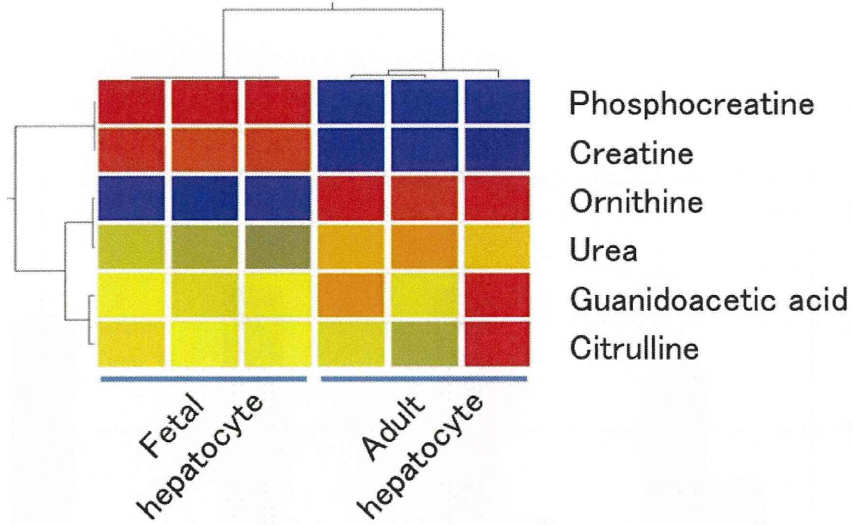


A



B

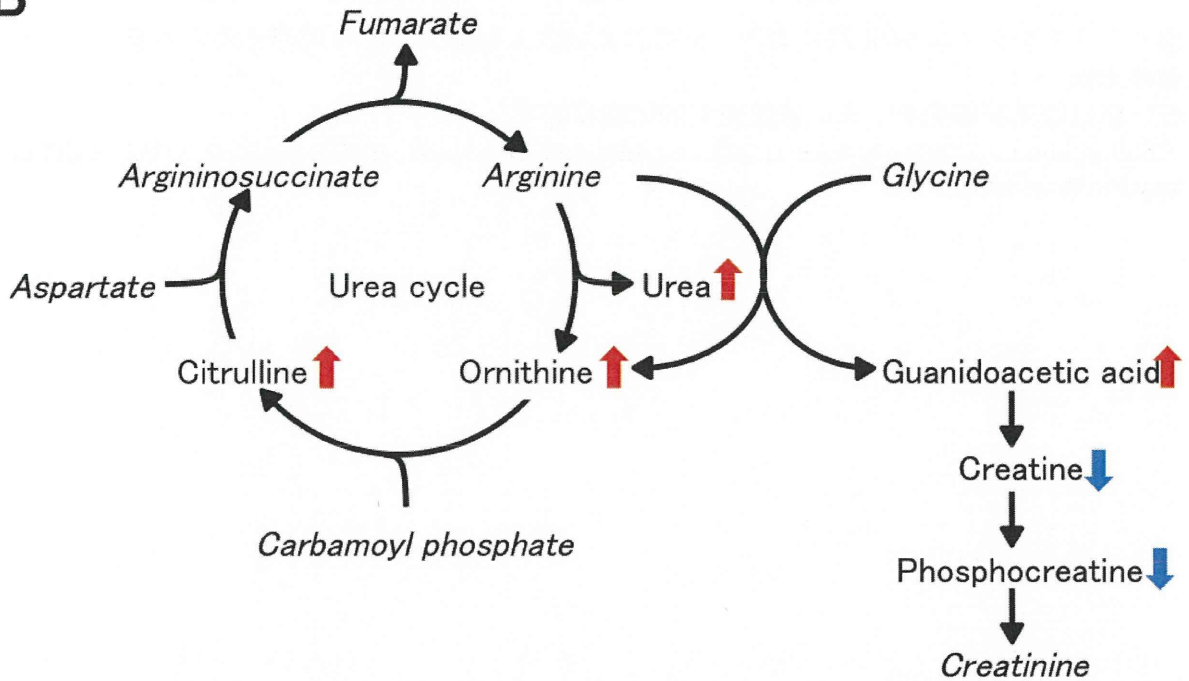


図7. 胎児および成人肝細胞間での尿素回路とクレアチン経路の代謝産物の存在量の変化  
 A、存在量が有意 (t-test,  $p < 0.05$ ) に変化する代謝産物のヒートマップ。B、尿素回路とクレアチン経路の代謝マップ。赤い上向きの矢印と青い下向きの矢印は、それぞれ胎児肝細胞と比較して成人肝細胞で相対的存在量が増加、または、減少した代謝産物を示す。

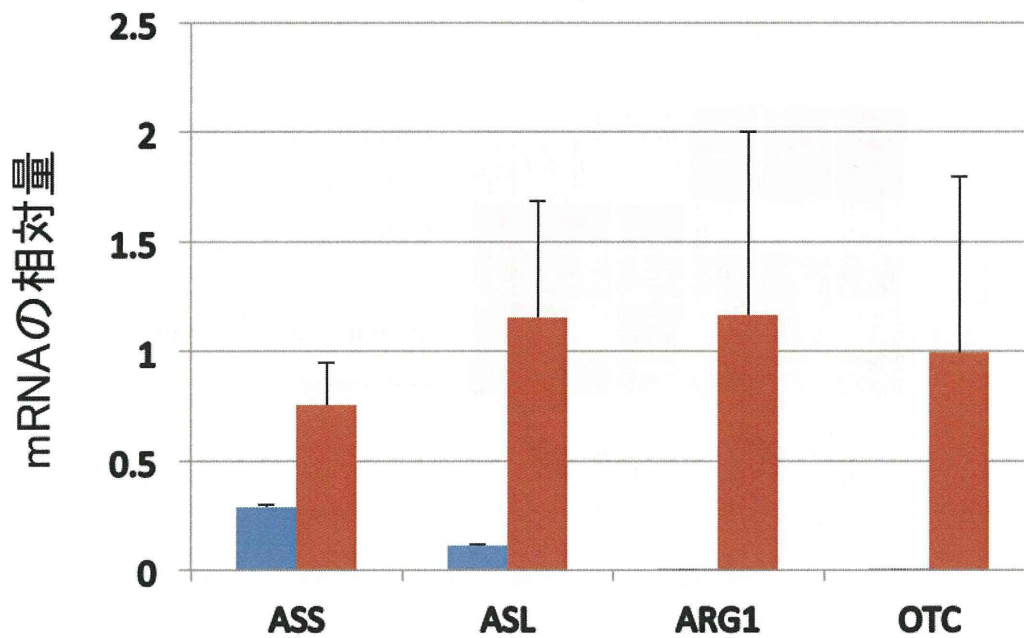


図8. リアルタイム PCR 法による、胎児および成人肝細胞間での尿素回路の各遺伝子の発現量の比較

青い棒は胎児肝細胞を、赤い棒は成人肝細胞を表す。

ASS, argininosuccinate synthase 1; ASL, argininosuccinate lyase ; ARG1, arginase; OTC, ornithine transcarbamylase .

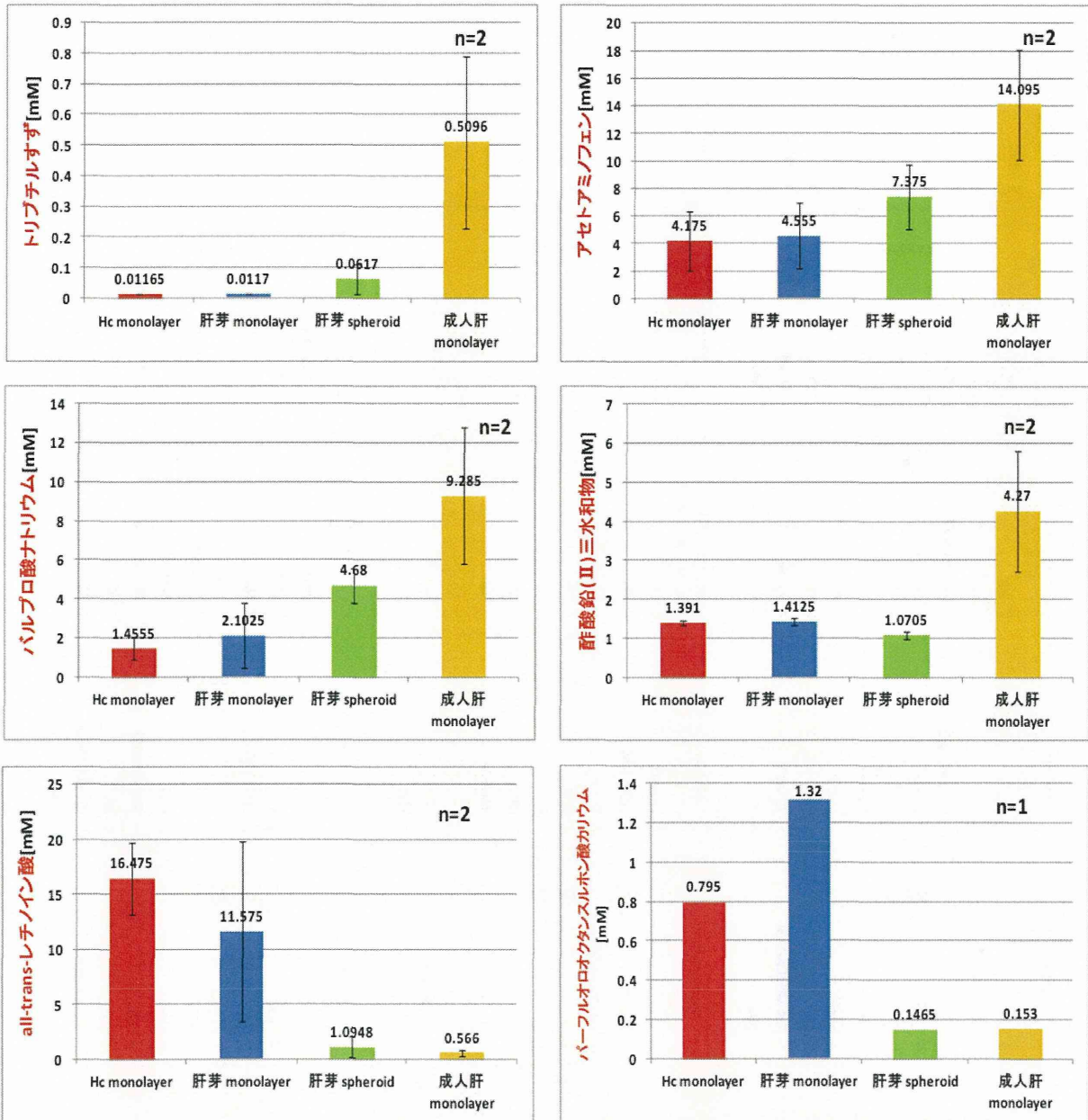


図9. 各細胞の化学物質72時間暴露におけるIC<sub>50</sub>値。  
 縦軸に各化学物質の濃度、横軸は左から順に胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養およびスフェロイド培養、成人肝細胞の単層培養を示す。

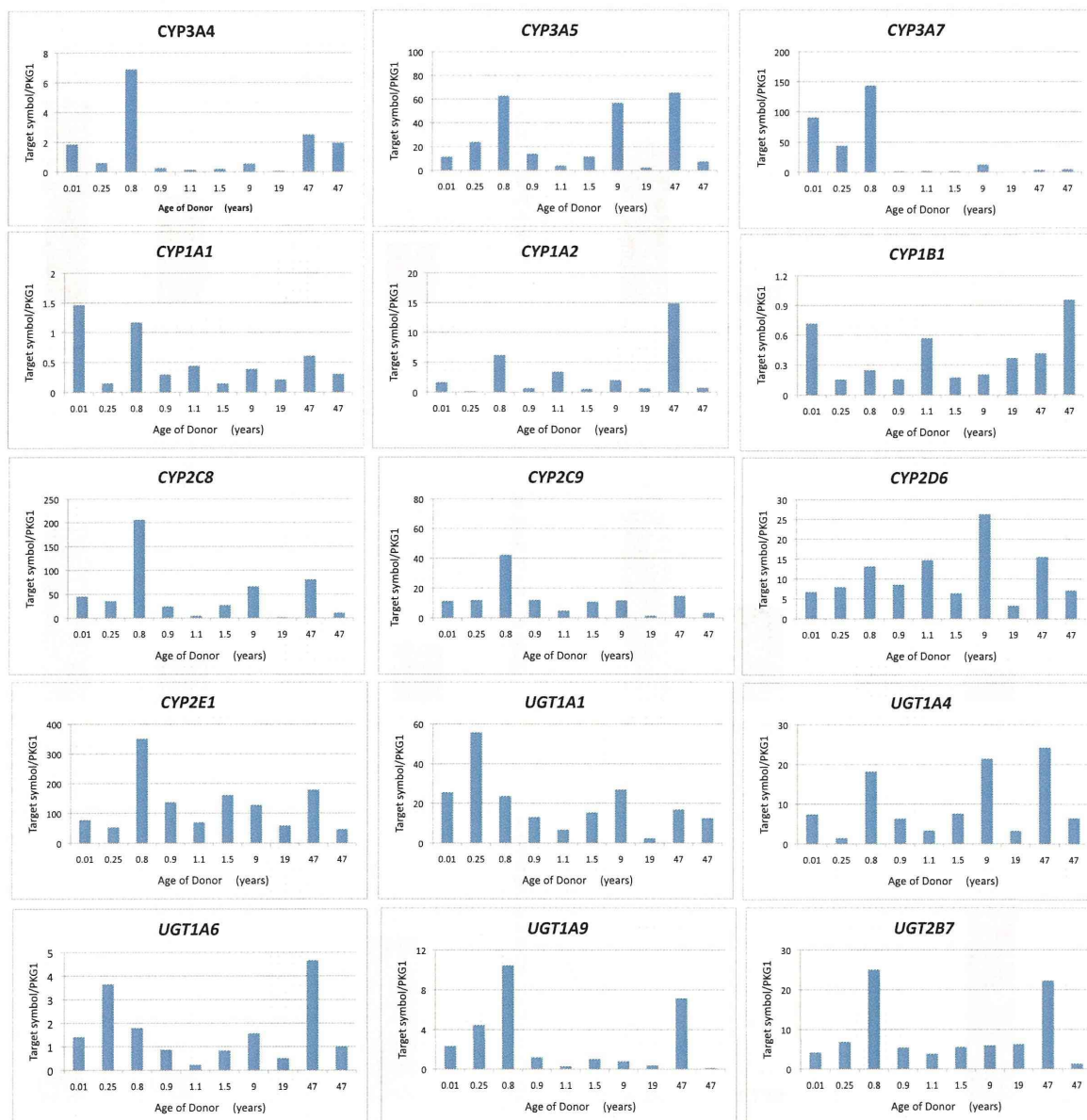


図 10. ヒト肝細胞における薬物代謝因子の発現  
 UGT; UDP glycosyltransferase family

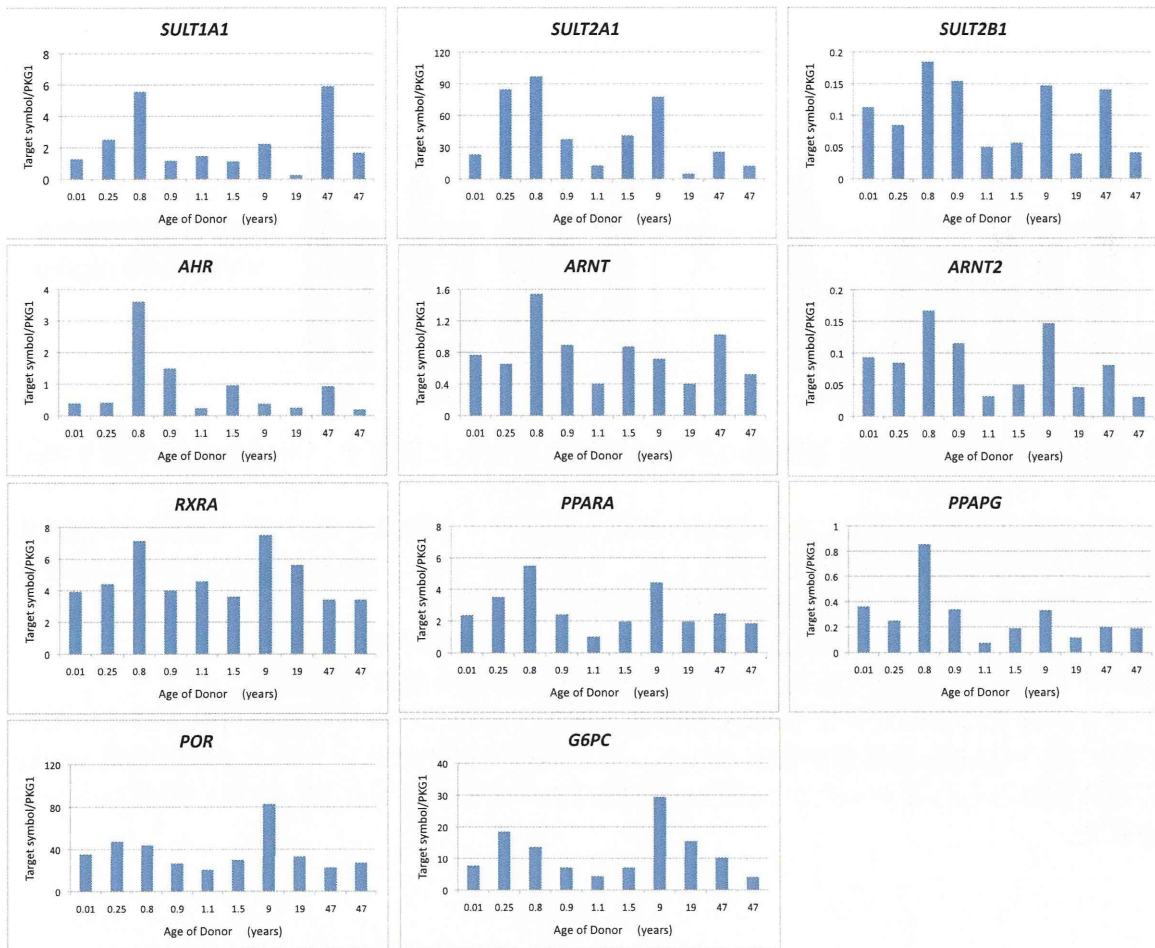


図 11. ヒト肝細胞における薬物代謝因子の発現

SUL; Sulfotransferase family

AHR; Arylhydrocarbon receptor

ARNT; Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator

RXRA; Retinoid X receptor, alpha

PPAPA/G; Peroxisome proliferative activated receptor, alpha/gamma

POR; Cytochrome P450 oxidoreductase

G6PC ; Glucose-6-Phosphatase

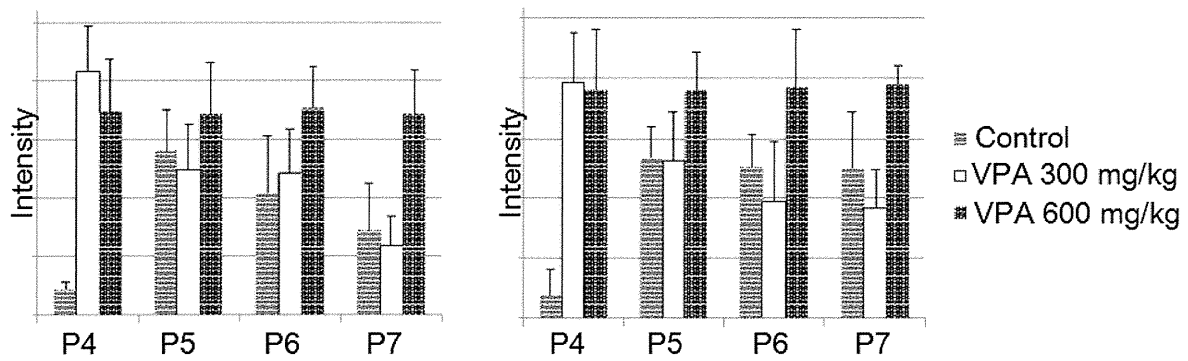


図 12. 小脳皮質からの GABA 遊離量の生後日齢による変化に及ぼすバルプロ酸経口投与の影響

生後のそれぞれの日齢で摘出した小脳から作成したスライス標本を用いて、GABA の細胞外遊離量を示す蛍光強度の日齢変化を測定した。コントロール群、300 mg/kg のバルプロ酸経口投与群、600 mg/kg のバルプロ酸経口投与群を比較している。

A:小脳スライスの外顆粒層 (EGL) における GABA 遊離量の生後日齢変化

B:小脳スライスの内顆粒層 (IGL) における GABA 遊離量の生後日齢変化

コントロール群では生後 5 日で GABA 遊離量が増加するが、バルプロ酸経口投与群では生後 4 日で既に高い GABA 放出量が観察された。その他の日齢ではコントロール群と 300 mg/kg 群との間に差はみられなかったが、600 mg/kg 群において生後 8 日において高い遊離レベルが観察された。

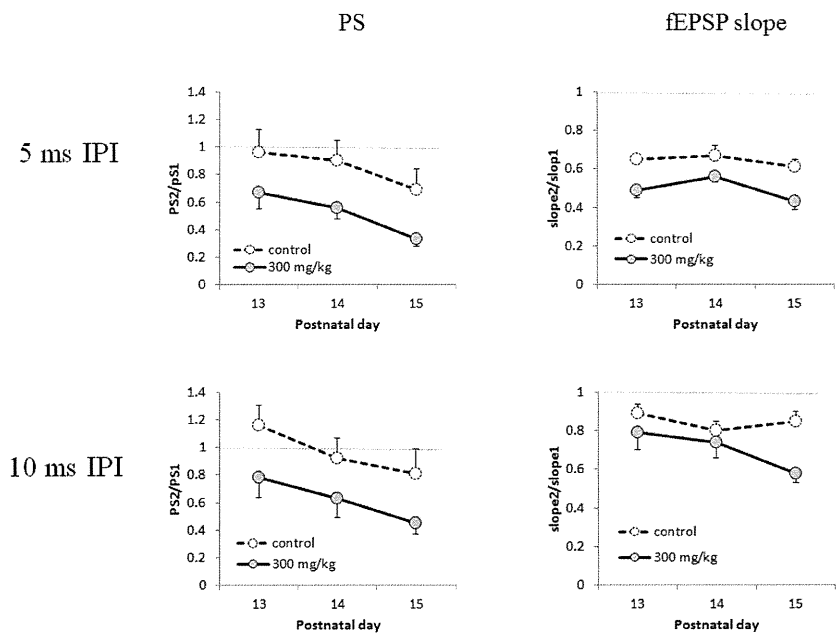


図 13. フィードバック抑制への VPA 曝露の影響

錐体細胞の細胞体層と樹状突起シナプス層へのフィードバック抑制について、PND13-15 で調べた。5, 10 ms いずれの刺激間隔においても、フィードバック抑制は増加しており、抑制性 GABA 機能が VPA 曝露によって亢進した。5 ms 刺激間隔のときの PS については  $p=0.0029$ , slope については  $p=0.00004$ 、10 ms 刺激間隔のときの PS については、 $p=0.0035$ , slope については  $p=0.0018$  となり、いずれも曝露の影響が顕著であった。曝露の影響の有無については、繰り返しのある二元配置分散分析で検定した。

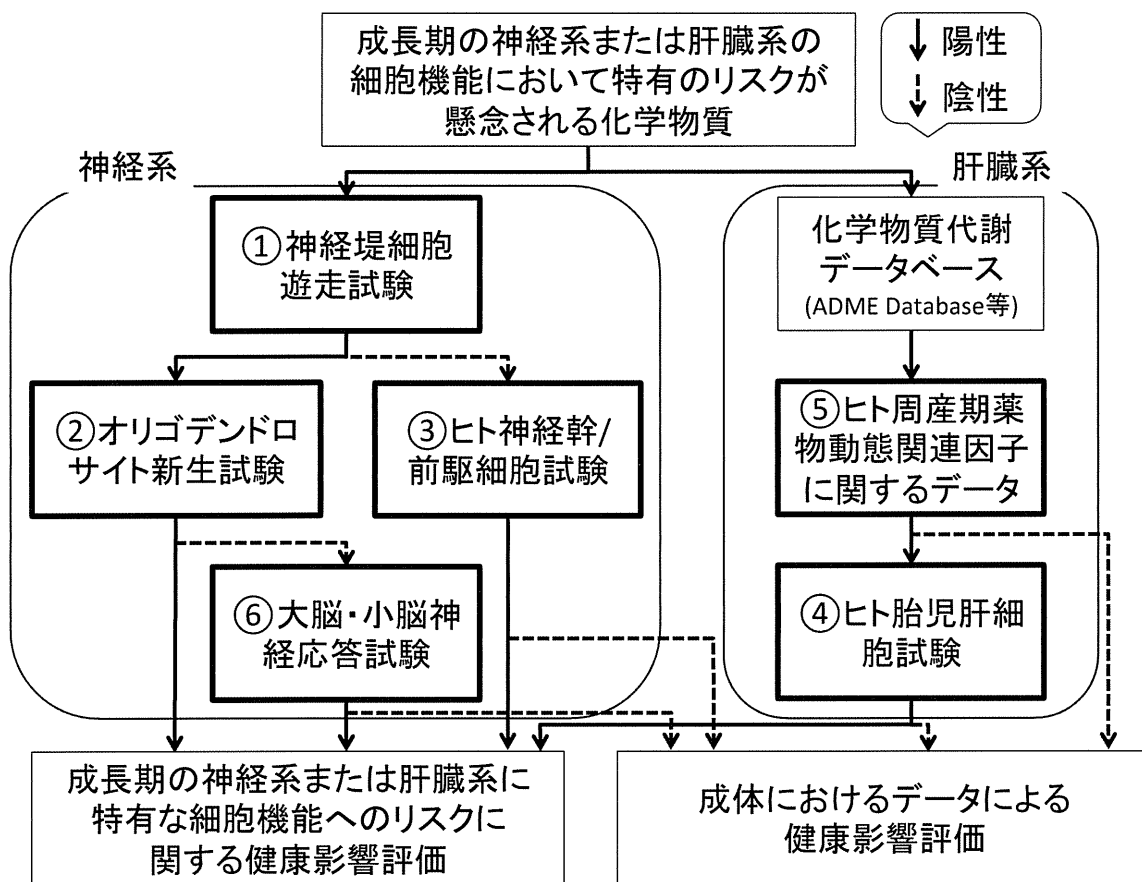


図 14. 個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による化学物質の健康影響評価法を示す枝分かれ図



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て、発生毒性を有する種々の化学物質による神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べた。その結果、13-シスレチノイン酸、イブプロフェン、酢酸鉛、サリチル酸およびセレン酸の添加により、神経堤細胞の遊走は濃度依存的に阻害された。一方、アセトアミノフェン、カフェイン、エタノール、インジウム、フェントイン、亜セレン酸、トリブチルスズおよびバルプロ酸の添加では、神経堤細胞の遊走に影響は認められなかった。神経堤細胞の遊走を阻害した化学物質について、神経堤細胞における Rho シグナルパスウェイのリン酸化アクチン結合タンパクを調べた結果、セレン酸においてのみタンパク量の減少が認められた。このことから、タンパク量に変化が認められなかった 13-シスレチノイン酸、イブプロフェン、酢酸鉛およびサリチル酸と、セレン酸とでは遊走阻害作用のメカニズムが異なると推定される。これらの結果から、本実験法は、発生毒性メカニズムに基づいた化学物質の健康影響評価法として有用であると考えられた。

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。

初年度においては、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。2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。今年度は、本研究の最終年度として、発生毒性を有する種々の化学物質による神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べ、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

ウィスターラット (CrIj: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 (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% CO<sub>2</sub>、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。

### 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 $\mu$ 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。セミドライプ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を検出した。

## C. 研究結果

### 1. 発生毒性を有する化学物質が神経堤細胞遊走に及ぼす影響

発生毒性を有する 13 種類の化学物質を、ラット全胚培養において胚毒性を示す濃度又は、文献における発生毒性を起こす血中濃度を参考にして、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。その結果、13-シスレチノイン酸、イブプロフェン、酢酸鉛、サリチル酸およびセレン酸の添加により、神経堤細胞の遊走は濃度依存的に阻害された (図 1)。一方、アセトアミノフェン、カフェイン、エタノール、インジウム、フェニトイン、亜セレン酸、トリブチルスズおよびバルプロ酸の添加では、神経堤細胞の遊走に影響は認められなかった (図 2)。

### 2. リン酸化アクチン結合タンパクに及ぼす化学物質の影響

神経堤細胞の遊走を阻害した化学物質について、ウェスタンブロットティング法により、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。その結果、セレン酸においてタンパク量の減少が認められた (図 3)。一方、13-シスレチノイン酸、イブプロフェン、酢酸鉛およびサリチル酸では、リン酸化アクチン結合タンパクのタンパク量に変化は認められなかった (図 4)。

### (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

今年度はラット神経堤細胞遊走実験法を用いた化学物質の健康影響評価法について検討した。前年度までに確立した実験法を用

いて、発生毒性を有する種々の化学物質の神経堤細胞遊走に及ぼす影響を調べた結果、半数近い種類の発生毒性物質に頭部神経堤細胞の遊走阻害作用が認められた。したがって、本実験法は発生毒性物質の健康影響評価法として有用であると考えられる。

本実験法により神経堤細胞の遊走阻害作用が認められた発生毒性物質には、Rho シグナルパスウェイのリン酸化アクチン結合タンパクのタンパク量に変化が認められたものと認められなかったものがあった。これらの発生毒性物質間では遊走阻害作用のメカニズムが異なると推定される。すなわち、リン酸化アクチン結合タンパクのタンパク量を増加させたセレン酸と、タンパク量に変化が認められなかった 13-シスレチノイン酸、イブプロフェン、酢酸鉛およびサリチル酸とでは遊走阻害作用のメカニズムが異なると推定される。Rho シグナルパスウェイ以外のシグナルパスウェイの関与など、ヒトへの外挿性を高めるためには、これらの発生毒性物質の遊走阻害作用メカニズムについて検討する必要がある。

エタノールについては、前年度とは異なる結果が得られた。すなわち、前年度では、ラット全胚培養法で胚毒性が認められる濃度において神経堤細胞の遊走阻害が認められたが、今年度はヒトで報告されている血中濃度では遊走阻害が認められなかった。このことから、試験に用いる被験物質の濃度設定について根拠とするデータの動物種について検討する必要があると考えられる。

## E. 結論

ラット神経堤細胞遊走実験法により発生毒性を有する種々の化学物質の半数近い種類の発生毒性物質に頭部神経堤細胞の遊走阻害作用が認められたことから、本実験法は発生毒性物質の健康影響評価法として有用であると考えられる。神経堤細胞における Rho シグナルパスウェイのリン酸化アクチン結合タンパクに及ぼす影響の差から、13-シスレチノイン酸、イブプロフェン、酢酸鉛およびサリチル酸と、セレン酸とでは遊走阻害作用のメカニズムが異なると推定される。これらの結果から、本実験法は、発生毒性メカニズムに基づいた化学物質の健康影響評価法として有用であると考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし。

### 2. 学会発表

- [1] 宇佐見 誠, 満長 克祥, 入江 智彦, 宮島 敦子, 関野 祐子, 培養ラット胚におけるエタノールによる発生毒性のプロテオミクス解析. 第 52 回日本先天異常学会学術集会, 東京, 2012.

## 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。

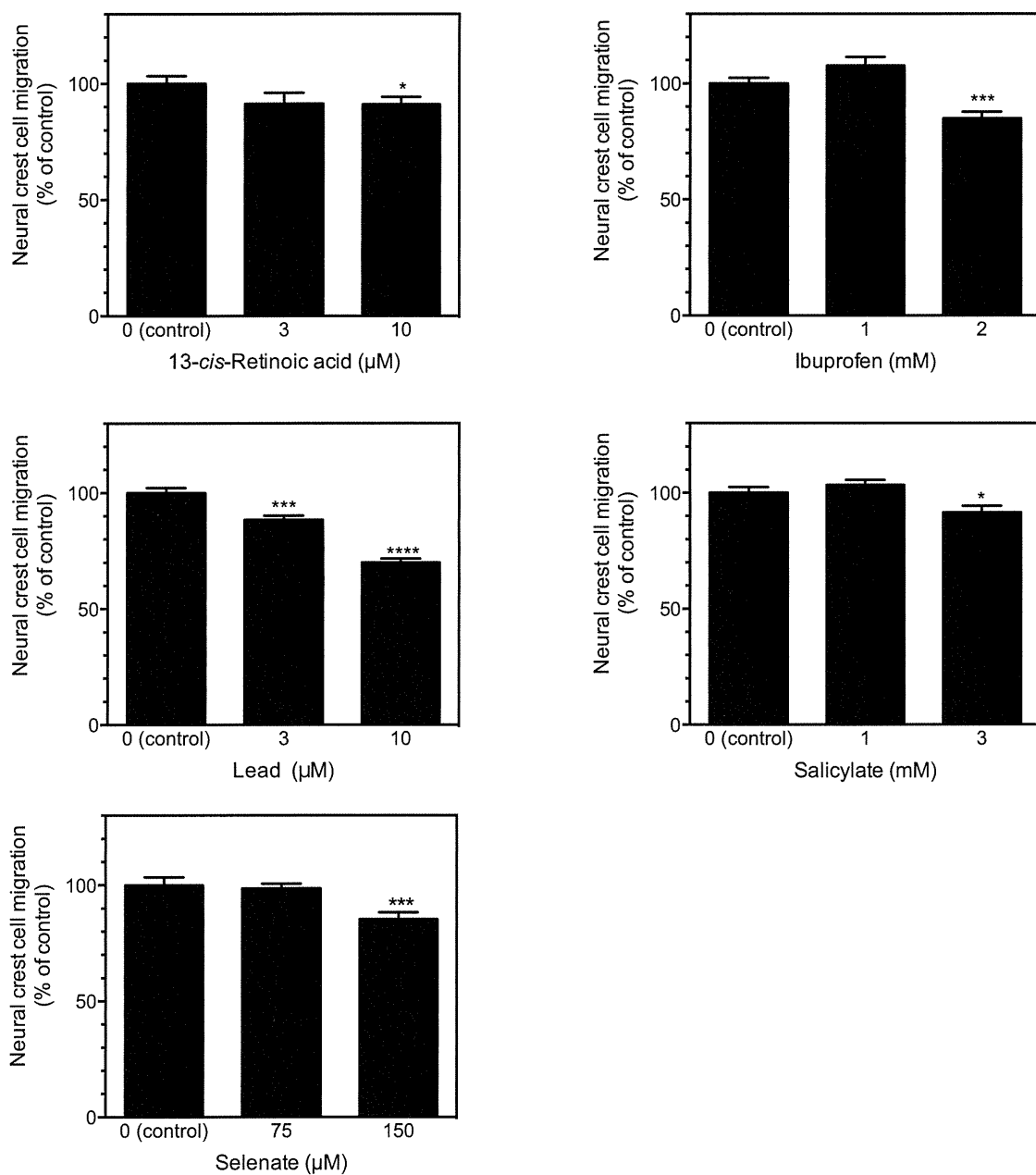


図1. ラット頭部神経堤細胞の遊走を阻害した発生毒性を有する化学物質  
 平均値と標準誤差を示す。アスタリスクは、対照群と比較して統計学的に有意差があること  
 を示す (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ )。

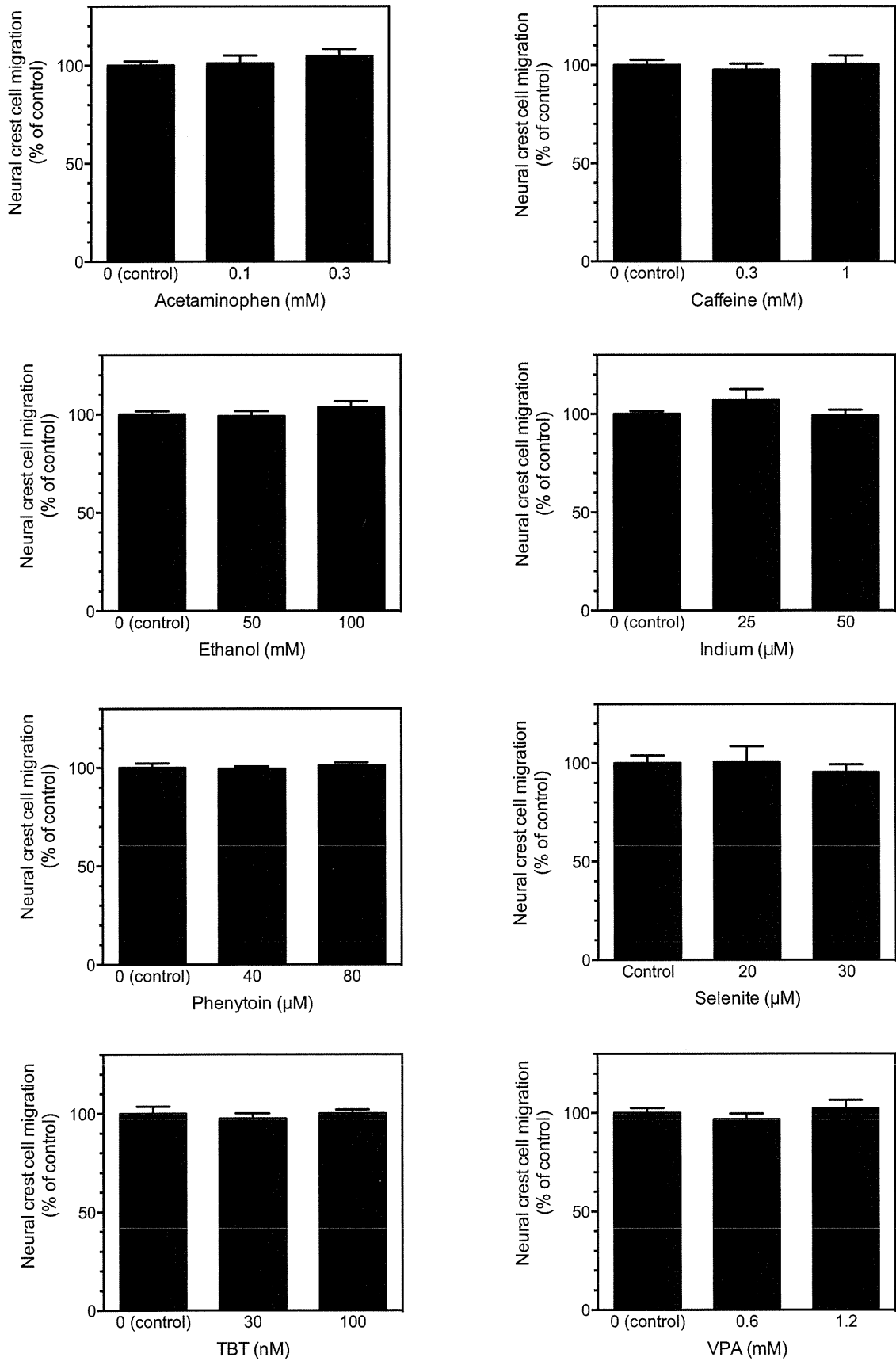


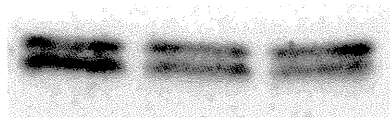
図2. ラット頭部神経堤細胞の遊走を阻害した発生毒性を有する化学物質  
 平均値と標準誤差を示す。



図3. セレン酸が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

13-*cis*-Retinoic acid( $\mu$ M)

0 (control) 3 10



Phosphorylated  
actin-binding protein

Ibuprofen (mM)

0 (control) 1 2



Phosphorylated  
actin-binding protein

Lead ( $\mu$ M)

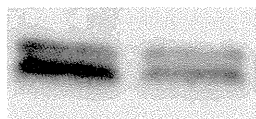
0 (control) 10 20



Phosphorylated  
actin-binding protein

Salicylate (mM)

0 (control) 3



Phosphorylated  
actin-binding protein

図3. 13-シスレチノイン酸、イブプロフェン、酢酸鉛およびサリチル酸が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ブロット解析

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

発達成長期ニューロン・グリア新生評価法

研究分担者 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長

研究要旨

本研究は、脳神経系形成の基礎過程であるニューロン・グリア新生に化学物質が及ぼす影響について評価するための新たな評価手法を確立することを目的とする。今年度は生後初期脳のオリゴデンドロサイト新生評価法を用いて、ヒトへの外挿を目指すため、メカニズムに基づくマーカー分子の探索を行った。また、本実験系を用いて、鉛、およびサリチル酸の影響評価を行い、両化学物質が生後初期オリゴデンドロサイトの分化、遊走を阻害することを明らかとした。

A. 研究目的

本研究は、脳神経系形成の基礎過程であるニューロン・グリア新生に化学物質が及ぼす影響について評価するための新たな評価手法を確立することを目的とする。ラット脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) では新生～一週間ほどの間、神経幹細胞からニューロン新生およびグリア新生の両者が活発に起こっている。この時期の新生ニューロンは 吻側移動経路 (rostral migratory stream: RMS) を通り嗅球の介在性神経に、新生グリアは放射状に遊走しオリゴデンドロサイト及びアストロサイトに分化することが知られている (J Comp Neurol 519(4) 690-713, 2011; J Neurosci 29(36) 11172-81, 2009)。特に、オリゴデンドロサイトはこの時期以降、ほとんど新生が起らないため、この時期の異常が重篤な悪影響を及ぼす可能性が高い。昨年度までに、前脳矢状面切片培養系の SVZ 神経幹細胞および前駆細胞を緑色蛍光蛋白質 (enhanced Green Fluorescent Protein: eGFP) により標識し、オリゴデンドロサイトの分化・遊走に対する化学物質の作用を検討可能な *in vitro* 実験系を確立した。また、cytocrine arabinoside (AraC)、プロラクチン (prolactin: Prl) を用いて、この *in vitro* 実験系がオリゴデンドロサイトの分化・遊走に対する正負両方向の影響を検出できることを確認した。また、これらの細胞現象への影響を反映するバイオマーカーとして fibroblast growth factor receptor (FGFR)1 (J Neurosci 31(42) 14899-14909, 2011) および platelet derived growth factor receptor (PDGFR) (Nat Biotechnol 29(10)

34-942, 2011) が有力な候補であることを見いだした。本年度はこれらのバイオマーカー候補の妥当性を AraC を用いて検討するとともに、実際の化学物質として鉛およびサリチル酸の影響評価を試行する。

B. 研究方法

1. 前脳矢状面切片培養系

生後 2 日齢ラットの前脳矢状面切片標本 (150  $\mu\text{m}$ ) を作成しトランスメンブレン (Millipore) 上に静置し、eGFP tag を組み込んだ改変型レトロウイルス (NIT-eGFP; J Neurosci 19 (19) 8487-97, 1999) を SVZ に 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。その後、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。必要に応じて AraC (1, 10  $\mu\text{M}$ ) 共存下で培養した。

2. 前脳矢状面培養切片の免疫組織化学的検討

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) または抗 FGFR1 抗体 (Santa Cruz, V-17, SC31178) または抗 PDGF $\alpha$  抗体 (Santa Cruz, S16, SC-31169) 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 2 日間処理し (4°C)、PBS で洗浄した。eGFP (+) 細胞中の eGFP (+) O1 (+) 細胞の比率 (%) を算出した。

3. eGFP 標識細胞を含む前脳矢状面切片培



## 養系を用いた薬理的検討

SVZ の神経幹細胞および神経系前駆細胞が eGFP で標識された前脳矢状面切片を酢酸鉛 (3, 10  $\mu\text{M}$ ) 存在下で 3 日間培養し、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖と遊走に対する作用を検討した。同様に、サリチル酸ナトリウム (1, 3  $\mu\text{M}$ ) の作用についても検討した。

(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。

## C. 研究結果

### 1. ヒトへの外挿に資するマーカー分子の探索

AraC によるオリゴデンドロサイト前駆細胞増殖に対する負の作用は濃度依存的であったが、遊走に対する負の作用は 1 mM において頭打ちとなった。AraC による FGFR1(+) $\text{O1}(+)$  細胞数の減少曲線は濃度依存的であった。一方、 $\text{O1}(+)\text{PDGF}\alpha(+)$  細胞の減少曲線は 1 mM で頭打ちとなった。

### 2. オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖・遊走に対する鉛およびサリチル酸の影響

酢酸鉛 (3, 10 mM) により eGFP(+) 細胞数は濃度依存的に減少した (図 1, A)。また、eGFP(+)O1(+)細胞数も濃度に依存して減少した。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合は 3, 10 mM とともに同程度減少していた (図 1, B)。さらに、NIT-eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走も濃度依存的に阻害された (図 2)。酢酸鉛 10 mM においてその差は有意であった。コントロール群および酢酸鉛 10 mM 適用群の典型的な蛍光免疫組織化学染色像を図 3 に示す。

サリチル酸 (1, 3  $\mu\text{M}$ ) により eGFP(+) 細胞数は濃度依存的に減少した (図 4A)。また、eGFP(+)O1(+) 細胞数も濃度に依存して減少し、3  $\mu\text{M}$  ではほぼ 0 となった。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合は 3  $\mu\text{M}$  の濃度で有意に減少した (図 4B)。NIT-eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走は濃度依存的

に阻害される傾向が見受けられた (図 5)。コントロール群およびサリチル酸 3  $\mu\text{M}$  適用群の典型的な蛍光免疫組織化学染色像を図 6 に示す。

## D. 考察

### 1. ヒトへの外挿に資するマーカー分子の探索

FGFR1(+) $\text{O1}(+)$  細胞数の減少曲線は新生オリゴデンドロサイト前駆細胞数の減少曲線に類似していたことから、FGFR1 はオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を反映するマーカーとして有望であることが示唆される。一方、 $\text{O1}(+)\text{PDGF}\alpha(+)$  細胞の減少曲線はオリゴデンドロサイト前駆細胞遊走の減少曲線と類似していたことから、PDGF $\alpha$  はオリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走を反映するマーカーとして有望であることが示唆される。

### 2. オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖・遊走に対する酢酸鉛の影響

酢酸鉛は濃度依存的にオリゴデンドロサイト前駆細胞数を減少させたが、eGFP(+) 細胞におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞数の割合は 3, 10 mM で変化がなかったことから、酢酸鉛はオリゴデンドロサイト以外のグリア、神経の前駆細胞の増殖に対しても負の作用を持つことが示唆される。オリゴデンドロサイト前駆細胞の初代培養系で鉛によってオリゴデンドロサイトマーカーの発現が抑制されることが示されているが (Deng et al., Toxicol Appl Pharmacol. 2001 174(3):235-44)、我々の実験系からはむしろ、細胞増殖全般に対する負の作用である可能性が高いことが示唆される。オリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走に対しても負の作用を持つことが示された。オリゴデンドロサイトによって形成されるミエリンに鉛が蓄積することが報告されている (Dabrowska-Bouta et al., Food Chem Toxicol. 2008 46(3):961-6)。このとき、ミエリンに蓄積した鉛により、細胞膜の流動性に変化が現れることも観察されている (Dabrowska-Bouta et al., Exp Toxicol Pathol. 2000 52(3):257-63)。今回の増殖、遊走阻害メカニズムに関連する可能性も考えられる。

サリチル酸の中樞神経系における毒性情報はほとんどなく、今回の結果は新知見として検証の必要がある。サリチル酸はリンパ系

細胞において NFAT を介したサイトカイン産生を阻害することが知られており (Aceves et al., *J Immunol* 2004 173(9): 5721-9)、今回の作用との関連に興味を持たれる。急性毒性症例報告として、大脳皮質白質のミエリン脱落、グリア細胞における caspase-3 発現が報告されており (Rauschka et al., *Neurotoxicology* 2007 28(1):33-7)、オリゴデンドロサイトが毒性標的となる可能性も考えられる。

現在、作用の明らかだった酢酸鉛、サリチル酸の FGFR1, PDGF $\alpha$  発現への影響について検討しており、増殖、遊走のマーカー分子としての有用性について検証中である。

## E. 結論

生後初期脳のオリゴデンドロサイト新生評価法を用いて、ヒトへの外挿に資するメカニズムに基づくマーカー分子として FGFR1, PDGF $\alpha$  が有望であることを見いだした。鉛、およびサリチル酸の影響評価を行い、両化学物質が生後初期オリゴデンドロサイトの分化、遊走を阻害することを明らかとした。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] K. Takahashi, R. Ishii-Nozawa, K. Takeuchi, K. Nakazawa, Y. Sekino, K. Sato, Niflumic acid activates additional currents of the human glial L-glutamate transporter EAAT1 in a substrate-dependent manner. (Submitted) (C.A.)
- [2] Y. Shigemoto-Mogami, J.E. Goldman, Y. Sekino, K. Sato, Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. (submitted) (C.A.)
- [3] A. Oguchi-Katayama, A. Monma, Y. Sekino, Y. T. Moriguchi, K. Sato, Comparative gene expression analysis of the amygdalae of juvenile rats exposed to valproic acid at prenatal and postnatal stages. *J Toxicol Sci* (in press) (C.A.)
- [4] M. Kinoshita, K. Nasu-Tada, K. Fujishita, K. Sato, S. Koizumi, Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of Tonic P2Y14-receptor-mediated signal(s). *Cell Mol Neurobiol* 33 (1) (2013) 47-58.
- [5] J. Takaki, K. Fujimori, M. Miura, T. Suzuki, Y. Sekino, K. Sato, L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression

in neuroinflammation: the ‘collusion’ hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 9, (2012) (C.A.)

- [6] 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* 32 (6) (2012) 953-6.
- [7] 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* 8 (1) (2013) e55166.
- [8] K. Sato, J. Kuriwaki, K. Takahashi, Y. Saito, J. Oka, Y. Otani, Y. Sha, K. Nakazawa, Y. Sekino, Ohwada, T. Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without Interaction with estrogen receptors. *ACS Chem Neurosci* 3 (2), 105-113 (2012) (C.A.)
- [9] 最上 (重本) 由香里、佐藤 薫 (2012) ミクログリアの最近の話題 ～次々と明らかになるミクログリアの生理的新機能～*日薬理誌* 140: 216～220.

### 2. 学会発表

#### 国内学会

- [1] 佐藤 薫：ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた毒性評価系の可能性, 日本薬学会第 133 回年会シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築 —現状と課題そして期待—」(オーガナイザー, シンポジスト), 日本薬学会第 133 回年会 (2013.3, 横浜)
- [2] 最上 (重本) 由香里, 干川和枝, 三浦麻利衣, 関野祐子, 佐藤 薫：神経細胞とグリア細胞 (アストロサイト・ミクログリア) が共存する新規 In Vitro 血液脳関門モデルの開発, 日本薬学会第 133 回年会 (2013.3, 横浜)
- [3] 高橋華奈子, 最上 (重本) 由香里, 大津香苗, 岡田洋平, 岡野栄之, 関野祐子, 佐藤 薫：ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の遺伝子発現プロファイリングの株間比較, 日本薬学会第 133 回年会 (2013.3, 横浜)

- [4] 片山敦子, 門馬彰彦, 秋友孝文, 廣末愛, 星裕姫乃, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤 薫 : バルプロ酸幼弱期暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー遺伝子群の探索, 日本薬学会第 133 回年会 (2013.3, 横浜)
- [5] 佐藤 薫, 片山敦子, 門馬彰彦, 守口 徹, 関野祐子 : バルプロ酸を胎生期あるいは生後適用したラット扁桃体の遺伝子発現マイクロアレイ解析, 第 86 回 日本薬理学会年会 (2013.3, 福岡)
- [6] 最上由香里, 大野泰雄, ジェームズ E ゴールドマン, 関野祐子, 佐藤 薫 : ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生, オリゴデンドロサイト新生を促進する, 第 86 回 日本薬理学会年会 (2013.3, 福岡)
- [7] 藤森康希, 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木武之 : パロキセチンは P2X4 受容体活性化の抑制によりミクログリアの活性化を抑制する, 第 86 回 日本薬理学会年会 (2013.3, 福岡)
- [8] 佐藤 薫 : ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた毒性評価実現にむけた取り組み, スーパー特区フォーラム in 大阪 (講演) (2013, 1, 大阪)
- [9] 三浦麻利衣, 佐藤 薫, 鈴木岳之 : グリア型グルタミン酸トランスポーター機能に対し極長鎖脂肪酸が与える影響の検討, 第 6 回先端分子薬理研究会 (2012. 12, 東京)
- [10] 大和田智彦, 佐藤 薫, 栗脇淳一, 高橋華奈子, 齊藤善彦, 岡 淳一郎, 中澤憲一, 関野祐子, 沙宇, 尾谷優子 : タモキシフェンを基盤としたグルタミン酸トランスポーター阻害剤の開発, 第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2012. 11, 東京)
- [11] Fujimori, K., Takaki, J., Sato, K., Suzuki, T.: Paroxetine prevents the functional impairment of L-glutamate transporters in inflammation by microglial glutamate release, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9, 名古屋市)
- [12] Shigemoto-Mogami, Y., Fujimori, K., Igarashi, Y., Hirose, A., Sekino Y., Sato, K.: Effects of carbon nanotubes on : proliferation of neural stem cells and microglial viability, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9, 名古屋市)
- [13] Takahashi, K., Tomohiko I., Sekino, Y., Sato, K.: Development of the epitope-tagged EAAT2 in *Xenopus* oocyte expression system, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9, 名古屋市)
- [14] Oguchi-Katayama, A., Monma, A., Otomo, Y., Imai, M., Akitomo, T., Takahashi, Y., Kato, F., Sekino, Y., Sato, K.: Search for genetic markers for risks in emotion and social interaction caused by exposure to chemical compounds in embryonic or neonatal periods, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9, 名古屋市)
- [15] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y.: The Clonal difference in response to L-glutamate and ATP of human induced pluripotent stem cell-derived neurons, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9, 名古屋市)
- [16] 最上 (重本) 由香里, 関野祐子, 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 14 回応用薬理研究会 (2012. 9, 甲府市)
- [17] 片山 敦子, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤 薫 : 幼弱期化学物質暴露による情緒社会性への影響の予測, 第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9, 甲府市)
- [18] 高橋華奈子, 入江智彦, 関野祐子, 佐藤 薫 : グルタミン酸トランスポーター EAAT2 機能調節機構の解析ツールとしてのエピトープ標識 EAAT2 の開発, 第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9, 甲府市)
- [19] 佐藤 薫, 栗脇淳一, 高橋華奈子, 齊藤善彦, 岡 淳一郎, 尾谷祐子, 謝宇, 中澤憲一, 関野祐子, 大和田智彦 : タモキシフェンを基盤とした新規グルタミン酸トランスポーター阻害剤の開発, 第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9, 甲府市)
- [20] 里吉 寛, 眞嶋 悠幾, 井手 聡一郎, 佐藤 薫, 南 雅文 : 胎生～新生期における鉛暴露が成熟後のラットの情動に及ぼす影響, 日本薬学北海道支部第 138 回例会 (2012. 6, 札幌市)
- [21] 佐藤 薫 : iPS 細胞由来ニューロンの薬理的解析 平成 24 年度厚科研 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業公開シンポジウム in 前

橋「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」(2012.5, 前橋)

国際学会

- [22] Sato, K., Fujimori, K., Takaki, J., Suzuki, T., Sekino, Y.: Paroxetine Prevents the Functional Impairment of L-Glutamate Transporters in Inflammation by Modulating Microglial Glutamate Release. SfN 2012 (2012. 10) (New Orleans, USA)
- [23] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, Y., Sekino, Y.: The comparative study of the mRNA-expression of P2 receptors and glutamate receptors between neurons differentiated from 201B7 and 253G1 human induced pluripotent stem cell lines. the 11th biennial meeting of APSN and the 55th annual meeting of JSN (2012. 9, Kobe, Japan)
- [24] Sekino, Y., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, Y., Sato, K.: The clonal difference in response to ATP and L-Glutamate of human induced pluripotent stem cell-derived neurons, the 11th biennial meeting of APSN and the 55th annual meeting of JSN (2012. 9, Kobe, Japan)
- [25] Sato, K., Kuriwaki, J., Takahashi, K., Saito, Y., Oka, J., Otani, Y., Sha, Y., Nakazawa K., Sekino, Y., Ohwada, T.: Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without interaction with estrogen receptors, FENS meeting 2012 (2012.7, Barcelona, Spain)
- [26] Takahashi, Y., Katayama, A., Nagase, M., Moriguchi, T., Sato, K., Kato, F.: Electrophysiological and transcriptomic identification of the remote influence in the central amygdala following single postnatal administration of valproate in rats, FENS meeting 2012 (2012.7, Barcelona, Spain)
- [27] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y.: The clonal difference in response to ATP of human induced pluripotent stem cell-derived neurons, ISSCR2012 (2012.6, Yokohama, Japan)
- [28] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y.: The clonal difference in response to ATP of human induced pluripotent stem cell-derived

neurons, Purine2012 (2012.5-6, Fukuoka, Japan).

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。