

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23125

研究課題名（和文）ネオニコチノイド曝露によるヒト胎児の神経発達と血液脳関門への影響評価

研究課題名（英文）The effects of neonicotinoid on neural differentiation and blood brain barrier

研究代表者

藤原 悠基 (Fujiwara, Yuki)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20881220

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：農薬として使用されているネオニコチノイドは昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に選択的に作用するが、ヒトnAChRにも影響を及ぼす可能性が指摘されている。nAChRは神経分化に重要であり、ニコチンを用いた研究においても神経前駆細胞から神経系細胞に分化する際のnAChRを介する影響が報告されている。本研究ではヒト胎児脳由来神経前駆細胞株を用いた神経系分化に対するネオニコチノイドの曝露影響を検証した。その結果、分化開始から3日目の間に神経前駆細胞から神経系への分化にネオニコチノイドが影響を及ぼす可能性は低いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、農薬として主に使用されるネオニコチノイド類曝露によるヒト神経発達への毒性評価を行ったもので、ネオニコチノイド類の有効活用を行うために必須である閾値の明確にするための一助となる重要な基礎データである。

研究成果の概要（英文）：Neonicotinoids are chemicals used as pesticides because they are selectively toxic to the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in insects. However, it may also affect the human nAChR, which is important for neuronal differentiation. Therefore, I examined the effects of neonicotinoid exposure on neurodevelopment and differentiation using Rencell VM cells, a human fetal midbrain-derived neural progenitor cell line. The results of RT-PCR and immunostaining showed no significant difference in both β -tubulin and GFAP in the neonicotinoid-exposed group compared to the control group. These results suggest that neonicotinoids are unlikely to affect the differentiation of neural progenitor cells into neural cells.

研究分野：神経発達毒性学

キーワード：脳発達 農薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

農薬として使用されているネオニコチノイドは昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に選択的に作用するが、ヒト nAChR にも影響を及ぼす可能性が指摘されている。nAChR は神経分化に重要であり、ニコチンを用いた研究においても神経前駆細胞から神経系細胞に分化する際の nAChR を介する影響が報告されている。そこで、本研究では胎児期におけるネオニコチノイド曝露による神経発達障害に注目し、ヒト胎児脳由来神経前駆細胞株を用いた神経系分化及び血液脳関門に対するネオニコチノイドの曝露影響を検証する必要がある。

(1) 神経分化に対する影響

ニコチンを用いた研究では、神経前駆細胞からニューロン・グリア細胞に分化する際、nAChR を介するニコチンの影響が報告されている(Takarada T et al., PLoS One. 2012)。さらに、新生仔ラットの脳培養細胞において、ネオニコチノイド曝露によりニコチンと類似した神経機能への作用が明らかにされた(Kimura-Kuroda et al., J. PLoS One 2012)。以上から、ヒトを含めた哺乳動物でも nAChR を介した神経分化・機能への影響が懸念されるが、ヒトの神経分化・機能に対する影響は明らかではないため検証する必要がある。

(2) 血液脳関門(BBB)に対する影響

BBB に対するネオニコチノイドの影響に関して評価した論文は報告が少なく明らかでない。ダイオキシンを始めとする神経毒性化学物質が神経系細胞に直接作用するのみならず、BBB 機能を攪乱することにより間接的に中枢神経系の発達・機能に影響をおよぼす可能性を示されている (Miyazaki W, Fujiwara Y et al., Neurotoxicology.2016)。よって、血液脳関門再構成キットを用いて、ネオニコチノイドによる BBB の構築・機能への影響について検証する必要がある。

2. 研究の目的

ネオニコチノイドの周産期曝露による胎児脳神経系の発達、発育への影響とその機序を明らかにすることを旨とする。本研究では、周産期における中枢神経系へのネオニコチノイドの影響について、下記の2点を中心に検証する。

(1) ヒト胎児由来神経系前駆細胞株を用いた神経分化への影響

(2) BBB モデルを用いた BBB 透過性ならびに機能への影響

3. 研究の方法

(1) ネオニコチノイド類曝露による神経分化比率への影響

ヒト胎児腹側中脳由来神経前駆細胞株(ReNcell VM (Merck Millipore 社):ニューロン・アストロサイト・オリゴデンドロサイトへの分化能を持つ)を用いて、神経分化におけるネオニコチノイド(アセタミプリド、イミダクロプリド、ジノテフラン)の影響を ReNcell VM 細胞の神経分化に重要な時期とされる、分化開始から3日目まで各種ネオニコチノイドの曝露を行い、各種神経系マーカーを用いてリアルタイム PCR 法及び免疫組織化学染色法を用いて解析する。また、細胞毒性試験を行うことで各種ネオニコチノイドの ReNcell VM 細胞に対する毒性評価を行う。

(2) BBB モデルを用いた BBB 透過性ならびに機能への影響

ウシ細胞を用いた研究においてニコチンが BBB を構成するタイトジャンクションのたんぱく質に影響を及ぼすことが報告されている(Abbruscato TJ et al., J pharm Sci. 2002)。ネオニコチノイドにおいても同様の影響が現れる可能性がある。よって、BBB 試験管内再構成モデルを用いて脳

内移行検定を行い、ネオニコチノイドのBBB透過性を検証する。また、BBBのバリア機能について、透過抵抗値並びにタイトジャンクションタンパク発現を確認し、BBB機構への影響を検証する。

4. 研究成果

(1) ネオニコチノイド類曝露による神経分化比率への影響

ReNcell VM細胞に対する細胞毒性評価を行うため、未分化維持培地(+bFGF, EGF)から分化培地に変更する際にネオニコチノイド(アセタミプリド:ACE、ジノテフラン:DIN、イミダクロプリド:IMI)をそれぞれ 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} Mの濃度で曝露を行った。3日目において細胞毒性試験を行った(図1)。その結果、コントロール群と比較して各種ネオニコチノイドの低濃度曝露群において細胞数の増加傾向を認めたが、有意な差は得られなかった。また、ACE高濃度曝露群において細胞数の減少傾向を認めたが、有意な差は得られなかった。以上の結果から今回のネオニコチノイド曝露濃度では細胞毒性は認めない結果となった(図2)。

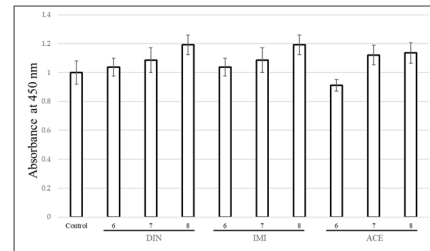
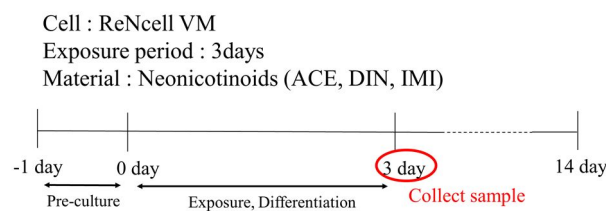


図1. 研究方法

図2. 細胞毒性試験結果

神経分化に対する各種ネオニコチノイドの影響を評価するため、細胞毒性試験と同様のプロトコルを用いて分化及び各種ネオニコチノイド曝露開始から3日目において、totalRNAを抽出しRT-PCR法を用いて、各種神経系分化マーカーである β -tubulin, MAP2(ニューロン), GFAP(アストロサイト), DCX(神経幹細胞マーカー)を用いて神経分化比率に影響がないか検証を行った。また、ネオニコチノイドがニコチン様化学物質であるためポジティブコントロールとしてニコチン(10^{-6} M)を用いた。その結果、ACE 10^{-6} M曝露群においてDCXがコントロール群と比較して有意に増加する結果が得られたが、ACE 10^{-6} M曝露群は β -tubulinおよびGFAPに対しては影響を与える結果は得られなかった。また、DIN、IMI曝露群については有意な変化は得られなかった。

mRNAレベルでは影響を認めないこと結果が得られたが、細胞形態を確認しネオニコチノイドによる曝露影響がないか確認するため、細胞毒性試験と同様のプロトコルを用いて3日間培養を行い、3日目に β -tubulinおよびGFAP抗体を用いて免疫組織化学染色を行い検証した。その結果、コントロール群と比較して各種ネオニコチノイド曝露群では β -tubulin陽性の細胞数の有意な変化は得られなかった。しかし、本研究は分化過程(ReNcell VM細胞は7日目に成熟するとされる)であるため、7日目や14日目で評価を行った際に神経突起の伸長に差を認める可能性はありより詳細に検討を進めていく必要がある。

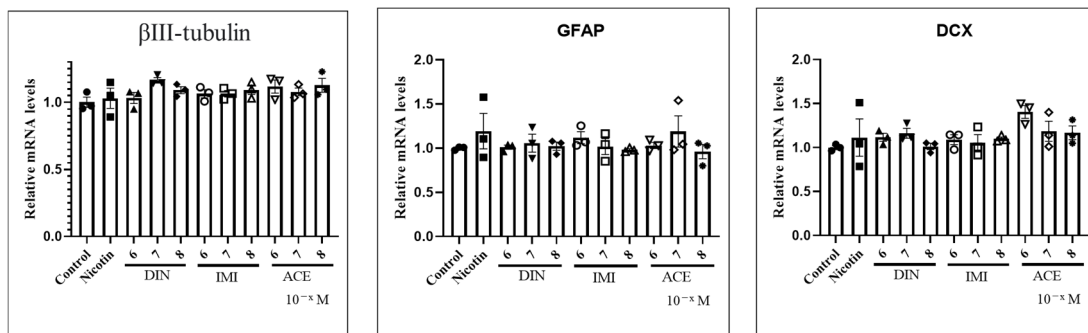


図3. 神経分化マーカーを用いたRT-PCR法の結果

(2) BBBモデルを用いたBBB透過性ならびに機能への影響

BBBへの毒性評価を行うため、ラット由来である血液脳関門in vitro再構成キット(ファーマコセル社)を用いて検討を行った。BBBが構成される培養4日目からネオニコチノイド(ACE, IMI, DIN)を 10^{-5} Mの濃度で24時間曝露を行った。その際に経皮内電気抵抗(TEER)を曝露から6時間後、12時間後、24時間後に測定することでBBBの機能が維持されているか、検証を行った。

その結果、すべてのネオニコチノイド曝露群はコントロール群と比較して TEER は有意な変化は示されなかった。しかし、成熟した BBB に対して影響は認めなかったが未成熟である BBB に対してネオニコチノイド曝露されることにより BBB の発達が阻害されその機能に影響を与える可能性があるため、さらに詳細に検討を行っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原 悠基, 宮崎 航, 鯉淵 典之
2. 発表標題 ヒト胎児脳由来神経前駆細胞を用いた神経分化に対するネオニコチノイド曝露の影響
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022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
---------	---------