

## 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成23年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業、H23-化学-一般-004）

神経系発生-発達期の化学物質暴露による遅発中枢影響解析に基づく  
統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究

### 分担研究課題名

## 情動認知行動異常発現メカニズムの解明

### 一発生-発達期ビスフェノールA暴露による 遅発影響としての遺伝子発現プロファイル

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

1

### 本研究班の目的

遅発性の情動認知行動異常を今後の行政施策へ反映させる必要性を考慮し、  
標準プロトコルの確立、及び客観的評価指標の提案を目指す

#### 背景、必要性と期待される成果

- ・ 先行研究：胎生期及び幼若期マウスへの化学物質の投与  
→従来の神経毒性試験法（所謂、FOB:機能観察総合評価）からは想定困難な遅発性の情動認知行動異常を誘発。神経科学的物証、及びその分子メカニズムの一端を捉えた。  
⇒直接的な細胞障害を惹起しないレベルの暴露が、微細な脳構造形成不全や神経回路構築異常を誘発し、成長後に情動認知行動異常として顕在化する
- ・ 情動認知行動異常の客観的評価指標は現在までのところ確立されていない  
= 定性的・定量的な毒性評価に馴染まない  
⇒本研究では、特徴的な異常を示す遺伝子改変マウス等を普遍的な基準点と位置付け、情動認知行動、神経科学的物証項目（微細形態、タンパク・遺伝子発現、神経回路機能等）をスコア化  
→被験物質による異常を上記基準点との「スコア差」として客観的に記述し評価する方法を提案
- ・ 従来法では検出が困難であった遅発性の情動認知行動毒性のリスク評価に関し、行政対応に必須のバリデーションに耐えるガイドラインの作成が期待できる。



## 情動認知行動異常発現メカニズムの解明

一発生-発達期ビスフェノールA暴露による  
遅発影響としての遺伝子発現プロファイル

### 本分担研究の目的

網羅的遺伝子発現変動解析によって  
「情動認知行動異常に至る分子メカニズム」を明らかにする事



#### ・ Perce llome法による網羅的遺伝子発現変動解析

・ 本研究班では、情動認知行動異常の客観的評価指標の為の基準点として、特徴的な異常を示す遺伝子改変マウス等が位置付けられている  
⇒特に、既に情動認知行動異常等を同定済みである複数のエストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスに着目しており、また被験物質としては、ER結合性化学物質に着目している

## 平成23年度本分担研究

#### ・ 被験物質： **ビスフェノールA (BPA)**

ER結合性化学物質。合成樹脂からの溶出が報告されている。

・ 周産期暴露（妊娠期から離乳期までの妊娠マウスへの飲水投与）後の成熟期マウスの海馬における網羅的遺伝子発現変動解析

⇔ 情動・認知行動解析の結果との比較検討



## ビスフェノールA [Bisphenol A]

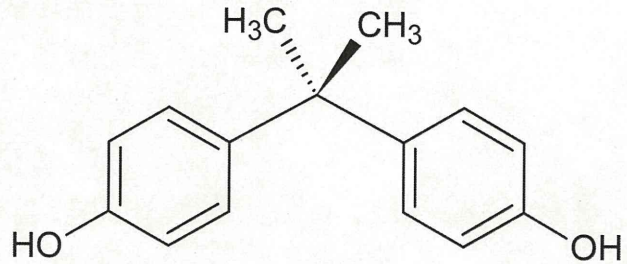
[0, 0.06, 1及び15ppm 飲水投与]

(周産期投与：交配開始時～離乳時（4週齢時）まで）

2つのフェノール基を持つ芳香族化合物

- ・ポリカーボネート製のプラスチックを製造する際のモノマーや、エポキシ樹脂の原料として利用。
  - ・抗酸化剤、あるいは重合阻止剤としてポリ塩化ビニルの可塑剤に添加される。
- これらの合成樹脂からの溶出が報告されている

エストロゲン受容体と反応しエストロゲン様作用を有する。  
→内分泌攪乱化学物質としての懸念されている



CAS No: 80-05-7

分子量：228.3

半数致死量（マウス、経口）：1,600～5,200 mg/kg (RTECS)

## BPA飲水投与実験プロトコール

交配開始 出生 4週齢 離乳 12週齢 行動解析 15週齢 脳採取

BPA飲水投与

↑  
海馬RNAサンプリング  
(時刻：10時)

群構成

4群 (n=4, 行動解析はn=8)

離乳

4週齢時

Percellome解析

海馬

BPA: 0, 0.06, 1, 15ppm

TDI: 50 ug/kg/dayを考慮

♂4匹/ケージ

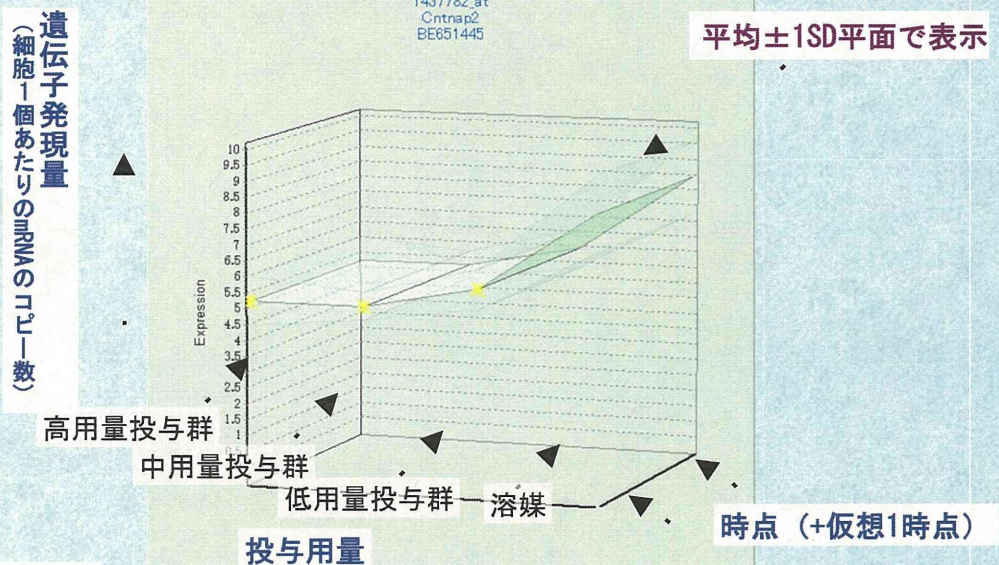
暴露直後ではなく、暴露から時間が経過した定常状態での解析



## 遺伝子発現変動解析実験 表示例

(各点n=4、計16匹)

濃度依存性、遺伝子発現量及び時点 (+仮想1時点) についての3次元グラフ  
あわせて、各平面の上下に標準偏差(SD)平面 (薄い色) を示す



Cntnap2  
1437782\_at  
contactin associated protein-like 2

7

RSortによる解析:

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

→ 用量依存性と遺伝子発現量の2次元情報であるため使用できない

⇒ t検定による遺伝子リストの抽出 [解析ソフトMF Analyzer使用]

※この際、溶媒対照群と投与群の発現比、及び発現コピー数に制限を設けなかった

8



## BPA周産期暴露後、成熟期マウス海馬 解析結果

条件:

溶媒対照群と比較し、いずれかの投与群で有意 ( $t$ 検定、 $P < 0.05$ ) な発現変動を示す遺伝子

※この際、溶媒対照群と投与群の発現比、及び発現コピー数に制限を設けなかった

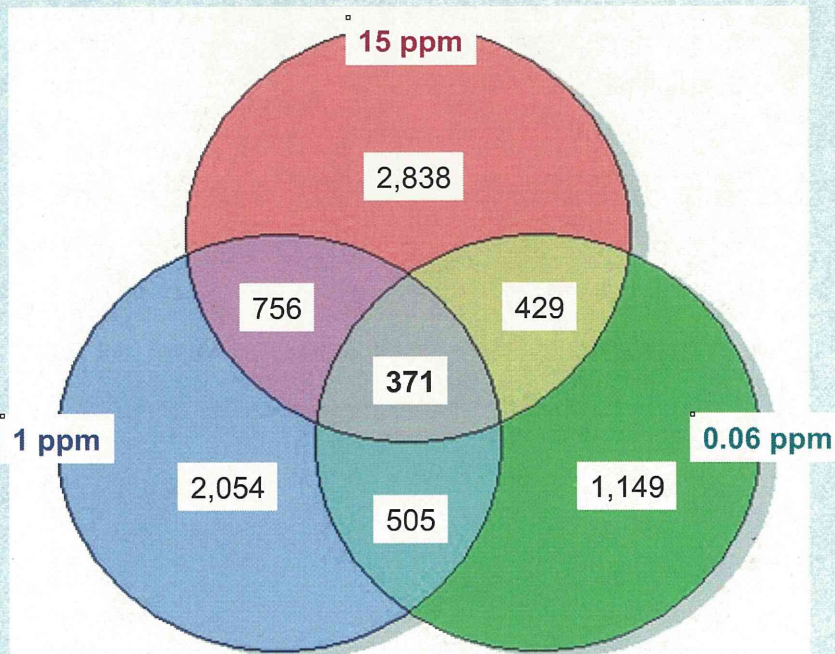
0.06 ppm投与群 : 2,454 ps  
1 ppm投与群 : 3,686 ps  
15 ppm投与群 : 4,394 ps

総計 : 10,534 ps (重複を含む)  
: 8,102 ps (重複を含まない)

9

## BPA周産期暴露後、成熟期マウス海馬 解析結果

溶媒対照群と比較し、各投与群について有意に発現変動を示す遺伝子数[ベン図]



投与群にて発現変動を示した遺伝子数は 計8,102 ps

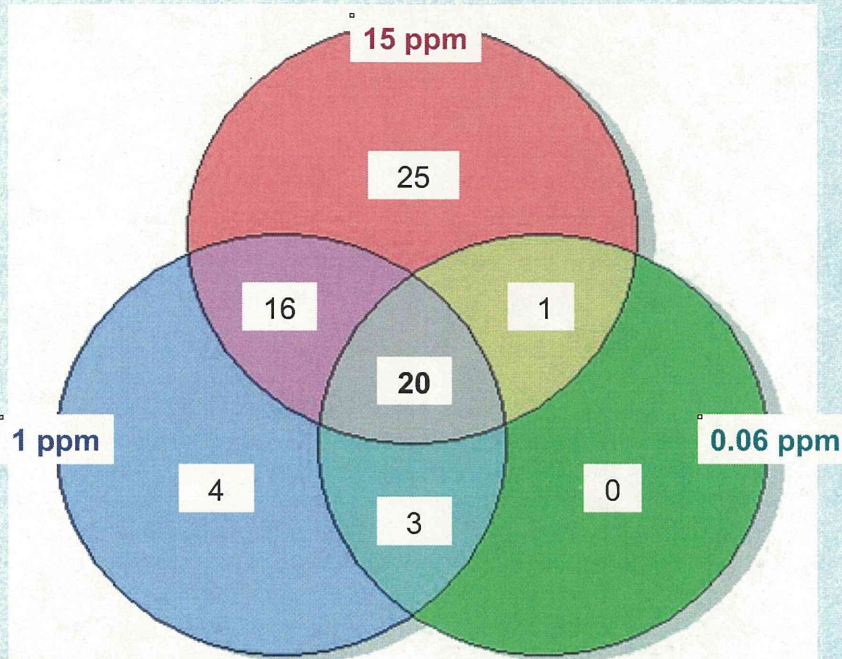
62

10



# BPA周産期暴露後、成熟期マウス海馬 解析結果

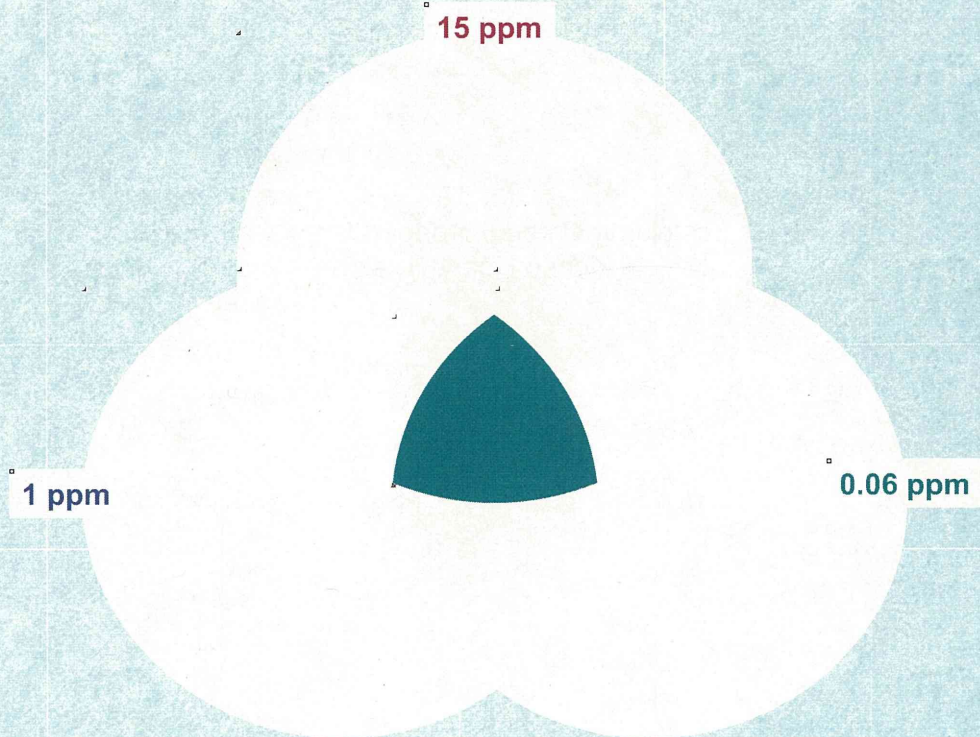
目視により、生物学的な変動を示すと考えられる遺伝子を選択 [ベン図]



発現変動幅及び標準偏差の観点

投与群にて発現変動を示した遺伝子数は 計69 ps

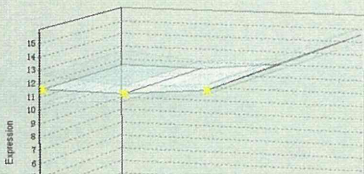
3用量に共通して発現変動を示した遺伝子: 20 ps





Bscl2  
1420632\_a\_at

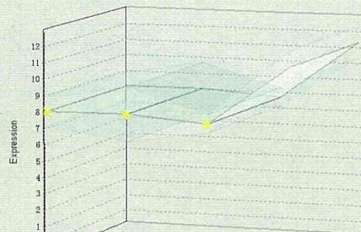
1420632\_a\_at  
Bscl2  
T389954



Bernardinelli-Seip congenital  
lipodystrophy 2 homolog  
(human)

1200003C05Rik  
1451238\_at

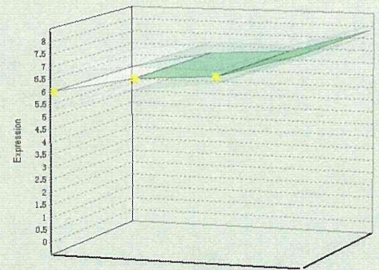
1200003C05Rik  
BC000238



RIKEN cDNA 1200003C05  
gene

Rab3ip  
1436103\_at

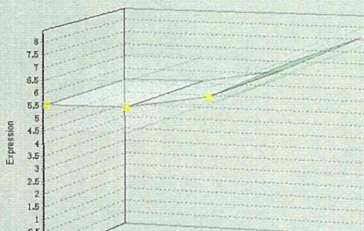
1436103\_at  
Rab3ip  
AV29584



RAB3A interacting protein

Ssh1  
1455854\_a\_at

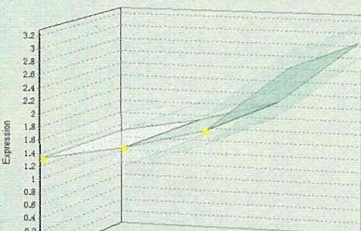
1455854\_a\_at  
Ssh1  
EF53082



slingshot homolog 1  
(Drosophila)

4832406H04Rik  
1458584\_at

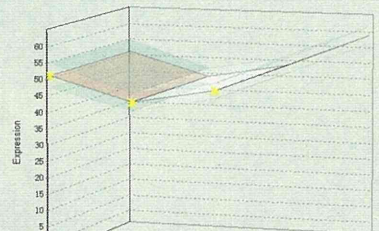
4832406H04Rik  
BE548424



RIKEN cDNA 4832406H04  
gene

4921506J03Rik  
1428128\_at

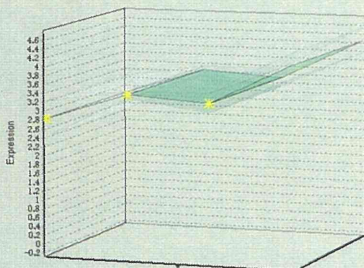
4921506J03Rik  
BC397566



RIKEN cDNA 4921506J03  
gene

Txnr1  
1424486\_a\_at

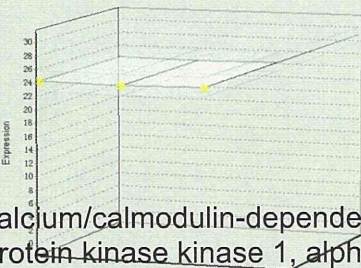
1424486\_a\_at  
Txnr1  
EF524199



thioredoxin reductase 1

Camkk1  
1418954\_at

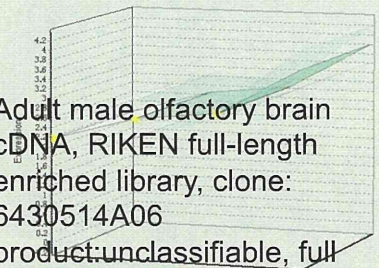
1418954\_at  
Camkk1  
NM\_018983



calcium/calmodulin-dependent  
protein kinase kinase 1, alpha

---  
1440630\_at

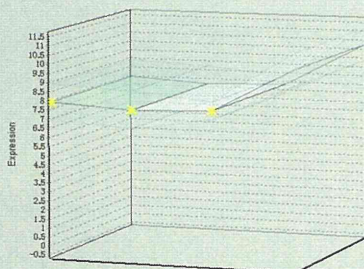
1440630\_at  
AV340255



Adult male olfactory brain  
cDNA, RIKEN full-length  
enriched library, clone:  
6430514A06  
product: unclassifiable, full  
insert sequence

Rnf41  
1423842\_a\_at

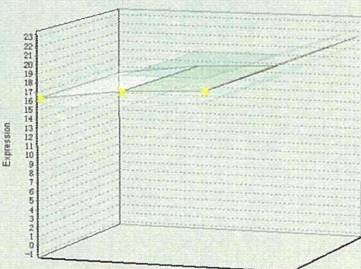
1423842\_a\_at  
Rnf41  
AF200780



ring finger protein 41

Abr  
1433477\_at

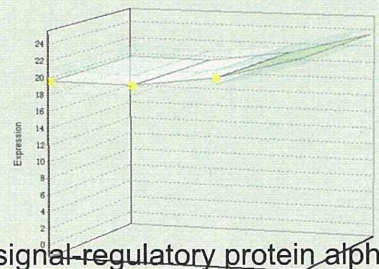
1433477\_at  
Abr  
AV325118



active BCR-related gene

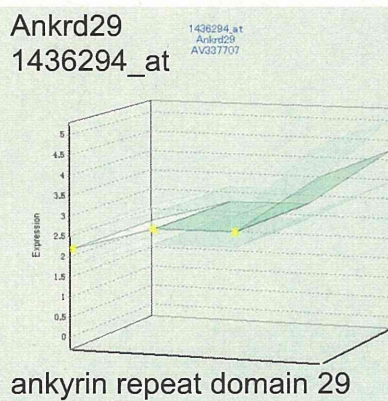
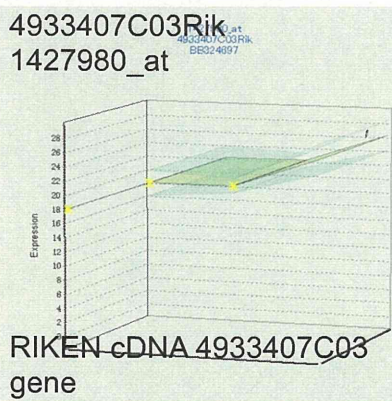
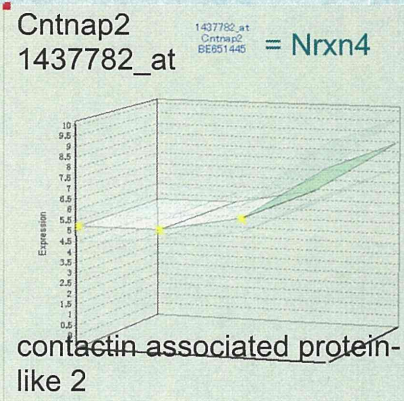
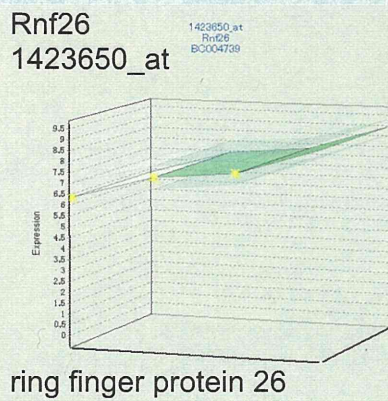
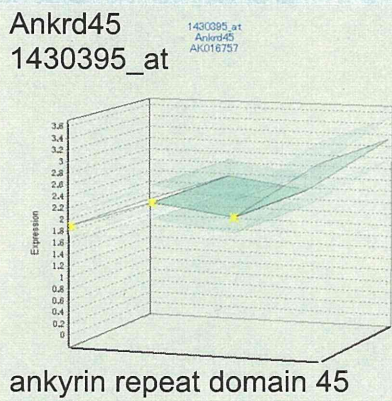
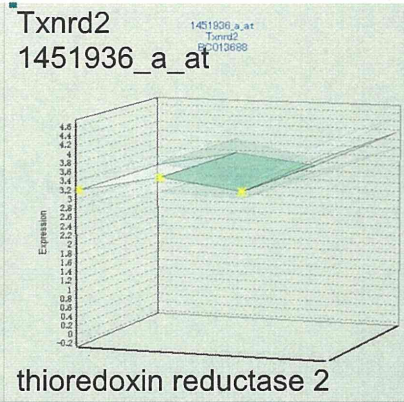
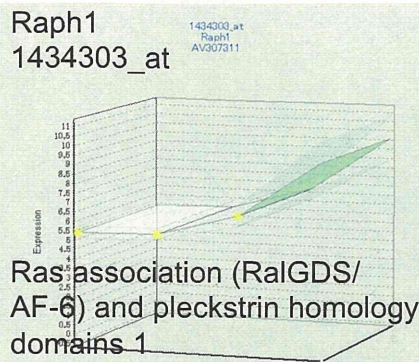
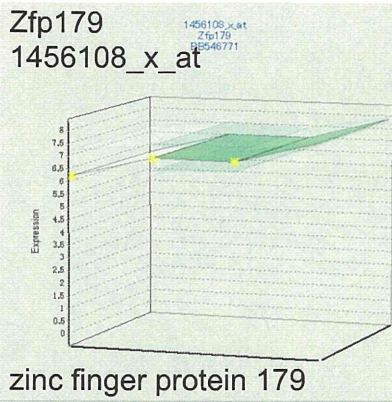
Sirpa  
1448534\_at

1448534\_at  
Sirpa  
AB018194



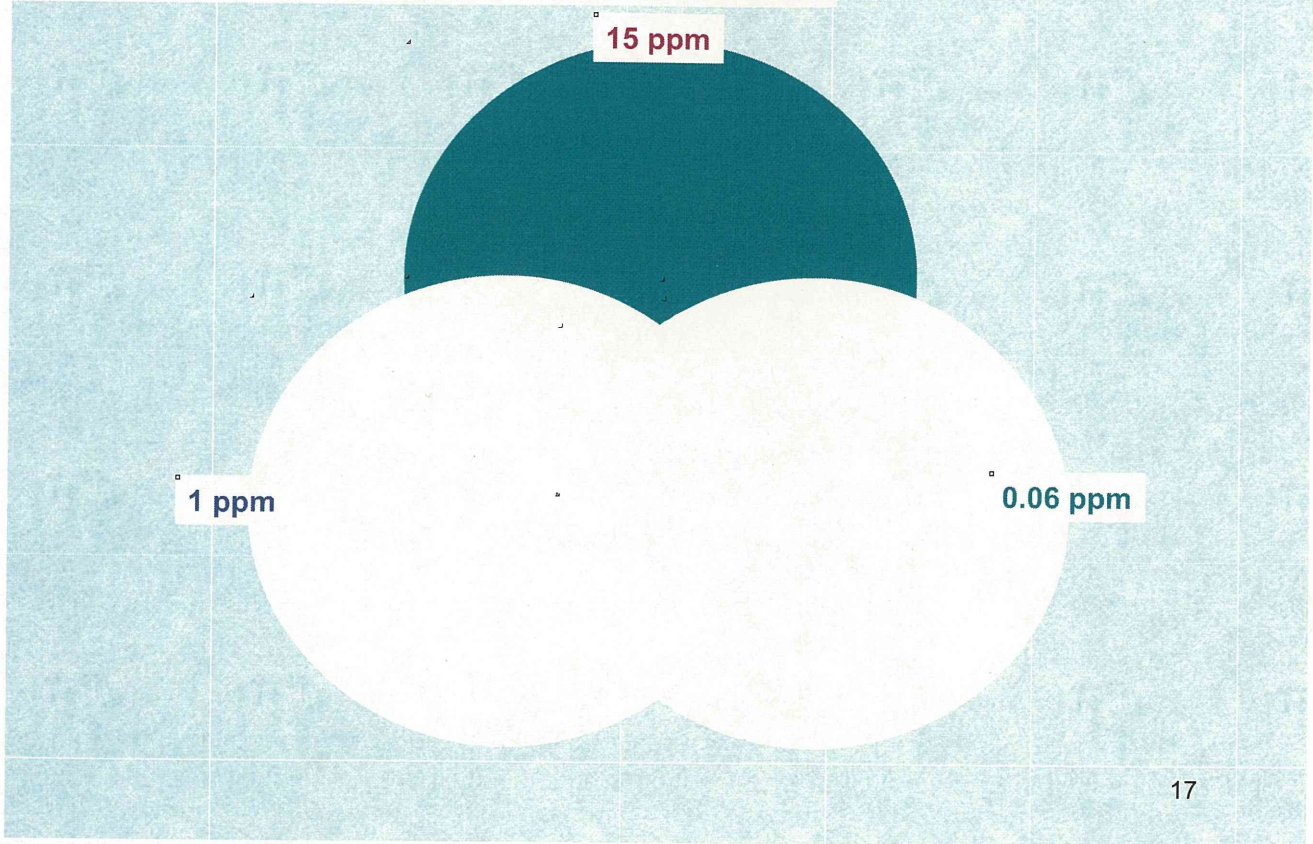
signal regulatory protein alpha



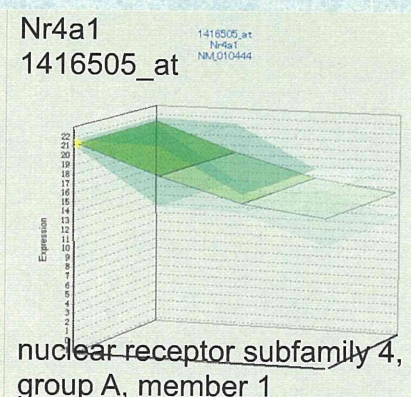
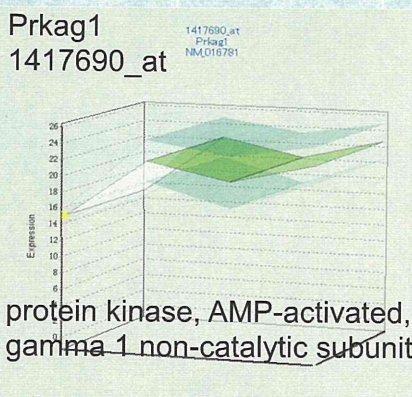
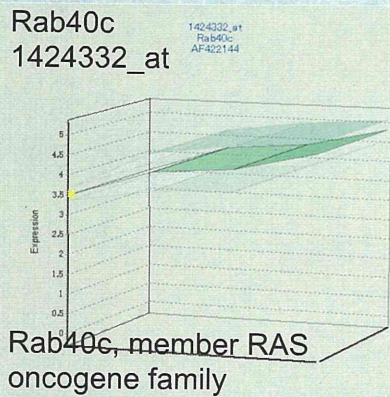
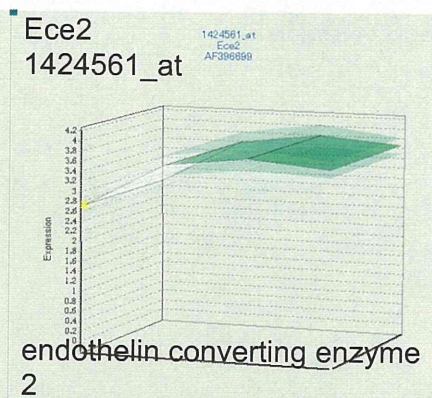
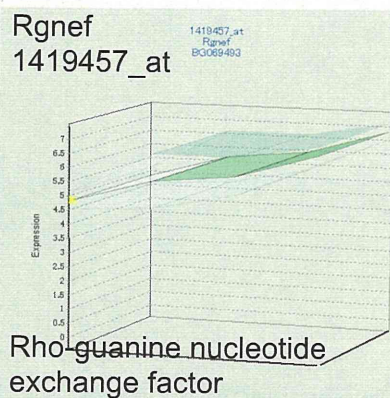
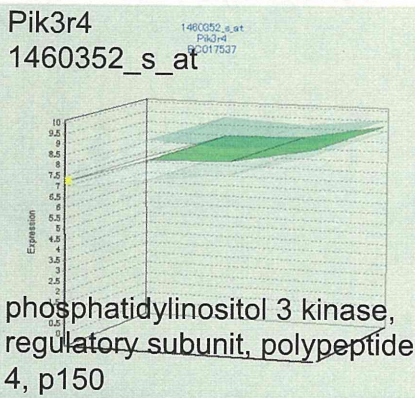




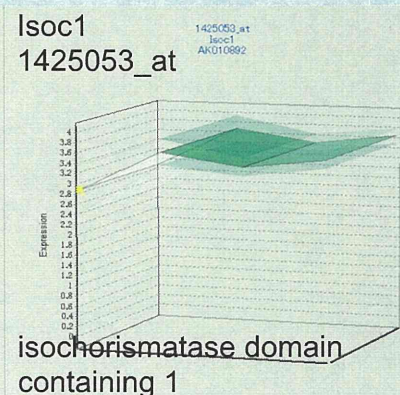
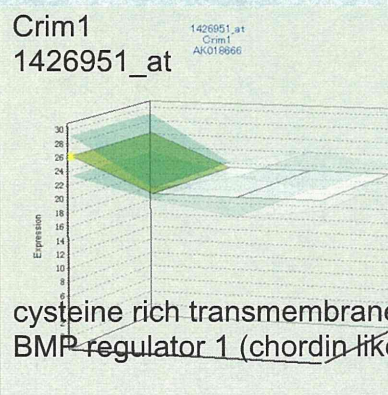
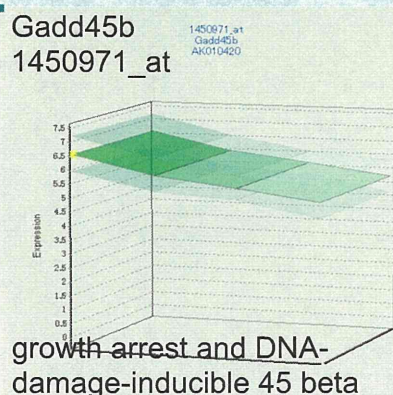
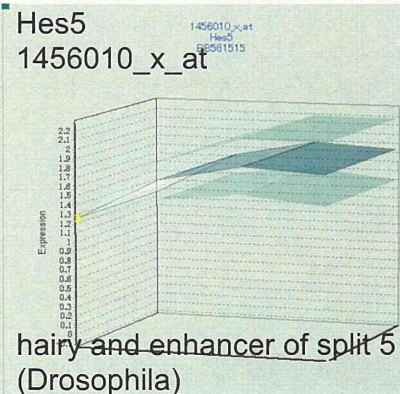
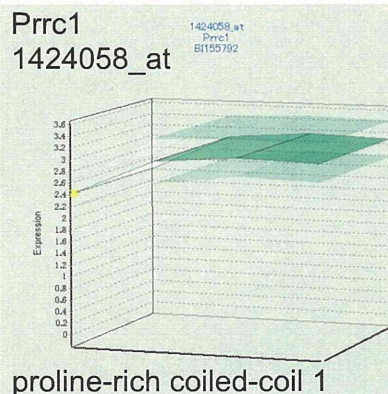
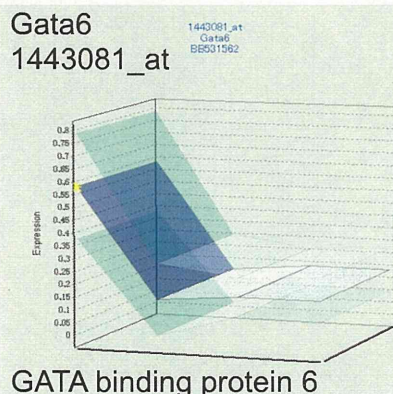
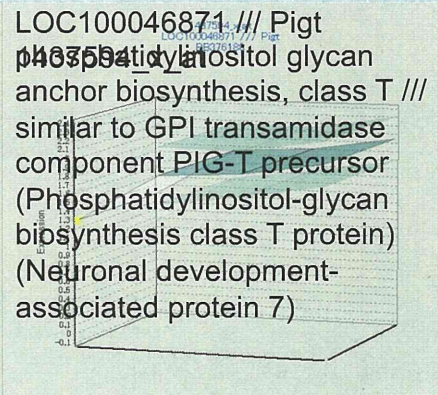
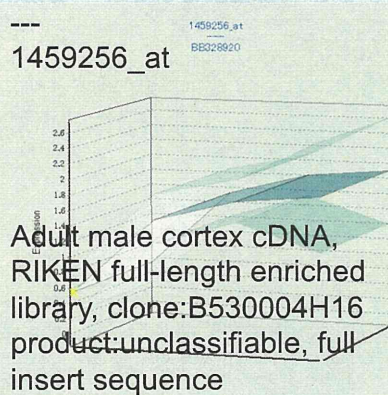
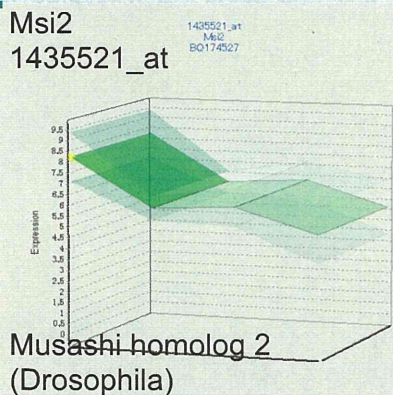
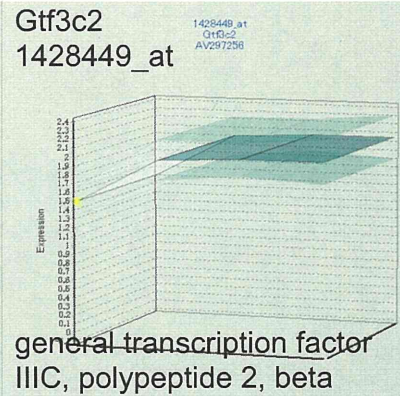
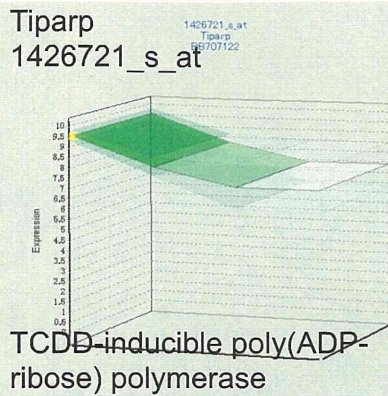
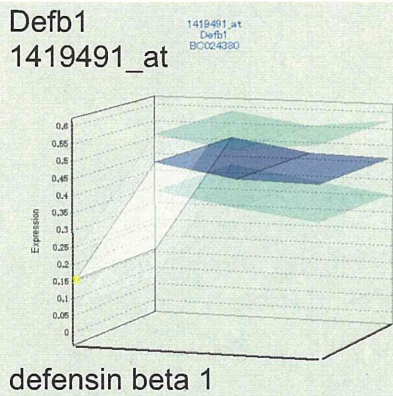
高用量のみで発現変動を示した遺伝子: 25 ps



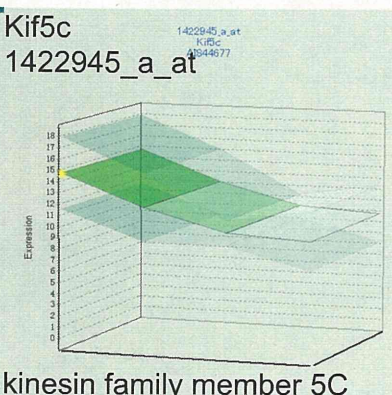
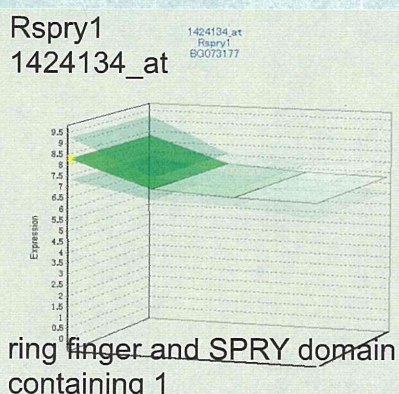
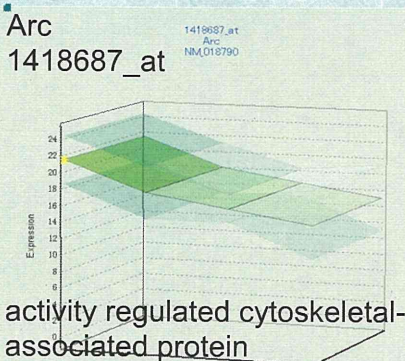
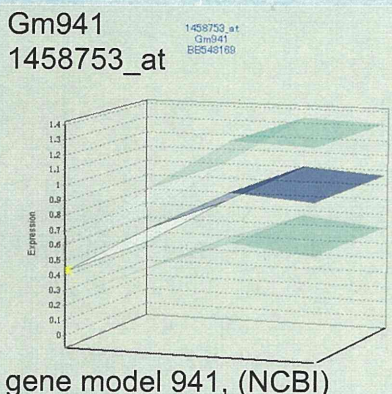
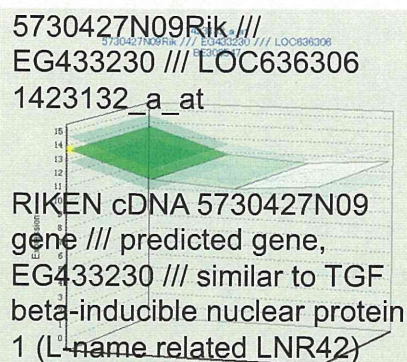
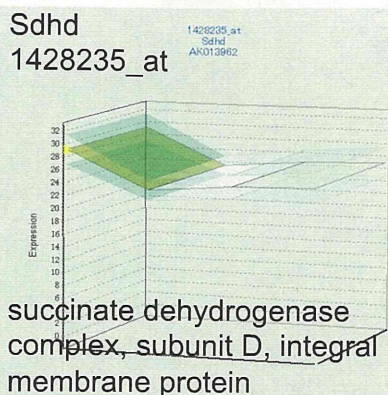
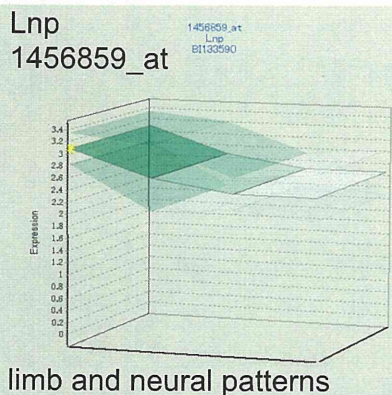
17



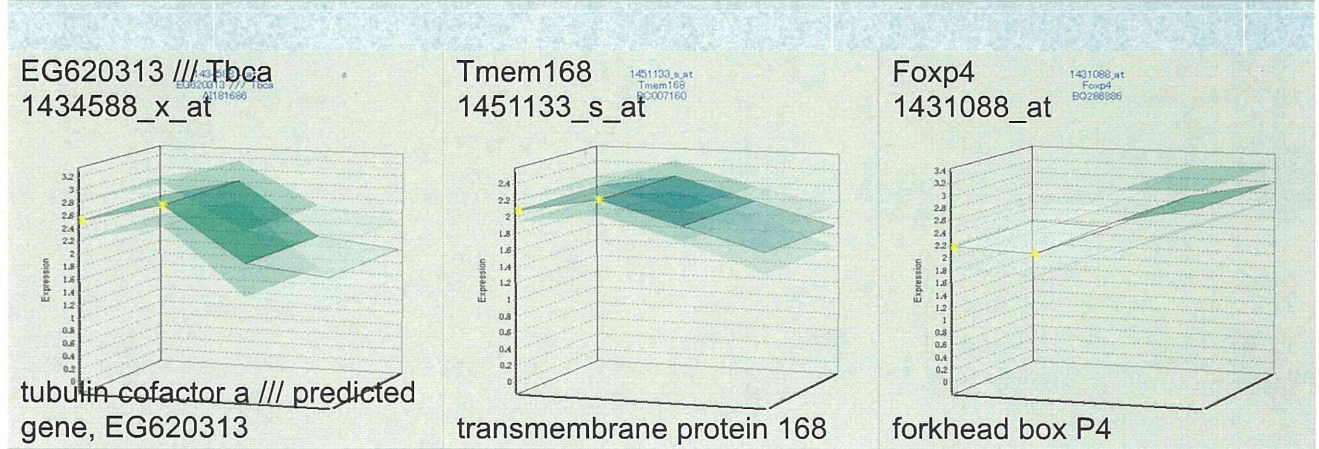
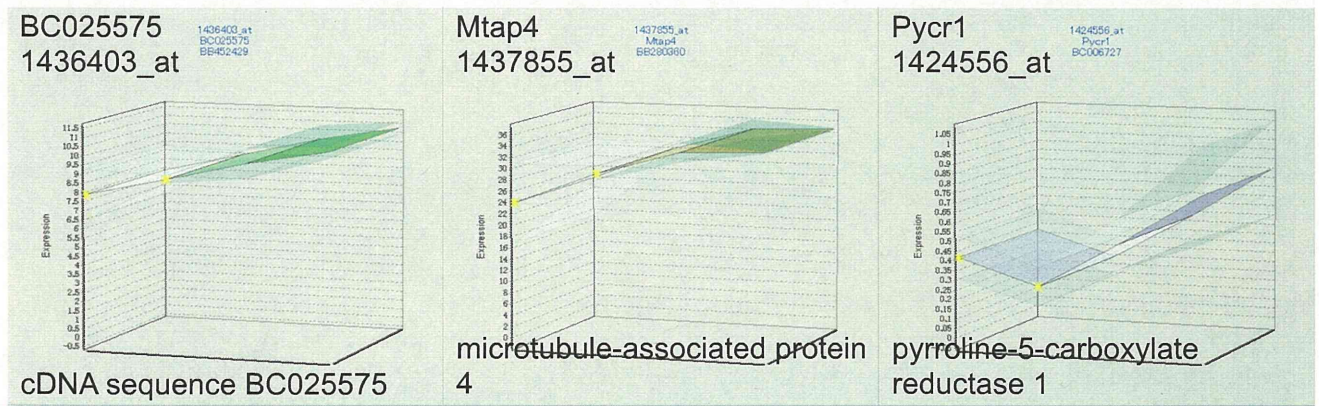
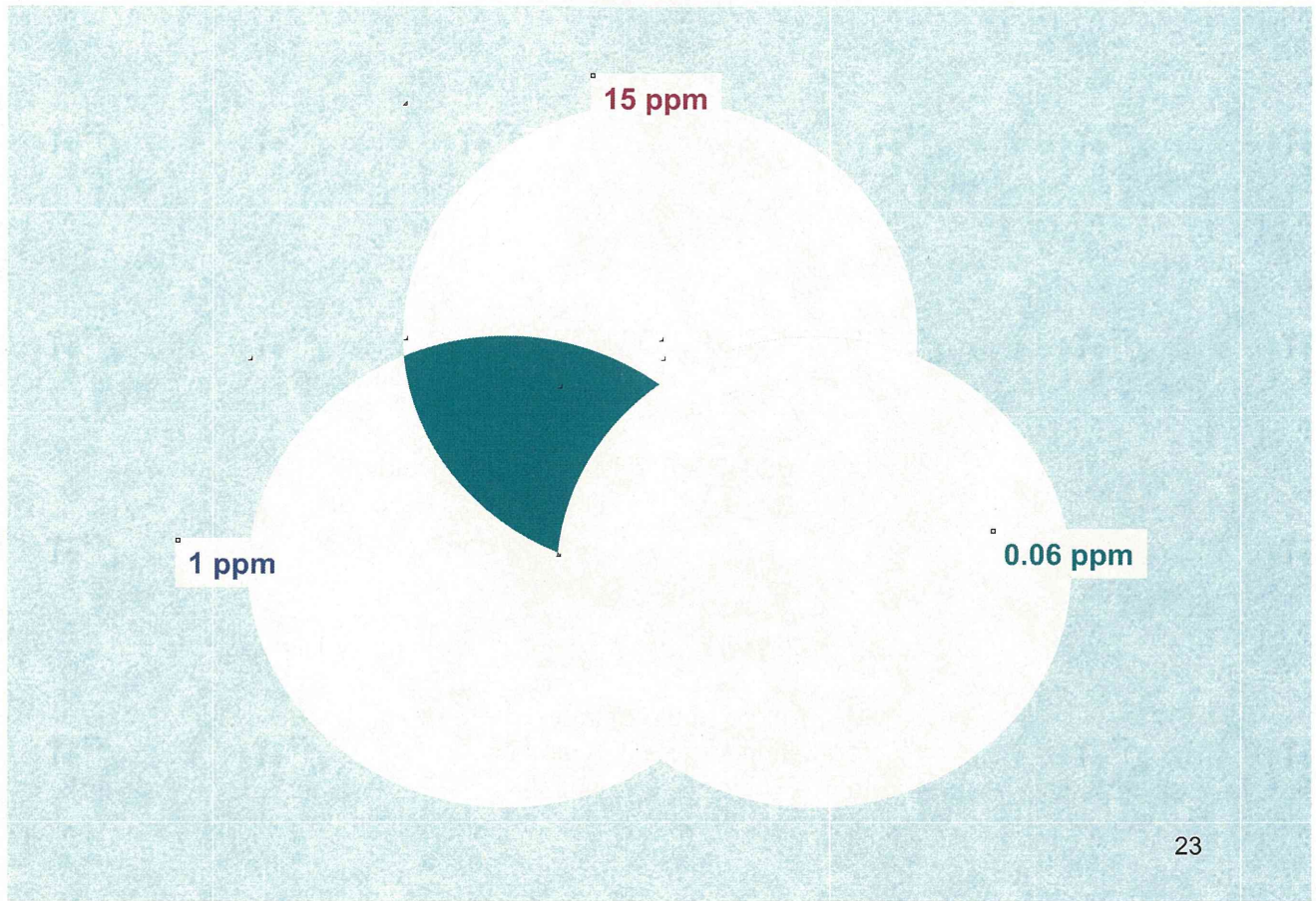








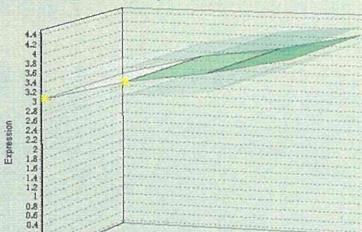






Sin3b  
1425630\_at

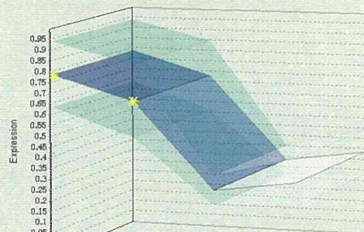
1425630\_at  
Sin3b  
L38822



transcriptional regulator,  
SIN3B (yeast)

4930470B04Rik  
1454057\_at

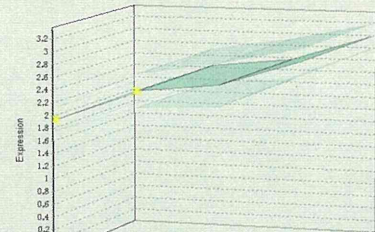
4930470B04Rik  
AK015351



RIKEN cDNA 4930470B04  
gene

Wdr46  
1437828\_s\_at

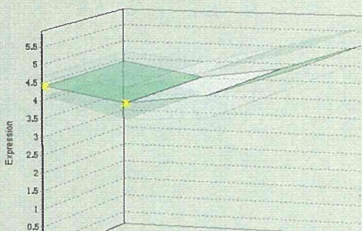
1437828\_s\_at  
Wdr46  
U75559



WD repeat domain 46

Atm  
1421205\_at

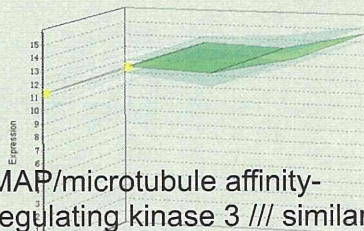
1421205\_at  
Atm  
NM\_007469



ataxia telangiectasia mutated  
homolog (human)

LOC100047588 /// Mark3  
1418316\_a\_at

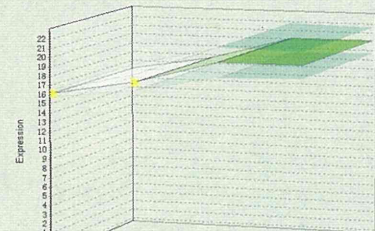
LOC100047588 /// Mark3  
BC026443



MAP/microtubule affinity-  
regulating kinase 3 /// similar  
to MAP/microtubule affinity-  
regulating kinase 3

Poldip3  
1455788\_x\_at

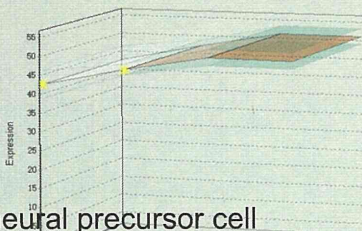
1455788\_x\_at  
Poldip3  
U5495487



Polymerase (DNA-directed),  
delta interacting protein 3

Nedd8  
1423715\_a\_at

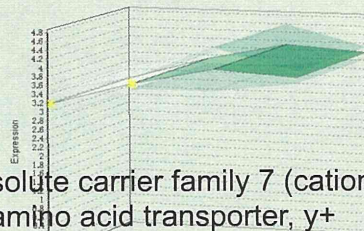
1423715\_a\_at  
Nedd8  
U754625



neural precursor cell  
expressed, developmentally  
down-regulated gene 8

Slc7a4  
1436776\_x\_at

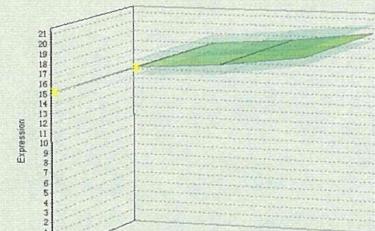
1436776\_x\_at  
Slc7a4  
AK021932



solute carrier family 7 (cationic  
amino acid transporter, y+  
system), member 4

1200013P24Rik  
1415721\_a\_at

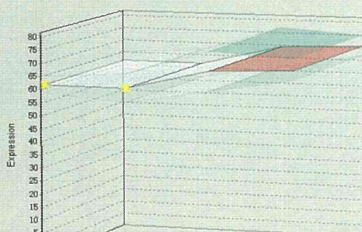
1200013P24Rik  
AK004750



RIKEN cDNA 1200013P24  
gene

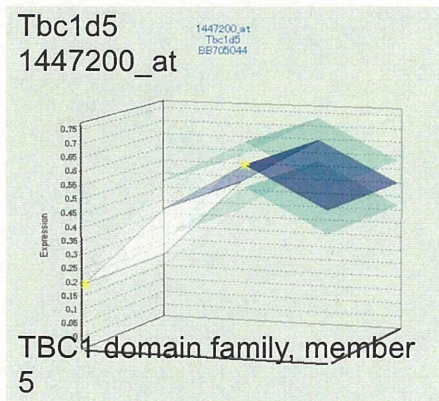
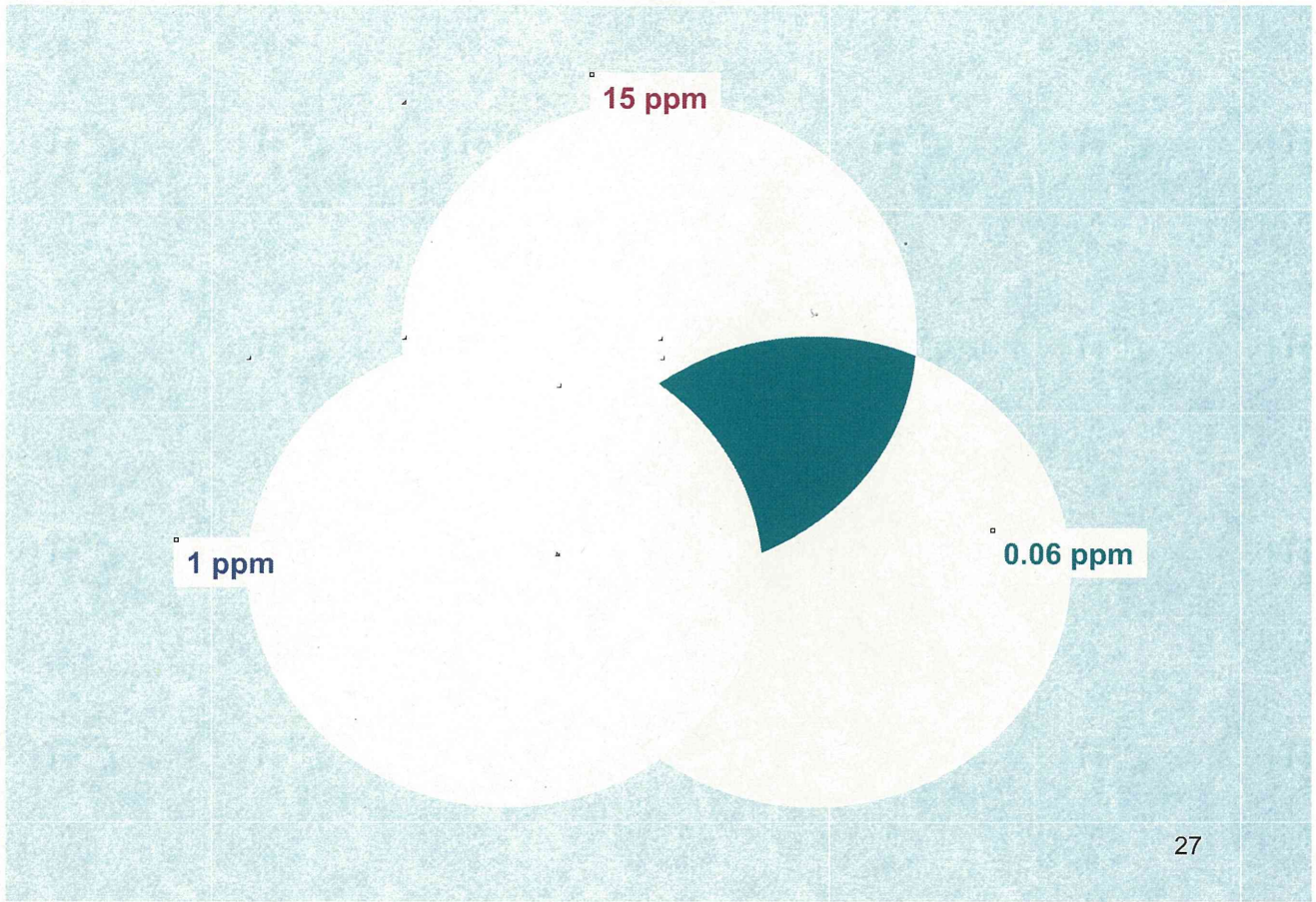
Gja1  
1437992\_x\_at

1437992\_x\_at  
Gja1  
U500268

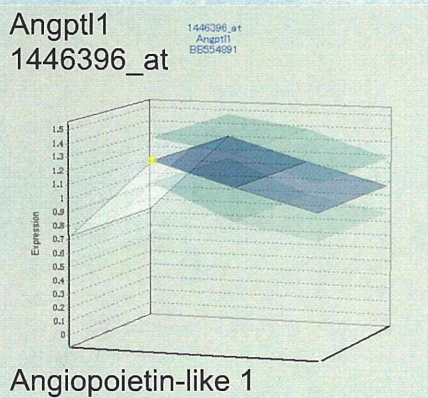
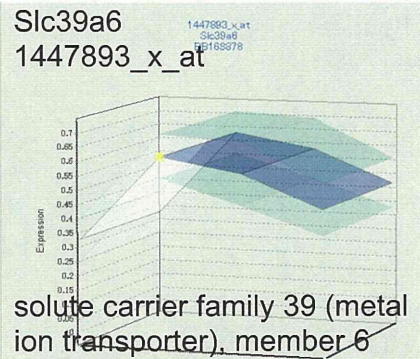
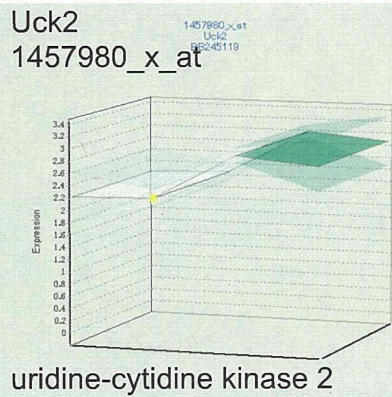
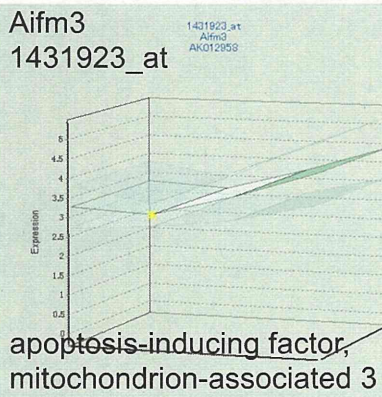
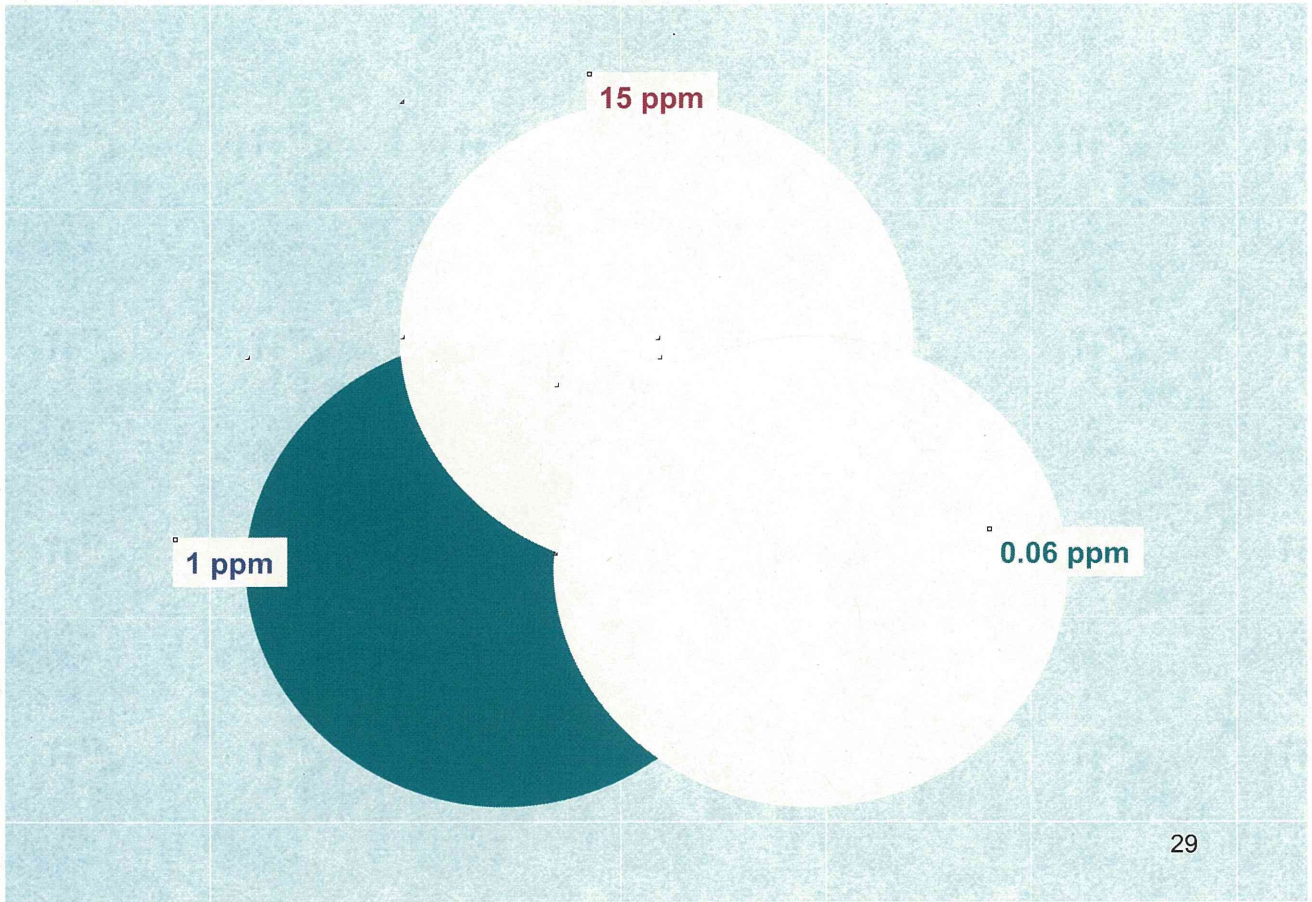


gap junction protein, alpha 1

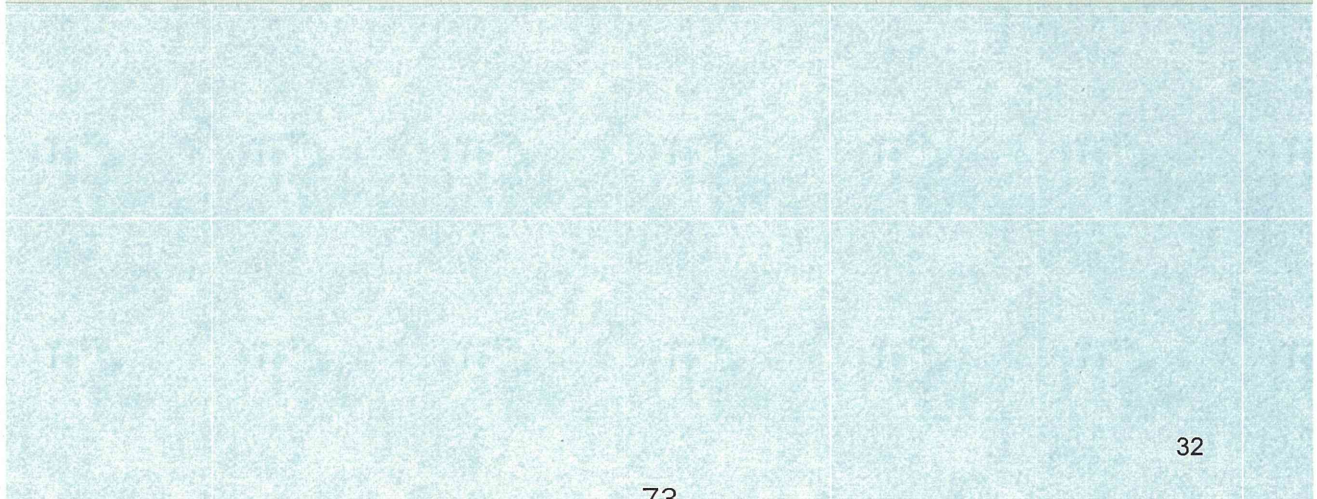
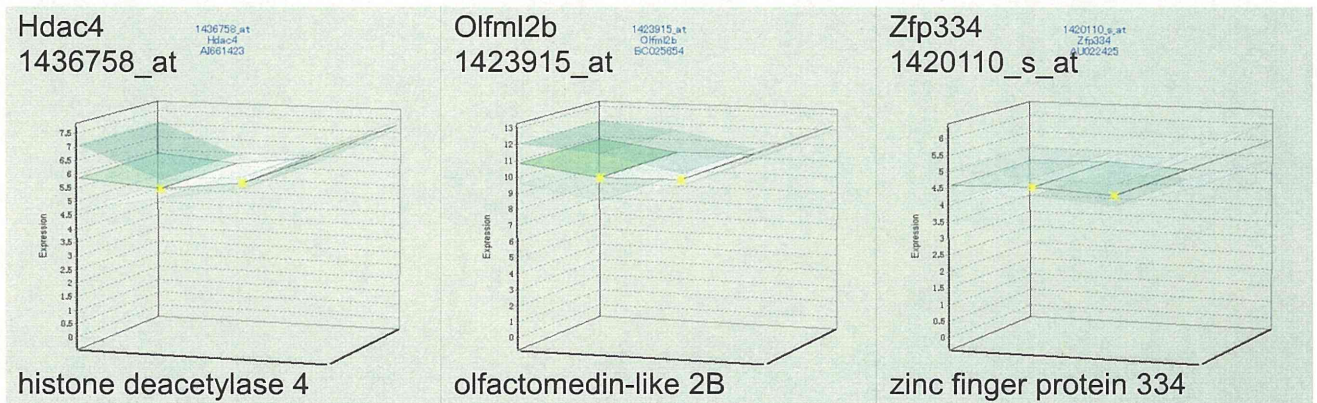
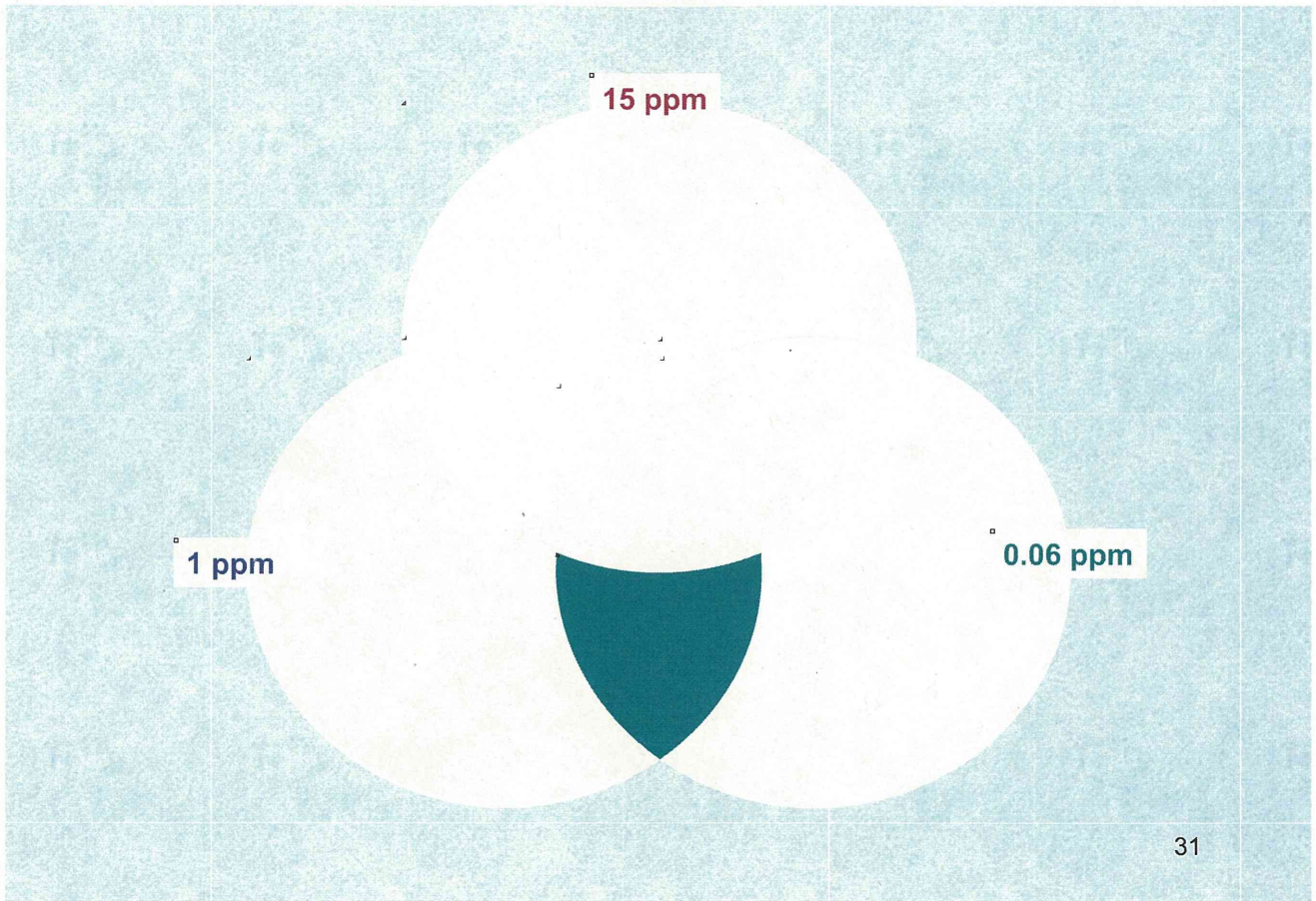




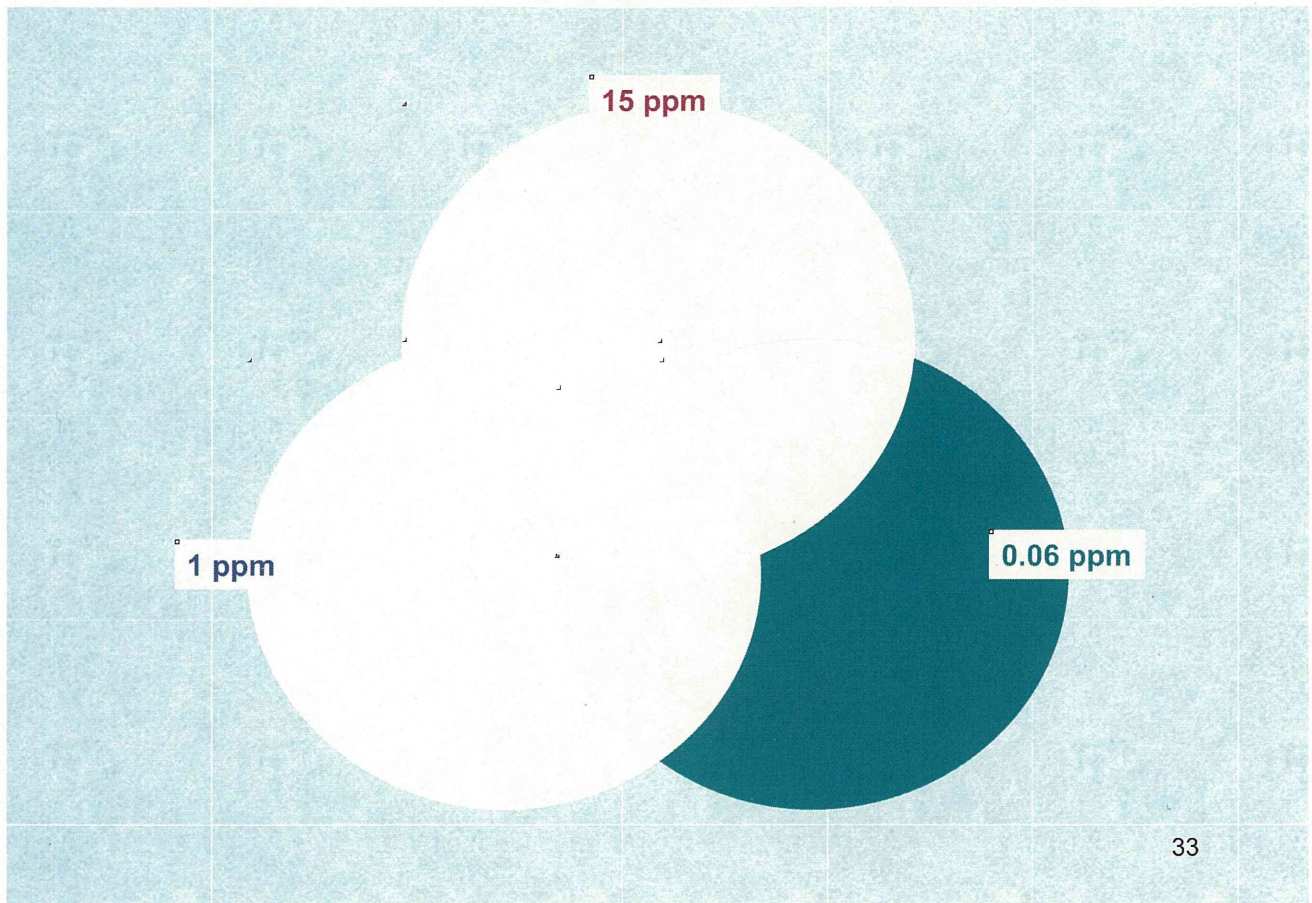












33



34



## 69遺伝子について特定のシグナルネットワークは見いだされなかった

神経系と関連する遺伝子を探る為に、

発現変動が認められた69遺伝子について文献検索 (PubMed使用)

- 1) 記憶と関係する  
Camkk1 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha)の発現減少(高・中・低用量)
- 2) 遺伝子欠失マウスにて $\beta$ アミロイド蓄積が認められる  
Ece2 (endothelin converting enzyme 2)の発現減少(高用量)
- 3) 神経幹細胞に発現する  
Msi2 (Musashi homolog 2 (Drosophila))の発現増加(高用量) 及び  
Hes5(hairy and enhancer of split 5 (Drosophila))の発現減少(高用量)
- 4) 神経伝達における初期応答遺伝子(immediate early genes, IEGs)であるArc (activity regulated cytoskeletal-associated protein) 及び  
Gadd45b(growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta)の発現増加(高用量)
- 5) 神経細胞での物質輸送に関係し微小管をレールとするモーター分子であるKif5c (kinesin family member 5C)の発現増加(高用量)

神経系と関連する遺伝子を探る為に、

発現変動が認められた69遺伝子について文献検索 (PubMed使用)

(続き)

- 6) 酸化ストレスに関連する  
Txnrd1(thioredoxin reductase) 及び  
Txnrd2(thioredoxin reductase 2)の発現減少(高・中・低用量)が認められた。
- 7) 自閉症患者での変異が報告され(Alarcon Mら、Am J Hum Genet 82: 150-159, 2008)、また遺伝子欠失マウスが自閉症と似た行動異常を示す(Penagarikano Oら、Cell 147: 235-246, 2011)、**Cntnap2 (contactin associated protein-like 2)**の発現減少(高・中・低用量)

いずれもこれまでBPA暴露との関連を示唆する報告は認められず新規の知見



