

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461545

研究課題名(和文) 幼弱脳におけるプロスタグランジンD2を介したミクログリア-神経相関の解明

研究課題名(英文) Neuroinflammation by PGD2 affects neurodevelopment during perinatal period

研究代表者

毛利 育子 (Mohri, Ikuko)

大阪大学・連合小児発達学研究所・准教授

研究者番号：70399351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：米国Autism Tissue Programから自閉症およびコントロールの剖検脳組織の供与を受け免疫染色を行った。自閉症脳ではミクログリアが増加している事および、それらのミクログリアは造血器型プロスタグランジンD合成酵素(HPGDS)陽性であることを見いだした。脳組織より抽出したmRNAを用いて定量的RT-PCRを行い、自閉症脳ではHPGDS, IL-6, TGF-beta1が有意に増加していることを確認した。これらの所見は自閉症で異常が示唆されている前頭葉で認められたが、後頭葉では認められなかった。さらに、培養神経細胞においてPGD2刺激により樹状突起数が増加することをみいだした。

研究成果の概要(英文)：Brain tissues of autistic patients and controls with no neurological symptoms were obtained through the Autism Tissue Program. Using Paraffin slice, we found increased number of hematopoietic prostaglandin D synthase (HPGDS)-positive microglia in the frontal lobe of the autistic brain. Quantitative RT-PCR revealed that the levels of HPGDS mRNA, IL-6 mRNA and TGF-beta1 mRNA were significantly higher in autistic brains than control brains, in the frontal lobe, but not in the occipital lobe. Using primary cultured neuron, we found that the number of dendrite is significantly increased by PGD2 receptor agonist. Many data suggested the frontal lobe dysfunction in autistic patients. Our findings were compatible those findings and may lead understanding the pathogenesis of autism.

研究分野：小児神経、神経病理

キーワード：ミクログリア 自閉症 神経発達 神経炎症 プロスタグランジンD2

1. 研究開始当初の背景

自閉症は「社会性の障害」「コミュニケーションの障害」「想像力の障害」とされているが、ドーパミン系、セロトニン系、GABA系など、様々な神経系の異常を認め、病態上の主座がシナプスにあること、また、生後の樹状突起棘の刈り込み異常が病態に関与していること(Hutsler and Zhang. Brain Res. 2010)が知られてきている。さらに、自閉症脳においてミクログリアが増加していること(Morgan et al. Biol Psychiatry. 2010)、PET 研究で成人の自閉症で活性化ミクログリアが正常に比し増加していることが示され(Suzuki et al. 2013)、ミクログリアを中心とした神経炎症機序が自閉症発症に関与していることが大きな注目をあつめている。胎内感染や周産期の低酸素イベントなどが自閉症発症リスクを高め(Gardener et al. Pediatrics. 2011)胎内から病態発生が始まっていると考えられることを併せて、幼弱脳における炎症機転が自閉症発症に重要な影響を与えると考えられる。

我々は長年脳における炎症担当細胞であるミクログリアの神経炎症における役割を研究してきた。ミクログリアは脳障害がおこると静止型から活性型に形態的に変化を遂げ、細胞残渣を貪食し、様々なサイトカインを含む炎症物質を産生・放出する。我々は活性化したミクログリアが、造血器型 PGD 合成酵素(HPGDS)を発現し、強力な炎症メディエータであるプロスタグランジン D₂(PGD₂)を産生する事を見いだした(Mohri et al. Glia, 2003)。また、PGD₂ 特異的受容体である DP1 および DP2 を介したシグナル伝達を通じてアストロサイトの活性化も引き起こすことも見いだしている(Mohri et al., J Neurosci, 2006)。

近年アストロサイトの傍シナプス終足がシナプスを調節すること(Shavit et al. J Neurochem. 2011)が多くの研究で見いだされている。さらに、予備的検討にて GFAP 陽性ラディアルグリアに DP1 が発現していること

も見いだしており、我々はミクログリアが産生する PGD₂ がラディアルグリアに何らかの作用を及ぼし神経遊走に影響を与えている可能性を示している。

一方、我々は、正常マウス幼弱脳において、生後2週までミクログリアが遊走しながら HPGDS を強発現し、不要な細胞を貪食していることを見いだした(Mohri et al. Glia, 2003)。マウスでは生後2週までプログラムされたシナプス形成が進むが、正常脳の発達においてシナプス数をミクログリアが調節していることが報告されている(Paolicelli et al. Science. 2011)。我々が見いだした HPGDS の強発現はこのシナプス形成の時期と一致している(Mohri et al. Glia, 2003)。シナプスが形成後も、シナプス伝達の際にミクログリアがシナプスに突起をのぼして、シナプス調節をしていることや、神経からの刺激によりミクログリアが神経保護因子を産生放出すること(Nakajima et al., 2007、Neurochem Int)など、ミクログリアー神経連関が近年注目されてきている。以上の証拠より、我々は幼弱脳におけるミクログリアの活性化は樹状突起棘の刈り込みやシナプス調節に関与しているとの仮説をたてている。

これまでの研究で、我々はマウスモデルを用い、進行性脱髄疾患であるクラッペ病(Mohri et al., J Neurosci, 2006)、アルツハイマー病(Mohri et al., J Neuropathol Exp Neurol, 2007)、新生児脳性麻痺の原因である低酸素性虚血性脳症(Taniguchi et al., J Neurosci, 2007)、脊髄損傷(Redensek et al. 2011)など様々な疾患で HPGDS がミクログリアに発現し、炎症増悪に関与していることを報告した。PGD₂ は DP1 および DP2 を介したシグナル伝達を通じて、ミクログリア自身やアストロサイトを活性化し、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 などの向炎症性サイトカイン産生を促進することにより、二次的な障害拡大に関与している。我々は、クラッペ病モデルマウスおよび筋ジストロフィーモデルマウスを使った研究で、HPGDS 阻害剤投

与により炎症を抑制し、疾患の進行を阻害できることも報告した (Mohri et al., J Neurosci, 2006, Mohri et al., J.Path. 2009)。このように HPGDS の阻害剤、PGD₂ 拮抗剤が開発されているため、自閉症病態発生における PGD₂ の関与が確認されれば、新しい治療開発に結びつく可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、自閉症脳における HPGDS の発現増加を確認し、さらにその生理的意義を明らかにするため、幼弱脳における PGD₂ シグナルのミクログリアやアストロサイトの活性化における作用、さらには、シナプス形成における作用を調べ、炎症自閉症仮説のモデルを確立する。

3. 研究の方法

米国 Autism Tissue Program から自閉症脳およびコントロール脳の供与を受け、ミクログリアのマーカーである CD68 および抗 HPGDS 抗体を用いて免疫染色を行い、ミクログリア、および HPGDS 陽性細胞数をカウントする。さらに、脳組織から RNA を抽出し、LightCycler システム (Roche Diagnostics) を用いて定量的 RT-PCR にて HPGDS およびその受容体、また、炎症生サイトカインの mRNA を定量する。

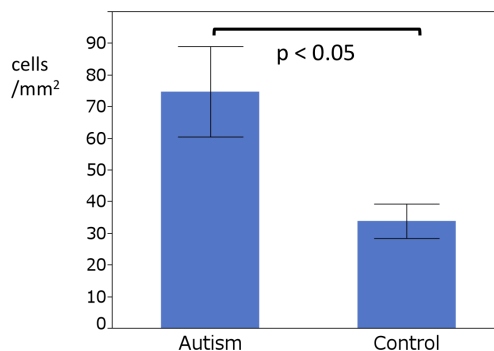
また、マウス新生仔にミクログリアの活性化が始まる日齢 5 より HPGDS 阻害剤 (HQL-79) もしくは PGD₂ 作動薬 (BW246C) または vehicle (0.5% methylcellulose) を連日皮下投与し、日齢 20 で深麻酔下にて断頭し、脳をサンプリングする。パラフィン切片を作成し、HPGDS および DP1 による免疫染色をおこない、発現の変化を見る。さらに、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ニューロンそれぞれのマーカーで免疫染色し、vehicle 投与群と細胞動態を比較する。

4. 研究成果

米国 Autism Tissue Program から自閉症脳 18

ケース (平均年齢 14.7 歳) コントロール脳 27 ケース (平均 26.2 歳) の供与を受けた。パラフィン切片を用い、ミクログリアのマーカーである CD68、HPGDS の免疫染色では、自閉症脳の前頭葉および小脳で有意に陽性細胞数が増加していた。また、CD68 と HPGDS

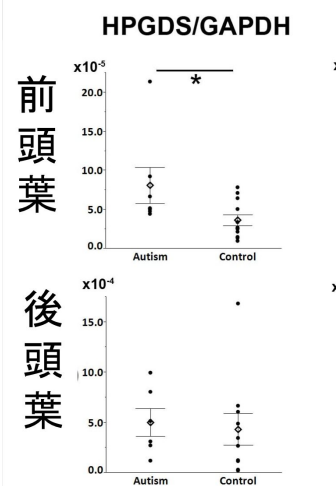
前頭葉における HPGDS 陽性細胞数



の二重染色を行い HPGDS 陽性細胞はミクログリアであることを確認した。しかしながら、後頭葉ではいずれの増加も認めなかった。

また、脳組織から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を行い、HPGDS, PGD₂ の受容体である DP1, DP2, 炎症生サイトカインである IL-6, TGF-beta1 の RNA の定

量を行った。結果、自閉症脳の前頭葉ではコントロールに比し、HPGDS, IL-6, TGF-beta1 が有意に増加していたが、後頭葉では差は認めなかった。



幼若脳における HPGDS の役割を調べるため、マウス新生仔に日齢 5 より HQL-79 もしくは BW246C または vehicle を連日皮下投与をおこなったところ、HPGDS 阻害剤投与では体重増加不良が生じサンプリング予定日まで生存できず、実験の継続が困難であった。

神経細胞のプライマリカルチャーを用い、

PGD₂が神経発達にどのような影響を与えるかを検討するため、周産期に相当する神経発達段階で PGD₂ 受容体アゴニストを投与したところ、樹状突起の有意な増加を認めた。

これらの結果より、幼若期におけるミクログリアの活性化と引き続きいて生じる HPGDS の増加による PGD₂ 産生増加が神経発達に影響を及ぼす可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1. Hanaie R, Mohri I, Kagitani-Shimono K, Hirata I, Matsuzaki J, Nagatani F, Watanabe Y, Taniike M. White matter volume in the supramarginal gyrus and brainstem is related to motor dysfunction in children with autism spectrum disorder: A voxel-based morphometry study. Autism Research, in press
2. Hirata I, Mohri I, Kato-Nishimura K, Tachibana M, Kagitani-Shimono K, Ohno Y, Ozono K, Taniike M. Sleep problems including obstructive sleep apnea are more frequent and associated with problematic behaviors in preschoolers with autism spectrum disorder. Research in Developmental Disabilities.
3. Yasuda Y, Hashimoto R, Fukai R, Okamoto N, Hiraki Y, Yamamori H, Fujimoto M, Ohi K, Taniike M, Mohri I, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Miyake N, Takeda M. Duplication of the NPHP1 gene in patients with autism spectrum disorder and normal intellectual ability: a case series. Ann Gen Psychiatry. 2014 Aug 6;13:22. doi: 10.1186/s12991-014-0022-2. eCollection 2014.
4. Progressively Increased M50 Responses to Repeated Sounds in Autism

Spectrum Disorder with Auditory

Hypersensitivity: A

Magnetoencephalographic Study. Matsuzaki J, Kagitani-Shimono K, Sugata H, Hirata M, Hanaie R, Nagatani F, Tachibana M, Tominaga K, Mohri I, Taniike M. PLOS ONE, 23 : 9 (7), 2014 .

5. Abnormal corpus callosum connectivity, socio-communicative and motor deficit in children with autism spectrum disorders: A diffusion tensor imaging study. Hanaie R, Mohri I, Kagitani-Shimono K, Tachibana M, Azuma J, Matsuzaki J, Watanabe Y, Fujita N, Taniike M. Journal of Autism and Developmental Disorders, 44(9):2209-2220, 2014 .
6. Correlations between the Broad Autism Phenotype and Social Cognition among Mothers of Children with Autism Spectrum Disorder.
7. Hasegawa K, Sakai S, Okuno H, Eto M, Kagitani-Shimono K, Mohri I, Taniike M. Japanese Journal of Research on Emotions, 21(3): 143-155, 2014 .

[学会発表](計 2件)

- ・第16回 ORIGIN 神経科学研究会2015.8.17. 山口. 毛利育子, 早田敦子, 橋本均, 谷池雅子. 自閉症脳におけるprostaglandin D₂の関与.
- ・ Society for Neuroscience 2015, Chicago, USA Oct 19-21, 2015. Abnormal cerebellar functional connectivity in children with autism spectrum disorder . Hanaie R, Mohri I, Kagitani-Shimono K, Hirata I, Matsuzaki J, Nagatani F, Watanabe Y, Taniike M.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

毛利 育子 (Ikuko Mohri)
大阪大学・連合小児発達学研究所・准教授
研究者番号：70299251

(2)研究分担者

谷池雅子 (Masako Taniike)
大阪大学・連合小児発達学研究所・教授
研究者番号：30263289

下野 九理子 (Kuriko Kagitani-Shimono)
大阪大学・連合小児発達学研究所・講師
研究者番号：60403185

(3)連携研究者

()

研究者番号：