

主論文の要旨

**Prenatal Nicotine Exposure Impairs the Proliferation of  
Neuronal Progenitors, Leading to Fewer Glutamatergic  
Neurons in the Medial Prefrontal Cortex**

胎生期のニコチン暴露は神経前駆細胞の増殖を障害し、  
内側前頭前皮質のグルタミン酸作動性神経細胞の減少を誘発する

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
臨床薬物情報学講座 医療薬学分野

(指導：山田 清文 教授)

青山 雄紀

## 【緒言】

妊娠中の喫煙は、生まれてくる子供の注意欠陥多動性障害や認知機能障害、不安障害などの神経行動障害の発症リスクを高めることが知られている。タバコに含まれるニコチンは発達段階の胎児の脳のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に作用することで、上記障害の発症リスクを高めると考えられている。げっ歯類を用いた研究において、胎生期のニコチン暴露は多動や認知・情動機能障害などの行動異常を引き起こすことが報告されている。このことから胎生期のニコチン暴露は胎児の脳構造やその機能に長期的な影響を与えると考えられるが、そのメカニズムについては未だ明らかではない。これまでの行動薬理的解析により胎生 14 日目から出生日 (E14-P0) までの期間、妊娠マウスにニコチンを投与するとその仔に顕著な行動障害が観察されることを明らかとしてきた。本研究ではその障害のメカニズムを明らかとするため、E14-P0 まで胎生期にニコチン暴露を行ったマウスの行動解析および神経化学的解析を行った。

## 【方法および結果】

### 胎生期のニコチン暴露は内側前頭前皮質のグルタミン酸作動性神経細胞数を減少させた

胎生期のニコチン暴露は E14-P0 の期間に妊娠マウスへ 0.2 mg/mL のニコチンを含む 2% スクロース水を自由飲水させることにより行った。コントロール群には 2% スクロース水を自由飲水させた。胎生期にニコチン暴露を受けたマウス (ニコチン群) が 10 週齢に達した後、脳内グルタミン酸および GABA 含量、脳内微量透析法により細胞外グルタミン酸遊離量、免疫染色法によりグルタミン酸神経細胞数の測定を行った (Figure 1)。その結果、ニコチン群では前頭皮質におけるグルタミン酸含量の低下および細胞外グルタミン酸基礎遊離量の減少が認められた (Figure 1A-B)。さらにニコチン群において NeuN 陽性細胞数および NeuN/GLS2 共陽性細胞数の減少が認められた (Figure 1C)。

### 胎生期のニコチン暴露は神経細胞の移動には影響せず、増殖を障害した

ニコチン暴露開始前の E13、開始後の E14、E15、または E16 に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を単回投与し、P7 において脳のサンプリング後、抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、E13、E14、E15、E16 における免疫染色像全体の BrdU 陽性細胞数に対する各領域での BrdU 陽性細胞数の割合を算出したところ、前頭皮質の第 6 層側から 1 層側にそのピークのシフトが認められたが、コントロール群とニコチン群との間に差は認められなかった (Figure 2A-B)。一方、各タイムポイントにおける BrdU 陽性細胞数は E14、E15、E16 のニコチン群において有意な減少が認められた (Figure 2C)。E14、E16 に BrdU を単回投与し生育後に同様の解析を行った結果、ニコチン群において BrdU 陽性細胞数の減少が認められた (Figure 2C)。次に、Figure 2C で認められた BrdU 陽性細胞数の減少に nAChR が関与しているかどうか確認するため、BrdU 投与の 15 分前に  $\alpha 7$ nAChR 拮抗薬である methyllycaconitine (MLA) あるいは  $\alpha 4\beta 2$ nAChR

拮抗薬である dihydro- $\beta$ -erythroidine を前投与した。その結果、BrdU 投与 30 分後において BrdU 陽性細胞数の減少が認められ、その影響は MLA により用量依存的に拮抗された (Figure 2D)。

#### 胎生期のニコチン暴露は脳室帯および脳室下帯の神経前駆細胞数を減少させた

ニコチン暴露開始後、各タイムポイントにて胎児の脳のサンプリングを行い、胎生期のニコチン暴露が神経前駆細胞数に与える影響について免疫染色法により検討した。その結果、ニコチン群において BrdU 陽性細胞数の減少が認められた他、神経発生の増殖層である脳室帯 (VZ) の神経前駆細胞マーカーである Pax6、脳室下帯 (SVZ) の神経前駆細胞マーカーである Tbr2、細胞増殖マーカーである PCNA、細胞周期 M 期のマーカーである pH3 陽性細胞数の減少が認められた (Figure 3)。

#### 胎生期のニコチン暴露は神経前駆細胞の細胞周期を延長させた

神経前駆細胞数の減少の原因を明らかにするため、胎生期のニコチン暴露が神経前駆細胞の細胞周期に与える影響を解析した。ニコチン暴露を開始後、2 時間間隔で BrdU の投与を行い、その 30 分後に胎児を摘出し、各タイムポイントでのサンプルとした (Figure 4A)。免疫染色にて全細胞数のうち BrdU 陽性細胞の割合を Labeling Index としてプロットし、回帰直線より細胞周期全体の長さおよび S 期の長さを算出した (Figure 4B)。その結果、コントロール群は S 期の長さが 5.92 (3.60-9.73) 時間、細胞周期全体の長さが 15.38 (14.50-18.25) 時間であるのに対し、ニコチン群は S 期が 8.91 (6.50-12.36) 時間、全体の長さが 22.37 (20.19-23.65) 時間であり、細胞周期の有意な延長が認められた (Table 1)。

#### 胎生期のニコチン暴露による認知機能障害は D-サイクロセリンの投与により改善した

最後に胎生期のニコチン暴露が生育後の認知・情動行動に与える影響について行動薬理的解析を行った。潜在抑制試験の持続潜在抑制条件下においてニコチン群ではすくみ行動の増加が認められず、学習障害が示唆された (Figure 5A)。また、恐怖条件付け試験の消去学習後の再想起過程において、ニコチン群はコントロール群と比較してすくみ行動の減弱の程度が少なく、消去学習の障害が示唆された (Figure 5B)。次に、NMDA 受容体部分作動薬である D-サイクロセリン (DCS) を用いて、グルタミン酸作動性神経系の活性化による行動障害の改善について検討した。Object-based attention 試験の保持試行において認められる探索嗜好性の減少、高架式十字迷路試験において認められるオープンアームへの進入回数割合の減少、ビー玉覆い隠し試験において認められるビー玉覆い隠し行動の増加は、DCS の全身投与 (30 mg/kg, s.c.) により有意に改善した (Figure 5C-E)。一方で、DCS の前頭前皮質への脳内微量投与 (片側 5 nmol/0.5  $\mu$ l  $\times$  2 (両側注入)) により、恐怖条件付け試験における消去学習障害の改善が認められたが (Figure 5F)、高架式十字迷路試験における不安様行動には改善が認められなかった (Figure 5G)。

### **【考察】**

以上の結果から、胎生期のニコチン暴露により神経前駆細胞の細胞周期が延長し、細胞増殖が障害されることでVZおよびSVZでの神経前駆細胞数が減少し、生育後のグルタミン酸作動性神経細胞数の減少を引き起こす可能性が考えられた。また、内側前頭前皮質におけるグルタミン酸作動性神経細胞数の減少によるグルタミン酸神経系の機能低下と認知機能障害との関連が示唆された。

### **【結語】**

胎生期のニコチン暴露は前頭前皮質形成に重要な神経前駆細胞の増殖やグルタミン酸作動性神経細胞への成熟を障害し、生育後の認知機能障害を引き起こすことが示唆された。