

機関番号：13802

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791125

研究課題名 (和文) 自閉症死後脳でのセロトニントランスポーター密度低下の原因探索

研究課題名 (英文) Probing the mechanism of reduced serotonin transporter densities in autistic brains: a postmortem brain study

研究代表者

須田 史朗 (Shiro Suda)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・助教

研究者番号：40432207

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、PET 研究で捉えられた自閉症患者の脳内でセロトニントランスポーター (SERT) 密度が低下しているという知見を死後脳を用いて検証した。リアルタイム PCR、ウエスタンブロットによって帯状回の SERT mRNA、蛋白の発現量を計測したところ、自閉症群と対照群とで発現量に有意差は認められなかった。PET で用いられるトレーサーは細胞膜に発現している SERT 蛋白に結合するため、本研究結果から、自閉症患者の脳内 SERT 密度低下は、蛋白の量的低下によって生じるのではなく、細胞膜への輸送機構の障害によって生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Emerging evidence from neuroimaging study using positron emission tomography (PET) suggests reduced serotonin transporter (SERT) densities in the brains of subjects with autism. To probe the mechanism of reduced SERT densities in autistic brains, we examined the postmortem brains of autistic subjects to identify any changes in the expression of SERT proteins. mRNA and protein expression of SERT protein were examined in the autistic brain and control subjects using real time PCR and Western blotting. The result showed that none of mRNA and protein expression was found to be significantly altered. Since PET tracers bind the membrane expressed SERT proteins, this finding suggests that dysregulation of protein transport, trafficking and transporter internalizing systems may underlie the reduced SERT densities in autistic brains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：児童・思春期精神医学・自閉症

1. 研究開始当初の背景

(1) 自閉症は対人的相互作用やコミュニケーションの障害、興味・活動の限定された反復的常動的な行動様式などによって特徴付けられる発達の障害である。その生物学的基盤は未だ特定されていない。自閉症の有病率は世界各国で増加傾向にあるが、有効な治療法や予防法は見つかっておらず、その生物学的基盤も未だ特定されていない。自閉症の病態メカニズムの究明が求められている。

(2) 近年、申請者らの教室では PET (positron emission tomography) を用いた研究により、自閉症者ではセロトニントランスポーター (SERT) の密度が広範な脳部位で低下していること、また、この低下は自閉症の中核症状である「対人的相互作用やコミュニケーションの障害」や「興味・活動の限定された反復的常動的な行動様式」と関連していることを明らかにした。このことから脳内の SERT の密度低下が自閉症の病態基盤を形成していることが示唆された。しかし、脳内で SERT の密度低下が生じるメカニズムは解明されていない。

(3) PET で用いられるトレーサーは、生体内では細胞表面、すなわち細胞膜に発現している SERT 蛋白に結合する。従って、PET 研究で捉えられた自閉症脳内で SERT 密度が低下しているという知見は、神経細胞膜に発現している SERT 蛋白が減少していることを示唆する。そこで、申請者は自閉症脳内 SERT 密度低下の原因について考えられる以下の仮説を立てた。

仮説①: mRNA 発現量の低下により SERT 密度が低下する

仮説②: 蛋白発現量の低下により SERT 密度が低下する

仮説③: SERT 蛋白の細胞膜への輸送の障害により、細胞膜に発現する蛋白量が減少し、結果的に SERT 密度の低下が生じる

これらの仮説を検証するために、申請者らはアメリカ自閉症死後脳バンク Autism Tissue Program よりセロトニン神経の起始核である縫線核、PET 所見と症状との関連がみられた帯状回の脳サンプルを取得した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、PET 研究で捉えられた自閉症患者の脳内で SERT 密度が低下しているという知見を、自閉症死後脳を用いて検証した。すなわち、セロトニン神経の起始核である縫線核、PET 所見と症状との関連がみられた帯状回での SERT 蛋白発現量の変化を自閉症死後脳を用いて検討した。

(2) セロトニン神経系の発達に関連し、自

閉症で認められる大脳白質の走行異常との関連が示唆されている軸索ガイダンス蛋白の発現変化を検討した。

(3) セロトニン神経系との相互作用が指摘され、自閉症患者での異常の存在が指摘されているグルタミン酸神経系に着目し、グルタミン酸の生合成系に関与する酵素群の発現変化も検討した。

3. 研究の方法

(1) 研究には Autism Tissue Program (プリンストン、米国)、NICHD Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders (ボルチモア、米国) より取得した自閉症死後脳サンプルを用いた (自閉症群 8 例、対照群 13 例)。計測部位は、PET 研究で自閉症の中核症状の重症度と SERT 密度低下の相関が最も強い帯状回とした。

(2) SERT 蛋白の発現解析にはリアルタイム PCR 法、およびウエスタンブロット法を用いた。計測部位は、セロトニン神経の起始核である縫線核、PET 研究で自閉症の中核症状の重症度と SERT 密度低下の相関が最も強い帯状回とした。

(3) SERT 蛋白、軸索ガイダンス蛋白 ephrin A4 (EFNA4)、ephrin B3 (EFNB3)、plexin A4 (PLXNA4)、roundabout 2 (ROBO2)、roundabout 3 (ROBO3) の発現解析にはリアルタイム PCR 法、およびウエスタンブロット法を用いた。計測部位は、帯状回とした。

(4) また、グルタミン酸の生合成系に関与する酵素群 glutamine synthetase (GS)、glutaminase 1 (GLS1)、glutaminase 2 (GLS2)、glutamate dehydrogenase 1 (GDH1)、glutamate dehydrogenase 2 (GDH2) の発現はウエスタンブロット法を用いて検討した。計測部位は、帯状回とした。

4. 研究成果

(1) リアルタイム PCR 法によって縫線核、帯状回の SERT mRNA の発現量を計測したところ、自閉症群と対照群とで発現量に有意差は認められなかった。続いて同じサンプルを用いてウエスタンブロット法を行い、SERT 蛋白の発現量を検討したが、自閉症群と対照群の発現量に有意差は認められなかった。SERT 蛋白は通常細胞膜に存在しているため、帯状回において膜蛋白分画抽出キットを用い細胞質分画、全膜分画、細胞膜分画を抽出し、それぞれウエスタンブロットを行い、SERT 蛋白の発現量を自閉症群と対照群とで比較検討したが、両群で有意差は認められな

かった。

(2) また、軸索ガイダンス蛋白 EFNA4、EFNB3、PLXNA4、ROBO2、ROBO3 に関してリアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法を行い、発現変化を検討したところ、PLXNA4、ROBO2 の発現量が自閉症群の帯状回で有意に減少していることが観察された。

(3) グルタミン酸の生合成系に関与する酵素群については、GS、GLS1 の自閉症群帯状回における発現低下がウエスタンブロットで観察された。その他の酵素 GLS2、GDH1、GDH2 は有意な変化が認められなかった。

PET で用いられるトレーサーは、生体内では細胞表面、すなわち細胞膜に発現している SERT 蛋白に結合する。従って、我々は PET 研究で捉えられた自閉症脳内で SERT 密度が低下しているという知見から、自閉症では神経細胞膜に発現している SERT 蛋白が減少しているという仮説を立てたが、本研究では自閉症群、対照群間の SERT 蛋白発現量の有意差を見いだせず、この仮説を立証することが出来なかった。細胞膜分画でも差がなかったことから、トランスポーターの internalizing 等の機構が介在している可能性があり、自閉症脳内での SERT 密度低下の病態生理についてはさらなる検討が必要であると考えられる。また、軸索ガイダンス蛋白は脳の発達期において神経回路網の形成に重要な役割を担う蛋白群であり、その機能低下は大脳白質の走行異常と関連することが示唆されている。一方、脳画像研究により自閉症では大脳白質の走行異常が存在することが報告されている。本研究から、軸索ガイダンス蛋白の中でも PLXNA4、ROBO2 の低下が自閉症で認められる大脳白質の走行異常の病態形成に関与している可能性が示唆された。また、自閉症脳での GS、GLS1 の発現低下が認められ、自閉症脳におけるグルタミン酸—グルタミン代謝回転の異常の存在が示唆された。自閉症の病態ではセロトニン神経系の機能異常の重要性が指摘されているが、その発症基盤は明らかにされていない。PET 研究では自閉症脳内で SERT 密度が低下していることが報告されているが、本研究により死後脳では自閉症群、対照群間の SERT 蛋白発現量に有意差がないことが判明したため、自閉症の病態解明に向けてはさらなる研究が必要であると考えられる。また、本研究により自閉症では軸索ガイダンス蛋白 PLXNA4、ROBO2 の機能低下、およびグルタミン酸関連酵素 GS、GLS1 の機能低下が存在することが明らかとなり、今後、これらの分子が自閉症の治療標的分子として発展する可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Shimmura C, Suda S, Tsuchiya KJ, Hashimoto K, Ohno K, Matsuzaki H, Iwata K, Matsumoto K, Wakuda T, Kamenno Y, Suzuki K, Tsujii M, Nakamura K, Takei N, Mori N. Dysregulation of the Peripheral Glutamatergic System in Children with Autism. *PLoS ONE* 投稿中
- ② Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Suda S, Miyachi T, Itoh H, Kanayama N, Hirano K, Ohzeki T, Takei N and the HBC Study Team. Searching for very early precursors of autism spectrum disorders: the Hamamatsu Birth Cohort for Mothers and Children (HBC). *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 1:158-73, 2010
- ③ Suzuki K, Okada K, Wakuda T, Shinmura C, Kamenno Y, Iwata K, Takahashi T, Suda S, Matsuzaki H, Iwata Y, Hashimoto K, Mori N. Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine. *PLoS ONE* 5:e9260, 2010.
- ④ Suda S, Sugihara G, Suyama R, Mori N, Takei N. Donepezil and concurrent sertraline treatment is associated with increased volume of the hippocampi in a patient with depression. *J Clin Psychiatry* 71:806-8, 2010.
- ⑤ Nakamura K, Sekine Y, Ouchi Y, Tsujii M, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Suda S, Sugiyama T, Takei N, Mori N. Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism. *Arch Gen Psychiatry* 67:59-68, 2010.
- ⑥ Kajizuka M, Miyachi T, Matsuzaki H, Iwata K, Shinmura C, Suzuki K, Suda S, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Sugiyama T, Takei N, Mori N. Serum levels of platelet-derived growth factor BB homodimers are increased in male children with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:154-158, 2010.
- ⑦ Fujita-Shimizu A, Suzuki K, Nakamura K, Miyachi T, Matsuzaki H, Kajizuka M,

Shimura C, Iwata Y, Suda S, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Sugihara G, Iwata K, Yamamoto S, Tsujii M, Sugiyama T, Takei N, Mori N. Decreased serum levels of adiponectin in subjects with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:455-458, 2010.

〔学会発表〕（計2件）

- ① Shimura C, Suda S, Tsuchiya KJ, Hashimoto K, Matsuzaki H, Iwata Y, Kamenoyama Y, Nakamura K, Takei N, Mori N. Dysregulation of glutamatergic biosynthetic pathway in subjects with autism. Neuroscience 2010, the 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA, November 2010
- ② Suda S, Iwata K, Anitha A, Thanseem I, Nakamura K, Matsuzaki H, Iwata Y, Yamamoto S, Suzuki K, Takei N, Mori N. Serotonin related gene expression changes in subjects with autism: A postmortem brain study. Neuroscience 2009, the 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, IL, USA, October 2009

〔図書〕（計1件）

- ① Suda S, Takei N. Disturbed growth in early life and later neurocognitive development associated with psychiatric disorders. In: Preedy VR, Watson RR, Martin CR (Eds.), *Handbook of Behavior, Food and Nutrition* New York: Springer, 2011, chapter 100

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須田 史朗 (Shiro Suda)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・助教

研究者番号：

4 0 4 3 2 2 0 7

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：