

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10090

研究課題名(和文)胎生期神経免疫応答による生後発達期の脳神経ネットワークへ及ぼす影響

研究課題名(英文) Insight into a neuropathological mechanism of functional brain network abnormalities in offspring with maternal immune activation

研究代表者

水間 広 (Mizuma, Hiroshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：00382200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自閉性スペクトラム障害や統合失調症の病因研究の一環として、マウス妊娠中に疑似ウイルス感染(母体免疫活性化、MIA)により出生したモデル動物を対象に、社会性行動異常と脳機能ネットワークの関連性を調べるため、小動物専用のMRI装置とPET装置を用い、同一個体を覚醒下にて撮影した。社会性行動異常を呈した発達障害モデルマウスは大脳皮質での機能的連絡性の亢進が認められ、自閉性スペクトラム患者のfMRI研究と同様の結果が得られた。また、PETではモデルマウスでは視床・中脳領域での神経活動低下と大脳皮質領域での神経活動増加が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、MIAにより誘発された社会性行動障害をもつ動物が生後での脳幹部における神経活動の低下および大脳皮質領域での機能的ネットワーク異常を持つことが明らかとなった。今後もより詳細な神経病理メカニズムを明らかにするための動物基礎研究を進め、自閉性スペクトラム障害や統合失調症の新たな病態予測や早期の診断・治療法の開発に寄与することを考えている。

研究成果の概要(英文)：Maternal immune activation (MIA) induced by pregnant bacterial or viral infection has been considered as one of the risk factors of autistic spectrum disorder (ASD). To investigate a brain function of MIA-affected offspring, we performed resting-state functional magnetic resonance imaging (rs-fMRI) and positron emission tomography (PET). MIA model was generated by intraperitoneal injection of polyinosinic:polycytidylic acid (20 mg/kg) in pregnant mice on gestational day 12.5. The rs-fMRI study revealed that the MIA-affected offspring with social deficit had hyper-connectivity of functional networks with over and local preferred connectivity, which were similar to those of human studies in ASD patients. PET imaging showed the MIA model had low glucometabolism in the brainstem. These results suggest that abnormal functional network connectivities associated with glucometabolic activity may be crucial in the appearance of the behavioral phenotype in the MIA model.

研究分野：医歯薬学

キーワード：母体免疫活性化 イメージング 脳神経発達障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠期におけるウイルス、細菌、または寄生虫感染が統合失調症や自閉症の疾患のリスクファクターとして知られている (Patterson et al., Behav Brain Res, 2009)。実際、国外の研究で妊娠期に採取された母親の血液検体を解析した結果、自閉症や知的障害と診断された出生児の母親では血中サイトカイン (IFN- γ 、IL-4、IL-5) が健常児をもつ母親よりも有意に増加していること、他にウイルス感染によりケモカインの一種である MCP-1 が自閉症を持つ母親の妊娠時血清および羊水で有意に上昇していることが明らかとなっている (Goines et al., Mol Autism, 2011; Abdallah et al., Brain Behav Immun, 2012)。したがって、母体感染によるリスクファクターは、いわゆる風疹ウイルスなどの母体からの垂直感染による直接的な影響ではなく、母体がウイルス感染に曝されることにより免疫応答として誘導された様々なサイトカイン等の免疫応答因子が、間接的に胎児の脳発達に極めて重要な影響を及ぼすことが想定されている (母体免疫活性化, maternal immune activation, MIA)。MIA の実験動物研究から、ウイルスまたは疑似ウイルスの投与により MIA を誘発された妊娠動物から出生した仔は、生後の社会性行動やプレパルス抑制試験異常が出現し、脳内では大脳皮質や海馬での形態変化や様々な分子の発現異常が認められ、自閉性スペクトラム障害や統合失調症の病態に類似することから動物モデルとして確立されている (Fatemi et al., Mol Psychiatry, 1999; Shi et al., J Neurosci, 2003)。原因として、ウイルス感染により母体末梢組織での免疫が活性化され、母体内で産生された胎仔脳蛋白に対する抗体が自己抗体化した結果、胎仔脳の神経系の形成に影響を及ぼすことが推測されている (Estes & McAllister, Nat Rev Neurosci, 2015)。また、MIA に生後の外的環境ストレスが加わることで、異常行動が露見し症状が増悪する報告もなされている (Giovanolli et al., Science, 2013)。最近、MIA 誘発後に胎仔脳組織内で IL-6、IL-17、TNF 等の炎症性サイトカイン類が上昇し、大脳皮質における層構造パターンが変化し、出生後も異層構造が維持されることが報告された (Choi et al., Science, 2016)。大脳皮質での層構造パターンの不可逆的变化は、母親体内のヘルパー T17 型細胞が関与していることから、母体の過剰免疫応答が胎仔の脳神経系発達に影響を及ぼしたことが示唆された (Choi et al., Science, 2016)。

しかし、これまでの研究では、胎生期における脳神経系形態異常と生後に認められる社会性行動の異常との因果関係については不明であり、特に、神経免疫異常が生後発達期におけるシナプスの発生や可塑性に影響し、どのようにして社会性行動異常に関係するのかが明らかにされていない。同一個体の生後発達に伴う脳機能を長期間観察するためには、非侵襲的イメージング技術が最適である。申請者は世界で最初に麻酔を施さずにマウスの PET 脳機能イメージング法を確立し、麻酔処置による血流や体温などの生理機能低下を伴わずに脳内における糖代謝、受容体結合能などを測定することに成功し、これまでに本法を用いて発達障害や神経変性疾患などの病態モデルにおける脳機能変化を明らかにしてきた (Mizuma et al., J Nucl Med, 2010; Kambe et al., NeuroBiol Dis, 2011 ほか)。

本研究では、MIA による病態モデル動物を作製し、PET や MRI による生体分子イメージングを用いて同一個体で長期間追跡することで、発達に伴う脳神経系の機能的ネットワークを詳細に調べ、社会性行動異常に関連する領域を抽出し、病態発現のメカニズムの一端を明らかにする。

2. 研究の目的

自閉性スペクトラム障害や統合失調症などの病因基礎研究の一環として、モデル動物を用い胎生期神経免疫応答による神経機能と社会性行動との関連性について明らかにするため、以下の実験を行った。

実験 1 : MIA による病態モデルマウスの作製および社会性行動解析

実験 2 : 同一個体追跡による無麻酔下での脳機能イメージング

3. 研究の方法

1) MIA による病態モデルマウスの作製

雌性マウス (C57BL/6J 系) の妊娠 12.5 日目に poly(I:C) を 20 mg/kg (10 mM PBS にて 2 mg/mL で溶解) の用量を腹腔内投与した。poly(I:C) を投与された妊娠マウスから出生した雄性マウスを実験に用いた (poly(I:C) 処置群)。対照には、妊娠 12.5 日目のマウスに 10 mM PBS を投与した後に出生した雄性マウスとした (PBS 処置群)。

2) 社会性行動解析

生後における社会性行動の評価には、対個体への接近度を指標としたスリーチャンバーテストを行った。スリーチャンバー装置 (縦 40cm、横 60cm、高さ 20cm) は 3 つの同面積の部屋 (縦 40cm、横 20 cm、高さ 20 cm) から構成されており、中央の部屋をニュートラルとし、左右両端の部屋にそれぞれ円形の檻 (直径 5 cm) を一つずつ配置した。檻の中には、一方にテスト個体に対し新規の同系雄マウスを入れ、もう一方にはマウスの形をした模型を入れた。テストは午前 9 時から午後 1 時までの間に行った。マウスを装置に順化後、中央から左右の部屋へ自由に往来する扉を開放した後、10 分間の行動を記録した。各対象物 (生きたマウスと模型マウス) への 2 cm 以内に接近する時間を計測し、各対象物の接近時間を両対象物の合計接近時間から除した値 (%interaction) を指標とし、Poly(I:C) 処置群と PBS 処置群を比較した。

3) 安静時機能的 MR イメージング

行動実験と同一のマウス(12~16週齢)の脳機能データを得るため、小動物用の高磁場(11.7T) MRI装置を用いて安静時機能的 MR イメージング(rs-fMRI)を行った。またデータの収集にはマウス頭部専用の低温冷却 RF コイルを用いてスキャンした。覚醒下での頭部撮影のため、予めマウスの頭蓋骨上部に非金属製の固定具取付けの手術を麻酔下にて実施した(Yoshida et al., J Neurosci Methods, 2016)。本スキャン前までに1日2時間程度(計8日)のMRスキャンと同環境を再現し順化を行った。血中酸素濃度依存性(BOLD)のデータは、グラジエントエコー法を用いて取得した。取得したfMRIデータは前処理として、C57BL/6マウスの定位MRI脳テンプレートに対して正規化した後、平滑化処理を行った。機能的連絡性の解析には、大脳において100の関心領域を設定し、BOLD信号のROI間の時間的相関に基づいて機能相関行列を算出した。また、群間のclustering coefficientとcharacteristic path lengthのネットワーク解析を行った。

4) PET イメージング

rs-fMRIスキャンした同一マウス(16~20週齢)の脳神経活動を測定するため糖代謝能を指標としたPETイメージングを実施した。糖代謝は、グルコース類縁体で陽電子放出核種であるフッ素18を標識したフルオロデオキシグルコース($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$)の脳組織への集積を小動物用PET装置で撮影した。PET測定は、rsfMRIスキャン用の頭部固定具を継続して使用し、覚醒下状態で行った。また、PET実験環境への馴化のため、1日2時間の頭部固定を本スキャン前までに3回実施した。本スキャン当日にマウスはスキャン開始時間の8~12時間前から絶食させ、血糖値を測定後に、尾静脈に投与用カテーテルを留置した。マウスを頭部固定装置にセットし、30分間のトランスミッションスキャン後に、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ (250~650MBq/kg)をシリンジポンプにて静脈内に自動的に10秒間注入したときに60分間の動態画像を取得した。脳内の $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 取り込みの定量分析は、PMODソフトウェアを用いた。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 取り込みの指標は、局所脳取り込み値(Bq/mL)を全脳取り込み値(Bq/mL)で正規化した値を用いた。なお、データの個体内誤差を最小化するために、各個体は2-3回のPET測定を行った。

4. 研究成果

出生後の社会性行動能力を評価するため、スリーチャンバー社会性テストを行い、正常発達であるPBS処置群ではマウス模型への接近時間よりも生きたマウスへの接近時間が相対的に長く、一方でPoly(I:C)処置群ではマウス模型および生きたマウスへの接近時間がほぼ同等であった。算出された%interactionではPoly(I:C)処置群ではPBS処置群に比較して、有意な社会性行動の異常が認められた。また、rs-fMRIデータから脳の100領域間でのネットワーク解析を行った結果、社会性行動異常を呈したpoly(I:C)処置群ではPBS処置群との比較で、大脳皮質の広範囲で機能的連絡性が亢進していた。また、100領域間のclustering coefficientとcharacteristic path lengthを分析した結果、clustering coefficientはpoly(I:C)処置群ではPBS処置群よりも有意に高く、characteristic path lengthではpoly(I:C)処置群ではPBS処置群よりも有意に低い値を示した。MIAモデルマウスでの結果は、以前に報告された自閉性スペクトラム障害患者を対象としたヒトfMRI研究と同様の結果が得られた。また、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PETイメージングでは、poly(I:C)処置群での脳内における糖代謝はPBS処置群に比べて、視床、中心灰白質および中脳で有意に低く、皮質領域にて有意な高値であった。本研究での結果から、MIAによる脳発達障害のモデルマウスでは、生後での脳幹部における脳神経活動低下に関連した大脳皮質領域での機能的ネットワーク異常が社会性行動異常と関連していることが推測される。

本研究では、MIAにより誘発された社会性行動障害をもつ動物が生後の脳機能ネットワークに異常を持つことが明らかとなった。今後もより詳細な神経病理メカニズムを明らかにするための動物基礎研究を進め、自閉性スペクトラム障害や統合失調症の新たな病態予測や早期の診断・治療法の開発に寄与することを考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mizuma H, Hikishima K, Hosaka N, Matsumoto Y, Takata N & Onoe H
2. 発表標題 Neuroimaging in awake mouse using a neurodevelopmental disorder model.
3. 学会等名 World Molecular Imaging Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuma H, Hikishima K, Hosaka N, Matsumoto Y, Takata N & Onoe H
2. 発表標題 Functional brain imaging in a mouse model of neurodevelopmental disorder.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 48th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水間広, 疋島啓吾, 保坂奈美, 松本佳乃, 高田則雄, 尾上浩隆
2. 発表標題 母体免疫活性化により産まれたマウスの脳神経イメージング
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuma H
2. 発表標題 In vivo brain PET imaging in awake mice.
3. 学会等名 RIKEN-BDR Retreat 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuma H, Hikishima K, Hosaka N, Matsumoto Y, Takata , Onoe H
2. 発表標題 Neuroimaging in mouse offspring affected by maternal immune activation.
3. 学会等名 RIKEN-BDR Retreat 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuma H
2. 発表標題 Functional brain imaging in human disease model mice under unanesthetized condition.
3. 学会等名 A3 Foresight Program Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 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