



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 胎仔期バルプロ酸曝露マウスの精神異常行動発現に関わる分子基盤解析                                                                                                                |
| Author(s)    | 片岡, 駿介                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 2013, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/60084">https://hdl.handle.net/11094/60084</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                           |
|---------------|-----------------------------------------------------------|
| 氏 名           | かた 片 岡 駿 介                                                |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (薬学)                                                  |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 5 9 6 6 号                                             |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 25 年 3 月 25 日                                          |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>薬学研究科応用医療薬科学専攻                        |
| 学 位 論 文 名     | 胎仔期パルプロ酸曝露マウスの精神異常行動発現に関わる分子基盤解析                          |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 松田 敏夫<br>(副査)<br>教 授 橋本 均 教 授 八木 清仁 教 授 辻川 和丈 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

統合失調症や気分障害などの精神疾患は、遺伝的要因のみならず環境要因、とりわけ胎生期から思春期までの発育・養育環境要因の密接な関与により発症する多因子疾患である。特に、胎生期は脳発達形成が著しく、外的刺激に対する防御機構が未熟な時期であるため、出生後の脳機能に対する環境要因の影響が非常に大きな時期であると考えられている。この考え方と一致して、妊娠期の母親のウイルス感染や薬物服用により、出生児において統合失調症あるいは自閉症の発症リスクの増大が認められている。発達障害の一つに分類される自閉症は、社会性や他者とのコミュニケーション能力に問題が見られる疾患で、脳器質障害に病因があると考えられている。しかしながら、病態の分子基盤については未だ不明であり、その治療は対症療法に限られている。

一方、パルプロ酸ナトリウム (VPA) は、てんかん、てんかんに伴う性格行動障害、躁病および躁うつ病の躁状態などの治療に臨床応用されている薬物である。VPA は、比較的安全性が高い薬物とされているが、妊娠中の服用により催奇形性や胎児性 VPA 症候群など重篤な毒性がもたらされること、ならびに出生児において自閉症や精神遅滞といった発達障害の発症リスクを増大させることが報告されている。VPA はγ-アミノ酪酸トランスアミナーゼ阻害作用を含むいくつかの作用を有しているが、近年ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害することが見いだされ、VPA の作用に DNA の塩基配列変化に起因しない遺伝子発現制御変化 (エピジェネティック制御) が関わる可能性が示された。エピジェネティック制御には、ヒストンテイルの化学的修飾 (アセチル化、メチル化、リン酸化など) や DNA のメチル化による機構があり、近年精神疾患の発症にも関与していることが報告されている。しかしながら、妊娠中の VPA 服用によって引き起こされる出生児の発達障害にエピジェネティック制御異常が関与しているか否かは不明である。

本研究では胎生期の VPA 曝露が生後の精神発達に異常をもたらす分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、まず、胎仔期 VPA 曝露による自閉症様モデルマウスを作製し、行動学および組織化学的解析手法により病態モデル動物としての妥当性を評価した。また、病態モデルマウスの精神異常行動に対する HDAC 阻害作用の関与について検討し、さらに、胎仔期 VPA 曝露マウスの学習記憶障害に対する薬物治療の可能性について追究した。

妊娠中の VPA 服用による出生児への影響は、妊娠期によって異なる障害を発現することが臨床所見として認められている。本研究では、胎仔期 VPA 曝露マウスが、VPA を投与する妊娠日に応じて、奇形あるいは情動行動異常といった異なる障害を発現することを示した。また、妊娠 12.5 日目 (E12.5) に VPA 曝露した仔マウスが発育後に自発運動量の低下、不安様行動の惹起、社会性行動の低下、学習記憶障害といった異常行動を発現することを示した。すなわち E12.5 に VPA 曝露した仔マウスの異常行動は自閉症様症状の一部を反映しており、一つの自閉症モデル動物になると考えられた。さらに、自閉症様異常行動の発現との関連性が示唆される脳組織形態学的変化として、前頭前皮質および体性感覚皮質の細胞数の減少を見だし、本現象が VPA 曝露後の早い時期に新生する神経細胞の大脳皮質層への移動障害によることを示した。

E12.5 に VPA 曝露したマウスの精神異常行動発現と大脳皮質の細胞数減少に関わる分子機序として、HDAC 阻害の関与について追究した。パルプロミド (VPD) は、HDAC 阻害作用が欠落した VPA アナログであることが報告されており、VPA の HDAC 阻害作用の解析における有用な比較対照ツールとして用いられている。VPA 曝露では、胎仔脳において、一過性のアセチル化ヒストンレベルの増大と、それに引き続く、大脳新皮質の細胞死の促進と基底核原基の細胞増殖の抑制を認めた。さらに、VPD の胎仔期曝露では行動学および組織解剖学的な変化が生じないことを認めた。大脳新皮質は興奮性神経細胞が新生する領域、基底核原基は抑制性神経細胞が新生する領域として知られ、これら領域で新生した細胞が大脳皮質に移動して層構造の形成に関わるということが報告されている。これらの知見を合わせて考えると、本研究で見いだした胎仔期 VPA 曝露マウスの自閉症様異常行動の発現において、HDAC 阻害作用が重要な役割を持ち、本作用をトリガーとする胎仔脳での細胞死の促進と神経細胞の増殖抑制と、これらに伴って生じると考えられる大脳皮質層の構成細胞数の減少が病態発現の分子機序であることが示唆された。

近年、エピジェネティック制御異常に対して HDAC 阻害薬が有効性を示すことが示唆されており、また、神経変性疾患モデルマウスにおいて認められる学習記憶障害に対して、VPA および酪酸ナトリウム (SB) などの HDAC 阻害薬が有効性を示すことが報告されている。本研究では、VPA および SB の慢性投与が胎仔期 VPA 曝露マウスの学習記憶障害に対して改善作用を示すことを見いだした。また、胎仔期 VPA 曝露マウスの海馬 CA1 領域において、神経細胞の樹状突起スパイン密度が減少していることを明らかにし、学習記憶障害を改善させた生後の VPA および SB の慢性投与が、このスパイン密度の減少を対照群と同レベルにまで回復させることを見いだした。すなわち、本マウスの学習記憶障害が、神経

細胞の形態異常に起因する可能性を示した。

以上、本研究で得られた知見は、発達障害の病態発現におけるエピジェネティクスとスパインバイオロジーの重要性を示すものであり、これら学問の概念を取り入れた今後のさらなる研究により、胎児期環境因子負荷による発達障害発現の分子基盤の解明と新たな発達障害治療薬の開発に繋がることが期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

発達障害の一つに分類される自閉症は、社会性や他者とのコミュニケーション能力に問題が見られる疾患で、その病態の分子基盤については未だ不明である。一方、てんかん、躁病および躁うつ病の躁状態などの治療に臨床応用されているバルプロ酸ナトリウム（VPA）は、比較的安全性が高い薬物とされているが、妊娠中の服用により催奇形性や胎児性VPA症候群など重篤な毒性がもたらされることが、ならびに出生児において自閉症や精神遅滞といった発達障害の発症リスクを増大させることが報告されている。VPAは $\gamma$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ阻害作用を含むいくつかの作用を有しているが、近年ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）を阻害することが見いだされ、VPAの作用にDNAの塩基配列変化に起因しない遺伝子発現制御変化（エピジェネティック制御）が関わる可能性が示されている。エピジェネティック制御は、精神疾患の発症にも関与していることが報告されているが、妊娠中のVPA服用によって引き起こされる出生児の発達障害にエピジェネティック制御異常が関与しているか否かは不明である。本研究では胎生期のVPA曝露が生後の精神発達に異常をもたらす分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、胎仔期VPA曝露による自閉症様モデルマウスを作製し、神経薬理学的検討を行った。その結果、胎仔期VPA曝露マウスが自閉症様の行動変化を示すこと、自閉症様異常行動の発現との関連性が示唆される脳組織形態学的変化を示すこと、これらの作用にHDAC阻害作用が関わっていることを明らかにした。また、胎仔期VPA曝露マウスの学習記憶障害が発育後のHDAC阻害薬慢性投与により改善すること、この作用がスパイン密度の変化と関連していることを明らかにした。これらの成果は、発達障害の病態発現におけるエピジェネティクスとスパインバイオロジーの重要性を示すものであり、胎児期環境因子負荷による発達障害発現の分子基盤の解明と新たな発達障害治療薬の開発に貢献すると考えられ、博士（薬学）の学位授与に十分値するものと評価できる。