

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591519

研究課題名(和文) 選択的注意能の発達に及ぼす脳由来神経栄養因子の役割と自閉症発症への関与

研究課題名(英文) The role of bdnf on the development of the nervous system of selective-attention: from view points related to autistic spectrum disorders

研究代表者

福光 秀文 (Fukumitsu, Hidefumi)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00308280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害(ASD)では、脳由来神経栄養因子(BDNF)のシグナル遺伝子が病態発症の危険因子として考えられている。ASDは社会適応の障害を主症状とする。
 bdnf^{+/-}マウスでは、社会性行動が低下し、他者認識に重要な役割を持つ頬ひげの触覚系において、識別機能は低下しないが、情報学習の障害が認められた、軽度ストレスに対する情動応答が亢進していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Several signaling-molecule genes for brain-derived neurotrophic factor (bdnf) have been known as risk factors of autistic spectrum disorders and the social-related behavioral abnormalities. In this study, we found that significant deficits in the social behaviors of bdnf heterozygous knock out (bdnf^{+/-}) mice. Further investigations revealed that whisker tactile sensation, important for social behaviors, were comparable in bdnf^{+/-} and wild-type mice; however bdnf^{+/-} mice had learning disabilities of whisker-cued maze task and that hyperactivities in limbic systems of bdnf^{+/-} mice were significantly increased comparing to those of wild-type when induced by height-stress. These functional abnormalities in the brain would affect the social behavior of bdnf-deficient mice.

研究分野：神経科学

キーワード：脳由来神経栄養因子 選択的注意 情動機能 自閉症スペクトラム障害

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害は社会適応に問題があり、患者は社会的な自立に困難さを伴う。罹患率は人口の約1-2%。近年増加傾向にあり、現代社会における大きな問題となっている。社会適応は複合的な脳機能であり、様々な脳領域の機能失調が臨床症状と関連付けて説明されてきた。しかし、病態の中核をなす神経科学的な変化は不明であり、治療薬開発のための障壁となっている。自閉症児は母親が提示した情報に対して、選択的に注意を向けることができない。このことは乳児と母親の間で育まれる対人関係の基礎がうまく形成されないことを意味する。つまり、選択的注意能の失調は初期の中核症状として、社会適応能に関わる広範な脳領域の発達に影響する可能性がある。選択的注意には前頭葉を含む大脳皮質が重要な役割を果たすが、その根底にある分子基盤はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

一般に特定の脳機能は活動性の高い神経回路のシナプス結合が強化されて発達する。この現象を支える分子が脳由来神経栄養因子(BDNF)である。BDNFは活動性の高い神経細胞で合成され、シナプス形成を促進するタンパク質である。したがって、BDNFは広汎な脳機能に関わり、自閉症病態の鍵を握る分子であると考えられている。実際に、BDNFの遺伝子変異だけでなく、その発現を抑制するMECP2や分泌を促進するCADPSの遺伝子変異も自閉症の発症リスクを高めることが知られている。

本研究では、選択的注意能発達に及ぼすBDNFの役割、その機能失調がマウスの適応能の発達に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究の実施にあたり、岐阜薬科大学のバイオセーフティー委員会および動物飼育・動物実験委員会の審査・承認を得て、以下のとおり実験を行った。

(1) 記憶学習試験

金網注意(wire net attention: WNA)タスク
8方向放射状迷路の4つのアームの両側に金網をかけ、その4アームのみにエサを置く。初日にマウスを装置へ馴化させた後、1日1回マウスを放し装置内を自由に探索させ、行動を観察した。なお、エサを報酬として使用するため、給餌を行動試験終了後2時間のみに制限した。

頬ひげ触覚認知能試験 (gap-crossing test)
直方体の2つの箱を用意し、一方の箱の上に試験マウス、もう一方に餌を置き、隙間のない状態で、他方に移ると餌を獲得できることを学習させる。その後、2つの箱を離して設

置することで隙間 (gap) を作り、マウスに再度同様の施行を行わせる。マウスは餌を求め gap に近づき、頬ひげを使い gap の幅をはかり、とびこえられると判断すると gap をこえて反対側に向かう。跳躍を成功するたびに gap 幅を 0.5 cm 間隔で広げていき、施行を継続する。連続 2 試行で跳躍を失敗したとき、1 つ前の施行で跳び越えた間隔を最大跳越距離と定義し、頬ひげの触覚機能評価の指標として用いる (頬ひげの機能が低下したマウスは身体的に跳躍可能な間隔でも、跳び越えようとしない)。

ERK1/2 のリン酸化の阻害による WNA タスクへの影響

WNA タスク 3 日目あるいは 12 日目に MEK 阻害剤である SL327 (50mg/kg) を腹腔内投与した。その 1 時間後に WNA タスクを課し、行動を観察した。

(2) 社会性関連行動試験

社会優位性試験 (social dominance tube test)
攻撃性に基づく社会優位性 (階層性) を評価する試験として汎用されている tube test を用いて評価した (Hahn and Schanz, 1996)。装置は直径 3.5 cm、長さ 30 cm の円筒である。まず、マウスを装置に慣れさせるため装置内を 2 分間自由に探索させる。慣らしの終了したペアの 2 匹のマウスを両端の区画にそれぞれ 1 匹ずつ入れる。2 匹のマウスを装置内に入れた後、仕切り板を外すと、マウスはお互いに近づき接触する。社会優位性の高いマウスは相手のマウスを装置の外まで押し出すことが知られている。仕切り板をはずしてから 2 分以内に装置から 4 本の肢がでたマウスを「負け」、装置内にとどまったマウスを「勝ち」とし、2 分以内に両方のマウスが装置からでてこなかった場合「引き分け」とする。この試行を 1 ペアにつき 2 回ずつ行い、各群の勝率を計算し、社会優位性の指標として評価した。

社会相互作用試験 A (social interaction test A)

装置は天板のない直方体の箱 (60 cm、60 cm、20 cm) である。被験マウスおよび被験マウスと同系統、同性、同週齢で体重差が 0.1 % 未満でありかつ初対面であるプローブマウスを同時に装置中央に解き放ち自由に装置内を 10 分間探索させた。通常マウスは初対面のマウスに対して興味を持ち、匂いかぎや後追いなどの社会性行動を示す。これらの行動時間を社会行動時間と定義し、10 分間における被験マウスのプローブマウスに対する社会行動時間を測定した。

社会相互作用試験 B (social interaction test B)

社会性相互作用試験 A で用いた装置の 4 隅の内、対角となる 2 隅に網籠 (半径 5 cm、

高さ 15 cm) を設置してあるものを使用した。まず、2 つの網籠に何もいれずに、被験マウス (WT マウス、*bdnf*^{+/-} マウス) を 1 匹ずつ装置内に解き放ち 10 分間自由に探索させた。その後被験マウスを一度装置から取り出し、片方の網籠に被験マウスと同系統、同性、同週齢でプローブマウス 1 匹を入れた後、被験マウスを再び装置内に戻し 10 分間における行動を観察した (何も入っていない網籠を basket A、プローブマウスが入っている網籠を basket B とする)。この時通常マウスは初対面のマウスに興味を示し、プローブマウスが入っている網籠に対し匂いを嗅ぐ、よじ登るといった行動をとる。プローブマウスが入っている網籠に対する被験マウスの鼻先の接触時間を社会性行動時間として評価した。

(3) 高所ストレス負荷試験

bdnf^{+/-} マウスあるいは WT マウスを 1 匹ずつ、高く足場が狭い円柱 (直径 6 cm、高さ 25 cm) の上に乗せることで高所ストレスを 30 分間負荷した。その後、ストレス応答を組織化学的に評価した。

(4) 組織化学的評価

行動試験やストレス負荷の終了 2 時間後にマウスを灌流固定し、脳切片を作製した。作製した切片を H₂O₂ 処理後、ブロッキングし、抗 c-Fos 抗体 (Santa Cruz) と反応させた後、2 次抗体 (抗ウサギ IgG 抗体) と反応させた。その後、ABC 溶液中で一晩反応させたのち、DAB 溶液で発色した。また、隣接切片はニッスル染色することで、領域の特定に用いた。

(5) 染色切片の評価

染色した脳切片はオールインワン顕微鏡 (KEYENCE) を用いて撮影し、扁桃体外側部 (basolateral amygdala: BLA)、視床下部室傍核 (paraventricular nucleus: PVN)、前頭葉 (眼窩前頭皮質 lateral orbitofrontal cortex: LO、ventral orbitofrontal cortex; VO、内側前頭皮質 medial orbital cortex: MO、Prelimbic cortex: PrL) における c-Fos もしくはニッスル陽性細胞の数をカウントした。各領域は、扁桃体外側部は Bregma -0.94 mm から -1.58 mm、視床下部室傍核は Bregma -0.70 mm から -0.94 mm、前頭葉は Bregma 2.34 mm から 2.10 mm の範囲において 30 μm 厚の連続切片を作成し、そのうち、2 枚おきに 1 枚を免疫染色に使用、1 枚をニッスル染色に使用し、免疫染色では計 5 枚の切片を、ニッスル染色では計 3 枚の切片を用いた。The mouse brain in stereotaxic coordinates (Paxinos and Franklin, 2001) を参考に各領域を区分し、その領域内に含まれるすべての陽性細胞数をカウントし、単位面積 (mm²) 当たりの各陽性細胞数 (細胞密度: cell density) を算出した。

(6) 統計学的解析

データはすべて平均値、標準偏差で示し、Student's t-test、X² test、One-way ANOVA with post hoc Tukey's *t*-test を用いて統計学的に解析した。

4. 研究成果

(1) 記憶学習試験

本試験は金網を手掛かりに餌の位置を学習するタスクである。野生型マウスでは頼ひげを用いて金網を認識、手掛かりとして、1 日 1 回 12 日間のタスク学習により、最短施行で餌を獲得できるようになった。しかし、*bdnf*^{+/-} マウスではこのタスクを学習することができなかった。一方、gap-crossing test による評価において、*bdnf*^{+/-} マウスの最大跳躍距離は野生型と同程度であり、有意な差は認められなかった。したがって、*bdnf*^{+/-} マウスでは触覚機能には異常がないが、その情報を「手掛かり」として用いた迷路学習には障害があることが明らかとなった。

一方、学習が成立した学習開始から 2 日目において、両群の脳を摘出し、神経活動に依存して発現上昇する最初期遺伝子 c-fos の翻訳産物である c-Fos タンパク質の発現分布を調べた。野生型マウスでは、ホームケージ群と比較して、触覚情報を処理する大脳皮質体性感覚野、手掛かり記憶の増強にかかわる扁桃体や前頭葉において c-Fos 陽性細胞の数が増加していた。野生型と比較して、*bdnf*^{+/-} マウスでは記憶に関わる扁桃体および前頭葉では、タスクの反復学習に伴う c-Fos 陽性細胞数の顕著な増加が認められなかったが、体性感覚野では野生型マウスと同様に陽性細胞数の増加が観察された。このことは、*bdnf* 遺伝子発現の低下は頼ひげを使った物体識別能 (gap-crossing test における間隔識別能) の発達には大きな影響を及ぼさないが、その情報を手掛かりとした学習が成立しないこと (WNA タスク) と一致する。

さらに、体性感覚野における c-Fos 陽性細胞数の学習成立に伴う増加は SL327 の投与による影響を受けなかった。したがって、少なくともこの領域における BDNF/MAPK シグナルは学習成立との関与が低い可能性が示唆される。今後、学習に伴う MAPK シグナルと各脳領域の c-Fos 陽性細胞の増加の関係を調べていく予定である。

(2) 社会関連行動試験

社会優位性試験において、*bdnf*^{+/-} マウスは野生型マウスに対して有意に勝率が低く、*bdnf* 遺伝子の欠損により社会優位性が低下する可能性が示唆された。本試験において、相手マウスの代わりにボールを用いた場合には tube 内の滞在時間に野生型および *bdnf*^{+/-} マウス間の差は認められなかった。したがって、*bdnf* 遺伝子発現量の低下は新規物体に対する忌避 (あるいは探索) 行動には影響しないが、社会優位性 (攻撃性に基づく社

会階層性)の低下をもたらすことが明らかになった。

、のいずれの社会相互作用試験においても、*bdnf*^{+/-} マウスでは野生型マウスと比較して、初対面のマウスに対する社会相互作用の時間が短縮された。

したがって、*bdnf* 遺伝子の発現低下により、社会性行動の質(階層性、相互作用)が低下することが明らかとなった。

(3) 高所ストレスに対する脳の神経応答

(2) の社会行動には脳の情動機能が関与する。そこで、*bdnf* 遺伝子の発現低下が情動機能に及ぼす影響について調べることにした。すなわち、*bdnf*^{+/-} マウス、野生型マウスに高所ストレスを負荷し、その時の情動機能に関する脳領域の c-Fos 陽性細胞の数を測定した。*bdnf*^{+/-} マウスは野生型マウスと比較して、ストレス応答に関わる視床下部室傍核および扁桃体で c-Fos 陽性細胞の増加が認められ、その過活動を制御する前頭葉での c-Fos 発現の低下が観察された。したがって、*bdnf*^{+/-} マウスではストレス応答に伴う神経活動が増強または持続し、社会性行動の質の低下に結びついている可能性が示唆される。

(4) 大脳皮質層特異的転写因子のBDNF/MAPK シグナルに及ぼす影響

当初の実験計画では、大脳皮質各層に特異的に発現する転写因子の発現抑制ウイルスベクターを構築し、その影響を調べる予定であったが、予想したよりも発現の抑制効率が高くなかったため、CRISPR/gRNA を用いてコンディショナルノックアウトマウスを作製することにした。現在キメラマウスの作成に成功したため、F1 世代の樹立を試みているところである。

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 4 件)

Shibata S, Inuma M, Soumiya H, Furukawa Y, Furukawa S. A novel 2-decenoic acid thioester ameliorates corticosterone-induced depression- and anxiety-like behaviors and normalizes reduced hippocampal signal transduction in treated mice. *PharmacolRes Perspect*. 2015 3(2):e00132. doi: 10.1002/prp2.132.

Toratani A, Soga H, Fukumitsu H, Soumiya H, Furuakwa Y, Furuakwa S.

Caffeic acid phenethyl ester ameliorates depression-and anxiety-like behaviors of mice exposed to chronic mild stress. *J Neurophysiol Neurol Disord*, 2014 1:1-82.

Ohtsuka M, Soumiya H, Hanai M, Furukawa S,

Fukumitsu H.

Neurotrophin-3 influences the number and the laminar fate of cortical progenitors in the developing cerebral cortex through the MEK/ERK1/2 signaling pathway.

Biomed Res. 2013; 34 (5):231-239 (査読あり)

Makino A, Inuma M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa Y, Furuakwa S.

Anxiolytic-like effect of trans-2-decenoic acid ethyl ester in stress-induced anxiety-like model mice.

Biomed Res. 2013; 34 (5):259-267 (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

五代亜由美、福光秀文、宗宮仁美、古川昭栄

脳由来栄養因子ヘテロ型遺伝子欠損マウスの社会性行動に関する研究 第 60 回日本薬学会東海支部会、2014 年 7 月 5 日、鈴鹿

宗宮仁美、福光秀文、五代亜由美、荒磯ひろみ、金城史織、古川昭栄

生後初期の頬ひげからの感覚入力遮断が情動制御システムの発達に及ぼす影響

日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福光 秀文 (FUKUMITAU, Hidefumi)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00308280

(2) 研究分担者

該当なし。

(3) 連携研究者

古川 昭栄 (FURUKAWA Shoei)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90159129

宗宮 仁美 (SOUMIYA, Hitomi)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20548713