

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591398

研究課題名（和文） 自閉症におけるセロトニン伝達系機能異常の機構解明

研究課題名（英文） analysis of serotonin transductional dysfunction in autism

研究代表者

アニータ A ピライ (Anitha A. Pillai)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・特任助教

研究者番号：70377753

研究成果の概要（和文）：

我々は PET 研究により自閉症者の脳内で SERT 密度が低下していることをつきとめた。この異常の発症基盤を明らかにするため、セロトニン・トランスポーター（以下 SERT と略す）の発現とその調節因子である STX1A・ROBO3・ITGB3・MacMARCKS について解析を行った。遺伝子および死後脳解析の結果、自閉症特異的な各遺伝子の発現変化が有意に認められたが、自閉症者死後脳中の SERT の定量結果は正常であった。以上より、PET で認めた自閉症者脳内 SERT の広汎な密度低下は、発現低下に起因するものではなく、細胞内の SERT 輸送異常が原因として疑われた。

研究成果の概要（英文）：

We have found serotonin transporter (SERT) binding was significantly lower throughout the brain in autistic individuals compared with healthy controls by PET study. To clarify mechanism underlying, we have analyzed gene and postmortem brain of autistic subjects and the controls. As results, we have found change of SERT-related gene expression in the study. However, there was no difference in SERT expression of postmortem brains between them. Taken together, SERT dysfunction in autistic brain may be caused by intracellular trafficking dysfunction but not expression impairment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成22年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：自閉症、中枢神経系、インテグリン β 3、セロトニン

1. 研究開始当初の背景

自閉症は社交性や言語の発達の遅れ、反復的な行動（強迫症状）などの症状に特徴づけられる発達障害である。近年、自閉症の有病率は最新調査において実に2.1%（1970年代の約50倍）とされるが、その病態の原因は不明であり、根本的な治療法は確立されていない。

い。

今日、自閉症の病態を説明する仮説の一つに「セロトニン仮説」がある。これは自閉症の症状の一部に SSRI（選択的セロトニン再取込阻害剤）が有効であること、自閉症児の末梢血中セロトニン値が高値であるという臨床所見に拠って提唱された（Schain &

Freedman 1961, Hanley et al 1977, Cook 1990, Anderson et al 1990, DeLong 1999)。長くこの仮説は検証されずに来たが、われわれは自閉症当事者の自助グループである NPO 法人アスペ・エルデの会の協力を得て、PET 研究により、自閉症者の脳内で SERT 密度が低下していることをつきとめた(図 1)。

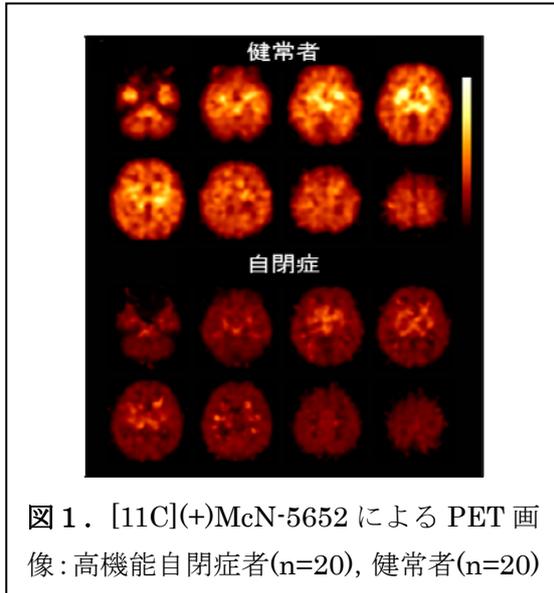


図 1. [11C](+)McN-5652 による PET 画像: 高機能自閉症者(n=20), 健常者(n=20)

自閉症では、その一卵性双生児の発症一致率 (70-90%) から生物学的要因が主たる病因をなす。その基盤には神経発達関連遺伝子の関連が想定されるが、これまで自閉症の病態形成への関与が明らかな遺伝子は知られていない。SERT の密度低下のメカニズムが判明すれば、自閉症の病態解明につながると考えられる。そこでわれわれは、近年の報告から、細胞接着分子のインテグリンβ3 サブユニット (以下、ITGB3 と略す) に注目した。

ITGB3 は血小板中に多く存在するが、中枢神経系でも海馬シナプスの発達における重要性が報告されている (Chavis & Westbrook 2001)。その遺伝子は 17q21.31 領域に位置し、ゲノム解析により血中の総セロトニン量との相関 (Weiss et al 2004) および自閉症との相関 (Weiss et al 2006) が指摘されている。最近の遺伝子解析では、自閉症者における SERT 発現との相関も指摘された (Coutinho et al 2007)。そこで上記自閉症者の末梢リンパ球中の mRNA を測定したところ、ITGB3 mRNA が自閉症者サンプルで有意に低下していることが判明した (図 2)。

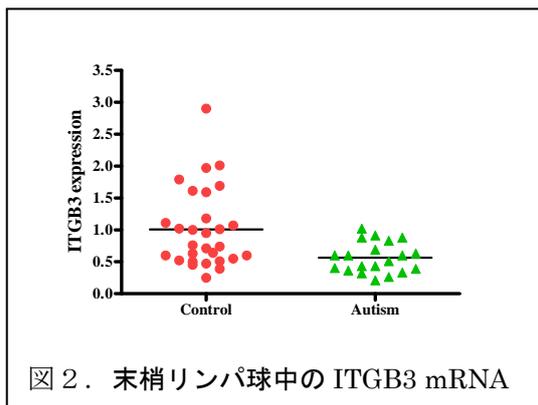


図 2. 末梢リンパ球中の ITGB3 mRNA

2. 研究の目的

ITGB3 と SERT の間には、遺伝子解析上の関連は指摘されているものの、生物学的作用は今のところ報告されていない。両者はシナプスに存在する膜タンパクであるため、中枢神経系セロトニン神経終末のシナプス膜上で近接して相互作用を及ぼしている可能性がある。この有無をまず検討する。

直接的作用のない場合は、両者の連携を中継する分子の存在が考えられる。SERT に結合する分子として、syntaxin 1A, 14-3-3 τ , MacMARCKS の 3 種が知られている (Haase et al 2001, Jess et al 2002, Quick 2003) が、本研究では ITGB3 に関連が深い分子として MacMARCKS に注目する。

MacMARCKS はアクチンフィラメントと結合して、主に細胞の分化・成長の調節に関与する膜タンパクで、Protein Kinase C の基質として発見された (Aderem 1992, Blackshear 1993, Dekker & Parker 1994)。その後、SERT に直接結合して、セロトニン再取り込み機能に影響を及ぼすこと (Jess et al 2002)、ITGB3 によって発現調節を受けること (van den Bout et al 2007) が報告された。これらより、ITGB3 が MacMARCKS の発現調節を介して SERT の機能を左右している可能性が考えられる。本研究では ITGB3 ノックアウトマウスを用いた解析 (①)、SERT ノックアウトマウスを用いた解析 (②)、自閉症患者の PET 所見および死後脳を用いた解析 (③) を行なうことで、ITGB3 がセロトニン機能へ及ぼす影響を中心に、脳内でのこれらの分子の相互作用、自閉症臨床症状との対応を検討する。

我々は、米国 Autism Genetic Resource Exchange、米国 Autism Tissue Project の厳正な審査を通過し、本邦初の自閉症の死後脳サンプルの供与を受けている。また、自閉症の国際的研究用診断基準である ADI-R (Autism Diagnostic Interview Revised)、ADOS (Autism Diagnostic Observation Scale) にも習熟しており、アスペ・エルデの会との共同研究により、国際的研究用診断基準にかなった日本人症例を対象としている。

3. 研究の方法

初年度は、まず ITGB3 ノックアウトマウスおよび SERT ノックアウトマウスを用いて、双方向から ITGB3-SERT の相互作用について解析をすすめる。さらに、自閉症に特徴的な行動所見・セロトニン所見が生じるメカニズムを解析の結果から明らかにする。

次年度以降は、この動物実験で明らかにした ITGB3 にまつわるメカニズムが、実際に自閉症者の脳内で起きているかどうかを検討する。さらに自閉症にみられる臨床所見が

ITGB3 の変化に相関しているかどうかを調べる。

2008 年度

①ITGB3 ノックアウトマウスを用いた解析

(1) 脳病理組織学的評価 (担当: 松崎)
ITGB3 と MacMARCKS および SERT の関係を評価するため、ITGB3 ノックアウトマウスを用いて in situ hybridization 法および免疫組織化学染色法を行い、中枢神経系での MacMARCKS および SERT 発現の違いをホモ・ヘテロ・野生群で比較検討する。

(in situ hybridization 法) 生直後から生後 12 週のマウスを断頭し、速やかに摘出した脳を氷上で厚さ 3~4 mm の冠状断片に分割する。粉碎したドライアイスで凍結後、クリオスタットで 20 μ m 厚の切片を作製し、シランコーティングされたスライドグラスに貼付する。MacMARCKS、および SERT の cDNA 配列を基に合成したプローブを用いて、中枢神経系の発達段階の mRNA 発現を評価する。

(免疫組織化学染色法) 生直後から生後 12 週のマウス脳を灌流固定したのち冠状断連続切片を作製し、各切片について MacMARCKS および SERT の特異的抗体を用いて可視化し、蛍光顕微鏡下でタンパク質発現を評価する。

(2) 社会的行動評価 (担当: 岩田)

自閉症者は新しい対人接触を避け、社会的引きこもりを呈する傾向がある。マウスの社会的行動が障害されるかどうかオープンフィールドで評価を行う。異なるケージで飼育された同群のマウスを 2 匹ずつ 60cm \times 60cm のオープンフィールド内に置き、5 分の観察時間内に見られた社会的行動に費やす時間を測定する。

(3) 感覚運動系機能評価 (担当: 岩田)

自閉症では感覚運動系の障害が生物学的なマーカー(中間表現型)として着目されている。この系は聴覚刺激に対する驚愕反応の先行刺激による抑制 (Prepulse inhibition: PPI) として計測されるが、自閉症ではこの PPI が障害されている。小動物用 PPI 測定装置 (San Diego Instruments 社製) を用いて聴覚刺激による驚愕反応を用い、マウスの感覚運動情報処理能力 (sensorimotor gating) を評価する。

(4) 生化学的評価 (担当: 鈴木)

自閉症で認められるセロトニン神経系の活動異常に着目し、末梢血中のセロトニン濃度測定、マイクロダイアライシス法による縫線核におけるセロトニン放出量測定を試みる。末梢血測定は HPLC で行なう。マイクロダイアライシス法について簡潔に

述べる。すなわち動物をペントバルビタール麻酔下に脳定位手術装置に固定し、微小透析プローブを Paxinos & Watson のアトラスに基づいて右側縫線核に留置する。手術から 24 時間後、無麻酔・無拘束下に人工脳脊髄液を 1 μ l/min の流速で灌流し、灌流開始から 2 時間後に生理食塩水を、4 時間後に MDMA5mg/kg を、それぞれ腹腔内に投与する。灌流開始の 1 時間後から 20 分毎に灌流液を回収し、微量生体試料分析システム (BMA-300、(株)エイコム製) により経時的セロトニン放出量を定量する。

②SERT ノックアウトマウスを用いた解析

(1) 脳病理組織学的評価 (担当: 松崎)
SERT と MacMARCKS、および ITGB3 の関係を評価するため、SERT ノックアウトマウスを用いて in situ hybridization 法および免疫組織化学染色法を行い、中枢神経系での MacMARCKS および ITGB3 の発現の違いをホモ・ヘテロ・野生群で比較検討する。方法は上記に準じる。

(2) 社会的行動評価 (担当: 岩田)

方法は上記に準じる。

(3) 感覚運動系機能評価 (担当: 岩田)

方法は上記に準じる。

2009 年度

③自閉症患者由来のサンプルを用いた

ITGB3 遺伝子の解析

(1) 死後脳の ITGB3 遺伝子の発現変化の検討 (担当: アニータ・A・ピライ、中村)

Autism Tissue Program (プリンストン、米国) より供与された自閉症の死後脳サンプルを用い、リアルタイム PCR により ITGB3 遺伝子の発現を調べる。0.5g の死後脳サンプル (帯状回、視床) より RNA を抽出し精製後、逆転写酵素、ランダムプライマーを用いて cDNA を作成する。得られた cDNA をテンプレートとして ITGB3 遺伝子のリアルタイム PCR を行い、健常対照と比較して mRNA 発現量の検討を行う。なお、内部標識としてはハウスキーピング遺伝子である GAPDH、cyclophilin を用いる。

(2) 自閉症者 ITGB3 mRNA 所見を用いた相関解析 (担当: 辻井・鈴木)

PET に参加した自閉症者の ITGB3 mRNA 所見と SERT の密度低下について、SPM 解析を行い、相関を調べる。また、PET に参加した自閉症患者については、全員 ADI-R (Autism Diagnostic Interview Revised)、ADOS (Autism Diagnostic Observation Scale) によるスコアリングを行う。国際的な自閉症診断面接 ADI-R を保護者に、また

ADOS を本人に施行し、自閉症の臨床診断を正しく評価して、スコアと ITGB3 mRNA 所見の相関を調べる。

2010 年度

2010 年度は上述の研究を継続して、得られた結果の統合を図る。

また、自閉症者脳内 ITGB3 の PET 計測を試みる。ITGB3 は [18F]Galacto-RGD をトレーサーとして用いることで、臨床レベルでの PET 計測が可能である (Beer et al, 2006)。トレーサーを入手できれば、自閉症者の生体脳でえた所見と臨床症状との相関をみることも可能となるため、現在トレーサーを所有するグループとの共同研究を模索している。

このようにして、自閉症にみられるセロトニン機能異常の原因について検討を加え、発症基盤の解明をめざす。また、得られた結果に基づいて自閉症の問題行動に対する薬物療法などの治療法の確立を図る。

4. 研究成果

死後脳研究として、4 つの因子に対する mRNA の発現の相異を検討した。検討部位は前帯状回・皮質運動野・視床とした。これらのサンプルに qRT-PCR を施行し、遺伝子発現の変化は 2-DDCT によって決定した。その結果、STX1A の発現が前帯状回で有意に減少していた。また、ROBO3 の発現は前帯状回と皮質運動野で、ITGB3 の発現は前帯状回と視床で、MacMARCKS の発現は前帯状回でそれぞれ有意に増加していた。この結果を SERT KO マウスで検証するため、脳内の *in situ* hybridization を行ったが、同様な分子発現の再現性は得られなかった。また、自閉症者死後脳中の SERT の定量結果は正常であった。以上より、自閉症中枢神経内 SERT の広汎な密度低下は、発現低下に起因するものではなく、細胞内の SERT 輸送異常により細胞膜内に正しく運ばれないことが原因として疑われた。そこで今年度でこの計画は終了し、今後の自閉症セロトニン機能研究は脳内の SERT 細胞内輸送異常に焦点を当てた研究計画を推進することとした。

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 5 件)

1. Anitha A, Nakamura K, Yamada K, Suda S, Thanseem I, Tsuji M, Iwayama Y, Hattori E, Toyota T, Miyachi T, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, et al. Genetic analyses of Roundabout (ROBO) axon guidance receptors in autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 147B(7):1019-27,

2008.

2. Nakamura K, Anitha A, Yamada K, Tsuji M, Iwayama Y, Hattori E, Toyota T, Suda S, Takei N, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, et al. Genetic and expression analyses reveal elevated expression of syntaxin 1A (STX1A) in high functioning autism. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2:1-12, 2008
3. Thanseem I, Nakamura K, Miyachi T, Toyota T, Yamada S, Tsuji M, Tsuchiya KJ, Anitha A, Iwayama Y, Yamada K, Hattori E, Matsuzaki H, Matsumoto K, Iwata Y, Suzuki K, et al. Further evidence for the role of MET in autism susceptibility. *Neurosci Res.* 68(2):137-41, 2010. 24.
4. Nakamura K, Sekine Y, Ouchi Y, Tsuji M, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Nishimura K, Takebayashi K, Kawai M, Iwata Y, Suzuki K, Suda S, Matsuzaki H, et al. Brain Serotonin and Dopamine Transporter Bindings in Adults with High-Functioning Autism. *Arch. Gen. Psychiatry.* 67(1):59-68, 2010.
5. Nakamura K, Iwata Y, Anitha A, Miyachi T, Toyota T, Yamada S, Tsuji M, Tsuchiya KJ, Iwayama Y, Yamada K, Hattori E, Matsuzaki H, Matsumoto K, Suzuki K, et al. Replication study of Japanese cohorts supports the role of STX1A in autism susceptibility. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35(2): 454-8, 2011.

[学会発表] (計 6 件)

1. Matsuzaki H, Nakamura K, Tsuji M, Anitha A, et al.: Genetic analyses of serotonergic factors in autism. *The 7th annual International Meeting for Autism Research*, May 15-17, 2008, London, UK
2. Suda S, Iwata K, Anitha A, Thanseem I, Nakamura K, Matsuzaki H, Iwata Y, Yamamoto S, Suzuki K, et al. Serotonin transporter and serotonin related gene expression in autism. *The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience*, Washington, Nov17, 2008
3. Nakamura K, Miyachi T, Anitha A, Tsuji M, Suda S, Thanseem I, Tsuchiya K, Matsuzaki H, et al. Genetic and Expression Analyses of Serotonergic Factors in Autism. *The 8th Annual International Meeting For Autism Research*, Chicago, May, 2009
4. Suda S, Iwata K, Anitha A, Thanseem I, Matsuzaki H, Kameno Y, Nakamura K, Mori N, Takei N. Serotonin related gene expression changes in subjects with autism: A

postmortem brain study. *The Society for Neuroscience 39th annual meeting*, Oct19, 2009, Chicago, USA

5. Nakamura K, Ouchi Y, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, et al. Brain Serotonin and Dopamine Transporter Bindings in Adults with Autism. *The 9th annual International Meeting for Autism Research*, May21, 2010, Philadelphia, USA
6. Nakamura K, Iwata Y, Mori N, Sugihara G, Ouchi Y, Tsujii M, Sugiyama T, Tsuchiya KJ, Suzuki K, Matsuzaki H, Suda S, Takei N.: Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with autism. *The Society for Neuroscience 40th annual meeting*, Nov16, 2010, San Diego, USA.

〔図書〕（計〇件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計〇件）

○取得状況（計〇件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

アニータ・A・ピライ

(anitha ayappan pillai)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・特任助教

研究者番号：70377753

(2)研究分担者

松崎秀夫 (matsuzaki hideo)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・特任准教授

研究者番号：00334970

中村和彦 (nakamura kazuhiko)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80263911

辻井正次 (tsujii masatsugu)

中京大学・現代社会学部・教授

研究者番号：20257546

鈴木勝昭 (suzuki katsuaki)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・特任准教授

研究者番号：00285040

岩田圭子 (iwata keiko)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・特任助教

研究者番号：30415088

岩田泰秀 (iwata yasuhide)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10285025

宮地泰士 (miyachi taishi)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・特任助教

研究者番号：60444345

須田史朗

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・特任助教

研究者番号：40432207