

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82611

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23789

研究課題名（和文）自閉症における臓器連関を介した病態制御機構の解明

研究課題名（英文）The effect of circulating factor in autism spectrum disorder

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・リサーチフェロー

研究者番号：80850693

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：自閉スペクトラム症(ASD)には遺伝的要因が関与し、全身で機能する遺伝子の不全の場合には末梢環境での変化が脳機能に影響する可能性が考えられる。本研究では、ASD関連遺伝子CHD8の変異型マウスにおける神経機能異常が血中因子に制御されることを、並体結合実験から見出した。このメカニズムを同定するため、脳血管内皮細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、関与が示唆されるレセプターを探索した。候補分子の発現をCHD8変異型マウスで抑制した結果、CHD8変異マウスの機能異常が改善した。このことから、脳血管が脳外部環境から受容するシグナル伝達が、ASD関連症状を誘導する機序が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ASDをはじめ、精神・神経疾患の基礎研究の対象は脳が中心である。これらの疾患には、脳機能に重要な神経伝達の基盤であるシナプスで働く分子に加えて、全身で発現して個体の発生や恒常性維持に重要な遺伝子の変異も関与することが報告されている。CHD8はその様な遺伝子の1つだが、神経新生や神経細胞、オリゴデンドロサイトの発達など、脳内の細胞での機能について盛んに解析が行われている。本研究はこれらに加え、脳の外部環境での変化がASDの症状に及ぼす影響とその機構を明らかにすることで、精神・発達障害の病態形成を全身環境から理解するという新たな視点をもたらすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Autism spectrum disorder (ASD) refers to a complex neurodevelopmental condition that include challenges in social interaction, verbal and nonverbal communication, and repetitive behaviors. In this study, we investigated the effect of circulating factors on neurological dysfunction related to ASD. Parabiosis experiments revealed that circulating factor in mice deficient for CHD8, one of the frequently mutated genes in individual with ASD, regulated ASD-like behavior. We searched ligand-receptor mechanisms which mediates this regulation by comprehensive gene expression analysis of brain microvascular endothelial cells and following upstream analysis of differentially expressed genes. The loss-of-functional analysis of receptors in brain endothelial cells further provided the possibility that signaling transduction which brain receives from the outside of central nervous system linked to ASD-related neurological dysfunction.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：自閉スペクトラム症 ASD 臓器連関 CHD8 脳血管

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (Autism spectrum disorder, ASD)は、言語コミュニケーションや社会性行動における障害、興味の著しい限局を主な特徴とし、近年国内外で患者数が増加している発達障害群である。多動性や不安など、発達にともなう様々な症状を合併することが知られ、治療法や治療薬は確立されていない。ASD には遺伝的要因が関与し、欧米を中心に ASD の大規模なエキソーム解析が進められており、神経回路の基盤であるシナプスに関連する遺伝子の変異が多く報告されることから、シナプス機能の破綻と ASD の関連についての解析が精力的に進められてきた。一方で、Wnt シグナルやクロマチン制御など、全身で機能する遺伝子の変異の関与も示唆されている (Krumm, et al., *Trends Neurosci.*, 2014; Satterstrom, et al., *Cell*, 2020)。この場合には、脳外部環境での変化が血液循環を通じて脳に作用し、ASD 症状の要因となる可能性が考えられるが、その実態は明らかでない。例えば、クロマチン再構成因子 CHD8 は、ASD で突然変異頻度の高い遺伝子であり、そのヘテロ欠損型マウスは ASD と関連した社会性行動の異常や、不安様行動の増加を示すことが報告されている (Katayama et al., *Nature*, 2016)。CHD8 はエピゲノム制御を介して p53 シグナル経路に関与し、個体発生に不可欠など、脳外部でも重要な機能を担っている (Nishiyama et al., *Nat Cell Biol.*, 2009)。しかし、このように全身性に機能する分子についても、ASD 関連研究においては機能解析の対象が中枢神経系に限局しており、遺伝子変異による末梢環境の変化が ASD 関連症状に与える影響については解析が進んでいない

2. 研究の目的

そこで本研究では、CHD8 変異による血中因子の変化が脳機能に影響を及ぼすとの仮説を掲げて検証するとともに、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。そのために、野生型マウスと CHD8 変異型マウスを外科的に結合して野生型マウスに ASD 全身環境を暴露し、行動学的解析により ASD 様症状が影響されるか検証した。また、この変化を媒介するメカニズムを調べるため、末梢環境と中枢神経のコミュニケーションに重要な役割を果たしている脳血管内皮細胞に着目し、その網羅的遺伝子発現解析を行った。変動遺伝子の上流解析から関連の示唆させるレセプターを探索し、機能阻害実験により ASD 症状との関連を検証した。

3. 研究の方法

(1) 血中因子によるASD関連症状の変化の解析

CHD8 変異による末梢環境の変化が ASD 関連症状に関与するか調べるため、CHD8 ヘテロ欠損型と野生型マウスの並体結合実験を行った。離乳した 5-6 週齢の野生型と変異型マウスの体側を皮下レベルで外科的に結合して 2 週間維持し、体循環を共有させた。その後分離してそれぞれの皮膚を縫合し、1 週間術後の回復を図ったのち、CHD8 ヘテロ欠損型マウスで顕著な上昇がみられた不安様行動 (Katayama et al., *Nature*, 2016) を、オープンフィールド試験、明暗選択箱試験、高架式十字迷路試験により解析した。対照群として野生型同士、CHD8 変異型同士で結合した個体でも同試験を行い、CHD8 変異型の血中因子が野生型の、また野生型の血中因子が CHD8 変異型の行動へ与える影響を評価した。

(2) 血中因子によるASD症状の制御機構の解明

(1)の変化をもたらす血液含有因子、およびそれが脳に作用するメカニズムを同定するため、脳血管内皮細胞に着目した。脳血管内皮細胞は、脳を構造的・機能的に支える神経血管ユニットの主要な構成成分であり、血液脳関門の破綻をはじめとする血管内皮細胞の機能不全が種々の脳神経疾患において病態形成に関与することが報告されている。そこで本研究においても、末梢環境の変化が脳血管内皮細胞の機能変化を介して脳に作用する可能性を検証するため、CHD8 変異型マウスと同腹の野生型マウスから脳血管内皮細胞を MACS と FACS により単離し、網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに変動遺伝子の上流解析により関与が示唆されるレセプターを探索した。

(3) 脳血管内皮細胞における機能阻害実験

上記のように探索したレセプターが実際に ASD 関連症状の表出に関与するか調べるため、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus, AAV) による脳血管内皮細胞における機能阻害実験系の構築を行った。脳血管内皮細胞に指向性高く感染する改良型 AAV の Rep・Cap 遺伝子を含む pAAV-BR1 (Körbelin et al., *EMBO Mol Med.*, 2016) ベクター、pHelper ベクター、およびパッケージングされる DNA として標的レセプターの発現を抑制する 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 AAV-BR1-shRNA を 6-7 週齢の CHD8 ヘテロ欠損型マウスに投与し、2 週間おいた後に、行動学的変化を観察した。

4．研究成果

(1) 血中因子による ASD 関連症状の変化の解析

CHD8 ヘテロ欠損型と野生型マウスの並体結合実験を行った結果、CHD8 ヘテロ欠損型マウスと並体結合された野生型マウスでは、野生型同士で結合したマウスに比べて、高架式十字路において壁のない通路での滞在時間が減少した。また逆に、野生型マウスと結合した CHD8 ヘテロ欠損型マウスでは、CHD8 ヘテロ欠損型マウス同士で結合した個体に比べて、オープンフィールド試験において中央領域での滞在時間が増加した。以上のことから、CHD8 変異による ASD 関連症状は、末梢を循環する血中因子により制御される可能性が示唆された。

(2) 血中因子による ASD 症状の制御機構の解明

血中因子による ASD 症状の制御機構を解明するため、脳内で血中因子に暴露されている脳血管内皮細胞に着目して解析を進めた。CHD8 ヘテロ欠損型マウスと同腹の野生型マウスから脳血管内皮細胞を単離し、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、血管内皮細胞の機能に關与する接着因子やトランスポーターについて変動がみられた。このような変動遺伝子の上流シグナルをデータベースを用いて解析した結果、いくつかの細胞表面受容体について關与が示唆された。

(3) 血中因子による ASD 症状の制御機構の解明

上述の細胞表面受容体が実際に ASD 関連症状に關与しているか検証するため、脳血管内皮細胞に感染するアデノ随伴ウイルス (AAV-BR1) に候補受容体の発現を抑制する shRNA または control の shRNA を発現するベクターを組み込んだ AAV ベクターを作製した。CHD8 ヘテロ欠損型マウスに尾静脈投与により感染させ、2 週間後に行動学的変化を解析した結果、一部の候補受容体の発現を抑制した場合には、control の shRNA を導入した CHD8 ヘテロ欠損型マウスと比較してオープンフィールドでの中央領域での滞在時間が増加する結果が得られた。以上の結果から、脳外部から脳血管内皮細胞が受容するシグナルが、ASD 関連症状を制御するメカニズムが存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村松永彬、植田堯子、田辺章悟、鈴木立紀、村松里衣子
2. 発表標題 DDAH1はオリゴデンドロサイトの分化を促進し、中枢神経系の再髄鞘化を促進する
3. 学会等名 第63回日本神経化学会
4. 発表年 2020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
---------	---------