

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

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 ㊦

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) は先天性の神経発達障害の 1 つであり、社会的コミュニケーション障害に加え、症例の 9 割以上に感覚過敏・鈍麻といった感覚機能の異常を伴う。発達期に生じる感覚障害が ASD 特有の社会行動障害を引き起こすことが示唆されているほか、感覚障害の程度が将来の社会行動障害の予測指標となるなど、ASD における感覚障害の重要性が明らかになってきている。ASD における感覚情報処理の特徴として、外部からの刺激に対する神経応答が大きくばらつき、応答の信頼性が低いことが挙げられる。この神経応答の信頼性低下が感覚障害の原因と推測されるものの、神経応答のばらつきがどのようにして生じるのか、また、このばらつきが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関連しているのかは不明である。

神経応答のばらつきは確率的な現象であるため、ばらつきを正確に捉えるためには多数の神経応答データを取得する必要がある。加えて、ASD 関連遺伝子の候補は増え続けており、それらの機能を解析するためにはスループットの高い解析系が必要となる。線虫 *C. elegans* は、体が小さく透明なためイメージングが容易、遺伝子組換えが容易、ヒトの ASD 関連遺伝子と相同な遺伝子を持ち、それらの変異体が多数作製されているなど、ハイスループットに ASD 関連遺伝子の機能を解析するのに適したモデル生物である。そこで、本研究では、線虫を対象として自作のマクロ蛍光顕微鏡システムにより、感覚刺激に対する神経応答と行動応答をハイスループットに取得することで、なぜ神経応答がばらつくのかを明らかにする。これによって、ASD において感覚異常が生じる神経生物学的なメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

①線虫行動の定量

自由に動く線虫に感覚刺激を与え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た。マイクロ流路デバイスは、CAD ソフトウェア AutoCAD によりフォトマスクを設計し、光リソグラフィ法によってシリコンウェハ上に鋳型を作製した。鋳型へ PDMS シリコン樹脂を流し込み硬化させたものをスライドガラス上に載せて、シリンジを用いて流路中へ線虫を挿入した。線虫の入ったマイクロ流路デバイスをカメラで撮影して動画データを取得した。動画データは、解析ソフトウェア MATLAB によって線虫位置の検出、姿勢判別を行い、感覚刺激が与えられたときにどのような行動応答が行われたかを定量した。浸透圧刺激溶液は、グリセロールを緩衝液に溶解して作製した。匂い刺激は、ジアセチルを緩衝液に溶解し 1.15 μM の濃度で作製した。

②使用した線虫株と遺伝子組換え体の作製

野生型の線虫は N2 株を、ASD 関連遺伝子変異株は、*nlg-1*, *chd-7* を用いた（線虫株はすべて Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota より分与）。Ca²⁺イメージングのための GCaMP6f 発現株、シナプス伝達阻害のための TeTx 発現株は、標的となる神経細胞に対応したプロモーター下に GCaMP6f または TeTx の核酸配列を連結したプラスミドを、マイクロインジェクション法によって線虫生殖腺に打ち込むことで作製した。

③神経活動と行動のハイスループット記録

Ca²⁺センサーGCaMP6f を発現した線虫株に対し、マイクロ流路デバイス中でグリセロール溶液による浸透圧刺激を与え、自作のマクロ蛍光顕微鏡システムにより GCaMP6f の蛍光および線虫行動を撮影した（図 1）。浸透圧刺激は、マイクロ流路デバイスに接続した電磁弁をコンピュータにより制御し、5 秒間のパルス刺激として線虫に与えた。

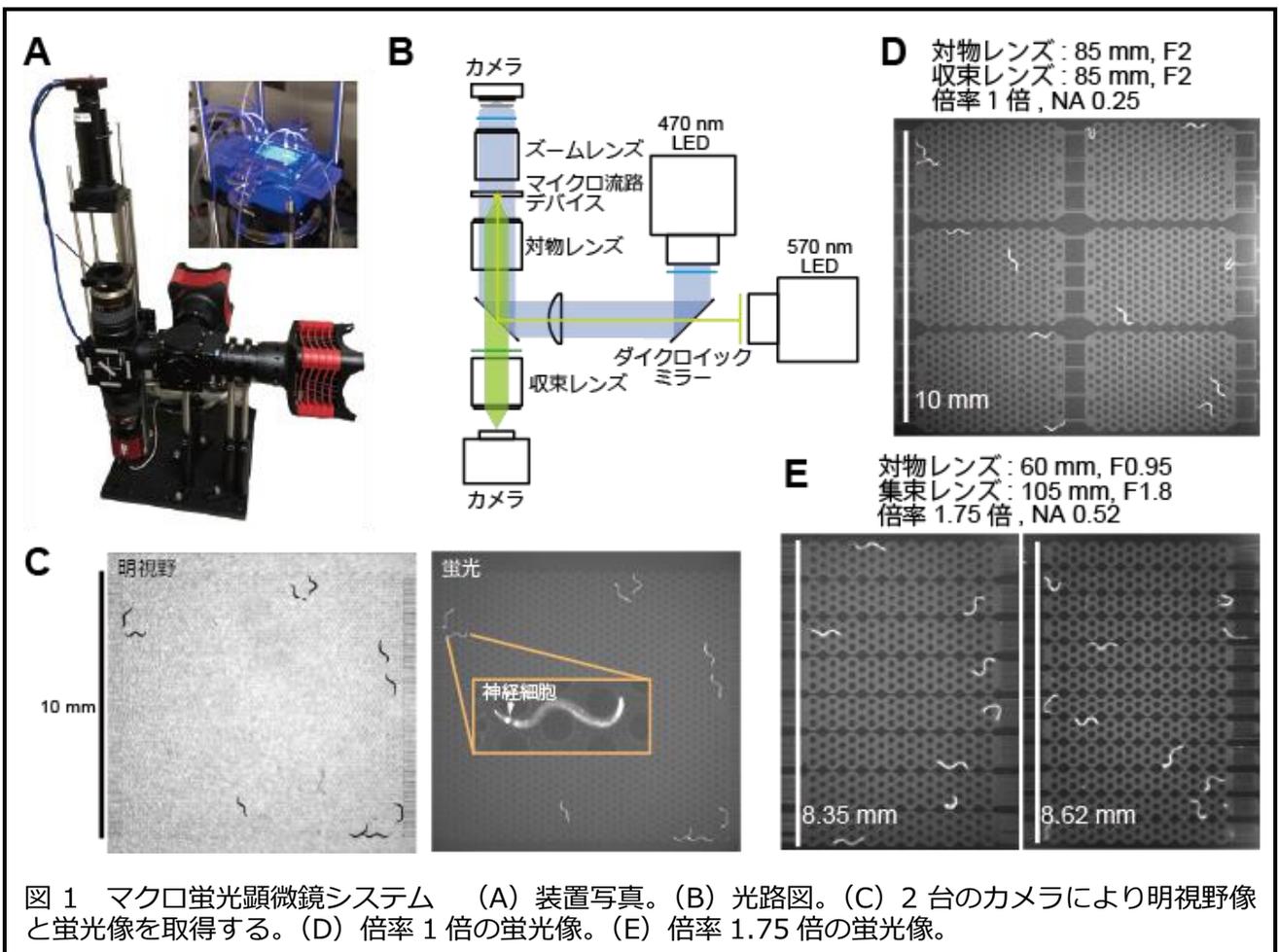
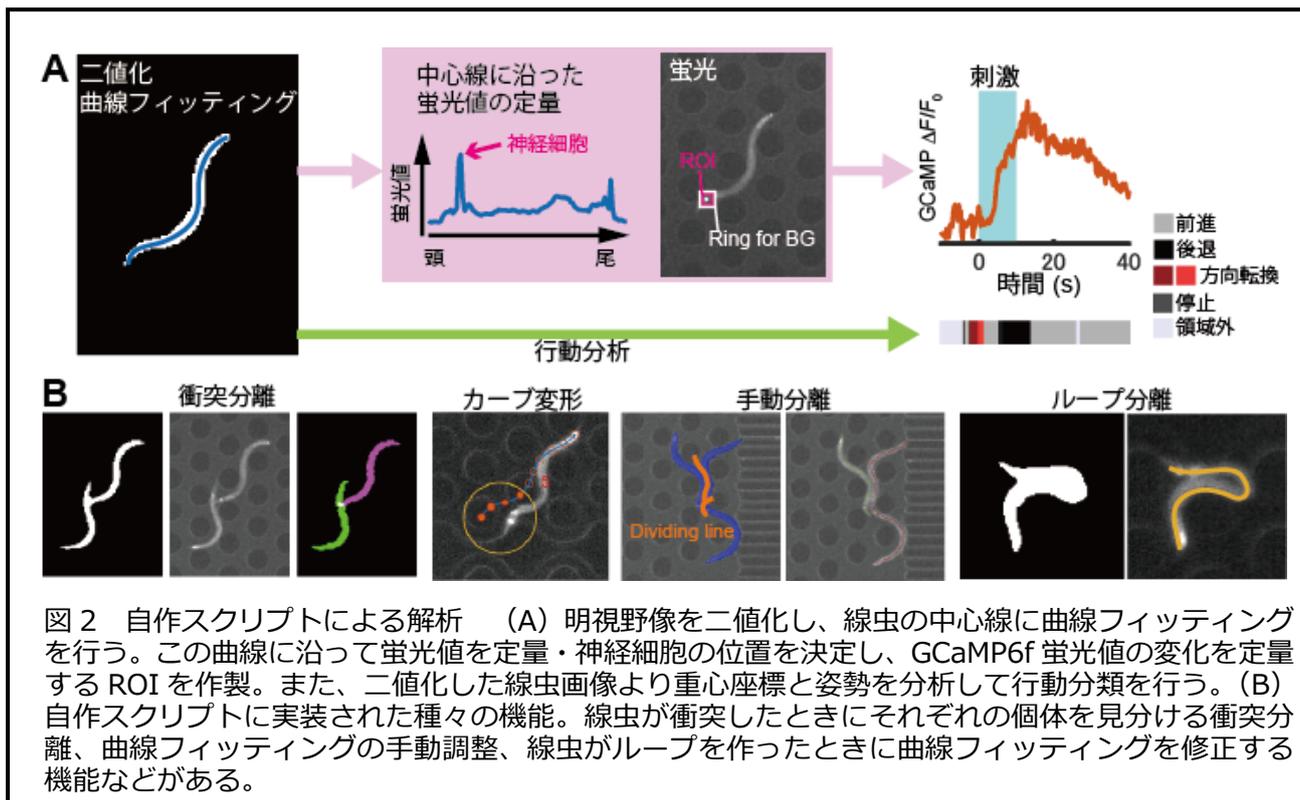


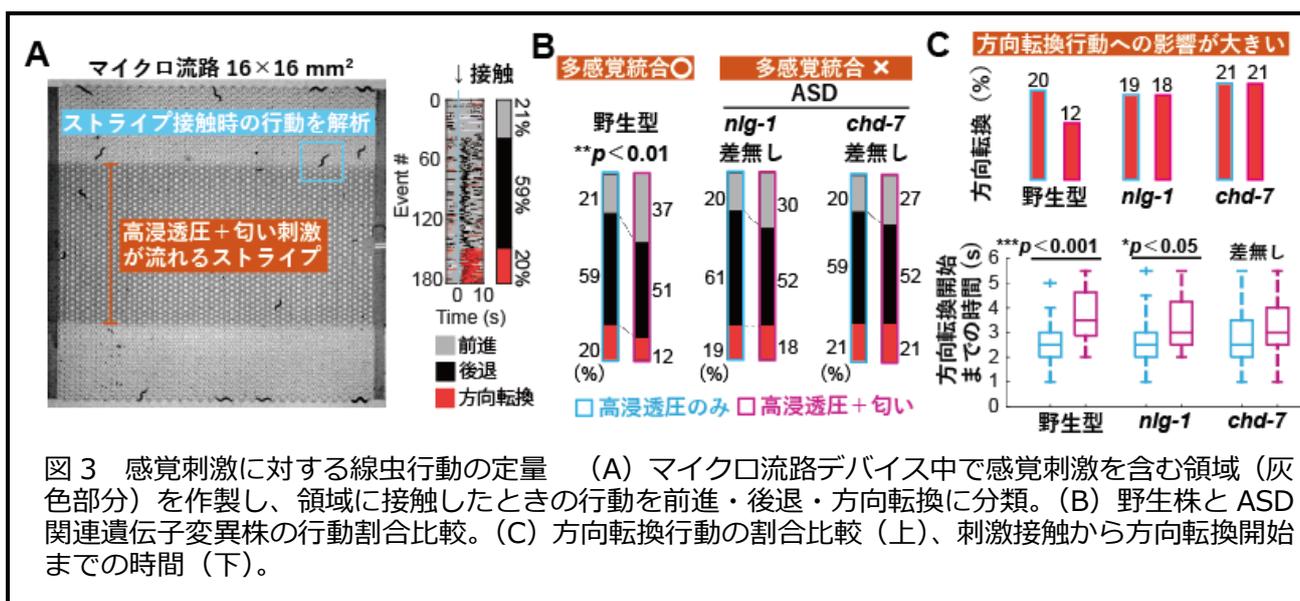
図 1 マクロ蛍光顕微鏡システム (A) 装置写真。(B) 光路図。(C) 2 台のカメラにより明視野像と蛍光像を取得する。(D) 倍率 1 倍の蛍光像。(E) 倍率 1.75 倍の蛍光像。



取得した動画データは、解析ソフトウェア MATLAB で自作スクリプトによって、線虫の検出、曲線フィッティング、神経細胞位置の検出を行った (図 2)。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、上昇・下降フェーズの分類により Ca^{2+} 応答の持続時間を計測することで分析を行った。

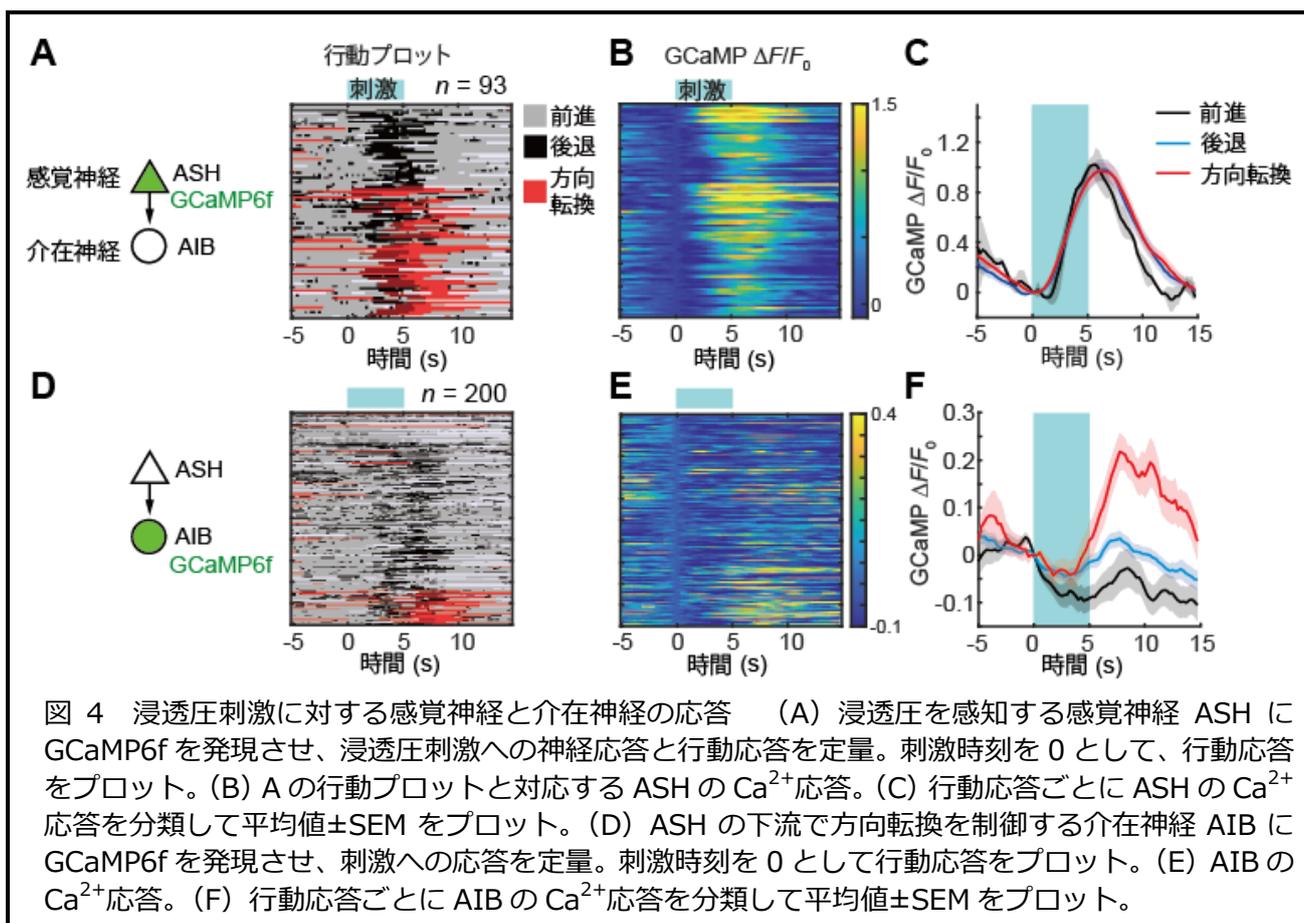
4. 研究の成果

① ASD 関連遺伝子変異株における感覚応答異常の定量



線虫は、ヒトの ASD 関連遺伝子と相同な遺伝子を持つ。線虫においても、これらの遺伝子変異が感覚障害を引き起こすか否かを確かめるため、マイクロ流路を用いて線虫が忌避する浸透圧刺激および線虫が好む匂い刺激を与えて行動応答を定量した (図 3A)。浸透圧刺激に対して、線虫野生株は前進・一瞬の後退・方向転換による回避のいずれかの行動を示す。浸透圧刺激と匂い刺激を同時に与えると、野生株では、方向転換による回避行動の割合が減少した (図 3B,C)。一方、ASD 関連遺伝子変異株 *nlg-1*, *chd-7* においては、匂い刺激の追加による方向転換の現象が見られなかった (図 3B,C)。これらの結果より、ASD 関連遺伝子変異株では、2 つの異なる感覚を統合する多感覚統合の過程が障害されていることが示され、線虫でも ASD 関連遺伝子の変異が感覚障害をもたらすことが明らかとなった。

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、具体的には、浸透圧刺激を受容する感覚神経 ASH と、ASH からシナプス入力を受け方向転換の発生を制御する介在神経 AIB に着目した (図 4A,D)。マクロ蛍光顕微鏡システムにより、線虫に浸透圧刺激を与え、感覚神経 ASH の神経応答と線虫の行動応答を取得した。浸透圧刺激を与えると、線虫は、前進・後退・方向転換のいずれかの行動を出力した (図 4A)。同時に ASH に発現した GCaMP6f の蛍光も取得した (図 4B)。行動応答 (図 4A) によって ASH の Ca^{2+} 応答 (図 4B) を分類すると、出力された行動は同じでも ASH の応答はほとんど同じでありばらつきは少なかった (図 4C)。

ASH の下流にある AIB についても浸透圧刺激に対する応答を取得したところ、ASH に比べて GCaMP6f の蛍光変化幅が小さかった (図 4E)。行動応答 (図 4D) によって AIB の Ca^{2+} 応答を分類する

と、前進行動で応答したとき AIB はほとんど応答せず、後退運動時には弱い応答が見られ、方向転換時には強い応答が見られた (図 4F)。これらの結果から、刺激に対する神経応答は、感覚神経の段階ではばらつきはなく、介在神経層でばらつくことが明らかとなった。

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介在神経 AIB の応答はばらつきが大きい。感覚神経 ASH と AIB は直接シナプスで接続しているため、応答信頼性の高い ASH からの情報伝達が他の神経細胞によって調節された結果、AIB の応答のばらつきが生じていることが示唆される。このような情報伝達の調節は、AIB を含む神経回路内の興奮と抑制のバランスにより決定されるのではないかと考えられる。

線虫は、電子顕微鏡による神経系の解析 (コネクトーム解析) により、すべての神経細胞について解剖学的なつながりが明らかとなっている。これらの解剖学的なつながりのデータベースから、AIB に接続する介在神経細胞を探したところ、13 個の神経細胞が見つかった (図 5A)。これらのうち、とくに AIB とのシナプス接続が密な介在神経 AIZ、AIA、RIM、RIB を選び、各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て、マクロ蛍光顕微鏡システムを用いて浸透圧刺激に対する AIB の応答と行動応答がどのように変化するかデータ取得を行った (図 5B)。行動応答の割合を比較したところ、AIA、AIZ、RIM を阻害した場合に行動割合が変化し、とくに AIA または RIM を阻害したときに方向転換行動に影響が見られた (図 5C)。また、AIB の Ca^{2+} 応答について、刺激に対する応答開始の遅延時間の算出や、GCaMP6f 蛍光値の上昇または下降のフェーズが刺激開始後 10 秒間でどれくらいの時間を占めるか、また、一度の上昇または下降がどれくらい持続するかを計測した (図 5D)。応答遅延時間を比較すると、AIA からのシナプス伝達を阻害すると遅延時間が有意に減少した (図 5E)。また、AIA を阻害した場合、上昇フェーズの総時間と持続時間が有意に長くなった (図 5F,G)。AIZ を阻害した場合は、AIB の応答に統計的に有意な差は見られなかった。RIM を阻害すると、上昇フェーズの持続時間がやや短くなり (図 5G)、下降フェーズの総時間が有意に長くなった (図 5H)。RIB を阻害した場合、上昇フェーズの総時間が長くなり (図 5F)、下降フェーズの総時間も長くなった (図 5H)。

まとめると、AIA を阻害すると、方向転換の割合が増加し、AIB の応答の信頼性が高まったことから、AIA の本来の機能は、AIB の活動を抑制することであると明らかになった。また、RIM を阻害すると、方向転換の発生がほとんどなくなり、AIB が応答しにくくなったことから、RIM の本来の機能は、AIB の活動を活性化 (興奮) することが明らかとなった。AIZ、RIB については、方向転換行動の出力に与える影響は見られず、AIB の活動に与える影響も小さいといえる。したがって、AIB の応答のばらつきは、介在神経 AIA による抑制、介在神経 RIM による興奮のバランスによって調節されることが明らかとなった。

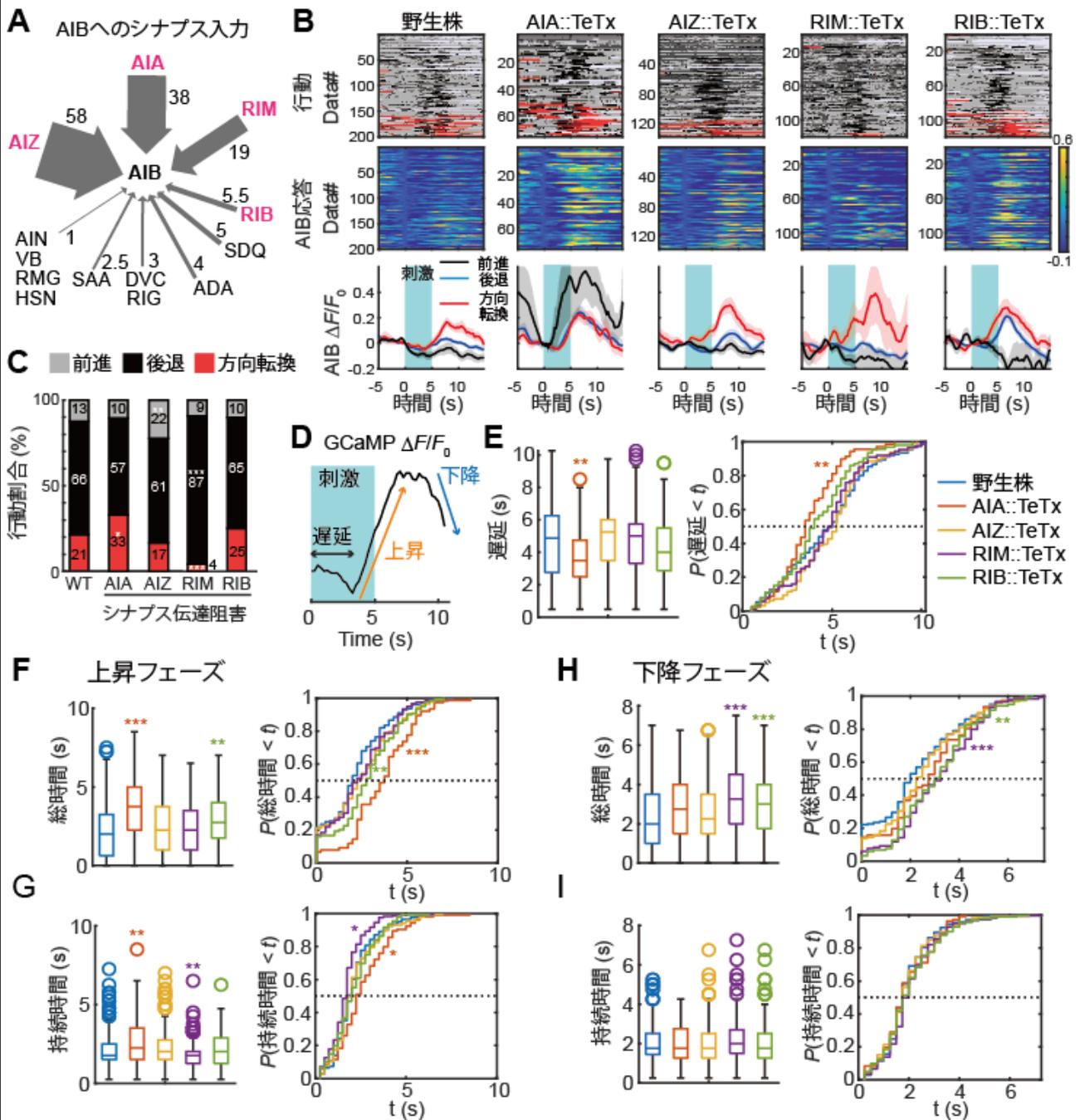


図5 AIBのばらつきを調節する神経回路の探索 (A) AIBにシナプス入力を行う介在神経の接続マップ。矢印の大きさや数字はシナプス接続の緊密さを表す。(B) AIA、AIZ、RIM、RIBからのシナプス伝達を阻害したときの、浸透圧刺激に対する行動応答とAIB応答。(C) Bの行動プロットより、刺激に対する行動応答の割合を定量。P値は、 χ^2 検定により計算し ($\chi^2(8) = 44.9, P = 3.8 \times 10^{-7}$)、残差分析を行った (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。 (D) AIB Ca^{2+} 応答の解析方法。刺激開始から、AIB応答が増加するまでの時間を遅延時間とした。AIB応答が増加する時間を上昇フェーズ、減少する時間を下降フェーズとした。(E-I) 遅延時間 (E)、上昇フェーズの総時間 (F) と持続時間 (G)、下降フェーズの総時間 (H) と持続時間 (I) について、箱ひげ図および累積分布をプロット。P値は、箱ひげ図においては Wilcoxon rank sum test、累積分布プロットにおいては、Kolmogorov-Smirnov test を行い、Holmの方法により調整した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

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

浸透圧刺激に対する介在神経 AIB のばらつきは、介在神経 AIA および RIM により制御されていることが明らかとなった。ゆえに、刺激を与えたときに AIB がどのように応答するかは、その時点で AIA および RIM の自発的な神経活動がどのような状態にあるかを観察しなければ明らかにならない。そこで、本研究では、独自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とカメラを追加することによって緑色および赤色の蛍光画像を同時取得するシステムを開発した。さらに、対物レンズを倍率の高いものに変更し、4 倍の倍率で撮影することで、個々の神経細胞の判別を試みた。

介在神経 AIB の細胞核に GCaMP6f および赤色蛍光タンパク質 mCherry、介在神経 AIA に GCaMP6f のみを発現した線虫株を作製し上記のシステムで撮影したところ、マイクロ流路デバイス中で自由に動き回る線虫において、緑・赤2色の撮影に成功した(図6A)。また、線虫頭部では、AIB のみに発現した mCherry によって、AIA と AIB の細胞の区別が可能であった(図6B)。

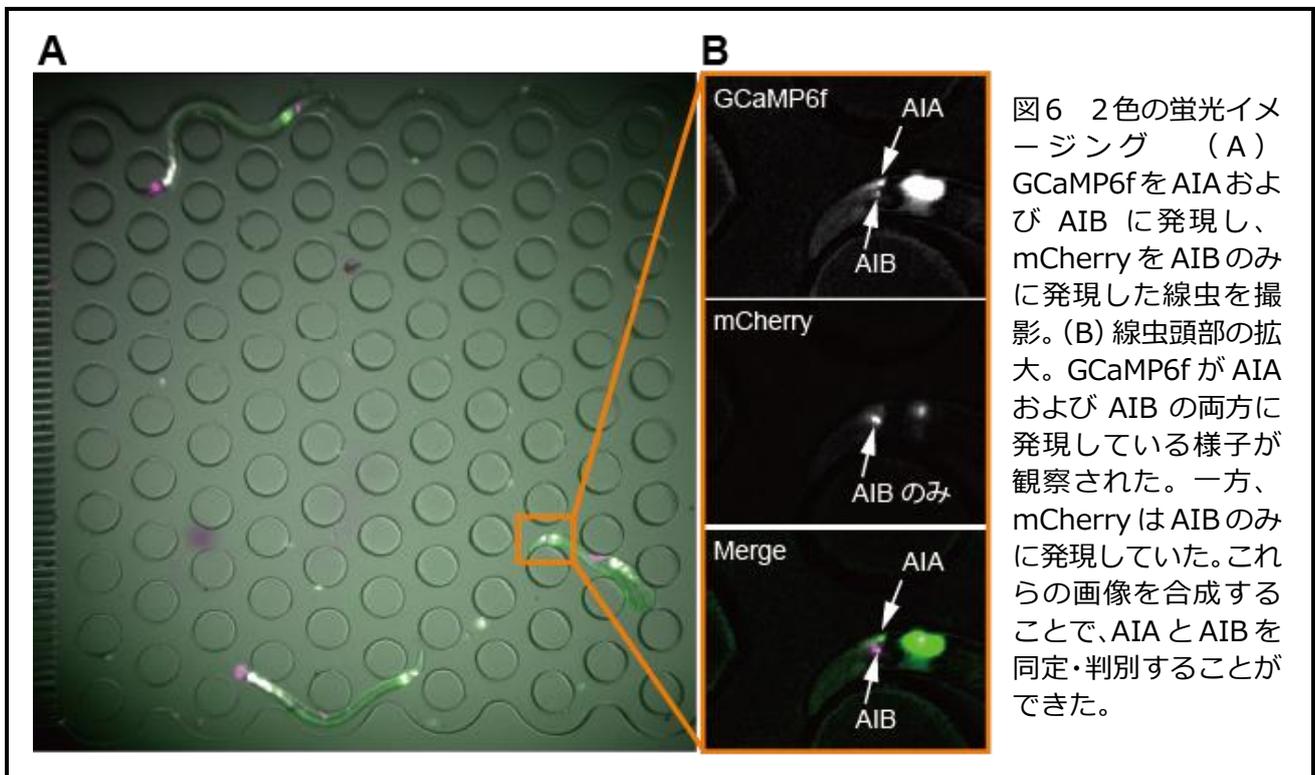


図6 2色の蛍光イメージング (A) GCaMP6fをAIAおよびAIBに発現し、mCherryをAIBのみに発現した線虫を撮影。(B)線虫頭部の拡大。GCaMP6fがAIAおよびAIBの両方に発現している様子が観察された。一方、mCherryはAIBのみに発現していた。これらの画像を合成することで、AIAとAIBを同定・判別することができた。

5. まとめと今後の展望

本研究で得られた知見は下記のようにまとめられる。

- ①線虫の ASD 関連遺伝子変異株では、複数感覚の統合に障害が生じる。
- ②浸透圧刺激時、感覚神経 ASH の応答のばらつきは少ない。一方、その下流の介在神経 AIB の応答はばらつきが大きく、行動応答との相関がある。
- ③介在神経 AIB の応答のばらつきは、主に介在神経 AIA からの抑制性入力と RIM からの興奮性入力によって調節される。
- ④マクロ蛍光顕微鏡システムの改良により、自由に動き回る線虫において、複数の神経細胞を区別してイメージングすることに成功した。

これらの知見を踏まえた上で、今後は下記のように研究を発展させていく予定である。

① AIA、AIB、RIM の同時イメージングによる AIB 活動の制御機構解明

本研究で開発した 2 色同時イメージングシステムを活用し、AIA、AIB、RIM の 3 つの神経細胞から同時に神経活動を取得する。一般に、線虫の介在神経細胞は、自発的に活動状態を変化させることが知られている。これら 3 つの神経細胞の活動を長時間観察することで、AIA および RIM がどのような活動状態にあるかを把握できると期待される。浸透圧刺激を与えた瞬間の AIA および RIM の活動状態と、実際に AIB がどのように応答したかを関係づけることが可能になるため、線虫内部の自発的な神経活動状態に外部からの感覚刺激入力統合されることで AIB の応答が決まるという神経機構を明らかにできると考えられる。

② ASD 関連遺伝子変異株における神経応答のばらつきの定量

上記の知見まとめ①に関連して、ASD 関連遺伝子変異株では、浸透圧刺激と同時に匂い刺激を与えても野生株のように方向転換の割合は低下しない (図 3C)。これは、野生株では、匂い刺激を加えることで浸透圧刺激に対する AIB の応答が抑えられることで AIB 応答のばらつきが低下しているが、ASD 関連遺伝子変異株では、匂い刺激を加えても AIB の応答のばらつきが低下せず、方向転換割合が変化しないということを示唆している。線虫に好ましい匂い刺激 (ジアセチル) を与えると、介在神経 AIA が活性化することが知られている。知見まとめ③から、野生株では、匂い刺激の追加によって AIA の活性化が起こり、結果として AIB の活動が抑制されると考えられる。しかし、ASD 関連遺伝子変異株では、匂い刺激により AIB の活動が抑制されていないことが示唆されることから、AIB のばらつきを制御する神経回路に何らかの機能不全があると推測される。ゆえに、ASD 関連遺伝子変異株においても、AIA、AIB、RIM の同時イメージングを行うことで、ASD での AIB 応答のばらつきを定量するとともに、AIB 応答のばらつきを制御する AIA と RIM からなる神経回路機能の破綻メカニズムを明らかにできると期待される。

6. 研究の発信方法 (予定を含む)

本研究は、下記の学会において発表を行った。

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

また、2023 年 9 月 4-6 日に開催予定の第 33 回日本神経回路学会全国大会 (東京大学本郷キャンパス) でも発表を予定している。