

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)

I. 総括研究報告書

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）  
総括研究報告書

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)

研究代表者：中西 剛（岐阜薬科大学 薬学部・教授）、

### 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評価等の次世代影響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。

今年度は、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検証するとともに、Syn-Repマウスを用いて妊娠期に甲状腺機能低下を誘導した際の次世代影響について検討を試みた。また得られたデータを効果的に化学物質リスク管理に繋げるためには、甲状腺機能低下の影響を*in vitro*で評価できるアッセイ系を構築することが重要である。そこで今年度は、甲状腺機能低下モデルのヒトiPS細胞の作製を行い、DNT陽性対照物質を曝露した際の影響を検証することで、甲状腺機能低下モデル細胞として有用性を検討した。

その結果、今年度は以下のことを明かにした。

- Syn-Repマウスのレポーター分子は、脳の高次機能に関わる部位に存在する神経細胞特異的に発現していた。またその発現プロファイルは出生前から発現し始め、出生後4日～1週間でピークを迎えた後に急激に減少し、離乳期以降は低いレベルで定常状態となった。さらにこのレポーター分子の発現は*in vivo*イメージングにより定量的に検出することが可能であった。以上から、Syn-Repマウスのレポーター分子をトレースすることで、非侵襲的に神経細胞の分化状態を検証できる可能性が示された。
- DNT陽性対照物質であるバルプロ酸を用い、DNTが誘導される条件で妊娠期のSyn-Repマウスに投与したところ、児動物脳のレポーター分子の発現量が有意に低下した。またレポーター分子の発現量は成熟期脳の神経細胞数と平行であったことから、レポーター分子を*in vivo*イメージングでトレースすることで非侵襲的にDNTを評価できる可能性が示された。
- マウスにおける妊娠期甲状腺機能低下にはラットで有効性が確認されているプロピルチオウラシル（PTU）の混餌投与系が望ましい可能性が示唆された。またPTUを妊娠期のSyn-Repマウスに投与して妊娠期甲状腺機能低下を誘導したところ、児動物脳においてレポーター分子の発現上昇が認められ、ヒトで報告されている児のIQ低下を反映したものである可能性が示唆された。
- 甲状腺ホルモン受容体 $\alpha$ をノックダウンしたヒトiPS細胞は、甲状腺機能低下時における化学物質の発達神経毒性を評価できる有効なモデルとなる可能性が示唆された

以上より、Syn-RepマウスおよびヒトiPS細胞を用いた*in vitro*系を組み合わせることで、妊娠期の甲状腺機能低下時やDNT陽性対照物質の脳神経系構築への影響評価やメカニズム解明を効果的に行うことができる可能性が示された。

今後はSyn-Repマウスを用いて、妊娠期に甲状腺機能を低下させた際の、脳神経系構築への影響を解明すると共に、各種行動試験との紐付けを行うことで、妊娠母体の甲状腺関連指標の変動と脳神経ネットワークの形成不全との因果関係（Adverse Outcome Pathway：AOP）の解明を試みる。最終的には国際標準となりうるガイドライン試験のためのエンドポイントの同定に繋がりたいと考えている。また*in vivo*実験で得られた結果を基に、ヒトiPS細胞などを用いた*in vitro*試験でも用いることが可能な有効なマーカー分子を見出し、これを用いた*in vitro*評価法の構築を目指す予定である。

## 分担研究者

諫田泰成	国立医薬品食品衛生研究所・部長
田熊一敬	大阪大学 大学院歯学研究科・教授
松丸大輔	岐阜薬科大学 薬学部・講師
村嶋亜紀	岩手医科大学 医学部・助教

## A. 研究目的

ヒトでは妊娠初期における胎児の甲状腺ホルモンが母親からの供給に 100%依存していることから、妊娠期における甲状腺機能低下は、妊娠維持や出生後の児の発育に影響が及ぶ可能性が懸念されている。現在のところ、児の出生時体重の異常や周産期死亡率の頻度の上昇との因果関係については賛否が分かれているが、児の脳の発達については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 IQ 低下との間に明確な相関がみられることが大規模疫学調査から明らかとなっている。このような背景を踏まえ、妊娠期間中に母親の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、2018 年に既存の OECD ガイドライン試験において甲状腺ホルモン関連指標の検討が追加された。また甲状腺に対する何らかの影響が観察された化合物について発達神経毒性 (DNT) 試験実施の必要性を判断するために、Comparative Thyroid Assay (CTA) という新たな *in vivo* 試験法が提案され、試験実施の trigger やこれらの試験で得られるデータの解釈について、各国のリスク評価当局者による議論や意見交換が続いているのが現状である。しかし、母動物の甲状腺機能関連指標の変動と発達期における脳神経系への影響 (発達神経毒性: DNT) との詳細な因果関係が不明であることから、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。特に脳神経系の毒性に関しては、一般的な毒性評価には有効とされている病理組織学的解析での判定が極めて困難であると

いう問題がある。したがって、妊娠期の化学物質曝露により誘導される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 評価の困難性を含む諸問題をブレイクスルーできる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次世代影響との関係に関する学術的基盤を堅固なものにする必要がある。

我々は化学物質によって誘導される次世代影響の中でも最も評価が難しい項目の一つである DNT の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シナプシン 1 (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。

一方で、得られたデータを効果的に化学物質リスク管理に繋げるためには、甲状腺機能低下の影響を *in vitro* で評価できるアッセイ系を構築することが重要である。このようなアッセイ系の構築は、化学物質の影響をメカニズムベースで解析できるのみならず、3Rs の促進にもつながることが期待される。このような背景のもと、ヒト iPS 細胞はヒト発生過程を *in vitro* で模倣できることから、化学物質の神経毒性を検出できることが示唆されているため、甲状腺機能低下症に認められる化学物質影響にも応用できる可能性がある。

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を、DNT 陽性対照物質のリストから選定したバルプロ酸 (VPA) を用いて検証することと共に、このマウスを用いて妊娠中に甲状腺機能低下を誘導した際の次世代影響について検討を試みた。また甲状腺機能低下モデルのヒト iPS 細胞の作製を行い、VPA をモデル化合物として曝露した際の影響を検証することで、甲状腺機能低下モデル細胞として有用性を検討した。

## **B. 研究方法 (図表については、各分担研究報告書の該当ページのもの参照されたい。)**

### **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・大阪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**

Syn-Rep マウスを安楽死させた後に各臓器を摘出した。ホモジナイズ処理後、上清を回収した。黒色の 96 穴プレートに上清を添加し、これに D-luciferin 緩衝液を添加後、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  $\mu\text{g}$  量当たりのルシフェラーゼ活性 (photons/second/ $\mu\text{g}$  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、前固定液中で振盪した。PBS で洗浄後、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。

また脳の組織形態学的変化は、8 週齢での Nissl 染色法により解析した。被験マウスをリン酸緩衝液の全身灌流により脱血後、4% パラホルムアルデヒドで組織を固定した。全脳をパラフィン包埋し、厚さ 5  $\mu\text{m}$  の冠状切片を作製した。切片を MAS coating slide glass に貼付し、洗浄および浸漬した後、0.1% クレシルバイオレット溶液で 10 分染色した。染色切片を洗浄および脱水した後、封入し、Nissl 陽性細胞数を測定した。

### **4. in vivo イメージング解析**

発達期 (4~22 日齢、以後 P4~P22) または 4 週齢および 8 週齢において、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、東京) 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。

### **5. 抗甲状腺薬の投与**

プロピオチオウラシル (PTU: 6-プロピル-2-チオウラシル、Sigma-Aldrich #P3755) 混餌投与は、PTU を完全調整食の AIN-93M (日本クレア) に 10 ppm (w/w) となるように混餌し、妊娠 Syn-Rep マウスに E6.5 より自由摂取させることで行なった。児動物の出生後も母動物に PTU 混餌食を継続して与えた。P13~P21 の期間は児動物の摂食も始まるため、混餌食の PTU 濃度を 5 ppm (w/w) に変更した (P49、図 5A)。出生後、得られた児動物については、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、P4 において 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。

## 6. 行動薬理学的解析

児動物の行動解析は生後 8 週齢で実施した。自発行動変化は、オープンフィールド試験により評価した。透明なアクリル板と黒色プレキシガラス製の床からなるオープンフィールド装置 (45 cm × 45 cm × 30 cm, 床敷き無し) に被験マウスを入れ、この新奇環境における移動距離、立ち上がり回数、中央付近の区画を横切った回数を Acti-Track System (Panlab) を用いて 90 分間測定した。

社会性行動変化は、社会性相互作用試験により評価した。被験マウス (resident マウス) を新たな透明ポリカーボネート製ケージ (38 × 22 × 20 cm) 内で 60 分馴化させた後、異なるケージで飼育した同性同系統かつ体重が同程度の侵入マウス (intruder マウス) を入れ、被験マウスの侵入マウスに対する行動を観察した。嗅覚行動 (face sniff および anogenital sniff)、毛づくろい行動 (上体を起こし前肢あるいは鼻を侵入マウスに接触させる行動)、ならびに攻撃行動 (biting、pushing under、sideways posturing および aggressive grooming) を社会性行動の指標として、各行動の総時間を計測した。行動試験はいずれも明期 (8:00~20:00) に行った。

## 7. 細胞実験

ヒト iPS 細胞株 253G1 [Nakagawa et al., *Nat.*

*Biotechnol.*, 2008] は、TeSR-E8 培地 (Stem Cell Technologies) にてフィーダーフリー [マトリゲル (BD Biosciences) コート] の条件で培養した。外胚葉への分化は Dual smad 阻害法 [Chambers et al., *Nat. Biotechnol.*, 2009] に従い、BMP シグナル阻害剤 LDN193189 (Wako) 及び Activin シグナル阻害剤 SB431542 (Wako) を用いてヒト iPS 細胞を 4 日間培養した。ノックダウン細胞は、shRNA をレンチウイルス (SIGMA) で導入することで作製した。ヒト iPS 細胞にウイルスを moi 1 で感染させた。さらに 24 時間後にピューロマイシンを添加して感染細胞のセレクションを行った。

## 8. 統計学的解析

データは全て「平均値±標準誤差」で表し、統計学的処理には解析ソフト SPSS 15.0J for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) もしくは Prism 9 for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いた。対応のない t 検定を行い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## C. 研究結果 (図表については、各分担研究報告書の該当ページのもの参照されたい。)

### 1. Syn-Rep マウスにおける 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 (P17、図 1)。

その結果、成体マウスでは雌雄ともに、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。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、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。

### 2. 出生直前から離乳期脳の各部位における 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、胎齢 18.5 日 (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 (P18、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 (P18、図 2A, B)。さらに線条体、海馬においても大脳皮質の 1/3~1/4 程度の活性が認められた。雌雄間で Luc2 の発現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。

Luc2 と同時に発現するもう一つのレポーター分子である LacZ の発現について、脳スライスを X-gal 染色することで解析を行ったところ、Luc2 の発現パターンと同様の傾向が認められた。

### 3. 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。その結果、雌雄ともに 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 (P20、図 4)。また、発達期脳の発光パターンは定常状態では性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。

### 4. 胎生期 VPA 曝露に対する SynRep マウスのレポーター応答性の検証

SynRep マウスを用いて、E12.5 に VPA を投与した雌雄児動物の影響について解析を行った。体重増加に関して、一部の日齢で有意差な低下が認められたものの、出生後から 8 週齢までの期間全体を通して VPA 曝露による顕著な影響は認められなかった。この条件下で発達期の脳を対象にした *in vivo* イメージングを行ったところ、VPA 曝露群では対照群と比較して、P4~P13 におけるレポーター

の発現が有意に低下した (P32、図 2 A, B)。またこの傾向は雌雄ともに確認された。

また 8 週齢時の児動物の脳 (図 3 A: Bregma +1.94 mm の領域) の組織学的解析を行った。その結果、VPA 曝露群で前頭前皮質の上層 (II/III 層) における神経細胞数の有意な減少が確認された (P33、図 3 B, C)。このときの前頭前皮質の Luc2 活性についても検討したところ、対照群と比べて有意に低下していた (P33、図 3 D)。

### 5. 胎生期 VPA 曝露を受けた児動物の行動薬理学的解析

この投与条件における VPA の児動物への影響について行動薬理学的解析を行った。新奇環境下での自発運動に及ぼす VPA 曝露の影響をオープンフィールド試験により検討した (P35、図 5)。VPA 曝露群では、生後 8 週齢において、経時的な移動距離、総移動距離および立ち上がり回数が対照群と比べて有意に減少していた。また児動物の社会性行動に及ぼす影響を社会的相互作用試験により検討した (P37、図 7)。VPA 曝露群では、8 週齢において、対照群と比べて初めて遭遇した intruder マウスに対する嗅覚行動時間が有意に減少していた (P37、図 7A)。また、VPA 曝露群では毛づくろい行動 (P37、図 7B) および攻撃行動 (P37、図 7C) は有意ではないものの、増加傾向が認められた。

### 6. 抗甲状腺薬を用いた妊娠期甲状腺機能低下時における SynRep マウスのレポーター応答性の検証

抗甲状腺薬を用いて、妊娠期に甲状腺機能低下を誘導した際の SynRep マウスの応答性の検証を行った。最近、ラットを用いた検討で PTU を混餌投与することで TSH の上昇を伴う T3/T4 の低下状態を再現できることが報告された [須藤英典ら、第 48 回日本毒理学学会学術年会]。そこで本検討では、この条件下で甲状腺機能低下の誘導ができることを期待して、SynRep マウスの *in vivo* イメージング解析を行った。

膾プラグを確認した母動物に E6.5 より 10 ppm PTU 混餌投与を行なったところ、妊娠期の母動物体重増加は対照群よりも有意に高かったが、授乳期においてはそのような傾向は観察されなかった (P49、図 5B)。母動物の摂餌量に関しては、妊娠期、授乳期ともに特段の影響は認められなかった (P49、図 5C)。一方で児動物では、雌雄共に PTU 投与群で体重が有意に小さかった (P50、図 6A)。またこのような児動物の脳における *in vivo* イメージング解析では、雌雄共にレポーター遺伝子の発現が高くなる傾向が認められ、特に P4~P7 については有意な上昇が観察された (P50、図 6B)。

## 7. ヒト iPS 細胞を用いた甲状腺機能低下モデルの作製と VPA 曝露時の影響の検証

ヒト iPS 細胞を用いて、甲状腺機能低下モデル細胞の構築を試みた。未分化のヒト iPS 細胞には甲状腺ホルモン受容体 (THR)  $\alpha$  と  $\beta$  の両方のアイソフォームが発現していることを qPCR で確認した。またこの細胞を神経分化へと分化させた際の THR $\alpha$ 、 $\beta$  の発現変化を調べたところ、THR $\alpha$  のみ発現亢進が観察された

そこで次に shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて THR $\alpha$  のノックダウンを行った。qPCR を行って発現量を確認した結果、scramble control を導入した細胞に比べて THR $\alpha$  が約 93% ノックダウンされた細胞を得ることができた。

さらに THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞に VPA を曝露 (100 $\mu$ M) し、神経 (外胚葉) 分化能に対する影響を調べた。ヒト iPS 細胞の神経分化時に VPA を曝露したところ、分化マーカーである PAX6 の発現はわずかに減少した (P58、図 5, left panel)。一方、THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に VPA を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて分化マーカーである PAX6 の発現が約 64% 抑制された (P58、図 5, right panel)。したがって、THR $\alpha$  は VPA の発達神経毒性に関与している可能性が考

えられた。

以上より、甲状腺機能低下症のモデルとして THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞が有用である可能性が示唆された。

## D. 考察 (図表については、各分担研究報告書の該当ページのもの参照されたい。)

### 1. SynRep マウスの基礎データの収集について

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。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、以後 Syn1-CAT マウス) 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が、マウスにおいても脳以外にも脊髄や精巣での発現が認められていたことが報告されている。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。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 および LacZ 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 (P20、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かなり衰退するパターンを示した。Syn1-CAT マウスにおいても同じような発現のパターンであることが報告されていることから、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 SynRep マウスの発達期の脳に対する *in vivo* イメージングでは、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。

## **2. VPA を用いたレポーターマウスの有用性の検証**

得られた Syn-Rep マウスの基礎データを基に、DNT 評価における SynRep マウスの有用性を妊娠期に VPA を投与する DNT モデルで検証を行った。その結果、VPA 曝露群では P4~P13 で *in vivo* イメージングにおける発光が有意に低下したことから、VPA 曝露が脳神経系に影響を及ぼす時期は P4~P13 である可能性が Syn-Rep マウスを用いることで確認できた。また VPA 曝露群では 8 週齢の児動物の前頭前皮質において神経細胞数の有意な減少が確認されたことに加えて、Luc2 活性も有意に低下していたことから、この時期においてもレポーター分子は神経細胞の構築状態を反映した指標となりうることを確認された。

さらに今回用いた条件下での胎生期 VPA 曝露は、雌雄児動物の自発運動量の低下、雄の児動物においては ASD 様の社会性行動異

常を誘導した。また本総括研究報告書では触れていないが、雌雄児動物の不安行動の増加、学習記憶能の低下も観察されたことから、レポーター遺伝子の発現変動が行動異常を捉える指標となる可能性が示された。

Syn-Rep マウスのレポーター分子はシナプス構築タンパク質 Syn1 のプロモーターで発現制御されていることから、VPA 曝露による頭部発光の低下はシナプス構築状態の異常を反映していると考えられる。一方でヒトにおいても ASD をはじめとする神経発達症においては、発達期のシナプス構築状態が異常な経時変化パターンを示すことが知られている。このことから Syn-Rep マウスのレポーター分子の発現パターンの経時的モニタリングは、妊娠期の甲状腺機能低下による脳への影響のみならず、神経発達症の様々な候補遺伝子の影響の検証にも応用可能である可能性が考えられた。しかしその一方で化学物質による DNT や神経発達症の発症メカニズムは非常に複雑で決して単一の経路で誘導されるものではない。今後は SynRep マウスが様々な誘導メカニズムの DNT や神経発達症にも対応可能であるのかを検証して行く必要があると考えられる。このような観点から、次年度以降も、DNT 陽性対照化学物質である鉛やクロルピリホスについても検討を行っていく予定である。

## **3. 抗甲状腺薬を用いた甲状腺機能低下条件の検証**

マウスにおける抗甲状腺薬を用いた妊娠期甲状腺機能低下の誘導は、チアマゾール (MMI) を用いた飲水投与が報告されているため、当初はこの系を用いて検討を行う予定であった。しかし MMI には極度の苦味があるために、MMI 投与群では飲水量が対照群の半分程度にまで減少するという問題が起こった。このように飲水量に影響が及ぶと投与量を予測することが難しい上に、用量依存性の検討も難しくなることから、投与系の変更を行った。

最近、ラットを用いた検討で PTU を混餌

投与することで TSH の上昇を伴う T3/T4 の低下を誘導することが報告された [須藤英典ら、第 48 回日本毒性学会学術年会]。ことから、マウスにおいてもこの条件で甲状腺機能低下の誘導ができることを期待して、この系を採用した。胎生期に PTU を曝露した児動物脳の *in vivo* イメージング解析を行ったところ、雌雄共に P4~P7 で有意な発光の上昇が確認された。したがって SynRep マウスは、妊娠期の甲状腺機能低下による児動物脳への影響を検出できる可能性が示された。一方で、PTU を曝露した児動物脳の *in vivo* イメージングの発光パターンは、DNT 陽性対照物質である VPA を曝露した結果（発光減少）とは対称的な結果となった。このことは、DNT に至るメカニズムが決して単一なものではなく、多様であることを支持していると考えられる。今後は、SynRep マウスを用いることで影響を受ける部位を同定し、これらの系の相違・類似性を、遺伝子発現や組織学的手法を用いて解析・整理する必要があると考えられる。

PTU は MMI よりも抗甲状腺作用は弱いとされているものの、本検討においては混餌投与した際の摂餌量に影響が認められなかった。このことから、PTU の混餌投与系の方が今後用量依存性等を検討するのにも適していることが示唆された。また PTU 混餌投与系は、ラットにおいても妊娠期の甲状腺機能低下を再現できることが明らかになっていくことから、Syn-Rep マウスで得られた結果をラットに落とし込める可能性が期待される。さらに MMI 飲水投与系よりも投与期間が短いので、試験期間も短くて済む。これらの利点を考慮して今後は PTU 混餌投与の系を用いて、マウスにおける甲状腺関連指標の検討等を進めていくとともに、妊娠期甲状腺機能低下による次世代影響の詳細を検討する予定である。

#### 4. ヒト iPS 細胞を用いた甲状腺機能低下モデルにおける VPA 曝露の影響

今年度は、THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト

iPS 細胞を用いて、本研究班で共通の DNT 陽性対照物質として使用している VPA の影響を解析した。ATP 産生を指標とした解析では iPS 細胞、THR $\alpha$  ノックダウンした iPS 細胞において VPA に対する細胞応答には大きな違いは認められなかったが、神経分化を指標とした解析では THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞では、VPA による神経分化抑制が認められた。このことから、VPA によるヒト発達期の神経毒性に THR $\alpha$  が関与していることが示唆された。

THR には  $\alpha$  と  $\beta$  のアイソフォームが存在しており、ノックアウトマウスを用いた研究では、THR $\alpha$  は神経発生に関係するが、脳における THR $\beta$  はフェノタイプが認められていない (Krieger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2019)。また、分化誘導にともない THR $\alpha$  の発現が選択的に亢進したことから、今回は THR $\alpha$  を優先的に評価した。しかしながら、THR $\alpha$  と  $\beta$  の機能的な違いについては明らかにされておらず、甲状腺機能低下による子どもの影響を考慮する上でどちらがより重要であるのかは慎重に検討する必要がある。

今後は、鉛等の重金属やクロルピリホスを初めとする農薬など発生毒性や神経毒性が懸念されている他の化学物質に焦点を当てて同様に曝露影響の解析を行い、本モデルの有用性を明らかにしていく予定である。

#### E. 結論

1. Syn-Rep マウスは、妊娠期の甲状腺機能低下時や DNT 陽性対照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。
2. PTU の混餌投与系を用いた妊娠期甲状腺機能低下モデルは、マウスにおいても甲状腺機能低下の影響を検討する上で有効である可能性が示された。
3. THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、甲状腺機能低下時における化学物質の発達神経毒性を評価できる有効なモ

デルとなる可能性が示唆された。

以上、Syn-Rep マウスおよびヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 系を組み合わせることで、妊娠期の甲状腺機能低下時や DNT 陽性対照物質の脳神経系構築への影響評価やメカニズム解明を効果的に行うことができる可能性が示された。

## **F. 健康危険情報**

特になし

## **G. 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. 今戸瑛二、浅野智志、中村庸輝、中島一恵、森岡徳光、津賀一弘、入船正浩、**田熊一敬**、吾郷由希夫：胎生期バルプロ酸投与マウスは熱刺激およびカプサイシン誘発痛の増大と機械的アロディニアを示す，第 139 回日本薬理学会近畿部会，

Web 開催，2021 年 6 月

2. 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
3. 諫田泰成：インビトロ発達神経毒性評価法の現状と今後の課題，第 61 回日本先天異常学会学術集会シンポジウム、Web 開催、2021 年 8 月
4. 南川祥輝、石田慶士、森 一馬、辰巳佳乃子、**松丸大輔**、**田熊一敬**、**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
5. 諫田泰成、安彦行人：ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性評価法の現状と今後の展望、日本薬学会第 142 年会シンポジウム、Web 開催、2022 年 3 月

## **H. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし