

ゼブラフィッシュ表現型解析を用いた自閉スペクトラム症治療薬の探索

木村 亮

京都大学 大学院医学研究科 形態形成機構学

【研究の背景】

自閉スペクトラム症(ASD)は、社会コミュニケーションの障害などを特徴とし、国内外で増加しているが、その原因は不明である。近年、大規模なゲノム研究により ASD に関わる遺伝子が多数報告されているが、それら個々の遺伝子の機能解析は遅れており、創薬への障壁となっている。ゼブラフィッシュは、ヒトと高い相同性を有し、マウスに比べ飼育コストがかからず、多数の検体を扱えることなどから、近年モデルとして注目を集めている。我々は、これまでに行動解析やゲノム編集技術などを活用し、ゼブラフィッシュによる精神疾患の病態解明を目指してきた(Suzuki S et al. Molecular Brain 2022)。

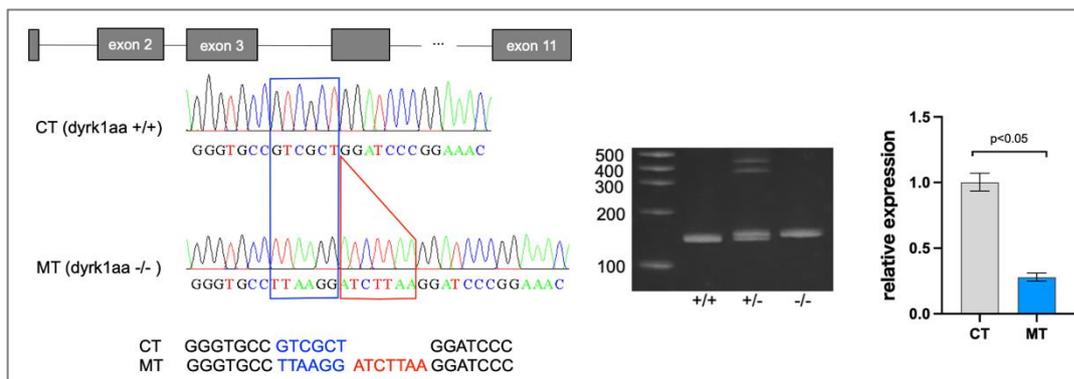
【目 的】

本研究の目的は、ASD 発症に関わる最有力遺伝子の一つである *dyrk1a* 遺伝子を標的として、モデル作成・表現型解析等を通じて、創薬スクリーニングへの可能性を検討することである。*dyrk1a* 変異を有する患者では、自閉症症状に加え、知的障害、てんかん、消化器症状などが生じることが知られているが、治療法はない。

【方法と結果】

1)ゲノム編集による *dyrk1aa* 変異を有する zebrafish の作成

ゼブラフィッシュは、遺伝子重複により、ヒト *dyrk1a* と相同性を有する遺伝子が、2種(*dyrk1aa*, *dyrk1ab*)がある。今回の実験では、ヒトとの相同性がより高い *dyrk1aa* を標的とした。CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集により、*dyrk1aa* exon3 に変異を有する魚を得た。ヘテロ二本鎖移動度分析(HMA)による泳動像および遺伝子発現の結果を下図に示す。



2) 社会性および不安様行動異常

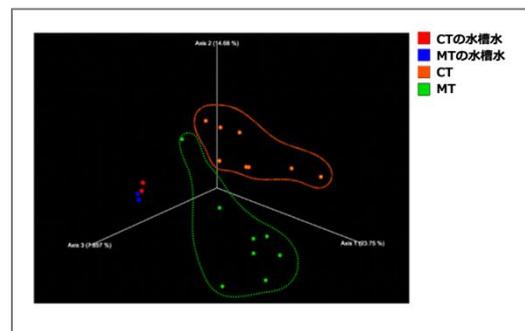
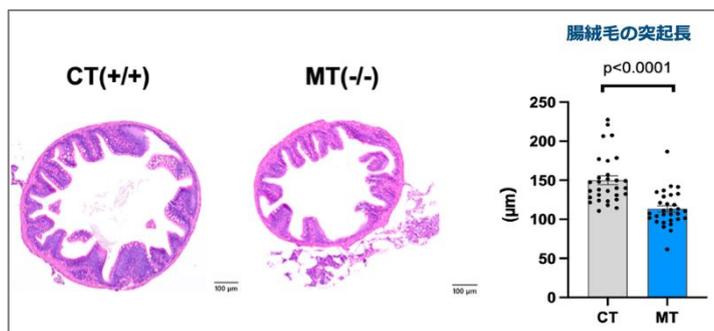
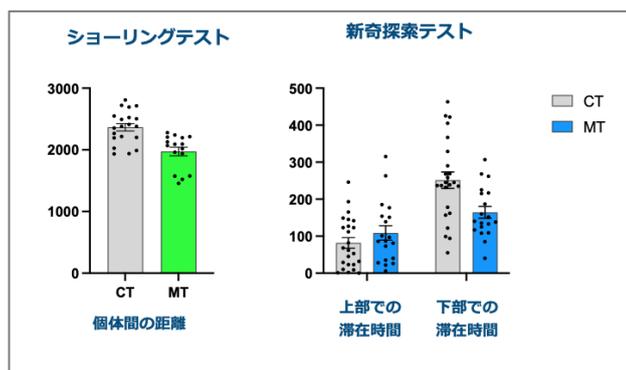
ゼブラフィッシュは高い社会性を有することが知られている。そこで、グループ内の魚の平均距離を測定するショールングテストを実施したところ、変異体では、個体間の距離が有意に長いことがわかった。このことは変異体では社会性が低下していることが示唆された。また不安様行動を調べる新奇探索テストを実施したところ、変異体では、水槽下部での滞在時間が少なく、上部での滞在時間が長い傾向がみられ、新奇環境に暴露された際の不安が少ないことが示唆された。

3) 腸管組織異常

ゼブラフィッシュの各組織について顕微鏡観察(HE 染色)を行ったところ、変異体では腸管組織に顕著な違いがみられた。具体的には、変異体では柔突起の長さが有意に短く、また杯細胞も少ない傾向が見られた。

4) 腸内細菌叢解析

脳と腸は自律神経系や液性因子を介して密に関連しており(腸脳相関)、近年、ASD などの神経発達症においても腸内細菌叢異常が見いだされている。そこで本研究でみられた腸管組織異常は、腸内細菌叢と関連しているのか検証した。具体的には、給餌条件を厳密にコントロールして生育し、腸管内容物を採取、16S rRNA 菌叢解析を実施した。水槽内の飼育水の影響も考慮し同時に菌叢解析を実施した。その結果、野生型と変異体とでは細菌叢の有意な違いが認められた。



【考 察】

本研究で作成した *dyrk1aa* 変異ゼブラフィッシュでは、行動異常だけでなく、興味深いことに腸管組織・腸内細菌叢異常が認められた。これまでに行われたヒトやマウスを用いた ASD の研究においても、腸内細菌叢異常が認められており、動物種に関わらず共通の要因なのかもしれない。一方で、行動異常と腸内細菌叢との因果関係については、今後、無菌系を用いた実験での検証が必要であろう。現在、解析を継続中であるが、今後は本モデルを用いて症状を改善しうる新規化合物・既存薬スクリーニングを実施していく予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

ASD は異質性が高いことから、関連が見いだされた個々の変異について、モデル作成等を通じて病態解明を行い、それらの結果を収束・統合するアプローチが有用であると考えられる。そのような観点から、ゼブラフィッシュを用いた病態解明・創薬探索研究は実臨床にとって非常に重要である。

消化器症状は、診断基準(DSM-5)にはないものの、臨床現場では重要な合併症状として認識されている。行動異常に加え、腸内細菌叢異常の観点から病態を考える上でも、ゼブラフィッシュモデルを活用した研究は、今後臨床への貢献度が大きいことが予想される。

【参考・引用文献】

Suzuki S, Kimura R, Maegawa S, Nakata M, Hagiwara M. Different effects of methylphenidate and atomoxetine on the behavior and brain transcriptome of zebrafish. *Molecular Brain*. 13(1):70, 2020