

厚生労働省科学研究補助金  
化学物質リスク研究事業

個体の成長期における毒性メカニズム  
に基づく新規 in vitro 発達神経毒性  
評価法に関する研究  
(H25-化学-一般-002)

平成 25 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 諫田 泰成

平成 26 (2014) 年 5 月

## 目 次

|      |                                                                                                                                                                                     |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I.   | 総括・分担研究報告<br>個体の成長期における毒性メカニズムに基づく新規 in vitro<br>発達神経毒性評価法に関する研究-----1<br>諫田 泰成                                                                                                     |
| II.  | 分担研究報告<br>神経堤細胞の機能解析による評価法の開発-----13<br>宇佐見誠<br><br>発達成長期神経系細胞新生への化学物質の影響評価-----22<br>佐藤薫<br><br>生後神経回路の機能的影響評価指標に関する研究-----33<br>関野祐子<br><br>幼若期の神経回路機能に対する化学物質の影響評価-----46<br>上野晋 |
| III. | 研究成果の刊行に関する一覧表 -----61                                                                                                                                                              |
| IV.  | 研究成果の刊行物・別刷 -----63                                                                                                                                                                 |
| V.   | 化学物質リスク事業・班会議内容資料-----187<br>平成 25 年 8 月 23 日開催<br>平成 26 年 2 月 6~7 日開催 (in vivo 研究グループ)                                                                                             |

# I. 総括・分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総括・分担研究報告書

個体の成長期における毒性メカニズムに基づく新規 in vitro 発達神経毒性評価法  
に関する研究

研究代表者

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室  
諫田 泰成

要旨

近年、自閉症など発達障害が急速に増加し社会問題となっている。その原因の一つは発達期における化学物質の曝露とされる。発達期の神経系は成体より化学物質に対する感受性が高く、健康被害が長期間あるいは遅発性に生じることが考えられるため、子どもの影響評価法の確立が強く望まれる。現在、OECDやEPAによって、妊娠ラットを用いる発達神経毒性試験ガイドラインが制定されているが、試験方法が複雑で、試験期間は1年以上、動物数は720にも及び経費も膨大である。さらに、日本ではこのようなガイドラインは未整備である。そこで我々は、現行ガイドラインの欠点を克服し、簡便かつ低コストのin vitro評価系として、神経系の発達評価法、胎児期曝露による遅発性の神経回路異常による毒性評価法の基盤を開発している。

本年度は、研究班で共通の陽性対照化合物として自閉症モデル動物の作成に使用されるバルプロ酸を用いた。バルプロ酸に関しては医薬品として有用であることは周知の事実であるが、ここでは化学物質としての作用のみに着目して各発生過程にもたらす影響を検討し、各発達段階における有害事象を明らかにした。さらに、遅発性の毒性発現に関して脳スライス法を用いた神経回路機能により検証し、バルプロ酸によって神経回路の早期の形成異常を明らかにした。これらの結果から、我々の評価法は、幹細胞から生後・幼若期までの各発達段階において神経毒性が検出できることを明らかにした。

また、近年、内分泌かく乱物質の中枢に対する作用を見直す動きが出ている。そこで、ヒト未分化細胞NT2/D1を用いて、発達神経毒性が懸念される内分泌攪乱物質であるトリブチルスズ（Tributyltin: TBT）の細胞内代謝物質および増殖・分化に対する影響評価を行った。TBTを用いてメタボローム解析により新たな毒性マーカーとしてNAD-IDH阻害作用を見いだした。さらに、TBTによりNAD-IDH阻害作用を介して増殖抑制および神経分化の亢進を見いだした。また、バルプロ酸処理においてもNAD-IDH活性阻害が認められた。従って、NAD-IDH阻害作用のある化合物が、ヒト未分化細胞の増殖・分化に対してリスクを有することが示された。

今後は、毒性発現メカニズムに基づいた化学物質のin vitro健康影響評価法の確立を目指す。上記の方法を統合的に体系づけることで、予測性の向上およびコストの大幅削減が可能となる。将来的には、OECDなどの発達毒性試験を代替できる評価系になることが期待される。

研究分担者一覧

宇佐見誠（国立衛研）：神経堤細胞の機能解析による評価法の開発

佐藤薫（国立衛研）：発達成長期神経系細胞新生への化学物質の影響評価

関野祐子（国立衛研）：生後神経回路の機能的影響評価指標に関する研究

上野晋（産業医大）：幼若期の神経回路機能に対する化学物質の影響評価

A. 研究目的

発達期の中枢神経系は成体より化学物質に対する感受性が高く、健康被害が長期間あるいは遅発性に生じることが懸念される。原行のOECDガイドラインの発達神経毒性ガイドラインにおいては、妊娠動物を用いて発達神経毒性を評価しているが、1化合物につき1億円以上もかかり、相当な時間も必要となる。従って、低コストで簡便なin vitro試験法が期待される。

化学物質の中でも、内分泌攪乱物質はエストロゲン受容体の活性化を指標に評価

されているが、子供の発達期における神経毒性も懸念されている。有機スズ化合物の1種であるトリブチルスズ(TBT)も動物を用いた検討により発達期の曝露による行動異常などが報告されている。

そこで、我々は平成22～24年度の化学物質リスク事業「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に関する研究」において、各発達段階における評価系を構築した。

そこで、本年度は、遅発性の神経毒性が懸念されるバルプロ酸(valproic acid; VPA)を共通の化学物質として使用し、当初の計画に従って、我々が独自に構築した各発達段階におけるin vitro神経毒性評価を行った。以下に示すように、幹細胞から生後・幼若期までの各発達段階においてバルプロ酸の神経毒性作用が検出できることを明らかにした。

各分担項目は以下の通りである。

【①ヒト未分化細胞の代謝】バルプロ酸により、TCA回路における酵素活性が化学物質により阻害されATP産生が抑制される新規の毒性発現メカニズムを明らかにした。

【②神経堤細胞の遊走】バルプロ酸によりラット胚由来の頭部神経堤細胞の遊走が促進される作用を見出した。

【③発達成長期神経系細胞新生】前脳矢状切片の脳室下帯に存在する神経幹細胞および前駆細胞を蛍光標識し切片培養を行い、細胞数の増加および形態異常を明らかにした。

【④生後神経回路】バルプロ酸投与動物では、伝達物質の放出時期、放出量、放出分布が発達過程で変化することを明らかにし、神経細胞の早期分化と回路形成の異常が示唆された。

【⑤幼若期神経回路】バルプロ酸の胎生期曝露ラットを用いて授乳期の海馬神経回路の発達を検討したところ、早期からの興奮系の亢進と反回抑制が見られた。

今後は、上記の結果を基にして各発達期における毒性発現メカニズムを明らかにして、他の化学物質に適用することにより体系化な評価系の開発を行う。

本健康影響評価法の利用により、化学物質の安全対策の観点から、国民の健康と生活環境の維持・向上に資する成果が期待される。特に、各発達段階の感受性を基にして、化学物質による健康被害を受けやすい時期を特定し、健康被害を予防することが期待される。

また、成体での実験結果から経験的に決められている、化学物質の曝露許容量を設定するための安全係数についても、感受性の高い個体についても安全を確保できるような実験データに基づく決定法の確立に寄与することが期待される。さらに、複合的な化学物質の影響評価に応用し、体系的・総合的な評価手法として発展させることにより、新たな毒性学的概念の確立に資することも期待される。研究期間が終了するまでに各試験系に共通の化学物質に関するデータを取得し、OECDで定められている発達毒性試験を代替あるいは補完できるような健康影響評価法に発展させることを目指す。

## B. 研究方法

ヒト未分化細胞に関しては以下の通りである。その他の項目は各分担報告書を参照されたい。

### 1. ヒト未分化細胞の培養と分化誘導

ヒト未分化細胞NT2/D1はATCCより購入し、DMEM (Sigma #D6046) に10%FBSを加えた培地にて培養した。また、神経系への分化はレチノイン酸(RA, 1  $\mu$ M)で14日間培養することにより行った。分化は分化マーカーの発現をqPCRにより評価した。

### 2. メタボロームによる細胞内代謝産物の網羅的解析

常法に従って、細胞内代謝産物を抽出した後、CE-TOFMSにより代謝物質の量を測定した。

### 3. 細胞におけるIDHの活性

市販のIsocitrate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision)を用いて酵素活性を測定した。プロトコールに従って、NT2/D1細胞を可溶化した後、NADあるいはNADP存在下で酵素活性の測定を行った。

### 4. recombinant NAD-IDHの活性

ヒトNAD-IDHの $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットをタンデムに組み込んだplasmidを大腸菌BL21株(BioDynamics)に発現させて、NAD-IDHの活性測定に使用した。

### 5. シミュレーションによるNAD-IDHの立体構造の予測

ヒトNAD-IDH  $\alpha$ サブユニットおよびヒトNADP-IDHの立体構造をMolecular Operating Environment (MOE) 2012.10を用いて予測した。ASEDockにより酵素活性部位にTBTと相互作用しうるスペースがある

のか検討した。

#### 6. NAD-IDH のノックダウン

NT2/D1 細胞に NAD-IDH  $\alpha$  サブユニットの shRNA を組み込んだレンチウイルスを感染させ、puromycin でセレクション後に使用した。

#### C. 研究結果

ヒト未分化細胞に関しては以下の通りである。その他の項目は各分担報告書を参照されたい。

##### 1. 細胞内代謝物質に対する TBT の影響

我々は平成 22~24 年度の化学物質リスク研究事業において、成体内に存在しうる nM オーダーの TBT はヒト未分化細胞の ATP 産生、酸素消費量を抑制し、その結果、増殖抑制作用が認められることを見いだしている。そこで、今回は細胞内代謝産物の定量により毒性マーカーの探索を行った。その結果、図 1 に示すように、TBT 暴露により TCA 回路の代謝物質の中で、 $\alpha$  ケトグルタル酸以降の代謝産物の産生が抑制されていることを見いだした。一方、クエン酸、イソクエン酸の量は特に変化が認められなかった。また、毒性の少ない無機スズ (TA) はいずれの代謝物質に対して影響を与えなかった。これらの結果から、TBT はイソクエン酸から  $\alpha$  ケトグルタル酸の代謝を阻害している可能性が示唆された。

##### 2. NAD-IDH 酵素活性に対する TBT の影響

TBT の作用はイソクエン酸から  $\alpha$  ケトグルタル酸の代謝酵素である NAD-IDH であることが示唆されたので、NAD-IDH の酵素活性および発現に対する TBT 曝露の影響を検討した。図 2A に示すように、TBT は NAD-IDH 活性の阻害が認められたが、遺伝子発現やタンパクの発現に対しては影響を与えなかった。また、ほかの TCA 回路の酵素である NADP-IDH やアコニターゼに対しては特に活性の阻害作用が認められなかった。以上の結果から、TBT の新規作用点として NAD-IDH が明らかになった。

##### 3. recombinant NAD-IDH の活性に対する TBT の影響

TBT による NAD-IDH 活性阻害が直接なのか間接的であるのか検証するために、リコン

ビナント NAD-IDH を作製し、活性を測定した。その結果、神経系の発生過程に影響するのかについて検討した。

##### 4. TBT と NAD-IDH の作用に関するシミュレーションの予測

TBT が NAD-IDH を選択的かつ直接阻害する可能性が示唆されたため、阻害メカニズムについてさらに確認するため、シミュレーションによる立体構造の予測を行った。その結果、NAD-IDH の活性ポケットには TBT が入り込むスペースが認められた。一方、NADP-IDH にはそのようなスペースが認められなかった。

##### 5. 細胞増殖および神経分化に対する TBT の影響

さらに、TBT による NAD-IDH 活性阻害が増殖や分化に影響するのかについて検討した。TBT 暴露により、レチノイン酸 (RA) による神経分化が亢進することを見いだした。さらに、IDH のノックダウンによっても同様に分化マーカーの発現亢進が認められたことから、TBT の作用は NAD-IDH 阻害を介している可能性が示唆された。一方、NAD-IDH のノックダウンにより細胞増殖が抑制された。従って TBT による増殖抑制は NAD-IDH 阻害による可能性が示唆された。

##### 6. NAD-IDH 酵素活性に対する VPA の影響

TBT 以外の化学物質が NAD-IDH に影響を与えるのか確認するために、VPA の作用を検討した。その結果、VPA 100  $\mu$ M 処理により NAD-IDH の活性が阻害された。

#### D. 考察

本研究において、ヒト未分化細胞を用いて TBT および VPA の新たな作用点 NAD-IDH を見いだした。さらに、NAD-IDH は未分化細胞の増殖や神経分化を制御することが示唆されたから、発達期の神経毒性との関連が考えられる。これらの結果から、NAD-IDH 阻害作用のある化合物が神経系の発達に対してリスクを有することが考えられた。従って、NAD-IDH は新たな毒性指標になる可能性が考えられる。

TBT は転写因子 PPAR  $\gamma$  のアゴニスト作用により、内分泌攪乱作用をもたらすことが知られている。NT2/D1 細胞において PPAR  $\gamma$

アゴニストは特に作用を示さなかったことから、既存のアッセイ系ではその毒性を評価できていなかった。今回、我々はTBTの非ゲノム作用が神経促成に関与する可能性を明らかにした。今後、他の内分泌攪乱物質も非ゲノム作用による神経毒性をもたらす可能性が考えられ、非常に興味深い。

また、VPAはHDAC阻害剤(IC<sub>50</sub> = 400 μM)として抗がん作用、抗炎症作用、神経保護作用などを示すことから(J.Biol.Chem. 276, 36734-, 2001)、現在、HDAC阻害剤として実験的に広く使われている。我々は非ゲノム作用としてNAD-IDHの阻害を見いだした。神経毒性を考えるうえで、ゲノム作用に加えて非ゲノム作用を解析する必要があると考えられる。

#### E. 結論

バルプロ酸は、神経発達の各過程において毒性を誘導する可能性が示唆された。また、内分泌かく乱物質であるTBTがヒト未分化細胞のNAD-IDH活性の阻害により、増殖抑制及び分化亢進を誘導することが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- [1] Ishida K., Kotake Y., Miyara M., Aoki K., Sanoh S., Kanda Y., Ohta S. Involvement of GluR2 decrease in lead-induced neuronal cell death. *J. Toxicol. Sci.* 38:513-21 (2013).
- [2] Yamada S., Kotake Y., Sekino Y. and Kanda Y. AMP-activated protein kinase-mediated glucose transport as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Metallomics* 5:484-91 (2013).
- [3] 諫田泰成、再生心筋細胞を用いた安全性薬理評価系の開発、再生医療における臨床研究と製品開発、p572-576、技術情報協会 (2013).

##### 2. 学会発表

###### 国内学会

- [1] 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田泰成：ADAM17 mediates cancer stem cell phenotype in MCF-7 cells、第11回幹細胞シンポジウム、東京 (2013)
- [2] 諫田泰成：第40回日本毒性学会シンポジウム「ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた安全性薬理試験の開発」(2013)

- [3] 山田茂、古武弥一郎、関野祐子、諫田泰成：ヒト胎児性癌細胞のエネルギー産生に対する有機スズ化合物の影響、第128回日本薬理学会関東部会、東京、2013.07.14.
- [4] 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田泰成：NO/sGC/cGMP経路を介した乳癌幹細胞の増殖、第86回日本生化学会、横浜 (2013)
- [5] 石田慶士、古武弥一郎、宮良政嗣、青木香織、佐能正剛、諫田泰成、太田茂：グルタミン酸受容体が関与する鉛の神経毒性メカニズムの解明、フォーラム2013：衛生薬学・環境トキシコロジー、名古屋 (2013)
- [6] 諫田泰成：癌幹細胞を標的とした創薬の可能性、第36回生物工学会、広島 (2013)
- [7] 諫田泰成：メタロバイオサイエンス研究会 2013、メタボロミクスによる有機スズの新たな毒性メカニズム、静岡 (2013)
- [8] 平田尚也、諫田泰成：In vitro および in vivo における mammosphere の増殖に対するニコチンの影響、第72回日本癌学会学術総会、横浜 (2013)
- [9] 黒川洵子、李敏、諫田泰成、関野祐子、古川哲史：ヒトiPS由来心筋を用いた心臓毒性評価系の構築、第30回心電学会、青森 (2013)
- [10] 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田泰成：スフィンゴシン 1 リン酸受容体 S1PR3 を介した乳癌幹細胞の増殖機構、第129回日本薬理学会関東部会、東京 (2013)
- [11] 諫田泰成：細胞アッセイ研究会、「ヒトiPS細胞由来分化細胞の標準化と創薬への応用」東京 (2013)
- [12] 黒川洵子、李敏、諫田泰成、芦原貴司、関野祐子、古川哲史：ヒトiPS由来心筋を用いた薬剤誘発性不整脈の研究、生理研研究会、岡崎 (2013)
- [13] 山田茂、古武弥一郎、関野祐子、諫田泰成：トリブチルスズの新規標的分子 IDH3 の同定、第36回分子生物学会、神戸 (2013)
- [14] 黒川洵子、諫田泰成、古川哲史：iPS心筋を用いた心機能評価、第23回日本循環薬理学会、福岡 (2013)
- [15] 諫田泰成：Development of an in vitro

- cardiac safety testing using human iPS-cell derived mature cardiomyocytes、第1回心臓安全性に関するシンクタンクミーティング 2014 in 霧島 (2014)
- [16] 諫田泰成：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた安全性評価法の現状と今後の展望、厚生労働省公開シンポジウム、東京 (2014)
- [17] 高橋和也、早川智広、國弘威、辰田寛和、松居恵理子、矢田博昭、諫田泰成、黒川洵子、古川哲史：イメージングによる培養心筋細胞の拍動伝播評価、第5回日本安全性薬理研究会、東京 (2014)
- [18] 中村裕二、松尾純子、宮本憲優、小島敦子、安東賢太郎、諫田泰成、澤田光平、杉山篤、関野祐子：Assessment of testing methods of the drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS-derived cardiomyocytes sheet: Multi-site validation study、第5回日本安全性薬理研究会、東京 (2014)
- [19] 諫田泰成：ヒューマンサイエンス振興財団—開発振興/規制基準合同委員会、ヒト iPS 細胞を用いた心毒性評価の現状と課題 (2014)
- [20] 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田泰成：乳癌幹細胞の増殖に対するスフィンゴシン 1 リン酸受容体 S1PR3 の影響、第13回日本再生医療学会、京都 (2014)
- [21] 平田尚也、山田茂、正田卓司、栗原正明、関野祐子、諫田泰成：S1PR3 は乳癌幹細胞に対する新規標的分子である、第87回日本薬理学会、仙台 (2014)
- [22] 山田茂、古武弥一郎、関野祐子、諫田泰成：メタボロミクスによる有機スズの新規標的分子 IDH3 の同定、第87回日本薬理学会、仙台 (2014)
- [23] 麻薙美紀、山田茂、平田尚也、板垣宏、関野祐子、諫田泰成：有機スズ化合物のミトコンドリア機能に対する影響、第87回日本薬理学会、仙台 (2014)
- [24] 李敏、諫田泰成、芦原貴司、笹野哲郎、関野祐子、古川哲史、黒川洵子：ヒト iPS 由来心筋を用いた薬物誘発性 QT 延長に対する新規 in vitro 評価系、第87回日本薬理学会、仙台 (2014)
- [25] 藤塚美紀、黒川洵子、鳥野初萌、中井雄二、永森収志、金井好克、諫田泰成、松居恵理子、古川哲史：ヒト iPS 由来心筋細胞の収縮に対する基質硬度の影響、第87回日本薬理学会、仙台 (2014)
- [26] 中村裕二、松尾純子、宮本憲優、小島敦子、安東賢太郎、諫田泰成、澤田光平、杉山篤、関野祐子：iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた薬物性再分極遅延評価法の分析：多施設間バリデーション、第87回日本薬理学会、仙台 (2014)
- [27] 諫田泰成：第87回日本薬理学会、ヒト iPS 細胞由来の成熟心筋細胞の開発—実用化に向けて、仙台 (2014)
- [28] 長久保貴哉、出水庸介、佐藤由紀子、諫田泰成、奥平桂一郎、関野祐子、内藤幹彦、栗原正明：エストロゲン受容体転写阻害ペプチドの創製、日本薬学会、熊本 (2014)
- 国際学会
- [1] Li Min, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. Functional optimization of commercially available human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iCell-CMs) for evaluation of drug-induced QT prolongation. The 2nd HD physiology international symposium on multi-level systems biology. Tokyo, Japan (2013).
- [2] Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Shigeru Yamada, Yuko Sekino. Role of sphingosine kinase in cancer stem cells. FASEB Summer Research Conference, Niseko, Japan (2013).
- [3] Shigeru Yamada, Yaichiro Kotake, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Yuko Sekino, Yasunari Kanda. Mitochondrial isocitrate dehydrogenase is the target of tributyltin, 4<sup>th</sup> DynaMito2013, Okinawa (2013).
- [4] Yasunari Kanda, Shigeru Yamada, Yaichiro Kotake and Yuko Sekino. Metabolomic approach for tributyltin-induced toxicity. International Society for Trace Element Research in Humans, Tokyo (2013).
- [5] Yasunari Kanda, Li Min, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. Development of human iPS cell-derived mature cardiomyocytes for assessment of drug-induced QT prolongation. The 7<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences. Osaka (2014).
- [6] Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Shigeru Yamada, and Yuko Sekino. A novel role of sphingosine-1-phosphate receptor S1PR3 in cancer stem cell expansion via a Notch-dependent pathway. Keystone

symposium, Canada (2014).

- [7] Li Min, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. A novel approach for evaluation of drug-induced QT prolongation using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Biophysical Society 58th Annual Meeting, San Francisco, USA (2014).

#### H. 知的財産の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特許出願番号：2013-116243

「正常な内向きのカリウム電流特性を有する iPS 細胞由来心筋モデル細胞」

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

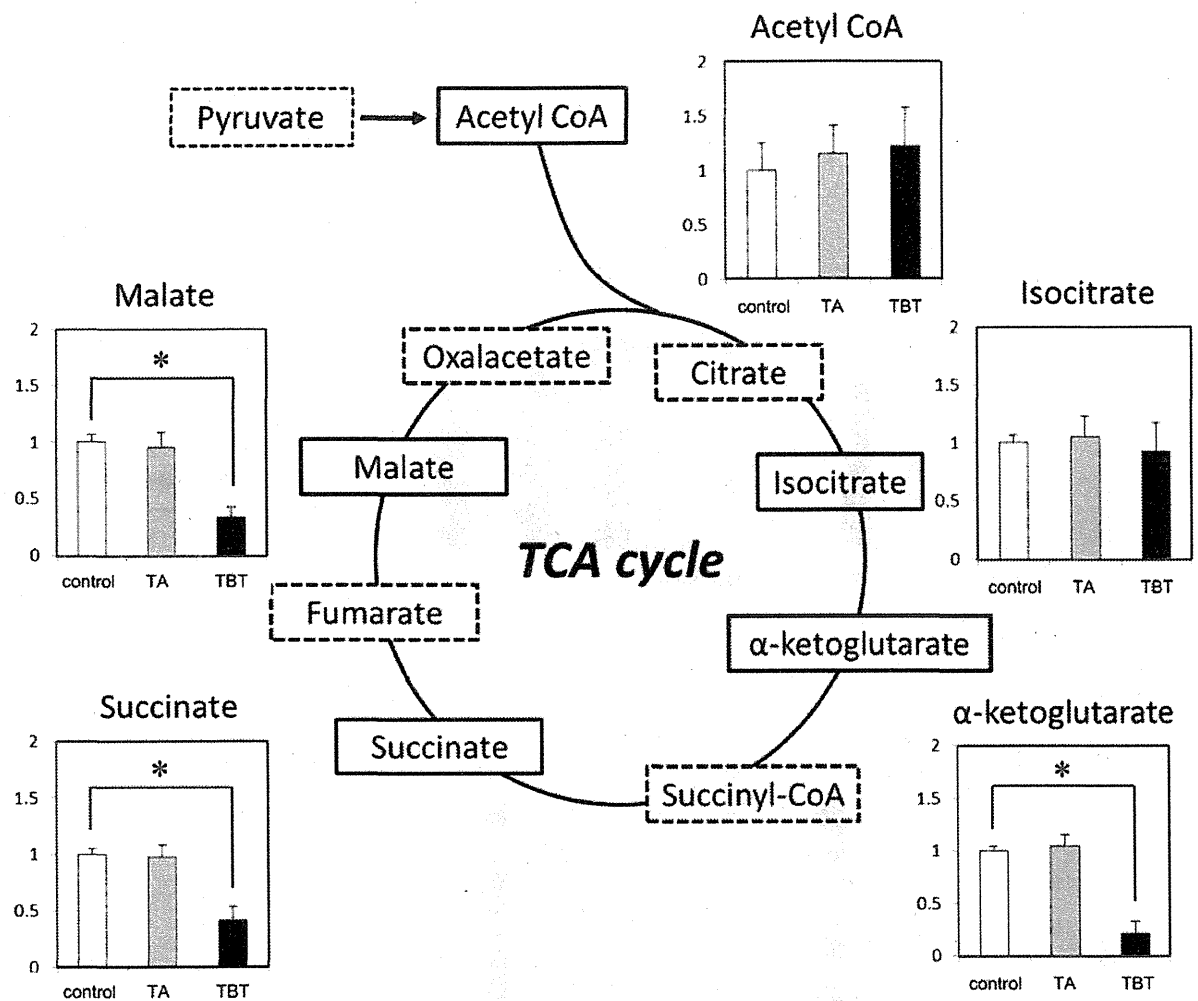


図 1.細胞内代謝物質に対する TBT 曝露の影響

NT2/D1 細胞を 100nM の有機スズ (TBT) あるいは無機スズ (TA) で 24 時間曝露し、CE-TOFMS で代謝物質量を測定した。(\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )

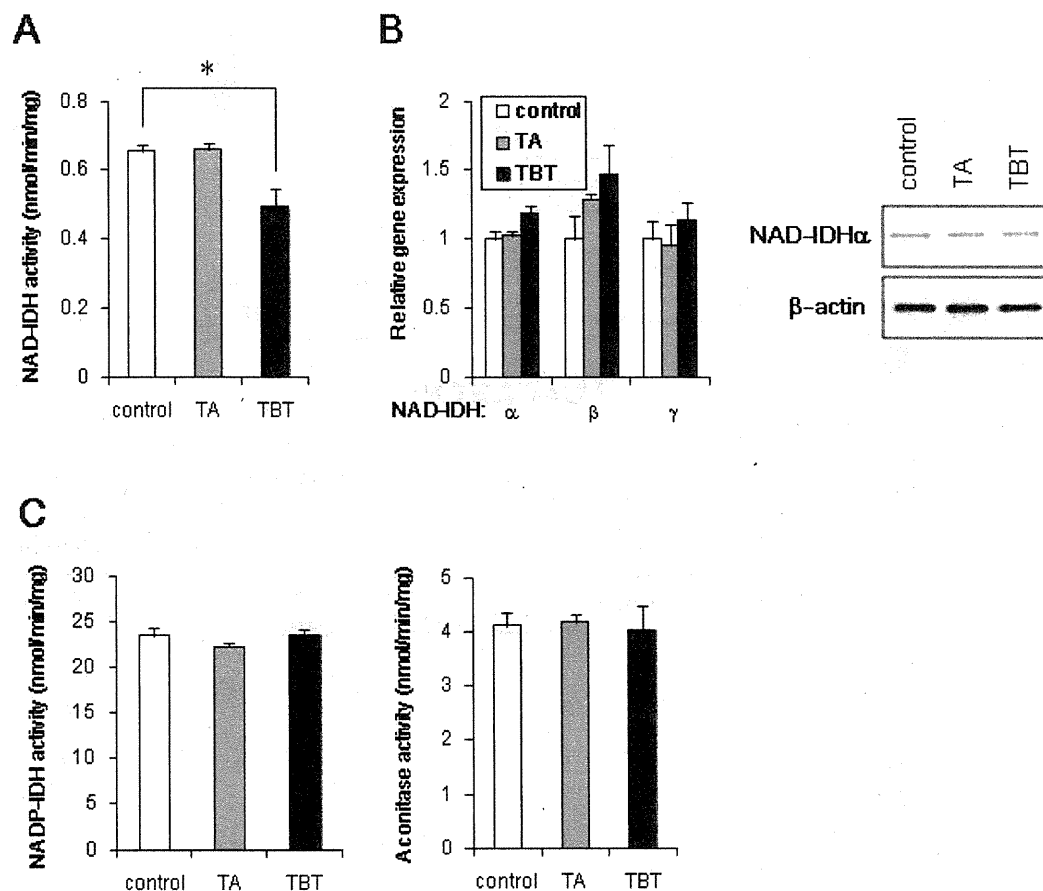


図 2. TCA 回路の酵素活性に対する TBT 曝露の影響

(A) TBT 100nM の曝露により NAD-IDH 活性は阻害された。(B) TBT 100nM の曝露により NAD-IDH の遺伝子発現、タンパク発現には有意な影響が認められなかった。(C) TBT 100nM の曝露により、NADP-IDH 活性およびアコニターゼ活性には影響が認められなかった。(\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )

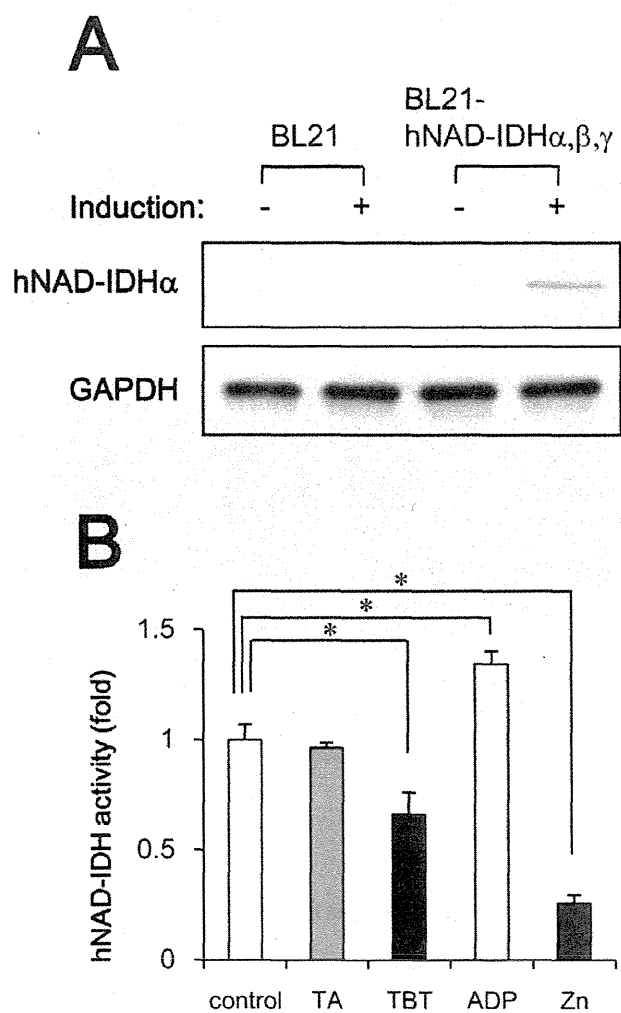


図 3. recombinant NAD-IDH 活性に対する TBT 曝露の影響

(A) Human NAD-IDH の各サブユニットをタンデムに組みこんだ plasmid を大腸菌 BL21 株に導入し、タンパクを誘導後に lysate を調整した。NAD-IDH  $\alpha$  サブユニットの発現はウエスタンブロットにより確認した。(B) lysate を TBT (100nM) で 1 時間曝露して、NAD-IDH 酵素活性を測定した。酵素活性を上昇させる化学物質として ADP を、阻害する物質として Zn を用いた。(\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )

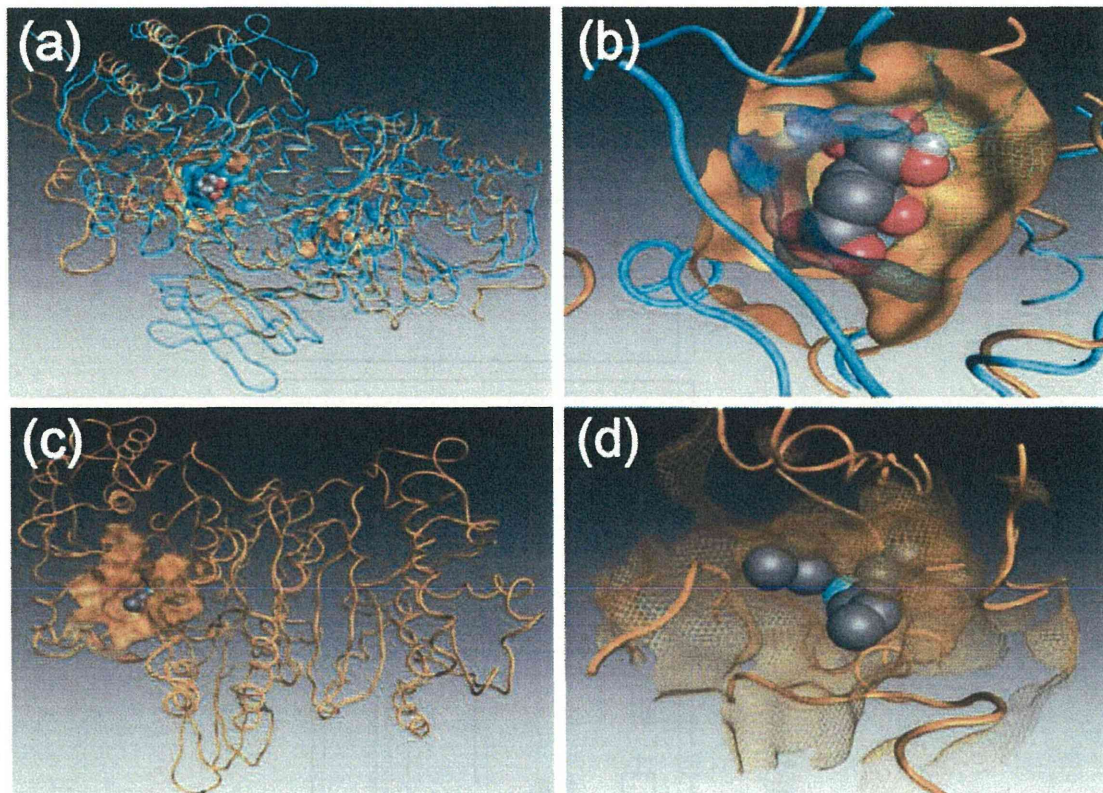


図 4. シミュレーションによる NAD-IDH に対する TBT の作用予測

(A) NAD-IDH の構造。(B) NAD-IDH の酵素活性部位に TBT が作用しているモデル。  
 (C) NADP-IDH の構造。(D) NADP-IDH の酵素活性部位には TBT が入り込むような十分なスペースが認められない。

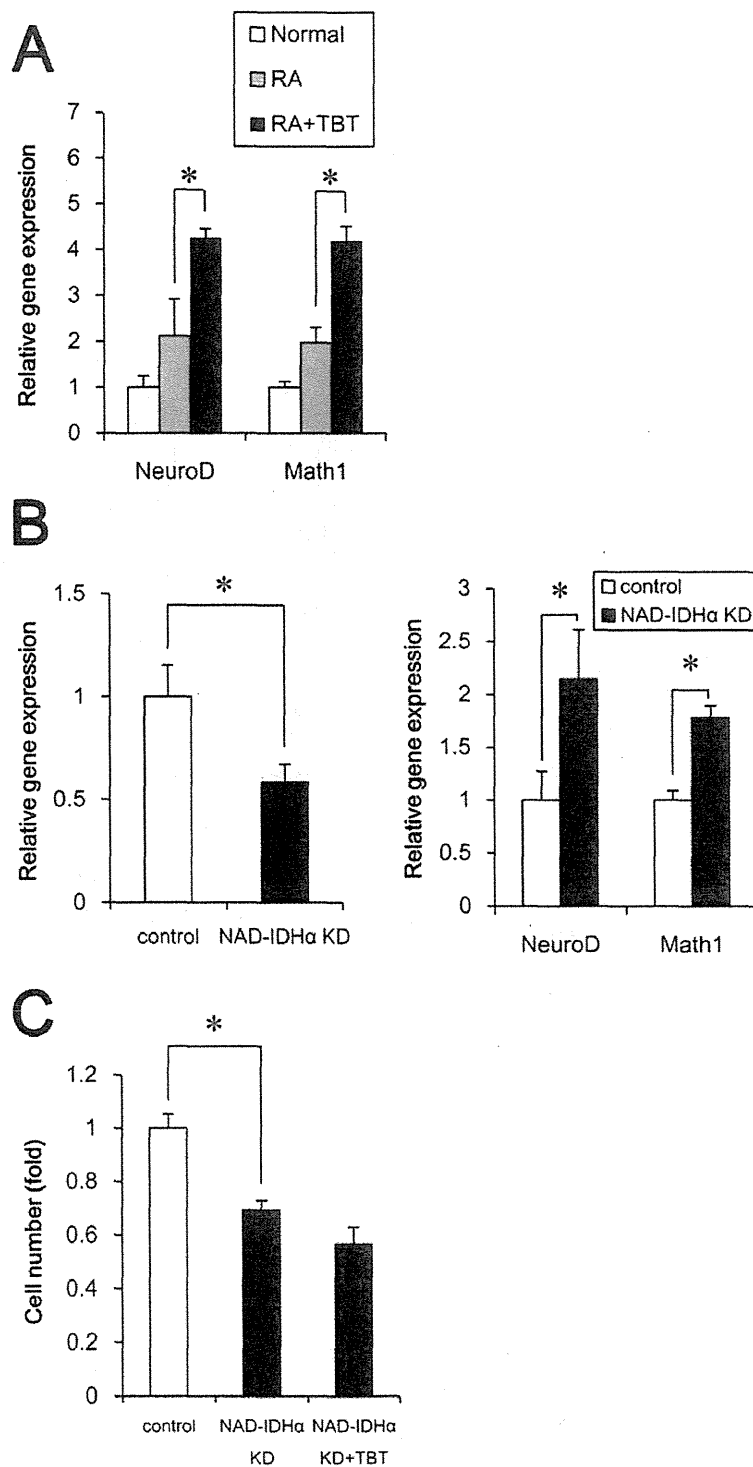


図 5. 神経分化と増殖に対する TBT 曝露および NAD-IDH ノックダウンの影響

(A) レチノイン酸 (RA, 10uM) による神経分化に対する TBT の影響。(B) NAD-IDH  $\alpha$  サブユニットのノックダウンを遺伝子発現により確認した。NAD-IDH のノックダウンにより神経分化マーカーの発現が誘導された。(C) NAD-IDH のノックダウンにより細胞増殖が抑制された。

(\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )

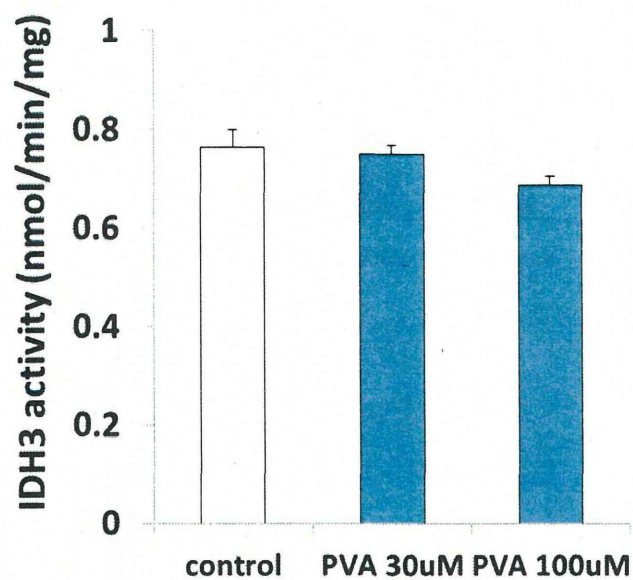


図 6. NAD-IDH 活性に対する VPA の影響

NT2/D1 細胞を VPA (30 あるいは 100uM) で処理後、NAD-IDH 活性を測定した。

## II. 分 担 研 究 報 告

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

|       |                               |
|-------|-------------------------------|
| 研究分担者 | 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第四室長<br>宇佐見 誠 |
| 研究協力者 | 宮島 敦子                         |
| 研究協力者 | 入江 智彦                         |

要旨

ラット神経堤細胞遊走実験法を用いて、発達神経毒性を有するバルプロ酸が神経堤細胞に及ぼす影響を調べた。ラット 10.5 日胚から菱脳部の神経管を摘出して培養し、遊出する神経堤細胞の 48 時間後の広がりから神経堤細胞の遊走を推定した。バルプロ酸の濃度は、ラット全胚培養法において胚毒性を示す濃度(0.6 および 1.2 mM)を用いた。培養 48 時間目からの暴露では、18 時間目に神経管を除去した場合には神経堤細胞の遊走が促進されたが、神経管を除去しない場合には影響は認められなかった。培養開始時からの暴露では、神経管を除去しなくても神経堤細胞の遊走が認められたことなどから、神経管存在下では遊走促進作用がマスクされたと考えられた。細胞遊走に關与する Rho キナーゼである Rock の阻害剤(Rocki)を用いて、バルプロ酸の神経堤細胞遊走促進作用のメカニズムについて検討したところ、神経管を残した場合および除去した場合のいずれにおいても、Rocki とバルプロ酸の相互作用は検出されなかった。以上のように、ラット神経堤細胞遊走実験法により、発達神経毒性を有するバルプロ酸の神経堤細胞遊走促進作用を明らかにすることが出来た。また、培養条件を変えること、およびパスウェイ阻害剤を用いることにより、遊走促進作用のメカニズムについて検討することが出来た。本実験法は、毒性発現メカニズムに基づいた化学物質の発達神経毒性評価法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しているが、その原因として化学物質の関与が指摘されている。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に末梢神経、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。

今年度は、神経系の発生に影響を及ぼすことが知られているバルプロ酸をモデル化学物質として用いて、ラット神経堤細胞遊走実験法の発達神経毒性評価法としての有用性について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 動物

ウィスターラット (Crj: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 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. ラット神経堤細胞の培養

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 時間に化学物質を含む培養液に交換して、48 時間まで培養した。バルプロ酸は、バルプロ酸ナトリウム (Valproic Acid, Sodium Salt, CAS 1069-66-5, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を培養液に溶解および希釈して用いた。

### 3. ラット神経堤細胞の観察

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からのデータは解析から除外した。

### 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. 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。バルプロ酸への暴露には、バルプロ酸ナトリウムをハンクス液に溶解して、培養液であるラット血清に 2%の割合で添加した。発育指標および形態異常発生率の有意差検定には、*t* 検定および Fisher の性格確立検定をそれぞれ用いた。

(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。

## C. 研究結果

### 1. バルプロ酸のラット培養胚に及ぼす影響

バルプロ酸は、統計学的な有意差は認められなかったが、濃度依存的に培養ラット胚の発育を抑制した。1.2 mM ではすべての培養胚に形態異常が認められた (表 1)。これらの形態異常にはバルプロ酸により誘発されることが知られている神経管の異常が含まれていた (図 1)。神経管の異常としては、膨潤

が最も高い発生率で認められた。これらの結果から、ラット神経堤細胞遊走実験では、胚毒性を示す濃度として6および1.2 mMでバルプロ酸を培養液に添加した。

## 2. バルプロ酸のラット神経堤細胞に及ぼす影響

バルプロ酸を培養24時間目に添加して、ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べたところ、最高濃度の1.2 mMにおいても有意な変化は認められなかった(図2A)。しかし、培養18時間目に神経管を除去して神経堤細胞のみで培養した場合には、1.2 mMの(図2B)。

神経堤細胞が遊出していない培養開始時からバルプロ酸を添加した場合には、神経管が存在下で、約13%の遊走促進が認められた(図3)。

## 3. バルプロ酸のラット神経堤細胞遊走促進効果に及ぼすRock阻害剤の影響

細胞遊走に関与するRhoキナーゼであるRockの阻害剤(Rocki)を用いて、バルプロ酸の神経堤細胞遊走促進作用のメカニズムについて検討した(図4)。培養24時間目のRockiの添加により、神経堤細胞の遊走は、神経管がある場合で約80%、神経管がない場合で約90%の、遊走促進作用を惹起した。バルプロ酸を同時に添加した場合には、Rockiを添加していない場合と同様に、神経管がある場合には影響が認められず、神経管がない場合には遊走促進作用が認められた。二元配置分散分析では、神経管を残した場合および除去した場合のいずれにおいても、Rockiとバルプロ酸の相互作用は検出されなかった。

## D. 考察

ラット神経堤細胞遊走実験法により、発達神経毒性を有するバルプロ酸の神経堤細胞遊走促進作用を明らかにした。この遊走促進作用は、培養24時間目からの暴露では、神経管を除去したときにのみに認められたが、培養開始時からの暴露では、神経管を除去しなくても認められたことから、神経管から放出される因子等によるものではないと考えられる。むしろ、神経堤細胞の遊走はコンタクトインヒビションにより制御されること、神経管存在下での培養では細胞密度が高いこと、および細胞遊走による移動距離は神経

管存在下の方が2倍程度大きいことなどから、これらの作用により神経管存在下では遊走促進作用がマスクされたと考えられる。

細胞遊走に関与するRhoキナーゼであるRockの阻害剤を用いた実験では、バルプロ酸による神経堤細胞遊走促進作用に対する効果は認められなかった。二元配置分散分析により、Rockiとバルプロ酸の相互作用は検出されなかったことから、バルプロ酸の神経堤細胞遊走促進作用の発現メカニズムは、Rhoパスウェイを介さない可能性がある。

一方、バルプロ酸の神経堤細胞に及ぼす影響のメカニズムについては、さらに検討する必要がある。本実験法は、細胞数の変動による影響を受けるので、バルプロ酸の神経堤細胞遊走促進作用は、細胞運動の亢進だけではなく、細胞増殖の促進による可能性がある。また、バルプロ酸の神経堤細胞遊走促進作用は、ラット培養胚の神経管に異常を引き起こす濃度において認められたので、神経管異常の発生に関与する可能性がある。今後はさらに、神経堤細胞の増殖に及ぼすバルプロ酸の影響およびバルプロ酸による神経管異常発生に対する抑制効果が知られている葉酸の効果を調べる予定である。

## E. 結論

ラット神経堤細胞遊走実験法により、発達神経毒性を有するバルプロ酸の神経堤細胞遊走促進作用を明らかにすることが出来た。さらに、培養条件を変えること、およびパスウェイ阻害剤を用いることにより、遊走促進作用のメカニズムについて検討することが出来た。本実験法は、毒性発現メカニズムに基づいた化学物質の発達神経毒性評価法として有用であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] Usami M., Mitsunaga K., Irie T., Miyajima A. and Doi O. Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos. *The Journal of Toxicological Sciences* 39: 285–292 (2014).
- [2] Usami M., Mitsunaga K., Irie T. and Nakajima M. Various definitions of reproductive indices: a proposal for combined use of brief definitions. *Congenital Anomalies* 54: 67–68 (2014).

## 2. 学会発表

[1] 宇佐見誠、満長克祥、入江智彦、宮島敦子、土井 守：発生毒性物質がラット神経堤細胞の遊走に及ぼす影響に関する研究、第 53 回日本先天異常学会学術集会、大阪 (2013)

[2] Sunouchi M., Kikura-Hanajiri R., Kojima H., Nakazawa K. and Usami M. Characteristics of drug metabolism-related gene expression in juvenile human hepatocytes 幼若期における薬物代謝酵素関連遺伝子発現の特性、日本薬物動態学会 第 28 回年会、船堀 (2013)

## 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。