

機関番号：24601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ~ 2010

課題番号：19591350

研究課題名 (和文) モデル動物を用いた自閉症治療法についての検討

研究課題名 (英文) Investigation about the treatment of autism spectrum disorder using Animal model for autism.

研究代表者 定松美幸 (Sadamatsu Miyuki)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90252387

研究成果の概要 (和文) : 中枢神経系の発達に重要な役割を果たす甲状腺ホルモンを操作し、発達障害モデル動物としての可能性を検討した。甲状腺ホルモンノックアウトマウスについて行動解析を行ったところ、甲状腺ホルモンβ受容体ノックアウトマウスは著しい多動を示し、不安閾値が高いことが明らかになった。小脳顆粒細胞の migration 異常と側座核、線条体でドーパミン濃度の上昇を認めたことから、甲状腺ホルモンβ受容体ノックアウトマウスは、ヒト注意多動欠陥性障害のモデルとしての可能性があることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : I investigated about the possibility as the potential animal model for autism with operating thyroid hormone which plays an important role in the development of central nervous system. In the open-field tests, thyroid hormone β receptor knockout (TRβ (-/-)) mice exhibited a significant increase in locomotor activation. HPLC analysis revealed that TRβ (-/-) mice displayed a significant increase of dopamine concentrations in the striatum as well as in the nucleus accumbens. It was suggested that TRβ (-/-) mice might be as a potential animal model for attention-deficit hyperactivity disorder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：自閉症、甲状腺ホルモン、セロトニン、小脳

1. 研究開始当初の背景

最近、自閉症をはじめとする広汎性発達障害 (PDD) の有病率が先進国を中心として増加しているといわれる。PDD の病因はいまだ不明であるが、サリドマイド児や結節性硬化症 (TS) では PDD 罹患率が有意に高いということから、遺伝

子異常や中枢神経系における早期の発達異常が関与しているとされる。申請者らは、これまで PDD の発症と甲状腺ホルモンとの関連を研究してきた。出生時から3週間後までの一定期間 (ヒトでは胎生後期にあたる) 抗甲状腺剤 (プロピオチオウラシル; PTU) により、軽度の

低甲状腺ホルモン状態においた仔ラット（以下、PTU ラットと呼ぶ）では、成長後の多動、学習障害や聴原性てんかんといった永続的異常を示すことから、これをヒト自閉症のモデルとして検討を進めている。甲状腺ホルモンはヒトでは胎生後期中枢神経系の発達に関与するため、甲状腺ホルモンレセプターの機能異常や低甲状腺ホルモン下での転写因子の発現変化は、発達段階のプログラムを乱すことにより永続的な神経系の機能異常を残すのではないかと考える。甲状腺ホルモン受容体(TR)は、胎生期では Unliganded TR として遺伝子発現を抑制するが、その後に甲状腺ホルモン上昇に対応して Liganded TR として働いて必要な遺伝子発現を誘導する。この発生プログラムには転写因子が介在することや、TR α と TR β ではその役割が異なることが知られる。

2. 研究の目的 本研究では、PTU ラットでは海馬に異常を来たすが、その神経細胞障害は微細であり、電子顕微鏡下で調べる必要がある。また、TR α 、 β の遺伝子改変マウスにおいても、CA1 は長期増強 (LTP) の異常や微細な形態的異常が報告されており、mitochondria の形態的異常がすでに報告されている他、preliminary ではあるが TR α ノックアウトマウスでは錐体細胞の軸索変性が認められた。

最近、PDD では小脳（虫部）にも形成異常が生じていることが指摘されている。しかし、小脳の形成異常と高次脳機能の異常の関連、また小脳形成の異常をもたらすメカニズムは未だに不明である。これらの動物モデルにおいて、海馬および小脳のどのような細胞群に異常が発現するか調べていく。

予備的には PTU ラットにおいて小脳に分布するセロトニンニューロンの発達に異常があることを確認している。この所見から、PTU ラットにおいて出生後のセロトニン神経系の働きを操作することにより、行動異常が変化するかどうか、治療的戦略の観点から検討していく。

3. 研究の方法 PTU ラット (N=50)、TR α 、 β の遺伝子改変マウスの Homo、Hetero、Wild について、多動を赤外線行動モニター、オープンフィールドテストで、放射状迷路、モリス水迷路テスト、受動ストレス回避テストにて記憶障害の解析を行う。脳内セロトニン濃度を操作したラットについても同様の行動実験を行う。成長期の神経発達に関わる物質について甲状腺ホルモン受容体が影響を及ぼす蛋白発現や生理的成長段階で起こるアポトーシス (TUNEL 法) と細胞新生に関連する蛋白動態を観察する。

PTU ラット、TR α 、 β の遺伝子改変マウスを用いて、胎生後期・新生児期脳を固定して TR と関連すると思われるシナプス関連蛋白、細胞構造蛋白について免疫組織化学的に調べる。

とくに、脳幹カテコールアミン神経系(セロトニン、ノルアドレナリン)の構築障害 (Migration の阻害) について、セロトニン、ノルアドレナリン、代謝酵素 (Monoamine oxidase typ A,B、DBH)、セロトニン、ノルアドレナリン受容体、セロトニンと関連する成長因子 FGF8 や細胞構築に重要な役割を持つ蛋白について、免疫染色とウエスタンブロット法により動態解析を行う。

4. 研究成果 甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウス (TRKO) の基本的な行動解析、組織学的検討を試みた。TRKO α 、 β ともに homozygotes, heterozygotes マウスの安定した作成が可能になり、十分な個体数がそろったため、雌雄でコントロールと3群の比較が可能になった。

結果、他施設の報告では、TRKO α は行動異常が認められないという報告があったが、われわれの TRKO α はオープンフィールドテストの行動で多動と不安閾値が高いことが示された。Homozygotes にその傾向は強く、heterozygotes はコントロールと homozygotes の中間の傾向を示したことから、受容体の有無が影響していることが示唆された。雌雄の差は有意ではなかった。多動傾向は TRKO β でより顕著で、 α と同様に不安閾値の高さが明らかになった。homozygotes が最も多動で、heterozygotes はコントロールと中間を示す所見も同様であった。外見からは TRKO α 、 β ともに、コントロール群との差は認められなかったが、小脳の組織学的検討では、小脳外顆粒細胞層の migration の遅れを認めた。プルキンエ細胞の形成、数に有意な差は認められなかった。

今回の行動解析で、特に TRKO β については、今後 AD/HD のモデル動物としての可能性が示唆された。液体クロマトグラフィーによる脳内各部位におけるカテコールアミン濃度を検討したところ、TRKO β では線条体と側坐核でドーパミン濃度が上昇しており、対照的にダブルノックアウトでは側坐核におけるドーパミン濃度の低下を認め、TRKO すべてについて、セロトニン濃度が対照群より低下していることが明らかになった。ノックアウトマウスの行動異常について、ドーパミンとセロトニン双方が影響を与えていることが示唆された。

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)

定松美幸 発達障害 精神科 13 62-65
2008

[学会発表] (計1件)

定松美幸、金井裕彦、岸本年史、加藤進昌 甲状腺ホルモン受容体のノックアウトマウスにおける行動学的、形態学的異常の検討 第30回日本神経科学大会 2007/9/12

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

定松美幸 (Sadamatsu Miyuki)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90252387

(2) 研究分担者

金井裕彦 (Kanai Hirohiko)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：30293830

(3) 連携研究者

牧之段学 (Makinodan Manabu)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00510182