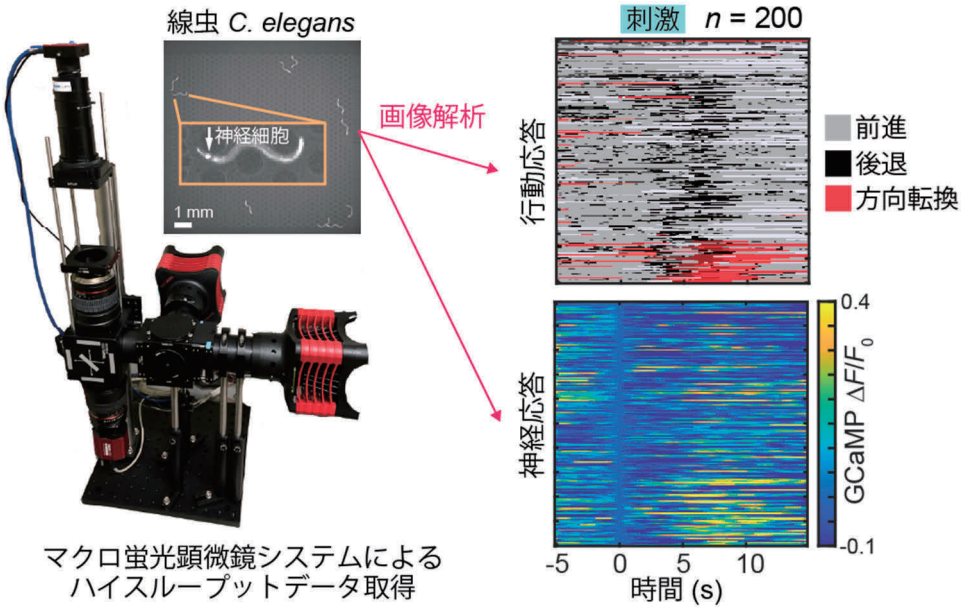
124　自閉スペクトラム症における神経変動性機構の解明	高橋　光規

【目的】自閉スペクトラム症（Autism Spectrum Disorder : ASD）では、症例の 9 割で感覚機能の異常が報告されている。この感覚障害の原因として、ASD では感覚刺激に対する神経応答のばらつき（変動性）が昂進し、外界の感覚刺激を正しく受容できないためではないかという仮説が提唱されている。しかし、そもそもなぜ神経変動性が生じるのかという基礎的な神経メカニズムは未だ不明である。神経応答の変動性は確率的現象であり、その解析には多数の神経応答データが必要となる。このような多数のデータを必要とする解析には、体が小さくイメージングが容易なモデル生物の線虫 *C. elegans* が適する。線虫は、様々な ASD 関連遺伝子の変異株が存在し、高速フェノタイプ解析が可能であるという利点もある。本研究では、独自のマクロ蛍光顕微鏡システムを用いて、線虫に感覚刺激を与えた際の神経応答データをハイスループットに取得し、神経応答変動性の源となる神経回路の同定を目指した。

【方法】線虫の行動と神経応答を観察しながら感覚刺激の制御を行うため、光リソグラフィ法によりシリコンウェハ上に鋳型を作製し、ポリジメチルシロキサン（PDMS）シリコン樹脂を流し込んでマイクロ流体デバイスを作製した。野生型の線虫株として N2 を、ASD 関連遺伝子変異株として *nlg -1*、*chd-7* を用いた。神経応答の取得や、シナプス伝達の抑制のため、DNA マイクロインジェクション法により、Ca^{2+}センサーGCaMP6f または開口放出を阻害するタンパク質 TeTx を各神経細胞に発現させた株を作製した。マクロ蛍光顕微鏡下で、マイクロ流体デバイス中の線虫に感覚刺激を与え、神経応答および行動応答を取得した。データの解析は、MATLAB の自作スクリプトによって行った。

【結果】浸透圧刺激と匂い刺激を同時に与え、感覚統合が正しく行われるか試したところ、野生型では、匂い刺激存在下で浸透圧刺激に対する方向転換応答の割合が低下した。一方、ASD 関連遺伝子変異株では、匂い刺激の有無が浸透圧刺激に対する方向転換応答の割合に影響を与えなかった。続いて、浸透圧刺激を受容する感覚神経 ASH と、方向転換を制御する介在神経 AIB の神経応答を取得したところ、ASH の応答変動性は低いのに対し、AIB の応答変動性は高いことを見いだした。AIB の応答変動性を制御する神経経路の同定のため、AIB に接続する介在神経からのシナプス伝達を抑制した線虫株を作製し、AIB の応答を取得したところ、AIB の活動を抑制する介在神経 AIA および AIB の活動を活性化する介在神経 RIM を見出した。

ハイスループット神経応答記録による神経応答変動性の解析



124. 自閉スペクトラム症における神経変動性機構の解明

高橋　光規

山梨大学 大学院総合研究部 医学域 解剖学講座 構造生物学教室

Key words：線虫，介在神経，Ca^{2+}イメージング，感覚異常，自閉スペクトラム症

緒　言

自閉スペクトラム症（Autism Spectrum Disorder：ASD）は、人口の 1%に発症する先天性の神経発達障害であり、社会的コミュニケーション障害を主徴とする。興味深いことに、ASD 症例の 9 割で感覚の過敏や鈍麻などといった異常が報告されており［1］、発達期に感覚機能の障害が生じると、ASD に見られる社会行動障害が引き起こされることが示唆されている［2］。このような ASD の感覚障害の背景には、感覚刺激に対する神経応答のばらつき（変動性）の昂進がある［3］。本来、行動応答や神経応答に見られる変動性は動物の神経系固有の性質であり、行動の学習・最適化により環境変化を適切に予測するための重要な神経機能である［4，5］。しかし、ASD ではこの神経変動性の昂進のために、感覚刺激から環境変化を正しく予測することが困難であるという仮説が提唱されている［6］。したがって、神経変動性が生じるメカニズムを解明することで ASD の神経生物学的な理解が進み、新たな治療法の開発も期待できるが、そもそもなぜ神経変動性が生じるのかは不明な点が多い。

神経応答の変動性は確率的現象であり、その観察には多数の神経応答データが必要である。我々は、これまでに線虫 *C. elegans* をモデル生物として用い、光で神経活動を制御しつつ神経応答の光学的記録を行う系を開発してきた［7］。線虫はイメージングが容易であり、また、様々な ASD 関連遺伝子の変異株が存在し、高速フェノタイプ解析が可能である［8］。本研究では神経変動性の源となる神経回路の同定を目的として、線虫に感覚刺激を与えたときの行動応答と神経応答を多数取得し、応答データの時系列解析を行うことで神経変動性制御に関わる介在神経を同定した。

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体デバイスを作製した。マイクロ流体デバイスは、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体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出力されたかを定量した。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）。Ca^{2+}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

Ca^{2+}センサーGCaMP6f を発現した線虫株に対し、マイクロ流体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。浸透圧刺激は、マイクロ流体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。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。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。

結　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、マイクロ流体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 1A）。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 1B、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減少が見られなかった（図 1B、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。

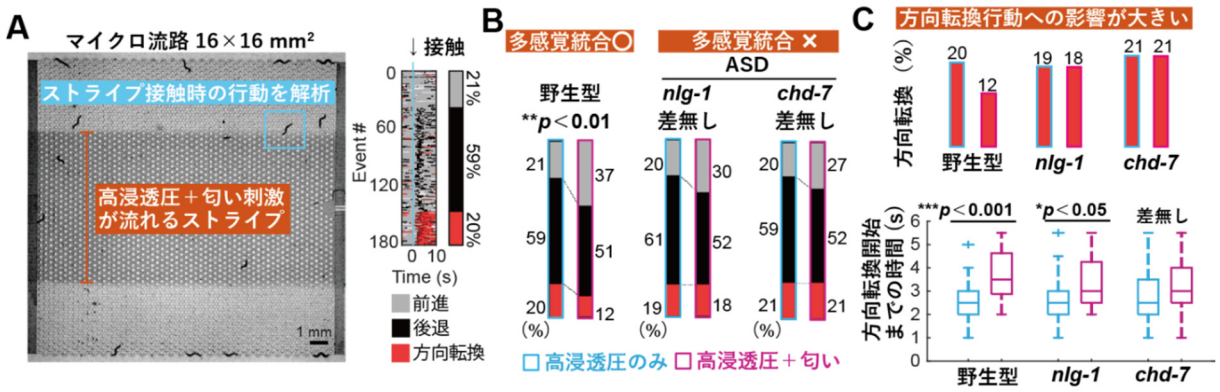


図 1. 感覚統合過程の解析

A) マイクロ流体デバイス中に感覚刺激を含むストライプ領域を作製し、領域に接触したときの線虫行動を前進・後退・方向転換に分類した。

B) 浸透圧刺激のみを与えた場合と、浸透圧刺激に加え匂い刺激も同時に与えた場合の線虫行動応答を比較した。P 値はχ^2検定により計算した。

C) 方向転換行動の割合を比較（上）。刺激接触から方向転換行動開始までの時間を定量した（下）。P 値は Wilcoxon rank sum test により求めた。

2. 浸透圧刺激に対する神経応答変動性の定量

感覚刺激に対する神経応答の変動性を検出するため、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 2A、D）。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 2A）。同時に ASH に発現した GCaMP6f の蛍光も

取得し（図 2B）、行動応答（図 2A）によって ASH の Ca^{2+}応答（図 2B）を分類すると、出力された行動が違っても 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 2C）。

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 2E）。行動応答（図 2D）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 2F）。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。

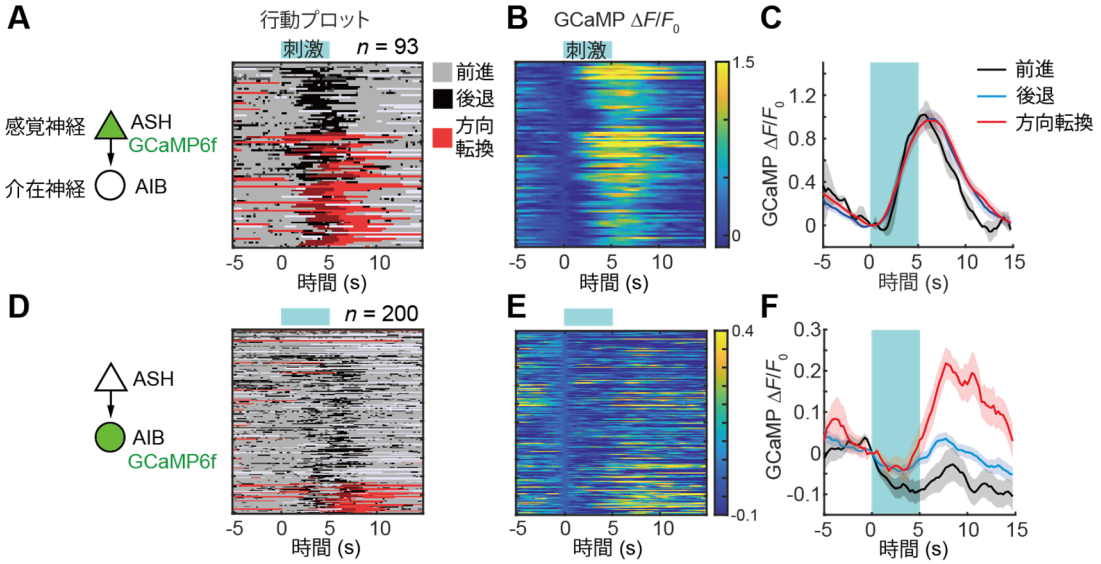


図 2. 浸透圧刺激に対する感覚神経および介在神経の応答解析

A） 浸透圧刺激を受容する感覚神経 ASH に GCaMP6f を発現させ、神経応答と行動応答を同時に取得した。浸透圧刺激開始時刻を 0 として行動データをプロットした。

B） A）の行動データに対応する ASH の神経活動データをプロットした。

C） 行動応答によって ASH の神経応答を分類し、平均値±SEM をプロットした。

D） ASH の下流にある介在神経 AIB に GCaMP6f を発現させ、神経応答と行動応答を同時に取得した。

E） D）の行動データに対応する AIB の神経活動データをプロットした。

F） 行動応答によって AIB の神経応答を分類し、平均値±SEM をプロットした。

3. 介在神経 AIB の神経変動性を調節する神経回路の探索

介在神経 AIB の神経応答はばらつきが大きいことが明らかとなったが、そのような神経応答変動性を調節する神経回路機構の探索を行った。まず、線虫コネクトームデータベース（全神経細胞の解剖学的つながりのデータ）により AIB にシナプスをつくる介在神経を探したところ、13 個の細胞が見つかった（図 3A）。これらのうち、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た。これらのシナプス伝達阻害株に浸透圧刺激を与え、マクロ蛍光顕微鏡システムにより AIB の神経応答と行動応答を同時に取得した（図 3B）。まず、刺激に対する行動応答を比較したところ、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 3C）。続いて、AIB の神経応答の解析を試み、刺激開始から神経応答発生までの遅延時間、神経応答の上昇総時間、下降総時間を定量した（図 3D）。神経応答の遅延時間は、AIA を阻害した場合のみ有意に短くなった（図 3E）。神経応答の上昇総時間は、AIA または RIB を阻害したときに有意に延

長した（図 3F）。神経応答の下降総時間は、RIM または RIB を阻害したときに有意に延長した（図 3G）。

これらから、AIBの神経活動を調節するのは、介在神経AIA、RIB、RIMであることが明らかとなり、中でもAIAおよびRIMは行動出力にも影響を与えることが明らかとなった。AIBの神経変動性に対し、AIAを抑制するとAIBの応答性が向上することで変動性が低下したことから（図3B、E、F）、AIAの本来の機能は、AIBを抑制して変動性を大きくすることであるといえる。一方、RIMを抑制すると、AIBの応答性が低下することで変動性が低下したことから（図3B、E、F）、RIMの本来の機能は、AIBを興奮させ変動性を大きくすることであるといえる。

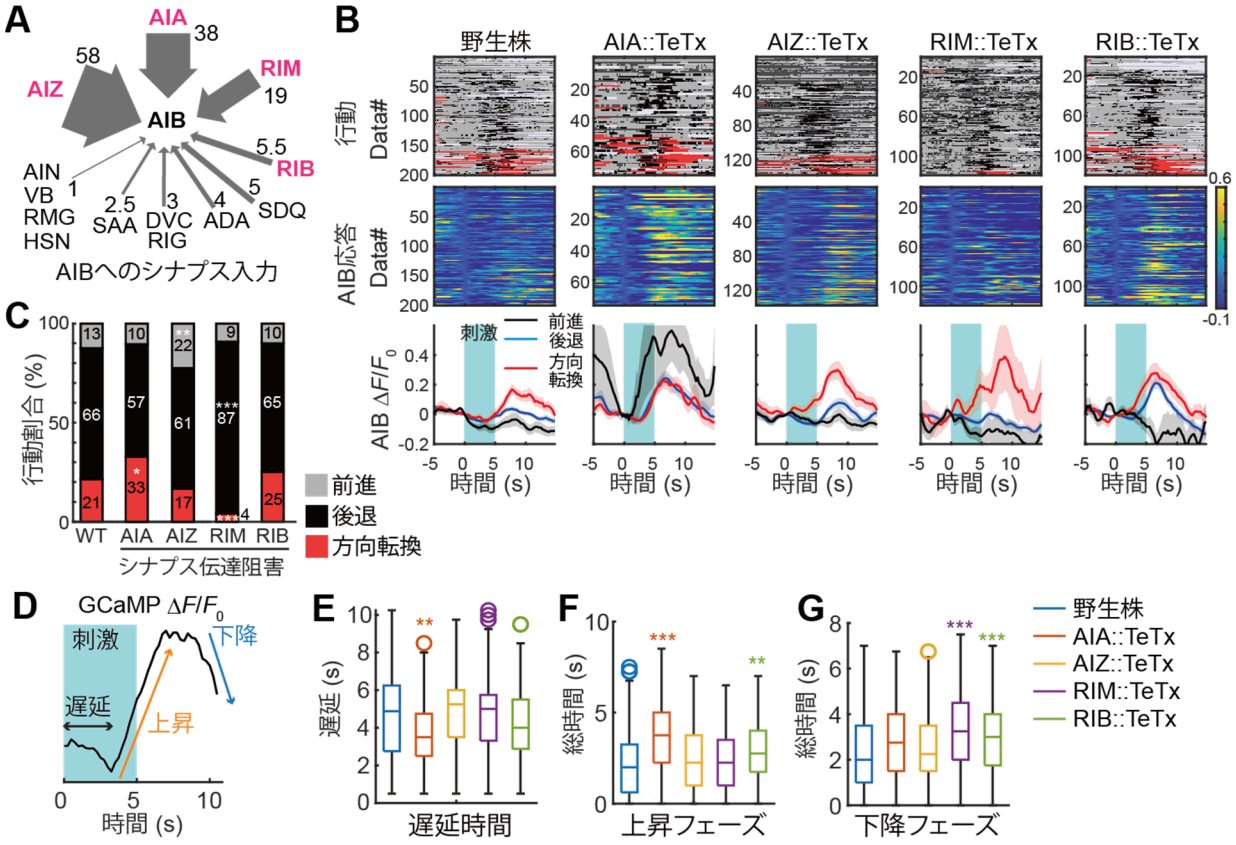


図 3. 介在神経 AIB の神経変動性を調節する神経回路

A) AIB にシナプス入力を行う介在神経の接続図。矢印の大きさと数字は、シナプス接続の緊密さを表す。

B) AIA、AIZ、RIM、RIB からのシナプス接続を阻害したときの浸透圧刺激に対する行動応答（上段）、AIB 神経応答（中段）、行動で分類したときの AIB 応答（平均値±SEM 下段）。

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（χ^2 (8) ＝44.9、P＝3.8×10^{-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 応答が上昇し始め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) 遅延時間をプロットした箱ひげ図。

F) 上昇フェーズ総時間をプロットした箱ひげ図。

G) 下降フェーズ総時間をプロットした箱ひげ図。E～G において、野生株との比較を行い、P 値は Wilcoxon rank sum test により求め Holm の方法で調整した*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001）。

考　察

本研究では、ASD 関連遺伝子の線虫変異株において、浸透圧刺激と匂い刺激の統合が障害される感覚異常が生じることを明らかにした（図 1）。また、介在神経 AIB に注目することによって、浸透圧刺激の感覚処理において、AIB の神経応答変動性を調節する神経回路を見出すことができた（図 2、3）。これらの結果から、浸透圧刺激と匂い刺激の統合過程では、匂い刺激の存在によって AIB の活性化が抑制され、浸透圧刺激に対する方向転換行動の割合が低下することが示唆される。一方、ASD 関連遺伝子の変異株では、匂い刺激の有無が、浸透圧刺激時の方向転換行動の出力に影響を与えないことから、匂い刺激による AIB の抑制が生じておらず、AIB 変動性が高いと予想される。今後は、浸透圧刺激と匂い刺激の感覚統合過程に着目し、野生株および ASD 関連遺伝子変異株で AIB の神経応答を取得するとともに、本研究で同定した変動性を調節する AIA および RIM の神経活動も取得し、ASD 関連遺伝子変異株において感覚刺激に対する神経応答変動性が調節される機構の解明を目指す予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、山梨大学大学院総合研究部医学域解剖学講座構造生物学教室の小田賢幸教授ならびに同大学院総合研究部工学域機械工学系の浮田芳昭准教授である。また、実験試料の作製にあたって丸山奈津子技術職員のサポートをいただいた。ここに深く感謝を述べる。最後に、本研究の遂行にあたり多大なご支援をいただいた上原記念生命科学財団に深くお礼申し上げる。

文　献

1) Robertson CE, Baron-Cohen S. Sensory perception in autism. Nat Rev Neurosci. 2017 Nov;18(11):671-684. Epub 2017 Sep 29. PMID: 28951611 DOI: 10.1038/nrn.2017.112
2) Orefice LL, Zimmerman AL, Chirila AM, Sleboda SJ, Head JP, Ginty DD. Peripheral Mechanosensory Neuron Dysfunction Underlies Tactile and Behavioral Deficits in Mouse Models of ASDs. Cell. 2016 Jul 14;166(2):299-313. Epub 2016 Jun 9. PMID: 27293187 DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.033
3) Dinstein I, Heeger DJ, Lorenzi L, Minshew NJ, Malach R, Behrmann M. Unreliable Evoked Responses in Autism. Neuron. 2012 Sep 20;75(6):981-91. PMID: 22998867 DOI: 10.1016/j.neuron.2012.07.026
4) Renart A, Machens CK. Variability in neural activity and behavior. Curr Opin Neurobiol. 2014 Apr;25:211-20. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24632334 DOI: 10.1016/j.conb.2014.02.013
5) Tumer EC, Brainard MS. Performance variability enables adaptive plasticity of 'crystallized' adult birdsong. Nature. 2007 Dec 20;450(7173):1240-4. PMID: 18097411 DOI: 10.1038/nature06390
6) Sinha P, Kjelgaard MM, Gandhi TK, Tsourides K, Cardinaux AL, Pantazis D, Diamond SP, Held RM. Autism as a disorder of prediction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Oct 21;111(42):15220-5. Epub 2014 Oct 6. PMID: 25288765 DOI: 10.1073/pnas.1416797111
7) Takahashi H, Kamiya M, Kawatani M, Umezawa K, Ukita Y, Niwa S, Oda T, Urano Y. Neural and behavioral control in Caenorhabditis elegans by a yellow-light–activatable caged compound. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Feb 9;118(6):e2009634118. PMID: 33542099 DOI: 10.1073/pnas.2009634118
8) McDiarmid TA, Belmadani M, Liang J, Meili F, Mathews EA, Mullen GP, Hendi A, Wong WR, Rand JB, Mizumoto K, Haas K, Pavlidis P, Rankin CH. Systematic phenomics analysis of autism-associated genes reveals parallel networks underlying reversible impairments in habituation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Jan 7;117(1):656-667. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31754030 DOI: 10.1073/pnas.1912049116