The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	バルプロ酸誘発自閉症モデルマウスの皮質形成異常に関する神経化学的研究
Author(s)	河内, 琢也
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61699
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　河内　琢也　　）	
論文題名	バルプロ酸誘発自閉症モデルマウスの皮質形成異常に関する神経化学的研究

論文内容の要旨

自閉症スペクトラムは，遺伝的要因と環境要因の相互作用によって発症する神経発達障害である．当研究室では，バルプロ酸ナトリウム(VPA)を胎生(E)12.5に投与した妊娠マウスから出生したマウス(以下，胎仔期VPA曝露マウス)の自閉症モデルとしての有用性について検証し，自発運動量の減少，不安様行動の増加，社会性行動障害，および認知記憶障害などの行動異常を発現すること，またVPA投与後24時間において胎仔大脳新皮質で細胞死の増加，胎仔基底核原基で細胞増殖能の低下，またマウス成熟後では前頭前皮質，体性感覚皮質や海馬といった脳領域において，神経細胞数や樹状突起スパイン密度の減少が見られることを明らかにしている．これらの成績は，VPAによる行動異常の発現に，神経細胞の成熟の異常や樹状突起スパインの形成異常など，発達期の皮質形成異常が関与していることを示唆するが，その詳細なメカニズムは不明である．

胎仔マウスの大脳皮質形成において，E12.5は神経幹細胞が神経細胞に分化する神経細胞産生期の初期段階であり，神経幹細胞や神経前駆細胞の占める割合が高いことが知られている．したがって，E12.5のVPA曝露が神経幹細胞へ作用し，分化する神経細胞やアストロサイトなどの機能に影響している可能性が考えられる．本研究では，妊娠中のVPA曝露により引き起こされる皮質形成異常の神経化学的なメカニズムを明らかにすることを目的に，大脳皮質由来の神経幹細胞，神経細胞およびアストロサイトを用いた*in vitro*での検討を行った．

VPAが大脳皮質由来神経幹細胞の増殖および分化に及ぼす影響について検討を行った結果，0.1 mM以上のVPAを処置後3日目において， 5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU)取り込み能の低下およびニューロスフィア形成の抑制が認められた．また，VPAが神経幹細胞の分化に及ぼす影響について，神経細胞マーカーであるClass III β-tubulinおよびアストロサイトマーカーであるglial fibrillary acidic protein (GFAP)のmRNA発現変化を指標に検討した結果，VPA処置群では対照群と比べてClass III β-tubulin mRNA発現量が増加し，GFAP mRNA発現量が減少していることを見出した．一方, 選択的ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬であるトリコスタチンA (TSA)を用いた検討においても, BrdU取り込み能の低下，ニューロスフィア形成の抑制，Class III β-tubulin mRNA発現増加およびGFAP mRNA発現減少を認めた．以上の結果から，VPAがHDAC阻害作用を介して神経幹細胞の増殖能を低下させること，神経細胞への分化を促進しアストロサイトへの分化を抑制することが明らかになった．

VPA曝露マウス由来の培養神経細胞および培養アストロサイトを用いた研究では，胎仔期にVPAに曝露された神経幹細胞から分化すると考えられる，神経細胞とアストロサイトの成熟・機能について解析した．その結果，E12.5でのVPA曝露によって，培養神経細胞では， Neuroligin1，Shank2およびShank3 mRNAの発現減少やCntnap2 mRNA

の発現増加といった自閉症関連遺伝子の発現変動がみられ，樹状突起の形成遅延やスパイン密度の低下が認められた．培養アストロサイトにおいては，細胞増殖能の低下，グルタミン酸クリアランス能の亢進，グルタミン酸トランスポーターの発現減少，そしてグルコース取り込み能の低下とグルコーストランスポーターおよび乳酸トランスポーターの発現減少が認められた．また，E12.5にTSAを曝露したマウス由来の培養神経細胞および培養アストロサイトを用いて検討を行った結果，培養神経細胞では，VPAと同様の遺伝子発現変動，樹状突起の形成遅延およびスパイン密度の低下が認められ，VPAによる神経細胞の成熟異常や遺伝子の発現変動には，HDAC阻害作用が重要な役割を担っていることが示唆された．一方，培養アストロサイトにおいては，TSAは，細胞増殖能が増加したが，グルタミン酸クリアランス能の亢進，グルタミン酸トランスポーターの発現減少，そしてグルコース取り込み能の低下とグルコーストランスポーターおよび乳酸トランスポーターの発現減少についてはVPAと同様であった．このように培養アストロサイトでは，TSAとVPAとで一部異なる作用がみられ，VPAによるアストロサイトの機能異常には，HDAC阻害作用以外の作用も関与している可能性が示された．

以上，本研究は，VPA自閉症モデルの病態メカニズムの一端として，神経幹細胞から神経細胞への分化の促進，神経細胞の成熟異常とスパイン形成不全，そして神経細胞の機能維持に必須であるアストロサイトの機能異常を明らかにしたものである．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　河内　琢也　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	橋本　均
	副 査　教 授	田熊　一敞
	副 査　教 授	辻川　和丈

論文審査の結果の要旨

「バルプロ酸誘発自閉症モデルマウスの皮質形成異常に関する神経化学的研究」と題する論文において学位申請者は、胎生期のバルプロ酸投与が神経幹細胞、神経細胞、アストロサイトの発達・成熟や機能に及ぼす影響について細胞レベルで明らかにした。この研究は、自閉症の原因の一つと考えられている大脳皮質の形成異常のメカニズムの解明につながるものであり、その意味において神経薬理学的に興味深い研究である。

以下、本学位論文で発表された研究成果とその評価を示す。

胎生12.5日目(E12.5)にバルプロ酸を投与した母親マウスから出生した雄性マウスは、自閉症様の行動異常を示すことが明らかになっている。またバルプロ酸が、投与後24時間において胎仔大脳皮質で細胞死を増加させること、そしてマウス成熟後では前頭前皮質や体性感覚皮質といった脳領域において、神経細胞数や樹状突起スパイン密度の減少を引き起こすことが見出されている。これらの知見から、バルプロ酸による行動異常の発現には、神経細胞の成熟の異常など、発達期の皮質形成異常が関与している可能性が考えられるが、それらを引き起こす分子機序は不明である。本学位論文において学位申請者は、妊娠期のバルプロ酸投与により引き起こされる皮質形成異常のメカニズムを明らかにするため、バルプロ酸が大脳皮質由来の神経幹細胞の増殖および分化に与える影響と、胎仔期にバルプロ酸に曝露されたマウス由来の神経細胞およびアストロサイトの成熟や機能に与える影響について解析を行い、以下のことを明らかにした。

1. バルプロ酸は、神経幹細胞の増殖を抑制し、神経細胞への分化を促進した。また、バルプロ酸の作用機序の一つであるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害作用を有する化合物トリコスタチンAによっても、神経幹細胞の増殖が抑制され、神経細胞への分化が促進されることを見出した。
2. E12.5のバルプロ酸曝露は、神経細胞の成熟遅延および樹状突起スパイン形成異常を引き起こすこと、またこれらの形態学的異常にNeuroligin、Contactin-associated protein-like 2、Shank2、Shank3などのシナプス関連因子の遺伝子発現変動が関与することを明らかにした。一方、トリコスタチンAの曝露においても、同様の神経形態学的異常や遺伝子発現変動が認められた。
3. E12.5のバルプロ酸曝露は、アストロサイトの増殖とグルコース取り込み能を低下させ、グルタミン酸クリアランス能を亢進させた。一方、トリコスタチンAの曝露は、アストロサイトのグルタミン酸クリアランス能の亢進と、グルコース取り込み能の低下を引き起こしたが、増殖能に関しては亢進させた。

以上のように、バルプロ酸が、神経幹細胞から神経細胞への分化の促進、神経細胞の成熟異常とスパインの形成不全、そして神経細胞の機能維持に関わるアストロサイトの機能異常を引き起こすことを示した。また、バルプロ酸の作用におけるHDAC阻害の役割を明らかにした。以上の通り、本研究の成果は、バルプロ酸誘発自閉症モデルマウスの病態メカニズムの一端を細胞レベルで明らかにしたものであり、薬の生体における作用機構に関する有用な薬学的研究であることから、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。