

図6. 培養前脳矢状面切片 SVZ における O1 および PDGFa の発現

A: merge 画像。B: PDGFa (緑) 染色像。C: O1 染色像 (赤)。D: orthogonal 画像。ほぼ全ての O1(+) 細胞に PDGFa 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、PDGFa 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。

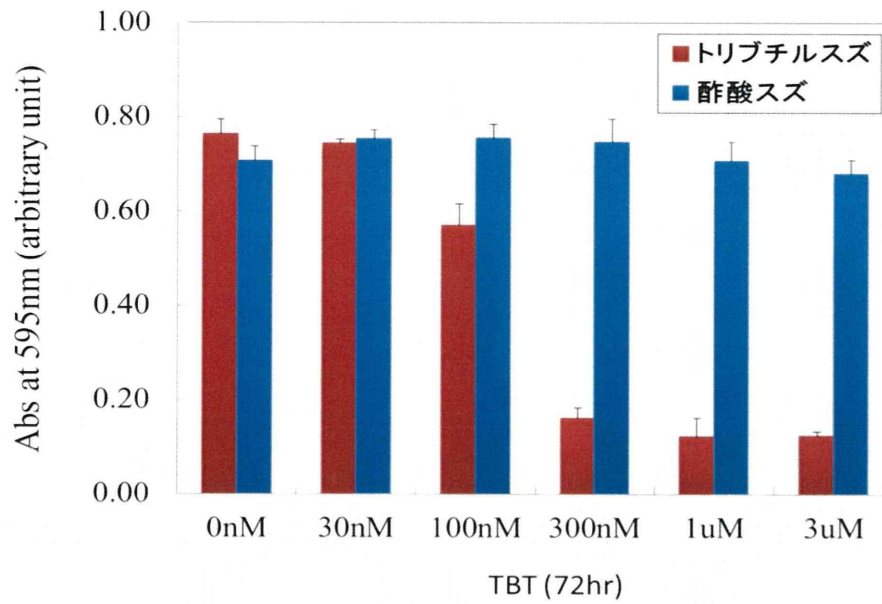
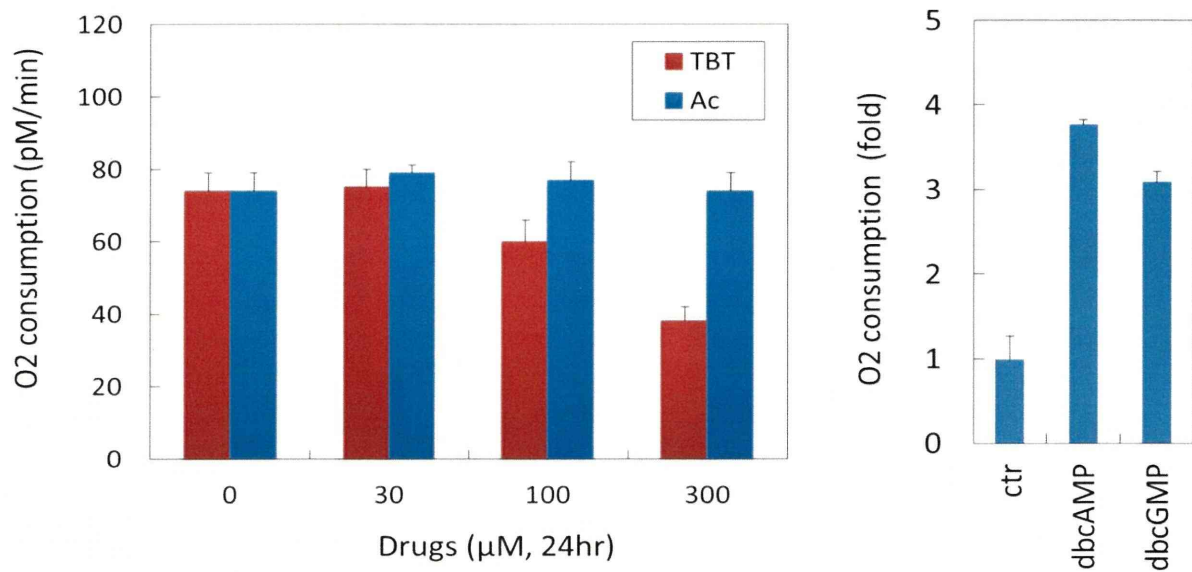


図7. 神経幹／前駆細胞の増殖に対するトリブチルスズの影響
 NT2 由来の神経幹／前駆細胞を用いて、種々の濃度のトリブチルスズ（青色）あるいは酢酸スズ（赤色）を暴露し、細胞の生存数に対する影響を検討した。



TBT: トリブチルスズ
 Ac: 酢酸スズ

図8. 神経幹/前駆細胞の酸素消費量に対するトリブチルスズの影響

(右) NT2 由来の神経幹/前駆細胞に種々の濃度のトリブチルスズあるいは酢酸スズで 24 時間曝露し、酸素消費量を測定した。(左) NT2 由来の神経幹/前駆細胞にミトコンドリア機能を活性化させる試薬ジブチル cAMP あるいはジブチル cGMP を曝露し、酸素消費量を測定した。

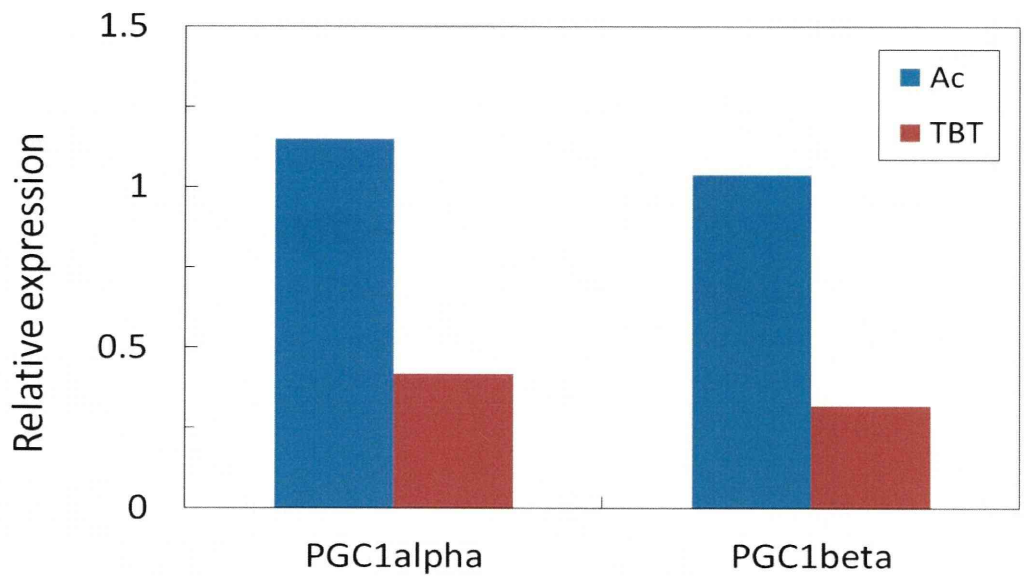


図9. PGC1 発現に対するトリブチルスズ曝露の影響
 NT2 由来の神経幹/前駆細胞に種々の濃度のトリブチルスズあるいは酢酸スズで6日間曝露し、転写共役因子 PGC1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した。発現量は曝露しない細胞における発現量を1としてその相対値として示した。

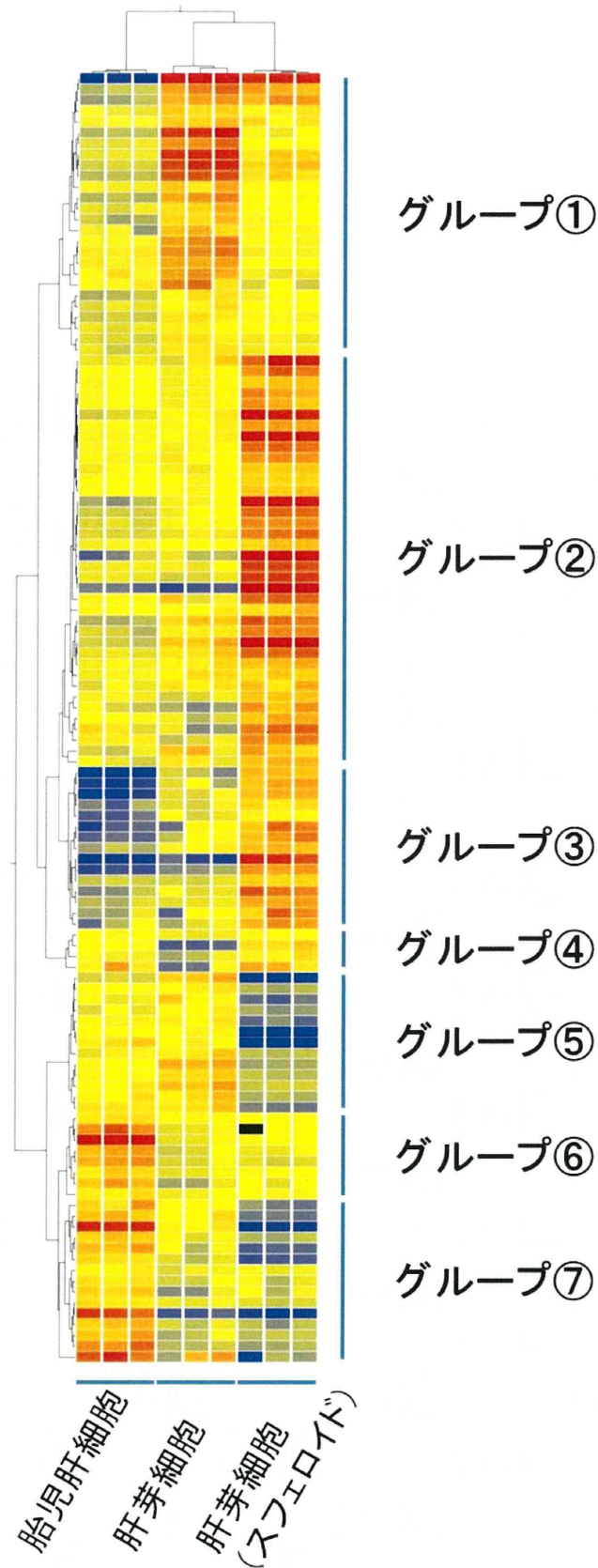


図 10. メタボローム解析において胎児肝細胞、肝芽細胞（平面培養）、肝芽細胞（スフェロイド培養）で存在量が変化していた代謝物の階層的クラスタリングによる分類

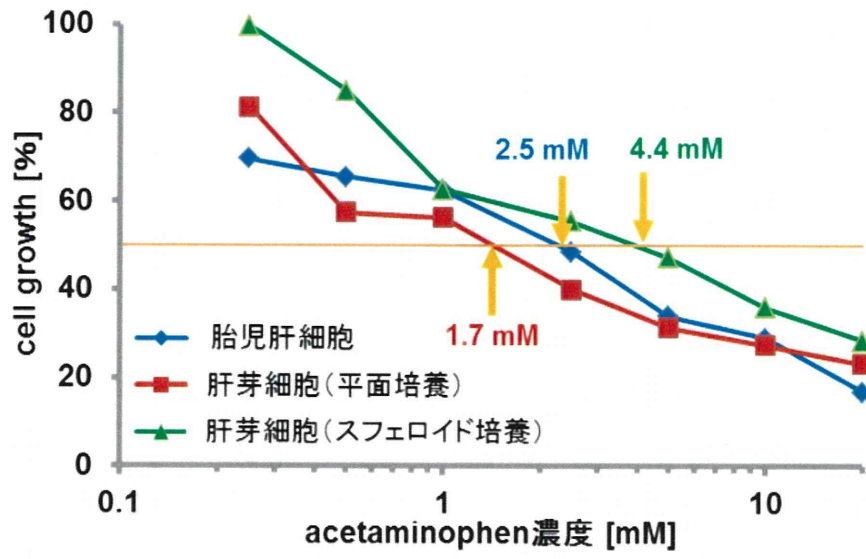


図 11. 胎児肝細胞由来細胞の増殖に対するアセトアミノフェンの効果

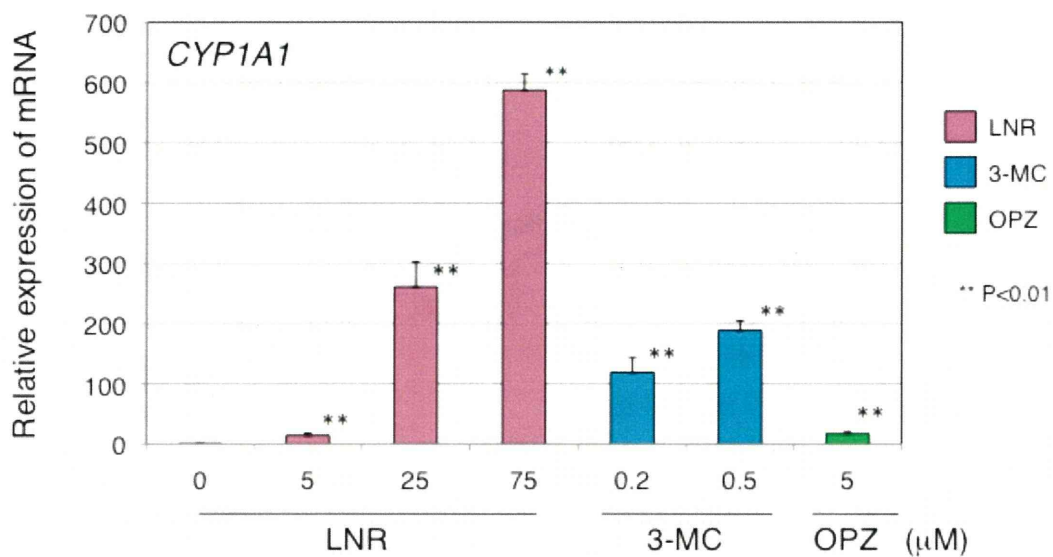


図 12. リニユロン、メチルコラントレンおよびオメプラゾールが *CYP1A1* mRNA に及ぼす影響

Expression of *CYP1A1* mRNA in primary cultured human hepatocytes exposed to LNR, 3-MC and OPZ for 9 hours. Relative expression of mRNA was calculated with comparative cycle threshold (*Ct*) method. Columns represent the mean \pm S.D. (n= 3).

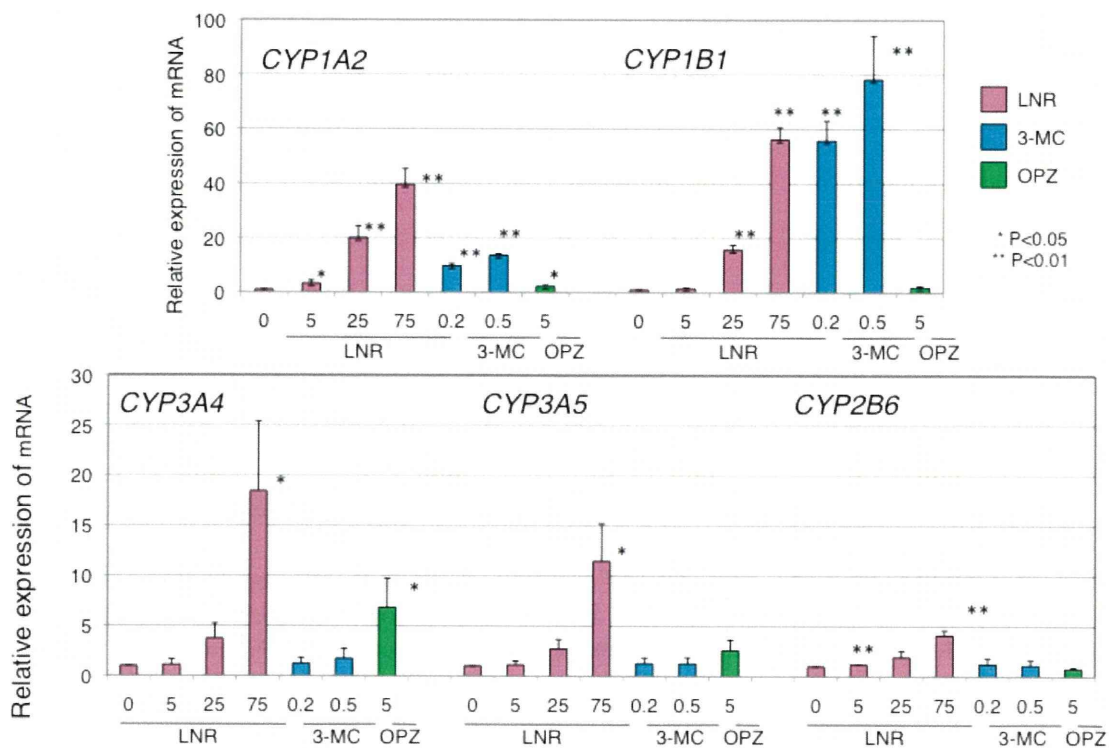


図 13. リニユロン、メチルコラントレンおよびオメプラゾールが種々の CYP mRNA に及ぼす影響

Expression of *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP3A4*, *CYP3A5* and *CYP2B6* mRNAs in primary cultured human hepatocytes exposed to LNR, 3-MC and OPZ for 9 hours. Relative expression of mRNA was calculated with comparative cycle threshold (*Ct*) method. Columns represent the mean \pm S.D. (n= 3).

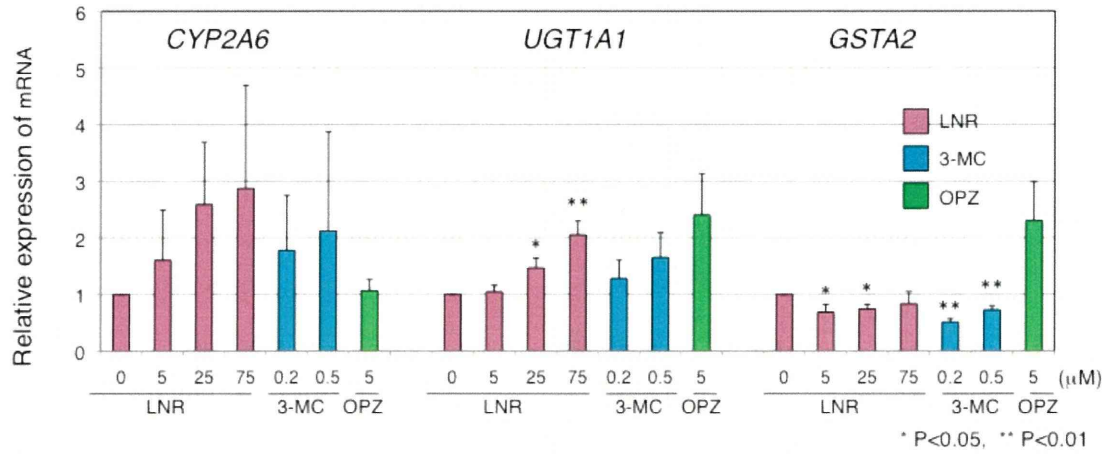
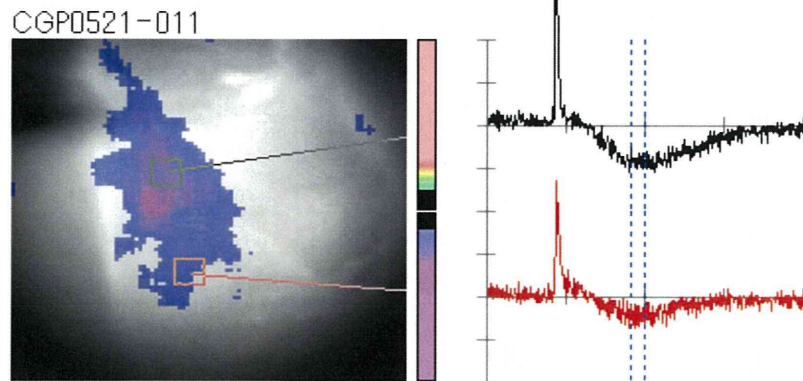


図 14. リニユロン、メチルコラントレンおよびオメプラゾールが *CYP2A6*、*UGT1A1* および *GSTA2* mRNA に及ぼす影響

Expression of *CYP2A6*, *UGT1A1* and *GSTA2* mRNAs in primary cultured human hepatocytes exposed to LNR, 3-MC and OPZ for 9 hours. Relative expression of mRNA was calculated with comparative cycle threshold (*Ct*) method. Columns represent the mean \pm S.D. (n= 3).

A. Control



B. GABA_B receptor antagonist (100 μ M CGP 35348)

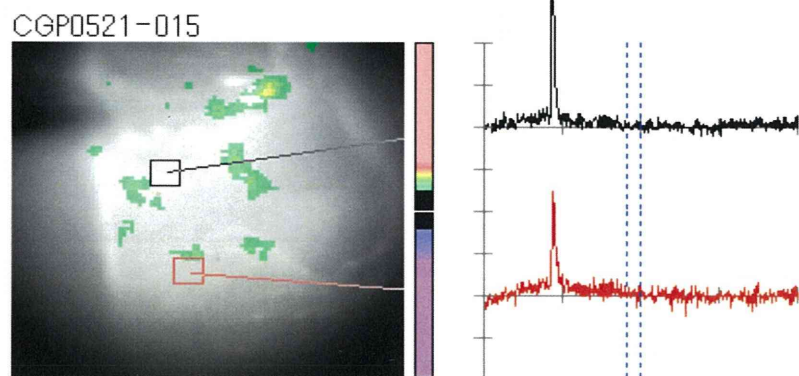


図 15. 膜電位感受性色素により可視化された GABA による抑制性過分極応答
A. 扁桃体の外側核と基底外側核全体に過分極応答がひろがる様子が可視化された。
B. 刺激後 350 ms 後の画像と黒と赤の四角で示された画像部位の光学応答波形
GABA_B 受容体の阻害薬により遅い過分極成分が消失した。

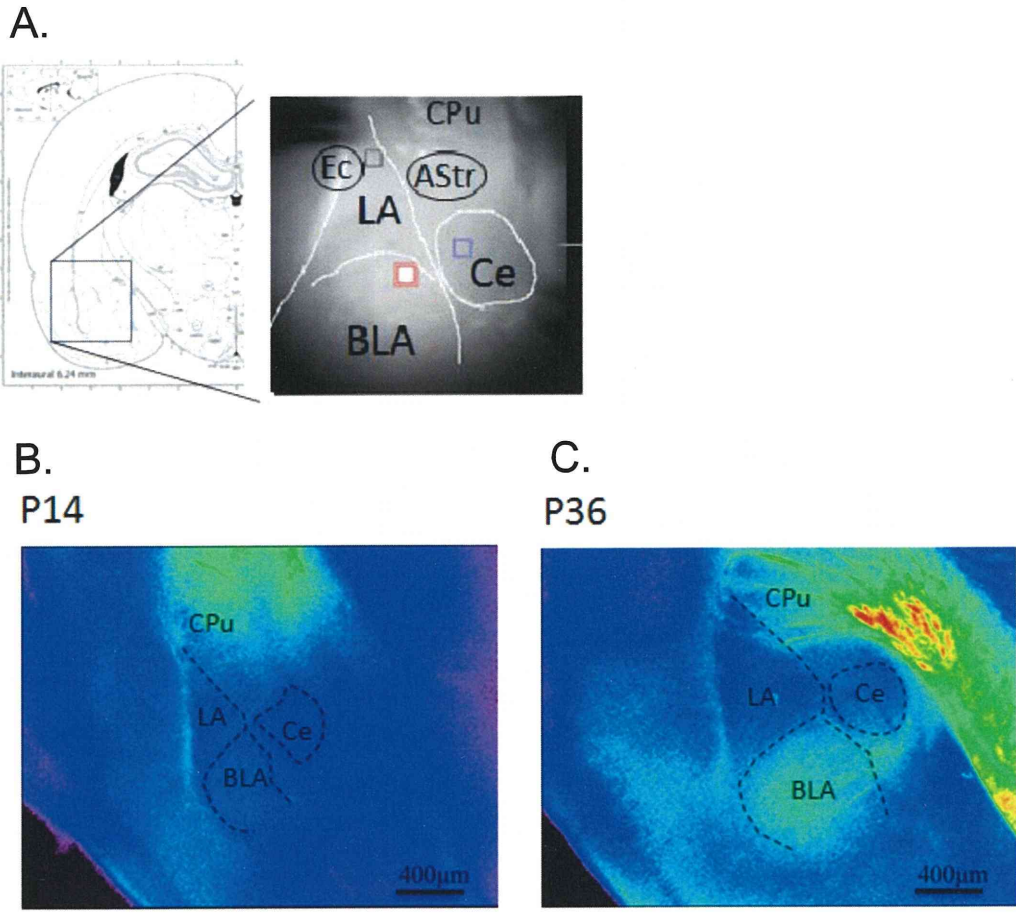


図 16. マウス扁桃体スライスからの GABA の自発的遊離の空間分布の可視化
 生後 2 週齢と 36 日齢では扁桃体からの GABA 遊離パターンが大きく異なっていた。
 A. マウス脳の扁桃体部位を示す脳定位マップとスライスの部位を示した図
 外側核 (LA)、基底外側核 (BLA)、中心核 (Ce)、外包 (EC)、扁桃体線条体移行部 (AStr)、線条体 (CPu)。青が遊離の低いところ、遊離が多くなるほど、緑から黄色、赤と疑似カラーで表示している。
 B. 生後 14 日のマウス扁桃体スライスからの GABA 遊離。扁桃体からの遊離は少ない。Cpu には GABA の遊離が見られる。
 C. 生後 36 日のマウス扁桃体スライスからの GABA 遊離。扁桃体内では BLA に限定して遊離量がふえている。線条体で高い遊離量が認められた。

集合スパイク電位

集合シナプス後電位

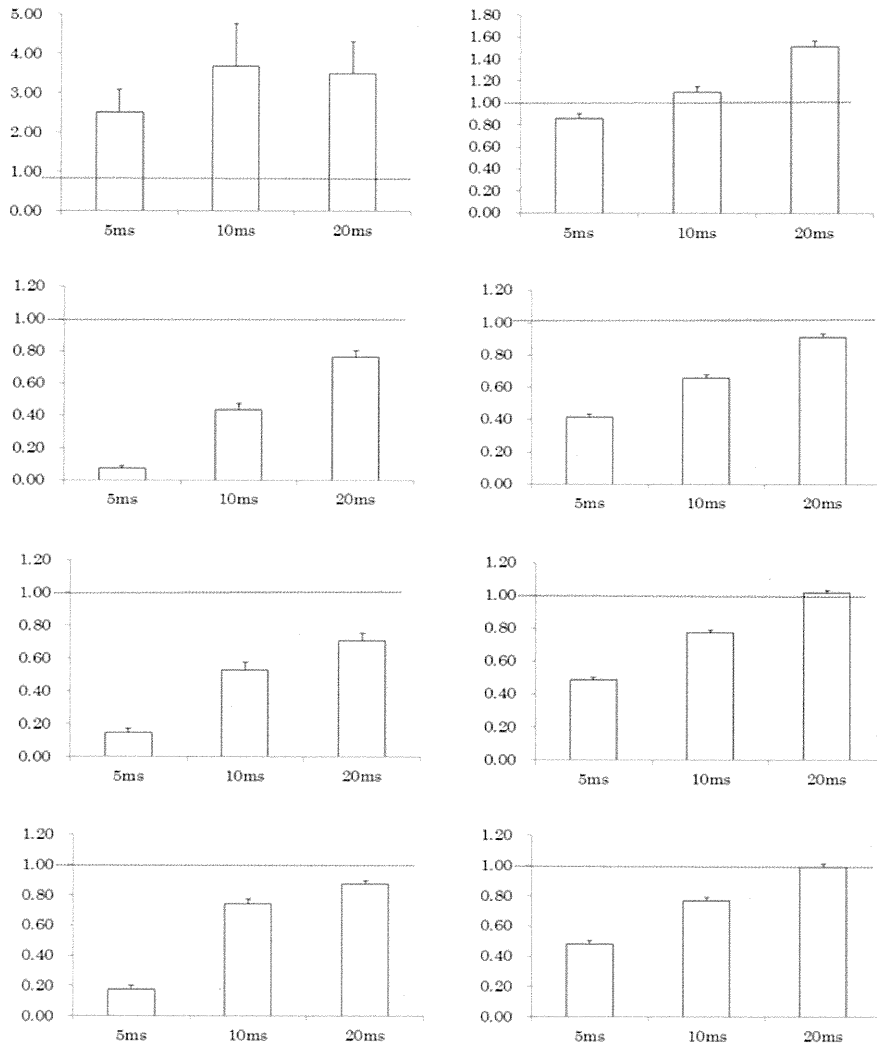


図 17. ラットの脳の発達と海馬 CA1 領域のペアパルス比
 左の 4 枚のグラフは細胞層から記録された集合スパイク電位の振幅(PS amplitude)の比を刺激間隔ごとに計算したものである。右の 4 枚のグラフはシナプス層から記録されたシナプス後電位の傾き(slope)の比を刺激間隔ごとに計算したものである。ラットの週齢は、上から 2 週齢、5 週齢、8 週齢、13 週齢である。点線は比が 1 であることを示した。

表 1. 胎児肝細胞の培養法により発現が変化した遺伝子数

>= 2 fold	胎児肝細胞	肝芽細胞	スフェロイド培養
胎児肝細胞	---	424	587
肝芽細胞	424	---	504
スフェロイド培養	587	504	---

>= 4 fold	胎児肝細胞	肝芽細胞	スフェロイド培養
胎児肝細胞	---	63	68
肝芽細胞	14	---	29
スフェロイド培養	31	52	---

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

神経堤細胞の機能解析による評価法の開発

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
研究協力者 宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部第二室長

研究要旨

ラット神経堤細胞遊走実験法を用いた、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および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。その結果、本実験法において Rho パ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が認められ、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、メカニズムの解析法の確立にはさらに検討が必要であった。エタノールおよびメタノールをモデル化学物質として用いて検討したところ、ラット胚に毒性を示す濃度において、エタノールは本実験法において神経堤細胞遊走街作用を示したが、メタノールによる影響は認められなかった。この結果などから、本実験法において検出される神経堤細胞遊走阻害作用は、単純な細胞毒性ではないと考えられた。頭部神経堤細胞と体幹神経堤細胞とでは、細胞遊走に及ぼす化学物質の影響に対する感受性が異なることを示した。

A. 研究目的

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、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、神経堤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。

また、神経堤細胞のうち、頭部神経管に由来する頭部神経堤細胞の異常では、顔面の奇形などの形態形成に及ぼす影響も認められる。神経堤症による顔面奇形と同様の奇形は、胚のレチノイン酸への過剰暴露においても生じることから、神経堤細胞は化学物質による毒性の標的組織となり得ると考えられている。しかし、適切な実験法が確立されていないため、化学物質の神経堤細胞機能に及ぼす影響は、ほとんど調べられていない。

本研究では、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。神経堤細胞実験法としては、初期着床胚をまるごと培養するラット全胚培養法との比較実験が可能であり、解析が容易な、ラット神経堤細胞を用いた実験法の確立を目指した。

本実験法を利用することにより、神経堤細胞遊走に影響する化学物質とそのメカニズムを同定し、ヒトにおける当該化学物質に対する高暴露集団およびメカニズムに関与する遺伝子疾患等を有する集団などの、ハイリスク集団について、疫学的調査の基盤的情報を提供すると共に、健康影響の予防のための方策となる情報を得られることが期待される。

前年度においては、毒性発現メカニズムの解析が可能な簡便で安定したラット神経堤細胞遊走実験法を確立することができた。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。

B. 研究方法

1. 動物

ウイスターラット (Crlj:WI, 日本チャールスリバー) を用いた。発情前期の雌ラットを雄と終夜同居させ、妊娠ラットを得た。同居中の深夜を妊娠 0 日として起算した。妊娠 9.5 又は 10.5 日に、妊娠ラットから初期着床胚を摘出して実験に用いた。

2. 培養方法

摘出したラット初期着床胚から、電解研磨したタングステン針を用いて、菱脳部を切り出し、物理的に神経管を取り出した。体幹神経堤細胞を用いる場合は、前肢芽の部位から神経管を同様の方法で取り出した。取り出した神経管を、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。化学物質の影響を調べる場合には、培養 24 時間に神経堤細胞の遊走が認められた神経管の培養液に添加して 48 時間まで培養した。

3. 観察方法

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付着及び遊走細胞の広がりを観察した。いずれかの観察時において、培養容器底面に付着していない神経管のデータは実験から除外した。

4. データの解析

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つないでできる図形を円とみなして、そのピクセル数で表される面積か

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。実験群間の有意差の検定には *t* 検定を用いた (有意水準 5%)。

5. ウェスタンブロット解析

培養 48 時間の位相差顕微鏡観察の後、タングステン針を用いて培養底面から神経管を掻き取り、培養器底面に残った神経堤細胞に、50~100 μ l の SDS サンプルバッファーをかけて溶解し、電気泳動サンプルとして回収した。電気泳動サンプルを、SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライして、電気泳動によりタンパクを分離した。セミドライブロットティング装置を用いて、泳動ゲルから分離タンパクを転写した PVDF 膜について、化学発光法によりウェスタンブロットティングを行い、リン酸化アクチン結合タンパク検出した。

6. 神経堤細胞数の計測

化学物質の神経堤細胞数に及ぼす影響を調べる場合には、培養 24 時間で培養器底面から神経管を掻き取り、残った神経堤細胞を、FBS を含まない培養液で 1 回洗った後、DiO (10 μ l/ml, Molecular Probes) を含む培養液で、20~30 分培養することにより、蛍光標識した。標識後、FBS を含まない培養液で 3 回洗った後、通常の培養液に戻し、さらに 24 時間培養した。細胞数の計測は、FITC フィルターを通して蛍光顕微鏡 (BZ-900、株式会社キーエンス) で撮影した画像について、顕微鏡に付属のソフトウエアであるダイナミックセルカウント BZ-H1C を用いて行った。

7. ラット全胚培養

ラット初期着床胚を回転培養法により、24 時間培養した。妊娠 10.5 日 (精子確認日を 0.5 日とする) に妊娠ウイスターラットから摘出した胚を 1 個あたり 0.8-1.0 ml のラット血清と共に培養瓶に入れ、37-38°Cにて 24 時間、35rpm で回転培養した。培養終了時に、胚の発育および形態異常の有無を実体顕微鏡下で観察した。

C. 研究結果

1. Rho パスウェイの阻害剤および活性化剤が神経堤細胞遊走に及ぼす影響

Rho パスウェイのキナーゼである 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)。ウェ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。

2. 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

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 3B)。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。

3. エタノールおよびメタノールの神経堤細胞遊走に及ぼす影響

本実験法は、細胞の広がり量を遊走量として解析するため、細胞数の変化等の細胞毒性が遊走異常として検出される可能性が考えられる。そこで、類縁化合物であり、同様の濃度でラット培養胚に毒性を示す、エタノールとメタノールをモデル化学物質として用いて、細胞毒性が本実験法における神経堤細胞の遊走に及ぼす影響について検討した。

エタノール及びメタノールはラット全胚培養実験において同じ濃度域において毒性

を示す (表 1、図 4)。そこで、これらの濃度における神経堤細胞遊走に及ぼす影響を調べた結果、エタノールでは 9 mg/ml において、統計学的に有意な約 10%の遊走阻害作用が認められたが、メタノールでは神経堤細胞の遊走に及ぼす影響は認められなかった (図 5A および B)。これらの結果により、本実験法では単純な細胞毒性を遊走阻害として検出しているのではないと考えられた。

4. 神経堤細胞数に及ぼすエタノールの影響

エタノールは神経堤細胞のアポトーシスによる細胞死を誘発すると報告されていることから、神経堤細胞遊走阻害作用を示したエタノールについて、神経堤細胞数に及ぼす影響を調べた。

神経堤細胞を DiO で蛍光染色し、培養 24 時間および 48 時間における細胞数の比を指標として計測した (図 6A および B)。その結果、神経堤細胞遊走阻害作用を誘発する濃度においても、神経堤細胞数にエタノールによる有意な影響は認められなかった。この結果から、エタノールによる神経堤細胞遊走阻害作用は細胞数の減少によるものではないと考えられた。

5. 体幹神経堤細胞の遊走に及ぼすエタノールの影響

神経堤細胞は、由来する部位により異なる神経系の細胞に分化するので、由来が異なる神経堤細胞において化学物質に対する感受性が異なる場合は、発達中の神経系に及ぼす影響が異なることが予想される。そこで、体幹に由来する体幹神経堤細胞を用いて同様の遊走実験を行い、エタノールの影響について検討した (図 7A)。

その結果、頭部神経堤細胞において遊走阻害が認められた 9 mg/ml においても、体幹神経堤細胞では、エタノールによる遊走阻害作用は認められず、由来する部位の異なる神経堤細胞では化学物質に対する感受性が異なることが示された (図 7B)。

(倫理面への配慮)

動物の使用にあたっては国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験に関する指針」を遵守した。

D. 考察

前年度において確立したラット神経堤細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もので、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。

エタノール及びメタノールを用いた実験では、胚に毒性を示す濃度において、神経堤細胞の遊走に及ぼす影響は、化学物質ごとに異なることから、本実験法では単純な細胞毒性を遊走阻害として検出しているのではないと考えられた。また、エタノールによる遊走阻害は、細胞数の減少に伴うものではないと考えられた。しかし、ラット神経堤細胞遊走実験法における遊走量の測定法は、原理的に細胞数変化の影響を受けると考えられるので、神経堤細胞遊走阻害のメカニズムとしての細胞死等による細胞数減少の解析法を確立する必要がある。

本実験法を応用して、頭部神経堤細胞と体幹神経堤細胞とでは、細胞遊走に及ぼす化学物質の影響に対する感受性が異なることを示した。神経堤細胞に由来する主要な神経系細胞は、頭部神経堤細胞では脳神経系、体幹神経堤細胞では脊髄神経系および自律神経系である。そのため、これらの神経堤細胞に及ぼす化学物質の影響が異なる場合には、成長する個体に異なる影響を及ぼすと考えら

れる。このことは、本実験法により、神経堤細胞の感受性の違いを含めた、化学物質の影響を調べることが出来ることを意味する。また、由来の異なる神経堤細胞に及ぼす影響の比較は、化学物質による影響のメカニズムの解明においても有用であると期待される。

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。本実験法において検出される神経堤細胞遊走阻害作用は、単純な細胞毒性ではないと考えられた。頭部神経堤細胞と体幹神経堤細胞とでは、細胞遊走に及ぼす化学物質の影響に対する感受性が異なることを示した。

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 CR1g (Z39Ig)-expressing macrophages in the large intestine. *Innate Immunity*. 18 (2012) 258-67.

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.

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。

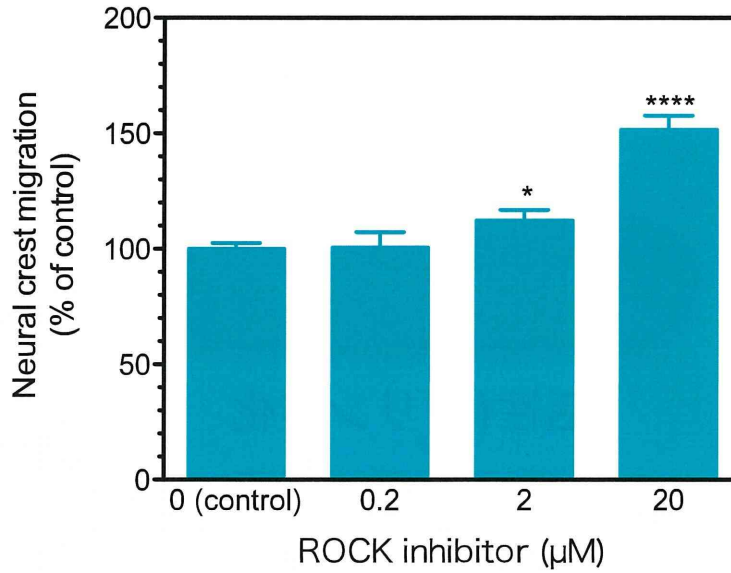
3. その他

なし。

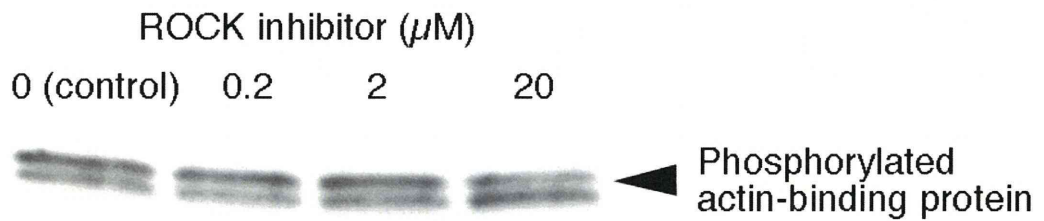


図1. Rho パスウェイにおけるアクチン結合タンパクのリン酸化制御の概略
Rho パスウェイのキナーゼである ROCK により活性化されたキナーゼが、アクチン結合タンパクをリン酸化する。

A



B



C

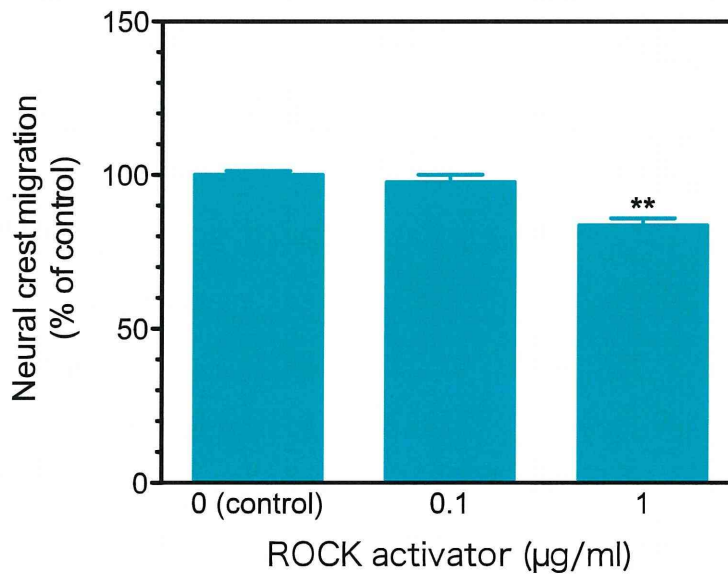


図2. ROCK 阻害剤および活性化剤がラット頭部神経堤細胞の遊走に及ぼす影響。A, ROCK 阻害剤の影響。B, ROCK 阻害剤が頭部神経堤細胞アクチン結合タンパクリン酸化に及ぼす影響のウエスタンブロット解析。C, ROCK 活性化剤の影響。平均値と標準誤差を示す。アスタリスクは、対照群と比較して統計学的に有意差があることを示す (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$)。

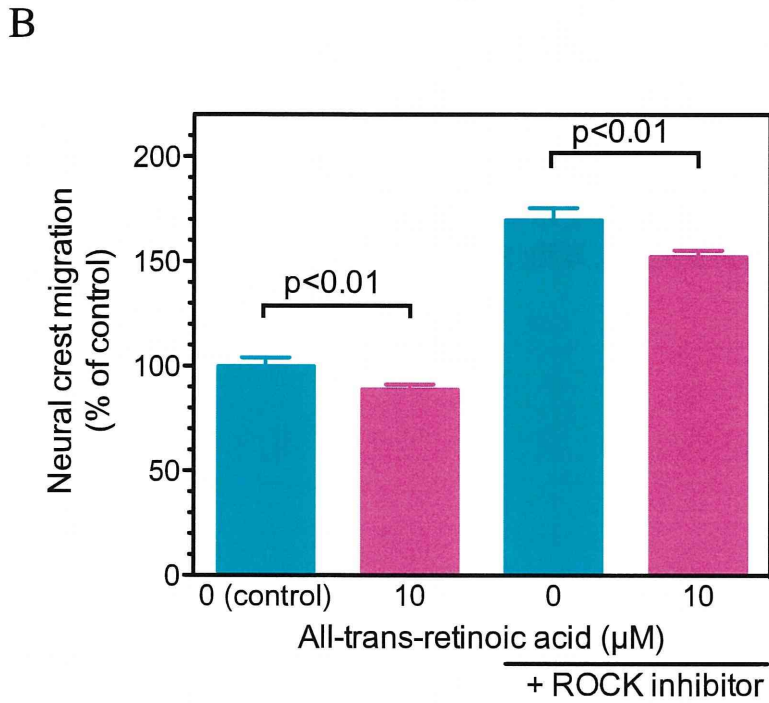
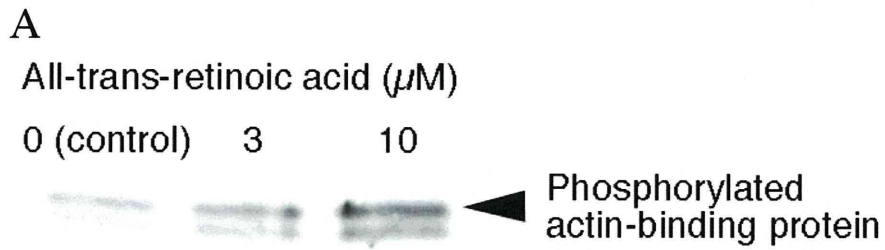


図 3. レチノイン酸によるリン酸化アクチン結合タンパクおよび神経堤細胞遊走に及ぼす影響

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エ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。