

アミノ酸を中心とした脳発達の栄養学的研究

タクミ
内匠 透

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

緒言

脳内神経伝達物質にはグルタミン酸や GABA などのアミノ酸、さらにはアミノ酸代謝産物であるセロトニンやドーパミンといったアミノ酸及びその関連物質があり、脳機能に重要な働きをしている。また、アミノ酸は脳発達に重要であることは知られているが、その詳細な機構は不明である。

自閉症をはじめとする発達障害は、患者数の増加とともに社会的にも大きな問題である。我々は、最新の染色体工学的手法を用いて、自閉症ヒト型モデルマウスを作製することに最近成功した¹⁾。ヒト染色体 15q11-13 重複は、自閉症の細胞遺伝的な異常としてもっとも頻度の高いものとして知られている。本モデルマウスは、このヒト染色体 15q11-13 重複をマウス相当染色体領域(マウス染色体 7 番)に人工的に構築したものである。また、本重複領域はゲノム刷込み領域としても知られた領域であり、父親由来のアレル、母親由来のアレルでそれぞれ遺伝子発現が異なる。

本モデルの特徴は、下記の通り自閉症様行動を示すだけでなく、ヒト自閉症患者の染色体異常を同様に有している点と、自然発症マウスを見つける事が困難な精神疾患に対して、自閉症遺伝学のためのファウンダーマウスを意図的に作製したという点であり、構成的妥当性を有するモデルと言える。すなわち、真の意味でのヒト型モデルと呼べる²⁾。ノックアウトマウスでたまたま自閉症様症状が見られたこれまでの "putative" モデルマウスとは、一線を画しており、勿論世界初の報告である。

一連の行動解析の結果、本父性重複マウスは、社会的相互作用の障害、超音波啼鳴 (USV) 発達の遅延、固執的常同様運動、不安等の自閉症様行動を示した。また、本社会性異常行動の原因の一つとして、重複領域内にある非コード RNA である snoRNA の解析の結果、セロトニン 2c (5HT2c) 受容体の RNA editing を介するセロトニンシグナルの異常を明らかにした¹⁾。

本研究では、本モデルを用いて、脳発達障害におけるアミノ酸及びその代謝産物であるモノアミン系の異常を調べることにより、脳発達に及ぼすアミノ酸の機能を明らかにする。さらなる行動解析と脳内のモノアミン解析の結果、発達期におけるセロトニンの異常が脳発達に関与している可能性が示唆された³⁾。

結果

1. 行動解析

すべての行動解析は C57BL/6J に 10 世代以上戻し交配したものを使用した。

12 時間明暗周期 (LD) の同調ののち、恒常暗条件 (DD) 条件下で、patDp/+ マウスの概日行動リズムは野生型との間に有意な差を認めなかった。概日リズム周期は両者の間で有意な差がなかった。同調期間の最初の 1 週間の活動量は明期、暗期いずれも patDp/+ マウスは野生型に比べて減少していた。また、位相変位の実験においても、patDp/+ マウスと野生型間で有意な差を認めなかった。

オープンフィールドテストにおいては、patDp/+ マウスは野生型に比べて、総移動距離が減少、中心領域での滞在時間が減少、垂直方向の運動が減少していた。最初 30 分間の中心滞在時間/総移動距離の比を計算すると、patDp/+ マウスは野生型に比べて有意に低い値を示した。これらの結果は、patDp/+ マウスにおいて不安様行動が増加し、新奇環境での探索行動が減少していることを示唆している。

Novelty suppressed feeding test では、24 時間の給餌制限ののち、food pellet をオープンフィールド内の中心において、行動を測定した。patDp/+ マウスは野生型に比べて餌を食べに行くまでの時間が有意に長かった。また、野生型マウスではほとんどのものが 5 分以内に餌を食べるのに対し、60% の patDp/+ マウスは餌を食べなかった。これらの結果は、空腹という生理現象の中でも patDp/+ マウスの不安様行動が増加していることを

示唆している。

Contextual and cued fear conditioning テストにおいて、条件刺激 (CS) として 60dB white noise を 30 秒、非条件刺激 (US) として mild foot shock (2 sec, 0.5 mA) を行った。foot shock に対するすくみ反応は patDp/+ および野生型マウスで同様に見られた。しかしながら、調べたいかなる条件下においても (刺激の有無にかかわらず)、patDp/+ マウスのもとのすくみ率は高かった。これらの結果は、patDp/+ マウスが恐怖様行動を示していることを示唆している。あるいは、patDp/+ マウスのもともとのすくみ率が高いことから新奇な環境での不安度の高さを意味しているかもしれない。

Y 迷路テストでは、patDp/+ マウスがアームに入る数の差が野生型に比べて明らかに減少していた。一方、正しいアームを選択する率には両者に差は見られなかった。これらの結果は、patDp/+ マウスの作業記憶は障害されていないものの、新奇探索行動が減少していることを示唆している。

ガラス玉埋め行動テストでは、12 × 27 × 9 cm のケージの中で、5 cm の床敷の上に 25 個のガラス玉をおき、ガラス玉を埋める行動を自動的に記録した。patDp/+ マウスのガラス玉を埋める数は野生型に比べて有意に減少していた。一方、両者の自発運動量には差が認められなかった。これらの結果は patDp/+ マウスの新

奇探索行動が減少していることを示唆している。

2. 神経化学的解析

アダルト脳の領域毎のモノアミン量を HPLC で測定したところ、patDp/+ マウスの小脳、中脳、嗅脳において、セロトニン (5-HT) およびその代謝物である 5-HIAA の量が減少していた。一方、ドーパミン (DA)、ノルエピネフリン (NE) には差がみられなかった (表 1)。

さらに発達段階を調べるために、1、2、3 週の脳の領域毎のモノアミン量を同様に測定した。調べた脳領域すべてにおいて (大脳皮質、海馬、小脳、視床下部、中脳、橋および延髄)、patDp/+ マウスの 5-HT 量は野生型に比べて減少していた。また、DA およびその代謝物である HVA, DOAPC は、patDp/+ マウスの橋および延髄で増加傾向にあった。一方、NE およびその代謝物である MHPG では一定の傾向はみられなかった (図 1)。

以上の結果から、脳内、特に発達期における 5-HT 量の減少が行動異常に関与していることが示唆された。

考 察

行動実験の結果、patDp/+ マウスは新規環境における不安度の増加という共通の現象が観察された。129S6 バックグランドを用いた行動解析でも、例えば、放射状迷路試験では、最終的学習能力に差がないものの、空腹

表 1 アダルト patDp/+ マウス脳におけるモノアミン量

| Region and genotype | | 5-HT (pg/mg protein) | 5-HIAA (pg/mg protein) | 5-HT turnover (5-HIAA / 5-HT) | DA (pg/mg protein) | DOPAC (pg/mg protein) | NE (pg/mg protein) |
|---------------------|---------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| Cerebellum | WT | 800.89 ± 51.09 | 610.68 ± 32.47 | 0.78 ± 0.05 | 91.32 ± 5.54 | 35.67 ± 5.26 | 2988.23 ± 71.28 |
| | patDp/+ | 747.14 ± 54.16 | 533.36 ± 13.65* | 0.74 ± 0.05 | 85.99 ± 2.69 | 31.20 ± 1.47 | 2912.16 ± 44.96 |
| Midbrain | WT | 5723.94 ± 181.88 | 4670.96 ± 135.58 | 0.82 ± 0.03 | 2113.13 ± 62.56 | 695.06 ± 26.39 | 4731.57 ± 105.54 |
| | patDp/+ | 5051.83 ± 173.53* | 4089.1 ± 139.51* | 0.82 ± 0.04 | 2985.01 ± 931.77 | 808.40 ± 193.80 | 4688.49 ± 131.68 |
| Olfactory bulb | WT | 4660.38 ± 104.9 | 2015.87 ± 145.69 | 0.44 ± 0.04 | 2630.63 ± 113.94 | 770.08 ± 53.47 | 3111.66 ± 100.50 |
| | patDp/+ | 4266.45 ± 142.64* | 1590.04 ± 57.23* | 0.38 ± 0.02 | 2622.95 ± 50.96 | 709.17 ± 45.87 | 3244.77 ± 63.60 |
| Prefrontal cortex | WT | 7093.56 ± 142.73 | 1690.35 ± 60.42 | 0.24 ± 0.01 | 3208.95 ± 1083.73 | 540.37 ± 88.40 | 5771.15 ± 123.21 |
| | patDp/+ | 6846.74 ± 102.99 | 1546.28 ± 57.71 | 0.23 ± 0.01 | 2151.43 ± 595.04 | 373.67 ± 60.14 | 5545.47 ± 85.69 |
| Pons and medulla | WT | 4405.72 ± 649.21 | 4354.89 ± 294.4 | 1.28 ± 0.24 | 1070.44 ± 170.95 | 339.01 ± 34.75 | 6086.68 ± 204.58 |
| | patDp/+ | 4359.11 ± 620.47 | 4148.24 ± 160.09 | 1.21 ± 0.21 | 1041.80 ± 149.70 | 337.42 ± 20.21 | 6487.35 ± 199.50 |

小脳 (cerebellum) 大脳皮質 (cerebral cortex) 海馬 (hippocampus) 視床下部 (hypothalamus) 中脳 (midbrain) 橋および延髄 (pons and medulla)。* p<0.05.

であってもなかなか餌を食べに行かないという、今回の一連の行動実験でみられた同様の行動が観察された²⁾。ヒト父性重複例では、同様の不安様行動が報告されている⁴⁾。さらに、ヒト父性重複例においては、運動協調性の問題が指摘されている⁵⁾。マウス小脳は探索行動や動機付けに関与するとされており⁶⁾、低い探索傾向や常同様の行動を示す自閉症患者と小脳の低形成がリンクするこ

とが報告されている⁷⁾。このようなことから、小脳はさらに解析する標的領域の一つである。

今回の実験結果よりアダルト脳よりも発達期の脳内での5-HT量の違いが顕著であったことから、発達期の5-HT量の重要性が示唆される。実際、マウスの生後4-21日でのSSRI投与は、成長後の行動異常(探索行動の現象、不安の上昇、うつ様行動等)を示すが、アダルト

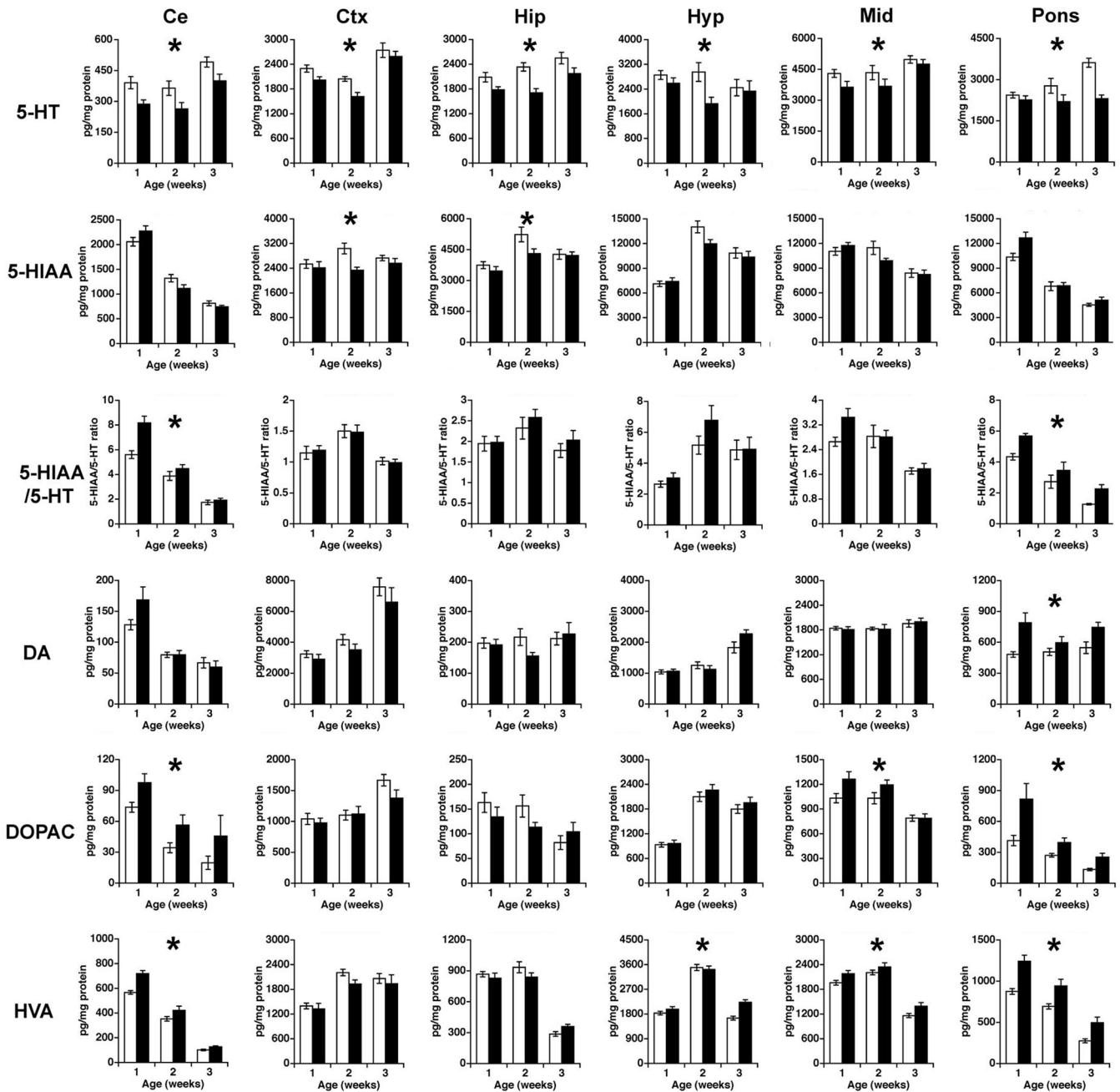


図 1

atDp/+ マウスでは 5-HT の減少がみられる
 発達期 (1、2、3 週) の脳内組織でのモノアミン量を測定。小脳 (cerebellum) 大脳皮質 (cerebral cortex) 海馬 (hippocampus)
 視床下部 (hypothalamus) 中脳 (midbrain) 橋および延髄 (pons and medulla)。* p<0.05.

トでの SSRI の投与ではこれらの異常が観察されないことが報告されている^{8,9)}。

今回の行動実験や神経化学的解析でみられた patDp/+ マウスの表現型は、5-HT 関連の遺伝子改変マウスの表現型と共通のものが観察される。特に、セロトニントランスポーター (5-HTT) 欠損マウスとは、行動、神経化学両実験の結果とよく似通っている^{10,11)}。面白い事に、5-HTT ノックアウトマウスでも、社会性行動の異常が観察されている¹²⁻¹⁴⁾。

我々は既に重複領域内に存在する snoRNA の MBII52 は父性発現を示すことおよびセロトニン 2c 受容体 (5-HT2cR) の関連を明らかにした¹⁾。5-HT2cR が背側縫線核の GABA 作動性インターニューロンに発現すると 5-HT 神経活動および神経伝達を抑制することが報告されている¹⁵⁾。patDp/+ マウスでは、背側縫線核における局所回路の障害の可能性があり、この障害が異常行動の関連しているかもしれない。

また重複領域内父性発現遺伝子である Necdin と 5-HT の関連が示唆されており、Necdin 欠損マウスでは、縫線核の 5-HT 神経小胞が大きくなっており、5-HT 神経線維の形態変化が観察されている¹⁶⁾。この結果は、Necdin が patDp/+ マウスの責任遺伝子の一つである可能性を示唆している。

謝 辞

援助いただきました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝致します。本研究の共同研究者は、広島大学大学院医歯薬学総合研究科の玉田紘太、畠中史幸、中井信裕、元大阪バイオサイエンス研究所の中谷仁、友永省三、藤田保健衛生大学の宮川剛、生理学研究所の高雄啓三、各博士であり、皆様に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) J. Nakatani, et al.; *Cell*, **137**, 1235-1246, 2009.
- 2) T. Takumi; *Brain Dev.*, **32**, 753-758, 2010.
- 3) K. Tamada, et al.; *PLoS ONE*, **5**: e15126, 2010.
- 4) R. Mao, et al.; *Genet. Med.*, **2**, 131-135, 2000.
- 5) C. Depienne, et al.; *Biol. Psychiatry*, **66**, 349-359, 2009.
- 6) J. Caston, et al.; *Brain Res.*, **808**, 232-237, 1998.
- 7) K. Pierce and E. Courchesne; *Biol. Psychiatry*, **49**, 655-664, 2001.
- 8) M.S. Ansorge, et al.; *Science*, **306**, 879-881, 2004.
- 9) M.S. Ansorge, et al.; *J. Neurosci.*, **28**, 199-207, 2008.
- 10) D.L. Murphy and K.P. Lesch.; *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, 85-96, 2008.
- 11) A.V. Kalueff, et al.; *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **34**, 373-386, 2010.
- 12) A.V. Kalueff, et al.; *Brain Res.*, **1169**, 87-97, 2007.
- 13) A.V. Kalueff, et al.; *Genes Brain Behav.*, **6**, 389-400, 2007.
- 14) S.S. Moy, et al.; *Genes Brain Behav.*, **8**: 129-142, 2009.
- 15) F. Sotty, et al.; *Neuropharmacology*, **57**: 18-24, 2009.
- 16) S. Zanella, et al.; *J Neurosci.*, **28**, 1745-1755, 2008.