

## 周産期における異常免疫応答による神経精神毒性に関する研究

分担研究者：山田清文

研究協力者：衣斐大祐、小池宏幸、北原裕子、Jinghua Yu、新田淳美

（名古屋大学大学院医学系研究科・附属病院薬剤部）

### [研究要旨]

本研究では、生体との相互作用を介した化学物質による精神発達障害の機構解明を目的として、周産期における異常免疫応答が脳神経発達および成長後の脳機能に及ぼす影響について動物モデルを用いて研究を行う。具体的には、生後2日目から6日目までの5日間、ICR系マウスに合成2本鎖RNAアナログである polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C, 5 mg/kg) を皮下投与し、周産期擬似ウイルス感染モデルを作製した。なお、コントロール群には溶媒として用いた生理食塩液を投与した。PolyI:C 処置マウスが10週齢に達した後、学習記憶および情動の異常を系統的な行動解析により調べた。海馬におけるグルタミン酸作動性神経系の機能変化は *in vivo* dialysis 法を用いて解析した。さらに、polyI:C 処置により誘発される脳機能障害の分子機構を解明するために、DNA アレイを用いて海馬における遺伝子発現変化を網羅的に解析するとともに、統合失調症関連遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR 法で調べた。PolyI:C 処置マウスはコントロール群と比較して、不安様行動の増加、学習記憶や感覚情報処理機能の障害および社会性行動の異常を示した。しかし、自発運動活性やメタンフェタミンおよび NMDA 受容体アンタゴニストである MK-801 により誘発される多動には変化は認められなかった。さらに、polyI:C 処置マウスでは、学習記憶や情動に関与している海馬におけるグルタミン酸の基礎遊離量が増加し、逆に高カリウム刺激による脱分極誘発性グルタミン酸遊離は低下した。DNA アレイを用いた解析により、polyI:C 処置マウスの海馬において mRNA レベルが 50%以下に有意に低下した4つの遺伝子 (*Srd5a21*, *Creg2*, *Ptgds* および機能不明の遺伝子) を見出した。一方、リアルタイム PCR 法による解析では、*Ifitm3* mRNA が polyI:C 最終投与2時間から24時間後まで持続的に増加することが明らかになった。今後、polyI:C 処置マウスにおける脳機能障害とこれら遺伝子の発現変化との関連性について、より詳細に検討する予定である。

### A. 研究目的

化学物質の精神毒性には、物理化学的な性質に基づくそれぞれの化学物質に固有の毒性と化学物質と生体との相互作用に基づく化学物質全般に共通する影響があると考えられる。生体との相互作用を介した化学物質による精神発達障害の機構解明を目的として、周産期における異常免疫

応答が脳神経発達および成長後の脳機能に及ぼす影響について動物モデルを用いて研究を行う。

### B. 研究方法

#### 1. 周産期擬似ウイルス感染動物モデルの作製

生後2日目から6日目までの5日間、ICR系マウス(日本エスエルシー、静岡)に合成2本鎖RNA

アナログである polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を 5 mg/kg の用量で 1 日 1 回皮下投与し、周産期擬似ウイルス感染モデルを作製した。コントロール群には溶媒として用いた生理食塩液を投与した。なお、本実験計画は名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、名古屋大学医学部実験動物指針に準じて行った。

## 2. 行動解析

PolyI:C 処置マウスが 10 週齢に達した後、学習記憶および情動の異常を以下の行動試験により調べた。

### オープンフィールド試験

灰色の亚克力製円形オープンフィールド（直径 60 cm, 高さ 35 cm）の中央にマウスを置き、5 分間の外円および内円（直径 40 cm）における歩行量および滞在時間を Ethovision 自動トラッキングプログラム（Brainscience Idea Co. Ltd., Osaka, Japan）を用いて解析した。

### 新奇物体探索試験

新奇物体探索試験は Nagai らの方法 (2007) に準じて行った<sup>3)</sup>。実験装置は亚克力製のオープンフィールドを用いた (30×30×35 cm)。マウスを実験装置に 3 日間 (10 分間/日) 慣らした後、訓練試行を行った。訓練試行では装置内に異なる 2 つの物体を置き、装置内を 10 分間自由に探索させた。訓練試行の 24 時間後に保持試行を行った。保持試行では訓練試行時に用いた 2 つの物体の片方を新奇物体と置き換え、動物を装置内に入れ 5 分間自由に探索させた。訓練試行および保持試行における 2 つの物体に対するそれぞれの探索（接触、臭い嗅ぎなど）時間を測定した。訓練試行においては、2 つの物体のいずれかを探索した時間と総探索時間との比を、保持試行においては新奇物体を探索した時間と総探索時間と

の比を探索嗜好性 (exploratory preference; EP) として示した。

### プレパルス抑制試験

プレパルス抑制試験は Takahashi らの方法 (2007) に準じて SR-LAB 驚愕反応測定システム (San Diego Instruments, San Diego, CA, U.S.A.) を用いて測定した<sup>5)</sup>。装置内には背景ノイズ (Background; BG) として 65 dB の音を流した。65 dB の BG 下で 10 分間馴化させた後、次の 3 種類のトライアルをそれぞれ 10 回ずつ負荷した。①驚愕反応を引き起こす 120dB、40 msec の音刺激（パルス刺激）のみ、②パルス刺激の 100 msec 前に 69、73、77 または 81 dB、20 msec の音刺激（プレパルス刺激）を加えたトライアル、③BG のみ。テストでは最初にパルス刺激を 5 回、次に 3 種類のトライアルを 10 から 22 秒の間隔でランダムに 10 回ずつ、最後にパルス刺激を 5 回提示し、合計 70 回のトライアルを負荷した。この時、音刺激と同期させて 1 msec 間隔で 1 秒間驚愕強度を記録した。得られたデータから、以下の式に従い PPI を算出した。

$$PPI (\%) = [ 1 - (pPx / P120) ] \times 100$$

P120 : パルス刺激の単独提示時の驚愕強度最大値の平均

pPx : プレパルス刺激 (69-81dB) とパルス刺激の連続提示時の驚愕強度最大値の平均

### 社会性行動試験

社会性行動試験は Tremolizzo らの方法 (2005) に準じて行った<sup>6)</sup>。生理食塩水または polyI:C 処置マウスをポリカーボネート製試験ケージ（透明：34×22×15 cm）に移して 2 日間馴らした。これらのマウスとは別に通常飼育を行ったマウス（新奇侵入マウス）を試験ケージに入れ、5 分間の行動を解析した。社会性行動試験はこの試行を 30 分間間隔で 4 回繰り返した。能動的な接近行動、

追尾行動、臭い嗅ぎ行動、毛繕い行動を社会性行動として、噛み付き行動、尾の戦振、襲いかかり行動を攻撃行動として、また新奇侵入マウスから離れる行動を逃避行動として、それぞれの行動の時間を測定した。

#### 自発運動量および薬物誘発性運動量増加反応

マウスをアクリル製オープンフィールド (25×30×18 cm) に入れ 120 分間馴化させた後、MK-801 (0.1-0.3 mg/kg) あるいはメタンフェタミン (2 mg/kg) を皮下投与した。投与直後から 180 分間の運動量を赤外線センサー (NS-AS01, Brainscience Idea Co. Ltd.) を用い測定した。

### 3. インビボ・ダイアリシス

10~12 週齢雄性マウスの海馬 (AP: -3.3, ML: +2.8 from bregma, DV: -2.5 mm from the skull) にプローブを挿入し 1.0  $\mu$ L/min の流速でリングル液を灌流した。10 分毎に回収されたリングル液中に含まれるグルタミン酸量を高速液体クロマトグラフィ (HTEC 500, EICOM, Corp., Kyoto, Japan) を用いて定量した<sup>2)</sup>。脱分極誘発性のグルタミン酸遊離量を測定する場合には 60 mM KCl を含むリングル液を灌流した。

### 4. 遺伝子発現解析

Bioanalyzer 2100 electropherograms (Agilent; Santa Clara, CA, USA) を用いて、電気泳動後の 18S および 28S リボソーム RNA のシグナルを指標に抽出した全 RNA のクオリティーを検査した。全 RNA (5  $\mu$ g) から T7 オリゴプライマーを用いた逆転写により cDNA を合成した。ビオチン標識されたリボヌクレオチド存在下において T7 RNA ポリメラーゼにより cDNA からビオチン化 cRNA を合成した。ビオチン化 cRNA を金属誘発性の加水分解により約 20 から 200 塩基程度に断片化し、GeneChip mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix;

Santa Clara, CA, USA) にハイブリダイズさせた。DNA マイクロアレイを洗浄し、フィコエリスリン標識ストレプトアビジンと反応させ GCS3000 laser scanner (Affymetrix) で蛍光強度を読み取った。得られたシグナルのバックグラウンドノイズ補正および正規化には Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) から提供されている GCRMA アルゴリズムを用いた。統計計算やグラフ化には R 言語を用いた (<http://www.r-project.org/>)。コントロール群と polyI:C 投与群の間の遺伝子発現変化は線形モデルを用いて解析した。スキッチャープロットおよび階層的クラスタリング解析は SPOTFIRE 8.2.1 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) を用いた。

リアルタイム PCR 法による定量では、polyI:C 最終投与 24 時間後の海馬から抽出した RNA を Superscript III (Invitrogen, Eugene, OR) を用いて cDNA に変換した後、7300 real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて mRNA 量を定量した。

### 5. 統計解析

データは平均±標準誤差で示した。独立多群間の比較には一元配置分散分析 (analysis of variance, ANOVA) または反復測定分散分析法 (repeated measures ANOVA) を用い、有意差が認められた場合には Bonferroni/Dunn の検定を用いた。いずれの検定においても、危険率 5% 以下で差が認められる場合を有意差ありと判定した。2 群間の比較は Student t-test を用いて行った。

## C. 研究結果

### 1. PolyI:C 処置マウスの学習記憶および情動変化

新生児期に polyI:C (5mg/kg) を連続投与すると、4 週齢までは若干の体重減少 (10% 以下、 $p<0.05$ ) が観察されたが、それ以降は生理食塩水を投与し

たコントロール群と全く差は認められなかった。また、10週齢の polyI:C 処置マウス脳の Nissl 染色では、脳細胞の形態・層構造に異常は認められなかった。

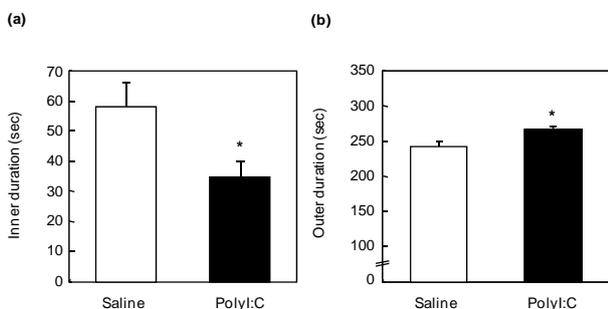


Fig. 1 Effect of neonatal polyI:C treatment on anxiety-like behavior in mice. Individual mice were allowed to explore the open field freely for 5 min. Time spent in (a) inner and (b) outer sectors. Values indicated the mean  $\pm$  SE (n=7-8). \*p<0.05 vs. saline-treated control group (two-tailed t-test).

オープンフィールド試験において、polyI:C 処置群はコントロール群に比較して内円での滞在時間が減少し、外円での滞在時間および歩行距離が有意に増加した (Fig.1)。一方、オープンフィールド内での総歩行距離は両群間で差がなかったことから、polyI:C 処置マウスでは不安が増加していると考えられた。

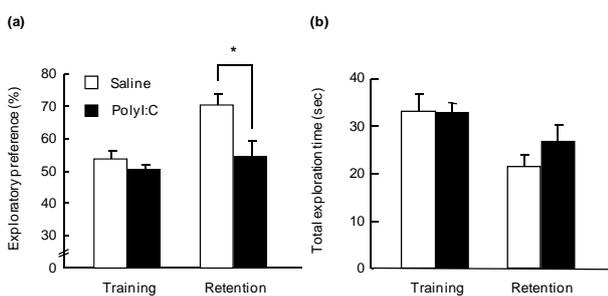


Fig. 2 Effect of neonatal polyI:C treatment on recognition memory in mice. (a) Exploratory preference. (b) Total exploration time. Values indicated the mean  $\pm$  SE (n=8). \*p<0.05 vs. saline-treated control group (two-tailed t-test).

次に、polyI:C 処置の認知記憶を新奇物体探索試

験により評価した。訓練試行における新奇物体への総探索時間 (Fig.2b) および探索嗜好性 (Fig.2a) は、polyI:C 処置群とコントロール群との間で差はなく、新奇物体に対する好奇心などには変化がないことが示唆された。一方、保持試行における探索嗜好性はコントロール群に比較して polyI:C 処置群で有意に低下した (Fig.2a)。したがって、polyI:C 処置マウスにおける認知記憶の障害が示唆された。

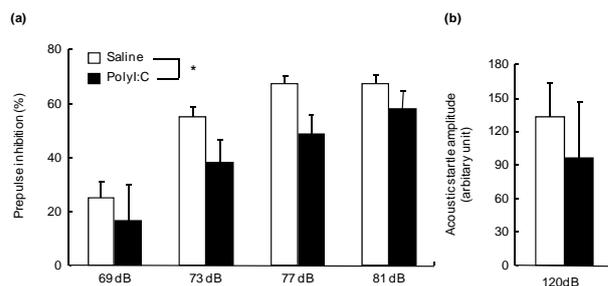


Fig. 3 Effect of neonatal polyI:C treatment on PPI in mice. (a) PPI (%) at four different prepulse intensities (69, 73, 77 and 81 dB). (b) Acoustic startle amplitude as measured in trials without prepulse. Values indicated the mean  $\pm$  SE (n=8). \*p<0.05 vs. saline-treated control group.

PolyI:C 処置マウスの感覚情報処理能力をプレパルス抑制試験により評価した (Fig.3)。PolyI:C 処置群とコントロール群の間でパルス刺激により誘発される驚愕反応に差は認められなかった (Fig.3b)。パルス刺激の直前に弱いプレパルス刺激を挿入すると驚愕反応の減弱 (プレパルス抑制) が観察されたが、その程度はコントロール群に比較して polyI:C 処置群で低下していた (Fig.3a)。すなわち、polyI:C 処置マウスではプレパルス抑制の障害が認められた。

PolyI:C 処置マウスの社会性行動の変化を Fig.4 に示した。第1試行におけるマウス間の相互作用の時間には、polyI:C 処置群とコントロール群の間で差は認められなかった。第2試行以降、コントロールマウスでは相互作用の時間が漸減し、新奇

マウスに対する慣れが観察された。一方、polyI:C 処置群ではこの減少反応の増強が認められた。新奇物体探索試験において、polyI:C 処置マウスの認知記憶障害が示唆されたことから、この行動変化は新奇マウスの記憶に関連した慣れの促進ではないと考えられる (Fig. 4a)。なお、新奇マウスに対する逃避行動 (Fig. 4b) や攻撃行動 (Fig. 4c) は何れのマウスもほとんど示さず、差は認められなかった。

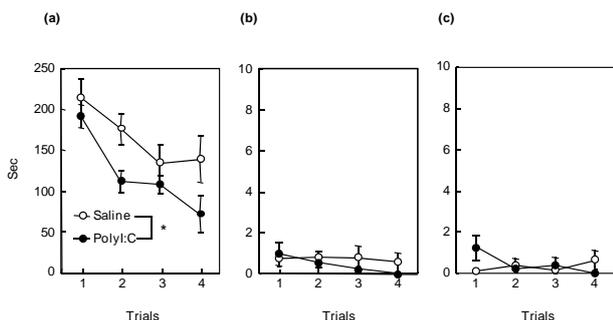


Fig. 4 Effect of neonatal polyI:C treatment on social behavior in mice. (a) Social interaction, (b) Escape behavior and (c) Aggressive behavior for 5 min in each trial. Values indicated the mean  $\pm$  SE (n=8). \*p<0.05 vs. saline-treated control group.

最後に NMDA 受容体アンタゴニストである MK-801 およびメタンフェタミンに対する反応性を比較した。薬物投与前の自発運動量、MK-801 あるいはメタンフェタミンにより誘発される運動過多に変化は認められなかった (Fig. 5)。

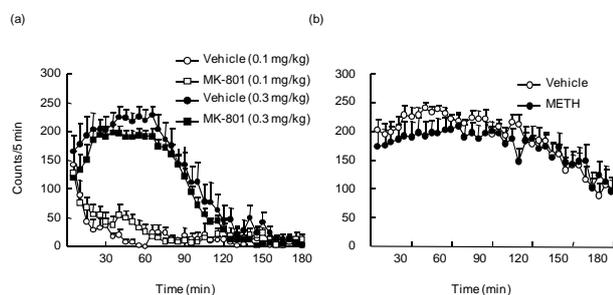


Fig. 5 Effect of neonatal polyI:C treatment on sensitivity to MK-801 or METH in mice. Hyperactivity was induced by (a) MK-801 (0.1 or 0.3 mg/kg, i.p.) or (b) METH (2 mg/kg, i.p.) treatment. Values indicate the mean  $\pm$  SE (n=7-10).

## 2. PolyI:C 処置マウスの海馬におけるグルタミン酸神経伝達

学習記憶や情動に関与している海馬のグルタミン酸作動性神経系の機能を調べるために、*in vivo* dialysis 法を用いて細胞外グルタミン酸量を測定した。PolyI:C 処置マウスではコントロール群に比較して、海馬におけるグルタミン酸基礎遊離量が増加し、高カリウム刺激による脱分極誘発性グルタミン酸遊離は低下していた (Fig. 6)。

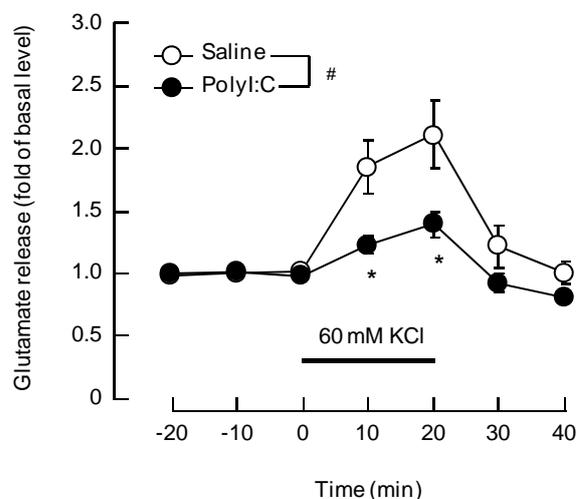


Fig. 6 Effect of neonatal polyI:C treatment on depolarization-evoked glutamate release in the hippocampus of mice. Values indicated the mean  $\pm$  SE (n=7). \*p<0.05 vs. saline-treated control group (two-tailed t-test). #p <0.05 vs. saline-treated control group.

## 3. PolyI:C 処置マウスの海馬における遺伝子発現変化

DNA アレイを用いた解析により、polyI:C 処置マウスの海馬において mRNA レベルが 50%以下に有意に低下した 4 つの遺伝子 (*Srd5a21*, *Creg2*, *Ptgds* および機能不明の遺伝子) を見出した。一方、リアルタイム PCR 法による解析より、*interferon-induced transmembrane protein 3 (ifitm3)* mRNA が polyI:C 最終投与 2 時間から 24 時間後まで持続的に増加することが明らかになった。

## D. 考察

本研究では、生体との相互作用を介した化学物質による精神発達障害の機構解明を目的として、特に周産期のウイルス感染が胎児・新生児の脳神経精神発達に及ぼす影響について新たな動物モデルを作製して研究した。すなわち、グリア細胞の増殖・移動や脳一血液関門の形成が活発な新生児期のマウス（生後2日目から6日目）に二本鎖RNAアナログである polyI:C を5日間連日皮下投与して動物モデルを作製した。脳一血液関門はヒトでは妊娠中期から後期の胎生期に形成されること<sup>1)</sup>、またこの時期に妊婦がインフルエンザに感染すると胎児が統合失調症などの精神疾患を発症するリスクが高くなることから<sup>4)</sup>、本擬似ウイルス感染モデルは、ヒトにおける胎生期ウイルス感染モデルと考えられる。また、polyI:C は toll-like receptor 3 を活性化して炎症性サイトカインの産生を誘導など<sup>7)</sup>、自然免疫を活性化することが知られている。

10週齢に成長した polyI:C 処置マウスの神経精神機能を系統的行動解析により調べた結果、本モデルマウスには不安行動の増加、認知機能の障害および社会性行動の異常が認められた。さらに、*in vivo dialysis* による研究により、学習記憶や情動に関与している海馬のグルタミン酸作動性神経系に機能障害があることも示唆された。すなわち、脳神経系の発達期にウイルス感染あるいは化学物質への暴露等により異常な免疫応答が生じると、海馬における神経伝達の障害を伴った記憶・情動障害や社会性行動の異常が生じる可能性が示唆された。

PolyI:C 処置により誘発される脳機能障害の分子機構を解明するために、海馬における遺伝子発現の変化を網羅的に解析し、発現レベルが低下する4つの遺伝子 (*Srd5a2l*, *Creg2*, *Ptgds* および機能不明の遺伝子) と増加する1つの遺伝子 (*Ifitm3*) を見出した。今後、polyI:C 処置により誘発される

脳機能障害の分子機構について、これらの遺伝子の発現変化との関係から検討していく予定である。

## E. 結論

新生児期に polyI:C を連続処置したマウスは、成長後に不安様行動の増加、認知機能障害および社会性行動の異常を示し、海馬における脱分極誘発性グルタミン酸遊離が低下した。脳神経系の発達期にウイルス感染や化学物質への暴露等により異常な免疫応答が生じると、海馬における神経伝達の障害を伴った記憶・情動障害や社会性行動の異常が生じる可能性が示唆された。

## [参考文献]

- 1) Clancy B, Darlington RB, Finlay BL: Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, 105: 7-17, 2001.
- 2) Murai R, Noda Y, Matsui K, et al.: Hypofunctional glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex is involved in the emotional deficit induced by repeated treatment with phencyclidine in mice: Implications for abnormalities of glutamate release and NMDA-CaMKII signaling. *Behav Brain Res.*, 180: 152-160, 2007.
- 3) Nagai T, Takuma K, Kamei H, et al.: Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex. *Learn. Mem.*, 14:117-125, 2007.
- 4) Patterson PH: Maternal effects on schizophrenia risk. *Science*, 318: 576-577, 2007.
- 5) Takahashi K, Nagai T, Kamei H, et al.: Neural circuits containing pallidotegmental GABAergic neurons are involved in the prepulse inhibition of the startle reflex in mice. *Biol. Psychiatry*, 62:148-157, 2007.

- 6) Tremolizzo L, Doueiri MS, Dong E, et al.: Valproate corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioral modifications induced by methionine in mice. *Biol. Psychiatry*, 57:500-509, 2005.
- 7) Wang T, Town T, Alexopoulou L, et al.: Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.*, 10: 1366-1373, 2004.

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Arai, S., Takuma, K., Mizoguchi, H., Nagai, T., Kamei, H. and Yamada, K.: GABA<sub>B</sub> receptor agonist baclofen improve methamphetamine-induced cognitive deficit in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 602: 101-104, 2009.
- 2) Nagai, T. Nabeshima, T. and Yamada, K.: Basic and translational research on proteinase-activated receptors: Regulation of nicotine reward by the tissue plasminogen activator (tPA)-plasmin system via proteinase-activated receptor 1. *J. Pharmacol. Sci.*, 108: 4048-414, 2008.
- 3) Niwa, M., Nitta, A., Cen, X., Kitaichi, K., Ozaki, N., Yamada, K. and Nabeshima, T.: A novel molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  in pheochromocytoma-12 cells. *J. Neurochem.*, 107: 1697-1708, 2008.

### 2. 学会発表

- 1) Ibi D, Nagai T, Mizoguchi H, Nitta A, Takuma K and Yamada K: Development of schizophrenia-like behaviors and susceptibility gene expression in a viral infection model during perinatal stage. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. Nagoya, Japan, September 24, 2008.
- 2) 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 小池宏幸, 田熊一徹, 山田清文: 周産期ウイルス感染モデル

における認知障害. 第31回日本神経科学大会, 東京, 2008.7.9-11.

- 3) 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 田熊一徹, 北原裕子, 小池宏幸, 日比(古川)陽子, 新田淳美, 米田幸雄, 山田清文: 周産期におけるウイルス感染が精神機能発達および統合失調症関連遺伝子発現に及ぼす影響. 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同年会, 東京, 2008.10.1-3.
- 4) 北原裕子, 永井拓, 衣斐大祐, 新田淳美, 山田清文: 周産期における免疫応答異常が精神機能発達およびグルタミン酸作動性神経系に及ぼす影響. 第114回日本薬理学会近畿部会, 神戸, 2008.11.4.
- 5) 永井拓, 北原裕子, 衣斐大祐, 山田清文: 周産期 polyinosine:polycytidylic acid 投与による精神機能発達およびグルタミン酸作動性神経系の変化. 第19回マイクロダイアリス研究会, 東京, 2008.12.6.
- 6) 永井拓, 衣斐大祐, 溝口博之, 鍋島俊隆, 山田清文: 周産期における免疫異常は思春期マウスにおける情動および認知機能を障害する. 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 京都, 2008.12.20-21.
- 7) 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 北原裕子, 小池宏幸, 新田淳美, 米田幸雄, 澤明, 鍋島俊隆, 山田清文: 新生児期 polyI:C 投与がドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスの情動・認知機能に及ぼす影響. 第82回日本薬理学会年会, 横浜, 2009.3.16-18. (予定)
- 8) 山田清文: 遺伝-環境相互作用に基づく統合失調症モデル. 第82回日本薬理学会年会, 横浜, 2009.3.16-18. (予定)

## H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし