

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16490

研究課題名（和文）カルシウムシグナリング破綻に着目した自閉スペクトラム症における神経回路病態の解明

研究課題名（英文）Deciphering neural circuit abnormality underlying autism spectrum disorder caused by calcium signaling dysfunction

研究代表者

堀金 慎一郎（Shin-ichiro, Horigane）

名古屋大学・環境医学研究所・講師

研究者番号：60775906

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、自閉スペクトラム症の背景にある神経回路病態を解明し、具体化した標的に対する効果的な治療開発の推進を目的としている。研究成果として、自閉スペクトラム症患者より同定された、変異型のL型カルシウムチャネルを発現するマウス系統が自閉スペクトラム症様の行動異常を示し、同マウス系統が神経回路形成および細胞内カルシウム動態の異常を示すことを明らかにした。またさらに、同マウス系統の変異型L型カルシウムチャネルを標的とした治療的介入手法の開発について、予備的検討を完了した。本研究課題により得られた学術的知見・実験手法は、自閉スペクトラム症の治療開発における新たな基盤となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉スペクトラム症は生後初期からその症状が認められ、胎生・発達期にかけた神経回路形成の破綻が発症原因の一つと考えられている。しかしその一方で、神経回路の形成過程や出来上がった神経回路の機能にどのような異常があるのかという「神経回路病態」について多くが未解明であり、病態理解を基礎とした合理的な治療法の開発が困難な状況にあった。本研究課題により得られた研究成果は、こうした自閉スペクトラム症の背景にある神経回路病態の一端を明らかにするものであり、並行して開発を進める治療的介入法とあわせて、自閉スペクトラム症の治療開発へ寄与することが強く期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to elucidate neural circuit pathology underlying autism spectrum disorder (ASD) and develop a therapeutic method. To address this, 1) we evaluate behavioral abnormality of an ASD-related mouse model expressing mutant L-type Ca²⁺ channels and found ASD-like behaviors in the mouse model. 2) We also identified dysfunction in neural circuit formation and intracellular Ca²⁺ dynamics in the mouse model. Furthermore, 3) we developed a brain-wide genetic recombination technique to establish a therapeutic method targeting the mutant L-type Ca²⁺ channel in this mouse model. These new insights and an experimental method are expected to contribute to developing effective treatment for ASD.

研究分野：病態神経科学

キーワード：自閉スペクトラム症（ASD） Timothy症候群 病態モデルマウス カルシウムシグナリング L型カルシウムチャネル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 自閉スペクトラム症は人口の約1%が発症する発達障害であり、社会性の障害や固執・繰り返し行動を主な特徴とする。自閉スペクトラム症は生後初期からその症状が認められ、胎生・発達期にかけた神経回路形成の破綻が発症原因の一つと考えられている。しかしその一方で、神経回路の形成過程や出来上がった神経回路の機能にどのような異常があるかという「神経回路病態」について多くが未解明であり、病態理解を基礎とした合理的な治療法の開発が困難な状況にある。

(2) 代表的セカンドメッセンジャーであるカルシウムイオンは、神経回路形成や神経可塑性など多様な細胞イベントを制御する。近年、各種の精神障害患者からカルシウムシグナリング関連遺伝子における変異が同定され、カルシウムシグナリング破綻と精神障害との関係が注目される。しかしその一方で、両者の因果関係については多くが未解明である。

自閉スペクトラム症を併発する Timothy 症候群の患者より、L型カルシウムチャネルの1アミノ酸変異(G406R、カルシウム流入量を増大させる機能獲得型)が同定されている。我々はこうした変異型カルシウムチャネルを発生期の神経細胞に強制発現させることで、神経細胞移動が障害されることを見出した。こうした独自知見に基づき、カルシウムシグナリング破綻と自閉スペクトラム症との関係を明らかにする目的で、同変異型カルシウムチャネルを発現する新たな自閉スペクトラム症モデルマウスを作出している。

2. 研究の目的

(1) 自閉スペクトラム症の背景にある、神経回路病態の解明および病態にもとづく効果的な治療戦略の開発は、自閉スペクトラム症研究における喫緊の課題と考えられる。本研究の目的は、申請者が作出した変異型L型カルシウムチャネル(G406R)を発現する自閉スペクトラム症モデルマウスを活用し、神経回路病態の解明と治療法の探索を行い、新たな自閉スペクトラム症治療法の基盤を得ることである。

(2) 研究目的を達成するため、自閉スペクトラム症モデルマウスに対し一連の行動学的評価を行い、同マウス系統における神経回路形成ならびに細胞内カルシウム動態の異常を評価する。これらの検討により、変異型L型カルシウムチャネル(G406R)を原因とした、自閉スペクトラム症における特徴的な行動異常の有無とその背景にある神経回路病態を明らかにする。またさらに、同マウス系統の変異型L型カルシウムチャネルを標的とした治療的介入手法の開発を推進する。

3. 研究の方法

自閉スペクトラム症様行動(社会性障害・繰り返し行動)の評価

我々は自閉スペクトラム症を併発する、Timothy 症候群患者に由来する変異を導入した自閉スペクトラム症モデルマウスを作出したが、同マウスが自閉スペクトラム症様行動(社会性障害・繰り返し行動)を示すかは明らかでない。そのため、同マウスの自閉スペクトラム症様行動を3チャンパーテストおよびグルーミング時間の計測などにより検討する。また自閉スペクトラム症患者は他の発達障害である学習障害(LD)および注意欠陥多動性障害(ADHD)と重複した症状を示す場合があるため、恐怖連合学習およびオープンフィールドテストなどでLDおよびADHD様行動を評価し、同マウスの発達障害様行動を広く検討した。

神経回路形成と細胞内カルシウム動態の評価

これまでに我々は、カルシウムシグナリングの破綻が発生期における神経回路形成(神経細胞移動・神経突起伸長)を障害することを明らかにしている。そのため自閉スペクトラム症モデルマウスを対象とした組織学的評価により、発生期における神経細胞移動および軸索・樹状突起伸長、成体期における細胞体配置・神経突起形態・シナプス形成を評価する。また神経細胞機能の評価するため、自閉スペクトラム症モデルマウスから初代培養神経細胞を作製し、カルシウムイメージングにより細胞内カルシウム動態を評価する。

変異型L型カルシウムチャネルを標的とした治療法の探索

我々が作出した自閉スペクトラム症モデルマウスは、遺伝子組換え酵素により、変異型L型カルシウムチャネル(G406R)の発現と欠失を任意のタイミングで実施できる。そのため本研究では、変異型L型カルシウムチャネル(G406R)発現による神経系への影響を詳細に検討する目的で、神経系特異的に高効率で遺伝子組換えを可能とするウイルスベクターの選定を行った。

4. 研究成果

自閉スペクトラム症様行動（社会性障害・繰り返し行動）の評価

我々が作出した自閉スペクトラム症モデルマウスに対し行動学的評価を行い、自閉スペクトラム症の中核症状である、社会性障害および繰り返し行動を見出した。また我々が作出したマウス系統と同一の変異型L型カルシウムチャンネル（G406R）を全身性に発現する、既存の別系統マウスに対し、行動学的評価を行い、自閉スペクトラム症と関連のある行動異常を見出した（Horigane et al., FEBS Open Bio, 2020）。

神経回路形成と細胞内カルシウム動態の評価

我々が作出した自閉スペクトラム症モデルマウスに対し組織学的評価を行い、自閉スペクトラム症と関連する内側前頭前野において、神経細胞の減少を見出した。また同モデルマウスから初代培養神経細胞を作製し、膜電位の脱分極により、野生型マウスと比較し過剰な細胞内へのカルシウム流入が生じることを明らかにした。

また変異型L型カルシウムチャンネル（G406R）を全身性に発現する、既存の別系統マウスに対しても組織学的評価を行い、発達期における抑制性シナプスの増加・シナプスサイズの減少、胎生期における移動中の抑制性神経細胞の増加を見出した（Horigane et al., FEBS Open Bio, 2020）。さらにL型カルシウムチャンネルが発生期のいかなる時期から活性をもち、各種の細胞イベントへ関与するかを明らかにするため、一連の検討を行っている。その結果、L型カルシウムチャンネル主サブユニットの発現は、移動中の興奮性神経細胞で次第に増加し、大脳皮質中間帯の上層部で、自発的な細胞内カルシウム濃度上昇へ寄与することを明らかにした（Horigane et al., Neuroscience Research, 2021）。

変異型L型カルシウムチャンネルを標的とした治療法の探索

我々が作出した自閉スペクトラム症モデルマウスは、遺伝子組換え酵素により、変異型L型カルシウムチャンネル（G406R）の発現と欠失を任意のタイミングで実施できる。本研究では、ウイルスベクター（AAV-PHP.eB）によるCre遺伝子組換え酵素の発現検討（プロモーター種、マウス個体あたりのウイルスベクター量）を行い、神経系特異的に高効率で遺伝子組換え可能なウイルスベクター条件を特定した。今後はさらに、FLP組換え酵素を利用した、変異型L型カルシウムチャンネル（G406R）の欠失操作についても検討を進め、発生期から成体期にかけて、どの時期における変異体発現が各種の表現型へと結びつくか、また変異体の欠失により表現型が回復するかについて検討を進める。こうした一連の検討により、変異型L型カルシウムチャンネルを標的とした自閉スペクトラム症治療法の探索を推進する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wang C, Horigane S, Wakamori M, Ueda S, Kawabata T, Fujii H, Kushima I, Kimura H, Ishizuka K, Nakamura Y, Iwayama Y, Ikeda M, Iwata N, Okada T, Aleksic B, Mori D, Yoshida T, Bito H, Yoshikawa T, Takemoto-Kimura S, Ozaki N	4. 巻 12(1):84
2. 論文標題 Identification of ultra-rare disruptive variants in voltage-gated calcium channel-encoding genes in Japanese samples of schizophrenia and autism spectrum disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-022-01851-y	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 Horigane S, Ozawa Y, Zhang J, Todoroki H, Miao P, Haijima A, Yanagawa Y, Ueda S, Nakamura S, Kakeyama M, Takemoto-Kimura S	4. 巻 10(8)
2. 論文標題 A mouse model of Timothy syndrome exhibits altered social competitive dominance and inhibitory neuron development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1436-1446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12924.	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 Horigane S, Hamada S, Kamijo S, Yamada H, Yamasaki M, Watanabe M, Bito H, Ohtsuka T, Takemoto-Kimura S	4. 巻 S0168-0102(20)30391-6
2. 論文標題 Development of an L-type Ca ²⁺ channel-dependent Ca ²⁺ transient during the radial migration of cortical excitatory neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.06.003.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Horigane S, Takemoto-Kimura S, Kamijo S, Adachi-Morishima A, Fujii H, Bito H.
2. 発表標題 Calcium transient as an intracellular beacon that orchestrates stepwise nucleus deformation required for neuronal migration.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hyodo F, Ozawa Y, Pan M, Ueda S, Abe M, Sakimura K, Horigane S, Takemoto-Kimura S.
2. 発表標題 Development of a novel mouse model of Timothy syndrome associated with autism spectrum disorder.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Horigane S, Takemoto-Kimura S, Kamiyo S, Adachi-Morishima A, Fujii H, Bito H.
2. 発表標題 Calcium transients as an intracellular beacon that orchestrates a morphogenetic cycle underlying neuronal migratory movement.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Timothy症候群のモデル動物	発明者 竹本さやか、堀金慎一郎、阿部学、小澤享弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-108698	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------