

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：32704

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06962

研究課題名(和文) 広範囲伝播脱分極波による胎児脳発生の制御と喫煙による脳障害発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Effects of prenatal exposure to nicotine on spontaneous correlated wave activity and the brain development

研究代表者

佐藤 容子 (Momose-Sato, Yoko)

関東学院大学・栄養学部・教授

研究者番号：70251501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：発生初期の中枢神経系において、広範に伝播する脱分極波と呼ばれる自発活動が、神経回路網形成の一時期に発現することが知られている。鶏胚、マウス胚、ラット胚の摘出中枢神経系標本を用いた解析で、脱分極波はニコチン性アセチルコリン受容体に依存し、ニコチン投与によって抑制されることがわかった。In ovo鶏胚でニコチンを慢性投与し、迷走神経感覚核におけるシナプス回路網形成への影響について解析したところ、二次感覚核である傍腕核におけるシナプス後電位が著明に減弱した。このことから、胎生期におけるニコチンへの暴露は、脱分極波の抑制を介して、脳幹内シナプス回路網の機能的発生を阻害することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠中の喫煙は、胎児・新生児期における様々な脳機能障害や致死性の疾患に関与していることが知られている。本研究の成果は、妊娠中の喫煙がおよぼす神経系への影響について、広範囲伝播脱分極波の阻害による神経回路網形成の異常という新たな病態メカニズムの概念を導入した。喫煙の影響は、本人の禁煙だけで解決できる問題ではなく、受動喫煙による障害をいかにして防ぎ、被った影響をいかにして是正するかが大きな社会問題となっている。本研究の成果は、臨床病態生理学のみならず、社会学的にも大きな影響をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Correlated spontaneous activity propagating over a wide region of the central nervous system is expressed during a specific period of embryonic development. Our previous studies using an antagonist of nicotinic acetylcholine receptors raised the possibility that prenatal nicotine exposure associated with maternal smoking affects the development of neural circuit formation by interfering with the correlated wave. In the present study, we tested this hypothesis by examining the effects of nicotine in avian and mammalian embryos. The application of nicotine transiently increased, but subsequently inhibited electrical bursts associated with the correlated wave. Furthermore, chronic exposure to nicotine in ovo markedly reduced functional synaptic expression in the brainstem sensory nucleus, the parabrachial nucleus. The results suggested that prenatal nicotine exposure disrupts the initial formation of neural circuitry by inhibiting the correlated spontaneous activity.

研究分野：神経生理学

キーワード：ニコチン 胎生期 脱分極波 神経系 発生 光学イメージング

1. 研究開始当初の背景

妊娠中の喫煙は、胎児・新生児期における様々な脳機能障害や致死疾患に関与していることが知られている(文献1、2)。われわれは、これまでにニューロン電位活動の光学的イメージング法を用いて、脊椎動物中枢神経系の機能発生・機能構築過程の解析を行ってきた(文献3)。その過程で、胎生期における中枢神経系の機能発生に重要な役割を果たすと考えられる広範囲伝播脱分極波(depolarization wave)を発見した(文献4、5)。この脱分極波は、前脳から脊髄まで中枢神経系の非常に広範囲にわたって伝播する興奮波で、発生の一時期に局限して発現するが、その発現時期はシナプス回路網の形成期と重なっており、脱分極波を介するニューロン群の秩序正しい同期的活動が、神経回路網の正常な発生に不可欠であることが示唆された。これに続く伝播ネットワークの解析で、ニコチン性アセチルコリン受容体が脱分極波の伝播に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

これらの結果をふまえて、われわれは「喫煙にともなう母体のニコチン摂取が脱分極波に影響を及ぼし、それによって神経回路網の正常な形成過程が阻害され、胎児脳機能障害が生じるのではないか」という仮説を提唱するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、ニコチンへの暴露による胎児脳発達への影響という観点から、脱分極波を介した神経系発生の制御機構と、それに関連したニコチン型アセチルコリン受容体の役割について解析を行い、喫煙が及ぼす胎生期の神経系発生への影響について、新たな病態発生メカニズムを提唱することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料・標本

脱分極波の機能解明と慢性薬理学的実験の初期解析用に、孵卵4-8日(E4-E8)の鶏胚を用い、哺乳類での解析用に、妊娠11-14日(E11-E14)のマウス胎仔、ラット胎仔を用いる。摘出中枢神経系標本の作成では、鶏胚を氷冷したRinger液中に取り出し、中脳レベルで断頭する。マウス、ラットの場合は、母体にイソフルラン麻酔を施した後頸椎を脱臼し、胎仔を取り出して氷冷したACSF液中で断頭する。断頭後、実体顕微鏡下で脳神経・脊髄神経をつけたままの脳-脊髄標本を摘出する。

(2) 計測・解析装置

①膜電位感受性色素を用いたニューロン電位活動の光学的イメージング

標本を、膜電位感受性色素NK2761(0.2 mg/ml)を含むRinger液またはACSF液中に10分間浸し、染色する。測定には、独自に開発・作成した光学的1020チャンネル同時測定システムを用い(文献3)、脳幹内の1020ヶ所の領域からニューロン電位活動を光学的変化 $\Delta I/I$ として同時記録する。

②集合活動電位の細胞外記録による自発性脱分極波の電気生理学的解析

脱分極波に伴って生じる脳神経・脊髄神経からの運動性出力(集合活動電位)を、ガラス吸引電極で記録する。迷走神経または脊髄神経の断端に吸引電極を取り付け、集合活動電位の波形をモニターする。

(3) 鶏胚における解析

①鶏胚における脱分極波に対するニコチンの作用の解析

脱分極波に対するニコチンの作用と濃度依存性を解析するために、摘出中枢神経系標本を用いて、脱分極波に伴って生じる集合活動電位をモニターしながら、nicotine液の灌流による応答を記録する。濃度条件を変えて測定を行い、得られた結果から、ニコチンの脱分極波に対する作用の同定と、②で用いる卵内投与量の算出を行う。

②ニコチンの *in ovo* 投与による鶏胚神経系の発生への影響の解明

脱分極波の発現時期である孵卵4~8日の鶏胚卵殻に穴を開け、nicotine液を卵内に投与する。脱分極波に伴って生じる鶏胚のembryonic motility(卵内で見られる全身を折りたたむような胚の自発運動)を指標にして、nicotine液の有効濃度を確認する。Nicotine液を投与後、卵殻の穴をテープで密封し、孵卵を継続する。同作業を、継続して1回/1日これを行う。孵卵8日目(機能的シナプス形成期)に鶏胚を取り出し、脱分極波の阻害によってどのような機能的異常が生じるのかを調べる。具体的には、これまでにbicuculline/strychnine混合液を用いて実験を行ってきた迷走神経回路網(文献6)を解析対象とし、迷走神経刺激によって感覚核に生じるシナプス後電位を光学的に測定して、脱分極波を阻害した鶏胚とコントロールの鶏胚での比較検討を行う。

(4) 哺乳類における解析

①マウス胚、ラット胚における脱分極波に対するニコチンの作用の解析

(3) ①の鶏胚で同定した脱分極波に対するニコチンの作用が、哺乳類でも同様に見られるかを解析する。(3) ①で同定した実験条件を目安に、脱分極波に伴う集合活動電位をモニターしながら、マウス胚・ラット胚摘出中枢神経標本における nicotine の作用を解析する。

②妊娠マウス母体のニコチン摂取による胎仔神経系の発生への影響の解明

妊娠マウスの母体にニコチンを投与し、(3) ②の鶏胚実験で同定した embryo 神経系の発生異常が、哺乳類 *in situ* で見られるかどうかを検証する。マウス母体へのニコチン投与方法については、Pauly らによる経口投与方法 (文献7、8) に倣い、妊娠3日目～実験日まで nicotine 水の経口投与を行う。妊娠14日目 (機能的シナプス形成期) に胎仔を取り出し、摘出中枢神経系標本を作成し、(3) ②の鶏胚で同定した異常が、種を超えて普遍的にみられるかどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) 鶏胚における脱分極波に対するニコチンの作用の解析

脱分極波に対するニコチンの作用を解析するために、鶏胚摘出中枢神経系標本を用いて、nicotine 液の灌流による影響を解析した。自発性脱分極波に伴う神経活動は、迷走神経の断端をガラス吸引電極で吸引し、集合活動電位として記録した。脱分極波にともなうシグナルはスパイク状を呈し、このシグナル1つ1つをバースト (burst) と名づけた。通常 Ringer 液中では、連続したバースト (burst) から成るエピソード (episode) と呼ばれる現象が、数分に1回の頻度で出現した。nicotine (10 μ M) 液を灌流すると、投与直後にバーストが連続して出現したが、その後バーストは抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、nicotine は一過性の興奮作用 (脱分極波の一過性の増大) とそれに続く抑制作用 (脱分極波のブロック) の二重作用をもつこと、脱分極波に対するメインの効果は抑制であることが明らかとなった。脱分極波の一過性の増大とブロックは、nicotine がアセチルコリン受容体に結合し、神経活動が一過性に増強されたあと、受容体の脱感作が生じたことによるものと推測される。

(2) マウス胚、ラット胚における脱分極波に対するニコチンの作用の解析

妊娠11~14日 (E11~E14) のマウス胚から摘出した中枢神経系標本において、自発性脱分極波に伴う迷走神経集合活動電位を測定した。通常 ACSF 液中では、1つもしくは連続したバースト (burst) から成るエピソード (episode) が、数分に1回の頻度で出現した。この活動は、E11~E13の時期にはニコチン性アセチルコリン受容体に依存しており、特に non- α 7-type の受容体が関与していることが明らかとなった。nicotine (10 μ M) 液を灌流すると、投与直後にバーストが連続して出現したが、その後バーストは消失した。E13のラット胚でニコチンを投与した実験でも、マウス胚と同様の結果が得られた。これらの結果から、鶏胚で同定した脱分極波に対するニコチンの二重作用が、哺乳類でも見られることが明らかとなった。鶏胚と哺乳類胚とでは、外液からニコチンを除去した後の自発活動の回復 (recovery) 過程に差が見られ、マウス胚、ラット胚の方が、より非可逆的に抑制された。

(3) ニコチンの *in ovo* 投与による鶏胚神経系の発生への影響の解明

脱分極波に伴って生じる鶏胚の embryonic motility を指標にして、脱分極波をブロックするのに必要な nicotine の *in ovo* 投与量を算定し、最終的な投与量を nicotine 5mM 液 100 μ L/日とした。孵卵4~7日の卵殻に穴を開け、一日一回 nicotine 液を投与した後、卵殻の穴をテープで密封し、孵卵を継続した。孵卵8日目 (機能的シナプス形成期) に鶏胚を取り出し、迷走神経感覚核におけるシナプス回路網形成への影響について解析した。一次感覚核である孤束核において、迷走神経刺激によって誘発されるシナプス後電位を光学的に測定し、その大きさと空間的な広がりについて比較したところ、コントロール標本と nicotine を *in ovo* 投与した標本との間に、明らかな違いは見られなかった。一方、孤束核からの二次投射を受ける傍腕核において同様の測定を行ったところ、傍腕核におけるシナプス後電位の応答は、nicotine を *in ovo* 投与した標本で著明に減弱することがわかった。これらの結果から、*in ovo* 鶏胚の nicotine への暴露は、脳幹内におけるシナプス回路網の機能的発生、特に高次感覚核におけるシナプス伝達機能の発生を阻害することが明らかとなった。

(4) 妊娠マウス母体のニコチン摂取による胎仔神経系の発生への影響の解明

In ovo 鶏胚の実験でシナプス機能の発生異常がみられた傍腕核をターゲットとし、哺乳類でも同様の異常がみられるかどうかを検証した。妊娠3~14日 (E3-E14) に、母体に0.2% nicotine 含有2% saccharin 水の経口投与を行ったところ、胎児死亡・胎児発育不全を引き起こしたため、0.01% nicotine 含有2% saccharin 水に変更して実験を行った。妊娠14日目に胎仔を摘出して、脳幹-迷走神経標本を作成した。これまでに、6例のコントロールマウス (水道水投与)、7例の2% saccharin 水投与マウス、11例の0.01% nicotine 含有2% saccharin 水投与マウスについて、迷走神経刺激に対する傍腕核応答の光学的計測を行ったが、シナプス後電位が消失するような劇的な影響は見られず、今後、統計解析を行うための症例数の増加や、nicotine 投与濃度の再検討などを行う予定である。

本研究の成果により、妊娠中の喫煙がおよぼす胎児神経系への影響について、胎生期におけるニコチンへの暴露が脱分極波を抑制し、それに伴って脳幹内シナプス回路網の機能的発生が阻害されるという、新たな病態メカニズムが提唱されるに至った。哺乳類胚を含めての種を超えた普遍性については、今後のさらなる検証が必要と思われる。

<引用文献>

1. Slotkin, T.A., 2004. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 198, 132-151.
2. Dwyer, J.B., McQuown, S.C., Leslie, F.M., 2009. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol. Therapeutics* 122, 125-139.
3. Momose-Sato, Y., Sato, K., Kamino, K., 2001. Optical approaches to embryonic development of neural functions in the brainstem. *Prog. Neurobiol.* 63, 151-197.
4. Momose-Sato, Y., Sato, K., 2013. Large-scale synchronized activity in the embryonic brainstem and spinal cord. *Front. Cell. Neurosci.* 7, Article 36, 1-15.
5. Momose-Sato, Y., Sato, K., 2016. Development of spontaneous activity in the avian hindbrain. *Front. Neural Circuits* 10, Article 63, 1-5.
6. Momose-Sato, Y., Sato, K., 2017. Developmental roles of the spontaneous depolarization wave in synaptic network formation in the embryonic brainstem. *Neuroscience* 365, 33-47.
7. Sparks, J.A., Pauly, J.R., 1999. Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57Bl/6 mice. *Psychopharmacology*, 141, 145-153.
8. Pauly, J.R., Sparks, J.A., Hauser, K.F., Pauly, T.H., 2004. In utero nicotine exposure causes persistent, gender-dependent changes in locomotor activity and sensitivity to nicotine in C57Bl/6 mice. *Dev. Neurosci.* 22, 329-337.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato, K. and Momose-Sato, Y.	4. 巻 56
2. 論文標題 Functional development of olfactory nerve-related neural circuits in the embryonic chick forebrain revealed by voltage-sensitive dye imaging.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4914-4929
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.15788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Momose-Sato, Y. and Sato, K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Prenatal exposure to nicotine disrupts synaptic network formation by inhibiting spontaneous correlated wave activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IBRO Reports	6. 最初と最後の頁 14-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibror.2020.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Momose-Sato, Y. and Sato, K.	4. 巻 6
2. 論文標題 Voltage-sensitive dye recording of glossopharyngeal nerve-related synaptic networks in the embryonic mouse brainstem.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IBRO Reports	6. 最初と最後の頁 176-184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibror.2019.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Sato, K. and Momose-Sato, Y.
2. 発表標題 Optical recording of spontaneous oscillatory activity in the absence of external Ca ²⁺ observed in the embryonic chick olfactory bulb.
3. 学会等名 第100回日本生理学会（京都）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Momose-Sato, Y. and Sato, K.
2. 発表標題 Effects of nicotine on spontaneous correlated wave activity in mammalian embryos.
3. 学会等名 第44回日本神経科学会大会 (神戸)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato, K., Takahashi, N. and Momose-Sato, Y.
2. 発表標題 Optical analysis of spontaneous oscillatory activity in the absence of external Ca ²⁺ observed in the embryonic chick cerebellum.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会 (仙台)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Momose-Sato, Y. and Sato, K.
2. 発表標題 Synaptic network formation controlled by spontaneous correlated wave activity is inhibited by prenatal exposure to nicotine.
3. 学会等名 第43回日本神経科学会 (web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sato, K. and Momose-Sato, Y.
2. 発表標題 Functional development of the olfactory-limbic neural network in the embryonic chick brain: Optical imaging with a voltage-sensitive dye.
3. 学会等名 第43回日本神経科学会 (web開催)
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Sato, K. and Momose-Sato, Y.
2 . 発表標題 Optical detection of neuronal activity in the olfactory-limbic network of the embryonic chick forebrain.
3 . 学会等名 第98回日本生理学会 (web開催)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Momose-Sato, Y. and Sato, K.
2 . 発表標題 Functional development of the mouse vestibular nucleus: Optical recording with a voltage-sensitive dye.
3 . 学会等名 第42回日本神経科学学会 (新潟)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sato, K. and Momose-Sato, Y.
2 . 発表標題 Optical analysis of functional development of the glossopharyngeal nerve pathway in the mouse fetus brainstem.
3 . 学会等名 第42回日本神経科学学会 (新潟)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Momose-Sato, Y. and Sato, K.
2 . 発表標題 Exposure to nicotine during development disrupts synaptic network formation by inhibiting correlated spontaneous wave activity.
3 . 学会等名 Society for Neuroscience 49th Annual Meeting (Chicago, USA) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato, K. and Momose-Sato, Y.
2. 発表標題 Voltage-sensitive dye recording of glossopharyngeal nerve-related synaptic networks in the embryonic mouse brainstem.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 49th Annual Meeting (Chicago, USA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Momose-Sato, Y. and Sato, K.
2. 発表標題 Prenatal exposure to nicotine disrupts synaptic network formation by inhibiting spontaneous correlated wave activity.
3. 学会等名 第97回日本生理学会 (紙上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sato, K. and Momose-Sato, Y.
2. 発表標題 Optical analysis of functional development of the glossopharyngeal nerve pathway in the mouse fetus brainstem.
3. 学会等名 第97回日本生理学会 (紙上開催)
4. 発表年 2020年

〔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
研究協力者	佐藤 勝重 (Sato Katsushige) (80291342)	駒沢女子大学・人間健康学部・教授 (32696)	

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
---------	---------