

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07610

研究課題名(和文) ADHDを伴う自閉症の小脳シナプス病態の解明とそれに基づく治療法についての検討

研究課題名(英文) Dysfunction of cerebellar synapses in a mouse model of autism comorbid with ADHD and its application to the development of treatment

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 注意欠如・多動性障害(ADHD)を伴う自閉症スペクトラム障害(ASD)様行動を示すKirrel3欠損マウスの小脳シナプス構造異常、及び小脳から腹側被蓋核を介して投射のある前頭前皮質のドーパミン濃度の異常を見いだした。これらの知見から、Kirrel3欠損マウスはASDの原因として注目されている小脳異常とADHDの原因として知られているドーパミン神経伝達異常を併せ持つASDモデルマウスであることが示唆された。今後、このマウスの小脳を介したドーパミン神経伝達異常の分子病態を解明し、それに基づいたドーパミン制御薬等の探索によりADHDを伴うASD様行動の改善のための新たな治療法の開発をめざす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

注意欠如・多動性障害(ADHD)を伴う自閉症スペクトラム障害(ASD)様行動を示すKirrel3欠損マウス的小脳において、ピンズーシナプスの形成に異常が見られ、ADHD治療薬であるドーパミン系賦活薬の投与によりADHD様行動の増悪が見られたことから、この疾患の新たな病態を見いだした。これらの知見から、ADHDを伴うASDと小脳やドーパミン伝達神経回路との関連性をさらに解明することで、ADHD単独の病態とは異なるこの疾患の治療法の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)： We found that Kirrel3-knockout mice, a model of ASD comorbid with ADHD, exhibited disorganization of cerebellar pinceau synapse. Analysis of monoamine content in the brain of Kirrel3-knockout mice revealed altered dopamine content in the prefrontal cortex, which is connected to the cerebellum via ventral tegmental area. The cerebellum is the most consistent sites of abnormality in ASD. Impaired dopamine neurotransmission is well known to be the pathophysiology of ADHD. Therefore, the Kirrel3-knockout mouse is an ASD comorbid with ADHD model of both pathophysiological features. Further studies are required to elucidate the molecular mechanisms of impaired dopamine neurotransmission based on the cerebellar dysfunction using this model mouse. Based on the underlying molecular mechanisms, we aim to develop the new treatment for ASD comorbid with ADHD, such as the drug to control dopamine neurotransmission.

研究分野：神経発生学、神経組織学、行動生理学

キーワード：自閉症スペクトラム障害 注意欠如・多動性障害 小脳 シナプス接着分子 免疫グロブリンスーパーファミリー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Kirrel3 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属するシナプス接着分子で、研究代表者らはマウスの感覚器官や脳における発現解析を行い、Kirrel3 が嗅上皮、嗅球、副嗅球、海馬や小脳に発現していることを報告してきた (文献①、②)。マウスでは、Kirrel3 が嗅上皮・鋤鼻上皮細胞の軸索集束 (文献③、④)、及び海馬の顆粒細胞のシナプス形成 (文献⑤) や時期特異的なシナプス活動 (文献⑥) に関与している可能性が示唆されているが、小脳における役割は不明である。

(2) 自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorder; ASD) 患者の染色体解析により、ASD と KIRREL3 遺伝子変異との関連性が示唆された (文献⑦、⑧) が、その分子メカニズムは不明である。研究代表者らは、Kirrel3 欠損マウスを作成し、その行動学的解析を行った結果、ASD 様行動と注意欠陥・多動性障害 (attention deficit/hyperactivity disorder; ADHD) 様行動の両方を示すことを見いだした (文献⑨)。

2. 研究の目的

シナプス接着分子の Kirrel3 は、患者の染色体解析から ASD の原因遺伝子である可能性が報告されている。研究代表者らは Kirrel3 遺伝子欠損マウスを作製し、その行動学的解析を行った結果、ADHD 様行動を伴う ASD のモデルマウスであることを報告した。ASD 患者に共通して異常の認められる脳部位として、小脳が注目 (文献⑩) されており、研究代表者らは Kirrel3 遺伝子が小脳に高発現していることを見いだしている (文献①)。本研究では、Kirrel3 の欠損による小脳神経回路・シナプスの形成異常と ADHD を伴う ASD 様の行動異常との関連性を解析することによりその分子病態を解明し、病態に基づく治療法の検討へと繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 発達過程、及び成獣の小脳における Kirrel3 遺伝子発現細胞と Kirrel3 タンパク発現部位の同定

① Kirrel3 遺伝子発現細胞の同定: Kirrel3 のプロモーター下に LacZ 遺伝子を組み込んだ Kirrel3 ヘテロマウスの小脳において、抗 β -galactosidase (β -gal) 抗体とプルキンエ細胞 (calbindin)、介在神経細胞 (バスケット細胞と星状細胞; parvalbumin)、顆粒細胞 (neuronal nuclei; NeuN)、ゴルジ細胞 (neurogranin) のマーカーに対する抗体との蛍光二重免疫染色を行った。

② Kirrel3 タンパク発現部位の同定: 野生型マウスの小脳において、抗 Kirrel3 抗体とプルキンエ細胞や介在神経細胞、顆粒細胞の軸索、樹状突起、及びシナプスマーカーに対する抗体を用いて、各々蛍光二重免疫染色を行った。

(2) Kirrel3 欠損マウスの小脳の組織学的解析: 野生型、及び Kirrel3 欠損マウスの小脳において、プルキンエ細胞やバスケット細胞のマーカー、及びそれらの軸索 (neurofilament 200; NF200, ankyrinG, myelin basic protein; MBP) や軸索終末 (potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1; HCN1, Kv1.2)、樹状突起 (calbindin)、シナプス (synapsin I, N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1; NMDAR1) のマーカーに対する抗体を用いて免疫染色を行い、細胞数やシナプス構造異常の有無を検討した。

(3) Kirrel3 欠損マウスの脳内各部位におけるモノアミンとその代謝産物の測定: 成獣の野生型、及び Kirrel3 欠損マウスの前頭前皮質、線条体、視床、大脳皮質、小脳、中脳等のセロトニン濃度、ドーパミン濃度、ノルアドレナリン濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

(4) 薬剤投与による行動異常の改善の検討: 野生型、及び Kirrel3 欠損マウスに ADHD 治療薬であるメタンフェタミンを腹腔内投与し、ASD・ADHD 様行動異常の改善を検討した。

4. 研究成果

(1) 発達過程、及び成獣の小脳における Kirrel3 遺伝子発現細胞と Kirrel3 タンパク発現部位の同定

① 発達過程、及び成獣の小脳における Kirrel3 遺伝子発現細胞の同定

生後の発達過程、及び成獣の小脳における Kirrel3 遺伝子発現細胞を同定するために Kirrel3 ヘテロマウスの小脳において、抗 β -gal 抗体と小脳の各種神経細胞マーカーに対する抗体との蛍光二重免疫染色を行った。その結果、 β -gal は生後 7 日齢で NeuN 陽性の顆粒細胞の一部の集団と calbindin 陽性のプルキンエ細胞の一部の集団に発現を認め、生後 14 日齢、21 日齢では顆粒細胞の多くに発現が認められた。分子層では、生後 14 日齢 (図 1 A) から parvalbumin 陽性介在神経細胞の一部の集団に発現を認め、生後 21 日齢 (図 1 B)、生後 28 日齢 (図 1 C)、生後 70 日齢 (図 1 D) では介在神経細胞の多くに発現していた。生後 14 日齢から生後 70 日齢にかけて、 β -gal と neurogranin との共存は見られなかった。したがって、Kirrel3 遺伝子は生後の発達過程において、顆粒細胞、プルキンエ細胞、介在神経細胞に発現し、ゴルジ細胞には発現していないことが示唆された。

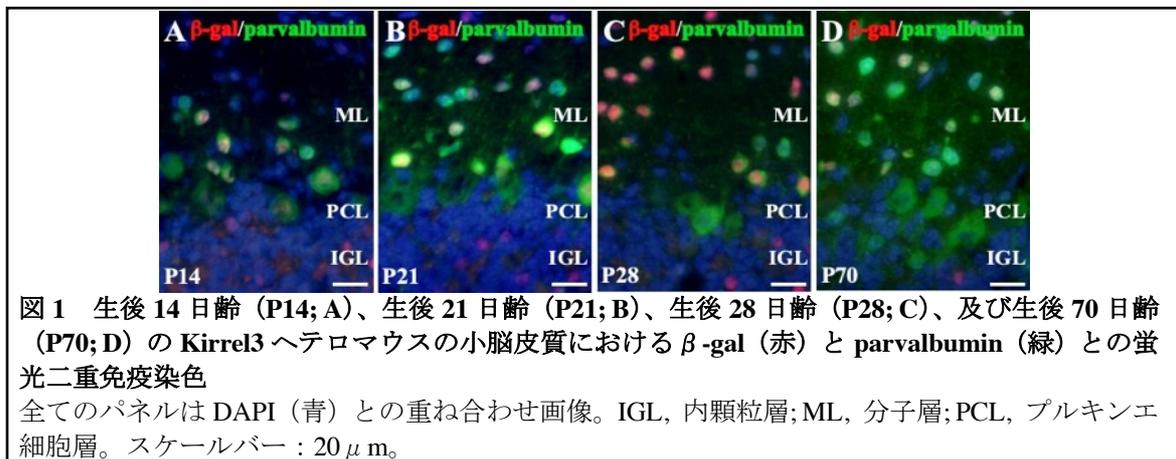


図1 生後14日齢 (P14; A)、生後21日齢 (P21; B)、生後28日齢 (P28; C)、及び生後70日齢 (P70; D) の Kirrel3 ヘテロマウスの小脳皮質における β -gal (赤) と parvalbumin (緑) との蛍光二重免疫染色

全てのパネルは DAPI (青) との重ね合わせ画像。IGL, 内顆粒層; ML, 分子層; PCL, プルキンエ細胞層。スケールバー: 20 μ m。

②発達過程、及び成獣の小脳における Kirrel3 タンパクの局在

生後の発達過程の小脳における Kirrel3 タンパク発現部位を同定するために、抗 Kirrel3 抗体と小脳プルキンエ細胞のマーカーである calbindin に対する抗体との蛍光二重免疫染色を行った。その結果、Kirrel3 タンパクは生後7日齢で内顆粒層に発現を認め (図 2A)、生後14日齢をピークとして発現が低下し (図 2B-2E)、生後70日齢では内顆粒層のプルキンエ細胞の軸索初節部 (axon initial segment; AIS) 周囲でのみ高発現が見られた (図 2E)。

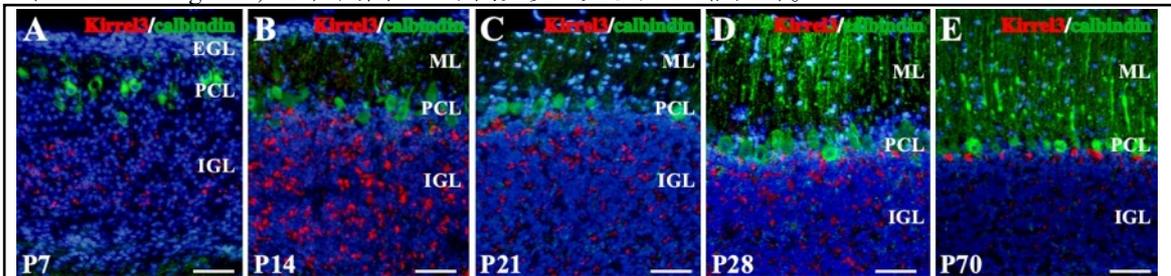


図2 生後7日齢 (P7; A)、生後14日齢 (P14; B)、生後21日齢 (P21; C)、生後28日齢 (P28; D)、及び生後70日齢 (P70; E) の小脳皮質における Kirrel3 (赤) と calbindin (緑) との蛍光二重免疫染色

全てのパネルは DAPI (青) との重ね合わせ画像。EGL, 外顆粒層; IGL, 内顆粒層; ML, 分子層; PCL, プルキンエ細胞層。スケールバー: 50 μ m。

内顆粒層の Kirrel3 発現部位を同定するために、顆粒細胞樹状突起終末に発現している NMDAR1 に対する抗体と抗 Kirrel3 抗体との蛍光二重免疫染色を行った。その結果、生後14日齢 (図 3A) では NMDAR1 と Kirrel3 は完全に共存を示したが、生後21日齢 (図 3B)、生後28日齢 (図 3C)、及び生後70日齢では、プルキンエ細胞の AIS 周囲の Kirrel3 陽性領域は NMDAR1 陰性であった。

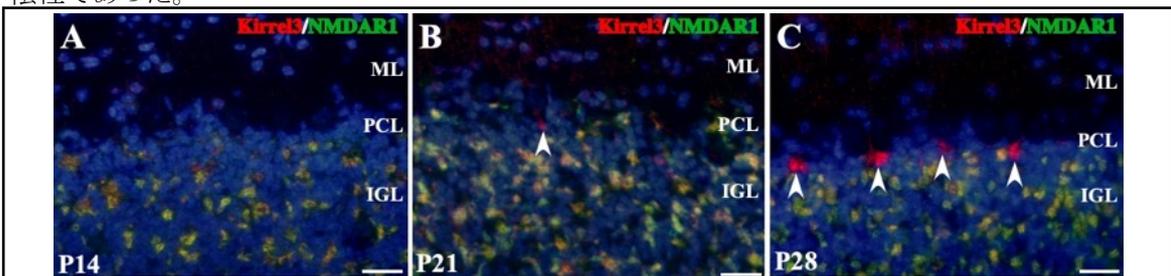


図3 生後14日齢 (P14; A)、生後21日齢 (P21; B)、及び生後28日齢 (P28; C) の小脳皮質における Kirrel3 (赤) と NMDAR1 (緑) との蛍光二重免疫染色

全てのパネルは DAPI (青) との重ね合わせ画像。パネル B, C の矢尻はピンスーシナプス部を示す。IGL, 内顆粒層; ML, 分子層; PCL, プルキンエ細胞層。スケールバー: 25 μ m。

生後21日齢から成獣にかけて3~7個のバスケット細胞からの軸索が1個のプルキンエ細胞軸索初節部 (AIS) に集束し、AIS 周囲では各々の軸索終末が分枝してピンスーシナプスを形成していることが報告されている (図 4A)。小脳バスケット細胞の軸索終末マーカーである HCN1 に対する抗体と抗 Kirrel3 抗体との蛍光二重免疫染色を行った結果、Kirrel3 タンパクは生後14日齢では HCN1 陽性の小脳バスケット細胞の軸索終末部には発現が見られず、生後21日齢 (図 4B) で発現を認め、生後28日齢 (図 4C)、及び生後70日齢 (図 4D) においても発現が持続していた。さらに、ピンスーシナプス部 AIS のマーカーである AnkyrinG と Kirrel3 との蛍光二重免疫染色を行ったところ、Kirrel3 は AnkyrinG 陽性の AIS 周囲にのみ見られた (図 4E-4G) ことから、ピンスーシナプスのバスケット細胞軸索終末に発現していることが示唆された。

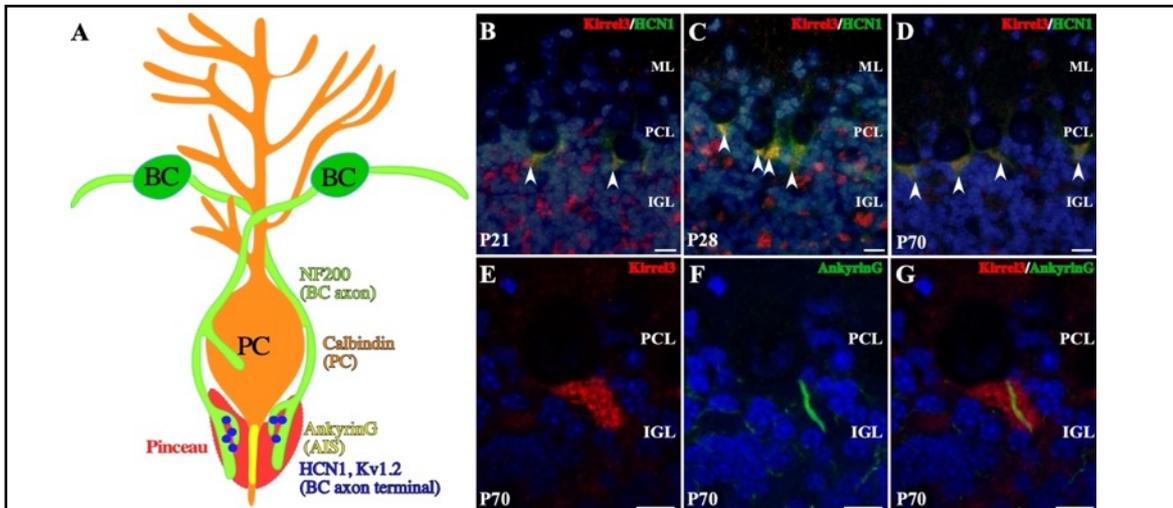


図4 ピンサーシナプスの構造と各部位のマーカー (A)、及び生後 21 日齢 (P21; B)、生後 28 日齢 (P28; C)、生後 70 日齢 (P70; D-G) の小脳皮質における Kirrel3 (B-E, G; 赤) と HCN1 (B-D; 緑)、及び AnkyrinG (F, G; 緑) との蛍光二重免疫染色

全てのパネルは DAPI (青) との重ね合わせ画像。パネル B-D の矢尻はピンサーシナプス部を示す。AIS, 軸索初節部; BC, バスケット細胞; IGL, 内顆粒層; ML, 分子層; PC, プルキンエ細胞; PCL, プルキンエ細胞層。スケールバー: 10 μ m。

(2) Kirrel3 欠損マウスの小脳バスケット細胞とプルキンエ細胞間ピンサーシナプス部の組織学的解析: 成獣で Kirrel3 タンパクの高発現が見られたピンサーシナプス部における Kirrel3 の役割 (バスケット細胞の軸索投射、軸索分枝、シナプス形成、シナプス除去等) を検討するため、野生型、及び Kirrel3 欠損マウスのピンサーシナプス部の組織学的解析を、シナプスタンパクや軸索マーカーを用いた免疫染色法により行った。

①ピンサーシナプス部のバスケット細胞軸索終末の解析: 成獣 (生後 70 日齢) の Kirrel3 欠損マウスにおいて、ピンサーシナプスのバスケット細胞軸索の AIS への投射や分枝に異常があるかを検討するために、ピンサーマーカーである Kv1.2 とバスケット細胞軸索に発現している NF200 との蛍光二重免疫染色を行った。Kv1.2 陽性エリアにおける NF200 の輝度を ImageJ により定量化したところ、野生型マウスと比べて Kirrel3 欠損マウスにおいて、Kv1.2 陽性ピンサーエリアの拡大とピンサーにおける NF200 の輝度の有意な増加が認められた。

②小脳バスケット細胞数、プルキンエ細胞数の解析: Kirrel3 欠損マウスのピンサーシナプスにおいて見られたバスケット細胞軸索分枝の増加がバスケット細胞数の増加による可能性を、parvalbumin の免疫染色により検討したところ、野生型と Kirrel3 欠損マウス間で分子層の parvalbumin 陽性バスケット細胞数に差は見られなかった (図 5A-5C)。また、プルキンエ細胞数の低下も見られなかった (図 5D)。これらのことから、1 個のバスケット細胞あたりの軸索分枝が増加している可能性が示唆された。

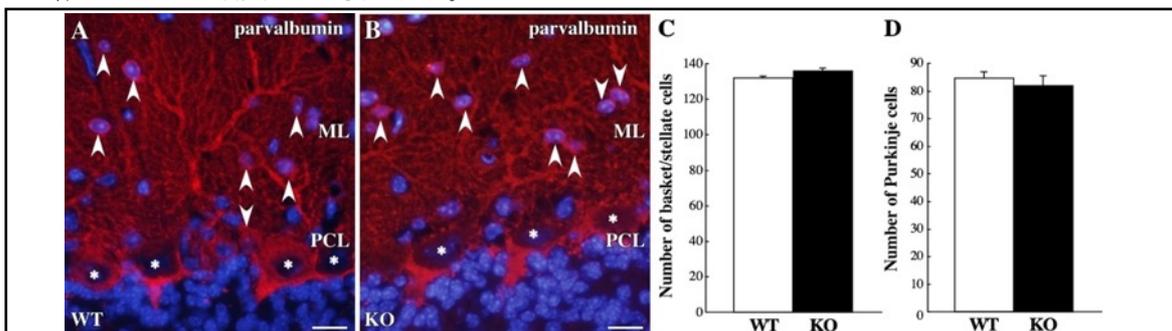


図5 野生型 (A)、及び Kirrel3 欠損 (B) マウスの小脳皮質における parvalbumin の免疫染色 (A, B)、及び parvalbumin 陽性バスケット細胞・星状細胞数 (C) と parvalbumin 陽性プルキンエ細胞数 (D) の定量

パネル A, B の矢尻は分子層の parvalbumin 陽性バスケット細胞・星状細胞、アスタリスクはプルキンエ細胞層の parvalbumin 陽性プルキンエ細胞を示す。ML, 分子層; PCL, プルキンエ細胞層。スケールバー: 25 μ m。

③バスケット細胞軸索終末のプルキンエ細胞 AIS への投射の解析: AIS の周囲のみにバスケット細胞軸索終末が投射しているかを検討するため、バスケット細胞軸索に発現している NF200、AIS マーカーの AnkyrinG、及びプルキンエ細胞軸索の AIS を除く遠位の軸索髄鞘に発現している MBP の三重免疫染色を行った。その結果、NF200 陽性のバスケット細胞の軸索は、AnkyrinG 陽性、MBP 陰性の AIS 周囲にのみ見られ (図 6)、AIS への投射は正常であることが示唆された。

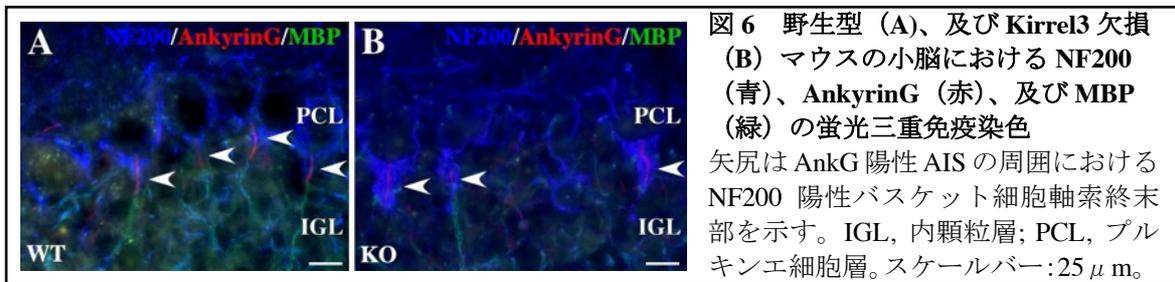


図6 野生型 (A)、及び Kirrel3 欠損 (B) マウスの小脳における NF200 (青)、AnkyrinG (赤)、及び MBP (緑) の蛍光三重免疫染色
矢尻は AnkG 陽性 AIS の周囲における NF200 陽性バスケット細胞軸索終末部を示す。IGL, 内顆粒層; PCL, プルキンエ細胞層。スケールバー: 25 μm。

④ピンスーシナプス部のバスケット細胞軸索終末のシナプスタンパクの発現の検討: ピンスーシナプス部のバスケット細胞軸索終末におけるシナプスの密度を検討するために、シナプス前部のマーカーである synapsin I とピンスーマーカーである HCN1 との蛍光二重免疫染色(図 7A、7B)を行い、HCN1 陽性エリアにおける synapsin I の輝度を Image J により定量化した(図 7C)。その結果、野生型、及び Kirrel3 欠損マウス間で有意な差は見られなかった。

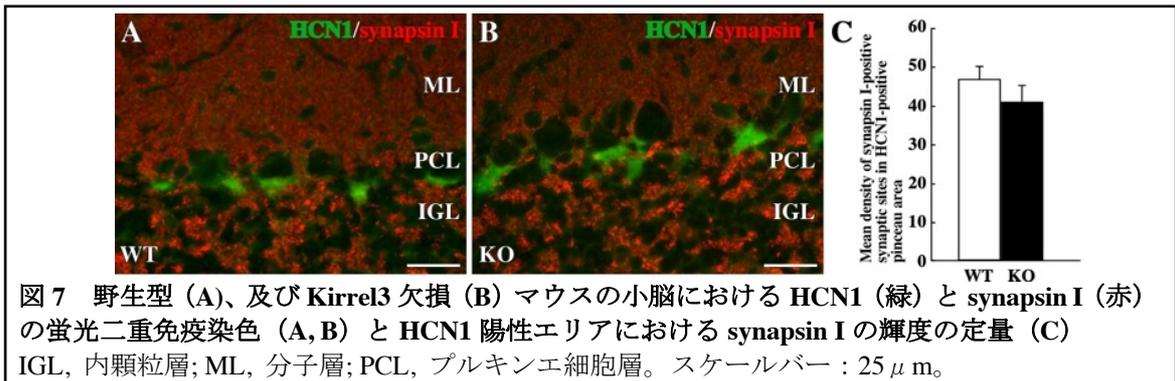


図7 野生型 (A)、及び Kirrel3 欠損 (B) マウスの小脳における HCN1 (緑) と synapsin I (赤) の蛍光二重免疫染色 (A, B) と HCN1 陽性エリアにおける synapsin I の輝度の定量 (C)
IGL, 内顆粒層; ML, 分子層; PCL, プルキンエ細胞層。スケールバー: 25 μm。

これらの結果から、Kirrel3 はバスケット細胞軸索の過剰な分枝の除去に関連している可能性が示唆された。ピンスーシナプスはプルキンエ細胞の軸索初節部の活動電位を電氣的に抑制していることから、Kirrel3 欠損マウスのピンスーシナプス構造異常が小脳プルキンエ細胞の活動電位抑制を障害し、ADHD を伴う ASD 様行動を惹起している可能性が考えられる。

(3) Kirrel3 欠損マウスの脳のモノアミン量の測定

成獣の野生型、及び Kirrel3 欠損マウスの前頭前皮質や線条体、小脳、中脳の組織中のセロトニン濃度やドーパミン濃度を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。その結果、Kirrel3 欠損マウスのセロトニン濃度には異常はなかったが、ドーパミン濃度は前頭前皮質において異常を示した。

(4) Kirrel3 欠損マウスの行動学的解析

Kirrel3 欠損マウスに ADHD 治療薬でドーパミン伝達系の賦活薬であるメタンフェタミン 2.5 mg/kg を腹腔内投与し、オープンフィールドテストにより ADHD 様行動(多動)が改善するかを検討した結果、メタンフェタミン非投与群と比べて多動の有意な亢進が見られた。この結果から、Kirrel3 欠損マウスの ADHD を伴う ASD の病態として、ADHD で報告されているドーパミン伝達系の低下ではなく、ドーパミン伝達系の亢進が関連している可能性が示唆された。

以上の結果より、ADHD を伴う ASD 様行動を示す Kirrel3 欠損マウスの小脳シナプス構造異常、及び小脳から腹側被蓋核を介して投射のある前頭前皮質のドーパミン濃度の異常と ADHD 治療薬であるドーパミン賦活薬に対する治療抵抗性を見いだした。これらの知見から、Kirrel3 欠損マウスは ASD の原因として注目されている小脳異常と ADHD の原因として知られているドーパミン神経伝達異常を併せ持ち、ADHD の治療薬に抵抗性のある ASD モデルマウスであると考えられる。

<引用文献>

- ① Tamura S *et al.*, Neuroscience 133, 615-624 (2005)
- ② Morikawa Y *et al.*, Neuroscience 150, 880-886 (2007)
- ③ Serizawa S *et al.*, Cell 127, 1057-1069 (2006)
- ④ Prince JE *et al.*, Development 140, 2398-2408 (2013)
- ⑤ Martin EA *et al.*, Elife 4, e09395 (2015)
- ⑥ Choi SY *et al.*, Front Cell Neurosci 9, 283 (2015)
- ⑦ Guerin A *et al.*, Am J Med Genet A 158A, 2551-2556 (2012)
- ⑧ Talkowski ME *et al.*, Cell 149, 525-537 (2012)
- ⑨ Hisaoka T *et al.*, Sci Rep 8, 1408 (2018)
- ⑩ Wang SS *et al.*, Neuron 83: 518-532 (2014)

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 Hisaoka Tomoko, Komori Tadasuke, Fujimoto Kohta, Kitamura Toshio, Morikawa Yoshihiro	4. 巻 563
2. 論文標題 Comprehensive expression pattern of kin of irregular chiasm-like 3 in the adult mouse brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 66~72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.05.063	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 久岡朋子、小森忠祐、北村俊雄、森川吉博
2. 発表標題 マウス大脳皮質における自閉症関連遺伝子Kirrel3の発現
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年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久岡朋子、小森忠祐、北村俊雄、森川吉博
2. 発表標題 自閉症関連遺伝子Kirrel3の小脳における発現と小脳ピンスー構造形成における役割
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Hisaoka, Tadasuke Komori, Toshio Kitamura, Yoshihiro Morikawa
2. 発表標題 Abnormal organization of pinceau in the cerebellum of Kirrel3-deficient mice
3. 学会等名 第61回日本神経化学学会大会・第40回日本生物学的精神医学会合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoko Hisaoka, Tadasuke Komori, Toshio Kitamura, Yoshihiro Morikawa
2. 発表標題 Abnormal synapse formation of cerebellar pinceau in Kirrel3-knockout mice
3. 学会等名 48th Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiro Morikawa, Tomoko Hisaoka, Tadasuke Komori, Toshio Kitamura
2. 発表標題 Autistic-like behaviors in postnatal and adult Kirrel3-knockout mice
3. 学会等名 48th Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Shikaze, Tadasuke Komori, Tomoko Hisaoka, Toshio Kitamura, Yoshihiro Morikawa
2. 発表標題 Characterization of Kirrel3-expressing cells in the mouse substantia nigra and ventral tegmental area
3. 学会等名 48th Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	森川 吉博 (Morikawa Yoshihiro) (60230108)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	北村 俊雄 (Kitamura Toshio) (20282527)	東京大学・医科学研究所・教授 (12601)	
連携研究者	小森 忠祐 (Komori Tadasuke) (90433359)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授 (24701)	

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