

## 胎生期母体免疫活性化に着目した自閉スペクトラム症の予測評価 (中間報告)

福井大学学術研究院医学系部門, 福井大学ライフサイエンスイノベーションセンター 平井孝治

### Predictive Evaluation of Autism Spectrum Disorders Focusing on Maternal Immune Activation During the Embryonic Period

Department of Psychiatric and Mental Health Nursing, School of  
Nursing, University of Fukui, Eiheiji, Japan,  
Life Science Innovation Center, University of Fukui, Eiheiji, Japan HIRAI, Takaharu

#### 要約

自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder: ASD) は, 多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated Fatty Acids: PUFA) に代表される脂質代謝の変化と関連している。PUFA はチトクローム P450 (Cytochrome P450: CYP) によりエポキシ脂肪酸に代謝され, 可溶性エポキシドヒドロラーゼによりジヒドロキシ脂肪酸が産生される。この代謝過程は, 児童の ASD 特性に影響を及ぼす可能性があるため, 本研究では臍帯血中の PUFA 代謝物と児童の ASD 症状および適応機能との関連を検証する。浜松母と子の出生コホート研究で得られた臍帯血を用いて CYP 経路の PUFA 代謝物を定量する。自閉症診断観察スケジュール, Vineland-II 適応行動尺度を用いて, その後の ASD 症状および 6 歳時の適応機能を評価する。本研究の知見は, 臍帯血を用いた ASD の超早期発見に寄与する可能性がある。

**【キーワード】 自閉スペクトラム症, エポキシ脂肪酸, ジヒドロキシ脂肪酸, 臍帯血**

#### Abstract

Autism spectrum disorders (Autism Spectrum Disorder: ASD) are associated with altered lipid metabolism represented by polyunsaturated fatty acids (Polyunsaturated Fatty Acids: PUFA). PUFAs are metabolized to epoxy fatty acids by cytochrome P450 (Cytochrome P450: CYP) and dihydroxy fatty acids are produced by soluble epoxide hydrolases. This metabolic process may influence ASD in children; therefore, this study will examine the association between PUFA metabolites in cord blood and ASD symptoms and adaptive function in children. Cord blood from the Hamamatsu Birth Cohort Study for Mothers and Children (HBC Study) is used to quantitate PUFA metabolites in the CYP pathway. To assess subsequent ASD symptoms and adaptive functioning at age 6 using the Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS-2) and the Vineland-II Adaptive Behavior Scale (VABS-II). The findings of this

study may contribute to the very early detection of ASD using cord blood.

**【Keywords】** utism Spectrum Disorder, epoxy fatty acid, dihydroxy fatty acid, cord blood

## 問題と目的

自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder: ASD) は、コミュニケーションの障害、興味の限局と常同的・反復的行動を特徴とする神経発達症である。ASD は遺伝的要因だけでなく、環境要因の影響も大きい (Bai et al., 2019)。後者においては、妊娠中の抗てんかん薬への曝露が ASD のリスク上昇と関連し (Wiggs et al., 2020)、妊娠中に閾値以上の発熱が続くと、その後の児の ASD リスクが上昇することが示されている (Atladóttir, Henriksen, Schendel, & Parner, 2012)。加えて、妊娠中のマウスに炎症性サイトカインの曝露をさせると、ASD 様の行動障害がみられる (Choi et al., 2016)。ノルウェーの出生コホート大規模研究では、臍帯血漿および妊娠中期の母体血漿中の免疫関連分子が ASD リスクの増加と関連していた (Che et al., 2022)。これらのことから、母体免疫活性化 (Maternal Immune Activation: MIA) が ASD の重要な危険因子であることが示唆される。

一方でアラキドン酸 (Arachidonic Acid: AA) とその代謝物に代表される多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated Fatty Acids: PUFA) は、免疫調節過程の重要なメディエーターであり (Poorani, Bhatt, Dwarakanath, & Das, 2016)、3つの主要な酵素経路 (シクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ、チトクローム P450 (Cytochrome P450: CYP) 経路) によって調節されている。特に CYP による代謝では、抗炎症性の作用を持つエポキシ脂肪酸 (Epoxy Fatty Acids: EpFA) と炎症性の作用を持つジヒドロキシ脂肪酸 (Dihydroxy Fatty Acids: Diol) が形成される。EpFA は、核内因子  $\kappa$  B の核内転移を減少させることにより、いくつかの炎症性サイトカインの転写を阻害し、抗炎症剤として作用する (Node et al., 1999)。Diol は、ケモカインである MCP-1 に反応して単球の走化性を促進することにより、炎症作用を発揮する (Kundu et al., 2013)。中枢神経系では、EpFA から Diol への代謝に関わる可溶性エポキシドヒドロラーゼ (Soluble Epoxide Hydrolase: sEH) を阻害することで、ミクログリアにおける抗炎症・神経保護作用を有するインターロイキン-10 が選択的に誘導される (Wang et al., 2013)。さらに、AA 由来の EpFA であるエポキシエイコサトリエン酸 (Epoxyeicosatrienoic acid: EET) は、神経細胞の神経突起伸長に寄与することが明らかになっている (Oguro, Inoue, Kudoh, & Imaoka, 2018)。したがって、CYP 経路の PUFA 代謝物は、MIA を通じて妊娠中の胎児の発育に影響を与える可能性がある (Kikut, Komorniak, Ziętek, Palma, & Szczuko, 2020)。

また、sEH をコードする遺伝子である *EPHX2* mRNA の発現が、ASD 患者の死後脳 (Brodmann area 9 と 40) で高いことが報告されている (Ma et al., 2019)。さらに、妊娠中および授乳期に高濃度のグリホサートに曝露すると、妊娠マウスの子孫に ASD 様行動が生じ、血漿、前頭前皮質、海馬、線条体における 8,9-EET レベルの低下と sEH レベルの上昇も認められる (Pu et al., 2020)。グリホサートに曝露した妊娠マウスに sEH 阻害剤を投与すると、子孫のグルーミング行動の増加や社会

性相互作用の障害といった ASD 様の行動異常が改善されることも示されている (Pu et al., 2020)。

これらのことから、胎生期における CYP 経路の PUFA 代謝物は、ASD の生物学的背景に参与していることが示唆された。我々は、胎生期における CYP 経路 PUFA 代謝物の動態、すなわち EpFA の低下や Diol の上昇、sEH 活性の上昇が、出生後の児の ASD 症状および適応機能の障害に影響するという仮説を立てた。この仮説をヒトで検証すべく、臍帯血を用いた CYP 経路 PUFA 代謝物の定量をおこない、その後の児童の ASD 症状や適応機能との関連について縦断的に評価する。

## 方法

### 対象者

本研究は、200 人の児童とその母親を対象とした現在進行中の前向きコホート研究である浜松母子の出生コホート研究 (HBC Study) のサブセットを用いた。HBC Study は、2007 年 11 月から 2011 年 3 月までに浜松医科大学病院または加藤マタニティクリニックを受診した妊娠第 1 期または第 2 期の女性を対象としており、これらの人口統計学的データおよび周産期データは、日本の一般集団における母子のデータと比較可能である (Takagai et al., 2016)。

### 臍帯血のサンプリングと解析

出生直後、臍静脈から 10-30mL の血液を採取した。サンプルは室温で 30 分間保持した後、3500rpm で 10 分間遠心分離した。得られた上清 (200  $\mu$  L) を臍帯血血清とし、アリコートに分け、分析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。臍帯血血清中の CYP 経路 PUFA 代謝物を定量するために、液体クロマトグラフィー質量分析をおこなった。

### ASD 症状と適応機能の評価

ASD 症状は、自閉症診断観察スケジュール (Autism Diagnostic Observation Schedule, Module 3 for the Generic or Second Edition: ADOS-2) を用いた (Pu et al., 2020)。適応機能は、Vineland-II 適応行動尺度 (Vineland Adaptive Behaviors Scales, Second Edition: VABS-II) を用いた (Sparrow, Cicchetti, & Balla, 2005)。いずれも、児童が 6 歳の時点で評価した。

### 倫理的配慮

ヘルシンキ宣言に従い、本研究は浜松医科大学倫理委員会(第 20-82 号, 第 21-114 号, 第 22-29 号, 第 24-67 号, 第 24-237 号, 第 25-143 号, 第 25-283 号, E14-062 号, 第 17-037 号, 第 17-037-3 号, 第 20-233 号) および福井大学研究倫理委員会の承認を得た。

## 現在の進捗状況

CYP経路のPUFA代謝物の定量、ASD症状と適応機能の評価は済んだ。解析によって、ASDの生物学的背景において重要な知見を得ることができた。その結果からEpFAとDiol代謝の上流にあたるsEHの検証が必要と考えられ、定量のための実験をすすめる。

## 引用文献

- Atladóttir, H., Henriksen, T. B., Schendel, D. E., & Parner, E. T. (2012). Autism after infection, febrile episodes, and antibiotic use during pregnancy: an exploratory study. *Pediatrics*, *130*(6), e1447-1454. doi:10.1542/peds.2012-1107
- Bai, D., Yip, B. H. K., Windham, G. C., Sourander, A., Francis, R., Yoffe, R., . . . Sandin, S. (2019). Association of Genetic and Environmental Factors With Autism in a 5-Country Cohort. *JAMA Psychiatry*, *76*(10), 1035-1043. doi:10.1001/jamapsychiatry.2019.1411
- Che, X., Hornig, M., Bresnahan, M., Stoltenberg, C., Magnus, P., Surén, P., . . . Lipkin, W. I. (2022). Maternal mid-gestational and child cord blood immune signatures are strongly associated with offspring risk of ASD. *Molecular Psychiatry*, *27*(3), 1527-1541. doi:10.1038/s41380-021-01415-4
- Choi, G. B., Yim, Y. S., Wong, H., Kim, S., Kim, H., Kim, S. V., . . . Huh, J. R. (2016). The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, *351*(6276), 933-939. doi:10.1126/science.aad0314
- Kikut, J., Komorniak, N., Ziętek, M., Palma, J., & Szczuko, M. (2020). Inflammation with the participation of arachidonic (AA) and linoleic acid (LA) derivatives (HETEs and HODEs) is necessary in the course of a normal reproductive cycle and pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, *141*, 103177. doi:10.1016/j.jri.2020.103177
- Kundu, S., Roome, T., Bhattacharjee, A., Carnevale, K. A., Yakubenko, V. P., Zhang, R., . . . Cathcart, M. K. (2013). Metabolic products of soluble epoxide hydrolase are essential for monocyte chemotaxis to MCP-1 in vitro and in vivo. *Journal of Lipid Research*, *54*(2), 436-447. doi:10.1194/jlr.M031914
- Ma, M., Ren, Q., Yang, J., Zhang, K., Xiong, Z., Ishima, T., . . . Hashimoto, K. (2019). Key role of soluble epoxide hydrolase in the neurodevelopmental disorders of offspring after maternal immune activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(14), 7083-7088. doi:10.1073/pnas.1819234116
- Node, K., Huo, Y., Ruan, X., Yang, B., Spiecker, M., Ley, K., . . . Liao, J. K. (1999). Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*, *285*(5431),

1276-1279. doi:10.1126/science.285.5431.1276

- Oguro, A., Inoue, T., Kudoh, S. N., & Imaoka, S. (2018). 14,15-epoxyeicosatrienoic acid produced by cytochrome P450s enhances neurite outgrowth of PC12 and rat hippocampal neuronal cells. *Pharmacology Research & Perspectives*, *6*(5), e00428. doi:10.1002/prp2.428
- Poorani, R., Bhatt, A. N., Dwarakanath, B. S., & Das, U. N. (2016). COX-2, aspirin and metabolism of arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their physiological and clinical significance. *European Journal of Pharmacology*, *785*, 116-132. doi:10.1016/j.ejphar.2015.08.049
- Pu, Y., Yang, J., Chang, L., Qu, Y., Wang, S., Zhang, K., . . . Hashimoto, K. (2020). Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(21), 11753-11759. doi:10.1073/pnas.1922287117
- Sparrow, S. S., Cicchetti, D. V., & Balla, D. A. (2005). *Vineland Adaptive Behavior Scales Vineland-II: Survey forms manual*: Pearson Minneapolis, MN.
- Takagai, S., Tsuchiya, K. J., Itoh, H., Kanayama, N., Mori, N., & Takei, N. (2016). Cohort Profile: Hamamatsu birth cohort for mothers and children (HBC study). *International Journal of Epidemiology*, *45*(2), 333-342. doi:10.1093/ije/dyv290
- Wang, J., Fujiyoshi, T., Kosaka, Y., Raybuck, J. D., Lattal, K. M., Ikeda, M., . . . Koerner, I. P. (2013). Inhibition of soluble epoxide hydrolase after cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation induces a neuroprotective phenotype in activated microglia and improves neuronal survival. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *33*(10), 1574-1581. doi:10.1038/jcbfm.2013.111
- Wiggs, K. K., Rickert, M. E., Sujan, A. C., Quinn, P. D., Larsson, H., Lichtenstein, P., . . . D'Onofrio, B. M. (2020). Antiseizure medication use during pregnancy and risk of ASD and ADHD in children. *Neurology*, *95*(24), e3232-e3240. doi:10.1212/wnl.0000000000010993