

201329004A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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

(H23-化学-一般-004)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 種村 健太郎

平成 26(2014)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

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

(H23-化学-一般-004)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 種村 健太郎

平成 26(2014)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

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

(H23-化学一般-004)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 種村 健太郎

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I.	総括研究報告書	
	研究の総括	
	種村 健太郎 6
II.	分担研究報告書	
1.	発生-発達期ビスフェノールA 暴露によるエピジェネティック影響解析	
	五十嵐 勝秀 20
2.	発生-発達期におけるビスフェノールA の代謝動態と代謝能力に関する研究	
	岩野 英知 55
3.	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 61
4.	発生-発達期ビスフェノールA 暴露による遅発行動影響と中枢解析	
	種村 健太郎 104
5.	神経活動イメージングによる中枢作動性物質の神経回路毒性解析	
	富永 貴志 129
6.	発生-発達期ビスフェノールA 暴露による脳構築異常解析	
	中島 欽一 145
7.	発生-発達期ビスフェノールA 暴露の行動発達に対する影響解析	
	山田 一之 150
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 163
IV.	研究成果の刊行物・別刷 166

別添3

I. 総括研究報告書

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（H23-化学一般-004）

研究代表者 種村健太郎・東北大学大学院農学研究科 准教授

【研究要旨】 先行研究「化学物質の情動・認知行動に対する影響の毒性学的評価法に関する研究-特に遅発性影響の評価系のメカニズム解明による確立-（H20-化学一般-009）」において、胎生期及び幼若期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、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することを明らかにし、加えて対応する神経科学的物証、及びその分子メカニズムの一端を捉えた。この神経系の発生-発達期における神経伝達物質受容体を介した神経シグナルかく乱について特筆されるのは、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事である。そこで、本研究では、上記の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、標準プロトコールの確立、及び客観的評価指標の提案を目指し、特徴的な異常行動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、情動認知行動及び対応する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）の異常所見をスコア化することにより、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。

平成 25 年度は、「情動認知行動スコア」及び「神経科学的物証スコア」作出のために、主として、ER ノックアウトマウスを用いた解析、周産期 BPA および BPAF 暴露による遅発中枢影響解析を行った。ER β KO マウスの行動解析から、記憶異常が認められ、「行動スコア」作出における基準値としての意義が確認された。「物証スコア」のための検討として、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、ER α KO マウス同様に、概日リズムが乱れる可能性が示唆された。周産期 BPAF 暴露マウスの生後発達過程における解析から、その結果、不安関連行動の逸脱を伴う学習記憶異常が生じていることが示唆された。また網羅的遺伝子発現解析から、GABA 受容体シグナル影響が推測された。

より測定精度が高い次世代シーケンサーを用いた検討により、結果が再現されると共に、タイリングアレイでは検出出来なかった変化も捉えられた。変化が認められたゲノム領域近傍に存在する遺伝子リストを IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 解析した結果、Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons, Axonal Guidance Signaling, CREB Signaling in Neurons など神経機能に関連する pathway が抽出された。これらの結果は BPA による DNA メチル化変化が成長後の行動変化に関与する可能性が高まった。さらに網羅的機能探索のための新規共焦点顕微鏡の開発、新規パターン刺激イメージング顕微鏡の開発、膜電位感受性蛍光タンパクを用いた解析、単離脳での匂い自然刺激解析など新規のより網羅的で非侵襲的な解析手法の開発を開始した。

研究代表者および研究分担者（五十音順）

五十嵐 勝秀

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・主任研究官

岩野 英知

酪農学園大学・獣医学部獣医生化学ユニット・
准教授

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

種村 健太郎

東北大学・大学院農学研究科・
動物生殖科学分野・
准教授

富永 貴志

徳島文理大学香川薬学部・病態生理学講座・
准教授

中島 欽一

奈良先端科学技術大学院大学・
バイオサイエンス研究科・
分子神経分化制御学講座・教授

山田 一之

理化学研究所・脳科学総合研究センター・
行動神経生理学研究チーム・研究員

A. 研究目的

先行研究「化学物質の情動・認知行動に対する影響の毒性学的評価法に関する研究-特に遅発性影響の評価系のメカニズム解明による確立-(H20-化学一般-009)」において、胎生期及び幼若期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の成熟マウスへの投与による神経毒性試験法（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することを明らかにし、加えて対応する神経科学的物証、及びその分子メカニズムの一端を捉えた。この神経系の発生-発達期における神経伝達物質受容体を介した神経シグナルかく乱について特筆されるのは、直接的な細胞障害を惹起しないレベルの神経作動性化学物質暴露が、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事である。

そこで本研究では、上記の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。そのため、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、情動認知行動及びこれに対応する神経科学的物証項目（微細形態、タンパク発現・遺伝子発現、神経回路機能等）の異常所見をスコア化し、神経作動性化学物質による異常を基準点との「スコア差」として客観的に記述し評価する方法の提案を目的とする。

具体的には、複数のエストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスを基準点とし、NACs としては、ER 結合性化学物質として理解されているジエチルスチルベストロール (DES)、ビスフェノール A (BPA)、及びビスフェノール AF (BPAF) を取り上げる。

B. 研究方法

本研究では、特に胎児や子どもへの化学物質暴露による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。その為に、後述の遺伝子改変マウス、及び被験物質を用い、①. 情動認知行動解析、②. 神経科学的物証の収集、③. 情動認知「行動スコア」と神経科学的「物証スコア」の作成、及び④. 情動認知行動異常発現メカニズム解明を行う。

①. 情動認知行動解析 (主担当者: 種村、山田)

エストロゲン受容体 (ER) ノックアウトマウス、及び被験物質として ER 結合化学物質と理解されているジエチルスチルベストロール (DES)、ビスフェノール A (BPA)、ビスフェノール AF (BPAF) を神経系の発生-発達期に投与した野生型マウスについて、成熟期 (生後 12-14 週齢) に、機能観察総合評価 (FOB) に加えて、情動認知行動試験バッテリー (オープンフィールド試験、明暗往来試験、Y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、他) を、標準化を念頭に置いた静寂・低照度環境下で高精度に実施し、遅発性の情動認知行動異常の内容と程度を明らかにする。尚、被験物質の投与は、すべて経口投与とし、その量の決定に際しては、直接的な細胞障害を惹起しないレベル、及び急性症状が顕著に表れない用量を基本に、ヒトの一日摂取許容量 (あるいはそれに相当する量) を十分に想定した用量設定を行う。

②. 神経科学的物証の収集 (主担当者: 種村、岩野、富永)

情動認知行動解析後のマウス脳について、病理形態解析に加え、神経細胞突起やシナプス動態の免疫染色法による解析、タンパク発現解析、網羅的遺伝子発現解析、膜電位感受

性色素を用いた光計測系による神経回路機能解析を行い、情動認知行動解析結果に対応する神経科学的物証を収集する。

③. 情動認知「行動スコア」と神経科学的「物証スコア」の作成 (主担当者: 種村、五十嵐)

情動認知行動、及び対応する神経科学的物証についての複数の項目ごとに異常の程度をスコア化することで、「行動スコア」と「物証スコア」を作成し、異常度を多面的に評価する。これによって被験物質による異常を客観的に記述し評価する方法を考案する。

④. 情動認知行動異常発現メカニズム解明 (主担当者: 五十嵐、北嶋、中島)

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。また、培養系を用いた神経細胞の増殖・分化や、神経突起伸長への影響解析による異常発現メカニズムの抽出を行う。これらのメカニズム解明研究は、ヒトへの外挿に向けた科学的根拠と位置づけられる。

平成 25 年度は、主に ER 遺伝子改変マウスを用いた解析結果に基づく「行動スコア」及び「物証スコア」の作出、周産期 BPA 暴露による遅発中枢影響解析 (情動認知行動解析、神経科学的物証の収集、異常メカニズム解明) を行った。

(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、それぞれの所属機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

平成25年度(研究開始3年目)は、「情動認知行動スコア」及び「神経科学的物証スコア」作出のために、主として、ER遺伝子改変マウスを用いた解析、周産期BPAおよびBPAF暴露による遅発中枢影響解析を行った。具体的な進捗状況は以下の通りである。

1) エストロジェン受容体(ER)関連遺伝子改変マウスとして、雄ER α 改変マウス、及び雄ER β 改変マウスを用いた。いずれも国立医薬品食品衛生研究所にて独自に作出されたマウスであり、受容体シグナル異常が想定される。エストロジェン受容体(ER)関連遺伝子改変マウスの行動解析の結果、雄ER α 改変マウスに条件付け学習記憶試験における学習記憶異常が認められた。また、雄ER β 改変マウスに明暗往來試験における明所滞在時間及び明暗往來数の減少と暗所滞在時間の増加、高架式十字迷路試験における開放部滞在時間の減少とともに、条件付け学習記憶試験における学習記憶異常、プレパルス驚愕反応抑制試験における抑制率の低下が認められた。

2) 周産期BPA暴露マウスの生後発達過程及び成熟後における中枢影響解析を行い、生後発達過程における解析から、衝動性と考えられる行動量の低下、環境刺激に対する反応性の鈍化経過が認められた。また発達過程における大脳皮質、特に脳梁におけるアストロサイト数の減少が認められた。成熟後マウスには不安関連行動の逸脱と記憶異常が認められた。また、BPA暴露による行動異常(不安関連行動の逸脱)は、妊娠後期の母動物への低葉酸給餌によって、さらに異常度が増すことが示唆された。周産期BPA暴露マウスの成

熟後の海馬の網羅的遺伝子発現解析から、神経細胞軸索機能影響が疑われる遺伝子カスケードへの影響が見いだされている。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いた形態解析より、神経突起形成・剪定不全による神経回路影響が推測された。また、次世代シーケンサーを用いたエピジェネティック影響解析から、Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons, Axonal Guidance Signaling, CREB Signaling in Neuronsなど神経機能に関連するpathwayへの影響が示唆された。

3) 発生-発達期におけるビスフェノールAF暴露による遅発中枢影響を明らかにする目的で、マウスに交配から離乳期まで飲水投与(妊娠期は経胎盤暴露、授乳期は経母乳暴露)し、成熟後に行動解析、遺伝子発現解析を行った。その結果、不安関連行動の逸脱を伴う学習記憶異常が生じていることが示唆された。また網羅的遺伝子発現解析から、GABA受容体シグナル影響が推測された。

4) 「物証スコア」作出のために、胎生期化学物質暴露を受けたマウスの海馬神経応答解析のため、膜電位感受性色素を用いた光計測による海馬機能評価系による検討を行った結果、ビスフェノールAは急性効果が見られないことからバルプロ酸の場合と同様に発達後の行動異常を手がかりに機構解析をする必要が考えられた。また、網羅的機能探索のための新規共焦点顕微鏡の開発、新規パターン刺激イメージング顕微鏡の開発、膜電位感受性蛍光タンパクを用いた解析、単離脳での匂い自然刺激解析など新規のより網羅的で非侵襲的な解析手法の開発を開始した。

D. 考察

本研究の結果から、周産期 BPA 類暴露による遅発神経影響として、学習記憶異常が生じていることが示唆された。また、分子レベル解析結果を含めて、こうした行動異常に対応すると考えられる神経科学的物証が得られた。今後、毒性学的な位置づけを行うとともに、異常発現に至る経時的なメカニズムについて検討を行う必要があると考えられる。今後の本研究の遂行により従来法では検出が困難であった遅発性の情動認知行動異常の高精度のリスク評価が、普遍性を持って実施可能となり、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。エストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスとして用いた雄 ER α 改変マウス、及び雄 ER β 改変マウスの行動様式は、それぞれ「記憶異常モデル」、「統合失調症モデル」マウスの行動様式を包括するものと考えられ、神経作動性化学物質による遅発性の行動異常を基準点との「スコア差」として客観的に記述し評価する方法として、遺伝子改変マウスの利用が有効であることが示された。今後、遺伝子改変マウスのみならず、行動異常誘発化学物質の利用によって、基準点を増やすことによって、「スコア」としての頑強性の向上が望まれる。

本研究が対象とする情動認知行動異常は、自閉症、統合失調症、大鬱症、認知症等の精神神経疾患の表現型モデルを包括する可能性が高い。ヒトにおいて、こうした精神神経疾患の一部に関して、その発症リスク上昇に化学物質暴露の関与が疑われていることから、本研究遂行の延長上には、分子メカニズム上の種差の解明、及び、普遍的基準点となるモデルマウスの組み合わせの充実 (エストロゲン受容体以外のシグナル伝達系の網羅) が必然的に見込まれ、それらの結果の集積により、ヒトへの外挿精度の向上とともに、上記の精神神経疾患の発症リスク軽減による将来的な医療費削減への貢献についても期待できる。

E. 結論

周産期 BPA 類暴露による遅発神経影響の実体として行動異常とそれに伴う神経科学的物証を捉えることに成功した。今後、その異常度を検討し、遺伝子改変マウスとの比較を行うことによって、毒性学的な位置づけを明瞭化するとともに、異常発現メカニズムの解明が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shirode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, Takeuchi JK, Kanno J, Bonewald LF, Imai Y. Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice. *Bone*. 2013 Dec 10;60C:68-77.

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, Kodama Y. Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci*. 2013;38(4):643-54.

Si Y, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Imai Y. Autoimmune regulator, Aire, is a novel regulator of chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013

Okuno Y, Ohtake F, Igarashi K, Kanno J, Matsumoto T, Takada I, Kato S, Imai Y. Epigenetic Regulation of Adipogenesis by PHF2 Histone Demethylase. *Diabetes*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print]

Fujimoto H, Woo GH, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Hirose M, Nishikawa A, Shibutani M. Increased cellular distribution of vimentin and Ret in the cingulum induced by developmental hypothyroidism in rat offspring maternally exposed to anti-thyroid agents. *Reprod Toxicol*. 2012 Aug;34(1):93-100.

Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J. Development of humanized steroid and xenobiotic receptor mouse by homologous knock-in of the human steroid and xenobiotic receptor ligand binding domain sequence. *J Toxicol Sci*. 2012; 37(2): 373-380.

Matsukura H, Aisaki K, Igarashi K, Matsushima Y, Kanno J, Muramatsu M, Sudo K, Sato N. Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 26;412(2):366-72. Epub

Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Okada M, Imai Y, Ni M, Meyer CA, Igarashi K, Kanno J, Brown M, Kato S. PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B. *Nat Cell Biol*. 13, 669-676(2011).

Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y. Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus. *Biol Reprod*. 84, 734-742(2011)

Iwano H, Ujita W, Nishikawa M, Ishii S, Inoue

H, Yokota H. Effect of dietary eugenol on xenobiotic metabolism and mediation of UDP-glucuronosyltransferase and cytochrome P450 1A1 expression in rat liver. *Int J Food Sci Nutr*. (2013) in press

L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in canine mammary gland tumors. Fukumoto, S., Hanazono, K., Komatsu, T., Iwano, H., Kadosawa, T. and Uchide, T. *J. Vet. Med. Sci*. 75:431-437. (2013.)

L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a new therapeutic target for canine mammary gland tumour. Fukumoto, S., Hanazono, K., Komatsu, T., Ueno, H., Kadosawa, T. Iwano, H. and Uchide, T. *Vet. J*. 198: 164-169. 2013

A new treatment for human malignant melanoma targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a pilot study in a canine model. Fukumoto, S., Hanazono, K., Dah-Renn, FU., Endo, Y., Kadosawa, T., Iwano, H. and Uchide, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 439: 103-108. (2013)

Mycoplasma species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. Higuchi, H., Gondaira, S., Iwano, H., Hirose, K., Nakajima, K., Kawai, K., Hagiwara, K., Tamura, Y., Nagahata, H. *Vet. Rec*. 172:557. (2013)

Effects of vitamin E supplementation on cellular α -tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves. Higuchi H, Ito E, Iwano H, Oikawa S, Nagahata H. *Can J Vet Res*. 77:120-125. (2013)

Relationship between concentration of lingual antimicrobial peptide and somatic cell count in milk of dairy cows. Kawai, K., Akamatsu, H., Obayashi, T., Nagahata, H., Higuchi, H., Iwano, H., Oshida, T., Yoshimura, Y., Isobe, N. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 15:298-301. (2013)

Terashita Y, Yamagata K, Tokoro M, Itoi F, Wakayama S, Li C, Sato E, Tanemura K, Wakayama T. Latrunculin a treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful

- development of cloned embryos. *PLoS One*. 2013 Oct 24;8(10):e78380.
- Lee S, Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Quantitative analysis in LC3-II protein in vitro maturation of porcine oocyte. *Zygote*. 2013 Jun 12:1-7.
- Yazaki T, Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. L-carnitine improves hydrogen peroxide-induced impairment of nuclear maturation in porcine oocytes. *Anim Sci J*. 2013 May;84(5):395-402.
- Hiraga K, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Selection of in vitro-matured porcine oocytes based on localization patterns of lipid droplets to evaluate developmental competence. *J Reprod Dev*. 2013;59(4):405-408. (表紙掲載)
- Kogasaka Y, Hoshino Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sato E. Distribution and association of mTOR with its cofactors, raptor and rictor, in cumulus cells and oocytes during meiotic maturation in mice. *Mol Reprod Dev*. 2013 Apr;80(4):334-348.
- Tominaga T., Kajiwar R., and Tominaga Y. VSD imaging method of ex vivo brain preparation *Journal of Neuroscience and Neuroengineering*, 2013, 2, 211-219 [Selected as a Featured Article]
- Tominaga T & Tominaga Y. A new non-scanning confocal microscopy module for functional voltage-sensitive dye and Ca²⁺ imaging of neuronal circuit activity *Journal of Neurophysiology*, 2013, 110, 553-561 [Also featured as a Key Scientific Articles on Global Medical Discovery(GMD)]
- Yi S.H., He X.B., Rhee Y.H., Park C.H., Takizawa T., Nakashima K. & Lee S.H. Foxa2 acts as a co-activator potentiating expression of the Nurrl-induced DA phenotype via epigenetic regulation. *Development* 141, 761-772 (2014).
- Uesaka M., Nishimura O., Go Y., Nakashima K., Agata K. & Imamura T. Bidirectional promoters are the major source of gene activation-associated non-coding RNAs in mammals. *BMC Genomics* 15, 35 (2014).
- Yuniarti N., Juliandi B., Muhchy C., Noguchi H., Sanosaka T. & Nakashima K. Prenatal exposure to suberoylanilide hydroxamic acid perturbs corticogenesis. *Neurosci Res* 77, 42-49 (2013).
- Urayama S., Semi K., Sanosaka T., Hori Y., Namihira M., Kohyama J., Takizawa T. & Nakashima K. Chromatin accessibility at a STAT3 target site is altered prior to astrocyte differentiation. *Cell Struct Funct* 38, 55-66 (2013).
- K. Nose-Ishibashi, J. Watahiki, K. Yamada, M. Maekawa, A. Watanabe, G. Yamamoto, A. Enomoto, Y. Matsuba, T. Nampo, T. Taguchi, Y. Ichikawa, T. C. Saido, K. Mishima, Y. Yamaguchi, T. Yoshikawa, K. Maki. Soft-diet feeding after weaning affects behavior in mice: potential increase in vulnerability to mental disorders. *Neuroscience*, 263: 2014: 257-268.
- S. Ito, I. Ogiwara, K. Yamada, H. Miyamoto, T. K. Hensch, M. Osawa, K. Yamakawa. Mouse with Nal.1 haploinsufficiency, a model for Dravet syndrome, exhibits lowered sociability and learning impairment. *Neurobiol. Disease*, 49: 2013: 29-40.
- M. Kabayama, K. Sakoori, K. Yamada, V. G. Ornthanalai, M. Ota, N. Norimura, K. Katayama, N. P. Murphy, J. Aruga. Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional responses. *J. Neurosci.* 33: 2013: 12940-12953

Namhira M. & Nakashima K. Mechanisms of astrocytogenesis in the mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* 23, 921-927 (2013)

MuhChyi C., Juliandi B., Matsuda T. & Nakashima K. Epigenetic regulation of neural stem cell fate during corticogenesis. *Int J Dev Neurosci* 31, 424-433 (2013)

学会発表

Tanemura K, Igarashi K, Furukawa Y, Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Sato E, Kanno J Delayed Effects on CNS Induced by Disturbance of Neural Activity during Development - Behavioral Impairment in Male Adult Mice Induced by Postnatal Oral Intake of Acephate- The XIII International Congress of Toxicology 2013. 7 (Korea, Seoul)

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、古川 佑介、大塚 まき、白形 芳樹、相崎 健一、北嶋 聡、佐藤 英明、菅野 純
発生～発達期マウスへの低用量ビスフェノールA 暴露による遅発中枢影響解析
第40回日本毒性学会 2013.6 (千葉)

五十嵐 勝秀、種村 健太郎、古川 佑介、大塚 まき、森山 紀子、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純
脳発達期における GABA シグナルの一過性活性化による遅発中枢神経系影響の解析
第40回日本毒性学会 2013.6 (千葉)

五十嵐 勝秀、富永 貴志、古川 佑介、大塚 まき、森山 紀子、菅野 純、種村 健太郎
化学物質と神経回路再編成 (行動からエピジェネティクスまで)
Neuro2013 (シンポジウム S3-4-2 見て調べる神経回路機能のダイナミクス:再編成と変調) 2013.6 (京都)

五十嵐勝秀、大塚まき、古川佑介、森山紀子、中島欽一、種村健太郎、菅野純
発生-発達期ビスフェノールA 曝露に伴う成長後のマウス脳DNA メチル化変化の網羅的解析 第7回エピジェネティクス研究会 2013.5 (奈良)

五十嵐勝秀 「エピジェネティック毒性」 第13回日本毒性学会生涯教育 講習会における招待講演 2012年7月, 仙台

五十嵐勝秀 「エピゲノム変化か関与する毒作用発現」 環境エヒケノミクス研究会 第7回定例会における招待講演 2012年5月, 東京

Epigenetics と MicroRNA の相互制御
[第38回日本トキシコロジー学会学術年会シンポジウム 毒作用発現における microRNA とエピジェネティクスの役割] 2011年7月

環境ホルモン学会第16回研究発表会 (2013年12月)

小池菜々子、岩野英知、大谷尚子、柳沢梨沙、井上博紀、横田博 胎仔腸におけるビスフェノールA グルクロン酸抱合体の動態
大谷尚子、岩野英知、須田光紫、井上博紀、横田博 妊娠期ビスフェノール A 暴露による次世代個体の行動影響
井上博紀、大谷尚子、柳沢梨沙、小池奈々子、細川佳純、岩野英知 ラット子宮灌流モデルを用いたビスフェノール F グルクロン酸/硫酸抱合体動態の解明

第156回日本獣医学会学術集会 (2013年9月)
藪崎梨沙、岩野英知、大谷尚子、須田光紫、井上博紀、横田博 胎仔腸におけるビスフェノールA グルクロン酸抱合体の動態
大谷尚子、岩野英知、須田光紫、井上博紀、横田博 妊娠期ビスフェノールA 暴露による次世代の行動影響

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度曝露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクス、第40回日本毒性学会学術年会 (2013.6.18.)

Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Katsuhide IGARASHI and Jun KANNO, Application of Percellome Toxicogenomics approach to food safety: A flavor, estragole appears to be a PPAR-alpha agonist, The XIII International Congress of Toxicology 2013 (ICT 2013) (2013.7.3.), Seoul, Korea

TOMINAGA T., TOMINAGA Y., JULIANDI B., IGARASHI K., TANEMURA K., KANNO J., NAKASHIMA K. Attenuation of inhibitory synaptic input of hippocampal neural activity following exposure to valproic acid: A voltage-sensitive dye imaging study,; 244.02/S16 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2013

Tominaga T., Tominaga Y., Kajiwara R. (2013) Slowly inactivating potassium conductance controls transmission at area 35 of perichinal cortex: VSD imaging study (緩徐不活性化カリウムコンダクタンスが嗅周囲野 35 野の情報伝達を制御する) 第 51 回日本生物物理学会年会(京都国際会館)10月28日から30日

五十嵐 勝秀 富永 貴志 古川 佑介 大塚 まき 森山 紀子 菅野 純 種村 健太郎 (2013) Chemical induced reorganization of neural circuit during development - from behavior to epigenetics Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会) シンポジウム S3-4-2 6月 京都国際会館 (口頭発表)

富永 貴志 富永 洋子 五十嵐 勝秀 種村 健太郎 菅野 純 中島 欽一 (2013) Optical assay of abnormal neuronal circuit dynamics: Effect of prenatal exposure to valproic acid. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会) シンポジウム S3-4-2 6月 京都国際会館 (口頭発表)

梶原 利一 高島 一郎 富永 貴志 (2013) Whole-scale voltage imaging of limbic network using isolated brain preparation. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会) シンポジウム S3-4-2 6月 京都国際会館 (口頭発表)

富永 洋子 五十嵐 勝秀 種村 健太郎 菅野 純 中島 欽一 富永 貴志 (2013) Disruption of the excitatory/inhibitory balance of hippocampal neural activity by prenatal valproic acid application: A voltage-sensitive dye imaging study. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会) 6月 京都国際会館

中島 欽一: 抗てんかん薬バルプロ酸による神経幹細胞制御とその作用、第164回耳鼻咽喉科・頭頸部外科学術講演会、九州大学医学部百年講堂、2013年12月7日 (特別講演)

中島 欽一: DNAメチル化による発生段階依存的神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得機構、第36回日本分子生物学会、神戸国際会議場、2013年12月3日~6日(4日) (口頭)

Chai Muh Chyi, 佐野坂 司, Juliandi Berry, 種村 健太郎, 五十嵐勝秀, 中島欽一: Developmental exposure of bisphenol A (BPA) causes brain region-specific abnormalities in mouse brain, 第36回日本分子生物学会、神戸国際会議場、2013年12月3日~6日(4日) (ポスター)

松田泰斗, 片野友貴, 村尾直哉, Juliandi Berry, 河合太郎, 審良静男, 中島欽一: 自然免疫関連分子Toll様受容体を介したてんかん誘導性異常ニューロン新生抑制機構、第36回日本分子生物学会、神戸国際会議場、2013年12月3日~6日(3日) (ポスター)

中島 欽一: Effects of an HDAC inhibitor valproic acid on the development and regeneration in the central nervous system, The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, 九州大学総合研究棟、2013年11月4日~6日 (5日) (シンポジウム)

中島 欽一: DNAメチル化酵素を介した発生段階依存的な神経幹細胞の分化制御機構、大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪大学蛋白質研究所、2013年11月1-2日 (2日) (セミナー)

辻村啓太、江頭良明、深尾陽一朗、藤原正幸、入江

浩一郎、中嶋秀行、伊藤雅之、高森茂雄、中島欽一：
The Rett syndrome-associated protein MeCP2 regulates microRNA processing、2013年度 包括脳ネットワーク夏のワークショップ、名古屋国際会議場、2013年8月29日-9月1日(8月31日)(ポスター)

辻村啓太、江頭良明、深尾陽一朗、藤原正幸、入江浩一郎、中嶋秀行、伊藤雅之、高森茂雄、中島欽一：
Rett 症候群原因因子 MeCP2 による microRNA プロセシングを介した神経機能制御、第5回 日本 RNAi 研究会、グランドプリンスホテル広島、2013年8月29日-31日(30日)(口頭)

入江浩一郎、辻村啓太、中嶋秀行、中島欽一：MeCP2 は miR-199a のプロセシングを介して軸索伸長を制御する、MeCP2 regulates axon outgrowth through processing of miR-199a、第5回日本 RNAi 研究会、広島県、グランドプリンスホテル広島、2013年8月29-31日(30日)(ポスター)

中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一：Rett 症候群原因遺伝子 MeCP2 による神経幹細胞分化制御機構の解明、Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, in neural stem cells、第5回日本 RNAi 研究会、広島県 グランドプリンスホテル広島、2013年8月29-31日(ポスター)

中島欽一：抗てんかん薬バルプロ酸による神経幹細胞制御とその影響、第60回毒素シンポジウム、兵庫 県 榎香荘、2013年7月17-19日(18日)(招待、口頭、特別講演)

Juliandi Berry、種村健太郎、五十嵐勝秀、古川佑介、大塚まき、富永貴志、あべ松昌彦、佐野坂司、辻村啓太、菅野純、中島欽一：Reduced adult neurogenesis and neuronal abnormalities in the hippocampus underlie cognitive deficiency following prenatal administration of the antiepileptic drug valproic acid、Neuro 2013 (第36回日本神経科学大会)、京都国際会館、2013年6月20-23日(22日)(口頭)

富永洋子、五十嵐勝秀、種村健太郎、菅野純、中島欽一、富永貴志：バルプロ酸妊娠投与による海馬神経回路の興奮-抑制バランスの破綻とVSD可視化解析、Disruption of the excitatory/inhibitory balance of hippocampal neural activity by prenatal valproic acid application: A govtage-sensitive dye imaging study、Neuro 2013 (第36回日本神経科学大会)、京都国際会館、2013年6月20-23日(22日)(ポスター)

堅田明子、佐野坂司、武藤哲司、中島欽一：神経幹細胞分化における発生期酸素濃度の影響とその分子機構、Impact of oxygen levels on fate switching of neural stem cells during corticogenesis、Neuro 2013 (第36回日本神経科学大会)、京都国際会館、2013年6月20-23日(22日)(口頭)

富永貴志、富永洋子、五十嵐勝秀、種村健太郎、菅野純、中島欽一：神経回路動作の網羅的定量解析-バルプロ酸による神経回路動作変容の解明、Optical assay of abnormal neural circuit dynamics: Effect of prenatal exposure to valproic acid、Neuro 2013 (第36回日本神経科学大会)、京都国際会館、2013年6月20-23日(22日)(口頭)

中島欽一：抗てんかん薬バルプロ酸の神経系細胞分化及び再生に及ぼす影響、Effects of an antiepileptic valproic acid on the development and regeneration in the central nervous system、Neuro 2013 (第36回日本神経科学大会)、京都国際会館、2013年6月20-23日(22日)(口頭)

中島欽一：神経発達における化学物質誘発エピジェネティック障害とその改善法、第40回日本毒性学会学術年会、幕張メッセ、2013年6月17-19日(17日)(招待、口頭)

中島欽一：脳・神経系の機能を制御するエピジェネティクスとその作用機序、第102回日本病理学会総会、ロイトン札幌、2013年6月6-8日(8日)(招待、口頭)

入江浩一郎、中嶋秀行、辻村啓太、中島欽一：MeCP2標的miRNAによる神経幹細胞の分化制御機構の解明、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30、31日（ポスター、31日）

浜崎伸彦、阿形清和、中島欽一、今村拓也：プロモーターノンコーディングRNAによるマウス初期胚エピゲノム改変、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30、31日（ポスター、31日）

上坂将弘、西村理、中島欽一、阿形清和、今村拓也：プロモーターノンコーディングRNAによるほ乳類エピゲノム形成、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30、31日（ポスター、31日）

辻村啓太、江頭良明、深尾陽一朗、藤原正幸、入江浩一郎、中嶋秀行、高森茂雄、中島欽一：レット症候群原因遺伝子産物MeCP2によるmicroRNAプロセッシング制御、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30、31日（ポスター、31日）

五十嵐勝秀、大塚まき、古川佑介、森山紀子、中島欽一、種村健太郎、菅野純：発生-発達期ビスフェノールA曝露に伴う成長後のマウス脳DNAメチル化変化の網羅的解析、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30、31日（ポスター、30日）

村尾直哉、松田泰斗、古関明彦、波平昌一、中島欽一：ヘミメチル化DNA認識因子Np95/Uhrf1による成体海馬ニューロン新生制御メカニズムの解明、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30、31日（ポスター、30日）

中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一：レット症候群原因因子MeCP2による神経幹細胞の分化制御機構の解明、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30、31日（ポスター、30日）

佐野坂司、三浦史仁、五十嵐勝秀、藤井信之、森山紀子、菅野純、池尾一穂、伊藤隆司、中島欽一：発生進行に伴う神経幹細胞のDNAメチル化変動と遺伝子発現解析、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30、31日（ポスター、30日）

野口浩史、波平昌一、佐野坂司、辻村啓太、深尾陽一朗、五十嵐勝秀、木村文香、中島欽一：神経幹細胞におけるDNAメチル化酵素DNMT1の機能解析、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30、31日（ポスター、30日）

木村文香、波平昌一、中島欽一：Dnmt1コンディショナルノックアウトマウスを用いた神経疾患との関連解析、第7回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013年5月30、31日（ポスター、30日）

中島欽一：レット症候群原因因子MeCP2の新規作用とその神経系細胞における役割、第60回日本実験動物学会総会、2013年5月15日-17日（16日）（招待、口頭）、つくば国際会議場

Chai, M., Juliandi, B., Sanosaka, T., Tanemura, K., Igarashi, K., Nakashima, K.: Brain-region specific developmental alterations in mouse prenatally and postnatally exposed to bisphenol A (BPA). NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013

Murao, N., Matsuda, T., Koseki, H., Namihira, M., Nakashima, K.: Analysis of mechanisms underlying neurogenesis in the adult hippocampus regulated by hemimethylated DNA recognition factor, Np95/Uhrf1. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013

Nakashima, H., Tsujimura, K., Irie, K., Nakashima, K.: Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, in neural stem cells. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013

Noguchi, H., Namihira, M., Sanosaka, T., Tsujimura, K., Fukao, Y., Igarashi, K., Kimura, A., Nakashima, K.: Maintenance DNA methyltransferase DNMT1 controls neuronal differentiation of late-gestational neural stem cells. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013

Matsuda, T., Katano, Y., Adefuin, M. A., Mura, N., Juliandi, B., Kawai, T., Akira, S., Nakashima, K.: TLR9 signaling in microglia suppresses epilepsy-triggered aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013

Nakashima, K.: Treatment of spinal cord injury by transplantation of neural stem cells. 2nd International spinal cord repair meeting, Barcelona, April 26-27, 2013 (oral)

M. Kabayama, K. Sakoori, K. Yamada, V. G. Ornathanalai, M. Ota, N. Norimura, K. Katayama, N. P. Murphy, J. Aruga. Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional responses. Neuroscience 2013, the Society for Neuroscience 43th Annual Meeting (San Diego, CA, November 9-13)

山田一之. 私論:マウス行動解析の昨今-何故、多くの心理学者達が去って行ったのか?- 2013, 薬物・精神・行動の会(招待)(4月26日 慈恵医科大学)

N. Tomioka, H. Miyamoto, M. Hatayama, N. Morimura, Y. Matsumoto, T. Suzuki, M. Odagawa, Y. Odaka, Y. Iwayama, K. Yamada, T. Yoshikawa, K. Yamakawa, J. Aruga Role of Eln1 in hippocampal inhibitory neural circuits containing somatostatin-positive neurons. 2013, 第36回日本神経科学大会(6月20-23日 京都国際会議場)

M. Kinoshita, T. Sano, E. Ooshima, C. Shimizu, H. Hama, K. Tohyama, T. Tachikawa, D. T. Le, T.

Suzuki, K. Yamada, A. Miyawaki, S. Sagao, Y. Hirabayashi. GPCR5B KO mice are induced axon degeneration in cerebellar Purkinje neurons, resulting in impaired motor coordination and learning. 2013, 第36回日本神経科学大会(6月20-23日 京都国際会議場)

M. Kabayama, K. Sakoori, K. Yamada, V. G. Ornathanalai, M. Odagawa, N. Morimura, K. Katayama, N. P. Murphy, J. Aruga. Rines E3 ubiquitin ligase regulates emotional behaviors by altering the monoamine dynamics in prefrontal cortex. 2013, 第36回日本神経科学大会(6月20-23日 京都国際会議場)

S. Manita, T. Suzuki, T. Matsumoto, C. Homma, K. Yamada, K. Ota, M. Odagawa, C. Matsubara, M. Ohkura, M. Sato, J. Nakai, Y. Hayashi, M. E. Larkum, M. Murayama. Top-down motor signals modulate sensory perception. 2013, 第36回日本神経科学大会(6月20-23日 京都国際会議場)

C. Homma, A. Kamoshida, K. Yamada, M. Oda, H. Yamakawa, M. Murayama. New behavior training system combined with tactile stimulation device in virtual world. 2013, 第36回日本神経科学大会(6月20-23日 京都国際会議場)

Y. Matsumoto, H. Miya, K. Katayama, K. Yamada, M. Odagawa, Y. Nozaki, Y. Yanagawa, J. Aruga. An essential role of Slitrk4 in the establishment of fear memory controlling neural circuit in amygdala. 2013, 第36回日本神経科学大会(6月20-23日 京都国際会議場)

本間千尋、鴨志田敦史、山田一之、鈴木崇之、織田充、山川宏、村山正宜. 体性感覚刺激の弁別学習が可能なマウス用行動トレーニングシステムの確立. 2013, 電気学会 電子・情報・システム部門大会(9月4-7日 北見工業大学)

山田一之、種村健太郎. 発生-発達期ビスフェノールA暴露の行動発達に対する影響解析. 2013, 第73回日本動物心理学会大会(9月14-16日 筑

波大学)

山田一之. 次世代の行動評定法の開発を目指して
第 73 回日本動物心理学会大会 ワークショップ
(招待) (9月 14-16 日 筑波大学)

樺山実幸、佐郡和人、山田一之、小田川摩耶、守
村直子、片山圭一、NP Murphy、有賀純. ユビキチ
ンリカーゼ Rines によるモノアミノオキシターゼ
(MAO-A) 分解を介した情動行動制御機構. 2013,
第 156 回 日本獣医学会学術集会 (9 月 20-20 日
岐阜大学)

樺山実幸、佐郡和人、山田一之、小田川 摩耶、
守村直子、片山圭一、NP Murphy、有賀純. ユビキ
チンリガーゼ Rines による、モノアミノオキシダ
ーゼ (MAO-A) 蛋白質分解制御を介した情動行動制
御機構. 2013, 第 36 回日本分子生物学会 (12 月 3
日-6 日 神戸ポートアイランド)

1.
3)

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

別添4

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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行動認知行動毒性評価系確立に資する研究

分担研究報告書

発生-発達期ビスフェノール A 曝露によるエピジェネティック影響解析

分担研究者 五十嵐勝秀 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究要旨

発生 - 発達期におけるビスフェノール A 曝露により、成長後に行動変化が生じることが明らかになってきている。これまで、一時的なビスフェノール A 曝露が持続的な脳機能変化をもたらす分子基盤の候補として、ゲノム DNA のメチル化変化を網羅的な観点から解析してきた。タイリングアレイを用いた解析により、ビスフェノール A 曝露に伴い変化が認められる領域を複数見出した。より測定精度が高い次世代シーケンサーを用いた検討により、結果が再現されると共に、タイリングアレイでは検出出来なかった変化も捉えられた。変化が認められたゲノム領域近傍に存在する遺伝子リストを IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 解析した結果、Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons, Axonal Guidance Signaling, CREB Signaling in Neurons など神経機能に関連する pathway が抽出された。これらの結果は BPA による DNA メチル化変化が成長後の行動変化に関与する可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

中枢神経系が正常に発達する過程に DNA メチル化を始めとするエピジェネティック制御が関わっていることが報告されている。DNA メチル化は主に発達期に確立されることが明らかになっており、その後は細胞の性質を維持する、いわば「細胞記憶」を支える仕組みの一つとして働くと考えられている。よって、DNA メチル化パターンの確立過程に影響を与える化学物質は、細胞の性質を恒久的に変え、その影響が記憶され長く残る深刻な作用を有すると考えられる。

一方で、アグーチイエローマウスを用いた解析により、ビスフェノール A が DNA メチル化に影響を与えうることが報告されている。アグーチイエローマウスは毛色に関わる *agouti* 遺伝子上流にトランスポゾンの挿入があり、野生型より *agouti* 遺伝子の発現が高く、黄色い毛色を示す。そのトランスポゾン配列がメチル化され、*agouti* 遺伝子の発現が

低下すると野生型同様の毛色になる。よって、*agouti* 遺伝子上流のトランスポゾン配列の DNA メチル化状態を毛色で推測することが可能であり、ビスフェノール A 等の作用が調べられた。その結果、交配前から離乳までの投与により、ビスフェノール A や Genistein が DNA メチル化を変化させるという報告がなされている (PNAS. 2007 :104:p. 13056-13061.)。しかし、これが *agouti* 遺伝子上流のトランスポゾン配列に限った作用であるか、ゲノムの他の領域にも生じる影響であるかは不明であり、生理的意義の解明も進んでおらず、更にはこの結果を否定する論文も発表されている (PNAS. 2013 :110(2):p. 537-542.)。一方、研究手法の進展により、今やゲノム DNA のメチル化状況を網羅的に調べる手法が開発され利用可能になっている。

本研究ではこの手法を活用し、ビスフェノール A 曝露に伴う中枢神経系の DNA メチル化変化について解析を行う。