

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790767

研究課題名（和文）

コレステロールがセロトニン神経およびドーパミン神経の発達に及ぼす影響

研究課題名（英文）

Role of cholesterol in development of serotonergic and dopaminergic systems.

研究代表者

坂田 ひろみ (SAKATA 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：50403720

研究成果の概要（和文）：

胎生期低コレステロールラットで、セロトニン(5-HT)およびドーパミン(DA)神経系の発達に大きな変化は認められなかった。また、胎生期 5-HT 欠乏ラットでは、胎生期脳内 5-HT 及び DA 量が低下していたが、成熟後は回復していた。同ラットで、条件付け恐怖を評価すると、受動的回避行動が促進されていた。よって、胎生期の脳内 5-HT および DA 量の減少は生後の不安様行動に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We examined the role of cholesterol and serotonin in prenatal brain development. A moderate level of cholesterol deficiency during the prenatal period did not affect development of the serotonergic and dopaminergic systems in rat fetuses. However, rats exposed to a inhibitor of an enzyme for serotonin synthesis showed a increased reactivity to conditioned fear during an elevated T-maze behavioral test. Prenatal brain serotonin might affect the sensitivities to adverse stimuli after birth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：脳発達障害、コレステロール、セロトニン、ドーパミン、不安様行動

1. 研究開始当初の背景

コレステロールは細胞膜の構成成分であり、生命活動を営む上で必須の物質である。最近になって、コレステロールは発生初期の形態形成に重要な役割を果たしていることが知られている。コレステロール合成酵素の変異のある Smith-Lemli-Opitz 症候群では脳の発達異常が認められ、妊娠母獣にコレステロール合成阻害剤を投与すると、胎仔脳に全前脳胞が生じることなどが報告されており、コレステロールが脳の発達にも影響していることが明らかとなっている。初期発生に重要な役割を果たしている

Shh シグナル系にはコレステロールが不可欠であることからコレステロールの不足は、ドーパミンおよびセロトニン神経系の発達障害をもたらすのではないかと考えた。最近では、コレステロール合成酵素を先天的に欠損したマウスでセロトニン神経細胞の過形成が報告されている。ドーパミン神経系とセロトニン神経系は情動などの精神活動を司っていると考えられており、またセロトニンは脳発達そのものに影響を及ぼすことも知られていることから、胎生期のコレステロールの不足による、セロトニン神経系およびドーパミン神経系の異常が、出生後になんらかの精神症状を呈する原因となっている可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 妊娠ラットへのコレステロール合成阻害剤投与により引き起こされる母獣の中等度のコレステロール不足が、仔の末梢神経系の発達に及ぼす影響および脳のドーパミン神経系とセロトニン神経系の発達に与える影響を調べる。

(2) 妊娠ラットへのセロトニン合成阻害剤の投与によって引き起こされる、胎生期のセロトニン神経系の異常が、脳発達に及ぼす影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) 動物の作製

妊娠 Wistar-Hannover ラットに対し、妊娠3日目（膈栓確認日＝妊娠0日）にコレステロール合成系の酵素である7-デヒドロコレステロール還元酵素（7-DHCR）の阻害剤である AY9944 を 75 mg/kg（1.5% [w/v] 水溶液）を投与した。対照妊娠ラットには蒸留水を同量投与した。妊娠12日および妊娠20日で、麻酔下にて母獣を開腹し、下大静

脈から採血した後、仔を採取した。胎生12日仔の胚仔は4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液（PFA/PB, pH 7.4）中で一昼夜浸漬固定した後、メタノールで処理し、メタノール中で-30℃保存し、Whole-mount免疫染色に供した。胎生20日齢の胎仔は、断頭し、氷冷した生理的食塩水中で脳を採取し、液体窒素中で凍結し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によるモノアミン定量に供した。また一部の胎仔脳はブアン液（酢酸抜き）中で浸漬固定した後、前頭断パラフィン切片を作製して、各種抗体を用いた免疫染色に供した。

(2) 免疫染色

メタノール中で30℃保存していた胎生12日齢胚仔で、抗Neurofilament抗体、および抗Islet抗体を用いたwhole-mount免疫染色を行った。また、胎仔および成獣ラットの脳は5-mm厚のパラフィン切片にした。中脳縫線核を含む脳切片で、抗5-HT抗体を用いた免疫染色を行った。

(3) 脳内5-HTとその代謝産物、および脳内DAとその代謝産物の定量

凍結保存をしていたラット脳をPCA溶液中でホモジナイズし、遠心分離を行い上清を採取した。液体高速クロマトグラフィー法によってこれらの5-HT量及びその代謝産物である5-ハイドロキシインドール酢酸（5-HIAA）量、DAとその代謝産物であるを定量した。

(4) 不安様行動の評価

60～70日齢で、行動解析を行い、不安様行動を評価した。

① 高架式十字迷路試験

壁のある通路（closed arm）と壁のない通路（open arm）が十字型に組み立てられた装置（Fig. 1）を用いた。ラットを各通路が交わる中心領域に顔が



Fig. 1 高架式十字迷路試験装置

closed armに向くようにして置き、10分間の行動をビデオカメラで録画した。その後、open arm、closed arm、十字の中心部

(platform)での滞在時間および各armへの侵入回数を計測した。

②高架式T字迷路試験

壁のあるclosed armと壁のないopen armをT字型に配置した装置(Fig. 2)を用いて下記の観察を行った。

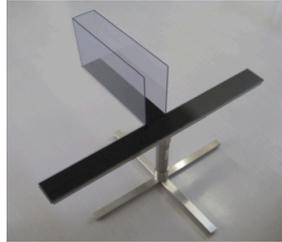


Fig. 2 高架式T字迷路試験装置

- (a) 受動的回避行動
closed armの端にラットを置き、open armに移動するまでの潜時を30秒間のインターバルを置いて3回連続で測定した。
- (b) 回避行動 (escape behavior)
(a)の試験終了の30秒後に、ラットをopen armの端に置き、closed armに出るまでの潜時を測定した。

4. 研究成果

(1) 母獣の血清コレステロール値

帝王切開時に採取した血液を用いて血清コレステロール値を定量したところ、AY9944投与母獣ラットでは、妊娠12日には対照群(52.1 mg/dl)の48.6% (25.4 mg/dl)、妊娠20日には対照群(93.0 mg/dl)の56.2% (52.34 mg/dl)の血清コレステロールレベルであった。

(2) 免疫染色

胎生12日齢の胚で抗Neurofilament抗体を用いたwhole-mount 免疫染色を行ったところ、AY9944曝露群における陽性線維の分布に大きな差は認められなかった(Fig. 3)

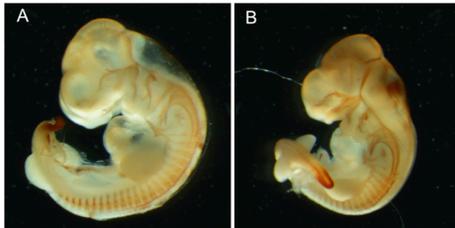


Fig. 3 抗Neurofilament抗体を用いたwhole-mount 免疫染色(胎生12日齢)
A: 対照群 B: AY9944曝露群 陽性線維の分布・走行について両群間に差は認められなかった

胎仔脳における抗5-HT抗体を用いた免疫染色では、AY9944 曝露群と対照群との間で5-HT神経細胞の局在に大きな差はみとめられなかった。

成獣になった胎生期PCPA曝露ラットにおいて中脳縫線核における5-HT神経細胞の局在を観察したところ、対照群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 4)

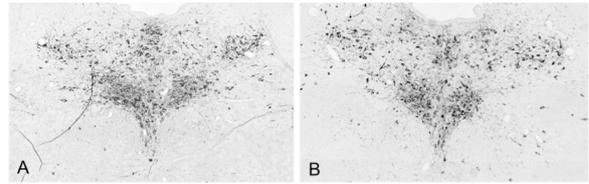


Fig. 4 抗5-HT抗体を用いた中脳縫線核の免疫染色(成獣)

A: Saline群 B: PCPA曝露群 5-HT陽性細胞の局在については、両群間に差は認められなかった

(3) 脳内モノアミン量の定量

HPLCにより胎生20日齢のラットで脳内モノアミン量を定量したところ、5-HTとその代謝産物である5-HIAA、DAとその代謝産物であるDOPAC、HVA、3-MT、およびNE、MHPGのいずれについても有意な差は認められなかった。

成獣になった胎生期PCPA曝露ラットにおいて全脳のモノアミン量を定量したところ、

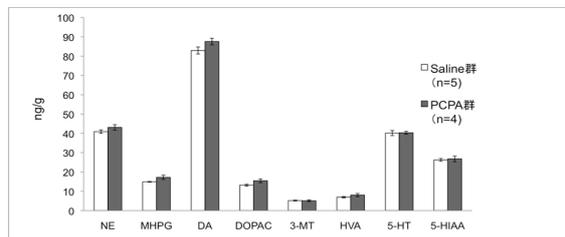


Fig. 5 胎生期PCPA曝露ラットの脳内モノアミン量(成獣)
胎生期PCPA曝露ラットでは、対照(saline)群と比較して脳内モノアミン量の有意な差は認められなかった。

いずれの物質についても有意な変化は認められなかった (Fig. 5)。

(4) 不安様行動

① 高架式十字迷路試験

PCPA曝露ラットにおいて、それぞれのアーム内およびplatform内での滞在時間およびk各アームへの進入回数のいずれの指標についても対照 (Saline) 群との間に有意な差は認められなかった(Fig. 6)。

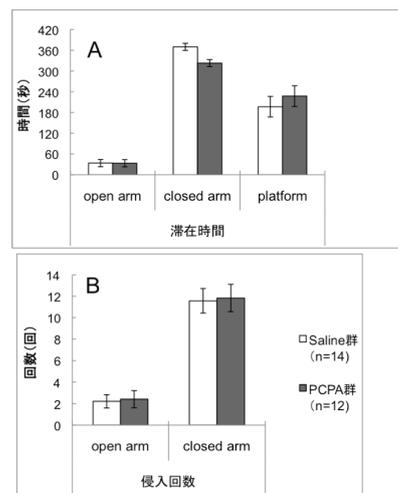


Fig. 6 高架式十字迷路試験による不安様行動の評価

A: 各アームおよびplatformでの滞在時間 B: 各アームへの侵入回数いずれの観察項目においても、群間有意な差は認められなかった。

② 高架式T字迷路試験

PCPA曝露ラットでは、受動的回避行動 (Closed armからopen armに渡るまでの潜時の変化により評価) が過剰に獲得される傾向がみとめられたが統計学的に有意な差には至らなかった。逃避行動 (open armからclose armへ逃げ込むまでの時間で評価) には対群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 7)。

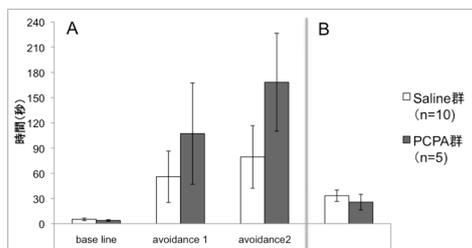


Fig. 7 高架式T字迷路試験による不安様行動の評価
A: 受動的回避行動 B: 逃避行動
胎生期PCPA曝露群では受動的回避行動が過剰に獲得された。
逃避行動については群間に有意な差が認められなかった。

先天性にコレステロール合成酵素を欠損したマウスでは、5-HT 神経系の過形成が報告されている。母獣にコレステロール合成阻害剤を投与して作製した胎生期低コレステロールラット脳では 5-HT 神経細胞数や脳内 5-HT 量に変化は認められなかった。母獣のコレステロール値から、今回の胎生期低コレステロールラットでは胎生 3 日から中程度 (50% 前後) の低コレステロール状態が保たれていたことが推察される。よって、中程度の低コレステロール状態では、仔の 5-HT 神経系の発達にそれほど大きな影響を及ぼさない可能性が示唆された。また、PCPA 曝露胎仔は脳内 5-HT およびその代謝産物、さらにドーパミンとその代謝産物の量が有意に低下しているが、成熟した PCPA 曝露ラットの全脳モノアミン量に有意な変化は認められなかった。しかし、高架式T字迷路試験により Conditioned fear (条件付け恐怖) を評価したところ、受動的回避行動が促進されていた。よって、胎生期の脳内 5-HT および DA 量の減少は生後の不安様行動に影響を与えることが示唆された。

5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計3件)

1. Ohta K, Sakata-Haga H, Fukui Y (2010) Alteration in anxiety-related behaviors and reduction of serotonergic neurons in raphe nuclei in adult rats prenatally exposed to ethanol. *Congenit Anom*, 50: 105-114. (査読あり)
2. Fukui Y, Sakata-Haga H (2009) Intrauterine environment-genome interaction and Children's

development (1): Ethanol a teratogen in developing brain. (*J Toxicol Sci.*) SP273-SP278. (査読有)

3. 福井義浩, 坂田ひろみ (2010) セロトニン神経系と脳発達障害. *分子精神医学*. 10: 163-164. (査読なし)

[学会発表] (計3件)

1. Sakata-Haga H, Ohta K, Yoshihiro F. Reduced Number of serotonergic neurons and behavioral changes in rats prenatally exposed to ethanol. 第32回日本神経科学大会. 2009. 9. 16-18
2. 坂田ひろみ, 太田健一, 福井義浩 ラット深部体温リズムの生後発達 第49回日本先天異常学会学術集会 2009. 6. 25-27
3. 坂田ひろみ, 太田健一, 福井義浩 幼若期ラットにおける深部体温リズムの観察 第48回日本先天異常学会学術集会 2008. 6. 28-30

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 ひろみ (SAKATA 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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者