

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09873

研究課題名(和文) ADHDを伴う治療抵抗性自閉症モデルマウスの確立とその分子病態の解明

研究課題名(英文) Establishment and analysis of a mouse model of treatment-resistant autism comorbid with ADHD

研究代表者

久岡 朋子 (HISAOKA, TOMOKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00398463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症リスク遺伝子として知られているKirrel3遺伝子の欠損マウスを作成し、その行動解析を行った結果、自閉症様の行動に加えて、多動(ADHD様行動)を伴うことを見いだした。さらにKirrel3欠損マウスにおいて、小脳や副嗅球のシナプス部の構造異常を見いだした。これらの結果から、Kirrel3遺伝子欠損による小脳や嗅覚神経回路・シナプス回路の形成異常は、ADHDを伴う自閉症様行動の発現に関与している可能性が考えられた。ADHDを伴う治療抵抗性の自閉症患者で異常となる脳領域・神経回路に関しては不明であり、本研究結果はADHDを伴う自閉症の病態解明につながる重要な知見を提供すると思われる。

研究成果の概要(英文)： In recent studies, it has been suggested that Kirrel3 is an autism-associated gene. We generated Kirrel3-knockout (KO) mice and investigated their behavioral phenotypes relevant to autism spectrum disorder (ASD). Kirrel3-KO mice exhibited ASD-like behaviors with hyperactivity. In addition, we observed abnormal synaptic organization in the cerebellum and accessory olfactory bulb in Kirrel3-KO mice. These results suggest that the abnormal synapse formation of cerebellum and accessory olfactory bulb in Kirrel3-KO mice may induce abnormal synaptic activity, which cause ASD-like behaviors with hyperactivity. It remains unknown which neural circuits are impaired in the patients with treatment-resistant autism comorbid with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Kirrel3-KO mice may be represented a mouse model of ASD comorbid with ADHD and could provide molecular and pathophysiological information for ASD comorbid with ADHD.

研究分野：神経発生学、神経組織学、行動生理学

キーワード：精神発達障害 自閉症スペクトラム障害 シナプス 注意欠如・多動性障害 神経科学

1. 研究開始当初の背景

Kirrel3 は細胞接着分子であるイムノグロブリンスーパーファミリーのメンバーで、我々は、発達過程、及び成獣のマウスの中樞神経系や感覚器系における発現解析を行ってきた。その結果、Kirrel3 mRNA が嗅球、線条体、海馬、大脳皮質、小脳などの神経細胞に広く発現していることを見いだした。さらに、生体内での役割を明らかにするために、Kirrel3 欠損マウスを作成し、そのヘテロマウスを用いて発達過程や成獣の脳における詳細な発現解析を行った結果、Kirrel3 が海馬の歯状回の投射ニューロン、及び小脳の介在ニューロンや投射ニューロンに強く発現していることを見いだした。Kirrel3 は橋核ニューロンの細胞移動や嗅球・副嗅球の感覚細胞の軸索収束、海馬の顆粒細胞のシナプス形成に関与していることが報告されている。また、自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorder; ASD) 患者や知的障害患者において KIRREL3 の遺伝子異常や欠損が認められたことが報告されている。

2. 研究の目的

ASD や注意欠如・多動性障害 (attention deficit hyperactivity disorder; ADHD) は、遺伝的要因の大きい神経発達障害の一つで、乳幼児期に発症し、その症状は生涯持続する。ASD の早期発見のための評価 (診断) 方法や早期介入による療育治療などは徐々に進んで来ているが、根本的な治療法は確立されていない。特に ASD と ADHD との合併は治療抵抗性で、病態解明に基づいた治療法の確立が切望されている。ASD の遺伝的要因の一つとしてシナプス接着分子の遺伝子異常が知られている。シナプス接着分子の一員である KIRREL3 についても、その遺伝子変異が ASD 患者において認められたことが報告されているが、KIRREL3 遺伝子の変異と ASD 発症との関連性や分子メカニズムは不明である。我々は、生体内での Kirrel3 の役割を明らかにするために、Kirrel3 欠損マウスを作成し、行動解析を行った結果、社会認知機能の低下や常同行動などの ASD 様の行動異常に加え、新規環境下での多動という ADHD 様の行動異常を見いだした。本研究では、ADHD を伴う治療抵抗型 ASD のモデルマウスとして Kirrel3 欠損マウスを確立し、より詳細な行動解析と、その組織学的解析により、病態の分子基盤の解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) 成獣の脳における Kirrel3 蛋白の局在の検討

成獣の脳における Kirrel3 蛋白の局在を、①ウェスタンブロット法、及び②抗 Kirrel3 抗体と軸索やシナプス蛋白に対する抗体を用いた多重免疫染色法により検討する。

(2) Kirrel3 欠損マウスの組織学的解析

Kirrel3 欠損マウスの ASD 様、ADHD 様行動異常の原因を検討するために、①Kirrel3 蛋白が高発現していた嗅球、海馬、小脳などを含む脳の HE 染色を行う。次に、②Kirrel3 蛋白が高発現していた軸索やシナプス部に対して、軸索やシナプス蛋白に対する抗体を用いた多重免疫染色法を行う。

(3) Kirrel3 欠損マウスの行動学的解析

これまでの Kirrel3 欠損マウスの行動解析の結果、ASD の主要症状と類似した社会性行動に異常を見いだしており、より詳細な解析を行う。ASD の主要症状である①社会性の障害を、3 チャンバー社会性相互作用テスト、及び社会認識記憶テストにより検討する。②音声コミュニケーションに異常がないかを、成獣間の超音波発声により検討し、生後の発達過程 (生後 3 日齢、7 日齢、14 日齢) におけるコミュニケーション機能に異常がないかを、母仔分離後、5 分間の超音波発声回数の解析により検討する。③活動性と常同行動の有無を、オープンフィールドテスト、ホームケージでの毛づくろい (grooming) 行動、穴掘り様 (digging) 行動、立ち上がり (rearing) 行動、及びロータロッドテストにより検討する。④知覚障害の有無を音響驚愕反射やショック感受性テスト、嗅覚弁別テストにより検討する。⑤さらに、ASD に合併する精神疾患として多く報告されている、ADHD、不安神経症、知的障害と類似する行動に関しても、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト、明暗選択テスト、モリス水迷路テスト、受動的回避テストにより検討する。

4. 研究成果

(1) 成獣の脳における Kirrel3 蛋白の局在

①ウェスタンブロット法による解析: Kirrel3 蛋白の発現が、嗅球 (Ob; 副嗅球を含む)、海馬 (Hip)、小脳 (Cb) において、野生型マウス (WT) でのみ認められ、Kirrel3 欠損マウス (KO) では認められなかった (図 1)。

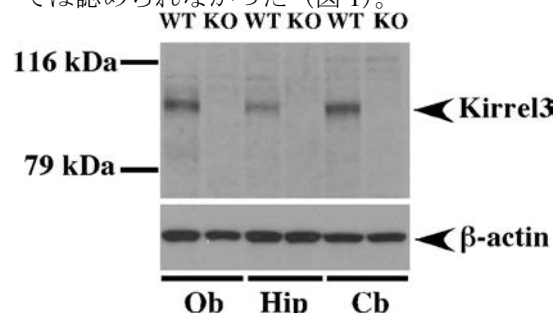


図 1 野生型マウス (WT) と Kirrel3 欠損マウス (KO) の脳における Kirrel3 のウェスタンブロット解析

②免疫染色法による解析: Kirrel3 蛋白の発現が、嗅球 (Ob; 図 2a)・副嗅球 (Aob; 図 2b) の糸球体層 (GL) や嗅神経層 (ON)・鋤鼻神経層 (vn)、海馬 (Hip; 図 2c) の分子層 (MoDG)・透明層 (SLu)、小脳 (Cb; 図 2d) の顆粒細胞層 (GCL) において、野生型マウス (WT) でのみ認められ

(図 2a-2d)、Kirrel3 欠損マウス(KO)では認められなかった(図 2e)。

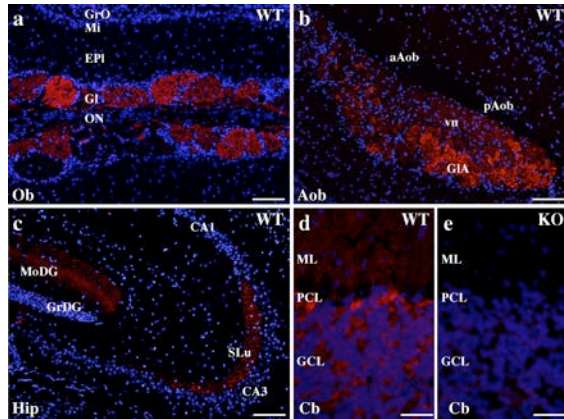


図 2 脳における Kirrel3(赤)の免疫染色像。青は核染色 (DAPI) 像。スケールバー=200 μm (a-c); 50 μm (d, e)。

③野生型マウス(WT)の嗅球(図 3a-3c)、副嗅球(図 3d-3f)、海馬(図 3g-3i)、小脳(図 4)において、Kirrel3 と軸索やシナプスマーカーとの共存が認められたことから、Kirrel3 蛋白が軸索やシナプス部に発現している可能性が示唆された。

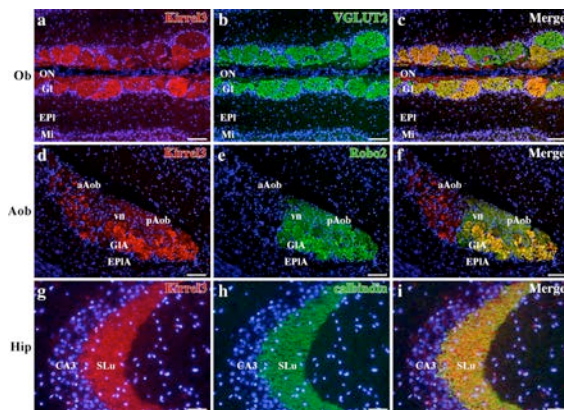


図 3 嗅球(a-c)の糸球体層(GI)・嗅神経層(ON)、副嗅球(d-f)の糸球体層(GIA)・鋤鼻神経層(vn)、海馬(g-i)の透明層(SLu)における Kirrel3(a, d, g; 赤)と嗅神経シナプスマーカーの VGLUT2(b; 緑), 鋤鼻神経軸索・シナプスマーカーの Robo2(e; 緑), 苔状線維軸索マーカーの calbindin(h; 緑)との二重免疫染色像。c, f, i は各々、a と b, d と e, g と h の重ね合わせ像(黄色)。青は核染色(DAPI)像。スケールバー=200 μm (a-f); 50 μm (g-i)。

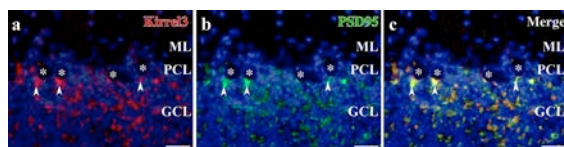


図 4 小脳顆粒細胞層(GCL)における Kirrel3(赤)とシナプスマーカー(PSD95, 緑)の二重免疫染色像。c は a と b の重ね合わせ像(黄色)。青は核染色(DAPI)像。星印はブルキンエ細胞の細胞体。Kirrel3 の発現が糸球体シナプス部、及びピンスーシナプス部(矢尻)に認められた。スケールバー=25 μm 。

(2)Kirrel3 欠損マウスの組織学的解析

①野生型マウス(WT)と Kirrel3 欠損マウス(KO)における脳の肉眼解剖(図 5a)、及び嗅球(Ob; 図 5b, 5c)、海馬(Hip; 図 5d, 5e)、大脳皮質(Cx; 図 5d, 5e)、小脳(Cb; 図 5f, 5g)の HE 染色像では差は認められなかった(図 5)。

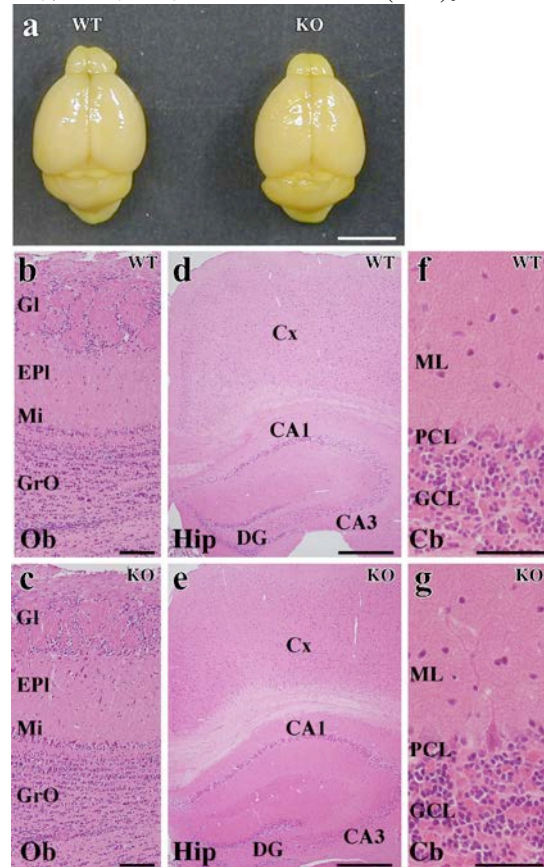
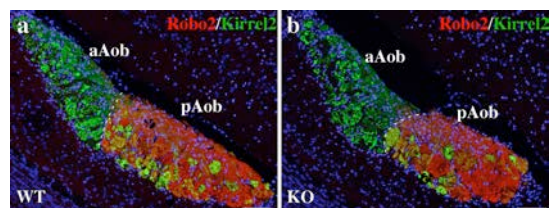


図 5 野生型マウス(WT; b, d, f)と Kirrel3 欠損マウス(KO; c, e, g)における脳の肉眼所見(a)と HE 染色像(b-g)。スケールバー=5 mm (a); 100 μm (b-e); 50 μm (f, g)。

②野生型マウス(WT)と Kirrel3 欠損マウス(KO)の副嗅球、海馬、小脳において軸索やシナプス蛋白に対する抗体を用いた多重免疫染色法を行った。その結果、副嗅球の鋤鼻感覚細胞の軸索投射異常を示唆する副嗅球の糸球体シナプス部の構造異常(図 6)と、小脳バスケット細胞の軸索分枝や投射の異常を示唆するピンスーシナプス部の構造異常(図 7)をみだした。海馬では、顆粒細胞の軸索(苔状線維) 終末部に発現している calbindin 蛋白の発現量に差は認められなかった(図 8)。



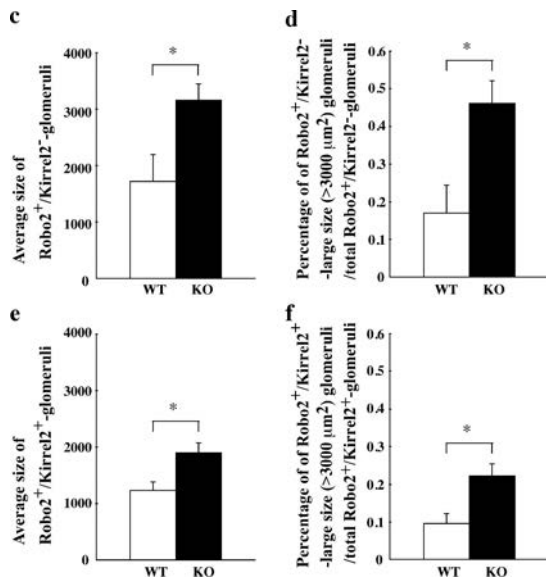


図6 野生型マウス(WT; a)、及び Kirrel3 欠損マウス(KO; b)の副嗅球における鋤鼻感覚細胞軸索投射異常。a, b は後部糸球体の軸索・シナプスマーカー(Robo2, 赤)と、Kirrel3 と相補的に発現することが報告されている Kirrel2(緑)との二重免疫染色像。KO において後部糸球体領域の Robo2 陽性/Kirrel2 陰性(赤)の糸球体の大きさ(c)が WT より大きく、大きい糸球体(3000 μm^2 以上)の割合も増加していた(d)。また、後部糸球体領域の Robo2 陽性/Kirrel2 陽性(黄色)の糸球体の大きさ(e)と大きい糸球体(3000 μm^2 以上)の割合も増加していた(f)。スケールバー=100 μm 。

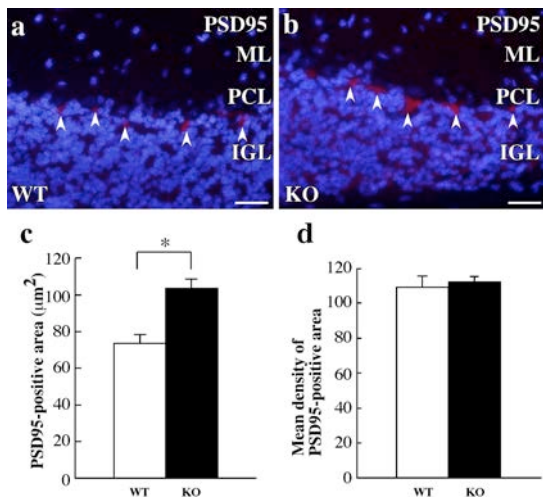


図7 野生型マウス(WT; a)、及び Kirrel3 欠損マウス(KO; b)の小脳における PSD95(赤、矢尻)の免疫染色。KO において小脳ピンスーシナプスのマーカーである PSD95 陽性領域の拡大を認めた(c)。PSD95 の輝度には差は認められなかった(d)。スケールバー=25 μm 。

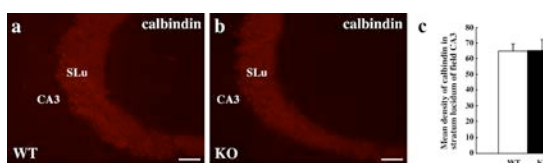


図8 野生型マウス (WT; a)、及び Kirrel3 欠

損マウス(KO; b)の海馬透明層における calbindin (赤) の免疫染色。KO において苔状線維のマーカーである calbindin の発現に差は認められなかった(c)。スケールバー=50 μm 。

(3) Kirrel3 欠損マウスの行動学的解析

行動学的解析の前にまず、発達過程、及び成獣における体重を解析した結果、差は認められなかった(図9)。

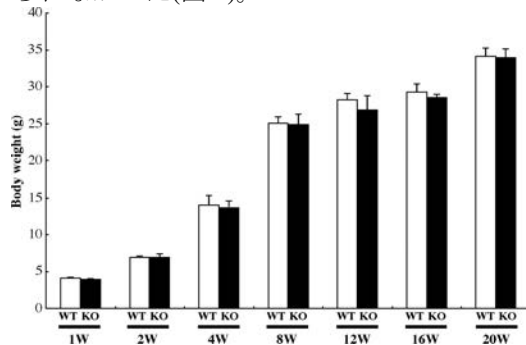


図9 野生型マウス(WT)と Kirrel3 欠損マウス(KO)の体重の推移。

次に、ASD の主要症状(①~④)、及び合併疾患の症状(③、⑤、⑥)と類似した行動解析を行った結果、Kirrel3 欠損マウス(KO)において ASD の主要症状の全てと、ADHD 様の行動を認めた(図10~図15)。

①社会性行動の検討では、Kirrel3 欠損マウス(KO)において、社会相互作用は正常であった(3 チャンバー社会性相互作用テストの社会性テスト; 図10a 左)が、社会認識記憶の低下を認めた(3 チャンバー社会性相互作用テストの新規探索性テスト; 図10a 右、社会認識記憶テスト; 図10b)。

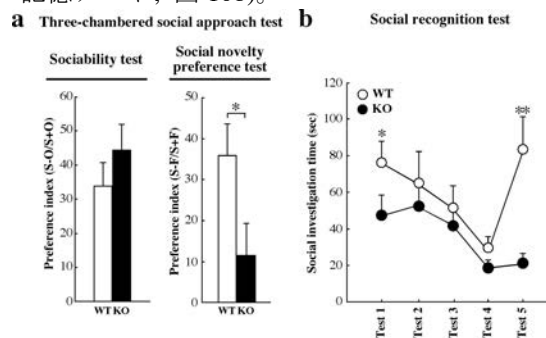


図10 Kirrel3 欠損マウス(KO)における社会認識記憶の低下。

②コミュニケーション機能の検討では、Kirrel3 欠損マウス(KO)において、母仔分離後、5 分間の超音波発声の解析では生後 7 日齢における超音波発声の増加を認めた(図11a)。また、成獣間の雌雄間、雄同士、雌同士の全てにおいて超音波発声の低下を認めた(図11b)。したがって、KO マウスは発達期、成獣期の両方でコミュニケーション異常を示すことが示唆された。

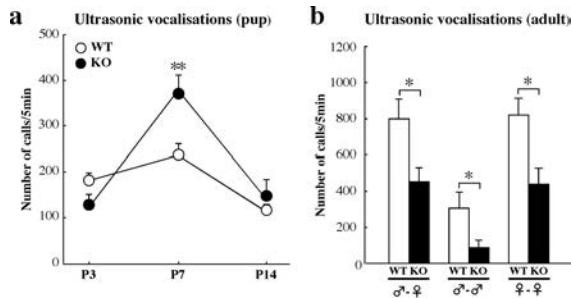


図 11 Kirrel3 欠損マウス(KO)における音声コミュニケーションの異常。

③活動性、及び常同行動の検討では、オープンフィールドテストにおいて、Kirrel3 欠損マウス(KO)で行動距離の増加と立ち上がり(rearing)行動の増加(図 12a)、及び側壁に沿って移動する走触性(thigmotaxis)行動の増加を認めた。また、ホームケージにおいても立ち上がり(rearing)行動の増加(図 12b)を認めたことから、KO マウスは新規環境と慣れた環境の両方において常同行動を示すと考えられる。毛づくろい(grooming)行動や穴掘り様(digging)行動の増加は認められなかった。また運動学習テストのロータロッドテストにおいても、運動学習が Kirrel3 欠損マウス(KO)で亢進(図 12c)しており、常同行動の亢進による可能性が考えられる。

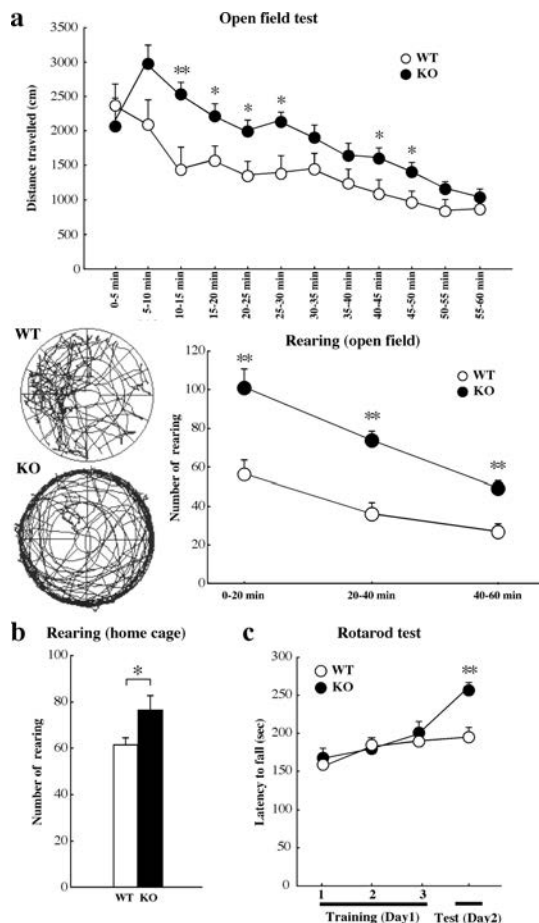


図 12 Kirrel3 欠損マウス(KO)における多動と常同行動の増加。

④知覚機能の検討では、音響驚愕反射におい

て Kirrel3 欠損マウス(KO)で驚愕反射の域値の低下と反応の大きさの亢進が認められた(図 13a)ことから、聴覚過敏である可能性が示唆された。また、嗅覚弁別テストでは、異なる食餌性の臭い(non-social odor)に対する弁別能は差を認めなかったが、異なる尿の臭い(social odor)に対する弁別能が低下していた(図 13b)。したがって、social odor の認識障害が、社会認識記憶の障害の原因となっている可能性が考えられる。

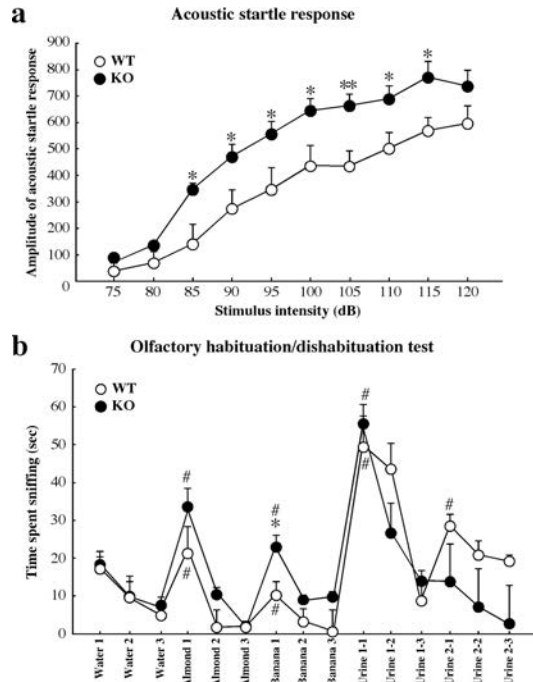


図 13 Kirrel3 欠損マウス(KO)における知覚行動異常。

⑤不安行動の検討では、明暗選択テスト(図 14a)、高架式十字迷路テスト(図 14b)において不安行動の指標となる明室滞在時間(図 14a)や閉鎖アーム滞在時間(図 14b)に差は認められなかったが、明所での活動性や明所暗所間横切り回数(図 14a)、及び総行動距離(図 14b)が Kirrel3 欠損マウス(KO)において亢進していた。したがって、不安行動は正常で、多動であると考えられる。

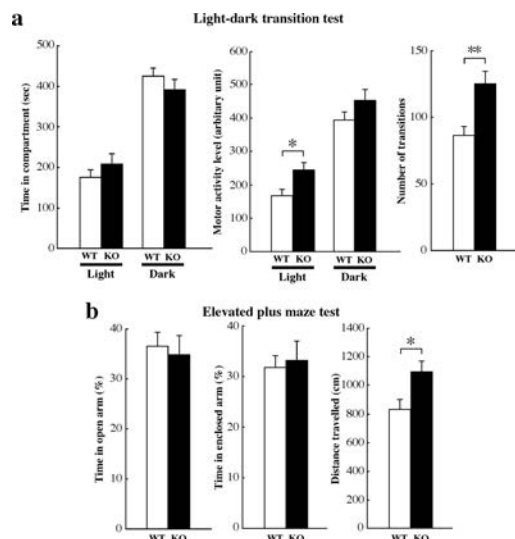


図 14 Kirrel3 欠損マウス(KO)における不安行動テスト。

⑥学習・記憶機能の検討では、モリス水迷路テスト(図 15a, 15b)、受動的回避テスト(図 15c)において差は認められなかった。したがって KO マウスは空間認知記憶や恐怖記憶には異常がないと考えられる。また、モリス水迷路テストのゴール位置の変更(reversal phase)にも対応できた(図 15b)ことから、固執性は亢進していないと考えられた。

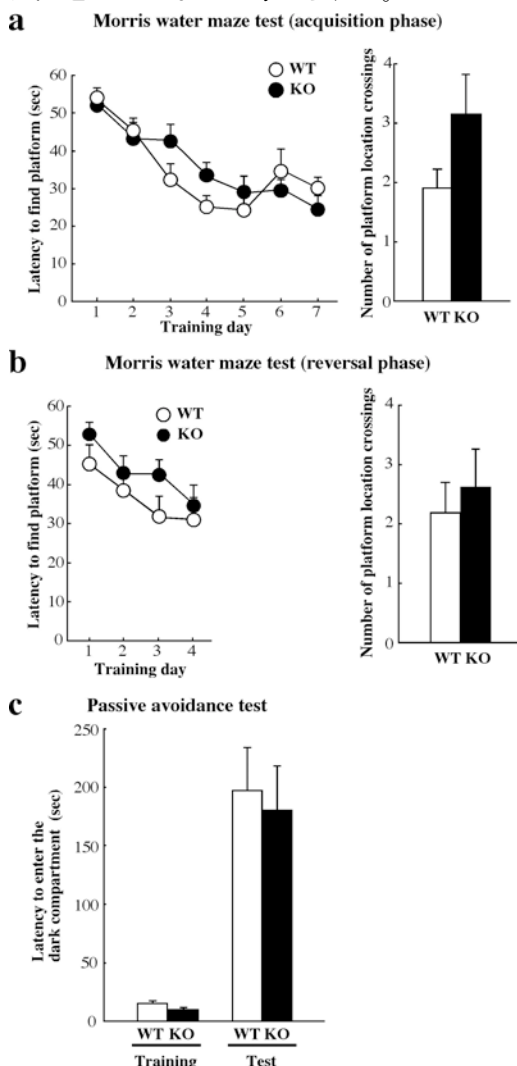


図 15 Kirrel3 欠損マウス(KO)における記憶・学習テスト。

以上の結果より、Kirrel3 欠損マウス(KO)は、社会認識行動の異常、音声コミュニケーションの異常、常同行動、知覚障害という ASD 様行動と、多動という ADHD 様行動があり、不安行動や学習・記憶障害のない ASD モデルマウスとなることが示唆された。また、KO マウスの組織学的解析結果から、嗅覚系や小脳のシナプス異常が ASD 様行動の原因となっている可能性が示唆された。

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 1 件)

Hisaoka T, Komori T, Kitamura T, Morikawa Y. Abnormal behaviours relevant to neurodevelopmental disorders in Kirrel3-knockout mice. *Sci. Rep.* 8: 1408, 2018.

[学会発表] (計 6 件)

①久岡朋子、小森忠祐、北村俊雄、森川吉博：シナプス形成期の脳における Kirrel3 の発現とその欠損マウスにおける発達期のコミュニケーション異常。第 1 2 3 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018.3.28 武蔵野

②Hisaoka T, Komori T, Gyobu H, Kitamura T, Morikawa Y. Further characterization of autistic-like behaviors in kirrel3-knockout mice. 第 6 0 回日本神経化学学会大会 2017.9.7 仙台

③久岡朋子、小森忠祐、形部裕昭、北村俊雄、森川吉博：脳における kirrel3 の局在とその欠損による行動異常。第 1 2 2 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.30 長崎

④Hisaoka T, Komori T, Gyobu H, Kitamura T, Morikawa Y. Deficiency of kirrel3, a synaptic cell adhesion molecule, results in behaviors relevant to ASD with ADHD. A Keystone Symposium [Synapses and Circuits: Formation, Function and Dysfunction] 2017. 3. 6 Santa Fe, NM

⑤Hisaoka T, Komori T, Gyobu H, Kitamura T, Morikawa Y. Autistic-like behaviors with hyperactivity in mice lacking kirrel3. 46th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2016. 11. 14 San Diego, CA

⑥久岡朋子、小森忠祐、形部裕昭、北村俊雄、森川吉博：kirrel3 遺伝子欠損マウスは注意欠陥・多動性障害(ADHD)を伴う自閉症様行動を示す。第 5 9 回日本神経化学学会大会 2016.9.9 福岡

6. 研究組織

(1)研究代表者

久岡 朋子 (HISAOKA TOMOKO)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00398463

(2)研究分担者

森川 吉博 (MORIKAWA YOSHIHIRO)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：60230108

(3)連携研究者

北村 俊雄 (KITAMURA TOSHIO)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：20282527

小森 忠祐 (KOMORI TADASUKE)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90433359