

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06497

研究課題名(和文) 自閉症モデル動物を用いたシナプス機能の修復の研究

研究課題名(英文) Alterations in synaptic stability and trials of their adjustment in autism model marmosets

研究代表者

野口 潤 (NOGUCHI, Jun)

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・室長

研究者番号：40421367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自閉スペクトラム症(自閉症)は、神経細胞のシナプス機能の変異によってその病態がもたらされると考えられる。脳の構造や遺伝子発現がヒトに類似している霊長類であるマーモセットを用いて、大脳皮質シナプスの安定性(シナプスの新規生成と既存シナプスの消去)の解析を行った。他個体の意図を推定する機能(心の理論)に関係する背内側前頭前皮質(8野)において、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて2/3層錐体細胞内に蛍光タンパク質を発現し、3日ごとの2光子顕微鏡観察を実施した。その結果、自閉症モデル動物ではシナプスを構成する樹状突起スパインや軸索ブトンの安定性が低下していることを支持する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプスの維持や不要シナプスの除去は、他者との相互作用に必要な脳機能の実行に必須と思われる。これはシナプスの多くの分子シグナルを統合して実行されることが明らかになりつつある。今回生体マーモセットでシナプス編集の様子が直接観察可能になったことは、その生理的役割と疾患の病態を評価する上で役立つ。また、ヒト自閉症の中核症状に効果を示す治療法を確立するためには、変容するシナプス機能を指標として治療薬候補を選択することが必要である。霊長類であるマーモセットでシナプス安定性の低下を見出したことは、ヒトの治療法開発の第一歩と考えている。今後はシナプス安定性を制御する分子メカニズムの解析を実施する。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorder (ASD) might result from alterations in cortical synaptic functions. We analyzed the stability of cortical synapses (generation of new synapses and elimination of existing synapses) using marmosets, whose brain structure and gene expression is more similar to that of humans than in rodents. We expressed fluorescent proteins in layer 2/3 pyramidal neurons using adeno-associated virus (AAV) vectors, in the dorsomedial prefrontal cortex (dmPFC, Area8), which is involved in the function of estimating the intentions of other individuals. Longitudinal two-photon microscopic observations were conducted every three days and the results support that the stability of dendritic spines and axonal boutons is reduced in the ASD model marmosets.

研究分野：神経生理学

キーワード：樹状突起スパイン 軸索ブトン 自閉スペクトラム症 マーモセット 2光子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

自閉症の中核的な症候に対する治療薬は、現在に至るまで確立されておらず、行動に働きかける療育が行われる。しかしながら、原因となっている遺伝子の発現量を正常発達と同じレベルにすることで、症候の一部を成長後も緩和可能であることが実験動物レベルで示されていた (Sztainberg et al. (2015) Nature. など)。げっ歯類自閉症モデルの薬物治療も複数報告され (Tyzio et al. (2014) Science. など)、また、オキシトシンの投与が実験動物のみならずヒトの自閉症においても一部の症候の緩和に有効であることが報告されており (Yamasue et al. (2018) Mol. Psychiatry.)、ヒト自閉症に対する薬物治療の将来性が示唆されていた。

そこで、遺伝子の発現パターンや解剖学的脳形態が、げっ歯類よりもヒトに近い霊長類であるマーモセットにおいてシナプス形態におけるエンドフェノタイプを見出し、ヒトに対する治療方法の開発のための基盤を整備することを計画した。

## 2. 研究の目的

マーモセットは、霊長類であり、げっ歯類よりヒトに近い遺伝的・代謝的・脳形態的形質を有している、心の理論に関連するミラーニューロンの存在が示されている (Suzuki et al. (2015) Front. Neurosci.)、個体間の関係性 (互惠性) を判定するといった高度な社会的価値判断の能力を有することが示されている (Yasue et al. (2015) Behav. Brain. Res.)、などの特徴がある。社会性が障害されるヒトの自閉症の治療への応用を考えた場合、より高い社会性を有し、遺伝子発現パターンなどがヒトに近いマーモセットでデータを蓄積することで、ヒト自閉症の治療に役立てたいと考えた。そこで、他者の意図を推定する能力 (心の理論) に関連する大脳皮質背内側前頭前野 (dmPFC) 前頭葉8野を対象脳領域として、バルプロ酸投与自閉症モデルマーモセットを用いて自閉症の兆候としての神経生理学的指標を探索した。

本研究代表者らは申請時までに2光子顕微鏡によるイメージング法やin vivoグルタミン酸2光子アンケイジング法をマウスを対象に開発してきた (Noguchi et al. (2012) J. Physiology., Noguchi et al. (2016) Sci. Rep.)。本研究では、霊長類であるマーモセットを用いて神経細胞樹状突起・軸索の継時観察を実施した。具体的には、「自閉症は神経細胞シナプスのダイナミクスの異常が原因である」という仮説に基づき、これまでの研究経験を生かして自閉症関連領域のシナプス安定性を2光子顕微鏡イメージング法で検討することを着想した。さらに、自閉症モデル動物におけるシナプス安定性の異常を定型発達個体に近づけることを指標として、治療薬のスクリーニングを計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) マーモセット自閉症モデルの作出とin vivo大脳皮質樹状突起の2光子顕微鏡観察

抗てんかん薬であるバルプロ酸 (valproic acid; VPA) は妊娠期の母親へ投与することで胎児の自閉症発症率が上昇することがヒトで報告されている。マーモセット母体に妊娠60日から7日間バルプロ酸を経口投与することによって、マーモセット自閉症モデル仔 (VPA個体) を得た。幼若マーモセットでは、親と分離 (isolation) された際、isolation callと呼ばれる鳴き声を発する。研究代表者と同じ所属の坂野・中神らの方法を用いて、通常発達個体 (Unexposed; UE個体) とVPA個体について、生後1週齢から最長20週齢にわたって5分間のisolationによる鳴き声を録音し、鳴き声の種類を分類した。

2光子顕微鏡によるin vivoイメージングの手法は、マウス(Grutzendler et al. (2002) Nature., Trachtenberg et al. (2002) Nature.など多数)で先行して開発され、本研究代表者らも実施してきた(Noguchi et al. (2012) J. Physiology., Nagaoka et al. (2016) Sci. Rep.)。マーモセットで実施するにあたり先行研究(Sadakane et al. (2016) eNeuro.など)を参考にしたが、数週間以上にわたる断続的イメージングを行うことは世界で初めてであったので、治具を特注するなど、そのための方法を整備した。

イメージング期間終了後、パラホルムアルデヒドによる組織固定を行なった死後脳の一部において、形態MRIの取得を理化学研究所との共同研究で行なった。

## (2) マーモセットシナプス安定性の検討

2光子顕微鏡を用いて樹状突起スパイン密度と生成消滅を3日ごとに観察し、シナプス安定性(新規スパインの新生と既存スパインの消去)を検討した。具体的には、背内側前頭前野2/3層錐体細胞に蛍光タンパク質を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを脳実質に接種し、その後観察部位直上の頭蓋骨と硬膜を除去してガラス観察窓を設置した。こうして神経細胞軸索と樹状突起を同じ蛍光タンパク質で可視化した。マーモセットをセボフルランで麻酔し、2光子顕微鏡下にセットした後、同一の神経突起を観察し、2週間以上にわたって繰り返し同一領域の観察を実施した。

## 4. 研究成果

前項に記載した方法を用いてVPA 個体作出後、1-20週齢の幼若個体を用いた検討を行い、幼若VPA 個体が発声するisolation callの種類は、UE 個体と比較して特定の鳴き方(Phee)に偏る傾向が大きいことを確認した。

次に、蛍光タンパク質(GFP, Venus, mCherry等)を発現するAAVを研究分担者の富田・菅野らのグループで作製し、あるいは理化学研究所から供与を受け、マーモセット大脳皮質で発現することを確認した。その後、麻酔下で生体の2光子顕微鏡蛍光イメージングを実施することにより条件検討を行い、断続的に最長3ヶ月以上にわたって同一樹状突起の形態を観察することに成功した。

次に、シナプス後部である樹状突起スパインの経時観察を系統的に進めた。大脳皮質dmPFC(8野)2/3層錐体細胞タフト樹状突起を3日ごとに繰り返し観察して新規スパインの生成と既存のスパインの消去を観察した。その結果、スパインの生成はadult 自閉症モデルマーモセット個体において対照個体より亢進しており、神経回路の安定性が低下していることを支持する結果が得られた。

樹状突起スパインは、その体積とシナプスの伝達効率(シナプス重み)に比例的な関係が報告されているので、体積とシナプス安定性の関係について今回得られたデータで解析を行った。現在までのところ、VPA 個体では、スパイン体積分布がUE 個体と異なる傾向がみられた。

また、樹状突起とともに撮影された軸索の解析を実施し、シナプス前部である軸索ブトンの安定性の評価を同様の手法で行った。その結果、VPA モデルの樹状突起においてスパイン生成・消去が促進されているのと同様に、軸索上のシナプス前部を構成する軸索ブトンも生成・消去が亢進し、シナプス安定性が低下している傾向が観察された。

オキシトシンは自閉症患者の一部の中核症状の緩和に有効であることが報告されている(Yamasue et al. (2018) Mol. Psychiatry.)。治療薬探索のモデルケースとして、オキシトシンがシナプスの安定性に及ぼす影響を調べた。マーモセットの鼻腔からオキシトシンを毎日もしくは

は1日おきに投与し、上記と同様に神経突起の2光子顕微鏡画像を取得したので、解析終了後論文報告する。

マーマセット死後脳の形態 MRI 画像を取得した個体については、スパイン安定性と白質のミエリン化等との関係性についての解析を実施し、論文報告に含める予定である。また、シナプス安定性は、グリア細胞の活性化や、シナプス内部あるいは外部のタンパク質の量や種類、リン酸化などの修飾状態に関連すると想定される。そこで、今後グリア細胞活性化の有無を免疫染色法を用いて検討するほか、大脳皮質をホモジナイズして得られるシナプス由来の小胞であるシナプトソームを用いて mRNA・タンパク質の解析を行い、今後これらの変化を指標として治療薬を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Noguchi J, Nagaoka A, Hayama T, Ucar H, Yagishita S, Takahashi N, Kasai H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Bidirectional in vivo structural dendritic spine plasticity revealed by two-photon glutamate uncaging in the mouse neocortex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 13922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50445-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 野口潤、渡辺恵、三嶋晶、中垣慶子、磯田李紗、境和久、菅野江里子、富田浩史、渡我部昭哉、山森哲雄、水上浩明、一戸紀孝
2. 発表標題 マーモセット自閉症モデル大脳皮質樹状突起スパインのin vivo 2光子顕微鏡観察
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口潤、渡辺恵、三嶋晶、中垣慶子、境和久、菅野江里子、富田浩史、渡我部昭哉、山森哲雄、水上浩明、一戸紀孝
2. 発表標題 Time-lapse in vivo two-photon imaging of cortical dendrites of autism model marmosets.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会（合同開催）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺恵、黒谷亨、小賀智文、中垣慶子、野口潤、一戸紀孝
2. 発表標題 Synaptic structure and function in valproate-induced autism model marmosets during postnatal development.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会（合同開催）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ucar H, Watanabe S, Noguchi J, Yagishita S, Morimoto Y, Takahashi N, Kasai H.
2. 発表標題 Mechanosensing of the enlargement of dendritic spines by presynaptic terminals in rat hippocampus.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Watanabe S, Kurotani T, Oga T, Nakagaki K, Noguchi J, Ichinohe N
2. 発表標題 Abnormalities in synaptic structure and function in valproate-induced autism model marmosets.
3. 学会等名 第96回日本生理学会大会（FAOPS2019合同開催）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小賀智文、黒谷亨、渡辺恵、中垣慶子、野口潤、一戸紀孝
2. 発表標題 自閉症モデルマーモセットにおけるシナプス可塑性異常。
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺恵、黒谷亨、小賀智文、中垣慶子、野口潤、関口正幸、和田圭司、一戸紀孝
2. 発表標題 バルブロ酸誘発性自閉症モデルマーモセットにおける大脳皮質シナプス機能の解析。
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立精神・神経医療研究センター 微細構造研究部 <a href="https://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_mic/index.html">https://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_mic/index.html</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	富田 浩史  (Tomita Hiroshi)  (40302088)	岩手大学・理工学部・教授   (11201)	
研究分担者	菅野 江里子  (Sugano Eriko)  (70375210)	岩手大学・理工学部・准教授   (11201)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	一戸 紀孝  (Ichinohe Noritaka)  (00250598)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・微細構造研究部・部長   (82611)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------