

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11478

研究課題名（和文）酸化ストレスと発達障害：社会的コミュニケーション障害発症の分子機構の解明

研究課題名（英文）The role of oxidative stress in developmental disorders

研究代表者

吉原 大作 (Yoshihara, Daisaku)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00567266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに研究代表者は、酸化ストレス防御系が脆弱なマウス（SOD1KOマウス）では、発育の遅延がみられるとともに、神経発達障害に類似した社会的コミュニケーション障害が現れることを報告してきた。本研究では、SOD1KOマウスおよび神経系培養細胞を用いて、発達障害の発症に酸化ストレスがどのように関与しているのか解析した。その結果、コミュニケーション障害の原因分子として注目されているドパミントランスポーター（DAT）の発現や局在に、酸化ストレスが影響を与えている可能性が示唆された。さらに、神経系などの細胞における鉄代謝異常（鉄欠乏）が、細胞内に酸化ストレスを惹起させる原因となる可能性も見出した。

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）等の発達障害に関する研究は、神経薬理的に様々な解析が進められてきた。それに対して、生化学的な解析は遅れており、発達障害の診断に利用できる病態マーカーも存在しない。本研究によって「酸化ストレス」と「発達障害」との関係が明らかになることで、発達障害発症の基本的かつ共通のメカニズムが解明できる可能性がある。また、生化学的解析によって、発達障害の発症時に特有の挙動を示す分子を明らかにすることで、これまでになかった発達障害の診断マーカーの開発や予防法（妊娠時の母親や成長期の小児への栄養指導や生活指導）の開発にもつながることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Developmental disorders, such as autism spectrum disorder (ASD) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), thought to be associated with oxidative stress. I have reported that SOD1 KO mice exhibited impaired motivational behavior in three-chamber social interaction tests. High levels of dopamine transporter protein and an acceleration of serotonin turnover were also detected in the cerebrums of the SOD1 KO mice. However, the relationship between oxidative stress and brain functions remains unclear. In this study, we found that SOD1 KO mice showed lower social approach activities in social interaction test. Additionally, we found that the expression and localization of DAT were affected by oxidative stress in cultured cells.

研究分野：生化学

キーワード：酸化ストレス SOD1 コミュニケーション障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸素を利用して生命活動を営む我々は、発生の段階から死に至るまで、常に活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) によるストレス (酸化ストレス) に曝されている。そのため、生体内には、ROS を制御するための抗酸化酵素 (Superoxide dismutase; SOD や Catalase) や抗酸化物質 (グルタチオンやアスコルビン酸) による酸化ストレス防御系 (抗酸化系) が備わっている。生体内における ROS の産生は、代謝量と相関することから、細胞分裂や代謝の活発な胎児期や成長期では、抗酸化系の需要が増す。また、出生時には低酸素環境の羊水中 (O_2 濃度 3%) から、大気中の高酸素環境 (O_2 濃度 21%) に曝されることから、急激に ROS が増加する。これらのことから、胎児期から出生を経て成長期までの抗酸化系の働きは極めて重要である。そのなかでも SOD1 は、酸素分子から最初に生成される ROS であるスーパーオキシドを消去することから、生体内における ROS 消去系の中でも特に重要な役割を果たしている。しかしながら、発育発達における SOD1 の役割については未解明な点が多い。

神経発達障害 (発達障害) は、発育に伴って発達するべき自己コントロール能力や社会的コミュニケーション能力 (社会性) に異常を示す疾患群である。発達障害の代表的なものとしては、自閉症スペクトラム障害 (Autism Spectrum Disorder: ASD) や注意欠陥多動性障害 (Attention-deficit hyperactivity disorder: ADHD) などが挙げられる。これらの発達障害の発症には、他の精神疾患と同様に、遺伝的要因が大きく関わっている。その一方で、遺伝的素因を持った者が必ずしも有病者となる訳ではないことから、発達障害の発症には、胎児期から成長期までにおける環境的要因の影響も大きく関与していると考えられている。しかしながら、環境的要因による発達障害発症のメカニズムには未解明な部分が多い。

これまでに研究代表者は、抗酸化酵素である Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD: SOD1) を欠損しているマウス (SOD1KO マウス) は、出生から離乳期までの発育が遅く、社会性の低下や様々な行動学的異常が認められることを報告してきた (Yoshihara et al., Free Radic Res. 2016) (図 1)。社会性の低下は、ASD の主要な症状である社会的コミュニケーション障害の一つであり、これまでに様々な ASD モデルマウスにも認められている行動学的異常である。この SOD1KO マウスは、抗酸化酵素である SOD1 の欠損によって酸化ストレスが亢進しており、「酸化ストレス亢進」の代表的なモデルとして知られている。さらに申請者は、SOD1KO マウス的大脑において、ドーパミン神経伝達の調節分子であるドーパミントランスポーター (DAT) が顕著に増加していることも見出している (図 2)。DAT は、ドーパミン (DA) の再取り込み輸送体であり、DA の作用 (運動調節、情動、意欲、学習など) を抑制する様に働くと考えられている。これまでに、DAT の欠損マウスが ADHD 様の多動症状を示すこと等が報告されており、DAT 発現の変化が発達障害における様々な症状と関連していることが示唆されている。これらのことから、SOD1KO マウスにおける DAT の顕著な増加は、DA による神経シグナルを抑制して、このマウスの社会性行動を低下させる原因となった可能性がある。しかしながら、SOD1KO マウスで DAT が顕著に増加するメカニズムや、DAT の増加と ASD 様の行動異常との因果関係は不明であった。

図 1

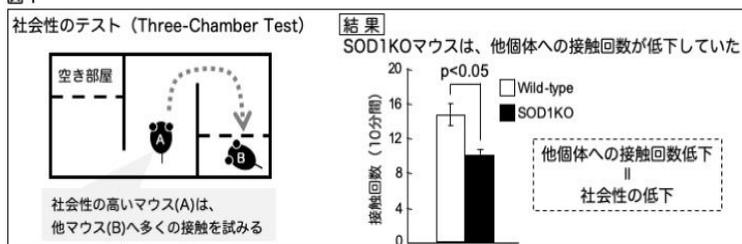
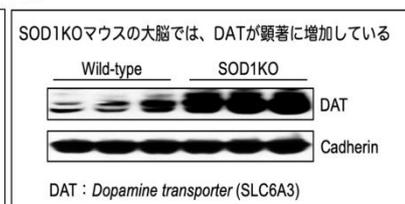


図 2



2. 研究の目的

『酸化ストレスは、発達障害発症の環境的要因であるのだろうか?』というのが、本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。本研究では、ASD などの発達障害発症の環境的因子としての「酸化ストレス」に着目し、酸化ストレスモデルマウスや神経系培養細胞などを用いた生化学的解析を通して、発達障害発症のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

実験動物

SOD1KO マウスおよびヒト野生型 SOD1 トランスジェニック (SOD1-Tg) マウスは Jackson Laboratory より購入したものを、C57BL/6J への戻し交配を行って使用した。SOD1KO マウスおよび交配用マウス等は兵庫医科大学の病態モデル研究センターで飼養した。動物実験は、兵庫医科大学動物実験委員会の承認を得て行った。(動物実験承認番号: 第 20-051 号)

培養細胞（株化細胞）

本研究で使用した培養細胞は、Neuro2a（マウス神経芽細胞腫由来）、SH-SY5Y（ヒト神経芽細胞腫）、PC12（ラット褐色細胞腫由来）、HepG2（ヒト肝癌由来）およびHEK293A（ヒト胎児腎由来）である。細胞培養の培地は、DMEM、DMEM/F12 および RPMI1640 使用した。培地には、5～10%のウシ胎児血清（FCS）を添加した。ただし、PC12 の培養には 5%FCS に加えて、ウマ血清（HS）を 10% 添加した。

DAT 発現初代培養細胞

C57BL6/J マウスの胎児（E14.5）より脳を摘出し、顕微鏡下で中脳部分（腹側中脳）を切り出した。これをトリプシンで処理し、細胞を分散させた。この細胞をあらかじめポリ-L-リシン（PLL）でコートした培養皿に播種した。培養後 24～72 時間程度で、神経突起の伸長が観察された。

(2) 行動学的解析

接触試験

この試験では、被験マウス（SOD1K0 および対象マウス:WT、8～12 週齢、雄）のホームケージ内に被験マウス（8～12 週齢、雌）と接触経験のないマウス（Stranger）を入れて、被験マウスが Stranger に接触した回数や時間を測定した。一回の試験時間は 10 分間で、同じ試験を Stranger を替えて 3 回行った。2 回目および 3 回目の試験は、1 回目の試験から 24 時間後および 48 時間後に行った。

受動的回避学習試験

この試験では、連結された明箱と暗箱からなる装置内に試験マウス（8～12 週齢、雄）を入れる。マウスは暗い場所を好むため、明箱に置かれると暗箱へ移動する。暗箱内では床から電気ショックが与えられる。そのため、暗室への進入と痛みである恐怖を関連付けて記憶される。そのために試験マウスは、暗箱への移動を躊躇するようになる。マウスが一度経験した電気ショック（嫌悪刺激）に対して示す受動的な回避行動を記憶の指標として、学習能力や記憶能力を評価する。本研究では、最初の試験から 3 日後と 7 日後に同様の試験を行なって、暗箱に入るまでの時間を測定した。

(3) SOD1K0 マウスおよび SOD1-Tg マウスの生化学的解析

SOD1K0 マウス、hSOD1-Tg マウスおよび野生型マウスより脳を摘出し、必要に応じて 3 部位（大脳、中脳、小脳）または 8 部位（嗅球、大脳皮質、海馬、線条体+側坐核、中脳、橋、小脳、視床+視床下部）に分割した。採取した組織から RNA およびタンパク質を抽出して、脳内モノアミン代謝や金属代謝に関わる分子の遺伝子発現解析（RT-PCR）、タンパク質発現解析（ウエスタンブロット法）および酵素活性の測定を行った。また、マイクロアレイを用いて SOD1K0 と野生型マウスとで発現量に差異のある遺伝子の解析も行った。

(4) 酸化ストレスが DAT 発現に与える影響の解析

酸化ストレスが DAT の発現や局在に与える影響を解析するために、培養細胞および DAT 発現初代培養細胞を ROS 産生剤や酸化ストレス誘導剤を添加した培地で培養した。その後、細胞から RNA およびタンパク質を抽出して、DTA および脳内モノアミン代謝や金属代謝に関わる分子の遺伝子発現解析（RT-PCR）、タンパク質発現解析（ウエスタンブロット法）、酵素活性の測定などを行った。培養細胞および DAT 発現初代培養細胞への酸化ストレスの負荷には、過酸化水素、DMNQ および Erastin を使用した。また、酸化ストレスが DAT の局在に与える影響をより詳細に解析するために、マウス中脳よりクローニングした DAT 遺伝子を pEGFP-N1 へ組み込み、培養細胞へ EGFP 融合 DAT を発現させて実験に供した。

4. 研究成果

(1) SOD1K0 マウスの行動学的解析

接触試験において、SOD1K0 および野生型マウス（WT）の Stranger に対する接触回数を測定した。その結果、SOD1K0 マウスの Stranger に対する接触回数は、野生型マウスが Stranger に対して接触する回数に比べて優位に少なくなることが分かった。これまでに研究代表者らは、Three-chamber test においても SOD1K0 の他個体への接触回数が優位に低下することを報告している。これらのことから、SOD1K0 では、他個体に対するコミュニケーション能力に異常があることが示唆された。一方で、受動的回避学習試験においては、SOD1K0 マウスと野生型マウスとの間に差は見られなかった。

(2) 生化学的解析

これまでに研究代表者らは、SOD1K0 マウスの大脳において DAT の発現が著しく増加していることを報告している。本研究では、SOD1-Tg マウスの大脳における DAT の発現も野生型マウスと比

較した。その結果、SOD1-Tg マウスでは、野生型マウスに比べて DAT 発現が少ないことが分かった。また、ドーパミン代謝と関連の深い脳内の金属(鉄および銅)に関係する分子の発現を SOD1K0 と野生型マウスとで比較したところ、SOD1K0 マウス的大脑では、鉄貯蔵タンパク質であるフェリチン(Ft)や鉄代謝調節タンパク質である Iron regulatory protein 1 (IRP1) が減少していることが分かった。この結果から、大腦では組織中の鉄量が減少している可能性が示唆された。一方で、中脳では組織中の鉄が増加していることを示唆する結果が得られた。さらに、マイクロアレイ解析によっても、SOD1K0 マウス的大脑において金属代謝異常や酸化ストレス亢進を示唆する遺伝子発現変動が認められた。現在は、マイクロアレイ解析で発現変動が認められた遺伝子について詳細な解析を進めている。

(3)酸化ストレスが DAT の発現や局在に与える影響の解析

神経系の株化細胞を ROS 産生剤や酸化ストレス誘導剤を添加した培地で培養したところ、DAT の遺伝子発現が亢進していた。しかしながら、ウエスタンブロットによる DAT タンパク質の発現解析では、発現量の変化は確認できなかった。そこで、マウス胎児から DAT タンパク質が発現している領域を採取し、初代培養を行った。この DAT 発現初代培養細胞と株化神経細胞とを用いて、DAT タンパク質の発現をウエスタンブロット法で解析したところ、株化神経細胞では DAT タンパク質がほとんど存在していない可能性が示唆された。そのため、今後の検討には DAT 発現初代培養細胞の利用が必要不可欠と考えられた。そのため現在は、採取した神経細胞中の DAT 陽性細胞の比率を上げるため、採取方法および選別方法に関して再検討を行い、解析に十分な量の DAT 陽性神経初代培養細胞を得る方法の確立を目指している。

また、SOD1K0 マウス的大脑では、鉄代謝異常が惹起されている可能性が示唆されたことから、酸化ストレス亢進時における鉄過剰や鉄欠乏が ROS 傷害に及ぼす影響について、培養細胞を用いて検討した。SOD1K0 マウス的大脑と同様な状態を誘導するために、培養細胞 (HEK293A 細胞) をスーパーオキシド産生剤もしくは SOD1 阻害剤を添加した培地で培養し、細胞内 ROS 量などを測定した。スーパーオキシド産生剤は 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ) を使用した。また、SOD1 阻害剤は Ammonium tetrathiomolybdate (ATTMo) または LCS-1 を使用した。鉄の過剰状態はクエン酸アンモニウム鉄 (FAC: 100 ~ 500 μ M、培地に添加) で誘導し、鉄欠乏状態は (DFP: 50 ~ 100 mM、培地に添加) で誘導した。その結果、鉄欠乏状態を誘導した場合には、通常の培養状態と比較して、DMNQ から産生される ROS 量が増大し、細胞内の NADH/NAD⁺ 比の顕著に減少することを見出した (Yoshihara et al., Free Radic Res. 2022)。

本研究によって、酸化ストレスがコミュニケーション障害を惹起させる原因となる可能性があることが示された。また、コミュニケーション障害の原因分子として注目されているドーパミントランスポーター (DAT) の発現や局在に、酸化ストレスが影響を与えている可能性が示唆された。さらに、SOD1K0 マウスや培養細胞を用いた解析から、鉄代謝異常 (鉄欠乏) が細胞内での活性酸素種 (ROS) の産生を亢進させることも見出した。引き続き、鉄欠乏や鉄欠乏を起因とする酸化ストレスが DAT などのモノアミン代謝関連分子の発現や挙動に与える影響について解析を進めている。さらに、DAT の発現や挙動の詳細な解析に関しては、DAT 高発現の株化神経細胞の入手や DAT 発現神経細胞の初代培養系の構築 (手技の簡便化など) が必要であり、これらの実験材料に関する検討も進めている。

本研究は、胎児期や成長期における酸化ストレスが、小児の発達に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実施した。これまでに自閉症スペクトラム障害 (ASD) 等の発達障害に関する研究は、神経薬理学的に様々な解析が進められてきた。それに対して、生化学的な解析は遅れており、発達障害の診断に利用できる病態マーカーも存在しない。本研究の成果は、発達障害発症の基本的かつ共通のメカニズムの解明に寄与できる可能性がある。また、今後の生化学的解析によって、発達障害の発症時に特有の挙動を示す分子を明らかにすることで、これまでになかった発達障害の診断マーカーの開発や予防法 (妊娠時の母親や成長期の小児への栄養指導や生活指導) の開発にもつながることが期待できる。現代社会の重要課題である「医療費削減」には、予防法の確立によって、有病者の発生を抑えることは極めて重要である。

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 0件）

1. 著者名 Yoshihara Daisaku, Fujiwara Noriko, Eguchi Hironobu, Sakiyama Haruhiko, Suzuki Keiichiro	4. 巻 56
2. 論文標題 Iron deficiency aggravates DMNQ-induced cytotoxicity via redox cycling in kidney-derived cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 544 ~ 554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2022.2154668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉原大作、藤原範子、江口裕伸、崎山晴彦、鈴木敬一郎
2. 発表標題 鉄欠乏状態におけるRedox cycling quinone: DMNQによる細胞傷害
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会 第21回日本NO学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 SOD1欠損マウスにおける脳内吉原大作、藤原範子、北中順恵、北中純一、崎山晴彦、江口裕伸、竹村基彦、鈴木敬一郎
2. 発表標題 SOD1欠損マウスにおける脳内モノアミン代謝の変化と行動異常
3. 学会等名 第75回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉原大作、藤原範子、江口裕伸、崎山晴彦、鈴木敬一郎
2. 発表標題 鉄欠乏状態はキノンの細胞毒性を増強させる
3. 学会等名 第46回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉原大作、藤原範子、江口裕伸、崎山晴彦、鈴木敬一郎
2. 発表標題 鉄欠乏はRedox cycling quinoneによるROS産生と細胞傷害性を増大させる
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
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
研究分担者	藤原 範子 (Fujiwara Noriko) (10368532)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	崎山 晴彦 (Sakiyama Haruhiko) (30508958)	千里金蘭大学・生活科学部・准教授 (34439)	
研究分担者	江口 裕伸 (Eguchi Hironobu) (60351798)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	
研究分担者	鈴木 敬一郎 (Suzuki Keiichiro) (70221322)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

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
---------	---------