

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

前脳矢状切片の側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った。評価化合物クロルピリホスを適用し神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生に対する影響について定量的評価を行った。クロルピリホスは新生細胞数を濃度依存的に減少させる傾向を示した。新生オリゴデンドロサイト数も減少の傾向を示したが、新生細胞全体の減少よりも小さな変化であった。新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合を算出したところ、クロルピリホス 10  $\mu\text{M}$  までは何ら影響がないが、100  $\mu\text{M}$  において新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合は増加の傾向を示した。従って、クロルピリホスはオリゴデンドロサイト以外の細胞に対して新生抑制影響がある可能性が示された。

A. 目的

幼児期の側脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) からは神経系細胞 (オリゴデンドロサイト、神経細胞、アストロサイト) 新生が活発に起こっており、この時期にこれらの細胞に異常が起こると重篤な高次機能影響を引き起こす可能性が高い。実際に、幼児期の抗がん剤使用は知能障害を引き起こすことが知られており禁忌となっている。我々はこれまでに生後 2-3 日齢ラットの前脳矢状面切片培養系の 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 (特にオリゴデンドロサイト) の新生や遊走に対する化学物質の影響評価系を確立した。本研究では有機リン酸系農薬であるクロルピリホスの神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生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 2-3 日齢ラットの前脳矢状面切片標本 (150  $\mu\text{m}$ ) 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(+) 細胞数、eGFP(+)O1(+) 細胞数、新生細胞遊走面積を算出した。

3. eGFP 標識細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いたクロルピリホスの評価

クロルピリホス (TRC, Canada) は 200 mM の DMSO ストックソリューションを作成し、培地にて用時希釈した。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クロルピリホス (1-100  $\mu\text{M}$ ) 存在下で 3 日間培養し、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。

## C. 研究結果

### 1. 被験化合物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

クロルピリホスは DMSO に溶解したため、まず DMSO の影響について検討した。

eGFP 標識された新生細胞群（神経幹細胞および前駆細胞）を SVZ に含む培養前脳矢状面切片をクロルピリホス適用時に想定される最高濃度の DMSO (0.05%) を含む培地で 3 日間培養したところ、eGFP(+) 細胞（神経幹細胞および前駆細胞）数、eGFP(+)O1(+) 細胞（新生オリゴデンドロサイト）数、新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合、これらの細胞の遊走に何ら影響はなかった（データ示さず）。

次に上記パラメーターに対するクロルピリホスの影響について検討した（図 1）。培養前脳切片をクロルピリホス入りの培地（final conc: 1-100  $\mu$ M）で 3 日間培養したところ、100  $\mu$ M クロルピリホス適用群では、培養前脳切片の膨潤がおこり切片の厚みが増していた。1-10  $\mu$ M においてはこのような変化は観察されなかった。クロルピリホス（1-100  $\mu$ M）は eGFP(+) 細胞（神経幹細胞および前駆細胞）数を濃度依存的に減少させる傾向があった（図 1B, 黄土色カラム）。eGFP(+)O1(+) 細胞（オリゴデンドロサイト前駆細胞）数も減少の傾向を示したが、新生細胞全体の減少よりも小さな変化であった（図 1B, 黄色カラム）。新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合（eGFP(+)O1(+) cell No. /eGFP(+) cell No. \*100%）を算出し、クロルピリホスの作用を確認したところ、クロルピリホス 10  $\mu$ M まではほとんど影響がなかったが、100  $\mu$ M において新生細胞中のオリゴデンドロサイト前駆細胞の割合が増加の傾向を示した（図 1C）。新生細胞の遊走範囲もクロルピリホスによって濃度依存的に減少した。これは、上記に示す新生細胞数の減少に矛盾しない結果となっている。

## D. 考察

クロルピリホスは有機リン酸系の殺虫剤であり、害虫の神経系アセチルコリンエステラーゼを阻害することにより作用を発揮するとされている。しかし、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用よりも低い濃度で注意や記憶を損なうことが、ヒト、動物で

ともに報告されている（Brown and Brix, *J Appl Toxicol* 1998, 18, 393-408; Ray and Richards, *Toxicol Lett* 2001, 120, 343-351; Johnson et al., *Toxicol Sci* 2009, 109(1) 132-42）。このようにクロルピリホスは多岐にわたる作用メカニズムを持ち、その作用も多岐にわたることが予想されるが神経発達に対する影響はあまり知見がない。本研究では生後初期の神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生に対する影響評価を前脳切片培養系を用いて行った。

クロルピリホス（1-100  $\mu$ M）は eGFP(+) 細胞（神経幹細胞および前駆細胞）数を濃度依存的に減少させる傾向があった。また、新生細胞中のオリゴデンドロサイト前駆細胞の場合は 100  $\mu$ M において新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合が増加の傾向を示した。従って、クロルピリホスはオリゴデンドロサイト以外の細胞に対して新生抑制を引き起こす可能性が示された。脳神経系は主に神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、血管系細胞で構成されているが、胎生期から生後にかけてクロルピリホスに暴露されたマウスは海馬の神経新生が低下することも報告されている（Wang et al., *Reprod Toxicol* 2013, 38, 25-36）。培養ヒトアストロサイト培養を用いた実験では、クロルピリホスがアストロサイトの炎症性活性化を引き起こすことが示されている（Mense et al., *Toxicol Sci*, 2006, 93(1) 125-35）。また、胎生期もしくは生後のクロルピリホスの *in vivo* 適用においては、グリア細胞新生時期に適用したときに最も発達阻害が誘発された

（Garcia et al., *Environ Toxicol Pharmacol* 2005, 19(3), 455-61）。また、胎生期暴露はアストロサイト活性化マーカーである GFAP 発現レベルを上昇させた（Carcia et al., *Brain Res Dev Brain Res* 2002, 133(2), 151-61）。しかし、一方でオリゴデンドロサイト前駆細胞に対しても毒性が報告されている（Saulsbury et al., *Toxicology* 2009, 259(1-2), 1-9）。細胞種によりクロルピリホスへの感受性が違っており、アストロサイトはその中でも感受性の高い細胞であることが考えられるが、細胞種による感受性の違いについては細胞種特異的なマーカーを用いて確認する必要がある。このような細胞毒性のメカニズムとして細胞骨格への影響が考え

られる。クロルピリホスの長期的な投与により、軸索内輸送に影響があることが報告されている (Hernandez et al., *Neurotoxicology* 2015, 47, 17-26)。キネシンによる輸送 (Gearhart et al., *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, 218, 20-29)、tubulin の修飾 (Grigoryan et al., 2008, *Chem Biol Interact* 175, 180-186)、微小管形成阻害作用なども明らかとなっている (Prendergast, et al., *Neuroscience* 2007, 146, 330-339)。さらに、胎児新皮質において細胞分裂面が垂直から水平に移行する作用も報告されており、このような分裂面の角度が細胞の運命決定に影響を及ぼす可能性も示唆されている

(Chen et al., *PLoS One* 2014, 9 (4) e95343)。さらに、ヒト胎生幹細胞由来神経幹細胞においてはクロルピリホスによって NF- $\kappa$ B 活性化を介したアポトーシスが誘導されること (Lee et al., *Neurotoxicology* 2014 42, 58-70)、ミトコンドリア長が増加するとともにその数が減ることも報告されており

(Middlemore-Risher et al., 2011, *J Pharmacol Exp Ther*, 399(2) 341-9)、直接的なアポトーシス誘導作用を持つ可能性も考えられる。

クロルピリホスは高濃度領域 (100  $\mu$ M) において培養前脳切片の膨潤を引き起こした。これまでこのような報告はなく、新たなメカニズムを考慮に入れながら今後の検討を進める必要がある。

## E. 結論

クロルピリホスは新生細胞数、新生オリゴデンドロサイト数、遊走面積ともに濃度依存的に減少させたが、その作用はオリゴデンドロサイト以外の細胞が標的となっている可能性が示された。さらに、高濃度クロルピリホス (>100  $\mu$ M) が浮腫を引き起こす可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] Ohara, Y., Koganezawa, N., Yamazaki, H., Roppongi, R. T., Sato, K., Sekino, Y., Shirao, T. (2015) Early-stage development of human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons. *J Neurosci Res* 93(12): 1804-13.
- [2] 佐藤 薫. (2015) ミクログリアの発生と

分化. *Clinical Neuroscience* 32(12) 1338-1341.

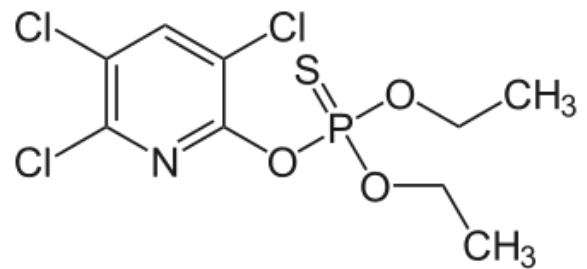
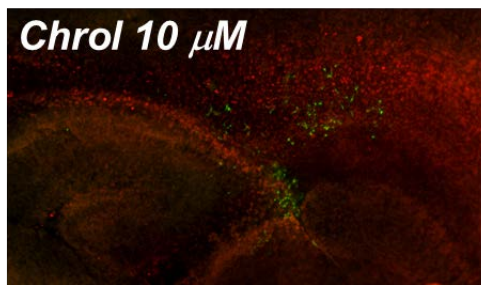
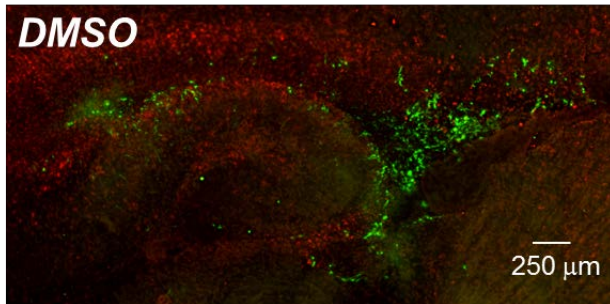
- [3] Sato, K. (2015) Microglia effects on neuronal development. *GLIA* 63(8): 1394-495.
- [4] Fujimori, K., Takaki, J., Miura, M., Shigemoto-Mogami, Y., Sekino, Y., Suzuki, T., Sato, K. (2015) Paroxetine prevented the down-regulation of astrocytic L-Glu transporters in neuroinflammation. *J Pharmacol Sci*, 127(1) 145-9.
- [5] 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.
- [6] 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 Toxcol Sci*, 1(3): 87-94.
- [7] 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).
- [8] 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).
- [9] 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

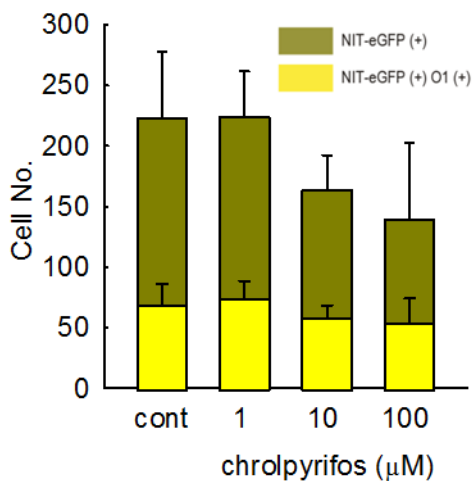
- [1] 高橋華奈子、最上(重本)由香里、清水英雄、中條かおり、干川和枝、岡田洋平、岡野栄之、関野祐子、佐藤 薫:ヒトiPS細胞由来神経細胞標本の機能的 NMDA 受容体発現とグルタミン酸興奮毒性発現の株間比較、日本薬学会第136年会(2016, 3,

- 横浜)
- [2] 重本一最上 由香里、片倉 明日美、長谷川 陽介、関野 祐子、田辺 光男、佐藤 薫: 神経幹細胞塊から機能的神経細胞を効率的に分化誘導するプロトコルの検討と分化に伴う機能的受容体分布変化、日本薬学会第 136 年会 (2016, 3, 横浜)
- [3] 佐藤 薫: ミクログリアの中枢神経系発達機能とその創薬・治療への応用、第 89 回日本薬理学会年会シンポジウム「創薬・治療のターゲットとしての細胞分化」(オーガナイザー) (2016, 3, 横浜)
- [4] 清水英雄、小針彩奈、須知由未子、花村健次、白尾智明、田辺光男、関野祐子、佐藤 薫: シナプスイメージングに基づく中枢神経系有害反応の *in vitro* 評価のための新規パラメータ確立の試み、第 89 回日本薬理学会年会 (2016, 3, 横浜)
- [5] 重本一最上由香里、干川和枝、関野祐子、佐藤 薫: 活性化型ミクログリアが引き起こす血液脳関門のバリア崩壊過程におけるサイトカイン・ケモカイン動態の解析、第 89 回 日本薬理学会年会 (2016, 3, 横浜)
- [6] 高橋華奈子、笠原のぞみ、小原悠、高瀬将弘、中條かおり、関野祐子、田辺光男、佐藤 薫: Neurosphere 維持期間が神経分化に及ぼす影響、第 89 回 日本薬理学会年会 (2016, 3, 横浜)
- [7] Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Shimizu, H., Chujo, K., Hoshikawa, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y., Sato, K.: Comparison of the NMDA receptor expression and the extent of excitotoxicity in human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons. CBI 学会 2015 年大会 (2015, 10, 東京)
- [8] Shigemoto-Mogami, Y., Sato, K., Hoshikawa, K., Kikura-Hanajiri, R., Hakamatsuka, T., Sekino, Y.: Evaluation of drug-induced CB2 cannabinoid receptor activity in the CNS using the ERK1/2 phosphorylation pathway of microglial cells, CBI 学会 2015 年大会 (2015, 10, 東京)
- [9] 佐藤 薫, 清水英雄, 小針彩奈, 花村健次, 白尾智明, 田辺光男, 関野祐子: 神経細胞の微細構造イメージングに基づく中枢神経系有害反応 *in vitro* 評価系の開発. 第 24 回日本バイオイメーjing学会学術集会 (2015, 9, 東京)
- [10] 佐藤 薫.: 非臨床薬理試験においてヒト iPS 細胞由来神経細胞を活用するために必要なこと. 千里ライフサイエンスセミナー J3 (講演), (2015, 9, 大阪)
- [11] Hoshikawa, K., Takahashi, K., Irie, T., Sekino, Y., Sato, K.: Study about the mechanisms of DHA-induced enhancement of glial excitatory amino-acid transporter EAAT2 function. 第 58 回日本神経化学学会大会 (2015, 9, さいたま市)
- [12] Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y., Sato, K.: Microglia regulate the cytokine/chemokine dynamics in the brain and enhance the functional maturation of blood-brain barrier. 第 58 回日本神経化学学会大会 (2015, 9, さいたま市)
- [13] Takahashi, K., Irie, T., Sekino, Y., Sato, K. Study about the mechanisms for the regulation of glial excitatory amino-acid transporter EAAT2 function by docosahexanoic acid. 第 38 回日本神経科学大会 (2015, 7, 神戸市)
- [14] Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y., Sato, K.: Microglia affect blood-brain barrier function via cytokines and chemokines release. 第 38 回日本神経科学大会 (2015, 7, 神戸市)
- [15] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y.: Microglia affect functional maturation and inflammation-induced breakdown of the blood brain barrier by modulating the dynamics of cytokines and chemokines. Society for Neuroscience 2015 (2015, 10, Chicago, USA)
- [16] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y.: Microglia have roles in both of maturation and break down of the barrier function of blood brain barrier. XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (2015, 7, Bilbao, Spain)

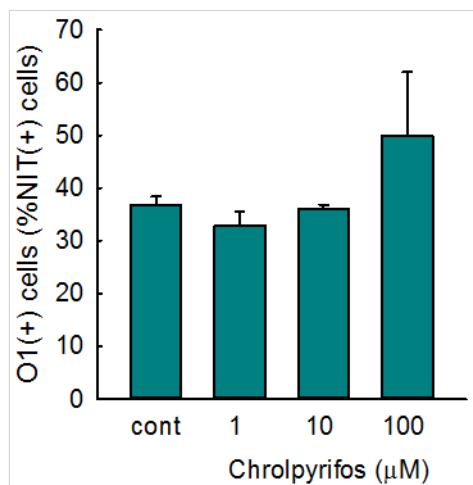
**A.**



**B.**



**C.**



**図 1. 前脳矢状面切片培養系における神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生に対するクロルピリホス 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 クロルピリホス (1-100 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)。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数。クロルピリホスは新生細胞数を濃度依存的に減少させる傾向を示した (黄土色カラム)。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 クロルピリホスで増加の傾向があり、その作用はオリゴデンドロサイト以外の細胞が標的となっている可能性が示された。\*: p<0.05, Tukey's test following ANOVA, N=4.