

V. 化学物質リスク研究事業・班会議資料

平成 28 年 9 月 2 日開催

平成28年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

「発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発」

(研究課題番号:H28-化学-一般-003)

平成 28 年度 第 1 回班会議 議事次第

日時:平成 28 年 9 月 2 日(金)13 時 30 分～18 時 15 分 (13:00 開場)

場所:八重洲倶楽部 第 7 会議室

(〒104-0028 東京都中央区八重洲 2-1)

<http://www.yaechika.com/access.php>

議事次第:

1. はじめに (13:30～14:00)

開会の挨拶

自己紹介

2. 本研究班の進め方(諫田) (14:00～14:30)

3. 各分担研究者より報告(14:30～18:00)

4. 連絡事項(18:00～18:15)

今後のスケジュール

閉会の挨拶

以上



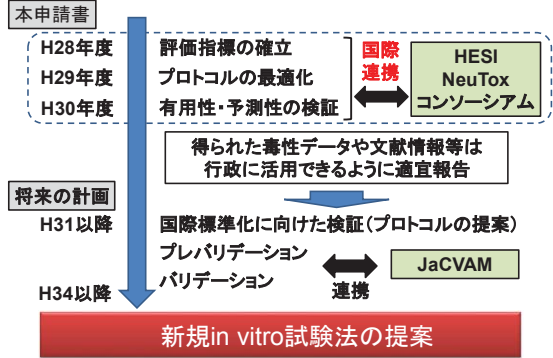
平成28年9月2日

平成28年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

発達期における統合的な 遅発性神経毒性試験法の開発

国立医薬品食品衛生研究所
薬理部
諫田 泰成

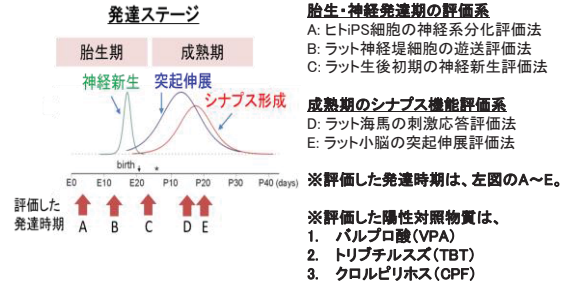
新規試験法の提案を踏まえたロードマップ



本研究班の特徴

1. in vitro試験法確立に向けて、一体となって取り組む
2. 国際的な協調を図る

これまでに確立した評価法の一覧

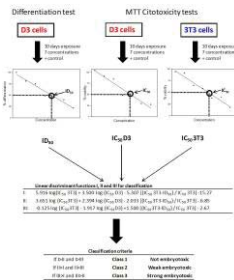


同一の陽性対照物質に対して、胎生期と成熟期における作用を比較し、各発達段階において毒性評価できることを示した。

in vitro試験法の紹介

Embryo Stem cell Test

ESTは2001年にECVAMの諮問機関から生殖発生毒性の代替試験法として提案された。



ES細胞の増殖阻害
ES細胞の分化能(拍動能)の阻害
3T3細胞の増殖阻害

各実験から算出したIC₅₀-3T3、IC₅₀-ES、ID₅₀-ESを決められた計算式で解析

被験物質の生殖発生毒性を評価

試験法の紹介

Embryo Stem cell Test

しかしながら、OECDのガイドライン化には至らなかった。

- その理由として、
- ①様々な毒性メカニズムをもつ多種類の被験物質の検証
 - ②判定法の改良
 - ③神経や骨など心筋以外の細胞への分化誘導系の導入
 - ④代謝の評価の導入等の必要性
- など。


EST法の改良

	Original EST	Hand1-Luc EST
細胞	ES-D3 細胞, balb/c 3T3 細胞	Hand1-ES 細胞
評価項目	ES-IC50	ES-IC50
	ES-ID50	ES-ID50
	3T3-IC50	
測定指標	拍動(顕微鏡)	ルシフェラーゼ活性等
期間	10 日間 (4 工程: 0, 3, 5, 10 日目)	5 日間 (2 工程: 0, 5 日目)

TOXICOLOGICAL SCIENCES 124(2), 460-471 (2011)

予測性がまだ高いとはいえ、さらに改良する必要性

統合的なアプローチが必要



HESI Translation Biomarkers of Neurotoxicity (NeuTox) Committee

Activities and Accomplishments

2015-2016

ILSI Health and Environmental Sciences Institute

HESI Subcommittee: Pilot Study Protocol

Main objective: identify circulating biomarkers that predict central & peripheral neurotoxicity resulting from exposure to a known and well-characterized neurotoxic agent by correlating them with behavioral, imaging, morphometric and neuropathological endpoints.

- US FDA NCTR contributing rats, lab space and imaging – timeline Sept – Nov 2015.
- Prototypical compound trimethyltin (TMT).
- Time-course assessments of blood, CSF, CNS, urine and imaging (MRI, MRS) compared to traditional assessment (i.e. functional (behavioral), and histopathology)
- Dosing at 8 mg/kg
- Sample collection, behavioral analyses and MRI/MRS imaging at 2, 6, 10, 14, 21 days



ILSI Health and Environmental Sciences Institute

9

Additional accomplishments

- Subteam formed to explore possible project to identify seizuregenic compounds using microelectrode array (MEA).
- Session planned at the 2015 Safety Pharmacology Society Annual Meeting in September.



ILSI Health and Environmental Sciences Institute

10

Increases in Autism Spectrum Disorders in USA

Surveillance Year	Birth Year	Number of ADDM Sites Reporting	Prevalence per 1,000 Children (Range)	This is about 1 in X children...
2000	1992	6	6.7 (4.5-9.9)	1 in 150
2002	1994	14	6.6 (3.3-10.6)	1 in 150
2004	1996	8	8.0 (4.6-9.8)	1 in 125
2006	1998	11	9.0 (4.2-12.1)	1 in 110
2008	2000	14	11.3 (4.8-21.2)	1 in 88

(Data from CDC)

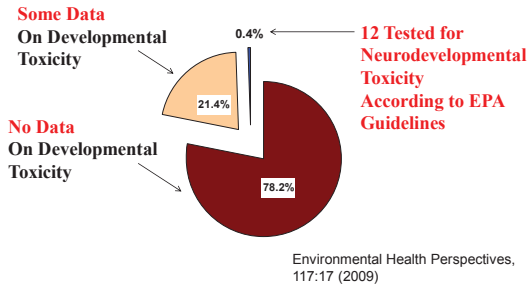


DNT testing



Developmental Neurotoxicity Testing for 2,863 Chemicals

Produced Above 1 million pounds/year



Current Status of DNT Testing

- Large numbers of chemicals identified for testing (e.g., pesticide) with no risk-based criteria for setting testing priorities
- Different regulatory authorities/different testing requirements with no scientific basis for flexible testing approach
- Current guideline testing is expensive, time consuming and requires large numbers of animals

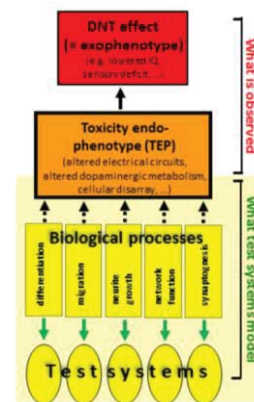
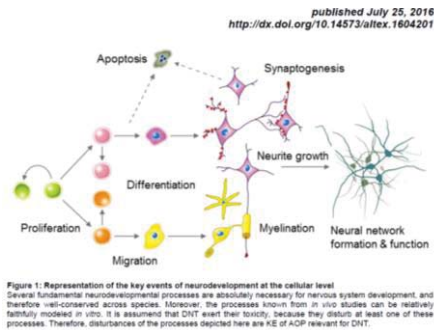
Research Challenge

- Develop alternative testing approaches that are fast and efficient
 - Use *in vitro* cell culture or *in silico* models
 - Use alternative species (non-mammalian)
- Provide data for prioritization of chemicals for further testing (targeted?)
- Such an approach will:
 - Reduce costs and animal use
 - Facilitate screening of large numbers of chemicals (*high-throughput*)

Research Approach - In Vitro

- In vitro tests based on key events of CNS development
 - proliferation, differentiation, growth, synaptogenesis, myelination, apoptosis
- Endpoints amenable to high throughput testing
 - cell-based endpoints, biomarkers, molecular signaling
- Show predictive ability based on “training set” of developmental neurotoxicants

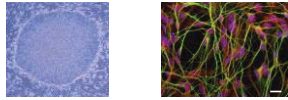
Key events of DNT at the cellular level



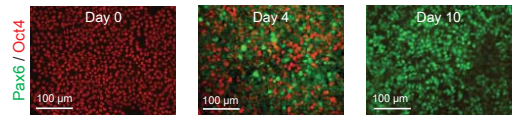
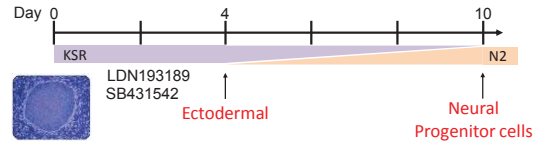
ヒトiPS細胞を用いた 発達神経毒性試験の可能性

1. Time, Cost-consuming
2. High Throughput screening
3. Species difference

in vitro test method using human iPS cells



Neural differentiation by dual SMAD inhibition in human iPS cells

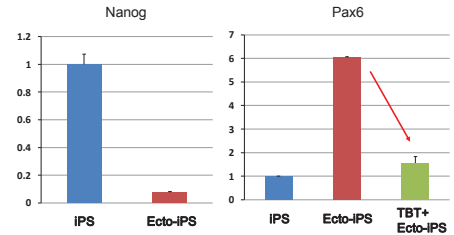


DNT compounds

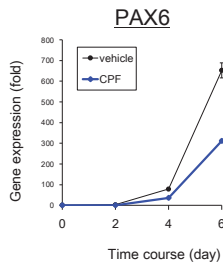
- | | | |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 2-Ethoxyethyl Acetate | Diazepam | Naloxone |
| Acibenzolar-S-methyl | Cytosine Arabinoside | Nicotine |
| Acylamide | DEET | Methoxyethanol, 2- |
| Aldicarb | Deltamethrin | Methylacetymethanol |
| Allethrin | Diazinon | Methylmercury |
| Aluminum (cl or lactate) | Diazinon | Osone |
| Amino-nicotinamide(6-) | Diazinon | Paracetamol |
| Aminopterin | Diethylstilbestrol | Parathion (ethyl) |
| Amphetamine(d-) | Diphanythantoin | PCBs (generic) |
| Arsenic | Epidermal Growth Factor | PCDEs |
| Aspartame | Ethanol | Permethrin |
| Azacylidine(5-) | Ethylene thiourea | Phenylalanine (dl) |
| Benomyl | Fluorouracil(5-) | Permethrin |
| Benzene | Fluazamin | Phenylalanine (dl) |
| Bisallethrin | Fluoride | Phthalate, di-(2-ethylhexyl) |
| Bis(tri-n-butyltin)oxide | Grisofulvin | Propylthiouracil |
| Blephanol A | Halothane | Retinoids/vit. A/isotretinoin |
| Bromodioxuridine(5-) | Hexachlorocyclopentadiene | Salicylate |
| Butylated Hydroxy Anisol | Hexachlorobenzene | Tebuconazole |
| Butylated hydroxytoluene | Hydroxyurea | Tellurium (salts) |
| Cadmium | Imminodipropionitrile (IDPN) | Terbuthaline |
| Caffeine | Ketamine | Thalidomide |
| Carbamazepine | Lead | THC |
| Carbaryl | Lindane | Toluene |
| Carbon monoxide | LSD | Triamcinolone |
| Chlordecone | Maneb | <u>Tributyltin chloride</u> |
| Chloridiazepoxide | Medroxyprogesterone | Trichlorfon |
| Chlorine dioxide | Mepivacaine | Trichloroethylene |
| Chlorpromazine | Methadone | Triethyllead |
| Chlorpyrifos | Methazolol | Triethyltin |
| Cocaine | Methylparathion | Trimethyltin |
| Colcemid | Monosodium Glutamate | Trypan blue |
| Colchicine | MPTP | Urethane |
| Cypermethrin | Naloxone | Valproate |
| Dexamethasone | | Vincristine |
| Diamorphine hydrochloride | | |

From EPA database

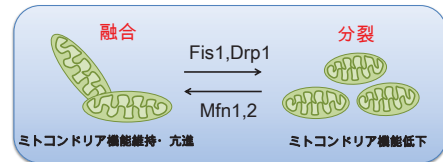
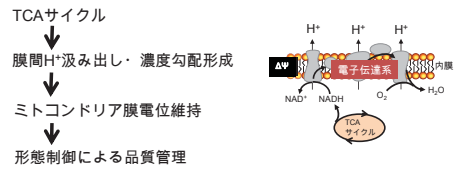
Effect of TBT on neural differentiation



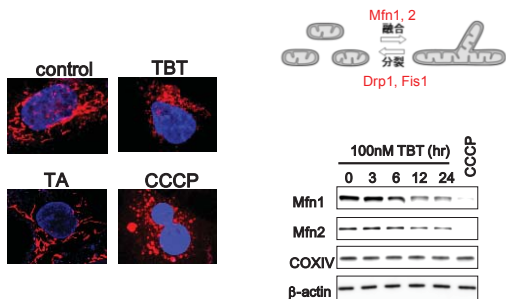
Effect of chlorpyrifos on neural differentiation



ミトコンドリア品質管理の制御

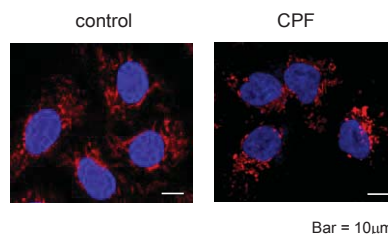


TBTによるミトコンドリア融合タンパク質の分解



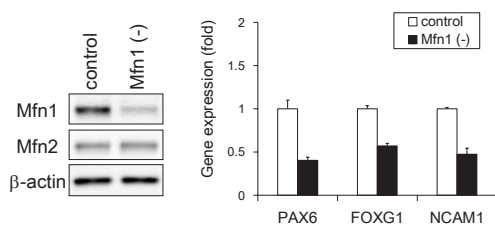
Yamada et al., Metallomics, 2015

ヒトiPS細胞のミトコンドリア形態に対するクロルピリホスの影響



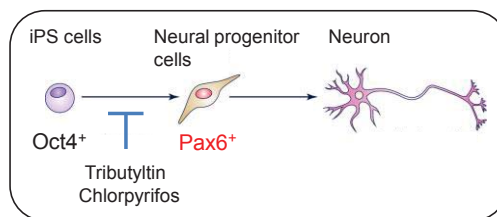
Yamada et al., in preparation

ヒトiPS細胞の神経分化に対するMfn1の影響



Yamada et al., in preparation

Summary



1. Capability of neural differentiation of human iPS cells can be used for assessment of chemicals with DNT.
2. This approach will reduce animal use and costs, facilitate screening of large numbers of chemicals and might provide data for prioritization of chemicals for further testing.

平成28年度厚生労働省科学研究費補助金
(化学物質リスク事業)
「発達期における統合的な発毒性神経毒性試験法の開発」
第1回 班会議 (2016年9月2日)

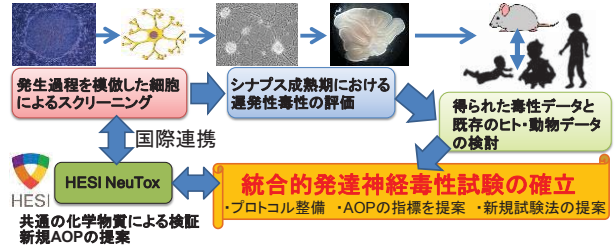
海馬ニューロンを用いた 神経ネットワークによる評価法の開発

分担研究者: 山崎 大樹(国立医薬品食品衛生研究所)
協力研究者: 白尾 智明(群馬大学)

分担研究課題について

すでに開発した生後の発達神経毒性の評価手法に基づき、国際コンソーシアムとの協調、既存の毒性データとの比較により、試験法の有効性・予測性を検証し、統合的な試験法を確立する。

神経スパイクによる神経活動評価法(研究協力者:群馬大学・白尾)
白尾研より提供される凍結ラット海馬ニューロンを用いて、スパイクによるネットワーク活動評価プロトコルを整備し、再現性などを検証する。また、高スループットスクリーニング系の構築を進める。

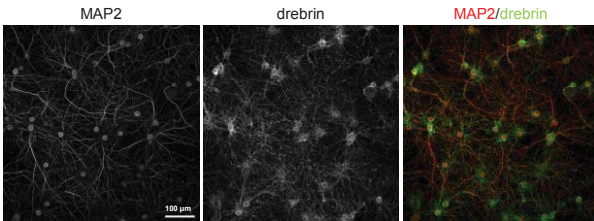


実験材料について

SKY Neuron

- 胎生18日のラット胎仔から海馬神経細胞を単離し、凍結したもの。
- 1 tubeあたり約80万個の細胞が入っている。
- 群馬大学・白尾研より提供いただいている。

21日間培養した際のMAP2とdrebrinの発現



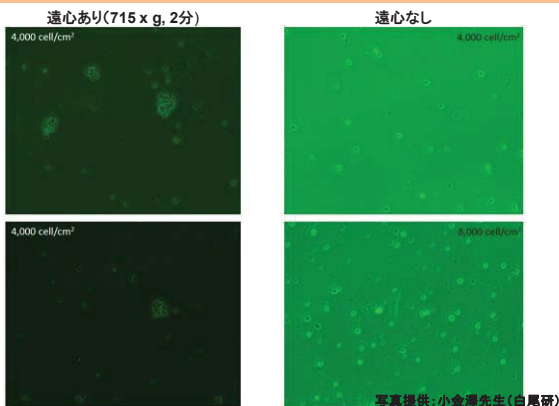
写真提供: 白尾先生

SKY Neuronの解凍

- 前日までにmestroプレートをPEIあるいはPLLでコーティング
- 細胞の解凍1時間前に、5 μlのラミニン(plating mediumに溶解)を各ウェルの電極部分に乗せて1 hrインキュベーター内に静置
- 3分間温浴で解凍
- バイアル中の細胞懸濁液(1 ml)を50 mlコニカルチューブに移し、バイアルを1 ml plating mediumでリンスし、2~5sec/1滴ずつ添加
- 2 ml plating mediumを2~3sec/1滴ずつ添加
- 2 ml plating mediumを少しずつ添加し、ゆっくりと転倒混和...final vol. 6ml
- 細胞懸濁液とトリパンプルーを1:1で混ぜ、適量を血球計算盤に添加し細胞数計測
- 細胞懸濁液を15 mlコニカルチューブに移し細胞を遠心:5180 x g, 5min, 室温
- Sup捨て、タッピング3~4回してほぐす
- カウントした生細胞数を元に懸濁する培地量を計算し、細胞を懸濁
- 5 μlの細胞懸濁液をコートしたラミニン上に乗せる
- プレートの周囲に乾燥を防止するための滅菌水を添加
- 37°C, CO₂ incubate, 1 hr.
- 各ウェルに500 μlのPlating mediumゆつくりと添加
- Incubate, 37°C, 4days
- Day4: Ara Cをculture mediumで溶解し培地交換を交換
- Incubate, 37°C
- Day7で培地交換、その後3-4日あるいは7日おきに培地交換
- 測定

白尾研より提供されたプロトコルを改変

遠心条件の検討



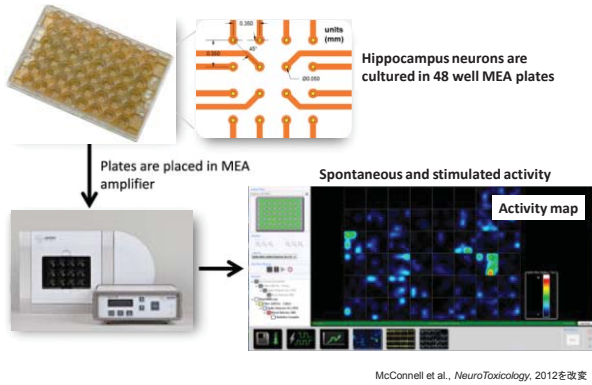
写真提供: 小倉澤先生(白尾研)

解凍時の細胞生存率

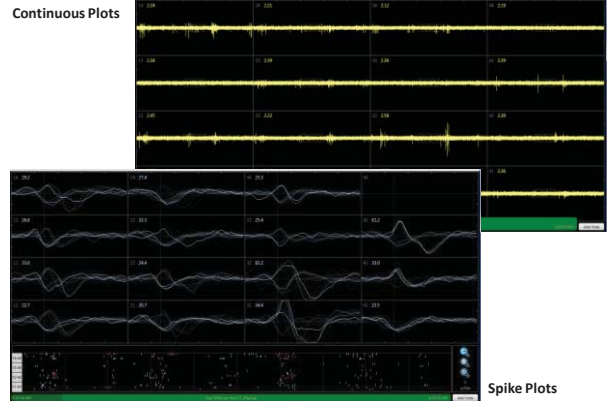
LOT #	細胞数	tube #	living cells	dead cells	Viability(%)	total cells
REH1004	1.3×10 ⁶ cells/tube	3	-	-	-	-
REH1004	1.3×10 ⁶ cells/tube	4	0.86 × 10 ⁶ cells	0.66 × 10 ⁶ cells	56.6	1.52 × 10 ⁶ cells
REH1004	1.3×10 ⁶ cells/tube	5	0.73 × 10 ⁶ cells	0.85 × 10 ⁶ cells	46.2	1.58 × 10 ⁶ cells
REH1004	1.3×10 ⁶ cells/tube	6	0.9 × 10 ⁶ cells	0.7 × 10 ⁶ cells	56.3	1.60 × 10 ⁶ cells
REH1004	1.3×10 ⁶ cells/tube	7	-	-	-	-
REH1006	1.21×10 ⁶ cells/tube	5	1.05 × 10 ⁶ cells	9.0 × 10 ⁵ cells	53.8	1.95 × 10 ⁶ cells
REH1006	1.21×10 ⁶ cells/tube	6	-	-	-	-
REH1006	1.21×10 ⁶ cells/tube	7	2.2 × 10 ⁶ cells	2.2 × 10 ⁶ cells	50.0	4.4 × 10 ⁶ cells
REH1006	1.21×10 ⁶ cells/tube	8	-	-	-	-
REH1006	1.21×10 ⁶ cells/tube	9	-	-	-	-
REH1006	1.21×10 ⁶ cells/tube	10	1.9 × 10 ⁶ cells	2.1 × 10 ⁶ cells	47.5	4.0 × 10 ⁶ cells
REH1009	7.13×10 ⁵ cells/tube	4	0.78 × 10 ⁶ cells	0.69 × 10 ⁶ cells	53.1	1.47 × 10 ⁶ cells
REH1009	7.13×10 ⁵ cells/tube	5	-	-	-	-
REH1009	7.13×10 ⁵ cells/tube	6	1.56 × 10 ⁶ cells	0.78 × 10 ⁶ cells	66.7	2.34 × 10 ⁶ cells
REH1010	8.1×10 ⁵ cells/tube	6	-	-	-	-
REH1010	8.1×10 ⁵ cells/tube	7	-	-	-	-
REH1010	8.1×10 ⁵ cells/tube	8	-	-	-	-

- 生存率は毎回50%程度で安定している。
- 白尾研での細胞数カウントとのギャップが大きい。

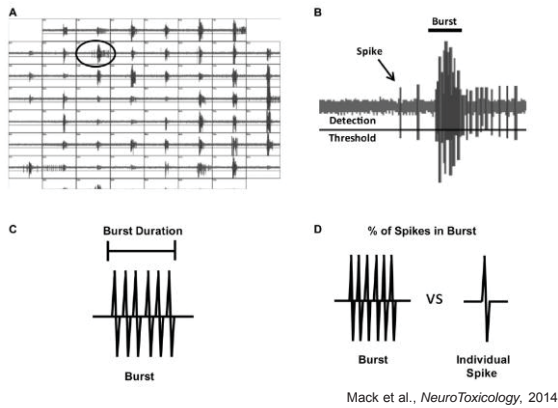
Maestro system 1



Maestro system 2



スパイクの評価系について



実験のタイムスケジュール

DIV	曜日	作業項目
-3~-1		コーティング(PLL or PEI)
Day 0	月 火	Lamininコーティング解除・播種
4	金 土	AraC添加(0.5 or 1 μM)、(Maestro測定?)
7	月 火	Maestro測定、(培地交換)
10	木 金	Maestro測定、(培地交換)
14	月 火	Maestro測定、(培地交換)
17	木 金	Maestro測定、(培地交換)
21	月 火	Maestro測定、(培地交換)
24	木 金	Maestro測定、(培地交換)
28	月 火	Maestro測定、(培地交換)

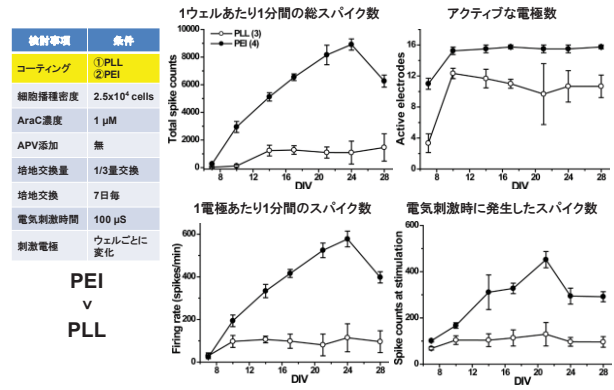
- PLLあるいはPEIコーティングした後は乾燥させ冷蔵庫にて保存可能
- maestroプレートへ播種は生細胞数を採用している
- グリア細胞の増殖を抑制するためにAraCを添加している
- 神経細胞は温度変化に対し弱いため、培養室から実験室への移動にはカルボックスを用いて温度変化を極力避けている



プロトコル整備

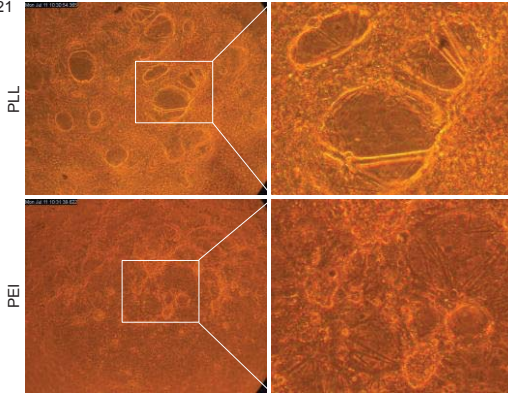
検討事項	Shafer's lab +Axion protocol (Cortical neuron)	条件① (Hippocampus)	条件② (Hippocampus)
コーティング	0.05% PEI⇒ 50 μg/ml laminin	0.05% PEI⇒ 50 μg/ml laminin	50 μg/ml PLL⇒ 50 μg/ml laminin
細胞播種密度	150,000 cells/25 μl	25,000 cells/5 μl	50,000 cells/5 μl
AraC濃度	5 μM	0.5 μM	1 μM
APV添加	無	無	有
培地交換量	半量交換	半量交換	全量交換
培地交換スケジュール	7日毎	3-4日毎	7日毎
投与方法	Acute(Day 12 to 22)	Acute	Chronic
電気刺激持続時間	—	100 μs	200 μs
刺激電極の位置	—	ウェルごとに変化	全ウェル同じ
検討濃度数	1濃度		
測定指標	Mean firing rate Active electrode (< 5 spikes/min) MFR on AE	Mean firing rate Active electrode (< 5 spikes/min) MFR on AE	Spike counts at stimulation

条件検討 -コーティング-



条件検討 -コーティング-

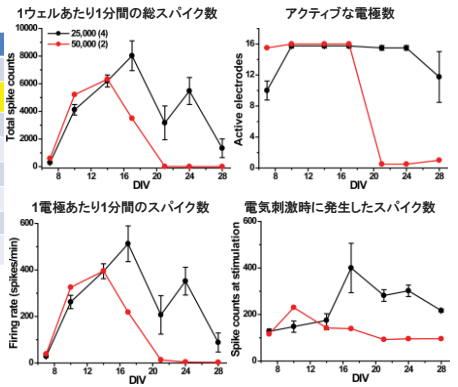
Day 21



条件検討 -細胞播種密度-

検討事項	条件
コーティング	PEI
細胞播種密度	① 2.5×10^4 cells ② 5.0×10^4 cells
AraC濃度	0.5 μ M
APV添加	無
培地交換量	1/3量交換
培地交換	7日毎
電気刺激時間	100 μ s
刺激電極位置	ウェルごとに 変化

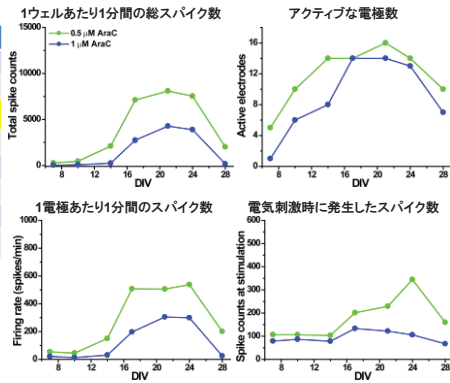
2.5×10^4 cells
v
 5.0×10^4 cells



条件検討 -AraC濃度-

検討事項	条件
コーティング	PEI
細胞播種密度	2.5×10^4 cells
AraC濃度	① 0.5 μ M ② 1 μ M
APV添加	無
培地交換量	全量交換
培地交換	3-4日毎
電気刺激時間	100 μ s
刺激電極位置	ウェルごとに 変化

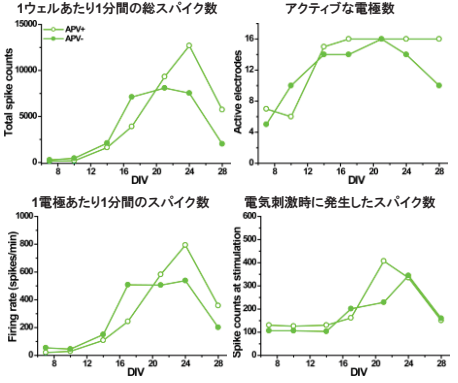
0.5 μ M AraC
v
1 μ M AraC



条件検討 -APV添加-

検討事項	条件
コーティング	PEI
細胞播種密度	2.5×10^4 cells
AraC濃度	0.5 μ M
APV添加	① 有 ② 無
培地交換量	全量交換
培地交換	3-4日毎
電気刺激時間	100 μ s
刺激電極位置	ウェルごとに 変化

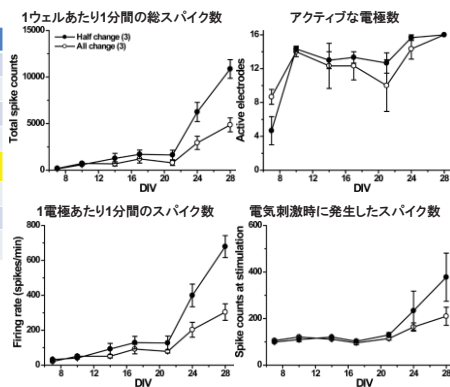
APV-
v
APV+



条件検討 -培地交換量-

検討事項	条件
コーティング	PEI
細胞播種密度	2.5×10^4 cells
AraC濃度	0.5 μ M
APV添加	無
培地交換量	① 半量交換 ② 全量交換
培地交換	3-4日毎
電気刺激時間	100 μ s
刺激電極位置	ウェルごとに 変化

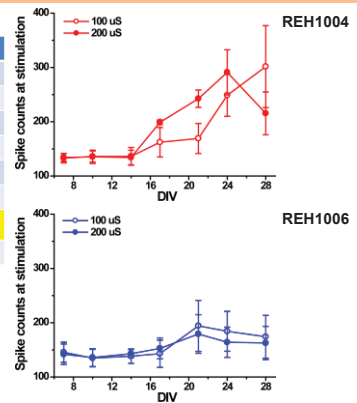
半量交換
v
全量交換



条件検討 -電気刺激持続時間-

検討事項	条件
コーティング	PLL
細胞播種密度	2.5×10^4 cells
AraC濃度	1 μ M
APV添加	無
培地交換量	1/3量交換
培地交換	7日毎
電気刺激時間	① 100 μ s ② 200 μ s
刺激電極位置	全ウェル同じ

100 μ s
||
200 μ s



新規評価指標の候補

Table 1. Features Used in Our Analysis and a Brief Description of How They Were Calculated.

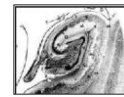
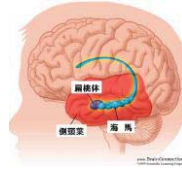
Feature	Description
MFR	The MFR on each electrode was calculated. The well value was the median value of all active electrodes.
Burst rate	The number of bursts per minute on an electrode was calculated. The well value was the median value from all electrodes that exhibited bursting behavior.
Burst duration	The mean duration of all bursts on an electrode over the recording period was calculated. The well value was the median value from all electrodes that exhibited bursting behavior.
Fraction of bursting electrodes	An electrode was classified as bursting if the burst rate on the electrode was at least one per minute. The well value was the number of electrodes classified as bursting as a fraction of the total number of active electrodes on the well.
Within-burst firing rate	The mean firing rate within all bursts on an electrode was calculated. The well value was the median value from all electrodes that exhibited bursting behavior.
Percentage of spikes in bursts	The number of spikes on an electrode classified as being within bursts divided by the total number of spikes on the electrode. The well value was the median value from all electrodes that exhibited bursting behavior.
Coefficient of variation (CV) of IBI	The ratio of the standard deviation to the mean of the length of all IBIs on an electrode. The well value was the median value from all electrodes that exhibited bursting behavior.
CV of within-burst ISIs	The ratio of the standard deviation to the mean of the length of all ISIs within bursts on an electrode. The well value was the median value from all electrodes that exhibited bursting behavior.
Network spike rate	The well value was the number of network spikes on the well per minute of the recording period (see Methods section for definition of a network spike).
Network spike duration	The duration of a network spike was defined as the length of time during which the number of active electrodes on the well exceeded the threshold value (5). The well value was taken as the median duration of all network spikes on the well during the recording period.
Network spike peak	The maximum number of active electrodes during each network spike. The well value was taken as the median peak value of all network spikes on the well during the recording period.
Mean correlation	The correlation between every pairwise combination of electrodes on a well was calculated using the spike time tiling coefficient ³⁹ with $\Delta t = 50$ ms (see Methods section for definition). The well value was the mean of the pairwise correlations between all distinct electrodes on the well. Cottenill et al., <i>J Biol Med Screen</i> , 2016

平成28年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
「発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発」
平成28年度 第1回班会議

研究分担者: 上野 晋
(産業医大 産業生態科学研究所 職業性中毒学)
研究協力者: 笛田由紀子
(産業医大 産業保健学部 作業環境計測制御学)

海馬とは

- 側頭葉の内部にある
- 記憶の司令塔
- 大脳皮質と神経連絡がある
 - 日常的な出来事や覚えた情報等は、海馬の中でいったんファイルされ整理整頓される。その後大脳皮質に蓄積されていく。
- 情動に関する脳内回路の一部
- ラットの海馬も記憶で重要



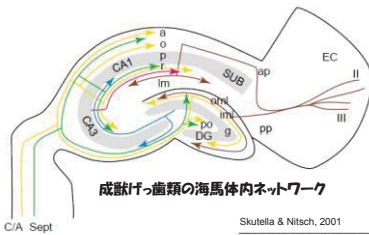
ヒトの海馬の断面図 ラットの海馬の断面図

Craig Watzon (山の明彦 訳) / フォトン神経科学辞典(1995) / モーレル・サイエンス・インターナショナル / Partion: The Rat Nervous System Second Edition (1995) Academic Press

- 海馬の層構造は2つのU字が向き合った層構造(細胞密度が大きいのので黒い線のように見える)。
- 海馬の層構造は、ヒトとラットでは似ている。

ラット海馬スライス標本

- 海馬は秩序だった細胞構築を持つ(ヒトと類似)
- 海馬内の神経ネットワークはすでに研究されている(下図)
 - おもな興奮性シナプス伝達物質はグルタミン酸(ヒトと類似)
 - おもな抑制性シナプス伝達物質はGABA(ヒトと類似)
 - 電気生理学的研究、薬理学的研究によく使用される

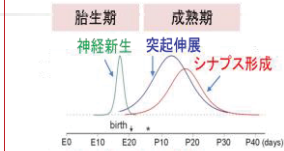


Skutella & Nitsch, 2001
TRENDS in Neurosciences

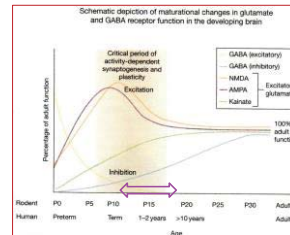
評価時期

生後13-18日齢のラット海馬

発達ステージ



評価した発達時期 A B C D E



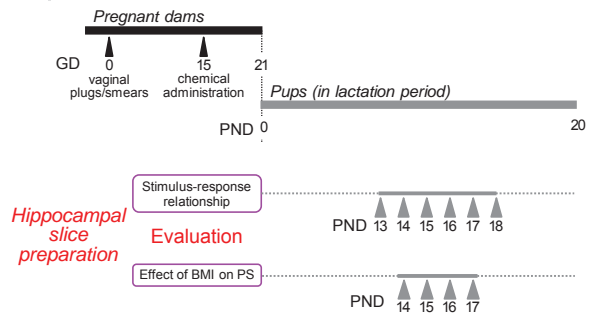
「Neural Circuit Development and Function in the Healthy and Diseased Brain」より

- シナプス形成期にあたる生後13-18日齢の脳はヒトでは生後1-2年に相当する。
- 部位による差があると思われるが、脳としては興奮系・抑制系がともに大きく変化する時期である。

研究の目的

- 胎生期に化学物質を投与した仔ラットについて、日齢13日から18日における海馬の神経回路機能を検討し、遅延性発達神経毒性の評価につながる指標を探索し、in vitro試験法での結果と合わせて新しい試験法の開発に結び付ける。

海馬神経ネットワーク：発達神経毒性評価のためのプロトコール

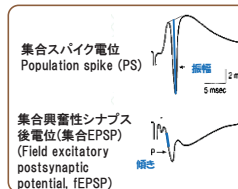
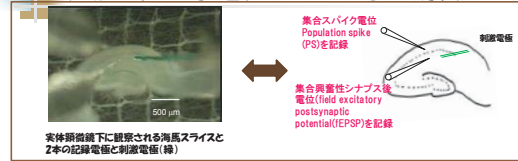


細胞外記録法の特徴

- 細胞外記録法とは、広義には神経細胞近傍に生じる微弱な電気的あるいは電気化学的変化を『電場電位』として調べる記録法。
- 目的の部位に測定電極(ガラス微小電極)を刺入し、十分に離れて電気的変動の少ない部位に基準電極(不関電極)を設けると、神経細胞の集団活動の結果生じる局所のフィールド電位を記録することができる。
- 特徴
 - 多くの神経細胞の電気的な変化を同時にとらえる(同期性)ことができるので、局所の電気的な性質がわかる。
 - 神経細胞膜を流れるイオン電流の総計を電場電位としてとらえる。海馬については生理学的な論理で解釈は可能で、薬理学的にも確認することができる。
 - Intactなスライス標本を作成できれば、技術的な難易度は低い。



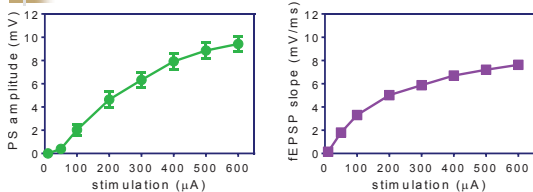
細胞外記録電位の生理学的解釈



電位の解釈

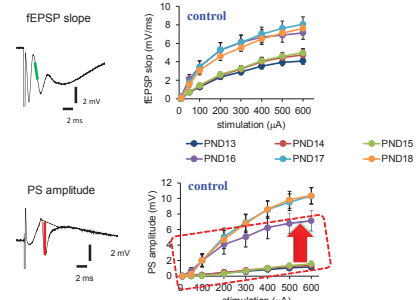
- 神経細胞からの出力特性
 - 集合スパイク電位を記録して、スパイク電位の振幅(青線)を解析する
 - 活動電位を発生している細胞の数を反映
- 神経細胞への入力特性
 - 集合EPSPを記録して、その傾き(青線)を解析する
 - 『fEPSP slope』という
 - 興奮性シナプスの強さを反映

刺激応答性による評価



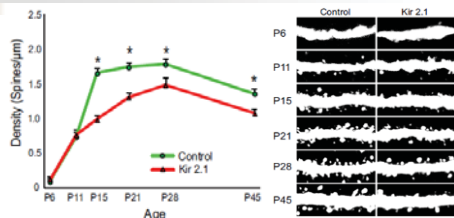
- PS振幅およびfEPSP slopeの大きさの電気刺激依存性を評価する。
- 例えば同じ電気刺激でも応答性が增大していれば、神経回路における興奮性入力(fEPSP slope)あるいは興奮性出力(PS振幅)が増強していることを示す。
- 生後13日齢から18日齢までの日齢ごとの刺激応答性、ならびにその生後発達に伴う変化を指標としている。

生後日齢毎に得られた集合EPSPとPSの刺激応答性



- PND15からPND16にかけて特にPS振幅の刺激応答性が一気に充進する。

最近の知見：海馬CA1領域におけるspine densityの生後増加とその内因性神経活動依存性



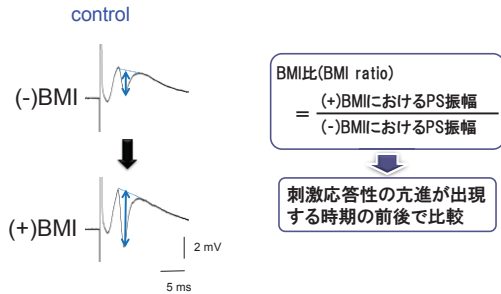
- CA1領域におけるspine densityは生後14日齢前後に急速に増加し最大となる。
- Kir2.1を過剰発現させ、内因性神経活動を抑制したマウスではdensityの増加が認められず、このdensityの増加が内因性神経活動に依存していることが示唆される。

Johnson-Venkatesh EM et al, Development 2015

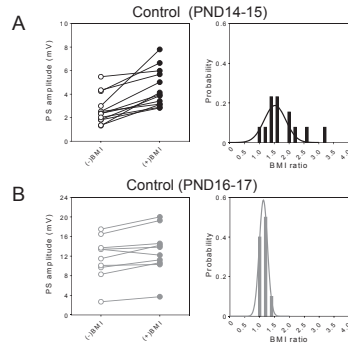
内因性の興奮性活動を調節する“ambient” GABA

- “Ambient” GABAとは・・・
 - シナプス間隙から逸脱してきた神経伝達物質のspillover(溢流)
 - グリア細胞からのCa²⁺非依存性/非小胞性のプロセスによる放出
 - トランスポーターを介した逆輸送などを供給源とするGABAのこと。
- この“ambient GABA”がもたらすものが“tonic inhibition”と呼ばれる持続的な抑制性調節機能であり、神経回路興奮性の調節に関与していると考えられている。
- PS振幅に対してambient GABAによる抑制性調節がどのように関与しているか、また胎生期曝露によりこの調節機能が影響を受けるかどうかを検討することで評価指標に繋げる。

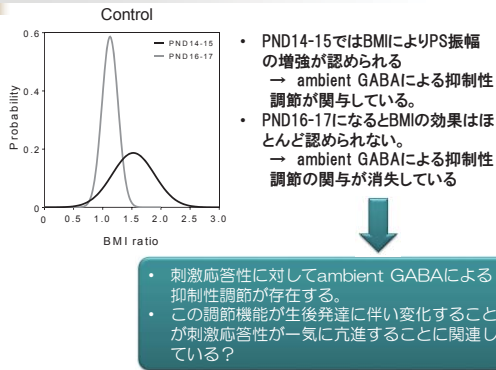
GABA_A受容体拮抗薬ピククリン(BMI、1 μM)のPS振幅に対する影響



PS振幅に対するBMIの効果：正常対照群の場合



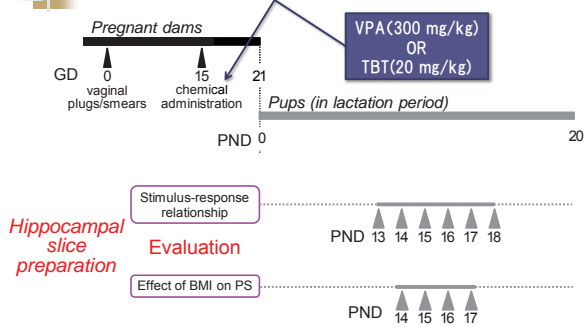
PS振幅におけるBMI比の分布



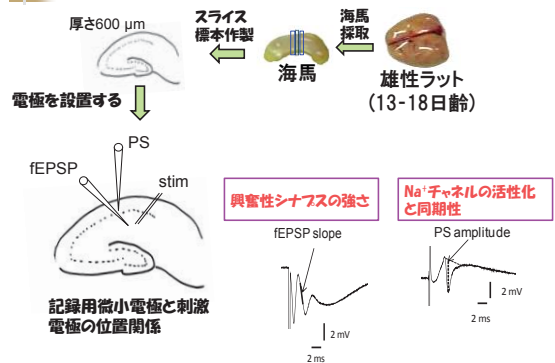
バルプロ酸(VPA)/トリプルスズ(TBT)の胎生期曝露による影響

➤ 回路興奮性:PS振幅とfEPSP slopeにおける刺激応答性を指標とする評価

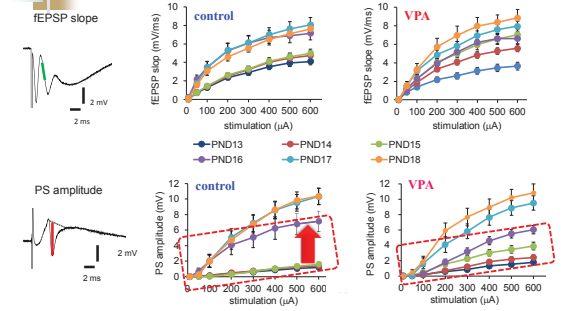
評価プロトコル



海馬スライス標本作成と誘発電位の指標

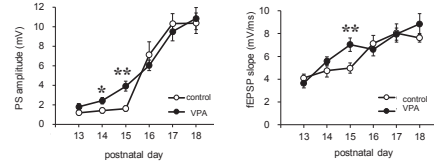


生後日齢毎に得られた集合EPSPと集合スパイク電位(PS)の刺激応答性：VPA



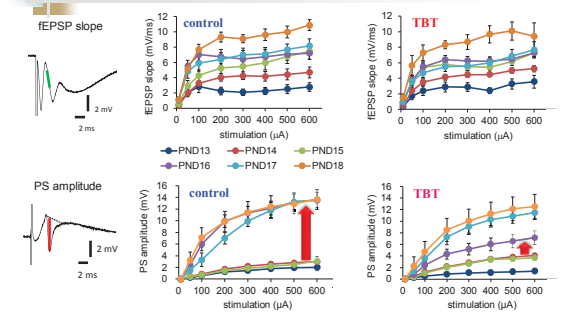
- 対照群ではPND15からPND16にかけて特にPS振幅の刺激応答性が一気に亢進した。しかしながらVPA群ではPND14からPND15の時期にかけて刺激応答性の亢進が徐々に出現し始めた。

VPA胎生期曝露における刺激応答性の発達に伴う変化



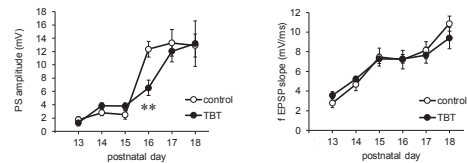
- 刺激電流600 μ AIにおけるPS振幅とfEPSP slopeを、生後13日齢から18日齢にわたる変化として再度グラフ化し、対照群と比較した。
- VPA群のPS振幅では生後14日齢と15日齢で、fEPSP slopeでは生後15日齢で対照群に比べ刺激応答性が有意に増大していた(*p<0.05, **p<0.01)。

生後日齢毎に得られた集合EPSPと集合スパイク電位(PS)の刺激応答性：TBT



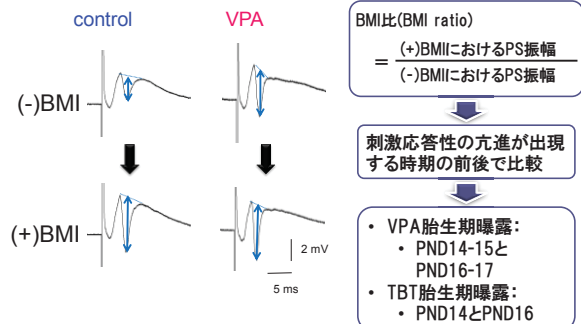
- 対照群と比較して、TBT群ではPND15からPND16に出現する刺激応答性の亢進が小さかった。

TBT胎生期曝露における刺激応答性の発達に伴う変化



- 刺激電流600 μ AIにおけるPS振幅とfEPSP slopeを、生後13日齢から18日齢にわたる変化として再度グラフ化し、対照群と比較した。
- TBT群ではPS振幅の方で生後16日齢における刺激応答性が低く、対照群と比べて有意差があった(**p<0.01)。

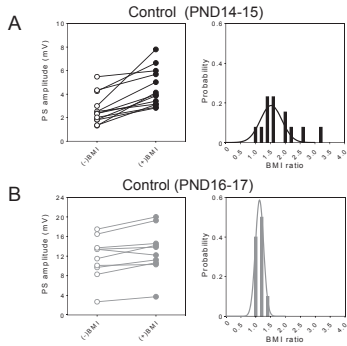
GABA_A受容体拮抗薬ピククリン(BMI、1 μM)のPS振幅に対する影響



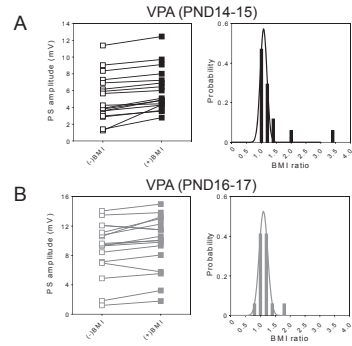
バルプロ酸(VPA)/トリプチルスズ(TBT)の胎生期曝露による影響

- 回路興奮性(PS振幅)に対する抑制性調節の生後発達を指標とする評価

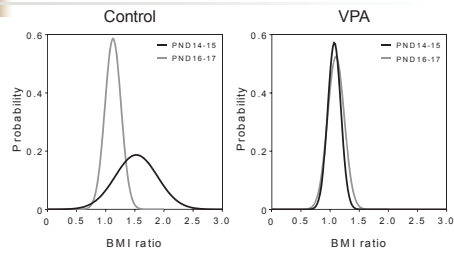
PS振幅に対するBMIの効果：正常対照群の場合



PS振幅に対するBMIの効果：VPA曝露群の場合



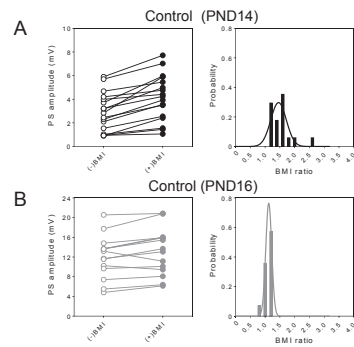
PS振幅におけるBMI比の分布：VPA



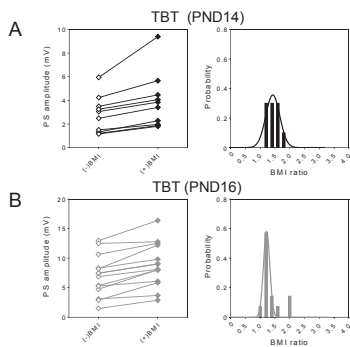
- 対照群で認められる発達に伴う分布の変化はVPA群で認められない。
- 対照群・PND16-17から得られたBMI比の分布はVPA群・PND16-17から得られた分布だけでなくPND14-15から得られた分布とほぼ一致している。

Ambient GABAによる抑制性調節の生後発達に伴う変化が**早期に出現(早熟)**している？

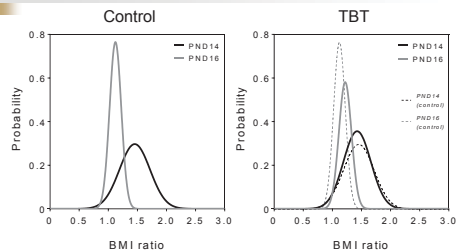
PS振幅に対するBMIの効果：TBT対照群の場合



PS振幅に対するBMIの効果：TBT曝露群の場合



PS振幅におけるBMI比の分布：TBT



- 発達に伴うBMI比分布の変化はいずれの群でも認められる。
- TBT群・PND16の分布は対照群/TBT群・PND14の分布と対照群・PND16の分布との間に位置する。

Ambient GABAによる抑制性調節の生後発達に伴う変化が**停滞/遅延**している？

まとめ

- VPA胎生期曝露ラットでは回路興奮性、およびこれに対する抑制性調節の生後発達における早熟化
- TBT胎生期曝露ラットでは回路興奮性、およびこれに対する抑制性調節の生後発達における遅延(停滞?)を見出した。

授乳期の海馬神経回路機能の発達を評価することが、発達神経毒性の早期スクリーニング手法の一つとして有用となる可能性が考えられた。

発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発
2016 Autumn

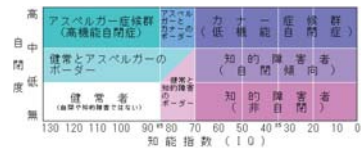
豊橋技術科学大学 環境・生命工学系
吉田祥子

自閉症・こころのもんだい

自閉症, 注意欠陥 多動性障害(ADHD), 学習障害(LD)

自閉症スペクトラム障害(Autism Spectrum Disorder, ASD)
広汎性発達障害(Pervasive Developmental Disorder, PDD)

- 「三つ組の障害」
1. 対人関係の形成が難しい「社会性の障害」
 2. ことばの発達に遅れがある「言語コミュニケーションの障害」
 3. 想像力や柔軟性が乏しく、変化を嫌う「想像力の障害」



Contents lists available at ScienceDirect
Neuroscience and Biobehavioral Reviews
journal homepage: www.elsevier.com/locate/neubiorev

Review article
Autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder in early childhood: A review of unique and shared characteristics and developmental antecedents
Janne C. Visser^{a,b}, Nanda N.J. Rommelse^{a,b}, Corina U. Greven^{a,c,d}, Jan K. Buitelaar^{a,c}

Table 1
Summary of findings on temperament in children with (traits of) ASD or ADHD.

Temperament dimension	6-11 months		1-2 years		2-3 years		3-4 years		4-5 years	
	ASD	ADHD	ASD	ADHD	ASD	ADHD	ASD	ADHD	ASD	ADHD
Approach/urgency										
Compliance score										
Activity										
Perceptual sensitivity										
High intensity pleasure										
Positive affect										
Positive anticipation/ non-objection*										
Impulsivity										
Negative affect										
Sadness/anger/fear										
Anger										
Distress/discomfort reactions										
Effortful control										
Compliance score										
Persistence/attention-distractibility Vigilance/interest (ADHD)										
Cuddliness										
Low intensity pleasure										
Attention shifting										
Control of attention										
Inhibitory control										

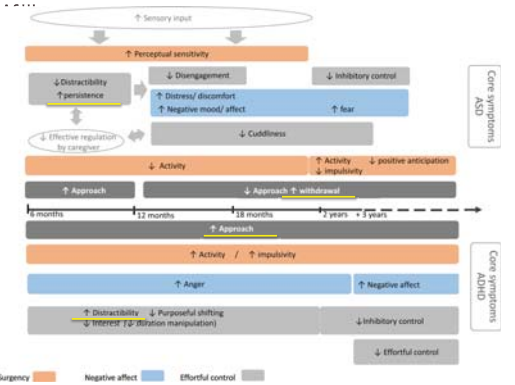
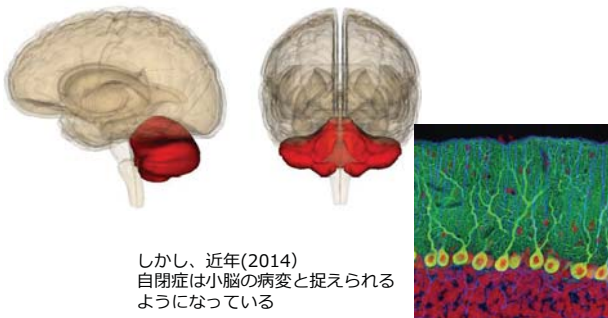
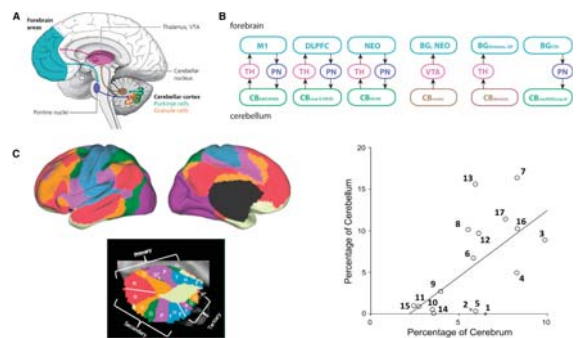


Fig. 1. Temperament traits in ASD and ADHD: ASD and ADHD share high levels of negative affect, but the underlying motivational and behavioral tendencies seem to differ, i.e. withdrawal vs approach in ASD vs ADHD, respectively. ASD and ADHD also share difficulties with control and shifting, but partly opposite behaviors seem to be involved, i.e. high persistence and low distractibility in ASD and poor sustained attention and high distractibility in ADHD.

高次機能に関わることから長く大脳の機能障害だと考えられてきた

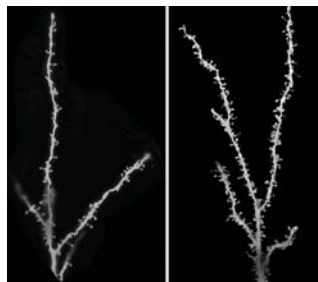


小脳は認知の座：大脳の情報を受け取り、同様に処理する



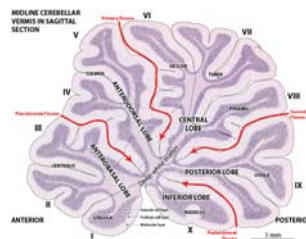
自閉症の進行 (仮説)

小脳が過剰発達する
↓
神経細胞死がおこる
↓
機能障害の発症



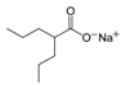
Neurons in brains from people with autism do not undergo normal pruning during childhood and adolescence. The images show representative neurons from unaffected brains (left) and brains from autistic patients (right); the spines on the neurons indicate the location of synapses.

Investigation of the effects of environmental chemicals to cerebellar development



The cerebellum is the center of motor coordination and motor learning, and also correlated with psychiatric disorder such as autism.

valproate

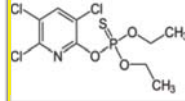


Popular antiepileptic drug
and
Major inducer of autism

VPA was administrated to E16 embryo (600mg/kg, p.o.)

Cerebellar development was checked during 2 weeks after birth.

Chlorpyrifos

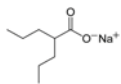


Widely used organophosphorus pesticide
and
inducer of autism

CPF was administrated to E16 embryo (10mg/kg, p.o.)

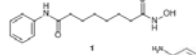
Cerebellar development was checked during 2 weeks after birth.

valproate

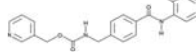


Class I HDAC inhibitor

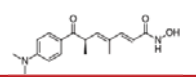
suberoylanilide hydroxamic acid: SAHA (Vorinostat)



MS-275 (Entinostat)

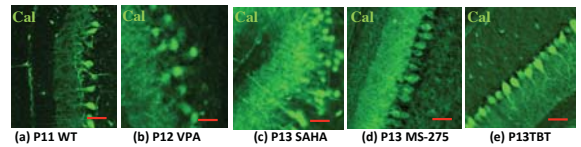


trichostatin A : TSA



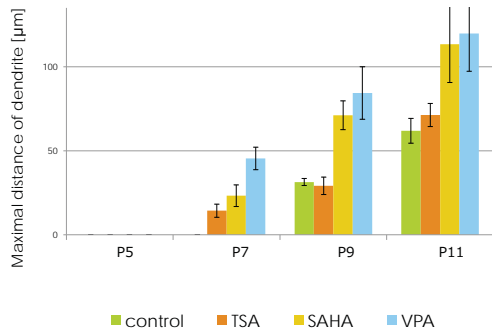
1. Alteration Purkinje cell differentiation
2. Alteration of glutamate-stimulated ATP release
3. Alteration of cerebellar gyrus

ブルキンエ細胞の突起進展異常



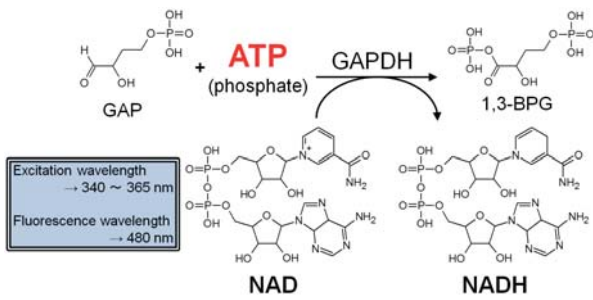
Immunofluorescent antibody staining of Purkinje cell (Bar =100μm)

1. Alteration Purkinje cell differentiation

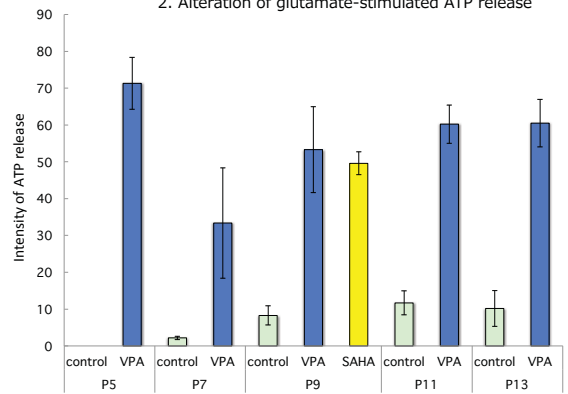


1. Alteration Purkinje cell differentiation
2. Alteration of glutamate-stimulated ATP release
3. Alteration of cerebellar gyrus

Enzyme-linked ATP detection

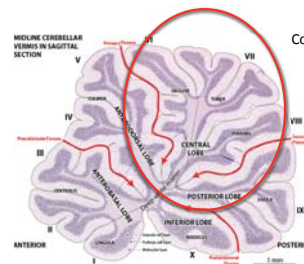


2. Alteration of glutamate-stimulated ATP release



1. Alteration Purkinje cell differentiation
2. Alteration of glutamate-stimulated ATP release
3. Alteration of cerebellar gyrus

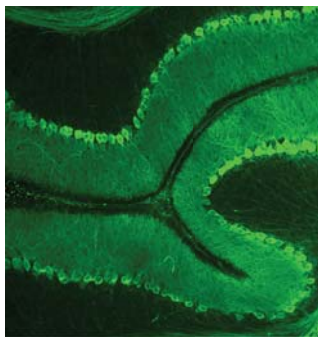
Cerebellar lobules and functions



Cognition and emotion areas in cerebellum

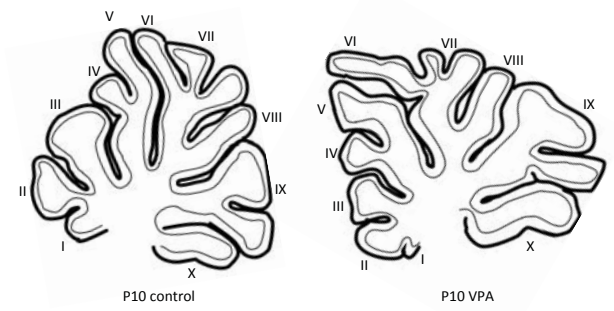
P60 rat cerebellum
from BrainDevelopmentMaps.org

V/VI層における脳回形成異常



P18 Rat Cerebellum
VPA administrated

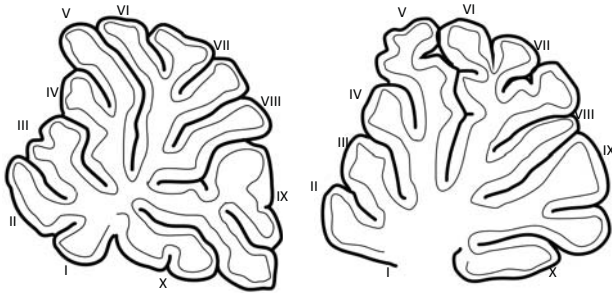
V/VI層における脳回形成異常



P10 control

P10 VPA

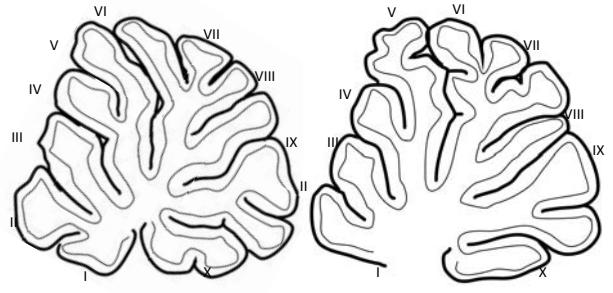
V/VI層における脳回形成異常



P16 control

P16 VPA

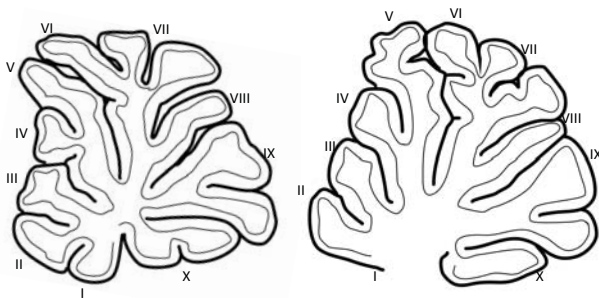
VPA濃度依存性



P16 VPA 200mg/kg

P16 VPA 600mg/kg

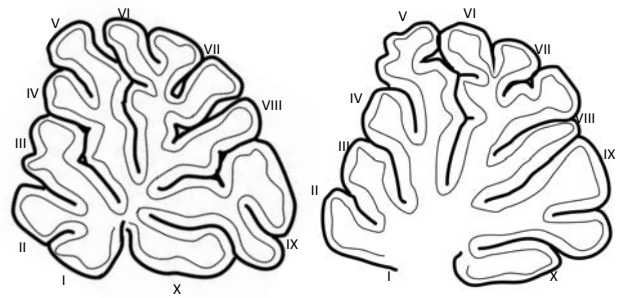
VPA濃度依存性



P16 VPA 400mg/kg

P16 VPA 600mg/kg

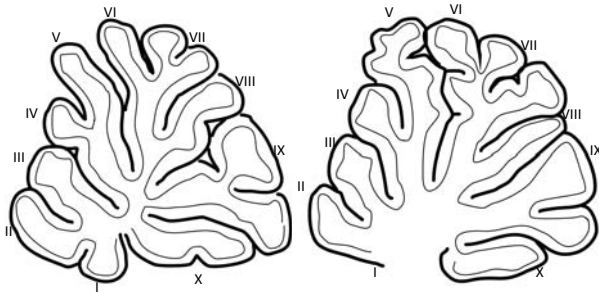
化学物質依存性



P15 CPF

P16 VPA 600mg/kg

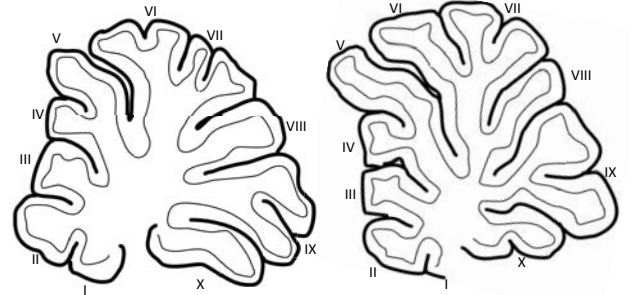
化学物質依存性



P15 MS-275

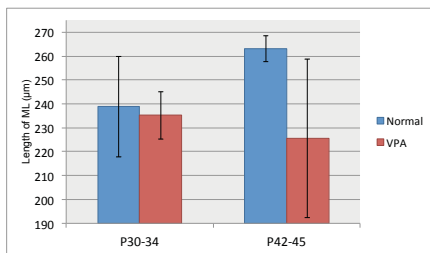
P16 VPA 600mg/kg

日齢による変化

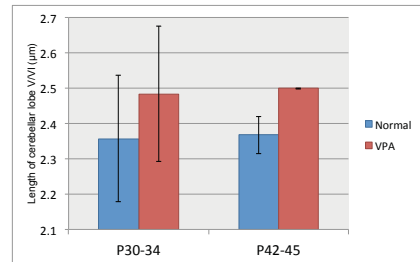


P35 control

P35 VPA



Thickness of Molecular Layer



Length of Lobule V/VI

Conclusions

- ・自閉症誘導化学物質であるVPAで、小脳プルキンエ細胞の突起進展異常が見られた
- ・神経細胞の変化が小脳の神経活動の異常につながっていた
- ・小脳虫部V/VI層の脳回異常が観察された
 - ・VPAの濃度依存性
 - ・化学物質依存性 が観察された
- ・これらの変化は成長により明瞭でなくなった
観察に適した時期は、生後1~3週間

さらに？

- ・行動への影響？
- ・エピジェネティックな影響？
- ・他の動物種での効果？



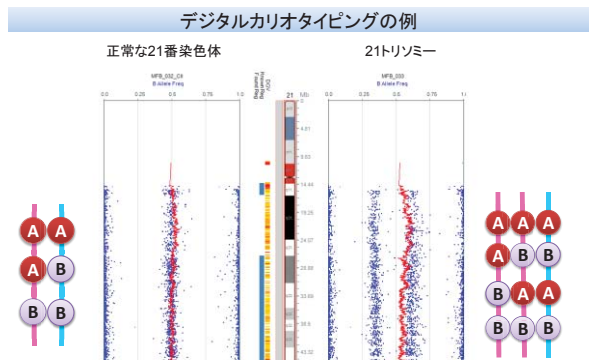
遺伝学と言えば...

優劣の法則
分離の法則
独立の法則

ビクトリア女王の家系と血友病

Royal family tree

優性遺伝、劣性遺伝、浸透率、遺伝子座異質性、表現型異質性、等々、抽象的な難しい概念が.....



稀な初期発生異常の解析例

ホモ変異体の親子のメチル化異常?

受精後のデジタル化維持異常?

5回胎状奇胎を繰り返した孤発例。

海外の家族性症例では、
・全胎状奇胎と同一の病理所見。
・核型は正常二倍体。
・DNAメチル化異常を伴う。(Nature 2002)

・NALP7 遺伝子、c6orf221 遺伝子変異と関連する。(Nat Genet 2006, Am J Hum Genet 2011)

・非反復例でも家族歴を有する患者にはNALP7 遺伝子変異が見出されている。

全エクソン配列解析で同定されたSNV

全てのエクソン 98,930ヶ所 → アミノ酸置換あり 11,362ヶ所 → 新規 676ヶ所 → ホモ 29ヶ所 → ホモのナンセンス変異は一ヶ所だけ

W→X

T61TfsX7 E113GfsX7 Y318CfsX7 R432X E570X L677PfsX6 P716LfsX21

加齢の影響は母だけではない

ARTICLE

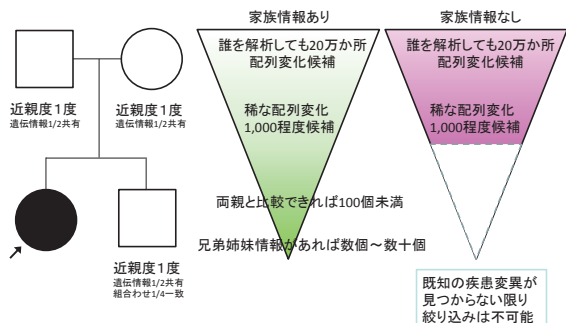
Rate of *de novo* mutations and the importance of father's age to disease risk

Nature (2012) 488, 471-475

- アイスランド78家系の全ゲノム配列解析結果。
- 一世代で平均約60個の新規変異。
- 父親の加齢とともに、子の新規変異数は増える(父20歳で15個、父40歳で65個)。
- 母親は、あまり加齢による変化はない(およそ15個くらい)。
- 雄生殖細胞は、生涯にわたり体細胞分裂するため、エラーが蓄積する。

子への影響は、母由来の影響(胎児期の母体栄養状態や加齢)だけでなく、父の栄養状態や加齢も、エピゲノム・ゲノム双方の機構を通じて作用する。

家系サンプルでの解析が重要



希少・未診断疾患イニシアチブ

IRUD-P
Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases in Pediatrics

診断のつかない子どもたちと、そのご家族のために。

<http://nrchd.ncchd.go.jp/irud-p/>

IRUD-

成育IRUD-P事務局: 03-5494-8137
慶應IRUD-P事務局: 03-5363-3906

国立成育医療研究センター・バイオバンク

- 臨床情報を伴う約7,000症例の既存検体
- 豊富な周産期・小児希少疾患
- 胎児期・出生時の正確な臨床情報と試料

NCHD BioBank
バイオバンクにご参加ください。

National Center Biobank Network
バイオバンクは、複数のバイオバンクセンターが連携して運営されています。
<http://www.bbiobank.org/information.html>

<http://ncchd.go.jp/school/research/section/bb/index.html>

日本人「正常」分娩集団データの有用性

「習慣流産特異的」として報告されたCNV17領域のうち8か所は、我々の独自データ日本人正常分娩歴集団でも観察されたことから、おそらく流産とは関係のないCNVと考えられた。

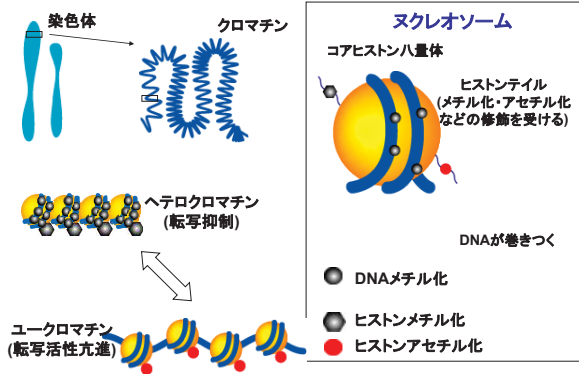
Table 3. CNVs identified in miscarriages and parents.

Sample	Family	Specimen number and karyotype	Contig	Breakpoints	Size (kb)	Type of CNV and origin
Miscarriage 1	03-3A (HLA-D)	642A	162,128,833-162,271,776	155	142	Loss (C,pat)
		642B1	75,123,874-75,467,349	545	Loss (C,mat)	
		642C1	46,407,526-46,464,646	59	Loss (C,pat)	
Miscarriage 6	06-20 (HLA-D)	1542B1	79,180,280-79,468,887	289	Loss (C,pat)	
		66-2D (HLA-D)	86,22,467,000-86,22,467,000	0	Loss (C,pat)	
		7-3A (HLA-D)	47,912,420-48,564,617	75	Loss (C,mat)	
Miscarriage 9	09-3B (HLA-D)	762D1	12,913,204-12,740,222	160	Gain (C,pat)	
		1542B1	75,123,874-75,467,349	545	Loss (C,pat)	
Miscarriage 10	10-3A (HLA-D)	1542B1	75,123,874-75,467,349	545	Loss (C,pat)	
		762D1	12,913,204-12,740,222	160	Gain (C,mat)	
Miscarriage 12	12-3B (HLA-D)	642B1	75,123,874-75,467,349	545	Loss (C,mat)	
		642C1	46,407,526-46,464,646	59	Loss (C,pat)	
Miscarriage 14	14-3A (HLA-D)	762D1	12,913,204-12,740,222	160	Gain (C,pat)	
		642B1	75,123,874-75,467,349	545	Loss (C,pat)	
Parent 1	1-1 (HLA-D)	642B1	75,123,874-75,467,349	545	Loss (C,pat)	
		642C1	46,407,526-46,464,646	59	Loss (C,pat)	
Parent 18	18-1A (HLA-D)	1542B1	75,123,874-75,467,349	545	Loss (C,pat)	
		642B1	75,123,874-75,467,349	545	Loss (C,pat)	

ORIGINAL ARTICLE | Reproductive genetics
Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss
E. Rajcan-Separovic^{1,2,3,4}, D. Diego-Alvarez^{1,4,5}, W.F. Robinson^{1,4}, C. Tyson¹, Y. Qiao^{1,4}, C. Hayward^{1,4}, C. Fawcett^{1,4}, D. Kabanek^{1,4}, T. Philip^{1,4}, M.J. Somerville^{1,4}, and M.D. Stephenson⁴

Human Reproduction vol 25, 2010

クロマチンとヒストン修飾



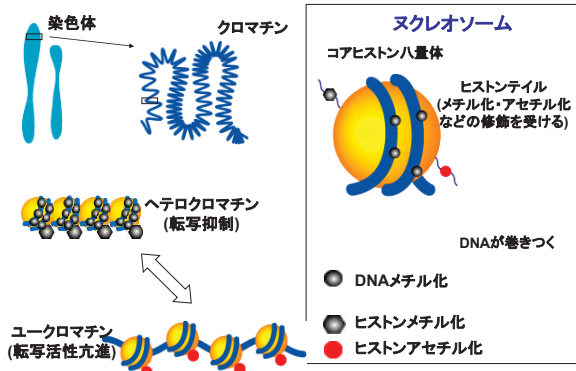
国際連携によるエピゲノムリファレンスデータ整備の試み

GREST
Genomic Reference for Epigenetic Tissues Consortium

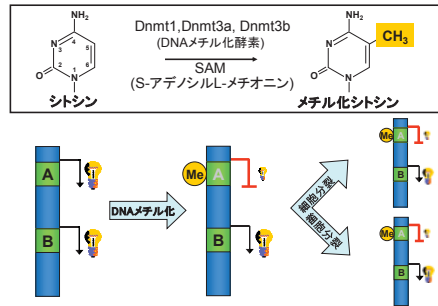
IHEC
International Human Epigenome Consortium

- 90%以上に純化した標的細胞
- DNAメチローム解析
- 6種のヒストン修飾解析 (H3K4me3, H3K4me1, H3K27me3, H3K9me3, H3K36me3, H3K27ac)
- トランスクリプトーム, small RNA

クロマチンとヒストン修飾



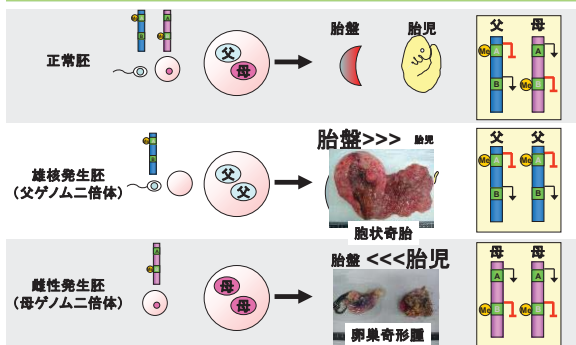
DNAのシトシンのメチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現制御



Epigenetics (エピジェネティクス)

- DNA配列を介さずに細胞分裂を経て安定に情報が「遺伝」する。

ゲノムインプリンティングの破綻と発生異常



胎児期の栄養状態は一生を左右する？

Dutch famine (オランダ飢饉) の疫学研究

1944年秋から約半年間ナチスドイツによる出入港禁止措置のためオランダの一部の地域で極度の食料難に陥り1人当たり700キロカロリーまで栄養摂取が落ち込んだとされる。



この時期に胎児だった人々の数十年後を追跡調査すると...

- 高血圧
 - 2型糖尿病
 - 高脂血症
 - 乳がん
 - 精神疾患
- いわゆる生活習慣病の発症リスクが高い

次世代の低体重(親世代の環境適応が次世代に遺伝?)

Decreased birthweights in infants after maternal in utero exposure to the Dutch famine of 1944-1945. Lumey LH *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1992; 6:240-53.

DOHaD学説 (Developmental Origin of Health and Diseases)

第5回 The 5th Annual Meeting of the Japan Society for Developmental Origin of Health and Disease

日本DOHaD研究会 学術集会

DOHaDをひろげる

特別講演

佐々木 裕之 (Yoshiyuki Sasaki)

Frank Bloomfield (The University of Auckland, New Zealand)

Justin O'Sullivan (The University of Auckland, New Zealand)

2016年7月23日(土)・24日(日)

国立成育医療研究センター 講堂

主催 一部

4月11日(日) 5月27日(日) <http://dohad5.umin.jp>

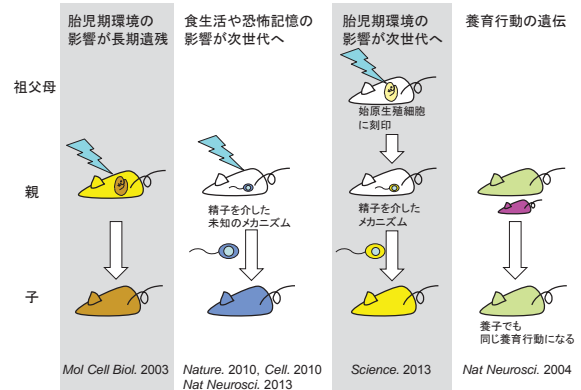
DOHaD学説とは:

受精時、胎芽期、胎児期の子宮内及び乳幼児期の望ましくない環境がエピゲノム変化を起し、それが疾病素因となり、出生後の環境との相互作用によって疾病が発症する。生活習慣病等の多因子疾患はこの2段階を経て発症する。

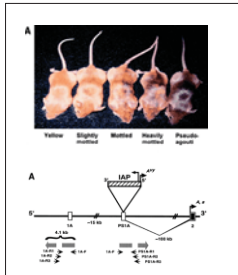
DOHaD研究会ホームページより

「環境は遺伝する」

環境エピゲノム変化(モデル生物)



妊娠中の食事の影響



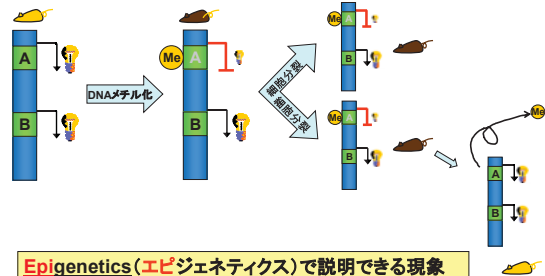
妊娠中の食事で子供の毛色が変わる

- ・妊娠中、授乳中の母マウスに高メチル基質食 (高ビタミンB12、葉酸、コリン、ベタイン食)
- ・A遺伝子上流のトランスポゾンのメチル化亢進
- ・A遺伝子上流のトランスポゾンの転写抑制
- ・A遺伝子本来の機能が回復
- ・野生色マウスの数 > 黄色マウスの数

R. Waterland and R. Jirtle (2003) *Mol Cell Biol*, 23, 5293-5300.

妊娠中の食事の影響で、胎児に偏ったエピゲノム情報が書き込まれ、長期にわたり遺伝子発現に影響した例

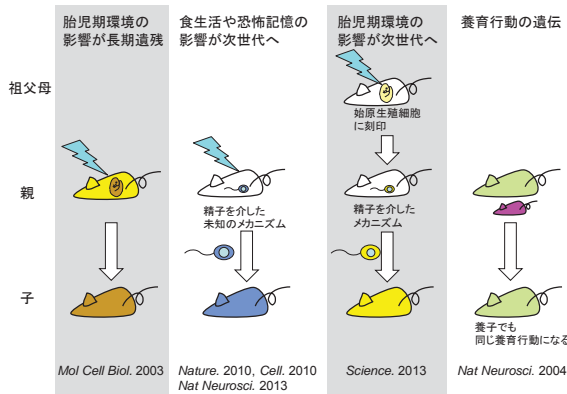
母親の食事が胎児の遺伝情報を変化させるメカニズム



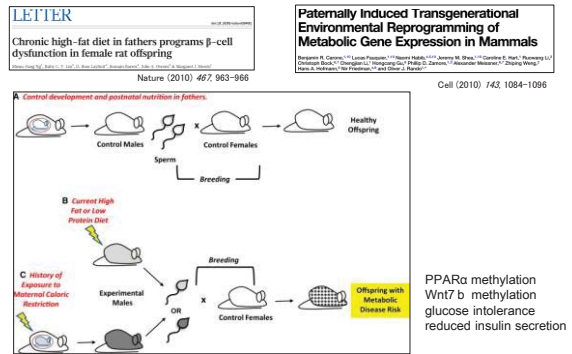
Epiogenetics (エピジェネティクス) で説明できる現象

- DNA配列を介さずに情報が「遺伝」する。
- 安定であるとともに、可逆的。

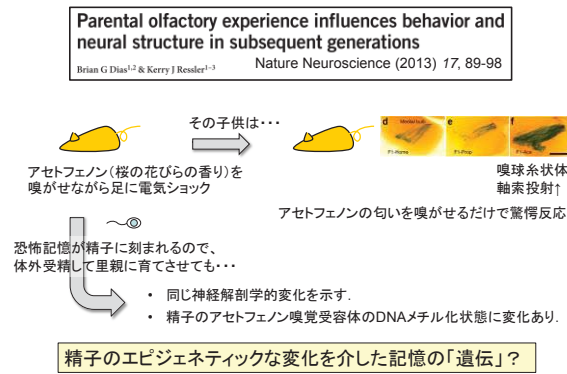
環境エピゲノム変化(モデル生物)



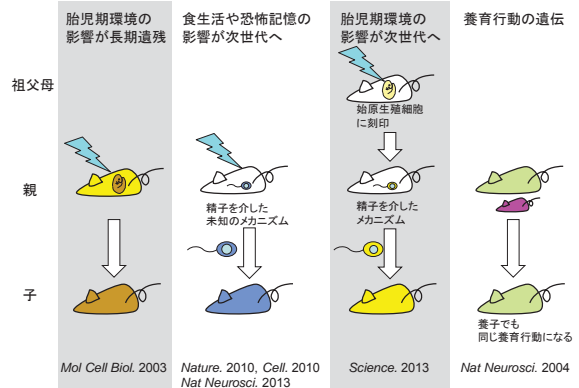
父親の若いころの食生活の影響が遺伝する?



恐怖記憶が遺伝する??



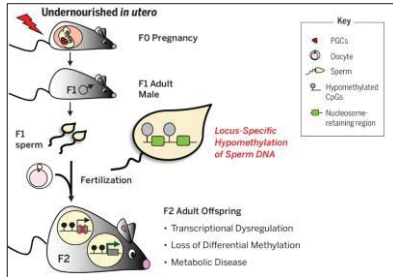
環境エピゲノム変化(モデル生物)



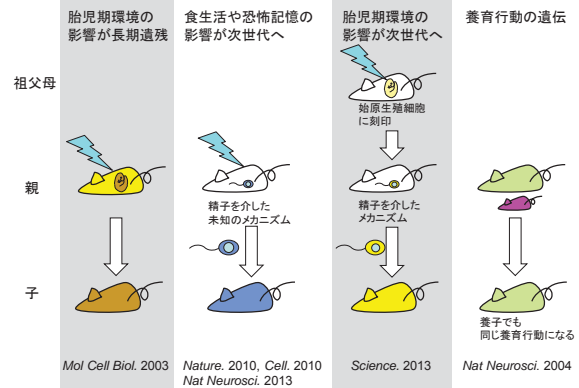
胎児期の影響が精子を介して次世代に伝わる？

RESEARCH ARTICLE
IN UTERO EFFECTS Science (2014) 245, 786-793

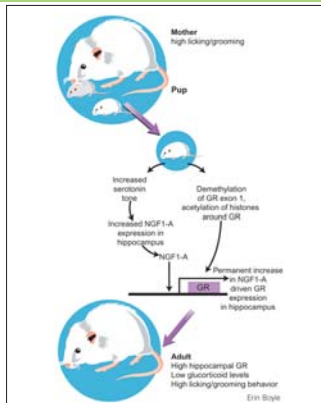
In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism
胎児期に低栄養を経験したオスのDNAメチル化が変化し、その子供も代謝異常を呈した。



環境エピゲノム変化(モデル生物)



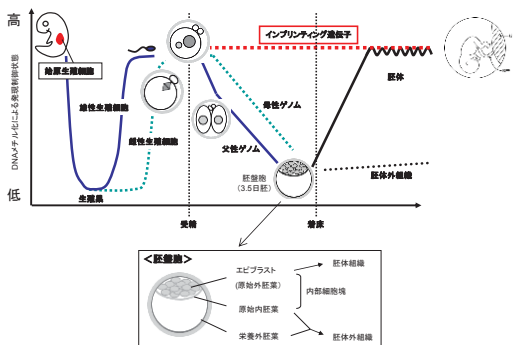
母親の養育行動が遺伝する例



「養育行動の”非遺伝的”伝播」
Weaver IC, et al.
Nat Neurosci. 2004, 7:48-54.

周産期の分子疫学の必要性

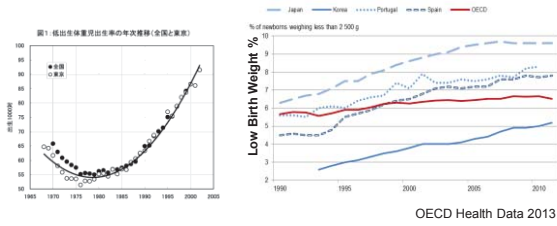
発生過程のエピジェネティックな制御



「小さく産んで大きく育てる」は誤り

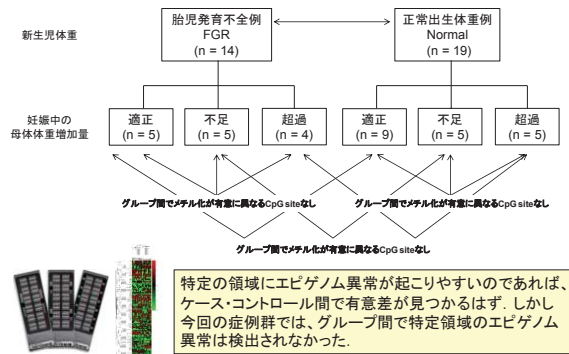
Dutch famine (オランダ飢饉) の疫学研究からわかったこと

日本では低出生体重児が突出して増加しつつある

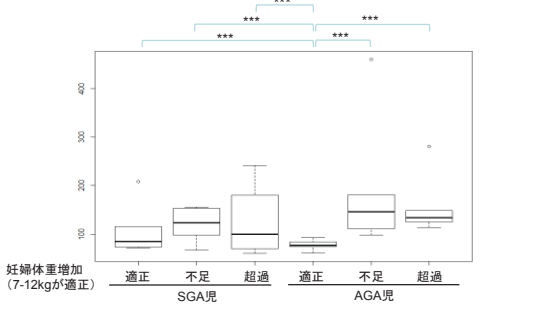


もし体重減が胎児期低栄養に起因するならば、
出生児の長期予後は？ 次々世代への影響は？

ヒトでも胎児期の栄養状態はエピゲノム変異を引き起こすか？

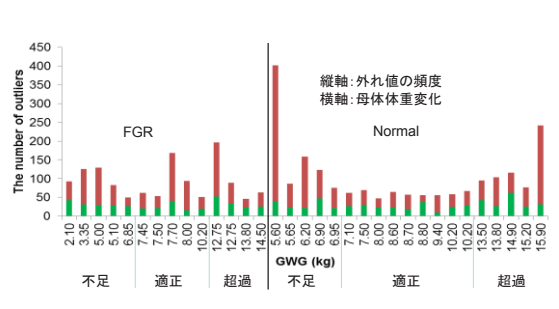


妊娠中の体重変化が胎盤DNAメチル化状態の「ばらつき」に及ぼす影響



ゲノム全領域(ほぼ全ての遺伝子領域)約45万カ所のDNAメチル化アレイ解析
正常出生児であっても、母体の体重増加が適正でないと、胎盤のDNAメチル化状態にばらつきが出る→潜在的なリスク群？

妊娠中の体重変化が胎盤DNAメチル化状態の「ばらつき」に及ぼす影響



出生体重が正常であっても、母体体重増加が適正でないと、
胎盤にランダムな異常DNAメチル化状態が観察される。

- ✓環境は遺伝する
- ✓DOHaD学説: 胎児期新生児期の環境は、成人後の健康に影響する
- ✓生殖補助医療によるエピゲノム異常が心配されているが、はっきりしたエビデンスはないし、実験的にも懸念する情報は乏しい
- ✓出生体重が正常でも、お母さんの体重増加が十分でないと、エピゲノムの乱れが生じる