

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590082

研究課題名（和文）ウイルス感染と中枢神経障害に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Investigation of the basic mechanisms for damage of central nervous system induced by virus infection

研究代表者

末丸 克矢（SUEMARU KATSUYA）

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：50363239

研究成果の概要（和文）：

本研究では、合成 2 重鎖 RNA の polyI:C を応用することにより、動物に擬似的ウイルス感染を作製することを試みた。角膜キンドリングマウスに polyI:C を投与すると、顕著な痙攣閾値の低下が認められた。その増悪は脳内ミクログリアの活性化阻害作用を有するミノサイクリンを前処置することにより抑制された。従って、キンドリングマウスに polyI:C を投与した擬似的ウイルス感染は、ウイルス感染に伴う痙攣発作などの中枢神経障害の研究に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Synthetic double-stranded RNA polyI:C elicits viral-like immune responses in mammals. In this study, we found that polyI:C treatment produced marked decrease of seizure threshold in corneally kindled mice. This exacerbation was suppressed by pretreatment with minocycline, an inhibitor of activated microglia. These results suggest that polyI:C treatment in corneal kindled mouse model is a useful tool in the study of brain damage including viral infection-related convulsion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：擬似的ウイルス感染；polyI:C；中枢神経障害；痙攣；角膜キンドリング

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染症は、しばしば中枢神経学的障害を惹起するが、その障害は小児の発達時期によって異なる。まず、周産期の感染は統合失調症の成因と関連することが指摘されている。すなわち、現在統合失調症の成因仮説として 2 ヒット説（1. 周産期感染症、2. 思

春期のストレス）における神経発達障害仮説が提唱されているが、周産期での感染症が第 1 ヒットとして免疫応答異常を誘発し精神機能障害に関与すると考えられている。乳児・小児期ではウイルス感染に伴う発熱が最も頻回な痙攣誘発因子であり、脳炎・脳症を発症した場合には神経学的後遺症が残り重大

な問題となっている。一方、てんかん患者ではそもそも発達障害や行動障害が精神医学的な問題となっているが、一部のてんかんには ACTH などのステロイド療法が奏効することから、脳内炎症とてんかんの関連性が推察されている。

実験動物を用いた基礎研究でも、周産期での細菌またはウイルスによる感染により、統合失調症に認められる認知機能障害や情報処理能力障害などの精神機能障害が誘発されることが確認されている。また、幼弱期の実験動物に高温を負荷し体温が上昇すると痙攣が惹起されることや、炎症モデルでの痙攣閾値の低下が報告されている。一方、神経免疫学的研究により、細菌やウイルスなど感染により免疫系細胞からインターロイキン (IL-1、IL-6)、TNF- α 、インターフェロンなどの様々なサイトカイン類が放出され、中枢神経系に対しても影響していることが明らかになっている。しかし、ウイルス感染と精神神経障害の関連性には未だ不明な点が多く残され、その発症機序の解明や治療法の開発も遅れている。

2. 研究の目的

近年、 $\alpha 7$ 型ニコチン受容体は神経終末上にばかりでなくマクロファージ上に存在して炎症反応に関与していることが明らかになり、ニコチン性抗炎症経路が注目されている。しかし、統合失調症の発病リスク因子と提唱されている母体感染ならびに行動障害とニコチン受容体との関連については不明である。本研究では、まず $\alpha 7$ 型および $\alpha 4 \beta 2$ 型ニコチン受容体と行動障害の関連性を明らかにする目的で、統合失調症動物モデルならびてんかん動物モデルを用いて基礎的検討を行った。

従来より、様々な炎症惹起剤を用いた炎症モデルが活用されてきたが、近年、合成 2 重鎖 RNA のポリイノシンポリシチジン酸 (polyI:C) を応用することにより、動物に擬似的ウイルス感染を作製できることが注目され、新たな動物モデルとして注目されている。本研究では、polyI:C を投与モデルがウイルス性の中枢神経障害モデルになるか否かを明らかにする目的で、痙攣を指標とした行動薬理的検討を行った。

3. 研究の方法

突然の音刺激に対する驚愕反応は直前に単独では反応を示さない弱い音刺激を先行させることにより抑制される。この現象 (prepulse inhibition, PPI) が統合失調症患者では減弱しており、統合失調症の注意障害や情報処理障害を反映していると考えられている。PPI はラットやマウスなどの実験動物によっても再現できることから統合失調

症の情報処理障害の動物実験モデルとして応用されている。実験では、ドパミン作動薬 (apomorphine) によって惹起されるラットの PPI 障害に対する $\alpha 7$ 型ニコチン受容体の影響を検討した。

てんかんの動物モデルは、GABA 受容体遮断薬の pentylenetetrazol ならびに角膜通電によるキンドリングモデルを使用した。

4. 研究成果

まず情報処理機能障害に対する $\alpha 7$ 型ニコチン受容体の影響を明らかにする目的で、音刺激による感覚情報処理能力を prepulse inhibition (PPI) 試験により検討した。実験では、ドパミン作動薬 (apomorphine) によって惹起されるラットの PPI 障害に対する影響を検討した結果、 $\alpha 7$ 型ニコチン受容体作動薬の tropisetron が有意な改善作用を示すことが明らかになった (図 1)。

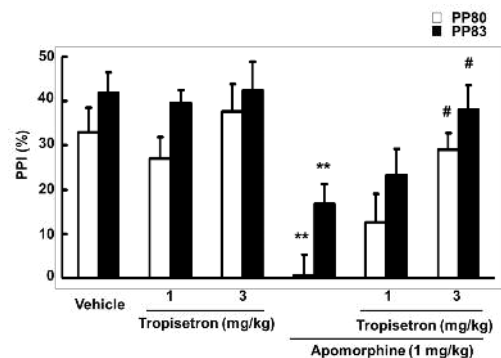


図 1 apomorphine 誘発 PPI 障害に対する $\alpha 7$ 型ニコチン受容体作動薬の (tropisetron) の影響

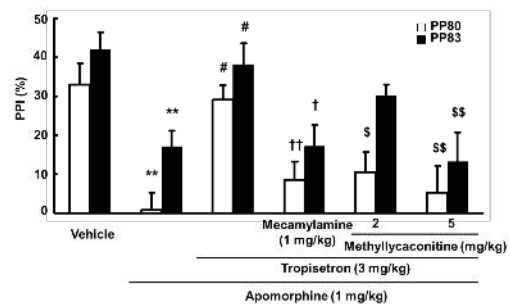


図 2 tropisetron の PPI 障害の改善作用に対する $\alpha 7$ 型ニコチン受容体作動薬遮断薬の (methyllycaconine) の影響

なお、tropisetron はセロトニン 3 (5-HT₃) 受容体にも親和性を有することから、選択的 $\alpha 7$ 型ニコチン受容体作動薬遮断薬 (methyllycaconine) の影響を検討した。その結果、tropisetron の PPI 障害の改善作用は、methyllycaconine によって拮抗されたことから (図 2)、 $\alpha 7$ 型ニコチン受容

体の関与が明らかとなった。以上の結果より、統合失調症の病態モデルを用いて検討した結果、 $\alpha 7$ 型ニコチン受容体が情報処理障害の改善作用を有することが示唆された。

次に、 $\alpha 4\beta 2$ 型ニコチン受容体と行動障害の関連性を明らかにする目的で、てんかんモデルを用いて検討した。てんかんモデルには、簡便に繰り返しけいれん発作を惹起させることが可能な電撃けいれん(ECS)を用いた。ラットに 7 日間 ECS を反復負荷すると、Y 字型迷路試験における自発的交替行動障害およびオープンフィールド試験における多動が誘発された。この障害は、抗てんかん薬 (phenobarbital, phenytoin および valproate) で連日電撃けいれんを抑制することで拮抗された。従って、反復 ECS モデルにおける認知・行動障害はけいれん発作自体によって惹起されることが明らかとなり、てんかん関連性の精神障害モデルとして有用性が示唆された。

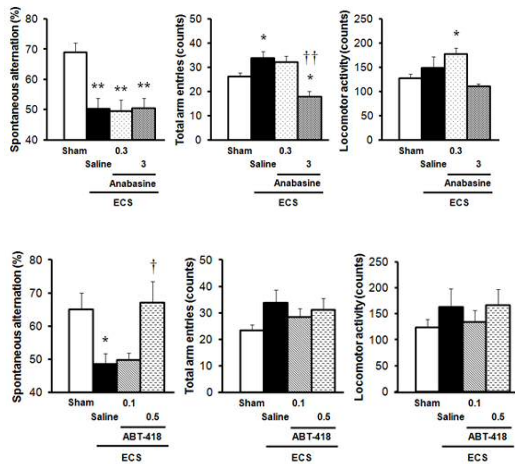


図 3 電撃けいれんモデルにおける $\alpha 4\beta 2$ および $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体作動薬の影響

次に、アセチルコリン神経系薬の影響について検討した結果、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬 physostigmine (0.5 および 1 mg/kg) が反復 ECS モデルにおける自発的交替行動障害のみを改善した。さらに、 $\alpha 4\beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体作動薬 ABT-418 (0.5 mg/kg) が自発的交替行動障害のみを改善したが、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体作動薬の (\pm)-anabasine では明らかな改善作用はみられなかった (図 3)。従って、アセチルコリン神経系のなかでも $\alpha 4\beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体が反復 ECS モデルの記憶障害に関与することが示唆された。

ウイルス感染症は、痙攣発作や統合失調症などの中枢神経障害に関連するため、そ

の病態や治療薬の研究には病態モデルの作製が重要である。そこで、合成 2 重鎖 RNA の polyI:C を実験動物に投与した擬似的ウイルス感染モデルを作製し、行動薬理的検討を行った。痙攣実験では、まず polyI:C

(1-30 mg/kg) を腹腔内投与したマウスに、GABA 受容体遮断薬の pentylenetetrazol を投与して痙攣の発現を観察したが、その増悪は軽度であった。しかし、polyI:C (50-100 μ g) を脳室内に微量注入したマウスでは用量依存的な痙攣の増悪が認められ、その作用は polyI:C 投与の 24 時間後で顕著であった。従って、polyI:C の脳室内投与モデルは、ウイルス感染時の痙攣増悪モデルとして有用と考えられ、その機序には脳内の GABA 神経系の関与が推察された。しかし、脳室内投与モデルでは、脳室内投与自体の影響が大きく、ウイルスの感染経路を考慮すると、病態モデルの改善が必要と考えられた。

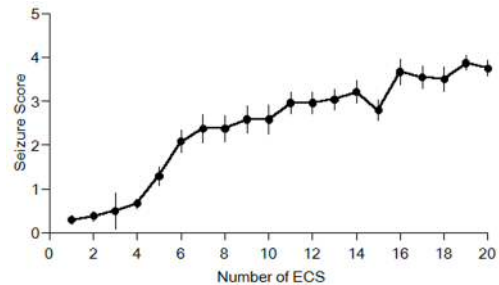


図 4 角膜通電によるキンドリングの形成

そこで次に、角膜キンドリングの手法を用いて“てんかんマウス”を作製し、てんかんモデルにおける polyI:C 投与の影響を検討した。まず、単回では痙攣を惹起することない電流 (5.6 mA) をマウスの角膜より通電し、この刺激を繰り返すことで最終的に全身性の痙攣発作を惹起する、いわゆる“てんかん原生を獲得したてんかんモデル”を作製した (図 4)。この“てんかんマウス”に抗てんかん薬のバルプロ酸ナトリウムを投与すると用量依存的な痙攣の抑制が認められた。

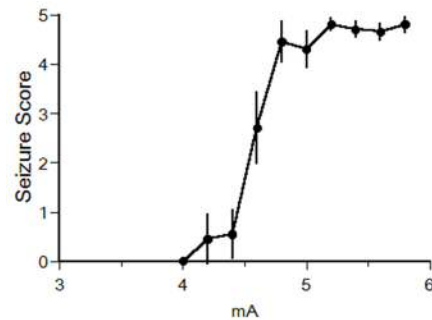


図 5 角膜キンドリング形成マウスにおける負荷電流の影響

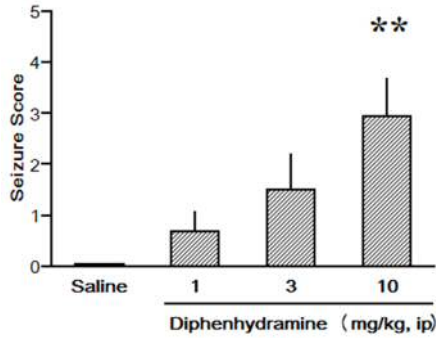


図 6 ジフェンヒドラミンによる角膜キンドリングの増悪

次に、“てんかんマウス”に対して、痙攣を誘発することない低電流値(4 mA)を動物個々に設定した(図5)。ヒトで痙攣を増悪することが知られているヒスタミン H1 受容体遮断薬(ジフェンヒドラミン)を前投与した後にその低電流を負荷すると、痙攣の増悪が確認された。すなわち、本てんかんモデルは、負荷電流量を調節することで、薬剤による痙攣の抑制と増悪を評価できる有用なモデルあることが明らかになった。

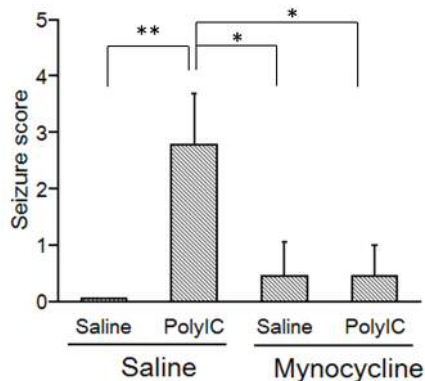


図7 polyICによる角膜キンドリングの増悪とミノサイクリンの影響

“てんかんマウス”に polyI:C を投与して角膜キンドリングを調べると、有意な痙攣閾値の低下が認められ、その増悪は無処置のマウスを用いた場合と比較して顕著であった。“てんかんマウス”における polyI:C による痙攣増悪は、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体作動の tropisetron や $\alpha 4 \beta 2$ アセチルコリン受容体作動の ABT-418 によって影響を受けなかった。しかし、脳内ミクログリアの活性化阻害作用を有するミノサイクリンを前処置することにより抑制された。

以上の結果より、“てんかんマウス”に polyI:C を投与した擬似的ウイルス感染モデルは、ウイルス感染に伴う痙攣発作など

の中中枢神経障害の研究に有用であると考えられた。

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 3 件)

- ① Hidaka N, Suemaru K, Kato Y, Araki H. Involvement of $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in working memory impairment induced by repeated electroconvulsive seizures in rats. *Epilepsy Research* 104: 181-185(2013) 査読有り
- ② Ochi R, Suemaru K, Watanabe S, Yamaguchi T, Takechi K, Kawasaki H, Araki H. Effect of heat exposure on aminophylline-induced convulsions in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34: 666-670(2011) 査読有り
- ③ Kohnomi S, Suemaru K, Goda M, Choshi T, Hibino S, Kawasaki H, Araki H. Ameliorating effects of tropisetron on dopaminergic disruption of prepulse inhibition via the $\alpha(7)$ nicotinic acetylcholine receptor in Wistar rats. *Brain Research* 1353: 152~158 (2010) 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① 越智理香, 末丸克矢, 武智 研志, 田坂祐一, 田中守, 田中亮裕, 荒木博陽. 角膜キンドリングマウスにおける行動変化と抗てんかん薬レベチラセタムの影響. 第 86 回日本薬理学会年会. 2013 年 3 月 21 日~3 月 23 日福岡.
- ② 越智理香, 末丸克矢, 武智研志, 田坂祐一, 田中亮裕, 田中守, 荒木博陽. 角膜キンドリングを用いた抗痙攣および痙攣増悪作用の評価方法に関する基礎的検討. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会・合同年会. 2012 年 10 月 18 日~20 日栃木.
- ③ 越智理香, 武智研志, 末丸克矢, 荒木博陽. Poly I:C 投与による擬似的ウイルス感染マウスにおけるペンチレンテトラゾール誘発けいれん. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会・合同年会. 2011 年 10 月 27 日 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末丸 克矢 (SUEMARU KATSUYA)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：50363239

(2)研究分担者

荒木 博陽 (ARAKI HIROAKI)

愛媛大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50294450

(3)連携研究者

(0)