

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32525

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790085

研究課題名(和文) 発達障害の発症に対する胎児期への小胞体ストレス負荷の影響

研究課題名(英文) Effects of endoplasmic reticulum stress in embryonic stage on neurodevelopmental disorders

研究代表者

川田 浩一 (Kawada, Koichi)

千葉科学大学・薬学部・講師

研究者番号：30581631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症は遺伝子異常によるシナプス形成異常などの先天性疾患である。一方、小胞体ストレスと自閉症との関連性はほとんど報告されていない。そこで、本研究では、小胞体ストレスが神経分化・成熟異常に及ぼす影響を解析した。

自閉症モデルマウス脳内において、小胞体ストレス負荷状態であることおよび神経分化が亢進状態にあることを見出した。さらに、培養条件下においても、小胞体ストレス負荷により神経分化が亢進するとともに神経突起の伸長が抑制された。これらの現象はユビキチンリガーゼHRD1を発現抑制することで正常化された。

つまり、自閉症発症に小胞体ストレス負荷を介したHRD1の増加が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorder (ASD) is a congenital type of the central nervous system such as abnormal synaptogenesis. Relevance to endoplasmic reticulum (ER) stress and ASD is not reported. In this study, I have investigated the effects of ER stress on neuronal differentiation and maturation. In the brain of ASD model mice, I found the condition of high ER stress and the enhancement of neuronal differentiation. In the culture cells, ER stress led to the enhancement of neuronal differentiation and the inhibition of neurite outgrowth. These events were normalized by the inhibition of ubiquitin ligase HRD1 expression.

The pathogenesis of ASD may be associated with increased HRD1 via high ER stress in the neuronal developmental process.

研究分野：神経薬理学

キーワード：小胞体ストレス 自閉症 神経成熟 神経分化 HRD1

### 1. 研究開始当初の背景

現在、自閉症は遺伝子異常、染色体異常、体内環境異常、周産期異常などの先天的な疾患であると知られている。遺伝子異常の観点からは、シナプス形成因子が関与し、染色体異常の観点からは、染色体 15q11-q13 の部分重複が関与すると報告されている。遺伝子異常の一つとして、シナプス形成やシグナル伝達に関与する接着分子である *neurexin* や *neuroligin* が報告された ( , )。この *neurexin* は分解されることにより凝集・蓄積することで記憶障害などを起こす ( )。

一方で、妊娠期間中のストレスが胎児期の脳組織に悪影響を及ぼし、自閉症様の症状が発現することが報告された ( )。このように、妊娠期間中のアルコールやたばこなどの環境要因による各種ストレスと自閉症との関連性が近年増加している。このアルコールなどの環境要因によって小胞体ストレスが増加するという報告がある ( , )。しかしながら、自閉症に関する多く報告がなされているにも関わらず、自閉症発症に関する環境要因との詳細なメカニズムや予防・治療法は未だ明確にされていない。さらに、自閉症の発症メカニズムに関して行動学的にも分子生物学的にも小胞体ストレスとの関連性は明確にされていない。

### 2. 研究の目的

妊娠期におけるアルコールなどの環境要因により自閉症が発症すること、および環境要因により小胞体ストレスが増加することがすでに報告されている。しかしながら、小胞体ストレスと自閉症に関する報告はほとんどない。小胞体ストレスは神経変性疾患に深く関与することがすでに知られており、胎生および妊娠期における小胞体ストレスが胎児脳に悪影響を及ぼすことは様々な知見から明白である。そこで本研究では、自閉症発症の原因として注目されているシナプス形成を含む神経分化・神経成熟に対する小胞体ストレスの影響を解析し、自閉症発症メカニズムを解明した。

### 3. 研究の方法

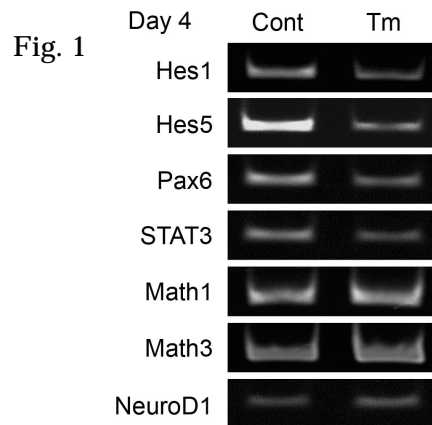
500 mg/kg パルプロ酸 (VPA) を妊娠 9.5 日目の妊娠マウスに腹腔内投与し、産まれた仔マウスを自閉症モデルマウスとして本研究に使用した。この自閉症モデルマウスを用いて、小胞体ストレスの発生およびモデルマウス脳内における神経分化および神経成熟に関する各種因子の変動が小胞体ストレスに起因するかどうかを解析した。

マウス胚性腫瘍 P19 細胞を用いて、神経細胞への分化過程で小胞体ストレスが神経分化・神経成熟に与える影響について、免疫細胞学的手法などを用いて解析した。P19 細胞は、0.5 mM レチノイン酸存在下で浮遊培養することにより、神経系の細胞へ分化誘導を行った。その後、接着培養により、神経細胞およびグリア細胞への分化誘導を行った。

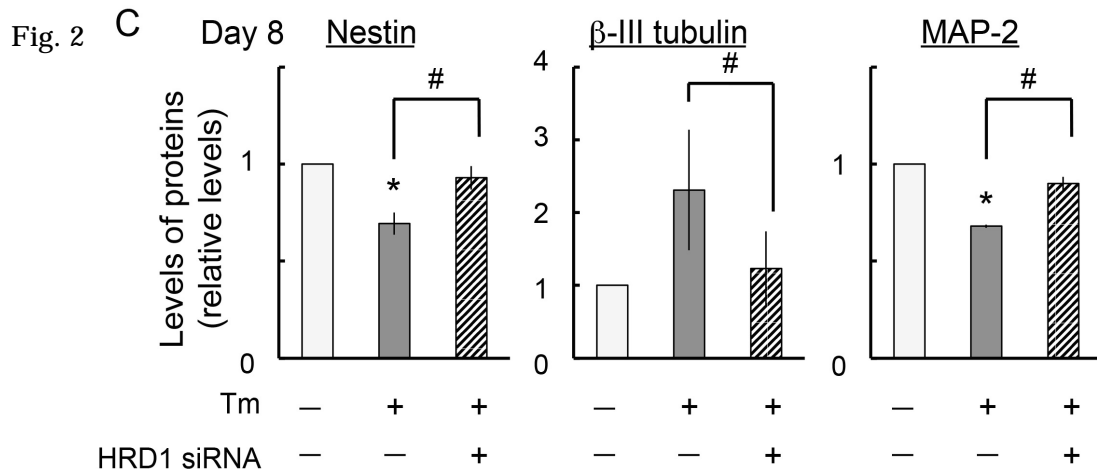
### 4. 研究成果

VPA 誘発性自閉症モデルマウスは、10 週目において、自発行動量の増加、探索行動の低下および攻撃性行動の増加などの異常行動が認められた。そこで、このモデルマウスの生後 1 日目に大脳皮質を摘出し、小胞体ストレスマーカーである GRP94 の発現を解析したところ、著明な増加がみられた。つまり、自閉症モデル動物脳内において、小胞体ストレス状態にあることが示唆された。

続いて、自閉症モデル動物脳内での小胞体ストレス負荷による神経分化への影響を解析するために、生後 1 日目の神経分化に関するプロニューラル遺伝子群の発現を解析した。その結果、幹細胞性を維持する *Hes1* および *Pax6* の mRNA レベルが低下し、神経分化を促進する *Math1* の mRNA レベルが増加していた。従って、自閉症モデルマウス脳内では小胞体ストレスの増加に伴い、神経分化が制御されている可能性が示唆された。



小胞体ストレス負荷により神経分化にどのような影響を与えるかを検討した。P19 細胞を用いて、小胞体ストレス誘導薬の 10 ng/mL ツニカマイシン (Tm) による小胞体ストレス負荷を行った。Tm 添加の予備実験として、P19 細胞の増殖および生存に影響がないこと、且つ小胞体ストレスが負荷されていることを確認している。この条件下において、プロニューラル遺伝子の発現を解析したところ、上記 *in vivo* 解析と同様に、*Hes1* および *Pax6* の mRNA レベルが低下し、*Math1* の mRNA レベルが増加していた。さらに、神経幹細胞マーカータンパク質の *nestin* の発現レベルは低下し、神経細胞マーカータンパク質の  $\alpha$ -tubulin の発現レベルは増加していた (Fig. 1, )。つまり、小胞体ストレスにより、神経分化が亢進することが示された。一方、樹状突起マーカータンパク質の MAP-2 の発現レベルおよび樹状突起の長さは顕著に抑制されていた。さらに、この樹状突起の抑制は、胎生 14.5 日目の大脳皮質由来初代培養神経細胞においても、Tm 添加により確認された。また、VPA 投与後の胎生 14.5 日目の大脳皮質由来初代培養神経細胞においても、樹状突起の抑制が認められた。以上の結果より、自閉症における小胞体ストレスが、神経分化・成熟に異常を来している可能性が示唆



された。

続いて、ヒト自閉症患者死後脳において小胞体関連分解に関与しているユビキチンリガーゼ HRD1 が増加していることが報告された( )。そこで、本研究における HRD1 の関与について解析を行った。その結果、P19 細胞に Tm を添加することで HRD1 の著明な増加が確認できた。そこで、この増加した HRD1 を RNAi により発現抑制することで神経分化・成熟へ及ぼす影響について解析した。その結果、Tm により発現レベルが低下した神経幹細胞マーカータンパク質 nestin は、HRD1 発現抑制により対照群と同レベルを示した (Fig. 2, )。さらに、発現レベルが増加した神経細胞マーカータンパク質  $\beta$ -III tubulin も、HRD1 発現抑制により対照群と同レベルを示した (Fig. 2, )。また、Tm により発現レベルが低下した樹状突起マーカータンパク質 MAP-2 も、HRD1 発現抑制により対照群と同レベルを示した (Fig. 2, )。従って、小胞体ストレスによる神経分化・成熟の異常は、ユビキチンリガーゼ HRD1 の発現増加を介していることが示唆された。つまり、HRD1 の詳細な解析を行うことで、自閉症発症メカニズムの解明、さらには自閉症の予防法や治療法の確立の一助を担えると考えている。

<引用文献>

Garber K, Neuroscience. Autism's cause may reside in abnormalities at the synapse. Science 317, 2007, 190-191.

Graf ER, Zhang X, Jin SX, et al., Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. Cell 119, 2004, 1013-1026.

Saura CA, Servián-Morilla E, Scholl FG, Presenilin/ -secretase regulates neurexin processing at synapses. PLoS One 6, 2011, e19430.

Mueller BR, Bale TL, Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. J. Neurosci. 28, 2008, 9055-9065.

Ke Z, Wang X, Liu Y, et al., Ethanol

induces endoplasmic reticulum stress in the developing brain. Alcohol Clin Exp Res. 35, 2011, 1574-1583.

Kunchithapautham K, Atkinson C, Rohrer B, Smoke exposure causes endoplasmic reticulum stress and lipid accumulation in retinal pigment epithelium through oxidative stress and complement activation. J Biol Chem. 289, 2014, 14534-14546.

Crider A, Pandya CD, Peter D, et al., Ubiquitin-proteasome dependent degradation of GABAA 1 in autism spectrum disorder. Mol Autism. 5, 2014, 45.

Kawada K, Iekumo T, Saito R, et al., Aberrant neuronal differentiation and inhibition of dendrite outgrowth resulting from endoplasmic reticulum stress. J Neurosci Res. 92, 2014, 1122-1133.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Ryo Saito, Masayuki Kaneko, Yoshihisa Kitamura, Kazuyuki Takata, Koichi Kawada, Yasunobu Okuma, Yasuyuki Nomura. (2014) Effects of oxidative stress on the solubility of HRD1, a ubiquitin ligase implicated in Alzheimer's disease. PLoS One 9, e94576. 査読：有. DOI: 10.1371/journal.pone.0094576.

Koichi Kawada, Takaaki Iekumo, Ryo Saito, Masayuki Kaneko, Seisuke Mimori, Yasuyuki Nomura, Yasunobu Okuma. (2014) Aberrant neuronal differentiation and inhibition of dendrite outgrowth resulting from endoplasmic reticulum stress. J Neurosci Res. 92, 1122-1133. 査読：有. DOI: 10.1002/jnr.23389.

Seisuke Mimori, Hiroyasu Ohtaka, Yukari Koshikawa, Koichi Kawada, Masayuki Kaneko, Yasunobu Okuma, Yasuyuki Nomura, Yasuoki Murakami, Hiroshi Hamana. (2013)

4-Phenylbutyric acid protects against neuronal cell death by primarily acting as a chemical chaperone rather than histone deacetylase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett.* 23, 6015-6018. 査読：有。DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.08.001.

Seisuke Mimori, Yasunobu Okuma, Masayuki Kaneko, Koichi Kawada, Toru Hosoi, Koichiro Ozawa, Yasuyuki Nomura, Hiroshi Hamana. (2012) Protective effects of 4-phenylbutyrate derivatives on the neuronal cell death and endoplasmic reticulum stress. *Biol Pharm Bull.* 35, 84-90. 査読：有。DOI: 10.1248/bpb.35.84 [学会発表](計18件)

川田浩一, 家雲高哲, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 小胞体ストレスによる神経成熟異常と神経発達障害. 日本薬学会第135年会, 神戸, 2015-03

川田浩一, 家雲高哲, 三森盛亮, 野村靖幸, 大熊康修: 自閉スペクトラム症における小胞体ストレスによる神経成熟異常. 第88回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015-03

三森盛亮, 大高泰靖, 村上泰興, 浜名洋, 川田浩一, 金子雅幸, 大熊康修, 野村靖幸: ツニカマイシンを用いた神経細胞死に対する4-フェニル酪酸の作用機作の解明. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2014, 大阪, 2014-08

Koichi Kawada, Takaaki Iekumo, Ryo Saito, Seisuke Mimori, Yasuyuki Nomura, Yasunobu Okuma: The endoplasmic reticulum stress may contribute to the pathogenesis of the autism spectrum disorders. CINP2014, Vancouver, 2014-06.

Seisuke Mimori, Hiroyasu Ohtaka, Koichi Kawada, Masayuki Kaneko, Yasuyuki Nomura, Yasunobu Okuma, Yasuoki Murakami, Hiroshi Hamana: Studies of the mechanism of action in protective effect against neuronal cell death of 4-phenylbutyrate and its derivatives for therapeutic agents of neurodegenerative disease. CINP2014, Vancouver, 2014-06.

家雲高哲, 川田浩一, 齋藤僚, 野村靖幸, 大熊康修: 自閉症における小胞体ストレスによる神経分化異常の関与. 日本薬学会第134年会, 熊本, 2014-03

川田浩一, 家雲高哲, 齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 自閉症における小胞体ストレスの関与. 第87回日本薬理学会年会, 仙台, 2014-03

齋藤僚, 金子雅幸, 川田浩一, 野村靖幸, 大熊康修: ユビキチンリガーゼ HRD1 の不溶化機構における酸化ストレスの影響. 第87回日本薬理学会年会, 仙台, 2014-03

川田浩一, 齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 小胞体ストレスによる樹状突起伸張への影響. 第43回日本神経精神薬理学会抄録集, 沖縄, 2013-10.

川田浩一, 家雲高哲, 齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: ストレスによる神経突起の伸張抑制. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2013, 熊本, 2013-08.

齋藤僚, 川田浩一, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 小胞体関連分解構成因子 SEL1L の発現抑制による神経分化の抑制. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2013, 熊本, 2013-08.

佐藤亜紗美, 豊田貴大, 齋藤僚, 川田浩一, 大熊康修: 神経分化におけるユビキチンリガーゼ Dofin の関与. 第128回日本薬理学会関東部会抄録集, 東京, 2013-07.

Koichi Kawada, Masayuki Kaneko, Ryo Saito, Yasuyuki Nomura, Yasunobu Okuma: Endoplasmic reticulum stress might be involved in the inhibition of neurite outgrowth via ubiquitin ligase HRD1. 24th Biennial Meeting ISN/ASN 2013, Mexico, 2013-04.

Ryo Saito, Koichi Kawada, Masayuki Kaneko, Yasuyuki Nomura, Yasunobu Okuma: Oxidative stress-induced insolubilization of an ubiquitin ligase HRD1 may be involved in amyloid generation. 24th Biennial Meeting ISN/ASN 2013, Mexico, 2013-04.

齋藤僚, 川田浩一, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 小胞体ストレス応答分子 SEL1L の発現抑制による神経分化およびシナプス形成への影響. 日本薬学会第133年会, 横浜, 2013-03.

川田浩一, 金子雅幸, 齋藤僚, 野村靖幸, 大熊康修: 小胞体ストレスはユビキチンリガーゼ HRD1 を介して神経成熟を制御する. 第86回日本薬理学会, 福岡, 2013-03.

齋藤僚, 川田浩一, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 酸化ストレスによるユビキチンリガーゼ HRD1 の不溶化がアルツハイマー病の病態形成に関与する可能性. 第86回日本薬理学会, 福岡, 2013-03.

Koichi Kawada, Masayuki Kaneko, Asami Sato, Yasuyuki Nomura, Yasunobu Okuma: Involvement of ubiquitin ligase HRD1 in the inhibition of neurite outgrowth by ER stress. 第35回日本神経科学学会大会, 2012-09.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川田 浩一 (KAWADA, Koichi)

千葉科学大学・薬学部・講師  
研究者番号：30581631

- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者  
なし