

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07609

研究課題名（和文）自閉スペクトラム症におけるM2マクロファージ機能不全に着目した病態解明

研究課題名（英文）Research focusing on macrophage dysfunction in autism spectrum disorders

研究代表者

山内 崇平（YAMAUCHI, Takahira）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20550817

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：自閉スペクトラム症（ASD）者のマクロファージの異常の有無について検討した。M1またはM2マクロファージに分けられるが、測定したサイトカインでは、想定していたM2マクロファージの異常はみられなかった。しかし、ASD者において、M1マクロファージのTumor necrosis factor- α （TNF- α ）が高値であることが特定された。また、ASD診断において、近年癌研究などで用いられている各分子発現量のM1/M2比について検討したところ、特に、TNF- α のM1/M2比が、尤度比16.55と診断効率が高値であり、高機能ASD者のバイオマーカーとなり得る可能性について明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉スペクトラム症（ASD）は社会的な問題となっているが、その病態や治療法は解明されておらず、その開発は喫緊の課題である。ASDでは、脳内炎症や末梢免疫系の障害など全身性に免疫異常が観察される。マクロファージは貪食や抗原提示能力を有しており、自然免疫において中心的な役割を担っている。今回、脳内のミクログリアと発生および動態が類似している血液マクロファージについて研究した。ASD者のM1マクロファージのTNF- α が高値であること、またそのM1/M2比が高機能ASD者の診断に有用であることを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated macrophage abnormalities in individuals with autism spectrum disorder (ASD). Macrophages were divided into M1 or M2 macrophages and the cytokines measured showed no significant abnormalities in M2 macrophages. However, elevated levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in M1 macrophages were identified in individuals with ASD. In ASD diagnosis, the likelihood ratio of TNF- α M1/M2 was 16.55, indicating high diagnostic efficiency and these findings suggest the possibility of biomarkers for high-functioning ASD individuals.

研究分野：精神医学

キーワード：自閉スペクトラム症 マクロファージ TNF-

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorders : ASD) は、現在有病率が 1~2%と以前に比べて高い頻度を示し、専門医療機関への受診も増加しており、社会的な関心が高い疾患である。多くの研究が行われているが、その病因及び病態は解明されていない。遺伝学研究では、遺伝要因が大きいことは周知されているが、それに加えて環境要因の重要性についても報告されている (Hallmayer et al., Arch Gen Psychiatry 2011)。母体の免疫活性に暴露した胎児が ASD の表現型を呈すると、疫学研究 (Mazina et al., J Dev Behav Pediatr 2015) やモデルマウス研究 (Meyer U, Biol Psychiatry 2015) で報告されている。

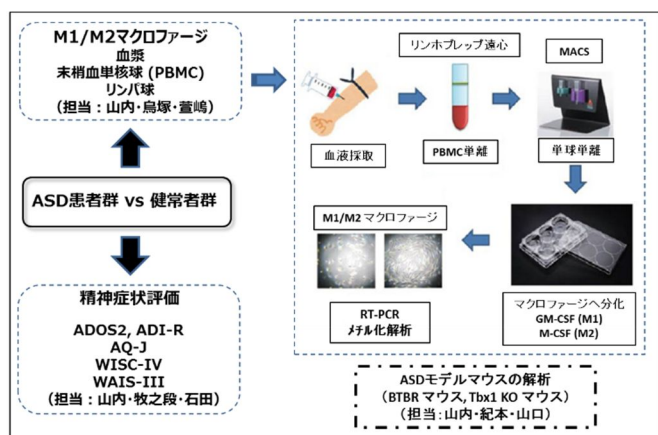
死後脳研究では、慢性の神経炎症所見や免疫、ミクログリア関連遺伝子の過剰発現が報告されており (Voineagu I et al., Nature 2011)、臨床的にも PET を用いた研究で、ASD 患者でミクログリアが活性化していることが報告されている (Suzuki K et al., JAMA Psychiatry 2013)。これらのことから、ASD は遺伝的要因だけではなく、環境要因またそれらによる炎症、免疫機構の関与が想定されている。

また、ASD はアレルギー疾患 (気管支ぜん息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、食物アレルギー) の併存が多いと報告されており (Pawankar et al., World Allergy Organization 2013)、国立成育医療研究センターの森等はメタ解析において、ASD は気管支ぜん息及びアレルギー性鼻炎の有病率が有意に高いと報告しており (Miyazaki et al., Rev J Dev Disord 2015)、中枢神経系 (CNS) だけではなく末梢組織においても免疫応答の亢進が想定される。自然免疫やアレルギー応答においてマクロファージが重要な役割を担っているが、それに加えて、マクロファージは高い可塑性や多様性を有しており、組織機能の獲得と維持に重要な役割を果たしている (Wynn T et al., Nature 2013; Davies LC et al., Nat Immunol 2013)。マクロファージは機能的に M1 型と M2 型に分別され、M1 型は細菌・ウイルス感染に対して炎症性サイトカインの発現を増強させ、M2 型は IL-10 や TGF- β などの発現を介して抗炎症性作用をもたらす。そして、大阪大学の審良らはアレルギー (Satoh T et al., Nat Immunol 2010) やメタボリックシンドローム (Satoh T et al., Nature 2013) などにおいて、疾患特異的な M2 マクロファージの機能不全の関与を報告している。また、M2 マクロファージの分化には STAT6 や PPAR などの転写因子が関与しており (Charo IF, Cell Metab 2007; Medzhitov R et al., Nat Rev Immunol 2009)、更に、エピジェネティックな制御も重要と考えられており、Jmjd3 やそのターゲット遺伝子である IRF4 が M2 マクロファージの分化に必需であると報告されている (Satoh T et al., Nat Immunol 2010)。

これらのことから、今回、本研究課題では、ASD 患者において M2 マクロファージの機能不全が存在するかどうかについて検討したいと考えた。また、M2 マクロファージのメチル化などエピジェネティックな制御不全が存在するかどうかについても検討したいと考えた。

2. 研究の目的

今回、本研究では、まず ASD 患者・対照健常群において M1 および M2 マクロファージを作成し、それぞれの炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- α , IL-17A)、抗炎症性サイトカイン (IL-10, IL-4, TGF- β) と臨床症状が相関性を有するかどうかについて検討する。また、マクロファージにおけるサイトカインや分化に関連する因子のエピジェネティックな制御について検討する。次に、ASD モデルマウスでも同様に M1/M2 マクロファージと行動実験の表現型の相関性について検討する。また、末梢と中枢を結ぶ BBB の異常の有無について検討することを目的とする。



3. 研究の方法

ASD 患者の臨床症状と M1/M2 マクロファージのサイトカイン発現量の相関性について検討

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5 (DSM-5) にて診断された、ASD 患者及び健常対照者の全血から、リンパ球分離溶液 (Lymphoprep, Axis-Shield) を用いて比重遠心法により末梢血単核球を単離し、その後、磁性細胞分離 (MACS) により CD14 陽性である単球を分離する。次に、M1/M2 マクロファージ分化誘導用キット (CellXVivo Human M1/M2 Macrophage Differentiation Kit, R&D Systems) を用いてそれぞれ M1 マクロファージ、M2 マクロファージへ分化させ (図 1) real-time PCR で、炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、TNF- α 、IL-17A) 抗炎症性サイトカイン (IL-10、IL-4、TGF- β) の発現量を測定し比較する。そして、ASD の諸症状を ADOS2 (autism diagnostic observation schedule 2)、AQ-J (Autism-Spectrum Quotient Japanese Version) WAIS-3 等で評価し、M1/M2 マクロファージにおけるサイトカインとの相関性について検討する。

ASD 血液サンプル及び ASD モデルマウスにおける DNA メチル化解析

これまでに検討してきたマクロファージの炎症性及び抗炎症性サイトカインや分化に関連する Jmjd3、IRF4 の DNA メチル化について検討する。パイサルファイト処理後のゲノム DNA 領域を PCR 増幅し、クローニング、シーケンス解析を行う (TaKaRa EpiTaqTM HS, TaKaRa)。

4. 研究成果

当該研究の内容は以下の課題名で Autism Research 誌に掲載された。

Tumor necrosis factor- α expression aberration of M1/M2 macrophages in adult high-functioning autism spectrum disorder.

Takahira Yamauchi, Manabu Makinodan, Michihiro Toritsuka, Kazuki Okumura, Yoshinori Kayashima, Rio Ishida, Naoko Kishimoto, Masato Takahashi, Takashi Komori, Yasunari Yamaguchi, Ryohei Takada, Kazuhiko Yamamuro, Sohei Kimoto, Yuka Yasuda, Ryota Hashimoto, Toshifumi Kishimoto. Autism Research, 11, 2330-2341, (2021).

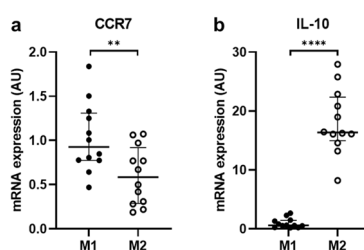
(1)

Table 1 に今回参加者の demographic data を示す。17 歳以上、FIQ70 以上の方で、健常群 30 名、ASD 群 29 名で解析を行った。血液から PBMC を分離し、次に CD14 陽性の単球を磁気単離した。そして、それぞれ M1 マクロファージ、M2 マクロファージへ分化させて実験に使用した。M1 マクロファージのマーカである CCR7、M2 マクロファージのマーカである IL-10 で当培養系の分化について確認した (下図)。

Table 1. Basic characteristics and clinical parameters

characteristics	TD (n=30)	ASD (n=29)	p-value
Age: mean (SD)	27.2 (5.6)	28.0 (6.9)	0.63
Sex: male, n (%)	25 (83.3)	24 (82.8)	1.00
Education period: median (IQR)	16.0 (15.8-18.0)	13.0 (12.0-16.0)	0.0004***
Full-scale IQ: mean (SD)	106.0 (11.7)	94.8 (13.3)	0.0019**
Allergic disease, n (%)	2 (6.7)	9 (31.0)	0.021*
AQ-J score: mean (SD)	21.2 (6.5)	33.5 (5.1)	<0.0001****

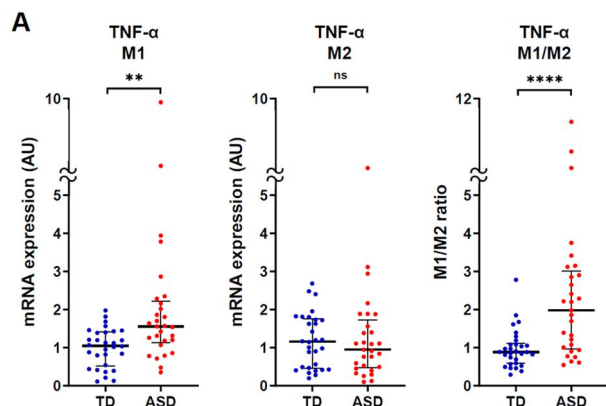
Allergic disease includes atopic dermatitis, asthma and food allergies.



(2)

健常群および ASD 群における M1、M2 マクロファージについて、種々のサイトカイン TNF- α 、IL-1beta、IL-6、IL-10、IL-17RA について検討したところ、M1 マクロファージにおける TNF- α の

発現量が、ASD 群において有意に増加していた。また、TNF- α の M1/M2 比についても ASD 群で増加していた。他のサイトカインについては群間で有意差はみとめなかった。



(3)

次に、ASD の診断について、TNF- α の ROC 解析を行った (下図)。その結果、TNF- α M1 の感度が 34.5%、特異度が 96.7%で、尤度比が 10.34、TNF- α M1/M2 比の感度が 55.2%、特異度が 96.7%で、尤度比が 16.55 であった (Table 2)。このことから、M1 マクロファージの TNF- α 発現量ならびに TNF- α の M1/M2 比が、大人の高機能 ASD のバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

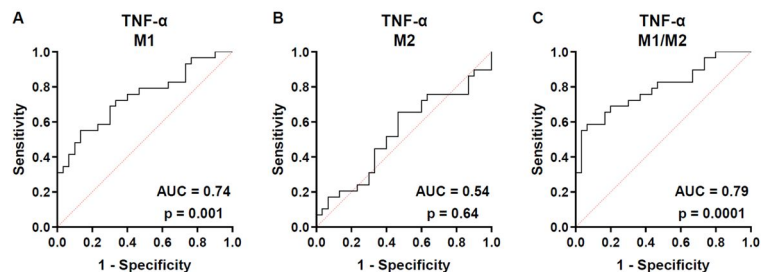


Table 2. Sensitivity, Specificity, and Positive Likelihood Ratio of TNF- α expression for ASD diagnosis

	Positive Predictive Value	Sensitivity% (95% CI)	Specificity% (95% CI)	Positive Likelihood Ratio
TNF- α M1	1.836	34.5 (19.9 - 52.7)	96.7 (83.3 - 99.8)	10.34
TNF- α M2	0.268	10.3 (3.6 - 26.4)	96.7 (83.3 - 99.8)	3.10
TNF- α M1/M2	1.853	55.2 (37.6 - 71.6)	96.7 (83.3 - 99.8)	16.55

(4)

マクロファージの炎症性及び抗炎症性サイトカインや分化に関連する Jmjd3、IRF4 について ASD 血液サンプルを用いた DNA メチル化解析を予定していたが、サンプルが不足したため解析をおこなうことができず、今後行っていきたいと考える。

今回の結果では、ASD 群において M2 マクロファージの異常を想定していたが、測定したサイトカインでは M2 マクロファージの異常はみられず、ASD 群における M1 マクロファージの TNF- α の高値であることが特定された。また、ASD 診断において、近年癌研究などで用いられている各分子発現量の M1/M2 比について検討したところ、特に TNF- α の M1/M2 比が、尤度比 16.55 と診断効率が高値であり、高機能 ASD 群のバイオマーカーとなる可能性について明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahira Yamauchi, Manabu Makinodan, Michihiro Toritsuka, Kazuki Okumura, Yoshinori Kayashima, Rio Ishida, Naoko Kishimoto, Masato Takahashi, Takashi Komori, Yasunari Yamaguchi, Ryohei Takada, Kazuhiko Yamamuro, Sohei Kimoto, Yuka Yasuda, Ryota Hashimoto, Toshifumi Kishimoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Tumor necrosis factor- expression aberration of M1/M2 macrophages in adult high-functioning autism spectrum disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autism research	6. 最初と最後の頁 2330-2341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/aur.2585	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内崇平 牧之段学 奥村和生 萱島善徳 高田涼平 鳥塚通弘 岸本年史
2. 発表標題 TNF- expression ratio of M1/M2 macrophages is a potential adjunctive tool for the diagnosis of autism spectrum disorder
3. 学会等名 第43回生物学的精神医学会、第51回日本神経精神薬理学会、合同年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 山内崇平
2. 発表標題 自閉スペクトラム症のマクロファージ解析
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2018年～2019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	紀本 創兵 (KIMOTO Sohei) (00405391)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	
研究分担者	鳥塚 通弘 (TORITSUKA Michihiro) (20588529)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	

	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
研究協力者	牧之段 学 (MAKINODAN Manabu)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (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