

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09590

研究課題名（和文）母体免疫活性化による胎児発達と生後予後に関する生理学的特徴の抽出

研究課題名（英文）Extraction of physiological characteristics of fetal development and postnatal prognosis by maternal immune activation

研究代表者

笠原 好之（Kasahara, Yoshiyuki）

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20511835

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：妊娠期の母体環境は胎児の発達や流産・早産といった周産期リスクに直結する。とりわけ、母体の免疫活性化（MIA）は、産子の将来の自閉症スペクトラム障害（ASD）のリスクとなる。本研究ではMIAのモデルマウスを用いて、胎児の心電図を計測することで胎児の生理学的特徴を捉え、ASDの胎児期における病態の解明と、胎児期からの早期診断の可能性を検討した。その結果、MIAマウスの胎児では、自律神経系の活動が変化していることが明らかになった。これは、ASDの胎児期の病態を初めて示したものであり、ASDの胎児期からの早期診断につながる結果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ASDのリスクには胎児期の環境要因が重要であったにも関わらず、これまでは胎児期の研究は非常に限られていた。この要因として胎児期は計測が難しいことが挙げられるが、本研究では我々が開発した胎児の心電図計測技術を用いることで、胎児の検証が可能になった。ASDモデルマウスの胎児では、自律神経活動が変化していることを見出した。ヒトにおいても胎児の心電図計測は可能であるため、マウスにおける結果はヒトの診断や治療に直結する成果である。これまで不明であった胎児期のASDの病態が明らかになったことと合わせ、学術的意義および社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：The maternal environment during pregnancy is directly related to perinatal risks such as fetal development, miscarriage, and preterm delivery. In particular, maternal immune activation (MIA) is a risk for future autism spectrum disorder (ASD) in the offspring. In this study, we used a mouse model of MIA to capture fetal physiological characteristics by measuring fetal electrocardiograms to elucidate the pathophysiology of ASD in the fetal period and to investigate the possibility of early diagnosis from the fetal period. The results revealed that the activity of the autonomic nervous system was altered in the fetuses of MIA mice. This is the first demonstration of the pathophysiology of ASD in the fetal period, and the results lead to early diagnosis of ASD from the fetal period.

研究分野：胎児病態学

キーワード：ASD 胎児 自律神経 胎児心電図 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 妊娠期の母体環境は胎児の発達や流産・早産といった周産期リスクに直結した影響を持つ。とりわけ母体免疫活性化(Maternal Immune Activation: MIA)は、早産、胎児発育不全(FGR)、心奇形を引き起こし、さらには産子の将来の自閉症スペクトラム障害(ASD)リスクを有意に高める。したがってMIA時の胎児状態を精査し母体免疫が引き起こす胎児異常の生物学的メカニズムを解明することは、周産期医療やASD早期診断のためには欠かせず、極めて重要である。

(2) MIAの動物モデルとしては母獣にウイルス外殻成分であるPoly(I:C)を投与し擬似的なウイルス感染状態を惹起したモデルがこれまでに多数用いられてきた(Poly(I:C)投与モデル)。母体へのPoly(I:C)投与は血中炎症性サイトカイン上昇やホルモン変化など様々な母体環境の変化をもたらし、その産子は成育後に常同行動、社会的相互作用の欠如などを呈しASD様行動を取る。一方、インターロイキン6(IL-6)欠損マウスを用いた検討では、母獣にPoly(I:C)を投与しても産子にASD様行動が生じず、MIAによる産子のASD様行動の発現のためにはIL-6が必須であることが示された。しかしIL-6欠損時に、胎児脳に対してIL-6下流のサイトカインであるIL-17Aを投与すると産子のASD様行動が出現したことから、IL-6はIL-17Aを介して胎児脳に影響を与え、MIAによるASD様行動を惹起させることが示唆される(Choi et al., 2016)。しかし、これらの先行研究による知見には胎児期の検証がなされておらず、さらに単独のサイトカインでの影響の精査がなされていないため、詳細な機序は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では動物モデルを用いてMIAが引き起こす胎児状態の変化について詳細に検討し、周産期リスク評価や診断を行う上で必要な基礎的データを収集すると共に将来のASDにつながる生物学的基盤の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) MIA動物モデルには母体Poly(I:C)投与モデルに加え、ハイドロダイナミクス法による母体IL-17A高発現モデルを用いた。ハイドロダイナミクス法は目的遺伝子を挿入した発現プラスミド溶液を尾静脈から注入し強制的に遺伝子発現をさせる方法である。妊娠マウスに対してIL-17A発現プラスミドをハイドロダイナミクス法によって強制発現させることで、MIAによって引き起こされる胎児状態の変化に際し、IL-17Aの役割を検証する。

(2) 母体Poly(I:C)投与モデルは妊娠12.5日にPoly(I:C)溶液を20mg/kg容量で皮下投与することで作成した。母体IL-17A高発現モデルは、IL-17A発現プラスミド溶液(0.1mol/mouse)を妊娠12.5日の母獣に尾静脈投与を行った。投与容量は体重の9%容量とし、5秒間でマウスに投与を行った(ハイドロダイナミクス法)。作成したモデルマウスに対して経時的に尾静脈より採血を行い、血中の炎症マーカーの値やIL-17Aの値を測定した。

(3) 妊娠18.5日の時点で、作成したMIAマウスに対して胎児心電図の計測を行った。胎児心電図の計測は母獣を麻酔した後、母体に3本、胎児に2本電極を触れさせることで測定した。胎児心電図の計測から偉える母体と胎児の詳細な心拍データをもとに心拍数や心拍細変動(STV)の計算を行った。さらに心拍変動をパワースペクトラム解析し、低周波成分(LF: 交感神経機能と副交感神経機能)、高周波成分(HF: 副交感神経機能)およびLF/HF(交感神経機能)を導出し、胎児期の自律神経機能について評価を行った。

(4) 生後のASD様行動の解析のために、MIA動物モデルから生まれ成体となったマウスに対して、三部屋式社会行動試験およびガラス玉覆い行動試験を実施した。三部屋式社会行動試験は、三部屋に分かれたボックスを用意し、最初の10分でボックスに馴化させた(Stage 1)。その後、三部屋のうち、片側の端の部屋に空のワイヤーケージを、もう片側の端の部屋にマウスの入ったワイヤーケージを設置し、10分間自由にマウスを探索させ、マウスへの接触時間を計測し、社会性の指標とした(Stage 2)。最後の10分に、Stage 2で空であった方のワイヤーケージにマウスを入れ、試験マウスと見知ったマウスおよび見知らぬマウスとの間のそれぞれの接触時間を評価することで、社会的新奇性の指標とした。ガラス玉覆い行動試験では、ボックスの中に床敷を入れ、その上にガラス玉を20個規則的に並べた状態で試験マウスを30分間自由に探索させた。30分の間に床敷に埋めたガラス玉の数をカウントし、不安様行動・固執行動の指標とした。

4. 研究成果

(1) 母体Poly(I:C)投与モデルにおける炎症を確認するために、マウスにおける炎症マーカーであるSAPを計測した。するとPoly(I:C)投与の24時間で母体SAP濃度が上昇しており、MIA

が引き起こされていることが確認できた。SAPの上昇は胎児心電図を計測する妊娠18.5日には基礎レベルへと戻っていた。胎児心電図の計測の結果、母体 Poly(I:C)投与モデルの胎児では、心拍数が有意に上昇していた。また、副交感神経機能の指標である HF が有意に減少していた。このことから、母体 Poly(I:C)投与による MIA モデルの胎児では、自律神経機能のうち特に副交感神経機能が変化することが明らかになった。

(2) 母体 IL-17A 高発現モデルにおいて、IL-17A の血中濃度を計測したところ、投与24時間には著しい IL-17A 濃度の上昇が見られ、それは胎児心電図を計測する妊娠18.5日まで継続していた。胎児心電図の計測の結果、母体 IL-17A 高発現モデルの胎児において、副交感神経機能の指標である STV および HF と、交感神経機能の指標である LF と LF/HF が、すべて有意に上昇していた。このことから、母体 IL-17A 高発現モデルの胎児では、交感神経機能と副交感神経機能の両方が変化していたことが明らかになった。

(3) これらの結果から MIA によって胎児の自律神経の機能あるいは発達が変化することが明らかになった。母体への Poly(I:C)投与の場合と母体 IL-17A 高発現の場合とで、両者ともに胎児の自律神経の活動は変化していたが、変化のパターンは異なる結果であった。これまでの研究では MIA によって IL-17A が惹起され、その IL-17A が胎児に移行し作用すると考えられていたが、IL-17A とは異なるシステムが存在している可能性が示唆された。

(4) 母体 Poly(I:C)投与モデルの産子を用いた三部屋式社会行動試験の結果、母体 Poly(I:C)投与モデルの産子では成育後の社会行動に性差があり、雄と雌では異なった表現型を示したが、雌雄ともに社会性あるいは社会的新奇性に变化が見られる結果であった。このことは母体 Poly(I:C)投与によって引き起こされる MIA が胎児に作用し、ASD 様行動を引き起こしたことを示している。ガラス玉覆い隠し行動試験においては変化が見られなかったことから、このモデルにおいては社会性の障害が強く出たものと考えられる。

(5) 母体 IL-17A 高発現モデルの産子を用いた三部屋式社会行動試験の結果、母体 IL-17A 高発現モデルの産子では成育後に大きな性差はなく、社会性と社会的新奇性が障害されていた。一方で、ガラス玉覆い隠し試験では母体 IL-17A 高発現モデルの産子では、雄において有意に埋めるガラス玉の数が減少していた。このことから、母体 IL-17A 高発現モデルにおいては、産子の雌雄ともに社会性あるいは社会的新奇性の障害が認められるが、不安様行動に関しては雄のみで認められることが明らかとなった。これらの結果は雌雄差があるものの、母体 IL-17A の高発現によって ASD 様行動が引き起こされることが示された。

(6) 以上のように、MIA による ASD モデルの胎児期の生理学的状態を精査したところ、胎児心電図の計測によって自律神経の活動の変化が認められた。我々のこれまでの先行研究から、妊娠マウスに対してバルプロ酸を投与するモデル(母体バルプロ酸投与モデル)においても、胎児の自律神経機能が変化することを見出していたことから(Kasahara et al., 2020)、ASD の胎児では共通して自律神経機能が変化することが考えられた。従来、胎児期の生理学的解析は技術的に難しく、ASD の胎児における生理学的状態の変化を見出したのは、本研究が初である。胎児心電図はヒトにおいても計測可能であるため、本研究結果は ASD の胎児期からの超早期診断と超早期治療に繋がりうる成果であり、その意義は極めて大きい。一方で、モデルによって自律神経活動が上昇している場合と、低下している場合とがあり、この違いがどのように生じるのかについては不明である。本研究で用いた MIA モデルマウスにおいても、Poly(I:C)投与による胎児の変化と、Poly(I:C)の投与によって惹起される母体免疫活性化の中心であると考えられていた IL-17A の高発現とでは、胎児の自律神経の活動が異なった結果となっていた。このことは異なる複数の病態へと至る機序が存在することを示唆するが、詳細は不明である。今後は、胎児期からの治療に関する検証を進めるとともに、病態機序の解明を目指す。

<引用文献>

1. Choi, GB et al., The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351(6276): p.933-939 (2016)

2. Kasahara et al., Alterations in the autonomic nerve activities of prenatal autism model mice treated with valproic acid at different developmental stages. *Scientific Reports*, 10(1): p.17722 (2020)

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 Murakami Y, Imamura Y, Kasahara Y, Yoshida C, Momono Y, Fang K, Nishiyama T, Sakai D, Konishi Y	4. 巻 14
2. 論文標題 The effects of maternal interleukin-17A on social behavior, cognitive function, and depression-like behavior in mice with altered kynurenine metabolites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Tryptophan Research	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） 10.1177/11786469211026639	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 Kasahara Yoshiyuki, Yoshida Chihiro, Saito Masatoshi, Kimura Yoshitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Assessments of Heart Rate and Sympathetic and Parasympathetic Nervous Activities of Normal Mouse Fetuses at Different Stages of Fetal Development Using Fetal Electrocardiography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	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） 10.3389/fphys.2021.652828	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桃野友太, 笠原好之, 木村芳孝, 八重樫伸生, 齋藤昌利
2. 発表標題 母体免疫活性化マウスにおける神経発達障害と胎児心電図変化
3. 学会等名 第10回日本DOHaD学会 学術集会・第45回日本女性栄養代謝学会
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
研究 分 担 者	高野 裕治 (Takano Yuji) (00424317)	人間環境大学・人間環境学部・教授 (33936)	

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	請園 正敏 (Ukezono Masatoshi) (50787778)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 知的・発達障害研究部・リサーチフェロー (82611)	

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