

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32525

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18879

研究課題名(和文) 神経発達症 / 神経発達障害の治療・予防における小胞体ストレスの病態生理学的解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of endoplasmic reticulum stress for therapy of 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経発達症とは、自閉スペクトラム症(ASD)や注意欠損多動症を始めとする中枢神経系の機能障害である。本研究では、胎児期および新生児期における小胞体ストレス負荷が神経回路構築に及ぼす影響を解析した。小胞体ストレスは、神経細胞の樹状突起伸長を抑制させることが明らかとなった。また、小胞体ストレスは、シナプスオーガナイザーの発現を低下させることが明らかとなった。さらに、4-フェニル酪酸(4-PBA)は、ASDモデルマウスにおいて認められる社会相互性の異常を改善させた。つまり、ASD発症において、小胞体ストレスが関与することは明らかである。

研究成果の概要(英文)：Neurodevelopmental disorders, which contain autism spectrum disorder (ASD), are dysfunction in central nerve system. In present, the pathogenic mechanism of ASD is related with synaptic organizer, but the detail is unclear. The stresses in gestation induce ASD-like symptoms by having bad influence in embryonic brain. In this study, I investigated the effects induced by ER stress in neural circuit formation. Moreover, I examined the effects of the drug against ER stress on the therapy for neurodevelopmental disorders.

I found that ER stress suppressed expansion of neuronal dendrites. Similarly, the expansion of the dendrites was suppressed in the cerebral cortex of ASD model mice. Moreover, ER stress was decreased in the expression of synaptic organizers in neuronal cell line. Additionally, molecular chaperone 4-phenylbutyric acid (4-PBA) improved the abnormality of social interaction in ASD model mice. Therefore, the relationship is obvious for ER stress and the onset of ASD.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：自閉スペクトラム症 小胞体ストレス シナプスオーガナイザー

1. 研究開始当初の背景

神経発達症とは、自閉スペクトラム症 (ASD) や注意欠損多動症を始めとする中枢神経系の機能障害である。現在、ASD は遺伝子異常、染色体異常、体内環境異常、周産期異常などによる先天的な疾患であるとされているが、未だ明確な発症メカニズムは解明されていない。一方、発症メカニズム解明に向けて研究も盛んに行われており、遺伝子異常の観点からは、neurexin, neuroligin, shank および CADM などのシナプスオーガナイザーが関与し、染色体異常の観点からは、GABA 受容体や神経成熟に関与する遺伝子などをコードしている染色体 15q11-q13 の部分重複が関与すると報告されている。

さらに、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、ASD 様の症状が発現することが報告された。このように、妊娠期間中のタバコ、肥満、糖尿病などの環境ストレスによる ASD 発症について注目されつつある。これら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。

小胞体は様々な膜タンパク質および分泌タンパク質の品質管理を行っており、この品質管理機構が破綻することにより不良タンパク質が小胞体内に蓄積し、小胞体ストレスとなる。現在までに、小胞体ストレスがアルツハイマー病など様々な中枢神経系疾患に深く関連するという知見が多く報告されている。これまでに我々は、胚細胞から神経細胞およびグリア細胞への分化過程において、小胞体ストレスを微弱かつ長時間負荷することにより、神経分化およびグリア分化に異常を来すことを報告している。

つまり、胎児期から新生児にかけての微弱な小胞体ストレスが ASD 発症に関与する可能性が高いことが容易に想定できる。

2. 研究の目的

本研究では、胎児期および新生児期における微弱かつ長時間の小胞体ストレス負荷が神経回路構築に及ぼす影響を解析すると共に、小胞体ストレスが負荷される要因およびその要因による ASD 発症メカニズムを詳細

に解析する。また、小胞体ストレスを軽減させる薬物によって ASD を始めとする神経発達症の予防および治療にどのような効果が得られるかを検討した。

3. 研究の方法

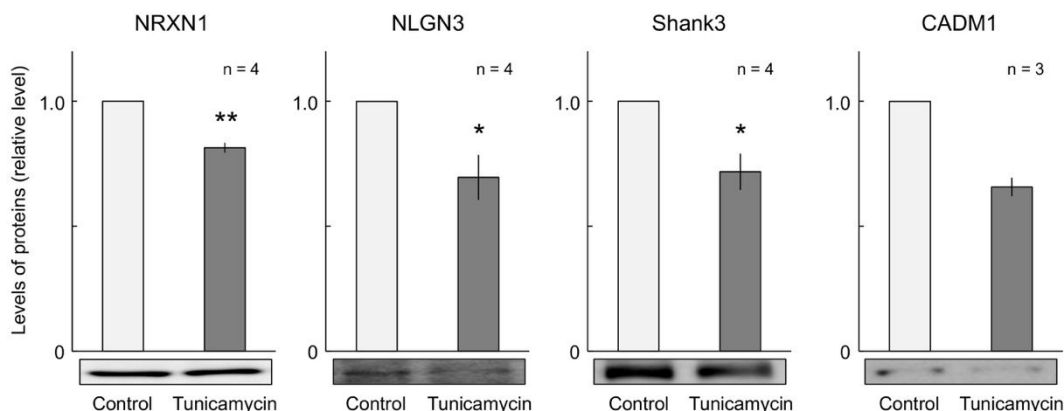
500 mg/kg バルプロ酸 (VPA) を妊娠 9.5 日目の妊娠マウスに腹腔内投与し、生まれた仔マウスを ASD モデルマウスとして本研究に使用した。また、ASD モデルマウスとして BTBR マウスも使用した。これらの ASD モデルマウスを用いて、小胞体ストレスの発生およびモデルマウス脳内における神経分化および神経成熟に関する各種因子の変動が小胞体ストレスに起因するかどうかを解析した。

マウス胚性腫瘍 P19 細胞および大脳皮質由来初代神経幹細胞を用いて、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。初代神経幹細胞は、レチノイン酸存在下で接着条件にて分化誘導を行った。

4. 研究成果

これまでの研究によって、小胞体ストレスは神経細胞への分化系譜を促進させることを明らかにした。本研究では、神経分化後の神経成熟、つまり神経突起の伸長について解析を行った。その結果、P19 細胞を用いて小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシン存在下で樹状突起のマーカータンパク質 MAP-2 に対する抗体による免疫染色を行った。その結果、樹状突起の長さが小胞体ストレスによって約 50%まで短縮された。さらに、初代神経細胞への小胞体ストレス負荷によっても樹状突起および軸索の長さが有意に短縮された。これらと同様の現象は VPA を使用した ASD モデルマウスから単離した大脳皮質由来初代神経細胞においても確認された。したがって、小胞体ストレスによる神経突起の伸

図1 分化誘導後



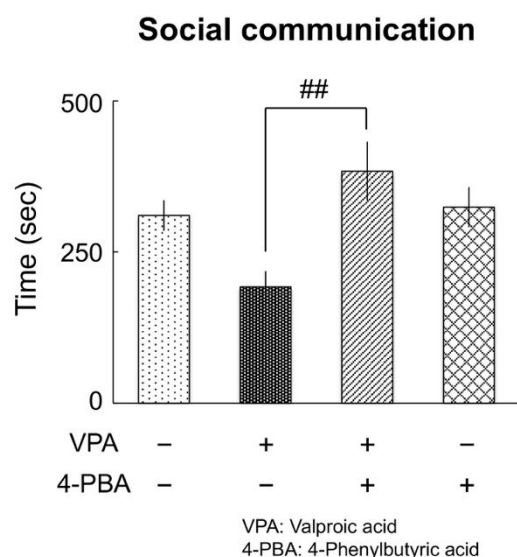
長抑制と同等の現象が ASD モデルマウス脳内においても確認できた。つまり, ASD において観察される神経突起の異常は小胞体ストレスに依存していると推察される。

また, P19 細胞において, 小胞体ストレスを負荷することにより, シナプスオーガナイザーである neurexin1, neuroligin3, shank3 および CADM1 の発現が低下することが明らかとなった(図1)。したがって, 小胞体ストレスにより神経突起の伸長が抑制されるとともにシナプスオーガナイザーの発現も抑制されることが判明した。

さらに, VPA を用いた ASD モデルマウス作成の際に前処置として分子シャペロンである 4-フェニル酪酸 (4-PBA) を投与した。その結果, 4-PBA は ASD モデルで上昇していた小胞体ストレスを軽減させた。さらに, 4-PBA は ASD モデルで低下していた社会相互性を改善させた(図2)。一方, 不安症状について, 4-PBA による改善効果はみられなかった。また, シナプスオーガナイザーの発現について 4-BAP は, 大脳皮質特異的に ASD モデルで低下した shank3 および CADM1 を改善させた。

以上の結果より, ASD の発症に小胞体ストレスが関与することは明白であり, ASD の症状の中でも社会性の欠如は小胞体ストレスをコントロールすることにより予防することが可能であると推察される。小胞体ストレスは, 肥満や糖尿病などの生活習慣病によって長期的に負荷されることが知られている。この事象が ASD の発症(特に社会性の欠如)に寄与すると推察できる。

図2



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)

Kawada K, Iekumo T, Kaneko M,

Nomura Y, Okuma Y. ER Stress-induced Aberrant Neuronal Maturation and Neurodevelopmental Disorders. *Yakugaku Zasshi*. 136, 811-815 (2016)

Koichi Kawada, Ryo Saito, Seisuke Mimori, Yasunobu Okuma, Yasuyuki Nomura, Regulation of neural differentiation and synaptogenic factors by silencing of ubiquitin ligase Dornin. *Glob. Drug. Therap.* 2 (2017)

Koichi Kawada, Seisuke Mimori. Implication of Endoplasmic Reticulum Stress in Autism Spectrum Disorder. *Neurochem Res.* 43, 138-143 (2018)

Kawada K, Mimori S, Okuma Y, Nomura Y. Involvement of endoplasmic reticulum stress and neurite outgrowth in the model mice of autism spectrum disorder. *Neurochem Int.* In press.

〔学会発表〕(計2件)

川田浩一, 竹内佑灯, 三森盛亮, 大熊康修, 野村靖幸: バルプロ酸誘発性異常行動マウスにおける4-フェニル酪酸の効果. 第90回日本薬理学会, 長崎, 2017-03

Koichi Kawada, Yuto Takeuchi, Seisuke Mimori, Yasunobu Okuma: Effects of 4-phenylbutyric acid in abnormal behavior-displayed mice. ISN-ESN2017, 2017-08

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔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

(4)研究協力者
三森 盛亮 (SEISUKE MIMORI)
竹内 佑灯 (YUTO TAKEUCHI)