

**厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業**

**発達期における総合的な
遅発性神経毒性試験法の開発
(H28-化学-一般-003)**

平成 28 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 諫田 泰成

平成 29 (2017) 年 3 月

目 次

I.	総括研究報告	
	発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発-----	1
	諫田 泰成	
II.	分担研究報告	
	ヒト幹細胞の分化による評価法の開発-----	3
	諫田 泰成	
	神経堤細胞の機能解析による評価法の開発-----	13
	宇佐見 誠	
	海馬ニューロンを用いた神経ネットワークによる評価法の開発-----	20
	山崎 大樹	
	生後小脳の神経回路の機能的影響による評価法の開発-----	32
	吉田 祥子	
	幼若期海馬の神経回路機能による評価法の開発-----	40
	上野 晋	
	既存の毒性データおよびヒトデータとの検証-----	52
	秦 健一郎	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	57
IV.	研究成果の刊行物・別刷-----	59
V.	化学物質リスク研究事業・班会議内容資料-----	240
	平成 28 年 9 月 2 日開催	

I. 総括研究報告

発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室長
諫田 泰成

<全体要旨>

近年、自閉症など発達障害が急速に増加し、社会問題となっている。その原因の一つは発達期における化学物質の曝露とされる。発達期の神経系は成体と比較して化学物質に対する感受性が高く、健康被害が長期間あるいは遅発性に生じることが考えられ、子どもの健康影響評価法の確立が強く望まれる。

現在、OECDやEPAによって、妊娠ラットを用いる発達神経毒性試験ガイドラインが制定されているが、試験方法が複雑で、試験期間は1年以上、動物数は720にも及び経費も膨大である。さらに、日本ではこのようなガイドラインは未整備である。そこで我々は、発達期における細胞機能異常と神経回路異常の毒性作用メカニズムに基づいて、新たにスループット性の高い発達神経毒性評価スキームを作製し、評価指標の選定やプロトコルの最適化を行うことにより統合的な発達神経毒性試験法の開発を行っている。

ヒトiPS細胞（神経発生モデル細胞の評価系）やラット小脳皮質およびラット海馬（生後初期における遅発性毒性評価系）を用いて、化学物質の影響評価に関する評価指標の最適化を行った。また、ラット海馬ニューロンを用いた、スループット性の高いスクリーニング系の構築に着手し、新たに、HESI NeuToxと国際バリデーションの議論を開始した。

また、バルプロ酸などのメカニズムを理解する上で、妊娠中の母親への摂取栄養の程度や栄養成分の偏りによって胎児のエピゲノムに影響し生後の発育や疾患の発症に寄与する、というDoHaDについて調査研究を行った。

今後は、最適化された評価指標をもとに統合的な遅発性毒性評価系のプロトコル最適化を行いながら、国際連携のもと試験法開発を目指す。

<研究課題一覧>

諫田泰成（国立衛研）

「ヒト幹細胞の分化による評価法の開発」

宇佐見誠（国立衛研）

「神経堤細胞の機能解析による評価法の開発」

山崎大樹（国立衛研）

「海馬ニューロンを用いた神経ネットワークによる評価法の開発」

吉田祥子（豊橋技科大）

「生後小脳の神経回路の機能的影響による評価法の開発」

上野晋（産業医大）

「幼若期海馬の神経回路機能による評価法の開発」

秦健一郎（成育医療センター）

「既存の毒性データおよびヒトデータとの検証」

A. 研究目的

本研究では、胎児期の神経発生モデル細胞を用いたスクリーニングを行い（細胞評価グループ）、さらに生後の成熟期における遅発性神経毒性の早期予測評価法（神経ネットワーク評価グループ）を検証し、統合的な新規試験法として開発を目指す。現在進行中のHESI NeuTox との国際連携をもとに、HESI リストの中から既に評価した化学物質と作用の異なる陽性対照物質および陰性対照物質を選定して検証する。

上記 2 グループに毒性データ検証グループを加えた 3 グループの密な連携により、我々が提案した発達期に対応した化学物質の発達神経毒性に関する新規試験法として提案を目指す。本試験法により化学物質規制行政への応用が期待される。

B. 研究方法

詳細は各分担報告書を参照のこと。

C. 研究結果

以下に、各分担研究者の詳細を記載する。

【①ヒト幹細胞の分化による評価法】

ヒト iPS 細胞を用いて、化学物質の影響評価に関する評価指標の最適化を行った。その結果、遅発性神経毒性が懸念される農薬であるクロルピリホス曝露により、ヒト iPS 細胞における神経分化の抑制が認められた。分化抑制メカニズムとして、Mfn1 分解を介したミトコンドリアの形態異常による ATP 産生の低下を見いだした。この結果はすでに論文として報告済である。以上より、ヒト iPS 細胞におけるミトコンドリア機能を指標にして、成長期における化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

【②神経ネットワークによる評価法】

スループット性および再現性の高い海馬ニューロンを用いた神経スパイクによる神経活動評価系の開発を行うため、米国 EPA の Timothy J Shafer 教授との共同研究体制を構築し各種条件の検討を行った。また、HESI NeuTox の多点電極システム(MEA)サブチームに参加し、プレバリデーションの議論を開始した。これまでに再現性の高い結果が得られていることから、今後は陽性・陰性対照物質を評価し、他の評価系で得られている結果と比較することで評価系の妥当性を検証する。

【③生後小脳の神経回路】

遅発性神経毒性が考えられる化学物質であるバルプロ酸、クロルピリホスを胎生期の動物に投与し、生後の神経回路発達の変化を小脳神経細胞の突起伸長と小脳構造の変化、動物の行動変化から定量化して示した。バルプロ酸に関する結果は、販売元の製薬企業に情報提供した。小脳の形態形成は生後早期の遅発性毒性を予測可能な指標となりうることが示唆された。

【④幼若期海馬の神経回路機能】

遅発性神経毒性試験手法の妥当性を調べる目的で、発達神経毒性の詳細が不明であった産業化学物質である 1BP について検討した結果、神経回路興奮性の亢進をもたらすことから、1BP が発達神経毒性を有する可能性が示唆された。以上より、発達神経毒性を示す化学物質に加えて産業化学物質についても生後早期の海馬神経回路機能評価が発達

神経毒性の評価指標として有用となる可能性が確認された。

【⑤既存毒性データ、ヒトデータとの検証】

陽性対照物質バルプロ酸などの作用メカニズムを明らかにするため、動物実験を中心に DoHaD のメカニズムについて文献調査を行った。また、ヒトのエピゲノムデータに関しても調査を開始した。調査研究により、胎児期あるいは新生児期に受けた影響により、ゲノムのメチル化が生じ生後長期に渡って継続し、疾患リスクとなる可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、ヒト iPS 細胞やラット小脳皮質およびラット海馬を用いて、化学物質の影響評価に関する評価指標の最適化を行い、各評価系において化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性の高い指標を決定した。

また、ラット海馬ニューロンを用いた、スループット性の高いスクリーニング系の構築は、HESI NeuTox において国際検証試験の議論が進んでおり、我々も国際電話会議、対面会議に参加して議論を行っている。国際連携のもと引き続き MEA プロトコルの最適化を行い、予測性の評価などに取り組む必要がある。

現在、世界的な流れは *in vivo* から *in vitro* 試験法となっているが、本研究データと動物データや現行ガイドラインと比較検討し、有用性や検出限界などの検討も必要である。今後、研究班が一体となり統合的な遅発性毒性評価系の構築に向けて取り組みたい。

E. 結論

胎児期、成熟期において陽性対照となる化学物質を用いて、試験法の確立に向けて安定な評価指標を選定した。また、ラット海馬ニューロンを用いた、スループット性の高いスクリーニング系を新たに構築した。また、バルプロ酸のデータをもとに DoHaD の調査研究を行った。

F. 研究発表

分担研究者の報告書に示すように、多数の論文発表および学会発表を行った。

II. 分 担 研 究 報 告

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

ヒト幹細胞の分化による評価法の開発

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 第二室長
諫田 泰成

要旨

ヒト iPS 細胞を用いて、化学物質の影響評価に関する評価指標の最適化を行った。その結果、遅発性神経毒性が懸念される農薬であるクロルピリホス（CPF）曝露により、ヒト iPS 細胞における神経分化の抑制が認められた。分化抑制メカニズムとして、Mfn1 分解を介したミトコンドリアの形態異常による ATP 産生の低下を見いだした。以上より、ヒト iPS 細胞におけるミトコンドリア機能を指標にして、成長期における化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しているが、その原因の一つとして環境中の化学物質の関与が指摘されている（Landrigan et al., *Environ. Health Perspect. Med.*, 2012）。ヒト iPS 細胞はヒト発生過程を *in vitro* で模倣できることから、化学物質の神経毒性を検出できる可能性が考えられる。しかし、評価系としての手法は確立されていない。

本研究では、化学物質の発達期における毒性を評価するために、ヒト iPS 細胞を用いて発達神経毒性を評価できるか検討を行った。評価系の構築には、HESI と共有している発達毒性が懸念される陽性対照物質のリストから、農薬であるクロルピリホスを選択した。

本年度は、ヒト iPS 細胞における毒性メカニズムの検討を行い、毒性評価における有用性を検証した。また、HESI NeuTox のメンバーとなり、国際検証試験の議論を開始した。

B. 研究方法

1. 細胞

ヒト iPS 細胞株 253G1 (Nakagawa et al., *Nat. Biotechnol.*, 2008) は、TeSR-E8 培地 (Stem Cell Technologies) にてフィーダーフリー[マトリゲル (BD Biosciences) コート]の条件で培養した。

2. ミトコンドリアの形態

細胞を 4%PFA で固定後、ミトコンドリアを 50 nM の MitoTracker Red CMXRos (Cell Signaling Technology) および核を DAPI によ

り染色し、confocal 顕微鏡 (Nikon A1) で観察した。点状のミトコンドリアが 10%未満の細胞数を計測した (Fan et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 2010)。

3. ミトコンドリア膜電位

細胞を JC10 (Life Technologies) で染色したのち FACS ARIAI (BD Biosciences) を用いて計測した。

4. ATP 量

ルシフェラーゼ法に基づいて定量した。

5. qPCR

TRIzol 試薬 (Life Technologies) を用いて RNA を抽出した。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN)、ABI PRISM 7900HT を用いて qPCR を行った。

6. shRNA を用いたノックダウン

shRNA 導入はレンチウイルス (SIGMA) を用いた。ヒト iPS 細胞にウイルスを moi 1 で感染させた。さらに 24 時間後にピューロマイシンを添加して感染細胞のセレクションを行った。

7. 神経分化誘導

Dual smad 阻害法 (Chambers et al., *Nat. Biotechnol.*, 2012) を用いて、BMP シグナル阻害剤 LDN193189 (Wako) 及び Activin シグナル阻害剤 SB431542 (Wako) により iPS 細胞を神経外胚葉から神経前駆細胞へと分化させた。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に対する CPF の作用

発達神経毒性が懸念される CPF を用いて iPS 細胞への影響を検討した。CPF 曝露は細胞内 ATP 含量の低下、ミトコンドリア膜電位の低下およびミトコンドリア形態異常を引き起こした (図 1)。したがって、iPS 細胞において CPF はミトコンドリア機能異常を引き起こすことが示唆された。

次に、ミトコンドリアの形態制御因子の発現について検討した。分裂因子 (Drp1, Fis1) および融合因子 (Mfn1, Mfn2, Opa1) の遺伝子発現には影響がなかった (図 2A)。一方で、CPF 曝露によって Mfn1 のタンパク分解が誘導されることを見出した (図 2B, C)。すでに報告したように shRNA を用いて Mfn1 をノックダウンするとミトコンドリア形態異常が観察されることから、CPF によるミトコンドリア機能の低下はミトコンドリア融合タンパク質の分解によって誘導されることが示唆された。

2. ヒト iPS 細胞の神経分化に対する CPF の作用

CPF が iPS 細胞の分化に及ぼす影響を調べるために、Dual smad 阻害法を用いて、iPS 細胞の神経分化誘導を行った。CPF 曝露した iPS 細胞に神経分化刺激を与えた結果、神経外胚葉のマーカーである PAX6 (Manuel et al., *Front. Cell Neurosci.*, 2015), FOXG1 (Shen et al., *Hippocampus*, 2006) や神経前駆細胞のマーカーである NCAM1 (Polo-Parada et al., *J. Neurosci.*, 2004) の発現低下が認められた (図 3)。したがって、CPF は iPS 細胞の初期の神経分化誘導を阻害することが明らかとなった。

次に CPF による神経分化の阻害がミトコンドリアの機能異常を介しているかを明らかにするために、Mfn1 をノックダウンした iPS 細胞を用いて、神経分化誘導を行った (図 4)。その結果、Mfn1 ノックダウンにより、CPF 曝露と同様に、PAX6, FOXG1, NCAM1 の発現低下が認められた (図 4D)。したがって、CPF による神経分化の阻害は、Mfn1 分解を介したミトコンドリア機能異常により引き起こされることが示唆された。

3. CPF の神経分化阻害における Erk シグナルの関与

ミトコンドリア機能の破綻は Erk のリン酸化を引き起こすことが報告されている (Yu et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012)。一方、

Erk のリン酸化によって PAX6 の発現が抑制され神経分化が阻害されるという報告もある (Greber et al., *EMBO J.*, 2011)。したがって、CPF による神経分化阻害の経路として Erk シグナルの関与が考えられる。まず CPF の作用に対する Erk シグナルの関与を調べるために、ヒト iPS 細胞に CPF を曝露した結果、Erk のリン酸化レベルの亢進が認められた。またこのリン酸化は Erk 阻害剤 U0126 処理により消失した (図 5A, B)。さらに CPF 曝露による PAX6 の低下は U0126 処理により回復した (図 5C)。

次に CPF により引き起こされる Erk シグナルがミトコンドリアの機能異常を介しているかを明らかにするために、Mfn1 をノックダウンした iPS 細胞において Erk のリン酸化を調べた。その結果、Mfn1 ノックダウンにより、Erk リン酸化レベルの亢進が認められた。またこのリン酸化は U0126 処理で消失した (図 6A, B)。さらに Mfn1 ノックダウンによる PAX6 の低下は U0126 処理により回復した (図 6C)。したがって、CPF によるミトコンドリア機能異常を介した神経分化の阻害は Erk シグナルが関与していることが示唆された (図 7)。

以上より、iPS 細胞において TBT と同様に、CPF はミトコンドリア機能異常を引き起こすことが明らかになった。また、iPS 細胞で ATP 量、ミトコンドリア膜電位・形態さらには神経分化といった指標を用いることにより、発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いて、これまで見出した指標 (ATP 産生量、ミトコンドリア膜電位・形態) により発達神経毒性が懸念される化学物質の影響を評価できることを明らかにした。特に、iPS 細胞で使用した CPF は血中に存在しうる濃度 (Huen et al., *Environ. Res.*, 2012) がアッセイに使用した 30 μ M であり、本アッセイ系は非常に好感度であると考えられた。

今回、iPS 細胞を用いて CPF の毒性作用点として、Mfn1 分解を介したミトコンドリアの分裂による ATP 産生の低下を見出し、TBT と同様のミトコンドリア毒性を示すことを明らかにした (論文発表 1, 2)。発達神経毒性を示す化学物質の毒性評価においてミトコンドリアの機能異常は有効であり、幅広く

応用できる可能性が期待される。今後も iPS 細胞において、発達神経毒性が懸念される被験物質を増やすことで、こうしたミトコンドリアを指標とした毒性マーカーの探索や評価法の検討を行い、簡便で再現性のある評価法の確立を目指す。

また、研究代表者として、HESI NeuTox の国際検証試験の議論を新たに開始して、連携を取りながら試験法の確立に取り組みたい。

E. 結論

ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能や分化を指標に、成長期における化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Yamada S., Kubo Y., Yamazaki D., Sekino Y. and Kanda Y. “Chlorpyrifos inhibits neural induction via Mfn1-mediated mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells.” *Sci. Rep.* (2017) 7:40925
- [2] Yamada S., Asanagi M., Hirata N., Itagaki H., Sekino Y. and Kanda Y. “Tributyltin induces mitochondrial fission through Mfn1 degradation in human induced pluripotent stem cells.” *Toxicol. In Vitro.* (2016) 34:257-263
- [3] Asanagi M., Yamada S., Hirata N., Itagaki H., Kotake Y., Sekino Y. and Kanda Y. “Tributyltin induces G2/M cell cycle arrest via NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase in human embryonic carcinoma cells.” *J. Toxicol. Sci.* (2016) 41:207-215
- [4] Hirata N., Yamada S., Asanagi M., Sekino Y. and Kanda Y. “Nicotine induces mitochondrial fission through mitofusin degradation in human multipotent embryonic carcinoma cells.” *Biochem.*

Biophys. Res. Commun. (2016) 470:300-305

2. 学会発表

- [1] 山田茂、麻薙美紀、平田尚也、板垣宏、関野祐子、諫田泰成：ヒト iPS 細胞のミトコンドリアダイナミクスを用いた細胞毒性評価、第 89 回日本薬理学会、2016 横浜
- [2] Yasunari Kanda, Shigeru Yamada, Naoya Hirata, Daiju Yamazaki, and Yuko Sekino. Role of mitochondrial dynamics in neural toxicity assessment in human iPS cells. 5th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology. US EPA Building Research Triangle Park, NC. 2016.9.29-30
- [3] 麻薙美紀、山田茂、平田尚也、板垣宏、関野祐子、諫田泰成：ヒト多能性幹細胞を用いた発達神経毒性評価の試み、第 89 回日本薬理学会、2016 横浜
- [4] 山田茂、関野祐子、諫田泰成：ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に基づいたクロルピリホスの毒性評価、第 134 回日本薬理学会関東部会、2016 大田原
- [5] 山田茂、久保祐亮、犬塚隆志、関野祐子、諫田泰成：ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能による医薬品の毒性評価、第 43 回日本毒性学会、2016 名古屋
- [6] 山田茂、関野祐子、諫田泰成：ミトコンドリアを指標としたヒト iPS 細胞毒性評価系の検討、第 2 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2016 東京
- [7] 山田茂、関野祐子、諫田泰成：ミトコンドリア機能を介した新規神経誘導メカニズム、第 39 回日本分子生物学会、2016 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

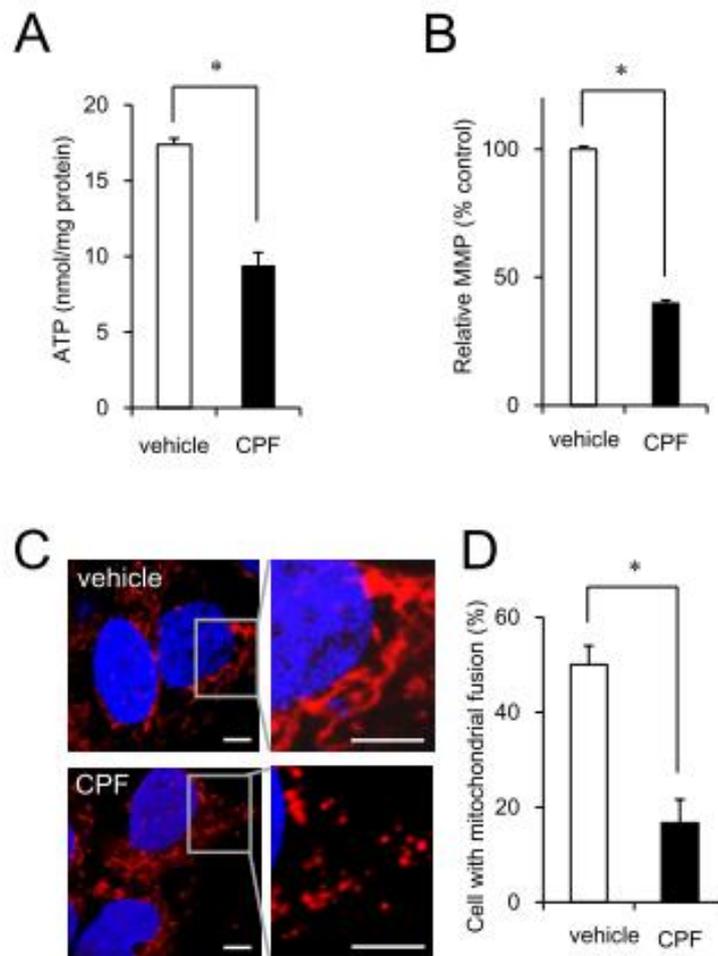


図1 CPFによるミトコンドリアの機能異常

- A) ヒト iPS 細胞において、CPF (30 μ M) の暴露によって ATP 産生低下が認められた。
 B) ヒト iPS 細胞において、CPF の暴露によってミトコンドリア膜電位の低下が認められた。
 C) ヒト iPS 細胞において、CPF の暴露によってミトコンドリアの分裂が誘導された。
 D) C)の結果を定量的に評価した。

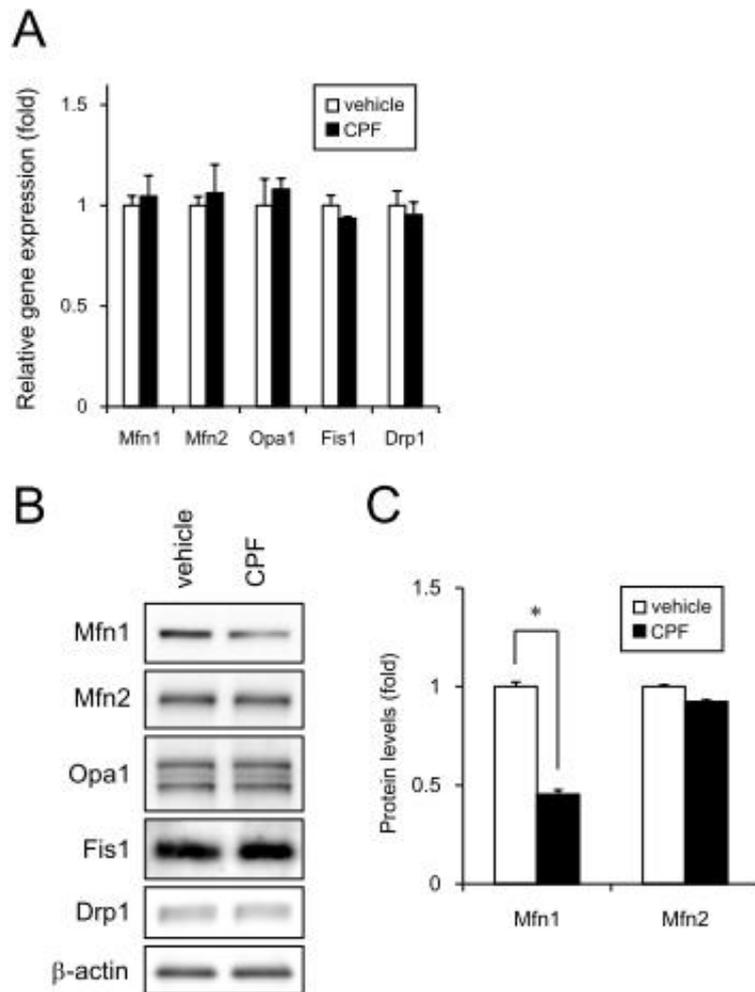


図2 CPFによるMfn1の分解

A) 30 μ M の CPF を曝露したヒト iPS 細胞から RNA を抽出し、Mfn1、Mfn2、Opa1、Fis1、Drp1 遺伝子の qPCR を行った。

B) 30 μ M の CPF を曝露したヒト iPS 細胞から cell lysate を作成し、Mfn1、Mfn2、Opa1、Fis1、Drp1 蛋白質の発現をウエスタン法によって調べた。

C) B) の Mfn1、Mfn2 蛋白質の発現を定量的に評価した。

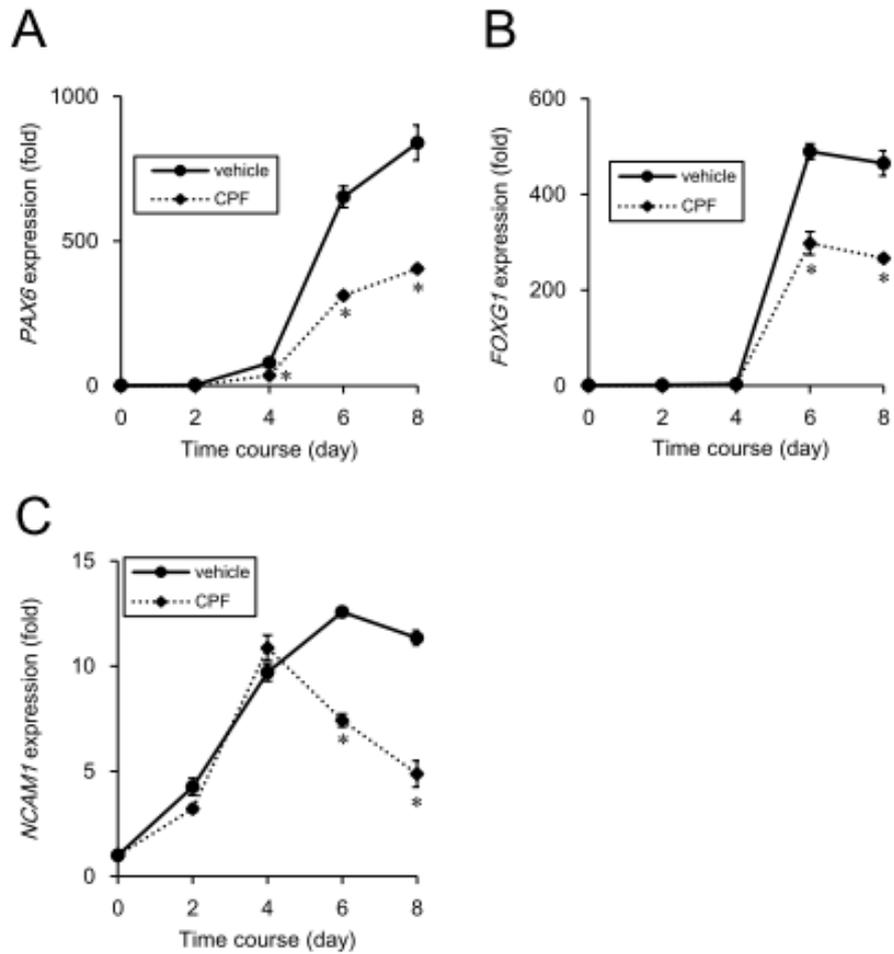


図3 CPFによる神経分化誘導の阻害

30 μ MのCPFを曝露したヒトiPS細胞に神経分化刺激を与えた後、タイムコースをとって神経分化マーカーの遺伝子発現をqPCRで調べた。

- A) 神経外胚葉マーカーPAX6遺伝子の発現変化
- B) 神経外胚葉マーカーFOXG1遺伝子の発現変化
- C) 神経前駆細胞マーカーNCAM1遺伝子の発現変化

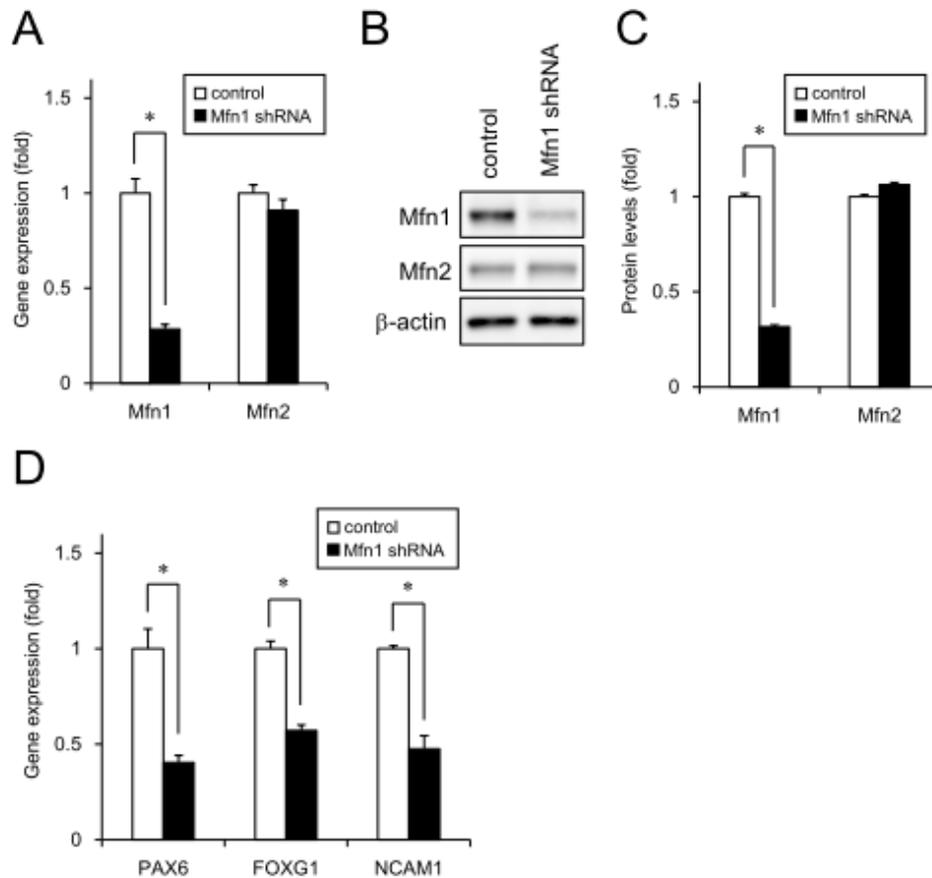


図4 Mfn1 ノックダウンによる神経分化誘導の阻害

- A) Mfn1-shRNA を導入したヒト iPS 細胞における Mfn1, Mfn2 の遺伝子発現を qPCR で調べた。
- B) Mfn1-shRNA を導入したヒト iPS 細胞における Mfn1, Mfn2 の蛋白発現をウェスタンブロット法で調べた。
- C) B)の結果を定量的に評価した。
- D) Mfn1 をノックダウンしたヒト iPS 細胞を用いて神経分化誘導を行い、神経分化マーカー (PAX6, FOXG1, NCAM1) の遺伝子発現を qPCR で調べた。

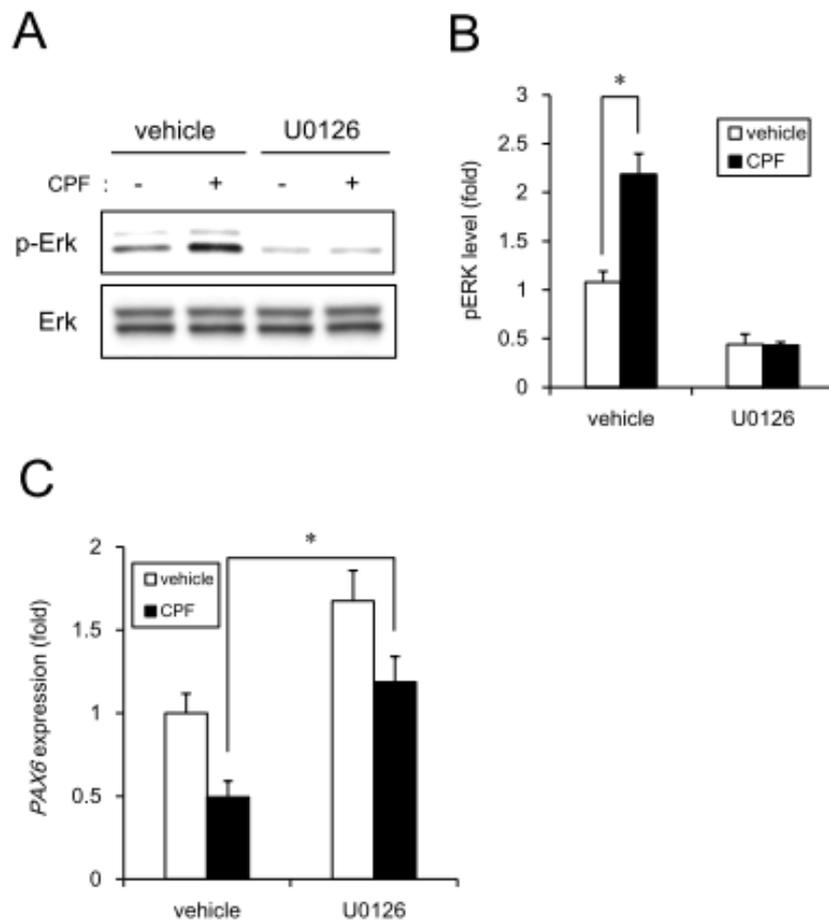


図5 CPFの神経誘導阻害におけるErkシグナルの関与

A) 30 μ MのCPFを曝露したヒトiPS細胞からcell lysateを作成し、Erkのリン酸化レベルをウエスタン法によって調べた結果、Erkリン酸化の亢進が認められた。このリン酸化レベルの亢進はErk阻害剤であるU0126処理により消失した。

B) A)の結果を定量的に評価した。

C)ヒトiPS細胞の神経分化誘導において、CPF曝露によるPAX6の発現低下は、U0126処理により回復した。

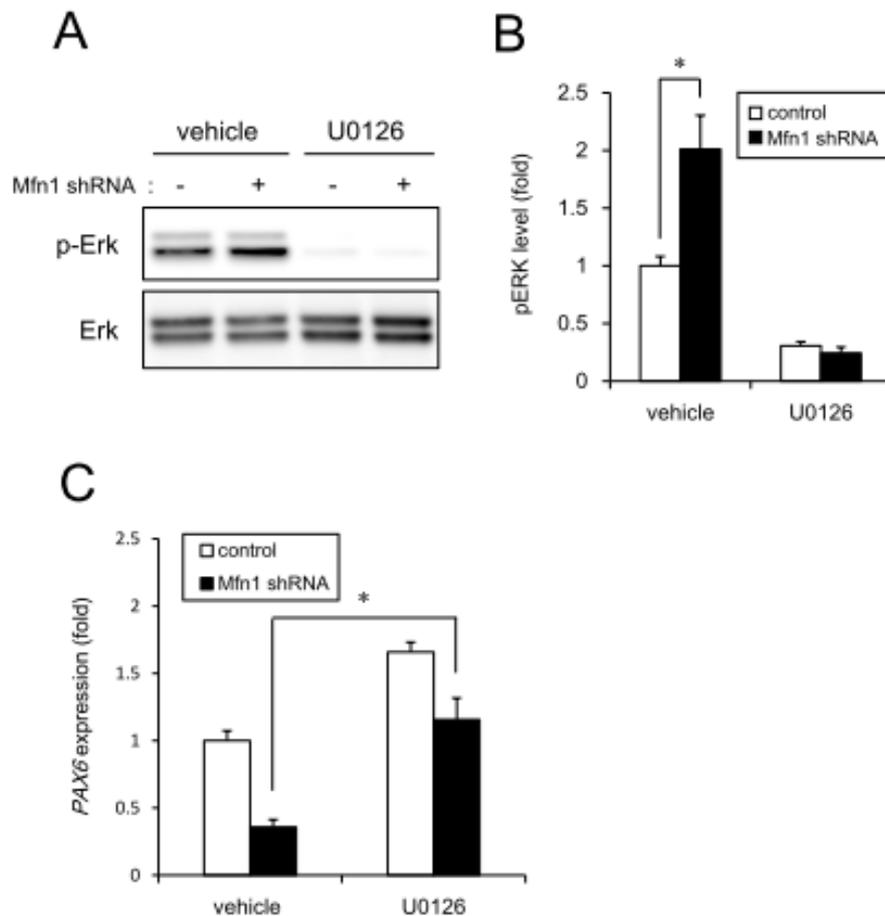


図 6 Mfn1 ノックダウンによる神経誘導阻害における Erk シグナルの関与

A) Mfn1 をノックダウンしたヒト iPS 細胞から cell lysate を作成し、Erk のリン酸化レベルをウエスタン法によって調べた結果、Erk リン酸化の亢進が認められた。このリン酸化レベルの亢進は Erk 阻害剤である U0126 処理により消失した。

B) A) の結果を定量的に評価した。

C) ヒト iPS 細胞の神経分化誘導において、Mfn1 ノックダウンによる PAX6 の発現低下は、U0126 処理により回復した。

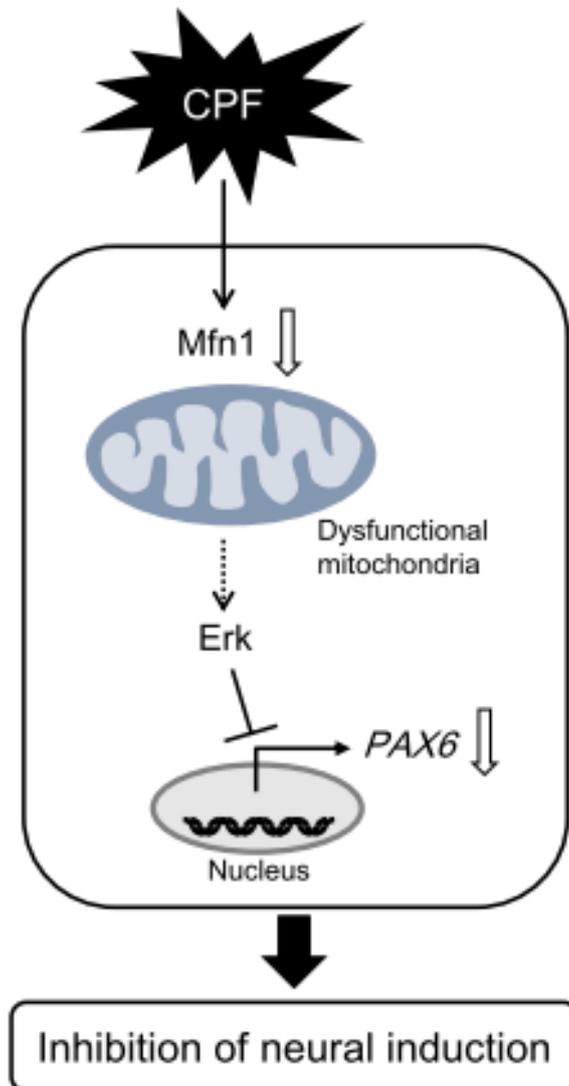


図7 CPFの神経分化阻害作用（模式図）

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

神経堤細胞の機能解析による評価法の開発

研究分担者	国立医薬品食品衛生研究所薬理部第四室長 宇佐見 誠
研究協力者	簾内 桃子
研究協力者	入江 智彦
研究協力者	日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部 奥田 裕計

要旨

ラット神経堤細胞の遊走等に及ぼす影響について、メカニズムに関する実験系としてタンパクリン酸化パスウェイの関与を調べる方法を検討した。ラット 10.5 日胚から頭部又は腹部の神経管を摘出して培養して、神経管から遊出する神経堤細胞の広がりや数を測定することにより、神経堤細胞の遊走を調べた。その結果、ピルビン酸を含まない培養液では、神経堤細胞の遊走は少ないことを示した。また、RNA 干渉実験の条件を検討し、リポフェクタミン RNAiMAX トランスフェクション試薬を用いる方法を確立した。さらに、確立した RNA 干渉実験法により、Rho キナーゼである Rock1 および Rock2 を同時に抑制して培養時間を延ばすことにより、神経堤細胞の遊走が促進されることを示した。本実験法は、Rho パスウェイが関与する毒性発現メカニズムに基づいた化学物質の発達神経毒性評価法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しているが、その原因として化学物質の関与が指摘されている。神経堤細胞は、脊椎動物における個体発生の限られた時期に存在し、胚の隅々に遊走した後、末梢神経、グリア細胞などの神経系細胞を含む様々な細胞に分化することにより、個体の機能発育および形態形成に重要な役割を果たす。そのため、発生過程における神経堤細胞の誘導、遊走、分化などにおける異常は、神経堤症と総称される神経芽細胞腫などの神経系の異常を含むさまざまな疾患を引き起こす。

また、神経堤細胞のうち、頭部神経管に由来する頭部神経堤細胞の異常では、顔面の奇形などの形態形成に及ぼす影響も認められる。神経堤症による顔面奇形と同様の奇形は、胚のレチノイン酸への過剰暴露においても生じることから、神経堤細胞は化学物質による毒性の標的組織となり得ると考えられている。しかし、適切な実験法が確立されていないため、化学物質の神経堤細胞機能に及ぼす影響は、ほとんど調べられていない。

本研究では、神経堤細胞の特徴的な機能である細胞遊走を主な指標とする、形態形成期に重要な役割を果たす神経堤細胞の機能に及ぼす化学物質の影響を調べる方法を確立し、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の一つとして用いることを目的とする。神経堤細胞実験法としては、初期着床胚をまるごと培養するラット全胚培養法との比較実験が可能であり、解析が容易な、ラット神経堤細胞を用いた実験法の確立を目指した。

本実験法を利用することにより、神経堤細胞遊走に影響する化学物質とそのメカニズムを同定し、ヒトにおける当該化学物質に対する高暴露集団およびメカニズムに関与する遺伝子疾患等を有する集団などの、ハイリスク集団について、疫学的調査の基盤的情報を提供すると共に、健康影響の予防のための方策となる情報を得られることが期待される。

初年度は、神経堤細胞の機能に関与することが報告されている、タンパクリン酸化パスウェイである Rho パスウェイを介した化学

物質の影響を調べることが可能な、ラット神経堤細胞遊走実験法について検討した。

B. 研究方法

1. 動物

ウィスターラット (Crj:WI, 日本チャールスリバー) を用いた。発情前期の雌ラットを雄と終夜同居させ、妊娠ラットを得た。同居中の深夜を妊娠 0 日として起算した。妊娠 10.5 日に、妊娠ラットから初期着床胚を摘出して実験に用いた。

2. ラット神経堤細胞の培養

頭部神経堤細胞を用いる場合は、摘出したラット初期着床胚から、電解研磨したタングステン針を用いて、菱脳部を切り出し、物理的に神経管を取り出した。腹部神経堤細胞を用いる場合は、前肢芽の部位から神経管を同様の方法で取り出した。取り出した神経管を、培養シャーレ (Becton, Dickinson and Company) に培養液 (10% Fetal Bovine Serum を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) と共に入れ、炭酸ガスインキュベーター内で、5% CO₂、37°Cにて培養した。

3. ラット神経堤細胞の観察

培養 24 時間及び 48 時間に、神経管から遊走した細胞すべてを含む領域を、位相差顕微鏡 (BZ-900、株式会社キーエンス) で撮影し、神経管の培養容器底面への付着及び遊走細胞の広がりを観察した。

4. データの解析

細胞の撮影画像ファイルを画像解析ソフト ImageJ (Rasband, W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009) で開き、最外側の神経堤細胞をポリゴンツールでつないでできる図形を円とみなして、そのピクセル数で表される面積から計算した半径を神経堤細胞の遊走距離として解析した。

(倫理面への配慮)

動物の使用にあたっては国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験に関する指針」を遵守した。

C. 研究結果

ラット神経堤細胞遊走に及ぼす化学物質の影響に関するカニズムを調べる方法としての感度を改善するために、基本培養液中のピルビン酸の影響を調べた。その結果、ピルビン酸を含まない培養液では、頭部および腹

部のいずれの神経堤細胞においても遊走が少ない傾向が認められ、二元配置分散分析では、ピルビン酸の有無による差は統計学的に有意であった。ラット胚の部位による神経堤細胞の起源とピルビン酸の影響との間に相互作用は認められなかった (図 1)。

Rho パスウェイを介した化学物質の影響を調べる方法として RNA 干渉実験の条件を確立するために、種々のトランスフェクション試薬について検討した結果、リポフェクタミン RNAiMAX 試薬を単独で用いた場合が効果的であった。さらに RNAiMAX 試薬の無毒性量を確認したところ、シャーレー一枚の培養液 (2 ml) あたり 4 μ l においても神経堤細胞の遊走に影響は認められなかった (図 2)。

確立した RNA 干渉実験法により、Rho キナーゼである Rock1 の発現抑制が神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べた。その結果、神経堤細胞の遊走に影響は認められなかった (図 3)。しかし、Rock1 および Rock2 の発現を同時に抑制して、培養 48 時間から 72 時間まで観察した場合には、神経堤細胞の遊走が促進された (図 4)。

D. 考察

本実験系で用いるラット胚は、嫌気的条件下から好气的条件に移る時期である。そのため、嫌气的エネルギー産生系である解糖系と、好气的エネルギー産生系であるトリカルボン酸サイクルの接点であるピルビン酸の有無は、実験結果に影響を及ぼす可能性が考えられた。本実験の結果、ピルビン酸を含む培養液の方が、神経堤細胞の遊走が大きいため、ダイナミックレンジが広くなり、実験系としての感度が良いと考えられる。

RNA 干渉実験法では、神経堤細胞遊走の観察時間を 48~72 時間に遅らせることおよび Rock1 および Rock2 の発現を同時に抑制することにより siRNA の効果を観察することが出来た。この観察時間は、一般的な RNA 干渉実験における mRNA の減少には 48 時間程度を要することと一致しており、神経堤細胞における mRNA のターンオーバーは一般的な速さであると考えられる。また、Rock1 および Rock2 の発現を同時に抑制した場合に神経堤細胞の遊走が促進されたことから、Rock1 と Rock2 の役割の違いなどについて調べる必要がある。

以上の結果から、本実験法は Rho パスウェイが関与する毒性発現メカニズムに基づ

いた化学物質の発達神経毒性評価法として有用であると考えられる。

E. 結論

ラット神経堤細胞の遊走等に及ぼす影響について、メカニズムに関する実験系としてタンパクリン酸化パスウェイの関与を調べる方法を検討した。その結果、ピルビン酸を含む培養液の方が、実験系としての感度が良いと考えられた。また、RNA 干渉実験の条件を確立した。確立した RNA 干渉実験法により、Rho キナーゼである Rock1 および Rock2 を同時に抑制することにより、神経堤細胞の遊走が促進されることを示した。本実験法は、Rho パスウェイが関与する毒性発現メカニズムに基づいた化学物質の発達神経毒性評価法として有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- [1] 宇佐見誠、満長克祥、奥田裕計、土井守：
クロルピリホスが培養ラット神経堤細胞
の遊走に及ぼす影響に関する 研究、第 43
回日本毒性学会学術年会、2016 名古屋

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

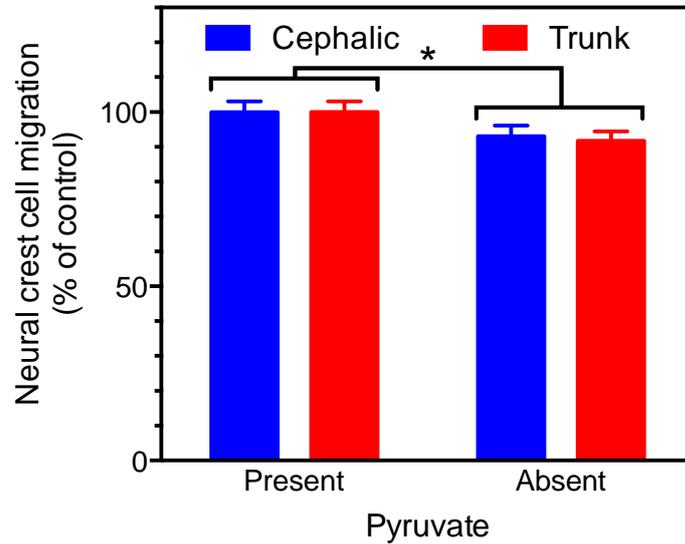


図1 ラット頭部 (cephalic) および腹部 (trunk) 神経堤細胞の遊走に及ぼすピルビン酸の影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞をピルビン酸を含む培養液 (1 mM) または含まない培養液で 48 時間培養した。「*」は統計学的な有意差があることを示す (* p < 0.05)。

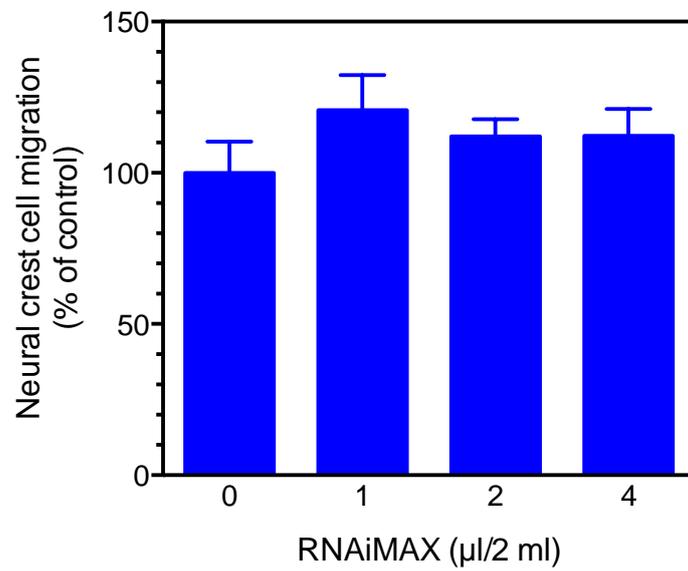


図2 ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすリポフェクタミン RNAiMAX トランスフェクション試薬の影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。神経管を培養 18 時間目に除去した。

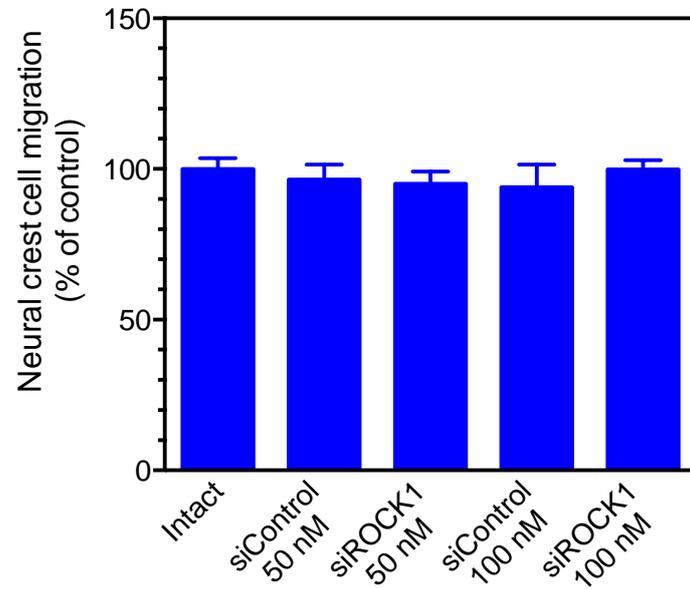


図3 ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす Rock1 発現抑制の影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。平均値と標準誤差を示す。神経管を培養 18 時間目に除去した。

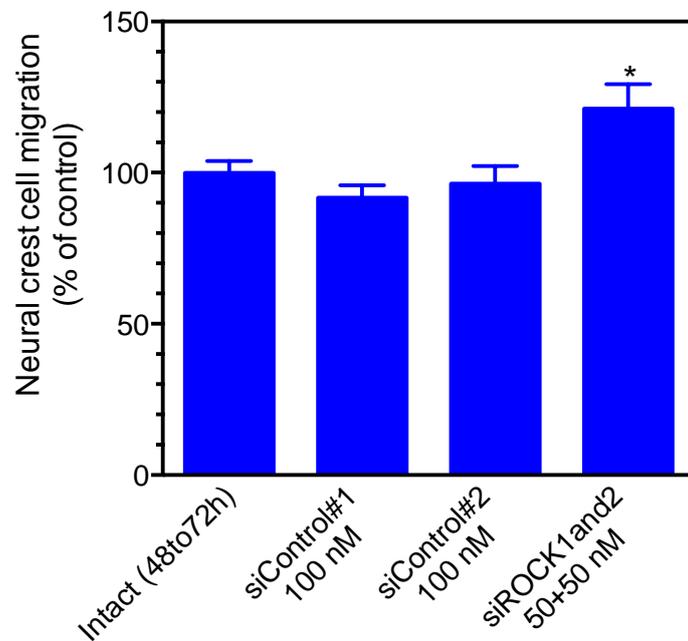


図4 ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす Rock1 および Rock2 発現抑制の影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 72 時間培養した。平均値と標準誤差を示す。神経管を培養 18 時間目に除去した。「*」は無処置群と比較して統計学的な有意差があることを示す (* $p < 0.05$)。

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

海馬ニューロンを用いた神経ネットワークによる評価法の開発

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 主任研究官
山崎 大樹
研究協力者 群馬大学大学院医学研究科 教授
白尾 智明

要旨

本研究では、神経ネットワーク形成過程およびネットワーク形成後の化学物質の毒性評価系の開発を目的として、以下の2つの内容に取り組んだ。第一に、高い再現性を目指すための条件検討項目として、プレートのコーティング方法、播種細胞密度、AraCの添加、培地交換の量について検証を行った。各々の条件検討の結果から、最適条件を得ることができ、その条件において再現性の高い結果が得られた。今後、本研究で得られた最適条件により化学物質の毒性評価を実施する予定である。第二に、化学物質の投与方法について溶媒として主に用いられるDMSOで検証を行った。その結果、高濃度のDMSOが細胞に対して直接接触することで測定パラメーターに大きく影響することが明らかとなった。DMSOを10倍に薄めて投与方法は測定パラメーターへ影響を与えないことから、今後の化学物質を評価する際の投与方法については、上記方法を採用することとした。また今回のプロトコル整備にあたり、米国環境保護庁のTimothy J Shafer教授との共同研究体制を構築した。さらに、HESI NeuToxのMEAサブチームにおけるプレバリデーション試験に関する議論に参加して、条件設定に関する有益な情報を得ることができた。

以上の経緯を以って開発した評価法により、今後は陽性・陰性対照物質の発達神経毒性に対する影響を効率よく評価していけるものと考えられる。

A. 研究目的

近年、自閉症など発達障害が急速に増加し社会問題となっており、その原因の一つは発達期における化学物質の曝露とされている。発達期の神経系は成体と比較して化学物質に対する感受性が高く、健康被害が長期間あるいは遅発性に生じることが考えられ、子どもの健康への影響に対する評価法の確立が強く望まれている。現在の発達神経毒性を評価するガイドライン(OECDおよびEPA)は、妊娠ラットを用いた複雑な試験系であり、試験期間が1年以上、動物数が720にも及び経費も膨大であるため、これまでにわずかな化学物質しか評価できていない。本邦においては、このようなガイドラインも未整備である。個体の成長期の高感受性の時期に一時的に曝露ただけで生涯にわたり脳神経機能に

影響をもたらすような危険な化学物質を優先的に選定するためには、新規試験法の開発が喫緊の課題となっている。そこで、我々は発達期の細胞評価系および生後初期における神経ネットワーク形成評価系を組み合わせた統合的な新規試験法の開発を行っている。

神経ネットワーク形成過程およびネットワーク形成後において、化学物質の毒性評価が可能な系として期待されているのが、多点電極(MEA, multi-electrode array)システムを用いたげっ歯類神経細胞の評価である。これは、電極が多数パターンニングされた平面に神経細胞を播種し、そこで長期間の培養を行うとともに神経活動(スパイクとよばれる電気活動)を記録するものである。

本研究では、神経ネットワーク形成過程およびネットワーク形成後の化学物質の毒

性評価系の開発を目指した。さらには、開発した評価系を用いて複数の陽性・陰性対照物質を評価し、これまで我々が開発してきた他の評価系で得られた結果と比較し、評価法の妥当性を検証する。

B. 研究方法

1. 細胞

細胞は研究協力者である群馬大学・白尾智明教授の研究室で作製された凍結ラット胎仔海馬神経細胞 (SKY Neuron) を用いた。この細胞は胎生 18 日目のラット胎仔海馬より単離されたものである。

2. プレートコーティング

AxionBiosystems 社製 Maestro プレート (48 ウェルタイプ) の各ウェルに 100 μ l の 0.1% ポリエチレンイミン (PEI) (0.1 % PEI in 0.1 M Boric acid buffer solution (pH 8.5)) を添加し、インキュベーター内に 1 時間静置した。その後、滅菌水で 3 回リンスし、クリーンベンチ内で 1 時間乾燥させた。乾燥後、フタをしてアルミホイルで遮光し、4°C に保管した。PEI コートしたプレートは原則 1 週間以内に使用した。

3. 細胞の解凍および播種

細胞が入ったバイアルを液体窒素保存容器から取り出し、速やかに 37°C の温浴に 3 分間浸した。その後、クリーンベンチ内で細胞懸濁液を 50 ml チューブに移し、バイアル内を播種用培地 (10% FBS, 1.14 mM Pyruvic acid, 0.7% Glucose in Minimum Essential medium) でリンスし、細胞懸濁液にゆっくりと滴下した。合計 6 ml となるように播種用培地を細胞懸濁液に一定の速度で滴下し、よく混合した後に細胞数を計測した。200 x g で 5 分間遠心し、一定の細胞密度になるよう laminin (20 μ g/ml) を含んだ播種用培地を添加し、10 μ l/ウェルでプレートに播種した。2 時間後、500 μ l の培養用培地 (0.25% GlutaMAX, 1% Penicillin-Streptomycin, 2% B27 in Neurobasal medium-A) を添加し、1 日おきあるいは 2 日おきに測定し、3 日おきあるいは 4 日おきに培地交換を行った。

4. MEA システム

評価系は AxionBiosystems 社製の Maestro を用いた。使用した 48 ウェルプレートの各ウェルには、4 x 4 の合計 16 個の電極がパターンニングされている。このプレートで細胞を培養した状態で MEA システムにセッ

トすると、各電極における自発的なスパイク発生をアクティビティマップにて可視化することができる (図 1A)。MEA システムではスパイクの検出閾値をノイズレベルの 6~8 倍に設定することでノイズの検出を防いでおり、検出閾値を超えたスパイクはラスタプロットとして表される (図 1B)。神経細胞の成熟とともにスパイクの発生頻度は増加し、やがて神経細胞の突起同士がシナプスを形成することで神経ネットワークを構築する。神経ネットワークの構築により各神経細胞で独立に発生しているスパイクが同期し、最終的にはバーストやネットワークスパイクと呼ばれる連続的でウェル中の複数の電極で同期した電位変化が起こるようになる (図 1C)。

5. 解析

評価系の開発にあたり、実験条件の検討や再現性の検証には、平均発火頻度と活性化電極数 (1 分間に 5 回以上のスパイクを生じた電極) の 2 つのパラメーターを用いた。平均発火頻度は 1 ウェルで 1 分間に発生したスパイク数を活性化電極数で割った値である。

C. 研究結果

1. 細胞の解凍

通常、ラット等げっ歯類の胎児から単離した神経細胞は、そのまま分散培養して各種実験に供する。しかしながら、状態の良い細胞を単離するには熟練した技術が必要であり、またそのための単離・培養設備を準備しなければならない。神経細胞を凍結することで同一ロットの細胞バイアルを大量に作成することができ、事前に当該ロットの状態をグルタミン酸に対する反応性などで確認することが可能なことから、再現性の高い結果が期待できる。一方で、細胞の凍結・融解は細胞に対してダメージを与えることが知られているため、凍結・融解による細胞の生存率への影響について検証した。表 1 にまとめたように生細胞数と死細胞数はほぼ半々であり、生存率としては平均 50% 強であった。ロットや実験者 (融解の際の) に依存した差はほとんどなかった。

2. コーティングに関する検討

Axion 社が提供している Maestro 用プロトコルでは、0.1% PEI によるプレートコーティングを推奨している。一方で、SKY

neuron 用のコーティングは PLL (Poly-L lysine) コーティングが実施されている。そこで、PEI コーティングと PLL コーティングを 1 枚のプレートに施し、その他の条件を全く同一にして実験を行った。その結果、平均発火頻度、活性化電極ともに PLL コーティングよりも PEI コーティングにおいて、値が上昇していた。電極がパターンニングされていないプレートによる細胞観察では、培養開始 2 日後には細胞の凝集が PLL コーティングの方で観察されている一方で、PEI コーティングでは、細胞が接着していないことによる隙間が極端に少なかった。次に PEI コーティングがどの程度有効なのかを調べるため、PEI コーティング直後、約 3 週間後および約 4 週間後のプレートを用いて実験を行った。その結果、コーティング 3 週間以降のプレートでは、活性化電極数はコーティング直後のものと大差ない変化を示すものの、平均発火頻度の時間依存的な上昇は AraC の有無にかかわらずコーティング直後に比べて低い値で推移することが明らかとなった (図 2)。活性化電極数については、コーティング期間の長さには影響されなかった。

以上より、Maestro による MEA システムにおいては、PEI コーティングの方が適しており、コーティングの効果は 3 週間保存することで低減することが示唆された。

3. 細胞播種密度の検討

MEA システムの性質上、電極部分に細胞が存在しなければスパイクの計測は不可能である。我々は再現性の高い結果を得るため、細胞播種密度の検討を行った。これまでに他の研究室ではラット大脳皮質神経細胞における検討が行われており、その際の細胞播種密度は 150,000 細胞/25 μ l である。今回の検討では、播種する細胞懸濁液量を全電極が覆うことのできる最小量 10 μ l とした。これまでの論文における細胞播種密度に関する情報と最小量 10 μ l を鑑みた上で細胞播種密度以外の条件を揃えて 6,000、12,500、25,000、50,000 細胞/10 μ l の 4 条件にて計測を行ったところ、12,500 細胞/10 μ l 以下では平均発火頻度および活性化電極数のいずれもほとんど増加しなかった。25,000 細胞/10 μ l の条件では、50,000 細胞/10 μ l の条件と比較して、平均発火頻度の増加が緩やかであり、また最高値も低かった (図 3A)。活性化電極数については、50,000 細

胞/10 μ l では 16 電極全てが活性化する一方で、25,000 細胞/10 μ l では最高で 12~14 電極が活性化した (図 3B)。細胞数を増やすことで 16 電極全てを確実に覆うことが可能になるものと考察される。以上より、細胞播種密度は、50,000 細胞/10 μ l が妥当との結論に至った。

4. AraC の添加

神経細胞単離の際、グリア細胞の混入は避けられない。また、培養によりグリア細胞は増殖するため、グリア細胞の割合によって化学物質に対する応答も異なる可能性が考えられる。

そこで、グリア細胞の増殖による神経ネットワーク形成への影響を検討するため、グリア細胞の増殖抑制剤である 0.5 μ M AraC を培養開始 5 日目に添加し 7 日目に除去する群 (0.5 AraC) と AraC を添加しない群 (0 AraC) の 2 群について比較した。その結果、0 AraC および 0.5 AraC のいずれにおいても培養開始 7 日後から急激な平均発火頻度の上昇が観察された (図 4A)。平均発火頻度の最高値は 0 AraC の方が高かった。これは、グリア細胞の増殖が抑制されなかったことにより、神経細胞間のネットワーク形成が亢進した可能性が考えられた。両群で活性化電極数の経時的変化に大きな差はなく (図 4B)、いずれの群においても培養開始 12~19 日目において平均発火頻度の値が安定していたことから、化学物質の急性投与実験を行うタイミングとしては、培養開始 16 日目が最適だと考えられる。

培地を全量交換ではなく半量あるいは 1/3 量で交換することで AraC の濃度を徐々に薄くしていく方法もある。しかし、Maestro プレートはウェル間で培地の蒸発量が異なっていることから、AraC の濃度を徐々に薄める方法では、同一の条件とはなり得ない。従って今回は培養 7 日目に AraC を培地の全量交換によって除去した。神経細胞の単離 (ロット) ごとにどの程度グリア細胞が混入しているかは不明であることから、AraC 非添加の場合にグリア細胞と神経細胞の割合がどの程度なのかは全く予想できない。AraC の添加によってグリア細胞の増殖がある程度抑制されれば、培養期間を通じてのグリア細胞が混入している割合はそれほど大きくばらつかないのではないかと考えられる。現段階では、定量的にどちらが最良か判断できないため、引き続き条件

検討を続けることが必要である。

5. 培地交換量

本研究では、最大で 28 日間の培養を行うが、その間 3 日あるいは 4 日おきに培地交換を行う。その際、ウェル中のすべての培地を除去して新たに培地を添加すると、細胞が乾燥してしまい結果に影響することが予想された。そこで、培地交換の量を半量あるいは全量の 2 条件について検討を行った。その結果、0 AraC の半量交換が全量交換に比べて顕著に高い平均発火頻度だったが、0.5 AraC では半量交換と全量交換に大きな差はなかった (図 5A)。活性化電極数にも半量交換と全量交換で大きな差はなかった (図 5B)。

3 日あるいは 4 日おきに培地交換を行うと、インキュベーター内の湿度が十分であっても各ウェルより培地が蒸発していく。しかもウェルごとに蒸発量が異なるため培地量を一定に保つことが困難だと考えられる。0.5 AraC の場合、半量交換と全量交換で大差なかったことから全量交換によって毎回ウェル中の培地を一定量に保つことが最適だと考えられる。

6. 急性投与の投与操作の検討

上述したように、化学物質の急性投与実験を行うタイミングとしては、培養開始 16 日目付近が最適だと考えられる。急性投与実験では、化学物質の投与前後でのパラメーターの比較を行うことから、化学物質による作用のみを抽出する必要があり、溶媒や投与操作によるパラメーター変動は避けたい。そこで、溶媒に最も多く用いられる培地と DMSO に関して、投与操作の検討を行った。DMSO の最終濃度を 0.1% に抑えたいため、500 μ l の培地に対して 5% DMSO を 10 μ l 投与した。

10 μ l の培地および DMSO を 1 ショットで投与した場合、培地では平均発火頻度の大きな変化は観察されなかったものの、DMSO の投与により平均発火頻度の値が大きく変化し時にはまったくスパイクが観察されない時間帯もあった (図 6)。これは高濃度の DMSO が神経細胞に対して直接作用したためだと考えられる。次に高濃度の DMSO が細胞に直接作用することを避けるため、以下の 4 つの投与方法を検討した。① 10 μ l の 5% DMSO を 1 ショットではなく、ゆっくりと時間をかけてウェル中に投与、② 96 ウェルプレートに配置した 10 μ l の 5%

DMSO に細胞を培養している実際のマエストロプレートウェルから培地を 50 μ l 抜いて混合し、元のウェルに戻す方法、③②における培地量を 100 μ l にした方法、④②における培地量を 200 μ l にした方法。①は 1 ショットで投与した場合と同じように、平均発火頻度が大きく変動した (図 7A)。②では添加直後に平均発火頻度がゼロとなる時間帯も観察された (図 7B)。③④はウェルに投与する DMSO の濃度が大幅に薄くなっていることから、投与による影響はほぼ消失した (図 7B-D)。以上より 100 μ l 以上の培地と 5% DMSO を混合し、ウェルに投与することが最適だと考えられる。

7. その他

上記の条件検討を行うにあたり非常に役立ったのが、米国環境保護庁 (EPA) の Timothy J Shafer 教授との共同研究体制である。EPA を訪問し、実際に作業を行っている実験補助の方を交えて直接話をする中で技術的な問題が解決できるとともに、プロトコルの最適化を加速することができた。特に、プレートのコーティングおよび細胞播種について、コーティング剤である Laminin を培地に混合しそこに細胞を懸濁させて播種することで、コーティング時間の短縮と電極上への確実な細胞播種を実現することができ、再現性が飛躍的に向上した。また、HESI (Health and Environmental Sciences Institute) の NeuTox サブチームにも参加し、プレバリデーションに関する議論を進めている。

D. 考察

本研究では、神経ネットワーク形成過程およびネットワーク形成後の化学物質の毒性評価系の開発を目指し、プレートのコーティング方法、播種細胞密度、AraC の添加、培地交換の量について検証を行った。その結果、最適だと考えられる条件が選択でき、より高い再現性が得られた。今後、化学物質の毒性評価に望む予定である。また、化学物質の投与方法についても溶媒である DMSO を用いて検証した。DMSO を 10 倍に薄めて投与する方法は測定パラメーターへ影響を与えないことから、今後の化学物質を評価する際の投与方法については、上記方法を採用することとした。今年度開発した評価法をもとに、性・陰性対照物質の発達神経毒性に対する影響を効率よく評価

する予定である。

E. 結論

海馬ニューロンを用いて神経ネットワーク形成過程およびネットワーク形成後の化学物質の毒性評価系の開発を行い、再現性が高く最適な評価系を構築した。また、対照物質の投与方法についても適切な方法を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Yamada S., Kubo Y., Yamazaki D., Sekino Y. and Kanda Y. “Chlorpyrifos inhibits neural induction via Mfn1-mediated mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells.” *Sci. Rep.* (2017) 7:40925

2. 学会発表

- [1] Yasunari Kanda, Shigeru Yamada, Naoya Hirata, Daiju Yamazaki, and Yuko Sekino. Role of mitochondrial dynamics in neural toxicity assessment in human iPS cells. 5th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology. US EPA Building Research Triangle Park, NC. 2016.9.29-30

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

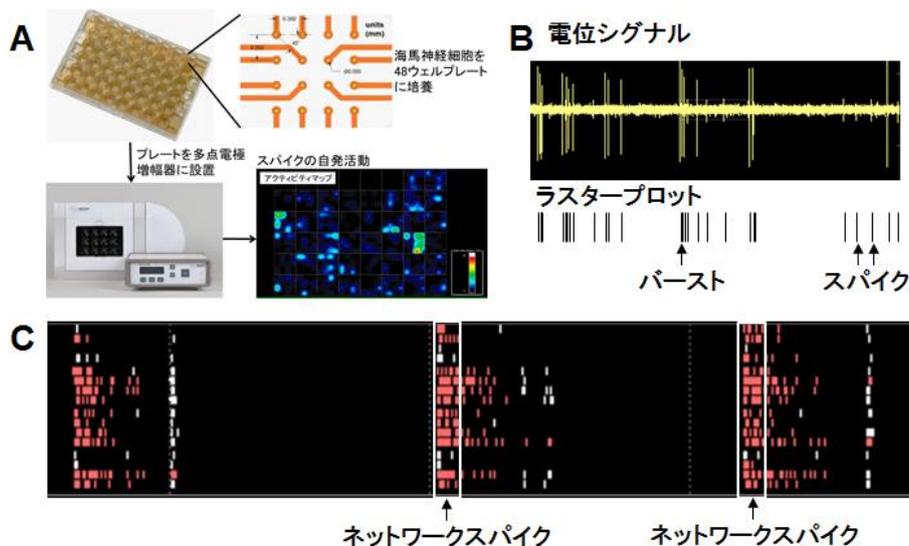


図1 神経細胞を用いた多点電極システムについて

A. 各ウェルに16個の電極が埋め込まれている48ウェルプレートに対して凍結ラット胎仔海馬神経細胞を1ウェルあたり50,000細胞を播種・培養し、Axion社製多点電極システムに設置し、神経活動を記録する。神経活動（スパイク）がアクティビティマップとして疑似カラー表示される。B. 1電極ごとに電位シグナルが検出され、検出閾値よりも大きなシグナルはラスタープロットとして表示される。ラスタープロット1本1本はスパイクを表しており、スパイクがまとまって発生した場合にはバーストと呼ばれる。C. 1ウェル（16電極）のラスタープロット。同期したスパイクをネットワークスパイクと呼ぶ。白のラスタープロットは単一のスパイク、赤のラスタープロットはバーストを表している。

表1 細胞融解時の生存率について

回数	生細胞数	死細胞数	生存率 (%)	総細胞数
1	0.86 x 10 ⁶	0.66 x 10 ⁶	56.6	1.52 x 10 ⁶
2	0.73 x 10 ⁶	0.85 x 10 ⁶	46.2	1.58 x 10 ⁶
3	0.9 x 10 ⁶	0.7 x 10 ⁶	56.3	1.60 x 10 ⁶
4	1.05 x 10 ⁶	0.9 x 10 ⁶	53.8	1.95 x 10 ⁶
5	2.2 x 10 ⁶	2.2 x 10 ⁶	50.0	4.4 x 10 ⁶
6	1.9 x 10 ⁶	2.1 x 10 ⁶	47.5	4.0 x 10 ⁶
7	0.78 x 10 ⁶	0.69 x 10 ⁶	53.1	1.47 x 10 ⁶
8	1.56 x 10 ⁶	0.78 x 10 ⁶	66.7	2.34 x 10 ⁶
9	0.53 x 10 ⁶	0.68 x 10 ⁶	43.4	1.21 x 10 ⁶
10	0.81 x 10 ⁶	0.54 x 10 ⁶	60.0	1.35 x 10 ⁶
11	1.8 x 10 ⁶	1.35 x 10 ⁶	57.1	3.15 x 10 ⁶
12	1.13 x 10 ⁶	0.95 x 10 ⁶	54.3	2.08 x 10 ⁶
13	0.81 x 10 ⁶	0.66 x 10 ⁶	55.1	1.47 x 10 ⁶
14	0.98 x 10 ⁶	0.68 x 10 ⁶	59.1	1.65 x 10 ⁶
15	0.80 x 10 ⁶	0.72 x 10 ⁶	52.3	1.52 x 10 ⁶
平均			54.1	

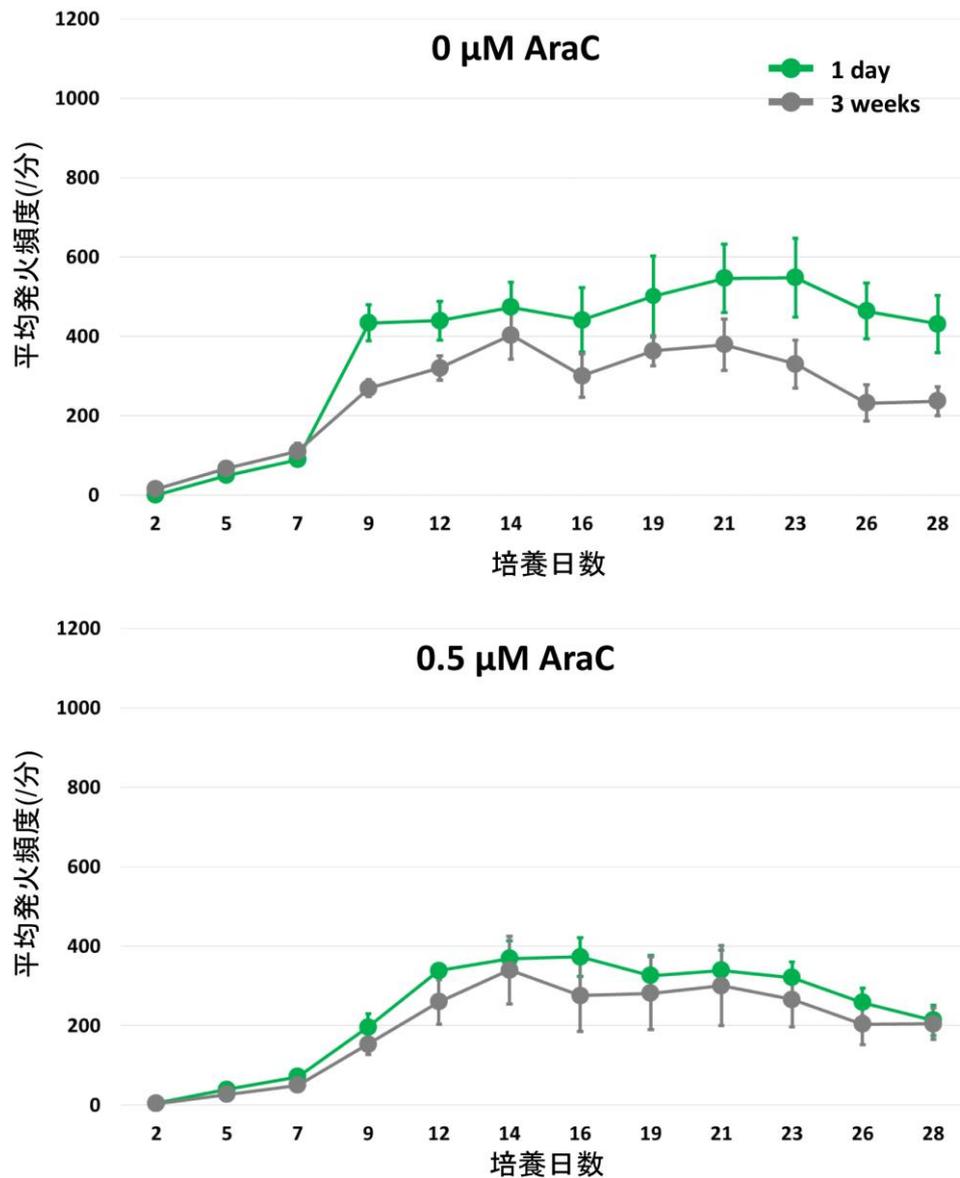


図2 コーティング後の保存期間の検討

マエストロプレートに対して0.1% PEI コーティングを行った後、1日 (1 day) あるいは3週間 (3 weeks) 後に細胞を播種し、28日後まで計測を行った。AraC を適用しない場合 (上段) には、3 weeks に比べて1 day の方が平均発火頻度は高値であった。一方で、0.5 μM AraC の適用 (下段) では、1 day および3 weeks に大きな差はなかったものの、コーティングから時間が経過すると、若干低い平均発火頻度で推移する傾向があった。

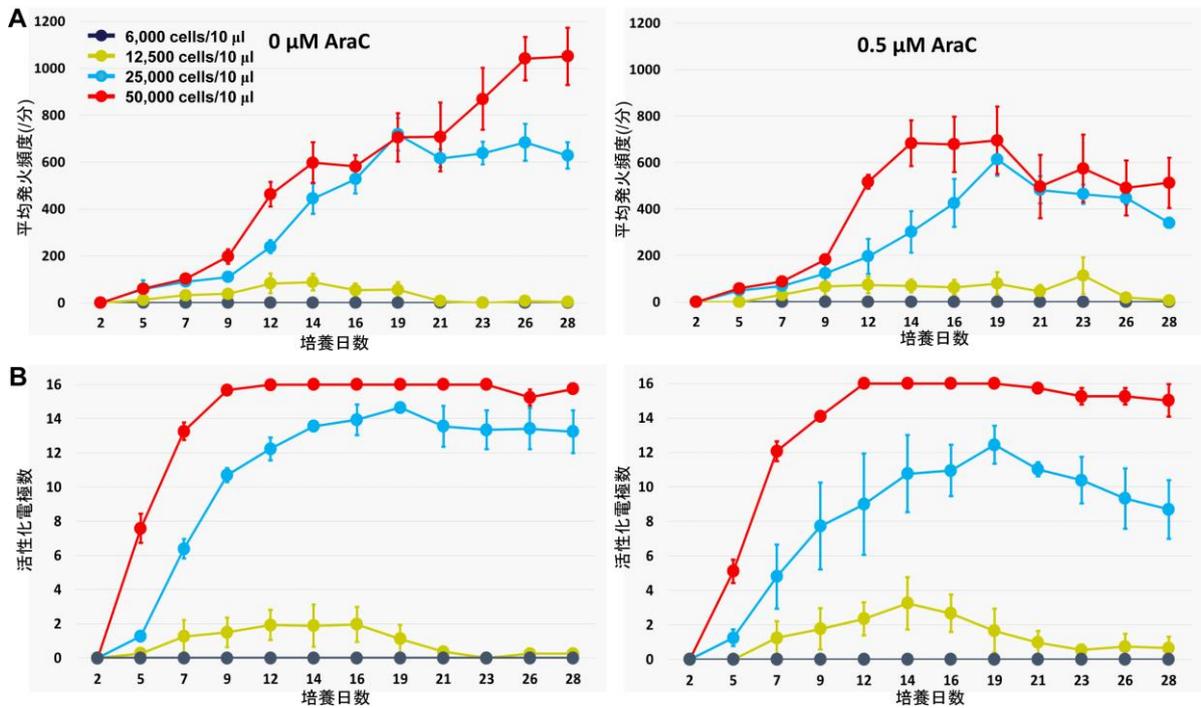


図3 播種細胞密度の検討

播種細胞密度について6,000、12,500、25,000、50,000細胞/10 μlで検討を行った。0 μM AraC（左）および0.5 μM AraC（右）を適用した際の平均発火頻度（A）および活性化電極数（B）について28日まで計測した。6,000細胞/10 μlおよび12,500細胞/10 μlでは、培養期間が9日を過ぎたところで平均発火頻度が上昇せず、28日目まで低値であった。活性化電極数も12,500細胞/10 μlや25,000細胞/10 μlではほとんどの電極が活性化しなかった。25,000細胞/10 μlでは、50,000細胞/10 μlに比べてわずかに遅れて平均発火頻度が上昇したものの、すべての電極が活性化しなかったことから全電極を覆うことができないものと考えられる。

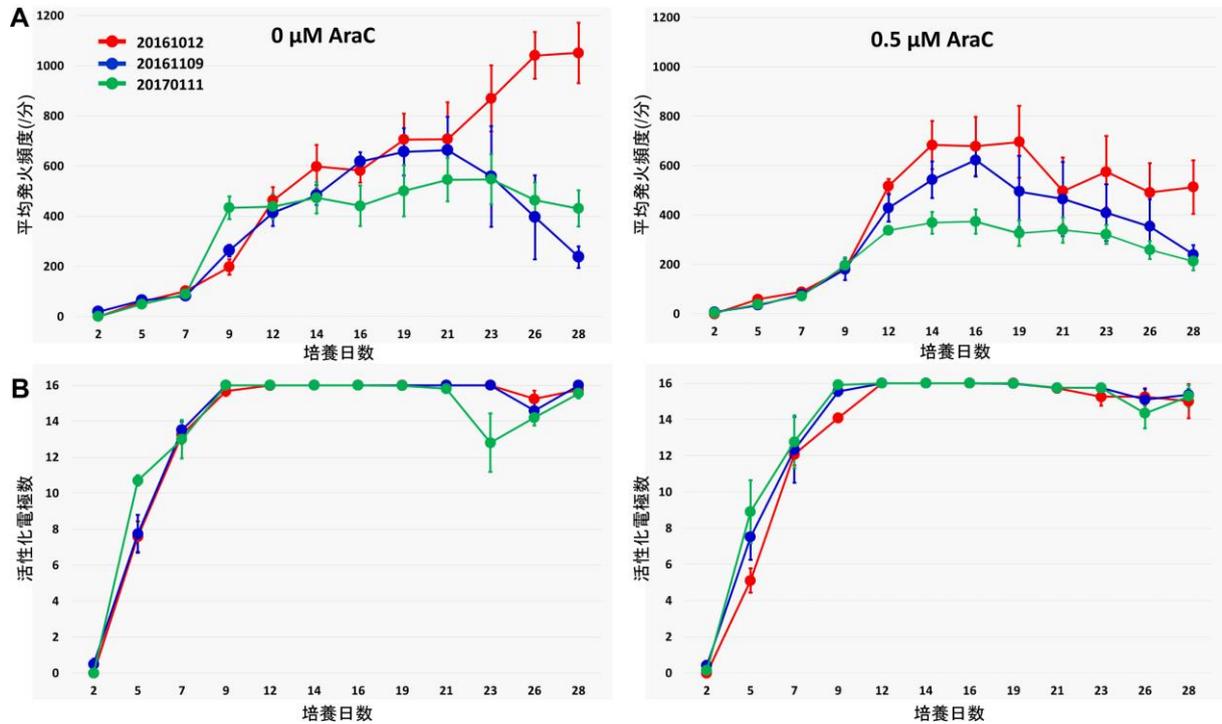


図4 AraC濃度の検討

Day 5 から Day 7 の3 日間に培地に AraC を加えるかどうかの検討を行った。0 μM AraC (左) および 0.5 μM AraC (右) を適用した際の平均発火頻度 (A) および活性化電極数 (B) について 28 日まで計測した。それぞれ同一ロット、同一条件にて 3 回行った結果を示した。AraC の添加、非添加のいずれにおいても平均発火頻度は Day 7 あるいは Day 9 から上昇し、一部を除いて Day 21 あたりから下降を始めた。活性化電極数については、いずれも Day 12 では最大値まで到達し、Day 19 まではそれを維持した。

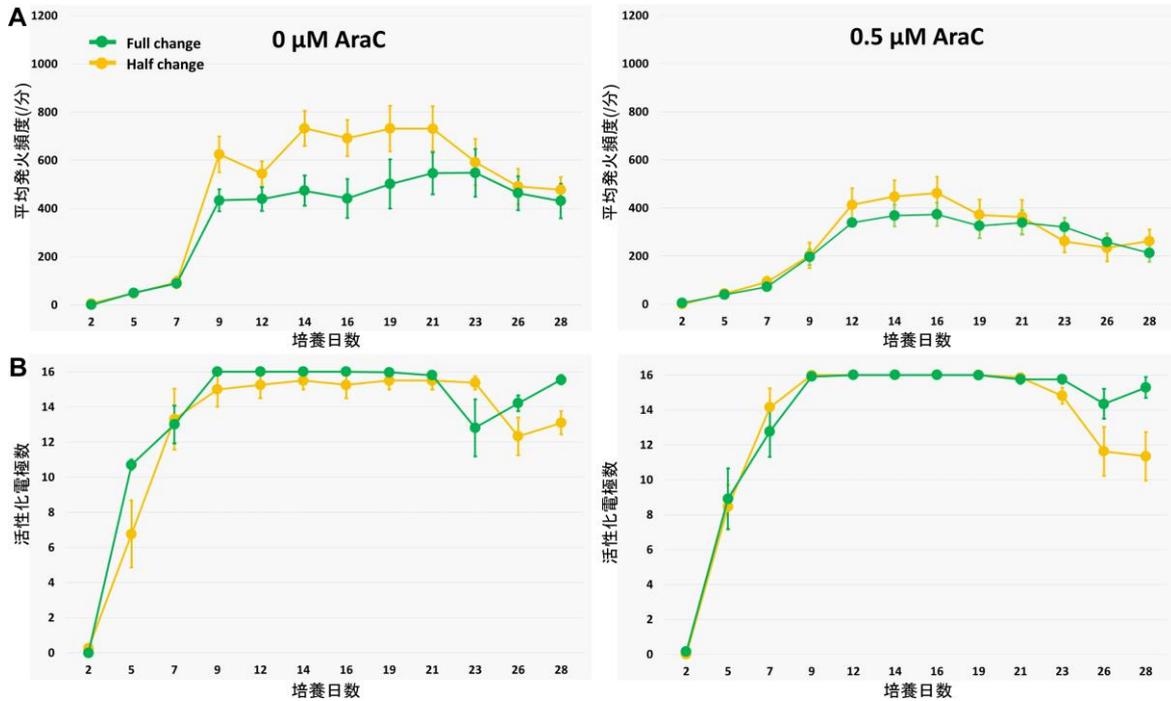


図5 培地交換量の検討

3日あるいは4日おきに実施している培地交換に関して、交換する培地の量を全量（緑）あるいは半量（黄色）か検討を行った。0 μM AraC（左）および0.5 μM AraC（右）を適用した際の平均発火頻度（A）および活性化電極数（B）について28日まで計測した。平均発火頻度については、0 μM AraCの半量交換を除いて他の3条件はほぼ同じような値で変化した。活性化電極数についても0 μM AraCの半量交換のみ最大値に到達しなかった。半量交換の条件では、培養期間後半のDay 23あたりから活性化電極数の下降が目立った。

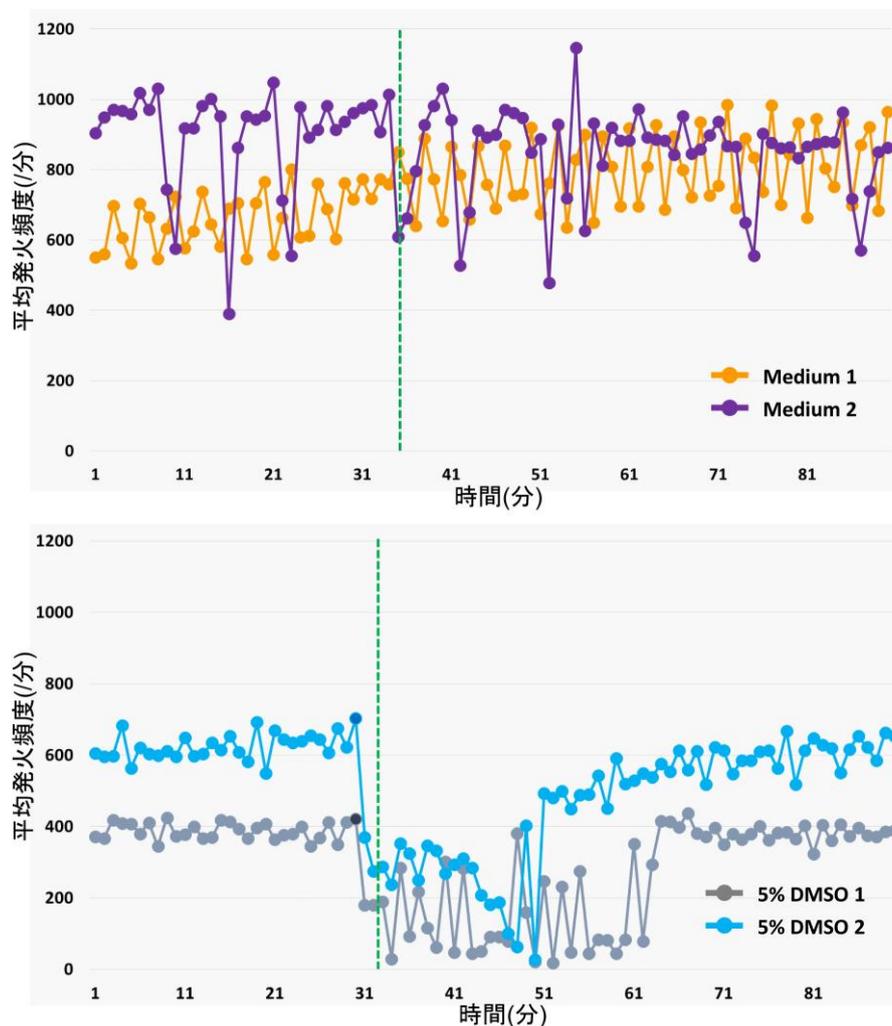


図6 投与方法に関する検討1

化学物質の投与方法に関する検討。およそ30分間の測定後に10 μ lのmedium(上段)および5% DMSO(下段)を1ショットでウェル中に投与し、その後60分間平均発火頻度を記録した。1分間ごとの総平均発火頻度をプロットした。緑色の点線がそれぞれ投与したタイミングである。Mediumを投与した細胞は培養26日目、DMSOを投与した細胞は培養16日目である。Mediumの投与では、平均発火頻度に大きな乱れは観察されなかったが、5% DMSOの投与によって急激な平均発火頻度の下降が観察され、その後30分間元の値に戻らなかった。

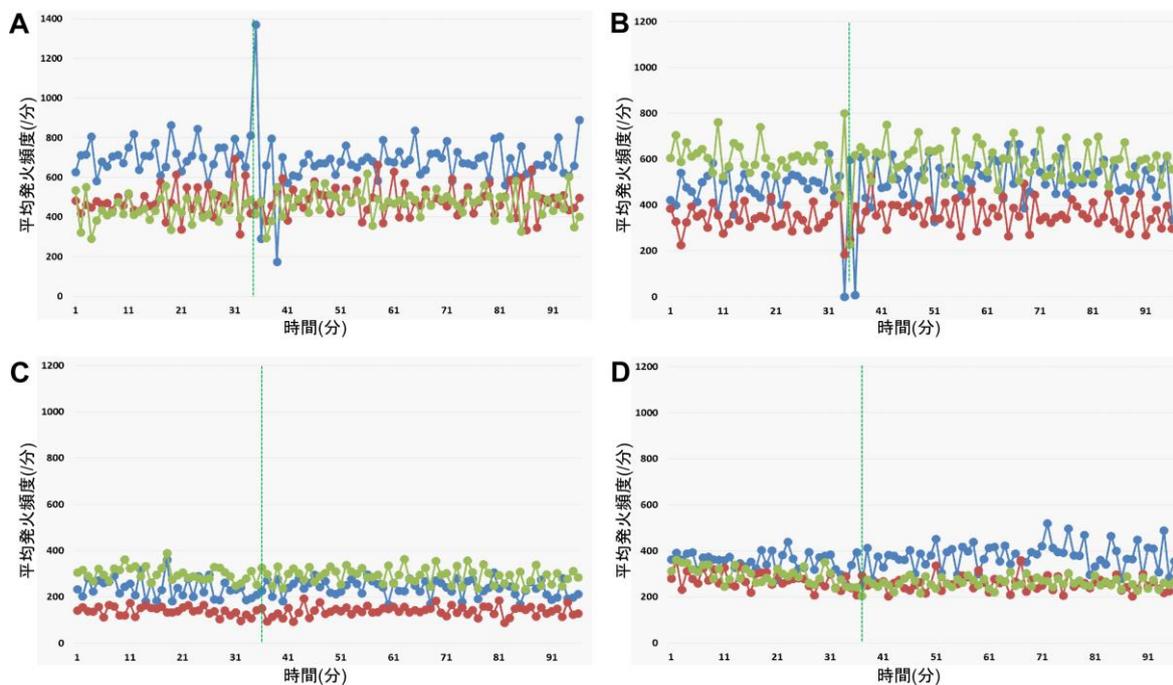


図7 投与方法に関する検討2

化学物質の投与方法に関する検討。およそ30分間の測定後に5% DMSOをウェルにゆっくりと添加 (A)、96ウェルプレートに分注した10 μ lの5% DMSOに記録するウェルから50 μ lの培地を抜いて混合しその混合液を記録するウェルに添加 (B)、96ウェルプレートに分注した10 μ lの5% DMSOに記録するウェルから100 μ lの培地を抜いて混合しその混合液を記録するウェルに添加 (C) および96ウェルプレートに分注した10 μ lの5% DMSOに記録するウェルから200 μ lの培地を抜いて混合しその混合液を記録するウェルに添加 (D) した。添加の後60分間平均発火頻度を記録した。1分間ごとの総平均発火頻度をプロットした。緑色の点線がそれぞれ投与したタイミングである。100 μ l以上の培地に5% DMSOを混合した場合に添加による影響が観察されなくなった。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

生後小脳の神経回路の機能的影響による評価法の開発

研究分担者 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系
吉田 祥子
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長
関野 祐子

要旨

本年度は、化学物質に対して感受性の高いラット小脳皮質を用いて、化学物質曝露による神経突起進展、神経回路形成への影響を検討し、最も適切な定量化方法を決定することを目的として実施した。ヒト自閉症誘発が報告されているバルプロ酸、およびクロルピリホスに加え、同様の薬理作用機序が考えられる SAHA、MS-275、環境毒性物質の有機スズについて、神経細胞レベルおよび小脳組織レベルでの変化を観察し、定量化を試みた。さらにバルプロ酸について、投与時期と投与濃度を変化させその効果を検討した。本年度は、化学物質投与による神経伸長変化の定量化、小脳虫部第一裂の過剰な褶曲の定量化、行動観察の定量化を行った。その結果、遅発性神経毒性が考えられる化学物質であるバルプロ酸、クロルピリホスが、生後の神経回路発達の変化を小脳神経細胞の突起伸展と小脳構造の変化、動物の行動変化を引き起こすことを定量的に示した。これにより投与量依存性、投与時期依存性が明瞭になり、さらに遺伝子レベル、たんぱく質レベルでの発達期神経毒性の定量化につなげることが期待される。

A. 研究目的

ヒト自閉症誘発が報告されているバルプロ酸（VPA）、VPA と同様にヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤であるスベロイルアニリドヒドロキサム酸（SAHA）、MS-275、ヒト自閉症誘発が報告されているクロルピリホス（CPF）、および環境毒性物質のトリブチルスズ（TBT）投与による小脳発達への影響を、免疫組織化学的手法による神経の形態的变化、およびヘマトキシリン-エオシン染色（HE 染色）による小脳虫部全体の構造変化を観察した。さらに個体の行動に及ぼす変化を確認するために、発達期個体の行動観察を行った。

B. 研究方法

近年自閉症の変異部位であることが報告されている小脳を研究試料として用いた。各化学物質を妊娠動物に投与し、出生動物の小脳を摘出してその効果を観察した。妊娠 16 日のラットに、600 mg/kg の VPA（経口）、

50 mg/kg の SAHA（腹腔内）、4 mg/kg の MS-275（経口）、10 mg/kg の CPF（経口）、20 mg/kg の TBT（経口）をそれぞれ投与した。VPA については、妊娠 14 日、18 日にそれぞれ 600 mg/kg の投与することを試験した。また、妊娠 16 日に 200 mg/kg、300 mg/kg、400 mg/kg の VPA 投与を試験した。

各投与動物を生後 2 から 3 週で灌流固定後、小脳虫部の矢状面スライス进行调整し、抗カルビンジン抗体による蛍光染色を行った。さらにスライス全体を HE 染色し、皮質層の変化を観察した。また各投与動物の任意に選んだ 3 匹について、生後 4 日から 10 日にかけて、温度維持した明環境下での 3 分間の自由行動の観察を行った。

抗カルビンジン抗体染色によってプルキンエ細胞の樹状突起長を測定し、化学物質投与による神経伸長変化の定量化を行った。

小脳虫部スライスの第 V/VI 小葉間にある primary fissure（第一裂）について、プルキンエ層の長さとの比を計算し、投与動

物と対照動物を比較して化学物質投与の影響の定量化を行った。

行動観察では、震えのような不随意運動の出現率を計測し、定量化を行った。

C. 研究結果

VPA投与動物、SAHA投与動物では、プルキンエ細胞の樹状突起伸長が対照動物より早く著しく、生後2週で1.6倍、生後3週でも1.3倍の伸長を示した。この現象はCPF投与動物でも観察されるが、MS-275投与動物、TBT投与動物では観察されなかった(図1、図2)。

VPA投与動物では、小脳虫部第一裂に過剰な褶曲ができることが観察された。これにより、プルキンエ層が長くなり、対照動物よりも1.2倍のプルキンエ層を持つに至った。この変化はCPF投与動物でも観察され、1.05倍のプルキンエ層を示した。一方MS-275、TBT投与動物では観察されず、神経突起伸展異常と同様の傾向を示した。妊娠14日にVPAを投与した動物では1.25倍のプルキンエ層が観察されたが、妊娠18日投与動物は対照動物と差を示さなかった。この変化はVPAの投与量に正の相関を示した(図3、図4)。

行動観察の結果、VPA投与動物では、P4で多くの不随意運動を確認したが、成長するにつれて減少する傾向にあった。SAHA投与動物では、対照動物やVPA投与動物と比較して多くの不随意運動を確認し、且つP4~P8にかけ増加する傾向が見られた。MS-275投与動物では対照動物より若干の不随意運動の増加が確認されたが、著しい変化は確認できなかった。TBT投与動物では、対照動物と比較して多くの不随意運動を確認することができた。また、P4~P7にかけて不随意運動が増加する傾向にあった(図5)。

D. 考察

今回提案した小脳変化の定量法によって、自閉症誘発が疑われる化学物質の神経毒性の定量化の可能性を示した。小脳の広い範囲に及ぶ変異は、SHH 遺伝子の発現変異や発生制御たんぱく質、神経栄養因子などの発現変異を示唆しているものと考えられる。動物を用いた試験法から得られた神経回路レベル、行動レベルでの変化を細胞レベルの変化につなげて行くことが必要であると考えられる。

E. 結論

本研究において、遅発性神経毒性が考えられる化学物質であるバルプロ酸、クロルピリホスを胎生期の動物に投与し、生後の神経回路発達の変化を小脳神経細胞の突起伸展と小脳構造の変化、動物の行動変化から定量化して示した。定量化により投与量依存性、投与時期依存性が明瞭になり、さらに遺伝子レベル、たんぱく質レベルでの発達期神経毒性の定量化につなげることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Mabuchi H., Ong HY., Watanabe K., Yoshida S. and Hozumi N. "Visualization of Spatially Distributed Bioactive Molecules Using Enzyme-Linked Photo Assay." *IEEJ Transactions on Fundamentals and Materials*, (2016) Vol.136, No.2, pp.99-104

2. 学会発表

- [1] 富田達朗、岩本早起、笛田由紀子、上野晋、関野祐子、Roman Maev、穂積直裕、吉田祥子、Alteration of cerebellar lobules in Valproate-induced autistic model rat、第39回日本神経科学大会、2016 横浜
- [2] 西川ちひろ、高橋信人、富田達朗、重本-最上由香里、佐藤薫、関野祐子、馬淵光、穂積直裕、吉田祥子、Interaction between neurosphere and cultured glial cell、第39回日本神経科学大会、2016 横浜
- [3] 三上哲理、渡邊一徳、笛田由紀子、上野晋、関野祐子、穂積直裕、吉田祥子、Fast glutamate release detection in normal and valproate-administrated rat cerebellum、第39回日本神経科学大会、2016 横浜
- [4] 高橋信人、馬淵光、重本-最上由香里、佐藤薫、関野祐子、穂積直裕、吉田祥子、Visualization of neurotransmitter release in the developing neurosphere cells using the enzyme-linked photo-assay、第39回日本神経科学大会、2016 横浜
- [5] 中嶋さりい、富田達朗、笛田由紀子、上野晋、関野祐子、吉田祥子、Alteration of neuronal development by Autism-induce drugs and recovery effects with bumetanide in developing rat cerebellum、第39回日本神経科学大会、2016 横浜
- [6] Hikaru Mabuchi, Nobuto Takahashi, Kaoru Sato, Yuko Sekino, Naohiro Hozumi and

Sachiko Yoshida. Visualization of neurotransmitter released from cultured granule cells and the neurosphere cells using enzyme-linked photo-assay combined with ICA. 46th Neuroscience meeting, 2016 San Diego

- [7] Sari Nakajima, Tatsuro Tomida, Koichiro Ikai, Yukiko Fueta, Susumu Ueno, Naohiro Hozumi, Yuko Sekino and Sachiko Yoshida. Alteration of Purkinje cells by autism-inducing drugs, and recovery effects with bumetanide or oxytocin administration in developing rat cerebellum. 46th Neuroscience meeting, 2016 San Diego
- [8] 佐藤誠太、中嶋さりい、笛田由紀子、上野晋、関野祐子、吉田祥子、抗てんかん薬バルプロ酸の曝露期・曝露濃度による発達期神経毒性の変化、第47回中部化学関係学協会連合会秋季大会、2016 豊橋

G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願
吉田祥子，穂積直裕，氏家雅彦，光学観察装置，特願 2016-221213
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

(Bar = 100 μ m)

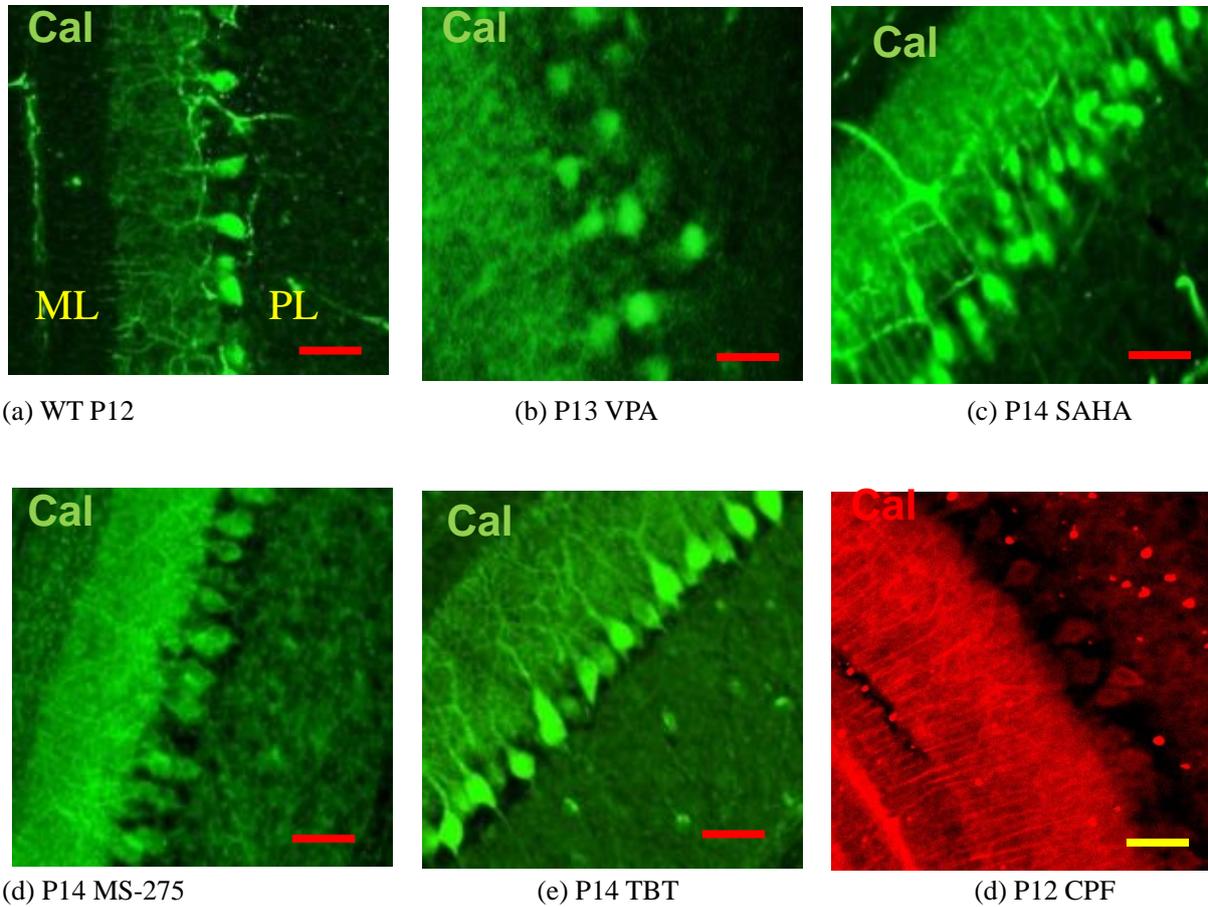


図1 各種物質投与動物の小脳プルキンエ細胞。抗 Calbindin D-28k 抗体染色。

WT:対照動物、VPA:バルプロ酸投与動物、SAHA: スベロイルアニリドヒドロキサム酸投与動物、MS-275:MS-275 投与動物、TBT:トリブチルスズ投与動物、CPF:クロルピリフォス投与動物のそれぞれ小脳。

VPA 投与動物、および SAHA 投与動物では、細胞体が一列に並ばず、樹状突起の乱れが観察された。

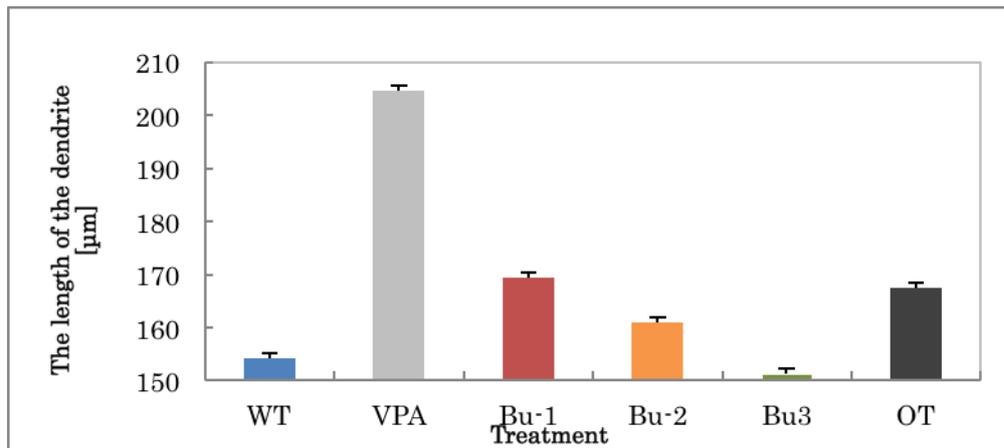
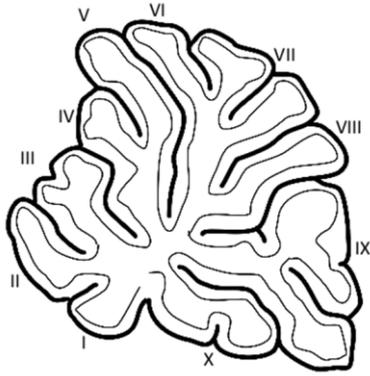


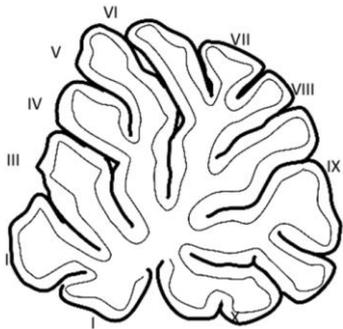
図2 各種物質投与動物の生後21日における小脳プルキンエ細胞樹状突起の長さ

WT:対照動物、VPA:バルプロ酸投与動物、Bu-1、Bu-2、Bu-3、OT:VPA投与動物にブメタニド(Bu)またはオキシトシン(OT)を追加投与した動物

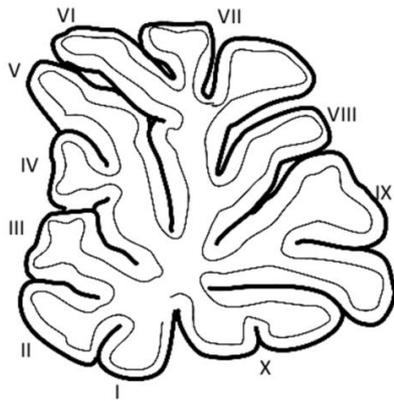
生後21日では、バルプロ酸投与動物に著しい樹状突起伸長が観察された。これらの伸長は、ブメタニド、またはオキシトシンの追加投与で改善された。



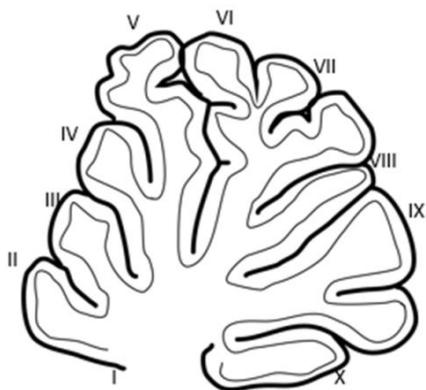
生後 16 日 対照動物小脳



VPA 200 mg/kg 投与動物小脳 (P15)



VPA 400 mg/kg 投与動物小脳 (P16)



VPA 600 mg/kg 投与動物小脳 (P16)

図 3 各条件で VPA を投与した動物の小脳虫部の褶曲構造の変化

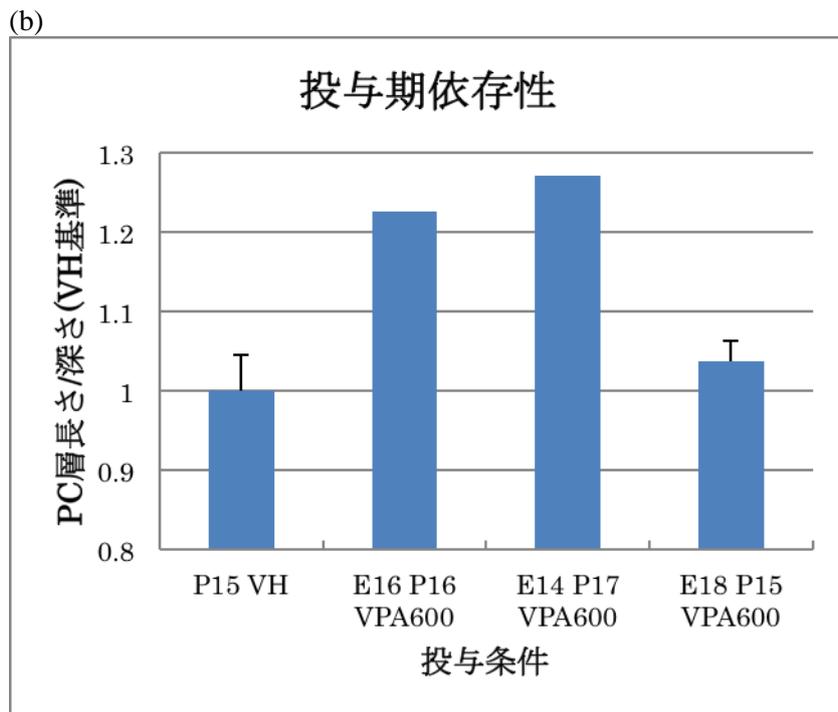
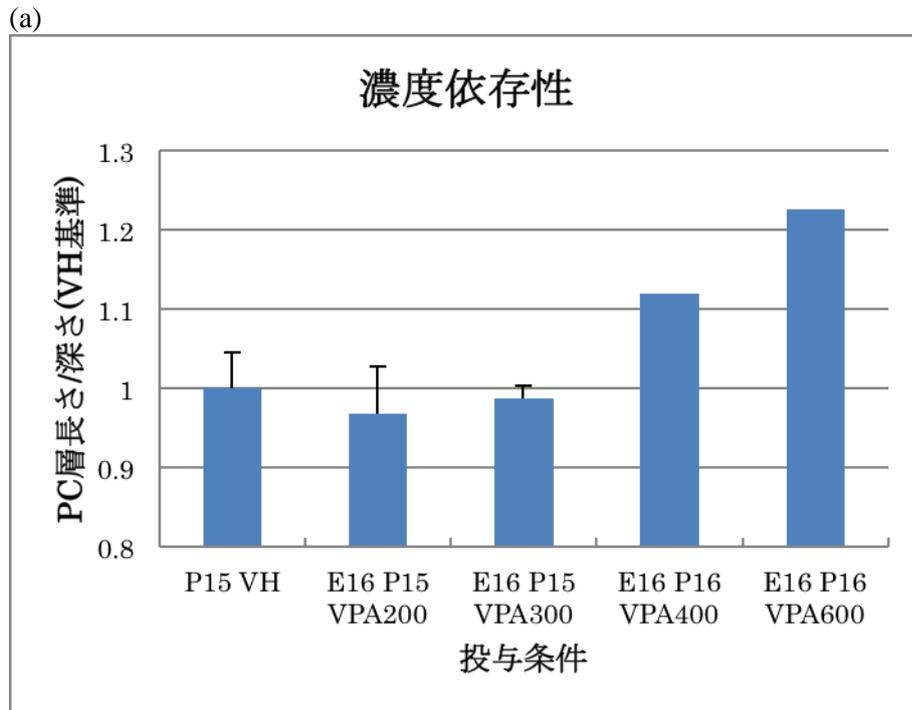
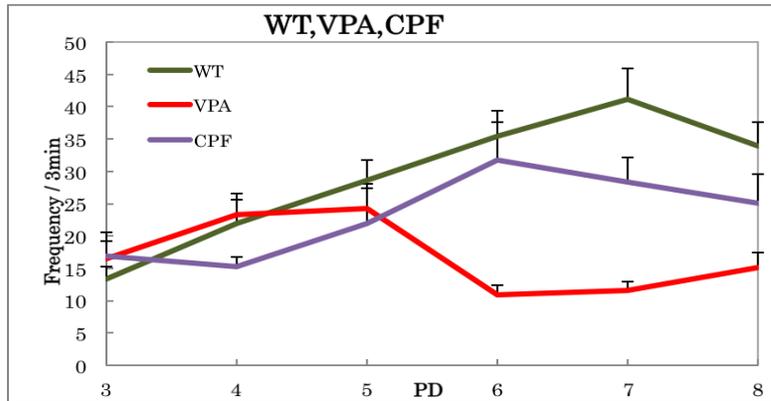
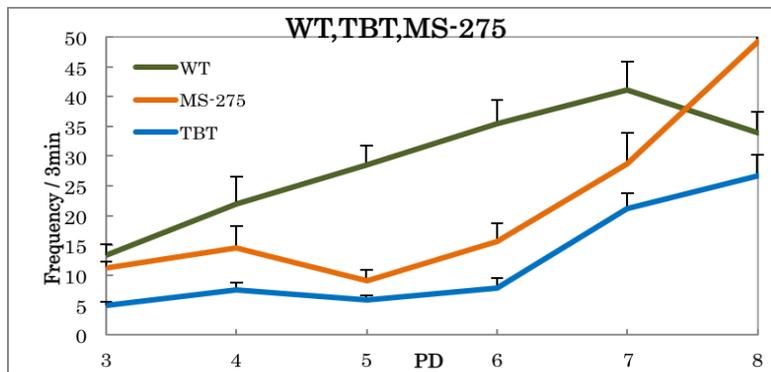


図4 VPAの投与濃度(a)、投与時期(b)による小脳虫部の褶曲度の変化

(a)



(b)



(c)

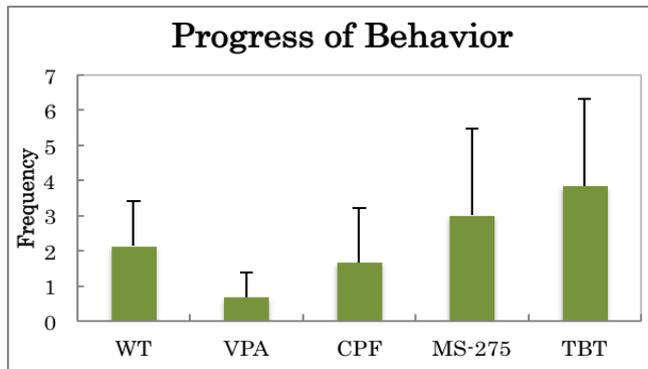


図5 VPA, CPF, TBT, MS-275 投与動物の生後10日程度の不随意運動の発生頻度

(a) VPA は対照動物よりも早く不随意運動の低下が見られる。

(b) TBT や MS-275 ではむしろ遅くなる。

(c) 運動の頻度変化をしめす。

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

幼若期海馬の神経回路機能による評価法の開発

研究分担者	産業医科大学 産業生態科学研究所 教授 上野 晋
研究協力者	産業医科大学 産業保健学部 講師 笛田由紀子
研究協力者	豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 講師 吉田祥子

要旨

本研究班が提案してきた遅発性神経毒性試験手法の妥当性を調べる目的で、産業化学物質 1-ブロモプロパン（1BP）を対象として検討した。1BPでは生殖毒性や神経毒性などが報告されているが、発達神経毒性は不明であり、ヒトにおける事例も報告されていない。そこで妊娠ラットに対して1BPの吸入曝露を行い、産まれた仔ラットの授乳期である2週齢、離乳後である5週齢、性成熟後の8週齢および13週齢にわたって、海馬の神経回路機能を検討した。その結果、1BP胎生期曝露により2週齢で神経回路機能の興奮性が亢進することが認められた。このことから、バルプロ酸の胎生期曝露と同様に、1BP胎生期曝露も神経発達期において神経回路興奮性の亢進をもたらすことが判明した。一方、8週齢および13週令において、海馬神経回路における抑制系回路の指標となるフィードバック抑制が減弱することが認められ、性成熟後では抑制系回路機能の減弱によって神経回路興奮性が変化する可能性が示唆された。以上の結果から1BPは遅延性発達神経毒性を有する可能性が示唆され、産業化学物質についても生後早期の海馬神経回路機能の評価が発達神経毒性の評価指標として有用となる可能性が確認された。

A. 研究目的

我々はこれまでに胎生期・神経発達期の化学物質曝露に起因する生後の遅発性神経毒性を評価する *in vitro* 試験法の開発を目指し、作用の異なる神経毒性物質（自閉症モデル動物作製に用いられるバルプロ酸、内分泌かく乱作用を示す有機スズ化合物、有機リン系農薬の一つであるクロルピリホス）を用いて、海馬神経回路機能の変化の有無を指標とした発達期の神経毒性評価を行ってきた。この知見をもとに、本申請課題の初年度、当分担研究班では発達神経毒性が不明な産業化学物質 1-ブロモプロパン（1BP）を用い、妊娠ラットに吸入曝露して産まれた仔ラットの脳スライス標本を採取し、授乳期、離乳後、性成熟後の神経回路異常の有無について電気生理学的手法による検証を行った。

B. 研究方法

1. 1BP の吸入曝露（研究協力者 笛田由紀子）

Wistar 系妊娠ラット（株式会社九動より購入）に対して、曝露チャンバー内で 1BP を濃度 200、400、700 ppm で 1 日 6 時間、妊娠 1～20 日目まで 20 日間の反復吸入曝露を行った。対照群には同様のチャンバーで新鮮空気を供与した。

2. 体重測定（研究協力者 笛田由紀子）

仔ラットの体重は毒性を評価する最も簡便な指標となる。よって、授乳期である生後 2、7、14、18 日にわたって体重を測定した。

3. 電気生理学的評価のための脳スライス標本の作製（研究協力者 笛田由紀子）

生後 2、5、8、13 週齢の雄性仔ラットをエーテルで深麻酔下断頭したのち海馬スライス標本を作製した。母ラットへの吸入曝露お

よび仔ラット出生後にスライスを作製する時期は、バルプロ酸胎生期曝露モデルを作製した時の実験プロトコルに順じた(図 1)。バルプロ酸胎生期曝露モデルでは、神経回路機能に変化が認められたのが開眼前であったことから、今回の 1BP 胎生期曝露モデルでは、あらかじめ予備実験で開眼時期を検討しており、その結果開眼時期に対する 1BP 胎生期曝露の影響は認められなかった(平均開眼日、対照群: 生後 15.6 日; 700 ppm: 15.7 日)。そこで、2 週齢のラットについては生後 13、14 日齢を開眼前期、生後 15 日齢を開眼期とする 3 種類の日齢に分けて解析した。

4. 刺激応答性とフィードバック抑制の電気生理学的評価法(研究協力者 笛田由紀子)

バルプロ酸胎生期曝露モデルでの検討と同様に、刺激電極と記録電極を海馬スライスに設置した後(図 2)、CA1 領野の錐体細胞層からは集合スパイク電位を、シナプス層から集合興奮性シナプス後電位を記録して神経回路興奮性および興奮性シナプス強度を評価した(図 3)。

評価法は、まず単一の電気刺激を与えたときの神経細胞の応答性の発達に伴う変化を、対照群、200 ppm 群、400 ppm 群および 700 ppm 群に分けて解析した。

フィードバック抑制は 2 連続刺激で誘発される電位を用いて評価した。すなわちフィードバック抑制が形成されていれば、2 回目の応答は 1 回目の応答よりも小さくなる。つまり、2 回目の応答の大きさを 1 回目の応答の大きさで除した比(ペアパルス比)が 1 よりも小さい値となる。この解析手法により、ペアパルス比が 1 よりも小さい場合では、抑制系の強さを簡便にかつ定量的に評価できる。

さらに離乳後の仔ラットを用いて、成長に伴う 1BP 胎生期曝露による影響の出現についても検討することとしたが、この検討には対照群と 700 ppm 群での比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、産業医科大学に定められた、関係する遵守すべき指針等を把握して、十分な管理体制のもと、倫理面に万全の配慮をしながらそれぞれの研究が進められた。

C. 研究結果

これまで検討してきたバルプロ酸の胎生期曝露による神経発達への影響と類似して、1BP の胎生期曝露でも、神経回路の刺激応答性の亢進(図 4)と興奮性シナプス強度の増強(図 5)が開眼前期である生後 14 日齢で認められた。

授乳期のラットの体重増加については、出産時は対照群と 700 ppm 群で有意差が認められないものの、生後 18 日齢までの評価によって 1 割程度の体重増加抑制が 700 ppm 群で見られた(図 6)。

離乳後 5 週齢の単一刺激への神経細胞の応答については、対照群と 700 ppm 群に有意差は認められず(図 7)、性成熟後の 8、13 週齢においても 1BP 胎生期曝露の影響は認められなかった。

しかしながら、2 連続刺激による誘発電位の変化については、性成熟後でも 1BP 胎生期曝露の影響が認められた(図 8)。対照群では、授乳期ではペアパルス比が約 2.0 となる、いわゆる促通効果が認められたが、離乳後(5 週齢以降)にはペアパルス比は著しく小さい値となりフィードバック抑制が形成されていることが認められた。一方、700 ppm 群ではすでに授乳期において、軽度ではあるもののフィードバック抑制(ペアパルス比 < 1.0)が認められた。5 週齢では対照群と同程度のペアパルス比を示したが、8 週齢以降、すなわち性成熟後のペアパルス比は対照群と比較して有意に大きく、フィードバック抑制が減弱していることが判明した。

D. 考察

産業化学物質 1BP の胎生期曝露ラットにおいて、バルプロ酸の胎生期曝露ラットで見出した現象と類似した、生後 2 週齢、特に開眼前期での海馬神経回路興奮性の亢進が認められた。このことから、1BP も発達神経毒性を有する化学物質である可能性が示唆される。しかしながら 1BP の胎生期曝露ラットが離乳後あるいは性成熟後にバルプロ酸胎生期曝露ラット、すなわち自閉症モデルラットと類似した社会行動異常を示すかは今後の検討課題として、本研究では電気生理学的手法による神経回路興奮性のみを指標として性成熟後まで検討した。その結果、700 ppm 群では、対照群に比べてフィードバック抑制が有意に減弱することが判明した。フィードバック抑制の減弱は神経回路興奮性

の変化を示す素因となり得ることがヒトやてんかんモデル動物において示されている。本研究は動物実験ではあるが、妊娠ラットに吸入曝露させた 1BP が、成長後の仔ラット脳の神経回路興奮性に影響を及ぼすという発達神経毒性を有する可能性を示唆するものである。さらにこの 1BP がもたらす遅発性神経毒性が、本研究で用いた我々の発達神経毒性評価法により、授乳期に予測できる可能性が示唆された。

1BP については日本産業衛生学会許容濃度等委員会より許容濃度 (0.5ppm) がすでに勧告されているものの、その提案理由の中に発達神経毒性はもとより発達毒性も考慮されていない。一方、米国産業衛生専門家会議 (ACGIH) が設定した許容濃度 (0.1ppm) には、ヒトの事例は認められないものの動物実験データに基づく発達毒性は考慮されているが、発達神経毒性については検討されていない。また母性保護のために、生殖機能などに有害な化学物質が発散する場所での女性労働者の就業を禁止する「女性労働基準規則 (女性則)」において、現在対象となっているのはわずか 25 物質に留まっている。日本の労働現場で取り扱われている化学物質は約 60,000 種類あり、毎年約 1,200 物質は新規に届出がなされている。発達毒性あるいは発達神経毒性を有する化学物質は女性則の対象物質になり得ると考えられるが、これら毒性の情報あるいは評価が十分行われているとは言い難い。産業化学物質の発達神経毒性評価にも本研究で用いた評価手法が応用できれば、個々の化学物質の許容濃度の提案、あるいは女性則の対象物質として提案に向けた評価などに対して、有益な情報を提供できることが期待される。

今回の曝露条件については、1BP の産業現場における曝露様式を想定して吸入曝露という経路を選択し、また曝露濃度および曝露期間については、先行研究 (論文発表 [1]) の中で作製した 1BP 胎生期曝露ラットにおける濃度を最高濃度としてさらに濃度を低く設定した。また妊娠した女性の就業を模して曝露期間は 20 日間を選択した。バルプロ酸や有機スズ化合物の評価を行った時のように妊娠後期における単回曝露という様式でも産業化学物質が評価できるかどうかは今後の検討課題である。

また、授乳期の神経回路興奮性の亢進には抑制性神経伝達物質 GABA のトランスポー

ターの分布が関連している可能性を研究協力者の笛田と吉田が見出しており、現在その詳細について検討中である。

E. 結論

発達神経毒性の詳細が不明であった産業化学物質である 1BP について検討した結果、胎生期曝露によって神経回路興奮性の亢進をもたらすことから、1BP が発達神経毒性を有する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Ishidao T., Fueta Y., Ueno S., Yoshida Y. and Hori H. “A cross-fostering analysis of bromine ion concentration in rats that inhaled 1-bromopropane vapor.” *J Occup Health* (2016) 58:241-246
- [2] Fueta Y., Sekino Y., Yoshida S., Kanda Y. and Ueno S. “Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus.” 論文投稿中
- [3] Fueta Y., Ishidao T., Ueno S., Yoshida Y., Kanda Y. and Hori H. “Prenatal exposure to 1-bromopropane causes delayed adverse effects on hippocampal neuronal excitability in the CA1 subfield of rat offspring.” 論文投稿中
- [4] Igarashi T., Wilson DJ. and Ueno S. “Acute exposure to toluene and xylene decrease the expression of connexin43 in human cardiac myocytes.” 論文投稿中

2. 学会発表

- [1] 笛田由紀子、関野祐子、吉田祥子、上野 晋、胎生期トリブチルスズあるいは酢酸スズ単回投与による授乳期ラットの行動と興奮・抑制系の変化、第43回日本毒性学会学術年会、2016 名古屋
- [2] Sari Nakajima, Tatsuro Tomida, Yukiko Fueta, Susumu Ueno, Yuko Sekino and Sachiko Yoshida. **Alteration of neuronal development by autism-induce drugs and recovery effects with bumetanide in developing rat cerebellum. The 39th annual meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016 横浜**
- [3] Tatsuro Tomida, Saki Iwamoto, Yukiko Fueta, Susumu Ueno, Yuko Sekino,

Roman Maev, Naohiro Hozumi and Sachiko Yoshida. Alteration of cerebellar lobules in Valproate-induced autistic model rat. **The 39th annual meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016** 横浜

- [4] Yukiko Fueta, Yuko Sekino, Sachiko Yoshida and Susumu Ueno. Novel approaches for electrophysiological and pharmacological evaluation of developmental neurotoxicity of chemicals using juvenile rat brain slices. 5th Prenatal Programming of Toxicology, 2016 北九州
- [5] Tatsuro Tomida, Yukiko Fueta, Susumu Ueno, Naohiro Hozumi, Yuko Sekino and Sachiko Yoshida. Alteration of Purkinje cells by autism-inducing drugs, and recovery effects with bumetanide or oxytocin administration in developing rat cerebellum. The 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2016 San Diego

G. 知的財産の出願・登録状況

(該当なし)

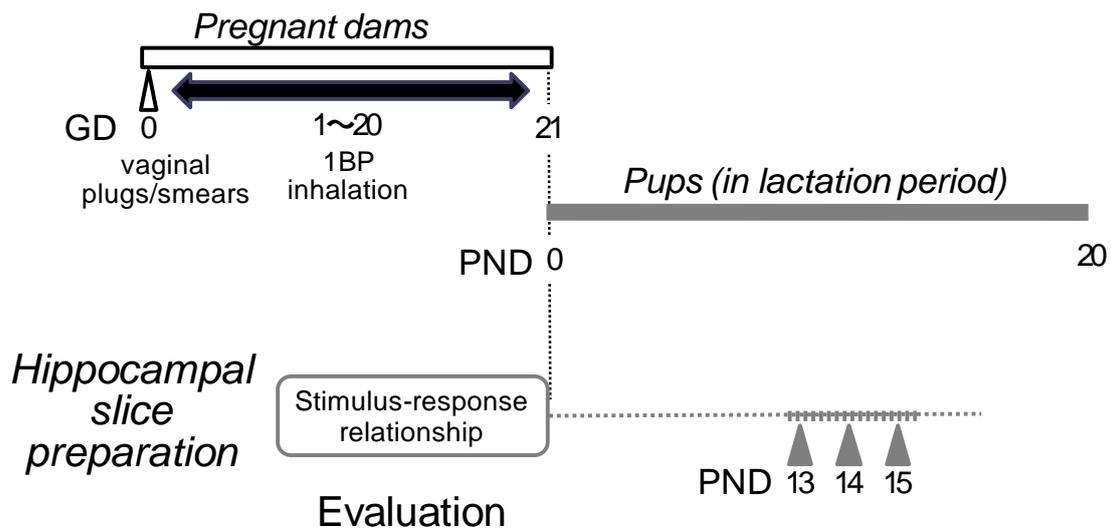
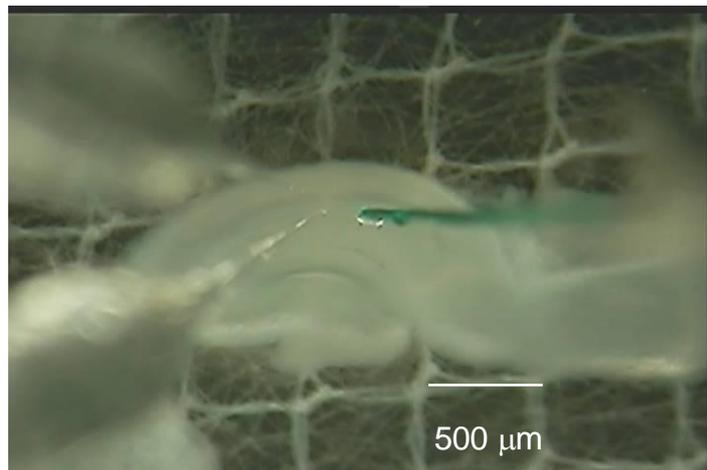
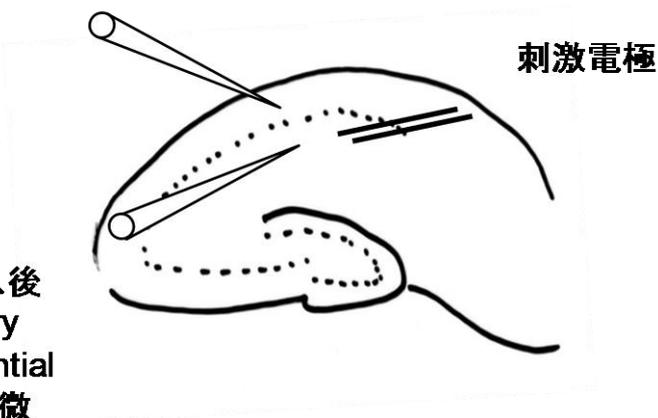


図1 海馬スライスを用いた電気生理学的手法による発達神経毒性評価のためのプロトコル
 ラットの妊娠期 1-20 日の 20 日間、産業化学物質 1BP を吸入曝露した。開眼前の生後 13、14 日および開眼が始まる生後 15 日の 3 日間に、連続して海馬スライス標本を作製して発達神経毒性の評価を行った。

集合スパイク電位
Population spike
(PS)を記録する微小
電電極

集合興奮性シナプス後
電位(field excitatory
postsynaptic potential
(fEPSP)を記録する微
小電極

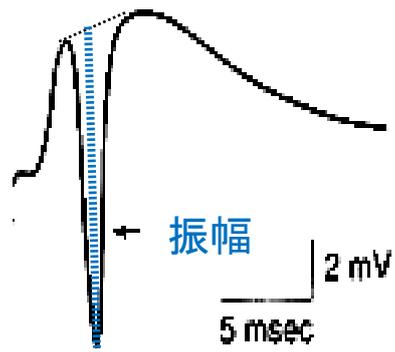


実体顕微鏡下に観察される海馬スライスと
2本の記録電極と刺激電極(緑)

図2 発達神経毒性評価法のための海馬スライスを用いた電気生理学的手法

上図：海馬スライスにおける双極性電気刺激電極の位置と2つの記録用ガラス微小電極を示す。下図：実体顕微鏡下に撮影した生の海馬スライスと、刺激電極（左）および記録用ガラス微小電極（左）の配置。

集合スパイク電位
Population spike (PS)



集合興奮性シナプス後電位(集合EPSP)
(Field excitatory postsynaptic potential (fEPSP))



図 3 発達神経毒性評価の指標とする集合スパイク電位(PS)の振幅～回路興奮性を反映～と集合興奮性シナプス後電位の傾き(fEPSP slope)～興奮性シナプス強度を反映～の計測方法

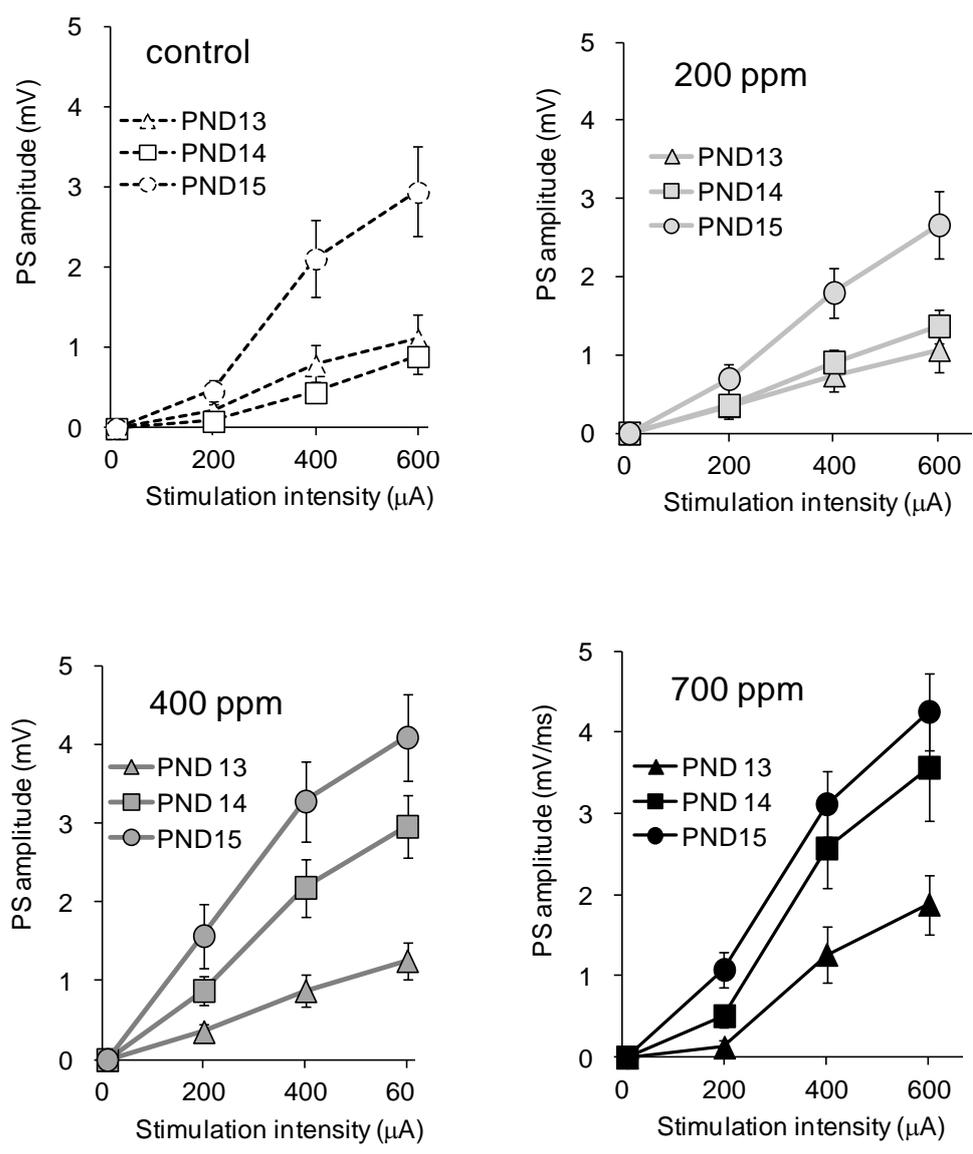


図4 妊娠1日目から20日目まで1BPを吸入曝露した母ラットから生まれた仔ラットの海馬CA1領野における電気刺激に対する集合スパイク電位の大きさ
 吸入曝露濃度は、0（対照群）、200、400、700 ppmとした。刺激電極はCA1領野への入力シナプスのある放線状層に置き、記録用微小電極は錐体細胞層に置いた。電気刺激の強度は10、200、400、600 μAに設定した。曝露濃度400 ppm群および700 ppm群で、開眼前のPND14において刺激応答性の亢進が認められた。データは平均値±SEMで表している。

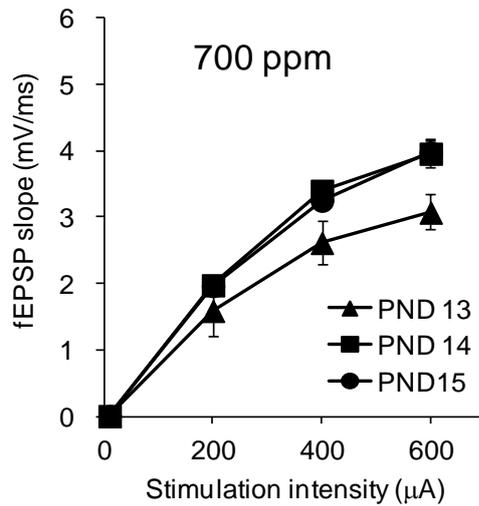
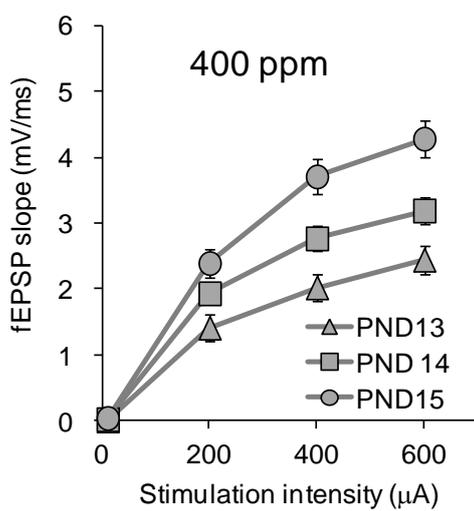
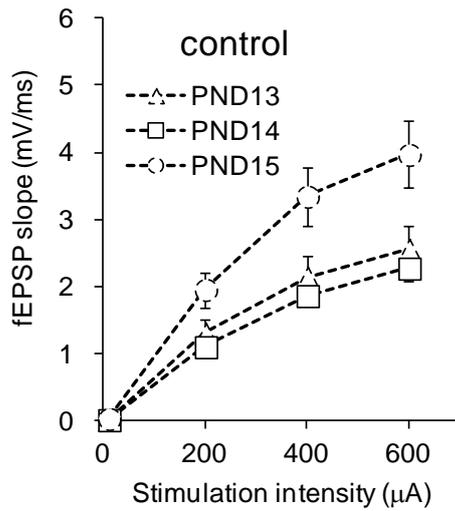


図5 妊娠1日目から20日目まで1BPを吸入曝露した母ラットから生まれた仔ラットの海馬CA1領野における電気刺激に対する興奮性シナプス強度の変化

図4において、対照群と比べて集合スパイク電位の振幅が亢進していた、400、700 ppm曝露群について解析した。400 ppm群と700 ppm群において、集合スパイク電位の亢進と同様に、開眼前のPND14において興奮性シナプス強度の増強が認められた。* $p < 0.05$, repeated measure ANOVA

刺激電極と記録用微小電極はCA1領野への入力シナプスのある放線状層においた。データは平均値 \pm SEMで表している。

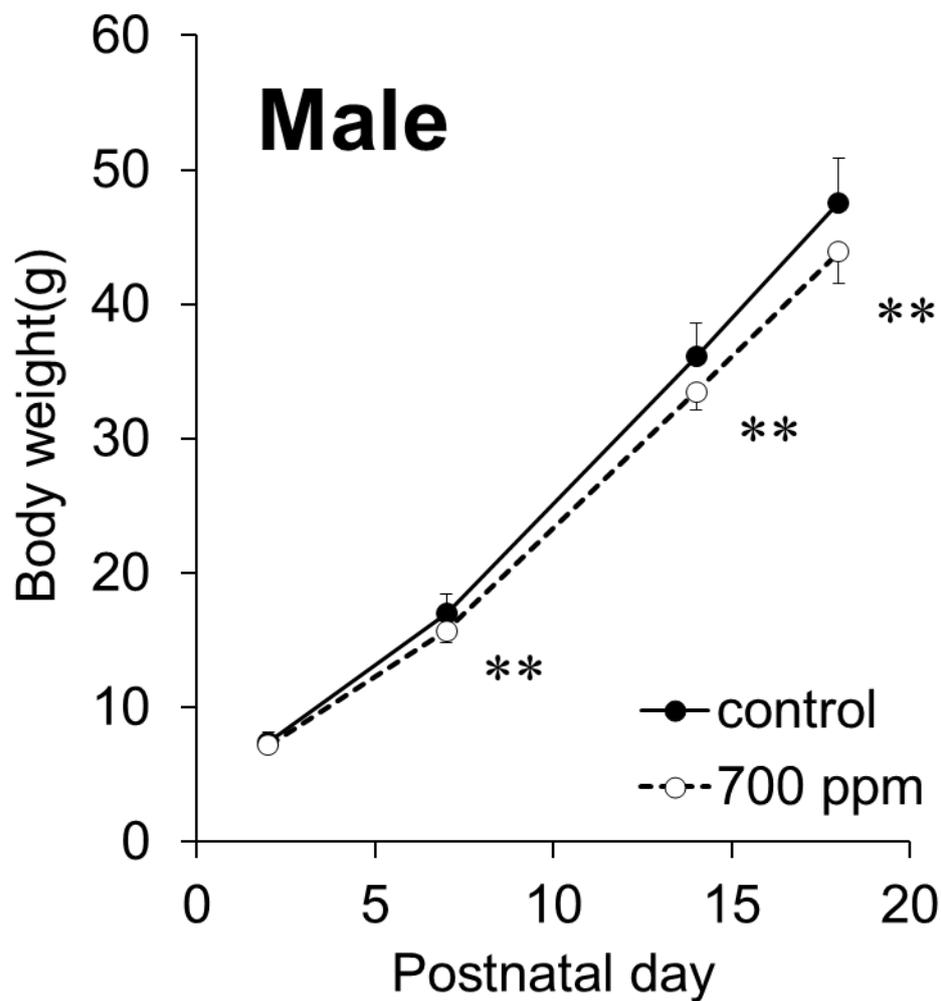


図 6 妊娠期に 20 日間 1BP を吸入曝露した母ラットから生まれた仔ラットの授乳期の体重変化

対照群と比較して、700 ppm 群では生後 2 日目では有意差が認められなかったものの、生後 7 日から 18 日までの計測において体重増加の有意な抑制が認められた。データは平均値±SD で表している。**p<0.01, Student's t-test

5 w Male

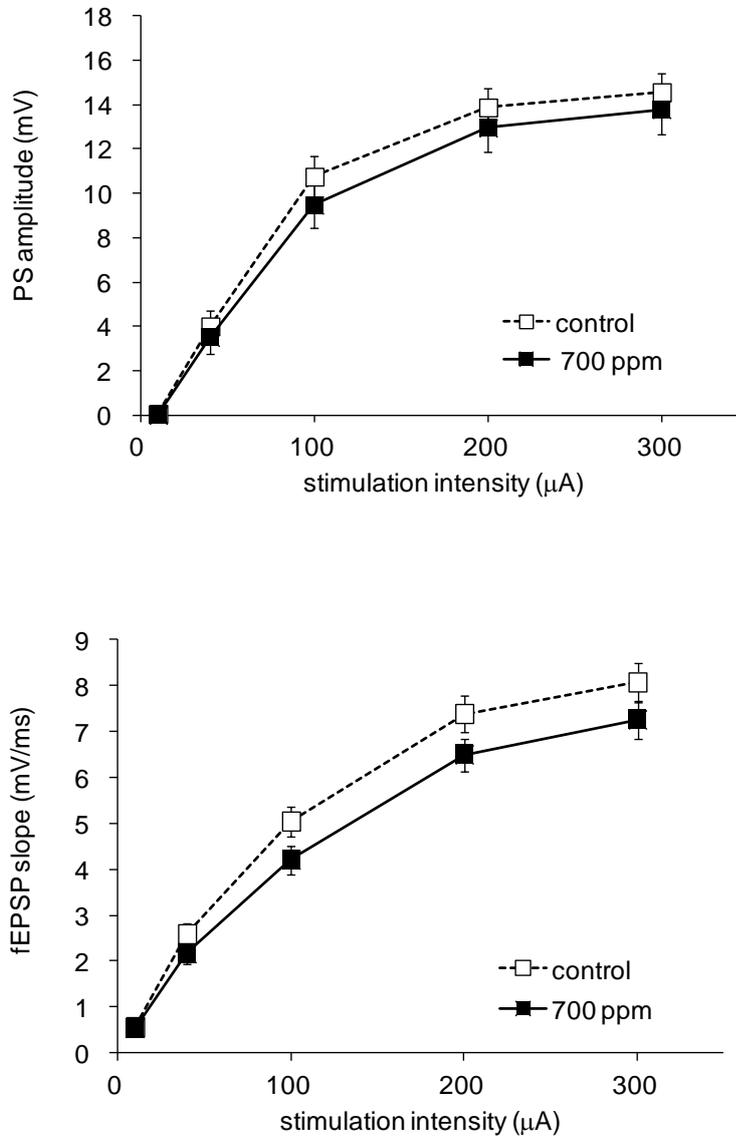


図7 妊娠期に1BPを吸入曝露した母ラットから生まれた雄性仔ラットの5週齢における海馬CA1領野の刺激応答性

集合スパイク電位の振幅、集合興奮性シナプス後電位の傾きのいずれにおいても、対照群と700 ppm群との間に有意差は認められなかった。(PS amplitude: $p=0.52$; fEPSP slope: $p=0.22$, repeated measure ANOVA)

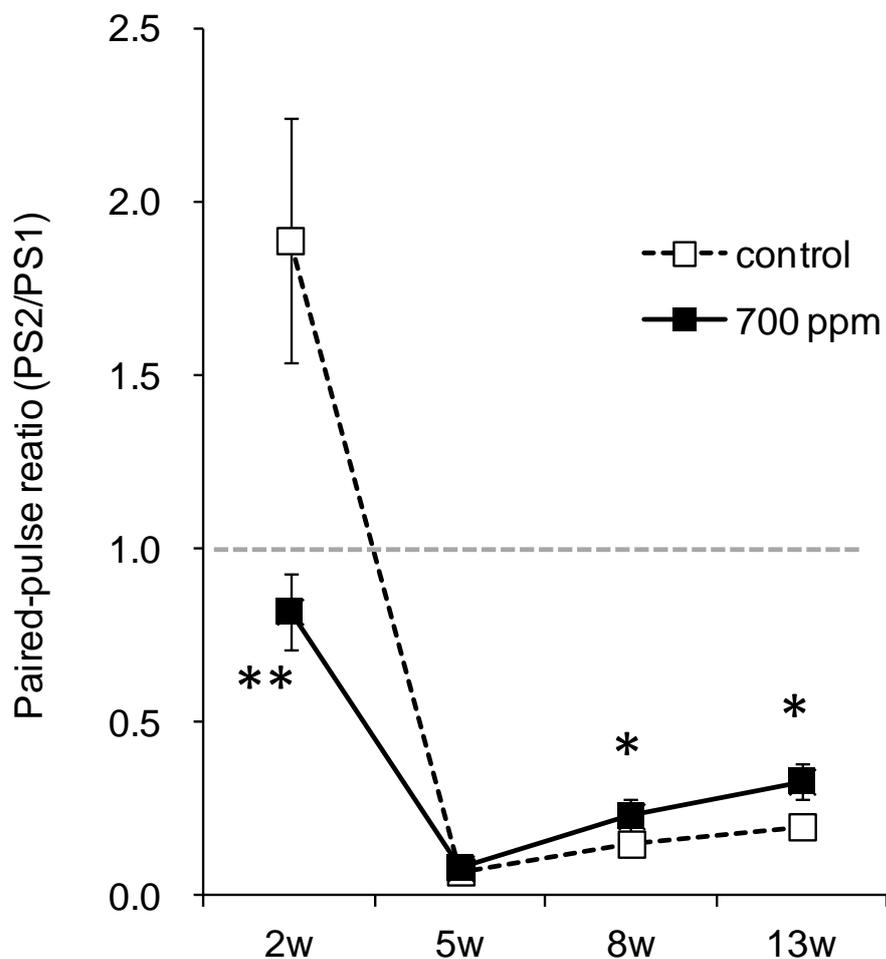


図 8 妊娠中に 1BP を吸入曝露した母ラットから生まれた雄性仔ラットにおける海馬 CA1 領野のペアパルス比の成長に伴う変化

対照群において、2 週齢では促通効果（ペアパルス比 > 1.0 ）が認められたが、5, 8, 13 週齢でのペアパルス比は 0.2 以下となり、著明なフィードバック抑制の形成が示唆された。これに対して、1BP 胎生期曝露群では、2 週齢でペアパルス比 < 1.0 となり、軽度ではあるがフィードバック抑制が形成されていることが判明した。さらに性成熟後の 8 週齢、13 週齢には対照群と比べてペアパルス比が有意に増加しており、フィードバック抑制が減弱していることが示唆された。破線はペアパルス比 = 1.0 を示しており、これは 2 連続刺激に対する 2 つの応答（誘発電位）が独立事象、すなわち 1 回目の刺激応答と 2 回目の刺激応答とが完全に独立していることを意味する値である。

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

既存の毒性データおよびヒトデータとの検証

研究分担者 国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所
周産期病態研究部・産婦人科学 部長
秦 健一郎

要旨

近年、妊娠中の母親の摂取栄養の程度や栄養成分の偏りが、胎児のエピゲノムに影響し、生後の発育や疾患の発症に寄与するという **Developmental Origins of Health and Disease**、**DOHaD** という概念が提唱されており、そのメカニズムについても明らかになりつつある。本研究では動物実験を中心に **DOHaD** のメカニズムについて文献調査を行った。また、ヒトのエピゲノムデータに関しても調査を開始した。

A. 研究目的

出生前後の環境が数十年後の疾患発症に関連していることが、疫学研究により明確に示されている。この現象を司る分子機構の一つとして、エピジェネティックな制御が示唆されており、それを裏付けるデータも集積してきている。これらの知見を背景に **DOHaD** (**Developmental Origins of Health and Disease**) 学説が提唱され、予防医学や先制医療の観点からも注目されている。また、このメカニズムを介して疾患発症を引き起こす出生前後の環境要因についても、栄養環境だけではなく、様々な要因の関与が示唆されている。本研究では、**DOHaD** のメカニズム解明を目的に行われたこれまでの動物実験の報告より、とくに化学物質の影響に着目した報告を取りまとめることを目的とした。さらに、ヒトを対象とした研究で報告されている、児のエピゲノムに影響を及ぼす出生前後の環境要因についてこれまで明らかになっているものを整理する目的で文献調査を行った。

B. 研究方法

DOHaD 学説をもとに、動物実験によりメカニズムの解析を行っている文献を調査した。同じく、同学説に基づきヒトのエピゲノムデータを解析している文献についても調査研究を行った。

C. 研究結果

エピゲノムすなわちエピジェネティックな

情報とは、ゲノムを変化させずにはたらしきを決め、しかもゲノム (DNA の塩基配列) を介さないにもかかわらず「遺伝」する情報のことである。エピゲノムを担う代表的な分子の実体として、ヒストンのメチル化・アセチル化や、DNA のシトシンのメチル化が挙げられる。哺乳類の初期発生時には特に、これらのエピゲノムがダイナミックに変化して消去と再構築されることが知られている。具体的には、受精直後に精子由来のメチル化は速やかに消去され (能動的脱メチル化)、卵子由来のメチル化はそれに遅れ、DNA 複製依存的に維持されずに失われていく (受動的脱メチル化)。親由来の DNA メチル化修飾情報はこのように、大部分が一度消去され、その後胚盤胞期まで低メチル化状態にある。着床後、それぞれの細胞は複数の DNA メチル化酵素によって、発生段階特異的かつ組織特異的な DNA メチル化修飾を確立する。このように、受精後から発生初期に観察されるエピゲノムの初期化と再構築の時期は、可塑性に富んでいると考えられ、この時期の環境負荷により DNA メチル化状態の違いが生じれば、その違いは長期にわたりそのまま残っている可能性が考えられる。もともと DNA メチル化は、細胞が分裂しても安定して娘細胞に情報が維持される性質を有しており、そのような特徴もこの可能性を支持する点である。したがって、**DOHaD** 学説はこの時期のエピジェネティックな制御に注目している。さらに、**DOHaD** 学説が注目する受精時、胎児期、新生児乳幼児期の環境には、栄養環

境だけではなく、内分泌かく乱物質などの影響や、喫煙や飲酒の影響、母体の精神状態に起因する内分泌の乱れ、等も含まれる。

(1) 妊娠中の神経内分泌異常の胎児への影響について

妊婦の精神的ストレスが、胎児の内分泌系にかかわる遺伝子のエピゲノム変化を誘導する可能性は、検証数を重ねることで確実性を増してきている。胎児の視床下部-下垂体-副腎の神経内分泌系、いわゆる HPA axis は、妊娠 22 週目より発達し 2 歳までの間は可塑性があることが知られている。したがって、妊娠中の母体のストレス経験が胎児の HPA axis をプログラムし永久的にその機能を変化させる可能性がある。Palma-Gudiel らによる 7 論文に基づく 977 人の被験者のメタ解析の結果は、妊娠中の不安状態やうつ傾向が、児のグルココルチコイドレセプター (GR) 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化レベルと有意に相関することを示している。メタ解析で対象とした 7 論文のうち 3 論文は 136 名、25 名あるいは 74 名分の臍帯血 DNA メチル化値を測定しており、残り 4 論文は、胎盤 (482 名分)、生後 2 か月前後の口腔粘膜 (56 名分)、14 か月時前後の唾液 (181 名分)、14 歳前後の末梢血 (23 名分) を解析している (Palma-Gudiel H et al. *Epigenetics* 2015)。この領域の DNA メチル化が上昇していると、GR 遺伝子の発現抑制によるグルココルチコイド不応性、抵抗性、が亢進するため、社会心理的ストレスに脆弱性を示す可能性が示唆されている。

(2) 外因性内分泌かく乱物質の胎児、新生児脳発達への影響について

主にポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂などの原料として使用され、広く環境中に存在する合成エストロゲンのビスフェノール A (BPA) を含み、外因性内分泌かく乱物質である環境ホルモンなどの化学物質への暴露が、自閉症など社会的障害に分類される神経行動障害の発症に関与している可能性が示唆されている。BPA はアメリカ人の 93% の尿中で検出されており (Calafat et al. *Environ. Health Perspect.* 2008)、胎盤を通過することより胎児血清や、母乳中にも検出される。ヒト血中レベルの BPA の妊娠期間中マウスへの暴露は、出生直前 (E18.5) の雌胎仔マウスの脳内の DNA メチル化酵素 Dnmt1 と Dnmt3a 量減少とグルタミン酸トランスポーター Slc1a1 発現を上昇させた

(Wolstenholme et al. *PLoS One.* 2011)。子宮内の BPA 暴露によって生後 28 日目の雌仔マウスの海馬 Bdnf の発現が上昇し、一方で雄仔マウスが減少。この影響は雌雄ともに生後 60 日目まで確認され、雄マウスの発現低下は Bdnf プロモーターの高メチル化と連動していた。さらに、ヒトにおいても妊娠中の血中の BPA 濃度が高かった母親から生まれた男児の臍帯血 DNA で BDNF のメチル化が高くなった (Kundakovic et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014)。最近の報告では、人体に影響はないといわれている濃度以下での動物実験において、妊娠中の BPA 暴露が新生仔の脳内の遺伝子発現を変化させている。影響に性差が認められる結果は一致しており、新生雌ラットでは、視床下部におけるエストロゲンレセプター α 、 β の発現と、海馬と視床下部のオキシトシンの発現が上昇していた。一方新生雄ラットでは海馬のオキシトシンの発現が減少していた (Arambula et al. *Endocrinology.* 2016)。妊娠中の BPA 暴露の影響は、孫世代の仔の行動異常にも認められた (Wolstenholme et al. *Horm Behav.* 2013)。

(3) 胎児期の外因性内分泌かく乱物質暴露が成人期の生殖能に及ぼす影響について

胎仔期・新生仔期の外因性内分泌かく乱物質への暴露が精子のインプリント領域 DNA メチル化異常を誘引し、その精子で受精した胚は最終的に流産あるいは不妊・不育症の原因となることが動物実験で報告されている (Guerrero-Bosagna et al. *Curr Opin Genet Dev.* 2014)。ゲノムインプリンティングは哺乳類が進化する過程で獲得した機構と考えられている。インプリンティング遺伝子とは、片親のアレル特異的に発現する遺伝子を指し、およそ数百個のインプリンティング遺伝子が存在すると推測されている。片親アレル特異的発現を制御する機構として、インプリンティング遺伝子の周辺領域には、片親のみでメチル化されているゲノム領域、すなわち、父親性あるいは母親性インプリント領域 (インプリンティングの分子の実体であるインプリントを有する領域) が存在する。インプリント領域で認められる DNA メチル化は、一般の遺伝子で認められる遺伝子の発現抑制のみではなく発現誘導にも機能する。インプリンティング遺伝子は、片親のアレルのみから発現することで、発生段階において厳密な発現量を保ちその機能が過剰に働くことを回避している。稀な先天奇形症候群である

インプリンティング疾患は、インプリンティング遺伝子にジェネティックな変異を持つか、インプリント領域にエピジェネティックな変異を持つことを原因とする疾患であり、胎児と胎盤の発生異常を特徴とすることが知られている。これまでに、原因不明と診断された習慣性流産を呈す父親の精子ゲノムにおいて H19 インプリント領域の有意な低メチル化が報告されている。精子ゲノムの H19 インプリント領域の低メチル化は不育症、乏精子症、精子無力症の患者においても認められている。

インプリント領域の DNA メチル化は、ゲノム全体のエピジェネティック情報の書き換えが行われる初期胚発生時において、受精直後のゲノム全体の脱メチル化から免れる機構を持っており、母親性あるいは父親性それぞれのインプリントメチル化情報が受精後も胚組織に維持される。母親性・父親性インプリントメチル化情報はそれぞれ卵子精子とも、生殖細胞の発生時期に確立される。DNA メチル化修飾のない始原生殖細胞から、雄性生殖細胞系列では胎児期にインプリント領域を含めメチル化修飾がゲノムに入り、出生前の精原細胞ではすでにゲノム全体が高メチル化されている。一方、雌性生殖細胞系列では、出生後の卵母細胞成長期にメチル化修飾が入る。したがって、少なくとも精子においては、胎児期のエピゲノム修飾獲得が鍵となり、その修飾状態が生涯にわたり維持され、妊孕能、胚発生・分化能に関与している可能性が示唆される。父親自身の胎児期環境が、この機構の確立に影響を及ぼし、次世代に影響する可能性が示唆されている。

新生仔期の BPA への暴露により、H19 インプリント領域の有意な低メチル化と遺伝子発現異常が認められ、かつこのラットの精子で受精した胚は着床後胚損失が生じた (Doshi et al. Mol Biol Rep. 2013)。農業用の防カビ剤の成分であるビンクロゾリンの胎仔の生殖腺の性分化が行われる時期の妊娠中雌ラットへの暴露は、胎仔の精子エピジェネティック異常と精子形成細胞のアポトーシスが 3 世代後まで遺残する (Anway et al. Science. 2005)。世代を超えたエピジェネティクス異常がいくつかのインプリント領域で生じる一方、世代を超えるごとに徐々に正常化する (Stouder et al. Reproduction. 2010)。ビンクロゾリン暴露による精子エピジェネティックへの影響は、胎仔期の中でも始原生殖

細胞ゲノムの DNA メチル化が一度すべて消去される時期での暴露が顕著 (Skinner et al. PLoS ONE. 2013) であったことより、始原生殖細胞における親由来の DNA メチル化情報の消去が正常に行われることが生殖能力に重要であることも示唆されている。

(4) 世代を超えて遺残する環境の影響

環境の影響は、本人のみではなく、世代を超えた影響がありうることで、その分子機構の解明が、近年多数報告されている。つまりは、ここまで述べてきた対象者の胎児期や新生児・乳幼児期だけでなく、対象者の親が若い頃の環境や、祖父母が経験した環境の影響にも注目が集まっている。

慢性的な高脂肪食下にあるオスのラットを親とするメスは、適正な食餌を与えても糖代謝異常と β 細胞機能不全が認められ、対照群に比べ膵島で多くの遺伝子の発現量が異なっており、プロモーターの DNA メチル化状態が異なっている遺伝子も同定された (Ng et al. Nature 2010)。また、若い時にタンパク質欠乏食を与えられたオスは、その後適正な食餌を与えても、自身の仔の肝臓で代謝にかかわる多くの遺伝子の発現が異常を呈し、脂質代謝のマスターレギュレーターである Ppara の DNA メチル化が異なっていた (Carone et al. Cell 2010)。これらの報告が 2010 年に共に発表されて以来、父親の生活環境が次世代に影響する現象とその分子機構の解明に関する報告がこれまでに集積してきている。不適切な食事負荷により糖尿病予備軍にあるマウスでは、精子の DNA メチル化パターンが健常のそれと異なっており、この異常メチル化パターンが世代を超えて仔の膵島でも確認され、仔世代の代謝異常を引き起こしていることが報告された (Wei et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014)。一方で、世代を超えて食事の乱れの影響が伝わるメカニズムは、DNA メチル化そのものの遺残ではないという報告もある。解析対象となるマウス (第 3 世代) の父 (第 2 世代) が、父自身の母親 (すなわち解析対象から見ると祖母、第 1 世代) の胎内にいる時期に栄養不良に曝されると、その時期の父 (第 2 世代) の生殖細胞に DNA メチル化変化が起き、出生後も精子メチル化パターンの変化が遺残し、その影響が解析対象 (すなわち、栄養不良だった妊娠マウスから見ると孫、第 3 世代) の代謝異常を引き起こしている可能性が示された (Radford et al. Science 2014)。この論文で

は、父（第2世代）の異常精子メチル化パターンは、仔（第3世代）の脳と肝臓には伝わっておらず、直接の代謝異常の原因ではないことが示唆される。前述したように、胚の発生初期には親由来のエピジェネティックな情報は一旦消去されて再構築されるため、これは理にかなっている。ところが、解析対象マウスの体組織において異常な発現が認められる遺伝子は、解析対象（第3世代）から見て祖母（第1世代）の栄養不良に伴い父（第2世代）の精子で観察される DNA メチル化異常領域の近傍にある遺伝子であり、やはり何らかの因果関係があることが強く示唆される。DNA メチル化以外の分子機構、例えばヒストン修飾の異常による伝達が候補に挙げられるが、実際にヒストン修飾の乱れが世代を超えて伝わる可能性も報告されており（Siklenka et al. Science 2015）、あるいはオスの食環境の乱れが精子内の RNA 分子を介した伝達をする可能性も示され（Sharma et al. Science 2016）、今後の研究発展が注目される。現在のところ、これらの分子機構は動物モデルにおける検証にとどまっているが、ヒトでも同様の分子機構が存在する可能性は十分に考えられる。

(5) 妊娠中の喫煙はヒト臍帯血の解毒や免疫機能に関わる遺伝子（AHRR、MYO1G、CYP1A1、CNTNAP2 など）のメチル化を変化させ、この変化は17歳時点の血液中でも継続した（Richmond et al. Hum Mol Genet. 2015）。

D. 考察

上記の調査研究により、以下のことが示唆された。

- ・胎仔期・新生仔期の環境要因の影響が出生後も持続して認められる。
- ・ヒトでも同様に、胎児期・新生児期はエピゲノムがダイナミックに変化する時期であると考えられ、環境の影響を受けやすい可能性が十分に予見される。
- ・発生段階の脳では、一過性の発現変化も結果的に不可逆的な脳機能変化を引き起こし、これは初期エピジェネティックな調節異常が遺残するためである。
- ・発生段階の脳において、外因性内分泌かく乱物質暴露によるエピジェネティック異常に伴う機能異常が生じる。
- ・始原生殖細胞における親由来 DNA メチル化情報の消去が正常に行われることが生殖

能力に重要である。

- ・発生初期の子宮内における環境要因の影響が、脳の発達においてエピジェネティックな制御を介し生後遺残する可能性が示されている。
- ・親の生活環境が生殖細胞のエピゲノムを介して、子に影響する可能性がある。
- ・祖母の妊娠中の環境が、親が祖母の子宮内で発生する段階で生殖細胞のエピゲノムを変化させ、孫に影響する可能性がある。

E. 結語

調査研究により、胎児期あるいは新生児期はエピゲノム確立に重要な時期であり、かつ、可塑性の高い時期であるため、この時期のエピゲノムは環境の影響を受けやすく、生じたエピゲノム変化は生後長期に渡って継続し、疾患リスクとなる可能性が示唆された。環境因子は、生殖細胞のエピゲノムを介し、次世代に変化を引き起こす現象も認められており、生殖細胞のエピゲノム確立期、並びに成熟生殖細胞のエピゲノムに変化を及ぼすような環境が、次世代で脳を含めた各臓器でどのような影響を及ぼすのか解明する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Kasuga Y., Hata K., Tajima A., Ochiai D., Saisho Y., Matsumoto T., Arata N., Miyakoshi K. and Tanaka M. “Association of common polymorphisms with gestational diabetes mellitus in Japanese women: A case-control study.” *Endocr J.* (2017) in press
- [2] Sakaki M., Ebihara Y., Okamura K., Nakabayashi K., Igarashi A., Matsumoto K., Hata K., Kobayashi Y. and Maehara K. “Potential roles of DNA methylation in the initiation and establishment of replicative senescence revealed by array-based methylome and transcriptome analyses.” *PLoS One.* (2017) 12:e0171431.
- [3] Liao H., Sato H., Chiba R., Kawai T., Nakabayashi K., Hata K., Akutsu H., Fujiwara S. and Nakamura H. “Human cytomegalovirus downregulates SLITRK6 expression through IE2.” *J Neurovirol.* (2017) 23:79-86.
- [4] Ito Y., Maehara K., Kaneki E., Matsuoka K.,

Sugahara N., Miyata T., Kamura H., Yamaguchi Y., Kono A., Nakabayashi K., Migita O., Higashimoto K., Soejima H., Okamoto A., Nakamura H., Kimura T., Wake N., Taniguchi T. and Hata K. “Novel Nonsense Mutation in the NLRP7 Gene Associated with Recurrent Hydatidiform Mole.” *Gynecol Obstet Invest.* (2016) 81:353-358.

- [5] Nohara K., Okamura K., Suzuki T., Murai H., Ito T., Shinjo K., Takumi S., Michikawa T., Kondo Y. and Hata K. “Augmenting effects of gestational arsenite exposure of C3H mice on the hepatic tumors of the F2 male offspring via the F1 male offspring.” *J Appl Toxicol.* (2016) 36:105-112.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし