

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03570

研究課題名(和文) 脳内免疫システムの破綻がもたらす脳発達障害の病態機序の解明

研究課題名(英文) Pathological mechanism of neurodevelopmental disorders caused by the disruption of neuroimmune system

研究代表者

田辺 章悟 (Tanabe, Shogo)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 神経薬理研究部・室長

研究者番号：40772166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳の発達期における過剰な免疫応答は正常な脳の発達を阻害し、通常形成されない神経回路が作られることで脳発達障害に発展するが、その分子メカニズムは不明であった。本研究では、自閉症スペクトラム障害や発達期の髄膜炎を対象にして脳内免疫システムの異常が脳発達障害を発症させる分子メカニズムの解明を目的に研究を行った。発達期のマウスの炎症により顕著な行動異常が観察され、その分子メカニズムを免疫系細胞と神経の細胞培養実験や免疫系細胞の細胞除去実験、ウイルスベクターによる神経のトレーシング実験、RNA-seqの解析により解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、自閉症スペクトラム障害や髄膜炎を対象に免疫系の異常に伴う脳発達障害の発症メカニズムを解明した。免疫系による異常な神経回路形成のメカニズムを分子レベルで解明することで発達期の炎症によって引き起こされる脳発達障害の発症を予防する新たな治療標的が発見されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although aberrant immune responses during brain development inhibit normal brain development and create neural circuits that do not normally form, leading to neurodevelopmental disorders, the molecular mechanisms have been unclear. In this study, we elucidated the molecular mechanisms by which abnormalities in the neuroimmune system cause neurodevelopmental disorders by focusing on autism spectrum disorders and neonatal meningitis. We observed behavioral abnormalities due to inflammation in developing brain, and identified the neural circuits that cause brain developmental disorders and their molecular mechanisms through cell culture experiments, cell depletion, neural tracing experiments, and RNA-seq analysis.

研究分野：神経科学

キーワード：脳発達障害 脳内免疫システム

1. 研究開始当初の背景

近年の遺伝子多型の解析により、脳発達障害の発症には免疫関連分子が関係していることが明らかになってきた。元来、脳は免疫系が欠如している臓器と認識されていたが、近年の研究により脳の特定の領域には免疫系細胞が局在しており、脳機能を制御していることを示す知見が蓄積している。脳内に常在している免疫系細胞であるミクログリアはシナプスの形成や軸索の伸長に関与し、T細胞は抑制性ニューロンの神経回路形成を制御していることが報告されている。このように、脳内免疫システムは様々な形で脳内の神経回路の形成を制御するが、脳発達障害へ関与する詳細な分子メカニズムはほとんど解明されていない。脳で正常に神経回路が発達するためには、適切な時期に適切な構造が造られる精緻なシステムが必要である。免疫系と神経系のクロストークはそのシステムにおける重要なファクターであり、脳発達障害では、そのシステムが破綻して正常な神経回路形成が行われていない可能性が考えられる。脳の発達期において、脳内の免疫系細胞は生体とは異なるサブpopulationを示し、ミエリンやシナプスの形成をサポートすることで脳の発達に寄与している。母体のウイルス感染や新生児期における微生物感染などにより脳で炎症が生じるとシナプスの異常形成やミエリンの形成不全により脳発達障害を発症する事例が多数報告されている。しかし、発達期の免疫応答がどのように脳発達障害を引き起こすのかという詳細な分子メカニズムは不明であった。本研究では、自閉症スペクトラム障害や新生児期の髄膜炎を対象に発達期の過剰な免疫応答が異常な神経回路の形成を促し、脳発達障害を引き起こす分子メカニズムを解明する。免疫系による異常な神経回路形成のメカニズムを分子レベルで解明することで発達期の炎症によって引き起こされる脳発達障害の発症を予防する新たな治療標的が発見されることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、発達期における脳内免疫システムの異常が脳発達障害を引き起こす分子メカニズムを解明する。脳発達障害の発症に関わる細胞や遺伝子を同定するとともに異常な神経回路の形成メカニズムを分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、ミクログリアにおける自閉症スペクトラム障害関連遺伝子の機能解析と新生児期の髄膜炎に伴う脳発達障害を対象に研究を行った。自閉症スペクトラム障害はこれまでに多数の遺伝子変異が知られており、その中でも *Chd8* と *Tsc2* は発生期のミクログリアに発現が認められる。ミクログリアは神経細胞やグリア細胞の発生に寄与することから、ミクログリアにおける *Chd8* と *Tsc2* の機能異常が脳の発達に影響を与える可能性を検証した。ミクログリアにおける *Chd8* と *Tsc2* の発現を RNA interference (RNAi) により抑制し、神経系細胞の発生に及ぼす影響を細胞培養実験により検討した。また、*Chd8* と *Tsc2* の発現を抑制させた初代培養ミクログリアを用いた RNA-seq により自閉症スペクトラム障害関連遺伝子が制御する遺伝子群を同定した。生体内のミクログリアにおける *Chd8* と *Tsc2* の機能を検証するため、mutated Adeno associated virus 6 (mAAV6) (Rosario et al., *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2016) を胎児の脳室内に投与して発生期のミクログリアにおける *Chd8* と *Tsc2* の発現を抑制させた。

発達期のマウスに髄膜炎を誘導するため、炎症性物質であるカラギーナンを大槽に投与し、脳に集積する免疫系細胞の数の種類をフローサイトメトリーにより解析した。発達後に行動異常が観察されるのかを検証するため、明暗選択箱、オープンフィールド、高架式十字迷路、プレパルス抑制、バーンズ迷路試験を行い、不安行動、多動行動、注意機能、認知機能に影響があるのかを解析した。神経症状を引き起こした免疫系細胞を特定するため、フローサイトメトリーで脳内に局在する免疫系細胞の種類を解析し、候補となった細胞を毒素の投与により除去した。異常が生じている神経回路を特定するため、神経が過剰に活動している領域を組織学的に探索するとともに、AAV を用いて薬理遺伝学的に神経活動を操作する実験を行った。免疫系細胞が異常な神経回路の形成を誘導する分子メカニズムを解明するため、脳から単離した免疫系細胞を用いた RNA-seq と Gene ontology (GO) 解析により候補分子を特定し、その分子に対する機能阻害抗体を投与して髄膜炎による神経症状が抑制されるのかを解析した。

4. 研究成果

(1) ミクログリアにおける自閉症スペクトラム障害関連遺伝子の機能解析

ミクログリアにおける *Chd8* と *Tsc2* の発現を siRNA あるいはレンチウイルスによる shRNA を用いて抑制させ、神経幹細胞と共培養させた。通常、ミクログリアと共培養することでミエリンを形成するグリア細胞であるオリゴデンドロサイトへの分化が促進されるが、*Chd8* あるいは *Tsc2* の発現を抑制させることでミクログリアによるオリゴデンドロサイトへの分化促進効果が抑制された。そのメカニズムを解明するため、*Chd8* あるいは *Tsc2* の発現を抑制させたミクログリアを用いた定量的 RT-PCR や RNA-seq を行ったところ、神経保護因子でありオリゴデンドロサイトの分化を促進させる作用を持つ *Igf1* の発現が抑制されていた。生体内のミクログリアにおける *Chd8* や

*Tsc2*がオリゴデンドロサイトの分化制御に関わるのかを検証するため、ミクログリアに感染しやすいよう改変されたmAAV6に*Chd8*と*Tsc2* に対するshRNAをコードし、子宮内の胎児脳の脳室に投与した。ミクログリア特異的にmAAV6が感染していることが確認され、脳から単離したミクログリアではin vitroの時と同様に*Igf1*の発現が減少していることが確認された。さらに、新生児期における脳梁、前交連、線条体におけるオリゴデンドロサイトの数を定量したところ、*Chd8*あるいは*Tsc2* に対するshRNAを投与したマウスでは成熟したオリゴデンドロサイトの数が減少していた。これらの結果から、ミクログリアにおける*Chd8*あるいは*Tsc2* は*Igf1*の発現を制御することでミクログリアによるオリゴデンドロサイトへの分化促進効果をサポートすることが示唆された。

(2) 新生児期の髄膜炎に伴う脳発達障害の発症機序の解明

発達期のマウスに対してカラギーナンを投与することで髄膜炎を誘導し、フローサイトメトリーにより脳内に浸潤する免疫系細胞の数と種類を解析した。その結果、CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、マクロファージといった免疫系細胞数が大きく増加していた。また、CD4⁺ T細胞は脳の実質には浸潤せず髄膜に局在していたのに対し、マクロファージは脳実質に多く浸潤している組織像が観察された。発達期の髄膜炎が脳発達障害を引き起こすのかを検証するため、成熟後に行動学的な解析を行ったところ、オープンフィールド試験において多動行動が観察された。この行動異常に関連する脳領域を同定するために組織学的な解析を実施したところ、線条体の一部で過剰な神経活動が観察された。また、薬理遺伝学的に神経活動を抑制させるhM4D (Gi)-mCherryをコードしたAAVを投与することで当該脳領域の活動を抑制させたところ、髄膜炎に伴う行動異常が緩和された。さらに、髄膜炎を誘導したマウスでは同領域に局在する神経におけるシナプス数の増加が確認された。これらの結果から、髄膜炎を誘導したマウスでは線条体の一部の領域でシナプスが過剰に形成されることで行動異常を引き起こされた可能性が示唆された。

フローサイトメトリーの結果から、マクロファージが非常に多く脳内に観察されている。髄膜炎に伴う行動異常にマクロファージが関わる可能性を検証するため、マクロファージを特異的に死滅させる毒素を投与したところ、髄膜炎に伴う過剰な神経の活性化や行動異常が抑制された。脳内に浸潤したマクロファージの性質を解析するため、マクロファージをcell sortingにより単離してbulk RNA-seqを行った。主成分分析からカラギーナンを投与したマウスから単離したマクロファージは通常のマクロファージとは全く異なる遺伝子発現パターンを示すことが明らかになり、多くの発現変動遺伝子が検出された。発現変動遺伝子からGO解析を行ったところ、発現が増加していた遺伝子は炎症や自然免疫、神経の突起伸長に関連するGO termに多くannotationされ、発現が減少していた遺伝子からはエピジェネティクスな制御に関わる遺伝子が多く検出された。髄膜炎に伴うシナプスの過剰形成に関わる遺伝子は、神経に直接作用できることから細胞外に局在する神経回路の形成に関わる遺伝子であると考えられる。RNA-seqで発現が上昇していた遺伝子の中からGO解析により'Cellular Component: extracellular space', 'Biological Process: regulation of neuron projection'の双方にannotationされている遺伝子を探索した。その結果、該当する遺伝子を同定することができ、当該遺伝子がコードするタンパク質に対する機能阻害抗体を髄膜炎誘導マウスに投与したところ、シナプスの過剰形成や行動異常が抑制された。以上の結果から、髄膜炎により誘導されたマクロファージは当該遺伝子を分泌することでシナプスの形成を過剰に促進させて脳発達障害を引き起こすことが示唆される。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuta Takanezawa, Shogo Tanabe, Daiki Kato, Rie Ozeki, Masayo Komoda, Tatsunori Suzuki, Hiroko Baba, Rieko Muramatsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Microglial ASD-related genes are involved in oligodendrocyte differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97257-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shogo Tanabe, Yuta Takanezawa, Rieko Muramatsu
2. 発表標題 Microglial ASD-related genes are involved in oligodendrocyte differentiation
3. 学会等名 第23回韓日合同薬理学セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shogo Tanabe, Rieko Muramatsu
2. 発表標題 Neonatal meningitis induces hyperactivity and attention-deficits behavior by increasing dopaminergic inputs
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 3. 田辺章悟、村松里衣子
2. 発表標題 発達期の髄膜炎に伴う脳発達障害の分子病態メカニズム
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------