

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670513

研究課題名(和文) 自閉症スペクトラム障害のセロトニン系・コリン系に及ぼす活性化型ミクログリアの影響

研究課題名(英文) Relationship between microglial activation and serotonergic or cholinergic system in the brain of subjects with autism spectrum disorder

研究代表者

飯田 妙子 (IIDA, TAEKO)

浜松医科大学・医学部附属病院・作業療法士

研究者番号：70616474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自閉症スペクトラム障害(ASD)における脳内セロトニン系やコリン系などの神経伝達系の機能不全に、活性化ミクログリアがどのように関与しているのかをPETで検討した。その結果、ASDでは橋において活性化ミクログリアとセロトニン・トランスポーター密度とが逆相関していること、ASDでは活性化ミクログリアが高い脳部位ではコリンエステラーゼ活性もまた高いという正相関があることが示唆された。自閉症の病態に果たすミクログリアの役割の詳細を明らかにするために、さらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Aim of the current study was to examine whether regional microglial activations were correlated with dysfunctions in central serotonergic or cholinergic systems in the brain of subjects with autism spectrum disorder (ASD). To test this, we recruited male adults with ASD and microglial activation in the brain was measured by means of positron emission tomography (PET) and a tracer 11C-PK11195. Either brain serotonin transporter binding or acetylcholinesterase activity was also measured by PET and 11C-McN5652 or 11C-MP4A, respectively. Their parametric maps were obtained and subjected to correlation analyses using SPM. As a result, we found that (1) there was a significant negative correlation between 11C-PK11195 binding and 11C-McN5652 binding in the pons, and (2) there were several clusters of voxels where regional 11C-PK11195 binding positively correlated with 11C-MP4A k3 value at the region. Further study is warranted to clarify a role played by activated microglia in ASD brain.

研究分野：精神科リハビリテーション

キーワード：自閉スペクトラム症 ポジトロン断層法 セロトニン・トランスポーター アセチルコリンエステラーゼ ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (ASD) は、社会性の障害と限定され反復的・常同的な行動様式とによって特徴づけられる発達障害である。ASD の病態形成において、免疫系の異常が関与していることを示唆する多くの知見がある。ASD 者やその同胞にアレルギー疾患や自己免疫疾患の合併が多いことは良く知られている。遺伝研究からは、自閉症とヒト白血球抗原遺伝子や主要組織適合遺伝子複合体 (補体 C4B 遺伝子) との関連が示されている。自閉症者の脳脊髄液や末梢血中において TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインが増加していることは繰り返し指摘されている。一方、ミクログリアは脳内の自然免疫担当細胞であり、病原体の侵入や神経細胞死などを察知すると速やかに活性化し、TNF- α や IL-1 β など炎症性サイトカインを産生する。その由来は yolk sac または骨髄からの幼若マクロファージで、ヒトでは妊娠中期 (12~24 週) に血流から脳内に定着し、後の脳発達におけるシナプス形成に重要な役割を果たす。自閉症の死後脳研究では、小脳において活性化型ミクログリアの増加とプルキンエ細胞の減少が報告されている。これらを総合すると、ASD では中枢でも末梢でも自然免疫系が活性化した状態にあること、および、おそらくその起源はミクログリアが脳内に定着する胎生期にあることが強く示唆される。

我々は、ASD 者 20 名と年齢・性を一致させた健常者 20 名とを対象に、トレーサーとして ^{11}C -(R)-PK11195 を用い脳内活性化ミクログリアを PET で計測した。その結果、ASD 群では脳の広汎な部位で活性化型ミクログリアが有意に増加していた (Suzuki et al., JAMA Psychiatry 2013)。しかし、活性化型ミクログリアの分布のパターンは ASD 群と対照群とで同様であった。これらの結果は、上述した ASD における免疫系の過剰な活性化の起源が胎生期にあるとする我々の仮説を強く支持するものであった。

ASD 脳内では、セロトニン系、ドパミン系、コリン系のそれぞれに特徴的な異常が認められること、および、それらの異常が自閉症を特徴づける臨床指標と有意に関連することが、我々の PET による先行研究から明らかにされている (Nakamura et al., Arch Gen Psychiatry 2010; Suzuki et al., Arch Gen Psychiatry)。しかし、これらの神経系の異常に、ミクログリアの活性化がどのように関与するのとは全く不明であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、ASD をもつ被検者を対象にセロトニン系、ドパミン系、または、コリン系を標識する放射性標識化合物を用いた PET 撮像を行い、それぞれの神経系と活性化型ミクログリアの増加との関係について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

【対象と臨床評価】 20 歳以上の成人 ASD 者を対象とした。ASD の診断は DSM-IV-TR に基づき、国際標準の診断面接法である ADI-R と ADOS とのいずれか、または両者によった。何らかの薬物療法を受けている者、他の精神・神経疾患を有する者、喫煙者は除外した。

【MRI 撮像】 まず、サーモプラスチック製のマスクで頭部を固定し T1 強調 MRI を撮像した。以下の PET 撮像時には、MRI 撮像時の頭部の位置情報をもとに PET ガントリーの角度を MR 画像と PET 画像とが AC-PC ラインに平行になるよう設定し、同じマスクを用いて頭部を固定し撮像した。つまり、厳密かつ正確な関心領域 (ROI) の設定が可能となるよう配慮した。

【PET 撮像】 ① 活性化ミクログリア測定: 特異的トレーサー ^{11}C -PK11195 を静脈内投与し、62 分間の連続撮像を施行した。Simplified Reference Tissue Model (SRTM) 法により脳局所における結合能 (BP_{ND}) を算出し、活性化ミクログリア数の指標とした。

② セロトニン系の評価: セロトニン・トランスポーターの特異的トレーサーである ^{11}C -McN5652 を用い、静脈内投与後 92 分間の連続撮像を施行した。SRTM 法により脳局所における BP_{ND} を算出し、セロトニン・トランスポーター密度の指標とした。

③ コリン系の評価: アセチルコリンのアナログである ^{11}C -MP4A をトレーサーとして用い、静脈内投与後 62 分間の連続撮像を施行した。reference tissue-based linear least-squares 法により脳局所におけるアセチルコリンエステラーゼ活性を求めた。

【統計学的解析】 PET 画像解析ソフトウェア PMOD により活性化ミクログリア数 (^{11}C -PK11195 BP_{ND})、セロトニン・トランスポーター密度 (^{11}C -McN5652 BP_{ND})、アセチルコリンエステラーゼ活性 (^{11}C -MP4A k_3 値) の 3 次元パラメトリック画像を作成した。画像統計解析ソフト Statisticcal Parametric Mapping (SPM8) を用い、各被験者の T1 強調 MRI をもとにパラメトリック画像を正規化・平滑化した後、ASD 群と対照群とで比較した。また、活性化ミクログリアとセロトニン系、コリン系との関係を明らかにするために、 ^{11}C -PK11195 BP_{ND} 画像と ^{11}C -McN5652 BP_{ND} 画像または ^{11}C -MP4A k_3 値画像との全脳レベル相関解析を、SPM8 上で行った。P < 0.001 を統計学的有意水準とした。

全脳レベルの探索において有意差が認められた脳部位については、正規化前の T1 強調 MRI 上であらためて ROI を設定し、各パラメータ間の相関関係を確認した。

4. 研究成果

①活性化ミクログリアとセロトニン系

本研究への参加について同意が得られ、撮像を完了したのは成人 ASD 男性 13 例（平均年齢 24.1 ± 4.0 歳）であった。

全 13 例について、 ^{11}C -McN5652 BP_{ND} 画像と ^{11}C -PK11195 BP_{ND} 画像との対比を図 1 に示した。全体の傾向として、 ^{11}C -McN5652 BP_{ND} が低下している ASD 者ほど ^{11}C -PK11195 BP_{ND} が高い傾向が認められた。

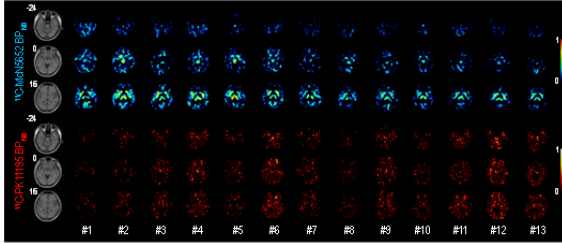


図 1. ASD 脳内における ^{11}C -McN5652 BP_{ND} (上段) と ^{11}C -PK11195 BP_{ND} (下段) との対比

しかし、全脳における voxel-to-voxel レベルの相関解析では、両者に有意な相関が認められたクラスターは脳幹にのみ存在していた。そこで、各被験者の T1 強調 MRI において中脳と橋に ROI を置き、 ^{11}C -McN5652 BP_{ND} と ^{11}C -PK11195 BP_{ND} との関係を見たところ、橋においては有意に逆相関していた（ピアソンの相関係数 = -0.74 、 $P = 0.0041$ ）。橋の ^{11}C -PK11195 BP_{ND} と他の脳部位における ^{11}C -McN5652 BP_{ND} との間には、有意な相関はなかった（図 2）。

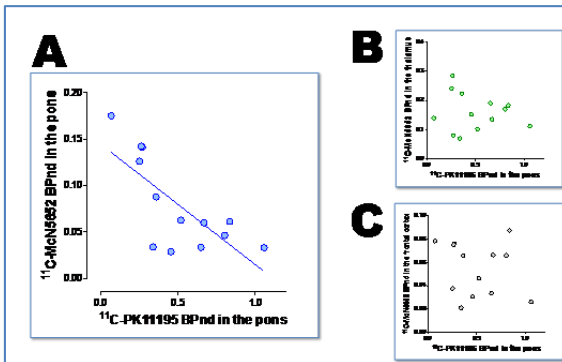


図 2. (A)橋における ^{11}C -McN5652 BP_{ND} は同部位の ^{11}C -PK11195 BP_{ND} と逆相関していた。(B) 視床や(C)前頭皮質など他の脳部位では、このような相関は認められなかった。

②活性化ミクログリアとコリン系

本研究への参加について同意が得られ、撮像を完了したのは成人 ASD 男性 13 例（平均年齢 24.1 ± 4.0 歳）であった。

代表的な 3 例について、 ^{11}C -MP4A k_3 画像と ^{11}C -PK11195 BP_{ND} 画像との対比を図 3 に示した。全脳における voxel-to-voxel レベルの相関解析の結果、両者が有意な正相関を示すクラスターが、脳の広範な部位で認められた（図 4）。ROI 法により確認したところ、右側紡錘状回や扁桃体において、弱い統計学的に有意な正相関が認められた。

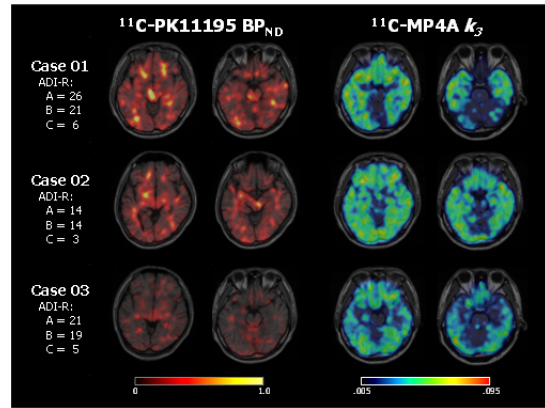


図 3. ASD 脳内における ^{11}C -MP4A k_3 (右側) と ^{11}C -PK11195 BP_{ND} (左側) との対比

Voxel-to-voxel correlation analysis between PK11195 BP and MP4A k_3 by SPM (n=13)

Positively correlated clusters ($r > 0.6$)

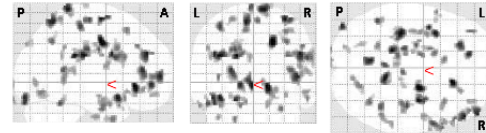


図 4. ASD では脳の広範な部位で活性化ミクログリアとコリンエステラーゼ活性が正の相関を示す。

本研究の結果から、ASD 者ではセロトニン系の起始核が存在する背側縫線核を含む橋において、活性化ミクログリアとセロトニン・トランスポーター密度とが逆相関していることが示唆される。すなわち、同部位での活性化ミクログリアは、脳内セロトニン系全体に影響を及ぼす可能性があると考えられた。一方、コリン系については、活性化ミクログリアが多い脳部位ではコリンエステラーゼ活性もまた高いという傾向が認められた。先行研究においてコリン系の機能低下が示唆されている紡錘状回においては、活性化ミクログリアとコリンエステラーゼ活性との間に有意な相関はなかった。しかし、紡錘状回の活性化ミクログリアが多いほど、同部位からの投射を受ける下側頭回や扁桃体でのコリンエステラーゼ活性は高いという関連が認められ、おそらく紡錘状回のみならず同部位の機能不全に対し代償的に活性化しているものと推測される。

いずれにせよ、自閉症の病態に果たすミクログリアの役割の詳細を明らかにするために、さらなる検討が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- Vasu MM, Anitha A, Thanseem I, Suzuki K, Yamada K, Takahashi T, Wakuda T, Iwata K, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N. Serum microRNA profiles in children with autism. Mol Autism. 2014 Jul 30;5:40.

2. Kameno Y, Iwata K, Matsuzaki H, Miyachi T, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Iwata Y, Suzuki K, Nakamura K, Maekawa M, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N. Serum levels of soluble platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are decreased in subjects with autism spectrum disorder. Mol Autism. 2013 Jun 17;4(1):19.
3. Anitha A, Nakamura K, Thanseem I, Matsuzaki H, Miyachi T, Tsujii M, Iwata Y, Suzuki K, Sugiyama T, Mori N. Downregulation of the expression of mitochondrial electron transport complex genes in autism brains. Brain Pathol. 2013 May;23(3):294-302.
4. Shimmura C, Suzuki K, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Ohno K, Matsuzaki H, Iwata K, Kameno Y, Takahashi T, Wakuda T, Nakamura K, Hashimoto K, Mori N. Enzymes in the glutamate-glutamine cycle in the anterior cingulate cortex in postmortem brain of subjects with autism. Mol Autism. 2013 Mar 26;4(1):6.
5. 鈴木勝昭. ポジトロン断層法による分子イメージング. 子どものこころと脳の発達. 2014 June 10;5(1):59-67.

[学会発表] (計 0 件)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田妙子 (IIDA, TAEKO)

浜松医科大学・医学部附属病院・作業療法士

研究者番号：70616474

(2) 研究分担者

鈴木勝昭 (SUZUKI, KATSUAKI)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00285040

竹林淳和 (TAKEBAYASHI, KIYOKAZU)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50397428

(3) 連携研究者

土屋賢治 (TSUCHIYA, KENJI)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・准教授

研究者番号：20362189