

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：34516

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461776

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症が小児期の精神・行動発達に及ぼす影響に関する分子基盤の解明

研究課題名(英文) The relationship between pregnancy-induced hypertension and developmental disability.

研究代表者

田淵 正樹 (Masaki, Tabuchi)

園田学園女子大学・健康科学部・准教授

研究者番号：20340771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧症に類似したモデルラットを用いて、妊娠期の高血圧に対する介入を行い、産仔の行動学的変化、胎児の神経幹細胞の分化・増殖能を明らかにすることで、妊娠高血圧症が発達障害に及ぼす影響とその分子基盤を解明することを目的として検討した。SHRSPの産仔では、正常血圧のWKYに比べて衝動性が観察されたが、この衝動性は降圧薬の投与により改善された。SHRSPの神経幹細胞を分化誘導したところ、神経細胞の形態異常やアポトーシスが観察された。降圧薬の投与は、これらを改善した。このことから、発達障害の発症に妊娠高血圧症が関与していること、妊娠高血圧の治療によりそれが予防できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated pregnancy-induced hypertension and developmental disease. In the elevated plus maze, SHRSP showed less anxiety-related behaviour than WKY rats. A treatment by antihypertensive drug to pregnancy-induced hypertension prevent less anxiety-related behaviour. A treatment by antihypertensive agent to pregnancy-induced hypertension may prevent developmental disease of a child.

研究分野：薬理学

キーワード：発達障害 妊娠高血圧症 神経幹細胞 降圧薬

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 注意欠陥/多動性障害

(attention-deficit/hyperactivity disorder: AD/HD)は、注意持続の欠如あるいはその子供の年齢や発達レベルに見合わない多動性や衝動性を主な特徴とする発達障害の概念の一つである。AD/HDの有病率は報告により多少の差があるものの、学齢期の小児の3~9%がこの範疇に属すると考えられている。AD/HDはその障害特異性により、社会生活で様々な問題を生じやすく、いじめの対象や不登校の原因にもなっている。AD/HDの原因に関しては、遺伝、胎内環境、生後の環境などが想定されているが、いずれも実証には至っていない。したがって、AD/HDをはじめとする発達障害の発症機序における分子基盤を確立することは、きわめて重要な課題である。

(2) 近年の研究において、ヘルシンキ大学のTuovinenらの報告では、母親が妊娠高血圧症候群(pregnancy induced hypertension: PIH)であった男性は、正常血圧の母親から生まれた男性に比べ、68.5歳における認知機能が低下していること、また20歳における認知機能も低下傾向を示すことが示された[Neurology, 79, 1578, 2012]。このことは、PIHが、妊娠-分娩時のリスクとなるだけでなく、出生児の脳機能の発達にも影響を及ぼしている可能性を示唆している。

(3) PIHは、妊娠20週以降、分娩12週まで高血圧がみられる場合、または高血圧に蛋白尿を伴う場合と定義されている。妊娠高血圧症候群は、妊婦の約1割に出現し、早産や帝王切開などの分娩リスクのほか、低出生体重児や仮死状態での出生など、胎児側のリスクも増加する。「妊娠高血圧症候群ガイドライン」では、PIHの発症リスクとして、母体年齢が最も高いことが示されている。発症頻度は35歳以上と15歳未満で多いが、40歳以上は出産経験の有無にかかわらず、若い女性の約2倍に増加する。わが国では晩婚化が社会問題の一つとなっており、PIHも増加することが予測されている。

(4) 以上のような社会的背景および過去の知見から、AD/HDをはじめとする発達障害の発症にPIHが関与している可能性があり、これを明らかにすることは発達障害の発症機序を明らかにできるだけでなく、PIHの治療において出生児の脳機能をエンドポイントとした新しい治療戦略の開発につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、妊娠高血圧症が出産児の小児期における精神・行動発達に及ぼす影響について実験動物モデルを用いて行動学的および脳神経系の発達・分化の面から明らかにし、発達障害の発症機序についての新たな知見を得ること、また、妊娠高血圧症に用いられる降圧薬が出産児の小児期における精

神・行動発達に及ぼす影響について明らかにすることで、出生児の脳機能の低下を防ぐ新しいPIH治療のための戦略を開発することである。

## 3. 研究の方法

本研究では、PIH類似のモデル動物として脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット

(Stroke-prone spontaneously hypertensive rats: SHRSP), 対照となる正常血圧モデルラットウイスター京都ラット(Wistar Kyoto rats: WKY)を用いた。SHRSPは、岡本、家森らによりWistar系ラットのうち血圧が高い雌雄を選択交配することで開発されたラットで、現在もヒト本態性高血圧症のモデル動物として、降圧薬の開発などに用いられている。Uenoらは、SHRSPを用いた検討により、AD/HDのモデルとして有用である可能性を報告している[Behav Pharmacol, 13, 1, 2002]。

ラットの衝動性を行動学的に解析するために、高架式十字迷路(Elevated plus-maze: EPM)試験を行った。EPM装置(図1)は、壁のある走行路(enclosed arm)と壁のない走行路(open arm)が十字に交差する迷路となっており、交差部にラットを載せ、一定時間におけるopen armに進入する回数、滞在時間を計測することにより、不安状態を客観的に評価することができる。すなわち、不安が低い状態では、open armに進入する回数、滞在時間が増加する。AD/HDの臨床症状として衝動性があるが、AD/HD児における不安状態の低さと衝動性に相関があることが示されている。実験では、SHRSP産仔とWKY産仔について、open armに進入する回数、滞在時間について比較を行った。また、妊娠中のSHRSPに対する降圧薬メチルドパおよび塩酸ヒドラルジンの投与が、産仔のopen armに進入する回数、滞在時間に与える影響について検討を行った。

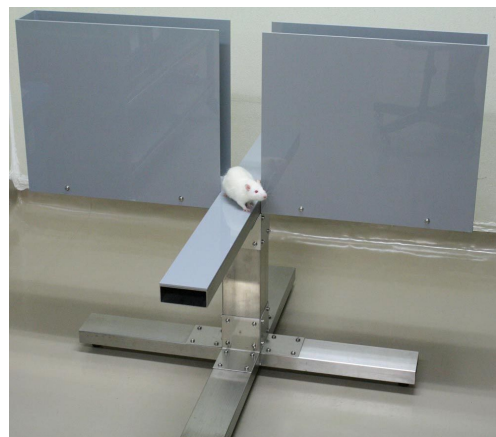


図1 高架式十字迷路

妊娠SHRSPおよびWKYについて、妊娠16日目に胎児を摘出し、神経幹細胞を10日間分化誘導し、細胞数、免疫染色による形態学的

な差異を比較検討した。また、妊娠中の SHRSP に対する塩酸ヒドララジンの投与が、神経幹細胞の分化に与える影響について検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) SHRSP 産仔では、若齢期 (5-8 週齢) において、WKY 産仔に比べ open arm 進入回数、open arm 滞在時間で有意に高値を示した。この傾向は 9 週齢以降に消失した。このことから、妊娠時高血圧により、産仔の若齢期の衝動性が亢進することが明らかとなった。

(2) 妊娠 SHRSP に降圧薬であるメチルドパおよび塩酸ヒドララジンの投与は、5 週齢における open arm 進入回数、open arm 滞在時間の増加を抑制した。

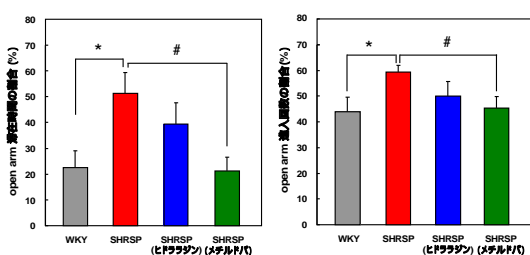


図2. EPM試験によるSHRSP (5週齢) 衝動性の亢進および降圧薬の効果

(3) SHRSP の神経幹細胞を 10 日間分化誘導したところ、SHRSP では WKY に比べ生細胞の有意な減少が認められた。抗 Caspase-3 抗体を用いた検討から SHRSP の細胞では、アポトーシスが観察された。妊娠時に塩酸ヒドララジンを投与した SHRSP では、アポトーシスの有意な減少が認められた。

(4) 抗  $\alpha$ -Tubulin 抗体を用いて、神経細胞数および形態を評価したところ、SHRSP で WKY に比べ神経細胞数が低値であった。WKY の神経細胞の形態は明瞭で突起の伸長が認められたが、SHRSP では神経細胞死が観察され、突起の断片化が多数認められた。塩酸ヒドララジンを投与した SHRSP の神経細胞数は、SHRSP よりも多く、また形態的にも明瞭な神経突起が認められた。

(5) 抗オリゴデンドロサイト抗体を用いた観察では、SHRSP のオリゴデンドロサイト数は、WKY に比べ有意に減少した。WKY のオリゴデンドロサイトには多数の突起が認められたが、SHRSP ではそれが認められなかった。一方、塩酸ヒドララジンを投与した SHRSP では、正常な神経突起が観察された。

本研究により、妊娠時の高血圧はその産仔の小児期における精神・行動発達を低下させることが示唆された。その機序として、高血圧による胎内環境の変化が、胎児期における神経幹細胞の分化に影響し、神経細胞およびオリゴデンドロサイトの形態異常やアポト

ーシスを引き起こしていることが考えられた。妊娠時の降圧薬治療はこれら神経幹細胞の分化を改善することが示された。以上のことから、発達障害の発症に、妊娠時高血圧が関与していること、高血圧の薬物治療が発達障害の発症を減少させることが示唆された。

#### 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)

Wakuda H, Tabuchi M (他 5 名, 4 番目) Is hyperuricemia a risk factor for arteriosclerosis? Uric Acid and arteriosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. Biol Pharm Bull. 37(12):1866-71, 2014. doi: 10.1248/bpb.b14-00201

Chiba T, Itoh T (他 3 名, 4 番目). Resveratrol partially suppresses inflammatory events but does not affect stroke onset in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. J Atheroscler Thromb, 22(9), 958-70, 2015. doi: 10.5551/jat.27789

Chiba T, Itoh T (他 3 名, 4 番目). Evaluation of methionine content in a high-fat and choline-deficient diet on body weight gain and the development of non-alcoholic steatohepatitis in mice. PloS one, 11(10) e0164191 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0164191

[学会発表](計 3 件)

蒲 直子, 田淵 正樹, 伊藤 龍生 (他 3 名, 5, 7 番目), 塩酸ヒドララジンによる発達障害の改善効果に関する検討, 第 71 回日本栄養・食糧学会, 2017 年 5 月 20 日, 沖縄

藪口 友暉, 佐藤 隆夫, 田淵 正樹, 伊藤 龍生 (他 4 名, 6, 7, 8 番目), 高血圧曝露によるラット胎仔神経幹細胞の発達・分化への影響, 第 71 回日本栄養・食糧学会, 2017 年 5 月 20 日, 沖縄

藪口 友暉, 田淵 正樹, 伊藤 龍生 (他 7 名, 9, 10 番目), 妊娠高血圧がラット胎仔神経幹細胞の発達・分化に及ぼす影響, 第 55 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会, 2016 年 10 月 22 日, 大阪

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田淵 正樹 (TABUCHI, Masaki)

園田学園女子大学・健康科学部・准教授  
研究者番号：20340771

(2)研究分担者

伊藤 龍生 ( ITOH, Tatsuki )  
近畿大学・農学部・教授  
研究者番号：40330245

佐藤 隆夫 ( SATOU, Takao )  
近畿大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：70162443