

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08792

研究課題名(和文) 補体異常を介する自己免疫性自閉症モデルマウスの作成

研究課題名(英文) a novel murine model of autoimmune autism mediated by complement abnormalities.

研究代表者

奥 健志 (Oku, Kenji)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：70544295

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)：抗補体抗体を用いた新規の自閉症スペクトラム(ASD)モデルマウスを作成した。妊娠したBalb/Cマウスにモノクローナル抗C1q抗体(JL-1)を投与し、産まれた仔マウス(ASDモデルマウス)で各種行動解析(高架式十字迷路、3-chamber test、nose-to-nose sniffing test)のいずれもが雌雄ともにコントロールマウス(コントロールIgG投与、PBS投与)に比べ有意にASDに特徴的な所見を認めた。現在、病理所見を解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

少子化が進行する我が国では不育症と共に児の発達障害は重要な問題である。自閉症スペクトラム(ASD)は対人関係の障害や環境への適応障害を特徴とする発達障害で我が国の調整有病率は3%を超えたとの報告もある。不育症、ASDの一部に抗C1q抗体が原因な一群があると判明すると周産期の同抗体の測定や、免疫抑制療法が効果的に出産や児童の予後を改善する可能性がある。治療により少子化や児童の発達障害に介入できる可能性があることになりその社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Novel murine model of autism spectrum disorder (ASD) using complement antibody was created. Pregnant Balb/C mice were administered monoclonal anti-C1q antibody(JL-1), and the offspring mice (ASD model mice) were born. Various behavioral analyses (elevated plus maze, 3-chamber test, nose-to-nose sniffing test) were performed, and both male and female ASD model mice exhibited significantly characteristic features of ASD compared to control mice (administered control IgG or PBS). Currently, pathological observations are being analyzed.

研究分野：膠原病内科

キーワード：自閉症モデルマウス 抗C1q抗体 C1q 不育症

### 1. 研究開始当初の背景

少子化が進む我が国で不育症や習慣流産といった不妊症と出産した児童の発達障害は大きな問題である。以前より不育症/習慣流産に補体活性化が関与することは知られていたが (Sugiura-Ogasawara S et al, Hum Reproduct 2006 他)、我々は全身性エリテマトーデス(SLE)の類縁疾患であり補体活性化が合併する抗リン脂質抗体症候群(APS)において補体古典経路の第1蛋白であるC1qに対する自己抗体(抗C1q抗体;aC1q)が高率に出現しており、それが不育症に関連することを報告した (Oomura K et al, Clin Immunol 2019, 科研費研究課題番号 16K09885)。すでに aC1q が SLE 患者の血清中で高発現することと、病原性を有する aC1q は中和抗体ではなく補体古典経路活性化を著明に up-regulate することが報告されていた。さらに我々は、APS が合併しない不育症患者でも aC1q が高発現していることを報告して、マウスモノクローナル aC1q(JL-1)を投与した妊娠 balb/c マウスは胎盤・全身炎症と共に流産を高率にきたし抗補体治療によって流産が改善することを報告した (不育症モデルマウス)。aC1q が補体活性化を惹起することによって胎盤炎症・胎盤不全を認め流産をきたすと考えられる。

一方、自閉症スペクトラム(ASD)は、神経発達障害に分類されるひとつの診断名であり、その中核症状は社会的コミュニケーションや社会的相互作用における持続的な欠陥であり、脳機能発達の偏りによる認知障害の一つとされる。ASD の発症機序は不明な点が多いが、妊娠時に母体の全身炎症(感染症、自己免疫疾患などに伴う)により活性化した免疫システムがサイトカインの誘導を介して胎児脳内のマイクログリアを活性化し正常な脳発達の障害に関係することが病態基盤の一つと考えられる。実際にマウスモデルにおいて IL-17a や poly I:C を投与した母体より生まれた仔マウスは ASD 様の行動異常をきたす (ASD の母体免疫賦活化 (maternal immune activation: MIA) モデル)。また、ASD では胎児期から幼少期に起こる神経の剪定が不十分で、それが未熟な神経細胞の除去不全につながり ASD 症状をきたすとされる。C1q はこの神経剪定に重要な役割を果たす。更に、不育症患者や SLE、APS 患者の母から生まれた児に ASD 患者が多いとの報告が文献上散見されるといったことから aC1q の妊娠母体での発現が子の ASD 発症を誘引する可能性が示唆された。

これら背景から aC1q を妊娠マウスに投与するモデルにおいて仔の ASD 発症が観察できる可能性が示唆された。すなわち、aC1q は胎盤および母体の全身炎症をきたすことによって、あるいは C1q の機能を障害することによって子の ASD 発症に寄与する可能性がある。

研究開始時点でもすでに複数の ASD モデルマウスが報告されていたが、自己免疫的な機序を利用したモデルは認められなかった。ASD モデルマウスの解析は行動解析が主として行われ、脳病理解析も行われることが多いが、ASD の特徴的所見が必ずしも定まっているわけではなく行動異常の解析が重要である。

### 2. 研究の目的

aC1q を妊娠マウスに投与する新規 ASD モデルマウスを作成することを目的として行動解析と病理解析を行う。不育症や自己免疫疾患 (SLE、APS) の患者血清中に高頻度に出現する自己抗体が流産のみではなく児が生まれた場合に神経発達障害を来す可能性があるかと判明したら、周産期医療において大きな影響を与えうる。この点の基礎データとすべく今回の研究を考案した。

### 3. 研究の方法

モデルマウスの作成: 妊娠した balb/c マウスに対して妊娠 8, 12 日目に JL-1 を経尾静脈投与して仔マウスを得る (ASD モデルマウス)。JL-1 投与量は仔マウスが 2-3 匹以上出産される用量まで調整する。Negative control はマウスコントロール IgG もしくは PBS を同量・同スケジュールで投与したものとす。Positive control は IL-17A 1ng/body を同スケジュールで投与する。

行動解析: ASD モデルマウスに対して行動解析を 4, 6, 8, 12 週後に行った。行動解析試験は高架式十字迷路試験、three-chamber 試験、nose-to-nose sniffing 試験をそれぞれ 10 分間行った。aC1q 投与のみで ASD の発症を認めなかった際には IL-17a と併用し投与したモデルを考案していた。高架式十字迷路は 2 つの開いたアーム (open arm) と遮蔽物で閉じたアーム (closed arm) を有し、ASD で頻繁に認められる不安症状を観察する。不安症状を呈するマウスは closed arm に進入回数が増える。Three-chamber 試験や nose-to-nose 試験はマウスの社会性や他者への興味を評価する試験である。Three-chamber 試験は 3 つの小部屋が出入り口のそれぞれ 1 つずつある 2 つの透明な仕切りで仕切られており、中央の小部屋に入れられたマウスが両脇の小部屋の小ケージ内の異物や stranger に対してどのように反応するかで解析するが、ASD モデルマウスでは stranger のいるケージに近寄らないか近寄っても匂いを嗅ぐなどの相手とのコミュニケーションをとらない。Nose-to-nose 試験はケージ内に被験マウスと対照マウスを入れ、一定時間内の対照マウスに対する sniffing などのコミュニケーション回数を測定する。ASD ではその回数が低下する。

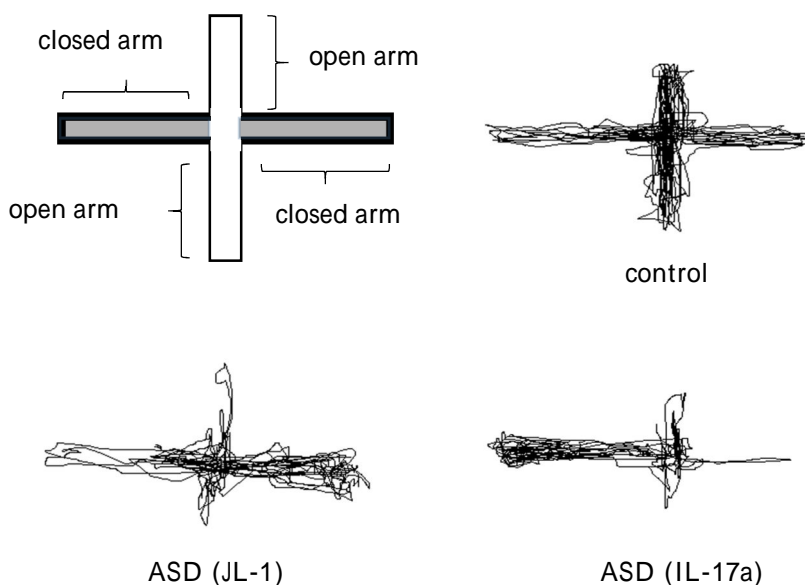
病理学的解析：マウス脳病理所見の解析として大脳半球、小脳半球、扁桃体を HE 染色、Golgi 染色で解析し、神経細胞数や形態、細胞成熟レベルについて解析する。さらに脳内における C1q の発現レベルについて解析し、分布異常など発現異常について検出する。

#### 4. 研究成果

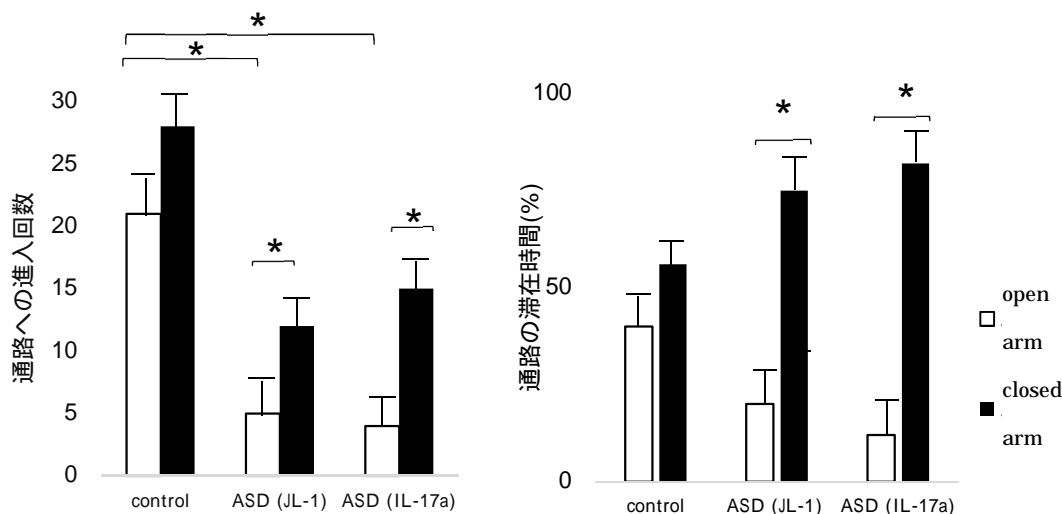
ASD モデルマウスに特徴的とされる行動異常を示すモデルは、8 週齢の妊娠 balb/c マウスに不育症モデルと同量の JL-1 (500-625 $\mu$ g/kg; 10-12.5 $\mu$ g/body) を妊娠 8、12 日目に投与することで得られた。1 回の出産数は 0-3 匹と少なかった。出産した仔マウス (ASD モデルマウス) の体長、体重、脳重量は、脳重量の体重あたりの比がややネガティブコントロールマウスより大きい傾向にあったがいずれも統計学的な有意差を認めなかった。

行動解析の結果、雌雄ともに、高架式十字迷路試験、three-chamber 試験、nose-to-nose sniffing 試験のいずれも ASD モデルマウスにおいて有意に ASD 症状の発現を認めたが、8、12 週齢での解析に比べて 4、6 週齢で個体差が大きく、行動異常の定量化解析では 8、12 週でネガティブコントロールと比較した際の差が統計学的に有意であった。各行動解析試験の結果は以下の通りである。

高架式十字迷路試験においては、オープンアームへの侵入回数と滞在時間の有意な低下を認め、新奇の環境に対する警戒や適応の障害が認められた (図 1、図 2)。

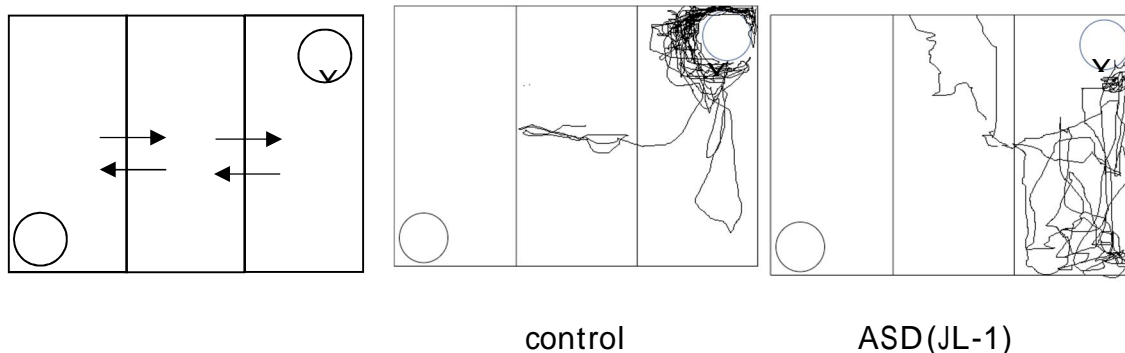


**図 1：高架式十字迷路試験解析結果（足跡）** 左上：高架式十字迷路試験の上方からみた模式図。遮蔽物があり通路の外側が確認できない closed arm と遮蔽物がない open arm に分かれており、十字の通路をマウスは自由に行き来できる 右上・左右下 control (コントロール IgG を投与した negative control)、それぞれ JL-1、IL-17a を投与した ASD モデルマウスの迷路内での足跡をトレースした。ASD モデルはそれぞれ JL-1、IL-17a 投与によるモデルでの結果を示している。観察時間は 5 分。マウスは雌 8 週齢で、いずれも代表的な結果を示している

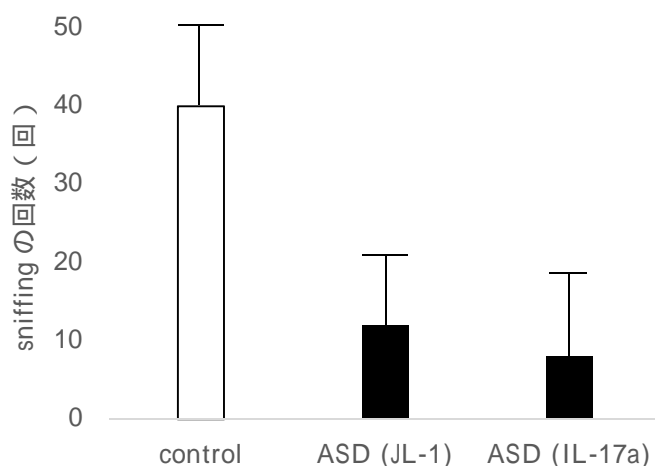


**図2：高架式十字迷路試験解析結果** 左：角通路への進入回数 高架式十字迷路法試験での open arm(白)、closed arm(黒)への進入回数を示す。右：各通路での滞在時間 両 arm での滞在時間の割合を示す。両試験ともに、マウスは雌の8週齢で3回試行の結果を統計解析し standard error bar を示している。各群の open/closed arm への進入回数・滞在時間の差は Mann-Whitney の U 検定で解析。3 群の open arm への進入回数の比較は Kruskal-Wallis 検定で解析。\* p<0.05

一方、three chamber 試験においては、stranger である見知らぬマウスのいるワイヤーケージへの反応を観察するが、ワイヤーケージへの近接時間も近接しての匂い嗅ぎ行動回数の低下など典型的な ASD 様行動異常を認めた(図3、図4)。ここでの匂い嗅ぎ行動とは鼻による相手の体への接触もしくは1cm以内の近接と定義している。



**図3. Three chamber 試験解析結果(足跡)** 左; three chamber 試験は透明な仕切りで区切られた3つの chamber(部屋)からなる。それぞれの部屋は仕切りの中央にある入り口から出入りできる。両側の chamber にはワイヤーゲージ(丸)を配置し、一方に見知らぬマウス(X)を入れ、もう一方は空にしてマウスの行動を解析した。中右;それぞれ negative control(control IgG 投与例)、ASD モデル(JL-1 投与例)のマウス足跡を示している(いずれも雌8週齢の5分間観察における代表的データ。見知らぬマウスは balb/c 8週齢雌を使用)。ASD モデルマウスではケージへの近接頻度が低い。



**図4. Three chamber 試験解析結果(見知らぬマウスに対する sniffing の回数)** Three chamber 試験において被験マウスが見知らぬマウスに近接して sniffing を行った回数を示している。いずれも8週齢雌マウスの結果(見知らぬマウスは8週齢 balb/c 雌マウス)で3回施行した結果を示している。Kruskal-Wallis 検定で解析。\* p<0.05

上記のように、three-chamber 試験では他者に対するコミュニケーション障害を認めており、これは nose-to-nose sniffing test でも確かめられた。マウス飼育ケージ内に被験マウスと見知らぬマウスを1頭ずつ設置して5分間の接触回数を観察する。ASD モデルマウス(JL-1)は three chamber 試験の際と同様に sniffing 回数の有意な低下や grooming 回数、無動である時間の上昇などが認められた(データ非表示)。

本研究は COVID-19 pandemic 下や、研究者の転任に伴う実験施設変更に際して長期間実験認可がされなかったことなどから予定していた病理解析は科研費研究期間終了後に開始しており、今後その結果を公表する。現時点で JL-1 を母体に投与し補体系の活性化を妊娠時に賦活化することによって生まれてくる仔マウスには、各種行動解析結果から、新奇の環境変化への適応が障害され、他者へのコミュニケーション能力の低下や関心の低下を認める ASD に特徴的な性質を認める。今後、脳の病理解析など詳細な検討を行い結果を公表していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaneshige Risa, Motoki Yukari, Yoshida Mika, Oku Kenji, Morishita Eriko, Ieko Masahiro, Ichihara Kiyoshi, Nojima Junzo	4. 巻 -
2. 論文標題 Determination of diagnostic threshold in harmonization and comparison of clinical utility for five major antiphospholipid antibody assays used in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Laboratory Analysis	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) 10.1002/jcla.24340	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 Kondo Junichi, Arinuma Yoshiyuki, Matsueda Yu, Hasegawa Yasuhiro, Muramatsu Takumi, Kanayama Yoshio, Hoshiyama Takayuki, Tono Toshihiro, Tanaka Sumiaki, Oku Kenji, Yamaoka Kunihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 A patient with Castleman's disease initially manifesting symmetrical synovitis with pitting oedema	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	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) 10.1093/mrcr/rxac003	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 Abe Nobuya, Kono Michihito, Kono Michihiro, Ohnishi Naoki, Sato Tomoya, Tarumi Masato, Yoshimura Masaru, Sato Taiki, Karino Kohei, Shimizu Yuka, Fujieda Yuichiro, Kato Masaru, Hasebe Rie, Oku Kenji, Murakami Masaaki, Atsumi Tatsuya	4. 巻 196
2. 論文標題 Glycogen synthase kinase 3 /CCR6 positive bone marrow cells correlate with disease activity in multicentric Castleman disease TAFRO	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 1194 ~ 1204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.17993	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 Arinuma Yoshiyuki, Hirohata Shunsei, Isayama Takuya, Hasegawa Yasuhiro, Muramatsu Takumi, Kondo Junichi, Kanayama Yoshio, Ino Kazuma, Matsueda Yu, Oku Kenji, Yamaoka Kunihiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Anti ribosomal P protein antibodies in patients with systemic lupus erythematosus is associated with hyperferritinemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 70 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.14245	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 Ninagawa Keita, Kato Masaru, Ohira Hiroshi, Tsuneta Satonori, Iwano Hiroyuki, Kono Michihito, Fujieda Yuichiro, Oku Kenji, Tsujino Ichizo, Atsumi Tatsuya	4. 巻 39
2. 論文標題 The assessment of left heart disease in patients with systemic sclerosis and pulmonary hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Rheumatology	6. 最初と最後の頁 103 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.55563/clinexprheumatol/c1j9gb	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 Oku Kenji, Hamijoyo Laniyati, Kasitanon Nuntana, Li Meng Tao, Navarra Sandra, Morand Eric, Tanaka Yoshiya, Mok Chi Chiu	4. 巻 24
2. 論文標題 Prevention of infective complications in systemic lupus erythematosus: A systematic literature review for the APLAR consensus statements	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 880 ~ 895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.14125	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 該当する

1. 著者名 Ogata Yusuke, Fujieda Yuichiro, Sugawara Masanari, Sato Taiki, Ohnishi Naoki, Kono Michihito, Kato Masaru, Oku Kenji, Amengual Olga, Atsumi Tatsuya	4. 巻 60
2. 論文標題 Morbidity and mortality in antiphospholipid syndrome based on cluster analysis: a 10-year longitudinal cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1331 ~ 1337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keaa542	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 Fujieda Yuichiro, Horita Tetsuya, Nishimoto Naoki, Tanimura Kazuhide, Amasaki Yoshiharu, Kasahara Hideki, Furukawa Shin, Takeda Tsuyoshi, Fukaya Shinji, Matsui Kazuo, Tsutsumi Akito, Furusaki Akira, Sagawa Akira, Katayama Kou, Takeuchi Kaoru, Katsumata Kazuaki, Kurita Takashi, Shane Peter, Kato Masaru, Oku Kenji	4. 巻 1
2. 論文標題 Efficacy and safety of sodium Risedronate for glucocorticoid-induced Osteoporosis with rheumatoid arthritis (RISOTTO study): A multicentre, double-blind, randomized, placebo-controlled trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1812835	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 -

1. 著者名 Aso Kuniyuki, Kono Michihito, Kono Michihiro, Watanabe Toshiyuki, Shimizu Yuka, Ogata Yusuke, Fujieda Yuichiro, Kato Masaru, Oku Kenji, Amengual Olga, Yasuda Shinsuke, Atsumi Tatsuya	4. 巻 29
2. 論文標題 Low C4 as a risk factor for severe neuropsychiatric flare in patients with systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lupus	6. 最初と最後の頁 1238 ~ 1247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0961203320938453	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 Lee Wen Shi, Kato Masaru, Sugawara Eri, Kono Michihiro, Kudo Yuki, Kono Michihito, Fujieda Yuichiro, Bohgaki Toshiyuki, Amengual Olga, Oku Kenji, Yasuda Shinsuke, Onodera Tomohiro, Iwasaki Norimasa, Atsumi Tatsuya	4. 巻 72
2. 論文標題 Protective Role of Optineurin Against Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1493 ~ 1504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41290	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 Lee Wen Shi, Yasuda Shinsuke, Kono Michihiro, Kudo Yuki, Shimamura Sanae, Kono Michihito, Fujieda Yuichiro, Kato Masaru, Oku Kenji, Shimizu Tomohiro, Onodera Tomohiro, Iwasaki Norimasa, Atsumi Tatsuya	4. 巻 212
2. 論文標題 MicroRNA-9 ameliorates destructive arthritis through down-regulation of NF- B1-RANKL pathway in fibroblast-like synoviocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 108348 ~ 108348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2020.108348	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 Karino Kohei, Kono Michihiro, Kono Michihito, Sakamoto Keita, Fujieda Yuichiro, Kato Masaru, Amengual Olga, Oku Kenji, Yasuda Shinsuke, Atsumi Tatsuya	4. 巻 59
2. 論文標題 Myofascia-dominant involvement on whole-body MRI as a risk factor for rapidly progressive interstitial lung disease in dermatomyositis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1734 ~ 1742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/kez642	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kenji Oku
2. 発表標題 Vaccination in SLE including COVID-19
3. 学会等名 International conference of Chinese rheumatologists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥健志
2. 発表標題 リウマチ性疾患患者と感染症：COVID-19から学んだこと
3. 学会等名 第66回リウマチ学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Oku
2. 発表標題 Prevention of infective complication in SLE for the APLAR consensus statements
3. 学会等名 23rd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥健志
2. 発表標題 SLE診療の現状とBelimumab
3. 学会等名 第30回 日本リウマチ学会 北海道・東北支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
---------	---------