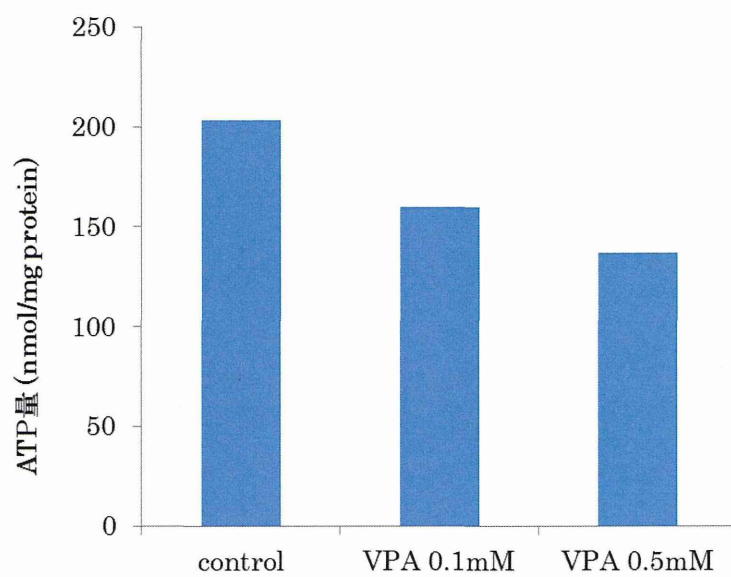


A



B

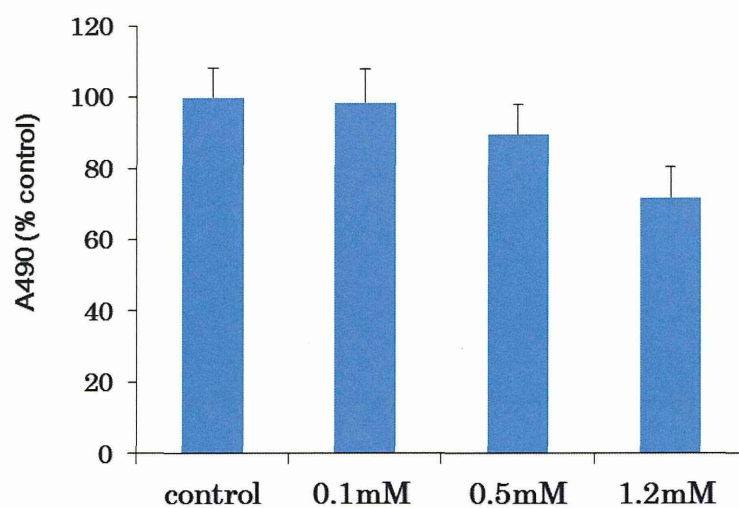


図1 NT2/D1 細胞におけるバルプロ酸による ATP 産生と増殖の抑制

A) NT2/D1 細胞において、バルプロ酸の暴露によって濃度依存的な ATP 産生低下が認められた。

B) バルプロ酸の暴露によって濃度依存的な増殖の抑制が認められた。

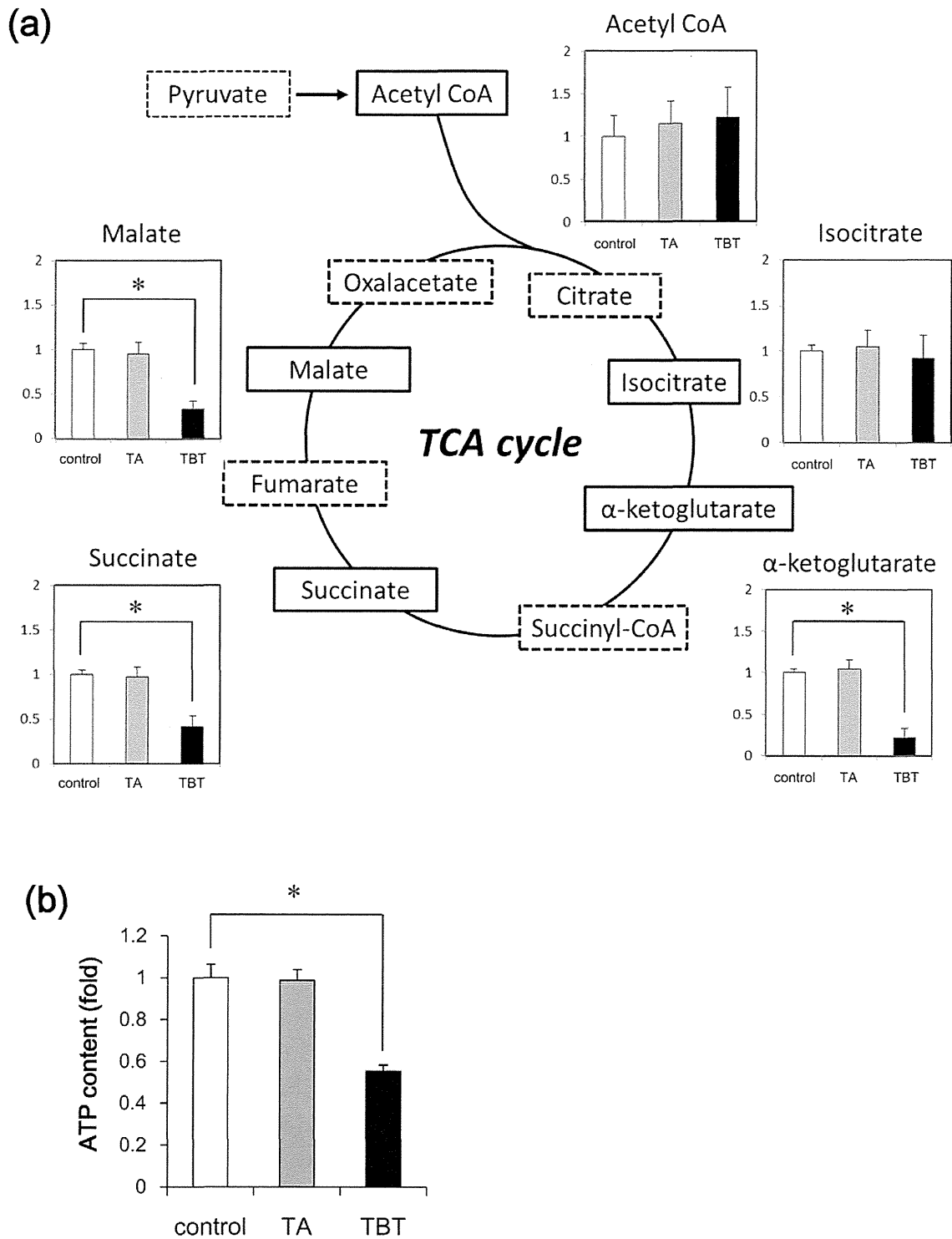


図2 NT2/D1細胞における代謝物質に対するTBT曝露の影響

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TCA回路の代謝物質量を測定した。(* $p < 0.05$, $n = 3$)

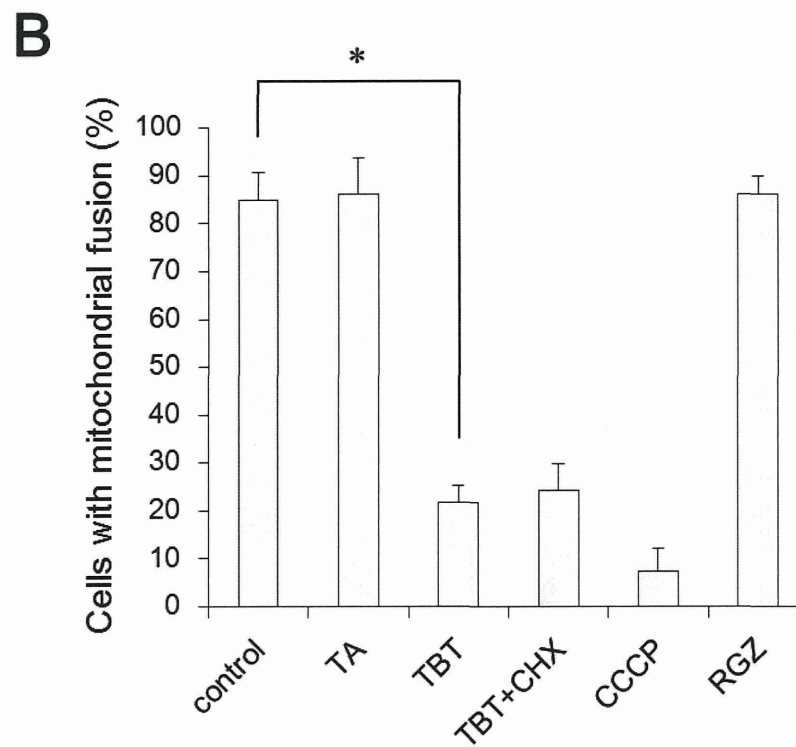
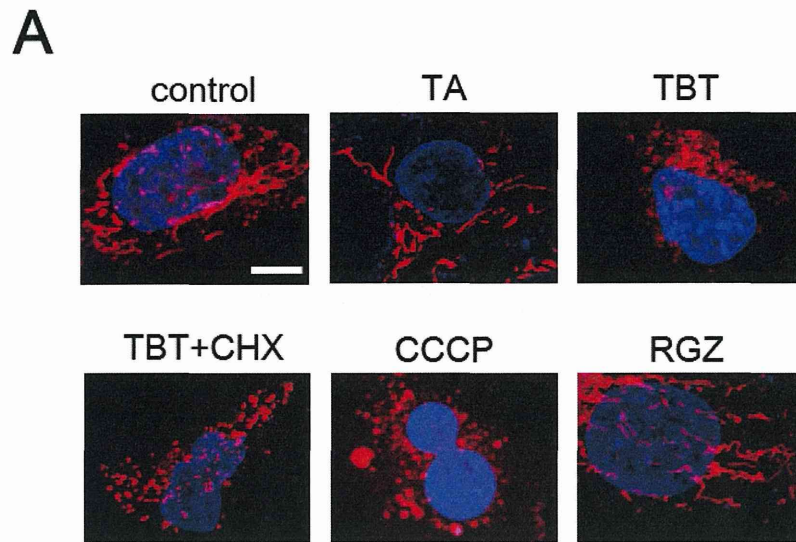


図3 トリブチルスズによるミトコンドリアの分裂亢進

A) 有機スズ TBT (100nM) により、ミトコンドリアの分裂が誘導された。一方、無機スズ TA によっては誘導されなかった。CCCP は脱共役剤でポジコンとして用いた。また、TBT の作用はタンパク質合成阻害剤 CHX によって影響を受けず、PPAR γ のアゴニストによって分裂は誘導されなかつたことから、非ゲノム作用による可能性が考えられた

B) A)の結果を定量的に評価した。

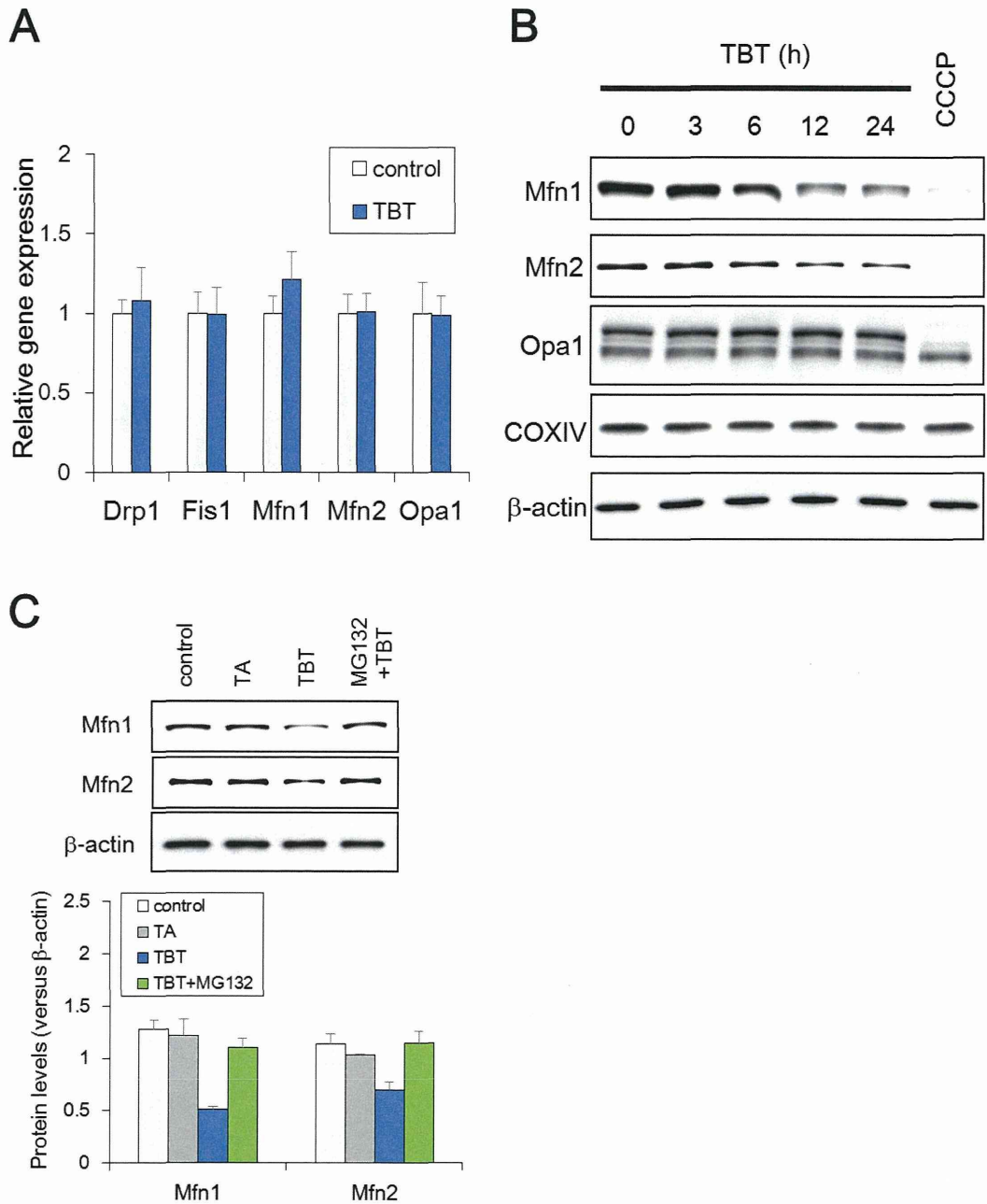


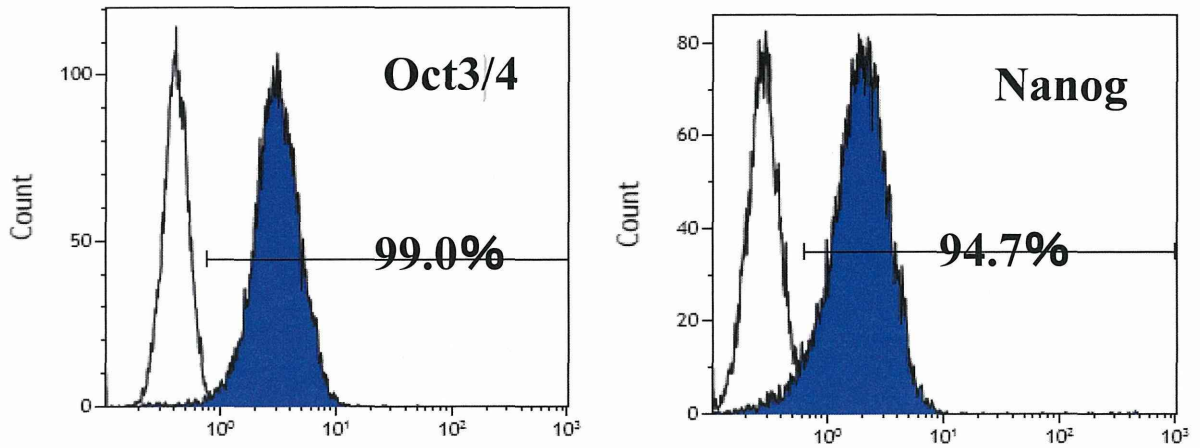
図4 トリプチルスズによる Mfn の分解

A) NT2/D1 細胞に 100nM の TBT を曝露させ、24 時間後に RNA を回収した。Drp1、Fis1、Mfn1、Mfn2、Opa1 の qPCR を行った。

B) 100nM の TBT を曝露した NT2/D1 細胞から cell lysate を作成し、分裂因子の発現をウエスタン法によって調べた。

C) Mfn1、Mfn2 の分解はプロテアソーム阻害剤の MG132 によって抑制された。

A



B

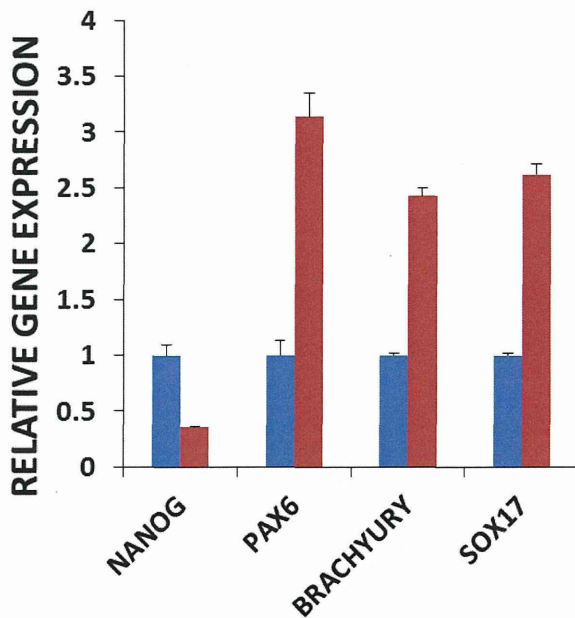


図5 ヒト iPS 細胞の未分化状態と多分能の評価

A) フィーダーフリーで継代した iPS 細胞 (253G1 株) を用いて、Oct4 あるいは Nanog を発現している細胞の割合を FACS で検討した。ほぼすべての細胞が Oct4、Nanog が陽性であった。

B) EB 形成法による多分化能を検討した。分化誘導に伴い、Nanog の発現が低下し、外胚葉マーカー Pax6、中胚葉マーカー Brachyury、内胚葉マーカー Sox17 の発現が亢進した。

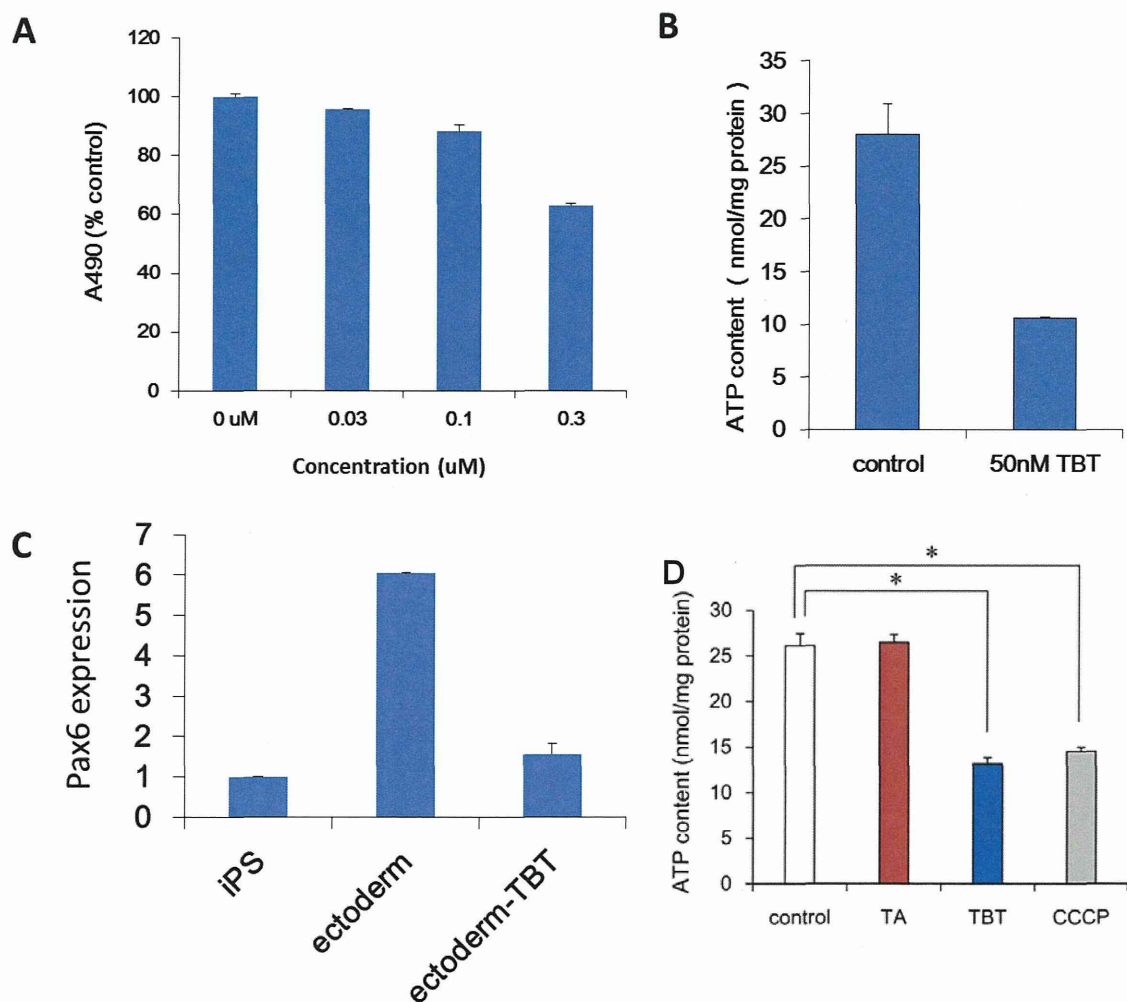


図6 ヒト iPS 細胞の増殖・分化に対するトリブチルスズの影響

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。

D) iPS 細胞に 50nM の TBT を曝露させ、72 時間後に ATP を測定した。TBT および脱共役剤 CCCP で ATP が低下した。TA は効果がなかった。

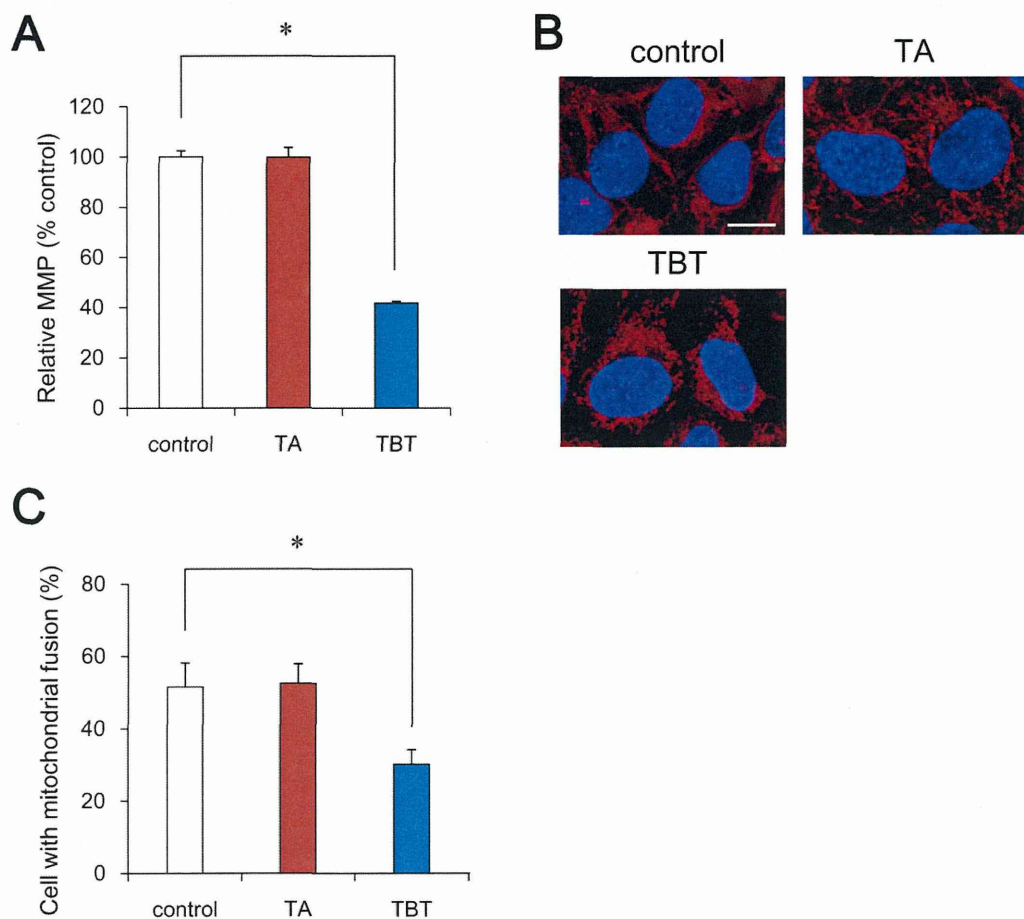


図7 トリプチルスズによるミトコンドリア機能阻害

A) iPS 細胞に 50nM の TBT を曝露させ、1 時間後にミトコンドリア膜電位を測定した。TBT で膜電位が低下した。TA は効果がなかった。

B) iPS 細胞に 50nM の TBT を曝露させ、72 時間後にミトコンドリア形態を共焦点顕微鏡で観察した。

C) B) の結果を定量的に評価した。TBT でミトコンドリア分裂低下が認められた。TA は変化がなかった。

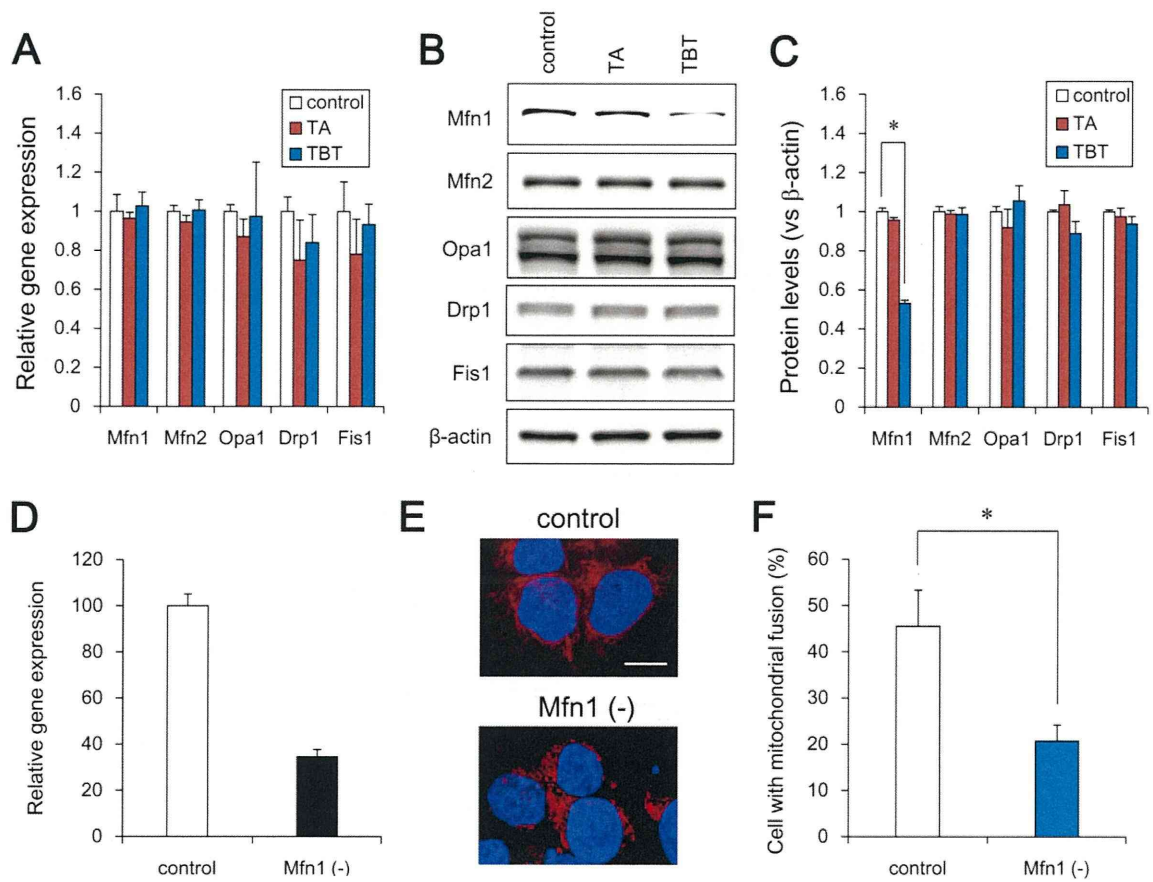


図8 トリブチルスズによる Mfn の分解

A) iPS 細胞に 50nM の TBT を曝露させ、72 時間後に RNA を回収した。Mfn1, Mfn2, Opa1, Drp1, Fis1 の qPCR を行った。

B) iPS 細胞に 50nM の TBT を曝露させ、72 時間後に蛋白質を回収した。Mfn1, Mfn2, Opa1, Drp1, Fis1 のウェスタンブロットを行った。

C) B) の結果を定量的に評価した。TBT で Mfn1 が分解した。

D) レンチウイルスを用いて iPS 細胞に Mfn1 shRNA を導入した後、RNA を回収した。Mfn1 ノックダウン効率を qPCR にて調べた。

E) Mfn1 ノックダウン細胞のミトコンドリア形態を共焦点顕微鏡で観察した。

F) E) の結果を定量的に評価した。Mfn1 ノックダウンによりミトコンドリア分裂低下が認められた。

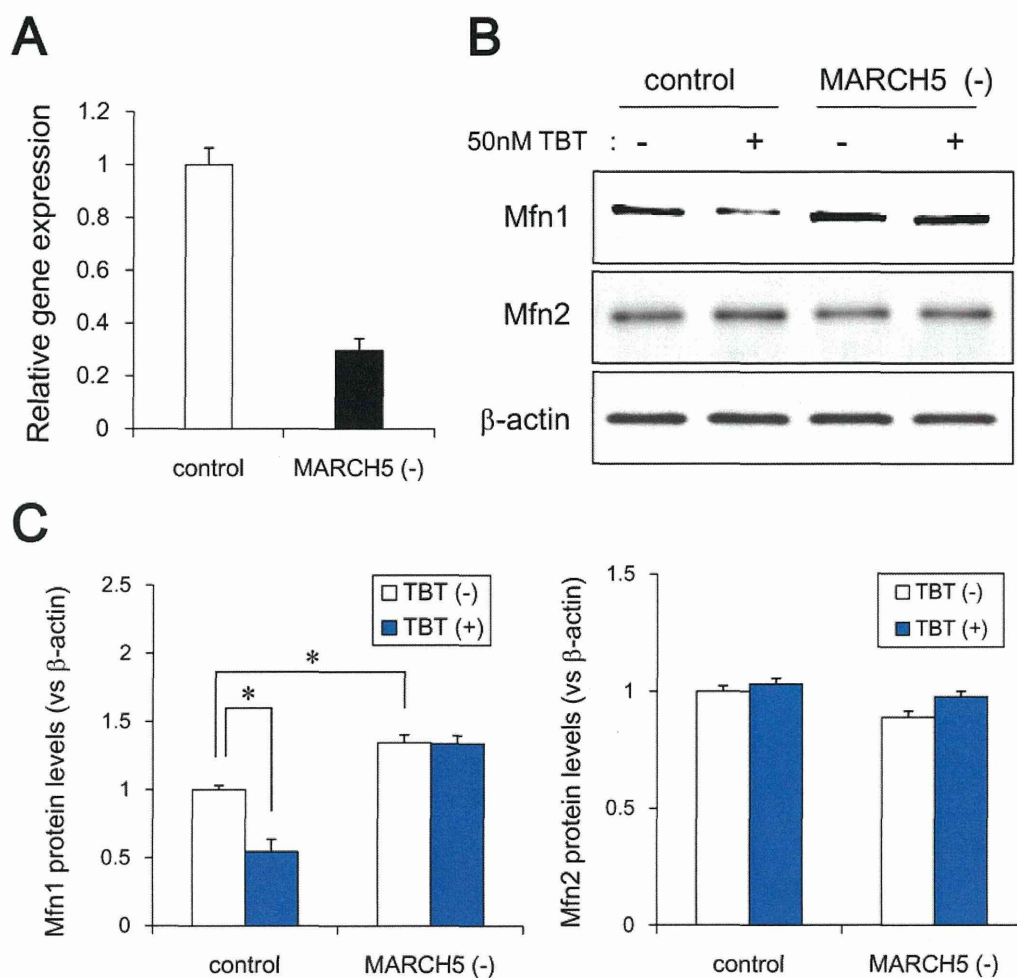


図9 トリブチルスズの Mfn1 分解における MARCH5 の関与

A) iPS 細胞に MARCH5 siRNA を導入した後、RNA を回収した。MARCH5 ノックダウン効率を qPCR にて調べた。

B) MARCH5 ノックダウン細胞に 50nM の TBT を曝露させ、72 時間後に蛋白質を回収した。Mfn1, Mfn2 のウェスタンブロットを行った。

C) B) の結果を定量的に評価した。MARCH5 ノックダウンにより TBT の Mfn1 分解が阻害された。

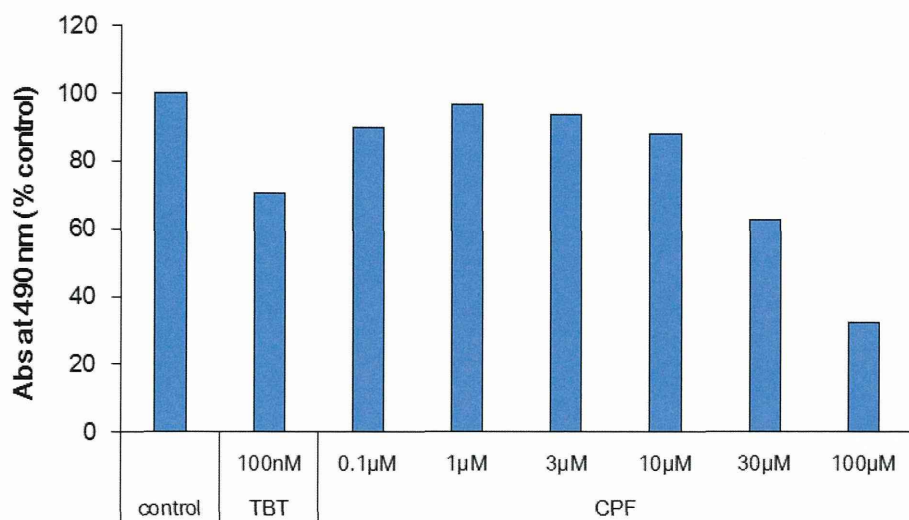


図10 クロルピリホスによる NT2/D1 細胞の増殖抑制

NT2/D1 細胞において、クロルピリホスの暴露による濃度依存的な増殖低下が認められた。

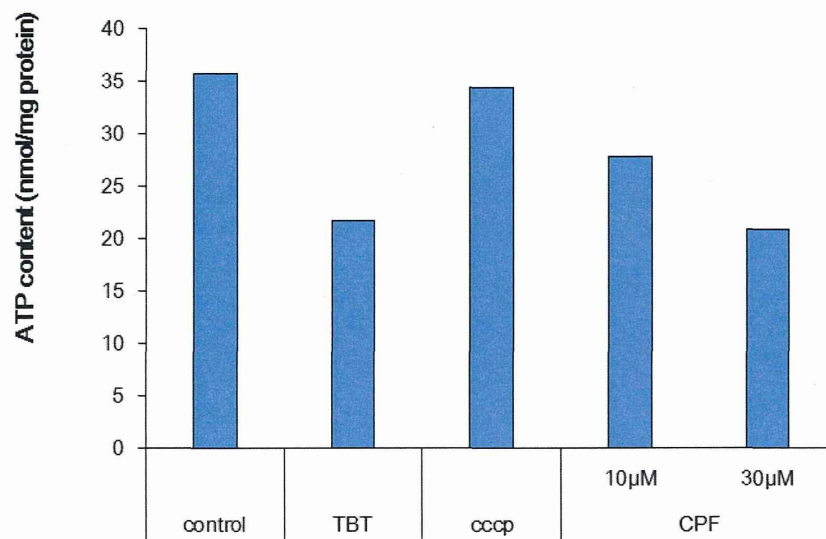


図 1 1 クロルピリホスによる NT2/D1 細胞の ATP 産生抑制

NT2/D1 細胞において、クロルピリホスの暴露による濃度依存的な ATP 産生抑制が認められた。

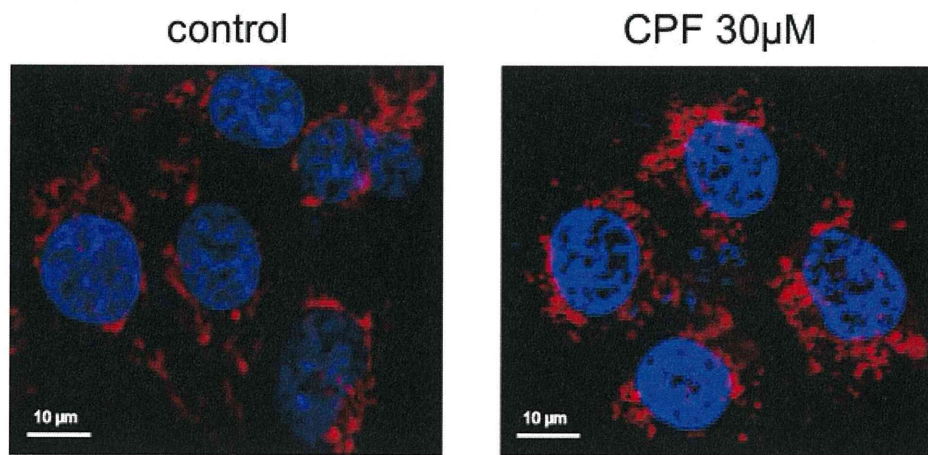


図 1 2 クロルピリホスによるミトコンドリア分裂促進
NT2/D1 細胞において、30μM クロルピリホスの暴露によりミトコンドリア分裂促進が認められた。

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

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、発達神経毒性を有すると考えられる化学物質として、バルプロ酸、トリブチルスズおよびクロルピリホスの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調べた。その結果、バルプロ酸は神経堤細胞遊走を促進した。遊走促進メカニズムを検討した結果、細胞遊走に関与する Rho キナーゼの関与は認められなかった。一方、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、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。また、クロルピリホスには、神経堤細胞の遊走に促進と抑制の相反する結果が認められ、遊走に対して複数のメカニズムを介して影響を及ぼすと考えられた。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化学物質の神経堤細胞に及ぼす影響を明らかにすることが出来た。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認し、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。

初年度は、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。次年度は、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た。最終年度は、神経発達毒性が報告されている農薬であるクロルピリホスをモデル化学物質として用いた。

B. 研究方法

1. 動物

ウイスターラット (Crlj: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% 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。バルプロ酸は、培養液に溶解して用いた。トリブチルスズおよびクロルピリホスは、ジメチルスルホキシドに溶解して用いた。

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。

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。

(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神経堤細胞に及ぼす影響

バルプロ酸 (0.6 および 1.2 mM) 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、1.2 mM においても有意な変化は認められなかった (図 1A)。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 で神経堤細胞の遊走促進が認められた (図 1B)。神経堤細胞が游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、神経管を存在下においても神経堤細胞の遊走促進が認められた (図 2)。

2. 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 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。培養 24 時間目の Rocki の添加により、神経堤細胞の遊走は、神経管の有無に関わらず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、神経管がある場合で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 (図 3)。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。

3. 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 4)。

4. 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 5)。

また、これまでに神経堤細胞遊走阻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、遊走阻害作用を増殖阻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阻害作用を示すにも関わらず、遊走阻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 6)。

5. クロルピリホスのラット神経堤細胞遊走に及ぼす影響

クロルピリホス (6.25, 12.5, 25, 50 および 100 μ M) 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、48 時間目では 100 μ M で、72 時間では 6.25 μ M 以上で、細胞毒性によると思われる遊走の抑制傾向が認められ、暴露時間の増加により作用が増強した (図 7)。一方、培養 18 時間で神経管を除去すると、クロルピリホス (100 μ M) は神経堤細胞の遊走を促進することがあったが (図 8)、72 時間目では、抑制傾向が認められた (図 9)。

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。

細胞遊走に關与する 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關与する可能性がある。

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。トリブチルスズの濃度 (100 nM) 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。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。

クロルピリホスは、神経堤細胞の遊走に相反する複雑な作用を示すことから、神経堤細胞の遊走に対して複数のメカニズムを介して影響を及ぼすと考えられる。

以上の結果から、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に關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、発達神経毒性を有すると考えられる化学物質の神経堤細胞に及ぼす影響を調べた。その結果、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。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。また、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。さらに、クロルピリホスは神経堤細胞の遊走に対して複数

のメカニズムを介して影響を及ぼすと考えられた。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。

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).
- [3] 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).
- [4] 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).
- [5] Usami M., Mitsunaga K., Miyajima A., Takamatu M., Kazama S., Irie T., Doi O., and Takizawa T. Effects of 13 developmentally toxic chemicals on the migration of rat cephalic neural crest cells in vitro. *Congenital Anomalies* (2015).
- [6] Irie T., Kikura-Hanajiri R., Usami M., Uchiyama N., Goda Y., and Sekino Y. MAM-2201, a synthetic cannabinoid drug of abuse, suppresses the synaptic input to cerebellar Purkinje cells via activation of presynaptic CB1 receptors. *Neuropharmacology* 95: 479–491 (2015).

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)
- [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).
- [6] 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. 化学物質が培養ラット神経堤細胞の増殖に及ぼす影響に関する研究. 第55回日本先天異常学会学術集会. 横浜 (2015).

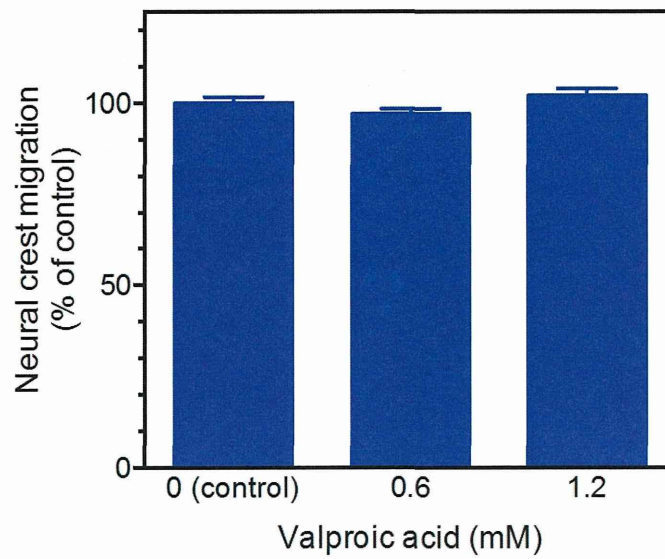
H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
なし。

(A)



(B)

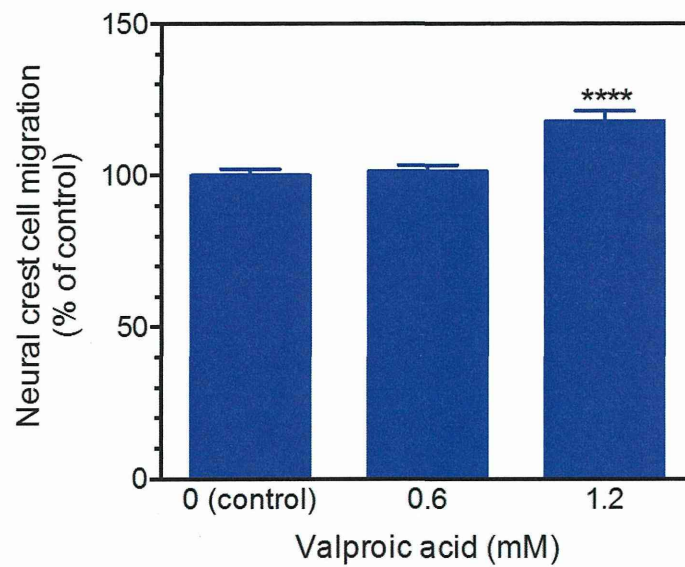


図 1. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすバルプロ酸 (valproic acid) の影響

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。

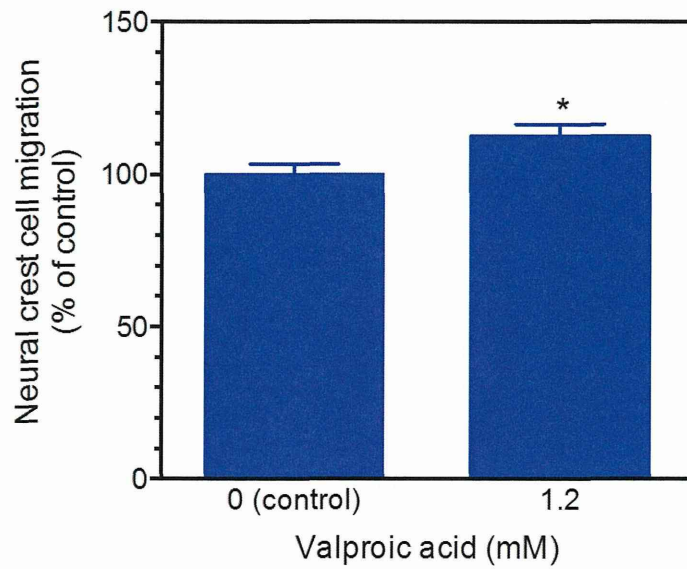


図 2. 培養開始時からのバルプロ酸添加が (valproic acid) ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす影響

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 (* $p < 0.05$)。

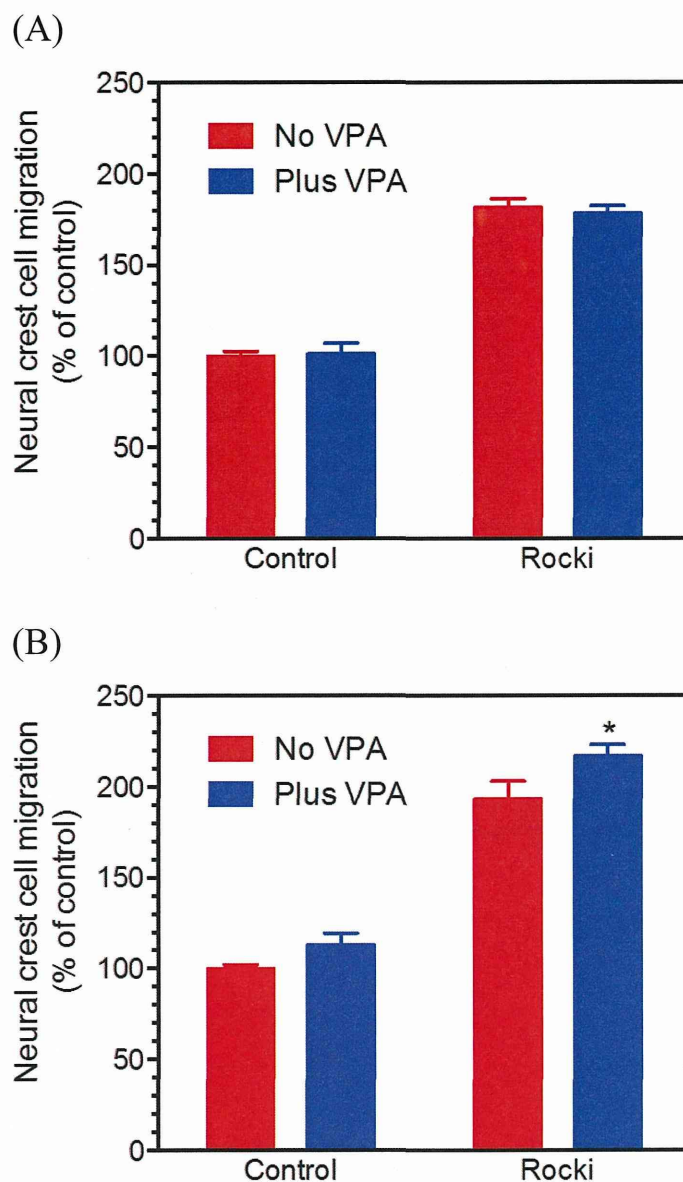


図3. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすバルプロ酸 (VPA) および Rho キナーゼ阻害剤 (Rocki) の影響

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。

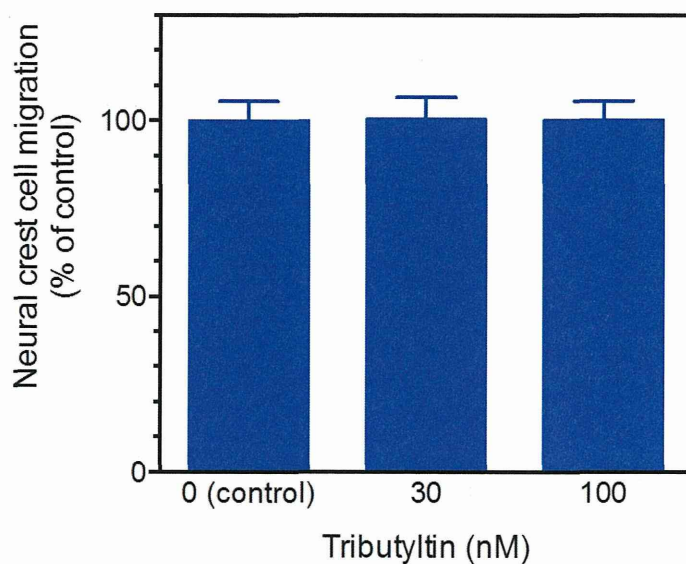


図 4. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすトリブチルスズ (tributyltin) の影響

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。