

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860836

研究課題名(和文) mTOR系機能亢進による自閉症の病態解明および新規治療薬開発の試み

研究課題名(英文) Investigation on the pathomechanism of autism spectrum disorder associated with hyperactivated mTOR signaling pathway

研究代表者

佐藤 敦志 (Atsushi, Sato)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60466745

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)：結節性硬化症(TSC)の原因遺伝子TSC1、TSC2それぞれに異常をもつマウスを用い、TSC患者に多く合併する自閉スペクトラム症(ASD)の違いを検討した。Tsc2に異常をもつマウスにASD様症状がより強く表れたが、mTORシグナル系の亢進は同程度だった。TSC治療にも使われるラパマイシンは、どのマウスでも蛋白質の異常を正常化した。先行研究と異なり、ASD様症状に対して代謝型グルタミン酸受容体mGluR5の刺激薬CDPPBは有効でなく、阻害薬MPEPに効果があると示唆された。

研究成果の概要(英文)：We compared autism-related behavioral deficits in mouse models of tuberous sclerosis complex (TSC) caused by haploinsufficiency of TSC1 and TSC2. The mice with Tsc2 mutations showed severer autism-related behavior though mTOR-mediated signaling was equally hyperactivated at the protein level. Rapamycin, the mTOR inhibitor, normalized autism-related behavior and hyperactivated mTOR signaling in the mutant mice. In-s opposed to the earlier research, CDPPB (positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor 5, mGluR5) was ineffective for behavioral deficits in the mutant mice. MPEP (negative allosteric modulator of mGluR5) rather improved the autism-related behavior in the mutant mice.

研究分野：行動薬理学

キーワード：自閉スペクトラム症 結節性硬化症 mTOR モデルマウス 行動薬理学

1. 研究開始当初の背景

結節性硬化症 (tuberous sclerosis complex, TSC) は、TSC1 および TSC2 遺伝子のヘテロ欠失によって発症する遺伝性疾患であり、mTOR シグナル伝達系の持続的な活性化亢進が病態として知られている。ヒトでは TSC2 欠失例のほうが重症化することがわかっている。また、TSC 患者は高頻度に自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder, ASD) を合併する。我々は先行研究において、Tsc1 および Tsc2 欠失マウスがヒト患者と同様に自閉症様行動を呈すること、これが mTOR 阻害剤ラパマイシンの短期投与によって改善することを見出している。この知見は、いまだに根本的薬物治療がない ASD の治療薬開発において重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではまず、Tsc1 および Tsc2 の欠失マウスにおける自閉症様行動を比較し、Tsc2 変異例のほうが重症である表現型があるか検討する。また、両者における mTOR シグナル系の亢進の程度も比較する。

mTOR シグナル系の下流ではたらいっている代謝型グルタミン酸受容体 mGluR5 に作用する薬剤が、Tsc モデルマウスの自閉症様行動に与える治療効果を有するか検討する。

これらを通じて、mTOR シグナル系の亢進を背景とする ASD の分子機構の解明および新規薬物治療の開発をめざす。

3. 研究の方法

マウス：雄 Tsc1 ヘテロ欠失マウス (Tsc1 マウス) と雌 Tsc2 ヘテロ欠失マウス (Tsc2 マウス)、または雄 Tsc2 マウスと雌 Tsc1 マウスを交配して、野生型、Tsc1 マウス、Tsc2 マウス、Tsc1-Tsc2 ダブルヘテロマウス (TscD マウス) を得た。これを生後 3 か月例まで飼育した後に下記実験を行った。

薬剤：ラパマイシン (5mg/kg)、CDPPB (mGluR5 positive allosteric modulator, 10mg/kg)、MPEP (mGluR5 negative allosteric modulator, 20mg/kg) をそれぞれ既定の溶媒に溶解し、各実験前に腹腔内投与した。ラパマイシンは実験の 48 時間前と 24 時間前に、CDPPB と MPEP は実験の 30 分前に投与した。

行動実験：【Social interaction test】対象マウスをホームケージに 1 匹だけ残し、15 分後に同性の新奇マウスを 10 分間提示した。対象マウスの行動をビデオ録画し、対象マウスが新奇マウスを探索する行動を計測した。

【3-chamber test】50cm x 50cm の装置を 3 等分し、左右に小さな空ケージを置いて対象マウスを中央から装置に入れ、10 分装置にならした。<social approach> 続いて左右の空ケージの一方には同性の新奇マウス (S1)、もう一方には新奇物体 (O) を入れて、対象マウスに 10 分間探索させた。<social preference> 続いて O を別の同性の新奇マウ

ス (S2) に替えて対象マウスへ提示し、10 分間探索させた。<preference for social novelty> 対象マウスを装置に慣らしたのち、新奇マウス (S1) と、対象マウスのケージメート (C) を提示して 10 分間探索させた。対象マウスの行動はビデオトラッキングにより自動解析した。

【social transmission of food preference】異なるおおいの 2 種類の餌の一方 (A) を、餌の匂いを提示するマウス (D) に食べさせた。続いて、マウス D と対象マウス (O) を 30 分一緒にしたのち、マウス O に 2 種類の餌 (A, B=非提示) を 30 分提示した。マウス O が食べた餌 A および B の量を測定した。

ウェスタンブロットティング：野生型、Tsc1、Tsc2、TscD マウスに 2 日間ラパマイシンまたは溶媒を投与し、その 24 時間後にマウスの全脳を採取した。脳は -80 に冷凍保存したのち連携研究者のもとで蛋白質を抽出し、Hamartin、Tuberin、S6K1 (総およびリン酸化) を測定した。

4. 研究成果

【Tsc2 マウスにおける自閉症様行動の重症化】Social interaction test において、Tsc 変異マウスはいずれも、野生型マウスに比較して新奇マウスへの探索行動が有意に低下していたが、その程度には Tsc1、Tsc2、TscD マウスいずれも差がなかった。

3-chamber test では、いずれのマウスも O より S1 を有意に多く探索した。野生型は S2 を S1 より多く探索したが、Tsc1、Tsc2、TscD マウスはいずれも S2 と S1 を区別せず、探索時間は同程度だった。S1 と C の比較では、野生型と Tsc1 マウスは S1 をより探索したが、Tsc2 と TscD マウスは S1 と C を区別しなかった。Tsc1 マウスにおいても、S1 を探索する選択性が野生型に比較して低下していた。

Social transmission of food preference では、いずれのマウスもマウス D が提示した餌 A をより多く摂食していた。

Tsc 変異マウスは、異なる 2 つのにおい刺激の識別そのものは正常に可能であることがわかった。社会的刺激であるマウスの識別が選択的に障害されていると考えられる。

【mTOR シグナル系の活性程度の比較】溶媒群において、Tsc1、Tsc2、TscD マウスの脳蛋白でリン酸化 S6K1 のレベルが野生型に比較して上昇していたが、その程度は遺伝子型による差はみられなかった。ラパマイシン群では、このリン酸化 S6K1 のレベルが野生型と同程度まで低下していた。

Tsc1、Tsc2 どちらのヘテロ欠失による行動異常も、mTOR シグナル系の亢進によって生じていると考えられる。3-chamber test でみられた Tsc2 変異による重症化を説明しうる結果は、今回の研究からは得られなかった。mTOR シグナル系の亢進の程度以外にも、未知の機序がある可能性もあり、今後の検討課題である。

【mGluR5 に作用する薬剤の効果】Tsc2 マウスを用いて、CDPPB および MPEP 投与下で social interaction test を行った。新奇マウスの探索時間は、CDPPB 群は溶媒群と同程度だった。MPEP 群では溶媒群に比べて増加傾向がみられた。MPEP は脆弱 X 症候群のモデルマウスの行動異常を改善することが知られており、この予備的実験の結果からは、TSC と脆弱 X 症候群が mGluR5 に関連する共通病態をもつ可能性が考慮される。

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 7 件)

1. Sato A, mTOR, a potential target to treat autism spectrum disorder. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2016;15(5):533-43.
2. 古田島(村上)浩子, 佐藤敦志, 池田和隆. 自閉症スペクトラム障害の病態解明と治療薬開発を目指して 自閉症スペクトラム障害の分子薬理学的研究. *日本薬理学会雑誌*, 2015; 145: 193-200.
3. Yui K, Sato A, Imataka G. Mitochondrial dysfunction and its relationship with mTOR signaling and oxidative damage in autism spectrum disorders. *Mini Rev Med Chem*, 2015; 15(5): 373-89.
4. 佐藤敦志, 高松幸雄, 笠井慎也, 小林敏之, 樋野興夫, 池田和隆, 水口雅. Tsc2 haploinsufficiency is associated with more severe autism-related behavioral deficits in mouse models of tuberous sclerosis complex. *日本神経精神薬理学会雑誌*, 2015; 35: 51-52.
5. 佐藤敦志, 池田和隆. 自閉症と薬物治療. *細胞工学*, 2015; 34(5): 490-494.
6. 佐藤敦志, 笠井慎也, 小林敏之, 高松幸雄, 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おける mTOR シグナル系の関与. *日本神経精神薬理学会雑誌*, 2014; 34: 51-52.
7. 佐藤敦志, 池田和隆: mTOR. *精神科領域の用語解説*. *分子精神医学*, pp 50(294)-52(296), Vol 14, No. 4, 先端医学社, 東京, 2014

[学会発表](計 9 件)

1. 佐藤敦志. 結節性硬化症のメカニズムと mTOR について. 結節性硬化症連携セミナー, 帝京大学(東京都板橋区), 2016 年 10 月 4 日
2. 笠井慎也, 佐藤敦志, 柏井洋文, 小林敏之, 樋野興夫, 水口雅, 池田和隆. Tsc2 ヘテロ遺伝子欠損による脳内遺伝子発現変化の網羅的解析. 第 45 回日本神経精神薬理学会 第 37 回日本生物学的精

神医学会 合同年会, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 2015 年 9 月 24-26 日.

3. Sato A, Tanaka M, Takamatsu Y, Kasai S, Kobayashi T, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M. Tsc2 haploinsufficiency causes more severe autistic-like behavioral deficit than Tsc1 in mice. 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Taipei, 14-17 May, 2015.
4. 佐藤敦志. 自閉症スペクトラム障害の新規治療薬開発. 第 4 回研究交流フォーラム, ソラシティ カンファレンスセンター(東京都千代田区), 2015 年 2 月 2 日.
5. Sato A, Takamatsu Y, Miho T, Kasai S, Kobayashi T, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M. Autistic-like behavioral deficits in mouse models of tuberous sclerosis complex are severer in Tsc2 mutation than in Tsc1 mutation. 53rd annual Meeting of American College of Neuropsychopharmacology, Arizona, 7-11 Dec, 2014.
6. 佐藤敦志. 結節性硬化症の脳機能障害と薬物治療の可能性. 第 2 回日本結節性硬化症学会学術総会, 東京大学医学部教育研究棟(東京都文京区), 2014 年 11 月 15 日.
7. 佐藤敦志. mTOR 阻害剤による自閉症治療の可能性. 第 110 回日本精神神経学会学術総会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2014 年 6 月 27 日.
8. Sato A, Takamatsu Y, Kasai S, Kobayashi T, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M. Tsc2 haploinsufficiency is associated with the more severe autism-related behavioral deficits in mouse models of tuberous sclerosis complex. 29th International College of Neuropsychopharmacology, Vancouver, 22-26 Jun, 2014.
9. 佐藤敦志, 高松幸雄, 小林敏之, 樋野興夫, 水口雅. 結節性硬化症モデルマウスにおいて Tsc2 変異はより重度の自閉症様行動と関連する. 第 56 回日本小児神経学会学術集会, アクトシティ浜松(静岡県浜松市), 2014 年 5 月 29-31 日.

[図書](計 1 件)

佐藤敦志, 水口雅. 自閉症モデル動物. 結節性硬化症の診断と治療最前線(編集 日本結節性硬化症学会) pp 27-33, 診断と治療社, 東京, 2016.

[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

<http://www.igakuken.or.jp/abuse/research/developmentaldisorder.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤敦志 (SATO, Atsushi)
東京大学医学部附属病院・小児科・助教
研究者番号：60466745

(2)研究分担者

(3)連携研究者

小林敏之 (KOBAYASHI, Toshiyuki)
順天堂大学大学院医学研究科・分子病理病態学・准教授

研究者番号：40260070

池田和隆 (IKEDA, Kazutaka)

東京都医学総合研究所・依存性薬物プロジェクト・参事研究員

研究者番号：60281656

(4)研究協力者

柏井洋文 (KASHII, Hirofumi)

田中美歩 (TANAKA, Miho)