

PET 所見に基づく自閉症・シナプス膜移行異常仮説の検証

松崎秀夫

福井大学子どものこころの発達研究センター

【研究の背景】

自閉症者の末梢血中セロトニンの高値が 1960 年代に報告されて以来、自閉症とセロトニン神経系の関連が注目されてきた (Schain & Freedman 1961)。セロトニントランスポーター (SERT) と自閉症の関連を示す生体脳での直接証拠として、我々は自閉症者脳内の SERT 分布密度を PET により解析した (Nakamura et al 2010)。その結果、自閉症者では脳の広範囲にわたり SERT トレーサー結合能が低下していた (図 1)。

PET 所見の原因として、SERT の発現量の低下 (翻訳の障害・分解の亢進)、SERT 蛋白質の細胞膜への輸送の障害、細胞膜上 SERT 蛋白質の構造異常による PET トレーサーの結合能低下の 3 つが考えられた。しかし米国の Autism Tissue Program より取得した死後脳で SERT mRNA の定量を行ったところ、健常群と自閉症群との間に脳内 SERT の発現の差異はなかった (図 2)。そこで細胞内輸送の障害がまず疑わしいと考え、細胞内で SERT を輸送する分子の中に自閉症の病態に関与するものがあると予想して SERT 結合分子群を網羅的に探索し、NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) を見出した。さらに NSF mRNA 発現が自閉症者リンパ球で有意に低下、および上記死後脳で減少する傾向を発見した (図 3; Iwata et al 2014)。培養細胞レベルで siRNA を用いて NSF の発現抑制を行うと、SERT の膜移行およびその機能が阻害される現象も示された (Iwata et al 2014)。

上記の研究成果から、脳神経細胞内で神経伝達物質関連分子 (受容体・トランスポーター) のシナプス膜移行異常によるシナプスの機能不全が自閉症の原因であるとする「自閉症のシナプス膜移行異常仮説」をたてた (図 4)。

【目 的】

PET 画像解析より自閉症者脳内ではセロトニントランスポーター (SERT) の分布異常を認める。一方、SERT の自閉症者脳内 mRNA 発現には有意差がないため、我々は自閉症者脳内 SERT の細胞膜移行の異常を疑い、輸送分子として N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) を同定した。この発現が自閉症者脳内で減少していることから、本研究では未だ成功例のない NSF コンディショナルノックアウトマウスを作成し、「自閉症のシナプス膜移行異常仮説」の可能性を検証する。具体的にはセロトニン神経特異的 NSF コンディショナルノックアウトマウス (NSF-cKO-SNS)、神経・グリア細胞特異的 NSF コンディショナルノックアウトマウス (NSF-cKO-NGS) の作製・解析を行い、SERT の脳内分布異常の有無と、自閉症様行動の有無を網羅的に解析して、仮説の正否を検証する。

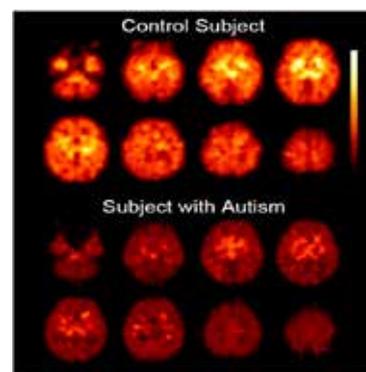


図 1 ヒト生体脳の SERT-PET (上: 健常者、下: 自閉症者)

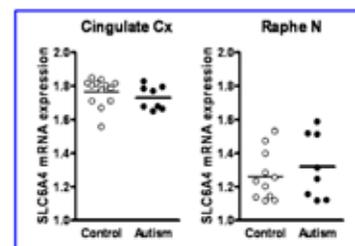


図 2 自閉症死後脳の SERT mRNA 発現

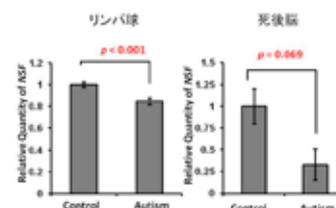


図 3 自閉症リンパ球と死後脳の NSF mRNA 発現 (リンパ球: 各 N=30、死後脳: 各 N=7)

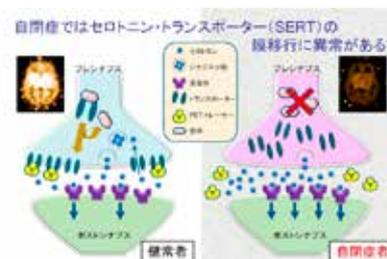


図 4 自閉症のシナプス膜移行異常仮説

【方 法】

1) NSF 遺伝子コンディショナルノックアウト(NSF-cKO)マウスの作製

Cre/loxP システム(図 5)を用いて NSF 遺伝子コンディショナルノックアウト(NSF-cKO)マウスの作出を行った。

まずグローバルに NSF 遺伝子をノックアウトしたマウスをデザインした。このマウス作出に使用されるターゲティングベクターでは第 6・第 7 エクソンの両側に loxP が配置され、その上流には FRT-En2SA-IRES-lacZ-pA-loxP-neo-FRT カセットが挿入されているため、En2SA-IRES-lacZ が第 5 エクソン以降に転写され、pA 配列で停止することで第 5 エクソン以降が転写されないマウス(NSF 遺伝子ノックアウトマウス)を構築できる。ついで Cre マウスを選択して上記のマウスと交配することにより、NSF の発現を種々の特異的条件で抑制したマウス NSF-cKO-SNS と NSF-cKO-NGS を作製・維持して、以下の実験に供した。

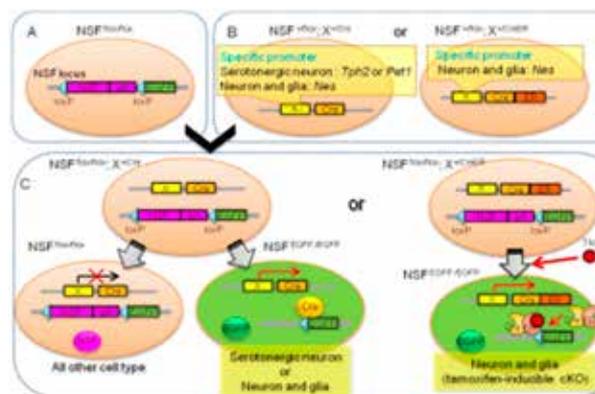


図 5 Cre/loxP システムによる NSF-cKO マウス作製工程

2) マウスの実験方法

①マウスの脳組織学的・生化学的検討:

4~6 週齢の雄マウスの脳全体にわたるセロトニン神経の分布を Tryptophan Hydroxylase を標的とした免疫組織化学で評価し、SERT の分布と比較する(n=10)。さらに脳組織の SERT 局在を確認するため細胞小器官の分画を抽出して、分画ごとの SERT 発現量を western blot 法で測定する(n=10)。さらに、NSF 遺伝子が AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) の細胞内輸送を担う機能を持つ(Lin & Sheng 1998; Shi et al 2001)。このため、次の電子顕微鏡による形態学的検討を行った。電子顕微鏡レベルの SDS 処理凍結割断レプリカ標識法 (SDS-FRL 法)

この試験は、4 週齢マウスの海馬固定組織を急速高圧凍結し、凍結割断レプリカを作製した後、SDS 処理により膜タンパク質以外の分子を洗い流してから、AMPA-R に対する免疫金標識を行った。電子顕微鏡下で海馬 CA1 錐体細胞のシナプスを膜内粒子の集積を頼りに同定し、興奮性シナプス後膜の面積と AMPA-R 標識数を測定した。

②マウスの行動解析:

4~6 週齢の雄マウスに見られる自閉症様の表現型を検討する目的で以下の行動評価を行う。まず基本となる運動量に差のないことをオープンフィールドテストで確認し、のち自閉症の症状を反映するバッテリー行動解析を実施する。正確を期するため、各群マウスは行動解析までに 10 世代以上継代したうえでオス n=10 以上を使用する。

オープンフィールドテスト

この試験は、新規の場所での行動量や不安行動、情動行動を解析する実験である。横方向のセンサーでマウスの運動量、縦方向のセンサーでマウスの立上回数が測れる明るい正方形のオープンフィールドの中に、4 週齢の雄マウスを入れ、30 分間で新規環境での移動距離、立ち上がり回数、中央区画滞在時間を測定した。

明暗選択テスト

この試験は、マウスが新奇環境下で探索行動を行う性質と、明るい環境を避ける性質を利用し、不安様行動を評価する実験である。明箱と暗箱を連結させた装置に 4 週齢の雄マウスを入れ、10 分間で明箱と暗箱にそれぞれ滞在時間と移動距離、明箱と暗箱を行き来した回数、最初に明箱に入るまでの潜時を測定した。

3 チャンバーテスト

この試験は、未知のマウスに対する反応を見て、社会的相互作用を解析する実験である。3 チャンバー装置は中央、左右の 3 つ部屋があり、左右の部屋の隅にケージが用意され、マウスは 3 つの部屋で自由に行動できる。はじめに、両方のケージが空の状態に 4 週齢の雄マウスを 5 分間置き、装置に慣れさせた。その後、右のケージに同週齢の未知の雌マウスを入れ、被験マウスの行動を 5 分間観察した。マウスが各ケージ周囲および部屋の移動距離、滞在時間を測定した。

母子分離誘発啼鳴反応

この試験は、仔マウスを母マウスから引き離れたときに仔マウスが発する、分離直後から超音波領域に主成分を持つ啼鳴反応を測定する実験である。生後 4、6、7、12 日齢の仔マウスを用いて試験を行った。母マウスより仔マウスを分離後、発声解析装置 MK-1500 の防音箱中のガラススピーカーに入れ、Vocalization analyzer により発声回数を 10 分間計測した。

【結 果】

1) NSF-cKO マウスの作出

最初に作製したグローバル NSF-KO マウスでは、予想通りホモ接合体が胎生致死であったため、まずNSFヘテロ KO マウスを用いて行動実験と脳組織の検討を行った。NSF-cKO-SNS と NSF-cKO-NGS についても作製・維持を行ってきたが、今年度内にマウスの脳組織学的・生化学的検討ないし行動実験を行うまでに至らなかった。

2) 実験結果

①マウスの脳組織学的・生化学的検討の結果:

NSF ヘテロ KO マウスでは NSF の発現が海馬にて減少していることを Western blot 法および免疫染色法により確認した。

・NSF はセロトニントランスポーターの膜表面およびセロトニンの発現を制御

NSF ヘテロ KO マウスのセロトニントランスポーターに影響があるかどうかを検討した。細胞外領域を認識するセロトニントランスポーター抗体を用いた免疫染色法を行った。NSF ヘテロ KO マウスでは、raphe 領域の膜表面セロトニントランスポーター発現が野生型マウスの発現に比べ低下していた。さらに、NSF ヘテロ KO マウスでは脳内セロトニンの発現も減少した。

・NSF はシナプス膜表面における AMPA-R の発現密度の制御に関与

NSF がシナプス膜上 AMPA-R 発現に及ぼす役割を再確認するために、NSF ヘテロ KO マウスで SDS-FRL 法を用いた AMPA-R 発現の高解像度解析を行った。NSF ヘテロ KO マウスでは、総 AMPA-R 標識のラベルでシナプス面積と標識数に有意な正の相関が認められ、かつ総 AMPA-R 標識密度が野生型マウスの標識密度に比べ有意に低いと判明した。すなわち NSF の欠損が、単一シナプスレベルにおける AMPA-R 発現密度制御に関与することが明らかとなった。

②マウスの行動解析結果:

・NSF ヘテロ KO マウスは不安行動を示す

NSF ヘテロ KO マウスでの不安行動を評価するために、オープンフィールドテストおよび明暗選択テストを行った。オープンフィールドテストによる運動量、滞在時間ではヘテロ KO マウスと野生型マウスとは差が出なかったが、立ち上がり回数では野生型マウスに比べ NSF ヘテロ KO マウスの回数は有意に多くなった。さらに、明暗選択テストにより明箱と暗箱にそれぞれ滞在時間と移動距離、明箱と暗箱を行き来した回数では差が見られなかったが、最初に明箱に入るまでの潜時では野生型マウスに比べ NSF ヘテロ KO マウスの潜時は有意に増加していることが認められた。以上の結果より、NSF ヘテロ KO マウスでは不安行動が有意に亢進していると考えられた。

・NSF ヘテロ KO マウスでは社会的相互作用が低下

NSF ヘテロ KO マウスでの社会的相互作用を評価するために、3 チャンバーテストを行った。野生型、ヘテロ KO マウスどちらも新規マウスに対して多くの時間を費やした。即ち、社会的相互作用は一定に保たれていることがわかった。しかし、ヘテロ KO マウスでは、新規マウスに対して滞在平均値が野生型マウスの滞在平均値に比べ有意に低下していることから、ヘテロ KO マウスでは自閉症様の行動異常社会的相互作用が低下したことを見出した。

・NSF ヘテロ KO マウスではコミュニケーションが低下

NSF ヘテロ KO マウスでの母仔間のコミュニケーション能力を評価するために、母子分離誘発後の仔マウスの啼鳴反応測定を行った。野生型、ヘテロ KO マウスのどちらも仔マウスでは生後 4 日に発声回数が増加したが、生後 6 日にはヘテロ KO マウスの発声回数が野生型マウスの発声回数に比べ有意に低いことを見出した。

【考 察】

今回の結果は、NSF の欠損の結果がセロトニントランスポーターのシナプス膜移行を阻害し、かつ自閉症様の行動表現型をマウスにもたらすことを示している。NSF は AMPA 受容体の神経細胞内輸送にも関わるが、この研究結果でも NSF の欠損により AMPA 受容体のシナプス膜移行の異常を再現することが確認できた。今後は NSF ヘテロ KO マウスの行動表現型がセロトニントランスポーターのシナプス膜移行阻害によるものなのかどうか因果関係を詰めることが求められ、すでに作出済の NSF-cKO マウス(NSF-cKO-SNS と NSF-cKO-NGS) の表現型がどうなるか、同様にマウスの行動と脳組織を検証していく必要がある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年、シナプスの形成異常や脳内炎症の関与が有力な自閉症の生物学的仮説をなすが、NSF は SNARE 分子の一つでシナプス機能への関与は広く知られており、NSF の機能異常は、すでに提唱された自閉症の仮説や先行報告を統合する中間表現型として、自閉症の発症メカニズムを包括的に理解する鍵の分子となる可能性がある。本研究での試みが成功すれば、自閉症のセロトニン動態をよく説明するため、自閉症のメカニズム解明に迫る新たな病態仮説の構築、自閉症の新たな診療手段の開発に貢献できる。

NSF は全組織に広く分布し、細胞内の小胞輸送、細胞外への開口分泌に関与する重要な分子である。ショウジョウバエにおいて NSF に変異が入ると致死性であることが示されている (Sanyal et al 1999; Sanyal & Krishnan 2001)。また、単なる NSF 遺伝子のグローバルノックアウトは離乳前に死亡するので成獣にはならない (The Jackson Laboratory)。本研究結果においても NSF 遺伝子ノックアウトマウスホモ接合体が胎生致死であることは再確認できた。本研究で作製・維持している NSF-cKO マウスは、特定の細胞に限定した遺伝子操作で胎生致死のリスクを回避し、さらに特異的な機能解析を可能にするため、今後の NSF-cKO マウスを用いた生体脳での NSF の役割・機能を調べる検討は有益である。

【参考・引用文献】

1. Schain RJ, Freedman DX. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *J Pediatr.* 58:315-20, 1961.
2. Nakamura K, Sekine Y, Ouchi Y, et al. Brain Serotonin and Dopamine Transporter Bindings in Adults with High-Functioning Autism. *Arch. Gen. Psychiatry.* 67(1):59-68, 2010.
3. Iwata K, Matsuzaki H, et al. N-ethylmaleimide-sensitive factor interacts with the serotonin transporter and modulates its trafficking: implications for pathophysiology in autism. *Mol Autism.* 10; 5:33, 2014.
4. Lin JW, Sheng M. NSF and AMPA receptors get physical. *Neuron.* 21(2):267-70, 1998.
5. Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell.* 105(3):331-43, 2001.
6. Sanyal S, Basole A, Krishnan KS. Phenotypic interaction between temperature-sensitive paralytic mutants comatose and paralytic suggests a role for N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor in synaptic vesicle cycling in *Drosophila*. *J Neurosci.* 19(24):RC47, 1999.
7. Sanyal S, Krishnan KS. Lethal comatose mutation in *Drosophila* reveals possible role for NSF in neurogenesis. *Neuroreport.* 12(7):1363-6, 2001.