

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）

総合研究報告書（分担3）

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」

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、ER $\alpha$  KIマウス、すなわちER $\alpha$ の発現が低下したER $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$  KIマウスは、ER $\alpha$  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 $\alpha$  スプライシングバリエントがER $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$  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 $\alpha$ 欠失マウスとER $\alpha$  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 $\alpha$ 欠失マウスとER $\beta$  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 $\alpha$ 欠失マウスとER $\beta$ 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<sup>+</sup>チャネル、Na<sup>+</sup>チャネルおよびCa<sup>2+</sup>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 $\alpha$ 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。そこで平成29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。

## 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 $\alpha$  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 $\beta$  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、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、妊娠マウスを含めC57BL/6NCrSlc マウス（日本エスエルシー）を実験に用いた。

ER $\alpha$  KI マウスは、エストロゲン（ER） $\alpha$  遺伝子座に、ER $\alpha$  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 $\alpha$  KI を使用した。ER $\alpha$  KI マウスのホモ型におけるER $\alpha$  の発現は野生型の20-25%であり、したがってER $\alpha$  KI マウスはER $\alpha$  ノックダウンマウスと考える事ができる。また、cDNAを導入していることから理論上、ER $\alpha$  のスプライシングバリエーションが生じないこととなる。加えて、ER $\alpha$  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。

ER $\beta$  KI マウスは、エストロゲン（ER） $\beta$  遺伝子座に、ER $\beta$  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 $\beta$  KI を使用した。ER $\beta$  KI マウスのホモ型に

における ER $\beta$  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。この点、同様に作製した ER $\alpha$  KI マウスのホモ型における ER $\alpha$  蛋白の発現量は、野生型の 20-25%であり、したがって ER $\alpha$  KI マウスは ER $\alpha$  ノックダウンマウスと考える事ができた事から、この遺伝子座における ER $\beta$  蛋白の発現は、野生型における ER $\alpha$  の発現量よりも低い可能性が示唆される。また、cDNA を導入していることから理論上、ER $\alpha$  のスプライシングバリエントが生じないこととなる。加えて、ER $\beta$  KI マウスは、認知関連、情動関連及び情報処理関連に障害に障害が認められることが確認されている。ER $\beta$  KI マウスでは、ER $\alpha$  KO と比べて、さらに「情報処理」の障害が認められる。したがって、ER $\beta$  KI マウスと ER $\alpha$  KO の遺伝子発現変動の比較することにより、この「情報処理」に関連するシグナルネットワークが明らかになるものと期待される。

ER $\alpha$  欠失マウス及び ER $\beta$  欠失マウスは、Pierre Chambon 教授 (フランス、ルイパスツール大学) より供与いただいた。比較に際し、野生型マウスと欠失マウスは同腹のものを使用した。

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 3 部位 (大脳皮質、海馬、脳幹) (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 3 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。抽出に当たっては、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  $\mu$ 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: 野生型及び ERαKI マウスの遺伝子発現の脳各部位間の比較 (平成 27 年度研究):

脳各部位について、野生型と比較し、ERα KI マウスの場合に、発現が有意に変動 (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。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。

大脳皮質: 168 ps (増加)、115 ps (減少)

海馬: 908 ps (増加)、64 ps (減少)

脳幹: 205 ps (増加)、25 ps (減少)

3 部位に共通して増加した遺伝子として 4 つ (5 ps: Sgk1, Adat2, Nfkbia, Rufy2)、他方、減少した遺伝子として、ERα (Esr1) を含む 2 つ (2 ps: Igh-6, Esr1) が得られた。野生型と ERα 遺伝子の発現量が減少している ERα KI マウスとの比較であるため、ERα (=Esr1) 遺伝子が抽出されてきたのは妥当と考える。

次いで、大脳皮質、海馬及び脳幹において、有意に変動した遺伝子の集合関係を検討したところ、脳の部位によって、野生型と比較し ERα KI マウスにおいて、有意に発現変動する遺伝子が、かなり異なることが明らかとなったため、部位ごとに分けて解析する事とした。

#### C-1-1: 大脳皮質における、野生型及び ERα KI マウスの遺伝子発現の比較 (平成 27

年度研究：

まず大脳皮質における ER $\alpha$  ともう一つの ER サブタイプである ER $\beta$  遺伝子の発現、及び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、野生型と ER $\alpha$  KI マウスとの比較を検討した。ER $\alpha$  遺伝子 (=Esr1) は、ER $\alpha$  KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER $\beta$  遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから大脳皮質においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER $\alpha$  KI マウスとで同程度である事が示唆された。

なお、G タンパク質共役受容体の一種であり形質膜上に存在するエストロゲン受容体である Gpr30 遺伝子の発現変動は認められなかった。

大脳皮質において、野生型マウスと比較し ER $\alpha$  KI マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、168 及び 115 ps であった。

増加分 168 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は現時点では見いだせなかった。ただし、多く (13 ps) の Slc トランスポーター遺伝子の発現増加が認められた。具体的には、Slc1a2 (GLT-1)、Slc2a12 (GLUT12)、Slc4a2 (AE2)、Slc6a11、Slc14a1、Slc16a2 (MCT8)、Slc16a9 (MCT9)、Slc17a6 (VGLUT2)、Slc24a4 (NCKX4)、Slc25a25 (APC3)、Slc26a8 (TAT1)、Slc29a4 (ENT4) 及び Slc43a2 (LAT4) 遺伝子であり、この内、Slc1a2 はグルタミン酸トランスポーターで

あり、Slc17a6 は小胞性グルタミン酸トランスポーターである。Slc トランスポーターは、ATP のエネルギーを利用しないものであるが、ATP のエネルギーを利用する Abc トランスポーターは Abcc1 の 1 ps のみ発現増加が認められた。

なお、2 種 (Kcnd3 及び Kcnj13) と、種類は少ないが K<sup>+</sup>チャネルの発現増加が認められた。

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、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) における Upstream Analysis を用いて検討した結果、Esr1 (=ER $\alpha$ ) が上位にリストアップされ、この標的遺伝子として 26 ps が抽出されてきた。具体的には、Ace, Arsg, Brwd1, Cdc42ep3, Cebpd, Clic6, Cpm, Csnk1a1, Enpp2, Igfbp2, Kcnj13, Lbp, Nfkb1a, Prkcd, Ramp3, Rdh5, Sgk1, Siah2, Slc16a2, Slc2a12, Sulf1, Tbcd, Tcf712, Tgfb2, Tgfbr1 及び Ttr 遺伝子であった。ER $\alpha$  KI マウスは、ER $\alpha$  ノックダウンマウスであるが、この結果からは、ER $\alpha$  KI マウスの大脳皮質ではむしろ機能的に、ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。

一方、減少分 115 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。ただし、発現増加の際と同様に、Slc トランスポーター遺伝子の発現減少が認められた (4 ps)。具体的には、Slc1a4 (ASCT1)、Slc8a2 (NCX2)、Slc12a6 (KCC3) 及び Slc35a5 遺伝子であった。

以上のことから、ER $\alpha$  KI マウスの大脳皮質においては、野生型マウスと比較し、多く

の Slc トランスポーターの発現が増加（一部、発現が減少）していることから、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進し、また発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子として ER $\alpha$  が抽出されてきたことから、むしろ ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。

C-1-2: 海馬における野生型及び ER $\alpha$  KI マウスの遺伝子発現の比較 (平成 27 年度研究) :

海馬における ER $\alpha$  ともう一つの ER サブタイプである ER $\beta$  遺伝子の発現、及び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、野生型と ER $\alpha$  KI マウスとの比較を検討した。ER $\alpha$  遺伝子 (=Esr1) は、ER $\alpha$  KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER $\beta$  遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER $\alpha$  KI マウスとで同程度である事が示唆された。

なお、G タンパク質共役受容体の一種であり形質膜上に存在するエストロゲン受容体である Gpr30 遺伝子の発現変動は認められなかった。

海馬において、野生型マウスと比較し ER $\alpha$  KI マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、908 及び 64 ps であった。

増加分 908 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

クとして、興奮性・抑制性双方の神経伝達の亢進が示唆された。具体的には、抑制性の GABA 受容体 (Gabbr3 及び Gabra4 遺伝子)、興奮性のグルタミン酸受容体 (Grin3a)、アドレナリン受容体 (Adra2a 及び Adrbk2 遺伝子) およびアセチルコリン受容体 (Chrna4 遺伝子) の発現増加が認められた。

また、過分極を示唆する K<sup>+</sup>チャネル遺伝子 (4 ps) の発現増加が認め、具体的には、Kcnj8、Kcnk4、Kctd18 及び Kend3 遺伝子であった。一方、脱分極を示唆する Ca<sup>2+</sup>チャネル遺伝子 (4 ps) の発現増加が認め、具体的には、Cacng8、Cacnb1、Cacna2d1、Cacna2d1 及び Cacng8 遺伝子であった。以上のことから、興奮性・抑制性双方の神経伝達が亢進している可能性が示唆された。

また大脳皮質の場合のように、多く (16 ps) の Slc トランスポーター遺伝子の発現増加が認められた。具体的には、Slc1a2 (GLT-1)、Slc1a4 (ASCT1)、Slc2a4rg-ps、Slc4a8 (NDCBE)、Slc7a6 (y+LAT2)、Slc7a6os、Slc7a11 (xCT)、Slc9a3r2、Slc11a2 (DMT1)、Slc20a2 (PiT-2)、Slc25a29 (ORNT3)、Slc25a36 (PNC2)、Slc35a5、Slc35b3 (PAPST2)、Slc52a2 及び Slco2a1 遺伝子であった。一方、Abc トランスポーターは Abcd2 及び Abcd4 の 2 ps のみ発現増加が認められた。

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、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) における Upstream Analysis を用いて検討した結果、Esr1 (=ER $\alpha$ ) が最上位にリストアップされ、この標的遺伝子として 77 ps が抽出されてきた。具体的には、Abhd2、

Anapc5, Ap3b1, Ar, Atg13, Avp, Bcl6, Bmp2, Casp8ap2, Cblc, Cdc42bpb, Cenpu, Crim1, Ddit4, Dusp5, Dyrk2, Fgf12, Gadd45b, Gnaq, Gopc, Gyg1, Hook2, Hsd17b7, Inip, Jak1, Jak3, Kif3b, Kif5b, Kllhl24, Kpnb1, Laptm5, Madd, Mark1, Mdm4, Myo6, Nfkbia, Nfyb, Nipsnap1, Nov, Nrcam, Onecut2, Ophn1, Pcbdl, Pcdhb4, Pdk4, Pdlim5, Pias1, Plcb1, Plxna2, Ppp1r3c, Ppp5c, Pten, Ptk2, Rab27a, Rabep1, Relb, Robo1, Rock1, Rp2, Sesn1, Sgk1, Skp2, Slc1a4, Slc25a36, Slc7a11, Spry4, Star, Stx6, Sufu, Tax1bp1, Terf2, Tfrc, Th, Tirap, Tjp2, Tsc22d3, Vezf1, Wasf2 及び Ypel1 遺伝子であった。ER $\alpha$ KI マウスは、ER $\alpha$ ノックダウンマウスであるが、この結果からは、ER $\alpha$ KI マウスの大脳皮質ではむしろ機能的に、ERシグナルが活性化している可能性が示唆された。

また、記憶形成に関わる Creb1 も上位にリストアップされ、この標的遺伝子として 41 ps が抽出されてきた。具体的には、Akt3, Apold1, Aqp11, Atf1, Avp, Bhlhe40, Cacna2d1, Camkk2, Capn5, Ccnj1, Cdh8, Cdk14, Ciart, Crim1, Errfil, Fam46a, Flt1, Gadd45b, Gadd45g, Gpr12, Hla-A, Homer1, Itgbl1, Klf7, Marcksl1, Mc11, Mdga1, Nptx2, Nrpl, Plxna2, Rbmx, Robo1, Sema4a, Sgk1, Sh3kbp1, Star, Tfrc, Th, Thop1, Ypel1 及び Zfp948 遺伝子であった。このことは、神経伝達が亢進した結果、ER $\alpha$ KI マウスの海馬では記憶形成に関わる Creb1 が活性化する可能性が示唆された。

一方、減少分 64 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。

以上のことから、ER $\alpha$ KI マウスの海馬においては、野生型マウスと比較し、GABA、アセチルコリン、グルタミン酸、アドレナリン受容体の発現増加が認められたことから、興奮性・抑制性双方の神経伝達が亢進していることが示唆され、また多くの Slc トランスポーターの発現が増加していることから、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進し、加えて発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子として ER $\alpha$  が抽出されてきたことから、むしろ ERシグナルが活性化している可能性が示唆された。また、発現調節因子として、記憶形成に関わる Creb1 が抽出されてきたことは、上記した神経伝達が亢進している示唆を支持するものと考え

C-1-3: 脳幹における、野生型及び ER $\alpha$ KI マウスの遺伝子発現の比較 (平成 27 年度研究):

脳幹における ER $\alpha$  ともう一つの ER サブタイプである ER $\beta$  遺伝子の発現、及び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、野生型と ER $\alpha$ KI マウスとの比較を検討した。ER $\alpha$  遺伝子 (=Esr1) は、ER $\alpha$ KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER $\beta$  遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER $\alpha$ KI マウスとで同程度である事が示唆された。

海馬において、野生型マウスと比較し ER $\alpha$  KI マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、205 及び 25 ps であった。

増加分 205 ps について、また減少分 25 ps についても、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。したがって脳幹において、野生型マウスと ER $\alpha$  KI マウスとの間に変化が認められるシグナルネットワークは、現時点では認められなかった。

C-1-4: ER $\alpha$  欠失マウスと ER $\alpha$  KI マウスにおける解析結果の比較 (平成 27 年度研究):

先行研究における ER $\alpha$  欠失マウスの大脳皮質、海馬及び脳幹における解析の結果、大脳皮質において、RAR シグナル伝達の低下、神経活動の活性化および概日リズムが乱れることが示唆され、海馬では神経系の障害に関わるシグナルネットワークは認められないが、脳幹では神経活動が活性化および概日リズムが乱れる可能性が示唆された。

したがって、ER $\alpha$  KI マウスと ER $\alpha$  欠失マウスにおける解析結果を比較すると、RAR シグナル伝達の低下および概日リズムが乱れる事が大きな相違点となる。

そこで ER $\alpha$  KI マウスの脳 3 部位における RAR シグナルおよび概日リズム関連遺伝子の発現変動を再解析したところ、いずれの関連遺伝子も、野生型のものと有意な差が認められなかった。この事から、ER $\alpha$  欠失マウスと ER $\alpha$  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と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。

他方、ER $\alpha$  KI マウスは、ER $\alpha$  の発現が低下した ER $\alpha$  ノックダウンマウスと考えることができるが、今回の解析結果からは、少なくとも大脳皮質と海馬において、ER $\alpha$  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、多くの ER $\alpha$  のスプライシングバリエントが、ER $\alpha$  の効果に対して dominant-negative な影響を有することが報告されていることから (Taylor SE ら、Cancer Lett 288(2): 133-148, 2010)、ER $\alpha$  のスプライシングバリエントが発現できない ER $\alpha$  KI マウスでは、野生型と比較し、ER $\alpha$  シグナルが亢進していることが推察された。

大脳皮質および海馬において、多くの Slc トランスポーター遺伝子の発現変動が認められた事から、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進していることが示唆されたが、この事が、神経系における障害に関わるか否かは現時点では不明である。

C-2: 野生型及び ER $\beta$  KI マウスの遺伝子発現の脳各部位間の比較 (平成 28 年度研究):

脳各部位について、野生型と比較し、ER $\beta$  KI マウスの場合に、発現が有意に変動 (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。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき、大脳皮質及び海馬において、それぞれ 1.0 及び 0.7 コピー以上のものを採用した。

大脳皮質: 51 ps (増加)、 190 ps (減少)  
海馬: 39 ps (増加)、 1,101 ps (減少)

2 部位に共通して増加した遺伝子として 5 ps (Adat2, Epm2a, Lats1, Klf2, Gkn3)、他方、減少した遺伝子は ER $\alpha$  (Esr1) を含む 19 ps (Atrx, Slc35a3, Zfp959, Sema3e, Gm7226, Tomm7, Sox18, Phf7, Htr1f, D6Wsu116e, Slpr2, Zfp385c, A230061C15Rik, Acvr1c, Dmp1, Phactr2, Tmem56, Esr1) が得られた。野生型と ER $\alpha$  遺伝子の発現量が減少している ER $\beta$  KI マウスとの比較であるため、ER $\alpha$  (=Esr1) 遺伝子が抽出されてきたのは妥当と考える。一方、ER $\beta$  (=Esr2) が抽出されなかった理由として、野生型においても ER $\beta$  の発現量が低い事に加え、導入した ER $\beta$  cDNA の発現量が低く、遺伝子導入により ER $\beta$  の発現量は増加していても、結果的に、発現量の検出限界以下となっている可能性が挙げられる。

次いで、大脳皮質及び海馬において、有意に変動した遺伝子の集合関係を検討したところ、脳の部位によって、野生型と比較し ER $\beta$  KI マウスにおいて、有意に発現変動する遺伝子が、かなり異なることが明らかとなったため、部位ごとに分けて解析する事とした。

C-2-1: 大脳皮質における、野生型及び ER $\beta$  KI マウスの遺伝子発現の比較 (平成 28 年度研究) :

まず大脳皮質における ER $\alpha$  ともう一つの ER サブタイプである ER $\beta$  遺伝子の発現、及び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、野生

型と ER $\beta$  KI マウスとの比較を検討した。ER $\alpha$  遺伝子 (=Esr1) は、ER $\beta$  KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER $\beta$  遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。G タンパク質共役受容体の一種で、膜上に存在するエストロゲン受容体である Gpr30 遺伝子も有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、オリゴデンドロサイトのマーカーの一つ Mbp 遺伝子のみが、ER $\beta$  KI マウスにて有意な増加が認められたが、もうひとつの Mag 遺伝子の方は有意な差が認められなかった事から、大脳皮質においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER $\beta$  KI マウスとで同程度である事が示唆された。

大脳皮質において、野生型マウスと比較し ER $\beta$  KI マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、51 及び 190 ps であった。

増加分 51 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は現時点では見いだせなかったが、概日リズムに関する Dbp 遺伝子の発現増加が有意に認められた。

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、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) 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、FOXO3、CRY2、CRY1 及び SMAD4 が抽出されてきた (>E-4)。CRY2 および CRY1 は概日リズム関連遺伝子であり、この標的遺伝子は DBP 及び SGK1 遺伝子であり、両遺伝子は発現増加していた。Cry2 も有意な増加が認められた。

一方、減少分 190 ps (この中には *Esr1* が含まれていた) 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)。

以上のことから、ER $\beta$  KI マウスの大脳皮質においては、野生型マウスと比較し、概日リズムが乱れている可能性が示唆された。加えて、発現が減少した遺伝子リストについて、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* が抽出されてこなかった事から、ER $\alpha$  シグナルは大脳皮質においては機能的にレスキューされている可能性が示唆された。

#### C-2-2 : 海馬における野生型及び ER $\beta$ KI マウスの遺伝子発現の比較 (平成 28 年度研究) :

海馬における ER $\alpha$  ともう一つの ER サブタイプである ER $\beta$  遺伝子の発現、及び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、野生型と ER $\beta$  KI マウスとの比較を検討した。ER $\alpha$  遺伝子 (= *Esr1*) は、ER $\beta$  KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER $\beta$  遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。G タンパク質共役受容体の一種で、膜上に存在するエストロゲン受容体である *Gpr30* 遺伝子も有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、

野生型と ER $\beta$  KI マウスとで同程度である事が示唆された。

海馬において、野生型マウスと比較し ER $\beta$  KI マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、39 及び 1, 101 ps であった。

増加分 39 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)。

一方、減少分 1, 101 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としては、神経伝達の抑制が示唆された。具体的には、膜の脱分極を示唆する K<sup>+</sup>チャンネル遺伝子(10 ps)の発現減少が認められ、具体的には、*Kcnn1*、*Kcnd1*、*Kcnj6*、*Kcnc3*、*Kcnu1*、*Kcmf1*、*Kcnq4*、*Kcnc1*、*Kctd8* 及び *Kctd3* 遺伝子であったが、一方、膜の過分極を示唆する Na<sup>+</sup>チャンネル(4 ps)及び Ca<sup>2+</sup>チャンネル遺伝子(2 ps)の発現減少が認められた。具体的には、*Scn1a*、*Scn2b*、*Scn4b* 及び *Cacng6*、*Cacng7* 遺伝子であった。この点、膜の分極状態だけでは、結果として、神経伝達が促進しているのか、抑制されているのか、不明瞭であるが、神経伝達物質合成酵素やシナプス小胞結合蛋白、イオンチャンネル、神経伝達物質受容体などをリン酸化することによって、それら蛋白機能を調節し、記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担う Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (*Camk2a*) 遺伝子の発現が抑制されている事から、神経伝達は抑制されている可能性が示唆された。

次いで、IPA における Upstream Analysis

を用いて検討した結果、Esr1 (=ER $\alpha$ )が最上位にリストアップされ、他に SMARCB1、SOX4 及び SP1 が抽出されてきた。Esr1 遺伝子の標的遺伝子として以下の 83 ps が抽出されてきた。

ABLIM1, AGT, ATP2A3, BCAT1, BIRC3, BRCA2, CD55, CENPU, CLDN4, CPM, CREBBP, CTSC, CYP26B1, DAB2, DLG5, DMP1, DSCR3, ESR1, FGFR2, FKBP4, GAL, GJA1, GJB1, GNA12, GREM1, HLA-G, ICOSLG/LOC102723996, IGF1, IQGAP1, ITGA2B, JAK3, KCNQ4, KHDRBS1, KIF13A, KIF5B, KLHL13, KLK3, KPNB1, LCK, MAGI1, MAP2K7, MAP7, METTL7A, MPHOSPH9, MYO6, NCAPH, OPA1, PAK6, PCM1, PDLIM5, PES1, PGRMC2, PPARGC1A, PTEN, PTK2, PTPN13, PTPRT, RBL1, RICTOR, RND3, ROCK1, RP2, SELL, SIAH2, SIGIRR, SLC12A4, SLC16A3, SLC1A4, SLC2A4, SMAD5, SMC3, SMURF2, SPINT1, STAM2, STAT3, STAT5A, SUCLA2, TFF1, TGFB1, TGFBR1, TJP2, TNFAIP3, TRPM2 及び YIPF2 遺伝子であった。この結果から、ER $\beta$  KI マウスの海馬においては、ER $\beta$  は ER $\alpha$  機能をレスキュー出来ない可能性が示唆された。

以上のことから、ER $\beta$  KI マウスの海馬においては、野生型マウスと比較し、K<sup>+</sup>チャネル、Na<sup>+</sup>チャネルおよび Ca<sup>2+</sup>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 $\alpha$  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。

C-2-4: ER $\alpha$  欠失マウスと ER $\beta$  KI マウスにおける解析結果の比較 (平成 28 年度研究) :

先行研究における ER $\alpha$  欠失マウスの大脳皮質、海馬及び脳幹における解析の結果、大脳皮質において、RAR シグナル伝達の低下、神経伝達の異常および概日リズムが乱れることが示唆され、海馬では神経系の障害に関わるシグナルネットワークは認められないが、脳幹では神経活動が活性化および概日リズムが乱れる可能性が示唆された。したがって、ER $\beta$  KI マウスと ER $\alpha$  欠失マウスにおける解析結果を比較すると、大脳皮質では ER $\alpha$  欠失マウスにおける RAR シグナル伝達の低下と神経伝達の異常が、海馬では ER $\beta$  KI マウスにおける神経伝達の抑制が大きな相違点となる。

そこで ER $\beta$  KI マウスの大脳皮質における RAR シグナル関連遺伝子の発現変動を再解析したところ、いずれの関連遺伝子も、野生型のものと有意な差が認められなかった。このことから、ER $\alpha$  欠失マウスと ER $\beta$  KI マウスにおける情動認知行動異常の差、すなわち「情報処理」に関連するシグナルネットワークは、大脳皮質における ER $\alpha$  欠失マウスにおける RAR シグナル伝達が低下及び神経伝達異常の正常化あるいは、海馬における神経伝達の抑制、特に記憶・学習をはじめとする神経機能の変化を担う Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (Camk2a) 遺伝子の発現が減少していることが関係している可能性が示唆された。

一方、ER $\alpha$  欠失マウスと ER $\beta$  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 $\alpha$  欠失マウスと ER $\beta$  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。このエス

トロジェンと概日リズムの関係に関しては、2014年にヒト乳がん細胞株 MCF-7 および MDA-MB-231 細胞を用いて、概日リズム関連遺伝子の一つ Clock 遺伝子のプロモーターにエストロジェン応答配列 (ERE) が存在し、エストロジェンは ER $\alpha$  の ERE への結合を促すことで、Clock 遺伝子の発現を増加させることが報告されている (Xiao et al., PLoS One 9(5): e95878, 2014) ことから、直接的な分子制御がおこなわれている可能性が高いものと考えられる。

今後、ER $\alpha$  KI マウスの場合と ER $\beta$  KI マウスの場合の比較解析を検討する。

C-3: アセタミプリドあるいはイミダクロプリドを成熟期あるいは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 (平成 29 年度研究) :

C-3-1: 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 (平成 29 年度研究) :

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。

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 A $\beta$  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-3-2: 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(平成29年度研究) :

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 $\beta$ 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-3-3: 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 (平成 29 年度研究) :

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せた。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 $\beta$  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-3-4: 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 (平成 29 年度研究) :

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、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 $\beta$  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。

#### D. 結論

平成 27 年度は、ER $\alpha$  KI マウス、すなわち ER $\alpha$  の発現が低下した ER $\alpha$  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 $\alpha$ 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 $\alpha$ KIマウスは、ER $\alpha$ 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 $\alpha$ スプライシングバリエントがER $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 欠失マウスとER $\alpha$ 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 $\alpha$ 欠失マウスとER $\beta$ 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 $\alpha$ 欠失マウスとER $\beta$ 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<sup>+</sup>チャネル、Na<sup>+</sup>チャネルおよびCa<sup>2+</sup>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 $\alpha$ 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

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.

## 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

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. )

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes

generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純

医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的  
バイオマーカー抽出研究

第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6. 29)

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、  
高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、  
菅野 純

シックハウス症候群レベルの極低濃度曝露  
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中枢影響  
解析

第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6. 30)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Toxicogenomics における動的  
バイオマーカー (Dynamic Biomarker) のカタ  
ログ化とその毒性予測利用

第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 7. 1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015.9.15), Porto, Portugal

種村健太郎、古川祐介、斉藤洋克、白形芳樹、

原健士朗、北嶋 聡、菅野 純  
幼若期マウスへのネオニコチノイド系農薬  
投与による神経行動毒性発現  
第 18 回環境ホルモン学会(2015. 12.)

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