

令和 3 年度 厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
(21KD1004)

分担研究課題名：妊娠期の甲状腺ホルモン関連指標変動による次世代影響の検討

～SynRep マウスの基礎データの収集～

研究代表者：中西 剛（岐阜薬科大学 薬学部・教授）

研究分担者；村嶋 亜紀（岩手医科大学 医学部・助教）

研究要旨

近年、ヒトでは妊娠期の甲状腺機能低下が児の脳発達に悪影響を与えることが疫学調査により明らかとなった。このような背景を踏まえ、化学物質の毒性評価を行う各関連ガイドライン試験法においても、甲状腺ホルモン関連指標の検討が追加された。しかしこれら関連指標の変動と化学物質の児動物における毒性学的意義、特に発達神経毒性（DNT）については不明な点が数多く取り残されている。化学物質曝露により誘導される妊娠期の甲状腺機能関連指標の変動をリスク評価に生かすためには、DNT評価を効果的に進めるための新たな技術を導入し、母体の甲状腺機能関連指標の変動と毒性との関係を明確にすることで、学術的基盤を堅固なものにする必要がある。本分担研究では、甲状腺機能低下によって誘導されるDNT評価を効果的に進めるために、神経細胞の分化状態を非侵襲的にトレースできることが期待されるSyn-RepマウスのDNT研究における有用性を確認するための基礎データの収集を行った。成熟期の雌雄において大脳皮質等の脳高次機能を担う部位において高いレポーター遺伝子（Luc2）の発現が認められた。脳以外の組織については、雄の精巣において高いLuc2活性が認められたが、その他の臓器ではほとんど検出されなかった。脳におけるLuc2発現は雌雄共に出生直後にピークを迎え、日齢が進むとともに急激に低下した。また脳スライスをX-gal染色して、LacZ遺伝子の発現を確認したところ、LacZについてもLuc2と同様の発現パターンを示した。これらの結果から、Luc2およびLacZの発現パターンは、神経細胞の分化状態を反映したものである可能性を示さるとともに、Syn-Repマウスを用いた*in vivo*イメージングにより、発達期脳の神経細胞分化状態を非侵襲的にトレースできる可能性が示された。

A. 研究目的

近年の疫学調査により、ヒトでは妊娠初期における胎児脳の発達が母親から供給される甲状腺ホルモンに100%依存し、母体の甲状腺刺激ホルモン（TSH）の上昇を伴うトリヨードチロニン（T3）／チロキシン（T4）の低下と児のIQ低下との間に明確な相関がみられることが明らかとなってきている。また実験動物においても母体の甲状腺機能低下と児の行動発達の相関性に関する報告が散見される。このような背景を踏まえ、妊娠期間中に甲状腺機能低下を引き起こす化学物質のヒトに対するリスクをより厳密に評価するために、OECDガイドラインの実験動物を用いた各関連試験法において甲状腺ホルモン関連指標（TSH／T3／T4の血中濃度、

甲状腺の重量および病理組織学的評価）の検討が追加された。これは妊娠期間中に母体の甲状腺機能低下を引き起こす化合物のヒトに対するリスク、すなわち発達神経毒性（DNT）のリスクをより厳密に評価することを主たる目的としたものであると推察される。その一方で、追加された検討項目に関する毒性学的意義については不明な点が数多く取り残されている。さらに一般的な毒性評価には非常に有効とされている病理組織学的解析を用いても、脳神経系の毒性に関しては判定が極めて難しいという問題もある。我々は化学物質のDNT評価やその作用メカニズム解明を効率よく行うために、成熟神経細胞のマーカーとして神経細胞分化の最終段階であるシナプス構築ステージにおいて

発現する Syn1 に着目し、Syn1 プロモーターの下流にルシフェラーゼ (Luc2) と LacZ の融合遺伝子をレポーター遺伝子に有するトランスジェニックマウス (Syn-Rep マウス) を独自に開発した。このマウスでは、成熟神経細胞のシナプス形成への影響 (Key Event : KE) を *in vivo* イメージングにより非侵襲的にトレースできることが期待され、また同一個体で行動試験 (Adverse Outcome : AO) までを行うことができる利点を有する。すなわち同一個体で時間軸の異なる Key Event (KE) と AO を直接紐付けることが期待される。そこで本研究では、甲状腺機能低下によって誘導される DNT 評価を効果的に進めるツールとして期待される Syn-Rep マウスの DNT 評価における有用性について検証することを目的に、レポーター (Luc2 および LacZ) の発現に関する基礎データの収集を行った。

B. 研究方法

1. 動物

実験には ICR 系の妊娠マウス、ならびに雄性 Syn-Rep マウスと野生型雌性 ICR マウスを交配することで得られた妊娠マウスを用いた。動物実験の実施に関しては、岐阜薬科大学において遺伝子組換え実験および動物実験に関する承認を得て行った。また動物実験における動物保護および倫理指針を遵守し、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」(法律第 68 号・平成 18 年 6 月 1 日施行) また WHO の医学研究顧問委員会の勧告に基づく「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」に準拠して以後の実験を行った。各臓器の摘出は、イソフルランガス麻酔を用いて安楽死をさせた後に行った。

2. *in vitro* ルシフェラーゼアッセイ

各臓器のルシフェラーゼアッセイは、Syn-Rep マウスを安楽死させた後に各臓器を摘出し、300 μ L のホモジナイズ緩衝液を加え、

ホモジナイズ処理した。4°C、15000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。黒色の 96 穴プレートに 10 μ L/well となるように上清を添加し、これに D-luciferin 緩衝液を 50 μ L/well で添加後、60 秒以内に IVIS Lumina II (住商ファーマ) にて測定をした。サンプルの発光量からブランクの発光量を引き、タンパク質 1 μ g 量当たりのルシフェラーゼ活性 (photons/second/ μ g protein) を算出した。

3. 組織学的解析

脳における LacZ 活性を指標にしたレポーターの発現部位の同定は、X-gal 染色法により行った。摘出した脳を 2 mm の厚さでトリミングし、4 °C で 60 分間、前固定液中で振盪した。PBS で洗浄後 (4°C 15 分間)、30 °C で 2 日間、X-gal 染色用発色液中で振盪した。室温で 2 日間、4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) で後固定後、実体顕微鏡 (ライカ) にて観察した。

4. *in vivo* イメージング解析

発達期 (4~22 日齢、以後 P4~P22) において経時的に *in vivo* イメージングを行った。*in vivo* イメージングを行う際には、児の成長の不均一性を排除するために OECD ガイドラインに準じて、出生後に得られた児動物を P4 時に 1 匹の母体から合計 8 匹 (雌 4 匹・雄 4 匹) となるように間引きを行った。2% イソフルランガスで麻酔後、D-luciferin 溶液を 10 mL/kg 体重で腹腔内に投与した。D-luciferin 投与直後から、25 分後までの頭部の発光量を背中側から 1 分毎に連続測定した。発光量測定には IVIS Lumina II (住商ファーマ) を使用した。各日齢における発光量の変化を表したグラフには、連続測定で得られたデータのうち発光量がピークを示した時点の値を使用した。得られたデータについて Living Image (住商ファーマ) を用いて解析し、頭部の発光強度を Total flux (photon/second) として定量化した。

C. 研究結果

1. 成体 Syn-Rep マウスの各臓器における Luc2 発現の検討

Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子には、Luc2 と LacZ 遺伝子を用いているが、*in vivo* イメージングを行うには定常状態における Luc2 の発現状態が重要になってくる。そこで本項では、まず各臓器における Luc2 の発現パターンについて解析を行った。

F1 または F2 世代の雌雄仔マウスを用いて解析を行った (図 1)。9~10 週齢の各仔マウスの脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、膵臓、胃、大腸、小腸、脂肪、筋、下垂体、脊髄について Luc2 活性を測定した。また脳については、発現部位における詳細な情報を得るために視床下部、小脳、嗅球、海馬、線条体、大脳皮質前部、大脳皮質後部に分割して検討を行った。さらに雄においては精巣、精巣上体、精嚢を、雌においては子宮、卵巣についても検討を行った。その結果、雌雄ともに、大脳皮質前部、大脳皮質後部で非常に強い活性が認められた (図 1)。また線条体、海馬で大脳皮質の半分程度の活性が認められ、わずかではあるが胃と視床下部でも活性が確認された (図 1)。さらに雄においては精巣で線条体や海馬と同程度の活性が認められた (図 1B)。

2. 出生直前から離乳期脳各部位における Luc2 発現の経時変化

出生直前から離乳期にかけての Luc2 の発現状況を検討するために、E18.5 および P4、P7、P13、P22 と 11 週齢以降の各脳部位についてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、雌雄共に P4 および P7 の大脳皮質前部、大脳皮質後部で最も高い発現が認められた (図 2A-D)。またその経時的な発現変動は、E18.5 から P7 にかけて上昇し、その後急激に発現が低下するパターンを示した (図 2A, B)。それ以外の部位では、線条体、海馬においてピークで大脳皮質の 1/3~1/4 程度の活性が認められた。さらにわずかではあるが、視床下部と小脳でも活性が認められた。嗅球でも活性は認められたが、大脳皮質と比較す

るとごくわずかであった。大脳皮質以外の部位においても雌雄間に特段の差は認められず、経時的な発現変動も P4~P13 で発現のピークを迎え、その後発現が低下するパターンを示した。

3. 脳の各部位における LacZ 発現の経時変化に関する組織学的解析

Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子は、Luc2 遺伝子に加え LacZ 遺伝子をタンデムに発現するように設計されている。そこで Syn-Rep マウスの各時期の脳における LacZ の発現状態を検討し、今後の解析における有用性についての検証を行った。E11.5、E14.5、E18.5 日の胎仔と P5、P13、P15、P22 の児動物について脳スライスを作成し、X-gal 染色による解析を行った (図 3)。その結果、E11.5 においては染色が全く検出されず、E14.5 においても脊髄を中心にわずかに染色が認められる程度であった。一方で E18.5 では大脳皮質で強い染色が確認され、海馬周辺でも染色が確認された。さらに染色の強さは P5 でピークとなり、その後経日的に低下した。

4. 発達期の脳における *in vivo* イメージングの検討

次に発達期の脳を対象にした *in vivo* イメージングを行った。DNT 陽性化学物質の中にはその影響に雌雄差が存在するものが報告されているため、Syn-Rep マウスを用いた DNT 評価を行う場面を想定して、雌雄別に定常状態での評価を行った。その結果、雌雄ともに出生 4 日後 (P4) を最大値としてその後 P13 にかけて急激に減少し、P13 から P22 にかけては緩やかに減少した (図 4)。また、発達期脳の発光パターンは雌雄差が無いことも明らかとなった。発達期脳におけるこれらの発光の経時変化のパターンは、先に示した脳の各構成部位における Luc2 活性の経時変化のパターンや脳スライスを用いた X-gal 染色の結果と一致するものであった。

5. 発達期の脳における *in vivo* イメージング

と体重との相関に関する検討

発達期における児の体重の不均一性は、毒性評価に影響を与える可能性が懸念される。また脳の *in vivo* イメージングにおいても、その結果が児の体重に影響を受ける可能性が考えられる。そこで本項では発達期の体重の差が *in vivo* イメージングの結果に与える影響を検証するために、*in vivo* イメージングの結果と体重との相関性について検討を加えた。P4 から P22 までの各日齢において、横軸には体重を、縦軸には *in vivo* イメージングにより得られた脳部位の発光量を示すグラフを作成し、相関性を表す R^2 値を算出した。その結果、雌雄別・雌雄混合のいずれのグラフにおいても R^2 値は低い値を示し、全ての日齢において体重と発光は相関が無いことが明らかとなった (図 5)。以上より、*in vivo* イメージングにおける脳の発光量は、体重に依存しないパラメーターであることが確認された。

D. 考察

本研究で用いる SynRep マウスは、神経細胞の分化マーカーとして汎用されており、神経細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスでもよく用いられている Syn1 プロモーター下にレポーター遺伝子として、V5 タグ付き Luc2 と LacZ を自己融解ペプチドで連結させたものを搭載している。今年度は、Syn-Rep マウスを DNT 評価に活用する前に、レポーターの発現に関する Characterization を行った。

その結果、脳で高い Luc2 発現を有することが確認できた。ただ雄においては精巣でも発現が認められた (図 2B)。用いるプロモーター領域は我々のものとは少し異なっているが、これまでも Syn1 プロモーター制御下でクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) や Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスが作製されている。これらのマウスにおいても大脳皮質や海馬、視床下部、扁桃体などの脳組織で導入遺伝子の発現が確認されている。ま

た脳以外にも脊髄や精巣での発現が認められるラインも存在していたと報告されている。今回、Syn-Rep マウスの雄において精巣での高い発現が確認されたが、過去の報告においても精巣で発現が認められるマウスラインが存在しており、Syn1 プロモーターを用いて作製したトランスジェニックマウスに認められる普遍的な傾向と考えられる。一方で過去の報告では脊髄での発現が認められていたが、Syn-Rep マウスでは発現が確認されなかった。この結果は Syn-Rep マウスが脳特異的な影響を検出できるツールとなることを示しており、今回の研究目的を達成する上で有用である可能性を示している。

また脳についてはレポーターの発現時期についても詳細な検討を行った。その結果、Luc2 の発現は出生前から認められ、P4~P7 でピークを迎えた後に、急激に減少することが明らかとなった (図 4)。脳の部位別の検討においては、大脳皮質での発現が非常に高く、海馬、線条体、視床下部でも高い発現が認められたが、いずれの部位においても離乳期までに発現が衰退するパターンを示した。Syn1 プロモーター制御下で CAT を発現するトランスジェニックマウスにおいても、頭部の CAT 活性を指標にレポーター遺伝子の発現の経時変化について検討されている。各マウスラインによって若干発現のパターンは異なるものの、いずれのマウスラインにおいても胎生期での活性はほとんど認められないが、出生後から少しずつ活性が認められ始め、P15~P20 当たりで発現のピークを迎えている。今回の結果は、概ね過去の報告と一致した発現のパターンとなったと考えられ、SynRep マウスにおけるレポーター分子の発現制御に問題はないと考えられた。

さらに LacZ 遺伝子の有用性を検討するために、胎生期および出生後の脳スライスについて X-gal 染色を行った。その結果、Luc2 活性と同様に大脳皮質周辺に強い染色像が認められるとともに、P5 で最も強い染色が認められ、その後は発現が減衰していく染色パターンを示した (図 3)。自己融解ペプチドを

用いて遺伝子を発現させると、理論的には1対1の割合で連結した分子が発現するとされているが、今回の結果でLuc2とLacZの発現がパラレルであったことから、Syn-Repマウスは当初の期待通りに遺伝子発現が制御できていると考えられた。

発達期の脳における*in vivo*イメージングは大脳皮質をはじめとする脳の各構成部位におけるルシフェラーゼアッセイの結果を反映して、良好に検出することができた。またこれらの発光の経時変化のパターンは、ルシフェラーゼアッセイの経時変化のパターンと一致するものであったことから、発達期の脳を対象とした生体*in vivo*イメージングは、組織レベルでのレポーターアッセイの結果を反映したものであるとともに、レポーター分子をトレースすることで成熟神経細胞の形成を非侵襲的に検出できる可能性が示された。

一方で本研究課題では*in vivo*イメージング解析の対象が出生後間もない児動物であるため、体重差や個体の大きさによる個体間のデータのバラツキが懸念される。特に毒性試験においては被験物質の投与による非特異的な影響も懸念されるため、個体の大きさや体重に*in vivo*イメージングの結果が左右されてしまうと、被験物質の脳に対する特異的な影響を検出できない可能性が懸念される。しかし今回の検討において、*in vivo*イメージングの結果と児動物の体重には全く相関が認められなかった(図5)。一般的に脳部位は他の部位と比較して成長しても大きさが変化しないと言われている。また生まれて間もない時期は、体重全体に占める脳の重量比も成獣よりも大きいことから、これがデータのバラツキを少なくしている可能性が考えられた。

生後発達期の神経系におけるシナプス形成は、出生直後に過剰に行われその数はピークを迎える。その後、環境や経験に依存して必要なシナプスは強められて残り、不要なシナプスは除去されることが知られている。この現象を「シナプス刈り込み」と呼び、機能

的で無駄の少ない神経回路を作るための基本的過程であると考えられている。最近、ヒトにおいても自閉スペクトラム症や統合失調症といった精神神経疾患とシナプス刈り込みの異常との関連が注目されている。Syn-Repマウスの脳の発光においても、出生直後をピークにピークを迎え、その後日齢に依存して減弱が認められたが、この減弱は「シナプス刈り込み」を反映したものである可能性が考えられる。このレポーター遺伝子の発現パターンが生理学的に何を意味するものなのかはさらなる精査が必要であるが、Syn-Repマウスにおいては神経細胞の分化のみならず、いわゆる「シナプス刈り込み」をも評価できるのかもしれない。

E. 結論

Syn-Repマウスは、妊娠期の甲状腺機能低下時やDNT陽性対象物質の脳神経系構築への影響を非侵襲的に評価することができる、非常に有効なツールとなる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **中西 剛**：内分泌かく乱に起因する生殖発生毒性評価の問題点とその将来展望(総説), *ファルマシア* 58:44 (2022)

2. 学会発表

1. 石田慶士、南川祥輝、森 一馬、**松丸大輔**、**中西 剛**：新規発達神経毒性評価系開発に向けた神経分化トレーサーマウスの解析, 第48回日本毒性学会学術年会, 神戸/Web, 2021年7月
2. 南川祥輝、石田慶士、森 一馬、辰巳佳乃子、**松丸大輔**、**田熊一徹**、**中西 剛**：神経分化トレーサーマウスを用いた新規発達神経毒性評価系の有用性検証, フォーラム2021: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 船橋/Web, 2021年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

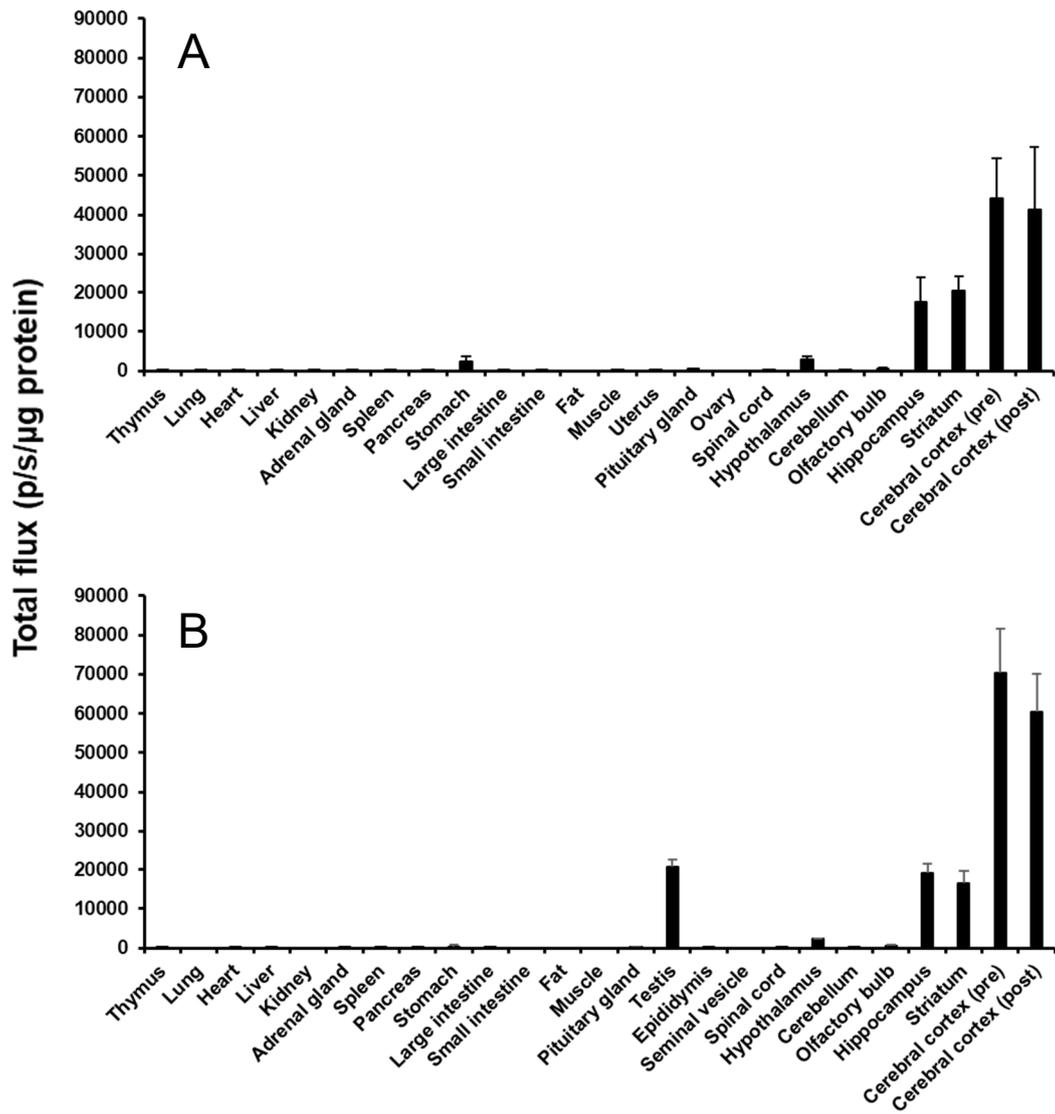


図1 Syn-Rep マウス雌 (A) および雄 (B) の各臓器における Luc2 活性
Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=3)

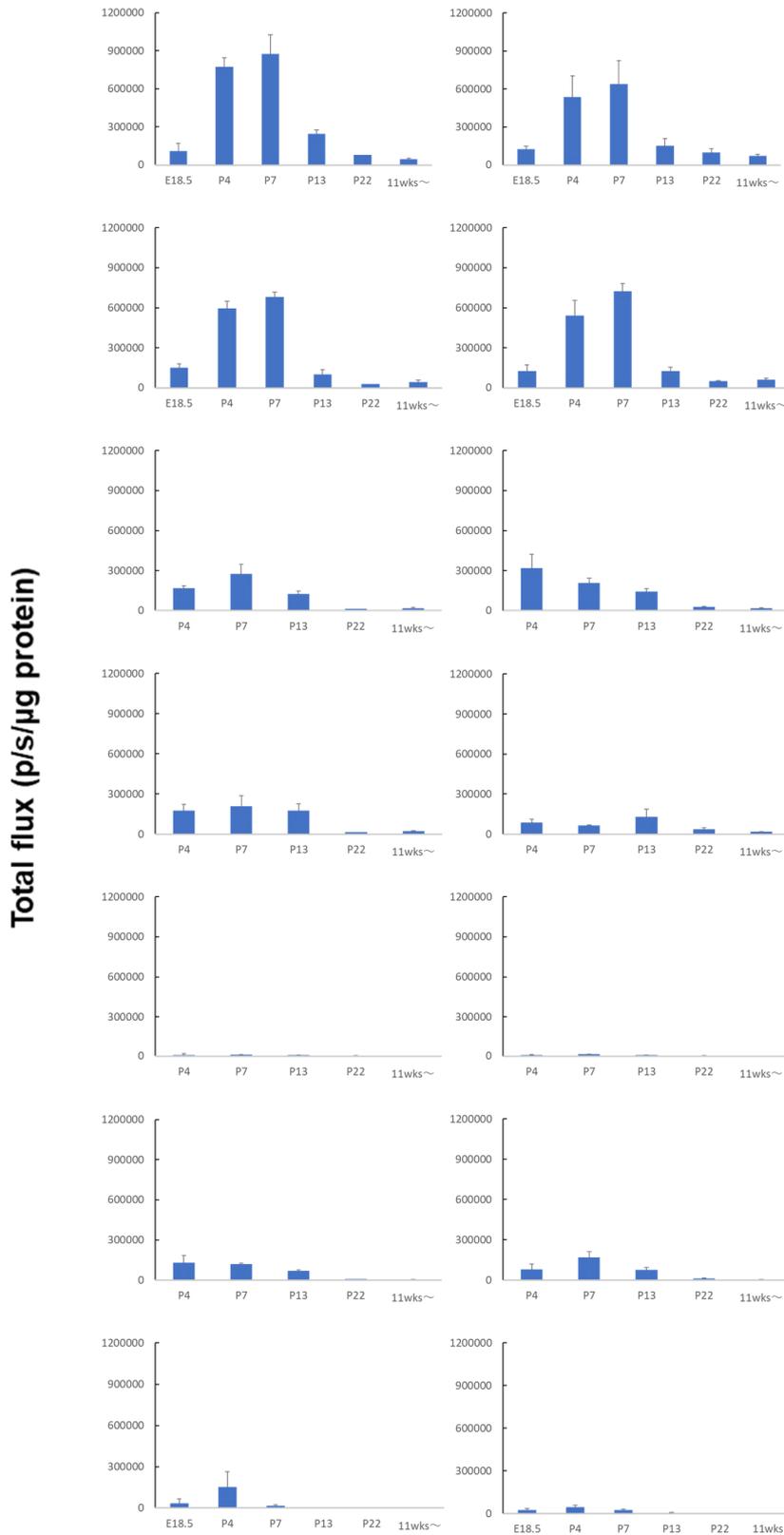


図2 Syn-Rep マウス (ライン#1) の出生直前から離乳期の脳における Luc2 活性
 雌 (A, C, E, G, I, K, M) および雄 (B, D, F, H, J, LN) の各時期における大脳皮質前部 (A, B)、大脳皮質後部 (C, D)、海馬 (E, F)、線条体 (G, H)、嗅球 (I, J)、視床下部 (K, L)、小脳 (M, N) の Luc2 活性を測定した。
 Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=3-7)

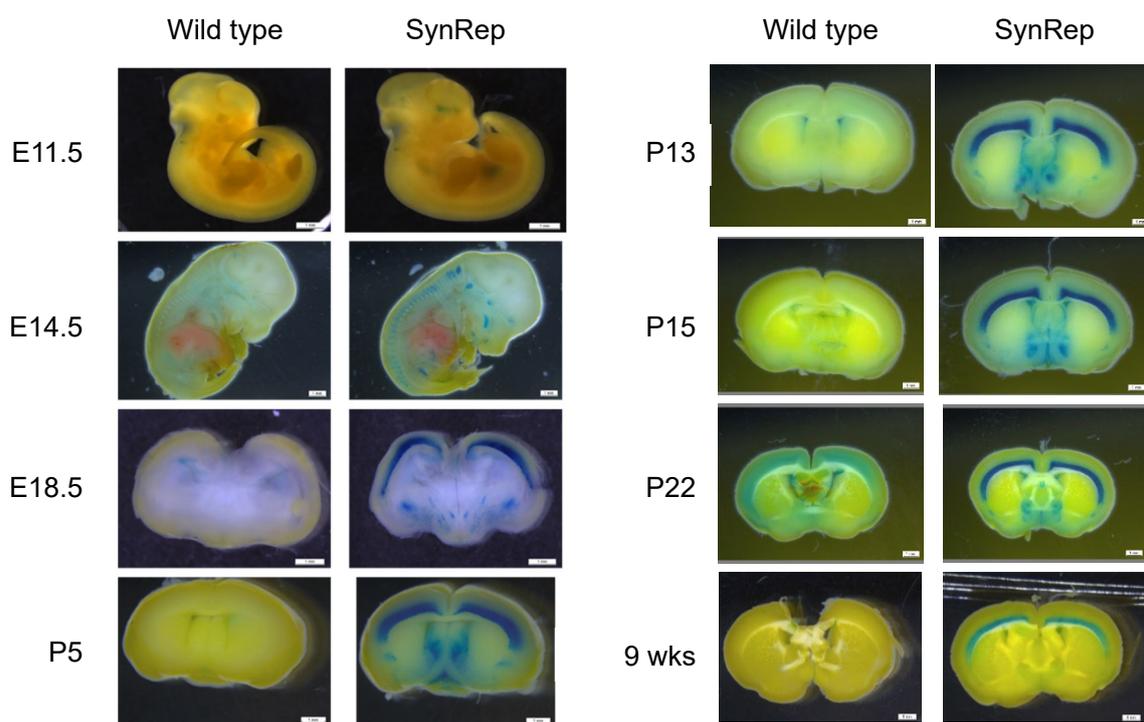


図3 X-gal染色を用いた Syn-Rep マウスの脳における LacZ 発現の経時変化に関する組織学的解析

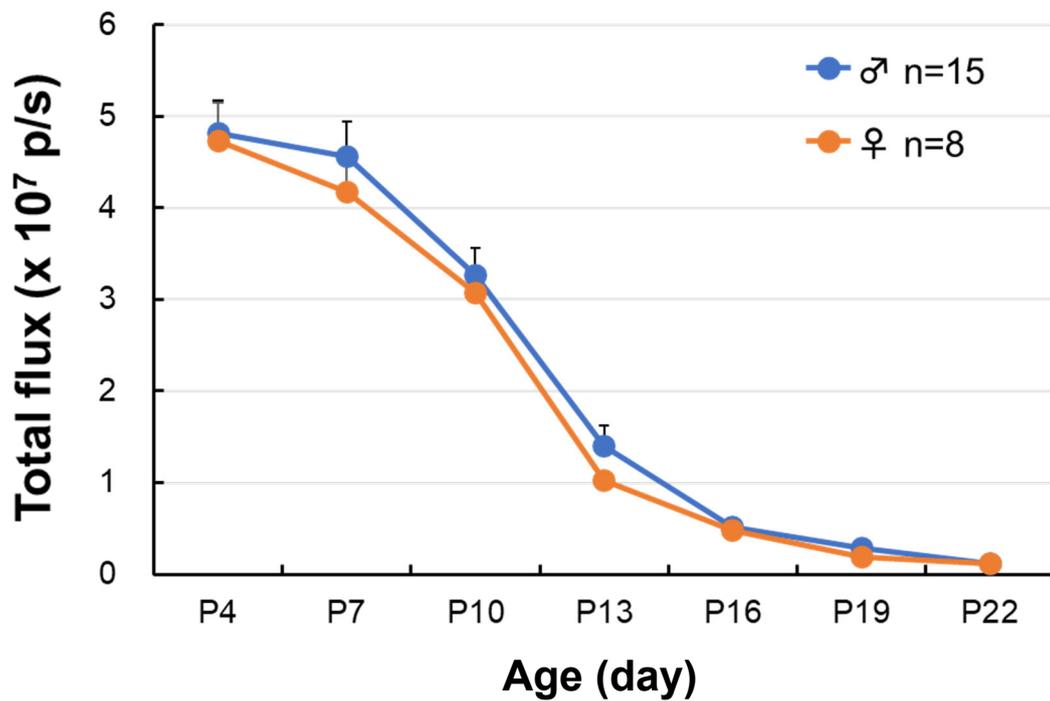
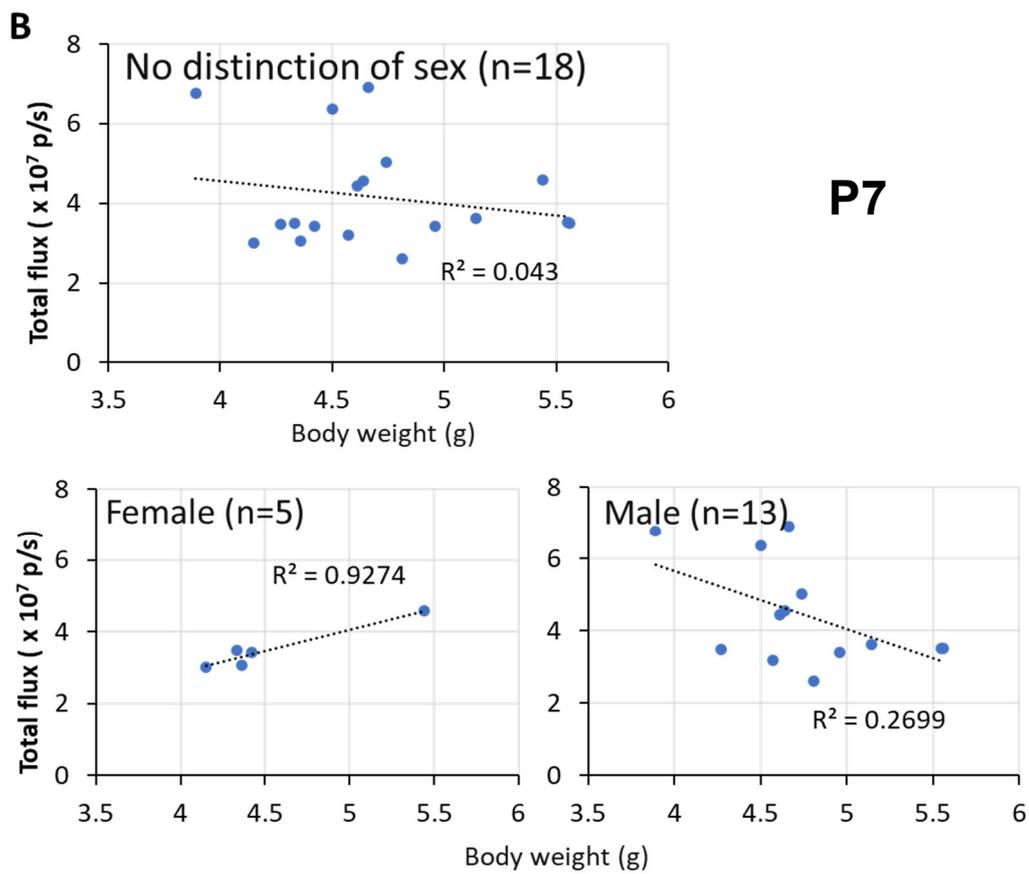
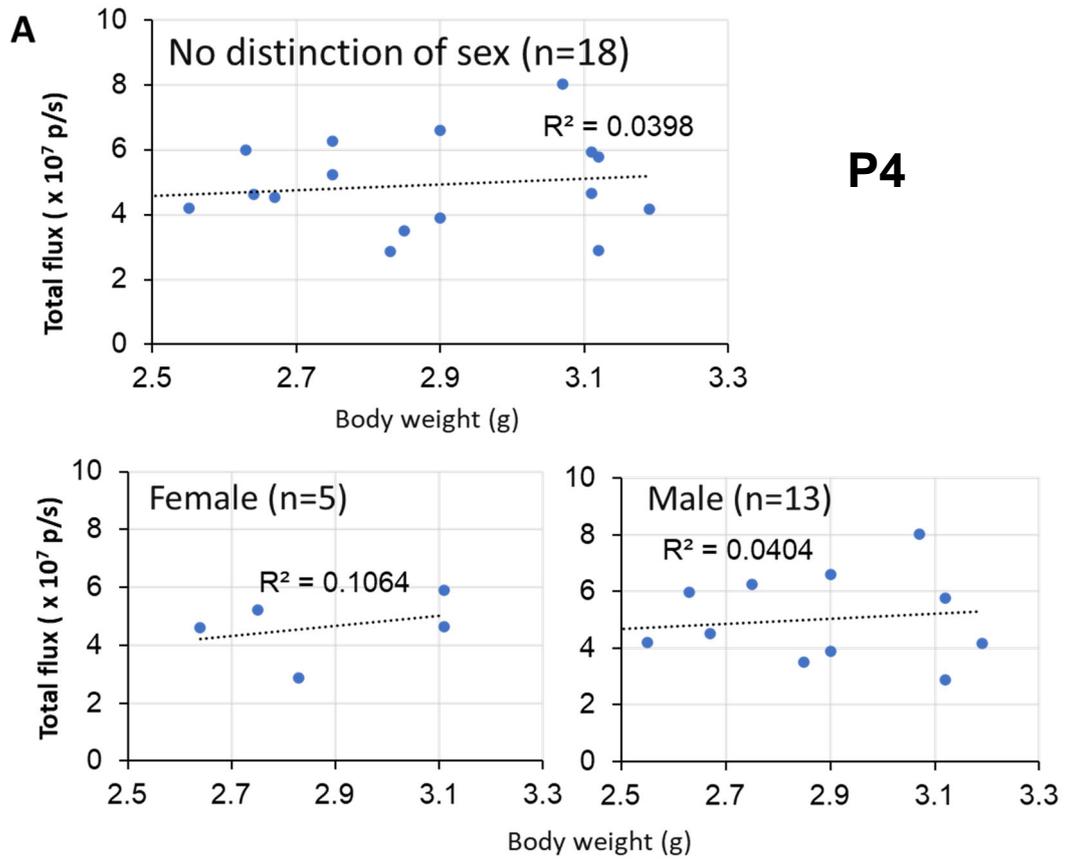


図4 雌雄 Syn-Rep マウスの発達期の頭部に対する *in vivo* イメージング解析

4 腹の母体から産まれた Syn-Rep マウスに対し、出生 4 日後 (P4) において児の数が 8 匹 (雌 4 匹/雄 4 匹) となるように間引きを行い、P4 から P22 における発達期の頭部に対する *in vivo* イメージングを行った。D-luciferin/PBS 溶液を i.p 投与直後から 1 分毎の連続測定を行い、発光量が頭打ちになるまでおよそ 25 分間測定を継続した。また得られたデータについて Living Image を用いて解析し、頭部の発光強度を Total flux として定量化した。また、連続測定で得られたデータのうち発光量がピークを示した時点の値を使用し、発達期の各日齢における発光量の変化を表した。Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=8 - 13)



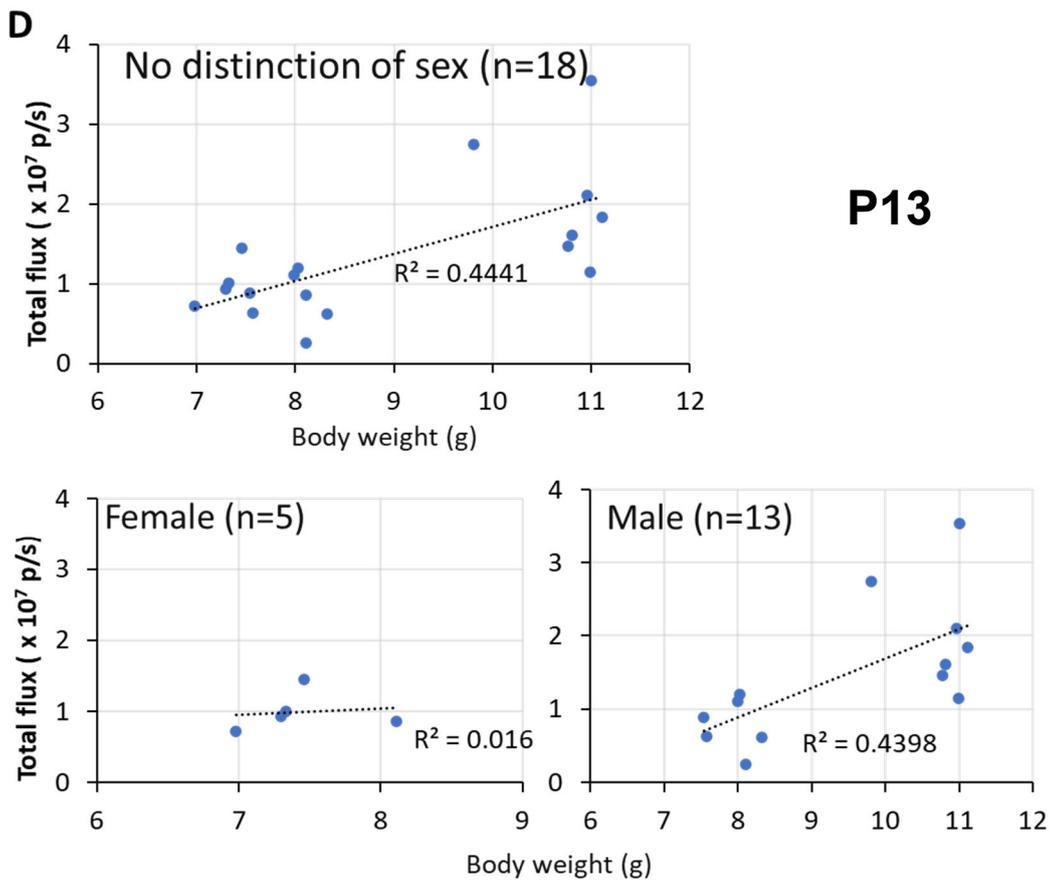
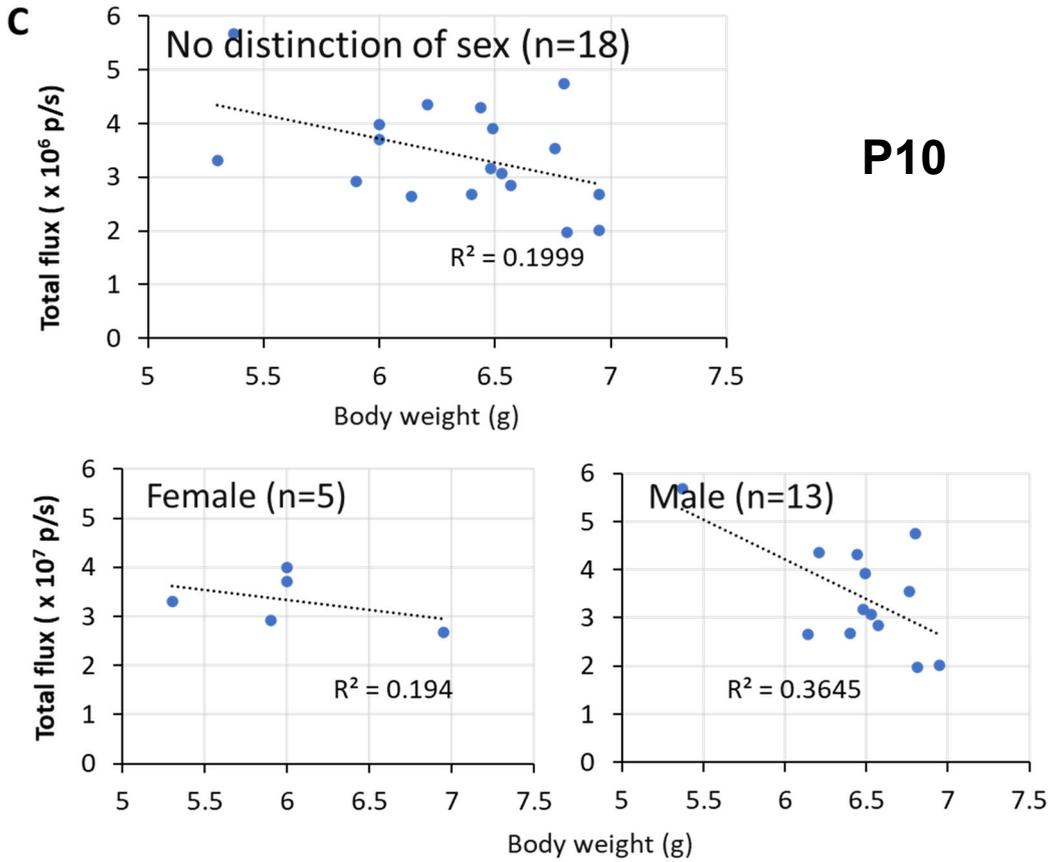


図5 続き

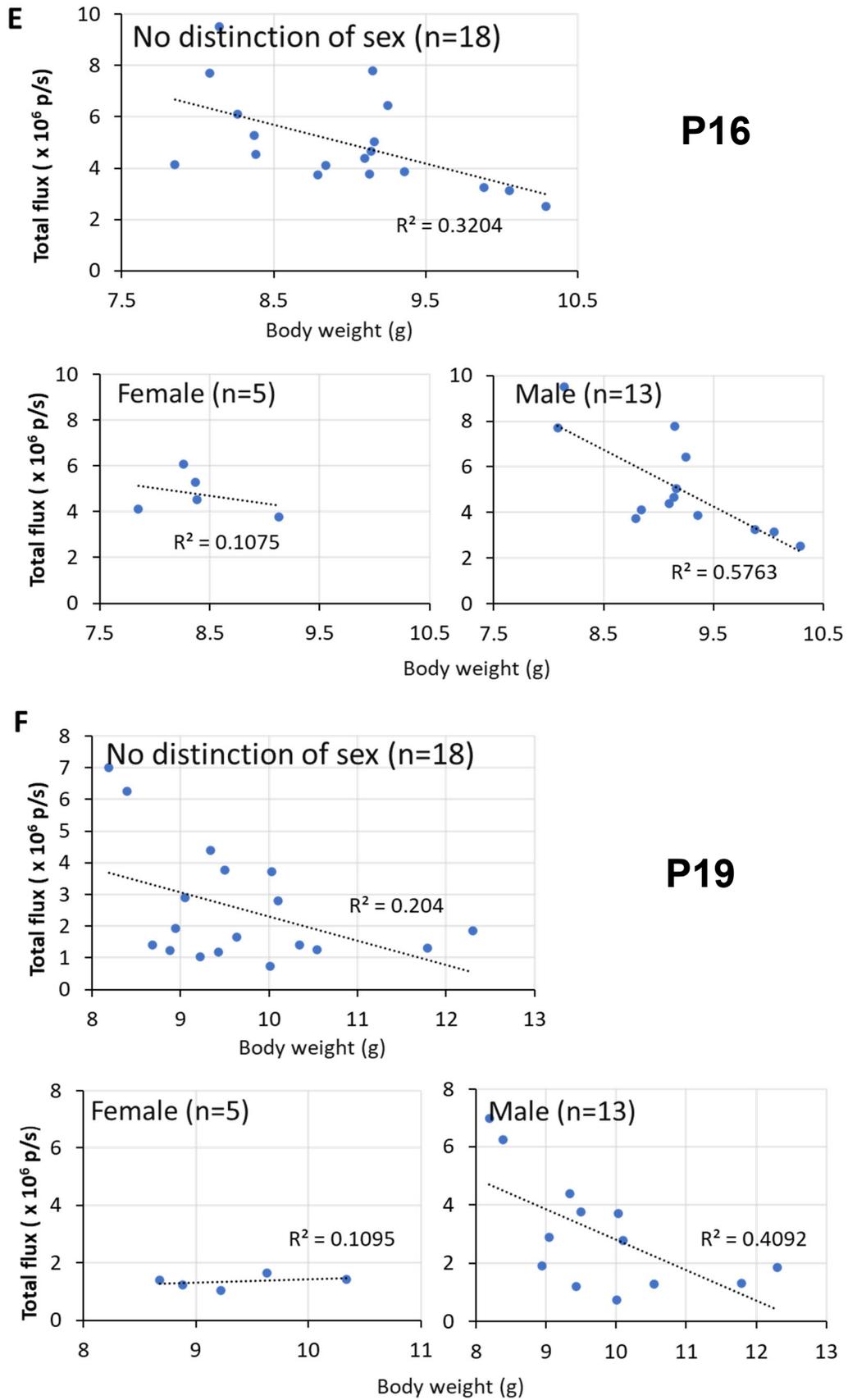


図 5 続き

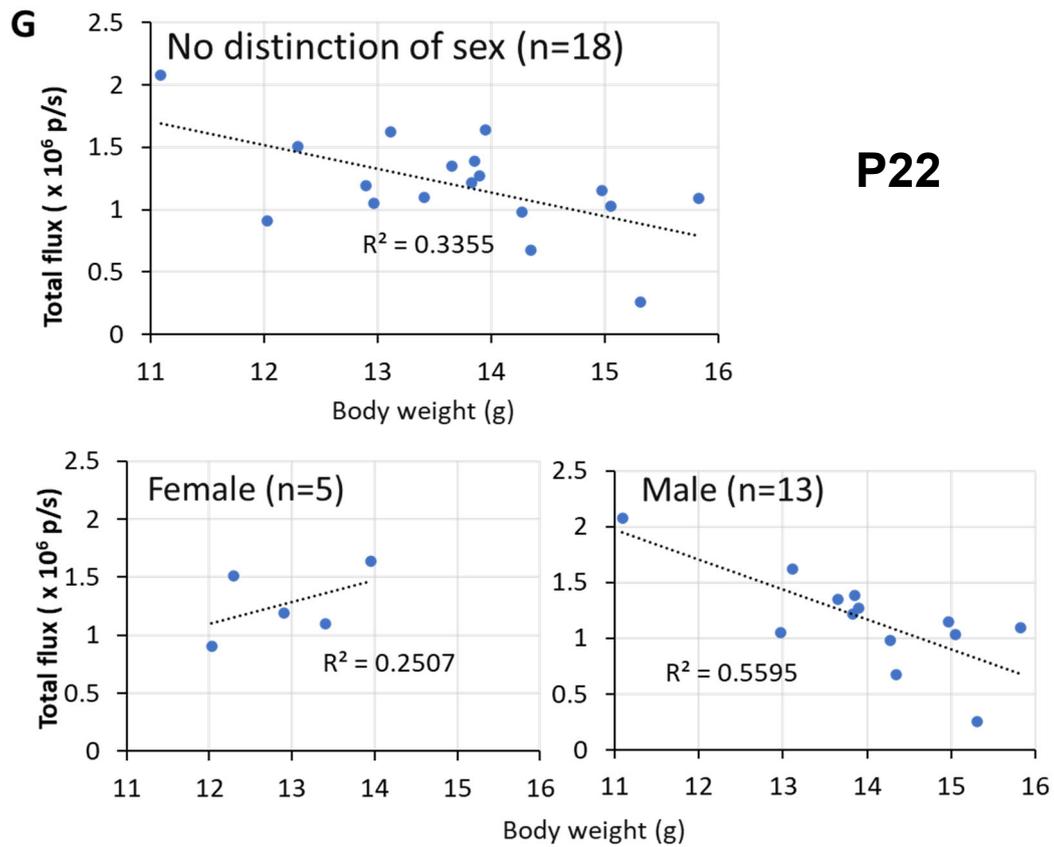


図 5 各日齢における頭部の発光と体重の相関性

Syn-Rep マウスに対し、P4 (A)、P7 (B)、P10 (C)、P13 (D)、P16 (E)、P19 (F) および P22 (G) における頭部の発光強度 (Total flux) と体重の相関性を R^2 値として算出した。Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=5 - 18)