

博士(医学) 内田 琢

論文題目

A heterozygous deletion in the glutamate decarboxylase 67 gene enhances maternal and fetal stress vulnerability

(GAD67 遺伝子ヘテロ欠損は母体および胎仔におけるストレス脆弱性を亢進する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

胎児期の中枢神経発達段階で母体がストレスを受けると、胎児の神経細胞の発達、シナプス形成などに異常が見られ、精神疾患の発症頻度が増すことが知られている。一方で、精神疾患患者の死後脳調査で γ -アミノ酪酸(GABA)合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素(glutamate decarboxylase 67, GAD67)の減少が報告されている。このことから GAD67 とストレスには何らかの関係がある可能性がある。脳内の GAD67 減少が母体および胎仔のストレス応答のリスク因子として働く可能性を調べるため、我々は GAD67-GFP knock-in マウスを用いて母体ストレス実験を行った。ヘテロ接合体では、GAD67 が通常の半分しか発現していない。

[方法]

ヘテロ接合体(+GFP)雄と野生型(+/+)雌、または+/GFP 同士を交配し、各々の妊娠中にストレス負荷を行った。条件は、妊娠 15 日目の母体を直径 3 cm のプラスチックチューブに入れ、150 W の白色光下 50 cm に 45 分間静置した。これを一日に 3 回、妊娠 17 日目まで続けた。ストレスへの脆弱性を母体、胎仔の体重と CORT(CORT)量にて評価した。統計解析は 4 群比較には二元配置分散分析(遺伝子型因子(GF)対ストレス因子(SF))、post-hoc として Tukey-Kramer test を用い、2 群比較には Student's t-test を用いた。値は mean \pm SEM で示した。

[結果]

①妊娠母体+/GFP のストレス応答。妊娠+/+および+/GFP はストレス負荷前日には体重に差がなかった(+/+ 29.74 \pm 0.94 g, +/GFP 31.99 \pm 0.69 g)。ストレス後の妊娠 14 日目からの体重変化率は、SF に差があった(GF $F_{1,18} = 2.15$, $p = 0.16$; SF $F_{1,18} = 29.4$, $p < 0.01$)。SF での post-hoc では+/+、+/GFP とともに体重増加が抑えられた(+/+ $p < 0.01$; +/GFP $p < 0.05$)。母体血中 CORT 量は、両因子に差があった。(GF $F_{1,17} = 56.7$, $p < 0.01$; SF $F_{1,17} = 45.1$, $p < 0.01$)。SF では+/+、+/GFP 共に血中 CORT 量が増加した(+/+ $p < 0.01$; +/GFP $p < 0.01$)。また、+/GFP 母体はストレス有無両条件下で+/+母体より血中 CORT 濃度が高かった(control(c) $p < 0.01$; stress(s) $p < 0.01$)。(母体体重変化率(%), +/+, c 119 \pm 2.4 (n = 7), s 103 \pm 1.6 (n = 5), +/GFP, c 113 \pm 1.9 (n = 4), s 102 \pm 2.6 (n = 6); 母体血中 CORT 量(ng / ml)+/+, c 618 \pm 70 n = 7, s 1272 \pm 195 n = 5, +/GFP c 1378 \pm 99 (n = 4), s 2482 \pm 138 (n = 5))②非妊娠雌性(NP)+/GFP のストレス応答。両遺伝子型 NP マウスの体重の変化率はストレス実験の結果差がなかった($F_{1,12} = 3.69$, $p = 0.15$)。血中

CORT 量は両因子に差があった(GF $F_{1,16} = 8.13$, $p < 0.05$; SF $F_{1,16} = 8.89$, $p < 0.01$)。post-hoc の結果、NP+/+血中 CORT 量はストレスで増加傾向だった($p = 0.058$)。NP+/GFP の血中 CORT 量はストレスで増加した($p < 0.05$)。妊娠時とは対照的に、非ストレス条件下で NP+/GFP 血中 CORT 量は NP+/+に比べて低かった($p < 0.05$)。(NP 体重変化率(%), +/+ 92.0 ± 1.4 (n = 5), +/GFP, 92.5 ± 4.6 (n = 9); NP 血中 CORT 量(ng/ml), +/+, c 73.8 ± 10 (n = 5), s 159 ± 37 (n = 5), +/GFP, c 42.8 ± 7.7 (n = 5), s 76.4 ± 6.5 (n = 5))③+/GFP 母体の胎仔へのストレスの影響。母体の GAD67 欠損での胎仔への影響を調べるため、ストレス後の+/+, +/GFP 両母体での+/+胎仔の体重と CORT 量を調べた。胎仔体重は両因子で差があった(母体 GF $F_{1,95} = 21.6$, $p < 0.001$; SF $F_{1,95} = 17.3$, $p < 0.001$)。両母体の胎仔体重はストレスにより減少し(+/+ mother $p < 0.001$; +/GFP mother $p < 0.05$)、+/GFP 母体の胎仔体重は+/+母体よりもストレス有無両条件で低かった(c $p < 0.01$, s $p < 0.01$)。CORT 量は SF による差があった(母体 GF $F_{1,31} = 1.66$, $p = 0.21$, SF $F_{1,31} = 16.3$, $p < 0.001$; SF post-hoc, +/+ 母体 $p < 0.01$, +/GFP 母体 $p < 0.01$)。(+/+胎仔体重(g), +/+ 母体, c 0.877 ± 0.015 (n = 34), s 0.796 ± 0.012 (n = 28), +/GFP 母体, c 0.785 ± 0.028 n = 17, s 0.677 ± 0.038 n = 20; +/+胎仔 CORT 量(ng/ml), +/+母体, c 23.5 ± 2.9 (n = 8), 56.5 ± 10 (n = 9), +/GFP 母体, c 24.1 ± 3.7 (n = 7), s 40.3 ± 3.6 n = 11)④胎仔の遺伝子型に対する母体ストレスの影響。+/+母体の+/GFP 胎仔の両遺伝子型胎仔体重と CORT 量を調べた。体重は両因子に差があった(胎仔 GF $F_{1,103} = 11.9$, $p < 0.001$; SF $F_{1,103} = 42.6$, $p < 0.001$)。両胎仔でストレスにより体重は減少し(+/+胎仔 $p < 0.001$; +/GFP 胎仔 $p < 0.001$)、ストレス後の+/GFP 胎仔体重は+/+胎仔より低かった($p < 0.01$)。CORT 量でも両因子に差があり(胎仔 GF $F_{1,29} = 17.0$, $p < 0.001$; SF $F_{1,29} = 33.1$, $p < 0.001$)、両胎仔はストレスで CORT 量が増加し(+/+胎仔 $p < 0.01$; +/GFP 胎仔 $p < 0.01$)、+/GFP 胎仔 CORT 量は両条件で+/+胎仔に対して増加した(c, $p < 0.01$; s, $p < 0.05$)。(胎仔体重(g),+/GFP 胎仔 c 0.845 ± 0.014 (n = 22), s 0.720 ± 0.021 (n = 23); 胎仔 CORT 量(ng/ml), +/GFP 胎仔 c 46.2 ± 3.7 (n = 9), s 86.2 ± 30 (n = 7))

[考察]

GAD67 のヘテロ欠損で母仔双方のストレス応答性が亢進していた。GAD67 の遺伝子異常ないし脳内 GAD67 の異常はストレス脆弱性を亢進し、精神疾患のリスク因子になると考えられた。母体のストレス脆弱性は、脳内の GABA 受容体の構成が妊娠時に変化し、視床下部-下垂体-副腎皮質-系での GABA が非妊娠時とは異なる応答を示すので、GAD67 ヘテロ欠損によりストレス応答の違いを生じると考えた。胎仔では GAD67 欠損とストレス脆弱性の直接的な関係は不明だが、+/+母胎中でも+/GFP 胎仔の体重低下と CORT 量増加が見られたので胎盤機能障害も考えられる。

[結論]

在胎中の過剰なストレスは GAD67 の遺伝子異常と共に精神疾患発症のリスク因子となり、GAD67 遺伝子のヘテロ欠損と母体ストレスを合わせたこのモデルは精神疾患の研究に有用である。+/GFP マウスは GABA 作動性神経細胞に GFP を発現しており、+/GFP 母体ストレスマウスは精神疾患における GABA の関与の機構を研究する上で有用なモデルであると考

えられる。

論文審査の結果の要旨

妊娠中のストレスで子どもの精神疾患リスクが高まること、また、精神疾患患者の死後脳で γ -アミノ酪酸(GABA)合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamate decarboxylase 67, GAD67) が減少することが報告されている。したがって、GAD67 とストレスには何らかの関係がある可能性がある。そこで申請者は、GAD67-GFP knock-in マウスを用いて、脳内のGAD67減少が母体および胎仔のストレス応答に如何なる影響を及ぼすかについて検討した。

GAD67 が通常の半分しか発現しないヘテロ接合体 (+/GFP) 雄と野生型 (+/+) 雌、または+/GFP 同士を交配し、各々の妊娠 15 日目から 17 日目までの 3 日間にわたって 1 回 45 分の拘束ストレスを 1 日 3 回与えた。ストレス脆弱性は、母体と胎仔ともに、体重とコルチコステロン (CORT) 量で評価した。

その結果、ストレス負荷により母体血中 CORT 量は+/+、+/GFP 共に増加したが、+/GFP 母体の CORT 濃度はストレス有無両条件下で+/+母体より高かった。また、両母体の胎仔体重はストレスにより減少したが、+/GFP 母体の胎仔体重は+/+母体よりもストレス有無両条件下で低かった。さらに、+/+母体の+/+と+/GFP の両遺伝子型胎仔の比較では、ストレスにより両胎仔の体重が減少したが、ストレス後の+/GFP 胎仔体重は+/+胎仔より低かった。一方、両胎仔の CORT 量はストレスで増加したが、+/GFP 胎仔 CORT 量はストレス有無両条件下で+/+胎仔より高かった。これらの結果から、申請者は GAD67 の遺伝子異常ないし脳内 GAD67 の異常は母仔双方のストレス脆弱性を亢進すると推論している。

審査委員会では、+/GFP マウスは GABA 作動性神経細胞に GFP を発現しており、GAD67 遺伝子のヘテロ欠損と母体ストレスを合わせたマウスモデルは精神疾患における GABA の関与の機構を研究する上で有用となる可能性を示唆した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 中原 大一郎
副査 森 則夫 副査 武井 教使