

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開用】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名		脳科学研究戦略推進プログラム
研究開発課題名		神経内分泌仮説に基づく知能障害を有する自閉症スペクトラム障害の診断と治療の展開研究（オキシトシン脳内作用機序の分子研究）
機関名		国立大学法人東北大学
研究開発 担当者	所属 役職	大学院農学研究科 教授
	氏名	西森 克彦

2. 研究成果の内容

①GABA ニューロンに於けるオキシトシン受容体（OXTR）機能の解析

平成 26 年度までの研究により、マウスの社会性に関わる扁桃体内側核の GABAergic Neurons の 30%、外側中隔の GABAergic Neurons のほぼ全てが OXTR を発現しているなど、社会行動制御性の神経核で OXTR は GABA 作動性介在ニューロンに強く発現することを見出した。一方、以前の実験で、*Oxtr* 欠損マウスで見られた社会的認知機能の異常が、OXTR 発現用 AAV ウィルスベクターの扁桃体内側核への注入と感染による OXTR 発現のレスキューに依り回復する事を見出しており、さらに平成 26 年度までの研究業務にて、GABA ニューロン特異的に Cre を発現する *Vgat-IRES-Cre* マウスと OXTR(fx/fx)マウスの掛け合わせにより得た、GABA ニューロン特異的な *Oxtr* 遺伝子欠損マウスが、Three Chamber 法等により社会的認知機能の低下を示す事を見出した。これらの結果は何れも、社会性に関与する OXTR 発現性ニューロンに占める GABA 作動性ニューロンの重要性を強く示唆していた。平成 27 年度はこの結果を重要視し、OXT/OXTR による GABA 作動性ニューロン制御と、社会記憶制御や自閉症発症、そして OXT による自閉症治療メカニズムとの関係を明らかにするため、以下の研究業務を実施した。

①-1) OXTR(-/-) ; *Vgat-IRES-Cre* マウスへの FLEX 型 AAV-OXTR 発現ベクター感染による、MeA の GABA 作動性神経特異的 *Oxtr* 遺伝子レスキュー

GABA ニューロンに発現する OXTR の持つ生理作用・行動制御作用を詳細に解析する為、OXTR(-/-);*Vgat-IRES-Cre* マウスの扁桃体内側核に AAV.FLEX-OXTR を感染させて *Oxtr* cDNA を導入し、GABA ニューロン・領域特異的な OXTR 遺伝子のレスキューを行った。操作マウスの社会記憶（Three chamber 法、social discrimination 法等）を解析したが、明瞭な社会記憶の回復は見られなかった。

① -2) GABA 作動性神経特異的 *Oxtr* 欠損マウスにおける社会行動の解析

作成した OXTR-cDNA.HA-IRES-Cre マウスと *Gad67(fx/fx)*（導入予定）との交配実験計画については、*Gad67(fx/fx)*マウスを国立研究開発法人理化学研究所より導入し、OXTR-cDNA.HA-IRES-Cre マウスと交配、行動実験等の準備が進みつつある。

① - 3) OXTR 発現 GABA 作動性ニューロンの特性の解析

扁桃体内側核(MeA)の OXTR 発現ニューロンの 30%を占める GABA 作動ニューロンはカルレチニン陽性の介在ニューロンであった。一方、雌マウスの社会行動の一つ、雄に対する生殖行動が前頭前皮質に分布する OXTR 発現性 Sst(+)の介在ニューロンにより制御されること(Nakajima,M.et al., Cell,159:295 (2014))は、OXT/OXTR による社会行動制御作用がカルレチニン陽性以外の GABAergic ニューロンサブタイプ依存するケースを示す。MeA と LS 以外の機能性 OXTR ニューロンサブタイプは、依然不明である。この為、社会性関連領域（側坐核、弓状核、海馬など）の OXTR ニューロンに関しても、作動性神経伝達物質を明らかにし、解析を広げていくことを予定した。この為、コンディショナルな OXTR 遺伝子欠損マウスの行動解析を考慮、*Vglut2-Cre*(グルタミン酸作動性)、*TH-Cre*(ドーパミン作動性)、などの導入を検討したが、速やかな導入と、OXTR(fx/fx)マウスとの 2 重変異マウスの早急な確保は課題 F 終了後と予想され、導入と実験の本格的実施については保留している。

①-4) OXTR 発現 GABA 作動性ニューロンの構成する神経回路の解析

平成 25、26 年度までの解析で、OXTR 発現性 GABA 作動性ニューロンは脳内に広く分布していることが明らかになっている。MeA と LS でのこれら OXTR 発現性 GABAergic 介在ニューロンの投射先と形成する神経回路を明らかにするため、引き続き、*Vgat-IRES-Cre* 及び、*OXTR.cDNA.HA-IRES-Cre* マウスの脳を用いて GABA 作動性ニューロンと、OXTR 発現ニューロン特異的に細胞標識を行う実験、及び Cre に依存して順行性に細胞を標識する FLEX-AAV-WGA を LS と MeA に感染させる実験などを継続した。

①-5) GABA作動性神経でのシナプス形成、及びミクログリア活性化にOXT/OXTR系が果たす役割の解析

平成 26 年度の解析により、OXTR系のシグナルがミクログリアの活性化制御を介し、GABA作動性神経におけるシナプス形成を制御する可能性を見出した。これについては、結果を精査し、オキシトシン受容体欠損マウスでミクログリアの活性化が起きることでシナプス異常が起き、これが社会性の異常を導いている事を示す幾つかの確証を得たので、これについて論文として公表した。

②OXTR 発現ニューロンの構成する神経回路の解析、及び OXTR 細胞内局在解析用マウスの作成

②-1) OXTR.cDNA.HA-IRES-Cre マウスを用いた社会性関連神経回路解析

平成 26 年度は、当初このマウスのオキシトシン受容体発現性の神経核へ FLEX 型 AAV-WGA ウィルスベクターを感染させ、トレーサー法による扁桃体内側核と外側中隔の OXTR 発現ニューロンからの投射神経回路解析を計画した。実際の実験では、シナプス透過性はないが、蛍光タンパクの検出感度が高い AAV-FLEX-ArchT-2A-GFP を用いた標識で、オキシトシン受容体発現性のニューロンの投射が明瞭に観察出来ることが判り、社会性に関わる神経核同士で OXTR 発現性のニューロンが構成する、幾つかの新たな回路の存在が示唆された。これらのオキシトシン依存性の投射回路が社会記憶形成において占める生理的な役割の解析の拡大により、ヒト ASD 患者へのオキシトシン投与による自閉症治療メカニズムがより明らかにされると考えている。

② -2) 分子 Tag による標識 OXTR 発現マウス開発と抗 OXTRmAb 開発

平成 26 年度までに作製し、2016 年に論文発表した、cDNA 型の OXTR ノックインマウス、OXTR-cDNA.HA-IRES-Cre マウスでは、OXTR 分子のニューロン内局在を明らかにする為、HA-Tag を PXTR.cDNA c 末に付加しており、OXTR の発現レベルが高いと思われる子宮内膜筋における抗 HA 抗体による OXTR 分子の検出が可能となったが、一方ニューロン膜上での抗原検出 (=オキシトシン受容体の検出) には至っていない。

並行して行っていた、ラットを用いたモノクロナル抗体開発によって得られた抗 OXTR モノクロー抗体は、子宮内膜筋での OXTR 分子を検出したが、ニューロン膜上での OXTR 抗原検出には至っていない。

開発の困難が示された抗 OXTR 抗体に依存せず、マウス OXTR 分子の N 末、C 末に Flag-tag、又は mCherry を付加した修飾分子発現用ベクターを作成、Neuro2 細胞で発現させ、細胞内での当該分子の局在と、オキシトシン受容体分子 N 末、C 末への Tag 付加が正常な GPCR 活性を傷害しないか、等その影響を解析、確認した。また、CRISPR/Cas9 法による標的遺伝子領域への Short Peptide 配列のノックインと、さらに比較的長いタンパク配列 (蛍光タンパク) のノックインに関する条件検討を行った。こうした data を元に、Crispr/Cas9 法によりマウスゲノム上の OXTR 遺伝子 C-末に m-Cherry 等を導入しすれば、OXTR の生理機能を改変せずに又特異的抗体に依存せず OXTR 分子の subcellular localization 分析が可能となると推定された。

③光遺伝学による OXTR 発現ニューロンの機能解析

平成 26 年度までに、光遺伝学に必要な機器類の購入・セットアップと、ファイバーの脳内埋設に必要な手術技術の習得を終えたため、平成 27 年度、OXTR-Cre ノックインマウスを利用し、扁桃体内側核と外側中隔へ逆位活性型 AAV-ChR(channel rhodopsin)、及び逆位活性型 AAV-ArchT ベクターを感染させ、当該マウス頭部にファイバーを埋め込み、LED 光源からの光照射により当該領域の OXTR 発現神経の活性化、または不活性化を誘導、当該マウスの社会的記憶の促進・抑制についての測定を試みる計画であったが、社会記憶測定については Three Chamber Arena Test でのマウスの行動範囲が、LED 光を供給するファイバーの稼働範囲を超えており、またファイバーを長くした場合、光量の減衰が激しいことから、より狭い行動範囲で Three Chamber Test とほぼ同様の計測が行える系の開発が必要と考えられた。この系 (仮称 ; two field test) の樹立と検証を行い、モデル実験において依り狭い実験区画にて Three Chamber Test とほぼ同様の結果を出しうる可能性が示された。

一方、光遺伝学実験とほぼ同様の実験目的が達成出来、一方で光源と動物の脳内照射領域を結ぶ複雑な器機を必要としない、Designer Receptors Exclusively Activated by a Designer Drug (DREADDs)系を用い、OXTR 発現ニューロンの活性化を外部から操作する実験を検討し、一部光遺伝学に代わるものとして実施した。この結果、Gq/11 活性化方の人工受容体、hM3Dq を AAV.FLEX タイプベクターで導入したマウスの脳内で、クロザピン (CNO) 投与による神経活性化を c-fos の発現誘導により確認出来た。

④ePet-Cre:OXTR(fx/fx)マウスを利用した、社会的報酬解析系の導入による縫線核 5-HT ニューロンに発現する OXTR 機能の解析

これまでの解析から、扁桃体内側核に存在する全 OXTR 発現ニューロンのうち 30%程度は GABA 作動性ということを明らかにしてきたが、平成 27 年度においては、各社会性関連領域に発現する OXTR 発現性のニューロンのうち、MeA の GABA 作動性 OXTR 発現ニューロン以外の社会性関連領域の OXTR 発現性ニューロンについても、OXT により投射を制御される神経伝達物質の制御機構の詳細を明らかにする事を目的としたものである。

⑤USV 測定法、three chamber 法、social reward 方等、新規社会性低下検出系の導入と改善による遺伝子変異マウスの評価

平成 26 年度までに、様々な遺伝子変換マウスの社会性異常、社会記憶異常（≡ヒト自閉症）を鋭敏に且つ迅速に測定する為に（1）three-chambered arena テスト、離乳前の遺伝子変換マウスを用いた社会行動異常の測定の為の（2）USV(Ultrasonic Vocalization；超音波発声)等の測定法を試み、導入に成功した。

⑤-1) 測定法の改善

引き続き測定法の改善を行い、これを基にマウスに於ける自閉症症状とヒト自閉症の症状について、その根底にあるメカニズム解析の一手法として活用できる状態へ整備する事を計画した。

⑤-2) OXTR(-/-)雄マウス USV 低下メカニズムの解析

USV 法は、7 DAB の幼弱仔に対して行え、遺伝子変異マウスの社会性測定としては最も迅速に行えるが、これまでの測定で、OXTR 遺伝子 KO マウスにつき、6 DAB 雌ではホモ変異 (OXTR(-/-)) のみ、USV 低下が見られたのに対し、6DAB 雄では、ホモのみならずヘテロ (OXTR(+/-)) でも USV 低下が見られた。雄マウスについて高感度で異常が示されるこの現象は、ヒト自閉症の発症が高頻度で男児に見られる現象を想起させ、以後のメカニズム解析のためにも再現性の確保に努める。また、Vgat-IRES-Cre : OXTR(fx/fx)マウス、ePet-Cre : OXTR(fx/fx)マウス等について同様の USV 測定を行う事を計画した。

⑤-3) social reward 測定法と social buffering 測定法の導入

社会性評価の幅を広げる為、social reward 測定法、social buffering 測定法について導入と改善を図り、本実験系で得られる各種の変異マウスの社会性をより広範囲に行うことで、OXTR 遺伝子の変異により惹起される社会性の異常を依り広範囲に評価する事を計画した。これは、④を行う為の新規実験系実として、ここに再記述したが、同一内容である。

⑥脳科学研究戦略推進プログラム内、共同研究

国立大学法人金沢大学東田特任教授等が自閉症患者から見出した変異型 OXTRcDNA について、マウス個体でその生理機能を調べる為、マウス OXTR 遺伝子中の配列とこのヒト変異型 cDNA を置き換えたノックインマウスの作製について、CRISPR/Cas9 法による迅速な方法の確立を計画した。この結果、単純遺伝子 KO 実施については目途が付き、又短い DNAfragment 挿

入も確認出来た。ヒト変異型 OXTR cDNA の様な、1000bp を越えるような遺伝子フラグメントの **Crispr/Cas9** 法によるゲノム特定領域への導入確率は高くないが十分可能と考えられた。ノックインマウス作製による解析は、今後、ASD 患者から見出された変異型 OXTR 分子の生理機能解析に力を発揮すると考えている。なお、平成 27 年度は、国立大学法人金沢大学での、置換用ノックインベクター作成が予定より遅れており、ノックインマウス作製には至っていない。

又、この条件検討により、②-2 で触れた様に、適切な分子 **Tag** とその付加位置に関する情報が得られ、②-2 での実験・解析の様に、OXTR 分子のニューロン内局在が容易に検出でき、且つその subcellular localization が変化せず、本来の GPCR 活性を維持出来ることが明らかとなった。

⑦OXT慢性投与の影響の解析

国立大学法人東京大学山末グループのヒト患者における解析結果から、OXTの慢性投与による効能・影響は単回投与とParallelではないことが示唆されており、OXTの単回投与と慢性投与の脳内メカニズムが異なる可能性がある。従来、OXTの野性型マウスへの投与の影響に関する治験は少なく、僅かに、野性型平原ハタネズミへのOXTの継続投与が、却ってペア形成行動を阻害するという報告 (L Bales, KL et al., Biol Psychiatry **74**: pp.180-8(2013)) などが有るに過ぎない。一方、ヒトの疫学研究で、誘発分娩にOXTを利用した場合に、生まれた子供でのASD発症率が高いという報告が複数報告されており (Gregory SG et al JAMA Pediatr, **167**, pp.959-66 (2013); Omri Weisman et al. Behav Brain Res, **284** pp. 207-12 2015)、我々は、野性型マウスでのオキシトシン投与による個体への生理学的影響を検出する系の一つとして、及び、上記ヒト疫学研究をマウスで検証すると言う2つの目的より、平成 27 年度は、まず妊娠マウス分娩時へのOXT単回投与モデルを樹立、OXTを単回投与した事による出生新生児へのOXTの急性副作用の有無等に付いて、行動学的特性や生化学的特性を解析すること、及びこの結果をふまえ、OXT慢性投与実験計画の基礎とすることを計画した。