

図7 ヒト iPS 細胞の増殖・分化に対するトリプチルスズの影響

A) 未分化 iPS 細胞を 96 well plate に播種して、TBT を曝露した。24 時間後に細胞数を MTT 法により調べた。

B) 未分化 iPS 細胞を TBT 曝露し、24 時間後に ATP 量をルシフェラーゼ法により調べた。

C) iPS 細胞を外胚葉に分化誘導した。100nM TBT により、神経系への分化が抑制された。

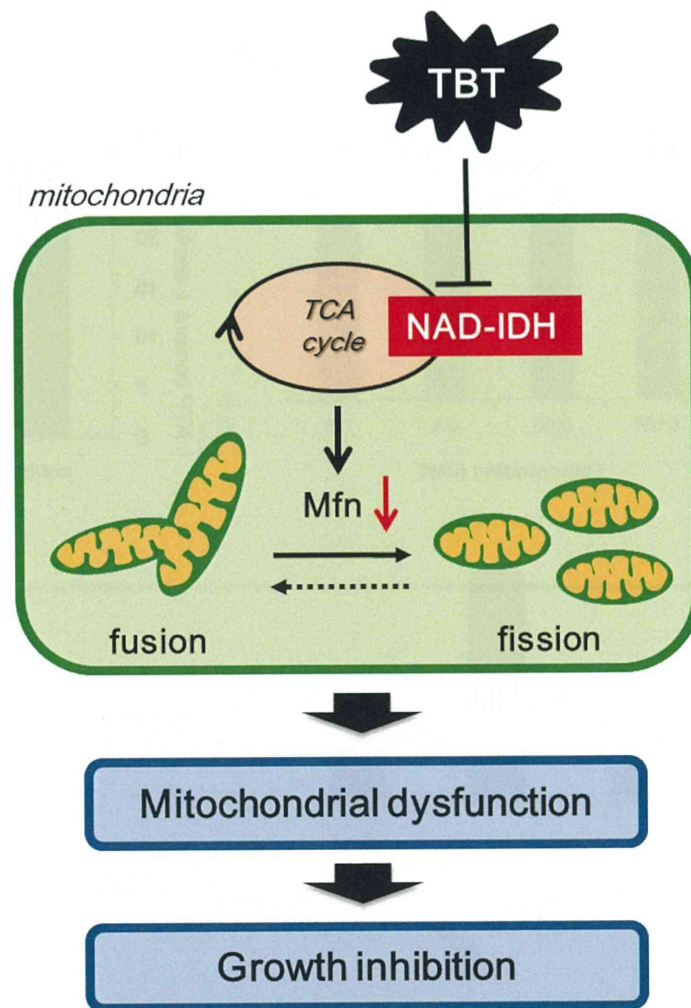


図8 トリブチルスズ的作用 (模式図)

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

研究分担者	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第四室長 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、トリブチルスズ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。トリブチルスズの濃度は、妊娠ラットへの投与実験における胎児中濃度を参考にした (30 および 100 nM)。その結果、神経堤細胞の遊走にはトリブチルスズの影響は認められなかった。しかし、神経堤細胞の増殖に及ぼす影響を調べたところ、100 nM で対照群に比べて細胞数の減少が認められ、トリブチルスズには細胞増殖抑制作用があると考えられた。以上のことから、トリブチルスズは神経堤細胞の遊走に影響しない濃度において、細胞増殖を抑制することにより、神経堤細胞から分化する組織に毒性影響を示す可能性があると考えられた。本実験法は、化学物質の神経堤細胞機能阻害が関与する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、内分泌攪乱作用を有する環境汚染物質であるトリブチルスズ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。また、トリブチルスズお

よびこれまでにラット神経堤細胞遊走の障害作用を見出した化学物質の、細胞増殖に及ぼす影響を調べ、遊走障害作用との関連を検討した。

B. 研究方法

1. 動物

ウィスターラット (Cr1j: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。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% CO₂、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。トリブチルスズ (和光純薬工業 (株)) は、DMSO (最終濃度 0.1%) で希釈して培養液に添加した。

細胞増殖に及ぼす化学物質の影響を調べる場合には、培養 18 時間で神経管を除去し、同様に培養した。

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。細胞増殖を調べる場合には、培養 24 時間では細胞数を ImageJ のセルカウンターで計測し、培養 48 時間では 4',6-diaminodino-2-phenylindole (DAPI, D-1306; Invitrogen) で蛍光染色した核の数を BZ-X Analyser (株式会社キーエンス) で計測した。実験群間の有意差の検定には *t* 検定を用いた。

(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. トリブチルスズのラット神経堤細胞遊走に及ぼす影響

トリブチルスズ (30 および 100 nM) 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 100 nM においても有意な変化は認められなかった(図 1)。

2. トリブチルスズのラット神経堤細胞増殖に及ぼす影響

培養 24 時間目および 48 時間目に神経堤細胞数を調べ、トリブチルスズ (30 および 100 nM) の影響を調べたところ、100 nM において対照群と比較して、細胞増殖の有意な減少が認められた(図 2)。

また、これまでに神経堤細胞遊走障害作用が認められた化学物質とトリブチルスズについて、遊走障害作用を増殖障害作用に対してプロットした結果、トリブチルスズは増殖障害作用を示すにも関わらず、遊走障害作用を示さないため、他の化学物質に比べて回帰直線から大きく離れていた(図 3)。

D. 考察

本研究では、ラット神経堤細胞遊走実験法により、トリブチルスズ 100 nM までの神経堤細胞への影響を調べた。この濃度は、妊娠ラットへの 2.5 mg/kg/日のトリブチルスズ投与により得られる妊娠動物の血中濃度とほぼ等しく、胎児および新生児には肉眼的な異常は認められていない。

しかし、本研究においては、神経堤細胞に及ぼすトリブチルスズの影響として、細胞遊走には変化が認められなかったが、細胞増殖

の抑制が認められた。これらの結果から、トリブチルスズは神経堤細胞から分化する組織に機能的な悪影響を起こす可能性があると考えられる。また、発達神経毒性評価法として、本実験法は、化学物質の神経堤細胞機能阻害が関与する影響の評価法として有用であると考えられる。

E. 結論

ラット神経堤細胞遊走実験法により、トリブチルスズが、細胞遊走に影響しない濃度において、神経堤細胞の増殖抑制作用を有することを明らかにすることが出来た。本実験法は、化学物質の神経堤細胞機能阻害が関与する発達神経毒性評価法として有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Kim S.-R., Kubo T., Kuroda Y., Hojyo M., Matsuo T., Miyajima A., Usami M., Sekino Y., Matsushita T. and Ishida S. Comparative metabolome analysis of cultured fetal and adult hepatocytes in humans. *The Journal of Toxicological Sciences* 39: 717–23 (2014).
- [2] Usami M., Mitsunaga K., Irie T., Miyajima A. and Doi O. Simple in vitro migration assay for neural crest cells and the opposite effects of all-trans-retinoic acid on cephalic- and trunk-derived cells. *Congenital Anomalies* 54: 184–8 (2014).

2. 学会発表

- [1] 宇佐見 誠. フリーディスカッションで生殖発生毒性を考える (仮) 第1回「生殖発生毒性試験におけるデータ解析について考える」. 第26回生殖・発生毒性学東京セミナー. 東京 (2014).

- [2] 宇佐見 誠. フリーディスカッションで生殖発生毒性を考える 第2回「生殖発生毒性試験におけるデータ解析について考える」. 第27回生殖・発生毒性学東京セミナー. 東京 (2014).

- [3] 宇佐見 誠, 高松 美奈, 風間 崇吾, 満長 克祥, 入江 智彦, 宮島 敦子, 土井 守, 滝沢 達也. 培養ラット胚におけるバルプロ酸による発生毒性のプロテオミクス解析. 第54回日本先天異常学会学術集会. 相模原 (2014).

- [4] 入江 智彦, 花尻 (木倉) 瑠理, 宇佐見 誠, 内山 奈穂子, 合田 幸広, 関野 祐子. 新規違法ドラッグ MAM-2201 は神経伝達を強力に抑制し, 複雑スパイク誘発性の細胞内 Ca²⁺上昇を減弱させる. 第37回日本神経科学大会. 横浜 (2014).

- [5] 入江 智彦, 花尻 (木倉) 瑠理, 宇佐見 誠, 内山 奈穂子, 合田 幸広, 関野 祐子. 新規違法ドラッグ MAM-2201 はCB1受容体を介して神経伝達を強力に抑制し, 複雑スパイク誘発性の細胞内 Ca²⁺上昇を減弱させる. 生理学研究所 研究会「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」. 岡崎 (2014).

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。

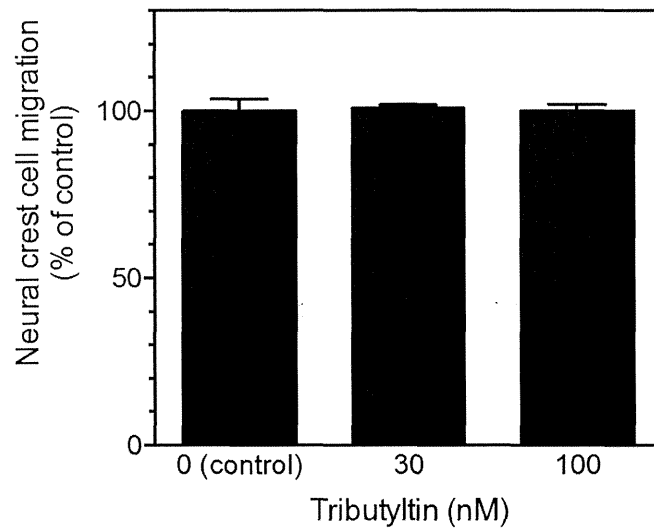


図 1. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすトリブチルスズ (tributyltin) の影響
ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養 24 時間目からトリブチルスズを培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。

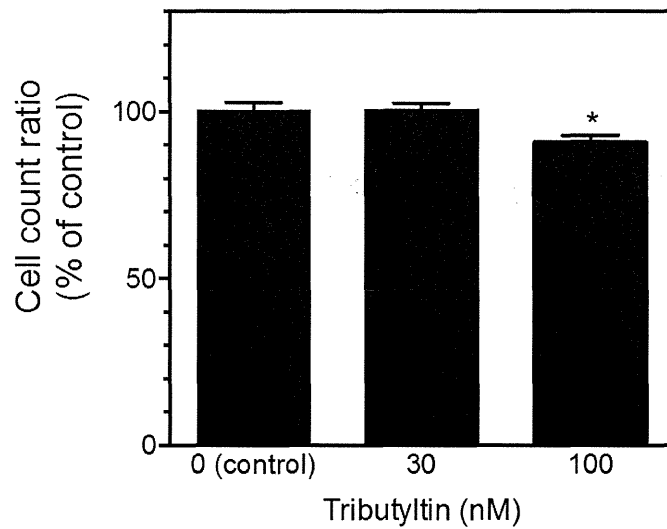


図 2. ラット神経堤細胞の増殖に及ぼすトリブチルスズ (tributyltin) の影響

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 18 時間で神経管を除去し、培養 24 時間目からバルプロ酸を培養液に添加した。培養 24 時間と 48 時間の細胞数の比 (48 時間の細胞数/24 時間の細胞数) を、平均値と標準誤差で示す。「*」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(* $p < 0.05$)。

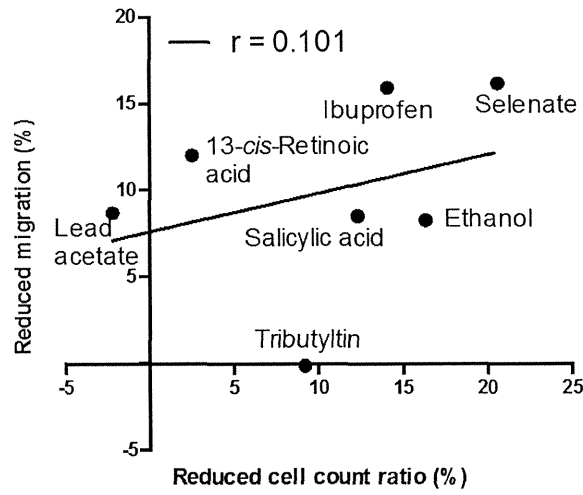


図 3. ラット神経堤細胞における遊走阻害作用の増殖阻害作用に対するプロット
 ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養開始時から化学物質を培養液に添加した。すべての化学物質のプロットを対象とした回帰直線と相関係数を示した。

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

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、評価化合物を適用し神経系細胞の新生と遊走に対する影響について定量的な評価を行った。ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害が新生神経系細胞数増加、新生細胞の突起発達を引き起こすことを明らかとした。有機スズ（tributyltin: TBT）は 100 nM から神経系細胞新生を劇的に抑制することを明らかとした。

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、生後初期にほぼすべての細胞新生が起こる。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る。

我々は昨年度までに生後 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、神経系細胞の新生、遊走、さらに、オリゴデンドロサイト新生、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。昨年度はこの評価系によりバルプロ酸 (valproic acid: VPA) が神経系新生細胞数を増加させ、著しい形態異常 (突起伸張の促進) を引き起こすことを明らかとした。本年度はこのメカニズムに VPA の脱アセチル化酵素 (histone

deacetylase: HDAC) 阻害作用が関与している可能性をさらに検討するため、強力な HDAC 阻害剤である suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) の作用を検討した。また、新たな研究班共通被検化学物質である有機スズ (tributyltin: TBT) の影響評価を行った。

B. 研究方法

1. 前脳矢状面切片培養系

生後 2-3 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ィルスを 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 suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) 10-100 nM 存在下で 3 日間培養し、神経系新生細胞の増殖と遊走、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。また、TBT 1nM-1 μ M についても同様に検討した。

(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が保持する動物実験の適正な実施に関する規程に従った。

C. 研究結果

1. SAHA の神経系新生およびオリゴデンドロサイト新生に対する影響

昨年度、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。VPA は HDAC 阻害作用を持つことが知られているため、生後初期の新生細胞に対する VPA の作用と HDAC 阻害作用との関連を検討するため、強力な HDAC 阻害薬である SAHA (IC₅₀: ~10 nM) の生後初期 SVZ 新生細胞に対する影響評価を行った。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 SAHA (10-100 nM) 処理した (3 日間)。図 1A は 3 日目の免疫蛍光染色画像における eGFP(+) 新生細胞 (緑色)、O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (赤) を示す。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は SAHA 10 nM において増加傾向が見られた。図 1B は培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数を表す。eGFP(+) 細胞数に対する SAHA の作用はベルシェープの結果となった (黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+) 細胞数も eGFP(+) 細胞数と同様の変化を示した (黄色カラム)。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合は SAHA によって減少する傾向にあったが有意な差には至らなかった (図 1C)。また、SAHA 10 nM はコントロール群に比較して、遊走中細胞の著しい突起伸張促進を引き起こした (図 2)。これらの作用はオリゴデンドロサイト前駆細胞に特異的ではなく、神経系新生細胞に対して非特異的に見受けら

れた。

2. TBT の神経系新生細胞およびオリゴデンドロサイト新生に対する影響

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 TBT (10-100 nM) 処理した (3 日間)。図 3A は 3 日目の免疫蛍光染色画像における eGFP(+) 新生細胞 (緑色)、O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (赤) を示す。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は TBT 100 nM 以上で劇的に低下した。1 mM においては生存新生細胞がほとんど確認されなかった。図 3B は培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数を表す。培養切片中 eGFP(+) 細胞数 (黄土色カラム)、eGFP(+)O1(+) 細胞数 (黄色カラム) は 100 nM 以上で劇的な減少が引き起こされた。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合は 10 nM 以上で劇的な減少が起こった (図 3C)。これは、新生細胞の中でもオリゴデンドロサイト前駆細胞が TBT に対して特に感受性が高い可能性を示している。また、このときの矢状面切片が非常に崩れやすくなっていったことから、細胞種非特異的な毒性も存在することが考えられる。本検討は例数 3 のため有意差検定を行っていないので、今後、さらに例数をあげて再現性を確認する予定である。

D. 考察

昨年度までに、VPA が神経系新生細胞数の増加、著しい突起伸張促進を引き起こすことを見いだしている。VPA は HDAC 阻害剤 (IC₅₀ = 400 μ M) 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、A β 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。我々は、VPA 同様 HDAC 阻害作用をもつトリコスタチン

(trichostatin A: TSA) も神経系新生細胞数の増加、著しい突起伸展促進を引き起こすこと、HDAC 阻害作用のないバルプロ酸アナログ バルプロミド (valpromide: VPM) はこれらの作用を持たないことも明らかとしている。そこで本年はさらに強力な HDAC 阻害薬である SAHA (IC50: ~10 nM) の生後初期 SVZ 新生細胞に対する影響評価を行った。SAHA も VPA, TSA と同様に、神経系新生細胞数の増加、著しい突起伸展促進を引き起こすことを明らかとした。従って、VPA の作用は主に HDAC 阻害作用を介して引き起こされることが示された。以上の結果は 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を示している。

また、TBT が神経系細胞の新生、遊走と分化に対して阻害作用を持つことがわかった。TBT は活性酸素種生成による神経細胞障害作用が報告されている (Neurochem Int, 60(8) 782-90, 2012)。TBT 適用培養スライス全体が非常にもろく崩れやすくなっていたのはこのような非特異的な毒性作用によるものであると考えられる。また、non-NMDA 受容体や NMDA 受容体 (Toxicol Sci 89(1) 235-42, 2006, Br J Pharmacol 136(2) 201-6, 2002)、GABA 受容体 (J Pharmacol Ext Ther 299(1) 171-7, 2001) との相互作用も報告されており、今回見いだした遊走および分化の阻害作用との関連に興味を持たれる。我々は、新生細胞の中でも特に オリゴデンドロサイト前駆細胞が TBT に対して感受性が高いことを示すデータを得た。このような知見はこれまで報告がなく TBT の新たなリスクといえる。

E. 結論

HDAC 阻害が新生神経系細胞数増加、新生細胞の突起発達を引き起こすことを明らかとした。TBT が神経系細胞新生を劇的に抑制する可能性が示された。特に、オリゴデンドロサイト前駆細胞が TBT に対して感受性が高いことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Sato, K. Microglia effects on neuronal development. GLIA (in press)

[2] Fujimori, K., Takaki, J., Miura, M., Shigemoto-Mogami, Y., Sekino, Y., Suzuki, T. and Sato, K. Paroxetine prevented the down-regulation of astrocytic L-Glu transporters in neuroinflammation. J Pharmacol Sci (in press)

[3] Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J.E., Sekino, Y. and Sato, K. (2014) Microglia enhances neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. J Neurosci 34(5): 2231-2243.

[4] Shigemoto-Mogami, Y., Fujimori, K., Ikarashi, Y., Hirose, A., Sekino, Y. and Sato, K. (2014) Residual metals in carbon nanotubes suppress the proliferation of neural stem cells. Fundam Toxicol Sci, 1(3): 87-94.

2. 学会発表

(国内学会)

[1] Sato, K.: Microglia enhance oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone, 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会シンポジウム (2015, 3, 神戸)

[2] Sato, K.: Accumulation of neurogenic microglia in the early postnatal SVZ clarified by a simple stereological imaging method, 第 88 回 日本薬理学会年会シンポジウム (2015, 3, 名古屋)

[3] 佐藤 薫、高橋華奈子、最上 (重本) 由香里、金村米博、正札智子、福角勇人、岡田洋平、岡野栄之、白尾智明、関野祐子：興奮毒性評価が可能なヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた薬理試験系確立の試み、第 88 回 日本薬理学会年会 (2015, 3, 名古屋)

[4] 最上 (重本) 由香里、干川 和枝、関野 祐子、佐藤 薫：ミクログリアの活性状態に依存した血液脳

- 関門のバリア機能への影響、日本薬学会 第 135 年会 (2015, 3, 神戸)
- [5]佐藤 薫、高橋華奈子、最上 (重本) 由香里、金村米博、正札智子、福角勇人、岡田洋平、岡野栄之、白尾智明、関野祐子：興奮毒性評価が可能なヒト iPS 細胞由来神経細胞の探索、日本薬学会 第 135 年会 (2015, 3, 神戸)
- [6]高橋華奈子、最上 (重本) 由香里、中條かおり、干川和枝、金村米博、正札智子、福角勇人、岡田洋平、岡野栄之、白尾智明、関野祐子、佐藤 薫：ヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞の非臨床試験への応用の試み、第 14 回 日本再生医療学会総会 (2015, 3, 横浜)
- [7]Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Kanemura, Y., Shofuda, T., Fukusumi, H., Okada, Y., Okano, H., Shirao, T. and Sekino, Y.: An attempt to establish neuron-specific toxicity evaluation systems using human iPSC-derived neurons, 日本安全性薬理研究会第 6 回学術年会 (2015, 2, 東京)
- [8]Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Kanemura, Y., Shofuda, T., Fukusumi, Y., Okada, Y., Okano, H., Shirao, T. and Sekino, Y.: An attempt to establish non-clinical experiments for nervous system using human iPSC-derived neurons, The 18th Takeda science foundation symposium on bioscience 'iPS Cells for regenerative medicine' (2015, 1, 大阪)
- [9]佐藤 薫：安全性薬理試験へのヒト iPS 細胞由来神経細胞の応用—神経特異的影響評価の可能性と課題、第 11 回 医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラムヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現にむけて (2014, 12, 東京)
- [10]佐藤 薫：hiPSC 由来神経細胞に期待すること—医薬品開発における実用のために、CBI 学会 2014 年大会 Focused session 「In vitro 実験系におけるヒト iPS 細胞由来神経細胞間の「シナプス形成不全」解決にむけて— Human neuronal circuitry on dish は実現できるのか」(オーガナイザー) (2014, 10, 東京)
- [11]Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y. and Sato, K.: Establishment of neuron-specific toxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons, CBI 学会 2014 年大会 (2014, 10, 東京)
- [12]Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J.E. and Sekino, Y.: Discovery of the population of activated microglia which enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone, Neuroscience2014 (2014, 9, 横浜)
- [13]Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y. and Sato, K.: Application of human induced pluripotent stem cell-derived neurons to the neurotoxicity evaluation system, Neuroscience2014 (2014, 9, 横浜)
- [14]Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y. and Sato, K.: Development of in vitro blood-brain barrier model including microglia, Neuroscience2014 (2014, 9, 横浜)
- [15]Kasahara, Y., Fujimori, K., Miura, M., Mogami, Y., Sekino, Y., Sato, K. and Suzuki, T.: Comparison of the effects of antidepressants on the microglial activation in LPS-inflammation model, Neuroscience2014 (2014, 9, 横浜)
- [16]Roppongi, R.T., Ohara, Y., Koganezawa, N., Yamazaki, H.,

- Ootsu, M., Sato, K., Sekino, Y. and Shirao, T: Slow axonal growth in human iPSCs-derived neurons, Neuroscience2014 (2014, 9, 横浜)
- [17] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Kanemura, Y., Shofuda, T., Fukusumi, H., Okada, Y., Okano, H. and Sekino, Y.: An attempt to apply human induced pluripotent stem cell-derived neurons to the excitotoxicity evaluation system, 第 36 回 日本生物学的精神医学会・第 57 回 日本神経化学学会大会合同大会 (2014, 9, 奈良)
- [18] Otsu, M., Yamazaki, H., Roppongi, R.I., Koganezawa, N., Ohara, Y., Sato, K., Sekino, Y. and Shirao, T.: Application of human iPSC-derived neurons at early developmental stages for drug discovery, 第 36 回 日本生物学的精神医学会・第 57 回 日本神経化学学会大会合同大会 (2014, 9, 奈良)
- [19] 佐藤 薫: ヒト iPS 細胞由来神経細胞は神経特異的有害反応を予測できるか、第 41 回 日本毒理学学会学術年会シンポジウム (2014, 7, 神戸)
- [20] 佐藤 薫: ヒト iPS 細胞由来神経細胞によるヒト神経有害反応予測系の構築、PMDA 講演 (2014, 4, 東京)
(国際学会)
- [21] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K. and Sekino, Y.: Microglia accelerates the maturation of barrier function of blood brain barrier. SfN2014 (2014, 11, Washington D.C., USA)
- [22] Koganezawa, K., Ohara, Y., Yamazaki, H., Roppongi, R.I., Sato, K., Sekino, Y. and Shirao, T.: Axonal polarity formation in human iPSCs-derived neurons. SfN2014 (2014, 11, Washington D.C., USA)
- [23] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Kanemura, Y., Shofuda, T., Fukusumi, H., Okada, Y., Okano, H., Shirao, T., Sekino, Y. and Sato, K.: Search for the human induced pluripotent stem cell-derived neurons capable of detecting the CNS-specific toxicity. SPS 14th annual meeting (2014, 10, Washington D.C., USA)
- [24] Sekino, Y., Ootsu, M., Ohara, Y., Yamazaki, H., Sato, K., Roppongi, R., Koganezawa, N. and Shirao, T.: Effects of valproic acid and astemizole on the neurite growth of human iPSCs-derived neurons. SPS 14th annual meeting (2014, 10, Washington D.C., USA)
- [25] Sato, K.: Microglia enhances neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. Dept Cell Biol Anat Seminar, New York medical college (2014, 10, Varhara, USA)
- [26] Sato, K.: Sequential expression of various receptors along with the differentiation of human iPSC-derived neurons. ISN satellite symposium (2014, 9, Tokyo, Japan)
- [27] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J.E. and Sekino, Y.: The Discovery of a population of microglia which enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal SVZ. 9th FENS forum of neuroscience (2014, 7, Milan, Italy)

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

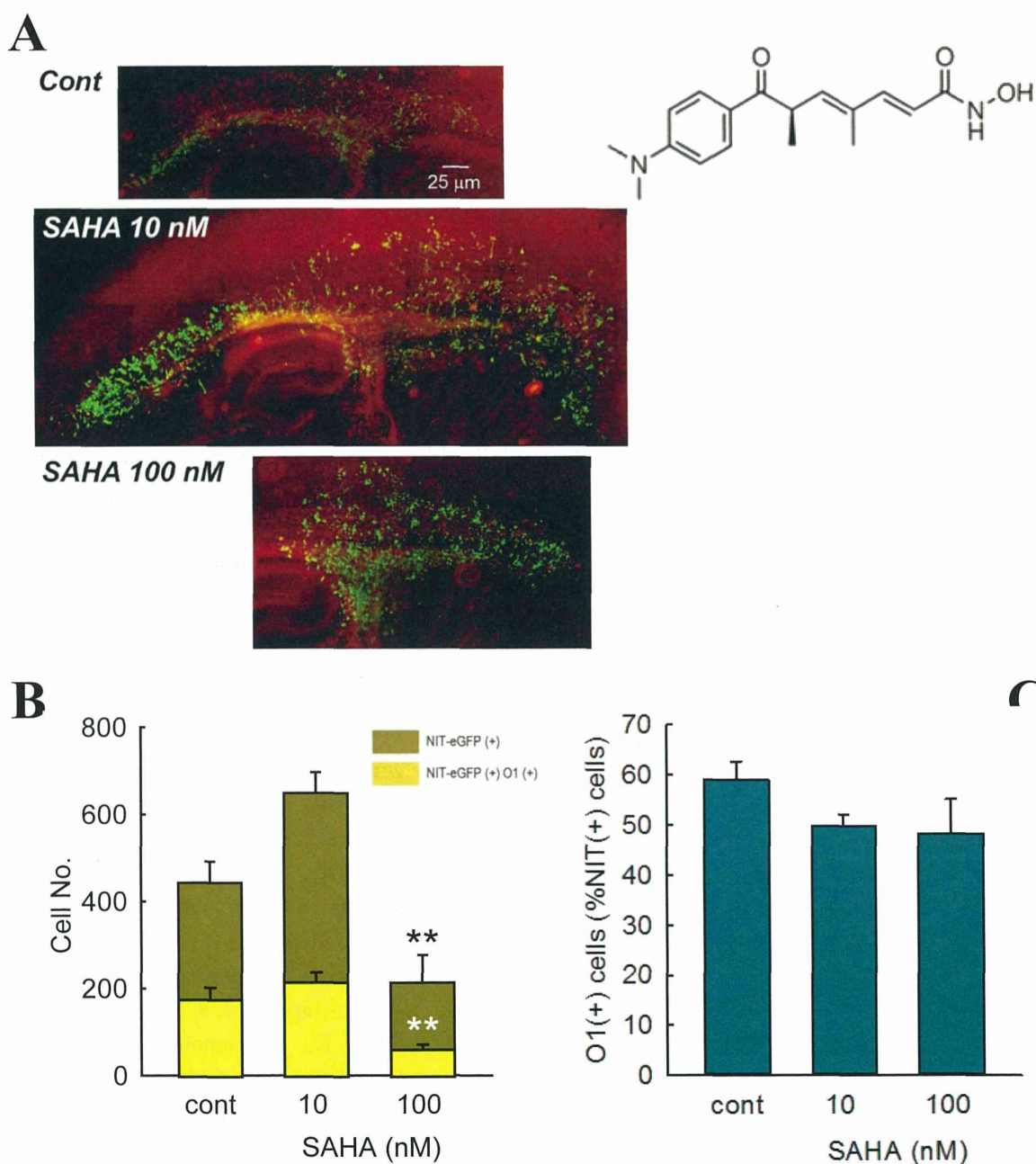


図 1. 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対する SAHA の影響
SVZ 中、ピンポイントに eGFP 標識された新生細胞群（神経幹細胞および前駆細胞）を含む培養前脳矢状面切片を SAHA (10-100 nM) 処理した (3 日間)。A: eGFP(+) 新生細胞 (緑色) O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (赤)。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は 10 nM において増加傾向が見られた。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数。eGFP(+) 細胞数に対する SAHA の作用はベルシェープの結果となった (黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+) 細胞数も eGFP(+) 細胞数と同様の変化を示した (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 SAHA によって減少する傾向にあったが有意な差には至らなかった。*: $p < 0.05$, Tukey's test following ANOVA, $N = 4$.

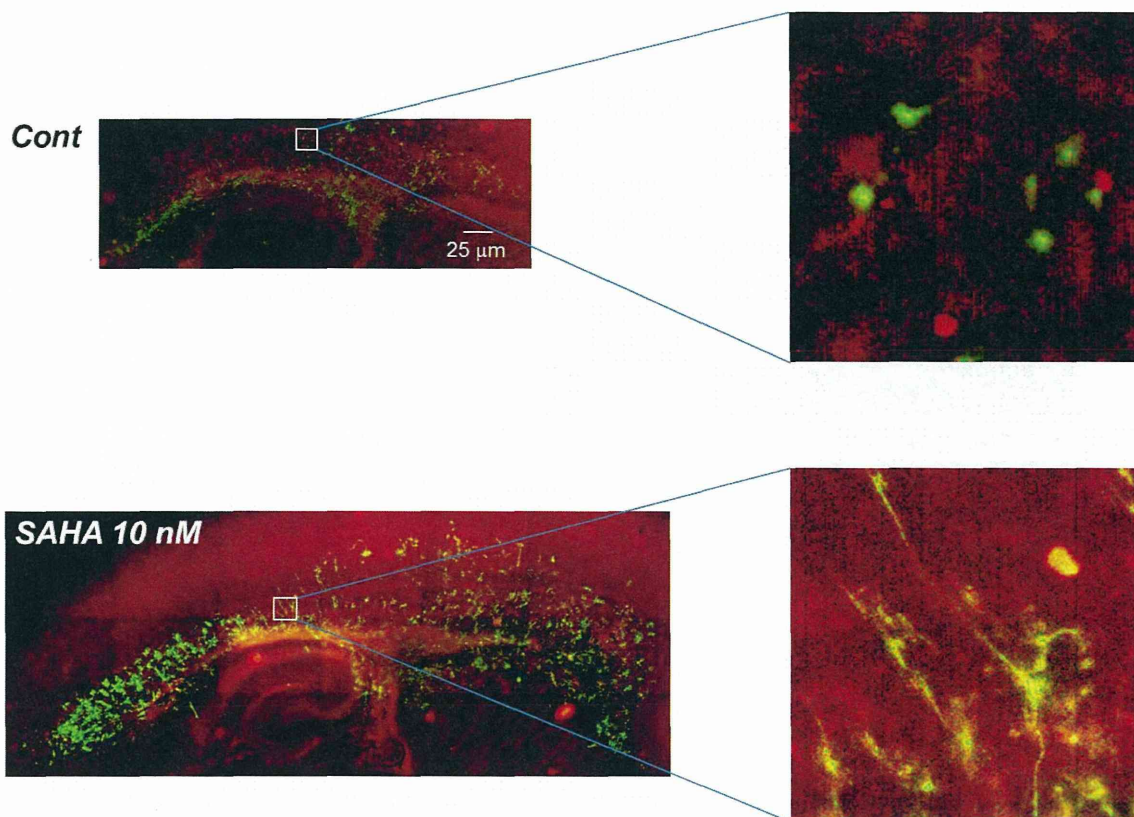


図 2. 遊走中細胞の形態に対する SAHA の影響
コントロール群では、遊走中の細胞の突起は短く、円形に近いものも多数見受けられるが、SAHA 処理群では、観察したほぼ全ての細胞で突起伸張が促進されていた。

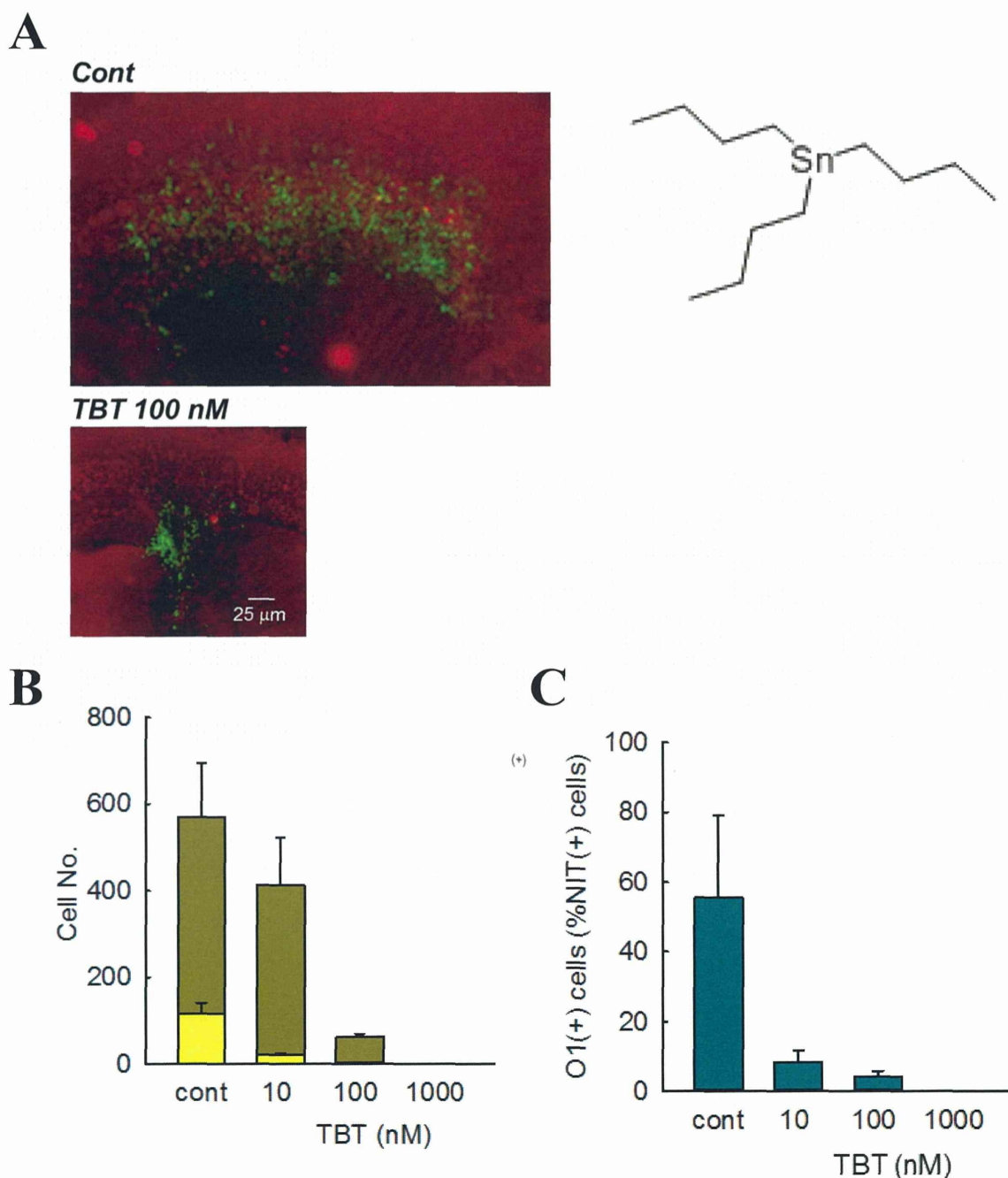


図 3. 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対する TBT の影響
 SVZ 中、ピンポイントに eGFP 標識された新生細胞群（神経幹細胞および前駆細胞）を含む培養前脳矢状面切片を TBT (10-100 nM) 処理した（3 日間）。A: eGFP(+) 新生細胞（緑色）O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞（赤）。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は 100 nM 以上で劇的に低下した。1 μ M においては生存細胞がほとんど確認されなかった。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数（黄土色カラム）、eGFP(+)O1(+) 細胞数（黄色カラム）は 100 nM 以上で劇的な減少が引き起こされた。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 10 nM 以上で劇的な減少が起こった。例数 3 のため有意差検定は行っていない。

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、前年度において、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。この効果が、バルプロ酸のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤効果に由来するものであるか確認するために、化学構造の異なる各種のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の生後神経回路発達に及ぼす効果を検討した。さらに、新たな共通化学物質として有機スズを選定し、これの投与による神経発達への効果を、行動と神経発達の両面から調査した。これらの結果から、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、神経発達の早期によって行動や脳の高次機能に影響する一方、有機スズは個体の行動に大きな影響現れるが神経構造への影響は小さいことが示唆された。今後、得られた個体レベルでの結果を、細胞レベルでの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)、スベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)、MS-275 の3種のヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤、およびトリブチルスズ(TBT)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、酵素を利用した測定法によって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。

これらの物質が個体の行動に及ぼす変化を確認するために、発達期個体の行動観察を行った。

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:バークマングリア)。

前年度の研究で、VPAが神経発達の早期化を引き起こすことが示唆されたため、本研究では化学構造の異なるHDAC阻害剤、および異なる作用機序で神経発達に影響すると考えられるTBTを妊娠動物に投与し、その効果を観察した(図2)。妊娠16日のラットに、600mg/kgのVPAを経口投与、50mg/kgのSAHAを腹腔内投与、4mg/kgのMS-275を経口投与、20mg/kgのTBTを経口投与でそれぞれ投与した。

生まれたラットは、生後4日から10日にかけて、各投与動物の任意に選んだ3匹について、温度維持した明環境下での自由行動の観察を行った。

シナプス形成のシグナルとされるATPの放出量の変化を、グリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素を用いた手法により測定した。(図3, 論文発表[1]、学会発表1)。各投与動物から、生後6日、8日、10日、12

日の小脳スライスを調整し、その皮質からのATP放出量を測定した。

さらに、神経細胞の発達を免疫組織化学により観察するために、各投与動物から生後10日から13日の小脳スライスを調整し、抗カルビンジン抗体による蛍光染色を行った。

C. 研究結果

3種のHDAC阻害剤、およびTBTを投与された動物を、3分間自由行動させた。薬物を投与しない動物においても、各日齢で数回のけいれん状の不随意運動を確認した。特にP4不近で多くの不随意運動を多く確認したが、これは、発達期前期ではまだ小脳の回路形成が不完全であり、そのため不随意運動を引き起こしたと考えられる。発達とともにこれらの行動は減少していった。VPA投与動物では、P4で多くの不随意運動を確認した。一方対照動物と同様に成長するにつれて減少する傾向にあった。SAHA投与動物では、対照動物やVPA投与動物と比較して多くの不随意運動を確認し、且つP4~P8にかけ増加する傾向が見られた。MS-275投与動物では対照動物より若干の不随意運動の増加が確認されたが、著しい変化は確認できなかった。TBT投与動物では、対照動物と比較して多くの不随意運動を確認することができた。また、VPA投与動物とは異なりP4~P7にかけて不随意運動が増加する傾向にあった(図4、学会発表5)。

各投与動物の小脳皮質からのATP放出量を比較すると、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるVPA、SAHA投与動物では、対照動物に比べ早期から小脳皮質でATPが放出されることが確認されたが、TBTは早期からの放出は顕著でなく、かつ放出量は対照動物よりむ

しろ少ないことが観察された (図5)。

さらに、各投与動物の小脳皮質におけるプルキンエ細胞の発達を、抗カルビンジンD-28k抗体を用いた免疫組織化学染色で観察したところ、対照動物ではプルキンエ細胞層が通常きれいに一列に細胞が整列した構造をとり、ML方向へと樹状突起を伸長するのに対し、SAHA投与動物では、プルキンエ細胞に異常がみられ、細胞が不規則な多重構造を形成していることが観察された。樹状突起伸長は対照動物より早く、神経発達の早期化が伺われた。MS-275投与動物では、P10でのみ、プルキンエ細胞が不規則な多重構造を形成していることが観察されたが、P13ではそのような分化異常は確認されず、正常な層構造を形成していた。著しい樹状突起伸長も観察されなかった。さらに、TBT投与動物では、プルキンエ細胞の層構造、樹状突起伸長のいずれにも異常はみられず、対照動物と同様の細胞層のきれいな列が観察された (図6、学会発表2、3)。

D. 考察

発達期神経毒性が疑われる薬物の投与により、動物においても発達の一時期に行動異常が見られることを示した。より早い時期の行動異常は小脳の神経発達の変化と強い相関がみられたが、やや後期の行動異常は、もっと脳の別の部位、海馬や大脳の異常による変化との相関を伺わせた。また、伝達物質ATP量の変化から、発達期神経毒性の機序には早すぎる神経発達と、遅滞型の神経発達があることが伺われた。これらの結果は細胞レベルの研究を保管するものとなると考えられる。今後、各種の薬物の投与が小脳皮質での神経

回路形成とその機能発現に与える影響を、光学測定を含めた各種実験手法を用いて検討する。

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及びトリブチルスズを用いて、生後の神経回路発達の変化を動物の行動、伝達物質放出量の変化、神経分化の変化として捉えることに成功した。これらの結果から、神経発達の早期化および遅滞化により脳の高次機能に影響があらわれると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

[1] 吉田祥子・穂積直裕, 発達期小脳アストロサイトの機能と秩序形成, JNNS. vol. 20, pp14-18 2013

2. 学会発表

[1] 阿部 巧, 村本 英樹, 笛田 由紀子, 関野 祐子, 吉田 祥子, Developmental change of ATP transmission to glutamate stimulation and in normally developing or valproate-modified rat cerebellar slices. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014

[2] 勝股 大樹, 村本 英樹, 穂積 直裕, 笛田 由紀子, 上野 晋, 関野 祐子, 吉田 祥子, Fetal application of HDAC inhibitors changes the development of Purkinje cell dendrites and network formation in rat cerebellar cortex. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014

[3] S. Yoshida, N. Hozumi, D. Katsumata, T. Abe, Y. Fueta, S. Ueno, Y. Sekino, Fetal application of HDAC inhibitors facilitates the elongation of Purkinje cell dendrites and the network formation in rat cerebellar cortex. 44th Neuroscience meeting, Washington, 2014

[4] S. Yoshida, N. Hozumi, D. Katsumata, T. Abe, Y. Fueta, S. Ueno, Y. Sekin, Alteration of GABA release dynamics in autistic-like anomalous developing cerebellum. 24th Neuropharmacology

Conference, Arlington 2014

- [5] 中嶋 さりい, 勝股 大樹, 笛田 由紀子, 上野 晋, 関野 祐子, 吉田 祥子, 胎生期 HDAC 阻害剤曝露による発達期小脳皮質での伝達物質放出変化と行動観察. 第 61 回中部日本生理学会 名古屋 2014
- [6] 富田 達朗, 山田 ひかり, 笛田 由紀子, 上野 晋, 関野 祐子, 吉田 祥子, 胎生期バルプロ酸投与動物由来の培養グリア細胞の発達変化. 第 61 回中部日本生理学会 名古屋 2014

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。