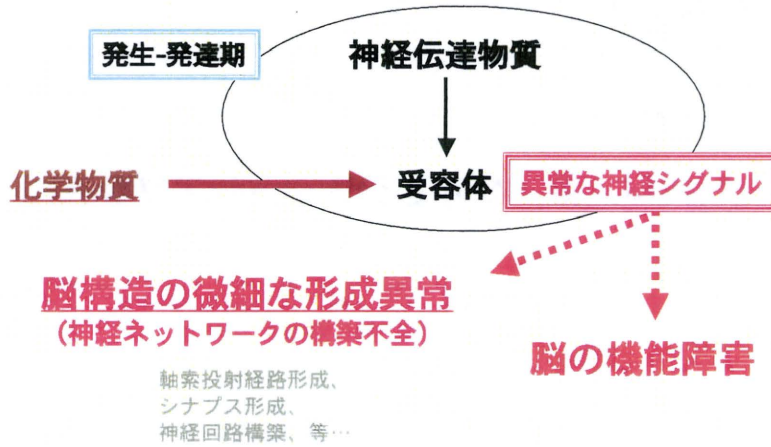
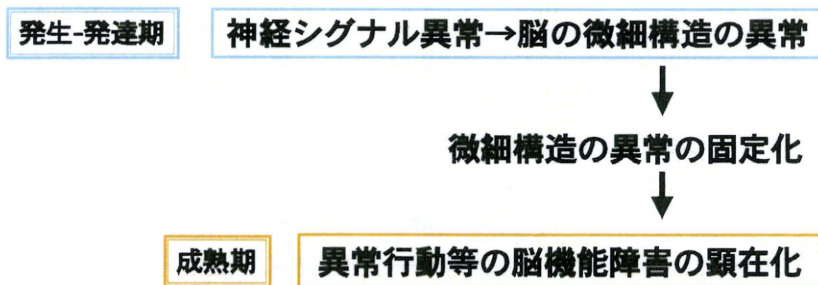


### 【神経系発生-発達期の神経シグナル】

神経シグナルのかく乱は脳の機能障害のみならず、  
脳構造の微細な形成異常を誘発する。



発生-発達期の脳において神経シグナルがかく乱されると、  
脳の微細構造の異常が引き起こされ、その異常が固定されると  
成長後に異常行動等の脳機能異常として顕在化する可能性がある。

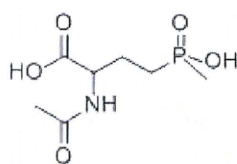


1. 除草剤：グルホシネート

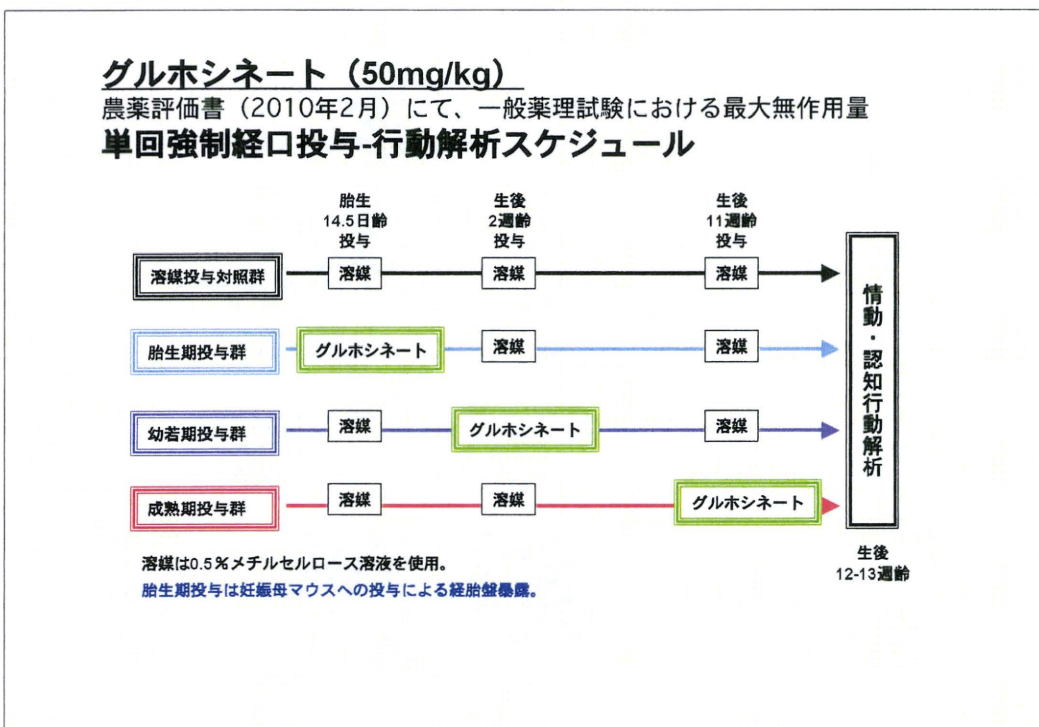
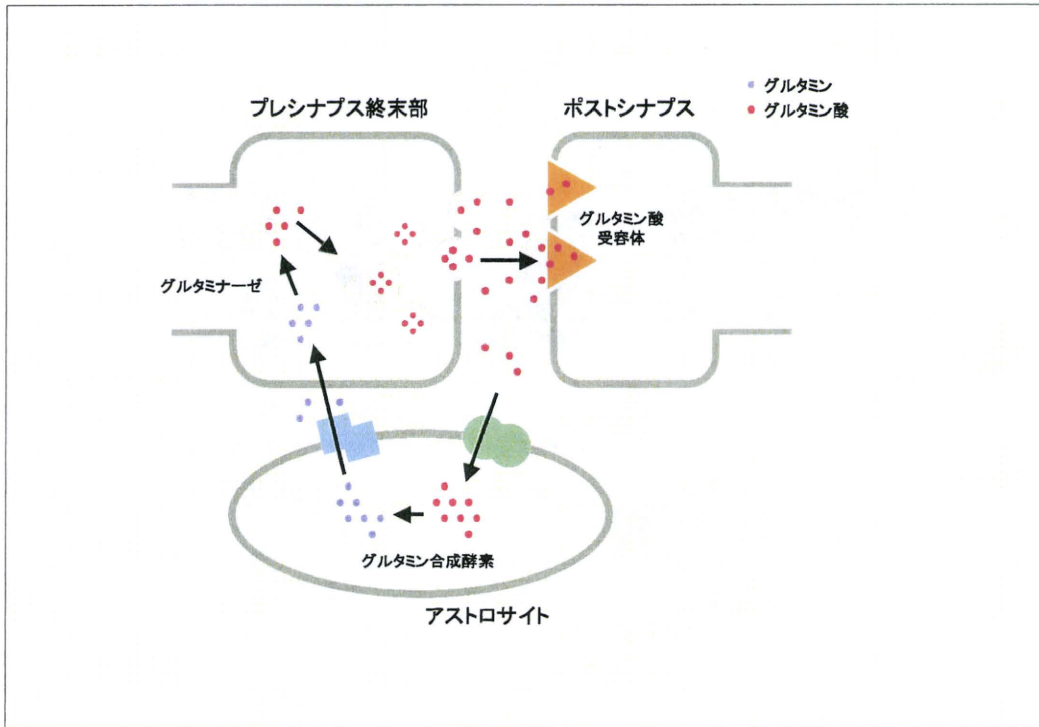
2. 抗不安薬：エチゾラム

(睡眠導入薬：ゾルピデム、トリアゾラム)

グルホシネート  
(グルホシネートアンモニウム塩)

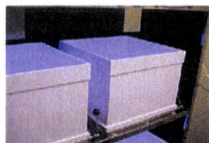


除草剤(商品名:パスタ、ハヤブサ)である。  
有機リン系農薬と同様の構造を有しているが、  
その作用機序はグルタミン合成酵素への拮抗的作用である。  
(有機リン系農薬はコリンエステラーゼ阻害とされる。)  
ヒトでは、眼振、意識障害、無呼吸発作、痙攣などがおきる。



## 行動解析

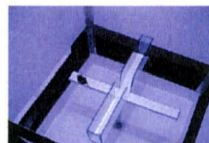
情動行動 状況に対応して急激に生じる行動変化



オープンフィールド試験



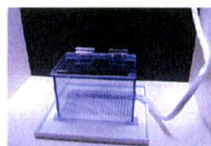
明暗往来試験



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



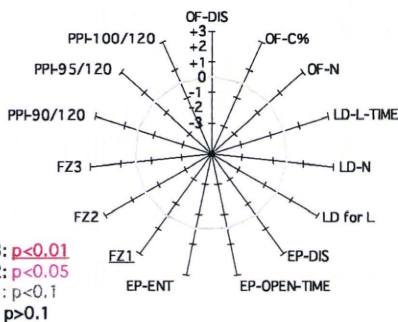
条件付け学習記憶試験

### 脳内情報処理

情報の受理・整理・対応



プレパルス驚愕反応抑制試験



OF: オープンフィールド試験-10min

OF-DIS: 総移動量  
OF-C%: 中央滞在率  
OF-N: 移動回数

LD: 明暗往来試験-5min

LD-L-TIME: 明所滞在時間  
LD-N: 明暗往来数  
LD for L: 初移動までの時間

EP: 高架式十字迷路試験-10min

EP-DIS: 高所総移動量  
EP-OPEN-TIME: 柵無しアーム部滞在時間  
EP-ENT: number of entry in arms

FZ: 条件付け学習記憶試験-6min

FZ1: 学習度 (短期記憶形成度)  
FZ2: 空間-連想記憶  
FZ3: 音-連想記憶

PPI: プレパルス驚愕反応抑制試験-30min

PPI-90/120: プレパルス 90db/120db  
PPI-95/120: プレパルス 95db/120db  
PPI-100/120: プレパルス 100db/120db



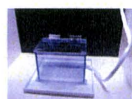
オープンフィールド試験



明暗往来試験



高架式十字迷路試験

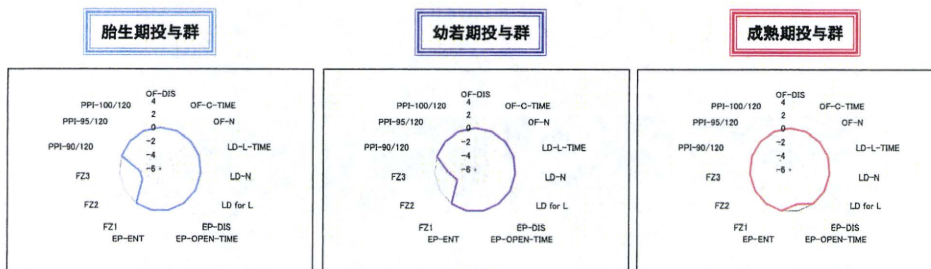


条件付け学習記憶試験

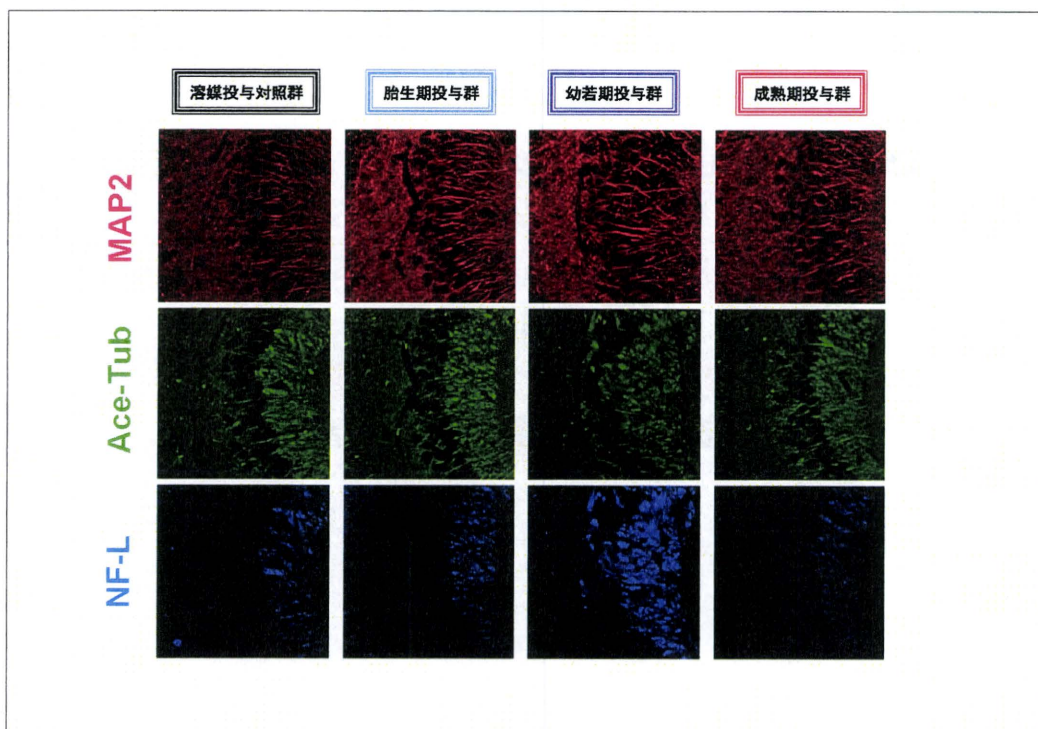


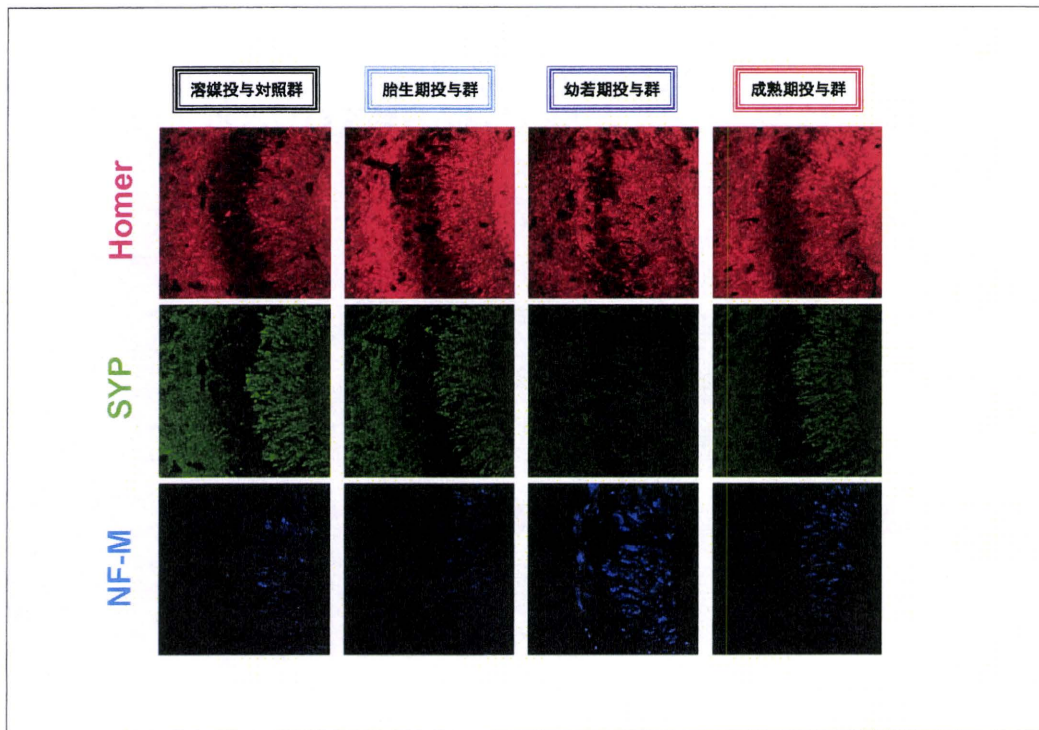
プレパルス驚愕反応抑制試験

## グルホシネート (50mg/kg) 単回強制経口投与による成熟期の行動逸脱レベル



胎生期投与群、幼若期投与群に記憶異常が疑われた





幼若期及び胎生期におけるグルホシネート投与は、  
 成熟期を用いた従来の試験法からは  
 最大無作用量とされる用量であっても、  
 予期できない遅発影響として、  
**海馬の形態異常像とともに記憶異常**  
 を引き起こすことが明らかとなった。

興奮性神経伝達物質：グルタミン酸

抑制性神経伝達物質：GABA

**GABA受容体シグナルと脳の発生・発達**

*In vitro*

神経細胞増殖、神経細胞分化、  
神経突起伸張、シナプス形成に貢献する。

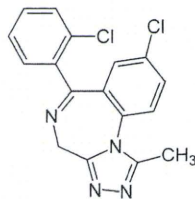
*In vivo*

受容体遺伝子欠損マウス神経発生に  
重篤な障害の報告はない。

イオントランスポーターが未発達である為、  
脳の発生・発達期のGABA受容体は成熟期とは機能的に異なる。

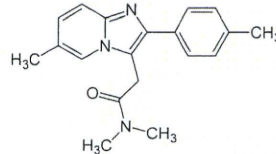
**トリアゾラム**  
(ハルシオン)

ベンゾジアゼピン系  
睡眠導入薬



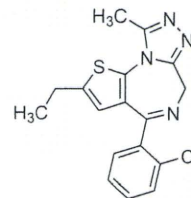
**ゾルピデム**  
(マイスリー)

非ベンゾジアゼピン系  
睡眠導入薬



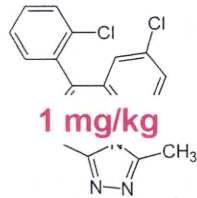
**エチゾラム**  
(デパス)

チエノジアゼピン系  
抗不安薬  
(睡眠導入薬)



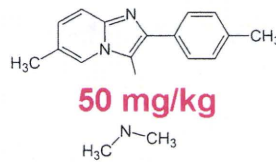
**トリアゾラム**  
(ハルシオン)

ベンゾジアゼピン系  
睡眠導入薬



**ゾルピデム**  
(マイスリー)

非ベンゾジアゼピン系  
睡眠導入薬



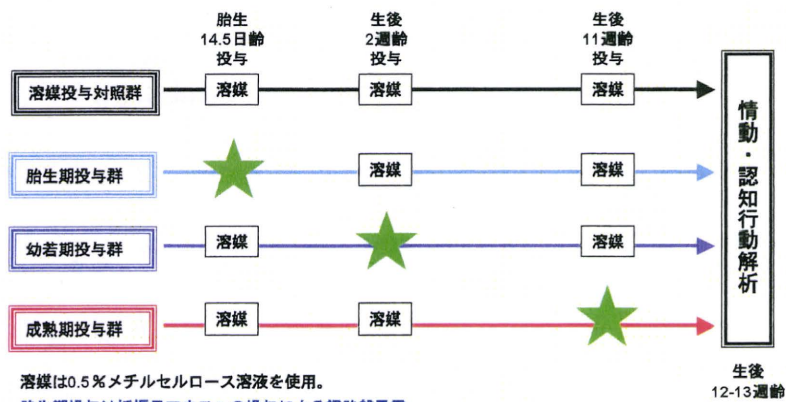
**エチゾラム**  
(デパス)

チエノジアゼピン系  
抗不安薬  
(睡眠導入薬)



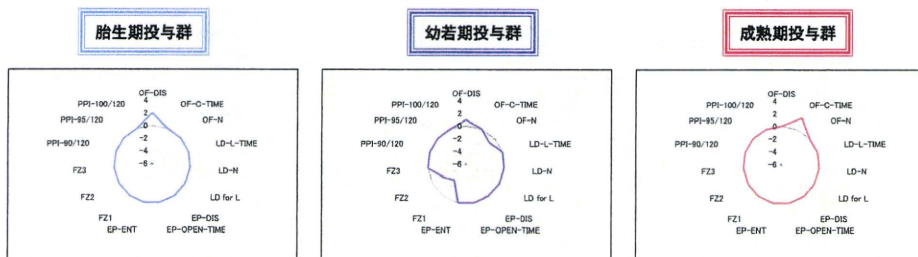
ヒトの一日最大使用量の100倍 (安全係数から逆算)

**トリアゾラム、ゾルピデム、エチゾラム (★)**  
単回強制経口投与-行動解析スケジュール



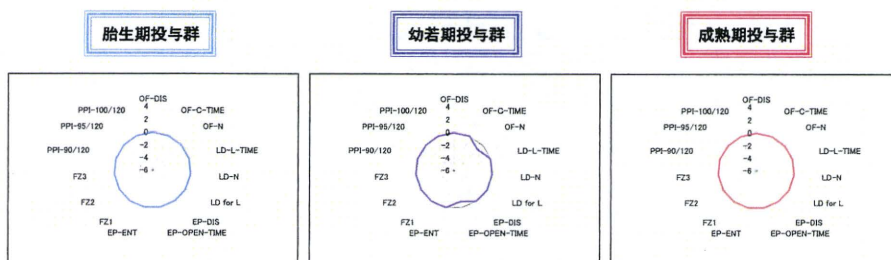


## トリアゾラム (1 mg/kg) 単回強制経口投与による成熟期の行動逸脱レベル



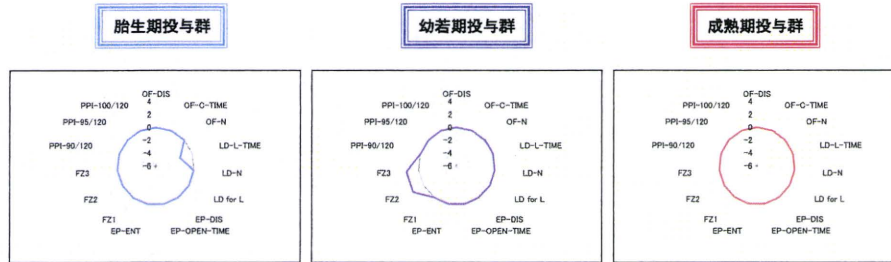
幼若期投与群に記憶異常が疑われた

## ソルピデム (50 mg/kg) 単回強制経口投与による成熟期の行動逸脱レベル



各群に顕著な行動異常は認められない。

## エチゾラム (6 mg/kg) 単回強制経口投与による成熟期の行動逸脱レベル



幼若期投与群に記憶行動逸脱が疑われた。

記憶異常の一様式と推測

## 幼若期における単回強制経口投与による 成熟期の行動逸脱レベル

**トリアゾラム**  
(ハルシオン)

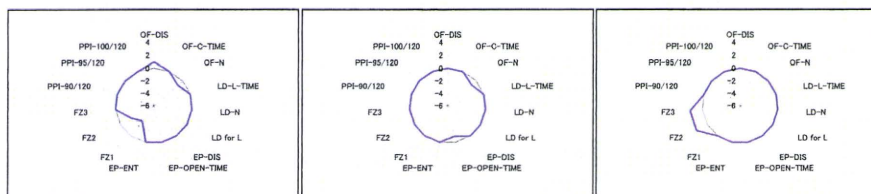
ベンゾジアゼピン系  
**1 mg/kg**

**ゾルピデム**  
(マイスリー)

非ベンゾジアゼピン系  
**50 mg/kg**

**エチゾラム**  
(デパス)

チエノジアゼピン系  
**6 mg/kg**



トリアゾラムに加えて、エチゾラムは幼若期投与による遅発性の**記憶異常**を引き起こす危険が示唆された。

我が国では、いずれも小児を対象として頻用されることは考えにくいですが、歯科治療や夜尿症対策、処方されるケースが考えられるため注意が必要である。

トリアゾラムに準じて、ゾルピデム、エチゾラムについて早急に分子レベル解析を含めた検討を行う予定だが、幼若期における過度のGABAシグナルは遅発中枢異常の起点となると推測される。

分担研究報告書

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】

昨年度の班会議では、胎仔期バルプロ酸曝露マウスでは、成長した成体脳海馬において神経幹細胞の増殖が減少し、学習記憶障害が観察されることを報告した。本年度の研究では、この成熟後の記憶異常が、成長過程でのランニングホイール設置による自発的運動増加によって改善されることがわかった。

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

本年度の研究では、胎生 12.5～14.5 日に妊娠マウスへバルプロ酸を経口投与（300 mg/kg、1 回/日）することで、バルプロ酸を経胎盤的に暴露した産仔マウスにおける、神経幹細胞の増殖とともに、暴露の結果、成熟期に至るまで残存する脳高次機能への影響の有無を検討する目的で、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、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験、尾懸垂試験からなる行動解析を行った。また、離乳後に回し車を飼育ケージに設置し、自発的運動を行わせることによる影響も検討した。

（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うものである。

### C. 研究結果

胎生 12.5-14.5 日にバルプロ酸に暴露されたマウスの出生・成長を待ち、生後 1 2 週から 1 週間、1 日 1 回 BrdU (150 mg/kg) を腹腔内に投与し、増殖細胞をラベルした。投与終了翌日に脳を固定し、海馬における増殖細胞について抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色により検出したところ、胎生期バルプロ酸暴露マウスにおいては、対照群と比較して、顕著な減少が見られた。さらに、回し車を設置したバルプロ酸胎仔期暴露マウス群においては、BrdU 陽性の新生ニューロン数が増加することも分かった。生後 1 2 週齢の雄マウスの行動解析から、対照群と比較し、胎生期バルプロ酸暴露マウスは記憶学習行動に障害が生じていることを昨年報告したが、本年度の研究では、この成熟後の記憶異常が、成長過程でのランニングホイール設置による自発的運動増加によって改善されることがわかった (種村班員との共同研究)。

### D. 考察

今回、バルプロ酸暴露は胎生期の 3 日間だけであるのに、成体になったマウスの海馬においてもその影響がみられ、神経幹細胞の増殖が減少していた。この原因として、胎仔期バルプロ酸暴露によりニューロン分化が亢進され、成体脳における神経幹細胞数が減少したことなどが考えられた。また、海馬でのニューロン新生は記憶学習と強く関連することが示唆されており、今回海馬における神経幹細胞の増殖減少がみられたことは、行動解析で明らかに

なった胎生期バルプロ酸暴露マウス成体での記憶学習障害の原因である可能性が高いと思われる。

### E. 結論

以上のようにマウス胎仔がバルプロ酸に暴露された場合、その成体マウスにおいて海馬での神経幹細胞の増殖減少と記憶障害が引き起こされ、これらの障害は自発的運動によりある程度改善できることが分かった。

### F. 健康危惧情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

##### 1) 書籍

1. Juliandi B., Abematsu M., Nakashima K. Epigenetics, Stem cells and Cellular differentiation. in *Handbook of epigenetics: The new molecular and medical genetics* (ed. Tollefsbol T.O.) 315-328 (Elsevier, 2010).

##### 2) 雑誌

1. Muotri A.R., Marchetto M.C., Coufal N.G., Oefner R., Yeo G., Nakashima K. & Gage F.H. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* 468, 443-446 (2010).
2. Abematsu M., Tsujimura K., Yamano M., Saito M., Kohno K., Kohyama

- J., Namihira M., Komiya S. & Nakashima K. Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. *J Clin Invest* 120, 3255-3266 (2010).
3. Kohyama J., Sanosaka T., Tokunaga A., Takatsuka E., Tsujimura K., Okano H. & Nakashima K. BMP-induced REST regulates the establishment and maintenance of astrocytic identity. *J Cell Biol* 189, 159-170 (2010).
  4. Mira H., Andreu Z., Suh H., Lie D.C., Jessberger S., Consiglio A., San Emeterio J., Hortiguera R., Marques-Torres M.A., Nakashima K., Colak D., Gotz M., Farinas I. & Gage F.H. Signaling through BMP-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7, 78-89 (2010).
  5. Juliandi B., Abematsu M. & Nakashima K. Chromatin remodeling in neural stem cell differentiation. *Curr Opin Neurobiol* 20, 408-415 (2010).
  6. Juliandi B., Abematsu M. & Nakashima K. Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation. *Dev Growth Differ* 52, 493-504 (2010).
2. 学会発表
- 〈国内学会〉
1. ° 裏山悟司、滝沢琢己、神山淳、中島 欽一： Analysis of DNA methylation-independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression in embryonic stem cells (ESCs). BMB2010、神戸ポートアイランド、2010年12月7-10日
  2. ° 鈴木暁也、辻村啓太、中島欽一： Rett 症候群原因遺伝子産物 MeCP2 の新規機能解析. BMB2010、神戸ポートアイランド、2010年12月7-10日
  3. ° 武藤哲司、中島欽一： Hypoxic condition facilitates Notch-induced DNA demethylation of astrocytic genes, resulting in the enhanced astrocyte differentiation of neural precursor cells. BMB2010、神戸ポートアイランド、2010年12月7-10日
  4. ° 中島欽一： 抗てんかん薬バルプロ酸のエピジェネティックな作用とその応用. 第3回 Stroke Science Academy、ホテル日航福岡、2010年12月3日（口頭）
  5. ° 中島欽一： 神経幹細胞制御におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の影響とその影響. 大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪大学吹田キャンパス、2010年11月25-26日（口頭）
  6. ° 中島欽一、Berry, J.： 抗てんかん薬バルプロ酸の神経系における良

- い作用と悪い作用、日本遺伝学会第82回大会。北海道大学高等教育機能開発総合センター、2010年9月20-23日（口頭）
7. ° Berry, J., Tanemura, K., Abematsu, M., Igarashi, K., Kanno, J., Nakashima, K.: Prenatal HDAC inhibition affects adult hippocampal neurogenesis. Neuro2010、神戸コンベンションセンター、2010年9月2-4日
  8. ° 辻村啓太、鈴木暁也、深尾陽一郎、藤原正幸、中島欽一：メチル化DNA結合タンパク質 MeCP2 の相互作用因子解析。Neuro2010、神戸コンベンションセンター、2010年9月2-4日
  9. ° 佐野坂司、波平昌一、滝沢琢己、中島欽一：アストロサイト分化誘導性サイトカイン発現細胞の同定。Neuro2010、神戸コンベンションセンター、2010年9月2-4日
  10. ° 齋藤敦、落合希実子、村上智彦、佐野坂司、中島欽一、和中明生、今泉和則：アストロサイト分化における小胞体ストレス応答の役割。Neuro2010、神戸コンベンションセンター、2010年9月2-4日（口頭）
  11. ° 滝沢琢己、高木美智、笹岡寛敏、伊藤謙治、中島欽一：神経活動依存性遺伝子発現の時空間制御。Neuro 2010、神戸コンベンションセンター、2010年9月2-4日（口頭）
  12. ° 中島欽一：発生期脳における神経幹細胞のアストロサイトへの分化能獲得および分化誘導機構。第50回日本先天異常学会学術集会、淡路夢舞台国際会議場、2010年7月8-10日（口頭）
  13. ° 裏山悟司、滝沢琢己、堀由貴奈、神山淳、中島欽一：胚性幹細胞におけるGFAP遺伝子の発現制御機構の解析。日本分子生物学会 第10回春季シンポジウム、ホテル松島大観荘、2010年6月8-9日
  14. ° 滝沢琢己、高木美智、伊藤謙治、中島欽一：神経活動依存性転写の時空間的制御。第9回核ダイナミクス研究会、ラフォーレ修善寺、2010年5月27-29日（口頭）
  15. ° 辻村啓太、鈴木暁也、藤原正幸、深尾洋一朗、中島欽一：メチル化DNA結合タンパク質 MeCP2 の新規相互作用因子の探索。日本エピジェネティクス研究会第4回年会、米子市文化ホール、2010年5月28-29日
  16. ° 武藤哲司、武藤正弘、古関庸子、古関明彦、中島欽一：成体海馬ニューロン新生におけるNP95の役割。日本エピジェネティクス研究会第4回年会、米子市文化ホール、2010年5月28-29日
  17. ° 中島欽一：HDAC阻害剤を用いた神経幹細胞制御による損傷脊髄新規治療法。日本エピジェネティクス研究会第4回年会、米子市文化ホール、2010年5月28-29日（口頭）
  18. ° 中島欽一：移植神経幹細胞由来ニューロンによる脊髄損傷治療。神経組織の成長・再生・移植研究会第25回学術集会、大阪市立大学、平成22年5月22日（口頭）
  19. ° Berry, J., 辻村啓太、精松昌彦、

神山淳、中島欽一： The role of histone acetylation on cortical development. 第8回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場、平成22年5月13-15日

20. ° 武藤哲司、中島欽一： Oxygen tension can control the DNA methylation status of GFAP promoter through Notch signaling and allows propagation and maturation of neuronal progenitor. 第8回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場、平成22年5月13-15日

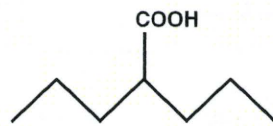
〈国際学会〉

1. ° Takizawa, T., Takagi, M., Itoh, K., Nakashima, K.: Spatiotemporal regulation of activity dependent genes in post-mitotic neurons. 40<sup>th</sup> Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010 (oral)
2. ° Abematsu, M., Tsujimura, K., Yamano, M., Saito, M., Kohno, K., Kohyama, J., Namiyama, M., Komiya, S., Nakashima, K.: Epigenetic regulation of transplanted neural stem cells reconstructed injured spinal cord. 40<sup>th</sup> Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010
3. ° Sanosaka, T., Namiyama, M., Takizawa, T., Nakashima, K.: Meningeal cells express astrocyte inducing cytokines in the developing mouse brain. 40<sup>th</sup> Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010
4. ° Tsujimura, K., Fukao, M., Fujiwara, R., Suzuki, A., Nakashima, K.: Proteomic identification of co-factors for the methyl-CpG binding protein, MeCP2. 40<sup>th</sup> Annual Meeting NEUROSCIENCE2010. San Diego, November 13-17, 2010
5. ° Urayama, S., Takizawa, T., Hori, Y., Kohyama, J., Nakashima, K.: Analysis of DNA methylation independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression in embryonic stem cells. 40<sup>th</sup> Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010
6. ° Mutoh, T., Nakashima, K.: Hypoxic condition facilitates Notch induced DNA demethylation of astrocytic genes, resulting in the enhanced astrocyte differentiation of neural precursor cells in response to the astrocyte inducing cytokine LIF. 40<sup>th</sup> Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010
7. ° Berry, J., Tsujimura, K., Abematsu, M., Kohyama, J., Nakashima, K.: The effects of histone deacetylase inhibition on cortical development. 40<sup>th</sup> Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San



- Diego, November 13-17, 2010
8. ° Sanosaka, T., Namihira, M., Takizawa, T., Nakashima, K.: Meningeal Cells Induce Astrocyte Differentiation of Neural Stem Cells. The 29<sup>th</sup> NAITO CONFERENCE ON GLIA WORLD, SHONAN VILLAGE CENTER, October 5-8, 2010
  9. ° Mutoh, T., Koseki, Y., Mutoh, M., Koseki, H., Nakashima, K.: Np95 Regulates Astroglialogenesis in the Developing Cerebral Cortex. The 29<sup>th</sup> NAITO CONFERENCE ON GLIA WORLD, SHONAN VILLAGE CENTER, October 5-8, 2010
  10. ° Nakashima, K.: Astrocyte Differentiation Mediated by Cytokines' Signaling. The 29<sup>th</sup> NAITO CONFERENCE ON GLIA WORLD, SHONAN VILLAGE CENTER, October 5-8, 2010 (oral)
  11. ° Nakashima, K.: Neurons derived from transplanted neural stem cells reconstruct disrupted neuronal circuits in the injured mouse spinal cord. 2010 Shanghai Summer Stem Cell Symposium, Shanghai, August 9-10, 2010 (oral)
  12. ° Takagi, M., Sasaoka, H., Itoh, K., Kimura, H., Nakashima, K., ° Takizawa, T.: Spatiotemporal regulation of activity dependent gene expression in post-mitotic neurons. The 75<sup>th</sup> Cold Spring Harbor Symposium, Cold Spring Harbor, NewYork, June 2-9, 2010
- H. 知的財産所有権の出願・登録状況  
(予定も含む)
1. 特許取得  
該当なし。
  2. 実用新案登録  
該当ない。
  3. その他  
特になし

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



Chemical structure of VPA



- 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

1

## 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

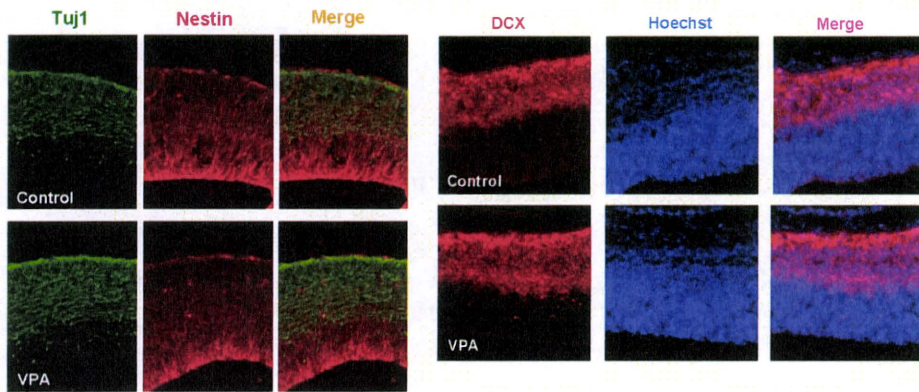
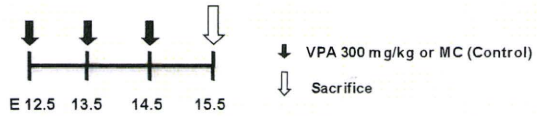
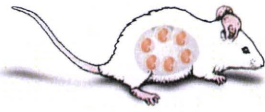
- 妊娠中にバルプロ酸を服用した母から生まれた子供の中に自閉症を発症する確立が高い。
- 妊娠中バルプロ酸曝露によるその他の行動異常



神経幹細胞の増殖・分化制御の観点から解析

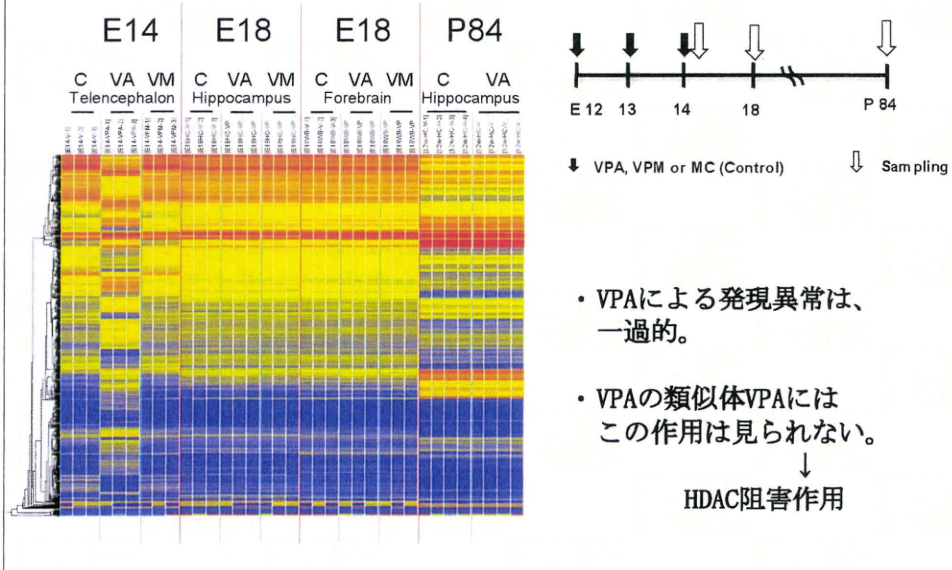
2

## 妊娠マウスバルプロ酸経口投与によって促進される胎仔脳内ニューロン分化

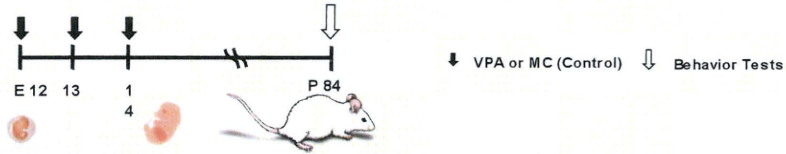


3

## 胎仔期バルプロ酸曝露マウスの遺伝子発現解析



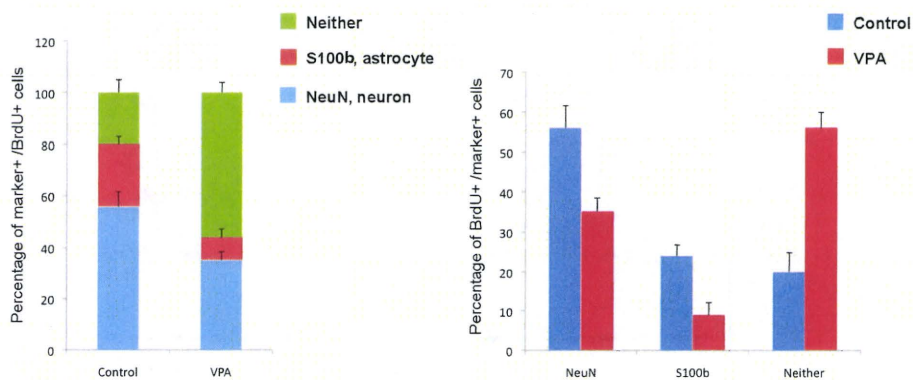
## 胎仔期バルプロ酸曝露により誘発される成体マウス記憶障害



Test Name	Behaviors Assessed	Results
Open Field	general activity level, gross locomotor activity, exploration habits	total distance, center time, move episode, distance per movement
Light/Dark Transition	anxiety-like	dark distance, dark time, transition, light distance, light time, latency to enter light
Elevated Plus Maze	anxiety-like	total distance, open time, close time, open entry, close entry, total entry
Pre-pulse Inhibition	sensorimotor gating	pre 90db/120db, pre 95db/120db, pre 100db/120db
Tail Suspension	depression	immobility time
Contextual/Cued Fear Conditioning	learning and memory	conditioning, contextual, cued
Y-Maze Alternation	learning and memory	correct alternation

5

## 胎仔期バルプロ酸曝露による成体マウス海馬での神経幹細胞分化抑制



6