

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08576

研究課題名(和文)ドーパミン神経系異常と心理的ストレスが引き起こす多動性障害の機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of the mechanism of hyperactivity disorder caused by dopaminergic abnormality and psychological stress

研究代表者

梅村 真理子 (Umemura, Mariko)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：30521489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、多動を特徴とした発達障害が増加し、多動の原因の一つはドーパミン神経系の異常であるとされている。私達は、神経細胞の分化・増殖の制御に関する転写因子ATF5の欠損マウスが多動や不安様行動などの異常行動を示すことを明らかにした。ATF5欠損マウスは、扁桃体でドーパミン量が減少しており、セロトニン量は異常がなかった。ATF5欠損マウスにおいて、扁桃体の全体的な構造に顕著な違いは認められなかったが、興奮性神経細胞が減少し、ドーパミン受容体を発現する神経細胞の数が減少していた。このことから、ATF5欠損マウスは、脳内でのドーパミンシグナルの攪乱が多動の原因の一つとなっている可能性が予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多動を特徴とした発達障害の脳内の原因の解明や、根本的な治療法や治療薬の開発はあまり進んでいない。本研究では、多動などの行動異常の原因解明のための新しい知見を得ることを目標として研究を進めた。ストレス応答性転写因子のATF5は、神経細胞の分化や増殖に関する。このATF5欠損マウスは、多動や不安様行動の亢進がみられ、脳の扁桃体のドーパミン量が減少していた。また、ドーパミン受容体の発現に異常があることがわかった。このことから、ATF5欠損マウスでは、ドーパミンシグナル系の異常があることがわかった。この研究で得られた知見は、多動性障害の原因の解明に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, developmental disorders characterized by hyperactivity have increased, and one of the causes of hyperactivity is thought of the dopamine nervous system abnormality. We developed that the mouse deficient in the transcription factor ATF5, which regulates neuronal differentiation. ATF5 deficient mice exhibit abnormal behavior such as hyperactivity and increased anxiety-like behavior. ATF5 deficient mice had decreased the dopamine levels in the amygdala, but not serotonin levels. In ATF5-deficient mice, there was no significant difference in amygdala structure, but excitatory neurons in the amygdala were decreased, and the number of dopamine receptors positive neurons was decreased. Taken together, it was expected that the ATF5 deficient mouse would have an abnormal dopamine signal in the brain, which may lead to hyperactivity.

研究分野：神経科学

キーワード：モノアミン 脳 マウス 行動異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 発達障害と二次障害について

近年、多動を特徴とする注意欠陥・多動性障害 (ADHD) や自閉症スペクトラム障害 (ASD) などの発達障害が増加していると報告されている。さらに、発達障害の患者は、二次障害として不安障害や反抗挑戦性障害などを併発し、外部の社会環境からの心理的ストレスに対する抵抗性が弱いことが予想されている。

(2) 多動性障害の原因の一つは脳内ドーパミン神経系の異常

脳内ドーパミン神経系は運動、意欲、報酬を制御している。多動性障害の原因の一つとしてドーパミン神経系の異常が報告されている。しかし、ドーパミン神経系の異常をひきおこす機構はほとんど報告されていない。多動の原因の解明や新しい治療法の開発が望まれている。

(3) ストレス応答因子 ATF5 の神経細胞での機能の解明

私達のグループでは、細胞内ストレス (ER ストレス、栄養欠乏、炎症等) に応答して発現が上昇するストレス応答性の転写因子 ATF5 を同定した。脳・神経系において、ATF5 は細胞内ストレスに応答して発現上昇し、細胞恒常性に関与する遺伝子 (アポトーシス、神経分化等) の転写を促し、細胞内ストレスから細胞を守る。私達は ATF5 の生理的意義を明らかにするために ATF5 欠損マウスを作製し、ATF5 は脳や嗅覚系組織の神経細胞に発現して、神経細胞の分化・成熟や、脳の形態形成に重要であることを明らかにした。

(4) ATF5 欠損マウスを多動性障害モデルマウスとして確立

ATF5 欠損マウスは、新規環境における総移動距離、移動速度、常同運動量が上昇し、多動の表現型を示した (Fig.1, Umemura et al, 2017, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*)。したがって、ATF5 欠損マウスは多動行動の原因解明のためのモデルマウスとして有用であると考えられた。特に、ATF5 欠損マウスは新規な環境において不安様行動が亢進しており、野生型マウスでは不安に感じない環境でも、ATF5 欠損マウスでは強く心理的ストレスを感じていることが予想された。

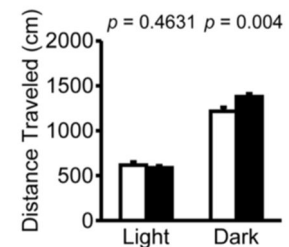


Fig.1 Light/dark transition test における移動距離。ATF5 欠損マウス (黒) は野生型マウス (白) に比べて、暗箱 (Dark) において多動の表現型を示した。明箱 (Light) では差はなかった。

2. 研究の目的

1 の背景に記載したとおり、多動性障害の原因解明が望まれている。このことから、本研究では、多動を引き起こすドーパミン神経系の破綻機構を明らかにするために、多動を示す ATF5 欠損マウスの脳内のメカニズムを解明することを目的とした。この研究を進めることにより、多動性障害の原因を解明し、新しい治療法の提案を目指したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) ドーパミンニューロンの局在と投射

ドーパミンニューロンマーカーである Tyrosine Hydroxylase (TH) に対する抗体を使用し、免疫組織化学的手法にて ATF5 欠損マウス脳のドーパミンニューロンを解析した。また、ドーパミンと同様にモノアミン神経伝達物質の一つであるセロトニンニューロンについても解析を

行った。セロトニンニューロンのマーカーとしては Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2)を用いた。

(2) ドーパミンを含むモノアミン神経伝達物質の定量解析、及びモノアミン合成・代謝経路に関する因子の発現レベル解析

様々な部位におけるドーパミンやその代謝物について詳細な定量を行った。急速冷凍した脳を冷凍のままスライスし、パンチアウト法にて微量な脳の部位を採材した。採材部位は、海馬 (hip-D)、扁桃体(BLA)、腹側被蓋野(VTA)、縫線核(背側縫線核 (DRD), 正中縫線核(MnR))などである。さらに、ドーパミンの生合成や代謝に関与している TH、AADC、COMT、MAOA/B、及び、モノアミントランスポーターである DAT、SERT 等の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。

(3) ドーパミン受容体を介したシグナル伝達経路

ドーパミン受容体は D1 から D5 の 5 種類のサブタイプがよく知られている。これらの局在や発現を免疫組織化学的手法や、ウエスタンブロットングにて解析した。

(4) ドーパミンニューロンの作成

マウス脳を用いるだけでなく、培養細胞を用いた解析も行うこととした。神経芽細胞腫 Neuro-2a 細胞にジブチリル cAMP (dbcAMP) を添加し、ドーパミンニューロンに分化させた (Roger et al., 2010, *Journal of Neuroscience Methods*)。

(5) 心理的ストレスと ATF5 の関係の解明

マウスが心理的ストレスを受けたとき、ストレスホルモンであるグルチコルチコイドが分泌される。グルチコルチコイドはグルチコルチコイド受容体 (GR) に結合し、GR は核内に移行して下流遺伝子を転写している。ATF5 欠損マウスの海馬における GR の発現レベルをリアルタイム PCR にて解析した。

(6) ATF5 が発現制御する下流因子の同定

ATF5 によって転写制御を受ける下流因子を同定するために、RNA シークエンス解析を行うこととした。まず、ATF5 抗体を用いた免疫組織化学的手法による染色を行い、ATF5 が発現している部位の同定を試みた。ATF5 が高発現している部位を、レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法にて微量部分を切り出した。その後、次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンス解析を行い、ATF5 の下流因子を同定することとした。候補因子の同定後は、ATF5 欠損において、候補因子の発現が増減しているのか、リアルタイム PCR で確認した。

4 . 研究成果

(1) ドーパミンニューロンの局在と投射

ドーパミンニューロンマーカーである TH に対する抗体を使用し、免疫組織化学的手法にて ATF5 欠損マウス脳のドーパミンニューロンを解析した。ATF5 欠損マウスにおいて、野生型と同じく、起始核である腹側被蓋野や黒質で TH の発現が高かった。また、ドーパミン投射先では、線条体で発現が高く、扁桃体、海馬、視床下部、嗅球などでも TH の蛍光像が得られた。これらの発現パターンは ATF5 欠損マウスと野生型マウスにおいて変化なかった。

一方、ドーパミンと同様にモノアミン神経伝達物質であるセロトニンニューロンの解析を行った。セロトニンニューロンのマーカーである TPH2 に対する抗体を使用し、免疫組織化学染色を行なったところ、ATF5 欠損マウスにおいて、セロトニンニューロン数が変化していることがわかった。この原因として、アポトーシスや炎症、グリオーシスなどの増減が原因ではないかと仮定し、ATF5 欠損マウスの縫線核の免疫染色解析を行なったが、明確な増減は今のところ検出できなかった。解析方法を見直す必要があると考える。

(2) ドーパミンを含むモノアミン神経伝達物質の定量解析、及びモノアミン合成・代謝経路に関する因子の発現レベル解析

視床下部、海馬、扁桃体、前頭前野、腹側被蓋野、縫線核などの微量部位を抽出し、ドーパミンやセロトニンとその代謝物の定量解析を行った (Table 1)。扁桃体でドーパミン (dopamine, DA) とその前駆体や代謝物である dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) と homovanillic acid (HVA) の減少がみられた。また、縫線核において、セロトニン (serotonin, 5-HT) とその代謝物である 5-hydroxyindol acetic acid (5-HIAA) の減少がみられた。一方、ドーパミンの生合成や代謝に関与している TH、AADC、COMT とモノアミントランスポーターである DAT、SERT の mRNA の発現解析を real time PCR にて解析したところ、ATF5 欠損マウスにおいて、顕著な発現レベルの増減はみられなかった。

(3) ドーパミン受容体を介したシグナル伝達経路

ドーパミン受容体の局在や発現を免疫組織化学的手法や、ウエスタンブロッティングにて解析を行った。ATF5 欠損マウスにおいて、D1 ドーパミン受容体 (D1DR) と D2 ドーパミン受容体 (D2DR) はドーパミンニューロンの投射先である線条体に高く発現しており、大脳皮質や扁桃体にも一部発現していることがわかった。扁桃体において、D1DR と D2DR の発現レベルを解析したところ、D2DR の発現が ATF5 欠損マウスにおいて異常になっていることが見出された。

(4) ドーパミンニューロンの作成

マウス脳を用いるだけでなく、培養細胞を用いた解析も行うために、神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞にジブチリル cAMP (dbcAMP) を添加し、ドーパミンニューロンに分化させることを試みた。0.5mM (もしくは 1mM) dbcAMP を添加した Neuro2a 細胞において、ドーパミンニューロンへの分化を誘導した。その後、TH の発現量を免疫細胞染色やウエスタンブロッティングで解析した。しかし、TH の発現量に顕著な変化は見られなかった。このことから、Neuro-2a 細胞のドーパミンニューロンへの分化は確認できなかった。

(5) 心理的ストレスと ATF5 の関係の解明

マウスが心理的ストレスを受けたとき、ストレスホルモンと呼ばれているグルチコルチコイドが分泌される。グルチコルチコイドはグルチコルチコイド受容体 (GR) に結合し、GR は核内に移行して下流遺伝子を転写している。ATF5 のプロモーター領域には、GR 応答配列が存在すると予想されている (Dario et al., 2007, *Endocrinology*, 148(12), 5811–5821)。ATF5 欠損マウスの海馬における GR の発現レベルをリアルタイム PCR で解析したところ、GR mRNA の発現レベルに変化は見られなかった。したがって、ATF5 欠損マウスは、通常飼育時のホームケージではストレス刺激に脆弱になっていないものと予想された。

(6) ATF5 が発現制御する下流因子の同定

ATF5 によって転写制御を受ける下流因子を同定するために、ATF5 抗体を用いた免疫組織化学的手法による染色を行い、ATF5 が発現している部位を解析した。次に、ATF5 が高発現している部位を、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法にて微量部分を切り出し、RNA を抽出して、RNA の品質を解析した。その後、品質が良かった RNA サンプルを用いて、RNA シーケンサー解析を行った。ATF5 欠損マウスにおいて、ストレス応答関連因子、神経細胞の骨格形成、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関する遺伝子の発現に増減が見られた。これらの候補遺伝子をリアルタイム PCR を用いて発現レベルの解析を行ったところ、ATF5 欠損マウスにおいて、エピジェネティックな遺伝子発現制御に係る遺伝子やストレス応答に係る遺伝子の発現に異常があることがわかった。

Table 1: モノアミン神経伝達物質の脳の各部位での解析 (Umemura et al., *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2017 より改変)

Region	G	DOPAC	DA	HVA	5-HT	5-HIAA
BLA	+/+	4.23 ± 0.51	58.37 ± 15.86	6.91 ± 0.80	15.47 ± 2.47	5.84 ± 0.65
	-/-	2.88 ± 0.27*	23.60 ± 4.69*	4.40 ± 0.42**	19.01 ± 2.45	5.95 ± 0.49
Hip-D	+/+	0.24 ± 0.04	0.70 ± 0.39	0.51 ± 0.06	15.16 ± 1.77	8.30 ± 0.83
	-/-	0.26 ± 0.04	0.42 ± 0.18	0.49 ± 0.08	13.89 ± 0.85	8.04 ± 0.66
SNR	+/+	2.67 ± 0.29	8.45 ± 1.23	4.77 ± 0.45	32.44 ± 5.01	11.37 ± 0.87
	-/-	2.37 ± 0.39	7.95 ± 1.62	4.59 ± 0.59	29.78 ± 4.61	10.90 ± 1.26
VTA	+/+	5.65 ± 0.60	18.72 ± 2.27	6.50 ± 0.55	20.72 ± 2.51	12.13 ± 1.01
	-/-	6.30 ± 0.64	20.14 ± 3.01	7.23 ± 0.66	22.54 ± 2.45	13.95 ± 1.62
MnR	+/+	1.96 ± 0.46	2.19 ± 1.03	4.11 ± 0.68	28.00 ± 3.50	24.06 ± 3.57
	-/-	1.05 ± 0.16	0.63 ± 0.29	1.93 ± 0.34*	26.60 ± 3.99	20.99 ± 2.44
DRD	+/+	1.47 ± 0.16	2.57 ± 0.37	2.06 ± 0.40	48.37 ± 6.45	23.67 ± 2.56
	-/-	1.38 ± 0.12	2.33 ± 0.29	1.43 ± 0.23	35.70 ± 3.46	17.39 ± 1.22*
MC	+/+	0.19 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.48 ± 0.05	10.38 ± 0.89	1.85 ± 0.18
	-/-	0.19 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.46 ± 0.03	10.76 ± 0.89	1.90 ± 0.15
Stri	+/+	15.84 ± 0.55	296.94 ± 21.99	21.47 ± 0.91	10.20 ± 1.22	6.00 ± 0.76
	-/-	15.96 ± 1.09	282.74 ± 20.76	21.06 ± 1.44	8.11 ± 0.60	5.77 ± 0.36
OB	+/+	1.24 ± 0.13	2.68 ± 0.14	1.92 ± 0.13	9.70 ± 1.09	2.81 ± 0.24
	-/-	1.02 ± 0.08	3.46 ± 0.24 *	1.51 ± 0.10 *	14.46 ± 0.72*	3.17 ± 0.12

数値は、 pmol/mg protein で示した (mean ± SEM. *p < 0.05 and **p < 0.01)

略語は以下の通りである。 G: genotype; DA: dopamine; DOPAC: dihydroxyphenylacetic acid; HVA: homovanillic acid; 5-HT: serotonin; 5-HIAA: 5-hydroxyindol acetic acid; 3-MT: 3-methoxytyramine; nd: not determined; basolateral nuclei of the amygdala (BLA), dorsal hippocampus (Hip-D), substantia nigra (SNR), ventral tegmental area (VTA), median raphe nucleus (MnR), dorsal region of the dorsal raphe nucleus (DRD), motor cortex (MC), striatum (Stri), olfactory bulb (OB).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Mariko Umemura, Tae Ogura, Ayako Matsuzaki, Haruo Nakano, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Yuji Takahashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Comprehensive Behavioral Analysis of Activating Transcription Factor 5-Deficient Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2017.00125	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 -

1. 著者名 Haruo Nakano, Yoshitaka Iida, Takahiro Murase, Natsuki Oyama, Mariko Umemura, Shigeru Takahashi, Yuji Takahashi	4. 巻 378
2. 論文標題 Co-expression of C/EBP and ATF5 in mouse vomeronasal sensory neurons during early postnatal development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 427-440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s00441-019-03070-2	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島原喜子, 梅村真理子, 大嶋梨乃, 中野春男, 高橋滋, 高橋勇二
2. 発表標題 Functional analysis of ATF5 in neuronal migration during cerebral cortex development in embryonic stage
3. 学会等名 NEURO2019（第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畑綾乃, 中野春男, 梅村真理子, 高橋滋, 高橋勇二
2. 発表標題 マウス腸管の生後発生における嗅覚受容体の発現解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子泰之, 梅村真理子, 金畑圭祐, 中野春男, 高橋滋, 高橋勇二
2. 発表標題 ATF5 is involved in the maintenance of the radial glia cells pool during cerebral cortex neurogenesis
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畑綾乃, 庄司大輝, 上坂望, 中野春男, 梅村真理子, 高橋滋, 高橋勇二
2. 発表標題 マウス腸管の嗅覚受容体発現に及ぼす高脂肪食の影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅村真理子, 小倉多恵, 金子泰之, 中野春男, 高橋滋, 高雄啓三, 宮川剛, 高橋勇二
2. 発表標題 Activating transcription factor 5 (ATF5) deficiency induces behavioral abnormality in mice
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中野春男, 粟野聖月, 古川愛子, 久保茉実, 平尾仁美, 梅村真理子, 高橋滋, 高橋勇二
2. 発表標題 ATF5調節性のmicroRNAによるマウス嗅細胞の分化誘導
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----