

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

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)

平成 27-29 年度 総合研究報告書

研究代表者 種村 健太郎

平成 30 (2018) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告書（総括）

研究の総括 （種村 健太郎） P9

II. 総合研究報告書（分担）

1. 周産期における低用量ネオニコチノイド系農薬暴露による成熟後マウスの行動異常、
およびエストロジェン受容体遺伝子改変マウスを用いた行動異常値設定の試み
（種村 健太郎） P27

2. 行動柔軟性/抑制課題試験の開発と毒性評価への応用
（掛山 正心） P33

3. 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
（北嶋 聡） P43

4. 学習異常を伴う海馬神経新生異常を指標にした神経毒性評価
（中島 欽一） P63

5. 光計測による神経回路解析の神経毒性評価への応用
（富永 貴志） P75

6. 国内外情報収集、OECD 対応、新規毒性マーカー探索に関する研究
（菅野 純） P83

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P99

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：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：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：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：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：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あり、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 |

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1）

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

「周産期における低用量ネオニコチノイド系農薬暴露による成熟後マウスの行動異常、
およびエストロゲン受容体遺伝子改変マウスを用いた行動異常値設定の試み」

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】

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（平成28-29年度）。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、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（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マウスおよびER β KIマウスの示す行動異常や、低用量のニコチンを用いた行動解析結果、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」の程度を検討することが可能となった。

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。

H28 年度には、①低用量化学物質の慢性暴露による次世代個体の神経行動毒性発現を検討する目的で、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について、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに低用量 (0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行い、成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウス行動異常について検討した。また、②情動認知行動異常値を設定する目的で、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、情動認知行動異常値を設定する検定項目として、オープンフィールド試験における総移動量と中央部滞在時間、条件付け学習記憶試験における短期記憶形成能と空間記憶能についての妥当性の検証を推し進めるために 2 種のエストロゲン受容体遺伝子改変マウス (北嶋、菅野との共同研究) を用意し、同様の情動認知行動解析を行った。

B. 研究方法

① 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について、幼若期投与として生後 2 週齢を、成熟期投与として生後 11 週齢を設定し、雄マウスに対してゾンデを用いて、急性参照用量 (ARfD) を参照とし、アセタミプリド (10mg/kg) またはイミダクロプリド (8mg/kg) を単回強制経口投与した (溶媒はコーンオイルを使用) (A)。

さらに、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに一日摂取許用量 (ADI) を参照とした低用量 (0.1mg/kg/day) にてアセタミプリドとイミダクロプリドを、また、類似化合物としてニコチンを用いて同用量にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行った (B)。

いずれの実験についても成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウス行動様式について、オープンフィールド試験 (検定項目として、総移動量、中央部滞在率、総移動回数)、明暗往来試験 (検定項目として、明所滞在時間、明暗往来数、暗所滞在時間)、高架式十字迷路試験 (検定項目として、総移動量、オープンアーム滞在時間、総アーム選択数)、条件付け学習記憶試験 (検定項目として、学習度、場所連想記憶度、音連想記憶度)、プレパルス驚愕反応抑制試験 (検定項目として、120dB に対する 90、95、100dB のプレパルスによる驚愕反応抑制抑制度) からなるバッテリー式の行動解析を行うことで検討した。

② 2 種のエストロゲン受容体遺伝子改変マウス (北嶋、菅野との共同研究) を用意し、①同様の情動認知行動解析を行い、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、情動認知行動異常値の仮設定を試みた。尚、本研究で用いたエストロジェン受容体遺伝子改変マウスは、相同組み替えによってエストロジェン受容体 α 遺伝子座の3'-UTRをウシ成長ホルモン遺伝子の3'-UTRに置き換えたマウス(ER α KIマウス)と、さらにエストロジェン受容体 α 遺伝子のORFをエストロジェン受容体 β 遺伝子座のORFに置き換えたマウス(ER β KIマウス)である。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、東北大学の規定にのっとり、あらかじめ実験計画について承認を受け、かつ3Rの原則を遵守しつつ実施した。

C. 研究結果

① ①Aバッテリー式の情動認知行動解析の結果、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、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。また、大脳、および海馬について網羅的遺伝子発現解析と、その解析結果に基づくパスウェイ解析から、幼若期アセタミプリド投与群に髄鞘機能低下、軸索機能異常、神経保護作用低下が生じていることが示唆された

② ②A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について、妊娠11.5日齢の妊娠雌マウスに低用量(0.1mg/kg/day)にて飲水投与を開始し、出産後の生後4週齢時の離乳時まで同投与を行い、成長後の生後12-13週齢の産仔雄マウスについて行動解析を行った結果、アセタミプリドの発生-発達期飲水投与によって、オープンフィールド試験による総移動量の増加、明暗往来における明所滞在時間

および明暗往来数の増加、高架式十字迷路試験における総移動量、オープンアーム滞在時間および総アーム選択数の増加が誘認められた($p < 0.05$)。また、イミダクロプリドの発生-発達期飲水投与によって、オープンフィールド試験による中央部滞在時間の減少、高架式十字迷路試験における総移動量、オープンアーム滞在時間および総アーム選択数の増加、条件付け学習記憶試験における学習度、場所-連想記憶度の低下が認められた($p < 0.05$)。しかしながら、ニコチンによる影響結果に比較すると、その程度はやや低いものであった。

② ②B生後12-13週齢時のER α KIマウスについて行動解析を行った結果、条件付け学習記憶試験における場所-連想記憶度および音-連想記憶度の低下、プレパルス驚愕反応抑制度の減少が認められた($p < 0.05$)。また、生後12-13週齢時のER β KIマウスについて行動解析を行った結果、オープンフィールド試験による中央部滞在時間の減少、明暗往来における明所滞在時間および明暗往来数の減少、高架式十字迷路試験における総移動量の減少、条件付け学習記憶試験における場所-連想記憶度および音-連想記憶度の低下、プレパルス驚愕反応抑制度の減少が認められた($p < 0.05$)。

D. 考察

ネオニコチノイド系農薬の発達期における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。

発生-発達期における慢性暴露モデルとして、妊娠11.5日齢の妊娠雌マウスに低用量(0.1mg/kg/day)にて飲水投与を開始し、出産後の生後4週齢時の離乳時まで同投与を行ったが、胎仔マウスに対しては経胎盤投与、産仔マウスに対して経乳投与されたと考えられる(特に、産仔マウスは、体が小さく給水口まで到達することがないため、化学物質は母マウスを介しての投与となる)。アセタミプリドによって重篤な多動が、またイミダクロプリドによって多動を伴う学

習記憶異常が誘発されたと考えられる。今回の用量設定においては、一日摂取許用量 (ADI) を元に、安全係数を 10 として、さらに母マウスの体重の約 1/10 を産仔マウスへ移行すると仮定し、いずれも 0.1mg/kg/day としたが、重篤な行動異常を誘発すると考えられた。特に、発生-発達期におけるアセタミプリド慢性暴露マウスの行動様式は、多動障害モデルマウスとして報告される行動様式を包括するものであり、また、発生-発達期におけるイミダクロプリド慢性暴露マウスの行動様式は、多動を伴う学習障害モデルとしての有用性も考えられた。

しかしながら、ニコチンによる影響結果に比較すると、その程度はやや低いものであったことから、今後、その毒性の程度に応じた対応策の検討が必要であると考えられた。

さらに、ER α KI マウスの行動様式は認知症 (アルツハイマー型認知症というよりも前頭側頭型認知症) モデルマウスの行動様式に非常に近く、また ER β KI マウスの行動様式は、陰性の統合失調症モデルマウスの行動様式としての特徴を多く兼ね備えていた。いずれも、本研究班で設定する行動毒性基準値を定める上で、非常に有益なものであると考えられた。

E. 結論

低用量ネオニコチノイド系農薬の発生-発達期における化学物質の慢性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捕捉することに成功した。また、エストロゲン受容体遺伝子改変マウスの利用によって情動認知行動「毒性基準値」の設定に向けた取り組みが大きく進んだ。特に胎生期から幼若期を通じての低用量暴露系は多くの化学物質について応用が可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

Sakai K, Ideta-Otsuka M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Igarashi K, Tanemura K. Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Apr 6;498(3):674-679.

2: Ohtani N, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Yokota H, Inoue H, Iwano H. Late pregnancy is vulnerable period for exposure to BPA. *J Vet Med Sci.* 2018 Mar30;80(3):536-543.

3: Saito H, Hara K, Tanemura K. Prenatal and postnatal exposure to low levels of permethrin exerts reproductive effects in male mice. *Reprod Toxicol.* 2017 Dec;74:108-115.

4: Sugimura S, Kobayashi N, Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, Yajima A, Hashiyada Y, Kaneda M, Sato K, Imai K, Tanemura K, Arima T, Gilchrist RB. Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding anooocyte with high developmental competence. *Sci Rep.* 2017 Jul 28;7(1):6815.

5: Umezu K, Hiradate Y, Numabe T, Hara K, Tanemura K. Effects on glycocalyx structures of frozen-thawed bovine sperm induced by flow cytometry and artificial capacitation. *J Reprod Dev.* 2017 Oct 18;63(5):473-480.

- 6: 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 Feb 28;79(2):432-439.
- 7: 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.
- 8: 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.
- 9: 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 D1Pas1, 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.
- 10: Umezu 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.
- 11: Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K. Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. *Stem Cell Reports.* 2015 Dec 8;5(6):996-1009.
- 12: Yabusaki R, Iwano H, Tsushima S, Koike N, Ohtani N, Tanemura K, Inoue H, Yokota H. Weak activity of UDP-glucuronosyltransferase toward Bisphenol analogs in mouse perinatal development. *J Vet Med Sci.* 2015 Nov;77(11):1479-84.
- 13: Otaka K, Hiradate Y, Kobayashi N, Shirakata Y, Tanemura K. Distribution of the sex chromosome during mouse spermatogenesis in testis tissue sections. *J Reprod Dev.* 2015;61(5):375-81.
- 14: Nakano K, Nishio M, Kobayashi N, Hiradate Y, Hoshino Y, Sato E, Tanemura K. Comparison of the effects of BPA and BPAF on oocyte spindle assembly and polar body release in mice. *Zygote.* 2016 Apr;24(2):172-80.
2. 学会発表 (抜粋)
- 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

G. 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

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2）

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

「行動柔軟性/抑制課題試験の開発と毒性評価への応用」

研究分担者

掛山 正心（早稲田大学人間科学学術院・行動神経科学研究室・教授）

【研究要旨】

マウスを対象とした行動柔軟性課題と行動抑制課題について検討した。行動柔軟性課題は本事業（H20-化学一般-010）において作成したものをを用い、無機ヒ素の曝露実験に適用し試験法の妥当性検証と修正を行った。通常的空間認知課題では影響の頭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の低下を認め、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。次に行動柔軟性課題をもとに、タッチスクリーン型オペラント実験箱を用いたGo/NoGo課題を開発した。Go/NoGo課題とは、ヒトにおいて認知機能を評価する課題として、例えば、認知症の程度や有無の検査などに使用されている。ADHD様の行動表現型を示すと考えられているDBA/2マウスを用い、同マウスもC57BL/6マウスと同様に課題の習得は可能であるが、反応までの時間が遅くなることが明らかとなった。本研究で確立したGo/NoGo課題は、ヒトにおけるそれと同様の指標を用いたものとして、世界初の課題だといえる。さらに既存のプロトコルに比べ、Pre-trainingを短縮した上で、Go正答率、NoGo正答率とも上昇させることに寄与する知見を得ることに成功した。

A. 研究目的

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が本研究の目的である。具体的には、マウスを用いての行動解析試験の成績を定量的な値として項目ごとに記録し、異常の定義を行う。項目ごとに定量化手法を決定し情動認知行動「毒性基準値」に対応する個々の神経科学的「異常基準値」を設定する。本分担研究では、行動柔軟性/抑制課題試験の開発と毒性評価への応用認知機能ならびに情動機能の評価手法について検討した。

B. 研究方法

行動柔軟性課題

行動柔軟性課題は本事業（H20—化学—一般-010）において作成したものを用いた。集団型全自動行動・学習測定システム IntelliCage (New Behavior社, Zurich) (Galsworthy, Amrein, Kuptsov, Poletaeva, Zinn, Rau, Vyssotski, & Lipp, 2005)を用いたもので、マウスの皮下に ID チップを埋め込むことで、最大 16 匹のマウスを同じケージ内で飼育しながら、個々の動物の試験成績を自動測定することができる。ケージの 4 隅にはオペラント・チャンバー（コーナー・チャンバー）が設置され、ノーズ・ポーク反応により報酬となる飲水が提示される。我々が開発した行動柔軟性課題は、2 つのコーナー・チャンバー間を往復させる行動系列の獲得を伴う空間学習（behavioral sequencing task）と、その後の反復逆転課題からなる (Endo et al., Behav. Brain Res. 2011, H20—化学—一般-010 の成果)。

ヒ素曝露実験による行動柔軟性課題の検証

疫学調査により、環境中に存在する無機ヒ素は比較的濃度曝露であっても IQ や認知機能の低下を引き起こすことが疫学調査結果から報告されている。そこで本研究では、発達期マウスに無機ヒ素を曝露し、後発的に行動にどのような異常が起るかを検討することで、行動柔軟性課題の妥当性検証と修正を行った。

妊娠 C3H マウス 8 日目から 18 日目まで、母マウスの飲水中に亜ヒ酸ナトリウム NaAsO₂ (85 ppm) を添加することで発達期無機ヒ素曝露群を作製した。飲水中に無機ヒ素を加えない母体から出生した仔を対照群として用いた。マウスが 60 週令に達した後、IntelliCage を用いて、マウスの行動量、飲水量、行動パターンの解析を行うと共に、空間学習

試験と行動柔軟性試験により行動異常の検出を試みた。行動試験終了後、脳を固定し、ゴルジ染色による大脳前辺縁皮質における神経突起長やスパイン数を計測した。

タッチスクリーン型行動抑制課題の開発

行動柔軟性課題をもとに、よりヒトへの外挿性を高める課題を開発するため、タッチスクリーン型オペラント実験箱を用いた行動抑制課題を開発することとした。スクリーン映像を用いた視覚弁別課題はマウスではこれまで不可能とされてきた。しかし数年前に Nature Protocol 誌 (8:1961-84., 2013) で発表された「Bussey 装置」によりマウスでも視覚課題ができることが明らかとなった。本研究ではまず、「Bussey 装置」よりもさらにマウスの視覚課題成績が向上した新規のオペラント箱を作成することとした。

検証実験として、C57BL/6 マウス（以下、B6 マウスと記載）と ADHD 様の行動表現型を示すことが示唆されている DBA/2 J マウス（以下、D2 マウスと記載）を用いた（各 10 匹）。動物飼育・実験は温度管理された動物飼育・実験室 (P1A) で行った（室温 22±3℃、湿度 40～70%、明暗周期 12 時間（明期 8:00～20:00））。すべての動物実験は早稲田大学動物実験審査委員会の指導と機関長の承認（総長：鎌田薫）のもと、早稲田大学の各種規則に則り行った。課題では餌を報酬として用いたため、自由給餌時のマウスの体重曲線を参考に、平均体重の 80%以上を維持しながら制限給餌を行った。試験期間中、飲水は自由とした。

タッチスクリーンオペラント実験装置は、15 インチのタッチスクリーン、スピーカーと報酬ディスプレイを備えたタッチスクリーンオペラント実験装置を作製した。タッチスクリーンモニターは、15 インチの有機 EL ディスプレイとタッチ検出ユニットから構成される。実験チャンバーはタッチパネルモニター側 (240 mm) から報酬ディスプレイ側 (55 mm) に向けて狭まっている台形状の高さ 200 mm の不透明アクリル製である。チャンバーとタッチスクリーンの間には、直径 35 mm の穴が開けられた黒色のプラスチック板が設置されており、チャンバー内のマウスはこの穴よりスクリーンを見て nose poking により回答する。また、チャンバーの両側には給水瓶が設置され、試験中、マウスは自由に飲水できるようになっている。チャンバーの上部にはカメラが設置され、課題中のマウスの行動をリアルタイムでモニタリングした。報酬としては 1 粒 10mg のペレットを使用し、課題時、自動的に報酬ディスプレイより与えた。

行動課題は、1日1セッション行った。慣化 (Habituation) は30分を1セッションとした。初めの15分は、前もって報酬ディスペンサーに15粒の報酬ペレットが置かれており、投入されたマウスはチャンバー内を自由に探索できる。次の15分間は、30秒毎に高いビープ音 (Correct Sound) とともに1粒の報酬ペレットが報酬ディスペンサーから獲得できる。マウスをホームケージに戻した後、報酬ディスペンサーに残ったペレットの数を計測した。

行動形成 (Shaping) は全ての実験群で5セッション行った。全てのセッションは15分間に設定した。各画像が提示されてから、nose poking するまでには制限時間は設定しなかった。初めの2セッションでは、マウスが報酬ディスペンサーへ nose poking することで開始し、モニター上に刺激画像が提示される。モニター上の刺激画像にマウスが nose poking する (タッチ検出ユニットにおいて検出する) と、報酬ディスペンサーより Correct Sound とともにペレットが獲得できる。マウスをホームケージに戻した後、マウスが食べたペレット数を記録した。次の2セッションでは、報酬として獲得できるペレットが3つから1つに減少する以外は、前の2セッションと同一である。最後のセッションでは、nose poking することで報酬が獲得できる刺激画像よりも先に、十字型の固定点画像が提示される。固定点画像に nose poking しなければ、刺激画像は提示されない。

Pre-training では、全て Go トライアルのみのセッションを行った。

Go/NoGo 課題では、Go Cue と NoGo Cue の2種類の視覚刺激を用いた (図4)。Go Cue と NoGo Cue を擬似ランダム提示した。マウスが固定点画像に nose poking した後に、Go Cue もしくは NoGo Cue が提示された。提示された画像が、Go Cue の場合 (Go トライアル) はモニターへ nose poking すれば、NoGo Cue の場合 (NoGo トライアル) は nose poking をしなければ、Correct Sound とともに報酬を獲得することが出来る。Go Cue において nose poking しなかった場合、NoGo Cue において nose poking した場合はエラーとされ、報酬は得られない。

固定点画像提示から報酬獲得もしくはエラーまでを1トライアルとし、100トライアル終了もしくはマウスがチャンバーに投入されてから45分経過した時点で終了とした。

統計解析には GraphPad PRISM 7 (GraphPad Software) を用いた。各課題における正答率の推移には repeated measure 2-way ANOVA と repeated measure 1-way ANOVA を用いた。同一課題での最

初のセッションと最後のセッションの試行数もしくは正答率の比較には 1-way ANOVA と対応のある t 検定を用いた。多重比較は、Tukey 検定を用いて行った。P 値 0.5 以下を統計的有意とみなした。

(倫理面への配慮)

早稲田大学ならびに研究協力機関 (国立環境研究所、東京大学) の動物実験委員会、遺伝子組み換え実験委員会等の関連委員会の審査のもと、各機関長承認を得た上で研究を行った。日本学術会議動物実験に関する詳細指針に基づき、飼養及び保管条件を厳守、苦痛の軽減、動物数と動物へのストレスを最小限にすること、安楽死の方法に配慮して実験を行った

C. 研究結果

行動柔軟性課題

この課題は全自動試験装置を用いて行われており、我々が作成したプログラムをインストールすることで、他の研究機関でもすぐに用いることができる。これまでに国内外の大学や研究所等に提供してきたが、そのうち3割ほどの研究機関では実験成績が一定しておらず、実験室の必要条件や管理に関する実験マニュアルの作成が求められていた。今回、経験者の指導のもと、同装置を初めて使用する大学院生がマニュアルをもとに作業を行い、成功することができた。すなわち同課題は、一般的なマウス飼育管理の経験をもつ担当者が実務作業を行うことが可能であることが実証された。

ヒ素曝露実験による行動柔軟性課題の検証

対照群と発達期無機ヒ素曝露群間で、行動量、飲水量、行動パターンに違いは認められなかった。また、空間学習能力にも違いは認められなかった。一方、行動柔軟性試験では、発達期無機ヒ素曝露群において、有意に適応力の低下が認められた (図1)。

また、行動柔軟性との関連が報告されている大脳前辺縁皮質では、スパイン数には群間で違いは認められなかったが、発達期無機ヒ素曝露群で有意に神経突起長の低下が認められた (図2)。このような結果は、発達期無機ヒ素曝露群では、大脳前辺縁皮質における神経突起長低下が行動柔軟性の異常を誘導している可能性を示唆している。

タッチスクリーン型行動抑制課題の開発

Pretraining における Go cue のみの課題において、B6 マウス D2 マウスともに90%以上の正答率を示したことから、すべてのマウスが pretraining を習得したとみなした。

ただし固定点画像から Cue 図形提示までの待機時間ごとに見てみると、D2 マウスにおいては、待機時間が長くなるほど正答率が有意に低下し、また Cue 図形提示後の反応までの時間が有意に長くなっていた (図 3)。この成績変化はごく些少ではあるが、個体ごとのデータのはらつきが少ないことから有意差が見出された。

Go/NoGo 課題においても、Go Cue 提示時の正答率 (Go Cue に反応して nose poke (正反応) した割合) は、B6、D2 マウスともに 90%以上を維持していた (data not shown)。

また、NoGo Cue 提示時の正答率 (NoGo Cue が提示された際に nose poke (誤反応) をせず報酬を受け取りにいくという正反応を示した割合) についても、課題開始 21 日目以降は 60%程度の正答率を示した (図 4)。B6 マウスと D2 マウスの正答率に違いはなく、すなわち両者ともに Go/NoGo 課題を習得していることが明らかとなった (図 4)。

次に Go/NoGo 課題中の、Go Cue 提示時の Cue 提示から反応までの時間について分析した。D2 マウスの Reward cue latency のピークは B6 マウスよりも遅く、またより長時間の Reward cue latency を示す反応が増えていた (図 5)。すなわち B6 マウスも D2 マウスは、Go Cue と No Go Cue の刺激の違いを視覚的に弁別し、それぞれに対して正しい反応を示すことができるようになるが、D2 マウスは Go Cue に対する反応が遅れることが明らかと鳴った。Go/NoGo Cue の提示時間が 1.2 秒であった第 1 から第 5 セッションブロックでは、Go/NoGo 正答率とも大きな変化はなく、どのセッションブロックでも、全ての実験群の正答率の順位は変化しなかった。Go 正答率では、実験群 1-2 と実験群 2 が約 75%を維持したが、実験群 1-1 では約 50%であった。NoGo 正答率では、実験群 1-1 が約 65%、実験群 1-2 が約 40%、実験群 2 が約 30%であった (図 3)。

Go/NoGo Cue の提示時間を 1.2 秒から 2 秒にして課題を行ったところ、全ての実験群で Go 正答率は上昇、NoGo 正答率は低下する傾向が見られた。第 15 セッションと第 18 セッションを比較すると、Go 正答率は全ての実験群において、10~15%程度上昇した。実験群 1-2 では、第 18 セッションの Go 正答率が 90%を超えた。第 18 セッションの NoGo 正答率は、第 15 セッションに比べ、実験群 1-2 で約 2 分の 1、実験群 2 で約 3 分の 1 に低下した。一方で、実験群 1-1 においては、NoGo 正答率の低下は約 3%に留まった (図 4)。

D. 考察

行動柔軟性課題

IntelliCage 装置は 16 匹のマウスの同時測定が

可能であり、本研究により実験マニュアルも整備することができた。一台につき 1000 万円程度と高価であるが、理論上は作業員一名で飼育管理を含めて 30 台を管理することができるので、一人あたり一年あたり 4800 匹の行動解析が可能となる。ハイスループット試験系として普及を期待したい。

ヒ素曝露実験による行動柔軟性課題の検証

行動柔軟性課題については、これまでにダイオキシン等の曝露実験により、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曝露実験に適用し、その試験法の妥当性検証と修正を行った。通常的空間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見出したことから、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。

タッチスクリーン型行動抑制課題の開発

今回の実験では、我々の研究グループが先行研究において検討した Go/NoGo 課題のプロトコル最適化を主眼に、3 つの実験群に異なる Pre-training を実施し、Go/NoGo 課題の成績を測定した。

結果、Go 正答率が高い傾向にあるのは、Pre-training において、Go トライアルのみのセッションと NoGo トライアルのみのセッションを 1 日毎に繰り返した群 (実験群 1-2) と Go トライアルのみのセッションに限って行った群 (実験群 2) であった。このことより、Go トライアルで報酬を得るための手順をマウスに理解させるためには、始めから Go トライアルと NoGo トライアルが混在する課題ではなく、Go トライアルを繰り返し行うことが重要と思われる。

一方、対照的に NoGo 正答率が高い傾向にあったのは、始めから Go/NoGo 課題を行った実験群 1-2 であった。これは、NoGo トライアルを適切に学習しているとも考えられるが、NoGo トライアルの性質上、マウスが NoGo Cue 提示の際、スクリーンに注目していないにもかかわらず、制限時間をすぎれば報酬が得られてしまうため、学習を放棄、もしくは“何もしないこと”を習得してしまった可能性も多分にある。NoGo トライアルにおける、指標の鋭敏化は今後の課題である。今回の実験では、実験期間の短縮を目的とした。行動形成は、先行研究において 9 セッションかけていたが、5 セッションに短縮することが出来た。一方、Go/NoGo 課題では、正答率改善のため、プロトコルの修正していく必要があると考えられる。以下、個々の実

験群について考察する。

実験群 1-1 では、Pre-training 1 すなわち、行動形成後に直ちに Go/NoGo 課題を 24 セッション (8 セッションブロック) 行った。第 8 セッションブロックでは、Go 正答率は 51.3%、NoGo 正答率は 61.9%であった。Pre-training 1 の後には、Pre-training 3 (Visual discrimination task) を行っている。Pre-training 3 を経験しながらも、次の Go/NoGo 課題において、実験群 1-1 は、Go 正答率約 50%、NoGo 正答率約 65%で、Pre-training 1 と同程度であった。更に、Go/NoGo 課題の最後の 3 セッションで Go/NoGo Cue の提示時間が変更されても、NoGo 正答率の低下は 3.3%に留まっており、他の実験群と比しても、有意に NoGo 正答率が高かった。以上より、Go/NoGo 課題を長期間行うことで NoGo 行動が影響を受けにくくなると考えられる。

実験群 1-2 の最終セッションブロック (Go/NoGo それぞれの第 4 セッションブロック) における、Go 正答率は 61%、NoGo 正答率は 60.4%であった。Pre-training 3 を行った後の Go/NoGo 課題では、Go 正答率が約 75%、NoGo 正答率が約 40%で推移した。また、Go/NoGo Cue の提示時間の変更後、Go 正答率は 73%から 90%に上昇した一方で、NoGo 正答率は 47.9%から 25.8%に低下しており、Go トライアルのみで構成されるセッションと NoGo トライアルのみで構成されるセッションを 1 日毎に交互に行った場合、同じ試行数の Go/NoGo 課題を行った場合に比べ、Go 行動が優位になりやすいことが示唆される。

実験群 2 は Go/NoGo 課題の前に、Go トライアルのセッションだけを行い、NoGo トライアルは経験していない。Go トライアルのみのセッションでは、正答率は 76.3%に達しており、その後の Go/NoGo 課題でも、Go 正答率は約 75%で推移している。一方で、NoGo 正答率は、どのセッションブロックでも、全ての実験群中で最低であった。これは、Go/NoGo 課題までに NoGo トライアルを経験していないことが大きいと考えられる。

しかしながら、Go/NoGo 課題での NoGo 正答率において、第 1 セッションブロックでは 24.5%、第 5 セッションブロックでは 34.4%で、他の実験群に比して上昇幅も大きい傾向にある。試行を続けた場合、更に上昇していくことも考えられる。

また、Go 正答率において、実験群 2 は Pre-training 4 が 8 セッションのみにも関わらず、Pre-training 2 で Go トライアルのみを 12 セッション行った実験群 1-2 と同程度の Go 正答率であり、Go 正答率を上昇させるには、8 セッションで十分であると考えられる。

E. 結論

本研究では、行動柔軟性課題の有効性を確認するとともに、ヒトにおける認知・情動行動課題と同様の成績指標を用いたマウス Go/NoGo 課題を開発した。実験群 2 が Pre-training を 8 日 (8 セッション) のみで、実験群 1-2 と同程度の Go 正答率を記録し、更に NoGo 正答率も上昇する傾向が見られている。今後は Pre-training としては Alternative task を採用し、Alternative task の期間を短縮・改良していくことが最善と思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

Aung KH, Kyi-Tha-Thu C, Sano K, Nakamura K, Tanoue A, Nohara K, Kakeyama M, Tohyama C, Tsukahara S, Maekawa F. Prenatal Exposure to Arsenic Impairs Behavioral Flexibility and Cortical Structure in Mice. *Front Neurosci.* 2016 Mar 31;10:137. doi: 10.3389/fnins.2016.00137. eCollection 2016.

Kimura E, Kubo KI, Endo T, Ling W, Nakajima K, Kakeyama M, Tohyama C. Impaired dendritic growth and positioning of cortical pyramidal neurons by activation of aryl hydrocarbon receptor signaling in the developing mouse. *PLoS One.* 2017 Aug 18;12(8):e0183497. doi: 10.1371/journal.pone.0183497. eCollection 2017.

Kubo KI, Deguchi K, Nagai T, Ito Y, Yoshida K, Endo T, Benner S, Shan W, Kitazawa A, Aramaki M, Ishii K, Shin M, Matsunaga Y, Hayashi K, Kakeyama M, Tohyama C, Tanaka KF, Tanaka K, Takashima S, Nakayama M, Itoh M, Hirata Y, Antalffy B, Armstrong DD, Yamada K, Inoue K, Nakajima K. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. *JCI Insight.* 2017 May 18;2(10). pii: 88609. doi: 10.1172/jci.insight.88609.

Kimura E, Kubo KI, Endo T, Nakajima K, Kakeyama M, Tohyama C. Excessive activation

of AhR signaling disrupts neuronal migration in the hippocampal CA1 region in the developing mouse. *J Toxicol Sci.* 2017;42(1):25-30. doi: 10.2131/jts.42.25.

2. 学会発表

掛山正心、「マウスを用いた前頭野依存性行動モデル：高次学習から実行機能へ」第45回日本神経精神薬理学会・第37回日本生物学的精神医学会シンポジウム 2015/09、東京.

Maekawa F, Htet Aung K, Sano K, Nakamura S, Tanoue A, Kakeyama M., Tohyama C., Nohara K, Tsukahara S. Prenatal arsenic exposure impaired behavioral flexibility and morphology of cortex in mice. 9th World Congress International Brain Research Organization. 2015/07, Rio de Janeiro, Brazil.

掛山正心、「環境と脳：ダイオキシン毒性実験からみた高次脳機能発達」第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会 2015/09、仙台.

ベナー聖子・尾藤晴彦・掛山正心・山末英典、「集団内行動の定量化に基づくオキシトシン効果判定指標の網羅的探索：マウスを用いた予備的検討結果」第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会 2015/09、仙台.

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. 2016年9月、熱海.

掛山正心. 子どもへの低用量化学物質ばく露評価

のための新たなマウス情動認知行動毒性試験装置の開発. 第44回日本毒性学会学術年会 (シンポジウム子ども期への低用量化学物質ばく露が誘発する情動認知行動影響の定量的解析法の開発状況と評価法確立への未来)、2017年7月、横浜.

掛山正心、マウスにおける早期環境要因操作による自閉スペクトラム表現型発現の検討. 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会シンポジウム 2017/09、札幌.

掛山正心、集団生活下のマウス個体識別と行動計測. 日本動物行動関連学会 2017 (Koudou2017) (5学会・研究会合同シンポジウム) 2017/09、東京.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

該当なし

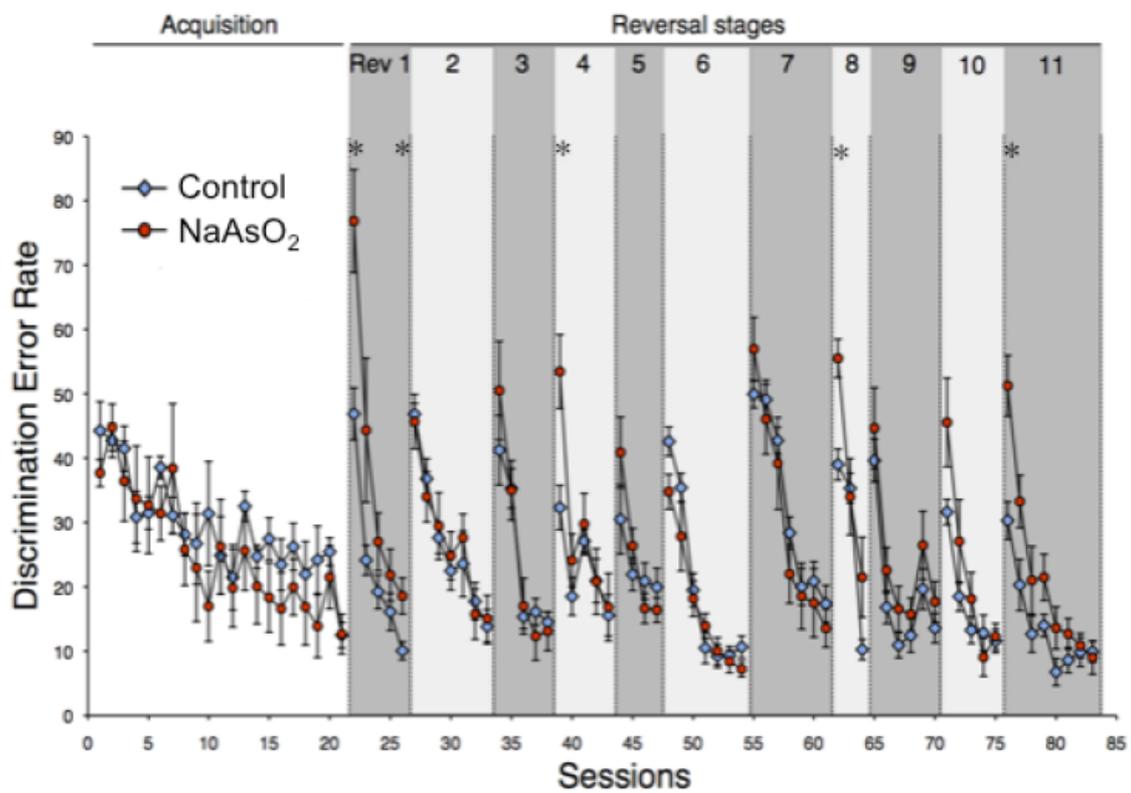


図1. マウス行動柔軟性課題による発達期の無機ヒ素曝露による後発的行動異常の検出 (各群 n=6)

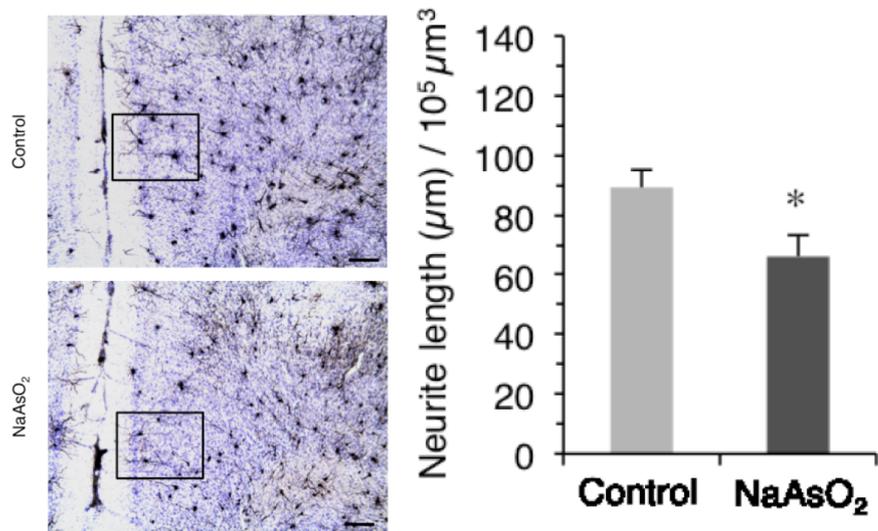


図2. 発達期ヒ素曝露による神経突起長の低下

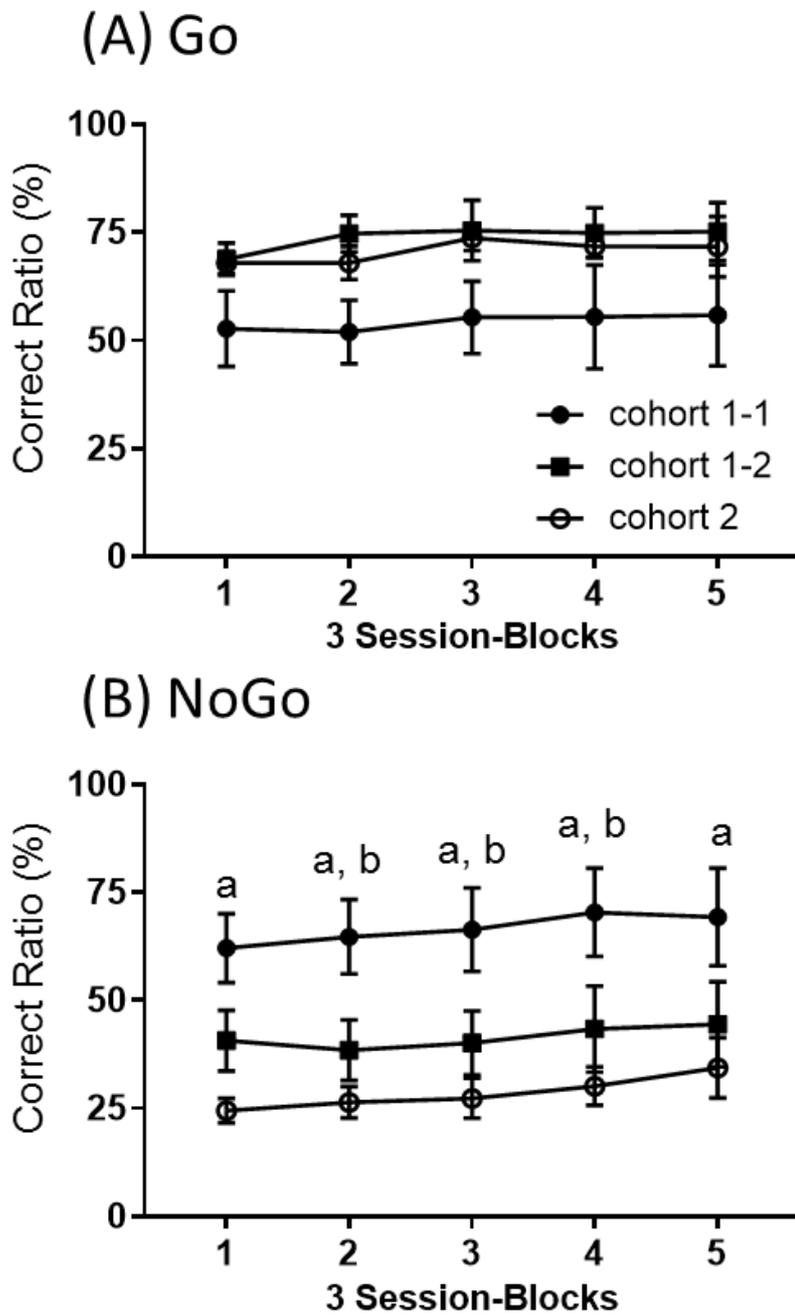


図 3. Go/NoGo 課題における (A)Go 正答率と (B)NoGo 正答率. a: $p < 0.05$, vs cohort 2, b: $p < 0.05$, vs cohort 1-2.

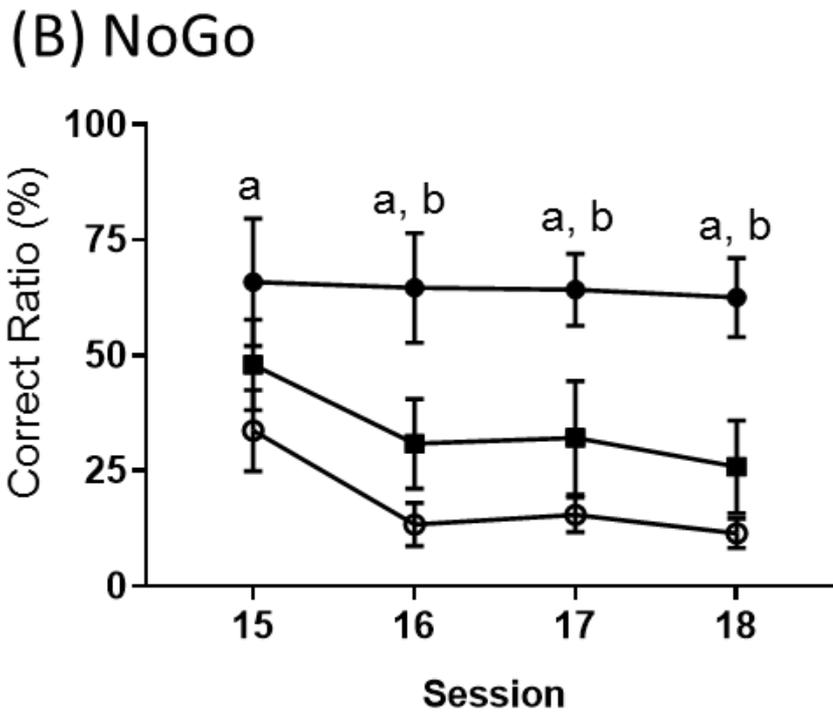
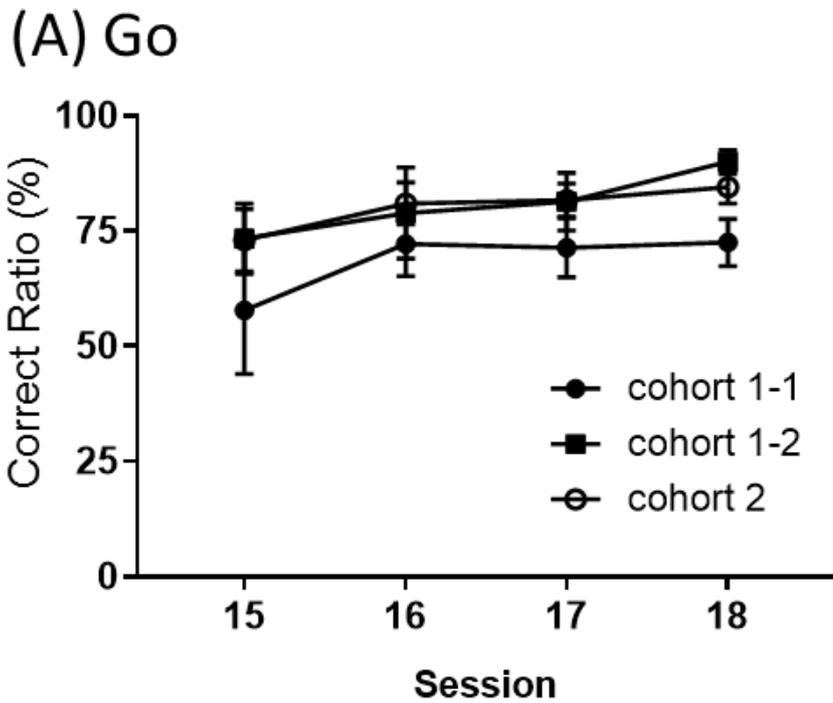


図 4. Go/NoGo 課題の最後の 4 セッションにおける (A)Go 正答率と (B)NoGo 正答率. a: $p < 0.05$, vs cohort 2, b: $p < 0.05$, vs cohort 1-2 ; 第 15 セッションは第 5 セッションブロックの最終日のデータ.

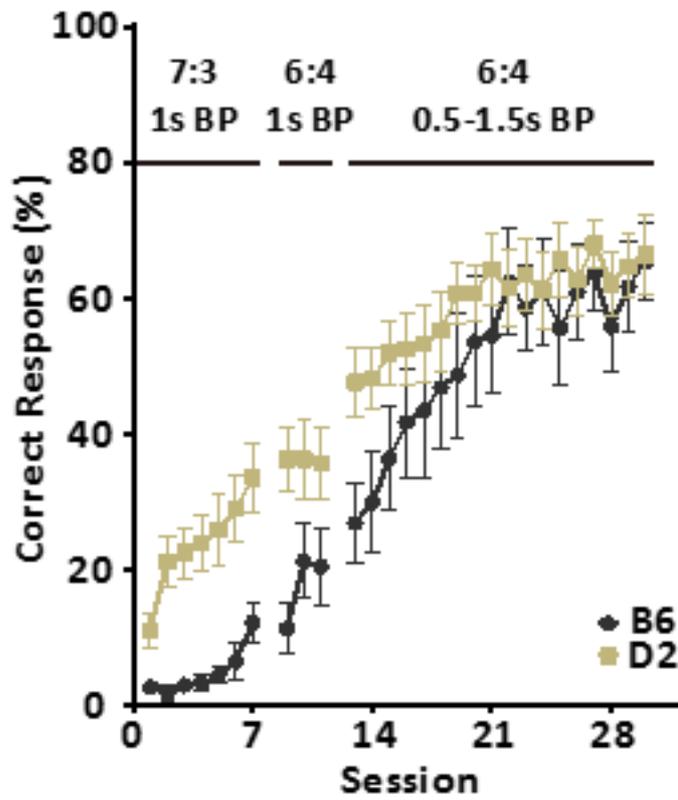


図 5. 長期間訓練による Go/NoGo 課題の NoGo Cue 提示時の正答率 (nose poke (誤反応) をせずに報酬を受け取りに行くという正反応を示した割合)。

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 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。

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。

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 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、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 α KI マウスは、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 KI を使用した。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、cDNAを導入していることから理論上、ER α 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 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。

ER β KI マウスは、エストロゲン（ER） β 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 KI を使用した。ER β KI マウスのホモ型に

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。この点、同様に作製した ER α KI マウスのホモ型における ER α 蛋白の発現量は、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た事から、この遺伝子座における ER β 蛋白の発現は、野生型における ER α 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 α 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 β 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 β KI マウスでは、ER α 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 β KI マウスと ER α 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 α 欠失マウス及び ER β 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: 野生型及び ER α KI 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、ER α 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, Ruffy2)、他方、減少した遺伝子として、ER α (Esr1) を含む 2 つ (2 ps: Igh-6, Esr1) が得られた。野生型と ER α 遺伝子の発現量が減少している ER α KI マウスとの比較であるため、ER α (=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 ER α 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 ER α 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 α ともう一つの ER サブタイプである ER β 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 α KI マウスとの比較を検討した。ER α 遺伝子 (=Esr1) は、ER α KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER β 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 α 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 α 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⁺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 α) 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 α KI マウスは、ER α ノックダウンマウスであるが、この結果からは、ER α 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 α 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 α 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 α 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 α ともう一つの ER サブタイプである ER β 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 α KI マウスとの比較を検討した。ER α 遺伝子 (=Esr1) は、ER α KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER β 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 α 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 α 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⁺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 Kcnd3 遺伝子であった。一方、脱分極を示唆する Ca²⁺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 α) 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 α KI マウスは、ER α ノックダウンマウスであるが、この結果からは、ER α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 α ともう一つの ER サブタイプである ER β 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 α KI マウスとの比較を検討した。ER α 遺伝子 (=Esr1) は、ER α KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER β 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 α 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 α 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 α 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 α 欠失マウスと ER α 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 α 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 α KI マウスと ER α 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 α 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 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 α KI マウスは、ER α の発現が低下した ER α 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 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、多くの ER α のスプライシングバリエントが、ER α 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 α のスプライシングバリエントが発現できない ER α KI マウスでは、野生型と比較し、ER α 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 β 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 β 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 α (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 α 遺伝子の発現量が減少している ER β KI マウスとの比較であるため、ER α (=Esr1) 遺伝子が抽出されてきたのは妥当と考える。一方、ER β (=Esr2) が抽出されなかった理由として、野生型においても ER β の発現量が低い事に加え、導入した ER β cDNA の発現量が低く、遺伝子導入により ER β 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 β 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 β 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 α ともう一つの ER サブタイプである ER β 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 β KI マウスとの比較を検討した。ER α 遺伝子 (=Esr1) は、ER β KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER β 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 β 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 β 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 β 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 β 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 α 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 β 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 α ともう一つの ER サブタイプである ER β 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 β KI マウスとの比較を検討した。ER α 遺伝子 (= *Esr1*) は、ER β KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER β 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 β 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 β 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⁺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⁺チャンネル (4 ps) 及び Ca²⁺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 Ca²⁺/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 α)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 β KI マウスの海馬においては、ER β は ER α 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 β KI マウスの海馬においては、野生型マウスと比較し、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。

C-2-4: ER α 欠失マウスと ER β 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 α 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 β KI マウスと ER α 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 α 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 β 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 β 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 α 欠失マウスと ER β 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 α 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 Ca²⁺/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 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。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 α 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する。

今後、ER α KI マウスの場合と ER β 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 シグナルが見いだせた。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 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。

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 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-3-3: 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 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-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 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。

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。

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) のカテゴリー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

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4）

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】

本研究は、抗てんかん薬バルプロ酸の胎生期曝露が、成体期の海馬ニューロン新生を減少させることを定量化でき、また副腎皮質由来褐色細胞腫細胞株を用いて、特定のノン・コーディングRNAが遺伝子発現を制御できることを明らかにできたことを受けて、ネオニコチノイド系農薬曝露による影響の定量化することを目的として着手された。これまで、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。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ため、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、農薬曝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、その後1週間 BrdU (100 mg/kg/日)を腹腔内投与した群、及び成体期(12週齢)まで待って同じく BrdU を投与した群を作製、脳を固定し成体海馬ニューロン新生解析用とした。それぞれ脳切片を作製し、幼若ニューロンマーカーである doublecortin (DCX) と BrdU に対する抗体を用いてニューロン新生を定量化した。また、同様に2週齢マウスに、コーンオイル、アセタミプリド、イミダクロプリドを単回経口投与し、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ことを計画した(慢性母性投与群)。

C. 研究結果

アセタミプリド及びイミダクロプリド投与後1週間 BrdU を投与したマウスについてニューロン新生の解析を行ったが、コントロールと比較して、明らかな差は観察されなかった。

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や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 MYOSIN 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

今回、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の2週齢マウス投与直後には、ニューロン新生への影響は見られなかった。しかし、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おり、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できるかは興味深く、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

今回の解析から、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、免疫染色では海馬ニューロン新生への影響は見られなかったもの、それ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

該当なし。

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 Methylome 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 11. 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.
11. 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
12. 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
13. Noguchi H, Kimura A, Murao N, Namihiro 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
14. 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
15. Yamamoto N, Agata K, Nakashima K, Imamura T. Bidirectional promoters link cAMP signaling with irreversible differentiation through promoter-associated non-coding RNA (pancrRNA) expression in PC12 cells. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jun 20;44(11):5105-22. doi: 10.1093/nar/gkw113. PMID: 26945044
16. Noguchi H, Murao N, Kimura A, Matsuda T, Namihiro 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

17. 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
 18. Tsujimura K., Irie K., Nakashima H., Egashira Y., Fukao Y., Fujiwara M., Itoh M., Uesaka M., Imamura T., Nakahata Y., Yamashita Y., Abe T., Takamori S. & Nakashima K. miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. *Cell reports* 12, 1887-1901 (2015).
 19. Noguchi H., Kimura A., Muraio N., Matsuda T., Namihira M. & Nakashima K. Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *Neurosci Res* 95, 1-11 (2015).
 20. Nakamura A., Funaya H., Uezono N., Nakashima K., Ishida Y., Suzuki T., Wakana S. & Shibata T. Low-cost three-dimensional gait analysis system for mice with an infrared depth sensor. *Neurosci Res* 100, 55-62 (2015).
 21. Muraio N., Noguchi H. & Nakashima K. Epigenetic regulation of neural stem cell property from embryo to adult. *Neuroepigenetics* (2015).
 22. Matsuda T., Muraio N., Katano Y., Juliandi B., Kohyama J., Akira S., Kawai T. & Nakashima K. TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature communications* 6, 6514 (2015).
 23. Juliandi B., Tanemura K., Igarashi K., Tominaga T., Furukawa Y., Otsuka I.M., Moriyama N., Ikegami D., Abematsu M., Sanosaka T., Tsujimura K., Narita M., Kanno J. & Nakashima K. Reduced adult hippocampal neurogenesis and cognitive impairments following prenatal administration of the antiepileptic drug, valproic acid. *Stem Cell Reports* 5, 996-1009 (2015).
 24. Hamazaki N., Uesaka M., Nakashima K., Agata K. & Imamura T. Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development. *Development* 142, 910-920 (2015).
 25. Andoh-Noda T., Akamatsu W., Miyake K., Matsumoto T., Yamaguchi R., Sanosaka T., Okada Y., Kobayashi T., Ohyama M., Nakashima K., Kurosawa H., Kubota T. & Okano H. Differentiation of multipotent neural stem cells derived from Rett syndrome patients is biased toward the astrocytic lineage. *Mol Brain* 8, 31 (2015).
 26. Abdulhaleem M.F., Song X., Kawano R., Uezono N., Ito A., Ahmed G., Hossain M., Nakashima K., Tanaka H. & Ohta K. Akhirin regulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in intact and injured mouse spinal cord. *Developmental neurobiology* 75, 494-504 (2015).
2. 学会発表
(国内学会)
1. 中島欽一[○]: 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[○]、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、4th 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[○]、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[○]：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[○]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[○]、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[○]、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[○]、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回内藤コフアレンス、北海道、シャトレゼガトキングダム sapporo、2017年8月27日-30日(29日)(ポスター)
 9. 中嶋秀行[○]、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[○]：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[○]：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[○]：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[○]、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、学術総合センター橋講堂、2017年5月22-23日(23日)(ポスター)
 14. 松田泰斗[○]、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、学術総合センター橋講堂、2017年5月22-23日(22日)(ポスター)
 15. 中島欽一[○]：HDAC阻害剤胎生期暴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)
 16. 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)
 17. 安井徹郎[○]、上藪直弘、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)
 18. 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)
 19. 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)
 20. 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)
 21. 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)
 22. 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)
 23. 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)
 24. 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ー学会学術集会、福岡市、九州大学百年講堂、2016年7月23-24日(23日)
 25. 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)
 26. 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)

27. 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)
28. 亀田朋典[○]、今村拓也、滝沢琢己、木村文香、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽二 : 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)
29. 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)
30. 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)
31. 亀田朋典[○]、今村拓也、滝沢琢己、木村文香、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽二 : 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)
32. 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)
33. 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ック機構、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
34. 中島欽一[○] : miR-199aはMeCP2とmTORシグナルをリンクしレット症候群発症に関与する、大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪府、大阪大学蛋白質研究所、2015年12月11日-12日(11日)
35. 堅田明子[○]、中島欽一 : 中枢神経系の発生・発達から老化までをも制御する組織としての脈絡叢、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(4日)(口頭)
36. 河村陽一郎[○]、野口浩史、堅田明子、中島欽一 : 胎生期マウス終脳におけるアストロサイト分化誘導因子産生細胞の同定、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(2日)(ポスター)
37. 松田泰斗[○]、村尾直哉、審良静男、河合太郎、中島欽一 : ミクログリアにおける自然免疫受容体TLR9シグナルはてんかん発作依存的な異常ニューロン新生を抑制する、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(2日)(ポスター)
38. 亀田朋典[○]、今村拓也、滝沢琢己、木村文香、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽二 : マウス胎仔海馬由来初代培養ニューロンにおけるPost-Bisulfite Adapter-Tagging法を用いた神経活動依存的DNAメチローム変動解析、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(2日)(ポスター)
39. 安井徹郎[○]、上菌直弘、野口浩史、村尾直哉、松田泰斗、中島欽一 : ヒト神経幹細胞の発生進行に伴った性質変化には低酸素条件が重要である、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(1日)(口頭)(ポスター)
40. 中島欽一[○] : 神経幹細胞のエピジェネティック制御とその作用、第6回神経

- 科学と構造生物学の融合研究会、愛知県、岡崎コンファレンスセンター、2015年11月26日-27日 (26日)
41. 松田泰斗[○]、村尾直哉、審良静男、河合太郎、中島欽一：ミクログリアにおける自然免疫受容体TLR9シグナルはてんかん発作依存的な異常ニューロン新生を抑制する、第11回成体脳のニューロン新生懇談会、愛知県、名古屋市立大学、2015年11月14日 (口演)
 42. 村尾直哉[○]、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一：成体海馬ニューロン新生におけるヘミメチル化DNA認識因子Np95/Uhrf1の役割、第11回成体脳のニューロン新生懇談会、愛知県、名古屋市立大学、2015年11月14日 (ポスター)
 43. 中島欽一[○]：幹細胞って何？神経幹細胞を中心とした病気や再生医療に関する話題、第8回形態科学シンポジウム、福岡県、九州大学コラボレーションI、2015年10月24日 (講演)
 44. 中島欽一[○]：The microRNA, linking MeCP2 with mTOR signaling and its dysregulation cause Rett syndrome phenotypes、第40回内藤コンファレンス、北海道、シャトレゼガトキングダムサッポロ、2015年9月15日-18日 (17日) (招待)
 45. 村尾直哉[○]、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一：Epigenetic regulator Np95/Uhrf1 regulates multiple stages of adult hippocampal neurogenesis、第40回内藤コンファレンス、北海道、シャトレゼガトキングダムサッポロ、2015年9月15日-18日 (17日) (ポスター)
 46. 野口浩史[○]、波平昌一、佐野坂司、辻村啓太、深尾陽一朗、五十嵐勝秀、木村文香、中嶋秀行、中島欽一：Maintenance DNA methyltransferase DNMT1 contributes to the fate regulation of neural stem cells through DNA methylation-dependent and-independent manners during cortical development、第40回内藤コンファレンス、北海道、シャトレゼガトキングダムサッポロ、2015年9月15日-18日 (16日) (ポスター)
 47. 中島欽一[○]：エピジェネティックな神経幹細胞制御、第16回運動器科学研究会、鹿児島県、みなみホール、2015年9月11日-12日 (11日) (招待) (セミナー)
 48. 松田泰斗[○]、村尾直哉、片野友貴、Juliandi Berry、審良静男、神山 淳、河合太郎、中島欽一：TLR9 signaling in microglia ensures homeostatic neurogenesis in the adult hippocampus、第38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日 (28日) (口頭)
 49. 村尾直哉[○]、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一：成体海馬ニューロン新生におけるヘミメチル化DNA認識因子Np95/Uhrf1の役割、第38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日 (29日) (口頭)
 50. 中嶋秀行[○]、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38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日 (28日) (口頭)
 51. 入江浩一郎[○]、辻村啓太、中嶋秀行、中島欽一：Analysis of the molecular mechanism of dendritic formation by MeCP2 through miR-199a processing、第38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日 (28日) (ポスター)
 52. 中島欽一[○]：胎生期HDAC阻害剤曝露による遅発性学習記憶障害とその発症機序、第42回日本毒性学会学術年会、ホテル日航金沢、2015年6月29日-7月1日 (7月1日) (シンポジウム)
 53. 浜崎伸彦[○]、上坂将弘、中島欽一、阿形清和、今村拓也：Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development、第48回日本発生生物学

- 会年会、茨城県、つくば国際会議場、2015年6月2日-5日(4日)(口頭)
54. 上坂将弘[○]、阿形清和、中島欽一、今村拓也 : Species-specific repertoires of promoter-associated non-coding RNAs may contribute to the diversification of gene expression profile、第48回日本発牛生物学会年会、茨城県、つくば国際会議場、2015年6月2日-5日(3日)(ポスター)
55. 浜崎伸彦[○]、上坂将弘、中島欽一、阿形清和、今村拓也 : 長鎖ノンコーディングRNAによるマウス胚性遺伝子活性化機構、第9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、2015年5月25日-26日(26日)(ポスター)
56. 山本直樹[○]、上坂将弘、阿形清和、中島欽一、今村拓也 : Bidirectional promoter-derived antisense noncoding RNA epigenetically regulates irreversible differentiation of PC12 cells、第9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、2015年5月25日-26日(26日)(ポスター)
57. 上坂将弘[○]、阿形清和、中島欽一、今村拓也 : Species-specific repertoires of promoter-associated non-coding RNAs may contribute to the diversification of gene expression profile、第9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、2015年5月25日-26日(25日)(ポスター)
58. 今村拓也[○]、浜崎伸彦、上坂将弘、阿形清和、中島欽一 : 雌性発生胚を活用したPost-Bisulfite Adapter-Tagging法によるマウスDNAメチローム解析、第9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、2015年5月25日-26日(25日)(ポスター)
- K., Nakashima K. : Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells, France·Japan EPIGENETICS 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
3. 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
4. Nakashima K. : Insights into Rett Syndrome using Neural Stem Cells, KEYSTONE SYMPOSIA, Olympic Valley, January 8-12, 2017
5. 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
6. 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
7. Katada, S., Honda, M., Nakashima K. : Oxygen regulates fate specification of neural stem cell during cortical development.

<国際学会>

1. Imamura, T., Yamamoto, N., Agata,

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5）

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

分担研究課題名

「光計測による神経回路解析の神経毒性評価への応用」

研究分担者

富永貴志（徳島文理大学・神経科学研究所 教授）

【研究要旨】

神経回路機能に対する化学物質の影響-特に認知機能への影響を網羅的に計測する手段として膜電位感受性色素（VSD）を用い、回路動作に対する定量的な毒性評価指標を確立する。これまでに発生初期の投与で異常を起こすバルプロ酸、ビスフェノールA、ネオニコチノイド暴露において神経回路活動にあらわれる異常を検出している。回路の発生初期の急性影響と成長後の遅発毒性について検討した。その結果、海馬神経回路でのGABA系の働きの変調と、シナプス可塑性の変調を見出した。また、ネオニコチノイド、バルプロ酸、ビスフェノールなどの遅発神経毒性に関わる物質による興奮/抑制バランス(E/Iバランス)の変調を精度よく検出できる可能性がある系として、GABA受容体に関係する各種の長期・短期可塑性を詳細に検討した。また、平行して大規模神経回路活動解析によって海馬以外の特徴的な変化を示す神経回路を探索し前帯状皮質（ACC）、傍梨状核（EPN）などのイメージング解析を行いその信号伝播パターンを明らかにした。これに、新規共焦点顕微鏡を利用したin vivo系での計測系、新規パターン刺激イメージング顕微鏡、膜電位感受性蛍光タンパクを用いた解析など新規のより網羅的で非侵襲的な解析手法の開発を行ない、特に無染色組織からの光信号の検出に成功した。これらは光計測による神経毒性検出における優位性を示している。

A. 研究目的

これまで情動・認知行動試験では、実際に小児期の化学物質への暴露により、発生・発達期、成熟期において中枢性の異常、影響が認められてきている。この化学物質の中枢神経毒性の遅延性発現の定量化は喫緊の課題である。そのメカニズム解析のために記憶・学習機能の中枢である海馬、海馬-嗅内野-扁桃核の機能、およびその相互作用を定量化することは重要で、それらの中枢神経回路機能の変化を定量化する手法の確立が求められている。本研究では、膜電位感受性色素による神経活動イメージング法 (図 1) を導入して、神経回路活動の定量を行い、*ex vivo* 実験系 (スライス標本) でマウスを材料と用いた毒性試験法を確立する。これにより、中枢神経作動性物質の毒性作用の遅延性発現の定量的なメカニズム解析を行い、毒性評価上の指標を設定することを目的とする。

B. 研究方法

(1) バルプロ酸, ビスフェノール A, ネオニコチノイド系物質の幼若期投与 (中島・種村らとの共同研究) バルプロ酸, ビスフェノール A, ネオニコチノイドの, 幼若期の急性影響と遅発影響の初期応答を神経回路異常として捉えることを目的としてマウス 2 週齢 (幼若期) に強制経口投与し, 強制投与後の 2, 12, 24 時間後の神経回路応答を網羅的な神経回路応答検出能力に優れた膜電位感受性色素を用いた神経回路活動検出系で海馬神経回路を中心に検証し, 細胞の興奮性に関する異常を検出した。遅発毒性の検討を行うためには, 同様の投与の後, 13 週令以降の動物での神経興奮伝播における神経回路異常の検討と, 可塑性発現の検証を行なった。

(2) 海馬以外の基準神経回路の探索

低倍率の光計測系を改良し, 海馬以外の神経回路についてもより網羅的な検証を行えるようにし, 特に前帯状皮質 (ACC), 体性感覚野, 運動野をまたいで傍梨状核 (EPN) までの広範な神経回路の定量的イメージングをおこなった (徳島大学歯学部吉村との共同研究)。また, ACC での脳両側への信号伝播について検討した。

(3) 海馬 CA1 野における GABA 受容体の関

与する可塑性調節機構についての光計測による解析

マウス海馬 CA1 野の基本的な神経回路動作をリストアップするために, 各種の刺激パターンに対する応答を計測し, GABA 受容体の関与について検討した。この中で, シヤーフアー側枝を 2 群に分割する手法を開発し, より自然な情報伝達での役割について検討した。

(4) 各種光計測技術の開発-網羅的計測, 遺伝子改変動物の利用, 偏光などを使った新規の計測法を開発している。

C. 研究結果

(1) バルプロ酸, ビスフェノール A, ネオニコチノイド系物質の幼若期投与 (中島・種村らとの共同研究)

急性効果: ネオニコチノイド系物質の強制投与後, 2 時間後には細胞体での興奮性が著しく亢進している様子が検出した。(図 4)

遅発毒性: 海馬の 3 シナプス回路について, 3 種類の刺激強度で刺激を加えた時の信号伝達について, 通常伝播パターンと GABA 受容体阻害剤 (SR-95531, Gabazine) を加えた時の応答について, イメージング解析を適用した。バルプロ酸の遅発毒性に関しては, 回路の E/I バランスの破綻を示唆する知見が得られている Juliandi ら, Stem Cell Rep 2015) (図 2)。またビスフェノール A では, とくに刺激強度が弱い領域での GABA 抑制条件での応答の違いが顕著に現れた (図 3)。

ネオニコチノイド類では, ACT の投与群において, 貫通繊維の刺激で歯状回 (DG) の過興奮がみられる個体があった。一方, CA1 ではバルプロ酸, ビスフェノールのような一貫性のある違い (が見出せなかった。そこで, 海馬 CA1 野でのシナプス可塑性に対する影響をさらに調べたところ, 長期増強 (LTP) の誘導について IM, ACT の投与でそれぞれ異なる遅発影響が現れていることがわかった (図 5)。今後, この神経回路機構を検証する必要がある。

(2) 海馬以外の基準神経回路の探索

海馬以外の神経回路で, 化学物質による改変を示すことが容易な神経回路を選ぶために, 探索的に他の神経回路の応答を検討している。今年度は, 引き続き皮質系の回路と

して、傍梨状核 (EPN), 体性感覚野, 前帯状皮質 (ACC) を1つのスライス標本に含む回路の発振現象が起こることを見出し, EPN, ACC が発振を起こす回路となっていることを明らかにした。

また, ACC に関しては海馬との信号伝達において重要な役割を果たしていること, 脳両側の信号伝達で重要な役割を果たしていることからさらに解析を進め, その深層からの信号が両側の信号伝達に重要であることを明らかにした。

(3) 海馬 CA1 野での結果から, シータ周期で引き起こされる新規の GABA 依存性の短期可塑性を見出した。これは, 高頻度刺激で引き起こされる短期可塑性と合せて, 周期的な神経活動が抑制性の回路を介して回路演算を調節する機構と考えた。さらに脳情報処理における意義を明らかにするため, 複数入力に対する応答を検討した。その結果, GABA 受容体の働き方として, フィードフォワードとフィードバックでそれぞれ異なる働き方をすることを明らかにした。これを遅発毒性検出に使えるかどうか, さらに可塑性との関連について検討を始めた。

(4) 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。今年度は特に無染色のスライス標本での計測を行いこれまで報告されていない哺乳類脳組織での光散乱による膜電位応答の光学計測に成功した。

D. 考察

光計測法によってバルプロ酸, ビスフェノールの遅発毒性における興奮-抑制バランスの変化が見られている。

一方, ネオニコチノイド類の遅発毒性の検討で ACT と IM で, 海馬神経回路の信号伝達において異なる影響が見出された。また, 可塑性への影響も異なっていた。この違いの背景にある神経回路機構を明らかにする必要がある。

これを再現性よく, 鋭敏に測定するためには, 興奮-抑制バランスによって回路動作が大幅に変わる神経回路指標を設定する必要がある。シータ周期のような周期的な神経活動の変調なども含め検討をすすめる。また, 無染色標本での計測は評価系として有

用だと思われるのでさらに計測法を確立する。

E. 結論

光計測法を使うことによって, 海馬神経回路の変調を効率よく, 定量的に検出する系が確立できた。この手法は幼若期から成長に伴ったどの成長段階の標本でも同じように適用できる上, 電気生理学的な知見と密接な関係があり相補的に解釈することで神経機構の解明に重要な意義を持つ。

今後とも光計測法を軸に, 神経回路の再編成を起こしうる化学物質の神経毒性解析を進めることは, 重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

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 and Tominaga Y Paired burst stimulation causes GABA receptor-dependent spike firing facilitation in CA1 of rat hippocampal slices. *Front. Cell. Neurosci.* 10:9. doi: 10.3389/fncel.2016.00009 (2016)

Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K, Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. *Stem Cell* 2015 Reports:1-14

doi:10.1016/j.stemcr.2015.10.012

2. 学会発表

Tominaga T and Tominaga Y. Voltage-sensitive dye imaging study of the input-dependent GABAergic control of the paired burst facilitation (PBF) in area CA1 of the hippocampus 471.13/G4 Neuroscience Meeting Planner. Washington DC, Society for Neuroscience, 2017

WAKAYAMA Y, KAMADA S, YAMADA Y, TOMINAGA T, KAJIWARA R Voltage-sensitive dye signal analysis of inhibitory components in mouse perirhinal-entorhinal cortical slices 378.05/H4 Neuroscience Meeting Planner. Washington DC, Society for Neuroscience, 2017

平島 寛司、富永 貴志、富永 洋子、岳 鳳鳴、滝澤 佐季子、横山 忠幸、松本 健、友常 大八郎、佐々木 克典 「膜電位感受性色素(VSD)を用いた光計測技術によるリプログラミングがん細胞膜電位計測法」第17回日本再生医療学会総会 2018.3.21 口頭発表 パシフィコ横浜

富永貴志 「イントロダクション」ワークショップ「個性」創発神経基盤の統合的理解に向けた階層横断的解析（オーガナイザー富永貴志，郷康広）2017.12.06 生命科学系合同年次大会 ConBio2017 神戸ポートピアホテル，神戸国際会議場

富永貴志 「膜電位イメージングの技術支援：実施例から」新学術領域「個性」創発脳の第2回若手の会・技術講習会 2017.11.21 京都大学 楽友会館 2F 会議・講演室（招待講演）

河野 睦，世戸 彩華，石田 正樹，富永 貴志，堀 学 ゾウリムシの逃走反応におけるストマチン様タンパク質の役割，2017/11/18，第50回日本原生生物学会大会と第1回日本共生生物学会大会 つくば

富永貴志 「ゾウリムシと電気生理学」シンポジウム「ゾウリムシ研究の新潮

流」（オーガナイザー 富永貴志，堀学，石田正樹）日本動物学会 2017.09.21（富山大学）

富永貴志，富永洋子 「海馬CA1野のペアドバーストファシリテーション（PBF）のGABAergicなフィードフォワード，フィードバック調節：膜電位感受性色素による研究」（Feedforward and feedback-GABAergic control of the paired burst facilitation (PBF) in area CA1 of hippocampus: A voltage-sensitive dye study Takashi Tominaga, Yoko Tominaga) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ，2017.07.20 口頭発表

吉村 弘，須貝 外喜夫，加藤 伸郎，富永 貴志，富永 洋子，長谷川 敬展，姚 陳娟，赤松 徹也 カフェイン投与により誘発されるラット視覚野オシレーションにおける non-NMDA 受容体と NMDA 受容体の相互交錯的関与（Interplay between non-NMDA and NMDA receptor activation during caffeine-induced oscillations in the visual cortex of rats) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ，2017.07.21

和歌山 ゆうか，鎌田 翔仁，山田 悠太，富永 貴志，梶原 利一 膜電位イメージングによる嗅周囲皮質の抑制性/興奮性神経活動の層分布解析（Layer Distribution Analysis of Inhibitory and Excitatory Activity Components in Perirhinal Cortex Using Voltage-Sensitive Dye Imaging) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ，2017.07.21

梶原 利一，和歌山 ゆうか，富永 洋子，富永 貴志 神経興奮伝播の促進に関与するマウス嗅皮質神経回路可塑性の膜電位イメージング（Voltage-sensitive dye imaging of the network plasticity facilitating the neural excitation propagation in mouse rhinal cortices) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ，2017.07.21

- 富永貴志, 富永洋子「情動認知行動影響の毒性評価における神経回路機能イメージング法を用いた神経基盤解析」第44回日本毒性学会学術年会 パシフィコ横浜 2017.07.12 シンポジウム招待講演
- 富永貴志 新学術領域「個性創発脳」第2回領域会議 「個性」創発の神経基盤解析のための神経回路イメージング法と行動様式プロファイリング 御殿場 2017.0708
- 富永貴志 「膜電位感受性色素を使った光計測法により神経回路機構を探るー海馬を中心として」第37回 Neuroscience Seminar Tokushima 徳島大学病院 2017.03.06 招待講演
- Takashi Tominaga Cellular electrophysiology to VSD imaging, International Symposium on Future of Brain Science 2017.03.03 東北大学 招待講演
- 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 imaging 302.14 / 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, Oldenburg 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 O2-J-2-3
- 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
- Tominaga T and Tominaga Y A spatio-

temporal analysis of the GABA_A receptor-dependent and independent membrane potential response to a gamma-band burst stimulus in area CA1 of hippocampal slice: A VSDI study 758.05/B4 Neuroscience Meeting Planner. Chicago, Society for Neuroscience, 2015

富永貴志, 富永洋子, 五十嵐勝秀, 大塚まき, 古川佑介, 菅野純, 種村健太郎 Neural circuit functional assay with voltage-sensitive dye imaging in hippocampal slices; effect of maternal bisphenol A 「膜電位感受性色素による神経回路機能のアッセイ系の構築—海馬スライスとビスフェノールA」第53回日本生物物理学会年会 The 53rd Annual Meeting of the BSJ (金沢大学) 2015

富永貴志 内藤豊 Hodgkin-Huxely type analysis of voltage-dependent potassium currents in Paramecium 「ゾウリムシの電位感受性 K チャネルの Hodgkin-Huxley 型の解析」日本動物学会 第86回 新潟大会 2015

富永貴志 富永洋子 VSD-imaging of 100 Hz stimulation induced GABA_A independent perisomatic membrane potential response in area CA1 of hippocampal slice 「海馬スライス標本で CA1 野で見られる 100Hz 刺激によって引き起こされる GABA_A 受容体以外の細胞体近傍での膜電位応答の可視化」第38回日本神経科学学会(神戸) 2015

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

図表はここからお願いします。

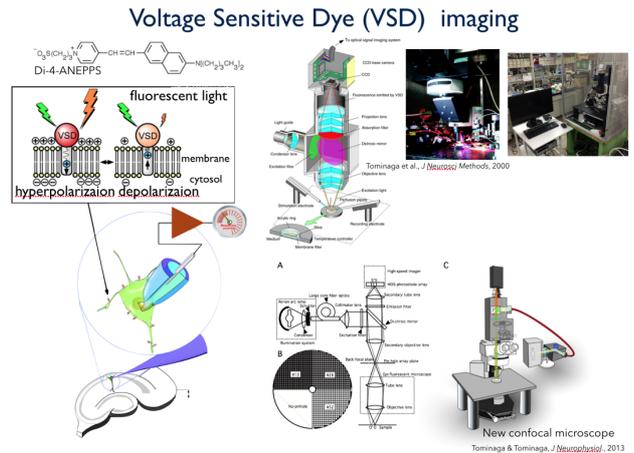


図1 光計測法の概要

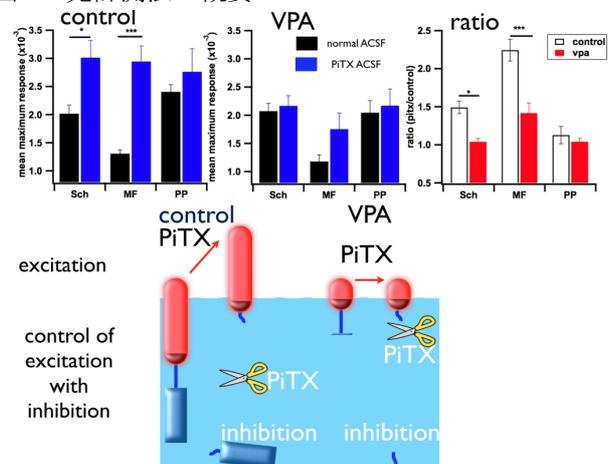


図2 バルプロ酸の遅発毒性

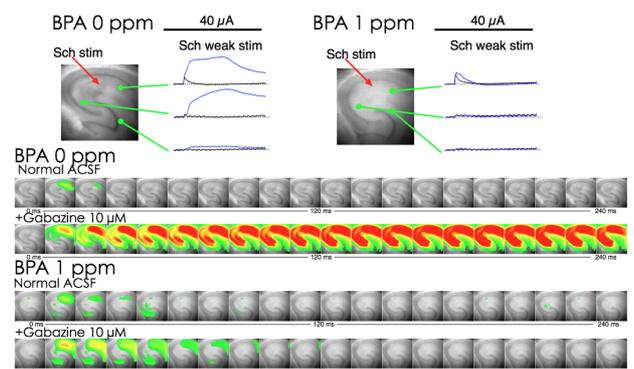


図3 ビスフェノールの遅発毒性

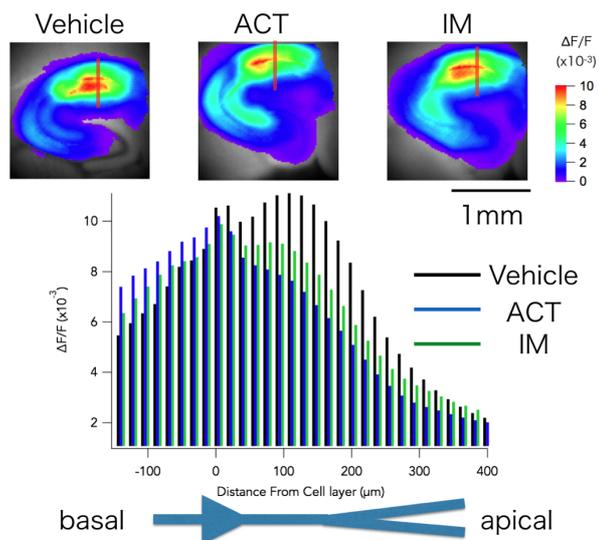


図4 ネオニコチノイドの急性影響

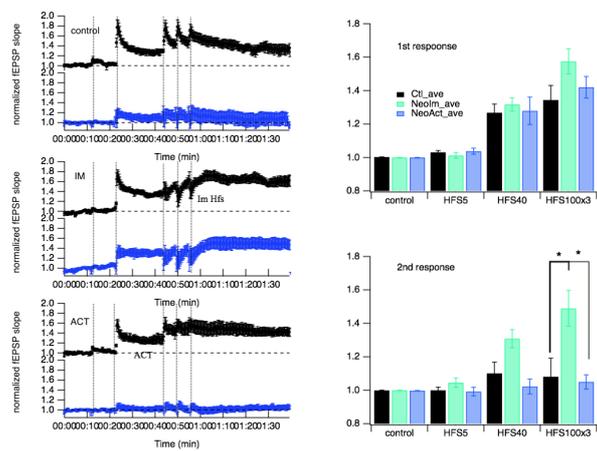


図5 ネオニコチノイドのシナプスへの影響

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6）

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

「国内外情報収集、OECD 対応、新規毒性マーカー探索に関する研究」

研究分担者

菅野 純（国立医薬品食品衛生研究所・客員研究員）

【研究要旨】

情動認知行動異常を呈したマウスにエピゲノム異常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に関する OECD 対応、および国内外の情報を収集する。複数の国際的会合に出席し、本研究班の成果の一部を情報発信した。本研究班において得られた神経行動学的所見、神経科学的所見、分子生物学的所見、及び、その獲得と解析に用いた研究手法は、いずれの会合においても、興味深く受け入れられ、高評価を得た。国際的に、これらの様な情報を基にしたリスク評価の必要性の高さは共通に認識されていることが確認されるとともに、その方法論の検討を積み重ねようとしていることが判明した。さらに、自らデータを作成しない方針の国や組織も、分子毒性学的情報の有用性を認識し、評価へ取り込む方法の開発と標準化に力を入れていることが明らかとなった。

加えて、情動認知行動異常の高精度なリスク評価の基礎となる、海馬の遺伝子発現プロファイルを、その高感受性期と考えられる胎生 11.5 日、14.5 日、および 17.5 日目の3時点について採取し、その継時的変化と諸形質との比較解析を実施した。その結果、細胞増殖促進（発現増加）及び抑制（発現減少）に関わる遺伝子、神経細胞分化マーカー（発現増加）、グリア細胞分化マーカーとその上流遺伝子（発現増加）が確認され、情動認知行動の逸脱を裏付ける客観的指標として有用であることが強く示唆された。

[ここに入力]

A. 研究目的

情動認知行動異常を呈したマウスの中樞神経組織にエピゲノム異常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に関するOECD対応、および国内外の情報を収集する。

加えて、外因性の要因により誘発される情動認知行動異常の高精度なリスク評価の基礎となる、海馬の遺伝子発現プロファイルを、その高感受性期と考えられる胎生11.5日、14.5日、および17.5日目の3時点について採取し、その継時的変化と諸形質との比較解析を実施する。

B. 研究方法

B-1 情報収集：

平成27年度は、OECD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年10月8～9日、OECD経済開発協力機構フランス・パリ)へ出席した。第2回マレーシア毒性学会(マレーシア、クアラルンプール、2015年10月29日)において内分泌かく乱化学物質問題と子供の毒性についての招待講演、ECETOCワークショップ「生殖毒性におけるエピジェネティクスの役割」(ベルギー、ブリュッセル、2015年11月12日)においてシグナル毒性の概念とエピジェネティクスに関する招待講演、基礎生物学研究所における第63回カンファレンス(2015年12月1日)においてシグナル毒性と内分泌かく乱化学物質問題についての招待講演を行った。また、第37回日本中毒学会学術集会(2015年7月17日、和歌山)、第42回日本中毒学会学術年会(2015年7月1日、金沢)にて、遅発性中枢毒性に関する発表を行った。

平成28年度は、OECD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:今年度は非開催となった(次年度5月開催予定)。2016年9月14～15日にUSEPA Accelerating Risk Assessment Workshop (於 国環境防護庁(D.C., USA))、2016年9月19～20日にEuropean Commission International

Workshop on Endocrine Disruptors (於 Hotel Bloom, Rue Royale 250, 1210 Brussels, Belgium)、2016年10月10～12日にEuropean Centre For Ecotoxicology and toxicology of Chemicals (ECETOC) Workshop on Applying 'Omics Technologies in Chemicals Risk Assessment (於 NH Eurobuilding Hotel, Madrid, Spain)、2016年11月29日にThe Korean Academy of Science and Technology International Symposium (於 Maple Hall, The Plaza Hotel, Seoul, Korea)、に出席し、情報収集を行うとともに、本研究班における成果の一部を情報発信した。

平成29年度は、OECD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:今年度は2017年5月17日～20日、パリでの第6回会議に出席した。2017年10月4～5日開催の第7回は日程等の都合により、国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部・広瀬明彦部長が出席し、同氏より情報を得た。2017年8月13～18日にGordon Research Conference (Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicology、Procter Academy, New Hampshire, USA、2017年10月15～18日にthe 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT)、Jinan, China、2017年12月04日にEndocrine Disruption Strategies Workshop、Raleigh、North Carolina, USA、2017年12月12日に環境ホルモン学会第20回研究発表会、神戸、2018年3月24日にThe 33th Joint Annual Conference of Biomedical Science、Taipei、Taiwan、に出席し、本研究班における成果の一部を情報発信するとともに情報収集を行った。

B-2 胎生期マウス海馬の遺伝子発現プロファイル解析：

情動認知行動異常の高精度なリスク評価の基礎となる、海馬の遺伝子発現プロファイルを、その高感受性期と考えられる胎生11.5日、14.5日、および17.5日目の3時点について採取し、その継時的変化と諸形質との比較解析を実施する。

[ここに入力]

B-2-1. 胎児終脳の採取

妊娠 8 日齢の C57BL/7NcrSlc 雌マウス(日本 SLC)を購入し、胎生 11.5 日、14.5 日、17.5 日の胎児終脳を採取する。

B-2-2. 胎児の雌雄判別

雄胎児のみを解析に用いるために、Y 染色体配列の検出により雄性を判別する。その際に用いる CR プライマーは下記である。

・Y-chromosome specific sequence
sense: 5' GAC TGG TGA CAA TTG TCT AG 3'
antisense: 5' TAA AAT GCC ACT CCT CTG TG 3'

B-2-3. 胎児終脳の遺伝子発現解析

胎生 11.5 日、14.5 日、17.5 日 3 時点の終脳の伝子発現解析を Percellome 法により実施する。

(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の配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。

(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程(平成 27 年 4 月版)及び国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則の承認を受けて行った。)

C. 研究結果

C-1 情報収集:

平成 27 年度は、内分泌かく乱化学物質評価のための AOP に関して、研究成果の報告及び提案を行うとともに、試験及び評価に関するテストガイドライン作成に向けて、参加各国及び関連研究機関を含む国際協調の下で最新の情報を交換し、今後の方針につ

いて討議を行った。各学会等において、情報収集と意見交換を行った。

平成 28 年度は、USEPA Accelerating Risk Assessment Workshop: 国際的な規制当局の科学支援研究者による様々なレベルの複雑な要件を含む定量的なリスク評価のための新たな優先付け、スクリーニングなどのツールの適用に関するディスカッションを行う場においてシグナル毒性としての知見を口頭発表(30 分)し、2 日間の会を通じて、情報交換を行った。

EC International WS on Endocrine Disruptors: EU 内、及び関係する国際的な通商関係にあるパートナー間での内分泌かく乱化学物質の試験法と評価に関するアプローチの共通点と相違点を明らかにし、その評価への適応法を論議するとともに、シグナル毒性としての内分泌かく乱化学物質の研究と試験法開発に関する知見を口頭発表(30 分)し、2 日間の会を通じて、情報交換を行った。

ECETOC WS: オミクス技術の化学物質リスク評価への適応に関する会合にて、今後のストラテジー構築に関するブレインストーミングと、それを受けての企画委員会に参画した。

The Korean Academy of Science and Technology International Symposium: 環境汚染物質への暴露と糖尿病発症に関するシンポジウムにおいて、そのメカニズムに関わる分子機構の考え方の例として、シグナル毒性の考え方、実際のデータ、及び解析手法を口頭発表(20 分)により提示した。

平成 29 年度は、第 6 回 OECD 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(2017 年 5 月 17 日~20 日、パリ)において、本研究班の成果である情動認知行動試験の重要性を、その背景と共に口頭発表し、情報交換を行った。現状では、標準化が行われる段階に到達していない問題が明らかとなり、本研究の先行研究で開発した機材の有用性を強調した。

第 7 回 OECD 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 2017 年 10 月 4~5 日は、広瀬明彦・安全性予測評価部長が出席し、主に環

[ここに入力]

境関係の論議がなされたとの報告を受けた。

Gordon Research Conference (Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicology, Procter Academy, New Hampshire, USA (2017年8月13~18))において、同会長からの招致をうけ、本研究班の成果である情動認知行動試験の重要性を含む、シグナル毒性解析の重要性を口頭発表し、情報交換を行った。評価が高く、2年後の開催に向けて、企画への参画を要請された。

The 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), Jinan, China (中国毒理学会学術年会 2017年10月15~18日)に招致され、本研究班の成果である情動認知行動試験の重要性を含む、シグナル毒性解析の重要性を基調講演として口頭発表し、情報交換を行った。1,500人ほどの参加者には若い毒性学者が多く含まれ興味を引いた。

Endocrine Disruption Strategies Workshop, Raleigh, North Carolina, USA (2017年12月04日)に全体講演者として招致され、本研究班の成果である情動認知行動試験の重要性を含む、シグナル毒性解析の重要性を口頭発表し、情報交換を行った。従来の内分泌かく乱という枠組みに収まらない中枢神経毒性という視点を強調し、所定の反響を得た。

環境ホルモン学会第20回研究発表会、神戸(2017年12月12日)にて、特別講演を行い、本研究班の成果である情動認知行動試験の成果を中心に口頭発表し、情報交換を行った。人における事例との類似性についての論議がなされた。

The 33th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, Taiwan (台湾毒理学会、2018年3月24日)に、本研究班の成果を中心に、特別講演を行った。

C-2 胎生期マウス海馬の遺伝子発現プロフィール解析:

C-2-1. 胎児終脳の採取

妊娠8日齢のC57BL/7NCrSlc雌マウス(日本SLC)を購入し、胎生11.5日、14.5日、17.5日に胎児を順次摘出し、全ての胎児の実体顕微鏡下にて終脳を採取し、RNAレイター中に浸漬し保管した。この、胎生11.5日、14.5日、17.5日3時点(以下、E11、E14、

E17と表記)、各3標本のクオリティチェックを行った。その結果、Percellome法による遺伝子発現解析が可能であることが確認できた。

C-2-2. 胎児の雌雄判別

雄胎児のみを解析に用いるために、終脳の採取時に得た胎児の尾部によって、Geno Typingによる雌雄判別を行った(2015年12月7~8日)。胎児尾部を溶解し、Y染色体配列の検出により雄性胎児を選抜した。

C-2-3. 胎児終脳の遺伝子発現解析

胎生11.5日胎児1匹の終脳では、Percellome法において必要な総RNA量に満たないため、4胎児分の終脳をプールし1標本とした(2016年2月29日)。胎生14.5日、17.5日の終脳に関しては十分な組織量であるため、1胎児1標本とした。以上を踏まえ、胎生11.5日、14.5日、17.5日3時点、各3標本によりPercellome法による遺伝子発現解析を実施した。

N=3のサンプルサイズにおける群間t検定の $p < 0.01$ 、細胞一個当たりmRNAコピー数1以上のProbesetのリストを解析した。経時的な遺伝子発現の増減を分類し、そのPS数を表1に示した。E14からE17にかけて、急速に発現増加する(E14<E17と表記)遺伝子の数が増加することが示された。細胞増殖、分化に関わる遺伝子のいくつかを図1~11に示す。細胞増殖促進(発現増加)及び抑制(発現減少)に関わる遺伝子、神経細胞分化マーカー(発現増加)、グリア細胞分化マーカーとその上流遺伝子(発現増加)が確認された。

D. 考察

本研究班において得られた分子生物学的な所見に裏打ちされた成果、及び、その獲得と解析に用いた研究手法は、いずれの会合においても、興味深く受け入れられるとともに高評価を得え、その研究の方向性について妥当性と新規性が確認された。国際的に、このような情報のリスク評価への適応については、その必要性の高さは共通

[ここに入力]

に認識されていることが確認されるとともに、その活用の方法論の検討を積み重ねようとしていることが判明した。

本研究班において得られた分子生物学的な所見、及び、それを裏付けるデータ取得と解析に用いた研究手法は、いずれの会合においても、興味深く受け入れられ、高評価を得たと判断されるとともに、その研究の方向性について妥当性と新規性が確認された。

国際的に、この様な情報のリスク評価への適応については、その必要性の高さは共通に認識されていることが確認されるとともに、その活用方法の検討を積み重ねようとしていることが判明した。

自らデータを作成しない方針を取る国や組織も、分子毒性学的情報の有用性を認識し、評価へ取り込む方法の開発と標準化に力を入れていることが明らか

E. 結論

当研究班の研究計画、成果とともに、交流した範囲において国際的に一定の評価を得た。また、研究の方向性について妥当性と新規性があることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし。

2) 雑誌

1. Ono R, Ishii M, Fujihara Y, Kitazawa M, Usami T, Kaneko-Ishino T, Kanno J, Ikawa M, Ishino F.(2015) Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes. *Sci Rep.*;5:12281
2. Xu J, Alexander DB, Iigo M, Hamano H, Takahashi S, Yokoyama T, Kato M, Usami I, Tokuyama T, Tsutsumi M, Tamura M, Oguri T, Niimi A, Hayashi Y, Yokoyama Y,

Tonegawa K, Fukamachi K, Futakuchi M, Sakai Y, Suzui M, Kamijima M, Hisanaga N, Omori T, Nakae D, Hirose A, Kanno J, Tsuda H.(2015) Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Sci.*;106(7):825-32.

3. Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K, Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K, Kanno J. (2015) Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep.* :16(2):192-201
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Buesen R, Chorley BN, da Silva Lima B, Daston G, Deferme L, Ebbels T, Gant TW, Goetz A, Greally J, Gribaldo L,

[ここに入力]

Hackermüller J, Hubesch B, Jennen D, Johnson K, Kanno J, Kauffmann HM, Laffont M, McMullen P, Meehan R, Pemberton M, Perdichizzi S, Piersma AH, Sauer UG, Schmidt K, Seitz H, Sumida K, Tollefsen KE, Tong W, Tralau T, van Ravenzwaay B, Weber RJM, Worth A, Yauk C, Poole A., (2017) Applying 'omics technologies in chemicals risk assessment: Report of an ECETOC workshop. Regul Toxicol Pharmacol. 2017 Dec;91 Suppl 1:S3-S13

8. Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J., Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. J Toxicol Sci. 2017;42(2):121-128

2. 学会発表

1. Jun Kanno, Percellome Project for Mechanistic Analysis of Chronic Toxicity by a New Concept of Repeated Dose Study (2016.3.16), Society of Toxicology 55th Annual Meeting, New Orleans, USA, poster
2. 菅野 純、複合影響の考え方—マウンテン・オブ・ハピネスから「ホルミシス」まで—(2016.2.26)、化学物質の安全管理に関するシンポジウム・複数化学物質のリスク評価-、東京、シンポジウム
3. 菅野 純、代替試験法の問題点と今後の方向性 -毒性学的観点からの考察- (2015.12.12)、日本動物実験代替法学会第 28 回大会、横浜、特別講演
4. 菅野 純、OECD EDTA-AG/EAGMST における AOP と、Toxicogenomic 応用の試み

(2015.12.11)、環境ホルモン学会第 18 回研究発表会、栃木、シンポジウム

5. Jun Kanno, Satoshi Kitajima and Kentaro Tanemura, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Endocrine Disrupting Chemicals Issues (2015.12.1), The 63rd NIBB Conference "Environment to Bioresponse", Okazaki, Symposium
6. Jun Kanno, Introduction of Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brussels, Oral
7. Jun Kanno, The concept of "repeated exposure" and possible links to epigenetic regulations. -with repeated dose studies introducing baseline responses and transient responses with possible link to epigenetics, (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brussels, Oral
8. Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project (2015.11.10), 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9), Natal, Brazil, Symposium
9. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura and Ken-ichi Aisaki, "Signal Toxicity" to study Endocrine Disruptors Issues and Children's Toxicology, and to make molecular-based linkage with

[ここに入力]

Classical Toxicology (2015.10.29),
2nd Malaysian Congress of
Toxicology(MyCOT2015), Chulan
Kuala Lumpur , Malaysia, Keynote

10. Jun Kanno, Important attributes of nanomaterials in predicting their long-term effects: In vivo studies (2015.10.21), 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH 2015), South Africa, Symposium
11. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study (2015.9.15), 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015), Porto, Portugal, poster
12. 菅野 純、シグナル毒性の概念の、内分泌かく乱化学物質問題や関連する「低用量、早期暴露-遅発影響」型の毒性の研究計画への導入について(2015.8.20)、環境省平成 27 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)、東京、セミナー
13. 菅野 純、種村健太郎、ヒトの急性中毒症状を動物実験で再現できるかー有機リン剤等曝露後の遅発性毒性の発現実験よりー(2015.7.17)、第 37 回日本中毒学会総会・学術集会、和歌山、シンポジウム
14. 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 (Dinamic Biomaker) のカタログ化とその毒性予測利用 (2015.7.1)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム
15. 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暴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 (2015.6.30)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、口演
16. 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 (2015.6.29)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム
17. 菅野 純、高橋祐次、高木篤也、小川幸男、広瀬明彦、石丸 直澄、今井田克己、Taquann 直噴全身暴露吸入法によるナノマテリアル有害性評価 (2015.6.29)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム
18. 津田洋幸、徐結荷、酒々井真澄、二口充、深町勝巳、広瀬明彦、菅野 純、多種のカーボンナノチューブの短・中期安全性評価手法の提案(2015.6.29)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム
19. Jun Kanno, Construction of “ Dynamic Biomarkers ” by Percellome Toxicology based on a new Concept of “Signal Toxicity” , The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6.25) Jeju, Korea, 特別講演

[ここに入力]

20. Hiroyuki Tsuda, Jiegou Xu, 2, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masumi Suzui, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Involvement of macrophage in inducing proliferative and neoplastic lesion development of the pleura of rats intrapulmonary treated with multi-walled carbon nanotubes, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral
21. Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Development of High Dispersion-Small Scale Whole Body Inhalation System for Nanomaterials (Taquann System): Application to Multi-wall Carbon Nanotube, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral
22. Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral
23. 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)
24. 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
25. 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.
26. 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)
27. 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)
28. 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.
29. 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,

[ここに入力]

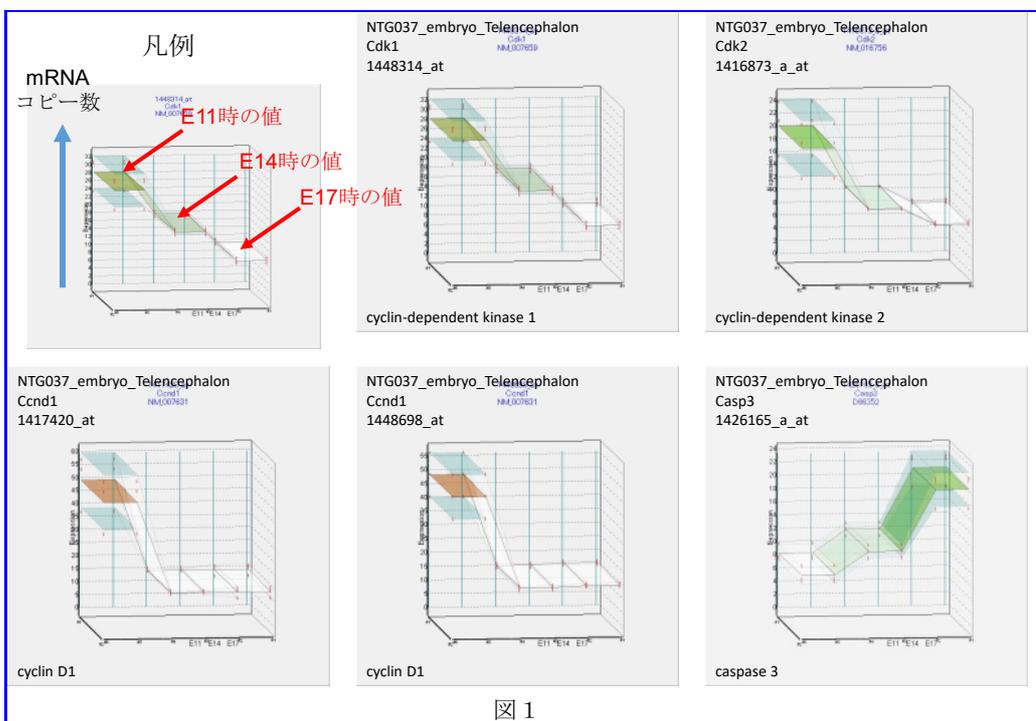
Mexico

30. 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,
 31. 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
 32. 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. 6. 30)
 33. 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 回日本獣医学会学術集会 (2016. 9.)
 34. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemical, pentachlorophenol, identified by Percellome Toxicogenomics Project., SOT2018, San Antonio, USA
 35. Jun Kanno, Nanomaterial respiratory toxicity monitored in rats after whole body inhalation. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2018. 1. 26) 沖縄、シンポジウム
 36. 菅野 純、「シグナルかく乱」による「シグナル毒性」としての内分泌かく乱化学物質問題、環境ホルモン学会第 20 回研究発表会、(2017. 12. 12) 神戸、特別講演
 37. Jun Kanno, Broadening Perspective from Endocrine Signaling to Receptor-Mediated Signaling, Endocrine Disruption Strategies Workshop, (2017. 12. 4) NC USA, Plenary
 38. 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.
 39. Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia (2017. 9. 13) poster
 40. Percellome Toxicogenomics Project for Mechanism-Based Toxicity Prediction. Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura. Gordon Research Conference (Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicology, Procter Academy, New Hampshire, USA (2017. 8. 17)
- 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. その他特になし。

[ここに入力]

NTG037_Telencephalon	
変化方向 ($p < 0.01$ 、1 copy/cell 以上)	Probeset 数
E11 < E14	1425
E14 < E17	13838
E11 > E14	512
E14 > E17	140
E11 < E14 > E17	4
E11 > E14 < E17	58

表 1



[ここに入力]

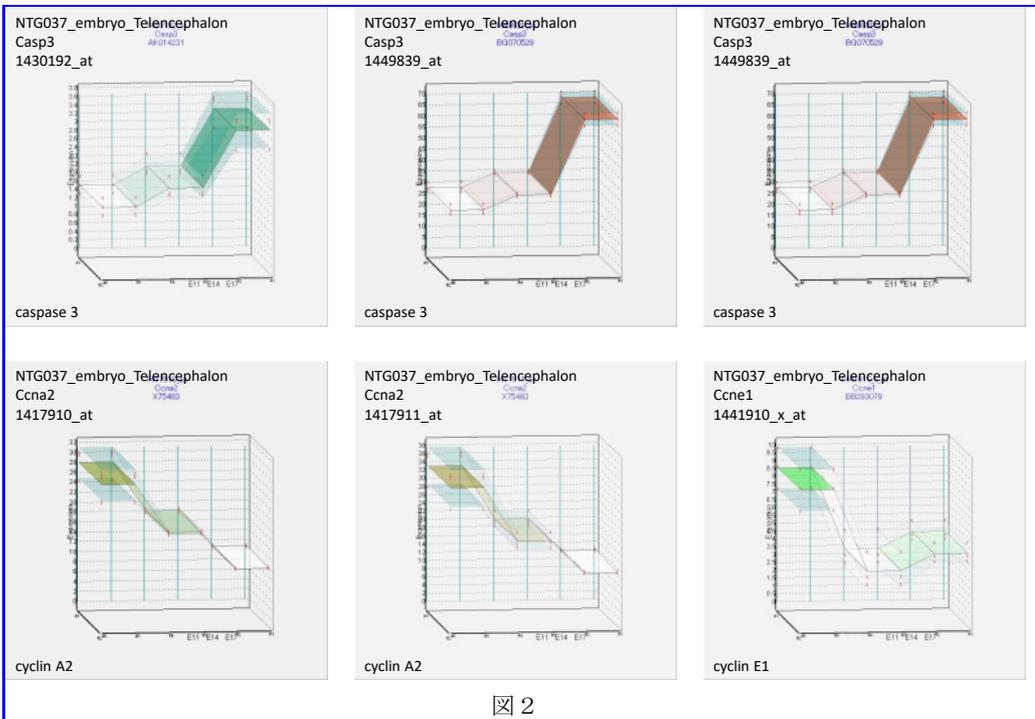


図 2

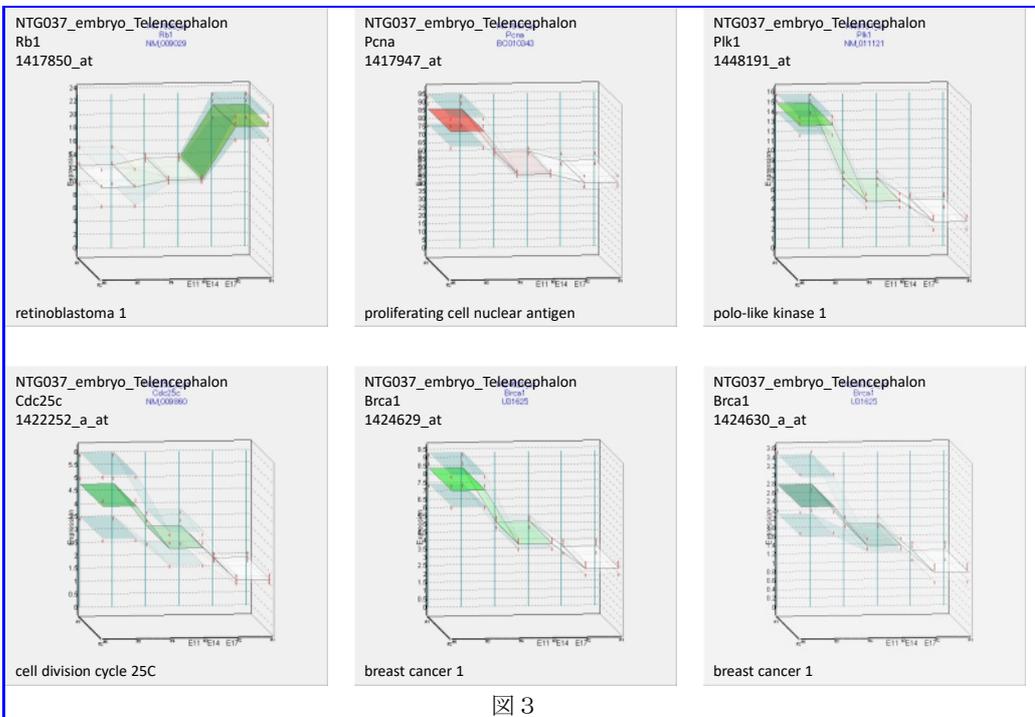
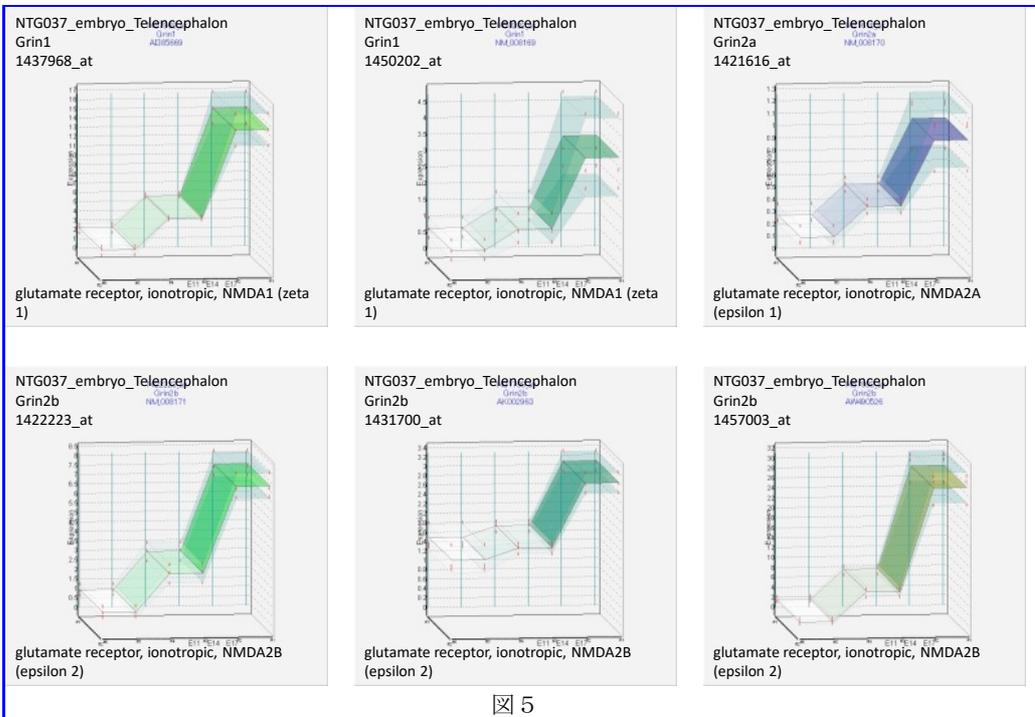
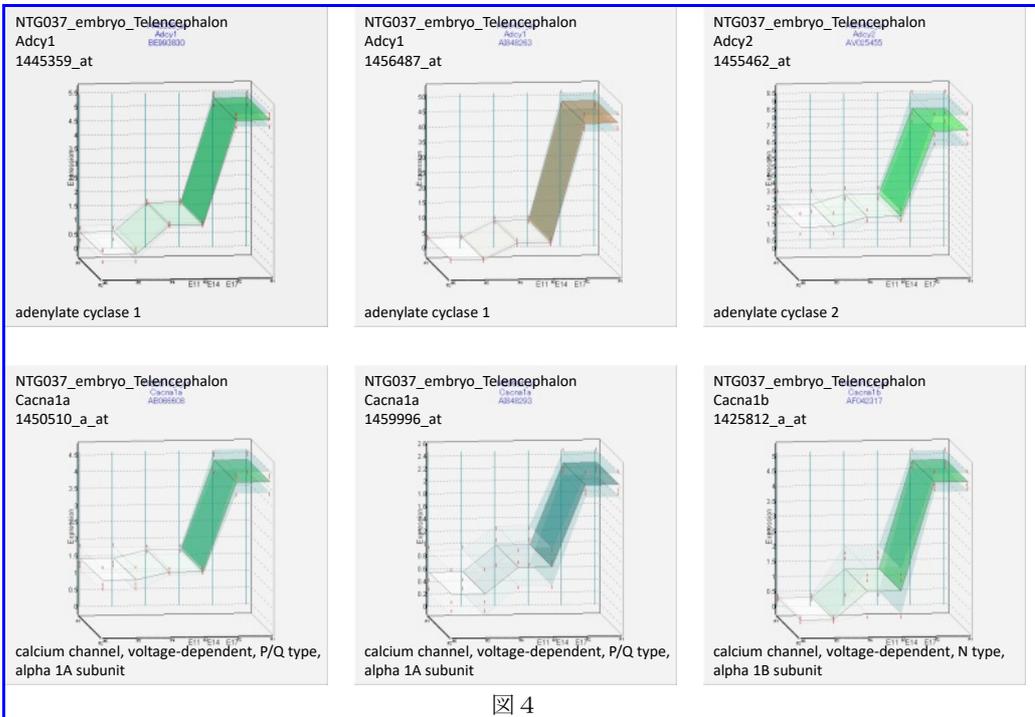


図 3

[ここに入力]



[ここに入力]

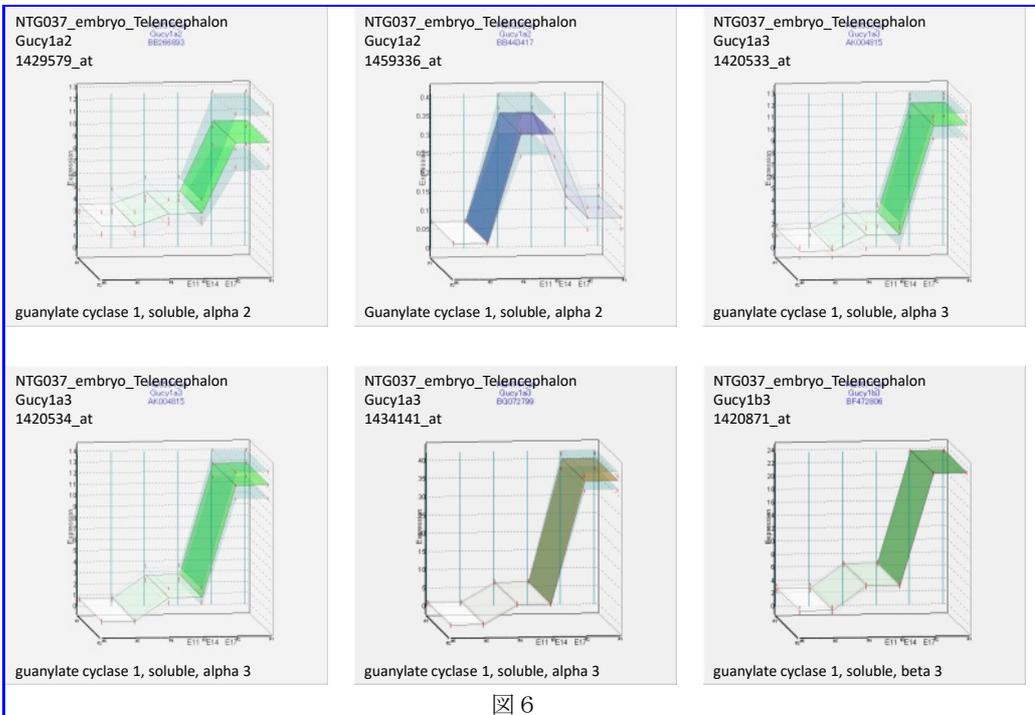


図 6

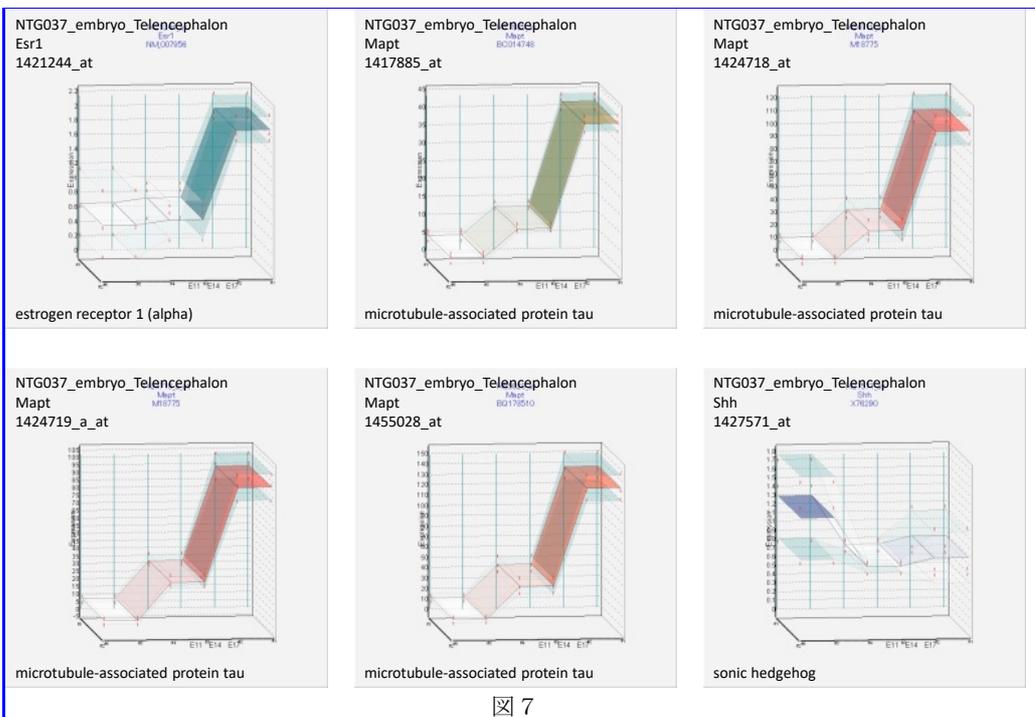
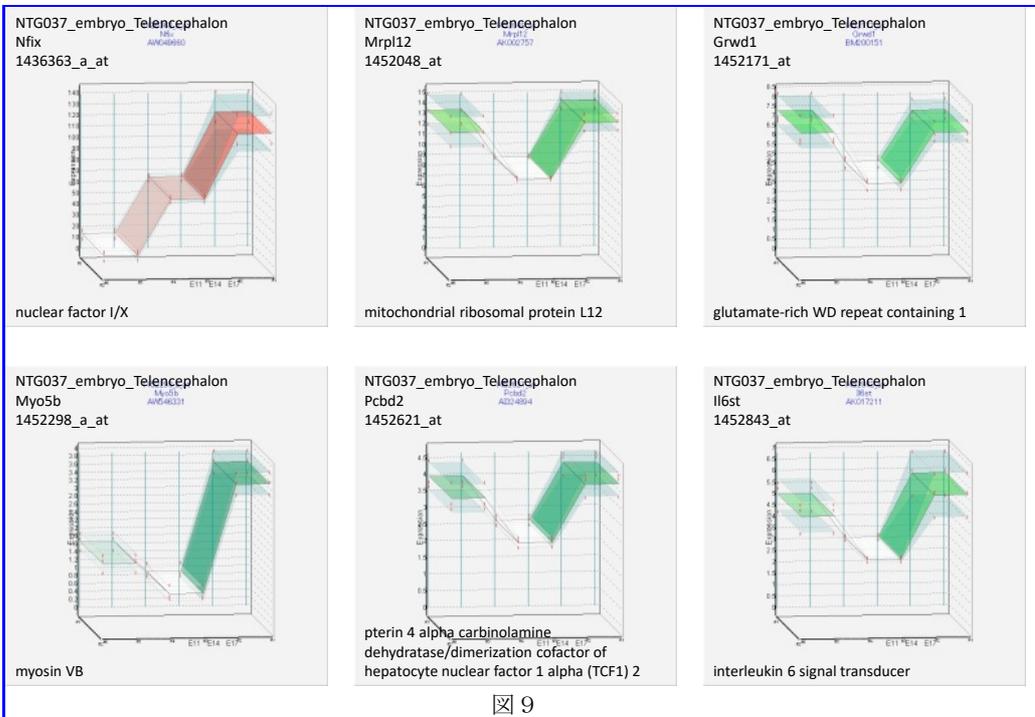
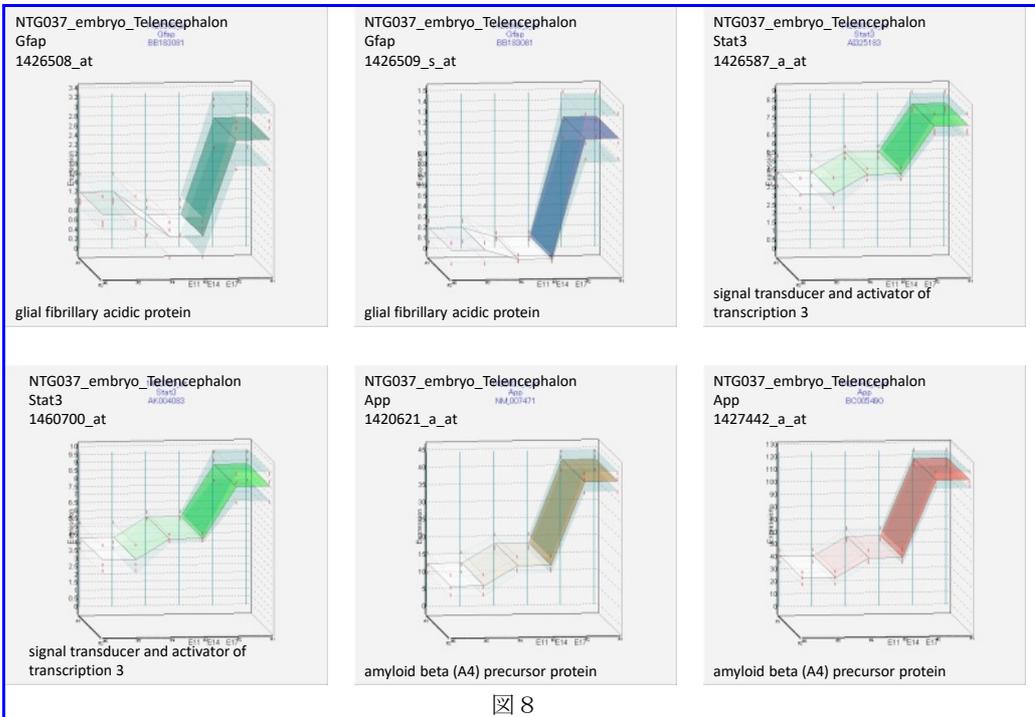
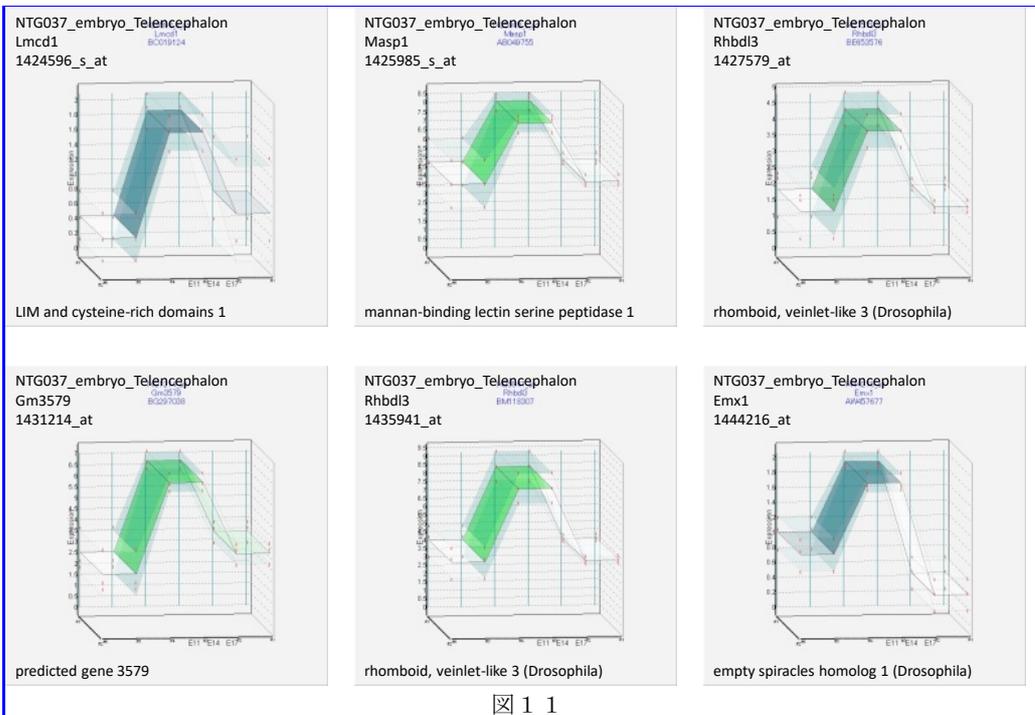
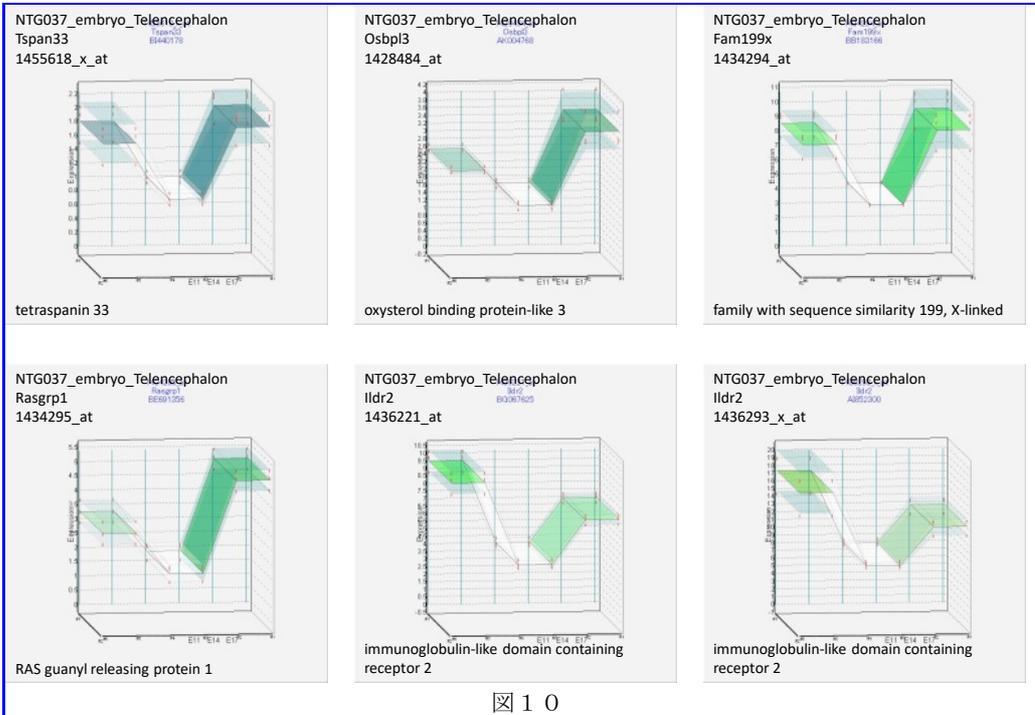


図 7

[ここに入力]



[ここに入力]



[ここに入力]

別添4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakai K, Ideta-Otsuka M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Igarashi K, Tanemura K.	Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity.	Biochem Biophys Res Commun.	498(3):	674-679	2018
Ohtani N, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Yokota H, Inoue H, Iwano H.	Late pregnancy is vulnerable period for exposure to BPA.	J Vet Med Sci.	80(3)	536-543	2018
Saito H, Hara K, Tanemura K.	Prenatal and postnatal exposure to low levels of permethrin exerts reproductive effects in male mice.	Reprod Toxicol.	74	108-115	2017
Sugimura S, Kobayashi N, Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, Yajima A, Hashiyada Y, Kaneda M, Sato K, Imai K, Tanemura K, Arima T, Gilchrist RB.	Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental competence.	Sci Rep.	7(1)	6815	2017
Umezu K, Hiradate Y, Numabe T, Hara K, Tanemura K.	Effects on glycolyx structures of frozen-thawed bovine sperm induced by flow cytometry and artificial capacitation.	J Reprod Dev.	63(5)	473-480	2017

[ここに入力]

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.	79(2)	432-439	2017
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.	11(11)	e0167127	2016
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 .	10	339	2016
Umezu 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.	62(4)	409-414	2016
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 D1Pas1, a DEAD-box RNA helicase, is required for the completion of first meiotic prophase in male germ cells.	Biochem Biophys Res Commun.	478(2)	592-598	2016
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.	24(3)	364-370	2016

[ここに入力]

Kimura E, Kubo KI, Endo T, Ling W, Nakajima K, Kakeyama M, Tohyama C.	Impaired dendritic growth and positioning of cortical pyramidal neurons by activation of aryl hydrocarbon receptor signaling in the developing mouse.	PLoS One	12(8)	e0183497.	2017
Kubo KI, Deguchi K, Nagai T, Ito Y, Yoshida K, Endo T, Benner S, Shan W, Kitazawa A, Aramaki M, Ishii K, Shin M, Matsunaga Y, Hayashi K, Kakeyama M, Tohyama C, Tanaka KF, Tanaka K, Takashima S, Nakayama M, Itoh M, Hirata Y, Antalffy B, Armstrong DD, Yamada K, Inoue K, Nakajima K.	Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. JCI Insight.	JCI Insight.	2(10)	pii: 88609.	2017
Kimura E, Kubo KI, Endo T, Nakajima K, Kakeyama M, Tohyama C.	Excessive activation of AhR signaling disrupts neuronal migration in the hippocampal CA1 region in the developing mouse.	J Toxicol Sci.	42(1)	25-30	2017
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.	Epub ahead of print		2018

[ここに入力]

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.	591	3809-3720	2017
Sanosaka T, Imamura T, Hamazaki N, Chai M, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Miura F, Ito T, Fujii N, Ikeo K, Nakashima K.	DNA Methylome Analysis Identifies Transcription Factor-Based Epigenomic Signatures of Multilineage Competence in Neural Stem/Progenitor Cells.	Cell Reports	20	2992-3003	2017
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.	247	229-238	2018
Zhu Y, Uezono N, Yasui T, Nakashima K.	Neural stem cell therapy aiming at better functional recovery after spinal cord injury.	Dev Dyn.	247	75-84	2018
Honda M, Nakashima K, Katada S.	PRMT1 regulates astrocytic differentiation of embryonic neural stem/precursor cells.	J Neurochem.	142	901-907	2017

[ここに入力]

Kameda T, Imamura T, Nakashima K.	Epigenetic regulation of neural stem cell differentiation towards spinal cord regeneration.	Cell Tissue Res.	371	189-199	2018
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	8	1743-1756	2017
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	8	1506-1515	2017
Uesaka M, Agata K, Oishi T, Nakashima K, Imamura T.	Evolutionary acquisition of promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) repertoires diversifies species-dependent gene activation mechanisms in mammals.	BMC Genomics	18	285	2017
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.	539(7628)	299-303	2016

[ここに入力]

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.	34(10)	1060-1065	2016
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	3(1).	e1232679.	2016
Irie K, Tsujimura K, Nakashima H, Nakashima K.	MicroRNA-214 Promotes Dendritic Development by Targeting the Schizophrenia-associated Gene Quaking (Qki).	J Biol Chem.	291(26)	13891-13904.	2016
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.	44(11)	5105-5122	2016.
Noguchi H, Murao N, Kimura A, Matsuda T, Namihira M, Nakashima K.	DNA Methyltransferase 1 Is Indispensable for Development of the Hippocampal Dentate Gyrus.	J Neurosci	36(22)	6050-6068	2016

[ここに入力]

Noguchi H., Kimura A., Murao N., Matsuda T., Namihira M. & Nakashima K.	Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus	Neurosci Res	95	1-11	2016
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.	6	23903	2016
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.	79	141-149	2016
Tominaga T, Tominaga Y.	Paired Burst Stimulation Causes GABAA Receptor-Dependent Spike Firing Facilitation in CA1 of Rat Hippocampal Slices.	Front Cell Neurosc.	10	9	2016

[ここに入力]

Buesen R, Chorley BN, da Silva Lima B, Daston G, Deferme L, Ebbels T, Gant TW, Goetz A, Greally J, Gribaldo L, Hackermüller J, Hubesch B, Jennen D, Johnson K, Kanno J, Kauffmann HM, Laffont M, McMullen P, Meehan R, Pemberton M, Perdichizzi S, Piersma AH, Sauer UG, Schmidt K, Seitz H, Sumida K, Tollefsen KE, Tong W, Tralau T, van Ravenzwaay B, Weber RJM, Worth A, Yauk C, Poole A.	Applying 'omics technologies in chemicals risk assessment: Report of an ECETOC workshop.	Regul Toxicol Pharmacol	91 Suppl 1	S3-S13	2017
Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J.	Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration.	J Toxicol Sci.	42	121-128	2017
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

[ここに入力]

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
Ono R, Ishii M, Fujihara Y, Kitazawa M, Usami T, Kaneko-Ishino T, Kanno J, Ikawa M, Ishino F.	Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes.	Sci Rep	5	12281	2015
Xu J, Alexander DB, Iigo M, Hamano H, Takahashi S, Yokoyama T, Kato M, Usami I, Tokuyama T, Tsutsumi M, Tamura M, Oguri T, Niimi A, Hayashi Y, Yokoyama Y, Tonegawa K, Fukamachi K, Futakuchi M, Sakai Y, Suzui M, Kamijima M, Hisanaga N, Omori T, Nakae D, Hirose A, Kanno J, Tsuda H.	Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study.	Cancer Sci.	106	825-32.	2015

[ここに入力]

Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K, Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K, Kanno J.	Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation.	EMBO Rep.	16	192- 201	2015
--	---	--------------	----	-------------	------

[ここに入力]