

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650215

研究課題名(和文) サイトカイン暴露で誘導されるサルの行動異常の検討 サル統合失調症モデル作出の試み

研究課題名(英文) Study on abnormal behavior induced by cytokine administration in nonhuman primates.-An attempt to produce a monkey model of schizophrenia-

研究代表者

中村 克樹 (NAKAMURA, Katsuki)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：70243110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトの精神疾患の原因のひとつとして考えられているサイトカイン暴露によって行動異常が誘導されるか否かを、サルを対象として実施した。新生児期に皮下に成長因子を投与したコモンマーモセットは、多動、眼球運動異常、前頭葉機能低下を示唆する学習障害を示した。精神疾患の原因の一つが周産期のサイトカイン暴露である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated whether abnormal behavior could be induced by administration of cytokine in monkeys. A common marmoset monkey subcutaneously injected EGF showed hyper activity, abnormal eye movement, and a learning deficit indicating hypofrontality. Our data suggest that perinatal exposure to cytokine can be a cause of mental disorders.

研究分野：認知神経科学

キーワード：コモンマーモセット アカゲザル EGF 認知機能障害 統合失調症 サイトカイン 新生児

1. 研究開始当初の背景

精神疾患の原因解明とその治療法の開発は、脳科学研究の大きな目標の一つであり、世界的にも多くの大学・研究機関さらには製薬会社等が盛んに研究している。しかし、現在まで適当な動物モデルが存在せず、その研究は進んでいないのが現状である。

統合失調症は人口の約1%にもおよぶ人が発症する精神疾患であるにも関わらず、その病因や病態は不明である。遺伝子の連鎖解析から数十におよぶ関連遺伝子が同定されてきたが、いずれの遺伝子も関連遺伝子もしくはリスク遺伝子といった弱い関連性しか示されていない。

ヒトの精神疾患の原因のひとつとして、胎児や新生児期における末梢の神経栄養活性を有する炎症性サイトカイン誘導が考えられている。げっ歯類を用いた研究では、新生仔の皮下に栄養因子を投与することで、認知行動異常が成熟後に誘発されることが知られている。しかし、精神疾患、特に統合失調症は、社会行動や認知行動の障害を主症状とするため、げっ歯類での行動異常からヒトの症状を外挿するには大きなギャップが有る。このような脳の高次機能が障害される精神疾患は、モデルとする動物の認知行動をもとにしか定義できる可能性がなく、この点を考慮するとヒトに近縁な動物（サル）でしか再現できない可能性が大きい。

本研究の目的は、ヒトの精神疾患の原因のひとつとして考えられているサイトカイン暴露によって行動異常が誘導されるか否かを、サルを対象として実施し、統合失調症の霊長類モデル作出を試み、その原因究明の第一歩として脳内遺伝子発現を健常個体と比較することである。

ニホンザルを代表とするマカクザルは、成熟するまでに5～6年必要であり、短期間での研究推進は困難である。こうした問題を解決する実験動物として近年コモンマーモセ

ットが注目されている。コモンマーモセットなら成熟までの期間が2年と短く、さまざまな社会行動を示す霊長類であり、精神疾患研究において理想的な実験動物であるといえる。

申請者らは、コモンマーモセットの社会的コロニーを立ち上げることに日本で初めて成功した。社会的コロニーでは、さまざまな協力行動や音声コミュニケーションなど社会行動が観察される。また、申請者らは、これまでに社会行動の評価に関する研究成果を発表してきている。例えば、音声コミュニケーションに関する研究 (Yamaguchi et al., 2009, 2010)、親に対する選好性の研究 (Saito et al., 2011)、親から子への食物分配行動に関する研究 (Saito et al., 2008, 2011)、親行動に関する研究 (Saito et al., 2011) などがある。

さらに、統合失調症等の精神疾患で障害される認知機能に関しても、コモンマーモセット専用の認知実験装置を開発した (Takemoto et al., 2011)。また、他の研究施設との共同研究でジーンチップを用いてコモンマーモセットの脳内遺伝子発現も調べられるようになった (Fukuoka et al., 2010)。こうした環境の整備ができたので、統合失調症のモデル作出の計画を実施できると考えた。

2. 研究の目的

胎児期および新生児期におけるサイトカイン暴露が、その後の発達段階における行動異常を引き起こすか否かを検討する。具体的には、妊娠中期の母体・妊娠初期の母体・新生児の各々を対象として成長因子を皮下に投与し、子どもの成長に伴う行動を観察する。

行動異常が現れた個体は、脳内における生化学的・組織学的変化を検討し、さらにジーンチップを用いた遺伝子発現パターンの変化を検討する。これらの変化の検証によって、行動異常の原因を究明する。

コモンマーモセットの認知機能と社会行

動などの変化を合せ評価できる施設は世界的に見てもほんの数カ所しかない。この環境を利用し、統合失調症モデルが作出できれば、統合失調症の原因究明のみならず、広く治療法・治療薬の開発へとつながり、社会的インパクトは非常に大きい。

3. 研究の方法

家族形態で社会性に富んだ環境で飼育・繁殖しているコモンマーモセットを対象として、発達初期にサイトカインに暴露し、発達とともにどのような行動異常が現れるのかを検討した。具体的な方法としては、1) 妊娠初期あるいは妊娠中期の母体に成長因子を皮下注射で投与し、生まれてくる子の行動を解析する場合と、2) 新生児に成長因子を皮下注射で投与し、その子の行動を解析する場合を設けた。これまでの経験や実績に基づき、特に社会性に注目して実験個体における行動異常を解析した。こうして得られた行動異常を示す個体において、ジーンチップを用いて脳内の遺伝子発現パターンを解析し、健常個体と比較してどのように変化しているのかを明らかにすることによって、どのような脳機能の異常が行動異常を引き起こしているのかを検討した。

(1) 投与方法

①胎児期への投与

コモンマーモセットはおよそ150日の妊娠期間で、妊娠初期は1~65日、妊娠中期は66~105日、妊娠後期は106日~150日と考えられる。脳血液関門の完成のタイミングを考慮し、効果的な投与は妊娠中期に設定した。また、大脳皮質の層構造が完成するタイミングであるE130までに投与しなければ投薬の効果が現れないと考え、以下のようなプロトコルを作成した。

妊娠中期のマーモセット母親を選出し、その健康を確認した上、上皮成長因子もしくは生理食塩水を0.3mg/kg体重(0.3ml)容量で

2日に1回皮下投与(計5回以上投与)した。上皮成長因子の代わりに、上皮成長因子の類縁分子ニューレグリン1を0.3mg/kg体重(0.1ml)容量で1日1回、10日間、同手順で投与した。なお、投与する因子はあらかじめ、無菌生理食塩水にて0.1mlに希釈しておいたものを使用した。投与期間中は、毎日妊娠個体の体重を計測し健康状態をモニターした。

②新生児への投与

新生児(ペア)を対象として出生後3~6日から以下の実験を開始した。コモンマーモセットは通常1度に2頭出産する。そのうち1頭を実験群、もう1頭を対照群に割り当てた。上皮成長因子もしくは生理食塩水を0.3mg/kg体重(0.1ml)容量で1日1回、10日間、コモンマーモセット新生児兄弟ペアの1頭ずつの背中に皮下投与(計10回投与)した。上皮成長因子の代わりに、上皮成長因子の類縁分子ニューレグリン1を0.3mg/kg体重(0.1ml)容量で1日1回、10日間、同手順で投与した。なお、投与する因子はあらかじめ、無菌生理食塩水にて0.1mlに希釈しておいたものを使用した。投与期間中は、毎日体重を計測し健康状態をモニターした。

(2) 行動解析

ニホンザル等のマカクザルでは、成熟するまでに5~6年必要であるため、研究期間内に結果が出ない。しかし、本研究で対象とするコモンマーモセットは、成熟するまでに1年半しかかからない。従って、2年目と3年目には、ヒトの思春期以降の行動を観察・解析することが可能である。

①多動性や社会性の変化

コモンマーモセット新生児のケージ内における行動・成長をビデオに記録し解析した。特に、多動性・常同行動・自傷行為が生まれるか否か、社会行動に変化が見られるか否か、

また幻覚がみられるような異常行動を示すか否か、といった点に特に着目し、数年間にわたって観察した。

②認知機能の変化

その一方で、統合失調症患者では、認知機能障害も報告されている。成長因子投与ザルにおいてこのような認知機能障害が認められるか否かを確認するために、申請者らが開発したコモンマーモセット用認知実験装置を用いた認知課題を訓練した。主に前頭葉の機能を評価することに用いられる逆転学習課題を用いた。

(3) 脳神経系の生化学的組織学的解析

もしなんらかの行動異常が顕在化した場合には、神経系の変化を確認するために実験殺を実施し、脳組織を調べることにした。生化学的変化の検査および組織学的変化の検査を実施することとした。これらの検査には、連携研究者の那波宏之教授（新潟大学）の協力を仰ぐ計画を立てた。さらに、行動異常を示したコモンマーモセットの脳内遺伝子発現をさまざまな領域で検討し、健常個体との差を調べることにした。特に、前頭葉のいくつかの領域、側頭連合野、海馬等の側頭葉内側部、頭頂連合野、大脳基底核を中心に調べる計画を立てた。

4. 研究成果

まず上皮成長因子及びニューレグリンを個体へ投与した時の副作用を検討した。0.3mg/kgを投与すると、5分後から口を動かし始め、投与8分後に嘔吐の反応が見られた。また排便も認められ、初回は嘔吐と同時に、2回目3回目は投与直後から数回連続排便し、排便回数を重ねるごとに正常から泥状・水様便へと性状が変化した。悪心、摂餌量低下、活動量減少は軽度だった。摂餌量は投与を重ねるたびに減少した。体重減少は約2%、このプロトコールで研究実施が可能であると

判断した。

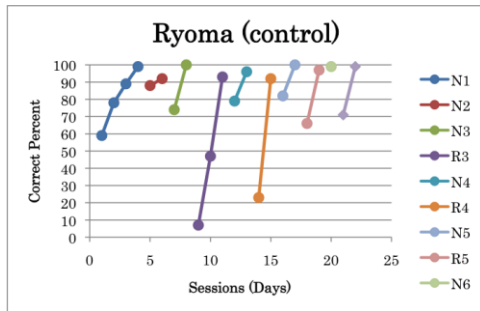
ニューレグリンを妊娠個体2頭に投与した。しかしながら、いずれも出産に至らなかった。ニューレグリン投与の影響であるのか否かは確認できていないが、妊娠個体への投与はいったん中止することとした。

行動評価は、以下の4つを中心に行った。

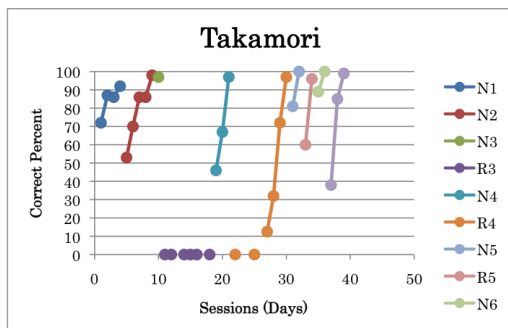
1) 加速時計を用いて活動量を定量化し異常性を統計的に検討した、2) 眼球運動をビデオ記録解析し健常個体と比較した、3) 認知課題の成績を健常個体と比較した、4) 一般的な行動を6カ月おきにビデオ撮影し健常個体と比較した。

新生児コモンマーモセット4頭、および新生児アカゲザル3頭に上皮成長因子を投与した。コモンマーモセットは1度に2頭生まれるので、上皮成長因子(EGF)を実験個体に生理食塩水を同腹子の対照個体に投与して比較した。これまでに、コモンマーモセット1頭とアカゲザル1頭で異常行動が確認できた。いずれの例でも、投与から発症まで2年以上必要であり、研究期間ぎりぎり確認されたため、行動評価が十分にできなかった。しかしながら、コモンマーモセットに関しては、一定の定量化が可能であった。同腹子と比べ1) 活動量が顕著に増加し、2) 眼球運動の異常が確認され、3) 通常の図形弁別課題には有意な差が見られなかったが、逆転学習課題の成績が顕著に悪くなることが示された(図参照)。その他、食欲や体重には大きな差が見られなかった。

また、この個体は2歳までは同腹子と区別なく成長していたが、2歳を過ぎた辺りから異常行動が顕著になった。新生児期におけるサイトカインへの暴露は認知機能などの障害を含む脳機能の成長に異常を引き起こすことが示唆された。



上の図の個体と同腹子（対照個体）の同時期における成績
逆転学習の顕著な障害は見られない



サイトカイン暴露で誘発された学習障害
前頭葉機能の評価に用いられる逆転学習
課題（R3 および R4）において成績が悪
くなっている

サル類を含め統合失調症の優れた動物モデル作出にはまだ誰も成功していない。今回の結果は、原因遺伝子が特定できていない精神疾患の原因の一つが周産期におけるサイトカインへの暴露である可能性を示す物である。

脳神経系の構造や機能がげっ歯類よりヒトに近いサルを用いて精神疾患のモデルが作出できれば、行動異常の評価もこれまでのラットやマウスと異なるレベルでヒトとの類似性を検討できる。今後、さらに行動解析をすすめ、さらにジーンチップを用いた遺伝子発現の研究や、どのような脳機能の異常が行動異常を生み出しているかという原因究明の研究を実施し、精神疾患のモデルとなる

ことを実証していく。

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 1 件）

- ① Takemoto A, Miwa M, Koba R, Yamaguchi C, Suzuki H, Nakamura K, Individual variability in visual discrimination and reversal learning performance in common marmosets., *Neurosci Res*, 査読有, 93, 136-143, 2014,
DOI:10.1016/j.neures.2014.10.001

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① Takemoto A, Miwa M, Koba R, Yamaguchi C, Suzuki H, Nakamura K, Individual difference in performance of pattern discrimination and its reversal learning in common marmosets. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2014年9月11-13日, パシフィコ横浜, (神奈川県・横浜市).

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 克樹 (NAKAMURA, Katsuki)
京都大学・霊長類研究所・教授
研究者番号：70243110

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

那波 宏之 (NAWA, Hiroyuki)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：50183083