

研究課題名

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

分担研究課題：

「行動異常標準マウス脳の遺伝子発現解析」

–ネオニコチノイド系農薬アセタミプリドとイミダクロプリドを、
2週齢或いは11週齢のマウスに単回経口投与後、13週齢時の海馬に
おける遺伝子発現プロファイル–

研究分担者 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長
研究協力者 古川佑介 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体遺伝子改変マウス2種（国立医薬品食品衛生研究所毒性部にて独自に作出した）を、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるが、平成27年および28年度は、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、脳における網羅的遺伝子発現変動解析を行った。

平成27年度は、エストロゲン(ER) α 遺伝子座に、ER α cDNAと牛成長ホルモン由来の3' -UTRをつなげたものを、相同組換えにより遺伝子導入し、独自に作製したER α 受容体遺伝子置換マウス（以降、このホモ型をER α KIと記載）を使用し、脳3部位（大脳皮質、海馬、脳幹）について網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。ER α KIマウス、すなわちER α の発現が低下したER α ノックダウンマウスの、少なくとも大脳皮質と海馬において、ER α シグナルがむしろ活性化していることが示唆された。この点、ER α KIマウスは、ER α スプライシングバリエントが発現できないマウスとの考える事が出来るが、多くのER α スプライシングバリエントがER α シグナルに対してdominant-negativeであることが報告されている事から、ER α シグナルが活性化していることが推察された。加えて、情動認知行動解析結果から、ER α KIマウスは、音-連想記憶及び空間-連想記憶に障害が認められることが確認されている。解析の結果、ER α 欠失マウスとER α KIマウスにおける情動認知行動異常の差（情動障害）は、大脳皮質におけるRARシグナル伝達の低下、あるいは大脳皮質および脳幹における概日リズムが乱れることが関係していることが示唆された。

平成28年度は、エストロゲン(ER) α 遺伝子座に、ER β cDNAと牛成長ホルモン由来の3' -UTRをつなげたものを、相同組換えにより遺伝子導入し、独自に作製したER β 受容体遺伝子置換マウス（以降、このホモ型をER β KIと記載）を使用し、脳2部位（大脳皮質、海馬）について網

網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型あるいはER α KIのものと比較・検討した。ER β KIマウスは、ER α の代わりにER β が発現するマウスであり、また理論上、ER α のスプライシングバリエントが発現できないマウスと考えることができる。なお、ER β KIマウスにおけるER β 蛋白の発現量は、よい抗体がないために、残念ながら現時点では不明である。遺伝子発現変動解析の結果、ER α 欠失マウスとER β KIマウス、双方ともに、大脳皮質において概日リズムが乱れる事が示唆された。他方、海馬では、K⁺チャネル、Na⁺チャネルおよびCa²⁺チャネル遺伝子の発現が減少し、記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担う Camk2a遺伝子の発現が減少し、神経伝達が抑制されている可能性が示唆され、また、プロモーター解析(in silico) の結果、遺伝子発現調節因子としてESR1が抽出されたため、ER α シグナルは海馬においては、機能的にレスキュー出来ない可能性が示唆された。

したがって今後特に、エストロジェンと概日リズムあるいはRAR (レチノイン酸受容体) のシグナルネットワークとの関連に着目することにより、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

他方、モデル化学物質としてビスフェノール類、農薬類を選択し、胎生期ないし幼若期のマウスに低用量投与することによって成熟後に顕在化する中枢行動毒性を、情動認知行動「毒性基準値」、および神経科学的「異常基準値」を以て検定するが、これによって設定した情動認知行動「毒性基準値」および神経科学的な異常の基準値の頑強性や妥当性を検証し、体系的・総合的な評価系として完成させることも目的としている。そこで本分担研究では、平成29年度(今年度)、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、ネオニコチノイド系農薬である10 mg/kgアセタミプリドと8 mg/kgイミダクロプリドを、2週齢或いは11週齢のマウスに単回経口投与後、13週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った。その結果、

1) アセタミプリドを成熟期に投与したマウス (成熟期) 海馬では、投与群においてニューロン(Mtap2, Mapt)およびアストロサイト (Gfap) マーカーの有意な発現上昇が認められる事から、投与群では、神経細胞あるいは樹状突起およびグリア細胞が増加している事が示唆され、また有害事象に関係するシグナルネットワークとして現時点では、EIF2 シグナル (翻訳過程の活性化)、 Protein Kinase A シグナル (軸索誘導、軸索再生やシナプス伝達の活性化)、 Axonal Guidance シグナル (軸索誘導の活性化) が見いだされ、海馬において「軸索誘導の活性化」が生じている事が示唆された。発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析(in silico) の結果、PSEN1、APPやMAPTが抽出されてきたため、神経毒性を有する A β が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進 (神経原線維変化) するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化に関係している事が考えられた。

2) アセタミプリドを幼若期に投与したマウス (成熟期) 海馬では、投与群においてニューロン(Mtap2)およびアストロサイト (Gfap) マーカーの有意な発現上昇が認められ、投与群では、神経細胞あるいは樹状突起およびグリア細胞が増加している事が示唆され、また有害事象に関係するシグナルネットワークとして現時点では、Mitochondrial Dysfunction (Oxidative

Phosphorylation) (ミトコンドリアにおけるATP合成系の亢進)、 Protein Ubiquitination pathway (タンパク分解系の亢進)、 EIF2 signaling (翻訳過程の活性化)、 CREB signaling (神経伝達活性化、長期記憶)、 Protein Kinase A signaling (軸索誘導、軸索再生やシナプス伝達の活性化) が見いだされ、海馬において「神経伝達の活性化」が生じている事が示唆された。プロモーター解析(in silico) の結果、PSEN1、APPやMAPTが抽出されてきたため、神経毒性を有する A β が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進(神経原線維変化)するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、神経伝達の活性化に関係している事が考えられた。

3) イミダクロプリドを成熟期に投与したマウス(成熟期)海馬では、投与群においてニューロン(Mtap2、Mapt) マーカーの有意な発現上昇が認められる事から、投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が増加している事が示唆され、また有害事象に係するシグナルネットワークとして現時点では、EIF2 シグナル(翻訳過程の活性化)、 Ubiquitination pathway (タンパク分解系の亢進)、 Axonal Guidance シグナル(軸索誘導の活性化)、 Mitochondrial Dysfunction (ミトコンドリアにおけるATP合成系の亢進)、 Oxidative stress (酸化ストレス) が見いだされ、海馬において「軸索誘導の活性化」が生じている事が示唆された。プロモーター解析(in silico) の結果、PSEN1、APPやMAPTが抽出されてきたため、神経毒性を有する A β が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進(神経原線維変化)するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化に関係している事が考えられた。

4) イミダクロプリドを幼若期に投与した(成熟期)海馬では、投与群においてニューロン(Mtap2、Mapt) マーカーの有意な発現上昇が認められ、投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が増加している事が示唆され、また有害事象に係するシグナルネットワークとして現時点では、Axonal Guidance シグナル(軸索誘導の活性化)、 Unfold protein response (異常タンパク応答)、 Protein Ubiquitination pathway (タンパク分解系の亢進)、 Oxidative stress (酸化ストレス)、 Endoplasmic Reticulum Stress pathway (小胞体ストレス) が見いだされ、海馬において「軸索誘導の活性化」が生じている事が示唆された。プロモーター解析(in silico) の結果、APPが抽出されてきたため、神経毒性を有する A β が生成されるアミロイド形成が亢進するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化に関係している事が考えられた。

このように、ネオニコチノイド系農薬である10 mg/kgアセタミプリドと8 mg/kgイミダクロプリドを、2週齢或いは11週齢のマウスに単回経口投与後、13週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った結果、投与群では、いずれも神経細胞あるいは樹状突起が増加し、軸索誘導あるいは神経伝達が活性化していることが示唆された。プロモーター解析(in silico) の結果から、この活性化に、PSEN1、APPやMAPT分子が関与している事が示唆された。

A. 研究目的

本研究全体の目的は、平成20年度に開始した先行研究 (H20-化学一般-009)にて、周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の神経毒性試験法では同定困難な情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉え、次の研究(H23-化学一般-004)では、それらが毒性指標として定量評価できるものであることを示したが、これらを背景に、発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することである。

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体遺伝子改変マウス2種(国立医薬品食品衛生研究所毒性部にて独自に作出した)を、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるが、平成27年および28年度は、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、脳における網羅的遺伝子発現変動解析を行った。

この目的遂行の為に、平成27年度は雄性ER α KIマウスの脳3部位(大脳皮質、海馬及び脳幹)の遺伝子発現変動を解析・検討した。平成28年度は、成熟期の雄性ER β KIマウスの脳2部位(大脳皮質及び海馬)のサンプルについて、Percellome法により網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。

他方、モデル化学物質としてビスフェノール類、農薬類を選択し、胎生期ないし幼若期のマウスに低用量投与することによって成熟後に顕在化する中枢行動毒性を、情動認知行動「毒性基準値」、および神経科学的「異常基準値」を以て検定するが、これによって設定した情動認知行動「毒性基準値」および神経科学的な異常の基準値の頑強性や妥当性を検証し、体系的・総合的な評価系として完成させることも目的としている。そこで本分担研究では、平成29年度(今年度)、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを、2週齢或いは11週齢のマウスに投与後、13週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った。

B. 研究方法

マウス、被検物質及び投与方法

マウスの系統は C57BL/6NCrSlc (日本エスエルシー)を用いた。

ネオニコチノイド系農薬(2種)の単回投与実験では、10 mg/kg アセタミプリド(CAS No. : 135410-20-7, 分子量: 222.68, カタログ No. : 010-24541, lot No. :AWG6799, 純度:99.7%, WAKO)と 8 mg/kg イミダクロプリド(CAS No. : 138261-41-3, 分子量: 255.66, カタログ No. :099-03771, lot No. : KPF0614, 純度: 99.1%, WAKO)(溶媒: コーンオイル[CAS No. : 8001-30-7, カタログ No. : C8267, Sigma-Aldrich]、投与容量: 10 ml/kg 体重)を、2週齢(以下、幼若期)、或いは11週齢(以下、11週齢以降を成熟期と定義)のマウスに投与後、12週齢時に情動認知行動解析を行い(n=8)、その後、13週齢時の海馬(n=3; 8例から3例をランダムに選択)における網羅的遺伝子発現変動解析を行った。

遺伝子発現変動解析

遺伝子発現変動解析に際しては、成熟期マウスの脳2部位(大脳皮質、海馬)(午前10時)(各n=4)について、Percellome法(遺伝子発現値の絶対化手法)(Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006)による網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて検討した。この際、我々が独自に開発した「MF analyzer」を用いて網羅的に解析した。脳2部位は、氷冷下にて左脳につき、小脳、脳幹部、海馬、大脳皮質の順に採取することにより得た(右脳はホルマリン固定した)。

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

Total RNA の分離精製

RNA抽出にあたっては、マウス組織を採取後すみやかにRNA later (Ambion社)に4°Cで一晩浸漬し、RNaseを不活化し、RNA抽出操作までは-80°Cにて保存した。抽出にあたっては、RNA laterを除いた後、RNeasyキット(キアゲン社)に添付されるRLT bufferを添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の10 μ Lを取り、DNA定量蛍光試薬Picogreenを用いてDNA含量を測定した。DNA含量に応じ、臓器毎にあらかじ

め設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

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

また、既知情報との照合によるシグナルネットワーク及び遺伝子発現の制御因子の探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版)」。

C. 研究結果及び考察

C-1: アセタミプリドを成熟期に投与したマウス海馬 (成熟期) における遺伝子発現変動解析 :

海馬における各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、投与群と対照群との比較を検討したところ、投与群でニューロン (Mtap2, Mapt) およびアストロサイト (Gfap) マーカーの有意な発現上昇が認められたことから投与群では、神経細胞あるいは樹状突起およびグリア細胞が増加している事が示唆された。以上のうち、Mtap2、Mapt および Gfap 遺伝子の発現変動について図 1 (最終ページ参照) に示す。

次いで、対照群と比較し、10 mg/kg アセタミプリドを成熟期に投与した場合に、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった (対照群に対して投与群の

比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

2,418 ps (増加)、40 ps (減少)

増加分 2,418 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、Axonal Guidance シグナルが見いだされた。IPA による Canonical pathway による検索においても、EIF2 シグナル、Protein Kinase A シグナルおよび Axonal Guidance シグナル (軸索誘導の活性化) が抽出され、それぞれ、翻訳過程の活性化、軸索誘導・軸索再生やシナプス伝達の活性化及び、軸索誘導の活性化が示唆された。なおアポトーシスや細胞死に関わる遺伝子の顕著な変動は認められなかった。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、PSEN1、APP や MAPT が抽出されてきた。したがって、神経毒性を有する Aβ が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進 (神経原線維変化) するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化に関係している事が考えられた。

一方、減少分 40 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (> E-4)。

C-2: アセタミプリドを幼若期に投与したマウス海馬 (成熟期) における遺伝子発現変動解析 :

海馬における各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、投与群と対照群との比較を検討したところ、投与群でニューロン (Mtap2) およびアストロサイト (Gfap) マーカーの有意な発現上昇が認められたことから投与群では、神経細胞あるいは樹状突起およびグリア細胞が増加している事が示唆された。

次いで、対照群と比較し、10 mg/kg アセタミプリドを幼若期に投与した場合に、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、

以下のとおりとなった(対照群に対して投与群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

5,056 ps (増加)、 8 ps (減少)

増加分 5,056 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、CREB シグナルが見いだされたことから、神経伝達の活性化や長期記憶の増強が示唆された。IPA による Canonical pathway による検索においても、Mitochondrial Dysfunction (Oxidative Phosphorylation)、Protein Ubiquitination pathway、EIF2 signaling、CREB signaling、Protein Kinase A signaling が抽出され、それぞれ、ミトコンドリアにおける ATP 合成系の亢進、タンパク分解系の亢進、翻訳過程の活性化、神経伝達活性化・長期記憶、軸索誘導・軸索再生やシナプス伝達の活性化が示唆された。なおアポトーシスや細胞死に関わる遺伝子の顕著な変動は認められなかった。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、PSEN1、APP や MAPT が抽出されてきた。したがって、神経毒性を有する A β が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進 (神経原線維変化) するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、神経伝達の活性化や、タンパク分解系・ATP 合成系の亢進に関係している事が考えられた。

一方、減少分 8 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (>E-4)。

C-3: イミダクロプリドを成熟期に投与したマウス海馬 (成熟期) における遺伝子発現変動解析:

海馬における各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、投与群と対照群との比較を検討したところ、投与群でニューロン (Mtap2、Mapt) マーカーの有意な発現上昇が認められたことから投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が増加している事が示唆された。

次いで、対照群と比較し、8 mg/kg イミダクロプリドを成熟期に投与した場合に、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して投与群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

4,253 ps (増加)、 12 ps (減少)

増加分 4,253 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、Axonal Guidance シグナルおよび酸化ストレスが見いだされた。IPA による Canonical pathway による検索においても、EIF2 シグナル、Ubiquitination pathway、Axonal Guidance シグナル、Mitochondrial Dysfunction、Oxidative stress が抽出され、それぞれ、翻訳過程の活性化、タンパク分解系の亢進、軸索誘導の活性化、ミトコンドリアにおける ATP 合成系の亢進、酸化ストレスが生じている事が示唆された。なおアポトーシスや細胞死に関わる遺伝子の顕著な変動は認められなかった。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、PSEN1、APP や MAPT が抽出されてきた。したがって、神経毒性を有する A β が生成されるアミロイド形成や、微小管結合タンパク質のタウ・タンパク質の異常リン酸化が亢進 (神経原線維変化) するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化や、タンパク分解系・ATP 合成系の亢進、酸化ストレスに関係している事が考えられた。

一方、減少分 12 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった (>E-4)。

C-4: イミダクロプリドを幼若期に投与したマウス海馬 (成熟期) における遺伝子発現変動解析:

海馬における各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、投与群と対照群との比較を検討したところ、投与群でニュー

ーロン(Mtap2、Mapt) マーカーの有意な発現上昇が認められたことから投与群では、神経細胞あるいは樹状突起が増加している事が示唆された。

次いで、海馬について、対照群と比較し、8 mg/kg イミダクロプリドを幼若期に投与した場合に、発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に変動(増加及び減少)する遺伝子(プローブセット: ps) 数を検討したところ、以下のとおりとなった(対照群に対して投与群の比率が、増加は 1.200 より大きいものを、減少は 0.833 より小さいものを採用)。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき海馬において 0.7 コピー以上のものを採用した。

2,256 ps (増加)、 11 ps (減少)

増加分 2,256 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、Axonal Guidance シグナルおよび酸化ストレスが見いだされた。IPA による Canonical pathway による検索においても、Axonal Guidance シグナル、Unfold protein 応答、Protein Ubiquitination pathway、Oxidative stress、Endoplasmic Reticulum Stress 応答が抽出され、それぞれ、軸索誘導の活性化、異常タンパク応答、タンパク分解系の亢進、酸化ストレス、小胞体ストレスが生じている事が示唆された。なおアポトーシスや細胞死に関わる遺伝子の顕著な変動は認められなかった。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析(*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討したところ、遺伝子発現調節因子として、APP が抽出されてきた。したがって、神経毒性を有する A β が生成されるアミロイド形成が亢進するシグナルが活性化する可能性が示唆され、この事が、軸索誘導の活性化や、タンパク分解系の亢進、酸化ストレス、小胞体ストレスに関係している事が考えられた。

一方、減少分 11 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。IPA における Upstream Analysis を用いて検討したが、遺伝子発現調節因子は抽出されてこなかった(> E-4)。

以上のように、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを、2 週齢或いは 11 週齢のマウスに投与後、13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った結果、投与群では、いずれも神経細胞あるいは樹状突起が増加し、軸索誘導あるいは神経伝達が活性化し

ていることが示唆された。プロモーター解析(*in silico*) の結果から、この活性化に、PSEN1、APP や MAPT 分子が関与している事が示唆された。

このように、それぞれの場合に発現変動を示した遺伝子群が似ていることが示唆されたため、これらの集合関係を検討したところ、発現増加分については重複するものが多く、とくに幼若期投与の場合に両物質を比較した場合、アセタミプリドにより発現増加が認められた遺伝子は全て、イミダクロプリドにより発現増加が認められた遺伝子と一致した。この集合関係を図 2 (最終ページ参照) としてベン図に示す。

D. 結論

平成 27 年度は、ER α KI マウス、すなわち ER α の発現が低下した ER α ノックダウンマウスの脳における遺伝子発現変動解析の結果、少なくとも大脳皮質と海馬において、ER α シグナルがむしろ活性化していることが示唆された。この点、ER α KI マウスは、ER α スプライシングバリエントが発現できないマウスとの考える事が出来るが、多くの ER α スプライシングバリエントが ER α シグナルに対して dominant-negative であることが報告されている事から、ER α シグナルが活性化していることが推察された。加えて、情動認知行動解析結果から、ER α KI マウスは、音-連想記憶及び空間-連想記憶に障害が認められることが確認されている。解析の結果、ER α 欠失マウスと ER α KI マウスにおける情動認知行動異常の差(情動障害)は、大脳皮質における RAR シグナル伝達の低下、あるいは大脳皮質および脳幹における概日リズムが乱れることが関係していることが示唆された。

平成 28 年度は、ER α 欠失マウスと ER β KI マウス、双方ともに、大脳皮質において概日リズムが乱れる事が示唆された。したがって、ER α 欠失マウスと ER β KI マウスとの共通の情動認知行動異常である、「情動および認知」障害は、概日リズムが乱れる事により誘発されている可能性が示唆された。他方、海馬では、K $^{+}$ チャンネル、Na $^{+}$ チャンネルおよび Ca $^{2+}$ チャンネル遺伝子の発現が減少し、記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担う Camk2a 遺伝子の発現が減少し、神経伝達が抑制されている可能性が示唆され、また、プロモーター解析(*in silico*) の結果、遺伝子発現調節因子として ESR1 が抽出されたため、ER α シグナルは海馬においては、機能的にレスキュー出来ない可能性が示唆された。

今後特に、エストロゲンと概日リズムあるいは RAR (レチノイン酸受容体) のシグナルネットワークとの関連に着目することにより、遅発性の情

動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

平成 29 年度 (今年度) は、モデル化学物質としてビスフェノール類、農薬類を選択し、胎生期ないし幼若期のマウスに低用量投与することによって成熟後に顕在化する異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを、2 週齢或いは 11 週齢のマウスに投与後、13 週齢時の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を行った。投与群では、いずれも神経細胞あるいは樹状突起が増加し、軸索誘導あるいは神経伝達が活性化していることが示唆された。プロモーター解析 (in silico) の結果から、この活性化に、PSEN1、APP や MAPT 分子が関与している事が示唆された。

今後特に、PSEN1、APP や MAPT 分子と、軸索誘導の活性化のシグナルネットワークとの関係に着目することにより、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, Jun Kanno, Neurobehavioral toxicity at adult period induced by neonicotinoid pesticides exposure at juvenile period of male mice. (2018. 3. 12) SOT 2018, San Antonio, USA

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki Interferon signaling chemical, pentachlorophenol, identified by Percellome Toxicogenomics Project. (2018. 3. 12) SOT 2018, San Antonio, USA

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi, Double Strand Break Repair by Capture of Unintentional Sequences, an Emerging New Possible Risk for the Leading-Edge Technology, (2018. 3. 12) SOT 2018, San Antonio, USA, poster

Ryuichi Ono, Keiko Tano, Satoshi Yasuda, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoji Sato and Yoko Hirabayashi, An emerging new possible risk of genome editing for human gene therapy, (2018. 1. 31) Keystone Symposia Conference / Precision Genome Editing with Programmable Nuclease, Colorado, USA, poster

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Progress of Percellome Toxicogenomics Project, and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology. OpenTox Asia Conference 2017 (2017. 5. 17.), Daejeon, Korea

北嶋 聡、シックハウス症候群レベルの極低濃度ばく露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性の情動認知行動影響解析、第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017. 7. 12.)

相崎 健一、小野 竜一、北嶋 聡、菅野 純、反復曝露試験における ncRNA 発現変動と DNA メチル化修飾の解析、第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017. 7. 11.)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for the mechanistic prediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017. 10. 16) Jinan, China, keynote

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia (2017. 9. 13) poster

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

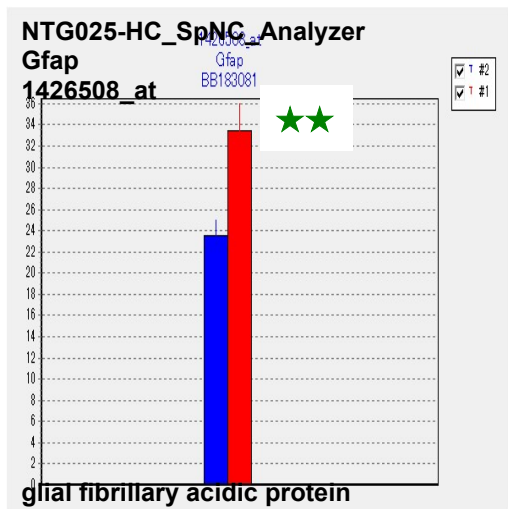
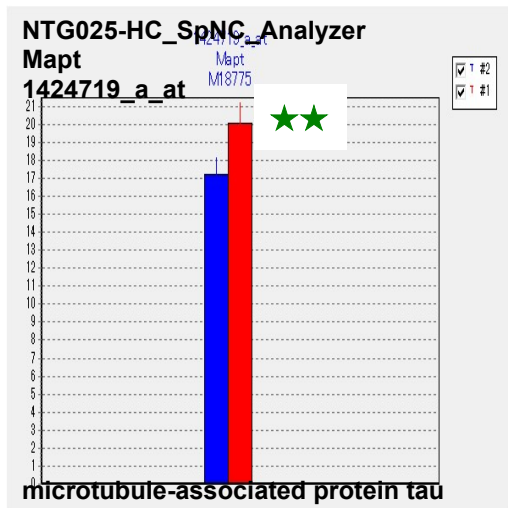
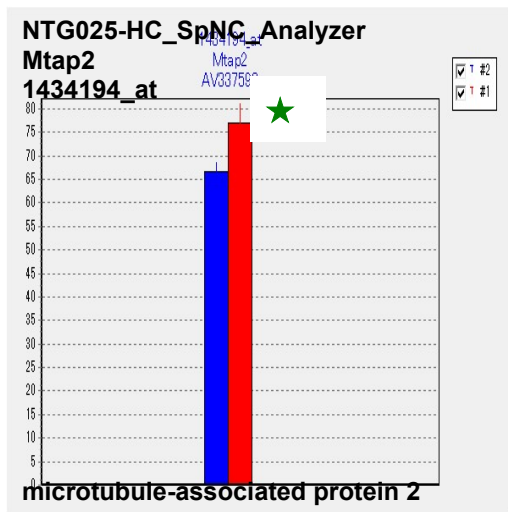


図1 アセタミプリドを成熟期に投与したマウス海馬（成熟期）において、有意に発現増加が認められた、ニューロンマーカーの Mtap2 と Mapt（上・中段）、及びアストロサイトマーカーの Gfap 遺伝子（下段）の発現変動

溶媒対照群：青、投与群：赤（n=3、平均値±標準偏差、*:P<0.05, **: P<0.01）

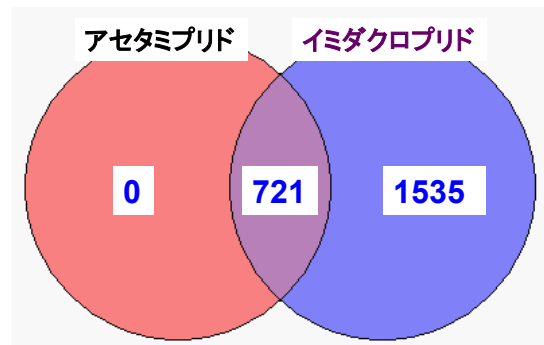


図2 海馬において、幼若期投与の際に、発現が有意に増加する遺伝子の中、アセタミプリドあるいはイミダクロプリド投与の場合の集合関係（ベン図で表記した）