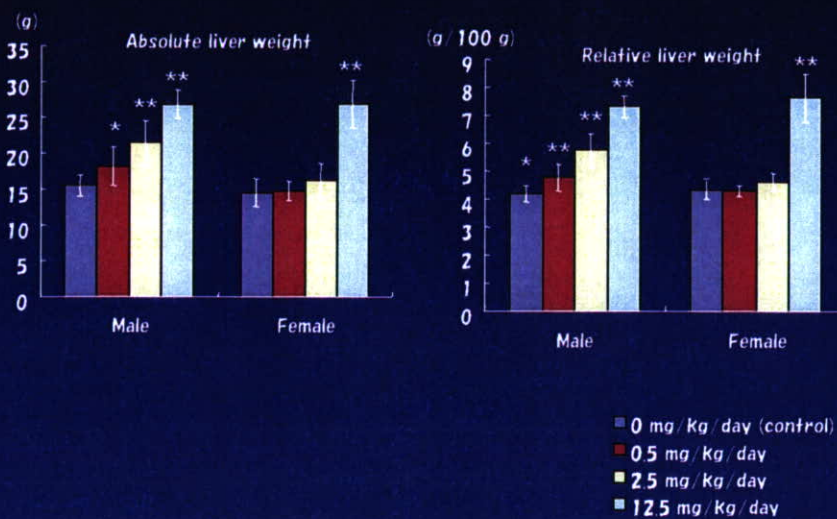


## 去勢ラットを用いた反復投与毒性試験の結果

	♂	♀
0.5 mg/Kg/day	血中アルブミン↑ 相対肝重量↑ 肝細胞肥大、核の大小不同、核小体肥大の増加	血中総蛋白・LDH↑
2.5 mg/Kg/day	血中アルブミン・LDH↑ 相対肝重量↑ 肝細胞肥大、核の大小不同、核小体肥大、細胞分裂増の増加	血中総蛋白・アルブミン・LDH↑ 肝細胞肥大、核の大小不同、核小体肥大、壊死
12.5 mg/Kg/day	血中アルブミン・LDH・AST・ALT・ALP↑ 相対肝重量↑ 肝細胞肥大、核の大小不同、核小体肥大、細胞分裂増の増加、壊死	血中総蛋白・アルブミン・LDH・ALP↑ 相対肝重量↑ 肝細胞肥大、核の大小不同、核小体肥大、壊死

## 去勢ラットを用いた反復投与毒性試験の結果



## 若齢ラットを用いた血中濃度測定試験

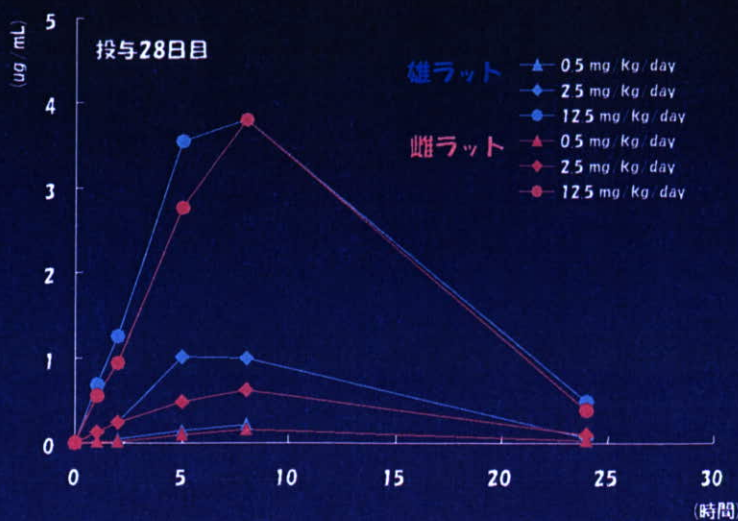
### 実験方法

HDBB (純度: 100%)をコーン油に懸濁した。

5週齢のCrl:CD(SD)ラットに 0, 2.5, 12.5 mg/kg bw/dayを28日間強制経口投与した。

初回投与の1, 2, 5, 8, 24時間後、投与7および14日の投与前、投与28日の投与前および投与1, 2, 4, 8, 24時間後に採血し、LC/MS/MSを用いて、血漿中のHDBB濃度を測定した。さらに、HPLC-PDAを用いて代謝物の検索を行った。

### 血中濃度測定試験



## 代謝安定性試験

### 実験方法

- 雌雄ラットの肝ミクロソーム (BD GENTEST)
- 雌雄ラットのS-9 (SD, 雄: 200匹, 雌: 100匹)
- HDBBをアセトニトリルに溶解し、ミクロソーム又はS-9と、0.2 mol/L リン酸緩衝液 及び5 mmol/L EDTA溶液の存在下で、約5分間フレインキュベート (37C)した。その後、NADPH生成系を加えて37Cで振盪しながら60分間インキュベートした。氷冷したアセトニトリルを加えて反応を停止させた後、冷却遠心機で遠心し (10000 x g, 4C, 15分間)、上清0.05 mLをHPLCで分析した。

## 代謝安定性試験

		HDBB残存率
ラット肝ミクロソーム	雄	73.4 %
	雌	76.1 %
ラットS-9	雄	98.1 %
	雌	91.4 %

- HDBB残存率に性差は認められなかった。
- 溶出時間1~2分付近に代謝物と思われるピークが検出された。



## CYP分子種特定試験

### 実験方法

14種のラットCYP発現系ミクロソーム [CYP1A1, 1A2, 2A1, 2A2, 2B1, 2C6, 2C11, 2C12, 2C13, 2D1, 2D2, 2E1, 3A1 及び3A2 (BD GENEST)]を用い、HDBB代謝に関与するラットCYP分子種を推定した。

HDBBをアセトニトリルに溶解し、各ラットCYP発現系と、0.2 mol/L リン酸カリウム緩衝液、5 mmol/L EDTA溶液及びコントロールミクロソームの存在下で、約5分間フレインキュベート (37°C)した。その後、NADPH生成系を加えて37°Cで振盪しながら60分間インキュベートした。氷冷したアセトニトリルを加えて反応を停止させた後、冷却遠心機で遠心 (10000 x g, 4°C, 15分間)し、上清0.05 mLをHPLCで分析した。

## CYP分子種特定試験

分子種	HDBB 残存率	分子種	HDBB 残存率
<b>CYP1A1</b>	<b>61.8 %</b>	CYP2C12	102.6 %
<b>CYP1A2</b>	<b>79.5 %</b>	CYP2C13	105.1 %
CYP2A1	96.9 %	CYP2D1	101.7 %
<b>CYP2A2</b>	<b>89.9 %</b>	<b>CYP2D2</b>	<b>80.7 %</b>
CYP2B1	88.4 %	CYP2E1	102.1 %
<b>CYP2C6</b>	<b>84.0 %</b>	CYP3A1	102.8 %
<b>CYP2C11</b>	<b>74.6 %</b>	<b>CYP3A2</b>	<b>100.7 %</b>

- ・ 未変化体以外のピークが複数検出され、代謝物が生成していると考えられる

## 肝薬物代謝酵素活性測定試験

### 実験方法

- ・ HDBB (純度: 100%) をコーン油に懸濁した。
- ・ 5週齢のCrl:CD(SD)ラットに 0.5, 2.5, 12.5 mg/Kg bw/day を28日間強制経口投与した。
- ・ 最終投与の翌日に、エーテル麻酔下で放血屠殺した後、肝ミクロソームの蛋白含量、P450含量、アミノピリンN-脱メチル化活性、7-エトキシマリンO-脱エチル化活性、7-エトキシレソルフィンO-脱エチル化活性、テストステロン6β水酸化活性、テストステロン2α水酸化活性、テストステロン16α水酸化活性を測定した。

### 肝薬物代謝酵素活性への影響

雄ラット

Dose (mg/Kg/day)	0.5	2.5	12.5
蛋白含量	-	-	-
P450含量	-	↑	↑
アミノピリン N-脱メチル化活性 (複数のCYP)	-	↓	↓
7-エトキシマリンO-脱エチル化活性 (CYP2B)	-	-	-
7-エトキシレソルフィン O-脱エチル化活性 (CYP1A)	↓	↓	↓
テストステロン6β水酸化活性 (CYP3A2)	-	-	-
テストステロン2α水酸化活性 (CYP2C11、成熟雄ラット特異的)	-	↓	↓
テストステロン16α水酸化活性 (CYP2C11、成熟雄ラット特異的)	-	↓	↓
ラウリン酸 12-ヒドロキシラーゼ活性 (CYP4A1)	↑	↑	↑

## 肝薬物代謝酵素活性への影響

雌ラット

Dose (mg/kg/day)	0.5	2.5	12.5
蛋白含量	-	-	-
P450含量	-	-	-
アミノピリン N-脱メチル化活性 (複数のCYP)	-	-	-
7-エトキシクマリン O-脱エチル化活性 (CYP2B)	-	-	-
7-エトキシレソルフィン O-脱エチル化活性 (CYP1A)	-	-	-
テストステロン 6β 水酸化活性 (CYP3A2)	-	-	-
ラウリン酸 12-ヒドロキシラーゼ活性 (CYP4A1)	-	-	↑

## まとめ

- ・ HDBBの毒性に見られる性差は去勢により顕著に軽減した。
- ・ 若齢ラットではHDBBの血中濃度に性差はみられなかった。
- ・ HDBBは代謝されること (CYP1A1, 1A2, 2C6, 2C11, 2D2 等が関与) が明らかになったが、代謝速度に性差はみられなかった。
- ・ HDBBを投与した若齢ラットでは、
  - ラウリン酸 14-水酸化活性の増加がみられ、明確な性差が認められたことから、HDBBの毒性発現にはPPARαが関与していると考えられる。
  - さらに、成熟雄ラットに特異的なCYP2C11活性の顕著な低下が認められたことから、HDBB毒性の過齢差および性差の発現に関与している可能性が示唆される。



厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

神経幹細胞系譜制御における化学物質の影響に関する研究

分担研究者 中島 欽一  
奈良先端科学技術大学院大学 教授

研究要旨

本研究は神経幹細胞系譜制御に対する化学物質影響の分子基盤解明を目的としている。化学物質の中でもレチノイン酸(RA)とバルプロ酸(VPA)に焦点を絞り、その神経幹細胞分化における作用および作用機序の解明を目指す。これまでの研究で、1)RAがES細胞の早期アストロサイト分化を誘導する際に、アストロサイト特異的遺伝子プロモーターの脱メチル化が生じること、2)RAが胎生期神経幹細胞のアストロサイト分化をサイトカイン LIF と協調して誘導すること、3)VPAが神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化を顕著に抑制すること、4)VPAが損傷脊髄機能回復に有効である可能性などを見出した。

A. 研究目的

本研究は化学物質の神経幹細胞系譜制御における影響の分子基盤の解明を目的とした。特に催奇形成を有するビタミン A(レチノイン酸)や明確な奇形を伴わない状況で自閉症を誘発するバルプロ酸の機能に着目した。マウス胚性幹細胞(ES細胞)や胎子および成体神経幹細胞を用いた先行実験では、レチノイン酸(RA)が神経幹細胞からアストロサイトへの分化時期を早めること、バルプロ酸(VPA)が成体神経幹細胞のニューロンへの分化を促進することなどを明らかにしていた。このような作用及び作用機序を明らかにすることにより、化学物質の子どもの脳神経系への影響を予想・考察する上で基盤となる知見が集積できると考えた。

B. 研究方法

生体内の発生過程において神経幹細胞はニューロンへの分化がアストロサイトへの分化に先行する。本分担研究者らはマウス ES 細胞を用い、血清非存在下に浮游培養することで上記現象を再現できる *in vitro* の系を確立した。ES 細胞を血清非存在下に4日間浮游培養した場合、胎生初期～中期の神経幹細胞に相当する神経幹細胞様

細胞が誘導されるため、アストロサイト誘導性サイトカイン LIF で刺激した場合にもアストロサイトへの分化は観察されない。しかしこの4日間の浮游培養中に RA を添加することで、LIF に応答したアストロサイトへの分化が見られるようになることが先行実験において明らかになっていた。分担研究者はこれらの結果と自身のこれまでの研究結果とを合わせて、このアストロサイト早期分化能獲得に DNA メチル化というエピジェネティックなゲノム修飾の関与を想定した。そこで本研究では DNA のメチル化状態が RA によって実際に変化を受けることを bisulfite シークエンスなどによって検討した。これと並行して RA が胎子神経幹細胞分化に及ぼす影響についても細胞種特異的抗体を用いた免疫染色法などにより検討した。VPA に関しては成体神経幹細胞のニューロン分化を促進することが分かっているものの胎子神経幹細胞に対する影響については不明であった。そこで本研究では胎子神経幹細胞に対する影響を成体神経幹細胞に対するそれと比較するとともに、マイクロアレイによる遺伝子発現解析などを足掛りとしてその作用機序解明も試みた。また VPA の脊髄損傷治療応用への可能性も検討した。

## (倫理面への配慮)

本研究は奈良先端科学技術大学院大学の動物倫理委員会の規定に基づき行われるものである。

## C. 研究結果

1. ES細胞から神経系細胞への分化におけるRAの影響: 我々はRAがES細胞からの早期アストロサイト分化を誘導するという結果を得ている。さらに我々はアストロサイト特異的遺伝子 GFAP プロモーターの転写因子 STAT3 結合配列は、神経幹細胞がアストロサイトへの分化能を獲得する胎生後期に脱メチル化を受けることを報告している。そこで RA 処理した ES 細胞においてこの STAT3 結合配列を含む周辺領域のメチル化を調べたところ、コントロールと比較して脱メチル化が促進されていることが分かった。またクロマチン免疫沈降法による解析から RA 刺激に応じて維持型 DNA メチル基転移酵素 Dnmt1 の GFAP プロモーターへの結合が減弱することがわかった。一方、Dnmt1 遺伝子欠損 ES 細胞では GFAP プロモーターは低メチル化状態にあり、アストロサイトへの早期分化が見られることも明らかにした。以上の結果から、RA による ES 細胞の早期アストロサイト分化誘導機構における Dnmt1 の関与が考えられる。またヒストンメチル化酵素 G9a 遺伝子欠損 ES 細胞においては、RA で刺激した場合にも全くアストロサイトへの分化が誘導されないことも見出している。

2. RA の胎仔神経幹細胞分化における影響: 我々は RA の合成・分解酵素や受容体群が胎生期の脳でも発現していることから、RA の胎仔期神経幹細胞分化における影響も検討した。既にアストロサイトへの分化能を獲得したマウス胎生 14 日の神経幹細胞をアストロサイト誘導性サイトカインである LIF と同時に RA で刺激したところ、相乗的なアストロサイト分化誘導が見られた。その分子基盤として、RA 刺激によりアストロサイト特異的遺伝子プロモーター中のヒストンのアセチル化が亢進し、結果として転写因子 STAT3 の結合が促進されるためであることを明らかにした。

3. 神経幹細胞分化におけるVPAの影響: 我々は本研究で、VPAが成体ラット神経幹細胞の場合と同様にマウス胎生期神経幹細胞のグリア細胞(アストロサイトとオリゴデンドロサイト)への分化を抑制しつつニューロンへの分化を促進することを示した。また、経時的にVPA処理した神経幹細胞から抽出したRNAを用いマイクロアレイ解析からは、ニューロン軸索伸長阻害タンパク質遺伝子の発現抑制が観察された。またVPA処理した神経幹細胞を脊髄

損傷モデルマウスの脊髄に移植したところ、未処理細胞移植群と比較して、顕著な機能回復が見られた。

4. 齧歯類やヒトにおいて、てんかんにより海馬歯状回の異所的ニューロン新生が促進されること及び長期認識障害が引き起こされることが知られている。VPAは抗てんかん薬としても知られるが、今回VPAがこの異所的ニューロン新生を阻害し、認識障害を回復させることを明らかにした。この作用は主にVPAのヒストン脱アセチル化酵素阻害作用によって発揮される。

## D. 考察

1. ES細胞から神経系細胞への分化におけるRAの影響: 本年度の研究からRAによるES細胞からの早期アストロサイト分化誘導過程において、「Dnmt1のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターへの結合減弱による脱メチル化促進」というメカニズムが推察された。またG9a遺伝子欠損ES細胞ではRAによる早期アストロサイト分化誘導が観察されないことから、今後はDNAメチル化とヒストンメチル化双方のエピジェネティックな観点からRAの作用機序解明に臨む。

2. 神経幹細胞分化におけるVPAの影響: 本研究から、VPAは損傷脊髄において移植幹細胞のニューロン分化を誘導できると共に、損傷脊髄機能回復を増進できることがわかった。今後はその作用機序の解明を目指す。

## E. 結論

本研究によってRAやVPAが神経幹細胞分化制御に様々な影響を及ぼすことが明らかとなった。今後はそのメカニズムを詳細に解析することで、生物学的に興味深い発見や、ひいては化学物質の子どもの脳神経系への影響を予想・考察する上で基盤となるような概念の提示を目指したい。

## F. 研究発表(今年度のものをご記入して下さい。)

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

該当無し

#### 2) 雑誌

1. Li, W., Sun, G., Yang, S., Qu, Q., Nakashima, K. & Shi, Y. Nuclear receptor TLX regulates cell cycle progression in neural stem cells of the developing brain. *Mol Endocrinol* 22, 56-64 (2008).
2. Fukuda, S., Abematsu, M., Mori, H., Yanagisawa, M., Kagawa, T., Nakashima, K., Yoshimura, A. & Taga, T.



Potentiation of astroglialogenesis by STAT3-mediated activation of bone morphogenetic protein-Smad signaling in neural stem cells. *Mol Cell Biol* 27, 4931-4937 (2007).

3. Jessberger, S., Nakashima, K., Clemenson, G.D., Jr., Meja, E., Mathews, E., Ure, K., Ogawa, S., Sinton, C.M., Gage, F.H. & Hsieh, J. Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline. *J Neurosci* 27, 5967-5975 (2007).
4. Chang, M.Y., Sun, W., Ochiai, W., Nakashima, K., Kim, S.Y., Park, C.H., Kang, J.S., Shim, J.W., Jo, A.Y., Kang, C.S., Lee, Y.S., Kim, J.S. & Lee, S.H. Bcl-XL/Bax Proteins Direct the Fate of Embryonic Cortical Precursor Cells. *Mol Cell Biol* 27, 4293-4305 (2007).

## 2. 学会発表(抜粋)

(国内学会)

1. 中島欽一<sup>○</sup>、高塚絵理子、山下徹、Hsieh, J., Gage F.H., 波平昌一、岡野栄之、澤本和延、神山淳:神経系細胞の分化・可塑性制御とエピジェネティクス。Neuro2007、パシフィコ横浜、2007年9月10日-12日
2. 中島欽一<sup>○</sup>:エピジェネティクスが関与する神経系細胞分化・可塑性制御とその応用。第64回発生工学・疾患モデル研究会、東京ガーデンパレス、2007年8月28日
3. 精松昌彦<sup>○</sup>、辻村啓太、神山淳、波平昌一、瀬戸口啓夫、米和徳、小宮節郎、五十嵐勝秀、菅野純、中島欽二:ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤バルプロ酸による神経幹細胞分化制御機構の解明と損傷脊髄再生治療への応用。第28回日本炎症・再生医学会、京王プラザホテル、2007年8月2日-3日
4. 神山淳、瀬戸口廣貴、波平昌一、中島欽一<sup>○</sup>:神経幹細胞分化及び可塑性制御とエピジェネティクス。第1回日本エピジェネティクス研究会年会、大阪大学コンベンションセンター、2007年6月15日-16日

5. 浅野弘嗣<sup>○</sup>、波平昌一、神山淳、青沼真、佐野坂司、中島欽二:レチノイン酸によるヒストン修飾変換を介した神経幹細胞のアストロサイト分化促進機構の解明。第5回幹細胞シンポジウム、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場、2007年5月17日-19日
6. 精松昌彦<sup>○</sup>、辻村啓太、神山淳、波平昌一、中島欽二、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による神経幹細胞分化制御と損傷脊髄再生治療への応用。第5回幹細胞シンポジウム、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場、2007年5月17日-19日

(国際学会)

1. Kohyama, J., Takatsuka, E., Namihira, M., Gage F. H., Okano, H., Sawamoto, K. and Nakashima, K. <sup>○</sup>: Epigenetic mechanism regulating fate determination and differentiation plasticity of cells in the mammalian brain. NAIST GCOE international Symposium. NARA-KEN NEW PUBLIC HALL. Nara. January 15-16, 2008
2. Namihira, M., Kohyama, J., Taga, T., and Nakashima, K. <sup>○</sup>: Pre-generated Differentiating Neurons Confer an Astroglialogenic Potential to Neural Precursors through Notch-signal Activation. The 19<sup>th</sup> Annual Meeting on the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Conference Center COEX, Seoul, Korea, October 17-19, 2007 (symposium)

G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

March 10, 2008  
江馬子ども班班会議

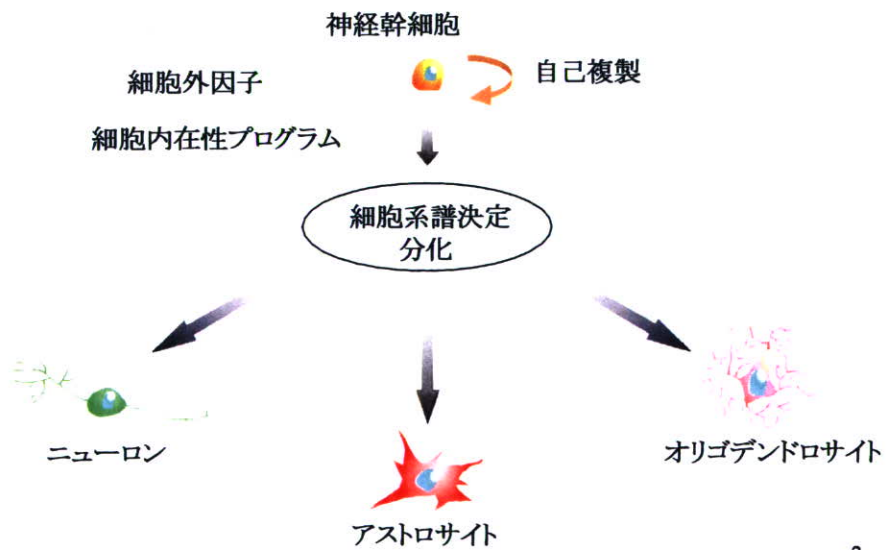
# 神経幹細胞系譜制御における 化学物質の影響

奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科  
分子神経分化制御学講座

中島 欽一

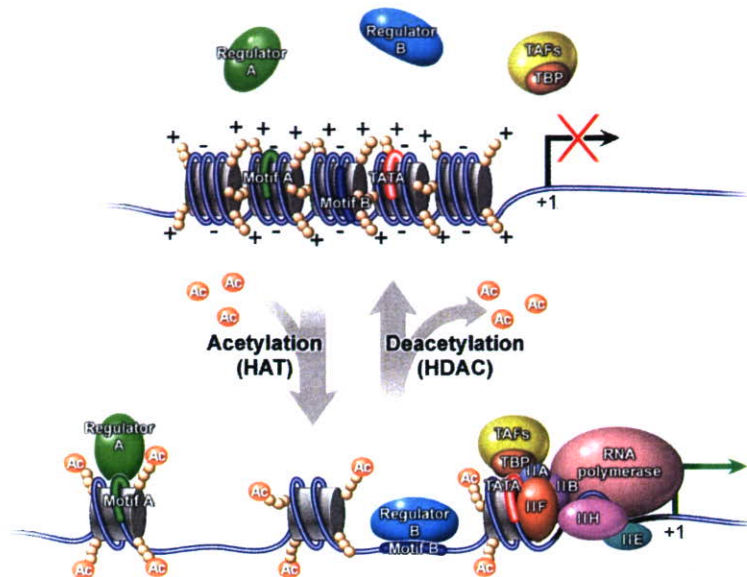


## 神経幹細胞の分化制御

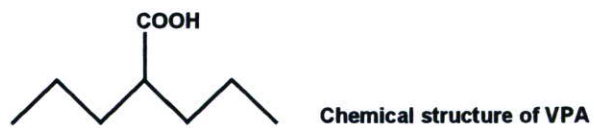


2

## ヒストンアセチル化のクロマチン構造や転写に及ぼす影響



## バルプロ酸 (VPA, 2-propylpentanoic acid)

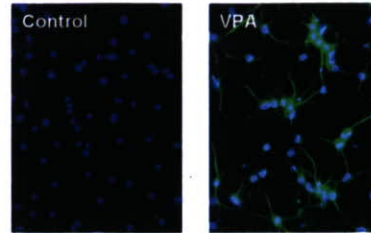
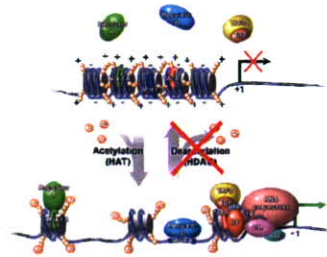


- 癲癇の治療薬として既に利用
- よく使用されるtrichostatin A (TSA)より少ない細胞毒性でヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)阻害活性を示す

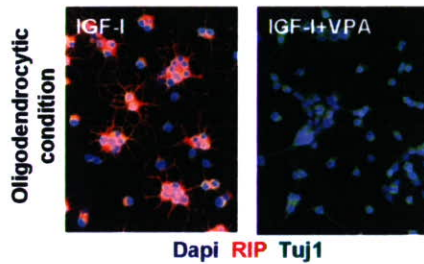
4



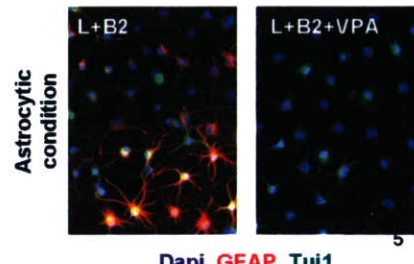
VPAは神経幹細胞のグリア細胞への分化を抑制すると同時にニューロンへの分化を促進する



Dapi MAP2ab



Dapi RIP Tuj1



Dapi GFAP Tuj1

## 脊髄損傷治療への応用

損傷脊髄が再生しにくい理由

1. ニューロン自体の再生力が弱い
  - ・ 移植神経幹細胞のニューロン分化促進、軸索伸長
2. ニューロンを取り巻く環境が再生に適していない
  - ・ myelin inhibitorの軸索伸展阻害作用の抑制
  - ・ ほとんどの内在性及び移植細胞が示すアストロサイト分化の抑制

### バルプロ酸 Valproic acid (VPA)

抗てんかん薬として古くから用いられている(安全性は確立されている)

HDAC inhibitorとしての機能 EMBO J., 2001, 20, 36734-41

神経系細胞の分化誘導作用 PNAS 2004, 101, 16659-64

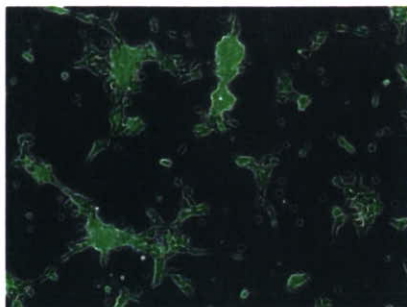
ニューロン分化促進作用

アストロサイト及びオリゴデンドロサイト分化抑制作用

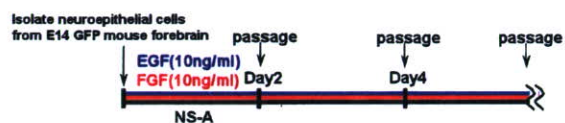
神経突起伸長作用 JBC 2001, 276, 31674-83

軸索伸展阻害タンパク質遺伝子発現抑制 our study

## E14 GFPマウス終脳由来 NS細胞



PLoS Biol. 2005 Sep;3(9):e283  
**Niche-independent symmetrical self-renewal  
of a mammalian tissue stem cell.**  
 Coni L, Pollard SM, Corba T, Restano E, Toselli M, Eletta G,  
 Sun Y, Sanzone S, Ring DL, Cattaneo E, Smith A.



7

バルプロ酸はどのようにして抗けいれん作用を発揮するのか

### Experimental paradigm

Kainic acid: 12 mg/kg  
 VPA: 2x 150 mg/kg a day  
 BrdU: 50 mg/kg

**Early group:**  
 Killed on the first day after last BrdU injection

**Late group:**  
 Killed 4 weeks after last BrdU injection

Con

VPA

Kainic acid

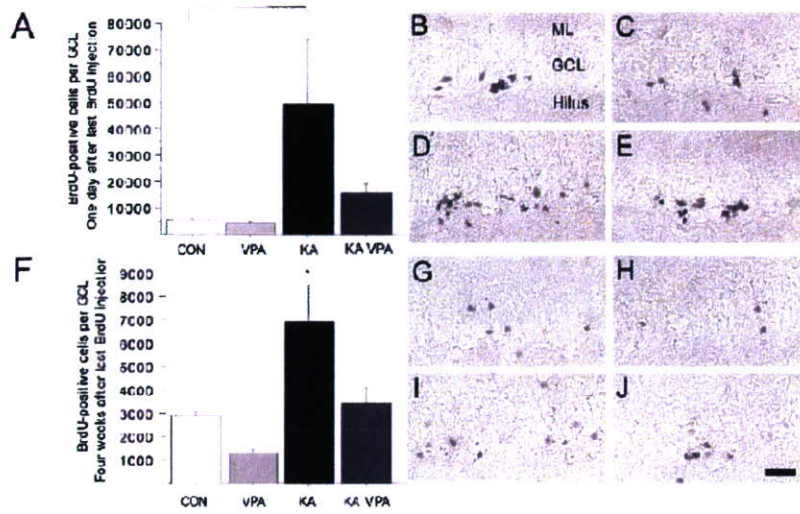
Kainic acid  
 VPA

7 daily BrdU injections



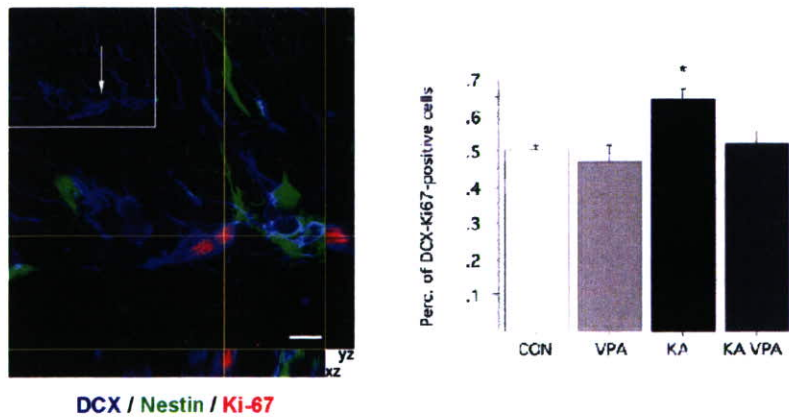
8

バルプロ酸はてんかんによる神経前駆細胞の増殖を抑制する



9

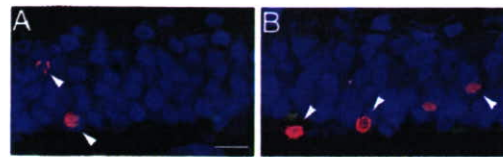
バルプロ酸によるニューロン前駆細胞の増殖抑制



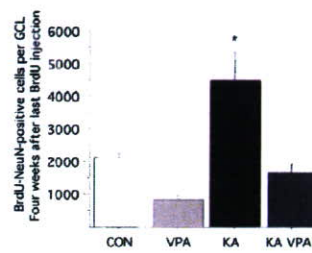
10



バルプロ酸はてんかんによって増大する  
総新生ニューロン数を減少させる

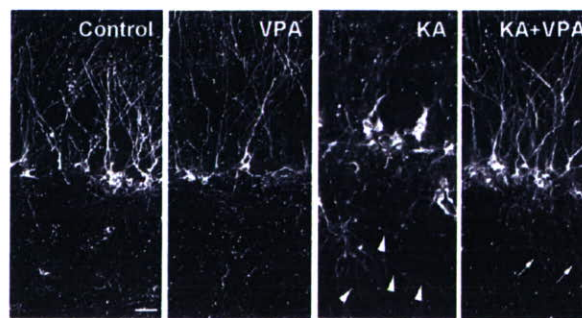
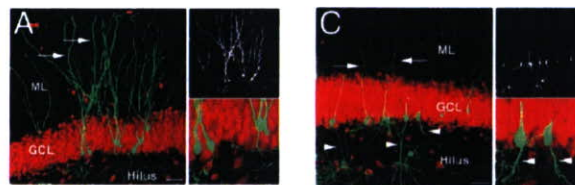


NeuN / S100- $\beta$  / BrdU



11

バルプロ酸による異所性基底樹状突起伸長の抑制



DCX

12

## 海馬依存性物体認識テスト

### Day 1-3

45 min familiarization in the testing room  
5 min fam. in the testing chamber

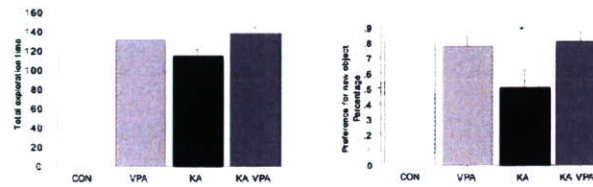
### Day 4

45 min fam. in the testing room  
1 min fam. in the testing chamber  
15 min exploration of two identical objects  
3 hour

15 min exploration with one new object

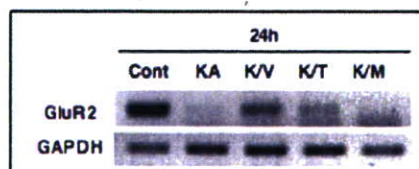
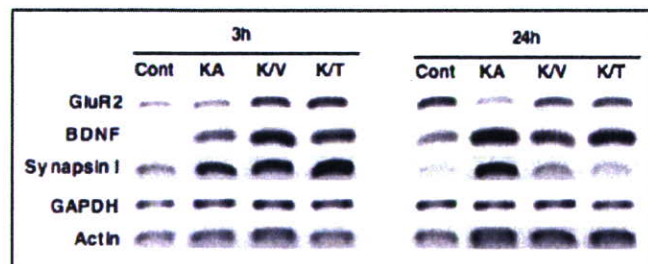


DELAY



13

## てんかん及びHDAC阻害剤による海馬遺伝子発現変化

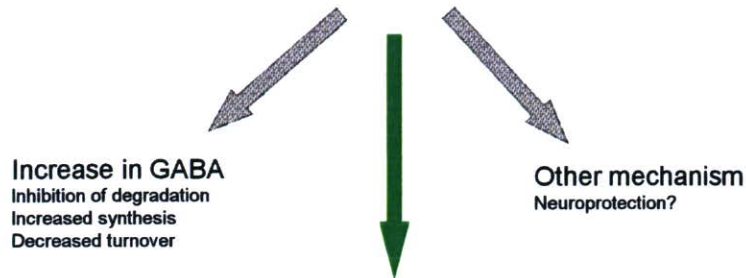


14

## Summary

- VPA inhibits seizure-induced neurogenesis.
- VPA improves hippocampal function following KA-induced seizures.

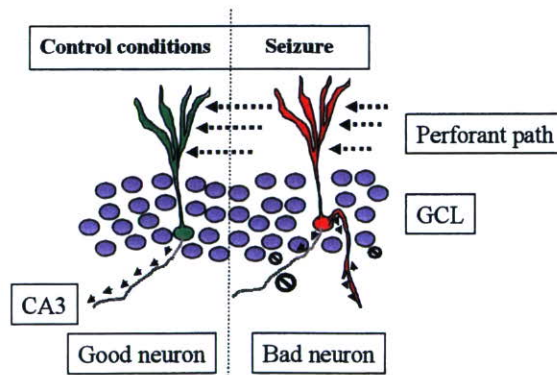
How acts VPA as an antiepileptic drug?:



**Hyperacetylation-mediated inhibition of seizure-induced neurogenesis**  
Decreased number of newborn neurons  
Morphology/position within the dentate area

15

## Model of dysfunctional integration of seizure-generated newborn neurons



The effectiveness of VPA as an anti-epileptic drug may be partially explained by the observed inhibition of seizure-induced changes in number, morphology and localization of newborn (bad) neurons within the dentate gyrus.

16



厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

脳形成・発達過程における神経伝達物質シグナルの外因性かく乱による脳障害に関する研究  
—モデル系開発とメカニズム解明—

分担研究者 種村健太郎

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・主任研究官

研究要旨

胎生期におけるグルタミン酸シグナルの外因性かく乱による神経毒性発現の解明を目的として、マウスにサリドマイド、フタルルグルタミン、フタルルグルタミン酸の経胎盤暴露を行った結果、フタルルグルタミン、フタルルグルタミン酸暴露群・成熟期に神経細胞軸索突起の発達不全が確認されるとともに、成熟期暴露では生じない、情動・認知行動の逸脱が生じた。特にフタルルグルタミンは、サリドマイドのヒト型代謝産物であり、本系は胎児期サリドマイド暴露による脳機能発達障害モデルとして位置づけることが出来ると考えられる。

A. 研究目的

中枢における主たる興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸のシグナル調節機構は、発生期の脳構造形成においても重要な役割を演じている。本研究は、(1)発生期のグルタミン酸受容体過剰刺激の脳構造形成への影響の有無、(2)胎生期の、大脳形成過程における感受性の差違、(3)生まれた場合の遅発性中枢行動毒性として影響の有無、について明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

胎生 14.5 日齢のマウスに対して妊娠マウスへの強制経口投与(100mg/kg)による経胎盤経由で、サリドマイド、フタルルグルタミン(サリドマイドのヒト型代謝産物)、フタルルグルタミン酸(フタルルグルタミン類似構造化学物質)を投与し、得られた雄マウスについて生後 10-12 週齢時に以下の行動解析及び形態機能解析を行った。

脳構造における障害性の有無に関しては、特に終脳における神経細胞突起の発達に焦点を合わせた免疫組織化学により検討した。同時に、脳内の興奮-抑制バランスへの影響評価を目的として各種受容体及び調節因子タンパクの発現を検討した。また行動解析は、情動・認知系行動に焦点を合わせ、オープンフィールド試験、明暗往來試験、高架式十字迷路試験、恐怖条件付け試験、及びプレパルス驚愕抑制試験を組み合わせたバッテリー試験として実施した。

C. 研究結果

胎生期サリドマイド暴露雄マウスでは情動・認知行動に関する逸脱は認められなかったが、胎生期フタルルグルタミン暴露雄マウスでは、高架式十字迷路試験での柵無しアームでの滞在時間増加と、プレパルス驚愕反応抑制試験での驚愕反応抑制度の低下が明らかとなった。また胎生期フタルルグルタミン酸暴露雄マ

ウスでは、オープンフィールド試験での総移動量減少と、高架式十字迷路試験での柵無しアームでの滞在時間及びアーム選択回数の増加、また場所-連想記憶障害が確認できた。成熟期(生後 10 週齢)雄マウスへのサリドマイド、フタルルグルタミン、フタルルグルタミン酸の強制経口投与からはこうした行動異常(溶媒対象群の呈する行動様式からの逸脱)は認められなかった。

上記の行動異常を呈した胎生期暴露マウスについて、大脳皮質及び海馬における神経細胞軸索構成タンパクに対する抗体を用いた免疫組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した結果、神経細胞軸索突起の発達不全が確認された。神経細胞軸索構成タンパクのリン酸化修飾状態および界面活性剤に対する溶解性について解析を行った結果、暴露群マウスにおける神経細胞軸索構成タンパクの特性は対照群と大きく異なることが示された。

#### D. 考察

胎生期サリドマイド暴露はヒトの広汎性発達障害の一因とされているが、そのメカニズムは不明である。モデル動物作出の試みとして、妊娠ラットへのサリドマイド投与による産子解析が挙げられるが、大量投与による(800-1200mg/kg)ストレスホルモンによる影響が混交要因として指摘されている。今回、我々の投与量はいずれも 100mg/kg での使用と、若干高めではあるが、サリドマイド自体の胎生期暴露から得られた産子解析から行動異常が検出できなかったことから、上記の混交要因による影響は排除できたと半断できる。以上を踏まえた上でサリドマイドのヒト型代謝物質であるフタルルグルタミン、及び、その類似構造を持つフタルルグルタミン酸のマウスへの経胎盤暴露の結果、成熟期に情動・認知行動の逸脱を認めたことは、外因性のグルタミン酸シグナルかく乱が、行動異常を伴う発達障害の起点となり得ることを示すものと考えられる。

#### E. 結論

(1)サリドマイドのヒト型代謝物質であるフタルルグルタミン、及び、その類似構造を持つフタルルグルタミン酸の経胎盤暴露は大脳皮質及び海馬に、神経細胞突起走行異常、髄鞘形成不全を主体とする脳構造形成不全を引き起こす。

(2)フタルルグルタミン、フタルルグルタミン酸の経胎盤暴露は上記の脳構造形成不全を原因として矛盾しない情動・認知行動異常を遅発性の中枢神経毒性として引き起こす。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamada M, Tanemura K, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Mizuno H, Ozawa M, Ohyama-Goto R, Kitamura N, Kawano M, Tan-Takeuchi K, Ohtsuka C, Miyawaki A, Takashima A, Ogawa M, Toyama Y, Okano H, Kondo T. Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. *Stem Cells*. (2007). 25(3):562-570.

Tanemura K, Chui DH, Fukuda T, Murayama M, Park JM, Akagi T, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Kimura T, Hashikawa T, Nakano Y, Kudo T, Takeda M, Takashima A. Formation of tau inclusions in knock-in mice with familial Alzheimer disease (FAD) mutation of presenilin 1 (PS1). *J Biol Chem*. (2006). 281(8):5037-5041.

Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M, Nakatomi R, Yamada K, Kondo T, Ogawa M, Obata K, Watanabe M, Hashikawa T, Tanaka K. Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2006). 103(32):12161-12166. Araya R, Noguchi T, Yuhki M, Kitamura N, Higuchi M, Saïdo

TC, Seki K, Itohara S, Kawano M, Tanemura K, Takashima A, Yamada K, Kondoh Y, Karno I, Wess J, Yamada M. Loss of M(5) muscarinic acetylcholine receptors leads to cerebrovascular and neuronal abnormalities and cognitive deficits in mice. *Neurobiol Dis.* (2006).24(2): 334-344.

2. 実用新案登録  
なし  
3. その他  
なし

## 2. 学会発表

アセフェート暴露によるマウス神経行動毒性の発現機構の Percellome 解析

種村健太郎、五十嵐勝秀、中津則之、  
相崎健一、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純  
(2007年6月、日本トキシコロジー学会)

エストロゲン受容体( $\alpha$ 型)非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳高次機能解析

種村健太郎、五十嵐勝秀、北嶋聡、  
菅野純  
(2007年11月、日本繁殖生物学会)

アセフェート暴露によるマウス神経行動毒性とその発現機構の Percellome 解析

種村健太郎、五十嵐勝秀、中津則之、  
相崎健一、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純  
(2007年12月、日本分子生物学会)

授乳期マウスへのドーモイ酸暴露による遅発性神経行動毒性発現のメカニズム解析

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、  
北嶋聡、菅野純  
(2008年3月、日本獣医学会)

## G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
なし