

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：37111
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K08172
研究課題名(和文) 自閉症モデルマウス由来アストロサイトによる興奮性シナプス伝達増強の分子機序解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism underlying enhancement of excitatory synaptic transmission in neurons co-cultured with ASD model astrocytes.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害(Autism Spectrum Disorder: ASD)では、脳が興奮性にシフトしていることが提案されている。本研究において、ASDモデル動物とされる胎仔期バルプロ酸暴露マウスから単離したアストロサイト(ASDアストロサイト)を正常な神経細胞と共培養すると、シナプス小胞の開口放出に関わる細胞膜発現分子(t-SNARE)の発現の増加が認められた。さらに、アストロサイトから遊離される候補因子Aの変化も認められた。従って、ASDアストロサイトでの候補因子Aの遊離変化がt-SNARE分子の発現を増加させ、興奮性シナプス伝達を増強させ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

ASDの有病率は約1%以上であるとされているが、その治療法は確立されておらず、その病態機序も不明な点が多い。これまでの殆どのASD病態機序研究は、神経細胞での変化に着目されており、アストロサイトに起因した神経細胞の機能変化についてはあまりなされていなかった。本研究結果は、アストロサイトの機能異常がASDの病態形成に影響することを提案するものである。ASDアストロサイトでは候補因子Aの切断・遊離機構の異常が認められており、この異常を補正する方がASD発症予防法開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：The excitatory/inhibitory cortical imbalance is suggested to lead autism spectrum disorder (ASD). The present study demonstrated that astrocytes isolated from prenatal valproate-exposed mice, which are ASD model mice, increase t-SNARE proteins in co-cultured neurons. The astrocytes also demonstrated abnormal release of candidate factor A. The abnormal release may be due to change in cleavage of candidate factor A. Taken together, abnormal release of candidate factor A from ASD model astrocytes might increase t-SNARE proteins expression, resulting in excitatory/inhibitory cortical imbalance.

研究分野：神経薬理学

キーワード：アストロサイト 自閉症 バルプロ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (Autism Spectrum Disorder: ASD) は、社会的コミュニケーションの障害と限局した反復的な行動を主徴とし、様々な精神・神経症状を併発している。その中でも、てんかんの合併が多いことから、ASD の病態の一つとして、興奮性-抑制性神経系バランスの興奮性へのシフトが提案されている。現在、ASD モデル動物の興奮性シナプス伝達増強が報告されているが、興奮性シフトの分子機序の全貌は明らかではない。

アストロサイトは脳全細胞の約半数を占め、シナプスを包み込んでいる。さらに、アストロサイトに発現する蛋白は、シナプスとの接着やシナプスへの分泌を介して、シナプスの形成・伝達を制御している。妊娠時のバルプロ酸 (Valproic acid: VPA) 服用は出生児の ASD 発症リスクを増加させることが示されている。同様にマウスにおいても認められており、妊娠マウスに VPA を投与して生まれた仔マウス (VPA マウス) は ASD 様行動変化 (超音波発声の減少、他マウスへの興味の低下) を示していることから、ASD モデルマウスとして提案されている。申請者らは、この VPA マウスから単離培養したアストロサイト (ASD アストロサイト) と共培養した正常マウス由来神経細胞が、興奮性シナプス伝達の増強を示すことをこれまでに明らかにした。また、VPA を培養アストロサイトに直接暴露した (VPA アストロサイト) 後に共培養した正常マウス由来神経細胞は、抑制性シナプス伝達の減少を示すことを明らかにしてきた。これらの結果から、ASD 脳における興奮性シフトの分子機序には、アストロサイトを介したシナプス形成・伝達異常が関与することが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ASD 脳における興奮性シフトの分子機序には、アストロサイトを介したシナプス形成・伝達異常が関与するという仮説の下、2 つのモデルアストロサイト (ASD アストロサイト、VPA アストロサイト) が共培養した正常神経細胞のシナプス形成・伝達異常を誘発する分子機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

3 - 1. ASD アストロサイトにおける解析方法

妊娠マウス (妊娠 12.5 日) に VPA を投与し、産まれてきた仔マウスを VPA マウスとし、生後 0~1 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。VPA マウス由来アストロサイト (ASD 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 (Ctrl 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 ASD 共培養モデルと Ctrl 共培養モデルとした。また、アストロサイト側の変化を解析するため、共培養せずに培養した標本も作製した。これらの細胞から蛋白を抽出し、western blot 解析をした。また、培養上清を回収し、ELISA 法によりアストロサイト由来分子の分泌量を解析した。

3 - 2. VPA アストロサイトにおける解析方法

正常マウス由来アストロサイトに VPA を処置し、VPA アストロサイトとした。その後、VPA を除去し、正常マウス由来の神経細胞を播種し、VPA 処置モデルを作製した。mRNA を回収し、定量 RT-PCR 法により分子の発現量を解析した。

4. 研究成果

4 - 1. ASD アストロサイトにおける解析結果

4 - 1 - 1. 神経細胞側の変化

ASD アストロサイトと共培養した神経細胞では、synaptotagmin と SNAP-25 の発現量が増加することをこれまでに示してきた。本研究では、さらにシナプス開口放出に関わる分子の発現量変化を解析した。SNARE タンパク質である SNAP-25 の変化が認められたことから、その他の SNARE タンパク質 (VAMP-2、Syntaxin 1) の発現量を検討した。Syntaxin 1 は ASD 共培養モデルで有意に増加したが、VAMP-2 の変化は認められなかった。小胞膜側に発現する VAMP-2 は変化なく、細胞膜側に発現する Syntaxin 1 と SNAP-25 の発現増加が認められたことから、シナプス前膜の形成変化が起きていることが示唆された。そこで、アクティブゾーンに発現する RIM1 の発現量を検討した。しかしながら、RIM1 の発現量変化は認められなかった。本研究では、その他のアクティブゾーンタンパク質 (Munc13-1、Basoon、Piccolo) の発現量検討はできておらず、今後の検討課題である。

4 - 1 - 2. ASD アストロサイト側の変化

ASD アストロサイトと共培養することで認められた神経細胞におけるシナプス開口放出関連

分子の発現増加の機序を探索するため、ASD アストロサイトにおける分子の発現変化を解析した。共培養せずに ASD アストロサイトからタンパク質を抽出し、western blot 解析をした結果、候補因子 A の発現変化が認められた。DIV35 (神経細胞と共培養した場合の 14 日目)では、Ctrl アストロサイトと比較して ASD アストロサイトの候補因子 A の切断された細胞内断片の低下が認められた (図 1)。一方で、DIV29 (神経細胞と共培養した場合の 8 日目)では、ASD アストロサイトの候補因子 A の細胞内断片増加が認められた。これらの結果から、候補因子 A は切断され、培養上清中に遊離断片を放出することで、シナプス開口放出関連分子の発現に関与することが示唆された。そこで、培養上清中の候補因子 A の遊離量を ELISA 法により解析した。ASD アストロサイトの候補因子 A の遊離断片は、Ctrl アストロサイトと比較して DIV29 で低下傾向であった (図 2)。また、ASD アストロサイトでは DIV28 から DIV35 の期間で、遊離断片の増加が認められた。これらのことから、ASD アストロサイトでは候補因子 A の切断・遊離機構の変化が起きていることが考えられた。切断機序については、現在検討中である。

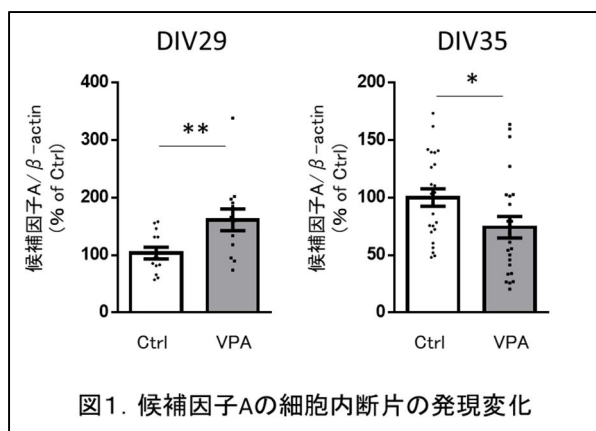


図 1. 候補因子Aの細胞内断片の発現変化

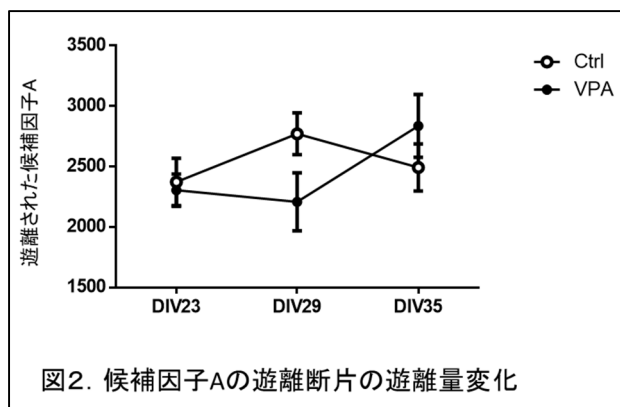


図 2. 候補因子Aの遊離断片の遊離量変化

以上の結果から、ASD アストロサイトでは候補因子 A の切断・遊離機構の異常により、神経細胞におけるシナプス開口放出関連分子の発現増加が起きることが考えられた (図 3)。今後は、候補因子 A の発現調節や切断調節により、シナプス伝達変化が引き起こされるか検証する必要がある。

4 - 2 . VPA アストロサイトにおける解析結果

申請者は以前に VPA アストロサイトと共培養した正常マウス由来神経細胞では、抑制性シナプスの伝達減少とシナプス数低下を示すことを明らかにしてきた。そこで、その機序を探索するため抑制性シナプス形成に寄与する分子 [Semaphorin4D (Sema4D)、Plexin-B1 (PlxnB1)、Slitrk3、Ptpd、Contactin5 (Cntn5)、Caspr4] の発現解析を行った。Ptpd mRNA は、VPA アストロサイトと共培養した正常マウス由来神経細胞で減少が認められたが、その他の分子については変化は認められなかった。本結果から VPA アストロサイトは、共培養した神経細胞の Ptpd 発現を減少させることで、抑制性シナプス形成を阻害することが示唆された。

本研究では、2つの ASD モデルアストロサイト (ASD アストロサイト、VPA アストロサイト) によるシナプス形成・伝達異常の機序を検討した。ASD アストロサイトでは候補因子 A の遊離異常がシナプス小胞開口放出に影響することが示唆された。VPA アストロサイトでは、Ptpd の発現を低下させることで、抑制性シナプス形成を阻害することが示唆された。本研究結果だけでは、ASD 脳での興奮性シフトの分子機序の全貌を明らかにすることはできず、今後さらなる検討が必要である。

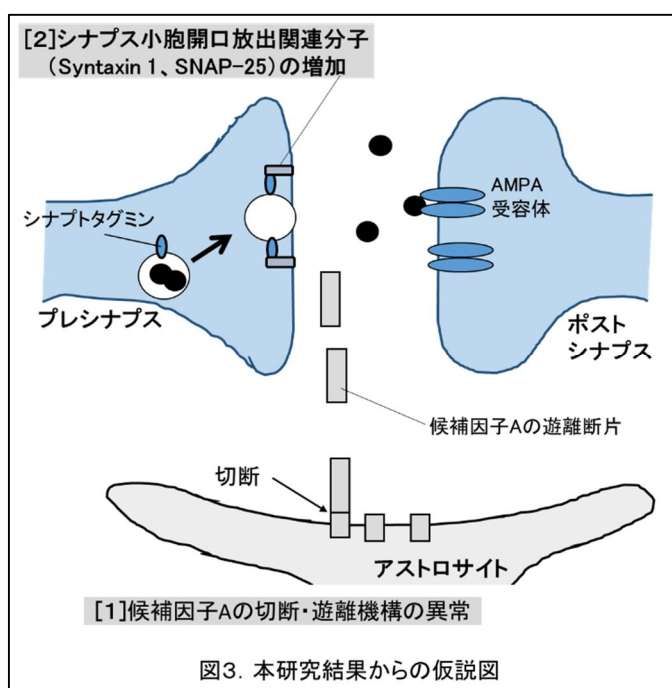


図 3. 本研究結果からの仮説図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺拓也、武田琴水、大藪康平、内野鉦也、窪田香織、桂林秀太郎、岩崎克典
2. 発表標題 バルブロ酸暴露アストロサイトのシナプス形成・伝達に対する影響
3. 学会等名 第142回薬学会年会
4. 発表年 2022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	桂林 秀太郎 (Katsurabayashi Shutaro)	福岡大学・薬学部・教授 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------