

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 22 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19759

研究課題名(和文) 自閉症モデル霊長類を用いた発達期神経回路再編成の異常の検証

研究課題名(英文) Verification of abnormality of postnatal synapse formation/pruning in a primate model of ASD

研究代表者

佐々木 哲也 (Sasaki, Tetsuya)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 微細構造研究部・科研費研究員

研究者番号：10634066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの脳では、新生児から子供の時期にかけてシナプスが急速に増えた後、大人になるにつれて減っていく。自閉症患者の脳では、シナプスの刈り込みがうまくいかず、余分な神経回路が残っていると考えられている。私たちは霊長類であるマーモセットを使って自閉症の原因に迫ろうとしている。まずマーモセットの脳で「刈り込み」が起こっていることを確認し、さらにバルプロ酸を妊娠しているサルに与えて自閉症の症状を示す霊長類モデルを作り出すことに成功した。本研究では、その脳でシナプスの「刈り込み」が不十分であることを見つけた。ヒト自閉症脳の特徴を反映したサルを用いることで、新しい治療法の開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Abnormalities of the processes of spinogenesis and pruning are implicated in several psychiatric disorders, such as ASD, SZ, and Rett's syndrome. In ASD, excess spine formation or incomplete pruning may occur, which leads to increased spine numbers. We have developed ASD model of the marmoset by expose to valproic acid (VPA) during gestation period. The VPA marmoset has a deficit in communication and perseveration, which are core features of ASD. On 2, 3, and 6 month old, the thickness of gray matter was found to be increased in the VPA-exposed animals compared to that in unexposed animals. In the prefrontal cortical area and the primary visual area, we found that excess spinogenesis and abnormal spine pruning of the ASD model compared with neurotypical animal. Search for the molecular mechanisms that underlie the developmental changes will provide further clues for an understanding of pathogenesis of ASD.

研究分野：神経解剖学、分子生物学

キーワード：霊長類 自閉症モデル シナプス スパイン 樹状突起 遺伝子発現 大脳皮質 領野

1. 研究開始当初の背景

ヒトの大脳皮質では、出生直後から興奮性シナプスが急速に増え、児童期に最大値に達した後減少する(オーバーシュート型シナプス形成)。シナプスの「刈り込み」は、機能的な神経回路を作り上げるために不可欠な過程とされるが、どのような仕組みで起こるかはわかっていない。このシナプス形成異常が、様々な精神疾患に関与していることが明らかになりつつある。例えば、自閉症スペクトラム障害者の脳では刈り込みが少ないため、過剰なシナプスが維持されていると考えられている。

本研究は、自閉症様行動を示す胎生期バルプロ酸曝露マーマセットを用いて、ヒト自閉症患者に見られる「オーバーシュート型」のシナプス形成の異常とその基盤となる分子メカニズムを明らかにしようと試みるものである。申請者はこれまでに、定型発達マーマセットの大脳皮質3領域(前頭連合野・側頭連合野・一次視覚野)の樹状突起の発達を調査し、どの領域でも生後90日齢でスパイン(興奮性シナプスの指標)数が最大となり、成体にかけて減少するオーバーシュート型シナプス形成が見られることを明らかにした(Oga, Sasaki et al., 2013)。また自閉症・統合失調症で異常が報告されている内側前頭前皮質の領域(area14r, area24)では、シナプス刈り込みの規模が小さいことを明らかにした(Sasaki et al., 2015)。刈り込みを制御する候補分子として軸索誘導因子、ミクログリア関連分子、グルタミン酸レセプターなどを見出した(Sasaki et al., 2014a, b)。

2. 研究の目的

本研究では、世界初となる自閉症病態モデル霊長類を用いて、大脳皮質のシナプス刈り込みの異常とその分子基盤を解明することを目的とする。胎生期バルプロ酸曝露マーマセットの樹状突起スパイン数と遺伝子発現の発達変化を経時的に調査し、定型発達マーマセットの発達プロファイルと比較する。この研究により、霊長類特異的な神経回路再編成の異常によって引き起こされると考えられる自閉症の生物学的基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、新しい霊長類モデル動物であるコモンマーマセット(*Callithrix jacchus*)を用いた。胎生期のマーマセットをバルプロ酸に曝露(200mg/kgを胚性60日から7日間連続投与)することにより、自閉症病態モデル霊長類(VPA マーマセット)を作出した。行動学的解析から、他個体への興味が少ない、特定の鳴き声が増加しているなどのDSM-5を満たす自閉症様症状を示すことが明らかになっている。本研究では、VPA マーマセットの大脳皮質領域(area12, V1)の第3層錐体細胞のスパイン密度・総数の発達変化を調査し、こ

の病態モデルのシナプス刈り込みに不全が見られるか検証した。また、DNA マイクロアレイを用いて胎生期バルプロ酸曝露マーマセットの発達過程の網羅的な遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

VPA マーマセットと定型発達個体の発達期大脳皮質の遺伝子発現解析を比較・解析を行った。先行研究と同じ6つの領域(area9, 12, 14r, 24, TE, V1)、5つの発達ステージ(新生仔、生後60, 90, 180日齢、成体)の灰白質組織を採取し totalRNA を抽出した。マーマセット特異的 DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を調査した。VPA 群では、新生仔で長距離神経結合形成に重要な分子の発現低下が認められた。また生後60日齢においてタンパク合成に関与する分子群の発現が上昇、オートファジーシグナリング経路に含まれる分子群の発現変動が顕著であることを見出した。生後60-180日齢で興奮性シナプスのマーカー遺伝子の発現量が上昇しており、この病態モデルでシナプス数が異常に増加していることが推定された。代謝型グルタミン酸受容体関連分子の発現変化も観察され、シナプス特性に異常が生じている可能性がある。また生後90-180日齢で補体分子や免疫関連分子の発現量が顕著に増加していることがわかった。

自閉症患者では頭周囲長が増加し、灰白質組織が厚くなっていることが報告されている。これは自閉症患者のシナプス刈り込み不全を反映しているものと考えられる。VPA 群では、生後180日齢・成体で顕著な脳重量の増加が認められた。生後60, 90, 180日齢のVPA 個体と非暴露個体の大脳の固定組織から前額断切片を作製し、組織学的特徴の検討を行った。切片面積はVPA 個体で増加しており、脳が大きくなっていることがわかった。また生後90日齢、180日齢個体の灰白質組織が厚くなっており、本モデル動物の脳形態の特徴は自閉症患者の特徴と類似していることが明らかになりつつある。前頭前皮質のニューロンの細胞体の大きさは変化がなく、密度は減少していた。灰白質組織の体積の過半をニューロン突起(樹状突起・軸索)が占めていることと本研究のマイクロアレイ解析の結果から、本モデル動物では樹状突起スパイン、軸索が増加していることが示唆された。

VPA マーマセットの前頭前皮質(12野)と一次視覚野(V1)の第3層錐体細胞に蛍光色素ルシファーイエローを注入して基底樹状突起全体を可視化し、スパインの密度・総数が実際に増加しているのか調査を行った。VPA マーマセットは、定型発達個体と比較して生後2か月齢以降大きな樹状突起展開面積を持ち、どの発達段階においても長い樹状突起をもっていることがわかった。また、定型発達個体と比較して、VPA マーマセットのスパイン密度は生後2ヶ月齢以降上昇していることが

観察された。定型発達個体では、生後 90 日齢から 180 日齢にかけて約 30%スパイン密度が低下する「刈り込み」が起こるのに対して、VPA マーモセットでは統計的に有意な変化は観察されず、この霊長類モデル動物で ASD 患者のシナプス刈り込み不全を再現できていることが分かった。

胎生期バルプロ酸曝露マーモセットは自閉症脳の解剖学的特徴を反映すること、これを形成する遺伝子発現に変化が起きていることが示されつつあり、今後新たな自閉症病態モデル動物として治療法の開発に貢献することが期待される。

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 3 件)

1. Osamu Sadakane, Akiya Watakabe, Masanari Ohtsuka, Masafumi Takaji, Tetsuya Sasaki, Masatoshi Kasai, Tadashi Isa, Go Kato, Junichi Nabekura, Hiroaki Mizukami, Keiya Ozawa, Hiroshi Kawasaki, and Tetsuo Yamamori. *in vivo* two-photon imaging of dendritic spines in marmoset neocortex. *eNeuro*. 2015 Sep 17; 2(4):1-10.

2. Tetsuya Sasaki, Hirosato Aoi, Tomofumi Oga, Ichiro Fujita, and Noritaka Ichinohe. Postnatal development of dendritic structure of layer III pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex of marmoset. *Brain Struct and Func*. 2015. Nov 220(6):3245-3258.

3. Tetsuya Sasaki, Tomomi Sanagi, Tomoko Manabe, Keiko Nakagaki, Shinichi Kohsaka, and Noritaka Ichinohe. Verification of abnormality of postnatal synapse formation/pruning in a primate model of ASD. *Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry*. 2016. Sep 55(2):147-147.

[学会発表](計 13 件)

1. 佐々木哲也、一戸紀孝、山森哲雄 マーモセット大脳新皮質領野の錐体細胞樹状突起スパイン形態の多様性。第 38 回 日本神経科学大会 2015 年 7 月 神戸

2. 佐柳友規、佐々木哲也、境和久、高坂新一、一戸紀孝。マーモセット脳発達過程におけるシナプス形成へのミクログリアの関与。第 38 回 日本神経科学大会 2015 年 7 月 神戸

3. Tetsuya Sasaki, Tomofumi Oga, Hirosato Aoi, Ichiro Fujita, and Noritaka Ichinohe. Postnatal development of dendritic structure of layer III pyramidal neurons in cerebral cortex of marmoset. Society for Neuroscience Neuroscience 2015 October 2015 Chicago (国際学会)

4. 佐々木哲也、山森哲雄、一戸紀孝。Morphological Speciality of Dendritic Spines of Pyramidal Cells in the Primate Prefrontal Cortex.

日本解剖学会総会・全国学術集会 第 121 回大会 2016 年 3 月 郡山

5. 佐々木哲也、中垣慶子、真鍋朋子、一戸紀孝。自閉症モデル霊長類の発達期大脳皮質シナプス再編成異常の検証。第 39 回 日本神経科学大会 2016 年 7 月 横浜

6. 佐柳友規、佐々木哲也、真鍋朋子、高坂新一、一戸紀孝。自閉症モデル霊長類の大脳皮質におけるミクログリアの形態異常。第 39 回 日本神経科学大会 2016 年 7 月 横浜

7. 佐々木哲也、佐柳友規、真鍋朋子、中垣慶子、高坂新一、一戸紀孝。自閉症モデル霊長類の発達期大脳皮質シナプス再編成異常の検証。第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会 合同年会 2016 年 9 月 福岡

8. 佐柳友規、佐々木哲也、真鍋朋子、高坂新一、一戸紀孝。Microglial abnormality in the cerebral cortex of a primate model of autism spectrum disorders. 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会 合同年会 2016 年 9 月 福岡

9. 佐柳友規、佐々木哲也、一戸紀孝、高坂新一。脳内ミクログリアの機能。第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会 合同年会 2016 年 9 月 福岡 (招待講演)

10. Tetsuya Sasaki, Tomomi Sanagi, Keiko Nakagaki, Tomoko Manabe, and Noritaka Ichinohe. Verification of abnormality of postnatal synapse formation/pruning in a primate model of ASD. The Society for Neuroscience, Annual Meeting 2016 November 2016 San Diego (国際学会)

11. 佐々木哲也、真鍋朋子、中垣慶子、一戸紀孝。自閉症モデル霊長類の発達期大脳皮質シナプス形成・刈り込みの異常。日本解剖学会 関東支部 第 104 回学術集会 2016 年 11 月 横浜

12. 佐々木哲也、真鍋朋子、中垣慶子、一戸紀孝。自閉症モデル霊長類の発達期大脳皮質シナプス形成・刈り込みの異常。第 10 回神経発生討論会 2017 年 3 月 10 日 秋保

13. 佐々木哲也、中垣慶子、真鍋朋子、佐柳友規、高坂新一、一戸紀孝。自閉症モデル霊長類の大脳皮質シナプス形成・刈り込みの異常。日本解剖学会総会・全国学術集会 第 122 回大会 2017 年 3 月 29 日 長崎

[その他]

1. 第 39 回日本神経科学大会プレスリリース 佐々木哲也「自閉症モデル霊長類の発達期大脳皮質シナプス再編成異常の検証-自閉症モデルサルの大脳皮質シナプスの刈り込みの異常を確認-」2016.7.20

2. マイナビニュース 空腹時のほうが効率的に学習できる? 「第 39 回日本神経科学大会開幕」佐々木哲也「自閉症モデルサルの大脳皮質シナプス「刈り込み」の異常を観察」

2016.7.20

3. excite ニュース 自閉症モデルサル
の脳でシナプス「刈り込み」の異常を
観察.

2016.7.20

4. 科学新聞 1 面 自閉症スペクトラム障
害のシナプス刈り込み異常再現
2016.7.29

しんぶん赤旗 自閉症の症状示すサル-ヒト
と同じ脳の異常-2016.8.20

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 哲也 (Tetsuya Sasaki)

国立精神・神経医療研究センター 神経研
究所 微細構造研究部 研究員

研究者番号：10634066

(4) 研究協力者

中垣 慶子 (Keiko Nakagaki)

佐柳 友規 (Tomomi Sanagi)

真鍋 朋子 (Tomoko Manabe)