

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08179

研究課題名(和文) 乳幼児突然死症候群モデル動物の開発と解析

研究課題名(英文) The development and analysis of sudden infant death syndrome (SIDS) model animal

研究代表者

大河原 剛 (Ohkawara, Takeshi)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20469034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳幼児突然死症候群(SIDS)は、これまで元気になっていた児が睡眠中に突然無呼吸に陥り、覚醒できずに亡くなる疾患で、その発症機序は不明である。私は、SIDSで亡くなった児の脳幹のセロトニン神経系に異常が見られたこと、SIDSで亡くなる前、児の85%以上に軽度の感染症状があったことを動物モデルで再現することで、SIDSモデルラットを作成した。私が作成したSIDSモデルラットは、疑似細菌感染24時間後の死亡率の増加が見られ、橋・延髄の遺伝子発現にも異常がある。また、リアルタイムPCRにより解析した結果、SIDSモデルラットの橋・延髄で7つのケモカインの発現量が増加していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳幼児突然死症候群(SIDS)は、元気になっていた児が睡眠中に突然無呼吸に陥り、覚醒できずに亡くなる疾患で、2021年の乳児死亡原因の第3位である。これまで多くのSIDSモデル動物が作成されたが、未だ発症機序の解明には至っていない。私が作成したSIDSモデルラットは、SIDSで亡くなった児に見られた異常(セロトニン神経系の異常、軽微な感染症状)を再現したもので、疑似細菌感染24時間後の死亡率が増加するという表現型を示す。これらのことから、当モデルラットを解析することで、SIDSの発症機序の解明が期待できる。また発症機序の解明により、予防やリスクの高い児の同定が可能になるため社会的な意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Sudden infant death syndrome (SIDS) is the sudden death during sleep of seemingly healthy infant which remains unexpected after a thorough investigation. I developed SIDS model rat based on results of epidemiological studies. My SIDS model rat at postnatal day (P) 11 showed increase of death rate after 24 hours of lipopolysaccharide (LPS) administration. In addition, SIDS model rat at P11 showed abnormalities of gene expression in pons and medulla after 4 hours of LPS administration. Moreover, I revealed that expression levels of seven cytokines are increased in SIDS model rat pons and medulla at P11 after 4 hours of LPS administration.

研究分野：乳幼児突然死症候群

キーワード：乳幼児突然死症候群 ケモカイン セロトニン神経系 胎生期のウイルス感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳幼児突然死症候群 (SIDS) は、睡眠中に突然無呼吸に陥った児が覚醒できずにそのまま亡くなる疾患で、毎年 100 名近い児がこの疾患で亡くなっている。SIDS の発症機序は不明だが、亡くなった児の脳幹のセロトニン神経系に異常が見られること¹⁾、亡くなった児の 85% 以上に亡くなる直前に感染症状が見られたことが報告されている²⁾。これらを再現することで申請者は、SIDS モデルラットの作製を行った。申請者が作製した SIDS モデルラットは、生後 11 日目に疑似細菌感染として lipopolysaccharide (LPS) を投与した 24 時間後の死亡率が有意に増加するという表現型を示した。また、発達期の SIDS モデルラットに空気または 5.9% 二酸化炭素ガスを吸気させた結果、生後 11 ~ 13 日目に 5.9% 二酸化炭素ガスを吸気させた際の呼吸能に異常があることを明らかにした。これらのことから申請者は、SIDS モデルラットの呼吸中枢のある橋・延髄に異常がある可能性を考えて、DNA マイクロアレイを用いて SIDS モデルラットの橋・延髄において発現異常を示す遺伝子が見られないか解析を行った。その結果、コントロールラットと比較して SIDS モデルラットにおいて 2 倍以上発現量が増加していたスポットが 1760 個、1/2 以下に発現量が減少したスポットが 1381 個得られた。これら発現異常を示した遺伝子の中から SIDS 発症に関与する遺伝子を同定することを目的に本研究がスタートした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が開発した SIDS モデルラットの橋・延髄から得られた遺伝子発現データをもとに、SIDS の原因遺伝子を同定し、SIDS の発症メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) Pubmedによる検索

DNA マイクロアレイで発現変化の見られた遺伝子に関して、「SIDS, 各遺伝子の Gene symbol」または「respiratory, 各遺伝子の Gene symbol」というキーワードで Pubmed 検索を行い、発現変化の見られた遺伝子の中に SIDS または呼吸機能に関係するものがないのか絞り込みを行った。

(2) リアルタイムPCR

絞り込まれた遺伝子に対する primer の設計を Primer-BLAST を用いて行った。設計した primer は、増幅効率や特異性を確認したのちに実験に用いた。LPS 投与 4 時間後の生後 11 日目ラットの橋・延髄を回収し、TRI reagent (Molecular Research Center, Inc.) に懸濁した。マニュアルに従い total RNA を抽出し、Nanodrop (Thermo Fisher SCIENTIFIC) により定量を行った。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて、cDNA の合成を行った。リアルタイム PCR は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用い、StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems) で行った。データの解析は、CT 法で行った。

(3) *in situ* Hybridization (ISH)

4% PFA in PBS で還流固定を行ったラットから脳を回収し、15, 20, 30% スクロースで置換したのち、OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン) へ包埋を行った。クライオスタットで 12 μm 厚の凍結切片を作成し、使用まで -80℃ で保存した。凍結切片は、染色当日に室温に戻したのち、ホットプレート上に置いて 37℃ で 1 時間以上乾燥させたのちに染色に用いた。切片を Proteinase K (Sigma-aldrich) で処理したのちにアセチル化を行った。ハイブリダイゼーション液にプローブを加え、65℃ で一晩、ハイブリダイゼーションを行った。切片を 0.1 x SSC, 65℃ で洗浄したのちに Anti-digoxigenin-AP Fab fragments (Sigma-aldrich) で室温 2 時間反応させた。発色は、NBT/BCIP (Sigma-aldrich) で一晩行った。切片の観察は、オリンパス顕微鏡 (BX50) で行った。

(4) ISH と免疫染色を組み合わせた 2 重染色

ISH と免疫染色を組み合わせた 2 重染色は、最初に ISH の染色を発色まで行ったのちに、3 日目から免疫染色を行った。ISH で染色した切片を PBS で洗浄したのちにクエン酸バッファー中でマイクロウェーブ処理をし、抗原の賦活化を行った。切片を 3% 過酸化水素 in PBS で処理したのちに 1 次抗体をのせて 4℃ で一晩反応させた。4 日目に ImmPRESS anti-mouse IgG (VECTOR LABORATORIES, INC.) または ImmPRESS anti-rabbit IgG (VECTOR LABORATORIES, INC.) で反応させたのち、DAB で発色を行った。染色した切片の観察は、オリンパス顕微鏡 (BX50) で行った。

(5) ラット脳幹への外来遺伝子の導入の検討

アデノ随伴ウイルス (AAV) セロタイプおよびタイターを検討するために、生後 0, 1 日目の新生仔ラットを氷中に 3 分置いて動かなくなったことを確認したのちに、NIPRO マイショット (インスリン自己注射器 30G) で側頭静脈から 5×10^{10} または 1×10^{11} GC の EGFP を発現する AAV1, AAV6, AAV9, AAVrh10 の導入を行った。生後 12 日目にブレインマトリクスを用いて、3mm 幅の脳幹の冠状断の切片を 3 枚作成し、それぞれ、未固定でそのまま蛍光顕微鏡で観察用、4% PFA で固定後スクロースで置換し、OCT コンパウンドに包埋して凍結切片作成用、ニッピパイオマッシャーで粉碎後、TRI reagent に懸濁し RNA の回収用とした。

4. 研究成果

(1) DNA マイクロアレイの結果、生後 11 日目の SIDS モデルラットの橋・延髄で 2 倍以上発現量が増加したスポットが 1760 個、1/2 以下に減少したスポットが 1381 個得られた。これらの中に SIDS 発症に関連した遺伝子が含まれていないか調べるために、マイクロアレイで発現変化の見られた遺伝子に関して、「SIDS, 各遺伝子の Gene symbol」または「respiratory, 各遺伝子の Gene symbol」というキーワードで Pubmed 検索を行った。その結果、6 個のケモカイン遺伝子を含む、27 個の遺伝子が抽出された。これら 27 個の遺伝子に関してリアルタイム PCR による検証を行った結果 (コントロール群; $n = 14$, SIDS モデル; $n = 13$)、最も P 値が低かった ($p = 0.002$) ものがケモカイン X (仮名) であった (2.87 倍増加)。ケモカイン X は、単球、好塩基球、リンパ球の遊走因子として働いているが、脳における機能はわかっていない。ケモカインの機能には冗長性があるため、ケモカイン X と似た機能をもつことが知られているケモカイン 16 個に関して、リアルタイム PCR により LPS 投与 4 時間後の橋・延髄における相対発現量を調べた (コントロール群; $n = 14$, SIDS モデル; $n = 13$)。その結果、有意に発現量が上昇したケモカインがケモカイン X を含めて 7 個あることを明らかにした (図 1)。

chemokine	相対発現量	P value
T	1.57	< 0.01
U	2.98	< 0.01
V	1.37	< 0.05
W	1.45	< 0.01
X	2.87	< 0.01
Y	1.88	< 0.05
Z	2.11	< 0.05

図 1 コントロール群の発現量を 1 とした際の相対発現量

(2) 次に申請者は、ISH により、LPS 投与 4 時間後の SIDS モデルラットの橋・延髄において、これら 7 個のケモカインの発現を調べた。その結果、ISH の染色パターンが 5 つに分類できることを明らかにした。形態的に、ミクログリア様の細胞が染色されるもの、神経細胞様の細胞が染色されるもの、血管内皮細胞様の細胞が染色されるもの、血管周囲と脳実質の細胞が染色されるもの、発現細胞の種類は推測できないが同じ染色パターンを示すものの 5 つである。更に、ISH と免疫染色を組み合わせた 2 重染色により、ケモカイン X 発現細胞はミクログリアであり、ケモカイン V 発現細胞は神経細胞であることを明らかにした (図 2)。

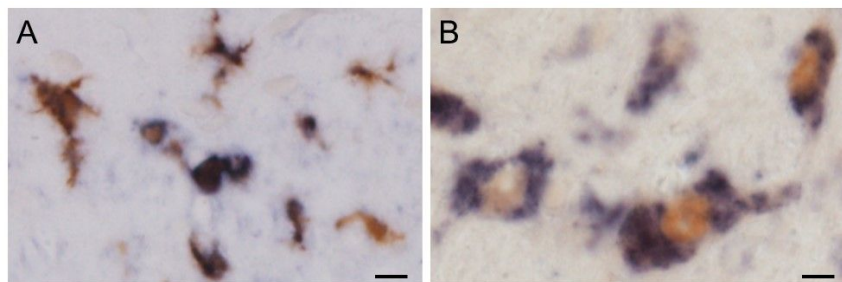


図 2 SIDSモデルラットの延髄におけるケモカインXおよびV発現細胞の同定
ケモカインXに対するプローブとミクログリアのマーカーである抗Iba1抗体を用いた2重染色 (A)。ケモカインVに対するプローブと神経細胞のマーカーである抗NeuN抗体を用いた2重染色 (B)。スケールバー: 10 μ m.

(3) 新生仔ラットの脳幹に外来遺伝子の導入を行うために AAV のタイターとセロタイプの検討を行った。生後 0 日目の Wistar ラットの側頭静脈から 5×10^{10} または 1×10^{11} GC の AAV1, AAV6, AAV9, AAVrh10 の導入を行い、生後 12 日目に脳を回収して、蛍光顕微鏡で観察を行った。その結果、 1×10^{11} GC の AAV1, AAV6 をインジェクションしたラットの延髄で強い蛍光が観察された (図 3)。またリアルタイム PCR により、延髄の EGFP の発現量を比較した結果、蛍光顕微鏡での観察結果と同様に 1×10^{11} GC の AAV1, AAV6 をインジェクションしたラットで EGFP の発現量が多いことが明らかとなった。

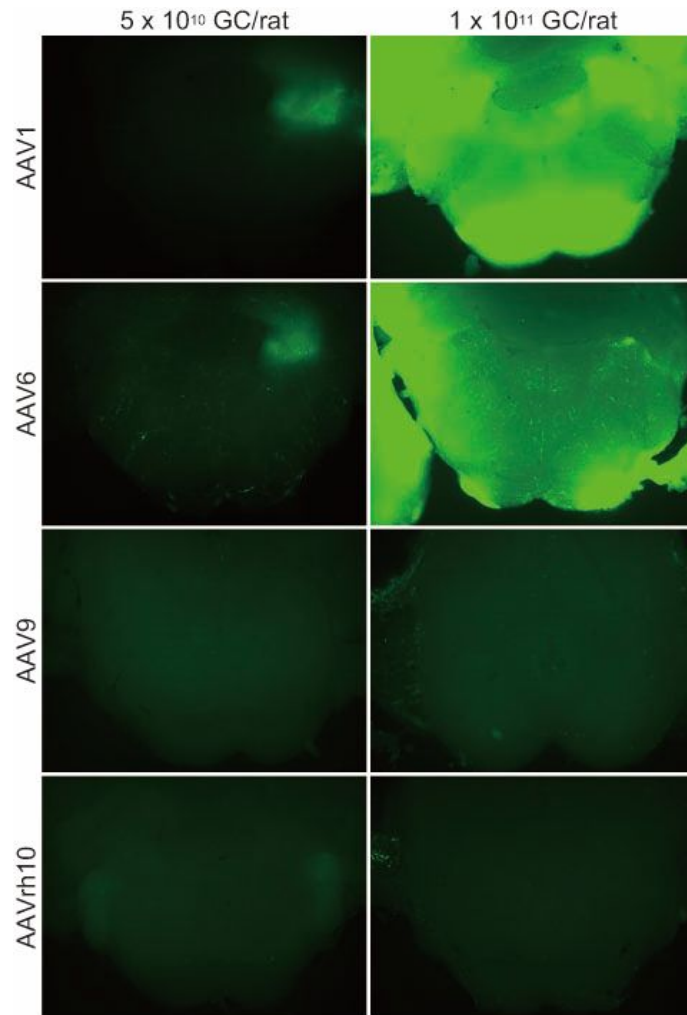


図3 生後12日目ラットの延髄におけるEGFPの発現

生後0日目のWistarラットの側頭静脈からAAVをインジェクションし、生後12日目に延髄を回収して蛍光顕微鏡で観察した。

引用文献

- 1) Duncan JR, Paterson DS, Hoffman JM, Mokler DJ, Borenstein NS, Belliveau RA, Krous HF, Haas EA, Stanley C, Nattie EE, Trachtenberg FL, Kinney HC. Brainstem serotonergic deficiency in sudden infant death syndrome. *JAMA*. 2010 303(5):430-7.
- 2) Jane Blood-Siegfried, Caroline Rambaud, Abraham Nyska, Dori R Germolec. Evidence for infection, inflammation and shock in sudden infant death: parallels between a neonatal rat model of sudden death and infants who died of sudden infant death syndrome *Innate Immun* 2008 14(3):145-52.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大河原 剛、中島 裕一、江藤 みちる、成田 正明
2. 発表標題 SIDSモデルラットの脳幹で過剰発現が見られたケモカインの発現細胞の同定
3. 学会等名 日本SIDS・乳幼児突然死予防学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大河原 剛、中島 裕一、江藤 みちる、成田 正明
2. 発表標題 乳幼児突然死症候群（SIDS）モデルラットの橋・延髄で過剰発現が見られた遺伝子の発現細胞の同定
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大河原 剛、江藤 みちる、成田 正明
2. 発表標題 乳幼児突然死症候群モデルラットの脳で過剰発現が見られたケモカインの解析
3. 学会等名 日本SIDS・乳幼児突然死予防学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大河原 剛、江藤 みちる、成田 正明
2. 発表標題 乳幼児突然死症候群モデルラットの脳で過剰発現していたケモカインの発現細胞の同定
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大河原 剛、江藤 みちる、成田 正明
2. 発表標題 SIDSモデルラットの橋・延髄で発現が増加していたケモカインとその受容体のin situ hybridizationによる解析
3. 学会等名 日本解剖学会 中部支部会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

三重大学大学院医学系研究科 発生再生医学研究分野 https://www.medic.mie-u.ac.jp/develop_regener/

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
---------	---------