

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461653

研究課題名(和文) 亜鉛イオンによる神経管閉鎖障害の発症メカニズムの解析

研究課題名(英文) Effects and mechanism analysis of zinc ion on neural tube defects

## 研究代表者

駒崎 伸二 (Komazaki, Shinji)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80129155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経管閉鎖障害(NTDs)は新生児の脳や脊髄に生じる先天的な奇形で、その出現頻度は比較的に高く、しかも、症状が重篤である。NTDsが引き起こされる原因とそのしくみについては不明な点が多く、遺伝的な因子、環境因子(環境汚染など)、栄養因子(ビタミンBや亜鉛イオンなどの過不足)など、さまざまな要因が指摘されている。そこで、我々は、NTDsが引き起こされるしくみを明らかにするために、両生類(イモリ)の神経管形成に亜鉛イオンが及ぼす作用を解析した。その結果、亜鉛イオンが両生類のNTDsに及ぼす特異的な作用と、それにより、NTDsが引き起こされるしくみの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neural tube defects (NTDs) are birth defects of the brain and spinal cord. NTDs are caused relatively at a high frequency in the newborn, and the symptoms are severe. The exact causes and mechanisms of NTDs are unclear. Many different factors, such as, genetics, environmental pollution, and nutrition (excess or deficiency of vitamin B and zinc ion) are likely to play a role. We analyzed the effects of excess zinc ions on neural tube formation of amphibian (newt) embryos in order to clarify the mechanism by which NTDs are caused. In this study, specific effects of zinc ions on the developing brain and spinal cord in amphibian embryos were demonstrated, and some mechanism of NTDs induced by zinc ions was revealed.

研究分野：発生生物学・細胞生物学

キーワード：神経管閉鎖障害 二分脊椎 亜鉛イオン 両生類 神経胚形成

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 小児の奇形の中でも出現頻度が高く、その症状が重篤なものに神経管欠損症 (NTD; Neural Tube Defects) がある。NTD は、発生過程における神経管の閉鎖障害により生じる奇形で、日本人に比較的に多く (5~6人/1万人) 発生することが知られ、その奇形は新生児に二分脊椎症、無脳症、脳ヘルニア、頭蓋破裂などの重篤な症状を引き起こす。そのために、NTD は社会的にも大きな問題となっている。

(2) NTD の原因としては、遺伝的な因子、環境因子 (環境汚染など)、栄養因子 (ビタミン B の欠乏や亜鉛イオンの過不足) など、さまざまな可能性が指摘されている。しかしながら、それらの因子がどのようなメカニズムで NTD を引き起こすのか依然として不明な点が多く、その予防策に関する知識も不足している。

## 2. 研究の目的

ヒトの初期胚発生過程で引き起こされる異常 (奇形) の発生を減らすためには、それを予防することが最善の方策と考えられる。しかしながら、現在、ヒトを含めた動物の NTD が引き起こされるメカニズムについては不明な点が多く、そのために、ヒトの NTD を予防するための適切な対策を講じることが難しい状況にある。このような状況において、NTD のしくみを細胞生物学的な面から詳細に明らかにすることは、その予防のために必要不可欠で急務なことと考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では、研究材料として両生類の胚を用いた。その理由は、哺乳類の胚と異なり、簡単な生理食塩水を用いて室温による培養実験が可能であるために、顕微鏡下で胚を連続的に観察しながら、さまざまな操作を加えた実験を容易に行うことができる。このよう

な実験上の便利さは、さまざまな種類の実験を容易にするとともに、そこから得られる結果の再現性の良さにも反映するからである。

両生類 (アカハライモリ、*Cynops pyrrhogaster*) の胚を用いて亜鉛イオンが引き起こす際の NTD のしくみを発生学と細胞生物学の両面から解析した。具体的には、以下に述べる方法を用いて、塩化亜鉛が NTD に及ぼす作用を解析した。(1) 亜鉛イオンが発生過程に及ぼす影響を明らかにするためのタイムラプス解析、(2) 細胞の微細構造に及ぼす影響を明らかにするための電子顕微鏡解析、(3) 胚細胞の形態形成運動に及ぼす影響を明らかにするための位相差顕微鏡によるタイムラプス解析、(4) 細胞内のカルシウムイオン濃度調節機能に及ぼす影響や細胞内亜鉛イオン濃度の変化を明らかにするための細胞内イオン濃度のリアルタイム画像解析 (蛍光指示薬の Fura-2 や Newport green を用いた解析)、(5) 胚細胞内の亜鉛イオンの分布や、その蓄積部位などを明らかにするための電子顕微鏡を用いた X 微量分析などである。

## 4. 研究成果

一定の濃度の塩化亜鉛を含む培養液中でイモリの胚と培養した胚細胞を用いて、塩化亜鉛がイモリの神経管形成過程に及ぼす作用を解析した。塩化亜鉛を含む培養液で原腸胚の開始時期 (Stage 10-11) から胚を培養しておく、培養液中に加えた塩化亜鉛の濃度が 2 mM 以下の濃度では神経管形成にはほとんど影響が見られなかった。塩化亜鉛が 3 mM と 4 mM の濃度では約 40% の胚に NTD が引き起こされた。そして、塩化亜鉛の濃度が 5 mM では、約 80% の胚に NTD が引き起こされた (図 1)。

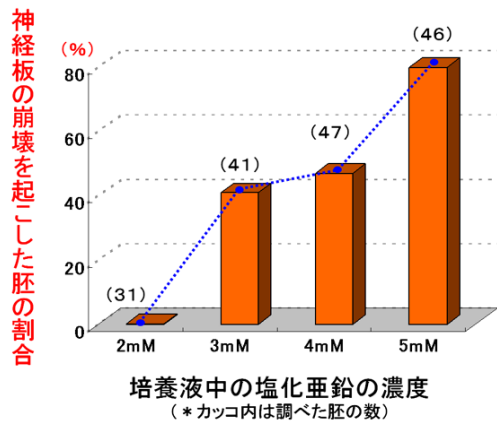


図 1. 培養液に加えた塩化亜鉛の濃度と、神経板の崩壊を起した胚の割合

原腸胚初期から塩化亜鉛を含む培養液で培養すると、3~4 mM の濃度から神経板の崩壊が生じ、5 mM ではほとんどの細胞の神経板の崩壊が観察された。

その際に、塩化亜鉛の濃度が異なると、神経管形成過程に及ぼす影響に違いが見られた。3 mM と 4 mM の塩化亜鉛の濃度では、胚の発生過程が Stage 20 の時期になると、将来の頸部になる部分の神経板の領域の異常が選択的に引き起こされ、やがて、その部分を基点に神経板の崩壊が全体的に広がっていった。そして、塩化亜鉛の濃度が 5 mM では、それよりも発生の早い Stage 19 の時期に頭部領域の神経板の部分が選択的に崩壊し、その部分を基点に神経板の崩壊が全体的に広がっていった (図 2)。

神経板の異常が引き起こされた胚をそのまま塩化亜鉛を含んだ培養液中で発生させると、やがて、全体に波及した神経管の閉鎖障害のために胚は死亡した。一方、神経管が閉鎖した Stage 21 以降からならば、胚に 5 mM 塩化亜鉛を作用させても、その後の神経管形成過程に明らかな影響は見られなかった。

### 塩化亜鉛に対する神経板の感受性

(反応領域と反応する発生時期が違う)

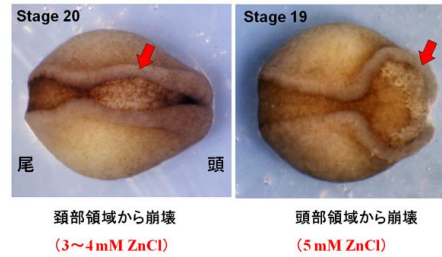
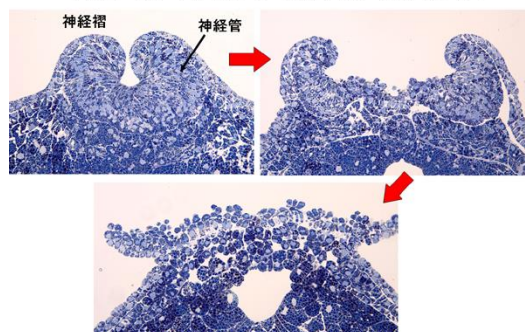


図 2. 塩化亜鉛による神経管形成過程への影響

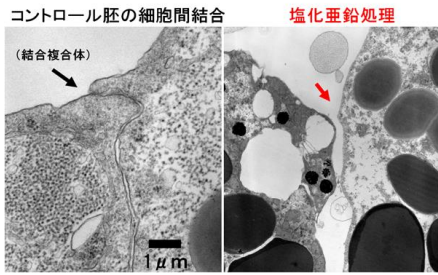
原腸胚初期から塩化亜鉛を含む培養液で培養すると、添加した塩化亜鉛の濃度に依存して、頸部領域と頭部領域の神経板の部分が選択的に影響を受ける。最初に、それらの領域の上皮構造が壊れ、やがて、その崩壊は神経板全体に広がっていった。矢印は壊れた神経板の領域を示す。

神経板の頸部や頭部の崩壊が引き起こされた時期に、胚を固定して神経板に起きている組織的な変化を光学顕微鏡で観察すると、神経板を構成する細胞が分離して、上皮構造を形成する神経板が崩壊していることが明らかになった (図 3A-C)。そして、電子顕微鏡による細胞の微細構造の観察結果から、塩化亜鉛による影響が神経板を構成する細胞間結合 (結合複合体、Junctional complex) を壊し、神経板の上皮構造を崩壊させることが明らかになった (図 3D, E)。

### 塩化亜鉛の作用による神経板の崩壊過程

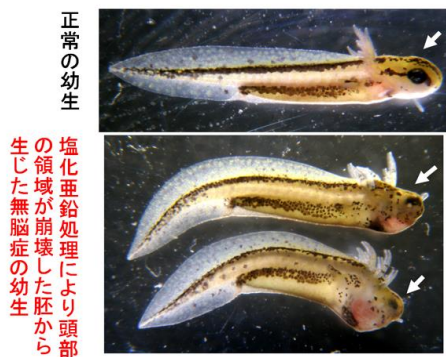


### 神経板細胞の電子顕微鏡観察



**図 3. 塩化亜鉛の作用による神経板の崩壊**  
 A は崩壊が始まる直前の神経管の頸部領域の断面を示す。B は崩壊が開始された初期の神経板の崩壊を示す。C は崩壊が進行して、神経板と神経褶全体の上皮構造が崩壊した状態を示す。3 mM の塩化亜鉛を含んだ培養液で培養した胚の場合を示す。D は正常の神経板の細胞の細胞間結合を示す。E は塩化亜鉛の影響で細胞間結合が壊れた状態を示す。矢印は細胞間結合（結合複合体）の部分を示す。

頸部や頭部の選択的な崩壊が開始された初期の段階で、胚をただちに塩化亜鉛を含まない正常の培養液に移すと、それ以上の神経板の崩壊は停止し、崩壊された部分の修復を行いながら発生が進行した。その結果、頸部に NTD を生じた状態の胚からは背部が折れ曲がった幼生が生じ、頭部に NTD を生じた状態の胚からはヒトの無脳症や小頭症に良く似た幼生が生じた（図 4）。

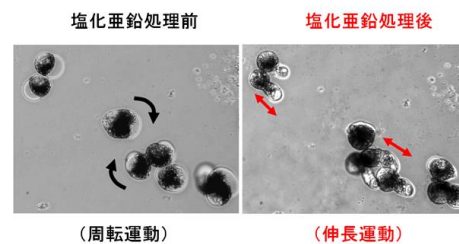


**図 4. 塩化亜鉛の影響で生じた頭部の NTD による影響**  
 A は正常に発生した幼生を示す。矢印は頭部領域を示す。B は 5 mM の塩化亜鉛を含

む培養液で培養して頭部の NTD が引き起こされた後、正常の培養液に戻して発生を続行させたものを示す。矢印は欠損した頭部領域を示す。ヒトの無脳症に良く似た状態を示している。

次に、塩化亜鉛が胚細胞の運動機能に及ぼす影響を解析した。それは、神経板や神経褶に引き起こされる形態形成運動が神経管の閉鎖に重要な役割を果しているからである。ここでは、塩化亜鉛が神経板の胚細胞の運動性に及ぼす影響について、タイムラプス撮影により解析を行った。一般に、外胚葉域から単離された胚細胞は、丸く膨らんだ突起（Bleb）が細胞の周囲を活発に回転する“回転運動”と呼ばれる運動を行うことが知られている。それらの胚細胞に塩化亜鉛を作用させると、短時間のうちに回転運動が伸長運動へと変化した（図 5）。そして、その影響は神経板の部域により明らかな違いが見られた。その影響は、塩化亜鉛の影響を受けやすい頸部の胚細胞に顕著で、塩化亜鉛の影響を受けにくい尾部ではほとんど見られなかった（図 6）。

### 神経板細胞への塩化亜鉛の作用



**図 5. 胚から単離した神経板の細胞運動に対する塩化亜鉛の影響**  
 Stage 18-19 の神経胚の頸部領域の神経板から胚細胞を単離して、塩化亜鉛を作用させる前と後の細胞運動の変化を示す。塩化亜鉛を作用させる前は周転運動をしているが、3 mM 塩化亜鉛を作用させると速やかに細胞運動が伸長運動へと変化する。矢印は細胞の運動の方向を示す。



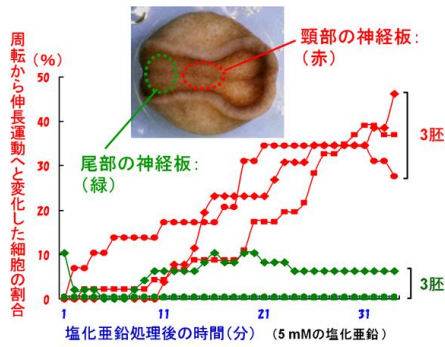


図 6. 塩化亜鉛が単離胚細胞の運動性に及ぼす影響の部域的な違い

Stage 18-19 の神経胚の頸部と尾部の神経板から単離した胚細胞を 5 mM の塩化亜鉛で処理した場合の細胞運動への影響を見ると、前者の領域の細胞は顕著な影響を受けるが、後者の領域の胚細胞には影響がほとんど見られない。

塩化亜鉛が細胞運動に影響を及ぼす一因として、塩化亜鉛が細胞内のカルシウムイオンの濃度に及ぼす影響が考えられる。そこで、塩化亜鉛処理による細胞内カルシウムイオン濃度の変化をリアルタイム画像解析法で調べた。その際に、カルシウムイオン濃度を調べるための蛍光指示薬として Fura-2-AM を用いた。そして、細胞内カルシウム濃度の変化は、340 nm と 380 nm の波長で励起した際の Fura-2 の蛍光の強さの比で計算した。その結果、塩化亜鉛の作用により、神経板の頸部から単離された胚細胞の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が確認された (図 7)。

頸部の神経板から単離した細胞の塩化亜鉛に対する反応 (細胞内カルシウムイオン濃度の変化)

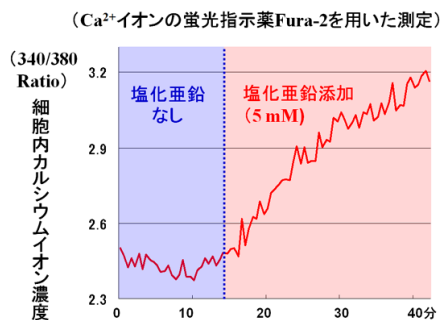


図 7. 神経板から単離した胚細胞の細胞内カ

ルシウムイオン濃度に及ぼす塩化亜鉛の作用

Stage 18-19 の神経胚の頸部から単離した胚細胞は、5 mM の塩化亜鉛を作用させると、細胞内のカルシウムイオン濃度が速やかに上昇した。

### 考察

今回の結果から、塩化亜鉛が濃度依存的に異なる部位に NTD を引き起こし、その影響は発生の時期と胚の領域に特異的であることも分かった。ヒトの場合でも、NTD により障害を受ける領域には部域的な違いがあることが知られているので、おそらく、神経管形成の時期の神経板には何らかの細胞機能の領域的な違いがあると考えられる。その 1 つが、今回注目した細胞内のカルシウムイオン濃度調節機能の違いであろう。

タイムラプス撮影による細胞運動の解析や、顕微鏡による観察結果から、塩化亜鉛が神経板を構成する胚細胞の細胞運動や細胞間結合に大きな影響を及ぼすことが分かった。そして、細胞内カルシウムイオン濃度のリアルタイム画像解析の結果から、塩化亜鉛の作用が細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させることも分かった。これらの結果は、塩化亜鉛による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が、神経板の上皮構造の崩壊や細胞運動の変化を引き起こすことにより、NTD を引き起こした可能性が強く示唆される。

塩化亜鉛処理により細胞内カルシウムイオン濃度が上昇した原因としては、細胞膜のカルシウムイオンチャネル (ジヒドロピリジン受容体、DHPR) が塩化亜鉛の影響を受けて、細胞外から細胞内にカルシウムイオンの流入を引き起こした可能性と、細胞内に流入した亜鉛イオンが小胞体膜のカルシウムイオンチャネル (リアノジン受容体、RyR) に作用して、小胞体から細胞内にカル

シウムイオンを放出させた可能性が考えられる(図8)。これらの可能性に関連し、両生類の胚では、発生の早い時期から RyR が胚細胞に発現しているが、DHPR は原腸胚から神経胚にかけて胚細胞に発現してくる<sup>(1)</sup>。そして、今回の Newport Green を用いた細胞内の亜鉛イオン濃度解析や X 線微量分析による解析の結果では、塩化亜鉛処理による胚細胞内の亜鉛イオンの上昇や蓄積は見られなかった。これらの事実から推測すると、塩化亜鉛は神経胚の時期になると多く発現する細胞膜の DHPR に作用して細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こした可能性が高いと考えられる。

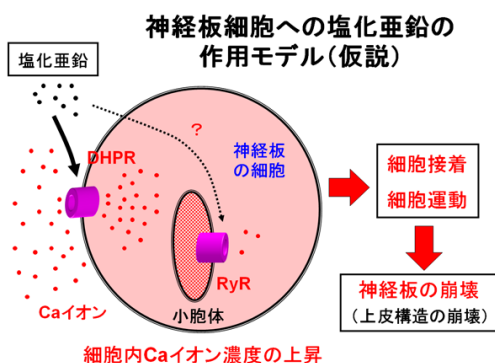


図 8. 塩化亜鉛が細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こすモデル (仮説)

亜鉛イオンが細胞膜のカルシウムチャンネルの DHPR に作用して、細胞外から細胞内へカルシウムイオンを流入させる可能性と、細胞内に浸入した亜鉛イオンがカルシウム貯蓄小胞に分布するカルシウムチャンネルの RyR に作用して小胞体からカルシウムイオンを放出させる可能性がある。今回の研究結果は前者の可能性を示唆する。

引き続き、塩化亜鉛処理により引き起こされた胚細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇が、細胞内に流入した亜鉛イオンの影響なのかどうか詳細な解析を続けている。その際に、胚細胞内の亜鉛イオン濃度の変化とカルシウムイオン濃度の変化の関連について、カ

ルシウムイオンや亜鉛イオンの蛍光指示薬を用いてリアルタイム画像解析により調べると同時に、亜鉛イオンの細胞内への蓄積とその分布に関しても、走査型電子顕微鏡による X 微量分析法を用いて解析している。さらに、カルシウムイオン濃度の上昇による細胞内への影響(細胞骨格への影響など)も解析を進めている。また、今回の結果が、普遍的な現象なのかどうかを確認するために、他の種類の動物の胚(両生類のツメガエルやニワトリ胚など)の発生過程でも、今回と同じような塩化亜鉛による神経管形成への影響が見られるかどうかの確認作業も進めている。

#### 引用文献

(1) Development of  $Ca^{2+}$  signaling mechanisms and cell motility in presumptive ectodermal cells during amphibian gastrulation. Takano, K, Obata, S, Komazaki, S, Masumoto, M, Oinuma, T, Ito, Y, Ariizumi, T, Nakamura, H, Asashima, M., Develop. Growth and Differ. 53, 37-47 (2011)

#### 5. 主な発表論文等

現在、今回の研究成果を雑誌に投稿する準備を進めている段階であり、発表論文はまだない。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

駒崎 伸二 (KOMAZAKI, Shinji)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80129155

##### (2) 研究分担者

猪股 玲子 (INOMATA, Reiko)  
埼玉医科大学・医学部・助手  
研究者番号: 50468378

亀澤 一 (KAMEZAWA, Hajime)  
埼玉医科大学・医学部・助手  
研究者番号: 50646677

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし