

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 4 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08133

研究課題名(和文) 自閉症モデルラット脳における神経伝達物質異常の定量的・形態学的解析

研究課題名(英文) Analysis of neurotransmitters in the brain of autism model rat

研究代表者

成田 正明(Narita, Masaaki)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80302404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症は、対人関係の障害・コミュニケーションの障害・こだわりなどを特徴とする先天的な脳発達障害である。原因は不明であり、解剖学的な異常、即ち脳の形態の異常は見出されていない。一方、神経生物学的には、こだわり、対人関係の障害、同一性の保持などの行動上の特徴から、脳内の神経伝達物質セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリンの異常が指摘されてきた。これまでの研究で研究代表者らは、自閉症モデルラット脳でのセロトニン神経系の異常について報告してきた。今回の研究ではドーパミン、ノルアドレナリン解析を試みた。自閉症モデル動物では広く神経伝達物質の異常が存在する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Autism is a congenital neurodevelopmental disorder characterized by deficits in social communication and social interaction, and restricted patterns of behavior. The cause of autism is not known, although abnormalities of neurotransmitter have been suggested to date. Previously, we have reported serotonergic abnormalities in the brain of autism using autism model rats. In the present study, we investigated other neurotransmitters such as dopamine and noradrenalin. We found that broad abnormalities of neurotransmitters may exist in the brain of autism.

研究分野：解剖学

キーワード：自閉症モデル動物

1. 研究開始当初の背景

自閉症は、対人関係の障害・コミュニケーションの障害・こだわりなどを特徴とする先天的な脳発達障害である。原因は不明であり、解剖学的な異常、即ち脳の形態の異常は見出されていない。一方、神経生物学的には、こだわり、対人関係の障害、同一性の保持などの行動上の特徴から、脳内の神経伝達物質セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリンの異常が指摘されてきた。

疾患の解明のためにはモデル動物を用いた解析が有用だが、大部分の自閉症は単一遺伝子異常による疾患ではなく、また「広汎性発達障害」とも命名されているようにその表現型も広汎であり、従来からの遺伝子改変技術に基づくモデル動物作成は無理があるとされてきた。これを克服するため研究代表者らは、“サリドマイド内服妊婦から自閉症児の出生が異常に多かった”というヒトでの疫学的事実をもとに、妊娠ラットにサリドマイドを内服させる方法で自閉症モデルラットを作成し、縫線核(=セロトニン神経の起始核)の形態異常を報告してきた。

研究代表者の作成してきた自閉症モデルラットは、妊娠ラットにサリドマイドを投与方法による。これは、ヒトで起こった疫学的事実、即ち妊婦が妊娠中のある特定の時期(ヒトで妊娠 20 - 24 日)にサリドマイドを内服すると、児に手足の奇形は起きないが自閉症が高率に発症する、という事象を、妊娠ラットで忠実に再現したものである(ヒト妊娠 20 - 24 日はラットでは妊娠 9 日に相当)。

研究代表者らによるこれまでの解析で本ラットでは

- セロトニン含量の増加、
- 血中セロトニン濃度の上昇、
- 延髄縫線核(=セロトニン神経の起始核)の形成異常、
- 行動異常として多動・非探索的行動、
- 顔面神経の分化発生異常、

などが得られており、特に血中セロトニン上昇、行動異常はヒト自閉症でも見られる所見であり興味深い。

並行して研究代表者は平成 24-26 年度に「妊娠中の化学物質による、子供の行動・情動への影響評価に関する基礎的・臨床的・疫学的研究」の班長として厚生労働省研究を推進してきた。ヒトで得られた厚労省研究の成果をさらに応用するため、動物による基礎データ収集が必要であり今回の研究申請に至った。

2. 研究の目的

研究代表者らは自閉症モデルラットでのセロトニンに関する異常所見を既に得ている。しかしながら自閉症の病態・臨床症状はセロトニン神経系の異常だけでは説明がつかず、ドーパミンやノルアドレナリン神経系の異常も存在する。今回の研究では、自閉症モデルラット脳において、セロトニンに加え、ドーパミン、ノルアドレナリン神経回路の異常の有無を調べることで、自閉症モデルラットでの神経伝達物質の異常による行動障害を理解する。さらにヒト自閉症でも投与が試みられている薬剤(選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害剤 SNRI)を自閉症モデルラットへ投与し、神経伝達物質の変化を調べる。

独自の自閉症モデル動物を使ってセロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリンの各神経系に焦点を当て自閉症モデルラット脳の神経回路解明を目指す点で学術的特色がある。同時に脳神経系の初期発生に焦点を当てつつ組織学的手法を駆使して解明を進めることは、神経発生学上も重要な研究テーマとして学術的特色を付与するといえる。選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害剤の投与下での自閉症モデルラット脳内のノルアドレナリン動態が明らかになれば、ノルアドレナリン活性低下に基づくとされる自閉症にしばしば併存する注意欠陥多動性障害

(ADHD)の病態理解をも可能にできるという点も目的の一つである。

3. 研究の方法

従来通りの方法で自閉症モデルラットを作成する(Miyazaki, et. Al., *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23: 287-297: 2005, Narita, et. Al., *Pediatric Research* 52: 576-579: 2002)。即ち妊娠 9 日目の妊娠ラットにサリドマイド (500mg/kg)を内服させ、胎仔、または生まれた仔ラット (生後 50 日)を用いる。研究代表者らの自閉症モデルラット作成は国内外でも多く引用されている (Drug Discovery Today, 2; 93: 2005, Neuroscience 142 ; 267: 2006, Neurosci Res, 57; 289: 2007)。妊娠 9 日目を選んだのは、ヒトでのサリドマイドによる自閉症はヒト受精 20-24 日目 = ラット妊娠 9 日目 = に内服した妊婦にのみ発症し、これを再現した自閉症モデルラットではやはり妊娠 9 日目に投与した群でのみ、脳海馬セロトニンが上昇していたためである。またサリドマイドの投与量は既報に基づく量を用いる。コントロールとして、溶媒 (5%アラビアゴム)のみ同様に内服させた妊娠ラットからの胎仔、または生まれた仔ラットを用いる。胎仔ラットまたは生まれた仔ラットで以下を解析する。

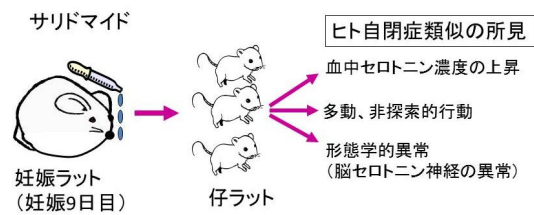
(1) 自閉症モデルラット脳及び正常ラット脳各部位におけるドーパミン、ノルアドレナリン量の発達に伴う発現推移の比較

脳の各部位及び発達に伴うドーパミン、ノルアドレナリン含量を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定を行うとともに、形態学的にもチロシンヒドロキシラーゼ染色 (ドーパミン)、ドーパミンベータヒドロキシラーゼ染色 (ノルアドレナリン) を行う。

(2) 胎生期の神経分化誘導因子の発現比較

sonic hedgehog (shh) はセロトニン神経、ドーパミン神経の分化誘導因子である。自閉症モデルラット胎仔で sonic hedgehog (shh、セロトニン・ドーパミンの分化誘導因子) の発現低下は定量 PCR で報告した。今回の研究では *in situ* hybridization 法を用い shh 発現を形態学的にさらに明らかにする。

サリドマイドを用いた自閉症モデルラット



(3) 脳幹ノルアドレナリン神経起始核 (= 青斑核) からの神経軸索投射パターンの把握

ヒト自閉症では、その臨床症状からノルアドレナリン神経系の異常が強く示唆されるが、自閉症におけるノルアドレナリン軸索投射異常の有無は不明のままである。青斑核から伸びる神経軸索をビオチン化デキストランアミンで可視化し軸索投射を検討。

(4) 選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害剤 (SNRI) 投与下でのノルアドレナリン変動

SNRI はシナプス間隙でのノルアドレナリンの再取り込みを阻害することでノルアドレナリン濃度を高めるため臨床でしばしば用いられている。SNRI はドーパミンの再取り込みにも影響する。正常及び自閉症モデルラットにおいて SNRI を投与し脳各部位でのドーパミン、ノルアドレナリン含量を測定。

今回の研究では、実際には上記のうち、おもに(1)に effort を concentrate した。

4. 研究成果

自閉症モデルラットを用い、脳内の神経伝達物質の異常を定量的・形態学的に解析を目標とする。研究代表者はこれまで、妊娠ラットにサリドマイドを投与する方法で自閉症モデルラットを作成し、セロトニン神経系の異常について報告してきた。本研究ではドーパミン、ノルアドレナリンの異常を明らかにする。さらに選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害剤投与下でのノルアドレナリン動態を解析する。自閉症モデルラット脳でセロトニンに加えてドーパミン、ノルアドレナリン異常を明らかにすることで、自閉症の行動異常の神経生物学的基盤が明らかになる。そのために従来通りの方法で自閉症モデルラットを作成する。即ち、ヒト妊婦が妊娠中のある特定の時期（ヒトで妊娠 20 - 24 日）にサリドマイドを内服すると、児に手足の奇形は起きないが自閉症が高率に発症する、という事象を、妊娠ラットで忠実に再現した方法である（ヒト妊娠 20 - 24 日はラットでは妊娠 9 日に相当）。具体的には妊娠 9 日目の妊娠ラットにサリドマイド (500mg/kg) を内服させ妊娠を継続させ、胎仔ラットまたは生まれた仔ラットを用いる。

3 年計画のうちの初年度は、予備実験として、自閉症モデルラット脳及び正常ラット脳各部位における神経伝達物質の、発達に伴う発現推移の比較（定量的及び免疫組織化学的手法で）を明らかにした。具体的には、まず発達段階の脳各部位を取り出し、発達に伴うドーパミン、ノルアドレナリン含量を、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定した。再検中である。今後、部位別、グループ別の統計的検討を今後行う。

2 年目は、自閉症モデルラット脳及び正常ラット脳各部位におけるドーパミン・ノルアドレナリンの、発達に伴う発現推移の比較（定量的及び免疫組織化学的手法で）を行った。具体的には、発達に伴う発現推移の比

較（定量的及び免疫組織化学的手法で）即ち脳各部位及び発達に伴うドーパミン、ノルアドレナリン含量を、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定するとともに、形態学的にもチロシンヒドロキシラーゼ染色（ドーパミン検出）、ドーパミンベータヒドロキシラーゼ染色（ノルアドレナリン検出）を行った。これも現在再検中である。

3 年目の最終年度は上記 1 年目 2 年目の再検、追試験を行っている。その結果、自閉症モデル動物では広く神経伝達物質の異常が存在する可能性があることが示唆されたが、最終的な結論を得るためにさらに追試験を実施している。確定的データが得られた段階で学会発表、論文報告を行う。

【研究の国内外の位置づけとインパクト】

自閉症の原因はさまざま唱えられているものの明確には不明である。その中で治療薬の開発が進んでいるがいずれも決定的なものではない。自閉症モデルラット脳における神経伝達物質異常が明らかになれば、ヒト自閉症にも応用可能であり、治療薬開発も一層進むことが期待できる。そのためにも再検に再検を繰り返し、正確なデータを医療界に提供したい。

厚生労働省研究班で得られた疫学調査・非侵襲的診断法の成果を、動物実験の側面から裏付け・補完するという点でも本研究は意義深い。さらに病態の正しい理解は、その支援法にも十分応用でき、本症に対し未だ誤解の多い一般社会への、科学的裏付けをもった啓蒙活動も推進できる点でも意義深い。

<参考文献>

Kaoru Miyazaki, Naoko Narita, Masaaki Narita.

Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring : implication for pathogenesis of autism

International Journal of Developmental Neuroscience,23: 287-297: 2005 (査読有)

Naoko Narita, Michiko Kato, Mami Tazoe, Kaoru Miyazaki, Masaaki Narita, Nobuo Okado.

Increased monoamine concentration in the brain and the blood of fetal thalidomide and valproic acid exposed rat ; putative animal models for autism.

Pediatric Research 52: 576-579: 2002 (査読有)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

http://www.medic.mie-u.ac.jp/develop_regener/

治療薬から考えたADHD病態 第21回活性アミンに関するワークショップ

成田 正明 2017年8月25日 京都

三重障害者職業センター講演会
発達障害と生活習慣

2015年12月22日 三重県津市

成田 正明

6 . 研究組織

(1)研究代表者

成田 正明(NARITA, Masaaki)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 80302404

(2)研究分担者

江藤 みちる (ETO, Michiru)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 80393148