

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15707

研究課題名(和文) iPS細胞と3次元共培養によるHPGDS経路のシナプス刈込と自閉症への関与の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of HPGDS pathway on synaptic pruning and its involvement in autism by iPS cells and 3D co-culture

研究代表者

橘 雅弥 (Tachibana, Masaya)

大阪大学・連合小児発達学研究所・特任准教授(常勤)

研究者番号：10722952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、炎症メディエーターであるプロスタグランジンD2 (PGD2) と、自閉症者のミクログリアで強く発現している造血器型プロスタグランジンD合成酵素 (HPGDS) に注目して、ニューロンのシナプス形成とその刈込へのHPGDS-PGD2経路の関与を検討した。ヒトiPS細胞にHPGDSを強制発現させたところ、分化スピードの変化がみられた。また、マウスの実験では、PGD2がニューロンのシナプス形態や成熟に影響することが示された。HPGDS-PGD2のミクログリアへの影響については、後継課題の基盤研究Cでも継続して検討を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉スペクトラム症 (ASD) においてはシナプス刈込異常のその病態への関与が指摘されている。一方で自閉スペクトラム症への神経炎症の関与が繰り返し示唆されている。自閉スペクトラム症において強く発現するHPGDSとその合成産物であるHPGDS-PGD2経路については、その阻害薬が既に開発されており、そのニューロンやシナプスへの影響を明らかにすることにより、ASDに対する新規治療法開発にもつながりうる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the inflammatory mediator prostaglandin D2 (PGD2) and hematopoietic prostaglandin D synthase (HPGDS), which is expressed strongly in microglia of autistic individuals, to investigate the involvement of the HPGDS-PGD2 pathway in the synapse formation of neurons and synaptic pruning. Forced expression of HPGDS in human iPS cells resulted in changes in differentiation speed. In addition, experiments in mice showed that PGD2 affects synaptic morphology and maturation of neurons; the effects of HPGDS-PGD2 on microglia will be continued in the succeeding project, Fundamental Research C.

研究分野：小児科学

キーワード：ニューロン ミクログリア iPS細胞 自閉スペクトラム症 神経炎症

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (ASD) は、社会的コミュニケーション・相互作用の障害と、限定された反復する行動 (常同行動) や興味によって特徴づけられる神経発達症であり、有病率は 1 - 2% とされる。ASD の発症には、遺伝的要因の関与が大きく、近年の遺伝解析技術の進歩に伴って、関連遺伝子の同定が進んできているが、同定された ASD 関連遺伝子は、シナプス関連蛋白、転写・翻訳因子、炎症関連因子などに収束することが示されており(1)、これらに注目した病態解明が進められている。一方、ASD 剖検脳の病理学的検討においては、大脳皮質の構造異常・過剰なシナプス形成と合わせてミクログリアの活性化が明らかになっている(2) (3)。また ASD においては乳幼児期に過剰な頭囲拡大を示す症例があり(4)、生後早期までの神経回路形成におけるシナプス形成・刈込と神経炎症がその発症に関与していることが示唆されている。申請者らは、ASD の剖検脳で活性化しているミクログリアにおいて、炎症メディエーターであるプロスタグランジン D₂ (PGD₂) の合成酵素である造血器型 PGD 合成酵素 (HPGDS) の発現が増加していることを見出した。さらに *in vitro* においてマウス初代培養神経細胞に PGD₂ 受容体作動薬を投与すると、樹状突起数が増加することを明らかにした。一方で正常マウスの幼若脳においては、生後 2 週まで HPGDS を強発現する活性型ミクログリアが、不要な細胞を貪食除去していることも明らかにしており(5)、脳の初期発達においては、ミクログリアがシナプス数を調整していることも知られている(6)。これらの知見から我々は、HPGDS-PGD₂ 経路を介したミクログリア-神経連関が、ASD における神経炎症とシナプス刈込の異常に関与しているという仮説を立て、これを検証するために本研究を計画した。

2. 研究の目的

上記の背景の背景を踏まえ、本研究では、ヒト iPS 細胞由来のミクログリア、ニューロンを用いて、ミクログリアにおける HPGDS の発現がミクログリアの細胞特性に及ぼす影響を明らかにすること、ニューロン間のシナプスの形成過程における PGD₂ の影響を明らかにすること、ニューロンとミクログリア (+ アストロサイト) を 3 次元培養系を用いて共培養し、ミクログリアの発現 HPGDS レベルによるシナプス刈込の差異について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HPGDS が神経系細胞への分化に及ぼす影響の検討

ヒト iPS 細胞にゲノム編集技術を用いて HPGDS をノックイン・ノックダウンし、ニューロンおよびミクログリアに分化させ、分化の各段階における細胞特徴の評価を行って、HPGDS が神経系細胞の分化に及ぼす影響を検討した。

(2) HPGDS 発現量を操作したミクログリアの細胞特性の解析

ミクログリアにおいて、HPGDS をノックイン、HPGDS の発現量がミクログリアの細胞特性 (遊走能、増殖能、貪食能、サイトカイン産生) に及ぼす影響を検討した。

(3) ニューロンのシナプス形成に PGD₂ が及ぼす影響の解析

マウスのプライマリカルチャー、および iPS 細胞をニューロンに分化させたもの、PGD₂

(あるいは PGD2 レセプター作動薬)の存在下でニューロスフィアおよび2次元上でのニューロン間のシナプス形成について、検討を行った。

4. 研究成果

(1) HPGDS が神経系細胞への分化に及ぼす影響の検討

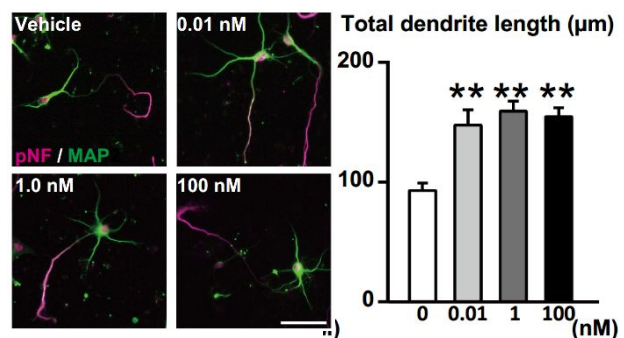
ヒト iPS 細胞に、抗生剤存在下で HPGDS を強発現するベクターを作成して導入した。この iPS 細胞を継代培養すると、HPGDS 強発現 iPS 細胞において、分化した細胞の出現が早くなる傾向が認められた。HPGDS により産生された PGD2 が、オートクライン・パラクラインによって細胞の分化に関与している可能性が示唆された。また、iPS 細胞からニューロン、ミクログリアへ分化させるプロトコルを検証し、効率的な分化培養系を立ち上げた。iPS 細胞からニューロン、ミクログリアへの各段階の細胞特徴の評価は引き続き行っており、後継の基盤研究 C の中でも明らかにしていく。

(2) HPGDS 発現量を操作したミクログリアの細胞特性の解析

iPS 細胞に HPGDS を強発現させてミクログリアに分化させて細胞特性の解析を行う前に、マウスのプライマリカルチャを用いて、ミクログリアの遊走能、増殖能、貪食能、サイトカイン産生を評価する系を検討、確定した。iPS 細胞のミクログリアへの分化プロトコルの確定に時間を要したため、HPGDS 強発現ミクログリアにおける細胞特性評価には至らなかったが、マウスミクログリアのプライマリカルチャにおける HPGDS ノックインミクログリアでは、現在までの検討では、HPGDS 発現量による細胞特性への明らかな影響は確認されていない。今後、iPS 細胞を分化させたミクログリアを用いての検証を行っていく。

(3) ニューロンのシナプス形成に PGD2 が及ぼす影響の解析

マウスを用いたニューロンのプライマリカルチャに PGD2 レセプターアゴニストを投与して、ニューロンの形態変化を確認したところ、樹状突起長の伸長、ニューロンのスパイン密度の変化を認めた。さらに、生後早期のマウスに PGD2 レセプターアゴニストを投与して神経細胞の形態を観察したところ、樹状突起の形態に変化が見られた。これらの HPGDS-PGD2 経路のニューロンの成熟とシナプス形成への影響を、iPS 細胞から分化したニューロンにおいても、時系列に沿った検討を行っているが、現在まだ途上であり、後継の基盤研究 C においても引き続き検討を行う。



(4) ニューロン・ミクログリア共培養による HPGDS 発現が神経発生に及ぼす影響の検討

本研究では、三次元共培養系を用いた iPS 細胞由来のニューロンと HPGDS 強発現ミクログリアを用いて、自閉スペクトラム症の脳にみられるシナプス刈込の異常と HPGDS の関連を検討することが最終目的であった。iPS 細胞からミクログリアへの分化の系の確立に時間を要したことから、三次元共培養系の確立は遅延しており、現在培

養条件の検討中である。この系を確立することにより、時系列に沿った神経成熟のプロセスにおける HPGDS-PGD2 系の関与が明らかになる。

最後に、本研究を行うにあたり科研若手研究での支援をいただけたことに謝意を表す。

参考文献

1. Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet.* 2014;94(5):677-94.
2. Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, Nakamura K, Futatsubashi M, Takebayashi K, et al. Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry.* 2013;70(1):49-58.
3. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol.* 2005;57(1):67-81.
4. Hazlett HC, Gu H, Munsell BC, Kim SH, Styner M, Wolff JJ, et al. Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder. *Nature.* 2017;542(7641):348-51.
5. Mohri I, Eguchi N, Suzuki K, Urade Y, Taniike M. Hematopoietic prostaglandin D synthase is expressed in microglia in the developing postnatal mouse brain. *Glia.* 2003;42(3):263-74.
6. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science.* 2011;333(6048):1456-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsumura N, Fujino H, Yamamoto T, Tanida Y, Ishii A, Tatsumi A, Nakanishi M, Tachibana M, Mohri I, Okuno H.	4. 巻 19(4)
2. 論文標題 Effectiveness of a Parent Training Programme for Parents of Adolescents with Autism Spectrum Disorders: Aiming to Improve Daily Living Skills.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 2363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph19042363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jayanath S, Hamzah N, Ahmad Fauzi A, Syarinaz Ahmad Adlan A, Asiah Muhamad N, Zaiti Zainal A, Mohri I, Tachibana M.	4. 巻 -
2. 論文標題 The Japanese Sleep Questionnaire for Preschoolers within a Malaysian context.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.15123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kamiya C, Kagitani-Shimono K, Iwatani Y, Tachibana M, Mohri I, Taniike M.	4. 巻 50
2. 論文標題 The relationship between multisensory hypersensitivity and behavioral problems in children with autism spectrum disorders.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Brain Science	6. 最初と最後の頁 63-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20821/jbs.50.0_63	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shiraishi Y, Tachibana M, Shirota A, Mohri I, Taniike M, Yamashiro T, Kato T.	4. 巻 44(11)
2. 論文標題 Relationships between cortical, cardiac, and arousal-motor activities in the genesis of rhythmic masticatory muscle activity across sleep cycles in primary sleep bruxism children.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sleep	6. 最初と最後の頁 zsab156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/sleep/zsab156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山本知加、橘 雅弥	4. 巻 35 (2)
2. 論文標題 発達評価 (新版K式発達検査、WISC、M-CHAT、ASD、ADHDのスクリーニングスケール)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 with NEO	6. 最初と最後の頁 120-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinohara Mitsuru, Kanekiyo Takahisa, Tachibana Masaya, Kurti Aishe, Shinohara Motoko, Fu Yuan, Zhao Jing, Han Xianlin, Sullivan Patrick M, Rebeck G William, Fryer John D, Heckman Michael G, Bu Guojun	4. 巻 9
2. 論文標題 APOE2 is associated with longevity independent of Alzheimer 's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e62199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.62199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhao N, Ren Y, Yamazaki Y, Qiao W, Li F, Felton LM,... , Tachibana M, Aikawa T, Oue H, Job L, Yamazaki A, Liu CC, Storz P, Asmann YW, Ertekin-Taner N, Kanekiyo T, Kaddurah-Daouk R, Bu G	4. 巻 106
2. 論文標題 Alzheimer 's Risk Factors Age, APOE Genotype, and Sex Drive Distinct Molecular Pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 727 ~ 742 .e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2020.02.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 相良壮馬, 村田七海, 中原一帆, 橘 雅弥
2. 発表標題 中高大学生による発達障害に関する課題解決の取り組み - inochi Gakusei Innovators' Program 2020の成果
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田絵美, 吉崎亜里香, 毛利育子, 橘 雅弥, 谷池雅子
2. 発表標題 幼児の睡眠に影響を与える生活習慣の検討
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橘 雅弥, 片山泰一, 谷池雅子, 横山茂, 土屋賢治, 平野好幸, 清水栄司, 松崎秀夫, 友田明美, 中村和彦, 佐藤真
2. 発表標題 第63回日本小児神経学会学術集会
3. 学会等名 子どものこころの発達研究センターから展開するアジア発達障害共同研究拠点形成と共同利用推進
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蘇 平, 橘 雅弥, 谷池雅子, 毛利育子
2. 発表標題 中国語版「子どもの眠りの質問票」をつかった中国青海省における子どもの睡眠調査
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉崎亜里香, 山本知加, 村田絵美, 花家竜三, 平田郁子, 橘 雅弥, 毛利育子, 谷池雅子
2. 発表標題 双方向性スマートフォンアプリ「ねんねなび」による幼児の睡眠習慣への介入 - 社会実装による有用性検討 -
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬戸史子, 橘雅弥, 石田秀和, 平将生, 細川清人, 奥山宏臣
2. 発表標題 発達障害 (ADHD/ASD) を有する患児の周術期心理支援 ~ チャイルド・ライフ・スペシャリスト (CLS) による治癒的介入 ~
3. 学会等名 第31回小児外科QOL研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池泰河, 早田敦子, 毛利育子, 橘 雅弥, 谷池雅子, 橋本 均
2. 発表標題 胎児期におけるPGD2シグナル活性化による社会性行動や神経細胞形態への影響
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoka Yamamoto, Masaya Tachibana, Arika Yoshizaki, Atsuko Ishii
2. 発表標題 How did Covid-19 pandemic affect children with neurodevelopmental disorders or their family? A report from Japan
3. 学会等名 The Annual Malaysian Psychiatry Association Meeting 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池泰河, 早田敦子, 毛利育子, 橘 雅弥, 谷池雅子, 橋本 均
2. 発表標題 胎児期におけるPGD2シグナル活性化による社会性行動や神経細胞形態への影響
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉崎亜里香, 山本知加, 村田絵美, 花家竜三, 平田郁子, 橘 雅弥, 毛利育子, 谷池雅子
2. 発表標題 双方向性スマートフォンアプリ「ねんねなび」による幼児の睡眠習慣への介入 –社会実装による有用性検討–
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蘇 平, 橘 雅弥, 谷池雅子, 毛利育子
2. 発表標題 中国語版「子どもの眠りの質問票」をつかった中国青海省における子どもの睡眠調査
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橘 雅弥, 片山泰一, 谷池雅子, 横山茂, 土屋賢治, 平野好幸, 清水栄司, 松崎秀夫, 友田明美, 中村和彦, 佐藤真
2. 発表標題 子どものこころの発達研究センターから展開するアジア発達障害共同研究拠点形成と共同利用推進
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田絵美, 吉崎亜里香, 毛利育子, 橘 雅弥, 谷池雅子
2. 発表標題 幼児の睡眠に影響を与える生活習慣の検討
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相良壮馬, 村田七海, 中原一帆, 橘 雅弥
2. 発表標題 中高大学生による発達障害に関する課題解決の取り組み - inochi Gakusei Innovators' Program 2020の成果
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬戸史子, 橘雅弥, 石田秀和, 平将生, 細川清人, 奥山宏臣
2. 発表標題 発達障害 (ADHD/ASD) を有する患児の周術期心理支援 ~ チャイルド・ライフ・スペシャリスト (CLS) による治癒的介入 ~
3. 学会等名 第31回小児外科QOL研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橘雅弥, 中西真理子, 酒井佐枝子, 平田郁子, 下野九理子, 毛利育子, 大藺恵一, 谷池雅子
2. 発表標題 大学病院小児科における科内発達障害カンファレンスの意義
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 毛利育子, 中西真理子, 橘雅弥, 下野九理子, 谷池雅子
2. 発表標題 学業の過負荷がゲーム・ネット依存の引き金となった発達障害児2症例の検討
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下野九理子, 平田郁子, 橘雅弥, 岩谷祥子, 富永康仁, 中西真理子, 毛利育子, 大園恵一, 谷池雅子
2. 発表標題 大学病院発達外来における受診のニーズと課題
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田郁子, 橘雅弥, 毛利育子, 大園恵一, 谷池雅子
2. 発表標題 当院におけるナルコレプシーの臨床経過
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩谷祥子, 毛利育子, 中西真理子, 橘雅弥, 平田郁子, 富永康仁, 大園恵一, 谷池雅子, 下野九理子
2. 発表標題 自閉スペクトラム症における脳波異常の検討
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kamiya C, Kagitani-Shimono K, Nakanishi M, Tachibana M, Mohri I, Taniike M
2. 発表標題 Usefulness of sensory profile as a biomarker for autism spectrum disorder
3. 学会等名 International Society for Autism Research 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hayata-Takano A, Mohri I, Okuda K, Tachibana M, Kikuchi T, Shintani Y, Nakazawa T, Taniike M, Hashimoto H
2. 発表標題 Prostaglandin D2 modulates neuronal morphological development via activation of DP1 receptor
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早田 敦子、奥田 健太、毛利 育子、橘 雅弥、新谷 勇介、菊池 泰河、中澤 敬信、谷池 雅子、橋本 均
2. 発表標題 マウス新生仔へのプロスタグランジンD2受容体DP1作動薬による神経細胞の形態や行動への影響
3. 学会等名 第48回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------