

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07819

研究課題名(和文) iPS細胞由来ミクログリア ニューロン3次元共培養系による自閉症の病態解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of autism using iPS cell-derived microglia-neuron 3D co-culture system

研究代表者

橘 雅弥 (Tachibana, Masaya)

大阪大学・大学院連合小児発達学研究所・准教授

研究者番号：10722952

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のミクログリアに発現する造血器型プロスタグランジンD合成酵素(HPGDS)とプロスタグランジンD2(PGD2)に注目して、HPGDSがシナプス刈込に及ぼす影響を検討した。iPS細胞にTet-Onシステムを備えたPiggybac vectorを導入してHPGDS強発現ミクログリアを作成したが増殖効率が悪く、三次元共培養による検討は完結できなかった。マウスでの検討では、HPGDS-KOマウス由来ミクログリアで細胞増殖能や細胞viabilityに変化はなかったが、貪食能の亢進が認められ、HPGDS-PGD2経路がミクログリアの貪食能の抑制・制御への関与が示唆された。

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においてはHPGDSの強発現が見られ、発達早期にミクログリアの貪食によるシナプスの刈込込みが進まなかったり遅延することが指摘されており、HPGDSによるミクログリアの貪食能の抑制が、自閉スペクトラム症の一部における病態の原因となっている可能性が示唆された。PGD2レセプターアンタゴニストにより、一部の自閉症における病態の改善につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on hematopoietic prostaglandin D synthase (HPGDS) and its product prostaglandin D2 (PGD2) expressed in microglia of autism spectrum disorder to investigate the effect of HPGDS on synaptic pruning. However, the study of the effect of HPGDS on synaptic pruning by three-dimensional co-culture could not be completed due to the low proliferation efficiency of iPS cell-derived microglia. In the mouse study, microglia derived from HPGDS-KO mice showed no difference in cell proliferative capacity or cell viability compared to wild-type microglia, but showed an increase in phagocytosis. This suggests that the HPGDS-PGD2 pathway may be involved in the inhibition and regulation of phagocytosis in microglia.

研究分野：小児科学

キーワード：造血器型プロスタグランジンD合成酵素 ミクログリア プロスタグランジンD2 自閉スペクトラム症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 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 - 3% とされる。ASD は行動的特徴によって診断されるが、その症状の程度や特徴が患者によって大きく異なり、その病因や病態が不均一であることが近年の研究で示唆されている。一方、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。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 D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) 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 PGD<sub>2</sub> 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、PGD<sub>2</sub> 経路が神経細胞の形態や機能に関係する可能性を示した。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)。これらより、シナプスの刈りこみに重要な役割を果たすミクログリアの機能が HPGDS-PGD<sub>2</sub> 経路によって影響を受けている可能性が考えられたが、HPGDS-PGD<sub>2</sub> 経路がミクログリアの形態や機能に与える影響は明らかではない。そこで、我々は、HPGDS-PGD<sub>2</sub> 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

本研究は、科研費若手研究における、自閉スペクトラム症のミクログリアに発現する造血器型プロスタグランジン D 合成酵素 (HPGDS) とその産生物であるプロスタグランジン D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) に注目して、HPGDS-PGD<sub>2</sub> 経路の神経発生とミクログリアの機能への影響に関する検討を踏まえ、ヒト iPS 細胞由来のミクログリア、ニューロン、および HPGDS とそのレセプター DP1 の発現を遺伝的に操作したマウス由来のニューロン・ミクログリアを用いて、ミクログリアにおける HPGDS の発現量の変化がニューロンの形態・シナプス形成および刈込に及ぼす影響を、3 次元共培養系を用いて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

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、まずミクログリアにおいて、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。あわせて、マウスプライマリーカルチャーを用いて、HPGDS の発現量とミクログリアの細胞特性との関連

について解析を行った。さらに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・ミクログリアに分化させたものの共培養によって、HPGDS-PGD2 経路がシナプス形成およびシナプス刈込に及ぼす影響についての解析を試みた。

#### 4 . 研究成果

iPS 細胞に HPGDS を強発現させてミクログリアに分化させ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構築した。当初、iPS 細胞からミクログリアへの分化効率が不安定であったが、この不安定さを解消し、Tet-On システムを備えた Piggybac vector の導入により、HPGDS 強発現ミクログリアを作成して、その性質の同定を行った。iPS 細胞からニューロンへの分化は問題なくできたが、iPS 細胞由来のミクログリアの増殖効率が悪く、各実験に使用可能な十分な数の細胞を得るのに時間がかかった。このため、当初の目的としていた iPS 細胞由来のニューロンとミクログリアの共培養系によるシナプス刈込への影響は本研究の実施期間において、最後まで完遂することが困難であった。このため、バックアップとして計画していた HPGDS ノックアウトマウスおよび PGD2 レセプターである DP1 のノックアウトマウスを用いた動物実験を並行して進めた。これらの遺伝子改変マウスからミクログリアの primary culture を行い、HPGDS-PGD2 経路の細胞特性への影響を検討した。HPGDS-KO マウス由来のミクログリアでは、野生型マウス由来のミクログリアに比べて、細胞増殖能や細胞の viability には変化が見られなかったが、蛍光ビーズを使った貪食能の比較においては貪食能の亢進が認められた。このことから、HPGDS-PGD2 経路がミクログリアの貪食能の抑制・制御に関与している可能性が示唆された。自閉スペクトラム症においては HPGDS の強発現が見られ、発達早期にミクログリアの貪食によるシナプスの刈込みが進まなかったり遅延することが指摘されており、HPGDS によるミクログリアの貪食能の抑制が、自閉スペクトラム症の一部における病態の原因となっている可能性がある。ヒト iPS 細胞由来のミクログリアにおいても同様に HPGDS の発現の程度によって細胞特性に違いがあるかどうか、実際にシナプス刈込への関与に違いがあるかどうかについて、本研究の期間内での検証には至らなかったが、引き続き検討を行っていく。最後に、本研究を行うにあたり科研費基盤研究 C 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12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 3件）

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村田拳一朗, 早田敦子, 菊池泰河, 岩崎美咲, 毛利育子, 橘雅弥, 田熊一敞, 片山泰一, 谷池雅子, 橋本均
2. 発表標題 胎生期PGD2-DP1シグナル活性化はマウスの自閉症様の精神行動異常を引き起こす
3. 学会等名 第50回日本脳科学学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橘 雅弥
2. 発表標題 自閉スペクトラム症における 神経炎症とプロスタグランジン D2
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会 / 第66回日本神経科学学会大会合同大会
4. 発表年 2023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

〔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
研究分担者	佐藤 真  (Sato Makoto)  (10222019)	大阪大学・大学院連合小児発達学研究所・教授    (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	毛利 育子  (Mohri Ikuko)  (70399351)	大阪大学・大学院連合小児発達学研究所・准教授    (14401)	
研究分担者	早田 敦子  (Hayata Atsuko)  (70390812)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授    (14401)	

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