

マウス母体へのサイトカイン投与が与える 産仔の認知行動発達変化

青木 弘行

新潟大学脳研究所分子神経生物学分野

(主任：那波宏之教授)

Neurocognitive Impairments of Offspring Induced by Maternal Cytokine Challenges

Hiroyuki AOKI

Division of Molecular Neurobiology

Brain Research Institute, Niigata University

要 旨

統合失調症発症の仮説の一つに妊娠母体のウイルス感染などの周産期障害が原因とする説がある。実際、妊娠実験動物でのインフルエンザの感染は、母体に炎症を誘発し流産を起こすと共に、かろうじて生存した産仔も様々な認知行動異常を呈する。本研究では、この母体ウイルス感染の結果がゲノム RNA 投与により再現できるか、関与している炎症性サイトカインはどんなものかという疑問を検討した。マウス妊娠中後期に、2本鎖 RNA を尻尾静脈投与する、もしくはウイルス感染により誘導される炎症性サイトカイン（インターフェロン α 、インターロイキン-1 α 、-2、-6）を腹腔投与した。その母体から産まれてきたマウスを成長させ、新奇探索運動量、音驚愕反応、プレパルスインヒビションの行動指標を測定した。結果、マウス仔の行動異常は、ウイルスゲノム成分である2本鎖 RNA の投与で再現され、また、インターロイキン-2投与も同様に運動量上昇とプレパルスインヒビション障害を誘発した。これらの実験結果は、妊娠母体インフルエンザ感染に誘発される産仔の認知行動異常には、自然免疫を介したサイトカイン誘導といった母体内の免疫炎症反応が関与していることを示している。

キーワード：インフルエンザ、統合失調症、サイトカイン、プレパルスインヒビション

緒 言

統合失調症は深刻な精神疾患のひとつであり、その罹患率は全世界で人口の約1%とされている¹⁾。しかしながらその病因は未だ解明されてお

らず、環境因子と複数の遺伝子に支配される疾患であると推測されている。統合失調症は遺伝的素因と神経発達の不全が相互作用して発症し、最終的にはドーパミンやグルタミン酸、セロトニンなどを介した神経伝達の障害が進行性の病態変化を

Reprint requests to: Hiroyuki AOKI
Division of Molecular Neurobiology
Brain Research Institute Niigata University
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学脳研究所分子神経生物学分野 青木弘行

引き起こす可能性が提唱されている。最近、統合失調症の発症リスク因子として、妊娠母体のインフルエンザウイルス感染などの周産期障害が注目されている²⁾³⁾。また、その媒介分子としてサイトカインの関与についても多く論じられている。サイトカインは免疫系や神経系で分化・増殖を制御する因子として古くから知られているが、母体妊娠過程においても、胎盤の分化、増殖や子宮の弛緩、収縮も制御している¹⁾。それでは実際に母体内の炎症、とくにサイトカインの誘導が、その胎児に作用しその後の統合失調症の発病を促進することができるのであろうか。この疑問に対し、本研究では統合失調症の母体ウイルス感染仮説を、母体免疫炎症という観点で動物実験により評価した。まず、ウイルス増殖とウイルス性細胞障害が誘発されないゲノム RNA 成分の投与により、ウイルス自然免疫のみを妊娠母体に誘導することで、その産仔の行動発達への影響を評価した。さらにその自然免疫反応に関与しうるサイトカイン 4 種も妊娠母体マウスに負荷し、その産仔への効果も同様に実験検討した。

方 法

実験動物

妊娠マウス (C57BL/6J ; 妊娠 15 日齢, 日本チャールズリバー ; 各群 2-3 腹) の尻静脈への留置針から、2 本鎖 RNA (ポリイノシン:ポリシトシン重合体, ポリ IC) を 2, 4, 8 mg/kg 一体重の用量で単回投与した⁴⁾⁵⁾。投与するサイトカインとしては、ヒト型組み換え体のインターフェロン- α 、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-6 を使用し、同種の妊娠マウス (13.5 日—15.5 日 ; 各群 2—3 腹) に、1 日 1 回、計 3 回の腹腔内投与を実施した。なお投与量は、インターフェロン- α (アドパフェロン, 10 万 IU/kg), インターロイキン-1 α (20 μ g/kg), インターロイキン-2 (5 万 IU/kg), インターロイキン 6 (5 万 IU/kg) とした。対照群には、同量の生理食塩水を注入した動物から産まれた仔マウスを用いた。明暗周期を 12 時間に保ち、水と餌を

自由摂取できる環境で飼育した。

行動学的測定

プレパルスイヒビション (prepulse inhibition; PPI) の測定には、SRLab 社の驚愕反応測定装置を用いた⁶⁾。まず、マウスをチャンバー内に入れ 70dB のバックグラウンドノイズの下で 5 分間馴化させた。馴化後、プレパルス+パルス (驚愕刺激)、パルスのみ、バックグラウンドノイズのみ (無刺激) のトライアルを 15 秒間隔で合わせて 50 回行った。プレパルス+パルスでは、プレパルスとして 74,78,82dB (セット 1), もしくは 73, 76, 79, 82 dB (セット 2) のいずれかを 20ms 与えた後、100ms の間隔を置いて、主パルスとして 120dB を 40ms 与えた。主パルスのみでのトライアルではプレパルスは与えず、その間はバックグラウンドノイズを流した。バックグラウンドノイズのみでは刺激を全く与えなかった。驚愕反応の記録はパルス提示と同時に開始した。PPI は、次の計算式で計算した: $PPI (\%) = 100 - (\text{プレパルス+パルス提示時の驚愕反応}) / (\text{パルスのみ提示時の驚愕反応}) \times 100$ として計算した。

脳組織学評価

行動異常が、神経細胞死によるものかどうかを判定する目的で、ポリ IC 処置された母マウスから生まれたマウス仔を 2 ヶ月齢において、4% パラホルムアルデヒドにて還流固定した。パラフィン包埋をのち、4 μ m の組織切片を作製し、クリューバー・バレラ染色法で組織観察を実施した。

統計解析

単変量データは両側 T テストにて検定し、多変量データは、被験者内因子、薬物投与量を被験者間因子とした多元配置分散分析 (ANOVA) によって解析した。適応があれば post hoc に Fisher 最小有意差検定法を用いた。全ての行動指標において、性差による主効果や交互作用は有意差を認めなかったため、雌雄のデータを結合して解析した。 α レベルは 0.05 とした。

結 果

妊娠時ポリ IC の処置と子孫の音驚愕反応に対する影響

妊娠マウスにポリ IC を 2, 4, 8 mg/kg で静脈注射し, その生まれた仔マウスの行動を 2 ヶ月齢の時点で解析した. 120dB に対する音驚愕反応は, いずれの用量でも影響を見なかった (図 1). PPI については, ポリ IC の最低用量で, すでに顕著な PPI の低下が観察され, 高用量ではむしろ PPI への効果が減少する傾向があった (図 2). 従って, ポリ IC の用量依存性は明確でなかった. これらの音驚愕反応テスト負荷 (約 20 分) に対するストレス順化能を, テスト前とテスト後に音驚愕反応強度を測定し, その変化率として推定した (図 3). この音順化度はコントロール動物がマイナス 50 %, つまり初期の 50 % レベルまで爆音順化により音への驚愕反応が低下したのに対し, ポリ IC 処置群では, それほど顕著な順化反応は観察されず, 敏感なままであった. このように母体ポリ IC 処置は仔マウスのストレス順化能にも影響を与えていることが判明した.

行動テスト終了後に, これらマウスを還流固定し, 脳組織像を病理検査した. 海馬をはじめ大脳皮質の錐体細胞数はコントロールマウスに比較して顕著な変化はなく, 神経細胞の脱落は確認できなかった (図 4).

母体へのサイトカイン投与が産仔の行動発達に与える効果

妊娠時のポリ IC 処置は母体内で免疫炎症反応を惹起すると考えられる. このポリ IC 処置は, 母体内に種々の炎症性サイトカインを血液中に誘導することが知られている. その候補分子としてインターフェロン- α , インターロイキン-1 α , インターロイキン-2, インターロイキン-6 を想定し, ポリ IC の代わりに妊娠マウスに 3 回投与した. 投与量は, ヒトの抗癌治療に使われている用量 (おおよそ 1 μ g/kg 体重) を参考にして, 胎児が流産してしまわない量を負荷した. ただしインターロイキン-1 α のみ, 約半数の胎児が流産に見

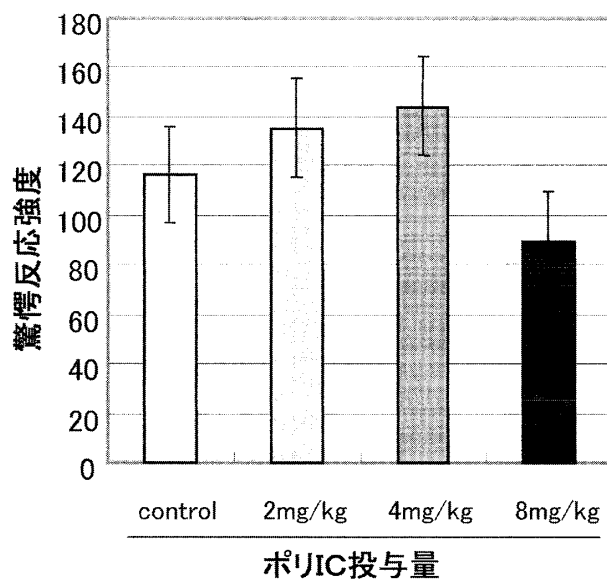


図 1 ポリ IC 投与されたマウス母体から産まれた仔の成長後の音驚愕反応

ポリ IC (2, 4, 8 mg/kg) もしくは同量の生理食塩水を妊娠 15 日齢でマウス母体に投与した. 産仔の出生後, 生後 60-70 日齢まで成長させ, 120dB の爆音に対する驚愕強度を測定した. $F = 2.23$, $P = 0.1$ (ANOVA). コントロール群; $N = 10$ 匹, ポリ IC 群; $N = 10$ 匹 (2 mg/kg), 16 匹 (4 mg/kg), 18 匹 (8 mg/kg).

舞われる投与用量 (20 μ g/kg 体重) を用いて子宮収縮の影響を推定した. その他のサイトカインについては, いずれのケースでも産仔数に異常は見られなかった.

ポリ IC 投与実験と同じように, サイトカイン投与された母体から生まれたマウス仔を 2 ヶ月齢まで成長させて, 音驚愕反応量とプレパルスインヒビションを測定した (図 5-8). 120dB に対する音驚愕反応は, インターフェロン- α とインターロイキン-6 処置された母マウスから生まれた仔マウスで, 有意な低下を見た (図 5, 図 8). プレパルスインヒビションに関してはインターロイキン-2 処置された母マウスの仔が, 顕著な低下を示した (図 7). 強い子宮収縮と流産をともなったインターロイキン-1 α 処置マウスでも, その仔のプレパルスインヒビションレベルは, 統計学的

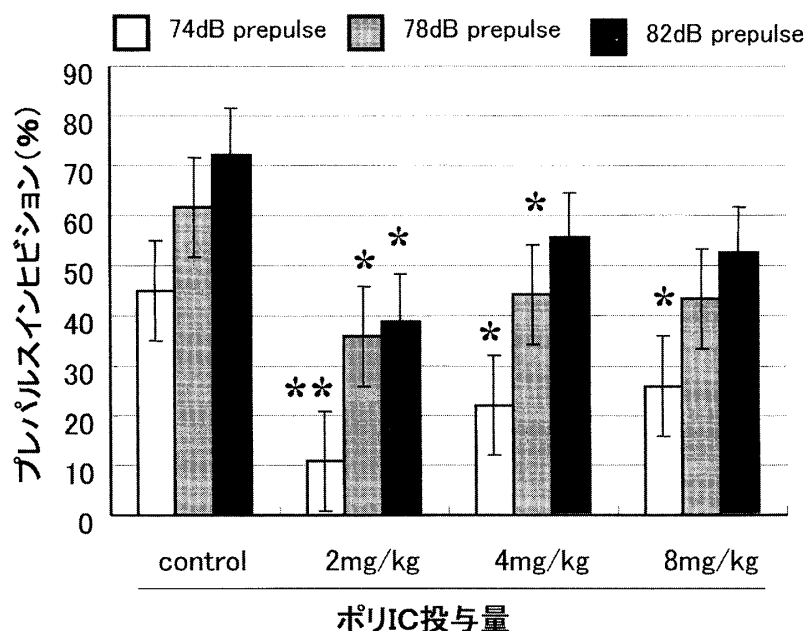


図2 ポリ IC 投与されたマウス母体から生まれた仔の成長後のプレパルスインヒビション

マウスの妊娠後期 (E15) に、ポリ IC (2, 4, 8 mg/kg) を尻静脈から投与した。その母マウスから生まれた仔を、その成長後に音驚愕反応装置に入れ、120dB に対する音驚愕反応強度と 74, 78, 82dB プレパルス音に対するプレパルスインヒビション (PPI ; %) を測定した。データは平均 \pm 標準偏差で表記。コントロール群; N = 10 匹, ポリ IC 群; N = 10 匹 (2 mg/kg), 16 匹 (4 mg/kg), 18 匹 (8 mg/kg)。

には有意でない低下傾向を示すにとどまった (図 6)。サイトカイン種によって産仔への影響は異なったものの、妊娠中のサイトカイン暴露は、その仔マウスの成長後の行動様式に影響を与えることが確認された。

考 察

統合失調症の脳発達障害仮説において、母体のウイルス感染との関係が今盛んに研究されている。インフルエンザや、ボルナウイルス、ヘルペスなどの妊娠中の感染が、統合失調症の発症リスクを上昇されると提唱されている²⁾³⁾⁷⁾⁸⁾。なかでも、インフルエンザ感染との関係は疫学的に多く研究がなされてきていて、妊娠中期における感染

が高いリスク因子と言われてきた²⁾。インフルエンザウイルスを妊娠中のネズミに感染させると、その胎児が成熟 (2ヶ月齢) に達したとき、プレパルスインヒビションやラテントインヒビションをはじめとする様々な統合失調症様の認知・行動異常が誘導される⁵⁾⁹⁾。ほぼ同様の動物モデルが、ウイルスのゲノム成分である RNA (ポリイノシン: シトシン重合体, ポリ IC) の尾静脈注射でも作製される⁵⁾⁴⁾¹⁰⁾。今回の実験でも、この効果は追試された。意外なことに、PPI の障害度合いはポリ IC の投与用量には依存せず、むしろ最低量 (2mg/kg) で最も顕著であった。従って投与したポリ IC の用量依存性は明らかでなく、単なるポリ IC 投与によって引き起こされた自然免疫反応や炎症反応にその原因を求めることには無理があ

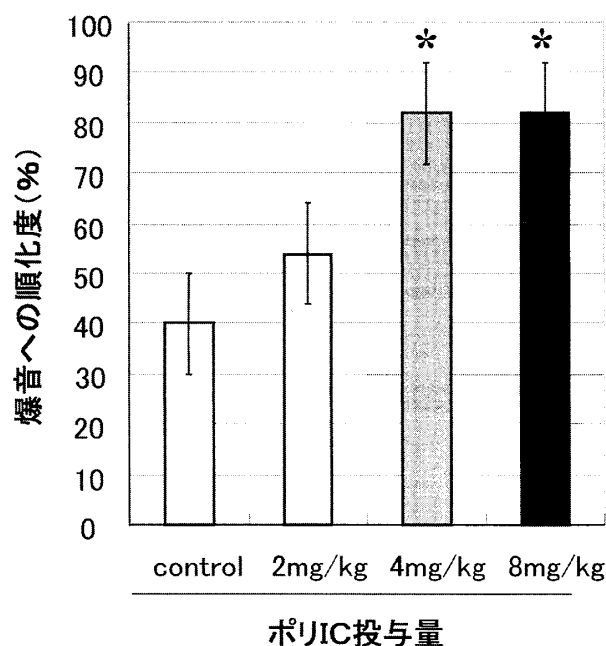


図3 音驚愕反応の順化度

20分間のプレパルスインヒビション測定のための音驚愕反応テストの前後における驚愕反応への順化度を測定した。テスト後の120dB音への驚愕反応強度をテスト前の値と比較して、%比率で表示した。コントロール群；N=10匹，ポリIC群；N=10匹(2mg/kg)，16匹(4mg/kg)，18匹(8mg/kg)。

るかもしれない。もちろん、上記の現象は母体もしくは胎児のウイルスによる感染病態の結果ではなく、ウイルスRNAに対するなんだかの免疫炎症反応が原因であると考えられるが、その実態は不明のままである²⁾。

以前の妊娠ラットを用いたポリIC投与に関する病理学的研究では、産まれた仔ラットの海馬錐体細胞に萎縮や異常形態が報告されていた¹⁰⁾。これを検証する目的で、本研究でも産まれたマウス脳の神経病理所見を検討した。PPIに異常を呈した3-4匹マウスについて検索したものの、報告になるような異常な海馬構造は観察されなかった。今後、この違いがマウス・ラットの種間差に由来するのか、投与方法などに依存するか検討を要する。いずれにしても、報告にあるような海馬

構造の異常はPPIなどの認知行動変化に必要がないことが明らかとなった。

今回の研究では、母体へのポリIC投与に引き続き起こる炎症に関与しうる4つのサイトカイン(インターフェロン- α 、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-6)を仮定し、これらサイトカイン単独の母体投与も試みた。サイトカイン処置動物から生まれた仔マウスは、母体投与されたサイトカイン種に依存して、種々のパターンで音驚愕反応強度やプレパルスインヒビションの障害を呈した。なかでも、顕著なプレパルスインヒビション障害を引き起こしたのはインターロイキン-2処置された母体から生まれた仔マウスである。意外なことに、一部流産を誘発させるまで用量をあげて投与したインターロイキン-1 α は、弱いプレパルスインヒビション低下傾向を示すだけに止まった。これは、プロスタグランジン産生を介した強い子宮収縮作用を有するインターロイキン-1 α の産仔への効果を否定するものである。このように子宮収縮やそれともなう胎児虚血とプレパルスインヒビション障害を直接関連付けることに無理があるのかもしれない。実際、筆者の予備実験において、ポリICと抗炎症剤(COX阻害剤；セレコキシブ)との妊娠母体マウスへの共投与を試みたことがあるが、この場合でも産仔のプレパルスインヒビション障害は改善されなかった¹¹⁾。したがって、母体内炎症と産仔の認知行動発達の関係には、更なる実験評価が必要である。

Mayerらによると、この母体ウイルス感染モデルにおいて、炎症反応を励起するtoll-like受容体の関与が疑われているが、実際、母体でのインターロイキン1などの炎症性サイトカイン誘導が確認されている⁴⁾。また、著者の研究室で行われている新生仔ネズミへのサイトカイン投与モデルでは、多くのサイトカインの中でも、インターロイキン-1が最も強い認知行動発達障害を誘発する¹²⁾。また最近のSmithらの研究によるとポリICによって2次的に誘導されたインターロイキン-6の重要性が提唱されている¹³⁾。本実験では、むしろインターロイキン-2が最も顕著な

ポリ IC 投与マウスの仔



コントロールマウスの仔



図4 ポリ IC 投与されたマウス母体から生まれた仔の成長後の神経病理所見

マウスの妊娠後期に、ポリ IC (2, 4, 8 mg/kg) を尻静脈から投与した。その母マウスから生まれた仔を、その成長後にプレパルスインヒビションを計測し、異常のあった個体とコントロールマウスの海馬構造を検証した。海馬錐体細胞に委縮や異常形態は見られなかった。

レパルスインヒビション異常を呈している。それぞれの実験において、母体妊娠齢やマウス・ラットの系統が違うことが、この結果の差を生んでいるのか、もしくはサイトカインの投与量の違いで説明できるのか、今後残された課題も多い。

今回の研究結果を含めこれまでの報告は、一貫して免疫異常や炎症シグナル障害が本疾患の発症や病態に少なからず関連することを示唆している。もちろん統合失調症発症の母体ウイルス感染仮説の是非は、まだ議論の分かれるところであるが、このような母体や胎児の異常な炎症反応と脳発達障害との関連を研究することは、有意義であ

ると考えられる¹⁴⁾。実際に、これらの母体内炎症が物理的に胎児に影響しているのか、子宮胎盤壁をとおして胎児脳へ直接なんだかの分子シグナルが及んであるのかなど、まだ不明の点も多い。今後、ここで樹立した母体サイトカイン投与モデルの更なる研究が、これらの疑問点を明らかにしてくれることを切望する。

謝辞

御指導をいただきました新潟大学脳研究所の那波宏之教授、ならびに横山峯介教授にはここからの謝辞を申し上げます。本研究に多大な助言をいただきました同

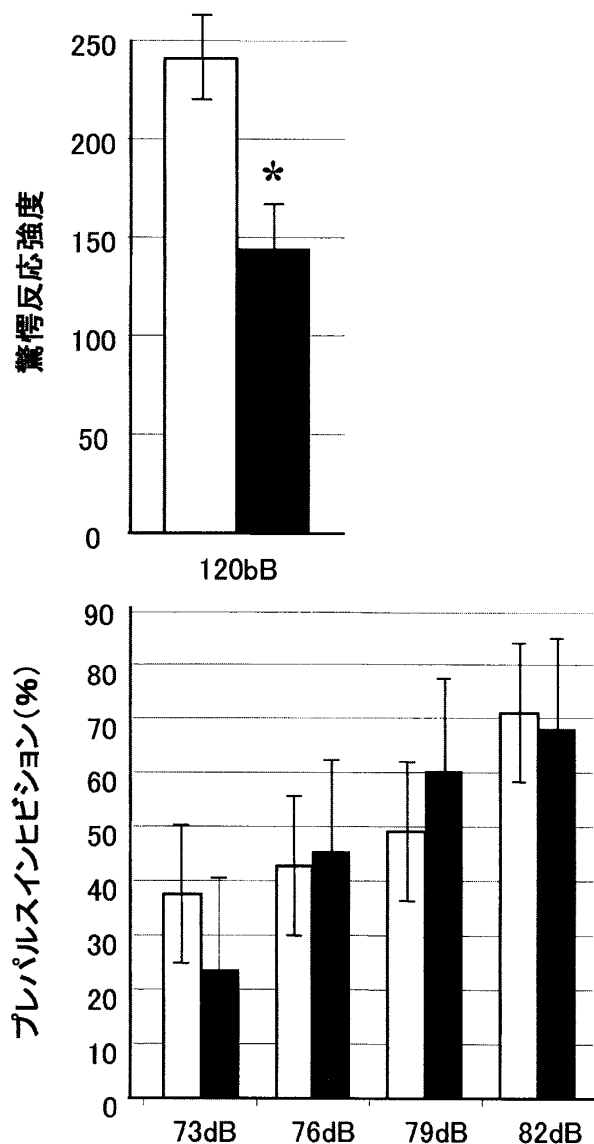


図5 インターフェロンを投与されたマウス母体から産まれた仔の成長後のプレパルスインヒビション

マウスの妊娠後期に、インターフェロン- α (1000000 IU/kg) を投与し、その母マウスから生まれた仔を、その成長後に音驚愕反応装置に入れ、120dB に対する音驚愕反応強度と 73, 76, 79, 82dB プレパルス音に対するプレパルスインヒビション (PPI ; %) を測定した。データは平均 \pm 標準偏差で表記。PPI ; $F = 3.77$, $P = 0.56$ (繰り返し ANOVA), 音驚愕強度 ; $P = 0.04$ (Tテスト)。コントロール ; $N = 8$ 匹, IFN- α 群 ; $N = 9$ 匹。

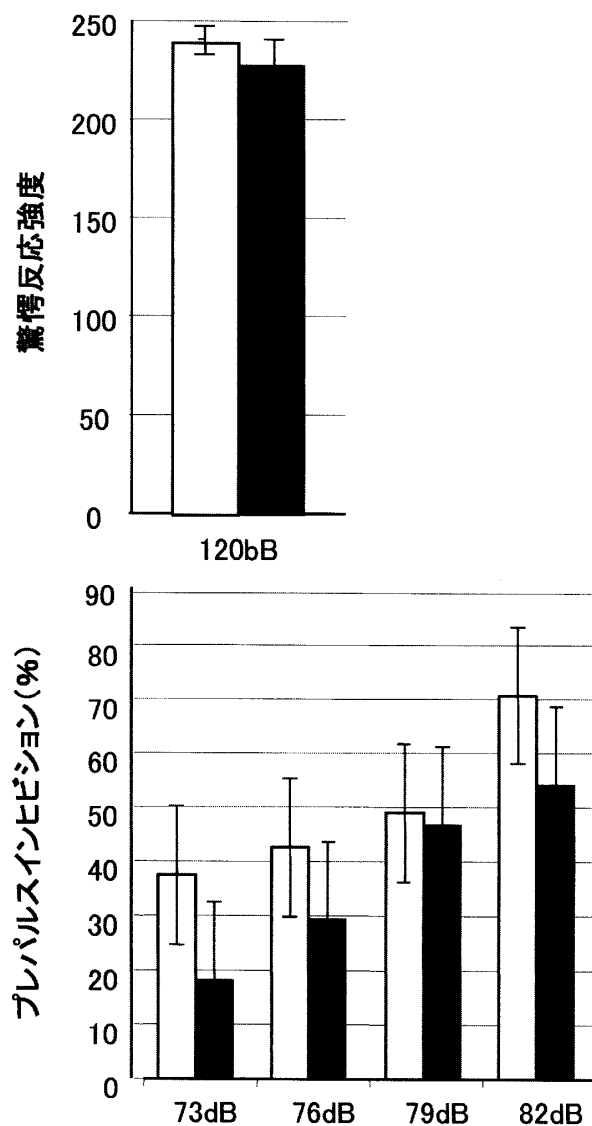


図6 インターロイキン-1を投与されたマウス母体から産まれた仔の成長後のプレパルスインヒビション

マウスの妊娠後期に、インターロイキン-1 α (20 μ g/kg) を3回腹腔内投与し、その母マウスから生まれた仔を、その成長後に音驚愕反応装置に入れ、120dB に対する音驚愕反応強度と 73, 76, 79, 82dB プレパルス音に対するプレパルスインヒビション (PPI ; %) を測定した。データは平均 \pm 標準偏差で表記。PPI ; $F = 11.71$, $P = 0.07$ (繰り返し ANOVA), 音驚愕強度 ; $P = 0.84$ (Tテスト)。コントロール ; $N = 8$ 匹, IL-1群 ; $N = 6$ 匹。

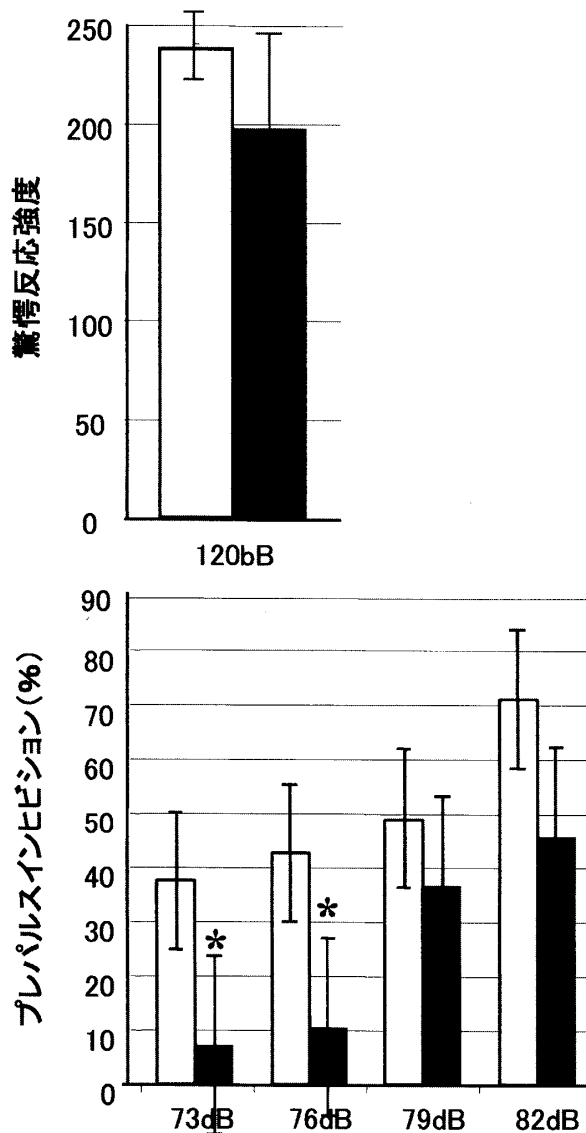


図7 インターロイキン-2を投与されたマウス母体から産まれた仔の成長後のプレパルスインヒビション

マウスの妊娠後期に、インターロイキン-2 (50000 IU/kg) を3回腹腔内投与し、その母マウスから生まれた仔を、その成長後に音驚愕反応装置に入れ、120dBに対する音驚愕反応強度と73, 76, 79, 82dBプレパルス音に対するプレパルスインヒビション (PPI ; %) を測定した。データは平均 \pm 標準偏差で表記。PPI ; $F = 21.16$, $P = 0.031$ (繰り返しANOVA), 音驚愕強度 ; $P = 0.53$ (Tテスト)。コントロール ; $N = 8$ 匹, IL-2群 ; $N = 6$ 匹。

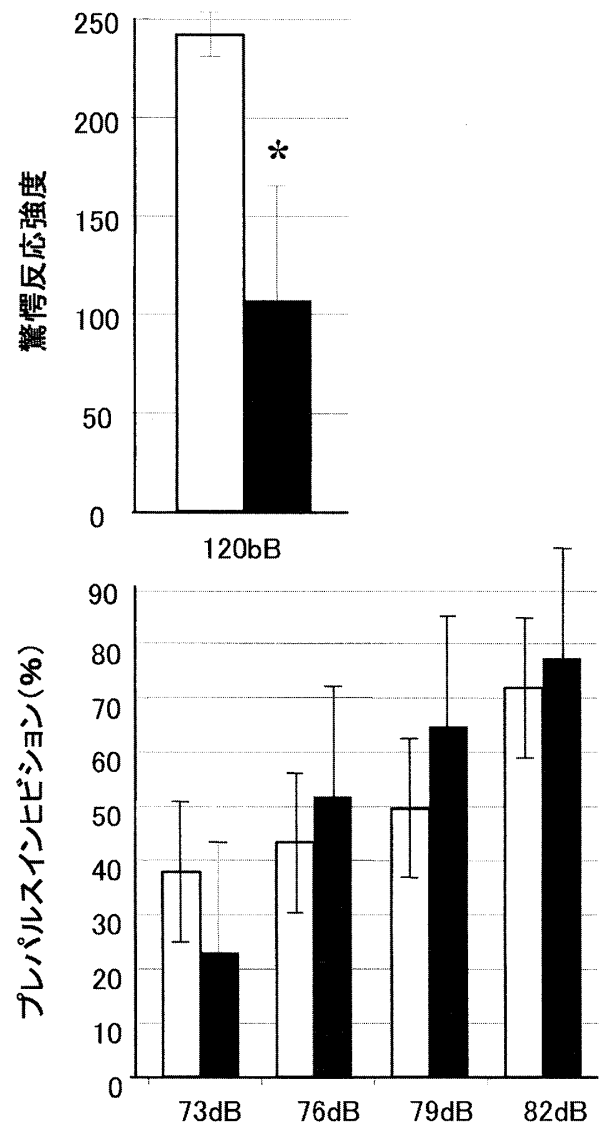


図8 インターロイキン-6を投与されたマウス母体から産まれた仔の成長後のプレパルスインヒビション

マウスの妊娠後期に、インターロイキン-6 (50000 IU/kg) を3回腹腔内投与し、その母マウスから生まれた仔を、その成長後に音驚愕反応装置に入れ、120dBに対する音驚愕反応強度と73, 76, 79, 82dBプレパルス音に対するプレパルスインヒビション (PPI ; %) を測定した。データは平均 \pm 標準偏差で表記。PPI ; $F = 2.88$, $P = 0.71$ (繰り返しANOVA), 音驚愕強度 ; $P > 0.01$ (Tテスト)。コントロール ; $N = 8$ 匹, IL-6群 ; $N = 11$ 匹。

脳研究所の柿田明美先生, 超域研究機構の水野誠先生に深く感謝いたします。なお, 本研究は那波教授に対する厚生労働科学研究費と学内プロジェクト研究費, ならびに先進医薬研究振興財団からの資金援助により実施されました。

文 献

- 1) Nawa H, Takahashi M and Patterson PH: Cytokine and growth factor involvement in schizophrenia — support for the developmental model. *Mol Psychiatry* 5: 594 - 603, 2000.
- 2) O'Callaghan E, Sham P, Takei N, Glover G and Murray RM: Schizophrenia after prenatal exposure to 1957 A2 influenza epidemic. *Lancet* 337: 1248 - 1250, 1991.
- 3) Patterson PH: Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr Opin Neurobiol* 12: 115 - 118, 2002.
- 4) Meyer U, Feldon J, Schedlowski M and Yee BK: Towards an immuno - precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 913 - 947, 2005.
- 5) Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW and Patterson PH: Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci* 23: 297 - 302, 2003.
- 6) Futamura T, Toyooka K, Iritani S, Niizato K, Nakamura R, Tsuchiya K, Someya T, Kakita A, Takahashi H and Nawa H: Abnormal expression of epidermal growth factor and its receptor in the forebrain and serum of schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 7: 673 - 682, 2002.
- 7) Dickerson FB, Boronow JJ, Stallings C, Origoni AE, Ruslanova I and Yolken RH: Association of serum antibodies to herpes simplex virus 1 with cognitive deficits in individuals with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 60: 466 - 472, 2003.
- 8) Haga S, Motoi Y and Ikeda K: Borna disease virus and neuropsychiatric disorders. The Japan Bornavirus Study Group. *Lancet* 350: 592 - 593, 1977.
- 9) Fatemi SH, Earle J, Kanodia R, Kist D, Emamian ES, Patterson PH, Shi L and Sidwell R: Prenatal viral infection leads to pyramidal cell atrophy and macrocephaly in adulthood: implications for genesis of autism and schizophrenia. *Cell Mol Neurobiol* 22: 25 - 33, 2002.
- 10) Zuckerman L, Rehavi M, Nachman R and Weiner I: Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 28: 1778 - 1789, 2003.
- 11) Tohmi M, Tsuda N, Watanabe Y, Kakita A and Nawa H: Perinatal inflammatory cytokine challenge results in distinct neurobehavioral alterations in rats: implication in psychiatric disorders of developmental origin. *Neurosci Res* 50: 67 - 75, 2004.
- 12) Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K and Patterson PH: Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin - 6. *J Neurosci* 27: 10695 - 10702, 2007.
- 13) Nawa H and Takei N: Recent progress in animal modeling of immune inflammatory processes in schizophrenia: implication of specific cytokines. *Neurosci Res* 56: 2 - 13, 2006.

(平成19年12月26日受付)