

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350498

研究課題名(和文) グリア由来伝達物質が制御する小脳神経回路分化の分子のカスケード

研究課題名(英文) Control mechanism with glial transmitters in cerebellar development

研究代表者

吉田 祥子 (Yoshida, Sachiko)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40222393

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)：HDAC阻害剤の一部が小脳プルキンエ細胞の発達及び小葉のV/VI葉のprimary fissureに過剰な褶曲を早期に形成する変化をもたらした。この変化は、自閉症を引き起こすバルプロ酸(VPA)、クロルピリホスで観察され、さらにHDAC阻害剤の一部でも引き起こされることが観察された。薬物投与はReelinの発現亢進を引き起こし、シナプス形成と関連するATPの放出を亢進した。VPA投与の濃度依存性、投与時期依存性を検討したところ、臨界濃度は300mg/kg、臨界期は妊娠16日と推定された。新たに酵素光学測定デバイスを開発し10msecの時間分解能での伝達物質放出の観察を可能とした。

研究成果の概要(英文)：Some HDAC inhibitors including Valproate and SAHA, and chlorpyrifos were observed to induce the alteration of Purkinje cell development and excess folding at V/VI lobule of cerebellum. Valproate and Chlorpyrifos are known as the inducer of autism. Also these chemicals increased in developing cerebellar cortex both Reelin expression which would relate to neuronal migration, and ATP release which would relate to synaptogenesis. The critical concentration and critical period of VPA administration was 300 mg/kg maternally and embryonic day 16, respectively. We developed newly high sensitive enzyme-linked photo assay system with 10 msec time resolution.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳分化 自閉症 プルキンエ細胞 神経伝達物質

### 1. 研究開始当初の背景

小脳は、脳の皮質形成のモデル系として長く研究され、解剖学的、電気生理学的、組織化学的知見が十分に蓄積された研究対象である。申請者は小脳皮質の分化過程の研究で、グルタミン酸とアミノ酪酸(GABA)の放出パターンを調べるために、伝達物質の酸化還元酵素を用い、発生する蛍光分子によって神経伝達アミノ酸の分布を観察するデバイスを自家開発した。平成23年度～25年度の科学研究費補助金研究において、小脳神経回路発達に關する伝達物質とそれを制御する分子の研究を進めたところ、未分化のグリア細胞からGABA放出が見られることを見いだした。グリア細胞の分化に伴い、GABA合成酵素GAD65/67の発現が低下し、同時にGABAトランスポータのVGATの発現が消失すること、これらの現象が細胞内リン酸化で制御されている可能性を発見した。

グリア細胞からのGABA放出は、顆粒細胞の増殖を強く刺激することも観察されたが、神経回路形成への関与ははっきりしなかった。そこで、グリア細胞の情報伝達物質であるATPの時空間分布を可視化する新規の酵素光学法を開発した。酵素にグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素を用いてグルタミン酸刺激によるATP放出量を測定したところ、小脳プルキンエ層(PL)及び顆粒層(IGL)で、一過性のATP放出が観察された。グルタミン酸刺激による小脳皮質からのATP放出小脳分化に対するGABAトランスポータの影響を調べるために、抗てんかん薬バルプロ酸を胎児期に投与したところ、出生仔の小脳で過剰なGABAの放出が観察された。GABAトランスポータの影響を調べるために、抗てんかん薬バルプロ酸を胎児期に投与したところ、出生仔の小脳で過剰なGABAの放出が観察された。GABAトランスポータの発現は抑制され、同時にプルキンエ細胞の樹状突起が早期から著しく発達していた。バルプロ酸投与動物では、ATPも早期から大量に放出され、神経回路発達に介入することが観察された。

### 2. 研究の目的

本研究では、小脳神経回路形成に影響するHDAC阻害剤を用い、これらのグリア性小脳分化制御におけるReelinおよび関連する分化誘導因子の関与を、新規の光学・物性デバイスを用いて明らかにすることを目的とした。

目的1として、作用スペクトルの異なるHDAC阻害剤を小脳発生の各時期に投与し、GABA放出と神経分化への影響を研究した。目的2として、HDAC阻害剤の投与によるReelinの発現増強を確認し、合わせて発達期小脳外顆粒層( EGL )におけるReelin放出細胞を確定することを目標とした。

目的3として、グリア細胞からのATPを介したシナプス形成誘導機構を、HDAC阻害剤

による増強の機序を含めて解明する。神経突起形成に重要なアクチン繊維はReelin他の因子で安定化されるが、申請者らで開発している高分解能音響インピーダンス顕微鏡を用い、生きた細胞の中のアクチン繊維の重合度を観察することを目標とした。

### 3. 研究の方法

(1)作用スペクトルの異なるHDAC阻害剤を、小脳発生の各時期に投与し、GABA放出と神経分化への影響を研究する。

バルプロ酸は脂肪酸系のHDAC阻害剤で、HDAC1を特異的に阻害する。Reelinを誘導するHDAC阻害剤には、ヒドロキサム酸系のスペロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)、トリコスタチンA(TSA)や、MS-275があり、HDAC阻害作用とともにDNAの脱メチル化作用が報告されている。

(2)バルプロ酸の投与時期、投与濃度を振って、濃度依存性、投与時期依存性を検討する。これらは免疫組織化学的に観察する。

(3)高感度高速CCDを用いて、HDAC阻害剤投与動物の小脳組織における、グルタミン酸刺激に対する伝達物質放出反応速度の変化を観察する。グルタミン酸刺激に対する反応は、神経細胞の分化とトランスポータの発現にともなって高速化する。この変化を観察することで、HDAC阻害剤による神経細胞の変化を観察する。

(4)超音波を利用した音響インピーダンス顕微鏡を用いて組織の音響インピーダンス変化を観察し、樹状突起伸長、シナプス形成に至る細胞骨格の変化を観察する。

### 4. 研究成果

(1)ヒドロキサム酸系HDAC阻害剤のスペロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)、TSA、MS-275、脂肪酸系のHDAC阻害剤バルプロ酸を、妊娠16日に投与したところ、SAHAではVPAと同様の神経回路形成異常が見られたがTSAは微弱でMS-275はほとんど見られなかった。効果スペクトルが異なることが示唆された。ATP放出量の変化はSAHAで高く、TSAが中程度、MS-275では大きな変化が見られなかった。

(2)従来細胞レベルの変化を観察してきたが、小脳虫部全体を観察したところ、小葉のV/VI葉のprimary fissureに過剰な褶曲が早期に形成されることを観察した。この褶曲は生後2週間ではコントロール動物にはほとんど見られず、一方VPA投与動物では75%に観察された。

(3)この褶曲を指標としてVPA投与の濃度依存性、投与時期依存性を検討したところ、VPA200mg/kgの投与ではほぼ変化が現れず、3臨界濃度は300mg/kgと推定された。また、妊娠18日の投与では効果が現れない一方、妊娠14日の投与で強く効果が現れることが明らかとなった。早期のVPA投与は動物を致死に追い込むことが多く、実験条件としては妊娠16日が適当であると考えられる。

(4)高速高感度CCDを用いて10msecの時

間分解能で伝達物質放出を測定するシステムを構築した。さらに培養細胞からの微弱な伝達物質放出の測定を可能とした。

(5) HDAC 阻害剤の投与によって外顆粒層の Reelin 発現が増強することを観察した。GLAST との距発現を観察すると、グリア細胞での発現であることが確認された。

(6) 超音波顕微鏡を用いてバルプロ酸投与された動物の小脳組織の体積弾性率を測定したところ、内顆粒層の弾性率が上昇することが観察された。細胞腫は確認できていないが、神経回路の変化が捉えられたものと考えられる。

#### 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 8 件)

Y Fueta, Y Sekino, S Yoshida, Y Kanda, S Ueno. Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus. , Neurotoxicology, 2017 in press

TTK Soon, TW Chean, H Yamada, K Takahashi, N Hozumi, K Kobayashi, S Yoshida. Quantitative Research on the Effects of Anticancer Drugs on Glia-Glioma Brain Tumor Model Using Ultrasonic Microscope. Japanese Journal of Applied Physics, 2017 in press

K Takanashi, M Washiya, K Ota, S Yoshida, N Hozumi, K Kobayashi. Quantitative Evaluation Method of Differentiation Process in C2C12 Myoblasts Using Ultrasonic Microscope. Japanese Journal of Applied Physics, 2017 in press

H. Mabuchi, HY Ong, K. Watanabe, S Yoshida, N Hozumi. Visualization of Spatially Distributed Bioactive Molecules Using Enzyme-Linked Photo Assay. IEEJ Transactions on Fundamentals and Materials 2016 136(2) pp 99-104

K. Watanabe, N. Takahashi, N Hozumi, S Yoshida. Improvements in Enzyme-Linked Photoassay Systems for Spatiotemporal Observation of Neurotransmitter Release. Sensors and Materials, 2015 27(10) pp.1035-1044

Al Gunawan, N Hozumi, S Yoshida, Y Saijo, K Kobayashi, S Yamamoto. Numerical analysis of ultrasound propagation and reflection intensity for biological acoustic impedance microscope. Ultrasonics 2015 61

pp.79-87

Al Gunawan, N Hozumi, K Takahashi, S Yoshida, Y Saijo, K Kobayashi, S Yamamoto. Numerical analysis of acoustic impedance microscope utilizing acoustic lens transducer to examine cultured cells. Ultrasonics 2015 63 pp.102-110

K Kobayashi, S Yoshida, Y Saijo, N Hozumi. Acoustic impedance microscopy for biological tissue characterization. Ultrasonics 2014 54(7) pp.1922-8.

[学会発表](計 40 件)

S Yoshida, N Hozumi, Y Fueta, S Ueno, Y Sekino. Prenatal Administration Of Valproic Acid Alters Both The Purkinje Cell Dendrites And The Granule Cell Proliferation In Rat Developing Cerebellum. Society of Toxicology, 2016.3.15 55th Annual Meeting New Orleans, LA

Y Fueta<sup>1</sup>, Y Sekino, S Yoshida, S Ueno. Prenatal Single Administration Of Tributyltin Alters Developmental Transient Of Spontaneous Behaviors And Basic Excitability In The Hippocampal Slices Of Immature Rats Society of Toxicology, 2016.3.15 55th Annual Meeting New Orleans, LA

T Tomida, S Iwamoto, Y Fueta, S Ueno, Y Sekino R Maev, N Hozumi, S Yoshida. Alteration of cerebellar lobules in Valproate-induced autistic model rat 2016.7.22 第 39 回日本神経科学大会

C Nishikawa, N Takahashi, T Tomida, Y Shigemoto-Mogami, K Sato, Y Sekino, H Mabuchi, N Hozumi, S Yoshida. Interaction between neurosphere and cultured glial cell Interaction between neurosphere and cultured glial cell 2016.7.22 第 39 回日本神経科学大会

T Mikami, K Watanabe, Y Fueta, S Ueno, Y Sekino, N Hozumi, S Yoshida. Fast glutamate release detection in normal and valproate-administrated rat cerebellum 2016.7.22 第 39 回日本神経科学大会

N Takahashi, H Mabuchi, Y Shigemoto-Mogami, K Sato, Y Sekino, N Hozumi, S Yoshida. Visualization of neurotransmitter release in the developing neurosphere cells using the enzyme-linked photo-assay 2016.7.22 第 39 回日本神経科学大会

S Nakajima, T Tomida, Y Fueta, S Ueno, Y Sekino S Yoshida. Alteration of neuronal development by

Autism-induce drugs and recovery effects with bumetanide in developing rat cerebellum 2016.7.22 第 39 回日本神経科学大会  
馬淵 光・高橋信人・吉田祥子・穂積直裕・関野祐子・佐藤 薫 ICA を用いた ES 細胞の観察 2016.3.17 平成 28 年電気学会全国大会  
高梨恭一・高橋健太・高橋信人・吉田祥子・穂積直裕・小林和人 超音波顕微鏡を用いた C2C12 筋芽細胞の分化過程の定量的評価 2016.3.17 平成 28 年電気学会全国大会  
S. Yoshida, R.H. Rahayu, K. Takanashi, K. Kishikawa, H. Kurita, K. Takashima, N. Hozumi, K. Kobayashi, S. Yamamoto Cultured tumor model inspection for anticancer drugs using acoustic impedance microscope 2016.12.1 5th Joint Meeting of the Acoustical Society of America and the Acoustical Society of Japan  
N. Hozumi, K. Takanashi, M. Washiya, S. Yoshida, K. Kobayashi, Y. Saijo Non-invasive in-situ quantitative observation of biological cells by acoustic microscopy, 2016.12.1 5th Joint Meeting of the Acoustical Society of America and the Acoustical Society of Japan  
H. MABUCHI, N. TAKAHASHI, K. SATO, Y. SEKINO, N. HOZUMI, S. YOSHIDA. Visualization of neurotransmitter released from cultured granule cells and the neurosphere cells using enzyme-linked photo-assay combined with ICA 2016.11.16 46th Neuroscience meeting San Diego, USA  
S. NAKAJIMA, T. TOMIDA, K. IKAI, Y. FUETA, S. UENO, N. HOZUMI, Y. SEKINO, S. YOSHIDA Alteration of Purkinje cells by autism-inducing drugs, and recovery effects with bumetanide or oxytocin administration in developing rat cerebellum 2016.11.16 46th Neuroscience meeting San Diego, USA  
K Takanashi, M Washiya, K Ota, N Hozumi, S Yoshida, K Kobayashi Quantitative evaluation method of differentiation process in C2C12 myoblasts using ultrasonic microscope 2016.11.23 The 37th Symposium on Ultrasonic Electronics (USE 2016) Busan, Korea  
TTK Soon, TW Chean, K Takahashi, N Hozumi, K Kobayashi, S Yoshida Quantitative research on the effects of anticancer drugs on glia-glioma brain tumor model using ultrasonic

microscope 2016.11.23 The 37th Symposium on Ultrasonic Electronics (USE 2016) Busan, Korea  
M Washiya, K Takanashi, K Ota, N Hozumi, K Kobayashi, S Yoshida Subcellular observation of C2C12 myoblast differentiation using ultrasonic microscope 2016.11.23 The 37th Symposium on Ultrasonic Electronics (USE 2016) Busan, Korea  
佐藤誠太・中嶋さりい・笹田 由紀子・上野晋・関野祐子・吉田祥子 抗てんかん薬バルプロ酸の曝露期・曝露濃度による発達期神経毒性の変化 2016.10.1 第 47 回中化連秋季大会  
中嶋さりい, 勝股大樹, 阿部巧, 穂積直裕, 笹田由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子 自閉症薬物モデル動物における神経回路発達異常と行動変化 2015.7.29 第 38 回日本神経科学大会  
高橋信人, 渡邊一徳, 穂積直裕, 吉田祥子 小脳神経回路からの伝達物質放出を可視化する酵素光学デバイスの開発 2015.7.29 第 38 回日本神経科学大会  
富田達朗, 穂積直裕, 笹田由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子 発達期小脳グリア細胞に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の影響 2015.7.29 第 38 回日本神経科学大会  
21 大熊真人, 堀尾佳世, 金田誠, 吉田祥子, 福田敦夫, 宮地栄一 マウス網膜スライスの網状層におけるグルタミン酸放出の可視化 2015.7.29 第 38 回日本神経科学大会  
22 F Yukiko, Y Sekino, S Yoshida, S Ueno, GABAERGIC INVOLVEMENT IN THE HIPPOCAMPAL DEVELOPMENT OF THE BASIC EXCITABILITY AND FEEDBACK INHIBITION IN JUVENILE RATS PRENATALLY EXPOSED TO VALPROIC ACID 2015.3.24 Society of Toxicology 54th Annual Meeting  
23 S Yoshida, Y Fueta, S Ueno, Y Sekino Prenatal administration of valproic acid or SAHA alters the development of Purkinje cell dendrites and network formation in rat cerebellum 2015.9.9 第 58 回日本神経化学学会大会  
24 高橋健太・アグースインドラグナワン・山田ひかり・吉田祥子・穂積直裕・小林和人 超音波顕微鏡を用いた細胞の定量評価 2015.3.24 平成 27 年電気学会全国大会  
25 馬淵 光・渡邊一徳・吉田祥子・穂積直裕 神経伝達物質の可視化システムの開発 2015.3.24 平成 27 年電気学会全国大会  
26 N Takahashi, H Mabuchi, Y Shigemoto Mogami, K Sato, Y Sekino, N Hozumi, S Yoshida Visualization of neurotransmitter release in the rat

- derived neurosphere cells using enzyme linked photo assay 2015.11.23 8th FAOPS Congress Bangkok, Thai
- 27 S Kajima, N Hozumi, S Yoshida, K Kobayashi, Y Saijo, S Yamamoto Viscoelastic Imaging Using Acoustic Impedance Microscope and Its Application for Biomedical Tissue 2015.10.23 IEEE International Ultrasonics Symposium Taipei, Taiwan
- 28 S Iwamoto, D Katsumata, Y Fueta, S Ueno, Y Sekino, N Hozumi, S Yoshida Developmental alteration with administration of valproate enhanced neuronal activities in the juvenile cerebellar cortex 2015.10.25 AP-IRC2015
- 29 T Mikami, S Nakajima, Y Fueta, S Ueno, Y Sekino, N Hozumi, S Yoshida Observation of the alteration of neuronal activities in Valproate-administrated rat cerebellum using the enzyme-linked photo-assay 2015.10.25 AP-IRC2015
- 30 RH Rahayu, K Takahashi, H Yamada, AI Gunawan, K Kobayashi, S Yamamoto, N Hozumi, S Yoshida Quantitative assay to determine the efficacy of anti-cancer drugs to co-cultured glia and glioma using high-resolution acoustic impedance microscope 2015.10.25 AP-IRC2015
- 31 中嶋さりい, 勝股大樹, 笛田由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子 胎生期 HDAC 阻害剤曝露による発達期小脳皮質での伝達物質放出変化と行動観察 2014.11.7 第61回中部日本生理学会
- 32 富田達朗, 山田ひかり, 笛田由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子 胎生期バルプロ酸投与動物由来の培養グリア細胞の発達変化 2014.11.7 第61回中部日本生理学会
- 33 K Watanabe, N Takahashi, N Hozumi, S Yoshida Improvements of Enzyme-Linked Photo Assay Systems for Spatio-temporal Observation of Neurotransmitter Release 2014.12.15 IGNITE 2014 Penang, Malaysia
- 34 S. YOSHIDA, N. HOZUMI, D. KATSUMATA, T. ABE, Y. FUETA, S. UENO, Y. SEKINO Fetal application of HDAC inhibitors facilitates the elongation of Purkinje cell dendrites and the network formation in rat cerebellar cortex 2014.11.18 44th Neuroscience meeting Washington, USA
- 35 S. Yoshida, N. Hozumi, D. Katsumata, T. Abe, Y. Fueta, S. Ueno, Y. Sekino Alteration of GABA release dynamics in autistic-like anomalous developing cerebellum 2014.11.14 24th Neuropharmacology Conference 2014
- 36 阿部巧, 村本 英樹, 笛田 由紀子, 関野 祐子, 吉田祥子 発達期小脳皮質における ATP 情報伝達の分子機序と、バルプロ酸投与による変化 2014.9.11 第37回日本神経科学大会
- 37 勝股大樹, 村本英樹, 穂積直裕, 笛田由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による小脳神経回路発達の変化 2014.9.11 第37回日本神経科学大会
- 38 渡邊一徳, 原田太一, 穂積直裕, 吉田祥子 小脳皮質からの伝達物質放出の高速光学測定 2014.9.11 第37回日本神経科学大会
- 39 K. Takahashi, H. Yamada, M. Betsudan, A.I. Gunawan, K. Kobayashi, S. Yamamoto, S. Yoshida, N. Hozumi Quantitative observation of cultured glia and glioma using high-resolution acoustic impedance microscope 2014.9.12 ISN Special Conference
- 40 M Ohkuma, K Horio, M Kaneda, S Yoshida, A Fukuda, E Miyachi Visualization of the glutamate release in the mouse retina 2014.3.18 第91回日本生理学会 大会生理学会 シンポジウム
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 1 件)
- 名称: 光学観察装置  
 発明者: 吉田祥子、穂積直裕、氏家雅彦  
 権利者: 豊橋技術科学大学、パルステック工業  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2016-221213  
 出願年月日: 2016.11.14  
 国内外の別: 国内
- 〔その他〕  
 ホームページ等
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
 吉田 祥子 (YOSHIDA Sachiko)  
 豊橋技術科学大学・大学院工学系研究科・講師  
 研究者番号: 40222393
- (2) 研究分担者  
 穂積 直裕 (HOZUMI Naohiro)  
 豊橋技術科学大学・国際協力センター・教授

研究者番号：30314090

(3)連携研究者

福田 敦夫 (FUKUDA Atsuo)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50254272