

平成25年度厚生労働科学研究補助金（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）

分担研究報告書

分担研究課題：「情動認知行動異常発現メカニズムの解明」
-エストロゲン受容体 β 欠失マウスの脳における遺伝子発現プロファイル-

研究分担者 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

研究要旨

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、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、標準プロトコールの確立、及び客観的評価指標の提案を目指す中、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」を明らかにする事を目的とする。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、この中でも、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いる。

今年度（平成25年度）はこの目的に向け、成熟期の雄性ER β 欠失マウスの脳3部位（大脳皮質、海馬、脳幹）について網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。その結果、野生型と比較しER β 欠失マウスの大脳皮質、海馬及び脳幹では、それぞれ752（増加：728、減少：24）、315（増加：162、減少：153）及び27（増加：11、減少：16）プローブセット(ps)の有意な発現変動が認められた。脳3部位に共通して、発現が有意に増加した遺伝子はSnapc1(snRNA-activating protein complex subunit 1)の1つ、他方、減少した遺伝子はEsr2（Estrogen receptor 2 = ER β ）とSstr1（Somatostatin receptor 1）遺伝子の2つであった。エストロゲンがSstr1遺伝子の発現制御に関わるとの報告があるが、昨年度検討したER α 欠失マウスの脳3部位では野生型と同様であった事から、この発現制御はER β を介したものと考えられる。

各部位における解析の結果、ER β 欠失マウスの大脳皮質では、神経活動が低下（過分極）及び概日リズムが乱れる可能性が示唆された。海馬及び脳幹では、野生型マウスとの間に有害事象に関わる違いは認められなかった。昨年度検討したER α 欠失マウスでは、大脳皮質と脳幹で共通して、神経活動の活性化及び概日リズムが乱れる可能性が示唆された。ER β 欠失マウスの大脳皮質でも概日リズムが乱れる可能性が示唆された為、今後、特にエストロゲンと概日リズムのシグナルネットワークとの関連に着目した検討により、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

A. 研究目的

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、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中、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」を明らかにする事を目的とする。

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、この中でも、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いる。今年度 (平成 25 年度) は、この目的遂行の為に、成熟期 (15 週齢) の雄性 ER β 欠失マウスの脳 3 部位 (大脳皮質、海馬及び脳幹) のサンプルについて、Percellome 法により網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。

B. 研究方法

マウスの系統は C57BL/6NcrSlc (日本エスエルシー) を用いた。ER β 欠失マウスは、Pierre Chambon 教授 (フランス、ルイパスツール大学) より供与いただいた。比較に際し、野生型マウスと ER β 欠失マウスは同腹のものを使用した。

遺伝子発現変動解析に際しては、15 週齢の成熟期マウスの脳 3 部位 (大脳皮質、海馬、脳幹) (午前 10 時) (各 n=4) について、Percellome 法 (遺伝子発現値の絶対化手法) (Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006) による網羅的遺伝子発現解析をマイクロア

レイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて検討した。この際、我々が独自に開発した「MF analyzer」を用いて網羅的に解析した。脳 3 部位は、氷冷下にて左脳につき、小脳、脳幹部、海馬、大脳皮質の順に採取することにより得た (右脳はホルマリン固定した)。

有意差の検定は、Student の t 検定によりおこない、P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値 \pm 標準偏差 (SD) にて示した。

Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晩浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトックス社のプロトコルに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ

cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。

(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、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「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 (平成 19 年 4 月版)」。

C. 研究結果及び考察

C-1: 野生型及び ERβ 欠失マウスの遺伝子発現の脳各部位間の比較:

脳各部位について、野生型と比較し、ERβ 欠失マウスの場合に、発現が有意に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ以下のとおりとなった。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき、大脳皮質、海馬及び脳幹において、それぞれ 1.0、0.7 及び 0.8 コピー以上のものを採用した。

大脳皮質: 728 ps (増加)、24 ps (減少)

海馬: 162 ps (増加)、153 ps (減少)

脳幹: 11 ps (増加)、16 ps (減少)

次いで、大脳皮質、海馬及び脳幹において、有意に変動した遺伝子の集合関係を検討したところ、図 1 のベン図の通りとなった。

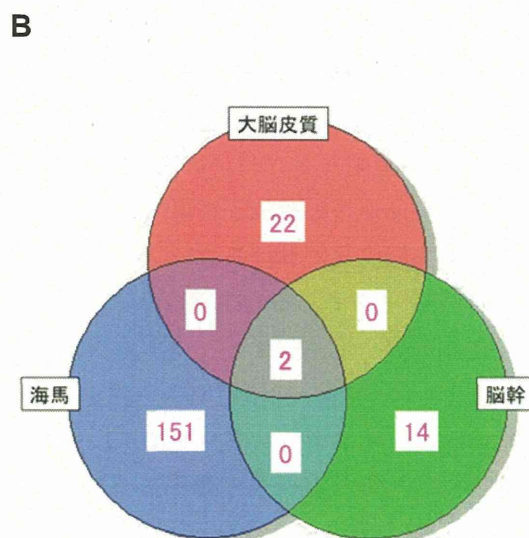
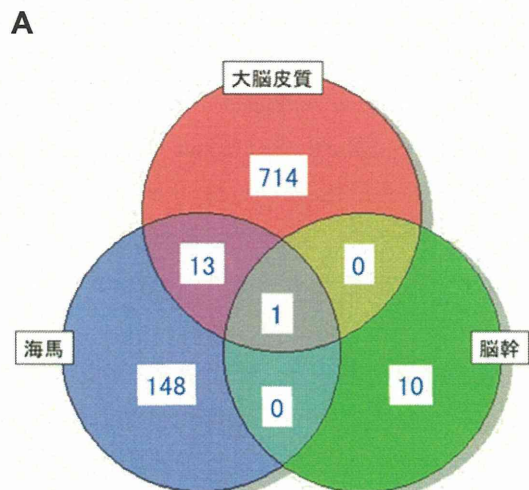


図1 脳各部位について、野生型と比較し、ERβ欠失マウスの場合に、発現が有意に増加(A)あるいは減少(B)する遺伝子数(ベン図で表記した)

脳3部位に共通して、発現が有意に増加した遺伝子は Snapcl (snRNA-activating protein complex subunit 1)、他方、減少した遺伝子は Esr2 (Estrogen receptor 2 = ERβ)と Sstr1 (Somatostatin receptor 1) 遺伝子であった。野生型とERβ欠失マウスとの比較であるため、ERβ (=Esr2) 遺伝子が抽出されてきたのは妥当と考える。

脳の部位によって、野生型と比較しERα欠失マウスにおいて、有意に発現変動する遺伝子が、かなり異なることが明らかとなったため、部位ごとに分けて解析する事とした。

C-2: 脳各部位における、野生型及びERα欠失マウスの遺伝子発現の比較:

C-2-1: 大脳皮質における、野生型及びERβ欠失マウスの遺伝子発現の比較:

まず大脳皮質におけるERβともう一つのERサブタイプであるERα遺伝子の発現、及び各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、野生型とERβ欠失マウスとの比較を検討した。ERβ遺伝子 (=Esr2) は、ERβ欠失マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ERα遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、Nes 遺伝子ではERβ欠失マウスで有意に減少して

いたが(P=0.049)、このp値を考慮すると顕著な差ではないと考えられ、その他の分子マーカーではいずれも有意な差が認められなかった。これらのことから大脳皮質においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型とERβ欠失マウスとで同程度である事が示唆された。この内、ERβであるEsr2及び神経幹細胞マーカーであるNes遺伝子の発現について図2に示す。

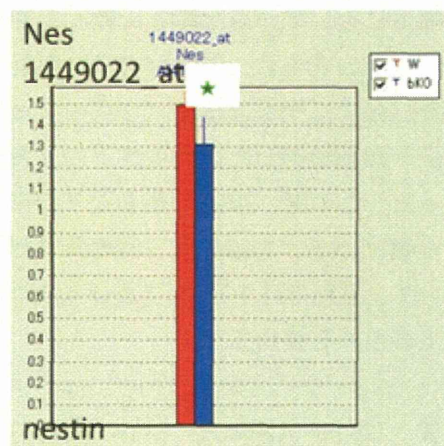
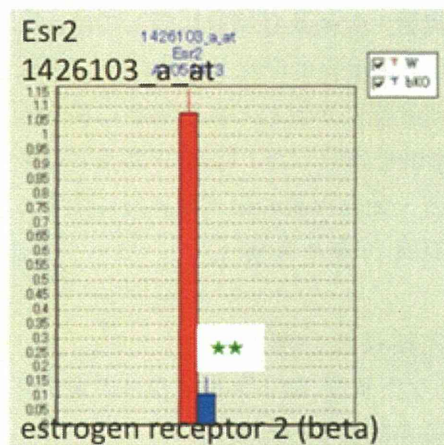


図2 大脳皮質における、Esr2(上)及び神経幹細胞マーカーNes 遺伝子(下)の発現変動

野生型：赤、ERβ欠失マウス：青 (n=4、
 平均値±標準偏差、*：P<0.05、**：P<0.01)

大脳皮質において、野生型マウスと比較しERβ欠失マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、728及び24 psであった。

増加分728 psについて、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、カリウムチャネル関連遺伝子(Kcne11、Kcnb1、Kcnma1、Kcnd2、Kcnmb2)、神経伝達物質受容体(アドレナリン受容体α：Adra1b、セロトニン受容体1B：Htr1b、GABA-A受容体：Gabbr2、ニューロペプチドY受容体：Npy2r)、軸索ガイダンス因子であるエフリン(Efnb2、Epha5、Epha6)やセマフォリン(Sema3a、Sema3e、Sema5b、Sema7a)関連遺伝子、概日リズム関連遺伝子(Dbp、Nr1d2)及びGper(Gpr30)遺伝子が見いだされた。GperはエストロゲンをリガンドとするGタンパク質共役受容体の一種であり、DNAとの直接的な相互作用を行わず、下流に存在するセカンドメッセンジャーを介してイオンチャネルに対して影響を与えると考えられている。

活性化により、膜の過分極が誘発されるカリウムチャネル遺伝子の発現が増加していることから、ERβ欠失マウスの大脳皮質では、神経活動が抑制されている可能性が示唆された。神経伝達物質受容体や軸索ガイダンス因子の関連遺伝子の発現増加は、神経活動が抑制されたことによるポジティブ

フィードバックの結果生じた可能性が考えられた。また、概日リズム関連遺伝子の発現増加から、概日リズムが乱れている可能性が示唆された。この内、Kcne11、Htr1b及びDbp遺伝子の発現変動について3に示す。

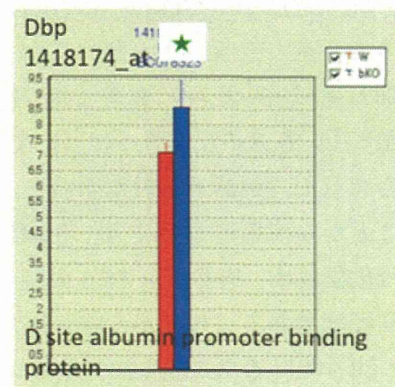
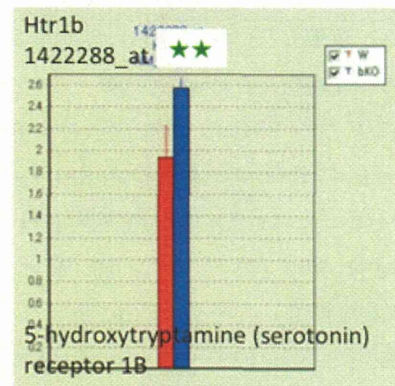
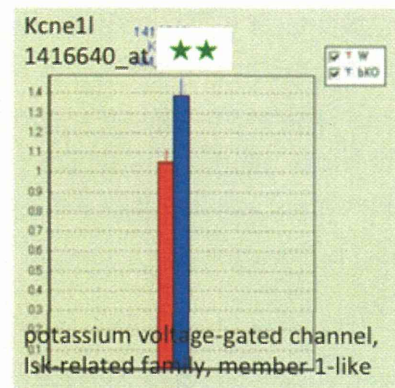


図3 大脳皮質において、野生型マウスと比較し ER β 欠失マウスにおいて、有意に発現減少が認められた、Kenell (上段)、Htr1b (中段) 及び Dbp 遺伝子 (下段) の発現変動

野生型：赤、ER α 欠失マウス：青 (n=4、
 平均値±標準偏差、*:P<0.05, **: P<0.01)

他方、減少分 24 ps については、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。この減少分には、既述の脳 3 部位に共通して、発現が有意に減少した遺伝子 Esr2 (ER β) と Sstr1 (Somatostatin receptor 1) が含まれる。

C-2-2: 海馬における、野生型及び ER β 欠失マウスの遺伝子発現の比較:

海馬における ER α と ER β 遺伝子の発現、及び各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、野生型と ER α 欠失マウスとの比較を検討した。ER β 遺伝子 (=Esr2) は、ER β 欠失マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER α 遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER β 欠失マウスとで同程度である可能性が示唆された。この内、ER α である Esr1 及び ER β である Esr2 遺伝子の発現について図 4 に示す。

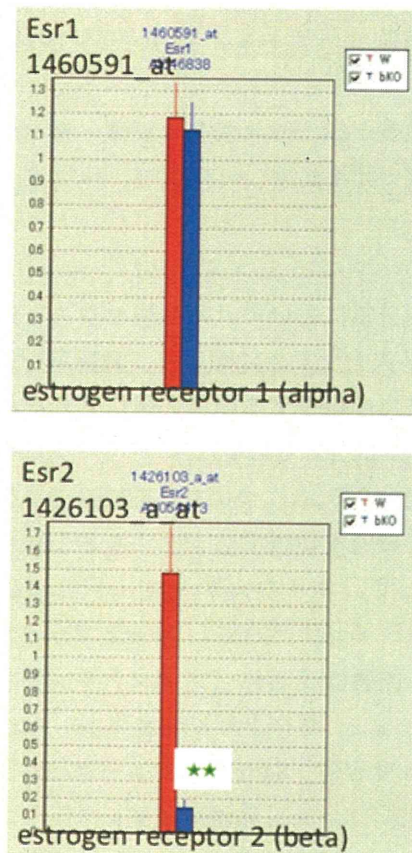


図4 海馬における Esr1 (上段) 及び Esr2 遺伝子 (下段) の発現変動

野生型：赤、ER β 欠失マウス：青 (n=4、
 平均値±標準偏差、*:P<0.05, **: P<0.01)

海馬において、野生型マウスと比較し ER β 欠失マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、162 及び 153 ps であった。

増加分 162 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。シナプスの機能調節や記憶に関与し、その欠失マ

ウスで情動認知行動異常が認められる Camk2a (Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II α) 遺伝子の発現増加が、ER β 欠失マウスで認められた。しかし、他の関連遺伝子の発現変動が認められないため、Camk2a 遺伝子の発現変動と有害事象との関連は明らかではなかった。Camk2a の遺伝子発現変動について、図 5 に示す。

減少分 153 ps については、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。なおこの減少分には、既述の脳 3 部位に共通して、発現が有意に減少した遺伝子 Esr2 (ER β) と Sstr1 (Somatostatin receptor 1) が含まれる。

したがって海馬において、野生型マウスと ER β 欠失マウスとの間に変化が認められるシグナルネットワークは、現時点では認められなかった。

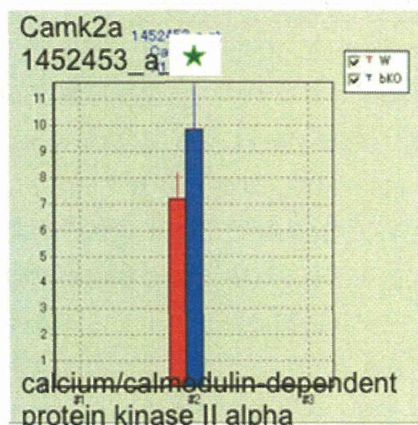


図 5 海馬における、Camk2a 遺伝子の発現変動

野生型：赤、ER β 欠失マウス：青 (n=4、平均値±標準偏差、*:P<0.05, **: P<0.01)

C-2-3：脳幹における、野生型及び ER β 欠失マウスの遺伝子発現の比較：

脳幹における ER α と ER β 遺伝子の発現、及び各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、野生型と ER β 欠失マウスとの比較を検討した。ER β 遺伝子 (=Esr2) は、ER β 欠失マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER α 遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER β 欠失マウスとで同程度である可能性が示唆された。この内、ER α である Esr1 及び及び ER β である Esr2 遺伝子の発現について図 6 に示す。

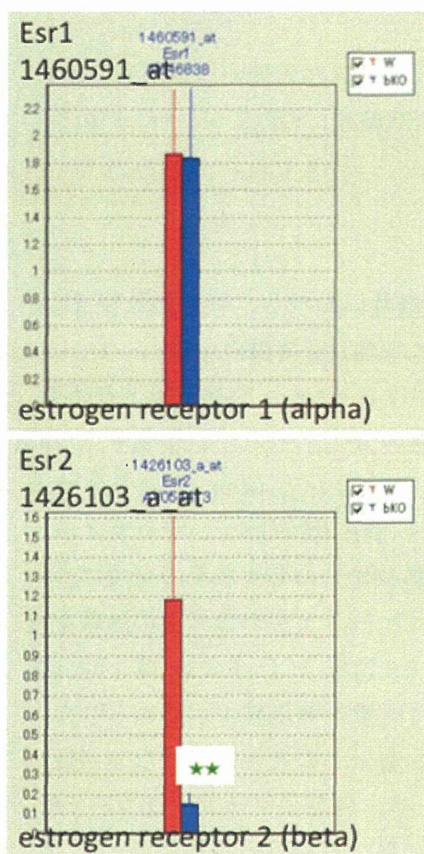


図6 脳幹における Esr1(上段)及び Esr2 遺伝子(下段)の発現変動

野生型：赤、ER β 欠失マウス：青 (n=4、
 平均値 \pm 標準偏差、*:P<0.05, **: P<0.01)

脳幹において、野生型マウスと比較し ER β 欠失マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、11 及び 16 ps であった。

増加分 11 ps について、また減少分 16 ps についても、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。なおこの減少分には、既述の脳3部位に共通して、発現が有意に減少した遺伝子 Esr2 (ER β)と Sstr1

(Somatostatin receptor 1)が含まれる。

したがって脳幹において、野生型マウスと ER β 欠失マウスとの間に変化が認められるシグナルネットワークは、現時点では認められなかった。

C-2-4: 脳3部位に共通して、発現の著しい低下が認められた Sstr1 (Somatostatin receptor 1)遺伝子について:

Sstr1 遺伝子の発現は、ER β 欠失マウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)に共通して著しい低下が認められた。他のサブタイプである Sstr2、Sstr3、Sstr4、Sstr5 遺伝子の場合には野生型と比較し有意な差は認められなかった。エストロゲンが Sstr 遺伝子の発現制御に関わるとする報告 (Rivera ら、J Carcinog 4(1):10, 2005) があり、昨年度検討した ER α 欠失マウスの脳3部位では、野生型と比較して有意な差が認められなかったことから、ER α ではなく ER β が Sstr1 遺伝子の発現制御に関与することが示唆された。ソマトスタチンが Sstr1 を介して海馬でのシナプス伝達を抑制する事が報告 (Cammalleri ら、J Neurochem 111(6): 1466-1477, 2009) されている為、ER β 欠失マウスにおいて Sstr1 遺伝子の発現低下によりソマトスタチンの機能が抑制され、シナプス伝達に影響が生じる可能性が考えられたが、ER β 欠失マウスの海馬及び脳幹での遺伝子発現解析結果からはシナプス伝達への影響は示唆されず、この可能性は低いものと考えられた。

D. 結論

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、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中、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」を明らかにする事を目的とする。

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、この中でも、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いる。今年度 (平成 25 年度) は、この目的遂行の為に、成熟期 (15 週齢) の雄性 ER β 欠失マウスの脳 3 部位 (大脳皮質、海馬、脳幹) のサンプルについて、Percellome 法により網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。

その結果、ER β 欠失マウスの大脳皮質では、野生型マウスと比較し、752 (増加 : 728、減少 : 24) ps の有意な発現変動が認められ、これらの遺伝子機能の検索の結果、神経活動の低下 (過分極) 及び概日リズムが乱れる可能性が示唆された。増加した遺伝子には、神経伝達物質受容体 (アドレナリン受容体、セロトニン受容体、GABA-A 受容体、ニューロペプチド Y 受容体)、軸索ガイダンス因子 (エフリン、セマフォリン)、概日リズム関連遺伝子 (Dbp, Nr1d2) 及びエストロゲンをリガンドとする G タンパク質共役受容体 Gper (Gpr30) 遺伝子が含まれていた。海馬及び脳幹では、野生型マウスと比較し、それぞれ 315 (増加 : 162、減少 : 153) 及び 27 (増加 : 11、減少 : 16) の有意な発現変動が認められ、これらの遺

伝子機能の検索の結果、野生型マウスと ER β 欠失マウスとの間に有害事象に関わる違いは、両部位ともに現時点では認められなかった。

Sstr1 遺伝子の発現は、ER β 欠失マウスの脳 3 部位 (大脳皮質、海馬、脳幹) に共通して著しい低下が認められた。ソマトスタチンが Sstr1 を介して海馬でのシナプス伝達を抑制する事が報告 (Cammalleri ら、J Neurochem 111(6) : 1466-1477, 2009) されている為、ER β 欠失マウスにおいて Sstr1 遺伝子の発現低下によりソマトスタチンの機能が抑制され、シナプス伝達への影響が生じる可能性が考えられたが、ER β 欠失マウスの海馬及び脳幹での遺伝子発現解析結果からはこの影響は示唆されず、この可能性は低いものと考えられた。

昨年度検討した ER α 欠失マウスでは、大脳皮質と脳幹で共通して、神経活動の活性化及び概日リズムが乱れる可能性が示唆された。ER β 欠失マウスの大脳皮質でも概日リズムが乱れる可能性が示唆された為、ER β 欠失マウスの大脳皮質でも概日リズムが乱れる可能性が示唆された為、今後特に、エストロゲンと概日リズムのシグナルネットワークとの関連に着目した検討により、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima

S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, and Kodama Y, Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. J Toxicol Sci 38: 643-654, 2013.

2. 学会発表

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暴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

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 暴露による晩発中枢影響解析、第40回日本トキシコロジー学会学術年会 (2013. 6)

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回日本トキシコロジー学会学術年会 (2013. 6)

Kentaro Tanemura, Katsuhide Igarashi, Yusuke Furukawa, Maki Otsuka, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Eimei Sato and Jun Kanno, 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 (ICT 2013) (2013. 7.), Seoul, Korea

Katsuhide Igarashi, Kentaro Tanemura, Yusuke Furukawa, Maki Otsuka, Noriko Moriyama, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima and Jun Kanno, Analysis of Late-onset Effects on CNS Induced by Transient GABA Signal Activation with Hypnotics During Brain Development, The XIII International Congress of Toxicology 2013 (ICT 2013) (2013. 7.), Seoul, Korea

G. 知的財産所有権の出願・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