

令和元年6月4日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18010

研究課題名(和文) 母体感染により発症する自閉症に対するフラボノイドの予防効果

研究課題名(英文) Luteolin attenuates interleukin-6-mediated astrogliosis in human iPSC-derived neural aggregates: A candidate preventive substance for maternal immune activation-induced abnormalities

研究代表者

吉田 路子 (yoshida, michiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70754571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞から分化誘導した神経凝集体を用いて、フラボノイドの一種であるLuteolin投与により、「母体免疫系の活性化により発症する自閉症スペクトラム障害」の表現型が回復することを示した。一方、Luteolin同様、抗炎症作用が報告されているDHAでは同表現型の回復は認められなかった。また、Luteolinの過量投与により細胞のアポトーシスが誘導されることを明らかにし、適切な投与量の検討が必要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「母体感染によって生まれてくる子が発症する自閉症スペクトラム障害」に対し、発症予防効果を持ち、安全で妊婦も安心して摂取できる食品成分の探索を行った。候補として、炎症性サイトカインの産生抑制効果が報告されているフラボノイドと多価不飽和脂肪酸に着目し、フラボノイドの一種であるルテオリンが表現型を回復することを示した。

研究成果の概要(英文)：Maternal infection during pregnancy increases the risk of autism spectrum disorders in offspring. Among animal studies, prenatal exposure to interleukin-6 (IL-6) has been associated with autism, though such findings remain to be elucidated in humans. We developed a human cell-based model of maternal immune activation (MIA) by exposing human induced pluripotent stem cells-derived neural aggregates to IL-6 and investigated whether luteolin; a naturally occurring flavonoid found in edible plants; could prevent MIA-induced abnormalities. Luteolin treatment counteracted IL-6-mediated increases of astrocytes, reductions of neurons and increases of STAT3 phosphorylation. Our observations suggest that the flavonoid luteolin may attenuate or prevent MIA-induced neural abnormalities. As we observed increased apoptosis at high concentrations of luteolin, further studies are required to determine the optimal intake dosage and duration for pregnant women.

研究分野：小児神経学

キーワード：自閉症スペクトラム障害 フラボノイド iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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) の発症機序は未だ不明で、治療法の開発が望まれるが、母親の感染が胎児の ASD 発症リスクを増大することが疫学的に証明されている。モデル動物により、炎症性サイトカインである IL-6 直接投与や poly(I:C) によるサイトカイン産生刺激のみで胎仔に ASD 様症状が観察され、阻害することで症状が改善することから、母体免疫系の活性化 (maternal immune activation : MIA) により ASD を発症すると考えられている。齧歯類を用いた MIA モデルの解析では、JAK2/STAT3 リン酸化経路活性化に引き続く炎症性サイトカインの増加が神経細胞数の減少、アストロサイトの増生をきたすことが示された。一方、ポリフェノールの一種であり、安全で食事に取り入れやすいフラボノイドの抗炎症作用が注目されており、マイクログリアによる炎症性サイトカイン産生抑制を介して神経保護作用を発揮することで、神経機能の調節、認知・学習に関わる神経変性疾患の治療に効果を発揮することが報告されている。

### 2. 研究の目的

母体感染により発症する自閉症スペクトラム障害をターゲットに、発症予防効果を持ち、安全で妊婦も安心して摂取できる食品成分の探索を行う。候補として、炎症性サイトカイン産生抑制効果が明らかになったフラボノイドに着目し、表現型を改善し得るフラボノイドのスクリーニングの後、投与時期・量の決定を行う。

### 3. 研究の方法

iPS 細胞から分化誘導した神経細胞凝集体に IL-6 を投与することで、JAK/STAT シグナルの活性化が惹起され、CTIP2 陽性の神経細胞数が減少、GFAP 陽性のアストロサイト細胞数が増加する「MIA による ASD の大脳皮質モデル」を用いた (申請者らが既に構築済み)。上記「MIA による ASD の大脳皮質モデル」に、抗炎症効果が報告されているフラボノイドの一種である Luteolin と、多価不飽和脂肪酸の一種である DHA を IL-6 とともに投与し、IL-6 のみを投与した群に比し、リン酸化 STAT3/総 STAT3 を低下させ、CTIP2 陽性 (神経細胞)/GFAP 陽性 (アストロサイト) 比を増加させる作用があることをそれぞれウエスタンブロッティングと免疫染色を用いて確認する。その後、上記を positive control として、フラボノイド、多価不飽和脂肪酸のスクリーニングをリン酸化 STAT3/総 STAT3 の定量化により行って候補薬とし、適切な濃度と投与時期を決定する。

### 4. 研究成果

フラボノイドの一種である Luteolin 投与により、「MIA による ASD」の表現型 (IL-6 を投与することで、JAK/STAT シグナルの活性化が惹起され、CTIP2 陽性の神経細胞数が減少、GFAP 陽性のアストロサイト細胞数が増加する) が回復することを示した (図 1、2)。また、Luteolin の過量投与により細胞のアポトーシスが誘導されることを明らかにし、適切な投与量の検討が必要であることを示した (図 3)。一方、Luteolin 同様に抗炎症作用が報告されている多価不飽和脂肪酸 DHA については、「MIA による ASD」の表現型の回復は示さなかった (data not shown)。また、上記の ASD モデルでは、神経細胞とアストロサイトを含む神経細胞凝集体の分化誘導に 60 日間を要し、スクリーニングには適さないことから、より簡便な分化系の構築を試みたが、構築には至らず、フラボノイドのスクリーニングには着手できなかった。

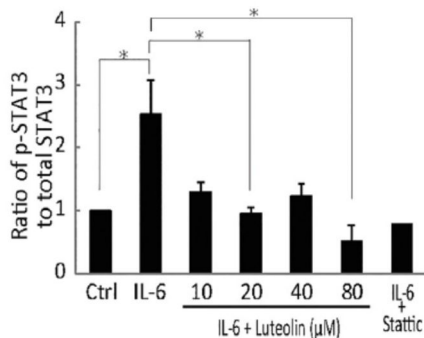


図 1 Luteolin 投与により、IL-6 投与で惹起される STAT3 リン酸化が阻害される

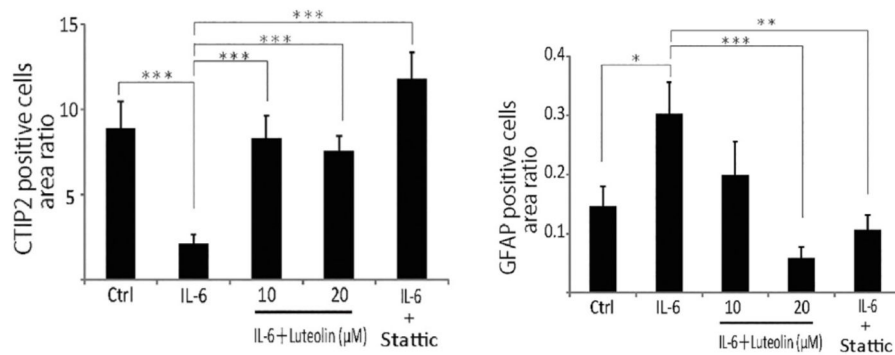


図2 Luteolin 投与により、IL-6 投与により惹起される CTIP2 陽性の神経細胞数減少、GFAP 陽性のアストロサイト細胞数増加が回復する

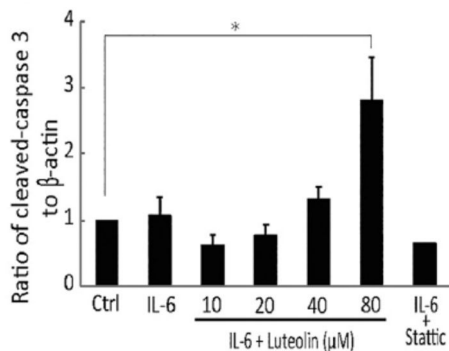


図3 Luteolin 過量投与により、アポトーシスが誘導される

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Zuiki M, Chiyonobu T, Yoshida M, Maeda H, Yamashita S, Kidowaki S, Hasegawa T, Gotoh H, Nomura T, Ono K, Hosoi H, Morimoto M. Luteolin attenuates interleukin-6-mediated astrogliosis in human iPSC-derived neural aggregates: A candidate preventive substance for maternal immune activation-induced abnormalities. *Neuroscience Letters* 査読あり、2017; 653 296-301

### 〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 瑞木匡、千代延友裕、前田裕史、山下哲史、吉田路子、長谷川龍志、森本昌史．ルテオリンは IL-6 による神経分化障害を改善するーヒト iPSC 細胞を用いた母体炎症による胎児脳障害の治療探索．第 59 回日本小児神経学会学術集会．2017 年 6 月 16 日；大阪
- 2) Zuiki M, Chiyonobu T, Yoshida M, Kidowaki S, Yamashita S, Hasegawa T, Morimoto M. Modeling the neural impact of maternal immune activation using human induced pluripotent stem cells. The 14<sup>th</sup> Internal Child Neurology Congress. 2016 May 1-5; Amsterdam, the Netherlands.

### 〔図書〕(計 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：瑞木 匡

ローマ字氏名：Zuiki Masashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。