

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）

研究代表者

種村 健太郎（東北大学大学院農学研究科・動物生殖科学分野・教授）

【研究要旨】

本研究は、発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、中枢神経系に対する毒性学的な意義を明確に評価する試験系を確立し、もって行政施策へ反映することを目的とする。

測定環境の影響を排除し再現性と定量性を確保するために独自開発した防音密閉式の情動認知行動解析機器群と測定プロトコルを用いて、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、生後 2 週齢（以下、幼若期）、或いは、生後 11 週齢（以下、11 週令以降を成熟期と定義）のマウスに投与し、生後 12-13 週齢時（平成 27 年度）或いは生後 24-25 週齢時（平成 28 年度）の成熟期に、情動認知行動解析を行った。その結果、幼若期投与による異常の誘発が生後 12-13 週齢時に確認され、さらに生後 24-25 週齢時には、むしろ異常の程度が増すことが示された。特に、学習記憶異常と不安関連行動異常が顕著に増悪し、その程度は、統合失調症や認知症といった神経疾患モデルマウスが示す異常の範囲と程度を超えるものであった。

胎生期から幼若期にかけての経母体暴露のモデルとして、妊娠/泌乳期雌マウスに、ADI（一日許容摂取量）を想定した低用量のアセタミプリドとイミダクロプリドを飲水投与し、雄産仔マウスについて成熟期の情動認知行動解析を進めた結果、不安関連行動異常を伴う学習記憶異常を検出した。併行して、低用量のニコチンを用いた行動結果、また、これまでに行ったドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬であるアセフェート等の発生発達期暴露により成熟期に誘発される行動解析結果と併せて、オープンフィールド試験、明暗往來試験、条件付け学習記憶試験における各検定項目の「情動認知行動異常」の程度を検討している。

統合失調症や発達障害において問題とされている行動様式の柔軟性欠如に相当する行動異常検出への対応を目的として、行動柔軟性課題と行動抑制課題についてタッチスクリーン型オペラント実験装置の開発に着手し（平成 27 年度）、毒性評価への応用について検討を進めた結果、良好な結果が得られている（平成 28-29 年度）。

平成 27 年度に、妊娠マウスへのバルプロ酸により得られた産仔マウスが成体期における学習記憶異常を示すこと、その際、海馬神経新生が減少すること、成体期マウスへのカイニン酸投与で異所性かつ形態異常な海馬神経新生が生じることを見いだした。これらの所見が毒性指標となりうるか、他の暴露モデルを用いて検討を重ねている（平成 28-29 年度）。

膜電位感受性色素を用いたイメージングで、バルプロ酸、ビスフェノール類の胎生期投与による成熟期の機能変調パターンを計測した（平成 27 年度）。これを拡張し、海馬・皮質神経回路で回路の機能変調を示す毒性値の設定を目的として、用量相関性について検討を進めた。

幼若期マウスへの化学物質投与直後の海馬における機能変調パターンの検出系の開発に着手し（平成 28 年度）、アセタミプリドおよびイミダクロプリドの海馬スライス培養への添加による影響を捉えることに成功している（平成 29 年度）。

特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるエストロゲン受容体 α 遺伝子改変マウスとして、ER α KI マウス（平成 27 年度）および ER β KI マウス（平成 28 年度）の脳および海馬について、網羅的遺伝子発現解析を行い、パスウェイ解析を進めた。

また、第 5 回内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関するアドバイザーグループ会合（於 OECD）に参加し、内分泌かく乱化学物質の評価のための AOP（Adverse Outcome Pathway）に関して討議を行い（平成 27 年度）、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としての提案に向けた取り組みを進めた（平成 28-29 年度）。

【研究組織】

代表：種村 健太郎

東北大学大学院農学研究科

動物生殖科学分野・教授

研究総括、情動認知行動解析と毒性基準値の設定、
神経突起解析、遺伝子発現パスウェイ解析を担当。

分担：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

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を担当。

分担：掛山 正心

早稲田大学人間科学学術院

応用生理学研究室・教授

情動認知行動解析と毒性基準値の設定を担当。

分担：富永 貴志

徳島文理大学・神経科学研究所・准教授

神経回路機能解析と異常基準値の設定を担当。

分担：北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所・

安全性生物試験研究センター・毒性部・室長

エストロジェン受容体遺伝子改変マウスの解析、
遺伝子発現解析と異常基準値の設定を担当。

分担：菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター・毒性部・

客員研究員

国内外情報収集、OECD 対応、新規毒性マーカー探
索を担当。

A. 研究目的

先行研究 (H20-化学一般-009)にて、周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の神経毒性試験法では同定困難な情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉えた。次の研究 (H23-化学一般-004)では、それらが毒性指標として定量評価できることを示した。本研究は、先行研究を踏まえて発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量的に捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することを目的とする。これにより情動認知行動異常の高精度なリスク評価が普遍性を持って実施可能となり、行政対応に必須のバリデーションに耐え、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としてのガイドライン作成と、OECDへの提案を通じての国際貢献を目指す。

尚、中枢神経系の発生発達に重要な役割を果たす神経可塑性の分子背景が各種の脳内伝達物質の適切な機能に深く依存しているという知見と、その機能の外的なかく乱が人の集団の情動認知機能異常を引き起こすという疫学的調査報告が有り、低用量の化学物質が胎児や小児に及ぼす中枢影響の毒性学的評価が問題となっている。この様な、低用量暴露の結果として成熟後に情動認知行動異常が顕在化するという毒性を評価するための動物試験は、従来は主観的な心理学的記述に終始する事が多く、行政対応への適用が困難であった。この為、普遍的、客観的、定量的、かつ高精度な情動認知行動異常リスクの評価系の作成が必要である。

B. 研究方法

本研究では、二つの先行研究 (H20-化学一般-009)および (H23-化学一般-004)の成果を踏ま

えて発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、客観性、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3年計画で作出する。

【マウス情動認知行動異常の基準値設定】

発生発達期暴露により成熟期に情動認知行動異常を誘発することを確認済みのドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬等を、野生型マウスに暴露し、オープンフィールド試験、明暗往来試験、及び、条件付け学習記憶試験(行動解析バッテリー試験)を実施する。その成績を定量的な値として項目ごとに記録し、異常であると認定される最小値を、その項目の基準値として「毒性基準値」と定義する。その際に、溶媒対照とは別に、情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体 α および β 遺伝子欠損マウス、および精神神経疾患モデルマウスとして報告されているマウスの行動様式を包括した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」として用いることで、国際的なバリデーション展開時に利用できる異常値を複数点用意するとともに、国内3カ所で同一規格の機器を用いた行動解析バッテリー試験を施行し、バリデーションを見据えた頑強性を確認しつつ最適化を図る(種村、掛山、北嶋)。

【マウス情動認知行動異常誘発メカニズムの解明と神経科学的な異常の基準値設定】

これまでの研究に於いて、情動認知行動異常を呈するマウス脳から通常の光学顕微鏡的な病理所見は得られない場合が多いが、分子マーカ

一を用いての神経新生異常、大脳層構造異常、神経突起異常、および膜電位感受性色素を利用した光計測から神経回路機能異常を情動認知行動異常と対応した異常所見として検出してきた。さらに、それらは遺伝子発現プロファイリングによって裏付けられるものであった。そこで、野生型マウス(暴露)及び遺伝子改変マウス(非暴露)について神経幹細胞動態解析、大脳層構造形態解析(中島)、神経突起解析(種村)、神経回路機能解析(富永)、遺伝子発現プロファイリング(北嶋)を行い異常行動誘発メカニズムの解明を推し進めるとともに、それらの項目ごとに定量手法を確定し、対応する神経科学的な異常の基準値として設定する。その際、遺伝子発現プロファイリングに関しては、機知のパスウェイへの関与を明らかにする(種村)。

【発生-発達期における低用量化学物質暴露による成熟後の中枢行動毒性検定】

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、上記の情動認知行動「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。用量は、一日摂取許用量、急性参照用量を元に設定する(全員)。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。本研究成果については、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としてOECDへの提案を行う(菅野)。

【新規毒性マーカーの探索】

これまでの成果の一部として、情動認知行動

異常を示したマウスにエピゲノム変化が検出されていることから、それが分子レベルにおける基準値として設定できるかを検討する。近年、生物学的意義が明らかになりつつあるノン・コーディング RNA の変動についても、新規毒性判断指標としての妥当性を検討する(菅野、中島)。

C. 研究結果

ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリド(10mg/kg)とイミダクロプリド(8mg/kg)を生後2週齢および生後10週齢のマウスに単回経口投与し、生後12-13週齢時(平成27年度)或いは生後24-25週齢時(平成28年度)に、また胎生期から幼若期にかけての経母体暴露のモデルとして、妊娠/泌乳期雌マウスに、ADI(一日許容摂取量)を想定した低用量のアセタミプリドとイミダクロプリド(いずれも0.01および0.1mg/kg/day)を飲水投与し、雄産仔マウスについて生後12-13週齢時(平成29年度)にオープンフィールド試験、明暗往來試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験から成るバッテリー式の情動認知行動解析を行った(測定環境の影響を排除し再現性と定量性を確保するために独自開発した防音密閉式の情動認知行動解析機器群と測定プロトコルを用いている)。その際、飲水投与については、類縁化学物質として毒性の知られるニコチン(同用量)を用いた。その結果、生後12-13週齢時にその結果、高架式十字迷路試験において、アセタミプリドの幼若期投与による不安関連行動の逸脱が認められるとともに条件付け学習記憶試験において、アセタミプリドおよびイミダクロプリドの幼若期投与による学習記憶異常の誘発が認められた。さらに生後24-25週齢時には、むしろ異常の程度が増すことが示された。特に、学習記憶異常と不安関連行動異常が顕著に増悪し、その程度は、統合失調症や認知症といった神経疾患モデルマウスが示す異常の範囲と程度を超えるものであった。また、低用量飲水投与実験の結果

としても、いずれも情動行動異常を伴う記憶異常が検出され、対照化学物質として使用したニコチンと類似する傾向であった（種村）。

また、神経新生マーカーを用いた免疫組織化学から、アセタミプリドおよびイミダクロプリドの幼若期投与群の海馬において神経新生能低下が示された（種村、中島）。併行して、特に海馬について網羅的遺伝子発現解析およびカスケード解析を行った結果、アセタミプリド幼若期単回投与の結果、成熟後に、GABA 受容体シグナル異常およびシナプスにおける長期増強異常が疑われた（種村、菅野）。

併行して、これまでに行ったドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬であるアセフェート等の発生活達期暴露により成熟期に誘発される行動解析結果と併せて、オープンフィールド試験、明暗往來試験、条件付け学習記憶試験における各検定項目の「情動認知行動異常値」の設定を進めている（種村、菅野）。

現在までに、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるエストロゲン受容体 α 遺伝子改変マウス（2種）の行動解析結果との比較を行っている。その1種は、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 受容体遺伝子改変マウス（以降、ER α KI と記載）であり、ER α KI マウスのホモ型における ER α の発現は野生型の 20-25%であり、したがって ER α KI マウスは ER α ノックダウンマウスと考える事ができる。また、先行研究から 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確認した（平成 27 年度）。もう1種はエストロゲン(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、独自に作製した遺伝子改変マウス（以降、ER β KI と記載）であり、統合失調症モデルマウスの示す特徴的な行動異常を呈することを明らかに

した（平成 28-29 年度）（種村、北嶋）。

統合失調症や発達障害において問題とされている行動様式の柔軟性欠如に相当する行動異常検出への対応を目的として、行動柔軟性課題と行動抑制課題について検討を行った。行動柔軟性課題については先行研究（H20-化学-一般-010）において作成したものをを用いた。これまでにダイオキシン等の暴露実験により、他の毒性指標よりも低用量の周産期曝露により行動柔軟性が低下することを明らかにしてきたが、今回は同試験法を無機ヒ素の暴露実験に適用し、その試験法の妥当性検証と修正を行った。無機ヒ素は比較的低濃度曝露であっても IQ 低下、認知機能低下、情動異常等、様々な高次脳機能異常を引き起こすことが疫学調査により報告されているためである。飲水中に無機ヒ素を加えた母体から生まれた仔マウスが成熟後に行動柔軟性試験を行った結果、通常の間題認知課題では影響の顕われない低用量の無機ヒ素曝露の仔マウスにおいて、行動柔軟性課題における有意な適応力低下を認めた。以上の結果から、行動柔軟性課題は認知・情動機能を鋭敏に検出する評価手法であることが明らかとなった。併行して、行動柔軟性課題と行動抑制課題についてタッチスクリーン型オペラント実験装置を開発に着手し（平成 27 年度）、装置を用い、Go/NoGo 課題をマウスにおいて実現することに成功した。我々の知る限り、マウスでの成功例は世界初である。Go/NoGo 課題は、正解(GO)の図形と不正解(NoGo)の図形をランダムに呈示し、“GO”の場合には素早く「タッチする」と報酬が与えられ、“NoGo”の場合は逆に一定時間タッチしなければ報酬が与えられる課題である。“NoGo”の際には、タッチする習慣を意志の力で抑制するセルフコントロールが要求

されるもので、ヒトにおいては、注意欠如・多動症 (ADHD) や自閉スペクトラム症 (ASD) (いわゆる「自閉症」)、うつ病や統合失調症、認知症の当事者において成績不良 (後述) や課題遂行時の脳活動異常が報告されている。すなわちヒトの精神症状を検出するものと同じ課題パラダイムをマウスで実現できる可能性があり、毒性試験のヒトへの外挿性を検討する上で非常に有効な試験法だと考えられる。(平成 28-29 年度) (掛山)。

特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるエストロゲン受容体 α 遺伝子改変マウス (前記の ER α KI マウスおよび ER β KI マウス) の大脳、海馬、脳幹について、網羅的遺伝子発現解析を行った。成熟期の雄性 ER α KI マウスの脳 3 部位 (大脳皮質、海馬、脳幹) のサンプルについて、網羅的遺伝子発現解析を行い、脳各部位について、野生型と比較し、ER α KI マウスの場合に、発現が有意に異なる (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ以下のとおりとなった。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき、大脳皮質、海馬及び脳幹において、それぞれ 1.0、0.7 及び 0.8 コピー以上のものを採用した。その結果、大脳皮質: 192 ps (増加)、122 ps (減少)、海馬: 950 ps (増加)、68 ps (減少)、脳幹: 243 ps (増加)、30 ps (減少) が抽出された。また、3 部位に共通して増加した遺伝子として 5 つ、減少した遺伝子として 2 つが得られている。(平成 27 年度)。さらに ER β KI マウスについて、同様の網羅的遺伝子発現解析を進め、(平成 28 年度) 両者の比較検討を進めている (平成 29 年度) (北嶋、種村)。

マウス海馬神経回路での基準となる基礎的な信号パターンを設定を行った。特に、発生-発達に関わる重要な指標である、興奮-抑制 (E/I) バランスの変動を評価できる標準的な回路パターンを設定を行った (平成 27 年度)。この一部は胎生期バル

プロ酸投与で起きるエピジェネティックな回路機能の変化の検出に有効に用いることができた (Juliandi ら、Stem Cell Rep 2015)。これをさらに拡張したモデルを用いてビスフェノール類の胎生期幼若暴露の遅発毒性発現系を解析し興奮性の閾値に関する知見を発見している (平成 27 年度)。一方、他の皮質回路 (嗅内野、梨状皮質、傍梨状核、感覚野、運動野など) では、基準となる信号パターンが殆ど無いとあって良い。このためこの系での基準パターンの設定に着手し、特に周期応答に着目して解析している。嗅内野-梨状皮質間、梨状皮質-傍梨状核間の特徴的な周期的神経活動を再現性よく観測することに成功しており、このパターンからのズレを定量的な指標にすることを検討するとともに (平成 27 年度)、これを拡張し、海馬・皮質神経回路で回路の機能変調を示す毒性値の設定を目的として、用量相関性について検討を進めている (平成 28-29 年度)。また、幼若期マウスへの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) の単回強制経口投与後の、初期における神経回路影響としての機能変調パターンを検出すべく、海馬神経回路機能について検討した。その結果、強制投与後、2 時間後には細胞体での興奮性が著しく亢進していた。その他 In vivo 系での神経回路計測系の開発、膜電位依存性蛋白の使用を含む新規イメージング法の開発を進めている (平成 27-29 年度) (富永)。

バルプロ酸胎仔期暴露マウスにおいては、成体海馬の増殖性神経幹細胞が 2/3 にまで減少することがわかった。また、その結果新生ニューロンの数も約 2/3 にまで減少していた (平成 27 年度)。またこれらの減少が、自発的運動 (回し車によるランニング) により、コントロールマウスと同程度まで回復することも明らかとなった。続いて成体期のカイニン酸投与により、ニューロン新生が約 2 倍にまで増加することがわかった。さらにこれらの中には通常あまりに見られない海馬歯状回門に局在する異所性の新生ニューロンが約 10 倍

増加していること見いだした。加えて、この異所性ニューロン新生は、自然免疫受容体である TLR9 の欠損や、ミクログリアの不活性化によりさらに増大することも明らかとなった（平成 27 年度）。これらの所見が毒性指標となりうるか、他の暴露モデルを用いて検討を重ねている（平成 28-29 年度）さらに、新規の神経行動毒性マーカーとしての小分子 RNA の利用についての検討を進めている（平成 28-29 年度）。（中島）

第 5 回内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関するアドバイザーグループ会合（2015. 10. 8-9、於 OECD）に参加し、内分泌かく乱化学物質の評価のための AOP（Adverse Outcome Pathway）即ち、化学物質の放出（放出源の確定）、それによる環境汚染（環境濃度）、暴露（暴露濃度）、体内に入り、細胞内の受容体等への結合、細胞の応答、個体の応答、集団への影響、動物社会への影響について、物質の暴露から毒性影響が表れるまでの過程に関して討議を行い（平成 27 年度）、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としての提案に向けた取り組みを進めている（平成 28-29 年度）（菅野）。

D. 考察

ネオニコチノイド系農薬や、無機ヒ素、ビスフェノール類、バルプロ酸を用いた発生-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異常と、対応する神経科学的物証について、暴露による影響を効率良く、また高精度に、かつ定量的に捕捉することに成功していると考えられた。また、今後、情動認知行動異常の基準値設定や、神経新生能、神経回路機能、神経突起動態等の神経科学的な異常の基準値設定を進める上で、「指標」の選定が非常に重要であると考えられるとともに、その為に用いる、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるエストロゲン受容体 α 遺

伝子改変マウスの導入は非常に有望であると考えられた。また、本研究課題の成果は、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法として、OECD の AOP 開発プログラムへの提案に貢献するものであると考えられた。

E. 結論

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異常と、対応する神経科学的物証について、暴露による影響を効率良く、また高精度に、かつ定量的に捕捉することに成功している。今後、情動認知行動異常の基準値設定、神経科学的な異常の基準値設定によって毒性学的な意味づけを明確にできる評価系の作出に資することが期待できる。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

（種村）

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

Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Chiba H, Shirakata Y, Hara K, Tanemura K, Arima T. Genome-Scale Assessment of Age-Related DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa.

PLoS One. 2016 Nov 23;11(11):e0167127.

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

Inoue H, Ogonuki N, Hirose M, Hatanaka Y, Matoba S, Chuma S, Kobayashi K, Wakana S, Noguchi J, Inoue K, Tanemura K, Ogura A. Mouse *DIPas1*, a DEAD-box RNA helicase, is required for the completion of first meiotic prophase in male germ cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Sep 16;478(2):592-8.

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

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

(北嶋)

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

(中島)

Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature.* 2016 Nov 10;539(7628):299-303. doi: 10.1038/nature20104. PMID: 27750280

Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, Hatada I. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol.* 2016 Oct;34(10):1060-1065. doi: 10.1038/nbt.3658. PMID: 27571369

Noguchi H, Kimura A, Murao N, Namihira M, Nakashima K. Prenatal deletion of DNA methyltransferase 1 in neural stem cells impairs neurogenesis and causes anxiety-like behavior in adulthood. *Neurogenesis (Austin).* 2016 Sep 9;3(1):e1232679. PMID: 27844025

Irie K, Tsujimura K, Nakashima H, Nakashima K. MicroRNA-214 Promotes Dendritic Development by Targeting the Schizophrenia-associated Gene Quaking (*Qki*). *J Biol Chem.* 2016 Jun 24;291(26):13891-904. doi: 10.1074/jbc.M115.705749. PMID: 27129236

Yamamoto N, Agata K, Nakashima K, Imamura T. Bidirectional promoters link cAMP signaling with irreversible differentiation through promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) expression in PC12 cells. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jun 20;44(11):5105-22. doi: 10.1093/nar/gkw113. PMID: 26945044

Noguchi H, Murao N, Kimura A, Matsuda T, Namiyama M, Nakashima K. DNA Methyltransferase 1 Is Indispensable for Development of the Hippocampal Dentate Gyrus. *J Neurosci*. 2016 Jun 1;36(22):6050-68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0512-16.2016. PMID: 27251626

Ito K, Sanosaka T, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aizawa A, Uosaki Y, Noguchi A, Arakawa H, Nakashima K, Takizawa T. Identification of genes associated with the astrocyte-specific gene Gfap during astrocyte differentiation. *Sci Rep*. 2016 Apr 4;6:23903. doi: 10.1038/srep23903. PMID: 27041678

(富永)

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

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

(菅野)

Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, deta-

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

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

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

2. 学会発表 (抜粋)

(種村)

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

Kentaro Tanemura

Neuro 2016, 神奈川、2016年7月20-22日

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

Kentaro Tanemura and JUN Kanno

ICT XIV, メキシコ、メリダ、2016年10月2-6日

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

Temporal alternations in DNA methylation patterns of spermatozoa in early young mice, The 17th AAAP Societies Animal Science Congress, Kyushu Sangyo University, 福岡、2016年8月20-25日

Norio Kobayashi, Hiroaki Okae, Hitoshi Hiura, Hatsune Chiba, Yoshiki Shirakata, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, Takahiro Arima
Age-related changes in DNA methylation patterns of spermatozoa in mice,
BLUEPRINT/IHEC conference, Crowne Plaza
Brussels, Brussels, Belgium, 2016年9月8-9日

小林記緒、岡江寛明、樋浦仁、千葉初音、白形芳樹、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎
性成熟から繁殖期を通じたマウス精子DNAメチル化様式の変齢性変化、第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川、2016年9月11-15日

小林記緒、岡江寛明、樋浦仁、千葉初音、白形芳樹、原健士朗、種村健太郎、有馬隆博
繁殖期におけるマウス精子 DNA メチル化様式の変齢性変化、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日

斉藤洋克、井上弘貴、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎
ビタミンE欠乏給餌によるマウス精巣影響と精子DNAメチローム変化
第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川、2016年9月11-15日

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

後藤萌 斉藤洋克 白形芳樹 原健士朗 種村健太郎
浸透圧変動に対するMII期卵母細胞の細胞膜状態についてのマウス系統間の差違

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

梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎
ウシ精子機能へのニューロテンシンの影響
第159回日本獣医学会大会、日本大学、神奈川、2016年9月6-8日

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

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

(掛山)

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

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

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

京相和貴・宇治田和佳・若菜茂晴・遠藤のぞみ・掛山正心. Grin1 ミュータントマウスの社会性行動の解析. 第 25 回日本行動神経内分泌研究会.

泌研究会. 2016年9月、熱海

(北嶋)

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity.

第43回日本毒性学会学術年会(2016.6.29)

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

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復曝露の比較による予測性向上 -

第43回日本毒性学会学術年会(2016.7.1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study.

The 52nd Congress of EUROTOX (EUROTOX2016) (2016.9.6), Seville, Spain.

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純

キシレンの経気道吸入曝露によるマウス行動影響解析

第43回日本毒性学会学術年会(2016.6.30)

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純

キシレン吸入曝露によるマウスへの中枢機能影響解析

第159回日本獣医学会学術集会(2016.9.)

(中島)

Katada, S., Yamashita, R., Nakashima, K.: Implication of structure and functional changes of aging choroid plexus in neural stem

cells regulation and brain functions, KEYSTONE SYMPOSIA, Olympic Valley, January 8-12, 2017

Nakashima, K.: Insights into Rett Syndrome using Neural Stem Cells, KEYSTONE SYMPOSIA, Olympic Valley, January 8-12, 2017

Imamura, T., Yamamoto, N., Agata, K., **Nakashima, K.:** Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells. Society for Neuroscience 2016, San Diego Convention Center, November 12-16, 2016

Nakashima K.: Neural Stem Cell Regulation and Its Therapeutic Application to Spinal Cord Injury, Gordon Research Conference (Molecular & Cellular Neurobiology) (Hong Kong, China) June 12-17, 2016

中島欽一[○]: HDAC阻害剤胎生期曝露による学習記憶障害とその改善法、第35回日本認知症学会学術集会、東京都、東京国際フォーラム、2016年12月1-12月3日(2日)(シンポジウム)

本田瑞季[○]、堅田明子、大塚まき、山本直樹、五十嵐勝秀、今村拓也、中島欽一: 胎生期の神経幹細胞における発生時期依存的なBMP応答性変化の分子機構、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日(2日)(ポスター)

安井徹郎[○]、上菌直弘、中嶋秀行、松田泰斗、中島欽一: 低酸素培養によるヒトiPS由来神経幹細胞の短期アストロサイト分化誘導、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日(1日)(ポスター)

藤本雄一[○]、亀田朋典、小野田孝太、吉良潤一、中島欽一、今村拓也：ヒトES/iPS細胞から神経幹細胞への誘導とその分化過程におけるノンコーディングRNA (pancRNA) を介した特異的遺伝子活性化、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日（1日）（ポスター）

中島欽一[○]：神経幹細胞のエピジェネティック制御と脊髄損傷治療への応用、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日（30日）（シンポジウム）

坂井淳彦[○]、松田泰斗、加藤聖子、中島欽一：胎児期抗てんかん薬曝露マウスの成体でのけいれん感受性増加、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日（30日）（ポスター）

亀田朋典[○]、今村拓也、滝沢琢己、木村文香、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一：マウス海馬ニューロンにおいて神経活動によりDNA化が変動し遺伝子発現応答能を改変する、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日（30日）（ポスター）

山本直樹、阿形清和、中島欽一、今村拓也[○]：長鎖ノンコーディングRNAはほ乳類ニューロン完全増殖停止に必須である、第109回日本繁殖生物学会大会、神奈川県、麻布大学、2016年9月11-15日（13日）

中島欽一[○]：神経系細胞のエピジェネティクス、第46回新潟神経学夏期セミナー、新潟県、新潟大学脳研究所、2016年7月28-7月30日（30日）（招待講演）

坂井淳彦[○]、中島欽一、加藤聖子：マウス神経幹細胞の胎仔期バルプロ酸曝露による晩発性影響とその分子基盤の解明、第26回日本サイトメトリ

学会学術集会、福岡市、九州大学百年講堂、2016年7月23-24日（23日）

中島欽一[○]：Mechanism of Rett syndrome pathogenesis、第39回日本神経科学大会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年7月20-22日（20日）（シンポジウム）

中島欽一[○]：レット症候群原因因子MeCP2のmiRNA生合成を介したニューロン機能制御、第43回日本毒性学会学術年会、愛知県、ウインクあいち、2016年6月29-7月1日（30日）（シンポジウム）

山本直樹、阿形清和、中島欽一、今村拓也[○]：Regulation of Non-coding RNA Contributes to the Complete Cessation of Cell Proliferation of Neuron-like Cells、第35回札幌国際がんシンポジウム、北海道、ロイトン札幌、2016年6月24-25日（24日）（ポスター）

亀田朋典[○]、今村拓也、滝沢琢己、木村文香、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一：マウス胎仔海馬由来初代培養ニューロンにおける神経活動依存的DNAメチル化変動の検出、第35回札幌国際がんシンポジウム、北海道、ロイトン札幌、2016年6月24-25日（24日）（ポスター）

中島欽一[○]：神経系におけるエピジェネティクス、第10回日本エピジェネティクス研究会、大阪府、千里ライフサイエンスセンター、2016年5月19-20日（20日）（講演）

今村拓也[○]、山本直樹、阿形清和、中島欽一：cAMPシグナルによるPC12細胞の最終分化機構には両方向性プロモーター由来のノンコーディングRNA (pancRNA) 発現制御が必須である、第10回日本エピジェネティクス研究会、大阪府、千里ライフサイエ

ンスセンター、2016年5月19-20日 (20日) (ポスター)

亀田朋典[○]、今村拓也、滝沢琢己、木村文香、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一：マウス胎仔海馬由来初代培養ニューロンにおける神経活動依存的DNAメチローム変動の検出、第10回日本エピジェネティクス研究会、大阪府、千里ライフサイエンスセンター、2016年5月19-20日 (19日) (ポスター)

小野田孝太[○]、佐藤弘明、浜崎伸彦、中嶋秀行、東村博子、前多敬一郎、中島欽一、今村拓也：マウス性的二型核内の細胞でみられるアンドロジェン依存的なDNAメチル化レベルの変化、第10回日本エピジェネティクス研究会、大阪府、千里ライフサイエンスセンター、2016年5月19-20日 (19日) (ポスター)

中島欽一[○]：神経幹細胞分化とニューロン機能を制御するエピジェネティクス機構、第1回 名市大頭脳循環セミナー、名古屋市、名古屋市立大学、2016年4月8日

(富永)

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

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

R. Kajiwara, Y. Wakayama, Y. Tominaga, T.

Tominaga Network plasticity facilitating the neural excitation propagation between the perirhinal and entorhinal cortices as revealed by voltage-sensitive dye imaging302.14 / F15 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016

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

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

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

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

8. 吉村弘, 富永洋子, 富永貴志 (2016) ラット傍梨状核において大脳皮質脱抑制下で生じるエコー波 Cortical disinhibition-induced echo wave in the EPN of rat 第39回日本神経科学大会 Neuroscience 2016 パシフィコ横浜 7月20 - 22日 P2-058

(菅野)

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

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement. 14th International Congress of Toxicology 2016 (ICT 2016) (2016. 10. 3), Merida, Mexico

Jun Kanno, Percellome Project for Mechanistic Analysis of Chronic Toxicity by a New Concept of Repeated Dose Study, Society of Toxicology 55th Annual Meeting (2016. 3. 16), New Orleans, USA.

菅野 純
Pathology-based optimization of toxicology by tie-ups with cutting-edge biology and systems biology. 第 105 回日本病理学会総会(2016. 5. 13)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡
Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復曝露の比較による予測性向上 - 第 43 回日本毒性学会学術年会(2016. 7. 1)

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

Jun Kanno, Introduction to the Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology. 第 14 回国際毒性学会 (ICT2016) (2016. 10. 3), Merida, Mexico

Jun Kanno, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Environmental Pollutants on Health. the 27th Korean Academy of Science and Technology (KAST) International Symposium (2016. 11. 29), Seoul, Korea,

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

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

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

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |