

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06829

研究課題名(和文) ミクログリアのライソゾーム機能不全が自閉スペクトラム症発症に与える影響

研究課題名(英文) Influences of microglial lysosome dysfunction on the pathogenesis of autism spectrum disorders

研究代表者

朱 紅 (Zhu, Hong)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・博士研究員

研究者番号：90778614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：自閉スペクトラム症の発症過程においてミクログリア細胞のライソゾームの機能不全が関与するのかが否かを明らかにするために、poly(I:C)母体注入による発達障害モデルラットを作製した。胎児脳の免疫組織染色によって下記の所見を得た。(1)脳内血管壁に一致する熱ショックタンパク75 (Hsp75)の発現亢進を見出した。(2)ライソゾームストレス誘導性糖タンパクGpnmb (glycoprotein non-metastatic melanoma b)の発現亢進が認められた。これらの結果から、ライソゾーム膜の不安定化が示唆される。

研究成果の概要(英文)：To clarify whether lysosomal dysfunction in microglia was involved in the pathogenesis of developmental disorders, we tried to established experimental models by injecting pregnant rats with poly (I:C) (polyinosinic-polycytidylic acid). By immunohistochemical staining of embryonic brains, we find out changes in lysosome-related proteins as follows: (1) Heat shock protein 70 expression was augmented in the vascular wall. (2) Lysosomal stress-related Gpnmb (glycoprotein non-metastatic melanoma B) expression was enhanced in glial cells. These data suggest that lysosomal membranes become destabilized during the pathogenesis of developmental disorders.

研究分野：神経科学

キーワード：自閉スペクトラム症 ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症は、社会性障害、他者との言語コミュニケーションの障害・困難、反復するこだわり行動を主要な症状とする精神疾患である。罹患率は全人口の1%を超えるとされており、治療法の開発・改善への社会的要請が大きい。現在、治療薬として向精神薬などが対症的に使用されているが、根本的な治療薬はない。オキシトシン点鼻療法が世界的に大規模臨床試験の段階にあるが、これまで公表された小規模試験の結果を見ても、奏功しない症例があることは事実であるし、その長期効果についても不明である。自閉スペクトラム症は「スペクトラム」である以上、多様な発症メカニズムが背景にあり、画一的な治療法で改善しないことが当然予想される。したがって、新たな発症プロセスの仮説の提唱と検証、新規薬物の発見に向けた試みは絶えずなされなければならない。

これまでの自閉スペクトラム症の病態解明と薬物開発の主要対象は、ホルモン・神経伝達物質、およびその受容体、シナプス構成タンパクであった。2006年 Texas Southwestern Medical Center の Parada らのグループは mTOR (mammalian target of rapamycin) 欠損マウスに自閉症様症状を見出した。2014年 Columbia 大学の Sulzer らのグループは、自閉症患者の脳ではシナプスが過剰な状態になっており、それがライソゾーム (lysosome) 酵素によるオートファジー (autophagy) の不全によることを報告した。さらに同グループは、オートファジー誘導作用をもつ薬剤ラパマイシンが『刈り込み』を正常に作動させることを示した (Tang et al., Neuron 83, 1131-1143, 2014)。これらの発見はライソゾームの神経発達への関与を示唆するものである。また、ラパマイシン自体が自閉スペクトラム症の治療薬となる可能性もあるが、その免疫抑制作用が懸念される。このため、ライソゾーム機能を保持させる他の薬剤の発見あるいは創出が期待される。

申請者は、サル脳虚血細胞死に際して熱ショックタンパク 70.1 (Heat Shock Protein 70.1: HSP70.1) が酸性スフィンゴミエリナーゼを介してミクログリアのライソゾーム膜を安定化し、神経細胞死を抑制する作用があることを世界に先駆けて報告した (Zhu, H., et al. J. Biol. Chem., 2014; Zhu, H., et

al. J. Neurochem., 2012)。これらの研究から、神経発達障害で観られる『刈り込み』不全は類似した原理に基づいており、薬物で制御できるのではないかという発想をもつに至った。

2. 研究の目的

1. 自閉スペクトラム症様症状を呈する個体の発達脳において、ミクログリアのライソゾームの膜不安定性があるのか否かを明らかにする。

2. 自閉スペクトラム症モデルラットの発達脳において、ライソゾーム膜を安定化する薬物が症状改善効果をもつか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

自閉スペクトラム症モデルラットを作製する。

同モデルラット脳のライソゾームの安定性を免疫化学、生化学的に検証する。

同じくライソゾームの安定性を形態学的に検証する。

培養ミクログリアのライソゾーム安定性試験

ライソゾーム膜を安定化する薬物を全身性あるいは脳内局所に投与することによって、自閉スペクトラム症モデルラットの行動異常が改善するか否かを調べる。

ライソゾーム膜を不安定化する薬物を発達期の正常ラットに投与し、行動異常が生じるか否かを調べる。

4. 研究成果

自閉スペクトラム症の発症過程においてミクログリア細胞のライソゾームの機能不全が関与するののか否かを明らかにするために、モデル動物の作製を試みた。既報に基づいて、妊娠ラットにバルプロ酸を腹腔内注射するモデルを試みたが、流産のため新生児ラットを得ることができなかった。そこで、ウイルス RNA を模倣する合成二本鎖 RNA 化合物 (polyinosinic-polycytidylic acid: poly(I:C)) を母体腹腔内に注射し、出生した仔ラットが神経発達障害モデルになりうるか否かを検討した。並行して、妊娠マウスにリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) を腹腔内注射し脳内炎症変化を惹起して出生し

たモデルラットも作成した。いずれのモデルでも仔ラットの出生に至った。poly(I:C)母体注射後に出生した仔ラットで open field test を行ったところ、不安様行動変化が認められた。また、USV (ultrasonic vocalization) test でも、発声パターンの変化が認められている。

poly(I:C)誘発自閉症モデルラット

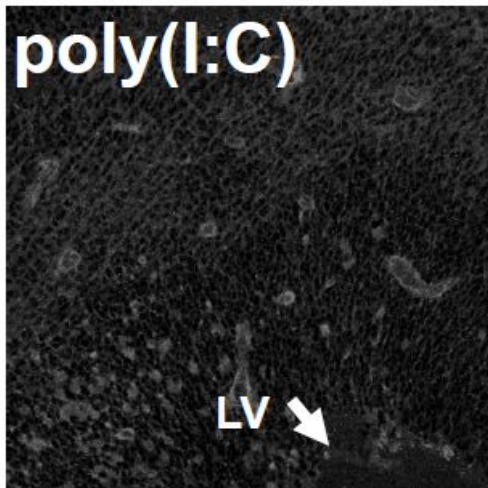


図1 母体にpoly(I:C)を注射後の胎児大脳(E18/19)でのHSP70-immunoreactivityの増強。対照として生理食塩水(saline)を注射した。側脳室の辺縁を矢印で示している。

の脳内血管壁に一致する熱ショックタンパク70 (Hsp70)の発現亢進を見出している。膜不安定化時のカウンターバランス

的变化と解釈している(図1)。これ以外にも、ライソゾームストレス誘導性糖タンパク Gpnmb (glycoprotein non-metastatic melanoma b)の脳内発現亢進が認められた。これらの結果から、ライソゾーム膜の不安定化が示唆される。

さらに、poly(I:C)あるいは生理食塩水を妊娠ラットに注射後の胎児脳からRNAを抽出し、マイクロアレイ解析により比較した。poly(I:C)注射後の脳で増加、減少している分子種が認められており、その再現性の確認を行っている。

3- については実験に取りかかることができず、今後の課題となった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Yokoyama, S., and Zhu, H. (2017) Expression of glycoprotein non-metastatic melanoma B in the embryonic rat brain. The 47th Annual Meeting of Society for Neuroscience. November 12 (November 12-16), 2017. The Walter E. Washington Convention Center, Washington DC, MD, U.S.A. (Soc. Neurosci. Abstr. 197.14.)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

<http://kodomokokoro.w3.kanazawa-u.ac.jp>

/

6．研究組織

(1)研究代表者

朱 紅 (HONG, Zhu)

金沢大学・子どものこころの発達研究セン

ター・博士研究員

研究者番号：90778614

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()