

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年5月28日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21671002

研究課題名（和文）

定量的行動試験をもとにした顕微鏡解析による発達神経毒性の分子標的の同定

研究課題名（英文） Microscopic analysis based on the quantitative behavioral tests in rodents for identification of the molecular target of developmental neurotoxicity

研究代表者

掛山 正心 (KAKEYAMA Masaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授

研究者番号：30353535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）79,200,000円、（間接経費）23,670,000円

研究成果の概要（和文）：化学物質の曝露影響のなかでも、母体にはなんら影響が顕われない極めて低用量の曝露が脳発達に及ぼす影響をターゲットとして、定量的行動試験をもとにした顕微鏡解析により、毒性の有無と分子標的の同定を目指した。ダイオキシン等の環境化学物質の胎仔期低用量曝露が皮質-皮質下機能アンバランスを引き起こし、認知学習から社会性行動、問題行動に至る行動異常を表出することを明らかにし、その分子標的候補を同定した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to develop the microscopic analysis methodology, and identify the molecular marker for developmental neurotoxicity of environmental chemicals. We found that perinatal exposure to a low dose of dioxin induces abnormal behaviors, including behavioral inflexibility, compulsive repetitive behavior, and low social dominance in mice. Immunohistochemical analysis validated that hypoactivation of the medial prefrontal cortex (mPFC) and hyperactivation of the amygdala are the potential biological basis for these behavioral abnormalities.

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：有害化学物質、神経科学、解剖学、行動学、環境政策

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

化学物質は人間の活動や発展を支え、生活に欠かすことのできないものである。しかしその有用性にもかかわらず、適切な管理がなされないケースではヒトの健康や環境に有害な影響を及ぼすため、化学物質曝露による健康リスク評価が必要になる。健康リスク評価はこれまで、ヒトにおける知見とともに、実験動物を用いた毒性試験において、致死性、催奇形性、発がん性をはじめ様々な毒性エンドポイントをもとに評価されてきた。しかし近年、半致死量の数十分の一～数百分の一という、母体にはなんら影響が顕われない極めて低用量の曝露であっても、その化学物質が胎盤・母乳経路で移行し、子どもの脳発達に影響を及ぼしうることが疫学調査等や動物実験により繰り返し示唆され、曝露影響の中で発達神経毒性がとりわけ注目されるようになってきた。

特に「先進」国においては、「じっとしていられない」、「キレやすい」といった子どもの情動異常の増加、うつ病など精神疾患の増加、自殺の増加などが社会的問題となっている。このような「こころ」の発達の問題の増加に有害化学物質の曝露が関わっている可能性は、環境科学分野だけでなく精神医学分野からも指摘されている。

子どもの「こころ」の健全な発達は万人の願いであり、化学物質曝露との因果関係の解明、影響の程度の科学的評価は、緊急かつ極めて重要な課題である。しかし「こころ」の問題は評価が難しく、発達神経毒性全般において、動物毒性試験の結果がリスク評価の根拠データとなるケースは極めて少ない。わずかに例があるのは病理組織学的検査の結果であるが、重度の精神症状・行動異常を示す統合失調症等のヒト患者において病理組織学的な異常を見出すのが困難な現状を考えると、病理学的検査の高精度化に加えて、行動異常そのものを捉える行動試験をもとにした影響評価が進むことが望ましいと言えよう。

しかし、OECD テストガイドライン等の標準化されたものは実験者による目視観察が主体であり、試験結果に定量性が伴わないものが多い。大学等の研究機関で行われる場合でも、行動試験に特化した研究室・研究者によるケースが多く、遺伝子や蛋白発現といった生化学的解析による科学的裏付けが伴わないことが多く、また別の研究機関では行動試験そのものが再現できないこともしばしばである。結果的に行動試験成績の意味や影響の度合いがわかりにくいまま、リスク評価の際にはひとまとめに「学習成績低下」と表現されることが多く、心の問題に踏み込んだ議論がなされていないのが現状といえる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、定量性・再現性の極めて高い行動試験を出発点として、新たな顕微鏡解析により行動変化に伴う分子イベントを解析する。これにより、行動と分子イベントの間の空間的、時間的隔たりによる現象解明の困難性を打開し、「ネズミの行動変化がヒトの場合、どのような意味を持つのか」を科学的に説明できるよう、化学物質曝露と「こころ」の問題の因果関係を明らかにすることを目的とする。具体的には、(1)行動変化に伴う分子イベントの解析により、行動試験の成績を解釈するための科学的情報を提供するとともに、個体レベルの影響に直結した「影響の質と程度を示す」分子マーカーを見出す。(2)影響が顕れる時期と場所（細胞）を特定することで、従来よりも鋭敏に毒性影響を検出する。(3)発達時系列をおった顕微鏡解析により、曝露時期と影響の発現時期との間を埋め、曝露と影響の因果関係を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

研究は、行動イベントの担当領域を同定し分子標的の探索を進める「成熟期脳解析」、曝露を行っている胎仔期・授乳期における解析を進める「胎仔期・授乳期脳解析」、そして両者をつなげる「発達時系列脳解析」という三つの戦略をとった。

行動試験は既に関済済のものを用い、また脳組織切片の遺伝子発現解析のための蛍光LMD法も独自に確立したものを出発点としている（さらに本研究内で改善が進み、実験法としても大きく進展させることができた）。

分子標的の探索・同定はLMD-定量的PCR法を基本として、マイクロアレイ解析、蛋白定量も加え、異なる発達ステージ、異なる化学物質曝露での比較により候補を絞り込んだ。さらに、培養細胞系やヒト血液サンプルといった異質のサンプル間での比較も行うことで、毒性分子標的としての普遍性を担保する戦略をとった。

4. 研究成果

(1) 前頭皮質の重要性発見とその分子標的の探索

本研究開始前に、R. Morris 教授（エジンバラ大）との共同研究により、これまでヒトやサルを用いなければ難しいとされていた、獲得済みの知識を利用した対連合学習（スキーマ依存性学習）をラットで実現し（Tse et al. Science 2007）、低用量のダイオキシンやメチル水銀曝露により、短期・長期記憶には影響がない低用量であってもスキーマ依存性学習が阻害されること、すなわち皮質機能が障害される予備知見を得ていた。本研究では、

この化学物質影響の追加実験を行い、確定的知見として論文報告した (Arc Toxicol 2013) (同成果は、NHK ニュース等にて報道)。

また、R. Morris 教授と共同で、スキーマ依存性学習における前頭全皮質の働きを明らかにした (Science 2011)。さらに蛍光 LMD 法 (トピック (3) 参照) を用い、スキーマ依存性学習で障害が見られたダイオキシン曝露ラットの頭葉から arc 陽性細胞を回収し遺伝子発現解析を行った。arc mRNA の発現が高いことを確認し、加えて、グルタミン酸受容体サブユニット等、発現異常を示す複数の遺伝子を同定した (トピック (6) 参照)。

(2) 「皮質-皮質下機能のアンバランス」の発見

最初に、母体経由でダイオキシン曝露を受けたマウスにおいて、皮質下機能依存性の恐怖記憶の障害があることを明らかにした (Neurotoxicol. 2010)。次にスキーマ依存性学習をマウスで再現すべく、全自動集団型行動試験装置 IntelliCage を用いたマウス行動課題を確立した (Behav. Brain Res. 2011)。同試験により、ダイオキシン曝露マウスでは行動柔軟性 (頭の柔らかさ) が低下していることを見出した (図 1)。

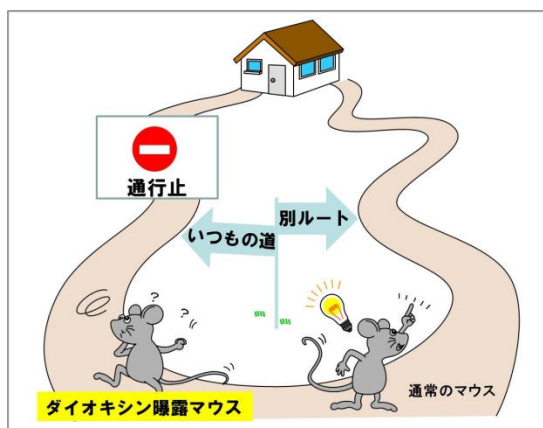


図 1. ダイオキシン曝露マウスの行動柔軟性低下を示す図。

行動柔軟性が問われる場面では、認知学習能力が問われるだけでなく、イライラする、不安になるなど心の問題も表出しやすい。そこで本研究において情動行動を詳細に解析したところ、ダイオキシン曝露マウスは、課題遂行中に報酬に対して執着し無駄な行動を繰り返さず固執の行動があること、さらに複数のマウスで飼育された社会的場面に特異的に、「ひっこみじあんになる」(社会的劣位性を示す) ことを見出した (図 2)。加えて arc 等の免疫組織解析により、前頭皮質では神経活動が過多に、扁桃体では活動が低下しているという「皮質-皮質下機能アンバランス」が生じ

ていることを見出した。以上の知見は、環境化学物質の胎仔期低用量曝露が皮質-皮質下機能アンバランスを引き起こし、認知学習から社会性行動、問題行動に至る行動異常を表出することを示している。化学物質とメンタル・ヘルスの関係を動物実験で科学的証拠とともに示す初めての報告となった。ヒトが環境中から受けうるレベルのごく低用量の曝露で見られた影響でもあり、社会医学、精神医学、神経科学において、インパクトの非常に高い成果と言えるだろう (PONE2011) (共同通信ニュース、ナショナルジオグラフィックニュース等にて報道)。

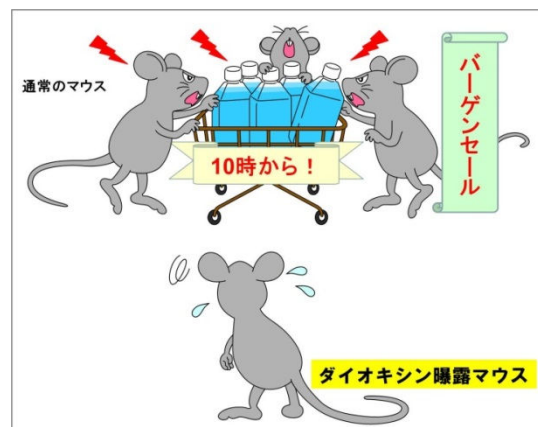


図 2. ダイオキシン曝露マウスの社会行動異常を示す図。

(3) 蛍光 LMD 法の精度向上

本研究では、独自に開発を進めてきた蛍光 LMD 法 (蛍光顕微鏡下で組織切片から任意の微小領域・細胞をレーザーで切断・回収し、遺伝子発現解析を行う) の検出感度を向上させ、さらにマイクロアレイに適用し標的分子の探索と同定を目指している。これまでに、組織切片からの細胞 10 個程度の試料から、安定的に遺伝子発現定量することに成功した。この手法は毒性実験だけでなくライフサイエンス全般において価値の高いものなので、領域特異的遺伝子の発現量を絶対定量することで方法論の検証を行った (Sci Rep 2011) (日刊工業新聞等にて報道) (図 3)。

(4) 発達脳解析による標的分子の探索

標的分子の探索では、最初に LMD 法によらず、従来のリセクション法 (裸眼による外科的領域分け) により、大脳皮質、海馬、嗅球等の領域毎にマイクロアレイ解析のデータを収集した。そのデータをもとに、LMD 法により、例えば海馬 CA1 錐体細胞層と DG 顆粒細胞層など、従来法では不可能だった小領域毎に、また IUE 法で可視化された神経細胞特異的に定量的検証を進めている。これまでにダイオ



図 3. レーザーで切り抜き回収された組織断片の例。神経細胞を緑色蛍光色素で標識してある。研究者の思い通りの形で組織断片を切り抜くことができ、なおかつ、回収された組織にレーザー光のダメージが無いことを示している。

キシシン曝露により 20 を超える遺伝子発現が変動することを LMD 法により定量的に確認した。

(5) 候補分子からの同定作業 1 (ダイオキシン受容体関連遺伝子群)

上記の探索作業で得られた候補分子の情報から、「毒性の分子標的」の同定作業を進めた。まず、ニューロン初代培養細胞系の解析から、ダイオキシン受容体 ahr やその関連遺伝子は、ダイオキシンだけでなく、作用メカニズムが全く異なるはずのメチル水銀でも発現変動している知見を得た。さらに、ダイオキシン曝露によるそれらの発現変動部位から、ahr やその関連遺伝子は、社会行動制御そのものに関わる可能性が考えられた。そこで同遺伝子群のヒト遺伝子多型を調べたところ、コミュニケーション能力と強い相関がある多型部位を見出した。本研究の目的と離れるのでこれ以上のメカニズム解析は行わないが、これら遺伝子多型と機能的表現型との相関は一切報告がなく、初めての知見である。

(6) 候補分子からの同定作業 2 (ストレス応答系)

マイクロアレイ・データのパスウェイ解析の結果、海馬において、グルココルチコイド代謝系遺伝子の変動が著しいという知見を得た。そこで曝露動物のコルチコステロン系を精査したところ、ダイオキシン曝露マウスではコルチコステロンの恒常的血液中濃度が低下していること、海馬垂領域におけるグルココルチコイド受容体 GR mRNA レベルが低下し代謝酵素 hsd11b2 mRNA レベルが増加していることを定量的に確認した。さらに成熟マウスではストレス負荷行動試験における反応性

に異常があることも確認した。トピック (1) で見出されたストレス応答系に関与する候補分子について発達時系列解析を行った結果、生後 21 日目の曝露マウスの脳でも発現変動を認めた。同遺伝子は脳形成に関与することも明らかとなった。

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 12 件)

1. Takeyama M, Endo T, Zang Y, Miyazaki Y, Tohyama C, 2013, Disruption of paired-associate learning in rat offspring perinatally exposed to dioxins. *Archives of Toxicology* 88:789-98. 査読有. doi: 10.1007/s00204-013-1161-y. (NHK ニュース 2012 年 12/8、マイナビニュース 2012 年 12/10 等にて報道)
2. Doi H, Nishitani S, Fujisawa TX, Nagai T, Takeyama M, Maeda T, Shinohara K, 2013, Prenatal exposure to a polychlorinated biphenyl (PCB) congener influences fixation duration on biological motion at 4-months-old: a preliminary study. *PLoS One* 8:e59196. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0059196.
3. Endo T, Takeyama M (責任著者), Uemura Y, Haijima A, Okuno H, Bito H, Tohyama C, 2012, Executive function deficits and social-behavioral abnormality in mice exposed to a low dose of dioxin in utero and via lactation. *PLoS One* 7:e50741. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0050741. (2013 年 12/13 共同通信ニュース、東京新聞、信濃毎日新聞他、12/14 東奥日報、熊本日日新聞、長崎新聞、ヤフーニュース・ヘッドライン他、12/18 日刊工業新聞他、12/20 ナショナル・ジオグラフィック・ニュース他報道)
4. Yoshioka W, Endo N, Kurashige A, Haijima A, Endo T, Shibata T, Nishiyama R, Takeyama M (責任著者), Tohyama C, 2012, Fluorescence laser microdissection reveals a distinct pattern of gene activation in the mouse hippocampal region. *Scientific Reports* 2:783. 査読有. doi: 10.1038/srep00783 (2012 年 10/31 日刊工業新聞、11/2 ヤフーニュース・ヘッドライン他報道)
5. Tse D, Takeuchi T, Takeyama M, Kajii Y, Okuno H, Tohyama C, Bito H, Morris RG, 2011, Schema-dependent gene

activation and memory encoding in neocortex. *Science* 333:891-895 査読有. doi: 10.1126/science.1205274.

(Science Express に掲載)

6. Endo T, Maekawa F, Vöikar V, Haijima A, Uemura Y, Zhang Y, Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K, Wolfer DP, Yada T, Tohyama C, Lipp HP, Takeyama M (責任著者), 2011, Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behavioural Brain Research* 221:172-181. 査読有. doi: 10.1016/j.bbr.2011.02.037.

[学会発表] (計 28 件)

1. 掛山正心、「環境毒性：低用量の環境汚染物質への曝露の影響をどのように評価するか」日本毒性学会第 14 回生涯教育講習会、2013 年 6 月 16 日、幕張メッセ (千葉県) (招待)
2. 掛山正心「げっ歯類を用いた高次脳機能評価法開発と環境化学物質の神経毒性評価への適用」第 83 回日本衛生学会学術総会、2013 年 3 月 26 日、金沢大学、(日本衛生学会奨励賞受賞者講演) (招待)
3. 掛山正心他「乳仔期環境とマウス社会性：ダイオキシン胎仔期曝露影響との共通性」第 83 回日本衛生学会学術総会、2013 年 3 月 25 日、金沢大学 (招待)
4. 掛山正心、「高次脳機能評価系としてのラット・マウス行動テストのイノベーション」第 24 回日本生物学的精神医学会・アボット・ジャパン共催ランチョンセミナー、2012 年 9 月 30 日、神戸国際会議場 (招待)
5. 掛山正心他「認知・行動毒性学：マウスにおける認知機能と社会行動の定量化」第 39 回日本毒性学会、2012 年 7 月 17 日、仙台国際会議場 (招待)
6. Takeyama M, Endo T, Effects of maternal chemical exposure on social anxiety and learning”, Workshop on Neurobehavioral Mechanisms of Affiliative Behavior and Cooperation:Prospects for Translational Advances for Psychiatric Disorders, “. 2011 年 10 月 23 日, Atlanta (招待、Endo T が代理講演)
7. 掛山正心、「実験動物高次脳機能評価法の今後の展開」第 13 回日本環境ホルモン学会・特別シンポジウム、2010 年 12 月 16 日、東京大学 (招待)

[図書] (計 1 件)

1. 掛山正心、「3.6 節 高次脳機能の行動試験法」、熊谷嘉人・姫野誠一郎・渡辺知保編著、毒性の科学：分子・細胞から人間集団まで、東京大学出版会 2013 年、4 項.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/physlgy2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

掛山 正心 (KAKEYAMA Masaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・准教授

研究者番号：30353535

(2) 研究分担者

該当なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし