

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19510077

研究課題名（和文） 有害環境における AhR の分化制御メカニズムの解析

研究課題名（英文） The regulation mechanism of neural differentiation by AhR under hazardous environment.

研究代表者

石原 美津子（菅野美津子）(ISHIHARA-SUGANO MITSUKO)

株式会社東芝 研究開発センター 機能材料ラボラトリー 主任研究員

研究者番号：10374076

研究成果の概要：有害環境化学物質による神経発達障害を、ダイオキシン受容体であるアリルヒドロカーボン受容体（AhR）とドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素（TH）遺伝子の分子連関から解明することを主眼として、AhR/TH シグナルの活性化に対応して発光がモニターできる TH-Tg マウスと、発達初期の多能性神経幹細胞が分化するプロセスにおける AhR/TH シグナルを可視化できる TH-imNSC 細胞の構築に成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：内分泌かく乱物質、ダイオキシン、神経毒性

1. 研究開始当初の背景

現代社会の抱える化学物質による環境汚染は深刻な問題である。ダイオキシンや PCB といった環境有害化学物質は、周産期曝露によって脳神経系へ影響を与え、認知的、行動科学的障害を引き起こすことが、疫学的な調査や実験動物を用いた研究により報告されていた。しかしながら、その作用機構はまだ不明な部分が多く、安全性評価や無害化技術開発の視点からも解明が急務であった。

一方で、ダイオキシンや PCB 類の生体への作用機構という視点から見ると、アリルヒドロカーボン受容体（AhR）がその中心的な役割を担っている。AhR は、ダイオキシンや PCB など多環芳香族炭化水素類など幅広い化学

物質に対する結合性を示す核内受容体である。化学物質の結合により活性化した AhR が様々な遺伝子の転写を活性化すること（AhR-mediated pathway の活性化）がこれら化学物質の有害性の本態であることが多くの報告により示されていた。

しかしながらダイオキシン類の神経発達障害と AhR の関係を結ぶ直接的な証拠は得られていなかったことから、我々は、化学物質の神経発達障害と AhR-mediated pathway の関係に注目したのである。我々は本研究に先駆けて、マウスの神経芽細胞腫 Neuro2a に AhR を過剰発現させた細胞株 N2a-R 細胞の作製し、AhR の過剰な活性化が神経分化を誘導することを示した。さらに、未分化な N2a-R 細胞内

で活性化した AhR が、ドーパミン合成の機能分子であるチロシン水酸化酵素 (TH) 遺伝子を転写活性化することを示し、*Environmental Health: A Global Access Science Source 2006, 5:24*にて報告した。

このように、株化細胞を用いた知見から、ダイオキシンは未分化な神経細胞に対して、AhR-mediated pathway を介して直接的に神経分化を逸脱させている可能性を示してきたが、ダイオキシン類の神経発達障害への影響を立証するためには、より in vivo に近いモデル系により検証することが求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、活性化 AhR が神経発達に及ぼす影響の分子機構を解明することを目的とし、そのための in vivo モニターマウス個体、および in vitro 評価系の確立を行った。

3. 研究の方法

トランスジェニックマウスの作製

ラット TH 遺伝子上流 (-238 ~ -167bp) に存在するダイオキシン応答配列 (TH gene enhancer) の 6 回繰り返し配列とホタルルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を含むレポーターベクター (図 1) から配列 A を切り出し、トランスジーン (レポーターコンストラクト) とした。

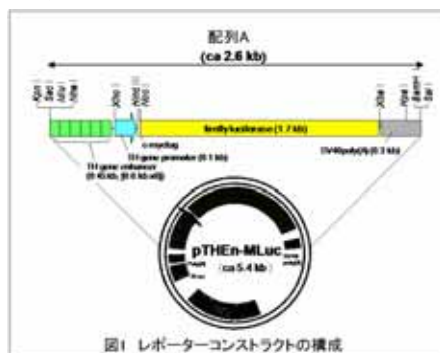


図1 レポーターコンストラクトの構成

トランスジェニックマウスの作製には、C57BL/6 近交系マウスを用いた。血清性性腺刺激ホルモン (PMSG) と胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) を腹腔内注射した 4-6 週齢の雌マウスを雄マウスと交配させ、膈栓のあった雌マウスから受精卵を採取し、CO₂インキュベーター内で培養した。培養した受精卵にトランスジーン (配列 A) をインジェクションし、24 時間培養後、偽妊娠雌マウスに移植して個体へと発生させた。得られた個体は、ジェノタイピングにより、ゲノム上のトランスジーンの有無を検証し、トランスジェニックマウス (TH-Tg マウス) の選択を行った。

TH-Tg マウスへの ナフトフラボン投与
コーンオイルに溶解した ナフトフラボン (NF) を 40 mg/kg BW となるように腹腔内投与した。対照には、コーンオイルのみを投与した。24 時間後、NF 投与 TH-Tg マウスの腹腔内に 150 mg/kg BW でルシフェリンを投与し、この 5 分後に IVIS System (In vivo Imaging system 100 series、ゼノジェン社) で TH-Tg マウス個体の発光を検出した。

神経幹細胞の分離

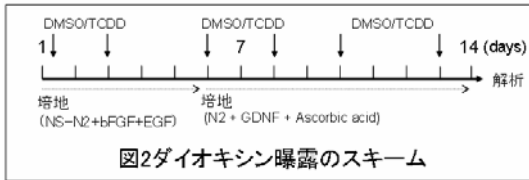
得られた TH-Tg マウスと野生型マウスを交配した後、膈栓が確認された妊娠マウスから胎児 (胎生 15 日) を取り出した。同胎児の脳から Neural Tissue Dissociation Kit (Papain) (ミルテニーバイオテク社) を用いて細胞を分離した。分離した細胞から MACS 法 (Magnetic cell sorting) により、神経幹細胞 (NSC) を分離した。磁性マイクロビーズには、NSC の特異的表面抗原: Prominin-1 を認識する抗体を固定化した抗 Prominin-1 マイクロビーズ (ミルテニーバイオテク社) を使用した。磁気分離カラム処理は 2 回行い、分離した NSC は、ケミコン社の Neural stem cell expansion medium に成長因子 (20 ng/ml FGF, 20 ng/ml EGF, 2 μg/ml Heparin) を添加した培地中、ラミニンとオルニチンをコートした培養プレートを用いて、37 °C、5% CO₂ 雰囲気下で培養した。NSC は、Nestin と SOX2 の発現をそれぞれ特異抗体 (ケミコン社製) を使用した間接蛍光抗体法により検出し、確認した。

神経幹細胞の不活化

NSC の不活化は、T 抗原遺伝子の導入により行った。NSC に感染させるレトロウイルス溶液は、パッケージング細胞の PLT 細胞 (北村俊雄博士提供) を播種して 24 時間培養後、パッケージングシグナルを持つ SV40 ウィルス Large T 抗原 (T 抗原) と、コンポーネントベクター (pE-eco/pGP) をトランスフェクションし、更に 24 時間培養を続けてから細胞の培養上清として得た。このレトロウイルス溶液を前日から培養しておいた NSC に終濃度 5% で添加することで感染させた。感染処理後、薬剤選択培地 (1 μg/ml プューロマイシンと 10 % FCS を含む DMEM 培地) で細胞を培養し、T 抗原がゲノムに安定に挿入された不活化 NSC (imNSC) を選択した。

不活化神経幹細胞へのダイオキシン曝露

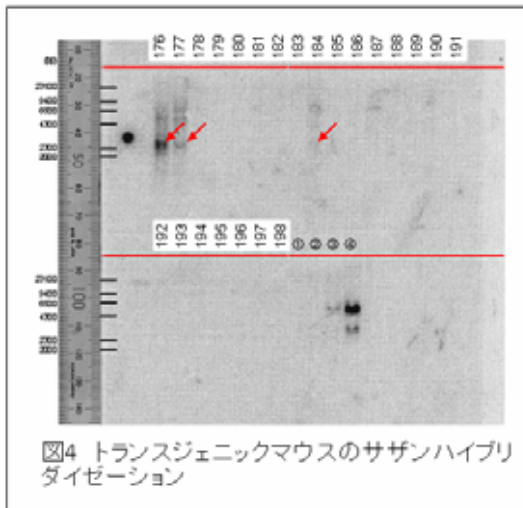
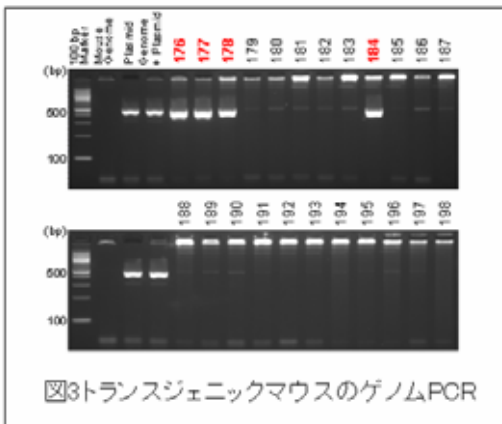
imNSC へのダイオキシン曝露は図 2 に示すスキームにより行った。TH の発現は、抗 TH 抗体 (AB152; ケミコン社) を用いた間接蛍光抗体法により検出した。



4. 研究成果

AhR/TH 活性モニターマウス(TH-Tg マウス)の作製

TH エンハンサーを含むレポーターコンストラクトを導入したトランスジェニックマウスを作製した結果、23 個体を得た。これら 23 個体からゲノムを抽出し、トランスジーン PCR とサザンハイブリダイゼーションを行った結果が図 3 と図 4 である。



個体番号 176 から 198 の個体について解析を行った結果、ゲノム PCR では、176、177、178、184 の 4 個体についてトランスジーンが検出されたが、トランスジーンをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションでは 178 の個体のシグナルが検出されず、トランスジーンの全長が挿入されていないものと思われる。また、サザンハイブリダイゼーション

の結果から、トランスジーンの挿入数が多いと推測された 176 番個体 (#176) を今後の解析に用いることとした。

*in vivo*における有害物質による AhR/TH シグナルの活性化

#176 マウスと野生型マウスを掛け合わせて得た T1 世代マウス(4 週齢)に、NF を投与し、AhR の活性化に基づく TH 転写活性化シグナル(発光)を IVIS を用いて解析した。

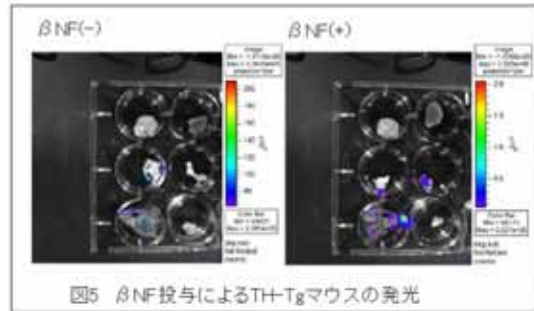
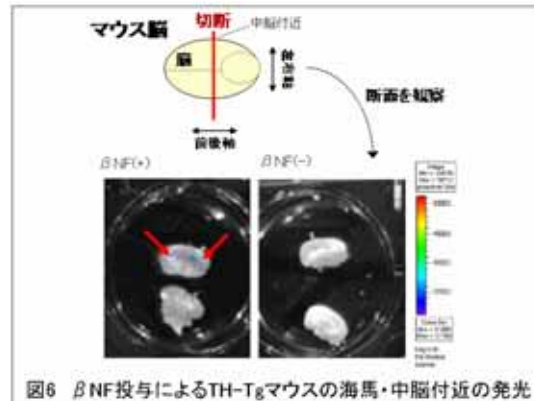


図 5 に示したように、TH-Tg マウスの頭部においては、NF 投与による発光の誘導が顕著に観察された。ことに、図 6 に示したように TH の本来の発現部位(中脳、嗅球、海馬など)では、強い発光が見られており、TH-Tg マウスは AhR/TH 活性モニターモデル動物となることが示された。



神経分化における AhR/TH シグナルモニター細胞 (TH-imNSC) の作製

TH-Tg マウス (#176) と野生型マウスを掛け合わせて得た T1 世代のマウス (E15 日胚) から神経幹細胞を単離し、T 抗原遺伝子をゲノムに挿入することで不死化神経幹細胞 (TH-imNSC) を作製した。

作製した TH-imNSC は、図 7 に示したように、NSC マーカーである Nestin や SOX2 を発現していることから未分化な神経幹細胞としての特徴を備える一方で、30 回を超える継代を経て増殖能を維持しており、多能的な分化能も有することを確認した。多能的な分化能

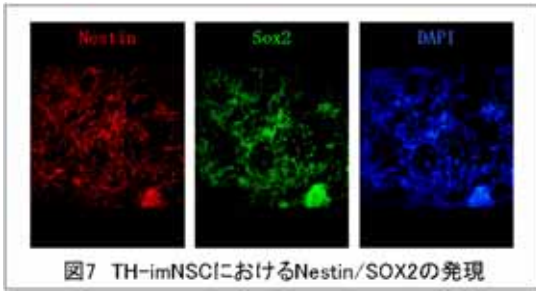


図7 TH-imNSCにおけるNestin/SOX2の発現

は、N2 medium-10ng/ml GDNF- 200 μ M ascorbic acid 条件下 (7日間)における各特異マーカーTuj-1(神経細胞)、GFAP(アストログリア)、O4(オリゴデンドログリア)の発現により確認した(図8)。このように、TH-imNSCは、初代培養細胞のNSCの性質を維持しながら、長期間の培養が可能なモデル細胞である。

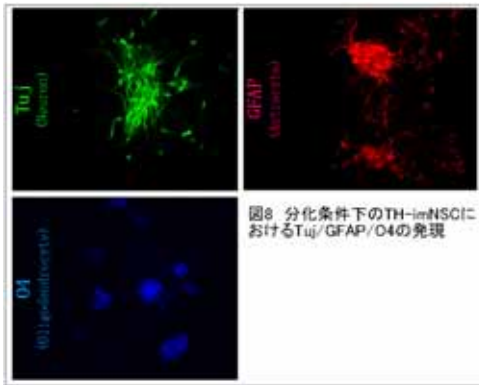


図8 分化条件下のTH-imNSCにおけるTuj/GFAP/O4の発現

ダイオキシンによる神経分化の逸脱

TH-imNSCに図2に示した条件でダイオキシンを14日間曝露した結果、図9(A)に示し

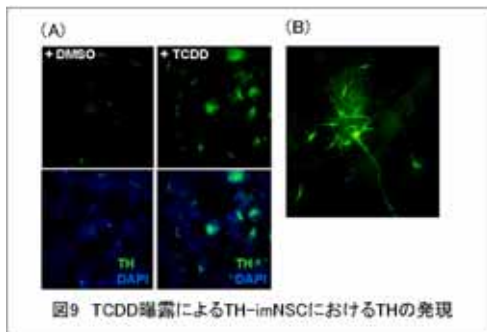


図9 TCDD曝露によるTH-imNSCにおけるTHの発現

たように、THの発現が有意に誘導された。(B)はTHを発現し、神経細胞様に分化したTH-imNSCである。TH-imNSCは通常のNSCと同様、AhR/ARNTの高発現が見られる。したがって、TH-imNSCにおいて、ダイオキシンによるTH陽性細胞への優先的な分化誘導は、発達初期の神経幹細胞が有害環境に曝されることによって、正常な神経発達に必要なAhRが活性化され、TH陽性神経細胞への分化が誘導される可能性を示すものである。さらに、その発達期のTH陽性細胞の増加とそれに基づくドーパミン量制御の逸脱が、発達障害のひとつの引き金になるものと推測された。

まとめ

本研究では、有害環境が神経発達に与える影響を解析するためのモニター系を構築した。TH-imNSCは、神経幹細胞におけるAhRシグナルを可視化できる有用性の高いモデル細胞系である。この細胞系を用いて、ダイオキシンが、神経幹細胞に作用し神経分化を逸脱させている可能性を初めて示した。これは、ダイオキシンの神経発達障害を解明する上で非常に重要な知見を提供するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Eiichi Akahoshi, Seiko Yoshimura, Saeko Uruno, and Mitsuko Ishihara-Sugano

“Effect of dioxins on regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by aryl hydrocarbon receptor: a neurotoxicology study” Environ Health. 8(1):24. (2009)査読有り

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:被験物質の有害性を評価する遺伝子改変動物

発明者:石原美津子、宍戸知行、赤星英一、川田滋久

権利者:株式会社東芝

種類・番号:特許P2008-244392

出願年月日:2008年9月24日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

石原 美津子(菅野美津子)

(ISHIHARA-SUGANO MITSUKO)

株式会社東芝・研究開発センター・機能材料
ラボラトリー・主任研究員

(2)研究分担者

宍戸 知行 (SHISHIDO TOMOYUKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科・准教授

研究者番号:80321701

星 信彦 (HOSHI NOBUHIKO)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号:10209223

(3)研究協力者

川田 滋久 (KAWATA SHIGEHISA)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科

赤星 英一 (AKAHOSHI EIICHI)

株式会社東芝・研究開発センター・機能材料
ラボラトリー・研究員