

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10050

研究課題名(和文) 自閉症モデルラットを用いた自閉症における音源定位能の基盤的研究

研究課題名(英文) Mechanism of sound localization in human autism using autism model rats

研究代表者

江藤 みちる(伊田みちる)(Iida-Eto, Michiru)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80393148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症は、コミュニケーション障害・社会性の障害・常同行動といった中核症状のほか、感覚過敏など感覚の問題がしばしば合併する。本研究では、ヒト自閉症診断への応用を目指すことを目的として、自閉症モデルラットを用いて聴覚の中樞神経系の中継核異常の機能的意義、特に音源定位に関わる神経核に着目して形態学的解析を行った。

音源定位に関わる神経核である外側上オリブ、内側上オリブ、台形体核においては自閉症モデルラットでシナプス関連分子の発現変化が見られ、神経回路に異常を引き起こしていることが示唆された。自閉症モデルラットでは音刺激で台形体核の細胞応答異常が見られたが、音源の方向による差は見いだされなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、自閉症の患者数は増加の一途をたどっている。社会性行動など中心的な病態の解析は進んでいるが感覚の問題は見逃されておられ、なかでも聴覚過敏を伴う自閉症患者は多い。さらに、自閉症患者は呼びかけに気付きにくく、音の発生源を見つけにくいことがあり、音源定位に障害があることを示唆している。自閉症に音源定位の障害があることが明らかになったことから、問診の際に「音がどこから聞こえるか、わからないときがありますか？」と尋ねることで、さらに正確な自閉症診断が可能になる。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorders is characterized by impairment in social interaction; communication abnormalities; and limited activity and curiosity. Sensory hypersensitivity is frequently observed with ASD. In this study, I performed morphological analysis of ASD model rats, focusing on the functional significance of neural circuit in the auditory central nervous system, especially sound localization.

Superior olivary complex nuclei (lateral olivary nucleus, medial olivary nucleus, and medial nucleus of the trapezoid body) are associated with sound localization. In these nuclei, abnormal expression of synapse-associated molecules were observed in ASD model rats, suggesting an abnormality in neural circuits. Following sound stimulus, altered neuronal activity of the medial nucleus of the trapezoid body. However, the difference by the direction of the sound source was not found.

研究分野：神経科学、解剖学

キーワード：自閉症 ラット サリドマイド 聴覚 脳幹 抑制性ニューロン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症は、コミュニケーション障害・社会性の障害・常同行動を特徴とする発達障害である。感覚障害を併発しやすく、特に聴覚過敏が多くみられるが、その病態解明はほとんどなされていない。

研究代表者の所属研究室では、子に自閉症をもつ母親が妊娠の特定の時期にサリドマイドを服用したという疫学的事実に基づき自閉症モデルラットを作製し (Narita et al. *Pediatr Res* 2002)、ヒト自閉症と同様にセロトニン神経系の異常を呈することを報告してきた (Narita et al. *Neurosci Res* 2010)

研究代表者は「自閉症患者に聴覚過敏が多い」という事実に着目して自閉症モデルラットの聴覚神経系の解析を行い、脳幹の上オリーブ複合体、特に台形体核の形態異常を報告した (Ida-Eto et al. *Pediatr Int* 2017)。台形体核は主にグリシン作動性抑制性ニューロンで構成され、音がどちらの報告から来ているのかを判断する「音源定位」において重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、台形体核の異常がある自閉症モデルラットでは音源定位の異常も引き起こされているのではないかと仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

#### (1)自閉症モデルラットの聴覚中枢神経系の形態学的特徴の解明

聴覚神経系は内耳からの信号が脳幹、中脳、視床を経由し大脳皮質へと信号が送られ、途中でいくつもの神経核を経由する。なかでも音源定位に関わる神経核 (台形体核、外側上オリーブ、内側上オリーブ)は左右の蝸牛神経核からの入力を受け、左右耳の強度差や時間差を検出している。本研究では自閉症モデルラットにおけるこれら神経核および神経回路についての形態学的解析を幼若ラットおよび成獣ラットで解析する。

#### (2)自閉症モデルラットにおける音刺激による聴覚神経核の反応の解明

自閉症モデルラットにおいて音刺激によってどの聴覚神経核や細胞で神経活動が起こっているか、神経活動マーカーを用いて形態学的解析を行う。音刺激の方法により、周波数の異なる純音を用いた周波数地図解析、音源の角度を変えた音源定位解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1)自閉症モデルラットの作製

自閉症モデルラットの作製は既報に従った (Narita et al. *Pediatr Res* 2002)。具体的には、妊娠9日目のWistarラットに5%アラビアゴムに溶解したサリドマイドを500 mg/kgで投与し、生まれた仔ラットを自閉症モデルラットとした。薬剤ばく露対照群では妊娠ラットに5%アラビアゴムのみを投与した。

#### (2)音響ばく露実験

音ばく露装置として、外に遮音シート (RIX Corp.) 中にポリウレタンフォーム (Sound guard W, Yahata Corp.) を貼った40 cm四方のアクリル箱を用意し、スピーカー (Tweeter Loud Speaker, EAS-8HH17G, Matsushita)、アンプ (TA7252AP, Toshiba)、シンセサイザー (FS-1301, TOA Electronics Ltd.) を接続した。音量は騒音計 (SM325, Sato Corp.) で計測し、62 dBに調整した。周波数は4 kHzもしくは16 kHzの純音とした。高周波数帯対応マイクで録音した音をOctaveで周波数分析を行い、他の周波数成分の混入が無い純音であることを確認した。ラットを麻酔下もしくは無麻酔で20 cm四方の蓋つき網かごに入れて音ばく露アクリル箱に入れ、30分無音の後に1時間の音響ばく露を行った。音響ばく露対照群ではアクリル箱にいれたのち90分間無音とした。音響ばく露の後、ただちに麻酔し、灌流固定を行った。

#### (3)免疫組織化学

麻酔後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で灌流固定し、脳を摘出した。4%PFAで一晩浸漬固定し、スクロース溶液に置換後、OCTコンパウンドに包埋して厚さ50 μmの浮遊凍結切片を作製した。DABで発色する場合には、3%過酸化水素-メタノール溶液で内在性ペルオキシダーゼの失活を行い、ブロッキングし、1次抗体を反応させたのち、酵素標識ポリマー法 (ImmPRESS, Vector Laboratories) を行った。二重染色の場合には、二次抗体にAlexa Fluor標識した抗体を使用し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, Olympus) で観察した。

### 4. 研究成果

#### (1)自閉症モデルラットの聴覚中枢神経系の形態学的解析

##### 外側上オリーブの解析

本モデルラットでは台形体核の異常が明らかになっている (Ida-Eto, 2017)。台形体核から抑制

性投射を受ける外側上オリブは両耳間音圧差を検知して音源定位に關与する神経核である。台形体核からの投射はグリシン作動性であることから、グリシン受容体に対する抗体 (GlyT2) を用いて成獣ラットの外側上オリブの免疫組織化学を行った。その結果、自閉症モデルラットでは外側上オリブの免疫陽性反応の低下および細胞数の減少が見られた。生後 21 日で同様の解析を行ったところ、コントロールに比べて自閉症モデルラットでは免疫反応および陽性細胞が減少しており、すでに幼若期において聴覚神経系の異常を引き起こしていることが明らかとなった。

#### 内側上オリブの解析

台形体核から抑制性投射を受ける内側上オリブは両耳間時間差を検知して音源定位に關与している。興奮性シナプスマーカーである vGluT1 で内側上オリブの免疫組織化学を行ったところ、細胞体から少し離れた部分 (興奮性入力部位) において自閉症モデルラットでの免疫陽性反応の増加が見られた。この興奮性入力は同側および対側の蝸牛神経核からの入力であることが知られている。自閉症モデルラットでは蝸牛神経核からの細胞終末にも異常を引き起こしていることが明らかとなった。蝸牛神経核には数種類の細胞が存在していることから、この異常を引き起こす細胞の同定などの詳細な解析が今後必要である。

#### シナプスの解析

台形体核の機能を明らかにするため、シナプスの解析を行った。プレシナプスマーカーである synaptophysin を用いて成獣ラットと幼若ラットの台形体核について比較したところ、コントロール群および自閉症モデル群ともに生後 14 日で一過性に発現上昇し、生後 21 日ではコントロール群で顕著な発現減少が見られた。この現象はシナプスの刈り込みと呼ばれるものであり、必要なシナプスだけが強められて不要なシナプスは除去される発達期の脳に見られる重要なステップである。自閉症モデルラットではシナプス刈込異常が起こっていることが示された。また、興奮性シナプスマーカーとして vGluT、抑制性シナプスマーカーとして vGAT を用いて台形体核の免疫組織化学を行った。その結果、自閉症モデルラットでは vGAT の免疫陽性反応が低下していた。このことは他の神経核からの抑制性入力の低下を示唆しており、抑制性神経核である MNTB が抑制された結果、強い興奮性出力が引き起こされ聴覚過敏を呈することが考えられた。

#### (2) 自閉症モデルラットにおける音刺激の周波数の違いによる反応の変化

ラットの可聴域はヒトとは異なり 4 kHz ~ 40 kHz である。聴覚神経系は Tonotopy (音地図) が存在し、各神経核で周波数によって反応する細胞が異なることが知られている。本研究では低音の 4 kHz と中音域の 16 kHz の純音をばく露した後、c-Fos 抗体を用いた免疫組織化学を行った。台形体核において、音地図に従った細胞の応答が既報と同様に検出された (Friauf, 1992)。以降の実験は解析が容易であった中音域の 16 kHz で行った。

#### (3) 自閉症モデルラットにおける音刺激によるさまざまな聴覚神経核の反応

ラットを無麻酔で防音箱に入れ、シンセサイザーで 16 kHz の純音を 1 時間ばく露した。直後に灌流固定を行って脳スライスを作製し、c-Fos 抗体を用いて免疫組織化学を行った。コントロールでは蝸牛神経核、台形体核、下丘、大脳皮質聴覚野において 16 kHz の音に反応する領域に c-Fos 陽性細胞が観察された。自閉症モデルラットでは上記すべての神経核においても c-Fos 陽性細胞の反応領域が高周波数領域へと広がっており、さらに陽性細胞数も増加していた。しかしながら、音源定位に關与する外側上オリブ、内側上オリブにおいては c-Fos 陽性細胞は観察されなかった。

#### (4) 自閉症モデルラットにおける音刺激の音源の方向の違いによる反応の変化

音源の方向を定めるため、ラットを麻酔した後に防音箱に入れて 16 kHz の純音をばく露し、台形体核における c-Fos の免疫組織化学を行った。麻酔の有無による c-Fos の発現に差は見られなかった。音源の方向を前方あるいは右側と変化させたときの c-Fos の発現を比較したところ、前方の場合に左右差は見られなかったが、右側の場合には左の台形体核における c-Fos の発現増加の傾向が見られた。自閉症モデル群とコントロール群での差は見られなかったことから、本研究では自閉症モデルラットでは音源の方向による神経細胞の応答異常は見いだせなかった。しかしながら個体数が少なかつたことに加えて、そのため統計解析にまで至っておらず、今後個体数を増やして検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsugiyama Lucila E., Ida Eto Michiru, Ohkawara Takeshi, Noro Yuichi, Narita Masaaki	4. 巻 60
2. 論文標題 Altered neuronal activity in the auditory brainstem following sound stimulation in thalidomide induced autism model rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 82 ~ 86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cga.12353	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 江藤みちる、沢恵美加、前川佳澄、Tsugiyama Lucila Emiko、大河原剛、成田正明
2. 発表標題 小児自閉症における聴覚過敏の発症機序の解明：幼若自閉症モデルラットを用いた台形体核の解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiru Ida-Eto, Lucila Emiko Tsugiyama, Takeshi Ohkawara, Masaaki Narita
2. 発表標題 Functional abnormalities of auditory brainstem in autism model animal by thalidomide exposure to pregnant rats
3. 学会等名 The 19th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江藤みちる
2. 発表標題 ヒト自閉症に併発する聴覚過敏の機序解明と自閉症の新たな診断方法：自閉症モデルラットを用いた解析
3. 学会等名 第58回日本先天異常学会学術集会 2018年度奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----