

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15637

研究課題名（和文）血中エクソソームを基軸とした自閉症スペクトラム障害の病態理解

研究課題名（英文）Investigation of circulating exosome-related factors in autism spectrum disorders

研究代表者

植田 堯子 (Uyeda, Akiko)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 神経薬理研究部・薬理作用研究室長

研究者番号：80850693

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：自閉スペクトラム症(ASD)の発症には様々な遺伝子変異の関与が示唆され、その中には末梢臓器で機能する遺伝子も含まれる。本研究では、末梢臓器におけるASD関連遺伝子の機能不全が、血液循環を介して脳に作用するという仮説のもと、その分子実体とエクソソームの関連を明らかにすることを目指した。候補分子を野生型マウスに投与した結果、ASD様行動が誘導された。一方、候補因子の産生臓器でその発現を抑制した結果、ASDモデルマウスで観察されるASD様行動が改善された。候補因子はエクソソームに内包され、病態時に血管障害を誘導するとの報告もあり、今後ASDにおける同分子とエクソソームの関連について追求したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神・神経疾患の基礎研究は脳や脊髄からなる中枢神経を中心に進められてきた。一方、これらの疾患には、中枢神経のみならず末梢臓器の恒常性を維持するのにも重要な遺伝子の変異も関与することが報告されている。本研究では、従来行われてきた脳内細胞での遺伝子変異による病態形成メカニズム研究に加え、脳の外部環境での変化が脳機能へ作用する機序の一旦を明らかにするものである。これにより、末梢環境による脳機能制御という新たな視点をもたらすとともに、中枢神経疾患に対して末梢から介入するという、新たな治療法開発に貢献できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Autism spectrum disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental condition characterized by challenges in social interaction, verbal and nonverbal communication, and repetitive behaviors. Hundreds of genes have been identified as ASD-related genes, which include genes having role in peripheral organs as well as central nervous system. In this study, we investigated the effect of changes in systemic milieu on neurological dysfunction related to ASD with focusing on exosome. The peripheral administration of the candidate molecule, which is reportedly exosome-related factor, induced ASD-like behavior in wild-type mice. Conversely, the silencing of candidate molecule in organ of origin attenuated ASD-like behavior in ASD model mice. These results raised the possibility that changes in peripheral organs could affect ASD pathology via circulation.

研究分野：神経科学

キーワード：自閉スペクトラム症 ASD 脳-末梢連関

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (Autism spectrum disorder, ASD) は社会性行動やコミュニケーションにおける困難、興味の著しい限局などを主な特徴とする発達障害群である。国内外において ASD 患者の大規模なエクソーム解析が行われており、これまでに数百にわたる遺伝子変異の関与が示唆されている (Krumm, et al., *Trends Neurosci.*, 2014; Satterstrom, et al., *Cell*, 2020)。その中には神経回路の基盤であるシナプスの機能を支える遺伝子に加えて、末梢臓器の恒常性維持に重要な遺伝子も含まれる。後者の場合には、末梢臓器で生じた変異が、その臓器での機能不全をもたらす可能性が考えられる。脳や脊髄からなる中枢神経系は、血液循環や神経経路を介して末梢臓器と相互作用することが近年明らかにされている (Katsimpardi et al., *Science*, 2014)。このことから、ASD 関連遺伝子の機能不全による末梢臓器での変化が、脳機能に影響を及ぼす可能性が考えられるが、その実体はほとんど明らかにされていない。血液には様々な液性因子が含まれ、臓器間ネットワークを担うメディエーターとして機能するものも報告されている。また血中には、エクソソームと呼ばれるエンドソーム由来の細胞外小胞も豊富に存在している。エクソソームは核酸やタンパク質を内包して細胞間相互作用を担い、がんを初めとして、神経疾患を含む多様な疾患における重要性が示唆されている (Thompson et al., *Nat Rev Neurol.*, 2016)。様々な疾患において、エクソソームの血中変化と病態形成の関連についての解析が精力的に進められているが、ASD における血中エクソソームと病態形成の関連については知見が少ない。

2. 研究の目的

本研究では、末梢臓器における ASD 関連遺伝子の機能不全が、血液循環を介して脳に作用するという仮説のもと、その分子実体としてエクソソーム関連因子に着目し、ASD 病態形成における役割を明らかにすることを目指した。そのために、野生型マウスと ASD モデルマウスから血液を採取し、エクソソームとの関連が示唆される候補因子の血中レベルの変化を解析した。また、この変化と ASD 症状との因果関係を、野生型マウスに対する候補因子の投与、および ASD マウスに対する候補因子の介入により検証した。

3. 研究の方法

(1) ASDモデルマウス血中における候補因子の解析

ASD 関連遺伝子の変異が血中のエクソソーム関連因子の発現レベルを変化させるか調べるため、ASD 関連遺伝子の一つである Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 8 (CHD8) のヘテロ欠損型 (ASD モデルマウス) と、同腹の野生型マウス (8-9 週齢) から血清を採取し、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) により候補因子の濃度を測定した。ASD モデルマウスで野生型マウスと比較して上昇が見られる因子を抽出した。

(2) ASD症状誘導因子の同定

(1) の変化と ASD 症状との因果関係を検証するため、抽出した因子の野生型マウス (C57BL/6J) への投与実験を行った。候補因子の組換えタンパク質を充填した浸透圧ポンプ (Alzet) を野生型マウス (C57BL/6J) の皮下に留置し、2 週間持続的に投与した。その後、ASD モデルマウスで顕著な上昇がみられる不安様行動を、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験により解析した (Katayama et al., *Nature*, 2016)。対照群として Vehicle を充填した浸透圧ポンプを留置した野生型マウスでも同試験を行い、候補因子の末梢投与が ASD 様行動に与える影響を評価した。

(3) ASDモデルマウスに候補因子の機能阻害実験

(2) で同定した ASD 誘導因子が ASD 症状緩和のためのターゲットとなり得るか検討するため、ASD モデルマウスにおいて同因子への介入実験を行った。具体的には、末梢臓器における候補因子の発現量比較を定量 RT-PCR にて行い、他の臓器と比較して発現が高い臓器を特定した。その臓器に対して、候補因子の発現を阻害するアデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus, AAV) を導入した。AAV は、産生臓器に効率よく感染する血清型である AAV5 の Rep・Cap 遺伝子を含む pAAV2/5 ベクター、pHelper ベクター、およびパッケージングされる DNA として標的因子の発現を抑制する short-hairpin RNA (shRNA) と蛍光タンパク質 EYFP を発現するベクターの 3 種類を AAVpro 293T 細胞 (Takara) にトランスフェクションし、AAVpro purification kit (Takara) により精製、タイターの算出を行った。作製した AAV5-shRNA を、6-7 週齢の CHD8 ヘテロ欠損型マウスの標的臓器に対して局所投与した。2-3 週間おいた後に、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験を行った。対照群として control shRNA を発現する AAV5 を導入した ASD マウスにおいても同試験を行い、候補因子の発現抑制により ASD モデルマウスの ASD 様症状が改善されるか検討した。

4. 研究成果

(1) ASD モデルマウス血中における候補因子の解析

ASD モデルマウスおよび野生型マウスから採取した血液から血清を調整し、候補因子の濃度を測定した結果、一部の因子について ASD モデルマウスでは野生型と比較して有意な上昇がみられた。該当の因子は血中エクソソームに内包され、心血管疾患の病態時に血管障害を誘導すると報告されていたことから、ASD の病態形成時にも機能することが想定され、以後この因子に着目して検討を行った。

(2) 候補因子による ASD 症状誘導作用の検討

(1) で同定した因子が実際に ASD 症状を誘導するか検討するため、候補因子の組換えタンパク質を野生型マウスに対して末梢投与したところ、オープンフィールド試験における中心領域での滞在時間が Vehicle 投与群と比較して有意に減少した。高架式十字路試験においても、壁のない通路に滞在する時間の割合が、候補因子投与群では Vehicle 投与群と比較して減少する傾向が観察された。このことから、該当の因子には、末梢から作用して、ASD 様症状として不安様行動を誘発する機能が備わっていることが示唆された。

(3) 候補因子への介入による ASD 症状緩和の検討

(2) で同定した因子が ASD 症状緩和のための標的となり得るか検討するため、まず介入先となる産生臓器を定量 RT-PCR で特定したところ、肺で特に発現が高かった。そこで、ASD モデルマウスの肺に対して、同因子の発現を抑制する shRNA を組み込んだ AAV を投与した結果、control shRNA を発現する AAV を導入した ASD マウスと比較して、オープンフィールド試験において中心領域に滞在する時間の割合が有意に増加した。また高架式十字路試験においても、壁のない通路に滞在する時間の割合が増加する傾向が観察された。また、同マウスの肺にマーカー遺伝子 (EYFP) が発現していること、shRNA の導入により候補因子の血中レベルが減少することを確認した。このことから、ASD 症状を緩和する標的として同因子が有望な候補であることが示唆された。

以上により、ASD 症状を誘導する末梢由来因子として、エクソソームに内包される分子の関与が示唆された。今後、ASD モデルマウスにおける同因子とエクソソームの関連と、その ASD 病態形成における役割について追求したい。これにより、末梢環境による脳機能制御メカニズムの一端を明らかにするとともに、末梢介入による ASD 治療法へ応用できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------