

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791167

研究課題名(和文) サリドマイド投与による自閉症モデルラットの解析

研究課題名(英文) Analysis of autism model rats exposed to thalidomide

研究代表者

大河原 剛 (Ohkawara, Takeshi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・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、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、妊娠ラットにサリドマイドを投与することにより発症させた自閉症モデルラットにおいて、自閉症の特徴であるセロトニン神経系の異常、セロトニン神経の起始核である縫線核の異常や行動異常が起こることを明らかにしている。本研究では、この自閉症モデルラットにおいて、運動中枢である小脳に形態学的な異常があることを明らかにした。また脳(海馬、線条体)におけるモノアミン量の測定も行ったが、自閉症モデルラットと対照群の間に違いが見られなかった。

研究成果の概要(英文)：We have shown that "our autism model rats" which exposed to thalidomide during pregnancy impair serotonergic system including raphe nucleus and show behavior abnormality to the offspring. Now we have also shown that exposure to thalidomide during pregnancy induces morphological abnormalities in the cerebellum to the offspring. However, monoamine contents in the hippocampus and striatum did not differ between control group and thalidomide-treated group.

研究分野：神経科学、発生学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：自閉症 小脳 サリドマイド モノアミン

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症は、対人関係の障害、コミュニケーションの障害、想像性の障害に起因するこだわり行動を3主徴とする発達障害であり、その頻度は人口の1~2%である。さらに、自閉症をはじめとする生まれながらの認知行動の異常(発達障害)は、この30年間で10倍以上に増加しており、この異常な増加は医師の診断技術の向上では説明のつかないものであり、妊婦をめぐる環境の変化、即ち妊娠中の環境有害物質の曝露が原因であると考えられている。このように急増する発達障害の原因となる環境有害物質を同定し、これらの物質が妊娠中のどの時期に、どのようなメカニズムで発達障害を引き起こすのかを解明することは、科学や医学の面だけでなく、全社会的課題と言える。

これらのことから研究代表者が所属する研究室では、サリドマイド被害者において自閉症が通常の30倍以上高率に発症した疫学的事実に基づき、併発した外表奇形から妊婦に投与された時期を推定し、それに相当する時期に妊娠ラットにサリドマイドを経口投与することで自閉症モデルラットの作製を試みた。研究代表者の所属する研究室では、このようにして作り出された自閉症モデルラットを用いて研究を行い、自閉症の特徴であるセロトニン系の異常、セロトニン神経の起始核である縫線核の異常や行動異常が起こることを明らかにしている。このようにヒトの自閉症患者で観察される様々な症状が見られたことから、研究代表者の所属する研究室で考案されたサリドマイドを用いた自閉症モデルラットは、サリドマイドという環境有害物質により引き起こされた自閉症の良い研究モデルであると考えられる。さらに、他の多くの研究者も我々の方法で作製した自閉症モデルラットを用いて行動実験などの研究を行っていることから我々のモデルラットは自閉症研究に有用であることが示唆される。

これまでに自閉症では、セロトニン代謝異常の他に、ドーパミンやノルアドレナリンの異常、ペプチドホルモンであるオキシトシンの異常、増殖因子や接着因子の異常、脳の肥大、社会行動の異常などが報告されている。我々が、考案したサリドマイドを用いた自閉症モデルラットでは、セロトニン系の異常や行動異常が起こることをすでに報告しているが、セロトニン以外のモノアミン系や脳の肥大や社会行動に関しては解析を行っておらず、未解明のままである。

### 2. 研究の目的

これまでに自閉症では、セロトニン代謝異常の他に、ドーパミンやノルアドレナリンの異

常、ペプチドホルモンであるオキシトシンの異常、増殖因子や接着因子の異常、脳の肥大、社会行動の異常などが報告されている。我々が、考案したサリドマイドを用いた自閉症モデルラットでは、セロトニン神経系の異常や行動異常が起こることをすでに報告しているが、セロトニン以外のモノアミン系や脳の肥大や社会行動に関しては解析を行っておらず、未解明のままである。そのため本研究では、それらの未解決な問題に関して、サリドマイドを用いた自閉症モデルラットではどうなのか、生化学的、形態学的、行動学的解析を行い明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) サリドマイド投与による自閉症モデルラットの作製とサンプル回収

蒸留水で溶解した5%(W/V)アラビアゴムを溶媒として、妊娠9、10日目に500mg/kgのサリドマイド(Tocris Bioscience)をWistarラットに経口投与を行った。その後、妊娠を継続させて、産まれてきた仔ラットが生後50日になった時点で、20%(W/V)の抱水クロラルを腹腔内投与した。麻酔が完全に効いたのちに大脳皮質、海馬、線条体を回収し、液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。小脳は正中矢状断し、4%パラフォルムアルデヒドを用いて一晩室温で浸漬固定した後、段階的にスクロースで置換を行い(最終濃度は30%)、OCTコンパウンド(Sakura Finetech Co. Ltd.)に包埋した。妊娠9、10日目に同量の5%(W/V)アラビアゴムを経口投与したラットをコントロールとした。メスのラットは性周期により脳のモノアミン量が変化するため、HPLCによるモノアミン量の測定、および、小脳の形態学的解析には、全て雄のラットを用いた。

#### (2) 小脳のPurkinje細胞数の測定

包埋を行った小脳は、Leica CM1850 cryostat (Leica Microsystems, Germany)を用いて、18µmの厚さで薄切を行った。作製した切片は、PBSで洗浄したのち、10mMクエン酸バッファー(pH6.0)に浸し、抗原賦活化のために5分間、2回のマイクロウェーブ処理を行った。PBSで洗浄した後、blocking液(10%胎仔牛血清、0.1%Tween-20 in PBS)で室温1時間ブロッキングを行い、Can Get Signal solution A (TOYOBO)で3000倍に希釈した抗Calbindin D28k抗体(Sigma)と4で一晩反応させた。翌日、PBSで3回洗浄した後にblocking液で1000倍に希釈したanti-mouse IgG Alexa488 (Invitrogen)と室温3時間反応させた。その後、PBSで3回洗浄し、Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen)を用いて封入を行い、Olympus

FV1000 コンフォーカル顕微鏡 (OLYMPUS) を用いて観察を行った。Purkinje 細胞層の長さあたりの Purkinje 細胞数の測定は、L. Shi 等の方法 (Brain, Behavior and Immunity (2009) 23: 116-123) に従って、FV10-ASW software (OLYMPUS) を用いて行った (図 1)。サリドマイド投与群、コントロール群ともに各 10 匹の雄ラットを実験に用いた。

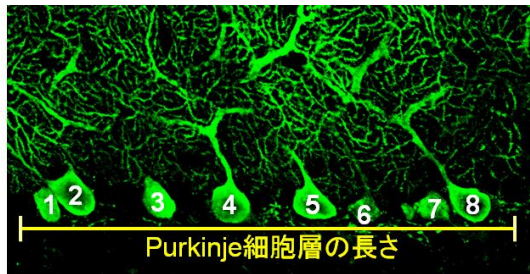


図1 Purkinje細胞層の長さあたりのPurkinje細胞の数の測定

### (3) 脳におけるモノアミン量の測定

- 80 で保存しておいた脳 (海馬、線条体) は、重量を測定した後に、脳試料 1g に対して 5 ml の 0.2 M 過塩素酸 (100  $\mu$ M EDTA · 2N を含む) を加えたのちに、内部標準として 200 ng のイソプロテレノールを加え、超音波破碎機で脳試料を完全に破碎した。遮光した状態で水中で 30 分間放置した後に、4 で 20000 x g, 15 分間遠心分離を行ったのちに、200  $\mu$ l の上清を新しいチューブに移し、そこに 27  $\mu$ l の 1M 酢酸ナトリウムを加え、pH の調整を行った。0.45  $\mu$ m のフィルターでろ過を行った後に、HPLC 法でモノアミン含量の測定を行った。HPLC (エイコム HTEC-500) の測定には、EICOMPAK SC-50DS カラム (エイコム) を使用し、移動相としては、84 % 0.1 M 酢酸 クエン酸バッファー (pH 3.5), 16 % メタノールに 190 mg/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウムと 5 mg/L EDTA · 2Na を含む溶液を用いた。今回の実験では、両群ともに 3 匹の母親ラットを用いた。雌のラットのセロトニン含量は性周期により増減することが知られているため、今回の実験では雄ラットのみを測定に用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 自閉症モデルラットの小脳における Purkinje 細胞数の減少

一部の自閉症患者では、手先が不器用であることや運動失調が見られることが報告されているが、その分子基盤はあまりわかっていない。本研究では、自閉症者で見られる不器用さは小脳の異常に起因している可能性があると考え、我々が考案し作製した自閉症モデルラットの小脳の解析を行った。具体的に

は、妊娠 9 日目、10 日目の Wistar ラットに 500mg/kg のサリドマイドを経口投与し、生まれてきたラットの解析を生後 50 日目に行った。生後 50 日目のラットを麻酔し、取り出した小脳を 4 % パラフォルムアルデヒドで固定した後に、15%、20%、30% のスクロースで置換を行った。その後、OCT コンパウンドに包埋し、18  $\mu$ m の厚さで凍結切片の作成を行った。作成した切片は、Purkinje 細胞を可視化するために抗 Calbindin D28k 抗体で染色を行った。その結果、サリドマイド投与群 ( $n=10$ ) では、コントロール群 ( $n=10$ ) に比べ、Purkinje 細胞層の長さには違いが見られなかったが、Purkinje 細胞層の長さあたりの Purkinje 細胞の数が有意に減少していることが明らかとなった (サリドマイド投与群:  $18.12 \pm 0.51$  個/mm, コントロール群:  $20.57 \pm 0.91$  個/mm, 図 2)。

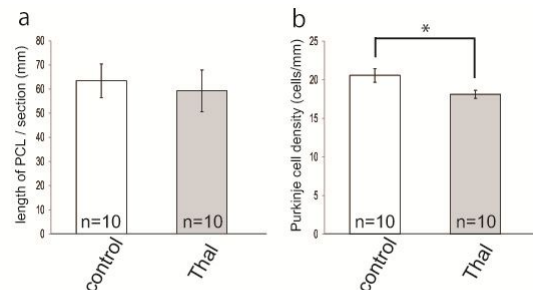


図2 自閉症モデルラット小脳における Purkinje 細胞数の減少  
a: 切片当たりの Purkinje 細胞層の長さ、b: Purkinje 細胞層の長さあたりの Purkinje 細胞数。control: コントロール群、Thal: サリドマイド投与群。\*;  $p < 0.01$ 。

### (2) 自閉症モデルラットの海馬・線条体におけるモノアミン量の測定

これまでに研究代表者が所属する研究室では、サリドマイドによる自閉症モデルラットを解析した結果、自閉症の特徴的な症状であるセロトニン神経系の異常と新規場所での行動異常が見られることを明らかにしている。自閉症モデルラットで見られた新規場所での行動異常は、セロトニン神経系の異常だけでは説明がつかず、ドーパミンやノルアドレナリンの異常が示唆される。そのため、研究代表者は、自閉症モデルラットと対象ラットの線条体、海馬を取り出し、HPLC によりモノアミンの濃度を測定を行った。その結果、海馬のノルアドレナリン含量、線条体のノルアドレナリン含量、ドーパミン含量に違いが見られなかった (図 3)。また今回結果は示さないが、ドーパミンの代謝産物である 3, 4-ジヒドロキシフェニル酢酸、ホモバニリン酸の含量も測定したが、変化は見られなかった。

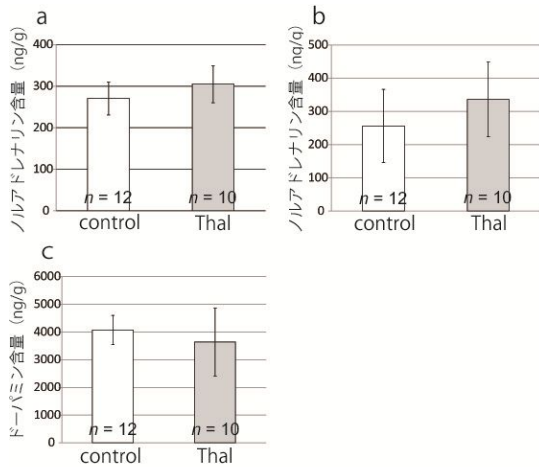


図3 海馬と線条体におけるモノアミン含量  
 a: 海馬におけるノルアドレナリン含量、b: 線条体におけるノルアドレナリン含量、c: 線条体におけるドーパミン含量。control: コントロール群、Thal: サリドマイド投与群。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

大河原剛、江藤みちる、成田正明、自閉症モデルラットにおける小脳のPurkinje細胞数の減少、日本神経科学会、2013年6月21日、国立京都国際会館(京都市左京区)

大河原剛、葛山貴士、江藤みちる、成田正明、胎内でのウイルス感染モデルによるセロトニン神経系への影響 化学物質ばく露とのメカニズムの違い 日本解剖学会(シンポジウム)、2013年3月28日、サンポートホール高松(香川県高松市)

大河原剛、葛山貴士、大藪明子、江藤みちる、櫻本新、太城康良、成田正明、妊娠中のウイルス感染は、セロトニン神経に長期的毒性を引き起こし、その機序はサリドマイドやバルプロ酸によるそれとは異なる、日本神経科学会、2012年9月

20日、名古屋国際会議場(名古屋市熱田区)

〔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.medic.mie-u.ac.jp/develop\\_regener/](http://www.medic.mie-u.ac.jp/develop_regener/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河原 剛 (OHKAWARA Takeshi)  
 三重大学・大学院医学系研究科・講師  
 研究者番号：20469034

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：