

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09271

研究課題名(和文) 妊娠時抗うつ剤服用における胎児脳発生リスク評価のための研究基盤の確立

研究課題名(英文) Basic study for risk assessment of embryonic brain development by antidepressant treatment during pregnancy

研究代表者

佐藤 智美 (Sato, Tomomi)

埼玉医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50373311

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)：本研究は、ゼブラフィッシュ胚をヒト胎児モデルとし、抗うつ薬SSRIの脳の初期発生への影響とその作用機序を明らかにすることを目的とした。SSRIの標的タンパク質セロトニントランスポーターSERTは、神経幹・前駆細胞で発現し、脳室面に局在することを示し、SERTの発現抑制は頭部縮小と神経発生阻害、分裂細胞の増加をもたらすことを明らかにした。SSRIは、SERT発現抑制と類似した作用を示し、SSRIによる影響は、5-HTで再現されることを明らかにした。セロトニンは、ヒト胎児脳より母体胎盤で多く産生されていることが示唆され、高濃度セロトニンは、重篤な発育遅延を引き起こすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠中の抗うつ薬SSRI服用が出生児の自閉症リスクを高めるとの報告がある。自閉症は、遺伝要因に依存した多因子性疾患であるだけでなく、胎児期の環境要因にも依存する神経発達障害である。セロトニントランスポーターSERTは、自閉症の原因遺伝子の一つであるが、脳の発生過程におけるSSRIの作用とSERTの役割、自閉症発症の分子機構は未だ不明である。セロトニンの進化的起源は古く、脳の発生機構は基本的に保存されていることから、本研究の成果は、SSRIの胎児脳発生に対する副作用の分子機構解明に有用であり、自閉症のリスク評価に必要な不可欠なバイオマーカーを探索・同定するための研究基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Using zebrafish embryos as a model of human fetuses, we attempted to elucidate effects of antidepressant SSRI and the mechanisms of action on early development of the brain. Serotonin transporter SERT, the target protein of SSRI, was expressed in neural stem/progenitor cells, and localized in the surface of the ventricular zone. Knockdown of SERT facilitated mitoses, suppressed neurogenesis, and exhibited small brains in the embryos. SSRI showed effects similar to SERT knockdown, and those effects reproduced by 5-HT. Our data implied that serotonin was more generated by the maternal placenta than the embryonic brain. In addition, we showed that treatment with serotonin at higher concentrations caused severe growth retardation of the embryos.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：SSRI 5-HT セロトニントランスポーター 脳発生 自閉症 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

(1) 妊娠・出産は、女性のライフサイクルにおいて、最も心に不調をきたしやすい時期である。最近、東京 23 区内において、過去 10 年間の妊産婦の自殺が、産科異常による妊産婦死亡率の 2 倍以上であったことが報告され(竹田, 2016)、妊婦の約 4 割がうつ病、統合失調症であったことから、妊産婦の心のケアの重要性が改めて指摘されている(妊産婦メンタルヘルスマニュアル)。一方、周産期の薬物療法には、母体の健康回復・維持と胎児の催奇形成や脳機能の発生・発達への影響という治療上のジレンマを伴う(山下, 2013)。胎盤移行により薬剤に曝露された胎児のリスクを科学的に理解することは、母児のリスクベネフィットを正確に分析する上で非常に重要である。

(2) 周産期の精神疾患の中で、うつ病は有病率が 15~20%と最も頻度が高く、妊娠期では 7 割以上が妊娠初期に発症する(山下, 2013)。新しい抗うつ剤である選択的セロトニン再取り込み阻害剤(Selective Serotonin Reuptake Inhibitor: SSRI)は、1999 年に国内で初めて導入されて以来、妊産婦にも使用されてきた(坂元, 2004)。妊娠中の SSRI 服用により、大奇形の発生率に有意な増加は認められていないものの、SSRI は完全移行型で胎盤を通過することが判明し(Kim, 2006)、妊娠中の SSRI 服用が出生児の自閉症リスクを高めるとの報告が相次いでいる(Millard, 2017)。このことは、胎盤を介して胎児に移行した SSRI が、胎児脳にセロトニン系の機能不全を起し、その結果、成育後の脳機能に自閉症の原因となる影響を及ぼすことを示唆し、胎児脳の発生にセロトニン系が重要な役割を果たすことを意味する。しかし、脳の初期発生において、セロトニン系がどのように作用し、それに対して SSRI がどのような影響を及ぼすのかは、まだほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

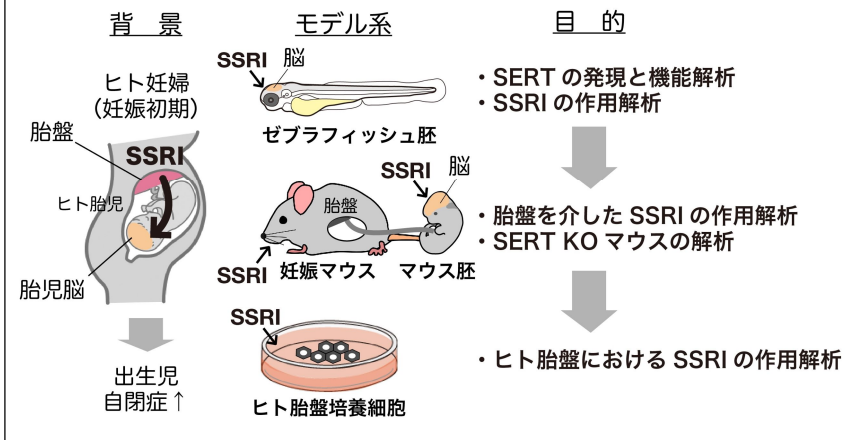
(1) 本研究は、抗うつ剤 SSRI の標的タンパク質であるセロトニントランスポーター(SERT, SLC6A4)の脳の発生過程における発現と局在を明らかにし、SSRI による脳の初期発生への影響とその作用機序を明らかにすることを目的とする。加えて、SSRI による胎児脳発生そのものに対する影響だけでなく、母体の胎盤を介した影響にも着目する。近年、子宮内胎仔の前脳には、セロトニン神経細胞が発生し、胎仔由来セロトニンが供給され始める(胎生期 14.5 日)以前に、母体胎盤で合成されたセロトニンが一時的に局在することが明らかにされ、脳の初期発生において、胎盤由来のセロトニンが重要な役割を果たすことが示唆されている(Bonnin, 2011)。しかし、セロトニンがどのように脳の初期発生を制御しているのか、その具体的なメカニズムは未だ明らかにされていない(Trowbridge, 2011)。

(2) SERT 阻害剤である SSRI の第 1 三半期(妊娠初期)における曝露は、自閉症の発症確率を上げることが報告されている(Croen, 2011)。SERT は、胎盤由来セロトニンの胎児への取込みにも寄与することから、応募者は、発生初期の胎児脳において、SSRI の曝露による胎盤由来セロトニンの取込み阻害が、成育後に自閉症の原因となり得る脳の発生異常をもたらすのではないかと考えた。本研究は、これを検証することにより、SERT の初期脳発生における新たな機能を明らかにし、妊娠期の SSRI 服用による自閉症リスクを抑える治療戦略の確立に有用な新たな知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュモデル系の確立：まず、発生が体外で進行し、胚が透明で観察が容易なゼブラフィッシュ胚を発生初期の胎児モデルとし、ゼブラフィッシュ胚脳における SERT の発現・機能解析と SSRI の作用解析を行う(図 1)。 *in situ* ハイブリダイゼ

図 1. 妊娠時抗うつ薬服用における胎児脳発生リスク評価のための研究基盤
初期脳発生における抗うつ薬 SSRI とセロトニントランスポーター SERT の機能解析



ーション、蛍光免疫染色により、脳の神経幹細胞、前駆細胞における SERT の発現と局在を明らかにする。マーカー遺伝子の発現解析、細胞系譜特異的に可視化したトランスジェニック系統を用いて、SERT の発現抑制、変異体、SSRI 処理により、神経幹細胞・前駆細胞の増殖、分化にどのような変化が見られるのかを明らかにする。また、神経回路を可視化した系統を用いて、発生初期の SSRI 処理が、発達期の回路形成にどのような影響をもたらすのかを明らかにする。

(2) マウスモデル系の確立：次に、ゼブラフィッシュ胚の脳で明らかにされた SSRI の作用機序が、マウス胎仔の脳においても保存されているかどうかを検証する(図 1)。野生型妊娠マウスへの SSRI 投与や、SERT 欠損マウス(Slc6a4^{-/-})を用いて、神経幹細胞、前駆細胞、神経細胞マーカータンパク質の免疫組織化学染色を行い、マウス脳の初期発生における SSRI の影響を明らかにする。

(3) ヒト胎盤モデル系の確立：さらに、SSRI がヒト胎盤形成そのものに影響するかどうかを明らかにする(図 1)。ヒト胎盤における SERT の発現を確認し、ヒト妊娠初期の絨毛外絨毛細胞株(HTR-8/SVneo)の球状体(胎児側)とヒト子宮内膜細胞株(EtsT499)(母体側)の共培養によるヒト *in vitro* 着床モデルを用い、SSRI が子宮内膜細胞の増殖、分化(脱落膜化)や、絨毛細胞の増殖、移動、子宮内膜細胞への浸潤に作用するかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

ゼブラフィッシュ胚脳における SERT/SLC6A4A タンパク質の局在を同定

ゼブラフィッシュ胚脳を発生初期のヒト胎児脳モデルとし、抗うつ薬、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)の標的であるセロトニントランスポーター(SERT, slc6a4a)の発現と機能解析を行なった。slc6a4a mRNA は、受精後 3 日目(dpf)の縫線核セロトニン神経細胞で発現するが、発生初期における SLC6A4 の発現と局在は不明であった。SERT に対する抗体を用いて、セロトニン神経が発生する以前の受精後 24 時間(hpf)で全胚蛍光免疫染色を行ったところ、SERT は、神経幹・前駆細胞である放射状グリア細胞で発現し、脳室に面する脳室帯の頂端側に局在することが示された。このことから SERT は、胎児脳の神経幹細胞において、何らかの役割を果たすことが示唆された。

SLC6A4A 発現抑制は頭部縮小、神経発生阻害と分裂細胞の増加をもたらす

神経幹細胞における SERT の機能を明らかにするために、slc6a4a に対するアンチセンスモルフォリノオリゴ(AMO)による発現阻害を行ったところ、頭部が縮小し、神経発生が阻害されることが明らかになった。この発現抑制により、リン酸化ヒストン H3 (pH3) 陽性の分裂細胞は、脳で顕著に増加することが示された。網膜視蓋投射を指標として、SLC6A4A 発現抑制による神経回路形成への影響を調べたところ、視蓋の神経細胞領域と軸索投射領域は有意に拡大する一方で、神経細胞数と回路発達と相関する指標は有意に低下することが明らかになった。自閉症や自

閉症モデルマウスにおいても、頭部縮小や軸索投射領域の拡大が報告されており、ゼブラフィッシュ胚における発生初期の SERT 阻害が自閉症発症のモデル系となり得る可能性が示唆された。

SSRI は SLC6A4A 発現抑制と類似した表現型を示す

SERT の発現抑制による表現型が、SERT 阻害剤である SSRI によって再現されるかを検証した。発生初期からの SSRI 処理により、多くの個体は SERT 発現抑制と同様に、頭部縮小を示す一方で、脳で pH3 陽性の分裂細胞が増加し、中脳後脳境界の神経幹細胞を可視化した GFP 発現領域が拡大した個体が観察された。

SSRI による表現型は 5-HT で再現される

この SSRI の効果がセロトニン(5-HT)を介しているかを調べるため、発生初期から 5-HT で処理したところ、多くの個体は SSRI 処理胚と同様に、頭部が縮小する一方で、脳で pH3 陽性の分裂細胞が増加し、GFP を発現する中脳後脳境界の神経幹細胞領域が拡大する個体が出現した。これらの結果から、抗うつ薬 SSRI は、SERT を阻害して細胞外セロトニン濃度を上昇させることで、神経幹細胞の増殖を促すことが示唆された。

5-HT はヒト胎児脳よりも母体胎盤で多く産生される

哺乳類脳の初期発生において、胎盤由来のセロトニンが一時的に胎児前脳に局在し、第 1 三半期（妊娠初期）における SSRI の曝露は、自閉症の発症確率を上げるとの報告がある。ヒト成体と胎児組織におけるセロトニン関連遺伝子の発現を RT-qPCR により解析したところ、*slc6a4* は、ヒト成体脳でセロトニン受容体 *htr1a*、合成酵素 *tph1*, *tph2*、代謝酵素 *maoa*, *maob* よりも弱く発現していたが、母体胎盤では、*slc6a4* と *maoa* の高い発現が検出された。胎児脳では、*slc6a4* の発現が *tph1* と共に極めて弱いながらも検出され、*htr1a*, *maoa*, *maob* は、他の器官（肺、肝臓、腎臓、心臓）よりも弱く発現していた。この結果から、子宮内でのヒト胎児脳の発生過程において、胎盤に由来するセロトニンが、胎児脳内のセロトニン濃度を大きく左右する可能性が示唆された。

高濃度 5-HT は重篤な発育遅延を引き起こす

上記の結果は、哺乳類胎児は、胎盤に由来する高濃度のセロトニンに曝されることを示唆する。ゼブラフィッシュ初期胚をより高濃度の 5-HT で処理したところ、重度の発育不全となり、*gfap* 陽性放射状グリア細胞が大きく減少することが明らかとなった。この結果は、自閉症児の中には、高セロトニン血症を示す患者が 25%以上存在し、高セロトニン血症モデルマウスは、社会行動障害を示すとの報告から (Muller, 2016)、自閉症リスク要因をセロトニン代謝異常とする仮説とも一致する。

以上の結果から、SSRI 処理は 5-HT 濃度の上昇をもたらし、神経幹細胞の増殖を促すことで神経細胞の産生が抑制され、発育不全に至る可能性が示唆された。

(2) 国内学における位置づけとインパクト

セロトニンは、鬱や統合失調症などヒト精神疾患に深く関わる神経伝達物質であるだけでなく (Baou, 2016)、細胞増殖、分化、回路形成、シナプス形成など脳の発達期にも重要な役割を果たす (Gaspar, 2003)。このことから、セロトニンの細胞外濃度を高める抗うつ薬 SSRI は、胎児に対する副作用が懸念されている (Kinast, 2013)。事実、妊娠中の SSRI 服用が出生児の自閉症リスクを高めるとの報告が増えていることから (Millard, 2017)、SSRI の作用機序と標的である SERT の脳の発生・発達過程における分子機構を明らかにすることが重要である。

自閉症 (自閉スペクトラム症、ASD) は、これまでに多くの感受性遺伝子が同定され (Autism Genome Project, 2007)、遺伝要因に依存した多因子性疾患であるだけでなく (Happé, 2006)、胎児期の子宮内環境にも依存する小児神経発達障害である (Muhle, 2018)。抗うつ薬 SSRI だけでなく、サリドマイドやバルプロ酸などの催奇性薬剤も、妊娠初期の服用で自閉症の発症リスクを増加させることから (Dufour-Rainfray, 2011)、胎児脳の初期発生過程に自閉症発症に関わる重要なメカニズムがあると考えられる。

SERT (SLC6A4) は、自閉症の原因遺伝子の一つとして同定され (Abrahams, 2008)、遺伝子欠損マ

ウス(*Slc6a4*^{-/-})は、ヒト自閉症モデルとして報告されているが(Olexova, 2012)、脳の初期発生過程における母体胎盤を介した SSRI の作用、SERT の役割、自閉症発症に至る分子機構については未だ不明な点が多い。

本研究は、ゼブラフィッシュ胚をヒト胎児モデルとし、発生初期に SSRI で処理された胚を解析したところ、SERT の発現抑制と類似した、神経幹・前駆細胞の増殖亢進と神経細胞の産生阻害の結果、最初の表現型として頭部縮小をもたらすことを明らかにした。セロトニンは進化的に古くから存在する神経伝達物質であり、脊椎動物の脳発生における基本的分子機構は、種を超えて保存されていることから、本研究で確立されたゼブラフィッシュモデル系は、抗うつ薬 SSRI の胎児脳発生に対する副作用の分子機構解析に有用であり、発達障害のリスク評価に必要な不可欠なバイオマーカーを探索・同定するための研究基盤となり得ることが示された。

(3) 今後の展望

抗うつ薬 SSRI の初期脳発生に対する影響とセロトニン 5-HT、セロトニントランスポーター SERT の脳の発生・発達・機能における役割と分子機構を理解し、出生後の発達障害リスク評価のための新たな指標を同定するために、以下の項目についてさらに解析を進め、明らかにして行く必要がある。

脳の発生・発達段階に応じた SSRI/5-HT 暴露の影響と作用機序
個々の SSRI に対応した脳の発生・発達への作用と相違点
発生初期の SSRI 暴露による神経回路発達や機能、行動への影響

< 引用文献 >

- 竹田、日産婦誌 68:1815-1822, 2016
- 日本産婦人科学会 妊産婦メンタルヘルスケアマニュアル:8-15 平成 29 年 3 月
- 山下、母子保健情報 67: 30-34, 2013
- 坂元、臨床精神薬理 7:1889-1894, 2004
- Kim, J. Clin. Pharmacol. 61:155-163, 2006
- Millard, Neurosci. Biobehav. Rev. 80:743-765, 2017
- Bonnin, Nature, 472:347-350, 2011
- Trowbridge, Anat. Rec. 294:1615-1623, 2011
- Croen, Arch. Gen. Psychiatry 68:1104-1112, 2011
- Muller, Neuroscience, 321:24-41, 2016
- Baou, Schizophr. Res. 170:18-29, 2016
- Gaspar, Nature Rev. Neurosci., 4: 1002-1012, 2003
- Kinast, Frontiers Cell. Neurosci., 7: 72, 2013
- Millard, Neurosci. Biobehav. Rev. 80:743-765, 2017
- Autism Genome Project, Nature Genet. 39: 319-328, 2007
- Happe, Nature Neurosci. 9: 1218-1220, 2006
- Muhle, JAMA Psychiatry, 75: 514-523, 2018
- Dufour-Rainfray, Neurosci. Biobehav. Reviews, 35: 1254-1265, 2011
- Abrahams, Nature Rev. Genet. 9: 341-355, 2008
- Olexova, Neurosci. Res. 74: 184-194, 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomomi Sato, Takumi Ito and Hiroshi Handa	4. 巻 9
2. 論文標題 Cereblon-Based Small-Molecule Compounds to Control Neural Stem Cell Proliferation in Regenerative Medicine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.629326	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 Hideki Ando, Tomomi Sato, Takumi Ito, Junichi Yamamoto, Satoshi Sakamoto, Nobuhiro Nitta, Tomoko Asatsuma-Okumura, Nobuyuki Shimizu, Ryota Mizushima, Ichio Aoki, Takeshi Imai, Yuki Yamaguchi, Arnold J Berk, and Hiroshi Handa	4. 巻 15
2. 論文標題 Cereblon Control of Zebrafish Brain Size by Regulation of Neural Stem Cell Proliferation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 95-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.04.007	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 智美
2. 発表標題 発生初期の抗うつ剤SSRI処理によるゼブラフィッシュ脳における作用解析
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 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 智美、梶原 健、半田 宏、永島 雅文
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ脳の発生過程における抗うつ剤SSRIの作用機構
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会 合同年会
4. 発表年 2018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
研究 分担者	梶原 健 (Kajihara Takeshi) (80286103)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

	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	栗崎 知浩 (Kurisaki Tomohiro) (90311422)	埼玉医科大学・医学部・講師 (32409)	

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
---------	---------