

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19407

研究課題名（和文）農薬曝露による神経シナプス形成への影響評価と病態発症機構の解明

研究課題名（英文）Effects of pesticide exposure on central synapse formation

研究代表者

和泉 宏謙（Izumi, Hironori）

富山大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：00377342

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、農薬曝露が神経シナプス形成に及ぼす影響評価を通して、神経発達障害の病態発症機構を解明することを目的とした。有機リン系農薬のグルホシネートを曝露した胎児では、その培養神経細胞のシナプス誘導量が変化することを示した。また遺伝子発現解析から、グルホシネート曝露による神経発達の遅延が示唆された。一方、Ptpd遺伝子変異導入マウスの作製・解析を通して、この遺伝子が特定のシナプス誘導に寄与することを示した。また、シナプス誘導の競合関係を遺伝的に偏らせたマウスの作製・解析から社会性行動が変化することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、これまで農薬曝露による中枢神経系への影響では明らかになっていなかった神経シナプスにおける病態を新たな知見として得られたことは学術的に大きな意義がある。本研究の応用により、農薬を含む化学物質が高次脳機能に与える影響を簡便且つ高感度に検出可能なリスク評価法の開発が期待できる。また、シナプス病態から学習・行動異常を引き起こす細胞集団の特徴付けを行うことで、神経発達障害に対する治療戦略の基盤構築に結び付くと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the pathogenic mechanism underlying neurodevelopmental disorders through evaluation of the effects of pesticide exposure on the synapse formation in central nervous system.

Our study showed changes in the amount of presynaptic differentiation in cultured neurons of fetal mice with maternal exposure to organophosphorus pesticide, glufosinate ammonium (GLA) compared to saline-control group. We also identified differentially expressed genes related to nervous system development between GLA-treated and saline-control groups by the transcriptome analysis of primary cultured cortical neurons.

On the other hand, through the production and analysis of Ptpd gene mutant mice, we found that this gene contributes to the induction of specific presynaptic differentiation. In addition, we demonstrated that changes in social behavior was induced in mutant mice in which presynaptic competitive interactions are genetically biased.

研究分野：発達神経毒性学、公衆衛生学、神経科学、実験動物学

キーワード：農薬曝露 神経シナプス形成 発達神経毒性

## 1. 研究開始当初の背景

農薬への曝露は子どもの脳に影響を与え、発達障害の一因になることが懸念されている (Roberts et al., *Pediatr Res*, 2018)。特に、日常生活の中で曝露する低濃度の農薬は、急性毒性と比較して、症状の隠蔽性が高く、子どもの中枢神経系の発達に与える影響と分子メカニズムについては未だ不明であり、その解明が急がれている。近年の研究成果により、農薬曝露によるストレス負荷で生じる神経細胞の生理的な活動や細胞内シグナル、遺伝子発現誘導などの一次的な変化、また、マウスなどの実験動物を用いた低濃度の農薬曝露実験からの最終的なアウトプットとなる学習・行動障害に関するデータが蓄積されつつある。今後の課題は、「一次的な変化を誘発された神経細胞が、どのような二次的・三次的な反応変化を経て、最終的な表現型へ結びつくのか」を明らかにすることである (図1)。その中でも特に、神経回路の基盤を成し、外的因子に対して可塑的に変化する「神経シナプス」への影響評価が求められている (Vester and Caudel, *Toxics*, 2016)。

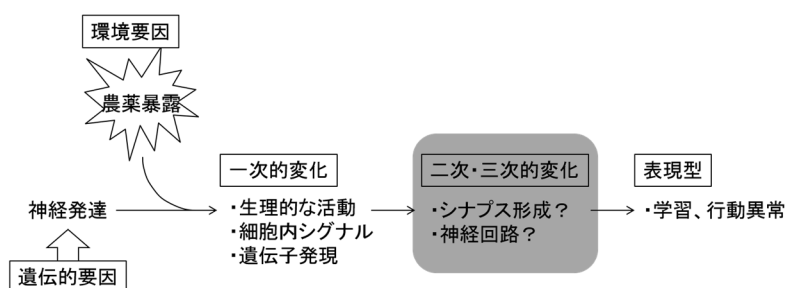


図1. 想定される農薬曝露による発達異常の病態発症機構と課題点

我々の研究室では、これまでに樹立した脳内遺伝子発現モニターマウスに改良を加えて (Izumi et al., *BMC Neurosci*, 2017)、発達期脳に対する農薬曝露の影響についての解析を進めてきた。その結果、有機リン系農薬のグルホシネートやピレスロイド系農薬のデルタメトリンを長期間曝露した場合に、発達期では成熟後と異なる感受性を示し、神経細胞間のシナプス調節を担う分子 (Arc や Bdnf など) の異常な発現変化を示すなどの所見を得てきた。これらの結果から、発達期における農薬曝露によって神経細胞が本来持つシナプス調節機能が破綻し、神経回路の形成・維持に障害が生じることが想定された。

## 2. 研究の目的

本研究では、農薬曝露による神経細胞のシナプス調節機能への影響評価として、「どのようなシナプスが、どれだけ形成・除去されるか」という点を明らかにし、神経細胞の本来持つシナプス調節機能の破綻によって個体レベルでの発達異常 (学習・行動障害) に至るとい病態発症モデルについて検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 農薬曝露による神経細胞のシナプス誘導能の解析

農薬曝露による神経シナプス形成への影響を明らかにするため、妊娠マウスへ有機リン系農薬であるグルホシネートを曝露し、胎生 18.5 日目の胎児脳 (大脳皮質) から培養神経細胞を調製して実験に用いた。シナプス後部に存在する細胞接着分子 Nlgn1 で標識したビーズを培養神経細胞と共培養し、その後、シナプス前終末マーカーである Bassoon に対する抗体で染色し、シナプス前終末が誘導されるか否かを観察した。次に、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、グルホシネート曝露を施した培養神経細胞における遺伝子発現プロファイルの変化について検討を行った。また、グルホシネート曝露後の産仔脳を固定し、抑制性ニューロンのマーカー蛋白に対する抗体で染色し、陽性細胞数を比較した。

### (2) 発達障害モデルマウスの作製と解析

マウス作製には、体外受精後の前核期胚を使用した。ノックイン用ドナーDNA を Cas9 タンパク質と sgRNA とともに、エレクトロポレーション法又はマイクロインジェクション法で受精卵内へ導入し、正常に発生した受精卵を偽妊娠マウスへ移植した。得られたマウスを交配・繁殖し、各種行動試験や組織学的解析を通して変異導入による影響評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) グルホシネート曝露によるシナプス誘導能の変化

これまでに、発達期におけるグルホシネート曝露によって神経活動が変化し、シナプス調節を担

う Arc が変動することを見出していたことから、グルホシネート曝露によるシナプス形成への影響が考えられた (Izumi et al., Neurotoxicology, 2019)。そこで、グルホシネート曝露を施した胎児脳より調製した初代培養神経細胞と Nlgn1 で標識したビーズ間でのシナプス形成量の変化の有・無について検討を行ったところ、コントロール群 (生理食塩水投与群) と比較し、グルホシネート曝露を施した神経細胞では、Nlgn1 で標識したビーズ上に集積した Bassoon が相対的に少なくなることが分かった ( $p < 0.05$ ) (図 2)。また、この減少割合には母体間での違いがあることが分かった。これらの結果は、シナプス後部に存在する別の細胞接着分子 I11rap11 で標識したビーズに対する Bassoon 集積量の変化とは異なったことから、シナプス種ごとに影響が異なることが示唆された。さらに、ピレスロイド系農薬であるデルタメトリンを曝露する条件下での結果と異なったことから、農薬の種類に依存した病態の多様性の存在が示唆された (Data not shown)。マイクロアレイを用いて経時的な遺伝子発現プロファイルと比較した結果、両群ともに神経細胞の培養期間に依存した遺伝子発現変動が生じることが分かった (図 3)。このうち、コントロール群に対してグルホシネート群での発現変動が最も大きくなった培養 10 日目 (DIV10) において、発現低下を示した遺伝子群を用いて遺伝子オントロジー解析を行った。その結果、「シナプス」を含む神経発達に関連する遺伝子がエンリッチしていることが分かった。一方、発現上昇を示した遺伝子群については、炎症や免疫活性に関連するものがエンリッチしていることが分かった。これらの結果から、妊娠マウスへのグルホシネート曝露による神経発達の遅延が強く示唆された。

以上を踏まえ、引き続き、グルホシネート曝露後の産仔脳での影響についての解析を行った結果、大脳皮質においてパルプアルブミン (Pvalb) 陽性ニューロンが減少しており、これは自閉症モデルマウスに特徴的な病理学的所見と合致する ( $p < 0.05$ ) (図 4)。さらに、産仔脳でのシナプス形成への影響評価を行うために、胎児脳内で神経細胞を蛍光標識する子宮内エレクトロポレーション法の構築を進めた。今後、グルホシネート曝露後の産仔脳におけるスパイン形成量の確認を予定している。

## (2) 発達障害モデルマウスの作製と解析

ゲノム編集を用いた発達障害モデルマウス作製を効率的に進めるために、まずエレクトロポレーション法の構築を進めた。これにより、Ptprd 遺伝子のエクソン 9 に終止コドンを変異挿入したマウスを従来法よりも短期間で作製できた。このマウス由来の培養神経細胞では、I11rap11 との間におけるシナプス形成が消失しており、この培養神経細胞に対するレスキュー実験を通して Ptprd の D2 ドメイン (Liprin- と結合サイト) がシナプス形成に必要であることが分かった (Wakita et al., Nat Commun, 2020)。同様の手法で、Ptprd 遺伝子ならびにこの分子と競合的にシナプスを誘導する分子 (ニューレキシン) について、いずれかのシナプス形成のみを障害する 2 種の変異導入マウスの作製と行動解析を通して、社会性行動が真逆 (抑制・促進) に変化することが分かった (Yoshida et al., Nat Commun, 2021)。以上の結果から、各シナプス種の割合を緻密に制御することが神経発達に重要であると考えられた。これらを受け、新たに Ptprd 遺伝子をモニターするノックインマウス系統を樹立した。今後このマウスの解析を予定している (図 5)。

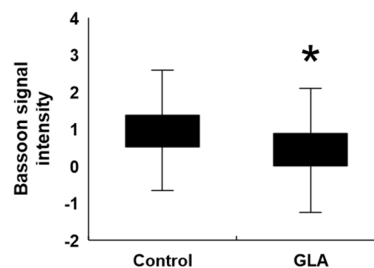


図 2 . Bassoon シグナルの比較

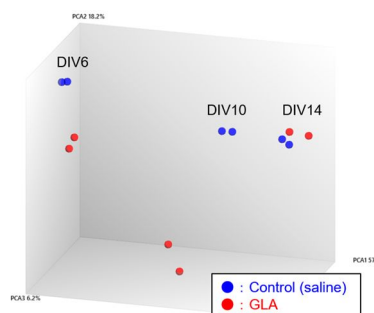


図 3 . 主成分分析を用いた遺伝子発現プロファイルの比較

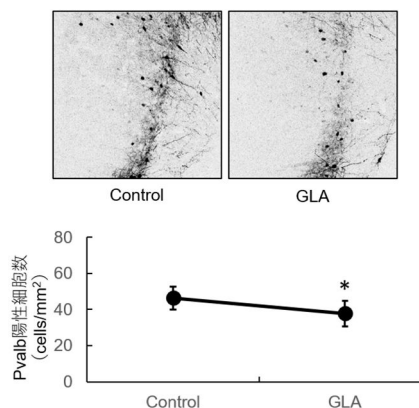


図 4 . Pvalb 陽性細胞数の比較

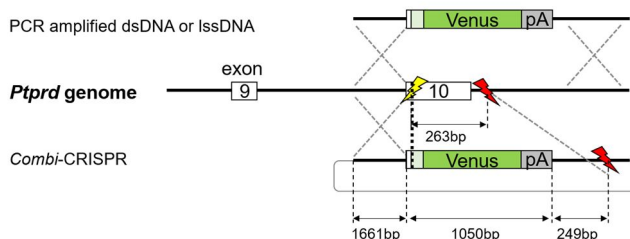


図 5 . Ptprd 遺伝子座へのノックインの模式図

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 和泉宏謙, 出村舞奈, 今井彩子, 吉田知之, 小川良平, 森寿	4. 巻 44
2. 論文標題 グルホシネートの発達神経毒性のリスク評価	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生理学技術研究会報告・生物学技術研究会報告合同技術研究会報告	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yaku Keisuke, Palikhe Sailesh, Izumi Hironori, Yoshida Tomoyuki, Hikosaka Keisuke, Hayat Faisal, Karim Mariam, Iqbal Tooba, Nitta Yasuhito, Sato Atsushi, Migaud Marie E., Ishihara Katsuhiko, Mori Hisashi, Nakagawa Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 BST1 regulates nicotinamide riboside metabolism via its glycohydrolase and base-exchange activities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27080-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Tomoyuki, Yamagata Atsushi, Imai Ayako, Kim Juhyon, Izumi Hironori, Nakashima Shogo, . . . Fukai Shuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Canonical versus non-canonical transsynaptic signaling of neuroligin 3 tunes development of sociality in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22059-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kuwano Takahide, Izumi Hironori, Aslam Muhammad Rahil, Igarashi Yoshiko, Bilal Muhammad, Nishimura Ayumi, Watanabe Yoshiyuki, Nawaz Allah, Kado Tomonobu, Ikuta Koichi, Yamamoto Seiji, Sasahara Masakiyo, Fujisaka Shiho, Yagi Kunimasa, Mori Hisashi, Tobe Kazuyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Generation and characterization of a Mefflin-CreERT2 transgenic line for lineage tracing in white adipose tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0248267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 和泉宏謙、吉田知之、森寿	4. 巻 43
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 システムを用いたノックインマウスの作製	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生理学技術研究会報告・生物学技術研究会報告合同技術研究会報告	6. 最初と最後の頁 36-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuchi Mamoru, Saito Ryohei, Maki Shojiro, Hagiwara Nami, Nakajima Yumena, Mitazaki Satoru, Izumi Hironori, Mori Hisashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Visualization of activity-regulated BDNF expression in the living mouse brain using non-invasive near-infrared bioluminescence imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00665-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wakita Maiko, Yamagata Atsushi, Shiroshima Tomoko, Izumi Hironori, Maeda Asami, Sendo Mizuki, Imai Ayako, Kubota Keiko, Goto-Ito Sakurako, Sato Yusuke, Mori Hisashi, Yoshida Tomoyuki, Fukai Shuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural insights into selective interaction between type IIa receptor protein tyrosine phosphatases and Liprin-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14516-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyao Nariaki, Hata Yukiko, Izumi Hironori, Nagaoka Ryo, Oku Yuko, Takasaki Ichiro, Ishikawa Taisuke, Takarada Shinya, Okabe Mako, Nakaoka Hideyuki, Ibuki Keijiro, Ozawa Sayaka, Yoshida Tomoyuki, Hasegawa Hideyuki, Makita Naomasa, Nishida Naoki, Mori Hisashi, Ichida Fukiko, Hirono Keiichi	4. 巻 15
2. 論文標題 TBX5 R264K acts as a modifier to develop dilated cardiomyopathy in mice independently of T-box pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0227393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0227393	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Izumi Hironori, Ishimoto Tetsuya, Yamamoto Hiroshi, Mori Hisashi	4. 巻 71
2. 論文標題 Bioluminescence imaging of Arc expression in mouse brain under acute and chronic exposure to pesticides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NeuroToxicology	6. 最初と最後の頁 52 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuro.2018.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 和泉宏謙, 出村舞奈, 今井彩子, 吉田知之, 小川良平, 森寿
2. 発表標題 グルホシネートの発達神経毒性のリスク評価
3. 学会等名 第44回生理学技術研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Izumi Hironori, Maina Demura, Ayako Imai, Tomoyuki Yoshida, Ryohei Ogawa, Hisashi Mori
2. 発表標題 Effect of the herbicide glufosinate-ammonium exposure on neural synapse formation
3. 学会等名 第4回医薬品毒性機序研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和泉宏謙, 出村舞奈, 今井彩子, 吉田知之, 小川良平, 森寿
2. 発表標題 シナプス形成を指標としたグルホシネート曝露による中枢神経系への影響評価
3. 学会等名 第55回日本実験動物技術者協会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福地守, 齊藤亮平, 齊藤亮平, 牧昌次郎, 萩原なみ, 中島夢奈, 和泉宏謙, 三反崎聖, 森寿
2. 発表標題 新規ルシフェラーゼ基質アカルミネ塩酸塩「TokeOni」を利用した生体マウス脳内における神経活動依存的なBDNF遺伝子発現誘導の可視化
3. 学会等名 第141回日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和泉宏謙
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 システムを用いたノックインマウスの作製
3. 学会等名 第43回生理学技術研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和泉宏謙, 出村舞奈, 今井彩子, 吉田知之, 小川良平, 森寿
2. 発表標題 グルホシネートばく露に伴う中枢神経系への影響評価
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------