

自閉症に関わるシナプス受容体を制御する新たな分子の役割の解明

研究代表者：謝 敏珏（子どものこころの発達研究センター・助教）

共同研究者：深澤 有吾（医学部・教授）

概要	我々は自閉症者ではセロトニンおよびセロトニン・トランスポーター（SERT）の脳内分布に異常があることを報告した。このメカニズムの解明を目的として、SERTを細胞膜に輸送する分子の網羅的解析を行い、N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) が SERT に結合すること、および、自閉症患者のリンパ球に NSF の機能異常が認められることを明らかにした。そこで、独自に作出した NSF ノックアウト (KO) マウスの行動表現型とシナプス伝達について検討した。NSF ヘテロ KO マウスには社会的相互作用及び母仔間コミュニケーションの低下、および自閉症様の不安行動の増加が見られた。また、シナプス膜表面における AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) および NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) の発現密度の制御に NSF が関与することを示唆する結果を得た。
関連キーワード	NSF、自閉症、SERT、受容体

研究の背景および目的

自閉症は、コミュニケーションや社会性行動の障害などを特徴とする精神発達障害である。自閉症者の脳ではセロトニンをはじめとする神経伝達物質の含有量に異常があることが報告されており、我々も自閉症者でセロトニン・トランスポーター (SERT) の脳内分布に異常があることを見出した (Nakamura 2010)。自閉症患者の死後脳では SERT mRNA 発現が健常者と同じであったことから、SERT の細胞膜発現調節機構の異常が疑われ (自閉症の機能分子シナプス膜移行異常仮説)、この異常と自閉症発症との関与を検討する必要が生じた。そこで、SERT の膜発現調節の分子実体を明らかにするため、SERT 結合分子の網羅的解析を行い、N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) を同定した。さらに自閉症患者の死後脳で NSF mRNA 発現量が減少傾向であることも見出した (Iwata 2014)。また、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培養細胞レベルで示した (Iwata 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「自閉症の機能分子シナプス膜移行異常仮説」をたてた。

本申請課題では、NSF 遺伝子ヘテロ KO マウスを作製し、このマウスの社会的相互作用異常、コミュニケーションや不安など自閉症に頻発する行動異常の有無を検証する。さらに、この NSF ヘテロ KO マウスの脳内で SERT の発現異常が起きているかを検証する。また、NSF がシナプス伝達関連分子 (グルタミン酸、ドーパミン、GABA などの受容体) 輸送に関与すると報告されていることから (Lin and Sheng 1998, Kneussel 2002)、セロトニン神経やドーパミン神経特異的な NSF ノックアウトマウス (cKO) の作製と解析を試み、「自閉症の機能分子シナプス膜移行異常仮説」をさらに深く検証し、自閉症発症の分子メカニズムの解明につなげたい。

研究の内容および成果

1) NSF-KO マウスの作出と解析

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。セロトニン神経細胞特異的な NSF-cKO マウスについても作製・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

①NSF ヘテロ KO マウスの組織学的・生化学的検討:

NSF ヘテロ KO マウスの海馬では、NSF の発現量が野生型に比べ 50%以下に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 はシナプス膜表面における AMPAR および NMDAR の発現密度の制御に関与する

NSF がシナプス膜上 AMPAR 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 AMPAR 発現密度の高解像度解析を行った。NSF ヘテロ KO マウスでは、総 AMPAR 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 AMPAR 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 が単一シナプスレベルにおける AMPAR 発現密度制御に関与することが明らかとなった。同様に NMDAR の必須サブユニットである NR1 の発現解析も実施し、NSF ヘテロ KO マウスで NR1 標識密度が野生型マウスの標識密度に比べ有意に増加することを見出した。以上のことから NSF はシナプスの興奮性グルタミン酸受容体の局在に重要な役割を果たしていることを証明した。

②NSF ヘテロ KO マウスの行動解析:

・NSF ヘテロ KO マウスは不安様行動を示す

NSF ヘテロ KO マウスの不安様行動を評価するため、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では運動量、滞在時間にヘテロ KO マウスと野生型マウスと間に有意な差は認められなかったが、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かった。明暗選択テストでは、明箱と暗箱の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みられず、暗箱から明箱に初めて入るまでの潜時は野生型マウスに比べ NSF ヘテロ KO マウスで有意に増加していた。以上の結果より、NSF ヘテロ KO マウスでは不安様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する

NSF ヘテロ KO マウスの社会的相互作用を評価するため、3チャンバーテストを行った。野生型とヘテロ KO マウスの両方で、新規マウスに対する接触行動が認められたが、ヘテロ KO マウスの新規マウスに対する接触時間は野生型マウスに比べ有意に低下していた。即ち、NSF の脳内発現量が半減することにより、社会的相互作用行動が低下することが明らかとなった。

・NSF ヘテロ KO マウスではコミュニケーションが低下する

NSF ヘテロ KO マウスの母仔間のコミュニケーション能力を評価するため、母子分離誘発後の仔マウスの啼鳴反応を測定した。野生型、ヘテロ KO マウスの仔マウスではどちらも生後 4 日目に発声回数の増加が同程度確認されたが、生後 6 日目のヘテロ KO マウスの発声回数は野生型マウスの発声回数に比べ有意に低かった。

上記の実験結果の通り、NSF ヘテロ KO マウスは自閉症様の行動異常を呈し、グルタミン酸受容体のシナプス局在に異常があることを見出した。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

本助成による成果発表は投稿する予定。

「学会発表」

Xie MJ, Ishikawa Y, Yagi H, Matsuzaki H, Fukazawa Y, Sato M. Phosphoinositide-responsive Phldb2 regulates synaptic plasticity through glutamate receptors. The Society for Neuroscience 47th annual meeting (11月11日～15日)、2017年11月11日、ワシントン、USA.

謝 敏カク、松崎秀夫: 新規セロトニントランスポーター制御因子としての NSF ヘテロノックアウト

マウスの解析. 第 18 回 ORIGIN 神経科学研究会、2017年8月26日、大阪府河内長野市.

Xie MJ, Iwata K, Fukazawa Y, Matsuzaki H: Autism-like behavioral abnormalities in N-ethylmaleimide-sensitive factor knockout mice. 第 60 回日本神経化学会、2017年9月7日、宮城県仙台市