

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461629

研究課題名(和文) 母体由来タウリン低下による大脳新皮質神経幹細胞の性質制御の攪乱とその機構の解析

研究課題名(英文) Analyses on the mechanisms underlying the perturbation of regulatory machinery of intrinsic cellular properties of neural progenitors by the suppressed level of maternally-derived taurine

研究代表者

栃谷 史郎 (Tochitani, Shiro)

福井大学・子どものこころの発達研究センター・特命助教

研究者番号：90418591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを含む哺乳類の胎児はタウリン合成能を殆ど持たず、母親から胎盤を介して与えられるタウリンに依存している。本研究においては胎児が低タウリン環境にさらされた場合に、脳発達がどのような影響を受けるかについて、特に脳の神経細胞を生み出す神経前駆細胞の性質制御の観点からマウスを用いて検討した。低タウリン状態では、神経前駆細胞が神経細胞を生み出す時期の遅延や生みだされる神経細胞種の変化が観察された。タウリンの受容体を胎児期に阻害すると、行動の変化が観察され、妊娠期低タウリン環境が仔の脳発達を阻害することが示された。

研究成果の概要(英文)：Mammalian fetuses including humans have little ability to synthesize taurine. Therefore, fetuses are dependent on the taurine delivered via the placenta from their mothers. In this study, we examined whether fetal exposure to low taurine condition during pregnancy influences the brain development of offspring especially regarding the regulation of properties of neural progenitors, which differentiate into neurons. The results showed that the exposure to low taurine condition induced the delay in the onset of the differentiation of neural progenitors into neurons and the alterations in the cellular types of neurons that neural progenitors produce. The inhibition of the receptors of taurine in fetal brain during specific periods of brain development induced a considerable alteration in offspring behavior. These results suggest that the maternal low taurine condition during pregnancy hampers the healthy development of the fetal brain.

研究分野：神経科学

キーワード：タウリン 神経発生 神経前駆細胞 層特異的神経細胞 胎盤 母体由来栄養 神経発達障害 GABA受容体

1. 研究開始当初の背景

胎児中枢神経系の発達と胎盤を介して胎児に与えられる母体由来栄養の関係は未だ十分には明らかではなく、胎児の脳の健全な発達のために妊娠中に摂取すべき栄養に関する指針を得るには母体栄養と中枢神経系の発生機構の関係を1つ1つ丹念に解明していく必要がある。

ヒトを含む哺乳類成体はタウリンを食物から摂取するとともに、主に肝臓でシステインからタウリンを合成し利用している。ただし、胎児はタウリン合成能を殆ど持たず、母親から胎盤を介して与えられるタウリンに依存している。タウリン除去食を与えた母親ネコから生まれる仔の脳重量が著しく小さくなり、肉眼的形態異常も頻度高く認められること (Sturman, 1991) から、母体由来タウリンが脳発達に重要なことは古くから推察されているが、胎児期低タウリン環境が脳発達にどのような器質的、機能的な変化をもたらすかについては未だ詳細な解析はなされていない。

大脳新皮質原基神経幹細胞は発生過程において増殖を続けながら決まったタイミングで神経細胞への分化を開始する。さらに、大脳新皮質深層となる神経細胞から表層の神経細胞へと決まった順に、決まったタイミングで神経幹細胞は特定の神経細胞種へ分化する。研究代表者らは GABA_A 受容体が神経幹細胞に発現し、分化開始のタイミングや特定の時期に神経幹細胞から産出される神経細胞種の制御に関わることを示した (投稿準備中)。GABA_A 受容体の内因的リガンドとしては gamma-aminobutyric acid (GABA) とタウリンの 2 つが知られる。免疫組織化学によりタウリンの存在はマウス胎生 10 日目で大脳新皮質原基に確認できたのに対し、GABA の存在は E14 に始めて観察された (Tochitani *et al.*, 2011)。HPLC による定量も大脳新皮質中に存在するタウリンは E13 において GABA に対し 500 倍以上のモル比で存在することを示した (Tochitani *et al.*, 未発表)。これらの結果は大脳新皮質発生初期において、GABA_A 受容体のリガンドとしてタウリンが主要な役割を果たすこと、さらに低タウリン環境が神経幹細胞の性質制御を攪乱することを示唆する。

2. 研究の目的

本研究は母体由来栄養の 1 つとして、タウリンの胎児脳発達における機能に注目し、低タウリン環境が発生の時系列に伴う大脳新皮質原基神経幹細胞の性質制御に与える影響の有無とその分子機構、低タウリンへの感受性を明らかにするとともに、低タウリン環境により生じる器質的变化が出生後の行動異常をもたら

すかについて検討する。

3. 研究の方法

(1) タウリントランスポーター (TauT) ノックアウトマウス胚の胎児脳組織解析

母親から胎児への胎盤を介したタウリン輸送にはタウリントランスポーター (TauT) が関与する。TauT ノックアウトマウスは低タウリン環境に曝露されていると考えられる。TauT ノックアウトマウス胚の大脳皮質について、その層構造等の観点から組織学的解析を行い、胎児期低タウリン環境が脳発達に与える影響を検討する。

(2) 妊娠期 D-cysteine sulfinic acid (DCSA) を受けた母親の胎児脳組織の解析

タウリン合成阻害剤である DCSA を妊娠マウスに投与することで、母体の低タウリン環境を引き起こすことができる。DCSA を妊娠マウスへ投与することで、低タウリン環境に曝露されたマウス胎児の脳の器質的变化を検討する。

(3) 培養神経前駆細胞、急性脳スライスを用いたイメージング

GABA_A 受容体のリガンドとしてタウリンが機能するかを検討するために、Ca²⁺インジケーターを用いた培養神経前駆細胞、急性脳スライスに対する Ca²⁺イメージングにおいて、タウリンが GABA_A 受容体を介して神経前駆細胞を刺激するかを検討する。また、様々なステージから得たスライスに対して同様の実験を行うことで、タウリンに対して感受性を持つ時期を特定することも目的とする。

(4) DNA マイクロアレイを用いた分子機構解析

GABA_A 受容体刺激に応答し神経前駆細胞において発現が変化する遺伝子を DNA マイクロアレイ解析により探索し、タウリン刺激に対する神経前駆細胞の応答の基盤となる分子メカニズムを明らかにする。

(5) 胎児期低タウリン環境に曝露された仔の行動解析

胎児期に低タウリン環境へ曝露された仔がどのような行動様式を示すのかをホームケージアクティビティ試験、オープンフィールド試験、社会的相互作用試験などの行動実験を基に明らかにする。

4. 研究成果

(1) タウリントランスポーター (TauT) ノックアウトマウス胚の胎児脳組織解析

TauT ノックアウトマウス胚及び同腹の胚の胎生 12 日目終脳について、タウリン濃度は遺伝子量に依存して変化し、TauT ノックアウトマウス胚ではほぼ 0 となることが分かった (図 1)。また、胎生 12 日目の胚の大脳皮

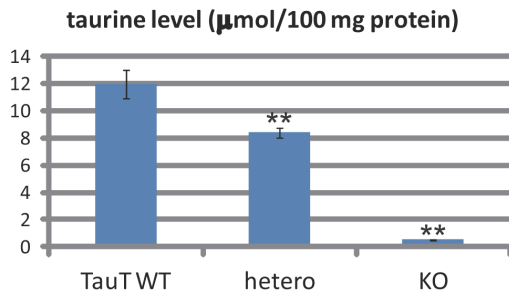


図1 TauT ノックアウトマウス (KO) と同腹の野生型 (WT)、ヘテロ (hetero) における終脳におけるタウリンレベルを示すグラフ。**, $p < 0.01$ vs. WT

質の組織学的解析の結果、神経上皮細胞からラジアルグリア細胞への分化の遅延、中間型神経前駆細胞のマーカーである Tbr2 陽性細胞の割合の減少が観察され、神経前駆細胞の神経分化が抑制されている所見が得られ、神経前駆細胞の時系列的な性質変化の調節にタウリンが関わる可能性が示唆された。

(2) 妊娠期 D-cysteine sulfinic acid (DCSA) を受けた母親の胎児脳組織の解析

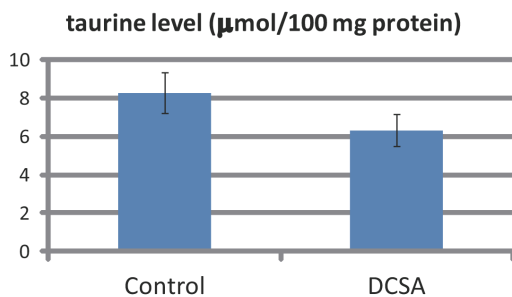


図2 Control とタウリン合成阻害剤投与 (DCSA) 母親マウス由来の E12 胚仔終脳におけるタウリンレベルを示すグラフ。

妊娠マウスに対する胎生 9 日目から 13 日目までの DCSA の投与により、胎生 13 日目胚終脳におけるタウリン濃度は約 24% 減少することが明らかになった (図 2)。この胎児の大脳皮質に対して組織学的解析を行うと、Tbr2 陽性細胞の頻度減少、神経細胞層厚みの減少、大脳皮質表層の神経細胞の割合の減少、大脳皮質深層の神経細胞の割合の増加などが観察され、神経前駆細胞の時系列的な性質変化の調節にタウリンが関わる可能性が示唆された。

(3) 培養神経前駆細胞、急性脳スライスを用いたイメージング

成熟した神経細胞においては、GABA_A 受容体刺激が細胞膜の過分極を引き起こすが、幼若な神経細胞、神経前駆細胞においては、NKCC1 の発現により細胞内塩化物イオン濃度が高く保たれているため、GABA_A 受容体刺激は細胞に脱分極を引き起こすことが知られる。マウス大脳新皮質に対する免疫組織化学的解析の結果、少なくとも胎生 11 日目の時点で、NKCC1 が神経前駆細胞に既に発現

していることが明らかになった。また、同様の解析により胎生 11 日目の時点で膜電位感受性 Ca²⁺チャンネルの1つである Cav_{1.2} が神経前駆細胞に発現していることが明らかになった。そこで、GABA_A 受容体へのリガンドによる刺激が神経前駆細胞に脱分極とそれに伴う Ca²⁺の流入を引き起こすかについて Ca²⁺インジケータの Fluo-4 を用いた大脳皮質急性スライスに対するイメージング解析で検討した。その結果、GABA はある発生時期以降のスライスにおいて、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を引き起こした。一方タウリンは、実験に用いたいずれの発生段階のスライスにおいても明瞭な細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を引き起こした。さらに、このタウリンによる刺激は GABA_A 受容体阻害薬の picrotoxin との共投与では観察されなかった。また、異なる発生時期の大脳皮質から神経前駆細胞を培養し、1 日経た後に、同様のイメージング及びパッチクランプ解析を培養神経前駆細胞に対し行った場合も、GABA が GABA カレントの変化や細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を引き起こすのはある発生時期以降の大脳皮質から培養した神経前駆細胞だけであった。これらの結果は、タウリンが picrotoxin 感受性の受容体を介して神経前駆細胞に脱分極を引き起こすこと、神経前駆細胞はタウリンにのみ反応し、GABA には反応しない発生時期があることを示した。

(4) DNA マイクロアレイを用いた分子機構解析

(3)の実験で、タウリンが GABA_A 受容体を介して神経前駆細胞を刺激することが明らかになった。そこで、大脳皮質神経前駆細胞を GABA_A 受容体亢進薬の1つである phenobarbital で刺激した場合、どのような遺伝子発現変動が生じるかについて DNA マイクロアレイを用いた解析を行った。その結果、phenobarbital 投与で遺伝子発現が上昇する遺伝子のいくつかは、脈絡叢など大脳皮質背内側部にその発現が限局していた。大脳皮質背内側部は大脳皮質の発生のパターンニングセンターと呼ばれ、複数の液性因子等が発現する部位である。タウリンによる GABA_A 受容体を介した大脳皮質神経前駆細胞の性質制御の基盤となるメカニズムとして、大脳皮質背内側部の神経前駆細胞の成熟を促進することが引き金になる可能性が示された。

(5) 胎児期低タウリン環境に曝露された仔の行動解析

(3)の実験によりある発生時期以前はタウリンだけが picrotoxin 感受性の受容体を介して、神経前駆細胞を刺激できることがわかった。そこで、神経発生早期に picrotoxin を妊娠マウスに投与し、胎児における受容体の機能を阻害した。その後、生後 4 週における仔の行動を観察した。この条件は、低タウリン

環境に曝露され、受容体への刺激が低下した状態を模した状態であると言える。その結果、通常環境における低活動、新奇環境における多動、新奇環境において壁沿いを好む空間嗜好性、社会的相互作用に関する行動の変容が観察され、神経発生早期における受容体の機能阻害や低タウリン環境への曝露が仔の将来の行動変化につながることを示された。

(6)結果の総括

本研究の結果、代表的な母体由来栄養の1つであるタウリンと神経前駆細胞の時系列的性質制御に基づく神経発生の関連を示すことができた。本研究の結果は子どもの脳の健全な発達を望む周産期の母親に生活の指針を示唆し、神経発達障害の予防法の確立に寄与する結果であると言える。

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)

Tochitani S. Functions of maternally-derived taurine in fetal and neonatal brain development. *Adv Exp Med Biol* 2017 (in press).

[学会発表](計 9 件)

栃谷 史郎. 母体由来タウリンはマウス発生期大脳皮質神経系前駆細胞の内在的性質を制御する. 第 94 回日本生理学大会 シンポジウム「タウリンの多彩な生理機能」、2017年3月29日. 浜松アクトシティコングレスセンター(静岡県浜松市).

Tochitani S., Furukawa T, Bando R, Kondo S, Ito T, Matsushima Y, Kojima T, Matsuzaki H., Fukuda A. GABA_A receptor activation by maternally-derived taurine underlies the temporal regulation of cellular properties of the neural stem cells in the mouse developing cortex. The 20th International Taurine Meeting, 2016年5月27日. The Plaza Hotel (Seoul, South Korea).

栃谷 史郎, 古川 智範, 伊藤 崇志, 小島 俊男, 松崎 秀夫, 福田 敦夫. 発生期マウス大脳皮質においてタウリンは神経前駆細胞の時系列的性質変化を制御する. 第 2 回国際タウリン研究会日本部会, 2016年3月5日. アオッサ福井(福井県福井市).

栃谷 史郎. 神経発達障害の環境要因のメカニズム: 妊娠初期低栄養と妊娠期飲酒習慣. 第3回生物学自閉症研究会, 2016年2月20日. 慶應大学三田キャンパス(東京都港区).

栃谷 史郎, 古川 智範, 伊藤 崇志, 小島 俊男, 松崎 秀夫, 福田 敦夫. 発生期マウス大脳皮質においてタウリンは神経前

駆細胞の時系列的性質変化を制御する. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学大会合同大会)2015年12月2日. 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).

栃谷 史郎, 古川 智範, 伊藤 崇志, 小島 俊男, 松崎 秀夫, 福田 敦夫. 発生期マウス大脳皮質においてタウリンは神経前駆細胞の時系列的性質変化を制御する. 第42回日本脳科学会, 2015年11月12日. ANA ホテルインリゾート宮崎(宮崎県宮崎市).

栃谷 史郎. タウリンは GABA_A 受容体のリガンドとしてマウス発生期大脳皮質神経系前駆細胞の内在的性質を制御する. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会シンポジウム 61「抑制システムにマルチモダリティをもたらす形態と機能の仕組みとそのダイナミクス」, 2015年3月23日. 神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市).

栃谷 史郎, 古川 智範, 伊藤 崇志, 福田 敦夫. タウリンは GABA_A 受容体のリガンドとしてマウス発生期大脳新皮質神経前駆細胞の性質変化を制御する. 第1回国際タウリン研究会日本部会, 2015年2月22日. 兵庫医療大学(兵庫県神戸市).

Shiro Tochitani, Tomonori Furukawa, Takashi Ito, Junichi Azuma, Atsuo Fukuda. GABA_A receptor activation underlies the temporal regulation of cellular properties of the neural stem cells in the mouse developing cortex. Neural Oscillation Conference 2014, 2014年7月. 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市).

[図書](計 1 件)

栃谷 史郎 「読んで効くタウリンの話」国際タウリン研究会日本部会著 村上 茂監修 成山堂書店、第3章第2節「胎児・乳児のタウリン」P. 98-P. 105.

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 自閉症スペクトラム障害モデル動物ならびにその作製方法および用途

発明者: 栃谷 史郎

権利者: 福井大学

種類: 特許権

番号: 特願 2014-142334

出願年月日: 2014年7月10日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

http://www.suzuka-u.ac.jp/achievements/11_hr/hr_tochitani.pdf

<https://researchmap.jp/tochitani/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栃谷 史郎 (TOCHITANI, Shiro)

福井大学・子どものこころの発達研究セン

ター・特命助教

研究者番号：90418591

(2) 研究分担者

松崎 秀夫 (MATSUZAKI, Hideo)

福井大学・子どものこころの発達研究セン

ター・教授

研究者番号：00334970

(3) 研究分担者

岩田 圭子 (IWATA, Keiko)

福井大学・子どものこころの発達研究セン

ター・特命助教

研究者番号：30415088

(4) 研究分担者

福田 敦夫 (FUKUDA, Atsuo)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号:50254272