

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：23701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21332

研究課題名（和文）神経分化トレーサーマウスを用いた発達神経毒性におけるグリア細胞の影響評価

研究課題名（英文）Evaluation of glial cells in developmental neurotoxicity using neural differentiation tracer mice

研究代表者

石田 慶士（Ishida, Keishi）

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90908310

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では独自に作製したレポータートランスジェニック（Syn-Rep）マウスを用いて、化学物質による発達神経毒性（DNT）におけるグリア細胞の関与を明らかにすることを目的とした。Syn-Repマウスの母体にDNTの陽性対照物質であるバルプロ酸を投与したところ、児動物脳のレポーター発現量に変化が認められたことから、本マウスのDNT評価ツールとしての有用性が確認された。また、母体免疫活性化モデルにおいても児動物脳のレポーター発現変化と活性化したグリア細胞の形態が観察されたことから、Syn-Repマウスが化学物質によるグリア細胞を介した神経発達影響を検出できる可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、グリア細胞に特化したin vitro DNT試験法の開発が国際的に求められているが、グリア細胞とDNTの關係に不明な点が多いため現状その開発はほとんど進んでいない。Syn-Repマウスを用いてDNTとグリア細胞の關係を効率的に検討することで、グリア細胞特有のDNTマーカーの同定が可能になるとともに、グリア細胞をベースにしたin vitro DNT試験系の構築に多大な貢献ができると期待される。

研究成果の概要（英文）：In the current study, we investigated the relationship between chemicals-induced developmental neurotoxicity (DNT) and glial cells using reporter transgenic mice (Syn-Rep mice), which we have originally generated. The reporter gene expression was changed in the brain of Syn-Rep mice pups, which was prenatally treated with valproate, a DNT reference chemical. This result suggests that the Syn-Rep mice are potentially useful tools for detection of chemical-induced DNT. In the maternal immune activation model, the changes in the reporter gene expression and morphologies of the glial activation were detected in the brain of Syn-Rep mice pups. These results suggest that the Syn-Rep mice can detect the effects of chemicals on neuronal development via glial cells.

研究分野：発達神経毒性学

キーワード：in vivoイメージング レポータートランスジェニックマウス 発達神経毒性 グリア細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、自閉スペクトラム症 (ASD)、注意欠如多動症 (ADHD) などの神経発達症をもつ子供の増加が社会問題となっており、その原因の1つとして化学物質の脳の発達に対する影響、すなわち発達神経毒性 (developmental neurotoxicity: DNT) が懸念されている。そのため化学物質の DNT を正確に評価し、そのリスクを理解することは極めて重要である。これまでも個々の化学物質に対して DNT 研究が行われてきたが、*in vivo* における十分な知見は得られておらず全貌解明には至っていない。脳神経ネットワークの構築は非常に複雑であり、神経細胞の分化にはグリア細胞の役割が必要不可欠であるが、DNT とグリア細胞の関係についても不明な点が多い。

神経細胞の分化にはグリア細胞の役割が必須であるため、DNT メカニズムを明らかにするためにも、神経細胞分化異常が認められる時期におけるグリア細胞の解析が必要不可欠であると考えられる。一方、従来のアプローチで DNT の経時的な解析を行うためには胎生期から成熟期に至るまでの各発達ステージにおいて、その都度解剖して組織学的解析を行う必要があり、そのような解析を個々の化学物質に対して行うのは非現実的であった。DNT を誘発する化学物質のグリア細胞への影響を明らかにするためには、DNT を *in vivo* で効率的に検出できる新しい評価ツールの開発が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記 *in vivo* DNT 評価の解析上の問題点を解決するために、独自に作製した神経細胞のシナプス構成タンパク質シナプシン1のプロモーター制御下でルシフェラーゼ (Luc) を発現するレポータートランスジェニック (Syn-Rep) マウスの *in vivo* DNT 評価ツールとしての有用性を検証した。さらに、Syn-Rep マウスを用いて化学物質による神経発達への影響を生きたまま「可視化」することで、DNT 誘発化学物質によるグリア細胞を介した神経分化阻害メカニズムを明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 薬物の投与

実験には ICR 背景の雄性 Syn-Rep マウスと野生型雌性 ICR マウスを交配することで得られた妊娠マウスを用い、産まれた児動物について解析した。DNT の陽性対照物質であるバルプロ酸ナトリウム (VPA) 投与は ASD 様の症状が惹起される条件下で妊娠母体に腹腔内に単回投与した。母体免疫の活性化 (maternal immune activation: MIA) モデルマウス作製にはウイルス RNA を模倣する合成二本鎖アナログである Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C)) 投与モデルを用いた。Poly(I:C)投与は MIA による ASD 様症状の惹起が報告されている条件下で妊娠母体に腹腔内に単回投与した。

出生後、得られた児動物については、児の成長の不均一性を排除するために OECD ガイドライン (TG426 発達神経毒性試験) に準じて、4日齢において1匹の母体から合計8匹 (雌4匹・雄4匹) となるように間引きを行った。

### (2) *In vivo* イメージング解析

出生後発達期および成熟期において経時的に *in vivo* イメージングを行った。イソフルランガスで麻酔後、D-luciferin 溶液を腹腔内投与し、頭部の発光量を IVIS Lumina II (住商ファーマ) を用いて測定・定量化した。

### (3) *In vitro* ルシフェラーゼアッセイ

前頭前皮質のルシフェラーゼアッセイは、*in vivo* イメージングが終了した成熟期の Syn-Rep マウスから大脳皮質を摘出し、ホモジナイズ緩衝液を加え、ホモジナイズ処理および遠心により上清を回収した。黒色の96穴プレートに上清を添加し、これに D-luciferin 緩衝液を添加後、発光量を IVIS Lumina II を用いて測定をした。

### (4) 脳の組織学的解析

成熟期のマウスをイソフルランガスで麻酔下でのリン酸緩衝液の全身灌流により脱血後、4% パラホルムアルデヒドで組織を固定した。発達期 (離乳前) のマウスはイソフルランガスで安楽死後、全脳を4% パラホルムアルデヒドで固定した。回収した全脳をパラフィン包埋し、厚さ5  $\mu\text{m}$  の冠状切片を作製した。切片をスライドガラスに貼付し、脱パラフィン・水和した。ニッスル染色には0.1%クレシルバイオレット溶液を用いた。免疫組織化学染色には Glial fibrillary acidic protein (GFAP; アストロサイトのマーカー) と Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1; ミクログリアのマーカー) の特異的抗体を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) VPA を用いた DNT 評価における Syn-Rep マウスの有用性検証

まず、VPA を用いて、Syn-Rep マウスの DNT 評価ツールとしての有用性を検証した。VPA はてんかんなどの治療薬に用いられているが、妊娠中の服用により出生児において ASD や精神遅滞といった神経発達症の発症リスクを増大させることが報告されている。さらに VPA はマウスに対しても胎児期曝露により神経発達症様の症状を誘導することから、DNT 陽性対照化学物質として用いられている。そこで、妊娠 Syn-Rep マウスに VPA を曝露し、産まれた児動物の頭部の発光量を発達期から成熟期まで経時的に *in vivo* イメージングで定量解析したところ、Luc 発現量は発達期全体を通して変化が認められた。さらに発達期の特定の時期においては Luc 発現量の変化は特に顕著であった。このことから、Syn-Rep マウスの *in vivo* イメージングにより、VPA 誘導性の DNT を脳の Luc 発現変動として生きたまま検出できることが明らかとなった。

次に、成熟期の脳においてニッスル染色を行い神経細胞の形態を観察したところ、VPA 曝露群では前頭前皮質における神経細胞数が対照群と比較して有意に減少していた。さらに同脳領域における Luc の発現量についても VPA 曝露群では対照群と比較して顕著な変化が認められた。また、頭部の発光量で特に顕著な影響が認められた発達期の特定の時期においても前頭前皮質の組織学的解析を行ったところ、VPA 曝露群では対照群と比較して神経細胞数の有意な減少が認められた。このことから Syn-Rep マウス脳における Luc の発現変動が組織学的影響を反映したものであると考えられた。本検討から、Syn-Rep マウスが DNT 評価ツールとして有効であることが明らかになると共に、Syn-Rep マウスを用いた DNT の解析プロトコルを確立することができた。

## (2) MIA 誘導時の Syn-Rep マウス脳における Luc の発現量とグリア細胞への影響評価

(1) の検討から、VPA モデルにおける Luc 発現変化は神経細胞への直接的な影響を反映している可能性が示唆されたため、次にグリア細胞への作用を介した神経発達影響が報告されている MIA モデルを用いて検討した。妊娠期の感染症等に起因する MIA は児の ASD 発症リスクを上昇させることがヒト疫学調査より報告されており、MIA 誘導性 ASD のメカニズムについては実験動物を用いた研究から母体の炎症性サイトカイン誘導と、それに伴う胎児脳のグリア細胞活性化の関与が報告されている。そこで、胎生期に曝露すると MIA による神経発達症様症状を誘導することが知られている Poly(I:C) を用いて、グリア細胞を介した神経発達への影響を Syn-Rep マウスで検出できるか否かについて検証した。妊娠 Syn-Rep マウスに Poly(I:C) を曝露し、産まれた児動物の発達期における頭部の発光量を経時的に *in vivo* イメージングで定量解析したところ、Luc 発現量は発達期全体を通して変化が認められ、その発現プロファイルは VPA 投与群とは全く異なるものであった。さらに発達期の特定の時期においては Luc 発現量の変化は特に顕著であった。

次に、頭部の発光量で顕著な影響が認められた発達期の特定の時期の脳においてニッスル染色と免疫組織化学染色を行ったところ、神経細胞の形態に顕著な影響は認められなかったものの活性化したアストロサイトとミクログリアの形態が観察された。本検討から、Syn-Rep マウスは MIA に起因するグリア細胞を介した神経発達影響を Syn-Rep マウスの *in vivo* イメージングで生きたまま検出できる可能性が明らかとなった。

## (3) まとめ及び今後の展望

本研究より、独自に作製した Syn-Rep マウスの *in vivo* イメージングは DNT 評価ツールとして有効であることが明らかとなり、神経細胞へ直接的な影響のみならずグリア細胞を介した神経発達影響も検出できる可能性が示唆された。また、VPA モデルと MIA モデルで Syn-Rep マウス頭部の Luc 発現プロファイルが異なっていたことから、被験物質ごとの作用メカニズムの違いも Syn-Rep マウスで捉えることができると考えられた。

近年、グリア細胞に特化した *in vitro* DNT 試験法の開発が国際的に求められているが、エンドポイントとなるグリア細胞特有の有用な DNT マーカーが明確でないことから現状その開発はほとんど進んでいない。今後は Syn-Rep マウスを用いて DNT とグリア細胞の関係を詳細に検討することで、グリア細胞特有の DNT マーカーの同定が可能になるとともに、グリア細胞をベースにした *in vitro* DNT 試験系の構築に多大な貢献ができると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishida Keishi, Tatsumi Kanoko, Minamigawa Yoshiki, Mori Kazuma, Matsumaru Daisuke, Nagase Hisamitsu, Kanda Yasunari, Takuma Kazuhiro, Nakanishi Tsuyoshi	4. 巻 206
2. 論文標題 Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting in vivo developmental neurotoxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115332 ~ 115332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2022.115332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishida Keishi, Matsumaru Daisuke, Shimizu Shinya, Hiromori Youhei, Nagase Hisamitsu, Nakanishi Tsuyoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Evaluation of the Estrogenic Action Potential of Royal Jelly by Genomic Signaling Pathway &lt;i>in Vitro&/i> and &lt;i>in Vivo&/i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1510 ~ 1517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishida Keishi, Furukawa Motoshi, Kunitani Masataka, Yamagiwa Rai, Hiromori Youhei, Matsumaru Daisuke, Hu Jianying, Nagase Hisamitsu, Nakanishi Tsuyoshi	4. 巻 445
2. 論文標題 Novel, highly sensitive, in vivo screening method detects estrogenic activity at low doses of bisphenol A	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hazardous Materials	6. 最初と最後の頁 130461 ~ 130461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhazmat.2022.130461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石田 慶士、南川 祥輝、森 一馬、松丸 大輔、中西 剛
2. 発表標題 新規発達神経毒性評価系開発に向けた神経分化トレーサーマウスの解析
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南川 祥輝、石田 慶士、森 一馬、辰巳 佳乃子、松丸 大輔、田熊 一敬、中西 剛
2. 発表標題 神経分化トレーサーマウスを用いた新規発達神経毒性評価系の有用性検証
3. 学会等名 フォーラム2021： 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辰巳 佳乃子、石田 慶士、南川 祥輝、森 一馬、松丸 大輔、永瀬 久光、諫田 泰成、田熊 一敬、中西 剛
2. 発表標題 発達神経毒性評価の効率化に向けた脳神経分化トレーサーマウスの有用性検証
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 一馬、石田 慶士、南川 祥輝、辰巳 佳乃子、松丸 大輔、村嶋 亜紀、永瀬 久光、諫田 泰成、中西 剛
2. 発表標題 妊娠期甲状腺機能低下モデルにおける児動物脳のイメージング解析
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田 慶士、南川 祥輝、辰巳 佳乃子、森 一馬、松丸 大輔、永瀬 久光、諫田 泰成、田熊 一敞、中西 剛
2. 発表標題 化学物質の発達神経毒性評価の効率化に向けた神経分化トレーサーマウスの有用性検証
3. 学会等名 第68 回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田 慶士、南川 祥輝、辰巳 佳乃子、森 一馬、松丸 大輔、永瀬 久光、諫田 泰成、田熊 一敞、中西 剛
2. 発表標題 発達神経毒性評価の効率化に向けたin vivo神経細胞分化トレーサー系の構築
3. 学会等名 第62回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辰巳 佳乃子、石田 慶士、南川 祥輝、森 一馬、松丸 大輔、永瀬 久光、諫田 泰成、田熊 一敞、中西 剛
2. 発表標題 化学物質の発達神経毒性評価系としての神経分化トレーサーマウスの有用性検証
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田 慶士、辰巳 佳乃子、南川 祥輝、森 一馬、松丸 大輔、村嶋亜紀、永瀬 久光、諫田 泰成、田熊 一敞、中西 剛
2. 発表標題 Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting in vivo developmental neurotoxicity
3. 学会等名 In vivoイメージングフォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ishida K, Minamigawa Y, Tatsumi K, Mori K, Matsumaru D, Nagase H, Kanda Y, Takuma K, Nakanishi T
2. 発表標題 Validation of brain neuronal differentiation reporter mice for improved developmental neurotoxicity evaluation
3. 学会等名 2022 ICCA-LRI & NITE Workshop (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田 慶士、松丸 大輔、中西 剛
2. 発表標題 DOHaD学説からみた甲状腺機能低下：児の神経発達へのリスク評価を目指して
3. 学会等名 フォーラム2022： 衛生薬学・環境トキシコロジー（招待講演）
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
---------	---------