

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04339

研究課題名（和文）周産期化学物質曝露による脳機能障害の発症機序の解明と障害の予防・抑制法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of brain dysfunction caused by perinatal environmental chemicals exposure and development of methods to prevent and control the disorder

研究代表者

宮崎 航（Miyazaki, Wataru）

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：90512278

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

研究成果の概要（和文）：環境化学物質の周産期曝露が脳発達に影響を及ぼし、成長後に様々な脳機能障害を引き起こすことが知られている。化学物質の周産期曝露は内分泌系や恒常性機能などに影響を及ぼし、神経系細胞の形態形成や機能などに変化を引き起こすことから、このような遺伝子、機能、形態の異常が成長後の脳機能異常に繋がる素因となる可能性が考えられるが、素因がどのように保存され、成長後の異常につながるかは未だ不明な点が多い。本研究では、脳発達、特に小脳における遺伝子発現とエピゲノム変化、miRNAならびに表現型の関連について検証を行い、周産期から維持されるエピゲノム変化が成長後の脳機能障害に繋がる可能性を示唆する結果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの環境化学物質の毒性影響に関する研究は、分子、細胞、動物、ヒトを統合的・包括的に行われたものが少ない。本研究では分子レベルの変化から実際の表現型を結びつけた包括的な検証を行い、今後の発展につながる基礎データを得られたことに非常に大きな意義がある。

また、これまでの多くの環境化学物質に関する研究は、毒性影響を見出すことが主な目的となり、発現機構の解明が不十分であることに加え、化学物質曝露による毒性影響を予測・予防・抑制する方策を示すにまで至っていない。本研究のmiRNAやメタボロームの解析、行動解析の結果が毒性影響の予防・抑制のための新たな評価法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It is known that perinatal exposure to environmental chemicals affects brain development and causes various brain dysfunctions in adulthood. Perinatal exposure to chemicals causes changes in the morphogenesis and function of neuronal cells. However, it is still unclear how these effects are preserved and how they lead to abnormalities later in life. In this study, we examined the relationship between gene expression and epigenomic changes, miRNAs, and phenotypes in brain development, especially in the cerebellum, and showed that epigenomic changes maintained from the perinatal period may lead to brain dysfunction after growth.

研究分野：衛生学、毒理学

キーワード：エピゲノム 環境化学物質 周産期曝露 脳発達 miRNA

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン類などの環境化学物質の周産期曝露が脳発達に影響を及ぼし、成長後に学習障害や情動障害など様々な脳機能障害を引き起こすことが知られている⁽¹⁾⁽²⁾。化学物質曝露は内分泌系や恒常性機能、核内受容体などの転写因子の機能に影響を及ぼし⁽³⁾、神経系細胞の形態形成や機能に参与する遺伝子発現変化⁽⁴⁾や神経系細胞の形態・機能・回路形成の変化を引き起こす⁽⁵⁾。このような環境化学物質の周産期曝露時の遺伝子・タンパク発現および機能、細胞・組織形態の異常が成長後の脳機能異常に繋がる素因となる可能性が考えられるが、これらの素因がどのように保存され、成長後の異常の発現につながるかは未だ不明な点が多い。

研究代表者はこれまで、化学物質曝露による甲状腺ホルモン(TH)系のかく乱が小脳を含む様々な脳機能に影響を及ぼしうることを報告した⁽³⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾。小脳の発育・発達における TH の作用には周産期周辺に臨界期が存在しており、この時期の TH 系作用の不足が小脳の細胞に形態異常などの不可逆的な変化を引き起こす。その結果、小脳機能に異常がもたらされる⁽⁸⁾。しかし、これまでに報告した周産期化学物質曝露による成長後の脳機能異常において、曝露時の遺伝子発現変化や形態異常が成長後に必ずしも保存されておらず、周産期の変化と成長後の変化を結びつけることができていない。また、曝露影響を受けているのが TH 系のみとは限らず、他の内分泌系や恒常性機能に影響を及ぼしていることも十分予想される。

成長後に脳機能障害を誘発する一因として、化学物質曝露による DNA メチル化をはじめとするエピゲノム変化が考えられている⁽⁹⁾。研究代表者は胎児期、離乳期、成長後のマウス小脳の DNA メチル化状態を解析し、成長に伴ってメチル化状態が変化すること、そして、周産期甲状腺機能低下症マウスと野生型マウスの小脳を比較し、遺伝子(micro RNA を含む)の発現に関わる領域の DNA メチル化が変化していることを見出した。曝露により異常なエピゲノム変化が成長後の異常を引き起こす素因として維持された結果、成長後に遺伝子・タンパク発現の変化を引き起こし、脳機能異常が出現する可能性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、周産期化学物質曝露により引き起こされる成長後の脳機能異常の発生メカニズムの解明である。この目的のため、下記の目標を設定し、研究を開始した。

- (1) 周産期化学物質曝露による成長後の異常を引き起こす素因の解明
- (2) 成長後の脳機能異常につながる素因の発生時期と保持、それに伴う遺伝子・タンパク発現と表現型の変化への影響の検証
- (3) 毒性発現を予防・抑制する新たな手法の開発

3. 研究の方法

本研究では、上記の研究目標に対応して、下記の研究を行った。

なお、本研究は、これまでに研究代表者らが周産期の曝露により成長後に脳機能異常を示すことを報告している 2 種の周産期曝露マウスモデル(ポリ塩化ビフェニル(PCB)、ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE))を用いることとした。どちらも周産期曝露による遺伝子発現変化と脳機能異常の関係も含め、多くの研究報告がされている。しかし、詳細なメカニズムの関係には至っておらず、本研究の有用性を示す上で適切なモデルである。また、本研究では小脳を中心に解析を行った。また、近年、曝露と毒性が懸念されている有機フッ素化合物についても検証を行った。

- (1) 周産期曝露によるエピゲノム変化と遺伝子発現変化の関連の解析

研究代表者は発育・発達に伴って、小脳でのエピゲノム(DNA メチル化)が変化すること、周産期甲状腺機能低下がエピゲノム異常を起こすことを確認していた。そこで、本研究では、まず、曝露から時間をおいて生じる毒性の発現機序を解明するため、胎児期、新生児期、離乳期におけるエピゲノム解析を行った。エピゲノム変化を認めた領域、特に遺伝子の発現変化にかかわる領域について、成長後(9-10 週齢)にも変化が維持されているかを検証した。併せてエピゲノム変化によりもたらされる遺伝子発現変化について検証した。

- (2) 周産期曝露により変化する microRNA(miRNA)の同定とタンパク発現への影響の解析

microRNA(miRNA)について、周産期甲状腺機能低下マウスの小脳の全ゲノムメチル化シークエンスより、miRNA のゲノム領域のエピゲノム変化を観察していたことから、発現の変化する miRNA があることも見出している。これらの miRNA を含め、胎児期、新生児期、離乳期、成長後(9-10 週齢)に小脳を採取し、miRNA を含む total RNA を抽出し、miRNA シークエンスにより各 miRNA の発現量比較および標的遺伝子の網羅的探索を行った。候補 miRNA については、培養細胞を用いた曝露実験とともに、候補 miRNA の miRNA inhibitor を導入し、化学物質曝露時と類似した変化が認められるかを検証した。

- (3) 周産期曝露によって生体に観察される変化と行動の関連の検証

(1)(2)にて明らかとなっているエピゲノム変化、遺伝子、miRNA と行動の関連を解析するため、化学物質曝露マウスと野生型マウスの行動解析(運動協調試験(運動学習)、物体再認識試験(記憶)、位置再認識試験(学習))を進めた。また、これまでに見られている周産期曝露による遺

伝子・タンパク発現変化により表現型が変化するかについて、成長後（9-10 週齢）小脳を採取し、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いてメタボローム解析を行う準備を進めた。

4. 研究成果

(1) 周産期曝露によるエピゲノム変化と遺伝子発現変化の関連の解析

これまでに周産期甲状腺機能低下症マウスから明らかとなっている発達・発育期(離乳時)の脳(小脳)のエピゲノム変化を見出していることから、成長後(9~10 週齢)のエピゲノム状態について解析を行った。その結果、離乳時のエピゲノム変化が維持されていることを確認した。一方、発達に伴って変化したと考えられるエピゲノム変化も検出された。また、遺伝子発現変化とエピゲノム変化の関連について、特に発現調節に関わるプロモーター領域のメチル化に着目して解析した結果、各遺伝子の転写開始点(TSS)から一定の距離にメチル化が起きていること、甲状腺機能低下症マウスと野生型マウスにメチル化の差があることを確認した(図1)。

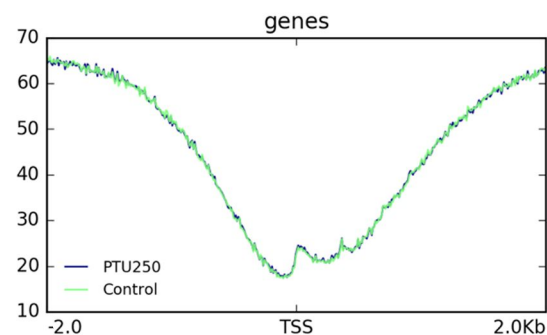


図1

さらにメチル化と遺伝子発現変化率の関係を図2の通り解析したところ、メチル化の変化によって発現が大きく減少する遺伝子が多く見られた。この中から神経に関連すると考えられる遺伝子のうち、プロモーター領域でメチル化が大きく変化した領域と遺伝子発現が変動した遺伝子について抽出して解析を行った(図3)。その結果、小脳発達に関連する遺伝子候補が抽出された。

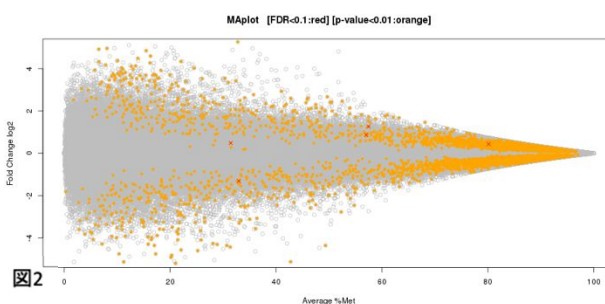
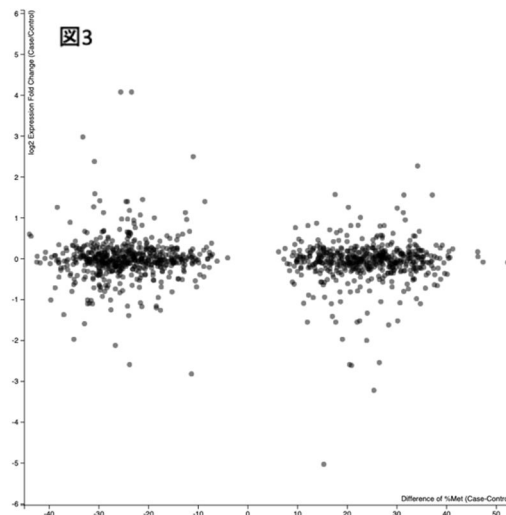


図2

候補遺伝子が明らかになる一方、変化を認めた遺伝子がどのような経路・機能をもつ遺伝子であるかをさらに検証するため、メチル化変化を引き起こした遺伝子について、パスウェイ解析を行った。有意に関連があったパスウェイとしては、アルツハイマー病関連、アセチルコリン合成のほか、小脳発達に重要な役割をはたす Wnt シグナル伝達系の関与も見出した。現在、DNA メチル化阻害剤を用いて、上記の異常なエピゲノム変化を抑制できるかを検証している。

(2) 周産期曝露により変化する microRNA(miRNA)の同定とタンパク発現への影響の解析

すでに研究前から明らかとなっている miRNA に加え、さらなる miRNA に関する解析を進めるため、胎児期、新生児期、離乳期、成長後(9-10 週齢)に小脳を採取し、miRNA を含む total RNA を抽出し、miRNA シークエンスにより各 miRNA の発現量比較および標的遺伝子の網羅的探索を行った。これまでの網羅解析から明らかとなっている個々の miRNA の発現について確認したところ、一部の miRNA の発現が変化していることを確認した。合わせて、各 miRNA 群と小脳組織のマイクロアレイ解析の結果と比較したところ、小脳発達に関連する遺伝子を抑制しうる miRNA 候補が明らかとなった。さらに、メチル化との相関も確認し、遺伝子によっては、メチル化でなく、miRNA の影響が大きい可能性が示唆された。そのため、特に培養細胞を用いて、特定の miRNA の機能を抑制する miRNA Inhibitor の検討を進め、数種の miRNA と脳発達関連遺伝子の組み合わせが決定しつつある。



(3) 周産期曝露によって生体に観察される変化と行動の関連の検証

(1)、(2)の検証をさらに進めるため、モデル化学物質をペルフルオロアルキル物質およびポリフルオロアルキル化合物(PFAS)ならびにポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE)として化学物質曝露モデルマウス作成し、胎児期、新生児期、離乳期、成長後(9-10 週齢)における小脳での各 miRNA の発現量比較および標的遺伝子の網羅解析を行い、現在 miRNA と遺伝子発現との関連について検証を進めている。また、同様にメタボローム解析に向けてのサンプリングも行っている。

合わせて、モデルマウスと野生型マウスの行動解析(運動協調試験(運動学習)、物体再認試験(記

憶)、位置再認試験(学習))を行うため、同様にモデルマウスを作成し、行動解析に向けての準備を進めている。なお、動物実験については、分担研究者のみならず、研究代表者の施設においても推進することとし、行動解析にかかる設備・プロトコルの確認を行った。

なお、DNAメチル化阻害剤を用いた検証については、その作用の広汎性から困難な点も多く、現在も検討を進めている。なお、新型コロナウイルス感染症の影響により、遅れていた行動解析については現在も検証中であり、また、サンプリングを行っている最中である。今後、以上の成果をまとめ公表する予定である。

・引用文献

- (1) Haijima A et al., Neurotoxicology. 2010. 31(4):385-390.
- (2) Endo T et al., Behavioural Brain Research. 2011. 221(1):172-81.
- (3) Miyazaki W et al., Journal of Biological Chemistry. 2004. 279(18):18195-18202.
- (4) Kakeyama M et al., Archives of Toxicology. 2014. 88(3):789-798.
- (5) Tian YH et al., Synapse. 2010. 64(6):432-9.
- (6) Khairinisa MA et al., Frontiers in Endocrinology. 2018. 9:228.
- (7) Iwasaki T et al., Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002. 299(3):384-388.
- (8) Koibuchi N and Chin WW. Trends Endocrinol Metab. 2000. 11(4):123-8.
- (9) Hu J et al., Chemosphere. 2019. 226:259-272.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	野見山 桂 (Nomiya Kei) (30512686)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・准教授 (16301)	
研究分担者	中西 剛 (Nakanishi Tsuyoshi) (50303988)	岐阜薬科大学・薬学部・教授 (23701)	
研究分担者	配島 旭 (Haijima Asahi) (70555672)	早稲田大学・人間科学学術院・講師(任期付) (32689)	

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