

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15765

研究課題名(和文) 母胎を介した薬剤曝露による社会性行動障害メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanisms of social deficits caused by drug exposure via the womb

研究代表者

村上 浩子(古田島浩子)(MURAKAMI, Hiroko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員

研究者番号：60619592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、バルプロ酸及びエタノール曝露による2つのモデルマウスの比較・解析を行い、社会性行動障害と胎生期GABAシグナルの関連を明らかにすることを目的とした。これらのモデルマウスにGABAA受容体阻害剤を投与したところ、社会性行動障害の改善を示すことや、GABA関連遺伝子の発現異常を検出したことから、胎生期におけるGABAシグナルの異常が生後の社会性行動障害に寄与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、胎生期のGABAシグナル異常が生後の社会性行動障害に関連することを薬剤曝露による自閉症モデルマウスを用いて明らかにしたものである。これまでの先行研究において、生後脳における興奮/抑制のアンバランスは研究されてきたが、薬剤曝露による胎仔脳のGABAシグナルによる興奮/抑制のアンバランスに着目したものはなく、薬剤曝露による自閉症モデル動物に関して、新たな知見を得ることができ、社会性行動障害の病態解明と治療薬開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the relationship between social behavioral deficits and the GABA signaling using two mice models prenatally exposed to valproic acid or ethanol. Administration of GABAA receptor inhibitors to these model mice showed improvement in social behavioral deficits. Abnormal expression of GABA-related genes was detected in mice exposed to valproic acid. We found that abnormal GABA signaling in utero affected social behavioral deficits.

研究分野：医歯薬学

キーワード：自閉症 社会性行動障害 バルプロ酸 エタノール GABA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症(自閉症)は、社会性相互交流の障害を中核症状とする発達障害の一つである。罹患率は出生 80 人に 1 人と高く、自閉症は小児科領域の解決すべき重要な疾患の一つである。行動療法を早期に開始することで、健常者と近いレベルの社会生活を送れるようになる場合もあるが、根本的な治療はなく、家庭や学校、職場においても対応が困難とされる疾患である。自閉症の発症メカニズムとして遺伝的要因が中心に調べられているが、薬剤曝露などの後天的な要因も示されてきた。

抗てんかん薬や抗うつ薬として広く用いられるバルプロ酸は臨床的に重要な薬剤であるが、妊娠期の母親が服用すると、子が自閉症と診断される確率が高くなる (Christensen et al., 2013)。胎生期におけるバルプロ酸曝露動物は、社会性行動の障害や小脳の形態異常が自閉症と類似していることから、自閉症モデル動物として用いられてきた (Schneidel et al., 2005)。しかしながらバルプロ酸曝露によって、なぜ社会性行動障害が生じるのかは不明である。胎仔期の GABA は脱分極側(興奮性)に作用し、神経系の発生、細胞移動、シナプス形成に寄与することで神経回路の発達に重要な役割を果たす (Ben-Ari, 2014)。自閉症病態の一つとして、生後脳の神経回路における興奮/抑制のアンバランスが考えられている。例えば、マウス前頭前皮質において抑制性細胞の活動を変化させることなく、興奮性細胞をオプトジェネティクスにて増強すると社会性行動の障害が生じることや (Yizhar et al., 2011)、自閉症関連遺伝子改変マウスやバルプロ酸曝露マウスでは生後脳における GABA 作動性ニューロンの指標であるパルプアルブミン (PV) 陽性細胞の減少が示されている (Gogolla et al., 2009)。一方、エタノールは GABA_A 受容体に作用し、GABA シグナルを増強させ、胎生期の継続的なエタノール曝露は、仔の社会性や認知行動を障害することが示されている。また、バルプロ酸曝露モデル動物と同時期の胎生 12 日におけるラットに、エタノールを単回投与すると仔ラットの社会性行動が障害される (Middleton et al., 2012)。

このため、バルプロ酸及びエタノール曝露による胎仔脳における興奮/抑制のアンバランスが生後の神経回路発達に影響し、社会性行動障害を生じる要因の 1 つと考え、2 つのモデルの比較・解析を行い社会性行動障害と GABA シグナルの関連を検討する。

2. 研究の目的

本研究は、妊娠 12.5 日のマウスにバルプロ酸あるいはエタノールを投与し、仔マウスの行動への影響を調べると共に、GABA_A 受容体阻害剤 (ピクロトキシン) を同時投与した際の影響を検討し、2 つのモデルの興奮性及び抑制性シグナルに関連する分子解析や社会性行動を司る脳部位の組織化学解析を行い、社会性行動障害と胎生期 GABA シグナルの関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

妊娠マウスにバルプロ酸あるいはエタノールを投与し、仔の身体発達と幼若期から成熟期における運動機能、情動、社会性行動を比較・検討する。胎生 12.5 日の薬剤曝露と同時に GABA_A 受容体阻害剤を投与し、仔マウスの社会性行動障害が改善するかを調べた。

具体的には、生後 7 日から 25 日齢まで身体成熟 (体重・開眼)、運動機能 (平衡感覚、姿勢反射、握力) を調べる。身体成熟における開眼テストは、生後 14 日から 18 日まで両眼が開くかを観察し、両眼が閉じている場合は 0 点、片眼が開眼すると 1 点、両眼が開くと 2 点とスコア化した。運動機能測定には、Negative geotaxis テスト、Righting reflex テスト、Grip strength テストを用いた。8-9 週齢、9-10 週齢において行動量や不安様行動 (高架式十字迷路テストとオープンフィールドテスト) を解析し、5-6 週齢 (若齢期) と 10-11 週齢 (成熟期) に社会性行動を解析した。社会性行動テストは Sato et al., 2012 の方法を用いて、ホームケージ内で新奇マウスと 1 対 1 にし、被験マウスの新奇マウス (同性、同じ週齢) に対する匂い嗅ぎや追跡行動の時間を評価した。GABA_A 受容体阻害剤であるピクロトキシンを胎生期 12.5 日に同時投与し、社会性行動を中心に解析した。分子解析のために、社会性行動テスト終了後の各マウスの全脳を回収し、totalRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。組織化学解析のために、社会性行動テスト終了後の各マウスの全脳を回収し、凍結切片を作成後、c-fos 発現の解析を行った。

4. 研究成果

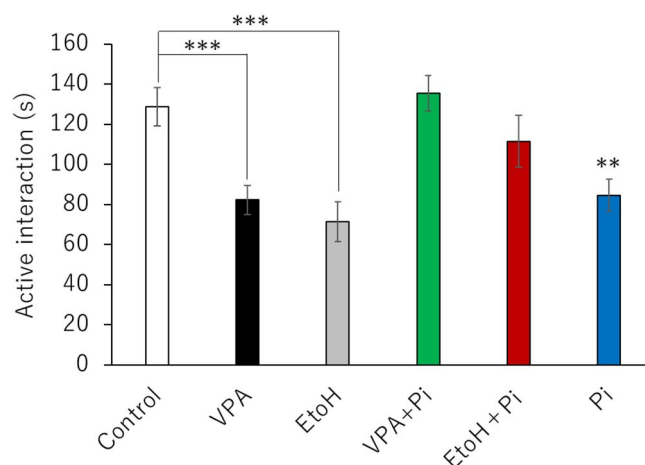


図. 社会性行動テスト

VPAとEtoHマウスは、コントロールマウスに対して有意に低い社会性行動時間を示したが、ピクロトキシン投与によって、改善することが示された (黒 vs. 緑, 灰 vs. 赤)。一方で、ピクロトキシン単体投与でもコントロールマウスに対して有意に社会行動時間が減少する (青)。

胎生期バルプロ酸曝露マウス (VPA マウス) と胎生期エタノール曝露マウス (EtoH マウス) の幼若期から成熟期におけるテストバッテリーを行ったところ、VPA マウスはコントロールマウスに対して、運動機能の低下や身体成熟の遅延を示したが、EtoH マウスでは示されなかった。行動量、不安様行動においては、共に有意な変化を示さなかった。社会性行動テストにおいては、コントロールマウス (生理食塩水投与) に対して、VPA マウスと EtoH マウスはともに有意に社会性行動時間の減少を示した (図)。メスマウスでは、VPA マウスと EtoH マウスともに社会性行動障害は示されなかった。

そこで、GABA_A 受容体阻害剤 (ピクロトキシン) を胎生期の同時期に曝露するマウス (Pi マウス) を作成し、同様に社会性行動テストを行うと、有意に社会性行動障害が改善することが示された (図)。一方で、ピクロトキシン単体の投与でも社会性行動障害が生じることが示された。これらの行動解析の結果は、胎生期における GABA シグナルの異常が生後の社会性行動障害に寄与することを示唆している。

行動解析終了後の、マウスの全脳を回収し、VPA マウスとコントロールマウスの比較解析を行った。解析した遺伝子のソーティングを Fold change 1.2 以上、-1.2 以下に、*P* 値は < 0.05 に設定し、生命科学情報検索エンジン BaseSpace Correlation Engine を用いて解析した。VPA マウスはコントロールマウスに対して、GABA 受容体関連遺伝子が有意に変化を示した (Gabbr2, *p* = 0.0154, Gabrr2, *p* = 0.0179, Slc6a1, *p* = 0.023, Gabrb3, *p* = 0.006, Gabra3, *p* = 0.0282)。また、pathway enrichment を解析したところ、コントロールマウスに対して VPA マウスにおいて有意に増加した遺伝子 (627 遺伝子) は神経新生や神経分化に関連する遺伝子群やグルタミン酸シグナル伝達に関連する遺伝子群が高い *P* 値を示していることを見出した。胎生期における GABA シグナルは、神経系の発生、細胞移動、シナプス形成に寄与することで神経回路の発達に重要な役割を果たすことが知られており、バルプロ酸曝露により、GABA シグナルを介して胎仔期の神経新生や分化に影響する可能性が示唆された。EtoH マウスや Pi マウスの分子解析に関しては、今後解析予定である。また、組織化学的解析においても解析途中になる。現在のところ、コントロールマウスと Pi マウスを免疫組織化学染色し、medial prefrontal cortex、somatosensory cortex、hippocampus、amygdala の c-fos 活性を検討した。Pi マウスにおいては社会性行動テスト後、medial prefrontal cortex における c-fos 活性が低い傾向を示すことを見出した。

< 引用文献 >

1. Christensen J et al., Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childfood Autism, JAMA 2013;309:1696-703. doi: 10.1001/jama.2013.2270.
2. Schneidel T et al., Behavioral Alterations in Rats prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal model of Autism, Neuropsychopharmacology 2005;30:80-9. doi:10.1038/sj.npp.1300518.
3. Ben-Ari Y, The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: A personal journey, Neuroscience 2014;279:187-219. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.001.
4. Yizhar O et al., Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. Nature 2011;477:171-8. doi: 10.1038/nature10360.
5. Gogolla N, et al., Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. J Neurodev Disord. 2009;1:172-81. doi: 10.1007/s11689-009-9023-x.
6. Middleton FA et al, Molecular substrates of social avoidance seen following prenatal ethanol exposure and its reversal by social enrichment, Dev Neurosci 2012;34:115-28. doi: 10.1159/000337858.
7. Sato et al., Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. Nat Commun 2012;3:1292. doi: 10.1038/ncomms2295.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kotajima-Murakami H, Kobayashi T, Kashii H, Sato A, Hagino Y, Tanaka M, Nishito Y, Takamatsu Y, Uchino S, Ikeda K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of rapamycin on social interaction deficits and gene expression in mice exposed to valproic acid in utero.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-018-0423-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hiroko Kotajima
2. 発表標題 mTOR signaling pathway plays a key role in autism spectrum disorder.
3. 学会等名 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (6th AsCNP) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotajima H
2. 発表標題 Effects of rapamycin treatment on impaired social interaction and gene expression in mice treated prenatally with valproic acid.
3. 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience (IBRO2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古田鳥(村上)浩子
2. 発表標題 心拍制御の研究から精神疾患研究まで - 心の解明を目指して -
3. 学会等名 第26回身体運動科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kotajima-Murakami H
2. 発表標題 Rapamycin improves social deficits in the mice treated prenatally with valproic acid.
3. 学会等名 57th American College of Neuropsychopharmacology (ACNP 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kotajima-Murakami H
2. 発表標題 Rapamycin ameliorates impairment of social interaction in the mice exposed in utero to valproic acid.
3. 学会等名 31st The International College of Neuropsychopharmacology World Congress (CINP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroko Kotajima-Murakami
2. 発表標題 Inhibition of mTOR improves autism-like behaviors in mice in utero exposed to valproic acid
3. 学会等名 Asian College of Neuropsychopharmacology (5th AsCNP) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古田鳥浩子
2. 発表標題 胎生期バルプロ酸曝露マウスの社会性行動障害のラパマイシン投与による改善
3. 学会等名 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本精神神経薬理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上(古田島)浩子
2. 発表標題 mTOR阻害剤投与による胎生期バルプロ酸曝露マウスの自閉症様行動への影響
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

TOPICS 2017 http://www.igakuken.or.jp/topics/2017/0429-2.html

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