

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：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860895

研究課題名(和文) 小型霊長類を用いた母体免疫活性化による出生児の脳神経形成への影響

研究課題名(英文) Functional changes in the offspring developing brain by maternal immune activation in marmosets

研究代表者

水間 広 (Mizuma, Hiroshi)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：00382200

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)：統合失調症や自閉症の病因病態に関わる分子・神経回路的メカニズムの解明を目指す研究の一環として、よりヒトに近い家族構成や社会性を持つ霊長類であるコモンマーモセットを病態モデルとした基礎研究を実施した。擬似ウイルス感染による母体免疫活性化を誘発するPolyIC:LCを妊娠90日目前後に投与し、出生児の脳組織中における脳神経形成や病態に関連する遺伝子(計8種)の発現パターンを調べた結果、脳神経形成関連遺伝子1種で特異的な発現パターンが認められた。このことから妊娠期における母体免疫活性化が脳神経形成に関わる遺伝子の発現パターンに変化をもたらし、生後発達後の脳機能異常に関与する可能性が推測される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the neural mechanism of neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders, we have developed a newer primate model using common marmoset and analyzed neurogenesis- and disease-associated gene expression patterns in the developing brain. The primate model was produced by maternal immune activation (MIA) following administration of poly:ICLC on Days 90 of gestation. Several genes expressions in the offspring brain within 24 hours after birth were analyzed by in situ hybridization. The expression patterns of Btdb3 gene was changed in the midbrain and pons in the neonate exposed to Poly:ICLC during embryo. This result indicates that MIA might be involved in neural dysfunction with development in primate brain.

研究分野：医歯薬学

キーワード：母体免疫活性化 マーモセット 発達障害

1. 研究開始当初の背景

妊娠期におけるウイルス、細菌および寄生虫などの感染が精神神経疾患である統合失調症や発達障害である自閉症のリスクファクターとして知られている(Patterson et al., 2002)。実際、米国の研究で出生児が自閉症や知的障害と診断された母親の妊娠中に採取された血清検体を検査した結果、血清中のサイトカイン(インターフェロン-、インターロイキン-4、インターロイキン-5)が健常児をもつ母親の検体よりも有意に増加していることが報告されている(Goines et al., 2011)。また、デンマークで行われたコホート研究では、自閉症児を持つ母親の妊娠時血清および羊水でウイルス感染によりケモカインの一種で単球の走化性因子であるMCP-1が有意に上昇していることが明らかとなっている(Abdallah et al., 2012)。

このように、母体への感染によるリスクファクターは、いわゆる風疹ウイルスなどの母体からの垂直感染による直接的な影響ではなく、母体がウイルス感染に曝されることにより誘発される免疫応答として誘導された様々なサイトカインが間接的に、胎児の脳発達に極めて重要な影響を及ぼすことだと考えられ、これを母体免疫活性化と呼ばれている(maternal immune activation, MIA)。

実験用動物を用いた研究では、母体のウイルスまたは疑似ウイルス投与によりMIAを誘発され、出生仔の大脳皮質や海馬における形態的な変化、分子の発現異常、そして社会性行動やプレパルス抑制試験の異常などが報告されている(Fatemi et al., 1999; Shi et al., 2003 ほか)。しかし、これらの研究結果はすべてマウスやラットのげっ歯類を用いた研究であり、ヒトと同様の霊長類での報告はほとんど無い。

ヒト特有の社会性行動やコミュニケーション能力における障害の有無について、げっ歯類を用いて客観的および定量的に評価する事は非常に困難であり、統合失調症や自閉症における発症機序や病因病態の真の解明とその克服には、霊長類を用いた研究は不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、医学生物学研究の分野において、マカクザルとは異なりヒトに近い社会性行動を持ち遺伝子操作が可能な霊長類として、近年、関心を集めている小型の新世界ザルの一種であるコモンマーモセット(Callithrix jacchus)に注目し、疑似ウイルス投与により誘発されるMIAが出生仔の脳神経系の発達にどのような影響を及ぼすのかについて調べる。特に、脳神経系を形成するために重要な遺伝子群や自閉症や統合失調症患者で報告されている遺伝子群に対する発現変化について、in situ ハイブリダイゼーション法による遺伝子レベルでの解析を行う。

本研究によりげっ歯類とは異なる霊長類での特異的な発現パターンを明らかにし、統合失調症や自閉症の病態の分子・神経回路のメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、妊娠期ウイルス感染モデルとして、実際のウイルスは使用せずにウイルスが細胞内で産生する二重鎖RNAを模した人工合成物である polyinosinic acid and polycytidylic acid (Poly:IC) を投与し、自然免疫機構である Toll 様受容体 3 型 (TLR3) に結合し、生体内での免疫応答を誘導させる。しかし、霊長類ではげっ歯類に比べて Poly:IC が血中で分解されやすく、投与時に見られるインターフェロン誘導効果が弱いことが知られているため(Field et al., 1971)、poly:IC よりも代謝安定性が知られている poly:IC/poly-L-lysine complex (poly:ICLC) を使用した。

妊娠日数の予測には子宮の触診に加え、予備試験として 10 例の超音波エコー検査による胎仔の児頭大横径の測定を実施し、成長曲線を作成し参考とした。妊娠 90 日前後に poly:ICLC (1 mg/kg) または溶媒を母獣の静脈内に投与した。poly:ICLC 投与後 24 時間以内に母獣の直腸温測定を行い発熱が認められた。また、末梢血中の血液細胞の形態観察から単球の割合が増加しており、ウイルス感染に似た免疫応答が確認された。出生仔の

脳組織採取は、出生後の外的環境下での影響を最小限に留めるために、出生してから 24 時間以内に 4%パラホルムアルデヒド (PFA) による灌流固定を行った。

PFA 固定された脳組織から切片を作製し、脳神経形成に重要な役割をもつタンパクとして、神経細胞への軸索伸長を調節するエフリンの受容体 A7 (EphA7)、クロマチン立体構造の局所的な制御に関連する遺伝子の発現を調節する BTB ドメイン含有タンパク質 3 (Btbd3)、細胞の接着、遊走、分化等に関連する結合組織増殖因子 (CTGF) として大脳皮質における神経細胞の遊走に重要な働きを持つ Sox5 の遺伝子発現について調べた。次に自閉症や統合失調症患者の遺伝子研究から発見された疾患特異的遺伝子群として、シナプス形成に重要な contactin-associated protein-like 2 (Cntnap2)、脳由来神経栄養因子の分泌を調節する CADPS2、自閉症および統合失調症の両方で異常が報告された L 型電位開口型カルシウムチャンネル $\alpha 1C$ サブユニット (Cacna1c) として、自閉症と同じ広汎性発達障害に分類されており、自閉症に類似した症状を示すレット症候群の責任遺伝子の一つであるメチル化 CpG 結合タンパク質 2 (MECP2) の遺伝子発現について調べた。

また、poly:ICLC 投与による脳の形態学的変化の有無や、神経細胞やグリア細胞の形態や細胞数に変化があるか否かについても免疫組織学的手法にて調べた。

4 . 研究成果

出生仔の生後 24 時間以内の脳組織中における脳神経系の形成に関連する遺伝子 4 種 (*Ctgf*, *Btbd3*, *Sox5*, *Epha7*) および疾患に関連する遺伝子 4 種 (*Cntnap2*, *Cadps2*, *Cacna1c*, *Mecp2*) の計 8 種の遺伝子の発現パターンについて調べた結果、*Btbd3* の発現が Poly:ICLC 投与により擬似ウイルス感染されたマウスから産まれた仔の中脳および脳幹領域において溶媒投与された母親から出生した対照マウスと比較して、特異的な発現パターンが認められた。

また、Poly:ICLC の曝露による脳組織の湿重量に変化はなく、また目立った外形の異常

は確認されなかった。さらに、組織染色としてニッスル染色による神経細胞の形態にも異常は認められず、ミクログリアに特異的なマーカーである Iba-1 の免疫染色を実施し、形態および細胞数について対照群と比較したが変化は認められなかった。

このことから妊娠期における母体免疫活性化が脳神経形成に関わる遺伝子の発現パターンに変化をもたらす、生後発達後の脳機能異常に関与する可能性が推測される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
特になし。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水間 広 (MIZUMA HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエ
ンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：00382200