

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14743

研究課題名(和文)母体の糖尿病によるマウス脳正中欠損発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the action of maternal diabetes on the midline determination during mouse brain development

研究代表者

元山 純 (Motoyama, Jun)

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号：70321825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胎齢7.5から7.75日に脊索前板からのShhシグナルによって神経板の正中部が決定されるが、その過程が妊娠期間中の糖尿病の罹患によって影響を受け正中欠損の原因となる可能性が示唆されている。一方、胎齢14日齢ではShhは脳皮質の神経幹細胞に対して分化誘導作用があることがわかっている。初期胚での正中決定も後期胚での脳皮質の発達も妊娠糖尿病に敏感であり、その影響によって先天奇形、知能発達障害、自閉症等のリスクが増加するとの報告がある。糖尿病による正中欠損や発達障害発症機構の理解のため、高血糖環境がShhシグナルの作用に干渉する可能性の検証を行った。

研究成果の概要(英文)：The action of Shh protein determines the midline of the neural plate during E7.5 to E7.75 in the developing mouse embryos. It has been known that the midline defect is caused by the maternal diabetes. The condition of the high glucose may affect the Shh signaling during midline determination. On the other hand, Shh also functions as activator of differentiation of the neural stem cells into the intermediate neural progenitors during mouse cortical development. During the development of the central nervous system, maternal diabetes increases the risks of developmental disorder, mental retardation, and autism in human. We tried to examine the effects of high glucose condition on the Shh signaling, to understand the etiology of developmental disorder caused by the maternal diabetes.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経発生 マウス 初期胚 Shh 環境因子

## 1. 研究開始当初の背景

全前脳症はヒト自然分娩では 16,000 人に 1 人、自然流産胎児では 200 件に 1 件の割合で起こる正中欠損を特徴とする先天性奇形である(1)。研究代表者は全前脳症の遺伝的な原因の一つが分泌タンパク質ソニックヘッジホッグ(Shh)遺伝子の変異であり、正常マウス中枢神経系発生過程において Shh が正中構造の決定因子であることを示してきた(2,3)。しかしヒト全前脳症の原因の多くは環境因子によるため、環境因子による Shh シグナル減弱の可能性に興味を持つようになった。全前脳症発症の環境因子の中でも、糖尿病の妊婦からの発症率は糖尿病でない妊婦からの発症率の 200 倍である事が知られている(1)。しかし高血糖環境が正中決定に及ぼす影響は解明されていない。一方、妊娠初期での胎児へのエタノールの作用については研究代表者によって Shh タンパク質を分泌する脊索前板の細胞に対し、Shh タンパク質発現阻害を誘導すること、脊索前板の細胞死を誘導することを示してきた。

さらに中枢神経系の形成過程において Shh の機能は正中細胞の決定に限らない。胎生後期過程では神経幹細胞が分裂分化を繰り返し分化した神経細胞による回路形成が進行するが、研究代表者らは Shh は神経幹細胞から神経前駆細胞への分化を促進することを見出している。そして、胎生後期過程でもエタノールや高血糖等の環境因子は、脳の形成に影響し結果として知能発達障害、自閉症、言語障害といった脳機能障害のリスクを高めることが知られている。

## 2. 研究の目的

中枢神経系の発生過程の初期でも後期過程でもエタノール、高血糖といった環境因子により Shh シグナル経路への干渉が生じ、それが先天的な脳発生異常の発症の原因となっている可能性を探りたい。

## 3. 研究の方法

(1) 高グルコース環境が神経板細胞あるいは神経幹細胞へ及ぼす影響

胎齢 7.75 日齢(0 体節)のマウス胚を 24 時間(12 体節)、または 60 時間(30 体節)、in vitro で培養する(3)。さらに胎齢 14 日齢のマウス大脳皮質スライスを用いて、培養液中に様々な濃度でグルコースを添加する。血中グルコース濃度はヒトでは通常空腹時で平均 110mg/dL 未満であり、126mg/dl を超えると糖尿病とみなされる。マウスでは、空腹時の血糖値が平均 150~200 mg/dl である。この空腹時血糖値を基準に、培養液へグルコースを様々な濃度で添加し培養を実施する。そして 24 時間、あるいは 60 時間培養をしたマウス胚を用いて、添加したグルコースの影響を、細胞分裂周期、細胞分化、グルコースの代謝

について調べる。グルコースはトランスポーターを介して細胞に取り込まれる。細胞内へのグルコースの取り込みをトレーサーである 2DG(2-deoxy glucose)を用いて測定する。取り込まれたグルコースは解糖系によって分解され ATP が合成される。解糖系の活性測定のために、乳酸放出量と NAD<sup>+</sup>/NADH を測定する。乳酸は解糖系の最終産物であり、細胞から培養液中に放出される。解糖系が亢進すると乳酸合成のために NAD<sup>+</sup>が多量に合成され、NAD<sup>+</sup>/NADH の値が大きくなる。

(2) 高グルコース環境が Shh シグナル伝達経路へ及ぼす影響

24 時間、あるいは 60 時間培養をしたマウス胚、あるいは胎齢 14 日齢のマウス大脳皮質スライスを用いて、添加したグルコースの影響を Shh シグナル伝達制御の点から脊索前板での Shh 合成量、Shh 標的細胞での Shh 感受性、標的細胞内でのシグナルの伝達量について調べる。Shh シグナルが標的細胞の一次繊毛に到達し受容されると 2 通りの経路でシグナルの伝達が生じる(4)。1 つはカノニカル経路と呼ばれ、転写調節因子 Gli の活性化とその核内への移行により遺伝子発現調節を伴う経路である。Shh シグナルの作用から数時間程度で遺伝子発現の変化が確認できる。もう 1 つはノンカノニカル経路と呼ばれ、細胞内にカルシウムイオンの流入を起こし、AMPK の活性化とそれに引き続き解糖系の亢進が起こる経路である。この経路では Shh シグナルの作用からカルシウムイオンの流入は数秒以内に、解糖系の亢進は 10 分程度で観察される(5)。ただしこのノンカノニカル経路は初期胚の細胞ではまだ確認されていない。それぞれの経路について、分子生物学的(in situ hybridization, 定量 RT-PCR)及び組織学的手法(カルシウムイメージング)にて活性化されている経路の同定を行う。生化学的手法(ラクトース放出量、NAD<sup>+</sup>/NADH 測定)にてノンカノニカル経路が活性化した場合に検出される代謝の変化は初年度に解析する予定である。

## 4. 研究成果

(1) 高グルコース環境が神経板細胞あるいは神経幹細胞へ及ぼす影響

2016 年度ではマウス胚に対する高血糖の作用を観察するために、胎齢 7.75 日マウス胚を母体外で培養しつつ、細胞周期、ミトコンドリア形態、カルシウム濃度の変動を観察する実験系の確立を行なった。また平行して同様に Shh の作用に依存している大脳皮質神経幹細胞、神経前駆細胞での細胞分裂、細胞分化促進過程について、胎齢 14 日マウス胚大脳皮質スライスを用いた同様の観察を行なった。また高血糖以外の代謝物による作用の可能性も考慮し、糖尿病モデルマウス系統の導入と繁殖を行なった。

胎齢 7.75 日マウス胚を培養しつつ細胞周

期、ミトコンドリア形態、カルシウム濃度の変動を観察する実験系の確立を行なった。野生型マウス (C57Bl6J) の空腹時血糖値はおよそ 150~200 mg/dl である。糖尿病モデルマウスでは膵臓 細胞への毒性を持つストレプトゾシンを腹腔内投与して作成した場合、インシュリンの欠乏により 350-600mg/dl となることを観察した。培養液中のグルコース濃度は培養前に測定した上で培養を行なった。その結果、最終グルコース量が野生型マウスの正常血糖値では胎齢 7.75 日マウス胚は培養下で 24 時間生存できない事を確認した。すなわち確立されているマウス全胚培養法で使用している培養液では、コントロール群として 100%ラット血清(血糖値が平均 120mg/dl)に更に 200mg/dl 分のグルコースを添加している。ちなみにこのグルコースの添加がないとマウス胚は培養下で成長しない。ラット血清は絶食後のリタイア雄個体から採取しているが、グルコース添加後の最終濃度が 320mg/dl 以上となっていることが多い。すなわち現状ではコントロールですでに糖尿病に近いグルコース濃度になっている。したがって今後は胎齢 7.75 日胚を実験で用いる場合は培養期間、培養液等の見直しを行なう必要がある。そのため以降は 14 日齢のマウス大脳皮質スライスを用いたイメージング実験に専念して実施した。

(2) マウス胎齢 14 日齢大脳皮質スライスにおける細胞胴体の観察と Shh シグナルに対する応答について

2017 年度では胎齢 14 日マウス胚大脳皮質スライスを用いた神経幹細胞、神経前駆細胞に対する Shh シグナルによる細胞分裂、細胞分化促進過程について、集中的に解析を行なった。特に Shh シグナルのノンカノニカル経路と呼ばれ、細胞内にカルシウムイオンの流入を起し、AMPK の活性化とそれに引き続き解糖系の亢進が起こる経路の存在について解析を行った。この経路では Shh シグナルの作用からカルシウムイオンの流入は数秒以内に、解糖系の亢進は 10 分程度で観察される(6)。このノンカノニカル経路はマウス胚の細胞ではまだ確認されていない。過去の研究代表者の知見によって大脳皮質で機能する Shh の作用濃度はカノニカル経路を活性化しない濃度であることがわかっていたため、高濃度で機能するカノニカル経路とは異なるノンカノニカル経路の存在を検討した。

1. その結果、胎齢 12、14、16 日マウス胚から作成した大脳皮質スライス(厚み:500nm)を用いて 20 分の短時間ではあるが経時的に自発的細胞内カルシウム濃度変動が観察できた。胎齢が若い組織中の細胞での細胞内カルシウム濃度変動ほど振幅が大きく、発生の進行とともに変動の振幅は減少することを確認した。本イメージング実験では Ca イオ

ン指示薬の取り込み培養液は DMEM-HF12、イメージング時の環境は aCSF を用いているため外液の環境因子を管理する事が容易である。

2. 外液中に 5mM EGTA を添加して Ca イオンをキレートしたところ観察されていた自発的 Ca イオン濃度変動は消失した。このことから、細胞膜に存在するチャネルタンパク質を介して細胞内への Ca イオンの流入が生じ自発的変動を示していることが示唆された。
3. 次に外液中に Shh タンパク質を様々な濃度で添加し、大脳皮質スライスでの自発的 Ca イオン濃度変動への影響を観察した。その結果、1-10nM の濃度の添加直後から自発的 Ca イオン濃度変動の振幅、頻度共に顕著に活性化されることを見出した。加えて 1mM では顕著に自発的 Ca イオン濃度変動を阻害する効果が観察された。

さらに 1-10nM Shh の添加で自発的 Ca イオン濃度変動の振幅、頻度共に顕著に活性化される状態において、解糖系の亢進すなわち、グルコースの取り込み、ラクトースの産生増加、NAD<sup>+</sup>/NADH 値の増加、が観察されるかどうか検討した。いずれもコントロールと比べて顕著な変動は見られなかった。質量分析イメージング(6)による解析を行いグルコースの取り込み量を測定したがコントロールと Shh 投与群とで差は見出せなかった。このことから Shh シグナルによって細胞内への Ca イオンの流入は顕著に促進されることはわかったが、解糖系の亢進はおこらないことがわかった。マウス胚の神経幹細胞では、すでに報告されている成体の脂肪細胞とは異なるノンカノニカル経路が機能していることが示唆された。

胎齢 7.75 日マウス胚を母体外で培養しつつ高血糖による正中細胞発生への影響を観察する実験については、正常血糖値と同じグルコース濃度では 24 時間の *in vitro* 全胚培養が困難であること、コントロールでのグルコース濃度が既に正常より高い事が判明したため条件の変更が必要である。変更点としては長期間の培養ができないのであれば、短時間での高血糖作用下での細胞の状態変化を観察する事が考えられる。7.75 日マウス胚の形態は大脳スライスのように平坦ではなく、定量可能なイメージングを行なうためには工夫が必要であるが、初期胚への高血糖の影響を解析する実験系の確立実現の可能性を探りたい。

本課題と同時に並行して行なっている大脳スライスでの観察実験では、20 分の観察ではあるが、細胞内カルシウムイオン濃度の変動とミトコンドリアの形態変化を経時的に観察できている。この実験系を用いてノンカノニカル経路の実態を解明するとともに高血糖濃度やエタノール等の作用の検討を今後実施する。

引用文献

1. Cohen M.M.Jr. & Shiota K. *Am. J. Med. Genet.*109(1):1-15,2002.
2. Aoto K. et al., *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 82: 224-231,2008.
3. Aoto K. et al., *Dev. Biol.* 327,106-120,2009.
4. Teperino R. et al., *Semin Cell Biol.* 33:81-92, 2014.
5. Teperino R. et al., *Cell* 151:414-426, 2012.
6. Stoeckli M. et al., *Nat. Med.* 4:493-496, 2001.

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

Jun Motoyama<sup>1</sup>, Yoshiaki Nishimura<sup>2</sup> (Grad. School of Brain Science, Doshisha Univ.<sup>1</sup>, Faculty of Medicine, Tohoku Med. & Pharm. Univ.<sup>2</sup>). Shh enhances intracellular calcium fluctuation in the neural progenitor cells during mouse cortical development. 50th annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB), cosponsored by the Asia Pacific Developmental Biology Network (APDBN), Tokyo, May 10 to 13, 2017.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

元山 純 (代表)

同志社大学・脳科学研究科・教授  
研究者番号：70321825

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )