

シナプス膜移行異常モデルを用いた新規自閉症治療標的の検討

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】

我々は自閉症成人の PET 研究でセロトニン・トランスポーター (SERT) の脳内分布異常を発見した (Nakamura et al., 2010)。その原因が細胞内分子の膜移行異常にあるのではないかと考え、N-ethylmaleimide sensitive fusion protein (NSF) の変化が自閉症の病態に関与する可能性を突きとめた (Iwata et al., 2014)。そこで平成 28 年度に精神薬療一般研究助成「PET 所見に基づく自閉症・シナプス膜移行異常仮説の検証」の補助を得て、これまでに前例のない NSF ノックアウトマウスの作出と解析を試みた。

そのホモ接合体は胎生致死だったため、NSF ヘテロノックアウト (NSF+/-) マウスと野性型 (NSF+/+) マウスを比較した行動実験を行ったところ、社会的相互作用の障害・常同行動・コミュニケーション能力の障害を強く示唆する自閉症様行動異常が NSF+/- マウスに出現した (図 1、図 2、図 3)。NSF+/- マウスにおける SERT 分子の膜移行阻害の有無を検証する目的で、縫線核由来の細胞膜分画中 SERT 発現を調べたところ、細胞膜への SERT 移行が減少していた。また、NSF は AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) に結合して、そのシナプス膜移行も制御する (Song et al., 1998) (Lee, Liu, Wang, & Sheng, 2002)。そこで電子顕微鏡で NSF+/- マウス海馬の AMPAR 発現を確認したところ、そのシナプス膜移行も減少していた。

このシナプス膜移行異常は自閉症の治療標的となるかを確認するために、本研究では【臨床的意義】の項で述べる先行研究から edoneric maleate と運動負荷を NSF+/- マウスに与える実験を行って、治療標的としての可能性を検証する。シナプス膜移行異常の観点から自閉症発症の分子メカニズムを考察し、治療標的を新規に確立しようとする点が特色である。

【目 的】

我々は N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) の機能異常が自閉症の病態に関わる可能性をつきとめ、NSF+/- マウスに自閉症様行動異常が現れることを発見した。本研究では「自閉症のシナプス膜移行異常仮説」を立て、近年報告された AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス膜移行を促す化合物 edoneric maleate と運動負荷を NSF+/- マウスに与えて、マウスに現れる自閉症様の表現型が修復できるかどうかを検証する。本研究で検証する仮説は、従来の自閉症の仮説を統一して説明できる利点があり、ここで得られる知見は将来の自閉症の治療手段の開発にも役立つ可能性がある。

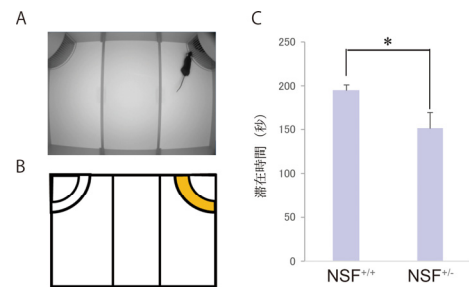


図 1: NSF+/-マウスの社会認識行動

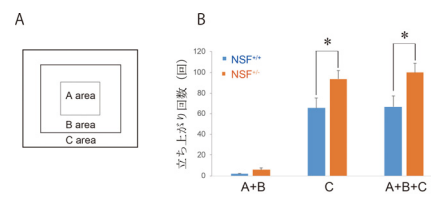


図 2: NSF+/-マウスの常同行動

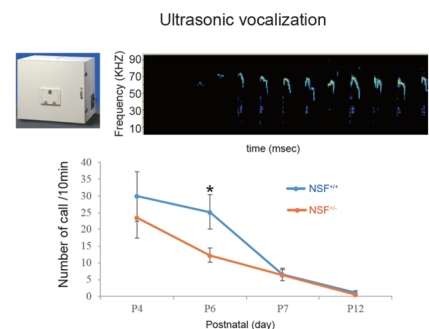


図 3: NSF+/-マウスの超音波発声解析

## 【方 法】

①NSF+/-マウスの行動解析: NSF+/-マウスに認められる自閉症様行動が、edonerpic maleate(図 4)投与とトレッドミル(図 5)による運動負荷の前後でどのように変化するかを検討する。NSF+/-マウスに edonerpic maleate 30mg/kg を 4 週齢の時点から連日朝夕に腹腔投与して、かつトレッドミルによる運動負荷を毎日一定時間与える。1 週間後、2 週間後、4 週間後の時点で図 1～図 3 の行動解析を実施し、薬物および運動負荷を行わなかった対照群と比較して投与効能評価を行う。行動評価の正確を期すため、各群の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。

②NSF+/-マウスの脳組織解析: 上記行動実験と同様の条件で薬物および運動負荷をかけた NSF+/-マウスにみられる SERT ないし AMPAR のシナプス膜移行の障害が、薬物および運動負荷を行わなかった対照群と比較してどのように変化するかを各群オス n=5 以上で検討する。

A) 生化学的評価: 深麻酔下にマウスを経心臓的に灌流・脱血して脳を摘出し、まず Western Blot (WB) 法により、総 SERT ないし AMPAR の発現を調べる。次に脳組織の細胞小器官の分画を抽出して、分画毎の SERT と AMPAR 発現量を WB 法で測定する。また、大脳皮質、海馬、線条体および中脳のシナプス分画を抽出し、分画毎の SERT ないし AMPAR 発現量を WB 法で測定する。

B) 組織学的評価: NSF と AMPAR はともに海馬に強く発現しているため、NSF+/-マウスにおける AMPAR サブユニット微細局在は海馬神経細胞のシナプス内外の膜上で調べる。深麻酔下にマウスを経心臓的に灌流固定して脳を採取する。SERT ないし AMPAR サブユニットの電子顕微鏡レベルの局在を、SDS 処理凍結割断レプリカ標識法 (SDS-FRL 法) (図 6) を用いて、発現量と空間配置の両面で解析し、上記の生化学的実験結果の形態学的な確認を行う。更に、薬物および運動負荷後の分子局在レベルの効果を確認する目的で、NSF+/-マウスへの薬物および運動負荷の有無による海馬 AMPAR の局在変化も検討する。また、シナプス可塑性に深く関与する NMDA 型グルタミン酸受容体の微細局在についても同様に検討する。

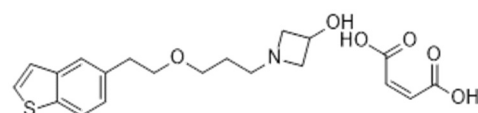


図 4: Edonerpic maleate



図 5: トレッドミル装置 (メルクエスト)

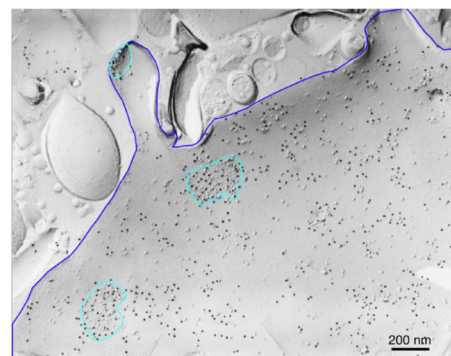


図 6: 海馬歯状回の凍結割断レプリカ免疫標識像: 黒い粒子が AMPAR

## 【結 果】

NSF+/-マウスに edonerpic maleate の投与実験を開始する前の確認として、横浜市立大学医学部・高橋研究室と共同で、マウス脳内の AMPA-R 発現を再検討した。その結果、NSF+/-マウスの海馬では野生型に比して細胞膜上の AMPA-R 発現に有意差がない(図 7)と判明し、その後に皮質でも同じ傾向が確認された(図 8)。そのため、edonerpic maleate の投与実験は残念ながら見送られた。

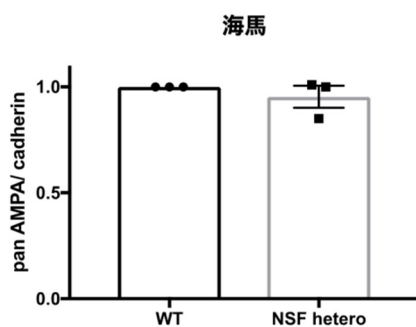


図 7: マウス海馬の AMPA-R 発現 (N=3)

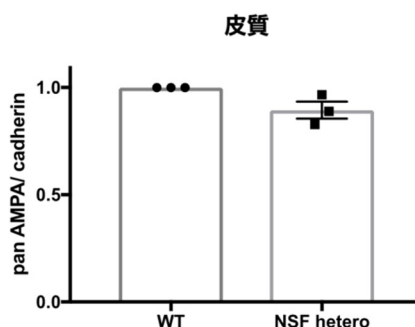


図 8: マウス皮質の AMPA-R 発現 (N=3)

一方、電子顕微鏡で NSF+/-マウスの海馬シナプス上 AMPA-R を再び精査した。低倍率で dendritic spine は、樹状突起から出たドーム状の構造として観察される(図 9:小さい黒い標識は GluA1-4 の全てを認識する pan AMPA-R 抗体による免疫金標識。大きいドットは NR1 標識。興奮性シナプス後膜領域は膜内粒子 IMP がクラスター上に観察される紫色で色付けされた領域で、これをシナプス面積として計測)。各計測シナプスの面積とその内部の AMPAR 標識数の関係を示した解析では、野生型、KO どちらも正の相関があり、シナプスの AMPAR 発現密度は一定に保たれていた。この AMPAR 標識密度の平均値は、野生型に比べて KO で有意に低下していた。この傾向は、シナプス可塑性の初期相の誘導と維持に関与が深い GluA1 サブユニットに着目した解析を行うと、より顕著に確認された。

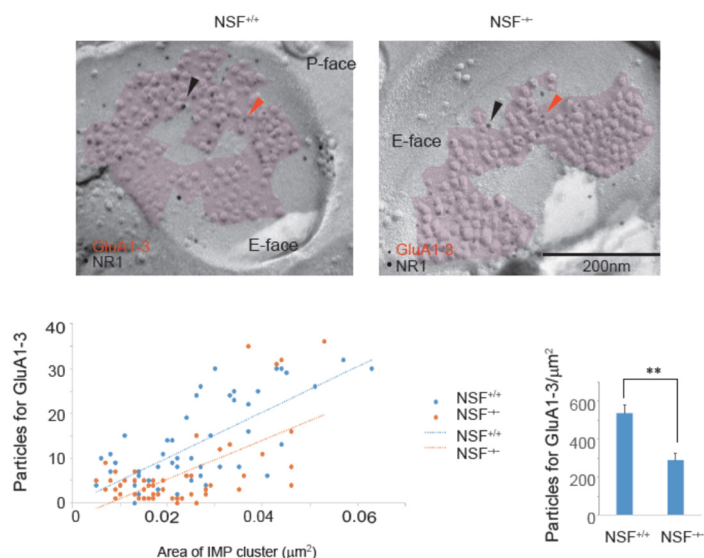


図 9: NSF ヘテロ KO マウスの海馬シナプス上の AMPA-R.

## 【考 察】

以上の結果から、NSF+/-マウスの海馬で細胞膜への AMPA-R 移行に差はないものの、シナプスでの dendritic spine への移行には明確な有意差があったことから、NSF は dendritic spine への AMPA-R 移行を担っているものと考えられた。

今後は、自閉症モデルマウスに Ampakine (CX516, CX546) の投与が有効とする報告 (Tatsukawa et al., 2019) (Guo et al., 2019) から、NSF ヘテロ KO マウスに認められる自閉症様の異常行動が、Ampakine (CX516, CX546) の投与と自発運動負荷の前後でどのように変化するかを検討する。NSF+/-マウスに 4 週齢の時点から Ampakine (CX516, CX546) 25mg/kg を連日腹腔投与し、かつ回転輪を設置したケージで wheel running による自発運動負荷を毎日一定時間与える(図 10)。1 週間後、2 週間後、4 週間後の時点で、自閉症様行動を反映するバッテリー行動解析を実施し、薬物および運動負荷を行わなかった対照群と比較して投与効能評価を行う。



図 10: 回転輪による自発運動負荷

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

シナプス分子の細胞膜移行を促す手段は長い間知られていなかったが、横浜市立大学の高橋らは、edonergic maleate が AMPAR のシナプス膜移行を促すことで脳損傷後の脳の可塑性を向上させ、リハビリテーション依存性に運動機能が回復することを動物実験で示した (Abe et al., 2018)。自閉症の臨床においても、運動療法は社会性や遂行機能の向上に有用である (Yu, Wong, Lo, So, & Chan, 2018) (Andoh et al., 2019)。脳内 AMPAR のシナプス膜移行の減少によりマウスに自閉症様の表現型が現れることは他の自閉症モデル研究でも指摘されている (Irie, Badie-Mahdavi, & Yamaguchi, 2012) (Heise et al., 2018)。しかし、自閉症の治療標的としての可能性は未知である。NSF の発現阻害によるシナプス膜移行異常は、自閉症の治療標的となり得るだろうか。Zoghbi が 2003 年に唱えた「自閉症のシナプス異常仮説」以来、自閉症はシナプス分子の輸送・集積機構の異常が原因ではないかと多くの研究者が検討し、関連遺伝子も見出されている (Morimura et al., 2017)。しかし、シナプス膜移行異常の観点から治療手段が具体的に提示されたことはなく、この点で本研究は独創的といえる。本研究から得られる知見は自閉症の基本原理の理解に貢献できるのみならず、将来の自閉症の治療手段開発にも役立つ可能性がある。

## 【参考・引用文献】

- Abe, H., Jitsuki, S., Nakajima, W., Murata, Y., Jitsuki-Takahashi, A., Katsuno, Y., ... Takahashi, T. (2018). CRMP2-binding compound, edonergic maleate, accelerates motor function recovery from brain damage. *Science*, *360*(6384), 50-57. <https://doi.org/10.1126/science.aao2300>
- Andoh, M., Shibata, K., Okamoto, K., Onodera, J., Morishita, K., Miura, Y., ... Koyama, R. (2019). Exercise Reverses Behavioral and Synaptic Abnormalities after Maternal Inflammation. *Cell Reports*, *27*(10), 2817-2825.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.015>
- Guo, B., Chen, J., Chen, Q., Ren, K., Feng, D., Mao, H., ... Wu, S. (2019). Anterior cingulate cortex dysfunction underlies social deficits in Shank3 mutant mice. *Nature Neuroscience*, *22*(8), 1223-1234. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0445-9>
- Heise, C., Preuss, J. M., Schroeder, J. C., Battaglia, C. R., Kolibius, J., Schmid, R., ... Boeckers, T. M. (2018). Heterogeneity of cell surface glutamate and GABA receptor expression in shank and CNTN4 autism mouse models. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*(June), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00212>
- Irie, F., Badie-Mahdavi, H., & Yamaguchi, Y. (2012). Autism-like socio-communicative deficits and stereotypies in mice lacking heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(13), 5052-5056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117881109>
- Iwata, K., Matsuzaki, H., Tachibana, T., Ohno, K., Yoshimura, S., Takamura, H., ... Mori, N. (2014). N-ethylmaleimide-sensitive factor interacts with the serotonin transporter and modulates its trafficking: Implications for pathophysiology in autism. *Molecular Autism*, *5*(1). <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-33>
- Lee, S. H., Liu, L., Wang, Y. T., & Sheng, M. (2002). Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron*, *36*(4), 661-674. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01024-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01024-3)
- Morimura, N., Yasuda, H., Yamaguchi, K., Katayama, K.-I., Hatayama, M., Tomioka, N. H., ... Aruga, J. (2017). Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrfr2/SALM1-deficient mice. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/10.1038/ncomms15800>
- Nakamura, K., Sekine, Y., Ouchi, Y., Tsujii, M., Yoshikawa, E., Futatsubashi, M., ... Mori, N. (2010). Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism. *Archives of General Psychiatry*, *67*(1). <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.137>
- Song, I., Kamboj, S., Xia, J., Dong, H., Liao, D., & Huganir, R. L. (1998). Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron*, *21*(2), 393-400. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80548-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80548-6)
- Tatsukawa, T., Raveau, M., Ogiwara, I., Hattori, S., Miyamoto, H., Mazaki, E., ... Yamakawa, K. (2019). Scn2a haploinsufficient mice display a spectrum of phenotypes affecting anxiety, sociability, memory flexibility and amphetamine CX516 rescues their hyperactivity. *Molecular Autism*, *10*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13229-019-0265-5>
- Yu, C. C., Wong, S. W., Lo, F. S., So, R. C., & Chan, D. F. (2018). Study protocol: A randomized controlled trial study on the effect of a game-based exercise training program on promoting physical fitness and mental health in children with autism spectrum disorder. *BMC Psychiatry*, *18*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12888-018-1635-9>