

Result summary (tentative)

<E15>

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1. Unchanged cell cycle length | BrdU+/Ki67+; unchanged |
| 2. Promote neurogenesis | Nestin; Down
Tuj1 and DCX; Up |
| 3. Promote RGCs → IPCs | BrdU+/Tbr2+ in SVZ; Up
PH3+/Tbr2 in SVZ; Up |
| 4. Reduce RGCs | PH3+ in VZ surface; Down |
| 5. Increase brain size | |

<P7>

- | | |
|------------------------|--|
| 1. Increase GFAP+ NPCs | GFAP+/Nestin+/Sox2+; Up
GFAP+/Nestin+ processes; Up |
| 2. Decrease astrocytes | GFAP+/S100β+; Down |
| 3. Decrease brain size | |

<P56>

- | | |
|------------------------|--|
| 1. Decrease brain size | |
|------------------------|--|

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

中枢作動性物質による遅発性の情動・認知毒性発現の分子メカニズムの解明

研究代表者 北嶋 聡

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 室長

【研究要旨】

化学物質による遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤を明らかにすることを目的として、モデル中枢作動性物質としてバルプロ酸ナトリウム(VPA)を選択し、「成熟期」・「幼若期」・「胎生期」暴露時の情動・認知行動解析ならびに「成熟期」暴露時の網羅的遺伝子発現変動解析を比較検討した結果、1) VPAの急性毒性は、成熟期よりも幼若期の方が強く誘発されること、2) VPAの胎生期、幼若期、成熟期投与群共に、顕著な情動・認知障害が認められないこと、3) 成熟期投与における海馬ではアポトーシス関連遺伝子の発現上昇が認められること、が明らかとなった。したがって、成熟期におけるVPA単回投与時、情動・認知障害という毒性発現が認められなくとも、潜在的に、海馬におけるアポトーシスが誘発される可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究班では、化学物質の中枢神経系に対する遅発性の影響を科学的に明らかにし、特に子どもの特性に配慮した毒性評価法を確立することを目的とする。この確立を通して、今までに評価法が定まらず看過されてきた化学物質も含めた「遅発性」・「中枢性」神経毒性の同定と、高感受性集団としての子どもの反応特性を解明する。その際、胎児期～小児期暴露と成熟期暴露との毒性の差異について、脳の発生、発達及び成熟との関係をも明らかにする。

「本分担研究の目的」は、モデル中枢作動性物質を用いて「成熟期」暴露時の情動・認知行動解析、先端的な形態機能解析ならびに網羅的遺伝子発現変動解析を検討し、他の分担研究である「胎生・幼若期暴露」時の解析結果と比較しつつ、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤を明らかにすることである。今年度は、モデル中枢作動性物質として、抗てんかん薬として繁用されている医薬品であるバルプロ酸ナトリウム(VPA)を選択した。VPAの臨床用量は、1日400～1,200mg(経口)であり、また文献上の半数致死量(マウス、経口)は977mg/kgである。

VPA を選択した主な理由は、実際にアミノ酸系神経伝達物質受容体に作用し、発達期の情動・認知障害を引き起す可能性が示唆されるためであるが、具体的には以下の通りである。1) GABA(γ -アミノ酪酸)トランスアミナーゼ阻害によりシナプスにおける GABA 量の増加作用を有し、したがって実際に神経伝達物質受容体を活性化すること、2) 分子メカニズムが不明であるが自閉症 (Autism) 誘発作用を有する可能性が示唆されていること、3) 分子メカニズムが不明であるが二分脊椎など催奇形性作用を有し、発生期の神経系に作用することが知られていること、4) すでに当毒性部において、成熟期マウスに VPA を単回投与した際の肝における遺伝子発現データベースを有しており用量設定などの条件検討を含む参照データが豊富にあること、以上である。なお VPA はこの他、ペルオキシゾーム増殖作用(PPAR α 受容体の活性化)、弱いヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害作用、iPS 細胞作製時のリプログラム効率増加作用(c-Myc の代替)についての報告がある。

B. 研究方法

C57BL/6CrSlc マウス(日本エスエルシー)を実験に用いた(プラグが確認された日を胎生 0.5 日とした)。

VPA (Sigma)の投与経路は経口投与、投与容量は 10 (ml/kgBW)、溶媒は 0.5%メチルセルロース(WAKO)とし用事調整にて投与溶液を作製した。投与時期は、本プロジェクトに則したかたちで、以下の 3 種、すなわち妊娠 14.5

日(胎生期投与)、生後 2 週齢雄性マウス(幼若期投与)、生後 11 週齢雄性マウス(成熟期投与)とした。胎生期投与は妊娠マウスへの経胎盤暴露であり、胎児は胎生 14.5 日で暴露されることとなる。

VPA の用量設定は、先ず各群 3 匹の雄性成熟期マウスに各種濃度(0, 30, 50, 100, 200, 300, 500 mg/kgBW)の VPA を単回経口投与し、一般状態の観察および投与 24 時間後の剖検による肉眼的所見を指標に設定した。死亡例は認められず、100 mg/kg 以上の投与群で投与約 30 分後までよろめき歩行、その後投与約 2 時間後まで傾眠が認められたが、投与 3 時間後にはどの群でも回復した。300 mg/kg 以上の投与群で腎の白色化が認められた。投与 3 時間後には一般状態の変化が回復したことから、VPA の最高用量として 500 mg/kg を選択した。

ところが、幼若期マウスに 500 mg/kg VPA を経口投与したところ、けいれんが認められ 6 時間以内に 8 匹中 4 匹が死亡し、生存例も体温低下が認められ 30 時間後には全例死亡した。

以上の予備実験の結果より、VPA の最高用量を、成熟期投与ならびに胎生期投与に際しては 500 mg/kg、幼若期投与ではこのおよそ 1/3 量である 150 mg/kg とした。情動・認知行動解析では、この幼若期投与の比較対照のため、150 mg/kg VPA を成熟期に投与した群も設けた。いずれの場合でも溶媒対照群として、0.5%メチルセルロース液を投与した群を設けた。

情動・認知行動解析は、生後 12-13 週齢時に、各群 8 匹について、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を組み合わせた情動-認知行動バッテリー解析を行った。

遺伝子発現変動解析は、先ず成熟期投与群のマウスについて、VPA (0,50,100,500 mg/kg)を単回経口投与し、経時的(投与2,4,8,24 時間後)得られた海馬の RNA サンプルを用い、マイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて検討した。遺伝子発現変動を、我々が開発した「Rsort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトは、各遺伝子(probe set: ps)につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした 3 次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全ての ps を生物学的に有意な順に並び替えるソフトである。また、シグナルパスウェイの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

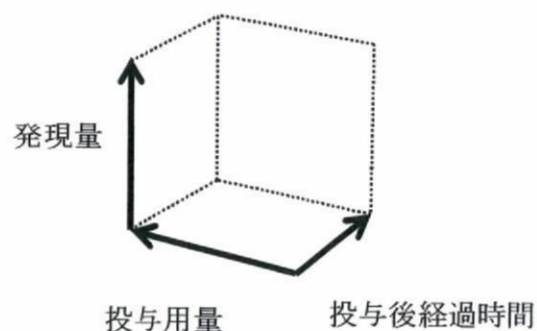
動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程(平成 19 年 4 月版)」。

C. 研究結果

情動・認知行動解析の結果、溶媒対照群と比較し、150 mg/kg VPA の幼若期ならびに成熟期投与群共に有意な変化は認められず、

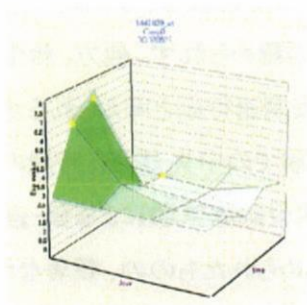
行動異常は認められなかった。500 mg/kg VPA の胎生期投与群ならびに成熟期投与群では、溶媒対照群と比較し、成熟期投与群では有意な変化が認められず、他方、胎生期投与群では、不安関連行動と考えられるオープンフィールド試験での中央部滞在時間の増加と、条件付け学習記憶試験による音-連想記憶能低下が認められたものの、顕著な情動・認知障害は認められなかった。

成熟期投与群での遺伝子発現変動解析では、発現が、有意(t 検定での P 値<0.05)に増加するものとして 1,636 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 560 ps が見いだされた。IPA による検討の結果、シグナルパスウェイとして、apoptosis signaling が抽出され、アポトーシスに関連する遺伝子、例えば Caspase 3、Caspase 9 や Bid など (いずれも投与 2 および 4 時間後)の発現上昇が認められた。また、GABA の作用に関係するクロライドチャンネル(Clcn 2)遺伝子の発現上昇が認められた。この代表的な遺伝子の変動を図 1 に示す。図はすべて下記のように濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量について標準偏差平面とともに 3 次元グラフとして示す。



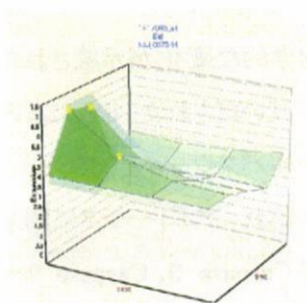
A) Casp3 遺伝子

[caspase 3]



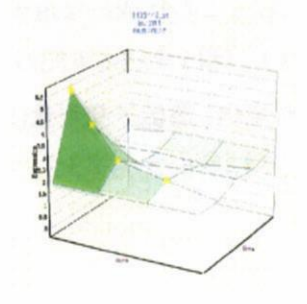
B) Bid 遺伝子

[BH3 interacting domain death agonist]



C) Bcl2l11 遺伝子

[BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)]



D) Clcn2 遺伝子

[chloride channel 2]

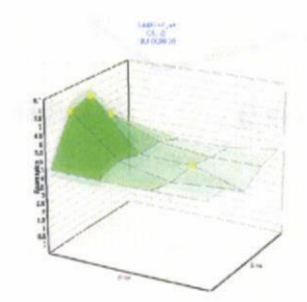


図 1 アポトーシスに関与する遺伝子(A-C)およびクロライドチャンネル遺伝子(D)の発現変動

D. 考察

以上の結果から、1) VPA の急性毒性は、成熟期よりも幼若期の方が強く誘発されること、2) 150 mg/kg VPA の幼若期投与群及び成熟期投与群、ならびに 500 mg/kg VPA の胎生期投与群及び成熟期投与群共に、顕著な行動異常が認められないこと、3) 成熟期投与における海馬での遺伝子発現変動解析の結果、アポトーシス関連遺伝子の発現上昇が認められること、以上が明らかとなった。したがって、成熟期における VPA 単回投与時、情動・認知障害という毒性発現が認められなくとも、潜在的に、海馬におけるアポトーシスが誘発される可能性が示唆され、反復投与により障害が顕在化する可能性が考えられた。

E. 結論

化学物質による遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤を明らかにすることを目的として、モデル中枢作動性物質として VPA を選択し、「成熟期」・「幼若期」・「胎生期」暴露時の情動・認知行動解析ならびに「成熟期」暴露時の網羅的遺伝子発現解析を比較検討した結果、1) VPA の急性毒性は、成熟期よりも幼若期の方が強く誘発されること、2) 150 mg/kg VPA の幼若期投与群及び成熟期投与群、ならびに 500 mg/kg VPA の胎生期投与群及び成熟期投与群共に、顕著な情動・認知障害が認めら

れないこと、3)成熟期投与における海馬での遺伝子発現変動解析の結果、アポトーシス関連遺伝子の発現上昇が認められること、以上が明らかとなった。今後は、胎生期ならびに幼若期投与における遺伝子発現変動解析ならびに先端的な形態機能解析をおこない、成熟期のものと比較検討し、加えて、VPA以外のモデル中枢作動性物質についても検討する。本研究を通して、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤を明らかにすることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小川幸男、関田清司
「第3節 トキシコゲノミクスの大規模高精度データベースの構築と解析」編集委員：野村護、堀井郁夫、吉田武美、「非臨床試験ーガイドラインへの対応と新しい試みー」株式会社 エル・アイ・シー、東京、2008年

2) 雑誌

Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S, Saga Y, Fukayama M, Sata M and Kudo, A, Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction

J Exp Med, 205: 295-303, 2008.

David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Muller-Hoecker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R and Franz WM, MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation via Dkk-1 mediated blockage of wnt-signalling. Nat Cell Biol, 10: 338-345, 2008.

Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J and Saga Y, Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of Mesp2.

Development 135: 3511-3519, 2008.

2. 学会発表

北嶋 聡、菅野 純

トキシコゲノミクスによる毒性評価法の高精細化 [第35回日本トキシコロジー学会学術年会] 2008年6月

北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、児玉 幸夫、高木 篤也、関田 清司、今井 清、

菅野 純

Percellome 手法を用いたフタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の腎に及ぼす遺伝子発現変動の比較 [第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2008 年 6 月

Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J and Saga Y

Functional importance and evolutionary conservation of Tbx6 binding sites in presomitic mesoderm (PSM) specific enhancer of Mesp2. [第 41 回日本発生生物学会] 2008 年 5 月

Takahashi Y, Kitajima S, Yasuhiko Y, Kanno J and Saga Y

Delta-like 3(Dll3) does not substitute for Delta-like 1 (Dll1) in somitogenesis in vivo but modulates Dll1/Notch signaling in the posterior PSM. [第 41 回日本発生生物学会] 2008 年 5 月

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純

発生期ドーモイ酸暴露によるマウス脳微細構造異常と情動-認知行動障害 [第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会]2008 年 6

月

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純

エストロゲン受容体 (α 型) ノックダウンマウスの神経行動解析 [第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会]2008 年 6 月

今井 清、坪井 優、向井 大輔、山下 龍、関田 清司、高木 篤也、北嶋 聡、菅野 純

フタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の比較毒性学的研究[第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2008 年 6 月

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

本分担研究の目的

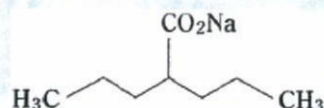
「成熟期」マウスにモデル中枢作動性物質を暴露した際の、経時的情動・認知行動解析、先端的な形態機能解析ならびに網羅的遺伝子発現解析を検討し、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤を明らかにすること



- ・本研究班の胎生・幼若期暴露時の解析結果との比較・検討
- ・従来の神経毒性評価手法を補う←成熟期動物の末梢神経系への急性影響を対象

モデル中枢作動性物質

バルプロ酸の選択理由



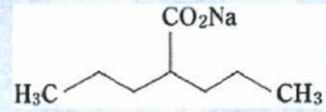
抗てんかん薬、抗躁薬(医薬品)

臨床用量: 1日 400~1,200mg(経口)→ 8~24 mg/kg

文献上の半数致死量(マウス、経口):977 mg/kg

- 1) アミノ酸系神経伝達物質受容体を活性化する:
GABA(γ-アミノ酪酸)トランスアミナーゼ阻害による、シナプスにおけるGABA量の増加作用
- 2) 発達期の神経系に作用する可能性がある:
自閉症(Autism)誘発作用を有する可能性が示唆されている。分子メカニズムは不明。
・指標: nociception, diminished prepulse inhibition, locomotor, social behavior (Schneider and Prezewlocki, Neuropsychopharmacology, 2005)
- 3) 発生期の神経系に作用する:
二分脊椎などの催奇形性作用がある。分子メカニズムは不明。
神経管の欠損(二分脊椎・無脳症)、外表奇形、心臓血管系奇形、口唇裂、口蓋裂、骨の奇形等
- 4) 当方に毒性学的参照データが比較的豊富にある:
すでに当毒性部において、成熟期マウスにバルプロ酸を単回強制経口投与した際の肝における遺伝子発現データベースを有する(用量設定などの条件検討を含む)。

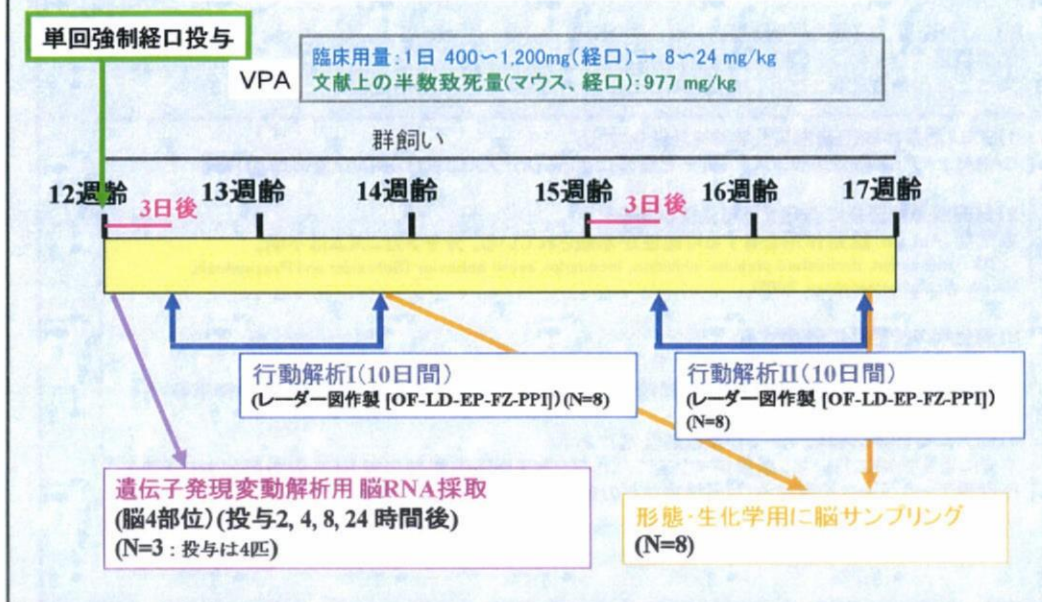
パルプロ酸のその他の特徴



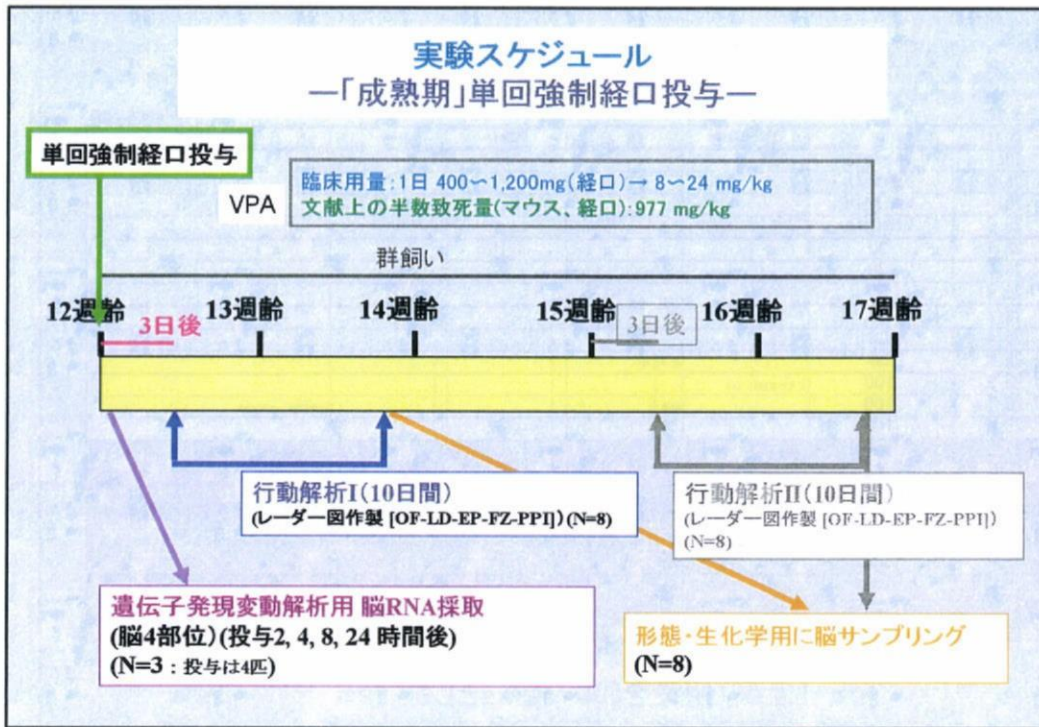
- ・ナトリウムチャンネルの阻害、電位依存性T型Caチャンネルの阻害
→ GABAトランスアミナーゼ阻害以外の作用
- ・ペルオキシゾーム増殖作用 (PPAR α 受容体の活性化)
- ・弱いヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害作用
- ・iPS細胞作製時のリプログラム効率増加作用(c-Mycの代替)

実験スケジュール

—「成熟期」単回強制経口投与—



実験スケジュール —「成熟期」単回強制経口投与—



バルプロ酸単回投与の用量設定(成熟期投与)

バルプロ酸単回投与の用量設定(成熟期投与)

バルプロ酸Na 単回投与24hr後解剖
投与前

Vehicle:0.5XMC

体重 (g)	Dose (mg/kg)	直後~30min	60min	120min	3~4hr	解剖所見
28.7	Vehicle					
26.0	Vehicle					
25.9	Vehicle					
25.3	Vehicle					
28.6	30					
26.1	30					
25.9	30					
28.2	50					
26.4	50	うずくまり				
25.8	50		毛づくろい			
28.2	100	よろめき歩行 (+)				
26.7	100		痙攣			左側腎臓：のう胞腎
25.6	100			痙攣~震てる		
28.0	200	四肢びみ				腎臓：色味濃濁、まだら
26.7	200		痙攣 (静止期)		歩行回復	
25.6	200		歩行		驚くひ、伸びが早い	
28.0	300	よろめき歩行 (+)				腎臓：ブナ紋様、白い(++)
27.2	300	よろめき歩行 (+)				腎臓：ブナ紋様、白い(+)
25.5	300	よろめき歩行 (++)	痙攣			腎臓：ブナ紋様、白い(+/-)
27.8	500	よろめき歩行 (+++)				腎臓：ブナ紋様、白い(++)
27.5	500	よろめき歩行 (+++~四肢)		痙攣~おこす		
25.4	500	よろめき歩行 (+++)	痙攣	よろめき歩行 (++)		腎臓：ブナ紋様、白い(+++)

→(最高)用量を500 mg/kgとした

バルプロ酸単回投与の用量設定(幼若期投与)

バルプロ酸単回投与の用量設定(幼若期投与)

幼若期マウスに500 mg/kg VPAを経口投与:

- けいれんが認められ、投与6時間以内に8匹中4匹が死亡
- この生存例も体温低下が認められ、投与30時間後には全例死亡



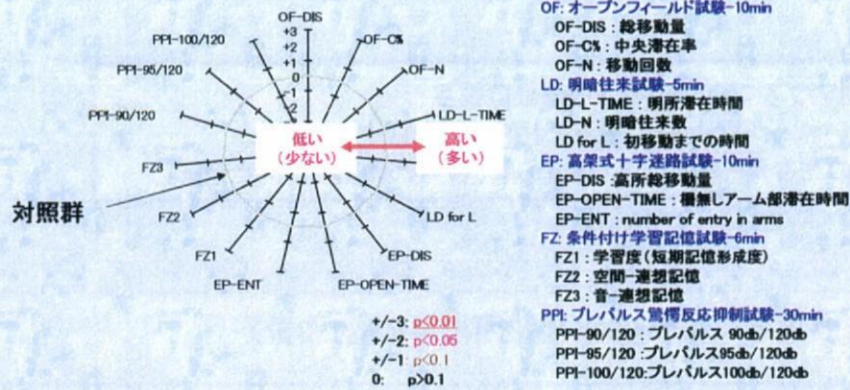
・幼若期投与: 150 mg/kg(成熟期投与の約1/3量)

・成熟期、胎生期投与: 500 mg/kg

→ 比較のため、成熟期でも150 mg/kg投与群を設けた

情動・認知行動解析

【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

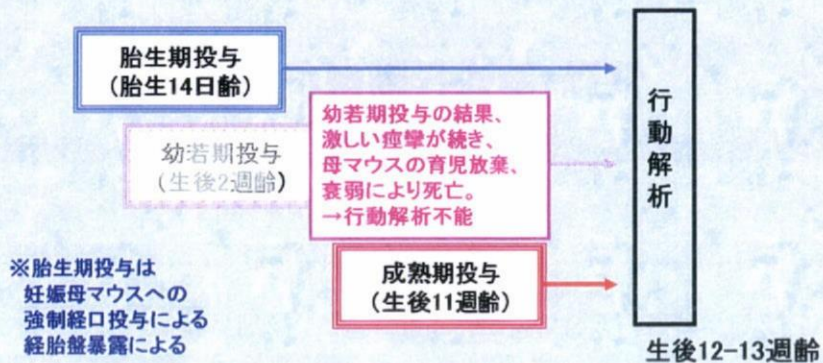


条件付け学習記憶試験



プレパルス覚醒反応抑制試験

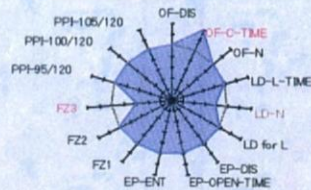
【500mg/kg VPA強制経口投与】単回



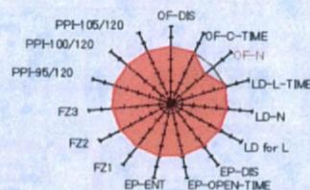
いずれの投与時期についても溶媒投与対照群に異常行動が無いことを確認しており、本解析については、成熟期における溶媒投与対照群をもって対照群とした。

バルプロ酸(500mg/kg) 投与時期による行動逸脱レベルの比較

バルプロ酸(500mg/kg)
胎生期投与(n=8)



バルプロ酸(500mg/kg)
成熟期投与(n=8)



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

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

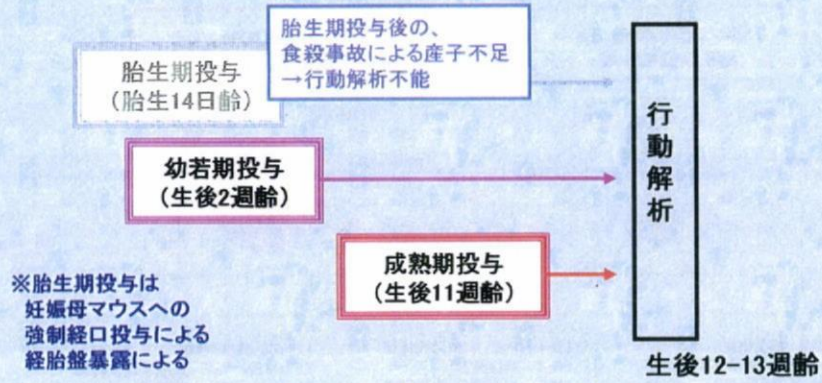
FZ1: 条件付け(短期記憶形成度)
FZ2: 場所-連想記憶度
FZ3: 音-連想記憶度

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

バルプロ酸(500mg/kg) 成熟期投与 胎生期投与

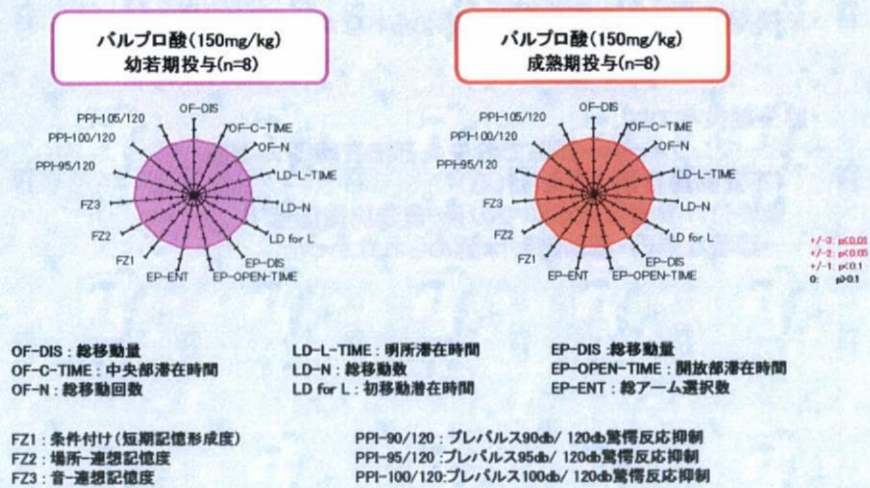
- ・成熟期投与では有意な変化が認められなかった
- ・胎生期投与では、
オープンフィールド試験での中央部滞在時間の増加
(不安関連行動と考えられる)
条件付け学習記憶試験での音-連想記憶能低下
→ 顕著な情動・認知障害は認められなかった

【150mg/kg VPA強制経口投与】単回



いずれの投与時期についても溶媒投与対照群に異常行動が無いことを確認しており、本解析については、成熟期における溶媒投与対照群をもって対照群とした。

バルプロ酸 (150mg/kg) 投与時期による行動逸脱レベルの比較



バルプロ酸 (500mg/kg)
成熟期投与 胎生期投与

- ・成熟期投与では有意な変化が認められなかった
- ・胎生期投与では、
オープンフィールド試験での中央部滞在時間の増加
(不安関連行動と考えられる)
条件付け学習記憶試験での音-連想記憶能低下
→顕著な情動・認知障害は認められなかった

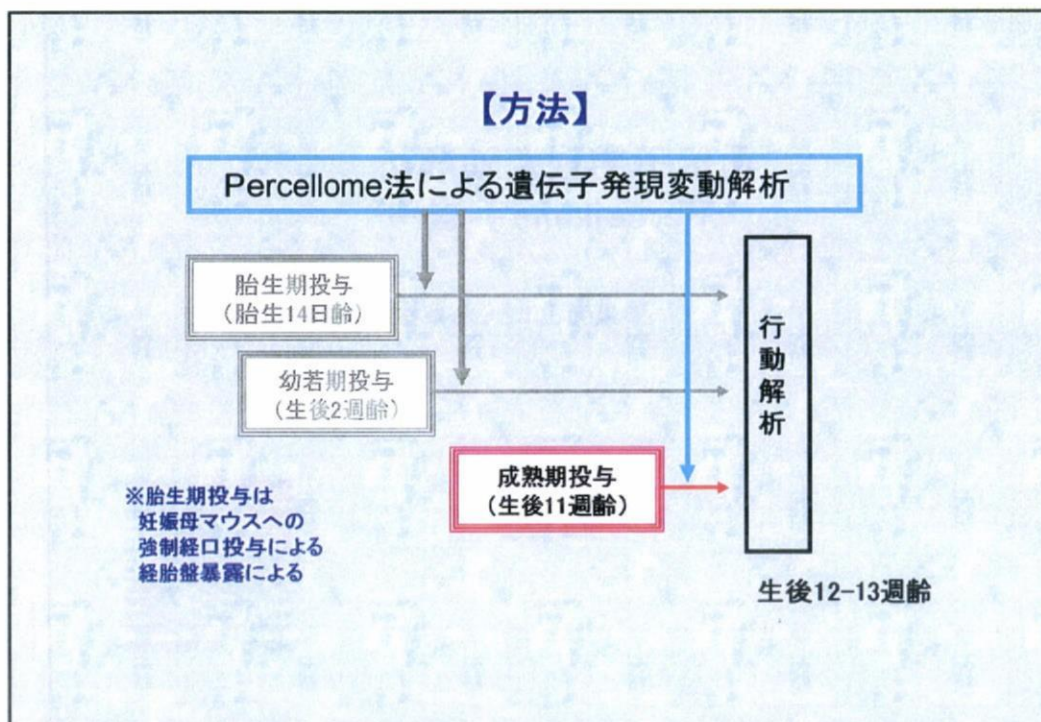
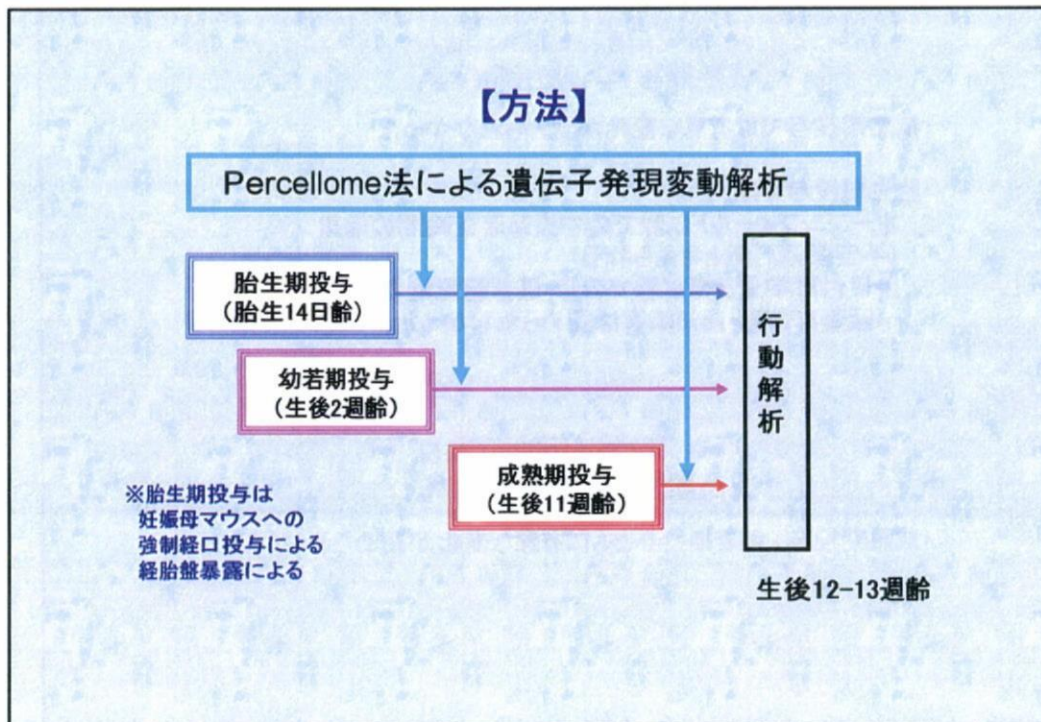
バルプロ酸 (150mg/kg)
成熟期投与 幼若期投与

- ・成熟期投与、幼若期投与ともに有意な変化が認められなかった

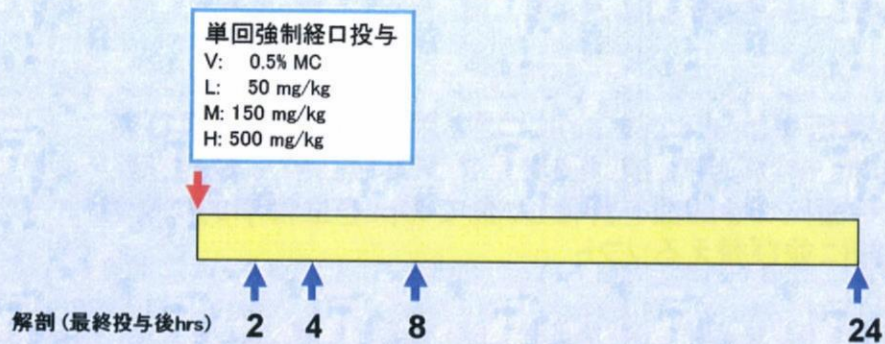
遺伝子発現変動解析
—Percellome手法—

形質発現にとられないアプローチ

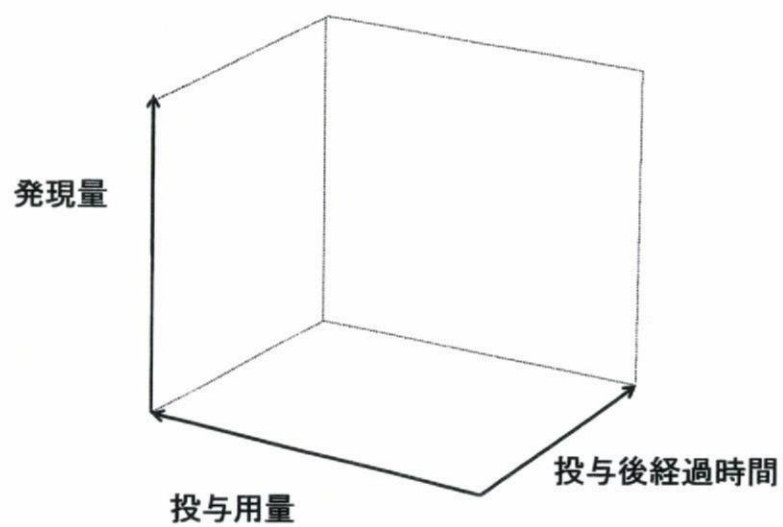




VPA単回投与時の海馬における遺伝子発現変動解析[成熟期]



Millefeuille data (MF surface data)



Rsortによる解析:

各遺伝子(probe set: ps)につき、用量、経時変化及び発現コピー数を各軸とした3次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全てのpsを生物学的に有意な順に並び替えるソフト

VPA単回 [成熟期投与] 海馬

TTG157-HC_VPA single [Multi] 90127

Rsort抽出条件

“Condition”

More than 3copy

Max group: 3

$P < 0.05$

Positive(先ず発現増加分のみ)

H, M

2, 4, 8, 24 hrs

→ 1,636 ps

→ 目視選択後: 560 p.s.

-2, 4時間後に変動するものが多い

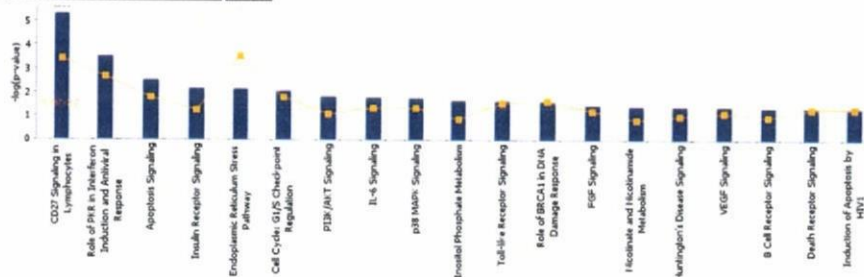
影響を受けたシグナルパスウェイの探索 (インフォマティクスの活用)

Ingenuity Pathways Analysis (IPA)
(Ingenuity Systems Inc.)

Canonical pathways Apoptosis signaling

Analysis: TTG157-HC VPA select - 2009-02-02 04:01 午後

■ TTG157-HC VPA select - 2009-02-02 04:01 □ □ Ratio



© 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.