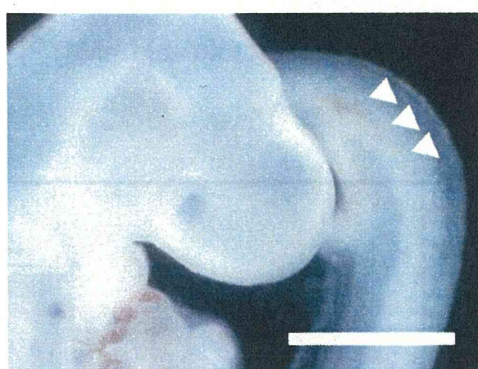


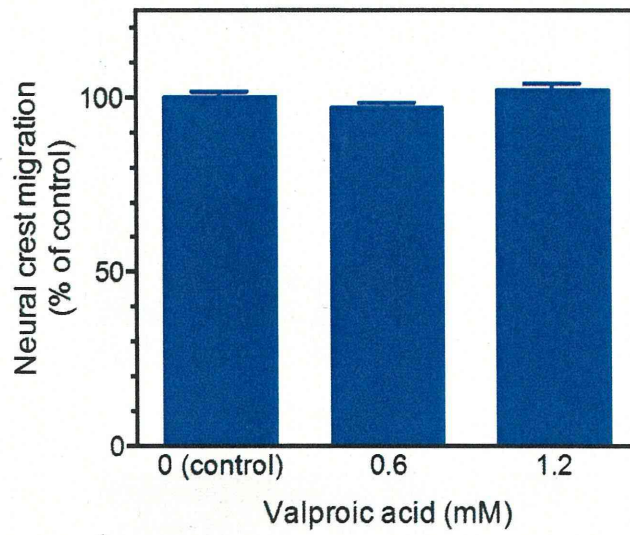
Control



Valproic acid

図1. バルプロ酸(valproic acid)存在下で培養したラット胚における神経管の異常
ラット10.5日胚をバルプロ酸(1.2 mM)の存在下で24時間培養した。白矢頭は神経管の異常(膨隆)がわかりやすい箇所を示す。スケールバーの長さは1 mm。

(A)



(B)

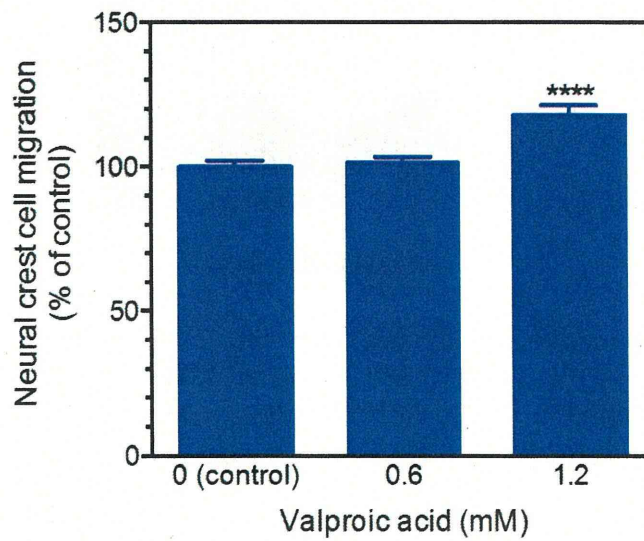


図 2. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすバルプロ酸(valproic acid)の影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養 24 時間目からバルプロ酸を培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。「*」は対照群と比較して統計学的な有意差があることを示す(**** $p < 0.0001$)。 (A)神経管を残したまま培養した。 (B)神経管を培養 18 時間目に除去した。

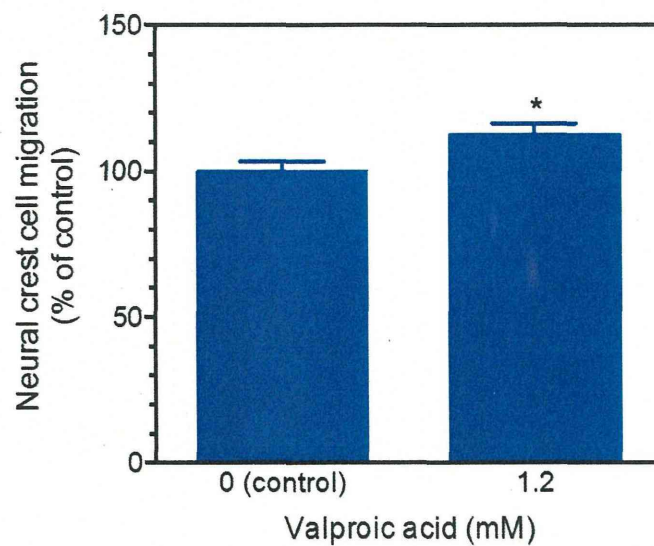


図 3. 培養開始時からのバルプロ酸添加が(valproic acid)ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす影響
ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養開始時からバルプロ酸を培養液に添加して、神経管を残したまま培養した。平均値と標準誤差を示す。「*」は対照群と比較して統計学的な有意差があることを示す(* $p < 0.05$)。

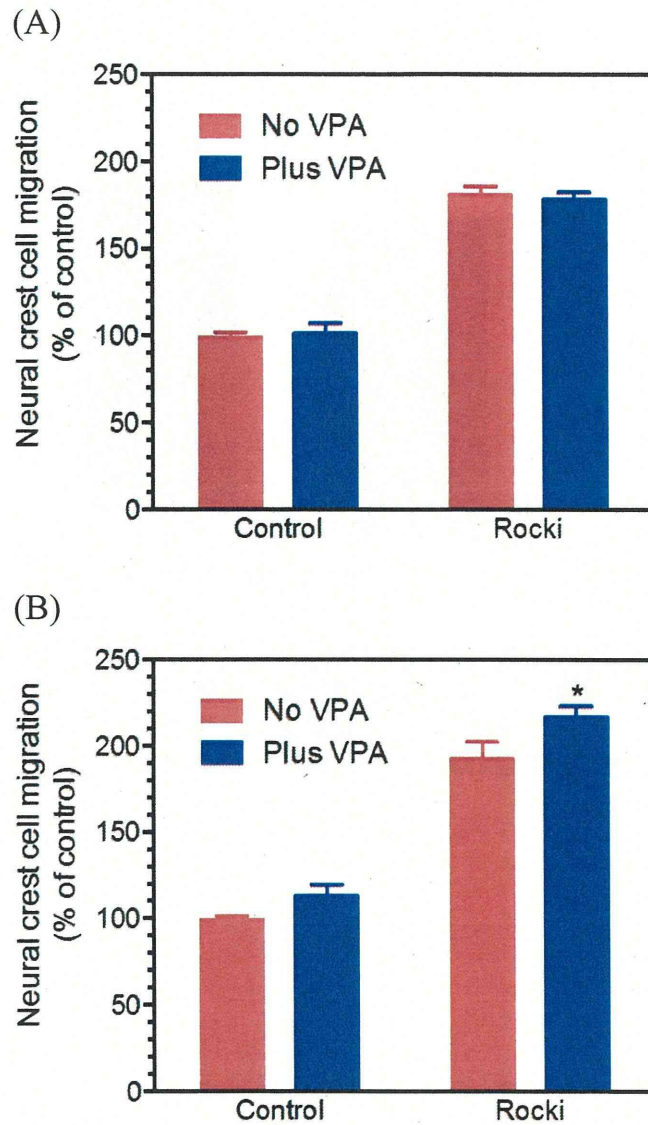


図 4. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすバルプロ酸(VPA)および Rho キナーゼ阻害剤(Rocki)の影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養 24 時間目からバルプロ酸(1.2 mM)および Rho キナーゼ阻害剤を培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。「*」はバルプロ酸非存在下と比較して統計学的な有意差があることを示す(* $p < 0.05$)。(A)神経管を残したまま培養した。(B)神経管を培養 18 時間目に除去した。

表 1. 培養ラット胚の発育に及ぼすバルプロ酸(valproic acid)の影響

	Valproic acid (mM)			
	0 (Control)	0.3	0.6	1.2
No. of embryos	6	6	6	6
No. of viable embryos	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)
Crown-rump length (mm)	4.24 ± 0.27	4.19 ± 0.20	4.15 ± 0.21	3.98 ± 0.31
Head length (mm)	2.34 ± 0.16	2.29 ± 0.16	2.25 ± 0.16	2.10 ± 0.30
No. of somite pairs	27.3 ± 1.03	27.0 ± 0.63	27.2 ± 0.75	26.7 ± 0.82
No. of abnormal embryos	0	3 (50%)	3 (50%)	6 (100%)**
Deformed optic vesicle	0	0	0	6 (100%)**
Deformed otic vesicle	0	1 (16.7%)	1 (16.7%)	3 (50.0%)
Deformed tail	0	1 (16.7%)	0	0
Irregular somites	0	1 (16.7%)	2 (33.3%)	6 (100%)**
Open neural tube	0	0	3 (50.0%)	3 (50.0%)
Swollen neural tube	0	0	2 (33.3%)	6 (100%)**
Zigzag neural tube	0	2 (33.3%)	0	5 (83.3%)*

ラット 10.5 日胚をバルプロ酸存在下で 24 時間、回転培養した。発育の指標は、平均値±標準偏差をしめす。形態異常は、胚数および発生率を示す。「*」は対照群と比較して統計学的な有意差があることを示す(* p < 0.05; ** p < 0.01)。

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

発達成長期神経系細胞新生への化学物質の影響評価

研究分担者

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長
佐藤 薫

要旨

前脳矢状面切片培養系を用いて、バルプロ酸（valproic acid: VPA）の生後初期オリゴデンドロサイト分化・遊走に対する影響評価を行った。VPA が生後初期脳室下帯（subventricular zone: SVZ）の新生細胞数を非特異的に増加させる事を見いだした。また、VPA が遊走中細胞の突起伸張を促進する可能性を見いだした。この突起伸張作用にヒストン脱アセチル化酵素（histone deacetylase: HDAC）阻害作用が関与していることが示唆された。HDAC 阻害作用のある化合物が、生後初期神経系の新生細胞の遊走と分化に対してリスクを持つことが示された。

A. 研究目的

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、子どもの健康を守るためにも簡便かつ低コストの試験法＝in vitro 実験系を開発する必要がある。

中枢神経系においてミエリン鞘を形成するオリゴデンドロサイト細胞は、生後初期のみ新生が起こる。そのため、幼児期の抗がん剤使用は重篤な知能障害を引き起こすことが知られており、現在では幼児期の使用は禁忌となっている。従って、この時期のオリゴデンドロサイト新生における化学物質リスクを明らかにすることは大変重要であり、このための in vitro 評価系確立が急がれる。

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、生後 2-3 日齢の前脳矢状面切片培養系の脳室下帯（sub ventricular zone: SVZ）に含まれる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）によりピンポイントで標識し、免疫組織化学的検討と組み合わせることによりオリゴデンドロサイト分化・オリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走に対する化学物質の影響を評価

可能とした。本年度は、この技術を用いて、班員共通の標的化合物であるバルプロ酸（valproic acid: VPA）のオリゴデンドロサイト分化・遊走に対する影響評価を行った。

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 μm）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 ピンポイントで滴下することにより、局所的に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。

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）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）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

ピンポイントでeGFPで標識された神経幹細胞および神経系前駆細胞をSVZに持つ前脳矢状面切片をVPA(120 μM, 1.2 mM)、trichostatin A (TSA) (10 nM-1 μM)、valpromide (VPM) (120 μM, 1.2 mM)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。

(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 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対するVPAの影響

SVZ中、ピンポイントにeGFP標識された新生細胞群(神経幹細胞および前駆細胞)を含む培養前脳矢状面切片をVPA(120 μM, 1.2 mM)処理したところ(3日間)、図1のような結果となった。図1AはeGFP(+)新生細胞(緑色)およびO1(+)オリゴデンドロサイト前駆細胞(赤)、eGFP(+)新生細胞のうちO1(+)オリゴデンドロサイト前駆細胞に分化したeGFP(+)O1(+)細胞(黄色)の培養前脳矢状面切片中の分布を示す。eGFP(+)細胞、eGFP(+)O1(+)細胞の遊走範囲はVPA 1.2 mMにおいて増加傾向が見られた(図1A)。興味深いことに、eGFP(+)細胞数はVPAによって濃度依存的に増加した(図1B、黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+)細胞数もVPAによって濃度依存的に増加した(図1B、黄色カラム)。eGFP(+)細胞中のeGFP(+)O1(+)細胞の割合を計測したところ、VPAによって影響を受けていなかった(図1C)。

VPAは遊走中細胞の形態に大きな影響を与えることを見いだした(図2)。コントロ

ール群では、遊走中細胞の突起は短く、円形に近いものも多数見受けられるが、1.2 mM VPA処理群では、観察したほぼ全ての細胞で突起伸張が促進されていた。

2 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対するTSAの影響

VPAはヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase: HDAC)阻害作用が有名である(J.Biol.Chem. 276, 36734-, 2001)。そこで、HDAC阻害作用と1.で得られたVPAの作用との関連について、より強力なHDAC inhibitorであるTSAを用いて検討した。eGFP標識された新生細胞群(神経幹細胞および前駆細胞)を含む培養前脳矢状面切片をTSA処理した(10 nM-1 μM)(3日間)。eGFP(+)細胞、eGFP(+)O1(+)細胞の遊走範囲はTSA 10 nMでは増加傾向にあり、1 mMでは減少傾向にあった(図3A)。10 nMでeGFP(+)細胞数およびeGFP(+)O1(+)細胞数を増加させる傾向が見られたが有意な差には至らなかった(図3B)。100 nM以上の濃度では、逆に減少させる傾向が見られ、1 μMにおいては有意な減少が見られた。eGFP(+)細胞中のeGFP(+)O1(+)細胞の割合を計測したところ、TSAによって影響を受けていなかった(図3C)。

大変興味深いことに、TSAも遊走中細胞の形態に大きな影響を与えることを見いだした(図4)。コントロール群では、遊走中細胞の突起は短く、ほぼ全ての細胞が円形であったが、100 nM TSA処理群では観察したほぼ全ての細胞で突起伸張が促進されていた。遊走中細胞の突起伸張にHDAC阻害作用が関連していることが示唆された。

3 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対するVPMの影響

VPAの作用とHDAC阻害作用との関連についてさらに確認するため、HDAC阻害作用をもたないVPAアナログであるVPMを用いて検討した。eGFP標識された新生細胞群(神経幹細胞および前駆細胞)を含む培養前脳矢状面切片をVPM(120 μM-1.2 mM)処理した(3日間)。eGFP(+)細胞、eGFP(+)O1(+)細胞の遊走範囲はVPAによってほとんど変化しなかったが、1.2 mMにおいて増加傾向が見られた(図5A)。eGFP(+)細胞数はVPMによってほとんど影響を受けなかった。1.2

mM においてわずかな増加傾向を示したが、有意差には至らなかった (図 5B、黄土色カラム)。eGFP(+)/O1(+) 細胞数もほとんど影響を受けなかった (図 5B、黄色カラム)。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)/O1(+) 細胞の割合を計測したところ、VPM によって影響を受けていなかった (図 5C)。

VPM は遊走中細胞の形態にほとんど影響を与えなかった (図 6)。コントロール群、1.2 mM VPM 処理群ともに、遊走中の細胞の突起は短く、円形に近いものが多数見受けられた。

D. 考察

VPA は HDAC 阻害剤 (IC₅₀ = 400 μM) として抗がん作用、抗炎症作用、神経保護作用などを持つ (J.Biol.Chem. 276, 36734-, 2001)。また、GABA トランスアミナーゼ阻害作用があり、GABA レベルを上昇させるため抗てんかん作用もある。NMDA 受容体、Na⁺ チャンネルを阻害することも報告されている (Folia Biologica 53, 37-, 2007)。さらに、Aβ 生成も阻害する (J.Exp.Med. 205, 2781-, 2008)。このように VPA は非常に多くの生体内分子と相互作用する薬剤であるが、現在は HDAC 阻害剤として実験的に広く使われる様になっている。

本研究において、VPA は生後初期 SVZ の新生細胞数 (eGFP(+) 細胞) を増加させたが、オリゴデンドロサイト前駆細胞数

(eGFP(+)/O1(+) 細胞数) の新生細胞中の割合に変化はなかった。この結果は VPA による eGFP(+) 細胞数増加は分裂細胞全体に対する作用であり、ある細胞種が特異的に影響を受けているわけではないことを示している。このような有意な新生細胞数の増加は HDAC 阻害剤である TSA, HDAC 阻害作用のない VPA アナログである VPM でも見られなかった。従って、VPA の持つ多くの作用メカニズムの内、HDAC 阻害、GABA、Na⁺ チャンネルへの影響以外のメカニズムが関与していることが示唆される。

VPA は遊走中細胞の形態に大きな影響を与えることを見いだした。ほぼ全ての細胞で突起の伸張が促進されていた。同様の突起伸張促進作用は TSA 適用によっても見受けられたが、VPM 適用によっては引き起こされなかった。以上のことから、VPA の突起伸張促進作用は HDAC 阻害作用が関連している

ことが示唆される。今後はこの突起伸張促進作用が現れる細胞種を特定する必要がある。これまで、HDAC と細胞の突起伸張との関連についてはほとんど報告がない。しかし、HDAC の細胞骨格系との相互作用については tubulin 系 (PLoS One. 2011, 6(6), e20696, 2011)、actin 系 (FASEB J. 19(8), 966-8, 2005) ともに報告がある。標的となっている分子およびメカニズムの解明についてはさらなる検討が必要である。また、幼弱脳では epigenetic control が成熟脳よりもかかりやすいという報告もある (Nat Neurosci, 11(9), 1024-34, 2008)。今回見られた、HDAC 阻害剤による突起伸張促進作用についても、年齢依存性を検討する必要がある。

E. 結論

VPA が生後初期 SVZ の新生細胞数を非特異的に増加させる事を見いだした。また、VPA が遊走中細胞の突起伸張を促進することを見いだした。この突起伸張促進作用に HDAC 阻害作用が関与していることが示唆された。HDAC 阻害作用のある化合物が、生後初期神経系の新生細胞の遊走と分化に対してリスクを持つことが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Shigemoto-Mogami Y., Hoshikawa K., Goldman J., Sekino Y. and Sato K. Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 34(5): 2231-2243 (2014).
- [2] Takahashi K., Ishii-Nozawa R., Takeuchi K., Nakazawa K., Sekino Y. and Sato K. Niflumic acid activates additional currents of the human glial L-glutamate transporter EAAT1 in a substrate-dependent manner. *Biol Pharm Bull* 36(12): 1996-2004 (2013).
- [3] Oguchi-Katayama A., Monma A., Sekino Y., Moriguchi T. and Sato K. Comparative gene expression analysis of the amygdalae of juvenile rats exposed to valproic acid at prenatal and postnatal stages. *J Toxicol Sci* 38(3): 381-402 (2013).
- [4] Kinoshita M., Nasu-Tada K., Fujishita K.,

Sato K. and Koizumi S. Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of Tonic P2Y14-receptor-mediated signal(s). *Cell Mol Neurobiol* 33 (1): 47-58 (2013).

2. 学会発表

国内学会

- [1] 佐藤 薫、関野祐子：化学物質が生後初期神経・グリア新生に及ぼす影響を簡便に検討するための in vitro 評価系の開発、日本薬学会 第 134 年会、熊本 (2014)
- [2] 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を用いた神経毒性評価系の構築、日本薬学会 第 134 年会、熊本 (2014)
- [3] 片山敦子、門馬彰彦、秋友孝文、虞末愛、星裕姫乃、守口徹、関野祐子、佐藤 薫：胎生期および新生期の化学物質暴露の情緒社会性への影響を予測する、遺伝子発現解析に基づく新規評価手法の開発、日本薬学会 第 134 年会、熊本 (2014)
- [4] 最上(重本)由香里、干川和枝、関野祐子、佐藤 薫：ミクログリアによる血液脳関門の機能制御機構の解明、日本薬学会 第 134 年会、熊本 (2014)
- [5] 笠原由香、三浦真理恵、最上(重本)由香里、関野祐子、佐藤 薫、鈴木岳之：抗うつ薬と P2X4 受容体の相互作用の比較検討、日本薬学会 第 134 年会、熊本 (2014)
- [6] 佐藤 薫：ミクログリアの病理的新機能と生理的新機能一極性からみた神経疾患治療の可能性、第 87 回日本薬理学会年会シンポジウム「ニューロン・グリア連関から紐解く神経疾患」、仙台 (2014)
- [7] 大原由貴、山崎博幸、大津真生、佐藤 薫、関野祐子、白尾智明：ヒト iPS 細胞由来神経細胞の発達に関する研究、第 91 回日本生理学会大会、鹿児島 (2014)
- [8] 佐藤 薫：ヒト iPS 細胞由来神経細胞に期待すること、4 社共催：ヒト iPS 細胞由来神経ワークショップ (講演)、横浜 (2014)
- [9] 佐藤 薫：hiPSC-ニューロンで神経特異的有害反応は予測可能か、公開シンポジウム ヒト iPS 細胞の創薬プロセスへの応用～国際情勢を見据えた新規試験法開発を目指して～、東京 (2014)
- [10] Takahashi K., Shigemoto-Mogami Y., Ohtsu K., Okada Y., Okano H., Sekino Y. and Sato K.: An attempt to establish the neurotoxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons, the 7th Takeda science foundation symposium on pharmasciences 'iPS Cells in drug discovery and development', 大阪 (2014)
- [11] 佐藤 薫、高橋華奈子、重本一最上 由香里、大津香苗、岡田洋平、岡野栄之、関野祐子：ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた神経毒性評価系確立の試み、第 22 回日本バイオイメーキング学会、東京 (2013)
- [12] Sato K., Fujimori K., Takaki J., Suzuki T. and Sekino Y.: P2X4 receptor-mediated acceleration of microglial activation is important for the L-glutamate release from activated microglia in the early stage of inflammation, Neuro2013、京都 (2013)
- [13] Shigemoto-Mogami Y., Hoshikawa K., Miura M., Sekino Y. and Sato K.: Development of in vitro blood-brain barrier model reflecting the function of neurovascular unit, Neuro2013、京都 (2013)
- [14] Takahashi K., Irie T., Sekino Y. and Sato K.: The function of glial excitatory amino-acid transporter EAAT2 is enhanced by docosahexanoic acid, Neuro2013、京都 (2013)
- [15] Ohtsu K., Takahashi K., Shigemoto-Mogami Y., Okada Y., Okano H., Sato K. and Sekino Y.: An Attempt to develop a neurotoxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons vulnerable to excitotoxicity, Neuro2013、京都 (2013)
- [16] Hoshikawa K., Shigemoto-Mogami Y., Ohno Y., Goldman J.E., Sekino Y. and Sato K.: Activated microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis via inflammatory cytokines, Neuro2013、京都 (2013)
- [17] Katayama A, Monma A, Akitomo K, Hirosue M, Hoshi Y, Moriguchi T, Sekino Y, Sato K: Search for genetic markers for the risk of the postnatal exposure to chemical compounds in emotion and social behavior after maturation, Neuro2013、(京都) (2013)

- [18] 関野祐子、大原由香、佐藤 薫、高橋華奈子、山崎博幸、白尾智明: iPS 細胞由来分化細胞の生理機能を確認するための実験プロトコール作成の試み、第 6 回上肢の神経機能回復セミナー、秋田 (2013)

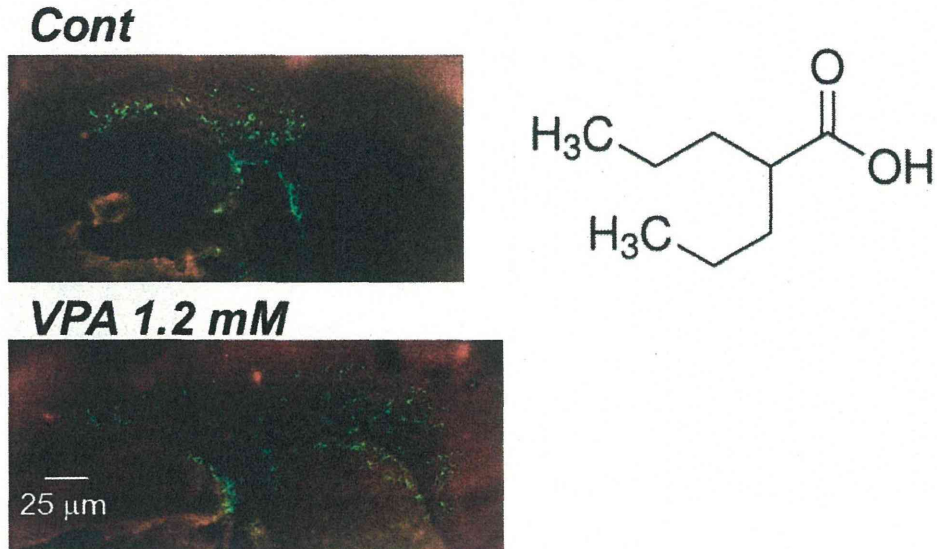
国際学会

- [1] Sato K, Shigemoto-Mogami Y, Goldman JE, Sekino Y: The role of microglia in neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. SfN2013 (2013. 11) (San Diego, USA)
- [2] Ohara Y, Yamazaki H, Sato K, Shirao T, Sekino Y: Morphological development and expression of synaptic proteins of human iPSC-derived neurons. SfN2013 (2013. 11) (San Diego, USA)
- [3] Sato K, Takaki J, Fujimori K, Miura M, Suzuki T, Sekino Y: L-Glutamate released from activated microglia down regulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. ISN-ASN 2013 (2013. 4) (Cancun, Mexico)
- [4] Sato K, Takaki J, Fujimori K, Miura M, Suzuki T, Sekino Y: L-Glutamate released from activated microglia down regulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation. ISN-ASN 2013 satellite meeting (2013. 4) (Merida, Mexico)
- [5] Sekino Y., Takahashi K., Mogami-Shigemoto Y., Ohtsu K., Okada Y., Okano H. and Sato K.: Calcium signalling of human iPSC-derived neurons responding to ATP and L-glutamate stimulation. ISN-ASN 2013 (2013. 4) (Cancun, Mexico)
- [6] Sekino Y., Takahashi K., Mogami-Shigemoto Y., Ohtsu K., Okada Y., Okano H. and Sato K.: Calcium imaging of responses to ATP and L-glutamate stimulation of human iPSC-derived neurons. ISN-ASN 2013 satellite meeting (2013. 4) (Playa del Carmen, Mexico)

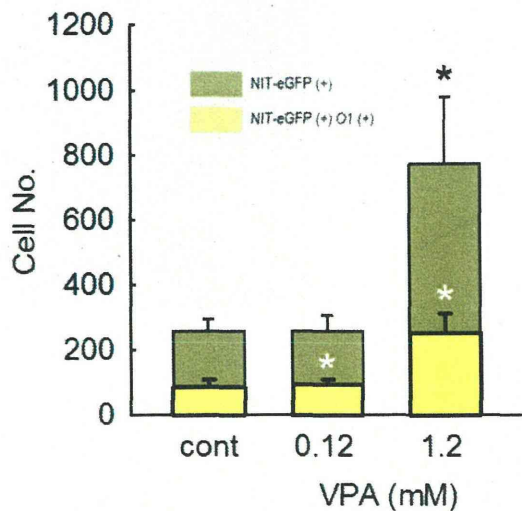
H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

A



B



C

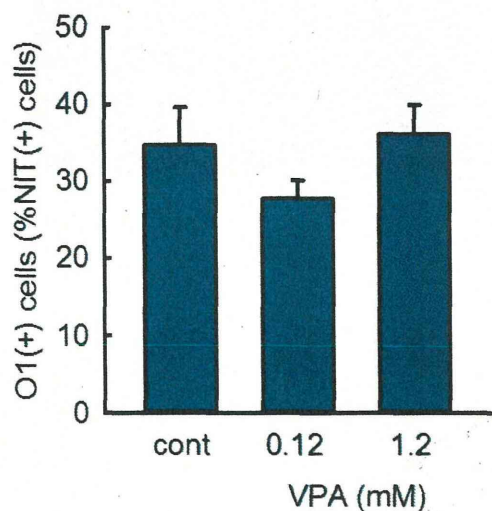


図 1. 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対する VPA の影響
 SVZ 中、ピンポイントに eGFP 標識された新生細胞群 (神経幹細胞および前駆細胞) を含む培養前脳矢状面切片を VPA (120 μM, 1.2 mM) 処理した (3 日間)。A: eGFP(+) 新生細胞 (緑色) O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (赤)。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は 1.2 mM において増加傾向が見られた。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数。eGFP(+) 細胞数は VPA によって濃度依存的に増加した (黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+) 細胞数も VPA によって濃度依存的に増加した (図 1B、黄色カラム)。C: eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合は VPA によって影響を受けていなかった。*: $p < 0.05$, Tukey's test following ANOVA, $N=4$.

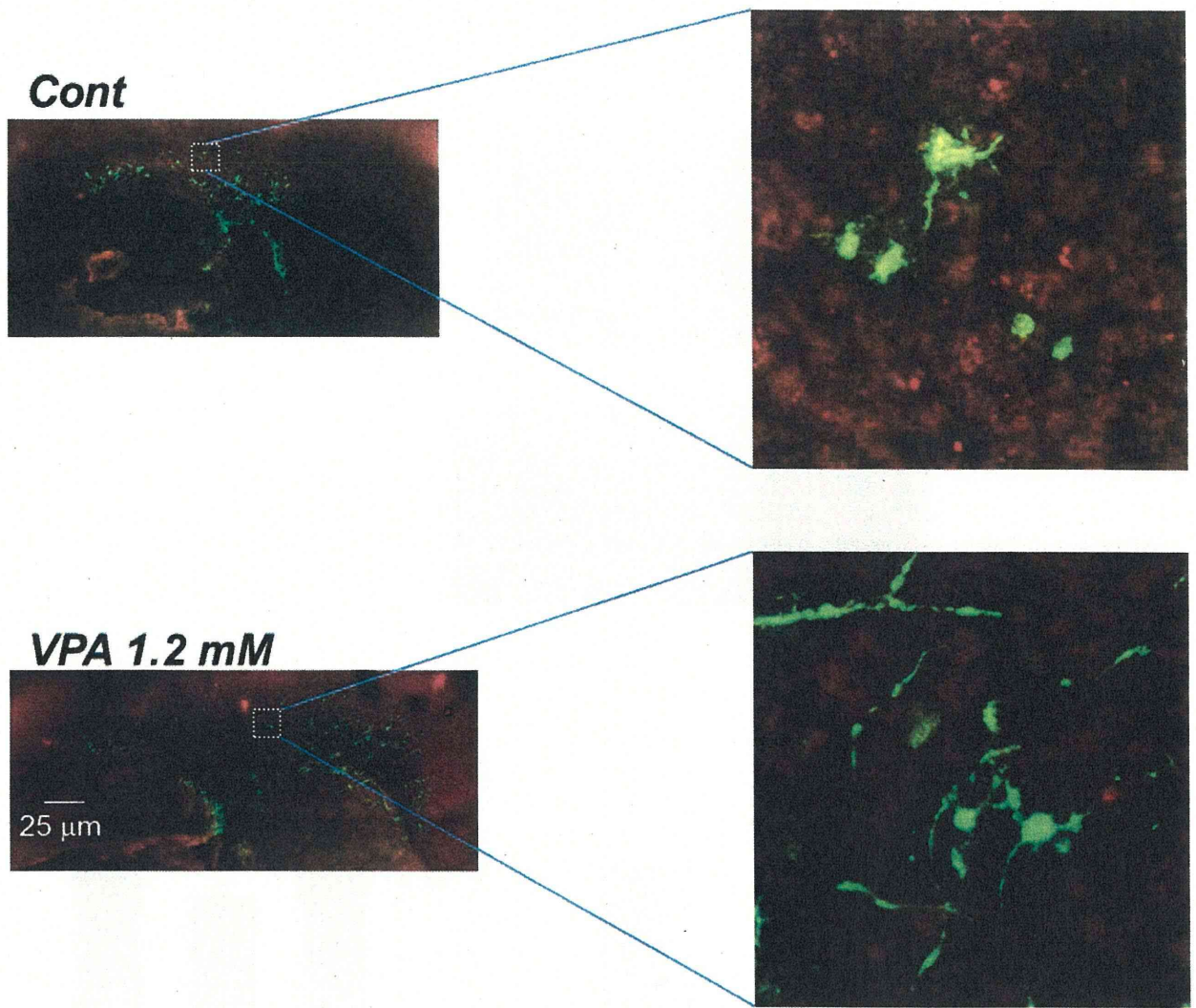


図 2. 遊走中細胞の形態に対する VPA の影響
コントロール群では、遊走中の細胞の突起は短く、円形に近いものも多数見受けられるが、VPA 処理群では、観察したほぼ全ての細胞で突起伸張が促進されていた。

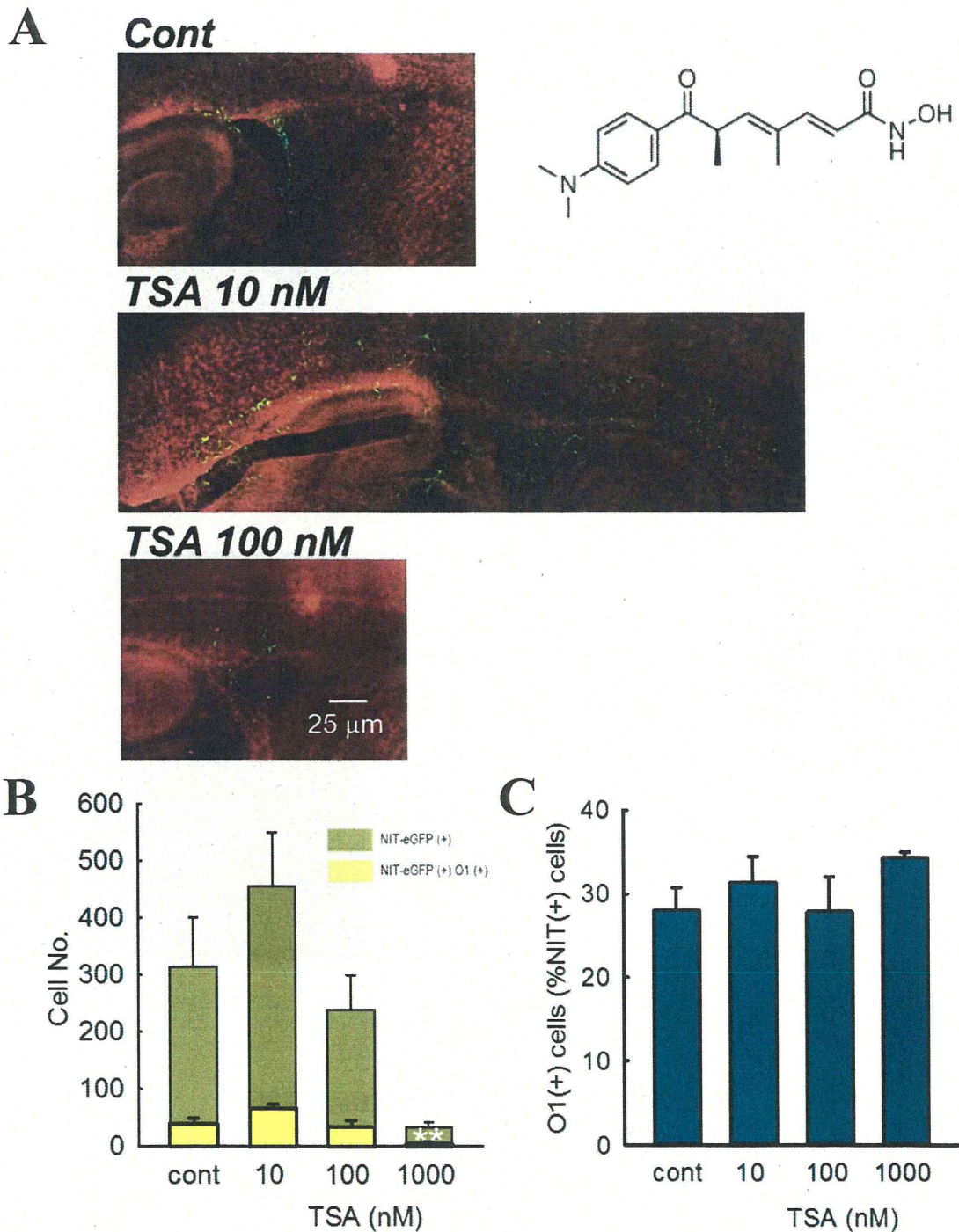


図3. 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対する TSA の影響
 eGFP 標識された新生細胞群（神経幹細胞および前駆細胞）を含む培養前脳矢状面切片を VPA (10 nM-1 μM) 処理した (3 日間)。A: eGFP(+) 新生細胞 (緑色) O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (赤)。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は TSA 10 nM では増加傾向にあり、1 mM では減少傾向にあった。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数 (黄土色カラム) および eGFP(+)O1(+) 細胞数 (黄色カラム)。10 nM で eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数を増加させる傾向が見られた。100 nM 以上の濃度では、逆に減少させる傾向が見られた。C: eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合は TSA によって影響を受けていなかった。**: $p < 0.01$, Tukey's test following ANOVA, $N=4$.

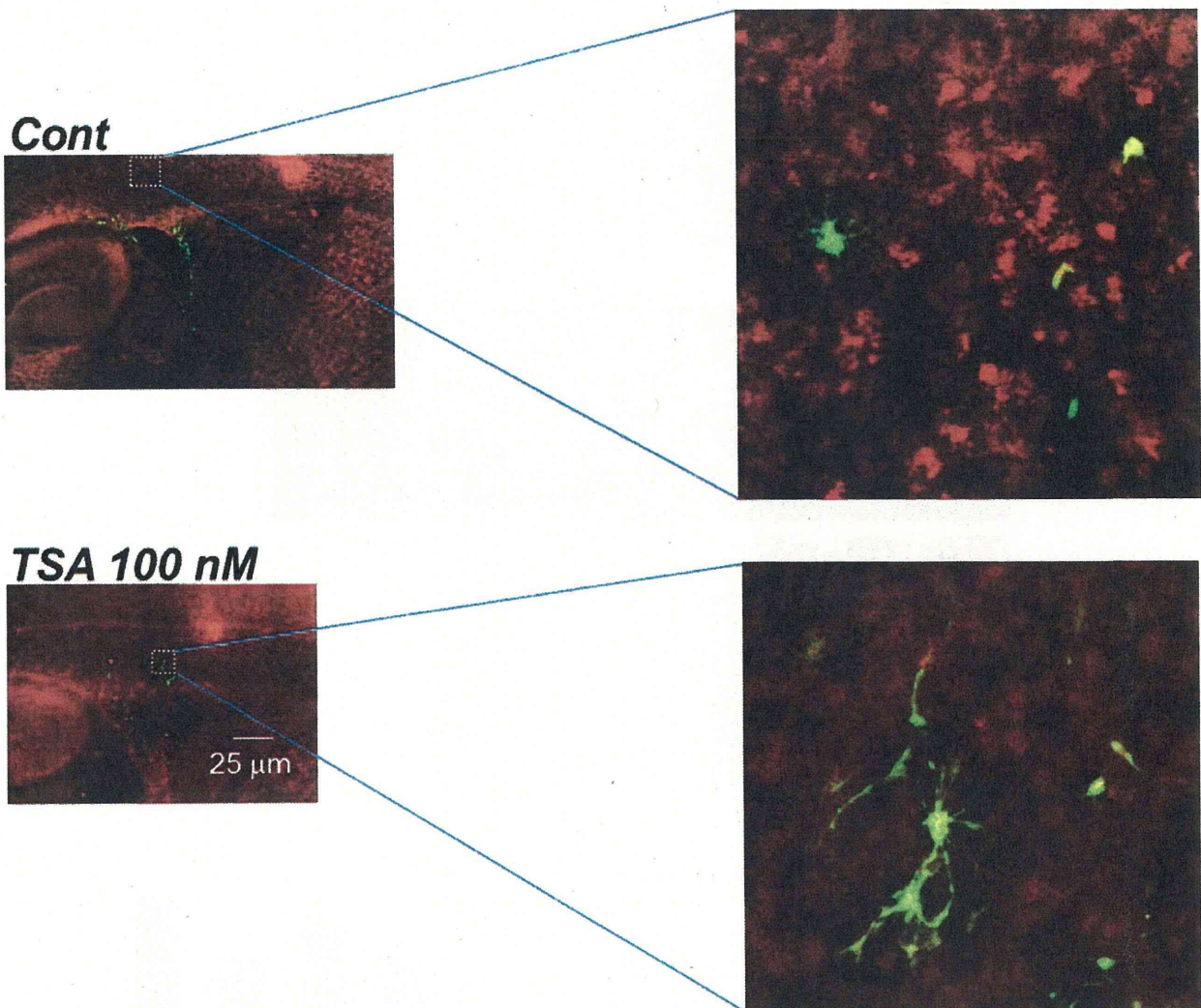


図 4. 遊走中細胞の形態に対する TSA の影響

コントロール群では、遊走中の細胞の突起は短く、円形に近いものも多数見受けられるが、TSA 処理群では、観察したほぼ全ての細胞で突起伸張が促進されていた。

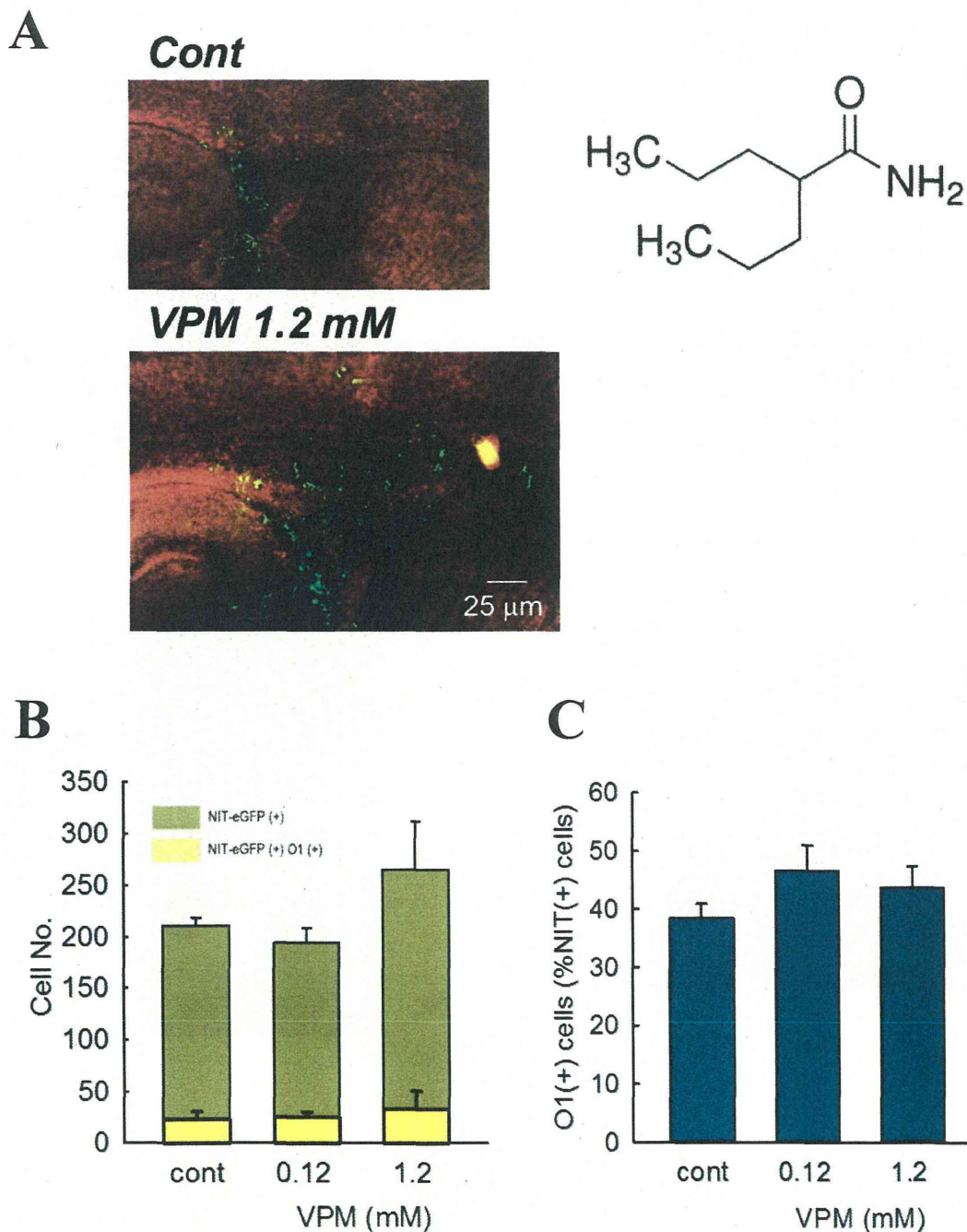


図 5. 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対する VPM の影響
 GFP 標識された新生細胞群（神経幹細胞および前駆細胞）を含む培養前脳矢状面切片を VPM (120 μM, 1.2 mM) 処理した (3 日間)。A: eGFP(+) 新生細胞 (緑色) O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (赤)。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は VPA によってほとんど変化しなかったが、1.2 mM において増加傾向が見られた。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数。eGFP(+) 細胞数は VPM によってほとんど影響を受けなかった。(黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+) 細胞数もほとんど影響を受けなかった (黄色カラム)。C: eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合は VPM によって影響を受けていなかった。*: p<0.05, Tukey's test following ANOVA, N=4.

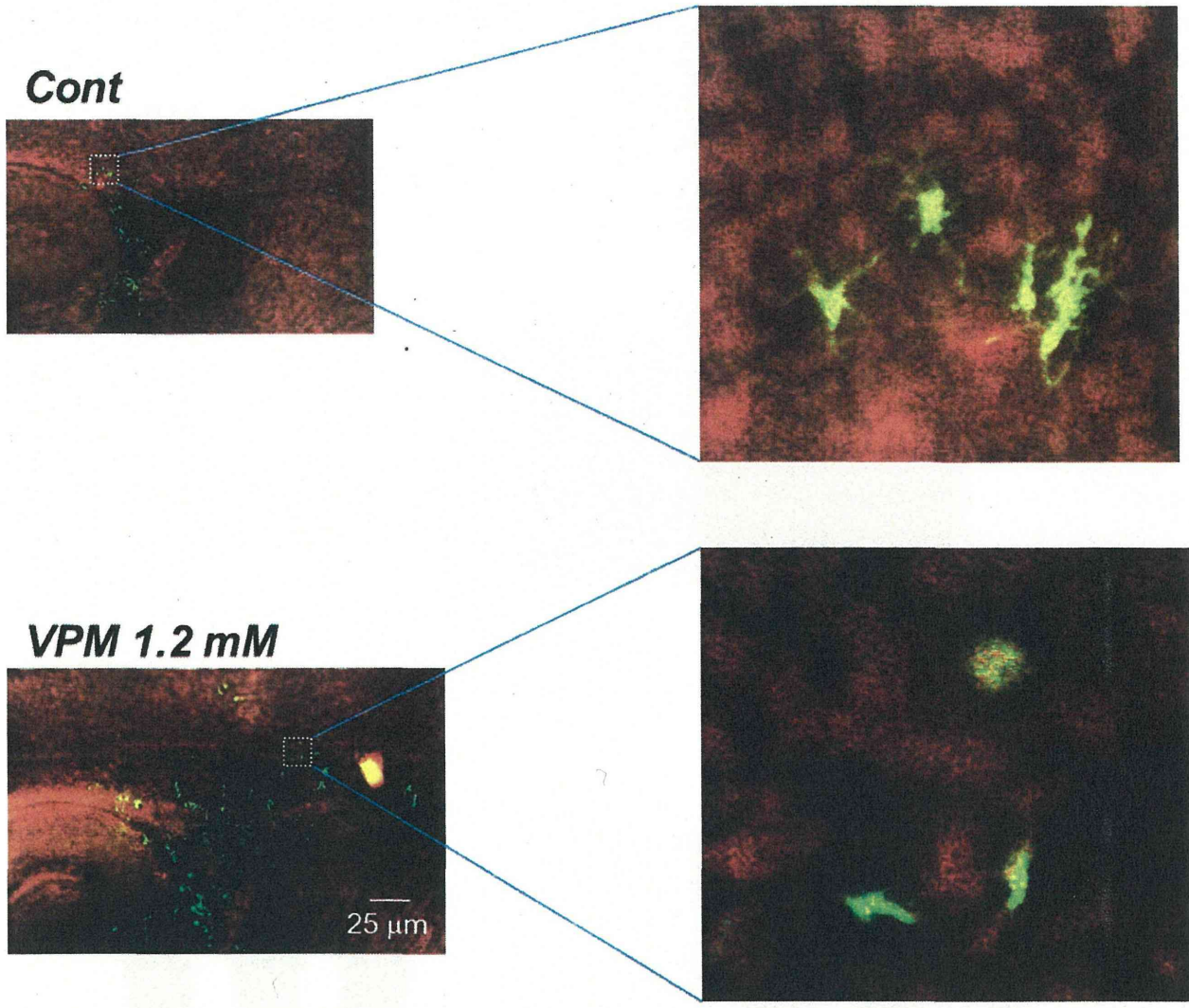


図 6. 遊走中細胞の形態に対する VPM の影響

コントロール群では、遊走中の細胞の突起は短く、円形に近いものも多数見受けられた。VPM 処理群はこれらの形態にほとんど影響を与えなかった。

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

生後神経回路の機能的影響評価指標に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長
関野 祐子
研究協力者 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系
吉田 祥子

要旨

本研究において、研究班共通の化学物質であるバルプロ酸を用いて、生後の神経回路発達の変化を伝達物質放出分布の変化として捉えることに成功した。これらの結果から、神経発達の早期化が脳の高次機能にも影響しているものと考えられる。今後、バルプロ酸の濃度、投与方法を検討するとともに、他の化学物質を用いて小脳皮質での伝達物質放出に与える影響を検討することにより、新たな化学物質の毒性評価法の構築につなげる予定である。

A. 研究目的

バルプロ酸（VPA）投与による神経回路発達の変化を発生初期の小脳回路を用いて検討するために、酵素を利用した光測定法によって、小脳皮質からの伝達物質グルタミン酸、 γ -アミノ酪酸（GABA）およびATPの放出変化を観察した。同時に免疫組織化学的手法により、神経の形態的变化を観察した。

B. 研究方法

研究試料として、発達期小脳を用いた。ほ乳類の小脳は深い脳溝によって大脳に匹敵する広大な表面積をもち、5種の神経細胞が一定の様式で層状に配列し小脳皮質を形成する。小脳の発生過程では、GABA作動性神経細胞であるプルキンエ細胞、ゴルジ細胞、バスケット細胞、星状細胞がすべて脳室帯（ventricular zone）で発生し、小脳板表面に順次整列する。唯一のグルタミン酸作動性神経細胞である顆粒細胞は胎生期の菱脳唇で発生し、未分化な状態で小脳板表面に遊走し、

小脳皮質の最表面に未分化細胞の層である外顆粒層（external granular layer; EGL）を形成する。これらの神経細胞の発生には、いくつかの特異的な遺伝子の発現が必要であることが示唆される。出生時のラット・マウスの小脳は、外顆粒層と未発達のプルキンエ細胞層（Purkinje cell layer; PL）から構成されるが、生後約2週間かけて顆粒細胞が分裂・分化しプルキンエ細胞下に遊走して内顆粒層（internal granular layer; IGL）を形成、同時にプルキンエ細胞は樹状突起を伸長させ、顆粒細胞および脳室帯から遊走してくるゴルジ細胞、バスケット細胞、星状細胞と神経回路を構成して皮質表面に分子層（molecular layer; ML）を形成し、成熟した小脳の3層構造をかたち作る（図1。P:プルキンエ細胞、Gra:顆粒細胞、B:バスケット細胞、S:星状細胞、Go:ゴルジ細胞、Ba:バークマンングリア）。

GABAは脳の主要な抑制性神経伝達物質で

あり、また幼弱な神経や損傷した神経では興奮性の伝達物質として働く。GABA 受容体の阻害剤を用いた研究から、神経発生過程で GABA が増殖刺激や神経細胞の遊走制御、神経細胞の成熟促進などの多様な働きを持つことが示唆されている。小脳発生においても GABA が重要な分子であることが示唆されていたが、出生直後の小脳では GABA 作動性神経細胞は未発達で、顆粒細胞が増殖・分化する外顆粒層にはほとんど分布していない。GABA 放出分布を可視化する技術の開発が急務だった。

本研究での GABA 放出分布は、研究者らが開発したガラス表面に固定化した GABA 分解酵素 (GABase) を用いた蛍光測定法を使用した。GABase は GABA 転移酵素とコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素の複合体で、補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP⁺) 存在下で GABA を異化し、コハク酸とグルタミン酸に分解する。このとき同時に、NADP⁺ は NADPH になり、360 nm 近辺の励起光により、480 nm の蛍光を発する (図 2)。この蛍光によって、GABA 放出を間接的に光学測定することができる。発生過程の小脳皮質からの GABA 放出を観察したところ、出生直後の外顆粒層からの GABA 放出が観察された。この層には GABA 作動性神経細胞が殆ど分布しておらず、非神経性の GABA 放出であることが示唆された。外顆粒層からの GABA 放出は生後 1 週間程度続き、バスケット細胞・星状細胞が分布して神経性の GABA 放出が始まると消失することが観察された。同様に、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) を用いてグルタミン酸を測定した。

本研究ではさらに、ATP を基質とするグリ

セルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素を用いて ATP の放出分布を可視化した (図表 3, 論文発表 [1])。ATP はシナプス形成のシグナルとして働いていると考えられており、ATP 受容体を阻害することで神経回路発達が抑制されるが、ATP 放出を可視化する手法は今までほとんどなかった。上記の方法で ATP の放出分布を観察すると、生後 10 日で急激にグルタミン酸刺激性の ATP 放出が増加することが観察される。

これらの伝達物質の可視化は、ガラス導波路表面に固定化した酵素の光反応を用いて行った (図 4)。光源は UV-LED とし、高感度 CCD (ORCA-ER, Hamamatsu) を用いて観察した。

VPA による神経回路発達の変化がこれらの伝達物質放出と小脳分化に与える影響を調べるために、妊娠 16 日から 19 日のラット腹腔内に 600 mg/kg の VPA を投与した。生まれたラットを生後 5 日 (P5)、P6、P8、P10、2 週間において小脳スライス標本を作製し、伝達物質放出分布を光学測定した。同時に、免疫組織化学染色を行った。さらに、VPA と類似の細胞内反応を引き起こすことが報告されているヒドロキサミン酸サブエロイルアニリド (SAHA) の腹腔内投与を行い、その影響を見た (図 5)。

C. 研究結果

ラット発達期小脳からの GABA 放出は、生後 1 週間で最大値に達した後減少し、また増加する。これは、グリア生 GABA 放出から神経細胞性 GABA 放出への転換と考えられるが、VPA 投与ラットでは、対照動物と比べ GABA が小脳皮質全体から放出され続けることが観察さ

れた(図6、学会発表[1])。グルタミン酸放出においては、大きな差異は観察されなかった(図7)。

グルタミン酸刺激性ATP放出には、著しい差異が観察された。対照動物では生後10日頃急激に増加するATP放出が、VPA投与動物では生後6日ごろから始まり、特に内顆粒層で大きく増加することが観察された(図8、学会発表[2])。

さらに、SAHAを投与した群と比較すると、SAHA投与群においてもVPA投与群と同じく、生後6日からATPの放出が観察された。放出量はVPA投与群より少なく、内顆粒層での著しい放出は見られなかった(図9)。

VPA投与によるGABAおよびATP放出量の変化は、投与によって発達期小脳の神経発達が変化していることを示唆する。そこで、カルビンジンD-28抗体を用いて小脳プルキンエ細胞の形態変化を観察したところ、VPA投与ラットでは、対照動物より数日早く樹状突起の発進が進むことが観察された(学会発表[3])。生後12日でのプルキンエ細胞樹状突起発進を比較すると、対照動物 $61.9 \pm 7.4 \mu\text{m}$ に対し、VPA投与動物 $119.8 \pm 22.5 \mu\text{m}$ 、SAHA投与動物 $113.4 \pm 22.8 \mu\text{m}$ と、著しい樹状突起伸長を示し、神経回路の早期発進が進んでいることを表した(表1)。

D. 考察

VPAによる神経回路発進の変化を、伝達物質放出分布の変化として捉えることができた。神経発進の早期化が脳の高次機能にも影響しているものと考えられる。今後、VPAの

濃度、投与方法を検討しつつ、各種の薬物の投与が小脳皮質での伝達物質放出に与える影響を、光学測定を用いて検討する。

E. 結論

本研究において、研究班共通の化学物質であるバルプロ酸を用いて、生後の神経回路発進の変化を伝達物質放出分布の変化として捉えることに成功した。これらの結果から、神経発進の早期化が脳の高次機能にも影響しているものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

[1] 勝股大樹, 村本英樹, 田野崎真, 笛田由紀子, 関野祐子, 吉田祥子, 胎生期バルプロ酸曝露による発達期小脳皮質での伝達物質放出変化. 第60回中部日本生理学会, 岐阜, 2013

[2] 吉田祥子, 田野崎真, 福田敦夫, 笛田由紀子, 関野祐子, Valproate application to rat fetus changes developing GABA release and neuronal differentiation. 第56回日本神経科学学会大会, 京都, 2013

[3] S. Yoshida, H. Muramoto, M. Tanozaki, N. Hozumi, Y. Fueta, Y. Sekino, Valproate application to rat fetus encourages the development of Purkinje cell dendrites and network formation in cerebellar development. 43th Neuroscience meeting, San Diego, 2013.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

2. 特許取得
なし。

3. 実用新案登録
なし。

4. その他
なし。

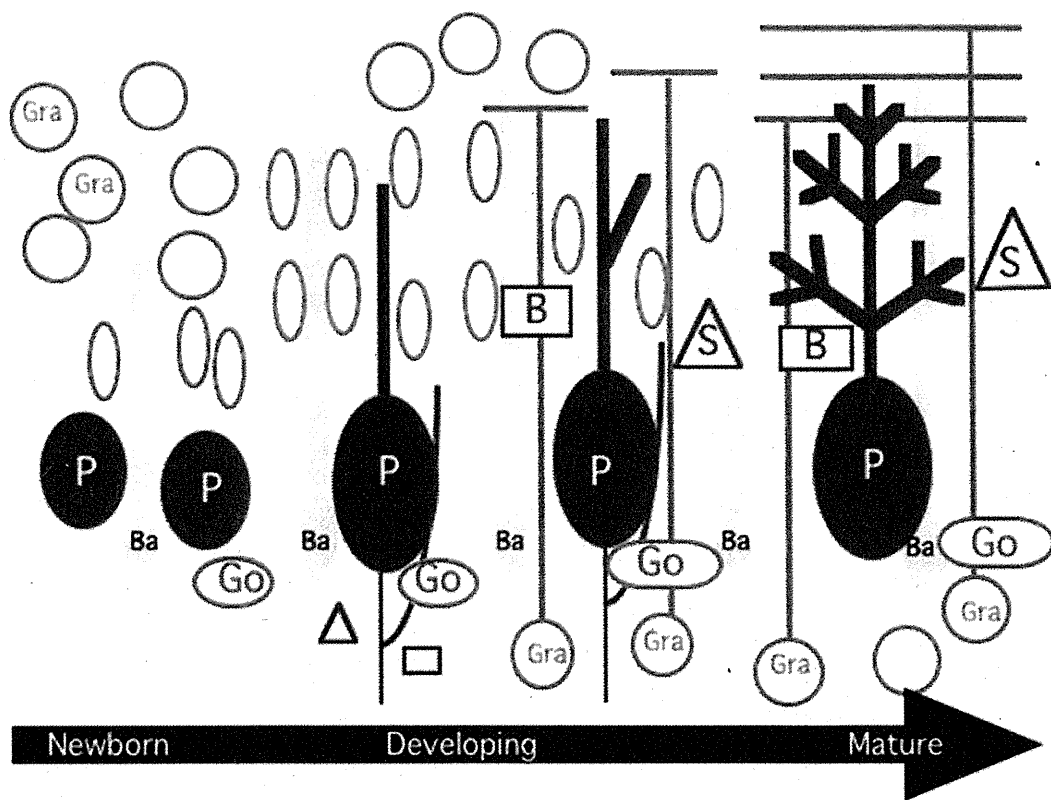


図1 ラット・マウスの小脳の発達様式

出生時のラット・マウスの小脳は、外顆粒層と未発達のプルキンエ細胞層(Purkinje cell layer; PL)から構成されるが、生後約2週間かけて顆粒細胞が分裂・分化しプルキンエ細胞下に遊走して内顆粒層(internal granular layer; IGL)を形成、同時にプルキンエ細胞は樹状突起を伸長させ、顆粒細胞および脳室帯から遊走してくるゴルジ細胞、バスケット細胞、星状細胞と神経回路を構成して皮質表面に分子層(molecular layer; ML)を形成し、成熟した小脳の3層構造をかたち作る。

(P:プルキンエ細胞、Gra:顆粒細胞、B:バスケット細胞、S:星状細胞、Go:ゴルジ細胞、Ba:パーグマングリア)。