

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：32658

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18655

研究課題名（和文）iPS細胞技術及び疾患モデルマウスを用いた環境要因の脳機能への影響の分子病態解析

研究課題名（英文）Molecular analysis of the effects of environmental factors on higher brain function using iPSC technology and mice

研究代表者

中澤 敬信（Nakazawa, Takanobu）

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：00447335

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：自閉スペクトラム症は、その発症に遺伝的要因のみならず、様々な環境要因が関与しているのではないかと考えられていますが、そのメカニズムは不明な点が多く残されています。本研究では、妥当性の高い疾患モデルマウスを用いて環境要因に関する研究を推進しました。具体的には、母マウスの飼育環境を豊かにすることにより、疾患モデル新生仔マウスの社会性行動異常や神経系細胞の発達異常が回復することを示唆するデータを得ました。これらの結果は、母マウスの飼育環境が胎子の脳発達や脳機能に影響を与える可能性を示唆するものです。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、環境要因というファクターが脳機能、特に社会性行動の制御機構や脳発達に与える影響の一端が分子レベルで明らかになりました。本研究結果から、自閉スペクトラム症の分子病態のみならず、環境要因に関する分子レベルの理解、及び自閉スペクトラム症の創薬に貢献する基礎データを提供することができたと考えられます。本研究結果は、社会的急務の自閉スペクトラム症の解決を加速することが期待される点で学術的意義が大きいものです。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of onset for autism spectrum disorder remains largely unknown. In this study, we are focusing on environmental factors using a disease-model mouse with high validity for autism spectrum disorder. Specifically, we found that enriching the breeding environment of mother mice resulted in the recovery of social behavioral abnormalities and developmental abnormalities in the nervous system of neonatal disease model mice. Taken Together, we provided data that contributes to understanding the molecular and cellular pathogenesis of autism spectrum disorder and molecular mechanism behind environmental factors, as well as therapeutic interventions for autism spectrum disorder.

研究分野：神経科学

キーワード：3q29領域欠失 疾患モデルマウス ultrasonic vocalization 環境エンリッチメント 環境要因 自閉スペクトラム症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症は社会的相互作用やコミュニケーションの障害を主な症状とする頻度の高い神経発達障害ですが、病因や病態の分子メカニズムは不明な点が多く残されており、未だに治療薬は存在しません。我々は、自閉スペクトラム症の分子病態を明らかにすべく、病態に直結する効果サイズが大きいと考えられる変異に関する分子病態解析を推進してきました (*Neuropsychopharmacol*, 2019; *Nat Commun*, 2020, 他)。我々は、これまでに基礎研究の報告がほとんどないですが、疾患に対するオッズ比が約 60 以上と精神疾患分野ではほぼ最大であり、疾患との関連性が強く示唆されている 3q29 欠失変異について、先駆的に研究を推進しており、3q29 領域と相同な領域に欠失を導入した疾患モデルマウスにおいて、神経細胞の発達異常や、社会性行動の異常といった自閉スペクトラム症様の異常を見いだしています (*Neuropsychopharmacol*, 2019; *Mol Brain*, 2022)。また、3q29 領域欠失をもつ患者から iPSC 細胞を独自に樹立し、分化神経細胞における神経発達異常やシナプス機能異常を見いだしています。我々の研究から、3q29 領域欠失により、神経細胞の発達の最初期過程に異常が引き起こされることが明らかになりつつありますが、その分子病態は不明な点が多く残されています。

自閉スペクトラム症などの神経発達障害は遺伝的要因だけではその発症を説明できない可能性が考えられており、近年、様々な環境要因が遺伝的要因と複雑に絡み合って発症するのではないかと考えられています。具体的には、母体への感染とそれに対する免疫反応、出生時の障害、胎児期栄養、環境汚染物質による影響などが指摘されています。それらの分子基盤として、エピジェネティクスや炎症性サイトカイン等が考えられていますが、不明な点が多く残されています。そのような背景のもと、環境要因を悪化させることによって自閉スペクトラム症様異常が出現するといった方向性の研究が推進されてきていますが、環境要因を改善することによって自閉スペクトラム症の解決をめざすという方向性の研究は、まだまだ発展途上です。

発達障害である自閉スペクトラム症は、胎児期の神経発達の異常が主な原因の 1 つとして考えられていることから、母マウスの環境要因と疾患モデル胎仔マウスの脳機能との関連性を分子レベルで明らかにすることによって、自閉スペクトラム症の分子レベルの理解のみならず、不明な点が多い環境要因を分子レベルで記述すること、及び自閉スペクトラム症の新規分子メカニズムに基づく創薬に貢献する基礎データを提供することが可能になると考えられます。

## 2. 研究の目的

自閉スペクトラム症は社会的相互作用やコミュニケーションの障害を主な症状とする頻度の高い神経発達障害ですが、病因や病態の分子メカニズムは不明な点が多く残されています。近年、遺伝的要因のみならず環境要因が自閉スペクトラム症と関連している可能性が注目されていますが、環境要因が脳機能に影響を与える分子メカニズムは明確になっていません。本研究では、我々が独自に開発した「患者と同じ変異を導入した」ヒト型自閉スペクトラム症モデルマウス群 (*Neuropsychopharmacol*, 2019; *Nature Commun*, 2020) を用いて、不明な点が多い環境エンリッチメントといった環境要因を分子レベルで記述することのみならず、急務である自閉スペクトラム症の新規メカニズムに基づいた創薬に貢献する基礎データの提供をめざします。

我々は、健常者両親には存在せず患者に突然生じる *de novo* 染色体コピー数変異は研究が進んでいる遺伝性の変異とは違い、選択圧を受けておらず自閉症の発症に大きく寄与すると考えており、疾患に対するオッズ比 (病気への罹りやすさ) が 60 以上と、精神疾患分野ではほぼ最

大であり、疾患と強く関連していると考えられる 3q29 領域欠失モデル等に注目しています。これまでの研究から、およそ 20 遺伝子のヘテロ欠失が生じる 3q29 欠失変異により、神経細胞の発達の最初期過程の異常やコミュニケーション障害等の自閉スペクトラム症様の行動異常が引き起こされることが明らかにしてきました。さらに我々は、患者と同様の遺伝子領域欠失を導入することにより、患者の変異を忠実に再現したヒト型疾患モデルマウス（3q29 欠失マウス）に見いだしている自閉スペクトラム症様異常を妊娠時の母マウスに介入することによって回復させる研究を推進してきました。予備的に、仔マウスの 3q29 領域欠失内の遺伝子群の発現が母マウスの環境エンリッチメントにより変動することを見いだしています。本研究では、すでに自閉スペクトラム症様行動異常があることを明らかにしている 3q29 欠失マウスを題材として、母マウスの環境エンリッチメントと仔マウスのコミュニケーション異常との関連性の分子メカニズムを明らかにします。本研究は、環境要因というファクターが脳機能、特に社会性行動の制御機構に与える影響を分子・シナプス・神経回路レベルで詳細に記述するところに新奇性があり、自閉スペクトラム症のこれまでにない新奇の分子病態を明らかにできるのみならず、自閉スペクトラム症の創薬を加速することに貢献する基礎データが蓄積されることが期待されます。

### 3．研究の方法

本研究では、3q29 欠失マウスの超音波発声や社会性行動といったコミュニケーション異常の表現型が、母マウスの環境エンリッチメントにより回復することを調べるとともに、環境エンリッチメント下で飼育した母マウスから産まれた仔マウスの脳内の変化を分子レベルで明らかにします。また、分子レベルのみならず、神経回路レベルの研究を実施し、環境要因の操作により自閉スペクトラム症様行動異常が回復するメカニズムを詳細に明らかにします。以上の解析から、環境要因を礎とした自閉スペクトラム症の解決のための基礎データを提供します。具体的には以下の研究計画を推進しました。

3q29 領域欠失ヒト型疾患モデルマウスの環境要因を考慮した行動試験：母マウスを環境エンリッチメント下で飼育することにより、仔マウス（3q29 欠失マウス）の社会性行動異常の表現型が回復するか検討しました。

環境要因の操作による自閉症様行動異常の回復に関わる分子・シナプス・神経回路レベルの解析：環境エンリッチメント下で飼育した母マウスから産まれた仔マウスの脳内の変化を分子・シナプス・神経回路レベルで解析しました。すでに、予備的に見いだしている仔マウスの 3q29 領域欠失内の遺伝子群の発現が母マウスの環境エンリッチメントにより変動するメカニズムの一端も解析しました。

### 4．研究成果

(1) 妊娠期の母体に環境エンリッチメント処理を施し、その後、産仔の生後3日目における社会性行動を測定しました。社会性行動として、仔マウスが母マウスに対してコミュニケーションする際に発する鳴き声 (ultrasonic vocalization; USV) に注目しました。その結果、母体の環境エンリッチメント処置により、産仔 (3q29欠失マウス) のUSV異常が回復することが明らかになりました。

(2) USVについて、さらに詳細に解析したところ、3q29欠失マウスでは複雑なcallパターンの割合が減少していることが明らかになりました。また、母体の環境エンリッチメント処置により、複雑なcallパターンの割合が野生型マウスのものと同程度まで回復することが明らかになりました。複雑なcallパターンの割合は、脳の発達レベルと関連することが示唆されており、この結果は、母体の環境エンリッチメント処置により、胎児マウスの脳発達が回復することを示唆しています。

( 3 ) 母体の環境エンリッチメント処置が産仔の脳機能に影響を与える分子基盤の一つとして、産仔の脳内のmRNA発現ネットワークが変化する可能性が考えられます。そこで、環境エンリッチメント処置を施した母体由来の産仔(生後7日目)の全脳RNAサンプルを用いた網羅的RNA発現解析を実施しました。その結果、最初期遺伝子の発現上昇や細胞分裂や運命決定に関わるタンパク質をコードする遺伝子、あるいは細胞内情報伝達を仲介するシグナル分子群をコードする遺伝子などの発現量に異常があることが明らかになりました。

( 4 ) USV実験の結果より、母体の環境エンリッチメント処置により、3q29欠失マウスの脳発達異常が回復することが示唆されました。網羅的RNA発現解析結果のさらなる詳細な解析を推進したところ、母体の環境エンリッチメント処置により、3q29欠失マウスの各種神経細胞マーカーの発現量が野生型マウスのものと同レベルまで回復することが明らかになりました。この結果は、各種神経細胞の発達が、母体の環境エンリッチメント処置により影響を受けることを示唆しています。

## 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 9件）

1. 著者名 Yokoyama Rei, Higuchi Momoko, Tanabe Wataru, Tsukada Shinji, Igarashi Hisato, Seiriki Kaoru, Nakazawa Takanobu, Kasai Atsushi, Ago Yukio, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 154
2. 論文標題 Long-lasting anti-despair and anti-anhedonia effects of (S)-norketamine in social isolation-reared mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 72 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2023.12.005	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 Hirato Yumi, Seiriki Kaoru, Kojima Leo, Yamada Shohei, Rokujo Hiroki, Takemoto Tomoya, Nakazawa Takanobu, Kasai Atsushi, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Clozapine Induces Neuronal Activation in the Medial Prefrontal Cortex in a Projection Target-Biased Manner	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 478 ~ 485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00898	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 Yokoyama Rei, Ago Yukio, Igarashi Hisato, Higuchi Momoko, Tanuma Masato, Shimazaki Yuto, Kawai Takafumi, Seiriki Kaoru, Hayashida Misuzu, Yamaguchi Shun, Tanaka Hirokazu, Nakazawa Takanobu, Okamura Yasushi, Hashimoto Kenji, Kasai Atsushi, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 (R)-ketamine restores anterior insular cortex activity and cognitive deficits in social isolation-reared mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41380-024-02419-6	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 Asano Satoshi, Ono Ami, Baba Kaede, Uehara Teru, Sakamoto Kotaro, Hayata-Takano Atsuko, Nakazawa Takanobu, Yanamoto Souichi, Tanimoto Kotaro, Hashimoto Hitoshi, Ago Yukio	4. 巻 154
2. 論文標題 Blockade of vasoactive intestinal peptide receptor 2 (VIPR2) signaling suppresses cyclin D1-dependent cell-cycle progression in MCF-7 cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 139 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2024.01.002	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 Mori Daisuke, Ikeda Ryosuke, Sawahata Masahito, Nakazawa Takanobu, Hashimoto Ryota, Kaibuchi Kozo, Kume Kazuhiko, Yamada Kiyofumi, Ozaki Norio, et al	4. 巻 14
2. 論文標題 Phenotypes for general behavior, activity, and body temperature in 3q29 deletion model mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-023-02679-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 Nakazawa Takanobu	4. 巻 77
2. 論文標題 Modeling mental disorders in a dish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 307 ~ 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.13552	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 Nagai Yuma, Kisaka Yuri, Nomura Kento, Nishitani Naoya, Andoh Chihiro, Koda Masashi, Kawai Hiroyuki, Seiriki Kaoru, Nagayasu Kazuki, Kasai Atsushi, Shirakawa Hisashi, Nakazawa Takanobu, Hashimoto Hitoshi, Kaneko Shuji	4. 巻 42
2. 論文標題 Dorsal raphe serotonergic neurons preferentially reactivate dorsal dentate gyrus cell ensembles associated with positive experience	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112149 ~ 112149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112149	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 Asano Satoshi, Ono Ami, Sakamoto Kotaro, Hayata-Takano Atsuko, Nakazawa Takanobu, Tanimoto Kotaro, Hashimoto Hitoshi, Ago Yukio	4. 巻 161
2. 論文標題 Vasoactive intestinal peptide receptor 2 signaling promotes breast cancer cell proliferation by enhancing the ERK pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170940 ~ 170940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2023.170940	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 Asano Satoshi, Yamasaka Misa, Ozasa Kairi, Sakamoto Kotaro, Hayata-Takano Atsuko, Nakazawa Takanobu, Hashimoto Hitoshi, Waschek James A., Ago Yukio	4. 巻 12
2. 論文標題 Vasoactive intestinal peptide?VIPR2 signaling regulates tumor cell migration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 852358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.852358	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

[学会発表] 計7件(うち招待講演 5件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 奥山灯、秋本祐弥、福島穂高、三浦大樹、中澤敬信
2. 発表標題 妊娠期の環境エンリッチメントが脳機能に与える影響の分子メカニズム解析
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 秋本祐弥、馬場優志、福島穂高、三浦大樹、橋本均、橋本亮太、中澤敬信
2. 発表標題 環境エンリッチメントによる3q29領域欠失導入マウスの精神疾患様行動の回復
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 Takanobu Nakazawa
2. 発表標題 Basic and clinical collaborative research on psychiatric disorders
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takanobu Nakazawa
2. 発表標題 Modeling psychiatric disorders with iPS cell technology and disease mouse models
3. 学会等名 The 2nd RIKEN CBS Co-Creation International Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中澤敬信
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いた精神疾患のリバーストランスレショナルリサーチ
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会・第44回日本臨床薬理学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中澤敬信
2. 発表標題 iPS細胞技術及び疾患モデルマウスを用いた発達障害に関わる分子病態研究
3. 学会等名 遺伝研研究会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takanobu Nakazawa
2. 発表標題 Modelling psychiatric disorders with patient iPSC-derived neurons and mouse disease models
3. 学会等名 Molecular and Cellular Cognition Society Asia(招待講演)(国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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