

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名	山梨大学大学院総合研究部医学域
職名・氏名	助教 高橋光規 (印)

1 研究テーマ

自閉スペクトラム症における感覚情報処理の解明

2 研究の目的

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障害を主徴とし、症例の 9 割以上に感覚過敏・鈍麻といった感覚異常が伴う。ASD の感覚処理系は、外部からの感覚刺激に対する神経応答のばらつきが大きく、応答の信頼性が低いことが知られている。この神経応答の信頼性低下が、ASD における感覚障害の原因と推測される。しかし、なぜ ASD で神経応答がばらつくのか、また、これまでに多数発見されている ASD 関連遺伝子の変異とどのように対応しているのかは不明な点が多い。

このような神経応答のばらつきは確率的な現象であるため、その解析には多数のデータ取得が必要になる。また、ASD 関連遺伝子の候補は増え続けており、それらの遺伝子の変異が神経系に与える影響を明らかにするためには、ハイスループットな解析系が必要とされる。本研究では、小さな神経系を備え、ASD 関連遺伝子の変異株も存在する線虫 *C. elegans* をモデル生物として、ハイスループットな神経活動および行動の解析により、なぜ感覚刺激に対する神経応答にばらつきが生じるかを明らかにして ASD の感覚異常が生じる神経生物学的なメカニズムに迫る。

3 研究の方法

①感覚刺激に対する線虫行動応答の定量

線虫の行動を定量的に観察するため、シリコン樹脂製のマイクロ流路デバイスを作製し、自由に動く線虫に感覚刺激を与えながら行動を動画撮影した。この動画を解析ソフトウェア MATLAB により分析して、線虫の行動応答を定量した。

②感覚刺激に対する神経応答および行動のハイスループット記録

ガラス針を用いた顕微鏡下での線虫生殖腺への核酸溶液注入により、各神経細胞に Ca^{2+} センサー GCaMP6f もしくは神経伝達阻害タンパク質 TeTx を発現する遺伝子組換え株を作製した。自作のマクロ蛍光顕微鏡システムを用いて、これらの組換え株に対し浸透圧刺激を感覚刺激として与え、神経応答および行動応答を低倍観察した (1~1.75 倍)。神経応答は、GCaMP6f の蛍光変化を追跡し、刺激に対する応答遅延時間や蛍光変化の増減持続時間を計測することで分析した。

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

4 研究の成果

①ASD 関連遺伝子変異体における感覚応答異常の定量

まず、ASD 関連遺伝子変異した線虫株でも感覚異常が生じているかどうかを確かめるため、マイクロ流路を用いて線虫に浸透圧刺激および匂い刺激を同時に与え、線虫行動を分析した。ASD 関連遺伝子変異株は、*nlg-1*、*chd-7*を用いた。浸透圧刺激のみを与えると、野生株と変異株では行動の違いは見られなかったが、浸透圧刺激に加え線虫が好む匂い刺激を同時に与えると、野生株では、浸透圧刺激からの回避行動が減少したのに対し、変異株では変化が見られなかった。すなわち、ASD 関連遺伝子変異株では、2つの異なる感覚刺激を統合する過程に障害があることが明らかになった。

②浸透圧刺激に対する神経応答のばらつきの定量

感覚刺激に対する神経応答のばらつきを検出するため、本研究では、浸透圧刺激を受容する感覚神経 ASH と、その下流に存在し線虫の回避行動を制御する介在神経 AIB に着目した。まず、線虫に浸透圧刺激を与え、マクロ蛍光顕微鏡システムにより感覚神経 ASH の応答と線虫行動を多数取得した。浸透圧刺激に対する行動応答は、前進行動を維持、一瞬の後退、方向転換による回避という3種類に分類された。これらの行動応答にしたがって、同時に取得した ASH の神経応答を分類すると、出力された行動は違っても ASH の神経応答はほとんど同じであり、ばらつきは少なかった。

一方、ASH の下流にある介在神経 AIB についても、浸透圧刺激に対する応答を取得した。出力された行動応答によって分類すると、AIB は、前進行動を維持するときにはほとんど応答せず、後退するときはやや応答し、方向転換を行うときには強く応答することが明らかとなり、神経応答のばらつきが大きいことが確認された。

③介在神経 AIB の応答のばらつきを制御する神経回路の探索

浸透圧刺激に対する感覚神経 ASH の応答はほぼ一定であるのに対し、そのすぐ下流にある介在神経 AIB の応答はばらつきが大きい。このようなばらつきは、AIB を含む神経回路内の興奮と抑制のバランスにより制御されるのではないかと考えられる。そこで、線虫のコネクトームデータベース（線虫神経回路の解剖学的つながりを電子顕微鏡解析により明らかにしたもの）を参考に、AIB に接続する介在神経のうち、AIB とのシナプス接続が密な介在神経 AIA、AIZ、RIB、RIM の4つを選び、それぞれの神経細胞にシナプス伝達を阻害するタンパク質 TeTx を発現させた線虫株を作製した。これらの線虫株に浸透圧刺激を与え、AIB の神経応答と行動応答を取得した。AIB の神経応答と、線虫の行動応答に影響を及ぼしたのは、AIA と RIM から AIB へのシナプス伝達を抑制した線虫株であった。

AIA を抑制すると、浸透圧刺激に対する AIB の応答性は向上し、刺激を与えてから応答が始まるまでの遅延時間が短くなり、AIB の応答のばらつきは減少した。また、行動応答は、方向転換を伴う回避行動の割合が増加した。したがって、AIA の本来の機能は、AIB の活動を抑制するものであると明らかになった。一方、RIM を抑制すると、浸透圧刺激に対する AIB の応答性が低下し、方向転換を伴う回避行動の割合がほぼ0になった。したが

留意事項

① 3枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

って、RIM の本来の機能は、AIB の活動を活性化するものであると明らかになった。

これらのことから、AIB の応答のばらつきは、介在神経 AIA と RIM の活動状態によって制御されることが明らかとなった。

④複数細胞からの神経活動取得を目指した 2 色蛍光イメージングシステムの開発

介在神経 AIB の応答のばらつきが生じるメカニズムを明らかにするためには、介在神経 AIA および RIM の活動状態も同時に観察する必要がある。そこで、線虫の行動を記録しながら、同時に複数の神経細胞から神経活動を取得するイメージングシステムの開発を行った。独自に開発したマクロ蛍光顕微鏡システムに、マルチカラーダイクロイックミラーおよびカメラを追加することにより、緑色および赤色の蛍光の同時取得が可能となった。さらに、対物レンズを変更することでやや倍率を上げたうえで (~4 倍)、GCaMP6f および赤色蛍光タンパク質 mCherry を神経細胞の核に発現させた線虫を観察し、複数の神経細胞を見分けて撮影することに成功した。

5 今後の展望

線虫の ASD 関連遺伝子変異株でも感覚異常が見られることがあきらかとなり、また、独自のマクロ蛍光顕微鏡システムによって、浸透圧刺激に対する介在神経 AIB の応答のばらつきを取得が可能となった。また、AIB の活動が他の介在神経 AIA と RIM により制御されることも明らかとなった。今後は、野生株および ASD 関連遺伝子変異株において、2 色蛍光イメージングシステムを用いて AIB、AIA、RIM の 3 つの神経細胞から浸透圧刺激に対する応答を取得し、AIB 応答のばらつきと比較、AIA および RIM の活動状態の違いを分析する。また、浸透圧刺激と匂い刺激を同時に与え、野生株および ASD 関連遺伝子変異株で AIB 応答のばらつきと比較を試みる。これらの実験から、ASD 関連遺伝子変異株では、シナプス伝達が変化し、AIA、RIM から AIB への興奮と抑制のバランスが変化することで、AIB 応答のばらつきが大きくなるという仮説の検証を行い、ASD における感覚異常の神経生物学的メカニズムの全貌解明を目指す。

6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

本研究の成果は、下記の学会で発表を行った。今後も、解剖学会、神経科学会、神経回路学会において発表を行う予定である。また、国際論文誌への投稿を行い、受理された際にはプレスリリースを行って発信する予定である。

1. 「神経活動と行動のハイスループット同時計測システム」、高橋光規、浮田芳昭、小田賢幸、線虫研究の未来を創る会 2022 (オンライン)、2022 年 8 月 29 日
2. 「ハイスループットイメージングによる行動多様化機構の解明」高橋光規、小田賢幸、第 128 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (東北大学)、2023 年 3 月 20 日

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。