

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12602  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2019  
課題番号：18K15508  
研究課題名(和文) オキシトシン-グリア関連に着目した自閉症スペクトラム障害病因病態メカニズムの解明  
  
研究課題名(英文) Analysis of OXT function in glial cells in the pathology of Autism spectrum disorder  
  
研究代表者  
平岡 優一 (Hiraoka, Yuichi)  
  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教  
  
研究者番号：00778681  
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)：自閉症スペクトラム障害(ASD)は数多くの疾患関連遺伝子が同定されるなど盛んに研究が進められているが、依然として有効な治療法や予防法は確立されていない。本研究ではオキシトシンとグリア細胞の関連に着目し、新規ASD病態モデル動物の作製を行った。生涯に渡り多様な機能を持つオキシトシンの関連を解析するため、時空間条件依存的制御が可能なモデルの作出を目指し、CRISPR/Cas13システムによる遺伝子ノックダウンを検討したが、*in vitro*では十分な効率が得られたが*in vivo*ではうまくいかなかった。そこでカルシウムシグナル阻害を用いてOXTR下流シグナル阻害モデルマウスを作出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
本研究では当初目標とした自閉症スペクトラム障害病態の解明には至らなかったが、その過程で新規な技術の開発に成功した。CRISPR/Cas13システムは、ゲノム情報を改変せずに遺伝子発現制御が可能な技術であり、現在利用されている遺伝子治療技術と比較してより安全な治療法の基礎となりうる技術である。また、新規に開発されたカルシウムシグナル阻害マウスは、オキシトシン受容体に限らず多くのGタンパク質共役型受容体研究に応用が可能である。Gタンパク質共役型受容体は昨今多くの疾患において注目される創薬標的であり、本計画で作出されたモデルマウスが今後の新規治療法開発の場において利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorder (ASD) is a common neurodevelopmental disorder but no effective cures has been identified. Recent studies have shown amelioration of ASD symptoms by intranasal administration of oxytocin(OXT) and demonstrated the association of polymorphisms in the oxytocin receptor (Oxtr) gene with ASD patients. In this back ground, many researchers are focusing on OXT in ASD pathology with OXT receptor (OXTR) on neurons but few are focused on glial cells. In this study, I purposed to establish novel model animal which focused on the relationship between OXT and glial cells in ASD.  
ASD is a kind of developmental disorder but OXT has various functions through the lifespan. To exclude the effects not related to developmental stage, Oxtr expression must be regulated in spatio-temporal manner. CRISPR/Cas13 system was utilized to solve this problem, and OXTR expression was successfully suppressed *in vitro* but not *in vivo*.

研究分野：神経科学

キーワード：CRISPR/Cas13 オキシトシン アストロサイト

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害(ASD)は社会性機能の異常を主徴とし、注目を集めている器質性神経発達障害の一つである。ゲノム解析技術の進歩から数多くの疾患関連遺伝子が同定されるなど盛んに研究が進められていたが、その病因病態の分子メカニズムは依然として謎に包まれており、有効な治療法や予防法は確立されていなかったが、神経ホルモンの一種として知られるオキシトシン(OXT)の経鼻投与が ASD 患者のコミュニケーション障害や過剰な攻撃性などの症状を緩和するという報告があり、ASD の病態における OXT の働きに急速に注目が集まっていた。一方で、OXT に着目した研究の多くは発症後の病態における機能について解析を行っているため、OXT に関わる異常が ASD 病態の成り立ちに重要なかどうかは依然として不明であった。また、OXT に対する受容体(OXTR)は脳内全域に渡って発現し、また発現する細胞種も多岐にわたることが、レポーターマウスの解析によって明らかになっていた。にも関わらず現在世界中で進められている OXT 関連研究は神経細胞にのみ注目しており、グリア細胞と OXTR の関連に関しては全く手付かずの状態である。申請者はこれまでに神経発達期における OXT の働きに着目して解析を進めており、OXTR の欠損がヒト ASD 患者と同様な過剰なミクログリアの活性化を引き起こすことを発見し、さらにその活性化を薬理的に抑制することによって OXTR 欠損マウスが本来示す ASD 様症状を予防可能であることを明らかにした。また、ASD と相関の深い脳領域の一つである小脳においては OXTR がアストロサイトのみに発現することや、周産期に過剰な OXT を暴露した脳ではオリゴデンドロサイトが減少することなども見出すなど、OXT が神経のみならずグリア細胞に対しても多彩な機能を持つことで神経発達に影響を及ぼしていることが予想され、OXT-グリア関連の分子基盤を明らかにすることは神経発達のメカニズムを理解し、更には ASD の病態メカニズムを理解する上で非常に意義深いと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では神経発達における「神経ホルモン」と「グリア細胞」の機能に着目しながら神経発達障害の病態メカニズム、特に発症に関わるメカニズムの分子基盤に迫ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ・時空間条件特異的 OXTR 遺伝子発現制御マウスの開発

OXTR 発現は胎生中期から始まり生涯に渡って持続するため、OXT-グリア関連の機能は発生期と病態確立後のどちらに寄与しているかが不明である。そこで OXTR 遺伝子発現を時期特異的に ON/OFF できるマウスを用いて OXT-グリア関連の時期に応じた役割を明らかにする。

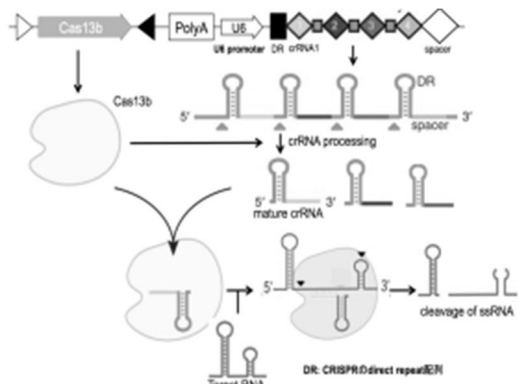
#### ・神経発達期において OXT-グリア関連が小脳神経回路形成に与える影響

小脳は ASD 患者において、萎縮やスパインの過剰形成、ミクログリアの過剰活性化などが報告されており、ASD との相関が強い脳部位である。小脳グリア細胞から特異的に OXTR を欠損させた際に、ASD 脳と同じスパイン増加やミクログリア増加が起きるかを確かめる。またそれらの形態学的異常が ASD 様行動を惹起するかを解析する。

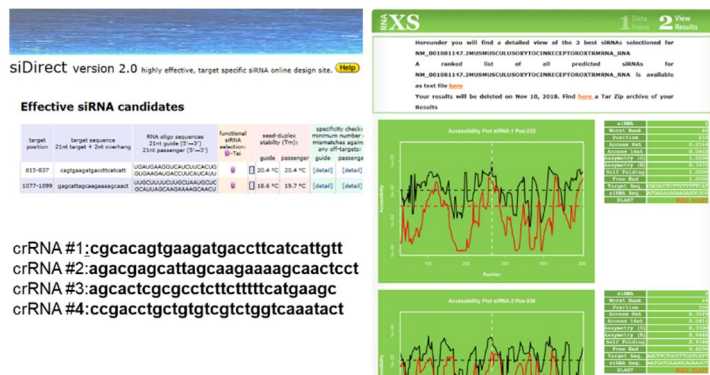
### 4. 研究成果

#### ・CRISPR/Cas13 システムを用いた OXTR 遺伝子発現制御システムの最適化

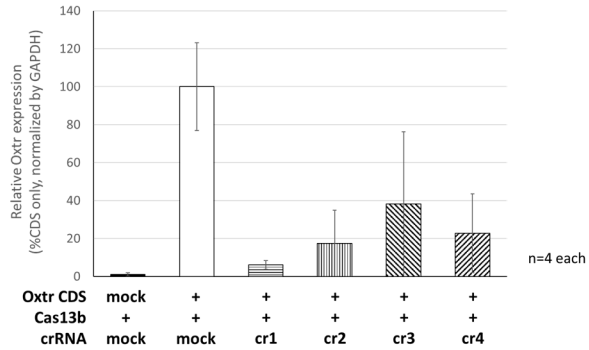
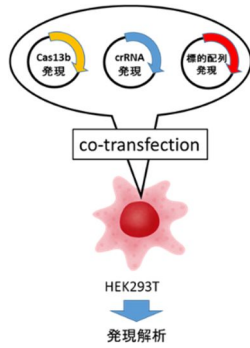
小脳グリア細胞において発達期特異的に OXTR 発現制御を行うため、時空間条件特異的に発現制御可能な実験系の構築が必要であった。当初計画においては PIN-dCas9 (Batra R, 2017) を用いる予定であったが、PIN-dCas9 システムには強制発現を行った際に非特異的 RNA 分解が起きることが判明したため計画を変更し、配列依存的 RNA 分解酵素である Cas13 を用いた CRISPR/Cas13 システムを用いることとした。HEK293 細胞へ Cas13b およびガイド RNA を発現するベクターを導入し、co-transfection した OXTR 遺伝子の発現量を定量 PCR で解析し、最もノックダウン効率のよいガイド RNA 配列を決定した。



CRISPR/Cas13 システムの概要



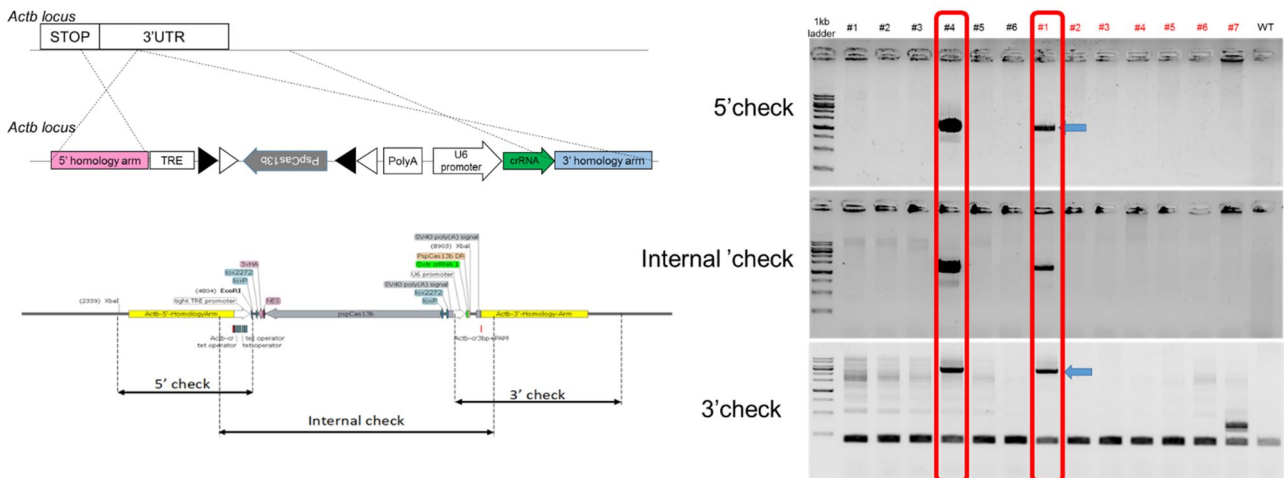
siRNA 設計ツールを用いたガイド RNA 配列の設計



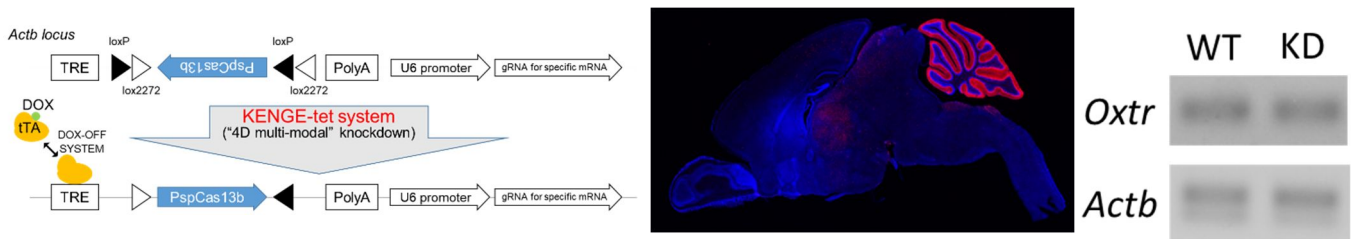
in vitro 実験系を用いたガイド RNA ノックダウン効率の評価

・ in vivo モデル動物の作成

in vitro 実験系での評価をもとに選定したガイド RNA 配列及び Cas13b 発現カセットを含む配列を、安定遺伝子発現座である Actb 遺伝子の 3' UTR 領域へ挿入したマウスを作成した。作成には CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を活用して行い、2 匹のノックイン個体を得た。得られたノックイン個体を Sept4-Cre/Mlc1-tTA マウスと交配し、ドキシサイクリン依存的小脳アストロサイト特異的にノックダウンが行われるか RT-PCR で確認を行ったところ、ほとんどノックダウンが行われないことが明らかになった。



Actb 遺伝子座への Cas13/crRNA 発現カセットノックインマウスの作成



小脳特異的なノックダウンマウスの概要と RFP による発現確認、RT-PCR によるノックダウン評価

・ 小脳アストロサイト特異的なカルシウムシグナル阻害マウスの作成

CRISPR/Cas13 システムの開発者である Dr. Konermann に確認をしたところ、Cas13b の in vivo での応用にはまだ技術的な障害が多いということであった。そこで当初計画を変更し、OXT 受容シグナルの阻害を行うマウスの作出を目指した。OXT 受容時には細胞内カルシウム濃度上昇によってシグナルを伝達する。そこで Cas13 同様の仕組みで、人工的なカルシウムポンプを Cre/tTA 依存的に発現するカセットを Actb 遺伝子座へ挿入したマウスを作成した。現在、作出したマウスを Cre/tTA マウスと交配した産仔の解析を実施中である。

本研究は、計画に必要な遺伝子改変マウスの作出に難航したため、当初想定した研究目標を達成することができなかった。一方で、新規技術である CRISPR/Cas13 システムを利用した in vitro でのノックダウンについては成功しており、今後の解析へこの技術を活用していく予定である。また新たに作成したカルシウムシグナル阻害マウスは OXT 以外の GPCR 研究へ応用可能であり、今後の利用拡大が期待される。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirayama Takashi, Hiraoka Yuichi, Kitamura Eri, Miyazaki Shinji, Horie Kengo, Fukuda Tomokazu, Hidema Shizu, Koike Masato, Itakura Atsuo, Takeda Satoru, Nishimori Katsuhiko	4. 巻 46
2. 論文標題 Oxytocin induced labor causes region and sex specific transient oligodendrocyte cell death in neonatal mouse brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 66 ~ 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.14149	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 平岡優一
2. 発表標題 Cloning-free法を用いた遺伝子改変マウス作製とグリア研究への応用
3. 学会等名 第4回日本ゲノム編集学会ランチョンセミナー（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuichi Hiraoka, Haruka Takigawa, Tomomi Aida, Kenji F Tanaka, Kohichi Tanaka
2. 発表標題 Astrocyte Ca2+ activation in mouse preoptic area elevates body temperature.
3. 学会等名 日本神経科学会第41回大会（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----