

令和 7 年 5 月 29 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K07586

研究課題名（和文）免疫系細胞とヒトiPSニューロン共培養系によるASDの病態解析

研究課題名（英文）Pathobiological analysis of ASD by using the co-culture system of immune cells and human iPSC-derived neurons

研究代表者

鳥塚 通弘（Toritsuka, Michihiro）

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：20588529

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）：自閉スペクトラム症（ASD）の病因、病態については依然未解明であるが、末梢や中枢における炎症反応の亢進と免疫系の異常の関与が近年報告されている。我々は、免疫系細胞がヒト神経細胞に与える影響について、脳の免疫細胞であるミクログリアと細胞系譜が同じで機能も類似する末梢血由来のマクロファージを用いて、二つの実験系で調べた。結果は、ASD者のマクロファージでは炎症性サイトカインの分泌が高く、このため神経細胞の樹状突起の伸長を阻害する作用がより強かった。また、シナプス蛋白質の貪食能が低かった。

本研究課題におけるこれらの知見から、今後のASD病態解明に向けた一助となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果からは、自閉スペクトラム症で想定されている炎症仮説やシナプス仮説を支持する結果が得られた。精神疾患研究において、ヒト脳内のミクログリアを直接採取して観察することは倫理的に不可能であることがネックであった。ミクログリアとマクロファージの表現型の異同については今後の研究により慎重な判断を要するが、末梢血から得られる機能的に類似したマクロファージを用いてこれらの成果が得られたことは、今後のヒト細胞を用いた病態解明や、その先にある新規検査法の開発、新規薬剤の検索において、大変有用で意義深いと考えている。

研究成果の概要（英文）：A growing body of evidence suggests that immune dysfunction and inflammation in the peripheral tissues as well as the central nervous system are associated with the neurodevelopmental deficits observed in autism spectrum disorder (ASD). To elucidate the effect of immune cells on human neurons, we used two methods; a co-culture system of human iPSC-derived neurons and differentiated macrophages instead of microglia, and synaptosome phagocytosis measurement system. Co-culture experiments showed that GM-CSF macrophages affect the dendritic outgrowth of neurons through the secretion of pro-inflammatory cytokines, IL-1 and TNF- $\alpha$ . Macrophages derived from individuals with ASD exerted more severe effects than those derived from TD individuals. Synaptosome phagocytosis measurement revealed impaired synapse phagocytosis of M-CSF macrophages derived from ASD individuals compared to those from TD individuals. These findings may help in the future elucidation of ASD pathobiology.

研究分野：精神疾患

キーワード：自閉スペクトラム症 マクロファージ iPS細胞 シナプス 貪食能 炎症性サイトカイン

## 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) の病因・病態については、依然不明な点が多い。かつては 90% 以上と見積もられていた遺伝的要因が 2000 年代に入り 50~80% にまで低下し、環境要因にも注目が集まっており、近年の患者数増加の要因の一つであると考えられている。そんな中で注目を集めているのが、ASD の免疫系の異常である (Sekar et al, Nature 2016; Gandal et al, Science 2018)。脳内の免疫細胞はミクログリアであるが、ミクログリアがシナプスプルーニングに関与することが明らかになって久しく (Stevens et al, Cell, 2007; Paolicelli et al, Science 2011) ASD の病態仮説としてシナプス仮説が提唱されており (Penzes et al, Nature Neuroscience 2011) 実際に ASD のリスク要因としてミクログリアが同定されている (Gandal et al, Science 2018) ことからミクログリアへの注目度は高い。一方で ASD では中枢神経系のみならず全身性に炎症反応・免疫応答が亢進しており、末梢血単核球 (PBMC) における炎症性サイトカインと ASD 者の臨床症状の重症度に相関があるという知見を申請者が所属する研究グループでは得ている (Makinodan et al, NeurochemInt 2017)。末梢血中のサイトカインがミクログリアの活性を変化させている可能性に加え、炎症反応に伴って末梢の単核球やマクロファージが脳内に侵入し、病理の主体を担っている可能性がある (Herz et al, Immunity 2017) ことから、我々はマクロファージが神経細胞に与える影響について解析を進めてきた。末梢静脈血から得た CD14 陽性細胞を、分離キットを用いて炎症惹起型の M1 マクロファージと組織修復型の M2 マクロファージに分けて培養し、健常株の iPS 細胞由来神経細胞 (以下、iPS ニューロンと称する) と共培養した際には、樹状突起やシナプス形成に対して与える影響が ASD 群と定型発達 (Typically Developed; 以下 TD) 群では異なっていることを見出してきた。疾患は異なるが、最近の研究で筋委縮性側索硬化症のモデルマウスを用いて、末梢血中のマクロファージを制御することで中枢の病態進行を食い止められる可能性が示唆されていることから (Chiot et al, NatNeurosci 2020) マクロファージを対象に研究を進める意義は大きいと考えている。

ではこれらマクロファージの反応を制御する因子は何か? 実験系においては、マクロファージを誘導因子によって M1/M2 の各タイプに誘導し用いているが、生体内では様々な細胞や因子との相互作用によってマクロファージの状態は揺れ動くと考えられている。その重要な因子として、我々は CD4 陽性 T 細胞に注目している。CD4 陽性 T 細胞は、Th17、Treg、Th1、Th2 という各種細胞により構成される。最近の研究で、ヒト脳内にも存在していることが確認され、発達期にミクログリアが成熟し十分な機能を発揮するためには CD4 陽性 T 細胞が必要であることがわかった (Pasciuto E et al, Cell 2020)。さらに、Th17 細胞が分泌する IL-17A が ASD の治療薬になる可能性や (Reed et al, Nature 2020) ASD モデルとして汎用されている Maternal immune activation モデルマウスの行動異常が Treg 細胞の移植で改善したとする報告 (Xu et al, NatNeurosci 2021) もあり、CD4 陽性 T 細胞が ASD の病理に関与していることは疑いようが無い。これら T 細胞はマクロファージと相互作用することも知られており、生体内におけるマクロファージの変化を左右する重要な要素であると考えている。よって、本研究課題では、ヒト細胞を用いて、ASD の病理におけるマクロファージ、CD4 陽性 T 細胞の分子病態を明らかにしたい。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ASD 者由来の免疫系細胞の相互作用、並びにそれらがヒト iPS ニューロンに対して与える影響を検討し、ASD の病因・病態の解明に迫ることである。

免疫系の細胞が、どの様に中枢神経に影響を与えるか、について、ヒト-ヒト細胞で観察することは、やはり動物モデルではわからない知見が得られる可能性があり、この点は本研究の独自性、創造性に繋がると考える。

研究開始前の計画と異なり、前提となるマクロファージの病理についての解析が不十分でありより深く検討することで新しい知見が得られると考え、マクロファージの解析を中心に進めた。

### 3. 研究の方法

(1) 対象: 奈良県立医科大学附属病院に通院、入院中で DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition) の診断基準を満たす ASD 者と、年齢・性別を一致させた TD 者を対象とした。各種検査 (WAIS 知能検査、AQ-J、SRS-2、ADOS-2 等) を施行し、臨床的指標を評価するが、これについては既に先行研究において ASD 者約 100 名と TD 者約 80 名の臨床評価が完了しており、このうち本研究への参加同意が得られた者から検体を得た。

(2) マクロファージの解析: 末梢採血から得られた PBMC を、顆粒球マクロファージ刺激因子誘導性マクロファージ (GM-CSF マクロファージ; 以前の M1 (炎症惹起型) マクロファージ) と、マクロファージ刺激因子誘導性マクロファージ (M-CSF マクロファージ; 以前の M2 (組織修復型) マクロファージ) に 6 日間で分化誘導できるキットを用い、簡便に短時間で極性

を持ったマクロファージを得て、サイトカイン産生などの性質がどのように変化するかを、qRT-PCR 法等で測定した

(3) 神経細胞への影響の解析： 健常者由来 iPS 細胞株に Piggybac ベクターを用いて必要遺伝子を導入し、興奮性神経細胞を分化誘導した。神経細胞におけるシナプス形成・樹状突起の変化については、qRT-PCR 法、免疫細胞染色法にて解析した。パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析については研究分担者である山室和彦が担当した。

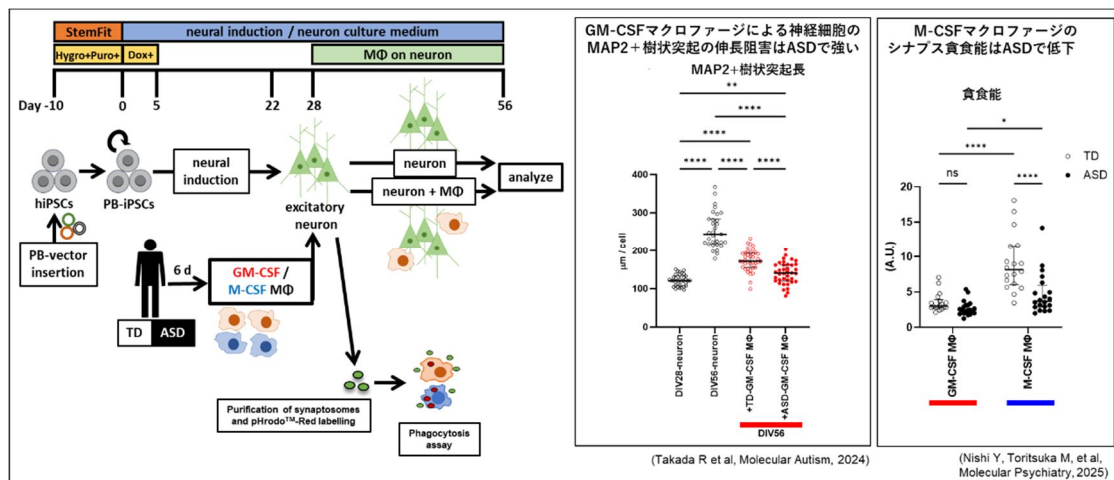
(4) 貪食能の解析： 健常者由来 iPS 細胞株から興奮性神経細胞を分化誘導し、56 日間培養した。培養した神経細胞から、Syn-PER reagent™ を用いてシナプトソーム分画を抽出し用いた。

#### 4. 研究成果

ASD の病態を反映すると考えられる 2 種類の研究を行った。

(1) 一つ目は、マウスの研究から、社会的敗北ストレスを与えたマウスの忌避行動には、ミクログリアが分泌する炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) によって起こる神経細胞樹状突起の退縮が関与しているという報告がある (Nie X et al, Neuron 2018)。ASD 者は学校や職場で類似のストレスを受けた際に社会的忌避に至る危険性が高いと報告されているが、我々は以前の研究で ASD 者の GM-CSF マクロファージで炎症性サイトカインの発現が高いことを報告していることから (Yamauchi T et al., Autism Research, 2021) マクロファージを用いて細胞レベルで同定できるのではないかと考えた。健常者由来 iPS 細胞株から分化誘導した興奮性神経細胞の上に、上記で調整した TD 者・ASD 者由来の GM-CSF マクロファージをそれぞれ共培養し、MAP2 陽性樹状突起がどのように変化するかを観察した。結果は、TD 者の GM-CSF マクロファージでも MAP2 陽性樹状突起の伸長阻害効果が認められるが、ASD 者由来の GM-CSF マクロファージではその阻害作用がより顕著であった。この効果は、マクロファージが神経細胞に接触していなくても同様であったことから、液性因子の関与と考えられた。マウス研究から同定された候補分子である TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  を神経細胞を培養している培地中に添加しても同様の現象が観察され、それぞれの中和抗体を同時に添加すると予防できた。TD 者と ASD 者の違いはこれらサイトカインの分泌が ASD 者で高いことによると考えられた。ASD の中核症状ではないが、実臨床で ASD 者で認められ苦慮する病状に炎症性サイトカインの関与が示唆され、今後の新しい治療法開発のヒントとなると考えている (Takada R, et al., Molecular Autism, 2024)。

(2) 二つ目は、シナプスの貪食能についてである。ASD 者の脳で認められるシナプス過剰はミクログリアの機能障害によると想定されるが、これを M-CSF マクロファージを用いて細胞レベルで確かめることとした。一つ目の研究と同様に、健常者由来 iPS 細胞株から分化誘導した興奮性神経細胞を用い、比重遠心法によってシナプトソーム分画を分離し、これに酸性環境下で蛍光を発する pHrod™ 色素を結合し実験に供した。マクロファージがこのシナプトソーム粒子を貪食し細胞内に取り込むと、消化のため酸性環境下にシナプトソームが置かれることになり蛍光を発するため、蛍光強度を測定することで貪食能を比較することとした。結果は、ASD 者の M-CSF マクロファージで顕著な貪食能の低下が認められた。さらに、シナプス貪食については様々な研究から、貪食を促進する分子 / 貪食を阻害する分子が同定されており、一部は精神疾患への関与も考えられているため、マクロファージにおける分子発現について調べた。結果、我々はこれまでシナプス貪食に関してほとんど報告の無い遺伝子 CD209 が、ASD 者で認められた貪食能低下と相関していることを見出した。今後この遺伝子を切り口に ASD 病態のさらなる解明を目指したいと考えている (Nishi Y, Toritsuka M, et al., Molecular Psychiatry, 2025)。



以上の通り、マクロファージを用いた解析から、ASD の病態に関与する可能性のある分子の発見に至った。研究期間内に他の免疫細胞との関連までは解析できなかったが、今後の課題としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takada Ryohei, Toritsuka Michihiro, Yamauchi Takahira, Ishida Rio, Kayashima Yoshinori, Nishi Yuki, Ishikawa Mitsuru, Yamamuro Kazuhiko, Ikehara Minobu, Komori Takashi, Noriyama Yuki, Kamikawa Kohei, Saito Yasuhiko, Okano Hideyuki, Makinodan Manabu	4. 巻 15
2. 論文標題 Granulocyte macrophage colony-stimulating factor-induced macrophages of individuals with autism spectrum disorder adversely affect neuronal dendrites through the secretion of pro-inflammatory cytokines	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Autism	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） 10.1186/s13229-024-00589-2	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 Nishi Yuki, Toritsuka Michihiro, Takada Ryohei, Ishikawa Mitsuru, Ishida Rio, Kayashima Yoshinori, Yamauchi Takahira, Okumura Kazuki, Takeda Tsutomu, Yamamuro Kazuhiko, Ikehara Minobu, Noriyama Yuki, Kamikawa Kohei, Murayama Shuhei, Ichikawa Osamu, Nagata Hidetaka, Okano Hideyuki, Iwata Nakao, Makinodan Manabu	4. 巻 -
2. 論文標題 Impaired synaptosome phagocytosis in macrophages of individuals with autism spectrum disorder	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	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） 10.1038/s41380-025-03002-3	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西佑記、高田涼平、鳥塚通弘、石田理緒、萱島善徳、神川浩平、竹田奨、石川充、山内崇平、岡野栄之、牧之段学
2. 発表標題 自閉スペクトラム症患者由来マクロファージにおける貪食能の評価
3. 学会等名 第45回日本生物学的精神医学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鳥塚通弘
2. 発表標題 ヒト細胞リソースを用いた精神疾患研究
3. 学会等名 BPCNP4 学会合同年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryohei Takada 1, Michihiro Toritsuka 1 Takahira Yamauchi 1, Yoshinori Kayashima 1, Rio Ishida 1 Yuki Nishi 1 Hiroaki Fukui 1, Mitsuru Ishikawa 2, Hideyuki Okano 2, and Manabu Makinodan 1
2. 発表標題 Cellular analysis of Autism Spectrum Disorder using co culture system of hiPSC derived neurons and macrophage s from patients
3. 学会等名 ISN-APSN meeting (国際学会)
4. 発表年 2022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	山室 和彦 (Yamamuro Kazuhiko)  (60526721)	奈良県立医科大学・医学部・講師  (24601)	

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
---------	---------