

研究課題名

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）

分担研究課題名

「周産期における低用量ネオニコチノイド系農薬暴露による成熟後マウスの行動異常、およびエストロジェン受容体遺伝子改変マウスを用いた行動異常値設定の試み」

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28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妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに低用量（0.1mg/kg/day）にて飲水投与を開始し、出産後の生後4週齢時の離乳時まで同投与を行い、生後12-13週齢時に成長した産仔雄マウスについて情動認知行動解析を行った。その結果、アセタミプリド飲水投与による顕著な不安関連行動異常の誘発と、イミダクロプリド飲水投与による顕著な不安関連行動異常並びに学習記憶異常の誘発が認められた。また、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後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推し進めるために2種のエストロジェン受容体遺伝子改変マウス（北嶋、菅野との共同研究）を用意し、同様の情動認知行動解析を行った。

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。

H28 年度には、①低用量化学物質の慢性暴露による次世代個体の神経行動毒性発現を検討する目的で、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、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに低用量 (0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行い、成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウス行動異常について検討した。また、②情動認知行動異常値を設定する目的で、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推し進めるために 2 種のエストロゲン受容体遺伝子改変マウス (北嶋、菅野との共同研究) を用意し、同様の情動認知行動解析を行った。

B. 研究方法

① 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、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに一日摂取許容量 (ADI) を参照とした低用量 (0.1mg/kg/day)

にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行い、成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウス行動様式について、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うことで検討した。

② 2 種のエストロゲン受容体遺伝子改変マウス (北嶋、菅野との共同研究) を用意し、①同様の情動認知行動解析を行い、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の仮設定を試みた。尚、本研究で用いたエストロゲン受容体遺伝子改変マウスは、相同組み替えによってエストロゲン受容体 α 遺伝子座の 3'-UTR をウシ成長ホルモン遺伝子の 3'-UTR に置き換えたマウス (ER α KI マウス) と、さらにエストロゲン受容体 α 遺伝子の ORF をエストロゲン受容体 β 遺伝子座の ORF に置き換えたマウス (ER β KI マウス) である。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、東北大学の規定にのっとり、あらかじめ実験計画について承認を受け、かつ 3R の原則を遵守しつつ実施した。

C. 研究結果

① 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、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに低用量 (0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、

出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行い、成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウスについて行動解析を行った結果、アセタミプリドの発生-発達期飲水投与によって、オープンフィールド試験による総移動量の増加、明暗往来における明所滞在時間および明暗往来数の増加、高架式十字迷路試験における総移動量、オープンアーム滞在時間および総アーム選択数の増加が誘認められた ($p < 0.05$)。また、イミダクロプリドの発生-発達期飲水投与によって、オープンフィールド試験による中央部滞在時間の減少、高架式十字迷路試験における総移動量、オープンアーム滞在時間および総アーム選択数の増加、条件付け学習記憶試験における学習度、場所-連想記憶度の低下が認められた ($p < 0.05$)。

② 生後 12-13 週齢時の ER α KI マウスについて行動解析を行った結果、条件付け学習記憶試験における場所-連想記憶度および音-連想記憶度の低下、プレパルス驚愕反応抑制度の減少が認められた ($p < 0.05$)。また、生後 12-13 週齢時の ER β KI マウスについて行動解析を行った結果、オープンフィールド試験による中央部滞在時間の減少、明暗往来における明所滞在時間および明暗往来数の減少、高架式十字迷路試験における総移動量の減少、条件付け学習記憶試験における場所-連想記憶度および音-連想記憶度の低下、プレパルス驚愕反応抑制度の減少が認められた ($p < 0.05$)。

D. 考察

発生-発達期における慢性暴露モデルとして、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに低用量 (0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行ったが、胎仔マウスに対しては経胎盤投与、産仔マウスに対して経乳投与されたと考えられる (特に、産仔マウスは、体が小さく給水口まで到達することがないため、化学物質は母マウスを介しての投与となる)。アセタミプリドによって重篤な多動が、またイミダクロプリドによって多動を伴う学習記憶異常が誘発されたと考えられる。今回の用量設定においては、一日摂取許容

量 (ADI) を元に、安全係数を 10 として、さらに母マウスの体重の約 1/10 を産仔マウスへ移行すると仮定し、いずれも 0.1mg/kg/day としたが、重篤な行動異常を誘発すると考えられた。特に、発生-発達期におけるアセタミプリド慢性暴露マウスの行動様式は、多動障害モデルマウスとして報告される行動様式を包括するものであり、また、発生-発達期におけるイミダクロプリド慢性暴露マウスの行動様式は、多動を伴う学習障害モデルとしての有用性も考えられた。

さらに、ER α KI マウスの行動様式は認知症 (アルツハイマー型認知症というよりも前頭側頭型認知症) モデルマウスの行動様式に非常に近く、また ER β KI マウスの行動様式は、陰性の統合失調症モデルマウスの行動様式としての特徴を多く兼ね備えていた。いずれも、本研究班で設定する行動毒性基準値を定める上で、非常に有益なものであると考えられた。

E. 結論

ネオニコチノイド系農薬の発生-発達期における化学物質の慢性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、エストロゲン受容体遺伝子改変マウスの利用によって情動認知行動「毒性基準値」の設定に向けた取り組みが大きく進んだ。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

Ohtani N, Iwano H, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Inoue H, Yokota H. Adverse effects of maternal exposure to bisphenol F on the anxiety- and depression-like behavior of offspring. *J Vet Med Sci.* 2017 79(2) 432-439.

Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Chiba H, Shirakata Y, Hara K, Tanemura K, Arima T. Genome-Scale Assessment of Age-Related DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa. *PLoS One*. 2016 Nov 23;11(11):e0167127.

Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J. Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period. *Front Neurosci*. 2016 Jul 20;10:339.

Inoue H, Ogonuki N, Hirose M, Hatanaka Y, Matoba S, Chuma S, Kobayashi K, Wakana S, Noguchi J, Inoue K, Tanemura K, Ogura A. Mouse D1Pas1, a DEAD-box RNA helicase, is required for the completion of first meiotic prophase in male germ cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep 16;478(2):592-8.

Umezaki K, Hiradate Y, Oikawa T, Ishiguro H, Numabe T, Hara K, Tanemura K. Exogenous neurotensin modulates sperm function in Japanese Black cattle. *J Reprod Dev*. 2016 Aug 25;62(4):409-14.

Lee S, Hiradate Y, Hoshino Y, Ko YG, Tanemura K, Sato E. Localization and quantitative analysis of Cx43 in porcine oocytes during in vitro maturation. *Zygote*. 2016 Jun;24(3): 364-70.

2. 学会発表

Late effects on CNS with behavioral disturbance induced by early exposure of environmental chemicals.

Kentaro Tanemura

Neuro 2016, 神奈川、2016年7月20-22日

Neurobehavioral toxicity at adult period Induced by pesticide exposure at juvenile period

Kentaro Tanemura and JUN Kanno

ICT XIV, メキシコ、メリダ、2016年10月2-6日

Norio Kobayashi, Hiroaki Okae, Hitoshi Hiura, Hatsune Chiba, Yoshiki Shirakata, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, Takahiro Arima

Temporal alternations in DNA methylation patterns of spermatozoa in early young mice,

The 17th AAAP Societies Animal Science Congress, Kyushu Sangyo University, 福岡、2016年8月20-25日

Norio Kobayashi, Hiroaki Okae, Hitoshi Hiura, Hatsune Chiba, Yoshiki Shirakata, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, Takahiro Arima

Age-related changes in DNA methylation patterns of spermatozoa in mice, BLUEPRINT/IHEC conference, Crowne Plaza Brussels, Brussels, Belgium, 2016年9月8-9日

小林記緒、岡江寛明、樋浦仁、千葉初音、白形芳樹、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎

性成熟から繁殖期を通じたマウス精子DNAメチル化様式の変加齢性変化、第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川、2016年9月11-15日

小林記緒、岡江寛明、樋浦仁、千葉初音、白形芳樹、原健士朗、種村健太郎、有馬隆博

繁殖期におけるマウス精子 DNA メチル化様式の変加齢性変化、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川、2016年11月30日-12月2日

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欠乏給餌によるマウス精巣影響と精子DNAメチローム変化

第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川、2016年9月11-15日

梅津康平, 平舘裕希, 原健士朗, 種村健太郎

ニューロテンシンはウシ凍結精液の受精能獲得および先体反応を促進する
第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川県、2016年9月11-15日

後藤萌 斉藤洋克 白形芳樹 原健士朗 種村健太郎

浸透圧変動に対するMII期卵母細胞の細胞膜状態についてのマウス系統間の差違
第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川県、2016年9月11-15日

梅津康平, 平舘裕希, 原健士朗, 種村健太郎

ウシ精子機能へのニューロテンシンの影響
第159回日本獣医学会大会、日本大学、神奈川県、2016年9月6-8日

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純 :

キシレン吸入暴露によるマウスへの中枢機能影響解析
第159回日本獣医学会大会、日本大学、神奈川県、2016年9月6-8日

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純 :

キシレンの経気道吸入暴露によるマウス行動影響解析
第 43 回日本毒性学会学術年会 2016 年 6 月 30 日

G. 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

研究課題名

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）

分担研究課題名

「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（早稲田大学人間科学学術院・行動神経科学研究室・教授）

【研究要旨】

Go/NoGo 課題とは、ヒトにおいて認知機能を評価する課題として、例えば、認知症の程度や有無の検査などに使用されている。本研究では、独自開発したマウス用タッチスクリーン・オペラント試験装置を用いてマウス Go/NoGo 課題を確立した。加えて本研究では、ADHD 様の行動表現型を示すと考えられている DBA/2 マウスを用い、同マウスも C57BL/6 マウスと同様に課題の習得は可能であるが、反応までの時間が遅くなることが明らかとなった。このような反応時間の遅延は、認知症や注意欠如多動症の当事者でも見られる、本来のヒト Go/NoGo 課題で最も鋭敏な指標として用いられるものである。本研究で確立した Go/NoGo 課題は、ヒトにおけるそれと同様の指標を用いたものとして、世界初の課題だといえる。

A. 研究目的

Go/NoGo 課題とは、ヒトにおいて認知機能を評価する課題として、例えば、認知症の程度や有無の検査などに使用されている（Cummins, 2011）。Go/NoGo 課題では、Go Cue、NoGo Cue と呼ばれる 2 種類の視覚刺激を使用する。視覚刺激としては、色や文字、図形が使用される。Go/NoGo 課題では、Go Cue が提示された際には行動すること（例えば、“ボタンを押す”など）、NoGo Cue が提示された際には行動しないこと（行動抑制；セルフコントロール）が要求される。ヒトにおける Go/NoGo 課題では、特に注意欠如・多動症や認知症を持つ人の成績不良（健常者に比べ、“Go Cue”の際の反応時間が長くなる）や課題遂行時の脳活動異常が報告されている。これは、認知機能低下による状況判断速度の低下や行動抑制機能の問題によるものと考えられている。Go/NoGo 課題臨床検査や疫学調査でも多く用いられている。これまでのげっ歯類における Go/NoGo 課題ではラットにおいては報告があるものの、マウスにおける成功例は極めて少ない。またラットにおいても、成績指標は Go/NoGo 課題の正答率が用いられており、ヒトにおける Go/NoGo 課題の成績指標とは必

ずしも一致していない（後述）。

そこで本研究では、ヒトにおける認知・情動行動課題と同様の成績指標を用いたマウス Go/NoGo 課題の確立に取り組んだ。

B. 研究方法

(1) 実験動物

C57BL6 マウス（以下、B6 マウスと記載）と ADHD 様の行動表現型を示すことが示唆されている DBA/2 D マウス（以下、D2 マウスと記載）を用いた（各 10 匹）。動物飼育・実験は温度管理された動物飼育・実験室（P1A）で行った（室温 22±3℃、湿度 40～70%、明暗周期 12 時間（明期 8:00～20:00））。すべての動物実験は早稲田大学動物実験審査委員会の指導と機関長の承認（総長：鎌田薫）のもと、早稲田大学の各種規則に則り行った。

課題では餌を報酬として用いたため、自由給餌時のマウスの体重曲線を参考に、平均体重の 80% 以上を維持しながら制限給餌を行った。試験期間中、飲水は自由とした。

(2) タッチスクリーンオペラント実験装置

15 インチのタッチスクリーン、スピーカーと報酬ディスペンサーを備えたタッチスクリーンオペ

ラント実験装置を作製した (図 1)。タッチスクリーンモニターは、15 インチの有機 EL ディスプレイとタッチ検出ユニットから構成される。実験チャンバーはタッチパネルモニター側 (240 mm) から報酬ディスペンサー側 (55 mm) に向けて狭まっている台形状の高さ 200 mm の不透明アクリル製である。チャンバーとタッチスクリーンの間には、直径 35 mm の穴が開けられた黒色のプラスチック板が設置されており、チャンバー内のマウスはこの穴よりスクリーンを見て nose poking により回答する。また、チャンバーの両側には給水瓶が設置され、試験中、マウスは自由に飲水できるようになっている。チャンバーの上部にはカメラが設置され、課題中のマウスの行動をリアルタイムでモニタリングした。報酬としては 1 粒 10mg のペレットを使用し、課題時、自動的に報酬ディスペンサーより与えた。

(3) 行動課題の手順

以下のすべての段階において、1 日 1 セッション行った。

慣化 (Habituation)

慣化は 30 分を 1 セッションとした。初めの 15 分は、前もって報酬ディスペンサーに 15 粒の報酬ペレットが置かれており、投入されたマウスはチャンバー内を自由に探索できる。次の 15 分間は、30 秒毎に高いビープ音 (Correct Sound) とともに 1 粒の報酬ペレットが報酬ディスペンサーから獲得できる。マウスをホームケージに戻した後、報酬ディスペンサーに残ったペレットの数を計測した。

行動形成 (Shaping)

行動形成は全ての実験群で 5 セッション行った。全てのセッションは 15 分間に設定した。各画像が提示されてから、nose poking するまでには制限時間は設定しなかった。

初めの 2 セッションでは、マウスが報酬ディスペンサーへ nose poking することで開始し、モニター上に刺激画像が提示される (図 2)。モニター上の刺激画像にマウスが nose poking する (タッチ検出ユニットにおいて検出する) と、報酬ディスペンサーより Correct Sound とともにペレットが獲得できる。マウスをホームケージに戻した後、マウスが食べたペレット数を記録した。

次の 2 セッションでは、報酬として獲得できるペレットが 3 つから 1 つに減少する以外は、前の

2 セッションと同一である。

最後のセッションでは、nose poking することで報酬が獲得できる刺激画像よりも先に、十字型の固定点画像が提示される (図 3)。固定点画像に nose poking しなければ、刺激画像は提示されない。

Pre-training

Pre-training では、全て Go トライアルのみのセッションを行った。

Go/NoGo 課題

Go/NoGo 課題では、Go Cue と NoGo Cue の 2 種類の視覚刺激を用いた (図 4)。Go Cue と NoGo Cue を擬似ランダム提示した。マウスが固定点画像に nose poking した後に、Go Cue もしくは NoGo Cue が提示された。提示された画像が、Go Cue の場合 (Go トライアル) はモニターへ nose poking すれば、NoGo Cue の場合 (NoGo トライアル) は nose poking をしなければ、Correct Sound とともに報酬を獲得することが出来る。Go Cue において nose poking しなかった場合、NoGo Cue において nose poking した場合はエラーとされ、報酬は得られない (図 4)。

固定点画像提示から報酬獲得もしくはエラーまでを 1 トライアルとし、100 トライアル終了もしくはマウスがチャンバーに投入されてから 45 分経過した時点で終了とした。

(4) 統計解析

統計解析には GraphPad PRISM 7 (GraphPad Software) を用いた。

各課題における正答率の推移には repeated measure 2-way ANOVA と repeated measure 1-way ANOVA を用いた。同一課題での最初のセッションと最後のセッションの試行数もしくは正答率の比較には 1-way ANOVA と対応のある t 検定を用いた。多重比較は、Tukey 検定を用いて行った。P 値 0.5 以下を統計的有意とみなした。

C. 研究結果

Pretraining

Pretraining における Go cue のみの課題において、B6 マウス D2 マウスともに 90% 以上の正答率を示したことから、すべてのマウスが pretraining を習得したとみなした。

ただし固定点画像から Cue 図形提示までの待機時間ごとに見てみると、D2 マウスにおいては、待機時間が長くなるほど正答率が有意に低下し、また Cue 図形提示後の反応までの時間が有意に長く

なっていた (図 5)。この成績変化はごく些少ではあるが、個体ごとのデータのはらつきが少ないことから有意差が見出された。

Go/NoGo 課題

Go/NoGo 課題においても、Go Cue 提示時の正答率 (Go Cue に反応して nose poke (正反応) した割合) は、B6、D2 マウスともに 90%以上を維持していた (data not shown)。

また、NoGo Cue 提示時の正答率 (NoGo Cue が提示された際に nose poke (誤反応) をせずに報酬を受け取りにいくという正反応を示した割合) についても、課題開始 21 日目以降は 60%程度の正答率を示した (図 6)。B6 マウスと D2 マウスの正答率に違いはなく、すなわち両者ともに Go/NoGo 課題を習得していることが明らかとなった (図 6)。

次に Go/NoGo 課題中の、Go Cue 提示時の Cue 提示から反応までの時間について分析した。D2 マウスの Reward cue latency のピークは B6 マウスよりも遅く、またより長時間の Reward cue latency を示す反応が増えていた (図 7)。すなわち B6 マウスも D2 マウスは、Go Cue と No Go Cue の刺激の違いを視覚的に弁別し、それぞれに対して正しい反応を示すことができるようになるが、D2 マウスは Go Cue に対する反応が遅れることが明らかと鳴った。

D. 考察

本研究において、視覚刺激を用いたマウス Go/NoGo 課題を確立した。我々の知る限りマウスにおいて成功したのは世界初となる。加えて本研究結果が示すように、ごく僅かな個体間誤差により成績が定量化できることが確認できた。毒性試験として求められる定量性と再現性についても実用レベルのものであることと考えられる。

また本研究では、C57BL/6 マウスに比して「落ち着きがない」ように見えることから ADHD 様の行動表現型を示すと考えられている D2 マウスにおいて、Go/NoGo 課題の反応正答率としては B6 マウスと同様であり、すなわち D2 マウスも課題の習得そのものはできているが、反応までの時間が遅くなることが明らかとなった。この結果は、D2 マウスは B6 マウスに比して、待機時間が長くなることで注意力が低下することを示している。

すなわち D2 マウスでは注意持続能力が B6 マウスよりも低いことが行動指標としてとしてはじめて検出されたといえる。このような反応時間の遅延は、認知症や注意欠如多動症の当事者でも見られる、本来のヒト Go/NoGo 課題で最も鋭敏な指標として用いられるものである。ヒトの場合、Go と

NoGo の Cue 図形の識別ができない、あるいは NoGo とわかっていても押してしまうようなケースは極めて稀であり、認知症であっても終日介護が必要な中等度から重度に限られる。認知症の初期段階 (軽度) や注意欠如多動症の当事者にみられる症状は、正答率の低下ではなく反応時間の遅延である。

これまでラットを用いた実験では、毒性試験においても Go/NoGo 課題を用いた報告が散見されるが、いずれも正答率の低下を指標としており、ヒトにおける指標と乖離があった。本研究で確立した Go/NoGo 課題は、ヒトにおけるそれと同様の指標を用いたものとして、世界初の課題だと言える。

E. 結論

本研究では、ヒトにおける認知・情動行動課題と同様の成績指標を用いたマウス Go/NoGo 課題の確立に成功した。

この課題は、マウスを試験装置に投入したあとは全自動で行われるので、毒性試験としての普及もおおいに期待できる。ただし今回は、試験完了までに 9 ヶ月を要したことから、今後は課題プロトコルの見直しを行い、試験期間の短縮を行う必要があるだろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

なし。

2. 学会発表

掛山正心. 脳発達における AhR の役割とダイオキシン発達神経毒性. 環境ホルモン学会第 19 回研究発表会 (シンポジウム講演)、2016 年 12 月、つくば。

宇治田和佳・遠藤のぞみ・小山博史・掛山正心. マウス早期離乳が成熟期における集団内社会性行動に及ぼす影響. 第 25 回日本行動神経内分泌研究会. 2016 年 9 月、熱海。

牧野友祐・岡田絢・遠藤俊裕・等々力博恵・遠藤のぞみ・掛山正心. タッチスクリーン型オペラント実験装置によるマウス Go/NoGo 課題の開発. 第 25 回日本行動神経内分泌研究会. 2016 年 9 月、熱海。

京相和貴・宇治田和佳・若菜茂晴・遠藤のぞみ・掛山正心. Grin1 ミュータントマウスの社会性

平成 28 年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書

研究課題名

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」
行動異常標準マウス脳の遺伝子発現解析
-エストロゲン受容体 β 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（昨年度）は、エストロゲン(ER) α 遺伝子座に、ER α 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 α 受容体遺伝子置換マウス（以降、このホモ型をER α 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 α KIマウスにおけるER α の発現は野生型の20-25%であり、したがってER α KIマウスはER α ノックダウンマウスと考える事ができる。また、ER α cDNAと置換していることから、理論上、ER α のスプライシングバリエントが発現できないマウスと考える事ができる。情動認知行動解析結果から、ER α 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。解析の結果、ER α 欠失マウスとER α 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 α KIマウスは、ER α ノックダウンマウスと考える事ができるが、今回の解析結

果からは、ER α 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 α のサプライシングバリエントが、ER α 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 α のサプライシングバリエントが発現できないER α KIマウスでは、野生型と比較し、ER α シグナルが亢進していることが推察された。

平成28年度（今年度）は、エストロゲン(ER) α 遺伝子座に、ER β 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 β 受容体遺伝子置換マウス（以降、このホモ型をER β KIと記載）を使用し、脳2部位（大脳皮質、海馬）について網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型あるいはER α KIのものと比較・検討した。ER β KIマウスは、ER α の代わりにER β が発現するマウスであり、また理論上、ER α のサプライシングバリエントが発現できないマウスと考えることができる。なお、ER β KIマウスにおけるER β 蛋白の発現量は、よい抗体がないために、残念ながら現時点では不明である。

遺伝子発現変動解析の結果、野生型と比較し、ER β KIマウスの大脳皮質及び海馬では、それぞれ241（増加：51、減少：190）及び1,140（増加：39、減少：1,101）プローブセット(ps)の有意な発現変動が認められた。脳2部位に共通して、発現が有意に増加した遺伝子は5 ps（Adat2, Epm2a, Lats1, Klf2, Gkn3）、他方、減少した遺伝子はER α （Esr1）を含む19 ps（Atrx, Slc35a3, Zfp959, Sema3e, Gm7226, Tomm7, Sox18, Phf7, Htr1f, D6Wsu116e, S1pr2, Zfp385c, A230061C15Rik, Acvr1c, Dmp1, Phactr2, Tmem56, Esr1）であった。各部位における解析の結果、ER β KIマウスの大脳皮質では、概日リズムが乱れている可能性が示唆された。加えて、発現が減少した遺伝子リストについて、プロモーター解析(in silico)の結果、遺伝子発現調節因子としてESR1が抽出されてこなかったことから、ER α シグナルは大脳皮質においては機能的にレスキューされている可能性が示唆された。他方、海馬では、K⁺チャネル、Na⁺チャネルおよびCa²⁺チャネル遺伝子の発現が減少し、記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担うCamk2a遺伝子の発現が減少し、神経伝達が抑制されている可能性が示唆され、また、プロモーター解析(in silico)の結果、遺伝子発現調節因子としてESR1が抽出されたため、ER α シグナルは海馬においては、機能的にレスキュー出来ない可能性が示唆された。

他方、先行研究におけるER α 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 α 欠失マウスとER β KIマウスにおける解析結果を比較すると、ER β KIマウスの脳では、ER α 欠失マウスの場合に認められたRARシグナル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 α 欠失マウスとER β KIマウスにおける情動認知行動異常の差、すなわち「情報処理」に関連するシグナルネットワークは、大脳皮質におけるER α 欠失マウスにおけるRARシグナル伝達の低下及び神経伝達異常の正常化あるいは、海馬における神経伝達の抑制、特に記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担うCamk2a遺伝子の発現が減少していることが関係している可能性が示唆された。一方、ER α 欠失マウスとER β KIマウス、双方ともに、大脳皮質において概日リズムが乱れる事が示唆された。したがって、ER α 欠失マウスとER β KIマウスとの共通の情動認知行動異常である、「情動および認知」障害は、概日リズムが乱れる事により誘発されている可能性が示唆された。

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。

この目的遂行の為に、昨年度は雄性ER α KIマウスの脳3部位（大脳皮質、海馬及び脳幹）の遺伝子発現変動を解析・検討し

たが、今年度（平成28年度）は、成熟期の雄性ER β KIマウスの脳2部位（大脳皮質及び海馬）のサンプルについて、Percellome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 β KIマウスは、エストロゲン(ER) α 遺伝子座に、ER β 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 β KIを使用した。ER β KIマウスのホモ型におけるER β 蛋白の発現量は、よい抗体がないために、残念ながら現時点では不明である。この点、同様に作製したER α KIマウスのホモ型におけるER α 蛋白の発現量は、野生型の20-25%であり、したがってER α KIマウスはER α ノックダウンマウスと考える事ができた事から、この遺伝子座におけるER β 蛋白の発現は、野生型におけるER α の発現量よりも低い可能性が示唆される。また、cDNAを導入していることから理論上、ER α 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 β KIマウスは、認知関連、情動関連及び情報処理関連に障害に

障害が認められることが確認されている。ER β KI マウスでは、ER α KO と比べて、さらに「情報処理」の障害が認められる。したがって、ER β KI マウスと ER α KO の遺伝子発現変動の比較することにより、この「情報処理」に関連するシグナルネットワークが明らかになるものと期待される。

遺伝子発現変動解析に際しては、成熟期マウスの脳2部位（大脳皮質、海馬）（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2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°C で一晩浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作までは -80°C 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砕液を調製した。得られた破砕液の 10 μ 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 μ 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°C 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 27 年 4 月版）」。

C. 研究結果及び考察

C-1: 野生型及び ER β 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 β 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、大脳皮質及び海馬において、それぞれ 1.0 及び 0.7 コピー以上のものを採用した。

大脳皮質：51 ps (増加)、 190 ps (減少)
海馬：39 ps (増加)、 1,101 ps (減少)

2 部位に共通して増加した遺伝子として 5 ps (Adat2, Epm2a, Lats1, Klf2, Gkn3)、他方、減少した遺伝子は ER α (Esr1) を含む 19 ps (Atrx, Slc35a3, Zfp959, Sema3e, Gm7226, Tomm7, Sox18, Phf7, Htr1f, D6Wsu116e, Slpr2, Zfp385c, A230061C15Rik, Acvr1c, Dmp1, Phactr2, Tmem56, Esr1) が得られた。野生型と ER α 遺伝子の発現量が減少している ER β KI マウスとの比較であるため、ER α (=Esr1) 遺伝子が抽出されてきたのは妥当と考える。一方、ER β (=Esr2) が抽

出されなかった理由として、野生型においても ER β の発現量が低い事に加え、導入した ER β cDNA の発現量が低く、遺伝子導入により ER β の発現量は増加していても、結果的に、発現量の検出限界以下となっている可能性が挙げられる。

次いで、大脳皮質及び海馬において、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 (最終ページ参照) のベン図の通りとなった。

脳の部位によって、野生型と比較し ER β 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 β 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 β KI マウスの遺伝子発現の比較:

まず大脳皮質における ER α ともう一つの ER サブタイプである ER β 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 β KI マウスとの比較を検討した。ER α 遺伝子 (=Esr1) は、ER β KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER β 遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。G タンパク質共役受容体の一種で、膜上に存在するエストロゲン受容体である Gpr30 遺伝子も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、オリゴデンドロサイトのマーカーの一つ Mbp 遺伝子のみが、ER β KI マウスにて有意な増加が認められたが、もうひとつの Mag 遺伝子の方は有意な差が認められなかった事から、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 β KI マウスとで同程度である事が示唆された。

大脳皮質において、野生型マウスと比較し ER β 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、51 及び 190 ps であった。

増加分 51 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が、概日リズムに関係する Dbp 遺伝子の発現増加が有意に認められた。

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 を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、FOXO3、CRY2、CRY1 及び SMAD4 が抽出されてきた (>E-4)。CRY2 および CRY1 は概日リズム関連遺伝子であり、この標的遺伝子は DBP 及び SGK1 遺伝子であり、両遺伝子は発現増加していた。Cry2 も有意な増加が認められた。この内、Dbp 及び SGK1 遺伝子の発現変動について図 2 に示す。

一方、減少分 190 ps (この中には Esr1 が含まれていた) 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。IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (>E-4)。

以上のことから、ER β KI マウスの大脳皮質においては、野生型マウスと比較し、概日リズムが乱れている可能性が示唆された。加えて、発現が減少した遺伝子リストについて、プロモーター解析 (*in silico*) の結果、遺伝子発現調節因子として ESR1 が抽出されてこなかった事から、ER α シグナルは大脳皮質においては機能的にレスキューされ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 β KI マウスの遺伝子発現の比較:

海馬における ER α ともう一つの ER サブタイプである ER β 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 β KI マウスとの比較を検討した。ER α 遺伝子 (=Esr1) は、ER β KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER β 遺伝子の発現は有意な差が認められ

なかった。Gタンパク質共役受容体の一種で、膜上に存在するエストロゲン受容体である Gpr30 遺伝子も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 β 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 β 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、39 及び 1, 101 ps であった。

増加分 39 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。IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (>E-4)。

一方、減少分 1, 101 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としては、神経伝達の抑制が示唆された。具体的には、膜の脱分極を示唆する K⁺チャンネル遺伝子 (10 ps) の発現減少が認められ、具体的には、Kcnn1、Kcnd1、Kcnj6、Kcnc3、Kcnu1、Kcmf1、Kcnq4、Kcnc1、Kctd8 及び Kctd3 遺伝子であったが、一方、膜の過分極を示唆する Na⁺チャンネル (4 ps) 及び Ca²⁺チャンネル遺伝子 (2 ps) の発現減少が認められた。具体的には、Scn1a、Scn2b、Scn4b 及び Cacng6、Cacng7 遺伝子であった。この点、膜の分極状態だけでは、結果として、神経伝達が促進しているのか、抑制されているのか、不明瞭であるが、神経伝達物質合成酵素やシナプス小胞結合蛋白、イオンチャンネル、神経伝達物質受容体などをリン酸化することによって、それら蛋白機能を調節し、記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担う Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (Camk2a) 遺伝子の発現が抑制されている事から、神経伝達は抑制されている可能性が示唆された。この内、Kcnn1 及び Camk2a 遺伝子の発現変動について図 3 に示す。

次いで、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、Esr1 (=ER α) が最上位にリストアップされ、他に SMARCB1、SOX4 及び SP1 が抽出されてき

た。Esr1 遺伝子の標的遺伝子として以下の 83 ps が抽出されてきた。

ABLIM1, AGT, ATP2A3, BCAT1, BIRC3, BRCA2, CD55, CENPU, CLDN4, CPM, CREBBP, CTSC, CYP26B1, DAB2, DLG5, DMP1, DSCR3, ESR1, FGFR2, FKBP4, GAL, GJA1, GJB1, GNA12, GREM1, HLA-G, ICOSLG/LOC102723996, IGF1, IQGAP1, ITGA2B, JAK3, KCNQ4, KHDRBS1, KIF13A, KIF5B, KLHL13, KLK3, KPNB1, LCK, MAGI1, MAP2K7, MAP7, METTL7A, MPHOSPH9, MYO6, NCAPH, OPA1, PAK6, PCM1, PDLIM5, PES1, PGRMC2, PPARGC1A, PTEN, PTK2, PTPN13, PTPRT, RBL1, RICTOR, RND3, ROCK1, RP2, SELL, SIAH2, SIGIRR, SLC12A4, SLC16A3, SLC1A4, SLC2A4, SMAD5, SMC3, SMURF2, SPINT1, STAM2, STAT3, STAT5A, SUCLA2, TFF1, TGFB1, TGFB1, TJP2, TNFAIP3, TRPM2 及び YIPF2 遺伝子であった。この結果から、ER β KI マウスの海馬においては、ER β は ER α 機能をレスキュー出来ない可能性が示唆された。

以上のことから、ER β KI マウスの海馬においては、野生型マウスと比較し、K⁺チャンネル、Na⁺チャンネルおよび Ca²⁺チャンネル遺伝子の発現が減少し、記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担う Camk2a 遺伝子の発現が減少し、神経伝達が抑制されている可能性が示唆され、また、プロモーター解析 (in silico) の結果、遺伝子発現調節因子として ESR1 が抽出されたため、ER α シグナルは海馬においては、機能的にレスキュー出来ない可能性が示唆された。

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

先行研究における ER α 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、神経伝達の異常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 β KI マウスと ER α 欠失マウスにおける解析結果を比較すると、大脳皮質では ER α 欠失マウスにおける RAR シグナル伝達の低下と神経伝達の異常が、海馬では ER β KI マウスにおける神経伝達の抑制が大きな相違点となる。

そこでER β KIマウスの大脳皮質におけるRARシグナル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、野生型のものと有意な差が認められなかった。このことから、ER α 欠失マウスとER β KIマウスにおける情動認知行動異常の差、すなわち「情報処理」に関連するシグナルネットワークは、大脳皮質におけるER α 欠失マウスにおけるRARシグナル伝達が低下及び神経伝達異常の正常化あるいは、海馬における神経伝達の抑制、特に記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担うCa²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII(Camk2a)遺伝子の発現が減少していることが関係している可能性が示唆された。

一方、ER α 欠失マウスとER β KIマウス、双方ともに、大脳皮質において概日リズムが乱れる事が示唆された。したがって、ER α 欠失マウスとER β KIマウスとの共通の情動認知行動異常である、「情動および認知」障害は、概日リズムが乱れる事により誘発されている可能性が示唆された。このエストロゲンと概日リズムの関係に関しては、2014年にヒト乳がん細胞株MCF-7およびMDA-MB-231細胞を用いて、概日リズム関連遺伝子の一つClock遺伝子のプロモーターにエストロゲン応答配列(ERE)が存在し、エストロゲンはER α のEREへの結合を促すことで、Clock遺伝子の発現を増加させることが報告されている(Xiao et al., PLoS One 9(5): e95878, 2014)ことから、直接的な分子制御がおこなわれている可能性が高いものと考えられる。

今後、ER α KIマウスの場合とER β KIマウスの場合の比較解析を検討する。

D. 結論

各部位における解析の結果、ER β KIマウスの大脳皮質では、概日リズムが乱れている可能性が示唆された。加えて、発現が減少した遺伝子リストについて、プロモーター解析(in silico)の結果、遺伝子発現調節因子としてESR1が抽出されたことから、ER α シグナルは大脳皮質においては機能的にレスキューされている可能性が示唆された。他方、海馬では、K⁺チャンネル、Na⁺チャンネルおよびCa²⁺チャネ

ル遺伝子の発現が減少し、記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担うCamk2a遺伝子の発現が減少し、神経伝達が抑制されている可能性が示唆され、また、プロモーター解析(in silico)の結果、遺伝子発現調節因子としてESR1が抽出されたため、ER α シグナルは海馬においては、機能的にレスキュー出来ない可能性が示唆された。先行研究におけるER α 欠失マウスと、ER β KIマウスにおける解析結果を比較すると、ER β KIマウスの脳では、ER α 欠失マウスの場合に認められたRARシグナル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 α 欠失マウスとER β KIマウスにおける情動認知行動異常の差、すなわち「情報処理」に関連するシグナルネットワークは、大脳皮質におけるER α 欠失マウスにおけるRARシグナル伝達の低下及び神経伝達異常の正常化あるいは、海馬における神経伝達の抑制、特に記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担うCamk2a遺伝子の発現が減少していることが関係している可能性が示唆された。一方、ER α 欠失マウスとER β KIマウス、双方ともに、大脳皮質において概日リズムが乱れる事が示唆された。したがって、ER α 欠失マウスとER β KIマウスとの共通の情動認知行動異常である、「情動および認知」障害は、概日リズムが乱れる事により誘発されている可能性が示唆された。

今後特に、エストロゲンと概日リズムあるいはRAR(レチノイン酸受容体)のシグナルネットワークとの関連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

Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, deta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J. Learning and memory deficits in male adult mice treated with a benzodiazepine sleep-inducing drug during the juvenile period. Front Neurosci 10: 339- ,2016.

2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity. 第 43 回日本毒性学会学術年会(2016. 6. 29)

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement. 14th International Congress of Toxicology 2016 (ICT 2016) (2016.10.3), Merida, Mexico

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Project の進捗 — 単回および新型反復曝露の比較による予測性向上 —
第 43 回日本毒性学会学術年会(2016. 7. 1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study. The 52nd Congress of EUROTOX (EUROTOX2016) (2016. 9. 6), Seville, Spain.

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純
キシレンの経気道吸入曝露によるマウス行動影響解析
第 43 回日本毒性学会学術年会(2016. 6. 30)

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純
キシレン吸入曝露によるマウスへの中枢機能影響解析
第 159 回日本獣医学会学術集会(2016. 9.)

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

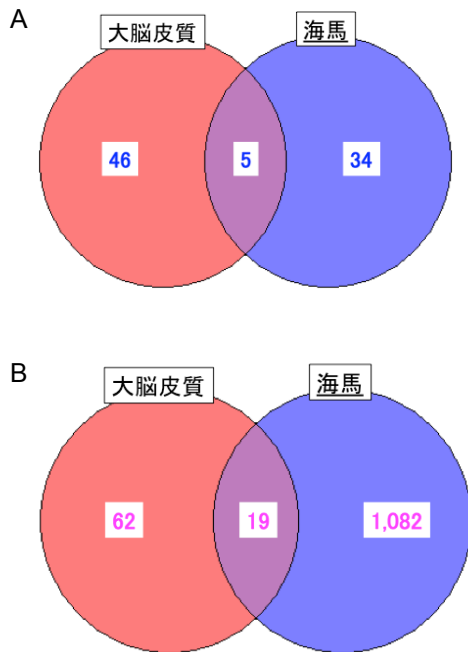


図 1 脳各部位について、野生型と比較し、ERβ KI マウスの場合に、発現が有意に増加(A)あるいは減少(B)する遺伝子数(ベン図で表記した)

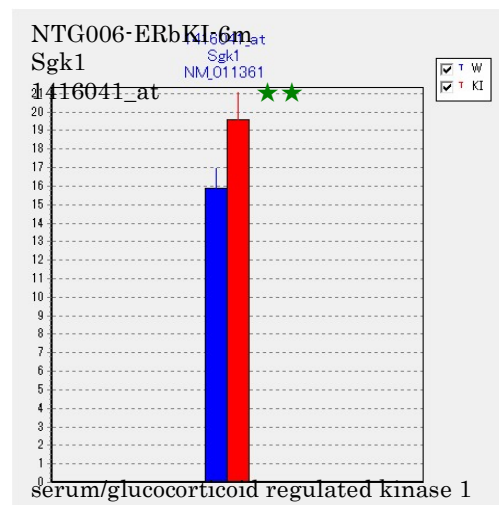
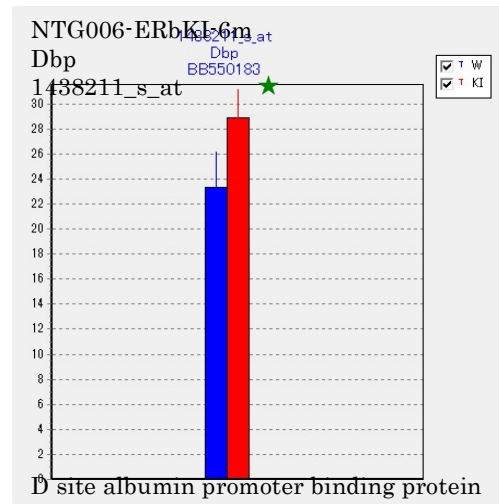


図 2 大脳皮質において、野生型マウスと比較し ERβ KI マウスにおいて、有意に発現増加が認められた、Dbp (上段) 及び SGK1 遺伝子 (下段) の発現変動

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

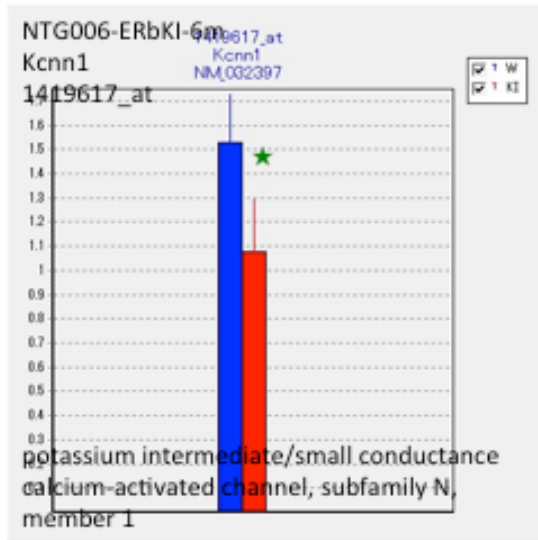
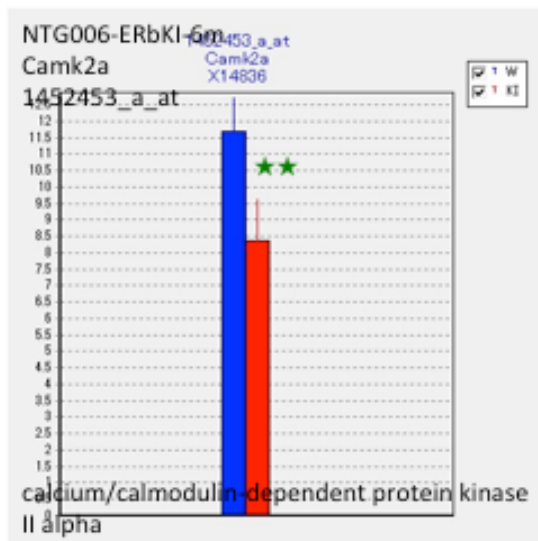


図 3 海馬において、野生型マウスと比較し ERβKI マウスにおいて、有意に発現減少が認められた、Kcnn1 (上段) 及び Camk2 遺伝子 (下段) の発現変動

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



研究課題名

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）

分担研究課題名

「神経幹細胞動態解析および大脳層構造形態解析と異常基準値の設定、新規毒性マーカー探索」

研究分担者

中島 欽一（九州大学大学院医学研究院・基盤幹細胞学分野・教授）

【研究要旨】

昨年度の研究では、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。また、ニューロン分化のモデル細胞である、副腎髄質由来褐色細胞腫細胞株を用いて、特定のノン・コーディングRNAが遺伝子発現を制御できることを明らかにした。そこで、本年度は、これらの表現型や遺伝子発現が、他の物質による神経系への影響を定量化する指標となりうるかどうかを検討するための研究に着手した。

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・幼若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、これまでに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。ところで、ネオニコチノイド系の農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドの幼若期暴露によって遅発性の情動・認知行動異常が生じることが明らかとなっており、またニューロン新生への影響が示唆される結果が研究代表者らによって得られている。そこで、本分担者は、対象化学物質として、ネオニコチノイド系農

薬を選択し、ニューロン新生とノン・コーディングRNAの発現・機能に及ぼす影響の詳細な解析、及びその定量化を目的として研究に着手した。

B. 研究方法

まず、幼若期（2週齢）マウスに、コントロールとしてコーンオイル、アセタミプリド（10mg/kg）、イミダクロプリド（8mg/kg）を単回経口投与し、その後1週間BrdU（100 mg/kg/日）を腹腔内投与した群、及び成体期（12週齢）まで待つて同じくBrdUを投与した群を作製、脳を固定し成体海馬ニューロン新生解析用とした。それぞれ脳切片を作製し、幼若ニューロンマーカーである doublecortin (DCX) と BrdU に対する抗体を用いてニューロン新生を定量化する。また、同様に2週齢マウスに、コーンオイル、アセタミプリド、イミダクロプリドを単回経口投与し、成体期（13週齢）まで待ち、ノン・コーディングRNA発現解析用に脳を凍結保存した。この脳よりノン・コーディングRNAを含むRNAを抽出し、ライブラリーを作製後、次世代シー

ケンサーを用いて発現データを得る。

C. 研究結果

本年度は、アセタミプリド及びイミダクロプリド投与後1週間 BrdU を投与したマウスについてニューロン新生の解析を行ったが、コントロールと比較して、明らかな差は観察されなかった。

ノン・コーディング RNA 解析に関しては、各脳より抽出した RNA を用いて、シーケンス用のライブラリー作製まで行った。

D. 考察

今回、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の2週齢マウス投与直後には、ニューロン新生への影響は見られなかった。しかし、研究代表者が行った、同様に両農薬を投与したマウスの成体期(12-13週齢)における行動解析では、恐怖条件付けテストにおいて明らかに障害がみられていることから、成体期でのニューロン新生解析が重要であると思われる。

E. 結論

今回の解析から、ネオニコチノイド系農薬である、アセタミプリド(10mg/kg)、イミダクロプリド(8mg/kg)投与直後には、海馬ニューロン新生への影響は見られないことがわかった。したがって、その影響を明らかにするためには、成体期でのニューロン新生解析とノン・コーディング RNA 解析による定量化が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

- Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K.

Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*. 2016 Nov 10;539(7628):299-303. doi: 10.1038/nature20104. PMID: 27750280

- Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, Hatada I. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol*. 2016 Oct;34(10):1060-1065. doi: 10.1038/nbt.3658. PMID: 27571369
- Noguchi H, Kimura A, Murao N, Namihira M, Nakashima K. Prenatal deletion of DNA methyltransferase 1 in neural stem cells impairs neurogenesis and causes anxiety-like behavior in adulthood. *Neurogenesis (Austin)*. 2016 Sep 9;3(1):e1232679. PMID: 27844025
- Irie K, Tsujimura K, Nakashima H, Nakashima K. MicroRNA-214 Promotes Dendritic Development by Targeting the Schizophrenia-associated Gene Quaking (Qki). *J Biol Chem*. 2016 Jun 24;291(26):13891-904. doi: 10.1074/jbc.M115.705749. PMID: 27129236
- Yamamoto N, Agata K, Nakashima K, Imamura T. Bidirectional promoters link cAMP signaling with irreversible differentiation through promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) expression in PC12 cells. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jun 20;44(11):5105-22. doi: 10.1093/nar/gkw113. PMID: 26945044
- Noguchi H, Murao N, Kimura A, Matsuda T, Namihira M, Nakashima K. DNA Methyltransferase 1 Is

- Indispensable for Development of the Hippocampal Dentate Gyrus. *J Neurosci.* 2016 Jun 1;36(22):6050-68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0512-16.2016. PMID: 27251626
7. Ito K, Sanosaka T, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aizawa A, Uosaki Y, Noguchi A, Arakawa H, Nakashima K, Takizawa T. Identification of genes associated with the astrocyte-specific gene Gfap during astrocyte differentiation. *Sci Rep.* 2016 Apr 4;6:23903. doi: 10.1038/srep23903. PMID: 27041678
2. 学会発表
 <国内学会>
1. 中島欽一[○]: HDAC阻害剤胎生期暴露による学習記憶障害とその改善法、第35回日本認知症学会学術集会、東京都、東京国際フォーラム、2016年12月1-12月3日(2日)(シンポジウム)
 2. 本田瑞季[○]、堅田明子、大塚まき、山本直樹、五十嵐勝秀、今村拓也、中島欽一: 胎生期の神経幹細胞における発生時期依存的なBMP応答性変化の分子機構、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日(2日)(ポスター)
 3. 安井徹郎[○]、上菌直弘、中嶋秀行、松田泰斗、中島欽一: 低酸素培養によるヒトiPS由来神経幹細胞の短期アストロサイト分化誘導、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日(1日)(ポスター)
 4. 藤本雄一[○]、亀田朋典、小野田孝太、吉良潤一、中島欽一、今村拓也: ヒトES/iPS細胞から神経幹細胞への誘導とその分化過程におけるノンコーディングRNA(pancrRNA)を介した特異的遺伝子活性化、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日(1日)(ポスター)
 5. 中島欽一[○]: 神経幹細胞のエピジェネティック制御と脊髄損傷治療への応用、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日(30日)(シンポジウム)
 6. 坂井淳彦[○]、松田泰斗、加藤聖子、中島欽一: 胎児期抗てんかん薬曝露マウスの成体でのけいれん感受性増加、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日(30日)(ポスター)
 7. 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: マウス海馬ニューロンにおいて神経活動によりDNA化が変動し遺伝子発現応答能を改変する、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日(30日)(ポスター)
 8. 山本直樹、阿形清和、中島欽一、今村拓也[○]: 長鎖ノンコーディングRNAはほ乳類ニューロン完全増殖停止に必須である、第109回日本繁殖生物学会大会、神奈川県、麻布大学、2016年9月11-15日(13日)
 9. 中島欽一[○]: 神経系細胞のエピジェネティクス、第46回新潟神経学夏期セミナー、新潟県、新潟大学脳研究所、2016年7月28-7月30日(30日)(招待講演)
 10. 坂井淳彦[○]、中島欽一、加藤聖子: マウス神経幹細胞の胎仔期バルプロ酸曝露による晩発性影響とその分子基盤の解明、第26回日本サイトメトリ学会学術集会、福岡市、九州大学百年講堂、2016年7月23-24日(23日)
 11. 中島欽一[○]: Mechanism of Rett syndrome pathogenesis、第39回日本神経科学大会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年7月20-22日(20日)(シンポジウム)
 12. 中島欽一[○]: レット症候群原因因子MeCP2のmiRNA生合成を介したニューロン機能制御、第43回日本毒性学会学術年会、愛知県、ウインクあいち、2016年6月29-7月1日(30日)(シンポジウム)
 13. 山本直樹、阿形清和、中島欽一、今村拓也[○]: Regulation of Non-coding

RNA Contributes to the Complete Cessation of Cell Proliferation of Neuron-like Cells、第35回札幌国際がんシンポジウム、北海道、ロイトン札幌、2016年6月24-25日(24日)(ポスター)

14. 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神経活動依存的DNAメチル化変動の検出、第35回札幌国際がんシンポジウム、北海道、ロイトン札幌、2016年6月24-25日(24日)(ポスター)
15. 中島欽一[○]：神経系におけるエピジェネティクス、第10回日本エピジェネティクス研究会、大阪府、千里ライフサイエンスセンター、2016年5月19-20日(20日)(講演)
16. 今村拓也[○]、山本直樹、阿形清和、中島欽一：cAMPシグナルによるPC12細胞の最終分化機構には両方向性プロモーター由来のノンコーディングRNA(pancRNA)発現制御が必須である、第10回日本エピジェネティクス研究会、大阪府、千里ライフサイエンスセンター、2016年5月19-20日(20日)(ポスター)
17. 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神経活動依存的DNAメチル化変動の検出、第10回日本エピジェネティクス研究会、大阪府、千里ライフサイエンスセンター、2016年5月19-20日(19日)(ポスター)
18. 小野田孝太[○]、佐藤弘明、浜崎伸彦、中嶋秀行、東村博子、前多敬一郎、中島欽一、今村拓也：マウス性的二型核内の細胞でみられるアンドロジェン依存的なDNAメチル化レベルの変化、第10回日本エピジェネティクス研究会、大阪府、千里ライフサイエンスセンター、2016年5月19-20日(19日)(ポスター)
19. 中島欽一[○]：神経幹細胞分化とニューロン機能を制御するエピジェネティクス機構、第1回名市大頭脳循環セ

ミナー、名古屋市、名古屋市立大学、2016年4月8日

<国際学会>

1. Katada, S., Yamashita, R., **Nakashima, K.** : Implication of structure and functional changes of aging choroid plexus in neural stem cells regulation and brain functions, KEYSTONE SYMPOSIA, Olympic Valley, January 8-12, 2017
 2. **Nakashima, K.** : Insights into Rett Syndrome using Neural Stem Cells, KEYSTONE SYMPOSIA, Olympic Valley, January 8-12, 2017
 3. Imamura, T., Yamamoto, N., Agata, K., **Nakashima, K.** : Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells. Society for Neuroscience 2016, San Diego Convention Center, November 12-16, 2016
 4. **Nakashima K.** : Neural Stem Cell Regulation and Its Therapeutic Application to Spinal Cord Injury, Gordon Research Conference (Molecular & Cellular Neurobiology) (Hong Kong, China) June 12-17, 2016
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
該当なし。
 2. 実用新案登録
該当なし。
 3. その他
特になし。

研究課題名

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）

分担研究課題名

「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・神経科学研究所 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ネオニコチノイド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。特にバルプロ酸、ビスフェノールAで遅発性におこる興奮/抑制バランス（E/I バランス）の変調を精度よく検出でき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、とくに大規模神経回路活動解析によって海馬以外の特徴的な変化を示す神経回路を探索した。これに、新規共焦点顕微鏡を利用したin vivo系での計測系、新規パターン刺激イメージング顕微鏡、膜電位感受性蛍光タンパクを用いた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) ネオニコチノイド系物質の幼若期投与（種村らとの共同研究）ネオニコチノイド系の農薬の幼若期暴露によって遅発性の情動・認知行動が生じることが明らかとなっている。この遅発性の情動・認知行動には神経新生への影響が示唆されている。この遅発影響の初期応答を神経回路異常として捉えることを目的としてネオニコチノイド系の農薬を幼若マウスに経口投与し、神経回路の異常の検出を試みた。ネオニコチノイド系の農薬としてアセタミプリドとイミダクロプリドを用い、マウス 2 週齢（幼若期）に強制経口投与し、強制投与後の 2, 12, 24 時間後の神経回路応答を網羅的な神経回路応答検出能力に優れた膜電位感受性色素を用いた神経回路活動検出系で海馬神経回路を中心に検証した。

(2) 海馬以外の基準神経回路の探索

低倍率の光計測系を改良し、海馬以外の神経回路についてもより網羅的な検証を行えるように基礎的な神経回路応答を検討した。

(3) 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。

(4) 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。

(5) 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) ネオニコチノイド系物質の幼若期投与 (種村らとの共同研究) ネオニコチノイド系物質の強制投与後、2 時間後には細胞体での興奮性が著しく亢進している様子が検出された。今後、この初期応答が遅発影響とどのような相関関係があるかをこの農薬で検証する。また、他の遅発影響を起こす原因薬物 (BPA, バルプロ酸, ドーモイ酸等) で同様の傾向がみられるか、他の初期応答が見られるかを検証する。バルプロ酸, BPA では神経回路活動への遅発影響として興奮・抑制バランスの破綻が見られており、初期応答ではどのような影響があるかを見ることによって遅発影響の早期発見系として確立すると同時にその神

経回路機構を検証する。

(2) 海馬以外の基準神経回路の探索

海馬以外の神経回路で、化学物質による改変を示すことが容易な神経回路を選ぶために、探索的に他の神経回路の応答を検討した。今年度は、皮質系の回路として、視覚野、傍梨状核、嗅内野、嗅周囲皮質など様々な神経回路において、主に興奮抑制のバランスの変更が起こす現象を検討した。

(3) 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。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。

(4) 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、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。

(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を開発を進めている。

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. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

1: Yoshimura H, Sugai T, Kato N, Tominaga T, Tominaga Y, Hasegawa T, Yao C, Akamatsu T. Interplay between non-NMDA and NMDA receptor activation during oscillatory wave propagation: Analyses of caffeine-induced oscillations in the visual cortex of rats. *Neural Netw.* 2016 Jul;79:141-9. doi: 10.1016/j.neunet.2016.03.012. PubMed PMID: 27136667.

2: Tominaga T, Tominaga Y. Paired Burst Stimulation Causes GABAA Receptor-Dependent Spike Firing Facilitation in CA1 of Rat Hippocampal Slices. *Front Cell Neurosci.* 2016 Jan 29;10:9. doi: 10.3389/fncel.2016.00009. PubMed PMID: 26858604; PubMed Central PMCID: PMC4731501.

2. 学会発表

1. Tominaga T and Tominaga Y. Activation of GABAA-receptors by high-frequency stimuli causes paired burst facilitations in area CA1 of the hippocampal slice 504.19 / L2 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016

2. M. Koike-Tani, S. Mehta, T. Tominaga, R. Oldenbourg, T. Tani Imaging of polarized light signal changes associated with neuronal activity in mouse hippocampus 300.03 / E7 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016

3. R. Kajiwara, Y. Wakayama, Y. Tominaga, T. Tominaga Network plasticity facilitating the neural excitation propagation between the perirhinal and entorhinal cortices as revealed by voltage-sensitive dye imaging 302.14 / F15 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016

4. T. Luyben, J. Borovac, M. Valencia, M. Khan, T. Tominaga, K. Okamoto Rapid postsynaptic cAMP signaling regulates structural and functional potentiation underlying learning and memory 505.07 / L10 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016

5. 富永 貴志, 富永 洋子「使える」膜電位感受性色素による神経回路解析法 “Conventional” voltage sensitive dye imaging of neural circuit activity 第 54 回日本生物物理学会年会 (つくば国際会議場)「神経活動イメージングの最先端:新規ツールとその活用 (Advances in imaging neuronal activity: New tools and applications) オーガナイザー ベアン クン (沖縄科学技術大), 富永 貴志 (徳島文理大) 2016 年 11 月 25 日

6. 小池 (谷) 真紀, Mehta Shalin, Oldenbourg Rudolf, 富永 貴志, 谷 知己 新規偏光顕微鏡を用いたマウス海馬スライスにおけるシナプス活動の非侵襲的計測 Imaging of neuronal activity in mice hippocampal slices by instantaneous polarized light microscopy 第 54 回日本生物物理学会年会 (つくば国際会議場)「神経活動イメージングの最先端:新規ツールとその活用 (Advances in imaging neuronal activity: New tools and applications) オーガナイザー ベアン クン (沖縄科学技術大), 富永 貴志 (徳島文理大) 2016 年 11 月 25 日

7. 富永貴志 富永洋子 (2016) GABA 依存のペアードバースト促進は海馬 CA1 における新規の NMDA 非依存的な短期可塑性である GABA dependent paired burst facilitation (PBF) is a new class of NMDA-independent short-term plasticity in area CA1 of the hippocampal slice. A voltage-sensitive dye study 第 39 回日本神経科学大会 Neuroscience 2016 パシフィコ横浜 7月 20 - 22 日 02-J-2-3

8. 吉村弘, 富永洋子, 富永貴志 (2016) ラット傍梨状核において大脳皮質脱抑制

下で生じるエコー波 Cortical disinhibition-induced echo wave in the EPN of rat 第 39 回日本神経科学大会 Neuroscience 2016 パシフィコ横浜 7月 20 - 22 日 P2-058

G. 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

研究課題名

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）

分担研究課題名

「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・客員研究員）

【研究要旨】

複数の国際的会合に出席し、本研究班の成果の一部を情報発信した。本研究班において得られた神経行動学的所見、神経科学的所見、分子生物学的所見、及び、その獲得と解析に用いた研究手法は、いずれの会合においても、興味深く受け入れられ、高評価を得た。国際的に、これらの様な情報を基にしたリスク評価の必要性の高さは共通に認識されていることが確認されるとともに、その方法論の検討を積み重ねようとしていることが判明した。さらに、自らデータを作成しない方針の国や組織も、分子毒性学的情報の有用性を認識し、評価へ取り込む方法の開発と標準化に力を入れていることが明らかとなった。

A. 研究目的

情動認知行動異常を呈したマウスの中枢神経組織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の収集を行う。

加えて、外因性の要因により誘発される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：今年度は非開催となった（次年度 5 月開催予定）。2016 年 9 月 14～15 日に USEPA Accelerating Risk Assessment Workshop（於 国環境防護庁（D. C., USA））、2016 年 9 月 19～20 日に European Commission

International Workshop on Endocrine Disruptors（於 Hotel Bloom, Rue Royale 250, 1210 Brussels, Belgium）、2016 年 10 月 10～12 日に European Centre For Ecotoxicology and toxicology of Chemicals (ECETOC) Workshop on Applying ‘Omics Technologies in Chemicals Risk Assessment（於 NH Eurobuilding Hotel, Madrid, Spain）、2016 年 11 月 29 日に The Korean Academy of Science and Technology International Symposium（於 Maple Hall, The Plaza Hotel, Seoul, Korea）、に出席し、情報収集を行うとともに、本研究班における成果の一部を情報発信した。

B-2 胎生期マウス海馬の遺伝子発現プロファイル解析：

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CR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:

USEPA Accelerating Risk Assessment Workshop: 国際的な規制当局の科学支援研究者による様々なレベルの複雑な要件を含む定量的なリスク評価のための新たな優先付け、スクリーニングなどのツールの適用に関するディスカッションを行う場においてシグナル毒性としての知見を口頭発表(30分)し、2日間の会を通じて、情報交換を行った。

EC International WS on Endocrine Disruptors: EU内、及び関係する国際的な通商関係にあるパートナー間での内分泌かく乱化学物質の試験法と評価に関するアプローチの共通点と相違点を明らかにし、その評価への適応法を論議するとともに、シグナル毒性としての内分泌かく乱化学物質の研究と試験法開発に関する知見を口頭発表(30分)し、2日間の会を通じて、情報交換を行った。

ECETOC WS: オミクス技術の化学物質リスク評価への適応に関する会合にて、今後のストラテジー構築に関するブレインストーミングと、それを受けての企画委員会に参画した。

The Korean Academy of Science and Technology International Symposium: 環境汚染物質への暴露と糖尿病発症に関するシンポジウムにおいて、そのメカニズムに関わる分子機構の考え方の例として、シグナル毒性の考え方、実際のデータ、及び解析手法を口頭発表(20分)により提示した。

C-2 胎生期マウス海馬の遺伝子発現プロファイル解析:

昨年度に得た、胎生11.5日、14.5日、17.5日3時点(以下、E11、E14、E17と表記)、各3標本から取得したデータのクオリティチェックを行った。その結果、Percellome法による遺伝子発現解析が可能であることが確認できた。

N=3のサンプルサイズにおける群間t検定の $p < 0.01$ 、細胞一個当たりmRNAコピー数1以上のProbesetのリストを解析した。経時的な遺伝子発現の増減を分類し、そのPS数を表1に示した。E14からE17にかけて、急速に発現増加する(E14 < E17と表記)遺伝子の数が増加することが示された。細胞増殖、分化に関わる遺伝子のいくつかを図1~11に示す。細胞増殖促進(発現増加)及び抑制(発現減少)に関わる遺伝子、神経細胞分化マーカー(発現増加)、グリア細胞分化マーカーとその上流遺伝子(発現増加)が確認された。

次年度にかけてさらに、詳細解析を行う。

D. 考察

本研究班において得られた分子生物学的な所見に裏打ちされた成果、及び、その獲得と解析に用いた研究手法は、いずれの会合においても、興味深く受け入れられるとともに高評価を得え、その研究の方向性について妥当性と新規性が確認された。国際的に、この様な情報のリスク評価への適応については、その必要性の高さは共通に認識されていることが確認されるとともに、その活用の方法論の検討を積み重ねようとしていることが判明した。自らデータを作成しない方針の国や組織も、分子毒性学的情報の有用性を認識し、評価へ取り込む方法の開発と標準化に力を入れていることが明らかであった。

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。今後の機能的所見と海馬における分子毒性学的客観所見の解析が、本課題の更なる強固な基礎を形成するものと期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍 なし

2) 雑誌

Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, deta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J. Learning and memory deficits in male adult mice treated with a benzodiazepine sleep-inducing drug during the juvenile period. *Front Neurosci* 10: 339- , 2016.

Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, Kanno J, Tanaka K. , The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- κ B Signaling. *Mol Cell* 64(2): 251-266, 2016.

Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Alexander WT, Jiegou X, Tsuda H. , Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci* 107(7): 924-935, 2016.

2. 学会発表

<国内学会>

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity. 第43回日本毒性学会学術年会(2016. 6. 29)

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement. 14th International Congress of Toxicology 2016 (ICT 2016) (2016.10.3), Merida, Mexico

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

菅野 純

Pathology-based optimization of toxicology by tie-ups with cutting-edge biology and systems

biology.

第105回日本病理学会総会(2016. 5. 13)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復曝露の比較による予測性向上 - 第43回日本毒性学会学術年会(2016. 7. 1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study. The 52nd Congress of EUROTOX (EUROTOX2016) (2016. 9. 6), Seville, Spain.

Jun Kanno, Introduction to the Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology.

第14回国際毒性学会 (ICT2016) (2016. 10. 3), Merida, Mexico

Jun Kanno, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Environmental Pollutants on Health.

the 27th Korean Academy of Science and Technology (KAST) International Symposium (2016. 11. 29), Seoul, Korea,

Kentaro Tanemura and Jun Kanno, Neurobehavioral toxicity at adult period Induced by pesticide exposure at juvenile period. 14th International Congress of Toxicology 2016 (ICT 2016) (2016. 10. 5), Merida, Mexico

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純

キシレンの経気道吸入曝露によるマウス行動影響解析

第43回日本毒性学会学術年会(2016. 6. 30)

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純

キシレン吸入曝露によるマウスへの中枢機能影響解析

第159回日本獣医学会学術集会(2016. 9.)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

特になし。

NTG037_Telencephalon	
変化方向 ($p < 0.01$ 、1 copy/cell 以上)	Probeset 数
E11 < E14	1425
E14 < E17	13838
E11 > E14	512
E14 > E17	140
E11 < E14 > E17	4
E11 > E14 < E17	58

表 1

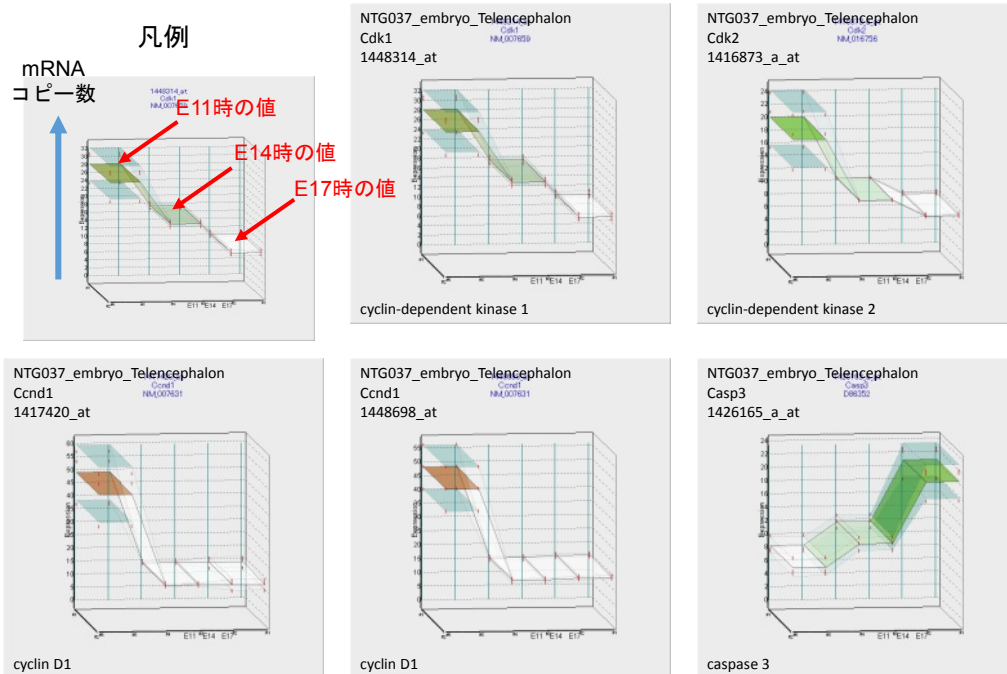


図 1

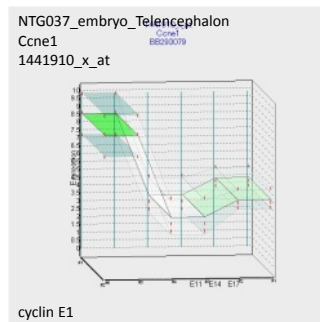
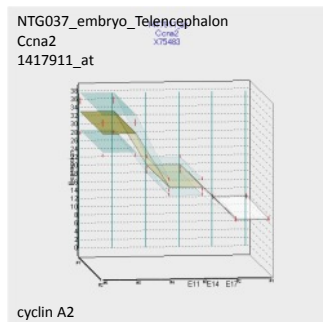
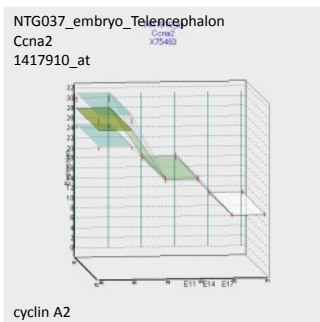
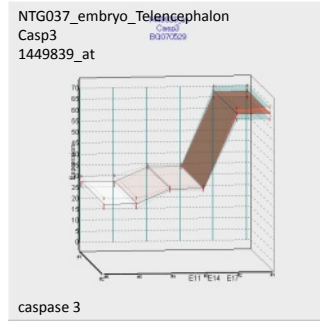
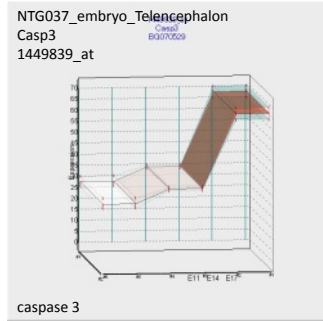
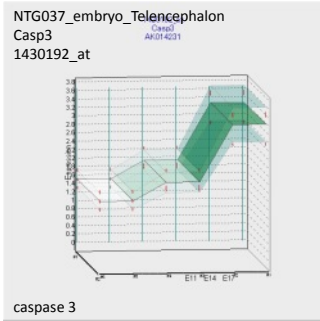


图 2

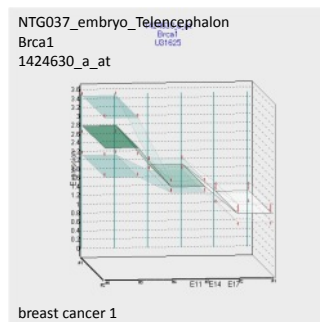
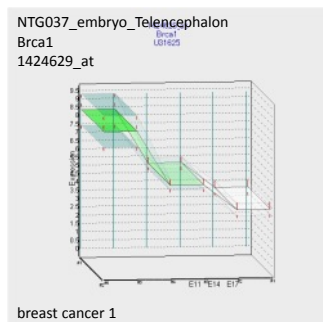
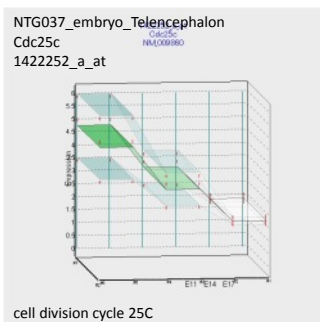
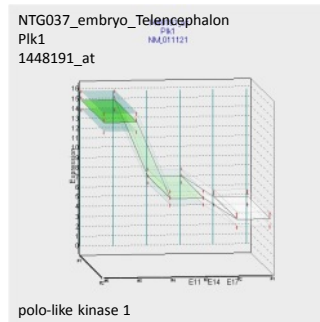
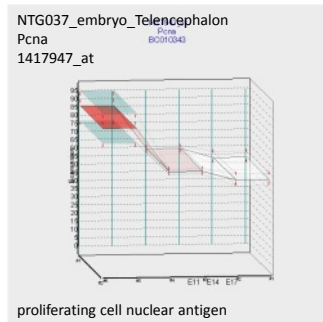
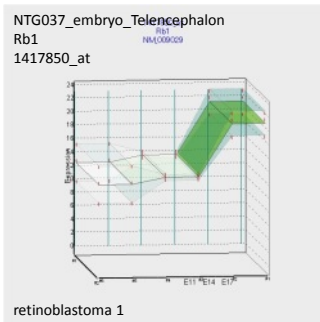


图 3

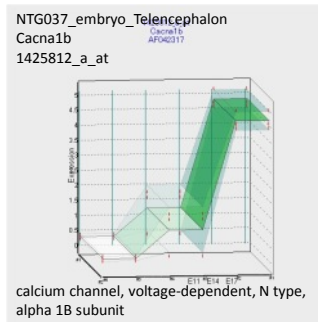
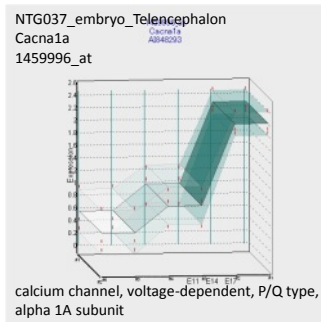
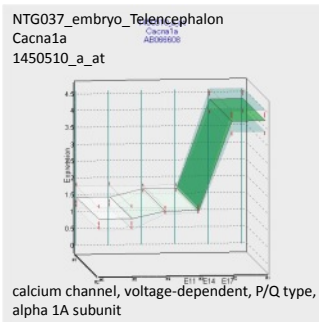
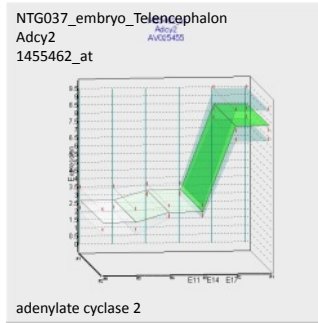
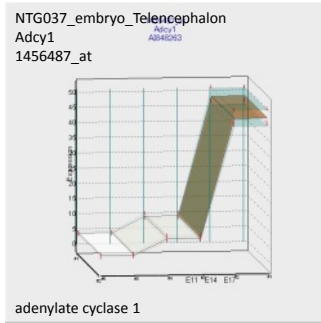
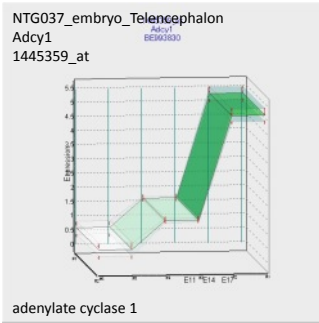


图 4

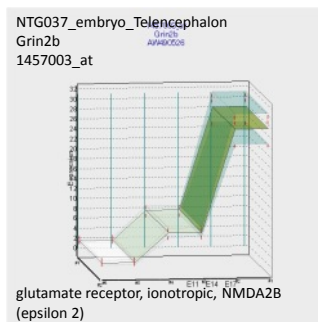
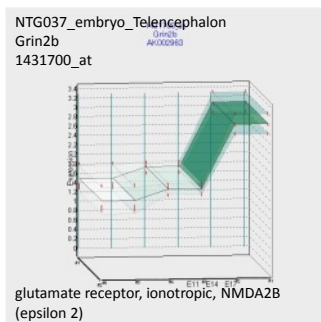
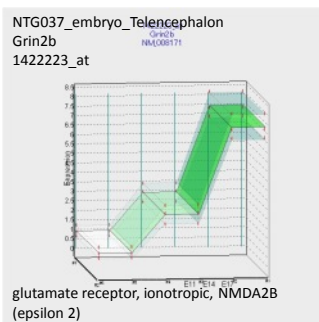
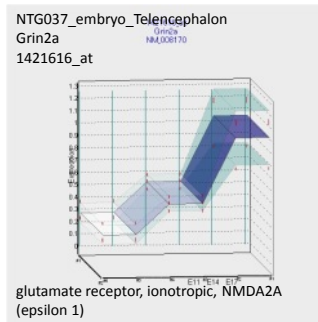
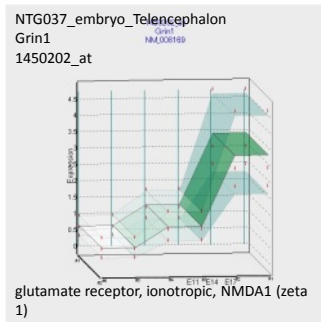
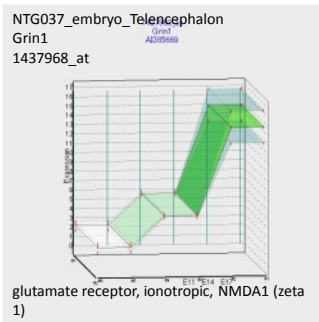
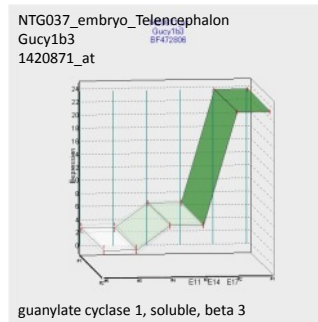
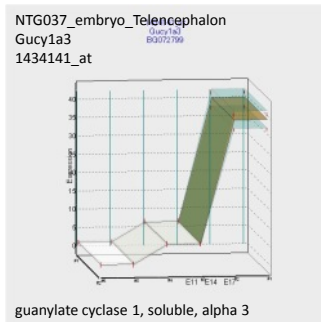
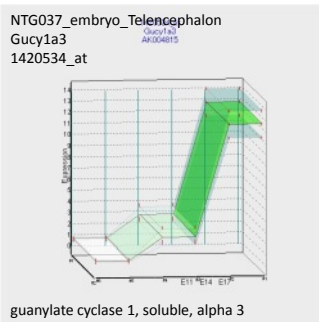
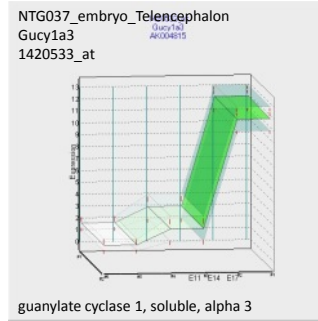
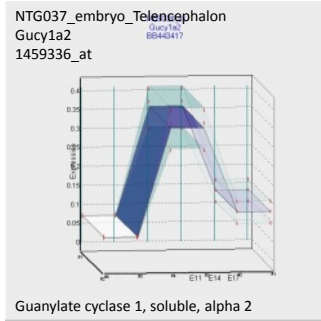
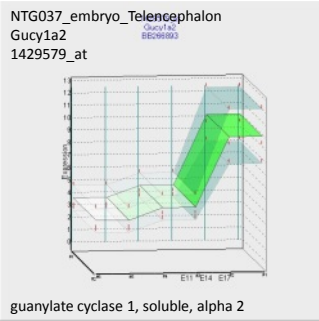
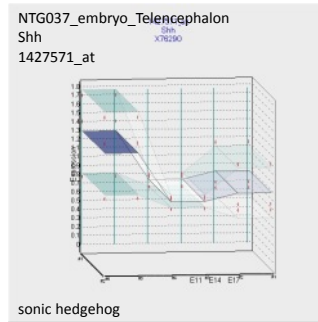
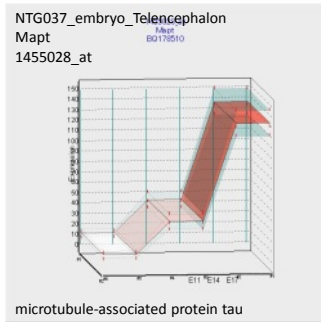
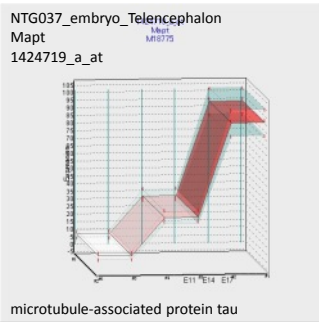
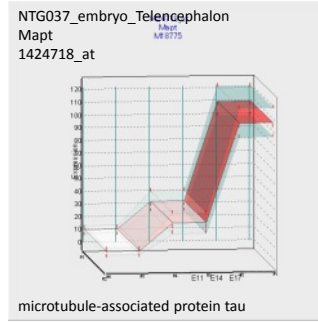
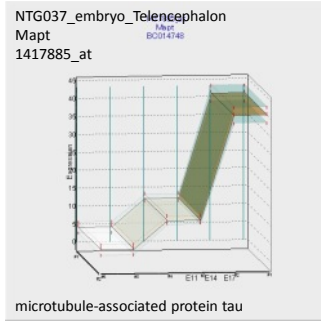
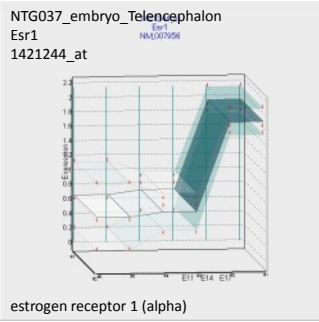
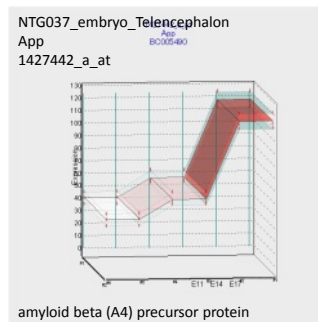
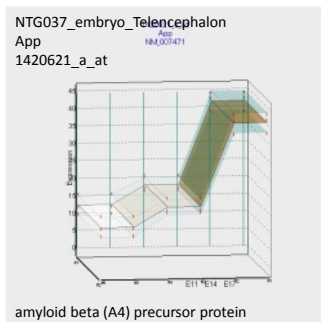
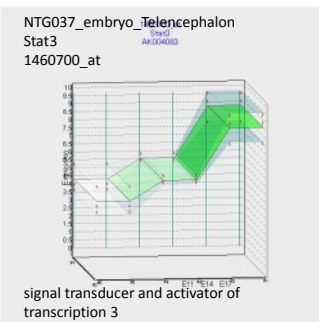
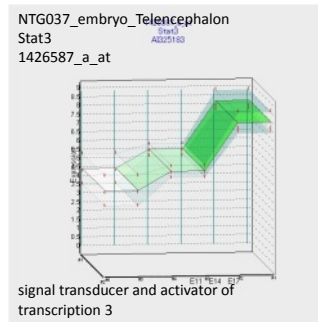
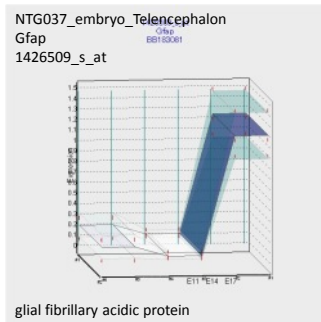
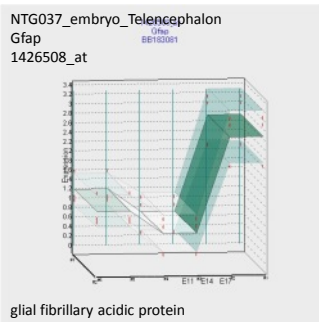


图 5

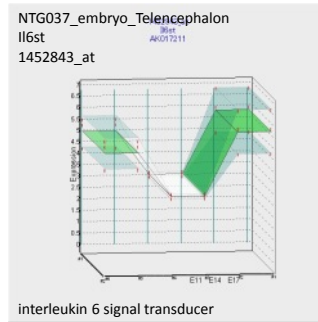
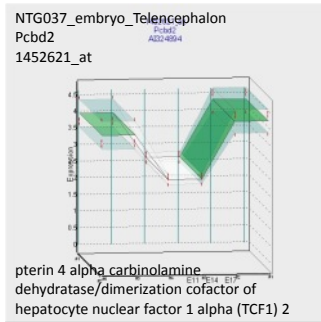
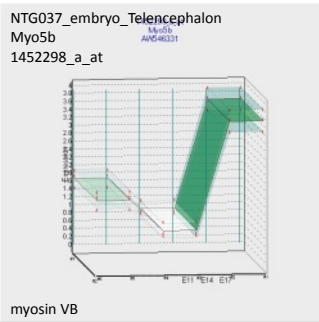
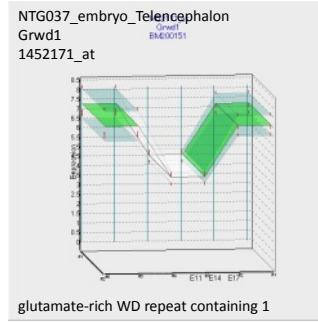
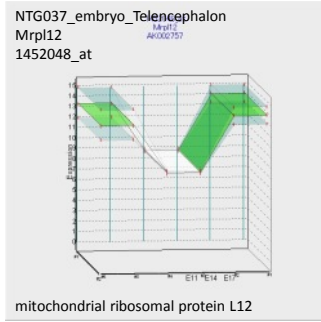
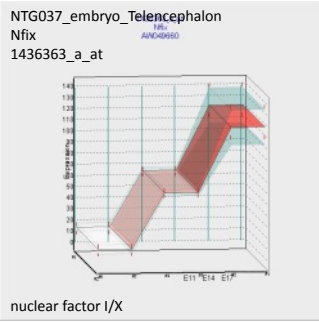


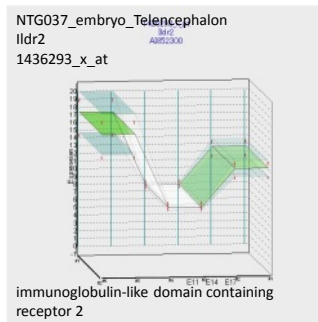
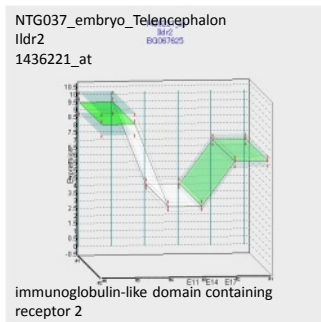
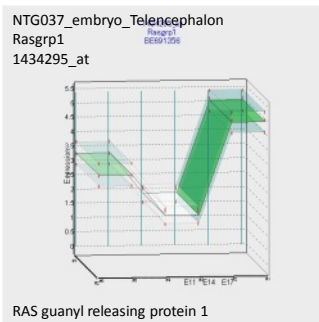
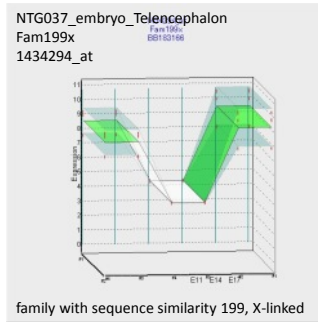
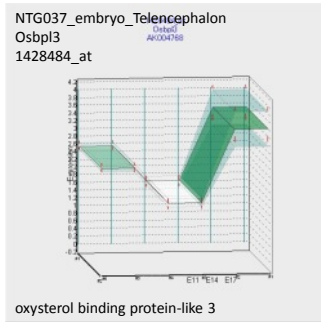
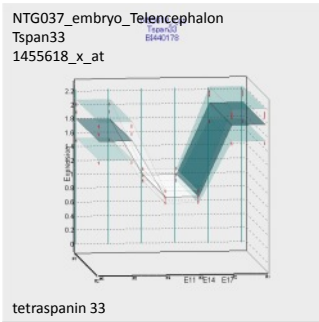


7

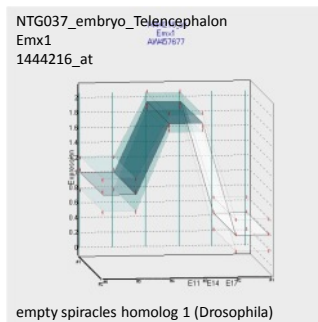
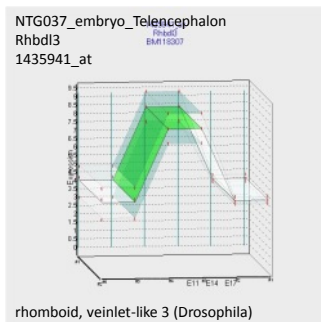
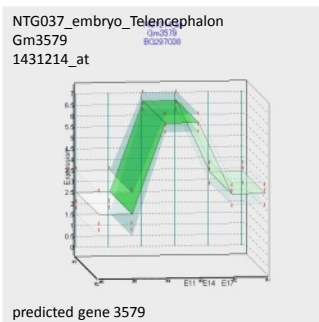
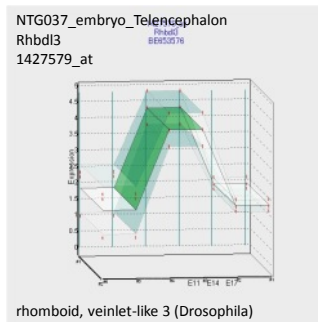
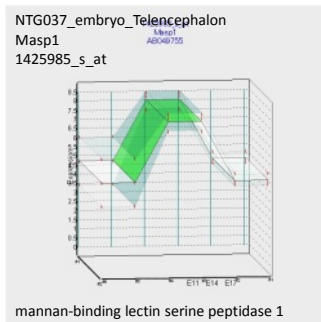
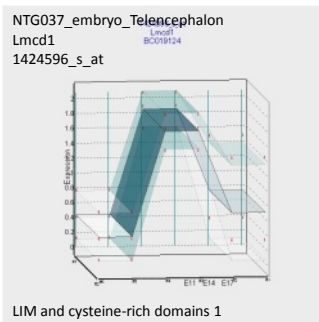


8





☒ 1 0



☒ 1 1