

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08222

研究課題名(和文) 母体免疫活性化に伴う生後神経ネットワーク異常に関わる神経病理の解明

研究課題名(英文) Insight into the 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・客員研究員

研究者番号：00382200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害(ASD)のような神経発達障害の病因の一つに胎児期における神経免疫応答の影響が知られている。本研究ではASDの病因基礎研究の一環として、胎生期神経免疫応答により生じる脳内炎症状態が生後脳シナプス形成へどのように影響を及ぼすかについてPETイメージングを中心に検討した。マウス妊娠12.5日目にPoly I:C投与し、出生した雄性マウスを対象とし、成長後、社会性行動、固執行動に異常を認めた個体をシナプスおよび炎症のPETイメージングを実施した。現在、正常に発達したマウス群を対照に行動と脳機能異常との関連性について解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では神経発達障害の病因基礎研究の一環として、脳神経発達障害のヒト病態を模した動物(病態モデル)を用い、生きたまま脳機能を調べる生体イメージング研究である。イメージングには陽電子断層撮影(PET)装置を用い、放射線を放出する元素を標識した化合物を動物へ投与し、体内からの放射線を検出することで画像化する。脳内での炎症や脳組織構造に重要なタンパクの密度を画像化・解析し、自閉スペクトラム症などの神経発達障害で特徴的な社会性の行動異常との関連性を調べ、病態メカニズムの一端を明らかにする。本研究により、将来、これら障害の早期の診断や新たな治療介入法の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Abnormal neuroimmune responses during the fetal period are one of the etiologic factors of neurodevelopmental disorders such as autism spectrum disorder (ASD). The present study examines how the inflammatory state in the brain caused by the neuroimmune response during the fetal period affects postnatal brain synapse formation, using a human pathological model of neurodevelopmental disorders and focusing on PET imaging. To generate the disease model, we administered Poly I:C to mice on Day 12.5 gestation. In addition, we tested male offspring for social and repetitive behaviors after birth. We also performed brain PET imaging of the synapse formation and neuroinflammation in the mice that showed abnormal social and repetitive behaviors like ASD. Currently, we are analyzing the pathological model mice compared to typically developing mice to investigate the relationship between behavior and abnormal brain function.

研究分野：放射線科学

キーワード：母体免疫活性化 自閉症スペクトラム障害 マウス ミクログリア イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorder: ASD) は脳発達障害の一つであり、社会性相互作用やコミュニケーションの障害と限局的・反復的な興味・行動、新規環境下での抵抗性等を特徴としている (DSM-V, 2013)。ASD の発症原因は以前不明のままであるが、遺伝的素因に加え、生後の環境的誘因が複合し脳機能への障害を引き起こすと考えられている (Gardener et al., 2011)。ASD の脳機能障害の全容は明らかになっていないが、脳機能を調べるため、磁気共鳴装置 (MRI) やポジトロン断層撮影法 (PET) などの非侵襲的計測法による報告が多数なされており、例えば、大脳皮質の肥大や小脳の萎縮などの構造的変化 (Pagnozzi et al., 2018) やセロトニントランスポーターの機能障害 (Nakamura et al., 2010) が知られている。近年では、MRI 装置の性能向上や新規解析法の開発が進み、中でも安静状態での脳活動を計測する安静時機能的 MRI が行われ、ASD 患者研究からデフォルトモードネットワークと呼ばれる内側前頭前野、後部帯状回・楔前部、下頭頂葉小葉から構成させる領域間の機能的連絡の減弱や ASD の症状との負の相関が報告されている (Anderson et al., 2011)。また、グラフ理論を用いた全脳を情報ネットワークとして再構成し領域間の機能的連絡性を解析した結果、正常発達者に比較して ASD 患者では遠位連絡性が弱く、逆に近位連絡性が強化されていることが報告されており、脳の機能的ネットワーク異常が示唆されている (Li et al., 2014)。

これらのような ASD の脳機能障害の遠因のひとつに胎児期における神経免疫応答異常との関連が、ASD のモデル動物研究から報告されている。我々も以前から病態モデル動物を用いた研究を進めており、妊娠期の母獣に対し疑似ウイルス感染を誘発し、産まれた仔の発達期における社会性行動の異常を確認した後、動物用の高磁場 MRI を用いて ASD 患者と同様に rsfMRI 測定を実施した。その結果、ASD 患者と同様の遠位連絡性の減弱と近位連絡性の増強が観察された。ヒト患者と同様の知見を得られたことで、胎生期の神経免疫応答が生後の脳神経機能ネットワークに異常をもたらす可能性を示している。しかしながら、この神経機能ネットワーク異常の成因については不明である。生後の神経機能ネットワークの構築には発達臨界期に過形成された神経シナプスに対して刈り込みが起こるが、このシナプスの形成・除去・可塑性等の機能修飾にはグリア細胞のひとつであるミクログリアが重要な役割を果たすことが知られている。ミクログリアはシナプスの機能修飾に加え、神経細胞の膜電位調節に関与しており、神経回路網の恒常性を維持する役割を持つ。しかし、ミクログリアの活動が異常になると脳機能障害を引き起こすと考えられ、事実、ASD 患者では背外側前頭前皮質、前帯状皮質や小脳領域でのミクログリアの活性化 (Suzuki et al., 2013) やシナプスの刈り込み異常から未熟なスパイン密度の上昇やシナプスの構造異常 (Hutsler et al., 2010) が報告されていることからミクログリアが ASD の病態に深く関与していることが予測される。

## 2. 研究の目的

胎生期の神経免疫応答により生後に確認された神経機能的ネットワーク異常の素過程に脳ミクログリアの活性化によるシナプス形成異常との関連性について、病態モデル動物を用いて、我々が独自に開発した無麻酔下での脳 PET イメージング法を中心に検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) MIA による病態モデルマウスの作製

C57BL/6J 系雌性マウスの妊娠 12.5 日目に poly(I:C) を 20 mg/kg の用量で腹腔内に投与した。poly(I:C) 投与妊娠マウスから出生した雄性マウスを実験群として用いた (poly(I:C) 処置群)。また、妊娠 12.5 日目のマウスに溶媒である PBS を投与し、出生した雄性マウスを対照群とした (PBS 処置群)。

### (2) 行動解析

生後 10 週齢の時点での社会性行動を評価するため、対個体への接近度を指標としたスリーチャンパーテストを行った。スリーチャンパーテストは、3 つの同面積の部屋 (縦 40cm、横 20cm、高さ 20cm) を並列構成された装置 (縦 40cm、横 60cm、高さ 20cm) である。各部屋は、中央はニュートラル区画とし、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。檻は、テスト個体に対しこれまでに接触のない新規の同齢の雄マウスを入れ、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 2cm 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時間で除した接近時間割合を算出した。

### (3) PET イメージング

社会性行動異常が認められたマウスの脳内炎症および脳シナプス密度を調べるため、我々が開発した無麻酔下での脳 PET イメージングを実施した。脳内炎症には、陽電子放出核種であるフッ素 18 を標識した DPA-714 ( $^{18}\text{F}$ ]DPA-714) をトレーサーとして用いた。DPA-714 は脳グリア細胞のひとつであるミクログリアのミトコンドリア外膜に発現するトランスロケータータンパク (TSPO) と結合する。炎症時に活動する活性型ミクログリアは TSPO を安静型に比べ高発現していることから、PET で炎症を観察することが可能となる。また、シナプス密度の測定にはシナプス小胞タンパクである SV2A に結合する炭素 11 標識した UCB-J ( $^{11}\text{C}$ ]UCB-J) を用いた。頭部固定による無麻酔での測定のため、マウスはあらかじめ PET 実験環境へ馴化させた。スキャン当日にマウスは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、 $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 または  $^{11}\text{C}$ ]UCB-J (18.5 - 30 MBq) をシリンジポンプにて静脈内に自動的に 10 秒間注入し、同時に 90 分間の動態画像を取得した。得られた画像は画像解析ソフトウェア (PMOD) を用いた。

#### (4) 免疫組織化学染色

脳 PET 計測後、マウスは深麻酔下にて灌流固定を行い、組織染色用に脳組織を採取した。脳組織から切片を作製し、脳内炎症およびシナプスに関連するタンパクを検出するため、免疫組織化学染色し、顕微鏡にて観察した。

## 4 . 研究成果

病態モデルである poly(I:C)処置群は、社会性行動テストで生きたマウスへの接触時間割合が PBS 処置群に比較して有意に短く、マウス模型への接近時間が有意に長かった。社会性行動に有意な変化が認められた poly(I:C)処置個体、および同数の対照マウス (PBS 処置) に対し PET 計測を完了した。現在、社会性行動異常と脳シナプス密度との関連性、および炎症領域の特定を進め、得られた特異領域での脳組織標本での変化との確認を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mizuma H.
2. 発表標題 Small Animal PET Imaging: Applications in Medical Research and Drug Development.
3. 学会等名 第61回日本核医学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------