

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791035

研究課題名 (和文) 大脳皮質原基神経幹細胞の成熟、分化へのエタノールの影響と作用機序の解析

研究課題名 (英文) The mechanistic analyses on the effects of ethanol on the maturation and the differentiation of neural stem cells in the primordium of cerebral cortex.

研究代表者 栢谷 史郎 (TOCHITANI SHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：90418591

## 研究成果の概要 (和文)：

エタノールは中枢神経系に対し先天障害を引き起こす可能性のある催奇形因子である。本研究の結果、エタノールが GABA<sub>A</sub> 受容体を介して大脳皮質原基脳室帯にある神経前駆細胞 (神経幹細胞) に正常とは異なる分裂方向の細胞分裂を誘導することが明らかになった。また胎生10日目から GABA<sub>A</sub> 受容体 alpha4 サブユニットが神経前駆細胞に発現していること、同じく胎生10日目から Taurine や GABA という GABA<sub>A</sub> 受容体の内在的なアゴニストが大脳皮質原基に特定の層分布を示しながら、存在することが明らかになった。以上の結果は、エタノール曝露がエタノールの GABA<sub>A</sub> 受容体への作用を通じ、神経前駆細胞の細胞分裂方向制御を攪乱する結果、エタノールが中枢神経系に対し催奇形性を持つ可能性を示唆する。

## 研究成果の概要 (英文)：

Ethanol is a potent teratogen to induce congenital malformation in the central nervous system. The results of this study showed that ethanol alters mitotic cleavage plane orientation of the neural progenitors at the apical surface of the ventricular zone in the developing neocortex. Immunohistochemical analyses also showed that the alpha4 subunit of GABA<sub>A</sub> receptors is already expressed in the neural progenitors at E10. GABA and Taurine, the endogenous agonists of GABA<sub>A</sub> receptors, are also present in the developing neocortex with specific laminar patterns throughout the stages after E10. These results suggest that fetal exposure to ethanol perturbs the regulation of mitotic spindle orientation via GABA<sub>A</sub> receptors, which may result in congenital malformation in the central nervous system.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010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、神経前駆細胞、エタノール、GABA<sub>A</sub>受容体、発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) エタノールは中枢神経系に対する強

力な催奇形因子であり、胎児期におけるアルコール曝露はしばしば重篤な神経障害を引

き起こすが、エタノールが分子レベル、細胞レベルに関して、どのような機序で催奇形性を持つかは分かっていなかった。

(2) エタノールの薬理的作用の主要なものには GABA<sub>A</sub> 受容体への亢進作用と NMDA 型グルタミン酸受容体への阻害作用があることが知られていた。

(3) 中枢神経系を構成するほとんどの細胞は神経上皮細胞とそれから派生する神経幹細胞(神経前駆細胞)が増殖し、分化して生じる。中枢神経系への催奇形性は神経前駆細胞の増殖や分化また神経前駆細胞から分化して生じた神経細胞の移動などへの薬剤の影響によるものと考えられる。

(4) 上記(1) - (3)に基づき、エタノールが GABA<sub>A</sub> 受容体への亢進作用や NMDA 型グルタミン酸受容体への阻害作用を介して、神経前駆細胞の増殖と分化に影響し、その結果、エタノールの催奇形性が生じるという仮説を構築した。

(5) 脳室壁に対して垂直な細胞分裂軸をとり細胞分裂を行う神経幹細胞は対称分裂(神経幹細胞を複製する)をし、脳室壁に対して平行な細胞分裂軸をとり細胞分裂を行う細胞は1つの神経前駆細胞から2つの神経細胞もしくは1つの神経細胞と1つの神経前駆細胞を生じる非対称分裂をする、すなわち細胞分裂の方向が神経前駆細胞の細胞運命の決定に影響があるという報告があった(Chenn and McConnell, 1995)。

(6) 大脳皮質において神経前駆細胞が存在する脳室帯において GABA<sub>A</sub> 受容体の alpha4, beta1, gamma1 サブユニットの発現が認められることが *in situ* hybridization で示されていた(Ma and Barker, 1995)。また GABA とグルタミン酸は胎生 10 日目の時点で、大脳皮質原基に存在していることは分かっていた(Haydar *et al.*, 2000)。

## 2. 研究の目的

次の4つの目的を設定し、研究を進めた。

(1) エタノールが神経前駆細胞の形質制御に影響を与えるかをまず、細胞の分裂方向という容易に観察可能な指標を基に検討する。

(2) エタノールへの曝露が神経前駆細胞の細胞分裂方向の制御に対し影響を与える場合、エタノールの作用が GABA<sub>A</sub> 受容体への亢進作用を介したのか、NMDA 型グルタミ

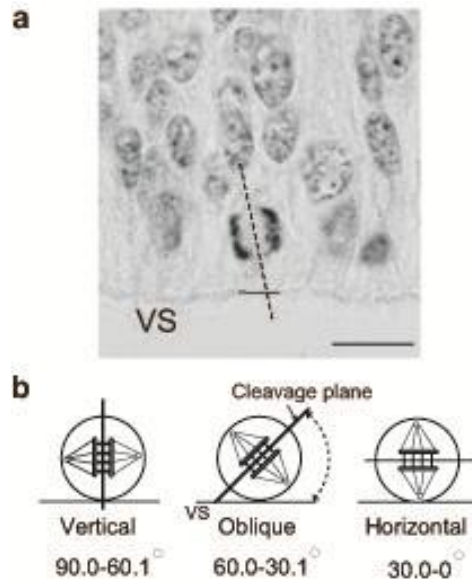


図 大脳皮質原基における細胞分裂像と細胞分裂方向の角度計測の例 (a) と細胞分裂方向の分類 (b) (Tochitani *et al.*, 2010 より改変)

ン酸受容体への阻害作用を介したのか、それ以外の経路を経ているかを明らかにする。

(3) エタノールが GABA<sub>A</sub> 受容体への亢進作用や NMDA 型グルタミン酸受容体への阻害作用を介して神経前駆細胞の形質制御に影響を与えた場合、内在的にそれぞれの受容体とアゴニストは神経前駆細胞の形質制御に関与していることを示しているはずである。それぞれのシグナルメカニズムに関与する分子の発現解析を行い、内在的に GABA<sub>A</sub> 受容体や NMDA 型グルタミン酸受容体とそのアゴニストの相互作用が大脳皮質発生に関与しているかを明らかにする。

(4) 神経前駆細胞の細胞分裂方向制御が攪乱されたときに、結果としてどのような器質的变化が大脳皮質原基に生じるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

上記研究の目的(1) - (4)についてそれぞれ次の方法で研究を進めた。

(1) 妊娠マウスに対して、妊娠 10 日目及び 11 日目にエタノールを投与し、妊娠 12 日目に胚を採取し、ブアン固定後パラフィン包埋したうえで 5 μm の厚さの切片を作製した。スライドガラスに張り付けたのち、ヘマトキシリン染色を行い、封入し、永久標本を作製

した。そして、大脳皮質原基脳室壁に存在する細胞分裂像を撮影し、細胞分裂軸の脳室壁に対する角度をプリントアウトした写真上で計測し、対称群と比較した(図 a)。対称群としては生理的食塩水をエタノールに代わり投与した妊娠マウスから得た胚の大脳皮質原基を用いた。そして、角度が  $90.0-60.1^\circ$  のものを「vertical」、 $60.0-30.1^\circ$  のものを「oblique」、 $30.0-0^\circ$  を「horizontal」として分類し、それぞれの割合を比較した(図 b)。

(2) エタノールが GABA<sub>A</sub> 受容体を介して作用するかを検討するために、まず上記(1)でエタノールを投与するかわりに、GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニストと GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニストをそれぞれ単独で投与した。また、エタノールを投与する 30 分前に GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニストを投与した群も作成し、(1)の実験と同様の解析を行った。またエタノールが NMDA 型グルタミン酸受容体への阻害作用を介して作用するかを検討するために、エタノールの代わりに NMDA 受容体アンタゴニストである (+)MK801 を投与する群も作成し、(1)の実験と同様の解析を行った。

(3) GABA<sub>A</sub> 受容体の alpha4, beta1, gamma1 サブユニットの発現を特異的な抗体を用いた免疫組織化学により解析した。GABA<sub>A</sub> 受容体の内在的アゴニストである GABA, Taurine の発現パターンについて免疫組織化学で解析を行った。脳室帯にある神経前駆細胞のマーカーである Pax6 の抗体により神経幹細胞は同定する。さらに、GABA 合成酵素である GAD65/67 に対する免疫組織化学も行った。

(4) 「研究開始当初の背景」の(5)で述べたように脳室壁に垂直な細胞分裂軸をとり細胞分裂を行う細胞は神経前駆細胞を複製する対称分裂をし、脳室壁に平行な細胞分裂軸を持って細胞分裂を行う細胞は一つの神経前駆細胞から2つの神経細胞もしくは1つの神経細胞と1つの神経前駆細胞を生じる非対称分裂をする、という仮説が正しく、エタノール曝露により神経前駆細胞の細胞分裂方向の制御が攪乱を受けるときには、神経細胞への分化や basal progenitor と呼ばれる、脳室下帯にある神経前駆細胞への分化が促進されるはずである。この観点から、幼若神経細胞のマーカーである Doublecortin や basal progenitor のマーカーである Tbr2 の免疫組織化学を行い、定量的な解析を行った。

#### 4. 研究成果

上記研究の方法(1)-(4)に記載した内容の実験を行い得られた成果について次に述べる。

(1) エタノールを投与した胚の大脳皮質原基脳室帯において、対照群と比較し有意に脳室壁に対して水平な細胞分裂方向を示すもの(horizontal)が有意に増加していた。このことはエタノールが神経前駆細胞の細胞分裂方向の制御機構に影響を与えることを示し、エタノールの中樞神経系に対する催奇形性の細胞レベルのメカニズムの一つが細胞分裂方向制御の攪乱によることを示唆する。

(2) GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニストである Phenobarbital を妊娠マウスに投与したところ、エタノールと同様に脳室壁に平行な分裂を示す細胞(horizontal)の数が有意に増加した。また GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニストである Picrotoxin を妊娠マウスに投与したところ、大脳皮質原基における細胞分裂方向に明瞭な変化は認められなかった。そして、(1)の実験においてエタノール投与のそれぞれ30分前に Picrotoxin を投与するとエタノールの効果が打ち消され、細胞分裂方向に関しては対照群と違いが認められなくなった。さらに NMDA 型グルタミン酸受容体のアンタゴニストである (+)MK801 を投与しても、対照群と神経前駆細胞の細胞分裂方向について有意な差は認められなかった。以上の結果は、エタノールの大脳皮質原基脳室帯にある神経前駆細胞の細胞分裂方向への影響が GABA<sub>A</sub> 受容体への亢進作用を介したものであり、NMDA 型グルタミン酸受容体への阻害作用を介したのではない可能性が示された。エタノールの催奇形性のメカニズムとしては細胞への酸化作用の結果生じる細胞死などが提唱されてきたが、エタノールの GABA<sub>A</sub> 受容体への亢進作用とその結果としての細胞分裂方向制御の攪乱という新たな細胞レベルのメカニズムを提唱することができた。

(3) GABA<sub>A</sub> 受容体 alpha4 サブユニット、beta1 サブユニット、gamma1 サブユニットに対する抗体を入手し、妊娠 10 日目、12 日目、14 日目のマウス大脳皮質原基に対する免疫組織化学染色を行った。alpha4 サブユニットは解析した発生時期を通じて、脳室帯にひげ状に発現が認められた。神経前駆細胞の radial process に沿うように発現しているらしく、神経前駆細胞のマーカーである Pax6 との共染色により神経前駆細胞に発現していることが確かめることができた。今後神経前駆細胞の radial process を染色する抗体との2重染色により、実際に radial process に沿って alpha4 サブユニットが発現することは確認する必要がある。beta1 サブユニッ

ト、 $\gamma$  サブユニットに関しては明瞭なシグナルが得られなかった。発現していないのか、適切な染色条件を見いだせなかったかは今後検討の必要がある。また  $GABA_A$  受容体の内在的アゴニストの1つである  $GABA$  に対する免疫組織化学を行うと、胎生 10、12 日目には主に脳室帯に面した部位と軟膜側の部位に  $GABA$  が分布し、胎生 14 日目には軟膜付近と脳室帯付近に加え、脳室下帯などに  $GABA$  の分布が認められた。この結果はすでに  $GABA$  の発生期大脳皮質原基における分布を調べた報告 (Haydar *et al.*, 2000) と一致していた。Taurine も胎生 10 日目には脳室帯の細胞の全てではなくところどころの細胞に「ゴマ塩 salt and pepper」状に存在が認められた。胎生 12、14 日目には軟膜下の marginal zone にやや強い発現を示しながら、大脳皮質原基の層全体に認められた。  $GABA$  合成酵素の2つ  $GAD65$ ,  $GAD67$  の両方を認識する抗体を利用して免疫組織化学を行うと、 $GABA$  を合成する酵素は胎生 14 日目に初めて現れることが分かった。 $GABA$  が胎生 10 日目にすでに大脳皮質原基に存在することは観察しているため、胎生 14 日目以前の大脳皮質の  $GABA$  が何に由来しているか興味深い問題である。以上から、胎生 10 日より神経前駆細胞に  $GABA_A$  受容体サブユニットの一部が発現していることが確認され、また  $GABA_A$  受容体の内在的アゴニストである  $GABA$  と Taurine も胎生 10 日の時点で大脳皮質原基に存在していることが分かった。これらのことは早い発生時期から  $GABA_A$  受容体とその内在的アゴニストが機能し大脳皮質発生に関与している可能性を示しており、また (2) の成果とともに、エタノールが  $GABA_A$  受容体への亢進作用により内在的な  $GABA_A$  受容体を介した神経前駆細胞の細胞分裂制御機構を攪乱し、その結果として中枢神経系に対する催奇形性を呈する可能性を示すものである。

(4) 妊娠 10 日目、11 日目に  $GABA_A$  受容体アゴニスト Phenobarbital や Pentobarbital を投与した後、妊娠 12 日目に大脳皮質原基に対する免疫組織化学的解析について予備実験を行い、次の2つの結果が得られている。  
① basal progenitor とよばれる脳室下帯に存在する神経前駆細胞のマーカーである  $Tbr2$  を発現する細胞の数が生理的食塩水を投与した対照群に比して増加した。  
② 幼若な神経細胞のマーカーである Doublecortin を発現する神経細胞の層の厚みが対照群に比して増加した。

妊娠 10-13 日目に  $GABA_A$  受容体アンタゴニストを投与し、妊娠 14 日目の大脳皮質原基に対し免疫組織化学的解析を行う実験も進めている。今後は例数を増やすとともに  $GABA_A$  受容体アゴニスト、アンタゴニストを投与す

る期間を様々に設定し、上記の結果をさらに確認するつもりである。さらに、 $GABA_A$  受容体アゴニストもしくはアンタゴニストへの曝露により、神経前駆細胞の大脳皮質原基内における層分布に影響はないか、等についても解析する予定である。そして、神経前駆細胞の細胞分裂方向制御をエタノールが攪乱する結果、大脳皮質原基にどのような器質的変化が生じるか、大脳皮質原基がエタノールや  $GABA_A$  受容体アゴニストへの感受性を持つ発生時期はいつかを解明していきたいと考えている。

## 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)

Shiro Tochitani, Hiromi Sakata-Haga, Yoshihiro Fukui  
Embryonic exposure to ethanol disturbs regulation of mitotic spindle orientation via  $GABA_A$  receptors in neural progenitors in ventricular zone of developing neocortex.  
Neuroscience letters, 査読有, 472, 2010, 128-132.

[学会発表] (計 1 件)

栢谷 史郎, 坂田ひろみ, 福井義弘  
発生期新皮質神経前駆細胞の細胞分裂軸制御に対するエタノールの影響、第 49 回日本先天異常学会学術集会、2009 年 6 月 25-27 日、鹿児島

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

栢谷 史郎 (TOCHITANI SHIRO)  
徳島大学・大学院ヘルスパイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：90418591

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：