

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11230

研究課題名(和文)胎内炎症曝露が及ぼすエピジェネティック変化とその制御

研究課題名(英文) Epigenetic change by perinatal inflammation and its regulation

研究代表者

小谷 友美 (KOTANI, TOMOMI)

名古屋大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70359751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：早産などは炎症が原因のひとつとして考えられており、胎児は炎症曝露による影響を受ける。本研究では、胎内炎症曝露により出生後自閉症スペクトラム様所見を呈し、脳組織において扁桃体などにミクログリア活性化を主体とした変化が生じることが示された。さらにその分子学的機序についても一部を解明した。また、早産児に対する出生後の精神神経疾患発症予防として、出生前の分子状水素投与により、発症を予防する可能性を示唆する結果を得た。今後、他の炎症性疾患合併妊娠においても同様の効果が得られる可能性があり、さらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早産など母体に炎症をきたす場合には、胎児は胎内で炎症に曝露されることになり、出生後、自閉症などの精神神経疾患の発症リスクが高くなることを動物モデルで示し、またその機序の一部を解明した。また、次世代における疾患発症リスクを低減する予防法として、出生前の分子状水素の投与が効果がある可能性を示す結果を得た。このように、環境要因に介入し、出生後の疾患発症リスクを低減する試みは、他の疾患領域においても新たな先制医療の確立につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Preterm birth occurs by inflammation, and the fetus is affected by exposure to inflammation. In the present study, it was shown that exposure to inflammation in utero caused postnatal autism spectrum like findings, accompanied with several alterations in the brain tissues, amygdala, including microglial activation. Furthermore, some of the molecular mechanisms have been elucidated. In addition, as a preventive strategy against , the results suggesting that antenatal molecular hydrogen administration may prevent the development of postnatal neuropsychiatric disorders in preterm infants. Pregnant women with other inflammation related diseases will be also indicated as candidates for this preventive strategy, although further studies are needed.

研究分野：産婦人科

キーワード：炎症 早産 自閉症スペクトラム エピジェネティクス ミクログリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 先進国において、早産児の生存率が改善した反面、脳障害をはじめとする長期予後不良児が生存児に占める割合は、13%から22%へと増加している(1)。とくに超早産児(妊娠28週未満で出生)の予後改善は社会的要請の高い課題のひとつとなっている。
- (2) 長期予後における神経障害や呼吸障害といった後遺症発症は生活の質(QOL)を左右する重篤な後遺症であり、その発症リスクは母体感染に起因する胎内炎症曝露により増加することが知られている。他方、分娩週数が早い早産ほど高率に組織学的絨毛膜羊膜炎が合併しており、子宮内炎症は週数の早い早産における主要な原因となっていると考えられる。
- (3) 私たちは、抗炎症・抗酸化ストレス作用を有する分子状水素(H<sub>2</sub>)がこれらの児の障害を軽減する可能性を示唆する結果を蓄積してきた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、発症頻度1%と増加傾向の自閉症スペクトラム発症に関わるエピジェネティック制御に着目し、胎内炎症曝露が児に及ぼすエピジェネティック変化を、出生前のH<sub>2</sub>投与が抗炎症・抗酸化ストレス作用を介して制御できるかを検討することである。周産期における介入でその発症頻度を減少することが証明できれば、画期的な先制医療研究へと展開していく足がかりとなりうると考えた。

### 3. 研究の方法

- (1) 胎内炎症曝露病態解明：動物モデル  
妊娠母獣へのLPS(リポ多糖)投与による自閉症スペクトラム発症モデル作成  
・Y-maze試験(生後3週齢)、Three chamber試験(生後4週齢)  
で作成したモデルにおける母獣の炎症性サイトカイン検討  
・母獣IL-17値の比較検討、仔IL-6値の比較検討  
で作成したモデルにおける出生後仔大脳におけるグリア細胞の動態の検討  
・経時的な免疫組織学的評価
- (2) 胎内炎症曝露病態解明：ミクログリア機能  
培養ミクログリアで確認されたIL-17 10ng/mL投与による影響の検討  
・各サイトカイン発現の変化  
におけるmicroRNAへの影響検討  
・MiSeqによる網羅的解析、RT-PCRによる量的変化の妥当性を検証
- (3) 早産病態解明とH<sub>2</sub>の効果検討  
妊娠母獣へのLPS(リポ多糖)投与による早産モデルの作成  
モデルにおけるH<sub>2</sub>による早産予防効果について検討  
臨床検体における組織学的絨毛膜羊膜炎症例における検討  
・Toll様受容体の発現検討  
ヒト卵膜組織を用いて絨毛膜羊膜炎の病態解明  
・Toll様受容体のリガンド刺激による炎症性サイトカインの検討
- (4) 疾患女性の子宮内環境が次世代に及ぼす影響  
統合失調症(病態と炎症活性化と関連と既報告あり)女性の血清評価(プロテオーム解析)  
統合性失調症母体から出生した児の臍帯血のプロファイル

### 4. 研究成果

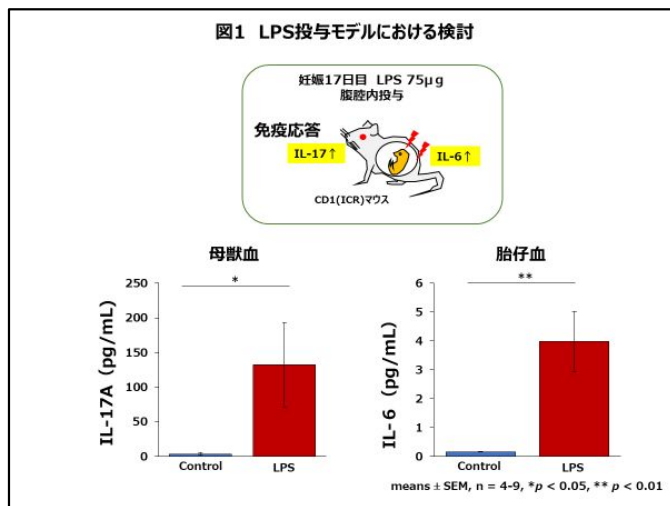
- (1) 胎内炎症曝露病態解明：動物モデル

モデル(論文報告, Sci Rep 2018)

妊娠17日目にLPSを腹腔内投与した母マウスから出生した仔マウスにおいて以下の行動異常を認め、自閉症スペクトラム様所見を呈していると考えられた。

- ・空間作業記憶の有意な低下
- ・新規なものへの関心、社交性の有意な低下

モデルにおいて、図1の



結果が得られた。出生後5週齢において以下の所見が認められた。

- ・活性化アストロサイトの有意な増加
- ・ニューロン数の有意な減少
- ・オリゴデンドロサイトの有意な減少

以上より、図2に示されるような機序が示唆された。

(2) 胎内炎症曝露病態解明：ミクログリア機能（未報告データ）

ミクログリアにおけるIL-17受容体の確認、IL-6, IL-1b, iNOSの有意な増加が認められた。

miSeqによるmiRNAの網羅的解析結果からIL-17刺激により、2倍以上の有意な増加を示したのが、miR-206-3pであり、有意な低下を示したのが、miR-151-5p, miR-29b-3pであった。miRのRT-PCRでmiR-206-3pの発現は約4倍の有意な増加を認めた。

ターゲットスキャンでの予測遺伝子、TGFb、IGF1、HDAC4が候補遺伝子と挙げられた。

小括：IL-17により、胎内でミクログリアはmiRの発現変化を介し、HDAC4といったヒストン脱アセチル化酵素の発現を変化させる可能性が示唆された。ヒストンはDNAが巻き付く蛋白であり、アセチル化などの修飾により巻き付きが緩められ、DNAの転写（蛋白として発現が誘導）が開始すると考えられている。アセチル化・脱アセチル化のようなヒストン修飾は、遺伝子配列の変化を伴わず蛋白の発現が変化する機序であるエピジェネティック変化のひとつである。今回の結果より、胎内炎症曝露によるIL-17がエピジェネティック変化を伴い次世代へ影響を及ぼす機序として、ミクログリアにおけるmiRの発現変化を介してヒストンアセチル化に影響を及ぼし、ミクログリア機能にエピジェネティック変化を与えている可能性が示唆される新しい知見を得たことになる。現在も引き続き、解析中である。

(3) 早産病態解明とH<sub>2</sub>の効果検討（論文報告、Biomed Rep 2018）

妊娠15.5日目に500μgLPS/kg投与により投与後平均18.3時間で分娩となるモデルを作成した。

H<sub>2</sub>投与により、投与から分娩まで平均33.3時間と有意な妊娠延長効果を認めた。また、効果の機序として以下の変化を認めた。

- ・TNF, IL-6, IL-8の発現低下（子宮筋）
- ・Cox2, Cx43, オキシトシン受容体の発現低下（子宮筋）
- ・MMP-3の発現低下
- ・母獣黄体ホルモン値の有意な増加

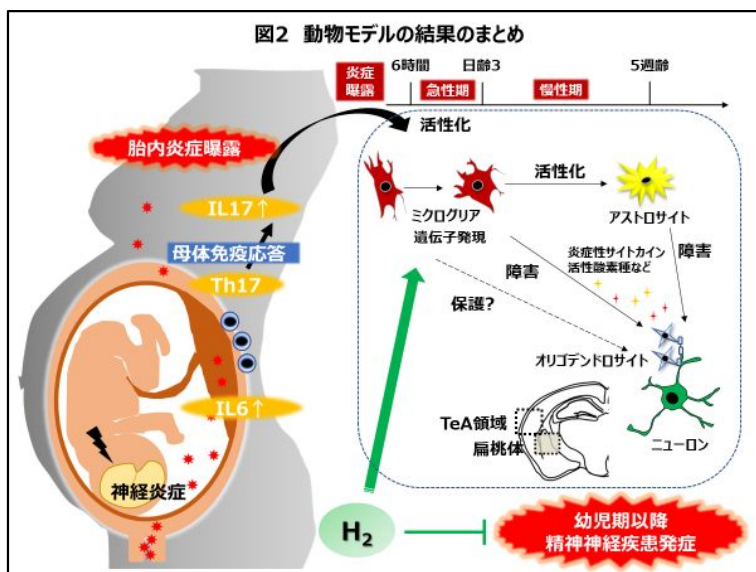
小括：H<sub>2</sub>は子宮筋における炎症性サイトカイン発現亢進の抑制効果および黄体ホルモン産生低下の抑制効果を示した。また、子宮筋収縮因子を低下させ、また陣痛発来への関与が知られているマトリクスメタロプロテアーゼMMP-3の発現を低下させていた。子宮筋への炎症波及による陣痛発来、早産へと至る経路に対し、一定の抑制効果を有する可能性が示唆された。

(4) 疾患女性の子宮内環境が次世代に及ぼす影響（論文報告、Schizophr Res 2018）

統合失調症女性が妊娠中に正常妊娠女性と比較して、補体系活性化など炎症に傾いていることが示唆された。また、出生した児の臍帯動血でも補体系活性化が認められた。補体系活性化は統合失調症の病態にも関与することが知られており、以上の結果により、感染以外の疾患で、炎症系が活性化するような病態を有する妊婦においては、その影響が次世代にも変化を与えている可能性が示唆された。

(5) 成果のまとめ

本研究期間において、胎内炎症曝露により自閉症スペクトラム様所見を呈することが示された。また脳組織において経時的にミクログリア活性化、アストロサイト活性化、オリゴデンドロサイトやニューロンの減少といった変化が、扁桃体などで示され、行動異常と矛盾しない結果であった。これらの所見は、出生前のH<sub>2</sub>投与により改善を認め、その機序のひとつとして、抗炎症・抗酸化作用を介している可能性が示唆された。一方で、子宮筋収縮抑制効果は有意差を認めたものの限定的であり、コントロール群と同等までの改善は認められなかった。以上を総合的に評価すると、切迫早産妊婦へのH<sub>2</sub>投与は、早産防止効果は限定的であるが、胎内炎症曝露が児に及ぼすエピジェネティック変化を、出生前のH<sub>2</sub>投与が抗炎症・抗酸化ストレス作用を介して制御する効果は期待できることが判明した。また、その他の炎症系が優位となる病態の基礎疾患を有する妊婦においても、胎内での炎症曝露による上記精神神経疾患発症リスクがあると推測



され、出生前の H<sub>2</sub> 投与による予防効果が期待される。この仮説を検討していくことは、今後の先制医療の開発において重要な点である。

また臨床検体での検討では、統合失調症で補体系活性化を認める母体から出生した児において、出生時にすでに補体系活性化が認められた。統合失調症は自閉症スペクトラムと類似する病態として知られており、発症には遺伝的要因・環境要因があり、補体系活性化の病態への関与は既知である。したがって、児の今後の発症に関与するのか、さらなる検討が必要ではあるが、胎内環境が次世代に影響を及ぼすひとつの知見となった。

最後に、分子学的な病態機序として、胎内炎症曝露によりミクログリア遺伝子発現に影響を及ぼすこと、その変化には miRNA やヒストン修飾の関与が示唆される結果を得た。これをふまえ、今後は、これらの機序への H<sub>2</sub> 作用やその他の候補となる標的薬の開発に向けた研究が必要であることが判明した。

< 引用文献 >

(1) Moor T et al. BMJ 2012; 345 doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.e7961>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Moroï Hiroaki, Kotani Tomomi, Miki Rika, Tsuda Hiroyuki, Mizuno Masako, Ito Yumiko, Ushida Takafumi, Imai Kenji, Nakano Tomoko, Li Hua, Sumigama Seiji, Yamamoto Eiko, Iwase Akira, Kikkawa Fumitaka	4. 巻 62
2. 論文標題 The expression of Toll-like receptor 5 in preterm histologic chorioamnionitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 63-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbr.16-103	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 -

1. 著者名 Nakano T, Kotani T, Imai K, Iitani Y, Ushida T, Tsuda H, Li H, Iwase A, Toyokuni S, Kikkawa F	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of molecular hydrogen on uterine inflammation during preterm labour	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Rep	6. 最初と最後の頁 454-460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2018.1082	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 -

1. 著者名 Imai K, Kotani T, Tsuda H, Nakano T, Ushida T, Iwase A, Nagai T, Toyokuni S, Suzumura A, Kikkawa F	4. 巻 8
2. 論文標題 Administration of molecular hydrogen during pregnancy improves behavioral abnormalities of offspring in a maternal immune activation model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 9221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27626-	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 -

1. 著者名 Moriyama Y, Kotani T, Ushida T, Imai K, Nakano T, Tsuda H, Kikkawa F.	4. 巻 S0920-9964(18)
2. 論文標題 Altered proteomic profile in umbilical arterial serum from mothers with schizophrenia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Schizophr Res	6. 最初と最後の頁 30101-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.schres.2018.02.024	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 -

1. 著者名 小谷友美	4. 巻 69
2. 論文標題 周産期における炎症 その生理と病態 子宮内炎症による早産児の後遺症軽減する新たな治療法の確立への取り組み 新規抗酸化剤・分子状水素を用いて(解説)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本産科婦人科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1687-1699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小谷友美、今井健史、小林知子、飯谷友佳子、牛田貴文、森山佳則、吉川史隆
2. 発表標題 胎内炎症曝露による疾患発症リスクの低減を目指して
3. 学会等名 第7回新胎児学研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小谷友美、今井健史、中野知子、飯谷友佳子、牛田貴文、森山佳則、吉川史隆
2. 発表標題 胎内炎症曝露による自閉症発症モデルにおける病態解明と発症予防法の開発
3. 学会等名 第35回日本産婦人科感染症学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小谷友美
2. 発表標題 子宮内炎症による早産児の後遺症軽減する新たな治療法の確立への取り組み～新規抗酸化剤・分子状水素を用いて～
3. 学会等名 日本産科婦人科学会第69回学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/> (名古屋大学医学部産婦人科)

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
研究協力者	飯谷 友佳子  (Yukako Iitani)		