

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07087

研究課題名（和文）神経発達障害に起因する精神疾患の機序解明と新規治療基盤の確立

研究課題名（英文）Elucidation of role of NOX1/NADPH oxidase in the development of neurodevelopment disorders.

研究代表者

衣斐 督和 (Ibi, Masakazu)

金城学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：10336539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：自閉症様行動の発現における活性酸素産生酵素のNOX1/NADPHオキシダーゼの役割について解析を行なった。Nox1-KOと野生型マウスを比較することで、Poly(I:C)の投与による母体免疫活性化（MIA）は、仔獣でみられた社会性行動と協調運動の減少および小脳プルキンエ細胞の脱落に発達期のNOX1/NADPHオキシダーゼが関与することを見出した。本研究により自閉症スペクトラム（ASD）の発症に活性酸素とその産生源NOX1/NADPHオキシダーゼの重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神疾患は、遺伝要因と環境要因が相互作用して発症する高次脳機能障害である。近年その罹患率は増加しており、本疾患の克服が喫緊の課題となっている。本研究により、ASDの新たな発症機序に活性酸素産生酵素のNOX1/NADPHオキシダーゼが重要であることを見出した。本研究結果は、ASDの新たな治療薬開発に基礎的知見を提供できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of NOX1/NADPH oxidase, an enzyme generating reactive oxygen species, in the development of ASD using Nox1-deficient mice (Nox1-KO). In the MIA model of gestational polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) exposure, impairment of social preference and defects in motor coordination were observed in WT offspring but not in offspring deficient in Nox1. MIA up-regulated NOX1 mRNA in the cerebral cortex and cerebellum of the fetus but not in the adult offspring. Moreover, the dropout of Purkinje cells in lobule VII of MIA-affected offspring was significantly ameliorated in Nox1KO. Taken together, these results suggested that NOX1/NADPH oxidase plays an essential role in some behavioral phenotypes observed in ASD, possibly by promoting the loss of Purkinje cells in the cerebellum.

研究分野：神経薬理学

キーワード：発達障害 活性酸素種

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

精神疾患は遺伝要因と環境要因が相互作用して発症する高次脳機能障害である。近年その罹患率は増加しており、本疾患の克服が喫緊の課題となっている。剖検脳および動物モデルの知見から、精神疾患の病態に寄与する共通のシグナリング分子として活性酸素種(ROS)が注目されているが、その産生源は明らかではない。そこで申請者は触媒サブユニット NOX1 により構成される NADPH オキシダーゼに着目し、NOX1-KO マウスを用いてうつ様行動への NOX1 由来 ROS の寄与とその分子機構を明らかにした(Ibi et al., *J. Neurosci.* 2017)。さらに最近、ストレスや持続痛による不安様行動発現にも NOX1 が関与することを見出した(未発表)。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、神経発達障害により引き起こされる精神疾患様行動における NOX1 の役割を解析し、「諸種の精神疾患の発症・進展に関わる共通分子としての NOX1 の位置付けとその分子機構を明らかにする」ことである。

### 3. 研究の方法

#### 母体免疫活性化(MIA)の作製

妊娠 12.5 日の野生型(WT)または *Nox1* 遺伝子欠損(*Nox1*-KO)の雌マウスに 3mg/kg の poly(I:C)を腹腔内投与することで作製した。

#### 血清 IL-6 の測定

Poly(I:C)投与 3 時間後に血清を採取し、ELISA にて定量した。

#### 定量 PCR

常法に従って、NucleoSpinRNA (タカラバイオ)を用いて total RNA を抽出し、Prime Script RT Master Mix (タカラバイオ)にて cDNA を合成し、SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ)を用いて StepOne Plus を用いて定量 PCR を行なった。

#### 行動解析

社会性行動は 3 chamber sociability 試験で、協調運動は Rotarod 試験でそれぞれを評価した。

#### 免疫染色

4%パラホルムアルデヒドで還流固定した後、OCT コンパウンドで包埋し、凍結切片を作製した。その後、常法に従って蛍光免疫染色を行なった。

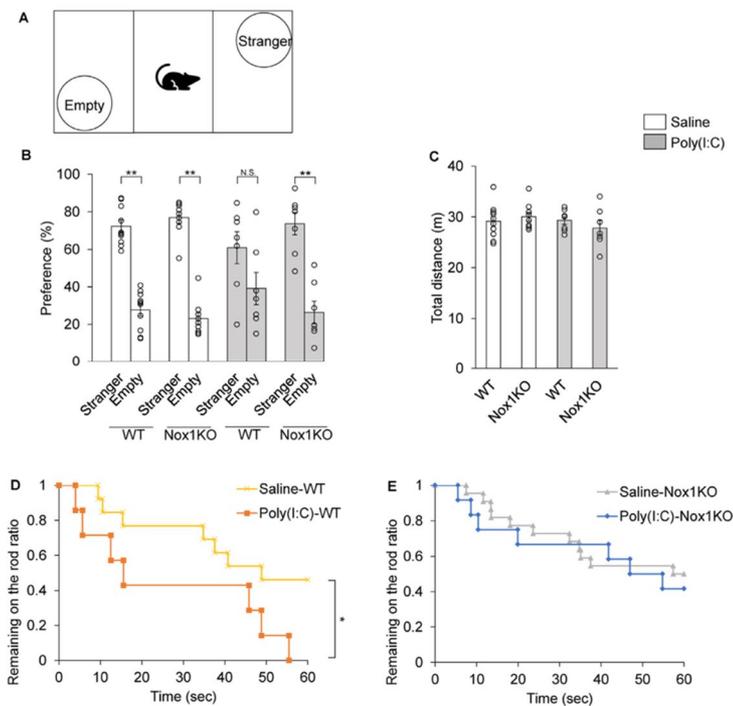
### 4. 研究成果

#### 1. poly(I:C)投与による母体免疫活性化(MIA)の誘導

妊娠 12.5 日目の野生型マウスおよび *Nox1*-KO マウスに poly(I:C)を腹腔内投与し、3 時間における血清 IL-6 を測定した。その結果、血清 IL-6 は poly(I:C)投与により有意に増加し、その増加は野生型(WT)マウスおよび *Nox1*-欠損(*Nox1*-KO)マウスにおいて差は認められなかった。この結果より両遺伝子群で、poly(I:C)投与による MIA は同程度誘導されることが示された。

#### 2. MIA による仔獣の社会性行動および協調運動の低下

次に、poly(I:C)投与を受けた妊娠マウスから生まれた仔獣を用いて、MIA による社会性行動および協調運動の低下における NOX1 の関与について解析した。MIA を受けた妊娠マウスから生まれた WT の仔獣では、3-chamber 試験における他のマウスへの接触回数の減少が認められ、MIA は WT マウスにおいて社会性行動を低下させることを示された。一方、*Nox1*-KO マウスでは認められなかった。さらに、Rota-Rod 試験において MIA は WT マウスの協調運動を低下させたが、この減少は *Nox1*-KO マウスでは認められなかった。



### 3. MIA による Nox 発現の誘導

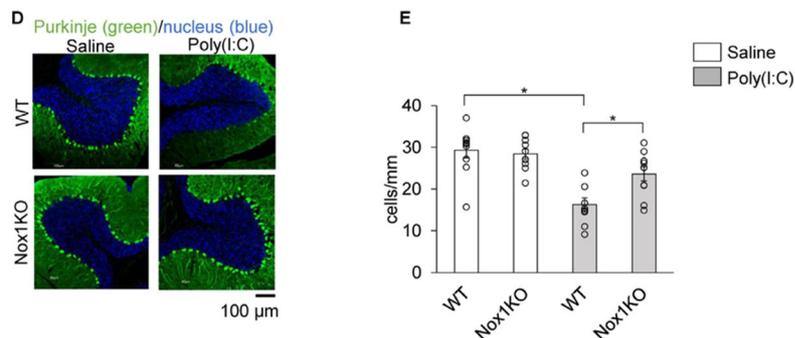
Poly(I:C)投与を受けた2日後の妊娠14.5日の胎仔脳におけるNox mRNA発現を定量PCRで解析した。その結果、Nox1 mRNAは小脳および大脳皮質で有意な発現増加が認められたが、Nox2 mRNAおよびNox4 mRNAの発現には変動が認められなかった。一方、MIAを受けた8週齢の仔獣の小脳および大脳皮質ではNox1 mRNAの発現増加は認められなかった。

### 4. MIA による大脳皮質の形態変化

発達障害では大脳皮質の神経層構造の乱れや興奮-抑制系の破綻が認められる。発達期における大脳皮質のSATB2陽性およびPV陽性ニューロンの減少とそれに続いて生じる仔獣での層構造の乱れが、仔獣の自閉症様行動の発現に関わることが報告されている。しかし、本MIAモデルでは、発達期の大脳皮質におけるSATB2 mRNAおよびPV mRNA陽性ニューロンの減少と、仔獣の大脳皮質の各層内におけるSATB2 mRNAおよびPV mRNA陽性ニューロン数の減少は認められなかった。次に、興奮および抑制の伝達に関わる受容体、グルタミン酸受容体(NR1, NR2A, GluA1, GluA2, GluA3)とGABA受容体(GABRA1, GABRA2, GABRB1, GABRB2)のmRNAを解析したところ、全ての遺伝子発現においてMIAによる変動が認められなかった。

### 5. MIA による小脳プルキンエ細胞の脱落

自閉症患者で認められている小脳プルキンエ細胞の脱落について着目し、MIAによるプルキンエ細胞の脱落におけるNOX1の関与について解析した。その結果、MIAはWTマウスのプルキンエ細胞を脱落させたが、Nox1-KOマウスではその脱落が抑制されていた。



以上の結果から、発達期の小脳におけるNox1/NADPHオキシダーゼの発現増加が、思春期における自閉症の発現に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Matsumoto M, Sawada H, Iwata K, Ibi M, Asaoka N, Katsuyama M, Shintani-Ishida K, Ikegaya H, Takegami S, Umemura A, Yabe-Nishimura C.	4. 巻 9
2. 論文標題 Bortezomib is an effective enhancer for chemical probe-dependent superoxide detection.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Med (Lausanne)	6. 最初と最後の頁 941180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.941180.	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 Kubota H, Yamada H, Sugimoto T, Wada N, Motoyama S, Saburi M, Miyawaki D, Wakana N, Kami D, Ogata T, Ibi M, Matoba S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Repeated Social Defeat Enhances CaCl <sub>2</sub> -Induced Abdominal Aortic Aneurysm Expansion by Inhibiting the Early Fibrotic Response via the MAPK-MKP-1 Pathway.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11040732.	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 Asaoka N, Ibi M, Hatakama H, Nagaoka K, Iwata K, Matsumoto M, Katsuyama M, Kaneko S and Yabe-Nishimura C	4. 巻 41
2. 論文標題 NOX1/NADPH Oxidase Promotes Synaptic Facilitation Induced by Repeated D2 Receptor Stimulation: Involvement in Behavioral Repetition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2121-2120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2121-20.2021.	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 -
1. 著者名 Matsumoto M, Liu J, Iwata K, Ibi M, Asaoka N, Zhang X, Katsuyama M, Matsuda M, Nabe T, Schroder K and Yabe-Nishimura C	4. 巻 146
2. 論文標題 NOX1/NADPH oxidase is involved in the LPS-induced exacerbation of collagen-induced arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 88-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.01.009.	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 該当する

1. 著者名 Sugimoto T, Yamada H, Wada N, Motoyama S, Saburi M, Hiroshi Kubota H, Miyawaki D, Wakana N, Kami D, Ogata T, Ibi M and Matoba S	4. 巻 10
2. 論文標題 Repeated Social Defeat Exaggerates Fibrin-Rich Clot Formation by Enhancing Neutrophil Extracellular Trap Formation via Platelet-Neutrophil Interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10123344.	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 Kubota H, Yamada H, Sugimoto T, Wada N, Motoyama S, Saburi M, Miyawaki D, Wakana N, Kami D, Ogata T, Ibi M, Matoba S	4. 巻 11
2. 論文標題 Repeated Social Defeat Enhances CaCl <sub>2</sub> -Induced Abdominal Aortic Aneurysm Expansion by Inhibiting the Early Fibrotic Response via the MAPK-MKP-1 Pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11040732.	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 Motoyama S, Yamada H, Yamamoto K, Wakana N, Kikai M, Wada N, Saburi M, Sugimoto T, Kubota H, Miyawaki D, Kami D, Ogata T, Ibi M, Yabe-Nishimura C and Matoba S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Social stress increases vulnerability to high-fat diet-induced insulin resistance by enhancing neutrophil elastase activity in adipose tissue.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9040996. Social Stress Increases Vulnerabil	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 Katsuyama M, Kimura E, Ibi M, Iwata K, Matsumoto M, Asaoka N and Yabe-Nishimura C.	4. 巻 95
2. 論文標題 Clioquinol inhibits dopamine-beta-hydroxylase secretion and noradrenaline synthesis by affecting the redox status of ATOX1 and copper transport in human neurobla	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch Toxicol.	6. 最初と最後の頁 135 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-020-02894-0.	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 -

1. 著者名 Zhang X, Ibi M, Haga R, Iwata K, Matsumoto M, Asaoka N, Liu J, Katsuyama M and Yabe-Nishimura C.	4. 巻 534
2. 論文標題 NOX1/NADPH oxidase affects the development of autism-like behaviors in a maternal immune activation model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bochem Biophys Res Commun .	6. 最初と最後の頁 59-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.070.	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 衣斐督和
2. 発表標題 精神疾患様行動を制御するNADPHオキシダーゼ
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
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	浅岡 希美  (Asaoka Nozomi)  (90826091)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教    (24303)	

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