

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460345

研究課題名(和文) 発達障害治療を指向した脳部位特異的ミクログリアにおけるmicroRNA機能解析

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy for neurodevelopmental disorders based on site-specific microglial and microRNA functions

研究代表者

鈴木 秀典 (Suzuki, Hidenori)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30221328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム症(ASD)を含む広汎性発達障害の発症機構を研究するため、ASD患者の染色体重複を模倣した病態モデルマウス(patDp/+)を用いて、ミクログリアの役割を検討した。生後7日のpatDp/+マウスの扁桃体基底外側核でミクログリアの活性化マーカーIba1の発現が低下していた。周産期のミノサイクリン投与によってIba1の発現は対照と同程度に回復し、成熟期の不安行動も改善した。ミクログリアへの直接作用が報告されているセロトニン再取り込み阻害薬を新生仔期にpatDp/+マウスに投与すると、成熟期の社会的行動が改善した。以上の結果はミクログリアの発達障害病態への関与を示している。

研究成果の概要(英文)：The underlying neural mechanisms of neurodevelopmental disorders including autism spectrum disorder (ASD) are poorly understood. We examined an involvement of microglia in ASD using mice with paternal duplication (patDp/+) corresponding to human chromosome 15q11-q13. Iba1, a microglial activation marker, was decreased in the basolateral amygdala in patDp/+ mice at postnatal day 7. Perinatal treatment with minocycline, a microglial modulator, restored the Iba1 expression in the basolateral amygdala and reduced anxiety-related behaviors in adolescence. Further, early postnatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor, which has been reported to directly affect microglial functions, ameliorated a deficit in social interaction behavior in adolescence. The results of the present study suggest important roles of microglia in pathophysiology of neurodevelopmental disorders and provide a key piece of information to develop novel microglia-related drugs for these disorders.

研究分野：神経薬理学

キーワード：自閉症動物モデル 社会的行動 背側縫線核 発達障害 不安様行動 扁桃体 microRNA ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

自閉症を含む広汎性発達障害は発達期に発症する精神疾患の一群で、生物学的側面からの研究は立ち後れている。中核症状である社会的行動障害は他の精神疾患にも共通するが、未だ科学的根拠に基づく治療法はない。広汎性発達障害の病因として、遺伝的素因に加え環境因子が関与し、発達期における神経回路の形成異常が示唆されている。ミクログリアは中枢神経に常在する免疫担当細胞として感染等によって活性化されるだけでなく、神経細胞のアポトーシス、シナプスの刈込や神経伝達の調節などに関与するといわれ、正常な神経系の発達において重要な役割を果たしている (Kettenmann et al., *Physiol Rev*, 2011, 91, 461)。しかしながら、広汎性発達障害に関して発達期におけるミクログリアの重要性については十分明らかにされていない。最近、社会行動障害を示す MeCP2 欠損レット症候群モデルマウスにおいて、発達期に正常なミクログリアを移植することで、行動障害が改善されることが報告された (Derecki et al., *Nature*, 2012, 484, 105)。すなわち、発達期におけるミクログリア機能が社会性行動障害の発現に大きく影響していることを示唆している。

microRNA (miRNA) は 20 前後の塩基からなる RNA で、mRNA の 3' - UTR の相補的な塩基配列を認識し、複数の mRNA の翻訳を制御している。最近、我々は神経障害性疼痛モデルラットにおいて、miRNA の 1 つである miR-7a が疼痛発症後、感覚神経で低下し、miR-7a の投与で疼痛が緩和されることを見出し、併せて miR-7a を抑制すると疼痛が出現することを報告している (Sakai et al., *Brain*, 2013, 136, 2738)。この研究手法を広汎性発達障害に導入し、特にミクログリア特異的な miRNA の役割を検討することで、病態理解と治療法開発に新たな視点を提供できる。発達障害では多くの分子変化が予想されるので、広範な

遺伝子群を制御し、かつ低分子の miRNA は治療薬開発の標的として利点を持っている (Yu et al., *Cell*, 2012, 150, 895)。

以前の我々の研究で、ステロイド負荷を妊娠ラットにあたえると、仔ラットは成熟期以降に不安様行動を示した (Nagano et al., *Neurosci Res*, 2008, 60, 364)。また、前頭前野のセロトニン受容体 5-HT_{1A} mRNA は、生後 4 週で既に低下しており、生後早期の選択的セロトニン再取り込阻害薬 (SSRI) 投与によって 5-HT_{1A} mRNA 量の正常化とともに行動異常も改善した。さらに、SSRI の作用は 5HT_{1A} 受容体を介することを明らかにした (Nagano et al., *Neuropharmacol*, 2012, 63, 292)。この結果は、適切な発達早期の治療介入によって精神病態が改善しうることを示している。

以上の点を踏まえ、病態責任脳部位特異的なミクログリア及び miRNA 機能の観点から発達障害病態を理解し、その成果を基盤として疾患治療の可能性を検討する必要があると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では発達期における脳部位特異的なミクログリア機能が行動異常の発現に大きく関与するとの仮説のもと、発達障害病態モデル動物におけるミクログリアの病態への関与、およびミクログリア特異的な miRNA について発現変化とその機能を検討し、研究を通して、広汎性発達障害の発症基盤の理解と治療法の開発基盤を形成することを最終目標とした。

具体的には以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) 発達障害モデル動物における脳部位特異的なミクログリア及び miRNA の発現変化：遺伝子工学的に作製された動物および感染やストレスにより行動異常が惹起された動物などの発達障害モデルマウスにおいて、どの脳部位においてどのようなミクログリ

ア及び miRNA の発現変化がみられるかを見出し、疾患とミクログリア機能との関連を明らかにする。

(2) 発達障害モデル動物のミクログリアで発現変化する miRNA の機能：発現変化するミクログリア miRNA に関して、当該脳部位で実際にどのような分子を標的として機能しているか、miRNA の発現変化はどのような機構でもたらされるか、について分子生物学的に明らかにする。

(3) ミクログリアにおける miRNA 発現調節で誘導される *in vivo* 生理機能および行動変化：ミクログリアでの miRNA 発現を分子生物学的に修飾することで、*in vivo* 神経生理機能および行動がどのように変化するかを検討し、miRNA の治療応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 発達障害モデル動物における脳部位特異的ミクログリアの発現変化の検討：発達障害モデルマウスとして、遺伝子工学的に作製された *patDp/+* 自閉症モデルマウスを用いて、ミクログリアの発現変化を網羅的にスクリーニングし、形態学的に発現変化する脳部位の特定を試みた。生後 1 週から 5 週にかけて、脳スライス標本をミクログリアのマーカで染色し、ミクログリアの形態と量的変化を指標として全脳領域を網羅的にスクリーニングした。特に、病態の責任部位と推測されている前頭前野、海馬、扁桃体、小脳を主要な観察領域とした。

(2) 発達障害モデル動物における脳部位特異的ミクログリアの miRNA 発現変化の検討：*patDp/+* 自閉症モデルマウスを用いて、ミクログリアの発現変化が特定された脳部位において、miRNA マイクロアレイを用いて miRNA 発現変化を網羅的にスクリーニングし、候補となる miRNA を見出すことを試みた。

(3) 発達障害モデル動物におけるミクログリア機能の修飾による、組織化学的、分子生物学的、生理学的及び行動学的効果の脳部位

特異的検討：ミクログリア機能を修飾する薬物をマウス個体に投与し、疾患に関連する脳部位において、ミクログリアの形態変化、機能変化を観察した。併せて、行動学的にこれらの修飾薬物の効果を検討した。行動解析においては、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験等の不安行動検査、ソーシャル・インタラクション試験および母親から分離した際の仔マウスの超音波発声 (ultrasonic vocalization; USV) 試験など、発達障害で見られる社会的行動の変化を中心に観察した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

発達障害モデル動物における脳部位特異的ミクログリアの発現変化の検討：発達障害モデルマウスとして、遺伝子工学的に作製されたヒト染色体 15q11-q13 に相当するマウス染色体領域の父性重複を有する自閉症モデル (*patDp/+*) 雄性マウスを用いた。生後 1 週と 5 週のモデル動物における脳スライス標本をミクログリアの活性化マーカーである Iba1 で染色し、ミクログリアの形態と量的変化を指標として、前頭前野、海馬、扁桃体を中心に網羅的にスクリーニングした。前頭前野と海馬では組織学的に顕著な変化は見られなかった。一方、生後 1 週の *patDp/+* マウスの扁桃体基底外側核で活性化マーカーである Iba1 の発現が低下していたが、ミクログリアの数には変化が見られなかった。扁桃体中心核では Iba1 発現、ミクログリア数共に変化は見られなかった。生後 5 週の *patDp/+* マウスの扁桃体基底外側核では Iba1 の発現は変化していなかった。

ミクログリアの組織学的解析と同時に、モデル動物の行動解析を行ったところ、生後 5 週時点でのオープンフィールド試験において、野生型に比べより不安様行動を示すことが確認された。扁桃体も不安行動に関与する脳

部位と考えられるため、治療薬効果判定の行動指標となりえると考えられた。

発達障害モデル動物における脳部位特異的ミクログリアの miRNA 発現変化の検討：ミクログリアの発現変化が特定された脳部位において、miRNA マイクロアレイを用いて miRNA 発現変化を網羅的にスクリーニングし、候補となる miRNA を見出すことを試みた。*patDp/+*マウスの扁桃体基底外側核を用いて、miRNA の発現変化をマイクロアレイ解析法スクリーニングした。複数個の miRNA が増加していたが、染色体重複に由来するものと考えられた。Iba1 の発現変化がみられた扁桃体基底外側核のミクログリアに限定して発現変化を検討する手法を検討中である。

発達障害モデル動物におけるミクログリア機能の修飾効果の検討：*patDp/+*マウスにおけるニューロン-グリア相互作用に伴い変化する電気的特性およびシナプス伝達機能について、本モデルで異常が示唆されているセロトニン神経系について、細胞体が集簇する中脳背側縫線核(DRN)において電気生理学的解析を行った。細胞膜特性及び入力系の解析から野生型に比べて、DRN セロトニン神経細胞が低活動状態であることが示唆された。DRN に入力する神経の一部は社会的行動の調節に関与する前頭前皮質から入力するという過去の結果とも一致していた。

本モデルマウスにおける脳内セロトニンレベルを薬理的に操作する目的で、出生後母乳を介して SSRI を投与したところ、5~7 週齢のマウスにおいて、DRN セロトニン含有神経細胞の電気生理学的性質が回復した。さらに、本 SSRI 処置 *patDp/+*マウスでは、成長後に社会的行動の改善がみられた。

次に、ミクログリア機能修飾作用を持つミノサイクリンを妊娠後期(妊娠 17 日)から生後 21 日にかけて母親マウスへ経口投与し、仔に対する効果を検討した。*patDp/+*マウスの扁桃体基底外側核では生後 1 週で Iba1 の

発現が低下していたが、ミノサイクリン投与によって、対照と同程度に回復した。

行動学的検討では、母親から分離した際の仔マウスの USV の回数が、*patDp/+*マウスでは生後 10 日から野生型に比べ有意に多く、生後 21 日まで発声が認められたが、ミノサイクリン投与によっては正常化しなかった。一方、オープンフィールド内の中心域滞在時間は、*patDp/+*マウスにおいて有意に減少していたが、ミノサイクリン投与によって改善した。

以上より、本自閉症モデルマウスにおいては、幼若期における扁桃体外側基底核のミクログリアの変化が不安行動に関与している可能性が示唆された。

(2) 得られた成果の位置付けとインパクト
本研究を通して、現在有効な治療法が見いだされていない発達障害の 1 つである自閉症スペクトラム患者に対する早期治療介入において、ミクログリア機能の修飾は有用な治療手段の 1 つとなり得ることが示唆された。ミノサイクリンはその作用機構の詳細は不明ながら、ミクログリアの機能を修飾することが知られている。また、SSRI も直接ミクログリアに作用することが報告されている。これらの薬物が発達障害疾患にみられる異なる行動異常を改善させることから、各症状によって基盤となる責任脳部位及び神経機構が異なっていることも併せて示唆された。これらの結果は、今後の本疾患病態研究にとって特に重要な知見であると考えられる。

(3) 今後の展望

本研究では、発達障害モデルとして *patDp/+*マウスを中心に解析を行った。本マウスは疾患モデルとしての妥当性は十分満たしていると考えられるが、他のモデルにおいても今回の結果が再現できるかを今後検討していく必要がある。また、薬理的手法ではミク

ログリアの関与は示されたものの、扁桃体基底外側核を検体とした miRNA アレイを用いたスクリーニングでは、疾患モデルで有意に変化する miRNAs は見出せなかったため、ミクログリアに限定して検討する必要がある。現在、ミクログリアを可視化・同定できるトランスジェニックマウスを導入し検討を行っている。また、我々が神経障害性疼痛研究から病態関連分子として同定した miRNA クラスターが発達障害にも関与していることが最近報告されたため、個体で候補分子を強制的に発現変化させる実験系からのアプローチも進めている。

これらの研究を通して、新しい発想の治療法開発に繋がることを期待している。

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 31 件)

Kimura M, Sakai A, Sakamoto A, Suzuki H. Glial cell line-derived neurotrophic factor-mediated enhancement of noradrenergic descending inhibition in the locus coeruleus exerts prolonged analgesia in neuropathic pain. *Br J Pharmacol*, 172:2469-2478, 2015.

doi:10.1111/bph.13073. 査読有

Shigemori T, Sakai A, Takumi T, Itoh Y, Suzuki H. Altered microglia in the amygdala are involved in anxiety-related behaviors of a copy number variation mouse model of autism. *J Nippon Med Sch*, 82:92-99, 2015.

doi:10.1272/jnms.82.92. 査読有

Funayama T, Ikeda Y, Tateno A, Takahashi H, Okubo Y, Fukayama H, Suzuki H. Modafinil augments brain activation associated with reward anticipation in the nucleus accumbens. *Psychopharmacol*, 231:3217-3228, 2014.

doi:10.1007/s00213-014-3499-0. 査読有

Ogawa K, Tateno A, Arakawa R, Sakayori T, Ikeda Y, Suzuki H, Okubo Y. Occupancy of serotonin transporter by tramadol: a positron emission tomography study with [¹¹C]DASB. *Int J Neuropsychopharmacol*, 17:845-850, 2014.

doi:10.1017/S1461145713001764. 査読有

Onouchi T, Kobayashi K, 他 14 名 11 番目 Targeted deletion of the C-terminus of the mouse adenomatous polyposis coli tumor suppressor results in neurologic phenotypes related to schizophrenia. *Mol Brain*, 7:21, 2014.

doi:10.1186/1756-6606-7-21. 査読有

Hayashi Y, Nabeshima Y, 他 14 名 7 番目 Enhanced stability of hippocampal place representation caused by reduced magnesium block of NMDA receptors in the dentate gyrus. *Mol Brain*, 7:44, 2014.

doi:10.1186/1756-6606-7-44. 査読有

Nagahara N, Nagano M, Ito T, Shimamura K, Akimoto T, Suzuki H. Antioxidant enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria. *Sci Rep*, 3:1986, 2013.

doi:10.1038/srep01986. 査読有

Sakai A, Saitow F, Miyake N, Miyake K, Shimada T, Suzuki H. miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability. *Brain*, 136:2738-2750, 2013.

doi:10.1093/brain/awt191. 査読有

[学会発表](計 55 件)

坂井 敦、三宅紀子、丸山基世、三宅弘一、島田 隆、岡田尚巳、鈴木秀典 miR-17-92 クラスターによる神経障害性疼痛及び軸策伸長の調節. 第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.9-11 パシフィコ横浜

伊藤直美、坂井 敦、三宅紀子、三宅弘一、岡田尚巳、坂本篤裕、鈴木秀典 オキサリブリン誘発性神経障害性疼痛における miR-15b の関与. 第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.9-11 パシフィコ横浜

坂井 敦、三宅紀子、丸山基世、三宅弘一、島田 隆、岡田尚巳、鈴木秀典 神経損傷に伴う疼痛及び軸策伸長における miR-17-92 クラスターの機能解析. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015.12.1-4 神戸ポートアイランド

Shigemori T, Sakai A, Takumi T, Suzuki H, Itoh Y. Involvement of altered microglia during early development in anxiety-related behaviors of a copy number variation mouse model of autism. 11th ASPR Congress & the 118th Annual Meeting of the Japan Pediatric Society, 2015.4.15-18, Osaka

重盛朋子、坂井 敦、内匠 透、伊藤保彦、鈴木秀典 染色体重複自閉症モデルマウスにおける周産期ミノサイクリン投与による扁桃体ミクログリアと不安行動への効果. 第 88 回日本薬理学会年会 2015.3.18-20 名古屋国際会議場

坂井 敦、三宅紀子、三宅弘一、島田 隆、鈴木秀典 神経障害性疼痛に対する miR-17-92 クラスターの関与. 第 37 回日本神経科学大会 2014.9.11-13 パシフィコ横浜

Sakai A, Miyake N, Miyake K, Shimada T, Suzuki H. miR-17-92 cluster upregulation contributes to intractable neuropathic pain. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Regulatory & Non-Coding RNAs. 2014.8.26-30, Cold Spring Harbor Laboratory, State of New York, USA.

Suzuki H, Sakai A. Symposium: MicroRNA and CNS disorders. Role of microRNAs in neuropathic pain. The 12th Meeting of The

Asian-Pacific Society for Neurochemistry. 2014.8.23-26, Kaohsiung (Ta-Kao), Taiwan
牛腸義宏、齋藤文仁、柳川右千夫、坂井 敦、鈴木秀典 マウス背側縫線核における GABA 作動性細胞の電気生理学的特性の解析. 第 91 回日本生理学会大会 2014.3.16-18 鹿児島大学

〔図書〕(計 3 件)

Sakai A, Suzuki H. microRNA and Pain. microRNA: Medical Evidence From Molecular Biology to Clinical Practice, Springer, 17-39, 2015.

〔その他〕ホームページ

<http://www.nms.ac.jp/nms/pharmacol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 秀典 (SUZUKI HIDENORI)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30221328

(2) 研究分担者

齋藤 文仁 (SAITOW FUMIHITO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20360175

坂井 敦 (SAKAI ATSUSHI)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30386156

永野 昌俊 (NAGANO MASATOSHI)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60271350

(3) 連携研究者 該当者なし