

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22913

研究課題名(和文) 自閉スペクトラム症の中核症状に対する腸内細菌叢の影響とその分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying gut microbiome-mediated change in the behaviors associated with autism spectrum disorder

研究代表者

飯島 陽子 (Hanno-iijima, Yoko)

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：50451860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢の変化が自閉スペクトラム症(ASD)の症状に影響するという報告から、近年ASDの環境的要因として注目されている。本研究では、腸内細菌の有無による違いを調べるモデルとして無菌(GF)マウスを導入したがGFマウスでASD様の異常行動や形態学的表現型は観察されなかった。そこで、GFマウスの胎生期の母体にASDの環境的要因を曝露したモデルマウスを作製し、通常環境(SPF)の同ASDモデルマウスとの比較検討を行った。この結果、ウイルス感染を模倣した刺激を与えたGFマウスにおいてASD様行動がより強く観察されたことから、ASD様行動に腸内細菌叢の有無が影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作製したGFマウスを用いたASDモデルマウス(GF-ASD)において、これまでに確立されたASDモデルマウスで報告されてきた異常と共通した変化が見出されれば、その変化はASD患者内で共通して起こる可能性がより高いものと考えられる。その変化に着目して研究を進めることで将来ASDの普遍的メカニズムの解明に繋がっていく可能性がある。また、このGF-ASDモデルマウスは、SPFベースのモデルよりも更にASDの行動が顕著な新たなモデルと成り得る。これまでに確立されてきたASDモデル動物と共に発症機構の解明や治療薬の開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Gut microbiota has been attracting attention as an environmental factor of autism spectrum disorder (ASD) because it has been reported that changes in that affect the symptoms of ASD. In this study, germ-free (GF) mice were introduced as a model for investigating the difference between the presence and absence of gut microbiota. However, no ASD-like abnormal behavior or morphological phenotype was observed in GF mice. Therefore, we prepared model mice in which the environmental factors of ASD were exposed to the pregnant female of GF mice, and compared them with the ASD model mice in the specific pathogen free (SPF). As a result, ASD-like behavior was observed more strongly in GF mice that were stimulated to mimic virus infection, suggesting that the gut microbiota affects ASD-like behavior.

研究分野：神経科学

キーワード：自閉スペクトラム症 環境的要因 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症(ASD)は100~200人のうち1人という高頻度で現れる先天的な神経発達障害である。ASDの発症は遺伝的背景の関与が非常に強いとされる一方で、妊娠時の母親への細菌・ウイルス感染や薬剤服用などにより生まれた子供のASD発症率が上昇することから、胎生期における何らかの外的な要因(環境的要因)がASD発症や病態に強く影響すると考えられる。さらに、この様な母体への刺激は胎児の発達に大きく影響し、その腸内細菌叢にも異常をきたすことがわかってきた。これらのことから、近年ASDの環境的要因として腸内細菌叢が注目されている。

2. 研究の目的

本研究は、ASDモデルマウスを用いて脳での病態的变化を探ることにより、ヒトのASDの脳内で起こると予想される変化と、その変化に腸内細菌がどのように関与するのかASD発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ASDの原因となる複数の環境的要因(細菌・ウイルス感染や薬物服用)を模倣した刺激を負荷したASDのモデルマウスとアイソレーター中で飼育する無菌(GF)マウスを用いて、個体レベル、組織レベル、または脳組織由来の初代培養による細胞レベルの検体を用いて、形態学的・生化学的・行動学的な比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウスのASD様行動試験系のセットアップ

実験動物を用いた研究レベルにおいて、ASDの中核症状「社会性・コミュニケーションの障害」や「行動や興味の偏り」に相当する行動試験系が確立されてきた。そこでマウス間の社会性を測るultrasonic vocalization(USV)試験、reciprocal social interaction(RSI)試験と、常同行動を検出する試験系(毛繕い: grooming、ガラス玉覆い隠し行動)の立ち上げを行った。

実験系の確認のため、胎生期に薬剤(VPA)またはウイルス感染を模倣した刺激(poly(I:C))を曝露したASDモデルマウスを作製し、生後7日においてUSV試験、8週齢に達した後にその他の試験を行った。ASDモデルマウスにおいて、ガラス玉覆い隠し行動は対照群と比較して違いは見られなかったものの、USV、RSI、grooming試験で両モデル共に対照群と比較して有為に変化することが確認された(図1:USV試験)。

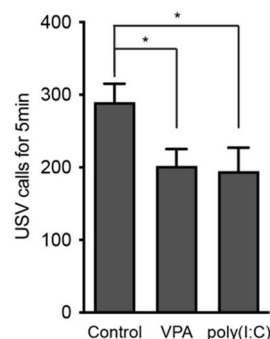


図1 ASDモデルマウスでのUSVの減少

(2) GFマウスの行動学的・組織学的解析

本学で飼育されてきたGFマウスが無菌状態を保持していないことが前年度判明したため、新たにGFマウスを日本クレアより導入し繁殖を行った。無菌状態の確認は定期的に行われた。まず、このGFマウスを用いて(1)で立ち上げた行動試験を行った。しかしながら、通常の実験動物の環境下で飼育されているSPFマウスと比較し、GFマウスでのASD様の行動異常は観察されなかった。grooming試験ではSPFマウスよりもむしろ減少する傾向があった(図2:GF-Control vs Control)。さらに大脳皮質の組織学的解析においても、胎生期曝露によるASDモデルマウスで見られる大脳皮質での神経細胞の変化も観察されなかった(図3)。このことから、腸内細菌叢を持たないGFマウスではASD様の行動および形態に目立った表現型が出現しないと考えられる。

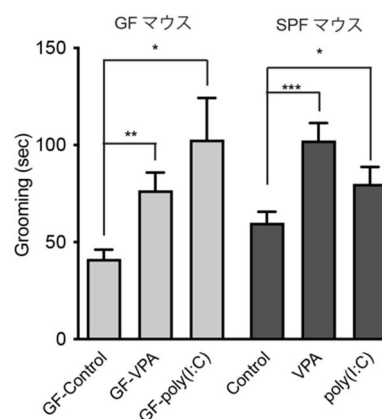


図2 GF-ASDマウスのgrooming変化

(3) GFマウスを用いた環境的要因によるASDモデル(GF-ASDマウス)の作製と行動学的解析

ASDの原因として決定的なものが存在しないことから、ASDは異なるリスク要因の重複により

発症する可能性が指摘される。(2)で示したように GF マウス単独では ASD 様の異常を観察できなかったが、これに他の環境的要因を組み合わせることにより ASD 様行動や組織学的変化が現れる可能性があると考えた。そこで、妊娠 GF マウスに VPA または poly(I:C) を曝露し、GF ベースの ASD モデルマウス (GF-ASD モデルマウス) を作製した。作製したマウスは目立った胎生致死が起こらず、基本的な成長 (体重など) への影響も観察されなかった。

そこで成長後の GF-ASD モデルマウスに対して社会的相互作用や反復行動などの ASD 様の行動学的表現型に関する評価を行い、より強い ASD 様症状が発現するかどうかについて検討した。しかしながら、VPA 曝露の GF マウスでは、対照群の GF マウスよりも grooming の時間の増加は見られたものの、SPF の VPA 曝露マウスと比較して強い表現型は現れなかった (図 2 :GF-VPA vs VPA)。一方で、poly(I:C) 曝露した GF マウスでは SPF の poly(I:C) 曝露マウスよりも grooming を増加する傾向が見られた (図 2 :GF-poly(I:C) vs poly(I:C))。poly(I:C) 曝露による ASD モデルマウスでの ASD 行動に腸内細菌叢の有無が影響することが示唆された。

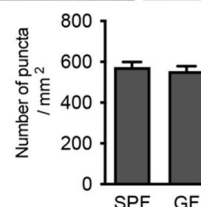
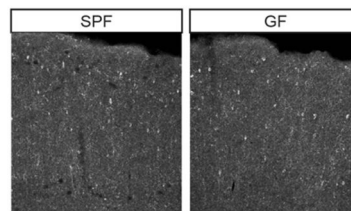


図3 SPF vs GF の抑制性神経細胞数

(4) GF-ASD マウスの組織学的解析

(3)で行動学的解析を行った後の GF-ASD モデルマウスの脳組織を還流固定で摘出した後、免疫組織化学解析を行った。ここでも神経細胞のマーカー分子やシナプス分子の発現における各モデルマウス間での比較検討を行った。特に grooming 試験で SPF より強い表現型が観察された GF-poly(I:C) に特に注目して進めているが、現在までのところ組織学的表現型はわかっていない。GF-poly(I:C) においてその異常を見出すことができれば、それを手掛かりに ASD に関連する分子やそのシグナルなどを明らかにする可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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