

審査の結果の要旨

氏名 加藤 喜久

本研究は疫学研究で示唆されている妊娠高血圧腎症（Preeclampsia : PE）から生まれた児が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を明らかにすることを試みたものであり、下記の結果を得ている。

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 を持続投与することにより PE モデルマウスを作製した。皮下に埋め込んだ Osmotic Mini Pump を用いて、Ang II を E10.5 から妊娠マウスに持続投与した。Ang II の持続投与により妊娠マウスは高血圧、尿蛋白、胎仔発育不全、という PE に特徴的な表現型を呈することを確認した。

2. PE モデルマウスの胎仔脳におけるサイトカインの発現亢進

PE モデルマウスの胎仔脳でのサイトカインの発現の変動を Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) を用いて検討した。Ang II 持続投与マウスにおいて E 17.5 の妊娠マウスの子宮から胎仔を単離し、頭部より全脳を摘出し RT-qPCR を施行した。Interleukin (IL) -6、IL-17a、tumor necrosis factor-alpha、interferon-gamma、IL-12、IL-4、IL-10 など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。

3. PE モデルマウスの胎仔脳における Microglia の活性化の亢進

PE モデルマウスの胎仔脳での Microglia の活性化状態を Immunohistochemistry (IHC)により検討した。E17.5 において PE モデルマウスを灌流固定後、抗 Iba-1 抗体で免疫染色を行った。一般に活性化した 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。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、より円形の Ameboid 型を呈しており、Microglia の活性化が亢進していた。

4. 各種行動実験における PE モデルマウスからの出生仔の表現型の解析

PE モデルマウスからの出生仔に対して行動解析を行った。運動や発達については背地走性テスト、正向反射テスト、断崖回避テスト、アイオープニングテスト、ハンギングワイヤテストを施行した。運動や発達について、PE モデルマウスからの出生仔に一貫した確かな表

現型は得られなかった。記憶力を検討するテストとしてノベルオブジェクト探索テスト、疼痛を検討するテストとしてホットプレートテストを行ったが、PE モデルマウからの出生仔に有意差のある表現型は認めなかった。恐怖心を検討するテストとして、オープンフィールドテストと高架式十字迷路テストを施行した。これらのテストにおいて、PE モデルマウスからの出生仔は不安様行動を示唆する行動を示した。社会性を検討するテストとしてソーシャルインタラクションテストを施行した。PE モデルマウスからの出生仔は社会性行動障害の表現型を示唆する行動を示した。これらの検討により、PE モデルマウスからの出生仔は ASD 様の行動異常を呈することが明らかとなった。

5. マイクロアレイを用いた PE モデルマウスからの出生仔の脳での遺伝子発現変化の検討

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 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。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 を用いて行った。Ang II 持続投与マウスにおいて出生仔での脳での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。解析は BaseSpace を用いて行った。Pathway Enrichment 解析の結果 Immunoglobulin に関する Pathway の関与が示唆された。

以上、本論文は母体の PE 罹患が出生児の自閉症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成果である。本論文は PE 患者からの出生児における神経発達症の発症機序の解明に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。