

## H27 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

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の  
誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究  
(H27-化学-一般-007)

分担研究課題：幼若期ネオニコチノイド暴露による行動毒性

研究代表者：種村 健太郎（東北大学大学院農学研究科・動物生殖科学分野・教授）

### 【研究要旨】

本研究は、発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することを目的とする。

平成27年度は、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを生後2週齢および生後10週齢のマウスに投与し、生後12-13週齢に情動認知行動解析を行った。その結果、幼若期投与による学習記憶異常の誘発が認められた。また、いずれも海馬において神経新生能が有意に低下していた（中嶋との共同研究）。さらに大脳、海馬における網羅的遺伝子発現解析に基づくパスウェイ解析を行った結果から、幼若期アセタミプリド投与群に髄鞘機能低下、軸索機能異常、神経保護作用低下が生じていることが示唆された（菅野、北嶋との共同研究）。

また、これまでにを行ったドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬であるアセフェート等の発生発達期暴露により成熟期に誘発される行動解析結果と併せて、情動認知行動異常値を設定する検定項目として、オープンフィールド試験における総移動量と中央部滞在時間、条件付け学習記憶試験における短期記憶形成能と空間記憶能についての妥当性の検証を開始した。

### A. 研究目的

先行研究 (H20-化学-一般-009)にて、周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の神経毒性試験法では同定困難な情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉えた。次の研究 (H23-化学-一般-004)では、それらが毒性指標として定量評価できることを示した。本研究は、先行研究を踏まえて発生発達期における化学物質の低用量暴露が

成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量的に捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することを目的とする。これにより情動認知行動異常の高精度なリスク評価が普遍性を持って実施可能となり、行政対応に必須のバリデーションに耐え、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としてのガイドライン作成と、OECD への提案を通じての国際貢献を目指す。

尚、中枢神経系の発生発達に重要な役割を果たす神経可塑性の分子背景が各種の脳内伝達物質の適切な機能に深く依存しているという知見と、その機能の外的なかく乱が人の集団の情動認知機能異常を引き起こすという疫学的調査報告が有り、低用量の化学物質が胎児や小児に及ぼす中枢影響の毒性学的評価が問題となっている。この様な、低用量暴露の結果として成熟後に情動認知行動異常が顕在化するという毒性を評価するための動物試験は、従来は主観的な心理学的記述に終始する事が多く、行政対応への適用が困難であった。この為、普遍的、客観的、定量的、かつ高精度な情動認知行動異常リスクの評価系の作成が必要である。

H27 年度には、本分担研究として、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドについて、幼若期マウスへの投与による成長後の成熟期の行動異常と、それと対応する神経科学的物証の収集を行うとともに、これまでに行ったドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬であるアセフェート等の発生発達期暴露により成熟期に誘発される行動解析結果と併せて、情動認知行動異常値を設定する検定項目として、オープンフィールド試験における総移動量と中央部滞在時間、条件付け学習記憶試験における短期記憶形成能と空間記憶能についての妥当性の検証を開始した。

## B. 研究方法

ネオニコチノイド系農薬としてアセタミプリドとイミダクロプリドを用いた。幼若期投与として生後 2 週齢を、成熟期投与として生後 11 週齢を設定し、雄マウスに対してゾンデを用いて、アセタミプリド (10mg/kg) またはイミダクロプリド (8mg/kg) を単回強制経口投与した (溶媒はコーンオイルを使用)。いずれのマウスも生後 4 週齢時に離乳させ、4 匹/ケージにて飼育した。溶媒投与群 (生後 2 および 11 週齢時にコーンオイルを強制経口

投与した) とともに、生後 12-13 週齢時にオープンフィールド試験 (検定項目として、総移動量、中央部滞在率、総移動回数)、明暗往来試験 (検定項目として、明所滞在時間、明暗往来数、暗所滞在時間)、高架式十字迷路試験 (検定項目として、総移動量、オープンアーム滞在時間、総アーム選択数)、条件付け学習記憶試験 (検定項目として、学習度、場所連想記憶度、音連想記憶度)、プレパルス驚愕反応抑制試験 (検定項目として、120dB に対する 90、95、100dB のプレパルスによる驚愕反応抑制抑制度) からなるバッテリー式の行動解析を行った。

行動解析後のマウスについて、免疫組織化学解析、percellome 法による網羅的遺伝子発現解析 (大脳および海馬) を行った。さらに遺伝子発現解析結果に基づき Ingenuity Pathway Analysis にてパスウェイ解析を行った。

先行研究「H20-化学-一般-009」および「H23-化学-一般-004」にて行ったドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬であるアセフェート等の発生発達期暴露により成熟期に誘発される行動解析を元に、情動認知行動異常値を設定する検定項目として、オープンフィールド試験における総移動量と中央部滞在時間、条件付け学習記憶試験における短期記憶形成能と空間記憶能についての妥当性の検証を目的として、これまでの溶媒投与対象群マウス (生後 12-13 週齢) 300 匹の計測値との比較を行った。

## C. 研究結果

バッテリー式の情動認知行動解析の結果、高架式十字迷路試験において、アセタミプリドの幼若期投与による不安関連行動の逸脱が認められるとともに条件付け学習記憶試験において、アセタミプリドおよびイミダクロプリドの幼若期投与による学習記憶異常の誘発が認められた。さらに、神経新

生マーカーを用いた免疫組織化学から、アセタミプリドおよびイミダクロプリドの幼若期投与群の海馬において神経新生能低下が示された。また、大脳、および海馬について網羅的遺伝子発現解析と、その解析結果に基づくパスウェイ解析から、幼若期アセタミプリド投与群に髄鞘機能低下、軸索機能異常、神経保護作用低下が生じていることが示唆された

これまでの研究から得られた溶媒投与対象群マウス（生後 12-13 週齢）300 匹についての、オープンフィールド試験における総移動量と中央部滞在時間、条件付け学習記憶試験における短期記憶形成能と空間記憶能について比較を行った結果、溶媒投与群の呈する解析値の幅が多く、異常「個体」値の設定には至らなかった。

#### D. 考察

ネオニコチノイド系農薬の発達期における化学物質暴露による成熟後の神経行動異常と、対応する神経科学的物証について、暴露による影響を効率良く、また高精度に、かつ定量的に捕捉することに成功していると考えられた。

化学物質の暴露影響評価は、一般に「群」間の比較に基づくものである。今回、300 匹分の溶媒投与群の行動解析結果を元に、異常「個体」値の設定を開始したが、溶媒投与群のそれぞれの個体の解析値が分散しているため、異常「個体」値の設定には至らなかった。今後、溶媒の種類や試行時期についても検討を加える必要があると考えられた。

#### E. 結論

ネオニコチノイド系農薬の発達期における化学物質暴露による成熟後の神経行動異常と、対応する神経科学的物証について捕捉することに成功した。また、情動認知行

動異常の基準値設定は、従来の「群」間の評価を中心に検討するとともに、「個体」値での評価も併行して検討する必要があると考えられた。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

なし

###### 2) 雑誌

Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K. Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. *Stem Cell Reports*. 2015 Dec 8;5(6):996-1009.

Yabusaki R, Iwano H, Tsushima S, Koike N, Ohtani N, Tanemura K, Inoue H, Yokota H. Weak activity of UDP-glucuronosyltransferase toward Bisphenol analogs in mouse perinatal development. *J Vet Med Sci*. 2015 Dec 1;77(11):1479-84.

Otaka K, Hiradate Y, Kobayashi N, Shirakata Y, Tanemura K. Distribution of the sex chromosome during mouse spermatogenesis in testis tissue sections. *J Reprod Dev*. 2015 Oct 21;61(5):375-81.

Nakano K, Nishio M, Kobayashi N, Hiradate Y, Hoshino Y, Sato E, Tanemura K.

Comparison of the effects of BPA and BPAF on oocyte spindle assembly and polar body release in mice. *Zygote*. 2015 Apr 30;1-9.

Ishikawa S, Hiraga K, Hiradate Y, Tanemura K. The effects analysis of two neonicotinoid insecticides on in vitro maturation of porcine oocytes using hanging drop monoculture method. *J Vet Med Sci*. 2015 Jun;77(6):725-8.

Ohtake J, Sakurai M, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Expression of focal adhesion kinase in mouse cumulus-oocyte complexes, and effect of phosphorylation at Tyr397 on cumulus expansion. *Mol Reprod Dev*. 2015 Mar;82(3):218-31.

## 2. 学会発表

北嶋聡、種村健太郎、菅野純「医療現場への還元に向けた Percollome

Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究」第 42 回日本毒性学会学術集会、2015 年 6 月（金沢市）

菅野純、種村健太郎「ヒトの急性中毒症状を動物実験で再現できるか-有機リン剤等暴露後の遅発性毒性の発現実験より-」第 37 回日本中毒学会学術集会、2015 年 7 月（和歌山市）

梅津康平、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「フローサイトメトリー分離によるウシ精子のレクチン結合様式への影響」第 65 回東北畜産学会、2015 年 8 月（仙台市）

関根雅史、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、平館裕希、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「バルプロ酸の利用によるマウス精子エピゲノム改変誘導の試み」第 65 回

東北畜産学会、2015 年 8 月（仙台市）

内藤秋、記緒、斉藤隼人、沼邊孝、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「受精能獲得に伴うブタ精子のヒストン H4 修飾様式の変化」第 65 回東北畜産学会、2015 年 8 月（仙台市）

小林記緒、白形芳樹、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「マウス精子における MeCP2 タンパクの発現解析」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月（十和田市）

斉藤洋克、井上弘貴、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「ビタミン E 欠乏給餌におけるマウス雄性生殖機能影響解析」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月（十和田市）

内藤秋、白形芳樹、小林記緒、斉藤隼人、沼邊孝、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「ブタ精子におけるヒストン H4 の修飾動態解析」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月（十和田市）

梅津康平、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシ精子におけるレクチン結合様式」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月（十和田市）

関根雅史、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、平館裕希、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「生体内におけるマウス精子エピゲノム改変の化学的誘導」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月（十和田市）

原健士朗、種村健太郎、吉田松生「精細管基底区画における分化軸に沿った精原細胞の局在変化」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）

平舘裕樹、井上弘貴、小倉淳郎、種村健太郎「マウス卵成熟過程における Tau の発現とリン酸化パターンの解析」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）

井上弘貴、種村健太郎、小倉淳郎「H2B-eGFP+H2B-mCherry ダブル T G マウスを用いた FRET 法の開発およびその初期胚クロマチン動態解析への試み」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）

小林記緒、白形芳樹、平舘裕希、岡江寛明、樋浦仁、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「社会的生育環境要因が惹起する雄性生殖細胞系列および次世代へのエピジェネティック影響」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）

白形芳樹、小林記緒、平舘裕希、岡江寛明、樋浦仁、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「低用量ビスフェノール類慢性暴露によるマウス雄性生殖細胞エピジェネティック修飾への影響解析」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）

猪股大貢、原健士朗、種村健太郎「Hanging Drop 法を用いた体外成熟単培養系におけるマウス卵母細胞へのネオニコチノイド類暴露影響解析」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）

斉藤洋克、植松未知、白形芳樹、原健士朗、種村健太郎「幼若期雄マウスへのペルメトリン投与による成熟期生殖機能影響解析」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）

種村健太郎、古川祐介、斉藤洋克、白形芳樹、原健士朗、北嶋聡、菅野純「幼若期マウスへのネオニコチノイド系農薬投与による神経行動毒性発現」第 18 回環境ホル

モン学会、2015 年 12 月（下総市）

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

H27 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

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、  
その毒性学的評価系構築に資する研究  
(H27-化学-一般-007)

分担研究課題：行動柔軟性/抑制課題試験の開発と毒性評価への応用

研究分担者 掛山 正心

早稲田大学 教授

【研究要旨】

マウスを対象とした行動柔軟性課題と行動抑制課題について検討した。行動柔軟性課題は本事業（H20 - 化学-一般-010）において作成したものを、無機ヒ素の曝露実験に適用し試験法の妥当性検証と修正を行った。通常の空間認知課題では影響の顕われない低用量の無機ヒ素曝露の仔マウスにおいて行動柔軟性の低下を認め、行動柔軟性課題は認知・情動機能を鋭敏に検出する評価手法であることが明らかとなった。次に行動柔軟性課題をもとに、タッチスクリーン型オペラント実験箱を用いた行動抑制課題の開発に着手した。

A. 研究目的

発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することが本研究の目的である。具体的には、マウスを用いての行動解析試験の成績を定量的な値として項目ごとに記録し、異常の定義を行う。項目ごとに定量化手法を決定し情動認知行動「毒性基準値」に対応する個々の神経科学的「異常基準値」を設定する。本年度は、認知機能ならびに情動機能の評価手法について検討した。

B. 研究方法

本年度はマウスを対象とした行動柔軟性課題と行動抑制課題について検討した。

測定することができる。ケージの4隅にはオペラント・チャンバー（コーナー・チャンバー）が設置され、ノーズ・ポーク反応により報酬となる飲水が提示される。我々が開発した行動柔軟性課題は、2つのコーナー・チャンバー間を往復させる行動系列の獲得を伴う空間学習（behavioral sequencing task）と、その後の反復逆転課題からなる（Endo *et al.*, Behav. Brain Res. 2011、H20 - 化学-一般-010の成果）。

**ヒ素曝露実験による行動柔軟性課題の検証**

疫学調査により、環境中に存在する無機ヒ素は比較的低濃度曝露であってもIQや認知機能の低下を引き起こすことが疫学調査結果から報告されている。そこで本研究では、発達期マウスに無機ヒ素を曝露し、後発的に行動にどのような異常が起こるか検討することで、行動柔軟性課題の妥当性検証と修正を行った。

妊娠C3Hマウス8日目から18日目まで、母マウスの飲水中に亜ヒ酸ナトリウムNaAsO<sub>2</sub> (85 ppm)を添加することで発達期無機ヒ素曝露群を作製した。飲水中に無機ヒ素を加えない母体から出生した仔を対照群として用いた。マウスが60週令に達した後、IntelliCageを用いて、マウスの行動量、飲水量、行動パターンの解析を行うと共に、空間学習試験と行動柔軟性試験により行動異常

**行動柔軟性課題**

行動柔軟性課題は本事業（H20 - 化学-一般-010）において作成したものを、集団型全自動行動・学習測定システムIntelliCage（New Behavior社、Zurich）（Galsworthy, Amrein, Kuptsov, Poletaeva, Zinn, Rau, Vyssotski, & Lipp, 2005）を用いたもので、マウスの皮下にIDチップを埋め込むことで、最大16匹のマウスを同じケージ内で飼育しながら、個々の動物の試験成績を自動

の検出を試みた。

行動試験終了後、脳を固定し、ゴルジ染色による大脳前辺縁皮質における神経突起長やスパイン数を計測した。

### **タッチスクリーン型行動抑制課題の開発**

行動柔軟性課題をもとに、よりヒトへの外挿性を高める課題を開発するため、タッチスクリーン型オペラント実験箱を用いた行動抑制課題を開発することとした。

スクリーン映像を用いた視覚弁別課題はマウスではこれまで不可能とされてきた。しかし数年前に Nature Protocol 誌(8:1961-84., 2013)で発表された「Bussey 装置」によりマウスでも視覚課題ができることが明らかとなった。本研究ではまず、「Bussey 装置」よりもさらにマウスの視覚課題成績が向上した新規のオペラント箱を作成することとした。

(倫理面への配慮)

早稲田大学ならびに研究協力機関(国立環境研究所、東京大学)の動物実験委員会、遺伝子組み換え実験委員会等の関連委員会の審査のもと、各機関長承認を得た上で研究を行った。日本学会議動物実験に関する詳細指針に基づき、飼養及び保管条件を厳守、苦痛の軽減、動物数と動物へのストレスを最小限にすること、安楽死の方法に配慮して実験を行った。

## C. 研究結果

### **行動柔軟性課題**

この課題は全自動試験装置を用いて行われており、我々が作成したプログラムをインストールすることで、他の研究機関でもすぐに用いることができる。これまでに国内外の大学や研究所等に提供してきたが、そのうち3割ほどの研究機関では実験成績が一定しておらず、実験室の必要条件や管理に関する実験マニュアルの作成が求められていた。今回、経験者の指導のもと、同装置を初めて使用する大学院生がマニュアルをもとに作業を行い、成功することができた。すなわち同課題は、一般的なマウス飼育管理の経験をもつ担当者が実務作業を行うことが可能であることが実証された。

### **ヒ素曝露実験による行動柔軟性課題の検証**

対照群と発達期無機ヒ素曝露群間で、行動量、飲水量、行動パターンに違いは認められなかった。

また、空間学習能力にも違いは認められなかった。

一方、行動柔軟性試験では、発達期無機ヒ素曝露群において、有意に適応力の低下が認められた(図1)。

また、行動柔軟性との関連が報告されている大脳前辺縁皮質では、スパイン数には群間で違いは認められなかったが、発達期無機ヒ素曝露群で有意に神経突起長の低下が認められた(図2)。このような結果は、発達期無機ヒ素曝露群では、大脳前辺縁皮質における神経突起長低下が行動柔軟性の異常を誘導している可能性を示唆している。

### **タッチスクリーン型行動抑制課題の開発**

これまでに作成したオペラント箱により、図形の単純弁別課題で正答率90%以上を達成し、行動抑制課題のプログラム作成も開始した。

## D. 考察

### **行動柔軟性課題**

IntelliCage装置は16匹のマウスの同時測定が可能であり、本研究により実験マニュアルも整備することができた。一台につき100万円程度と高価であるが、理論上は作業員一名で飼育管理を含めて30台を管理することができるので、一人あたり一年あたり4800匹の行動解析が可能となる。ハイスループット試験系として普及を期待したい。

### **ヒ素曝露実験による行動柔軟性課題の検証**

行動柔軟性課題については、これまでにダイオキシン等の曝露実験により、他の毒性指標よりも低用量の周産期曝露により行動柔軟性が低下することを明らかにしてきたが、今回は同試験法を無機ヒ素の曝露実験に適用し、その試験法の妥当性検証と修正を行った。通常空間認知課題では影響の顕われない低用量の無機ヒ素曝露の仔マウスにおいて、行動柔軟性課題における有意な適応力低下を見出したことから、行動柔軟性課題は認知・情動機能を鋭敏に検出する評価手法であることが明らかとなった。

## E. 結論

発生発達期における化学物質の低用量曝露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性的な意味づけを明確にできる評価系を作出する上で、行動柔軟性課題

の適用と行動抑制課題の開発をさらに進めるべきである。

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Aung KH, Kyi-Tha-Thu C, Sano K, Nakamura K, Tanoue A, Nohara K, Takeyama M, Tohyama C, Tsukahara S, Maekawa F. Prenatal Exposure to Arsenic Impairs Behavioral Flexibility and Cortical Structure in Mice. *Frontiers in Neuroscience* 10, 137(eCollection), 2016.

2. 学会発表

掛山正心、「マウスを用いた前頭野依存性行動モデル：高次学習から実行機能へ」第45回日本神経精神薬理学会・第37回日本生物学的精神医学会シンポジウム2015/09、東京。

Maekawa F, Htet Aung K, Sano K, Nakamura S, Tanoue A, Takeyama M., Tohyama C., Nohara K, Tsukahara S. Prenatal arsenic exposure impaired behavioral flexibility and morphology of cortex in mice. 9th World Congress International Brain Research Organization. 2015/07, Rio de Janeiro, Brazil.

掛山正心、「環境と脳：ダイオキシン毒性実験からみた高次脳機能発達」第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会2015/09、仙台。

ベナー聖子・尾藤晴彦・掛山正心・山末英典、「集団内行動の定量化に基づくオキシトシン効果判定指標の網羅的探索：マウスを用いた予備的検討結果」第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会2015/09、仙台。

H. 知的財産所有権の出願・登録状況  
該当なし



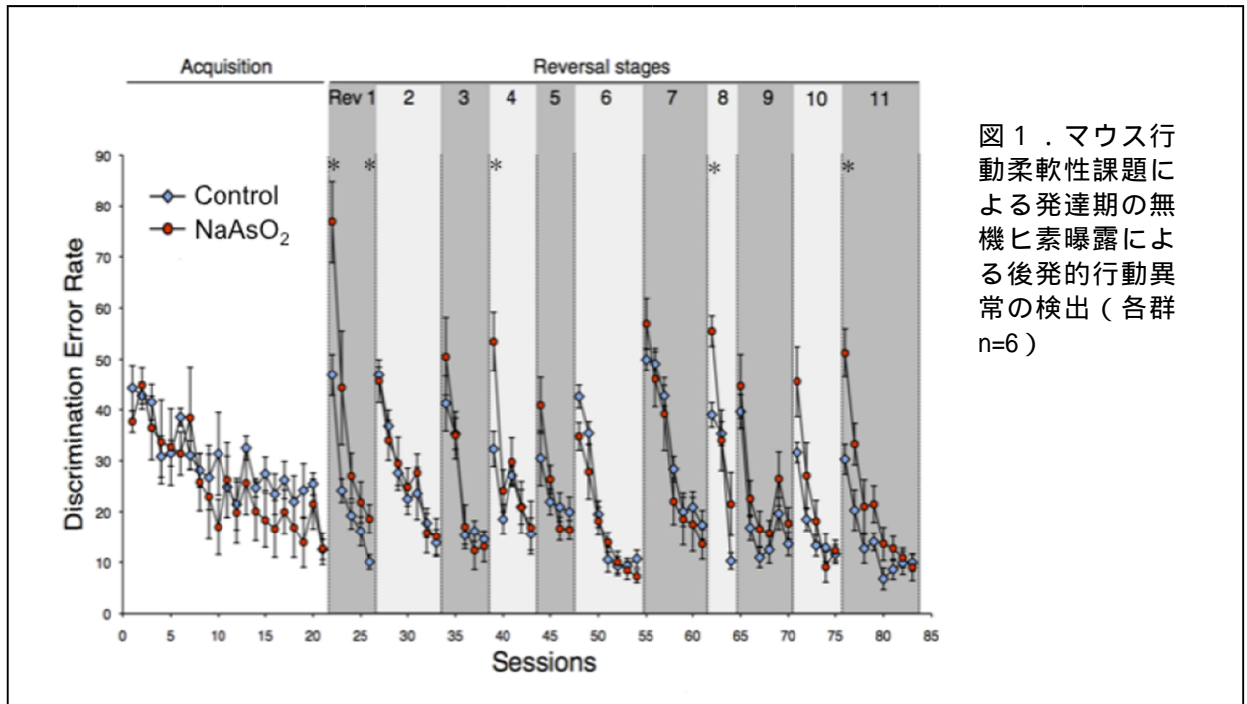
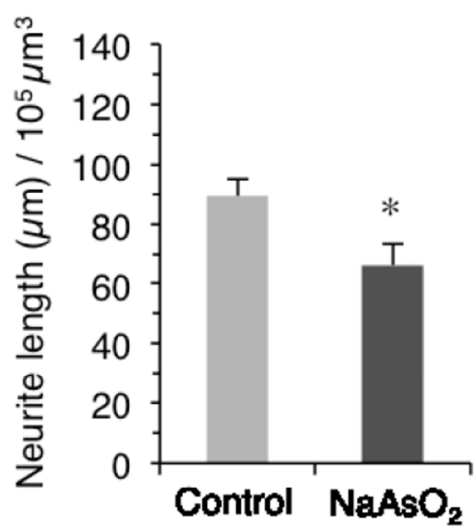
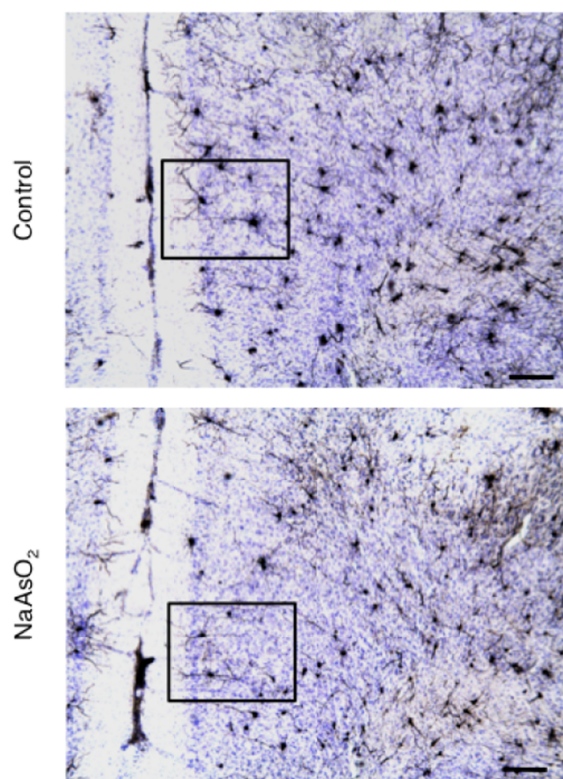


図1．マウス行動柔軟性課題による発達期の無機ヒ素曝露による後発的行動異常の検出（各群 n=6）

図2. 発達期ヒ素曝露による神経突起長の低下



**H27 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**

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、  
その毒性学的評価系構築に資する研究  
(H27-化学-一般-007)

分担研究課題：「エストロゲン受容体遺伝子改変マウスの解析、  
遺伝子発現解析と異常基準値の設定」  
-エストロゲン受容体 置換マウスの脳における遺伝子発現プロファイル-

研究分担者      北嶋 聡      国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

**【研究要旨】**

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体遺伝子改変マウス2種(国立医薬品食品衛生研究所毒性部にて独自に作出した)を、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるが、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、脳における網羅的遺伝子発現変動解析を行う。

平成27年度(今年度)は、エストロゲン(ER) 遺伝子座に、ER cDNAと牛成長ホルモン由来の3'-UTRをつなげたものを、相同組換えにより遺伝子導入し、独自に作製したER 受容体遺伝子置換マウス(以降、このホモ型をER KIと記載)を使用し、脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)について網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。ER KIマウスにおけるER の発現は野生型の20-25%であり、したがってER KIマウスはER ノックダウンマウスと考える事ができる。また、ER cDNAと置換していることから、理論上、ER のスプライシングバリエーションが発現できないマウスと考えることができる。情動認知行動解析結果から、ER KIマウスは、音-連想記憶及び空間-連想記憶に障害が認められることが確認されている。

遺伝子発現変動解析の結果、野生型と比較し、ER KIマウスの大脳皮質、海馬及び脳幹では、それぞれ283(増加:168、減少:115)、972(増加:908、減少:64)及び230(増加:205、減少:25)プロセッティング(ps)の有意な発現変動が認められた。脳3部位に共通して、発現が有意に増加した遺伝子は4つ(5 ps: Sgk1, Adat2, Nfkb1a, Ruffy2)他方、減少した遺伝子はER (Esr1)を含む2つ(2 ps: Igh-6, Esr1)であった。各部位における解析の結果、ER KIマウスの大脳皮質では、神経系の障害に関わるシグナルネットワークは現時点で認められないが、多くのSlcトランスポーターの発現変動が認められ、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進していること、また発現増加遺伝子のプロモーター解析(*in silico*)の結果、Esr1が上位にリストアップされたことから、ERシグナルが活性化している可能性が示唆された。海馬

では、GABA、アセチルコリン、グルタミン酸、アドレナリン受容体の発現が増加し、K<sup>+</sup>チャネルとCa<sup>2+</sup>チャネル遺伝子の発現が増加することから、興奮性・抑制性双方の神経伝達が亢進していること、また大脳皮質と同様に、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進し、ERシグナルが活性化している可能性が示唆された。一方、脳幹では、神経系の障害に関わるシグナルネットワークは現時点で認められなかった。

他方、先行研究におけるER 欠失マウスの大脳皮質、海馬及び脳幹における解析の結果、大脳皮質において、RARシグナル伝達の低下、神経活動の活性化および概日リズムが乱れることが示唆され、海馬では神経系の障害に関わるシグナルネットワークは認められないが、脳幹では神経活動が活性化および概日リズムが乱れる可能性が示唆された。そこで、ER 欠失マウスとER KIマウスにおける解析結果を比較すると、ER KIマウスの脳では、RARシグナルおよび概日リズム関連遺伝子の発現変動は、野生型のものとは有意な差が認められないため、ER 欠失マウスとER KIマウスにおける情動認知行動異常の差（情動障害）は、大脳皮質におけるRARシグナル伝達の低下、あるいは大脳皮質および脳幹における概日リズムが乱れることが関係していることが示唆された。また、ER KIマウスは、ER ノックダウンマウスと考えることができるが、今回の解析結果からは、ER シグナルがむしろ活性化していることが示唆された。この点、多くのER のスプライシングバリエーションが、ER の効果に対してdominant-negativeな影響を有することが報告されていることから、ER のスプライシングバリエーションが発現できないER KIマウスでは、野生型と比較し、ER シグナルが亢進していることが推察された。

## A. 研究目的

本研究全体の目的は、平成20年度に開始した先行研究 (H20-化学-一般-009)にて、周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の神経毒性試験法では同定困難な情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉え、次の研究(H23-化学-一般-004)では、それらが毒性指標として定量評価できるものであることを示したが、これらを背景に、発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することで

ある。

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体遺伝子改変マウス2種(国立医薬品食品衛生研究所毒性部にて独自に作出した)を、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるが、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、脳における網羅的遺伝子発現変動解析を行う。

今年度(平成27年度)は、この目的遂行の為に、成熟期(48週齢)の雄性ER KIマウスの脳3部位(大脳皮質、海馬及び脳幹)のサンプルについて、Perce llome法により網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものとは比較・検討した。

## B. 研究方法

マウスの系統は C57BL/6NCrSlc (日本エスエルシー)を用いた。ER KI マウスは、エストロゲン(ER) 遺伝子座に、ER cDNA と牛成長ホルモン由来の 3' -UTR をつなげたものを、相同組換えにより遺伝子導入し、独自に作製した ER KI を使用した。ER KI マウスのホモ型における ER の発現は野生型の 20-25%であり、したがって ER KI マウスは ER ノックダウンマウスと考える事ができる。また、cDNA を導入していることから理論上、ER のスプライシングバリエーションが生じないこととなる。加えて、ER KI マウスは、音-連想記憶及び空間-連想記憶に障害が認められることが確認されている。

遺伝子発現変動解析に際しては、48 週齢の成熟期マウスの脳 3 部位 (大脳皮質、海馬、脳幹) (午前 10 時) (各 n=4) について、PerCellome 法(遺伝子発現値の絶対化手法) (Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006) による網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて検討した。この際、我々が独自に開発した「MF analyzer」を用いて網羅的に解析した。脳 3 部位は、氷冷下にて左脳につき、小脳、脳幹部、海馬、大脳皮質の順に採取することにより得た (右脳はホルマリン固定した)。

有意差の検定は、Student の t 検定によりおこない、P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値 ± 標準偏差 (SD) にて示した。

### Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4 で一晩浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作までは -80 にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用い

て破碎液を調製した。得られた破碎液の 10  $\mu$ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

### GeneChip 解析

全 RNA 5  $\mu$ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45 にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。

### (倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「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 (平成 19 年 4 月版)」。

## C. 研究結果及び考察

C-1: 野生型及び ER KI マウスの遺伝子発現の脳各部位間の比較:

脳各部位について、野生型と比較し、ER KI マウスの場合に、発現が有意に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット):

ps) 数を検討したところ以下のとおりとなった。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき、大脳皮質、海馬及び脳幹において、それぞれ 1.0、0.7 及び 0.8 コピー以上のものを採用した。

大脳皮質：168 ps (増加) 115 ps (減少)  
 海馬：908 ps (増加) 64 ps (減少) 脳幹：205 ps (増加) 25 ps (減少)

3 部位に共通して増加した遺伝子として 4 つ (5 ps: Sgk1, Adat2, Nfkbia, Ruffy2)、他方、減少した遺伝子として、ER (Esr1) を含む 2 つ (2 ps: Igh-6, Esr1) が得られた。野生型と ER 遺伝子の発現量が減少している ER KI マウスとの比較であるため、ER (=Esr1) 遺伝子が抽出されてきたのは妥当と考える。

次いで、大脳皮質、海馬及び脳幹において、有意に変動した遺伝子の集合関係を検討したところ、図 1 のベン図の通りとなった。

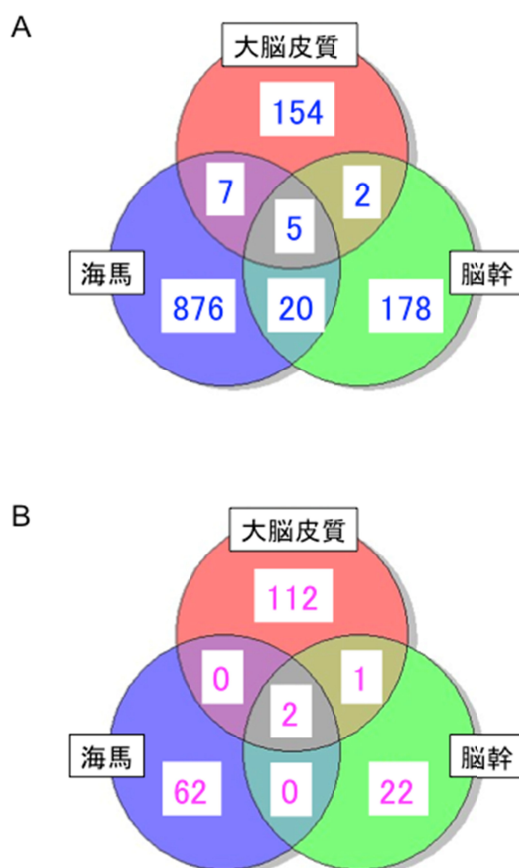


図 1 脳各部位について、野生型と比較し、ER KI マウスの場合に、発現が有意に増加 (A) あるいは減少 (B) する遺伝子数 (ベン図で表記した)

脳の部位によって、野生型と比較し ER KI マウスにおいて、有意に発現変動する遺伝子が、かなり異なることが明らかとなったため、部位ごとに分けて解析する事とした。

C-2: 脳各部位における、野生型及び ER KI マウスの遺伝子発現の比較:

C-2-1: 大脳皮質における、野生型及び ER KI マウスの遺伝子発現の比較:

まず大脳皮質における ER ともう一つの ER サブタイプである ER 遺伝子の発現、及び各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)

Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞)の各遺伝子の発現について、野生型と ER KI マウスとの比較を検討した。ER 遺伝子 (=Esr1) は、ER KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER 遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから大脳皮質においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER KI マウスとで同程度である事が示唆された。

なお、G タンパク質共役受容体的一种であり形質膜上に存在するエストロゲン受容体である Gpr30 遺伝子の発現変動は認められなかった。

大脳皮質において、野生型マウスと比較し ER KI マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、168 及び 115 ps であった。

増加分 168 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。ただし、多く (13 ps) の Slc トランスポーター遺伝子の発現増加が認められた。具体的には、Slc1a2 (GLT-1)、Slc2a12 (GLUT12)、Slc4a2 (AE2)、Slc6a11、Slc14a1、Slc16a2 (MCT8)、Slc16a9 (MCT9)、Slc17a6 (VGLUT2)、Slc24a4 (NCKX4)、Slc25a25 (APC3)、Slc26a8 (TAT1)、Slc29a4 (ENT4) 及び Slc43a2 (LAT4) 遺伝子であり、この内、Slc1a2 はグルタミン酸トランスポーターであり、Slc17a6 は小胞性グルタミン酸トランスポーターである。Slc1a2 と Slc17a6 遺伝子の発現変動について図 2 に示す。

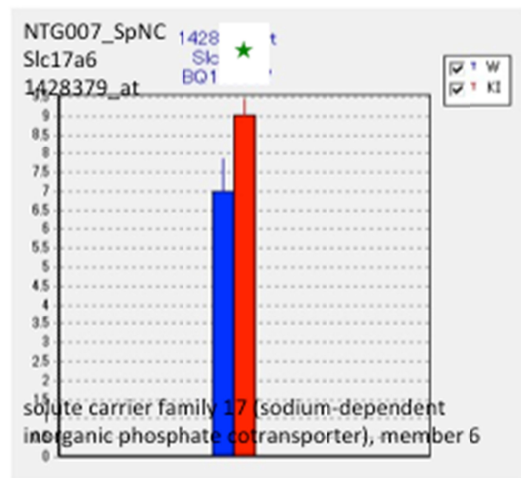
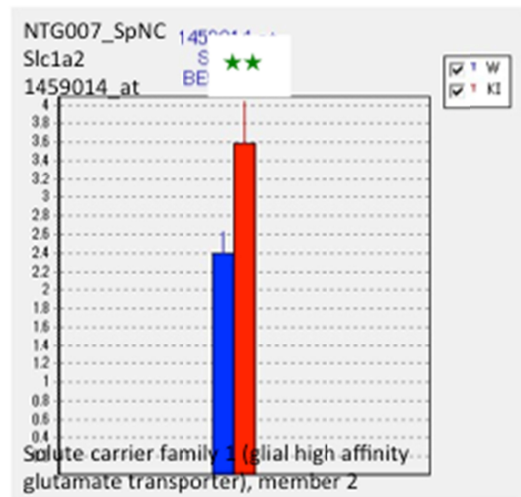


図 2 大脳皮質において、野生型マウスと比較し ER KI マウスにおいて、有意に発現増加が認められた、Slc1a2 (上段) 及び Slc17a6 遺伝子 (下段) の発現変動

野生型 : 赤、ER KI マウス : 青 (n=4、平均値 ± 標準偏差、\*: P<0.05, \*\*: P<0.01)

Slc トランスポーターは、ATP のエネルギーを利用しないものであるが、ATP のエネルギーを利用する Abc トランスポーターは Abcc1 の 1 ps のみ発現増加が認められた。なお、2 種 (Kcnd3 及び Kcnj13) と、種類は少ないが K<sup>+</sup>チャネルの発現増加が認められた。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター

解析(*in silico*) を、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) における Upstream Analysis を用いて検討した結果、Esr1 (=ER )が上位にリストアップされ、この標的遺伝子として 26 ps が抽出されてきた。具体的には、Ace, Arsg, Brwd1, Cdc42ep3, Cebpd, Clic6, Cpm, Csnk1a1, Enpp2, Igfbp2, Kcnj13, Lbp, Nfkb1a, Prkcd, Ramp3, Rhd5, Sgk1, Siah2, Slc16a2, Slc2a12, Sulf1, Tbcd, Tcf7l2, Tgfb2, Tgfbr1 及び Ttr 遺伝子であった。ER KI マウスは、ER ノックダウンマウスであるが、この結果からは、ER KI マウスの大脳皮質ではむしろ機能的に、ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。

一方、減少分 115 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。ただし、発現増加の際と同様に、Slc トランスポーター遺伝子の発現減少が認められた(4 ps)。具体的には、Slc1a4 (ASCT1)、Slc8a2 (NCX2)、Slc12a6 (KCC3) 及び Slc35a5 遺伝子であった。

以上のことから、ER KI マウスの大脳皮質においては、野生型マウスと比較し、多くの Slc トランスポーターの発現が増加(一部、発現が減少)していることから、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進し、また発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子として ER が抽出されてきたことから、むしろ ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。

C-2-2 : 海馬における野生型及び ER KI マウスの遺伝子発現の比較 :

海馬における ER ともう一つの ER サブタイプである ER 遺伝子の発現、及び各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、野生型と ER KI マウスとの比較を検討した。ER 遺伝子 (=Esr1) は、ER KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER 遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER KI マウスとで同程度である事が示唆された。

なお、G タンパク質共役受容体の一種であり形質膜上に存在するエストロゲン受容体である Gpr30 遺伝子の発現変動は認められなかった。

海馬において、野生型マウスと比較し ER KI マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、908 及び 64 ps であった。

増加分 908 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、興奮性・抑制性双方の神経伝達の亢進が示唆された。具体的には、抑制性の GABA 受容体 (Gabbr3 及び Gabra4 遺伝子)、興奮性のグルタミン酸受容体 (Grin3a)、アドレナリン受容体 (Adra2a 及び Adrbk2 遺伝子) およびアセチルコリン受容体 (Chrna4 遺伝子) の発現増加が認められた。この内、Gabbr3 及び Grin3a 遺伝子の発現変動について図 3 に示す。



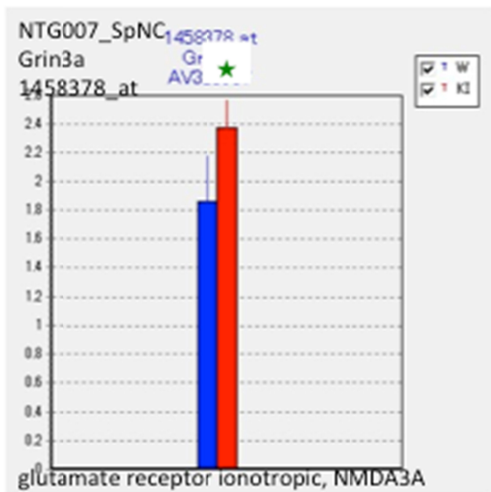
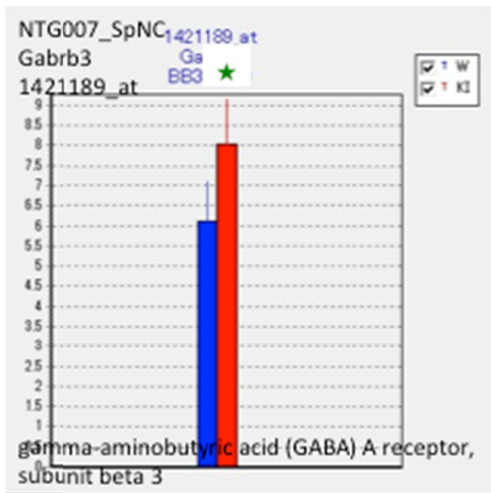


図 3 海馬において、野生型マウスと比較し ER KI マウスにおいて、有意に発現増加が認められた、Gabrb3 (上段) 及び Grin3a 遺伝子 (下段) の発現変動

野生型 : 赤、ER KI マウス : 青 (n=4、平均値 ± 標準偏差、\*:P<0.05, \*\*: P<0.01)

また、過分極を示唆する K<sup>+</sup>チャネル遺伝子(4 ps)の発現増加が認め、具体的には、Kcnj8、Kcnk4、Kctd18 及び Kcnd3 遺伝子であった。一方、脱分極を示唆する Ca<sup>2+</sup>チャネル遺伝子(4 ps)の発現増加が認め、具体的には、Cacng8、Cacnb1、Cacna2d1、Cacna2d1 及び Cacng8 遺伝子であった。以上のことから、興奮性・抑制性双方の神経伝達が亢進している可能性が示唆された。

また大脳皮質の場合のように、多く(16 ps)の Slc トランスポーター遺伝子の発現増加が認められた。具体的には、Slc1a2 (GLT-1)、Slc1a4 (ASCT1)、Slc2a4rg-ps、Slc4a8 (NDCBE)、Slc7a6 (y+LAT2)、Slc7a6os、Slc7a11 (xCT)、Slc9a3r2、Slc11a2 (DMT1)、Slc20a2 (PiT-2)、Slc25a29 (ORNT3)、Slc25a36 (PNC2)、Slc35a5、Slc35b3 (PAPST2)、Slc52a2 及び Slc2a1 遺伝子であった。一方、Abc トランスポーターは Abcd2 及び Abcd4 の 2 ps のみ発現増加が認められた。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) における Upstream Analysis を用いて検討した結果、Esr1 (=ER) が最上位にリストアップされ、この標的遺伝子として 77 ps が抽出されてきた。具体的には、Abhd2、Anapc5、Ap3b1、Ar、Atg13、Avp、Bcl6、Bmp2、Casp8ap2、Cblc、Cdc42bbp、Cenpu、Crim1、Ddit4、Dusp5、Dyrk2、Fgf12、Gadd45b、Gnaq、Gopc、Gyg1、Hook2、Hsd17b7、Inip、Jak1、Jak3、Kif3b、Kif5b、Klhl24、Kpnb1、Laptm5、Madd、Mark1、Mdm4、Myo6、Nfkbia、Nfyb、Nipsnap1、Nov、Nrcam、Onecut2、Ophn1、Pcbd1、Pcdhb4、Pdk4、Pdlim5、Pias1、Plcb1、Plxna2、Ppp1r3c、Ppp5c、Pten、Ptk2、Rab27a、Rabep1、Relb、Robo1、Rock1、Rp2、Sesn1、Sgk1、Skp2、Slc1a4、Slc25a36、Slc7a11、Spry4、Star、Stx6、Sufu、Tax1bp1、Terf2、Tfrc、Th、Tirap、Tjp2、Tsc22d3、Vezf1、Wasf2 及び Ypel1 遺伝子であった。ER KI マウスは、ER ノックダウンマウスであるが、この結果からは、ER KI マウスの大脳皮質ではむしろ機能的に、ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。

また、記憶形成に関わる Creb1 も上位にリストアップされ、この標的遺伝子として 41 ps が抽出されてきた。具体的には、Akt3、

Apold1, Aqp11, Atf1, Avp, Bhlhe40, Cacna2d1, Camkk2, Capn5, Ccnj1, Cdh8, Cdk14, Ciart, Crim1, Errfi1, Fam46a, Flt1, Gadd45b, Gadd45g, Gpr12, Hla-A, Homer1, Itgbl1, Klf7, Marcks11, Mcl1, Mdga1, Nptx2, Nrp1, Plxna2, Rbmx, Robo1, Sema4a, Sgk1, Sh3kbp1, Star, Tfrc, Th, Thop1, Ypel1 及び Zfp948 遺伝子であった。

このことは、神経伝達が亢進した結果、ER KI マウスの海馬では記憶形成に関わる Creb1 が活性化する可能性が示唆された。

一方、減少分 64 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。

以上のことから、ER KI マウスの海馬においては、野生型マウスと比較し、GABA、アセチルコリン、グルタミン酸、アドレナリン受容体の発現増加が認められたことから、興奮性・抑制性双方の神経伝達が亢進していることが示唆され、また多くの Slc トランスポーターの発現が増加していることから、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進し、加えて発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子として ER が抽出されてきたことから、むしろ ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。

C-2-3: 脳幹における、野生型及び ER KI マウスの遺伝子発現の比較:

脳幹における ER ともう一つの ER サブタイプである ER 遺伝子の発現、及び各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、野生型と ER KI マウスとの比較を検討した。ER 遺伝子 (= Esr1) は、ER KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER 遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのこ

とから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER KI マウスとで同程度である事が示唆された。

海馬において、野生型マウスと比較し ER KI マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、205 及び 25 ps であった。

増加分 205 ps について、また減少分 25 ps についても、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。したがって脳幹において、野生型マウスと ER KI マウスとの間に変化が認められるシグナルネットワークは、現時点では認められなかった。

C-2-4: ER 欠失マウスと ER KI マウスにおける解析結果の比較:

先行研究における ER 欠失マウスの大脳皮質、海馬及び脳幹における解析の結果、大脳皮質において、RAR シグナル伝達の低下、神経活動の活性化および概日リズムが乱れることが示唆され、海馬では神経系の障害に関わるシグナルネットワークは認められないが、脳幹では神経活動が活性化および概日リズムが乱れる可能性が示唆された。したがって、ER KI マウスと ER 欠失マウスにおける解析結果を比較すると、RAR シグナル伝達の低下および概日リズムが乱れる事が大きな相違点となる。

そこで ER KI マウスの脳3部位における RAR シグナルおよび概日リズム関連遺伝子の発現変動を再解析したところ、いずれの関連遺伝子も、野生型のものとは有意な差が認められなかった。このことから、ER 欠失マウスと ER KI マウスにおける情動認知行動異常の差(情動障害)は、大脳皮質における RAR シグナル伝達の低下と大脳皮質および脳幹における概日リズムが乱れることが関係していることが示唆された。

他方、ER KI マウスは、ER の発現が低下した ER ノックダウンマウスと考えるこ

とができるが、今回の解析結果からは、少なくとも大脳皮質と海馬において、ER シグナルがむしろ活性化していることが示唆された。この点、多くのER のスプライシングバリエントが、ER の効果に対して dominant-negative な影響を有することが報告されていることから (Taylor SE ら、Cancer Lett 288(2): 133-148, 2010)、ER のスプライシングバリエントが発現できない ER KI マウスでは、野生型と比較し、ER シグナルが亢進していることが推察された。

大脳皮質および海馬において、多くの Slc トランスポーター遺伝子の発現変動が認められたことから、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進していることが示唆されたが、この事が、神経系における障害に関わるか否かは現時点では不明である。

#### D. 結論

各部位における解析の結果、ER KI マウスの大脳皮質では、神経系の障害に関わるシグナルネットワークは現時点で認められないが、多くの Slc トランスポーターの発現変動が認められ、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進していること、また発現増加遺伝子のプロモーター解析 (in silico) の結果、Esr1 が上位にリストアップされたことから、ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。海馬では、GABA、アセチルコリン、グルタミン酸、アドレナリン受容体の発現が増加し、K<sup>+</sup>チャネルとCa<sup>2+</sup>チャネル遺伝子の発現が増加することから、興奮性・抑制性双方の神経伝達が増進していること、また大脳皮質と同様に、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が増進し、ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。一方、脳幹では、神経系の障害に関わるシグナルネットワークは現時点で認められなかった。

先行研究における ER 欠失マウスと、ER KI マウスにおける解析結果を比較すると、

ER KI マウスの脳では、ER 欠失マウスの場合に認められた RAR シグナルおよび概日リズム関連遺伝子の発現変動は、野生型のものと有意な差が認められないため、ER 欠失マウスと ER KI マウスにおける情動認知行動異常の差 (情動障害) は、大脳皮質における RAR シグナル伝達の低下、あるいは大脳皮質および脳幹における概日リズムが乱れることが関係していることが示唆された。また、ER KI マウスは、ER ノックダウンマウスと考えることができるが、今回の解析結果からは、ER シグナルがむしろ活性化していることが示唆された。この点、多くのER のスプライシングバリエントが、ER の効果に対して dominant-negative な影響を有することが報告されていることから、ER のスプライシングバリエントが発現できない ER KI マウスでは、野生型と比較し、ER シグナルが亢進していることが推察された。

今後特に、エストロゲンと、RAR シグナルあるいは概日リズムのシグナルネットワークとの関連に着目した検討に加え、ER のスプライシングバリエントの機能に着目することにより、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純  
医療現場への還元に向けた Percellome  
Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的  
バイオマーカー抽出研究  
第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6.29)

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、  
高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、  
菅野 純  
シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露  
の際の海馬における Percellome 法による吸  
入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解  
析  
第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6.30)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡  
Percellome Toxicogenomics における動的  
バイオマーカー(Dynamic Biomarker)のカタロ  
グ化とその毒性予測利用  
第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.7.1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi  
Aisaki, Percellome Toxicogenomics for  
Mechanistic Analysis Towards Chronic  
Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose  
Study, 51st Congress of the European  
Societies of Toxicology (EUROTOX2015)  
(2015.9.15), Porto, Portugal

種村健太郎、古川祐介、齊藤洋克、白形芳樹、  
原健士朗、北嶋 聡、菅野 純  
幼若期マウスへのネオニコチノイド系農薬  
投与による神経行動毒性発現  
第 18 回環境ホルモン学会(2015.12.)

## G. 知的財産所有権の出願・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

**H27 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**

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、  
その毒性学的評価系構築に資する研究  
(H27-化学-一般-007)

分担研究課題：学習異常を伴う海馬神経新生異常を指標にした神経毒性評価

研究分担者 中島 欽一

九州大学大学院医学研究院 教授

**【研究要旨】**

本年度の研究では、マウス胎仔期バルプロ酸により、成体期の海馬ニューロン新生が減少し学習記憶障害が生じること、さらに成体期マウスへのカイニン酸投与で異所性かつ形態異常な海馬ニューロン新生が増大することを報告した。今後はこれらの表現型が、他の物質による神経系への影響を測る指標となりうるかどうかを検討する。

**A. 研究目的**

脳・神経系は主要な3つの細胞種、ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトによって構成されるが、これらは共通の神経幹細胞から産生され、互いに密接に連携しながら高度な情報処理機能を発揮する。そのためには胎児期から成体における神経幹細胞から各種細胞への分化・成熟が時空間的に精妙に制御される必要がある。これが破綻した場合、これまでも重度な神経疾患や機能障害に至ることが数多く示されているがその原因の詳細については不明な点が多く、また種々の化学物質によりこれらが受ける影響を数値化し、定量的に解析する方法も乏しい。そこで本分担者は、化学物質として、バルプロ酸とカイニン酸を選択し、それぞれ胎仔期暴露による成体海馬のニューロン新生及び成体期投与による海馬ニューロン新生の増減を解析した。

**B. 研究方法**

本年度の研究では、妊娠12、13、14日目にバルプロ酸を母マウスに経口投与し、産仔が成体になってからの海馬神経幹細胞の増殖をBrdUの取り込みを指標に解析した。またカイニン酸に関しては、成体マウスに腹腔内投与を行い、同様にBrdUの取り込みを指標に海馬神経幹細胞の増

殖を解析した。また、両研究において、新に産生されたニューロンは、BrdUとニューロンマーカーに対する抗体に共陽性となるかどうかで検出した。

**(倫理面への配慮)**

本研究は九州大学の動物実験委員会の規定に基づき行うものである。

**C. 研究結果**

バルプロ酸胎仔期暴露マウスにおいては、成体海馬の増殖性神経幹細胞が2/3にまで減少することがわかった。また、その結果新生ニューロンの数も約2/3にまで減少していた。またこれらの減少が、自発的運動(回し車によるランニング)により、コントロールマウスと同程度まで回復することも明らかとなった。続いて成体期のカイニン酸投与により、ニューロン新生が約2倍にまで増加することがわかった。さらにこれらの中には通常あまりに見られない海馬歯状回門に局在する、異所性の新生ニューロンが約10倍増加していることもわかった。加えて、この異所性ニューロン新生は、自然免疫受容体であるTLR9の欠損や、ミクログリアの不活性化によりさらに増大することも明らかとなった。

#### D. 考察

我々は以前にバルプロ酸が神経幹細胞からニューロンへの分化を促進することを報告しており、今回の胎仔期バルプロ酸暴露では、バルプロ酸のこの作用により、本来成体海馬まで保存されているべき神経幹細胞がニューロンへと分化させられてしまい、枯渇してしまったために、成体海馬における、ニューロン新生が減少したものである。成体期カイニン酸投与の場合は、ニューロンの異常な活性化が生じ、その結果、異所性のニューロン新生が増大したものである。また、生理的条件下では、ミクログリアに存在するTLR9が、変性ニューロンから放出される内在性DNAを認識し、その結果ミクログリアから産生されるTNF $\alpha$ が神経幹細胞の増殖を抑制し、異所性のニューロン新生の増大を抑えるように働いているものと考えられた。

#### E. 結論

両研究において、成体海馬ニューロン新生の異常を定量化することができた。また、これらの異常はいずれも認知機能の低下と関連していた。今後は、これらのニューロン異常を指標として、他の化学物質の影響が定量化できるかどうかの検討を実施したい。また、今年度は特定ノン・コーディングRNAが遺伝子発現を制御できることも明らかにしたので、他の化学物質の投与により、これらのノン・コーディングRNAの発現が変動し、その変化が化学物質の影響の指標となるかどうかも検討したい。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

Murao N., Noguchi H. & Nakashima K. Epigenetic regulation of neural stem cell property from embryo to adult. Neuroepigenetics in press.

Juliandi B., Tanemura K., Igarashi K., Tominaga T., Furukawa Y., Otsuka I.M., Moriyama N., Ikegami D., Abematsu M., Sanosaka T., Tsujimura K., Narita M., Kanno J. & Nakashima K. Reduced adult

hippocampal neurogenesis and cognitive impairments following prenatal administration of the antiepileptic drug, valproic acid. *Stem Cell Reports* 5, 996-1009 (2015).

Tsujimura K., Irie K., Nakashima H., Egashira Y., Fukao Y., Fujiwara M., Itoh M., Uesaka M., Imamura T., Nakahata Y., Yamashita Y., Abe T., Takamori S. & Nakashima K. miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. *Cell reports* 12, 1887-1901 (2015).

Noguchi H., Kimura A., Murao N., Matsuda T., Namihira M. & Nakashima K. Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *Neurosci Res* 95, 1-11 (2015).

Nakamura A., Funaya H., Uezono N., Nakashima K., Ishida Y., Suzuki T., Wakana S. & Shibata T. Low-cost three-dimensional gait analysis system for mice with an infrared depth sensor. *Neurosci Res* 100, 55-62 (2015).

Matsuda T., Murao N., Katano Y., Juliandi B., Kohyama J., Akira S., Kawai T. & Nakashima K. TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature communications* 6, 6514 (2015).

Hamazaki N., Uesaka M., Nakashima K., Agata K. & Imamura T. Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development. *Development* 142, 910-920 (2015).

Andoh-Noda T., Akamatsu W., Miyake K., Matsumoto T., Yamaguchi R., Sanosaka T., Okada Y., Kobayashi T., Ohyama M.,

Nakashima K., Kurosawa H., Kubota T. & Okano H. Differentiation of multipotent neural stem cells derived from Rett syndrome patients is biased toward the astrocytic lineage. *Mol Brain* 8, 31 (2015).

Abdulhaleem M.F., Song X., Kawano R., Uezono N., Ito A., Ahmed G., Hossain M., Nakashima K., Tanaka H. & Ohta K. Akhirin regulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in intact and injured mouse spinal cord. *Developmental neurobiology* 75, 494-504 (2015).

## 2. 学会発表

### 国内学会

中島欽一 : miR-199aはMeCP2とmTORシグナルをリンクシレット症候群発症に関与する、大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪府、大阪大学蛋白質研究所、2015年12月11日-12日(11日)

堅田明子、中島欽一 : 中枢神経系の発生・発達から老化までをも制御する組織としての脈絡叢、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(4日)(口頭)

河村陽一郎、野口浩史、堅田明子、中島欽一 : 胎生期マウス終脳におけるアストロサイト分化誘導因子産生細胞の同定、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(2日)(ポスター)

松田泰斗、村尾直哉、審良静男、河合太郎、中島欽一 : ミクログリアにおける自然免疫受容体TLR9シグナルはてんかん発作依存的な異常ニューロン新生を抑制する、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(2日)(ポスター)

亀田朋典、今村拓也、滝沢琢己、木村文香、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一 : マウス胎仔海馬由来初代培養ニューロンにおけるPost-Bisulfite Adapter-Tagging法を用いた神経活動依存的DNAメチローム変動解析、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(2日)(ポスター)

安井徹郎、上園直弘、野口浩史、村尾直哉、松田泰斗、中島欽一 : ヒト神経幹細胞の発生進行に伴った性質変化には低酸素条件が重要である、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(1日)(口頭)(ポスター)

中島欽一 : 神経幹細胞のエピジェネティック制御とその作用、第6回神経科学と構造生物学の融合研究会、愛知県、岡崎コンファレンスセンター、2015年11月26日-27日(26日)

松田泰斗、村尾直哉、審良静男、河合太郎、中島欽一 : ミクログリアにおける自然免疫受容体TLR9シグナルはてんかん発作依存的な異常ニューロン新生を抑制する、第11回成体脳のニューロン新生懇談会、愛知県、名古屋市立大学、2015年11月14日(口演)

村尾直哉、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一 : 成体海馬ニューロン新生におけるヘミメチル化DNA認識因子Np95/Uhrf1の役割、第11回成体脳のニューロン新生懇談会、愛知県、名古屋市立大学、2015年11月14日(ポスター)

中島欽一 : 幹細胞って何？神経幹細胞を中心とした病気や再生医療に関する話題、第8回形態科学シンポジウム、福岡県、九州大学コラボレーションI、2015年10月24日(講演)

今村拓哉、浜崎伸彦、上坂将弘、阿形清和、中島欽一 : 雌性発生胚を活用したPost-Bisulfite Adapter-Tagging法によるマウスDNAメチローム解析第108回日本繁殖生物学会大会、宮崎市、宮崎大学、2015年9月19日(口頭)

中島欽一 : The microRNA, linking MeCP2 with mTOR signaling and its dysregulation cause Rett syndrome phenotypes、第40回内藤コッパルス、北海道、シャトレゼガトキグダムサッホ、2015年9月15日-18日(17日)(招待)

村尾直哉、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一 : Epigenetic regulator Np95/Uhrf1 regulates multiple stages of adult hippocampal neurogenesis、第40回内藤コッパルス、北海道、シャトレゼガトキグダムサッホ、2015年9月15日-18日(17日)(ポスター)

野口浩史、波平昌一、佐野坂司、辻村啓太、深尾陽一朗、五十嵐勝秀、木村文香、中嶋秀行、中島欽一 : Maintenance DNA methyltransferase DNMT1 contributes to the fate regulation of neural stem cells through DNA methylation-dependent and-independent manners during cortical development、第40回内藤コッパルス、北海道、シャトレゼガトキグダムサッホ、2015年9月15日-18日(16日)(ポスター)

中島欽一 : エピジェネティックな神経幹細胞制御、第16回運動器科学研究会、鹿児島県、みなみホール、2015年9月11日-12日(11日)(招待)(セミナー)

松田泰斗、村尾直哉、片野友貴、Juliandi Berry、審良静男、神山 淳、河合太郎、中島欽一 : TLR9 signaling in microglia ensures homeostatic neurogenesis in the adult hippocampus、第38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日(28日)(口頭)

村尾直哉、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一 : 成体海馬ニューロン新生におけるヘミメチル化DNA認識因子 Np95/Uhrf1の役割、第38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日(29日)(口頭)

中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一 : Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, mediated by microRNA in neural stem cells fate specification、第38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日(28日)(口頭)

入江浩一郎、辻村啓太、中嶋秀行、中島欽一 : Analysis of the molecular mechanism of dendritic formation by MeCP2 through miR-199a processing、第38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日(28日)(ポスター)

山本直樹、上坂将弘、阿形清和、中島欽一、今村拓哉 : Bidirectional promoter-derived antisense noncoding RNA epigenetically regulates irreversible differentiation of PC12 cells、第38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日(28日)(ポスター)

中島欽一 : 胎生期HDAC阻害剤曝露による遅発性学習記憶障害とその発症機序、第42回日本毒性学会学術年会、ホテル日航金沢、2015年6月29日-7月1日(7月1日)(シポジウム)

浜崎伸彦、上坂将弘、中島欽一、阿形清和、今村拓也 : Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development、第48回日本発生生物学会年会、茨城県、つくば国際会議場、2015年6月2日-5日(4日)(口頭)

上坂将弘、阿形清和、中島欽一、今村拓也 : Species-specific repertoires of promoter-associated non-coding RNAs may contribute to the diversification of gene expression profile、第48回日本発生生物学会年会、茨城県、つくば国際会議場、2015年6月2日-5日(3日)(ポスター)



浜崎伸彦、上坂将弘、中島欽一、阿形清和、今村拓也：長鎖ノンコーディングRNAによるマウス胚性遺伝子活性化機構、第9回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都、学術総合センター一橋講堂、2015年5月25日-26日(26日)(ポスター)

該当なし。

3. その他  
特になし。

山本直樹、上坂将弘、阿形清和、中島欽一、今村拓也：Bidirectional promoter-derived antisense noncoding RNA epigenetically regulates irreversible differentiation of PC12 cells、第9回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都、学術総合センター一橋講堂、2015年5月25日-26日(26日)(ポスター)

上坂将弘、阿形清和、中島欽一、今村拓也：Species-specific repertoires of promoter-associated non-coding RNAs may contribute to the diversification of gene expression profile、第9回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都、学術総合センター一橋講堂、2015年5月25日-26日(25日)(ポスター)

今村拓也、浜崎伸彦、上坂将弘、阿形清和、中島欽一：雌性発生胚を活用した Post-Bisulfite Adapter-Tagging法によるマウスDNAメチローム解析、第9回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都、学術総合センター一橋講堂、2015年5月25日-26日(25日)(ポスター)

#### <国際学会>

Katada, S., Honda, M., **Nakashima, K.**: Oxygen regulates fate specification of neural stem cell during cortical development. KEYSTONE SYMPOSIA, Santa Fe, February 22-26, 2015

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
該当なし。
2. 実用新案登録

H27 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

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、  
その毒性学的評価系構築に資する研究  
(H27-化学-一般-007)

分担研究課題：光計測による神経回路解析の神経毒性評価への応用

研究分担者 富永 貴志（徳島文理大学 准教授）

【研究要旨】

神経回路機能に対する化学物質の影響-特に認知機能への影響を網羅的に計測する手段として膜電位感受性色素（VSD）を用い、回路動作に対する定量的な毒性評価指標を確立する。これまでに発生初期の投与で異常を起こすバルプロ酸、ビスフェノール A 暴露において神経回路活動にあらわれる異常を検出しているが、その生理機構を明らかにし、毒性評価指標としての有用性が高い計測値を探索した。特に興奮/抑制バランス（E/I バランス）の変調を精度よく検出出来る可能性がある系として、GABA 受容体が関係する各種の長期・短期可塑性を詳細に検討した。また、新規共焦点顕微鏡を利用した *in vivo* 系での計測系の開発、新規パターン刺激イメージング顕微鏡の利用、膜電位感受性蛍光タンパクを用いた解析、大規模神経回路活動解析など新規のより網羅的で非侵襲的な解析手法の開発を行なっている。

A. 研究目的

これまで情動・認知行動試験では、実際に小児期の化学物質への暴露により、発生・発達期、成熟期において中枢性の異常、影響が認められてきている。この化学物質の中枢神経毒性の遅延性発現の定量化は喫緊の課題である。そのメカニズム解析のために記憶・学習機能の中枢である海馬、海馬-嗅内野-扁桃核の機能、およびその相互作用を定量化することは重要で、それらの中枢神経回路機能の変化を定量化する手法の確立が求められている。本研究では、膜電位感受性色素による神経活動イメージング法を導入して、神経回路活動の定量を行い、*ex vivo* 実験系（スライス標本）でマウスを材料と用いた毒性試験法を確立する。これにより、中枢神経作動性物質の毒性作用の遅延性発現の定量的なメカニズム解析を行い、毒性評価上の指標を設定することを目的とする。

B. 研究方法

(1) バルプロ酸、ビスフェノール A 投与の発

達期投与による遅発毒性の検討（中島・種村らとの共同研究）

妊娠中の母マウスにバルプロ酸、ビスフェノール A を決められたプロトコルで投与し、生まれた仔について大人になった後に海馬神経回路の機能評価を行った。

(2) 海馬 CA1 野における GABA 受容体の関与する可塑性調節機構についての光計測による解析  
マウス海馬 CA1 野の基本的な神経回路動作をリストアップするために、各種の刺激パターンに対する応答を計測し、GABA 受容体の関与について検討した。

(3) 各種光計測技術の開発-網羅的計測、遺伝子改変動物の利用、偏光などを使った新規の計測法を開発している。

（倫理面への配慮）

動物実験に際しては、徳島文理大学における「徳

島文理大学における動物実験と動物の飼養及び保管等に関する規程」にのっとり、あらかじめ実験計画書を同大学実験動物委員会、倫理委員会へ提出し、承認を受けたうえで実施した。

#### C. 研究結果

(1) マウス海馬神経回路での基準となる基礎的な信号パターンの設定を行った。特に、発生-発達に関わる重要な指標である、興奮-抑制(E/I)バランスの変動を評価できる標準的な回路パターンの設定を行った。この一部は胎生期バルプロ酸投与で起きるエピジェネティックな回路機能の変化の検出に有効に用いることができた(Juliandi ら, Stem Cell Rep 2015)。これをさらに拡張したモデルを用いてビスフェノールの胎生期幼若暴露の遅発毒性発現系を解析し興奮性の閾値に関する知見を発見している。これら基準を毒性指標として用いるため、海馬神経回路で急性毒性での影響検出を行い、神経回路の変調を示す値の設定を検討中である。この際、シータ波等の回路固有の神経活動を利用することを想定している。

(2) 海馬 CA1 野での結果から、シータ周期で引き起こされる新規の GABA 依存性の短期可塑性を見出した。これは、高頻度刺激で引き起こされる短期可塑性と合せて、周期的な神経活動が抑制性の回路を介して回路演算を調節する機構と思われる。今後、バルプロ酸、ビスフェノールなどによってどのように変調が起こるかについて調べる予定である。

一方、他の皮質回路(嗅内野、梨状皮質、傍梨状核、感覚野、運動野など)では、基準となる信号パターンが殆ど無いといって良い。このためこの系での基準パターンの設定に着手し、特に周期応答に着目して解析している。嗅内野-梨状皮質間、梨状皮質-傍梨状核間の特徴的な周期的神経活動を再現性よく観測することに成功しており、このパターンからのズレを定量的な指標にすることを検討している。この系も GABA 受容体阻害剤に対して非常に鋭敏に、またダイナミックに応答するので、興奮-抑制バランスの変化に対して鋭敏に反応する可能性がある。

(3) In vivo 系での神経回路計測系の開発、膜電位依存性蛋白の使用を含む新規イメージング法の開発を進めている。

#### D. 考察

バルプロ酸、ビスフェノールの遅発毒性においてはこれまで、興奮-抑制バランスの変化が見られている。これを再現性よく、鋭敏に測定するためには、興奮-抑制バランスによって回路動作が大幅に変わる神経回路指標を設定する必要がある。シータ周期のような周期的な神経活動の変調なども含め検討をすすめる。

#### E. 結論

今後とも光計測法を軸に、ビスフェノール A を始めとする神経回路の再編成を起こしうる化学物質の神経毒性解析を進めることは、重要である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

なし

###### 2) 雑誌

Tominaga T and Tominaga Y Paired burst stimulation causes GABAA receptor-dependent spike firing facilitation in CA1 of rat hippocampal slices. Front. Cell. Neurosci. 10:9. doi: 10.3389/fncel.2016.00009 (2016)

Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. Stem Cell Reports: 5(6)996-1009. doi:10.1016/j.stemcr.2015.10.012 (2015)

## 2. 学会発表

Tominaga T and Tominaga Y A spatio-temporal analysis of the GABA<sub>A</sub> receptor-dependent and independent membrane potential response to a gamma-band burst stimulus in area CA1 of hippocampal slice: A VSDI study 758.05/B4 Neuroscience Meeting Planner. Chicago, Society for Neuroscience, 2015

富永貴志, 富永洋子, 五十嵐勝秀, 大塚まき, 古川佑介, 菅野純, 種村健太郎 Neural circuit functional assay with voltage-sensitive dye imaging in hippocampal slices; effect of maternal bisphenol A 「膜電位感受性色素による神経回路機能のアッセイ系の構築—海馬スライスとビスフェノールA」第53回日本生物物理学会年会 The 53rd Annual Meeting of the BSJ (金沢大学) 2015

富永貴志 内藤豊 Hodgkin-Huxely type analysis of voltage-dependent potassium currents in Paramecium 「ゾウリムシの電位感受性 K チャネルのホジキン—ハックスレー型の解析」日本動物学会 第 86 回 新潟大会 2015

富永貴志 富永洋子 VSD-imaging of 100 Hz stimulation induced GABA<sub>A</sub> independent perisomatic membrane potential response in area CA1 of hippocampal slice 「海馬スライス標本で CA1 野で見られる 100Hz 刺激によって引き起こされる GABA<sub>A</sub> 受容体以外の細胞体近傍での膜電位応答の可視化」第 38 回日本神経科学学会 (神戸) 2015

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

### 1. 特許取得

なし。

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3. その他

なし。

**H27 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**

発生・発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズ  
ム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究  
(H27-化学-一般-007)

分担研究課題：「国内外情報収集、OECD 対応、新規毒性マーカー探索に関する研究」

研究分担者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

**研究要旨**

情動認知行動異常を呈したマウスにエピゲノム異常が検出されていることから、それが分子レベルにおける基準値として設定できるかに関する OECD 対応、および国内外の情報を収集する。

加えて、情動認知行動異常の高精度なリスク評価の基礎となる、海馬の遺伝子発現プロファイルを、その高感受性期と考えられる胎生 11.5 日、14.5 日、および 17.5 日目の 3 時点について採取し、その継時的変化と諸形質との比較解析を実施する。

**A. 研究目的**

情動認知行動異常を呈したマウスにエピゲノム異常が検出されていることから、それが分子レベルにおける基準値として設定できるかに関する OECD 対応、および国内外の情報を収集する。

加えて、情動認知行動異常の高精度なリスク評価の基礎となる、海馬の遺伝子発現プロファイルを、その高感受性期と考えられる胎生 11.5 日、14.5 日、および 17.5 日目の 3 時点について採取し、その継時的変化と諸形質との比較解析を実施する。

**B. 研究方法**

**B-1 情報収集：**

OECD 内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関するアドバイザーグループ会合（2015 年 10 月 8～9 日、OECD 経済開発協力機構フランス・パリ）へ出席した（資料：

末尾に添付）。第 2 回マレーシア毒性学会（マレーシア、クアラルンプール、2015 年 10 月 29 日）において内分泌かく乱化学物質問題と子供の毒性についての招待講演、ECETOC ワークショップ「生殖毒性におけるエピジェネティクスの役割」（ベルギー、ブリュッセル、2015 年 11 月 12 日）においてシグナル毒性の概念とエピジェネティクスに関する招待講演、基礎生物学研究所における第 63 回カンファレンス（2015 年 12 月 1 日）においてシグナル毒性と内分泌かく乱化学物質問題についての招待講演を行った。また、第 37 回日本中毒学会学術集会（2015 年 7 月 17 日、和歌山）第 42 回日本中毒学会学術年会（2015 年 7 月 1 日、金沢）にて、遅発性中枢毒性に関する発表を行った。

**B-2 胎生期マウス海馬の遺伝子発現プロフ**

ファイル解析：

情動認知行動異常の高精度なリスク評価の基礎となる、海馬の遺伝子発現プロファイルを、その高感受性期と考えられる胎生 11.5 日、14.5 日、および 17.5 日目の 3 時点について採取し、その継時的変化と諸形質との比較解析を実施する。

#### B-2-1. 胎児終脳の採取

妊娠 8 日齢の C57BL/7NcrSlc 雌マウス(日本 SLC)を購入し、胎生 11.5 日、14.5 日、17.5 日の胎児終脳を採取する。

#### B-2-2. 胎児の雌雄判別

雄胎児のみを解析に用いるために、Y 染色体配列の検出により雄性を判別する。その際に用いる PCR プライマーは下記である。

・Y-chromosome specific sequence

sense: 5' GAC TGG TGA CAA TTG TCT AG 3'

antisense: 5' TAA AAT GCC ACT CCT CTG TG 3'

#### B-2-3. 胎児終脳の遺伝子発現解析

胎生 11.5 日、14.5 日、17.5 日 3 時点の終脳の遺伝子発現解析を Percellome 法により実施する。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程(平成 27 年 4 月版)及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の承認を受けて行った。

### C. 研究結果

#### C-1 情報収集：

内分泌かく乱化学物質評価のための AOP

に関して、研究成果の報告及び提案を行うとともに、試験及び評価に関するテストガイドライン作成に向けて、参加各国及び関連研究機関を含む国際協調の下で最新の情報を交換し、今後の方針について討議を行った。各学会等において、情報収集と意見交換を行った。

#### C-2 胎生期マウス海馬の遺伝子発現プロファイル解析：

##### C-2-1. 胎児終脳の採取

妊娠 8 日齢の C57BL/7NcrSlc 雌マウス(日本 SLC)を購入し、胎生 11.5 日、14.5 日、17.5 日に胎児を順次摘出し、全ての胎児の実体顕微鏡下にて終脳を採取し、RNA レイター中に浸漬し保管した(2015 年 11 月 13 ~ 19 日)。

##### C-2-2. 胎児の雌雄判別

雄胎児のみを解析に用いるために、終脳の採取時に得た胎児の尾部によって、Geno Typing による雌雄判別を行った(2015 年 12 月 7 ~ 8 日)。胎児尾部を溶解し、Y 染色体配列の検出により雄性胎児を選抜した。その際に用いた PCR プライマーは下記である。

・Y-chromosome specific sequence

sense: 5' GAC TGG TGA CAA TTG TCT AG 3'

antisense: 5' TAA AAT GCC ACT CCT CTG TG 3'

##### C-2-3. 胎児終脳の遺伝子発現解析

胎生 11.5 日胎児 1 匹の終脳では、Percellome 法において必要な総 RNA 量に満たないため、4 胎児分の終脳をプールし 1 標本とした(2016 年 2 月 29 日)。胎生 14.5 日、17.5 日の終脳に関しては十分な組織量であるため、1 胎児 1 標本とした。以上を踏まえ、胎生 11.5 日、14.5 日、17.5 日 3 時点、各 3 標本により Percellome 法による遺伝子発現解析を年度内に実施する。

#### D. 考察

情報収集の結果、当研究班の成果は国内外においても評価される内容であること、研究の方向性について妥当性と新規性があることが確認された。

#### E. 結論

当研究班の研究計画、成果ともに一定の評価を得た。今後の海馬の解析が更なる強固な基礎を形成するものと期待された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

なし

###### 2) 雑誌

Ono R, Ishii M, Fujihara Y, Kitazawa M, Usami T, Kaneko-Ishino T, Kanno J, Ikawa M, Ishino F. (2015) Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes. *Sci Rep.*;5:12281

Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K, Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K, Kanno J. (2015) Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep.* ;16(2):192-201

##### 2. 学会発表

Jun Kanno, Percellome Project for Mechanistic Analysis of Chronic Toxicity by a New Concept of Repeated Dose Study (2016.3.16), Society of Toxicology 55th Annual Meeting, New Orleans, USA, poster

菅野 純、複合影響の考え方 - マウンテン・オブ・ハピネスから「ホルミシス」まで - (2016.2.26)、化学物質の安全管理に関するシンポジウム-複数化学物質のリスク評価-、東京、シンポジウム

菅野 純、代替試験法の問題点と今後の方向性 - 毒性学的観点からの考察 - (2015.12.12)、日本動物実験代替法学会第28回大会、横浜、特別講演

菅野 純、OECD EDTA-AG/EAGMST における AOP と、Toxicogenomic 応用の試み (2015.12.11)、環境ホルモン学会第18回研究発表会、栃木、シンポジウム

Jun Kanno, Satoshi Kitajima and Kentaro Tanemura, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Endocrine Disrupting Chemicals Issues (2015.12.1), The 63rd NIBB Conference "Environment to Bioresponse", Okazaki, Symposium

Jun Kanno, Introduction of Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brussels, Oral

Jun Kanno, The concept of "repeated exposure" and possible links to epigenetic regulations.-with repeated dose studies introducing baseline responses and transient responses with possible link to epigenetics, (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brussels, Oral

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project (2015.11.10), 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9), Natal, Brazil, Symposium

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura and Ken-ichi Aisaki, "Signal Toxicity" to study Endocrine Disruptors Issues and Children's Toxicology, and to make molecular-based linkage with Classical Toxicology (2015.10.29), 2nd Malaysian Congress of Toxicology(MyCOT2015), Chulan Kuala Lumpur, Malaysia, Keynote

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study (2015.9.15), 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015), Porto, Portugal, poster

菅野 純、シグナル毒性の概念の、内分泌かく乱化学物質問題や関連する「低用量、早期暴露-遅発影響」型の毒性の研究計画への導入について(2015.8.20)、環境省平成 27 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー (EXTEND2010)、東京、セミナー

菅野 純、種村健太郎、ヒトの急性中毒症状を動物実験で再現できるか - 有機リン剤等曝露後の遅発性毒性の発現実験より - (2015.7.17)、第 37 回日本中毒学会総会・学術集会、和歌山、シンポジウム

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome

Toxicogenomics における動的バイオマーカー(Dinamic Biomaker)のカタログ化とその毒性予測利用 (2015.7.1)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解析 (2015.6.30)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、口演

北嶋 聡、種村健太郎、菅野 純、医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究 (2015.6.29)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム

Jun Kanno, Construction of "Dynamic Biomarkers" by Percellome Toxicology based on a new Concept of "Signal Toxicity", The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6.25) Jeju, Korea, 特別講演

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral



H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし