

学位論文題名

老化促進モデル動物 SAMP 8 における  
学習記憶障害発症機序に関する研究

学位論文内容の要旨

SAMP8 マウスは若齢より学習記憶障害を自然発症するモデル動物であり、老化に伴いその学習記憶障害は悪化していく。これまでに SAMP8 の学習記憶障害発症機序の解明が試みられており、海馬における神経伝達物質の遊離や受容体の減少が報告されている。また、脳および肝臓での抗酸化酵素の減少による酸化タンパク質や過酸化脂質量の増加などが報告されており、酸化ストレスによるシナプス活動の低下を示唆する結果が得られている。しかしながら、SAMP8 の学習記憶障害発症の原因遺伝子および発症メカニズムは未だ明らかにされていない。本研究ではこの SAMP8 の学習記憶障害責任遺伝子の同定と学習記憶障害発症機序の解明を行った。

1. SAMP8 における学習記憶障害の遺伝分析

SAMP8 は学習記憶障害を自然発症するマウスであり、老人性痴呆症のモデル動物として国内外で広く使われている。しかしながら、この学習記憶障害が優性遺伝あるいは劣性遺伝なのか、また、単一遺伝子あるいは複数の遺伝子が関与している多因子遺伝により制御されているのか未だに明らかにされていない。そこで、遺伝分析を行い、学習記憶障害の遺伝様式を明らかにした。

5ヶ月齢における SAMP8 と正常マウスである JF1 を交配した各交雑世代におけるマウスの学習記憶能力を Step-Through 型行動解析装置で測定した結果、SAMP8 および F1 を JF1 に戻し交配した世代(BC2)のみに雌が雄より重篤な記憶障害を発症する有意な性差が認められた、雄の去勢実験により、この性差は性ホルモンの影響であることが判明した。さらに、F1 世代(すべての個体がヘテロ型)では性差が認められないことから、この性差は遺伝子型依存的であり、SAMP8 由来の遺伝子がホモ型となった場合に雌個体において影響が現れることが明らかとなった。また、F1 世代における学習記憶能力は両親系統の中間値を示しており、F1 世代および BC2 世代の学習記憶障害発症率は期待値より低いことから常染色体不完全優性遺伝であることが示唆された。

F2 および BC2 世代における各個体の学習記憶能力の分布は連続的であることから2個以上の遺伝子が関与している多因子遺伝であることが考えられ、遺伝子数の推定により SAMP8 の学習記憶障害には2個から4個の遺伝子が関与していることが示唆された。さらに、F2 および BC2 世代の学習記憶障害発症率がメンデルの法則に従うことから、SAMP8 の学習記憶障害は1個の主遺伝子と複数の変更遺伝子群により制御されている可能性が示唆された。

2. 連鎖解析による学習記憶障害責任遺伝子の同定

前章において、SAMP8 の学習記憶障害は複数の遺伝子によって制御されていることを明らかにした。本実験ではこれら遺伝子を特定するために、量的形質遺伝子座(Quantitative Trait Loci: QTL)

解析により学習記憶障害責任遺伝子の同定を試みた。その結果、1番染色体、12番染色体、13番染色体および15番染色体上に有意なピークを示す QTL が検出された。各染色体上の QTL の最も高いピークの近傍に存在するマイクロサテライト・マーカーの遺伝子型とその表現型を比較すると、1番染色体、12番染色体および13番染色体上の QTL は SAMP8 由来の遺伝子であるが、15番染色体上の QTL は正常マウスである JF1 に由来することが判明し、JF1 もまた15番染色体に学習記憶障害に関与する遺伝子を持つことが示唆された。さらに、1番染色体のマーカーの遺伝子型が SAMP8 ホモ型になると雌個体において雄よりも重篤な記憶障害を示すことから、性ホルモンの影響を受ける遺伝子は1番染色体の QTL に存在することが示唆された。また、1番染色体の QTL 候補領域内に存在する既知遺伝子の変異を調べたところ、MAP2 遺伝子にアミノ酸置換の起こる変異が検出された。MAP2 は神経細胞のシナプス形成に関与していることから、学習記憶障害の有力な候補遺伝子であると考えられる。

### 3. SAMP8 脳における遺伝子発現の検討

次に若齢期の SAMP8 の脳において発現している遺伝子の発現の変化から、学習記憶障害発症に関与している遺伝子の同定を試みた。

今回の実験では、エストロゲン受容体 (ER)  $\beta$  および  $\alpha$ 、NMDA 受容体、ドーパミン受容体、神経栄養因子 (GDNF、BDNF、NT-3、IGF-1)、ニューロステロイド合成酵素遺伝子について検討を行ったところ、海馬において ER  $\beta$  および GDNF 遺伝子の発現が有意に減少していることが明らかとなった。しかし、大脳皮質では ER  $\beta$  も GDNF も共に SAMP8 と正常マウスである SAMR1 の間でその遺伝子発現に違いは認められなかった。SAMP8 の ER  $\beta$  遺伝子の発現量は学習記憶能力と高い相関性が認められ、ER  $\beta$  は雄性の12番染色体 QTL 候補領域内に存在することから学習記憶障害発症に関与していることが示唆された。しかしながら、QTL 解析の結果、ER  $\beta$  遺伝子の位置の QTL のピークが減少したことから、ER  $\beta$  は学習記憶障害の直接的な原因遺伝子ではないことが明らかとなった。また、ER  $\beta$  遺伝子の発現量は GDNF 遺伝子の発現量と高い相関性が認められた。現在のところ ER  $\beta$  と GDNF の関連については明らかではないが、GDNF は海馬において主に神経細胞で産生され、胎生期マウスの神経細胞ではエストロゲンにより GDNF の発現が誘導されることから、神経細胞においてエストロゲンは ER  $\beta$  を介して GDNF の産生を制御している可能性が考えられる。

### 4. SAMP8 海馬における CREB のリン酸化と学習記憶障害

本実験では SAMP8 の学習記憶障害発症のメカニズムを解明する目的で、海馬 CA1 領域の神経細胞においてシナプス可塑性や長期記憶形成に深く関与している CREB のリン酸化について検討を行った。

2ヶ月齢の SAMP8 および SAMR1 に電気ショックを与えた後、1時間後、3時間後、6時間後、9時間後、12時間後に海馬 CA1 領域を摘出して、ウエスタンブロッティング法にてリン酸化 CREB (p-CREB) の量を測定し、p-CREB の経時的变化を検討した。正常マウスである SAMR1 における p-CREB 量の経時的变化は3時間後と12時間後に2相性にピークが出現した。このような2相性ピークは正常ラットにおける学習記憶試験でも認められ、この2相性ピークが長期記憶形成に重要であることが示唆されている。一方、SAMP8 では3時間後をピークに p-CREB 量は12時間後まで暫時減少してゆき2度目のピークは出現しなかったことから、海馬 CA1 神経細胞における CREB のリン酸化異常が SAMP8 の学習記憶障害の原因になっている可能性が示唆された。また、前章で示したように SAMP8 ではエストロゲン受容体 (ER)  $\beta$  遺伝子や MAP2 遺伝子に異常が認められており、ER  $\beta$  欠損マウスでは CREB のリン酸化が抑制されることが報告されている。さらに、ER  $\beta$  や MAP2 もシナプス形成に関与している。このことから、SAMP8 の海馬では神経細胞のシナプス形成異常が若齢期より起こっており、海馬

における神経ネットワーク構築が十分に形成されない可能性が考えられる。今後、QTL 解析により SAMP8 の学習記憶障害責任遺伝子を同定することで、学習記憶障害発症機序が解明され、ヒトにおける痴呆症の予防や治療薬開発に貢献できると期待される。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 村 靖 幸  
副 査 教 授 有 賀 寛 芳  
副 査 助 教 授 松 本 健 一  
副 査 助 教 授 大 熊 康 修

学 位 論 文 題 名

### 老化促進モデル動物 SAMP 8 における 学習記憶障害発症機序に関する研究

SAMP8 は若齢期より学習記憶障害を自然発症し、加齢に伴い重篤化してゆく老人性痴呆症のモデル動物である。これまでに、SAMP8 の学習記憶障害発症機序の解明が試みられ、老齢化した SAMP8 の海馬においてグルタミン酸の放出量の増加、ムスカリン性アセチルコリン受容体や NMDA 受容体数の減少、protein kinase C 量の減少等の神経化学的変化が報告されている。しかし、学習記憶障害発症の本質的なメカニズムについては未だに不明である。今回、申請者はこの学習記憶障害発症の原因遺伝子の同定および若齢期における学習記憶障害発症機序の解明を試みた。

SAMP8 は遺伝的に学習記憶障害を発症するが長い間、その遺伝様式と原因遺伝子については明らかにされてこなかった。今回の研究では JF1 との交雑実験により、SAMP8 の学習記憶障害は常染色体不完全優性遺伝であり、また複数の遺伝子によって制御されている多因子遺伝であることを証明した。さらに、雌個体においては SAMP8 由来の遺伝子がホモ型の場合にのみ性ホルモンの影響を受ける、つまり女性ホルモン感受性の遺伝子が存在することを見出している。そして、QTL 解析により今回示唆された複数の遺伝子の同定を試みた結果、1番染色体、12番染色体、13番染色体および15番染色体上に学習記憶障害に関与する遺伝子の存在が示唆される QTL(量的形質遺伝子座)を検出した。これら QTL のうち1番染色体、12番染色体、13番染色体上の QTL は SAMP8

由来であったが、15番染色体上の QTL は JF1 由来であることが明らかとなり、興味深いことに JF1 系正常マウスにも学習記憶障害に関与している遺伝子が存在することが示唆された。また、女性ホルモン感受性の遺伝子は1番染色体の QTL に存在することを示唆する結果を示した。さらに、原因遺伝子を同定するために、各 QTL 領域内の既知遺伝子の塩基配列を検討したところ1番染色体の QTL 領域内に存在する MAP2 遺伝子に変異があることを見出し、学習記憶障害発症に関与している可能性を示した。次に申請者は遺伝子の発現変化から学習記憶障害に関与する遺伝子の検出を目的に、2ヶ月齢の学習記憶障害発症初期における SAMP8 の脳における遺伝子発現の変化を検討した。その結果、海馬においてエストロゲン受容体 (ER)  $\beta$  および glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) 遺伝子の発現が有意に減少していることを見出した。また、ER  $\beta$  遺伝子の発現量は SAMP8 の学習記憶能力と高い相関性があること、ER  $\beta$  遺伝子の発現と GDNF 遺伝子の発現にも高い相関性があることが認められ、ER  $\beta$  が学習記憶障害の原因遺伝子である可能性が考えられた。しかし、QTL 解析により、ER  $\beta$  遺伝子は学習記憶障害発症には関与しているが、直接的な原因遺伝子ではないことが示された。さらに、申請者は SAMP8 の海馬 CA1 神経細胞における CREB のリン酸化に着目し、学習獲得試験後のリン酸化 CREB (p-CREB) の経時的変化を検討したところ、SAMP8 の p-CREB のリン酸化パターンに異常があることを見出し、CREB のリン酸化、脱リン酸化のバランスの崩壊が若齢期における SAMP8 の学習記憶障害発症の原因である可能性を示唆した。

以上の通り、申請者は SAMP8 における学習記憶障害責任遺伝子の同定と学習記憶障害発症機序について研究を行い、SAMP8 の学習記憶障害責任遺伝子として有力な候補遺伝子を同定した。また、SAMP8 の海馬神経細胞において ER  $\beta$  遺伝子の発現異常や CREB のリン酸化異常が学習記憶能力の低下に関連していることを見出すなど、SAMP8 の学習記憶障害発症のメカニズムを解き明かす新しい知見を見出した。よって、申請者は博士(薬学)の学位を受領するに十分な資質を有する者であることを認めた。