

福岡大学博士論文

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

令和2年度3月

PD171006

武田 琴水

目次	1
----	---

緒言	3
----	---

第1章 バルプロ酸ナトリウム曝露アストロサイトによるシナプス伝達機能への影響	5
--	---

1 実験材料および実験方法

1-1 実験動物

1-2 実験方法

1-2-1 VPA の調整及び処置

1-2-2 アストロサイトのマス培養標本およびオータプス培養標本の作製手順

1-2-3 ニューロン-アストロサイト共培養標本の作製手順

1-2-4 ホールセルパッチクランプ法を用いたシナプス伝達機能の解析

1-2-5 蛍光免疫染色法を用いたシナプスおよびニューロン形態の解析

1-2-6 RT-PCR 法を用いたシナプス形成関連遺伝子の発現解析

1-2-7 統計処理

2 実験結果

2-1 VPA 曝露アストロサイトによるシナプス伝達機能への影響

2-2 VPA 曝露アストロサイトによるシナプスおよびニューロン形態への影響

2-2-1 VPA 曝露アストロサイトによるシナプス形成への影響

2-2-2 VPA 曝露アストロサイトによる樹状突起形態への影響

2-2-3 VPA 曝露アストロサイトによる軸索形態への影響

2-3 VPA 曝露アストロサイトによるシナプス形成関連遺伝子への影響

3 小括

第2章 自閉症スペクトラム障害モデルマウス由来アストロサイトによるシナプス伝達機能への影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29

1 実験材料および実験方法

1-1 実験動物

1-2 実験方法

1-2-1 VPA の調整及び処置

1-2-2 超音波発声測定による ASD モデルマウスの選定

1-2-3 アストロサイトのマス培養標本およびオータプス培養標本の作製手順

1-2-4 ニューロン-アストロサイト共培養標本の作製手順

1-2-5 ホールセルパッチクランプ法を用いたシナプス伝達機能の解析

1-2-6 蛍光免疫染色法を用いたシナプスおよびニューロンの形態解析

1-2-7 ウェスタンブロット法を用いたシナプス小胞関連タンパク質の発現解析

1-2-8 統計処理

2 実験結果

2-1 ASD モデルマウス由来アストロサイトによるシナプス伝達機能への影響

2-2 ASD モデルマウス由来アストロサイトによるシナプスおよびニューロン形態への影響

2-2-1 ASD モデルマウス由来アストロサイトによるシナプス形成への影響

2-2-2 ASD モデルマウス由来アストロサイトによる樹状突起形態への影響

2-3 ASD モデルマウス由来アストロサイトによるシナプス小胞関連因子への影響

3 小括

総括ならびに結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 48

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 50

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 56

緒言

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 [1,2]、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 [3]。これらの報告のように妊娠中の 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、妊婦に対する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、VPA を服用した妊婦の出生児と同様に、胎内で VPA を曝露したマウス (VPA マウス) は社会性行動障害や反復行動等の ASD 様症状や認知機能障害などを示し [4,5]、またヒトの妊娠第 3 三半期に相当する出生後 14 日の仔マウスに 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 [6,7,8]。これらのモデルマウスでは、グルタミン酸作動性シナプス伝達の増強 [9] と GABA 作動性シナプス伝達の減弱 [10] が見られ、興奮性/抑制性神経バランス (E/I バランス) の不均衡が認められる。また、培養皮質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 バランスが増大する不均衡が認められる [11,12]。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、神経発達の過程でシナプス形成やシナプス伝達の機能調節等の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細胞である [13]。大脳皮質の発達に応じて、神経幹細胞は最初にニューロンへと分化し、続いてアストロサイト、最後にオリゴデンドロサイトへと分化する [14]。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 [15-23]。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。

第1章 バルプロ酸ナトリウム曝露アストロサイトによるシナプス伝達機能への影響

1 実験材料および実験方法

1-1 実験動物

動物を扱った全ての実験は福岡大学の実験動物管理福祉委員会の規則を遵守し行った。妊娠12日目のICRマウス（Catalogue ID: Jcl:ICR, CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan）を九動（Tosu, Japan）から購入し、アストロサイトおよびニューロンの初代培養には生後0～1日目のマウスを使用した。マウスは12時間の明暗サイクル（7～19時）で一定温度（ 23 ± 2 °C）に制御された部屋に収容し、プラスチックケージにて個別に飼育した。食料（CLEA Rodent Diet, CE-2, CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan）および水は自由摂取とした。

1-2 実験方法

1-2-1 VPAの調整及び処置

VPA（Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan）は滅菌水に溶解し1 M VPA溶液を調整した。さらに10 % FBS含有D-MEM溶液（10 % FBS溶液）に希釈し、0.3 mM、1 mM、3 mMの濃度で実験を行った。アストロサイトはニューロンを播種する前に6日間VPAに曝露された。アストロサイトのVPA曝露とニューロン-アストロサイト共培養スケジュールは図1aに示す。6日間のVPA処置後、VPAを溶解した10 % FBS溶液を除去した。10 % FBS溶液の組成は以下に示す。

【10 % FBS含有D-MEM溶液の組成】

- ・ 450 mL DMEM, High Glucose, GlutaMAX™, Pyruvate
(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- ・ 50 mL US Fetal Bovine Serum (FBS), Defined
(HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA)
- ・ 1 mL Penicillin-Streptomycin, liquid
(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- ・ 0.25 mL MITO+ Serum Extender, 5 mL
(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)

1-2-2 アストロサイトのマス培養標本およびオータプス培養標本の作製手順

- ① 生後 0～1 日後の ICR マウスから全脳を取り出し、冷却した HBSS 溶液 (HBSS (-), Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan) 中で大脳皮質を分画、摘出した。
- ② 摘出した大脳皮質を Trypsin/EDTA 溶液 (0.05 w/v% トリプシン-0.53 mmol/l EDTA・4Na 溶液, Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan) が 1 mL 入った 1.5 mL マイクロチューブに入れ、37 °C、700 rpm で 20 分間振とうした。
- ③ 振とう後、マイクロチューブ内の Trypsin/EDTA 溶液を除去し、10 % FBS 溶液で洗浄した。
- ④ 新たに 10 % FBS 溶液を 1 mL 加え攪拌単離し、上清を 10 % FBS が 10 mL 入った培養フラスコ (細胞培養フラスコ 75 cm² フィルターキャップ, BM Equipment Co.,Ltd., Tokyo, Japan) に入れ、インキュベーター内で約 6 時間培養を行った (37 °C、CO₂ 濃度 5.0 %)。
- ⑤ 約 6 時間後、培養フラスコ内の浮遊細胞を除去するため、新たな 10 % FBS 溶液 10 mL と入れ替えインキュベーター内で 14 日間培養を行った。
- ⑥ 14 日間の培養後、アストロサイトが培養フラスコ底面に十分に育っていることを確認し、フラスコ底面を平面に数回打ち付け上位細粒細胞等を除去した。
- ⑦ 10 % FBS 溶液を吸引除去し PBS 溶液 (D-PBS(-), Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan) で数回洗浄した後、Trypsin/EDTA 溶液を 5 mL 加え 3～5 分程度インキュベートした。
- ⑧ アストロサイトが培養フラスコ底面から剥離されていることを確認し、Trypsin/EDTA 溶液と同量以上の 10 % FBS 溶液を加えて中和し酵素反応を止めた。
- ⑨ 剥離されたアストロサイトを 15 mL チューブに移し、3 分間遠心分離した (37 °C、1000 rpm)。
- ⑩ 遠心分離後、上清を除去し新たに 10 % FBS 溶液を 1 mL を加え攪拌し、さらに 10 % FBS 溶液を加え全量を 3～4 mL とした。
- ⑪ セルカウンター (Disposable Cell Counting Plate, Improved Neubauer Type, WATSON, Tokyo, Japan) を用いて細胞懸濁液中の細胞数を算出し、マス培養標本の場合は 150,000 個/1 well/6 well プレート (細胞培養プレート 6 well 平底, BM Equipment Co.,Ltd., Tokyo, Japan)、オータプス培養標本の場合は 25,000 個/1 well/6 well プレートとなるようにアストロサイトを播種した。5～6 時間後、1 mM VPA を添加し 6 日間培養を行った (「1-2-1 VPA の調整及び処置」参照)。培養液は 10 % FBS 溶液とし、2 mL/1 well/6 well プレートの条件で培養した。マス培養標本およびオータプス培養標本に用いるカバーガラスの作製方法については以下に示す。

【マス培養標本用カバーガラスの作製方法】

1. カバーガラス（22 丸 No.1, Matsunami Glass Ind.,Ltd., Osaka, Japan）を蓋付き容器に入れ、硝酸（Nitric Acid, Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan）に浸漬させ 1 日以上攪拌洗浄した。その後蒸留水で数日間洗浄することで脱脂処理を行った。
2. 洗浄したカバーガラスを 6 well プレートに 1 枚ずつ入れ、20 分間紫外線照射し殺菌した。
3. 2 mg/mL Collagen 溶液 (Collagen I, rat tail, 100 mg, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Bergen County, NJ, USA) と 0.5 mg/mL Poly-D-lysine hydrobromide (PDL) 溶液 (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) を 1:1 で混合した溶液を作製し、コーティング溶液とした。綿棒を用いてカバーガラスに薄く塗布した後、室温にて十分に乾燥させた。

【オータプス培養標本用カバーガラスの作製方法】

1. カバーガラスの洗浄と殺菌は上記【マス培養標本用カバーガラスの作製方法】と同様に行った。
2. 0.2 % アガロース溶液 (Agarose Type II-A Medium EEO, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) を作製し、綿棒を用いてカバーガラスに薄く塗布した後、20 分間紫外線照射し 1 日以上乾燥させた。
3. 上記【マス培養標本用カバーガラスの作製方法】で示したコーティング溶液を作製し、スタンプを用いてドット状のパターンコーティングを施した。使用したスタンプは直径 26 mm、ドットサイズ 300×300 μm 、ドット間隔 400 μm 、ドット高 500 μm とした。35 mm culture dish にレンズクリーニングティッシュを丸く切ったものを 3 枚程度敷き、コーティング溶液を 150 μL 程度入れこれをスタンプ台とした。
4. 0.2 % アガロース溶液を塗布したカバーガラスにスタンプした後、20 分間の紫外線照射により殺菌し、室温にて十分に乾燥させた。

1-2-3 ニューロン-アストロサイト共培養標本の作製手順

- ① 「1-2-2 アストロサイトのマス培養標本およびオータプス培養標本の作製手順」で作製したプレート内でアストロサイトがシート状およびドット状に育ったことを確認し、10 % FBS 溶液を吸引除去し NBM 溶液に置換した。NBM 溶液の組成は以下に示す。

【NBM 溶液の組成】

- ・ 245 mL Neurobasal-A Medium (NBA)(1X), liquid
(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- ・ 5 mL B-27 Serum-Free Supplement(50X), liquid
(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- ・ 2.5 mL GlutaMAX- I Supplement
(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- ・ 0.5 mL Penicillin-Streptomycin, liquid
(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

- ② 生後 0～1 日後の ICR マウスから全脳を取り出し、冷却した HBSS 溶液中で大脳皮質を摘出した。
- ③ 摘出した大脳皮質を Enzyme 溶液が 800 μ L 入った 1.5 mL マイクロチューブに入れ、37°C、700 rpm で 55 分間振とうした。Enzyme 溶液の組成は以下に示す。

【Enzyme 溶液の組成】

- ・ 10 mg L-Cystein hydrochloride monohydrate
(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 0.5 mL 100 mM CaCl₂ 溶液 (Calcium Chloride, Anhydrous)
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)
- ・ 50 μ L 0.5 M EDTA 溶液
(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 50 mL DMEM, High Glucose, GlutaMAX™, Pyruvate
(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

上記を冷凍保存し、用時解凍した。上記 2.5 mL に対してパパイン原液 (Papain, Suspension, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) 50 μ L を添加して用時調整し、95 % O₂, 5 % CO₂ 混合ガスで 20 分間バブリングを行った。

- ④ 55 分間の振とう後、マイクロチューブ内の Enzyme 溶液を除去し、Inactivation 溶液 600 μ L に置換した。再度 37 °C、700 rpm で 15 分間振とうし酵素反応を止めた。Inactivation 溶液の組成は以下に示す。

【Inactivation 溶液の組成】

- ・ 125 mg Trypsin inhibitor from chicken egg white
 (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 125 mg Albumin bovine serum Initial fractionation by heat shock
 (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 50 mL 50 μ L 10 % FBS 溶液
 (「1-2-1 VPA の調整及び処置」参照)

上記を冷凍保存し、用時解凍した。

- ⑤ 15 分間の振とう後、マイクロチューブ内の Inactivation 溶液を除去し、NBM 溶液で洗浄した。
- ⑥ 新たに NBM 溶液を 1 mL 程度加え攪拌単離し、上清を NBM 溶液で 10 倍程度に希釈した。
- ⑦ セルカウンターを用いて細胞懸濁液中の細胞数を算出し、マス培養標本の場合は 50,000 個/1 well/6 well プレート、オートプス培養標本の場合は 12,000 個/1 well/6 well プレートとなるように、アストロサイト層の上にニューロンを播種し 2 週間培養した。

1-2-4 ホールセルパッチクランプ法を用いたシナプス伝達機能の解析

パッチクランプ法は細胞膜における単一あるいは複数のイオンチャネルの活動について、チャネルを通るイオン電流として記録する方法である。1976 年に Neher と Sakmann によって開発された。

本法では、細胞膜にパッチ電極（ガラス管微小ピペット）をギガ・オーム ($G\Omega$) 以上の高抵抗で密着（ギガ・シール）させ、その先端開口部分の微小膜領域を電氣的に他の領域と隔絶した状態で電位固定させることで、そこに含まれるイオンチャネルを通るイオン電流を計測する方法である。本研究ではパッチ膜以外の全細胞膜を流れるイオン電流を計測するホールセルモードで実験を行った。

シナプス電流はパッチクランプアンプ (Multi Clamp700B, Molecular Device) を使用して測定した。DIGIDATA 1440A (Axon Instruments) を介し、pClamp 10 (Molecular Device) を用いて記録した。記録は 20kHz でサンプリングおよび 10kHz でフィルタリングし、コンピュータに取り込んだ。パッチ電極は BORO SILICA GLASS (SUTTER INSTRUMENT CO.) を用いて作製し、FLAMING/BROWN MICROPIPETTE PULLER (SUTTER

INSTRUMENT CO.) を用いて 3-4 段引きで作製した。記録したデータは AxoGraph X 1.2 software (AxoGraph Scientific, Berkeley, CA, USA) を用いて解析を行った。

【チャンバー内を還流する細胞外液の組成】

- ・ 1400 mM NaCl (Sodium Chloride)
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)
- ・ 24 mM KCl (Potassium chloride)
(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 100 mM HEPES, Molecular Biology Grade (free acid)
(Promega Corporation, Madison, WI, USA)
- ・ 100 mM Glucose (D(+)-Glucose (Dextrose, Anhydrous))
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)
- ・ 40 mM CaCl_2 (Calcium Chloride, Anhydrous)
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)
- ・ 10 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Magnesium Chloride Hexahydrate)
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)

上記を 10×ストックとして 1 L 作製し、用時希釈して使用した。pH は Tris-base (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol, KISHIDA CHEMICAL Co., Ltd, Osaka, Japan) を用いて 7.4 に調整した。

【細胞内を還流する電極内液の組成】

- ・ 1.0 mL ATP-GTP stock 溶液 (10×)
- ・ 0.1 mL 100 mM K-EGTA stock 溶液
- ・ 8.9 mL KCl-HEPES stock 溶液

上記を混合して冷凍保存し、用時解凍した。
各溶液の組成は以下に示す。

<ATP-GTP stock 溶液 (10×) の組成>

- ・ 120 mM Phosphocreatine disodium salt hydrate
(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 3 mM GTP-Na (Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate)
(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 40 mM ATP-Mg (Adenosine 5' -triphosphate magnesium salt)
(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 500 units Creatine Phosphokinase from rabbit muscle Type I
(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 6 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Magnesium Chloride Hexahydrate)

上記を 10×ストックとして作製し冷凍保存した。pH は KOH を用いて 7.48 に調整した。

<100 mM K-EGTA stock 溶液の組成>

- ・ 100 mM EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N' -
tetraacetic acid) (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)

EGTA 液を上記濃度に調整し冷凍保存した。pH は KOH を用いて 7.4 に調整した。

<KCl-HEPES stock 溶液の組成>

- ・ 153 mM KCl (Potassium chloride)
- ・ 20 mM HEPES, Molecular Biology Grade (free acid)

上記を作製し冷凍保存した。pH は KOH を用いて 7.4 に調整した。

● シナプス電流計測の操作手順

- ① 作製したマス培養標本プレート中のカバーガラスを倒立顕微鏡の記録チャンバーに設置した。
- ② パッチ電極に内液を充填してヘッドステージに設置したのち、顕微鏡下でマニピュレーターを用いてガラス電極を操作し、陽圧下でニューロンの細胞体表面に電極の先端を接近させた。
- ③ 5 mV、10 ms の矩形波を連続的に加え、抵抗値が上がる（矩形波の振幅が減少する）ことを確認して陽圧を解除し、三方活栓につないだシリンジから吸引してパッチ電極内を陰圧にしながらパッチ電極と細胞表面にギガオームシールを形成した。
- ④ -70 mV に膜電位を固定し、ギガ・シールになったことを確認後、シリンジを吸引して

高陰圧を与えることによりパッチ電極下の細胞膜を破った。

- ⑤ 十分に細胞膜が破られたことを確認し、膜容量 (pF) および直列全抵抗値 (R_s) を補正した。
 - ⑥ パッチ電極から下記に示す条件刺激を与え、各シナプス応答を検討項目として解析した。
- 自発性微小興奮性後シナプス電流 (miniature Excitatory Postsynaptic current, mEPSC) 活動電位ならびに微小抑制性後シナプス電流 (miniature Inhibitory Postsynaptic current, mIPSC) を抑制し、mEPSC を記録し観察した。

【mEPSC 記録用細胞外液の組成】

- ・ 1 μ M Tetrodotoxin, from Puffer Fish
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)
- ・ 1 μ M Gabazine
(SR-95531, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)

- 自発性微小抑制性後シナプス電流 (miniature Inhibitory Postsynaptic current, mIPSC) 活動電位ならびに mEPSC を抑制し、mIPSC を記録し観察した。

【mIPSC 記録用細胞外液の組成】

- ・ 1 μ M Tetrodotoxin, from Puffer Fish
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)
- ・ 5 μ M CNQX disodium salt hydrate
(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 25 μ M DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid solid
(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)

上記試薬を細胞外液に溶解し、薬液投与チューブを用いてマス培養ニューロンに 100 秒間投与した。内向きに観察される mEPSC および mIPSC の発生頻度 (frequency, Hz)、振幅 (amplitude, A) をそれぞれ測定した。なお、得られた値の平均値は、1 つの興奮性および抑制性シナプス小胞が開口放出したものと近似することができる。

1-2-5 蛍光免疫染色法を用いたシナプスおよびニューロン形態の解析

蛍光免疫染色法を用いて興奮性プレシナプスおよび抑制性プレシナプス、樹状突起、軸索

の形態解析を行った。オータプス培養標本を用いることによって 1 ニューロンあたりのシナプス形成数や突起伸長、分岐数を解析することが可能となる。撮影した画像は、imageJ software (1.48v, Wayne Rasband, NIH, available at 230 <http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて解析を行った。使用した試薬の組成、一次抗体および二次抗体は以下に示す。

【細胞固定液の組成】

- ・ 4 % -Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution
(NACALAI TESQUE, INC, Kyoto, Japan)

上記試薬に対して 2 % 濃度となるよう Sucrose (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) を添加し使用した。

【抗体溶液の組成】

- ・ 0.1 M Tris-base (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)
- ・ 0.15 M NaCl (Sodium Chloride)
- ・ 0.1 % Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 2 % Normal Goat Serum (ab7481) (Abcam, Cambridge, UK)

上記を混合し抗体溶液とした。溶媒には超純水を使用し、pH は HCl を用いて 7.4 に調整した。

【細胞洗浄用 PBS 溶液】

- ・ Phosphate Bufferd Saline Powder (0.01mol/L, pH7.2~7.4)
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)

上記試薬を超純水に溶解し、オートクレーブで滅菌し使用した。

【一次抗体】

- ・ VGLUT-1 (Polyclonal rabbit antiserum) = 1:1000
(Synaptic Systems, Goettingen, Germany)
- ・ VGAT (Polyclonal rabbit antiserum) = 1:1000
(Synaptic Systems, Goettingen, Germany)
- ・ Anti-MAP2 (Polyclonal Guinea pig antiserum) = 1:1000
(Synaptic Systems, Goettingen, Germany)
- ・ Tau (Tau46) Mouse mAb = 1:1000
(Cell Signaling TECHNOLOGY, Danvers, MA, USA)

【二次抗体】

- ・ Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (H+L) = 1:400
(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- ・ Alexa Fluor 488 goat anti-guinea pig IgG (H+L) = 1:400
(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- ・ Anti-Mouse IgG (H+L), CFTM 488A antibody produced in goat = 1:400
(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)

● 蛍光免疫染色標本作製の手順

- ① 6well プレート内の 10 % FBS を吸引除去し、PBS 溶液で 1 回洗浄した (2 mL/1well)。
- ② 細胞固定液を入れ室温にて 20-30 分間静置し、細胞固定した (2 mL/1well)。
- ③ 細胞固定後、PBS 溶液で各 well を 3 回程度洗浄した (2 mL/1well)。
- ④ パラフィルム上に一次抗体液を 150 μ L 置き、各 well からカバーガラスを取り出し細胞接着面が溶液と接するように置いた。カバーガラスが沈殿していないこと、気泡が入っていないことを確認し、4°Cで一晩以上一次抗体反応させた。
- ⑤ PBS 溶液で各 well を 3 回程度洗浄した (2 mL/1well)。
- ⑥ ④と同様に二次抗体反応させた。二次抗体反応は室温、遮光下にて 1 時間程度静置した。
- ⑦ PBS 溶液で各 well を 3 回程度洗浄した (2 mL/1well)。
- ⑧ スライドガラスに DAPI 含有封入剤 (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を 20 μ L 置き、各 well からカバーガラスを取り出し細胞接着面が封入剤と接するように置いた。
- ⑨ 封入剤を 30 分以上馴染ませた後、共焦点顕微鏡 LSM710 ZEN (Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて蛍光観察を行い、594 nm および 488 nm の蛍光波長を観察した。

1-2-6 RT-PCR 法を用いたシナプス形成関連遺伝子の発現解析

RT-PCR 法を用いて、GABA 作動性ニューロンやシナプスの成長や形成に関与する因子の遺伝子発現解析を行った。

RT-PCR 法は逆転写によって RNA から cDNA を合成し、その cDNA を用いて PCR を行う方法である。本手法により、タンパク質をコードする遺伝子を選択的に増幅し、少量しか存在しない mRNA を増幅して解析に使用することが可能となる。

● mRNA 抽出手順

- ① 6well プレート内の 10 % FBS を吸引除去し、PBS 溶液で 2 回洗浄した (2 mL/1well)。

- ② ISOSPIN Cell & Tissue RNA (NIPPON GENE Co. Ltd., Tokyo, Japan) を使用し、添付のマニュアルに従い mRNA 抽出を行った。
- ③ 濃度測定を行い mRNA の抽出を確認した。

- 逆転写反応手順

抽出した mRNA は SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用し、添付のマニュアルに従い逆転写反応させた。

- RT-PCR 法手順

逆転写反応で合成した cDNA は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO Co. Ltd., Osaka, Japan) および各プライマー (表 1) と混合し、LightCycler® Nano System (Roche, Basel, Switzerland) を使用して cDNA の増幅を行った。サンプルは比較 Ct 法により相対定量し、 β -actin 遺伝子を内部標準として用いた。

1-2-7 統計処理

全ての統計処理には GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。2 群間の統計処理には Student's t-test を用いた。多群間の統計処理には、一元配置分散分析の結果に基づき Dunnett's test および Tukey's test を用いた。結果は全て平均±標準誤差で表記し、p 値が 0.05 以下である場合を有意差ありとした。

2 実験結果

2-1 VPA 曝露アストロサイトによるシナプス伝達機能への影響

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に与える影響について、膜電位固定下におけるホールセルパッチクランプ法を用いて評価した。アストロサイトに曝露した VPA は 0.3 mM、1 mM、3 mM および 0 mM (control) とし、4 群比較し濃度検討した。実験にはマス培養した DIV 13-14 のニューロンを用いた。

まず、自発的なシナプス伝達を評価するために mEPSC および mIPSC を記録した。図 2a、b は各群の典型的な波形を示し、内向きに観測される微小な応答が mEPSC および mIPSC である。一般的に mEPSC および mIPSC の解析では、frequency をシナプス前終末の伝達物質放出の多寡の指標とし、amplitude をシナプス後膜の受容体の密度や感受性の指標として用いる。

mEPSC では、frequency、amplitude とともに 4 群間の差は見られなかった (frequency: 0 mM, n=19, 2.81 ± 0.54 Hz; 0.3 mM, n=19, 2.93 ± 0.42 Hz; 1 mM, n=17, 3.79 ± 0.81 Hz; 3 mM, n=17, 3.01 ± 0.76 Hz; 図 2c; amplitude: 0 mM, n=19, 26.6 ± 2.44 pA; 0.3 mM, n=19, 29.8 ± 2.18 pA, 1 mM, n=17, 29.9 ± 3.34 pA; 3 mM, n=17, 29.8 ± 2.69 pA; 図 2e)。

一方、mIPSC では、1 mM、3 mM の VPA を曝露したアストロサイトと共培養したニューロンにおいて frequency が有意に減少した (0 mM, n=20, 3.61 ± 0.40 Hz; 0.3 mM, n=18, 2.86 ± 0.53 Hz; 1 mM, n=16, 1.91 ± 0.31 Hz; 3 mM, n=16, 1.70 ± 0.40 Hz; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; 図 2d)。amplitude には有意な差は認められなかった (0 mM, n=20, 51.6 ± 4.31 pA; 0.3 mM, n=18, 47.3 ± 5.72 pA, 1 mM, n=16, 41.7 ± 4.27 pA; 3 mM, n=16, 40.2 ± 5.03 pA; 図 2f)。

以上のデータは、VPA を曝露したアストロサイトが濃度依存的に共培養ニューロンの GABA 作動性シナプス伝達機能を低下させることを示す。VPA 曝露アストロサイトによる影響が mIPSC の発生頻度にのみ現れたことは、アストロサイトを介した VPA の作用が興奮性および抑制性神経ネットワークの不均衡をもたらすことを示唆する。

2-2 VPA 曝露アストロサイトによるシナプスおよびニューロン形態への影響

2-2-1 VPA 曝露アストロサイトによるシナプス形成への影響

VPA 曝露アストロサイトと共培養した GABA 作動性ニューロンのシナプス伝達頻度の減少は、形成されるシナプス数の減少に起因する可能性がある。蛍光免疫染色法を用いて、オータプスニューロンのシナプス形成に対する VPA 曝露アストロサイトの影響について検討を行った。皮質ニューロンの GABA 作動性シナプスは多数の小胞性 GABA トランスポーター (vesicular GABA transporter, VGAT) を保有するため、VGAT 抗体で標識されたシナプスを GABA 作動性シナプスとみなし定量した (図 3b)。アストロサイトの VPA 曝露濃度は、シナプス伝達機能への影響が認められた 1 mM とした。

DIV 14 の GABA 作動性ニューロンにおいて、VGAT 抗体陽性シナプス数は VPA 曝露アストロサイトによって顕著に減少した (control, $n=30$, 422.42 ± 46.23 ; VPA, $n=30$, 207.12 ± 30.35 ; **, $p<0.01$; 図 3d)。同様にして、小胞性グルタミン酸トランスポーター1 (vesicular Glutamate transporter 1, VGLUT1) 抗体で標識されたシナプスをグルタミン酸作動性シナプスとして定量したところ (図 3a)、DIV 14 のグルタミン酸作動性ニューロンでは VGLUT1 抗体陽性シナプス数に変化はなかった (control, $n=23$, 363.1 ± 48.97 ; VPA, $n=20$, 377.83 ± 35.26 ; 図 3c)。

以上の結果は、前述したグルタミン酸作動性ニューロンには影響を与えないが GABA 作動性ニューロンのシナプス伝達を抑制したパッチクランプ法による電気生理学的結果と一致する。GABA 作動性シナプス伝達機能の低下が、GABA 作動性シナプス数の減少に起因する可能性が示唆された。

2-2-2 VPA 曝露アストロサイトによる樹状突起形態への影響

神経発達障害に関連する変異を有するアストロサイトは、共培養ニューロンの樹状突起形態の変化を誘発する[24,25]。そこで本研究では、微小管関連タンパク質 2 (MAP2) 抗体で標識された樹状突起の形態を観察した (図 3a,b)。

DIV 14 のグルタミン酸作動性ニューロンにおいて、樹状突起の長さ、分岐数のいずれも VPA 曝露アストロサイトによる影響は受けなかった (突起長: control, $n=23$, 1550.56 ± 151.89 μm ; VPA, $n=20$, 1496.84 ± 179.92 μm ; 図 3e; 分岐数: control, $n=23$, 24.05 ± 2.64 ; VPA, $n=20$, 22.73 ± 2.30 ; 図 3f)。DIV 14 の GABA 作動性ニューロンにおいても同様に、

樹状突起の長さ、分岐数ともに 2 群間の変化は認められなかった（突起長: control, n=30, $1175.65 \pm 110.42 \mu\text{m}$; VPA, n=30, $1094.68 \pm 103.66 \mu\text{m}$; 図 3g; 分岐数: control, n=30, 17.3 ± 1.72 ; VPA, n=30, 19.87 ± 2.32 ; 図 3h）。

以上の結果は、VPA 曝露アストロサイトは共培養したグルタミン酸作動性ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンの樹状突起のサイズや形態に影響を与えなかったことを示す。

2-2-3 VPA 曝露アストロサイトによる軸索形態への影響

アストロサイトが放出する液性因子は、GABA 作動性ニューロンの軸索の長さ、分岐数およびシナプス形成を変化させる[17]。GABA 作動性シナプス形成の減少が、軸索の発達の程度に起因するものであるかどうかを検討するため、GABA 作動性ニューロンの発達初期（DIV 5）と後期（DIV 14）における軸索の形態とシナプス形成について解析した。軸索はタウタンパク質で標識された細胞の長さ、分岐数、GABA 作動性シナプスは VGAT 抗体陽性シナプス数を解析した（図 4a）。

GABA 作動性ニューロンの軸索の長さおよび分岐数は、コントロールアストロサイト群と VPA 曝露アストロサイト群のいずれにおいても、発達の初期から後期にかけて有意に増大した。しかしコントロールアストロサイト群と VPA 曝露アストロサイト群の間には有意な差は認められなかった（突起長: control (DIV 5), n=18, $973.62 \pm 135.81 \mu\text{m}$; VPA (DIV 5), n=18, $737.87 \pm 121.58 \mu\text{m}$; control (DIV 14), n=13, $1764.71 \pm 191.85 \mu\text{m}$; VPA (DIV 14), n=16, $1845.51 \pm 213.162 \mu\text{m}$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$; 図 4b; 分岐数: control (DIV 5), n=18, 8.67 ± 0.97 ; VPA (DIV 5), n=18, 6.67 ± 0.69 ; control (DIV 14), n=13, 20.69 ± 2.88 ; VPA (DIV 14), n=16, 19.44 ± 2.22 ; ****, $p < 0.0001$; 図 4c)。

また、GABA 作動性シナプスの指標である VGAT 抗体陽性シナプス数は、コントロールアストロサイト群ではニューロンの発達の初期から後期にかけて増加を示した。一方で VPA 曝露アストロサイト群では VGAT 抗体陽性シナプス数は発達の増加は示さなかった（control (DIV 5), n=18, 251.11 ± 26.25 ; VPA (DIV 5), n=18, 163.39 ± 13.22 ; control (DIV 14), n=13, 455.00 ± 48.85 ; VPA (DIV 14), n=16, 202.19 ± 29.33 ; ****, $p < 0.0001$; 図 4d)。VPA 曝露アストロサイト群では GABA 作動性シナプスの発達が抑制されたが、軸索の成長はコントロールアストロサイト群と同様の結果であった。

以上の結果から、VPA 曝露アストロサイトは軸索の成長とは無関係に GABA 作動性シナプスの形成能を減衰させることが示唆された。

2-3 VPA 曝露アストロサイトによるシナプス形成関連遺伝子への影響

シナプスは、発達過程におけるシナプス前終末とシナプス後膜間でのシグナル伝達を介して形成される。例えば、Semaphorin4D は GABA 作動性シナプスの発生に必要とされるが、グルタミン酸作動性シナプスの発生には関与していない[26,27]。また、Semaphorin4D の海馬ニューロンへの曝露は、GABA 作動性シナプス形成を PlexinB1 依存的に増加させることが報告されている[28]。SLITRK3 (Slit and NTRK-like family member 3) と PTPRD (protein tyrosine phosphatase receptor type delta) のシナプス間相互作用は GABA 作動性ニューロンのシナプス前分化のみを誘導することが知られており[29,30]、SLITRK3 欠損マウスは mIPSC の amplitude には影響を与えず frequency の低下を示す[29]。また、Contactin5/Caspr4 複合体は、脊髄の GABA 作動性シナプス形成を担っている[31]。本研究において、アストロサイトを介した VPA の作用が神経細胞の中でも GABA 作動性神経に対して特異的である点に着目し、GABA 作動性シナプスの形成・機能発達に関連する mRNA の発現レベルについて、*Semaphorin4D* (*Sema4D*)、*Plexin-B1* (*PlxnB1*)、*Slitrk3*、*Ptprd*、*Contactin5* (*Cntn5*)、*Caspr4* の解析を行った。

VPA 曝露アストロサイトと共培養されたニューロンの *Ptprd* mRNA の発現レベルは、DIV 7 では変化しなかったが (control, n=14, 100±12.53 %; VPA, n=14, 110.2±11.15 %; 図 5a)、DIV 14 では有意に低下した (control, n=10, 100±7.92 %; VPA, n=10, 65.5±12.33 %; 図 6a)。他の mRNA の発現レベルは DIV 7 および DIV 14 のいずれにおいても変化しなかった (DIV 7, control, n=14; VPA, n=14 : *Sema4D*: control, 100±8.03 %; VPA, 79.32±6.672 %; 図 5b; *PlxnB1*: control, 100±12.01 %; VPA, 114.6±10.38 %; 図 5c; *Slitrk3*: control, 100±9.926 %; VPA, 119.3±12.95 %; 図 5d; *Cntn5*: control, 100±12.62 %; VPA, 131.7±13.87 %; 図 5e; *Caspr4*: control, 100±11.3 %; VPA, 119.4±12 %; 図 5f; DIV 14, control, n=10; VPA, n=10 : *Sema4D*: control, 100±9.98 %, VPA, 95.26±12.33 %, 図 6b; *PlxnB1*: control, 100±11.74 %, VPA, 95.27±13.08 %, 図 6c; *Slitrk3*: control, 100±15.10 %, VPA, 80.54±11.35 %, 図 6d; *Cntn5*: control, 100±20.12 %, VPA, 86.31±15.29 %, 図 6e; *Caspr4*: control, 100±14.98 %, VPA, 87.01±14.8 %; 図 6f)。VPA 曝露アストロサイトは共培養した GABA 作動性ニューロンの *Ptprd* mRNA の発現レベルを低下させることにより、GABA 作動性シナプスの形成異常を引き起こす可能性が考えられる。また、*Gfap* mRNA の発現レベルはコントロールアストロサイトと VPA 曝露アストロサイトの間に差が認められなかったため、VPA はアストロサイトの増殖および分化に影響を与えないことを示す (DIV 7, control, 100±10.52 %; VPA, 136.5±17.99 %; 図 5g; DIV 14, control, 100±6.68 %, VPA, 93.3±9.19 %; 図 6g)。同様に、*Map2* mRNA および *Tubb3* mRNA の発現レベルにも変化はなく、VPA 曝露アストロサイトが樹状突起および軸索の成長に影響しないことがわかる (DIV 7, control, n=14; VPA, n=14: *Map2*: control, 100±8.897 %; VPA, 113.1±

8.605 %; 図 5h; *Tubb3*: control, 100 ± 11.79 %; VPA, 127.9 ± 12.37 %; 図 5i; DIV 14, control, n=10; VPA, n=10: *Map2*: control, 100 ± 13.16 %, VPA, 92.3 ± 10.1 %, 図 6h; *Tubb3*: control, 100 ± 15.71 %, VPA, 81.09 ± 13.8 %; 図 6i)。

以上の結果より、VPA 曝露アストロサイトは共培養した DIV 14 のニューロンの *Ptprd* mRNA の発現を低下させた。*Ptprd* mRNA の発現低下が抑制性シナプス伝達の減少および形成能の低下を誘起した可能性が示唆された。

3 小括

胎児期におけるニューロンの VPA 曝露および培養ニューロンの VPA 直接曝露による神経伝達の機能異常は、興奮性/抑制性神経バランスの崩壊が一因と言われている [9,10]。しかし、胎内における VPA 曝露の場合、アストロサイトも同時に VPA を曝露していることになり、ニューロンの伝達機能異常に VPA 曝露アストロサイトのニューロン発達調整機能がどの程度関与しているかについては明らかではない。また、VPA を直接曝露した培養ニューロンについても、ニューロンの単独培養による実験であるためアストロサイトのニューロンの発達調整機構についての検討はなされていない。*in vivo* による実験または通常の共培養実験の場合、ニューロンおよびアストロサイトの両者に VPA を曝露してしまうため、VPA 曝露によるアストロサイトの異常がニューロンに及ぼす影響を特定することは不可能である。そこで本研究では、VPA を曝露したアストロサイトと VPA を曝露していないニューロンを共培養することにより、VPA 曝露アストロサイトによるニューロン発達調整機構について研究を行った。本章では、VPA を直接曝露したアストロサイトのニューロン発達調整機構について検討した。

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、mIPSC の amplitude は変化せず frequency のみが低下した (図 2d, f)。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 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 (図 3d)。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。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。PTPRD は IL1RAPL1 および IL-1RAcP、SLITRK3 等と結合し複合体を形成する [30,32,33,34]。GABA 作動性シナプスにおいては SLITRK3 と相互作用しシナプス前分化を誘導することが報告されている [29]。本研究では、VPA 曝露アストロサイトと共培養した DIV 14 のニューロンにおいて、*Ptprd* mRNA 発現レベルが低下したが、*Slitrk3* mRNA 発現レベルは変化しなかった (図 6a, d)。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 [35]。また ASD および ADHD において、PTPRD の突然変異が報告されており [36,37]、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。

胎児期に VPA を曝露した ASD モデルマウスでは、GABA 作動性シナプス前終末および

後膜の機能低下が認められる[10]。また、VPA を直接曝露された培養ニューロンも、GABA 作動性シナプスの伝達と形成機能の低下を示す[11,12]。これらの報告と本研究結果より、VPA はニューロンとアストロサイトのいずれにも影響を与え、相加効果または相乗効果によって GABA 作動性シナプスの機能障害を引き起こし、E/I バランスの不均衡を誘発する可能性がある。E/I バランスの不均衡は、ASD や統合失調症の動物モデルで認められており、これらの疾患の神経病理の一部であると考えられている[38,39,40]。VPA 曝露アストロサイトが E/I バランスの不均衡をもたらすと仮定すると、ASD や統合失調症などの神経発達障害は、異常なアストロサイトによって引き起こされるシナプス形成の異常に起因する可能性がある。

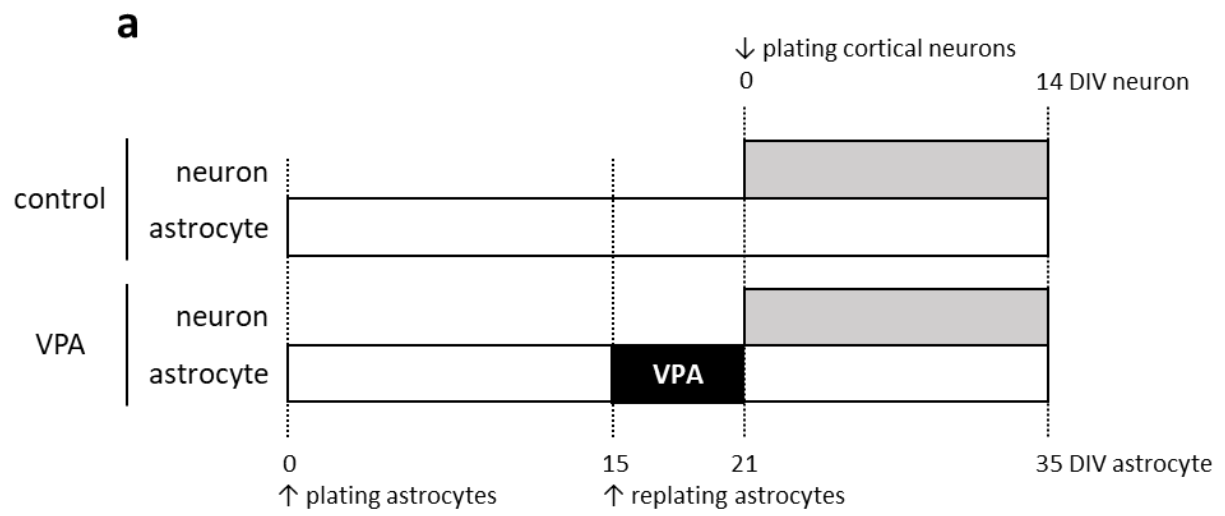


図1 アストロサイトの VPA 曝露とニューロン-アストロサイト共培養スケジュール

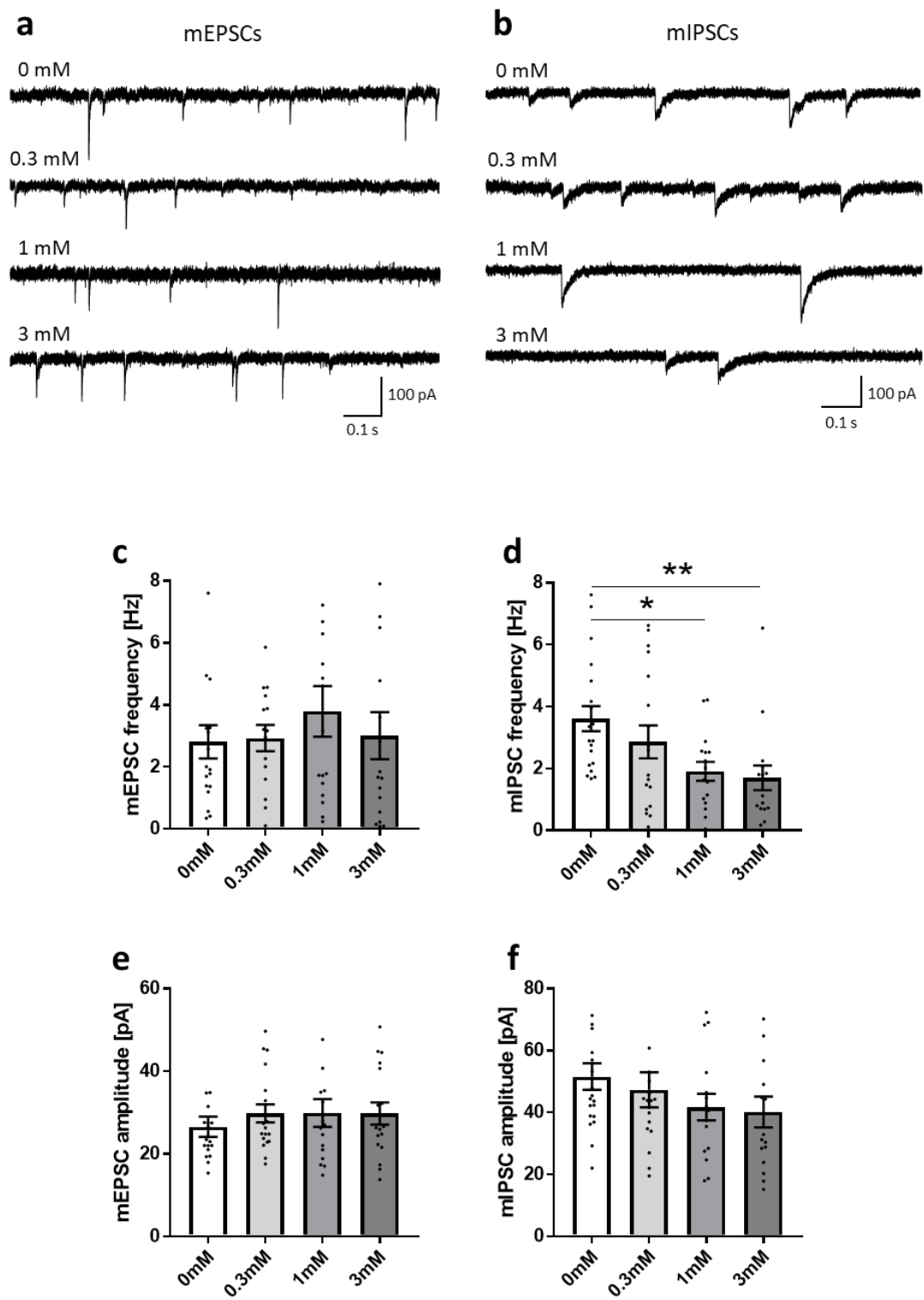


図2 VPA 曝露アストロサイトのシナプス伝達機能への影響

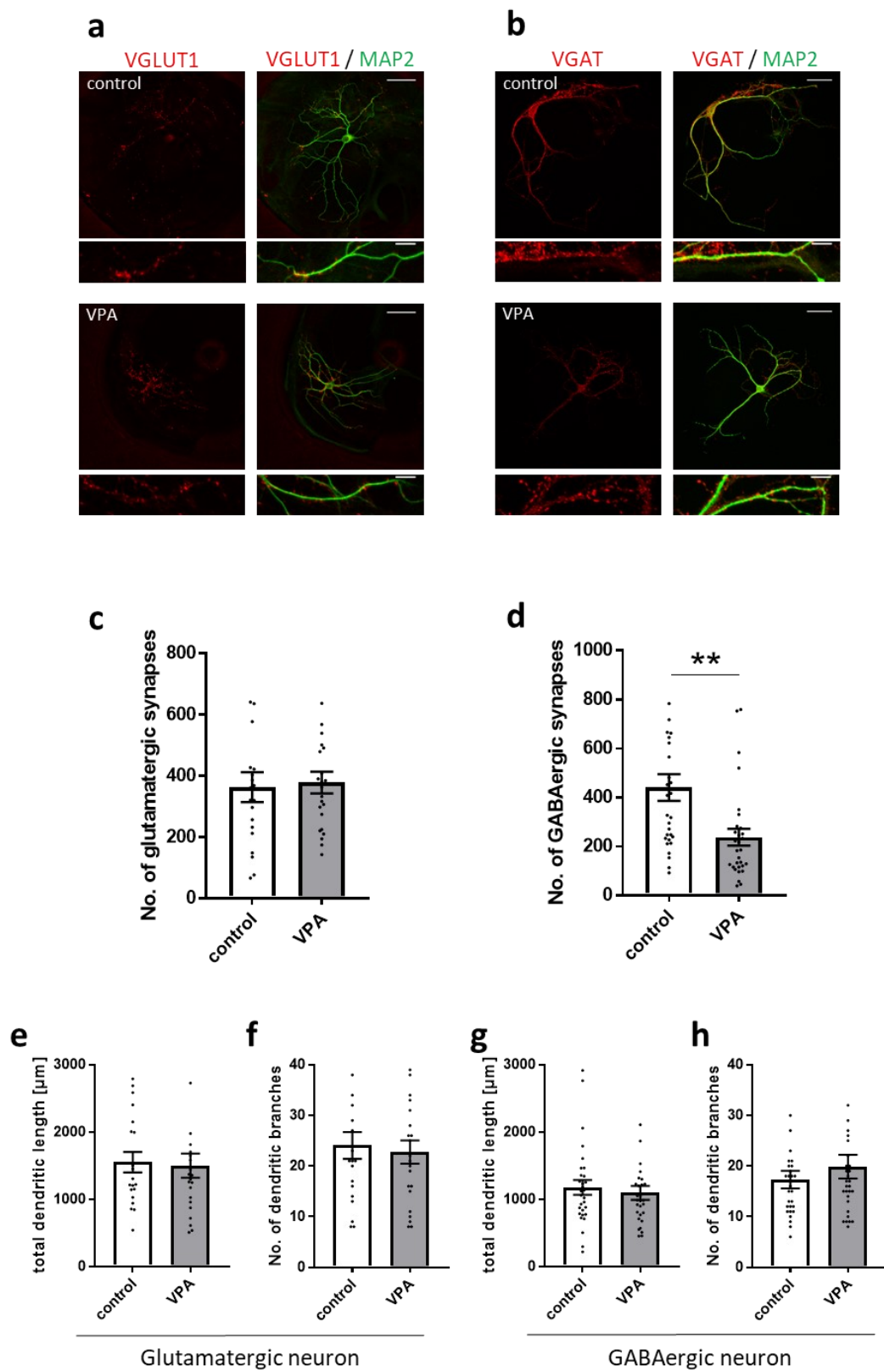


図3 VPA曝露アストロサイトのシナプスおよび樹状突起形態への影響

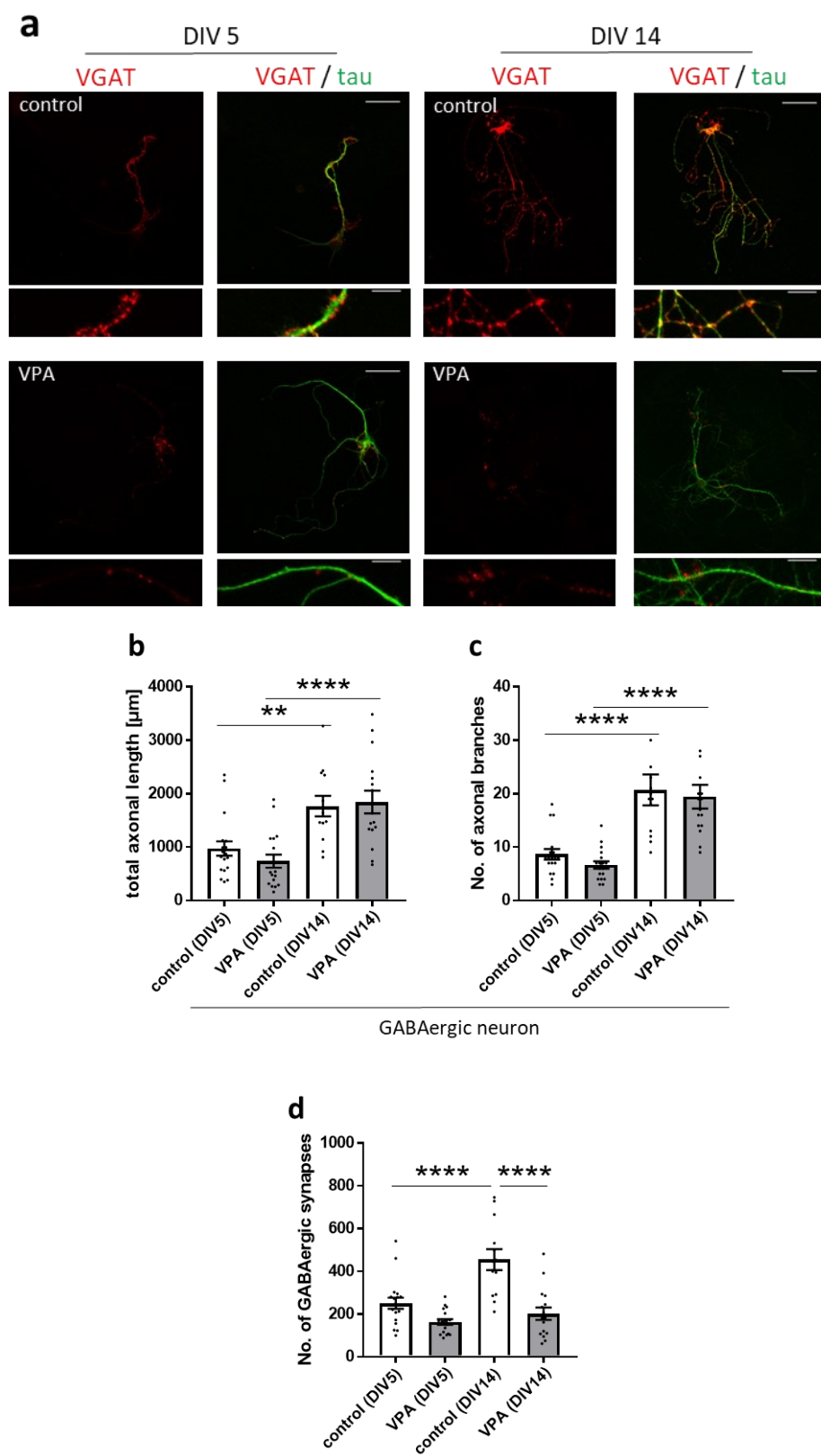


図4 VPA 曝露アストロサイトのシナプスおよび軸索形態への影響

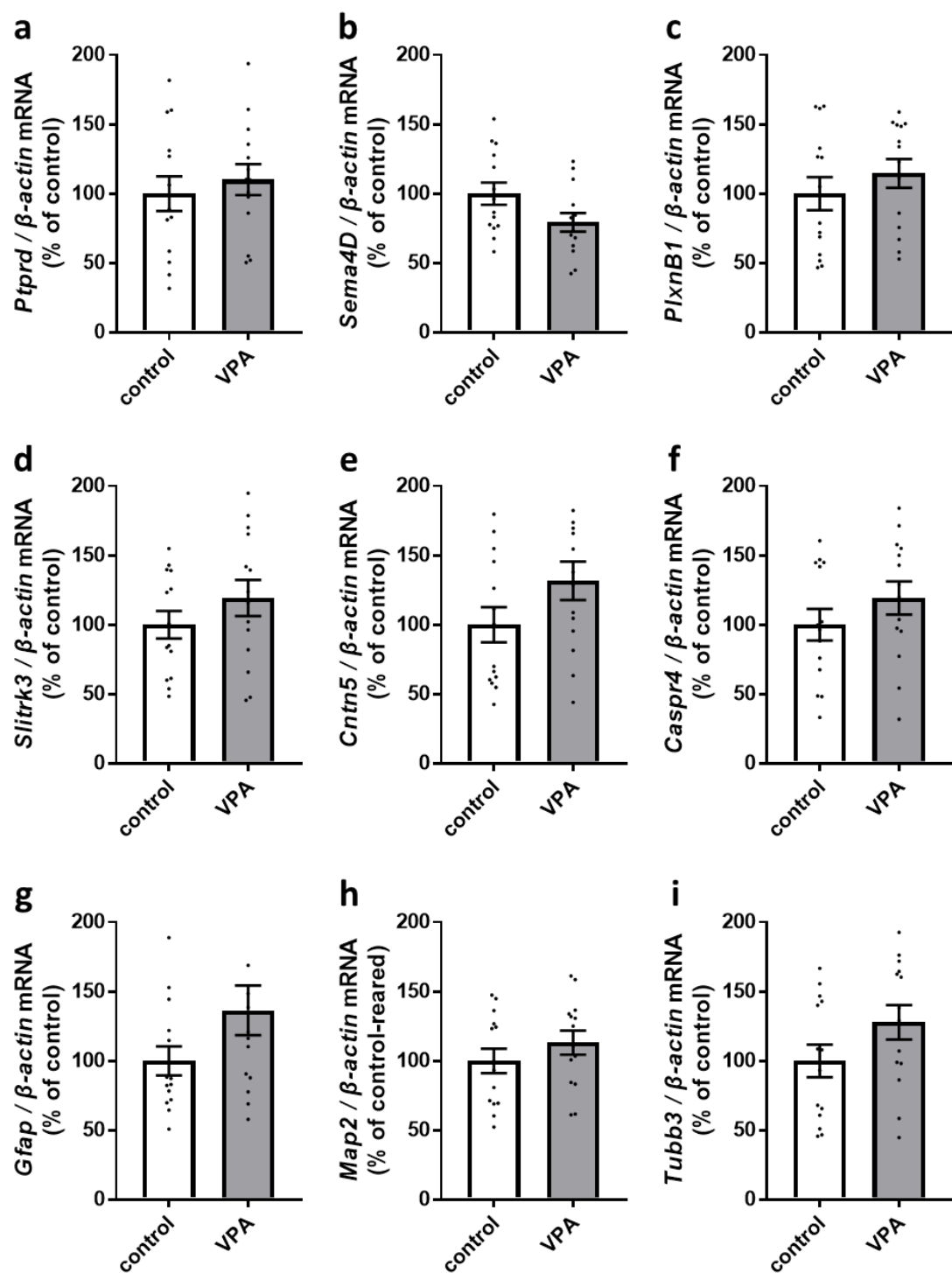


図5 VPA 曝露アストロサイトによるシナプス形成関連遺伝子への影響 (DIV 7)

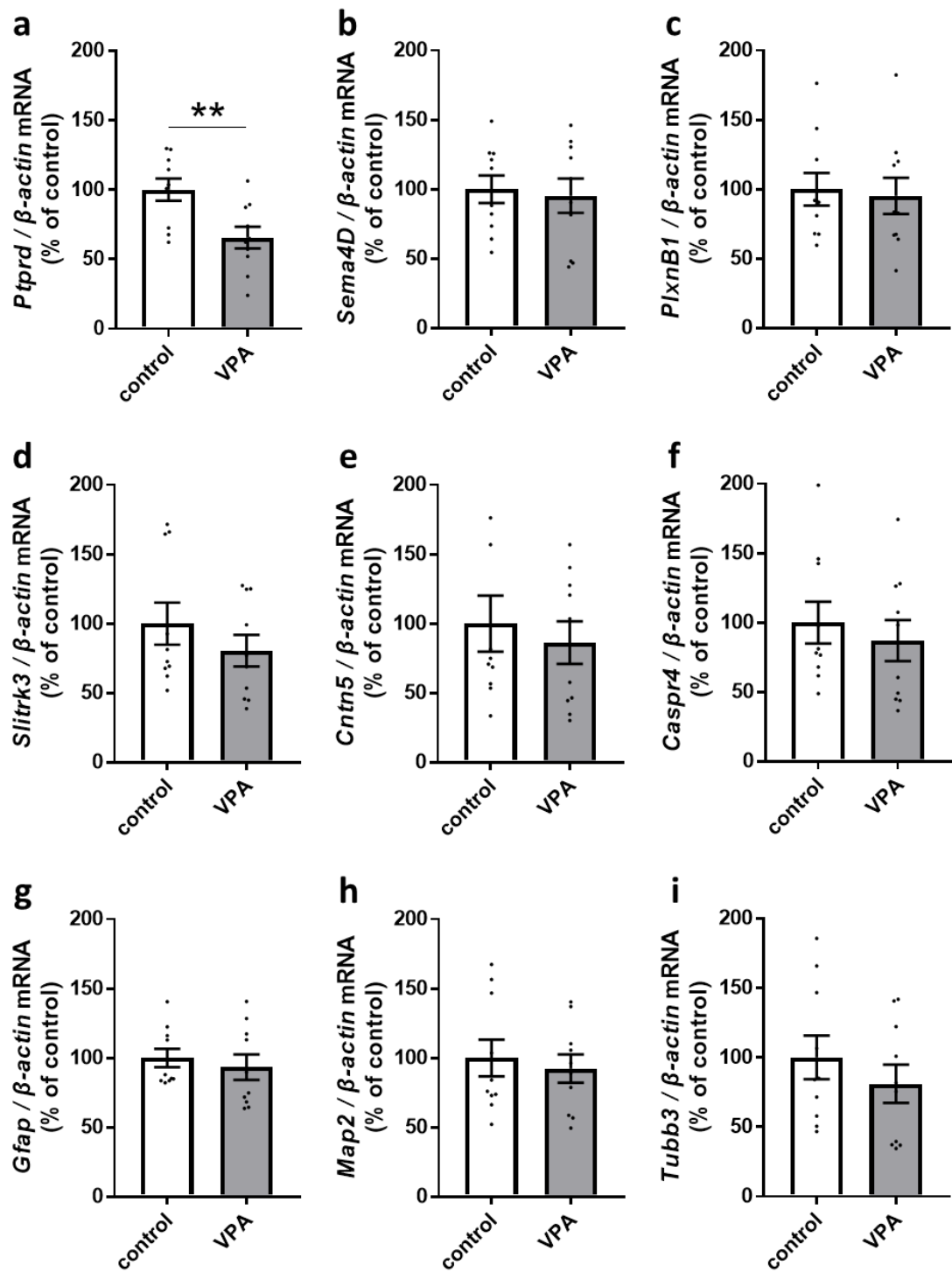


図6 VPA曝露アストロサイトによるシナプス形成関連遺伝子への影響 (DIV 14)

Primer (Forward) (Reverse)	Sequence (5'-3')
PTPRD-F	5'-CCC CCA GGT TTA CAC GAA CTC-3'
PTPRD-R	5'-ATC CAG ACC CAT CGT CAA ATT C-3'
Sema4D-F	5'-CCT TGA GGA CGG AGT ATG CC-3'
Sema4D-R	5'-TCT GGA TCA CGT CAG CAA AGA-3'
PlxnB1-F	5'-CAC ACA TCT ACT ACA CTT GGC AA-3'
PlxnB1-R	5'-CAA TCC CGG CTG TCA TTC AC-3'
Slitrk3-F	5'-TGA AGC CAA GCA TAG CTG AAA-3'
Slitrk3-R	5'-ATC AGG GGA ATT GGG GTA GTC-3'
Cntn5-F	5'-ACT CCT CAG ATG CCT TCA GAC A-3'
Cntn5-R	5'-AGT TCC ATT CCG AAG CCA TCT G-3'
Caspr4-F	5'-TTT GGA ACG CAG CTT CCT TTA-3'
Caspr4-R	5'-GAG AGG GCT GTC GTC TTG AAA-3'
GFAP-F	5'-GCA AAA GCA CCA AAG AAG GGG A-3'
GFAP-R	5'-ACA TGG TTC AGT CCC TTA GAG G-3'
MAP2-F	5'-GCC AGC CTC AGA ACA AAC AG-3'
MAP2-R	5'-AAG GTC TTG GGA GGG AAG AAC-3'
Tubb3-F	5'-TAG ACC CCA GCG GCA ACT AT-3'
Tubb3-R	5'-GTT CCA GGT TCC AAG TCC ACC-3'
β -actin-F	5'-GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG-3'
β -actin-R	5'-CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T-3'

表 1 RT-PCR 法に使用したプライマー塩基配列

第2章 自閉症スペクトラム障害モデルマウス由来アストロサイトによるシナプス伝達機能への影響

1 実験材料および実験方法

1-1 実験動物

本章で用いたマウスは第1章 1-1 と同様の ICR マウスである。妊娠 12 日目に入荷した ICR マウスに対して、12.5 日目に 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[41,42,43]。アストロサイト初代培養には生後 1 日目の VPA マウスを使用した。比較対照群には、同容量の生理食塩水を腹腔内投与した妊娠マウスから出生した仔マウスを使用した。また、ニューロンの初代培養には無処置の妊娠マウスから出生した生後 0~1 日目の仔マウスを使用した。マウスは 12 時間の明暗サイクル (7~19 時) で一定温度 (23 ± 2 °C) に制御された部屋に収容し、プラスチックケージにて個別に飼育した。食料 (CLEA Rodent Diet) および水は自由摂取とした。

1-2 実験方法

1-2-1 VPA の調整及び処置

本章で用いた VPA は第1章 1-2 と同様の VPA である。生理食塩水に溶解し、妊娠 12.5 日目の ICR マウスに対して 500mg/kg の濃度で腹腔内投与した。

1-2-2 超音波発声測定による ASD モデルマウスの選定

小ビーカー内に仔マウス (P1) を入れ、超音波発声測定用マイクを被せた。五分間計測を行い、45 kHz 以上の超音波発声回数を記録した (Saline, $n=540$, 88.65 ± 1.774 ; VPA, $n=681$, 67.64 ± 1.522 ; ****, $p < 0.0001$; 図 7a)。本実験では正常対照群 (saline 群) の中から発声回数が 90 回以上の個体、VPA 群の中から発声回数が 60 回以下の個体を選び、アストロサイトの初代培養に使用した (Saline, $n=225$, 122.6 ± 2.194 ; VPA, $n=225$, 32.85 ± 1.121 ; ****, $p < 0.0001$; 図 7b)。

1-2-3 アストロサイトのマス培養標本およびオータプス培養標本の作製手順

VPA マウスを用いて、第 1 章 1-2-2 と同様の方法でアストロサイトのマス培養標本およびオータプス標本を作製した。アストロサイト初代培養のスケジュールは図 8a に示す。

1-2-4 ニューロン-アストロサイト共培養標本の作製手順

「1-2-3 アストロサイトのマス培養標本およびオータプス培養標本の作製手順」で作製したプレート内でアストロサイトがシート状およびドット状に育ったことを確認し、10 % FBS 溶液を吸引除去し NBM 溶液に置換した。以下第 1 章 1-2-3 と同様の方法でニューロンを単離し、ニューロン-アストロサイト共培養標本を作製した。ニューロン初代培養のスケジュールは図 8a に示す。

1-2-5 ホールセルパッチクランプ法を用いたシナプス伝達機能の解析

本章では、マス培養標本およびオータプス標本を用いてホールセルパッチクランプ法によるシナプス伝達機能の解析を行った。マス培養標本を用いた解析方法については、第 1 章 1-2-4 に記載した実験方法と同様である。以下オータプス培養標本を用いた解析方法について記載する。

【チャンバー内を還流する細胞外液の組成】

第 1 章 1-2-4 と同様の組成で実験を行った。

【細胞内を還流する電極内液の組成】

- ・ 1.0 mL ATP-GTP stock 溶液 (10×)
- ・ 0.1 mL 100 mM K-EGTA stock 溶液
- ・ 8.9 mL K-Gluconate-HEPES stock 溶液

上記を混合して冷凍保存し、用時解凍した。

各溶液の組成は以下に示す。

<ATP-GTP stock 溶液 (10×) の組成>

<100 mM K-EGTA stock 溶液の組成>

第 1 章 1-2-4 と同様の組成である。

<K-Gluconate-HEPES stock 溶液の組成>

- ・ 164.4 mM K-Gluconate (Potassium D-gluconate)
(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 20 mM HEPES, Molecular Biology Grade (free acid)

上記を作製し冷凍保存した。pH は KOH を用いて 7.4 に調整した。

- シナプス電流計測の操作手順

第 1 章 1-2-4 と同様の方法で計測を行った。パッチ電極から下記に示す条件刺激を与え、各シナプス応答を検討項目として解析した。

- 興奮性シナプス後電流 (Excitatory Postsynaptic current, EPSC)

シナプスを自己投射しているオータプスニューロンは、静止膜電位 -70 mV から 0 mV へ 2 ms の脱分極パルスを与えることで、発生した活動電位が軸索を伝導しシナプス前末端のシナプス小胞からグルタミン酸が放出される。シナプス間隙に放出されたグルタミン酸がシナプス後膜上の AMPA 受容体に結合すると、Na⁺イオン透過性が増加し、内向きの応答が観察される (EPSC)。EPSC の振幅 (amplitude, A) の値をシナプス伝達強度の指標とし評価した。

- 自発性微小興奮性後シナプス電流 (miniature Excitatory Postsynaptic current, mEPSC)

薬液投与チューブを用いて、オータプス標本に 1 μ M のテトロドトキシン (TTX) を 60 秒間投与し、内向きに観察される mEPSC の発生頻度 (frequency, Hz)、振幅 (amplitude, A) をそれぞれ測定した。なお、得られた値の平均値は、興奮性シナプス小胞が一つ開口放出したものと近似することができる。

- Readily Releasable Pool (RRP) size

RRP とは、神経軸索終末に存在するシナプス小胞のうち、細胞膜融合により神経伝達物質を開口放出する準備が整った状態にあるシナプス小胞群を意味する。薬液投与チューブから 0.5 M の高浸透圧スクロース溶液を投与すると、内向きに一過性の応答が観察される。この応答面積 (area, C) を RRP サイズとして評価した。また、RRP 面積を mEPSC の平均面積 (C) で除した値を RRP に含まれるシナプス小胞数の理論値として計算し評価した。

- シナプス小胞放出確率 (Vesicular release probability (Pvr) , %)

EPSC の面積 (C) を RRP の面積 (C) で除した値をシナプス小胞の開口放出確率の指標として評価した。つまり、Pvr は 1 回の活動電位刺激によって開口放出されるシナ

プス小胞の割合を示す。

1-2-6 蛍光免疫染色法を用いたシナプスおよびニューロン形態の解析

第 1 章 1-2-5 と同様の方法により蛍光免疫染色法を行い、シナプスおよびニューロン形態の解析を行った。

【細胞固定液の組成】

【抗体溶液の組成】

【細胞洗浄用 PBS 溶液】

第 1 章 1-2-5 と同様の組成で実験を行った。

【一次抗体】

- ・ VGLUT-1 (Polyclonal rabbit antiserum) = 1:1000
- ・ Anti-MAP2 (Polyclonal Guinea pig antiserum) = 1:1000

【二次抗体】

- ・ Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (H+L) = 1:400
- ・ Alexa Fluor 488 goat anti-guinea pig IgG (H+L) = 1:400

1-2-7 ウエスタンブロット法を用いたシナプス小胞関連タンパク質の発現解析

本章では、マス培養により作製したニューロン-アストロサイト共培養標本を使用し、ウエスタンブロット法を用いたタンパク質発現解析を行った。

● タンパク質抽出手順

- ① 6well プレート内の 10 %FBS を吸引除去し、PBS 溶液で 2 回洗浄した (2 mL/1well)。
- ② 細胞溶解液を調整し細胞を溶解した。3well 分の細胞を n=1 として抽出した。細胞溶解液の組成は下記に示す。
- ③ 1.5 mL マイクロチューブにタンパク質抽出液を回収し、10 分間遠心分離した (4°C、12000 rpm)。
- ④ 遠心分離後、新たな 1.5 mL マイクロチューブに上清を回収しサンプルとした。

【細胞溶解液の組成 (n=1 あたり)】

- ・ 200 μ L T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent
(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- ・ 2 μ L ホスファターゼ阻害剤カクテル (EDTA フリー)
(NACALAI TESQUE, INC, Kyoto, Japan)
- ・ 2 μ L プロテアーゼ阻害剤カクテル (動物細胞抽出物用) DMSO 溶液
(NACALAI TESQUE, INC, Kyoto, Japan)

● タンパク質定量手順

Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を用いてタンパク質定量を行い、ウェスタンブロッティング用のサンプルを調整した。

● ウェスタンブロット法によるタンパク質発現解析手順

- ① 分離ゲルと濃縮ゲルを作製した。各ゲルの組成は下記に示す。
- ② ゲル板を装置にセットし分離ゲルを流し込み、Isobutanol (2-Methyl-1-propanol, Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan) を少量加え分離ゲルが固まるまで 45 分間静置した。
- ③ Isobutanol を捨て精製水で洗浄し、濃縮ゲルを流し込んだ。
- ④ 15well 用コームをゆっくり差し込み、濃縮ゲルが固まるまで 30 分間静置した。
- ⑤ 作製したゲルを電気泳動装置[Mini-PROTEAN Terata Cell (Bio-Rad)]にセットし、Running buffer を入れた。使用した Running buffer の組成は下記に示す。
- ⑥ 各 well に BlueStar Prestained Protein Marker (NIPPON Genetics Europe, Dueren, Germany) およびサンプルをアプライし電気泳動を行った (100 V, 90 分間)。
- ⑦ メンブレン (Immobilon®-P-Membrane, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) をメタノール (Methyl Alcohol, Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan) に浸した後、ブロッティング用ろ紙と共に Transfer buffer に浸した。使用した Transfer buffer の組成は下記に示す。
- ⑧ 電気泳動後、ろ紙 (7 枚)、PVDF 膜、ゲル、ろ紙 (7 枚) の順に重ね、Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) にセットし転写した (2.5 V, 0.3 A, 50 分間)。
- ⑨ 転写後、PVDF 膜を TBS-T で洗浄し、Blocking buffer [Blocking-One (NACALAI TESQUE, INC, Kyoto, Japan)]に浸し、30 分間振とうした。使用した TBS-T の組成は下記に示す。
- ⑩ TBS-T と Blocking buffer を 4:1 の割合で混合し、抗体溶液とした。一次抗体を希釈し、PVDF 膜を浸漬した (4 °C, over night)。使用した一次抗体は下記に示す。
- ⑪ 反応終了後、PVDF 膜を TBS-T で洗浄した (10 分間×3 回)。
- ⑫ 抗体溶液に二次抗体を希釈し、PVDF 膜を浸漬した (室温、1 時間、振とう)。使用し

た二次抗体は下記に示す。

- ⑬ 反応終了後、PVDF 膜を TBS-T で洗浄した (10 分間×3 回)。
- ⑭ イムノスターLD (Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan) を使用し、CCD fluor chemTM (Alpha Inotech)により発光したバンドを検出した。
- ⑮ 画像処理および解析は fluor chemTM 付属ソフトおよび imageJ software を使用した。

【Separation Gel (10-12 %, 20 mL) の組成】

- ・ 6.8-9.4 mL 精製水
- ・ 5.4-8.0 mL 30 % acrylamide
- ・ 5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8, Trizma[®] base 溶解後、HCl で pH 調整)
(Trizma[®] base, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA)
- ・ 0.2 mL 10 % Sodium Dodecyl Sulfate
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)
- ・ 10 µL N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
(NACALAI TESQUE, INC, Kyoto, Japan)
- ・ 100 µL 10 % Ammonium Peroxodisulfate
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)

【Stacking Gel (4 %, 10 mL) の組成】

- ・ 6.1 mL 精製水
- ・ 1.3 mL 30 % acrylamide
- ・ 5 mL 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8, Trizma[®] base 溶解後、HCl で pH 調整)
- ・ 0.2 mL 10 % Sodium Dodecyl Sulfate
- ・ 10 µL N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
- ・ 50 µL 10 % Ammonium Peroxodisulfate

【30 % acrylamide の組成】

- ・ 29.2 % Acrylamide
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)
- ・ 0.8 % N,N'-Methylenebis (acrylamide)
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)

【Running buffer (10×) の組成】

- 0.25 M Trizma® base
- 1.92 M Glycine (Aminoacetic Acid)
(NACALAI TESQUE, INC, Kyoto, Japan)
- 1 % w/v 10 % Sodium Dodecyl Sulfate

【Transfer buffer の組成】

- 25 mM Trizma® base
- 192 mM Glycine (Aminoacetic Acid)
- 20 % v/v Methanol
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)

【TBS-T の組成】

- 99.5 % Tris Buffered Saline (TBS)
- 0.5 % Tween-20
(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)

【 Tris Buffered Saline (TBS) (10×) の組成】

- 0.2 M Trizma® base
- 1.4 M Sodium Chloride
(Fujifilm Wako pure chemical corporation, Osaka, Japan)

【一次抗体】

- Anti-Synaptotagmin antibody =1:1000
(Abcam, Cambridge, UK)
- Anti-SNAP25 antibody =1:1000
(Abcam, Cambridge, UK)
- SYP (D-4) =1:1000
(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)
- Glypican 4 Polyclonal antibody=1:1000
(Proteintech Group Inc, Chicago, IL, USA)
- Anti-GFAP antibody =1:1000
(Abcam, Cambridge, UK)
- Beta Tubulin antibody =1:1000
(Proteintech Group Inc, Chicago, IL, USA)
- Anti- β -actin antibody =1:2000
(Abcam, Cambridge, UK)

【二次抗体】

- Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey =1:10000
(Cytiva, Tokyo, Japan)
- Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey =1:10000
(Cytiva, Tokyo, Japan)
- Goat IgG (H&L) Antibody Peroxidase Conjugated =1:10000
(Rockland Immunochemicals, Inc. Limerick, PA, USA)

1-2-8 統計処理

全ての統計処理には GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を使用した。2 群間の統計処理には Student's t-test を用いた。結果は全て平均±標準誤差で表記し、p 値が 0.05 以下である場合を有意差ありとした。

2 実験結果

2-1 ASD モデルマウス由来アストロサイトによるシナプス伝達機能への影響

ASD モデルマウスから単離し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に与える影響について、膜電位固定下におけるホールセルパッチクランプ法を用いて評価した。ASD モデルマウス (VPA マウス) 由来アストロサイトを VPA 群、比較対象を Saline 群として比較した。マス培養標本およびオータプス培養標本を使用し、DIV 13-14 のニューロンを用いて実験を行った。

まずマス培養標本を用いてテトロドトキシン (TTX) 存在下で mEPSC および mIPSC を記録し評価した。図 9a、b は各群の典型的な波形を示す。

mEPSC、mIPSC とともに frequency に変化は見られなかった (mEPSC: saline, $n=32$, 5.927 ± 0.988 Hz; VPA, $n=34$, 5.773 ± 1.154 Hz; 図 9c; mIPSC: saline, $n=28$, 2.516 ± 0.442 Hz; VPA, $n=31$, 3.03 ± 0.4646 Hz; 図 9d)。また amplitude にも変化は認められなかった (mEPSC: saline, $n=32$, 38.89 ± 2.992 pA; VPA, $n=34$, 37.82 ± 2.239 pA; 図 9e; mIPSC: saline, $n=28$, 55.33 ± 5.839 pA; VPA, $n=31$, 44.72 ± 2.818 pA; 図 9f)。

以上の結果は、ASD モデルマウス由来アストロサイトは共培養したニューロンの自発的なシナプス伝達機能には影響を与えないことを示す。マス培養標本における自発的なシナプス伝達機能では変化が認められなかったため、活動電位刺激による興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録し解析した。また、より詳細な影響を捉えるため、単一ニューロンあたりの解析が可能なオータプス培養標本を使用した。

オータプス標本によるパッチクランプ法では、まず活動電位刺激による興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録した。実験には DIV 13-14 のニューロンを用いた。図 10a に各群の典型的な EPSC の波形を示す。

ASD モデルマウス由来アストロサイトと共培養されたグルタミン酸作動性ニューロンにおいて、EPSC amplitude は優位に増大し (saline, $n=40$, 8.975 ± 0.6017 nA; VPA, $n=34$, 11.71 ± 0.8705 nA; **, $p<0.01$; 図 10b)、シナプス伝達機能を増強させた。

次に、TTX 存在下で mEPSC を記録し、自発性微小興奮性後シナプス伝達機能を評価した。図 10c は各群の典型的な波形を示す。図 10d はその発生頻度 (frequency, Hz)、図 10e は振幅 (amplitude, A) の平均値を示す。mEPSC の frequency をシナプス前終末の伝達物質放出の多寡の指標とし、amplitude はシナプス後膜の受容体の密度や感受性の指標として解析した。結果は、saline 群と VPA 群のいずれにおいても frequency、amplitude の変化は

認められず (frequency: saline, $n=34$, 6.184 ± 1.07 Hz; VPA, $n=32$, 5.788 ± 1.008 Hz; 図 10d; amplitude: saline, $n=34$, 31.26 ± 1.701 pA; VPA, $n=32$, 30.94 ± 1.519 pA; 図 10e)、シナプス前終末における開口放出機能は ASD モデルマウス由来アストロサイトの影響を受けないことが示唆された。

さらにより詳細な解析を行うため、0.5 M のスクロース溶液を用いた高浸透圧刺激により、RRP に存在する小胞群を強制的に開口放出させることで RRP area (nC) を測定した。薬液投与チューブから 10 秒間の投与を行った。図 11a は各群の典型的な波形を示す。

ASD モデルマウス由来アストロサイトと共培養されたグルタミン酸作動性ニューロンでは、RRP area の有意な増大を示した (saline, $n=31$, 0.818 ± 0.1148 nC; VPA, $n=28$, 1.464 ± 0.3057 nC; *, $p<0.05$; 図 11b)。また、記録された RRP area を mEPSC area で除した値は、RRP に含まれるシナプス小胞数の理論値を示す。結果は、RRP area に対応した結果となり、VPA 群のニューロンにおいて RRP におけるシナプス小胞数が優位に増加した (saline, $n=29$, 5236 ± 671 ; VPA, $n=25$, 7431 ± 822.7 ; *, $p<0.05$; 図 11c)。

以上の結果より、ASD モデルマウス由来アストロサイトが共培養したグルタミン酸作動性ニューロンに与える影響として、①グルタミン酸作動性シナプス数を増加させる、もしくは、②グルタミン酸作動性シナプス伝達効率を上昇させることが示唆された。

ASD モデルマウス由来アストロサイトが共培養したグルタミン酸作動性ニューロンのシナプス伝達効率を上昇させる可能性について検討するため、シナプス小胞の開口放出確率 (Vesicular release probability (Pvr), %) について解析した。EPSC area を RRP area で除して算出した。結果は、VPA 群のニューロンにおいても Pvr に変化は認められなかった (saline, $n=31$, 17.37 ± 2.603 %; VPA, $n=28$, 13.25 ± 1.511 %; 図 11d)。

以上より、ASD モデルマウス由来アストロサイトは共培養したグルタミン酸作動性ニューロンのシナプス伝達効率には影響を及ぼさないことが示唆された。つまり、活動電位刺激によるグルタミン酸作動性シナプス伝達の増強は、グルタミン酸作動性シナプス小胞数の増加による伝達物質放出量の増加に起因する可能性が考えられる。

2-2 ASD モデルマウス由来アストロサイトによるシナプスおよびニューロン形態への影響

2-2-1 ASD モデルマウス由来アストロサイトによるシナプス形成への影響

ASD モデル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ける EPSC の増大およびシナプス小胞数の増加は、形成されるシナプス数の増加に起因する可能性がある。第 1 章同様、蛍光免疫染色法を用いてグルタミン酸作動性シナプスの数を解析した。VGLUT1 抗体で標識されたシナプスをグルタミン酸作動性シナプスとみなし定量した (図 12a)。結果は、DIV 14 のグルタミン酸作動性ニューロンにおけるシナプス数 (VGLUT1 抗体陽性シナプス数) に差異は認められなかった (saline, $n=82$, 661.3 ± 38.41 ; VPA, $n=81$, 646.5 ± 36.35 ; 図 12b)。

2-2-2 ASD モデルマウス由来アストロサイトによる樹状突起形態への影響

ASD モデルマウス由来アストロサイトがグルタミン酸作動性シナプス形成に及ぼす影響についての解析と同時に、グルタミン酸作動性ニューロン形態に変化を誘発するか観察した。MAP2 抗体で標識された樹状突起の形態を撮影し解析した (図 12a)。結果は、樹状突起の伸長および分岐数のいずれにおいても saline 群と VPA 群の間に差異は認められなかった (total dendritic length: saline, $n=82$, $1327 \pm 75.91 \mu\text{m}$; VPA, $n=82$, $1489 \pm 70.74 \mu\text{m}$; 図 12c; No. of dendritic branches: saline, $n=82$, 18.46 ± 0.897 ; VPA, $n=82$, 20.83 ± 1.134 ; 図 12d)。

以上の蛍光免疫染色法による解析結果より、ASD モデルマウス由来アストロサイトによるグルタミン酸作動性シナプス伝達の増強は、シナプス数の増加によるものではないことが示唆された。

2-3 ASD モデルマウス由来アストロサイトによるシナプス小胞関連因子への影響

第2章 2-2 までの検討結果より、ASD モデルマウス由来アストロサイトは共培養したグルタミン酸作動性ニューロンのシナプス小胞数を増加することでシナプス伝達を増強するが、シナプスの形成数には変化を与えないことが明らかとなった。つまり、1 つあたりのグルタミン酸作動性シナプス内においてシナプス小胞数が増加し、伝達機能が増強したことが示唆される。シナプス小胞の構成や、シナプス小胞からの神経伝達物質の開口放出の際に必須とされるタンパク質について解析を行った。例えば、synaptotagmin はシナプス小胞開口放出の際の主要なカルシウムセンサーとして神経伝達物質の放出を左右しており[41,42]、SNAP25 も同様に神経伝達物質放出に必須な因子である[43,44]。また、synaptophysin もシナプス小胞のエンドサイトーシスの制御に関与する重要なタンパク質である[45]。ASD モデル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ける synaptotagmin、SNAP25 および synaptophysin の発現についてウエスタンブロット法により解析を行った。

ASD モデルマウス由来アストロサイトと共培養されたニューロンでは synaptotagmin と SNAP25 の発現が有意に増加した (synaptotagmin: saline, n=20, 100 ± 3.058 %; VPA, n=20, 116 ± 5.757 %; *, $p < 0.05$; 図 13a; SNAP25: saline, n=20, 100 ± 7.059 %; VPA, n=20, 124.7 ± 7.93 %; *, $p < 0.05$; 図 13b)。synaptophysin の発現は ASD モデルマウス由来アストロサイトの影響を受けなかった (saline, n=20, 100 ± 9.099 %; VPA, n=20, 126.2 ± 14.25 %; 図 13c)。また、VGLUT1 の発現は 2 群間で差異がなかったため、2-2-1 で示した蛍光免疫染色法の実験結果と一致していると考えられる (saline, n=20, 100 ± 3.06 %; VPA, n=20, 107.7 ± 4.943 %; 図 13d)。

なお、GFAP のウエスタンブロッティング結果より、ASD モデルマウスと正常対照マウスにおいてアストロサイトの分化・発達に差異はないと言える (saline, n=24, 100 ± 7.299 %; VPA, n=24, 103.9 ± 12.76 %; 図 13e)。

以上の結果より、ASD モデルマウス由来アストロサイトは共培養したニューロンの synaptotagmin および SNAP25 の発現を増加させた。synaptotagmin および SNAP25 の発現増加が RRP におけるグルタミン酸作動性シナプス小胞の増加とそれに伴うシナプス伝達の増強を誘起した可能性が示唆された。

3 小括

第1章では、VPAを直接曝露したアストロサイトのニューロンに対する影響について検討を行ったが、本章では実際に病態モデルマウスのアストロサイトを用いて検討を行った。胎児期にVPAを曝露したマウスは社会性行動障害や常同行動等のASD様症状を示し[4,5,46,47,48]、ASDモデルマウスとして広く使用されている。社会性行動障害を示すASDモデルマウスではアストロサイトの発現増加が認められ[49]、またグルタミン酸作動性シナプスマーカーであるVGLUT1の発現増加[9]やGABA作動性シナプスマーカーであるVGADの発現減少[10]が報告されている。これらの報告と本研究第1章の結果より、ASDモデルマウスの示すASD様症状はアストロサイトに起因した神経発達障害である可能性がある。本章では、ASDモデルマウスのアストロサイトと正常マウスのニューロンを共培養することにより、ASDモデルマウス由来アストロサイトによるニューロン発達調整機構について検討した。

ASDモデル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、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EPSCが増強した(図10b、d、e)。この理由としてRRPにおけるシナプス小胞数が増加したことが挙げられる(図11b、c)。シナプス小胞数の増加について分析するため、グルタミン酸作動性シナプスの蛍光免疫染色を行いVGLUT1の発現を解析したところ、ASD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陽性シナプス数に差異は認められなかった(図12b)。つまり、ASDモデル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。シナプス小胞を構成するタンパク質にsynaptotagminやSNAP25がある。Synaptotagminはシナプス小胞開口放出の際の主要なカルシウムセンサーとして神経伝達物質の放出を左右しており[41,42]、SNAP25も同様に神経伝達物質放出に必須な因子である[43,44]。本研究では、ASDモデル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の発現が増加した(図13a、b)。SynaptotagminおよびSNAP25はRRP sizeの調節を担うことが報告されている[50,51]。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、ASDモデル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。

本研究により、ASDモデルマウス由来アストロサイトは正常ニューロンのグルタミン酸作動性シナプス伝達を上昇させることが明らかとなった。ASDモデルマウスではグルタミン酸作動性ニューロンのシナプス伝達が増強することが報告されている[9]。これらの報告

と本研究結果より、胎児期に曝露された VPA はアストロサイトを介してグルタミン酸作動性ニューロンおよびシナプスに異常をきたし、E/I バランスが増大し不均衡を誘発する可能性がある。E/I バランスの崩壊が神経病理の一つとして挙げられる ASD や ADHD、統合失調症などの神経発達障害の発症メカニズムについて、アストロサイトに焦点を当てることができると思う。

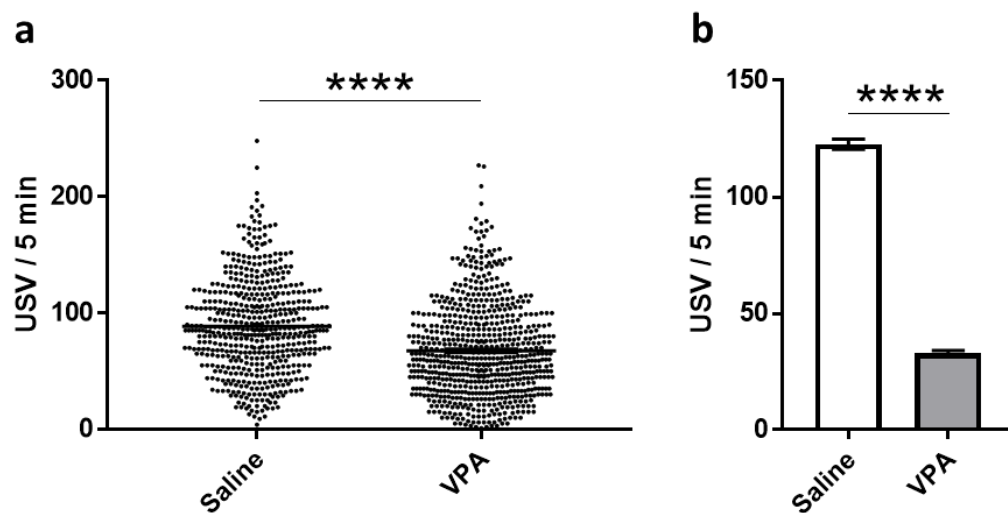


図7 ASDモデルマウスと実験に使用したASDモデルマウスの超音波発声回数

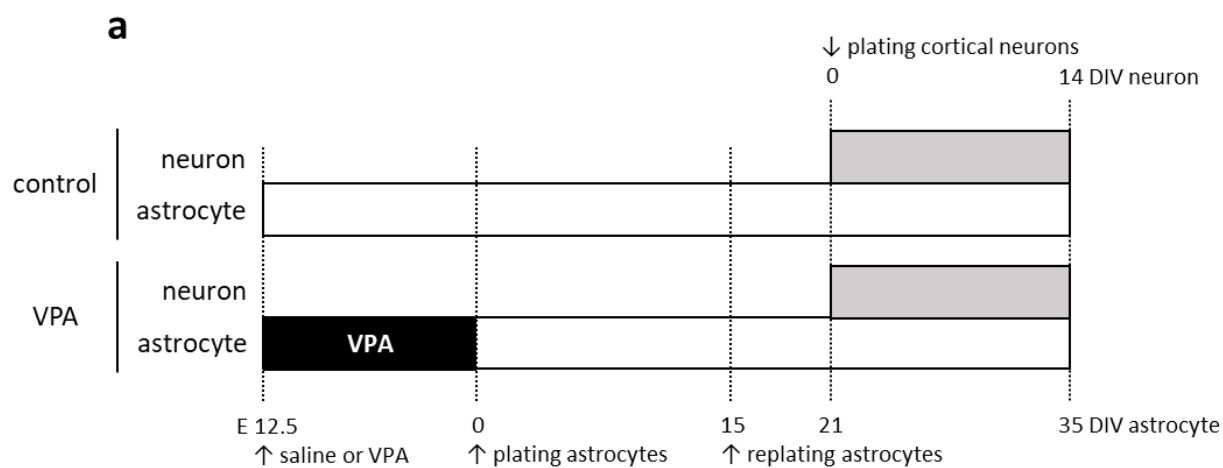


図8 ASDモデルマウスのVPA曝露とニューロン-アストロサイト共培養スケジュール

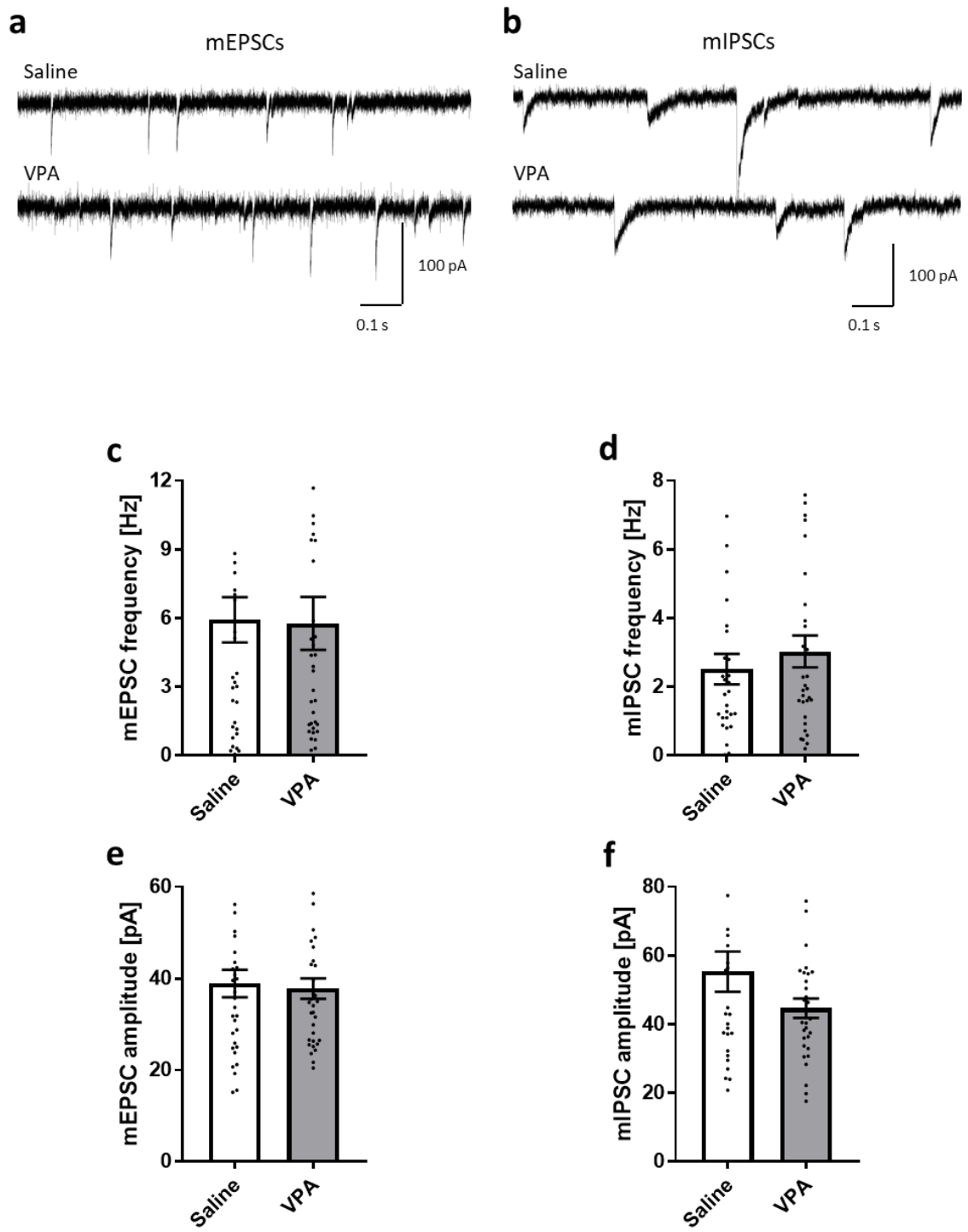


図9 ASDモデルマウス由来アストロサイトのシナプス開口放出機能への影響

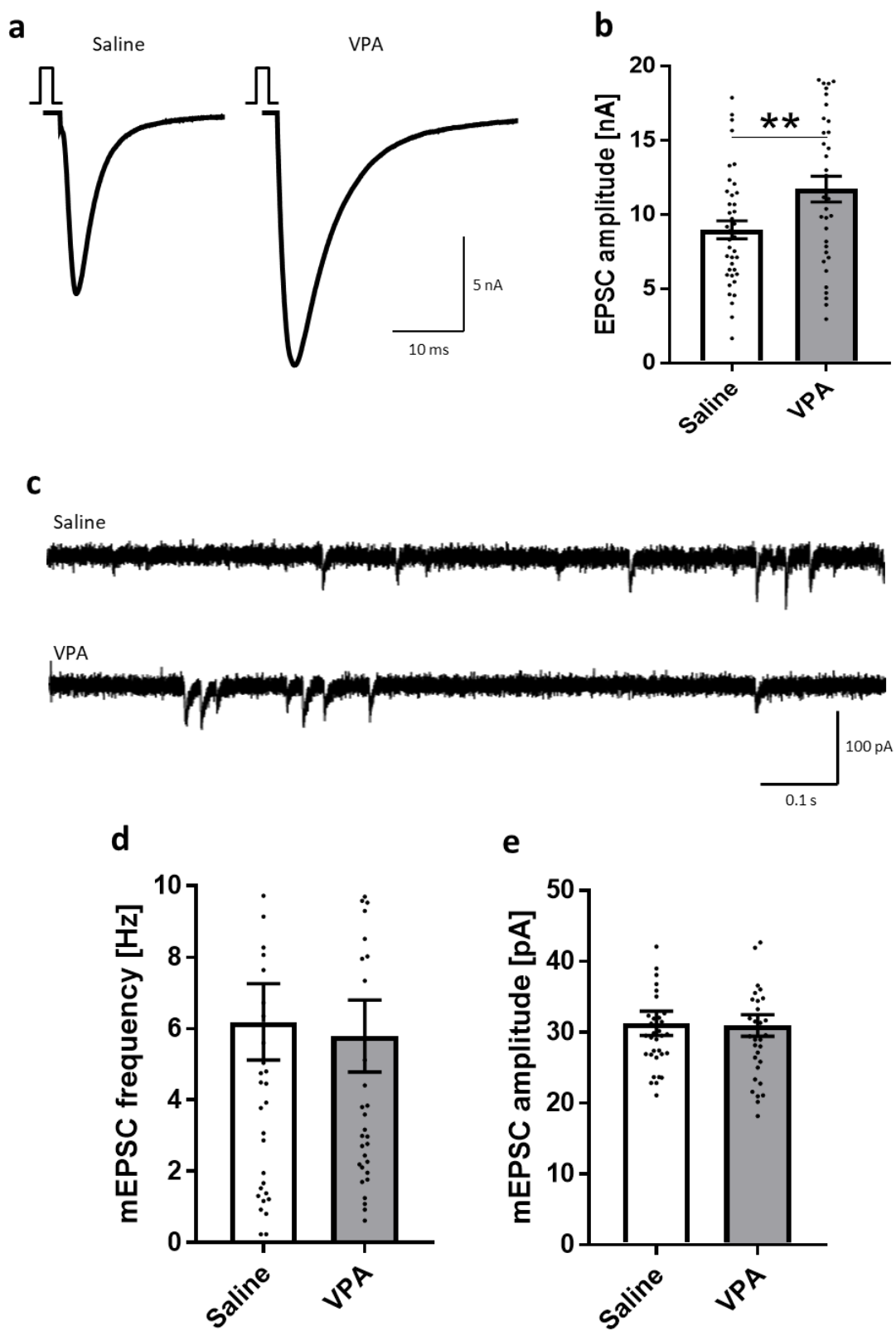


図 10 ASD モデルマウス由来アストロサイトのシナプス伝達機能への影響

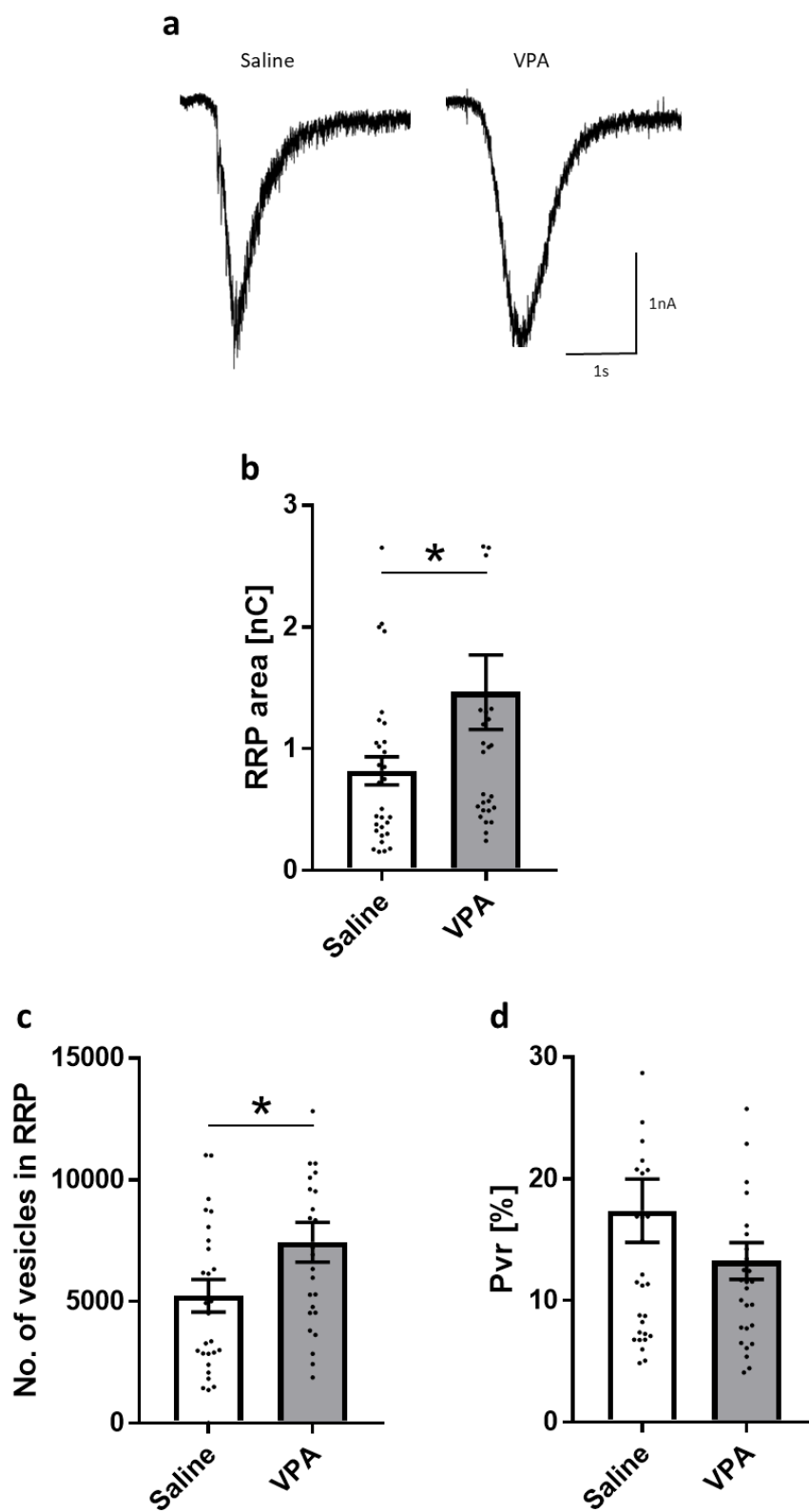


図 11 ASD モデルマウス由来アストロサイトの RRP シナプス小胞数への影響

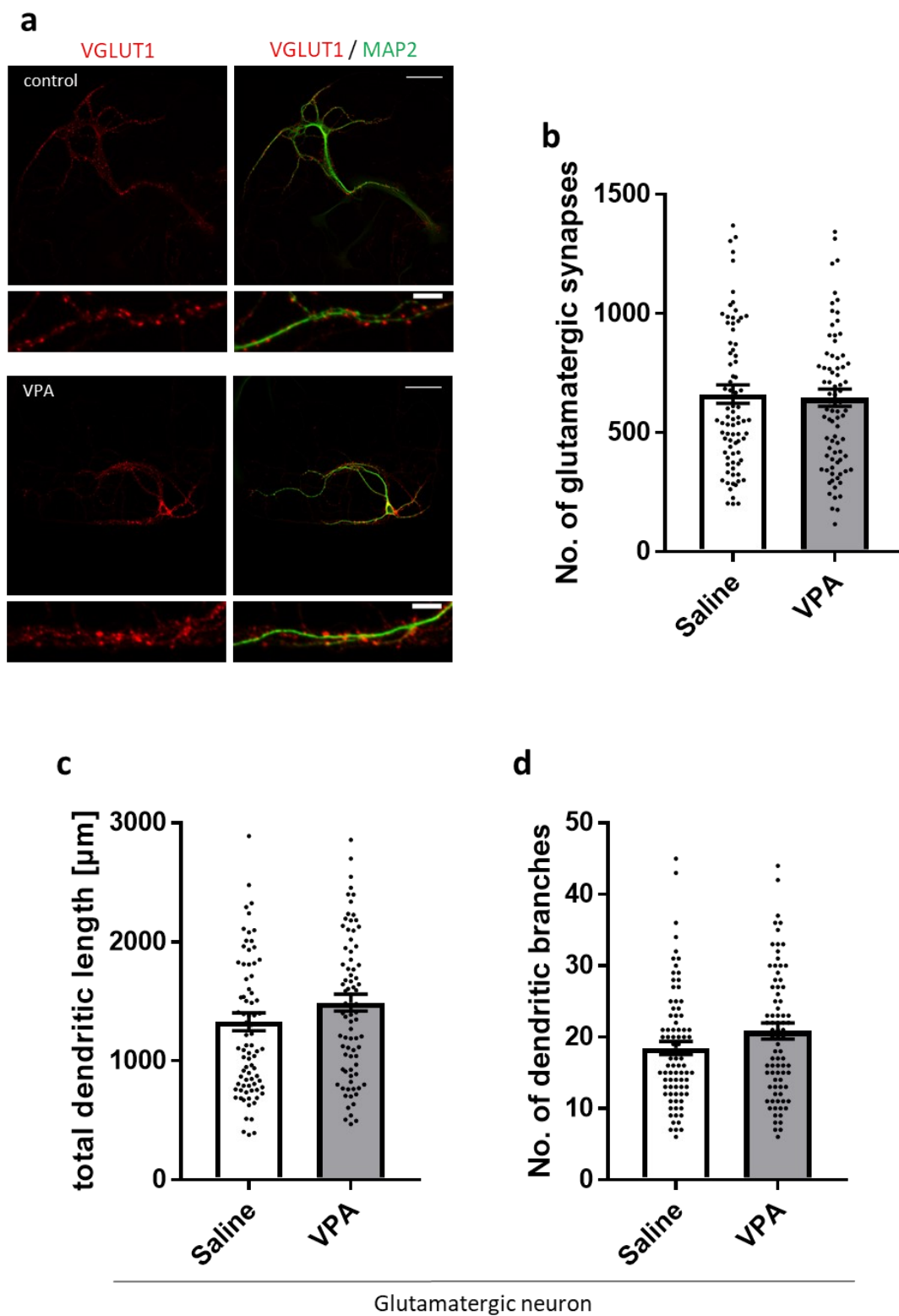


図 12 ASD モデルマウス由来アストロサイトの興奮性シナプス形成への影響

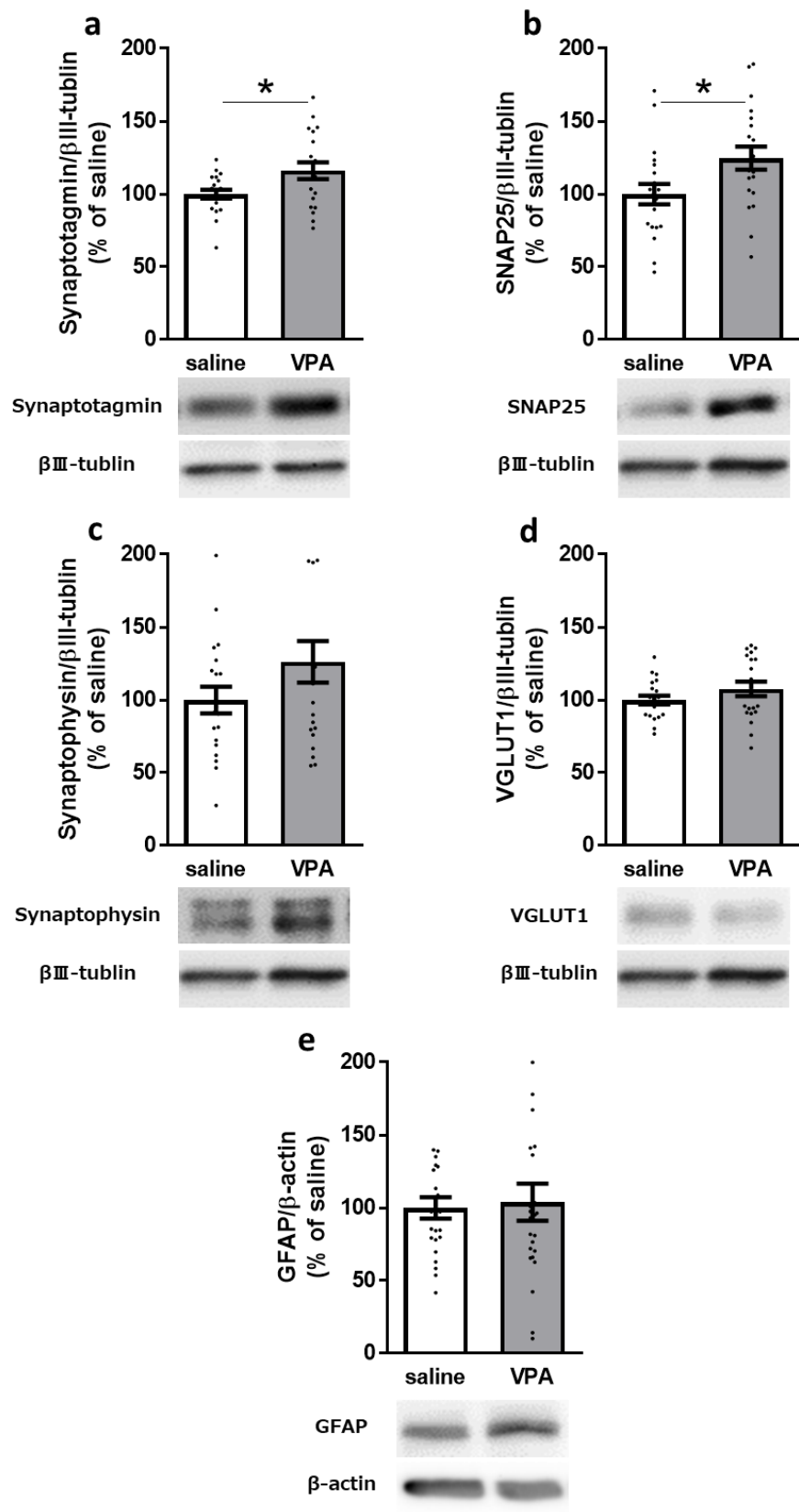


図 13 ASD モデルマウス由来アストロサイトのシナプス小胞関連因子への影響

総括ならびに結論

本研究は、VPA の妊娠期服用によって懸念される出生児の神経発達障害について、神経発達の調整を担うアストロサイトに着目しシナプス伝達機構に対する影響を検討することにより、VPA を由来とする神経発達障害の発症機序の解明を目的とした。第 1 章では VPA を *in vitro* において直接曝露されたアストロサイト、第 2 章では ASD モデルとされる VPA マウスのアストロサイトを用いて、それぞれのアストロサイトの神経発達調整機構について電気生理学、免疫組織学、分子生物学および生化学的手法により検討を行った。

第 1 章では、1 mM の VPA を曝露した培養アストロサイトは、共培養したニューロンのシナプス伝達機能を抑制するが、その影響は GABA 作動性ニューロンに対して特異的であることが示唆された。

1. *in vitro* において VPA を曝露したアストロサイトは共培養したニューロンの GABA 作動性シナプス伝達機能を低下させ、シナプス前終末の RRP におけるシナプス小胞数を減少させることが明らかとなった。
2. 免疫組織学的解析の結果、VPA を曝露したアストロサイトと共培養した GABA 作動性ニューロンにおいて、軸索および樹状突起形態が変化しないにも関わらず GABA 作動性シナプス数が減少しており、つまりシナプス形成能が低下したと言える。
3. GABA 作動性シナプスの発達および構成に関与する遺伝子の発現について検討を行ったところ、VPA を曝露したアストロサイトと共培養したニューロンでは *Ptprd* mRNA の発現レベルが低下した。

以上の結果から、VPA 曝露アストロサイトによる GABA 作動性シナプスに特異的な伝達機能およびシナプス形成能の低下は、GABA 作動性シナプス伝達機能およびシナプス形成能に関与する PTPRD の発現低下に起因することが明らかとなった。PTPRD の発現に関与するアストロサイト由来の液性因子もしくは接着因子の特定については、今後さらなる研究が必要である。

第 2 章では、VPA を胎内曝露した ASD モデルマウスのアストロサイトは共培養したグルタミン酸作動性ニューロンのシナプス伝達機能を増強することが示唆された。

1. ASD モデルマウスのアストロサイトは共培養したグルタミン酸作動性ニューロンの RRP におけるシナプス小胞数を増加させ、活動電位刺激によるシナプス伝達を増強した。
2. 免疫組織学的解析の結果、ASD モデルマウスのアストロサイトは共培養したグルタミ

ン酸作動性ニューロンの樹状突起形態およびシナプス形成能に影響しなかった。

3. グルタミン酸作動性シナプス小胞の構成およびシナプス小胞の開口放出に関するタンパク質の発現について解析を行ったところ、synaptotagmin および SNAP25 の発現増加が認められた。

以上の結果から、ASD モデルマウスのアストロサイトによるグルタミン酸作動性シナプス伝達機能の増強は、synaptotagmin および SNAP25 の発現増加に由来する RRP におけるシナプス小胞数の増加に起因する可能性が示唆された。Synaptotagmin および SNAP25 の発現を制御するアストロサイト由来の因子の特定が今後の課題となる。

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 ASD モデル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。また、第 2 章においてはオータプス培養標本を使用してグルタミン酸作動性ニューロンの解析を詳細に行ったが、第 1 章の結果を考慮すると GABA 作動性ニューロンに焦点を当てた詳細な研究が必須となる。

現在の日本では 100 人に 1 人以上の高い割合で ASD 患者が認められているが、現時点では対症療法しかなく、根治を期待できる治療法は確立されていない。近年多くの神経発達障害において、その神経病理にアストロサイトの異常が関与していることが明らかになっている。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標的の一つとしてアストロサイトを提案する。

参考文献

1. Christensen, J. *et al.* Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* **309**, 1696–1703. doi:10.1001/jama.2013.2270 (2013).
2. Christensen, J. *et al.* Association of prenatal exposure to valproate and other antiepileptic drugs with risk for attention-deficit/hyperactivity disorder in offspring. *JAMA Netw Open* **2**, e186606. doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.6606 (2019).
3. Meador, K. J. *et al.* Fetal antiepileptic drug exposure and cognitive outcomes at age 6 years (NEAD study): a prospective observational study. *Lancet Neurol* **12**, 244–252. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70323-X (2013).
4. Kang, J. & Kim, E. Suppression of NMDA receptor function in mice prenatally exposed to valproic acid improves social deficits and repetitive behaviors. *Front Mol Neurosci* **8**, 17. doi: 10.3389/fnmol.2015.00017 (2015).
5. Juliandi, B. *et al.* Reduced adult hippocampal neurogenesis and cognitive impairments following prenatal treatment of the antiepileptic drug valproic acid. *Stem Cell Rep* **5**, 966–1009. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.10.012 (2015).
6. Rice, D. & Barone, S. Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* **108**, 511–533. doi: 10.1289/ehp.00108s3511 (2000).
7. Fuenari, M. A., Saw, L. C., Kong, A. N. & Wagner, G. C. Altered behavioral development in Nrf2 knockout mice following early postnatal exposure to valproic acid. *Brain Res Bull* **109**, 132–142. doi: 10.1016/j.brainresbull.2014.10.006 (2014).
8. Yochum, C. L., Dowling, P., Reuhl, K. R., Wagner, G. C & Ming, X. VPA-induced apoptosis and behavioral deficits in neonatal mice. *Brain Res* **1023**, 126–132. doi: 10.1016/j.brainres.2008.01.055 (2008).
9. Wang, R., Hausknecht, K., Shen, R. Y. & Haj-Dahmane, S. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission onto dorsal raphe serotonergic neurons in the valproic acid model of autism. *Front Pharmacol* **9**, 1185. doi: 10.3389/fphar.2018.01185

(2018).

10. Banerjee, A. et al. Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *Int J Neuropsychopharmacol* **16**, 1309–1318. doi: 10.1017/S1461145712001216 (2013).
11. Iijima, Y. et al. Distinct defects in synaptic differentiation of neocortical neurons in response to prenatal valproate exposure. *Sci Rep* **6**, 27400. doi: 10.1038/srep27400 (2016).
12. Kumamaru, E., Egashira, Y., Takenaka, R. & Takamori, S. Valproic acid selectively suppresses the formation of inhibitory synapses in cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* **569**, 142–147. doi: 10.1016/j.neulet.2014.03.066 (2014).
13. Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S. A. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**, 523–530. doi: 10.1016/j.tins.2003.08.008 (2003).
14. Sauvageot, C. M. & Stiles, C. D. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 244–249. doi: 10.1016/s0959-4388(02)00322-7 (2002).
15. Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S. & Barres, B. A. Control of synapse number by glia. *Science* **291**, 657–661. doi: 10.1126/science.291.5504.657 (2001).
16. Diniz, L. P. et al. Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor β signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons. *J Biol Chem* **287**, 41432–41445. doi: 10.1074/jbc.M112.380824 (2012).
17. Hughes, E. G., Elmariah, S. B. & Balice-Gordon, R. J. Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Mol Cell Neurosci* **43**, 136–145. doi: 10.1016/j.mcn.2009.10.004 (2010).
18. Stogsdill, J. A. et al. Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis. *Nature* **551**, 192–197. doi: 10.1038/nature24638 (2017).
19. Diniz, L. P. et al. Astrocyte transforming growth factor beta 1 promotes inhibitory

- synapse formation via CaM kinase II signaling. *Glia* **62**, 1917 – 1931. doi: 10.1002/glia.22713 (2014).
20. Ebrahimi, M. *et al.* Astrocyte-expressed FABP7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic function of cortical neurons. *Glia* **64**, 48–62. doi: 10.1002/glia.22902 (2016).
 21. Kucukdereli, H. *et al.* Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, E440 – 449. doi: 10.1073/pnas.1104977108 (2011).
 22. Kaczor, P., Rakus, D. & Mozrzymas, J. W. Neuron-astrocyte interaction enhance GABAergic synaptic transmission in a manner dependent on key metabolic enzymes. *Front Cell Neurosci.* **9**, 120. doi: 10.3389/fncel.2015.00120 (2015).
 23. Christopherson, K. S. *et al.* Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* **120**, 421–433. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.020 (2005).
 24. Ballas, N., Liroy, D., Grunseich, C., & Mandel, G. Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. *Nat Neurosci* **12**, 311–317. doi: 10.1038/nn.2275 (2009).
 25. Yang, Q. *et al.* Excessive astrocyte-derived neurotrophin-3 contributes to the abnormal neuronal dendritic development in a mouse model of fragile X syndrome. *PLoS Genet* **8**, e1003172. doi: 10.1371/journal.pgen.1003172 (2012).
 26. Raissi, A. J., Staudenmaier, E. K., David, S., Hu, L. & Paradis, S. Sema4D localizes to synapses and regulates GABAergic synapse development as a membrane-bound molecule in the mammalian hippocampus. *Mol Cell Neurosci* **57**, 23–32. doi: 10.1016/j.mcn.2013.08.004 (2013).
 27. Paradis, S. *et al.* An RNAi-based approach identifies molecules required for glutamatergic and GABAergic synapse development. *Neuron* **53**, 217–232. doi: 10.1016/j.neuron.2006.12.012 (2007).
 28. Kuzirian, M. S., Moore, A. R., Staudenmaier, E. K., Friedel, R. H. & Paradis, S. The

- class 4 semaphorin Sema4D promotes the rapid assembly of GABAergic synapses in rodent hippocampus. *J Neurosci* **33**, 8961–8973. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0989-13.2013 (2013).
29. Takahashi, H. *et al.* Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTP δ trans-synaptic interaction. *Nat Neurosci* **15**, 389–398, S1-2. doi: 10.1038/nn.3040 (2012).
 30. Yim, Y. S. *et al.* Slitrks control excitatory and inhibitory synapse formation with LAR receptor protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 4057–4062. doi: 10.1073/pnas.1209881110 (2013).
 31. Ashrafi, S. *et al.* Neuronal Ig/Caspr recognition promotes the formation of axoaxonic synapses in mouse spinal cord. *Neuron* **81**, 120–129. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.060 (2014).
 32. Yoshida, T. *et al.* IL-1 receptor accessory protein-like 1 associated with mental retardation and autism mediates synapse formation by trans-synaptic interaction with protein tyrosine phosphatase δ . *J Neurosci* **31**, 13485 – 13499. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2136-11.2011 (2011).
 33. Valnegri, P. *et al.* The X-linked intellectual disability protein IL1RAPL1 regulates excitatory synapse formation by binding PTP δ and RhoGAP2. *Hum Mol Genet* **20**, 4797–4809. doi: 10.1093/hmg/ddr418 (2011).
 34. Yoshida, T. *et al.* Interleukin-1 receptor accessory protein organizes neuronal synaptogenesis as a cell adhesion molecule. *J Neurosci* **32**, 2588 – 2600. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4637-11.2012 (2012).
 35. Han, K. A. *et al.* PTP σ Drives Excitatory Presynaptic Assembly via Various Extracellular and Intracellular Mechanisms. *J Neurosci* **38**, 6700 – 6721. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0672-18.2018 (2018).
 36. Pinto, D. *et al.* Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* **466**, 368–372. doi: 10.1038/nature09146 (2010).

37. Elia, J. *et al.* Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Mol Psychiatry* **15**, 637–646. doi: 10.1038/mp.2009.57 (2010).
38. Han, S. *et al.* Autistic-like behaviour in *Scn1a*^{+/-} mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature* **489**, 385–390. doi: 10.1038/nature11356 (2012).
39. Antoine, M. W., Langberg, T., Schnepel, P. & Feldman, D. E. Increased excitation-inhibition ratio stabilizes synapse and circuit excitability in four autism mouse models. *Neuron* **101**, 648–661.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2018.12.026 (2019).
40. Gandal, M. J. *et al.* GABA_B-mediated rescue of altered excitatory-inhibitory balance, gamma synchrony and behavioral deficits following constitutive NMDAR-hypofunction. *Transl Psychiatry* **2**, e142. doi: 10.1038/tp.2012.69 (2012).
41. Fernández-Chacón, R. *et al.* Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* **410**, 41–9. doi: 10.1038/35065004 (2001).
42. Pang, Z. P., Shin, O. H., Meyer, A. C., Rosenmund, C. & Südhof, T. C. A gain-of-function mutation in synaptotagmin-1 reveals a critical role of Ca²⁺-dependent soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex binding in synaptic exocytosis. *J Neurosci* **26**, 12556–65. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3804-06.2006 (2006).
43. Salaün, C., Gould, G. W. & Chamberlain, L. H. Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* **280**, 19449–53. doi: 10.1074/jbc.M501923200 (2005).
44. Washbourne, P. *et al.* Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci* **5**, 19–26. doi: 10.1038/nn783 (2002).
45. Kwon, S. E. & Chapman, E. R. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron* **70**, 847–54. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.001 (2011).
46. Schneider, T. & Przewlocki. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* **30**, 80–9. doi:

1038/sj.npp.13005518 (2005).

47. Wagner, G. C., Reuhl, K. R., Cheh, M., McRae, P. & Halladay, A.K. A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J Autism Dev Disord* **36**, 779-93. doi: 10.1007/s10803-006-0117-y (2006).
48. 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* **16**, 91-103. doi: 10.1017/S1461145711001714 (2013).
49. Kazlauskas, N., Campolongo, M., Lucchina, L., Zappala, C. & Depino, A. M. Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* **72**, 11-21. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.06.001 (2016).
50. Bacaj, T., Wu, D., Burré, J., Malenka, R. C., Liu, X. & Südhof, T.C. Synaptotagmin-1 and -7 Are Redundantly Essential for Maintaining the Capacity of the Readily-Releasable Pool of Synaptic Vesicles. *PLoS Biol* **13**, e1002267. doi: 10.1371/journal.pbio.1002267 (2015).
51. Nagy, G. *et al.* Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron* **41**, 417-29. doi: 10.1016/s0896-6273(04)00038-8 (2004).

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に終始熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました福岡大学薬学部薬学科臨床疾患薬理学教室の岩崎克典教授、桂林秀太郎准教授、窪田香織講師に感謝の意を表します。本研究の遂行にあたり多大なご指導とご助言を賜り、終始実験を援助して頂いた渡辺拓也助教に深く感謝申し上げます。また、共に実験に従事して頂きました大藪康平氏、大場雄貴氏、塚本春太郎氏、吉田志織女史、野見山和将氏をはじめ、臨床疾患薬理学教室の皆様にご心よりお礼申し上げます。最後に、本研究の遂行にあたり尊い生命を提供して頂きました実験動物の諸霊に深く感謝しご冥福をお祈りいたします。