

## 自閉症モデル霊長類を用いた発達期シナプス刈り込み異常の検証

佐々木哲也<sup>1,2)</sup>, 中垣慶子<sup>1)</sup>, 佐柳友規<sup>1)</sup>, 一戸紀孝<sup>1,2)</sup>

- 1) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 微細構造研究部
- 2) 理化学研究所脳科学総合研究センター 高次脳機能分子解析チーム

### 【研究の背景】

ヒトの大脳皮質では、出生直後から興奮性シナプスが急速に増え、児童期に最大値に達した後減少する(オーバーシュート型シナプス形成)。シナプスの「刈り込み」は、機能的な神経回路を作り上げるために不可欠な過程とされるが、どのような仕組みで起こるかはわかっていない。このシナプス形成異常が、様々な精神疾患に関与していることが明らかになりつつある。例えば、自閉症スペクトラム障害者の脳では刈り込みが少ないため、過剰なシナプスが維持されていると考えられている。

本研究は、自閉症様行動を示す胎生期バルプロ酸曝露マーモセットを用いて、ヒト自閉症患者に見られる「オーバーシュート型」のシナプス形成の異常とその基盤となる分子メカニズムを明らかにしようと試みるものである。申請者はこれまでに、定型発達マーモセットの大脳皮質 3 領野(前頭連合野・側頭連合野・一次視覚野)の樹状突起の発達を調査し、どの領野でも生後 90 日齢でスパイン(興奮性シナプスの指標)数が最大となり、成体にかけて減少するオーバーシュート型シナプス形成が見られることを明らかにした(Oga, Sasaki et al., 2013)。また自閉症・統合失調症で異常が報告されている内側前頭前皮質の領野(area14r, area24)では、シナプス刈り込みの規模が小さいことを明らかにした(Sasaki et al., 2015)。刈り込みを制御する候補分子として軸索誘導因子、ミクログリア関連分子、グルタミン酸レセプターなどを見出した(Sasaki et al., 2014a,b)。

### 【目 的】

本研究では、世界初となる自閉症病態モデル霊長類を用いて、大脳皮質のシナプス刈り込みの異常とその分子基盤を解明することを目的とする。胎生期バルプロ酸曝露マーモセットの樹状突起スパイン数と遺伝子発現の発達変化を経時的に調査し、定型発達マーモセットの発達プロファイルと比較する。この研究により、霊長類特異的な神経回路再編成の異常によって引き起こされると考えられる自閉症の生物学的基盤を明らかにする。

### 【方 法】

本研究では、新しい霊長類モデル動物であるコモンマーモセット(*Callithrix jacchus*)を用いた。胎生期のマーモセットをバルプロ酸に曝露(200mg/kgを胚性 60 日から 7 日間連続投与)することにより、自閉症病態モデル霊長類(VPA マーモセット)を作出した。行動学的解析から、他個体への興味が少ない、特定の鳴き声が増加しているなどの DSM-5 を満たす自閉症様症状を示すことが明らかになっている。本研究では、VPA マーモセットの大脳皮質領野(area12, V1)の第 3 層錐体細胞のスパイン密度・総数の発達変化を調査し、この病態モデルのシナプス刈り込みに不全が見られるか検証した。また、DNA マイクロアレイを用いて胎生期バルプロ酸曝露マーモセットの発達過程の網羅的な遺伝子発現解析を行った。

### 【結 果】

VPA マーモセットと定型発達個体の発達期大脳皮質の遺伝子発現解析を比較・解析を行った。先行研究と同じ 6 つの領

野 (area9、12、14r、24、TE、V1)、5つの発達ステージ(新生仔、生後 60、90、180 日齢、成体)の灰白質組織を採取し total RNA を抽出した。マーモセット特異的 DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を調査した。VPA 群では、新生仔で長距離神経結合形成に重要な分子の発現低下が認められた。また生後 60 日齢においてタンパク合成に関与する分子群の発現が上昇、オートファジーシグナリング経路に含まれる分子群の発現変動が顕著であることを見出した。生後 60-180 日齢で興奮性シナプスのマーカー遺伝子の発現量が上昇しており、この病態モデルでシナプス数が異常に増加していることが推定された。代謝型グルタミン酸受容体関連分子の発現変化も観察され、シナプス特性に異常が生じている可能性がある。

自閉症患者では頭周囲長が増加し、灰白質組織が厚くなっていることが報告されている。これは自閉症患者のシナプス刈り込み不全を反映しているものと考えられる。VPA 群では、生後 180 日齢・成体で顕著な脳重量の増加が認められた。生後 60、90、180 日齢の VPA 個体と非暴露個体の大脳の固定組織から前額断切片を作製し、組織学的特徴の検討を行った。切片面積は VPA 個体で増加しており、脳が大きくなっていることがわかった。また生後 90 日齢、180 日齢個体の灰白質組織が厚くなっており、本モデル動物の脳形態の特徴は自閉症患者の特徴と類似していることが明らかになりつつある。前頭前皮質のニューロンの細胞体の大きさは変化がなく、密度は減少していた。灰白質組織の体積の過半をニューロン突起(樹状突起・軸索)が占めていることと本研究のマイクロアレイ解析の結果から、本モデル動物では樹状突起スパイン、軸索が増加していることが示唆された。

VPA マーモセットの前頭前皮質(12野)と一次視覚野(V1)の第3層錐体細胞に蛍光色素シプアーイエローを注入して基底樹状突起全体を可視化し、スパインの密度・総数が実際に増加しているのか調査を行った。VPA マーモセットは、定型発達個体と比較して生後 2 か月齢以降、大きな樹状突起展開面積を持ち、どの発達段階においても長い樹状突起をもっていることがわかった。また、定型発達個体と比較して、VPA マーモセットのスパイン密度は生後 2ヶ月齢以降上昇していることが観察された。定型発達個体では、生後 90 日齢から 180 日齢にかけて約 30%スパイン密度が低下する「刈り込み」が起こるのに対して、VPA マーモセットでは統計的に有意な変化は観察されず、この霊長類モデル動物で ASD 患者のシナプス刈り込み不全を再現できていることが分かった。

## 【考 察】

胎生期バルプロ酸曝露マーモセットは自閉症脳の解剖学的特徴を反映すること、これを形成する遺伝子発現に変化が起きていることが示されつつあり、今後新たな自閉症病態モデル動物として治療法の開発に貢献することが期待される。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

自閉症をはじめとした児童・思春期に発症する精神疾患には併存性があり、想定される発症機序・診断に用いられる手法、治療などでオーバーラップする部分があると考えられる。「オーバーシュート型」のシナプス発達の素過程とその異常に関する回路・分子レベルの知見は、自閉症のみならず、多くの精神疾患の原因理解・バイオマーカー・治療戦略に新たな展開をもたらすことができるだろう。

## 【参考・引用文献】

- 1) Sasaki T. Postnatal development of dendritic structure of layer III pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex of marmoset. *Brain Struct and Func.* 220(6): 3245-58. 2015.
- 2) Sasaki T. Developmental expression profiles of axon guidance signaling and the immune system in the marmoset cortex: Potential molecular mechanisms of pruning of dendritic spines during primate synapse formation in late infancy and prepuberty (I). *Biochem Biophys Res Commun.* 444(3): 302-306. 2014.
- 3) Sasaki T. Developmental genetic profiles of glutamate receptor system, neuromodulator system, protector of normal tissue and mitochondria, and reelin in marmoset cortex: potential molecular

mechanisms of pruning phase of spines in primate synaptic formation process during the end of infancy and prepuberty (II). *Biochem Biophys Res Commun.* 444(3): 307-310. 2014.