—Review for award—

ドパミン神経系賦活化薬の慢性投与は自閉症モデルマウスの行動異常を改善する

原 雄 大

Chronic Activation of the Dopaminergic Neuronal Pathway Improves Behavioral Abnormalities in the Prenatal Valproic Acid Exposure Mouse Model of Autism Spectrum Disorder

Yuta Hara

*Cell Biology Laboratory, School of Pharmacy, Kindai University;
3-4-1 Kowakae, Higashiosaka, Osaka 577-8502, Japan.*

(Received May 20, 2019)

Over the last decade there has been an increase in the prevalence of autism spectrum disorder (ASD); however, its pathogenic mechanisms remain unclear. To date, no effective drug has been developed to treat the core symptoms of ASD, especially social interaction deficits. Previous studies have mainly focused on the glutamatergic, GABAergic, and serotonergic signaling pathways; however, a growing number of studies have reported abnormalities in the dopaminergic pathway, such as mutations and functional alterations of dopamine-related molecules, in ASD patients. Furthermore, atypical antipsychotic drugs risperidone and aripiprazole are prescribed for the treatment of non-core symptoms, such as irritability, in patients with ASD. These observations suggest that the dopaminergic pathway is involved in the pathogenesis of ASD. Previously, we have established a mouse model of ASD based on clinical research, which shows that exposure to valproic acid, an antiepileptic drug, during pregnancy causes an increase in the risk of developing ASD in children. This review summarizes our recent studies, which have assessed alterations in the prefrontal dopaminergic pathway. In addition, we discuss the effects of treatment with attention deficit/hyperactivity disorder drugs and atypical antipsychotic drugs, which activate the prefrontal dopaminergic pathway, on ASD-like behavioral abnormalities in the valproic acid exposure mouse model of ASD.

Key words—autism; valproic acid; dopamine; prefrontal cortex; animal model**1. はじめに**

自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder; ASD) は、社会性の障害、コミュニケーションの障害、常同行動や興味・活動の限局化の3つを主症状とする神経発達障害である。¹⁾ その患者数は、年々増加しており、現在有病率は59人に1人の割合となっている。²⁾ 発症原因はいまだ不明であるが、遺伝的要因と環境要因との相互作用により発症すると考えられており、近年、欧米を始め世界でASDの有病率が劇的に上昇していることや、双生児を対象とした疫学調査での知見より、環境要因の占める割合は55%にも及ぶと算出されている。³⁾ また、妊娠中のウイルス感染やビタミン不足によりASDの

発症リスクが増大することが示され、胎生期・周産期の環境要因についても、広義の意味で、ASD発症に係わる環境因子として考えられるようになった。したがって、最近の国内外のASDに関する基礎研究では、胎生期～幼児期の環境要因の役割解明を目的とする研究が目立つようになってきた。しかしながら、ASDの病態発現に係わる分子基盤はいまだ明らかではなく、また、主症状に対して有効性を示す薬物はいまだ存在しない。

バルプロ酸 (valproic acid; VPA) は、てんかんや双極性障害の治療など広く臨床応用されている薬物であり、妊娠可能な女性のてんかん患者にとってしばしば唯一の治療選択肢とされている。一方、抗てんかん薬を妊娠中に服用した女性から生まれた子供では、奇形や精神遅滞などの障害を持つリスクが高いこと、なかでもVPAの服用による発症リスクが最も高いことが報告された。^{4,5)} このような臨床知見を背景に、胎生期にVPAを投与したげっ歯類、

近畿大学薬学部細胞生物学研究室 (〒577-8502 大阪府東大阪市小若江 3-4-1)

e-mail: hara@phar.kindai.ac.jp

本総説は、2018年度日本薬学会関西支部奨励賞 (生物系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

特にラットが自閉症のモデル動物として用いられてきた。^{6,7)} 筆者らは、既存の遺伝子改変自閉症モデルマウスとの比較が容易であること、遺伝子-環境相互作用の解析が可能であるなどの理由から、胎生期の VPA 投与によるマウスでの自閉症モデルの作製を試みた。そして、胎生 12.5 日目に VPA (500 mg/kg) を投与した ICR 系マウス由来のオスの出生仔が、種々の ASD 様の行動異常を示すこと、^{8,9)} 大脳皮質での神経細胞数の減少⁸⁾や海馬での樹状突起スパイン密度の低下⁹⁾といった脳組織学的変化が起きていることを明らかにした。

自閉症の発症には、脳内の神経伝達物質の異常が関与していると考えられている。これまでは、興奮性神経と抑制性神経のバランスの乱れによる発症仮説の広まりから、グルタミン酸神経系や GABA 神経系に焦点を当てた研究が数多く行われてきた。¹⁰⁾ また、ASD 患者におけるドパミン受容体などのドパミン神経系関連遺伝子の変異やタンパク質の機能変化が近年報告されているが、¹¹⁾ ドパミン神経系の変化と自閉症の病態発現との関連性の詳細は不明である。また、注意欠陥多動性障害 (attention deficit hyperactivity disorder; ADHD) 治療薬や抗精神病薬などのドパミン神経系を標的とした薬物が、多動や易刺激性などの ASD の付随症状の改善に使用されているが、¹²⁾ その作用機序についても不明である。

本稿では、胎生期 VPA 曝露マウスにおいてこれまで筆者らが見出した知見を中心として、ASD におけるドパミン神経系の変化及びその治療標的としての可能性について考察する。

2. 自閉症モデルマウスにおけるドパミン神経系機能の低下

筆者らは、モノアミン含量、代謝回転及び基礎遊離量の観点より、ASD モデルマウスの定常状態におけるドパミン神経系の変化を検討したが、ドパミン神経系の主要な投射先である前頭前皮質及び線条体において、いずれも対照群と差異はなく、また、ノルアドレナリン及びセロトニンなど他のモノアミンについても群間で差異は認められなかった。

ASD 患者では、外部からの刺激の入力により多動などの異常な行動を示すこと、社会性行動や他者とのコミュニケーションに障害があることなどが特徴として知られており、外的な刺激に対する神経細胞の応答性が障害されていることが示唆される。そ

こで筆者らは、中枢興奮薬であるメタンフェタミンを用いた薬理学的手法により、モデル動物の神経細胞の応答性変化を追究した。メタンフェタミンは、げっ歯動物において、自発運動量、脳内のモノアミン遊離量、並びに神経活動を増加させることが知られている。^{13,14)} オスの ASD モデルマウスでは、メタンフェタミンによる運動量、並びに前頭前皮質でのドパミン遊離量及び神経活性化マーカー c-Fos タンパク質の増加作用が有意に減弱していた (Fig. 1)。さらに、モデルマウスの前頭前皮質において、ドパミン D₁ 及び D₂ 受容体の mRNA 発現量が減少していた。一方、メタンフェタミンによる前頭前皮質での他のモノアミン遊離量の増加作用に影響はなく、さらに線条体ではいずれの変化も認められなかった。メタンフェタミンによる運動量の増加作用には、前頭前皮質のドパミン D₁ 及び D₂ 受容体が関与していること、^{14,15)} また、c-Fos 陽性細胞数の増加作用にはドパミン D₁ 及び D₂ 受容体が関与していること^{16,17)} が報告されている。これらの報告、及び線条体ではドパミン受容体の発現量に変化がなかったことより、ASD モデルマウスで認められたメタンフェタミンに対する薬理学的感受性の低下は、前頭前皮質のドパミン神経系の機能低下に起因する可能性が考えられた。

ASD は、男児に多いという性差が知られている。¹⁸⁾ 臨床知見と一致して、筆者らは、本モデルマウスでの社会性行動障害が、オスマウスのみ発現することを認めている。^{8,19)} また、前頭前皮質のドパミン神経系の機能低下に関しても、メスのモデルマウスでは発現しないことを認めた。

これらの知見より、胎生期の抗てんかん薬投与誘発の ASD モデルマウスにおいて、オスの前頭前皮質特異的にドパミン神経系の機能低下が生じていることが明らかとなった。

原 雄大

2011 年 3 月に大阪大学薬学部を卒業後、同大学院薬学研究科 (薬物治療学分野: 主宰 松田敏夫教授, 神経薬理学分野: 主宰 橋本 均教授) に進学し、2017 年 3 月に博士 (薬科学) を取得する。2017 年 4 月より近畿大学薬学部の助教に着任し、現在に至る。

Fig. 1. Reduced Prefrontal Dopaminergic Function in a Mouse Model of Autism Spectrum Disorder

Prenatal exposure to valproic acid decreased the pharmacological response to methamphetamine, such as dopamine release and increased c-Fos-positive cells in the prefrontal cortex, and hyperlocomotion. METH: methamphetamine, DA: dopamine, ASD: autism spectrum disorder.

Fig. 2. Chronic Treatment with ADHD and Atypical Antipsychotic Drugs Ameliorate ASD-like Behavioral Abnormalities and the Loss of Dendritic Spine Morphology in Mice Prenatally Exposed to Valproic Acid

ADHD: attention deficit hyperactivity disorder, PFC: prefrontal cortex, ASD: autism spectrum disorder.

3. ASD様の行動異常に対するドパミン神経系賦活化薬の効果

つぎに、メタンフェタミンに対する薬理的応答性を指標に見出した前頭前皮質のドパミン神経系の機能低下について、ASDの治療標的としての可能性について追究した。ADHDの治療薬であるメチルフェニデート及びアトモセチンは、低用量で慢性投与すると、マウスの前頭前皮質選択的にドパ

ミン神経系を活性化することが知られている。²⁰⁾ 筆者らは、*in vivo* 脳微小透析法により、メチルフェニデート及びアトモセチンが、ASDモデルマウスの前頭前皮質におけるドパミン遊離量を増加させることを見出し、また両薬物が、2週間の慢性投与により社会性行動の障害及び付随症状の1つである認知記憶の障害を改善することを明らかとした (Fig. 2)。

樹状突起スパインは、神経細胞上に存在し、興奮性の神経伝達を担う微小な構造である。近年、ASDの病態発現への樹状突起スパインの関与が注目されており、²¹⁾最近Kangらは、樹状突起スパインの変化と行動学的変化との関連について、樹状突起スパインの成熟に係わるIRSp53の欠損マウスが社会性行動及び認知記憶の障害を示すことを報告している。²²⁾また筆者らは、ASDモデルマウスの前頭前皮質において樹状突起スパイン密度が減少していること、ADHD治療薬の慢性投与により、その低下が改善することを見出した(Fig. 2)。また、ADHD治療薬によるASD様行動及びスパイン形態学的異常の改善作用は、ドパミンD₁受容体拮抗薬SCH39166若しくはD₂受容体拮抗薬ラクロプリドとの併用投与により拮抗され、アドレナリン α_2 受容体拮抗薬イダゾキサンの併用投与により影響を受けなかった。

非定型抗精神病薬であるリスペリドン及びアリピプラゾールは、ADHD治療薬とは異なる作用発現機序を持つが、メチルフェニデート及びアトモキセチンと同様にマウス前頭前皮質のドパミン神経系を活性化させる。^{23,24)}一方、定型抗精神病薬であるハロペリドールにはそのような作用は認められない。²⁵⁾前頭前皮質のドパミン神経系の活性化作用と相関して、リスペリドン及びアリピプラゾールは、慢性投与によりASDモデルマウスの行動異常及び樹状突起スパイン密度の低下を改善させ(Fig. 2)、一方、ハロペリドールでは効果が認められなかった。なお、リスペリドン及びアリピプラゾールは、単回投与ではASD改善作用を示さなかったことより、作用発現には持続的あるいは反復的なドパミン神経系の活性化が必要であることが示唆される。

4. おわりに

筆者らは、オスのASDモデルマウスにおいて、前頭前皮質のドパミン神経系特異的に機能が低下していること、²⁶⁾さらに、前頭前皮質のドパミンD₁及びD₂受容体の慢性的な活性化がモデルマウスのASD様の行動異常及び樹状突起スパイン密度の低下を改善すること^{27,28)}を示した。

神経精神疾患のモデル動物は、表面妥当性、構成妥当性及び予測妥当性の3つを満たすことが望ましいとされている。²⁹⁾これまでに、*Cntnap2*欠損マウス³⁰⁾及びNL3^{R451C}マウス³¹⁾といった単一遺伝子変

異によるASDモデル動物において、すべての妥当性を満たすことが示されているが、多因子要因を持ち、実際の病因をより反映するとして用いられているモデル動物において、3つの妥当性を満たすものは知られていない。筆者らは、VPAを曝露した胎仔由来の全脳及び大脳皮質神経細胞において、MeCP2, Shank2, 及びNeuroligin-1などの複数のASD関連遺伝子の発現が変動することを見出している。^{32,33)}また、最近の臨床試験において、ASD患者の主症状に対して改善効果が見い出された神経ペプチドであるオキシトシンが、³⁴⁾本モデルマウスの社会性行動障害を改善することを明らかにしている。³⁵⁾すなわち、本モデルマウスにおいて筆者らが見出した一連の知見は、本マウスがASDの表面妥当性(性差を含むASD様の行動異常の発現)、構成妥当性(ASD関連遺伝子群の発現変動)及び予測妥当性(オキシトシンによるASD様行動の改善効果)を満たすことを示しており、本モデルマウスが妥当性の高い非常に有益なASDモデルであることが考えられる。したがって、本モデルマウスより得られた今回の知見は、ASDにおけるドパミン神経系の機能低下の重要性、及びドパミン神経系を標的とする薬物治療の可能性を強く提唱するものであり、いまだ有効性を示す薬物が存在しないASDの治療において、新たな情報とアイディアを提供し、大きな発展をもたらすものと期待される。

謝辞 本研究を行うにあたり、終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科薬物治療学分野 松田敏夫名誉教授、神経薬理学分野 橋本 均教授、歯学研究科薬理学教室 田熊一徹教授、並びに薬学研究科薬剤学分野 吾郷由希夫准教授に心より厚く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり協力頂きました大阪大学大学院薬学研究科薬物治療学分野のメンバー諸氏に感謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Geschwind D. H., Levitt P., *Curr. Opin. Neurobiol.*, **17**, 103–111 (2007).
- 2) Baio J., Wiggins L., Christensen D. L., Maen-

- ner M. J., Daniels J., Warren Z., Kurzius-Spencer M., Zahorodny W., Robinson Rosenberg C., White T., Durkin M. S., Imm P., Nikolaou L., Yeargin-Allsopp M., Lee L. C., Harrington R., Lopez M., Fitzgerald R. T., Hewitt A., Pettygrove S., Constantino J. N., Vehorn A., Shenouda J., Hall-Lande J., Van Naarden Braun K., Dowling N. F., *MMWR Surveill. Summ.*, **67**, 1–23 (2018).
- 3) Hallmayer J., Cleveland S., Torres A., Phillips J., Cohen B., Torigoe T., Miller J., Fedele A., Collins J., Smith K., Lotspeich L., Croen L. A., Ozonoff S., Lajonchere C., Grether J. K., Risch N., *Arch. Gen. Psychiatr.*, **68**, 1095–1102 (2011).
 - 4) Williams P. G., Hersh J. H., *Dev. Med. Child Neurol.*, **39**, 632–634 (1997).
 - 5) Christensen J., Grønberg T. K., Sørensen M. J., Schendel D., Parner E. T., Pedersen L. H., Vestergaard M., *JAMA*, **309**, 1696–1703 (2013).
 - 6) Schneider T., Przewłocki R., *Neuropsychopharmacology*, **30**, 80–89 (2005).
 - 7) Kim K. C., Kim P., Go H. S., Choi C. S., Yang S. I., Cheong J. H., Shin C. Y., Ko K. H., *Toxicol. Lett.*, **201**, 137–142 (2011).
 - 8) Kataoka S., Takuma K., Hara Y., Maeda Y., Ago Y., Matsuda T., *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **16**, 91–103 (2013).
 - 9) Takuma K., Hara Y., Kataoka S., Kawanai T., Maeda Y., Watanabe R., Takano E., Hayata-Takano A., Hashimoto H., Ago Y., Matsuda T., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **126**, 43–49 (2014).
 - 10) Nelson S. B., Valakh V., *Neuron*, **87**, 684–698 (2015).
 - 11) Nguyen M., Roth A., Kyzar E. J., Poudel M. K., Wong K., Stewart A. M., Kalueff A. V., *Neurochem. Int.*, **66**, 15–26 (2014).
 - 12) Goel R., Hong J. S., Findling R. L., Ji N. Y., *Int. Rev. Psychiatry*, **30**, 78–95 (2018).
 - 13) Ago Y., Araki R., Yano K., Hiramatsu N., Kawasaki T., Chaki S., Nakazato A., Onoe H., Hashimoto H., Baba A., Takuma K., Matsuda T., *Psychopharmacology (Berl.)*, **217**, 443–452 (2011).
 - 14) Hall D. A., Powers J. P., Gulley J. M., *Brain Res.*, **1300**, 51–57 (2009).
 - 15) Wang J. Q., McGinty J. F., *J. Neurochem.*, **65**, 2706–2715 (1995).
 - 16) Zahniser N. R., Simosky J. K., Mayfield R. D., Negri C. A., Hanania T., Larson G. A., Kelly M. A., Grandy D. K., Rubinstein M., Low M. J., Fredholm B. B., *J. Neurosci.*, **20**, 5949–5957 (2000).
 - 17) Nagai T., Takuma K., Kamei H., Ito Y., Nakamichi N., Ibi D., Nakanishi Y., Murai M., Mizoguchi H., Nabeshima T., Yamada K., *Learn. Mem.*, **14**, 117–125 (2007).
 - 18) Miles J. H., *Genet. Med.*, **13**, 278–294 (2011).
 - 19) Hara Y., Maeda Y., Kataoka S., Ago Y., Takuma K., Matsuda T., *J. Pharmacol. Sci.*, **118**, 543–546 (2012).
 - 20) Koda K., Ago Y., Cong Y., Kita Y., Takuma K., Matsuda T., *J. Neurochem.*, **114**, 259–270 (2010).
 - 21) Penzes P., Cahill M. E., Jones K. A., VanLeeuwen J. E., Woolfrey K. M., *Nat. Neurosci.*, **14**, 285–293 (2011).
 - 22) Kang J., Park H., Kim E., *Neuropharmacology*, **100**, 27–39 (2016).
 - 23) Hertel P., Nomikos G. G., Iurlo M., Svensson T. H., *Psychopharmacology (Berl.)*, **124**, 74–86 (1996).
 - 24) Bortolozzi A., Díaz-Mataix L., Toth M., Celada P., Artigas F., *Psychopharmacology (Berl.)*, **191**, 745–758 (2007).
 - 25) Kuroki T., Meltzer H. Y., Ichikawa J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**, 774–781 (1999).
 - 26) Hara Y., Takuma K., Takano E., Katashiba K., Taruta A., Higashino K., Hashimoto H., Ago Y., Matsuda T., *Behav. Brain Res.*, **289**, 39–47 (2015).
 - 27) Hara Y., Ago Y., Taruta A., Katashiba K., Hasebe S., Takano E., Onaka Y., Hashimoto H., Matsuda T., Takuma K., *Autism Res.*, **9**, 926–939 (2016).
 - 28) Hara Y., Ago Y., Taruta A., Hasebe S., Kawase H., Tanabe W., Tsukada S., Nakazawa T., Hashimoto H., Matsuda T., Takuma K., *Psychopharmacology (Berl.)*, **234**, 3217–3228 (2017).
 - 29) Nestler E. J., Hyman S. E., *Nat. Neurosci.*, **13**, 1161–1169 (2010).
 - 30) Peñagarikano O., Lázaro M. T., Lu X. H., Gordon A., Dong H., Lam H. A., Peles E., Maidment N. T., Murphy N. P., Yang X. W., Golshani P., Geschwind D. H., *Sci. Transl.*

- Med.*, **7**, 271ra8 (2015).
- 31) Burrows E. L., Laskaris L., Koyama L., Churilov L., Bornstein J. C., Hill-Yardin E. L., Hannan A. J., *Mol. Autism*, **6**, 62 (2015).
- 32) Kawanai T., Ago Y., Watanabe R., Inoue A., Taruta A., Onaka Y., Hasebe S., Hashimoto H., Matsuda T., Takuma K., *Neurochem. Res.*, **41**, 2574–2584 (2016).
- 33) Hara Y., Ago Y., Takano E., Hasebe S., Nakazawa T., Hashimoto H., Matsuda T., Takuma K., *Mol. Autism.*, **8**, 33 (2017).
- 34) Watanabe T., Kuroda M., Kuwabara H., Aoki Y., Iwashiro N., Tatsunobu N., Takao H., Nippashi Y., Kawakubo Y., Kunimatsu A., Kasai K., Yamasue H., *Brain*, **138**, 3400–3412 (2015).
- 35) Hara Y., Ago Y., Higuchi M., Hasebe S., Nakazawa T., Hashimoto H., Matsuda T., Takuma K., *Horm. Behav.*, **96**, 130–136 (2017).