

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659199

研究課題名（和文） 母体内環境の胎児脳の発達に与える影響の評価システムの開発

研究課題名（英文） Environmental influence on embryonic brain development

研究代表者

村上 富士夫（MURAKAMI FUJIO）

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：20089882

研究成果の概要（和文）：発達障害は社会的に大きな問題であるにも拘らず、その発症機序には未解明の部分が多い。本研究ではげっ歯類の母体外胎児標本を用いて脳の神経回路の機能的発達を評価することでこの問題に迫る。すなわち、母マウスと臍帯でつながった状態で摘出した胎児を用いて、胎児に与えた感覚刺激の脳の機能的発達への影響を検討する。摘出胎児標本に改良を加えて用い、大脳皮質介在ニューロンの移動の記録を試み、長時間に亘って安定に記録することに成功した。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms that cause developmental disorders remain obscure despite its importance. In this study, we carried out live imaging of migrating cortical interneurons by using mouse embryos separated from their dams with the umbilical cord attached. We carried out imaging of migrating neurons in an attempt to evaluate the effect of environmental influence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床/胎児・新生児医学

キーワード：胎児医学、in vivo イメージング、マウス、電気穿孔

## 1. 研究開始当初の背景

近年自閉症、アスペルガー症候群、そしてその他の広汎性発達障害、学習障害、注意欠陥多動性障害など様々な発達障害が注目を集めている。出生前の原因としては受精から胎児が形をなすまでの遺伝子の異常と、胎児に感染症や薬物をはじめとする負荷、すなわち環境要因によるものに分けられる (McEwen, 2008)。周産期にかかる負

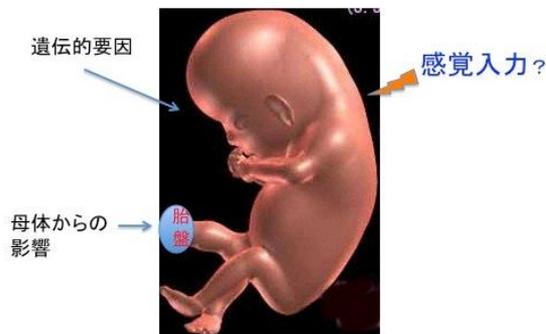
荷も原因となり得るが、近年我が国では、新生児医療や遺伝子医学の進歩に伴い、出生前疾患の比率が増加している。そのうち、胎盤を通して胎児に影響が及ぶ薬物、細菌、ウイルスなどについては研究が進んでいるが、胎児が直接受ける感覚入力の影響についてはほとんど不明であるそもそも神経回路が未完成である胎児期の脳においてどの程度の信号伝達が起きているの

かさえ不明である。これはモデル動物を用いた研究でも胎児脳の神経回路の機能的成熟を確認する手段がないことに起因している。

本申請者らは最近マウス胎仔の母体外標本を作製し、神経細胞の移動の *in vivo* 観察に成功した。その際極めて興味深い現象に遭遇した。すなわち胎生中期のマウスに光が当たった際、マウスが光に反応するかの如く手足を動かしたのである。このことは、この時期にすでに光に反応して手を動かすために必要な一連の神経回路が機能しはじめていることを示している。胎生期には神経細胞の一部は移動し続けているものの、神経回路の形成はある程度は進んでいることや、シナプス形成は妊娠早期の胎児ですすでにおこっている (Huttenlocher and de Courten, 1987) ことを考慮すると、神経回路が機能している可能性は十分に考えられる。いっぽう視覚系に見られるように、生後発達期でさえ脳に強い刺激が加わるとその影響は長期間に亘って持続し (Morishita and Hensch, 2008 等)、脳内に永続的な変化をもたらす可能性が高い。したがって、胎児期の脳が自然刺激感受性を有しているならば、その脳の発達への影響は計り知れない。

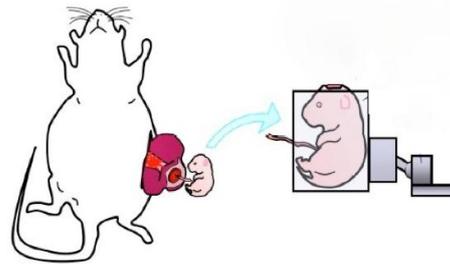
## 2. 研究の目的

そこで本研究ではこのモデル系を用いて、胎仔に直接与えた自然刺激に対する胎仔脳の神経細胞の反応を計測することで、胎児期における機能的神経回路の完成の程度を明らかにするとともに、有効な刺激のスペクトラムを明らかにする。その結果に基づき、母体内の胎仔が受けた感覚入力が、その後の脳の発達に及ぼす影響評価することの出来る系の開発を目指した (図1)。



## 3. 研究の方法 摘出胎仔標本

記録をおこなう標本は、これまでに申請者らが神経細胞の移動の研究のために開発してきたものに改良を加えて用いた。すなわち、胎生14-16日目付近のマウス胎仔を、ウレタン麻酔を施した母マウスの横腹を切開することで取り出し、臍帯を介する母体との結合を保ったまま、特殊な固定器具を用いて胎仔を固定した。その後頭部の皮膚を切開した (図2)。そして胎仔上方より顕微鏡のレンズ (水浸) を近づけ、観察を行った。顕微鏡は2光子励起レーザー顕微鏡を用い、画像の



取得を行った。

図2

細胞の標識のため、観察の数日前に大脳基底核隆起に電気穿孔法を用いて蛍光蛋白をコードする遺伝子を導入した。コンストラクトとしては pCAGGS-tdTomato、pCAGGS-EGFP、pCAGGS-GalT-EGFP、pCAGGS-GAP-tdTomato、pCAGGS-PACT-mKO1 を用いた。

移動の記録は最長10時間に及んだが、その間 GABA 作動性ニューロンは安定した移動速度を保った。記録中は体温、心拍、脳表面の血流のモニターを行い、安定に推移することを確認した。

画像の取得は8分おきに行った。動物の微妙な動きによる画像のずれを補償するために、神経細胞の向き (先端突起の向き) と見かけの動きが一致しない結果が得られた場合は補正を行った。

## 4. 研究成果

外界からの影響の評価のためには、細胞移動の安定な記録が不可欠である。そこで本研究では、これまでに申請者らが神経細胞の移動の研究のために開発してきた摘出胎仔標本に改良を加えて用いた。予め子宮内電気穿孔法で標識をしておいた、大脳皮質 GABA 作動性ニューロンの移動の記録を試み、長時間に

亘って安定に、また高解像度で記録することに成功した。記録できた介在ニューロンは大脳皮質辺縁層接線面において全方向に移動していることを確認することができた (Tanaka et al., 2003; 2006)。これはこれまでの我々の *in vitro* の実験の結果と一致するものである。更に我々は摘出胎仔標本における GABA 作動性ニューロンの移動のモードの詳細な

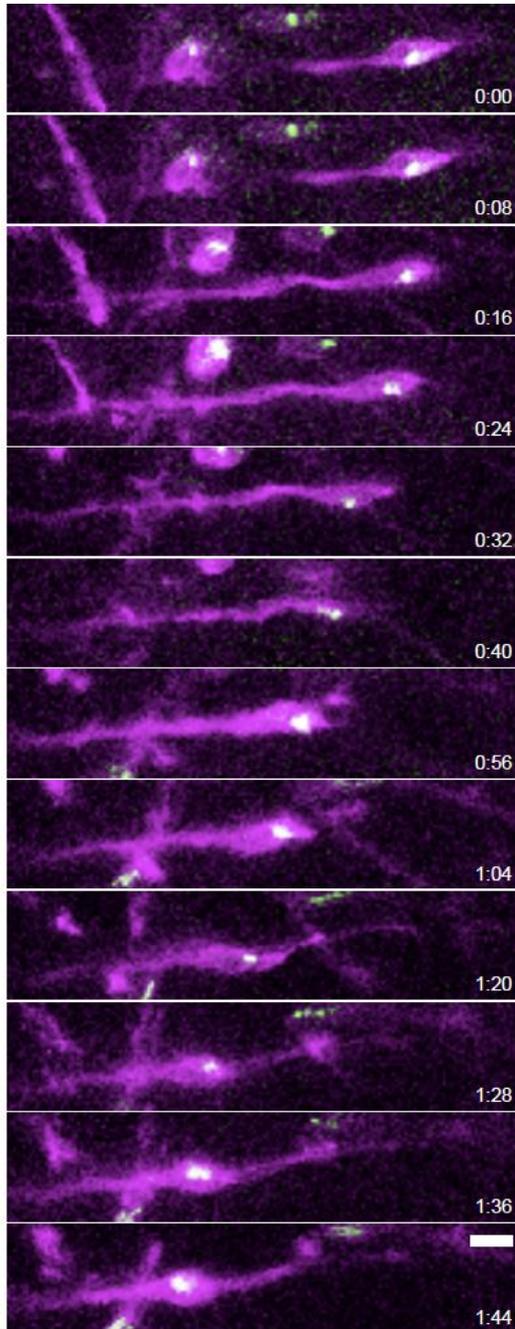


図 3

解析を進めた。そのため、2光子励起顕微

鏡を用い、pCAGGS-GAP-tdTomatoと pCAGGS-nls-EGFPを大脳基底核隆起に同時に導入することで、神経細胞の詳細な形態と細胞核との同時イメージングをおこなった。また、一部の細胞では pCAGGS-GalT-EGFPを用いて細胞体と Golgi体の同時イメージングも進めた。

その結果、胎仔の辺縁帯を勢いよく動きまわる GABA 作動性ニューロンの移動を明瞭に捉えることに成功した (図 3)。また、細胞体の動きとゴルジ体の動きを同時に捉えることもできた (図 3, 白点)。解析の結果、ゴルジ体が先に動き、それを追うように細胞体が前進するというこれまでの考えとは異なり、両者が協調して動く様子が頻繁に観察された。

実験では E16.5 の胎仔をゲルで包埋した状態で観察をおこなったが、顕微鏡観察する際に、水銀ランプを用いて光を照射すると (青色を通すフィルター使用)、頭部が動くことが確認された。このことは、開眼していないにもかかわらず、胎仔が何らかの機構を介して光に反応する様子を本実験系で捉えることができることを示している。しかしながら、残念ながら現時点では光照射を初めとする間隔刺激と細胞移動に関して明確な因果関係を見いだすことは出来ていない。これは実際に光刺激の影響が内という可能性も考えられるが、様々な理由が考えられるが、サンプル数が少ないためにデータのばらつきが残っており、変換を検出出来ていない可能性もある。今後はサンプルを増やすと共に更なる改良と検討が必要である。

##### 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 6 件)

- ① Yumiko Hatanaka, Kenta Yamauchi and Fujio Murakami, Formation of Axon-dendrite Polarity *in situ*: Initiation of Axons from Polarized and Non-polarized, *Dev Growth Differ*, 査読有、54 巻、(2012)、398-407
- ② Naoko Inamura, Toshiya Kimura, Satoshi Tada, Takashi Kurahashi, Mitsutoshi Yanagida, Yuchio Yanagawa, Kazuhiro Ikenaka, and Fujio Murakami, Intrinsic and Extrinsic Mechanisms Control the Termination of Cortical Interneuron Migration, *J Neurosci*, 査読有、32 巻、

(2012) 6032-6042

- ③ Kazuhiko Nishida, Kazuhide Nakayama, Saori Yoshimura and Fujio Murakami, Role of Neph2 in pontine nuclei formation in the developing hindbrain, *Mol Cell Neurosci*, 査読有、46 巻、(2011)、662-670、<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2011.01.007>
- ④ Yukiko Wada, Kenta Yamauchi, Fujio Murakami, Yasuto Tanabe, Temporally- and Spatially-Regulated Generation of Distinct Descendants by Sonic Hedgehog-Expressing Progenitors in the Forebrain, *Dev Neurobiol*, 査読有、(2010 Dec 28)、オンラインでのみ公開中、<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dneu.20861/pdf>
- ⑤ Yamasaki, E., Tanaka, DH., Yanagawa, Y., and Murakami, F., Cortical GABAergic interneurons transiently assume a sea urchin-like non-polarized shape prior to axon initiation, *J. Neurosci*, 査読有、30 巻、(2010), 15221-15227
- ⑥ Daisuke H. Tanaka, Sakae Mikami, Takashi Nagasawa, Jun-ichi Miyazaki, Kazunori Nakajima and Fujio Murakami. CXCR4 is Required for Proper Regional and Laminar Distribution of Cortical Somatostatin-, Calretinin- and Neuropeptide Y-expressing GABAergic Interneurons, *Cerebral Cortex*, 査読有、20 巻、(2010)、2810-2817

[学会発表] (計 10 件)

- ① 村上富士夫, Migration, its Termination, Axon Initiation and Maturation of Cortical Interneurons, 第 59 回 NIBB CONFERENCE “Neocortical Organization” 2012.3.10-13, 岡崎コンファレンスセンター
- ② 村上富士夫, 皮質介在ニューロンの移動、成熟と軸索形成、第 34 回日本神経科学大会、2011.9.16、パシフィコ横浜
- ③ 稲村直子、木村俊哉、多田智史、倉橋崇、

柳川右千夫、池中一裕、村上富士夫、内在性要因と環境が大脳皮質抑制性ニューロンの移動の停止を調節する、第 34 回日本神経科学大会、2011.9.16、パシフィコ横浜

- ④ 萩本和也、高見紗季、鳥越万紀夫、村上富士夫、田辺康人、線条体 striosome/matrix 構造形成過程における medium spiny neuron の発生・発達様式、第 34 回日本神経科学大会、2011.9.16、パシフィコ横浜
- ⑤ Yan Zhu, Xun Hong, Koki Shirosaki, Frederic Sierro, Fabienne Mackay, Takashi Nagasawa, Fujio Murakami, Achemokine receptor CXCR7 non-cell-Autonomously controls migration and nuclei formation of pontine neurons from the migratory environment, 第 34 回日本神経科学大会、2011.9.15、パシフィコ横浜
- ⑥ 村上富士夫、柳田光俊、生体内の胎仔脳における神経細胞移動、第 33 回日本神経科学大会、2010.9.2、神戸コンベンションセンター
- ⑦ 喜多善亮、西田和彦、川上浩一、高橋淑子、村上富士夫、小脳ニューロンの時空間的な発生制御—子宮内電気穿航孔法を用いた解析—、第 33 回日本神経科学大会、2010.9.2、神戸コンベンションセンター
- ⑧ 篠原正樹、Yan Zhu、村上富士夫、橋核形成における 3 次元的方向転換、第 33 回日本神経科学大会、2010.9.2、神戸コンベンションセンター
- ⑨ 和田有希子、山内健太、村上富士夫、田辺康人、ソニックヘッジホッグ系譜細胞の前脳における時期依存的な発生様式、2010.9.2、神戸コンベンションセンター
- ⑩ 柳田光俊、三好良太、豊國龍平、村上富士夫、2 光子 in vivo リアルタイムイメージングによる大脳皮質介在ニューロンの動態観察、2010.9.2、神戸コンベンションセンター

[その他]

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/murakami-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上富士夫 (MURAKAMI FUJIO)  
大阪大学・生命機能研究科・教授  
研究者番号：20089882

(2) 研究分担者

無し

(3) 連帯研究者

無し