

特集 1 神経発達障害による精神疾患の発症・病態に関わる因子

2. 妊娠期の母胎炎症によって引き起こされる
神経発達障害様モデル村上 由希¹⁾, 今村 行雄^{2,3)}, 酒井 大輔⁴⁾, 小西 行郎^{5,6)}

抄録: 妊娠期の母体ストレス, 炎症, 栄養状態は自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder : ASD) を含めた神経発達障害のリスク因子である。特にげっ歯類では炎症を誘導する母体免疫賦活化モデル (maternal immune activation : MIA) を用いて, ASD 病態分子の解明が研究されている。細菌感染やウイルス感染を模した MIA モデルでは, toll-like receptor ligand である LPS や poly (I : C) 投与が汎用されてきたが, 免疫原性のばらつきが多く報告されている。本稿では, 母体炎症研究から明らかにされた ASD の新たな病態基盤について紹介しつつ, poly (I : C) 投与による MIA モデルの問題点について触れる。さらに筆者らが MIA モデルとして用いている炎症性サイトカインの恒常的発現モデルの有用性について紹介する。

日本生物学的精神医学会誌 32 (3) : 120-123, 2021

Key words : maternal immune activation, polyinosinic-polycytidylic acid [poly (I : C)], interleukin-17A, neurodevelopmental disease, autism spectrum disorder (ASD) -like phenotype

はじめに

神経発達障害である自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder : ASD) は, 脳機能発達の偏りによる認知障害の一つである。ASD のおもな症状として, 社会的な問題行動や適応困難, コミュニケーション支障などの対人障害と, 繰り返し行動や特定のものに対する強いこだわりなどの常同行動がある。また感覚の過敏や鈍麻など, 感覚系の異常を有することが特徴的である。それぞれの障害や行動表現は個人によって多様であり, スペクトラム (症状

などが曖昧な境界をもちながら連続しているという意味) として捉えられている。多くの場合, 行動観察などにより 3 歳までに診断され, 5 歳児におけるわが国の調整有病率はおよそ 3.2% と報告されている⁹⁾。

ASD の原因として, 一卵性双生児の臨床研究により, 遺伝的素因が大きいことが示されている²⁾。また遺伝学的家系解析により, 多くの原因遺伝子が同定されており, ASD の遺伝的多様性が表現型の多様性につながると示唆されている。一方で, 一卵性・二卵性双生児の大規模疫学と数理モデル研究か

Maternal immune activation related to neurodevelopmental disorder-like phenotype in mouse models

1) 関西医科大学医学部衛生・公衆衛生学講座 (〒 573-1010 大阪府枚方市新町 2-5-1) Yuki Murakami : Department of Hygiene and Public Health, Kansai Medical University, 2-5-1 Shinmachi, Hirakata, Osaka 573-1010, Japan

2) 同志社大学研究開発推進機構 (〒 610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3) Yukio Imamura : Organization for Research Initiatives and Development, Doshisha University, 1-3 Tataramiyakodani, Kyotanabe, Kyoto 610-0394, Japan

3) 大阪大学医学部附属病院救急医学講座 (〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-15) Yukio Imamura : Department of Traumatology and Acute Critical Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-15 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

4) 金沢医科大学医学部 (〒 920-0293 石川県河北郡内灘町大学 1-1) Daisuke Sakai : Department of Biology, Kanazawa Medical University, 1-1 Daigaku, Uchinada, Kahoku, Ishikawa 920-0293, Japan

5) 同志社大学赤ちゃん学研究センター (〒 619-0225 京都府木津川市木津川台 4-1-1) Yukuo Konishi : Center for Baby Science, Doshisha University, 4-1-1 Kizugawadai, Kizugawa, Kyoto 619-0225, Japan

6) 理化学研究所医科学イノベーション推進プログラム発達障害データ多層統合ユニット (〒 103-0027 東京都中央区日本橋 1-4-1) Yukuo Konishi : Healthcare and Medical Data Multi-level Integration Platform Group, RIKEN Medical Sciences Innovation Hub Program, 1-4-1 Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo 103-0027, Japan

【村上 由希 E-mail : murakamy@hirakata.kmu.ac.jp】

ら、遺伝的因子よりも生育環境因子による影響が強いことが報告された⁴⁾。二卵性双生児での共発症率が兄弟間よりも高いことから、生後環境よりも胎内環境の影響が強いと考えられる。妊娠期の母体の細菌やウイルス感染、ストレスによる異常な免疫機能の賦活化、抗てんかん薬や抗うつ薬の使用、栄養状態など、さまざまな要因が胎児の脳発達、あるいは脳発達に関与する遺伝的プログラミングに影響すると示唆されている¹³⁾。本稿では、げっ歯類での母体免疫賦活化 (maternal immune activation : MIA) による動物実験から、近年、明らかにされた ASD の新たな責任分子について紹介する。

1. 炎症性サイトカインと ASD

ヒトの疫学研究により妊娠初期のウイルス感染は、生まれてくる子どもの ASD 発症リスク因子であることが示された¹⁾。発症リスクの増加は、ウイルスが直接、胎児に影響するよりも、母体の免疫応答による影響と考えられた。感染による母体の免疫システムの活性化は、多くの炎症性サイトカインを誘導する。これらの分子が胎盤を通過し、胎児脳の発達に影響することが ASD の病態基盤であると考えられた。この仮説はウイルスリボ核酸 (ribonucleic acid : RNA) を模倣した合成二本鎖 RNA アナログである polyinosinic-polycytidylic acid [poly (I : C)] を投与した MIA モデルにより明らかにされている。ヒトの妊娠初期に相当する胎生 12.5 日 (E12.5) に poly (I : C) を投与した母獣から生まれた仔マウスは ASD 様の神経学的形態変化、行動異常を示す¹²⁾。さらに poly (I : C) を投与した母獣では血清中だけでなく、羊水、胎盤、胎児脳においてさまざまな炎症性サイトカインが増加し、そのなかでもインターロイキン (interleukin : IL) -6 の ASD 発症への関与が強く示唆された¹¹⁾。このことは、母獣への IL-6 投与だけでも ASD 様の行動異常がみられ、抗 IL-6 抗体の投与によって、poly (I : C) により誘導される行動異常が改善することからも明らかである。さらに poly (I : C) 投与による胎児脳での IL-6 増加が示された¹⁴⁾ が、IL-6 は神経幹細胞の増殖や分化、移動、シナプス形成を含んだ正常な脳の発達においても重要な役割を担っている。そのため、MIA による高い IL-6 発現が直接的に胎児脳の発達に影響し、その結果、ASD 発症につながるとはいいがたかった。IL-6 は強力な免疫メディエーターで、他のサイトカイン発現を誘導する。そこで、近年、ウイルス感染時に IL-6 シグナルによって発現が誘導

される IL-17A が新たな ASD 発症の責任分子として示唆されている。Choi ら³⁾ は、母獣への poly (I : C) 投与によって引き起こされる胎児の大脳皮質の形態異常ならびに行動異常は抗 IL-17A 抗体により改善し、胎児脳への IL-17A 投与により、同じような ASD 様障害が引き起こされることを明らかにした³⁾。さらに、胎児の大脳皮質特異的に IL-17 受容体 (IL-17R) を欠損させると、母体炎症の影響を受けなくなる。一方で IL-17R を発現した胎児の神経細胞を刺激すると体性感覚野の抑制性神経細胞が特異的に減少し、神経活動が生後も過活動になることなどが示された¹⁰⁾。これらの結果は ASD の病態基盤だけでなく、妊娠時、および生後におけるさまざまな予防介入の可能性を示唆する重要な知見である。

2. poly (I : C) による MIA の問題点

poly (I : C) 投与は、げっ歯類を使った MIA モデル研究でもっとも広く汎用されている方法である。しかし、投与の量、経路やタイミングが論文ごとに異なり、そのことが結果の解釈を複雑にしている。また poly (I : C) は合成アナログであるため、方法的な不一致だけでなく、製造ロットごとによるばらつきが免疫原性にも影響している。*in vitro* では poly (I : C) 鎖の長さや細胞種の違いにより免疫応答性が有意に変化することが示された⁶⁾。またラットやマウスを使った *in vivo* 実験では、poly (I : C) の分子量の違いにより、さまざまな炎症性サイトカインの分泌量が有意に変化し、異常行動にも違いがみられた。リポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) 混入はほとんどの poly (I : C) 試薬でみられないが、同じ製造元でもロットの違いにより、7 倍以上高い LPS が混入していた製品も報告されている⁷⁾。Mueller ら⁷⁾ は妊娠母獣への投与実験において、LPS 混入量によらず、poly (I : C) のロット間で母獣血、胎盤だけでなく、胎児脳でのサイトカイン分泌量が明らかに異なっていることを報告した⁷⁾。また分子量の違いによって、IL-6 をはじめとする炎症性サイトカインの分泌量が有意に異なっていた。これらの poly (I : C) に含まれる RNA 鎖を比較したところ、長鎖 RNA が多く含まれているほど、免疫原性が高いことも示されている。また免疫原性の高い poly (I : C) を E12 ~ 12.5 のマウスに投与すると、投与の量や経路に関わらず、自然流産率が高いことも示された。このように製造元やロットの違う poly (I : C) は異なる免疫反応性を引き起こす。つまり、異なる poly (I : C) 投与は母獣の生理的条件や妊娠

への影響も均一ではない可能性があり, poly (I : C) による MIA とそれに続く胎児脳への影響を解析するうえで, 十分に留意されるべきである。

3. サイトカイン恒常的発現モデル

プラスミド DNA (plasmid DNA : pDNA) は, 安全で生産性の高いベクターとして遺伝子治療や DNA ワクチン療法への応用が期待されている。しかし, pDNA を含めた細菌由来の DNA には非メチル化 CpG 配列 (CpG モチーフ) が高頻度に存在し, ほ乳類のマクロファージや樹状細胞に取り込まれると, 炎症性サイトカインの産生により免疫反応が誘導される。この炎症性サイトカインが標的細胞における遺伝子発現を低下させる原因と考えられている。一方で, 遺伝子導入方法も重要である。組織への直接注射やエレクトロポレーションの利用, 各種細胞特異的非ウイルスベクターとの複合体を利用した遺伝子導入法など多くの方法が開発され, 導入した遺伝子からの機能的タンパク質の発現が確認されている。これらの方法と比較して, Liu ら⁵⁾ が報告したハイドロダイナミクス法による遺伝子発現レベルは桁違いに高く, また機能的タンパク質発現量も有意に高いことが示されている⁵⁾。筆者らは, 以前, 京都大学薬学部高倉喜信先生ら⁸⁾ との共同研究で, CpG モチーフ数の少ないプラスミドとハイドロダイナミクス法による遺伝子導入法を用いて, 炎症性サイトカインであるインターフェロンを血中で持続発現させると, マウスで抑うつ様の行動異常がみられることを示した⁸⁾。そこで, IL-17A を母獣に持続的に高発現させることで, MIA モデルができないか, 試みることにした。CpG モチーフ数の少ないプラスミドは現在, InvivoGen 社から入手可能で, マウス脾臓から *mIl-17a* cDNA をクローニングした後, E12.5 の母獣マウスへハイドロダイナミクス法による遺伝子導入を試みた。その結果, 母獣血中で, 持続的に高濃度の IL-17A の発現が確認された。母獣の高い IL-17A は胎児の脳皮質の構造的変化を生じることがすでに Choi ら³⁾ により報告されていたため³⁾, E14.5 の胎児脳での形態的異常を調べたところ, 同じような異常が確認された。さらに poly (I : C) 投与による MIA モデルでは試薬のロットによって高い自然流産率が報告されているが, IL-17A 高発現モデルでは胎児の生育には問題がなかった。そこで, 成長した仔マウスにおいて, 種々の行動解析を行ったところ, poly (I : C) 投与による MIA モデルマウスと同じように, ASD 様の行動異

常が確認された (論文投稿中データ)。以上のことから, IL-17A 高発現モデルは, ASD の病態解析に有用なモデル動物であると考えている。

おわりに

ASD の病態研究において, poly (I : C) 投与による MIA モデル動物が多大な貢献をもたらしてきたことは疑いようがない。しかし, poly (I : C) が合成アナログであるがゆえの製品のばらつきは, 免疫原性に大きく影響する。今後, 製造ロットなどを論文に記載することは, 研究グループごとの知見を比較するために非常に重要であると考えられる。一方, IL-17A が ASD 病態の責任分子であることを示す知見は多くの研究グループによって報告されている。しかし, IL-17A によって特定の脳領域が障害されるメカニズムや, その脳領域の障害が情動や認知を含めた行動変化へどのようにつながるのか, 不明な点も残されている。また, 筆者らの作成した IL-17A 持続発現モデルは慢性炎症を引き起こしている。一過的な母獣の IL-17A 増加が胎児脳へ及ぼす影響との違いはまだ検証が必要である。今後, 筆者らが作成した ASD 病態解析モデルを含め, これらの動物実験によって得られた新たな知見が, ASD をはじめとする神経発達障害の病態解明や新たな治療法開発につながることを期待される。

本稿に記載した筆者らの研究に関してすべて倫理的配慮を行っている。開示すべき利益相反は存在しない。

謝辞

本稿で紹介した研究は, 文部科学省の科学研究費助成事業 (YM : 16K08948 ; YI : 17H04364) の助成金, ならびに国立研究開発法人理化学研究所 健康・医療データプラットフォーム形成事業の助成 (YM) を受けて行われた。

文 献

- 1) Atladottir HO, Thorsen P, Ostergaard L, et al (2010) Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 40 : 1423-1430.
- 2) Bourgeron T (2016) Current knowledge on the genetics of autism and propositions for future research. *C R Biol*, 339 : 300-307.
- 3) Choi GB, Yim YS, Wong H, et al (2016) The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351 : 933-

- 939.
- 4) Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, et al (2011) Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*, 68 : 1095–1102.
 - 5) Liu F, Song Y and Liu D (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*, 6 : 1258–1266.
 - 6) Mian MF, Ahmed AN, Rad M, et al (2013) Length of dsRNA (poly I : C) drives distinct innate immune responses, depending on the cell type. *J Leukoc Biol*, 94 : 1025–1036.
 - 7) Mueller FS, Richetto J, Hayes LN, et al (2019) Influence of poly (I : C) variability on thermoregulation, immune responses and pregnancy outcomes in mouse models of maternal immune activation. *Brain Behav Immun*, 80 : 406–418.
 - 8) Murakami Y, Ishibashi T, Tomita E, et al (2016) Depressive symptoms as a side effect of Interferon- α therapy induced by induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1. *Sci Rep*, 6 : 29920.
 - 9) Saito M, Hirota T, Sakamoto Y, et al (2020) Prevalence and cumulative incidence of autism spectrum disorders and the patterns of co-occurring neurodevelopmental disorders in a total population sample of 5-year-old children. *Mol Autism*, 11 : 35.
 - 10) Yim YS, Park A, Berrios J, et al (2017) Reversing behavioural abnormalities in mice exposed to maternal inflammation. *Nature*, 549 : 482–487.
 - 11) Smith SE, Li J, Garbett K, et al (2007) Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*, 27 : 10695–10702.
 - 12) Solek CM, Farooqi N, Verly M, et al (2018) Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Dev Dyn*, 247 : 588–619.
 - 13) Tordjman S, Somogyi E, Coulon N, et al (2014) Gene x Environment interactions in autism spectrum disorders : role of epigenetic mechanisms. *Front Psychiatry*, 5 : 53.
 - 14) Wu WL, Hsiao EY, Yan Z, et al (2017) The placental interleukin-6 signaling controls fetal brain development and behavior. *Brain Behav Immun*, 62 : 11–23.

■ ABSTRACT

Maternal immune activation related to neurodevelopmental disorder-like phenotype in mouse models

Yuki Murakami¹⁾, Yukio Imamura^{2,3)}, Daisuke Sakai⁴⁾, Yukuo Konishi^{5,6)}

1) *Department of Hygiene and Public Health, Kansai Medical University*

2) *Organization for Research Initiatives and Development, Doshisha University*

3) *Department of Traumatology and Acute Critical Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine*

4) *Department of Biology, Kanazawa Medical University*

5) *Center for Baby Science, Doshisha University*

6) *Healthcare and Medical Data Multi-level Integration Platform Group, RIKEN Medical Sciences Innovation Hub Program*

Maternal stress, inflammation, and nutrition during pregnancy are correlated with a higher prevalence of neurodevelopmental disorders, such as autism spectrum disorder (ASD), attention-deficit/hyperactivity disorder, and intellectual disability. In the widely used maternal immune activation (MIA) rodent model, the pathology of ASD has been studied. Administration of the viral mimetic, toll-like receptor (TLR) ligands, such as lipopolysaccharide or polyinosinic-polycytidylic acid [poly (I : C)], is commonly used as experimental tools to study neuronal and dysfunctions in ASD. However, a lot of evidence from investigations suggests that these TLR ligands can vary in terms of their immunogenicity in rodent. Here, we will introduce new research findings of the MIA-induced ASD pathogenesis as well as the problems inducing inflammation by poly (I : C) administration. In addition, we will explain about the usability for a mouse MIA model by gene transfer system continuously expressing proinflammatory cytokine.