

博士論文

炎症および免疫機能に着目した妊娠高血圧腎症による
出生児の高次脳機能障害の発症機序の検討

加藤 喜久

博士論文

炎症および免疫機能に着目した妊娠高血圧腎症による
出生児の高次脳機能障害の発症機序の検討

所属：東京大学大学院博士課程医学系研究科

生殖・発達・加齢医学専攻

指導教官：大須賀 穰

申請者：加藤 喜久

目次

目次·····	2
略語一覽·····	3
要旨·····	5
序文·····	6
方法·····	13
結果·····	40
考察·····	70
謝辭·····	82
参考文献·····	84

略語一覽

ASD : Autism Spectrum Disorder

AT₁-AA : Angiotensin II Type 1-Receptor Autoantibody

AT₁-R : Angiotensin Type 1 Receptor

Alb/Cre 比 : Albumin/Creatinine Ratio

Ang : Angiotensin

AVP : Arginine Vasopressin

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns

cDNA : Complementary Deoxyribonucleic Acid

DNA : Deoxyribonucleic Acid

ELISA : Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay

E : Embryonic Day

FGR : Fetal Growth Restriction

FIRS : Fetal Inflammatory Response Syndrome

MIA : Maternal Immune Activation

NGS : Normal Goat Serum

P : Postnatal Day

PBS : Phosphate Buffered Salts

PBST : 0.01M PBS with 0.3% Triton X

PE : Preeclampsia

PFA : Paraformaldehyde

Poly I:C : Double-Stranded RNA Polyinosinic–Polycytidylic Acid

RAS : Renin-Angiotensin System

RNA : Ribonucleic Acid

RT-qPCR : Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction

RUPP : Reduced Uterine Perfusion Pressure

sFlt-1 : Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1

IHC : Immunohistochemistry

IL : Interleukin

IFN- γ : Interferon-Gamma,

LPS : Lipopolysaccharide

CYP11A1 : The Mitochondrial Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-Alpha

要旨

妊娠高血圧腎症（Preeclampsia：PE）の母体から出生した児は自閉スペクトラム症を発症しやすい。本研究では、PE罹患が胎児期の脳に影響を与え、出生児の神経発達症の原因になっている、と仮説を立て、PEモデルマウスを用いて検証した。胎仔の脳では各種サイトカインの上昇を認め、脳内でMicrogliaの活性化が確認された。出生仔の行動実験では、不安様行動、社会性行動障害を認めた。さらに、マイクロアレイを用いて行ったPathway Enrichment解析では、Up Regulated Geneの上位にImmunoglobulinに関するPathwayが検出された。

本研究は、母体のPE罹患が胎児期の脳内に炎症性変化を起こし、出生児の神経発達症発生の契機となりうる可能性を示す成果である。

序文

近年の研究により、妊娠中のウイルス感染と、将来における児の自閉スペクトラム症(Autism Spectrum Disorder : ASD)を含む神経発達症群の発症に関連があることが明らかとなっている。その他、児の将来のてんかん・脳性麻痺・アルツハイマー病・統合失調症やパーキンソン病等の脳神経疾患の発症との関連も指摘されている^{1,2}。Maternal Immune Activation (MIA) は母体のウイルス感染などを契機とした炎症による、胎児期の環境要因により出生児が ASD や統合失調症を発症するリスクが上昇するとして注目されている概念である³。ASD とは神経発達疾患の一つで、社会性コミュニケーション能力の欠如に代表される症状を呈する。米国では 54 人に 1 人が ASD と診断されているが、ASD の患者は急激に増加傾向にある。このほか、血中の Interleukin-17 (IL-17) が高値であった母体から出生した児にコミュニケーション能力の欠如などの行動異常が観察され⁴、母体血中の IL-6 の上昇と強迫性障害や不安様行動などの脳障害との関連を指摘する研究がある^{5,6}。MIA では、母体血中の炎症性サイトカインが、胎盤を經由し胎児の Blood-Brain Barriers を通り胎児の脳発達に影響を与える、という病態モデルが考えられている⁶。Double-Stranded RNA Polyinosinic–Polycytidylic Acid (poly I:C) や、Lipopolysaccharide

(LPS) を投与する MIA の動物モデルでは、母獣において炎症性サイトカインが上昇し、胎仔脳においても炎症が亢進する⁷⁻¹⁰。

妊娠高血圧腎症 (Preeclampsia : PE) は全妊婦の 3-5% が罹患する、高血圧に腎臓や肝臓などの多臓器の障害、胎児発育不全などを伴う疾患である¹¹。母体、出生児の予後は悪く、根本的な治療は妊娠の終結のみである^{12,13}。PE の発症には様々な病態生理が関与していると考えられているが、病態機序を示す主なモデルとして Two Stage Disorder Model がある。

Two Stage Disorder Model は、妊娠初期の胎盤形成不全による血管形成不全が胎盤虚血を引き起こし、妊娠後期に胎盤機能不全を引き起こすという説である。正常妊娠では妊娠初期の胎盤形成期において、トロフォブラストが子宮螺旋動脈のリモデリングを起こし、子宮螺旋動脈が変化し動脈径が広がることにより、胎盤血流が増加する¹⁴。一方、PE 母体では胎盤において螺旋動脈形成不全が起き、胎盤虚血が生じる¹⁴。結果として、Soluble FcγR-like Receptor 1 (sFlt-1) などの血管新生阻害因子や、炎症性サイトカイン、後述する Angiotensin Type 1 Receptor (AT₁-R) に対する Agonistic な自己抗体である Angiotensin II Type 1-Receptor Autoantibody (AT₁-AA) などの胎盤での産生が惹起され、これ

らの病因因子が胎盤から母体循環に入り全身に作用することで、PEにおける多様な症状が表出される¹⁴⁻¹⁶。

PEの発症に関連する重要な機序として、レニンアンジオテンシン系（Renin Angiotensin System：RAS）系の亢進がある。Reninは腎臓の傍糸球体細胞から分泌され、Angiotensinの前駆体であるAngiotensinogenは肝臓で産生される。AngiotensinogenはReninによりAngiotensin Iに変換され、さらにAngiotensin変換酵素によりAng IIに変換される。また、AT₁-Rは血管内皮細胞などに存在しAng IIと結合することで血管収縮作用を示す。正常妊婦ではRAS系は心血管系に作用し母体および胎児の血流量を保持するために、末梢血管を拡張し末梢血管抵抗を低下させ、結果として、心拍出量を増加させるように働くことで、循環血液量を保持する。さらに腎臓に作用し血圧のコントロールや電解質のバランスを制御している。一方、PE患者では、Ang II濃度は正常妊婦に比べ低下しているが、早ければ妊娠中期からAT₁-AAが存在し、さらに血管筋層内に存在するAT₁-Rの発現が増加しており、疼痛、血管拡張物質であるBradykininと結合するThe Type 2 Bradykinin ReceptorとAT₁-Rがヘテロダイマーを形成することにより、レセプターの感受性の亢進が起こっている。結果としてPE患者では末梢血管の抵抗が増すことにより高血圧を発症する¹⁷。

AT₁-AA は多くの PE 患者の血中に存在し AT₁-R を活性化させる自己抗体で、1999 年に PE 患者血より発見された¹⁸。PE 患者より AT₁-AA を精製し妊娠マウスに投与すると、高血圧、蛋白尿、胎児発育不全など PE の症状が表出する^{19,20}。AT₁-AA による AT₁-R の過剰な活性化は、高血圧のみならず、絨毛細胞の機能障害による胎盤機能不全、腎障害など PE に特徴的な多臓器障害を惹起する²¹。このように、AT₁-AA による RAS 系の亢進は PE における中心的な機序の一つであると考えられている。

胎盤の虚血や RAS 系の亢進が PE の発症に深く寄与することは上述したが、これらの結果として母体が PE を発症すると、PE 患者では血中の TNF- α や IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインの発現亢進に特徴づけられる全身性の炎症の亢進が起こっていることが明らかとされている^{13,22,23}。その背景には、全身の血管内皮障害などが寄与していると考えられている²²。子宮胎盤虚血による妊娠ラットを用いた PE モデル (Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) モデル) では、母獣において TNF- α や IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインの上昇が認められている²⁴。また、Ang II 投与や AT₁-AA 投与による RAS 系亢進の PE モデルマウスでもこれら炎症性サイトカインの上昇を認めている^{25,26}。これら

のことは、PE は全身性に免疫系が賦活化して炎症状態の亢進した MIA の状態にあるという側面を持つことを示唆している。

近年、大規模疫学調査で PE 患者から生まれた児において、ASD、注意欠陥多動性症、てんかん、知的障がい等の発症リスクが上昇するとの報告があり、特に ASD に関しては多数の報告がなされている²⁷⁻²⁹。ノルウェーで行われた大規模コホート研究では、PE 患者からの出生児は正期産での出生であっても、ASD などの神経発達症のリスクが増すこと (Odds 比 1.29) が示されている²⁸。最近のメタ解析においても、PE から生まれた児は ASD 発症リスクが上昇すること (Relative Risk 1.34) が示されている³⁰。

しかしながら、母体の PE 罹患と出生児におけるこれらの神経発達症の発症の因果関係について、動物モデルを用いて基礎的な検討をした報告は限られている。最近 Giambrone らは、妊娠ラットの子宮胎盤血流を減少させる RUPP モデルで、胎仔脳において IL-1 β 、IL-6、IL-18 のサイトカインが上昇していることを報告した³¹。また、Vogtmann らは sFlit-1 を強制発現させる PE モデルマウスの胎仔脳を解析し、大脳皮質と海馬の体積が減少し、被殻の細胞密度が増加するといった構造異常が起こっていることを報告した³²。これらの報告に限られる現状からは、PE 患者と胎児期および出生後の脳内環境の変化や、神経発達

に与える影響については、多くが未解明であると言ってよい。全身性の炎症を伴い MIA の状態にある PE 患者から生まれた児は、胎児期から子宮内において炎症性変化による影響を受け、出生後にも脳内で何らかの免疫学的な変容が起き、さらには神経発達症の発生と関連している可能性は十分にある、と考えた。

本研究の目的について

上述したように、PE と出生児の神経発達症との関連の背景にある病態機序は未解明の点が多い。本研究は、RAS の亢進による PE マウスモデルを用いて、母体の PE 罹患が胎児や出生児の脳や神経発達に与える影響を検討することを目的とした。

本研究では下記の検討を行い、PE と出生児における神経発達症との関連の解明を目指した。

1. Ang II の持続投与による PE マウスモデルを作製する。
2. 胎仔脳内の炎症の状態を、サイトカインの発現や Microglia の活性化状態を解析することで調べる。
3. Ang II 持続投与マウスからの出生仔に対し、発達、運動、感情や社会性について調べるための行動解析を行う。

4. マイクロアレイによりAng II持続投与マウスからの出生仔の脳における遺伝子発現の変化を調べる。

方法

実験動物

全ての動物実験は東京大学医学部（医-H19-007）、東京都医学総合研究所（22-012）の動物実験委員会の承認を受けて施行した。C57BL/6J マウスを、東京大学および東京都医学総合研究所にて飼育を行い、実験を施行した。動物の飼育・管理については、12時間毎に昼夜のリズムを保ち飼育し、餌や水は自由に得られる環境を保ち、東京大学および、東京都医学総合研究所が定める施設動物実験規則を遵守して行った。

1. Ang II を持続投与することにより妊娠高血圧腎症モデルマウスを作製する

1-1. Ang II 投与による PE モデルマウスの作製

雌マウスは C57/BL6J を日本 SLC（静岡、日本）、または、CLEA（東京、日本）から非妊娠の雌マウスもしくは妊娠マウスを購入した。Zhou³³らの論文に記載されているプロトコルを参考に Ang II を妊娠マウスに持続投与することにより PE 表現型を誘導するマウスモデルを作製した。非妊娠雌マウスに関しては、朝に Vaginal Plug を確認した日を Embryonic Day 0.5 (E) とした。

E10.5 に、マウスの頭頸後部に切開を入れ背部皮下に Osmotic Mini Pump (Alzet model 2001; Alza Palo Alto, CA, USA) を挿入した (図 1)。Ang II (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) を Phosphate Buffered Saline (PBS) に溶解しポンプに充填し、ポンプからは Ang II が 1.5 mg/kg body weight/day 溶出するように設定した。コントロールとして PBS を充填した Osmotic Mini Pump を挿入した。麻酔にはイソフルラン (Pfizer Inc, NY, USA) 2-3% を使用した。妊娠マウスは PBS 投与群も Ang II 投与群も 7-9 匹の仔を E 20.5 に出産した。行動実験に使用したマウスは Postnatal day 1.5 (P) の時点で仔を 7 匹にそろえた。

1-2. PE モデルマウスの血圧、尿蛋白、胎仔重量の測定 (モデルマウスの検証)

Ang II 投与群 5 匹、PBS 投与群 4 匹について実験を行った。

マウスの血圧は E 6.5、E 8.5、E 10.5、E 13.5、E 15.5、E 17.5 に非観血血圧計 (CODA, Kent Scientific, Torrington, CT, USA) を使用し tail-cuff 法を用いて計測した。

尿蛋白については、E 16.5 にメタボリックケージ (TECNIPLAST, Lombardy, Italy) に妊娠マウスを入れ、E 17.5 に尿を回収した。回収した尿サンプルは

ELISA (Exocell, Pennsylvania, USA)により微量アルブミン濃度とクレアチニン濃度を測定した。

E17.5 の妊娠マウスをイソフルラン麻酔下で心臓脱血を行い、子宮を摘出した。その後、胎子を1匹ずつ子宮より摘出し Ang II 投与群 38 匹、PBS 投与群 28 匹の胎子重量を電子天秤で重量を測定した (図 1)。

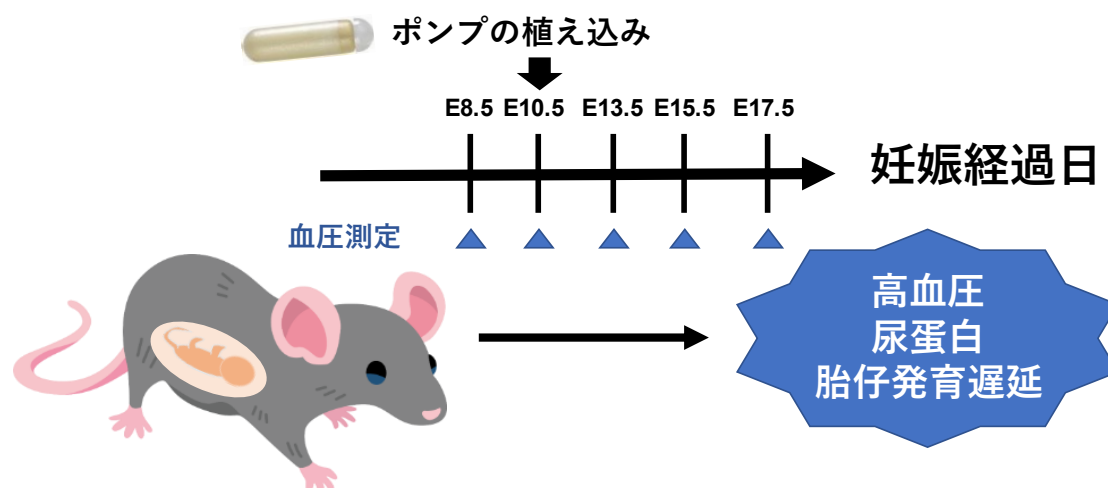


図 1. 妊娠高血圧腎症モデルマウスの作製

血圧は tail-cuff 法で E 8.5、E 10.5、E 13.5、E 15.5、E 17.5 に計測し、Albumin / Creatinine Ratio (Alb / Cre 比)を ELISA 法で計測し、胎子重量を電子天秤で計測した。

2. Ang II 持続投与マウスの胎仔脳でサイトカインの変動を Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) を用いて検討する。

Ang II 投与マウスと、PBS 投与マウス共に E 17.5 の妊娠マウスの子宮から胎仔を 1 匹ずつ単離し、断頭した。頭部より全脳を摘出し RT-qPCR の検体とした。Ang II 投与マウスの胎仔の脳を 9 検体、PBS 投与マウスの胎仔の脳 16 検体を用いた。摘出検体から Tissue Total RNA Kit (FAVORGEN, Ping Tung, Taiwan) を使用し Total Ribonucleic Acid (RNA) の抽出を行った。抽出した Total RNA は Spectrophotometer を使用して 260nm の吸光度を測定し、Total RNA の定量を行った。Total RNA を 3200ng (100 ng/ μ L) に合わせ、qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を添加し、Thermal Cycler を使用し逆転写反応を起こし、Complementary DNA (cDNA) を作成した。cDNA に、プライマー (表 1) と SYBR Green PCR Master Mix (Nippon Genetics Co, Tokyo, Japan) を混和し、QuantStudio1 (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, USA) を用いて増幅した。Messenger RNA (mRNA) の発現レベルは $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を使用し、 β -アクチンの相対値として解析した。プライマーは Sigma-Aldrich (Tokyo, Japan) のものを使用した³⁴ (表 1)。

表 1. プライマー配列

Target gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
β -actin	GCCTTCCTTCTTGGGTAT GG	AGGTCTTTACGGATGTC AACG
IL-6	AACGATGATGCACTTGCA GA	GAGCATTGGAAATTGGG GTA
TNF- α	TCTTCTGTCTACTGAACT TCGGGGTGA	GTGGTTTGCTACGACGT GGGCTA
IFN- γ	ATCGGCTGACCTAGAGAA GA	AGCCAAGATGCAGTGTG TAG
IL-4	CCCCAGCTAGTTGTCATC CTG	CAAGTGATTTTTGTCGC ATCCG
IL-10	AGAGACTTGCTCTTGAC TACC	GCTGAAGGCAGTCCGCA GCTC
IL-12	ACAGCACCAGCTTCTTCA TCAG	TCTTCAAAGGCTTCATCT GCAA

IL-17a	CTGAGAGCTGCCCCTTCA	CCACACCCACCAGCATC
	CT	TTC

IFN- γ : interferon-gamma, TNF- α : tumor necrosis factor-alpha.

3 . Ang II 持続投与マウスの胎仔脳での Microglia の活性を Immunohistochemistry (IHC)により検討する

E17.5 において Ang II 持続投与マウス、および、PBS 持続投与マウスを、次に述べる手順によって灌流固定した。麻酔導入剤として Pentobarbital Sodium (1.25~2.5 mg) を腹腔内投与した後、Isoflurane (2~4%濃度)で吸入麻酔した。まず、ヘパリン入りの生食で脱血を行い、その後、4%Paraformaldehyde (PFA) で灌流固定を行った。子宮から胎仔を摘出して断頭し、4%PFA に浸漬した後固定を行った。一晩浸漬した後、Sucrose/PBS (0.1M PBS with 0.2% NaN₃)への置換を行った。胎仔頭部を Distilled Water で3回洗浄 (5分間/回)し、続いて、Sucrose 濃度を 10%, 20%, 30%と段階的に高くした3つの溶液槽に順に浸漬した。

胎仔頭部から脳を摘出し、Optimal Cutting Temperature Compound (Sakura Finetek, Osaka, Japan) に沈めて凍結包埋した。薄切にはクリオスタット

(NX70, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, USA) を用い、切片厚を 16 μm として、冠状断での薄切を行った。薄切範囲は、前頭葉先端～小脳後端までとし、48 μm の間隔を空けながら切片を順次採取した。

本研究では、分析のターゲットを Microglia とし、抗 Iba-1 抗体 (Anti Iba1, rabbit, 019-19741) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp, Osaka, Japan) で免疫染色を行った。スライドガラスに貼った胎仔脳切片を 0.01M PBS で 3 回洗浄 (5 分間/回) した後、蛋白質ブロックとして、5% NGS (normal goat serum) / PBST (0.01M PBS with 0.3% Triton X) で切片を覆うように滴下し、湿潤箱で 30 分間静置した。

一次抗体の抗 Iba-1 抗体は、5% NGS/ PBST with 0.1% NaN_3 で 600 倍希釈し、4°C で一晩反応させた。PBST で 3 回洗浄 (10 分間/回) した後、二次抗体の反応を行った。二次抗体は、蛍光標識の抗 rabbit IgG 抗体 (Alexa-594 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), 111-585-144) (Jackson Immuno Research, Inc, PA, U.S.A.) を、5% NGS/ PBST で 200 倍希釈し、遮光して室温で 2 時間反応させた。反応終了後、0.01M PBS で 3 回洗浄 (10 分間 / 回) した後、褪色防止封入剤で封入した (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, H-1200, Vector Laboratories, Inc, Newark, USA) 。

作成したスライドは、レーザー共焦点顕微鏡である FV3000 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて 200 倍で観察した。各切片の Dorsal, Lateral, および Ventral area を 1 枚ずつ撮影して TIFF format で保存した(図 2)。

解析には Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) を用い、脳実質の Iba1 陽性細胞を解析した。Image J で画像を過去の報告に倣って “Circularity” と “Solidity” を計測した³⁵。また、コントラストが悪く Image J に読み込めない画像は除外した。384 μ m 毎の切片を解析し、結果として、E 17.5 における胎仔の前頭葉先端～小脳後端の Microglia の活性化状態について Ang II 投与群において胎仔脳は 3 匹、脳スライス 24 枚、測定箇所 66 ケ所、1934 個、PBS 投与群の胎仔脳は 3 匹、脳スライス 21 枚、測定箇所 55 ケ所 1573 個の Iba-1 陽性細胞を Image J を使用し Solidity、Circularity について解析した³⁵。Circularity と Solidity は $4\pi[\text{area}]/[\text{perimeter}]^2$ and $[\text{area}]/[\text{convex area}]$, の計算式を用いて計測した(図 2)。

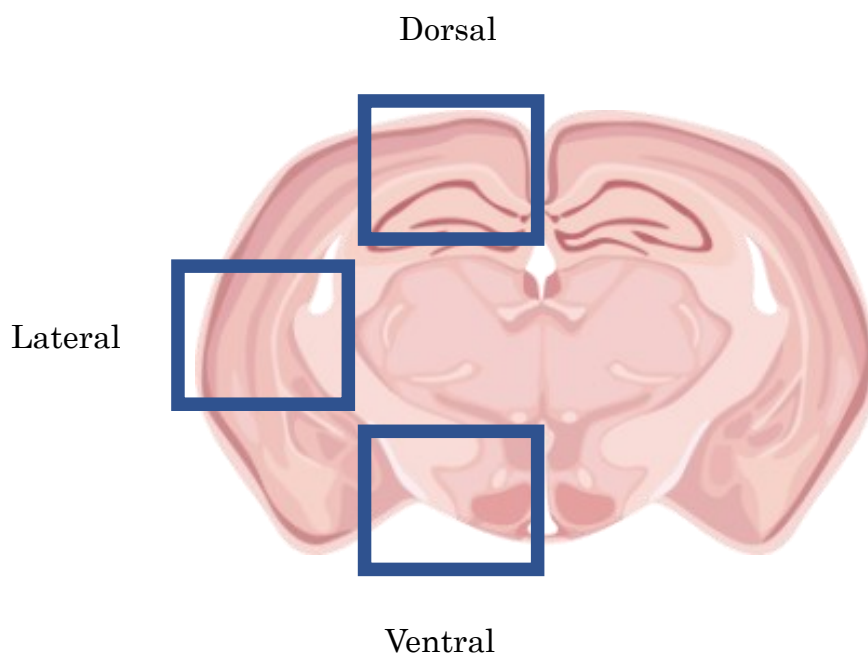


図 2. 胎仔脳における Microglia の評価

E17.5 において Ang II 持続投与マウス、および、PBS 持続投与マウスを、灌流固定し、子宮から胎仔を摘出して断頭した後、固定を行った。切片厚を 16 μm として、冠状断での薄切を行った。抗 Iba-1 抗体で染色した Microglia を切片ごとに Dorsal, Lateral, および Ventral Area に分けて撮影し観察した。

4. Ang II 持続投与マウスからの出生仔に対して行動解析を行う

E 10.5 より Ang II および PBS を持続投与したマウスから出生した仔マウスは 図 3 に示す行動実験の日程に従って、12-13 週齢まで行動実験を行った。12-14 週齢のマウスはマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析のために検体採取を行った。

行動実験の日程

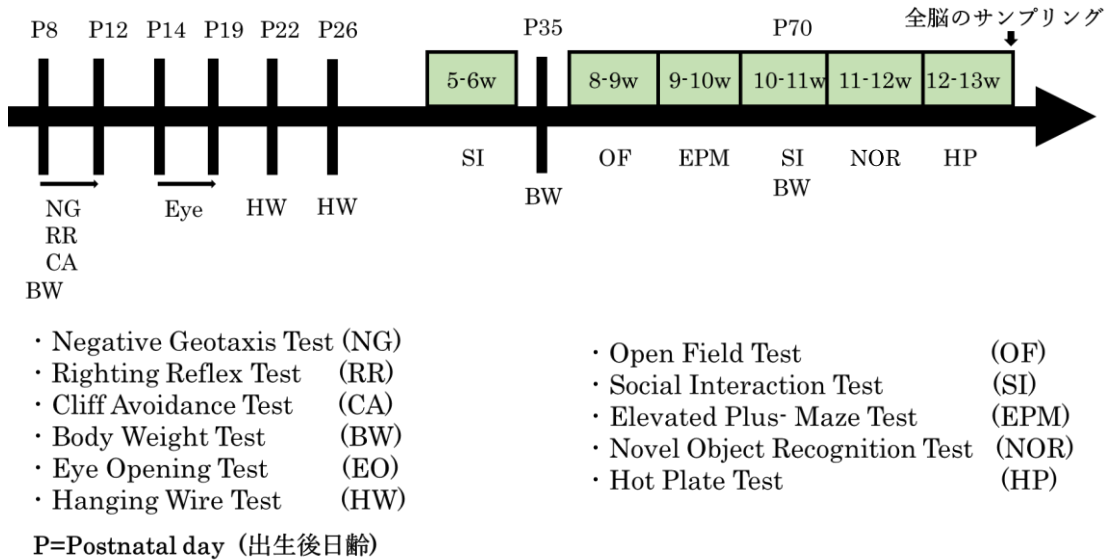
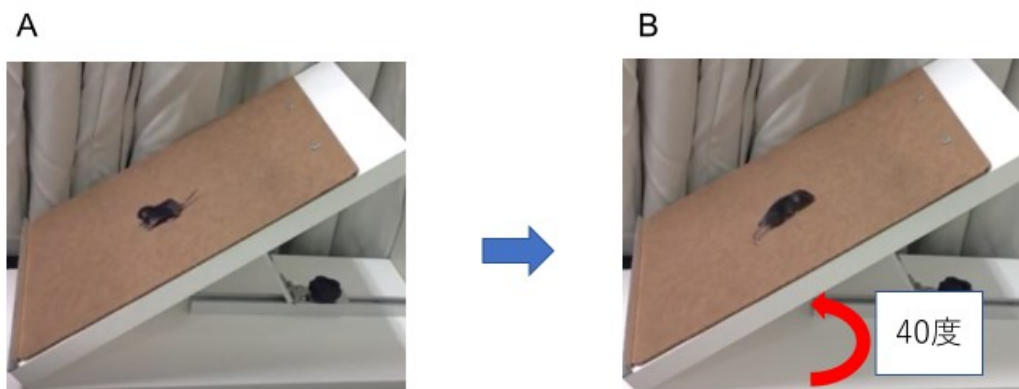


図 3.行動実験の日程

図は行った行動実験の日程である。背地走性テスト (Negative Geotaxis Test)、正向反射テスト (Righting Reflex Test)、断崖回避テスト (Cliff Avoidance Test) は P8、P10、P12 に施行した。体重は P8、P35、P70 に計測した。アイオープニングテスト (Eye Opening Test) は P14、から P18、まで行った。ハンギングワイヤテスト (Hanging Wire Test) は P22 と P26 に施行した。オープンフィールドテスト (Open Field Test) は出生後 8-9 週齢のマウスに対して施行した。高架式十字迷路テスト (Elevated Plus Maze Test) は出生後 9-10 週齢のマウスに対して施行した。ソーシャルインタラクションテスト (Social Interaction Test) は出生後 5-6 週齢と 10-11 週齢のマウスに対して施行した。ノベルオブジェクト探索テスト (Novel Object Recognition Test) は出生後 11-12 週齢に対して施行した。ホットプレートテスト (Hot Plate Test) は出生後 12-13 週齢のマウスに対して行った。すべての行動テストの終了後、12-14 週齢になったマウスの全脳を回収した。

4-1. 背地走性テスト

背地走性テストは協調運動機能や重力を手掛かりにした先天的な前庭機能などの発達を調べる試験である³⁶。P8、P10、P12 に施行した。Ang II 持続投与マウス 7 腹からの出生仔は、オスは 26 匹、メスは 23 匹、PBS 持続投与マウス 7 腹からの出生仔は、オスは 27 匹、メスも 22 匹に対して試験を施行した。マウスを実験環境に馴化させるために、ケージを実験室に 1 時間静置した。その後、40° に傾けたコルクボード上に、マウスの鼻先を下に向け静置し、180° 回転する（鼻先が上を向く）までの時間を計測した。（図 3A-E）。



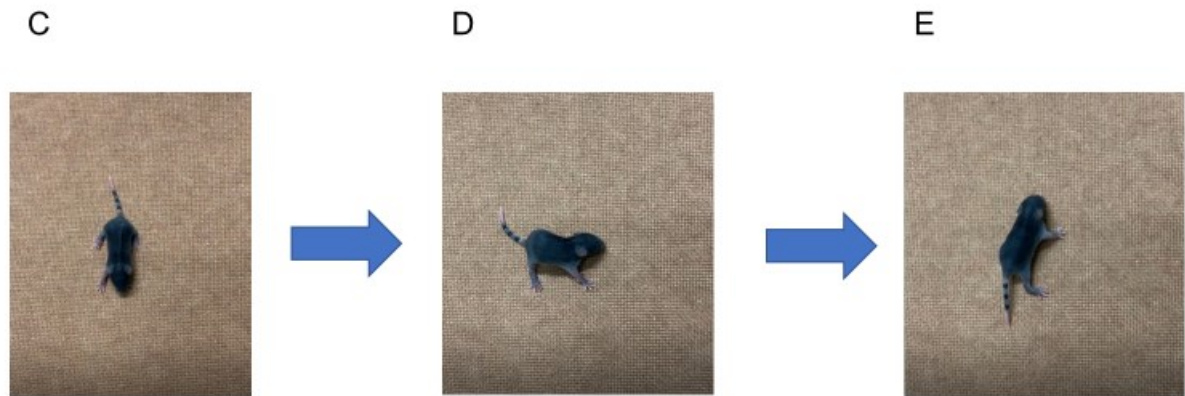


図 4. 背地走性テスト

マウスを 40° に傾けた地面がコルクボードの中心に頭部が下側になるように静置した (A)。その後、マウスが 180° 回転し頭部が上側に方向転換するまでの時間を計測した (B-E)。

4-2. 正向反射テスト

正向反射テストは仰臥位において肢ではねる力、反射能力、協調運動や前庭機能などの発達を調べる試験である³⁶。P8、P10、P12 に施行した。Ang II 持続投与マウス 7 腹からの出生仔は、オスは 26 匹、メスは 23 匹、PBS 持続投与マウス 7 腹からの出生仔は、オスは 27 匹、メスも 22 匹に対して試験を施行した。マウスを実験環境に馴化させるために、ケージを実験室に 1 時間静置した。水平面上の台にマウスを仰臥位に置き腹臥位に戻るまでの時間を計測した(図 5A-C)。

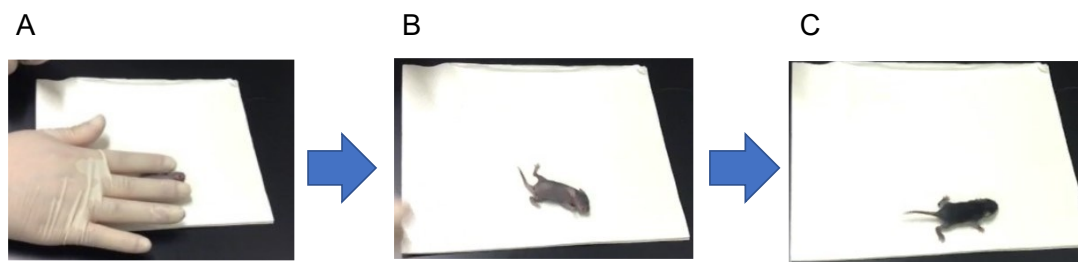


図 5. 正向反射テスト

愛護的にマウスを仰臥位にし、手を放し腹臥位に戻るまでの時間を計測した (A-C)。20 秒をカットオフ値とした。

4-3. 断崖回避テスト

断崖回避テストは平衡感覚や、協調運動などの発達を調べる試験である³⁶。

P8、P10、P12 に施行した。Ang II 持続投与マウス 7 腹からの出生仔は、オスは 26 匹、メスも 23 匹、PBS 持続投与マウス 7 腹からの出生仔は、オスは 27 匹、メスは 22 匹に対して試験を施行した。

マウスを実験環境に馴化させるために、ケージを実験室に 1 時間静置したのち、90° の崖を作り、崖から逃避するまでの時間を計測した (図 6 A. B)。

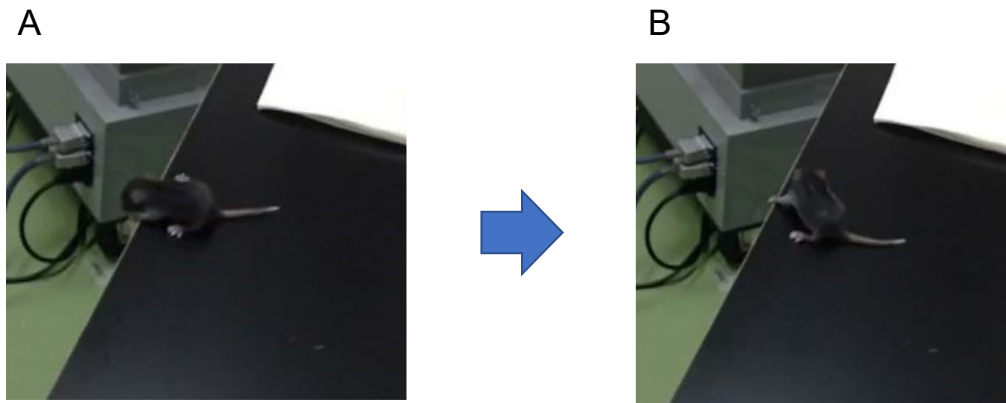


図 6. 断崖回避テスト

実験室で 1 時間 Habituation を行ったのち、90° の崖に前肢を置くように静置し、頭をそむける、前足を後退させるなど、崖から逃避するまでの時間を計測した (A.B)。

4-4. アイオープニングテスト

アイオープニングテストは発達を調べるためのテストで両眼の開眼の有無を日齢 14 から日齢 18 まで連日行った³⁷。Ang II 持続投与マウス 7 腹からの出生仔は、オスは 26 匹、メスは 23 匹、PBS 持続投与マウス 7 腹からの出生仔は、オスは 27 匹、メスは 22 匹に対して試験を施行した。

Eye Opening Score は両目が閉じているものが 0、片目が開いているものが 1、両目が開いているものを 2 としスコア化した。

4-5. ハンギングワイヤテスト

ハンギングワイヤテストは握力、平衡感覚、運動能力などの発達を調べるテストである³⁸。ジャンプして落下することを厭わないマウスでは、テストは成立しない。Ang II 持続投与マウス 7 腹からの出生仔は、オスは 25 匹、メスは 22 匹、PBS 持続投与マウス 7 腹からの出生仔は、オスは 27 匹、メスは 22 匹に対して試験を施行した。Hanging Wire test box (O'Hara & Co., Tokyo, JAPAN) を用いて P22 と P26 に施行した。

マウスは 150mm×150mm の広さで、把持する箇所は各 10mm×10mm の間隔があいている、金網に置かれ、金網を 180° 回転したのち、落下せずにいる時間を計測した。またカット off 値は 600 秒とした (図 7A-C)。

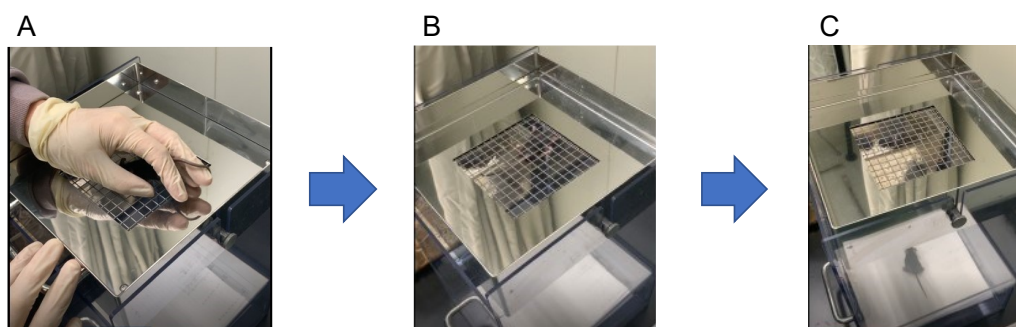
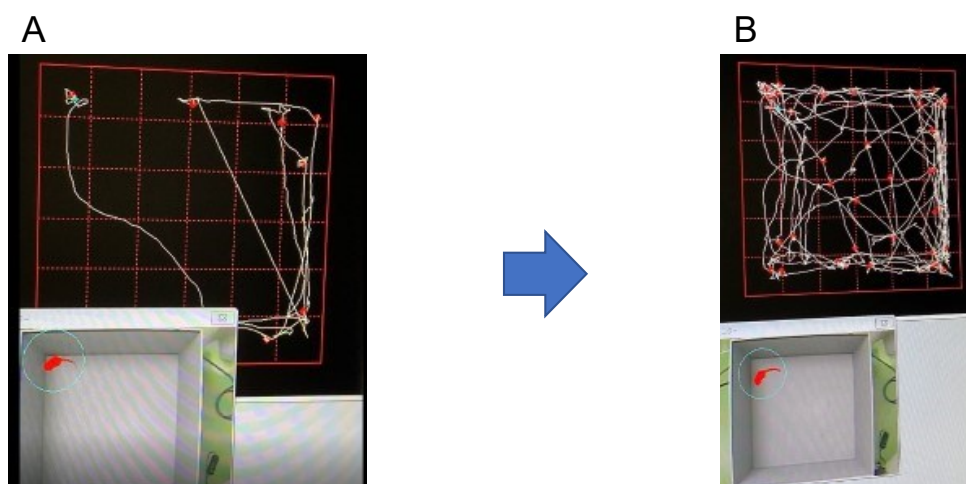


図 7. ハンギングワイヤテスト

金網の上にマウスを静置し、プレートを 180° 回転させ、マウスが落下するまでの時間を計測した (A-C)。

4-6. オープンフィールドテスト

オープンフィールドテストは新規の環境下での行動、活動性、不安関連を調べるテストである。出生後 8-9 週齢で行った³⁹。Ang II 持続投与マウス 6 腹からの出生仔は、オス 22 匹、メスは 22 匹、PBS 持続投与マウスからの出生仔は、6 腹からオス 25 匹、5 腹からメス 18 匹に対して試験を施行した。他のマウスに対する影響を考慮して 2 匹以下で飼っているマウスは除外して実験を行った。ホームゲージで 1 時間、馴化した後のマウスを、500mm×500mm の四角い箱中央に置き上方よりビデオで録画し 20 分間トラッキングした (Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)。6×6、計 36 マスの区画に区分し外側滞在時間と中央区滞在時間を計測した。また総行動距離も計測した (図 8A-D)。



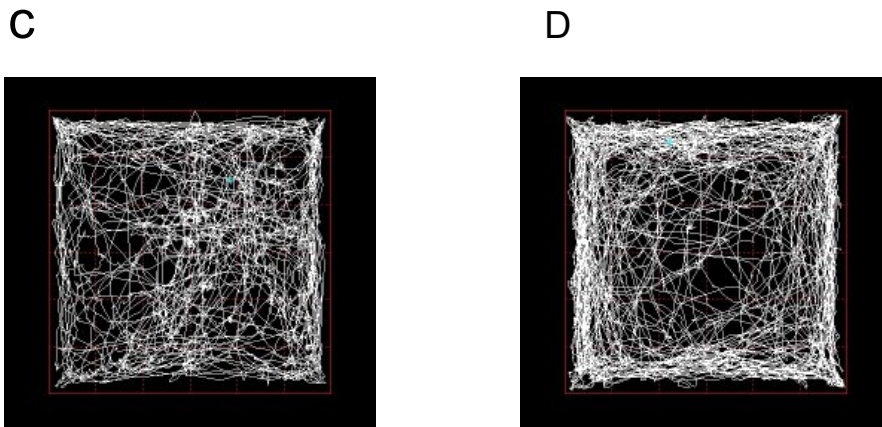


図 8. オープンフィールドテスト

箱に静置したマウスをビデオでトラッキングした (A.B)。主に箱全体を行動しているマウスと主に箱の壁側を行動している行動経路が明示されている (C.D)。

4-7. 高架式十字迷路テスト

高架式十字迷路テストは恐怖心や不安の強さを計測する試験である⁴⁰。

他のマウスに対する飼育下の社会的影響を考慮して 2 匹以下で飼育されているマウスは除外した。出生後 9-10 週齢で実験を行った。Ang II 持続投与マウスからの出生仔は、オスは 4 腹から 16 匹、メスは 3 腹から 10 匹、PBS 持続投与マウスからの出生仔は、オスは 4 腹から 14 匹、メスは 4 腹からメス 15 匹に対して試験を施行した。

マウスを実験環境に馴化させるために、ケージを実験室に 1 時間静置したのちにマウスを 60×260mm の壁のある床と、60×260mm の壁のない床が十字に

合わさった床の中心にマウスを静置し、ビデオトラッキングを用いて10分間撮影し壁のない床の滞在時間を計測した(図9 A-D)。

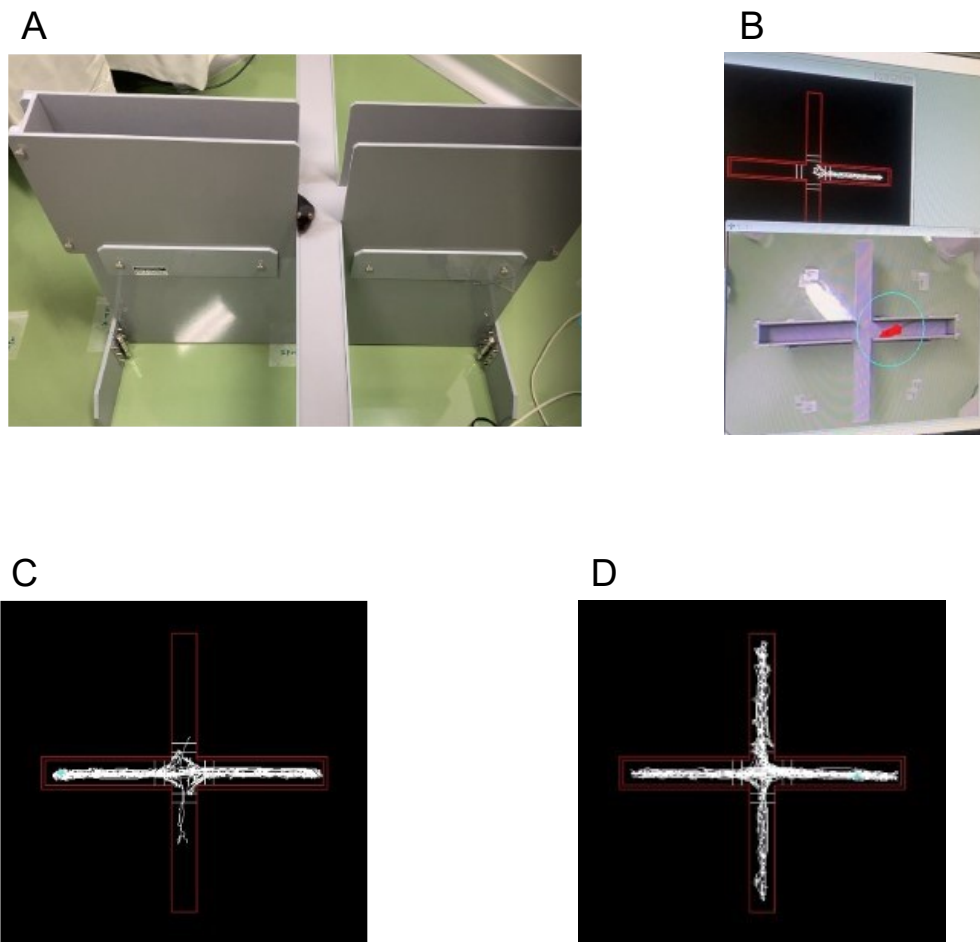


図9. 高架式十字迷路テスト

1時間、実験室で馴化した後にマウスを60×260mmの壁のある床と、60×260mmの壁のない床が十字に合わさった床の中心にマウスを静置した(A)。ビデオトラッキングを用いて10分間撮影し壁のある床と壁のない床におけるそ

それぞれの滞在時間を計測した (B)。壁のある床上を移動した時間が長い顕著な例と壁のない床上を移動した顕著な例を示す (C,D)。

4-8. ソーシャルインタラクションテスト

ソーシャルインタラクションテストは他個体に対する、関心度、社会性を調べるテストである。この実験は 5-6 週齢、10-11 週齢に行った³⁷。2 匹以下で飼育されているマウスは除外した。5-6 週齢において Ang II 持続投与マウスからの出生仔は、5 腹からオスは 22 匹、6 腹からメスは 21 匹、PBS 持続投与マウスからの出生仔は、6 腹からオスは 25 匹、5 腹からメスは 18 匹に対して試験を施行した。

10-11 週齢においては Ang II 持続投与マウスからの出生仔は、6 腹からオスは 20 匹、6 腹からメスは 20 匹、PBS 持続投与マウスからの出生仔は、6 腹からオスは 22 匹、6 腹からメスは 20 匹に対して試験を施行した。

各実験マウスをホームケージに入れ音刺激を減らした状態で 15 分間、馴化を行った。その後、同じ性別で、同じ週数の Stranger マウスを侵入させた。ホームケージマウスはビデオで 10 分間観察され、社会性行動として、においを嗅ぐ、後をつける、マウンティングする、相手を毛づくろいするなどの、各項目の時間を合計し、Active social interaction を計測した (図 10A. B)。

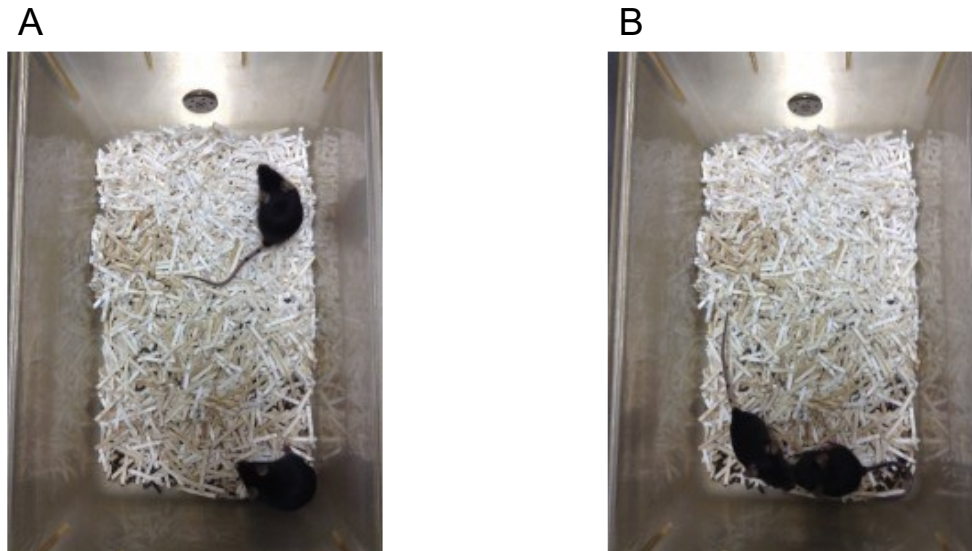


図 10. ソーシャルインタラクションテスト

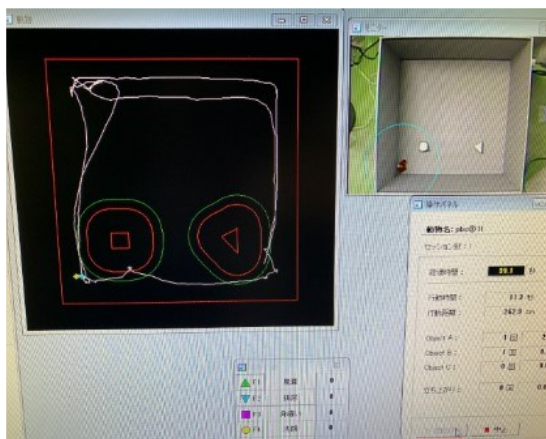
各実験マウスをホームケージに入れ音刺激を減らした状態で 15 分間、馴化をおこなった。その後、同じ性別で、同じ週数の Stranger マウスを侵入させた。他者に対して Social interaction を行っていないマウス (A)。他者に対して social interaction を行っているマウスを示している (B)。

4-9. ノベルオブジェクト探索テスト

ノベルオブジェクト探索試験は記憶力を計測するテストである⁴¹。Ang II 持続投与マウスからの出生仔は、6 腹からオスは 23 匹、6 腹からメスは 22 匹、PBS 持続投与マウスからの出生仔は、6 腹からオスは 24 匹、5 腹からメスは 18 匹に対して試験を施行した。

合計3日にかけてテストを行った。1回10分間、500mm×500mmの四角い箱の中央にマウスを置き上方よりビデオで録画し、行動を観察した(Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)。1日目は何も物体を置かない状態で、馴化を行った。2日目は箱に球形と三角柱という2つの形が異なる物体を静置しビデオトラッキングでどちらの新奇物体に興味を示すか、すなわちどちらの物体の近くに長時間滞在するかを計測した。3日目は2つの物体のうちの1つである円柱の物体を三角柱の物体へ置き換え、四角柱と三角柱のどちらに興味を示すか計測した(図11A-C)。また、Exploratory index (%) = 3日目の新奇物体付近の滞在時間 / 新旧両方の物体付近の滞在時間、を表している。

A



B



C



図 11. ノベルオブジェクト探索テスト

合計 3 日にかけて行うテストで、1 回 10 分間、500mm×500mm の四角い箱中央にマウスを置き上方よりビデオで 10 分間録画し、行動を観察した (A)。1 日目は何も物体を置かない状態で、馴化を行った。

2 日目は箱に四角柱と円柱という 2 つの形が異なる物体を静置しビデオトラッキングでどちらの新規物質に興味を示すか、すなわち長時間近くに滞在するかを計測した (B)。3 日目は 2 つの物体のうちの 1 つである円柱の物体を三角柱の物体へ置き換え、四角柱と三角柱のどちらに興味を示すか計測した (C)。

4-10. ホットプレートテスト

ホットプレートテストは熱した鉄板の上にマウスを静置し、足をなめる、立ち上がる、飛び跳ねるまでの時間を測定することで、疼痛への反応時間を調べるテストである⁴²。Ang II持続投与マウスからの出生仔は、4腹からオスは13匹、4腹からメスは12匹、PBS持続投与マウスからの出生仔は、5腹からオスは19匹、5腹からメスは16匹に対して試験を施行した。

プレートの温度は 55 ± 0.5 °Cに設定し200×250 mmの板を使用し実験を行った(図12)。

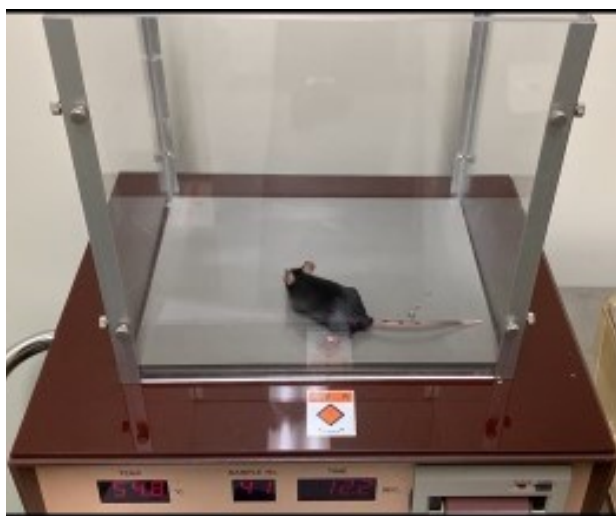


図12 ホットプレートテスト

55 ± 0.5 °Cに熱した200×250mmの板を使用し実験を行った。

体重測定

Ang II 持続投与マウスからの出生仔と PBS 持続投与マウスからの出生仔について P8、P35、P70 の出生後体重について調べた。

Ang II 持続投与マウスからの出生仔は、4 腹からオスは 17 匹、メスも 11 匹、PBS 持続投与マウスからの出生仔は、4 腹からオスは 17 匹、メスも 11 匹に対して電子天秤を用いて体重を計測した。

5. Ang II 持続投与マウスから出生した仔の脳を用いて遺伝子発現解析を行う

5-1. 脳採取と RNA 抽出

全ての行動実験が終わったのち、12-14 週齢のマウスの全脳を取り出した。取り出した脳は即座に液体窒素で凍らせ、 -80°C で保存した。

サンプル 100 mg あたり TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を 1 ml 入れる。脳の重量は 10 週齢のマウスで 480 mg くらいであるため、3 ml の TRIzol Reagent に摘出したマウスの脳を浸した。その後、ホモジナイザーで 120 秒ほどホモジナイズを行った。ホモジナイズした脳に更に TRIzol Reagent 2 ml を添加し、5 分間室温で静置した。蛋白質を抽出するため 15 ml の遠心管 (Corning 社) に、1 ml の TRIzol Reagent に対して、0.2 ml の

クロロホルムを入れた。今回は、1.0 ml のクロロホルムを混和した。手動で 15 秒ほど攪拌し、室温で 3 分静置した。4°C に冷やした遠心分離機を使用し 15 分間、12,000 rpm で遠心分離を行った。

上層と下層に分かれ水層である上層に RNA が抽出されているため 1.5 ml のチューブに 200 μ l 分注した。さらにイソプロパノールを 200 μ L 添加し転倒混和した。室温で 10 分間静置した後、再度、4 °C に冷やした遠心分離機を使用し 15 分間、12,000rpm で遠心分離を行った。上清を取り除いて RNA ペレットのみにして 1 ml の冷却した 75%エタノールを加え転倒混和した。15 分間、12,000 rpm、4 °C で遠心分離を行った。エタノールを捨て、さらにエタノールによる精製を 2 回繰り返した。その後、沈殿物である RNA を乾燥させ RNase free 蒸留水 20 μ L を加え、RNA を抽出した。

抽出した RNA は Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて計測した。全てのサンプルの A260/280 比は 2.0-2.1、A230/260 は 2.2-2.3 であった。

5-2. マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

マイクロアレイ解析は相補的な RNA をターゲットに the Whole Mouse Genome Microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて

行った。アレイスライドは SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies)を使用しスキャンした。得られたデータは、75%tile 法にてシグナル強度を補正した。検出が不明瞭なプローブ (compromised probe) は解析から除外した。The Benjamini and Hochberg false-discovery rate は本解析では実施しなかった。各群間比較は t 検定を行った ($P < 0.05$)。各群は Ang II 持続投与群における出生仔の雌雄、PBS 持続投与群における出生時の雌雄、計 4 群に分けて解析を行った。

Ang II 持続投与群における出生仔と PBS 持続投与群における出生仔のオスで遺伝子発現量に有意差があったもの、Ang II 持続投与群における出生仔と PBS 持続投与群における出生時のメスで有意差があったものを抽出し、さらに遺伝子発現量において雌雄共通に有意差があった遺伝子に pathway enrichment 解析を行った。解析は BaseSpace (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて行った⁴³。

統計解析について

各グラフは平均と標準誤差で表されている。

Ang II 投与群と PBS 投与群の母獣マウスの平均収縮期血圧、尿 Alb/Cre Ratio、胎仔体重、胎仔脳における RT-qPCR の比較は Student's t 検定を用いてそれぞれの群間で比較検討した。胎仔の出生後に出生仔に対して行った背地走性テスト、正向反射テスト、断崖回避テスト、体重、ハンギングワイヤテスト、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト、ソーシャルインタラクションテスト、ノベルオブジェクト探索試験、ホットプレートテストの比較は Mann-Whitney U Test を用いてそれぞれの群間で比較検討した。

胎仔脳における Microglia の Solidity、Circularity の比較も Mann-Whitney U Test を用いてそれぞれの群間で比較検討した。

アイオープニングテストについては Two Way ANOVA を用いてそれぞれの群間で比較検討した。統計ソフトは GraphPad Prism (version 8, San Francisco, La Jolla California USA) を使用し $P < 0.05$ を統計学的有意差があると判断した。

結果

1. Ang II 持続投与で誘導される PE モデルマウスの作製

Ang II に対する AT₁-R の感受性の亢進や、AT1-AA による AT₁-R の活性化による RAS の亢進は、PE の病態において中心的な機序である⁴⁴。この病態機序に即した Ang II 投与による PE マウスモデルを、過去の報告にならって施行した³³。Ang II 持続投与群、PBS 持続投与群ともに、E 20.5（中央値）で分娩に至り、分娩日について両群に差は認めなかった。

E 10.5 より Ang II の持続投与を行った妊娠マウスの平均血圧、蛋白尿、胎仔重量を計測した（図 13A-C）。Ang II 持続投与群のマウスは PBS 持続投与群のマウスに比べ E 17.5 に有意に高い血圧を呈していた（図 13A）。Ang II 持続投与群マウスは PBS 持続投与群マウスに比べ尿中 Alb/Cre Ratio が有意に高く、蛋白尿の表現型を認めた（図 13B）。Ang II 持続投与群マウスの胎仔は PBS 持続投与群マウスの胎仔に比べ胎仔重量が有意に低く、胎児発育不全（Fetal Growth Restriction : FGR）の表現型を呈していた（図 13C）。以上、Ang II の投与により、高血圧、蛋白尿、FGR という代表的な PE の徴候が Ang II 持続投与妊娠マウスに表出することを確認した。

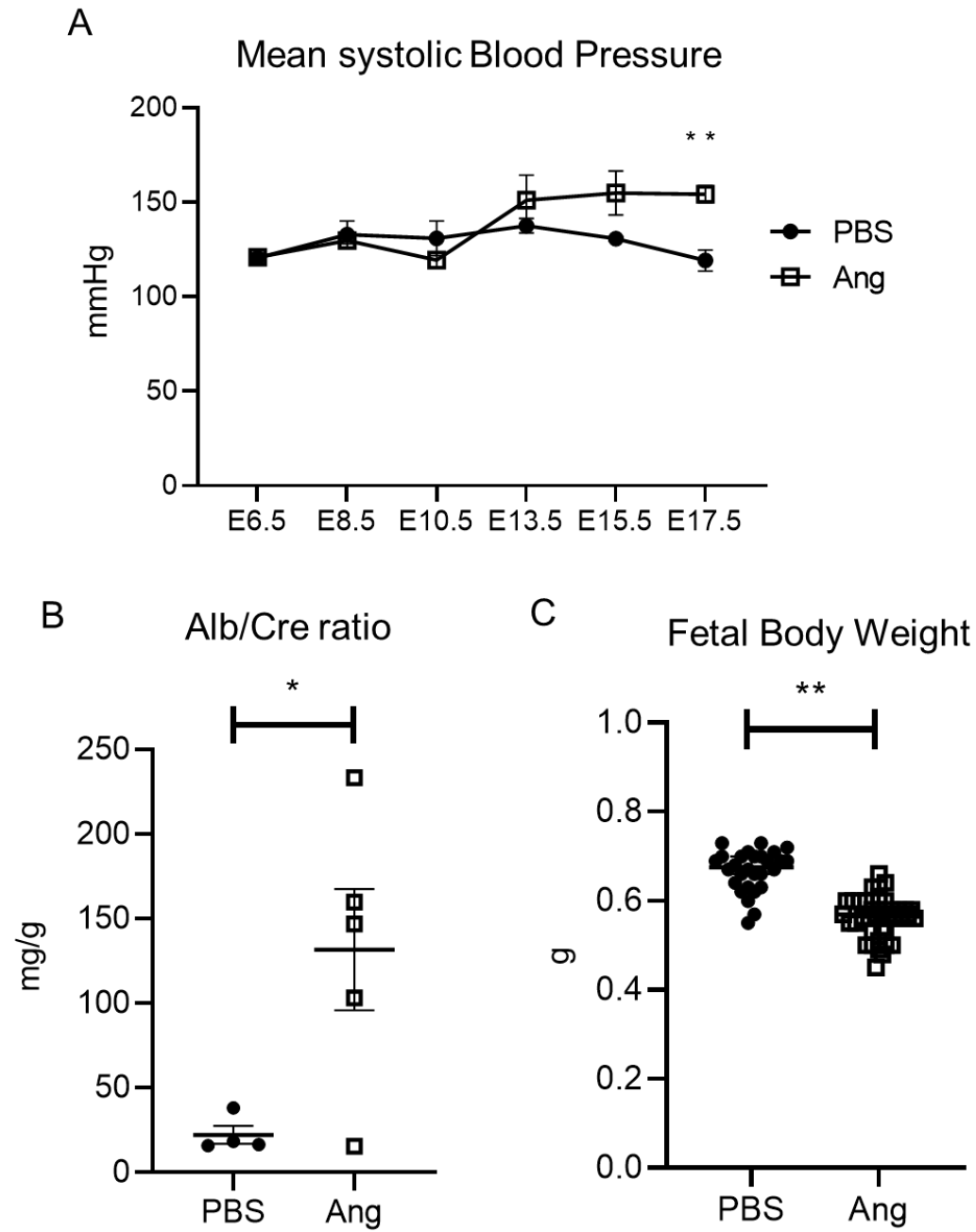


図 13. Ang II 持続投与による高血圧、尿蛋白、胎仔低体重 PE モデルマウスの作製

(A) Tail-Cuff 法での血圧測定の結果、E17.5 において Ang II 持続投与群 (N = 5) は PBS 持続投与群 (N = 4) に比べ有意に血圧高値を認めた。 (** $P < 0.01$)

(B) 尿蛋白の測定の結果、Alb/Cre Ratio において Ang II 持続投与群 (N = 5) は PBS 持続投与群 (N = 4) に比べ有意に高値を認めた。(* $P < 0.05$)

(C) E17.5 に胎仔重量の計測の結果、胎仔重量において Ang II 持続投与群 (N = 28) は PBS 持続投与群 (N = 38) に比べ有意に低値を認めた。(** $P < 0.01$)

2. Ang II 投与妊娠マウスの胎仔脳におけるサイトカインの発現亢進

Ang II 投与群の胎仔脳内と PBS 投与群の胎仔脳内における炎症の状態を調べるべく、E17.5 の胎仔脳における各種サイトカインの発現を検討した。IL-6 および Th17 から分泌される IL-17a は、MIA による出生児の神経発達症の発生に関わる事が知られるサイトカインであるが⁴⁵、これらの発現が Ang II 持続投与群の胎仔脳で亢進していた (図 14A, B)。また、感染性早産などを契機とした炎症性の胎児脳障害や、その後の脳性麻痺の発症機序で重要な働きを担う代表的なサイトカインである、TNF- α の発現も⁴⁶、Ang II 投与群の胎仔脳で亢進していた (図 14C)。さらには、Interferon- γ (IFN- γ)、IL-12 といった Th1 関連のサイトカインのみならず、IL-4、IL-10 といった Th2 関連のサイトカインの発現も Ang II 持続投与群の胎仔脳で亢進していた (図 14.D-H)。これらの結果は、Ang II 投与による PE モデルマウスの胎仔脳で全般的なサイトカインの上昇がもたらされていることを示唆するものであった。

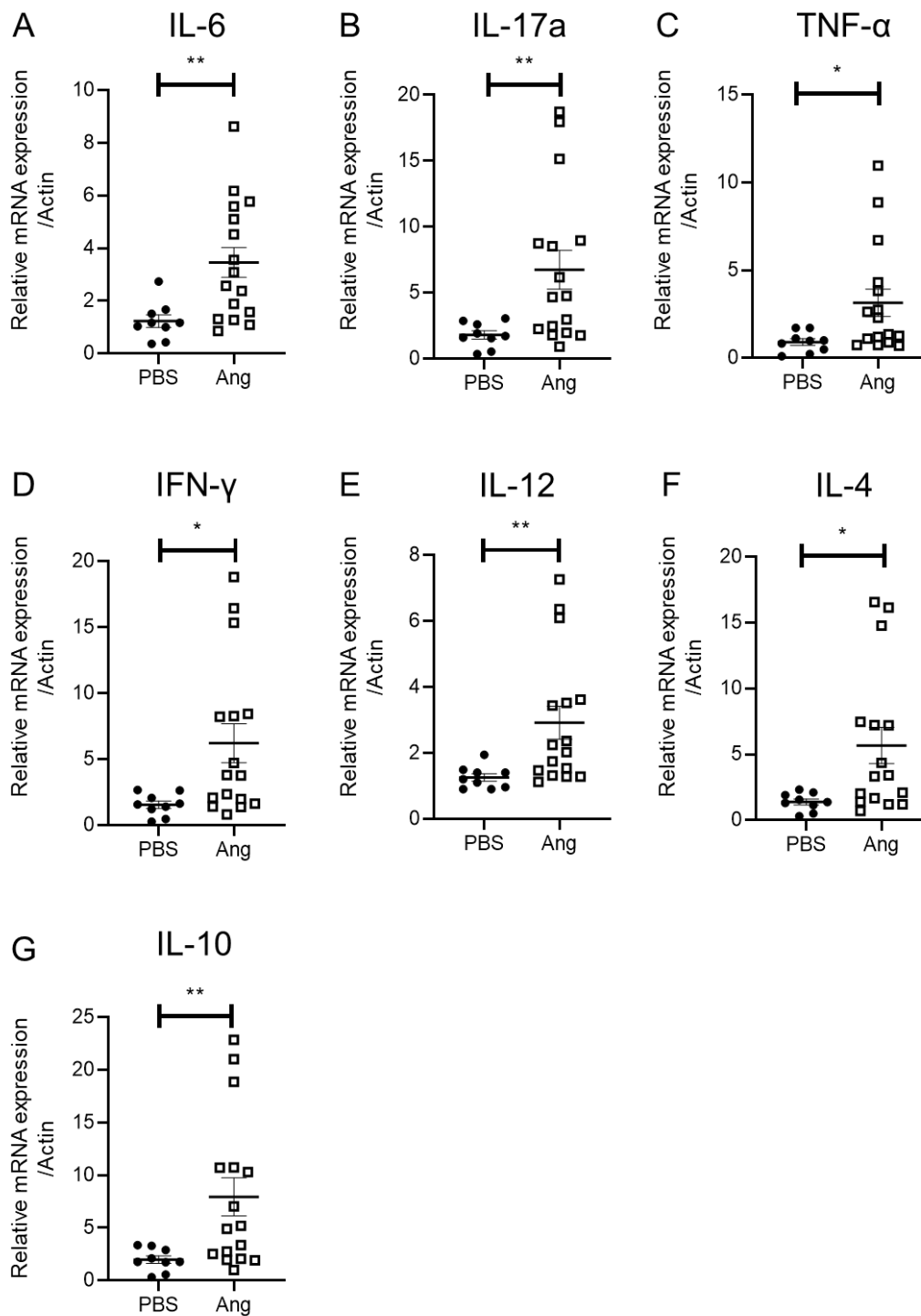


図 14. Ang II 持続投与マウスの胎仔脳におけるサイトカインの分泌の上昇

(A-G) 胎仔脳において様々なサイトカインの Messenger RNA (mRNA) を RT-qPCR を行い定量分析した。(A: IL-6, B: IL-17a, C: TNF- α , D: INF- γ , E: IL-12,

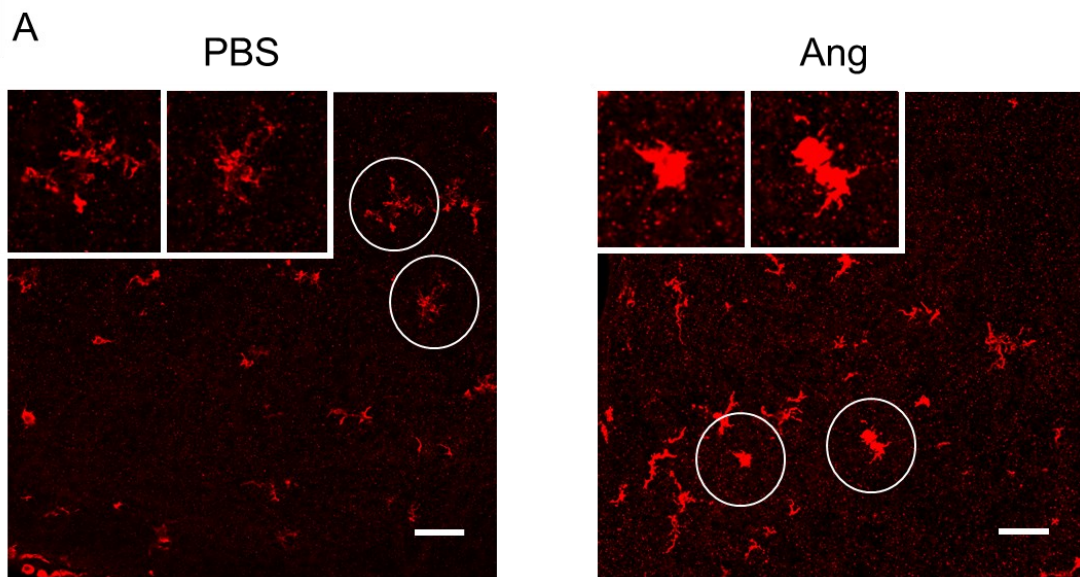
F: IL-4, G: IL-10)各種サイトカインについて、Ang II 持続投与群の胎仔脳 (N = 9)での発現は PBS 持続投与群の胎仔脳 (N = 16)での発現に比べ有意に高値であった。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). IFN- γ : interferon-gamma, TNF- α : tumor necrosis factor-alpha.

3. Ang II 持続投与マウスの胎仔脳における Microglia の活性化の亢進

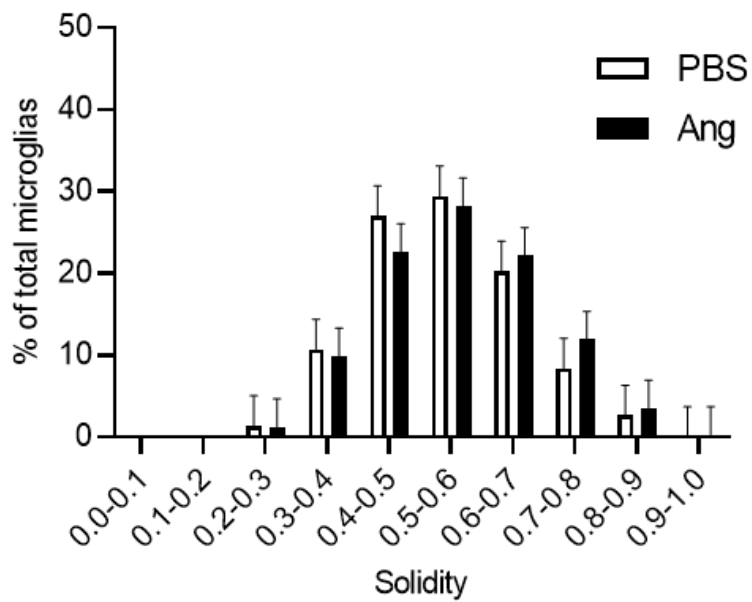
Microglia は、胎児期では脳内の免疫応答において中心的な役割を担う免疫細胞で、その過剰な活性化は、炎症を契機とした胎児の脳障害やその後の神経発達症の発生においても重要な機序であることが知られている⁴⁷。

一般に Microglia は非活性化状態では細胞体が小さく多数の分枝した突起を持つ Ramified な形態を示すが、活性化した Microglia は細胞体が腫大して円形になり突起が目立たない Ameboid な形態に変化する⁴⁸。そこで、IHC により Microglia の形態を定量的に評価することで、Ang II 持続投与群の胎仔脳と PBS 投与群の胎仔脳の Microglia について活性化の違いを評価した。E 17.5 の胎仔の脳実質を Dorsal, Lateral, Ventral area の 3 ヶ所に分けて 200 倍で Iba1 陽性 Microglia 細胞を解析した。Ang II 投与群の胎仔脳では 1934 個、PBS 投与マウスの胎仔脳では 1573 個の Microglia を解析した。代表的な Microglia の形態について、(図 15.A)に示す。Ang II 持続投与群の胎仔脳における Microglia の方が、PBS 投与群の Microglia に比べて円形を示しており、Ameboid 型をしていた。

Solidity と Circularity は共に細胞の円形度を示す尺度であるが、Microglia の活性度が高いほど、Solidity と Circularity の程度は増す⁴⁹。Ang II 持続投与群の胎仔脳は PBS 持続投与群の胎仔脳と比較して Microglia の Solidity と Circularity はいずれも上昇し、円形度が高かった (Solidity; PBS vs Ang II: 0.54 ± 0.0029 vs 0.56 ± 0.0032 , $P < 0.01$, Circularity; PBS vs Ang II: 0.25 ± 0.0038 vs 0.28 ± 0.0035 , $P < 0.01$)。さらに横軸にそれぞれ Solidity と Circularity、縦軸に各群の細胞数の割合を示した結果を図 15B, C に示す。Ang II 持続投与群の胎仔脳では、PBS 持続投与群の胎仔脳に比して Solidity と Circularity が高い状態の細胞がより多く存在していることが明らかとなった。以上より Ang II 投与持続マウスの胎仔脳では PBS 投与マウスの胎仔脳と比較して Microglia はより Ameboid 型の形態に変化しており、Microglia の活性化が亢進していることが示された。



B



C

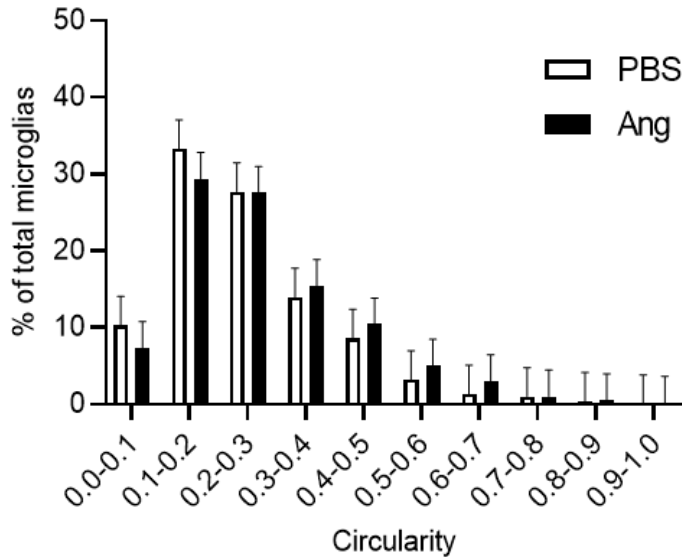


図 15. IHC による胎仔脳における Microglia の活性化状態の検討。

(A) Iba-1 を免疫染色することで、Microglia を形態学的に評価した。

それぞれの画像は胎仔脳において Ventral Area の Iba-1 陽性 Microglia が赤色蛍光染色され示されている。Ang II 持続投与群において胎仔脳の Microglia は PBS 持続投与群 における胎仔脳の Microglia に比べ、顕著に円形を表している。これは Microglia が活性化し Ameboid 型に変化していることを示している。上部左に示されている染色された Microglia は、円で囲まれた Microglia を拡大して表したものである。Scale Bars = 50 μ m.

(B および C) Solidity と Circularity の量的検討を行った。これはそれぞれ Microglia の Amoeboid 型への変化を示す値であり横軸は Solidity と Circularity、縦軸は各群の細胞数を全体の細胞数で割った比について Histograms で表されている (B.C)。Ang II 持続投与群の胎仔脳 N = 3、PBS 持続投与群の胎仔脳 N = 3 である。Solidity と Circularity の計算はそれぞれ $4\pi[\text{area}]/[\text{perimeter}]^2$ and $[\text{area}]/[\text{convex area}]$ で行った。

4. 各種行動実験における Ang II 持続投与マウスの出生仔の表現型の解析

Ang II 持続投与マウスの仔と PBS 持続投与マウスの仔に行った各種行動実験の結果を示す。主に発達を調べる行動実験として、背地走性テスト、正向反射テスト、断崖回避テストは P8、P10、P12 に施行した。体重は P8、P10、P12 に計測した。アイオープニングテストは P14. から P18. まで行った。ハンギングワイヤテストは P22. と P26. に施行した。主に感情などの脳機能を調べる行動実験としてオープンフィールドテストは出生後 8-9 週齢のマウスに対して施行した。高架式十字迷路テストは出生後 9-10 週齢のマウスに対して施行した。ソーシャルインタラクションテストは出生後 5-6 週齢と 10-11 週齢のマウスに対して施行した。ノベルオブジェクト探索テストは出生後 11-12 週齢に対して施行した。ホットプレートテストは出生後 12-13 週齢のマウスに対して行った。

4-1. 背地走性テスト

背地走性テストで運動機能や重力を手掛かりにした先天的な前庭機能などの発達などを調べた。実験の結果、Ang II 持続投与群のほうが PBS 持続投与群に比べ有意差は認めなかった。(図 16)。

背地走性テスト

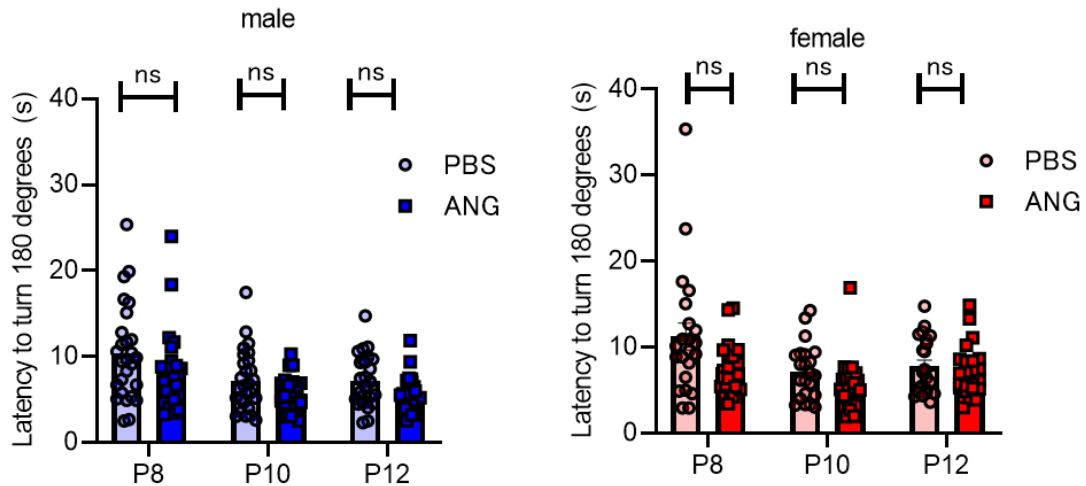


図 16. 背地走性テストによる発達の評価

棒グラフおよび点に使われている濃い青は Ang II 持続投与マウスから出生したオスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したオスの仔、棒グラフおよび点に使われている濃い赤は Ang II 持続投与マウスから出生したメスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したメスの仔を表している。縦軸はマウスが 180° 回転するまでの秒数、横軸は出生後日齢を表している。両群において有意差はなかった。

4-2. 正向反射テスト

正向反射テストで仰臥位において肢ではねる力、反射能力、協調運動や前庭機能などの発達を調べた。Ang II 持続投与群から生まれた仔は、PBS 持続投与群から生まれた仔に比べ、正向反射試験では、メスの P10 において有意に背臥位から腹臥位になるまでの時間が短かった (図 17)。

正向反射テスト

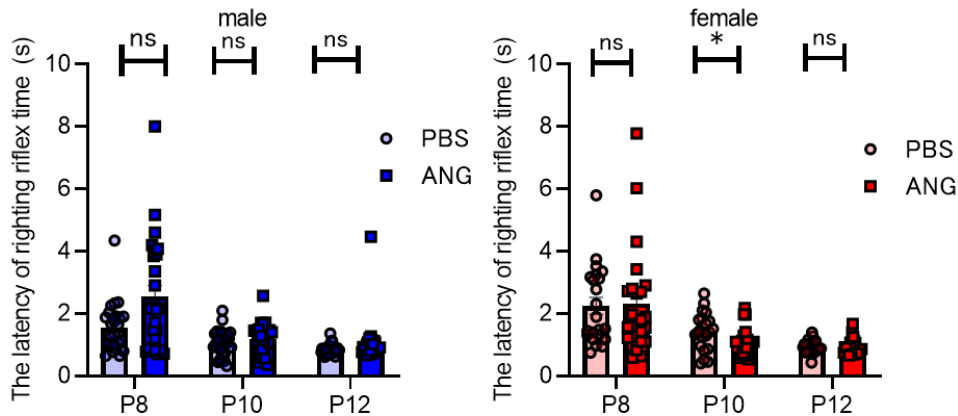


図 17. 正向反射テストによる発達の評価

棒グラフおよび点に使われている濃い青は Ang II 持続投与マウスから出生したオスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したオスの仔、棒グラフおよび点に使われている濃い赤は Ang II 持続投与マウスから出生したメスの仔、薄い赤は PBS 持続投与マウスから出生したメスの仔を表している。縦軸はマウスが背臥位から腹臥位になるまでの秒数、横軸は出生後日齢を表している。Ang II 持続投与群から生まれた仔は、PBS 持続投与群から生まれた仔に比べ、正向反射試験では、メスの P10 において有意に背臥位から腹臥位になるまでの期間が短かった。(* $P < 0.05$)

4-3. 断崖回避テスト

断崖回避テストで平衡感覚や、協調運動などの発達を調べた。断崖回避テスト

では Ang II 持続投与群から生まれた仔は、PBS 持続投与群から生まれた仔に比

べ、有意な差はなかった (図 18)。PE 母獣から出生した仔では平衡感覚の低下や、協調運動の低下を示さなかった。

断崖回避テスト

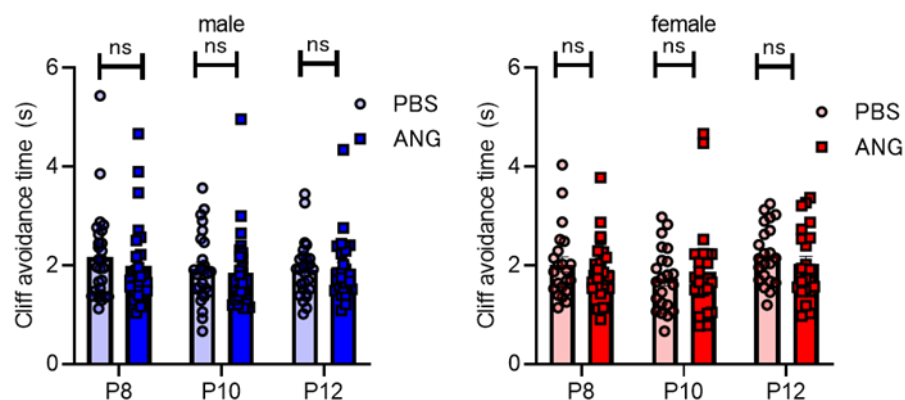


図 18. 断崖回避テストによる発達の評価

棒グラフおよび点に使われている濃い青は Ang II 持続投与マウスから出生したオスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したオスの仔、棒グラフおよび点に使われている濃い赤は Ang II 持続投与マウスから出生したメスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したメスの仔を表している。縦軸はマウスが崖から逃避するまでの秒数、横軸は出生後日齢を表している Ang II 持続投与群から生まれた仔は、PBS 持続投与群から生まれた仔に比べ、有意な差はなかった。

4-4. アイオープニングテスト

発達を調べるため両眼の開眼の有無をスコア化して P14 から P18 まで連日行った。Ang II を持続投与したマウスと PBS を持続投与したマウスから生まれた仔を雄雌で比較したが、有意差はなかった (図 19)。

アイオープニングテスト

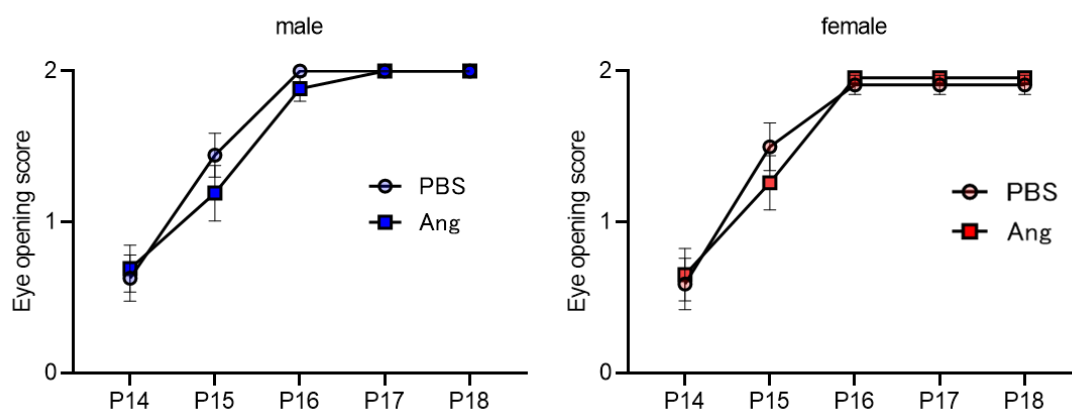


図 19. アイオープニングテストによる発達の評価

点に使われている濃い青は Ang II 持続投与マウスから出生したオスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したオスの仔、点に使われている濃い赤は Ang II 持続投与マウスから出生したメスの仔、薄い赤は PBS 持続投与マウスから出生したメスの仔を表している。縦軸はマウスの眼の開閉をスコア化した値、横軸は出生後日齢を表している Ang II 持続投与群から生まれた仔は、PBS 持続投与群から生まれた仔に比べ、オス、メスともに有意な差はなかった。

4-5. ハンギングワイヤテスト

ハンギングワイヤテストによって握力、平衡感覚、運動能力などの発達を調べた。

Ang II 持続投与マウスから出生した仔は PBS 持続投与マウスと比べて、オスは P22 においてメスは P26 において有意に落下までの時間が長かった。(図 20)。

ハンギングワイヤテストでは Ang II 持続投与マウスから出生した仔は PBS 持続投与マウスと比べてオスでは P22 において、メスでは P26 において筋力発達の亢進が示唆された。

ハンギングワイヤテスト

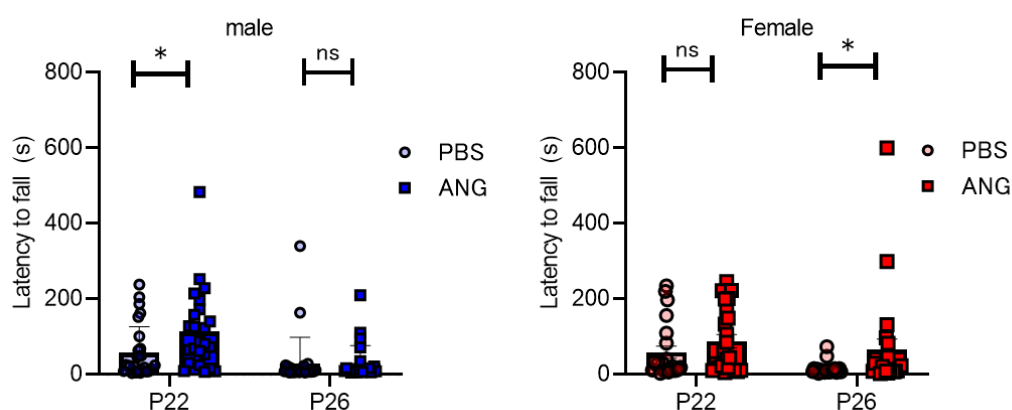


図 20. ハンギングワイヤテストによる発達の評価

棒グラフおよび点に使われている濃い青は Ang II 持続投与マウスから出生したオスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したオスの仔、棒グラフおよび点に使われている濃い赤は Ang II 持続投与マウスから出生したメスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したメスの仔を表している。縦軸はマウス

が台につかまっている秒数、横軸は出生後日齢を表している。Ang II 持続投与群から生まれた仔は、PBS 持続投与群から生まれた仔に比べ、ハンギングワイヤテストではオスは P22 で、メスは P26 において有意に落下までの時間が長かった。(* $P < 0.05$)

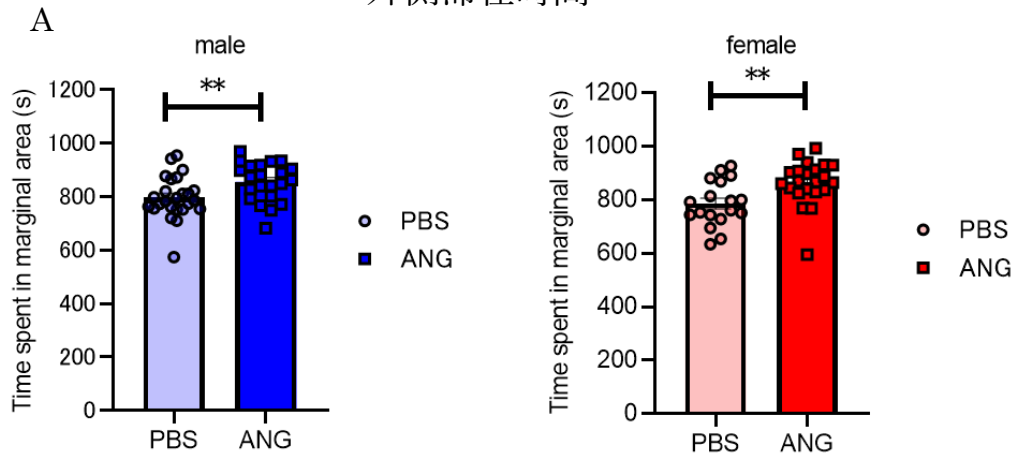
4-6. オープンフィールドテスト

オープンフィールドテストで新規の環境下での行動、活動性、不安関連を調べた。Ang II 持続投与マウスから出生した仔において、オス、メスともに外側滞在時間が長く、メスのほうがより、その傾向が強かった。これは恐怖心が強いことを示唆している。一方、メスでは移動距離が Ang II 持続投与群の仔で有意に低かった (図 21)。このことは、メスが区画の一部に滞在して移動せず、時間が経過することで外側滞在時間に影響を及ぼしている可能性もある。

本実験の結果は、PE 母獣から出生した新生仔が、新規の環境下で行動、活動性の低下、不安を呈しやすいこと示唆している。

オープンフィールドテスト

外側滞在時間



総行動距離

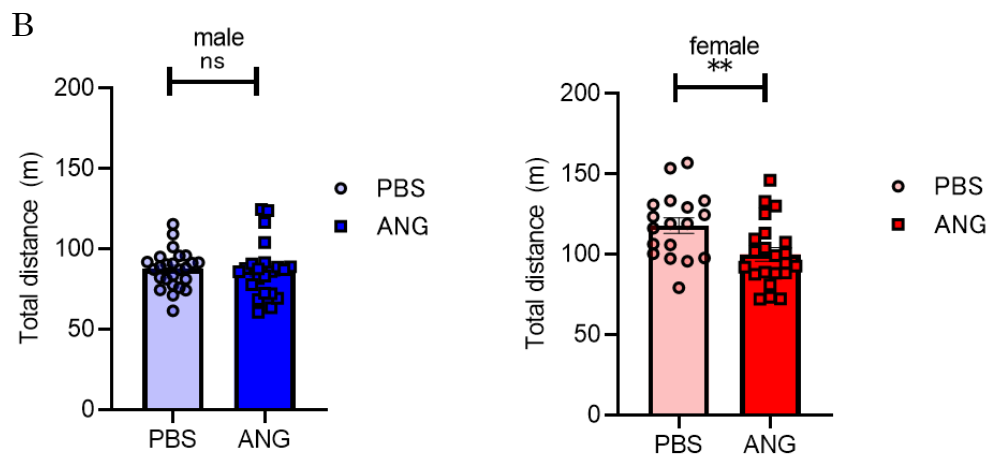


図 21. オープンフィールドテストによる脳機能の評価

棒グラフおよび点に使われている濃い青は Ang II 持続投与マウスから出生したオスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したオスの仔、棒グラフおよ

び点に使われている濃い赤は Ang II 持続投与マウスから出生したメスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したメスの仔を表している。縦軸はそれぞれ外側滞在時間と移動距離を表している。オープンフィールドテストでの滞在時間においては Ang II 持続投与群から生まれた仔は、PBS 持続投与群から生まれた仔に比べ、オス、メス共に有意に外側滞在時間が長かった (A)。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

移動距離においては Ang II 持続投与群から生まれた仔は、PBS 持続投与群から生まれた仔に比べ、オスでは有意な差はなかったが、オープンフィールドテストにおいてメスでは Ang II 持続投与群の仔のほうが有意に移動距離の減少を認めた(B)。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

4-7. 高架式十字迷路テスト

高架式十字迷路テストは恐怖心や不安の強さを計測する試験である⁴⁰。Ang II 持続投与群の出生仔は、PBS 持続投与群の出生仔に比べオスは有意に壁のある床の滞在時間が短く、メスは有意差を認めなかった (* $P < 0.05$) (図 22)。

本実験の結果は、PE モデルマウスから出生した新生仔の特にオスにおいて、恐怖心や不安が強いことを示唆している。

高架式十字迷路テスト

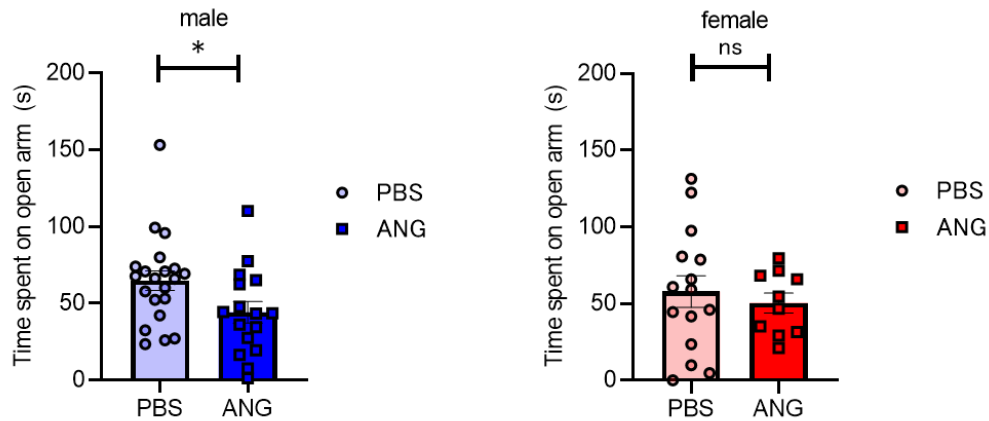


図 22. 高架式十字迷路テストによる脳機能の評価

棒グラフおよび点に使われている濃い青は Ang II 持続投与マウスから出生したオスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したオスの仔、棒グラフおよび点に使われている濃い赤は Ang II 持続投与マウスから出生したメスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したメスの仔を表している。縦軸は壁のない床の上の滞在時間を表している。高架式十字迷路テストにおいて Ang II 持続投与群から生まれた仔は、PBS 持続投与群から生まれた仔に比べ、オスにおいて有意に壁のない床の上の滞在時間が短かった。メスにおいては有意差を認めなかった。(* $P < 0.05$)

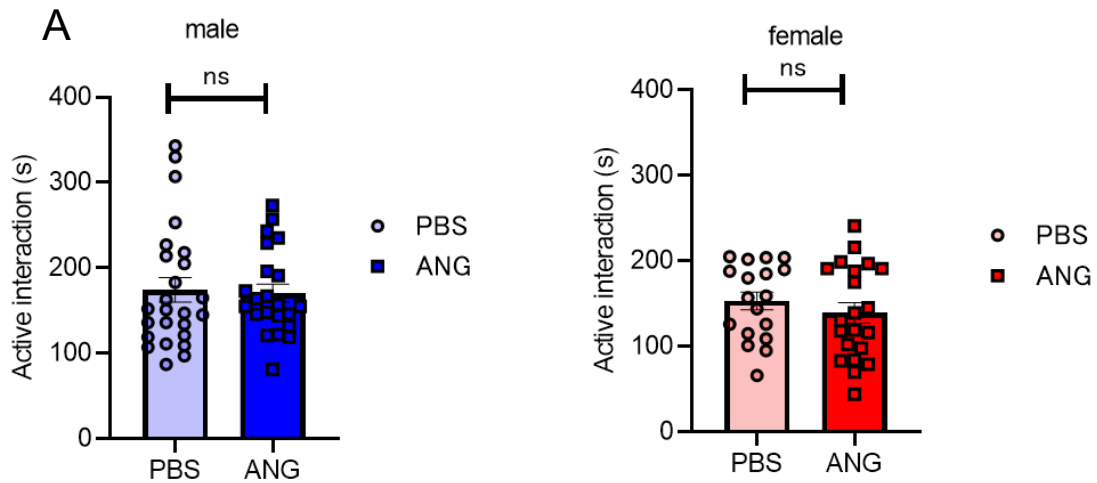
4-8. ソーシャルインタラクションテスト

ソーシャルインタラクションテストは他個体に対する、関心度、社会性を調べるテストである。5-6 週齢において Ang II 持続投与マウスと PBS 持続投与マウスからの出生仔において有意差は認められなかった (図 23A)。10-11 週齢にお

いては Ang II 持続投与マウスからの出生仔は、PBS 持続投与マウスからの出生仔に比べ、ソーシャルインタラクションテストにおいてオス、メスともに Active Social Interaction Time が有意に低下していた (図 23B)。Ang II 持続投与マウスから出生した仔では、関心度および社会性が低下している可能性が示唆された。

ソーシャルインタラクションテスト

5-6 週齢時のソーシャルインタラクションテスト



10-11 週齢時のソーシャルインタラクションテスト

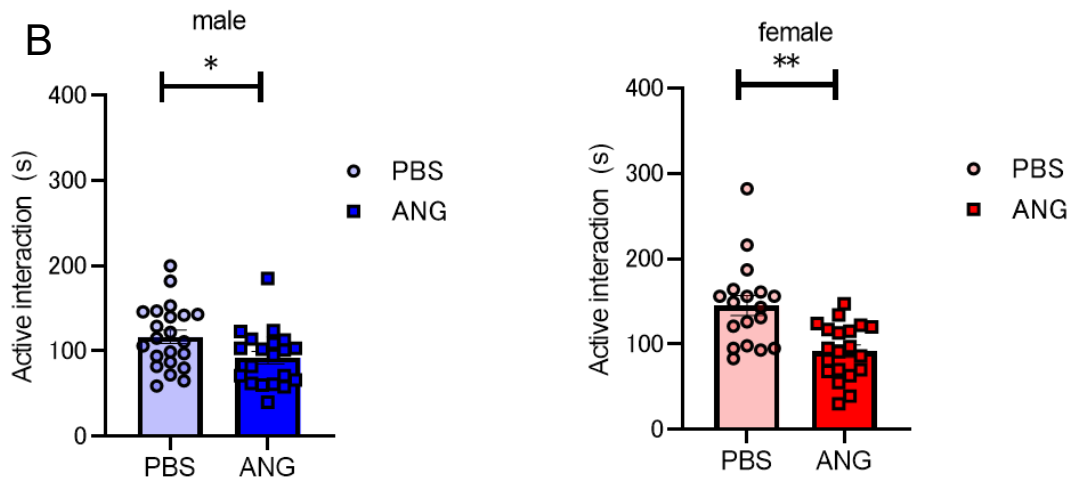


図 23. ソーシャルインタラクションテストによる社会性の評価

棒グラフおよび点に使われている濃い青は Ang II 持続投与マウスから出生したオスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したオスの仔、棒グラフおよび点に使われている濃い赤は Ang II 持続投与マウスから出生したメスの仔、薄

い青は PBS 持続投与マウスから出生したメスの仔を表している。縦軸は Active Interaction の時間を表している。

上図は 5-6 週齢におけるマウスの実験結果を表している。5-6 週齢において Ang II 持続投与マウスからの出生仔は、PBS 持続投与マウスからの出生仔に比べ、ソーシャルインタラクションテストにおいてオス、メスともに Active Social Interaction Time の有意差はなかった (A)。下図は 10-11 週齢におけるマウスの実験結果を示している。10-11 週齢において Ang II 持続投与マウスからの出生仔は、PBS 持続投与マウスからの出生仔に比べ、ソーシャルインタラクションテストにおいてオス、メスともに Active Social Interaction Time が有意長かった (B)。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

4-9. ノベルオブジェクト探索テスト

ノベルオブジェクト探索試験は記憶力を計測するテストである⁴¹。Ang II 持続投与マウスからの出生仔と、PBS 持続投与マウスからの出生仔で、有意差はなかった (図 24)。本実験の結果は、新生仔の記憶力には影響を与えないことを示唆している。

ノベルオブジェクト探索テスト

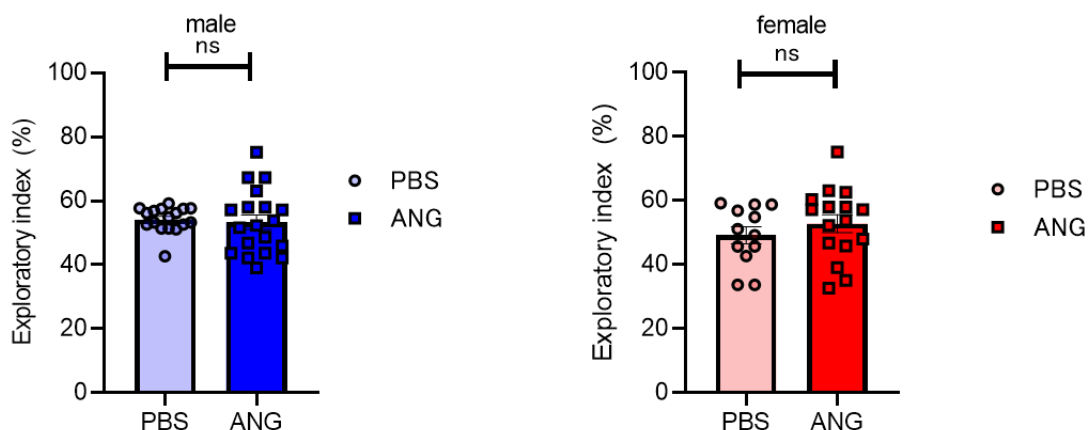


図 24. ノベルオブジェクト探索テストによる記憶力の評価

棒グラフおよび点に使われている濃い青は Ang II 持続投与マウスから出生したオスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したオスの仔、棒グラフおよび点に使われている濃い赤は Ang II 持続投与マウスから出生したメスの仔、薄い赤は PBS 持続投与マウスから出生したメスの仔を表している。縦軸は Exploratory Index (%) = 3 日目の新奇物体付近の滞在時間 / 新旧両方の物質付近の滞在時間、を表している。ノベルオブジェクト探索テストでは Ang II 持続投与マウスからの出生仔と PBS 持続投与マウスからの出生仔との間で Exploratory Index (%) に有意差はなかった。

4-10. ホットプレートテスト

ホットプレートテストは熱した鉄板の上にマウスを静置し、足をなめる、立ち上がる、飛び跳ねるまでの時間を測定することで、疼痛への反応時間を調べるテストである⁴²。Ang II 持続投与マウスからの出生仔と、PBS 持続投与マウスか

らの出生仔で、有意差はなかった (図 25)。PE 母獣から出生した新生仔で、疼
痛への反応時間が遅くなるということは認められなかった。

ホットプレートテスト

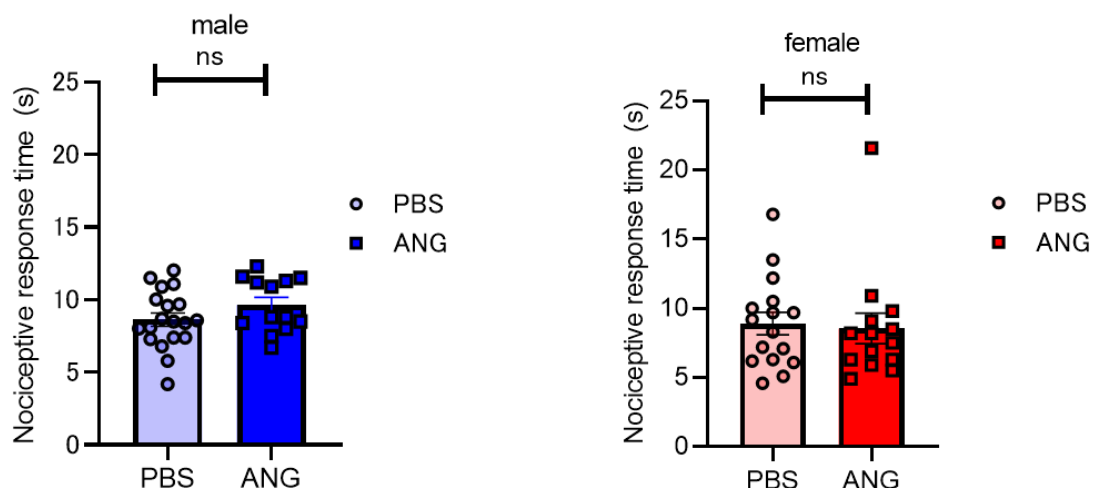


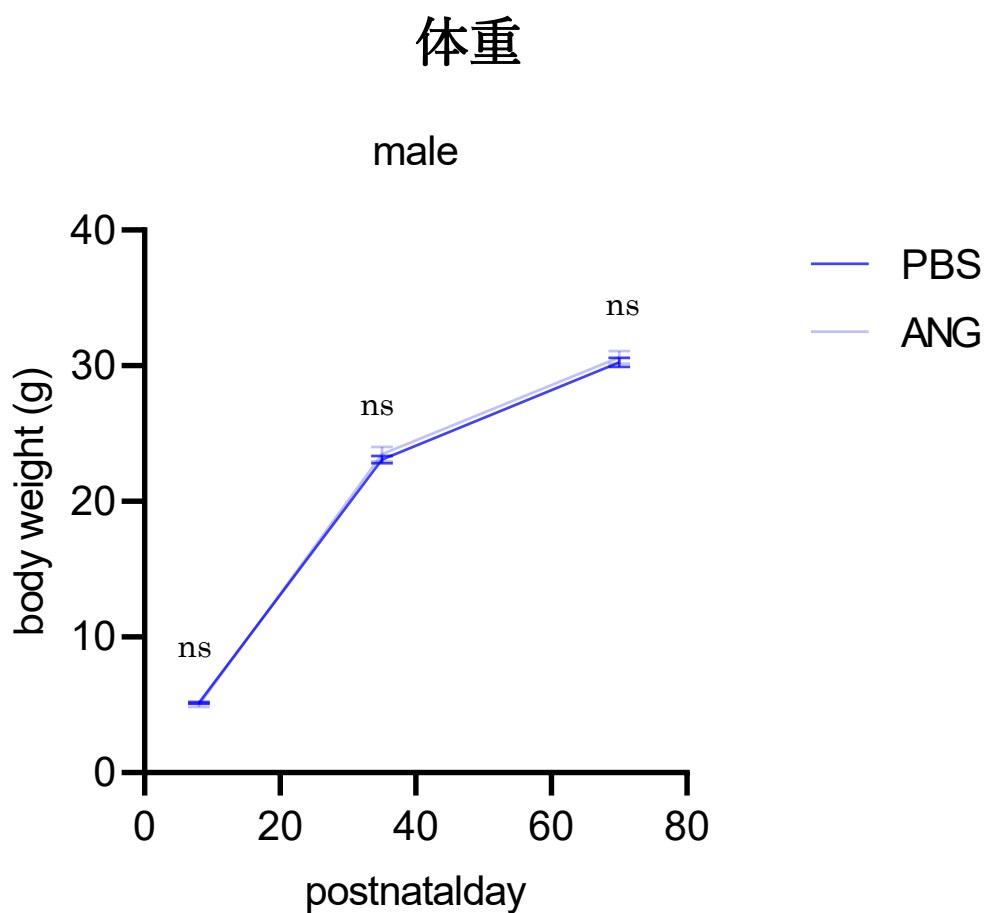
図 25. ホットプレートによる痛み刺激の評価

棒グラフおよび点に使われている濃い青は Ang II 持続投与マウスから出生したオスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したオスの仔、棒グラフおよび点に使われている濃い赤は Ang II 持続投与マウスから出生したメスの仔、薄い青は PBS 持続投与マウスから出生したメスの仔を表している。縦軸は熱した床からの逃避行動までの時間を示している。ホットプレートによる痛み刺激テストでは Ang II 持続投与マウスからの出生仔と PBS 持続投与マウスからの出生仔との間で熱した床からの逃避行動までの時間に有意差はなかった。

体重

発育を確認するために Ang II 持続投与マウスからの出生仔と PBS 持続投与マウスからの出生仔の出生後の体重を比べた。P8、P35、P70 に重量計測を行った。

Ang II 持続投与群から生まれた仔は胎仔期には PBS 持続投与群の仔と比べて胎仔期には低体重を示していたが、出生後には体重は catch-up して有意差はなくなった (図 26)。



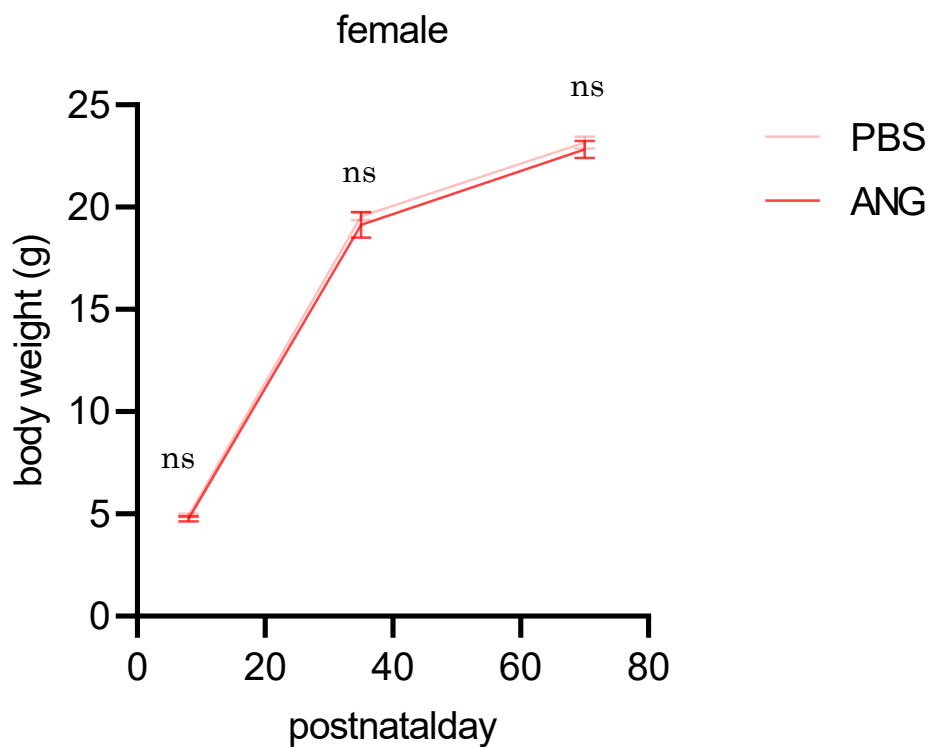


図 26. 体重による発育の評価

濃い青が使われている点は Ang II 持続投与マウスから出生したオスの仔、薄い青が使われている点は PBS 持続投与マウスから出生したオスの仔、濃い赤が使われている点は Ang II 持続投与マウスから出生したメスの仔、薄い赤が使われている点は PBS 持続投与マウスから出生したメスの仔を表している。

縦軸はマウスの重量 (g)、横軸は出生後日齢を表している

Ang II 持続投与群から生まれた仔は、PBS 持続投与群から生まれた仔に比べ、オス、メスともに有意な差はなかった。

4-11.行動実験の結果のまとめ

表 2.に行動実験の結果をまとめた。正向反射試験ではメスで P10 に有意差があった。ハンギングワイヤテストではオスで P22 に、メスで P26 に有意差があった。オープンフィールドテストにおいて外側滞在時間ではオス、メス共に有意差を認め、総行動距離ではメスに有意差を認めた。ソーシャルインタラクシオンテストではオス、メスともに 10-11 週齢で有意差を認めた。高架式十字迷路テストではオスで有意差を認めた。

表 2. 行動実験の結果

実験時期	NG			RR			CA			BW			EOT		HW	
	P8	P10	P12	P8	P10	P12	P8	P10	P12	P8	P35	P70	P14-P18	P22	P26	
オス	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	
メス	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	

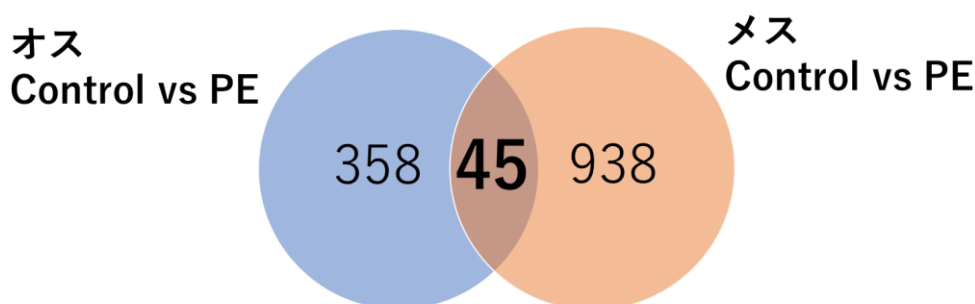
実験時期	OF①(外側滞在時間)		OF②(総行動距離)		SI		EPM	NOR	HP
	8-9w				5-6w	10-11w	9-10w	11-12w	12-13w
オス	**		ns		ns	*	*	ns	ns
メス	**		**		ns	**	ns	ns	ns

表 2.は行動実験の結果をまとめた表である。各略語は NG (背地走性テスト)、RR (正向反射テスト)、CA (断崖回避テスト)、BW (体重)、EOT (アイオープニングテスト)、HW (ハンギングワイヤテスト)、OF (オープンフィールドテスト)、SI (ソーシャルインタラクシオンテスト)、EPM (高架式十字迷路テスト)、NOR (ノベルオブジェクト探索テスト)、HP (ホットプレートテスト)、P (出生後日齢)、w (週齢) を示している。(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

5. マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

Ang II 持続投与マウスにおいて胎仔期の脳で免疫を担当する Microglia の変化を確認し、行動解析の結果、社会性行動障害や不安様行動を認めた。このような行動が免疫系の異常で起きているのか、他の因子が原因なのか、さらなる原因究明のため、12-14 週齢の Ang II 持続投与マウスにおける仔マウスの全脳を用いてマイクロアレイで遺伝子の網羅的解析を施行した。検体は Ang II 持続投与マウスと PBS 持続投与マウスでオスメス 5 例ずつ、各 3 家系を使用した。Fold Change は 1.2 以上、False Discovery Rate は補正なし、検定は T テストを行いカットオフは 0.05 とした。遺伝子発現の変化はオスで 403 個、メスで 983 個、変化した共通の遺伝子は 45 個であった。共通する 45 遺伝子のうち、同方向に変化するもので Pathway Enrichment 解析を行った (図 27)。

成熟脳（12-14週齢）マイクロアレイ →雌雄共通に45遺伝子の発現変化



雌雄共通の45遺伝子→Pathway Enrichment解析へ

図 27.雌雄共通の 45 遺伝子の検出

12-14 週齢の Ang II 持続投与群における出生仔と PBS 持続投与群における出生仔のオスで遺伝子発現量に有意差があったものは 403 遺伝子であった。また、12-14 週齢の Ang II 持続投与群における出生仔と PBS 持続投与群における出生仔のメスで有意差があったものは 983 遺伝子であった。

403 遺伝子と 983 遺伝子をさらに比較すると、共通する遺伝子として 45 遺伝子が抽出された。この 45 遺伝子を対象に、Pathway Enrichment 解析を行った。

5-1. Pathway Enrichment 解析の結果

雌雄において共通に変動のあった遺伝子について、Pathway Enrichment 解析を行い Up-Regulated、Down-Regulated されている Top5 について表を作製した。（表 3）。表 3 には用いたデータベース、共通した遺伝子、P 値が表されており、P 値の順に並んでいる。Data Base は Protein Families, InterPro, PMAP

を用いた。Pathway Enrichment 解析において Up-Regulated Genes 上位に Immunoglobulin を認めた。Common Gene としては immunoglobulin kappa chain complex, CD300 molecule like family member D4, immunoglobulin superfamily, member 10, coxsackie virus and adenovirus receptor, kirre like nephrin family adhesion molecule 1, WAP four-disulfide core domain 3, thioredoxin 2 であった。Pathway Enrichment 解析において Down-Regulated Genes 上位に Concanavalin A-like lectin/glucanase domain superfamily を認めた。Common Gene としては thrombospondin 4, neuronal pentraxin 2, mucin 16, scavenger receptor class A, member 5 であった。

表 3. Pathway Enrichment の結果

Top5 pathways in up -regulated genes			
Biogroup name	Data base	Common genes	p-value
Immunoglobulin V-set domain	InterPro	3	0.0018
Immunoglobulin subtype	InterPro	3	0.0055
I17 - mucus peptidase inhibitor inhibitor unit 2	Peptidase Inhibitors	1	0.0059
Thioredoxin, conserved site	InterPro	1	0.0063
Immunoglobulin I-set	InterPro	2	0.0103
Top5 pathways in down -regulated genes			
Biogroup name	Data base	Common genes	p-value
Concanavalin A-like lectin/glucanase domain superfamily	InterPro	2	0.0002
Pentraxin-related	InterPro	1	0.0013
SRCR domain	InterPro	1	0.0022
SRCR-like domain	InterPro	1	0.0022
SRCR-like domain superfamily	InterPro	1	0.0022

Up-Regulated Genes 上位に Immunoglobulin を認めた。Down-Regulated Genes 上位に Concanavalin A-like lectin/glucanase domain superfamily を認めた。

考察

本研究では、Ang II の持続投与による PE モデルマウスの胎仔脳で、サイトカインの上昇、および脳内で免疫を担当している Microglia の活性化により示される炎症状態の亢進が認められた。出生仔の発達や感情などの脳機能を調べる多数の行動解析の結果を総合的に判断すると、Ang II の持続投与による PE モデルマウスからの出生仔に ASD 様行動に特徴的な社会性行動障害および不安様行動を示唆する行動所見が見られた。出生仔の脳内での遺伝子発現についてマイクロアレイを用いて解析を行った。Pathway Enrichment 解析では、Up Regulated Gene において、上位に Immunoglobulin に関する Pathway が検出された。これらの結果は、母体において PE の罹患は児の中樞神経に胎児期から直接的な影響を与え、出生後の神経発達症の契機となりうる、という知見であった。

胎児期の炎症の亢進は、脳性まひや、ASD 等の神経発達症と関連があるといわれている¹。胎児の全身性の炎症亢進は胎児炎症反応症候群（Fetal Inflammatory Response Syndrome : FIRS）と呼ばれており、子宮内の細菌等の感染により引き起こされ、胎児脳では TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインの上昇を認める⁴⁶。これらの炎症性サイトカインの過度の産生は、胎児脳の白質に障害をもたらし、脳室周囲白質軟化症等の病変を生じることにより、結果

的に脳性麻痺となることがある^{50,51}。さらに妊娠中のウイルス感染等によって引き起こされる MIA は、胎児脳の炎症の亢進と免疫変容を引き起こし、将来的に ASD など神経発達症の発達障害を引き起こす⁵²。特に MIA による児の神経発達症の病因には、活性化型 Microglia により産生される、IL-6 および IL-17a が中心的な役割を果たしている^{48,53}。

PE においても、IL-6、IL-17a、TNF- α のような炎症性サイトカインの増加が生じている。このことは PE が MIA 同様に、全身性に免疫が活性化した状態となっていることを示唆していることは上述した。しかしながら、PE 患者の胎児脳の炎症状態や免疫システムの変化を動物モデルによって示した研究は限られている¹⁶。近年の研究では、PE モデルの 1 つである RUPP モデルを用いて胎盤虚血にさらされた胎仔の脳ではサイトカインの上昇が起こっていることが明らかとなっている³¹。特定のサイトカインの上昇ではなく興味深いことに IL-6 や IL-1 β 、IL-4、IL-10 など、さまざまなサイトカインが上昇している傾向を示している。我々が用いた RAS 亢進による PE モデルマウスも同様に、PE モデルマウスの胎仔脳での様々なサイトカインの発現亢進、という共通した表現型を示していた。PE の主な病態機序として、胎盤虚血を契機とした機序、さら

には RAS の全身性の亢進による機序があるが、これら異なる病態機序に共通した事象として胎児脳内の炎症亢進の存在が示されたことになる。

本研究に用いた PE マウスモデルでの胎仔脳での炎症亢進の機序について考察する。まず推察されるのは母獣のサイトカインが胎盤を經由し胎仔脳に到達し、胎仔脳に炎症状態を惹起する可能性である^{26,45}。MIA による児の脳への影響を検討した複数の報告では、母体血中で亢進した炎症性サイトカインが、胎盤を經由し胎児の Blood-Brain Barriers を通り胎児の脳発達に影響を与えることがマウスモデルで示されている^{4,54}。胎児期の脳では免疫担当細胞の Microglia が重要な働きをし、神経のシナプス形成や脳の構造形成を行っている⁵³。この Microglia は IL17a で活性化されるが、MIA の様に母体免疫が活性化した状態にさらされた児は、ASD のリスクが上昇する可能性がある。PE 患者においては MIA と似たサイトカイン分泌亢進状態になっており、胎児の脳に Microglia の活性化を引き起こし、ASD 様の行動を惹起している可能性は推察される⁵⁴。また、組織損傷により放出される Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) などの炎症の進展に寄与する因子が母から胎仔に移行し、胎仔脳に炎症を起こしている可能性もあるが、詳細な機序については今後の検討課題であると考えている。また、Ang II が母から胎仔に移行し直接的に影響を与えている

可能性は挙げられるが、Ang II は胎盤で分解され胎盤を通過しないことが示されており、Ang II が直接胎児の脳に影響を与えていることは考えにくい⁵⁵。一方、PE の病態において AT₁-AA により AT₁R が活性化することは RAS 系亢進による PE 発症の主な病態機序であるが、IgG 抗体である AT₁-AA は胎盤を通過し、胎児に直接的に肝障害を引き起こすという報告がある⁵⁶。このことから AT₁-AA が胎盤を通過しさらには Blood-Brain Barrier を通過し胎児脳に直接影響する可能性があるが、これについても AT₁-AA を用いたマウスモデルを施行することで、さらなる検討が必要であろうと考えている。

本研究では、Ang II 持続投与マウスの胎児脳において、サイトカインの亢進があるだけでなく、Microglia が活性化していることを IHC によって示した。Microglia は中枢神経の免疫細胞で中枢神経の発達にも関与しており、さらに神経細胞のミエリン化、神経発生、シナプス形成など胎児脳の恒常性維持に関与している細胞である。Microglia は出生後も、神経細胞の移動や他の細胞との相互作用を担っている⁵⁷⁻⁵⁹。シナプスのネットワーク形成やミエリン化の制御は胎児期や、出生後に正常な中枢神経を築くために非常に重要である。活性化した Microglia は炎症性および非炎症性サイトカインの両方を産生しており、両者の産生のバランスを保つことが、脳を正常に発達させるために重要である⁶⁰。MIA

によって仔が ASD を引き起こす病因としては、胎盤を通過した IL-6 や IL-17a が胎仔脳に移行し炎症を惹起するトリガーとなっていることが示されている⁵⁴。そして MIA の病態機序において胎仔脳内では Microglia は高い Solidity と Circularity、および高い貪食能を示す⁴⁸。我々は IHC により Microglia の定量的分析を行った。活性化を示唆する Ameboid 型の Microglia は Ang II 持続投与マウスの胎仔脳において前頭葉先端から小脳後端までと幅広い範囲で確認された。Microglia の Ameboid 型が広範囲に認められたことは、Microglia が PE 患者の胎児脳内で活性化しており、胎児期および出生後の脳において ASD 様の病態形成、すなわち神経発達の障害につながる機序に関連する知見であるかもしれない。

我々は Ang II 持続投与マウスから出生した仔を用いて、10 の行動実験を行った。ヒトで PE 患者から生まれた児の疫学的知見として、ASD、注意欠陥多動性症、てんかん、知的障がい、のリスク上昇が知られていることは上述した^{28,30}。また、これらの神経発達症は、早産による未熟性とは関係なく、正常産で生まれた出生児においても、高頻度に認められる²⁸。運動機能・前庭機能・協調運動・反射能力の評価には、背地走性テスト、正向反射テスト、断崖回避テスト、ハンギングワイヤテストを主に評価に用いた。活動性や不安、恐怖心、社会性の評価

については、オープンフィールドテスト、ソーシャルインタラクションテスト、および高架式十字迷路テストを用いた。その他、記憶力についてはノベルオブジェクト探索テスト、疼痛への反応の評価としてホットプレートテスト、発達の評価としてアイオープニングテストを施行した⁴³。これら行動実験の結果を総合的に判断した。背地走性テスト、対抗反射テスト、断崖回避テスト、ハンギングワイヤテスト、アイオープニングテストでは、有意差のあるものもあったが、一貫した解釈の難しいものであった。まずソーシャルインタラクションテストによって、社会性行動障害が示唆された。ヒトにおいて ASD 罹患児は社会性行動障害を示す⁶¹。この傾向が 10-11 週齢になってから有意となって表れていることも興味深い点である。しかし、5-6 週齢のソーシャルインタラクションテストで社会性の低下が検出できていなかった可能性もあり、3-チャンバーテストなどほかの社会性実験も含めてさらに研究を深めていく必要がある⁶²。Pan らの報告で The Mitochondrial Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme (CYP11A1) を用いた PE モデルマウスの子では不安様行動および社会性行動障害という ASD 様の行動を認める報告がある⁶³。一方、Arginine Vasopressin (AVP) 投与によって作製された PE モデルマウスにおいては仔のオスではソーシャルインタラクションの増加が観察された⁶⁴。これは同じ PE 表現型を示すマウスで

も、作製方法により違う行動表現があらわれることを示し、病態解明の一助になるかもしれない。また、今回の行動実験で総合的に示唆された結果として、Ang II持続投与マウスから出生した仔においてオープンフィールドテストと高架式十字迷路テストで不安様行動を認めた。ヒトにおいても ASD では不安様行動があげられる⁶。Gumusoglu らが行った AVP を用いた PE モデルマウスにおける仔の行動実験でもオスのみに高架式十字迷路テストで有意に不安様行動が認められるといった同様の結果であった⁶⁴。これは PE 患者からの出生児は男児に不安障害のリスクが上がることを示しているかもしれない。またオープンフィールドテストでは Ang II 持続投与マウスの仔はメスでは総行動距離が短かった。これは自発的な活動性の低下を示唆しているが、行動距離が短いと 1 区画に滞在する時間も長くなるため、不安様行動の指標となる外側滞在時間に影響を与えているかもしれない。ASD 様マウスを用いた先行研究では総行動距離に変化は認められないが、さらなる解析が必要であろう⁶⁵。ヒト ASD 罹患児では行動がぎこちない患者がいるため、発達の実験を行った⁶⁶。運動機能・協調運動については、背地走性テスト、正向反射テスト、ハンギングワイヤテストにおいて、総合的に行動実験を行った結果、一貫した結果は得られなかった。また平衡感覚・協調運動をみる断崖回避テスト、発達を調べるアイオープニングテスト

で、PE 母獣から出生した仔における明らかな機能低下は示さなかった。他の PE モデルマウスを用いてさらなる比較検討が必要であろう⁴³。記憶力の評価では Ang II 持続投与マウスから出生した仔に有意な記憶力の低下は示唆されなかった。ヒトにおいて ASD ではエピソード記憶に欠落があるとされる研究もあるが、異なる結果であった^{67,68}。一方、ASD 様モデルマウスには Shank や Auts2 などの遺伝子を Knock Out したものなどがある。Shank2/3 を Double Knockout したものは脳梁膨大後部の機能が低下して社会記憶障害を起こす⁶⁹。本実験に用いた PE マウスとは異なる結果であった。痛み刺激テストでは Ang II 持続投与マウスから出生した仔の間隔鈍麻の傾向はなかった。ASD では胎児期にバロプロ酸に暴露されると、感覚鈍麻になるという研究もあるが、異なる結果であった^{70,71}。今回の行動実験の結果を総合的に解釈すると、Ang II 持続投与マウスから出生した仔では、ヒトの ASD に認められる、社会性行動障害、不安様行動が示唆された。ヒトでは抗てんかん薬であるバロプロ酸を妊婦が内服すると、ASD 児が出生するリスクがあがる。その児は社会性行動障害及び不安様行動を示す⁷²。我々は Ang II 持続投与マウスを用いたが、ほかの PE モデルマウスを用いて、今回確認できなかったエピソード記憶や感覚鈍麻の有無など、更なる研究と比較が重要であろう^{63,64,68}。

社会性行動障害および不安様行動が示唆された Ang II 持続投与マウスからの出生仔において遺伝子の発現変化を調べるために、12-14 週齢の脳を用いてマイクロアレイを施行し Pathway Enrichment 解析を行った。結果として、Up Regulated Gene の上位に Immunoglobulin を認めた。PE 罹患時は活性化していたミクログリアは活性化が PE の終結とともに活性化が終わり、この病態で免疫系に異常な記憶が残り、Immunoglobulin のみが検出され、サイトカインの遺伝子は検出されなかった可能性がある。また Giacomo らは ASD 児らと正常児の抹消血で ASD 児の方がレギュラトリーB細胞、レギュラトリーT細胞が減少していることを示している⁷³。仮説ではあるが、我々の研究で得られた知見は、母体の PE 罹患により胎児期の脳内で惹起された炎症の亢進としてとらえられる免疫系の変容が、出生後も持続して中枢神経系の発達に影響をあたえ、ASD などの神経発達症の発生に寄与している可能性を示唆しているのではないかと考えている (図 28)。

すなわち、1) PE 母体の胎児の脳では Microglia などの免疫細胞の活性化やサイトカインの亢進などを伴う免疫系の異常が起こる。2) この免疫系の変容が出生後も持続し、脳の形成異常や、免疫系の過度な活性化を引き起こす。そして、この胎児期から持続する脳内の免疫異常が、出生児の ASD 様行動を引き起こす機

序として重要なのではないか。もしこの仮説が正しいとすれば、母体へのスタチンやアスピリン投与など抗炎症効果のある薬剤投与などが治療の可能性として考えられるかもしれない⁷⁴⁻⁷⁶。

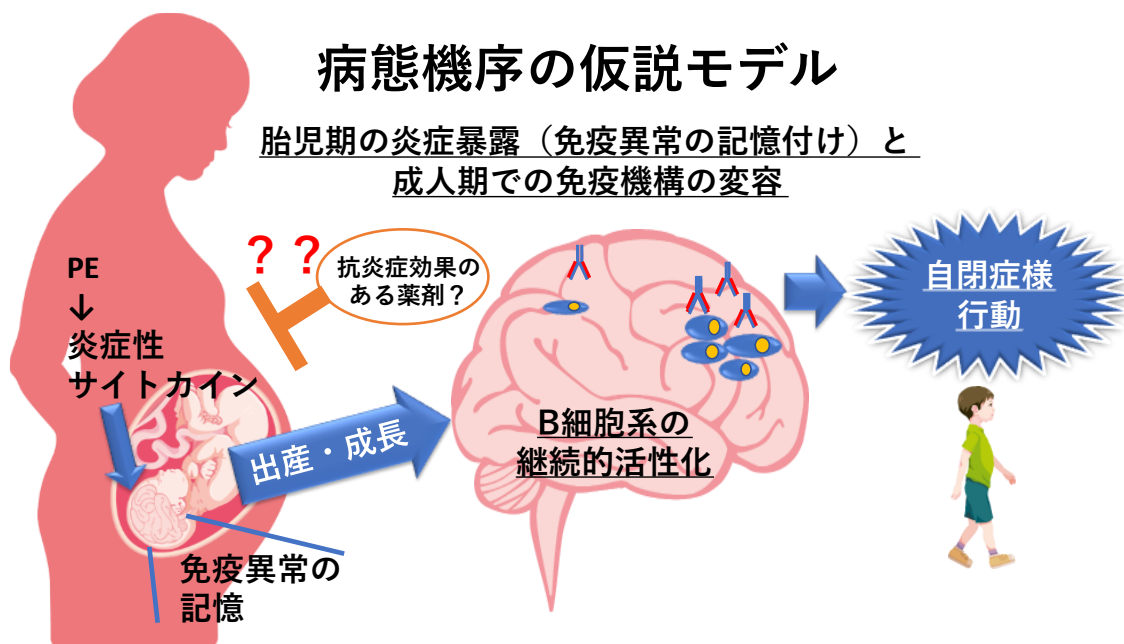


図 28. PE からの出生児に起こる神経発達症の病態機序の仮説モデル

PE 患者の胎児脳ではサイトカインの産生亢進やミクログリアの活性化で表出される免疫系の異常が起こっている。脳内では出生後も免疫変容が持続し、出生児に ASD 様の行動を引き起こす原因となっているのではないか。PE 患者を妊娠中から抗炎症作用のあるスタチンなどの薬剤で治療できれば、PE 患者からの出生児の神経発達症の発生を抑制できるかもしれない。

本研究の Limitation として、今回の胎仔脳の免疫異常、出生仔の行動異常という結果は、sFlt-1⁷⁷ やアデノシン¹¹ など、RAS の亢進とは異なる他の病因関連因子によってもたらされる PE の機序でも起こりうる、共通した表現型であ

るのか、については未検討である¹¹。これら他の病因関連因子を用いたモデルを施行しての解析により、今回の知見がより確固たるものになるであろう。AngIIの量の違いが実際のヒト PE と違いをもたらす可能性はあるのかということも、検討課題である。胎仔および出生仔の脳の解析を、それぞれ一時点でしか行っていないことも Limitation として挙げられる。今回観察された変化が、胎児期から出生後にかけてどのように生じているのか、さらなる検討が必要である。そして、胎仔および出生仔の脳内で起こっている変化について、免疫学的な観点で、免疫細胞の寄与や、さらには脳組織構造の変化の詳細についての検討も今後の課題である。

総括

本研究では、1) Ang II 持続投与による PE モデルマウスの胎仔脳において、様々なサイトカインの発現が亢進し、Microglia が円型の Ameboid 型を呈し、全脳にわたって活性化していること、2) 脳機能を評価する行動実験において、PE モデルマウスからの出生仔は対照マウスに比べ不安様行動、社会性行動障害という ASD 様の行動を示すこと、を明らかとした。また3) PE モデルマウスからの出生仔の脳でマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行ったと

ころ、Pathway Enrichment 解析で、Immunoglobulin に関する Pathway の関与が示唆された。本研究は、母体の PE 罹患が出生児の ASD を含めた神経発達症発生の契機になりうることを実験的に示す成果である。また、胎児期の脳内の炎症亢進を契機とした免疫学的変容が出生後も持続することが PE 患者の出生児における神経発達症発生の背景にある、という病態モデルを示唆する結果であると考えている。我々の研究が、PE 罹患が胎児脳に及ぼす影響、および PE 患者の出生児における神経発達症の発症機序の解明の一助になれば幸いである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の立案や方向性の決定、論文執筆に至るまでご指導を賜りました東京大学医学部産婦人科 講師 入山高行先生、東京都医学総合研究所依存性物質プロジェクト 池田和隆プロジェクトリーダー、に深く感謝の意を表します。

また、研究のご支援やご指導を賜りました東京大学医学部産婦人科 主任教授 大須賀穰先生、前主任教授 藤井知行先生に深謝申し上げます。

東京大学医学部産婦人科 前准教授 永松健先生、東京大学産婦人科講師 熊澤恵一先生、同講師 曾根献文先生、同助教 瀬山貴博先生、同助教 利光正岳先生、前助教 佐山晴亮先生、同助教 市瀬茉里先生、前助教 吉川美登里先生、同助教 稲岡直子先生には実験手技や研究内容に関してのご指導、ご助言、を賜りました。同大学院 矢野絵里子先生には、PEモデルマウスのデータ、胎仔脳のサイトカインの測定に関してご協力いただきました。

東京都医学総合研究所依存性物質プロジェクト 古田島(村上)浩子主任研究員には行動解析のご指導、マイクロアレイのデータ解析のご協力、論文執筆まで、ご助言、ご指導を賜りました。同教室の先生方には実験手技や研究内容に関してご指導、ご助言を賜りました。同研究所こどもの脳プロジェクト 佐久間啓プロ

ジェクトリーダーには胎仔脳の免疫染色から顕微鏡の使用法、Microglia の解析法など、ご教授いただきました。

同研究所ヒストロジーセンター 井口義信先生にはマウスの脳切片の作製法及び染色法をご指導、ご協力いただきました。東京大学小児科 助教 佐藤敦志先生には、研究の内容に至るまで、ご指導、ご助言をいただきました。

皆様に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1 Knuesel, I. *et al.* Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 643-660, doi:10.1038/nrneurol.2014.187 (2014).
- 2 Estes, M. L. & McAllister, A. K. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science* **353**, 772-777, doi:10.1126/science.aag3194 (2016).
- 3 Massarali, A., Adhya, D., Srivastava, D. P., Baron-Cohen, S. & Kotter, M. R. Virus-Induced Maternal Immune Activation as an Environmental Factor in the Etiology of Autism and Schizophrenia. *Front. Neurosci.* **16**, 834058, doi:10.3389/fnins.2022.834058 (2022).
- 4 Kwon, H.-K., Choi, G. B. & Huh, J. R. Maternal inflammation and its ramifications on fetal neurodevelopment. *Trends Immunol.*, doi:10.1016/j.it.2022.01.007 (2022).
- 5 Rudolph, M. D. *et al.* Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. *Nat. Neurosci.* **21**, 765-772, doi:10.1038/s41593-018-0128-y (2018).
- 6 Lim, S. & Lee, S. Chemical Modulators for Targeting Autism Spectrum Disorders: From Bench to Clinic. *Molecules* **27**, doi:10.3390/molecules27165088 (2022).
- 7 Massralli, A., Adhya, D., Srivastava, D. P., Baron-Cohen, S. & Kotter, M. R. Virus-Induced Maternal Immune Activation as an Environmental Factor in the Etiology of Autism and Schizophrenia. *Front. Neurosci.* **16**, 834058, doi:10.3389/fnins.2022.834058 (2022).
- 8 Bao, M., Hofsink, N. & Plösch, T. LPS versus Poly I:C model: comparison of long-term effects of bacterial and viral maternal immune activation on the offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **322**, R99-r111, doi:10.1152/ajpregu.00087.2021 (2022).
- 9 Simões, L. R. *et al.* Maternal immune activation induced by lipopolysaccharide triggers immune response in pregnant mother and fetus, and induces behavioral impairment in adult rats. *J. Psychiatr. Res.* **100**, 71-83, doi:10.1016/j.jpsychires.2018.02.007 (2018).
- 10 Mueller, F. S. *et al.* 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, doi:10.1016/j.bbi.2019.04.019 (2019).
- 11 Iriyama, T., Sayama, S. & Osuga, Y. Role of adenosine signaling in preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, doi:10.1111/jog.15066 (2021).

- 12 Iriyama, T. *et al.* Elevated placental adenosine signaling contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Circulation* **131**, 730-741, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013740 (2015).
- 13 Iriyama, T. *et al.* Hypoxia-independent upregulation of placental hypoxia inducible factor-1alpha gene expression contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Hypertension* **65**, 1307-1315, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05314 (2015).
- 14 Chaiworapongsa, T., Chaemsaihong, P., Yeo, L. & Romero, R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* **10**, 466-480, doi:10.1038/nrneph.2014.102 (2014).
- 15 Spence, T. *et al.* Maternal Serum Cytokine Concentrations in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. *J Pregnancy* **2021**, 6649608, doi:10.1155/2021/6649608 (2021).
- 16 Cornelius, D. C. Preeclampsia: From Inflammation to Immunoregulation. *Clin Med Insights Blood Disord* **11**, 1179545X17752325, doi:10.1177/1179545X17752325 (2018).
- 17 Leal, C. R. V. *et al.* Renin-angiotensin system in normal pregnancy and in preeclampsia: A comprehensive review. *Pregnancy Hypertens.* **28**, 15-20, doi:10.1016/j.preghy.2022.01.011 (2022).
- 18 Wallukat, G., Neichel, D., Nissen, E., Homuth, V. & Luft, F. C. Agonistic autoantibodies directed against the angiotensin II AT1 receptor in patients with preeclampsia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**, 79-83, doi:10.1139/y02-160 (2003).
- 19 Campbell, N., LaMarca, B. & Cunningham, M. W., Jr. The Role of Agonistic Autoantibodies to the Angiotensin II Type 1 Receptor (AT1-AA) in Pathophysiology of Preeclampsia. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **19**, 781-785, doi:10.2174/1389201019666180925121254 (2018).
- 20 Zhang, Y. *et al.* Detrimental effects of adenosine signaling in sickle cell disease. *Nat. Med.* **17**, 79-86, doi:10.1038/nm.2280 (2011).
- 21 Xia, Y. & Kellems, R. E. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies and hypertension: preeclampsia and beyond. *Circ. Res.* **113**, 78-87, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300752 (2013).
- 22 Raghupathy, R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med. Princ. Pract.* **22 Suppl 1**, 8-19, doi:10.1159/000354200 (2013).
- 23 Iriyama, T. *et al.* Reciprocal upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and persistently enhanced placental adenosine signaling contribute to the pathogenesis of preeclampsia. *FASEB J.* **34**, 4041-4054, doi:10.1096/fj.201902583R (2020).

- 24 Ali, S. M. & Khalil, R. A. Genetic, immune and vasoactive factors in the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy. *Expert Opin. Ther. Targets* **19**, 1495-1515, doi:10.1517/14728222.2015.1067684 (2015).
- 25 Zhou, C. C. *et al.* Angiotensin receptor agonistic autoantibody-mediated tumor necrosis factor-alpha induction contributes to increased soluble endoglin production in preeclampsia. *Circulation* **121**, 436-444, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.902890 (2010).
- 26 Oda, H. *et al.* Recombinant Thrombomodulin Attenuates Preeclamptic Symptoms by Inhibiting High-Mobility Group Box 1 in Mice. *Endocrinology* **162**, doi:10.1210/endocr/bqaa248 (2021).
- 27 Zhang, M., Jin, H. & Liu, X. Preeclampsia is associated with an increased risk of autism spectrum disorder (ASD): A systematic review and meta-analysis. *Asian J. Surg.* **45**, 2521-2523, doi:10.1016/j.asjsur.2022.05.133 (2022).
- 28 Sun, B. Z., Moster, D., Harmon, Q. E. & Wilcox, A. J. Association of Preeclampsia in Term Births With Neurodevelopmental Disorders in Offspring. *JAMA Psychiatry* **77**, 823-829, doi:10.1001/jamapsychiatry.2020.0306 (2020).
- 29 Maher, G. M. *et al.* A perspective on pre-eclampsia and neurodevelopmental outcomes in the offspring: Does maternal inflammation play a role? *Int. J. Dev. Neurosci.* **77**, 69-76, doi:10.1016/j.ijdevneu.2018.10.004 (2019).
- 30 Dachew, B. A., Mamun, A., Maravilla, J. C. & Alati, R. Pre-eclampsia and the risk of autism-spectrum disorder in offspring: meta-analysis. *Br. J. Psychiatry* **212**, 142-147, doi:10.1192/bjp.2017.27 (2018).
- 31 Giambrone, A. B., Logue, O. C., Shao, Q., Bidwell, G. L., 3rd & Warrington, J. P. Perinatal Micro-Bleeds and Neuroinflammation in E19 Rat Fetuses Exposed to Utero-Placental Ischemia. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, doi:10.3390/ijms20164051 (2019).
- 32 Vogtmann, R. *et al.* Systemic Maternal Human sFLT1 Overexpression Leads to an Impaired Foetal Brain Development of Growth-Restricted Foetuses upon Experimental Preeclampsia. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2022**, 3024032, doi:10.1155/2022/3024032 (2022).
- 33 Zhou, C. C. *et al.* Angiotensin II induces soluble fms-Like tyrosine kinase-1 release via calcineurin signaling pathway in pregnancy. *Circ. Res.* **100**, 88-95, doi:10.1161/01.RES.0000254703.11154.18 (2007).
- 34 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).

- 35 Matsushita, T. *et al.* Sustained microglial activation in the area postrema of collagen-induced arthritis mice. *Arthritis Res. Ther.* **23**, 273, doi:10.1186/s13075-021-02657-x (2021).
- 36 Feather-Schussler, D. N. & Ferguson, T. S. A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. *J Vis Exp*, doi:10.3791/53569 (2016).
- 37 Kotajima-Murakami, H. *et al.* Effects of rapamycin on social interaction deficits and gene expression in mice exposed to valproic acid in utero. *Mol. Brain* **12**, 3, doi:10.1186/s13041-018-0423-2 (2019).
- 38 Shi, X. *et al.* Behavioral Assessment of Sensory, Motor, Emotion, and Cognition in Rodent Models of Intracerebral Hemorrhage. *Front. Neurol.* **12**, 667511, doi:10.3389/fneur.2021.667511 (2021).
- 39 Nakagawa, H., Matsunaga, D. & Ishiwata, T. Effect of heat acclimation on anxiety-like behavior of rats in an open field. *J. Therm. Biol.* **87**, 102458, doi:10.1016/j.jtherbio.2019.102458 (2020).
- 40 Yoshizaki, K., Asai, M. & Hara, T. High-Fat Diet Enhances Working Memory in the Y-Maze Test in Male C57BL/6J Mice with Less Anxiety in the Elevated Plus Maze Test. *Nutrients* **12**, doi:10.3390/nu12072036 (2020).
- 41 Lueptow, L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*, doi:10.3791/55718 (2017).
- 42 Bannon, A. W. & Malmberg, A. B. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr. Protoc. Neurosci.* **Chapter 8**, Unit 8 9, doi:10.1002/0471142301.ns0809s41 (2007).
- 43 Kotajima-Murakami, H. *et al.* Exposure to GABA(A) Receptor Antagonist Picrotoxin in Pregnant Mice Causes Autism-Like Behaviors and Aberrant Gene Expression in Offspring. *Front Psychiatry* **13**, 821354, doi:10.3389/fpsy.2022.821354 (2022).
- 44 Liu, C., Kellems, R. E. & Xia, Y. Inflammation, Autoimmunity, and Hypertension: The Essential Role of Tissue Transglutaminase. *Am. J. Hypertens.* **30**, 756-764, doi:10.1093/ajh/hpx027 (2017).
- 45 Zawadzka, A., Cieslik, M. & Adamczyk, A. The Role of Maternal Immune Activation in the Pathogenesis of Autism: A Review of the Evidence, Proposed Mechanisms and Implications for Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, doi:10.3390/ijms222111516 (2021).
- 46 Vitaliti, G. & Falsaperla, R. Chorioamnionitis, Inflammation and Neonatal Apnea: Effects on Preterm Neonatal Brainstem and on Peripheral Airways: Chorioamnionitis and Neonatal Respiratory Functions. *Children (Basel)* **8**, doi:10.3390/children8100917 (2021).

- 47 Prins, J. R., Eskandar, S., Eggen, B. J. L. & Scherjon, S. A. Microglia, the missing link in maternal immune activation and fetal neurodevelopment; and a possible link in preeclampsia and disturbed neurodevelopment? *J. Reprod. Immunol.* **126**, 18-22, doi:10.1016/j.jri.2018.01.004 (2018).
- 48 Sasaki, T., Tome, S. & Takei, Y. Intraventricular IL-17A administration activates microglia and alters their localization in the mouse embryo cerebral cortex. *Mol. Brain* **13**, 93, doi:10.1186/s13041-020-00635-z (2020).
- 49 Zanier, E. R., Fumagalli, S., Perego, C., Pischiutta, F. & De Simoni, M. G. Shape descriptors of the "never resting" microglia in three different acute brain injury models in mice. *Intensive Care Med Exp* **3**, 39, doi:10.1186/s40635-015-0039-0 (2015).
- 50 Chang, E. Y., Zhang, J., Sullivan, S., Newman, R. & Singh, I. N-acetylcysteine attenuates the maternal and fetal proinflammatory response to intrauterine LPS injection in an animal model for preterm birth and brain injury. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **24**, 732-740, doi:10.3109/14767058.2010.528089 (2011).
- 51 Romero, R., Dey, S. K. & Fisher, S. J. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science* **345**, 760-765, doi:10.1126/science.1251816 (2014).
- 52 Sato, A., Kotajima-Murakami, H., Tanaka, M., Katoh, Y. & Ikeda, K. Influence of Prenatal Drug Exposure, Maternal Inflammation, and Parental Aging on the Development of Autism Spectrum Disorder. *Front Psychiatry* **13**, 821455, doi:10.3389/fpsy.2022.821455 (2022).
- 53 Otero, A. M. & Antonson, A. M. At the crux of maternal immune activation: Viruses, microglia, microbes, and IL-17A. *Immunol. Rev.*, doi:10.1111/imr.13125 (2022).
- 54 Fujitani, M., Miyajima, H., Otani, Y. & Liu, X. Maternal and Adult Interleukin-17A Exposure and Autism Spectrum Disorder. *Front Psychiatry* **13**, 836181, doi:10.3389/fpsy.2022.836181 (2022).
- 55 Mizutani, S. *et al.* In vitro degradation of angiotensin II (A-II) by human placental subcellular fractions, pregnancy sera and purified placental aminopeptidases. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **110**, 135-139, doi:10.1530/acta.0.1100135 (1985).
- 56 Irani, R. A. *et al.* The detrimental role of angiotensin receptor agonistic autoantibodies in intrauterine growth restriction seen in preeclampsia. *J. Exp. Med.* **206**, 2809-2822, doi:10.1084/jem.20090872 (2009).
- 57 Bilimoria, P. M. & Stevens, B. Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res.* **1617**, 7-17, doi:10.1016/j.brainres.2014.11.032 (2015).

- 58 Salter, M. W. & Stevens, B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat. Med.* **23**, 1018-1027, doi:10.1038/nm.4397 (2017).
- 59 Smolders, S., Notter, T., Smolders, S. M. T., Rigo, J. M. & Brone, B. Controversies and prospects about microglia in maternal immune activation models for neurodevelopmental disorders. *Brain. Behav. Immun.* **73**, 51-65, doi:10.1016/j.bbi.2018.06.001 (2018).
- 60 Kierdorf, K. & Prinz, M. Factors regulating microglia activation. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 44, doi:10.3389/fncel.2013.00044 (2013).
- 61 Estes, M. L. & McAllister, A. K. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 469-486, doi:10.1038/nrn3978 (2015).
- 62 Ebihara, K. *et al.* Decrease in endogenous brain allopregnanolone induces autism spectrum disorder (ASD)-like behavior in mice: A novel animal model of ASD. *Behav. Brain Res.* **334**, 6-15, doi:10.1016/j.bbr.2017.07.019 (2017).
- 63 Pan, T. *et al.* Autism-Like Behavior in the Offspring of CYP11A1-Overexpressing Pregnant Rats. *Front. Neurosci.* **15**, 774439, doi:10.3389/fnins.2021.774439 (2021).
- 64 Gumusoglu, S. B. *et al.* Altered offspring neurodevelopment in an arginine vasopressin preeclampsia model. *Transl Psychiatry* **11**, 79, doi:10.1038/s41398-021-01205-0 (2021).
- 65 Yang, X. *et al.* Social Deficits and Cerebellar Degeneration in Purkinje Cell Scn8a Knockout Mice. *Front. Mol. Neurosci.* **15**, 822129, doi:10.3389/fnmol.2022.822129 (2022).
- 66 Mathew, S. *et al.* Role of Serotonergic Antidepressants in the Development of Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review. *Cureus* **14**, e28505, doi:10.7759/cureus.28505 (2022).
- 67 Griffin, J. W., Bauer, R. & Gavett, B. E. The Episodic Memory Profile in Autism Spectrum Disorder: A Bayesian Meta-Analysis. *Neuropsychol. Rev.* **32**, 316-351, doi:10.1007/s11065-021-09493-5 (2022).
- 68 Liu, X. *et al.* Developmental and Functional Brain Impairment in Offspring from Preeclampsia-Like Rats. *Mol. Neurobiol.* **53**, 1009-1019, doi:10.1007/s12035-014-9060-7 (2016).
- 69 Garrido, D. *et al.* Shank2/3 double knockout-based screening of cortical subregions links the retrosplenial area to the loss of social memory in autism spectrum disorders. *Mol. Psychiatry*, doi:10.1038/s41380-022-01756-8 (2022).

- 70 Bogdanova, O. V. *et al.* The Current View on the Paradox of Pain in Autism Spectrum Disorders. *Front Psychiatry* **13**, 910824, doi:10.3389/fpsy.2022.910824 (2022).
- 71 Imado, E. *et al.* Prenatal exposure to valproic acid causes allodynia associated with spinal microglial activation. *Neurochem. Int.* **160**, 105415, doi:10.1016/j.neuint.2022.105415 (2022).
- 72 Deckmann, I., Schwingel, G. B., Fontes-Dutra, M., Bambini-Junior, V. & Gottfried, C. Neuroimmune Alterations in Autism: A Translational Analysis Focusing on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Neuroimmunomodulation* **25**, 285-299, doi:10.1159/000492113 (2018).
- 73 De Giacomo, A. *et al.* B and T Immunoregulation: A New Insight of B Regulatory Lymphocytes in Autism Spectrum Disorder. *Front. Neurosci.* **15**, 732611, doi:10.3389/fnins.2021.732611 (2021).
- 74 Cugurra, A. *et al.* Skull and vertebral bone marrow are myeloid cell reservoirs for the meninges and CNS parenchyma. *Science* **373**, doi:10.1126/science.abf7844 (2021).
- 75 Shin Yim, Y. *et al.* Reversing behavioural abnormalities in mice exposed to maternal inflammation. *Nature* **549**, 482-487, doi:10.1038/nature23909 (2017).
- 76 Kumasawa, K., Iriyama, T., Nagamatsu, T., Osuga, Y. & Fujii, T. Pravastatin for preeclampsia: From animal to human. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **46**, 1255-1262, doi:10.1111/jog.14295 (2020).
- 77 Stepan, H. *et al.* Clinical utility of sFlt-1 and PlGF in screening, prediction, diagnosis and monitoring of pre-eclampsia and fetal growth restriction. *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, doi:10.1002/uog.26032 (2022).