

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08478

研究課題名(和文) 胎児期バルプロ酸暴露誘発自閉症スペクトラム障害におけるアストロサイト分泌因子異常

研究課題名(英文) Effect of prenatal valproate exposure on astrocyte-regulated synaptic function

研究代表者

渡辺 拓也 (WATANABE, TAKUYA)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90509647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害(ASD)モデル動物とされる胎児期バルプロ酸暴露マウスから単離したアストロサイトと正常な神経細胞を共培養し、ASDモデル標本における神経細胞の発達を解析した。ASDモデル標本では、興奮性シナプス伝達が増強していることを明らかにした。また、ASDモデル標本では興奮性シナプス数には変化は認められなかったが、シナプス小胞の開口放出に寄与する分子の発現増加が認められた。従って、ASDモデル標本における興奮性シナプス伝達増強には、シナプス小胞の開口放出に寄与する分子の発現増加が起因することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症スペクトラム障害(ASD)の有病率は、約1%以上あるとされているが、その治療法は確立されておらず、その病態機序も明らかではない。本研究成果は、ASDモデル動物由来のアストロサイトが神経細胞におけるシナプス機能異常を引き起こすことを示しており、ASDの病態機序にアストロサイトによる神経機能調節が関与していることを提案している。従って、ASDの治療法開発のため、アストロサイトを標的とした創薬の方向性を本研究成果は提案するものである。

研究成果の概要(英文)：Neurodevelopmental change is examined in neuron co-cultured with astrocyte that is isolated from animal model of autism with prenatal exposure to valproic acid. The neuron co-cultured with autism model astrocyte demonstrated the increase in excitatory synaptic transmission compared with neuron co-cultured with normal astrocyte. The neuron co-cultured with autism model astrocyte did not show change in number of excitatory synapse. On the other hand, the neuron co-cultured with autism model astrocyte demonstrated the increased expression of molecules which are mediate synaptic vesicle release. Taken together, excitatory synaptic transmission increased by co-culturing with ASD model astrocyte may be due to increased expression of molecules which are mediate synaptic vesicle release.

研究分野：神経薬理学

キーワード：自閉症スペクトラム障害 アストロサイト バルプロ酸ナトリウム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

バルプロ酸は抗てんかん薬としてだけでなく、躁状態や片頭痛の治療薬として幅広く使用されている。しかし、妊娠期におけるバルプロ酸の服用が、出生児の自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorder: ASD) 罹患リスクを高めることが報告されている[1]。また、基礎研究においても、バルプロ酸を投与された妊娠マウスから出生した仔マウス(バルプロ酸マウス)は ASD 様行動を示すことから、バルプロ酸の副作用として ASD が提案されている。しかし、バルプロ酸の妊娠期服用による ASD 発症メカニズムは明らかではない。

ASD は他者とのコミュニケーションに困難を来すなどの社会性行動障害を基盤とする発達障害である。バルプロ酸マウスにおいても、他マウスへのおい嗅ぎ行動などの社会性行動の障害が認められている。社会性行動には、腹側被蓋野や海馬へのグルタミン酸神経伝達ならびに皮質のグルタミン酸/GABA 神経バランスが関与することが報告されている[2,3,4]。バルプロ酸マウスではグルタミン酸神経マーカーである VGLUT1 発現増加や GABA 神経マーカーである GAD 発現減少が認められており[5]、グルタミン酸神経伝達抑制はバルプロ酸マウスの社会性行動障害を改善している[6]。以上のことから、グルタミン酸神経とそのカウンターパートとなる GABA 神経の伝達異常による興奮性/抑制性神経バランスの興奮性へのシフトが、バルプロ酸マウスの社会性行動障害の原因であることが示唆される。これらの神経伝達異常の発現機序を明らかにすることはバルプロ酸による ASD 発症メカニズム解明の手掛かりとなる。

アストロサイトは脳全細胞の約半数を占めており、神経細胞の突起伸長やシナプス形成ならびにシナプス間隙での神経伝達物質濃度を調節し、神経伝達を制御している。ASD と同様に精神症状を示す統合失調症の病因候補遺伝子のアストロサイトでの発現は、神経突起伸長とグルタミン酸神経シナプス形成を阻害している[7]。ASD 病因候補遺伝子の多くもアストロサイトに発現しており[8]、ASD 患者死後脳ではアストロサイトマーカーの発現が増加している[9]。また、バルプロ酸マウスでもアストロサイト数の増加が報告されている[10]。これらのことから、バルプロ酸マウスでは、アストロサイト異常に起因するシナプス形成・伝達障害が起きていることが想定される。しかし、バルプロ酸マウスのアストロサイトがシナプス形成・伝達に与える影響を検討したものは未だ無い。

アストロサイトは様々な因子を分泌し、シナプス形成・伝達を調節している。Thrombospondins と Hevin はシナプス形成を誘導し、SPARC は Hevin によるシナプス形成を阻害する[11, 12]。また、ApoE リポ蛋白粒子はシナプス伝達効率を増強する[13]。これらの分泌因子は、ASD 症状もしくは ASD 病因候補遺伝子との関連性が報告されている[14, 15, 16]。従って、バルプロ酸マウスのアストロサイト分泌因子変化が、興奮性・抑制性シナプス形成・伝達異常を導き、社会性行動障害を引き起こすと仮説した。

### 2. 研究の目的

バルプロ酸マウス由来アストロサイトがシナプス形成・伝達に与える影響を検討し、アストロサイト分泌因子に着目して、シナプス形成・伝達変化のメカニズムを明らかにすることで、バルプロ酸の妊娠期服用による ASD 発症メカニズム解明を試みる。

### 3. 研究の方法

妊娠マウス(妊娠 12.5 日)にバルプロ酸を投与し、産まれてきた仔マウスをバルプロ酸マウスとし、生後 0~2 日の脳からアストロサイトを単離培養した。生理食塩水を妊娠マウスに投与し、産まれてきたマウスをコントロールマウスとした。バルプロ酸マウス由来アストロサイトとコントロールマウス由来アストロサイトの培養シート上に、正常マウス由来の神経細胞を播種し、それぞれをバルプロ酸モデルと生食モデルとした。

正常マウス由来アストロサイトにバルプロ酸を処置した後、正常マウス由来の神経細胞を播種し、バルプロ酸処置モデルを作製した。

神経細胞の培養 13~15 日後に、ホールセルパッチクランプ法によりシナプス伝達能を解析した。また、免疫染色法により樹状突起の形態とシナプス数を解析した。さらに、ウェスタンブロット法と定量 RT-PCR 法により分子の発現量を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) バルプロ酸モデルにおける解析

##### ① バルプロ酸モデルのシナプス伝達能の解析

興奮性神経細胞と抑制性神経細胞が混在した培養条件における微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) と微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) は、バルプロ酸モデルと生食モデルとの間で差は認められなかった。一方、単一神経細胞をアストロサイト上で培養したオータプス標本では、バルプロ酸モデルと生食モデルとの間で mEPSC に差は認められないが、活動電位誘発による興奮性シナプス後電流 (eEPSC) の振幅がバルプロ酸モデルで増加していることが認められた。さらに、スクロース溶液を用いた一過性高浸透圧刺激により解析した開口放出可能なシナプス小胞のサイズとシナプス小胞数は、バルプロ酸モデルで増加していた。これらの結果から、バルプロ酸モデルでは、活動電位発火時の興奮性シナプスにおけるシナプス小胞開口放出能が上昇していることが示唆された。

### バルプロ酸モデルのシナプス形成能の解析

シナプス形成能を解析するため、オートプス標本における VGLUT1 抗体と MAP2 抗体を用いた免疫染色を行った。VGLUT1 染色により興奮性シナプス数を解析したところ、バルプロ酸モデルと生食モデルとの間で差は認められなかった。また、MAP2 染色により樹状突起長と分岐数を検討したところ、VGLUT1 陽性興奮性神経細胞においてバルプロ酸モデルと生食モデルとの間で差は認められなかった。以上のことから、バルプロ酸モデルではシナプス形成に変化が無いことが示唆された。バルプロ酸マウスの海馬歯状回神経細胞の突起長は減少しており[17]、バルプロ酸マウスから単離培養した皮質神経細胞においても、樹状突起長の減少が報告されている[18]。本研究結果は、バルプロ酸マウスにおける神経突起成長異常には、アストロサイトが寄与しないことを提案している。

### バルプロ酸モデルのシナプスにおける分子の発現量解析

バルプロ酸モデルではシナプス数の変化は無いが、シナプス小胞開口放出能の増強が示された。そこで、シナプス小胞の開口放出に寄与する分子の発現を解析した。カルシウムセンサーとしてシナプス小胞開口放出を制御している synaptotagmin1 の発現増加が、バルプロ酸モデルにおいて認められた。さらに、シナプス前膜に存在し、シナプス小胞の融合に寄与する SNAP-25 の発現増加も、バルプロ酸モデルで認められた。以上のことから、バルプロ酸モデルでは、シナプス小胞開口放出に寄与する分子の発現増加により、シナプス小胞開口放出能が増加していることが示唆された。胎児期にバルプロ酸を暴露されたアストロサイトまたはアストロサイト前駆細胞は、神経細胞のシナプス放出機構に影響することで、興奮性シナプス伝達を増強することが考えられた。

### バルプロ酸モデルのアストロサイト分泌因子の発現量解析

興奮性シナプス伝達増強に寄与するアストロサイト分泌因子を検討するため、培養アストロサイトにおける候補分子 mRNA の発現量を解析した。Thrombospondin1 や Hevin、ApoE などの分泌因子の発現量について、バルプロ酸モデルで変化は認められなかった。一方、Notch シグナルに関連する分子の mRNA 量の増加がバルプロ酸モデルで認められたことから、アストロサイトと神経細胞間の接着が、興奮性シナプス伝達増強に寄与していることが示唆された。

バルプロ酸モデルにおける研究成果から、ASD の病態機序にはアストロサイトによるシナプス小胞開口放出の促進が関与することが示唆され、ASD 治療法開発のための標的の一つとしてアストロサイトが提案された。

## (2) バルプロ酸処置モデルにおける解析

### ① バルプロ酸処置モデルのシナプス伝達能の解析

アストロサイト培養期間中にバルプロ酸を処置したバルプロ酸処置モデルでは、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞が混在した培養条件において、無処置モデルと比較して、mEPSC に差は認められなかったが、微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) の頻度の減少が認められた。

### バルプロ酸処置モデルのシナプス形成能の解析

バルプロ酸処置モデルにおいて、VGLUT1 抗体ならびに VGAT 抗体、MAP2 抗体を用いた免疫染色を行った。VGLUT1 陽性興奮性神経細胞のシナプス数と樹状突起長、分岐数は、バルプロ酸処置モデルと無処置モデルとの間で差は認められなかった。一方、VGAT 陽性抑制性神経細胞のシナプス数は、無処置モデルと比較して、バルプロ酸処置モデルで減少していたが、樹状突起の変化は認められなかった。以上のことから、バルプロ酸処置モデルで認められた mIPSC 頻度低下は、抑制性シナプス数の減少に起因することが示唆された。

新生仔マウスから単離した培養神経細胞へのバルプロ酸処置は、抑制性シナプス特異的に、その形成を抑制することが報告されている[19]。一方、本研究は新生仔マウスから単離した培養アストロサイトへのバルプロ酸処置の効果を検討したものであり、培養アストロサイトへのバルプロ酸処置は、共培養神経細胞の抑制性シナプス特異的に、その形成抑制を示している。従って、神経細胞ならびにアストロサイトへのバルプロ酸処置は、抑制性シナプス特異的に形成を抑制するため、生体内においては両細胞が相加相乗的に抑制シナプス形成を抑制していることが示唆された。妊娠後期では、アストロサイトは脳内に存在し、幼児期においてシナプス形成がピークに達する[20]。従って、母乳を介した新生児のバルプロ酸摂取は、ASD 発症リスクを増加させることが考えられた。

本研究のバルプロ酸モデルとバルプロ酸処置モデルでは、興奮性・抑制性シナプスに与える影響は異なるが、興奮性/抑制性神経バランスが興奮性へシフトしていることが示された。これらのことから、胎児期と新生児期におけるバルプロ酸暴露は、アストロサイトを介した神経機能異常を招き、ASD 病態を形成することが考えられた。しかし、神経機能異常を誘導するアストロサイト側の分子は同定されておらず、今後さらな検討が必要である。

<引用文献>

- [1] Christensen J. et al., JAMA. 2013, 309(16):1696-703
- [2] Felix-Ortiz AC. et al., J Neurosci. 2014, 34(2):586-95
- [3] Bariselli S. et al., Nat Neurosci. 2016, 19(7):926-934
- [4] Yizhar O. et al., Nature. 2011, 477(7363):171-8
- [5] Kim KC. et al., J Neurochem. 2013, 124(6):832-43
- [6] Kim JW. et al., Neuropharmacology. 2017, 113(Pt A):71-81
- [7] Xia M. et al., J Neurochem. 2016, 138(4):518-24
- [8] Petrelli F. et al., Front Cell Neurosci. 2016, 10:21
- [9] Edmonson C. et al., Mol Autism. 2014, 5(1):3
- [10] Kazlauskas N. et al., Psychoneuroendocrinology. 2016, 72:11-21
- [11] Christopherson KS. et al., Cell. 2005, 120(3):421-33
- [12] Kucukdereli H. et al., PNAS. 2011, 108(32):E440-9
- [13] Mauch DH. et al., Science. 2001, 294(5545):1354-7
- [14] Cheng C. et al., Mol Brain. 2016, 9(1):74
- [15] Singh SK. et al., Cell. 2016, 164(1-2):183-196
- [16] Steeb H. et al., Mol Autism. 2014, 5(1):4
- [17] Juliandi B. et al., Stem Cell Reports. 2015, 5(6):996-1009
- [18] Kawanai T. et al., Neurochem Res. 2016, 41(10):2574-2584
- [19] Kumamaru E. et al., Neurosci Lett. 2014, 569:142-147
- [20] Semple BD. et al., Prog Neurobiol. 2013, 106-107:1-16

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kotomi Takeda, Takuya Watanabe, Yuki Oba, Shuntaro Tsukamoto, Kaori Kubota, Shutaro Katsurabayashi, Katsunori Iwasaki
2. 発表標題 Valproic acid-exposed astrocytes alter the inhibitory neurodevelopment and synaptic function
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	武田 琴水  (TAKEDA KOTOMI)		