

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04342

研究課題名(和文) 神経細胞死の前段階で変化する毒性マーカーを指標にした高感度神経毒性評価系の構築

研究課題名(英文) Sensitive evaluation method for neurotoxicity using a novel marker

研究代表者

古武 弥一郎 (Kotake, Yaichiro)

広島大学・医系科学研究科(薬)・教授

研究者番号：20335649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、有機スズによる神経細胞死の前段階で低下することをわれわれが見出した核呼吸因子-1 (NRF-1) が、高感度神経毒性マーカーとして利用できる可能性を探った。まず、NRF-1活性を簡単に評価できるレポーター細胞(N-Rep細胞)を作製した。次にこれを用いてさまざまな化学物質のNRF-1活性低下と細胞死の時間関係を調べたところ、メトキシクロル、PCP、ファモキサドンの3化合物の曝露において、細胞死が起こらない濃度からNRF-1低下が認められた。このように一部の物質では毒性が出る前段階からNRF-1低下が認められることから、NRF-1が高感度神経毒性マーカーとして有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学物質の神経毒性試験は、OECDなどのガイドラインに準拠した試験法により行われるが、大量の実験動物と莫大な費用、時間、労力が必要であり、有害性が疑われるごく一部の化学物質しか行うことができない。そのため、動物実験を行う前に神経毒性が疑われる物質を絞りこむための神経毒性指標が必要となる。ところが、既存の評価指標については神経毒性が発現してはじめて変化するのがほとんどであるため、早期に変動する高感度神経毒性指標の発見が望まれている。本研究で有用であることを見出したNRF-1のような高感度神経毒性マーカーは、未知化学物質の有害性早期発見に大いに役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored the possibility of using nuclear respiratory factor-1 (NRF-1), which we found to be decreased in the prophase of organotin-induced neuronal cell death, as a highly sensitive marker of neurotoxicity. First, we generated reporter cells (N-Rep cells) that can easily evaluate NRF-1 activity. Next, we used N-Rep cells to examine the time relationship between the decrease in NRF-1 activity and cell death for various chemicals. We found that NRF-1 decreased from concentrations at which cell death did not occur when exposed to methoxychlor, PCP, and famoxadone. Thus, NRF-1 decrease was observed for some substances even before the onset of toxicity, suggesting that NRF-1 is useful as a highly sensitive marker of neurotoxicity.

研究分野：神経毒性学

キーワード：毒性評価指標 神経毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

この世の中には1億種類以上の化学物質が存在し、われわれの身のまわりに存在する化学物質だけでも数十万種類と考えられている。化学物質の神経毒性試験は、**OECD**などのガイドラインに準拠した試験法により行われるが、大量の実験動物と莫大な費用、時間、労力が必要であり、有害性が疑われるごく一部の化学物質しか行うことができない。そのため、動物実験を行う前に神経毒性が疑われる物質を絞りこむための神経毒性指標が必要となる。ところが、既存の評価指標については神経毒性が発現してはじめて変化するものがほとんどであるため、早期に変動する高感度神経毒性指標の発見が望まれている。

環境中に存在する化学物質の神経毒性研究は数多く報告があるが、その多くは比較的高濃度の化学物質を用いて神経細胞死などのはっきりした毒性を報告したものである。有害性が指摘されていながら、その毒性メカニズムに未解明な点が多いメチル水銀などの化学物質については盛んに研究されている。一方、毒性を評価する際の評価指標についても研究は行われているものの、「既知の評価指標については毒性が発現してはじめて変化するものが多く、早期に変動する高感度毒性指標が望まれている」と総説でも述べられている。また、ヒトの疾患の多くは遺伝的素因と環境因子の相互作用により発症すると考えられており、原因不明な神経疾患の環境因子を解明するためにも、健康を害する可能性のある化学物質を効率的に絞り込む手段を考えることは重要である。

このような中で申請者は、ラットより単離した大脳皮質初代培養神経細胞を用いて、神経細胞死を惹起するよりはるかに低濃度である **20 nM** トリブチルスズ (**TBT**) が神経細胞に特徴的に発現する **GluA2** (神経細胞膜に存在する受容体のサブユニット) を持続的に発現減少させ、神経細胞を脆弱にする(細胞死を惹起しない弱い刺激でも死にやすくなる)ことを見出した。培養神経細胞を用いて **TBT** が **GluA2** を減少させるメカニズムを調べたところ、核呼吸因子-1 (**Nuclear Respiratory Factor-1, NRF-1**: 酸化ストレス応答転写因子である **Nrf2** とは無関係) という転写因子の発現および活性低下によることが明らかとなった。パーフルオロオクタンスルホン酸 (**PFOS**) や農薬など複数の環境化学物質(調べた低濃度環境化学物質の大部分)についても、同様のメカニズムにより低濃度で神経細胞が脆弱になることを、培養神経細胞を用いて明らかにしている。このうち **PFOS** については、*in vivo* においても低用量でこの現象を確認している。

これらの結果から、**NRF-1** 低下を介した **GluA2** 減少は、有機スズに特異的なメカニズムというよりはむしろ、一部の低濃度化学物質に共通する新規神経細胞脆弱化メカニズムとして一般化できる可能性が考えられる。**GluA2** を減少させる原因となる **NRF-1** 低下は、**GluA2** 減少と比較して早期段階から変化が認められるため、指標として用いるのに有用である。

2. 研究の目的

NRF-1 低下が一部の化学物質に共通する神経脆弱化メカニズムであることを明らかにし、高感度神経毒性マーカーとして利用することの可能性を探りつつ、このような神経細胞死の前段階で変化する神経脆弱化の指標を探索することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

3 - 1. **NRF-1** 活性を簡便に評価できるレポーター細胞 (**N-Rep** 細胞) の作製

Luc2 遺伝子の下流に自己切断ペプチド **P2A** と蛍光タンパク質 **EGFP** を連結してプロメガ社の **pGL4.23** ベクターに組み込み、ルシフェラーゼの発光と **EGFP** の蛍光の両方でプロモーター活性を検出できる **N-Rep** 細胞(安定発現系と一過性発現系の2種類)を作製した。ネガティブコントロール細胞として、**NRF-1** のドミナントネガティブ変異体を発現した細胞を別途作製した。

3 - 2. **N-Rep** 細胞を用いた各種化学物質による **NRF-1** 活性と細胞死の時間関係評価

さまざまな化学物質を用いて **NRF-1** 活性低下と細胞死が起こる時間関係を調べるため、一過性発現させた **N-Rep** 細胞に各種化学物質を曝露した。核染色剤である **Hoechst 33342** と死細胞染色色素である **Propidium Iodide (PI)** の共染色を併用し、**NRF-1** 活性(蛍光活性)と **PI** 陽性率の同時測定を行った。**NRF-1** 活性を低下させる既知化合物としてトリブチルスズ (**TBT**) を用いた。

3 - 3 . NRF-1 活性低下と神経突起伸長のアッセイ自動化に関する検討

分化誘導剤を添加した **N-Rep** 細胞を実験に用いた . **NRF-1** 活性をレポーターの **EGFP** 緑色で (**96** ウェルプレートの **6** ウェルの平均をコントロール群の平均で割って活性を算出) , **Thermo** 社の **Neurite Outgrowth Staining Kit** を使用し , 生細胞をカルセインの青色で , 神経突起を赤色で染色し , **High Content Screening** 装置 **Opera Phenix (Perkin Elmer)** を用いて神経突起長などを計測することによるアッセイの自動化を試みた . 実験条件を確立するためのモデル化合物としてトリブチルスズを用いた .

3 - 4 . 3 種類の化学物質で共通する発現変動遺伝子の探索

Slc:Wistar/ST 胎生 **18** 日齢ラット大脳皮質より調製した神経細胞に播種後 **1** 日目から **100 nM** メチル水銀 , **10 nM** トリブチルスズ , **30 μM** アクリルアミドを曝露し , 培養 **10** 日目に回収した **mRNA** を用いて **RNA-Seq** を行った .

4 . 研究成果

4 - 1 . NRF-1 活性を簡便に評価できるレポーター細胞 (N-Rep 細胞) の作製と活性評価系構築

安定発現させた **N-Rep** 細胞と一過性発現発現させた **N-Rep** 細胞を比較したところ , 安定発現株には内部標準遺伝子として導入したウミシイタケルシフェラーゼの発現量が多すぎるなどの問題があったため , 一過性発現系を用いて **NRF-1** 活性評価系を構築することにした . **24** ウェルプレートで培養したマウス神経芽細胞腫 **Neuro2a** 細胞に , 作製したレポータープラスミドを用いて野生型 **NRF-1** またはドミナントネガティブ **NRF-1** を発現させた . その結果 , **NRF-1** の活性に応じて , ホタルルシフェラーゼ由来の発光や **EGFP** 由来の蛍光が変化することが明らかとなった .

4 - 2 . N-Rep 細胞を用いた各種化学物質による NRF-1 活性と細胞死の時間関係評価

構築したプラスミドでは **EGFP** の蛍光をレポーターとして **NRF-1** 活性をモニターできるため , 他の蛍光との同時検出も可能である . そこで , 核染色剤と死細胞染色色素により今日染色を行い , **NRF-1** 活性 (蛍光活性) と **PI** 陽性率の同時測定を行った . 既知の **NRF-1** 阻害物質である **TBT** を曝露し **NRF-1** 活性 (蛍光活性) と **PI** 陽性率の用量反応曲線を作成した . その結果本評価系においても , これまでにわれわれが報告しているのと同様に , **TBT** 曝露で細胞死が起こらない濃度から **NRF-1** 活性低下が確認された .

さまざまな化学物質の **NRF-1** 活性低下と細胞死の時間関係を調べるため , **High Content Screening** 装置である **Opera Phenix (Perkin Elmer)** を用いて実験を行った . **Opera Phenix** 用に最適化された条件を用いて , われわれが見出したラット初代神経細胞において **GluA2** 発現減少を引き起こす化学物質の中から **NRF-1** 活性低下物質を探索した . その結果 , メトキシクロル , **PCP** , ファモキサドンの **3** 化合物の曝露において , 細胞死が起こらない濃度から **NRF-1** 活性低下が確認された . 一方 , **PFOS** のように **NRF-1** 活性低下が細胞死と同時に起きる物質も認められた .

4 - 3 . NRF-1 活性低下と神経突起伸長のアッセイ自動化に関する検討

Neuro2A の分化誘導条件の検討などに手間取り , 神経突起の自動認識も困難を極めたため , **NRF-1** , 生細胞 , 神経突起 3 者の自動定量化には至らなかった . 今後も検討を重ねていく予定である .

4 - 4 . 3 種類の化学物質で共通する発現変動遺伝子の探索

NRF-1 のような神経細胞死の前段階で変化する新たな毒性指標を探索するため , **100 nM** メチル水銀 , **10 nM** トリブチルスズ , **30 μM** アクリルアミドの **3** 種類に共通して変動する遺伝子の探索を試みた . これら **3** 種類の刺激は神経細胞死が起こり始める濃度の少し手前で , 同程度の刺激であることを確認した . 現在 **RNA-Seq** データを解析中であるが , 共通して発現変動している遺伝子として数十種類が候補になっている . 今後これらを精査して , **NRF-1** に続く新たな毒性指標の候補が見出されることが期待される .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Koya, Sanoh Seigo, Ishida Yuji, Tateno Chise, Ohta Shigeru, Kotake Yaichiro	4. 巻 47
2. 論文標題 Assessment of metabolic activation of felbamate in chimeric mice with humanized liver in combination with in vitro metabolic assays	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 277 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.47.277	査読の有無 有
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 Umeda-Miyara Kanae, Miyara Masatsugu, Sanoh Seigo, Kotake Yaichiro	4. 巻 172
2. 論文標題 Trehalose decreases mRNA and protein expressions of c-Jun and JunB in human cervical cancer HeLa cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 177 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac051	査読の有無 有
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 Mizutare Tohru, Sanoh Seigo, Kanazu Takushi, Ohta Shigeru, Kotake Yaichiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Improved Predictability of Hepatic Clearance with Optimal pH for Acyl-Glucuronidation in Liver Microsomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 3165 ~ 3173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2022.08.015	査読の有無 有
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 Imado Eiji, Sun Samnang, Abawa Abrar Rizal, Tahara Takeru, Kochi Takahiro, Huynh Tran Ngoc Bao, Asano Satoshi, Hasebe Shigeru, Nakamura Yoki, Hisaoka-Nakashima Kazue, Kotake Yaichiro, Irifune Masahiro, Tsuga Kazuhiro, Takuma Kazuhiro, Morioka Norimitsu, Kiguchi Norikazu, Ago Yukio	4. 巻 160
2. 論文標題 Prenatal exposure to valproic acid causes allodynia associated with spinal microglial activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105415 ~ 105415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2022.105415	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Ishida Keishi, Takeda Kazuki, Takehara Yuki, Takabayashi Tomoki, Miyara Masatsugu, Sanoh Seigo, Kawai Hidehiko, Ohta Shigeru, Kotake Yaichiro	4. 巻 46
2. 論文標題 Methylmercury Decreases AMPA Receptor Subunit GluA2 Levels in Cultured Rat Cortical Neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 292 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00744	査読の有無 有
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 Ohtsuki Yuya, Sanoh Seigo, Yamao Mikaru, Kojima Yuha, Kotake Yaichiro, Tateno Chise	4. 巻 48
2. 論文標題 Establishment of hyperoxic cell culture system for predicting drug-induced liver injury: reducing accumulated lipids in hepatocytes derived from chimeric mice with humanized liver	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 99 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.48.99	査読の有無 有
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 Hatano Misaki, Hatamiya Shunichi, Miyara Masatsugu, Kotake Yaichiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Tributyltin activates the Keap1-Nrf2 pathway via a macroautophagy-independent reduction in Keap1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 161 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.48.161	査読の有無 有
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 Hatamiya S, Miyara M, Kotake Y	4. 巻 592
2. 論文標題 Tributyltin inhibits autophagy by decreasing lysosomal acidity in SH-SY5Y cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 31-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.118	査読の有無 有
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 Kidoguchi Naohiro, Ishida Keishi, Sanoh Seigo, Miyara Masatsugu, Kotake Yaichiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Triphenyltin inhibits GA-binding protein nuclear translocation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 33 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.7.33	査読の有無 有
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 Sanoh Seigo, Hanada Hideki, Kashiwagi Keiko, Mori Tsukasa, Goto-Inoue Naoko, Suzuki Ken-ichi T., Mori Junpei, Nakamura Naoki, Yamamoto Takashi, Kitamura Shigeyuki, Kotake Yaichiro, Sugihara Kazumi, Ohta Shigeru, Kashiwagi Akihiko	4. 巻 228
2. 論文標題 Amiodarone bioconcentration and suppression of metamorphosis in Xenopus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquatic Toxicology	6. 最初と最後の頁 105623 ~ 105623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquatox.2020.105623	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤原 涼雅、宮良 政嗣、竹原 有希、高林 智樹、山本 佑樹、田原 栄俊、古武 弥一郎
2. 発表標題 発達神経毒性物質に共通する発現変動遺伝子の探索
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古武 弥一郎
2. 発表標題 有機スズの転写因子活性低下を介したシグナルトキシコロジー
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
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
研究 分担者	佐能 正剛 (Sanoh Seigo) (00552267)	和歌山県立医科大学・薬学部・准教授 (24701)	
研究 分担者	宮良 政嗣 (Miyara Masatsugu) (60816346)	広島大学・医系科学研究科(薬)・助教 (15401)	

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
---------	---------