

主論文の要旨

**A mouse model of Timothy syndrome exhibits
altered social competitive dominance and
inhibitory neuron development**

〔 Timothy 症候群モデルマウスは社会的競争優位性と
抑制性神経細胞回路形成の異常を示す 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
高次医用科学講座 臓器病態診断学分野

(指導：松下 正 教授)

小澤 享弘

【緒言】

自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder (ASD)) は、社会的コミュニケーションおよび相互関係における持続的な障害、常同的・反復的な行動・興味を主症状とする神経発達症である。ASD に関連する様々な遺伝的要因が報告されているが、生物学的メカニズムは依然として不明な点が多い。神経カルシウムシグナリングは、神経回路形成や神経活動修飾において重要な役割を果たす。幼弱神経細胞においては、 γ -アミノ酪酸 (GABA) やグルタミン酸によって誘発される、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネル ($\text{Ca}_v1.2$) を介した Ca^{2+} 流入が、抑制性神経細胞の移動を制御することが知られている。またカルシウムシグナリングは、興奮性および抑制性神経細胞でシナプス形成に寄与する。これらのプロセスは、ASD で報告されている、樹状突起密度の変化や興奮性・抑制性シナプス機能の均衡 (E/I バランス) の崩壊に関与すると考えられている。 Ca^{2+} と ASD の関連を示す疾患として Timothy 症候群 (TS) が注目され研究されている。TS は、 $\text{Ca}_v1.2$ の機能獲得型変異 (G406R 変異) によって引き起こされ、心電図 QT 時間延長、合指などの症状に加え、症候性 ASD を呈する。G406R 変異によって $\text{Ca}_v1.2$ の不活化遅延が生じ、細胞内 Ca^{2+} 流入量増加が起きることが TS の病因と考えられている。TS モデルマウス (TS2-neo) は、自閉症様行動である反復行動、社会性行動などの異常を示すことが知られているが、神経回路形成の異常に関しては不明な点が多い。

本研究では近年開発された行動評価系を用いて TS2-neo 系統の ASD 様行動表現型を検証するとともに、抑制性神経回路形成異常を組織学的に検討した。

【方法】

ASD 様行動の解析には、グループ飼育環境下での行動柔軟性と社会的競争優位性を判定する為に、IntelliCage システムを用いた。IntelliCage とはマウスの飼育が可能な長方形の大型ケージで、4つのコーナーに給水瓶が設置されている。給水瓶へは各マウスに埋め込まれたチップからの信号を受信するセンサーが設置されたトンネルを通らないとアクセスできないようになっており、同時に多数のマウスを装置内にいれ、給水瓶にアクセスしたマウスの情報を取得することが可能である。

本研究では行動柔軟性と社会的競争優位性を判定する為に以下のプロトコルを用いた。マウスは報酬コーナーへの鼻突きをした場合に、報酬として4秒間飲水することができ、対角線上に交互に指定される報酬コーナーを訪問することで継続的に飲水を行う。行動解析を行う session 以外の時間は絶飲とした。1日1 session (3時間、20:15-23:15) を、Acquisition phase として20日間行った後、報酬コーナーを反転させる9日間の Reversal learning phase を3回 (計27日間) 続けて行った。行動柔軟性の指標として、報酬コーナーではないコーナーへのアクセスを用いた。実験には、126日齢の TS2-neo (n=8) および WT (n=8) を使用した。3匹の TS2-neo は、コーナーへのアクセス回数が少なく、データからは除外した。

抑制性神経細胞移動解析には、TS2-neo と抑制性神経細胞において蛍光たんぱく質 (Venus) を発現する、VGAT-Venus 系統を交配し、抑制性神経細胞を蛍光標識した胎

生 13.5 日のマウス脳を用いて行った。また、シナプス数を評価するため、21 日齢のマウス脳にて、プレシナプスマーカー (VGAT、VGluT1、VGluT2) を用いて免疫染色を行い、バレル皮質の synaptic puncta の密度と面積を測定した。

【結果】

IntelliCage を用いた行動柔軟性実験では、Acquisition phase と 3 回の Reversal learning phase において、TS2-neo と WT の学習効率等は等しく、2 群間での行動柔軟性に違いはなかった。各 Session 開始時の報酬コーナーが混雑する時間帯において、TS2-neo の報酬コーナーへのアクセスのピークは、WT に比べて早かった。また TS2-neo は、最後 5 日間のセッションの最初 10 分において、有意に長い飲水持続時間を示した。以上より TS2-neo は、社会的競争優位性があると考えられた。

抑制性プレシナプスマーカーである VGAT puncta に対する免疫組織学染色では、TS2-neo と WT にバレル皮質第 2 層で明らかな違いは認められなかったが、第 4 層において TS2-neo で puncta の密度が増加し、そのサイズが小さくなっていた。これに対し、興奮性プレシナプスマーカーである VGluT1/2 puncta の密度、サイズに違いはみられなかった。胎生 13.5 日齢の大脳新皮質における移動中の Venus 陽性抑制性神経細胞の数および分布を定量解析した結果、TS2-neo では、移動中の抑制性神経細胞がより多く認められ細胞移動の亢進などが示唆された。一方、Venus 陽性抑制性神経細胞の垂直方向への分布に差はなかった。

【考察】

TS2-neo は、集団飼育状態において、行動柔軟性に変化はなかったものの、社会的競争優位性を示した。組織学的には、胎生期大脳新皮質における抑制性神経細胞の増加と、発達期バレル皮質第 4 層における VGAT puncta 密度の増加、サイズの減少がみられた。今回明らかとなった胎生期大脳新皮質における移動中抑制性神経細胞数の増加は、カルシウムシグナリングの異常に伴い、神経細胞の増殖、分化、移動などが変化した結果と考察されるとともに、その後の軸索・樹状突起発達やシナプス形成といった神経回路形成にも影響を与え得る。このような、カルシウムシグナリングの異常によって生じる回路形成変化は、今回見いだされた抑制性シナプス前マーカーである VGAT puncta の密度、サイズの異常に関連する可能性があり、これにより E/I バランスの乱れが生じることが、ASD 病態の一因となっていることが推測される。

【結語】

本研究から、グループ飼育という、より生理的かつ複雑な条件において TS2-neo マウスの社会的競争優位性が明らかとなった。また抑制性神経の回路形成異常が、ASD の病態において重要とされる E/I バランスの乱れを引き起こしている事が示唆された。TS 病態を理解するために、G406R 変異がどのように作用して神経回路形成・発達およびマウスの ASD 関連行動に影響を及ぼすか、さらなる研究が必要である。