

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860128

研究課題名(和文) 自閉症スペクトラム障害の原因解明と治療法に関する研究

研究課題名(英文) The role of synaptic vesicle protein 2A (SV2A) in the pathophysiology and treatment of Autism spectrum disorders

研究代表者

守屋 友加 (MORIYA, Yuka)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：00512295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害(ASD)では興奮性と抑制性のバランスが崩れ、通常感覚入力でも情報伝達異常が誘発されていると考えられる。本研究では、興奮-抑制バランスに關与するSynaptic Vesicle Protein 2A(SV2A)遺伝子上の変異が気質・性格に影響を与えること、およびSV2Aに作用するレベチラセタムが気質・性格に与える影響を与えることから、SV2Aが精神機能に寄与することを明らかにした。さらに、レベチラセタムをASDモデル動物に投与すると行動障害およびグルタミン酸神経伝達に關わるシグナル伝達の亢進は改善されることから、ASD治療へのレベチラセタムの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorders (ASDs) might reflect an increase in the ratio between excitation and inhibition leading to hyper-excitability of neuronal circuits. Synaptic Vesicle Protein 2A (SV2A) is involved in presynaptic neurotransmitter release. In this project, we clarified that 1) single nucleotide polymorphism of SV2A was associated with low harm avoidance and high novelty seeking in the Temperament and Character Inventory test, 2) Inhibition of SV2A by high dose of levetiracetam induced anxiety in mice. Thus, SV2A might contribute to the psychological function. Furthermore, low dose of levetiracetam attenuated impairments of sociality and object recognition memory in the animal model of ASDs. These findings suggest that levetiracetam might improve behavioral disturbances of ASDs.

研究分野：医療薬学

キーワード：自閉症スペクトラム障害 レベチラセタム SV2A

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorders: ASD) は、小児の代表的精神行動異常を示す疾患であるが、その症状は生涯にわたる事が多く、1) 社会的相互作用の障害、2) 社会的コミュニケーションの障害、3) 限定的、反復的、常道的な行動、興味、活動に代表される広汎性発達障害、を示す。自閉症患者のうち約 30% がてんかん発作を有し、50% 以上に睡眠中にてんかん性脳波所見がみられることから、自閉症患者の大脳皮質では、神経回路内の興奮性と抑制性のバランスが崩れ、興奮性優位な状態になり、通常感覚入力でも神経系の情報伝達異常が誘発されていると考えられる。脳内における神経細胞の種類や分布は遺伝的に精密にコントロールされているが、それだけではなく、このような興奮-抑制のバランスによって調節を受けて最終的な回路構築が完成すると考えられており、興奮-抑制バランス異常が正常な神経回路発達を妨ぐことが、その結果として自閉症になると想定できる。

### 2. 研究の目的

ASD は小児の代表的精神行動異常を示す疾患であるが、その原因については不明な点が多い。現時点において、そのメカニズムは、てんかんに似た症状を示す事が多く、中枢における興奮-抑制バランス異常によって引き起こされる事が考えられている。本研究では、興奮-抑制バランスに関与する Synaptic Vesicle Protein 2A (SV2A) 遺伝子上の変異と気質・性格との関連、および SV2A に作用するレベチラセタムが気質・性格に与える影響について検討を行うことで、SV2A が精神機能に寄与しているか明らかにする。さらに、レベチラセタムの ASD への効果について、ASD 動物モデルを用いて検討を行うことで、自閉症診断・治療のための新たな知見を得る事を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

ICR 系マウスを使用した。なお、本研究は、本研究室における動物実験は、藤田保健衛生大学動物実験委員会より実験計画が承認され、本研究は研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針、動物実験に関する日本薬理学会指針、Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23 1985) および藤田保健衛生大学動物実験規定に則って倫理的に行った。

#### (2) 薬物投与

ASD 動物モデルの作製のため、妊娠 10 日目の ICR 系マウスにバルプロ酸を投与した。また、レベチラセタムは各試験 30 分前に投与した。

#### (3) 行動薬理学的解析

#### オープンフィールド試験

正方形フィールド (50cm x 50cm) に四方に高さ 50cm の壁を配したものを装置とした。フィールドは 4 x 4 のマス目に区画し、その区画から center zone を設定した。装置の底面中心上 100 cm の高さに 100W の白色光を設置し、装置内は常に一定の明るさが保たれるようにした。マウスを装置片隅に入れ、その後から 5 分間、動き始めるまでの時間 (starting latency)、毛繕い回数 (No. of grooming)、立ち上がり回数 (No. of rearing)、排尿回数 (No. of urination) 及び脱糞回数 (No. of defecation) を測定した。また、Center zone における滞在時間、総移動距離 (Ambulation) についてはビデオトラッキング装置を用いて映像解析により求めた。

#### 高架式十字迷路試験

実験装置・手順：壁の高さが 20cm、長さ 25 cm、幅 8 cm のアーム (closed arm) と同様の長さを持つ、壁のないアーム (open arm) を十字に組み合わせ、高さ 50 cm の位置に設置した装置を用いた。マウスをアームの交差する位置に置き、その後 5 分間隔で 10 分間にわたって装置内を自由に散策させ、open arm に入った回数および留まっていた時間の割合を測定した。

#### 社会性行動試験

異なるケージで飼育していた被験マウスと同系統のマウスを同時に装置 (25 cm の高さ、25x30 cm のフィールド) の中央に置き、その後から 5 分間隔で 10 分間、社会性行動として、お互いに嗅ぎ合う行動、相手の動物を追いかける行動、相手の動物の上に乗りがかる行動、相手の動物の下に潜ろうとする行動、立ち上がり、相手の動物と接触する行動のいずれかを示している時間を測定した。

#### 強制水泳試験

水槽 (直径 15cm、高さ 20cm) に水 (水温約 22 度、深さ 13cm) を入れたものを装置とした。そこにマウスを入れ、その後から 1 分間隔で 10 分間、無動時間を赤外線センサによって測定した。

#### 新奇物体認知試験

マウスを 2 種類の異なった物体を離して設置した壁の高さ 29 cm の 40x40 cm 四方のフィールドに入れ、各物体に対する探索嗜好行動を 10 分間測定した (訓練試行)。訓練試行 24 時間後に、2 種類の物体のうち片方の物体を全く異なった新奇物体と置換し、各物体に対する探索嗜好行動を 10 分間測定した (テスト試行)。それぞれの物体に対する探索嗜好行動の割合を、物体へのアプローチ時間より算出した。

#### 自発運動量測定

透明なアクリル製のケース (45 x 26 x 40 cm)

と黒色のつや消しプラスチック製の床からなる装置を用いた。赤外線センサにより測定した。マウスを装置に入れ、2時間の自発運動量を測定した。

#### (4) 生化学的解析

##### ウエスタンブロッティング

マウスを断頭し、氷冷下で全脳を摘出した後、直ちに凍結させた。その後、粗蛋白量をタンパク定量し、サンプルバッファーを加え調製した。電気泳動は10%ポリアクリルアミドゲルで行い、PVDF膜へ蛋白を転写した後、膜を5%スキムミルクを用いてブロッキングし、一次抗体と反応させた。二次抗体と反応させた後、PVDF膜と化学発光液に反応させ、高感度冷却 CCD カメラを用いて検出した。

#### (5) 臨床研究

同意を得た健常な日本人77名より、全血を採取し、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いてDNAを精製した。遺伝子型の判定は、Mattheisenらの報告に基づき、Reference SNP ID number rs15931、rs626785、rs4926386、rs11205277のSV2A遺伝子に関する遺伝子型についてDirect SequencingおよびリアルタイムPCR法を用いて行った。本研究は名城大学薬学部の倫理委員会の承認を得ている。

#### (6) 統計学的解析

得られた結果は、全て平均値±標準誤差として示した。統計学的解析には、一元あるいは二元配置分散分析を用い、各群間の比較にはBonferroniの多重比較検定を行った。2群間の比較の場合には、Studentのt検定を用いた。全ての統計解析において、危険率5%未満の場合を有意差ありと判定した。

### 4. 研究成果

#### (1) SV2A 遺伝子多型のアレル頻度と気質・正確との関連

日本人77名より、SV2A遺伝子の各アレル頻度について検討を行った。rs15931およびrs626785については、17名を対象に、rs4926386およびrs11205277については77名を対象とした。rs15931の遺伝子変異は、17名全員がC-アレルを有していた。rs626785では、マイナーアレル(G-アレル)頻度は、0.045であり、A/Aが16名、A/Gが1名であった。rs4926386では、マイナーアレル(A-アレル)頻度が、0.338であり、C/Cが35名、A/Cが32名、A/Aが10名であった。rs11205277では、マイナーアレル(G-アレル)頻度が、0.253であり、A/Aが43名、A/Gが29名、G/Gが5名であった。そこで、ある程度アレル頻度の高いrs4926386およびrs11205277に注目し、被験者60名(男性30名、女性30名)を対象にTemperament and Character Inventory (TCI: 気質性格検査)およびBeck Depression

Inventory (BDI: ベック抑うつ評価尺度)により被験者のパーソナリティとSV2A遺伝子多型との関連について検討を行った。rs4926386のマイナーアレルを有する被験者は、メジャーアレルの被験者と比較して、損害回避が有意に低く、自己指向性が有意に高かった(Fig. 1)。また、rs4926386のマイナーアレルを有する被験者は、BDIが有意に低かった。一方、新奇性追求、報酬依存、接続、協調性、自己超越性に関しては差が認められなかった。rs11205277についてはTCIおよびBDIにおける気質・性格に関するいずれの項目においても有意な変化は認められなかった(Fig. 2)。rs4926386のマイナーアレルがSV2Aの発現や活性に与える影響について、今後検討する必要があるが、そのマイナーアレルを有すると目的志向(自己志向性の高値)や楽観性(損害回避およびBDIの低値)が認められることが示唆された。

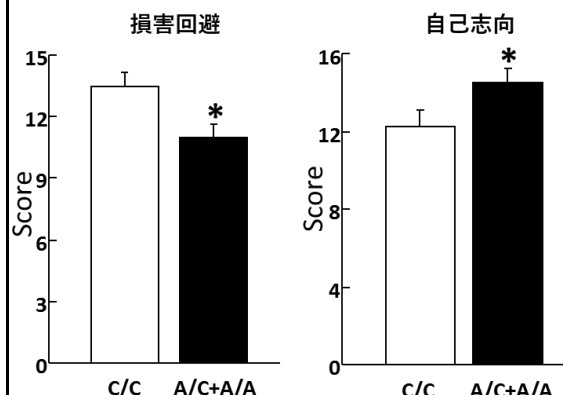


Fig.1 SV2A 遺伝子多型(rs4926386)のアレル頻度と気質・正確との関連 採血時に被験者60名(男性30名、女性30名)を対象にTemperament and Character Inventory (TCI: 気質性格検査)を行い、rs4926386のマイナーアレル(A-アレル)を有するから2群に分け、比較を行った。p<0.05 vs メジャーアレル(C/C)。

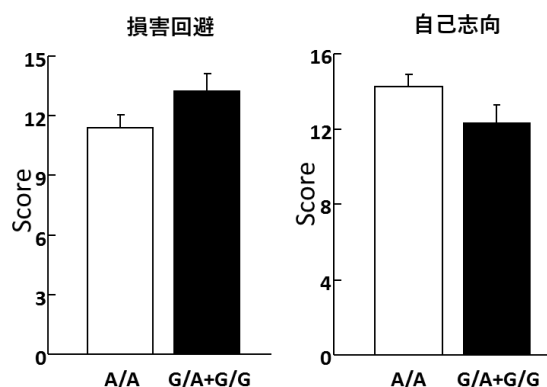


Fig.2 SV2A 遺伝子多型(rs11205277)のアレル頻度と気質・正確との関連 採血時に被験者60名(男性30名、女性30名)を対象にTCI(気質性格検査)を行い、rs11205277のマイナーアレル(G-アレル)を有するから2群に分け、比較を行った。

#### (2) レベチラセタムが情動機能に与える影響

SV2Aの遺伝子多型と情動機能に関連が認められたため、次にSV2Aの阻害作用を有するレベチラセタムが情動機能に与える影響

について検討を行った。オープンフィールド試験において、高用量のレベチラセタムはオープンフィールドの中央に滞在する時間を有意に短縮させ、立ち上がり行動を減少させた。さらに、高架式十字迷路において、高用量のレベチラセタムは open arm における滞在時間を有意に短縮させた (Fig. 3)。これらの行動試験から高用量のレベチラセタムは不安を惹起することが示唆された。次に、強制水泳試験および新奇環境摂餌行動抑制試験において、いずれの用量のレベチラセタムも行動指標に影響を与えなかった。すなわち、レベチラセタムは抑うつに関連した行動指標には影響を与えないことが示唆された。

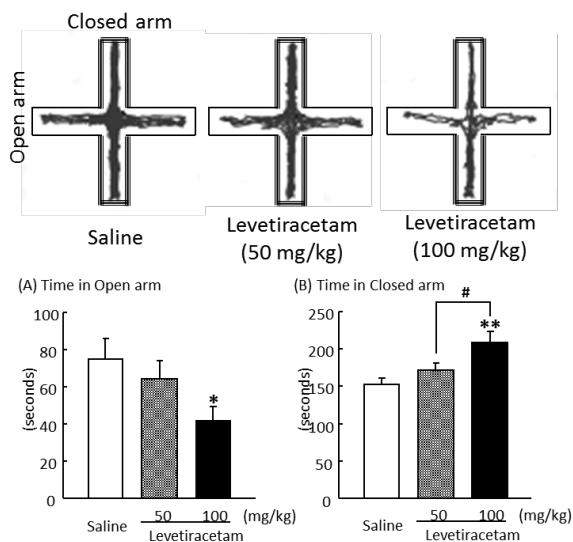


Fig.3 レベチラセタムが情動機能に与える影響 雄性 ICR 系マウスにレベチラセタムを投与し、投与 30 分後に高架式十字迷路試験を行った。\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs 生理食塩水投与群、# $p < 0.05$  低用量レベチラセタム (50mg/kg) 投与群。

### (3) レベチラセタムが ASD 動物モデルの行動異常に与える影響

高用量のレベチラセタムが不安に関連した情動機能に影響を与えることが示唆されたため、そのような影響が認められない低用量のレベチラセタムの投与が ASD 動物モデルである胎生期バルプロ酸投与マウスの行動異常に与える影響について検討を行った。胎生期バルプロ酸投与マウスにおいて、成体期において社会性行動試験における社会性行動の低下、新奇物体認知試験における認知機能の障害が認められた (Fig. 4)。これら行動障害に対して、低用量のレベチラセタムは有意な改善効果を示した。一方、胎生期 PBS 投与マウスに低用量のレベチラセタムを投与しても、社会性行動試験及び新奇物体認知試験の行動指標に有意な影響を与えなかった。また、レベチラセタムは新奇環境下での行動量に影響を与えなかった。すなわち、レベチラセタムは ASD 動物モデルに認められる行動異常を改善することが示唆された。

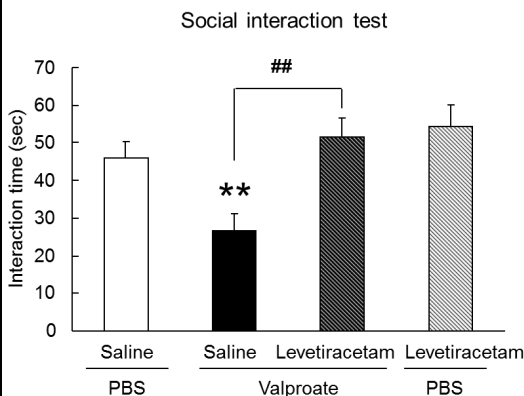


Fig.4 レベチラセタムが ASD 動物モデルの行動異常に与える影響に与える影響 妊娠 10 日目の ICR 系マウスにバルプロ酸を投与し、その出生仔を ASD 動物モデルとした。ASD 動物モデルにレベチラセタムを投与し、投与 30 分後に社会性行動試験を行った。\*\* $p < 0.01$  vs PBS/生理食塩水投与群、## $p < 0.01$  バルプロ酸/生理食塩水投与群。

### (4) レベチラセタムが ASD 動物モデルのグルタミン酸シグナル亢進に与える影響

低用量のレベチラセタムが ASD 動物モデルに認められる行動異常を改善することが示唆されたため、低用量のレベチラセタムの投与が胎生期バルプロ酸投与マウスの前頭皮質における細胞内シグナル与える影響を検討した。胎生期バルプロ酸投与マウスの前頭皮質において、レベチラセタムの標的タンパク質である SV2A の発現に変化は認められなかったが、NMDA 受容体サブユニットである NR2B の発現増加とともに、その下流シグナルである ERK のリン酸化の亢進が認められた。レベチラセタムの投与により、ERK のリン酸化の亢進は有意に抑制された (Fig. 5)。すなわち、レベチラセタムは胎生期バルプロ酸投与マウスの前頭皮質に認められるグルタミン酸シグナルの亢進を抑制することにより、行動異常を改善することが示唆された。

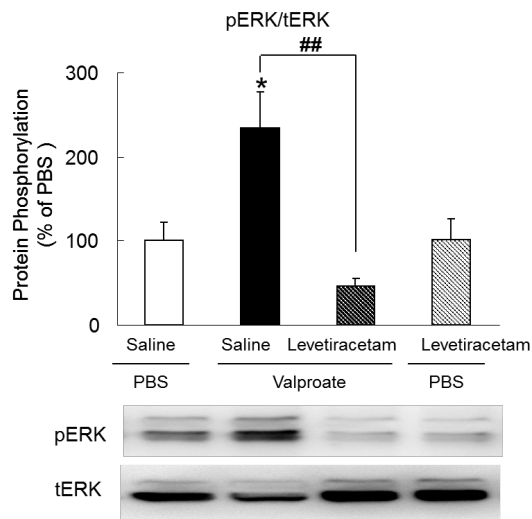


Fig.5 レベチラセタムが ASD 動物モデルのグルタミン酸シグナル亢進に与える影響 ASD 動物モデルにレベチラセタムを投与し、投与 30 分後に前頭皮質を採取した。\* $p < 0.05$  vs PBS/生理食塩水投与群、## $p < 0.01$  バルプロ酸/生理食塩水投与群。

本研究において、SV2A の遺伝子変異は健常者の気質・生活に影響を与えること、その阻害剤であるレベチラセタムは高用量により不安を惹起させるが、低用量では ASD モデルの行動障害とグルタミン酸シグナルの亢進を改善することが示唆された。本研究で得られた結果が、自閉症に対する病態解明ならびにレベチラセタムをはじめとする治療法の開発の確立につながることを期待したい。

#### 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)

守屋友加、自閉症スペクトラム障害に対する Synaptic Vesicle Protein 2A の影響に関する基礎的研究；名城大学総合研究所 紀要第 21 号,205-208,2016. 査読無

黒野俊介、伊東亜紀雄、守屋友加、早川伸樹、脇田康志、永松正、長谷川洋一、薬学生と薬剤師の実践力訓練のための患者シミュレータ活用の有用性；日本シミュレーション医療教育学会雑誌 2: 7-13, 2014. 査読有

守屋友加、後藤伸之、リキスミア皮下注 300mg；調剤と情報、97 - 104、2014. 査読無

##### [学会発表](計 10 件)

福井愛子、半谷眞七子、吉見陽、守屋友加、伊東亜紀雄、黒野俊介、山田重行、齋藤寛子、脇田康志、早川伸樹、長谷川洋一、野田幸裕、亀井浩行、学部 4 年生の 6 年生アドバンスト臨床実習生による症例検討会への参加により培われる臨床能力について；第 26 回日本医療薬学会年会(京都) 2016 年 9 月 18 日.

伊東亜紀雄、黒野俊介、守屋友加、山田重行、長谷川洋一、実務実習中に学生が感じた大学での授業内容と現場との乖離；第 1 回薬学教育学会(京都) 2016 年 8 月 28 日.

福井愛子、半谷眞七子、毛利彰宏、守屋友加、伊東亜紀雄、黒野俊介、山田重行、齋藤寛子、脇田康志、早川伸樹、長谷川洋一、野田幸裕、亀井浩行、遠隔教育システムを活用したアドバンスト臨床研修中の薬学生による症例検討の有用性；日本薬学会 136 年会(横浜) 2016 年 3 月 28 日.

明石威徳、守屋友加、黒野俊介、伊東亜紀雄、山田重行、長谷川洋一、抗アレルギー薬の眠気に関する使用上の注意の情

報提供に関する考察；第 25 回日本医療薬学会年会(横浜) 2015 年 11 月 23 日.

渡邊真実、守屋友加、伊東亜紀雄、黒野俊介、山田重行、澤田和久、石上仁美、三浦崇則、勝見章男、長谷川洋一、虚血性心疾患に対する抗血小板療法と 2 次予防への薬学的支援；医療薬学フォーラム 2015(名古屋) 2015 年 7 月 4 日.

木村江里、黒野俊介、守屋友加、伊東亜紀雄、山田重行、大野 愛、石上仁美、三浦崇則、勝見章男、長谷川洋一、医療スタッフへの医薬品の安全性情報の提供に関する考察；第 25 回日本医療薬学会年会(名古屋) 2015 年 7 月 4 日.

後藤昌也、伊東亜紀雄、守屋友加、黒野俊介、山田重行、石上仁美、三浦崇則、勝見章男、長谷川洋一、院内製剤「ゲンテラ軟膏」の配合性に関する薬学的考察；第 25 回日本医療薬学会年会(名古屋) 2015 年 7 月 4 日.

伊東亜紀雄、黒野俊介、齋藤寛子、野田幸裕、長谷川洋一、福井愛子、山田重行、毛利彰宏、守屋友加、実務実習事前学習における医療安全教育としての自主的過誤報告の取り組み - 医療安全に対する意識付け - ;日本薬学会第 134 年会(熊本) 2014 年 3 月 30 日.

三ツ井政伸、濱石華乃子、石上仁美、守屋友加、黒野俊介、伊東亜紀雄、山田重行、三浦崇則、勝見章男、長谷川洋一、薬物療法を拒否した患者に対する医療面接を経験して；日本薬学会第 134 年会(熊本) 2014 年 3 月 30 日.

杉田由紀、澤田和久、石上仁美、守屋友加、伊東亜紀雄、黒野俊介、山田重行、三浦崇則、勝見章男、長谷川洋一、うっ血性心不全患者に対し薬学的介入を行った 1 症例；日本薬学会第 134 年会(熊本) 2014 年 3 月 30 日.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

守屋 友加 (MORIYA, Yuka)  
名城大学・薬学部・助教  
研究者番号：00512295

##### (2) 研究協力者

長谷川 洋一 (HASEGAWA, Yoichi)  
名城大学・薬学部・教授  
研究者番号：90535098  
鍋島 俊隆 (NABESHIMA, Toshitaka)

藤田保健衛生大学・大学院保健学研究  
科・客員教授  
研究者番号：70076751

毛利 彰宏 (MOURI, Akihiro)  
藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授  
研究者番号：20597851

齋藤 邦明 (SAITO, Kuniaki)  
藤田保健衛生大学・医療科学部・教授  
研究者番号：80262765