

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16628

研究課題名（和文）妊娠期の抗精神病薬暴露が出生後の仔マウスへ与える影響

研究課題名（英文）Impact of gestational haloperidol exposure on offspring mice

研究代表者

吉野 祐太（Yoshino, Yuta）

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10646243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：母体への抗精神病薬投与が、どのように子の分子細胞生物学的に影響を与えているかは明らかにされておらず、我々はマウスを用いてこの点を解明する目的で研究を行った。抗精神病薬であるハロペリドールを母体へ投与し、産まれた仔の海馬においてmicroRNA-137-3pの低下、およびNr3c1遺伝子発現の上昇を確認した。更に細胞培養を用いた実験で、このmicroRNA-137-3pがNr3c1遺伝子発現を調節していることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母体への抗精神病薬投与が、どのように胎児への分子生物学的な影響を及ぼすかは明らかにされておらず、マウスを用いた研究ではあるが、その一部分を解明できたことは社会的に意義のあることである。また、それに加えて近年注目されているnon-coding RNAの1つであるmicroRNAのうち、統合失調症に関連するとされるmiR-137-3pが神経発達に影響を与えるNr3c1遺伝子の発現を調節することを明らかにしたことは、学術的にも意義のあることであり今後の統合失調症の解明の一助となると考える。

研究成果の概要（英文）：The impact of gestational haloperidol exposure on molecular cell biology in the offspring is unknown. To elucidate this point, we collected hippocampus RNA from a mice model that was born from pregnant mice which took haloperidol during the pregnancy period. The downregulation of microRNA-137-3p and upregulation of Nr3c1 mRNA expressions were confirmed in HAL treated offspring. Additionally, we revealed that microRNA-137-3p regulates the Nr3c1 mRNA expression by in vitro experiment.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：遺伝子発現 マイクロRNA 統合失調症 ハロペリドール 母体への薬剤暴露

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人種に関係なく有病率 1%の common disease であり、抗精神病薬は有効であるものの、慢性の経過をたどり進行性に社会機能が低下することが多い。ドパミン仮説をはじめ様々な仮説が提唱されているが、発症・病態の全てを解明するに至ってはいない。発症の要因として遺伝要因・環境要因の双方が関与しているとされ、ウイルス感染、母体の栄養不全など胎児期のストレスも環境要因として挙げられる (PMID: 31207234)。一方、母親が統合失調症である場合、児の統合失調症発症率は増加することが知られている (29132814)。この要因として、遺伝要因、統合失調症の母親の養育能力の不足、タバコを含む嗜好品等の環境要因が原因と考えられる (31226546)。しかし、母体の抗精神病薬内服と児の統合失調症発症リスクの相関に関して、ヒトを対象とした研究が倫理面、また追跡が困難という面からエビデンスに乏しいのが現状である。母体の抗精神病薬内服の胎児の催奇形性への影響は比較的検討されており、定型・非定型抗精神病薬では非内服群と比較して胎児の催奇形性に有意差はなかったとする報告がある (27029490、27484686)。しかしながら、胎児への分子生物学的な影響は我々の知る限り研究されておらず、発症の一因となっている可能性がある。そこで私は、マウスを用い妊娠開始から出産までハロペリドール (HAL) 投与を行い、出生した仔を対象として遺伝子発現実験を行った。HAL がドパミン D2 (DRD2) 受容体に高い親和性を持つことから、海馬の DRD2 mRNA 発現を qPCR 法にて測定したところ、驚くことに生理食塩水 (NS) 投与群と比較して HAL 投与群で有意に発現が上昇していた。次に mRNA 発現を網羅的に把握するために、海馬 RNA を RNA-seq に提出した (n = 6)。その結果 HAL 投与群において、1372 遺伝子の有意な発現増加、1261 遺伝子の有意な発現減少を確認した。有意かつ NS 群と比較して 1.5 倍の上昇を認める遺伝子 (176 遺伝子) を対象に DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) にて gene ontology (GO) 解析を行った。その結果、神経発生及びシナプス機能に関連する GO term を認めた。

## 2. 研究の目的

近年、non-coding RNA の一つである microRNA (miRNA) が遺伝子発現の調節を介して神経発生、シナプス機能に影響を与えること (21124738、19850129、20159450、1857789)、精神神経疾患の発症・病態に関わることが報告されている (25824307、22737160)。私は現在米国に留学し、ヒト死後脳と cell line を用い miRNA が精神神経疾患に与える影響を研究しており、帰国後も留学先で得た知識・技術を用いて同様の研究を継続、発展させていく予定である。我々の知る限り、母体の抗精神病薬曝露による仔への分子生物学的な影響に注目した研究は存在しない。そこで私は仔マウスを用いた preliminary data で得られている神経発生、シナプス機能に関連する遺伝子発現変化を miRNA の観点から明らかにする事を研究の目的とする。

### 3 . 研究の方法

#### モデル作成

C57BL/6 マウスの妊娠成立時より、vehicle (生理食塩水[NS])、haloperidol 1mg/kg (HAL) をそれぞれ出産に至るまで投与し、出生した仔雄マウスの 8 週齢時の海馬、前頭葉を摘出し解析に使用した (F1 マウス)。仔雌マウスは野生型 C57BL/6 雄マウスと交配させ、出生した仔雄マウスを F2 マウスとし、同様に 8 週齢時の海馬、前頭葉を解析に使用した。

#### RNA-seq の In silico 解析

神経発生、シナプス機能に関連する遺伝子発現変化のうち、統合失調症に関連する仮説に関連する遺伝子群を抽出した。

#### microRNA-seq による網羅的な miRNA 変化の解析

研究開始当初の背景で RNA-seq に提出した海馬 RNA を microRNA-seq に提出した (NS vs HAL, n = 6 each)。In silico 解析として、IPA software を使用し RNA-seq の結果から mRNA 発現を調節している可能性がある miRNA を抽出し、その後 microRNA-seq の結果と照らし合わせて miRNA を絞り込んだ。

#### 対象 mRNA、miRNA の再現実験

対象の mRNA、miRNA に関して qPCR 法を用いて再現実験を行った。

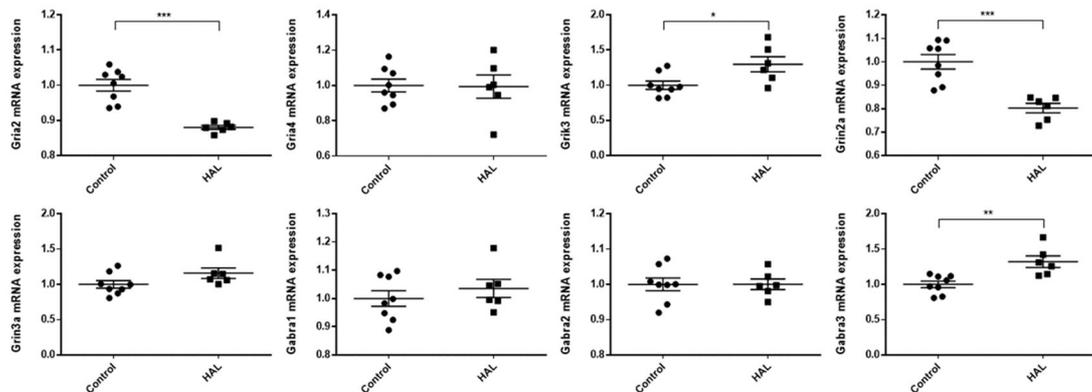
#### In vitro 実験系を用いた検証実験

対象の miRNA が mRNA を調節しているかを解明するために、Neuro2a (マウス神経芽細胞腫) に miRNA を過剰発現させ、対象の mRNA を qPCR 法にて測定した。また、miRNA は 3'-UTR の seed sequence に結合し、発現調節をすることより対象遺伝子の seed sequence を pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector にクローニングし、Neuro2a に miRNA と共にダブルトランスフェクションさせ、ルシフェラーゼの発光を確認した。

### 4 . 研究成果

#### 統合失調症に関連する仮説に関連する遺伝子群を RNA-seq より抽出

グルタミン酸、GABA に関連する遺伝子群の発現が変化していることが、RNA-seq より確認された。海馬での再現実験に加え (下図)、前頭葉でも同様の変化を認めた (data not shown)。



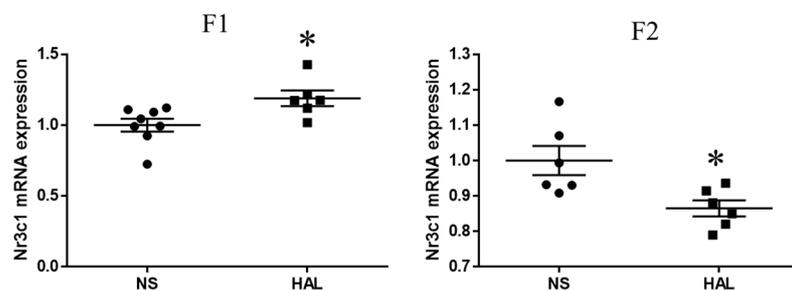
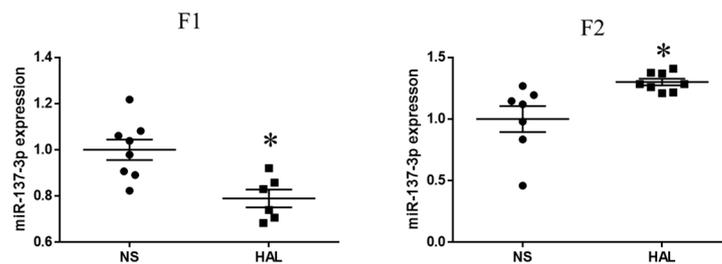
グルタミン酸、GABA は刺激性・抑制性神経に関連するとされ、統合失調症の発症・病態と関連があるとする報告が多数あり、母体への抗精神病薬が仔マウスのこれら病態に影響を与える可能性を明らかにした。この結果に関して、現在論文を投稿中である。

#### microRNA-seq による網羅的な miRNA 変化の解析

発現変化していた miRNA のうち統合失調症に関連すると報告がある miR-137-3p に注目し再現実験を行った結果、HAL 群において有意に発現が低下していることを再現できた。驚くことに F2 マウスでは発

現が増加していた(右図)、miR-137-3p が調節する可能性がある、かつ RNA-seq で発現が増加しており神経系に関わる遺伝子として、Nr3c1, Htr2c,

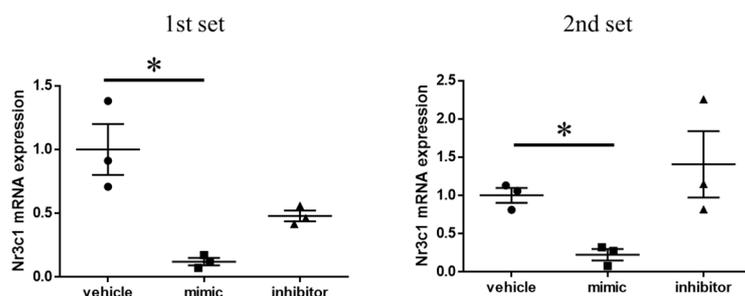
Gsk3b, Nr3c1 に関して再現実験を行い、Nr3c1 のみ有意に発現が上昇していることを確認できた。更に、F2 マウスでは発現が減少していることも確認できた(下図)。



#### In vitro 実験系を用いた検証実験

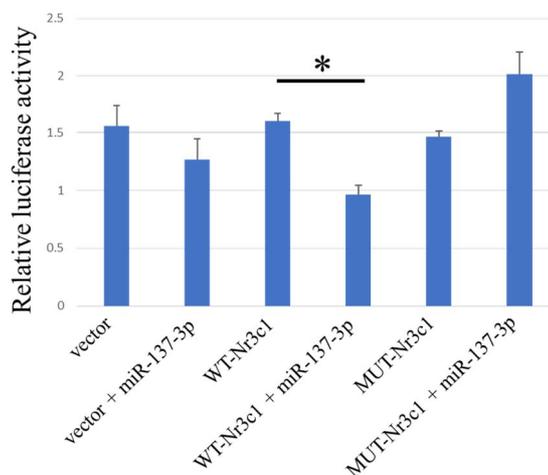
miR-137-3p oligo をトランスフェクションさせた Neruo2a cell (mimic 群) では、vehicle 群と比較して miR-137-3p が 40 倍に過剰発現していることを確認した (data not shown)。

Nr3c1 遺伝子発現は mimic 群で低下しており（下図）、miR-137-3p が Nr3c1 遺伝子発現を調節している可能性が示唆された。



更に、miR-137-3p が Nr3c1 3'-UTR に存在する seed sequence に結合することで発現を調節するかを検討するために、Dual-Luciferase assay を行った。その結果、seed sequence をクローニングしたプラスミド、miR-137-3p をダブルトランスフェクションさせた細胞群でルシフェラーゼ発光が有意に低下していた（右図）。

Position 2035-2041 of Nr3c1 3'UTR	
WT-Nr3c1	5'...GUGCAUAGAGGUUCCAGCAUAU... 3'
mmu-miR-137-3p	3'-GAUGCGCAUAAGAAUUCGUAU- 5'
MUT-Nr3c1	5'..GUGCAUAGAGGUUCCUCGUAU... 3'



以上の結果から、母体への HAL 投与は仔マウスの miR-137-3p 発現を減少させ、その結果 Nr3c1 遺伝子発現を上昇させることを明らかにした。Nr3c1 は統合失調症に関連するのみでなく（32281042）、HPA axis を通じて、神経発達に広く影響を与えることが知られている（32459992）。現在、これらの結果をまとめて論文投稿中である。

現在、このモデルの再現性を検証するために、同様のプロトコールでモデルを再作成した。今回の研究結果が再現できるか、また今回の研究では行わなかった行動解析を追加して、どのように表現型に影響を与えるか検討している。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------