

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03649

研究課題名(和文) 発達期精神疾患の発症基盤に胎内環境が与える影響の解析

研究課題名(英文) Effects of in utero environment on pathogenesis of neurodevelopmental disorders

研究代表者

高橋 孝雄 (Takahashi, Takao)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：80171495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：正常な大脳皮質発生においては、神経幹細胞の分裂増殖・分化誘導が秩序だてて進行することが極めて重要である。我々の先行研究より遺伝子異常や環境物質・薬物の胎内曝露などの異常によりエピジェネティクス機構の関与のもと神経幹細胞の細胞分裂動態に異常を生じ、神経細胞数が変動することで大脳皮質構築異常を生じる点が判明していた。そこで本研究は、ここ数十年間、日本での増加が懸念されている胎内低栄養状態や母体軽症感染がエピジェネティクス機構の異常を介して大脳皮質構築異常を生じる可能性について検討し、さらに皮質構築異常が生じうる上記精神疾患発症との関連性について明らかにすることを目的に実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的特色は、神経幹細胞の細胞周期調節機構と大脳皮質形成過程を胎児生体内において解析する点である。これら解析方法は煩雑で時間がかかる点が欠点であるが、培養細胞などと比較しより正常に近い状態で解析が行える点で重要な知見が得られる可能性が高い。本研究結果は、日本人の出生体重が減少傾向にある現在、若年女性のエネルギー摂取量の減少と高いやせ率に関して、妊娠母体から胎児が受け取るエネルギー量の減少が生後の子どもの神経発達に悪影響を及ぼす可能性を初めて示したものである。さらに、母体軽症感染においても生後発達に悪影響を与える可能性を定量的に明らかにした成果で、今後の社会啓発が重要と考える。

研究成果の概要(英文)：Precise regulation of cell cycle kinetics of neural stem/progenitor cells (NSPCs) is critical for neocortical histogenesis. Previous analyses by our group have indicated that genetical abnormalities and/or in utero exposure to environmental pollutant/drug affected cell cycle kinetics of the NSPCs. These dysregulations of the cell cycle led to neocortical dysgenesis by altering number of neurons within the specific neocortical layers. In this analysis, we evaluated effects of 1) mild caloric restriction and 2) mild maternal viral infection on neocortical histogenesis by using mathematical model of neocortical histogenesis. Moreover, we evaluated behaviors of offspring to examine whether those mice indicate abnormality that may potentially resemble to characteristics of children/adolescence of neurodevelopmental disorders.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経発生 大脳皮質 エピゲノム 胎内環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高次脳機能の中枢である大脳皮質は、胎児期の胎児側脳室周囲にある神経幹細胞より神経細胞やグリア細胞を産生することで形成される(図1)。近年の研究で大脳皮質の機能不全が小児期や成人期の発達障害や精神疾患の原因となりうるのではないかと指摘が相次いでおり、胎内環境に与える各種要因について、大脳皮質内の神経細胞産生数に着目した研究の必要性が高まっていると考えられる。特に注目すべきはこれらの発症が必ずしも単一遺伝子の機能異常で説明することが困難な点であり、複数の遺伝子異常の組み合わせや蛋白機能・発現量の異常の組み合わせ、胎内環境(栄養・感染等)の異常が病態発現に与える影響を解析する重要性にいち早く着目して研究を進めてきた。

しかし、実際の臨床の現場でヒトに実施可能な検査(MRI・脳波等)を上記患児・患者に実施しても異常を検出できない例が少なくとも半数以上あり、また培養細胞や iPS 細胞などを活用した研究では大脳皮質内の神経細胞ネットワークの再現が困難である。したがってこれらの病態解析では、質の高い成果を得るうえでげっ歯類や霊長類を用いた病態モデル動物の開発と解析が必要である。

一方、日本の小児を取り巻く現状については、過去30年にわたり継続的に出生体重が減少している点が指摘され(保健医療科学2014)またここ数年においては発達障害(自閉スペクトラム症や注意欠陥多動症)の罹患率の増加が注目されているが、その背景メカニズムは不明である。これら両者は、母体の高齢化といった遺伝的要因のみでは説明困難であり、胎内環境の変動自体がその主たる原因となっている可能性について基礎的解析の必要性が高まっていると考えられる。

出生体重の減少が生後の児にどのような影響を与えるかについては、メタボリック症候群や高血圧の発症リスクを増加させる点が指摘されている(*Science* 2004)。またこれらが脳皮質機能に与える影響については二つの大規模コホート研究で出生児の生後統合失調症発症率の増加や高齢時の認知力機能の低下(*Arch Gen Psychiatry* 1996, *JAMA* 2005, *Proc Natl Acad Sci USA* 2010)が指摘されているが、その背景メカニズムの詳細は不明である。さらに、出生体重の減少傾向には母体体重の減少傾向が同時に認められ、母体摂取カロリー量の減少がその一因として推測されているが、胎盤機能不全の関与を指摘する意見もあり、コンセンサスは得られていない。

一方、胎内感染が中枢神経奇形の原因となりうる点についてはサイトメガロウイルスや風疹ウイルスがよく知られているが、胎児ではなく母体の軽症感染が胎内において大脳皮質発生に与える影響と生後児の高次脳機能に与える影響との関連性については、詳しい病態解析がなされているとは言えない状況であった。

2. 研究の目的

本研究は、母体低栄養や母体軽症感染と生後大脳皮質機能異常の関連性について、皮質内投射神経細胞数と神経幹細胞の分裂動態の解析を糸口に明らかにし、生後児に生じる発達障害・精神疾患発症との関連性についてエピゲノムの視点で研究を展開する目的で実施した。具体的には(1)胎児神経幹細胞の細胞分裂動態と細胞周期調節蛋白発現量の解析、(2)大脳皮質構築の解析、(3)生後マウスの行動解析を実施し、それらに影響を与えうる胎児神経幹細胞のエネルギー状態や母体サイトカインの関与などを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 胎内低栄養が大脳皮質発生および高次脳機能に与える影響についての解析

miRNA 発現変化と細胞分裂動態に関する解析

先行実験より、胎内低栄養が神経幹細胞の特

定の miRNA (miR-92a) の発現を変動させる可能性が示唆されていた。そこで妊娠12日目の胎児前脳より total RNA を抽出し、本 miRNA の発現量を RT-PCR で確認した。また miRNA が神経幹細胞の分化誘導機構に与える影響が先行研究より報告されていたことから、胎生14日目と16日目の胎児大脳壁内において Tbr2 に対する免疫組織染色を実施した。

神経幹細胞のエネルギー状態に与える影響についての解析

胎内低栄養状態により神経幹細胞内ミトコンドリアでのエネルギー代謝に異常を生じる可能性があることから、胎生12日目の胎児大脳壁内神経幹細胞を精製し NAD/NADH 比を測定した。

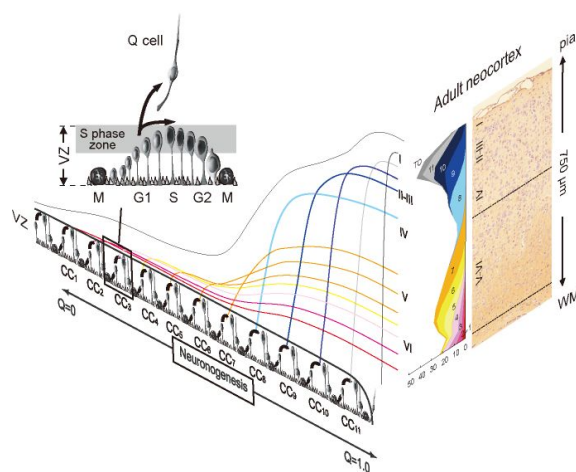


図1 大脳皮質の神経細胞産生過程

(Mitsuhashi T, Takahashi T. *Congenit Anom* 2016.)

神経幹細胞の遺伝子発現パターンに与える影響の解析

胎内低栄養が大脳皮質を形成する神経幹細胞の遺伝子発現パターンに与える影響について、妊娠 12 日目の胎児前脳より total RNA を抽出し RNA-seq 解析を実施した。

胎内低栄養で出生したマウスの行動解析

Open field test (活動量)、Y-maze test (作業記憶・参照記憶・固執傾向)、prepulse inhibition/startle response test (統合失調症様行動)、social interaction analysis (社会性)、高架式十字迷路テスト (不安様行動)、明暗箱テスト (不安様行動) を胎内低栄養に曝露した生後 4-5、8-9 週齢オスマウスを用いて実施した。

(2) 母体感染が大脳皮質発生および高次脳機能に与える影響についての解析

合成二本鎖 RNA アナログ polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C)) を妊娠 12 日目に単回腹腔内投与し、以下の実験に供した。

母体のサイトカイン測定

妊娠 14 日目の母体右心室より血液を採取し血清を分離、Milliplex MAP Mouse TH17 Magnetic Bead Panel (MTH17MAG-47K-06, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) で IFN、IL-1、IL-6、IL-10、IL-17A、TNF を定量した。

S 期特異的マーカーを用いた細胞周期各相の測定

妊娠 14 日目の母マウスに午前 9 時から BrdU を 3 時間おきに腹腔内投与し、胎児を摘出後 4% パラホルムアルデヒドで固定した。4 μm 厚の切片を作成し抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学染色後、神経幹細胞のうち BrdU 陽性細胞の割合 (Labeling Index, LI) を BrdU 曝露 2、4.5、6.5、12.5 時間後に計測した。横軸に時間、縦軸に LI を取りプロットし、LI の上昇率から神経幹細胞の細胞周期各相の長さを胎児前脳において計算した。

S 期特異的マーカーを用いた分化誘導の確率の測定

妊娠 14 日目の母マウスに午前 7 時から IdU、午前 9 時から BrdU を 3 時間おきに腹腔内投与し、胎児を摘出後 4% パラホルムアルデヒドで固定した。4 μm 厚の切片を作成し、抗 IdU/BrdU 抗体、抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学染色後、神経幹細胞のうち分化を開始した細胞の割合 (分化誘導の確率、Q 値) を計測した。

TUNEL 染色によるアポトーシスの解析

胎生 14 日目の胎児前脳を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、4 μm 厚の切片を作成のうえ TUNEL 染色を実施した。

生後 21 日における大脳皮質構造の解析

妊娠 14 日目の母マウスに午前 7 時から IdU、午前 9 時から BrdU を 3 時間おきに腹腔内投与し出産させた。生後 21 日まで飼育した仔マウスを 4% パラホルムアルデヒドで還流固定後、一次体性感覚野を含む厚さ 4 μm の連続冠状断切片を作成し、抗 IdU/BrdU 抗体、抗 BrdU 抗体、大脳皮質表層特異的マーカー (Cux1) を用いて蛍光免疫組織染色を行い、胎生 14 日目に産生された神経細胞の大脳皮質内分布パターンを計測した。

4. 研究成果

(1) 胎内低栄養が大脳皮質発生および高次脳機能に与える影響についての解析

miRNA 発現変化と細胞分裂動態に関する解析

胎内低栄養による miR-92a の発現量への影響を解析した結果、予想に反して減少させることが判明した。本 miRNA は神経幹細胞の分化を抑制させると先行研究で報告されていたことから、胎生 14 日目と 16 日目の胎児大脳壁内において Tbr2 に対する免疫組織染色を実施したところ、14 日目には変化を認めず、16 日目では Tbr2 陽性細胞が増加していた。これらの結果は、当方の先行実験で判明していた神経幹細胞の分化誘導の確率 (Q 値) が異常増加する点と矛盾しないものであった。

神経幹細胞のエネルギー状態に与える影響についての解析

胎生 12 日目の胎児大脳壁内神経幹細胞を精製し NAD/NADH 比を測定した結果、低栄養曝露が NAD/NADH 比を増加させる点を確認した。

神経幹細胞の遺伝子発現パターンに与える影響の解析

胎生 12 日目の胎児大脳壁から抽出した RNA を用いて解析した結果、胎内低栄養群では正常と比較し 169 個の遺伝子に発現変化を認め、110 個が増加、59 個が減少していた。遺伝子オンロジー解析の結果、神経細胞産生、軸索形成、神経細胞分化等に機能する遺伝子群が減少、蛋白質代謝、翻訳機構、有機窒素化合物の生合成に関与する遺伝子群が増加した。

胎内低栄養で出生したマウスの行動解析

胎内低栄養に曝露された生後 4 週齢の子マウスにおいて、open field test での中心滞在比率の減少、高架式十字迷路テストにおける open arm 滞在比率の減少、明暗箱での明箱滞在時間の増加といった不安様行動を検出した。

以上の結果より、胎内低栄養が特定の miRNA 発現に変動を与え、また神経発生に関与した遺伝子群の発現量を減少させることで皮質形成に異常を生じ、さらにそれらが影響して生後児に不安様行動を増加させる点を初めて明らかにした（投稿中）。

(2) 母体感染が脳皮質発生および高次脳機能に与える影響についての解析

母体のサイトカイン測定

妊娠 14 日目の母体血清中のサイトカインを測定した結果、poly (I:C) 投与により IL-1、IL-6、IL-10、TNF が有意に増加した（図 2）。このうち IL-6 量は体重が減少した変化量と有意に逆相関した（図 3）。

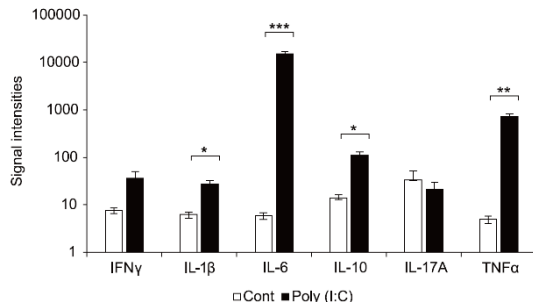


図 2 poly (I:C) 投与による母体サイトカイン
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ 、誤差範囲: 標準誤差 (Sasaki M, et al. *Dev Neurosci* 2023.)

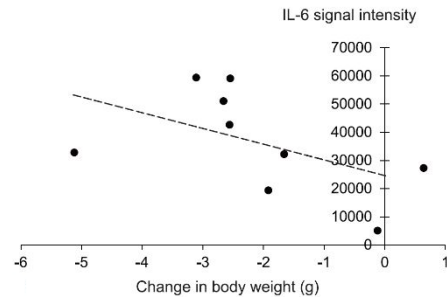


図 3 IL-6 シグナルと体重変化との相関 (Sasaki M, et al. *Dev Neurosci* 2023.)

S 期特異的マーカーを用いた細胞周期各相の測定

胎生 14 日目の胎児大脳壁内神経幹細胞の細胞周期長を測定した結果、poly (I:C) 投与は細胞周期各相を変動させなかった。

S 期特異的マーカーを用いた分化誘導の確率の測定

胎生 14 日目の胎児大脳壁内神経幹細胞の分化誘導の確率 (Q 値) を測定した結果、poly (I:C) 投与は Q 値を有意に増加させることが判明した。

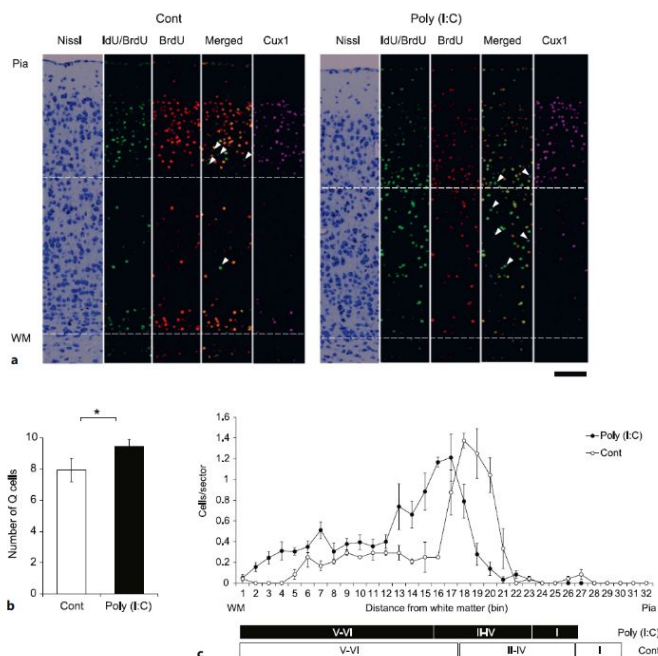


図 4 Poly (I:C) 投与による生後 21 日目仔マウスの大脳皮質構築異常

a. 大脳皮質（一次体性感覚野）の Nissl 染色および蛍光免疫組織染色写真

白矢印: 緑色のみ示す Q 細胞、緑色: IdU/BrdU 陽性核、赤色: BrdU 陽性核、マゼンタ: Cux1 陽性核、WM: 白質、スケールバー: 100 μm

b. 胎生 14 日目に産生された神経細胞総数の比較

*: $p < 0.05$ 、誤差範囲: 標準誤差

c. 胎生 14 日目に産生された神経細胞の大脳皮質内分布

WM: 白質、誤差範囲: 標準誤差

(Sasaki M, et al. *Dev Neurosci* 2023.)

生後 21 日における大脳皮質構造の解析

Poly (I:C) 投与は胎生 14 日目に産生された神経細胞数を増加させ、大脳皮質内分布パターン

を深層に偏らせる点を明らかにした(図4)。また poly (I:C) 投与による大脳皮質菲薄化が皮質全層にわたり非特異的であったことから、アポトーシスの影響を検討する目的で TUNEL 染色を実施した結果、TUNEL 陽性細胞が poly (I:C) 投与群で有意に増加している点を明らかにした(図5)。

本成果は、胎内感染がサイトカインを介して大脳皮質を形成する神経幹細胞の細胞分裂動態に直接的に影響を与え、その結果大脳皮質を菲薄化する点を明らかにしたもので、今後生後行動への悪影響が認められるか、また皮質機能を改善する薬剤投与でそれらを改善できるかについて検討する計画である。また本成果は母体の軽度なウイルス感染症でも大脳皮質発生に影響を与える可能性を示唆する。

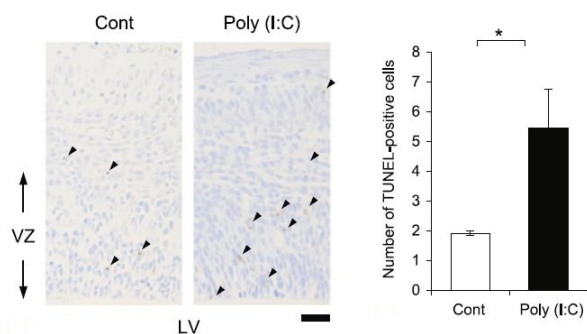


図5 Poly (I:C)投与による TUNEL 陽性細胞数の大脳壁内変化

黒矢印: TUNEL 陽性細胞、VZ: 脳室帯、LV: 側脳室、

*: $p < 0.05$ 、誤差範囲: 標準誤差

(Sasaki M, et al. *Dev Neurosci* 2023.)

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki Marie, Mitsuhashi Takayuki, Goto Fumiko, Shibata Shinsuke, Kubo Ken-ichiro, Oku Shinju, Owashi Akihiro, Takahashi Takao	4. 巻 -
2. 論文標題 Maternal immune activation by poly (I:C) exposure causes cerebral cortical dysgenesis through dysregulated cell cycle kinetics of neural stem/progenitor cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000529317	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 Mitsuhashi Takayuki, Hattori Satoko, Fujimura Kimino, Shibata Shinsuke, Miyakawa Tsuyoshi, Takahashi Takao	4. 巻 -
2. 論文標題 In utero exposure to valproic acid throughout pregnancy causes phenotypes of autism in offspring mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000530452	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	三橋 隆行 (Mitsuhashi Takayuki) (80338110)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究分担者	芝田 晋介 (Shibata Shinsuke) (70407089)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問教授 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	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	久保 健一郎 (Kubo Ken-ichiro) (20348791)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

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