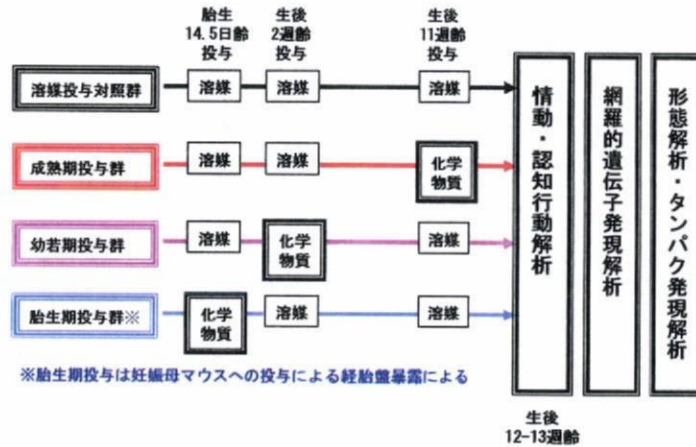


【方法】

トリアゾラム：1mg/kg（溶媒 0.5%メチルセルロース溶液）を強制経口投与
成人の一日の最大容量の100倍



090309第2回神経行動毒性班会議

行動解析

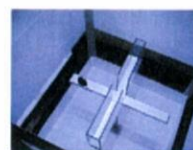
情動行動 状況に対応して急激に生じる行動変化



オープンフィールド試験



明暗往来試験



高架式十字迷路試験

認知行動-学習記憶

経験によって蓄積された意識の再生



条件付け学習記憶試験

認知行動-情報処理

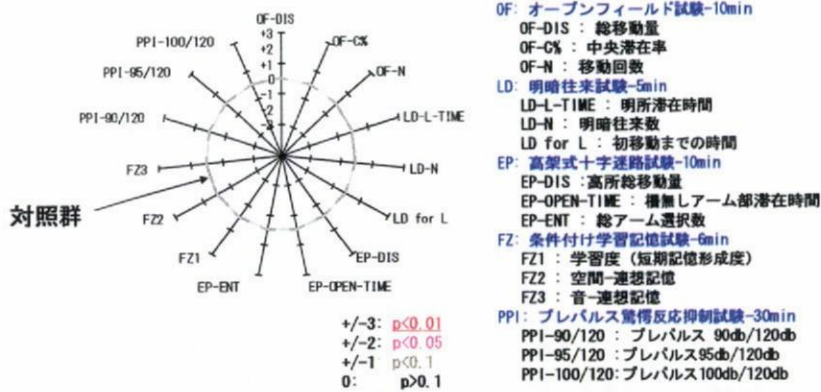
情報の受理・整理・対応



プレパルス驚愕反応抑制試験

090309第2回神経行動毒性班会議

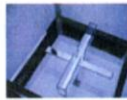
【行動の逸脱レベルを示すレーダー図】



オープンフィールド試験



明暗往来試験



高架式十字迷路試験



条件付け学習記憶試験



プレパルス驚愕反応抑制試験

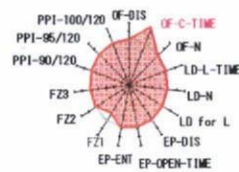
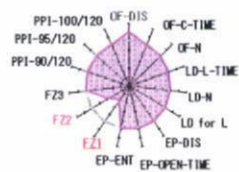
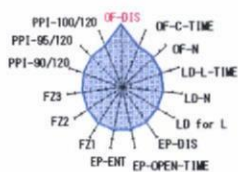
090309第2回神経行動毒性班会議

トリアゾラム投与時期による行動逸脱レベルの比較

トリアゾラム胎生期投与
(n=8)

トリアゾラム幼若期投与
(n=8)

トリアゾラム成熟期投与
(n=8)



OF-DIS : 総移動量
 OF-C-TIME : 中央部滞在時間
 OF-N : 総移動回数

LD-L-TIME : 明所滞在時間
 LD-N : 総移動数
 LD for L : 初移動滞在時間

EP-DIS : 総移動量
 EP-OPEN-TIME : 開放部滞在時間
 EP-ENT : 総アーム選択数

FZ1 : 条件付け (短期記憶形成度)
 FZ2 : 場所-連想記憶度
 FZ3 : 音-連想記憶度

PPI-90/120 : プレパルス90db/ 120db驚愕反応抑制
 PPI-95/120 : プレパルス95db/ 120db驚愕反応抑制
 PPI-100/120: プレパルス100db/ 120db驚愕反応抑制

+/-3: $p < 0.01$
 +/-2: $p < 0.05$
 +/-1: $p < 0.1$
 0: $p > 0.1$

090309第2回神経行動毒性班会議

【遺伝子発現解析】



Percellome 法：サンプルのDNA濃度を精密に計測し、
添加した外部標準mRNA（スパイクRNA）の測定値を基準として、
サンプルの測定値を細胞1個当たりのmRNA発現コピー数に
換算することでmRNA発現絶対量を得ることができる。



Molecular Anatomy by Percellome

化学物質による遅発中枢影響について
分子レベルで見落としなく解析することができる。

090309第2回神経行動毒性班会議

Molecular Anatomy by Percellome

解析部位：海馬

発現コピー数：>1

有意差：P<0.01

トリアゾラム
胎生期投与 (n=4)

トリアゾラム
幼若期投与 (n=4)

トリアゾラム
成熟期投与 (n=4)

636
probes

1,683
probes

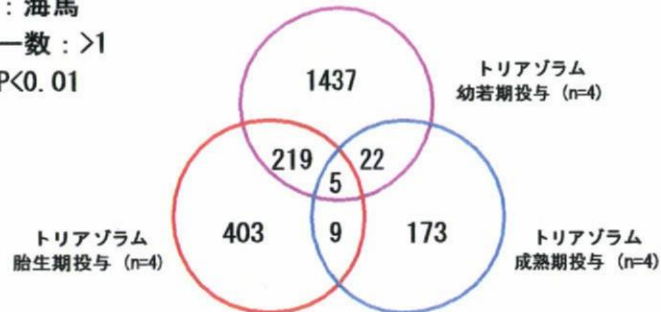
209
probes

幼若期トリアゾラム投与は
海馬の遺伝子発現様式に大きく影響を与える。

090309第2回神経行動毒性班会議

Molecular Anatomy by Percellome

解析部位：海馬
 発現コピー数：>1
 有意差：P<0.01

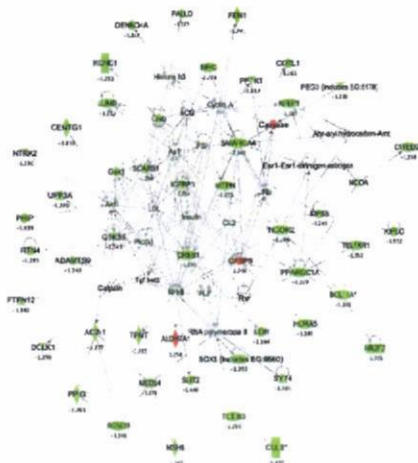


**トリアゾラム投与時期によって
 遺伝子発現様式は大きく異なる。**

発生-発達期におけるトリアゾラム投与の結果、海馬に不可逆的な異常が生じ、それが固定された（異常脳が出来上がった）まま成長したことを分子レベルで証明した。

090309第2回神経行動毒性班会議

Percellome法により抽出された (p<0.01, ratio>1.2) 遺伝子を Ingenuity Pathway Analysisに投入しパスウェイを作成した。

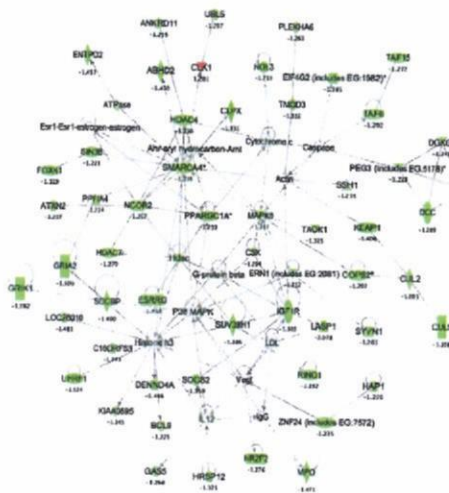


トリアゾラム
 胎生期投与
 (n=4)

遺伝子発現誘導：5
 遺伝子発現抑制：185

090309第2回神経行動毒性班会議

Percellome法により抽出された ($p < 0.01$, $\text{ratio} > 1.2$) 遺伝子を Ingenuity Pathway Analysis に投入しパスウェイを作成した。

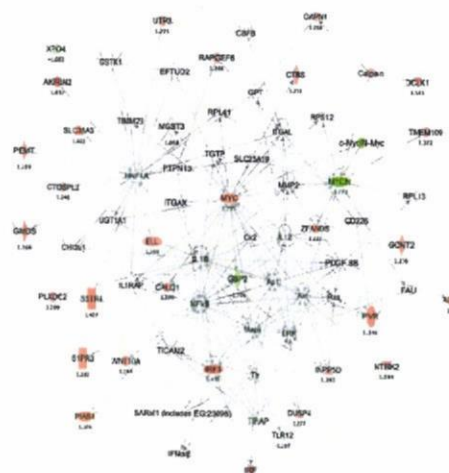


トリアゾラム
幼若期投与
(n=4)

遺伝子発現誘導 : 4
遺伝子発現抑制 : 470

090309第2回神経行動毒性班会議

Percellome法により抽出された ($p < 0.01$, $\text{ratio} > 1.2$) 遺伝子を Ingenuity Pathway Analysis に投入しパスウェイを作成した。

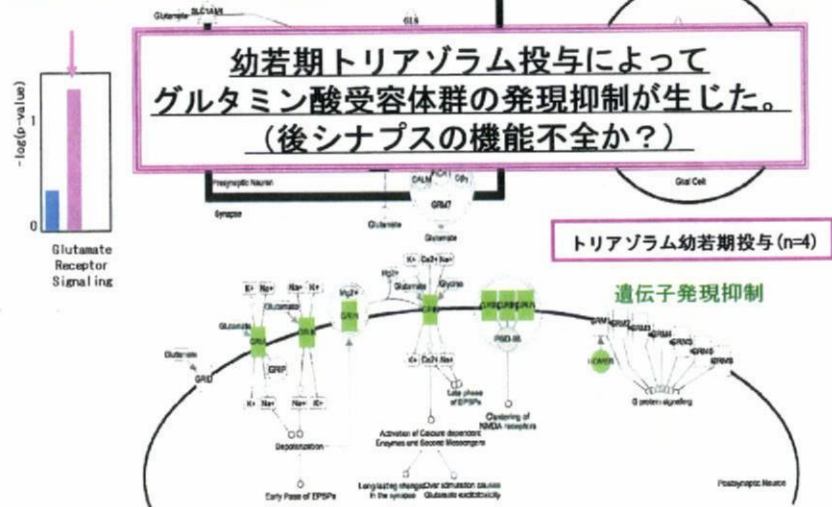


トリアゾラム
成熟期投与
(n=4)

遺伝子発現誘導 : 56
遺伝子発現抑制 : 11

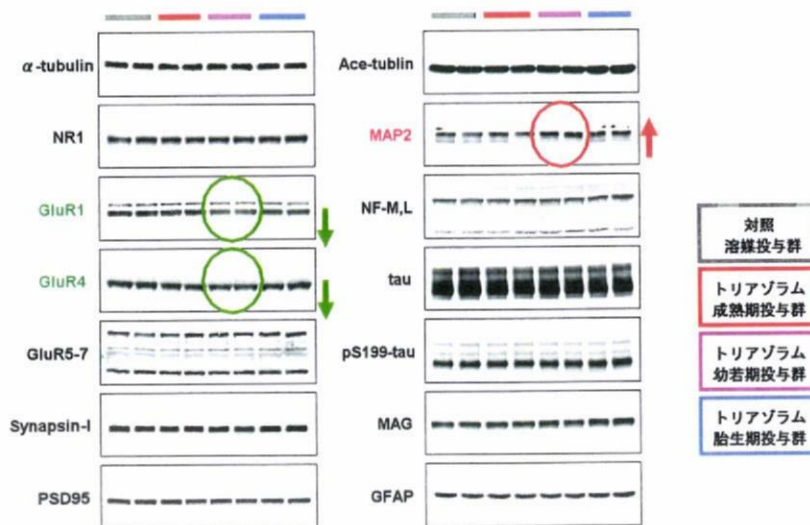
090309第2回神経行動毒性班会議

Percellome法により抽出された ($p < 0.01$, ratio > 1.2) 遺伝子の既知シグナルパスウェイへの関与についてIngenuity Pathway Analysisにて解析した。



090309第2回神経行動毒性班会議

ウェスタンブロットによるタンパク発現解析



090309第2回神経行動毒性班会議

【結果】

幼若期にトリアゾラム単回強制経口投与したマウスは

- ① 成熟後に学習記憶障害が認められた。
- ② 学習記憶障害時の海馬を用いた網羅的遺伝子発現解析から神経機能不全に対応する遺伝子発現様式が示された。
- ③ 海馬（CA1）に神経細胞突起の異常像が認められた。

090309第2回神経行動毒性班会議

【結論】

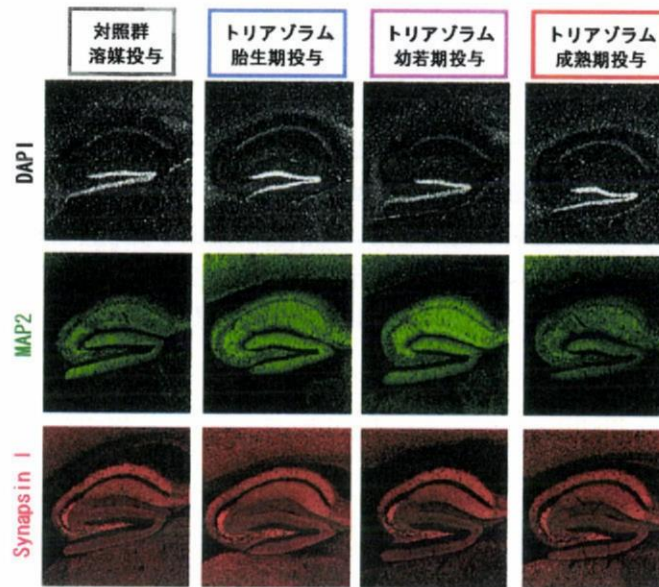
本研究結果から、

幼若期個体へのトリアゾラム投与の危険性が示唆された。

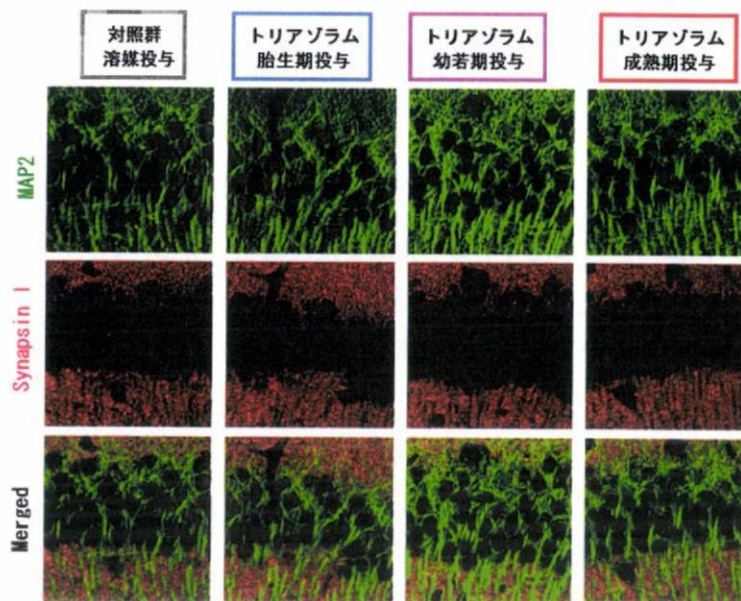
よって、国内においては「小児への安全性は確立されていない」とされているが、小児期の睡眠障害に対する治療薬の処方については、より慎重な対応が必要と考えられた。

090309第2回神経行動毒性班会議

【形態解析】



090309第2回神経行動毒性班会議



090309第2回神経行動毒性班会議

神経幹細胞分化様式かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明に関する研究

研究分担者 中島 欽一

奈良先端科学技術大学院大学 教授

【研究要旨】

本年度の研究では、マウスを胎仔期にバルプロ酸に暴露し、神経幹細胞分化と脳形態形成への影響を検討した。その結果バルプロ酸は胎仔期では神経幹細胞の増殖を阻害すると共にニューロンへの分化を促進することがわかった。またこれらのマウス脳を生後に観察するとその大きさが対照群と比べて小さいこともわかった。

A. 研究目的

脳・神経系は主要な3つの細胞種、ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトによって構成されるが、これらは共通の神経幹細胞から産生され、互いに密接に連携しながら高度な情報処理機能を発揮する。そのためには胎児期から成体における神経幹細胞から各種細胞への分化・成熟が時空間的に精妙に制御される必要がある。これが破綻した場合、これまでも重度な神経疾患や機能障害に至ることが数多く示されているがその原因の詳細については不明な点が多い。そこで本研究では神経幹細胞分化制御に影響を及ぼす可能性が考えられる化学物質のいくつかに焦点を絞り、その分子基盤と遅発性中枢毒性発現機序の解明を目指す。

B. 研究方法

大脳皮質は発生過程でインサイドアウトの様式でI-VI層の構造が形成される。早期に形成されるV,VI層のニューロンは皮質外の脊髄、脳橋、中脳、視床などへ投射し、後期に形成されるII,III層のニューロンは反側皮質へと投射し、IV層ニューロンは同側皮質内で局所的なネットワークを形成することが分かっている。ここでは胎生12.5-14.5日(300 mg/kg、1回/日、V-II層が形成される時期)に妊娠マウスへバルプロ酸を経口投与し、神経幹細胞分化と脳形態形成への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

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ったものである。

C. 研究結果

マウス胎生 12.5-14.5 日目において、神経幹細胞は脳室帯(VZ)と呼ばれる脳室に面した領域に存在し、細胞分裂を脳室表面で行っている。細胞周期M期の細胞は、抗リン酸化ヒストン H3 抗体により染色されるが、この細胞がバルプロ酸処理によって減少する、つまり細胞増殖が抑制される事がわかった。それに伴い、ニューロンへの分化は促進されることが判明した。また、最終投与終了一日後(胎生 15.5 日目)の脳はバルプロ酸の処理によってサイズが大きくなっているものの、生後 7 日目の脳は逆に若干小さくなる事が分かった。

D. 考察

今回、以前の *in vitro* の研究で見られたバルプロ酸の神経幹細胞の増殖抑制とニューロン分化促進という効果が胎仔期マウス脳でも見られることが明らかとなった。胎生 15.5 日目の脳サイズの増大は、この時期産生されるニューロン数が増大したためであると考えられる。さらに生後 7 日目の脳サイズの減少の原因としては、以下の2つの可能性が考えられる。1) 神経幹細胞からニューロンへの分化が促進された結果、その後の神経幹細胞数が減少してしまった、2) 神経幹細胞自身の増殖が抑制されてしまった。このような理由で、その後産生されるべき細胞が十分に供給出来なかったため、脳サイズの減少が見られたのではないかと考えられる。

E. 結論

以上のようにバルプロ酸は胎仔脳内において、神経幹細胞分化と脳形態形成に影響を及ぼすことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

該当なし

2) 雑誌

Namihira M., Kohyama J., Semi K., Sanosaka T., Deneen B., Taga T., Nakashima K. Committed Neuronal Precursors Confer Astrocytic Potential on Residual Neural Precursor Cells. *Dev Cell* 16, 245-255 (2009).

Ochiai W., Nakatani S., Takahara T., Kainuma M., Masaoka M., Minobe S., Namihira M., Nakashima K., Sakakibara A., Ogawa M., Miyata T. Periventricular notch activation and asymmetric Ngn2 and Tbr2 expression in pair-generated neocortical daughter cells. *Mol Cell Neurosci* 40, 225-233 (2009).

Kohyama J., Kojima T., Takatsuka E., Yamashita T., Namiki J., Hsieh J., Gage F.H., Namihira M., Okano H., Sawamoto K.,

Nakashima K. Epigenetic regulation of neural cell differentiation plasticity in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 18012-18017 (2008).

Sanosaka T., Namihira M., Asano H., Kohyama J., Aisaki K., Igarashi K., Kanno J., Nakashima K. Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells. *Neuroscience* 155, 780-788 (2008).

Namihira M., Kohyama J., Abematsu M., Nakashima K. Epigenetic mechanisms regulating fate specification of neural stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 2099-2109 (2008).

Hatada I., Namihira M., Morita S., Kimura M., Horii T., Nakashima K. Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation. *PLoS ONE* 3, e3189 (2008).

2. 学会発表

(国内学会)

中島欽一[○]: 神経幹細胞制御における抗てんかん薬パルプロ酸の影響とその応用。第5回宮崎サイエンスキャンプ フェニックス・シーガイア・リゾート ワールドコンベンションセンターサミット、2009年2月20日-22日

Kinichi, Nakashima [○] : Epigenetic Mechanisms regulation Neural Cell Differentiation and Plasticity. THE 23rd NAITO CONFERENCE ON Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells III. 湘南国際村センター、2008年11月11-14日。

中島欽一[○]、あべ松昌彦: 神経幹細胞分化・増殖制御におけるパルプロ酸の作用。第5回 NEFRE、フェニックス・シーガイア・リゾート ワールドコンベンションセンターサミット、2008年9月19-20日。

神山淳、高塚絵理子、佐野坂司、徳永暁憲、岡野栄之、中島欽一[○]: REST/NRSF を介した骨形成因 BMP による新規ニューロン分化抑制機構。第51回日本神経化学会大会、富山国際会議場、2008年9月11-13日。

あべ松昌彦、Hsieh, J., Gage F.H., 河野憲二、中島欽一[○]: 神経幹細胞分化・増殖制御におけるパルプロ酸の影響。第35回トキシコロジー学会、国立オリンピック記念青少年総合センター、2008年6月26日-28日。

中谷彩矢和、落合和、高原大志、貝沼雅彦、正岡実、波平昌一、中島欽一、小川正晴、宮田卓樹：“生まれたて”娘細胞クローンに置ける非対称な Ngn2-Tbr2カスケード起動。Neuroscience2008、東京国際フォーラム、2008年6月9-11日

辻村啓太[○]、あべ松昌彦、神山淳、波平昌一、中島欽一：MeCP2による神経細胞分化制御機構の解析と中枢神経系再生医療への応用。Neuroscience2008、東京国際フォーラム、2008年6月9-11日

中島欽一[○]、神山淳、波平昌一、Gage F.H、岡野栄之、澤本知延：神経系細胞分化を制御するエピジェネティクス機構。第50回日本小児神経学会総会、ホテル日航東京、2008年5月28-31日

辻村啓太[○]、瀬戸口廣貴、あべ松昌彦、神山淳、波平昌一、中島欽一：メチル化 DNA 結合タンパク質 MeCP2によるニューロン分化誘導機構の解明と中枢神経系再生医療応用への検討。第6回幹細胞シンポジウム、学術総合センター、2008年5月16-17日

(国際学会)

Nakashima K.[○] : Epigenetic regulation of neural stem cells and its therapeutic application. KRIBB-KU-NAIST joint Symposium, Seoul, February 26-28, 2009

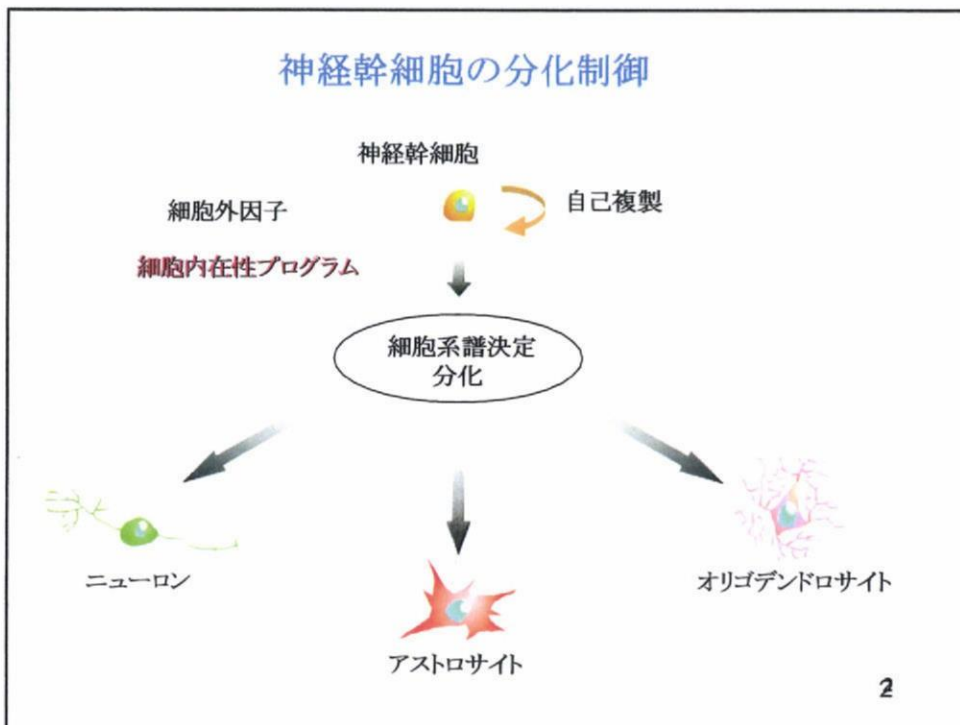
Nakashima. K.[○]: Epigenetic regulations for neural cell differentiation and plasticity. NAIST-Medicon Valley-Lund university seminar. Lund, December 17, 2008

Nakashima, K. [○] : Differentiating neurons confer astrocyte potential on neural precursor cells through Notch-signal mediated DNA demethylation during mouse brain development. International Joint Symposium Frontier In Biomedical Science : From Genes to Applications. Faculty of Medicine, Gadjah Mada University. Yogyakarta. November 24-25, 2008

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

神経幹細胞の分化制御



エピジェネティクス

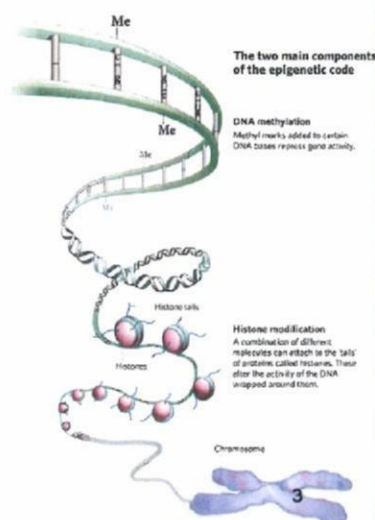
DNAの配列には変化を起こさないで遺伝子の機能を調節する仕組み。

- 哺乳類X染色体不活性化
- ゲノムインプリンティング
- 細胞・組織特異的遺伝子発現
- 癌化

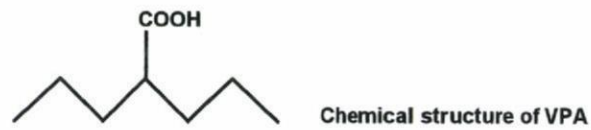
クロマチン修飾

以下のようなものを含む

- DNAメチル化
- ヒストン修飾
 - アセチル化, リン酸化,
 - メチル化, ユビキチン化



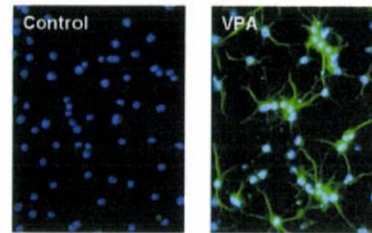
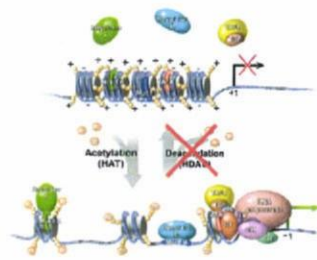
バルプロ酸 (VPA, 2-propylpentanoic acid)



- てんかん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

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (VPA) は神経幹細胞のニューロンへの分化を促進する



Dapi MAP2ab

5

バルプロ酸の作用は良いものばかりではない

バルプロ酸の副作用

- 消化器症状、肝機能異常、動作時振戦、失調、眠気・鎮静、体重増加(20%)、脱毛(4%)

バルプロ酸の催奇形性

- 神経管欠損(1-2%)、二分脊椎、心室中隔欠損等の心奇形、多指症、口蓋裂等外表奇形、特有の顔貌(前頭部突出、両眼離開、鼻根扁平、浅く長い人中溝、薄い口唇等)

バルプロ酸と行動異常

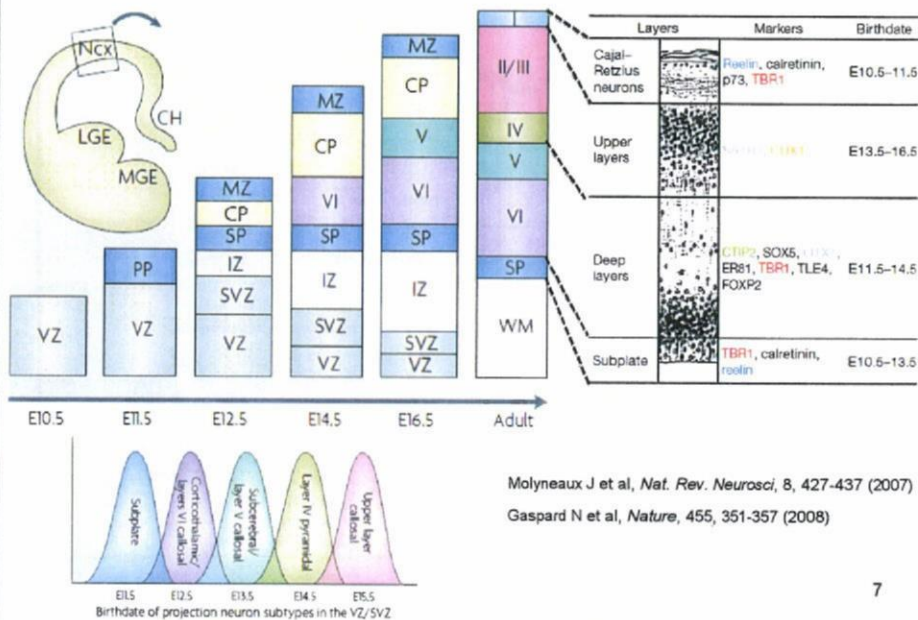
- 妊娠中にバルプロ酸を服用した母から生まれた子供の中に自閉症を発症する確立が高い。
- 妊娠中バルプロ酸曝露によるその他の行動異常(種村)



神経幹細胞の分化制御かく乱の観点から解析

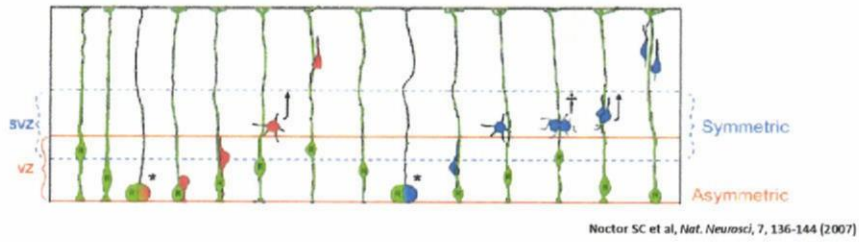
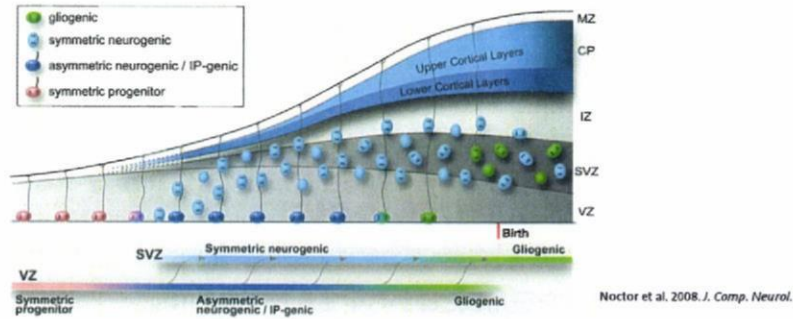
6

Inside-out様式で形成される脳層構造



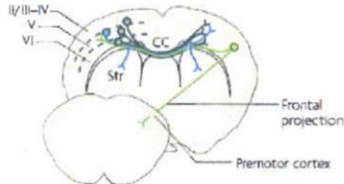
7

Distribution and mode of neural stem and progenitor cell divisions



各層に特異的な投射様式

a Commissural: callosal projection neurons



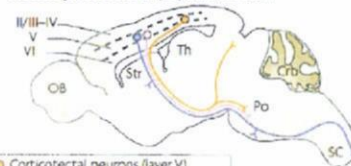
- Callosal neurons (layers II/III, V, VI)
- Callosal neurons with ipsilateral frontal projections (layer V)
- Callosal neurons with striatal projections (layer Va)

b Corticofugal: corticothalamic neurons



- Corticothalamic neurons (layer V)

c Corticofugal: subcerebral projection neurons

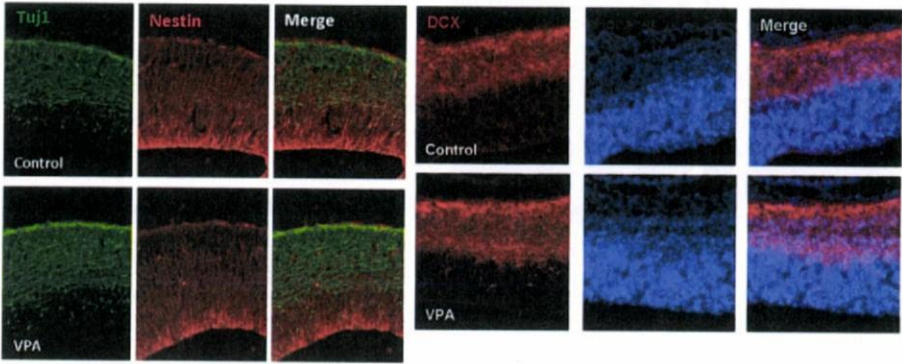


- Corticotectal neurons (layer V)
- Corticopontine neurons (layer V)
- Corticospinal motor neurons (layer V)

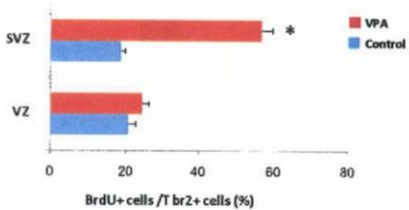
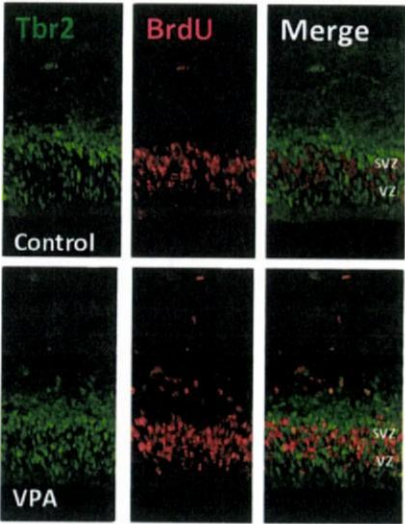
Molyneux J et al, *Nat. Rev. Neurosci*, 8, 427-437 (2007)

9

VPA enhances neurogenesis

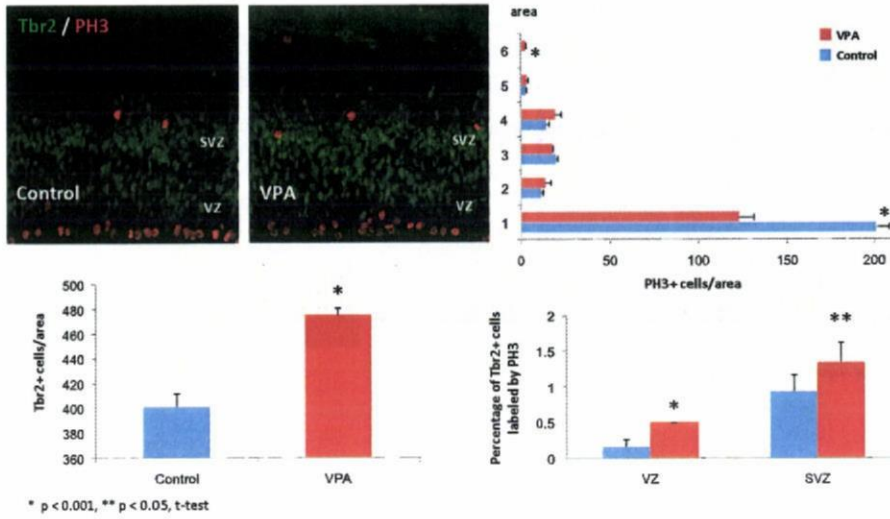


VPA increased number of IPC in S-phase at E15 SVZ

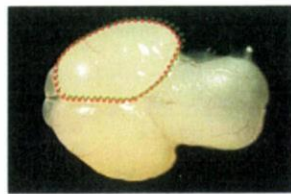


* p < 0.05, t-test

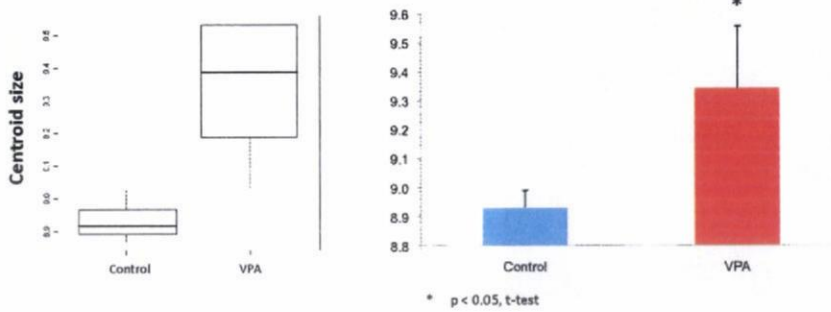
VPA reduced mitosis at apical VZ (likely radial glial cell), while increasing IPC and its mitosis



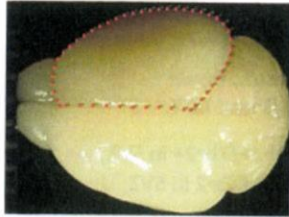
VPA increased forebrain size at E15



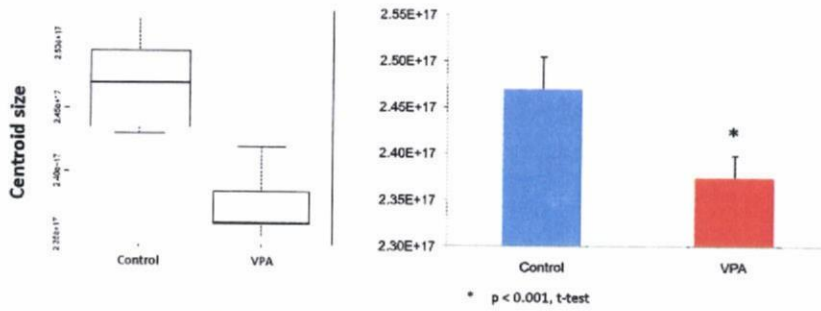
VPA, n=6
Control, n=9



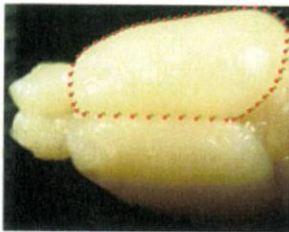
VPA reduced forebrain size at P7



VPA, n=8
Control, n=8



VPA reduced forebrain size at P56



VPA, n=2
Control, n=2

