

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23617034

研究課題名(和文) 母子親和行動中枢の発達における脂質栄養素の役割の解析

研究課題名(英文) Roles of fat-soluble nutrients in the development of neural circuits supporting parental infant relationship.

研究代表者

森田 規之(MORITA, Noriyuki)

安田女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：50239662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：絆の深まりや愛情や信頼の感情の育みが、生涯を通じて健全な食生活を送るための本質的な基盤となる。視床下部の養育・愛着行動中枢、不安情動制御に関わると考えられる脳領域に注目し、神経発生や発達、機能の発揮に際して、脂質栄養素がおよぼす影響について研究を進めた。エストロゲンシグナリングに対する脂溶性ビタミンEのトコトリエノールの作用に注目し、バイオイメージング法で細胞生物学的な解析を行い、ニューロン分化への影響について脳スライス培養系での検討を進めた。

研究成果の概要(英文)：Fostering ties between parents and children, and nurturing loving and committed relationships are fundamental to healthy dietary habit over a lifetime. Focusing on the hypothalamus and other brain regions involved in maternal, attachment, and anxiety-like behaviors, the effects of fat-soluble nutrients on neurogenesis and functional development of the neural circuits were investigated in mice.

Using single living cell imaging analysis of GFP-tagged estrogen receptor beta, natural fat-soluble vitamin E tocotrienols were evaluated to act as ligand for the receptor. The effects of tocotrienols on neuronal differentiation are under investigation in either postnatal cerebellar or embryonic hypothalamic slice culture system.

研究分野：神経発生学

キーワード：視床下部 縫線核 トコトリエノール エストロゲン受容体 小脳 脳スライス培養 in situ ハイブリダイゼーション 免疫組織化学

### 1. 研究開始当初の背景

母子の絆の深まりや、愛情や信頼の感情の育みが、生涯を通じて健全な食生活を送るための本質的な基盤となる。そこで、間脳の視床下部の養育行動中枢や愛着行動中枢、不安情動制御に関わると考えられる脳領域に注目し、神経発生や発達、機能の発揮に際して、脂質栄養素がおよぼす影響について検討することを企てた。

(1) 養育行動や愛着行動の中枢として、視床下部におけるオキシトシンニューロンを中心とするネットワークが想定され、これらニューロンの多くはエストロゲン受容体 (ER) を共発現し、その発達や機能がエストロゲンの影響下にある。

核内受容体として転写因子機能を有し、遺伝子発現を直接制御する ER には、ER $\alpha$  と ER $\beta$  の 2 つのサブタイプが存在し、生殖行動や母性行動には主に ER $\alpha$  シグナリングが、視床下部領域に加えて背側縫線核セロトニン作動性ニューロンでの発現が顕著な ER $\beta$  は、抗不安やストレス耐性などの情動行動に関与するとされ、閉経期や産後のうつ病は主に ER $\beta$  シグナリングの低下によることが示唆されている。

(2) ビタミン E 欠乏食を与えることで離乳期や成熟期の動物に不安行動を誘発できることについて、これまでの報告はビタミン E の抗酸化作用に基づいて酸化ストレスと不安行動の因果関係を推察するのみであった。

ところで、トコトリエノールが、乳がん細胞株において、特異的に ER $\beta$  の核内移行を促し、エストロゲン応答遺伝子群の転写を活性化することが報告された(引用文献)。そこで、母子親和行動や不安情動制御の脳中枢でもトコトリエノールによる ER $\beta$  シグナリングの賦活が、起こりうるのかに注目した。(3) 脂質栄養素と脳の発生・発達や機能の発揮を関連づける脂肪酸結合タンパク質 (FABP) が注目され、多価不飽和脂肪酸の細胞内への取り込みや輸送への関与、また核内受容体との複合体形成による遺伝子発現調節機能が示唆されている。間脳・視床下部領域の発生と関連させての FABP ファミリーメンバーの発現動態に興味をもたれた。

### 2. 研究の目的

乳がん細胞株で報告された、トコトリエノールによる特異的な ER $\beta$  の核移行と、それに基づくエストロゲン感受性遺伝子群の転写活性化について、脳神経系では検証されていない。

母子親和行動中枢の中核をなすオキシトシン等の神経ペプチド産生ニューロンや、縫線核セロトニン作動性ニューロンが ER $\beta$  を共発現していることに注目し、トコトリエノールが ER $\beta$  シグナリングの活性化を介して母子親和や、産後うつなどを緩和する抗不安の情動行動の脳中枢の機能発達に関わる可能性をさ

ぐることを、主要な目的とした。

(1) 中枢神経系のニューロン/グリアにおいても、トコトリエノールによる ER $\beta$  の核内移行の促進が起こりうるのかを、培養細胞や、視床下部由来の神経系細胞の初代培養系で検討を進める。

(2) トコトリエノールを培養培地へ添加し、オキシトシン等の神経ペプチドの発現量の変化、ニューロン、グリアの形態変化が誘起されるかどうかを免疫組織化学的に評価する。

(3) マウスのモデル動物において、母子親和行動中枢の発達に伴っての、脂肪酸結合タンパク質ファミリーの発現動態を神経組織学的に明らかにする。

### 3. 研究の方法

脂溶性ビタミンの一つであるビタミン E、中でもトコトリエノールが、また脂肪酸結合タンパク質を介して多価不飽和脂肪酸質が、母子親和や抗不安の行動中枢の発達や機能の発揮に影響を及ぼす可能性について、マウスをモデル動物として追究することを企てた。

解析にあたっては、分子から *in vitro* 細胞レベル、*in vivo* での細胞から脳内ネットワークレベル、個体の行動のレベルへと、生体の構造と機能の階層性に沿うように、順次進めることとした。

(1) トコトリエノールによるエストロゲン受容体  $\beta$  (ER $\beta$ ) の核内移行の初代培養系による解析

胎生後期のマウス脳を摘出し、ER $\beta$  発現ニューロンを含む脳領域(視床下部、背側縫線核、小脳)を、実体顕微鏡下で切り出す。酵素処理によって分散させた神経系細胞を、ポリエチレンイミンコーティングしたガラスカバースリップ上に播種した。無血清培地中で培養し、4 種のトコトリエノールおよび対照としての  $\alpha$ -トコフェロールのいずれかを培地に添加した。ビタミン E による ER $\beta$  の核内移行の促進の程度を免疫細胞化学染色によって評価することとした。ビタミン E 添加後、経時的に細胞を 4% パラホルムアルデヒド/PBS で固定し、ブロッキングの後、抗 ER $\beta$  抗体を用いて免疫染色を施した。

(2) 緑色蛍光タンパク質 (GFP) と ER $\beta$  の融合タンパクの挙動解析(京都府立医科大学大学院医学研究科生体構造科学部門松田賢一准教授との共同研究)

ガラスボトムディッシュ上に培養したアフリカミドリザル腎由来細胞 COS に対して、リポフェクトアミン法により、緑色蛍光タンパク質 (GFP) と ER $\beta$  の融合タンパク遺伝子をトランスフェクションした。本来のリガンドである 17 $\beta$ -エストラジオール、 $\gamma$ -トコトリエノールおよび  $\delta$ -トコトリエノールを培地に添加した後の GFP-ER $\beta$  融合タンパク質の挙動を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(3) 胎生期の間脳・視床下部領域における脂肪酸結合タンパク質発現の分子形態学的解析

マウスをモデル動物として解析をすすめた。視床下部の神経核を構成するニューロンは、大脳皮質よりも早期の胎生 10 日～12 日頃に、第 3 脳室に面した神経上皮で最終分裂を行い、細胞移動のち、胎生後期に神経核へと定着することが知られている。マウスの発生の各段階（胎生 10、12、14、16、18 日、生後 1 日）において、ホールマウント標本、組織切片標本を作成し、脂肪酸結合タンパク質遺伝子ファミリーのそれぞれに特異的なジゴキシゲニン標識 cRNA プローブを用いて、*in situ* ハイブリダイゼーションによる分子形態学的解析をすすめた。

視床下部の領域は発生に伴い形態が複雑に変化することから発現部位の解釈に困難を伴う。そこで視床下部発生過程の間で神経管の腹側で発現が維持されている Shh 遺伝子をランドマークとするため、Shh 遺伝子のフルオレセイン標識 cRNA プローブも併用し、二重染色 *in situ* ハイブリダイゼーションを施すこととした。また、ニューロンが産生する各種神経ペプチドとの関連性を調べる目的で、オキシトシン、バゾプレッシン、プロラクチン等や、脂肪酸結合タンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学法を行う。オキシトシンの産生は胎生後期に始まることから、オキシトシン産生ニューロンの系譜を追跡するため、より早い発生段階で発現が検出される Calbindin をマーカーとして用いることとした。

#### (4) 視床下部領域、小脳の脳スライス培養

胎仔期から新生仔マウスより脳を摘出し、視床下部領域については前額断、小脳については矢状断の厚さ 200～400 $\mu$ m のスライスを、マニュアルあるいはマイクロスライサーで薄切し、ガラスフィルター上のオムニポアメンブレンフィルターに静置してスライス培養を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 抗体について

注目するたんぱく質に特異的に反応する抗体が、幅広い研究に利用でき、優れた抗体の有無が、研究の進展に大きく影響する。エストロゲン受容体  $\beta$  に対する抗体として、mRNA レベルとたんぱく質レベルでの局在に矛盾がないことから推奨されてきた ZP8 抗血清がもはや入手不可能であることから、引用文献に基づいて、ウサギ抗 ER $\beta$  抗体、(PA1-310B, Thermo Fischer Scientific)を用いることとした。マウス成獣脳組織切片において、小脳プルキンエ細胞、室傍核、縫線核等での免疫陽性シグナルを確認した。

### (2) トコトリエノールによるエストロゲン受容体 $\beta$ (ER $\beta$ )の核内移行

ER $\alpha$  はほとんどが核内に、ER $\beta$  も多くは核に局在していることが報告されている。免疫化学的染色ではリガンド添加前の細胞質における染色シグナルは弱く、添加後における免疫染色陽性シグナルの細胞質から核

内への分布の変化も明確ではなかった。

### (3) 緑色蛍光タンパク質(GFP)と ER $\beta$ の融合タンパクの挙動解析

そこで、京都府立医科大学大学院医学研究科生体構造科学部門松田賢一准教授との共同研究により、緑色蛍光タンパク質(GFP)と ER $\beta$  の融合タンパク質遺伝子の COS トランスフェクタントをガラスボトムディッシュで培養して、共焦点レーザー顕微鏡で観察した(引用文献)。本来のリガンドである 17 $\beta$ -エストラジオール(E2)(0.1 $\mu$ M)の添加によって、融合タンパク質は、核内移行の挙動を示すことはなく、細胞核内においてドット状に凝集することが観察された。リガンドとして、 $\gamma$ -トコトリエノール(14 $\mu$ M)、あるいは  $\delta$ -トコトリエノール(28 $\mu$ M)を添加したところ、E2 添加時に見られたような細胞核内での凝集像は観察することができなかった。E2 に加えてトコトリエノールを添加する実験においては凝集像の消失がみられたことから、両者が拮抗する可能性は示唆された。

### (4) 胎生期の間脳・視床下部領域における脂肪酸結合タンパク質発現の分子形態学的解析

*in vitro* 転写反応によって cRNA プローブを調製するにあたり、既報の鑄型プラスミドの譲渡を受けることを試みたが、叶わなかった。そのため、理化学研究所 FANTOM や NIH Mammalian Gene Collection プロジェクトの全長 cDNA クローンを購入し、独自に設計した RNA プローブ領域の鑄型となる DNA 断片を PCR 法で増幅して、*in vitro* 転写用ベクタープラスミドにサブクローニングすることとした。

FABP ファミリーメンバーに対する特異的プライマーセットとして、以下のものを設計した。

Fabp3\_Fw1

ACGAGGTGACAGCAGATGAC,

Fabp3\_Rv1 TGACCTTGGAGCACCCCTTTG

Fabp3\_Fw2

GCCTTTGTCGGTACCTGGAA,

Fabp3\_Rv2

TGGAGCACCCCTTTGGATACAG

Fabp5\_Fw1

GTCTCTGCTGCTTTTGTGCTC,

Fabp5\_Rv1

CCAAGTTTGACATGAAGGTCCA

Fabp7-Fw1

GTGAATTACGGTGGTGGGTAA,

Fabp7-Rv1

CCAAGTTGTCAAAAAGTCCTGTC

Fabp7-Fw2

TTTTTCAGCTGACTAGGCGGTT,

Fabp7-Rv2

CTCCACACCGAAGACAAACTT

それぞれの FANTOM クローン等の cDNA を鑄型として Easy-A High-Fidelity PCR Cloning Enzyme (ストラタジーン)を用いてハイフィディティーPCRを行い、増幅された DNA 断片を pCR4-TOPO ベクターDNA

にライゲーションし、大腸菌 DH5α 株を形質転換して組換え体のコロニーを得た。サブクローニングして得たプラスミド DNA について、m13 プライマーとプローブ特異的プライマーを用いた PCR で *in vitro* 転写の鋳型となる DNA 断片を増幅し T3 あるいは T7 RNA ポリメラーゼによる反応で、ジゴキシゲニンもしくはフルオレセイン標識 cRNA プローブを調製した。

胎仔マウス脳を対象として whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、FABP ファミリーの中でも FABP7 について、胎生 12 日から 16 日にかけて視床下部領域の第 3 脳室に面した脳室帯で陽性シグナルが認められ、視床下部ニューロンの新生に参与することが示唆された。ER ノックアウトマウスにおいては視床下部ニューロンの発生・分化に異常が認められることから (引用文献) 現在、各種神経ペプチド、ER との発現の重複性や相補性について詳細な追究を進めている。

(5) トコトリエノールによる ERβ シグナリングの賦活の脳スライス培養系での解析  
視床下部ニューロン、特にカルレチニン発現ニューロンの発生・分化 (引用文献)、小脳のプルキンエ細胞の樹状突起の成長とスパイン形成 (引用文献) に ER シグナリングが関与することが報告されていることから、脳スライス培養系での解析を試みている。視床下部領域のスライス培養について (引用文献)、タイムウィンドウの設定、血清培地から無血清培地への転換等についての条件設定を進めており、現在のところ、結論を出すまでには至っていない。

<引用文献>

- Comitato R, Nesaretnam K, Leoni G, Ambra R, Canali R, Bolli A, Marino M, Virgili F. A novel mechanism of natural vitamin E tocotrienol activity: involvement of ERβ signal transduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Aug;297(2):E427-37. doi: 10.1152/ajpendo.00187.2009.
- Snyder MA, Smejkalova T, Forlano PM, Woolley CS. Multiple ERβ antisera label in ERβ knockout and null mouse tissues. *J Neurosci Methods.* 2010 May 15;188(2): 226-34. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.02.012.
- Ken-ichi Matsuda, Ikuo Ochiai, Mayumi Nishi, and Mitsuhiro Kawata. Colocalization and Ligand-Dependent Discrete Distribution of the Estrogen Receptor (ER)α and ERβ. *Mol Endocrinol.* 2002 Oct;16(10): 2215-30. DOI:http://dx.doi.org/10.1210/me.2002-0110
- Fan X, Warner M, Gustafsson JA.

Estrogen receptor beta expression in the embryonic brain regulates development of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 19;103(51):19338-43.

- Sakamoto H, Mezaki Y, Shikimi H, Ukena K, Tsutsui K. Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology.* 2003 Oct;144(10):4466-77.
- Yoshimura R, Yamamoto E, Endo Y. Morphological effects of isoflavones (daidzein and genistein) on hypothalamic oxytocin neurons in the neonatal mouse brain slice cultures. *Neurosci Lett.* 2011 Nov 14;505(2): 87-92. doi: 10.1016/j.neulet.2011.09.067.
- Nakaso K, Tajima N, Horikoshi Y, Nakasone M, Hanaki T, Kamizaki K, Matura T. The estrogen receptor β-PI3K/Akt pathway mediates the cytoprotective effects of tocotrienol in a cellular Parkinson's disease model. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Sep;1842(9):1303-12. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.04.008.

#### 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)

- Fujita, H., Morita, N., Furuichi, T. and Sugihara I. The Journal of Neuroscience 32(45) pp. 15688-15703 (2012) Clustered Fine Compartmentalization of the Mouse Embryonic Cerebellar Cortex and Its Rearrangement into the Postnatal Striped Configuration. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1710-12.2012

[学会発表] (計 5 件)

- Shinoda, Y., Sato, A., Koebis, M., Sadakata, T., Morita, N., Yuzaki, M., Inoue, T., Nishibe, H., Yamaguchi, Y. and Furuichi, T. : Cerebellar Development Transcriptome Database (CDT-DB) - Profiling of Spatio-Temporal Gene Expression During Postnatal Development of Mouse Brain. INCF Japan Node International Workshop: Advances in Neuroinformatics 2014, Wako, Japan (国際学会)、平成 26 年 9 月 26 日
- Sato, A., Shinoda, Y., Koebis, M., Sadakata, T., Morita, N., Yuzaki, M., Inoue, T., Nishibe, H., Yamaguchi, Y.

and Furuichi, T. : Cerebellar Development Transcriptome Database (CDT-DB).INCF Japan Node

International Workshop: Advances in Neuroinformatics 2014, Wako, Japan (国際学会)、平成26年9月25, 26日

- ・ 森田規之：管理栄養士養成教育における解剖見学実習の意義 コ・メディカル形態機能学会第12回学術集会・総会、広島国際大学（広島・呉）、平成25年9月14日

- ・ Fujita, H., Morita, N., Furuichi, T. and Sugihara, I. Spatial organization of Purkinje cell compartments in the E17.5 mouse cerebellar cortex and their rearrangement into longitudinal stripes in the postnatal Purkinje cell layer. Neuroscience 2012 The 42nd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, USA October 13-17, 2012

- ・ 藤田啓史, 森田規之, 古市貞一, 杉原泉：マウス胎仔期小脳皮質におけるプルキンエ細胞集団の分子発現パターンによる同定とその小脳縦縞区分への発達の追跡 第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場（愛知・名古屋）、平成24年9月18-21日

#### 〔図書〕(計8件)

- ・ 森田規之「1.実習にあたって 1.2 顕微鏡の原理と使い方、1.3 組織学研究法、1.4 スケッチの作法」pp.2-7
- ・ 森田規之「2.細胞とゲノム」pp.8-21
- ・ 森田規之「3.皮膚 3.1 肉眼解剖学実習、3.2. 組織学実習」pp.22-26
- ・ 森田規之「4.感覚器系 4.1 肉眼解剖学実習」pp.32-34
- ・ 森田規之「4.感覚器系 4.3 生理学実習 4.3.4 味覚、4.4 アドヴァンスト」pp.41-43
- ・ 森田規之「6.ラットの解剖 6.1 肉眼解剖学実習 6.1.2 ラットの解剖、6.2 アドヴァンスト」pp.65-73
- ・ 森田規之「12.神経系 12.1 肉眼解剖学実習、12.2 組織学実習、12.3 生理学実習 12.3.1 膝蓋腱反射、12.3.2 棒反応時間の測定」pp.131-142
- ・ 森田規之「14.生殖器系 14.2 生理学実習、14.3 アドヴァンスト」pp159-161  
講談社サイエンティフィック 栄養科学シリーズ NEXT 人体の構造と機能 解剖生理学実習 森田規之・河田光博・松田賢一/編 (2015) 総ページ数 172

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

森田規之 (MORITA, Noriyuki)

安田女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：5 0 2 3 9 6 6 2