

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791227

研究課題名（和文） 神経前駆細胞形質制御の攪乱を介した GABA_A 受容体標的薬の催奇形性の機序の解明研究課題名（英文） Analyses on the mechanisms of the teratogenic effects of GABA_A receptor-targeting drugs by way of the perturbation of the regulation of the cellular properties of neural progenitor cells.

研究代表者

梶谷 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）：

麻酔薬等に用いられる GABA_A 受容体作動薬への胎児期曝露は時に器質的变化を伴う脳機能障害を引き起こす。本研究の結果、GABA_A 受容体作動薬への曝露により、神経上皮細胞からラジアルグリアへの変化、神経前駆細胞が生み出す細胞種などが影響を受けることが明らかになった。これらが GABA_A 受容体標的薬の催奇性の基礎となる可能性が示唆された。また、マウス発生初期には GABA_A 受容体のリガンドとしてタウリンが主に機能していることも明らかになり、この GABA が少ない発生時期には大脳新皮質は GABA_A 受容体作動薬への感受性がより強い可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Fetal exposure to GABA_A receptor agonists, which are used as anesthetic drugs etc., often causes the malformation of brain tissues and the impairment of brain function. The results of this study showed that fetal exposure to GABA_A receptor agonists influence the transition from neuroepithelial cells to radial glia and the subtypes of neurons that the neural progenitors produce, suggesting that these effects underlie the functions of GABA_A receptor-acting substances as teratogens for the central nervous system. Our results also showed that taurine might function as a principal ligand for GABA_A receptors in the early phase of neocortical development, implying that the developing neocortices are more sensitive to GABA_A receptor agonists at these stages when GABA is much less than taurine in the developing neocortices.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：先天異常学、神経前駆細胞、発生・分化、脳発達障害、エタノール、GABA_A 受容体

1. 研究開始当初の背景

（1）GABA_A 受容体標的薬は麻酔薬、抗痙攣薬等に用いられるが、中枢神経系に対する催奇形をもつことが動物実験で明らかにされている。ヒトにおいても4歳以下の幼少期の麻

酔曝露と学習障害の関係が出生コホート研究の結果示唆されている。ただし、胎児期における GABA_A 受容体標的薬への曝露がどのような機序で中枢神経系の発生を阻害、攪乱するかは不明であった。

(2) 中枢神経系を構成する殆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、分化し生じる。中枢神経系の催奇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た神経細胞の移動などへの薬剤の影響と考えられる。

(3) 研究代表者はエタノール(GABA_A受容体に対し亢進作用を持つ)及びGABA_A受容体作動薬であるフェノバルビタールへの曝露が、大脳新皮質発生初期に神経前駆細胞に異常な細胞分裂方向を誘導することを示した(Tochitani *et al.*, 2010)。この結果は一つに、中枢神経系発生初期に神経前駆細胞でGABA_A受容体標的薬が発現し、機能を持っていることを示唆した。また、この結果はGABA_A受容体標的薬が神経前駆細胞の形質制御を攪乱し、その結果として中枢神経系に対する催奇形性を呈することを示唆した。

(4) 神経前駆細胞や幼若な神経細胞においてこれまで知られるGABA_A受容体のシグナル伝達様式としては、GABA_A受容体刺激による細胞膜の脱分極が起こり、膜電位感受性のカルシウムチャンネルを介し、細胞内へカルシウムが流入し、様々なカルシウム依存性タンパク質が活性化されるというシグナル伝達様式が知られる。このシグナル伝達様式がGABA_A受容体の催奇形性と関係があるかは不明であった。

2. 研究の目的

次の3つの目的を設定し、研究を進めた。

(1) GABA_A受容体への胎児期曝露がどのような組織の器質的变化につながるかを明らかにする。

(2) GABA_A受容体の催奇形性に対する感受性を明らかにする。

(3) GABA_A受容体が神経前駆細胞へ作用する分子機構(シグナル伝達機構)を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 次の3つの観点からGABA_A受容体標的薬への曝露が神経前駆細胞の性質制御にどのような影響を与えるか、その結果としてどのような器質的变化が生じる可能性があるかを検討した。

① 神経前駆細胞には2種類あり、脳室帯を形成する神経前駆細胞であるapical progenitor (AP, Pax6 陽性)と basal

progenitor (BP, Tbr2 陽性)が知られる。BPはAPより一過的に派生することが分かっている(Haydar *et al.*, 2005など)。これらの神経前駆細胞に対するマーカーを用いて、APからBPへの分化がGABA_A受容体標的薬への胎児期曝露に影響を受けるかを検討した。また、BPへ変化した細胞は既に神経細胞への分化が運命づけられていることが分かっている

(Miyata *et al.*, 2010)。そこで、幼若な神経細胞のマーカーであるDoublecortin抗体を用いて神経細胞への分化が影響を与えるかを検討した。

② 脳室帯を構成する神経前駆細胞は神経上皮細胞からラジアルグリアへ変化する。ラジアルグリアのマーカーであるBLBPに対する抗体を用いて、GABA_A受容体標的薬への曝露が神経上皮細胞からラジアルグリアへの変化に影響するかを検討した。

③ 大脳新皮質神経前駆細胞はまず将来大脳新皮質6層の内の深層となる神経細胞を生み出し、発生が進むと表層となる神経細胞を生みだすことが知られる(Okano and Temple, 2009)。深層神経細胞のマーカーであるTbr1に対する抗体、表層神経細胞のマーカーであるSatb2に対する抗体を用い、GABA_A受容体標的薬への曝露が神経前駆細胞より生みだされる神経細胞種に影響を与えるかを検討する。

(2) GABA_A受容体のリガンドにはGABAとTaurineがある。マウス発生期大脳新皮質において、以前の免疫組織化学的解析の結果、GABAは主に、胎生期13-14日目から明瞭なシグナルが観察されたのに対し、タウリンは胎生10日目から存在が確認できた。そこで、大脳新皮質の発生初期にはタウリンがGABA_A受容体の主要なリガンドではないかという仮説を立て、この仮説を検討するため、胎生10-13日目にD-CSA阻害剤を投与しその影響を組織学的に調べた。また高速液体クロマトグラフィーを用いて、発生期終脳におけるGABA及びタウリンの濃度を測定した。

(3) これまでラット大脳新皮質に対するCa²⁺イメージングの結果、胎生16日以降にGABA_A受容体刺激により細胞膜の脱分極と細胞内Ca²⁺濃度の上昇が生じることが分かっている(LoTurco *et al.*, 1995)。ただし、マウス大脳新皮質においてGABA_A受容体刺激がいつの時期から細胞内カルシウムの上昇をもたらすかは明らかではない。そこで、胎生11日以降の各発生段階にあるマウス大脳新皮質の急性スライスに対するカルシウムイメージングを行った。

4. 研究成果

(1) GABA_A受容体標的薬曝露により大脳新皮質に次のような組織学的変化が観察された。

①胎生10-11日目にGABA_Aアゴニストであるphenobarbitalもしくはpentobarbitalに曝露された大脳新皮質においては胎生12日目にTbr2陽性BP細胞の割合が増し、Doublecortin陽性の幼若神経細胞により構成される神経細胞の層の厚みが増していた。ただし、GABA_Aアゴニストに胎生10-13日目の期間曝露された大脳新皮質を胎生14日目に解析を行うと、対照群に比してTbr2陽性細胞の割合は少なくなり、Doublecortin陽性神経細胞層の厚みも減少していた。これらの結果はGABA_A受容体アゴニストへの胎児期曝露が一過的にAPからBPへの神経前駆細胞の変化と神経前駆細胞から神経細胞への分化を促進することを示した。GABA_Aアンタゴニスト投与群においてはいずれの投与期間においてもTbr2陽性BP細胞の割合、Doublecortin陽性神経細胞層の厚みは減少していた。以上の結果によりGABA_A受容体が神経前駆細胞の分化のタイミングの調節に何らかの形で関わること、神経細胞への分化のタイミングが攪乱されることが催奇形性の基礎となる可能性が示唆された。

②胎生10-11日目、GABA_Aアゴニストであるphenobarbitalもしくはpentobarbitalに曝露された大脳新皮質においては胎生12日目にラジアルグリアマーカーであるBLBP抗体染色のシグナルが対照群に比して強く観察され、GABA_Aアンタゴニストであるpicrotoxin, pentylenetetrazole投与群においてはBLBPシグナルは対照群に比して弱く観察された。胎生10-11日目にGABA_AアゴニストもしくはGABA_Aアンタゴニストに曝露された大脳新皮質より培養した神経前駆細胞に対しBLBP染色を行うと上記の組織染色の結果と一致し、アゴニスト投与群ではBLBP陽性神経前駆細胞の割合が大きくなり、アンタゴニスト投与群においてはBLBP陽性神経前駆細胞の割合は小さくなった。これらの結果は、GABA_A受容体が神経上皮細胞からBPへの移行に関与することを示唆する。このことはまた①と同じく神経細胞への分化のタイミングが攪乱されることが催奇形性の基礎となる可能性が示唆された。

③胎生10-12日目、GABA_Aアゴニストであるphenobarbitalもしくはpentobarbitalに曝露された大脳新皮質においては胎生13日目に表層細胞のマーカーであるSatb2陽性細胞の皮質板における割合が対照群に比して高く、深層細胞のマーカーであるTbr1陽性細胞

の皮質板における割合は低く観察された。GABA_Aアンタゴニストであるpicrotoxin, pentylenetetrazole投与群においては逆にSatb2陽性細胞の皮質板における割合が対照群に比して低く、深層細胞のマーカーであるTbr1陽性細胞の皮質板における割合は高く観察された。これらの結果はGABA_A受容体標的薬への曝露が神経前駆細胞の生み出す細胞種へ影響を与えることを示唆する。またこのことはGABA_A受容体の催奇形性の基礎の一つに大脳新皮質の層を構成する細胞種の変化、6層の構造に関する変化があることを示唆する。

(2) マウス胎生10-13日目にタウリン合成阻害剤であるD-CSAを投与し(胎生13日目は午前のみ)、胎生13日目に胚大脳新皮質を固定して組織学的解析を行った。その結果、Tbr2陽性BP細胞の割合の減少やDoublecortin陽性細胞層の厚みの減少、Satb2陽性神経前駆細胞の減少、Tbr1陽性神経細胞の増加が観察された。これらの表現型はGABA_A受容体アンタゴニストに曝露された大脳新皮質において観察されたものに類似していた。組織学的解析においてもGABAは胎生13-14日目以降に明瞭に観察されるようになるのに対し、タウリンは胎生10日目から観察されることが明らかになり、また高速液体クロマトグラフィーによる両アミノ酸の胎生13日目大脳新皮質における定量結果はGABAとタウリンがモル比で1:500であることを示した。以上結果は、大脳新皮質発生初期にはGABA_A受容体のリガンドとして主にタウリンが機能する可能性を示唆した。大脳新皮質発生の後期になるとタウリンもGABAも共に豊富に存在するようになる。タウリンが主なGABA_A受容体のリガンドである時期(マウスでは胎生12日目以前のGABAがタウリンに比べてごく少ない時期)には特にGABA_A受容体アゴニストへの感受性が高い可能性を示唆する。

(3) 様々な発生時期のマウス胚より大脳新皮質の急性スライスを作成し、カルシウムイメージングを行った。その結果、胎生13日目においてGABA刺激により明白なカルシウム濃度の上昇が観察されることが明らかになった。このことは胎生12日目以前においてGABA_A標的薬に神経前駆細胞が曝露された場合、細胞膜の脱分極と細胞内カルシウムの上昇というこれまで幼若細胞におけるGABA_A受容体のシグナル伝達様式として良く知られているものが、GABA_A受容体が関与する神経前駆細胞の性質変化制御の分子機構として常には当てはまらないこと、何らかの未知のシグナル伝達様式が存在する可能性が示唆された。

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)

- (1) Tochitani S and Kondo S:
Immunoreactivity for GABA, GAD65, GAD67
and Bestrophin-1 in the meninges and the
choroid plexus: implications for
non-neuronal sources for GABA in the
developing mouse brain. PLoS ONE 8(2):
e56901, 2013. DOI: 10.1371 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 栃谷 史郎、古川 智範、坂東 遼、近藤 重明、福田 敦夫、福井 義浩、マウス発生期大脳新皮質において GABA_A 受容体を介したシグナルは神経前駆細胞の内在的性質を制御する、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県)、2012 年 12 月 12 日
- ② 栃谷 史郎、近藤 重明、坂田ひろみ、福井 義浩、胎生期大脳新皮質における GABA_A 受容体シグナル分子の発現と機能、第 117 回日本解剖学会総会、山梨大学 (山梨県)、2012 年 3 月 26 日
- ③ Shiro Tochitani, Shigeaki Kondo, Hiromi Sakata-Haga, Yoshihiro Fukui, Neurogenesis is regulated by the signals via GABAA receptors in the neural progenitors in the developing cortex、第 34 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜 (神奈川県)、2011 年 9 月 15 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栃谷 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :