

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19743

研究課題名(和文) 自閉症マウスにおけるミクログリア機能の多角的解析

研究課題名(英文) Multilateral analysis of microglial function in autism model mice

研究代表者

井川 大輔 (IKAWA, DAISUKE)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00526717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はミクログリアがニューレグリン(NRGs)を産生すること、活性化によって発現が増加することを明らかにした。さらに、自閉症患者でミクログリアの活性化がみられていることに一致して、自閉症マウスのミクログリアの活性化並びにNRGs遺伝子発現が高いことを明らかにした。またこのモデルマウスではミクログリアと末梢血単核球のNRGs遺伝子発現量に強い相関を認めた。マウスから得られた知見を基に自閉症患者末梢血単核球のNRGs発現と症状評価尺度を用いて解析した。これにより末梢血単核球のNRG1 type の発現量が高いほど社会性が障害されていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Our research has revealed that microglia also express Neuregulins (NRGs), levels of which are markedly increased in activated microglia. Previous studies have indicated that microglia are activated in the brains of individuals with autism spectrum disorder (ASD). Therefore, we investigated microglial NRG mRNA expression in multiple lines of mice considered models of ASD. Intriguingly, microglial NRG expression significantly increased in ASD-model mice relative to that levels of controls. Furthermore, we observed a positive correlation between NRG expression in microglia and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in mice. To translate these findings for application in clinical psychiatry, we measured levels of NRG expression in clinically available PBMCs of patients with ASD. Levels of NRG1 type III expression in PBMCs were positively correlated with impairments in social interaction in children with ASD.

研究分野：神経科学

キーワード：ミクログリア 自閉症 ニューレグリン

1. 研究開始当初の背景

Neuregulin-1 (NRG1) は、神経系組織においてシナプス形成、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体発現、GABA 神経細胞の分化、オリゴデンドロサイトの発達・分化、ミエリン形成等に関与する神経成長因子であり、自閉症や統合失調症の病態に関わっているとされている (Corfas et al., 2004)。NRG1 はとりわけ神経回路形成が活発な発達期の脳で強く発現することが知られており、その回路形成や回路の態様に影響を与えることが考えられ、精神疾患の病態の基盤形成に関与していると想定される。また脳画像研究などから自閉症や統合失調症患者脳においてグリア細胞の一つであるミクログリアが活性化されていることが明らかとなっている (van Berckel et al., 2008; Suzuki et al., 2013; Kato et al., 2012)。ミクログリアが活性化されると炎症性サイトカインの発現が上昇し、それらが脳機能に影響を与え、精神障害が生ずると考えられている。これまでニューロンやアストロサイトが発現するとされていた NRG1 が、qRT-PCR 解析によりミクログリアでも発現していることを確認した。多くの NRG1 に関する研究において、NRG1 はニューロンで発現されるものであるという前提のもとに進められているが、申請者らの知見により、ミクログリア由来の NRG1 も考慮して研究を進めなければならぬことが明らかとなった。

2. 研究の目的

上記の研究背景に基づいて、自閉症や統合失調症患者脳でみられるミクログリア活性化とその精神症状との関連性につき、ミクログリア由来 NRG1、とりわけ幼若期におけるその効果、という観点から追究する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と飼育条件

BTBR マウス: BTBR マウスは通常の飼育を行い、生後 8 日目の雄マウスを用いた。対象に C57BL/6J 雄マウスを用いた。
 幼若期社会的隔離マウス: 3 ヶ月齢の C57BL/6J 雄と雌マウスを交配させ、児を生後 21 日目に離乳する。生後 21 日目から 34 日目まで同胞と引き離し単数飼育を行い、生後 35 日目に同胞と同居させる群を社会的隔離 (Isolation: IS) 群とし、生後 21 日目から同胞と同居させて飼育した群を通常飼育 (Regular Environment: RE) 群とした。

(2) ミクログリア、末梢血単核球単離

麻酔下で経心臓的に Phosphate Buffer Saline (PBS) を灌流し、脳から血液を除去すると同時に心臓から全血を採取する。脱血した脳を取り出し皮質を酵素的に切断し単細胞懸濁液を作成する。磁気細胞分離 (magnetic-activated cell sorting: Milteny Biotec) システムを用いてミクログリアの単

離を行った。単離には CD11b+ マイクロビーズを用いた。また採取した全血から密度勾配法 (Lympholyte®-Mammal: Cedar-lane Laboratories) を用いて末梢血単核球 (Peripheral mononuclear cells: PBMCs) を分離した。

(3) 蛍光免疫染色

生後 8 日目の C57BL/6J 雄マウスからミクログリアを単離し、PLL コートカバーガラス上に 24 時間接着培養を行った。ミクログリアを Iba1 抗体で標識し、同時に NRG1 抗体を用いて局在を確認した。

(4) LPS によるミクログリア活性化

生後 8 日目の C57BL/6J 雄マウスからミクログリアを採取する。LPS を 1.0mg/ml の濃度で添加した培地で、24 時間培養し、ミクログリアを回収する。

(5) 自閉症患者からのサンプリング

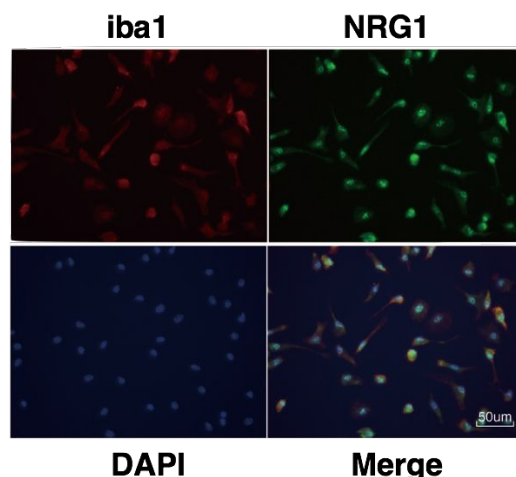
自閉症患者 (平均年齢 11.6±2.67 歳) を対象に末梢血単核球を採取した。そして 4 歳時の自閉症症状評価尺度 (The Autism Diagnostic Interview-Revised: ADI-R) を用いて社会性、コミュニケーション、反復・常同行為を点数化した。

(6) Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 解析

ミクログリア並びに PBMCs から RNA を精製し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。qRT-PCR 法にて NRG 並びに IL-1β、IL-6、TNF-α 遺伝子発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) ミクログリアにおける NRG 遺伝子発現がみられることを既に我々は明らかにしていた。次に、蛍光免疫染色を行い NRG1 抗体とミクログリアを標識する Iba1 抗体を用いて、局在が一致することを確認した。



文献(2)より引用改変

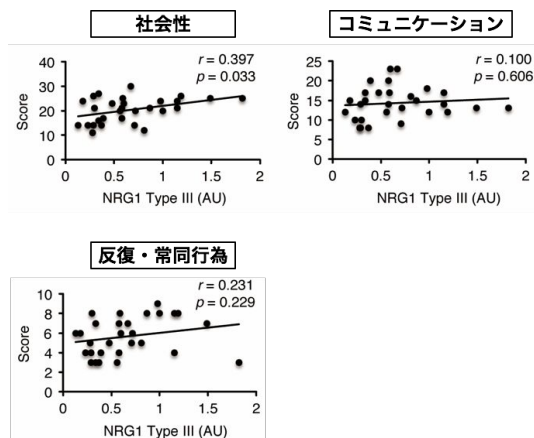
(2) 次にミクログリアの活性化によって NRG の発現変化が生じるのか、C57BL/6J マウスからミクログリアを単離し、LPS 添加培

養しミクログリアを活性化させ炎症性サイトカインの発現変化を調べた。コントロール群(PBS)に比較してNRG1、NRG3 遺伝子の有意な発現増加、NRG1 の splicing variant である typeI、typeII、typeIII 全ての発現増加を認めた。

(3) 生後 8 日目の自閉症モデルマウス BTBR マウス、コントロールの C57B6/J マウスからミクログリアを単離して qRT-PCR 法にて対象 mRNA 発現量を測定した。まず、活性化の程度を評価するため炎症性サイトカインを測定した。BTBR ミクログリアでは IL-18 の有意な上昇、IL-6 は有意な減少を認め、TNF- α は差がみられなかった。また NRG1 は有意な上昇がみられなかったが、splicing variant である NRG1 typeII でのみ有意な発現上昇を認めた。さらに NRG3 遺伝子も有意な上昇を認めた。

(4) 幼若期社会的隔離マウスは社会性の低下がみられる生後 65 日目にミクログリアを単離し、qRT-PCR 解析を行った。RE 群に比べ、IS 群のミクログリアでは IL-18 や TNF- α 遺伝子の発現上昇と、NRG1、NRG3 と NRG1 のスプライシングバリエーションである typeII、typeIII 遺伝子発現上昇を認めた。さらにこの社会的隔離マウスから末梢血単核球を採取し NRG 発現を調査し、RE 群に比べ IS 群でミクログリアと同様の NRG 遺伝子発現増加を認めた。そして末梢血単核球とミクログリアの NRG 遺伝子発現量に相関関係があることを見いだした。

(5) 当初、統合失調症患者から末梢血単核球を採取し、induced microglia-like cell (iMG) を作成し解析を行う予定であったが、自閉症モデルマウスの結果から自閉症患者から末梢血単核球を採取し、この末梢血単核球の NRG 発現を調査することにした。そして自閉症症状評価尺度である ADI-R を用いて自閉症患者の神経心理機能を評価し、社会性、コミュニケーション、反復・常同行為を点数化した。今回、自閉症患者末梢血単核球で NRG1 とスプライシングバリエーションである



文献(2)より引用改変

typeIII のみ発現を認めた。NRG1 typeIII 遺伝子の発現量と社会性のスコアに相関関係があることを確認した。これは NRG1 typeIII の発現量が高いほど社会性が障害されていることを示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) Makinodan M, Ikawa D, Miyamoto Y, Yamauchi J, Yamamuro K, Yamashita Y, Toritsuka M, Kimoto S, Okumura K, Yamauchi T, Fukami SI, Yoshino H, Wanaka A, Kishimoto T. Social isolation impairs remyelination in mice through modulation of IL-6. *FASEB J*. 2016 Dec;30(12):4267-4274. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27613805

(2) Ikawa D, Makinodan M, Iwata K, Ohgidani M, Kato TA, Yamashita Y, Yamamuro K, Kimoto S, Toritsuka M, Yamauchi T, Fukami SI, Yoshino H, Okumura K, Tanaka T, Wanaka A, Owada Y, Tsujii M, Sugiyama T, Tsuchiya K, Mori N, Hashimoto R, Matsuzaki H, Kanba S, Kishimoto T. Microglia-derived neuregulin expression in psychiatric disorders. *Brain Behav Immun*. 2017 Mar;61:375-385. doi: 10.1016/j.bbi.2017.01.003. PMID: 28089559

(3) Makinodan M, Iwata K, Ikawa D, Yamashita Y, Yamamuro K, Toritsuka M, Kimoto S, Okumura K, Yamauchi T, Yoshino H, Tsujii M, Sugiyama T, Tsuchiya K, Mori N, Matsuzaki H, Kishimoto T. Tumor necrosis factor- α expression in peripheral blood mononuclear cells correlates with early childhood social interaction in autism spectrum disorder. *Neurochem Int*. 2017 Mar;104:1-5. doi: 10.1016/j.neuint.2016.12.005. PMID: 28007470

〔学会発表〕(計 1 件)

D. Ikawa, M. Makinodan, Y. Yamashita, K. Okumura, T. Yamauchi, T. Tanaka, Y. Nishihata, T. Komori, Y. Yamaguchi, T. Kishimoto. MICROGLIA-DERIVED NEUREGULIN EXPRESSION IN AUTISM MODEL MICE. 13th World Congress of Biological Psychiatry. 2016. 11. 26, Lima, Peru.

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

井川 大輔 (IKAWA DAISUKE)
奈良県立医科大学精神医学講座・助教
研究者番号：00526717

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()