

Ⅱ. 分担研究報告書

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

分担研究報告書

分担研究課題：「脳を主対象とする網羅的遺伝子発現解析」

研究分担者 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。

本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる事を目的とする。我々はこれまでに催奇形性陽性物質21種類、陰性物質14種類を0.89の高い正確度かつハイスループットで判別可能なヒトiPS細胞を用いた*in vitro*発生毒性試験法を開発している(iScience 2022, J Biosci Bioeng 2022, STAR Protocols 2022)。この試験法では、胚発生を制御するシグナルネットワークに対する化学物質のかく乱作用を検出することで、1つの試験で発生毒性のAOPを包括的に評価可能である。1)本手法をまずは発生期のDNTの検出に適応拡大しOECDのガイドラインへの採択可能な試験系を開発する。バルプロ酸のようなDNTとの関連が指摘されている物質の評価にも成功しており、実現の可能性は高い。

一方、発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。2)これら独自技術を駆使して発達期DNTの発現機序を明らかにし、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要なシグナルネットワークを同定する。

今年度は、この発達期DNTの目的達成に向け、先行研究(22時間/日×7日間反復曝露による吸入曝露試験)における対照群(成熟期マウス海馬)をサンプルとして用いた。そして、当方が開発したPercellome手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析により、中枢神経系に関わる各細胞の分化マーカーとして、Mtap2、Mapt(ニューロン)、Dcx(新生ニューロン)、Gfap(アストロサイト)、Mag、Mbp(オリゴデンドロサイト)、Nes、Sox2(神経幹細胞)の各遺伝子を抽出し、その発現を確認した。

A. 研究目的

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。本研究では、DNTを発生期と生後発達期に分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる。

発達期のDNTに関しては、その複雑さ故に基礎的な背景データの不足が大きな問題である。我々はこれまでに、シックハウス症候群の動物試験モデルの開発に成功し、その中で、発達期においてキシレン等の吸入曝露により、成熟後、DNTの特徴の一つと考えられる情動認知行動異常が誘発されることを見出した。また、脳海馬領域の網羅的発現変動解析により、当該物質の影響をシグナルネットワークとして検出することに成功している。

本分担研究では、モデル揮発性物質を脳が高感受性期にあたる生後発達期に吸入曝露し、中枢神経系への影響を誘発したマウス脳サンプルの網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、将来的な*in vitro*試験法への適応拡大に必要な神経科学的データを収集する。

B. 研究方法

Total RNA の分離精製

マウス組織(脳)を採取後すみやかにRNA later (Ambion社)に4℃で一晩浸漬し、RNaseを不活化した。脳は摘出後、カミソリ刃にて正中で左右に切断し、左部について、小脳、脳幹、海馬及び大脳皮質の4部位に分離後、各々別チューブに採取した。その後、RNA抽出操作までは-80℃にて保存した。抽出に当たっては、RNA laterを除い

た後、RNeasyキット(キアゲン社)に添付されるRLT bufferを添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の10 µL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。100 ngを電気泳動しRNAの純度及び分解の有無を検討した。

遺伝子発現変動解析

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はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500 bp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℃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、得られた遺伝子リストと既知情報の照合による確認は、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、所属の研究機関が定める「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」を遵守した。

C. 研究結果及び考察

先行研究(22時間/日×7日間反復曝露による吸入曝露試験)の対照群である成熟期雄性マウス(C57BL/6J)の海馬における網羅的遺伝子発現解析の結果、中枢神経系に関わる遺伝子から、海馬

における各細胞の分化マーカーとして、Mtap2と Mapt (ニューロン)、Dcx (新生ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、MagとMbp (オリゴデンドロサイト)、NesとSox2 (神経幹細胞) の各遺伝子を抽出し、その発現が確認された (図1)。次年度、モデル揮発性物質による吸入曝露試験において取得したサンプルについて、抽出した候補遺伝子を中心に、関連する分子に着目した遺伝子発現変動解析およびその比較を行う予定である。

D. 結論

今回の検討により、DNTに関与すると考えられる中枢神経系の各細胞の分化マーカーとして利用可能な遺伝子について、その発現を成熟期の対照群において安定して検出できることを確認できた。今後、生後発達期DNTの分子機序解明に向け、吸入曝露実験および情動認知行動解析で行われた結果に基づき、上記分化マーカーとそれに関連するシグナルネットワークへの影響を検討する。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

Jing Pu, Satoshi Kofuji, Yoshimi Okamoto-Uchida, Keiko Danzaki, Ruoxing Yu, Akira Suzuki, Satoshi Kitajima, Hiroshi Nishina: Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation. *Stem Cells*, 2023; 41(12):1142-1156
[doi.org/10.1093/stmcls/sxad071]

Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Hiroaki Kitano, Ayako Yachie: DTox: A deep neural network-based in visio lens for large scale toxicogenomics data. *J Toxicol Sci*. 2024; 49(3): 105-115.
[doi.org/10.2131/jts.49.105]

Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure

in early-life. *Front. Neurosci*. 2023; 17:1239808.
[doi.org/10.3389/fnins.2023.1239808]

Hirokatsu Saito*, Kentaro Tanemura*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima (*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci*. 2023; 48(4): 203-210.
[doi.org/10.2131/jts.48.203]

Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats *Fundam. Toxicol. Sci*. 2023; 10: 69-82.
[doi.org/10.2131/fts.10.69]

Takahiro Sasaki*, Hirokatsu Saito*, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura (*co-first author): Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci*. 2023; 48(4): 211-219.
[doi.org/10.2131/jts.48.211]

五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡: 細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向, 月刊「食品衛生研究」, 2023; 通巻 885 号 (73 巻 12 号), 公益社団法人日本食品衛生協会 (東京)

齊藤洋克、北嶋 聡: 化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出, 化学物質と環境: 化学物質と環境との調和をめざす情報誌, 184, 3-6, 2024

Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci*. 2024; 11(1): 37-56.
[doi.org/10.2131/fts.11.37]

菅野純、相崎健一、北嶋 聡: 遺伝子発現を指標とした毒性評価・予測, 単行本「化学物質の複合影響と健康リスク評価」, 2024; 第2章 複合曝露に

よる毒性の評価手法 第1節, 医歯薬出版(東京)
[ISBN: 978-4-263-73220-5]

2023年9月26日

2. 学会発表(抜粋)

北嶋 聡: 生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月19日

菅野純, 相崎健一, 小野竜一, 北嶋 聡、新型反復ばく露実験による PFOA の毒性発現分析 - Clofibrate の網羅的エピジェネティック情報を参照して-, 第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月19日

Toshime Igarashi, Mari Matsumura, Izumi Ogawa, Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi, Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Recent trends in regulatory systems in other countries regarding the safety assurance of new food products including so-called cultured meat 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taiwan on 17 – 20 July 2023.

長谷川拓郎、白方渉太、高島 宏昌、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形麻樹子: LC-MS/MS を用いたウサギ血漿、精液および子宮内容物中のサリドマイドとその代謝物の同時測定法のバリデーション。第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜

高島宏昌、田中加奈子、長谷川拓郎、羽田亮、山崎浩史、北嶋 聡、桑形麻樹子: ウサギを用いたサリドマイド腔内投与による催奇形作用評価。第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜

桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋 聡: ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明。第63回日本先天異常学会学術集会(2023.7.28-30)

Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hi-roshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible ter-atogenic effects mediated by seminal plasma ex-posed to thalidomide in rabbits. EUROTOX2023. (2023.9.10-13)リュブリャナ、スロベニア

北嶋 聡: トキシコゲノミクスからみた付加体科学、第1回付加体科学部会研究会 2023、岡山、

北嶋 聡: 分子メカニズムに依拠した、迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発～食品トキシコゲノミクスを例に～、第9回 浜松毒性試験フォーラム 基調講演、浜松、2023年10月27日

北嶋 聡: 職域における環境因子による健康影響～化学物質によるヒト健康への影響評価に関する試験・研究～、第38回日本健康科学学会学術大会、東京、2023年12月2日

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

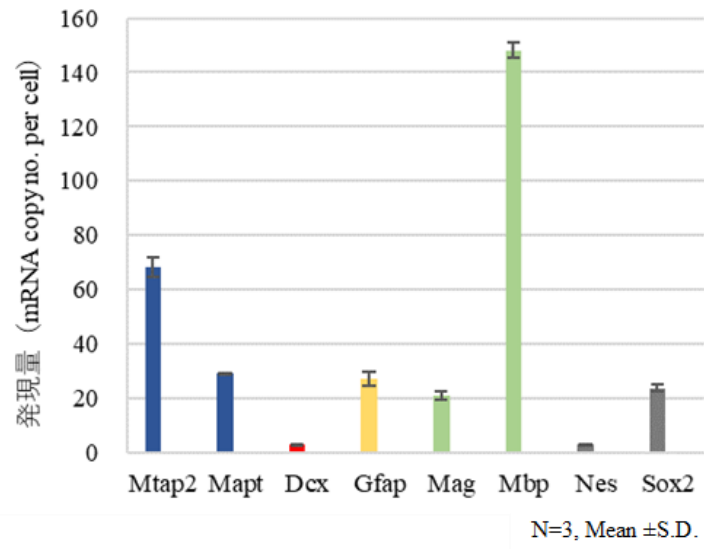


図 1. 海馬における各細胞の分化マーカーの遺伝子発現