

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460252

研究課題名(和文) 妊娠中のウイルス感染モデルを用いた神経発達の研究

研究課題名(英文) Study of neurodevelopment using viral infection model during pregnancy

研究代表者

大河原 剛 (Ohkawara, Takeshi)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20469034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、発症率が増加している自閉症の危険因子として妊娠中のウイルス感染が報告されているが、どの時期にウイルス感染が起こると産まれてきた児が自閉症になるリスクが高いのかに関してはあまりわかっていない。そのため研究代表者は、産まれてきた児が自閉症になる可能性が高いウイルス感染時期(臨界期)を調べるために、ウイルス感染モデルラットを用いて、自閉症への関与が疑われるセロトニン神経系の異常を指標に臨界期の同定を行った。その結果、産まれてきた仔のセロトニン神経系に異常を引き起こすウイルス感染時期が少なくとも2つあることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recently, the prevalence of autism spectrum disorder (ASD) is increased. It is reported that viral infection during pregnancy is one of the risk factors of ASD. However, little is known about critical period to viral infection during pregnancy that cause ASD. To examine the critical period to viral infection during pregnancy that cause ASD, I made viral infection model during pregnancy and examined the critical period. I revealed that there are at least two critical periods to viral infection during pregnancy that induce abnormality to serotonergic system of offspring.

研究分野：神経発達障害

キーワード：自閉症 妊娠中のウイルス感染

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だけ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作製した自閉症モデルラットを解析し、様々な自閉症様の異常が起こることを明らかにしている。

さらに、妊娠中の環境有害物質の曝露に加え、妊娠中の細菌感染やウイルス感染も自閉症の発症のリスクファクターであることが指摘されている。最近の自閉症研究の進展に伴い、妊娠中の細菌感染やウイルス感染により引き起こされる母体の免疫活性化が自閉症発症の引き金になることが明らかになりつつあるが、詳しい発症メカニズムは不明のままである。これまでに研究代表者は、ウイルス感染モデルとして良く実験に用いられる合成二本鎖RNAである polyriboinosinic : polyribocytidylic acid (poly I:C) を妊娠ラットに投与することで自閉症モデルラットの作製を試みた。その結果、poly I:C 投与ラットにおいて、胎生期のセロトニン神経細胞の発達異常が起こること、生後の海馬のセロトニン含量が減少することを明らかにした。セロトニン神経系は、情動や認知行動に関与しており、自閉症患者においてその機能低下が指摘されていることから、研究代表者が作製した poly I:C 投与ラットを解析することで、妊娠中のウイルス感染により引き起こされる自閉症の発症メカニズムが明らかになることが期待される。

2. 研究の目的

妊娠中のウイルス感染は、自閉症を含む発達障害を引き起こすことが報告されているが、その発症メカニズムはほとんど解っていない。妊娠中にウイルスに感染する女性は非常に多いが、ウイルスに感染した妊婦から産まれた児全てが自閉症になるわけではない。すなわち、ある特定の条件を満たした場合のみ、児に自閉症が発症すると言える。それでは、特定の条件とは何なのか。その中の一つに児の遺伝的なバックグラウンドが考えられるが、一卵性双生児の自閉症の一致率が6~9割であることから、それ以外にも原因があると考えられる。それ以外の原因として、臨界期の存在(ある特定の時期にウイルス感

染した場合のみ自閉症を発症する) 免疫活性化の程度が考えられる。本研究では、poly I:C 投与モデルを用い、自閉症を引き起こすウイルス感染の時期と免疫活性化の程度を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 臨界期の同定

妊娠5, 10, 17, 18, 19, 21日目、生後4, 5, 10日目のWistarラットにPBSに溶解した10 mg/kgのpoly I:Cを注射器で腹腔内に投与した。コントロール群は、同週齢のWistarラットに溶媒であるPBSを投与した。仔ラットが8週齢になった時点で、海馬を取り出して、液体窒素で急速に凍結した後、測定するまで-80で保存した。凍結しておいた脳の重量を測定した後に、脳試料1gに対して5mlの0.2 M 過塩素酸(100 μM 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、超音波破砕機で脳試料を完全に破砕した。遮光した状態で水中で30分間放置した後、4で20000 x g, 15分間遠心分離を行ったのちに、200 μlの上清を新しいチューブに移し、そこに27 μlの1M 酢酸ナトリウムを加え、pHの調整を行った。0.45 μm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。実験は薬剤の投与時期が同じもの(コントロール群とpoly I:C群)をペアとして同じ日に実験を行った。今回の実験で解析した雄ラットの数は、PBSの投与時期(コントロール群)が妊娠5日目で14匹、10日目で8匹、17日目で15匹、18日目で6匹、19日目で15匹、21日目で7匹、生後4日目で11匹、5日目で14匹、10日目で13匹であった。一方、poly I:C群は、妊娠5日目に投与した群で14匹、10日目で16匹、17日目で10匹、18日目で11匹、19日目で15匹、21日目で9匹、生後4日目で14匹、5日目で13匹、10日目で14匹であった。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。

(2) poly I:C 投与量の決定

12週齢の雌のWistarラットに、PBSに溶解した0.1, 1, 10 mg/kgのpoly I:Cを注射器で腹腔内に投与した。対照群は、溶媒であるPBSを同量、腹腔内に投与した。4時間後、肝臓を取り出し、TRIzol Reagentを用いて、total RNAを回収した。Nanodropを用いてRNAを定量した後、キアゲン社のQuantiTect Reverse Transcription Kitを用いてcDNAの合成を行った。Applied Biosystems 社製

Step One Real-Time PCR Systems を用い、タカラバイオ社の SYBR Premix EX Taq II を使用したインターカレーター法により定量的 PCR を行った。PCR の反応条件は、反応液を 95 30 秒で酵素の活性化を行った後に、95 5 秒の熱変性、60 30 秒のアニーリングと伸長反応を 40 サイクル行った。結果の解析は、比較 Ct 法を用いて行った。統計解析は *t* 検定で行った。本研究で使用した primer の配列を表 1 に記す。

| 遺伝子 | | 配列 |
|--------------|---------|-------------------------------|
| TNF α | Forward | 5'- tgggctccctctcatcagtt -3' |
| | Reverse | 5'- tgctcctctgcttggtgtg -3' |
| GAPDH | Forward | 5'-caagttcaacggcacagtcagg -3' |
| | Reverse | 5'-acatactcagcaccagcatcac -3' |

表 1 本研究で使用した primer の配列

(3) 母体の免疫活性化の程度が産まれてきた仔の脳のセロトニン含量に与える影響

妊娠 10 日目の Wistar ラットに、PBS に溶解した 0.1, 1, 10 mg/kg の poly I:C を注射器で腹腔内に投与した。対照群は、溶媒である PBS を同量、腹腔内に投与した。産まれてきた雄の仔が生後 50 日になった時に線条体を回収し、液体窒素で急速に凍結した後、測定するまで -80 で保存した。前述のようにサンプルの調整を行った後に 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。今回の研究では、コントロール群 4 匹、0.1 mg/kg poly I:C 投与群 11 匹、1 mg/kg poly I:C 投与群 8 匹、10 mg/kg poly I:C 投与群 4 匹を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 妊娠中のウイルス感染による自閉症の発症には、臨界期が存在する

妊娠中のウイルス感染による自閉症発症に臨界期が存在するのかを調べるために、妊娠 5, 10, 17, 18, 19, 21 日目、生後 4, 5, 10 日目の Wistar ラットに 10 mg/kg の poly I:C を投与し、雄の仔ラットが生後 8 週齢になった時点で海馬を取り出し、HPLC によりセロトニン含量を測定した。その結果、妊娠 5, 10, 17, 21 日目、生後 4, 5 日目に poly I:C を投与した群において、コントロール群と比較してそれぞれ 24.0, 19.8, 24.6, 20.0, 35.9, 14.5% の海馬セロトニン含量の有意な低下減少が見られた。しかしながら、妊娠 18, 19 日目、生後 10 日目に poly I:C を投与した群では、有意差が見られなかった。これらの結果から、妊娠中のウイルス感染が仔ラットの

脳のセロトニン神経系に影響を与える臨界期が少なくとも 2 つ (妊娠 5 日目 ~ 17 日目、妊娠 21 日目 ~ 生後 5 日目) 存在することが示唆された。

(2) サイトカイン遺伝子の発現量を量依存的に変化させる poly I:C の投与量の決定

サイトカイン遺伝子の発現量を量依存的に変化させる poly I:C の投与量を決めるために、12 週齢の雌の Wistar ラットに 0.1, 1, 10 mg/kg の poly I:C を投与し、その 4 時間後に肝臓を回収し、リアルタイム PCR により、サイトカイン遺伝子の相対的な発現量を調べた。その結果、コントロール群に比べ、0.1, 1, 10 mg/kg の poly I:C を投与した群において TNF α 遺伝子の発現量がそれぞれ 5.1, 19.0, 35.6 倍に増加することを明らかにした (図 1)。

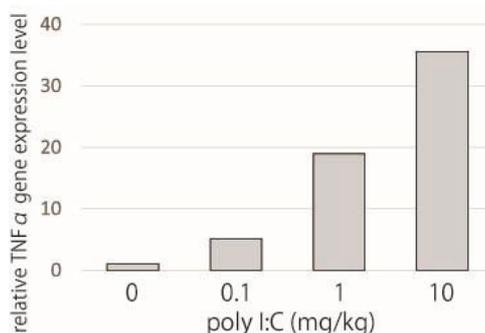


図 1 肝臓における TNF α 遺伝子の発現量は poly I:C の投与量に依存する

(3) 妊娠中のウイルス感染は産まれてきた仔の線条体のセロトニン含量には影響を与えない

妊娠 10 日目の Wistar ラットに 0.1, 1, 10 mg/kg の poly I:C を投与し、産まれてきた仔が生後 50 日になった時に線条体を回収し、HPLC によりセロトニン含量を調べた。その結果、コントロール群のセロトニン含量は 295.9 ± 21.4 ng/g, 0.1 mg/kg poly I:C 群では 277.4 ± 68.1 ng/g, 1 mg/kg poly I:C 群では 342.8 ± 46.7 ng/g, 10 mg/kg poly I:C 群では 423.6 ± 144.0 ng/g と poly I:C の投与量が増えるにつれて線条体のセロトニン含量が増加する傾向が見られたが、統計的な有意差は見られなかった (図 2)。

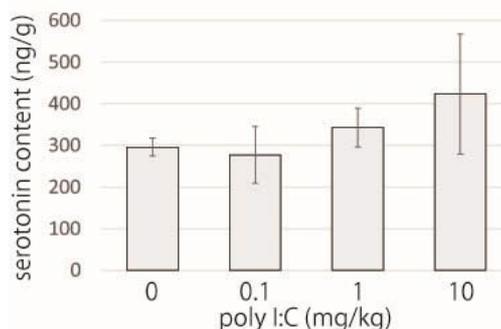


図 2 線条体におけるセロトニン含量

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)

Ohkawara T, Ida-Eto M, Narita M. Analysis of brain serotonin content following viral infection in timed-pregnant and developing rat - Implications for maternal viral infection in the cause of SIDS – The Journal of Japan SIDS Research Society. 査読あり、vol.16、2016、pp.3 - 7
<http://plaza.umin.ac.jp/sids/journal1601.html>

[学会発表](計2件)

大河原剛ほか、妊娠中のウイルス感染は児の呼吸動態に影響を与える ウイルス感染モデルラットを用いた実験より、日本解剖学会、2017年3月29日、長崎大学(長崎県長崎市)

大河原剛ほか、Viral infection during pregnancy causes long term effects on the gene expression in the rat brain、日本神経科学会、2016年7月21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)

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/

6. 研究組織

(1)研究代表者

大河原 剛 (OHKAWARA Takeshi)
三重大学・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：

(4)研究協力者

なし()