

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12361

研究課題名(和文) 発達期に大気汚染物質曝露されたラットの自閉症様行動と神経炎症反応の関連性

研究課題名(英文) Relationship between autistic behavior and neuroinflammatory response in rats exposed to air pollutants during the developmental period

研究代表者

Tin・Tin Win・Shwe (Win-Shwe, Tin-Tin)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・主幹研究員

研究者番号：00391128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ディーゼル排気ガス二次生成有機エアロゾル(DE-SOA)を大気汚染物質のモデルとして、自閉症のような社会的支配行動および神経免疫応答について検討した。妊娠12.5日目のSprague-Dawleyラットに、バルプロ酸(VPA)を投与し、社会行動の障害を確認した。胎児期・乳児期にDE-SOA曝露された成体ラットでは、社会行動の障害と関連する遺伝子発現の変化が得られた。さらに、ラットの前頭前野における肥満細胞数、活性化されたミクログリア細胞数などがDE-SOA群で優位に増加した。私たちの研究結果は、神経免疫クロストークが自閉症様行動において重要な役割を果たす可能性があることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症は神経発達障害であり、正確な病因と病態生理は不明である。発達期の大気汚染物質曝露と自閉症の関連性があることを示している。ヒトの研究では、妊娠中の大気汚染粒子状物質の曝露は、子供におけるASDと関連していることが報告された。本研究では、ディーゼル排気ガス二次生成有機エアロゾルを大気汚染物質のモデルとして発達期に曝露を行い、自閉症様社会行動および神経免疫応答に関するバイオマーカー、肥満細胞やミクログリアの活性化について検討した。その結果、神経免疫クロストークが重要な役割を果たすことが明らかになった。自閉症の病態生理学的メカニズムを理解することは、環境管理と臨床応用に役立つことである。

研究成果の概要(英文)：Using diesel exhaust secondary organic aerosols (DE-SOA) as a model for air pollutants, we investigated autism-like behaviors and neuroimmune responses in rats exposed to DE-SOA during developmental period. Valproic acid (VPA) was administered to Sprague-Dawley pregnant rats on the 12.5th day of gestation, and impaired social behavior occurred in ASD was confirmed. In both adult male and female rats exposed to DE-SOA during fetal and infancy, changes in gene expression associated with impaired social behavior were obtained. Furthermore, the number of mast cells and activated microglial cells in the prefrontal cortex of rats increased significantly in the DE-SOA group. Our findings suggest that neuroimmune crosstalk may play an important role in autism-like behavior.

研究分野：神経毒性学

キーワード：神経毒性 環境化学物質 発達期 ディーゼル排気ガス二次生成有機エアロゾル ラット

## 1. 研究開始当初の背景

大気汚染は依然として大きな問題であり、健康に継続的なリスクをもたらす。ここ数十年で、多くの疫学研究は、発達期の大気汚染物質への曝露と Autism spectrum disorder (ASD) の発生との間に関連性があることを示している。ヒトの研究では、妊娠中の大気汚染粒子状物質 (PM<sub>2.5</sub>) への母親の曝露は、子供における ASD のより大きなリスクと関連していることが報告された (Kalkbrenner et al., 2015; Raz et al., 2015)。PM<sub>2.5</sub> への胎児期および乳児期の両方の曝露が ASD のリスク増加と関連している可能性があることも報告された (Talbot et al., 2015)。動物実験では、出生後早期に大気汚染物質に曝露されたマウスが ASD の特徴を表した (Allen et al., 2014, 2017)。また、ディーゼル排気 (DE) は PM<sub>2.5</sub> の主な発生源であるとされているが、我々はこれまでに、成体マウスの脳神経伝達物質、炎症性バイオマーカーおよび学習能力に対するナノ粒子に富むディーゼル排気曝露の影響を示した (Win-Shwe et al., 2007, 2008, 2009, 2011b, 2011c, 2011f)。その後、ディーゼル排気粒子にオゾンを追加してディーゼル排気由来の二次有機エアロゾル (DE-SOA) を生成した SOA 吸入チャンバーを設置した。これを使用して、3 か月の SOA 曝露が成体の雄のマウスで学習と記憶障害を引き起こし、1 か月の SOA 曝露が雌マウスで母性行動の変化を引き起こす可能性があることを示した (Win-Shwe et al., 2014)。次に、環境汚染物質による学習障害を早期に検出するための新生児動物モデルを確立し、DE-SOA が離乳前のマウスの嗅覚に基づく空間学習活動を損なうことを報告した (Win-Shwe et al., *Nanomaterials*, 2015; 5(3):1147-1162, Kakenhi C, 25340066)。その研究では、学習障害が N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体、シグナル伝達経路遺伝子 CaMKII、および海馬の炎症マーカーの調節に関連していることも示した。次のステップでは、*Fmr1* および *Nlgn3* KO ラットと valproic acid (VPA) 誘発自閉症モデルラットの形態学的変化を評価するための非侵襲的手法として MRI 検査を確立しようとした (Win-Shwe et al., *J. Toxicol. Sci.*, 2018; 43(11):631-643, Kakenhi C, 16K00577)。これらの 2 つの研究により、発達期に大気汚染物質に曝露されたラットの自閉症用行動と神経免疫応答を調べられるようになった。調節不全の免疫系、シナプス形成神経成長因子、およびそれらのシグナル伝達経路の相互作用も、ASD 表現型の発達に寄与する (Ohja et al., 2017)。我々は、発達期の大気汚染物質への曝露が ASD の潜在的な原因であり、神経炎症が大気汚染物質と ASD のような異常を結びつけるメカニズムとして役立つ可能性があるかと仮定した。したがって、本研究では、ラットモデルの DE-SOA への発達期曝露における神経免疫応答の主要なプレーヤーである肥満細胞とミクログリアの役割を調べることを目指した。

## 2. 研究の目的

この研究では、ディーゼル排気ガス (DE) 二次生成有機エアロゾル (DE-SOA) を大気汚染物質のモデルとして使用し、自閉症のような社会的支配行動および神経学的および免疫学的を含む神経免疫応答に関するラットにおけるバイオマーカー、肥満細胞およびミクログリアの活性化について検討することを目指した。自閉症と病態生理学的メカニズムへの環境の貢献を理解することは、環境管理と臨床応用に役立つと考えた。

### 3. 研究の方法

#### (a) 2019 年度：自閉症モデルラットの確立と行動テストバッテリーの分析

まず、妊娠 12.5 日の Sprague Dawley ラットにバルプロ酸 (VPA) を腹腔内注射し、自閉症ラットモデルを確立した。次に、発達期に VPA 投与した主有ラットを対象に、3 チャンバーの社会行動テスト、チューブテスト、ガラス玉覆い隠しテストを含む行動テストバッテリーを実行した。さらに、行動テスト終了 24 時間後に、深麻酔下で脱血後脳を採取し、前頭前野における社会行動と関連する遺伝子、炎症性サイトカインおよび酸化ストレスマーカー等の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で調べた。

#### (b) 2020 年度：発達期に DE-SOA に曝露されたラットの神経学的および免疫学的バイオマーカーの測定

妊娠 8 日の Sprague Dawley ラット (n=24) を購入し、妊娠 14 日目から出生後 21 日目まで全身吸入曝露チャンバーを用いて、清浄空気群 (Control, n=8)、ディーゼル排気ガス群 (DEP, n=8)、DEP にオゾンを加えた DE-SOA 群 (n=8) の曝露 (5 時間/日、5 日/週) を行った。出生後 11~13 週齢の雄ラット (名群 8 匹) の社会行動を観察した。曝露後のラットの社会行動については社交性テスト (Sociability test), 社会的新奇性優先度テスト (Social novelty preference test) 等についてラット用ソーシャビリティテストシステムを用いて調べた。行動テスト終了 24 時間後に、深麻酔下で脱血後脳を採取し、前頭前野における社会行動と関連する遺伝子、炎症性サイトカインおよび酸化ストレスマーカー等の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で調べた。

#### (c) 2021 年度：発達期に DE-SOA に曝露されたラットにおける神経免疫相互作用の調査

Sprague-Dawley (SD) ラット (n=18) を、本研究所の全身曝露チャンバーで妊娠 14 日から出生後 21 日まで、清浄な空気、DE および DE-SOA に曝露した。11~13 週齢の時、組織学と免疫細胞化学を用いて、肥満細胞やミクログリアの活性化などの神経免疫応答に対する発達期の DE-SOA 曝露の影響を調査した。

### 4. 研究成果

#### 実験 (1) 2019 年度

妊娠 12.5 日目の Sprague-Dawley (SD) ラットに、腹腔内注射により 600 mg/kg のバルプロ酸 (VPA) を投与した。VPA 誘発自閉症の 11~13 週齢の雌雄のラットモデルは、対照 SD ラットと比べ、社会性の障害と社会的新規性の好みの障害を示した(図 1)。VPA に曝露された雌雄のラットの前頭前野におけるセロトニン受容体、神経栄養因子、ニューロリギン 3 などの社会的行動関連遺伝子の mRNA 発現が優位に減少し、インターロイキン-1 $\beta$  や腫瘍壊死因子- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの mRNA 発現が優位に上昇することが明らかになった。免疫染色の方法でミクログリアマーカーである Iba1 の発現を調べたところ VPA 誘導自閉症モデル雄ラットの海馬で Iba1 の発現増加が認められた。

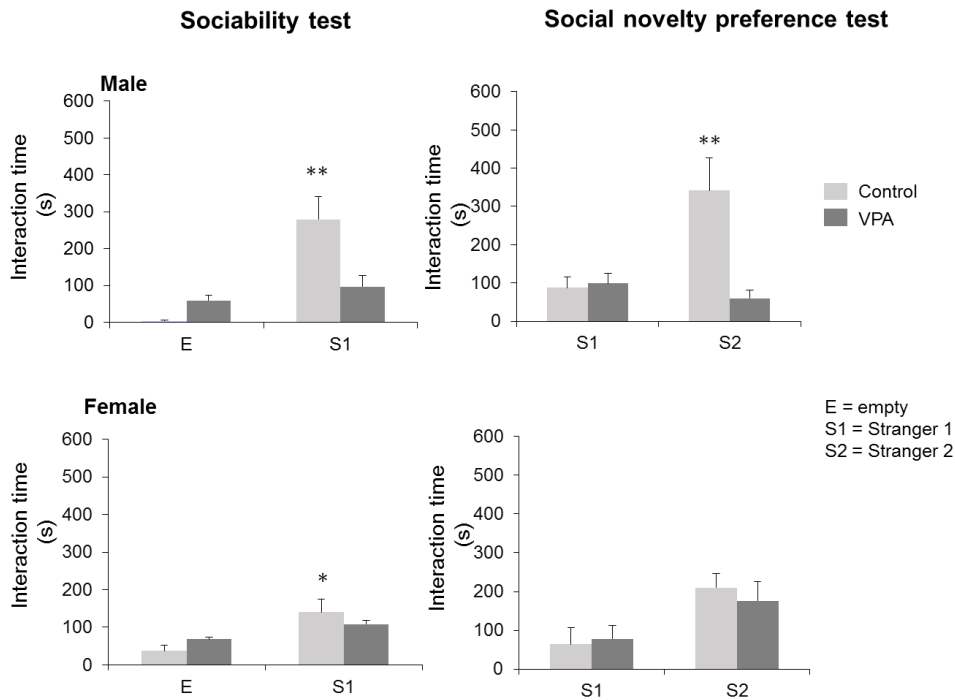


図 1. VPA 誘導自閉症モデルラットにおける社会行動:社交性テストと社会的な新奇性優先度テストの結果 (N = 16, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs. corresponding control)。

#### 実験 (2) 2020 年度

社会行動への影響では、胎児期・乳児期に DE-SOA 曝露された成体ラットでは、社交性テスト (Sociability test) で、対照群と比べ Stranger(1)ラットのカップの探査時間が有意に短かった。社会的な新奇性優先度テスト (Social novelty preference test) では、対照群で Stranger(2)ラットのカップに探査時間が長く、逆に、DE-SOA 曝露された群では、Stranger(1)ラットのカップの探査時間が有意に短かった。社会的相互作用テスト (Social interaction test) では、対照群は他の群と比べ、社会的な相互作用の時間が有意に長かったことが認められた。さらに、発達期に DE-SOA に曝露された雌雄のラットの前頭前野におけるセロトニン受容体(5HT5B)、神経栄養因子(BDNF)、ニューロロギン 3(Nlgn3)などの社会的行動関連遺伝子の mRNA 発現が優位に減少し、インターロイキン-(IL)1 $\beta$ や腫瘍壊死因子-(TNF) $\alpha$ 、酸化ストレスマーカーヘムオキシゲナーゼ(HO)1 などの、炎症性サイトカインの mRNA 発現が優位に上昇することが明らかになった (図 2)。発達期 DE-SOA 曝露された雌雄ラットに VPA 誘導自閉症モデルラットと同じ社会性の障害と社会的な新奇性の好みの障害や社会的行動関連遺伝子 mRNA 発現の変化が得られた。

#### 実験 (3) 2021 年度

発達期に DE-SOA に曝露された雌雄のラットの前頭前野における肥満細胞やミクログリアの活性化などの神経免疫反応について組織学と免疫細胞化学方法で調べた。ラットの前頭前野における肥満細胞をトルイジンブルーで染色して検討した結果、肥満細胞数、または、活性化されたミクログリア細胞数などが DE-SOA 群で優位に増加したことが明らかになった (図 3)。DE-SOA の成分の中で、有機炭素は神経毒性を誘発することが考えられる。我々の研究は、発達期 SOA 曝露がラットの前頭前野における神経免疫バイオマーカーを介して神経毒性を誘導し、社会的な優位行動に影響を与える可能性があることを示唆している。

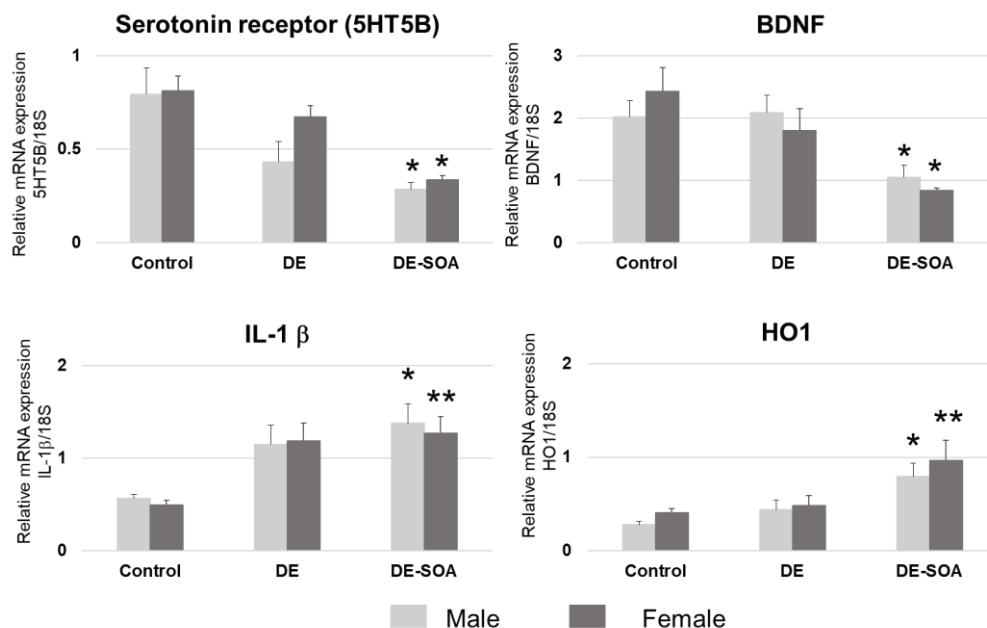


図 2. 発達期 DE-SOA 曝露されたラットの前頭前野における、社会行動と関連する遺伝子、炎症性サイトカインおよび酸化ストレスマーカーなどの mRNA 発現の結果 (N = 16, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs. corresponding control)。

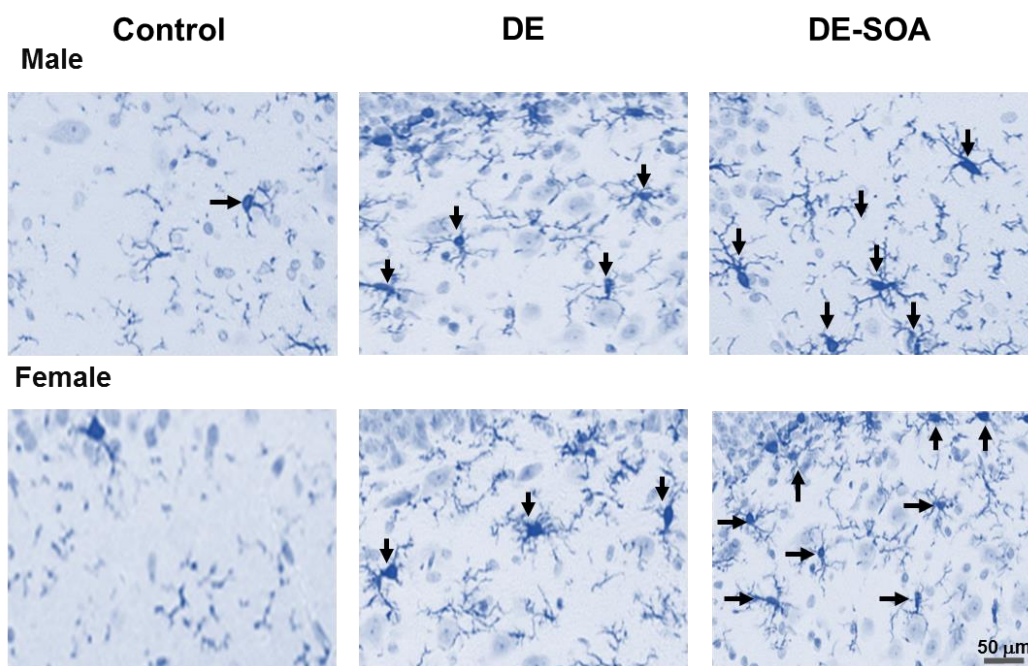


図 3. 発達期 DE-SOA 曝露されたラットの前頭前野におけるミクログリアマーカーIba1 免疫反応性。黒矢印は、活性化されたミクログリアを示す。

肥満細胞とミクログリアは脳の主要な免疫細胞として果たしている。化学物質による発達期曝露に脳免疫細胞が活性化され、その活性化された脳免疫細胞は、サイトカイン、神経成長因子、およびいくつかの毒性物質などのメディエーターを放出する。脳内免疫細胞は、これらのメディエーターを介してニューロンや星状細胞と通信し、神経炎症や神経行動障害を引き起こすことが考えられる。私たちの研究結果は、神経免疫クロストークが自閉症様行動において重要な役割を果たす可能性があることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tin-Tin Win-Shwe, Chaw Kyi Tha Thu, Yuji Fujitani, Shinji Tsukahara, Seishiro Hirano	4. 巻 22, 538
2. 論文標題 Perinatal Exposure to Diesel Exhaust-Origin Secondary	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22020538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tin-Tin Win-Shwe, Yuji Fujitani, Seishiro Hirano	4. 巻 22 (19)
2. 論文標題 Effects of diesel exhaust derived secondary organic aerosol (DE-SOA) exposure during developmental period on anxiety and depression in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Indoor Environment	6. 最初と最後の頁 23-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 1) Tin-Tin Win-Shwe, Chaw Kyi Tha Thu, Yuji Fujitani, Shinji Tsukahara, Seishiro Hirano
2. 発表標題 Effects of developmental exposure to secondary organic aerosols on immune cells and apoptosis in rat brain
3. 学会等名 the 91st Annual Meeting of the Japanese Society for Hygiene
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 4) Chaw Kyi-Tha-Thu, Tin-Tin Win-Shwe, Yuji Fujitani, Shinji Tsukahara, Seishiro Hirano
2. 発表標題 Developmental period exposure to diesel exhaust origin secondary organic aerosol induces autism-like behavior in rats
3. 学会等名 49th Myanmar Health Research Congress（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Tin-Tin Win-Shwe, Yuji Fujitani, Seishiro Hirano
2. 発表標題 Perinatal diesel exhaust originated secondary organic aerosol exposure produces autism-like behaviors in offspring rats: comparison with valproic acid autistic model
3. 学会等名 The 43rd meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Tin-Tin Win-Shwe, Yuji Fujitani, Seishiro Hirano
2. 発表標題 Developmental exposure to diesel exhaust -derived secondary organic aerosol (DE-SOA) on anxiety and depression in mice
3. 学会等名 28th Symposium on Japan Environmental Chemistry
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tin-Tin Win-Shwe, Hidehiro Watanabe
2. 発表標題 Alteration of social behavior and neuroimmune biomarkers in Fragile X mental retardation 1 knockout and valproic acid - induced autism rat models.
3. 学会等名 15th International Congress of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tin-Tin Win-Shwe, Yuji Fujitani, Seishiro Hirano
2. 発表標題 Alteration of social dominance behavior in rats after developmental exposure to secondary organic aerosol.
3. 学会等名 42nd Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tin-Tin Win-Shwe
2. 発表標題 Development of Pocket PM2.5 Sensor [Pro] for personal exposure assessment to particulate matters
3. 学会等名 90th Japanese Society for Hygiene (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------