

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03581

研究課題名(和文) シナプス膜移行異常モデルを用いた新規自閉症治療標的の検討

研究課題名(英文) The synaptic insufficient delivery hypothesis of autism based on PET findings

研究代表者

松崎 秀夫 (Matsuzaki, Hideo)

福井大学・子どものこころの発達研究センター・教授

研究者番号：00334970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はN-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) の機能異常が自閉スペクトラム症の病態に関わる可能性をつきとめ、独自に開発したNSFヘテロノックアウトマウス(NSF-hKO)に同様の行動異常が現れることを発見した。このマウスの脳ではセロトニントランスポーターの細胞膜移行に異常があり、海馬ニューロンのシナプス膜上にAMPA型グルタミン酸受容体の発現が低下している所見も認められた。そこでこれらNSF-hKOのデータをFrontiers in Geneticsに投稿して受理された。介入試験も検討したが有意な効果は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動負荷による介入実験が成功しなかったために、本研究で「シナプス膜移行異常仮説」の妥当性を証明するには至らなかったが、これまでにない観点から自閉症のモデルマウスを確立することができた。このモデルマウスを用いた介入試験をシーズ探索に利用することで、将来の自閉症の治療手段の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We previously identified N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) as a new serotonin transporter (SERT)-binding protein and described its importance in SERT membrane trafficking. In this study, we generated Nsf^{+/-} mice and investigated their phenotypes in vivo. Nsf^{+/-} mice exhibited abnormalities in sociability, communication, repetitiveness, and anxiety. Additionally, Nsf loss led to a decrease in membrane SERT expression in the raphe and accumulation of glutamate AMPA receptors at the synaptic membrane surface in the hippocampal CA1 region. We found that postsynaptic density and long-term depression were impaired in the hippocampal CA1 region of Nsf^{+/-} mice. Taken together, these findings demonstrate that NSF plays a role in synaptic plasticity and glutamatergic and serotonergic systems, suggesting a possible mechanism by which the gene is linked to the pathophysiology of autistic behaviors. Intervention trials were also examined, but no significant effect was observed.

研究分野：分子精神医学

キーワード：自閉症 シナプス NSF AMPA受容体 セロトニントランスポーター

1. 研究開始当初の背景

自閉症者の末梢血中セロトニンの高値が 1960 年代に報告されて以来、「自閉症のセロトニン仮説」として自閉症とセロトニン神経系の関連が注目されてきた (Schain & Freedman, J Pediatr 1961)。我々はセロトニン・トランスポーター (SERT) と自閉症の関連を示す生体脳での直接証拠を得るため自閉症者脳内の SERT 分布を PET 画像により解析した (Nakamura et al, Arch Gen Psychiatry 2010)。その結果、自閉症者では脳の広範囲にわたり細胞膜上の SERT トレーサー結合が低下し、この所見が自閉症症状と密接に関連することが示唆された (図 1)。しかし死後脳で SERT mRNA の定量を行ったところ、健常群と自閉症群との間に脳内 SERT の発現の差異はなかった (図 2)。この成果から SERT の神経細胞内輸送の障害が最も病態を説明すると考え、自閉症の病態に関わる SERT 結合分子を探索して NSF を見出し、自閉症者リンパ球での NSF mRNA 発現の有意な低下および上記死後脳での減少傾向を発見した (図 3、Iwata et al, Mol Autism 2014)。

以上より、我々は、神経細胞内でおきる神経伝達物質関連分子のシナプス膜移行異常が自閉症の原因とする「自閉症のシナプス膜移行異常仮説」をたて、平成 28 年度より基盤研究 (B)「PET 所見に基づく自閉症・シナプス膜移行異常仮説の検証」(研究代表者: 松崎秀夫)の補助を得て、これまで報告例のない NSF ノックアウト (KO) マウスの作出と解析を試みた。そのホモ接合体は胎生致死だったため、NSF ヘテロ KO マウス (NSF^{+/-}) と野性型マウス (NSF^{+/+}) を比較した行動実験を行ったところ、3chamber テストで 4 週齢の NSF ヘテロ KO マウスは新規マウスに遭遇するエリアの滞在時間が有意に減少 (図 4)。

Open field test で 4 週齢の NSF ヘテロ KO マウスは新規の場所での立ち上がり回数が有意に増加 (図 5)。

Ultrasonic vocalization test で、NSF ヘテロ KO マウスは出生直後の発声回数が有意に減少 (図 6) するなど、社会的相互作用の障害・常同行動・コミュニケーション能力の障害を強く示唆する自閉症様の行動異常が NSF ヘテロ KO マウスに出現した。

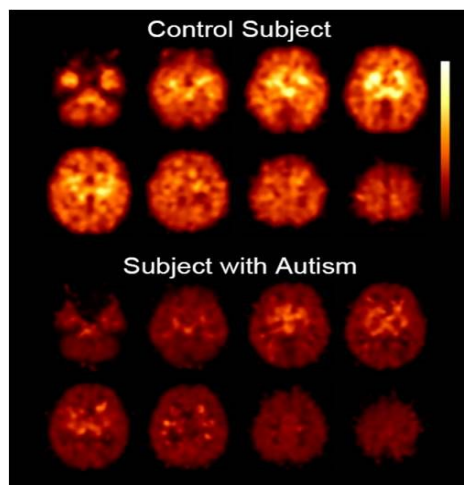


図 1 PET による自閉症者脳内の SERT 分布

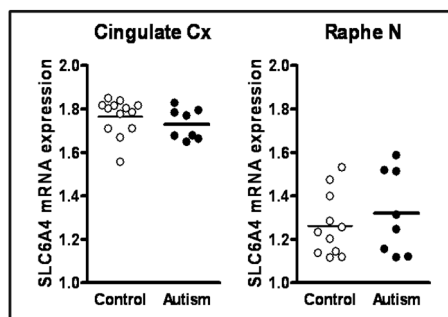


図 2 自閉症死後脳の SERT mRNA 発現

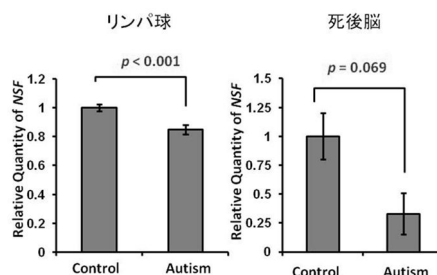


図 3 自閉症リンパ球と死後脳の NSF mRNA 発現 (リンパ球: 各 N = 30、死後脳: 各 N = 7)

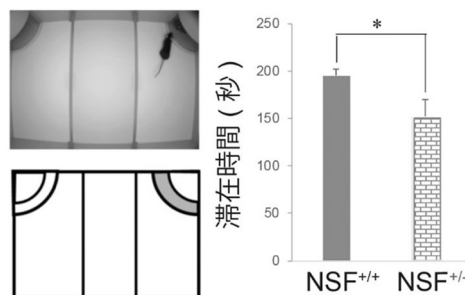


図 4: NSF ヘテロ KO マウスの社会認識行動

この NSF ヘテロ KO マウスにおける SERT 分子の膜移行阻害の有無を検討する目的で、縫線核由来の細胞膜分画中 SERT 発現を調べたところ、細胞膜への SERT 移行が減少していた (図 7)。また、NSF は AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) に結合して、そのシナプス膜移行も制御する (Song et al, Neuron 1998 ; Lee et al, Neuron 2002)。そこで電子顕微鏡を用いて NSF ヘテロ KO マウス海馬の AMPAR の発現を確認したところ、そのシナプス膜移行も減少していた (図 8)。シナプス分子の細胞膜移行を促す手段は長い間知られていなかったが、高橋らは、edonepic maleate が AMPAR のシナプス膜移行を促すことで脳損傷後の脳の可塑性を向上させ、リハビリテーション依存性に運動機能が回復することをマウスとサルの実験で示した (Abe et al, Science 2018)。自閉症でも運動療法の社会的な遂行機能の向上に有用である (Yu et al, BMC Psychiatry 2018)。また、脳内 AMPAR のシナプス膜移行の減少によりマウスに自閉症様の表現型が現れることは他の自閉症モデル研究でも指摘されている (Irie et al, PNAS 2012 ; Heise et al, Front Mol Neurosci 2018)。しかし、治療標的としての可能性は未知である。我々は、本研究課題の核心をなす学術的「問い」として「NSF の発現阻害によるシナプス膜移行異常は自閉症の治療標的となり得るか」を設定し、ここで NSF ヘテロ KO マウスに edonepic maleate と運動負荷を与える実験を行って、治療標的としての可能性を検証する。

2 . 研究の目的

本研究計画では、自閉症様の行動異常を確認した NSFヘテロKOマウスを用いて、edonepic maleate投与によるSERTないしAMPAのシナプス膜移行異常の修復が、マウスの自閉症様行動異常を修復できるかどうかを評価する。加えて、大脳皮質のE/Iバランスの変化も電気生理学的に評価する。これら動物実験の評価によって、非臨床レベルで脳内SERTないしAMPAのシナプス膜移行異常が自閉症の治療標的となるかどうか確認することを目的とする。

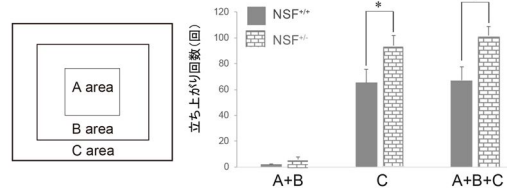


図 5: NSF ヘテロ KO マウスの常同行動
Ultrasonic vocalization

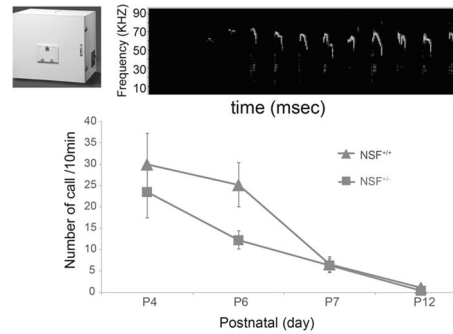


図 6: NSF ヘテロ KO マウスの超音波発声解析

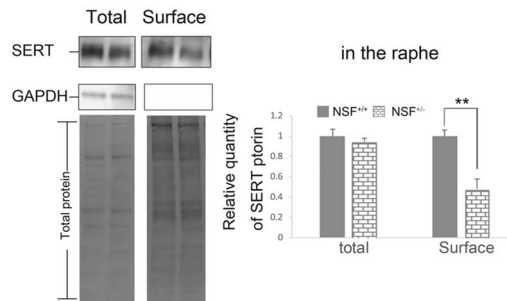


図 7: NSF ヘテロ KO マウスの縫線核における SERT 発現

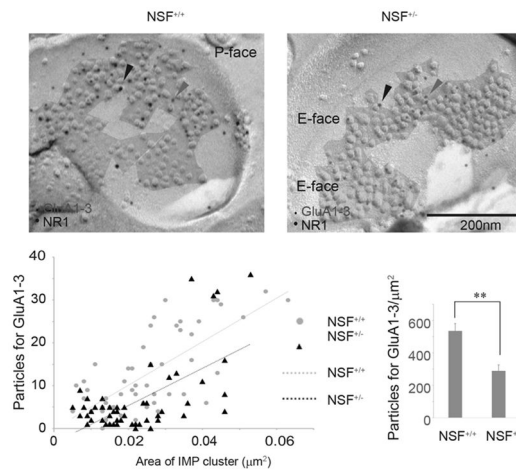


図 8: NSF ヘテロ KO マウスの海馬における AMPAR 発現

3. 研究の方法

本研究では「自閉症のシナプス膜移行異常仮説」に基づき開発した NSF ヘテロ KO マウスに、連日の edonergic maleate 投与とトレッドミルによる運動負荷を与え、マウスが示す表現型への効果を調べることで、シナプス膜移行異常が自閉症の新規治療標的となり得るか否かを検証する。

(1) NSFヘテロKOマウスの行動解析

NSFヘテロKOマウスに認められる自閉症様の異常行動が、edonergic maleate (図9) の投与とトレッドミル (図10) による運動負荷の前後でどのように変化するかを検討する。NSFヘテロKOマウスに4週齢の時点から edonergic maleate 30mg/kgを連日朝夕に腹腔投与し、かつトレッドミルによる運動負荷を毎日一定時間与える。1週間後、2週間後、4週間後の時点で自閉症症状を反映するバッテリー行動解析を実施し、薬物および運動負荷を行わなかった対照群と比較して投与効能評価を行う。行動評価の正確を期すため、各群のマウスは行動解析までに10世代以上継代したうえでオスn=10以上を使用する。

不安・常同行動・open field test

社会性行動・3 chamber test

強迫行動・marble-burying behavior test

学習・記憶・T-maze test

コミュニケーション・ultrasonic vocalization test

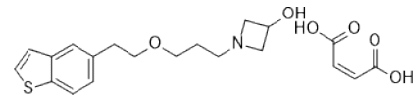


図 9 edonergic maleate



図 10 トレッドミル装置(メルクエスト)

(2) NSFヘテロKOマウスの脳組織解析

上記行動実験と同様の条件で薬物および運動負荷をかけたNSFヘテロKOマウスにみられる SERTないしAMPAのシナプス膜移行の障害が、負荷を行わなかった対照群と比較してどのように変化するかを各群オスn=5以上で検討する。

A) 生化学的評価：深麻酔下にマウスを経心臓的に灌流・脱血して脳を摘出し、まず Western Blot (WB) 法により、総SERTないしAMPAの発現を調べる。次に脳組織の細胞小器官の分画を抽出して、分画毎のSERTないしAMPA発現量をWB法で測定する。また、大脳皮質、海馬、線条体および中脳のシナプス分画を抽出し、分画毎のSERTないしAMPA発現量をWB法で測定する。

B) 組織学的評価：NSFとAMPAはともに海馬に強く発現しているため、NSFヘテロKOマウスにおけるAMPAサブユニット微細局在は海馬神経細胞のシナプス内外の膜上で調べる。深麻酔下にマウスを経心臓的に灌流固定して脳を採取する。SERTないしAMPAサブユニットの電子顕微鏡レベルの局在を、SDS処理凍結切断レプリカ標識法 (SDS-FRL法) を用いて、発現量と空間配置の両面で解析し、上記の生化学的実験結果の形態学的な確認を行う。

さらに、薬物および運動負荷後の分子局在レベルの効果を確認する目的で、NSFヘテロKOマウスへの薬物および運動負荷の有無による海馬AMPAの局在変化も検討する。また、シナプス可塑性に深く関与するNMDA型グルタミン酸受容体の局在についても同様に検討する。

(3) NSFヘテロKOマウスの電気生理学的解析

NSFヘテロKOマウスで認められるSERTないしAMPAのシナプス膜移行の障害が、上記行動実験と同様の条件で薬物および運動負荷をかけた大脳皮質でのシナプス興奮と抑制のバランス (E/Iバランス) に与える影響を電気生理学的に計測し、負荷を行わなかった対照群と比較し

てどのように変化するかを検討する。大脳皮質のin vivoパッチクランプ法によって電位固定下に生理的感覚刺激によって誘起される興奮性シナプス後電流 (Excitatory postsynaptic current, EPSC) や抑制性シナプス後電流 (Inhibitory postsynaptic current, IPSC) の記録・解析を行う。また、AMPAのシナプス膜移行の障害はシナプス可塑性に影響することからシナプス可塑性におけるNSFの役割を明確にする目的で、NSFヘテロKOマウスの海馬へ電気生理学的にLTPおよびLTDを誘導し、シナプス可塑性の有無を観察する。

4. 研究成果

令和元年度は、NSFヘテロKOマウスに edonepic maleate の投与実験を開始する前の確認として、横浜市立大学医学部・高橋研究室と共同で、マウス脳内のAMPA発現をWB法により再検討した。その結果、NSFヘテロKOマウスの海馬では、すでに得られた結果とは相違して、野生型に比べ細胞膜上のAMPA発現に有意差がないと判明し、その後に大脳皮質でも同じ傾向が確認された。NMDA型受容体発現にも有意差はなかったため、edonepic maleate の投与実験は残念ながら見送られた。

令和2年度は、NSFヘテロKOマウスに運動負荷を与え、マウスの表現型を修復するかについて検討した。トレッドミルによる運動負荷を与える前に、マウスの自発的なWheel running運動を与えて検討したところ、自発運動はNSFヘテロKOマウスが示す社会性の低下については効果がなかったが、立ち上がり回数(常同行動)を軽減させる傾向があると判明した。しかし、新型コロナウイルス感染症拡大防止の観点から動物の行動実験が制約を受け、かつマウスの交配を担当するスタッフの立ち入りも制限されたためマウスが思うように殖やせなかった。故に現在のデータの範囲でFrontiers in Geneticsに投稿することとした。

令和3年度は、NSFヘテロKOマウスの行動や脳組織に関して得られた表現型のデータをまとめてFrontiers in Geneticsに投稿し、再修正を経て受理された。運動負荷を与える介入実験では、マウスの表現型を修復するかについて引き続きできるだけ例数を上げて検討したが、最終的にマウスの自発的なWheel running運動前後で有意差はなかった。このため、運動負荷はNSFヘテロKOマウスの立ち上がり回数(常同行動)や社会性を回復させないと判断して運動負荷後の脳組織化学・電気生理学的な検討は行わなかった。交付期間内にAMPAKINE投与実験は行われず、本研究を終了した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 16件）

1. 著者名 Xie Min-Jue, Iwata Keiko, Ishikawa Yasuyuki, Nomura Yuki, Tani Tomomi, Murata Koshi, Fukazawa Yugo, Matsuzaki Hideo	4. 巻 12
2. 論文標題 Autistic-Like Behavior and Impairment of Serotonin Transporter and AMPA Receptor Trafficking in N-Ethylmaleimide Sensitive Factor Gene-Deficient Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 748627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2021.748627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Xie Min-Jue, Ishikawa Yasuyuki, Yagi Hideshi, Iguchi Tokuichi, Oka Yuichiro, Kuroda Kazuki, Iwata Keiko, Kiyonari Hiroshi, Matsuda Shinji, Matsuzaki Hideo, Yuzaki Michisuke, Fukazawa Yugo, Sato Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 PIP3-Phldb2 is crucial for LTP regulating synaptic NMDA and AMPA receptor density and PSD95 turnover	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40838-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Min-Jue Xie, Keiko Iwata, Yasuyuki Ishikawa, Yugo Fukazawa, Hideo Matsuzaki.
2. 発表標題 NSF deficient mice leads to autism like behavior with hippocampal synaptic dysfunction.
3. 学会等名 第64回日本神経化学会、2021年9月30日、WEB開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Xie MJ, Iwata K, Ishikawa Y, Fukazawa Y, Matsuzaki H.
2. 発表標題 Autistic phenotype in the N-ethylmaleimide sensitive factor gene lacking mice.
3. 学会等名 INSAR 2019 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 謝敏かく、岩田圭子、石川保幸、深澤有吾、松崎秀夫
2. 発表標題 Abnormal synaptic plasticity in the autistic like the N-ethylmaleimide sensitive factor knockout mice.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xie MJ, Iwata K, Ishikawa Y, Fukazawa Y, Matsuzaki H.
2. 発表標題 Autism-related deficits via dysregulated NSF-dependent membrane protein trafficking.
3. 学会等名 ISN-ASN 2019 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	岩田 圭子 (Iwata Keiko) (30415088)	福井大学・子どものこころの発達研究センター・助教 (13401)	
研究分担者	謝 敏かく (Xie Min-Jue) (40444210)	福井大学・子どものこころの発達研究センター・助教 (13401)	
研究分担者	深澤 有吾 (Fukazawa Yugo) (60343745)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	出雲 信夫 (Izumo Nobuo) (70368976)	横浜薬科大学・薬学部・教授 (32723)	
研究分担者	石川 保幸 (Ishikawa Yasuyuki) (90346320)	前橋工科大学・工学部・准教授 (22303)	
研究分担者	高橋 琢哉 (Takahashi Takuya) (20423824)	横浜国立大学・医学研究科・教授 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関