

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： 妊娠中バルプロ酸暴露による自閉スペクトラム症を手がかりとした創薬標的研究
Drug discovery research for autism spectrum disorder induced by exposure to valproic acid during pregnancy

研究開発実施期間： 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：伊藤賢伸
Masanobu Ito

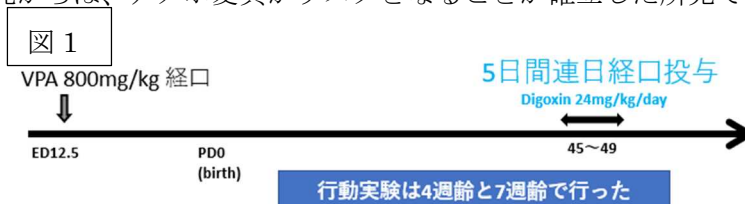
研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
順天堂大学医学部・精神医学講座・准教授
Associate professor, department of psychiatry, Juntendo university faculty of medicine

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

背景

自閉スペクトラム症（以下自閉症）は、幼児期にその症状が明らかとなり、生涯にわたり広汎な社会行動の障害を引き起こす疾患であり、米国では小児だけでも年間610億ドル（6兆6千億円）もの社会負担になっていると試算されているなど、大きな社会的影響のある疾患である。自閉症の原因は未だ不明な点が多く残っているものの、胎児期のバルプロ酸曝露という環境因が自閉症の高いリスクとなる（ハザード比 2.9 (Christensen ら 2013)）ことは確立した所見であり、妊娠中バルプロ酸投与によるモデル動物が広く研究されている (Kinjo ら 2019)。一方、ゲノム研究からは、デノボ変異がリスクとなることが確立した所見であり (Sanders ら 2012)、見出された変異のモデル動物も作成され、各遺伝子の性質に応じた創薬研究のアプローチ (TSC1 変異による自閉症に対するラパマイシンなど) も行われているが、多くの原因遺伝子により生じる自閉症に対し、遺伝子毎に異なる治療法を開発することは現実的ではなく、環境因による自閉症とゲノム要因による自閉症の病態を統一的に理解し、治療戦略につなげた研究はほとんど行われていない。最近、Takata ら (2018) は、in silico の研究で自閉症でデノボ変異が見出される遺伝子群は、バルプロ酸により発



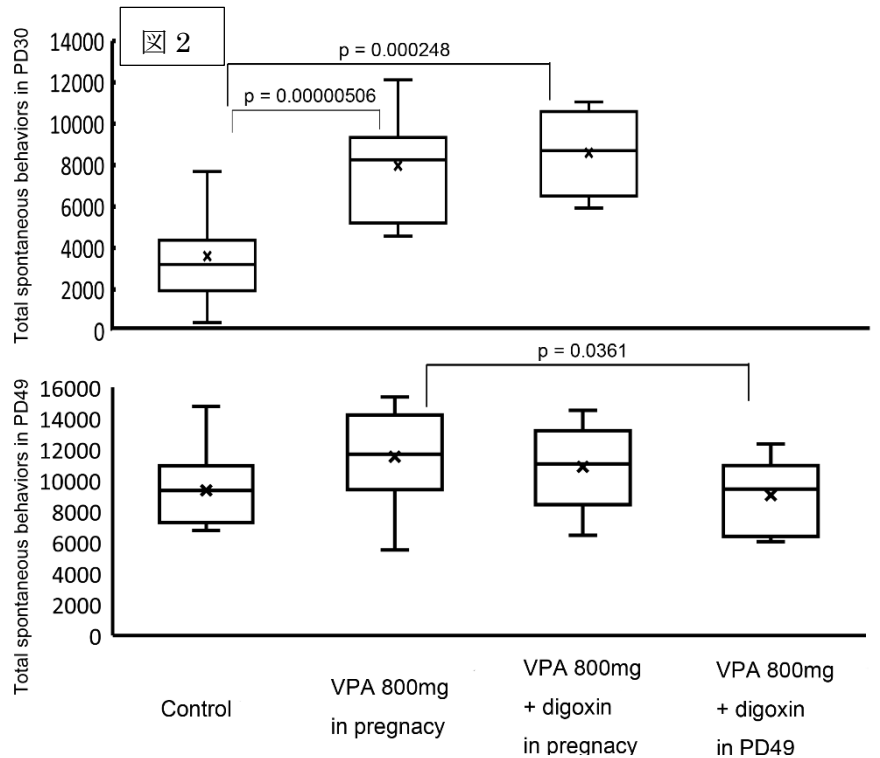
現が低下する遺伝子群と有意に多く重なることを見出し、両者の関係性を初めて指摘すると共に、これらの遺伝子群の発現を逆に上昇させる薬剤として、強心性配糖体である digoxin を見出した。興味深いことに、強心性配糖体である digoxin の強心作用を担う糖部分を持たない digoxigenin も同様の作用を有することがわかった。自閉スペクトラム症で抑制されている遺伝子が、digoxin や digoxigenin で賦活することができれば、これまで治療方法が確立していない自閉スペクトラム症の予防と治療を行える可能性がある。

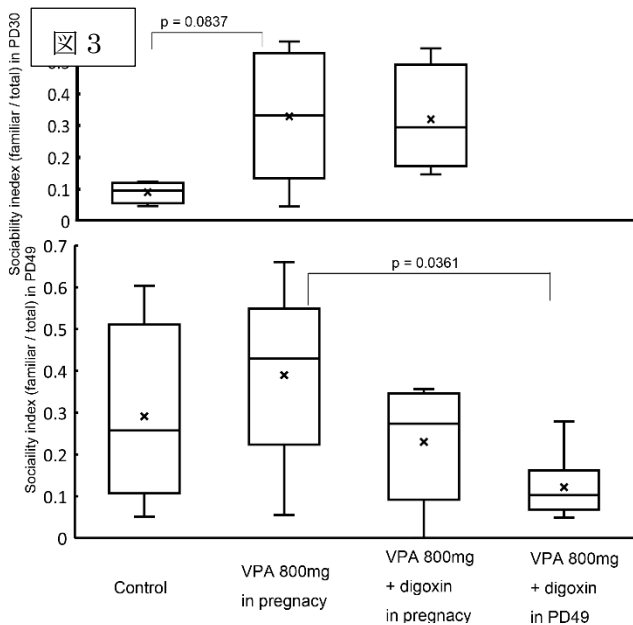
行動実験

自閉症スペクトラム症 (ASD) モデル動物作成のため、妊娠ラットにバルプロ酸ナトリウム (VPA) を投与した。In silico のデータによれば、VPA は ASD で抑制される遺伝子発現を抑制する一方、digoxin, digoxigenin は ASD に関連する遺伝子の発現を増加することが考えられた。そこで我々は、ASD モデルラットを作成し、実際に行動が変化するかどうかを検証した。先行研究を元に妊娠 12.5 日の Wistar rat にバルプロ酸ナトリウム (VPA) を 800mg/kg 投与し、出生仔を ASD モデルラットとした。Digoxin の投与タイミングは妊娠中 VPA と同時

(VPA 800mg + digoxin in pregnancy) と生後 45-49 日 (VPA 800mg + digoxin in PD49) の 2 通りで行った (図 1)。

ASD モデルラットに生後 digoxin を投与したところ、多動性が減少した。妊娠中の VPA・digoxin 投与では、多動性は著変を認めなかった。

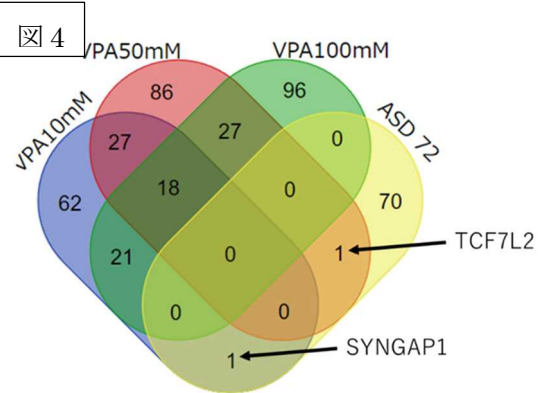




次に、社交性について、3-chamber による social interaction test を行った。社交性のあるラットは、見知らぬラットにより多くかかわろうとする性質を利用したもので社交性の指標として Sociability index (SI) を計算する。SI は低いほど社交性が高いことを示す。図 3 に示すように、ASD モデルである VPA 800mg 投与群に比較し、出生後 digoxin を投与した群では、社交性が改善していた。生後 digoxin を投与することで、自発運動量や社交性に变化が認められ、digoxin により行動が変化することが示され、その変化は ASD 的な行動が改善することを示していた。

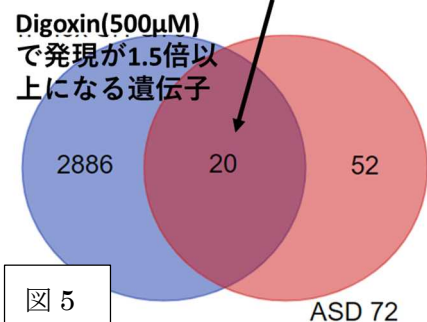
遺伝子発現に基づく作用機序の解明

Digoxin による ASD 行動の



改善が仮説通り、ASD 関連遺伝子の発現を変えることで起こっているのかどうかを検証するため、SH-SY5Y 細胞を用いて、RNA シークエンスを行った。VPA の濃度は 10mM, 50mM, 100mM で検証した。ASD 関連遺伝子としては、Duan ら (2020) がシステマティックレビューを行い特定された 72 の遺伝子を対象とした。その結果 VPA 曝露により発現顔減少した遺伝子のうち、ASD に関連したものは TCF7L2 と SYNGAP1 であった。次に digoxin 500 μ M に曝露することで遺伝子発現が 1.5 倍以上になる遺伝子について解析した。3006 の遺伝子の発現が増加し、そのうち 20 の遺伝子が ASD 関連遺伝子であった。Hypergeometric 検定を行ったところ有意に多くの遺伝子が ASD と関連していることが示された ($p < 2.23 \times 10^{-10}$)。これら 20 の遺伝子は VPA が遺伝子発現を減少させる ASD 関連遺伝子とは一致しなかったが、その他の ASD 関連遺伝子の発現を増加させることで、行動を変化させた可能性が示された。Digoxin の作用について、pathway 解析を行ったところ、histone や neuroprotection にかかわる pathway とのかかわりが認められた。

RFX3 NIPBL POGZ ASH1L CTNNB1 CUL3 AP2S1
NAA15 CHD2 SKI MED13 TCF20 TLK2 GIGYF1
SETD5 MED23 PIK3CA KMT5B DYRK1A WAC



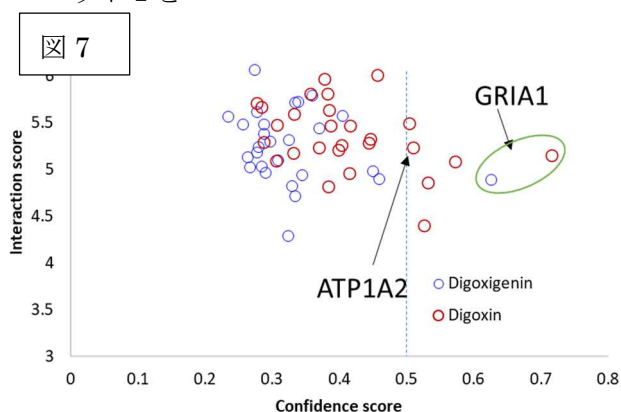
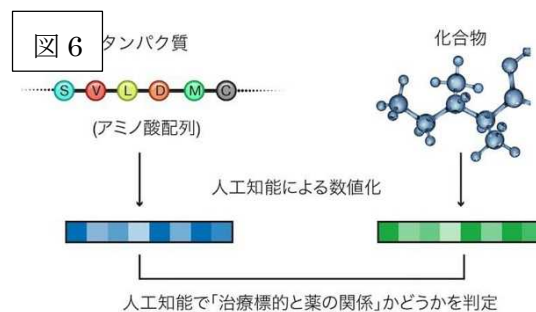
蛋白質同定

次に digoxin が作用する蛋白質の同定を行った。Digoxin と digoxigenin の共通骨格を残して、-NH₂ 基を付け、アフィニティビーズを作成し、これを用いて digoxigenin と親和性のある蛋白質を同定し、質量分析を行った。その結果 27 の蛋白質を同定することができた。

さらにこれらの蛋白質と digoxin、digoxigenin について理論的な結合能を調べるために、LIGHTHOUSE (Shimizu et al, iScience 25: 105314, 2022) を用いて解析した (図 6)。

その結果、GRIA1 遺伝子にかかわる蛋白質が、digoxin、digoxigenin とともに強く結合することが予測された (図 7)。

GRIA1 遺伝子は、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット 1 をコードする遺伝子であり、この蛋白質に作用することで行動の変化を起こしている可能性が示された。



Title: Drug discovery research for autism spectrum disorder induced by exposure to valproic acid during pregnancy

Background

Digoxin and digoxigenin, which are already clinically used as cardiotoxic agents, may increase the expression of pathways which is related to autism spectrum disorder (ASD). Their target of molecules may be different from cardiotoxic effects. The goal of this study is to confirm the effects of digoxin and digoxigenin on the nervous system *in vitro* and *in vivo*, and to identify their target molecules. There is a possibility that it will lead to the development of a new treatment for ASD.

Animal behavior studies

Sodium valproate (VPA) was administered to pregnant rats to create an animal model of ASD. *In silico* data suggest that VPA suppresses ASD-repressed gene expression, while digoxin and digoxigenin increase the expression of ASD-related genes. Therefore, we created an ASD model rat and verified whether the behavior changed. Based on previous studies, we administered 800mg/kg of sodium valproate (VPA) to Wistar rats on the 12.5th day of pregnancy, and used the offspring as ASD model rats. Digoxin was administered at the same time as VPA during pregnancy (VPA 800 mg + digoxin in pregnancy) or 45-49 days after birth (VPA 800 mg + digoxin in PD49).

Postnatal administration of digoxin to ASD model rats reduced hyperactivity. In the next step, we conducted a 3-channel social interaction test for sociability. The sociability index (SI) was calculated as an index of sociability. A lower SI indicates higher sociability. Compared with the ASD model VPA 800mg administration group, the postnatal administration of digoxin improved sociability. Postnatal administration of digoxin resulted in changes in locomotor activity and sociability, indicating that digoxin changed behavior, and that change improved ASD-like behavior.

Gene expression of digoxin

RNA sequencing was performed using SH-SY5Y cells to verify whether ASD-like behaviors improve with digoxin which caused altering the expression of ASD-related genes, as hypothesized. The concentrations of VPA were verified at 10mM, 50mM and 100mM. As ASD-related genes, we targeted 72 genes identified by Duan et al. (2020) in a systematic review. As a result, TCF7L2 and SYNGAP1 were associated with ASD among the genes whose expression was decreased by VPA exposure. Next, we analyzed genes whose gene expression increased 1.5-fold or more by exposure to digoxin 500 μ M. Expression of 3006 genes was increased, 20 of which were ASD-related genes. Hypergeometric tests showed that significantly more genes were associated with ASD ($p < 2.23 \times 10^{-10}$). Although these 20 genes did not match the ASD-associated genes whose gene expression was decreased by VPA, it was possible that digoxin increased the expression of other ASD-associated genes, thereby altering behavior. Pathway analysis of the action of Digoxin revealed that it is related to histone and neuroprotection pathways.

Mass spectrometry

We identified the proteins that digoxin acts on. We left the common group of digoxin and digoxigenin, attached -NH₂ group, identified proteins with affinity to digoxigenin using affinity beads, and performed mass spectrometric analysis. As a result, 27 proteins could be identified.

Furthermore, in order to examine the theoretical binding ability of these proteins with digoxin and digoxigenin, we analyzed them using the LIGHTHOUSE method (Shimizu et al, *iScience* 25: 105314, 2022). As a result, it was shown that the protein related to the GRIA1 gene strongly binds to both digoxin and digoxigenin. The GRIA1 gene is a gene that encodes AMPA receptor subunit 1, and it was suggested that acting on this protein may cause changes in behaviors.