

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06594

研究課題名(和文)性差解析を通じた自閉スペクトラム症の病態分子基盤の解明

研究課題名(英文)Clarification of the molecular pathogenesis of autism spectrum disorders through the analysis regarding sex differences

研究代表者

田熊 一敞 (Takuma, Kazuhiro)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：90289025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者らが自閉スペクトラム症(ASD)マウスモデルとして確立した「“雄性”の胎仔期VPA曝露マウス」と、ASD様行動が誘導されなかった“雌性”の胎仔期VPA曝露マウスとの“性差”を指標として、ASDの中核症状様行動の発現に関わる誘導分子あるいは抑制分子を解明することを目的とした。まず、胎生12.5日目のVPA曝露が、雄性仔マウスにおいてのみ社会性行動の低下を引き起こすことを確認した。VPA曝露6時間後の雌雄の胎仔マウスの大脳皮質より調製したtotal RNAを用いてRNAシーケンシング法により遺伝子発現の網羅的解析を行い、有意な増減を示す数十個の分子を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の疫学調査より、ASD発症が遺伝的要因だけでは説明できないことが明らかとされ、特に、胎児期の母体の感染や薬物摂取、および産科的合併症など胎生期・周産期の母体環境要因が注目されている。さらにこの4-5年は、遺伝的要因および環境要因とともに“性差”に関する報告が急増しており、“性差”の観点からASDの病態解明にアプローチしようとする研究の潮流が起きている。したがって、“性差”を指標としてASDの病態分子基盤にアプローチを試みた本研究は国内外の動向と一致するものであり、その成果は、ASDの病態研究の発展と新たな治療薬の開発に貢献しうる学術的ならびに社会的意義の高いものと評価される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the inducing or suppressing molecules involved in the expression of core symptom-like behaviors of autism spectrum disorder (ASD) using the indicators "sex differences" between male and female mice prenatally exposed to VPA, in which the research group of principal investigator established the male VPA-exposed mice as an ASD model. At first, we confirmed that prenatal VPA exposure caused a decrease in social behavior only in male offspring. We further prepared total RNA from the cerebral cortex of male and female mouse embryos at 6 hours after VPA exposure, performed a comprehensive analysis of gene expression using RNA sequencing method, and then detected several dozen molecules that showed significant increases and decreases. Furthermore, we will pick up and identify molecules related to ASD onset from the molecules detected by RNA sequence analysis.

研究分野：神経薬理学

キーワード：自閉スペクトラム症 パルプロ酸 性差 マウス 社会性障害

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、2000年代の終わりに報告された「妊娠中の抗てんかん薬服用により出生児において自閉スペクトラム症 (ASD) の発症リスクが増大する」という臨床知見 (Bromley et al., 2008) に着目し、「胎仔期バルプロ酸 (VPA) 曝露マウス」を作製して、その ASD モデルマウスとしての有益性を示し、また、その研究過程において、雄性の胎仔期 VPA 曝露マウスにのみ ASD 様の社会性行動の低下や大脳皮質の器質的および機能的変化が生じていることを見いだしていた (Hara et al., 2012; Kataoka et al., 2013; Takuma et al., 2014; Hara et al., 2015). 胎仔期 VPA 曝露による ASD モデルマウスの確立の後、研究代表者らは ASD の中核症状様の行動異常を改善する新たな薬物療法の開発に注力してきた (Takuma et al., 2014; Hara et al., 2016; Hara et al., 2017a; Hara et al., 2017b; Yamaguchi et al., 2017; Kawase et al., 2019) が、ASD 治療の新たな創薬標的分子の発見には至っていなかった。一方で、胎仔期 VPA 曝露マウスの確立当初より、本モデルマウスが臨床所見と同様に雄性で ASD 様症状の発現率が高いという「性差」を示すことを見いだしていた (Kataoka et al., 2013). そこで、この数年の ASD 研究の潮流を鑑みながら研究代表者らの成果を改めて見直したところ、「どのようにして VPA は雄性の出生仔だけに ASD の中核症状様の行動変化を惹起するのか?」という研究課題の核心をなす学術的「問い」に至ったことが研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが ASD マウスモデルとして確立した「雄性」の胎仔期 VPA 曝露マウス」と、ASD 様行動が誘導されなかった「雌性」の胎仔期 VPA 曝露マウスにおいて、VPA 曝露後の胎仔～出生仔の脳内における神経生化学的および神経解剖学的変化を比較解析し、「性差」を指標として、ASD の中核症状様行動の発現に関わる誘導分子あるいは抑制分子を解明することを目的とする。また、その成果を基に ASD の新たな薬物療法を追究することを目的とした。

なお、所属部局の耐震改修工事と本研究計画の実施期間の一部が重なっており、妊娠動物の作製に影響 (騒音と粉塵) が及ぶ期間があった。その間の代替え実験として、成体マウスを用いてストレス感受性の性差を検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

雌性および雄性の ICR 系マウス (7 週齢) を日本エスエルシー株式会社より購入して用いた。マウスは明期・暗期それぞれ 12 時間の条件下で飼育し、実験開始までの飼育期間は自由に飲水および節餌が行えるようにした。

(2) ASD モデルマウスの作製

妊娠 12.5 日目に 500 mg/kg の VPA を腹腔内投与した ICR 系マウス由来の胎仔および出生仔を用いた。対照群として生理食塩水を投与した妊娠マウス由来の胎仔および出生仔を用いた。生後 3 週齢時に母子分離を行い、雌雄別々に 1 ケージ 5-7 匹で群飼育した。

(3) 拘束ストレス負荷マウスの作製

拘束ストレスは、呼吸および体温調節ができるように先端部と側面部に穴を開けた 50 mL の

プラスチック製遠沈管にマウスを入れ、飼育ケージ内に静置することで負荷をした。単回ストレス群は 30 分の拘束ストレスを 1 回だけ負荷した。反復ストレス群は 1 日 4 時間の拘束ストレスを 5 日負荷した、反復ストレス群においては、マウスの健康状態の確認を含めた基礎的データの収集のため、ストレス負荷後に毎回体重を測定することとする。

(4) 抑うつ様行動の解析

マウスの抑うつ様行動の変化は強制水泳試験により解析した。被験マウスを水深 13.0 cm (水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$) としたアクリル製シリンダー (直径 19.0 cm, 高さ 25.0 cm) 内へ静かに入れ、6 分間の行動をビデオ録画した。「水面に浮く為の最小限度の行動を除いた静止状態」を無動と定義し、6 分間に観察される無動の総時間を手動で計測した。

(5) 血漿コルチコステロン量の測定

血漿標品を行動解析後のマウスより調製し、血漿コルチコステロン量を Corticosterone ELISA Kit (Cayman Chemical 社製) を用いて定量した。

(6) 性ホルモン関連分子の発現変動の解析

主に脳由来標品を用いて、性ホルモン関連分子 (アンドロゲン受容体, エストロゲン受容体, アロマターゼ, テストステロン, エストラジオールなど) の発現変動を Real-time PCR 法ならびに ELISA 法 (あるいは Western blot 法) により解析した。

(7) ASD モデルマウスの行動解析

ASD モデルマウスの行動解析は 8 週齢時に行い、自発運動量はオープンフィールド試験、不安様行動は高架式十字迷路試験、ならびに社会性行動は resident-intruder 相互作用試験によりそれぞれ評価した。

(8) 胎仔脳における遺伝子発現量変化

胎仔脳における mRNA および microRNA 発現量変化の網羅的解析は、VPA 曝露 6 時間後の各胎仔の大脳皮質より total RNA を調製し、大阪大学微生物学研究所に委託し RNA シークエンシング法により行った。なお、胎仔の雌雄は尾より抽出したゲノム DNA の PCR により決定した。

(9) 統計解析

データは全て「平均値 \pm 標準誤差」として求め、統計解析ソフト GraphPad Prism 10 for Mac を用いて比較検定を行った。2 群の比較検定は unpaired *t*-test により、多重比較検定は two-way ANOVA の後、Bonferroni's multiple comparison test によりを行った。なお、有意水準は $P < 0.05$ とした。

4. 研究成果

(1) 急性拘束ストレスが雌雄マウスの血漿コルチコステロン濃度および抑うつ様行動に及ぼす影響

単回の急性拘束ストレス (30 分, 1 回) を負荷した雄性マウスは、対照群と比べて、血漿コルチコステロン濃度の増加傾向を示した (Fig. 1A, $P = 0.072$, $n = 6$) が、強制水泳試験における無動時間に有意な変化は認められなかった (Fig. 1B, $P = 0.29$, $n = 6$)。一方、雌性マウスにおいては、

急性拘束ストレスは血漿コルチコステロン濃度を有意に増加させ (Fig. 2A, $P < 0.05$, $n = 6$), また強制水泳試験における無動時間を有意に減少させた (Fig. 2B, $P < 0.05$, $n = 6$).

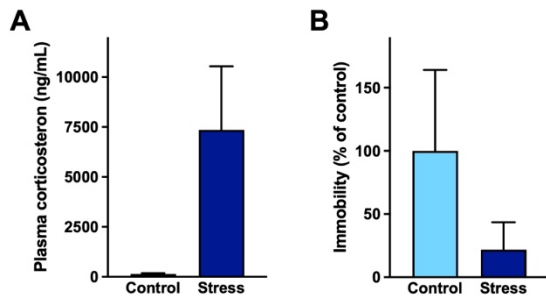


Fig. 1. Effects of acute restraint stress on plasma corticosterone level (A) and depressive behaviors (B) in male ICR mice.

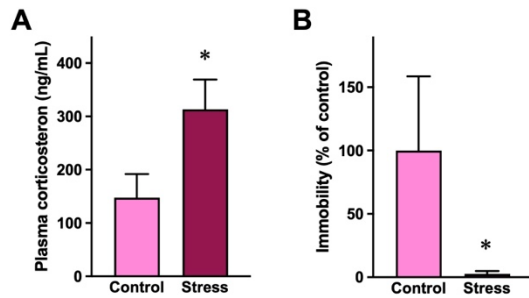


Fig. 2. Effects of acute restraint stress on plasma corticosterone level (A) and depressive behaviors (B) in female ICR mice. * $P < 0.05$, vs. Control.

(2) 慢性拘束ストレスが雌雄マウスの体重, 血漿コルチコステロン濃度および抑うつ様行動に及ぼす影響

5日間の慢性拘束ストレス (1日あたり4時間) により, 雄雌マウスともに体重増加量の低下が認められた (雄: Fig. 3A, $P < 0.05$, $n = 6$; 雌: Fig. 4A, $P < 0.05$, $n = 6$). また, 慢性拘束ストレス後の血漿コルチコステロン濃度は, 雌雄ともに対照群と比べて差はなく, 性差も認められなかった (図に示さず). 一方, 強制水泳試験において, 慢性拘束ストレスは雄性マウスの行動には影響を及ぼさず, 雌性マウスの不動時間を増加させる傾向を示した (雄: Fig. 3B, $P = 0.86$, $n = 6$; 雌: Fig. 4B, $P = 0.088$, $n = 6$). さらに予備実験して行ったオープンフィールド試験において, 慢性拘束ストレスが雌マウスの不安行動に有意に増加させることを観察した (図に示さず).

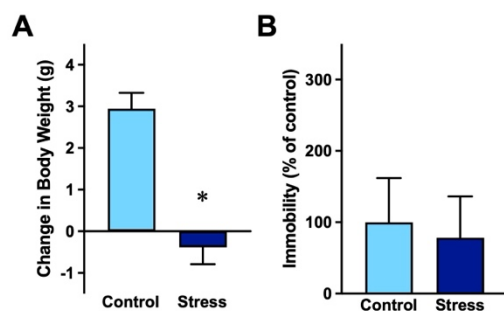


Fig. 3. Effects of chronic restraint stress on body weight (A) and depressive behaviors (B) in male ICR mice. * $P < 0.05$, vs. Control.

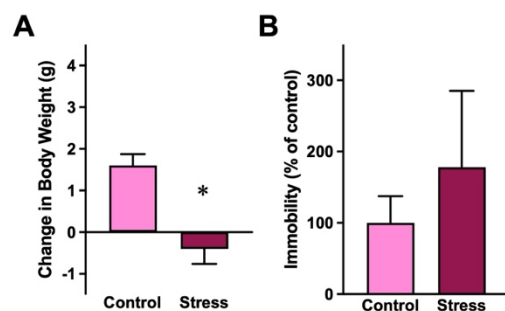


Fig. 4. Effects of chronic restraint stress on body weight (A) and depressive behaviors (B) in female ICR mice. * $P < 0.05$, vs. Control.

(3) 慢性拘束ストレスが雌雄マウスの性ホルモン関連分子およびストレス関連分子の発現量に及ぼす影響

5日間の慢性拘束ストレス (1日あたり4時間) を負荷したマウスの前頭皮質より調製した標品を用いた real-time PCR 解析では, エストロゲン受容体- α , オキシトシンおよび BDNF のい

れの mRNA 量においても，雌雄ともに慢性拘束ストレスの影響は認められなかった (図に示さず).

(4) 胎仔期 VPA 曝露が出生仔マウスの行動に及ぼす影響

既報 (Kataoka et al., 2013) と同様に，妊娠 12.5 日目の VPA 投与が，雄性仔マウスにおいて自発行動量の減少と社会性行動の低下を示すことを確認した (図に示さず). また雌性仔マウスは社会性行動の低下を示さないことを確認した (図に示さず).

(5) VPA 曝露が胎仔マウス脳の前遺伝子発現に及ぼす影響

VPA 曝露 6 時間後の雌雄胎仔マウスの大脳皮質より調製した total RNA を用いて RNA シークエンシング法によって遺伝子発現の網羅的解析を行った. その結果，統計学的に有意な増減を示す数十個の分子を検出した (Saline vs. VPA exposure: Fig. 5 A; VPA-exposed male vs. VPA-exposed female; Fig. 5B).

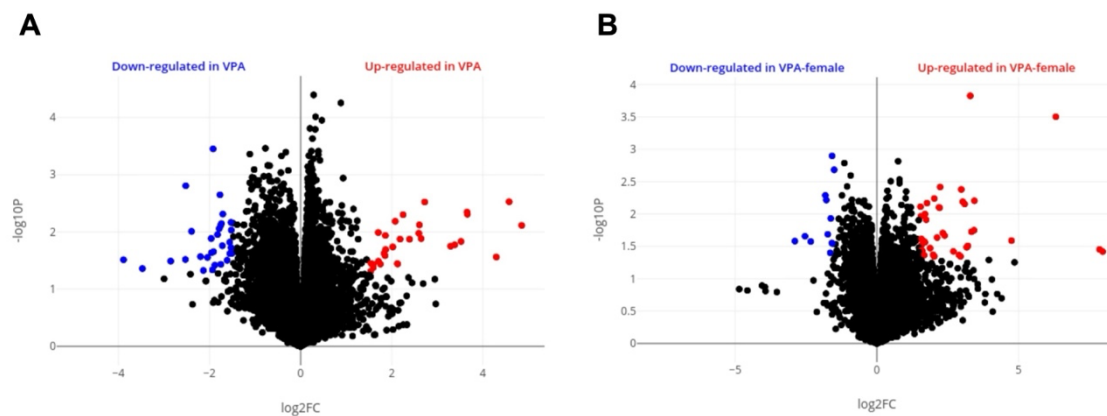


Fig. 5. Volcano Plot. The figure contains an interactive scatter plot which displays the log2-fold changes and statistical significance of each gene calculated by performing a differential gene expression analysis. (A) Saline ♂♀ vs. VPA ♂♀; (B) VPA ♂ vs. VPA ♀. Red points : significantly up-regulated genes; Blue points : down-regulated genes.

<引用文献>

- Bromley RL, Mawer G, Clayton-Smith J, et al. (2008) *Neurology*, 71, 1923–1924.
Hara Y, Maeda Y, Kataoka S, et al. (2012) *J. Pharmacol. Sci.*, 118, 543–546.
Hara Y, Takuma K, Takano E, et al. (2015) *Behav. Brain Res.*, 289, 39–47.
Hara Y, Ago Y, Taruta A, et al. (2016) *Autism Res.*, 9, 926–939.
Hara Y, Ago Y, Taruta A, et al. (2017a) *Psychopharmacology (Berl)*, 234, 3217–3228.
Hara Y, Ago Y, Higuchi M, et al. (2017b) *Horm. Behav.*, 96, 130–136.
Kataoka S, Takuma K, Hara Y, et al. (2013) *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 16, 91–103.
Kawase H, Ago Y, Naito M, et al. (2019) *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 176, 1–5.
Takuma K, Hara Y, Kataoka S, et al. (2014) *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 126, 43–49.
Yamaguchi H, Hara Y, Ago Y, et al. (2017) *Behav. Brain Res.*, 333, 67–73.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takemoto T, Baba M, Yokoyama K, Kitagawa K, Nagayasu K, Ago Y, Seiriki K, Hayata-Takano A, Kasai A, Mori D, Ozaki N, Takuma K, Hashimoto R, Hashimoto H, Nakazawa T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Oxytocin ameliorates impaired social behavior in a mouse model of 3q29 deletion syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-022-00915-w	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 Imado E, Sun S, Abawa AR, Tahara T, Kochi T, Huynh TNB, Asano S, Hasebe S, Nakamura Y, Hisaoka-Nakashima K, Kotake Y, Irifune M, Tsuga K, Takuma K, Morioka N, Kiguchi N, Ago Y.	4. 巻 160
2. 論文標題 Prenatal exposure to valproic acid causes allodynia associated with spinal microglial activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2022.105415	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 Shintani Y, Hayata-Takano A, Yamano Y, Kuta M, Takeshita R, Takuma K, Okada T, Toyooka N, Takasaki I, Miyata A, Kurihara T, Hashimoto H.	4. 巻 631
2. 論文標題 Small-molecule non-peptide antagonists of the PACAP receptor attenuate acute restraint stress-induced anxiety-like behaviors in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 146-151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.09.079	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 Ishida K, Tatsumi K, Minamigawa Y, Mori K, Matsumaru D, Nagase H, Kanda Y, Takuma K, Nakanishi T.	4. 巻 206
2. 論文標題 Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting in vivo developmental neurotoxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2022.115332	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 田熊 一敞	4. 巻 12
2. 論文標題 バルブロ酸の胎内曝露による発達障害モデルの作製と新規薬物療法の追究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 子どものこころと脳の発達	6. 最初と最後の頁 26-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34572/jcbd.12.1_26	査読の有無 無
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 Yamamoto K, Kuriu T, Matsumura K, Nagayasu K, Tsurusaki Y, Miyake N, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Fujiwara M, Baba M, Kitagawa K, Takemoto T, Gotoda-Nishimura N, Takada T, Seiriki K, Hayata-Takano A, Kasai A, Ago Y, Kida S, Takuma K, Ono F, Matsumoto N, Hashimoto R, Hashimoto H, Nakazawa T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Multiple alterations in glutamatergic transmission and dopamine D2 receptor splicing in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with familial schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-021-01676-1	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吾郷由希夫, 今戸瑛二, Samnang Sun, 中村庸輝, 中島一恵, 森岡徳光, 田熊一敞, 木口倫一, 浅野智志
2. 発表標題 マウス胎生期のバルブロ酸曝露は脊髄でのミクログリアの増殖とアロディニアを引き起こす
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吾郷由希夫, 内藤恵, 川瀬啓生, 樋口桃子, 山川英訓, 大波壮一郎, 小川公一, 中邨篤史, 河内貴弘, 今戸瑛二, 田原孟, 浅野智志, 古武弥一郎, 田熊一敞, 橋本均
2. 発表標題 鎮痛作用を示さない低用量 μ オピオイド受容体アゴニストは自閉スペクトラム症モデルマウスの社会性行動障害を改善する
3. 学会等名 BPCNP4学会合同年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kitagawa K, Baba M, Takemoto T, Tanuma M, Hayashida M, Yamaguchi S, Ago Y, Seiriki K, Hayata-Takano A, Takuma K, Kasai A, Hashimoto H, Nakazawa T
2. 発表標題 Intranasal oxytocin administration suppresses social contact-induced neural activity in a POGZ-Q1038R mutant mouse model of autism spectrum disorder
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (The 51st Annual Meeting of the Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田原孟, 今戸瑛二, 川瀬啓生, 樋口桃子, 山川英訓, 小川公一, 古武弥一郎, 田熊一敞, 橋本均, 浅野智志, 吾郷由希夫
2. 発表標題 TRPV1アンタゴニストAMG517は胎生期パルプロ酸投与誘発の自閉症モデルマウスにおいて痛覚感受性の異常と社会性行動障害を改善する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 (JPW2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹本智哉, 馬場優志, 北川航平, 永安一樹, 勢力薫, 早田敦子, 笠井淳司, 吾郷由希夫, 田熊一敞, 橋本亮太, 橋本均, 中澤敬信
2. 発表標題 ヒト染色体3q29領域欠失を導入した自閉スペクトラム症モデルマウスの社会行動異常はオキシトシンの投与により回復する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 瀬尾慧, 笠井淳司, 植野寛貴, 中井悠花, 島崎雄人, 田沼将人, 馬場優志, 吉永怜史, 大久保仁, 勢力薫, 田熊一敞, 久保健一郎, 橋本均
2. 発表標題 誕生日タグづけ法を用いた胎仔期パルプロ酸暴露による大脳皮質細胞分布異常の全脳解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今戸瑛二, 浅野智志, 中村庸輝, 中島一恵, 森岡徳光, 津賀一弘, 入船正浩, 田熊一敞, 吾郷由希夫
2. 発表標題 胎生期バルプロ酸投与マウスは熱刺激およびカプサイシン誘発痛の増大と機械的アロディニアを示す
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹本智哉, 馬場優志, 北川航平, 永安一樹, 勢力薫, 早田敦子, 笠井淳司, 吾郷由希夫, 田熊一敞, 橋本均, 中澤敬信
2. 発表標題 ヒト染色体3q29領域欠失を導入した自閉スペクトラム症モデルマウスの社会性行動異常はオキシトシンの投与により回復する
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今戸瑛二, Samnang Sun, Abawa Abrar, 浅野智志, 中村庸輝, 中島一恵, 森岡徳光, 津賀一弘, 入船正浩, 田熊一敞, 木口倫一, 吾郷由希夫
2. 発表標題 神経発達障害モデルマウスにおける機械的アロディニアの発症とミクログリアの関与
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠井淳司, 彌永祐輔, 植野寛貴, 中井悠花, 原雄大, 三浦大樹, 田沼将人, 林田美鈴, 横山玲, 大久保仁, 勢力薫, 早田敦子, 山口瞬, 北岡志保, 古屋敷智之, 吾郷由希夫, 中澤敬信, 田熊一敞, 橋本均
2. 発表標題 ASDモデルマウスの社会性行動と前頭前皮質の機能異常
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〕

大阪大学大学院 歯学研究科 薬理学講座
<https://web.dent.osaka-u.ac.jp/pharm/index.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
研究分担者	松崎 伸介 (Matsuzaki Shinsuke) (60403193)	森ノ宮医療大学・保健医療学部・教授 (34448)	

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