

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06468

研究課題名(和文) ガングリオシド欠損マウスのADHDモデルとしての確立と応用

研究課題名(英文) Establishment of new ADHD model mice based on ganglioside deficiency

研究代表者

吉原 亨 (Yoshihara, Toru)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：00401935

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)：セラミドを起点として合成されるガングリオシドは脳内の糖脂質の約1/3を占める主要な分子であり、ニューロンの成熟性にとって必須の機能を持つ。ガングリオシド形成の始点部にあたるラクトシルセラミド合成には、4ガラクトース転移酵素5および6がマウス脳内で必須である事を全脳で2つの酵素を欠損させたマウスによる解析から明らかにした(Yoshihara et al., 2018)。さらに、脳内ガングリオシドの行動特性を明らかにするために終脳特異的にガングリオシドを欠損させたマウスを作成し、このマウスが活動性、運動性、注意機能亢進、恐怖条件付けの増強などのADHD等の発達障害モデルたり得ることを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会的にも大きな問題となっている発達障害に関して、様々なモデルマウスを用いた研究がなされている。申請者はガングリオシドと呼ばれる糖脂質と発達障害との関連を明らかにすることを企図して、それらの合成の起点部となるラクトシルセラミド合成に必須である2つの糖転移酵素を大脳皮質等で欠損させたマウスを作成した。このマウスの行動様式はADHD等の発達障害モデルたり得ることを見だし、その原因や既知のモデルマウスとの比較により、新たなADHDモデルマウスを作成することができた。これらの知見は、新たなモデルマウスによる病態理解や治療戦略に向けて、学術的、社会的意義を持つものである。

研究成果の概要(英文)：Gangliosides, which are synthesized from ceramide, are major molecules accounting for about 1/3 of glycolipids in the brain and are essential for the maturation of neurons. We found that 4-galactosyltransferases 5 and 6 are essential for the synthesis of lactosylceramide, the starting site of ganglioside formation, in the mouse brain by analysis of mice lacking the two enzymes in the whole brain (Yoshihara et al., 2018). Furthermore, to evaluate the behavioral properties of gangliosides in the brain, we generated mice lacking gangliosides specifically in the telencephalon and found that these mice could serve as a model for developmental disorders such as ADHD, including increased activity, motility, attention, and fear conditioning.

研究分野：神経科学

キーワード：行動解析 マウス 発達障害 ADHD

1. 研究開始当初の背景

注意欠陥・多動性障害 (ADHD) は注意力・集中力の散漫, 多動性, 衝動性を主症状とする精神疾患である。これまでに特にドーパミン神経仮説 (DA 仮説) に基づき, DA レセプター, トランスポーター, 合成酵素の欠損・変異を持つ様々なモデルマウスが開発されてきた。その多くは中枢神経系全体での遺伝子改変モデルであること, また行動解析から観察される ADHD 様の症状の多くが多動性に限られるなど, ヒト疾患モデルとしての妥当性を十分に保有していない問題点が挙げられている。

本研究では ADHD の責任領域と考えられる前頭前野を含む終脳特異的に糖脂質であるガングリオシドを欠損させたマウスを用いて研究を進めた。このマウスでは, 注意機能の障害, 顕著な過活動性など多くの ADHD 様の行動障害が観察され, 神経ネットワーク形成に障害を持つ病態モデルとして確立し, 新たな病因理解, 治療法の提唱を目指した。

2. 研究の目的

申請者らは, 2つのガラクトース転移酵素 (B4galt5, B4galt6) が脳内ガングリオシド合成の起点において必須であり, Nestin-Cre マウスとの交配により, これらの転移酵素を全脳の神経細胞で欠損させたマウスでは脳内のガングリオシドが完全に消失することを報告した。このマウスは離乳期付近で死亡したが, 脳の組織学的解析, 培養系による検討では神経突起形成, 軸索伸長の不全やミエリン形成の顕著な障害が認められた (Yoshihara et. Al., PlosGenetics, 2018)。そこでガングリオシド欠損による神経ネットワーク形成障害と精神疾患との関連を検討するために, 大脳皮質, 海馬などの限局した領域でこれらの転移酵素を欠損したマウスを Emx1-Cre マウスとの交配によって作出した (以下, DKO マウス)。この DKO マウスは無事に成体にまで至ったため, 行動の表現型をテストバッテリー方式の行動解析により解析した。その結果, DKO マウスでは, 1) 新奇, 既知環境での顕著な過活動性, 2) プレパルスインヒビション (PPI) における注意機能障害, 3) 電気ショックに対する過敏性など, ヒト ADHD のモデルとなり得る特徴的な行動特性を備えていた (表 1)。本申請では, この行動障害が ADHD モデルたり得るか, まず始めに組織学的検討, 薬理的からモデル動物としての確証を試みて, 神経ネットワークの形成障害が ADHD 様の行動障害をどのように生じさせるのかを検証し, 新たな ADHD モデルマウスとしての有用性と治療戦略に向けたモデルマウスの活用を目的とした。

ADHD	DKOマウス
多動性	新奇・既知環境での過活動性
注意機能障害	PPIの障害
過敏性	電気ショックへの反応増強

表 1. 終脳特異的ガングリオシド欠損マウスの ADHD 様行動特性.

3. 研究の方法

(1) 行動薬理的解析

ヒト ADHD 患者においてはハロペリドールをはじめとした DA 系に作用する薬物が病態改善に有効であることが知られている。そこで表現系の薬理的妥当性を検討する目的で D1 および D2 レセプターに作用する薬物を投与した条件でいくつかの行動解析を行った。

(2) ニューロン成熟に関する組織学的検討

ヒト ADHD 患者においては、一部ニューロンにおいて、神経突起の伸長が脆弱であること、スパインを中心としたシナプス形成の未成熟性が知られている。そこでこれらの病態との類似性を組織学的に検討する目的でゴルジ染色といくつかの免疫組織染色を実施した。また、培養系での評価を目的として、出生直後のマウス終脳から得た細胞を基に培養系に検討を行った。

(3) ニューロン機能、成熟、シナプス形成に関わる遺伝子発現の検討

神経伝達に関わる各種レセプター、ニューロン成熟に関与する遺伝子ならびにシナプス形成に関わる遺伝子の発現変動について、終脳から調整した mRNA を基に定量的 RT-PCR を実施した。

(4) ニューロン機能、成熟、シナプス形成に関わるタンパク発現の検討

DA 系機能に関わるレセプター、酵素、およびミエリン形跡に関わるタンパク質について、western blot 法によるタンパク質の発現変動を検討した。

4. 研究成果

(1) 行動薬理的検討

DA 系レセプターに関して、D1 レセプターアンタゴニスト (Sch23390)、および D2 レセプターアゴニスト (Sumanrole) を投与 30 分後にオープンフィールドテストを実施したところ、両薬物ともに DKO マウスの過活動性を顕著に低減させることがわかり、DKO マウスの過活動性が DA 系の機能障害によって説明されることが示唆された。

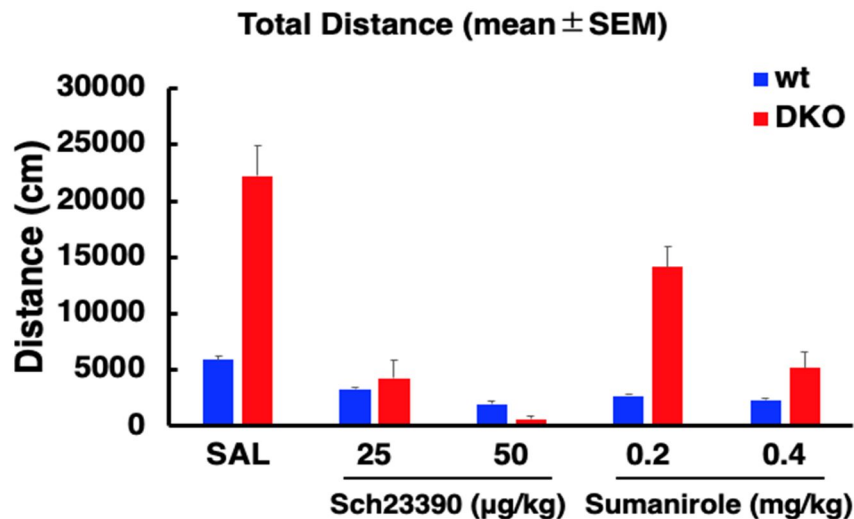


図 1. オープンフィールドテストにおける活動性(縦軸: 移動距離)。対象条件である生理食塩水(SAL)投与条件で見られていた DKO マウス(赤)の過活動性は、D1 ならびに D2 レセプター作用薬により顕著に低減した。

(2) 組織学的検討

成体マウス脳を対象とした Golgi 染色によって軸索、樹状突起の状態を確認した。野生型マウスでは (wt) では十分に伸長したこれら構造体が観察されたが、DKO マウス (DKO) では十分に伸長していない染色像が得られた。また、出生直後 (P0) マウス大脳皮質から得たニューロンについて、2 週間の培養後、wt マウスでは III Tubulin (緑) 陽性の神経突起が十分に伸長していたが、KO マウスでは伸長が十分ではない染色像が得られた (図 2)。

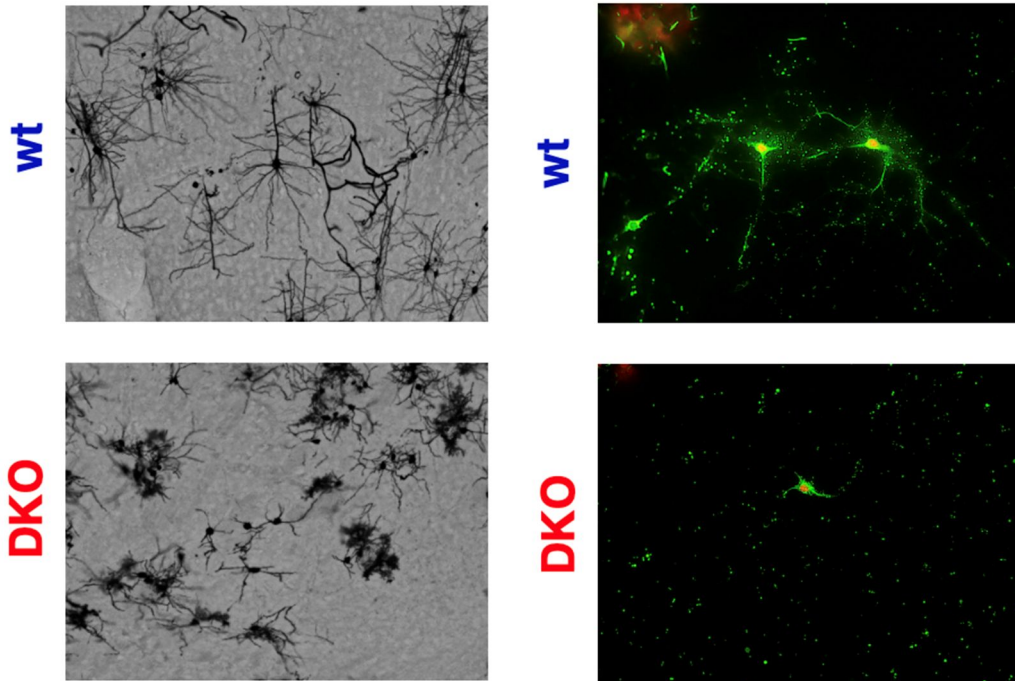


図 2. 成体マウス大脳皮質ゴルジ染色像(左)および P0 マウス由来神経細胞染色像。

(3) 遺伝子発現の検討

神経伝達に関わる各種レセプター (グルタミン酸受容体, GABA 受容体, DA 受容体, 同合成酵素, 分解酵素) については大脳皮質, 線条体ともに遺伝子発現の変動は見られなかった。ニューロン成熟に関与する遺伝子の発現変動については, 明らかな遺伝子発現の変動は見られなかった。シナプス形成に関わる遺伝子に発現の低下が見られ, 今後, 免疫染色等で確証を得る予定である。

(4) タンパク発現の検討

ミエリン関連タンパク質, DA 系肝タンパク質について, これまでに明確な発現変動を示すものは見いだせていない。

(5) 電気生理学的解析

本研究で用いた DKO マウスは大脳皮質を含む終脳領域での遺伝子欠損が想定される。過活動性の表現系は大脳皮質運動野を起点とし, 線条体, 淡蒼球へ通じる直接路, 間接路などの運動制御回路に障害が生じている可能性が考えられた。そこで, 電気生理学的な検討を共同研究として実施したところ, 特に直接路の神経投射, 神経制御に明確な障害が確認され, DKO マウスの過活動性は直接路障害が一因であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉原 亨・佐武寛之・西江敏和・沖野 望・八田稔久・大谷 浩・成瀬智恵・鈴木紘史・杉原一司・神村栄吉・徳田典代・古川圭子・古川鋼一・伊藤 信・浅野 雅秀
2. 発表標題 B4gal15と6遺伝子によってコードされるラクトシルセラミド合成酵素は神経系構築とミエリン鞘形成に必須である
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉原 亨・浅野雅秀・古川鋼一
2. 発表標題 ラクトシルセラミド合成に関わる脳部位特異的ガラクトース転移酵素群欠損マウスの行動解析
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019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
研究分担者	浅野 雅秀 (Asano Masahide) (50251450)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	

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
---------	---------