

平成 31 年 4 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18401

研究課題名(和文) ミクログリアを介した自閉症病態発現機序の解明と治療標的の探索

研究課題名(英文) Microglial involvement in ASD pathogenesis and screening of therapeutic target

研究代表者

佐柳 友規 (Sanagi, Tomomi)

東北大学・生命科学研究科・JSPS特別研究員(RPD)

研究者番号：00527012

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)：ヒトと同じ霊長類であるコモンマーモセットにバルプロ酸を経口投与することにより自閉症モデルを作製した。この自閉症マーモセットは複数の自閉症様行動異常を示し、ニューロンの刈り込み異常が認められることを確認している。固定脳切片を用いてミクログリアの形態や数の変化を解析し、自閉症マーモセットのミクログリアは密度の低下、突起の繊細化などの異常形態を有することを示した。免疫組織化学的解析からミクログリアの機能異常も示され、ミクログリアの異常が自閉症におけるシナプス刈り込み不全に関与している可能性が示された。大脳皮質各エリアにおける遺伝子発現変化の解析からも治療標的となりうる分子を見いだしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症スペクトラムは、他者とのコミュニケーション能力や社会性などが障害される発達障害の一種である。近年患者数の増加が顕著であり、社会生活が困難となる場合が多いことから病態解明や早期診断、治療法の開発が急がれている。本研究ではヒトと同じ霊長類であるコモンマーモセットを用いて、自閉症病態におけるミクログリアの関与を示した。自閉症モデルマーモセットではミクログリアの形態や機能に異常が認められること、遺伝子発現にも正常発達とは異なる変化が認められることなどから、これらが新しく治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：An autism model was created by oral administration of valproic acid to a common marmoset, which is the primate. We confirmed that this autism marmoset shows multiple autism-like behavior and synaptic pruning abnormalities of neurons are recognized. We analyzed the changes in the morphology and number of microglia using fixed brain sections, and showed that the microglia in autism marmoset have abnormal morphology such as decreased density and process thinning. Immunohistochemical analysis also showed functional abnormalities in microglia, indicating that microglial abnormalities may be involved in insufficiency of synapse elimination in autism. Analysis of gene expression changes in each area of the cerebral cortex has also found a molecule that can be a therapeutic target.

研究分野：細胞生物学

キーワード：自閉症 ミクログリア マーモセット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの脳は、1000億個を超えるニューロンがシナプスを介して神経回路を形成しており、形成された神経回路が構造的・機能的に維持されることが正常な高次脳機能の発現に必要である。ヒトを含む霊長類の大脳皮質では、生後直後から幼児期にかけてシナプスの急速な増大が生じ小児期に最大に達する。その後、児童期、青年期、成人となる過程で神経活動依存的なシナプスの成熟に伴い必要なシナプスだけが残される「シナプスの刈り込み」が起こり、成熟脳へと発達する (Penzes et al., 2011)。

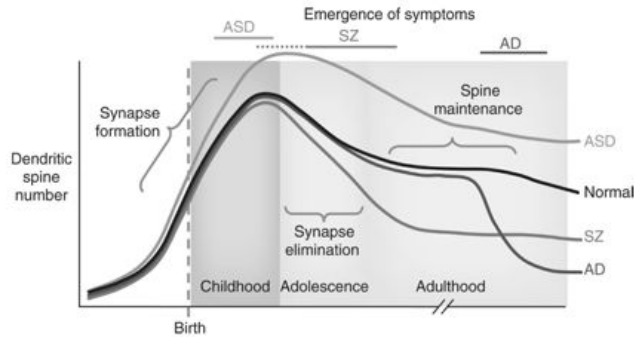


図 1. ヒト脳におけるスパイン数の変化

一過性に過剰なシナプスを形成しその後除去していく過程は、「オーバーシュート型」と呼ばれ、霊長類の機能的な神経回路を作り上げるために不可欠な過程とされるが、その分子基盤は明らかにされていない。

グリア細胞の一種であるミクログリアは、神経障害をいち早く感知して活性化し、その数や形態を著しく変化させ活性化ミクログリアとなることが知られている。活性化ミクログリアは障害部位への遊走、死細胞の貪食、炎症性サイトカイン、活性酸素、神経栄養因子などの産生など様々な作用を発揮し、神経保護や再生、組織修復、グリア細胞のさらなる活性化、神経変性や炎症反応などを起こすことから、種々の神経疾患への関与が示唆されている。近年、自閉症や統合失調症などの精神疾患の患者脳内においてミクログリアや炎症関連因子の異常が報告され (Morgan et al., 2010; Nakagawa et al., 2016) 精神疾患におけるミクログリアの関与が注目されている。ミクログリアの活性化を抑制することが知られているミノサイクリンにより、統合失調症患者や脆弱性 X 症候群患者の症状が改善されることも報告されている。また発達障害モデルマウスを用いた解析からも、ミクログリアの活性化及び炎症性サイトカインの発現誘導や、ミノサイクリン投与による症状改善効果が観察されていることから (Kumar et al., 2016) ミクログリアがこれらの疾患の病態発現に関与していることが示唆される。ミクログリアは活性化されたときの形態や機能の変化が非常に顕著であるため、病態脳・損傷脳における役割に着目した研究が先行して行われてきた。しかし遺伝子改変技術によりミクログリアが可視化されたマウスが作製されると、今までは静止型と考えられていた正常脳のミクログリアが、その突起を活発に伸縮させていることが *in vivo* 二光子イメージングにより明らかになった (Nimmerjahn et al., 2005)。また、ミクログリアはその突起を伸ばしてシナプスと直接接触することによりシナプスの状態をモニターし、その後の刈り込みに関与していることも明らかになった (Wake et al., 2009)。ミクログリア突起によるシナプスへの接触はニューロンの活動依存的に行われており、また傷害時にはその接触時間が延長されることから、ミクログリアがニューロンの機能調節に積極的に関与していることが強く示唆された。また最近ではミクログリア突起がシナプス形成にも関与することが報告された (Miyamoto et al., 2016)。自閉症などの精神疾患では、シナプス数の変動パターンに異常が認められることが報告されている (Penzes et al., 2011)。自閉症スペクトラム障害ではシナプス形成に比べて刈り込みが少ないことが示されており、このシナプス形成の異常にミクログリアが関わっている可能性が考えられる。従って、脳発達過程でヒトと同様のシナプス数変動パターンを示すマーモセットを用いて、自閉症病態におけるミクログリアの関与とその病態発現機序を明らかにすることで治療標的を探ることは、自閉症の新規治療法開発を目指す上で非常に重要である。

2. 研究の目的

自閉症スペクトラムは、他者とのコミュニケーション能力や社会性などが障害される発達障害の一種である。近年患者数の増加が顕著であり、社会生活が困難となる場合が多いことから病態解明や早期診断、治療法の開発が急がれている。近年自閉症患者の脳でミクログリアの異常や炎症関連因子などの発現増強が報告され、自閉症の発症や病態発現におけるミクログリアの関与が示唆されている。本研究では、ヒトと同じ霊長類であるマーモセットを用いて自閉症モデルを作製し、ミクログリアを介した自閉症病態発現機序を解明することにより、ミクログリアを標的とした自閉症病態を改善する新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

抗てんかん薬であるバルプロ酸をある時期に妊婦が服用すると、生まれてきた子の自閉症発症リスクが高まるという臨床報告から、げっ歯類ではバルプロ酸暴露による自閉症モデルを用いた研究が多く行われている。我々は胎生 60 日目の雌マーモセットにバルプロ酸を経口投与し、生まれた仔を自閉症モデルマーモセットとした。

定型発達マーモセットと自閉症モデルマーモセットについて、各発達段階における大脳皮質

各エリアより組織を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行った。固定脳切片を用いた解析では、ミクログリアの数や形態を定型発達マーマーモセットと自閉症モデルマーマーモセットと比較した。形態解析にはニューロルシダを用いた。固定脳切片を用いた解析では、遺伝子発現解析により見いだされた遺伝子のみならず、ミクログリア機能関連分子の発現についても解析を行った。

4. 研究成果

ヒトと同じ霊長類であるコモンマーマーモセットを用いて、自閉症モデルを作製した。すなわち、胎生 60 日目の雌マーマーモセットにバルプロ酸を 200mg/kg で経口投与し、生まれた仔を自閉症モデルマーマーモセット (VPA マーマーモセット) として用いた。作製した VPA マーマーモセットは、複数の自閉症様行動を示すことを確認している (Yasue et al., 2015)。また、発達過程におけるシナプス数の変化を解析し、この VPA マーマーモセットがヒト自閉症スペクトラム患者と同様の変動パターンを示し、シナプス刈り込み異常を有していることを見いだしている。

各発達段階 (生後直後、2、3、6 ヶ月齢、成体) の VPA マーマーモセットから複数の大脳皮質領域を採取し、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。定型発達マーマーモセットと比較解析することで、自閉症病態に関与する候補遺伝子を複数見いだした。

近年、自閉症や統合失調症などの精神疾患の患者脳内においてミクログリアや炎症関連因子の異常が報告され (Morgan et al., 2010; Nakagawa et al., 2016) 精神疾患におけるミクログリアの関与が注目されている。本研究において作製した VPA マーマーモセットにおいて、ミクログリアがどのような挙動を示すのかを明らかにし治療標的を探るため、数や形態の変化を詳細に解析した。VPA マーマーモセットの脳ではミクログリアの活性化が生じていることを予想していたが、前頭前皮質 12 野についてミクログリアマーカーである Iba1 に対する抗体を用いた免疫染色を行ったところ、VPA マーマーモセットのミクログリアは抗 Iba1 抗体の染色性が弱いことが明らかになった。ミクログリア密度を定量したところ、正常発達マーマーモセットと比較して VPA マーマーモセットでは、シナプス刈り込み期にあたる生後 6 ヶ月齢においてミクログリア密度が有意に減少していた。細胞間距離を計測したところ、ミクログリア間の距離が広がっていた。ミクログリアの形態と機能は密接な関係にあり、活性化により細胞体は大きく、突起は太く短くなることが知られている。そこで Iba1 免疫染色後の脳切片を用いて、ニューロルシダを用いて細胞体と突起のトレースを行い、三次元再構築を行った。その画像を元に解析したところ、VPA マーマーモセットのミクログリア細胞体は球形に近い形状をしているものを多く見いだされた。Sholl 解析により突起の詳細な解析を行ったところ、突起複雑性や突起展開面積に顕著な変化は認められなかったものの、VPA マーマーモセットのミクログリアはその突起が顕著に細くなっていることが明らかになった。以上の解析により、VPA マーマーモセットのミクログリアはこれまでに知られている病態脳で見られるような典型的な活性化ミクログリアの形態を示さないことが明らかになった。

我々はこれまでに、正常発達マーマーモセットではスパイン数がピークである生後 3 ヶ月齢においてブートン状に肥大した突起が多く見いだしている。また、このブートン状ミクログリア突起がニューロンのスパインと頻繁に接触する様子を観察している。VPA マーマーモセットではこのブートン状先端の数が有意に減少していることが明らかになった。げっ歯類では膨大したミクログリア突起先端がシナプスに接触し、シナプス再編成に関与していることが報告されている (Wake et al., 2009)。VPA マーマーモセットのミクログリアは除去すべきシナプスを認識できなくなっている可能性がある。さらに、VPA マーマーモセットのミクログリアは、Iba1 染色陰性の領域を多く有していることが明らかになった。別のミクログリアマーカー P2RY12 の免疫染色でも同様に染色陰性領域が観察され、VPA マーマーモセットではミクログリア突起に異常が生じていることが明らかになった。これらの異常形態は、自閉症患者の死後脳で観察されるミクログリアの形態に非常に類似していた。炎症性サイトカイン、増殖マーカー、貪食マーカー、M1 タイプミクログリアマーカー、M2 タイプミクログリアマーカーなどに対する抗体を用いた免疫染色を行ったところ、VPA マーマーモセットのミクログリアは正常発達マーマーモセットのミクログリアとは染色性が異なっており、機能異常を呈している可能性が示された。以上の結果より、バルプロ酸暴露マーマーモセットではミクログリアが異常形態を示しており、正常な機能を発揮できなくなっていることがシナプス刈り込み不全に関わっている可能性が示された。

本研究は、ヒトと同じ霊長類であり、ヒトと同様のシナプス形成パターンを示すコモンマーマーモセットを用いて自閉症モデルを作製し、ミクログリアの形態異常及び機能異常を明らかにしたことが大きな成果である。また、自閉症病態におけるミクログリアの関与が明らかとなり、ミクログリアを標的とした早期診断や治療法開発へとつながる可能性が示された。さらに、網羅的遺伝子発現解析の結果より、治療標的となりうる候補遺伝子も見いだされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

佐柳 友規、高坂 新一、脳内ミクログリアの機能、日本生物学的精神医学会誌、査読無、28 巻、2017、69-75

〔学会発表〕(計 2 件)

Tomomi Sanagi, Tetsuya Sasaki, Tomoko Manabe, Keiko Nakagaki, Shinichi Kohsaka,

Noritaka Ichinohe, Microglial abnormality in the prefrontal cortex of a primate ASD model by prenatal exposure of valproic acid. 第60回日本神経化学学会大会, 2017

Tetsuya Sasaki, Tomomi Sanagi, Tomoko Manabe, Shinichi Kohsaka, Noritaka Ichinohe, Immune-related Factors Influenced Postnatal Synapse Remodeling in the Primate Cerebral Cortex. 第60回日本神経化学学会大会, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。