

齢)、胎生期(胎生14.5日齢)のマウスに対して、ゾルピデム(50mg/kg:溶媒は0.5%メチルセルロース溶液)、エチゾラム(6mg/kg:溶媒は0.5%メチルセルロース溶液)を強制経口投与(胎生期投与は妊娠マウスへの強制経口投与による経胎盤暴露による)し、生後12-13週齢時に前項同様の行動解析を行った。尚、用量設定は安全係数から逆算し、成人の一日最大用量の100倍とした(上述のトリアゾラムも同様の用量設定を行っており1mg/kg:溶媒は0.5%メチルセルロース溶液にて使用した)。

マウスを用いた実験実施に際しては、「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定」を遵守し、科学的及び動物愛護的配慮を十分に行い施行した。

C. 結果

平成20年度

各群マウスとも、成長にともなう体重増加に異常はなく、また一般飼育環境下においても異常行動は観察されなかった。オープンフィールド試験の結果、胎生期投与群に総移動量増加($P<0.05$)、成熟期投与群に中央部滞在時間増加($P<0.05$)が認められた。また条件付け学習記憶試験から幼若期投与群に重篤な短期記憶形成能の低下($P<0.01$)と海馬依存性が高いとされる場所-連想記憶能の低下($P<0.05$)が確認された。尚、いずれの実験群においても明暗往来試験、高架式十字迷路試験、プレパルス驚愕反応抑制試験における行動逸脱は認められなかった。

Percellome法による海馬遺伝子発現解析から、対象群の海馬における発現コピー数が1以上の遺伝子群の中で、有意($P<0.01$)に遺伝子発現変動していたものは、成熟期投与群にて209個、幼若期投与群にて1683個、胎生期投与群で636個であった。また成熟期投与群においては遺伝子発現誘導傾向が高いのに対して、幼若期および胎生期投与群で

は遺伝子発現抑制傾向が顕著であった。Percellome法により抽出された遺伝子群のIngenuity Pathways Analysisによるパスウェイ解析から、幼若期および胎生期投与群の海馬にカルシウム伝達、およびグルタミン酸受容体シグナルカスケードへの影響が生じていることが示された。特に幼若期投与群では、NMDA型、AMPA型、KINATE型のグルタミン酸受容体遺伝子発現抑制が確認された。

抗体を用いた免疫組織化学を施した脳組織切片の共焦点レーザー顕微鏡による形態解析から、幼若期投与群の海馬(CA1)に神経細胞突起のMAP2反応性増強が認められた。

平成21年度

イボテン酸投与による急性影響として、投与2、4時間後の幼若期投与群に末梢神経症状が観察されたが、投与8時間後には回復し、その後、成長にともなう体重増加に異常はなく、また一般飼育環境下においても、胎生期投与群、成熟期投与群同様に、異常行動は観察されなかった。雄マウスを用いた行動解析の結果、対象群と比較して、幼若期投与群に、オープンフィールド試験における中央部滞在時間の増加(約160%:t-test、 $p<0.05$)、明暗往来試験における明暗往来数の減少(約70%:t-test、 $p<0.05$)と明所への初移動に要する時間(暗所潜在時間)の延長(約230%:t-test、 $p<0.05$)が認められた。また幼若期投与群に、条件付け学習記憶試験における、音-連想記憶能の低下(約65%:t-test、 $p<0.05$)が確認された。さらに、幼若期投与群に、プレパルス驚愕反応抑制試験において、70dBの背景音の下、120dBの刺激に対する85、90、95dBのプレパルス刺激による重篤な驚愕反応抑制不全が認められた(順に0.4%、4%、22%:いずれもt-test、 $p<0.05$)。胎生期投与群、並びに成熟期投与群に関しては、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において、行動様式

の異常や逸脱は認められなかった (表1)。

表1 行動解析結果

イボテン投与時期	成熟期	幼若期	胎生期
オープンフィールド試験			
総移動量	NS	NS	NS
中央部滞在時間	NS	↑ (p<0.05)	NS
総移動回数	NS	NS	NS
明暗往来試験			
明所滞在時間	NS	NS	NS
総移動回数	NS	↓ (p<0.05)	NS
暗所滞在時間	NS	↑ (p<0.05)	NS
高架式十字迷路試験			
総移動量	NS	NS	NS
開放アーム滞在時間	NS	NS	NS
総アーム選択数	NS	NS	NS
条件付け学習記憶試験			
場所-連想記憶度	NS	NS	NS
音-連想記憶度	NS	↓ (p<0.05)	NS
プレパルス驚愕反応抑制試験			
驚愕反応抑制率	NS	↓ (p<0.05)	NS

↑:増加上昇, ↓:減少低下, NS:有意差なし

成熟期投与群、及び幼若期投与群の Percellome 法による海馬の遺伝子発現変動解析から、それぞれの同週齢対象群の海馬における発現コピー数が1以上の遺伝子群の中で、ratio>1.2で有意 (t-test、p<0.01) に遺伝子発現変動【増加・減少】していた遺伝子プローブセット (PS) 数は、成熟期投与群にて、投与2時間後で【84・9】、投与4時間後で【119・29】、投与8時間後で【7・49】、投与24時間後で【12・88】であり、投与4時間までに遺伝子発現誘導が生じるとともに、投与8時間移行に遺伝子発現抑制が顕著になるという傾向を示した。一方、幼若期投与群では、投与2時間後で【14・96】、投与4時間後で【46・117】、投与8時間後で【20・13】、投与24時間後で【33・9】であり、投与4時間までに顕著な遺伝子発現抑制が認め

られた。両群に共通する遺伝子プローブセットは、投与2時間後で【1・1】、投与4時間後で【6・1】、投与8時間後で【0・0】、投与24時間後で【0・0】であった。

特に、成熟後の情動・認知行動異常を呈した幼若期投与群に焦点を合わせ、Percellome法により抽出された発現変動遺伝子を Ingenuity Pathways Analysis に投入し、パスウェイ解析を行った結果、細胞免疫応答シグナル群、細胞死シグナル群、細胞障害応答シグナル群への影響とともに、神経系関連シグナルとして、軸索誘導シグナル、エフェリン受容体シグナル、神経栄養因子シグナルへの影響が生じていることが示された。

平成22年度

①いずれの投与群についても、成長にともなう体重増加に異常はなく、また一般飼育環境下においても、胎生期投与群、成熟期投与群同様に、異常行動は観察されなかった。雄マウスを用いた行動解析の結果、幼若期投与群、及び胎生期投与群における条件付け学習記憶試験における、場所-記憶連想記憶能及び、音-連想記憶能の低下が明らかとなった。尚、いずれの群においても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、プレパルス驚愕反応抑制試験において、行動様式の異常や逸脱は認められなかった。

②ゾルピデム、エチゾラム、いずれの投与群についても、成長にともなう体重増加に異常はなく、また一般飼育環境下においても、胎生期投与群、成熟期投与群同様に、異常行動は観察されなかった。雄マウスを用いた行動解析の結果、エチゾラム幼若期投与群における条件付け学習記憶試験における、場所-記憶連想記憶能及び、音-連想記憶能のすくみ率の異常上昇が明らかとなった。またエチゾラム胎生期投与群に明暗往来試験における明所滞在時間の減少が認められた。ゾルピデム投与に関しては、いずれの群においても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、プレパルス驚愕反応抑制試験において、行動様式の異常や逸脱は認められなかった

D. 考察

平成20年度

成人に対するトリアゾラムの副作用として、頻度不明ながらも前向き健忘が挙げられている。また小児等への安全性の確立はなされておらず（使用経験が少ない）、妊娠後期には治療上の有益性が危険性（他のベンゾジアゼピン系化合物の使用により新生児の呼吸困難、筋緊張低下が報告されている）を上回る場合にのみ使用すると注意喚起されている。しかし、全米外来医療調査から、1993-2004年の間に睡眠障害のため受診した未成年者は1,860万件で、約81%のケースで薬剤を処方されており、その中におけるベンゾジアゼピン系睡眠導入剤の処方は、その約15%を占めていた、とあり、決して少ないものではない。

本研究結果から、幼若期マウスへのトリアゾラム投与が海馬に影響を与え、成熟期における学習記憶能低下に至ることが明確に示された。これは発達期の神経系に対するトリアゾラムの危険を示すものである。

海馬遺伝子発現解析から、トリアゾラム投与時期による分子レベルでの残存影響の差違を網羅的に示すことに成功するとともに、特に幼若期トリアゾラム投与による記憶毒性メカニズムのひとつとしてポストシナプス機能不全が疑われた。すなわち、幼若期トリアゾラム投与の結果に生じた海馬におけるグルタミン酸受容体遺伝子群の発現抑制は、低グルタミン酸状態を引き起こす一因と考えられ、これは海馬依存性の学習記憶能低下と対応する所見と判断でき、同事に行動異常を裏付ける科学的物証と判断できる。

平成21年度

本研究によって、幼若期マウスへのイボテン酸の単回強制経口投与の結果に生じる成熟後マウスの行動異常を示した。この行動異常は、成熟期マウスへの投与影響解析から推測不能のものであると考えられ、小児期を対象とした新たな安全性試験の必要性を示すものと判断できる。

行動異常の特徴としては、不安関連行動の逸脱（オープンフィールド試験及び明暗往来試験から）、記憶異常（条件付け学習記憶試験から）、及び極めて重篤な脳内情報処理能低下（プレパルス驚愕反応抑制試験から）である。特に、プレパルス驚愕反応抑制不全は、統合失調症において報告されている数少ない生理学的な異常反応であり、近年では統合失調症の動物モデルの評価法として多用されている。本マウスの示す重篤な脳内情報処理能低下は、多くの統合失調症関連遺伝子改変マウスの示す表現型を包括するものであり、同疾患との関連が示唆された。

本系における行動解析バッテリーからは、成熟期投与群のみならず、胎生期投与群では行動異常の検出に至らなかった。この理由として、イボテン酸、及び、その脱炭酸化産物であるムシモールの標的となる受容体の発現パターンによる違いに依存することが考えられるが、現時点では詳細は不明である。

Percellome法による海馬の遺伝子発現変動解析から、幼若期マウス海馬の示す遺伝子応答パターンは、成熟期マウス海馬のものと殆ど共通を持たず、大きく異なるとともに、細胞免疫応答シグナル群、細胞死シグナル群、細胞障害応答シグナル群への影響が大きい特徴を示した。これは、幼若期マウス海馬の感受性がイボテン酸に対して高いことを示唆する。また、神経系関連シグナルとして、軸索誘導シグナル、エフェリン受容体シグナル、神経栄養因子シグナルへの影響が抽出されたことは、幼若期におけるイボテン酸投与の結果、神経突起伸張に障害が起きていることを示唆する。即ち、脳の発生-発達期の神

経回路形成過程に必要な、適切な神経細胞分化・移動・配置、適切な神経突起（軸索、樹状突起）の伸長、シナプス形成、神経回路の選択（軸索側枝の除去・軸索剪定・シナプス淘汰等）における神経突起の伸長に影響が生じていることを示唆し、神経回路形成時における不可逆的な微細構造の構築異常が疑われるとともに、成熟後の中枢神経行動毒性の分子メカニズムの端緒と推測された。

平成 22 年度

① 本研究によって、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記憶異常を引き起こすことが明らかとなった。この異常は、成熟期マウスへの投与影響解析から推測不能のものであると考えられ、小児や妊婦を対象とした新たな安全性試験の必要性を示すものと判断できる。

今後、用量を下げた詳細な解析とともに、記憶異常に至る機構解明が必要と考えられる。

② 本研究によって、特に幼若期におけるトリアゾラムに加えて、エチゾラムの投与は、遅発性の行動異常を引き起こす危険が示された。この結果は、幼若期における GABA 受容体シグナルかく乱が、脳の発達に影響を及ぼした結果と推測される。

ゾルピデムの投与結果からは、行動異常が認められなかった為、非ベンゾジアゼピン系の睡眠導入薬については、他のモデル化学物質を加えて検討するとともに、異常を誘発したベンゾジアゼピン系、チエノジアゼピン系の化学物質による遅発影響について分子レベルでの比較検討が必須と考える。

E. 結論

平成 20 年度

本結果は、個体の幼若期におけるトリアゾ

ラム暴露が遅発性の中枢毒性を誘発する危険を示唆するものである。国内では、「小児への安全性は確立されていない」と注意喚起されているが、小児睡眠障害の治療薬については、より慎重な対応が必要と考えられた。

平成 21 年度

本研究によって、個体の幼若期におけるイボテン酸の暴露によって、脳の発達過程における神経回路形成が不可逆的に阻害され、遅発性の行動異常を誘発する危険を科学的に示唆するものであるとともに、その分子メカニズムの端緒を捉えることに成功したと考えられた。

平成 22 年度

① 本研究によって、幼若期及び胎生期におけるグルホシネート投与は、一般薬理試験から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記憶異常を引き起こすことが明らかとなった。

② 本研究によって、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行動異常を引き起こす危険が示された。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として処方されるケースが考えられるため、より注意が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし。

2) 雑誌

Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J., Brain structure impairment and Behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams., J Toxicol Sci. 2009; 34 Suppl 2:SP279-286.

Sekiyama K, Hashimoto O, Ushiro Y, Adachi C, Kikusui T, Tanemura K, Hasegawa Y., Abnormalities in aggression and anxiety in Tg mice overexpressing activin E., Biochem Biophys Res Commun. 2009; 385(3):319-323.

2. 学会発表

「発達期における化学物質暴露による中枢影響とメカニズム解明」
種村健太郎、菅野 純
第 151 回日本獣医学会シンポジウム
(2011 年 3 月・東京)

「脳の発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発中枢毒性発現解析」
種村健太郎、菅野 純
第 70 回日本動物心理学会シンポジウム
(2010 年 8 月・東京)

「社会共生系形成過程における個の適応と連鎖に関する研究」
種村 健太郎、五十嵐 勝秀、菅野 純
第 149 回日本獣医学会
(2010 年 3 月・東京)

「脳発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発性中枢影響解析-幼若期雄マウスへのトリアゾラム投与による学習記憶障害について-」

種村 健太郎、松上 稔子、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純
第 36 回日本トキシコロジー学会
(2009 年 7 月・岩手)

「受容体原性毒性モデルとしての ER ノックダウンマウスの中枢神経症状、及び神経伝達かく乱による遅発影響の解析」
種村 健太郎、菅野 純
第 20 回環境ホルモン学会講演会
(2009 年 2 月・東京)

「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」
種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純
第 35 回日本トキシコロジー学会
(2008 年 6 月・東京)

「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」
種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純
第 35 回日本トキシコロジー学会
(2008 年 6 月・東京)

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

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】

胎仔期バルプロ酸曝露マウスでは、胎生期脳における神経幹細胞の増殖が抑制されると同時にニューロンへの分化が促進されることが分かった。また、成長した成体脳海馬においても神経幹細胞の増殖が減少し、学習記憶障害が観察された。また、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バルプロ酸の影響に焦点を絞り、その分子基盤と遅発性中枢毒性発現機序の解明を目指した。

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、神経幹細胞の増殖や分化とともに、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、尾懸垂試験からなる行動解析を行った。また、回し車による自発運動が、産仔マウスの成熟期における記憶学習行動に及ぼす影響も検討した。

C. 研究結果

胎生 15.5 日目脳ではバルプロ酸投与によるニューロン分化促進が観察された。また、生後 12 週から 5 日間、1 日 1 回 BrdU を腹腔内に投与し、増殖細胞をラベルした。投与終了翌日に海馬における増殖細胞を抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色により検出したところ、胎生期バルプロ酸曝露による顕著な減少が見られた。さらに BrdU 投与終了 4 週後に分化傾向を観察したところ、バルプロ酸曝露に

よる海馬ニューロン新生が減少していることもわかった。並行して生後 12 週マウスの行動様式も解析した(種村との共同研究)。その結果、胎生期バルプロ酸曝露マウスにおいては動き(移動量)に若干の減少が見られたものの、不安関連行動に大きな影響は見られなかった。しかしさらに解析を加えたところ、胎生期バルプロ酸曝露マウスでは記憶学習障害が観察された。さらにこの記憶障害は、回し車を使った自発的運動により、ある程度改善されることがわかった。

D. 考察

今回、バルプロ酸曝露は胎生期の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、胎仔期バルプロ酸曝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曝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曝露された場合、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. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

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

Suzuki A., Raya A., Kawakami Y., Morita M., Matsui T., Nakashima K., Gage F.H., Rodriguez-Esteban C., Izpisua Belmonte J.C. Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-mediated dedifferentiation of committed mesoderm progenitors. in **Regulatory networks in stem cells** (eds. Rajasekhar, V.K. & Vemuri, M.C.) 37-53 (Humana Press, New York, 2009).

2) 雑誌

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).

Mira H., Andreu Z., Suh H., Lie D.C., Jessberger S., Consiglio A., San Emeterio J., Hortiguera R., Marques-Torrejon 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).

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).

Juliandi B., Abematsu M. & Nakashima K. Chromatin remodeling in neural stem cell differentiation. *Curr Opin Neurobiol* 20, 408–415 (2010).

Juliandi B., Abematsu M. & Nakashima K. Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation. *Dev Growth Differ* 52, 493–504 (2010).

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).

Tsujimura K., Abematsu M., Kohyama J., Namihira M. & Nakashima K. Neuronal differentiation of neural precursor cells is promoted by the methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Exp Neurol* 219, 104–111 (2009).

Sanosaka T., Namihira M. & Nakashima K. Epigenetic mechanisms in sequential differentiation of neural stem cells. *Epigenetics* 4, 89–92 (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).

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).

Kuwabara T., Hsieh J., Muotri A., Yeo G., Warashina M., Lie D.C., Moore L., Nakashima K., Asashima M. & Gage F.H. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 12, 1097–1105 (2009).

Asano H., Aonuma M., Sanosaka T., Kohyama J., Namihira M. & Nakashima K. Astrocyte Differentiation of Neural Precursor Cells is Enhanced by Retinoic Acid Through a Change in Epigenetic Modification. *Stem Cells* 27, 2744–2752 (2009).

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, 2099–109 (2008).

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).

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〉

伊藤謙治、滝沢琢己、中島欽一、神経幹細胞性質変換に伴う遺伝子座の核内配置の変動解析、第5回神経発生討論会、福井県民ホール、2011年3月17-18日

鈴木暁也、辻村啓太、中島欽一：神経幹細胞の増殖・分化におけるメチル化DNA結合タンパク質MECP2の役割、第5回神経発生討論会、福井県民ホール、2011年3月17-18日

好岡美津子、切替郁枝、中島欽一：哺乳類の中枢神経系および免疫系の相互作用による神経幹細胞の増殖・分化制御機構の解明ー中枢神経系の免疫担当細胞ミクログリアにおけるToll様受容体の観点からー、第5回神経発生討論会、福井県民ホール、2011年3月17-18日

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

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

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

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）

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）

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）

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

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

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

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)

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)

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)

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

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)

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

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

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)

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)

Berry, J., 辻村啓太、椿松昌彦、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

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

Kanno, J., Igarashi, K., Tanemura, K., Asano, H., Nakashima, K.: Glucocorticoid induces expression of astrocyte marker GFAP mRNA in mouse neural stem cells. 第14回国際内分泌会議、国立京都国際会館、2010年3月29日 (口頭)

辻村啓太、鈴木暁也、中島欽一: Rett症候

群原因遺伝子産物MeCP2の機能解析. 第4回神経発生討論会、岡崎コンファレンスセンター、2010年3月19-20日(口頭)

高木美智、滝沢琢己、笹岡寛敏、中島欽一: ニューロン活動依存的に発現する遺伝子の核内空間配置解析. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Sasaoka, H., Takizawa, T., Kimura, H., Nakashima, K.: Analysis of chromatin modifications and transcriptional regulations of activity-dependent genes in post-mitotic neurons. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Urayama, S., Takizawa, T., Hori, Y., Kohyama, J., Nakashima, K.: Analysis of DNA methylation-independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Sanosaka, T., Inubushi, H., Kohyama, J., Takizawa, T., Nakashima, K.: A source of astrocyte-inducing cytokines in the developing mouse brain. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Berry, J., Tsujimura, K., Abematsu, M., Kohyama, J., Nakashima, K.: The Role of Histone Acetylation on Cortical Development. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

浅野弘嗣、青沼真、佐野坂司、神山淳、波平昌一、中島欽一: レチノイン酸誘導性ヒストン

アセチル化による神経幹細胞のアストロサイト分化促進機構. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

畑田出穂、波平昌一、森田純代、堀居拓郎、木村美香、中島欽一: Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

中島欽一: 脊髄損傷に対するエピジェネティック治療. 第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日(シンポジウム、口頭)

精松昌彦、辻村啓太、山野真利子、斉藤美知子、河野憲二、神山淳、波平昌一、小宮節郎、中島欽一: 移植神経幹細胞のエピジェネティック制御による損傷脊髄再生治療. 第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日

佐野坂司、波平昌一、神山淳、蟬克憲、田賀哲也、中島欽一: 神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得を制御するエピジェネティクス機構. 第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日(シンポジウム、口頭)

中島欽一: メチル化DNA結合タンパク質による神経系細胞の分化・可塑性制御. 神経化学会-GRT研究会連携オープンシンポジウム、伊香保温泉 ホテル天坊、2009年6月21日(シンポジウム、口頭)

滝沢琢己、中島欽一: アストロサイト特異的遺伝子GFAP発現制御に関するDNAメチル化と

遺伝子座核内配置. 第52回日本神経化学学会大会、伊香保温泉 ホテル天坊、2009年6月21-24日 (シンポジウム、口頭)

中島欽一: 神経幹細胞が生み出す細胞の順番付けの仕組み. 第52回日本神経化学学会大会、伊香保温泉 ホテル天坊、2009年6月21-24日 (シンポジウム、口頭)

滝沢琢己、Tom Misteli、中島欽一: アストロサイト特異的遺伝子 GFAP の核内配置と転写活性. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日

辻村啓太、精松昌彦、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と中枢神経系再生医療への応用. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日

笹岡寛敏、滝沢琢己、中島欽一: ニューロンでの遺伝子発現におけるエピジェネティック修飾の解析. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日

蟬克憲、波平昌一、神山淳、佐野坂司、中島欽一: 第7回幹細胞シンポジウム、Committed neuronal precursors confer astrocyte-differentiation potential on neural stem cells through Notch-signal mediated DNA demethylation during mouse brain development. 泉ガーデンギャラリー、2009年5月15-16日 (シンポジウム、口頭)

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 (口頭)

中島欽一、精松昌彦: 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 (口頭)

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 を介した骨形成因子 BMP による新規ニューロン分化抑制機構. 第51回日本神経化学学会大会、富山国際会議場、2008年9月11-13日 (シンポジウム、口頭)

精松昌彦、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26-28日 (シンポジウム、口頭)

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. 第31回日本神経科学大会、東京国際フォーラム、2008年6月9-11日

辻村啓太、精松昌彦、神山淳、波平昌一、中島欽一: MeCP2 による神経幹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. 第31回日本神経科学大会、東京国際フォーラム、2008年6月9-11日 (口頭)

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 (口頭)

辻村啓太、瀬戸口廣貴、精松昌彦、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)

Takiyazawa, T., Takagi, M., Itoh, K., Nakashima, K.: Spatiotemporal regulation of activity dependent genes in post-mitotic neurons. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010 (oral)

Abematsu, M., Tsujimura, K., Yamano, M., Saito, M., Kohno, K., Kohyama, J., Namihira, M., Komiya, S., Nakashima, K.: Epigenetic regulation of transplanted neural stem cells reconstructed injured spinal cord. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010

Sanosaka, T., Namihira, M., Takizawa, T., Nakashima, K.: Meningeal cells express astrocyte inducing cytokines in the developing mouse brain. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010

Tsujimura, K., Fukao, M., Fujiwara, R., Suzuki, A., Nakashima, K.: Proteomic identification of co-factors for the methyl-CpG binding protein, MeCP2. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010. San Diego, November 13-17, 2010

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. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010

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. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010

Berry, J., Tsujimura, K., Abematsu, M., Kohyama, J., Nakashima, K.: The effects of histone deacetylase inhibition on cortical development. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010

Sanosaka, T., Namihira, M., Takizawa, T., Nakashima, K.: Meningeal Cells Induce Astrocyte Differentiation of Neural Stem Cells. The 29th NAITO CONFERENCE ON GLIA WORLD, SHONAN VILLAGE CENTER, October 5-8, 2010

Mutoh, T., Koseki, Y., Mutoh, M., Koseki, H., Nakashima, K.: Np95 Regulates Astroglialogenesis in the Developing Cerebral Cortex. The 29th NAITO CONFERENCE ON GLIA WORLD, SHONAN VILLAGE CENTER, October 5-8, 2010

Nakashima, K.: Astrocyte Differentiation Mediated by Cytokines' Signaling. The 29th

NAITO CONFERENCE ON GLIA WORLD, SHONAN VILLAGE CENTER, October 5-8, 2010 (oral)

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)

Takagi, M., Sasaoka, H., Itoh, K., Kimura, H., Nakashima, K., Takizawa, T. : Spatiotemporal regulation of activity dependent gene expression in post-mitotic neurons. The 75th Cold Spring Harbor Symposium, Cold Spring Harbor, New York, June 2-9, 2010

Nakashima, K. : Mechanism in sequential differentiation of neural stem cells mediated by neuron-stem cell interaction. The 1st International Global COE Symposium. Gonryo Hall, Sendai, Japan, December 7-8, 2009 (oral)

Nakashima, K. : Mechanism in sequential differentiation of neural stem cells mediated by neuron-stem cell interaction. The 1st International Global COE Symposium. Gonryo Hall, Sendai, Japan, December 7-8, 2009 (oral)

Takizawa, T., Sasaoka, H., Takagi, M., Kimura, H., Nakashima, K. : The spatio-temporal regulation of activity-dependent genes in post-mitotic neurons. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, OIST Seaside House, Okinawa, Japan, November 29-December 3, 2009

Nakashima, K. : Mechanism for sequential acquisition of differentiation potential of neural stem cells. The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSN 2009, Busan, Korea, August 23-25, 2009 (Symposium oral)

Nakashima, K. : Epigenetic Regulations for Neural Cell Differentiation and Plasticity. Lasker/IRRF Initiative for Innovation in Vision Research, J. Erik Jonsson Center, Woods Hole, Massachusetts, July 13-15, 2009 (oral)

Sanosaka, T., Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Benjamin, D., Taga, T., Nakashima, K. : COMMITTED NEURONAL PRECURSORS CONFERS ASTROCYTE-DIFFERENTIATION POTENTIAL ON NEURAL STEM CELLS THROUGH NOTCH SIGNAL MEDIATED DNA DEMETHYLATION DURING MOUSE BRAIN DEVELOPMENT. ISSCR 7th Annual Meeting, Barcelona, Spain, July 8-11, 2009

Asano, H., Namihira, M., Kohyama, J., Aonuma, M., Sanosaka, T., Nakashima, K. : RETINOIC ACID-INDUCED CHROMATIN REMODELING PROMOTES ASTROCYTE DIFFERENTIATION OF NEURAL STEM CELLS. ISSCR 7th Annual Meeting, Barcelona, Spain, July 8-11, 2009

Kohyama, J., Tsujimura, K., Kirikae, I., Abematsu, M., Takebayashi, H., Nakashima, K. : REGULATION OF NEURAL CELL DIFFERENTIATION PLASTICITY IN ADULT CENTRAL NERVOUS SYSTEM. ISSCR 7th Annual Meeting, Barcelona, Spain, July 8-11, 2009

Takizawa, T., Taga, T., Misteli, T.,

Nakashima, K. : DYNAMIC CHANGES IN DNA METHYLATION AND SPATIAL POSITIONING OF AN ASTROCYTE SPECIFIC GENE, GFAP DURING ASTROCYTE DIFFERENTIATION. ISSCR 7th Annual Meeting, Barcelona, Spain, July 8-11, 2009

Nakashima, K. : Neuro-to-gliogenic switch triggered by Notch-induced demethylation in neural stem cells. CREST Neuroscience International Symposium, Awaji Yumebutai International Conference Center, June 2-3, 2009 (oral)

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 (oral)

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 (oral)

Nakashima, K. : Epigenetic Mechanisms regulating Neural Cell Differentiation and Plasticity. THE 23rd NAITO CONFERENCE ON Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells III, SHONAN VILLAGE CENTER, November 11-14, 2008 (oral)

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

該当なし。

2. 実用新案登録

該当しない。

3. その他

特になし

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

研究分担者 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】

本分担研究では、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平成20年度は抗てんかん薬のバルプロ酸ナトリウム、平成21年度はキノコ毒のイボテン酸、平成22年度はベンゾジアゼピン系睡眠薬のトリアゾラム（商品名：ハルシオン等）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の結果を参照しつつ、「幼若期」あるいは「成熟期」マウスに単回経口投与した際の、経時的（2、4、8及び24時間後）に採取した海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。その結果、1) バルプロ酸ナトリウムの幼若期、成熟期投与群共に、顕著な情動認知行動異常が認められないにも関わらず、成熟期投与群の海馬ではアポトーシス関連遺伝子の発現増加が認められる事、2) イボテン酸（1 mg/kg）の幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり情動認知行動異常が誘発されたが、幼若期投与群のみに発現変動が認められたシグナルネットワークとして、アポトーシス、膜の過分極、糖質コルチコイド、GABA-A受容体を介したシグナル、neuropilin・semaphorin分子を介する神経ガイダンスならびに、シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持を司るNpas4分子を介したシグナル、等が認められる事、3) トリアゾラム（1 mg/kg）の幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり情動認知行動異常が誘発されたが、幼若期投与群にて発現が減少した遺伝子リスト中にNpas4分子を介したシグナルが認められる事が明らかとなった。トリアゾラムとイボテン酸の幼若期投与群では、両化合物共に遅発性の情動認知行動異常が認められたため、この誘発分子機序の探索の為に、両化合物をそれぞれ幼若期に投与した際の海馬において、共通して発現減少を示す遺伝子を抽出したところ、Npas4とその関連遺伝子Bdnf、Egr4及びスパイン形成に関係するArc遺伝子を含む13遺伝子が見いだされた。このことは、少なくともこの13遺伝子は、遅発性の情動認知行動異常の誘発に関与する候補遺伝子であることを示唆しており、またこれらの遺伝子は、遅発性の情動認知行動影響との関連が示唆されていないため新規性の高い発見と考えられる。今後、このNpas4分子が関係するシグナルネットワークに着目した検討により、遅発性の情動認知行動異常の誘発分子機序に迫れるものとする。

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、幼若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、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。モデル中枢作動性物質として、平成20年度は抗てんかん薬のバルプロ酸ナトリウム [C₈H₁₅NaO₂、分子量：166.2、CAS No: 1069-66-5、Sigma]、平成21年度はキノコ毒のイボテン酸 [C₅H₆N₂O₄、分子量：158.1、CAS No: 2552-55-8、Tocris] を、平成22年度はベンゾジアゼピン系睡眠薬のトリアゾラム (商品名：ハルシオン等) [C₁₇H₁₂Cl₂N₄、分子量：343.2、CAS No: 28911-01-5、Wako] を選択した。

バルプロ酸ナトリウム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、発達期での情動・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 (PPARα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。バルプロ酸ナトリウムの臨床用量は、1日400-1,200 mg (経口) であり、また文献上の半数致死量 (マウス、経口) は977 mg/kg である。

イボテン酸を選択した理由は、イボテン酸はグルタミン酸と類似の構造を持ち、グルタミン酸のアゴニストとして働くものと考えられており、アミノ酸系神経伝達物質受容体に作用し、発達期での情動・認知障害を引き起こす可能性が示唆されるためであるが、これとは別に、すでに種村研究分担者との共同研究により、成熟期、幼若期、胎生期 (経胎盤投与) のマウスに同一用量のイボテン酸を単回経口投与し、それぞれ成熟後のマウスの情動認知行動を解析した結果、行動異常が幼若期においてのみ認められたという情報を得たためである。イボテン酸の文献上の半数致死量 (マウス、経口) は38 mg/kg である。

トリアゾラムは、GABA受容体に作用しCl⁻チャンネルを開口させCl⁻の透過性を亢進さ

せることで過分極を発生させ、活動電位の発生を抑制することにより催眠作用を発現するものと考えられている。トリアゾラムの文献上の半数致死量（マウス、経口）は1,080 mg/kgである。

トリアゾラムを選択した理由は、アミノ酸系神経伝達物質受容体に作用し、発達期での情動・認知障害を引き起こす可能性が示唆されるためであるが、これとは別に、すでに種村研究分担者との共同研究により、成熟期、幼若期、胎生期（経胎盤投与）のマウスに同一用量(1 mg/kg)のトリアゾラムを単回経口投与し、それぞれ成熟後のマウスの情動認知行動を解析した結果、行動異常が幼若期においてのみ認められたという情報を得たためである。

下記に各化学物質の構造式を記載する。

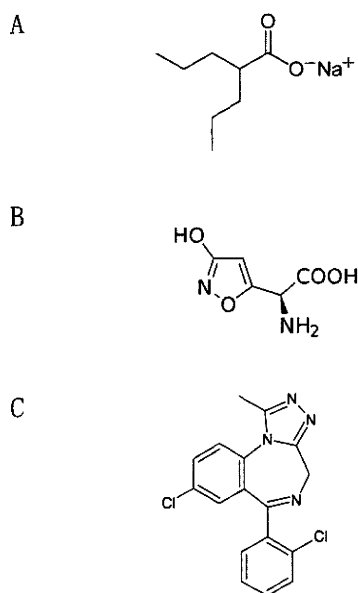


図1 バルプロ酸ナトリウム(A)、イボテン酸(B)、トリアゾラム(C)の構造式

B. 研究方法

妊娠マウスを含め C57BL/6CrSlc マウス（日本エスエルシー）を実験に用いた。被験物質の投与経路は強制経口投与、投与容量は10 (ml/kg)、溶媒は0.5%メチルセルロース（Wako）とし、メノウ鉢を用いて懸濁液を作製し用事調整にて投与液を作製した。

用量設定実験の結果ならびに、同一用量の被験物質を投与した際の成熟期、胎生期および幼若期の各投与群間の比較・検討を考慮し、バルプロ酸ナトリウムの最高用量を、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・認知行動解析実験では、この幼若期投与の比較対照として成熟期に150 mg/kgを投与した群も設けた。その結果、イボテン酸及びトリアゾラムの場合は、最高用量を1 mg/kgと設定した。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。

遺伝子発現変動解析に際しては幼若期（生後2週齢）あるいは成熟期（11週齢）の雄性マウスに3用量の被験物質（バルプロ酸ナトリウム：0、50、150及び500 mg/kg、イボテン酸及びトリアゾラム：0、0.1、0.3及び1 mg/kg）を単回強制経口投与し、投与後2、4、8及び24時間後に海馬をサンプリングし、Percellome法（遺伝子発現値の絶対化手法）（Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006）による網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて検討した。解析に際し、我々が独自に開発した「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、シグナルネットワークの探索は、市販のソフトである Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて検討した。

情動・認知行動解析では、胎生期 (妊娠 14.5 日)、幼若期 (生後 2 週齢)、成熟期 (生後 11 週齢) のマウスに 1 用量の被験物質を単回強制経口投与し、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。胎生期投与は妊娠マウスへの経胎盤暴露である。

有意差の検定は、Student の t 検定によりおこない、P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差 (SD) にて示した。

(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. 研究結果及び考察

C-1: バルプロ酸ナトリウムを単回経口投与した際の、情動・認知行動解析及び、網羅的遺伝子発現変動解析:

C-1-1: バルプロ酸ナトリウムを成熟期、幼若期および胎生期マウスに単回投与した際の、成熟後の情動・認知行動の比較解析:

情動・認知行動解析の結果、150 mg/kg バルプロ酸ナトリウム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 バルプロ酸ナトリウム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。

C-1-2: バルプロ酸ナトリウムを成熟期マウスに単回投与した際の、海馬における網羅的遺伝子発現変動解析:

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 及び 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。

C-2: イボテン酸を単回経口投与した際の、

情動・認知行動解析及び、網羅的遺伝子発現変動解析：

C-2-1：イボテン酸を成熟期、幼若期および胎生期に単回経口投与した際の、成熟後の情動・認知行動の比較解析：

情動・認知行動解析では、イボテン酸(1 mg/kg)を成熟期、幼若期、胎生期に単回経口投与し、各投与群につき、生後 12-13 週齢のマウスにつき検討したところ(n=8)、幼若期投与群では、溶媒対照群と比較し有意な変化が認められ、行動異常の誘発が示唆されたが、成熟期ならびに胎生期投与群では有意な変化が認められなかった。有意な変化が認められた検索項目は、条件付け学習記憶試験における音-連想記憶度の低下、オープンフィールド試験における中央部滞在時間の延長、明暗往来試験における総移動数の減少と初移動潜在時間の延長、プレパルス驚愕反応抑制試験におけるオーププレパルス 90db/ 120db 驚愕反応抑制とプレパルス 95db/ 120db 驚愕反応抑制の低下、であった。以上のことから、イボテン酸(1 mg/kg)の単回経口投与により、幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり、①不安関連行動逸脱と②記憶異常及び③情報処理能低下が誘発されたものと考えられた。

C-2-2：イボテン酸を単回経口投与した際の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析

C-2-2-A：イボテン酸を成熟期マウスに単回経口投与した際の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析

次いで、成熟期投与群での遺伝子発現変

動解析では、海馬において発現が有意に増加するものとして 1,708 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 107 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。また酸化的ストレス、アポトーシス、細胞増殖に関連する遺伝子の顕著な変動も認められなかった。神経伝達関連遺伝子では、Epha6 (Eph receptor A6) (投与 4 時間後、中・高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。投与初期(2 時間後)に顕著に発現が増加した遺伝子として、海馬あるいは神経系における機能は不明であるが、Aldh16a1 (aldehyde dehydrogenase 16 family, member A1) (投与 2 時間後、高用量)、Gpr137b (G protein-coupled receptor 137B) (投与 2 時間後、中・高用量) 遺伝子が認められた。Aldh は一般的に、アセトアルデヒドをカルボン酸に変換する酵素であることから Aldh16a1 はイボテン酸の代謝に関係する可能性が示唆された。なお、増加が認められた遺伝子のほとんどが、神経系での機能が不明であった。

成熟期マウスの海馬において、発現が有意に減少するものとして 260 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 4 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。また酸化的ストレス、アポトーシス、細胞増殖に関連する遺伝子の顕著な変動も認められなかった。

したがって現時点では、イボテン酸投与により、成熟期マウスの海馬において、発現が有意に増加あるいは減少する遺伝子リ