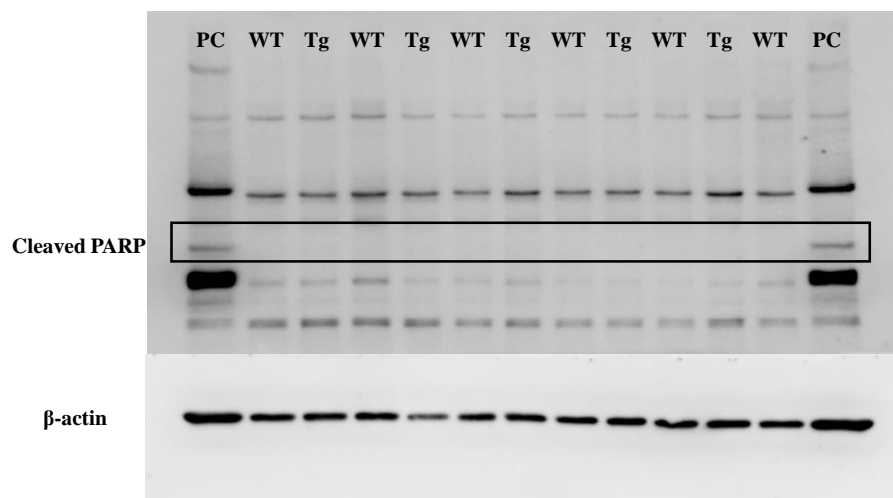


D



**Fig. 13 Histological analysis of the hippocampus and cortex in WT and VGF-overexpressing mice.**

(A-C) Histological analysis of the hippocampus. (A) The number of Nissl-stained cells counted in the CA1, CA3, and DG. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (WT,  $n = 11$ ; Tg,  $n = 9$ ). (B) Hippocampal volume in WT and VGF-overexpressing mice. (C) The hippocampal region of WT and VGF-overexpressing mice is visualized per section in a rostral to caudal manner. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (WT,  $n = 10$ ; Tg,  $n = 9$ ). (D) Cortical volume of WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (WT,  $n = 5$ ; Tg,  $n = 6$ ). DG: dentate gyrus, Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.



**Fig. 14 Western blot analysis of PARP expression in the striatum.**

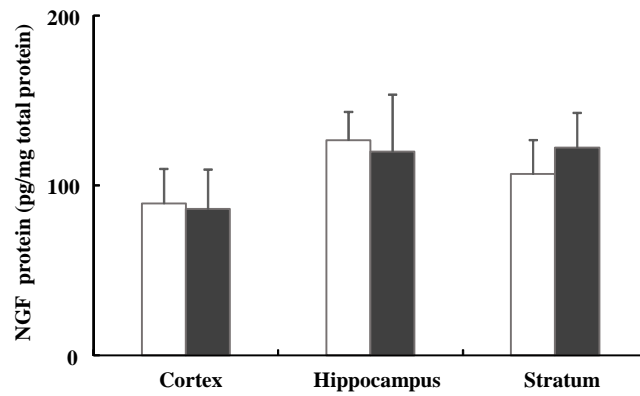
Representative immunoblot showing the PARP expression level. Western blot did not detect cleaved PARP in WT or VGF-overexpressing mice. NB-1RGB cells treated with UV-A (10 J/cm<sup>2</sup>) irradiation is the positive control (both ends of lanes, PC). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-4 VGF 過剰発現マウスの脳内の神経栄養因子の発現量

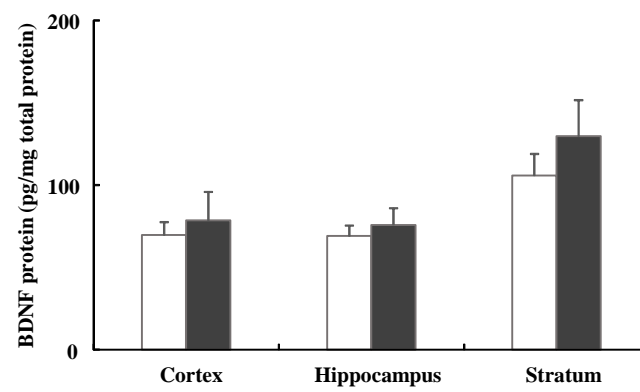
ELISA を用いて脳内の各部位における NGF 及び BDNF の発現量を評価した。VGF 過剰発現マウス及び野生型マウスの間で NGF 及び BDNF の発現量に明らかな変化は認められなかった (Fig. 15A, B)。



A



B



**Fig. 15 Tissue neurotrophic factor levels in brain sections.**

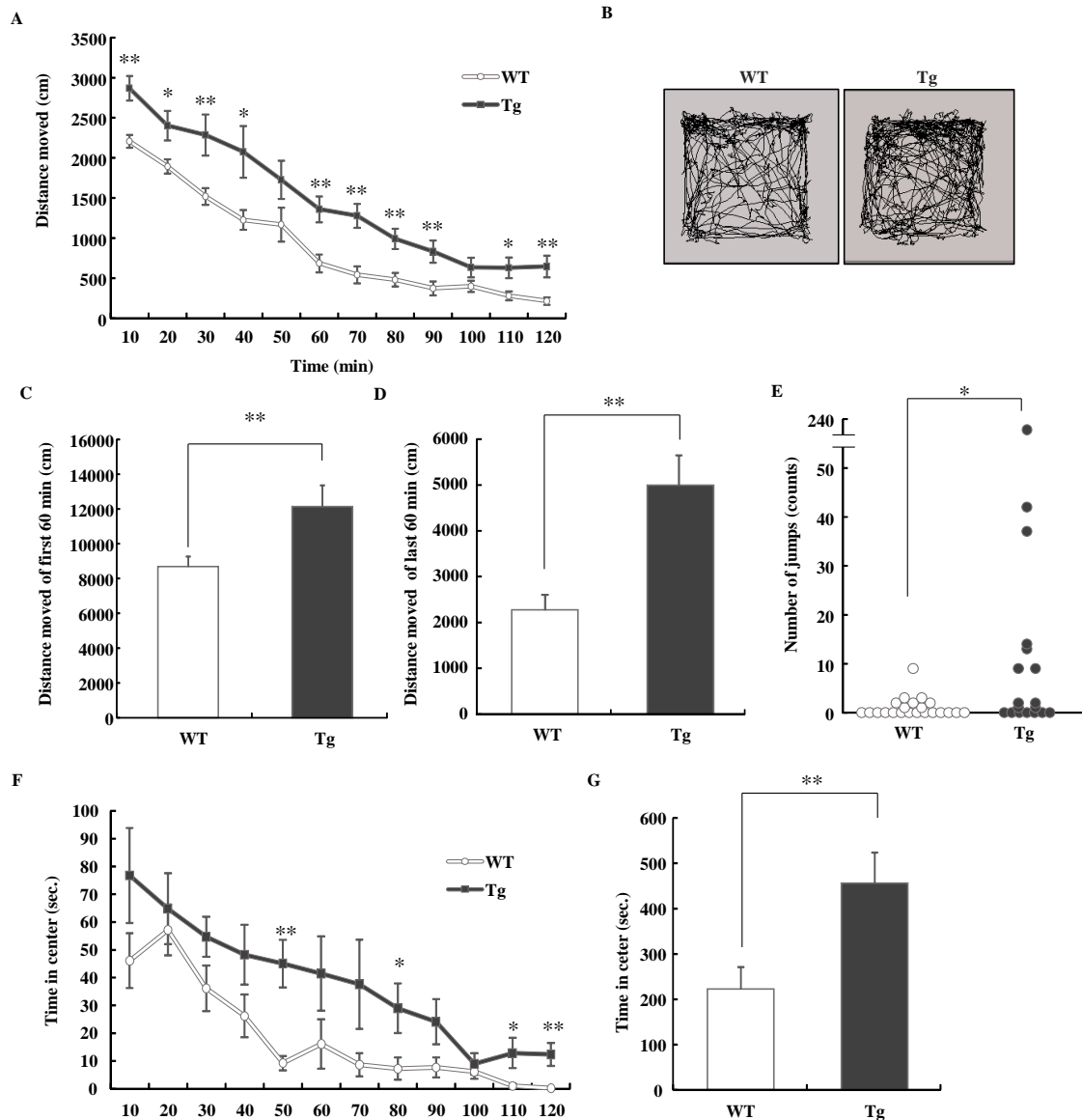
Levels of the neurotrophic factors (A) NGF and (B) BDNF were assayed by enzyme immunoassay (EIA). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (WT, n = 4; Tg, n = 6). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-5 行動試験

#### 3-5-1 オープンフィールド試験

VGF 過剰発現マウスの 120 分間における活動量を測定した。VGF 過剰発現マウスの活動量は、野生型マウスと比較して有意に増加した (Fig. 16A-D)。また、試験中のマウスの行動を観察したところ、異常な頻度の飛び上がり行動が観察された。活動量が豊富な初めの 10 分間において、その回数を測定した。

VGF 過剰発現マウスにおいて活動量の増加に伴い、飛び上がり回数が有意に増加した (Fig. 16E)。オープンフィールド試験における中央滞在時間は、抗不安薬の投与によってその時間が増加することから、不安関連行動の指標として一般的に使用されている (60)。本試験中の VGF 過剰発現マウスの中央滞在時間は、野生型マウスと比較して有意に増加した (Fig. 16F, G)。



**Fig. 16 Open field test.**

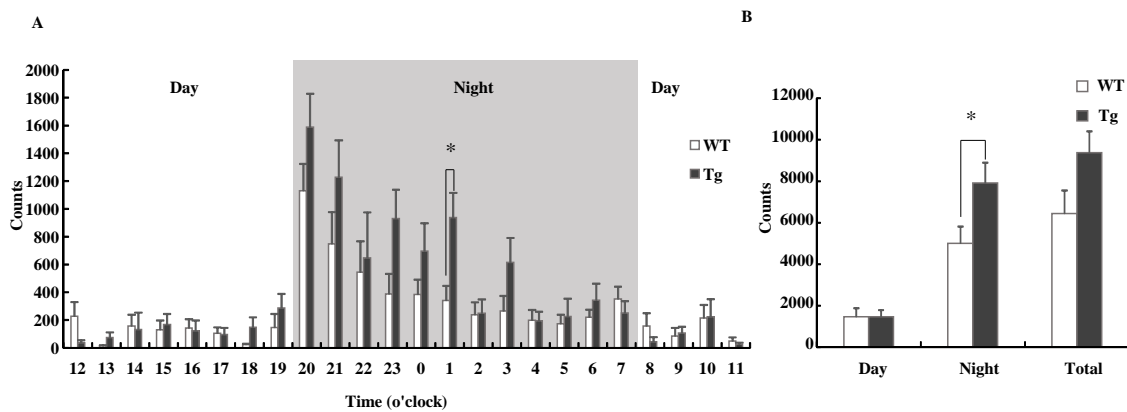
Mice were placed in an open field, and their locomotion was assessed for 120 min. WT ( $n = 22$ ), VGF-overexpressing mice ( $n = 20$ ). (A) Total distance was scored for each 10 min period. Genotype;  $F(1, 40) = 15.524$ ,  $P < 0.001$ , time;  $F(11, 440) = 81.235$ ,  $P < 0.001$ , genotype  $\times$  time;  $F(11, 440) = 1.283$ ,  $P = 0.231$ , two-way ANOVA with repeated measures. (B) Representative images show typical examples of exploring behavior of WT and VGF-overexpressing mice during the first 10 min of the open field test. (C) Total distance of first 60 min ( $t = -3.188$ ,  $df = 40$ ,  $p = 0.003$ ). (D) Total distance during last 60 min. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). (E) The number of jumps during first 10 min of the open field test. Actual number of jumps observed in individual mice. \* $P < 0.05$  vs. WT mice (Mann-Whitney  $U$ -

Continued on the next page

test). (F) Time spent in the center was scored for each 10 min period. Genotype;  $F(1, 40) = 8.108$ ,  $P = 0.007$ , time;  $F(11, 440) = 14.652$ ,  $P < 0.001$ , genotype  $\times$  time;  $F(11, 440) = 0.937$ ,  $P = 0.504$ , two-way ANOVA with repeated measures. (G) Time spent in the center throughout 120 min. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-5-2 自発運動量試験

続いて、新規な環境ではなく、慣れた環境下で VGF 過剰発現マウスの活動量を検討するために自発活動量試験を行った。野生型マウスと比べ、VGF 過剰発現マウスの日中（午前 8 時～午後 8 時）の自発活動量に変化は認められなかったが、夜間（午後 8 時～午前 8 時）の自発活動量は有意に増加した (Fig. 17A, B)。



**Fig. 17 Locomotor activity test.**

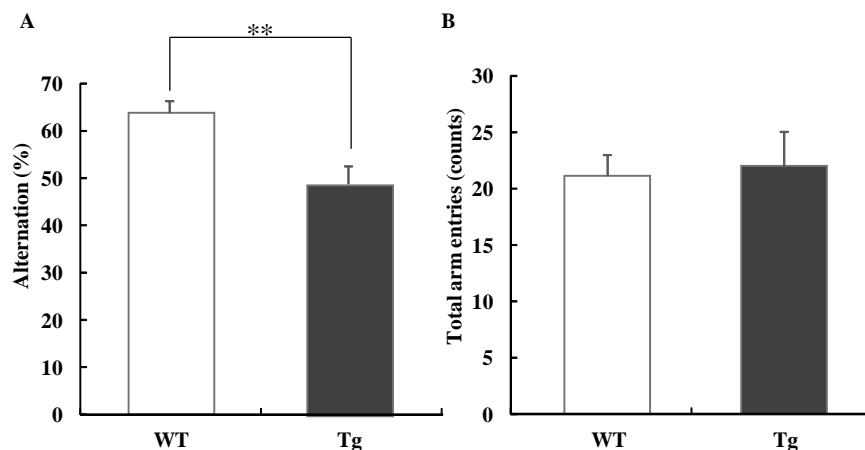
Mice were placed into an open field, and their locomotion was assessed every hour for 1 day after 24 h of acclimatization ( $n = 8$ ). (A) Locomotor activity throughout the 24-h period. Day: genotype;  $F(1, 14) = 0.001$ ,  $P = 0.979$ , time;  $F(11, 154) = 1.431$ ,  $P = 0.164$ , genotype  $\times$  time;  $F(11, 154) = 0.920$ ,  $P = 0.523$ , night: genotype;  $F(1, 14) = 5.112$ ,  $P = 0.040$ , time;  $F(11, 154) = 10.352$ ,  $P < 0.001$ , genotype  $\times$  time;  $F(11, 154) = 1.220$ ,  $P = 0.278$ , total: genotype;  $F(1, 14) = 3.729$ ,  $P = 0.074$ , time;  $F(23, 322) = 14.065$ ,  $P < 0.001$ , genotype  $\times$  time;  $F(23, 322) = 1.569$ ,  $P = 0.049$ , two-way ANOVA with repeated measures. (B) Locomotor activity was analyzed separately during the day and night. Data are

Continued on the next page

expressed as the mean  $\pm$  SEM.  $^*P < 0.05$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-5-3 Y字型迷路試験

マウスは新奇の環境を好む傾向があり、マウスを Y 字型の迷路の一端に置くと、通常は一つ前にいたアームに戻ることなく、3つのアームを順番に探索する習性がある。Y字型迷路試験はこの習性を利用し、ワーキングメモリーを評価する行動試験である (61, 62)。8 分間の探索行動において、VGF 過剰発現マウスは野生型マウスと比較して正常なアームの選択率が有意に低下した (Fig. 18A)。一方、8 分間におけるアームの選択数は野生型マウスと VGF 過剰発現マウス間に変化は認められなかった (Fig. 18B)。

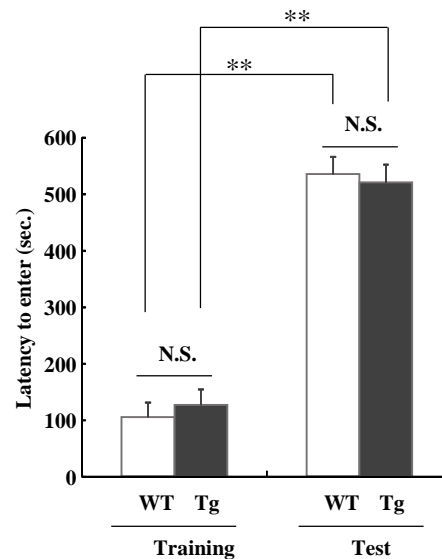


**Fig. 18 Y-maze test.**

WT (n = 22), VGF-overexpressing mice (n = 19). (A) The number of arm entries. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.  $*P < 0.05$  vs. WT mice (Student's *t*-test). (B) The percentage of alternation was calculated as (actual alternations/maximum alternations)  $\times$  100. Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

#### 3-5-4 受動回避試験

受動回避試験を用いて VGF 過剰発現マウスの恐怖記憶を評価した。試験 2 日目 (訓練試行: Training) において、野生型マウスと VGF 過剰発現マウス間で暗箱に入るまでの時間に変化は認められなかった (Fig. 19)。また、試験 3 日目 (試験試行: Test) において、野生型マウス及び VGF 過剰発現マウス共に暗箱に入る時間が有意に増加した (Fig. 19)。しかし、実験 3 日目においても実験 2 日目と同様に野生型マウスと VGF 過剰発現マウス間で暗箱に入るまでの時間に変化は認められなかった (Fig. 19)。



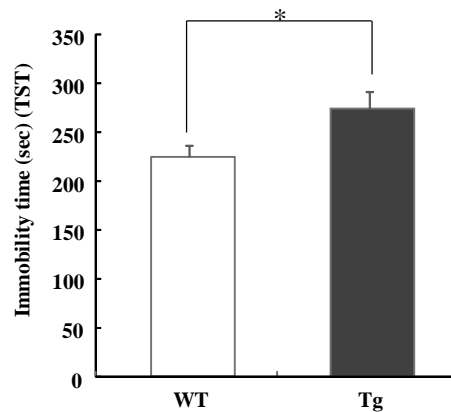
**Fig. 19 Passive avoidance test.**

WT (n = 22), VGF-overexpressing mice (n = 20). Latency to enter the dark compartment in WT and VGF-overexpressing mice at training and test session. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

\*\* $P < 0.01$  vs. training session (paired  $t$ -test). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-5-5 尾懸垂試験

マウスの尾を固定し、逆さに吊ると、一定時間の逃避行動の後、動作をせずぶら下がっている状態（無動行動）を示す。既存の抗うつ薬が無動行動を抑制することから、無動時間は抑うつ行動の指標として用いられている。VGF 過剰発現マウスの抑うつ行動の程度を評価するために、本試験では尾を固定し、マウスを 7 分間吊るした状態で無動時間を測定した。VGF 過剰発現マウスは 7 分間の無動時間が野生型マウスと比較して有意に増加した (Fig. 20)。



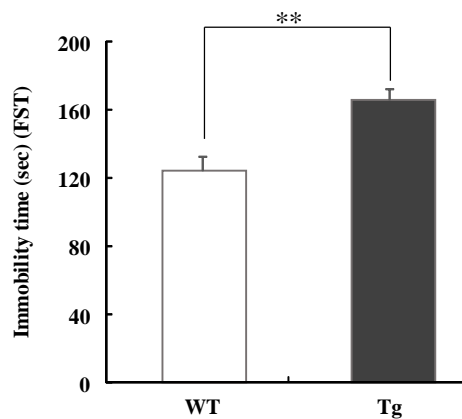
**Fig. 20 Tail-suspension test.**

WT (n = 20), VGF-overexpressing mice (n = 19). Immobile time of tail suspension test. Mice were tail suspended with an adhesive tape 50 cm above the floor for 7 min, and immobile time was measured. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $p$  < 0.05 vs. WT mice (Student's *t*-test). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.



### 3-5-6 強制水泳試験

本試験は、1977 年に Porsolt らによって開発された抑うつ行動の評価を行うことができる行動試験である (63)。マウスを足のつかない水の中に入れると水面上に頭だけを出し浮いている状態（無動行動）を示す。尾懸垂試験と同様にこの行動は既存の抗うつ薬によって抑制される。尾懸垂試験の結果をより強く支持するために強制水泳試験によっても無動時間を測定し、VGF 過剰発現マウスの抑うつ行動の程度を評価した。野生型マウスと比較して、VGF 過剰発現マウスの 3～7 分間における無動時間が有意に増加した (Fig. 21)。

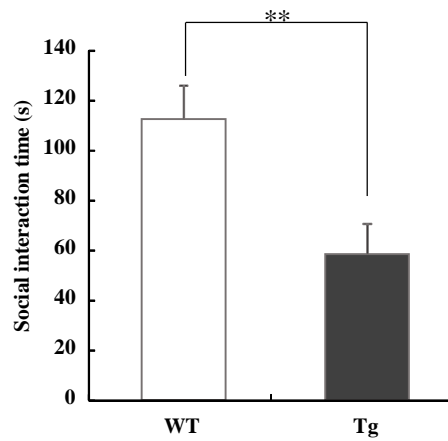


**Fig. 21 Forced swimming test.**

WT (n = 22), VGF-overexpressing mice (n = 20). Immobile time of forced swimming test. Mice were placed in water for a period of 7 min; only the last 4 min immobility time was measured. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$  vs. WT mice (Student's *t*-test). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-5-7 社会性行動試験

マウスの 10 分間における社会性行動を測定した。VGF 過剰発現マウスの試験中の総接触時間が野生型マウスと比較して有意に減少した (Fig. 22)。



**Fig. 22 Social interaction test.**

WT (n = 9), VGF-overexpressing mice (n = 8). Social interaction time measured for 10 min. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$  vs. WT mice (Student's *t*-test). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

#### 第4節 考察

VGF の発現増加は、統合失調症及びうつ病の患者において報告されている (48)。本章では、VGF 過剰発現マウスを作製し、VGF の発現増加が精神行動及び脳の構造に及ぼす影響を検討した。VGF 過剰発現マウスは生存可能であり、VGF 欠損マウスと異なり交配が可能であった (64)。しかし、本研究室で作製した VGF 過剰発現マウスは 6 ラインだったが、3 つのラインは繁殖に問題があり、2 ラインは十分な VGF の過剰発現が認められないため、最終的に得られた VGF 過剰発現マウスは 1 ラインのみであった。したがって、VGF は生存または生殖に関与し、VGF の発現レベルの程度が生存能力に影響を及ぼす可能性が考えられる。また、得られた VGF 過剰発現マウスと野生型マウスとの間で外見上の明らかな違い及び体重に変化は認められないが、脳重量が有意に減少した。VGF は神経の発生に重要な因子である Erk、Akt 及び GSK3 $\beta$  のリン酸化を促進することが報告されており、VGF はこれらの因子を介して脳の形成に寄与する可能性が考えられる (50, 65)。

側脳室の拡大、全脳及び線条体の体積の減少及び線条体の細胞密度の増加等の脳の形態学的な異常が VGF 過剰発現マウスにおいて認められた。しかし、大脳皮質及び海馬に形態学的な異常は認められなかった。脳の萎縮と関連することが知られている側脳室の拡大は、海馬が存在する後側に比し、線条体が存在する前側において顕著であることから、VGF 過剰発現マウスの側脳室の拡大は線条体の萎縮に関連している可能性が示唆された。加えて、VGF 過剰発現マウスは線条体において形態学的な異常が認められたにも拘わらず、アポトーシスマーカーである Cleaved-PARP の発現は認められなかった。過去の報告から、アポトーシスに伴う脳の萎縮には Cleaved-PARP が増加することから (66)、VGF 過剰発現マウスの線条体では、強いアポトーシスは認められないこ

とが示唆された。統合失調症の患者の前頭前皮質において皮質の厚さの減少及び細胞密度の増加が認められており、この現象には細胞の大きさ自体が減少していることが推察されている (67, 68)。VGF 過剰発現マウスの線条体においても同様の異常が認められる可能性がある。

また、VGF 過剰発現マウスが、精神疾患のモデルマウスとして表面妥当性を満たすか否かを検討するために、諸種の行動試験を行った。VGF 過剰発現マウスは新奇環境及びホームケージにおいて過活動を示した。加えて、VGF 過剰発現マウスは中央滞在時間が有意に増加しており、不安が低下している可能性が考えられる。また、Y 字型迷路試験において VGF 過剰発現マウスはワーキングメモリー (作業記憶) に障害が認められた。活動量及びワーキングメモリーは線条体を含むいくつかの脳領域に関連している (69, 70)。それ故に、VGF 過剰発現マウスが示した上記の行動異常には線条体の異常が寄与している可能性が示唆された。統合失調症モデルマウスにおいても、VGF 過剰発現マウスが示した過活動とワーキングメモリーの異常が認められることから、VGF の発現増加は統合失調症において関連が認められる行動異常に関与する可能性が示唆された (71-74)。

尾懸垂試験や強制水泳試験における無動時間は、抗うつ薬の投与によってその時間が減少するため、一般的にうつ様行動の指標として動物モデルで用いられている (56)。一方、同様の行動異常は、統合失調症の陰性症状とも関連しており、*N*-メチル-*D*-アスパラギン酸 (*N*-methyl-*D*-aspartate: NMDA) 受容体拮抗薬であるフェンシクリジン (Phencyclidine: PCP) 投与による統合失調症モデルマウス等で認められる (75, 76)。また、社会性の異常は、うつ病及び統合失調症のモデルマウスにおいて認められ、統合失調症の陰性症状に関連していることが報告されている (77-79)。したがって、VGF 過剰発現マウスは、うつ病や

統合失調症病態に関連した行動異常を示す動物と考えられる (Fig. 23)。以上より、今回作製した VGF 過剰発現マウスは、構成妥当性を満たすうつ病及び統合失調症に関連した行動異常を示し、表面妥当性も満たすモデルマウスであることが示唆された。

検討項目	VGF 過剰発現マウス	統合失調症 モデルマウス	うつ病 モデルマウス
活動量	↑	↑ (71-73)	—
作業記憶	↓	↓ (74, 80)	↓ (81, 82)
うつ様行動	↑	↑ (75, 76)	↑ (81, 83, 84)
社会性	↓	↓ (77, 78)	↓ (79, 81)

↑：増加、↓：減少、障害、—：一定の見解が得られていない

**Fig. 23 The summary of behavioral changes in VGF-overexpressing mice.**

VGF 欠損マウスは、VGF 過剰発現マウスと同様にうつ様行動の増加及び記憶障害を示す (38, 39)。したがって、VGF の活性低下及び活性減少は共通した行動異常を示すことが明らかになった。このことは、VGF 欠損マウス及び VGF 過剰発現マウスの共通の行動異常の上流に存在する分子メカニズムを理解することが極めて重要であることを示唆している。また、BDNF の機能低下及び機能向上を示すマウスが共通した行動異常を示すことが報告されている (85, 86)。BDNF に関しては、その欠損及び過剰発現する脳領域の部位が重要である。たとえば、海馬の BDNF の欠損はうつ様行動を増加させるが、一方で側坐核に投射する腹側被蓋野の BDNF の欠損はうつ様行動を減少させる (87, 88)。さらに、近年 VGF に関しても同様に海馬と側坐核では、VGF の欠損及び過剰発現が逆の行動異常を引き起こすことが報告された (89)。したがって、BDNF と同様に VGF もその欠損及び過剰発現する脳部位に依存して行動異常を示す可能性が考えられる。

前述のように、当研究室で作製できた VGF 過剰発現マウスは 1 ラインのみである。その結果、挿入部位の遺伝子の変動が及ぼす影響を排除できない。それ故、挿入部位の同定を行ったところマウスの 4 番染色体の *Lingo2* 遺伝子の 2 番イントロンに挿入されており、*Lingo2* の発現量が半減していることが明らかになった。*Lingo2* の遺伝子の変異は、ヒトにおいて本態性震戦及びパーキンソン病に関与することが報告されている (90, 91)。しかし、この遺伝子の生理的な機能に関する報告はない。本研究で得た VGF 過剰発現マウスの結果は、*Lingo2* の遺伝子異常ではなく VGF の発現増加に起因すると考えている。その理由として、①振戦を示す遺伝子改変マウスと同様の振戦が VGF 過剰発現マウスにおいて認められないこと、②黒質-線条体の神経細胞死がパーキンソン病病態において認められるが、VGF 過剰発現マウスの線条体においてアポトーシスマーカーである Cleaved-PARP の発現が WT マウスと同程度であることを想定している (92, 93)。しかし、本マウスの *Lingo2* の遺伝子異常の寄与を除外することは完全にはできないため、今後の研究において、神経細胞またはグリア細胞のプロモーターを用いたノックインマウスを作製し、*Lingo2* の遺伝子異常の寄与の除外に加えて、どの細胞種の VGF の過剰発現が行動異常に寄与するかを明らかにする必要がある。

以上、本章では VGF 過剰発現マウスは統合失調症やうつ病に関連した行動異常及び脳の形態学的な異常を示すことを明らかにした。この結果から、VGF の発現増加は精神疾患の病態及び脳の発達に関与しており、この遺伝子改変マウスは精神疾患のモデルマウスとして有用である可能性が示唆された。統合失調症患者で VGF の発現が増加するだけでなく、VGF が存在する遺伝子座と統合失調症との関連があることが連鎖解析によって報告されている。しかし、臨床的な報告はあるものの、VGF の発現増加が統合失調症病態にどのよう

に寄与するかその詳細なメカニズムについては未だ明らかになっていない。第2章では、VGFの発現量を増加させた際の統合失調症の病態メカニズムへの寄与を直接的に明らかにすべく、VGF過剰発現マウスの統合失調症のエンドフェノタイプとして最もよく用いられる指標の一つであるプレパルスインヒビションを検討した。加えて、VGF過剰発現マウスが統合失調症モデルマウスとしての予測妥当性を満たすか否かを明らかにするために過活動に対する抗精神病薬の作用を検討した。

## 第2章 統合失調症病態における VGF の発現増加の関与

### 第1節 緒言

統合失調症は、世界中の約1%が罹患する精神疾患である (94)。この疾患の症状は、幻覚や妄想を含む陽性症状と感情の鈍麻、平板化や意欲の減退を含む陰性症状、注意力の低下を含む認知機能障害に分けられる (95)。陽性症状は、抗精神病薬によって治療効果を得やすいが、陰性症状は薬物療法の効果が少なく、さらなる治療薬の開発が望まれている。

統合失調症は、薬理学的研究、遺伝学的研究、脳画像・生理学的研究及び死後脳研究から種々の病態仮説が提唱されている。中でも代表的なものとして、ドパミン仮説やグルタミン酸仮説等が挙げられる。ドパミン仮説は、初めての抗精神病薬であるクロルプロマジンの発見を契機に開発された多数の抗精神病薬の臨床用量とドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断活性が相関することから提唱された (96)。現在の統合失調症の治療薬の大半は、ドパミン仮説に基づいており、ドパミン仮説に関連した薬理学的、遺伝学的動物モデルが病態研究に用いられている (97-99)。しかし、ドパミン仮説は抗精神病薬が効果を示さない陰性症状及び認知機能障害の発症機序を説明できず、未だ問題点が多く存在する。一方、グルタミン酸仮説は、幻覚薬であるフェンシクリジン (Phencyclidine: PCP) が、陽性症状だけでなく陰性症状に類似した症状も引き起こし、その作用点が NMDA 型グルタミン酸受容体を阻害することから提唱された (100)。この発見を受けて、NMDA のサブユニットの欠損マウスを用いた研究が行われた。これらのマウスが統合失調症様の行動異常を呈することから、本病態仮説の正当性が高まった (101, 102)。また、NMDA 受容体のグリシン結合部位に結合しグルタミン酸シグナルを賦活する D-セリンは、臨床的及び実験的に統合失調症の主症状を改善したことから新規治療薬候補として期待されている (103, 104)。し



かし、統合失調症患者で、細胞外グルタミン酸濃度が増加していることやグルタミン酸の放出を抑制する代謝型グルタミン酸受容体 mGluR2/3 のアゴニストが統合失調症に有用であることを示唆した報告等、統合失調症では脳内でグルタミン酸濃度が増加していることも示唆されており、一致した見解が得られていない (105)。以上から、これまでの病態仮説では疾患を完全に説明できず、新規治療薬開発のために更なる病態発症機序の解明が必要である。

一卵性双生児の片方が統合失調症である場合、もう一方の双子がおよそ 80% の確率で発症することから、統合失調症の危険因子の一つとして遺伝的要因が考えられている (106)。このような背景から、統合失調症においても、序論で述べた遺伝子連鎖解析や GWAS を用いた研究が行われている。Disrupted-in-schizophrenia-1 (DISC1)、ニューレグリン 1、ディスバインディン等の有力な候補遺伝子、22q11、1q21.1 及び 15q13.3 等、頻度は低いが高いオッズ比を示すコピー数多型が発見された (107-111)。しかし、未だ病態形成の主要因といえる遺伝子は同定されていないため更なる研究が求められる。

VGF と統合失調症に関する臨床的報告として、統合失調症患者の脳脊髄液と前頭前皮質において VGF の発現量が増加していることや VGF 遺伝子が存在する 7q22.1 の複製型のコピー数多型が挙げられる (46-48)。加えて、統合失調症を頻発する家系の遺伝子連鎖解析からも 7q22 と統合失調症の関連が報告されている (49)。以上より、VGF の発現増加が、統合失調症の病態に関与している可能性が考えられる。しかし、臨床的な報告はあるものの、VGF の発現増加が統合失調症病態にどのように寄与するかその詳細なメカニズムは未だ明らかではない。第 1 章で、VGF の発現を増加させた VGF 過剰発現マウスにおいて、統合失調症の患者で認められる様な行動異常と脳の組織学的異常が認められることを明らかにした。しかし、VGF 過剰発現マウスが統合失調症の患者及び代

表的なモデルマウスで見られるプレパルスインヒビションの異常を示すか否かについては不明である。さらに、抗精神病薬によって VGF 過剰発現マウスの示す行動異常が改善されるかについても未だ不明である。

本章では、VGF の発現量を増加させた際の統合失調症の病態メカニズムへの寄与を直接的に明らかにすべく、VGF 過剰発現マウスの統合失調症のエンドフェノタイプとして最もよく用いられる指標の一つであるプレパルスインヒビションを検討した。加えて、VGF 過剰発現マウスが統合失調症モデルマウスとしての予測妥当性を満たすか否かを明らかにするために VGF 過剰発現マウスの過活動に対する抗精神病薬の作用を検討した。

## 第 2 節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。

Proteinase K は Qiagen (Venlo, Netherland)、オランザピン、ハロペリドール、SDS、酢酸アンモニウム、エタノール、Agarose S は Wako (Osaka, Japan)、EDTA は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Tris Borate EDTA (TBE) は Takara (Shiga, Japan)、DNA ladder は Nippon genetics (Tokyo, Japan)、生理食塩水は Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)、Tris-HCl、2-プロパノール、dimethyl sulfoxide (DMSO) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、Blend Taq<sup>®</sup> -Plus-は 東洋紡 (Osaka, Japan) よりそれぞれ購入した。

### 2-2 実験方法

#### 2-2-1 実験動物

VGF 過剰発現マウスは第 1 章で示した動物を用いた。すべてのマウス (11-20

週齢、雄性) は設定温度: 24°C (範囲: 22-26°C)、設定湿度: 55% (範囲: 40-70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00-午後 8:00) に維持された岐阜大学医学部生命科学棟 4 階または本学 6 階動物飼育室で飼育した。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm または、縦 36.9 × 横 15.6 × 高さ 13.2 cm) を用い、自由給水下に固形飼料 (CE-2; CREA) にて飼育した。行動試験はすべて午前 9:00 から午後 8:00 の間に行った。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。また、遺伝子改変動物は、岐阜薬科大学生命倫理・バイオセーフティー委員会に遺伝子組み換え実験申請を行い、許可を得て使用した。

#### 2-2-2 マウスジェノタイピング

マウスジェノタイピングは第 1 章 2-2-2-2 に準じて行った。

#### 2-2-3 行動試験

##### 2-2-3-1 プレパルスインヒビション試験

プレパルスインヒビションは、刺激を与える前に弱い刺激が先行することにより刺激に対する反応が抑制される現象を指す (Fig. 24)。プレパルスインヒビション試験は、小動物用驚愕反応測定装置 (SR-LAB; San Diego Instrument, CA, USA) を用いて過去の報告に準じて行った (112)。本装置は、防音箱内に振動センサーのついた保定シリンダー及び音刺激を付加するためのスピーカー部位と制御用コンピューター部位からなる。測定開始前に、マウスを測定装置に入れ 5 分間馴化させた。聴覚による驚愕反応におけるプレパルスインヒビションの測定において、マウスに 6 刺激からなる一連の刺激を与えた。この刺激には、a) 無刺激、b) 80 dB (prepulse のみ)、c) 120 dB (pulse のみ)、d) 73 dB の

prepulse + 120 dB、e) 76 dB の prepulse + 120 dB、f) 82 dB の prepulse + 120 dB が含まれる。Pulse のみの際の驚愕反応と prepulse を与えた後の pulse に対する驚愕反応の差をプレパルスインヒビション (Delta PPI) と定義した。Pulse は 40 ms、prepulse は 20 ms の持続時間である。Pulse と prepulse の開始時間の差は 100 ms である。マウスに上記の一連の刺激を 1 ブロックとして計 6 ブロック与えた。各トライアル間の時間は可変的であり、平均 30 s に設定した (20 s から 40 s の範囲)。最

初の 1 ブロックは変動しやすいため、それ以外の 5 ブロックの驚愕反応の平均をプレパルスインヒビションの算出に用いた。

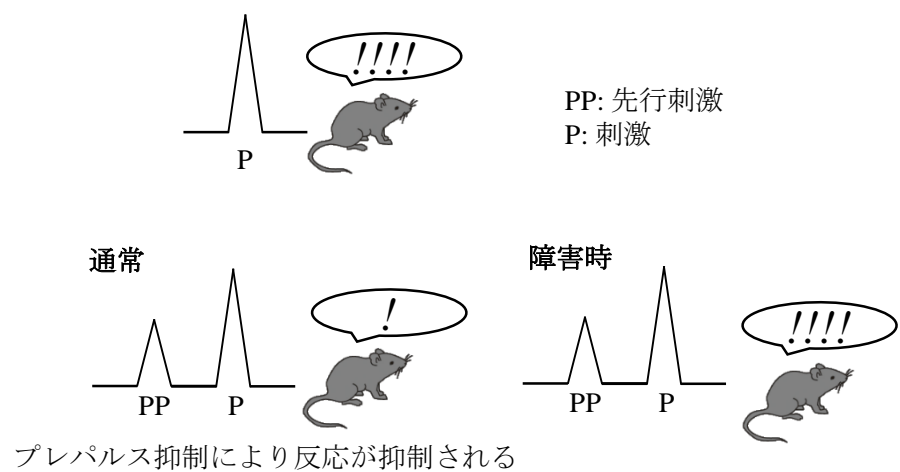


Fig. 24 Illustration of prepulse inhibition.

### 2-2-2-2 オープンフィールド試験

オープンフィールド試験は第 1 章の方法に準じた。オランザピンとハロペリドールの作用を検討するために、オランザピン (1 mg/kg/day; Wako, Osaka, Japan) とハロペリドール (0.2 mg/kg/day; Wako) は 1%DMSO 含有生理食塩水に溶解し、1 日 1 回 15 日間、10 mL/kg で腹腔内投与した。投与用量及び投与期間

の設定は過去の報告を元に行った。最終投与から 30 分後に行動試験を行った。

#### 2-2-2-3 カタレプシー測定

本検討は過去の報告に準じて行った (113)。マウスにハロペリドール (0.2 mg/kg/day) または溶媒である 1%DMSO 含有生理食塩水を 10 mL/kg で 1 日 1 回、7 日間、腹腔内投与した。投与 1 日目及び 7 日目の投与 90 分後にカタレプシー保持時間を測定した。カタレプシーは、3.5 cm の高さに地面と水平に設置した直径 0.3 cm の棒にマウスの前肢をおき、前足が棒から離れるまでの時間を、ストップウォッチを用いて計測した。カタレプシーの保持時間の最大は 2 分間とした。この試行を 3 回繰り返し、その平均をカタレプシー保持時間とした。

#### 2-2-4 統計学的解析

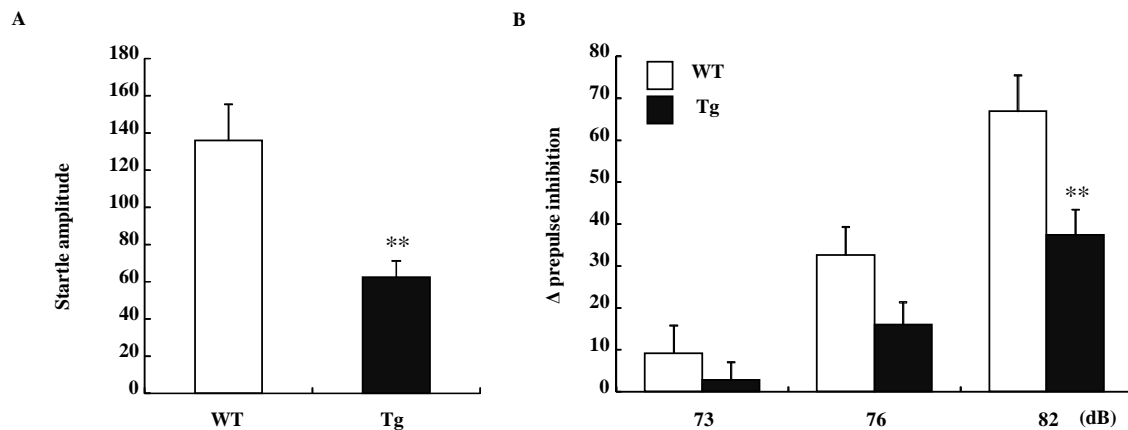
実験成績は平均値  $\pm$  標準誤差 (SEM) で示した。統計学的な比較は、SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて、Student's two-tailed *t*-test、paired *t*-test 及び Mann-Whitney *U*-test により行った。2 要因の分散分析を Two-way ANOVA with genotype and drugs as between-subject variables と Two-way ANOVA with repeated measures を用いて行った。危険率が 5%未満を有意差ありとした。

### 第 3 節 実験成績

#### 3-1 プレパルスインヒビション試験における検討

ヒト及びげっ歯類においてプレパルスインヒビションの異常は統合失調症の中間表現型として知られている。VGF 過剰発現マウスのプレパルスインヒビシ

ョンの評価を行うために、聴覚刺激を用いたプレパルスインヒビション試験を行った。VGF 過剰発現マウスは 120 dB の聴覚刺激の反応性が減少した (Fig. 25A)。さらに、VGF 過剰発現マウスは 82 dB をプレパルスに用いた際にプレパルスインヒビションが有意に減少した (Fig. 25B)。



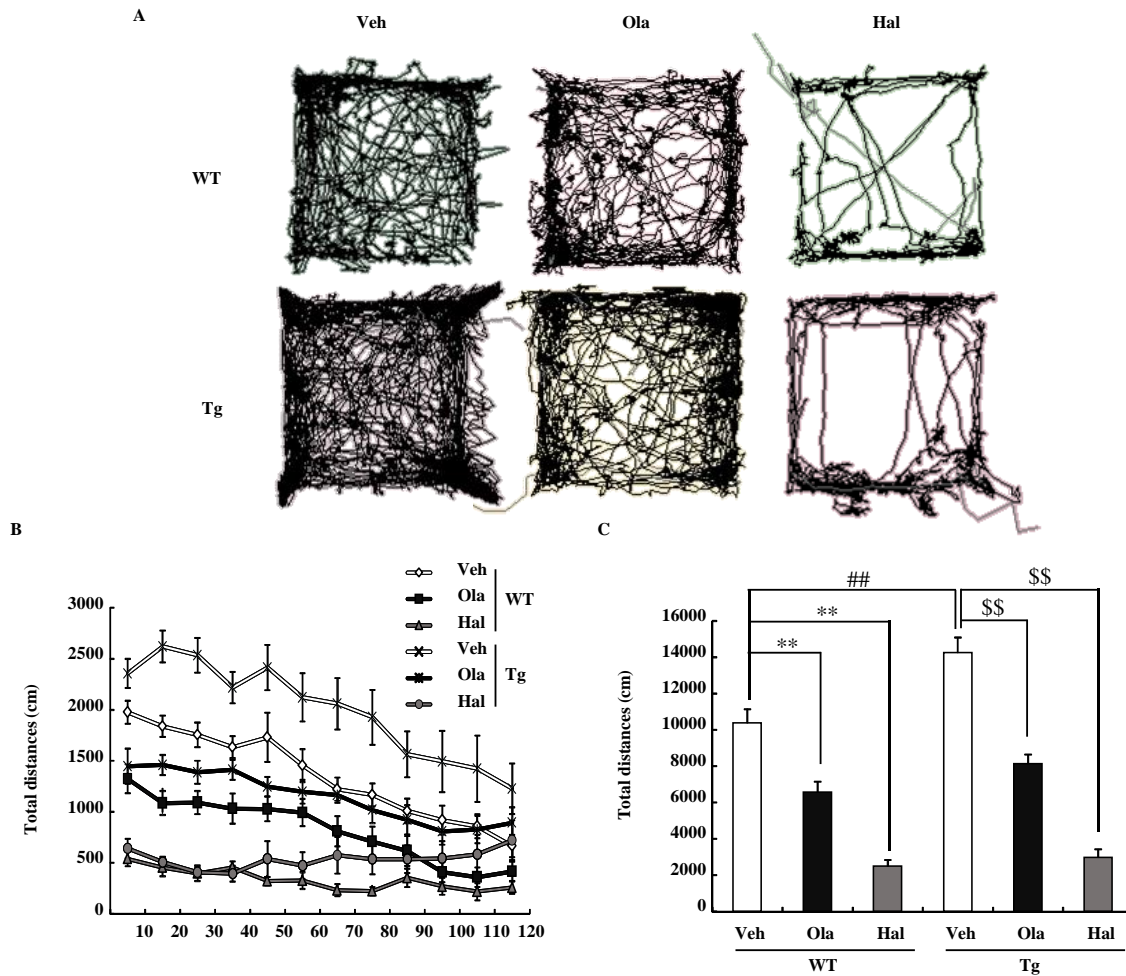
**Fig. 25 Prepulse inhibition (PPI) of acoustic startle response in VGF-overexpressing mice.**

(A) Acoustic startle response of WT and VGF-overexpressing mice. (B) Delta PPI of WT and VGF-overexpressing mice. Prepulse;  $F(2, 92) = 80.093$ ,  $P < 0.001$ , Genotype;  $F(1, 46) = 4.754$ ,  $P = 0.034$ , Prepulse  $\times$  Genotype;  $F(2, 92) = 4.994$ ,  $P = 0.009$ , two-way ANOVA with repeated measures. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. WT mice (Student's t-test). WT ( $n = 24$ ), VGF-overexpressing mice ( $n = 24$ ). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-2 VGF 過剰発現マウスの過活動における抗精神病薬の作用

第 1 章において、VGF 過剰発現マウスは、オープンフィールド試験において過活動を示した。VGF 過剰発現マウスの過活動が統合失調症様の行動異常か否かを明らかにするために定型抗精神病薬であるハロペリドール及び非定型抗精神病薬であるオランザピンの作用を検討した。Fig. 26B に 120 分間のオープンフィールド試験における 10 分ごとの活動量、Fig. 26C に初めの 60 分間の総活動量を示した。VGF 過剰発現マウスが示した過活動は、ハロペリドール及びオランザピンの連続投与によって改善し、野生型マウスと同程度であった (Fig.

26C)。



**Fig. 26 The effects of chronic treatment with olanzapine and haloperidol on locomotor activity of VGF-overexpressing mice.**

(A) Representative images show typical examples of exploratory behavior in WT and VGF-overexpressing mice during the first 60 min of the open field test. (B) Total distance was scored for each 10-min period. (C) Total distance during the first 60 min. Genotype;  $F(1, 90) = 8.089$ ,  $P = 0.006$ , Drugs;  $F(2, 90) = 68.538$ ,  $P < 0.001$ , Genotype  $\times$  Drugs;  $F(2, 90) = 2.422$ ,  $P = 0.094$ , two-way ANOVA with genotype and drugs as between-subject variables. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*\*  $P < 0.01$  vs. vehicle-treated WT mice (Dunnett's test), ##  $P < 0.01$  vs. vehicle-treated WT mice (Student's t-test), \$\$  $P < 0.01$  vs. vehicle-treated VGF-overexpressing mice (Dunnett's test). Vehicle-treated WT mice ( $n = 22$ ), olanzapine-treated WT mice ( $n = 13$ ), haloperidol-treated WT mice ( $n = 8$ ), vehicle-treated VGF-overexpressing mice ( $n = 27$ ), olanzapine-treated VGF-overexpressing mice ( $n = 14$ ), haloperidol-treated VGF-overexpressing mice ( $n = 12$ ). Hal: Haloperidol, Ola: Olanzapine, Tg: VGF-overexpressing mice, Veh: Vehicle, WT: wild-type.

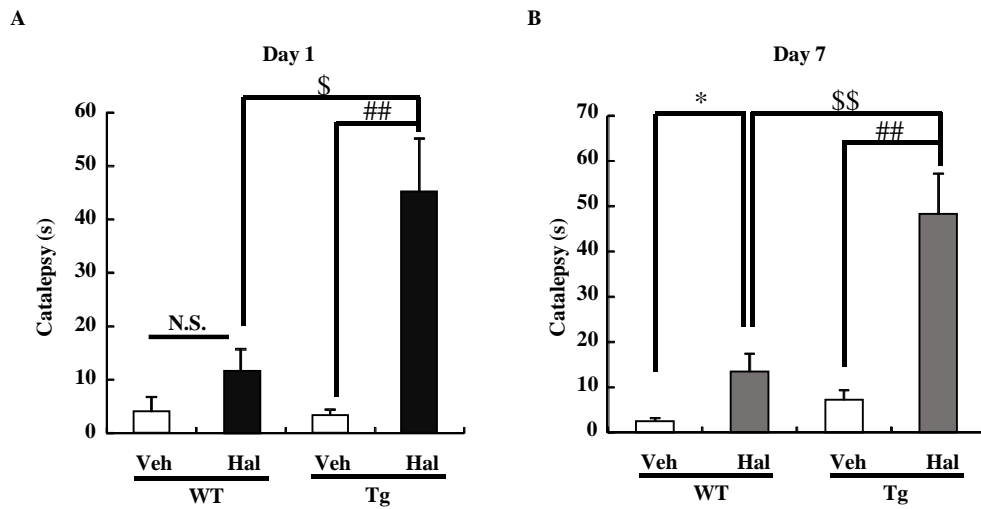


### 3-2 VGF 過剰発現マウスの異常な飛び上がり行動における抗精神病薬の作用

オープンフィールド試験において、VGF 過剰発現マウスは過活動に加えて過剰な飛び上がり行動を示すことを第 1 章で明らかにした。つづいて、抗精神病薬の連続投与は過活動に加え、過剰な飛び上がり行動に対する作用について検討した。VGF 過剰発現マウスは、野生型マウスと比較して過剰な飛び上がり行動を示した (Fig. 27)。VGF 過剰発現マウスにおいて認められた過剰な飛び上がり行動は、ハロペリドールの連続投与によって有意に抑制された (Fig. 27)。



生型マウスと比較してより強いカタレプシーが認められた (Fig. 28A, B)。



**Fig. 28 Cataleptic behavior of VGF-overexpressing mice.**

(A) The retention time of haloperidol-induced catalepsy in WT and VGF-overexpressing mice on day 1. Data are expressed as the mean  $\pm$ SEM. ##  $P < 0.01$  vs. vehicle-treated VGF-overexpressing mice, \$  $P < 0.05$  vs. haloperidol-treated WT mice (Student's t-test). Vehicle-treated WT mice ( $n = 7$ ), haloperidol-treated WT mice ( $n = 10$ ), vehicle-treated VGF-overexpressing mice ( $n = 16$ ), haloperidol-treated VGF-overexpressing mice ( $n = 14$ ). (B) The retention time of haloperidol-induced catalepsy in WT and VGF-overexpressing mice on day 7. Data are expressed as the mean  $\pm$ SEM. \*  $P < 0.05$  vs. vehicle-treated WT mice, ##  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated VGF-overexpressing mice, \$\$  $P < 0.01$  vs. haloperidol-treated WT mice (Student's t-test). Vehicle-treated WT mice ( $n = 7$ ), haloperidol-treated WT mice ( $n = 9$ ), vehicle-treated VGF-overexpressing mice ( $n = 14$ ), haloperidol-treated VGF-overexpressing mice ( $n = 12$ ). Hal: Haloperidol, Ola: Olanzapine, Tg: VGF-overexpressing mice, Veh: Vehicle, WT: wild-type.

#### 第4節 考察

第2章では VGF 過剰発現マウスを用いて、統合失調症の中間表現型であるプレパルスインヒビションの異常の有無及び抗精神病薬の反応性を評価した。VGF 過剰発現マウスは、(1) プレパルスインヒビションの異常、(2) 抗精神病薬による過活動の改善及び (3) ハロペリドール誘発カタレプシー反応の増加を示した。

プレパルスインヒビションは、弱い前刺激によってその後の刺激の反応性が減少する感覚運動情報制御機能 (Sensorimotor gating) の指標として用いられている (116, 117)。プレパルスインヒビションの障害は、統合失調症の患者及びその病態モデル動物において共通に認められる最も一般的な中間表現型である (118, 119)。VGF 過剰発現マウスは、第1章で明らかにした、過活動、ワーキングメモリー障害、うつ様行動の増加及び社会性低下等の統合失調症に関連した行動異常に加えて、プレパルスインヒビションの障害も認められた。したがって、VGF 過剰発現マウスは表面妥当性の面から統合失調症のモデルとして有用であると考えられる。

実験動物における過活動は統合失調症の陽性症状と関連があることが知られている (72)。遺伝的及び薬理学的な統合失調症の動物モデルは過活動を示し (72, 73, 120, 121)、この行動は定型及び非定型抗精神病薬によって改善されることが報告されている (120-122)。同様に、VGF 過剰発現マウスが示した過活動は定型抗精神病薬であるハロペリドール及び非定型抗精神病薬であるオランザピンの連続投与によって改善した。つまり、VGF 過剰発現マウスが示す過活動は、陽性症状の指標として用いられる統合失調症モデルマウスの過活動と同様の薬物反応性を示すことが明らかになった。したがって、陽性症状の観点においては、VGF 過剰発現マウスは予測妥当性を満たすことが示唆される。統合失

調症の症状は、陽性症状に加えて陰性症状及び認知機能障害が挙げられる。また、実験動物が示す社会性の低下及びうつ様行動の増加は陰性症状に (123-125)、またワーキングメモリー障害及びプレパルスインヒビションの障害は認知機能障害に関連が深いと言われている (119, 126)。今回の検討において、抗精神病薬によって VGF 過剰発現マウスの過活動が改善されることを示したが、その他の行動異常に対する抗精神病薬の作用は未知なままである。VGF の発現増加と統合失調症病態の関連性を明らかにするために、VGF 過剰発現マウスが示す陰性症状及び認知機能障害に対する抗精神病薬の作用を検討する必要がある。

第 1 章の検討により、VGF 過剰発現マウスはオープンフィールド試験において高頻度の飛び上がり行動を示すことを明らかにした。さらに、第 2 章の検討により、その行動は抗精神病薬であるハロペリドールの連続投与によって改善した。遺伝的 [Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 欠損マウス] 及び薬理的 (MK-801 投与モデル) な統合失調症モデルにおいて同様な高頻度の飛び上がり行動が認められており、ハロペリドールによって改善されることが報告されている (71, 122, 127)。統合失調症の病態との関連は未だ不明な点が多いが、この行動異常は統合失調症病態と関連があり、VGF 過剰発現マウス及びその他の統合失調症モデルマウスが示す飛び上がり行動は共通した分子メカニズムを有する可能性が考えられる。

最後に、抗精神病薬に対する反応性を評価するために、ハロペリドール誘発カタレプシー試験を行った。カタレプシーとは、受動的に強制された姿勢を保ち続け、自分の意志で変えようとしなない状態のことを意味する。カタレプシーは錐体外路障害の一つとして知られており、パーキンソン病や定型抗精神病薬の投与による薬剤性パーキンソン症候群の際に認められる (128)。錐体外路性

運動機能は、黒質-線条体のドパミン神経路によって調節されることが知られている。ドパミン受容体である  $D_{2L}$  受容体を欠損させた遺伝子改変マウスでは、ハロペリドールによって誘発されるカタレプシーは完全に消失する (115, 129)。ドパミン神経の他に、線条体に存在するコリン作動性神経やグルタミン酸作動性神経がカタレプシーの制御に関与することが報告されている (130)。本章の実験成績から、VGF 過剰発現マウスはハロペリドールによって誘発されるカタレプシーの程度が有意に増加した。オープンフィールド試験における抗精神病薬の作用と合わせて考えると、VGF 過剰発現マウスは、ドパミン神経の機能異常が認められることが示唆された。VGF 欠損マウスにおいて、海馬の神経可塑性の障害、神経伝達物質を内包する有芯小胞のサイズの減少及び有芯小胞に内包されたタンパク質量の減少が認められることが知られている (38, 131, 132)。このことから、VGF 過剰発現マウスにおいて種々の神経伝達物質の生成、分泌能に異常があることで今回の表現型が認められた可能性が考えられる。

以上、本章では VGF 過剰発現マウスが、①統合失調症の中間表現型であるプレパルスインヒビションの障害、②抗精神病薬による過活動の改善、③ハロペリドール誘発カタレプシーの異常反応性を示すことを明らかにした。したがって、VGF の発現増加は統合失調症病態及びドパミンシグナルに関与する可能性が示唆された。第 3 章では、VGF の発現増加が統合失調症病態形成に寄与するメカニズムを明らかにすべく、病態仮説の一つとして挙げられる神経発達障害仮説に焦点を当て、VGF の発現増加が神経の発生に及ぼす影響を検討した。

### 第3章 神経発生における VGF の発現増加の関与

#### 第1節 緒言

脳は脊椎動物の発生過程で形成される神経管から作られる。発生初期の神経管には、未分化な神経上皮細胞が存在する。Pax6、En1、Gbx2、Otx2、FGF8 等の遺伝子が脳領域の位置を決定することが明らかになっている (133)。その後、発生後期において、神経上皮細胞は対称分裂または非対称分裂によって神経細胞または神経前駆細胞を産生する。すなわち、この現象が分化である。神経上皮細胞 (神経幹細胞) の増殖と分化の転換は、Notch や線維芽細胞成長因子 (Fibroblast growth factor: FGF) 等多数の因子によって複雑に制御されている (134-136)。分化後の神経細胞は、遊走や神経突起形成等の過程を経て成熟する。以上、脳の形成過程は多数の因子が複雑に関わり合って厳密に制御されている。

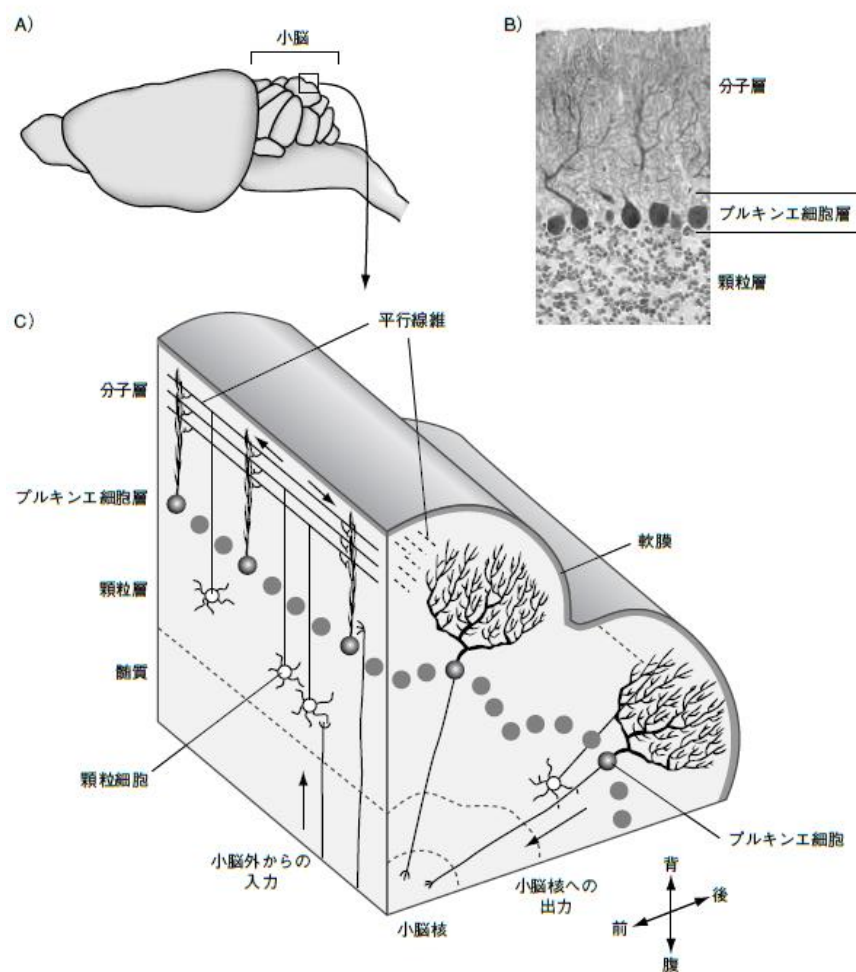
統合失調症の病態において、上述の神経発達が破綻している可能性が示唆されている。この仮説は、「神経発達障害仮説」と呼ばれている。その原因としてヒトにおいて、母体のウイルス感染や低栄養、高脂肪食等が統合失調症の発症に関与することが示唆されている。また、これらの臨床的な証拠に基づき、動物レベルにおいても母体の異常が仔に及ぼす影響が検討されている。たとえば、母体のウイルス感染モデルとして、新生仔サイトカイン投与モデルや母体 poly: IC (合成 2 本鎖) 投与モデル動物において、統合失調症様の行動異常が認められることが報告されている (137, 138)。また、統合失調症病態における神経発達障害仮説には、環境要因に加えて遺伝要因が関与することが知られている。具体的には、統合失調症の発症リスクを大きく増加させる 22 番染色体長腕 11.2 領域の一部の遺伝子が抜け落ちる 22q11.2 欠失症候群患者から作製した iPS 細胞由来の神経幹細胞は、神経細胞への分化の効率が減少するとの報告が

ある (139)。さらに、統合失調症発症と関連があると言われている 16 番染色体短腕 13.11 領域に存在する Nuclear Distribution E Homolog 1 (NDE1) が神経軸索伸長に影響を及ぼす因子であることも分かっている (140)。以上より、統合失調症の病態解明には、神経発達に焦点を当てた研究が重要である。

VGF は前述の通り、統合失調症患者の脳脊髄液及び前頭前皮質で増加し、VGF が存在する遺伝子座である 7q22 領域が統合失調症の発症に関連することが報告されている (47-49)。また、第 1、2 章の実験成績より、VGF 過剰発現マウスが統合失調症様の行動異常を示したことから、動物レベルにおいても VGF の発現増加が統合失調症病態に関与している可能性が示唆された。過去のげっ歯類を用いた検討において、VGF の脳の発現量は発達期において最も多いことが報告されている (141)。したがって、VGF の発現増加が統合失調症病態に及ぼす影響を検討する上で、神経発達における VGF の寄与は大きいと考えられる。VGF の神経発達に及ぼす影響に関してはこれまでに 5 報報告されている (39, 40, 142-144)。しかしこれらの報告は、海馬及び大脳皮質の初代培養細胞及び培養細胞 (ヒト神経芽細胞種: SHSY5Y) を用いた *in vitro* の検討のみであり、生体 (*in vivo*) における VGF の神経発達における役割は未だ不明な点が多い。

そこで、VGF の発現増加が生体の脳神経発達に及ぼす影響を検討する脳器官として小脳を対象とした。小脳は脳幹の背側に位置し、大脳皮質や海馬、線条体等の脳領域と離れて存在するため、別の脳領域の組織が混在しにくく生化学的な検討に適している。また、小脳は明瞭な 4 層構造を有しており、成体期では軟膜側から分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層の 3 層に分けられる。その下には髄質と 4 対の小脳核が存在する。その明確な層構造が故に形態学的な検討にも解





**Fig. 29 Cerebellar layer structure.**

(A) マウス脳の外観と小脳の位置、(B) 小脳皮質の断面図、(C) 小脳の層構造と基本回路 (脳・神経研究のフロンティア p 98 より引用)

析しやすい (Fig. 29)。小脳は古くから運動制御を司る脳器官と考えられてきたが、近年の研究によって小脳は言語や認知、行動制御をも司る重要な脳器官であることが分かってきている (145)。また、小脳機能の破綻は統合失調症や自閉症、注意欠損多動症患者においても認められることから臨床的にもその機能・発生を研究する価値は高い (145)。

本章では、VGF 過剰発現マウスの小脳の発達過程の検討及びその分子メカニズムの検討を行った。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。

Tris HCl、HCl、エタノール、メタノール、キシレン、パラホルムアルデヒド、Sample Buffer Solution (2ME+) (x4)、イムノスター®LD、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate; SDS)、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル [sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel]、6-アミノヘキサノ酸 (6-aminohexanoic acid)、Agarose S、塩化カリウム (potassium chloride: KCl)、パパイン、トリプシンは Wako (Osaka, Japan)、リン酸水素二ナトリウム・十二水和物 (sodium hydrogenphosphate 12-water)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate)、グリシン、2-プロパノール、Blocking One-P は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl)、ペントバルビタールは Kishida Chemical (Osaka, Japan)、BCA protein assay kit、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)、Hochst 33342、Neurobasal medium、B27 supplement は Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)、Mouse on Mouse (M.O.M.) Blocking Reagent, M.O.M. protein concentrate、Vectastain Elite ABC Reagent、ImmPACT DAB Substrate、Normal goat serum は Vector Labs (Burlingame, CA, USA)、ペニシリン、ストレプトマイシンは Meiji Seika (Tokyo, Japan)、フルオロマウントは Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)、Tris-Buffered Saline (TBS)、Tris Borate EDTA (TBE) は Takara (Shiga, Japan)、EDTA・2Na (disodium ethylenediamine tetraacetate) は同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II、phosphatase inhibitor cocktail

III、cresyl violet、酢酸アンモニウム、Igepal CA-630、poly-d-lysine、5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) は Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)、proteinase K solution は Qiagen (Venlo, Netherland)、DNA ladder は Nippon genetics (Tokyo, Japan)、Can get signal solution 1、Can get signal solution 2、Blend Taq<sup>®</sup> -Plus-は東洋紡 (Osaka, Japan)、Tween 20 Solution、Triton X-100 は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、O.C.T compound は Sakura Finetek Japan (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。

Phosphate buffered saline (PBS) は、KCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O を蒸留水または超純水に溶解し、調整した。Phosphate buffer (PB) は、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O を蒸留水に溶解し調製した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験動物

VGF 過剰発現マウスは第 1、2 章で示した動物を用いた。すべてのマウス (8-18 週齢、雄性) は設定温度: 24°C (範囲: 22-26°C)、設定湿度: 55% (範囲: 40-70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00-午後 8:00) に維持された岐阜大学医学部生命科学棟 4 階または本学 6 階動物飼育室で飼育した。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm または縦 36.9 × 横 15.6 × 高さ 13.2 cm) を用い、自由給水下に固形飼料 (CE-2; CREA) にて飼育した。行動試験はすべて午前 9:00 から午後 8:00 の間に行った。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。また、遺伝子改変動物は、岐阜薬科大学生命倫理・バイオセーフティー委員会に遺伝子組み換え実験申請を行い、許可を得て使用した。

## 2-2-2 マウスジェノタイピング

マウスジェノタイピングは第 1 章 2-2-2-2 に準じて行った。

## 2-2-3 ウェスタンブロット解析

### 2-2-3-1 試料採取

マウスを断頭し、脳を摘出した。摘出した脳は、氷冷したガラスシャーレの上に置き、小脳を切り分けた。組織は、マイクロチューブの中に入れ、液体窒素を用いて急速冷凍した。サンプルはタンパク質抽出時まで-80°Cに保存した。それ以後の検討は、第1章2-2-3-2及び2-2-3-3に準じて行った。一次抗体には、goat polyclonal anti-VGF (sc-10383; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit monoclonal anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (#4377; Cell Signaling Technology)、rabbit polyclonal anti-Erk1/2 (#9012; Cell Signaling Technology)、mouse monoclonal anti-pTrk (sc-8058, Santa Cruz Biotechnology)、mouse monoclonal anti-TrkB (sc-377218; Santa Cruz Biotechnology)、mouse monoclonal anti-GLI-2 (sc-271786; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit monoclonal anti-non-phospho (active)  $\beta$ -catenin (#8814, Cell Signaling Technology) 及びmouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (A2228; Sigma-Aldrich) を用いた。二次抗体には、HRP-conjugated rabbit anti-goat, goat anti-mouse, and goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

### 2-2-4 リアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR は、第 1 章 2-2-4 に準じて行った。用いたプライマーは、*Vgf* mRNA 5'-CAG GCT CGA ATG TCC GAA AG-3' (sense)、*Vgf* mRNA 5'-CTT GGA TAA GGG TGT CAA AGT CTC A -3' (antisense)、 $\beta$ -actin mRNA 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3' (sense) 及び  $\beta$ -actin mRNA 5'-

ATGGAGCCACCGATCCACA-3' (antisense) である。

## 2-2-5 小脳の組織学的検討

### 2-2-5-1 組織切片作成

成体または生後 3 日目マウスをペントバルビタール (50 mg/kg) で麻酔または低温麻酔を施し、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) を左心室内に注入して灌流固定した。その後、脳を取り除き同液にて少なくとも 24 時間 4°C 条件下で放置した。25%スクロースで脱水を行った後に、液体窒素を用いて O.C.T. compound により凍結し、薄切するまで -80°C にて保存した。体積評価を除く小脳の組織学的評価は、10  $\mu$ m、体積評価は 50  $\mu$ m のサジタル面の切片をクリオスタット (Leica) を用いて作製した。MAS コーティングされたスライドガラス (Matsunami) に乗せ、-80°C で保存した。一貫性を保つために、小脳虫部の薄切切片は内側の 250  $\mu$ m 以内の切片を、小脳半球部は小脳虫部第 10 葉の消失を確認したのちの 250  $\mu$ m 以内の切片を実験に用いた。

### 2-2-5-2 クレシルバイオレット染色

凍結切片は、20 分間 1%クレシルバイオレット液に浸して染色後、蒸留水、70%エタノールで洗浄し、95%、無水エタノールの順に 5 分間浸し脱水した。その後キシレンに 2 回浸したのちに封入した。

### 2-2-5-3 小脳の組織評価

染色像は蛍光顕微鏡 (BZ-X710; Keyence) を用いて撮影した。成体マウスの組織評価のために、小脳虫部及び半球部のサジタル面の薄切切片を用いた。ま

た、生後 3 日目のマウスの組織学的のために、小脳虫部のサジタル面の薄切切片を用いた。成体マウスの小脳の体積を評価するために、第 1 章 2-2-5-3 に準じて、250  $\mu\text{m}$  の間隔で Cavalieri's principle を使用し算出した。体積評価の範囲は、lateral 0.875 mm から 2.725 mm の範囲で行った。

## 2-2-6 小脳薄切切片を用いた免疫染色

### 2-2-6-1 組織切片作成

本章 2-2-5-1 に準じて薄切切片を作製した。抗 CalbindinD28K 抗体を用いた免疫染色は 50  $\mu\text{m}$ 、その他の抗体を用いた免疫染色は 10  $\mu\text{m}$  の薄切切片を用いて行った。

### 2-2-6-2 免疫染色

小脳虫部のサジタル面の薄切切片を用いた。抗 Brain lipid binding protein (BLBP) 抗体を用いた免疫染色以外は蛍光染色を行った。反応液の流出を防ぐために Super PAP pen (Daido sangyo, Osaka, Japan) を用いて切片の周囲を囲んだ。マウス由来の一次抗体を用いる際は M.O.M. Blocking Regent (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) により 1 時間ブロッキングした。それ以外の場合は 10 % serum (Vector labs) により 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体を用いて 4°C で 1 晩または、48 時間反応させた。その後、二次抗体を用いて 1 または 2 時間反応させた。続いて、Hoechst33342 により核染色を行った。染色後、Fluoromount (水溶性封入基材) で封入した。また、抗 calbindinD28K 及び Ki67 抗体を用いた免疫染色の際は、抗体の膜透過性を高めるために 0.5 及び 0.3% TritonX-100 を用いた。

抗 BLBP 抗体を用いた免疫染色には色素染色を行った。まず、内因性ペルオキシダーゼの不活性化のために 0.3%過酸化水素 10%メタノール溶液を用いて 30 分間反応させた。その後、10 % serum (Vector Labs) により 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体を用いて 4°C で 1 晩反応させた。その後 biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200 dilution: Vector Labs) にて 1 時間反応させ、Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Labs) で 30 分反応させた後、ImmPACT DAB Substrate (Vector Labs) を用いて染色した。染色後蒸留水で 2 回洗浄し、70%、95%、99%、無水エタノールの順に浸し脱水した。キシレンに 5 分間 2 回浸した後、封入した。

一次抗体には、mouse anti-calbindinD28K [1:250 dilution (C9848; Sigma-Aldrich)]、rabbit anti-BLBP [1:300 dilution (ABN14; Millipore, Bedford, MA, USA) ]、mouse anti-NeuN [1:100 dilution (MAB377)]、mouse anti-phospho-Histone H3 (pHH3) antibody [1:500 dilution (#9706; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-Ki67 antibody [1:100 dilution (AB9260; Millipore)]、二次抗体には、Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 goat anti-mouse IgG [1:1000 dilution (A11018; Thermo Fisher Scientific)]、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 rabbit anti-mouse IgG [1:1000 dilution (A21204; Thermo Fisher Scientific)]、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 goat anti-rabbit IgG [1:1000 dilution (A11008; Thermo Fisher Scientific)] 及び biotinylated goat anti-rabbit IgG [1:200 dilution (Vector Labs)] を使用した。

染色像は蛍光顕微鏡 (Keyence) または共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。プルキンエ細胞の細胞数及び細胞密度は、小脳全体の calbindinD28K<sup>+</sup>細胞から算出した。プルキンエ細胞の樹状突起の長さは同様の 8 箇所の場合の平均を各個体の値に算出した。NeuN<sup>+</sup>細胞及び pHH3<sup>+</sup>細胞の細胞数は第 6 葉から第 9 葉の間 (後葉) に

において計測した。Hoechst<sup>+</sup>細胞中の Ki67<sup>+</sup>細胞の割合は 8-9 葉の間の開裂部分において計測した。

## 2-2-7 小脳顆粒細胞前駆細胞の初代培養を用いた検討

### 2-2-7-1 初代培養

小脳顆粒細胞前駆細胞は生後 4 日目の野生型マウス及び VGF 過剰発現マウスの小脳を用いて、Lee HY らの方法を参考に行った。小脳を単離後すぐに HBSS グルコース内に入れた。その後、パパインを用いて分散を行った。細胞を 70  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュのフィルターに通し、プルキンエ細胞等の大きい細胞を除去したのちに、100  $\mu\text{g/mL}$  の poly-D-lysine (Sigma-Aldrich) でコーティングしておいたディッシュに播種し、20 分培養した。ディッシュを穏やかにタッピングすることで、浮遊しやすい顆粒細胞や顆粒細胞前駆細胞と接着しやすいアストロサイトを分離した。抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色のために、96 well プレートに  $3.5 \times 10^4$  cells/well、抗 Math1 抗体を用いた免疫染色のために、スライドチャンバー (Thermo Fisher Scientific) に  $3.5 \times 10^5$  cells/well の細胞密度で播種した。また、96 well プレートやスライドチャンバーはあらかじめ 100  $\mu\text{g/mL}$  の poly-D-lysine (Sigma-Aldrich) でコーティングしておいたものを用いた。用いた培地は、Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific)、B27 supplement (Thermo Fisher Scientific)、GlutaMax I (Thermo Fisher Scientific) 及び抗生剤とした。細胞の培養条件は、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で行った。抗 Math1 抗体を用いた免疫染色は、細胞を播種して 3 時間後に始めた。BrdU は、細胞播種 27 時間後に、最終濃度が 10  $\mu\text{M}$  になるように添加した。BrdU 添加 24 時間後に抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色を始めた。



#### 2-2-7-2 免疫細胞染色

初代培養細胞は 4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) で 15 分間、室温で固定した。その後、前処置として 2M の塩酸で 30 分間、0.3% TritonX-100 (Bio-Rad Labs) で 10 分間及び 0.1 または 0.05% トリプシンで直ちに処置を行った。その後、50 mM glycine 含有 PBS を加え室温で 15 分間静置した。その後、3% goat serum (Thermo Fisher Scientific) で 30 分間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体を 1 時間反応させ、Hoechst33342 で 5 分間反応させた。用いた一次抗体は、rat anti-BrdU antibody [1:300 dilution (ab6326; abcam, Cambridge, MA, USA)] 及び mouse anti-Math1 antibody [1:100 dilution (sc-136173, santa cruz)]、二次抗体は Fluor<sup>®</sup>546 goat anti-rat IgG or Fluor<sup>®</sup>546 goat anti-mouse IgG である。

染色像は蛍光顕微鏡 (Keyence) または共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。BrdU<sup>+</sup>細胞の定量的評価は、Hoechst<sup>+</sup>の細胞中の BrdU<sup>+</sup>細胞の割合で評価した。

#### 2-2-8 行動試験

##### 2-2-8-1 ロータロッド試験

実験には加速式ロータロッド (Fig. 30, Ugo Basile, Gemonio, Italy) を用いた。最大試行時間を 5 分間とし、4 から 40 rpm に加速するように設定した。協調運動の評価項目として、回転するロッドの上から落下するまでの潜時を測定した。1 日目は、マウス



Fig. 30 Rotarod apparatus.

を試験に慣らすために 5 rpm で回転するロッドの上に 2 分間×2 回乗せた。2-4 日目に上記の設定で協調運動を評価した。2 日目は 4 回、2、3 日目は 3 回試行を行った。

#### 2-2-8-2 フットプリント試験

前肢及び後肢に赤及び黒色のインクをそれぞれ付けた。その後、縦 7 × 横 30 × 高さ 12 cm からなる装置の端にマウスを置いて自由に歩行させた。マウスを歩行させる装置にはあらかじめ、白い紙を敷いてある。歩き始め及び歩き終わりの 1 歩目を除く 5 歩の連続した歩行を各マウスの歩行機能の評価に用いた。試験は盲検下で行われた。歩行パターンは、(1) 前肢及び後肢の歩幅、(2) 前肢及び後肢の足幅の二つのパラメータで評価した。

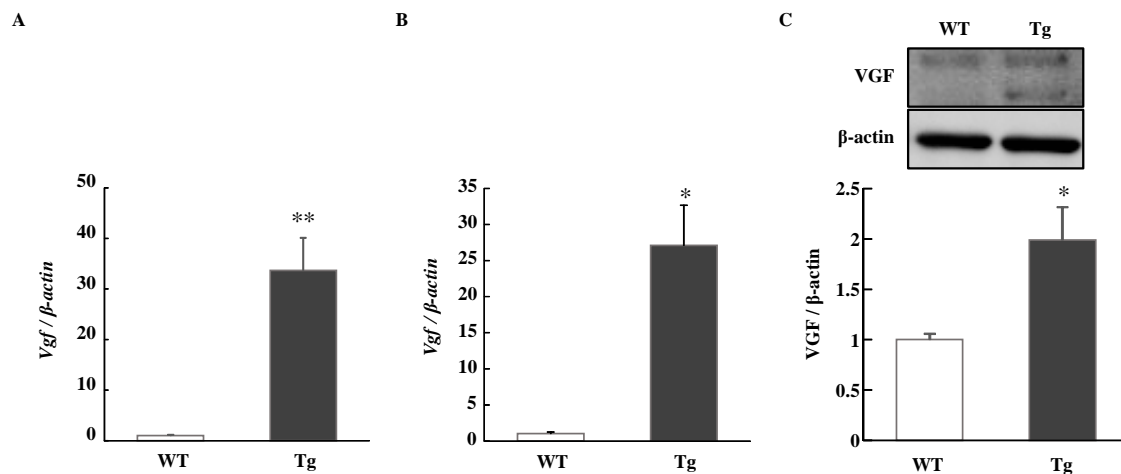
#### 2-2-9 統計学的解析

実験結果は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で表し、危険率 5%以下を有意とした。統計学的な比較は SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて、Student's two-tailed *t*-test により行った。危険率が 5%未満を有意差ありとした。

### 第 3 節 実験成績

#### 3-1 VGF 過剰発現マウスの生後発達期及び成体期の VGF の過剰発現の確認

まず始めに、ウェスタンブロット法及びリアルタイム RT-PCR 法を用いて VGF 過剰発現マウスの生後発達期及び成体期の VGF の過剰発現を確認した。成体期の VGF 過剰発現マウスにおいて *Vgf* mRNA の発現量が有意に増加した (Fig. 31A)。また、生後 3 日目の VGF 過剰発現マウスにおいて *Vgf* mRNA 及び VGF タンパク質が有意に増加した (Fig. 31B, C)。



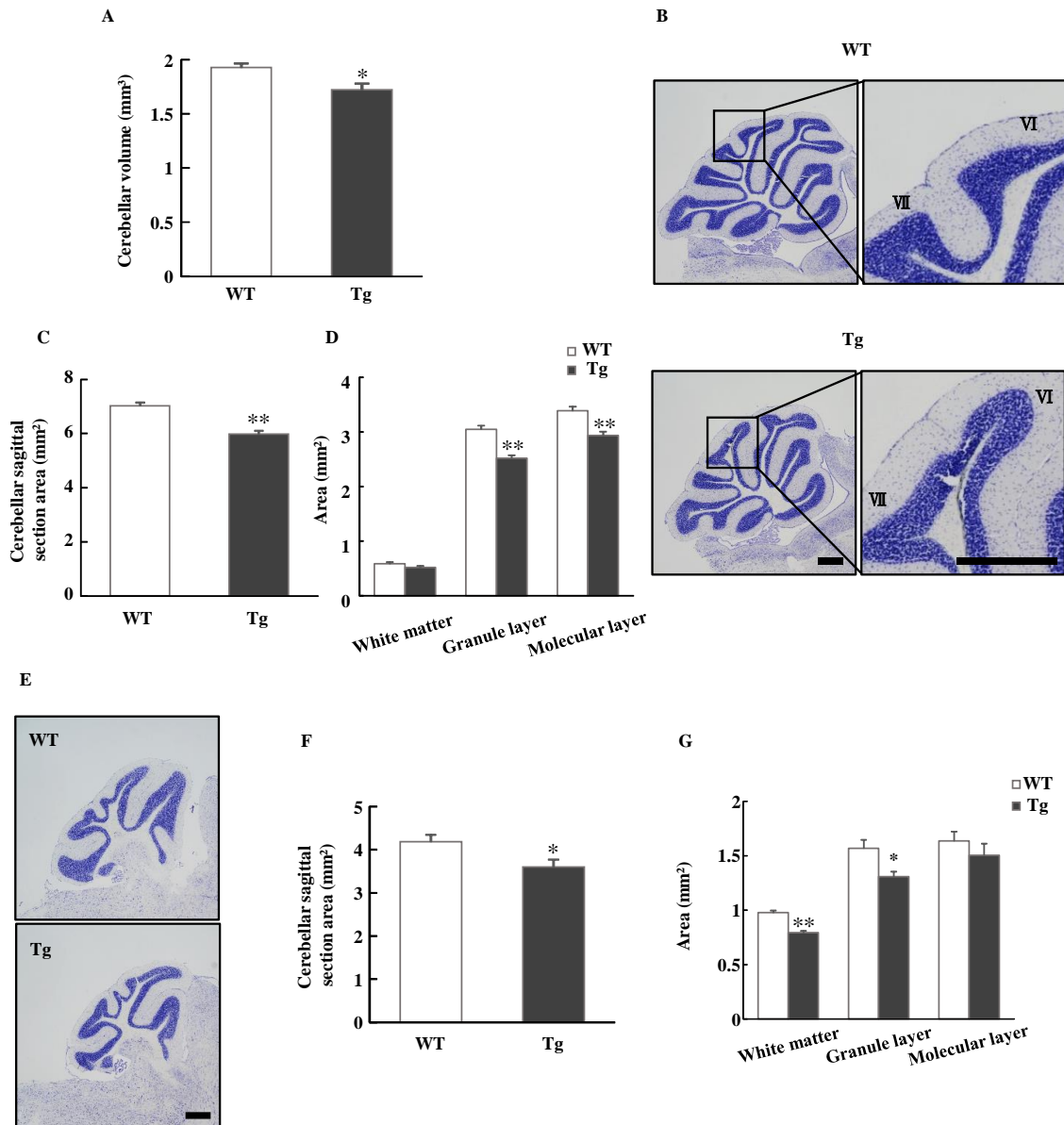
**Fig. 31 Upregulation of VGF in the cerebella of VGF-overexpressing mice**

A. The expression level of *Vgf* mRNA in adult mice (8–18 weeks old) relative to the  $\beta$ -actin level evaluated by real-time RT-PCR. Data are expressed as the mean fold difference versus WT mice  $\pm$  SEM. (n = 5 or 6). \*\*  $P < 0.01$  vs. WT mice (Student's *t*-test). B. The expression level of *Vgf* mRNA during the developmental period (postnatal day 3) relative to the  $\beta$ -actin level evaluated by real-time RT-PCR. Data are expressed as the mean fold difference versus WT mice  $\pm$  SEM. (n = 3 or 6). \*\*  $P < 0.01$  vs. WT mice (Student's *t*-test). C. Typical bands show VGF and  $\beta$ -actin. The expression level of VGF protein during the developmental period (postnatal day 3) relative to the  $\beta$ -actin level evaluated by western blot analysis. Data are expressed as the mean fold difference versus WT mice  $\pm$  SEM. (n = 8 or 11). \*  $P < 0.05$  vs. WT mice (Student's *t*-test). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-2 ニッスル染色による成体期 VGF 過剰発現マウスの小脳の組織評価

小脳の組織評価として、まず始めに連続切片を用いて小脳の体積を評価した。小脳虫部から半球部にかけて Lateral 0.875 mm から 2.725 mm の範囲の小脳の体積は、VGF 過剰発現マウスにおいて有意に減少した (Fig. 32A)。小脳は虫部、半球部共に外側から分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層、白質に分けられる。続いて、VGF 過剰発現マウスの分子層、顆粒細胞層、白質の面積を虫部及び半球部それぞれにおいて評価した。VGF 過剰発現マウスの虫部及び半球部の面積は共に有意に減少した (Fig. 32B, C, E, F)。また、虫部において顆粒細胞層の面積は共に有意に減少した (Fig. 32B, C, E, F)。また、虫部において顆粒細胞層の面積は共に有意に減少した (Fig. 32B, C, E, F)。

胞層及び分子層、半球部において顆粒細胞層及び白質の面積の有意な減少が認められた (Fig. 32D, G)。さらに、評価した VGF 過剰発現マウスのすべての例 (4 例中 4 例) において、BDNF<sup>-/-</sup> 及び BDNF や NT-3 の放出を制御する Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion (CAPS) 2<sup>-/-</sup> マウス等の神経栄養因子の変動を引き起こした際に認められる顆粒細胞層の第 VI 葉と第 VII 葉の間の開裂が消失した (Fig. 32B) (146, 147)。



**Fig. 32 Histological analysis of the cerebella in adult VGF-overexpressing mice.**

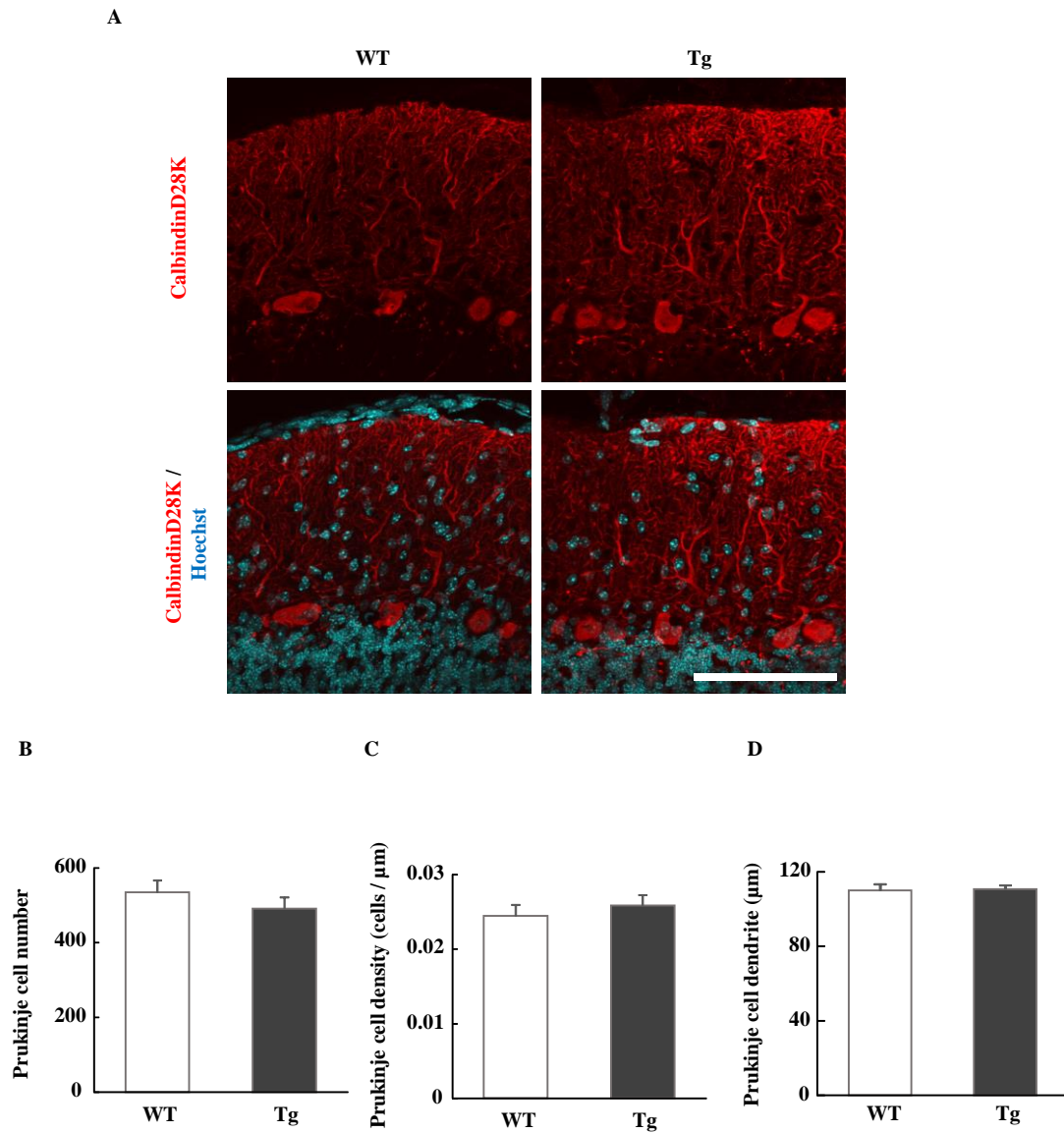
A. The cerebellar volume of WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 4). \*  $P < 0.05$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). B. Left: Representative images of cerebellar vermis stained with cresyl violet in adult WT and VGF-overexpressing mice. Scale bar = 500  $\mu$ m. Right: Enlarged images of the fissure between the sixth and seventh folia. C. The cerebellar sagittal section area in the cerebellar vermis of WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 4). \*\*  $P < 0.01$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). D. The cerebellar sagittal section area of white matter, granule layer, and molecular layer of WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 4). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs.

Continued on the next page

WT mice (Student's *t*-test). E. Representative images of cerebellar hemispheres stained with cresyl violet in adult WT and VGF-overexpressing mice. Scale bar = 500  $\mu$ m. F. The cerebellar sagittal section area in the cerebellar hemispheres of adult WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 4). \*  $P < 0.05$  vs. WT mice (Student's *t*-test). G. The cerebellar sagittal section area of white matter, granule layer, and molecular layer of adult WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 4). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. WT mice (Student's *t*-test). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type

### 3-2 成体期 VGF 過剰発現マウスのプルキンエ細胞の組織評価

プルキンエ細胞のマーカーである CalbindinD28K に対する抗体を用いた免疫染色によって、プルキンエ細胞の形態を評価した。成体期の VGF 過剰発現マウスのプルキンエ細胞の細胞数、細胞密度及び樹状突起の高さは、野生型及び VGF 過剰発現マウスの間で変化は認められなかった (Fig. 33A-D)。



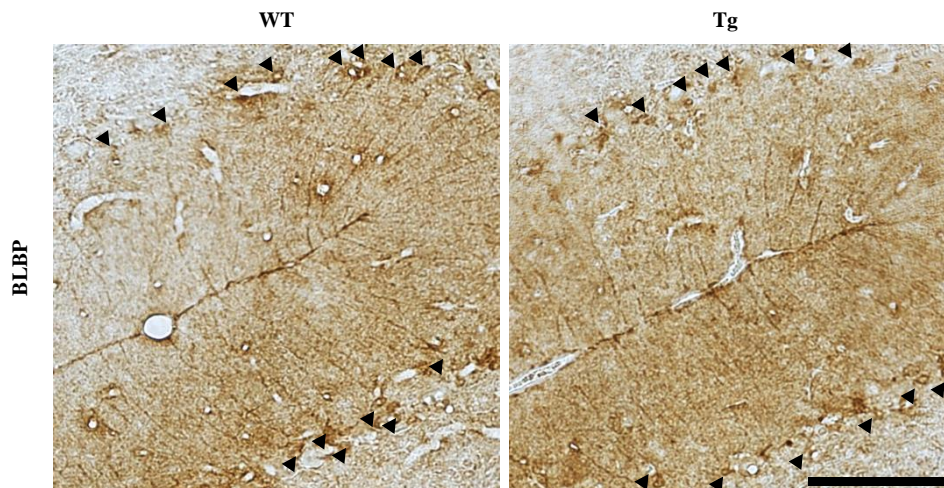
**Fig. 33 Immunohistochemistry of Prukinje cell and in adult VGF-overexpressing mice.**

A. Representative images of calbindinD28K staining in WT and VGF-overexpressing mice. B. The number of calbindinD28K<sup>+</sup> cells in the entire cerebellum of WT and VGF-overexpressing mice. C. The cell densities of calbindinD28K<sup>+</sup> cells in the entire cerebellum of WT and VGF-overexpressing mice. D. The length of the dendrites in WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 4). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type



### 3-3 成体期 VGF 過剰発現マウスのバーグマングリアの組織評価

バーグマングリアのマーカーである BLBP に対する抗体を用いた免疫染色によって、成体期の VGF 過剰発現マウスのバーグマングリアの形態を評価した。VGF 過剰発現マウスのバーグマングリアは、野生型マウスと同様にプルキンエ細胞層において単層を形成しており、バーグマングリアの突起は分子層の頂端部まで伸びていた (Fig. 34)。成体期の VGF 過剰発現マウスのプルキンエ細胞及びバーグマングリアに形態学的な変化は認められなかった。



**Fig. 34 Immunohistochemistry of Bergmann glia in adult VGF-overexpressing mice.**

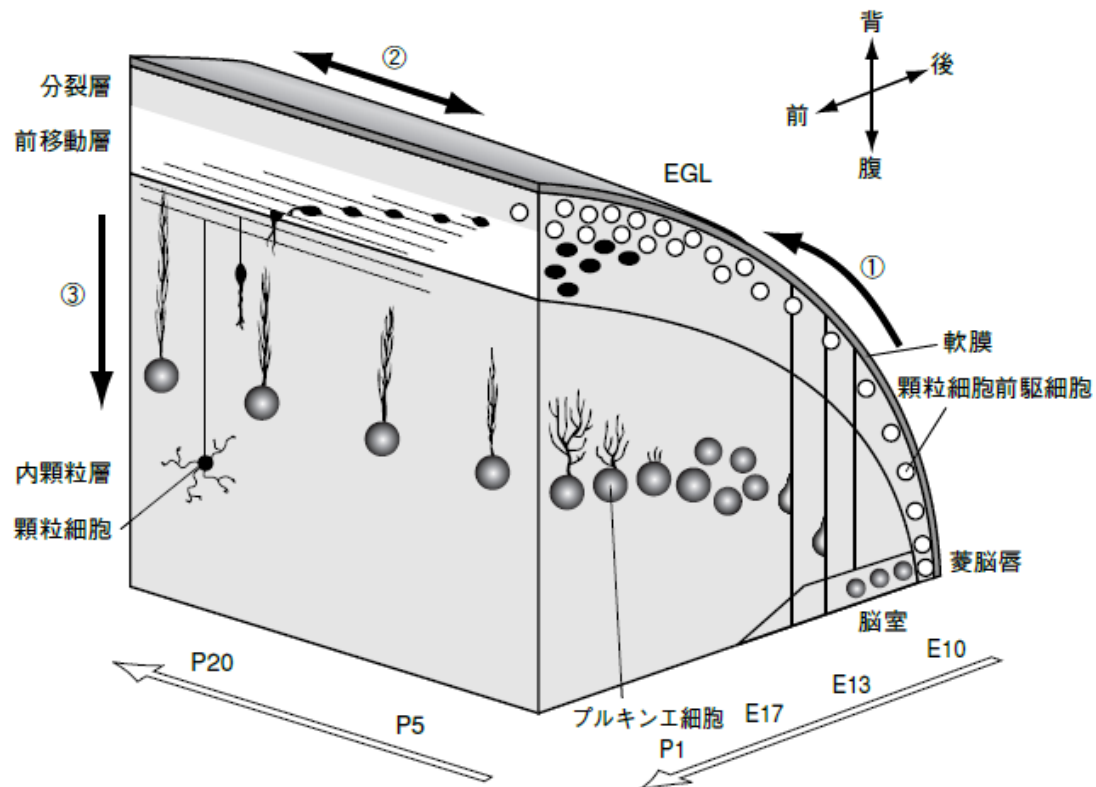
E. Representative images of BLBP staining in WT and VGF-overexpressing mice. Scale bar = 100  $\mu$ m. Arrowheads show the BLBP<sup>+</sup> Bergmann glia. BLBP: brain lipid binding protein, Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type

### 3-4 発達期の VGF 過剰発現マウスの顆粒細胞の組織評価

他の細胞と比較し、成体期の組織評価で変化が認められた顆粒細胞の発生過程の評価を行った。Fig. 35 に示すように、顆粒細胞は予定中脳域-後脳域に存在する菱脳唇で産生され、小脳の最も外側に位置する外顆粒層 (External granule layer: EGL) に遊走し増殖している。その後、外顆粒層の最も内層の顆粒細胞前駆細胞が分化する。外顆粒層の外側に位置し未分化性を有した顆粒細胞は Ki67



を発現しており、分化するとその発現が消失し神経細胞のマーカーである Tuj1 を発現する (148, 149)。分化した顆粒細胞はバグマングリアの突起をつたいプルキンエ細胞層を超えて内顆粒層 (Internal granule layer: IGL) に遊走される。

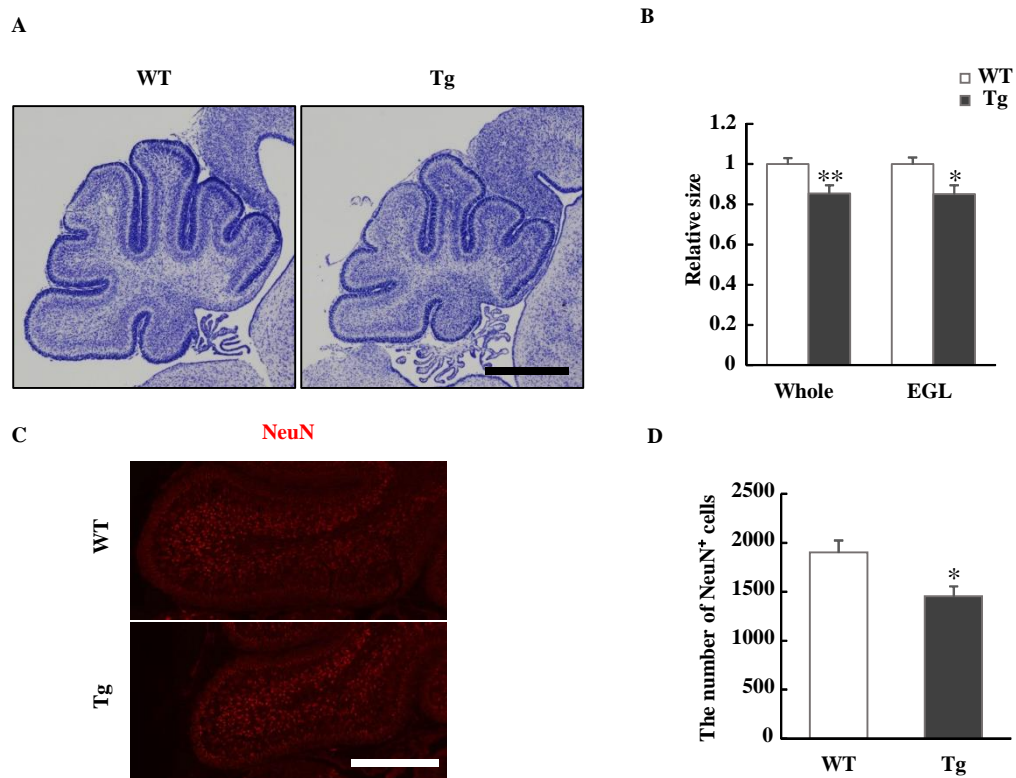


**Fig. 35 Illustration of development of granule cells.**

(脳・神経研究のフロンティア p 100 より引用)

始めに、生後 3 日目の矢状断面の虫部の薄切切片を用いて、ニッスル染色による組織評価を行った。VGF 過剰発現マウスの小脳全体の面積が野生型マウスと比較して有意に減少した。加えて、発達期の顆粒細胞前駆細胞が存在する外顆粒層の面積も野生型マウスと比較して有意に減少した (Fig. 36A, B)。さらに、プルキンエ細胞以外の有糸分裂を終えた細胞のマーカーである NeuN の抗体を用いて、IGL 中の NeuN<sup>+</sup>細胞の細胞数を検討した。VGF 過剰発現マウスの IGL

中の NeuN<sup>+</sup>細胞の細胞数が有意に減少した (Fig. 36C, D)。これらの結果から、VGF 過剰発現マウスの顆粒細胞層の低形成は生後発達期から起きていることが示唆された。

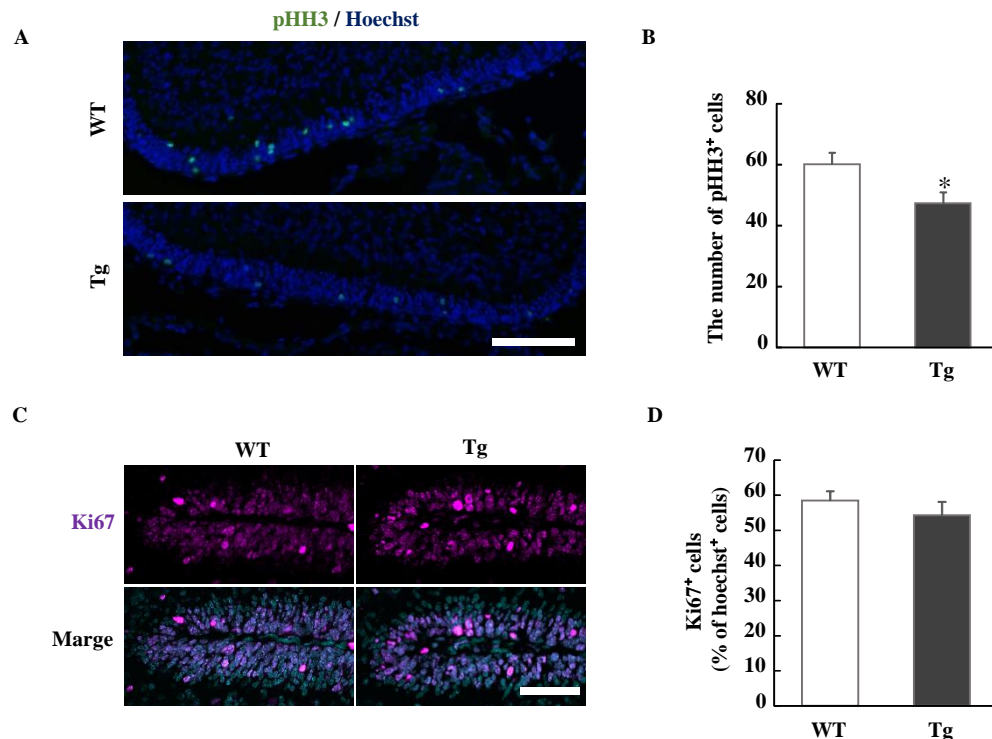


**Fig. 36 Histological analysis of the developing cerebellum in VGF-overexpressing mice.**

A. Representative images of cerebellar vermis stained with cresyl violet in postnatal day 3 of WT and VGF-overexpressing mice. Scale bar = 500  $\mu$ m. B. The size of the whole cerebellum and EGL in postnatal day 3 of WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 8 or 10). \*  $P < 0.05$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). C, D. NeuN staining (red) shows the differentiated granule cells in the IGL of WT and VGF-overexpressing mice. C. Representative images of NeuN staining in WT and VGF-overexpressing mice. Scale bar = 250  $\mu$ m. D. The number of NeuN<sup>+</sup> cells in the IGL. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 3 or 4). \*  $P < 0.05$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). EGL: external granule layer, GCP: granule cell precursor, IGL: internal granule layer, Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-5 発達期の VGF 過剰発現マウスの顆粒細胞の発生過程の評価

Fig. 36 で認められた VGF 過剰発現マウスの小脳顆粒細胞の低形成の原因を明らかにするために、生後 3 日目の VGF 過剰発現マウスの顆粒細胞前駆細胞の増殖能及び分化能の評価を行った。増殖能の評価として、細胞周期の M 期のマーカーである pHH3 の抗体を用いて免疫染色を行った。野生型マウスと比較して、外顆粒層中の pHH3<sup>+</sup>細胞の細胞数が有意に減少した (Fig. 37A, B)。上述の通り、外顆粒層中の未分化細胞は Ki67、分化後の細胞は Tuj1 を発現することから、外顆粒層中の全細胞における Ki67<sup>+</sup>細胞の割合を評価することで細胞の分化能を評価できる (150)。野生型マウス及び VGF 過剰発現マウス共に Ki67<sup>+</sup>細胞は外顆粒層の外側に局在しており、Hoechst<sup>+</sup>細胞に占める Ki67<sup>+</sup>細胞の割合に変化は認められなかった (Fig. 37C, D)。



**Fig. 37** Changes in the development of the granule cells in VGF-overexpressing mice.

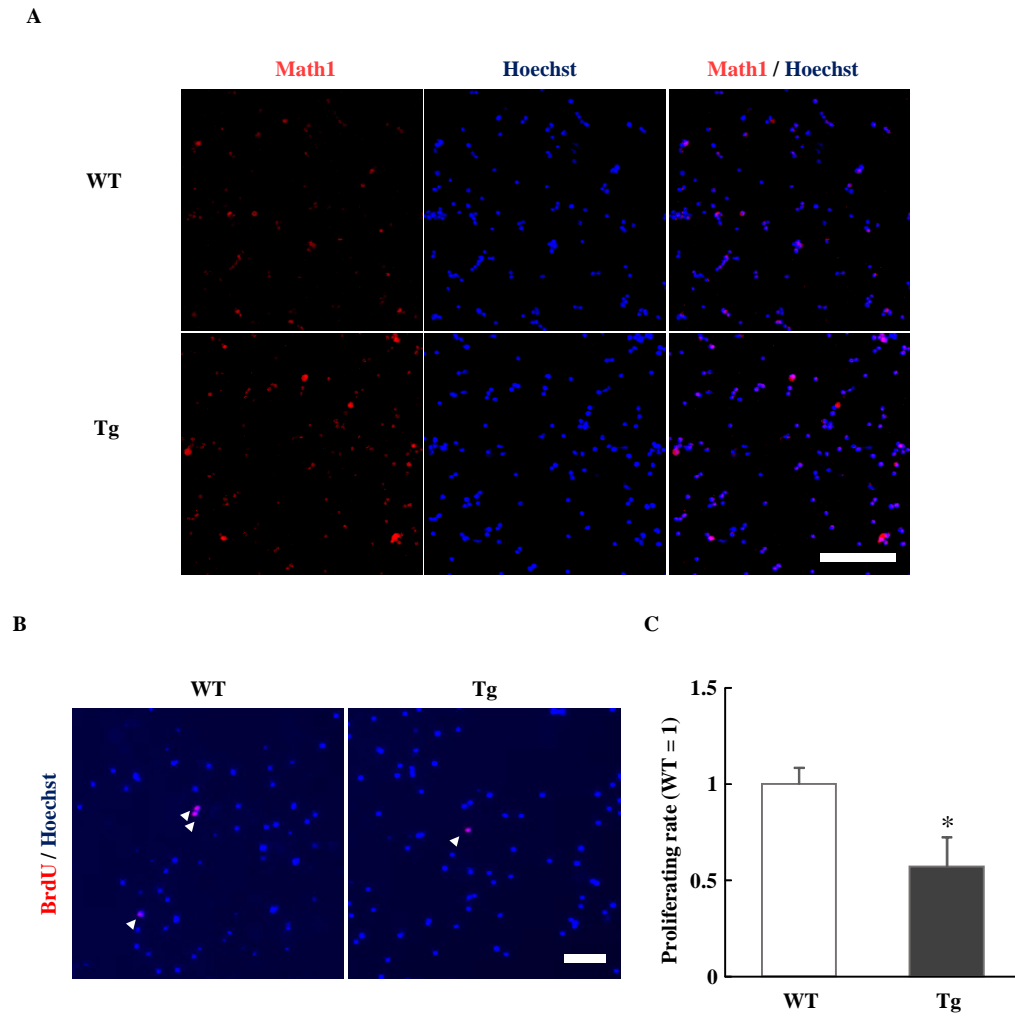
A, B. pHH3 staining (green) shows proliferating GCPs in the EGL. A. Representative images of pHH3 staining in WT and VGF-overexpressing mice. Scale bar = 100  $\mu$ m. B. The number of pHH3<sup>+</sup>

Continued on the next page

cells in the EGL. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 8 or 10). \*  $P < 0.05$  vs. WT mice (Student's *t*-test). C, D. Ki67 staining (magenta) shows proliferating GCPs in the EGL. C. Representative images of Ki67 staining in WT and VGF-overexpressing mice. Scale bar = 50  $\mu$ m. D. The percentage of Ki67<sup>+</sup> cells into Hoechst<sup>+</sup> all cells in the EGL. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 8 or 10). EGL: external granule layer, GCP: granule cell precursor, IGL: internal granule layer, pHH3: phospho histone H3, Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-6 初代培養細胞における顆粒細胞前駆細胞の増殖能の評価

小脳の組織標本を用いた検討において、顆粒細胞前駆細胞の増殖能の減少が認められた。同様の現象を *in vitro* においても検討した。まず、本検討で使用した初代培養細胞は小脳顆粒細胞前駆細胞のマーカーである Math1<sup>+</sup>細胞が非常に豊富に存在していた (Fig. 38A)。BrdU はチミジンアナログであり、細胞周期の S 期において新たに合成された DNA に取り込まれる。したがって、BrdU<sup>+</sup>細胞率を求めることで細胞の増殖能を評価できる。VGF 過剰発現マウス由来の小脳初代培養細胞の BrdU<sup>+</sup>細胞率は野生型マウス由来の初代培養細胞に比べて有意に減少した (Fig. 38B, C)。



**Fig. 38 Reduction of potential proliferation in GCPs of VGF-overexpressing mice.**

A. Representative images show proliferating cells (red by BrdU expression) in WT and VGF-overexpressing mice. Nuclei are blue by Hoechst 33342 staining. Scale bar = 500  $\mu$ m. B. Representative images of Math1 staining in WT and VGF-overexpressing mice. C. The quantitative data shows the percentage of BrdU<sup>+</sup> cells in WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the fold difference versus WT mice  $\pm$  SEM. (n = 6 or 7). \*  $P < 0.05$  vs. WT mice (Student's *t*-test). BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine, GCP: granule cell precursor, Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-7 VGF 過剰発現マウスの発達期の小脳の増殖関連シグナルの発現変化

これまでの検討において認められた顆粒細胞の発生異常の分子メカニズムを明らかにするために、顆粒細胞の増殖に関与するシグナルの発現量を評価した。Fig. 39 に示すように顆粒細胞の増殖には Shh シグナルや Wnt シグナル、MAPK シグナル等が重要であることが報告されている。発達期の VGF 過剰発現マウスの小脳における上記のシグナル変化を検討した。生後 3 日目の VGF 過剰発現マウスの小脳において、MAPK シグナルの関連タンパク質である Erk1 及び Trk のリン酸化が有意に増加した (Fig. 40A, B)。一方、Shh シグナル及び Wnt シグナルの関連タンパク質である Gli2 及び活性型  $\beta$ -カテニンの発現量に変化は認められなかった (Fig. 40C)。

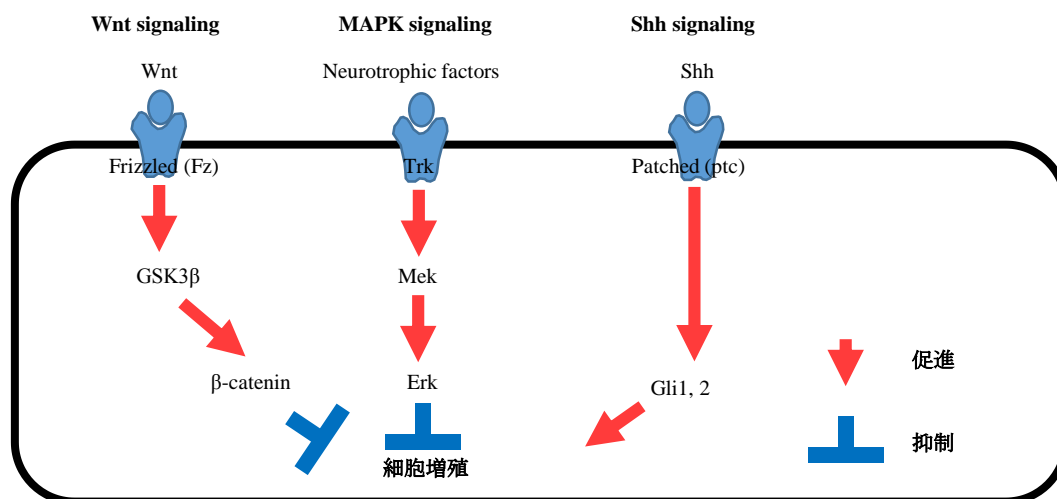
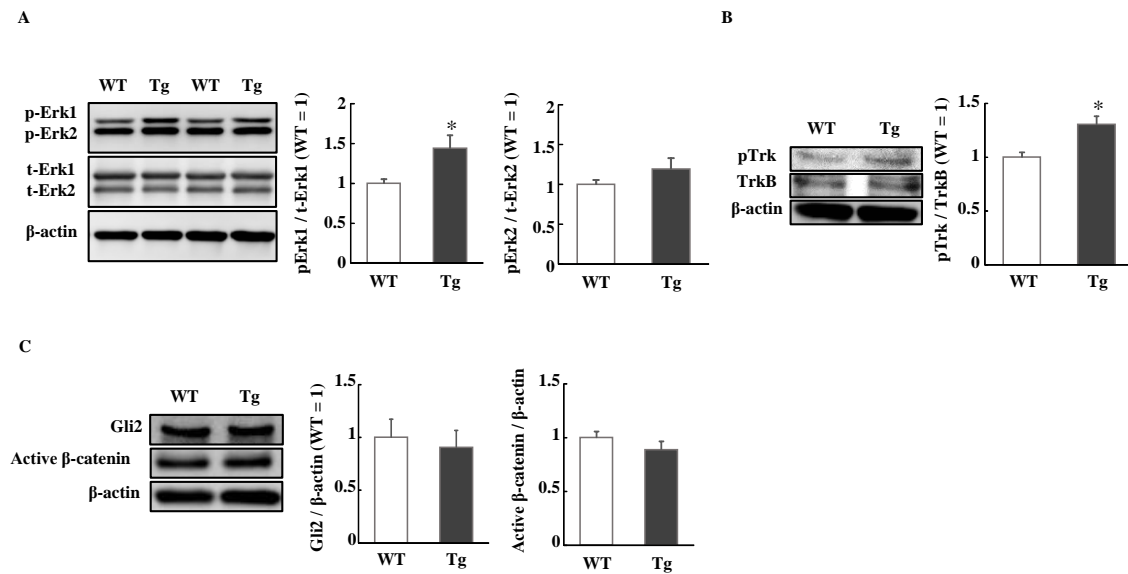


Fig. 39 Signaling which is implicated in the proliferation of granule cell precursors.



**Fig. 40 The expression changes of MAPK, Wnt, and Shh signaling in VGF-overexpressing mice during the developmental period.**

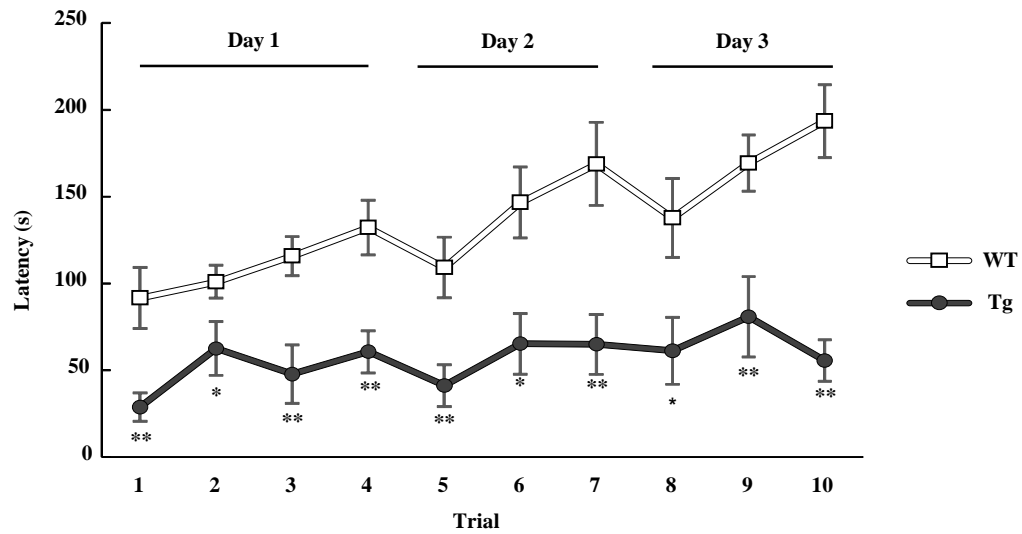
A. Representative images show pErk, Erk, and  $\beta$ -actin. The quantitative data show the expression pErk1 and pErk2 during the developmental period relative to Erk1 and Erk2 levels. Data are expressed as the fold difference versus WT mice  $\pm$  SEM. (n = 8 or 11). \*  $P < 0.05$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). B. Representative images show pTrk, TrkB, and  $\beta$ -actin. The quantitative data show the expression pTrk during the developmental period relative to the TrkB level. Data are expressed as the fold difference versus WT mice  $\pm$  SEM. (n = 3 or 6). \*  $P < 0.05$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). C. Representative images show Gli2, active  $\beta$ -catenin, and  $\beta$ -actin. The quantitative data show the expression Gli2 and active  $\beta$ -catenin during the developmental period relative to the  $\beta$ -actin level. Data are expressed as the fold difference versus WT mice  $\pm$  SEM. (n = 8 or 11). Shh: sonic hedgehog, Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

### 3-8 VGF 過剰発現マウスの運動機能の評価

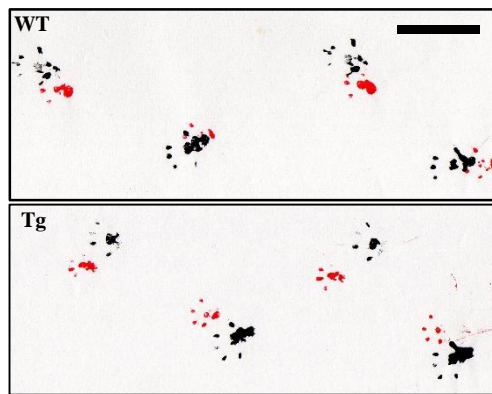
最後に小脳が担う重要な機能の一つである運動機能について評価を行うために、ロータロッド試験及びフットプリント試験を行った。ロータロッド試験は回転する棒の上にマウスを乗せ、落下するまでの時間を評価する試験であり協調運動の評価を行うことができる。VGF 過剰発現マウスはすべての試行において、野生型マウスと比べ回転する棒から落下するまでの時間が有意に減少した (Fig. 41A)。また、フットプリント試験はマウスの歩行した際の足跡から歩行パターンを評価し、マウスの歩行機能の評価する試験である。VGF 過剰発現マウスにおいて、後肢の足幅の有意な増加と前肢の歩幅の有意な減少が認められた (Fig. 41B, C)。



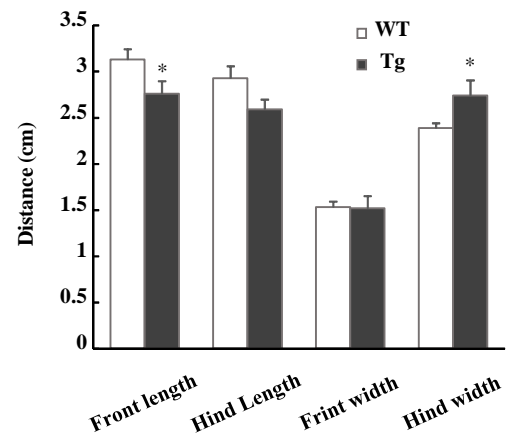
A



B



C



**Fig. 41 Ataxic phenotypes of VGF-overexpressing mice.**

A. Latency to fall of WT and VGF-overexpressing mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 8 or 10). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). B. Representative images of the footprint test in WT and VGF-overexpressing mice. C. The stride length and base width of front and hind feet. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 8 or 10). \*  $P < 0.05$  vs. WT mice (Student's  $t$ -test). Tg: VGF-overexpressing mice, WT: wild-type.

#### 第4節 考察

脳の発生異常は、統合失調症や自閉症を初めとする精神疾患の病態に関与していることが知られている (151-153)。VGF は海馬初代培養細胞及び大脳皮質初代培養細胞において、神経新生促進作用及び神経突起伸長促進作用を有することが報告されている (39, 40, 142, 143)。しかし、VGF が生体の脳の発生にどのような影響を及ぼすかは不明な点が多い。本章では、VGF が小脳の神経細胞の発生に影響を及ぼす可能性を初めて実証した。成体期及び生後発達期の VGF 過剰発現マウスの小脳の低形成及び顆粒細胞の発生異常を明らかにした。また、生後発達期の小脳において増殖に関連している MAPK シグナルの亢進を明らかにした。さらに、成体期の VGF 過剰発現マウスにおいて小脳の機能が関与する運動機能の異常が認められた。

緒言で述べた通り、小脳は外側から分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層及び白質と明瞭な層構造を有しており、形態学的な評価が容易である。また、小脳はその構造から内側の小脳虫部と外側の小脳半球部に分けられ小脳虫部は十個、小脳半球部は四個の葉を有している (154)。本検討では、VGF 過剰発現マウスの成体期の小脳の組織学的な検討から、最も顕著な変化が認められた顆粒細胞層の主細胞である顆粒細胞の発生について検討した。

緒言で示した通り、菱脳唇から産生される顆粒細胞前駆細胞は、前方へ軟膜直下を沿うように移動し外顆粒層を形成する (155)。外顆粒層において小脳顆粒細胞前駆細胞は増殖を続け、その後細胞周期を脱する。さらに、分化した小脳顆粒細胞はプルキンエ細胞層を超えて IGL に遊走する。本章の実験成績から、VGF 過剰発現マウスの小脳顆粒細胞前駆細胞の増殖能が低下していることを明らかにし、それが顆粒細胞層の低形成につながっている可能性が示唆され

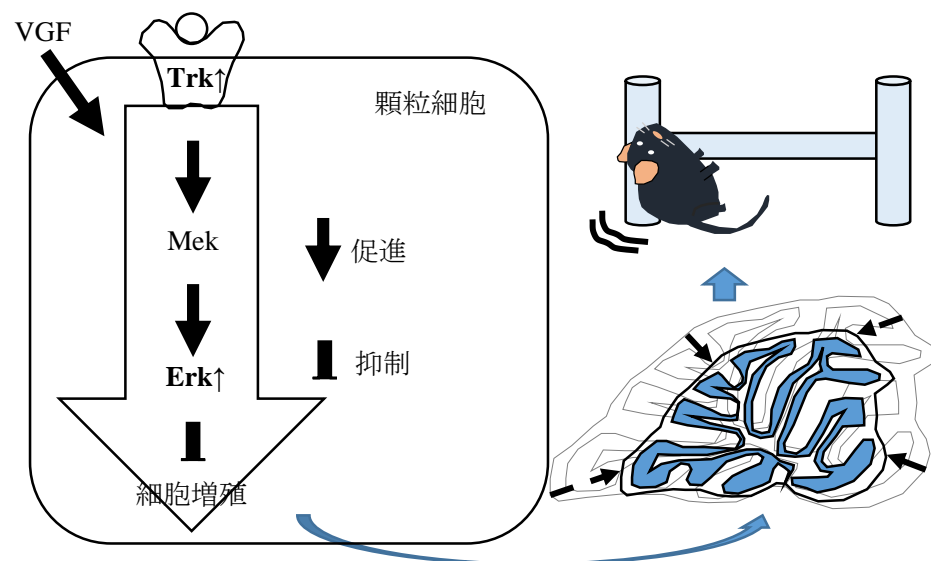
た。また、その分子メカニズムとして MAPK シグナルの関連タンパク質として、Erk 及び Trk のリン酸化が促進した。

Trk は BDNF や NT-3 を含めた成長因子の受容体である (156)。発達期の脳において、*trkA* mRNA は *trkB* や *trkC* mRNA に比較して発現量が少ないこと、また *trkB* mRNA は *Vgf* mRNA と最も高い共発現をしていることが報告されている (157)。以上のことから、本章の実験成績において認められた Trk のリン酸化の亢進は、TrkB に依存する可能性が示唆された。成長因子は小脳顆粒細胞の分化及び遊走を促進し、分化した顆粒細胞の成熟、維持を促進することが報告されている (146, 147, 158, 159)。さらに、BDNF や NT-3 の放出を制御する  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activator protein for secretion (CAPS) 2<sup>-/-</sup>マウスにおいて、顆粒細胞前駆細胞の分化が遅延し、外顆粒層が野生型マウスにおいてほとんど観察されなかった時期に明らかに認められている (147)。一般的に細胞周期の回転が低下すると、細胞の増殖能が低下することを加味すると、神経栄養因子は顆粒細胞前駆細胞に対して細胞周期から脱し、増殖能を低下させ、分化を促進する作用を有することが示唆される (160)。Erk は Ras/Raf/MEK/ERK シグナルカスケードの下流の因子である。Erk は細胞の増殖において促進的、抑制的の両方向に働き得ることが報告されている (161)。また、Erk は 44 kDa の Erk1 と 42 kDa の Erk2 の二つのアイソフォームからなる。Erk1 と Erk2 は 83%の相同性を有しているが、神経新生に対して異なる作用を有していることが知られている (162, 163)。Erk2 は細胞増殖を促進させる作用があるのに対して、Erk1 は細胞増殖に抑制的に働く (163, 164)。さらに、小脳顆粒細胞前駆細胞においては、Erk の活性化は RAS や Wnt3 を介して増殖能を減少させることが報告されている (159, 165)。以上のことから、本章の実験成績及び過去の報告から考察すると、VGF

は小脳顆粒細胞前駆細胞において Trk 及び Erk1 のリン酸化を介して細胞増殖を抑制している可能性が考えられる。

VGF 過剰発現マウスは、小脳の発生異常に加えて、協調運動及び歩行機能に異常が認められた。これらの行動異常は、小脳の機能異常を伴うマウスにおいて報告されている (166, 167)。VGF 過剰発現マウスの小脳は通常の間層構造を有していたにもかかわらず、小脳顆粒細胞前駆細胞の発生に異常が認められた。適切な小脳の細胞の発生は各細胞において密接につながっており、その異常は小脳の神経回路に影響を及ぼす。したがって、VGF 過剰発現マウスにおいて認められた顆粒細胞前駆細胞の発生異常は、小脳の神経回路の形成に影響を及ぼし、その結果運動機能に障害を与えた可能性が示唆された。しかし、VGF 過剰発現マウスの小脳の神経機能の検討は行っておらず、将来的に電気生理学的手法等を用いて詳細に検討する必要がある。また、第 1 章の実験成績から VGF 過剰発現マウスは、運動機能に影響を及ぼすことが報告されている線条体の形態学的異常も明らかにしている。したがって、本章で明らかにした VGF 過剰発現マウスの運動機能の異常は、小脳及び線条体の両方の異常に起因することを加味する必要がある。

以上、本章において、VGF の過剰発現は神経の増殖、分化及び成熟に重要な Trk/Erk シグナルを活性化し、顆粒細胞の発生を障害し、成体期の運動機能に影響を及ぼすことを明らかにした。



**Fig. 42 The mechanism of the role of VGF in cerebellar development.**

## 総括及び結論

精神疾患とは、精神・行動の異常が症状である疾患の総称である。代表的なものとして、統合失調症、うつ病、自閉症が挙げられる。その生涯有病率は約30%と罹患する確率が高く、近年、精神疾患によって医療機関を受診している患者数は急激に増加している。また、WHO の調べによると、精神疾患は本邦において生涯調整生命年 (disability-adjusted life year disability-adjusted life year: DALY) に最も影響を及ぼす疾患と位置付けられている。しかし、生化学的な診断法の確立や根本的な病態の解明は達成しておらず、現在の治療では未だ不十分な点が多い。

本研究では、精神疾患の病態解明と新規治療ターゲット探索を目的に、精神疾患患者において発現量変化及び遺伝的関与が報告されている VGF に着目し、その発現増加が脳機能に及ぼす影響を検討した。

第1章では、本学薬効解析学研究室で開発した VGF 過剰発現マウスを用いて、行動試験により精神行動に対する VGF の発現増加の影響を検討した。また、ニッスル染色を用いて脳の組織学的検討を行った。

- 1) VGF 過剰発現マウスの脳の各部位において VGF タンパク質及び Vgf mRNA の発現増加が認められた。
- 2) VGF 過剰発現マウスの脳重量が減少しており、それに伴い側脳室の拡大が認められた。
- 3) VGF 過剰発現マウスにおいて線条体の体積減少及び細胞密度の増加が認められた。
- 4) VGF 過剰発現マウスは、過活動、ワーキングメモリー障害、抑うつ行動の増加、社会性の低下等の行動異常が認められた。

第2章では、行動薬理学的手法を用いて統合失調症病態に対する VGF の発現増加の影響を検討した。

- 1) VGF 過剰発現マウスは、統合失調症の中間表現型であるプレパルスインヒビションに障害が認められた。
- 2) VGF 過剰発現マウスにおいて認められた過活動は、抗精神病薬であるハロペリドール及びオランザピンによって抑制された。
- 3) VGF 過剰発現マウスはハロペリドール誘発カタレプシーの反応性が増加した。

第3章では、統合失調症をはじめとする精神疾患の原因の一つとして考えられている神経発達における VGF の発現増加の影響を、小脳を対象に検討した。

- 1) VGF 過剰発現マウスの発達期の小脳において、VGF タンパク質及び *Vgf* mRNA の発現増加が認められた。
- 2) 成体期の VGF 過剰発現マウスにおいて、小脳の低形成が認められた。
- 3) 顆粒細胞が存在する顆粒細胞層の低形成は認められたが、プルキンエ細胞及びバグマングリア には形態学的な異常は認められなかった。
- 4) 発達期の VGF 過剰発現マウスにおいて、小脳及び顆粒細胞層の低形成が認められ、顆粒細胞前駆細胞の増殖能の低下が認められた。
- 5) 発達期の VGF 過剰発現マウスにおいて、MAPK シグナルの一つである Trk 及び Erk1 のリン酸化が亢進した。
- 6) 成体期の VGF 過剰発現マウスにおいて、運動機能の異常が認められた。

本研究において、VGF 過剰発現マウスは統合失調症やうつ病に関連した行動異常を示すことを明らかにした。このことから、VGF 過剰発現マウスはうつ病

や統合失調症の表面妥当性も満たすモデルマウスであることが示唆された。また、VGF 過剰発現マウスが示す行動異常の一部は抗精神病薬によって抑制されることを明らかにした。したがって、統合失調症においては、表面妥当性だけでなく、予測妥当性も満たすモデルマウスであることが強く示唆された。また、VGF 過剰発現マウスは脳重量低下、側脳室拡大、線条体及び小脳の組織学的異常を示すことや小脳顆粒細胞の神経発生異常を示すことを明らかにした。これらのことから、VGF は神経の発生において重要な役割を担うことが示唆された。

以上、精神疾患患者において報告されている VGF の発現増加は、精神疾患の中でもとくに統合失調症病態に関与することを明らかにした。また、統合失調症の原因の一つとして考えられている神経発達における VGF の役割を明らかにした。VGF は精神疾患特に統合失調症の新規治療標的及びバイオマーカーになることが期待される。



## 謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました恩師 岐阜薬科大学 学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本実験に際して終始御懇切なる御指導並びに御助言を賜りました岐阜薬科大学 学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士、助教 中村信介博士、前講師 鶴間一寛博士に深謝致します。また、諸種のご協力を頂きました薬効解析学研究室諸氏に心より感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なるご助言を賜りました岐阜薬科大学 学生体機能解析学大講座分子生物学研究室教授 福光秀文博士、岐阜薬科大学 生命薬学大講座生化学研究室講師 遠藤智史博士並びに岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座 臨床薬剤学研究室講師 神谷哲朗博士に深謝致します。

本研究は JSPS 科研費 18J14970 の助成を受けたものです。

## 引用文献

1. Americal Psychiatric Association, W., D., C. (2013) American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, Fifth Edition, DSM-5.
2. Ikebuchi, E. (2015) [Negative Symptoms Revisited--Toward the Recovery of Persons with Schizophrenia]. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* **117**, 179-194
3. Penn, E., and Tracy, D. K. (2012) The drugs don't work? antidepressants and the current and future pharmacological management of depression. *Ther Adv Psychopharmacol* **2**, 179-188
4. Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr., and Kunkel, L. M. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919-928
5. Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M., and Kunkel, L. M. (1986) Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* **323**, 646-650
6. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* **72**, 971-983
7. Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., Watkins, P. C., Ottina, K., Wallace, M. R., Sakaguchi, A. Y., and et al. (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* **306**, 234-238
8. Nothen, M. M., Wildenauer, D., Cichon, S., Albus, M., Maier, W., Minges, J., Lichtermann, D., Bondy, B., Rietschel, M., Korner, J., and et al. (1994) Dopamine D2 receptor molecular variant and schizophrenia. *Lancet* **343**, 1301-1302
9. Wellcome Trust Case Control, C. (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**, 661-678
10. International Schizophrenia, C., Purcell, S. M., Wray, N. R., Stone, J. L., Visscher, P. M., O'Donovan, M. C., Sullivan, P. F., and Sklar, P. (2009) Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* **460**, 748-752
11. O'Donovan, M. C., Craddock, N., Norton, N., Williams, H., Peirce, T., Moskvina, V., Nikolov, I., Hamshere, M., Carroll, L., Georgieva, L., Dwyer, S., Holmans, P., Marchini, J. L., Spencer, C. C., Howie, B., Leung, H. T., Hartmann, A. M., Moller, H. J., Morris, D. W., Shi, Y., Feng, G., Hoffmann, P., Propping, P., Vasilescu, C., Maier, W., Rietschel, M., Zammit, S., Schumacher, J., Quinn, E. M., Schulze, T. G., Williams, N. M., Giegling, I., Iwata, N., Ikeda, M., Darvasi, A., Shifman, S., He, L.,

- Duan, J., Sanders, A. R., Levinson, D. F., Gejman, P. V., Cichon, S., Nothen, M. M., Gill, M., Corvin, A., Rujescu, D., Kirov, G., Owen, M. J., Buccola, N. G., Mowry, B. J., Freedman, R., Amin, F., Black, D. W., Silverman, J. M., Byerley, W. F., Cloninger, C. R., and Molecular Genetics of Schizophrenia, C. (2008) Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat Genet* **40**, 1053-1055
12. Shi, J., Levinson, D. F., Duan, J., Sanders, A. R., Zheng, Y., Pe'er, I., Dudbridge, F., Holmans, P. A., Whittemore, A. S., Mowry, B. J., Olincy, A., Amin, F., Cloninger, C. R., Silverman, J. M., Buccola, N. G., Byerley, W. F., Black, D. W., Crowe, R. R., Oksenberg, J. R., Mirel, D. B., Kendler, K. S., Freedman, R., and Gejman, P. V. (2009) Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* **460**, 753-757
  13. Stefansson, H., Ophoff, R. A., Steinberg, S., Andreassen, O. A., Cichon, S., Rujescu, D., Werge, T., Pietilainen, O. P., Mors, O., Mortensen, P. B., Sigurdsson, E., Gustafsson, O., Nyegaard, M., Tuulio-Henriksson, A., Ingason, A., Hansen, T., Suvisaari, J., Lonnqvist, J., Paunio, T., Borglum, A. D., Hartmann, A., Fink-Jensen, A., Nordentoft, M., Hougaard, D., Norgaard-Pedersen, B., Bottcher, Y., Olesen, J., Breuer, R., Moller, H. J., Giegling, I., Rasmussen, H. B., Timm, S., Mattheisen, M., Bitter, I., Rethelyi, J. M., Magnusdottir, B. B., Sigmundsson, T., Olason, P., Masson, G., Gulcher, J. R., Haraldsson, M., Fossdal, R., Thorgeirsson, T. E., Thorsteinsdottir, U., Ruggeri, M., Tosato, S., Franke, B., Strengman, E., Kiemene, L. A., Genetic, R., Outcome in, P., Melle, I., Djurovic, S., Abramova, L., Kaleda, V., Sanjuan, J., de Frutos, R., Bramon, E., Vassos, E., Fraser, G., Ettinger, U., Picchioni, M., Walker, N., Touloupoulou, T., Need, A. C., Ge, D., Yoon, J. L., Shianna, K. V., Freimer, N. B., Cantor, R. M., Murray, R., Kong, A., Golimbet, V., Carracedo, A., Arango, C., Costas, J., Jonsson, E. G., Terenius, L., Agartz, I., Petursson, H., Nothen, M. M., Rietschel, M., Matthews, P. M., Muglia, P., Peltonen, L., St Clair, D., Goldstein, D. B., Stefansson, K., and Collier, D. A. (2009) Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* **460**, 744-747
  14. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, C. (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**, 421-427
  15. Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., Lundin, P., Maner, S., Massa, H., Walker, M., Chi, M., Navin, N., Lucito, R., Healy, J., Hicks, J., Ye, K., Reiner, A., Gilliam, T. C., Trask, B., Patterson, N., Zetterberg, A., and Wigler, M. (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* **305**, 525-528

16. Kushima, I., Aleksic, B., Nakatochi, M., Shimamura, T., Shiino, T., Yoshimi, A., Kimura, H., Takasaki, Y., Wang, C., Xing, J., Ishizuka, K., Oya-Ito, T., Nakamura, Y., Arioka, Y., Maeda, T., Yamamoto, M., Yoshida, M., Noma, H., Hamada, S., Morikawa, M., Uno, Y., Okada, T., Iidaka, T., Iritani, S., Yamamoto, T., Miyashita, M., Kobori, A., Arai, M., Itokawa, M., Cheng, M. C., Chuang, Y. A., Chen, C. H., Suzuki, M., Takahashi, T., Hashimoto, R., Yamamori, H., Yasuda, Y., Watanabe, Y., Nunokawa, A., Someya, T., Ikeda, M., Toyota, T., Yoshikawa, T., Numata, S., Ohmori, T., Kunimoto, S., Mori, D., Iwata, N., and Ozaki, N. (2017) High-resolution copy number variation analysis of schizophrenia in Japan. *Mol Psychiatry* **22**, 430-440
17. Botto, L. D., May, K., Fernhoff, P. M., Correa, A., Coleman, K., Rasmussen, S. A., Merritt, R. K., O'Leary, L. A., Wong, L. Y., Elixson, E. M., Mahle, W. T., and Campbell, R. M. (2003) A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics* **112**, 101-107
18. Karayiorgou, M., Simon, T. J., and Gogos, J. A. (2010) 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* **11**, 402-416
19. Gothelf, D., Presburger, G., Zohar, A. H., Burg, M., Nahmani, A., Frydman, M., Shohat, M., Inbar, D., Aviram-Goldring, A., Yeshaya, J., Steinberg, T., Finkelstein, Y., Frisch, A., Weizman, A., and Apter, A. (2004) Obsessive-compulsive disorder in patients with velocardiofacial (22q11 deletion) syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **126B**, 99-105
20. Jonas, R. K., Montojo, C. A., and Bearden, C. E. (2014) The 22q11.2 deletion syndrome as a window into complex neuropsychiatric disorders over the lifespan. *Biol Psychiatry* **75**, 351-360
21. Kimber, W. L., Hsieh, P., Hirotsune, S., Yuva-Paylor, L., Sutherland, H. F., Chen, A., Ruiz-Lozano, P., Hoogstraten-Miller, S. L., Chien, K. R., Paylor, R., Scambler, P. J., and Wynshaw-Boris, A. (1999) Deletion of 150 kb in the minimal DiGeorge/velocardiofacial syndrome critical region in mouse. *Hum Mol Genet* **8**, 2229-2237
22. Paylor, R., Glaser, B., Mupo, A., Ataliotis, P., Spencer, C., Sobotka, A., Sparks, C., Choi, C. H., Oghalai, J., Curran, S., Murphy, K. C., Monks, S., Williams, N., O'Donovan, M. C., Owen, M. J., Scambler, P. J., and Lindsay, E. (2006) Tbx1 haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: implications for 22q11 deletion syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7729-7734

23. Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G., and Aubry, J. M. (2002) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* **109**, 143-148
24. Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., Nakazato, M., Watanabe, H., Shinoda, N., Okada, S., and Iyo, M. (2003) Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* **54**, 70-75
25. Yoshimura, R., Mitoma, M., Sugita, A., Hori, H., Okamoto, T., Umene, W., Ueda, N., and Nakamura, J. (2007) Effects of paroxetine or milnacipran on serum brain-derived neurotrophic factor in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**, 1034-1037
26. Okamoto, T., Yoshimura, R., Ikenouchi-Sugita, A., Hori, H., Umene-Nakano, W., Inoue, Y., Ueda, N., and Nakamura, J. (2008) Efficacy of electroconvulsive therapy is associated with changing blood levels of homovanillic acid and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in refractory depressed patients: a pilot study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **32**, 1185-1190
27. Yukimasa, T., Yoshimura, R., Tamagawa, A., Uozumi, T., Shinkai, K., Ueda, N., Tsuji, S., and Nakamura, J. (2006) High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves refractory depression by influencing catecholamine and brain-derived neurotrophic factors. *Pharmacopsychiatry* **39**, 52-59
28. Iga, J., Ueno, S., and Ohmori, T. (2008) Molecular assessment of depression from mRNAs in the peripheral leukocytes. *Ann Med* **40**, 336-342
29. Iga, J., Ueno, S., Yamauchi, K., Motoki, I., Tayoshi, S., Ohta, K., Song, H., Morita, K., Rokutan, K., and Ohmori, T. (2005) Serotonin transporter mRNA expression in peripheral leukocytes of patients with major depression before and after treatment with paroxetine. *Neurosci Lett* **389**, 12-16
30. Tsao, C. W., Lin, Y. S., Chen, C. C., Bai, C. H., and Wu, S. R. (2006) Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **30**, 899-905
31. Possenti, R., Eldridge, J. D., Paterson, B. M., Grasso, A., and Levi, A. (1989) A protein induced by NGF in PC12 cells is stored in secretory vesicles and released through the regulated pathway. *EMBO J* **8**, 2217-2223
32. Benson, D. L., and Salton, S. R. (1996) Expression and polarization of VGF in developing hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res* **96**, 219-228
33. Laslop, A., Mahata, S. K., Wolkersdorfer, M., Mahata, M., Srivastava, M., Seidah, N. G., Fischer-Colbrie, R., and Winkler, H. (1994) Large dense-core vesicles in rat

- adrenal after reserpine: levels of mRNAs of soluble and membrane-bound constituents in chromaffin and ganglion cells indicate a biosynthesis of vesicles with higher secretory quanta. *J Neurochem* **62**, 2448-2456
34. Lewis, J. E., Brameld, J. M., and Jethwa, P. H. (2015) Neuroendocrine Role for VGF. *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**, 3
  35. van den Pol, A. N., Bina, K., Decavel, C., and Ghosh, P. (1994) VGF expression in the brain. *J Comp Neurol* **347**, 455-469
  36. Yamaguchi, H., Sasaki, K., Satomi, Y., Shimbara, T., Kageyama, H., Mondal, M. S., Toshinai, K., Date, Y., Gonzalez, L. J., Shioda, S., Takao, T., Nakazato, M., and Minamino, N. (2007) Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J Biol Chem* **282**, 26354-26360
  37. Snyder, S. E., and Salton, S. R. (1998) Expression of VGF mRNA in the adult rat central nervous system. *J Comp Neurol* **394**, 91-105
  38. Bozdagi, O., Rich, E., Tronel, S., Sadahiro, M., Patterson, K., Shapiro, M. L., Alberini, C. M., Huntley, G. W., and Salton, S. R. (2008) The neurotrophin-inducible gene *Vgf* regulates hippocampal function and behavior through a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. *J Neurosci* **28**, 9857-9869
  39. Hunsberger, J. G., Newton, S. S., Bennett, A. H., Duman, C. H., Russell, D. S., Salton, S. R., and Duman, R. S. (2007) Antidepressant actions of the exercise-regulated gene VGF. *Nat Med* **13**, 1476-1482
  40. Sato, H., Fukutani, Y., Yamamoto, Y., Tatara, E., Takemoto, M., Shimamura, K., and Yamamoto, N. (2012) Thalamus-derived molecules promote survival and dendritic growth of developing cortical neurons. *J Neurosci* **32**, 15388-15402
  41. Levi, A., Eldridge, J. D., and Paterson, B. M. (1985) Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science* **229**, 393-395
  42. Bonni, A., Ginty, D. D., Dudek, H., and Greenberg, M. E. (1995) Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Mol Cell Neurosci* **6**, 168-183
  43. Lin, W. J., Jiang, C., Sadahiro, M., Bozdagi, O., Vulchanova, L., Alberini, C. M., and Salton, S. R. (2015) VGF and Its C-Terminal Peptide TLQP-62 Regulate Memory Formation in Hippocampus via a BDNF-TrkB-Dependent Mechanism. *J Neurosci* **35**, 10343-10356
  44. Cattaneo, A., Bocchio-Chiavetto, L., Zanardini, R., Milanesi, E., Placentino, A., and Gennarelli, M. (2010) Reduced peripheral brain-derived neurotrophic factor mRNA levels are normalized by antidepressant treatment. *Int J Neuropsychopharmacol* **13**, 103-108

45. Jiang, H., Chen, S., Lu, N., Yue, Y., Yin, Y., Zhang, Y., Jiang, W., Liang, J., and Yuan, Y. (2017) Reduced serum VGF levels were reversed by antidepressant treatment in depressed patients. *World J Biol Psychiatry* **18**, 586-591
46. Doherty, J. L., O'Donovan, M. C., and Owen, M. J. (2012) Recent genomic advances in schizophrenia. *Clin Genet* **81**, 103-109
47. Huang, J. T., Leweke, F. M., Tsang, T. M., Koethe, D., Kranaster, L., Gerth, C. W., Gross, S., Schreiber, D., Ruhrmann, S., Schultze-Lutter, F., Klosterkotter, J., Holmes, E., and Bahn, S. (2007) CSF metabolic and proteomic profiles in patients prodromal for psychosis. *PLoS One* **2**, e756
48. Huang, J. T., Leweke, F. M., Oxley, D., Wang, L., Harris, N., Koethe, D., Gerth, C. W., Nolden, B. M., Gross, S., Schreiber, D., Reed, B., and Bahn, S. (2006) Disease biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with first-onset psychosis. *PLoS Med* **3**, e428
49. Wedenoja, J., Loukola, A., Tuulio-Henriksson, A., Paunio, T., Ekelund, J., Silander, K., Varilo, T., Heikkilä, K., Suvisaari, J., Partonen, T., Lonnqvist, J., and Peltonen, L. (2008) Replication of linkage on chromosome 7q22 and association of the regional Reelin gene with working memory in schizophrenia families. *Mol Psychiatry* **13**, 673-684
50. Thakker-Varia, S., Jean, Y. Y., Parikh, P., Sizer, C. F., Jernstedt Ayer, J., Parikh, A., Hyde, T. M., Buyske, S., and Alder, J. (2010) The neuropeptide VGF is reduced in human bipolar postmortem brain and contributes to some of the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci* **30**, 9368-9380
51. Nomura, J., Kannan, G., and Takumi, T. (2017) Rodent models of genetic and chromosomal variations in psychiatric disorders. *Psychiatry Clin Neurosci* **71**, 508-517
52. Sarnyai, Z., Jashar, C., and Olivier, B. (2015) Modeling combined schizophrenia-related behavioral and metabolic phenotypes in rodents. *Behav Brain Res* **276**, 130-142
53. Willner, P. (1984) The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* **83**, 1-16
54. Dai, Y., Dudek, N. L., Li, Q., Fowler, S. C., and Muma, N. A. (2009) Striatal expression of a calmodulin fragment improved motor function, weight loss, and neuropathology in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* **29**, 11550-11559
55. Rauskolb, S., Zagrebelsky, M., Drenjak, A., Deogracias, R., Matsumoto, T., Wiese, S., Erne, B., Sendtner, M., Schaeren-Wiemers, N., Korte, M., and Barde, Y. A. (2010)

- Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth. *J Neurosci* **30**, 1739-1749
56. Kakefuda, K., Oyagi, A., Ishisaka, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yokota, K., Shirai, Y., Horie, K., Saito, N., Takeda, J., and Hara, H. (2010) Diacylglycerol kinase beta knockout mice exhibit lithium-sensitive behavioral abnormalities. *PLoS One* **5**, e13447
  57. Oyagi, A., Oida, Y., Kakefuda, K., Shimazawa, M., Shioda, N., Moriguchi, S., Kitaichi, K., Nanba, D., Yamaguchi, K., Furuta, Y., Fukunaga, K., Higashiyama, S., and Hara, H. (2009) Generation and characterization of conditional heparin-binding EGF-like growth factor knockout mice. *PLoS One* **4**, e7461
  58. Ohba, T., Yoshino, Y., Ishisaka, M., Abe, N., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Oyama, M., Tabira, T., and Hara, H. (2015) Japanese Huperzia serrata extract and the constituent, huperzine A, ameliorate the scopolamine-induced cognitive impairment in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **79**, 1838-1844
  59. Zhu, J. P., Xu, W., and Angulo, J. A. (2006) Methamphetamine-induced cell death: selective vulnerability in neuronal subpopulations of the striatum in mice. *Neuroscience* **140**, 607-622
  60. Bruhwyler, J. (1990) Anxiolytic potential of a microgram dose of chlordiazepoxide in the open-field test. *Eur J Pharmacol* **187**, 547-549
  61. Deacon, R. M., and Rawlins, J. N. (2006) T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc* **1**, 7-12
  62. Swonger, A. K., and Rech, R. H. (1972) Serotonergic and cholinergic involvement in habituation of activity and spontaneous alternation of rats in a Y maze. *J Comp Physiol Psychol* **81**, 509-522
  63. Porsolt, R. D., Le Pichon, M., and Jalfre, M. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**, 730-732
  64. Hahm, S., Mizuno, T. M., Wu, T. J., Wisor, J. P., Priest, C. A., Kozak, C. A., Boozer, C. N., Peng, B., McEvoy, R. C., Good, P., Kelley, K. A., Takahashi, J. S., Pintar, J. E., Roberts, J. L., Mobbs, C. V., and Salton, S. R. (1999) Targeted deletion of the Vgf gene indicates that the encoded secretory peptide precursor plays a novel role in the regulation of energy balance. *Neuron* **23**, 537-548
  65. Kim, W. Y., Wang, X., Wu, Y., Doble, B. W., Patel, S., Woodgett, J. R., and Snider, W. D. (2009) GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. *Nat Neurosci* **12**, 1390-1397
  66. Uriguen, L., Gil-Pisa, I., Munarriz-Cuezva, E., Berrocoso, E., Pascau, J., Soto-Montenegro, M. L., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Madrigal, J. L., Castro, E.,



- Sanchez-Blazquez, P., Ortega, J. E., Guerrero, M. J., Ferrer-Alcon, M., Garcia-Sevilla, J. A., Mico, J. A., Desco, M., Leza, J. C., Pazos, A., Garzon, J., and Meana, J. J. (2013) Behavioral, neurochemical and morphological changes induced by the overexpression of munc18-1a in brain of mice: relevance to schizophrenia. *Transl Psychiatry* **3**, e221
67. Selemon, L. D., and Goldman-Rakic, P. S. (1999) The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* **45**, 17-25
  68. Selemon, L. D., Rajkowska, G., and Goldman-Rakic, P. S. (1995) Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch Gen Psychiatry* **52**, 805-818; discussion 819-820
  69. Takakusaki, K., Habaguchi, T., Ohtinata-Sugimoto, J., Saitoh, K., and Sakamoto, T. (2003) Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neuroscience* **119**, 293-308
  70. Winocur, G. (1974) Functional dissociation within the caudate nucleus of rats. *J Comp Physiol Psychol* **86**, 432-439
  71. Hashimoto, H., Shintani, N., Tanaka, K., Mori, W., Hirose, M., Matsuda, T., Sakaue, M., Miyazaki, J., Niwa, H., Tashiro, F., Yamamoto, K., Koga, K., Tomimoto, S., Kunugi, A., Suetake, S., and Baba, A. (2001) Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 13355-13360
  72. van den Buuse, M. (2010) Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: pharmacology and methodology aspects. *Schizophr Bull* **36**, 246-270
  73. van den Buuse, M., Wischhof, L., Lee, R. X., Martin, S., and Karl, T. (2009) Neuregulin 1 hypomorphic mutant mice: enhanced baseline locomotor activity but normal psychotropic drug-induced hyperlocomotion and prepulse inhibition regulation. *Int J Neuropsychopharmacol* **12**, 1383-1393
  74. von Engelhardt, J., Doganci, B., Jensen, V., Hvalby, O., Gongrich, C., Taylor, A., Barkus, C., Sanderson, D. J., Rawlins, J. N., Seeburg, P. H., Bannerman, D. M., and Monyer, H. (2008) Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron* **60**, 846-860
  75. Clapcote, S. J., Lipina, T. V., Millar, J. K., Mackie, S., Christie, S., Ogawa, F., Lerch, J. P., Trimble, K., Uchiyama, M., Sakuraba, Y., Kaneda, H., Shiroishi, T., Houslay, M. D., Henkelman, R. M., Sled, J. G., Gondo, Y., Porteous, D. J., and Roder, J. C.

- (2007) Behavioral phenotypes of *Disc1* missense mutations in mice. *Neuron* **54**, 387-402
76. Hashimoto, H., Hashimoto, R., Shintani, N., Tanaka, K., Yamamoto, A., Hatanaka, M., Guo, X., Morita, Y., Tanida, M., Nagai, K., Takeda, M., and Baba, A. (2009) Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. *J Neurochem* **110**, 595-602
  77. Ehrlichman, R. S., Luminais, S. N., White, S. L., Rudnick, N. D., Ma, N., Dow, H. C., Kreibich, A. S., Abel, T., Brodtkin, E. S., Hahn, C. G., and Siegel, S. J. (2009) Neuregulin 1 transgenic mice display reduced mismatch negativity, contextual fear conditioning and social interactions. *Brain Res* **1294**, 116-127
  78. Ishihama, T., Ago, Y., Shintani, N., Hashimoto, H., Baba, A., Takuma, K., and Matsuda, T. (2010) Environmental factors during early developmental period influence psychobehavioral abnormalities in adult PACAP-deficient mice. *Behav Brain Res* **209**, 274-280
  79. Kasahara, T., Takata, A., Kato, T. M., Kubota-Sakashita, M., Sawada, T., Kakita, A., Mizukami, H., Kaneda, D., Ozawa, K., and Kato, T. (2016) Depression-like episodes in mice harboring mtDNA deletions in paraventricular thalamus. *Mol Psychiatry* **21**, 39-48
  80. Meyer, U., Feldon, J., Schedlowski, M., and Yee, B. K. (2005) Towards an immunoprecipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* **29**, 913-947
  81. Yu, T., Guo, M., Garza, J., Rendon, S., Sun, X. L., Zhang, W., and Lu, X. Y. (2011) Cognitive and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice: an animal model of depression with cognitive dysfunction. *Int J Neuropsychopharmacol* **14**, 303-317
  82. Grizzell, J. A., Iarkov, A., Holmes, R., Mori, T., and Echeverria, V. (2014) Cotinine reduces depressive-like behavior, working memory deficits, and synaptic loss associated with chronic stress in mice. *Behav Brain Res* **268**, 55-65
  83. Willner, P., Muscat, R., and Papp, M. (1992) Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* **16**, 525-534
  84. Bian, Y., Yang, L., Wang, Z., Wang, Q., Zeng, L., and Xu, G. (2015) Repeated Three-Hour Maternal Separation Induces Depression-Like Behavior and Affects the Expression of Hippocampal Plasticity-Related Proteins in C57BL/6N Mice. *Neural Plast* **2015**, 627837
  85. Heldt, S. A., Stanek, L., Chhatwal, J. P., and Ressler, K. J. (2007) Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of

- aversive memories. *Mol Psychiatry* **12**, 656-670
86. Papaleo, F., Silverman, J. L., Aney, J., Tian, Q., Barkan, C. L., Chadman, K. K., and Crawley, J. N. (2011) Working memory deficits, increased anxiety-like traits, and seizure susceptibility in BDNF overexpressing mice. *Learn Mem* **18**, 534-544
  87. Berton, O., McClung, C. A., Dileone, R. J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S. J., Graham, D., Tsankova, N. M., Bolanos, C. A., Rios, M., Monteggia, L. M., Self, D. W., and Nestler, E. J. (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* **311**, 864-868
  88. Shirayama, Y., Chen, A. C., Nakagawa, S., Russell, D. S., and Duman, R. S. (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* **22**, 3251-3261
  89. Jiang, C., Lin, W. J., Sadahiro, M., Labonte, B., Menard, C., Pfau, M. L., Tamminga, C. A., Turecki, G., Nestler, E. J., Russo, S. J., and Salton, S. R. (2018) VGF function in depression and antidepressant efficacy. *Mol Psychiatry* **23**, 1632-1642
  90. Vilarino-Guell, C., Wider, C., Ross, O. A., Jasinska-Myga, B., Kachergus, J., Cobb, S. A., Soto-Ortolaza, A. I., Behrouz, B., Heckman, M. G., Diehl, N. N., Testa, C. M., Wszolek, Z. K., Uitti, R. J., Jankovic, J., Louis, E. D., Clark, L. N., Rajput, A., and Farrer, M. J. (2010) LINGO1 and LINGO2 variants are associated with essential tremor and Parkinson disease. *Neurogenetics* **11**, 401-408
  91. Wu, Y. W., Prakash, K. M., Rong, T. Y., Li, H. H., Xiao, Q., Tan, L. C., Au, W. L., Ding, J. Q., Chen, S. D., and Tan, E. K. (2011) Lingo2 variants associated with essential tremor and Parkinson's disease. *Hum Genet* **129**, 611-615
  92. Suzuki, N., Fukushi, M., Kosaki, K., Doyle, A. D., de Vega, S., Yoshizaki, K., Akazawa, C., Arikawa-Hirasawa, E., and Yamada, Y. (2012) Teneurin-4 is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination of small-diameter axons in the CNS. *J Neurosci* **32**, 11586-11599
  93. Dickson, D. W. (2012) Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**
  94. Balhara, Y. P., and Verma, R. (2012) Schizophrenia and suicide. *East Asian Arch Psychiatry* **22**, 126-133
  95. Owen, M. J., Sawa, A., and Mortensen, P. B. (2016) Schizophrenia. *Lancet* **388**, 86-97
  96. Seeman, P., and Lee, T. (1975) Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* **188**, 1217-1219
  97. Andersen, M. P., and Pouzet, B. (2001) Effects of acute versus chronic treatment

- with typical or atypical antipsychotics on d-amphetamine-induced sensorimotor gating deficits in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **156**, 291-304
98. Castall, B., Marsden, C. D., Naylor, R. J., and Pycock, C. J. (1977) Stereotyped behaviour patterns and hyperactivity induced by amphetamine and apomorphine after discrete 6-hydroxydopamine lesions of extrapyramidal and mesolimbic nuclei. *Brain Res* **123**, 89-111
  99. Qiao, H., Noda, Y., Kamei, H., Nagai, T., Furukawa, H., Miura, H., Kayukawa, Y., Ohta, T., and Nabeshima, T. (2001) Clozapine, but not haloperidol, reverses social behavior deficit in mice during withdrawal from chronic phencyclidine treatment. *Neuroreport* **12**, 11-15
  100. Javitt, D. C., and Zukin, S. R. (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* **148**, 1301-1308
  101. Miyamoto, Y., Yamada, K., Noda, Y., Mori, H., Mishina, M., and Nabeshima, T. (2001) Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor epsilon1 subunit. *J Neurosci* **21**, 750-757
  102. Mohn, A. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., and Koller, B. H. (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* **98**, 427-436
  103. Contreras, P. C. (1990) D-serine antagonized phencyclidine- and MK-801-induced stereotyped behavior and ataxia. *Neuropharmacology* **29**, 291-293
  104. Tsai, G., Yang, P., Chung, L. C., Lange, N., and Coyle, J. T. (1998) D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* **44**, 1081-1089
  105. Patil, S. T., Zhang, L., Martenyi, F., Lowe, S. L., Jackson, K. A., Andreev, B. V., Avedisova, A. S., Bardenstein, L. M., Gurovich, I. Y., Morozova, M. A., Mosolov, S. N., Neznanov, N. G., Reznik, A. M., Smulevich, A. B., Tochilov, V. A., Johnson, B. G., Monn, J. A., and Schoepp, D. D. (2007) Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat Med* **13**, 1102-1107
  106. Sullivan, P. F., Kendler, K. S., and Neale, M. C. (2003) Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* **60**, 1187-1192
  107. International Schizophrenia, C. (2008) Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* **455**, 237-241
  108. Millar, J. K., Wilson-Annan, J. C., Anderson, S., Christie, S., Taylor, M. S., Semple, C. A., Devon, R. S., St Clair, D. M., Muir, W. J., Blackwood, D. H., and Porteous, D. J. (2000) Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with

- schizophrenia. *Hum Mol Genet* **9**, 1415-1423
109. Stefansson, H., Rujescu, D., Cichon, S., Pietilainen, O. P., Ingason, A., Steinberg, S., Fossdal, R., Sigurdsson, E., Sigmundsson, T., Buizer-Voskamp, J. E., Hansen, T., Jakobsen, K. D., Muglia, P., Francks, C., Matthews, P. M., Gylfason, A., Halldorsson, B. V., Gudbjartsson, D., Thorgeirsson, T. E., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Bjornsson, A., Mattiasdottir, S., Blondal, T., Haraldsson, M., Magnusdottir, B. B., Giegling, I., Moller, H. J., Hartmann, A., Shianna, K. V., Ge, D., Need, A. C., Crombie, C., Fraser, G., Walker, N., Lonnqvist, J., Suvisaari, J., Tuulio-Henriksson, A., Paunio, T., Touloupoulou, T., Bramon, E., Di Forti, M., Murray, R., Ruggeri, M., Vassos, E., Tosato, S., Walshe, M., Li, T., Vasilescu, C., Muhleisen, T. W., Wang, A. G., Ullum, H., Djurovic, S., Melle, I., Olesen, J., Kiemenev, L. A., Franke, B., Group, Sabatti, C., Freimer, N. B., Gulcher, J. R., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., Andreassen, O. A., Ophoff, R. A., Georgi, A., Rietschel, M., Werge, T., Petursson, H., Goldstein, D. B., Nothen, M. M., Peltonen, L., Collier, D. A., St Clair, D., and Stefansson, K. (2008) Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* **455**, 232-236
  110. Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T. T., Hjaltason, O., Birgisdottir, B., Jonsson, H., Gudnadottir, V. G., Gudmundsdottir, E., Bjornsson, A., Ingvarsson, B., Ingason, A., Sigfusson, S., Hardardottir, H., Harvey, R. P., Lai, D., Zhou, M., Brunner, D., Mutel, V., Gonzalo, A., Lemke, G., Sainz, J., Johannesson, G., Andresson, T., Gudbjartsson, D., Manolescu, A., Frigge, M. L., Gurney, M. E., Kong, A., Gulcher, J. R., Petursson, H., and Stefansson, K. (2002) Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* **71**, 877-892
  111. Straub, R. E., Jiang, Y., MacLean, C. J., Ma, Y., Webb, B. T., Myakishev, M. V., Harris-Kerr, C., Wormley, B., Sadek, H., Kadambi, B., Cesare, A. J., Gibberman, A., Wang, X., O'Neill, F. A., Walsh, D., and Kendler, K. S. (2002) Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet* **71**, 337-348
  112. Koumura, A., Kakefuda, K., Honda, A., Ito, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Uchida, Y., Hozumi, I., Satoh, M., Inuzuka, T., and Hara, H. (2009) Metallothionein-3 deficient mice exhibit abnormalities of psychological behaviors. *Neurosci Lett* **467**, 11-14
  113. Ishisaka, M., Kakefuda, K., Oyagi, A., Ono, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Kitaichi, K., and Hara, H. (2012) Diacylglycerol kinase beta knockout mice exhibit attention-deficit behavior and an abnormal response on methylphenidate-induced

- hyperactivity. *PLoS One* **7**, e37058
114. Hattori, K., Uchino, S., Isosaka, T., Maekawa, M., Iyo, M., Sato, T., Kohsaka, S., Yagi, T., and Yuasa, S. (2006) Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice. *J Biol Chem* **281**, 7129-7135
  115. Wang, Y., Xu, R., Sasaoka, T., Tonegawa, S., Kung, M. P., and Sankoorikal, E. B. (2000) Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. *J Neurosci* **20**, 8305-8314
  116. Swerdlow, N. R., Weber, M., Qu, Y., Light, G. A., and Braff, D. L. (2008) Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology (Berl)* **199**, 331-388
  117. Takahashi, H., Hashimoto, R., Iwase, M., Ishii, R., Kamio, Y., and Takeda, M. (2011) Prepulse inhibition of startle response: recent advances in human studies of psychiatric disease. *Clin Psychopharmacol Neurosci* **9**, 102-110
  118. Geyer, M. A. (2006) The family of sensorimotor gating disorders: comorbidities or diagnostic overlaps? *Neurotox Res* **10**, 211-220
  119. Powell, S. B., Zhou, X., and Geyer, M. A. (2009) Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav Brain Res* **204**, 282-294
  120. Kitaichi, K., Yamada, K., Hasegawa, T., Furukawa, H., and Nabeshima, T. (1994) Effects of risperidone on phencyclidine-induced behaviors: comparison with haloperidol and ritanserin. *Jpn J Pharmacol* **66**, 181-189
  121. Nagai, T., Noda, Y., Une, T., Furukawa, K., Furukawa, H., Kan, Q. M., and Nabeshima, T. (2003) Effect of AD-5423 on animal models of schizophrenia: phencyclidine-induced behavioral changes in mice. *Neuroreport* **14**, 269-272
  122. Tanaka, K., Shintani, N., Hashimoto, H., Kawagishi, N., Ago, Y., Matsuda, T., Hashimoto, R., Kunugi, H., Yamamoto, A., Kawaguchi, C., Shimada, T., and Baba, A. (2006) Psychostimulant-induced attenuation of hyperactivity and prepulse inhibition deficits in *Adcyap1*-deficient mice. *J Neurosci* **26**, 5091-5097
  123. Noda, Y., Mamiya, T., Furukawa, H., and Nabeshima, T. (1997) Effects of antidepressants on phencyclidine-induced enhancement of immobility in a forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol* **324**, 135-140
  124. Noda, Y., Yamada, K., Furukawa, H., and Nabeshima, T. (1995) Enhancement of immobility in a forced swimming test by subacute or repeated treatment with phencyclidine: a new model of schizophrenia. *Br J Pharmacol* **116**, 2531-2537
  125. Sams-Dodd, F. (1995) Automation of the social interaction test by a video-tracking system: behavioural effects of repeated phencyclidine treatment. *J Neurosci Methods* **59**, 157-167

126. Danysz, W., Wroblewski, J. T., and Costa, E. (1988) Learning impairment in rats by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Neuropharmacology* **27**, 653-656
127. Rosse, R. B., Mastropaolo, J., Sussman, D. M., Koetzner, L., Morn, C. B., and Deutsch, S. I. (1995) Computerized measurement of MK-801-elicited popping and hyperactivity in mice. *Clin Neuropharmacol* **18**, 448-457
128. Hoffman, D. C., and Donovan, H. (1995) Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability. *Psychopharmacology (Berl)* **120**, 128-133
129. Usiello, A., Baik, J. H., Rouge-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P. V., and Borrelli, E. (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* **408**, 199-203
130. Shioda, N., Yamamoto, Y., Watanabe, M., Binas, B., Owada, Y., and Fukunaga, K. (2010) Heart-type fatty acid binding protein regulates dopamine D2 receptor function in mouse brain. *J Neurosci* **30**, 3146-3155
131. Fargali, S., Garcia, A. L., Sadahiro, M., Jiang, C., Janssen, W. G., Lin, W. J., Cogliani, V., Elste, A., Mortillo, S., Cero, C., Veitenheimer, B., Graiani, G., Pasinetti, G. M., Mahata, S. K., Osborn, J. W., Huntley, G. W., Phillips, G. R., Benson, D. L., Bartolomucci, A., and Salton, S. R. (2015) Erratum. The granin VGF promotes genesis of secretory vesicles, and regulates circulating catecholamine levels and blood pressure. *FASEB J* **29**, 2679
132. Stephens, S. B., Edwards, R. J., Sadahiro, M., Lin, W. J., Jiang, C., Salton, S. R., and Newgard, C. B. (2017) The Prohormone VGF Regulates beta Cell Function via Insulin Secretory Granule Biogenesis. *Cell Rep* **20**, 2480-2489
133. Nakamura, H. (2001) Regionalization of the optic tectum: combinations of gene expression that define the tectum. *Trends Neurosci* **24**, 32-39
134. Kageyama, R., and Nakanishi, S. (1997) Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 659-665
135. Massari, M. E., and Murre, C. (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**, 429-440
136. Vaccarino, F. M., Schwartz, M. L., Raballo, R., Nilsen, J., Rhee, J., Zhou, M., Doetschman, T., Coffin, J. D., Wyland, J. J., and Hung, Y. T. (1999) Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci* **2**, 848
137. Nawa, H., and Takei, N. (2006) Recent progress in animal modeling of immune inflammatory processes in schizophrenia: implication of specific cytokines. *Neurosci Res* **56**, 2-13

138. Ozawa, K., Hashimoto, K., Kishimoto, T., Shimizu, E., Ishikura, H., and Iyo, M. (2006) Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* **59**, 546-554
139. Toyoshima, M., Akamatsu, W., Okada, Y., Ohnishi, T., Balan, S., Hisano, Y., Iwayama, Y., Toyota, T., Matsumoto, T., Itasaka, N., Sugiyama, S., Tanaka, M., Yano, M., Dean, B., Okano, H., and Yoshikawa, T. (2016) Analysis of induced pluripotent stem cells carrying 22q11.2 deletion. *Transl Psychiatry* **6**, e934
140. Kimura, H., Tsuboi, D., Wang, C., Kushima, I., Koide, T., Ikeda, M., Iwayama, Y., Toyota, T., Yamamoto, N., Kunitomo, S., Nakamura, Y., Yoshimi, A., Banno, M., Xing, J., Takasaki, Y., Yoshida, M., Aleksic, B., Uno, Y., Okada, T., Iidaka, T., Inada, T., Suzuki, M., Ujike, H., Kunugi, H., Kato, T., Yoshikawa, T., Iwata, N., Kaibuchi, K., and Ozaki, N. (2015) Identification of Rare, Single-Nucleotide Mutations in NDE1 and Their Contributions to Schizophrenia Susceptibility. *Schizophr Bull* **41**, 744-753
141. Snyder, S. E., Pinter, J. E., and Salton, S. R. (1998) Developmental expression of VGF mRNA in the prenatal and postnatal rat. *J Comp Neurol* **394**, 64-90
142. Behnke, J., Cheedalla, A., Bhatt, V., Bhat, M., Teng, S., Palmieri, A., Windon, C. C., Thakker-Varia, S., and Alder, J. (2017) Neuropeptide VGF Promotes Maturation of Hippocampal Dendrites That Is Reduced by Single Nucleotide Polymorphisms. *Int J Mol Sci* **18**
143. Thakker-Varia, S., Behnke, J., Doobin, D., Dalal, V., Thakkar, K., Khadim, F., Wilson, E., Palmieri, A., Antila, H., Rantamaki, T., and Alder, J. (2014) VGF (TLQP-62)-induced neurogenesis targets early phase neural progenitor cells in the adult hippocampus and requires glutamate and BDNF signaling. *Stem Cell Res* **12**, 762-777
144. Yang, D., Zhang, W., Padhiar, A., Yue, Y., Shi, Y., Zheng, T., Davis, K., Zhang, Y., Huang, M., Li, Y., and Sha, L. (2016) NPAS3 Regulates Transcription and Expression of VGF: Implications for Neurogenesis and Psychiatric Disorders. *Front Mol Neurosci* **9**, 109
145. Salman, M. S., and Tsai, P. (2016) The Role of the Pediatric Cerebellum in Motor Functions, Cognition, and Behavior: A Clinical Perspective. *Neuroimaging Clin N Am* **26**, 317-329
146. Borghesani, P. R., Peyrin, J. M., Klein, R., Rubin, J., Carter, A. R., Schwartz, P. M., Luster, A., Corfas, G., and Segal, R. A. (2002) BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development* **129**, 1435-1442



147. Sadakata, T., Kakegawa, W., Mizoguchi, A., Washida, M., Katoh-Semba, R., Shutoh, F., Okamoto, T., Nakashima, H., Kimura, K., Tanaka, M., Sekine, Y., Itohara, S., Yuzaki, M., Nagao, S., and Furuichi, T. (2007) Impaired cerebellar development and function in mice lacking CAPS2, a protein involved in neurotrophin release. *J Neurosci* **27**, 2472-2482
148. Li, P., Du, F., Yuelling, L. W., Lin, T., Muradimova, R. E., Tricarico, R., Wang, J., Enikolopov, G., Bellacosa, A., Wechsler-Reya, R. J., and Yang, Z. J. (2013) A population of Nestin-expressing progenitors in the cerebellum exhibits increased tumorigenicity. *Nat Neurosci* **16**, 1737-1744
149. Qu, Q., and Smith, F. I. (2005) Neuronal migration defects in cerebellum of the Largemyd mouse are associated with disruptions in Bergmann glia organization and delayed migration of granule neurons. *Cerebellum* **4**, 261-270
150. Zanin, J. P., Abercrombie, E., and Friedman, W. J. (2016) Proneurotrophin-3 promotes cell cycle withdrawal of developing cerebellar granule cell progenitors via the p75 neurotrophin receptor. *Elife* **5**
151. Arnold, S. E., Talbot, K., and Hahn, C. G. (2005) Neurodevelopment, neuroplasticity, and new genes for schizophrenia. *Prog Brain Res* **147**, 319-345
152. Hazlett, H. C., Gu, H., Munsell, B. C., Kim, S. H., Styner, M., Wolff, J. J., Elison, J. T., Swanson, M. R., Zhu, H., Botteron, K. N., Collins, D. L., Constantino, J. N., Dager, S. R., Estes, A. M., Evans, A. C., Fonov, V. S., Gerig, G., Kostopoulos, P., McKinstry, R. C., Pandey, J., Paterson, S., Pruett, J. R., Schultz, R. T., Shaw, D. W., Zwaigenbaum, L., Piven, J., Network, I., Clinical, S., Data Coordinating, C., Image Processing, C., and Statistical, A. (2017) Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder. *Nature* **542**, 348-351
153. Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio, O., Peterson, B. S., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J., and Sulzer, D. (2014) Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron* **83**, 1131-1143
154. Cheng, Y., Sudarov, A., Szulc, K. U., Sgaier, S. K., Stephen, D., Turnbull, D. H., and Joyner, A. L. (2010) The Engrailed homeobox genes determine the different foliation patterns in the vermis and hemispheres of the mammalian cerebellum. *Development* **137**, 519-529
155. Altman, J., and Bayer, S. A. (1978) Prenatal development of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J Comp Neurol* **179**, 23-48

156. Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* **72**, 609-642
157. Snyder, S. E., Li, J., and Salton, S. R. (1997) Comparison of VGF and trk mRNA distributions in the developing and adult rat nervous systems. *Brain Res Mol Brain Res* **49**, 307-311
158. Doughty, M. L., Lohof, A., Campana, A., Delhay-Bouchaud, N., and Mariani, J. (1998) Neurotrophin-3 promotes cerebellar granule cell exit from the EGL. *Eur J Neurosci* **10**, 3007-3011
159. Sanchez-Ortiz, E., Cho, W., Nazarenko, I., Mo, W., Chen, J., and Parada, L. F. (2014) NF1 regulation of RAS/ERK signaling is required for appropriate granule neuron progenitor expansion and migration in cerebellar development. *Genes Dev* **28**, 2407-2420
160. Ruijtenberg, S., and van den Heuvel, S. (2016) Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle* **15**, 196-212
161. Chambard, J. C., Lefloch, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2007) ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1299-1310
162. Cargnello, M., and Roux, P. P. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **75**, 50-83
163. Vantaggiato, C., Formentini, I., Bondanza, A., Bonini, C., Naldini, L., and Brambilla, R. (2006) ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J Biol* **5**, 14
164. Indrigo, M., Papale, A., Orellana, D., and Brambilla, R. (2010) Lentiviral vectors to study the differential function of ERK1 and ERK2 MAP kinases. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **661**, 205-220
165. Anne, S. L., Govek, E. E., Ayrault, O., Kim, J. H., Zhu, X., Murphy, D. A., Van Aelst, L., Roussel, M. F., and Hatten, M. E. (2013) WNT3 inhibits cerebellar granule neuron progenitor proliferation and medulloblastoma formation via MAPK activation. *PLoS One* **8**, e81769
166. Rosin, J. M., McAllister, B. B., Dyck, R. H., Percival, C. J., Kurrasch, D. M., and Cobb, J. (2015) Mice lacking the transcription factor SHOX2 display impaired cerebellar development and deficits in motor coordination. *Dev Biol* **399**, 54-67
167. Wang, J. Y., Yu, I. S., Huang, C. C., Chen, C. Y., Wang, W. P., Lin, S. W., Jeang, K. T., and Chi, Y. H. (2015) Sun1 deficiency leads to cerebellar ataxia in mice. *Dis Model Mech* **8**, 957-967

## 略語一覽表

BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridine
BLBP	brain lipid binding protein
BSA	bovine serum albumin
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CAPS	Ca <sup>2+</sup> -dependent activator protein for secretion
DSM	diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DALY	disability-adjusted life year disability-adjusted life year
DG	dentate gyrus
DISC1	disrupted-in-schizophrenia-1
EGL	external granule layer
FGF	fibroblast growth factor:
GWAS	genome-wide association study
HBSS	hank's Balanced Salt Solution
IGL	internal granule layer
lingo 2	leucine rich repeat and Ig domain containing 2
NGF	nerve growth factor
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NDE1	nuclear Distribution E Homolog 1
NT-3	neurotrophin-3
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PBS	phosphate buffered saline
PCP	phencyclidine:
pHH3	phospho-Histone H3

SNP	single nucleotide polymorphism
TBE	tris Borate EDTA
Trk	tyrosine receptor kinase
TBS	tris-Buffered Saline:
VGF	VGF nerve growth factor inducible
WHO	world health organization
WT	wild-type