

## Ⅱ. 分担研究報告書

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。

令和5年度(初年度)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。

令和6年度(今年度)は、キシレン(2, 20 ppm)を幼若期に反復吸入曝露した際に得られた脳サンプルのうち、海馬について遺伝子発現を網羅的に解析した結果、特に高濃度(20ppm)曝露群において、情動認知行動解析で検出された学習記憶異常に対応すると考えられる神経系のシグナルネットワークを抽出し、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆された。またプロモーター解析(*in silico*)を、IPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討した結果からは、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロRNAであるmir23及びmir27が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。

## 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

令和5年度(初年度)は、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、その発現を確認し、その発現量の絶対値を求めることができた。

令和6年度(今年度)は、キシレン(2, 20 ppm)を幼若期吸入曝露試験を行ったマウスについて、行動解析終了後に採取した、脳4部位の内、背景データが多く揃っており、また学習記憶の責任部位の1つである海馬の遺伝子発現解析を行った。海馬における上記の各分化マーカーの遺伝子の発現について、曝露群(低濃度および高濃度)と対照群を比較したところ、低濃度(2 ppm)曝露群においてDCX(新生ニューロン)の有意な発現増加が認められた(図1)。

次いで、対照群と比較し、2 ppm(低濃度)のキシレン曝露群において、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(対照群に対して曝露群の比率が、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。

762 ps (増加)、 20 ps (減少)

増加分762 psならびに減少分20 psについて検討した結果、IPAにおけるCanonical pathwayによる検索、並びに、発現変動が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為にIPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討したが、いずれの場合においても、現時点では、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は見いだせなかった。

次に対照群と比較し、20 ppm(高濃度)のキシレン曝露群において、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(対照群に対して曝露群の比率が、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。

83 ps (増加)、 542 ps (減少)

増加分83 psについて、IPAにおけるCanonical pathwayによる検索、並びに、Upstream Analysisを用いて検討したが、神経系の有害事象に関わる顕著な影響を示す結果は現時点では見いだせなかった。

一方、減少分542 psについて検討した結果、IPAにおけるCanonical pathwayによる検索において、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、グルタミン酸AMPA受容体シグナル伝達、カルシウムシグナルが確認され、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆された。また、発現減少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、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロRNAであるmir23及びmir27が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆されたが、関与するシグナルネットワークについて、さらに詳細な解析を実施している。

この高濃度曝露群における解析結果については、情動認知行動試験によって検出された学習記憶への影響を支持するものであると考えられた。

遺伝子発現解析の結果に関しては、低濃度(2ppm)曝露群では、中枢神経系に関わる細胞の分化マーカーである、DCX(新生ニューロン)の発現変動(増加)が認められ、機能的ではない未熟なニューロンが過剰に産生されている可能性が疑われたが、現時点では免疫組織化学においてその影響を捉えられておらず、引き続き検討が必要である。また、高濃度(20ppm)曝露群では、中枢神経系に関わる各細胞の分化マーカーに関して、有意差は認められなかったものの、免疫組織化学における解析では、新生ニューロンマーカー陽性細胞数の減少が疑われたため、パスウェイ解析によって確認された神経伝達などに関与するシグナルネットワークが、間接的に神経細胞の分化・増殖に対して影響を及ぼすことが示唆された。

これまでの解析結果により、キシレンの低濃度曝露群と高濃度曝露群では検出される影響に異なる点が多いことから、それぞれ異なるシグナル

ネットワークを介して、中枢神経系に影響を及ぼしている可能性が示唆された。引き続き、解析結果を精査するとともに、トルエンについても、キシレン同様得られた脳サンプルの遺伝子発現データの解析を行い、毒性関連性を検討する予定である。

#### D. 結論

生後発達期DNTの分子機序解明に向け、キシレン(0、2及び20 ppm)を幼若期に反復吸入曝露した際に得られた脳サンプルのうち、海馬について遺伝子発現を網羅的に解析した結果、特に高濃度(20ppm)曝露群において、情動認知行動解析で検出された学習記憶異常に対応すると考えられる神経系のシグナルネットワークを抽出し、グルタミン酸受容体を介すると考えられる神経伝達の抑制が示唆され、またプロモーター解析(in silico)を、IPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討した結果からは、遺伝子発現調節因子として、中枢神経系における髄鞘形成に関与すると考えられるマイクロRNAであるmir23及びmir27が抽出され、神経伝達や神経回路の維持への関与が示唆された。

今後、引き続き、解析結果を精査するとともに、トルエンについても、キシレン同様得られた脳サンプルの遺伝子発現データの解析を行い、毒性関連性を検討する予定である。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表 (抜粋)

Yu Takahashi, Takeshi Igawa, Chiyo Nanba, Hajime Ogino, Hideho Uchiyama, Satoshi Kitajima: Perichordal Vertebral Column Formation in Rana kobai. J Morph. 2025; 286: e70044.  
[doi.org/10.1002/jmor.70044]

北嶋 聡: オミクスとインフォマティクスとの融合による迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発に向けて、国立医薬品食品衛生研究所報告 2024; 142 12-30.

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima: Application of the matrix profile algorithm

for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(6): 289-296.  
[doi.org/10.2131/fts.11.289]

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(4): 169-181.  
[doi.org/10.2131/fts.11.169]

Kiyoshi Hashimoto, Hiroshi Arakawa, Rikako Imamura, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takuya Sato, Kazuhide Makiyama, Takehiko Ogawa, Satoshi Yokota: A novel alternative method for long-term evaluation of male reproductive toxicity and its recovery using a pre-pubertal mouse testis organ culture system. J Appl. Toxicol. 2024; 44(5): 784-793.  
[doi.org/10.1002/jat.4584]

Hidenobu Miyaso, Satoshi Yokota, Kousuke Suga, Yui Hashimoto, Céline Kouno, Kenta Nagahori, Masahiro Itoh, Satoshi Kitajima: Histological differences between the central and peripheral areas of the testes of busulfan-administered mice. J Toxicol Sci. 2024; 49(4): 139-149.  
[doi.org/10.2131/jts.49.139]

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]

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]

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]

○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

齊藤洋克：農薬等の化学物質曝露によって生じる情動認知行動毒性，Jpn J Clin Toxicol，37，70-75，2024

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]

○Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada, Satoshi Kitajima. Establishment of placental organoids and application of metabolomic analysis to reproductive toxicity studies. Toxicology Letters. Vol. 399, S2. S188, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.07.469>

## 2. 学会発表 (抜粋)

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡：ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第71回日本実験動物学会総会、京都、2024年5月29日、ポスター

北嶋 聡、高橋祐次、相崎健一、菅野 純：フグ毒テトロドトキシンを単回経口投与した際のマウス肝及び海馬 Percellome トキシコゲノミクス、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月3日、口頭

横田 理、宮宗秀伸、菅 康佑、兼子 智、若山友彦、

北嶋 聡：Reactive blue 2の雄性生殖毒性評価への適用、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月5日、口頭

小野竜一、桑形麻樹子、成瀬美衣、渡邊章仁、鷹野正生、長谷川拓郎、高島宏昌、吉岡祐亮、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡：バルプロ酸(VPA)の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月5日、口頭

齊藤洋克、横田 理、北嶋 聡：セルトリ細胞におけるビメンチンの免疫組織化学的变化と精子形成不全との関連、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月3日、ポスター

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡：細胞培養食品の開発や規制に関する最近の国際動向、第51回日本毒性学会学術年会、2024年7月4日、ポスター

堀 正敏、三原大輝、後藤もも、徳永弥月、茶園貴志、黒澤珠希、北嶋 聡：細胞培養食品バイオハザード研究 2:培養細胞の遺伝子発現における老齢個体の影響と 継代による生体内有害物質合成/分解系の遺伝子変動、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、ポスター

高橋祐次、相崎健一、森田紘一、菅 康佑、辻 昌貴、北嶋 聡：心電図の異常検出法としてのマトリックスプロファイルアルゴリズムの応用、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、ポスター

横田 理、前野 愛、北條 幹、辻 昌貴、森田 紘一、菅 康佑、相田麻子、広瀬 明彦、菅野 純、高橋 祐次、北嶋 聡：多層カーボンナノチューブのマウス単回吸入曝露による肺負荷量の経時的変化、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、ポスター

北嶋 聡：毒性学 revisited-生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展-，基調講演 6L-1「拮抗剤、分析と中毒」，第46回日本中毒学会総会・学術集会，(2024.7.24.)、神戸

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡：細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向-一家畜・家禽以外の動物種を含めて-、日本動物学会第95回長崎大会、長崎、2024年9月14日、口頭

北嶋 聡: いわゆる培養肉の開発動向とその食品安全に関する諸外国の規制動向、日本食品化学学会 第 40 回食品化学シンポジウム、(2024. 11. 15)、川崎

北嶋 聡: 網羅的分子毒性学からみたヒトと化学物質との共生, シンポジウム 3S02m「ヒトとヒト、異種生物、そして環境との「共生」を考える」, APPW2025(第 130 回日本解剖学会・第 102 回日本生理学会・第 98 回日本薬理学会 合同大会), 2025. 3. 19、千葉

Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke. Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Detection of EVs in Hepatotoxicity Using CD9-mEmerald Reporter Mouse, INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES ANNUAL MEETING 2024, (2024. 5. 12, Melbourne, Australia) 、口頭

Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S: Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice, Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2024) (2024. 9. 4., Montreal, Canada)

Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke. Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Detection of extracellular vesicles (EVs) in Hepatotoxicity Using CD9-EGFP Reporter Mouse, 58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024. 9. 20., Copenhagen, Denmark)

Ryuichi Ono, Mie Naruse, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection, ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024. 3. 17, Orlando、口頭

Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S: パルプロ酸 (VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA、第

5 1 回日本毒性学会学術年会 (2024. 6. 21 福岡)、口頭

#### 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

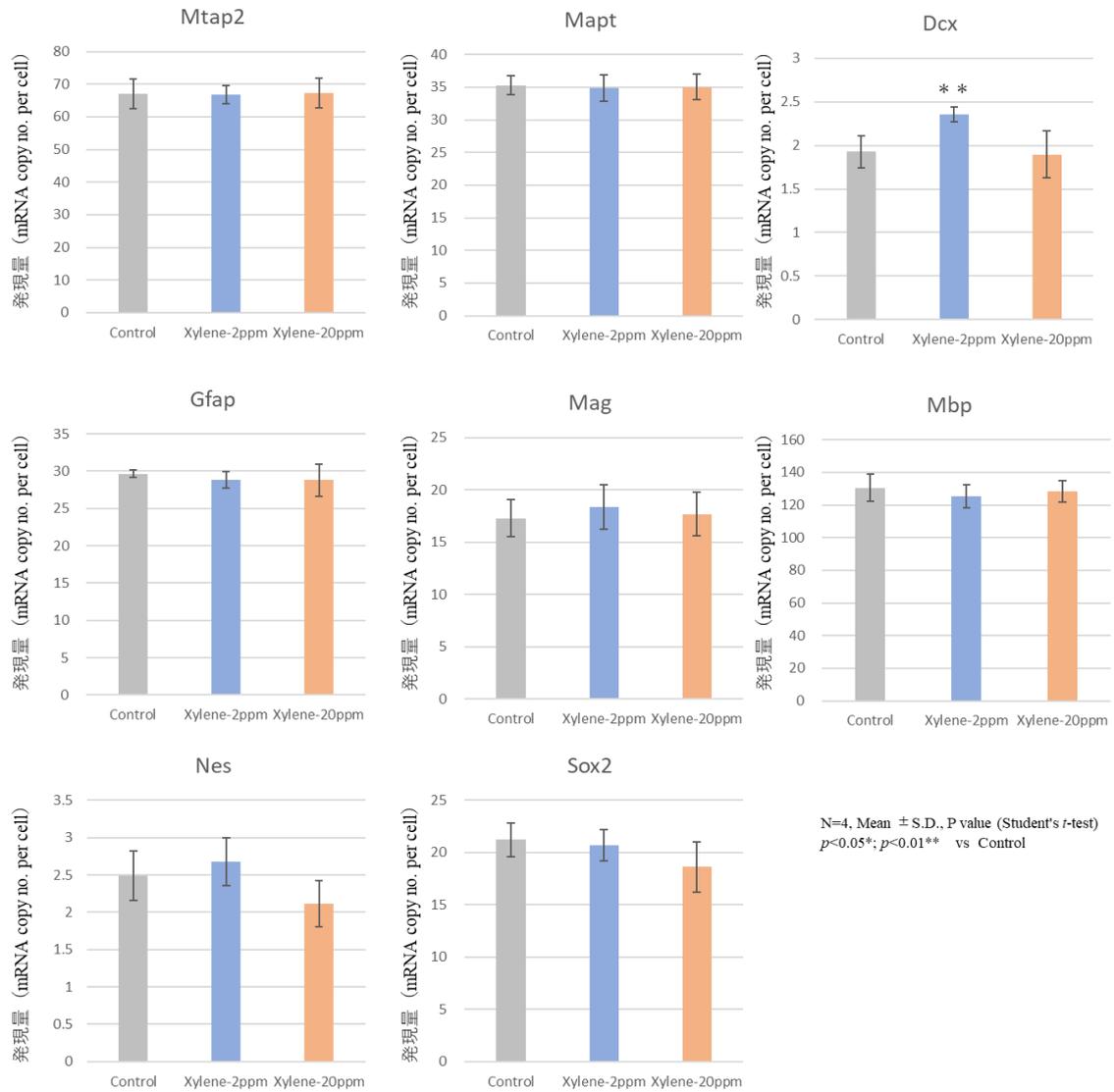


図 1. 海馬における各細胞の分化マーカーの遺伝子発現

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) の各遺伝子について、その発現量の絶対値を、各曝露群について比較した。