

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18785

研究課題名（和文）ヒト脱落乳歯幹細胞を用いた自閉症の神経発達におけるメラトニン作用機序の解明研究

研究課題名（英文）Elucidation of melatonin effects on neurodevelopment of autism spectrum disorder using human deciduous teeth-derived stem cells

研究代表者

木船 崇（Kifune, Takashi）

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：90830414

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、自閉スペクトラム症（ASD）児から得られた乳歯幹細胞をドーパミン作動性ニューロン（ASD-DN）に誘導し、メラトニン効果を解析した。メラトニンの非存在下では、ASD-DNは、コントロールDNと比較して、神経突起伸長の障害とミトコンドリア機能不全、サイトソルおよびミトコンドリアCa²⁺の低下、小胞体（ER）のCa²⁺蓄積を示した。メラトニンは、ERからミトコンドリアへのCa²⁺放出を促進し、ミトコンドリア機能と神経突起伸長を改善した。メラトニンは、サイトソルCa²⁺を上昇させ、ドーパミン放出も促進した。メラトニンは、ASDのドーパミン作動系の発達を改善する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、睡眠がメラトニンを介してニューロンの発達をどのように制御するかという観点から、ヒトの脳の発達における睡眠機能の分子機序解明に貢献できる。ニューロンの発達に対するメラトニンの薬理作用を明らかにすることにより、その作用に関連する分子を標的とした睡眠障害の新規治療薬の開発に貢献できる。脳の発達促進という観点から、健常児の睡眠障害に対する生活指導プログラムの構築のために科学的証拠を提示できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, dental stem cells obtained from children with autism spectrum disorder (ASD) were induced into dopaminergic neurons (ASD-DN), and melatonin effects were analyzed. In the absence of melatonin, ASD-DN showed impaired neurite outgrowth and mitochondrial dysfunction, reduced cytosolic and mitochondrial Ca²⁺, and Ca²⁺ accumulation in endoplasmic reticulum (ER), compared to control DN. Melatonin promoted Ca²⁺ release from ER to mitochondria and improved mitochondrial function and neurite outgrowth. Melatonin also increased cytosolic Ca²⁺ and promoted dopamine release. Melatonin will be effective in improving development of the dopaminergic system in ASD.

研究分野：小児口腔医学

キーワード：自閉スペクトラム症 メラトニン 神経発達 睡眠

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder; ASD) は、社会的相互作用とコミュニケーションの障害、行動や興味の限定性・反復性を特徴とする神経発達障害である。個々の患者の症状は幅広いスペクトラムを示すため、ASD 集団に共通する要因や発症機序は未だに解明されていない。これまでの研究から、ASD の病態を説明する多くの仮説が提示されており、その中には松果体仮説とドーパミン仮説がある。

松果体は、脳内にある神経内分泌腺として様々なホルモンを分泌している。メラトニン (melatonin; MLT) はその一つであり、睡眠/覚醒サイクルを含む概日リズム調節に関与している。一方で、MLT には神経保護や抗酸化など、多様な作用も報告されており、これらが ASD の神経発達病態に関与する可能性がある。ASD 患者の約 65% に血清メラトニン濃度の低下および睡眠障害が報告されている。

ドーパミン作動性ニューロン (dopaminergic neuron; DN) は、中脳の神経細胞体から脳の広範囲に神経突起を伸長分布させ、認知機能、記憶、報酬系、運動制御など脳の高次機能に深く関与する。ASD 患者では、脳内ドーパミンの放出減少、ドーパミン受容体遺伝子の変異など、ドーパミン作動性シグナルの異常が示唆されている。脳内ドーパミン量を調整する薬物は、ASD 症状の改善効果を示す。

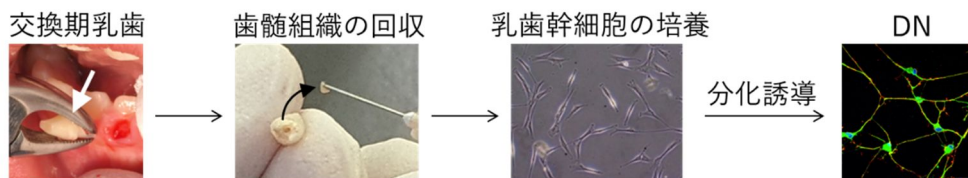
これらの仮説から、MLT 機能とドーパミン作動性系の発達との間には、ASD の病態に関連する重要な相互作用が存在する可能性が推定される。

2. 研究の目的

本研究では、ASD 患児のドーパミン作動性系の発達に対し MLT がどのような影響を及ぼすのか、その薬理学的作用を細胞生物学的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ASD のドーパミン作動性系の発達モデルとして、3 名の ASD 患児の交換期乳歯から得られた乳歯幹細胞を用いた。乳歯幹細胞は、神経堤由来の多能性幹細胞であり、in vitro で DN に誘導できる (下図)。この分化誘導系に、MLT を添加しその効果を細胞生物学的に解析した。対照として、定型発達児由来の乳歯幹細胞から誘導した DN を用いた。



4. 研究成果

(実験結果の要点)

1. MLT 非存在下では、ASD 児由来 DN (ASD-DN) は、神経突起の成長障害、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリアおよびサイトゾルの Ca^{2+} レベル低下、小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) の Ca^{2+} 蓄積、および脱分極誘発性ドーパミン分泌の低下を示した。

2. MLT は、ASD-DN の inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) を増加させ、IP3 受容体 (IP3 receptor; IP3R) を介した ER からミトコンドリアおよびサイトゾルへの Ca^{2+} 移動を促進した。

3. その結果、ミトコンドリアの酸化的リン酸化が改善し、ATP 産生が増加した。さらに、これは ASD-DNs の神経突起成長の促進をもたらした。

4. MLT による ASD-DN のサイトゾル Ca^{2+} レベルの増加は、脱分極誘発性のドーパミン放出を改善した。

5. これらの MLT 効果は、MLT 受容体 (MT1 および MT2) 阻害、IP3R 阻害、ミトコンドリア Ca^{2+} ユニポーター (mitochondrial calcium uniporter; mtCU) 阻害によって抑制された。

(考察の要点)

1. ASD-DNs における IP3 依存性 Ca^{2+} 調節不全とメラトニン効果の関連性

細胞内 Ca^{2+} は多様な細胞機能を調節するセカンドメッセンジャーであり、その恒常性の破壊は ASD を含むさまざまな精神神経疾患を引き起こす。ASD-DN では、ミトコンドリアとサイトゾルの両方の Ca^{2+} レベルが低下しているのに対し、ER では Ca^{2+} が蓄積していた。ER は、細胞内の Ca^{2+} の貯蔵、緩衝、供給において重要な役割を果たす。ER 膜上の IP3R は、 Ca^{2+} の移動に関与する主要なチャネルであり、その調節不全はミトコンドリアやサイトゾルの Ca^{2+} 恒常性を乱し、 Ca^{2+} 依存性の細胞応答の障害を引き起こす。ASD-DN では、IP3R のリガンドである IP3 レベルが低下しており、これが ER からの Ca^{2+} 放出の不足を引き起こし、ミトコンドリアとサイトゾル Ca^{2+} レベルの低下をもたらした可能性がある。

この可能性は、MLT が MT1 および MT2 依存的に ASD-DN のこれらの欠陥を改善したことを示すデータによって裏付けられる。MT1 および MT2 は、G タンパク質共役型受容体であり、その下流ではホスホリパーゼ C β (phospholipase C β subfamily; PLC β) が活性化され、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の加水分解によって IP3 が生成される。PLC β は、G タンパク質 α サブユニット i (G α_i) 依存的に G タンパク質 $\beta\gamma$ サブユニット二量体によって活性化される。MT1 と MT2 は、G α_i と共役することが示されているため、両方の受容体が、この経路を介して ASD-DN の IP3 生成に関与したと考えられる。PLC β は、G α サブユニット q/11 (G $\alpha_{q/11}$) によって直接活性化される。MT1 は G $\alpha_{q/11}$ と共役することから、この経路も ASD-DN の IP3 生成に寄与した可能性がある。したがって、ASD-DN では、MLT が MT1 と MT2 を介して PLC β を活性化し、IP3 生成を促進したと考えられる。

2. ASD-DN におけるメラトニン誘発性 IP3 増加がもたらす効果

IP3 依存的な ER からミトコンドリアへの Ca $^{2+}$ 移動の障害は、ASD-DN におけるミトコンドリア機能障害と神経突起伸長障害の一因であり、これは MLT による IP3 生成によって改善される可能性がある。ミトコンドリアの Ca $^{2+}$ は、TCA サイクルを制御する酵素を刺激し、次いで呼吸鎖複合体を介した電子輸送が加速され、ATP が生産される。ASD-DN では、IP3 不足とともに、ミトコンドリア Ca $^{2+}$ 、膜電位、ATP の減少が観察された。これは IP3 を介した ER からミトコンドリアへの Ca $^{2+}$ 移動の欠陥に伴うミトコンドリア機能不全を示唆する。MLT は、ASD-DN のミトコンドリア Ca $^{2+}$ レベルを上昇させ、この効果は IP3R または mtCU のいずれかを遮断することで抑制された。また、ASD-DN の神経突起伸長を促進する MLT 効果も、mtCU の遮断により抑制された。したがって、ASD のミトコンドリア Ca $^{2+}$ ホメオスタシスの障害は、MT1 および/または MT2 を介した IP3 依存的な Ca $^{2+}$ 応答によって改善され、さらにドーパミン作動性システムの神経発達障害も改善されると考えられる。

MLT は、ASD-DN の脱分極誘発性ドーパミン放出を増強する可能性もある。ドーパミンは、主にエキソサイトーシスによって放出される。エキソサイトーシスでは、SNARE タンパク質複合体が、分泌小胞とプレシナプス膜との融合に重要である。このプロセスは、膜脱分極に反応して電位依存性 Ca $^{2+}$ チャネルから流入する一過性の Ca $^{2+}$ 上昇によって誘発される。基底状態でサイトゾル Ca $^{2+}$ が減少していた場合、脱分極後もエキソサイトーシス局所の Ca $^{2+}$ が不足し、分泌応答が減弱する可能性がある。さらに、サイトゾル Ca $^{2+}$ の低下は、様々な Ca $^{2+}$ 依存性シグナル伝達経路を介した細胞代謝反応を減弱させ、分泌小胞プールや SNARE タンパク質複合体などのエキソサイトーシス装置の生成や維持に欠陥を引き起こす可能性がある。したがって、MLT による IP3 を介した Ca $^{2+}$ ホメオスタシスの調整は、ASD-DN における Ca $^{2+}$ 依存的ドーパミン分泌応答を改善すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木舩崇, 山座治義, 増田啓次, 小笠原貴子, 高山扶美子, 千葉雄太, 廣藤雄太, 佐藤綾子, 福本敏
2. 発表標題 混合型脈管奇形の患児の口腔管理の1例
3. 学会等名 小児歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤洋介, 高山扶美子, 小笠原貴子, 山座治義, 増田啓次, 廣藤雄太, 木舩崇, 佐藤綾子, 田中絢子, 稲田幸織, 福本敏
2. 発表標題 小帯異常からOFD症候群と診断され, 腎移植に至った1例
3. 学会等名 小児歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤綾子, 高山扶美子, 小笠原貴子, 山座治義, 増田啓次, 廣藤雄太, 千葉雄太, 木舩崇, 伊藤洋介, 田中絢子, 稲田幸織, 福本敏
2. 発表標題 外傷により完全陥入した上顎乳側切歯が抜歯に至った1例
3. 学会等名 小児歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中絢子, 廣藤雄太, 小笠原貴子, 山座治義, 増田啓次, 高山扶美子, 木舩崇, 佐藤綾子, 伊藤洋介, 稲田幸織, 福本敏
2. 発表標題 上顎中切歯の歯胚内で歯牙腫が生じ萌出を障害した1例
3. 学会等名 小児歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木船敏郎, 木船崇, 山座治義, 福本敏
2. 発表標題 早期乳犬歯抜歯により上顎犬歯異所萌出を回避した症例のパノラマ撮影による3D解析
3. 学会等名 小児歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小笠原貴子, 高山扶美子, 佐藤綾子, 木船崇, 増田啓次, 廣藤雄太, 千葉雄太, 伊藤洋介, 田中絢子, 稲田幸織, 山座治義, 福本敏
2. 発表標題 低年齢における重度乳歯外傷後の長期観察2例
3. 学会等名 小児歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山扶美子, 山座治義, 増田啓次, 小笠原貴子, 木船崇, 佐藤綾子, 廣藤雄太, 千葉雄太, 伊藤洋介, 田中絢子, 稲田幸織, 福本敏
2. 発表標題 COVID-19患者に歯科治療を施行した1例
3. 学会等名 小児歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木船敏郎, 木船崇, 山座治義, 福本敏
2. 発表標題 4歳時の上顎前方歯列と8歳時の同歯列のマルコフ連鎖モンテカルロ共分散構造分析による因果関係の解析
3. 学会等名 小児歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤洋介, 高山扶美子, 小笠原貴子, 山座治義, 増田啓次, 廣藤雄太, 千葉雄太, 木舩崇, 佐藤綾子, 田中絢子, 稲田幸織, 福本敏
2. 発表標題 歯肉腫脹を主症状としたクローン病の1例
3. 学会等名 小児歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuangshan Dong, Takashi Kifune, Hiroki Kato, Xiao Sun, Xu Han, Yu Zhang, Hiroshi Sato, Takahiro A. Kato, Yasunari Sakai, Satoshi Fukumoto, Keiji Masuda
2. 発表標題 Melatonin improves neuronal development of deciduous teeth-derived stem cells obtained from children with autism spectrum disorder
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------	---------