

令和元年9月12日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15854

研究課題名(和文) 雄性生殖系列を介して孫世代の脳機能障害を誘発する超微小粒子胎仔期曝露のインパクト

研究課題名(英文) Effects of prenatal exposure to nanoparticles on gene expression patterns in the brain of the second generation offspring via male germ cells

研究代表者

横田 理 (Yokota, Satoshi)

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究者番号：70706605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス雌(F0)の妊娠期に銀ナノ粒子を経気道曝露すると、F1雄を介してF2雄で海馬の遺伝子発現変化が引き起こされた。この原因として、F1生殖細胞のmicroRNA発現変化を仮定し、妊娠期銀ナノ粒子曝露によるF1精巣のmicroRNA発現変化を網羅的に解析した。

その結果、曝露濃度依存的に発現変動するmicroRNAを特定することに成功した。その中のmicroRNAには、海馬での遺伝子発現制御と深く関連するものが見出され、世代影響のメカニズムの一端を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノ粒子の妊娠期曝露により生じる多世代影響に関する報告は数少なく、そのメカニズムに関する報告は皆無である。このような状況下、私たちはマウス胎仔期曝露の実験により、F1世代の脳神経および雄性生殖器に粒子が蓄積し健康影響が生じることを解明してきた。本研究は、妊娠期曝露の多世代影響に関する実験検証を行う良いモデルを構築することに成功し、曝露を直接受けていないF2の脳神経系への影響を解明、ならびに、そのメカニズムとしてのF1生殖系列のエピジェネティックな変化を捉えることができた。本研究の遂行による世代影響のバイオマーカー同定に向けた基礎的知見を付与した点に学術的・社会的意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：The F2 offspring born to F1 sires which gestationally exposed to silver nanoparticles showed subtle changes in gene expressions related to behavior and acetylcholine signals compared to controls. To explore the mechanism of how the effects of F1 male pups were transmitted to F2 generation, we investigated changes in the expressions of one of the small non-coding RNA, microRNA, in the testes of F1 mice using microarray.

We observed significantly reduction of exposed F1 sperm motility and sperm number. We also identified some microRNA expression changes of exposed mice in a dose-dependent manner. These microRNA expressions were likely to be related to genes which were differentially expressed between exposed mice and controls in the F2 hippocampus. These data enable us to further investigate microRNA expression changes involved in the transgenerational effects of paternally acquired epigenetic effects.

研究分野：分子毒性学

キーワード：ナノマテリアル DOHaD 多世代・継世代影響 妊娠期曝露 精子形成 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

妊娠期は化学物質曝露などの環境ストレスの影響を受けやすく、子どもの成長後の疾患発症増悪化に関与することが知られている。これは、現在では **Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)** 学説として広く受け入れられている。

私たちはこれまでにディーゼル排気微粒子や酸化チタンナノ粒子の胎仔期 (F0) 曝露によって、F1 雄での行動異常や病理組織学的所見、それに基づくシナプス可塑性分子の発現変化を見出している (Takeda et al, 2009, Yokota et al, 2013, 2015)。一方で、F1 雄の精子性状にも影響が生じることを観察している (Yoshida et al, 2006, Ono et al, 2007, 2008)。これらの結果は、排ガスにフィルター処理を行いナノサイズの粒子を除去すると影響が認められなくなることから、ナノ粒子の妊娠期曝露が次世代に及ぼす健康影響が懸念されると同時に、多世代・継世代影響の引き金となり得ることが考えられた。実際に、妊娠中の母親への環境ストレス曝露が多世代・継代的に継承されることが報告されている (Skinner et al, 2006, 2012)。

私たちがこれまでに行ってきた先行の実験系において、F1 雄の精子性状が悪化していることから、F1 雄親から産まれる F2 世代への影響が生じるのではないかと作業仮説を立てた。しかしながら、ナノ粒子曝露の多世代影響に関する知見はほとんどなく、本研究課題で明らかにする必要があると考えた。そこで、私たちが先行研究において集積している F1 雄の脳神経系への影響に関するデータをもとに、F2 雄での脳神経系について遺伝子発現の観点から影響が生じる重要な遺伝子がないか探索を試みると同時に、世代影響のポイントとなる F1 雄の精巣毒性を解析し、世代影響のメカニズムとなり得る候補分子を探索することとした。

2. 研究の目的

本研究では、ICR 妊娠マウス (F0) に銀ナノ粒子 (AgNP) を曝露させ、F1 雄の精子性状がこれまでの曝露と同様に悪化するの否かを検討すること、また、F1 雄親から産まれた F2 雄マウスの大脳皮質と海馬での遺伝子発現レベルでの影響を探索することを目的とした。

さらに、F2 への世代影響の媒介として F1 雄の生殖細胞でのエピジェネティックな変化を仮定し、精巣 microRNA 発現を網羅的にを行い、世代影響の key となる分子を探る。これらの解析をもとに、ナノ粒子曝露が F2 世代まで影響を及ぼすポテンシャルがあるの否かを明らかにする。

3. 研究の方法

1) 実験動物およびナノ粒子曝露

AgNP を独自の方法で調整しフィルター処理を行った後、生理食塩水で段階希釈を行い、高濃度 (High) と低濃度 (Low) の 2 段階の濃度 (公比 10) を調整した。これらの溶液は、1 ヶ月間室温に静置しても安定した状態で分散していることが明らかになった。この高分散 AgNP 懸濁液は、ICR 妊娠マウスに投与する直前に調整した。投与は、吸入曝露の系を想定し、イソフルラン吸入麻酔下にて気管内投与を行った。AgNP 高濃度、低濃度、対照には生理食塩水を投与した。出生仔 (F1 世代) を飼育し、成獣期に、肛門生殖突起間距離 (AGD)、体重ならびに雄性生殖器重量を測定し、摘出した臓器は-80°Cにて解析まで保存した。また、解剖の 1 週間前に、それぞれの群の F1 雄マウスは、別の雌マウスと交配させ、F2 世代を作出した。F1 世代の精子性状解析は解剖の日に解析を実施し、精巣は-80°Cにて解析まで保存した。F2 世代については、3 週齢 (大脳皮質と海馬摘出) で解剖を行った。摘出した大脳皮質と海馬は-80°Cにて解析まで保存した。

2) F1 世代雄性生殖の解析

解剖にて採取した精巣上体尾部より精子培養液中で精子懸濁液を調整し、37°C下で精子性状解析 (細胞死、運動率、形態) を行った。また、精巣組織を固定した後、パラフィン包埋を行い、ミクロトームにより超薄切片を作成し、PAS 染色により病理組織学解析を行った。さらに、凍結保存していた精巣サンプルは、small RNA 画分を含んだ状態で核酸抽出を行い、Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 Array により、miRNA の網羅的発現解析を行った。

3) F2 世代大脳皮質海馬の遺伝子発現解析

F2 世代は、3 週齢の雄マウス大脳皮質と海馬の核酸抽出を行い、Affymetrix GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array により、mRNA の網羅的発現解析を行った。

4. 研究成果

1) F1 世代雄性生殖に及ぼす影響

F1 世代雄マウスの解剖時の体重は、対照: 45.3±5.2 g、Low: 44.4±2.2 g、High: 44.8±2.6 g となり、曝露による変化は認められなかった。また、凝固腺重量、精巣重量、精巣上体重量においても、曝露による変化は検出されなかった。しかし、AGD においては、曝露濃度依存的に有意に小さくなることが明らかとなった (5%有意水準で対照群と差ありとした、以下同様)。つぎに、精子性状解析を行ったところ、精子の生存率と運動率の有意な低下が認められた。つぎに、Low vs. Control、High vs. Control において、各群 N=4 以上の独立した RNA サンプルを用意し、マイクロアレイによる miRNA 発現解析を実施したところ、曝露濃度依存的に有意な発現低下を認めた miRNA が 10 個抽出された。この中の miRNA で次世代個体の発生に影響を及ぼすことが報告されている miRNA は 2 つであった。

2) F2 世代雄マウス大脳皮質と海馬のトランスクリプトーム解析

Low vs. Control、High vs. Control において、各群 N=3 以上の独立したサンプルで解析を行った。海馬では、High vs. Control において、Kcnj13 や Tshz2 など 13 個の遺伝子で発現亢進、11 個の遺伝子で発現低下が認められた。また、Low vs. Control では、Kcnj13 や Calb2 など 33 個の遺伝子で発現亢進、13 個の遺伝子で発現低下が認められた。一方で、大脳皮質では、曝露による遺伝子発現変化は 2, 3 個程度認められたものの、海馬で得られた結果とは対照的に発現変動した遺伝子数は少なく、脳領域で遺伝子発現の影響に差異があることが判明した。

海馬において、曝露により変動が認められた遺伝子群より、z-score と p-value を用いて有意に抽出された Gene Ontology (GO) term は、behavioral response to nicotine, adult behavior, locomotory behavior, regulation of acetylcholine secretion, acetylcholine secretion, acetylcholine transport, calcium ion binding, acetate ester transport, plasma membrane part, cell surface, neurotransmitter binding, synaptic transmission など、行動や神経伝達物質と深く関連する term が多く抽出された。

3) 総括

最後に、in silico により精巣 miRNA 発現変化と海馬で認められた遺伝子の発現変化との間に関連性が認められ、これらの中の miRNA の一部が F2 雄の海馬における遺伝子発現に影響を及ぼした可能性が示唆された。本研究により、妊娠期ナノ粒子曝露が F1 雄性生殖系列を介して F2 雄の海馬の遺伝子発現を変動させる重要な知見を初めて得ることに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Yokota S*, Shirahata T, Yusa J, Sakurai Y, Ito H, Oshio S: Long-term dietary intake of excessive vitamin A impairs spermatogenesis in mice.

J Toxicol Sci. 44(4):257-71 (2019). <https://doi.org/10.2131/jts.44.257>

*: Corresponding author

Nomura Y, Ikuta S, Yokota S, Mita J, Oikawa M, Matsushima H, Amano A, Shimonomura K, Seya Y, Koike C: Evaluation of critical flicker-fusion frequency measurement methods using a touchscreen-based visual temporal discrimination task in the behaving mouse.

Neurosci Res. in press. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.12.001>

Yokota S*, Oshio S: A simple and robust quantitative analysis of retinol and retinyl palmitate using a liquid chromatographic isocratic method. J Food Drug Anal. 26(2):504-11 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.002>

*: Corresponding author

横田理: 妊娠期の免疫活性化により生じる神経発達障害のメカニズムに迫る、ファルマシア (トピックス) 54(9): 903 (2018)

[学会発表] (計 9 件)

Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Hirabayashi Y, Hirose A, Kanno J: Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System. Society of Toxicology

58th Annual meeting, Baltimore, The U.S.A. (March 2019), poster

横田理：父親の視点からみる DOHaD の重要性と意義：受精卵の遺伝子発現制御を司る雄性生殖細胞系列のエピゲノムに着目して、第 26 回 DOHaD 寺子屋研究会、東京、2019 年 1 月 26 日、招待講演

横田理、武田健：大気由来超微小粒子胎仔期曝露により惹起される不安様行動とそれに関連した脳神経回路の同定、第 62 回日本薬学会関東支部大会、東京、2018 年 9 月 15 日、ポスター

横田理、佐藤央、武田健：微小粒子胎仔期曝露は慢性的にセロトニン神経活性化を介して不安様行動を惹起する、第 4 回日本レギュラトリーサイエンス学会、東京、2018 年 9 月 15 日、ポスター

横田理：精子形成におけるビタミン A の役割の解明を目指して、日本アンドロロジー学会第 37 回学術大会、兵庫、2018 年 6 月 16 日、招待講演

Yokota S, Oshio S, Takeda K: Exposure to diesel exhaust particles during the course of gestation increases risk of neurocognitive impairment of male offspring, 10th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD 2017), Rotterdam, The Netherlands (October 2017), Oral

横田理、押尾茂、武田健：超微小粒子胎仔期曝露は社会的隔離により誘発される攻撃性を上昇させる、フォーラム 2017：衛生薬学・環境トキシコロジー、宮城、2017 年 9 月、口頭

横田理、押尾茂、武田健： Δ FosB タンパク質を指標とした神経活動解析と胎仔期微小粒子曝露により惹起される不安様行動との関連、第 6 回 DOHaD 研究会学術集会、東京、2017 年 8 月、ポスター

横田理、押尾茂、武田健：胎仔期ディーゼル排ガス曝露により惹起される不安様行動と縫線核 Serotonin ニューロンの慢性的活性化、第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川、2017 年 7 月、ポスター

[その他]

ホームページ等

<https://researchmap.jp/>

https://scholar.google.com/citations?user=L_W-5RkAAAAJ&hl=en

※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。