

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22681008

研究課題名(和文) 脳発達における環境化学物質の作用機序の解明と代替実験法の確立

研究課題名(英文) Mechanism Verification of the Action of Environmental Chemicals on Brain Development

研究代表者

宮崎 航 (Miyazaki, Wataru)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：90512278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円、(間接経費) 5,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環境化学物質(ダイオキシンなど)の曝露が脳発達のどの時期に作用し、どの作用点・メカニズムに基づくものかの解明を目指しておこなった。さらに環境化学物質の脳発達影響へのin vitroでの代替実験法・スクリーニング法の確立に先立つ成果となることを念頭に研究を進めた。

ダイオキシンの作用機序の解明のため、マウス胎児脳から採取した神経細胞ならびにヒト胎児由来神経前駆細胞株の神経細胞分化過程の様々な期間にダイオキシン曝露を行い、神経分化および維持に関わるタンパクの発現変化を認めた。また動物実験を通じて、化学物質曝露による神経細胞におけるシナプスの減少や、行動の変化を見いだした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanisms of the adverse effects of environmental chemicals on brain development.

To clarify the mechanisms of the effects of the chemicals on neural development, we analyzed that what kind of effects were exerted by exposure of environmental using mice hippocampus primary culture cell and human-derived neural progenitor cell line. We observed some changes of gene expression related to neural development. Moreover, we performed mice experiments exposed environmental chemicals. In these study, we observed that the exposure caused several changes of neural circuit and abnormal behaviors. These results suggested that the chemicals disrupt construction of brain and exert abnormal brain development.

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境化学物質 脳発達

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳機能における環境化学物質の影響

環境化学物質、ポリ塩素化ビフェニル(PCB)類やダイオキシン類は、ヒトや野生動物の認知・記憶・学習・情動・生殖・生体調節などの脳機能に影響を及ぼすことが疫学的にも動物実験的にも示されている(Jacobson JL et al *N Engl J Med*. 335(11):783-739など)。その影響は致死性・催奇形性が引き起こされるとされてきた量よりもはるかに低用量で引き起こされる。特に注目すべきは胎児期や授乳期に曝露されることによりこれらの影響が認められ、その用量は母親には影響が認められない非常に低い用量である。周産期曝露の脳発達への影響は成獣に認められ、非常に劇的にかつ柔軟に変化する周産期・授乳期の脳発達・成熟へのダイオキシンの周産期での影響・変化が将来的に表れて来ると予測できる。申請者の所属する研究室においては、これまでダイオキシンによる性分化障害、脳発達異常に起因する早熟化だけでなく、ヒト認知機能の特徴である対連合学習に基づく試験「Flavour Map 法」をエジンバラ大学のモリス教授とともに開発し(Tse et al. *Science* 2007)、低用量のダイオキシン周産期曝露により対連合学習機能が低下することが認められた。幼若動物を用いたKODOMO 試験では ADHD(注意欠陥多動性障害)様行動異常が現れることを示している(第28回ダイオキシン国際会議にて発表)。

(2) 脳発達に対する環境化学物質の影響

脳発達は神経幹細胞を経て神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトと経時的に神経系細胞が生み出され、それらが密接に相互に関与しあい、神経突起の伸長やシナプス形成など伴って複雑な神経ネットワークを構築していく。申請者はマウス胚性幹(ES)細胞から神経細胞への分化実験系を用いて、環境化学物質(ダイオキシンおよびPCB)がオリゴデンドロサイト成熟に関与する転写因子ならびにソニックヘッジホッグの発現低下と MAP2(中枢神経マーカー)陽性細胞の神経突起の伸長阻害を報告している(第36回日本トキシコロジー学会、第29回ダイオキシン国際会議にて発表)。また小脳プルキンエ細胞を用いた実験系においても環境化学物質による神経突起の伸長阻害が報告されている(Kimura-Kuroda et al., *Brain Res Dev Brain Res*. 2005)。

以上のことから環境化学物質の脳発達への影響の解析は、神経細胞に重点が置かれており、実際に神経細胞に直接作用しているか、支持細胞か、双方かどうかははまだ明らかとなっていない。

さらに、神経系細胞の産生が主に胎児期、神経ネットワーク構築が授乳期(新生児期)に起こるうえ、環境化学物質は母体(胎盤)を介するか、母乳を介するかにより曝露量が異なる。このことから環境化学物質の影響は作用時期や作用機

構の違いにより、異なる表現型が観察される可能性がある。曝露時期の違いによる脳発達への環境化学物質の作用の違いは、分子機構を解明する上で非常に重要かつ必要な情報である。

(3) 脳発達における環境化学物質の分子レベルでの作用点

アリル炭化水素受容体 AhR はダイオキシン受容体とも呼ばれ、ダイオキシンをリガンドとし、CYP1A1 などの薬物代謝酵素の遺伝子発現を行う。その一方で、脳発達においては AhR が記憶・学習に関わる海馬や皮質における NMDA 受容体のサブユニット NR2A, NR2B の発現に関わっていることが報告されており(Lin CH et al. *J Neurochem*. 2009)、我々はこれらの発現が上記した学習機能に影響の出た成熟期の脳組織において変化していることを確認している。以上のことから AhR は環境化学物質(特にダイオキシン類)のターゲットとなり、脳発達へ影響を及ぼすことが示唆されるが、以下の理由から実際にはダイオキシンの作用点は AhR でなく他の経路が存在する可能性がある。

まず、これまでの AhR の機能解析には主に培養細胞が使われており、ダイオキシン曝露の指標として AhR の核内移行および CYP1A1 の発現が用いられている。しかし、実際には曝露動物の脳、特に海馬・皮質における AhR の核移行は観察されず、CYP1A1 の発現は変化していないという新たな知見を得ている(未発表)。マイクロアレイによる検討でも、CYP1A1 の発現に変化はなかった。

次に個体で影響を認めた曝露量よりも細胞実験で用いられる曝露量が高いことである。これまで申請者らが投与し影響が認められた量から換算すると 20pM(0.6 μg/kg 体重)程度である一方、細胞を用いた研究で用いられている量はこの 1,000 倍量であり、実際の曝露量を反映していない。100nM を超えると細胞死が起こることが報告されている(Sul D et al. *Toxicology*. 2009)。In vivo での CYP が発現される用量は申請者らが報告している用量の 100 倍量にて CYP1A1 が誘導されることが報告されている(Huang P et al. *Neurotoxicology*. 2002, *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003)。

これまで環境化学物質によって引き起こされる脳機能における影響は、個体に見られる現象に対して、予想されうる分子メカニズムを当てはめていくという研究が多く、実際に個体で起きた現象に至るまでの組織的な変化、細胞レベル・分子レベルでの変化を反映するものではなかった。ダイオキシンの主作用点であるはずの AhR の機能解析ですら、上述のように in vivo の現象に即さない可能性を示すものが多い。

2. 研究の目的

以上の背景から環境化学物質は様々な変化

を及ぼし、特に周産期の低用量曝露では脳機能に影響を及ぼすことが危惧されている。しかし *in vitro* や *in vivo* での検証が行われているにもかかわらず、両者の作用時期・部位（細胞）・分子機構の共通性と違いは明らかでない。結果、*in vivo* の利点である「影響（現象）の同定」と *in vitro* の「分子メカニズムの解明」とがリンクせず、環境化学物質の影響はおそらく危ないだろうという曖昧な状態のまま置かれている現状がある。本研究では脳発達における環境化学物質の影響の解明にあたり、ダイオキシンをモデル物質として *in vivo* での影響に即した作用機構を明らかにし、さらにそれに基づく新たな *in vitro* の動物実験代替法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 実験動物を用いた検証

曝露時期の違いによる行動の変化の検証

野生型マウス妊娠 12.5 日に 2,3,7,8-TCDD(0.6 μ g/kg 体重)もしくは対照物質としてコーン油を母体に経口投与による曝露を行う。出生後、母動物の入れ替え (cross-fostering) を行い、(1) 対象群 (コーン油のみ)、(2) 胎児期のみ曝露、(3) 授乳期のみ曝露、(4) 胎児期・授乳期曝露の 4 群を作成した。その仔動物に行動試験 (Intelligence 試験、Flavor map 試験、KODOMO 試験) を行い、学習機能への曝露影響を 4 群で比較・検討した。

新たな行動解析法の開発

これまでに我々が用いて来た Intelligence 試験において、高次学習能力の解析法を開発した。このたび新たに情動行動解析のための解析手法の確立を目指した。野生型マウスの妊娠中に BPA を曝露し、その母獣から生まれた仔について解析を行った。本研究では、飲水の制限を行うと同時に、飲水可能時間では、飲水行動に伴うノーズポーク (飲水機に鼻を入れる行動) の回数を増やし、この行動を誘発させた (手続き)。次のステージでは、ノーズポークを制限し、ノーズポーク間に待機時間を設け、一定時間待機すれば飲水可能になるとプログラムした (手続き)。これらの手続きを通じて、曝露動物において、どのような行動変化が起こりうるかを検証した。

化学物質曝露による脳内の構造変化

上記の行動解析を行うと同時に、周産期の仔マウスより、脳を回収し、神経細胞に関するタンパクの発現変化や、シナプスの変化を解析した。

(2) 培養細胞を用いた TCDD 作用メカニズムの解明

これまでの実験動物を用いた行動解析において、妊娠 12.5 日目の TCDD 曝露が仔動物

の行動に変化を及ぼすことから、TCDD の作用時期および作用メカニズムについて検証を行った。

マウス胎児海馬初代培養細胞を用いた検証

妊娠 12.5 日目からの TCDD 曝露のうち、どの時期にどのような作用が起こりうるかについて、胎生 12 日齢および 18 日齢のマウス胎児の海馬を用いて、初代培養細胞を作成した。これを 14 日間の培養期間のうち、全期間、前半 7 日間、後半 7 日間のそれぞれの曝露期間を指定し、TCDD 曝露を行った。

その後、これまでに報告されている NMDA 受容体サブユニットやアストロサイトの分泌タンパクなどの mRNA 発現についてリアルタイム PCR 法を用いて解析した。

ヒト胎児由来神経前駆細胞株を用いた検証

これまでに報告されている神経系細胞への影響がヒト胎児においても起きうるかを検証するため、胎生 10 週齢の胎児脳より樹立された神経前駆細胞株を用いて、神経分化における化学物質曝露影響について検証した。分化開始後から TCDD、BPA などを曝露し、各神経系細胞マーカーの発現量を指標に各神経細胞、アストロサイトなどへの分化の程度の変化を解析した。

作用メカニズムに関する検証

上記の細胞をそれぞれ用い、特に TCDD の作用受容体である AhR を中心に発達機におけるこれらの役割を検証した。

また、マイクロアレイ法ならびにカスケード解析法を用い、TCDD 曝露時に発現変化する遺伝子群の特定と、TCDD 曝露によりシグナル伝達がおこる可能性のある AhR 以外の経路についての探索を行った。

4. 研究成果

(1) 実験動物を用いた検証

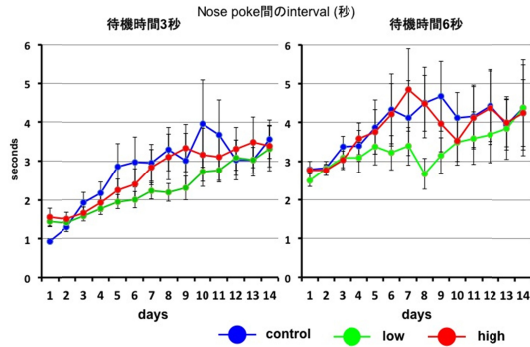
曝露時期の違いによる行動の変化の検証
曝露時期の違いによる影響の違いを検証するため、里親飼育による曝露期間が異なるマウスの作成を行った。これらの作成は、研究者の異動に伴う施設の使用形態の変化や、里親飼育時の初乳の扱い (初乳は化学物質の蓄積が多いとの報告がある) の困難さにより、十分な個体数を集めて解析を行うことができなかった。また、里親飼育では曝露時期の分割が難しいため、これまで行ってきた妊娠 12.5 日におけるダイオキシン曝露群に加え、生後 0 日目に母親へのダイオキシン曝露群の作成を目指したが、十分な個体数を得るに至っていない。

上記の通り、実験動物を用いた研究では、研究期間を通じて、施設・研究体制の変更も含め、十分な個体数を用いて検証することが

できなかった。現在、これらの研究も進行中であり、継続してデータを取得、解析し、研究成果を発表する予定である。

新たな行動解析法の開発

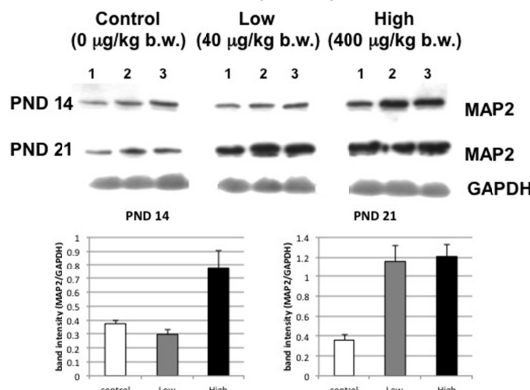
妊娠期に 0、40、400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ にて BPA を曝露し、その仔マウスについて IntelliCage を用いて検証した。その結果、手続きにおいて、ノーズポーク間の待機時間が長くなるにつれ、BPA 胎児期曝露群の飲水の回数の減少と、ノーズポーク間隔の減少が認められた。これらの結果から胎児期 BPA 曝露が衝動性を引き起こす可能性があることが示唆された（下図）。



化学物質曝露による脳内の構造変化

周産期ダイオキシン曝露を受けた成獣におけるシナプスの数を解析したところ、曝露群において減少していることが認められた。また、発達期の脳を採取し、発達期における種々の神経関連遺伝子の発現解析を行ったところ、細胞骨格関連タンパクのタンパク量の減少を認めた。AhR の発現については生後日齢を重ねるに連れて、発現が増加することが分かった。

一方、の BPA 曝露マウスについて、授乳期の脳組織における神経関連遺伝子の発現解析を行ったところ、細胞骨格タンパクの発現上昇が認められた（下図）。



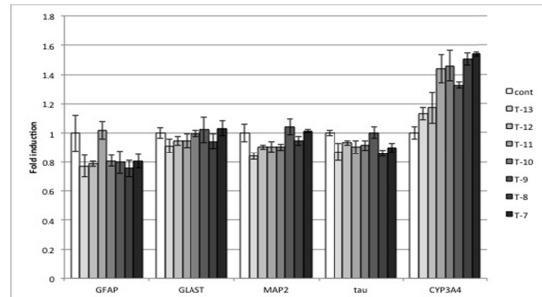
(2) 培養細胞を用いた TCDD 作用メカニズムの解明

マウス胎児海馬初代培養細胞を用いた検証

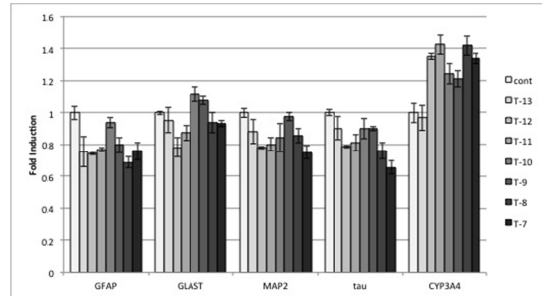
作用時期の特定のため、in vivo での環境化学物質の曝露時期に合わせたタイミング

で回収したマウス脳を用いて初代神経培養を開始した。全培養期間中、前半、後半、全期間に期間を分け、様々な濃度でダイオキシン曝露を行い、定量性 PCR を用いて神経細胞およびグリア細胞に関連する遺伝子の mRNA の発現を解析した。その結果、曝露時期によって、神経細胞ならびにグリア細胞に関連する遺伝子の発現が異なることが観察された。特に前半曝露によるグリア細胞分泌タンパク s100beta の発現の減少を認めた。加えて、曝露時期に関わらず細胞接着因子の発現の減少を認めた。以上のことから曝露時期の違いにより影響を及ぼす細胞および分子が異なるであろうことが示唆された。

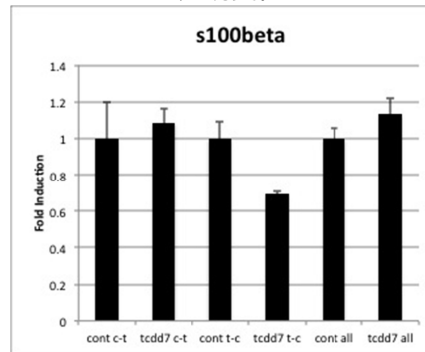
・ TCDD 後期曝露による遺伝子発現の変化



・ TCDD 前期曝露による遺伝子発現の変化



・ s100beta の発現変化

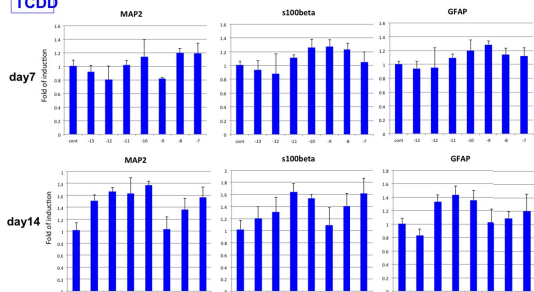


ヒト胎児由来神経前駆細胞株を用いた検証

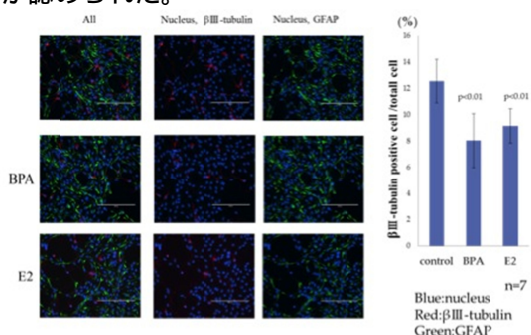
この細胞の分化スケジュールは全行程 14 日間であるため、分化のどの時期の曝露が分化に影響を及ぼしうるかを明らかにするため、様々な曝露期間を設定し検証した。まず、培養の全期間においてダイオキシン曝露し、各神経系細胞の分化状態について各マーカーを用いて確認した。その結果、グリア細胞マーカーの発現上昇が認められた。また、神

経細胞マーカーに関して変化が認められたが、用量特異的な変化が大きかった。

TCDD



さらに、曝露時期特異的な化学物質曝露による変化を解析するため、特に分化に関する遺伝子の増減が活発で、ほぼ細胞系譜が決まるとされる分化開始後の3日目において分化状態の確認をしたところ、BPA曝露時に神経細胞マーカーbeta3-tubulinの減少が認められ、さらにbeta3-tubulin陽性細胞の減少が認められた。



一方、アリル炭化水素受容体ならびにアリル炭化水素受容体核内移行因子の発現レベルが神経前駆細胞の分化が進むにつれ変化していくことが認められた。

作用メカニズムに関する検証

ダイオキシン曝露が分化の初期段階に作用し、神経系細胞の分化状態に影響を及ぼす可能性が示唆されたため、この時点での発現変化を起こしている遺伝子について、マイクロアレイ法をもちいて探索を試みた。さらに、このデータをもとにどの細胞内シグナル経路を介しているかを明らかにするため、カスケード解析を行った。その結果、これまでに報告されているセロトニン受容体を介する系(下図)のみならず、他の経路においても関与が認められた。

・TCDD曝露により引き起こされるセロトニン受容体を介するシグナル伝達ネットワーク図



(3)まとめ

本研究においては動物を用いた行動解析が十分に行うことができなかつたが、今後も

継続し、成果を発表する。

細胞を用いたメカニズム解析については新たな TCDD の関与するシグナル伝達経路が見つかるなど、作用メカニズムの解明に踏み込むことができた。さらにこれらの解析を勧め、新たなシグナル経路とメカニズムの解明を進めていく。

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8件)

Takeyama M, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Tohyama C.

Disruption of paired-associate learning in rat offspring perinatally exposed to dioxins.

Arch Toxicol. 2014 Mar;88(3):789-98. doi: 10.1007/s00204-013-1161-y. (査読有)

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.

Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage.

Behav Brain Res. 2011 Aug 1;221(1):172-81. doi: 10.1016/j.bbr.2011.02.037. (査読有)

Haijima A, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Takeyama M, Tohyama C.

In utero and lactational exposure to low doses of chlorinated and brominated dioxins induces deficits in the fear memory of male mice.

Neurotoxicology. 2010 Aug;31(4):385-90. doi: 10.1016/j.neuro.2010.04.004. (査読有)

[学会発表](計10件)

藤原悠基、ヒト胎児由来神経前駆細胞を用いた神経分化に置ける低用量ビスフェノール A の影響、日本内分泌攪乱化学物質学会、2013年12月12日、東京大学

宮崎航、甲状腺ホルモン受容体を介する転写に置ける AhR, Arnt の関与、日本内分泌攪乱化学物質学会、2012年12月18日、東京大学

宮崎航、ヒト胎児由来神経前駆細胞からの神経分化における鉛曝露の影響、日本衛生学会 第82回学術総会、2012年3月25日、京都大学

Wataru Miyazaki et al. Abnormal emotional behavior after maternal exposure to bisphenol A in mice detected by IntelliCage, Society of Toxicology, 2011.3.10, Washington D.C.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kumadai-publich.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 航 (MIYAZAKI, Wataru)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：90512278