

氏名	武田 琴水
学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1882号
学位授与の日付	令和3年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（課程博士）
学位論文題目	バルプロ酸ナトリウム誘発神経発達障害におけるアストロサイトの寄与に関する研究
論文審査委員	(主査) 福岡大学 教授 岩崎 克典 (副査) 福岡大学 教授 道具 伸也 福岡大学 准教授 桂林 秀太郎

内容の要旨

【背景・目的】

バルプロ酸ナトリウム (Valproic acid; VPA) は抗てんかん薬として広く使用されており、片頭痛発作の予防薬や双極性障害の躁状態の治療薬としても適応がある。その一方で、妊娠中の VPA 服用は出生児の自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorder; ASD) や注意欠陥多動性障害 (attention deficit/hyperactivity disorder; ADHD) 等の神経発達障害の罹患リスクを上昇させることが報告されており、また出生児の3歳時点における知能指数が低く、胎内で曝露した VPA の濃度と用量依存的な関係を示すことが知られている。このように妊娠中の VPA 服用は胎児の神経発達に有害な影響を及ぼすにも関わらず、VPA は妊婦に対しても使用されることがあり、妊婦のてんかん発作や気分障害のリスクと胎児の神経発達障害のリスクとのバランスを考慮しながら使用する必要がある。妊娠期の VPA 服用による胎児への有害事象の予防法を提案するためには、VPA が神経発達に及ぼす影響の詳細なメカニズムを解明することが重要である。

VPA と神経発達障害の関係については、近年多くの基礎研究が行われている。例えば、胎内で VPA を曝露したマウス (VPA マウス) は ASD 様症状や認知機能障害などを示し、ASD モデルマウスとして一般的に使用されている。また出生後の仔マウスに VPA を投与すると、VPA マウスと同様の ASD 様症状や記憶障害等を示すことが報告されている。これらのモデルマウスでは、興奮性/抑制性神経 (E/I) バランスの不均衡が認められる。また、ニューロンに対して VPA を直接曝露した場合も同様に E/I バランスが崩壊する。つまり、VPA が誘発するマウスの行動変化は脳神経回路の E/I バランスの不均衡が原因である可能性がある。しかし、これらの研究の多くは VPA がニューロンに与える影響に焦点を当てたものであり、神経発達の過程に重要な役割を担うアストロサイトが VPA によって受ける影響については未だに明らかでない。

アストロサイトは脳内において最大の体積を占めるグリア細胞の一種である。アストロ

サイトはニューロンの物理的支持やニューロンへの栄養供給のみならず、シナプス形成やシナプス強度の制御を担い、さらにアストロサイトのシナプスに対する影響はグルタミン酸作動性ニューロンと GABA 作動性ニューロンでは異なることが報告されている。つまり、アストロサイトは脳内における E/I バランスの制御に重要な役割を担っていることが予想され、ASD や ADHD 等の神経発達障害の発症に関与している可能性がある。

本研究は VPA を由来とした神経発達障害の発症機序の解明を目的とし、アストロサイトに着目して検討を行った。実験では *in vitro* において VPA を直接曝露したアストロサイトおよび ASD モデルマウスのアストロサイトがシナプスの形成や機能に与える影響について、電気生理学、免疫組織学、分子生物学、生化学的手法を用いて検討した。

【研究方法】

(第 1 章：VPA 曝露アストロサイト標本) 生後 0~1 日目の ICR マウス大脳皮質から単離培養したアストロサイトに 1 mM VPA を一定期間処置した。培養アストロサイトから VPA を洗浄除去し、その上に ICR マウス大脳皮質より単離したニューロンを播種して VPA 曝露アストロサイト-ニューロン共培養標本作製した。比較対照標本には VPA 無処置のアストロサイトを使用した。

(第 2 章：ASD モデルマウス由来アストロサイト標本) 妊娠 12.5 日目の ICR マウスに 500 mg/kg の濃度の VPA を腹腔内投与し、出生した仔マウスを VPA マウス (ASD モデルマウス) とした。出生後 0~1 日目の VPA マウス大脳皮質よりアストロサイトを単離培養した。その上に VPA 無処置の ICR マウスの大脳皮質より単離したニューロンを播種し、ニューロン-VPA マウス由来アストロサイト共培養標本作製した。比較対照標本には VPA と同容量の生理食塩水を腹腔内投与した ICR マウスから出生した仔マウスのアストロサイトを使用した。

本研究の培養方法により、VPA の影響をアストロサイトにのみを限局することが可能である。評価はパッチクランプ法による膜電位固定下におけるシナプス機能解析、免疫染色法による神経細胞の形態解析、RT-PCR 法による mRNA 発現解析ならびにウエスタンブロット法によるタンパク質発現解析を行った。

【結果：VPA 曝露アストロサイトによる抑制性シナプス伝達機能への影響】

in vitro において VPA に曝露されたアストロサイトが、共培養したニューロンのシナプス伝達機能に与える影響について検討を行った。VPA 曝露アストロサイトと共培養した GABA 作動性ニューロンでは、自発性微小抑制性後シナプス電流 (miniature Inhibitory Postsynaptic current, mIPSC) の amplitude は変化せず frequency のみが低下した。この結果は GABA 作動性シナプス前終末の機能が損なわれたことを示す。GABA 作動性シナプス前終末の変化を分析するため蛍光免疫染色法を用いて小胞性 GABA トランスポーター (vesicular GABA transporter, VGAT) の発現を解析したところ、VPA 曝露アストロサイトと共培養した GABA 作動性ニューロンでは、VGAT 抗体陽性シナプス数が減少した。これ

らの結果は、VGAT 抗体陽性シナプスの減少または欠損が GABA 作動性シナプス前終末の機能障害を誘起することを示唆する。パッチクランプ法および蛍光免疫染色法のいずれの実験結果においても、VPA 曝露アストロサイトは GABA 作動性ニューロンにのみ機能低下作用を示し、グルタミン酸作動性ニューロンに対しては影響を与えなかった。VPA 曝露アストロサイトの GABA 作動性ニューロンに対する作用点を解析するため、RT-PCR 法を用いて GABA 作動性シナプスの形成に関与する因子の mRNA の発現解析を行った。グルタミン酸作動性シナプスおよび GABA 作動性シナプスの前終末で発現するシナプス形成関連因子の一つに PTPRD がある。本標本における Ptprd mRNA 発現レベルは、VPA 曝露アストロサイトと共培養したニューロンにおいて優位に低下した。培養海馬ニューロンにおける PTPRD ノックダウンは、グルタミン酸作動性シナプスの形成および伝達機能に影響することなく GABA 作動性シナプスの形成と伝達機能を低下させることが報告されている。また、ASD および ADHD において、PTPRD の突然変異が知られており、つまり、本研究における GABA 作動性シナプスの形成能と伝達機能の低下は PTPRD の発現低下に起因し、さらに ASD や ADHD を誘発する原因となっている可能性がある。

【結果：ASD モデルマウス由来アストロサイトによる興奮性シナプス伝達機能への影響】

ASD モデルマウスである VPA マウスのアストロサイトが、共培養したニューロンのシナプス伝達機能に与える影響について検討を行った。VPA マウス由来アストロサイトと共培養したグルタミン酸作動性ニューロンでは、自発性微小興奮性後シナプス電流 (miniature Excitatory Postsynaptic current, mEPSC) によって指標されるシナプス前終末の開口放出機能に変化はなかったが、活動電位刺激による興奮性シナプス後電流 (Excitatory Postsynaptic current, EPSC) が増強した。この理由として Readily Releasable Pool (RRP) におけるシナプス小胞数が増加したことが挙げられた。シナプス小胞数の増加について分析するため、VGLUT1 抗体を用いてグルタミン酸作動性シナプスの蛍光免疫染色を行ったところ、VPA マウス由来アストロサイトと共培養したグルタミン酸作動性ニューロンの VGLUT1 抗体陽性細胞数に差異は認められなかった。つまり、VPA マウス由来アストロサイトと共培養したグルタミン酸作動性ニューロンにおいて、形成されるシナプス数に変化が認められないにも関わらずシナプス小胞数が増加しており、その結果グルタミン酸作動性シナプス伝達が増強したことが明らかとなった。VPA マウス由来アストロサイトのグルタミン酸作動性シナプス小胞への影響を検討するため、シナプス小胞の構成および開口放出に関与するタンパク質について、ウェスタンブロット法により解析を行った。VPA マウス由来アストロサイトと共培養したニューロンにおいて、synaptotagmin および SNAP25 の発現が優位に増加した。Synaptotagmin および SNAP25 は RRP size の調節を担うことが報告されており、つまり本研究におけるグルタミン酸作動性ニューロンのシナプス小胞数の増加およびシナプス伝達機能の上昇は、VPA マウス由来アストロサイトによる synaptotagmin および SNAP25 の発現増加に起因する可能性がある。

【総括】

第1章においてVPAを直接曝露したアストロサイトは共培養したGABA作動性ニューロンの機能を抑制し、第2章においてVPAマウス由来アストロサイトはグルタミン酸作動性ニューロンの機能を増強することが明らかになった。つまり、アストロサイトを介したVPAのニューロンに対する作用は、E/Iバランスを興奮性に傾倒するものであることが示唆される。本研究ではASDをはじめとしたVPAを由来とする神経発達障害の発症機序が、アストロサイトの異常に基づくものである可能性を示した。臨床における新たな神経発達障害の治療の一つとしてアストロサイトを提案する。

審査の結果の要旨

バルプロ酸ナトリウム（VPA）は抗てんかん薬として広く使用されているが、その一方で妊娠中のVPA服用は出生児の自閉症スペクトラム障害(ASD)や注意欠陥多動性障害(ADHD)等の神経発達障害の罹患リスクを上昇させる等の副作用が報告されている。妊婦にVPAを投与する際には、妊婦のてんかん発作や気分障害のリスクと胎児に対する神経発達障害のリスクとのバランスを考慮する必要があり、胎児への有害事象を予防するためにはVPAが神経発達に及ぼす影響の詳細なメカニズムを解明することが重要である。VPAと神経発達障害の関係については、近年多くの基礎研究が行われている。例えば、胎内でVPAを曝露したマウス（VPAマウス）はASD様症状や認知機能障害などを示し、ASDモデルマウスとして使用されている。VPAマウスでは脳内における興奮性/抑制性神経（E/I）バランスの不均衡が認められ、ASD様症状の原因の一つと考えられている。また、アストロサイトは脳内において最大の体積を占めるグリア細胞の一種であり、シナプスの機能調節を担うことから、E/Iバランスの制御に重要な役割を担っていることが予想され、ASDやADHD等の神経発達障害の発症に関与している可能性が考えられる。本研究はVPAを由来とした神経発達障害の発症機序の解明を目的とし、アストロサイトに着目して検討を行った。

【研究方法】

（第1章：VPA曝露アストロサイト標本）生後0～1日目のICRマウス大脳皮質から単離培養したアストロサイトに1 mM VPAを一定期間処置した。培養アストロサイトからVPAを洗浄除去し、その上にICRマウス大脳皮質より単離したニューロンを播種してニューロン-VPA曝露アストロサイト共培養標本作製した。比較対照標本にはVPA無処置のアストロサイトを使用した。

（第2章：ASDモデルマウス由来アストロサイト標本）妊娠12.5日目のICRマウスに500 mg/kgの濃度のVPAを腹腔内投与し、出生した仔マウスをVPAマウス（ASDモデルマウス）とした。出生後0～1日目のVPAマウス大脳皮質よりアストロサイトを単離培養した。その上にVPA無処置のICRマウスの大脳皮質より単離したニューロンを播種し、ニューロン-VPAマウス由来アストロサイト共培養標本作製した。比較対照標本にはVPAと同容量の生理食塩水を腹腔内投与したICRマウスから出生した仔マウスのアストロサイトを使用した。

本研究の培養方法により、VPAの影響をアストロサイトにのみに限局することが可能である。評価はパッチクランプ法による膜電位固定下におけるシナプス機能解析、免疫染色法による神経細胞の形態解析、RT-PCR法によるmRNA発現解析ならびにウエスタンブロット法によるタンパク質発現解析を行った。

【結果：VPA曝露アストロサイトによる抑制性シナプス伝達機能への影響】

*in vitro*においてVPAに曝露されたアストロサイトが、共培養したニューロンのシナ

プス伝達機能に与える影響について検討を行った。VPA 曝露アストロサイトと共培養した GABA 作動性ニューロンでは、GABA 作動性シナプスの形成能が低下し、それに伴い GABA 作動性シナプスの伝達機能が低下した。このシナプス機能変化は、PTPRD の発現低下に起因する可能性が考えられた。VPA 曝露アストロサイトは GABA 作動性ニューロンにのみ機能低下作用を示し、グルタミン酸作動性ニューロンに対しては影響を与えなかった。

【結果：ASD モデルマウス由来アストロサイトによる興奮性シナプス伝達機能への影響】

ASD モデルマウスである VPA マウスのアストロサイトが、共培養したニューロンのシナプス伝達機能に与える影響について検討を行った。VPA マウス由来アストロサイトと共培養したグルタミン酸作動性ニューロンでは、シナプス小胞数の増加とそれに伴うシナプス伝達機能の増強が認められた。このシナプス機能変化は、synaptotagmin および SNAP25 の発現増加に起因する可能性が考えられた。

以上のことから、VPA を直接曝露したアストロサイトは共培養した GABA 作動性ニューロンの機能を抑制し、VPA マウス由来アストロサイトはグルタミン酸作動性ニューロンの機能を増強することが明らかになった。つまり、アストロサイトを介した VPA のニューロンに対する作用は、E/I バランスを興奮性に傾倒するものであることが示唆された。このことは、ASD をはじめとした VPA を由来とする神経発達障害の発症機序が、アストロサイトの異常に基づくものである可能性を示したものである。公聴会での発表態度、発表内容、質疑に対する応答も問題なく完了した。従って本論文を薬学研究科の博士論文として承認する。