

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791013

研究課題名（和文） 社会的相互作用障害における脳内ヒストン修飾作用の関与

研究課題名（英文） Involvement of social interaction deficits and histone modification in brain

研究代表者

水間 広 (MIZUMA HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・分子プローブ機能評価研究チーム・研究員

研究者番号：00382200

研究成果の概要（和文）：

小児自閉症の特徴の一つである社会的相互作用障害と脳内ヒストン修飾作用による遺伝子発現調節機構との関連性について調べるため、ヒストン修飾作用の一つであるアセチル化修飾に着目し、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の生後発達に伴う変化を PET で測定した。その結果、脳内における HDAC 活性の局在を確認し、また、幼若期から成熟期にかけて増加することが確認された。本研究では脳内でのヒストン修飾作用を可視化することに成功し、将来、ヒト研究へと応用され社会的相互作用障害との関連性を明らかにすることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Social interaction deficits are one of the major characteristics in autism. To investigate the relationship between social interaction deficits and histone modification in brain, we measured the developmental changes in histone deacetylation in the rat brain by positron emission tomography (PET) imaging using with 6-([¹⁸F]-fluoroacetamide)-1-hexanoicanilide ([¹⁸F]FAHA). A gradual increase in brain uptake of [¹⁸F]FAHA was observed from infantile to adult period in parallel with acquisition of social interaction skills. The regional uptake of [¹⁸F]FAHA showed higher uptake in the cerebral cortex and striatum than that in other brain regions. These results indicate that [¹⁸F]FAHA-PET imaging could be visualize *in vivo* histone deacetylation and might be helpful for monitoring HDAC activity in human study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：PET、ヒストン脱アセチル化、小児自閉症、社会的相互作用、ラット

1. 研究開始当初の背景

小児自閉症は、1) 社会的相互作用の質的な障害、2) 言語性および非言語性のコミュ

ニケーション能力の質的な障害、3) 限局された行動および興味を特徴とする広汎性発達障害のひとつに分類されている。1000人に

約 1 人の割合で発症し、男女比が 4:1 と男児に多く見られる。しかしながら、発症の原因については依然不明であり、決定的な治療法も確立されていない。

近年、抗けいれん薬、抗躁病薬として使用されているバルプロ酸 (VPA) が、小児自閉症の新しいモデル動物を作製する薬剤として注目を集めている。このモデル動物は、VPA を服用した妊婦から産まれた子供の中に小児自閉症を高率に発症するという臨床報告を受けて開発されたもので、妊娠ラットに VPA を投与することにより曝露された胎児が、生後に社会性行動異常を生じるとの報告がある。

VPA には、ヒストン修飾に関連するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害作用があることが明らかにされているが、このヒストン修飾作用による遺伝子転写制御機構は、アルツハイマー病、ハンチントン病など様々な神経変性疾患に関与していることが報告されている。また、マウスを用いた研究から社会的挫折、すなわち他者による恐怖ストレス環境に曝した場合、ヒストンのアセチル化修飾が側坐核で促進し、関連酵素の HDAC 2 型の発現が低下することから、社会性行動におけるモノアミン神経系の異常発現にも、HDAC を介したヒストン修飾が密接に関係していることが予想される。

本研究では、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の特異的阻害剤を短半減期核種であるポジトロンでラベル化し、Positron Emission Tomography (PET) 法による自閉症の HDAC イメージングの可能性を探る。

2. 研究の目的

本研究ではヒストン修飾作用の一つであるヒストン脱アセチル化に着目し、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の特異的阻害剤をラベル化した PET トレーサーを用いて、非侵襲的 *in vivo* イメージングを行い、*in vitro* および *in vivo* の両面から PET トレーサーの HDAC に対する特異性および選択性を調べ、また、生後発達期における脳内脱アセチル化の変化を観ることにより、将来の小児自閉症患者における PET イメージング研究に活用するための基礎データを得る。

3. 研究の方法

1) PET トレーサーの HDAC アイソザイムに対する特異性および選択性

本研究で使用する PET トレーサーには、ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害剤である suberoyl-anilide hydroxamic acid (SAHA) の誘導体である 6-([¹⁸F]-fluoroacetamide)-1-hexanoicanilide にフッ素 18 (¹⁸F) を標識した化合物 ([¹⁸F]FAHA) を用いた。

[¹⁸F]FAHA の脳組織中にある HDAC との特異性

および選択性を確認するために、*in vitro* オートラジオグラフィ法を実施した。ラット脳組織の凍結切片を作製し、1 nM 濃度の [¹⁸F]FAHA を切片に添加し、HDAC 阻害剤である SAHA、M344、MS-275、および MC1568 をそれぞれ 10 μM 濃度で加え、インキュベーションした。その後、イメージングプレートに露光し、画像を取得した。

2) *in vivo* での脳内 HDAC 酵素活性定量

1.5%イソフルレン麻酔下のラットの尾静脈内に [¹⁸F]FAHA を投与し、投与後 30 分間の PET によるスキャンを実施し、同時に大腿動脈から動脈採血を行った。脳画像および動脈血のガンマ線カウントより得られた放射能時間曲線から patlak plot 法による動態解析を行った。

3) [¹⁸F]FAHA の発達に伴う脳内変化

対象には Wistar 系雄性ラットを用い、幼若、青年、成熟および老齢期 (4, 8, 24 および 96 週齢) の 4 つの実験群に分け、脳内 HDAC 活性を測定するため、1.5%イソフルレン麻酔下にて PET トレーサーである [¹⁸F]FAHA を尾静脈内に投与した。 [¹⁸F]FAHA 投与と同時に 60 分間の脳 PET スキャンを実施した。また、PET 測定後に脳を摘出し、2 mm 厚の冠状切片を作製し、イメージングプレートにて 20 分間露光し、 [¹⁸F]FAHA の詳細な局在を *ex vivo* オートラジオグラフィ法を実施した。得られた画像から大脳皮質、線条体、海馬、視床、脳幹、および小脳に対し関心領域を設定し、定量解析した。

4. 研究成果

1) PET トレーサーの HDAC アイソザイムに対する特異性および選択性

脳組織凍結切片への [¹⁸F]FAHA の添加により、脳の広範囲に結合することが明らかとなった。また、HDAC 阻害剤を用いた阻害実験の結果、SAHA、M344 および MC1568 にて阻害が認められ、特に SAHA および M344 での阻害が顕著であったことから、HDAC アイソザイムのうち、特に HDAC6 に対し選択的に結合することが明らかとなった。

2) *in vivo* での脳内 HDAC 酵素活性定量

動脈採血による入力関数および脳組織中の集積データをもとに [¹⁸F]FAHA の patlak plot 解析を行った結果、投与直後から 2 分、投与後 2 分から 10 分、そして投与後 10 分以降の 3 つの時間帯で異なる slope を抽出し、この中で投与後 2 分から 10 分までの slop が酵素反応に伴う成分であることが考えられた。

3) [¹⁸F]FAHA の発達に伴う脳内変化

生後4週齢である幼若期での脳内における¹⁸F]FAHAの集積は、海馬、線条体および視床で高値を示し、大脳皮質、脳幹部および小脳では低値を示した。その後も8週齢、24週齢と全ての領域で増加し、24週齢でピークを迎え、96週齢である老齢期では減少に転じ、その傾向は全ての領域で確認された(図1)。

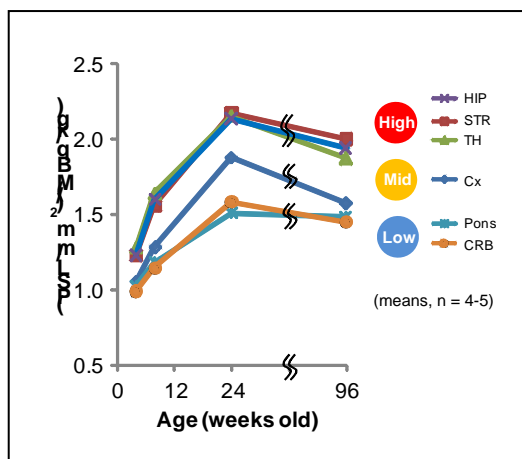


図1. 発達に伴うラット脳内への¹⁸F]FAHAの集積

これらの結果から、¹⁸F]FAHAによるHDACの酵素活性イメージングに成功し、また、脳内における¹⁸F]FAHAの集積は、HDAC阻害剤による阻害実験からHDAC6に高い選択性を示した。さらに、げっ歯類であるラットのみならず、霊長類であるマカクサルでも¹⁸F]FAHA-PET実験を行い、9か月齢、30か月齢、そして80か月齢での脳内変化を確認した。その結果、発達に伴い¹⁸F]FAHAの増加が脳の多くの領域で確認され、ラットとは異なり、大脳皮質が高く、特に前頭前野では幼若期で高値であることが判明した。

今後は、これらの基礎データをもとに、将来、ヒトのイメージング、特に発達期や小児自閉症患者へのイメージング研究へと応用されることが期待される。

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1件)

- ① Yeh HH, Tian M, Hinz R, Young D, Shavrin A, Mukhopadhyay U, Flores LG, Balatoni J, Soghomonyan S, Jeong HJ, Pal A, Uthamanthil R, Jackson JN, Nishii R, Mizuma H, Onoe H, Kagawa S, Higashi T, Fukumitsu N, Alauddin M, Tong W, Herholz K, Gelovani JG. Imaging epigenetic regulation by histone

deacetylases in the brain using PET/MRI with (18)F-FAHA. *NeuroImage*. 64(1): 630-639, 2103. (査読有り)

[学会発表] (計5件)

- ① Nishii R, Mizuma H, Kagawa S, Yamanaka H, Tachibana A, Takahashi K, Higashi T, Gelovani JG, Onoe H. Activity-related changes in brain HDAC with [F-18]FAHA PET in rats and monkeys. SNM2011, 58th Annual Meeting of Society of Nuclear Medicine, San Antonio, TX, USA, Jun. 4-8th, 2011.
- ② 西井龍一, 水間広, 加川信也, 立花晃子, 大野正裕, 平尾有日子, 高橋和弘, 東達也, 長町茂樹, 川井恵一, 田村正三, Juri G Gerovani, 尾上浩隆: 脳内ヒストン脱アセチル化酵素活性の脳神経活動に伴う変化: ¹⁸F]FAHAを用いた検討. 第6回日本分子イメージング学会, 神戸, 平成23年5月26, 27日.
- ③ 水間広, 西井龍一, 加川信也, 立花晃子, 大野正裕, 平尾有日子, 高橋和弘, 東達也, Juri G Gelovani, 尾上浩隆: 脳内ヒストン脱アセチル化酵素活性の発達に伴う変化: ¹⁸F]FAHAを用いた検討. 第6回日本分子イメージング学会, 神戸, 平成23年5月26, 27日.
- ④ Nishii R, Mizuma H, Kagawa S, Tachibana A, Takahashi K, Yamanaka H, Higashi T, Gelovani JG, Onoe H. Activity-related Changes in Brain HDAC using [18F]FAHA PET in Rats and Monkeys. World Molecular Imaging Congress 2010, Kyoto, Japan, Sep. 8-11th, 2010.
- ⑤ Mizuma H, Nishii R, Kagawa S, Tachibana A, Takahashi K, Tamura Y, Higashi T, Gelovani JG, Onoe H. Developmental changes in brain HDAC activity in rodents and non-human primates measured by ¹⁸F]FAHA-PET. SNM2010, 57th Annual Meeting of Society of Nuclear Medicine, Salt Lake City, UT, USA, Jun. 5-9th, 2010.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

[受賞]

SNM Poster Award Neurosciences Track
Second Place. Developmental changes in
brain HDAC activity in rodents and
non-human primates measured by
[¹⁸F]FAHA-PET. 57th Annual Meeting of
Society of Nuclear Medicine. Jun. 5th-9th,
2010.

[http://www.cmis.riken.jp/news/2010/1006
mizuma.html](http://www.cmis.riken.jp/news/2010/1006mizuma.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水間 広 (MIZUMA HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・分子プローブ機
能評価研究チーム・研究員

研究者番号：00382200