

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19271

研究課題名（和文）ヒト脱落乳歯幹細胞を活用した自閉スペクトラム症と概日リズム障害の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of autism spectrum disorders and circadian rhythm disorders using stem cells from human exfoliated deciduous teeth

研究代表者

高山 扶美子（fumiko, takayama）

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、歯髄からSHEDを調製して神経細胞へ分化させ、時計遺伝子の発現パターンを比較することで、自閉症と睡眠障害との関連を解明することを目的とする。健常児と自閉症児各5名の歯髄幹細胞を採取し、神経細胞へと分化させ、時計遺伝子を同調させ、4時間おきに細胞を回収してRNAの抽出を行い、時計遺伝子の発現パターンを比較した。しかし、時計遺伝子の発現量が安定せず、自閉症のみならず健常児においても、安定した発現リズムが得られなかった。そこで、同サンプルを用いて、網羅的解析を行った。結果、自閉スペクトラム症のサンプルにおいて、時計遺伝子や精神疾患関連遺伝子の発現量が有意に低下していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、実際の自閉スペクトラム症（ASD）患者のSHEDを神経細胞に分化させ日内変動を解析することでASD患児における睡眠障害の実態を明らかにし、睡眠障害から派生したASD症状の状態悪化を食い止め、ASD患児およびその家族に福音をもたらし、社会的医療費負担軽減に寄与できると考える。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the relationship between autism and sleep disorders by preparing SHED, differentiating it into nerve cells, and comparing the expression patterns of clock genes. Dental pulp stem cells of 5 healthy children and autistic children were collected and differentiated into nerve cells. Then, the clock genes were synchronized, cells were collected every 4 hours, RNA was extracted, and the expression patterns of the clock genes were compared. However, the expression level of the clock gene was not stable, and a stable expression rhythm could not be obtained not only in autism but also in healthy children. Therefore, a comprehensive analysis was performed using the same sample. As a result, we clarified that the expression levels of clock genes and psychiatric disease-related genes were significantly reduced in the autism spectrum disorder sample.

研究分野：小児歯科学

キーワード：神経細胞 睡眠障害 自閉スペクトラム症 概日リズム障害 SHED

1. 研究開始当初の背景

ASD は「社会的相互作用の障害」、「社会的コミュニケーションの障害」および「限定的な行動・興味・反復行動」を特徴とする広汎性発達障害であり、小児の代表的な精神行動異常疾患で半年から1年までには症状がみられ遅くとも3歳までには診断がつくが、その症状は一生にわたる。以前は1,000人あたり数人の発症頻度と言われてきたが、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、病態解明に期待が寄せられている。

ASD では一般的な小児に比較し 4~

8 割と睡眠障害の頻度が高く、概日リズム障害は一般の小児が1%に対し ASD では 35%に及ぶ。睡眠障害は、常同行動の増加や社会的スキルの低下、イライラ・衝動性の増悪をもたらし、一見したところ ASD 症状の増悪と捉えられる状態を引き起こすことがある。

昼夜における神経活動の変化は、シナプス密度およびシナプス活動性の日内変化に基づくことが知られており (Maret S et al., Nat Neurosci, 2011)、睡眠障害を特徴とする ASD 患児はシナプス活動性の日内変化が破綻していることが示唆される。さらに、自閉症の一種である Rett 症候群のモデルマウスに体内時計

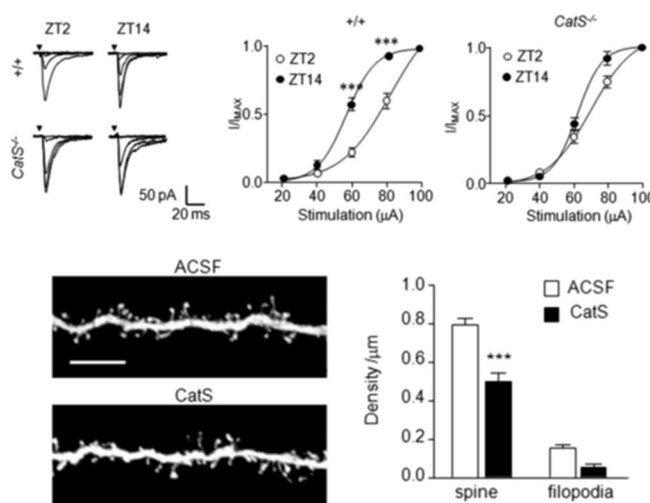


図1. CatS^{-/-}のシナプス活動およびスパイン密度日内変化の欠失

の異常があること (Tsuchiya et al., Genes to Cells, 2015)、自閉

症の睡眠・覚醒リズム障害が縫線核セロトニン系神経系の障害に起因し、乳児期の概日リズム矯正により自閉症の症状が軽減されることが報告されている。申請者は、脳内の免疫細胞であるミクログリアが、内在する時計遺伝子の発現を介して P2Y6 受容体依存的に脳内での食食反応を制御していること (Takayama et al., Sci Rep. 2016)、ミクログリア特異のプロテアーゼであるカテプシン S は時計遺伝子の制御下にあり、その欠損マウスにおいて シナプス活動ならびにスパイン密度の日内変化が欠失し (図1)、社会的コミュニケーションが障害される (図2) ことを明らかにした (Takayama et al., BBRC, 2017)。

さらに最近申請者は、ヒト脱落乳歯由来幹細胞 (SHED) を神経細胞へ分化させることに成功し、健常児と比較し 自閉症児の神

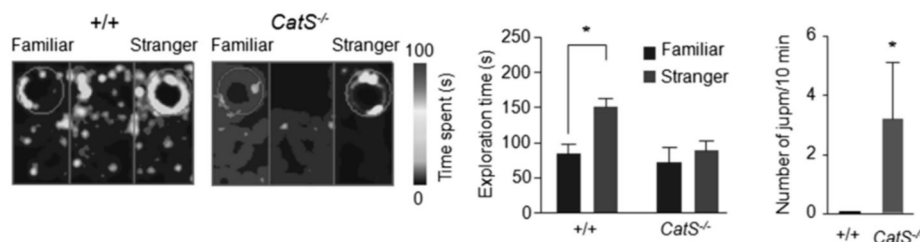


図2. CatS^{-/-}の社会的コミュニケーションの欠失

経細胞突起が有意に短く、ミトコンドリア活性および細胞内 ATP、カルシウムレベルが有意に低下していることを明らかにした

(Huong et al, Biochemistry and Biophysics Reports, 2018)。

そこで、本研究では ASD 患児における睡眠障害に焦点を当て、ASD 患者の SHED から分化させた神経細胞を用いて時計遺伝子の発現解析を行うことで同疾患の病態解明を行うことを目的とする。

2. 研究の目的

自閉症スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder, 以下 ASD) では健常児に比較し 4~8 割と睡眠障害の頻度が高く、Sacco らは ASD 患者における概日リズム障害と遺伝子の変異を示唆している (Sacco et al., 2010)、その詳細なメカニズムは不明である。夜間睡眠の短縮により社会的スキルの低下、衝動性の増悪、常同行為の増加をもたらす (Schreck et al., 2004)、睡眠障害が発達障害の症状をより強くすることが報告されている。すなわち ASD 患児において睡眠は脳神経発達に大きく関与するため、適切な睡眠を確保することが重要である。

そこで本研究では、ASD 患児から単離したヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) を用い、(1) SHED を分

化させた神経細胞の日内動態の解析 (2)網羅的解析による睡眠障害の原因遺伝子同定 (3)新しい治療法や創薬開拓に繋がる基盤研究法を提供することを目的とする。

3. 研究の方法

1. SHED を用いた時計遺伝子の発現解析

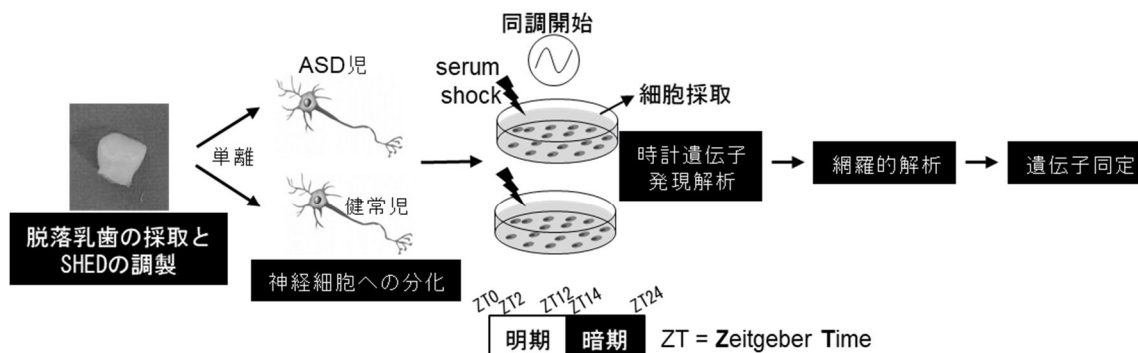


図3. 時計遺伝子の発現解析と網羅的解析

九州大学病院小児歯科・スペシャルニーズ歯科で、健常児と ASD 患児の乳歯を保護者の同意のもと採取し、歯髄から SHED を調製して神経細胞へ分化させ、時計遺伝子の発現解析を行う。時計遺伝子の同調は serum shock を与えることで開始する。4 時間

おきに細胞を回収して RNA 抽出を行い時計遺伝子の発現を解析し、健常児と自閉症児における時計遺伝子の発現パターンを比較する。

2. 神経細胞の網羅的解析

1 で得られた時計遺伝子発現量のうち、最も有意差がみられた時間帯で RNA を回収し、遺伝子発現の網羅的解析を行う。網羅的解析には CAGE (Cap Analysing of Gene Expression) 法を用いる。発現変動が認められた遺伝子の転写開始点情報をもとにプロモーター解析を行うことで時計遺伝子の発現を調節している遺伝子群を特定する。

3. RNAi を用いた時計遺伝子の発現解析

健常児の SHED から分化させた神経細胞に 2 の結果から同定された原因遺伝子の siRNA や阻害剤によるノックダウンを行い、1 と同様に同調を行った後に RNA を回収する。時計遺伝子の発現パターンの解析を行い、原因遺伝子のノックダウンにより日内変化が消失することを確認する。

4. ゲノム編集 (CRISPR/Cas9) 技術による遺伝子改変マウスを用いたシナプス機能解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて 2 の結果から得られた原因遺伝子のノックアウトマウスを作製し、前頭前野におけるシナプス機能(シナプス伝達、シナプス可塑性)の日内変化についてスライスパッチクランプ法を用いて解析する。

5. 遺伝子改変マウスを用いた行動解析

4 で作成したノックアウトマウスを用いて社会行動障害との関係を解析する。3-コンパートメントチャンバーを使用し、social interaction 試験を行い野生型マウスと比較する。

6. 遺伝子改変マウスを用いた神経細胞形態解析

4 で作成したノックアウトマウス前頭前野の切片を作製し、神経細胞および樹状突起スパインの日内変化について形態解析を行う。

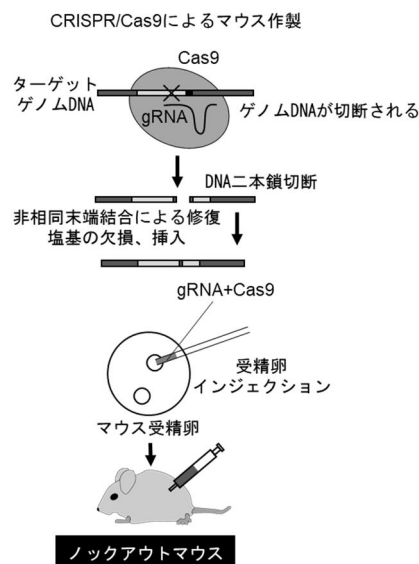


図4. (CRISPR/Cas9) 技術による遺伝子改変マウスの作製

4. 研究成果

当初の研究計画通り、健常児と自閉症児各 5 名の歯髄幹細胞を採取した。採取した歯髄幹細胞を調整して神経細胞へと分化させた。その分化させた神経細胞の培養を行い、serum shock を与えて時計遺伝子を同調させた。4 時間おきに細胞を回収して RNA の抽出を行い、時計遺伝子の発現パターンを比較した。しかしながら、時計遺伝子の発現量が安定せず、自閉症のみならず健常児においても、現時点で安定した発現リズムが得られなかった。そこで、自閉症および健常児のサンプルで、時計遺伝子の発現量に最も差がみられたポイントにおいて、網羅的解析を行った。網羅的解析には CAGE (Cap Analysing of Gene Expression) 法を用いた。結果、健常児と比較して、自閉スペクトラム症のサンプルにおいて、Bmal1 等

の時計遺伝子や、その他精神疾患に関わる遺伝子の発現量が有意に低下していることが明らかになった。しかしながら、サンプル間のばらつきがみられ、その下流の遺伝子の有意差は明らかになっていないため、サンプル数を増やしてさらなる詳細な解析が必要であった。また、当初の計画通り、時計遺伝子の発現リズムを確立できていないため、今後は発現リズムを確立させ、最も有意差がみられた時間でのサンプルを用いて CAGE を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------