

201133014A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による
化学物質の健康影響評価法に関する研究
(H22-化学-一般-004)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宇佐見 誠

平成 24 (2012) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による
化学物質の健康影響評価法に関する研究
(H22-化学-一般-004)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宇佐見 誠

平成24(2012)年5月

目 次

I. 総括研究報告	
個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による 化学物質の健康影響評価法に関する研究-----	1
宇佐見 誠	
II. 分担研究報告	
1. 神経堤細胞の機能解析による評価法の開発-----	31
宇佐見 誠	
2. 発達成長期ニューロン・グリア新生評価法-----	43
佐藤 薫	
3. 神経幹／前駆細胞を用いた化学物質評価システムの構築-----	49
諫田 泰成	
4. 胎児肝細胞による化学物質への細胞応答のゲノミクス、メタボロミクス解析-----	57
石田 誠一	
5. 周産期における薬物動態関連因子の発現解析-----	65
簾内 桃子	
6. 成長期の脳辺縁系回路機能解析による評価法の開発-----	73
関野 祐子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	86
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	87

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による
化学物質の健康影響評価法に関する研究

研究代表者 宇佐見 誠 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第四室長

研究要旨

本研究は、神経系および肝臓系の細胞を用いた、発生・発達・再生過程の神経系においての、メカニズムのみならず薬物動態を考慮したヒトへの外挿を可能とする、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の確立を目的とする。前年度は、実験系の確立および新生児肝における薬物動態関連因子の発現解析に関する検討を行った。今年度は、確立した実験系を用いて、毒性発現メカニズムに基づく化学物質の健康影響評価法としての有用性について調べ、下記①～⑥の成果を得た。最終年度では、共通の化学物質を被験物質として用いることにより、これらの実験系の特徴および有用性を検討し、化学物質の健康影響評価法を確立する。この評価法は、化学物質による健康被害を受けやすい遺伝的・環境的要因を持つハイリスク集団の特定、および感受性の高い個体についても安全を確保できるような安全係数の実験データに基づく決定法の確立、等に寄与することが期待される。

①ラット神経堤細胞遊走実験法を用いて、Rho バスウェイのキナーゼである ROCK の、阻害剤による遊走促進および活性化剤による遊走抑制を明らかにした。この結果から、Rho バスウェイにより制御される、アクチン結合タンパクのリン酸化を介した神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を解析することが可能であると考えられた。一方、モデル化学物質として用いたレチノイン酸による神経堤細胞遊走阻害作用は、ROCK の活性化に依存しない可能性が高いと考えられた。

②新生ラット前脳矢状面切片培養系において、オリゴデンドロサイト分化および遊走に対する正の作用も検出可能であることを明らかにした。この実験系において検出されたオリゴデンドロサイトの分化および遊走への影響に関する結果をヒトへ外挿するためのバイオマーカー候補分子として、fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1、platelet derived growth factor receptor (PDGFR) a を見いだした。

③ヒト Embryonic Carcinoma 細胞株由来の神経幹/前駆細胞を用いて、化学物質としてトリブチルスズの影響を検討した。その結果、ミトコンドリアの酸素消費量および PGC1 の発現低下を指標に、毒性を評価できることを明らかにした。

④メタボローム解析では、成人肝細胞がアミノ酸代謝過程で産生するアンモニアを、主に尿素回路を通して代謝しているのに対し、胎児肝細胞由来の細胞では別な経路で代謝していることが示唆された。また、メタボローム解析による予測と一致して、より成人肝細胞に近い肝芽細胞のスフェロイド培養で、グルクロン酸抱合を受けるアセトアミノフェンに対する毒性がより高濃度にシフトしていた。遺伝子発現は胎児肝細胞の培養方法により大きく変化していた。

⑤幼若期ヒト肝細胞においては、尿素系除草剤リニュロン並びに CYP1 ファミリーの誘導剤であるメチルコラントレンおよびオメプラゾールにより、薬物代謝酵素の CYP1 ファミリーが強く発現誘導されることを示した。リニュロンによる発現誘導は、CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6 および UGT1A1 においても認められた。これらの結果から、幼若期における化学物質の健康影響評価においても、薬物代謝酵の誘導を考慮する必要があると考えられた。

⑥発達期における脳の扁桃核、小脳、海馬での、脳スライスイメージングによる GABA 放出の定量的解析を行った。この実験法により、成長期における脳における抑制性神経回路に及ぼす化学物質の影響を解析できると考えられた。

究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名	
佐藤 薫	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長
諫田 泰成	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室長
石田 誠一	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第三室長
簾内 桃子	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部研究員
関野 祐子	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

A. 研究目的

化学物質の健康影響に対する感受性は、成体に比べて成長期の個体において高いと考えられている。また、成長期における健康被害は、長期間にわたる場合や、恒久的な障害が起こる場合があるため、化学物質の適切な健康影響評価は非常に重要である。一方、個体の成長期は動物実験の結果からヒトへの外挿が難しい時期である。そのため、毒性発現メカニズムの解明に基づく評価法が必要であるが、体系的な方法は見あたらない。

そこで本研究では、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法を確立することを目的として、(1)神経堤細胞の遊走等機能解析法、(2)発達成長期脳神経系ニューロン・グリア新生評価法、(3)学習などの高次機能に影響を与える神経幹/前駆細胞を用いた方法、(4)成体における代謝データを利用可能な新生児期の肝臓による化学物質代謝の解析法を確立する。神経系および肝臓系の細胞を組み合わせることにより、発生・発達・再生過程の神経系においての、メカニズムのみならず薬物動態を考慮したヒトへの外挿を可能とする、化学物質の健康影響評価法の確立を目指す。

本研究では、化学物質の安全対策の観点から、国民の健康と生活環境の維持・向上に資する成果が期待される。すなわち、成長期等の化学物質に対する感受性の高い個体を対象とする、メカニズムのみならず薬物動態を考慮した実験データのヒトへのより確かな外挿を可能とする化学物質の健康影響評価により、化学物質による健康被害を受けやすい遺伝的・環境的要因を持つハイリスク集団を特定し、健康被害を予防することが期待される。また、成体での実験結果から経験的に

決められている、化学物質の暴露許容量を設定するための安全係数について、感受性の高い個体についても安全を確保できるような、実験データに基づく決定法の確立に寄与することが期待される。

化学物質による健康被害が生じてしまった場合には、被害の軽減および治療法の開発に資すると考えられる。さらに、細胞系を利用した迅速かつ簡便な化学物質のリスク評価という特色により、グローバルな化学物質管理のための、化学物質の効率的な評価手法として活用されることが期待される。複合的な化学物質の影響評価に応用し、体系的・総合的な評価手法として発展させることにより、新たな毒性学的概念の確立に資する。

前年度は、実験系の確立として、神経堤細胞の機能解析法、発達成長期の脳神経系におけるニューロン・グリア新生評価実験法、神経幹/前駆細胞の培養法、及び胎児肝細胞の培養を確立した他、胎児・新生児肝における薬物動態関連因子の発現解析を行った。

今年度は、確立した実験系を用いて、毒性発現メカニズムに基づく化学物質の健康影響評価法としての有用性について調べた。

1. ラット神経堤細胞遊走実験法

神経堤細胞は、脊椎動物における個体発生の限られた時期に存在し、胚の隅々に遊走した後に、末梢神経、グリア細胞などの神経系細胞を含む様々な細胞に分化することにより、個体の機能発育および形態形成に重要な役割を果たす。そのため、発生過程における神経堤細胞の誘導、遊走、分化などにおける異常は、神経提症と総称される神経芽細胞腫などの神経系の異常を含むさまざまな疾患を引き起こす。

そこで本研究では、神経堤細胞の機能解析による評価法の開発として、神経堤細胞の特徴的な機能である細胞遊走を主な指標とする、形態形成期に重要な役割を果たす神経堤細胞の機能に及ぼす化学物質の影響を調べる方法を確立し、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の一つとして用いることを目的とする。今年度は、神経堤細胞の遊走を制御するシグナルパスウェイの一つである Rho パスウェイ (図1) の、本実験法の神経堤細胞遊走における意義を調べると共に、化学物質の神経堤細胞遊走に及ぼす影響との関連を調べる。得られた結果に基づ

いて、神経堤細胞遊走に及ぼす化学物質の影響のメカニズムおよびそれを利用した健康影響評価法について検討する。

2. オリゴデンドロサイト新生実験法

グリア前駆細胞であるオリゴデンドロサイトはニューロンの髄鞘を形成するグリアであり、発達期にこの細胞が十分に作られないと重篤な認知障害が引き起こされることが示唆されている。また、オリゴデンドロサイトが特異的に失われる脳疾患である多発性硬化症では、しびれ、運動麻痺、歩行障害などが現れる。従って、発達期のオリゴデンドロサイトの正常な分化、遊走は脳神経系が健全に発達するためには欠かせない過程であるが、これまでにオリゴデンドロサイトの発達に着目した評価系は確立されていない。

そこで本研究では、発達成長期ニューロン・グリア新生評価法として、放射状に遊走するグリア前駆細胞、特にオリゴデンドロサイト新生への影響評価系を確立する。オリゴデンドロサイト発達を緑色蛍光蛋白質 (enhanced Green Fluorescent Protein: eGFP) 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を採用した実験法の確立を目指した。本年度は、我々の確立した実験系でオリゴデンドロサイトの分化および遊走に対する正の作用も検出可能かどうかを検討し、本実験系の信頼性を検証する。また、ラット前脳矢状面切片培養系において得られたオリゴデンドロサイトの分化および遊走への影響に関する結果をヒトへ外挿するためのバイオマーカー分子を検討した。

3. ヒト神経幹／前駆細胞培養実験法

神経幹／前駆細胞は、胎児および成体に存在する未分化な細胞で神経細胞などへの分化能を有する。中枢神経系の発達に加えて、学習などの高次機能に寄与することが知られている。発達期に化学物質に暴露されて神経幹／前駆細胞に影響が出る場合には、その後長期にわたり中枢神経毒性が出る可能性が考えられる。従って、神経幹／前駆細胞を用いることによって、特に発達期における化学物質のリスクを評価できる可能性がある。

化学物質の健康影響評価法に使用可能なヒト神経幹／前駆細胞のソースとしては、初代培養細胞および幹細胞が考えられる。しかし、ヒト神経幹／前駆細胞の初代培養細胞は

入手が困難であり、また倫理的な問題があることから現実的ではない。幹細胞としては、ヒト Embryonic Stem (ES) 細胞やヒト induced pluripotent stem cells (iPS) 細胞、ヒト Embryonic carcinoma (EC) 細胞などがある。

ヒト ES 細胞の場合には初代培養細胞と同様に倫理的な障害があり、また培養の過程で脱分化することがある。ヒト iPS 細胞の場合には、様々な形質を有する細胞に分化誘導されるために、形質が安定した細胞が得られず、健康影響評価のモデル細胞には適さないと考えられる。

一方、ヒト EC 細胞はヒト胎児の繊維芽細胞から樹立され、神経系を含む多くの組織への分化能を有する。不死化されていることから形質も安定で、モデル細胞として扱える可能性が高い。しかし、ヒト EC 細胞から神経幹／前駆細胞への分化誘導法は確立されていない。そこで本研究では、ヒト EC 細胞を用いてヒト神経幹／前駆細胞のモデル細胞の作製を行い、化学物質の健康影響評価システムの開発を目指した。今年度は、有機スズ化合物を用いて、安全性評価の指標の探索を行った。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

個体の成長期である胎児・新生児においても、肝臓は重要な外来性化学物質の代謝器官であると共に、その毒性発現の標的器官でもある。また、胎児・新生児の肝臓は、成体と比べて、化学物質に対する感受性および代謝能などの機能に差異がある。そのため、個体の成長期における化学物質の健康影響評価においては、成長期の肝臓の感受性および機能を評価できる実験法が必要である。

本研究では、これまでに我々が研究してきたヒト胎児由来肝細胞培養実験法を、化学物質の健康影響評価に利用する方法を確立する。本年度は昨年度に引き続き、メタボローム解析を進めるとともに、昨年度の結果に基づき、化合物暴露実験を実施した。合わせて、ゲノミクス解析にも着手した。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

肝臓の薬物代謝酵素および薬物動態関連因子は、化学物質の健康影響評価において体内動態に関与する重要な因子であるだけでなく、化学物質の代謝活性化などの毒性発

現およびステロイドホルモン等生体内基質の生合成と密接に関連している。そのため、その発現変動は個体の成長に大きな影響を及ぼす可能性がある。

しかし、実験動物とヒトの間には、発現している CYP 酵素の種類、量そして酵素学的性質などの点で種差が認められることから、化学物質の暴露がヒト成長期に及ぼす健康影響を予測するためにはヒト組織を利用した検討が必要である。日本国内におけるヒト組織の入手は極めて困難であるが、成長期および成人ドナー由来の市販ヒト肝細胞を海外から入手し、各成長期における薬物代謝酵素および薬物動態関連因子の特性、および化学物質暴露による影響を明らかにすることで、化学物質がヒト成長期に与える影響の予測に貢献できると考えられる。

本研究では、成長期のヒト肝細胞における薬物代謝酵素および薬物動態関連因子の発現の特性およびそれらの化学物質への暴露による影響を、遺伝子レベルで調べる。今年度は、前年度に引き続き、とりわけ幼若期における化学物質の毒性発現に密接に関わる CYP1 ファミリーに焦点を当てた。ラットにおいて CYP1A2 誘導能を有することが知られている塩素を有するフェニルウレア系除草剤であるリニュロンの曝露が、ヒト肝薬物代謝誘導能に与える影響を mRNA および遺伝子レベルで検討した。

6. 成長期の脳辺縁系回路機能解析

動物を用いた試験結果のヒトへの外挿性を担保するためには、ヒトでも動物でも共通の機能バイオマーカーを設定する必要がある。GABA は、ヒトでも動物でも成熟脳の抑制性神経機能を担う伝達物質である。したがって、GABA の機能を評価の対象とすることで、動物を使った試験結果をヒトに外挿することが可能となる。また、扁桃体が情動を司り、小脳が運動機能を司り、海馬が記憶と学習を司るということに関しても、動物とヒトで共通している。さらに、成長期の脳の経験により機能を獲得していく可塑性の高さを決定する臨界期は、動物でもヒトでも GABA の機能発達により決定されている。このように GABA の機能は、動物にもヒトに共通するメカニズムである。成長期の GABA の働きは、脳の発達において重要な鍵である。近年、自閉症、統合失調症、気分障害などの原

因として GABA 機能の発達異常が示唆されている。

そこで、本年度は、GABA 機能の生後発達のインビトロ評価系の確立を目的とした。膜電位感受性色素による抑制性応答を可視化する実験法、細胞外に遊離される GABA を酵素で可視化する実験法、海馬神経回路の反回抑制を電気生理学的に定量的に評価する実験法、の3つのインビトロ実験法を比較検討した。

B. 研究方法

1. ラット神経堤細胞遊走実験法

ウィスター系ラット (Crlj:WI, 日本チャールスリバー) の妊娠 10.5 日胚から、タングステン針を用いて、物理的に菱脳部神経管を取り出した。取り出した菱脳部神経管を、培養シャーレ、培養マルチプレート又は培養用スライドチャンバー (Becton, Dickinson and Company) に培養液(10% Fetal Bovine Serum を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO)と共に入れ、炭酸ガスインキュベーター内で、5% CO₂、37°Cにて培養した。培養 24 時間及び 48 時間に、神経管から遊走した細胞すべてを含む領域を、位相差顕微鏡 (BZ-900、株式会社キーエンス) で撮影し、神経管の培養容器底面への遊走細胞の広がりを観察した。細胞の撮影画像ファイルを画像解析ソフト ImageJ (Rasband, W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009) で開き、最外側の神経堤細胞をポリゴンツールで繋いでできる図形を円とみなして、その面積から計算した半径を神経堤細胞の遊走距離として解析した。

2. オリゴデンドロサイト新生実験法

前脳矢状面切片培養系では、生後 2 日齢ラットの前脳矢状面切片標本を作成し (150 mm) トランスメンブレン (millipore) 上に静置し、SVZ に eGFP tag を組み込んだ改変型レトロウィルス (NIT-eGFP; J Neurosci 19(19) 8487-97, 1999) を 30 nl 注入することにより神経幹細胞および前駆細胞を標識した。切片培養用培地 (N2 1%, B27 1%, L-glutamine 2 mM, D-glucose 33.3 mM, Kynurenic acid 0.5 mM in Neurobasal) で 3 日間培養した。

オリゴデンドロサイト分化および遊走の

確認では、eGFP 標識細胞の O1 (オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー) の発現について免疫組織化学的に検討した。ブロッキング液で 1 時間処理した後、4°C で抗 O1 抗体 (IgM) (Millipore [Chemicon] MAB344) により 2 日間処理し、PBS で 3 回洗浄した後、蛍光標識された二次抗体で 4°C で 2 日間処理し PBS で洗浄した。eGFP (+) 細胞中の eGFP (+) O1 (+) 細胞の比率を算出した。

3. ヒト神経幹/前駆細胞培養実験法

ヒト EC 細胞株 NT2/D1 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。

NT2/D1 細胞を 10^6 cells/dish の割合で非接着性のペトリディッシュ (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) に播種した。週に 2 回の割合で培地を交換し、培養 1 週間後にレチノイン酸 (All-Trans Retinoic Acid $10\mu\text{M}$, Sigma-Aldrich) を添加して、さらに 1 週間培養を行った。得られた sphere を 0.25% トリプシン (Gibco BRL) とピペッティングにより single cell にして分化細胞として用いた。分化細胞を 10^4 cells/dish の割合で 96 穴プレート (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) に播種した。細胞増殖は、MTS (Promega) を加えて 1 時間培養し、595nm における吸光度の変化により解析した。

酸素消費量は、細胞外フラックスアナライザー (Seahorse Bioscience) を用いて、酸素消費速度 OCR (Oxygen Consumption Rate) により解析した。専用の 96 穴プレートに分化細胞を播種して、接着させた後、種々の濃度の有機スズあるいは酢酸スズを添加した。24 時間後に OCR の測定を行った。

遺伝子発現は、Applied Biosystems 7900HT Fast リアルタイム PCR システムを用いて解析した。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

ヒト胎児肝細胞 (CS-ABI-3716) は、DS ファーマバイオメディカル (株) より購入した。肝芽細胞を誘導する場合には、培養 4 時間後に培地交換を行い、1mM 酪酸ナトリウムを含んだ CSC Complete Medium で 8 日間培養を行った。肝芽細胞の三次元培養では、ヒト胎児肝細胞を HDM 培地に懸濁し、1mg/ml Poly-L-Glutamic acid 溶液で被覆した

直径 60mm の培養ディッシュ (IWAKI 社製、浮遊細胞用) に、 8×10^5 cells/dish の密度で播種した。ヒト成人肝細胞は、BIOPREDIC 社よりヒト非凍結肝細胞 (12.5 cm^2 フラスコ接着、製品番号 HEP220-FL12) 3 ロットを購入した (ロット番号: HEP220523、HEP220524、HEP220527)。

代謝物質の測定はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社に委託した (委託試験名: CE-TOFMS による培養細胞のメタボローム解析、報告書番号: NIHSF-HMT-003)。統計検定は Oneway ANOVA ($p < 0.05$) により行い、検定を通過した代謝物について階層的クラスタリングにより解析した。階層的クラスタリング解析は、距離の定義に Pearson uncentered を用い、群平均距離法 (Average) により行った。

化合物暴露実験では、培地中にアセトアミノフェンを $0.25\text{ mM} \sim 20\text{ mM}$ まで添加し、3 日間培養した。その後、セルカウンティングキット-8 (同仁化学) を用いて、相対的細胞数を計測した。対照としてはホスホマイシンを同濃度で同時間暴露した。

ゲノミクス解析では、サンプルより調製した RNA を定法に従い標識したのち、Affymetrix 社 HG-U133 チップを用いて、網羅的遺伝子発現データを得た。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

肝細胞における毒性発現と密接にかかわる CYP1 ファミリーの標的誘導剤であるメチルコラントレン (3-MC; $0.2, 0.5\mu\text{M}$)、オメプラゾール (OPZ; $5\mu\text{M}$) およびニユロン (LNR; $5 \sim 75\mu\text{M}$) を、5% CO₂-Air インキュベーター下、初代培養ヒト肝細胞に 9 時間曝露した。3-MC と LNR はアセトニトリルに、OPZ はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。溶媒の培地中終濃度はいずれも 0.1% とした。

Qiagen RNeasy Mini kit および High Capacity RNA-to-cDNA kit にて cDNA サンプルを調製した。qRT-PCR 法により以下の酵素、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6、CYP3A4、CYP3A5、UGT1A1 および GSTA2 の発現について調べた。標的遺伝子は比較 Ct 法にて相対的定量を行った。薬剤処理が標的遺伝子に与える影響は、溶媒対照の値を 1 とした場合の比率で示した。

6. 成長期の脳辺縁系回路機能解析

実験対象のラットまたはマウスをエーテルまたはハロセンで深麻酔したのち断頭し速やかに小脳、大脳を取り出した。McIlwain tissue chopper またはビブラトーム型スライサーを用いて、厚さ 400~450 μm (2 週齢ラットから海馬スライスを切り出す場合には厚さ 600 μm) の扁桃体、小脳、海馬スライス標本を作成した。

膜電位感受性色素による GABA 機能の評価では、成熟マウスの扁桃体の外側部を走行する外包に同心円型刺激電極を挿入して電気刺激を行った(強さ;10~50 μA 、持続時間 200 $\mu\text{秒}$)。スライス内の神経細胞集団の応答を、落射式蛍光顕微鏡 (MVX-10; オリンパス) と CMOS センサーを搭載した光量差分増幅カメラシステム (ULTIMA; ブレインビジョン) で撮影した

脳組織からの GABA 放出分布の測定には、ガラス表面に固定化した GABA 分解酵素 (GABase) を用いた蛍光測定法を使用した。種々の週令のラットまたはマウスの脳から作成した小脳と扁桃体スライスをのせて、脳スライス表面から遊離する GABA が α -ケトグルタル酸存在下で最終産物のコハク酸に分解される際に発生する NADPH の蛍光を高感度 CCD カメラで観察した。

ダブルパルス刺激後の反回抑制の測定による GABA 機能の評価では、刺激電極にはステンレスの双極電極 (直径 50 μm) を用い、CA3 領野から CA1 錐体細胞への入力線維が密集するシナプス層に置いた。記録電極にはガラス微小電極を用い (抵抗 1-2 $\text{M}\Omega$)、CA1 領野の錐体細胞層からは集合スパイク電位を、シナプス層から集合シナプス後電位を記録した。

(倫理面への配慮)

動物実験におい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程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。

ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱い「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法) および国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

ヒト胎児肝細胞は、米国 ABI 社がインフォームドコンセントを得て研究用に取得したものを、DS ファーマバイオメディカル(株)より購入した。

ヒト初代肝細胞は市販されているものであり、ドナー情報は連結不可能匿名化されており倫理的に問題はない。しかし、適宜倫理委員会に申請をし、審査承認を経たのち実施した。

凍結ヒト肝細胞は、個人情報情報が確実に連結不可能匿名化されている市販品で、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会において審査「非該当」と判断されたものを使用した。

C. 研究結果

1. ラット神経堤細胞遊走実験法

Rho パスウェイ (図 1) のキナーゼである ROCK の阻害剤を培養液に添加して、神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べた結果、ROCK 阻害剤の添加により、神経堤細胞の遊走は濃度依存的に促進された (図 2A)。ウエスタンブロッティング法により、回収した神経堤細胞におけるリン酸化アクチン結合タンパクを調べたところ、タンパク量の減少が認められた (図 2B)。これは Rho パスウェイの阻害効果と一致する。一方、ROCK 活性化剤を培養液に添加した場合には、神経堤細胞の遊走は抑制された (図 2C)。これらの結果により、Rho パスウェイによるアクチン結合タンパクのリン酸化制御により、神経堤細胞の遊走が制御されていると考えられた。

神経堤細胞遊走阻害作用を示したレチノイン酸存在下で培養した神経堤細胞におけるアクチン結合タンパクのリン酸化を調べたところ、リン酸化タンパクの増加が認められ (図 3A)、ROCK 阻害剤による遊走促進およびリン酸化タンパクの減少とは、逆の現象が起きていると考えられた。

この結果および上記の ROCK 活性化剤の結果から、レチノイン酸の神経堤細胞遊走阻害作用において、Rho パスウェイの関与が予想されたので、ROCK 阻害剤を同時に培養液に添加して、レチノイン酸の神経堤細胞遊走阻害に及ぼす影響を調べた。その結果、ROCK 阻害剤により、遊走が促進された神経堤細胞においてもレチノイン酸による遊走阻害作用が、レチノイン酸単独と同様の比率

で観察され、遊走阻害の ROCK 阻害剤による抑制は認められなかった (図 3 B)。この結果から、レチノイン酸による神経堤細胞遊走阻害作用は、ROCK の活性化に依存しない可能性が高いと考えられた。

2. オリゴデンドロサイト新生実験法

前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイトの分化および遊走に対するプロラクチン (Prl) の作用を調べた。前脳矢状面切片 SVZ の神経幹細胞および前駆細胞を eGFP で標識し、Prl 存在下 (10, 100 nM) で 3 日間培養した。図 1 B の eGFP (+) 細胞数が示すように、Prl は神経幹細胞および前駆細胞の増殖を抑制する傾向を示したが、有意な差には至らなかった。しかし一方、GFP (+) 細胞の遊走に対しては促進的に作用した (図 4 A)。また、eGFP (+) O1 (+) 細胞数は Prl の用量依存的に増加した (図 4 B)。eGFP (+) 細胞中の O1 (+) 細胞が占める割合を算出したところ、Prl の用量依存的に O1 (+) 細胞の比率が上がっていくことが明らかとなった (図 4 C)。Prl 100 nM においてはその差は有意となっていた。以上の結果は Prl によってオリゴデンドロサイトの分化および遊走が促進されたことを示している。

培養前脳矢状面切片において O1-FGFR1, O1-PDGFR α の二重染色を行い、FGFR1 および PDGFR α が遊走のバイオマーカーたり得るかどうかについて検討した。図 5 に示すように、SVZ の O1 (+) 細胞はほぼ全てが FGFR1(+) であった。図 5 D の orthogonal 画像が示すように、FGFR1 シグナルと O1 シグナルは確かに同一の細胞由来であった。しかし、FGFR1 (+) 細胞の中には O1 を発現していない細胞も数多く見受けられた。図 6 で示すように、PDGF α の場合も同様に、SVZ の O1(+) 細胞はほぼ全てが PDGF α (+) であった。しかし、PDGF α (+) 細胞の中には O1 を発現していない細胞も数多く見受けられた。図 6 D の orthogonal 画像が示すように、PDGF α シグナルと O1 シグナルは確かに同一の細胞由来であった。

3. ヒト神経幹/前駆細胞培養実験法

化学物質として有機スズ化合物であるトリブチルスズを用いて、神経幹/前駆細胞の生存率に対する影響を検討した結果、濃度依存的に生細胞数の減少が認められた (図 7)。

一方、コントロールとして毒性の少ない無機スズ化合物である酢酸スズでは、生細胞数の減少が認められなかった。従って、生細胞数は毒性と相関していることが示唆された。

神経幹/前駆細胞の生細胞数減少のメカニズムとしてミトコンドリア機能に着目し、酸素消費量の測定を行った結果、トリブチルスズ曝露によって濃度依存的に酸素消費量の低下が認められた (図 8)。また酸素消費量の低下は 100nM から認められたことから、細胞数と平行であった。一方、酢酸スズの曝露によってほとんど影響が認められなかった。また cAMP や cGMP のアナログは酸素消費量を上げることが知られているが、神経幹/前駆細胞においても同様の作用を確認している (図 9)。これらの結果から、トリブチルスズはミトコンドリアの酸素消費量の低下を介して細胞数を減少させることが示唆された。

このミトコンドリア機能の低下を分子レベルで検討することによりリスク評価の指標の候補が明らかになると考えて、トリブチルスズによって影響を受けるミトコンドリア関連遺伝子の探索を行った。その結果、トリブチルスズの長期曝露によりエネルギー産生に関わる転写共役因子 PGC1 α および β の発現が低下することを見いだした (図 9)。毒性の低い酢酸スズの曝露ではほとんど影響が認められなかった。従って、PGC1 はトリブチルスズの毒性に関連して発現が低下することが示唆された。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

メタボローム解析では、昨年度得られた結果に関して、更に詳細な検討として階層的クラスタリングにより分類したところ、成人肝細胞は元の胎児肝細胞と類似性が高いことが示唆された。胎児肝細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養の 3 群間の Oneway ANOVA 検定では 119 の代謝物が検定を通過し、階層的クラスタリング解析では代謝物を各群間の変動により大きく 7 つのグループに分けることができた (図 10)。胎児肝細胞由来の 3 細胞間の比較で胎児肝細胞の単層培養から肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養に向けて相対的存在量が増加する代謝物は、「解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエ

ン酸回路」や「その他の糖代謝」、「プリン代謝、ピリミジン代謝」などのパスウェイに属し、エネルギーを産生し代謝が活発に行っていることを示唆する代謝物が多く含まれていた。また、種々のアミノ酸代謝経路の代謝物に注目した場合、タンパク合成に使用されるアミノ酸で相対的存在量が増加傾向にあった。一方で、相対的存在量が減少する代謝物は「アミノ酸代謝 (Gly, Ser, Cys)」に属する代謝物が含まれ、脂肪酸の減少傾向と合わせ膜成分を合成する活性が亢進していることが示唆された。

化合物暴露実験については、昨年度のメタボロームの解析に基づいて、肝臓で95%以上がグルクロン酸抱合を受け尿中に排泄されることが知られているアセトアミノフェンの胎児肝細胞並びにそれから誘導された肝芽細胞に対する細胞毒性の発現を測定した(図11)。その結果、アセトアミノフェンの毒性発現には、肝芽細胞のスフェロイド培養で、胎児肝細胞より高濃度を必要としていた。

ゲノミクス解析において、胎児肝細胞の培養法により発現が変化した遺伝子数を表1に示す。上段は2倍以上の変化を示した遺伝子を計数した場合で、500前後の遺伝子で変化が認められた。そこで、4倍以上の変化を示した遺伝子を計測したところ、下段に示すように、なお50遺伝子前後で発現の変化が認められた。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

LNRを4歳時ドナー由来の肝細胞に曝露したところ、*CYP1A1*の顕著な発現増加が認められた。5 μ Mから75 μ M濃度範囲において、溶媒対照の14~587倍の濃度依存的な増加が認められた。25 μ Mおよび75 μ M濃度において*CYP1B1*と*CYP1A2*では、各々16~56倍、20~39倍の有意な発現の増加が見られた。*CYP1A1*、*CYP1B1*、*CYP1A2*発現の増加は、3-MCで最も強く、ついでLNRとOPZの順であった(3-MC) LNR \geq OPZ(図12および13)。

また、*CYP1*ファミリー以外の分子種でもLNRによる発現増加が認められた。LNR 75 μ M曝露においては、*CYP3A4* (18倍)、*CYP3A5* (11倍増加)、*CYP2B6*と*UGT1A1*も僅かであるがそれぞれ溶媒対照の約4倍と2倍の増加が認められた(図13および14)。LNRによる影響は、*CYP2A6*および*GSTA2*では認

められなかった(図14)

6. 成長期の脳辺縁系回路機能解析

マウス冠状スライスにおける扁桃体への入力線維が走行する外包を電気刺激すると、扁桃体外側核(LA)領域全体に脱分極性応答が広がった後に、過分極性の応答が観察された(図15A)。この過分極性の応答は持続時間が長く600~800ミリ秒持続した。この持続時間の長い過分極性応答がGABAによる抑制性の応答であることを確認する目的で、GABA受容体阻害薬により検証した。GABA_A受容体阻害薬を投与するとてんかん波が発生した。波形解析が困難となったため、GABA_B受容体阻害薬を用いたところ、持続時間の長い過分極成分が阻害された(図15B)。従って、扁桃体スライスで外包を刺激した際にLA内に観察される過分極に対応する光信号は、GABAに由来する抑制性の応答であることが判明した。

マウス扁桃体スライスから放出されるGABAを可視化する方法により、GABA機能の生後発達を観察した(図16A)。生後14日の扁桃体の各亜核からGABAの遊離は観察されなかった(図16B)が、生後36日になると扁桃体内のLAと中心核(Ce)ではGABA遊離は観察されないが、基底外側核(BLA)でのGABAの遊離が観察された(図16C)。情動を司る扁桃体において、細胞外へのGABAの遊離の空間パターンが生後に大きく変化することがわかった。

ダブルパルス刺激後の反回抑制の測定によるGABA機能の評価では、海馬CA1領域から記録した集合スパイク電位と集合シナプス後電位からそれぞれ比を求めた。また刺激間隔はGABA系の効果がどのくらい続くかをみるために20ミリ秒まで調べた。その結果を図17にまとめた。CA1領域の神経細胞への入力部位であるシナプス層で得られた集合シナプス後電位のペアパルス比は、脳発達期の2週齢でほかのどの週齢の値よりも大きかった。集合スパイク電位の比も脳発達期である2週齢で値が2を超えており、他の3群の値(1以下)よりも顕著に大きかった。

D. 考察

1. ラット神経堤細胞遊走実験法

前年度において確立したラット神経堤細胞

胞遊走実験法について、今年度は、化学物質による神経堤細胞遊走に及ぼす影響のメカニズムを解析する方法を確立するために、神経堤細胞の遊走を制御するシグナルパスウェイの一つである Rho パスウェイの、本実験法の神経堤細胞遊走における意義を調べると共に、化学物質の神経堤細胞遊走に及ぼす影響との関連を調べた。

Rho パスウェイのキナーゼである ROCK の阻害剤及び活性化剤を用いた実験により、Rho パスウェイによるアクチン結合タンパクのリン酸化制御により、神経堤細胞の遊走が制御されていることが示された。このことから、本実験法において、Rho パスウェイにより制御される神経堤細胞の遊走を解析することが可能であると考えられる。しかし、ROCK の活性化によると予想されたレチノイン酸による神経堤細胞遊走阻害作用は ROCK 阻害剤による影響を受けなかったので、メカニズムを解析する方法の確立には、さらに検討が必要である。現在、siRNA を用いた、アクチン結合タンパクのリン酸化に関連する分子の解析を実施中である。

2. オリゴデンドロサイト新生実験法

前脳矢状面切片培養系を用いて、Prl が神経新生ばかりでなく、オリゴデンドロサイトの分化および遊走も促進することを見いだした。この結果は、前脳矢状面切片培養系においてオリゴデンドロサイト分化および遊走に対する正の作用も検出できることを示している。Prl は eGFP(+) 細胞数をむしろ減少させる傾向を示し、一方で、O1 (+) 細胞数が増加した。また、eGFP(+) 細胞分布範囲もコントロール群に比較して明らかに広がっている。これは、Prl 処理により、SVZ の神経幹細胞および前駆細胞が増殖から分化の方向へとシフトしたことを示している。本 Prl 適用条件での神経新生の変化に興味を持たれる。

ラット前脳矢状面切片培養系において検出されたオリゴデンドロサイトの分化および遊走への影響に関する結果をヒトへ外挿するためのバイオマーカー候補分子を文献調査により探索したところ、遊走のバイオマーカーとして FGFR1、PDGFRa を見いだした。FGFR1 は多発性硬化症においてオリゴデンドロサイト前駆細胞が活発にリクルーティングされるときにオリゴデンドロサイ

ト前駆細胞に高発現している分子である。また、多発性硬化症などのミエリン異常疾患においてオリゴデンドロサイト前駆細胞を移植する場合、PDGFa (+) 細胞を移植すると非常に遊走能が高く移植の効果が高いことが知られている。今回、培養前脳矢状面切片において O1 (+) 細胞はほぼ全てが FGFR1 (+)、PDGFRa (+) であった。遊走が正常に起こっている場合、これらの両分子が確かに O1(+)
細胞に発現していることが確認された。本年度までにオリゴデンドロサイトの分化および遊走に対して正の方向に働く Prl と負の方向に働く AraC を見いだしている。そこで今後は、これらの薬物が FGFR1、PDGFRa の発現量、発現パターンにどのような影響を与えるのかを確認する必要がある。

3. ヒト神経幹／前駆細胞培養実験法

有機スズをモデル化合物として用いた結果、非常に低濃度の有機スズの曝露により神経幹／前駆細胞の生存率を抑制することを見いだした。既報では、500nM や 1μM など非常に高濃度のトリブチルスズ的作用を検討しており、毒性域の基準値の設定にはつながらないことが考えられる。本研究では 100 nM で作用が検出されたことから、本アッセイ系は従来よりも高感度で毒性を評価できる可能性がある。

作用のメカニズムとしては、PGC1 はエネルギー産生に関わる遺伝子発現を制御していることから、その下流のシグナル経路も抑制され、結果として酸素消費量が低下する可能性が考えられる。

化学物質のリスク評価は、従来、実験動物の行動薬理などを指標に行われているが、種差の問題がある。また、細胞に関しては動物由来やヒト由来の神経細胞株を用いて検討されているものの、適切なモデル細胞や毒性の指標などは開発されておらず、in vitro 健康影響評価系はまだ確立されてはいない。本研究で用いた、低濃度の有機スズの毒性をミトコンドリアの機能およびエネルギー産生に関わる転写共役因子 PGC-1 の発現低下により評価できる可能性が示唆された。PGC-1 発現量は他の化学物質評価の指標につながる可能性がある。今後は、ヒトにおけるデータと比較することにより成長期における化学物質の健康影響評価系の構築を目指したい。

4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

メタボローム解析に関しては、胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養の3群間の比較を行った。その結果、胎児肝細胞の単層培養と成人肝細胞間で変化する代謝物としては「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」、「アミノ酸代謝 (Gly, Ser, Cys)」、「アミノ酸代謝 (Asp, Ala, Lys)」、「解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路」の各代謝経路の代謝物が47代謝物中6代謝物以上含まれていた。尿素回路の主な機能は尿素の産生で、その主要産物である Ornithine (46.9-fold), Urea (7.7-fold), Citrulline (4.8-fold)が成人肝細胞で高いのは成人肝細胞がアミノ酸代謝の過程で細胞内に産生するアンモニアを主に尿素回路を通して代謝しているものと思われる。一方で、胎児肝細胞由来の3細胞はこれら3種の代謝物の細胞内のレベルが成人肝細胞に比べ低く、細胞内で産生するアンモニアを別な経路で代謝していることが示唆される。このことはArg代謝の別経路である Creatine の合成経路の代謝物が胎児肝細胞由来の細胞で分化誘導に伴い上昇し、成人肝細胞に比べ高いレベルを維持していることから示唆される。

昨年度と今年度を実施したメタボローム解析の結果をもとに、アセトアミノフェンへの暴露実験を行った。その結果、より成人肝細胞に近い、肝芽細胞のスフェロイド培養においてアセトアミノフェンに対する毒性発現がより高濃度にシフトしていたことは、胎児肝細胞より成人肝細胞でグルクロン酸抱合能が高いという予測と一致していた。

本年度はまた、ゲノミクス解析に着手した。各細胞から得た RNA サンプルを用いて、Affymetrix 社 HG-U133 チップにて網羅的発現解析を行った。その結果、胎児肝細胞の培養法の違いにより、多くの遺伝子において、発現に変化が認められた。遺伝子発現レベルでは、培養方法を変えることで、大きな変化が起きていると考えられ、今後、詳細を解析していくとともに、メタボローム解析の結果とも比較検討していくことが必要と考えられる。

5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

ヒト肝において CYP1A および CYP1B1 の酵素活性とタンパク、および mRNA の発現は極めて低いことが知られている。同様に幼若期のドナーに由来するヒト肝細胞においても CYP1 分子種の発現は低いものの、CYP1 mRNA は LNR 曝露により強く誘導された。特に CYP1A1 mRNA に対する誘導効果が顕著 (75 μ M で、587 倍) であることから、幼若期のヒト肝細胞は、CYP1 分子種特に CYP1A1 を強く誘導する能力を有することが示された。一方、生体内基質の代謝に関与することが知られている CYP1A2 も LNR により強く誘導されている (CYP1A1 > CYP1B1 \geq CYP1A2)。これらの結果から、幼若期における化学物質の健康影響評価においても、薬物代謝の誘導を考慮する必要があると考えられた。

6. 成長期の大脳辺縁系回路機能解析

膜電位変化を可視化する実験方法により、大脳辺縁系の抑制性回路の成熟を比較評価するためには、パラメータを決定するまでに今後いくつかの条件検討が必要である。

脳組織から遊離する GABA を可視化してその分布を調べる方法は、脳の成熟にともなって起こる遊離部位の変化は、扁桃体でも小脳でも非常に大きいため、遊離の空間パターン変化が各脳部位で起こる時期を調べることは、発達指標として非常に有望である。

反回抑制を評価する方法は簡便であり、生後発達変化が明確であり、かつ定量性が高いと言える。

E. 結論

ラット神経堤細胞遊走実験法において、Rho パスウェイにより制御されるアクチン結合タンパクのリン酸化を介した神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を解析することが可能である。レチノイン酸による神経堤細胞遊走阻害作用などにおけるメカニズムの解析法の確立にはさらに検討が必要である。

新生ラット前脳矢状面切片培養系において、オリゴデンドロサイト分化および遊走に対する正の作用も検出可能であることがわかった。オリゴデンドロサイト分化および遊走への影響に関する結果をヒトへ外挿するためのバイオマーカー候補分子として FGFR1、PDGFR α を見いだした。

ヒト EC 細胞から分化誘導した神経幹/前

駆細胞を用いて、ミトコンドリアの機能を指標とすることにより化学物質のリスク評価に応用できる可能性が示唆された。

メタボローム解析により、成人肝細胞がアミノ酸代謝過程で産生するアンモニアを主に尿素回路を通して代謝しているのに対し、胎児肝細胞由来の細胞では別な経路で代謝していることが示唆された。より成人肝細胞に近いと考えられる肝芽細胞のスフェロイド培養で、グルクロン酸抱合を受けるアセトアミノフェンに対する毒性がより高濃度にシフトしていた。遺伝子発現は胎児肝細胞の培養方法により大きく変化していることを示した。

CYP1 の誘導剤への暴露により、幼若期ヒト肝細胞において薬物代謝酵素の CYP1 ファミリーが強く発現誘導されたことから、幼若期における化学物質の健康影響評価においても、薬物代謝の誘導を考慮する必要があると考えられた。

有害反応のメカニズムとして、脳の GABA 機能を発達指標として評価することにより、生後発達の比較的早い段階で GABA 神経による抑制の発達障害を検出できることが示唆された。

本研究における化学物質の健康影響評価法は、健康被害を受けやすい遺伝的・環境的要因を持つハイリスク集団の特定、および感受性の高い個体についても安全を確保できるような安全係数の実験データに基づく決定法の確立、等に寄与することが期待される。

F. 健康危機情報 なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] M. Tanaka, T. Nagai, M. Usami, K. Hasui, S. Takao, T. Matsuyama, Phenotypic and functional profiles of CRIg (Z39Ig)-expressing macrophages in the large intestine. *Innate Immunity*. 18 (2012) 258-67.
- [2] K. Sato, J. Kuriwaki, K. Takahashi, Y. Saito, J. Oka, Y. Otani, Y. Sha, K. Nakazawa, Y. Sekino, T. Ohwada, Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without interaction with estrogen receptors. *ACS Chem Neurosci*. 3 (2012) 105-113 (C.A.)
- [3] F. Takata, S. Dohgu, A. Yamauchi, J. Matsumoto, T. Machida, K. Fujishita, K. Shibata, Y. Shinozaki, K. Sato, Y. Kataoka, S. Koizumi, In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from infant and adult rats retain age-related barrier properties. *Plos ONE* (in press)
- [4] Y. Morizawa, K. Sato, J. Takaki, A. Kawasaki, K. Shibata, T. Suzuki, S. Ohta, S. Koizumi, Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* (in press)
- [5] 佐藤 薫, グリア型グルタミン酸トランスポーター, 日薬理誌. 138 (2011) 127.
- [6] Y. Kanda, T. Hinata, S.W. Kang S.W., Y. Watanabe. Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Life Sciences* 89 (2011) 250-258.
- [7] W. Lin, N. Hirata, Y. Sekino, Y. Kanda. Role of $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor in Normal and Cancer Stem Cells. *Current Drug Targets* (in press).
- [8] R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, A. Miyajima, M. Sunouchi, Y. Goda, Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 400 (2011) 153-155.
- [9] 簾内桃子, トキシコキネティクス, 代謝試験の実験手法. 最新 動物実験代替法の技法ノウハウ. 小島 肇監修 (2011) pp 262-270 (東京)

2. 学会発表

- [1] 宮島敦子, 酒井恵子, 河上強志, 加藤玲子, 松岡厚子, 尾崎正康, 宇佐見誠, 伊佐間和郎, A549 細胞を用いたナノマテリアルの in vitro 生体影響評価系の検討. 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 2012.
- [2] 宇佐見 誠, 満長 克祥, 宮島 敦子, 簾内 桃子, 関野 祐子, 化学物質の発生毒性評価のための簡便なラット神経堤細胞遊走試験法の検討. 第 51 回日本先天異常学会学術集会, 東京, 2011.
- [3] 藤森康希, 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木岳之, 炎症時のグリア間コミュニケーションがグルタミン酸トランスポーター機能変化をもたらす. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム, 東京, 2011.
- [4] 佐藤 薫, 高木淳平, 藤森康希, 鈴木岳之, 関野祐子, パロキセチンは新規メカニズムにより炎症下のグルタミン酸取り込

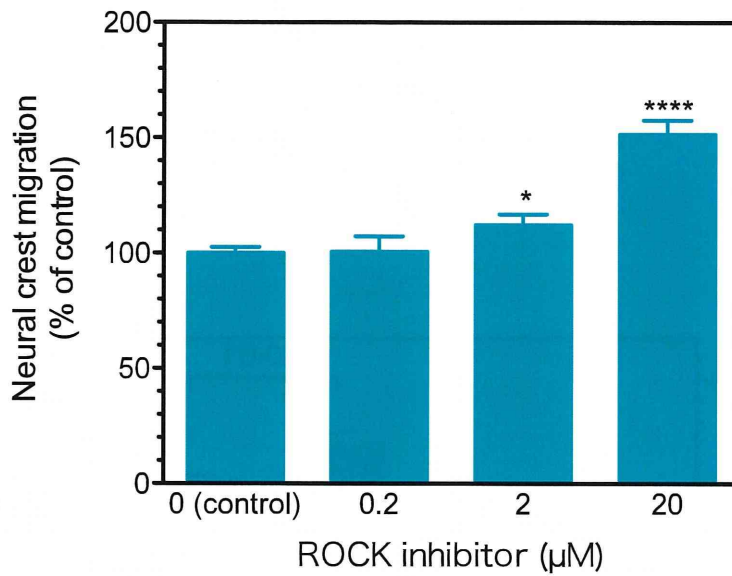
- み機能低下を抑制する. 第 34 回 日本神経科学大会, 横浜市, 2011.
- [5] 鈴木岳之, 高木淳平, 藤森康希, 佐藤 薫, 炎症時グリア間コミュニケーションによりアストロサイトグルタミン酸トランスポーター機能低下が引き起こされる. 第 34 回 日本神経科学大会, 横浜, 2011.
- [6] 最上(重本) 由香里, 関野祐子, 大野泰雄, 佐藤 薫, 生後ラットの脳・SVZ 周辺において活性化ミクログリアは神経およびグリア細胞の新生・分化を制御している. 第 34 回 日本神経科学大会, 横浜, 2011.
- [7] 片山(小口) 敦子, 門間彰彦, 大友ゆき, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤 薫, 胎生期および新生期バルプロ酸暴露によるラット扁桃体遺伝子発現変動の網羅的解析. 第 34 回 日本神経科学大会, 横浜, 2011.
- [8] 高橋由香里, 永瀬将志, 落合敏平, 安井豊, 中尾彩乃, 渡部文子, 高木 聡, 佐藤優, 奥津 浩也, 守口 徹, 佐藤 薫, 加藤総夫 胎生～新生期における化学暴露が扁桃体神経興奮性に及ぼす影響の多面的評価法 第 34 回 日本神経科学大会, 横浜市, 2011.
- [9] 中 誠則, 真嶋悠幾, 井手総一郎, 佐藤薫, 南 雅文, 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 東京, 2011.
- [10] 真嶋悠幾, 中 誠則, 井手総一郎, 佐藤薫, 南 雅文, 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響. 第 62 回日本薬理学会北部会, 仙台市, 2011.
- [11] 佐藤 薫, iPS 細胞由来ニューロンの薬理的プロファイリング 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金医療品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」, 東京, 2012.
- [12] 佐藤 薫, 最上由香里, 関野祐子, 創薬標的としてのミクログリアの新しい可能性 日本薬学会第 132 回年会シンポジウム「次世代創薬に向けた新たなストラテジー」 札幌市, 2012.
- [13] 高橋華奈子, 最上(重本)由香里, 岡田洋平, 大津香苗, 福角勇人, 正札智子, 金村米博, 岡野栄之, 関野祐子, 佐藤 薫, ヒト iPS 由来神経細胞標本の薬効・毒性評価への応用可能性—最適 iPS 株探索と標準プロトコルの作成. 日本薬学会第 132 回年会, 札幌市, 2012.
- [14] 最上(重本) 由香里, 藤森 康希, 五十嵐 良明, 広瀬 明彦, 関野 祐子, 佐藤 薫 カarbonナノチューブが神経幹細胞に与える影響. 日本薬学会第 132 回年会, 札幌市, 2012.
- [15] 片山敦子, 門馬彰彦, 大友ゆき, 今井美鈴, 秋友孝文, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤 薫, 胎生～新生期の化学物質暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー機能タンパク質遺伝子群の探索. 日本薬学会第 132 回年会, 札幌市, 2012.
- [16] 藤森康希, 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木岳志, 炎症条件下グルタミン酸トランスポーター機能低下に対する抗うつ薬の作用 第 85 回日本薬理学会年会, 京都市, 2012.
- [17] 佐藤 薫, 栗脇淳一, 高橋華奈子, 斉藤善郎, 岡淳一郎, 尾谷優子, 沙宇, 中澤憲一, 関野祐子, 大和田智彦, エストロゲン受容体を介さずグリア型グルタミン酸トランスポーターを抑制するタモキシフェン関連化合物の発見, 第 85 回日本薬理学会年会, 京都市, 2012.
- [18] K. Sato, Y. Shigemoto-Mogami, Y. Ohno, Y. Sekino, Microglia instruct neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal SVZ. ISN-ESN-2011 23rd Biennial Meeting, Athens, Greece, 2011.
- [19] K. Sato, Y. Shigemoto-Mogami, Y. Ohno, Y. Sekino, The role of activated microglia accumulated in the early postnatal SVZ. ISN Satellite meeting, Glial cells in (patho)physiology, Ljubljana, Slovenia, 2011.
- [20] K. Sato, J. Takaki, K. Fujimori, T. Suzuki, Y. Sekino, Down-regulation of astrocyte L-glu transporters under inflammation is caused by glia-glia communication. Washington D.C., USA, 2011.
- [21] 諫田 泰成, 平田 尚也, 林 和花, 関野 祐子, Effects of sex hormones on proliferation of breast cancer stem cell. 第 9 回幹細胞シンポジウム, 東京, 2011.
- [22] 平田 尚也, 林 和花, 関野 祐子, 諫田 泰成, エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖, 第 124 回薬理学会関東部会, 2011.
- [23] 李 敏, 黒川 洵子, 諫田 泰成, 関野 祐子, 古川 哲史, Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived

- cardiomyocytes, 第 124 回薬理学会関東部会, 2011.
- [24] Y. Kanda, N. Hirata, Y. Sekino, Sphingosine-1-phosphate mediates proliferation of breast cancer stem cells, FASEB summer conference, 2011.
- [25] 諫田 泰成, 平田 尚也, 関野 祐子, 乳癌幹細胞の増殖に対するスフィンゴシン 1 リン酸の作用, 第 34 回分子生物学会, 横浜, 2011.
- [26] M. Li, J. Kurokawa, Y. Kanda, S. Toyama, M. Murata, Y. Sekino, K. Fukuda, T. Furukawa Quantitative characterization of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, The 1st HD physiology international symposium: Integrative multi-level systems biology for in silico cardiology and pharmacokinetics, Tokyo, Japan 2012.
- [27] Y. Kanda, N. Hirata, Y. Sekino, Sphingolipid-mediated proliferation of cancer stem cells, Keystone Symposia (Q3), Banff, Canada, 2012.
- [28] 諫田 泰成, 厚生労働省公開シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」, 分化心筋細胞のクオリティコントロール, 2012.
- [29] 平田 尚也, 関野 祐子, 諫田 泰成, エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖に対する Src の影響, 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012.
- [30] 諫田 泰成, 平田 尚也, 山田 茂, 関野 祐子, トリブチルスズのミトコンドリア機能に対する影響, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 2012.
- [31] 石田 誠一, 久保 崇, 黒田 幸恵, 関野 祐子, 三次元培養による肝癌由来培養細胞の機能調節. 日本薬学会 第 132 年会, 札幌, 2012.
- [32] 太田 庸介, 大野 彰子, 石田 誠一, 黒田 幸恵, 栗原 正明, 関野 祐子, 斎藤 嘉朗, 福原 潔, ¹H NMR を用いた HepG2 細胞のメタボロミクス: APAP の影響. 日本薬学会 第 132 年会札幌, 2012.
- [33] M. Sunouchi, A. Miyajima-Tabata, R. Kikura-Hanajiri, S.-R. Kim, T. Kubo, S. Ishida, M. Usami, Y. Sekino. Inducibility of CYP1A by linuron in primary cultured human hepatocytes. The 47th Congress of the European Society of Toxicology, Paris, 2011.
- [34] 藤枝智美, 三輪秀樹, 白尾智明, 関野祐子, Modulation of neuronal circuits by GABA_B receptor activity in the mouse lateral amygdala (マウス扁桃体外側核の GABA_B 受容体による神経回路機能の修飾). 神経科学学会 Neuro2011, 横浜, 2011.
- [35] 藤枝智美, 三輪秀樹, 白尾智明, 関野祐子, マウス扁桃体外側核の GABA 受容体応答の可塑性に関する研究 (Plasticity of GABA receptor activity in the mouse lateral amygdala). 第 58 回 北関東医学会, 前橋, 2011.
- [36] 藤枝智美, 三輪秀樹, 白尾智明, 関野祐子, Inhibitory synaptic plasticity in the mouse lateral amygdala (マウス扁桃体外側核における抑制性シナプス可塑性に関する研究). 第 2 回 放射線神経生物学研究集会, 前橋, 2011.
- H. 知的財産の出願・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。

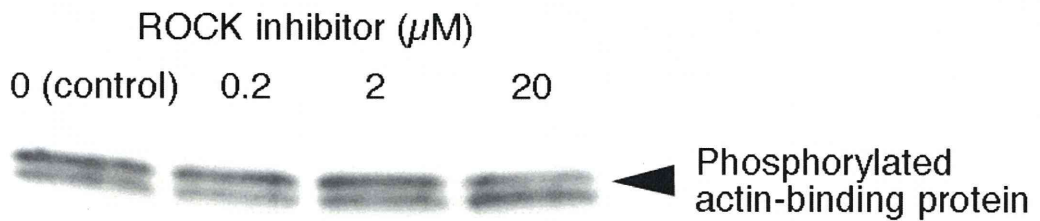


図1. Rho パスウェイにおけるアクチン結合タンパクのリン酸化制御の概略
Rho パスウェイのキナーゼである ROCK により活性化されたキナーゼが、アクチン結合タンパクをリン酸化する。

A



B



C

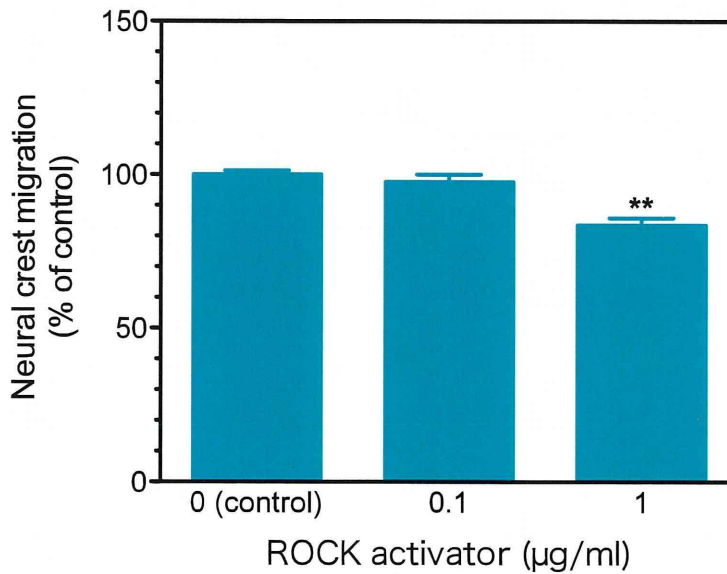
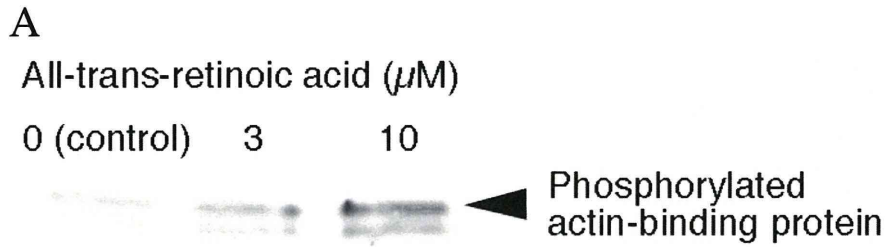


図2. ROCK 阻害剤および活性化剤がラット頭部神経堤細胞の遊走に及ぼす影響。A, ROCK 阻害剤の影響。B, ROCK 阻害剤が頭部神経堤細胞アクチン結合タンパクリン酸化に及ぼす影響のウェスタンブロット解析。C, ROCK 活性化剤の影響。平均値と標準誤差を示す。アスタリスクは、対照群と比較して統計学的に有意差があることを示す (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$)。



B

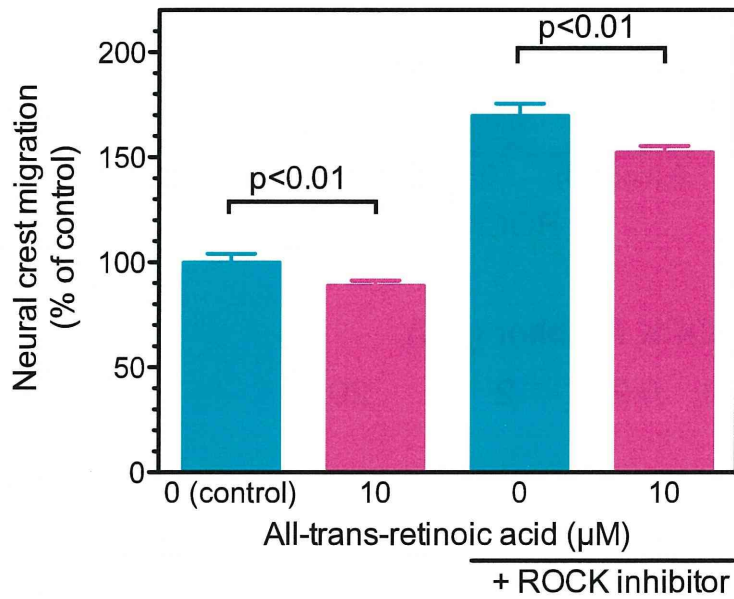


図3. レチノイン酸によるリン酸化アクチン結合タンパクおよび神経堤細胞遊走に及ぼす影響

A, レチノイン酸が頭部神経堤細胞アクチン結合タンパクリン酸化に及ぼす影響のウェスタンブロット解析。B, レチノイン酸の神経堤細胞遊走阻害作用に及ぼす ROCK 阻害剤の影響。平均値と標準誤差を示す。

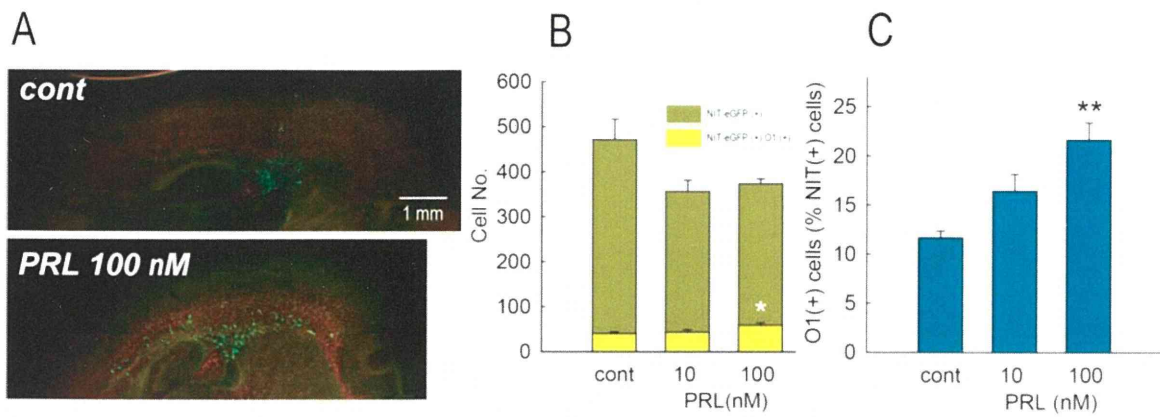


図4. eGFP 標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いた薬理的検討—Prl のオリゴデンドロサイト新生に対する影響

A: eGFP 標識神経幹細胞、前駆細胞を含む前脳矢状面切片を Prl (10, 100 nM) 存在下で培養したところ、eGFP 標識細胞の分布範囲が広がった。赤: O1、緑: eGFP。B: eGFP 標識細胞数を計測したところ細胞数に有意な変化は見られなかった。しかし、eGFP(+)O1(+) 細胞数は 100 nM Prl によって有意に増加していた。C: eGFP 標識細胞に占める O1(+) 細胞の比率も有意に増加していた。

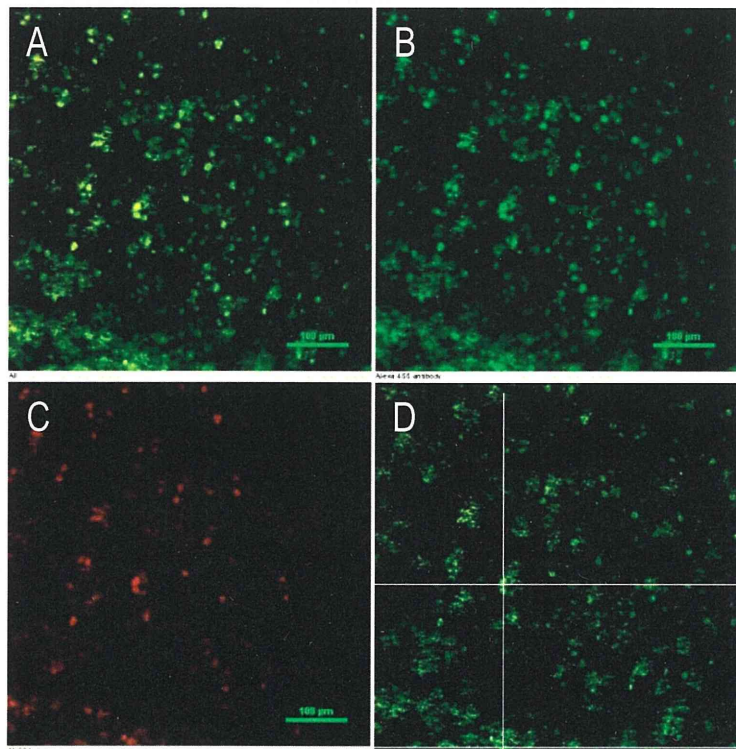


図5. 培養前脳矢状面切片 SVZ における O1 および FGFR1 の発現

A: merge 画像。B: FGFR1 (緑) 染色像。C: O1 染色像 (赤)。D: orthogonal 画像。ほぼ全ての O1(+) 細胞に FGFR1 が発現していることが確認された。D の orthogonal 画像が示すように、FGFR1 シグナルと O1 シグナルは確かに同一の細胞由来であった。