

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659490

研究課題名(和文)セロトニン系とmTOR系の情報伝達の交差：自閉症モデル動物における病態とその治療

研究課題名(英文) Crosstalk between serotonin and mTOR systems: molecular pathology in autism and its treatment

研究代表者

水口 雅 (MIZUGUCHI, Masashi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20209753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症の病態を脳内シグナル伝達の異常として把握し、薬物治療(分子標的療法)のモデル動物系を構築するための橋渡し研究を行った。自閉症を合併しやすい常染色体優性遺伝性疾患である結節性硬化症のモデルマウス(Tsc1およびTsc2遺伝子ノックアウトマウス)の社会的相互作用の障害(自閉症の中核症状)、mTOR阻害薬によるその改善を観察し、分子基盤を解明した。Tsc2変異がTsc1変異より重症となりやすいことをモデルマウスにおいて再現した。

研究成果の概要(英文)：We conducted a translational research to understand the pathomechanism of autism on the basis of abnormal signal transduction in the brain, and to establish animal models for the development of drug treatment (molecular target therapy). Using animal models (Tsc1 and Tsc2 knockout mice) of tuberous sclerosis complex (TSC), an autosomal dominantly inherited disorder that frequently presents with autism, we observed the cardinal symptom of autism, impaired social interaction, and its improvement by treatment with an mTOR inhibitor, elucidated the molecular basis, and recapitulated the clinical findings in human TSC patients that Tsc2 mutations tend to be severer than Tsc1 mutations.

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：小児神経学 発達障害 自閉症 シグナル伝達 結節性硬化症 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

(1) 自閉症は社会性(対人関係)障害、コミュニケーション障害、興味・活動の限定(こだわり)を中核症状とする発達障害で、病因は多種多様である。患者の20%に特定の基礎疾患があり(症候性自閉症)、うち一部は単一遺伝子変異による遺伝子病(結節性硬化症、脆弱X症候群など)である。残り80%は基礎疾患がなく(非症候性自閉症)、病因は多因子遺伝と推測される。自閉症の治療には行動療法、薬物療法があるが、いずれも満足すべき効果をあげていない。薬物としては抗精神病薬、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)、精神刺激薬などが用いられ、パニック、こだわり、多動などの症状をときに緩和しうるが、自閉症の中核症状(とりわけ社会性障害)を改善する効果はない。自閉症の病因・病態のより深い理解にもとづく、より本質的かつ有効な薬物療法の開発が切望されている。

(2) 脳内5-HT系の機能障害は、自閉症の病態の中心的位置を占めると推測されてきた。先行研究によると、自閉症者の25~60%で血中5-HT濃度が高い。髄液中5-HT代謝物の濃度は低く、脳内の5-HTターンオーバーが低いことが示唆されている。5-HT関連遺伝子変異と自閉症との関係についても検討が進み、セロトニントランスポーター(SERT)遺伝子(*SLC6A4*)多型と自閉症の関連が複数の研究により示された。さらに、自閉症の脳内SERT結合能が低いことがSPECTおよびPETを用いた研究で明らかにされた。

(3) いっぽう*PTEN*(頭圍拡大を伴う自閉症)、*TSC1/TSC2*(結節性硬化症)、*FMR1*(脆弱X症候群)などmTOR信号伝達系に属する因子の単一遺伝子変異は、いずれも自閉症を高率に合併する。この事実からわれわれは、mTOR系が「自閉症の最終共通経路」に近い位置にあ

り、その信号異常の是正が自閉症治療に有効なのではないかという仮説を立てた。この仮説にもとづき、平成22~23年度挑戦的萌芽研究を進め、*Tsc1*および*Tsc2*のノックアウトマウス(*Tsc1*^{-/-}と*Tsc2*^{-/-}の両者)がヒト自閉症に相当する行動異常を示すこと、それがmTOR阻害剤(ラパマイシン)によって正常化することを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 研究の中長期的目標は、5-HT系とmTOR系の相互関係を解明するとともに、mTOR阻害薬による自閉症治療の対象範囲を拡大(TSC/PTENから非症候性自閉症へ)することにあつた。

(2) 本研究は、その第一歩として5-HT系とmTOR系の遺伝子を改変したモデルマウスが自閉症に相当する行動異常を示すか、その異常がmTOR阻害剤によって改善するか」を検討することに目的を置いた。

3. 研究の方法

(1) 本研究の当初の計画では、SERT変異マウスを用いた実験を主として行い、セロトニン系異常のモデル動物におけるmTOR系の解析を行う予定であった。しかし予備実験の過程でmTOR系異常のモデル動物(*Tsc1*^{-/-}マウスおよび*Tsc2*^{-/-}マウス)でめざましい結果が得られたことから、計画を一部変更して、結節性硬化症モデルマウスにおける行動解析と遺伝子・タンパク解析に集中した。

(2) ヒト結節性硬化症においては50%以上の患者が自閉症を合併する。平成24年度の研究では自閉症とmTOR系シグナル伝達異常の関係について調べた。*Tsc1*^{-/-}マウスおよび*Tsc2*^{-/-}マウスの脳におけるmTOR系の遺伝子発現とタンパク質リン酸化の異常、およびラパマイシン投与後におけるその変化をマイ

クロアレイおよびWestern blottingを用いて検討した。

(3) ヒト結節性硬化症では *TSC1* 遺伝子変異より *TSC2* 遺伝子変異において自閉症の合併および重症化が多い。平成 25 年度は *Tsc1* および *Tsc2* のヘテロ欠失マウスにおける自閉症様行動に差があるか、行動実験によって検討した。*Tsc1^{+/-}*マウス、*Tsc2^{+/-}*マウスおよび *Tsc1-Tsc2* ダブル欠失マウス (*TscD*) に対して social interaction test (SIT)、3-chamber social approach task (3CST)、self-grooming test (SGT) を行った。ラパマイシン投与により行動異常が正常化するか否かを検討した。

4. 研究成果

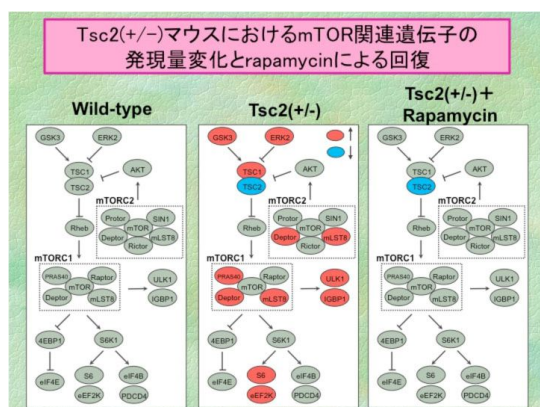


図1 *Tsc2^{+/-}*マウスにおける mTOR 関連遺伝子の発現量変化とラパマイシンによる回復

(1) 結節性硬化症モデル動物である *Tsc1^{+/-}*マウスおよび *Tsc2^{+/-}*マウス(成獣)に対し行動解析を行ったところ、新奇マウスに対する探索行動の減少、立ち上がり行動の増加という社会的相互交流障害が認められ、自閉症の中核症状である対人関係障害に該当すると考えられた。これらのマウスに対し mTOR 阻害薬ラパマイシンを投与すると、上記の行動異常が改善して野生型と差がなくなった。つぎに 2 型モデルマウスの脳内の遺伝子発現と蛋白リン酸化状況を調べたところ、mTOR 系

の複数の因子(*G3k3b*, *Mapk 1*, *Ulk1*, *Eef2k*, *Deptor*) の遺伝子発現に異常が生じており、下流の S6K 蛋白のリン酸化が亢進していたが、これらの異常もラパマイシン投与後に正常化した(図1)。以上からラパマイシンによる行動の改善は、mTOR 系の機能の正常化を介したものと判明した。

(2) 変異マウスはいずれも、SIT における新奇マウスへの探索時間減少、3CST における後から提示したマウスへの探索時間減少、SGT における self-grooming の増加を示した。3CST で新奇マウスとケージメイトを同時に提示すると、*Tsc1^{+/-}*マウスは新奇マウスへの選択性が低下し、*Tsc2^{+/-}*および *TscD* マウスは両者を区別できなかった。SIT と 3CST の異常は、ラパマイシン投与後に正常化した。以上の結果から、*Tsc2^{+/-}*マウスは *Tsc1^{+/-}*マウスに比して自閉症様行動がより重症であり、ヒト患者における所見を再現していることを初めて見出した。

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6件)

- (1) 水口雅. 小児の治療指針:結節性硬化症. 査読無, 2014; 77(Suppl): S807-809
- (2) 水口雅. 結節性硬化症にともなう自閉症の薬物治療. 査読無, 日本小児科学会雑誌 2013; 117(11): 1686-1693.
- (3) 水口雅. 遺伝子変異による先天異常:結節性硬化症. 査読無,小児科臨床 2013; 66(Suppl):1347-1355.
- (4) Tumurkhuu M, Saitoh M, Takita J, Mizuno Y, Mizuguchi M. A novel SOS1 mutation

in Costello/CFC syndrome affects signaling in both RAS and PI3K pathways. 査読有, Journal of Receptors and Signal Transduction Research 2013; 33(2): 124-128.

DOI: 10.3109/10799893.2013.779279.

- (5) Ohsawa M, Kobayashi T, Okura H, Igarashi T, Mizuguchi M, Hino O. TSC1 controls distribution of actin fibers through its effect on function of Rho family of small GTPases and regulates cell migration and polarity. 査読有, PLoS One 2013;8(1): e54503.

DOI: 10.1371/journal.pone.0054503.

- (6) Sato A, Kasai S, Kobayashi T, Takamatsu Y, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M. Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. 査読有, Nature Communications 3, 1292, 2012.

DOI: 10.1038/ncomms2295.

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 岩崎博之, 水野葉子, 太田さやか, 下田木の実, 高橋長久, 三牧正和, 岡明, 水口雅. TSC1 遺伝子のホモ欠失により片側肥大をきたした結節性硬化症の一女児. 第 60 回日本小児神経学会間等地方会, 東京大学 (東京都), 2014 年 3 月 15 日
- (2) 佐藤敦志, 笠井慎也, 高松幸雄, 小林敏之, 樋野興夫, 池田和隆, 水口雅. 結節性硬化症モデルマウスの自閉症様行動に対するラパマイシンの効果. 第 1 回日本結節性硬化症学会学術総会, 東京ガーデンパレス (東京都), 2013 年 11 月 1 日
- (3) 佐藤敦志, 高松幸雄, 笠井慎也, 田中美

歩, 小林敏之, 樋野興夫, 池田和隆, 水口雅. 結節性硬化症モデルマウス Tsc1, Tsc2 ヘテロ欠失マウスおよび Tsc1-Tsc2 ダブルヘテロ欠失マウスの自閉症様行動. 第 43 回日本神経精神薬理学会, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県), 2013 年 10 月 24 日~26 日

- (4) Sato A, Kasai S, Kobayashi T, Takamatsu Y, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M. Causal role of unregulated mTOR signaling in autism-related behavioral deficits in mouse models of tuberous sclerosis complex. 第 3 回アジア神経精神薬理学会, 北京国際コンベンションセンター(中国), 2013 年 9 月 11-14 日

- (5) 佐藤敦志, 笠井慎也, 高松幸雄, 小林敏之, 樋野興夫, 池田和隆, 水口雅. 結節性硬化症モデルマウスの自閉症様行動およびラパマイシンによる改善効果. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会 第 42 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 栃木総合文化センター (栃木県), 2012 年 10 月 18-20 日

- (6) 水口雅. 小児期での母斑のアプローチ 皮膚科から・小児科から 結節性硬化症の神経症状. 第 36 回日本小児皮膚科学会学術大会 (招待講演), 前橋テルサ (群馬県), 2012 年 7 月 14 -15 日

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 水口雅. ラパマイシンの自閉症治療薬としての可能性. 日本発達障害連盟 (編) 発達障害白書, 2014 年版. 明石書店, 東京, 2013, p.56.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

東京大学発達医科学教室 HP

<http://www.development.m.u-tokyo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水口 雅 (MIZUGUICHI, Masashi)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20209753

(2)研究分担者

池田 和隆 (IKEDA, Kazutaka)

東京都医学総合研究所・参事研究員

研究者番号：60281656

(3)連携研究者

佐藤 敦志 (SATO, Atsushi)

東京都医学総合研究所・研究員

研究者番号：60466745

(平成25年度より連携研究者)