

研究課題名

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

分担研究課題名

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

研究分担者

中島 欽一（九州大学大学院医学研究院・基盤幹細胞学分野・教授）

【研究要旨】

昨年度の解析から、ネオニコチノイド系農薬である、アセタミプリド（10mg/kg）、イミダクロプリド（8mg/kg）投与直後には、海馬ニューロン新生への影響が検出しにくいことが分かった。したがって、その影響を明らかにするためには、成体期でのニューロン新生解析とノンコーディングRNA解析による定量化が必要であると考えられた。そこで、本年度は、次世代シーケンサーによるRNA発現プロファイリングが神経系への影響を定量化する指標となりうるかどうかを検討するための研究を進め、農薬暴露による異常値検出の精度を鋭敏化できる一例を示すことに成功した。

A. 研究目的

脳・神経系は主要な3つの細胞種、ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトによって構成されるが、これらは共通の神経幹細胞から産生され、互いに密接に連携しながら高度な情報処理機能を発揮する。そのためには胎児・幼若期から成体における神経幹細胞から各種細胞への分化・成熟が時空間的に精妙に制御される必要がある。これが破綻した場合、これまでも重度な神経疾患や機能障害に至ることが数多く示されているがその原因の詳細については不明な点が多く、また種々の化学物質によりこれらが受ける影響を数値化し、定量的に解析する方法も乏しい。ところで、ネオニコチノイド系の農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドの幼若期暴露によって遅発性の情動・認知行動異常が生じることが明らかとなっており、またニューロン新生への影響が示唆される結果が研究代表者らによって

得られている。そこで、本分担者は、対象化学物質として、ネオニコチノイド系農薬を選択し、ニューロン新生とノンコーディングRNAの発現・機能に及ぼす影響の詳細な解析、及びその定量化を目的として研究に着手した。

B. 研究方法

まず、幼若期（2週齢）マウスに、コントロールとしてコーンオイル、アセタミプリド（10mg/kg）、イミダクロプリド（8mg/kg）を単回経口投与し、3週齢時あるいは成体期（13週齢）まで待ち、遺伝子とノンコーディングRNA発現解析用に脳を凍結保存した。この脳よりノンコーディングRNAを含むRNAを抽出し、ライブラリーを作製後、次世代シーケンサーを用いて発現データを得る（生後単回投与群）。更に、母マウスにコーンオイル、アセタミプリド（0.01mg/kg/day）、イミダクロプリド

(0.01mg/kg/day)に飲水投与することで、胎生 11 日目から出生後 28 日目まで慢性に暴露し、遺伝子とノンコーディング RNA 発現解析用に脳を凍結保存した。この脳よりノンコーディング RNA を含む RNA を抽出し・ライブラリーを作製し、次世代シーケンサーを用いて発現データを得る(慢性母性投与群)。

## C. 研究結果

生後単回投与群において、1 週間後に発現上昇してくる遺伝子群には、細胞増殖関連のものと細胞移動関連のものが認められた。例えば、イミダクロプリド投与群の場合、ジーンオントロジー(GO)タームに属する遺伝子として、MITOTIC CYTOKINESIS や MYOSHIN II COMPLEX 関連の遺伝子が総じて発現上昇していた(図 1)。したがって、神経幹細胞の増殖が異常に促進され、細胞移動を開始し、ニューロンに早期分化してしまうと考えられた。一方で、成体期に発現減少する遺伝子のプロファイリングから、ニューロンの質の低下あるいは量の減少が晩発性の影響として起こってしまうことも分かってきた。例えば、イミダクロプリド及びアセタミプリドいずれの投与群においても、GO タームに属する遺伝子として、NEURON SPINE 関連の遺伝子が総じて発現減少していた(図 2)。

この生後単回投与群のノンコーディング RNA 発現解析については、生後単回投与群におけるノンコーディング RNA の発現プロファイルを得るためのモデルトランスクリプトの作製スキームを開発中であり、定量したモデルトランスクリプト候補と遺伝子発現との関連付けの予備的検討を終えたところである。慢性母性投与群については、各脳より抽出した RNA を用いて、シーケンス用のライブラリー作製まで行った。

## D. 考察

研究代表者が行った、同様に両農薬を投与したマウスの成体期(12-13 週齢)にお

ける行動解析では、恐怖条件付けテストにおいて明らかに障害がみられていたが、そのことに一致して、今回、遺伝子発現プロファイリングから、ニューロンの質の低下あるいは量の減少が起こっていたことは興味深い。原因についても今回の遺伝子発現プロファイリングから明らかになりつつあり、ネオニコチノイド投与が 1 週間以内に神経幹細胞の異常増殖・早期分化を引き起こしたことである可能性が高い。今後、生後単回投与群と慢性母性投与群の結果を併せることで、上記の考察をサポートできる結果を得ることが出来るかは興味深く、また引き続きこのような取り組みを行うことで、ノンコーディング RNA の発現プロファイルを得るためのモデルトランスクリプトの精度が格段に上昇することが期待できる。

## E. 結論

昨年度の解析において、免疫染色では判別できなかった海馬ニューロン新生への影響が、次世代シーケンサー解析による遺伝子発現プロファイリングにより検出できたことは意義深く、現在取り組んでいるノンコーディング RNA の発現プロファイルを得るためのモデルトランスクリプトの精度上昇により、農薬暴露による異常値検出の精度を更に鋭敏なものにすることも強く期待できる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

#### 2) 雑誌

1. Kawamura Y, Takouda J, Yoshimoto K, Nakashima K. New aspects of glioblastoma multiforme revealed by similarities between neural and glioblastoma stem cells. *Cell Biol Toxicol.* 2018 Jan 31. doi: 10.1007/s10565-017-9420-y. [Epub ahead of print] Review. PMID:29383547.

2. Kawamura Y, Katada S, Noguchi H, Yamamoto H, Sanosaka T, Iihara K, Nakashima K. Synergistic induction of astrocytic differentiation by factors secreted from meninges in the mouse developing brain. *FEBS Lett.* 2017 Nov;591(22):3709-3720. doi: 10.1002/1873-3468. 12881. PMID: 29029363.
  3. Sanosaka T, Imamura T, Hamazaki N, Chai M, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Miura F, Ito T, Fujii N, Ikeo K, Nakashima K. DNA Methylation Analysis Identifies Transcription Factor-Based Epigenomic Signatures of Multilineage Competence in Neural Stem/Progenitor Cells. *Cell Rep.* 2017 Sep 19;20(12):2992-3003. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.086. PMID: 28930691.
  4. Kimura A, Matsuda T, Sakai A, Murao N, Nakashima K. HMGB2 expression is associated with transition from a quiescent to an activated state of adult neural stem cells. *Dev Dyn.* 2018 Jan;247(1):229-238. doi: 10.1002/dvdy.24559. PMID: 28771884.
  5. Zhu Y, Uezono N, Yasui T, Nakashima K. Neural stem cell therapy aiming at better functional recovery after spinal cord injury. *Dev Dyn.* 2018 Jan;247(1):75-84. doi: 10.1002/dvdy.24558. Review. PMID: 28766845.
  6. Honda M, Nakashima K, Katada S. PRMT1 regulates astrocytic differentiation of embryonic neural stem/precursor cells. *J Neurochem.* 2017 Jul;142:901-907. doi: 10.1111/jnc.14123. [Epub ahead of print] PMID: 28695568.
  7. Kameda T, Imamura T, Nakashima K. Epigenetic regulation of neural stem cell differentiation towards spinal cord regeneration. *Cell Tissue Res.* 2018 Jan;371(1):189-199. doi: 10.1007/s00441-017-2656-2. Epub 2017 Jul 10. Review. PMID: 28695279.
  8. Yasui T, Uezono N, Nakashima H, Noguchi H, Matsuda T, Noda-Andoh T, Okano H, Nakashima K. Hypoxia Epigenetically Confers Astrocytic Differentiation Potential on Human Pluripotent Cell-Derived Neural Precursor Cells. *Stem Cell Reports.* 2017 Jun 6;8(6):1743-1756. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.05.001. PMID: 28591654.
  9. Brulet R, Matsuda T, Zhang L, Miranda C, Giacca M, Kaspar BK, Nakashima K, Hsieh J. NEUROD1 Instructs Neuronal Conversion in Non-Reactive Astrocytes. *Stem Cell Reports.* 2017 Jun 6;8(6):1506-1515. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.013. Epub 2017 May 11. PMID: 28506534.
  10. Uesaka M, Agata K, Oishi T, Nakashima K, Imamura T. Evolutionary acquisition of promoter-associated non-coding RNA (pancrRNA) repertoires diversifies species-dependent gene activation mechanisms in mammals. *BMC Genomics.* 2017 Apr 7;18(1):285. doi: 10.1186/s12864-017-3662-1. PMID: 28388877.
2. 学会発表  
<国内学会>
1. 中島欽一<sup>○</sup>: 胎生期エピジェネティック攪乱による遅発性学習記憶障害とてんかん感受性増加のメカニズム、第26回海馬と高次脳機能学会、愛知県、名古屋市立大学、

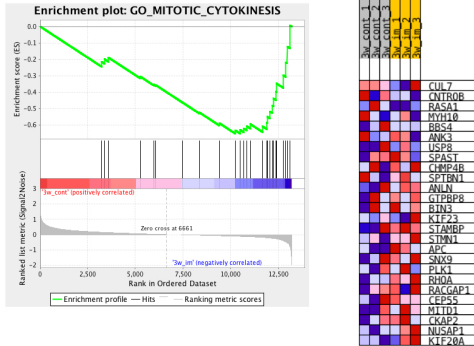
- 2017年9月30-10月1日(30日)(特別講演)
2. 今村拓也<sup>○</sup>、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島欽一 : DNA methylome s identify transcription factor-based epigenomic signatures for timed acquisition of differentiation competence in neural stem/progenitor cells towards neuronal and glia lineages、4<sup>th</sup> World Congress of Reproductive Biology、沖縄県、沖縄コンベンションセンター、2017年9月27-29日(29日)(ポスター)
  3. 吉川容司<sup>○</sup>、吾郷哲郎、立花正輝、古森元浩、芝原友也、脇坂義信、黒田淳哉、中嶋秀行、中島欽一、北園孝成 : 海馬歯状回における傷害反応性神経幹細胞増殖と神経新生における活性酸素種産生酵素Nox4の役割、第26回海馬と高次脳機能学会、愛知県、名古屋市立大学、2017年9月30-10月1日(30日)(一般口演)
  4. 中島欽一<sup>○</sup> : Hypoxia epigenetically confers astrocytic differentiation potential on human pluripotent cell-derived neural precursor cells、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13日)(口頭)
  5. 今村拓也<sup>○</sup>、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島欽一 : DNA methylome analysis identifies transcription factor-based epigenomic signatures of multi-lineage competence in neural stem/progenitor cells、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13-14日)(ポスター)
  6. 本田瑞季<sup>○</sup>、堅田明子、大塚まき、山本直樹、五十嵐勝秀、今村拓也、中島欽一 : Mechanism underlying developmental stage dependent changes in neural stem cells responsiveness to Bone Morphogenetic Proteins、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13-14日)(ポスター)
  7. 亀田朋典<sup>○</sup>、今村拓也、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一 : Neuronal activity-dependent DNA methylation changes in the naïve hippocampal neurons accelerate gene expression responses to the following stimuli、The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community、北海道、グランドホテルニュー王子、2017年9月13-15日(13-14日)(ポスター)
  8. 今村拓也<sup>○</sup>、山本直樹、阿形清和、中島欽一 : Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells、第43回内藤コンファレンス、北海道、シャトレセガトキングダムサッポロ、2017年8月27日-30日(29日)(ポスター)
  9. 中嶋秀行<sup>○</sup>、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一 : Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor,

- mediated by microRNA in neural stem cells fate specification、第40回日本神経科学大会、千葉市、幕張メッセ、2017年7月20日- 23日 (22日) (口頭)
10. 中島欽一<sup>○</sup>: DNA Methylation Regulating Neuron-Glia Fate Switching of Neural Stem Cells、第40回日本神経科学大会、千葉市、幕張メッセ、2017年7月20-23日 (21日) (シンポジウム)
  11. 今村拓也<sup>○</sup>: 長鎖ノンコーディングRNAによるほ乳類エピゲノム制御、第2回次世代生命科学の研究会、福岡県、九州大学コラボレーションI、2017年7月13-14日 (14日) (口頭)
  12. 今村拓也<sup>○</sup>: ニューロンにおけるエピゲノム制御とその破綻、第44回日本毒性学会学術年会、神奈川県、パシフィコ横浜、2017年7月10-12日 (12日) (シンポジウム)
  13. 亀田朋典<sup>○</sup>、今村拓也、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一: マウス海馬ニューロンは神経活動依存的にDNAメチロームを変動し、脱メチル化を介して遺伝子発現応答を高速化する、第11回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都、学術総合センター一橋講堂、2017年5月22-23日 (23日) (ポスター)
  14. 松田泰斗<sup>○</sup>、入江剛史、アデフィンアリア、中島欽一: エピゲノム変換を介したミクログリアからニューロンへの直接分化転換機構の解明、第11回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都、学術総合センター一橋講堂、2017年5月22-23日 (22日) (ポスター)
- Workshop 2017, Paris-Diderot University, November 6-8, 2017
2. Katada, S., Honda, M., Takouda, J., Igarashi, K., and Nakashima, K.: Developmental stage-dependent change of SMAD target genes defines the direction of neural stem cell differentiation induced by bone morphogenetic proteins, EMBO Conference 'Gene regulatory mechanisms in neural fate decisions', San Juan de Alicante, Spain, September 7-10, 2017
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
該当なし。
  2. 実用新案登録  
該当なし。
  3. その他  
該当なし。

<国際学会>

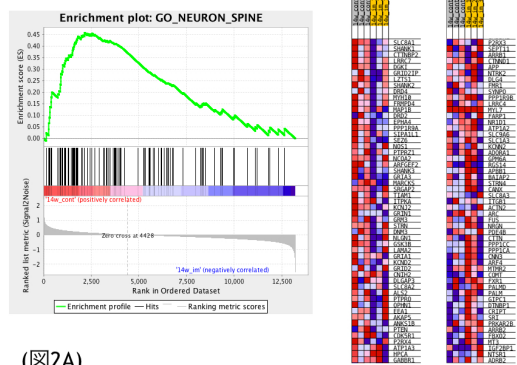
1. Imamura, T., Yamamoto, N., Agata, K., Nakashima, K.: Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells, France•Japan EPIGENETICS

GSEA解析：イミダクロプリド投与により早期に増加する遺伝子群は細胞周期進行に関連しているかもしれない



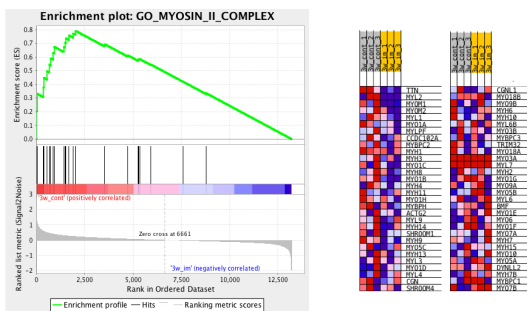
(図1A)

GSEA解析：イミダクロプリド投与による晩発性発現減少遺伝子群はニューロンの質的・量的変化に關する



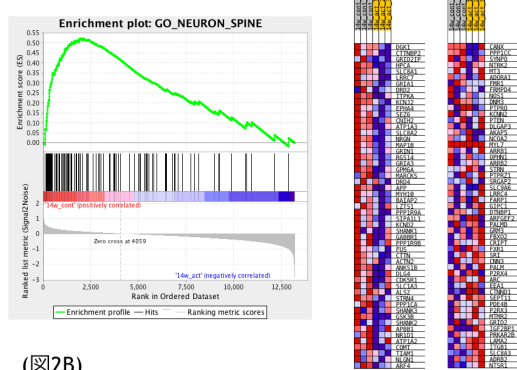
(図2A)

GSEA解析：イミダクロプリド投与により早期に減少する遺伝子群はミオシンに関連しているかもしれない



(図1B)

GSEA解析：アセタミプリド投与も同様にニューロンの質的・量的変化に關するかもしれない



(図2B)