

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461529

研究課題名(和文) ペルオキシソームの脂質代謝異常を伴う自閉症スペクトラムの治療に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental study for clinical application of autistic spectrum with peroxisome lipid metabolism abnormality

研究代表者

水野 由美 (Mizuno, Yumi)

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：20584014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、自閉症スペクトラム患者で、ペルオキシソームの脂質代謝機能低下やペルオキシソーム病の原因遺伝子に変異が見つかったという報告がある。申請者らは、これまでに、ペルオキシソームタンパク質のひとつであるTysnd1 (Trypsin domain containing 1)の欠損マウスの用いて解析した結果、Tysnd1欠損マウスでは自閉症様の行動異常が見られたため、Tysnd1欠損によるペルオキシソームの脂質代謝異常は、自閉症となんらかの関係があると考えられた。そこで本研究では、ペルオキシソームの脂質代謝異常と自閉症スペクトラムの発症メカニズムとの関係を明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：In recent years, there have been reports that mutations were found in the causative genes of peroxisomal disease, as well as decreased lipid metabolism of peroxisomes in autistic spectrum patients. Applicants have analyzed using mice deficient in Tysnd 1 (Trypsin domain containing 1) which is one of peroxisomal proteins, and as a result, autism-like behavior abnormalities were observed in Tysnd1-deficient mice. Therefore the abnormality of lipid metabolism of peroxisomes by Tysnd1 deficiency was thought to be related to autism. In this study, we aimed to clarify the relationship between abnormal lipid metabolism of peroxisome and the onset mechanism of autism spectrum.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：ペルオキシソーム 自閉症 脂質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

近年、自閉症スペクトラム患者で、ペルオキシソームの脂質代謝機能低下の報告やペルオキシソーム病の原因遺伝子に変異が見つかったという報告もある。一方、申請者らは、これまでに、ペルオキシソームタンパク質のひとつである Tysnd1 (Trypsin domain containing 1) がペルオキシソームタンパク質を切断するプロテアーゼであり、特にペルオキシソーム局在化シグナルタイプ 2 (PTS2) タンパク質のシグナルペプチドを切断することでペルオキシソームへの局在化を助ける機能を明らかにした。また、申請者らは、Tysnd1 欠損マウスを作製し、その表現型解析を行なった結果、Tysnd1 の欠損は軽度のペルオキシソーム代謝異常を呈することを明らかにした。さらに、Tysnd1 欠損マウスは網羅的行動解析の結果、不安様行動の低下、社会的行動の低下、文脈記憶の低下が見られたことから、Tysnd1 欠損によるペルオキシソームの脂質代謝異常は、自閉症となんらかの関係があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ペルオキシソームの脂質代謝異常と自閉症スペクトラムの発症メカニズムとの関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Tysnd1 欠損マウス脳の病理解析
マウス脳の病理解析は、トルイジンブルー染色、PSA-NCAM 抗体を用いた免疫組織染色、透過電顕、神経繊維を選択的に染色する Timm 染色等の方法を用い、解析を行った。

(2) Tysnd1 欠損マウス脳のプラスマローゲン量の測定
プラスマローゲン量の測定は、LC-MS/MS を用い、プラスマローゲン分子種の網羅的解析を行った。

(3) Tysnd1 欠損マウスの高脂肪食負荷解析
高脂肪食は、リサーチダイエツ社製の 60kcal% 脂肪含有量の超高脂肪食を使用した。コントロールとなる普通食は 10kcal% 脂肪含有量のものを使用した。体重、IPITT、OGTT、肝臓の病理解析、マイクロアレイによる遺伝子発現解析等で評価を行った。

(4) 臨床応用方法の探索

Tysnd1 欠損マウスの表現型解析の結果、症状改善の可能性のある候補物質を経口投与し、その効果を血液検査、病理解析等で評価を行った。

4. 研究成果

(1) Tysnd1 マウスの小脳および歯状回において形態学的な差異が見つかった。
ICR マウス脳切片を作製し、Tysnd1 抗体を用

いて免疫組織染色を行ったところ、Tysnd1 は特に歯状回、小脳、嗅球に多く存在することがわかった。そこで、Tysnd1 欠損マウスの脳を歯状回と小脳に注目して観察することにした。まず、トルイジンブルー染色で小脳を観察したところ、野生型では青く染まるプルキンエ細胞が Tysnd1 欠損マウスではほとんど染まらなかった。そこで、電子顕微鏡で小脳プルキンエ細胞の形態を観察したところ、プルキンエ細胞周辺の髄鞘の数が、野生型と比べて有意に低下していた。また、初期の神経前駆マーカーである PSA-NCAM 抗体を用い Tysnd1 欠損マウスの歯状回を観察したところ、前駆細胞の数が少ないことがわかった。さらに、歯状回門から伸びる神経繊維の状態を見るため、Timm 染色を行ったが、神経繊維の量についての有意差は認められなかった。

(2) Tysnd1 欠損マウスの脳ではプラスマローゲン量が減少する傾向が見られた。
プラスマローゲンはエーテルリン脂質の一種であり、脳ではミエリン鞘に多く含まれていることが知られている。このプラスマローゲンは、ペルオキシソームで初期の合成が行われ、その後小胞体で合成が完結するが、Tysnd1 欠損マウスでは、これまでの申請者らの研究で、精巣および精巣上体での一部分子種の低下が明らかとなっている。そこで、本研究では、脳全体でのプラスマローゲンおよび、前駆体のアルキルリン脂質量を測定したところ、Tysnd1 欠損マウスの脳では、野生型マウスに比べて、減少する傾向が明らかとなった。

(3) Tysnd1 欠損マウスの脂質代謝異常はミトコンドリア機能にも影響する。
ペルオキシソームは肝臓に多く存在する。近年、生活習慣病は血管性認知症やアルツハイマー病の発症に大きく関わっていることが報告されている。Tysnd1 欠損マウスは、ペルオキシソームの脂質代謝異常を呈するが、この脂質代謝異常が二次的に、自閉症様の表現系や歯状回や小脳の形態学的変化につながった可能性を考え、高脂肪食負荷による表現型を見ることにした。その結果、高脂肪食を投与した Tysnd1 欠損マウスは、高脂肪食を投与した野生型マウスに比べ体重上昇、インスリン抵抗性、耐糖能異常等が観察された。また、マイクロアレイによる解析の結果、その原因となりうる遺伝子の発現上昇が認められた。さらに、Tysnd1 欠損マウスでは、ペルオキシソームの脂質代謝は低下するのに対し、ミトコンドリアの脂質代謝は更新しており、ペルオキシソームの脂質代謝異常はミトコンドリアの機能にも影響していることが考えられた。これらの結果から、ペルオキシソームの脂質代謝機能低下による自閉症発症メカニズムには、体重増加、インスリン抵抗性等による二次的な要素の可能性も考えられた。また、ミトコンドリアの機能とも

関連しており、ミトコンドリア機能の障害による原因の可能性も考える必要があると考えられた。

(4) 臨床応用についての基礎データの収集。ペルオキシソームの脂質代謝異常が原因の症例について、臨床応用にむけての基礎データを得るため、Tysnd1 欠損マウスを用い、症状改善効果の可能性のある物質の経口投与を行った。血液検査や病理解析の結果、効果的な投与量や投与時期を明らかにでき、症状の改善について一定の効果が期待できることが分かった。

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 1 件)

1. DNMI1-related encephalopathy in infancy with Leigh syndrome-like phenotype and suppression-burst. Zaha K, Matsumoto H, Itoh M, Saito H, Kato K, Kato M, Ogata S, Murayama K, Kishita Y, Mizuno Y, Kohda M, Nishino I, Ohtake A, Okazaki Y, Matsumoto N, Nonoyama S. *CI in Genet*.12805, 2016 (査読あり) DOI: 10.1111/cge.12805

[学会発表](計 12 件)

- 1, 水野由美
ペルオキシソームの機能異常と精子
第 5 9 回日本卵子学会学術集会 (招待講演)
2018.5.26-27
- 2, 水野由美, 仲地 豊, 水野洋介, 金田秀貴, 若菜茂晴, 岡崎康司,
ペルオキシソームプロテアーゼ Tysnd1 を欠損したマウスの病態発症機構の解明と改善への試み Functional analysis of peroxisomal protease Tysnd1 deficient mice
2017 年度生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会年会, 第 90 回日本生化学会大会)2017.12.6-12.9
- 3, 水野由美, 水野洋介, 梶原 健, 石原理, 岡崎康司,
Tysnd1 欠損による造精機能障害はプラスマローゲン前駆体の投与で改善する
第 1 5 回 RCGM フロンティアシンポジウム
2017.12.1-12.2
- 4, 水野由美, 穂田真澄, 水野洋介, 仲地 豊, 梶原 健, 岡崎康司
ペルオキシソームで働くプロテアーゼ Tysnd1 を欠損したマウスの脳の形態学的解析
第 4 9 回 日本臨床分子形態学会総会・学術集

会 (岐阜) 2017.9.15-16/2016

- 5, 水野由美, 金田秀貴, 若菜茂晴, 穂田真澄, 梶原 健, 石原理, 岡崎康司
ペルオキシソーム脂質代謝異常マウスの奇形精子に対するバチルアルコール投与の効果
第 5 7 回日本卵子学会学術集会 (新潟)
2016.5.14-15
- 6, 水野由美, 水野洋介, 昌子浩孝, 仲地 豊, 穂田真澄, 西向めぐみ, 前場良太, 岡崎具樹, 若菜茂晴, Kurochkin Igor V., 宮川 剛, Schönbach Christian, 岡崎康司
Tysnd1 欠損マウスの脳の表現型解析
BMB2015 (神戸) 2015.11.30-12.4
- 7, 水野由美, 昌子浩孝, 水野洋介, 仲地 豊, 穂田真澄, 若菜茂晴, 宮川 剛, 岡崎康司
ペルオキシソームの脂質代謝機能が低下する Tysnd1 欠損マウスの網羅的行動解析
第 1 3 回 RCGM フロンティアシンポジウム(埼玉) 2015.10.30-31
- 8, 水野由美, 穂田真澄, 梶原 健, 石原理, 岡崎康司
ペルオキシソームの脂質代謝異常によって起こる奇形精子の形態改善への試み
第 4 7 回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会(長崎) 2015.9.18-19
- 9, 水野由美, 金田秀貴, 若菜茂晴, 西向めぐみ, 前場良太, 梶原 健, 石原理, 岡崎康司
ペルオキシソームで働くプロテアーゼ Tysnd1 とプラスマローゲン合成
第 2 0 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(名古屋) 2015.8.21-22
- 10, 水野由美, 昌子浩孝, 水野洋介, 仲地 豊, 穂田真澄, 若菜茂晴, Kurochkin Igor V., 宮川 剛, Schönbach Christian, 岡崎康司, ペルオキシソームの脂質代謝機能低下が脳に及ぼす影響について~Tysnd1 欠損マウスを用いた解析, 第 3 7 回日本分子生物学会年会, 1P-362, 横浜市, 2014/11/25
- 11, Mizuno Yumi, Mizuno Yosuke, Nakachi Yutaka, Akita Masumi, Shimozawa Nobuyuki, Okazaki Yasushi, Analysis of mitochondrial function using a peroxisomal processing protein or Tysnd1 deficient mice, The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier, Saitama, 2014/10/31
- 12, 水野由美, 水野洋介, 仲地 豊, 二宮裕一, 洞井康, 渡辺光博, 下澤伸行, 若菜茂晴, 穂田真澄, Kurochkin Igor V., Schönbach

Christian, 岡崎康司, ペルオキシソーム局在プロテアーゼ, Tysnd1 欠損マウスの高脂肪食投与による脂肪肝と耐糖能異常についての解析, 第 87 回日本生化学会大会, 3T14a-02(3P-249), 京都市, 2014/10/17

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 男性不妊症の予防乃至治療薬、及び食品乃至飼料

発明者: 水野 由美、岡崎 康司

権利者: 学校法人 埼玉医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-162011

出願年月日: 2014 年 8 月 8 日

国内外の別: 国内

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

水野 由美 (MIZUNO, Yumi)

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号: 20584014

(2) 研究分担者

仲地 豊 (NAKACHI, Yutaka)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10522097

(3) 連携研究者

大竹 明 (OHTAKE, Akira)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00203810

(4) 連携研究者

水野 洋介 (MIZUNO, Yosuke)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30406532

(5) 連携研究者

岡崎 康司 (OKAZAKI, Yasushi)

埼玉医科大学・医学部・客員教授

研究者番号: 80280733