

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15698

研究課題名(和文) 平原ハタネズミを用いた、オキシトシンの単回・継続投与が妊娠胎児へ与える影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect on fetus, by single and continuous administration of oxytocin to pregnant mother prairie vole.

研究代表者

西森 克彦 (Nishimori, Katsuhiko)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：10164609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：動物の”社会行動、向社会性”を担う神経修飾因子として注目されるオキシトシン(OXT)は、社会性低下を特徴とするASD(自閉症スペクトラム障害)の治療薬として期待されている。一方でOXTは以前より分娩誘発・促進剤として産科領域で広く用いられてきたが、最近外来OXTの胎児への暴露が自閉症発症のリスク因子となる可能性を示す疫学調査が報告され、マウスを用いた動物実験で外来OXTの胎児への影響を検討した。妊娠後期での高濃度OXT投与は胎児脳での虚血と幾つかの脳領域での細胞死を誘導している可能性を示したが、産仔の社会行動等に異常は見られなかった。引き続き妊娠期OXTの胎児への影響を精査する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Oxytocin (OXT) is neuromodulator controlling social and prosocial behaviors in animals, and expected as a new drug curing patients of Autistic Spectrum Disorders (ASD). Impaired social behaviors are also known as a core symptom of ASD patients. On the other hand, OXT has been widely used as labor-inducing drug in the area of gynecology. However, recent epidemiological studies reported that exposure of fetus to exogenously administrated OXT might be a risk factor to induce ASD. We studied the effect of exogenously administrated OXT on fetus, and it might induce brain ischemia during induced labor led to cell death in several nuclei, which were implicated as impaired nuclei in mental disorders, however we haven't found any abnormal social behavior with pups after birth. We continuously need to assess the safety of administrated OXT on pups until their adulthood.

研究分野：行動神経内分泌学、分子神経生理学、分子生物学

キーワード：誘発分娩 自閉症スペクトラム障害 平原ハタネズミ CRISPR/Cas9 浸透圧ポンプ ペア形成行動

1. 研究開始当初の背景

下垂体後葉性ホルモンのオキシトシン(OXT)は、子宮収縮作用や射乳作用に関して良く知られた生体由来物質であり、特にほ乳類での乳汁射出作用と分娩誘起作用についての研究が進み、産婦人科学領域では以前より陣痛発来促進剤としての応用が進んでいた(peripheral oxytocin)。

一方、近年のオキシトシンに関する研究により、脳中枢に於いて、OXTと受容体よりなる系(OXT・受容体系)が持つ脳内作用として、動物の行動制御作用、特に社会行動の制御作用について研究が進んだ結果、OXT・受容体系は我々ヒトなど社会的な動物に於いて、社会記憶(個体識別能)や母性行動、そして共感性行動など複数個体からなる社会性動物の個体個体間の結びつきを制御する、重要な役割を持つことが明らかとなってきた。1990年代には極めて近縁のバソプレッシン(AVP)と併せ、北米産平原ハタネズミの示す(動物として希な)一夫一妻制のペア形成行動を制御する脳内システムに於いてオキシトシンを始め、バソプレッシンも含めてこれらが彼らのペア形成維持の主要な制御因子として働く事が明らかとなり、注目を浴びることとなった(central oxytocin)。その後の神経分子生理学や、様々な遺伝子変異マウス作成を可能とする分子遺伝学の発展と共にオキシトシンに関する研究も拡大発展し、OXTは動物の”社会行動”(同種個体間の相互行動、母性行動やペア行動などがある)、或いは”向社会性”(他個体の生存の可能性を高める様な社会行動)を担う神経修飾因子としてその生物学的な位置づけが確定していった。しかし研究の進展と共に、オキシトシンやオキシトシン受容体の異常と疾病との関係に注目が集まることとなった。即ち社会性の低下をその主要な症状の一つとして示す自閉症(自閉症スペクトラム障害; ASD、人口の約1%が罹患しているとされ、社会的コストは無視し得ない)と、ヒトOXTTRの遺伝的異常との密接な関連を示す論文が多数報告されるに至り、OXT・受容体系への興味は、純粋生物学的なものから多くの罹患人口を抱えるASD、ヒト疾患の理解と治療へ向けた医・薬学的応用研究分野へ拡大し始めた。

精神医学領域での研究の進展に伴いOXTは自閉症治療薬として有力視され臨床研究が進

み、その臨床治験が開始されるなど、実用化目前の状態に至っている。一方で、分娩時の短期投与のみがオキシトシンの臨床応用例であったこれまでの状況から、ASD患者へのオキシトシンの長期投与が予想されるに至り、OXTの安全性の再確認は重要な課題となっている。

一方、前述の様に産科領域では、分娩誘発・促進を目的とし、OXTが広く用いられて来たが、最近胎児期の高濃度外来OXTへの暴露が自閉症発症のリスク因子となる可能性が疑われ、その疑いを高める結果も、米国での追跡調査研究より論文報告されるに至っている。OXT投与による誘発分娩は、一方で新生児死亡率を低下させ、又母胎の安全を脅かす可能性のある帝王切開を減少させることから、従来よりオキシトシンは産科領域では最も重要かつ頻用される医薬として位置付けられており、オキシトシン投与によるASD症誘導の可能性の真偽は産科領域にとっても、ひいては我々国民にとっても極めて重要な課題となっていた。

2. 研究の目的

米国で行われた幾つかの産科学領域での臨床例追跡調査により、分娩誘発・促進を目的としたオキシトシン(OXT)の妊婦への投与が、出産児に自閉症(ASD、自閉症スペクトラム障害)を発症するリスク因子となる可能性が米国研究グループより報告された(Wahl RUR, Med Hypotheses, **63**: 456-60 (2004); Gregory SG, et al, JAMA Pediatr, **167**: 959-66 (2013); Vintzileos AM, et al, Am J Obstet Gynecol, など)。これらに依れば出産総数当たりの発生率は必ずしも高くはないが、OXTを用いた誘発分娩の場合、自然分娩に比べ1/400程、ASD発症のリスクが増大する(男児の場合; Weisman, O., et al., (2015). *Behavioural Brain Research*, 284, 207-212より)との疫学dataなどが報告されるなど、出産時のOXT使用と、出産後の子の生育に伴うASD発症率の間に有意な相関性が認められたとの報告がある。一方で、精神医学領域での研究から自閉症や統合失調症など他の精神疾患の治療薬として、OXTに期待が集まっている。この一見paradoxicalな、自閉症薬としてのOXTと、分娩誘発の為の分娩時母体へのOXT投与が胎児へ与えた影響とASD発症との関係に関する解析は、OXTが持つ生物学的な脳内生理機能を知

ると共に、産科医学領域、小児科医学領域、精神医学領域にとってもヒトへのOXT投与の安全性を知る上でも重要な課題である。今後、依り多くの出産dataの疫学的解析と共に、動物実験による検証が重要であり、本研究ではまず、妊娠時マウスを用い、妊娠後期にOXTを継続的に投与した場合の、出産後の産仔の社会性について異常の有無を解析し、また、脳での解剖学的な異常の有無を調べ、自閉症の特徴である社会性の低下や自閉症発症と関連して起きることが報告されている様々な脳神経系の異常を調べる。さらに、社会性の異常症状を鋭敏に検出できる新たなモデル動物として、高い社会性を持つ事が知られる実験動物の平原ハタネズミを利用し、同様事件を進め、母体へのOXTの投与等が胎仔脳と、その出産後の社会性に与える影響を明らかにし、精神科領域や、産科領域での今後のOXTの臨床利用につき、その安全性に関する情報を得る事を目的とする。

3. 研究の方法

<実験方法>

1-a. 妊娠野生型雌マウスへの、胎児への急性症状が出ない条件でのOXTの単回投与が、出産成長後の産子の社会行動へ与える影響の評価・解析

妊娠マウスの分娩時に、浸透圧ポンプを用いて高濃度のOXTを持続的に投与し、出生後のマウスの各種社会行動の異常を検討した。

予め行っていた条件検討実験では、高濃度のOXT(6µg/day)を妊娠母マウスに浸透圧ポンプを用いて連続的に投与すると、子宮筋の収縮による締め付けによると推定される効果により、胎児脳内に虚血が誘導された可能性が示されており、この脳虚血障害も含め、各OXT単位投与後の、出産後の仔マウス生存率、並びに、妊娠母にオキシトシンを連続投与した場合の、仔マウスの出生成長後の社会行動の異常、鬱や不安症状の有無について解析を行った。オキシトシン投与条件は、周産期の母子へのOXT投与の副作用を明確にする為、妊娠後期、E15-18期に、オスモティックポンプを埋め込み、3IU、又は6IU/day程度のOXTを母体に対し継続投与した。

社会行動解析では、社会記憶を検定するthree chamber arena法による行動解析を行った。また、反復行動・強迫行動を検定するMarble buryy試験、超音波発声解析、共感性行動等を解析した。

また、出生後の仔マウス脳でのOXTR遺伝子のメチル化レベルについて、共同研究者であるLouisiana州立大学のTeruyama, R博士、Kim, J博士との共同研究で、転写因子と考えられるPeg3のoxytocin受容体遺伝子中の結合サイトにおけるメチル化状態の変動についての検討を依頼し、過度のoxytocin刺激が胎児脳内のOXTR遺伝子制御領域でのエピジェネティック修飾状態を変動させる可能性について検討(メチル化解析)を行った。マウス母体と仔への過剰な外来性OXT投与による暴露が発生期の胎児マウス、出生後の仔マウス、及びマウス母胎に与える影響を評価した。

1-b. 妊娠野生型雌平原ハタネズミへの、胎児への急性症状が出ない条件でのOXTの慢性(長期)投与が、出産成長後の産子の社会行動へ与える影響の評価・解析

<平原ハタネズミの行動解析系の開発・整備>

マウス実験と同様に、妊娠平原ハタネズミの分娩時に、浸透圧ポンプを用いて高濃度のOXTを持続的に投与し、出生後の平原ハタネズミの各種社会行動の異常の検討を試みることにし、それに先立ち、生まれてきた投与オキシトシン暴露仔ハタネズミの行動解析のための各種行動解析系の整備を行った。

平原ハタネズミでの行動解析系については、マウスの場合に準拠し、three chamber arena法による社会記憶テスト、成獣への成長後、体内で高濃度オキシトシンに暴露させた平原ハタネズミ雄のalloparental行動(継子養育行動)、超音波発声に関する解析、共感性解析などの各種行動解析方法の整備を行った。

これらの行動解析系の樹立の後、マウスの場合と同様に、妊娠平原ハタネズミに各OXT単位を浸透圧ポンプ埋め込みにより連続的に投与し、出産後の仔平原ハタネズミの生存率、並びに、妊娠期連続投与オキシトシンに暴露した仔平原ハタネズミの出生成長後の社会行動の異常、鬱や不安症状の有無について解析を行った。

妊娠平原ハタネズミへのオキシトシン等については、マウスでの条件と同様に、妊娠後期、E15-18期に、オスモティックポンプを埋め込み、3IU、又は6IU/day程度のOXTを母体に対し継続投与した。

<行動解析実験プロトコール>

共感性解析法

雄雌で同一ケージにて飼育しているマウスの又はペア形成している雄雌平原ハタネズミの雌を雄より引き離し(24min.)、この期間中に雌(被ダメージ個体)にブザー音発生時に同時にfootshock(電撃)を与えた。footshock処理中、ペアの雄はホームケージ内に隔離し、音とfootshockは与えない。分離期間後、雄雌は再度同一ホームケージに戻し、その後マウスについては臭いかぎ行動(sniffing)を、また平原ハタネズミについては慰め行動(grooming)時間について、1分ごとの慰め・臭い鍵行動時間を計10分間について記録した。

three chamber arena法による社会記憶測定

Three Chamber Arena Testは41 x 21 x 35 cmの、不透明な白色プラスチック製の計測箱で行った。長さ41cmの最大長部分は均等な2枚の、マウス(又は平原ハタネズミ)がくぐれる小さな穴を穿った白色不透明プラスチック板で第1、第2、第3室の3カ所に区切られており、LEDランプ(平均10 lux)で照明した。雄マウス(又は雄平原ハタネズミ)は1週以上同腹子(兄弟)から離して飼育し、テストの日テストケージ内で10min間、他個体と離して順化させた。その後、新規の、これまで披検個体と接触の無かった雄マウス(又は雄平原ハタネズミ)を網で出来た小型カップに入れ、第3室の端に置いた。その後、披検雄マウス(または雄平原ハタネズミ)は10分間自由行動させ、社会性試験とした。

社会性試験の後、新規の雄マウス(または雄平原ハタネズミ)を網で出来た小型カップに入れたものを第1室の端に置き、披検雄マウス(または雄平原ハタネズミ)には10分間自由行動をさせ、第1室と第3室のどちらに興味を示すか計測した(社会的新規性試験)。これらの試験結果はビデオで撮影し、それぞれの小型カップから5cm以内に近接したとき、新規、又は既知個体に興味を示したと設定してANY-mazeソフトウェアで解析した。

ペア形成行動(平原ハタネズミのみ)

3チャンバーに別れた大型ケージ(右室、中室、左室)を用い、各室(20 x 20 x 20cm)は、ハタネズミがくぐれる程度のパイプ(4-5cm、長さ10cm程度)にて連絡、ペア形成した雄平原ハタネズミと雌平原ハタネズミのうち、雌は右室最右端の壁に、小型結束バンドを用いて固定した。新規の雌平原ハタネズミは左室左端に小型結束バンドで固定した。ここへ、ペアの雄(被験個体)を投入し、20分間に右室、中室、左室それぞれ

に滞在した時間を計測した。

4. 研究成果

4-1. 妊娠マウスモデルを用いた誘発分娩実験

後期妊娠マウスへの浸透圧ポンプを用いた継続的なオキシトシン投与による産仔への影響を調べる実験に於いて、脳組織の病理学的な解析から、特に雄出産仔脳に於いて、出産時に誘導されたとみられる虚血の跡と細胞死が、特に前頭前野、手綱核、脳室周辺帯などの、精神疾患に起きて障害されているケースが報告される領域で観察された。

またオキシトシン誘導性の誘発分娩による脳虚血により、Olig2(グリア細胞、希突起膠細胞(oligodendrocyte)のマーカートンパク)を発現している細胞が選択的にダメージを受けている可能性を見いだした。オキシトシン投与による誘発分娩は、周産期に希突起膠細胞選択的な障害と、P5前後に於いては、この障害を相補するようなOlig2-陽性細胞(希突起膠細胞)の増殖をもたらしている可能性も見いだされた。

一方、遺伝子発現解析実験の結果は、オキシトシン投与による誘発分娩産仔の脳に於

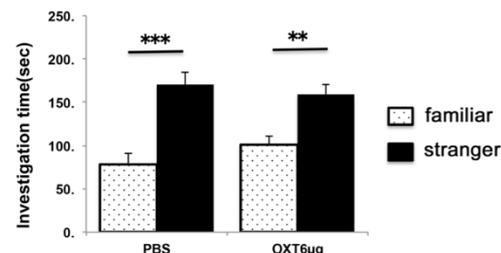


Fig.1 オキシトシン投与誘発分娩モデル産仔の成長後の社会記憶(Three Chamber Arena Test)

いて、オキシトシンやその受容体の有意な発現増加は見いだされなかった事を示した。これらの結果は、誘発分娩時に観察される脳内の細胞死が、OXT・受容体を介して起きているのではなく、虚血そのものにより誘導されている可能性を示している。これら、マウスモデルを用いての実験結果は、ヒト誘発分娩に関して得られている疫学的なdata、即ちオキシトシン投与による誘発分娩がASDやBP(bipolar disorder)の発症要因の一部を占めている可能性を部分的には説明することは可能である。しかし、こ

これらの条件で出生した産仔の USV(超音波発声; Ultrasonic vocalization)や、成獣への成長後に行われた社会記憶試験(Fig.1)、同じく当研究室で最近確立された共感性行動試験に於いては、何らの行動異常も検出されず、出生直後に確認された軽度な脳虚血とそれに伴うグリア細胞の異常は、マウスでは速やかに修復されるか、少なくとも社会行動の異常を伴うレベルまでの障害とはなり得ない可能性が示唆された。

また、Louisiana 州立大学の Teruyama, R 博士、Kim, J 博士との共同研究で、エピジェネティックな遺伝子の修飾に付随する転写因子と考えられる Peg3 が、oxytocin 受容体遺伝子中に結合サイトを持つ可能性、脳の一部でこの領域が母由来か、父由来かで異なったメチル化修飾を受ける可能性が見いだされた(PLoS One 投稿中)。胎児期に外来の高濃度オキシトシンに暴露した場合の、この領域のメチル化の変動については、現在試料を米国に送って解析中である。

4-2. 妊娠平原ハタネズミを用いた誘発分娩実験

この実験は、本来高度に社会的な平原ハタネズミにおいては、社会性異常を誘導する処置(薬剤誘導や遺伝子障害の導入など)を行った場合に、マウスに比べより高感度に障害を誘発する可能性を探るものである。

当研究室では、平原ハタネズミを用いた種々の社会行動(社会記憶など)や向社会行動の測定法について、確立していなかったため、まずその測定法の樹立を試みた。

又、その際の社会性異常が検出されることが期待される陽性コントロールとして、当研究室で新たに開発された oxytocin 受容体遺伝子 KO 平原ハタネズミを用いることとした。Oxytocin 受容体遺伝子欠損は、マウスに於いて、母性行動や社会記憶、仔マウスの USV (Ultrasonic vocalization) など様々な社会性障害やコミュニケーション障害を誘導する、ASD の病態モデル動物の一つであることが知られている。高度に社会的な平原ハタネズミにおいては、これらの測定により、より容易に様々な異常が観察されることが期待された。

実験の結果、oxytocin 受容体遺伝子 KO 平原ハタネズミに於いては、マウスと同様の

社会記憶能 (social novelty) 異常が検出され、またマウスでも測定は出来るものの、弱い共感性行動の異常に比べ、より容易に共感性行動異常が検出できることも初めて見いだされた。この発見は、今後例えば共感性の異常を妊娠時外来オキシトシンへ暴露した産仔などの社会行動異常解析に用いることで、より鋭敏にこのような薬剤暴露による胎児で誘導された異常を検出できる可能性が示され、様々な医薬やその他環境を汚染する可能性の或化学物質の精神機能への影響を調べるより鋭敏な系としての、平原ハタネズミの潜在的能力を示すこととなった。

一方、マウスの ASD モデルの一つである oxytocin 受容体遺伝子欠損マウス P7 仔マウスで検出されている USV の異常は検出できず、マウスに比べ平原ハタネズミの社会性が単に高いだけではなく、一部質的にマウスとは異なる可能性も示唆された。

野生型平原ハタネズミと oxytocin 受容体遺伝子欠損平原ハタネズミを比較しながら社会行動の測定法を樹立する事に当該挑戦的萌芽研究期間の大半を費やしてしまった結果、野生型妊娠平原ハタネズミの妊娠後期にオキシトシンを連続投与し、その産仔の行動測定を十分な検体数まで行うことや、同処理平原ハタネズミ産仔の脳内の異常の観察実験は、現在も継続中であり、本報告には含めない。

< 終わりに >

本研究は、産科領域で安全な分娩を行うために重要な薬剤であるオキシトシンの、産後の子どもに与える影響を知り、その安全性について確認すると共に、もし何らかの副作用が起きる可能性が見いだされた場合、これを有効に避けつつ安全な誘発分娩を達成するための貴重な資料として役立つものと確信する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1) Takayanagi Y, Yoshida M, Takashima A, Takanami K, Yoshida S, Nishimori K, Nishijima I, Sakamoto H, Yamagata T and Onaka T “Activation of supraoptic

oxytocin neurons by secretin facilitates social recognition.” *Biol Psychiatry* **81**(3): pp.243- 251 (2017)

2) Okabe,S., Tsuneoka,Y., Takahashi,A., Ooyama,R., Watarai,A., Maeda,S., Honda,Y., Nagasawa, N., Mogi,K., Nishimori,K., Kuroda,M., Koide,T., Kikusui,T., “Pup exposure facilitates retrieving behavior via the oxytocin neural system in female mice” *Psychoneuroendocrinology* **79**: pp. 20-30 (2017)

3) Ripamonti,S., Ambrozkiewicz,M.C., Guzzi,F., Gravati,M., Biella,G., Bormuth,L., Hammer,M., Tuffy,L.P., Sigler,A., Kawabe,H., Nishimori,K., Toselli,M., Brose,N., Parenti,M., Rhee,J., “Transient oxytocin signaling primes the development and function of excitatory hippocampal neurons” *Elife*

4) Lin, Y.-T., Chen, C.-C., Huang, C.-C., Nishimori, K., & Hsu, K.-S.. “Oxytocin stimulates hippocampal neurogenesis via oxytocin receptor expressed in CA3 pyramidal neurons.” *Nature Communications*, **8** (1), 537 (1-16) (2017)

総説・解説

1) 西森克彦「自閉スペクトラム症(ASD)研究の動向 “oxytocin・受容体系の向社会性制御に関する脳内機構と、自閉症モデルマウスへのオキシトシン投与による治療メカニズム解析”」 *分子精神医学* **17**, No.4, 242-253 (2017)s

〔学会発表〕(計4件)

(1) 矢田紗織、堀江謙吾、西森克彦 “オキシトシンによる共感性行動の神経制御機構解析-平原ハタネズミとマウスの比較解析”、第40回日本神経科学大会、日本、7-21, 2017

(2) 矢田紗織、堀江謙吾、日出間志寿、西森克彦、 “オキシトシンが制御する共感性の神経回路の解明” 日本動物行動関連学会・研究会合同大会(行動2017)、日本、9-1/2017

(3) 矢田紗織、堀江謙吾、日出間志寿、西森克彦、 “Analysis of empathic neural circuit regulated by oxytocin”、第9回光操作研究会、日本、10-22/2017

(4) Saori Yada, Kengo Horie, Shizu Hidema, Katsuhiko Nishimori, “Analysis of empathic neural circuit regulated by oxytocin.”、北米神経科学会、USA、11-13/2017

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.biochem.tohoku.ac.jp//bunsi/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西森 克彦 (NISHIMORI, Katsuhiko)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：10164609

(2) 研究分担者

竹田 省 (TAKEDA, Satoru)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：20143456

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

日出間 志寿 (HIDEMA, Shizu)
矢田 紗織 (YADA, Saori)
平山 貴士 (HIRAYAMA, Takashi)