

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07525

研究課題名(和文) ADHD合併自閉症のドーパミン神経回路障害の病態解明に基づく新規治療法の開発

研究課題名(英文) Dysfunction of dopaminergic circuits in a mouse model of autism comorbid with ADHD and its possible application to novel 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Kirrel3遺伝子はドーパミン(DA)神経回路に発現し、Kirrel3欠損(KO)マウスの前頭前皮質や腹側線条体ではDA量が増加していた。KOマウスはADHD合併ASD様行動を示すことから、ADHD治療薬の中枢刺激薬を投与したところ、多動の改善が見られず、KOマウスがADHD治療薬抵抗性であることが示唆された。一方、D2DA受容体(D2R)拮抗薬やD2Rの下流シグナルであるGSK3- $\beta$ の阻害薬の投与によりKOマウスでは多動が改善した。これらの結果から、KOマウスの治療薬抵抗性のADHD様行動は前頭前皮質や腹側線条体のDAの増加とそれによるD2Rシグナル亢進に起因する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

「ADHD合併ASD」モデルマウスであるKirrel3欠損マウスがADHD治療薬である中枢刺激薬に抵抗性であることを示した。このマウスのドーパミン神経系をHPLCや行動学的に解析した結果、前頭前皮質や腹側線条体のDAの増加とD2Rシグナル抑制によるADHD様行動(多動)の改善が見られた。本研究結果から、ドーパミン伝達系が低下していることが報告されている「ADHD単独罹患」とは異なり、中枢刺激薬治療抵抗性の「ADHD合併ASD」ではDAの増加やD2Rシグナル亢進がその病態形成に重要である可能性が示唆され、これらの病態に基づいた新規の治療戦略に繋がることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：The expression of Kirrel3 was detected in dopaminergic neuronal circuits. In Kirrel3-knockout (KO) mice, tissue dopamine (DA) levels were increased in the prefrontal cortex and ventral striatum compared to those of wild-type mice. When Kirrel3-KO mice, which exhibit ASD/ADHD-like behaviors, were treated with psychostimulants that increase DA and noradrenaline levels, ADHD symptoms could not be improved, suggesting that Kirrel3-KO mice were suitable for a mouse model of psychostimulants-resistant ADHD. In contrast, treatment of a DA receptor D2 (D2R) antagonist or a GSK3- $\beta$  inhibitor improved hyperactivity in Kirrel3-KO mice. These results suggest that activation of D2R signaling by increased DA may induce psychostimulants-resistant ADHD-like behaviors in Kirrel3-KO mice.

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 ドーパミン 前頭前皮質 シナプス接着分子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

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中樞神経系における発現解析を行い、Kirrel3 が脳において嗅球、線条体、大脳皮質、海馬、中脳、小脳等に広く発現していることを報告してきた (文献 1、2)。Kirrel3 欠損マウスの嗅覚・副嗅覚系と海馬を解析した報告から、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されているが、小脳や大脳皮質における役割は不明である。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ている (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 欠損マウスを作製し、その行動学的解析を行った結果、ASD 様行動と注意欠如・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

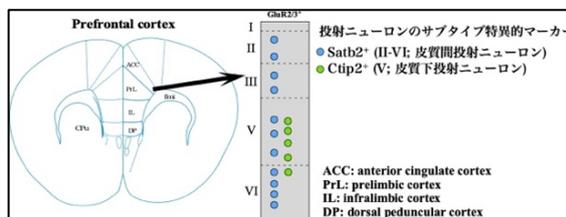
研究代表者らは、ASD のリスク遺伝子である Kirrel3 遺伝子の欠損マウスを ADHD 様行動を伴う ASD のモデルマウスとして確立し、その解析から、小脳シナプス部の形成異常に加えて、ADHD 治療薬で、ドーパミン (DA) やノルアドレナリン (NA) 増加作用のある中枢刺激薬に対する抵抗性を見出した。ADHD や ASD 患者において DA シグナル伝達を担う分子の遺伝子変異が報告されている (文献 10) が、その分子病態や小脳との関連性は大部分が不明である。本研究では、DA 神経回路における Kirrel3 の役割を明らかにし、Kirrel3 の欠損による DA 神経回路の制御異常と ADHD 様行動を伴う ASD 様の行動との関連を解析することによりその分子病態を解明し、病態に基づく新規治療法の開発へと繋げることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 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量の測定: 成獣の野生型、及び Kirrel3 欠損マウスの前頭前皮質、線条体、小脳、中脳等のセロトニン、DA、NA とその代謝産物量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。

(2) 成獣マウスの前頭前皮質 (PFC) における 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 ヘテロ欠損/LacZ 遺伝子導入マウスの前頭前皮質において、抗  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) 抗体と、ニューロン (NeuN)、興奮性投射ニューロン (イオンチャンネル型グルタミン酸受容体 2/3; GluR2/3)、皮質間投射ニューロン (Satb2)、皮質下投射ニューロン (Ctip2) のマーカー (図 1) に対する抗体との蛍光二重免疫染色を行った。

図 1 前頭前皮質の領域と投射ニューロンのサブタイプ特異的マーカー。ACC, 前帯状皮質; DP, 背側脚皮質; IL, 下辺縁皮質; PrL, 腹側前辺縁皮質。



(3) 薬剤投与による行動異常の改善の検討

① 中枢刺激薬 (シナプス間隙での DA・NA 増加作用) 投与: 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 (DA・NA の放出促進) 1 mg/kg、及びメチルフェニデート (DA・NA 再取り込み阻害) 0.5 mg/kg を腹腔内投与し、ADHD 様行動異常 (多動) の改善をオープンフィールドテストでの移動距離を指標として検討した。

② D2 型 DA 受容体 (D2R) シグナル阻害薬の投与: 野生型、及び Kirrel3 欠損マウスに D2R 拮抗薬のハロペリドール 0.05 mg/kg、及び D2R の下流のシグナル伝達経路の GSK3- $\alpha/\beta$  の阻害薬のリチウム 100 mg/kg を腹腔内投与し、多動の改善を (3) ① と同様に検討した。

## 4. 研究成果

(1) 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量の測定

成獣の野生型、及び Kirrel3 欠損マウスの PFC、腹側線条体 (側坐核)、背側線条体、小脳、中脳等の組織中のセロトニンや DA 量を HPLC により測定した。その結果、Kirrel3 欠損マウスの PFC と腹側線条体 (側坐核) においてのみ、野生型と比べて DA と DA 代謝産物の DOPAC が増加していた。

(2) 成獣マウスの PFC における Kirrel3 遺伝子発現細胞の同定

① HPLC により、Kirrel3 欠損マウスの PFC の DA 量が異常であったことから、PFC における Kirrel3 発現細胞を同定するために、Kirrel3 ヘテロ欠損/LacZ 遺伝子導入マウスで  $\beta$ -gal と NeuN に対する抗体による二重蛍光免疫染色を行った。PFC の Kirrel3 発現細胞は全て NeuN 陽性のニューロンで、その大部分は腹側前辺縁皮質、下辺縁皮質、背側脚皮質に分布していた (図 2)。

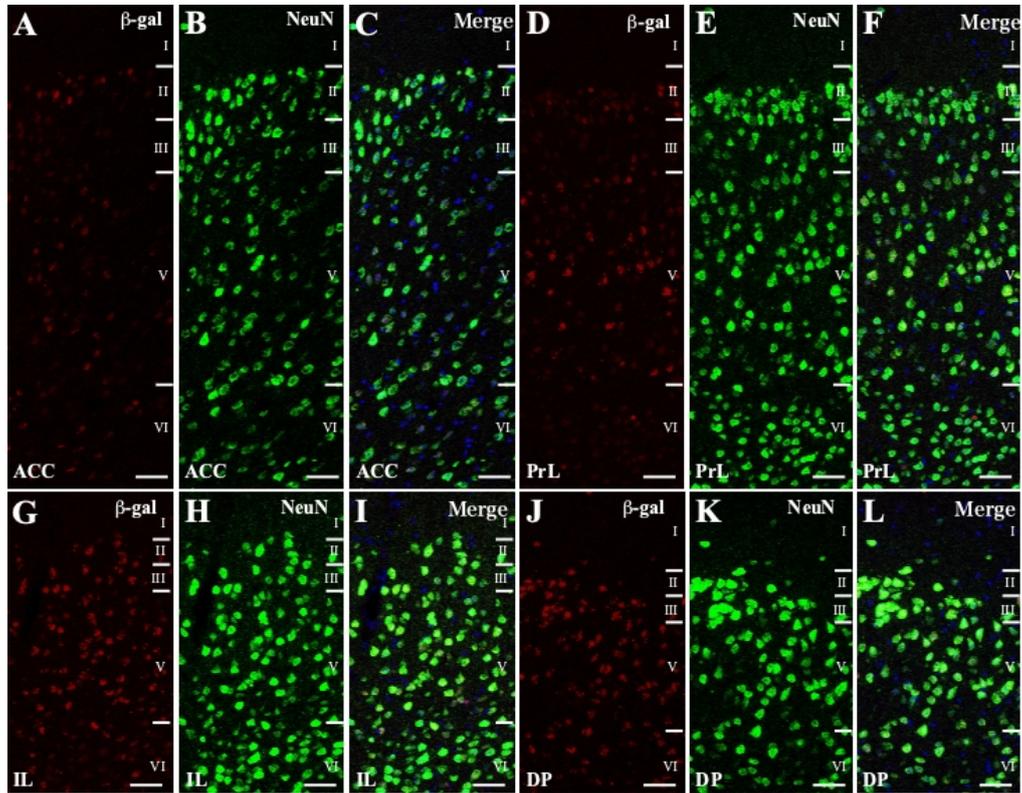


図2 Kirrel3ヘテロ欠損/LacZ遺伝子導入マウスの前頭前皮質における $\beta$ -galとNeuNとの二重蛍光免疫染色像。前帯状皮質(A-C)、腹側前辺縁皮質(D-F)、背側脚皮質(G-I)、及び下辺縁皮質(J-L)の冠状断における $\beta$ -gal(A,D,G,J: 赤)とNeuN(B,E,H,K: 緑)の染色像。C,F,I,Lは各々、AとB、DとE、GとH、JとK、及び核染色(DAPI: 青)の重ね合わせ画像。ACC, 前帯状皮質; DP, 背側脚皮質; IL, 下辺縁皮質; PrL, 腹側前辺縁皮質。Scale bars: 50 $\mu$ m。

② $\beta$ -galとGluR2/3に対する抗体による二重蛍光免疫染色を行った。Kirrel3発現細胞は、PFCの腹側前辺縁皮質の2層と5層、下辺縁皮質・背側脚皮質の2~5層に広く発現し、ほとんどがGluR2/3陽性(図3)であったことから、Kirrel3は主に興奮性投射ニューロンに発現していることが示唆された。

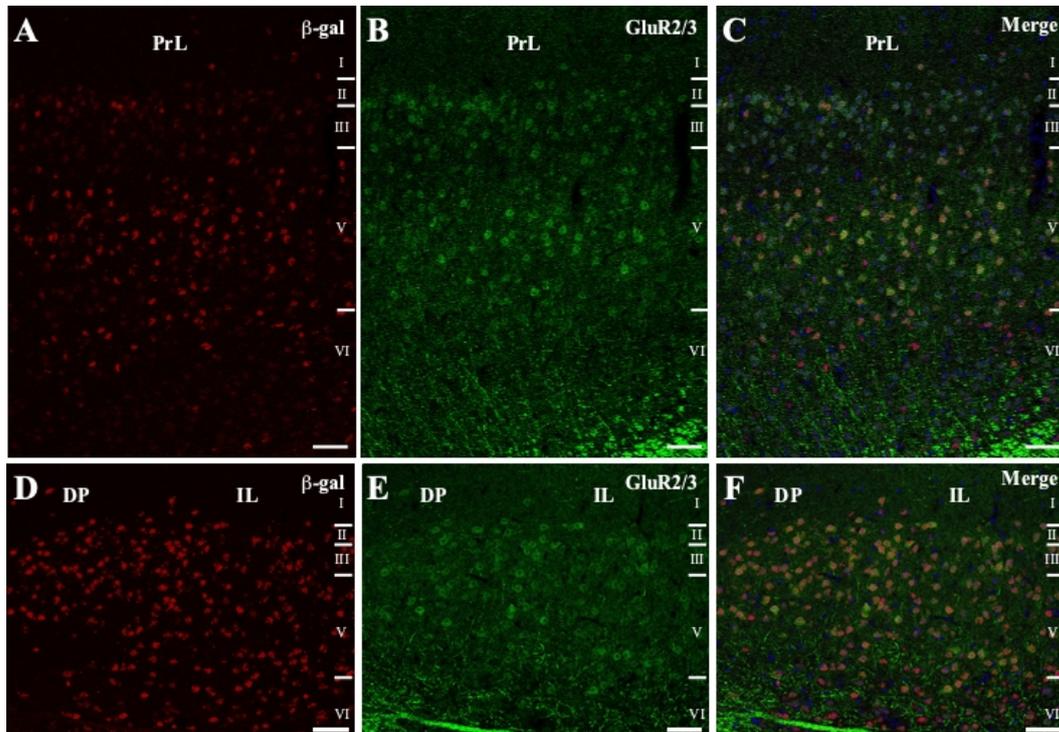


図3 Kirrel3ヘテロ欠損/LacZ遺伝子導入マウスの前頭前皮質における $\beta$ -galとGluR2/3との二重蛍光免疫染色像。腹側前辺縁皮質(A-C)と背側脚皮質・下辺縁皮質(D-F)の冠状断における $\beta$ -gal(A,D: 赤)とGluR2/3(B,E: 緑)の染色像。C,FはAとB、DとE、及び核染色(DAPI: 青)の重ね合わせ画像。DP, 背側脚皮質; IL, 下辺縁皮質; PrL, 腹側前辺縁皮質。Scale bars: 50 $\mu$ m。

③Kirrel3 の発現が認められた 2~5 層の投射ニューロンは、投射先により皮質間投射ニューロンと皮質下投射ニューロンに分類される。これらのサブタイプ特異的マーカー (Satb2、及び Ctip2) と  $\beta$ -gal に対する二重蛍光免疫染色を行った結果、Kirrel3 は 2~5 層の Satb2 陽性の皮質間投射ニューロンに少数発現していた (図 4) が、主に 5 層の Ctip2 陽性の皮質下投射ニューロンに発現していた (図 5)。

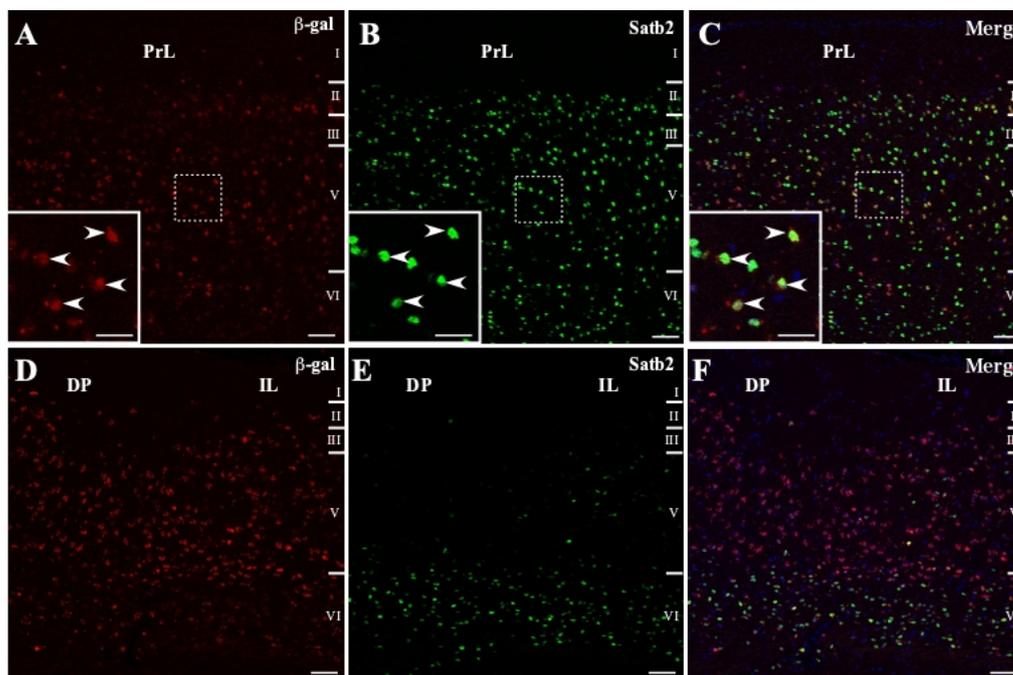


図 4 Kirrel3ヘテロ欠損/LacZ遺伝子導入マウスの前頭前皮質における $\beta$ -galとSatb2との二重蛍光免疫染色像。腹側前辺縁皮質(A-C)と背側脚皮質・下辺縁皮質(D-F)の冠状断における $\beta$ -gal(A,D: 赤)とSatb2(B,E: 緑)の染色像。C,Fは各々、AとB、DとE、及び核染色(DAPI: 青)の重ね合わせ画像。パネルA-Cのインセットは各々、点線で囲ったエリアの拡大像を示す。矢尻は $\beta$ -galとSatb2二重陽性細胞(C,F: 黄色)。背側脚皮質・下辺縁皮質ではSatb2陽性細胞は主に6層に見られ、2~5層の $\beta$ -gal陽性細胞にはほとんど発現が見られなかった。DP, 背側脚皮質; IL, 下辺縁皮質; PrL, 腹側前辺縁皮質。Scale bars: 50 $\mu$ m; 25 $\mu$ m (insets)。

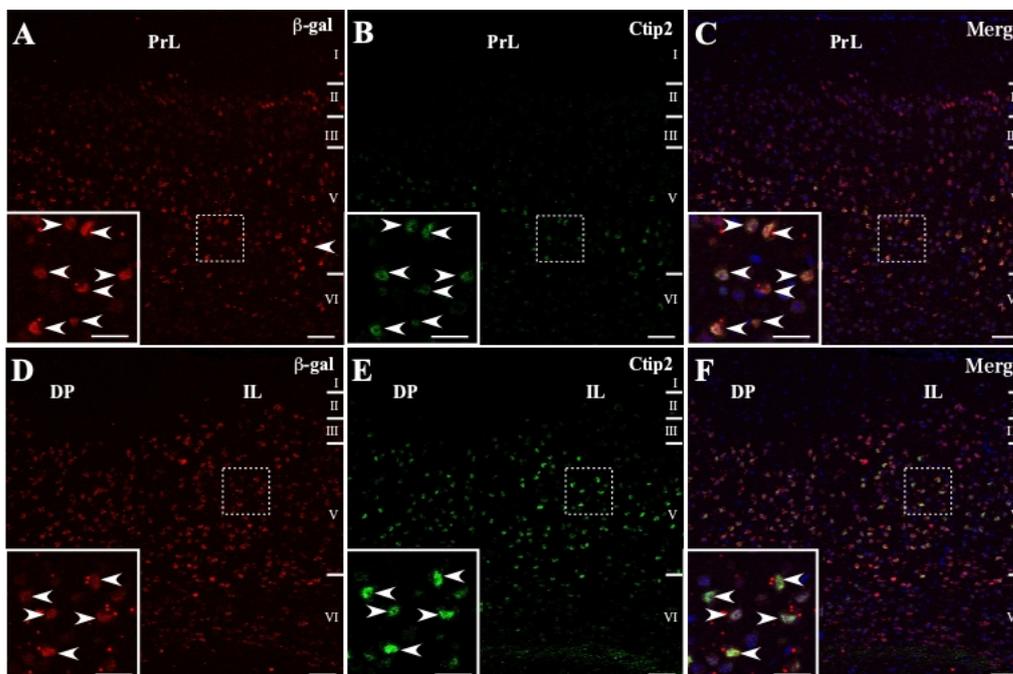


図 5 Kirrel3ヘテロ欠損/LacZ遺伝子導入マウスの前頭前皮質における $\beta$ -galとCtip2との二重蛍光免疫染色像。腹側前辺縁皮質(A-C)と背側脚皮質・下辺縁皮質(D-F)の冠状断における $\beta$ -gal(A, D: 赤)とCtip2(B, E: 緑)の染色像。C, Fは各々、AとB、DとE、及び核染色(DAPI: 青)の重ね合わせ画像。パネルA-Fのインセットは各々、点線で囲ったエリアの拡大像を示す。矢尻は $\beta$ -galとCtip2二重陽性細胞(C, F: 黄色)。DP, 背側脚皮質; IL, 下辺縁皮質; PrL, 腹側前辺縁皮質。Scale bars: 50 $\mu$ m; 25 $\mu$ m (insets)。

(3)成獣 Kirrel3 欠損マウスの行動学的解析 (薬剤投与による多動の改善の検討)

①中枢刺激薬：メタンフェタミン、及びメチルフェニデートを Kirrel3 欠損マウスの腹腔内に投与し、多動が改善するかをオープンフィールドテストの移動距離を指標として検討したところ、野生型と同様に Kirrel3 欠損マウスにメタンフェタミン、及びメチルフェニデートを投与した群は、非投与群と比べて移動距離が増加し、多動の改善が見られなかった。  
 ②D2R シグナル阻害薬：ハロペリドール、及びリチウムを投与し、①と同様に多動の改善を検討した。野生型ではハロペリドール、及びリチウム非投与群と比べて移動距離に差は見られなかったが、Kirrel3 欠損マウスでは、ハロペリドール、及びリチウム投与により移動距離の有意な減少が見られ、多動が改善した。

以上より、ASD 様行動と ADHD 様行動 (多動と新規物体認識行動低下) を示す Kirrel3 欠損マウスに、ADHD 治療薬である中枢刺激薬のメタンフェタミンやメチルフェニデートを投与した結果、多動の改善が見られなかった (図 6 a) ことから、Kirrel3 欠損マウスが ADHD 治療薬抵抗性であることが確認された。次に、D2R シグナル阻害薬のハロペリドールやリチウムを投与した結果、多動の改善が見られた (図 6 b)。また、Kirrel3 遺伝子は中脳の DA ニューロンから投射がある PFC の投射ニューロンや腹側線条体に発現し、Kirrel3 欠損マウスの PFC や腹側線条体では DA やその代謝産物量が増加していた (図 6 c)。これらの結果から、Kirrel3 欠損マウスでは中枢刺激薬の効果がある「ADHD 単独罹患」で報告されている PFC の DA 伝達系の低下 (図 6 d) とは異なり、DA の増加とそれによる D2R シグナル亢進が ADHD 様行動を惹起している可能性が示唆された。ASD に ADHD が合併すると ADHD 治療薬抵抗性の患者 (図 6 e) の割合が ADHD 単独罹患に比べて増加することが報告されていることから、本研究結果が ADHD 合併 ASD の新規の治療 (図 6 f) に繋がることを期待できる。

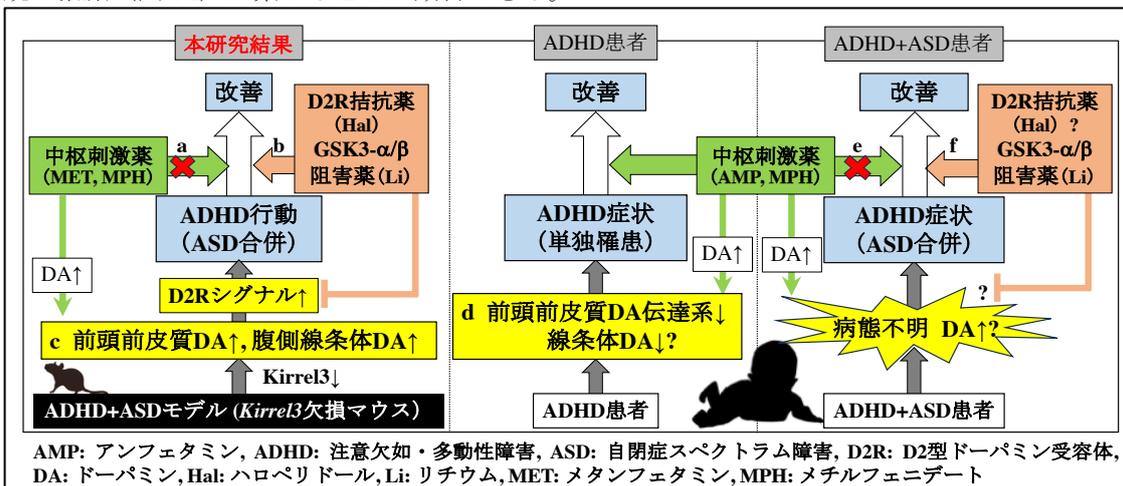


図 6 ADHD 合併 ASD の中枢刺激薬治療抵抗性の分子病態

<引用文献>

1. Tamura S *et al.*, Neuroscience 133, 615-624 (2005)
2. Hisaoka T *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 563, 66-72 (2021)
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. Pavál D., Dev Neurosci 39, 355-360 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久岡朋子、小森忠祐、森川吉博
2. 発表標題 Immunofluorescence characterization of Kirrel3-expressing cells in the prefrontal cortex
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術研究会・第66回日本神経化学会大会合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久岡朋子、小森忠祐、森川吉博
2. 発表標題 自閉症関連遺伝子Kirrel3の小脳バスケット細胞軸索分岐における役割
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 久岡朋子、小森忠祐、森川吉博
2. 発表標題 自閉症関連遺伝子Kirrel3の内側前頭前野における発現
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023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 成獣マウスの大脳皮質ニューロンにおける自閉症関連遺伝子Kirrel3の発現解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022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	森川 吉博  (MORIKAWA Yoshihiro)	和歌山県立医科大学・解剖学第2講座・教授  (24701)	
研究協力者	小森 忠祐  (KOMORI Tadasuke)	和歌山県立医科大学・解剖学第2講座・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
---------	---------