

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591595

研究課題名(和文) 脳発達におけるセロトニン神経系の役割を胎生期エタノール曝露モデルから考える

研究課題名(英文) Preventive effects of 5-HT agonists on the abnormal development of 5-HTergic system induced by prenatal ethanol exposure in rats

研究代表者

福井 義浩 (FUKUI, Yoshihiro)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：50144168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期EtOH曝露による5-HT神経障害を軽減し得る5-HT受容体活性化を検討した。5-HT1A受容体作動薬のipsapironeを投与したところ、EtOH曝露により生じる5-HT神経細胞数減少が軽減され、不安様行動の異常も認められなかった。5-HT2A/2C受容体である作動薬DOIでも同様の検討を行ったところ、5-HT神経細胞数の減少を軽減すること明らかにした。DOI投与による5-HT発達関連遺伝子の発現変化を検討した結果、胎生19日における脳内Phox2bの発現量は胎生期EtOH曝露により減少するが、胎生13-19日にDOIを投与するとその減少が生じないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We administered the 5-HT1A agonist, ipsapirone, or the 5-HT2A/2C agonist, DOI, against prenatal ethanol (EtOH)-exposed rats during E13-20. Based on our immunohistochemical observation on E20, administrations of both agonists prevented a reduction in the number of 5-HTergic neurons in the midbrain raphe nuclei induced by EtOH exposure during E10-20. Ipsapirone also alleviated an abnormality of anxiety-like behavior seen in an elevated-plus maze test caused by prenatal EtOH exposure. The quantitative analysis of gene expression in fetal brains revealed that an expression of Phox2b, which is related to development of 5-HT neurons, was reduced after prenatal exposure to EtOH, but DOI attenuated the effect of EtOH on Phox2b gene expression. We concluded that the effect of prenatal EtOH exposure on development of 5-HT neurons and behavioral changes resulting in the altered 5-HTergic systems could be alleviated by the enhancement of signaling via 5-HT1A or 5-HT2A/2C receptors during E13-20.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 胎児・新生児医学

キーワード：先天異常 セロトニン 5-HT1A受容体作動薬 5-HT2A/2C受容体作動薬 脳発達 エタノール

### 1. 研究開始当初の背景

脳発達期のエタノール曝露により、中枢神経系の発達障害が惹起されることが知られている。エタノールによる発達障害は多くの脳領域で報告されており、多様な機能障害の原因となっている。セロトニン (5-HT) 神経系はエタノールの発生神経毒性の影響を受けやすいことが報告されており、これまで我々を含む複数の研究グループが、胎生期エタノール曝露ラットにおける脳内 5-HT 量の減少、中脳縫線核における 5-HT 神経細胞数の減少などが報告した。5-HT 神経系は不安様行動を初めとした多くの行動に関与しており、各種の精神疾患との関連が注目されているが、胎生期エタノール曝露ラットでも不安様行動の異常が認められることより、中脳縫線核での 5-HT 神経細胞数の減少をはじめとした 5-HT 神経系の発達障害がこの不安様行動の異常の原因となっている可能性が示唆されている。

5-HT はモノアミン系の神経伝達物質であるが、脳発達時期には脳内の神経栄養因子をしての働きをしていることが知られている。中脳縫線核の 5-HT 神経細胞は、5-HT を産生し分泌する一方で、自らその細胞膜に 5-HT<sub>1A</sub> 受容体を有することで、ネガティブフィードバックを行うことができる「オートレセプター機構」を持つ。脳発達の早い時期 (ラットでは胎生 13 日頃) にはすでに中脳縫線核 5-HT 神経細胞に 5-HT<sub>1A</sub> 受容体が発現しており、この脳発達期における 5-HT<sub>1A</sub> 受容体を介したシグナル伝達が中脳縫線核 5-HT 神経細胞の正常な発達を促すことが報告されている。これまでに我々は中脳縫線核の 5-HT 神経細胞の発生が障害されている胎生期エタノール曝露ラットに対し、5-HT<sub>1A</sub> 受容体作動薬を投与すると、5-HT 神経細胞数の減少が軽減されることを明らかにしている。

### 2. 研究の目的

本研究は、脳発達におけるセロトニン (5-HT) の役割を明らかにすることを目的とし、5-HT 神経系発達障害が生じることがすでに明らかにされている胎生期エタノール曝露ラットに対し、各種 5-HT 受容体に対する作動薬を投与し、エタノールによる 5-HT 神経系発達障害の発症機序と 5-HT 神経系発達障害により二次的に生じる脳発達障害の詳細について明らかにすること、並びに種々の受容体を介した 5-HT 作用が脳発達に与える影響について検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 胎生期エタノール曝露ラットの作製

SD ラットの妊娠 10~20 日に 2.5~5% (v/w) EtOH 含有液体飼料を与えた。対照群

にはエタノールを等カロリーのシユークロースで置き換えた液体資料を等量与えた。

#### (2) 5-HT<sub>1A</sub> 受容体作動薬効果の検証

上述した EtOH 摂取妊娠ラットに対し、5-HT<sub>1A</sub> 受容体作動薬 ipsapirone (3.0 mg/kg/day) を投与した。対照群には生水を投与した。妊娠 20 日のラットを深麻酔下で帝王切開して胎仔を取り出した。また一部の妊娠ラットには出産させ、仔を無処置の里親に育てさせた。胎生 20 日と生後 14 日のラット仔の脳を取り出し、脳内 5-HT の定量と 5-HT 神経細胞数の計測を行い、8~10 週齢で行動学的解析を行った。

5-HT 量の定量では、全脳組織を 0.02M 過塩酸水溶液中でホモジナイズし、遠心分離して上清を採取した。pH 調整した後、HPLC により 5-HT とその代謝産物、およびその他のものアミン類の定量を行った。5-HT 神経細胞数の計測では、脳を 4% パラホルムアルデヒドで固定して前頭断パラフィン切片を作製した。5-HT 合成酵素である 5-トリプトファン水酸化酵素 (TPH) に対する抗体を用いて免疫染色を行い、TPH 陽性細胞数を計測した。

さらに不安様行動では、8-10 週齢のラットを、壁のない open arm (2 本)、壁のある closed arm (2 本)、およびこれら 4 本の arm つなぐプラットホームからなる迷路を床上 50cm に設置した高架式十字迷路のプラットホーム上に置き、15 分間行動を記録する。ラットが各 arm に侵入した回数と滞在時間を積算し、また迷路上での異常行動 (すくみ行動) を観察してラットの不安行動を評価した。さらに高架式十字迷路の closed arm を 1 本取り外した状態の高架式 T 字迷路を用いた行動試験も行った。まず、ラットを closed arm に置き、open arm に出るまでの時間を計測する。ラットが Open arm に出たら速やかにホームケージに戻し、30 秒後、同様に closed arm に置いてから open arm に出るまでの時間を計測する。さらにもう一度同様の観察を行う。1 回目 (baseline) の open arm に出るまでの時間 (潜時) と 2 回目、および 3 回目の潜時を比較し、恐怖体験の獲得状況を解析する (conditioned fear)。次に、ラットを open arm 上に置き、closed arm へ逃げ込むまでの潜時を計測した (unconditioned fear)。

#### (3) 5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体作動薬効果の検証

前述した EtOH 摂取妊娠ラットに対し、5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体作動薬である 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) を 1 mg/kg/day 量腹腔内投与した。対照群には等量の生食水を投与した。妊娠 19 日または 20 日のラットを深麻酔下で帝王切開して胎仔を取り出した。これらの胎仔脳を用い、前述と同様野手法で脳内 5-HT の定量と 5-HT 神経細胞数の計測を行った。また脳ホモジネートから total RNA を抽出し、特異的プライマーを用いて 5-HT 神経系発達に関連する遺伝子群の発現量を解析した。

#### 4. 研究成果

胎生期エタノール曝露ラットに対しての ipsapirone 投与は、背側縫線核と正中縫線核の両方においてエタノールによる 5-HT 神経細胞数減少を防いだ (Fig. 1)。この傾向はこれまで胎生 20 日のラットで明らかにしていたが、本研究では生後 14 日齢においても同様の結果が得られた (Fig. 2)。

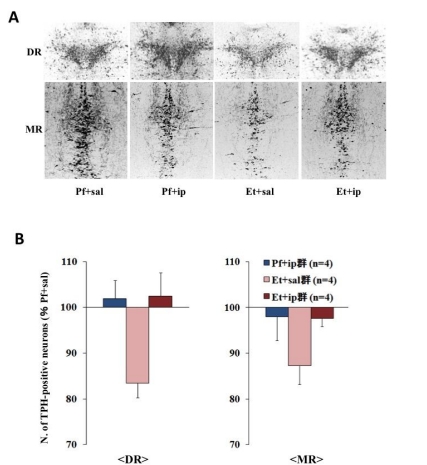


Fig. 1 胎生期エタノール曝露に起因した 5-HT 神経細胞数減少に対する 5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニスト ipsapirone の効果 (胎生 20 日齢ラット)  
A. 中脳縫線核における 5-HT 作動性神経細胞の局在  
B. 中脳縫線核における 5-HT 作動性神経細胞数の比較  
DR: 背側縫線核, MR: 正中縫線核

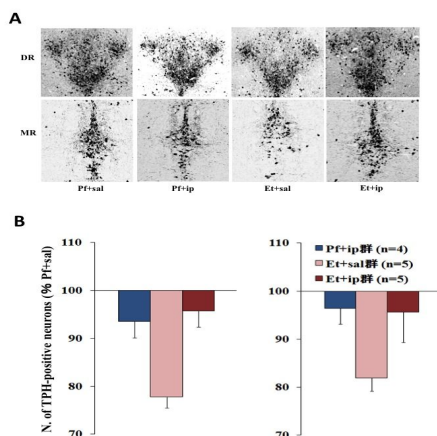


Fig. 2 胎生期エタノール曝露に起因した 5-HT 神経細胞数減少に対する 5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニスト ipsapirone の効果 (生後 14 日齢ラット)  
A. 中脳縫線核における 5-HT 作動性神経細胞の局在  
B. 中脳縫線核における 5-HT 作動性神経細胞数の比較  
DR: 背側縫線核, MR: 正中縫線核

全脳からの抽出液を用いた HPLC によるアミン類の定量においては、ipsapirone 投与を行っても 5-HT およびその代謝産物である 5-HIAA の有意な改善は認められなかった。しかしながら、5-HIAA 量および 5-HT/5-HIAA によって求められる 5-HT 利用

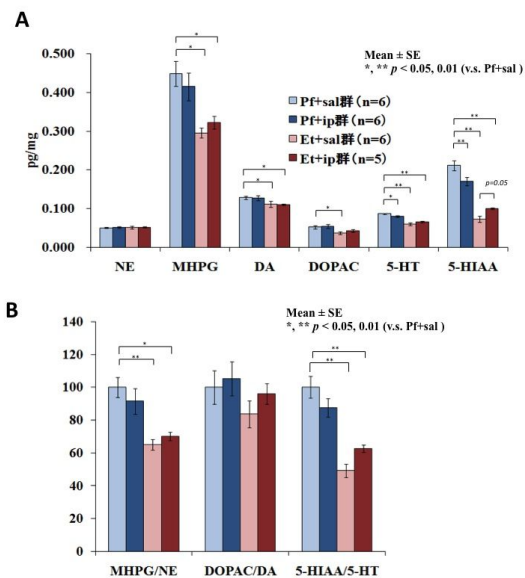


Fig. 3 胎生期エタノール曝露に起因した脳内 5-HT 量減少に対する 5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニスト ipsapirone の効果 (胎生 20 日齢ラット)  
A. 脳内 5-HT, DA およびそれらの代謝産物量  
B. 脳内 5-HT および DA の代謝効率

効率も改善傾向が認められた (Fig. 3)。

高架式十字迷路試験においては、エタノールの単独曝露群 (Et+sal) で open arm 滞在時間が有意であったが、ipsapirone との共曝露群では変化が認められなかった (Fig. 4)。よって、ipsapirone の投与によって胎生期エタノール曝露による 5-HT 神経細胞の減少を軽減すると、不安行動の異常も生じないことが明らかとなった。

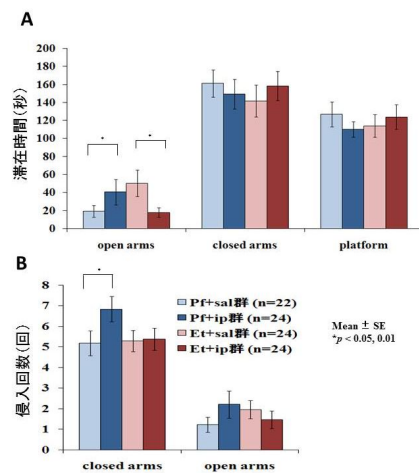


Fig. 4 高架式十字迷路試験による不安行動の評価  
A. 各領域での滞在時間  
B. 各アームへの侵入回数

5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体アゴニストである DOI の投与は、5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニストである ipsapirone 同様に、背側縫線核と正中縫線核の両方においてエタノールによる5-HT神経細胞数減少を有意に軽減した (Fig. 5)。

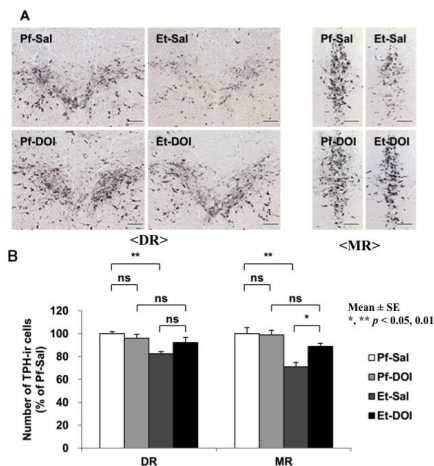


Fig. 5 胎生期エタノール曝露に起因した5-HT神経細胞減少に対する5-HT<sub>2A/2C</sub>受容体アゴニストDOIの効果(胎生20日齢ラット)  
A. 中脳縫線核における5-HT作動性神経細胞の局在  
B. 中脳縫線核における5-HT作動性神経細胞数の比較  
DR: 背側縫線核, MR: 正中縫線核

DOI が胎生期エタノールによる5-HT神経細胞数の減少を軽減するメカニズムを探るべく、5-HT神経の分化・成熟に関与

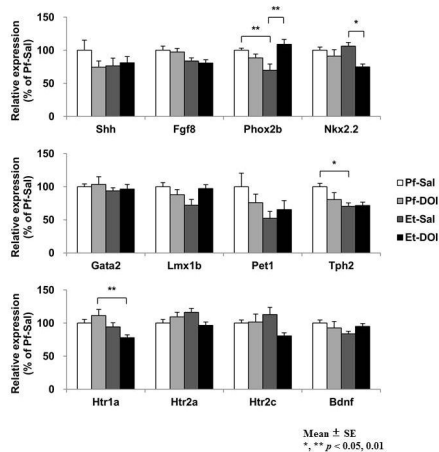


Fig. 6 胎生期エタノール曝露および5-HT<sub>2A/2C</sub>受容体アゴニストDOI投与による5-HT神経発達関連遺伝子発現量の変化(胎生19日齢ラット全脳)

する遺伝子群の発現量を解析したところ、Phox2b および Nkx2.2 の発現量が、DOI 投与したエタノール群において DOI 投与を受けなかったエタノール群と比較して有意な変化が認められた。特に Phox2b はエタノール曝露群(Et-sal)において対照群(Pf-sal)と比較して有意に低下したが、DOI を投与すると(Et-DOI)では対照群を有意差が認められないまでに回復しており、胎生期エタノール曝露による5-HT神

経細胞数減少に対する DOI の軽減効果に関与していることが推察された(Fig. 6)。

## 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)

Ken-ichi Ohta, Hiromi Sakata-Haga, Yoshihiro Fukui

Prenatal ethanol exposure impairs passive avoidance acquisition and enhances unconditioned freezing in rat offspring (査読有)

DOI : 1016/j.bbr.2012.07.0011

Behavioural Brain Research 234

255-258 (2012)

[学会発表](計 4 件)

Tsukasa Ishiguro,

Hiromi Sakata-Haga, Yoshihiro Fukui

Preventive effect of a 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor agonist of the reduction of serotonergic neurons induced by prenatal exposure ethanol in rats  
Neuroscience 2013 November /9-13 2013 (San Diego Convention Center)

石黒 司、坂田ひろみ、福井 義浩  
5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体アゴニスト投与による胎生期エタノール曝露ラットの中脳縫線核 5-HT 神経細胞減少の抑制  
第 53 回日本先天異常学会学術集会  
2013 年 7 月 21 日 ~ 23 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

石黒司、坂田ひろみ、福井義浩  
胎生期エタノール曝露による5-HT神経細胞の発生異常への5-HT<sub>2A/2C</sub>受容体アゴニストの作用  
第 118 回日本解剖学会学術集会  
2013 年 3 月 30 日 サンポートホール高松・香川国際会議場(高松)

金井友宏、坂田ひろみ、福井義浩  
セロトニン 1A 受容体作動薬はエタノールによるセロトニン神経系発達障害を防ぐことができるか?  
2011 年 7 月 22 日 ~ 24 日  
第 51 回日本先天異常学会学術集会  
シェーンバッハサポー(東京都)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 義浩 (FUKUI, Yoshihiro)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号 : 50144168

(2) 研究分担者  
坂田 ひろみ(Sakata-Haga, Hiromi)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師  
研究者番号：50294666