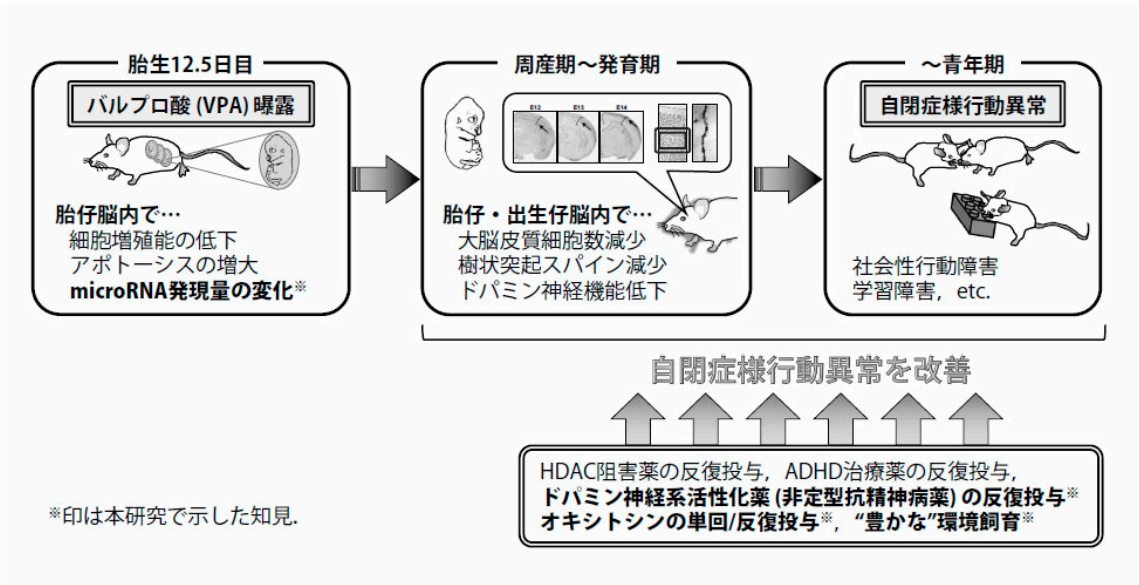
49　バルプロ酸の胎内曝露による自閉症の病態分子基盤解明	田熊　一敞

【目的】自閉症は、社会的なコミュニケーションの障害、興味の限定・反復的な常同行動を主徴とする発達障害の 1 つである。近年、自閉症は遺伝的要因と環境要因相互作用により発症することが明らかとされ、双生児を対象とした疫学調査において、環境要因の占める割合は 55%にのぼると算出されている（Arch. Gen. Psychiatry, 2011）。また、母親の妊娠中のウイルス感染や薬物摂取によって自閉症の発症リスクが増大することが示され、胎生期・周産期の環境要因についても、広義の意味で、自閉症発症に関わる生物学的環境因子として考えられるようになった。バルプロ酸（VPA）は、てんかんの治療をはじめ幅広く臨床応用されている薬であるが、妊娠期の服用による催奇形性や出生児の自閉症発症リスクの増大が知られている（JAMA, 2013）。我々は、胎生 12.5 日目に VPA を曝露したマウスの行動学的、神経組織学的解析を進め、自閉症モデルマウスとしての有用性を示してきた（Hara et al., J. Pharmacol. Sci. 118: 543-546, 2012; Kataoka et al., Int. J. Neuropsychopharmacol. 16: 91-103, 2013; Takuma et al., Pharmacol. Biochem. Behav. 126: 43-49, 2014 他）。本研究では、胎生期 VPA 曝露マウスを用いて、自閉症の病態分子基盤の解明と新規治療法の開発を目的とした。

【方法】動物は妊娠 12.5 日目に VPA 500 mg/kg 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。mRNA および microRNA の発現量変化は胎仔全脳由来の標品を用いて行った。また、8 週齢時に、行動学的解析および Golgi 染色法により樹状突起スパイン密度変化の解析を行った。環境強化飼育は、4 週齢時より 4 週間実施した。

【結果】胎仔脳での解析において、VPA 曝露後 2–12 時間に microRNA である miR-132 の発現量が増加すること、また miR-132 の抑制標的分子である MeCP2 および p250GAP の mRNA 量が、それぞれ VPA 曝露 6 および 24 時間後に減少することを明らかとした。非定型抗精神病薬であるリスペリドンならびにアリピプラゾールの慢性投与が、胎生期 VPA 曝露マウスの社会性行動障害や認知機能障害を改善させ、前頭前皮質の樹状突起スパイン密度の低下も回復することを見いだし、定型抗精神病薬であるハロペリドールはこのような改善効果を示さないことを明らかとした。また、オキシトシンの単回投与により、胎生期 VPA 曝露マウスの社会性行動障害が改善されることを見いだした。さらに、発育期の環境強化飼育が、胎生期 VPA 曝露マウスの自閉症様の異常行動を改善すること、ならびに胎生期 VPA 曝露マウスの脳海馬領域で認められたシナプス関連分子である PSD-95 および Shank2 の mRNA 量の低下を改善することを見いだした。

胎生期バルプロ酸曝露マウスにおける自閉症様行動の発現分子機序とその制御



49. バルプロ酸の胎内曝露による自閉症の病態分子基盤解明

田熊　一敞

大阪大学 大学院歯学研究科 顎口腔病因病態制御学講座 薬理学教室

Key words：自閉症，バルプロ酸，microRNA，ドパミン神経系，オキシトシン

緒　言

自閉症は、(1) 社会性の障害、(2) コミュニケーションの障害、(3) 常同行動や興味・活動の限局化の 3 つを主徴とする発達障害の 1 つである。自閉症の発症原因は未だ不明であるが、遺伝的要因と環境要因との相互作用により発症すると考えられており、近年、欧米をはじめ世界で自閉症の有病率が劇的に上昇していることや、双生児を対象とした疫学調査での知見より、環境要因の占める割合は 55%にも及ぶと算出されている［1］。また、母親の妊娠中のウイルス感染やビタミン不足によって自閉症の発症リスクが増大することが示され、胎生期・周産期の環境要因についても、広義の意味で、自閉症発症に関わる生物学的環境因子として考えられるようになった。したがって、最近の国内外の自閉症に関する基礎研究では、胎生期～幼児期の環境要因の役割解明を目的とする研究が目立つようになってきた。しかしながら、自閉症の病態発現に関わる分子基盤は未だ明らかではなく、その薬物療法については確立されていない。

バルプロ酸（VPA）は、てんかんや躁状態の治療、片頭痛発作の予防など広く臨床応用されている薬物で、妊娠可能な女性のてんかん患者にとってしばしば唯一の治療選択肢とされている。一方、てんかんを有する女性の子供が奇形や精神遅滞などの障害を持つリスクが高いことが知られ、抗てんかん薬の胎内曝露がその原因と考えられており、なかでも VPA による発症リスクが最も高いことが報告された［2］。このような臨床知見を背景に、胎生期に VPA を投与した齧歯類、特にラットが自閉症のモデル動物として用いられてきた。我々は、既存の遺伝子改変自閉症マウスモデルとの比較が容易であるなどの理由から、胎生期の VPA の投与によるマウスでの自閉症モデル化を試み、胎生 12.5 日目に VPA（500 mg/kg）を投与した ICR 系マウス由来の雄性出生仔が、生後に社会性行動障害といった自閉症様の行動異常を示すこと［3, 4］、大脳皮質層構造の異常［3］ならびに海馬での樹状突起スパイン密度の低下を示すこと［4］、前頭前皮質（PFC）においてドパミン神経系機能が低下していること［5］など、従来の自閉症モデル動物で認められる変化と類似の変化を示すことを見出し、マウスにおいて胎生期の VPA 投与による自閉症モデルを確立した。また最近、注意欠陥多動性障害治療薬であるメチルフェニデートおよびアトモキセチンの慢性投与が、胎生期 VPA 曝露マウスの自閉症様行動を改善することを明らかとした［6］。

本研究では、胎生期 VPA 曝露マウスにおいて、microRNA の発現変化、および自閉症様行動に対するドパミン活性化薬投与、オキシトシン投与ならびに環境強化飼育の効果を検討し、自閉症の病態分子基盤と新規治療法を追究した。

方　法

1. 自閉症モデルマウスの作製

動物は、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。

2. 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 発現量変化は、各胎仔の全脳より調製した total RNA を用いて real-time PCR 法により解析した。microRNA 発現量の網羅的解析は、BGI 社（Beijing, China）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。

3. 薬物投与

抗精神病薬（リスペリドン、アリピプラゾールおよびハロペリドール）の単回投与は、社会性行動試験の 24 時間前、新奇物体認識試験の試験試行の 24 時間前に行った。オキシトシンの単回投与は、社会性行動試験の 20 分前、新奇物体認識試験の訓練試行の直後に行った。抗精神病薬あるいはオキシトシンの慢性投与は、1 日 1 回 2 週間行い、最終投与の 24 時間後に各種試験を行った。

4. 成体マウスの行動解析試験

行動解析試験は 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、社会性行動は resident-intruder 相互作用試験、ならびに学習記憶能は新奇物体認識試験によりそれぞれ評価した。

5. 成体マウスの神経生化学および神経組織化学的解析

神経生化学および神経組織化学的解析は 8 週齢時に行い、脳内モノアミン遊離量は *in vivo* 脳微小透析法、神経活動度は免疫染色法による c-Fos タンパク質陽性細胞の計数、樹状突起スパイン密度は Golgi 染色法、脳由来神経栄養因子（BDNF）およびシナプス関連分子（PSD-95、Shank2、Shank3）の mRNA 発現量解析は real-time PCR 法によりそれぞれ数値化した。

6. 環境強化飼育

4 週齢時に、投与薬物ごとに無作為に 2 群に分け、(1) 通常環境群（対照群）、(2) 環境強化飼育群とし、4 週間飼育した。通常環境群は、一般的な透明なプラスティックケージ（28×20×12 cm^3）で、環境強化飼育群は、対照群よりも大きな 65×35×30 cm^3 のプラスティックケージに小動物用輪回し装置、ゴールデンハムスター用パイプ、Shepherd Shack®などを配置した環境下で飼育した。各飼育群とも、1 ケージあたり 5～7 匹のグループとした。

7. 統計解析

データは全て「平均値 ± 標準誤差」で表し、統計解析ソフト GraphPad Prism 5/6 for Windows/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 repeated measures ANOVA あるいは 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。

結果と考察

1. VPA 曝露マウス胎仔脳における microRNA の発現変化

妊娠 12.5 日目のマウスに VPA を投与し、その胎仔全脳において遺伝子発現変化を解析した［7］。雄性の胎仔脳において、VPA 曝露 6 時間後に miR-132 量の増大が認められた。一方で、miR-9 量および miR-124 量に変化は認められなかった（図 1a）。VPA 曝露による惹起される胎仔脳 miR-132 量の増大は、曝露後 12 時間を最大とする変化であった（図 1b）。VPA 曝露による miR-132 量の増大は雌性の胎仔脳においても認められた。また、胎生 12.5 日目の VPA 曝露は、miR-132 量の増大に先だって、神経活動マーカーである Arc および c-Fos、ならびに BDNF の mRNA 量を増大させた。なお、成育後に自閉症様行動を発現しない胎生 14.5 日目の VPA 曝露では miR-132 量の変化は認められなかった。また本研究では、miR-132 の抑制標的分子であり、発達障害への関連が知られるメチル化 CpG 結合タンパク質 2（MeCP2）および Rho GTPase 活性化タンパク質である p250GAP の mRNA 量が、それぞれ胎生 12.5 日目の VPA 曝露 6 および 24 時間後に減少することを明らかとした。さらに、RNA シークエンシング法により microRNA 発現量の網羅的解析を行い、胎生 12.5 日目の VPA 曝露が miR-132 を含むいくつかの microRNA 発現を変化させることを示した。これらの成績より、胎生 12.5 日目の VPA 曝露が胎仔脳内で神経活動依存的に miR-132 量の増大を含む microRNA の量的変化を惹起し、これらが VPA 曝露マウスの大脳皮質の神経解剖学的異常と成育後の自閉症様行動異常の要因となる可能性を示した。

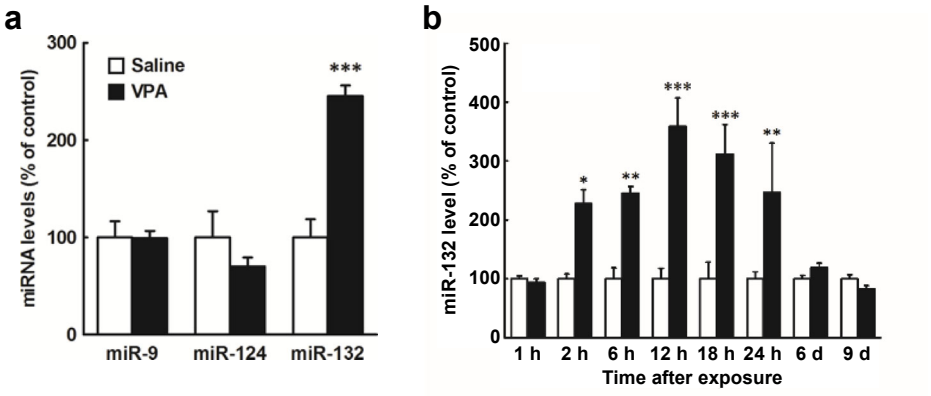


図 1. VPA 曝露によるマウス胎仔脳内での microRNA 発現変化

a）VPA 曝露 6 時間後の雄性マウス胎仔全脳での miR-9、miR-124 および miR-132 量。b）VPA 曝露後の雄性マウス胎仔全脳における miR-132 量の経時変化。生理食塩曝露（対照）群と比較して、$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$、$^{***}P < 0.001$（a： unpaired *t* test ; b : two-way ANOVA 後の Bonferroni's multiple comparison test）。

2. 胎生期 VPA 曝露マウスの自閉症様行動に対するドパミン神経系活性化薬の効果

我々は既に、メタンフェタミンに対する薬物応答性を指標として胎生期 VPA 曝露マウスのドパミン神経系の変化を解析し、ドパミン神経系の投射先の一つである PFC においてドパミン神経系の機能低下を認め、もう 1 つの主要な投射先として知られる線条体ではドパミン神経系の機能低下が認められないことを見いだしている［5］。本研究では、この PFC のドパミン神経系の機能低下が自閉症様行動異常の発現に関与しているのかを明らかにするため、ドパミン神経系活性化薬が胎生期 VPA 曝露マウスの行動異常に与える影響を検討した［8］。

非定型抗精神病薬であるリスペリドンならびにアリピプラゾールは、胎生期 VPA 曝露マウスの社会性行動障害ならびに認知記憶障害に対して、単回投与では影響を与えなかったが、2 週間の慢性投与により改善効果を示した（図 2a, b）。また、非定型抗精神病薬の 2 週間慢性投与は、PFC における樹状突起スパイン密度の低下を有意に改善した（図 2c）。一方、定型抗精神病薬であるハロペリドールは、慢性投与によっても改善効果を示さなかった（図 2）。

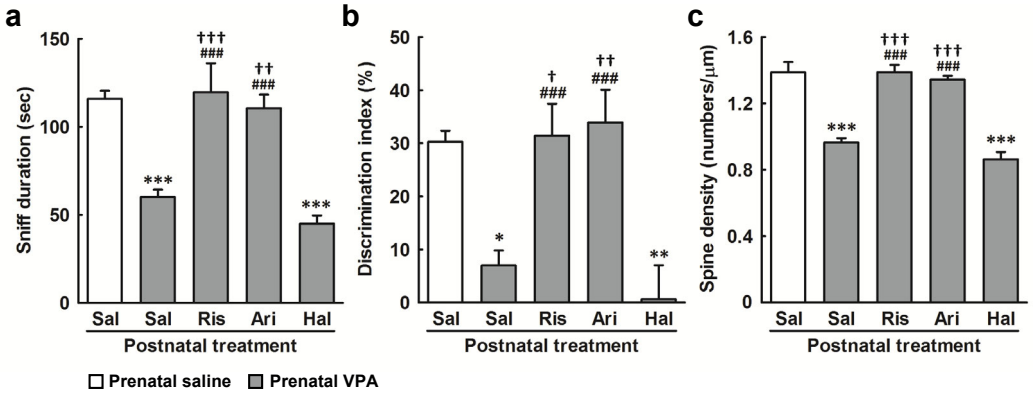


図 2. 胎生期 VPA 曝露マウスの自閉症様行動に対するドパミン神経系活性化薬の慢性投与の効果

抗精神病薬は方法に示すスケジュールで腹腔内投与した。a）Resident-intruder 相互作用試験における匂い嗅ぎ行動回数。b）新奇物体認識試験における訓練試行 24 時間後での識別指数。c）PFC における樹状突起スパイン密度。対照群（□）と比較して、$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$、$^{***}P < 0.001$; 抗精神病薬を非投与の胎生期 VPA 曝露群と比較して、$^{\dagger}P < 0.05$、$^{\dagger\dagger}P < 0.01$、$^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$; 非定型抗精神病薬（ハロペリドール）を投与した胎生期 VPA 曝露群と比較して、$^{\#\#\#}P < 0.001$（two-way ANOVA 後の Bonferroni's multiple comparison test）。Ris：リスペリドン、Ari：アリピプラゾール、Hal：ハロペリドール。

神経活動マーカーである c-Fos 発現を指標としてドパミン神経系投射先での薬物投与の効果を検討したところ、リスペリドン、アリピプラゾールおよびハロペリドールの全てが線条体で c-Fos 発現を増加したのに対し、PFC においてはリスペリドンおよびアリピプラゾールの 2 薬によって c-Fos 発現が認められ、ハロペリドールは効果を示さなかった。PFC における非定型抗精神病薬と定型抗精神病薬の反応性の違いは、マイクロダイアリシス法による遊離ドパミン量の測定においても認められた。これらの成績より、非定型抗精神病薬投与による PFC における反復したドパミン遊離が、樹状突起スパイン密度の低下を回復させ、VPA 曝露マウスの自閉症様行動異常の改善をもたらすことを示唆した。

3. 胎生期 VPA 曝露マウスの自閉症様行動に対するオキシトシンの効果

オキシトシンの経鼻単回投与は、用量依存的に胎生期 VPA 曝露の社会性行動障害を抑制し（図 3a）、その効果は少なくとも 2 時間持続した。一方、オキシトシンの単回投与は認知記憶障害に効果を示さなかった。オキシトシンの 2 週間経鼻慢性投与により、社会性行動障害の抑制効果の持続性が認められ、少なくとも投与 24 時間後まで効果が認められた。オキシトシンの経鼻単回投与により、室傍核（PVN）、PFC、体性感覚野で c-Fos 発現の増加が認められ、海馬 CA1 および CA3 領域では認められなかった（図 3b）。これらの成績より、オキシトシンの経鼻投与が、PVN を含む高次大脳皮質野の活性化を介して、VPA 曝露マウスの社会性行動障害の改善をもたらすことを示唆した［9］。

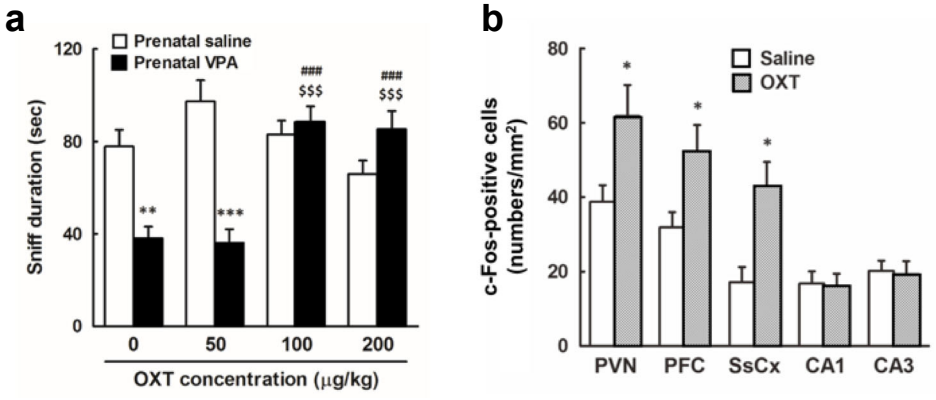


図 3. 胎生期 VPA 曝露マウスの自閉症様行動に対するオキシトシンの単回投与の効果

オキシトシン（OXT）は方法に示すスケジュールで経鼻投与した。a）Resident-intruder 相互作用試験における匂い嗅ぎ行動回数。b）新奇物体認識試験における訓練試行 24 時間後での識別指数。c）100 μg/kg オキシトシンの経鼻投与 2 時間後の各脳領域での c-Fos 発現細胞数。対照群（□）と比較して、$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$、$^{***}P < 0.001$; オキシトシン非投与の胎生期 VPA 曝露群と比較して、$^{\#\#\#}P < 0.001$；50 μg/kg オキシトシン投与の胎生期 VPA 曝露群と比較して、$^{\$\$\$}P < 0.001$（a：two-way ANOVA 後の Bonferroni's multiple comparison test；b：unpaired *t* test）。

4. 胎生期 VPA 曝露マウスの自閉症様行動に対する環境強化飼育の効果

環境強化飼育は、胎生期 VPA 曝露マウスの示す種々の行動異常のうち、不安様行動の増加、社会性行動障害、学習記憶障害を対照群のマウスと同程度にまで改善した。また、環境強化飼育は、対照群、胎生期 VPA 曝露群ともに海馬において BDNF mRNA 発現量を増加した。さらに、胎生期 VPA 曝露による海馬 CA1 領域の樹状突起スパイン密度の低下が、環境強化飼育により有意に改善された。通常飼育の胎生期 VPA 曝露マウスの海馬においてシナプス関連分子の PSD-95、Shank2 mRNA の発現低下が認められたが、環境強化飼育した胎生期 VPA 曝露マウスではこれらが消失していた。

これらの成績より、環境強化飼育が胎生期 VPA 曝露マウスの自閉症様行動異常を改善すること、またこれら行動異常の改善に、海馬における BDNF mRNA 発現量の増加、および海馬 CA1 領域における樹状突起スパイン密度低下の改善が寄与することを示唆した［10］。さらに、胎生期 VPA 曝露マウスの海馬 CA1 領域のスパイン密度低下および豊かな環境飼育によるスパイン密度低下の改善に、海馬における PSD-95 および Shank2 が関与する可能性が示された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院歯学研究科薬理学研究室の中澤敬信、長谷部茂、大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野の松田敏夫、橋本均、吾郷由希夫、原雄大、高野 恵利加、山口浩史、樋口桃子、川瀬啓生、田邊航、塚田信司である。

文　献

1) Hallmayer J1, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K, Lotspeich L, Croen LA, Ozonoff S, Lajonchere C, Grether JK, Risch N. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. Arch Gen Psychiatry. 2011 Nov;68(11):1095-1102. Epub 2011 Jul 4. PMID: 21727249 DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.76

2) Christensen J, Grønborg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, Vestergaard M. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. JAMA. 2013 Apr 24;309(16):1696-1703. PMID: 23613074 DOI: 10.1001/jama.2013.2270.

3) Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. Int J Neuropsychopharmacol. 2013 Feb;16(1):91-103. Epub 2011 Nov 18. PMID: 22093185 DOI: 10.1017/S1461145711001714.

4) Takuma K, Hara Y, Kataoka S, Kawanai T, Maeda Y, Watanabe R, Takano E, Hayata-Takano A, Hashimoto H, Ago Y, Matsuda T. Chronic treatment with valproic acid or sodium butyrate attenuates novel object recognition deficits and hippocampal dendritic spine loss in a mouse model of autism. Pharmacol Biochem Behav. 2014 Nov;126:43-49. Epub 2014 Sep 18. PMID: 25240644 DOI: 10.1016/j.pbb.2014.08.013.

5) Hara Y, Takuma K, Takano E, Katashiba K, Taruta A, Higashino K, Hashimoto H, Ago Y, Matsuda T. Reduced prefrontal dopaminergic activity in valproic acid-treated mouse autism model. Behav Brain Res. 2015 Aug 1;289:39-47. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25907743 DOI: 10.1016/j.bbr.2015.04.022.

6) Hara Y, Ago Y, Taruta A, Katashiba K, Hasebe S, Takano E, Onaka Y, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K. Improvement by methylphenidate and atomoxetine of social interaction deficits and recognition memory impairment in a mouse model of valproic acid-induced autism. Autism Res. 2016 Sep;9(9):926-939. Epub 2015 Dec 30. PMID: 26714434 DOI: 10.1002/aur.1596.

7) Hara Y, Ago Y, Takano E, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K. Prenatal exposure to valproic acid increases miR-132 levels in the mouse embryonic brain. Mol Autism. 2017 Jun 28;8:33. eCollection 2017. PMID: 28670439 DOI: 10.1186/s13229-017-0149-5.

8) Hara Y, Ago Y, Taruta A, Hasebe S, Kawase H, Tanabe W, Tsukada S, Nakazawa T, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K. Risperidone and aripiprazole alleviate prenatal valproic acid-induced abnormalities in behaviors and dendritic spine density in mice. Psychopharmacology (Berl). 2017 Nov;234(21):3217-3228. Epub 2017 Aug 10. PMID: 28798977 DOI: 10.1007/s00213-017-4703-9.

9) Hara Y, Ago Y, Higuchi M, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K. Oxytocin attenuates deficits in social interaction but not recognition memory in a prenatal valproic acid-induced mouse model of autism.Horm Behav. 2017 Nov;96:130-136. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28942000 DOI: 10.1016/j.yhbeh.2017.09.013.

10) Yamaguchi H, Hara Y, Ago Y, Takano E, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K. Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice.Behav Brain Res. 2017 Aug 30;333:67-73. Epub 2017 Jun 24. PMID: 28655565 DOI: 10.1016/j.bbr.2017.06.035.