

令和元年6月23日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17334

研究課題名(和文) ヒト脱落乳歯由来幹細胞を用いた自閉症治療法の開拓

研究課題名(英文) Development of treatment for autism spectrum disorder with exfoliated deciduous tooth-derived pulp stem cells

研究代表者

高山 扶美子 (takayama, fumiko)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20795950

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)：本研究はヒト脱落乳歯由来肝細胞(SHED)を活用して自閉スペクトラム症(ASD)の病態を解明することを目的とし、ASDのSHEDをドパミン神経細胞(DN)へ分化させて解析を行った。ASD群では健常児に比べ、DNの突起周長と分岐数、突起に局在するミトコンドリア数および活性が有意に減少し、細胞内ATPとカルシウム濃度に有意な低下を認めた。さらに、脳由来神経栄養因子(BDNF)とDNの共培養により、健常児群では突起周長と分岐数が有意に増加したが、ASD群では差は認めなかった。以上により、ASDにおいて、BDNF下流のシグナルによるミトコンドリア機能低下がDN突起伸張を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ASDは小児の代表的な精神行動異常疾患で、昨今では疾患概念が広範化され約100人に7～8人と推測され、社会問題となっており、一刻も早い病態解明が期待されている。本研究により、ミトコンドリア機能の低下が自閉症の病態発症に関与することが明らかとなり、同疾患の早期治療法の開拓に貢献したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the pathological association between development of dopaminergic neurons (DN) and mitochondria in Autism spectrum disorder (ASD) by using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). The SHED collected from ASD and typically developing children were differentiated into DN, and the neurobiology of these cells was examined. The DN derived from children with ASD showed impaired neurite outgrowth and branching, associated with decreased mitochondrial membrane potential, ATP production, number of mitochondria within the neurites, amount of mitochondria per cell area and intracellular calcium level. In addition, impaired neurite outgrowth and branching of ASD-derived DN were not improved by brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Our results suggest that mitochondrial dysfunction caused by impairment of the BDNF signaling pathway reduce dopaminergic neurite outgrowth in ASD.

研究分野：小児歯科学

キーワード：ドパミン神経細胞 自閉症 ミトコンドリア SHED

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

少子化日本社会では、子どもの発達障害（自閉症、学習障害、アスペルガー症候群、多動性注意欠陥症）の病態解明による新規治療法開拓に期待が寄せられている。自閉症は先天性脳機能障害である自閉症スペクトラム障害 (Autism spectrum disorder : ASD) と定義され、約 100 人に 7~8 人と推測されている。その症状は、(1)社会的相互交渉の未発達、(2)コミュニケーションの未発達、(3)興味・関心と活動範囲の狭さを 3 主徴とする。この ASD の症状は視床下部を中心とした中枢神経系の機能異常によって出現し、ドパミン代謝異常やミトコンドリア機能異常との関連が報告されているが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、ヒト乳歯由来幹細胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth : SHED)を活用し、ASD 患者から採取した SHED をドパミン神経細胞(dopaminergic neurons : DN)に分化させ、その形態およびミトコンドリア機能解析を行うことで、ASD の病態を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)SHED 培養

ASD 患者および健常児各 3 名の脱落乳歯から歯髄を単離し、SHED を調整した。SHED は 15% ウシ胎児血清、100U/mL ペニシリン、100 $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、250  $\mu$ g/mL ファンゲゾンを含む $\alpha$ MEM 培地で培養した。実験には 10 継代以内の SHED を用いた。

#### (2)DN への分化

SHED を 20ng/mL EGF と 20ng/mL bFGF、1%N2 サプリメントを含む DMEM 培地で 2 日間培養した後、2% B27 サプリメント、1mM ジブリン cAMP、0.5mM IBMX、200 $\mu$ M アスコルビン酸を含む Neurobasal 培地で 5 日間培養を行った。BDNF との共培養の際には、50ng/mL の BDNF を添加した。

#### (3)DN の形態解析および細胞内局在ミトコンドリアの解析

DN へ分化させた SHED を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、Tom20 および $\beta$ -Tubulin III 抗体で蛍光免疫染色を行った。Nikon C2 confocal microscope (Nikon)で撮影を行い、MetaMorph ソフトウェア(Molecular Devices)を使用して細胞突起周長と分岐数ならびにミトコンドリア細胞内比率の解析を行った。

#### (4) ミトコンドリア膜電位の解析

膜透過性 JC-1 色素にて染色を行い、フローサイトメトリーを使用して膜電位の計測を行った。

#### (5) 細胞内 ATP およびカルシウムレベルの解析

細胞内 ATP は CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用いて計測を行った。細胞内 Ca<sup>2+</sup>レベルは Fluo-4 AM でインキュベーションを行った後、Nikon C2 confocal microscope (Nikon)で蛍光強度の計測を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)ASD-SHED 由来 DN の形態学的解析

ドパミン神経細胞マーカーである TH、PITX3、NURR1 の mRNA を測定した。ASD-DN は Ctrl-DN と比較してその発現に有意な差を認めなかったが、神経突起の長さや分岐数が有意に減少していた(図 1)。これらの結果から、ASD-SHED はドパミン神経細胞に分化することは可能であるが、その成長は不十分であることがわかった。

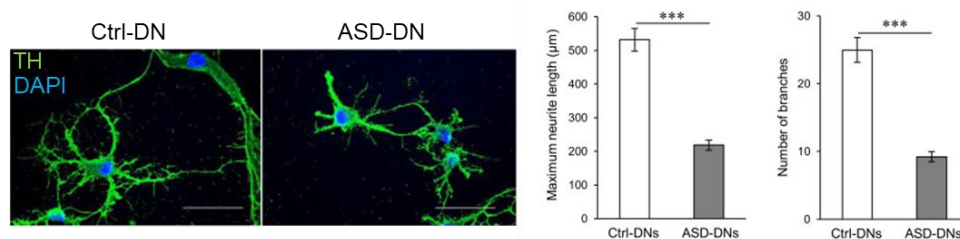


図1 SHED由来ドパミン神経細胞の形態学的解析

## (2) ASD-SHED 由来 DN のミトコンドリア活性および局在の解析

神経細胞突起の成長には ATP 産生が不可欠であり、ATP の維持にはミトコンドリア酸素呼吸が必須である。ASD-DN の神経突起成長と ATP、ミトコンドリア活性との関連を調べるため、ASD-DN のミトコンドリア ATP レベルと膜電位を測定した。ASD-DN は Ctrl-DN と比較して ATP レベルおよび膜電位に有意な低下がみられた (図 2)。さらに、DN 突起内のミトコンドリア数と局在に有意な減少を認めた (図 3)。このことから、ASD における神経突起成長不全にはミトコンドリア活性が関与していることが示唆された。

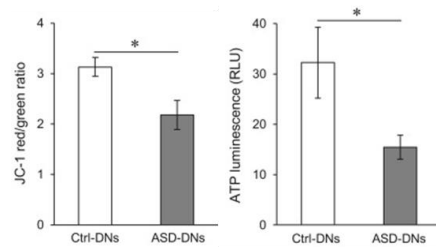


図2 ミトコンドリア膜電位およびATPの計測

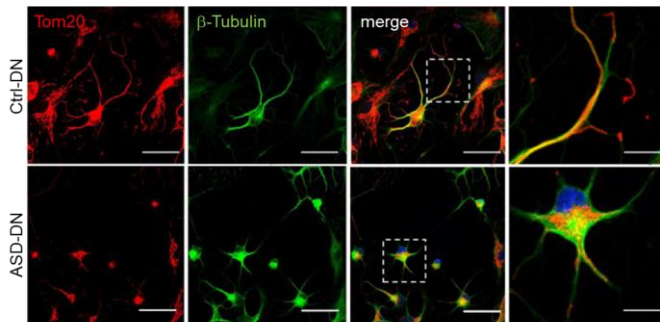


図3 ドパミン神経細胞内におけるミトコンドリア局在の解析

## (3) 細胞内カルシウムレベルの測定

細胞内  $Ca^{2+}$  は、神経細胞突起の伸張に関与し、ミトコンドリアは  $Ca^{2+}$  の取り込みおよび放出機構を有する。ドパミン神経細胞突起の成長低下と  $Ca^{2+}$  との関連を調べるために、ASD-DN の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を測定した。ASD-DN は Ctrl-DN と比較して、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に有意な低下を認めた (図 4)。このことから、ASD 由来ドパミン神経細胞突起の成長低下には、ミトコンドリアによる  $Ca^{2+}$  代謝が関与することが示唆された。

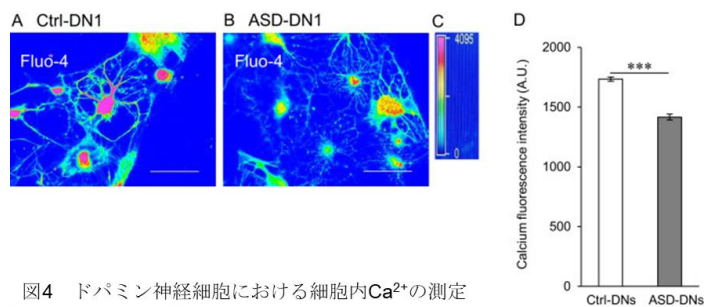


図4 ドパミン神経細胞における細胞内 $Ca^{2+}$ の測定

## (4) ドパミン神経細胞と BDNF の共培養

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、神経細胞突起の伸張に関与することが知られている。ドパミン神経細胞成長低下と BDNF との関連の有無を確認するために、ドパミン神経細胞と BDNF の共培養を行った。Ctrl-DN では BDNF の添加により突起周長および分岐数が有意に増加したが、ASD-DN では添加により有意な増加はみられなかった (図 5)。以上の結果から、ASD におけるドパミン神経の成長低下は、BDNF シグナルの下流でミトコンドリア機能不全により引き起こされることが示唆された。

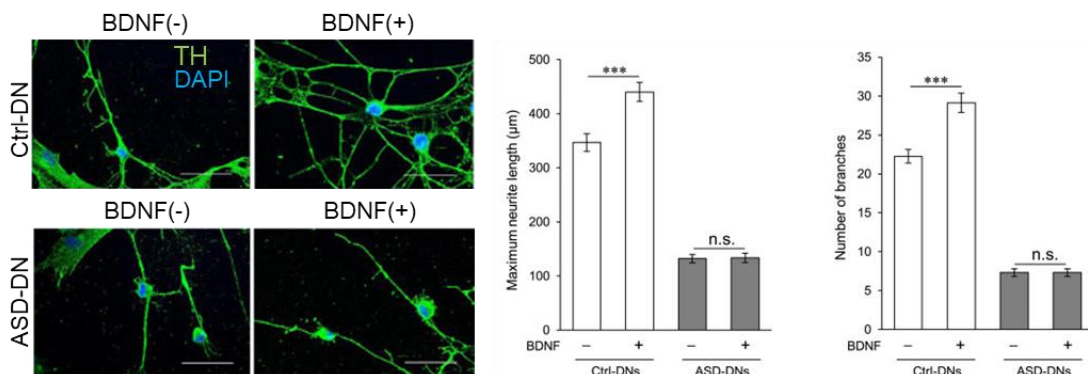


図5 BDNF共培養によるドパミン神経細胞の形態学的解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Huong Thi Nguyen Nguyena, Hiroki Kato,1, Keiji Masuda, Haruyoshi Yamaza, Yuta Hirofuji, Hiroshi Sato, Thanh Thi Mai Pham, Fumiko Takayama, Yasunari Sakai, Shouichi Ohga, Tomoaki Taguchi, Kazuaki Nonaka. Impaired neurite development associated with mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from exfoliated deciduous tooth-derived pulp stem cells of children with autism spectrum disorder. (2018) Biochem Biophys Rep 16:24-31, 査読有

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

※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。