様　式　Ｃ－４１

科学研究費助成事業　研究成果報告書

令和　２年　４月　３０日現在

機関番号：13301
研究種目：奨励研究
研究期間：2019
課題番号： 19H00388
研究課題名：マウスの生育過程・妊娠・出産期のオキシトシンに結合する担体 C4a の生理的役割の検証

研究代表者 由比　光子　（YUHI,Teruko）
（金沢大学・子どものこころの発達研究センター・技術補佐員）

交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：540000 円

研究成果の概要：
　自閉スペクトラム症患者へ施した点鼻オキシトシン（OT）が脳関門を通過することを証明した。この研究で我々は新たに、オキシトシン結合因子 C4a は OT 輸送担体 Receptor for Advanced Glycation End-products（RAGE）とも結合することを見出した。
　本課題では、本来は古典的経路で活性化され、炎症に関わる C4a が、妊娠や出産という OT が関与するライフステージにおいて、C4a の関連を自閉症モデルと野生型マウスを用いて研究した。結果、妊娠期において OT と C4a の血中濃度の高低変動が逆転していることを見出した。これは炎症状態が出生後の ASD 症状に影響する可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　C4a は古典的経路で活性化される因子で、炎症などによりその値が上昇することが知られているが、OT との生理的関連性は明らかではない。OT は、ヒトの社会性活動に関与すると共に、本来、妊娠や出産というライフイベントに大きな役割を果たすホルモンである。我々は、この期間の変動に注目し、C4a が OT の担体として、生理的な役割を果たすことができるかを検証した。本研究によって、OT の血中の安定性や脳内輸送機序を解明することが出来、治療の際の OT の効率的投与に対する新たな知見が得られ、ASD 患者本人ばかりでなく家族や周りの状況を変える助け（福音）になると考えている。

研究分野：医歯薬学

キーワード：オキシトシン、C4a、RAGE

１．研究の目的

　申請者らのグループは、自閉スペクトラム症(ASD)の、社会的相互交渉の障害に関わるオキシトシン(OT)の機能や機序を検証している。ASD は、コミュニケーションの障害と、常同的・反復的な行動・関心・活動の２つにより定義される先天的な脳の機能障害である。その治療には、確立されている療育による介入の他に近年は、ASD にオキシトシン(OT)を点鼻投与する臨床治験で、症状の改善効果の検討がなされている。一方、点鼻投与された OT が脳関門を通過するメカニズムについては、研究者によってほとんど議論されておらず、共通した認識が持たれていないのが現状である。
　申請者らはこれまでに、OT を輸送する担体候補の探索と検証を行い、得られた結合分子のうち Receptor for Advanced Glycation End-products（RAGE）に注目し、検討を行った（参考論文１）。その研究過程で我々は、補体の C4a が、RAGE にも OT にも直接結合することを確認した（未発表）。C4a は古典的経路で活性化される補体因子で、炎症などによりその値が上昇することが知られているが、OT との生理的関連は明らかではない。社会性に関与する OT は本来、妊娠、出産というライフイベントに大きな役割を果たすホルモンである。我々は、この期間の変動に注目し、C4a が OT の担体として、生理的な役割を果たすことができるかを検証することにした。
　本申請では、生後から成体に至る発達過程中や、妊娠、出産、授乳という劇的変化のある期間中の OT と C4a の血中や脳脊髄中濃度を同時に追うことにより、OT 担体としての C4a の働きを検証し、その関連を確認することを目的とする。OT は子宮収縮や射乳といった、妊娠、出産、育児の時に血中へ大量に放出されるホルモンである。このことから、申請者は C4a が担

体として関わりがあるならば、OT の濃度変動に伴い、C4a の濃度の変動が確認できるのではないかと仮定した。

参考論文

1. Yamamoto Y, Liang M, Munesue S, Deguchi K, Harashima A, Furuhara K, Yuhi T, Zhong J, Akther S, Goto H, Eguchi Y, Kitao Y, Hori O, Shiraishi Y, Ozaki N, Shimizu Y, Kamide T, Yoshikawa A, Hayashi Y, Nakada M, Lopatina O, Gerasimenko M, Komleva Y, Malinovskaya N, Salmina AB, Asano M, Nishimori K, Shoelson SE, Yamamoto H, Higashida H.Vascular RAGE transports oxytocin into the brain to elicit its maternal bonding behaviour in mice.2020. 査読あり Commun Biol., 25;2:76.

２．研究成果

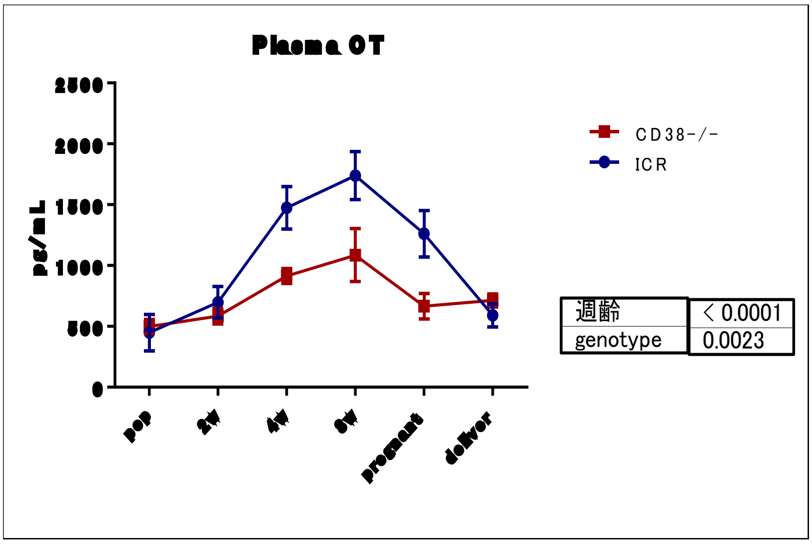
(1) 実験方法

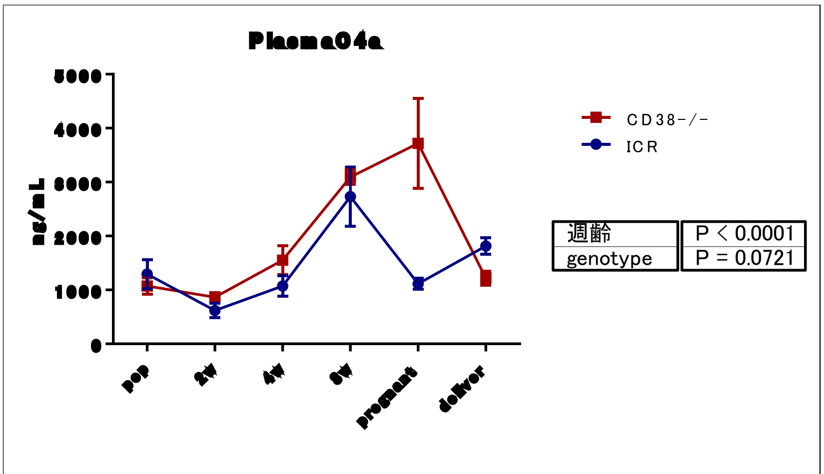
① ICR、ASD モデルマウス（CD38-/-）のメスマウスを使用する。それぞれ生後 1，2，3，4，8 週、妊娠、出産後にマウスを 5%抱水クロラールの腹腔内注射により麻酔し、脳脊髄液（CSF）と血液を採取する。

② CSF を採取後心臓採血し、ETDA 入りチューブに入れ遠心分離する。分離した血漿を容器に取り、それぞれ測定までー80℃で凍結保存する。

③ プロトコールに従って、血中と CSF 中の OT と C4a を Enzyme Immunoassay(EIA)にて測定する。

(2) 結果





血漿中の C4a 値は成長とともに増加した。妊娠期には CD38-/-ではさらに増加したのに対し、野生型マウスでは有意に減少し、出産後も減少した。週齢の増加と妊娠期における C4a 値の 2 系統における逆転現象は血漿中 OT の変化と逆に相関していた。この結果は、妊娠期の C4a 濃度から、CD38-/-は炎症傾向が強いことを示唆し、母親マウスにとって非自己である胎児への攻撃反応が強いのかもしれない。そのことが出生後の ASD 症状に影響するのかもしれない。また、過剰な C4a が RAGE に結合することにより OT の輸送を障害する可能性も考えられる。

CSF 中の C4a 濃度は血中に比べて非常に低濃度であるため、採取の際の血液の混入が測定値に大きな影響を及ぼすため得られたデータが少ないためさらに検討を進める必要がある。

３．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　４件）

(1) Kumazaki H, Muramatsu T, Kobayashi K, Watanabe T, Terada K, Higashida H, Yuhi T, Mimura M, Kikuchi M. Feasibility of autism-focused public speech training using a simple virtual audience for autism spectrum disorder.　査読あり。Psychiatry Clin Neurosci. 2020. 74(2):124-131.

(2) Owada K, Okada T, Munesue T, Kuroda M, Fujioka T, Uno Y, Matsumoto K, Kuwabara H, Mori D, Okamoto Y, Yoshimura Y, Kawakubo Y, Arioka Y, Kojima M, Yuhi T, Yassin W, Kushima I, Benner S, Ogawa N, Kawano N, Eriguchi Y, Uemura Y, Yamamoto M, Kano Y, Kasai K, Higashida H, Ozaki N, Kosaka H, Yamasue H. Quantitative facial expression analysis revealed the efficacy and time course of oxytocin in autism. 査読あり。Brain. 2019. 142(7):2127-2136.

(3) Ichinose W, Cherepanov SM, Shabalova AA, Yokoyama S, Yuhi T, Yamaguchi H, Watanabe A, Yamamoto Y, Okamoto H, Horike S, Terakawa J, Daikoku T, Watanabe M, Mano N, Higashida H, Shuto S. Development of a Highly Potent Analogue and a Long-Acting Analogue of Oxytocin for the Treatment of Social Impairment-Like Behaviors.査読あり。 J Med Chem. 2019. 62(7):3297-3310.

(4) Kumazaki H, Muramatsu T, Yoshikawa Y, Corbett BA, Matsumoto Y, Higashida H, Yuhi T, Ishiguro H, Mimura M, Kikuchi M. Job interview training targeting nonverbal communication using an android robot for individuals with autism spectrum disorder. 査読あり。Autism. 2019. (6):1586-1595.

〔学会発表〕（計　０件）

〔図書〕（計　０件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計　０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

４．研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：東田　陽博、辻　知陽、横山　茂

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。