

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16019

研究課題名（和文）カンナビノイドをツールとした自閉スペクトラムの画期的モデル動物の開発と治療研究

研究課題名（英文）Development of a novel animal model for autism spectrum disorder focusing on cannabinoid CB1 receptor

研究代表者

縄田 陽子（Nawata, Yoko）

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：00435140

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）：カンナビノイドCB1受容体遺伝子欠損（CB1KO）マウスは、社会的行動の障害、及び反復行動の増加を示し、自閉スペクトラム症（ASD）の中核症状を反映する行動変容を示した。また、同マウスはASDにおいて異常が報告されている血中オキシトシン及びコルチコステロン値の異常も示した。これらの結果に基づき、CB1KOマウスのASD様行動の回復を試みた。その結果、オキシトシン受容体作動薬またはコルチコトロピン放出因子（CRF）-1受容体拮抗薬は、CB1KOマウスのASD様行動を改善することが明らかになった。本研究成果により、CB1KOマウスの新規ASDモデルマウスとしての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで自閉スペクトラム症（ASD）のストレスシステム異常に基づく動物モデルは皆無であった。本研究成果によりカンナビノイドCB1受容体遺伝子欠損（CB1KO）マウスは、行動学的及び生化学観点からストレスシステム異常を示す新規ASDモデル動物となり得る可能性が示され、この点に本研究の学術的意義がある。また、オキシトシン受容体作動薬及び、コルチコトロピン放出因子（CRF）-1受容体拮抗薬はCB1KOマウスのASD様行動を改善することが明らかになった。中核症状に対する根本的治療薬がないASDにおいて、今後の有望な創薬ターゲットを提供出来た点に社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：We found that CB1KO mice demonstrated reduced sociability and elevated repetitive grooming behaviors compared to wild-type mice. We next measured serum corticosterone and serum/brain oxytocin, expected as biomarkers for ASD. As a result, serum corticosterone significantly increased in CB1KO mice. In contrast, both serum oxytocin were decreased in CB1KO mice. Based on these results, we next attempted to recover the autistic-like behaviors in CB1KO mice. Then, single administration of an oxytocin receptor agonist, or a type 1 corticotropin-releasing factor (CRF1) receptor antagonist, significantly ameliorated the decrease of sociability and elevated repetitive behaviors in CB1KO mice. Therefore, CB1KO mice could have potential as a novel ASD model mouse and provide possibilities of drug development for ASD using the oxytocin receptor agonist and CRF1 receptor antagonist.

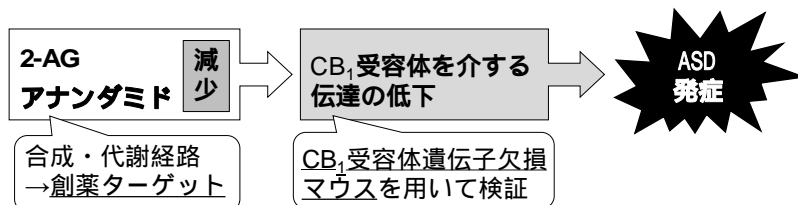
研究分野：CB1

キーワード：自閉スペクトラム症 動物モデル カンナビノイド オキシトシン コルチコステロン

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (**ASD**) は、社会性・コミュニケーションの質的な障害と興味の範囲の著しい限局性を主な特徴とする発達障害で、国内における有病率は高く **2.7%** もの高い有病率を有するとする報告もある。**ASD** の遺伝的要因をもとにいくつかの病態モデルが作製されているが、**ASD** の診断基準をすべて満たすものは少数であり、**ASD** の特定の症状モデルという位置づけに過ぎない。従って **ASD** の根本治療を目指す上において、より妥当性の高いモデル動物の創出が求められている。

大麻/マリファナは、世界中で広く乱用される薬物で、我が国では大麻取り締まり法により所持・使用が規制されているが、その一方、海外では医療用としていくつもの難病でその効果が確認されている。脳内では脳内大麻様物質 (エンドカンナビノイド) と呼ばれる内因性リガンドが存在し、主要なエンドカンナビノイドとして **2-AG** とアナンダミドが同定されている。カンナビノイド **CB₁** 受容体は脳内では最も多く存在する **G** 蛋白共役型受容体で、大麻やエンドカンナビノイドが作用する特異的な受容体として知られている。大麻乱用の目的の一つは社会性行動の向上効果が挙げられるが、近年 **ASD** 児の血中エンドカンナビノイド濃度が低下していることが明らかにされ、エンドカンナビノイドの低下が **ASD** 発症に関わる可能性が示されている。



2. 研究の目的

(目的)

本研究では、**ASD** の病態におけるエンドカンナビノイドの関与を明らかにすることを目的として以下の **3** 点を明らかにした。

CB1KO マウスが行動学的に **ASD** に類似する症状を表すか？

CB1KO マウスにおいて **ASD** 関連分子の発現異常が認められるか？

ASD 様行動に対して改善効果を有するリガンドはあるか？

および には **CB1KO** マウスの新規 **ASD** の病態モデルとしての妥当性を調べた。

また、 には **ASD** の新規薬物治療を見据え、将来的な治療薬候補を探索した。

2020-2022年度

CB₁受容体遺伝子欠損マウスの
ASDモデル動物としての検証実験

行動学的解析

- ・社会性行動
- ・反復行動
- ・不安様行動
- ・記憶・学習機能

生化学的解析

ASD関連分子の解析
(オキシトシン、
コルチコステロン)

2022-2023年度

新規ASD治療薬の探索

行動解析

オキシトシン、コルチコステロン
に関連するリガンドによるASD様行動
の改善効果の有無

3. 研究方法

ASDの中核症状を反映するマウスの行動変容は、**3-chambered social approach** 課題(社会的行動)及びホールボード試験(反復行動)にて評価した。ASDの併存症状として、不安様行動を高架式十字迷路試験、恐怖条件付け試験および、ホールボード試験にて評価した。また、同様に学習・記憶機能の障害は、**T**字迷路装置を用いた逆転学習課題および、**Y**字迷路試験により評価した(表)。一方、ASDのバイオマーカーとして示唆されているコルチコステロンおよびオキシトシンの血中濃度は、酵素免疫測定法(EIA)にて測定した。実験動物は、**CD1**(野生型;**WT**)マウスおよび、カンナビノイド**CB1**受容体ノックアウト(**CB1KO**)マウス(**CD1**バックグラウンド)を用いた。実験は、幼若期(6-7週齢)及び成熟期(9週齢以降)に分けて実施した。

マウスの行動試験(実験装置)	行動試験を反映するヒトでの症状	
3-chambered social approach課題 (3-チャンパー装置)	社会性・コミュニケーション能力の低下	中核症状
ホールボード試験 (ホールボード装置)	常同・繰り返し行動の増加	
高架式十字迷路試験 (高架式十字迷路装置)	不安の増加	併存症状
恐怖条件付け試験 (恐怖条件付け装置)		
ホールボード試験 (ホールボード装置)		
逆転学習試験 (T字迷路装置)	行動の切り替えが困難	
Y字迷路試験 (Y字迷路装置)	学習・記憶障害	

4. 研究成果

《2020年度》

2020年度は、**CB1KO**マウスが行動学的にASDに類似する症状を表すかを追究した。行動試験は、**3-chambered social approach**試験(社会性の評価)、高架式十字迷路試験および恐怖条件付け試験(不安水準の評価)ならびに、**Y**字迷路試験(記憶機能の評価)を実施した。実験動物は、幼若期(5-7週齢)と成熟期(9-20週齢)に分けて用いた。この結果、高架式十字迷路試験では、**CB1KO**マウスのオープンアームでの滞在時間は野生型マウスと比較し有意な増加が認められた。また、恐怖条件付け試験では、野生型マウスで認められるすくみ行動の発現は、**CB1KO**マウスにおいて有意に減弱した。次に、**Y**字迷路試験では、**CB1KO**マウスの交替行動は、野生型マウスと比較し有意に低下し、交替行動の障害が認められた。これらの**CB1KO**マウスの行動変容は、いずれも幼若期においてより顕著であった。一方、**3-chambered social approach**試験を用いた成熟マウスの社会的行動は、野生型マウスと**CB1KO**マウス間で有意な差は認められなかった。以上の結果から、**CB1KO**マウスでは、不安様行動の減弱が認められること、および短期記憶機能に障害がある可能性が示唆された。一方で我々は新奇物体探索試験における**CB1KO**マウスの物体再認知機能は、野生型マウスと差が認められないことを明らかにしている。今回実施した**Y**字迷路試験では、**CB1KO**マウスは固定のアーム間を行き来する行動を示したことから、**Y**字迷路試験での交替行動の減少は、一部のアームへの固執あるいは常同行動を表している可能性も考えられた。

《2021 年度》

2021 年度は、**CB1KO** マウスにおける **ASD** 様行動発現の有無を中心に研究を遂行した。その結果、幼若期の **CB1KO** マウスは、成熟期とは異なり、社会的行動の障害を示すことが明らかになった。また、幼若期および成熟期の **CB1KO** マウスは、ホールボード試験において反復行動の増加を示すことも分かった。さらに、**CB1KO** マウスでは同試験においてヘッドディッピング行動が有意に低下し、不安様行動の増加を示した。昨年度実施した高架式十字迷路試験の結果と合わせると、**CB1KO** マウスでは、情動行動の不安定さが認められることが分かった。

《2022 年度》

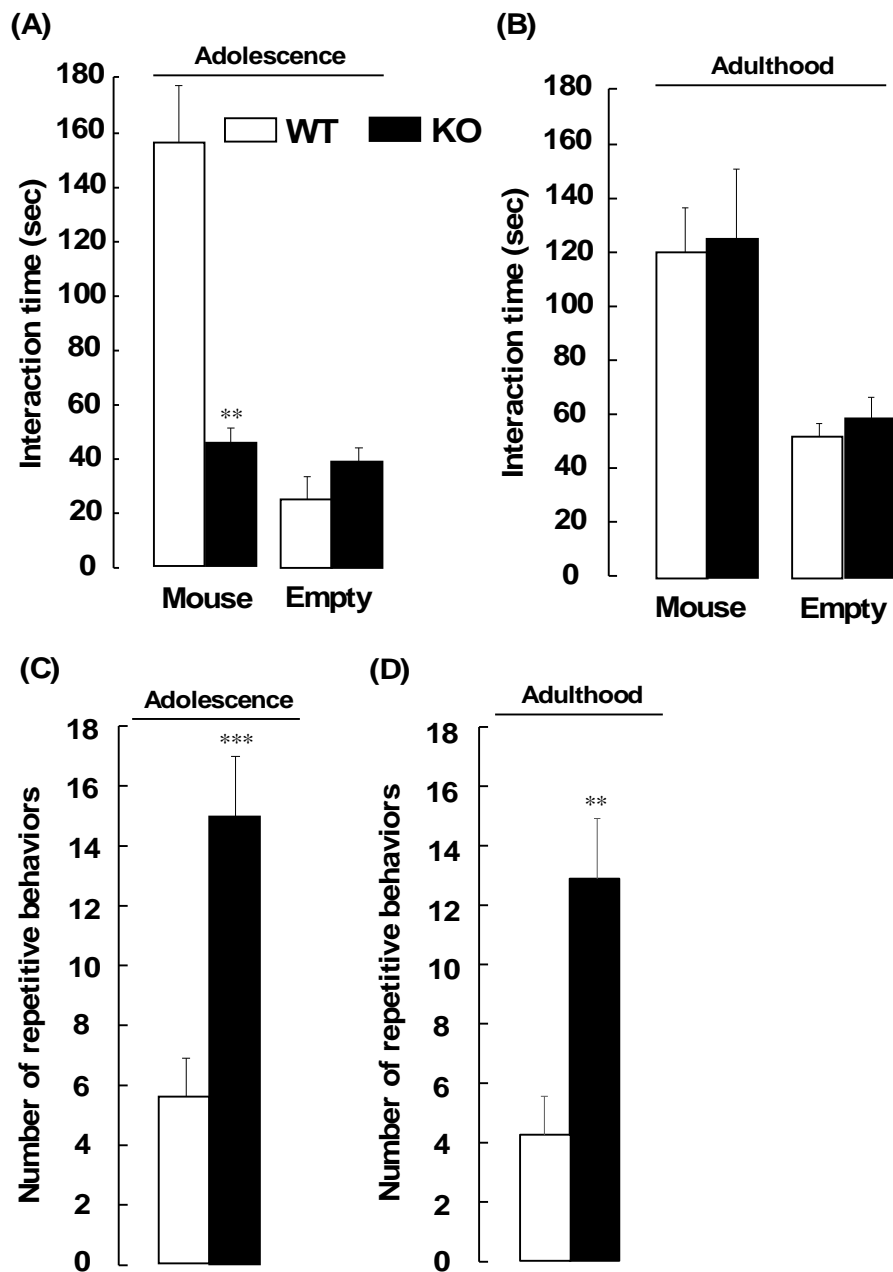
前年度までの検討により雄の **CB1KO** マウスは複数の **ASD** 様行動を示すことが明らかになった。ヒト **ASD** ではその発症に性差があることに着目して、2022 年度は、**CB1KO** マウスの **ASD** 様行動について、性差の有無を検討した。その結果、雌の **CB1KO** マウスは雄と同様に社会的行動の障害を示すが、この時期が雄とは異なることが明らかになった。また、雄において認められた反復行動の増加および短期記憶障害は、雌の **CB1KO** マウスでは認められなかった。このように、**CB1KO** マウスの **ASD** 様行動の発現には性差が認められることが明らかになった。次に、血中における **ASD** 関連因子の発現変容の有無の検討を行ったところ、**ASD** のバイオマーカーとしての可能性が示唆されているコルチコステロンおよびオキシトシンについて、異常値を示すことが明らかになった。

《2023 年度》

最終年度は、これまでに **CB1KO** マウスにおいて明らかになった **ASD** 様の血中変容に焦点をあて、これらの受容体リガンドによる **ASD** 様行動の改善効果の有無を検証した。その結果、オキシトシン受容体作動薬および、コルチコトロピン放出因子 1 型 (**CRF₁**) 受容体拮抗薬の単回投与は、**CB1KO** マウスの社会的行動、反復行動、および短期記憶障害を改善することが明らかになった。一方、グルココルチコイド受容体拮抗薬は、社会的行動を改善したが、反復行動は改善しなかった。

研究期間全体を通して、**CB1KO** マウスでは社会的行動の低下、及び反復行動の増加が認められ、**ASD** の中核症状を反映する行動変容を示すことが明らかになった。さらに、**ASD** のバイオマーカーとして期待されるオキシトシンやコルチコステロンに着目し測定したところ、**CB1KO** マウスでは血中オキシトシンの有意な低下、及びコルチコステロンの有意な増加が認められた。これらの変容に基づき、**CB1KO** マウスの **ASD** 様行動を改善するリガンドの探索を試みた。その結果、オキシトシン受容体作動薬、または **CRF₁** 受容体拮抗薬は、有意に **CB1KO** マウスの **ASD** 様行動を改善することが明らかになった。また、グルココルチコイド受容体拮抗薬は、一部の **ASD** 様行動に対して改善効果を示す事も明らかになった。本研究成果により、**CB1KO** マウスの新規 **ASD** モデルマウスとしての可能性、オキシトシン受容体作動薬、**CRF₁** 受容体拮抗薬やグルココルチコイド受容体拮抗薬を用いた将来的な **ASD** に対する新規治療薬開発の可能性が期待される。

《具体的研究結果》



(A, B) **CB1KO** マウス (幼若期) における社会的行動の障害。(C, D) **CB1KO** マウスにおける反復行動の増加。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nawata Yoko, Ooishi Rina, Nishioku Tsuyoshi, Yamaguchi Taku	4. 巻 456
2. 論文標題 Nalmefene attenuates reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in rats through group II metabotropic glutamate receptors (mGluR2/3)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 114708 ~ 114708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbr.2023.114708	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nawata Yoko, Nishioku Tsuyoshi, Yamamoto Tsuneyuki, Yamaguchi Taku	4. 巻 257
2. 論文標題 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) impairs cognitive function during withdrawal via activation of the arachidonic acid cascade in the hippocampus	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Drug and Alcohol Dependence	6. 最初と最後の頁 111139 ~ 111139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.drugalcdep.2024.111139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永野貴一, 山口拓, 西奥剛, 縄田陽子
2. 発表標題 選択的コルチコトロピン放出因子CRF1受容体拮抗薬はカンナビノイドCB1受容体遺伝子欠損マウスの自閉スペクトラム症様行動を改善する
3. 学会等名 第39回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 縄田陽子, 西奥剛, 山口拓
2. 発表標題 LIT-001, a non-peptide oxytocin receptor agonist, ameliorates autistic-like behaviors in cannabinoid CB1 receptor knockout mice
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会, 2023年12月
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nawata Y, Nishioku T, Yamaguchi T
2. 発表標題 Autistic-like behaviors mediated by the dysregulation of endocrine systems via oxytocin and corticosterone in cannabinoid CB1 receptor knockout mice
3. 学会等名 35th World Congress of International College of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 安作美香、縄田陽子、山口拓、西奥剛
2. 発表標題 カンナビノイドCB1受容体遺伝子欠損マウスにおける 自閉スペクトラム症モデル動物としての妥当性
3. 学会等名 第39回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 縄田陽子、安作美香、西奥剛、山口拓
2. 発表標題 カンナビノイドCB1受容体遺伝子欠損マウスにおける血清オキシトシンの低値と自閉スペクトラム症様行動の発現
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 縄田陽子、上野愛咲美、西奥剛、山口拓
2. 発表標題 嫌悪記憶の想起におけるエンドカンナビノイド分解酵素阻害薬の増強および抑制作用
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 縄田陽子, 上野愛咲美, 西奥剛, 山口拓
2. 発表標題 恐怖記憶の想起における脳内カンナビノイドによる制御機構
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 縄田陽子, 安作美香, 西奥剛, 山口拓
2. 発表標題 カンナビノイドCB1受容体遺伝子欠損マウスにおける社会性行動の低下
3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 縄田陽子, 安作美香, 西奥剛, 山口拓
2. 発表標題 カンナビノイドCB1受容体遺伝子欠損マウスにおける自閉スペクトラム症様行動の発現
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoko Nawata, Asami Ueno, Tsuyoshi Nishioku, Taku Yamaguchi
2. 発表標題 Bidirectional regulation by the endocannabinoid in retrieval of fear memory using the fear conditioning task in mice
3. 学会等名 The 94th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society
4. 発表年 2021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
研究協力者	山口 拓 (Yamaguchi Taku)		

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