

機関番号：32601

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20681005

研究課題名 (和文) サル類を用いた内分泌攪乱化学物質の神経発達影響評価系の確立

研究課題名 (英文) Establishment of tools for assessing the effect of endocrine-disrupting chemicals on brain development in non-human primates

研究代表者

根岸 隆之 (NEGISHI TAKAYUKI)

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：80453489

研究成果の概要 (和文)：本研究では内分泌攪乱化学物質のヒトにおけるリスク評価、特に神経発達影響のリスク評価について有用な情報を提供するためにカニクイザルを用いた神経発達影響評価系の確立を試みた。まず、カニクイザルの神経発達を分子生物学的に評価した結果、生後直後から 60 日にかけて急激に発達することを明らかにした。また、この時期に甲状腺ホルモンを欠乏させると抑制性神経伝達システムの発達が妨げられることを明らかにした。加えて影響評価に適したカニクイザル胎仔由来神経系細胞の培養法を確立した。

研究成果の概要 (英文)：This study aimed to establish effective tools for assessing the effect of endocrine-disrupting chemicals on brain development in cynomolgus monkey, because cynomolgus monkey is phylogenetically close to human. This study revealed that development of inhibitory neurotransmission system delayed by systemic reduction of thyroid hormone induced by thyroid hormone synthesis inhibitor (methimazole) injection from three to 60 days after birth, when neural development dramatically proceeded. And this study established some *in vitro* tools using neural cells derived from cynomolgus monkey for assessing the effect of endocrine-disrupting chemicals on brain development

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
平成 21 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
平成 22 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

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

1. 研究開始当初の背景

毒性学の一領域として環境中化学物質の神経発達毒性が注目されている。発達期の神経系は外来因子に対し、子宮内の血液胎盤関門、胎児の血液脳関門により堅固に守られていると考えられていた。しかしながら、環境中の化学物質の中にはこの関門が役に立た

ず子宮内の胎児が複数の化学物質に汚染しているという事実が明らかとなってきた。加えて胎児期の血液脳関門は発達しておらず、胎児の脳もこれらの化学物質に曝露している可能性が非常に高い。そのような化学物質の中に内分泌ホルモンと類似またはそのホルモンと拮抗する作用を有する化学物質、す

なわち「内分泌攪乱化学物質」がある。そもそも神経系の発達というものは発達期に非可逆的ステップを踏みながら進むものであるがゆえ、そこでの異常は成熟した後にも回復することはない。加えてそのステップの正常な進行に甲状腺ホルモンをはじめとする内分泌ホルモンが重要な役割を果たす。したがって、内分泌攪乱化学物質の発達期曝露により正常な神経発達が攪乱される可能性がある。

このような背景のなか、マウス・ラット等の実験動物を用いた内分泌攪乱化学物質の神経発達影響に関する研究が研究代表者のそれを含め急増した。言うまでもなく、これらの研究の最終目標はヒトでの影響評価である。ところが、マウス・ラット等のげっ歯類と霊長類であるヒトはその系統学的距離が比較的離れており、化学物質の吸収・分布・代謝・排泄も異なっている。加えてげっ歯類と霊長類の脳はその大きさ・形態はもちろん、発達期の内分泌系への依存度も異なる。より妥当にヒトにおける影響評価に役立つ情報を提供できる系が望まれていた。そこで本研究ではヒトにおける影響評価に役立つ情報を提供する目的で唯一のヒト型実験動物であるサル類を用いた神経発達影響評価系の確立を試みた。

2. 研究の目的

本研究は「サル類を用いた内分泌攪乱化学物質の神経発達影響評価系の確立」を主題として、環境中化学物質の中でも内分泌攪乱化学物質に的を絞り、ヒトにおけるリスクを妥当に評価しうるカンクイザルを用いた有用な系の提案、検証、そして確立を目指した。

(1)カンクイザルにおける甲状腺ホルモン依存性神経発達の評価

カンクイザルは国内で汎用される医学実験用サルであるが、その脳発達に関する情報は極めて少ない。甲状腺ホルモン依存性神経発達を検索する前に正常カンクイザルの神経発達を評価する必要がある。その上で、適切な時期に甲状腺ホルモンを欠乏させた発達期カンクイザルを作成し、評価した。

(2)カンクイザル胎仔由来神経系培養細胞を用いた神経発達影響評価系の確立

生体カンクイザルを用いた実験 (*in vivo*) は情報として貴重であり有用であることは疑いないが、貴重であるが故げっ歯類のように多数の個体を用いることはできないし費用の問題もある。また、実験系としても年単位の時間を要する。従って細胞レベルでの実験 (*in vitro*) を行い、生体を用いた実験の立案に役立てることが労力・費用・時間の面からも重要である。そこで、カンクイザル由来

の初代培養神経系細胞の確立・利用を目指した。さらに、カンクイザル由来神経幹細胞株の樹立を試みた。初代培養細胞は生体に近い細胞であるという利点があるが、一頭のカンクイザル胎仔からの初代培養であるが故、限られた細胞数しか得られないという欠点があるため、増殖能および多分化能を有する神経幹細胞を得てからそれを適切に分化することができれば大量の神経系細胞を得ることができる。

3. 研究の方法

(1)カンクイザルにおける甲状腺ホルモン依存性神経発達の評価

①カンクイザルにおける脳の正常発達

胎齢 80、110、130 日、生後 30、60、90 日、4 歳のカンクイザルの前頭葉皮質、帯状皮質、尾状核、海馬、および小脳の神経発達に重要な一連のタンパク質発現を Westernblotting 法により評価した。

②カンクイザルにおける発達期甲状腺ホルモン欠乏が脳発達に与える影響の評価

生後 3 日目から生後 60 日目まで甲状腺ホルモン合成阻害剤であるメチマゾールを投与したカンクイザルの上前頭回皮質、尾状核、扁桃核、海馬、後頭葉皮質および小脳虫部のタンパク質発現を Westernblotting 法により評価した。

(2) カンクイザル胎仔由来神経系培養細胞を用いた神経発達影響評価系の確立

①カンクイザル胎仔由来大脳皮質神経幹細胞培養系の確立

胎齢 80 日のカンクイザル大脳皮質組織を凍結保存し、それを随時解凍、細胞分散し未分化で増殖能を有する細胞を選択的に増殖させることにより、培養神経幹細胞の樹立を試みた。

②カンクイザル胎仔由来大脳皮質・小脳アストロサイト培養系の確立

研究代表者は既にカンクイザル胎仔大脳皮質由来初代培養神経細胞の作製法は確立しており、様々な化学物質の影響評価に利用してきた。ここでは神経細胞とともに神経機能発現に重要な役割を果たすアストロサイトについて大脳皮質・小脳を材料として選択的培養を試みた。

4. 研究成果

(1)カンクイザルにおける甲状腺ホルモン依存性神経発達の評価

①カンクイザルにおける脳の正常発達

大脳の脳回、脳溝や小脳の脳溝の発達を評価した結果、カンクイザルの大脳・小脳の発達は出生時にはマクロ形態学的にはほぼ完成していると考えられる。一方、発達に伴う神経系の機能発現に重要な役割を果たすタ

ンパク質発現を各脳部位（前頭葉皮質、帯状皮質、尾状核、海馬、および小脳）について評価した結果、以下の重要な結果を得た（()内は評価したタンパク質の名称）。

- ・シナプス構成タンパク質 (synaptophysin、synapsin1) の発現は胎生期はほとんど見られず出生後急激に上昇する。

- ・未分化な神経細胞に発現するタンパク質 (doublecortin、nestin) は出生直後には見られなくなり、分化した神経細胞が発現するタンパク質 (NeuN) は胎齢 110 日から既に発現しているため、神経細胞の分化は出生前にほぼ完了していると考えられる。

- ・抑制性神経伝達物質 GABA による神経伝達に関連するタンパク質 (GAD65、GAD67、VGAT、KCC2、GABA(A)R α -1、GABA(A)R β -2、GABA(A)R γ -2、gephyrin、GABA(B)R1、GABA(B)R2) の発現は出生後急激に発現上昇し、生後 60 日あたりをピークとするため、抑制性神経伝達の発達は生後直後から 60 日が臨界期と考えられる。

- ・興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体 (NMDAR1、NMDAR2A、NMDAR2B) および関連するタンパク質 (PSD95) の発現は胎齢 110 日から見られているため、神経伝達物質としてのグルタミン酸は胎生期にも重要な役割を果たしていると考えられる。

以上の結果は化学物質影響科学分野のみならず、広く神経科学にとって重要な情報であり、現在 *Journal of Comparative Neurology* に投稿中である。

②カニクイザルにおける発達期甲状腺ホルモン欠乏が脳発達に与える影響の評価

上述①の結果より、マクロ形態学的には出生時にはほぼ完成している脳も分子生物学的には未熟であり、特に抑制性神経伝達系の発達は生後直後から生後 60 日にかけて急激に進むことが明らかとなったため、甲状腺ホルモン合成阻害剤であるメチマゾールを生後 3 日目から 60 日目まで母体に経口投与し経乳汁で新生仔に投与した (n=4)。対照群には溶媒投与を行った (n=4)。生後 60 日の甲状腺ホルモン欠乏カニクイザルは血清中のサイロキシンの有意な低下、甲状腺の肥大、組織学的には濾胞上皮細胞の柱状化（一個体は濾胞コロイドの減少）が観察された。

生後 60 日の甲状腺ホルモン欠乏カニクイザルの各脳部位（上前頭回皮質、尾状核、扁桃核、海馬、後頭葉皮質および小脳虫部）について上述(1)と同様のタンパク質の発現を評価した結果、以下の結果を得た（()内は評価したタンパク質の名称）。

- ・甲状腺ホルモン欠乏により甲状腺ホルモン受容体 (THR α 1、THR α 2、THR β 1) の発現は評価部位では変化しなかった。

- ・甲状腺ホルモン欠乏により甲状腺ホルモン応答遺伝子 (MBP) の発現が評価部位全体的

に低下した。

- ・甲状腺ホルモン欠乏により神経細胞の分化に関連するタンパク質 (NeuN、doublecortin) の発現は評価部位では変化しなかった。

- ・甲状腺ホルモン欠乏によりシナプス構成タンパク質 (synaptophysin、synapsin1) の発現は評価部位では変化しなかった。

- ・甲状腺ホルモン欠乏により GABA 合成酵素 (GAD65、GAD67) の発現が、特に前頭葉皮質および扁桃核において低下した。

- ・甲状腺ホルモン欠乏により GABA 受容体のサブユニットの一部 (GABA(A)R γ -2) の発現が扁桃核および後頭葉皮質において上昇した。

- ・甲状腺ホルモン欠乏により興奮性神経伝達 (グルタミン酸) に関連するタンパク質 (NMDAR1、NMDAR2A、NMDAR2B、PSD95、VGLUT1、EAAT2) の発現は評価部位では変化しなかった。

以上の結果から、カニクイザルにおいて甲状腺ホルモンは神経発達そのものを遅らせるのではなく抑制性神経伝達の発達を特異的に遅らせていると考えられる。これは世界で初めて発達期カニクイザル脳における内分泌攪乱による影響を分子生物学的に明らかにしたという意味で重要であり、現在 *Endocrinology* に投稿中である。

(2)カニクイザル胎仔由来大脳皮質神経系細胞初代培養系を用いた神経発達影響評価系の確立

①カニクイザル胎仔由来大脳皮質神経幹細胞培養系の確立

胎齢 80 日のカニクイザル大脳皮質から得た細胞をヒト神経幹細胞培養に適用される培養液で培養した結果、14 日後には巨大な sphere が得られた。これを再度分散して、同様に培養を続けることによって増殖能を有する神経幹細胞を得ようと試みたが、継代後 sphere は成長しなかった。各種添加物の濃度も検討したが、現在のところ続けて大量培養にもちこめる手法は確立できていない。しかしながら、この sphere を培養皿に接着させ通常培養液で培養すると GFAP 陽性の細胞に分化させることに成功した。今後は添加物の種類・濃度を検討することにより大量培養可能な方法を確立することが課題である。

②カニクイザル胎仔由来大脳皮質・小脳アストロサイト培養系の確立

大脳皮質および小脳を分散培養した後、アストロサイトの増殖能を利用して継代を繰り返すことによりアストロサイトの選択培養系を確立した。アストロサイトの機能発現も大きく内分泌系に依存しているため、この細胞を用いた内分泌攪乱化学物質の影響評価は霊長類での神経発達影響の評価に貴重

な情報をもたらすと考えられる。

本研究では、カニクイザルの脳発達を分子生物学的に詳細に記述できたとともに、発達期における内分泌攪乱が脳発達に与える影響についてその感受性期を明らかにし、影響の分子生物学的エビデンスを得ることに成功した。医学実験用霊長類を用いた化学物質の神経発達影響評価が可能であることが明らかになった以上、今後さまざまな化学物質を用いてそれを実践していくべきである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Nakagami A, Koyama T, Kawasaki K, Negishi T, Ihara T, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Maternal plasma polychlorinated biphenyl levels in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) affect infant social skills in mother-infant interaction. *Developmental Psychobiology*. 53:79-88, 2010. (査読有)
- ② Asakawa H, Tsunoda M, Kaido T, Hosokawa M, Sugaya C, Inoue Y, Kudo Y, Satoh T, Katagiri H, Akita H, Saji M, Wakasa M, Negishi T, Tashiro T, Aizawa Y. Enhanced Inhibitory Effects of TBT Chloride on the Development of F(1) Rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58:1065-73, 2010. (査読有)
- ③ Kimura N, Inoue M, Okabayashi S, Ono F, Negishi T. Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by an increase in Rab GTPases: a potential mechanism underlying age-dependent endocytic dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*. 284:31291-302, 2009. (査読有)
- ④ Nakagami A, Negishi T (equal first-author), Kawasaki K, Imai N, Nishida Y, Ihara T, Kuroda Y, Yoshikawa Y, Koyama T. Alterations in male infant behaviors towards its mother by prenatal exposure to bisphenol A in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) during early suckling period. *Psychoneuroendocrinology*. 34:1189-97, 2009. (査読有)
- ⑤ Takahashi M, Negishi T, Imamura M, Sawano E, Kuroda Y, Yoshikawa Y, Tashiro T. Alterations in gene expression of glutamate receptors and exocytosis-related factors by a hydroxylated-polychlorinated biphenyl in the developing rat brain. *Toxicology*. 257:17-24, 2009. (査読有)
- ⑥ Kobayashi Y, Negishi T, Mizumura A, Watanabe T, Hirano S. Distribution and

Excretion of Arsenic in Cynomolgus Monkey Following Repeated Administration of Diphenylarsinic Acid. *Archives of Toxicology*. 82:553-61, 2008. (査読有)

- ⑦ Takahashi M, Negishi T, Tashiro T. Identification of genes mediating thyroid hormone action in the developing mouse cerebellum. *Journal of Neurochemistry*. 104:640-52, 2008. (査読有)
- ⑧ Yasumoto F, Hayashi A, Kamiya A, Negishi T, Yoshikawa Y, Sawa A. Genetic manipulation of brain cultures from the primates: a novel tool for molecular studies of neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*. 13:116-8, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 20 件)

- ① Nakagami A, Negishi T, Kawasaki K, Kuroda Y, Yoshikawa Y, Koyama T. THE EFFECT OF PRENATAL EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS (EDCS) ON THE DEVELOPMENT OF MACAQUE SOCIALIZATION. International Primatological Society XXIII Congress Kyoto 2010, 2010年12月16日、Kyoto University, Kyoto, Japan
- ② K. Oyanagi, T. Negishi, T. Tashiro, Effects of thyroid hormone on the survival and neurite outgrowth of cultured cerebellar granule cells, The 10th biennial meeting of the ASIA-PACIFIC SOCIETY FOR NEUROCHEMISTRY, 2010年10月19日、Phuket, Thailand
- ③ T. Negishi, K. Oyanagi, M. Takahashi, N. Imai, T. Ihara, T. Tashiro, Investigation of cerebral development in cynomolgus monkey - Histological and biochemical analyses, The 10th biennial meeting of the ASIA-PACIFIC SOCIETY FOR NEUROCHEMISTRY, 2010年10月18日、Phuket, Thailand
- ④ E. Sawano, T. Negishi, T. Tashiro, Local thyroid hormone metabolism in the hippocampus of senescence-accelerated SAMP8 mice, The 10th biennial meeting of the ASIA-PACIFIC SOCIETY FOR NEUROCHEMISTRY, 2010年10月18日、Phuket, Thailand
- ⑤ T. Uno, Y. Ishibashi, M. Takahashi, T. Negishi, T. Tashiro, Analysis of gene expression profiles in the hippocampus and cerebellum of the Goto-Kakizaki rat, an animal model of type 2 diabetes, The 10th biennial meeting of the ASIA-PACIFIC SOCIETY FOR NEUROCHEMISTRY, 2010年10月18日、Phuket, Thailand
- ⑥ Takayuki Negishi, Masaki Takahashi,

- Kohshi Oyanagi, Hiroaki Ohnishi, Seishiro Hirano, Tomoko Tashiro, Diphenylarsinic acid induced oxidative stress and expression of neuroactive and vasoactive peptides in cerebellar astrocytes、Neuro2010、2010年9月4日、神戸、神戸コンベンションセンター（国際会議場・国際展示場）
- ⑦ Masashi Tsunoda, Yuki Takeuchi, Ryouosuke Yoshioka, Takayuki Negishi, Ryutaro Ikeuchi, Takaya Kaido, Mayuko Hosokawa, Chiemi Sugaya, Tomoko Tashiro, Yoshiharu Aizawa、Perinatal exposure affects the sensitivity to TBT neurotoxicity after maturation: evaluation by gene expression and behavioral analyses、Neuro2010、2010年9月4日、神戸、神戸コンベンションセンター（国際会議場・国際展示場）
- ⑧ Koshi Oyanagi, Takayuki Negishi, Tomoko Tashiro、Non-genomic action of Thyroxine (T4) on survival and neurite outgrowth of cerebellar granule cells in culture、Neuro2010、2010年9月3日、神戸、神戸コンベンションセンター（国際会議場・国際展示場）
- ⑨ Erika Sawano, Takayuki Negishi, Tomoko Tashiro、Alterations in local thyroid hormone metabolism in the hippocampus of senescence-accelerated SAMP8 mice、Neuro2010、2010年9月3日、神戸、神戸コンベンションセンター（国際会議場・国際展示場）
- ⑩ Nobuyuki Kimura, Makoto Inoue, Sachi Okabayashi, Fumiko Ono, Takayuki Negishi、Traffic Jam hypothesis: dynein dysfunction causes endocytic pathology leading to intracellular A β accumulation.、Neuro2010、2010年9月2日、神戸、神戸コンベンションセンター（国際会議場・国際展示場）
- ⑪ 根岸隆之、サル類の行動を指標とした胎生期化学物質曝露による神経発達毒性の評価、第49回 日本先天異常学会、2009年6月25日、鹿児島県、鹿児島市民文化ホール
- ⑫ 角田 正史、若佐 美佳、浅川 秀雄、高橋 理貴、根岸 隆之、峽戸 孝也、細川 まゆ子、菅谷 ちえ美、井上 葉子、相澤 好治、田代 朋子、ラット脳の発達に対するトリブチルスズ曝露の影響に関する二世代トキシコジェノミック研究、第52回 日本神経化学会、2009年6月24日、群馬県、伊香保温泉
- ⑬ 根岸 隆之、高橋 理貴、小柳 洗志、大西 大空、平野 靖史郎、田代 朋子、小脳顆粒細胞におけるジフェニルアルシン酸による酸化ストレスと細胞死、第52回 日本神経化学会、2009年6月22日、群馬県、伊香保温泉
- ⑭ 小柳 洗志、高橋 理貴、根岸 隆之、田代 朋子、培養小脳顆粒細胞における低カリウム誘発細胞死に対する甲状腺ホルモン T4 の細胞保護作用、第52回 日本神経化学会、2009年6月22日、群馬県、伊香保温泉
- ⑮ 澤野 恵梨香、高橋 理貴、船津 尚子、木村 洋人、根岸 隆之、田代 朋子、GABA 神経伝達機構の発達における甲状腺ホルモンの役割、第52回 日本神経化学会、2009年6月22日、群馬県、伊香保温泉
- ⑯ 宇野 健史、石橋 瑛、高橋 理貴、根岸 隆之、田代 朋子、2型糖尿病モデル・GK ラットの脳におけるホモシステイン代謝の変化、第52回 日本神経化学会、2009年6月22日、群馬県、伊香保温泉
- ⑰ 豊島祐次郎、根岸隆之、伊原敏夫、吉川泰弘、メチマゾール短期曝露カニクイザル胎児における脳の組織学的検索、第146回 日本獣医学会、2008年9月24日、宮崎県、シーガイア・ワールドコンベンションセンター・サミット
- ⑱ 小柳洗志、高橋理貴、根岸隆之、田代朋子、初代培養ラット小脳顆粒細胞における低カリウム誘発細胞死に対する内因性グルタミン酸の役割、第51回 日本神経化学会、2008年9月13日、富山県、富山国際会議場
- ⑲ 若佐美佳、今村誠、吉岡良祐、高橋理貴、根岸隆之、角田正、相澤好治、田代英夫、田代朋子、トリブチルスズ経世代曝露による発達期脳の遺伝子発現変化、第51回 日本神経化学会、2008年9月13日、富山県、富山国際会議場
- ⑳ 高橋理貴、根岸隆之、澤野恵梨香、田代朋子、LPS 誘導末梢性炎症による脳内甲状腺ホルモンシステムの変化、第51回 日本神経化学会、2008年9月12日、富山県、富山国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根岸 隆之 (NEGISHI TAKAYUKI)
 青山学院大学・理工学部・助教
 研究者番号：80453489