

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月20日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K12826

研究課題名（和文）アリール炭化水素受容体の動態を指標とした毒性メカニズムのイメージング解析

研究課題名（英文）Imaging analysis for toxicity mechanisms using aryl hydrocarbon receptor dynamics

研究代表者

木村 栄輝 (Kimura, Eiki)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・JSPS特別研究員

研究者番号：90710054

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マウス脳を用いてダイオキシンの受容体であるアリール炭化水素受容体（AhR）の発現をイメージング解析により調べ、青斑核を構成するニューロンにてAhRが発現していることを明らかにした。また、ダイオキシンの曝露を受けたマウスについて青斑核ニューロンのAhR核内移行量を解析した結果、溶媒を投与したマウスと比べて核移行量の有意な増加が認められた。さらに、AhRの活性化体を発現したニューロンでは微細形態の異常が観察された。本研究結果より、ニューロンにおけるAhR発現とダイオキシン投与による核移行量の増加、そしてAhRの過剰な活性化が神経回路構造に影響を及ぼす可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイオキシンの受容体として機能するAhRを発現している細胞集団を同定することは、ダイオキシン毒性メカニズムを解明する上で必須となるが、これまで脳におけるAhRの発現を組織学的に捉え、ダイオキシン依存的なAhRの核移行量を定量的に解析した研究はほぼ皆無であった。本研究では、マウス脳の組織切片を用いてAhRを発現しているニューロンを同定したこと、そしてイメージング解析の利点を活かしてAhRの細胞内分布パターンを定量的に調べることに成功した点に学術的意義がある。今後はダイオキシン以外の化学物質曝露影響の解明においてもイメージング解析を活用し、毒性メカニズムに迫る研究を発展させていきたい。

研究成果の概要（英文）：The aryl hydrocarbon receptor (AhR), a ligand-activated transcription factor, is essential for dioxin toxicities, such as cancer, reproductive toxicity, and neurotoxicity. In the present study, we examined expression of AhR in the mouse brain, and found neuronal expression of AhR in the locus coeruleus (LC). In addition, we revealed that the amount of AhR in the nucleus was significantly increased in LC neurons of dioxin-exposed mice compared with that in vehicle-treated mice. Furthermore, impaired micromorphology of neurons that express active form of AhR was observed in the mouse brain. Our findings show the expression of AhR in brain neurons and nuclear translocation of AhR in a dioxin-dependent manner. These results suggest that overactivation of AhR may disrupt neural circuit structure.

研究分野：神経毒性学

キーワード：イメージング解析 アリール炭化水素受容体 ニューロン 脳 ダイオキシン

### 1. 研究開始当初の背景

塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックスファミリーに属する転写因子であるアリール炭化水素受容体 (AhR) は環境化学物質であるダイオキシンをリガンドにもち、ダイオキシンと結合して活性化した AhR は細胞質から核へと移行して標的遺伝子群の発現を誘導する。胎仔期に母体を介してダイオキシンの曝露を受けたマウスでは水腎症や口蓋裂が認められるが、AhR を欠損したマウスではこれらの毒性影響が顕れないため、ダイオキシン毒性は AhR の活性化を原因として生じると考えられる。

ダイオキシンの経胎盤・経母乳曝露が認知機能や行動異常を引き起こすことが疫学研究や動物実験から明らかにされており、発達神経毒性のメカニズムを解明する上で AhR を発現している脳領域や細胞集団を同定することが必須である。ダイオキシン曝露を受けた発達期マウスの脳において AhR 標的遺伝子群の発現増加が観察されているが、AhR を発現している脳領域や細胞集団を同定し、ダイオキシン曝露による AhR の核移行を定量的に解析した報告はほぼ皆無であった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、マウス脳を用いて AhR が発現している脳領域や細胞集団を同定し、ダイオキシン曝露依存的な AhR の核移行をイメージング解析により捉え、AhR の核移行量を定量的に評価することを目的とした。加えて、活性化 AhR が細胞の分化・成熟に及ぼす影響をイメージング解析により検討した。

### 3. 研究の方法

マウス脳にて AhR を発現している脳領域ならびに細胞集団を明らかにするため、固定したマウス脳から凍結切片を作製し、AhR とドーパミン-β-モノオキシゲナーゼ (DBH) あるいはチロシンヒドロキシラーゼ (TH) に対する抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行い、スライドガラスに切片を貼り付けて封入した。ニューロン内部の AhR 分布パターンを解析するため、細胞体の細胞質領域を TH で、核領域を Hoechst で可視化した。AhR、DBH または TH、Hoechst の蛍光シグナルを共焦点顕微鏡で撮影し、取得した画像は ImageJ ソフトウェアを用いて解析した。

アストロサイトにおける AhR の発現を調べるため、生後 1 日目の新生仔マウスの脳からアストロサイトを採取して初代培養細胞を作製した。培養後、アストロサイトからタンパク質を抽出してウエスタンブロットにより AhR とアストロサイトマーカーである GFAP の発現を調べた。

AhR 発現ニューロンを三次元レベルでイメージング解析するため、AhR ならびに TH に対する抗体による蛍光免疫組織染色を行い、続けて SeeDB 法により透明化した脳組織を作製した。透明化組織内の蛍光シグナルは共焦点顕微鏡を用いて検出した。

活性化した AhR がニューロン微細形態に及ぼす影響を調べるため、リガンド非依存的に核移行できる恒常活性化型 AhR (CA-AhR) を大脳皮質あるいは嗅球のニューロンに発現させ、微細形態のイメージング解析を行った。微細形態を可視化するための蛍光タンパク質 (GFP) ならびに CA-AhR の発現ベクターを発達期マウスの側脳室に注入し、電気パルスを与えて *in vivo* 電気穿孔法によるトランスフェクションを行った。その後、脳組織切片を作製して蛍光顕微鏡または共焦点顕微鏡による微細形態の再構築を行い、樹状突起の長さやスパイン密度について解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス脳における AhR 発現細胞の同定

AhR の発現が認められる脳領域および細胞集団に AhR を明らかにするため、マウスの脳組織切片を用いて蛍光免疫組織染色を行った。発達段階である生後 7 日と 14 日の脳切片を染色し、顕微鏡下で AhR の染色シグナルが認められる細胞を探したところ、脳幹に位置する青斑核において染色シグナルが認められた。青斑核は主にノルアドレナリン作動性ニューロンから構成されているため、これらのニューロンのマーカータンパク質である DBH あるいは TH と共染色したところ、これらのマーカータンパク質を発現する細胞集団にて AhR が存在することが分かった (図 1)。

蛍光免疫組織染色した脳組織切片の観察では、グリア細胞における AhR の染色シグナルが見られなかった。そこで、アストロサイトにおける AhR の発現を確認するため、新生仔マウスを用いてアストロサイトの初代培養を作製し、ウエスタンブロットにより発現を調べたが、AhR は検出されなかった (図 2)。これらの結果より、発達期マウスの脳では AhR は主にニューロンで発現していると考えられた。

次に、三次元イメージングによる AhR 発現ニューロンの解析手法を検討するため、蛍光免疫組織染色を行った脳組織を透明化し、AhR および TH の染色シグナルについて顕微鏡観察を行った。その結果、透明化処理した脳では TH 陽性細胞は検出できたが、明瞭な AhR の染色シグナルは検出できず、透明化組織に対応した免疫染色の条件検討が別途必要であることが分かった。

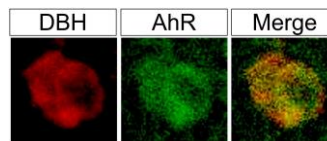


図 1. DBH 陽性細胞における AhR の発現。

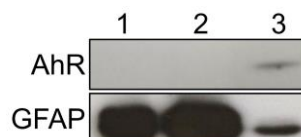


図 2. アストロサイト初代培養 (レーン 1, 2) とマウス脳 (レーン 3) における AhR と GFAP の発現。

## (2)ダイオキシン曝露による AhR 核移行の定量解析

上記(1)において、脳組織切片や初代培養細胞、透明化組織を用いた AhR のイメージング解析手法を検討した結果、脳組織切片を用いた蛍光免疫組織染色にて青斑核ニューロンの AhR 発現を明瞭に検出することができた。そこで、青斑核ニューロンを解析対象としてリガンド依存的な AhR 核移行の定量解析を行うことにした。

コーン油に溶かしたダイオキシン (TCDD) を経口投与した成獣マウスについて、投与した 24 時間後に脳を採取し、組織切片を作製して AhR ならびに TH に対する蛍光免疫組織染色を行った。AhR を発現している青斑核の TH 陽性細胞を共焦点顕微鏡により撮影し、取得した画像は ImageJ ソフトウェアを用いて解析した。TH 染色シグナルを指標に核領域と細胞質領域を含めた細胞体全体における AhR 染色シグナルの輝度値を計測し、続いて核領域のみの AhR 染色シグナルの輝度値を計測した。細胞体全体に対する核のみの輝度値の割合を算出して AhR 核移行量を表す数値とし、溶媒投与群と TCDD 投与群との間で比較した。その結果、TCDD 投与群では溶媒投与群と比べて AhR 核移行量が有意に増加しており、TCDD 依存的な AhR 核移行量を定量的に評価することができた(図 3)。また、溶媒投与群では細胞体全体に AhR が分布しているのに対し、TCDD 投与群では細胞体の中でも核近傍に AhR が集まっており、細胞体領域内でも AhR の分布パターンが変化していることも分かった。

次に、Hoechst 染色シグナルを指標として核領域内における AhR 分布パターンを比較解析した。ImageJ ソフトウェア上で共局在を解析するマクロを使用し、AhR と Hoechst の染色シグナルについて共局在を調べた所、溶媒投与群と TCDD 投与群との間で染色シグナルの共局在の程度に変化は見られなかった。これらの結果より、経口投与された TCDD が脳に到達してニューロンがもつ AhR の核移行を引き起こし、細胞体内の分布パターンにも影響を与えることが分かった。

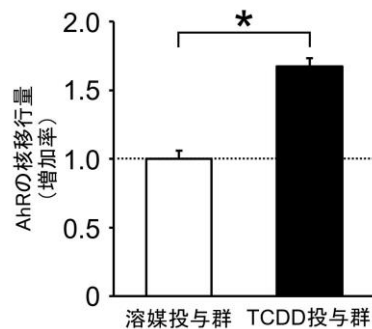


図 3. TCDD 投与による AhR 核移行量の増加. \*,  $p < 0.05$ .

## (3) AhR の活性化がニューロン微細形態に及ぼす影響

TCDD 投与マウスのニューロンでは AhR の核移行量が増加することから、ニューロンでは活性化した AhR により下流シグナル伝達経路が誘導されると考えられる。そこで、活性化 AhR がニューロン微細形態に及ぼす影響をイメージング解析により調べた。In vivo 電気穿孔法では青斑核ニューロンに対するトランスフェクションが技術的に困難であるため、トランスフェクションが簡便な大脳皮質ならびに嗅球のニューロンに GFP と CA-AhR を発現させて微細形態を解析した。

CA-AhR を発現した大脳皮質ニューロンでは、GFP のみ発現したニューロンと比べて樹状突起の分岐数と突起長の減少が認められた。野生型 AhR の過剰発現では樹状突起の形態異常が起きておらず、AhR が活性化することで突起の形態変化が引き起こされることが分かった。さらに、CA-AhR 発現ニューロンは大脳皮質内での分布パターンが深層側にシフトしており、ニューロンの移動機能への影響も示唆された。嗅球ニューロンでも、CA-AhR 発現が樹状突起の長さの減少を引き起こしていた。樹状突起から突き出したスパインの密度解析を行った結果、CA-AhR 発現ニューロンでは対照群ニューロンと比べてスパイン密度が有意に低下していた(図 4)。これらの結果より、AhR の活性化はニューロン微細形態の変化を引き起こし、神経回路の正常な形成を妨げる可能性が示された。

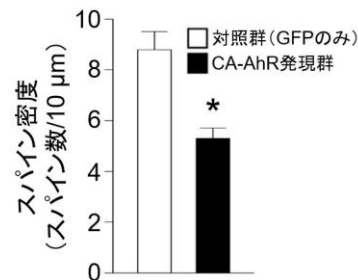
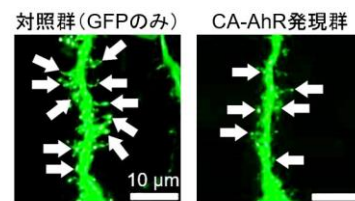


図 4. CA-AhR 発現によるスパイン密度の低下。(上) GFP と CA-Ah を共発現したニューロンの樹状突起では GFP のみ発現したニューロンと比べてスパイン(矢印)の数が減少する。(下) 樹状突起 10 μm あたりのスパイン数. \*,  $p < 0.05$ .

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. [Eiki Kimura](#), Ken-ichiro Kubo, Toshihiro Endo, Wenting Ling, Kazunori Nakajima, Masaki Kakeyama, Chiharu Tohyama (2017) 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. 査読有.

〔学会発表〕（計 5 件）

【招待講演】

1. 木村栄輝, かたちと動きから解き明かす化学物質曝露の毒性メカニズム. 行動 2017. 2017年9月. 東京.

【国際学会】

2. Eiki Kimura, Fumihiko Maekawa, Chiharu Tohyama. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the developing mouse brain. The 54<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology. September 2018. Belgium.
3. Eiki Kimura, Yunjie Ding, Chiharu Tohyama. Excessive activation of AhR signaling reduces dendritic growth in the developing mouse brain. DIOXIN 2017. August 2017. Canada.

【国内学会】

4. 木村栄輝, 前川文彦, 遠山千春. マウス脳におけるアリール炭化水素受容体の発現パターン. 第45回日本毒性学会学術年会. 2018年7月. 大阪.
5. 木村栄輝, 前川文彦, 遠山千春. 仔の鳴き声から探るダイオキシン曝露影響と毒性メカニズム. 第187回日仏生物学会例会. 2017年12月. 東京.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等  
該当無し

6. 研究組織

- (1) 研究分担者  
無し
- (2) 研究協力者  
無し

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。