

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310043

研究課題名(和文) ライブイメージングを利用した新規試験法による発達神経毒性評価と毒性発現機序の解明

研究課題名(英文) Assessment of developmental neurotoxicity and investigation of toxic mechanism by live imaging of cultured neuron

研究代表者

塚原 伸治 (TSUKAHARA, Shinji)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：90318824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円、(間接経費) 3,930,000円

研究成果の概要(和文)：脳発達に対する化学物質の有害影響は、社会生活の質の低下をまねく恐れがある。化学物質から被る健康リスクの低減には、化学物質の発達神経毒性評価が重要になるが、膨大な化学物質を網羅的に評価することは困難である。本研究では、作業効率が高い毒性試験法を開発するため、培養神経細胞のライブイメージング(細胞を生きた状態で観察し、画像化する技術)の適用性について検討した。その結果、培養神経細胞のライブイメージングが発達神経毒性評価のための有効な試験解析手法になることを示した。

研究成果の概要(英文)：Adverse effects of chemical exposure in brain development increase the risk of neurodevelopmental disorder. A few chemicals have been recognized as agents to induce neurodevelopmental disorders or subclinical brain dysfunction. However, most of environmental chemicals remain to be evaluated for the developmental neurotoxicity, because working out a hazard assessment for myriad substances is a demanding task. In this study, we aimed to establish new methods for efficient evaluation of the developmental neurotoxicity of environmental chemicals. We carried out live imaging analyses of cultured neuronal cells to monitor the toxic effects of test substances in neurite outgrowth and apoptotic cell death and to examine the toxic mechanisms. As the results of live imaging analyses, we showed that live imaging is a useful method for the screening of chemical toxicities and for improving the efficiency of toxicity evaluation.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響化学

キーワード：発達神経毒性 ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

環境中に存在する化学物質は膨大であり、これらの物質の毒性については未知な部分が多く残されている。しかし、既存する化学物質の全てを対象にして、毒性を網羅的に評価することは困難である。健康リスク低減に向けて、データの信頼性を損なうことなく、毒性評価の作業効率を向上させることが必要である。

従来の毒性評価では、成熟個体を対象にした研究が主流であった。しかしながら、近年では、化学物質の曝露影響を受けやすい集団（高感受性集団）の存在が注目され、高感受性集団に対する化学物質の健康影響評価を推進することが、全ての集団に対する健康リスクの低減に資すると考えられている。胎児や小児など、発達途上にある子どもは化学物質の曝露に対して脆弱な高感受性集団のひとつであり、発達期に曝露した化学物質の毒性を評価し、リスクを算出することは、子どもの健康影響を未然に防ぐ対策の立案に欠かせない。

環境化学物質の中でも、生活の質の低下に繋がる神経発達障害を引き起こす物質の毒性については社会的関心が高い。動物実験やヒト疫学研究から、数種の化学物質と神経発達障害との因果関係が指摘されている。しかし、先述した通り、環境化学物質の網羅的毒性評価は困難であり、より多くの物質を被験対象にするには毒性評価の効率化を図る必要がある。これまでの研究では、化学物質曝露と神経発達障害発症の関係性について、モデル動物の行動試験を用いて検討されてきた。しかし、動物を個体で扱う *in vivo* 試験のコストは、培養細胞を用いた *in vitro* 試験のそれに比べて高い。加えて、行動特性がヒトとは異なる動物の行動試験結果をヒトに外挿する手段は、解決すべき重要課題として残される。以上のことから、毒性評価には、作業効率向上だけでなく、ヒトへの影響を類推できるエンドポイントが不可欠である。そして、化学物質から被るリスクを管理する上で、被験物質の毒性が明らかになれば、その毒性発現のメカニズムも明らかにしなければならない。

脳発達において、神経細胞は神経突起を伸長して互いに連絡し、神経回路を構築する。自閉症、神経遅滞などの神経発達障害では、神経突起の構造が健常者とは異なることも最近明らかになってきた。また、神経細胞がアポトーシス細胞死を起こして選択的に脱落することが、適切な神経回路の構築に重要であることも知られている。このように、神経突起形成と細胞死は脳発達に重要な現象であり、発達神経毒性評価の有効なエンドポイントになる。

2. 研究の目的

本研究では、化学物質の発達神経毒性に関する評価の質と効率の向上を目的として、新

規の *in vitro* 評価解析手法の確立を行うとともに、被験物質の毒性メカニズムを明らかにする。

これまでの研究から、研究代表者は、培養細胞のライブイメージングが毒性評価スクリーニング手法として有効であることを報告している。ライブイメージングとは、細胞を生きた状態で経時的に観察し、画像化する手法である。ライブイメージングは、空間分解能および時間分解能に優れており、化学物質の毒性を詳細に調べることが可能である。

本研究では、(1) 幼若神経細胞のモデルとなる株化細胞のライブイメージングにより、新規の毒性評価解析手法を開発する。また、(2) 開発手法によって評価された被験物質の毒性発現機序を検証する。さらに、(3) 発達期に被験物質を曝露したマウスの神経細胞に対する影響を調べ、モデル細胞を用いた *in vitro* 試験法による評価結果が、個体レベルの影響として、どこまで当て嵌めることが出来るのか検証する。

3. 研究の方法

(1) 培養神経細胞のライブイメージングによる *in vitro* 毒性評価解析手法の確立と化学物質の毒性評価

幼若なニューロン(神経芽細胞)のモデルとしてマウス神経芽細胞腫由来細胞株 Neuro2A を使用した。Neuro2A を蛍光顕微鏡下で観察するため、SCAT3 を発現する pcDNA-SCAT3 ベクターを遺伝子導入した。SCAT3 は、改変 GFP (green fluorescent protein) である ECFP と Venus との間にカスパーゼによって切断されるアミノ酸配列を配置した融合タンパク質である。カスパーゼとはタンパク質分解酵素の一種であり、細胞死のシグナルによって活性化されるアポトーシス実行分子である。生きた細胞では、カスパーゼが不活性状態にあるので、ECFP の励起光を照射すると ECFP の励起エネルギーが Venus に移行する FRET (fluorescent resonance energy transfer) 現象が発生し、Venus 由来の蛍光が発せられる。一方、死のシグナルによってカスパーゼの活性が上昇した細胞では、細胞死が誘導されるとともに、カスパーゼによって ECFP と Venus が解離するため ECFP の励起光によって ECFP 本来の蛍光が発せられる。このような特徴を有した SCAT3 を利用することで、生きた状態の Neuro2A の神経突起と細胞体を Venus の蛍光シグナルで観察しつつ、ECFP の蛍光シグナルを同時に検出することで細胞の生存状態もモニタできるようになる。

SCAT3 発現 Neuro2A のライブイメージングを行うため、蛍光顕微鏡内に設置したインキュベーター内で細胞を培養し、タイムラプス撮影をおこなった。撮影した SCAT3 発現 Neuro2A の画像データを解析し、神経突起伸長と細胞生存性を定量数値化した。神経突起の計測には、Venus 蛍光シグナルの画像を使

用した。蛍光顕微鏡下で SCAT3 発現 Neuro2A を観察した結果、Venus の蛍光シグナル強度は細胞体と神経突起の間で異なり、神経突起に局在する Venus のシグナルは細胞体のシグナルよりも弱いことが分かった。この蛍光強度の違いを利用して、解析領域における神経突起および細胞体の面積を計測し、神経突起の面積と細胞体の面積の比を求めた (図 1)。

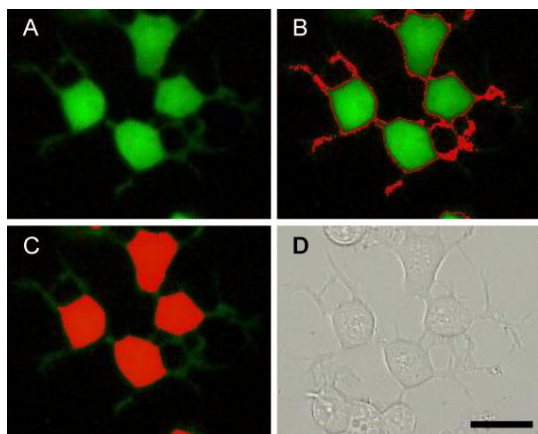


図 1. SCAT3 発現 Neuro2A のデジタル画像を用いた神経突起と細胞体の面積測定

(A) エリア抽出前の画像、(B) 神経突起を抽出した画像、(C) 細胞体を抽出した画像、(D) 透過光の画像

細胞生存性の定量では、Venus および ECFP の蛍光シグナルの画像を使用し、SCAT3 発現 Neuro2A の ECFP および Venus の蛍光強度の平均値を測定し、ECFP/Venus の蛍光強度比を求めた。SCAT3 発現 Neuro2A の画像データを解析して算出した評価指標値をもとに、化学物質の有害性評価が可能であるか否かを検討するため、化学物質を曝露した SCAT3 発現 Neuro2A のライブイメージングを行った。本実験では、被験物質として亜ヒ酸ナトリウムとフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) の影響について検討した。

ヒ素には強力な神経毒性があり、東南アジアにおける地下水の汚染物質の一つとして有名である。ヒ素を含む地下水を飲料水として長期間利用している地域では、子供の認知機能の低下が見受けられるという疫学調査報告がある。細胞生存性および神経突起形成に対する亜ヒ酸ナトリウムの影響を検証するため、亜ヒ酸ナトリウム (0、1、5、10 μM) を含む培地で SCAT3 発現 Neuro2A を培養し、曝露開始 2 時間後から 11 時間後までの期間、Venus および ECFP の蛍光シグナルの画像を 30 分間隔で撮影した。その後、画像解析により、SCAT3 発現 Neuro2A における神経突起/細胞体の面積比および ECFP/Venus 蛍光強度比を算出した。

DEHP は合成樹脂の可塑剤として使用されており、その用途から胎児や小児への曝露量が高く、発達神経毒性が疑われる物質の一つである。Neuro2A の生存性に対する DEHP の影響を検証するため、DEHP (0、1、10、100 μM)

を含む培地で SCAT3 発現 Neuro2A を培養し、曝露開始 1 時間後から 24 時間後までの期間、Venus および ECFP の蛍光シグナルの画像を 30 分間隔で撮影した。その後、画像解析により、ECFP/Venus 蛍光強度比を算出した。

(2) 被験物質の毒性発現機序に関する検討 細胞骨格関連遺伝子の発現に対する亜ヒ酸ナトリウムの影響

亜ヒ酸ナトリウム (0、1、5、10 μM) を含む培地で Neuro2A を培養した。亜ヒ酸ナトリウムの曝露を開始して 5 時間後、細胞を回収し、トータル RNA の抽出と cDNA の作製を行った。その後、作製した cDNA を使用して、各サンプルにおける特異遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。本実験では、Neuro2A の細胞骨格に対する亜ヒ酸ナトリウムの影響を調べるため、ニューロフィラメント-L、-M、-H (NF-L、NF-M、NF-H)、タウ、チューブリン、微小管関連タンパク質 2 (MAP2)、アクチンの mRNA 発現量を測定した。また、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH の mRNA 発現量を併せて測定し、各サンプルにおける各種遺伝子の mRNA 発現量を GAPDH の mRNA 発現量で除し、補正値を求めた。

DEHP の毒性発現における 1 型ヘムオキシゲナーゼの関与

1 型ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) は、種々のストレスにตอบสนองして発現が誘導される酵素である。DEHP を曝露したマウスの脳内では HO-1 の発現が上昇することが報告されている。そこで、本実験では、Neuro2A の生存性に対する DEHP 曝露の影響における HO-1 の関与を検討した。

Neuro2A における HO-1 の mRNA 発現に対する DEHP の影響を調べるため、DEHP (0、1、10、100 μM) を含む培地で Neuro2A を培養した。DEHP 曝露開始の 24 時間後、細胞を回収し、トータル RNA の抽出と cDNA の作製を行った。その後、各サンプルにおける HO-1 と GAPDH の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。各サンプルにおける HO-1 の mRNA 発現量を GAPDH の mRNA 発現量で除し、補正値を求めた。

DEHP を曝露した Neuro2A の細胞生存性における HO-1 の働きを明らかにするため、HO-1 をノックダウンした SCAT3 発現 Neuro2A のライブイメージングを行った。SCAT3 発現 Neuro2A に HO-1 siRNA あるいは対照核酸配列の siRNA を遺伝子導入した。siRNA の遺伝子導入の 2-3 日後 (HO-1 siRNA の遺伝子導入後 2-3 日には、Neuro2A の HO-1 mRNA レベルは 40% 程度に低下する) DEHP (0、100 μM) を含む培地で SCAT3 発現 Neuro2A を培養し、曝露開始 1 時間後から 24 時間後までの期間、Venus および ECFP の蛍光シグナルの画像を 30 分間隔で撮影した。その後、画像解析により、ECFP/Venus 蛍光強度比を算出した。

(3) マウスの脳内神経細胞に対する亜ヒ酸ナトリウムの発達期曝露の影響

妊娠8から18日の期間において、亜ヒ酸ナトリウム(0, 85 ppm)を溶解した水を妊娠マウスに自由摂取させた。妊娠マウスの出産を確認した後、出生21日目に仔マウスを離乳した。67から72週齢に達した仔マウスの脳を採取し、前額断凍結脳切片を作製した。その後、脳切片にゴルジ染色を施した。光学顕微鏡を用いて標本を観察し、解析ソフトウェアを使用して、前辺縁皮質における神経突起の長さを計測した。

4. 研究成果

(1) 培養神経細胞のライブイメージングによる *in vitro* 毒性評価解析手法の確立と化学物質の毒性評価

対照群(亜ヒ酸ナトリウム 0 μM)および1 μM の亜ヒ酸ナトリウム曝露群における細胞の神経突起は伸長し、比較的長い突起が観察された。一方、より高濃度の亜ヒ酸ナトリウム(5あるいは10 μM)を曝露した Neuro2A では、曝露時間が経過するにつれて神経突起が短縮した。SCAT3 発現 Neuro2A の神経突起と細胞体の面積比を算出して、曝露影響を検討した結果、対照群および1 μM の亜ヒ酸ナトリウム曝露群では、曝露開始後210から300分の間に面積比のピーク値がみられた(図2A)。しかし、5 μM あるいは10 μM の亜ヒ酸ナトリウムを曝露した細胞の神経突起/細胞体面積比は徐々に低下した。曝露開始後150-300分、330-480分、510-660分の期間における神経突起/細胞体面積比の平均値を統計学的に解析した結果、すべての期間において、5 μM および10 μM の亜ヒ酸ナトリウムを曝露した Neuro2A の神経突起/細胞体面積比は対照群に比べて有意に低くなっていた(図2B)。

対照群および1 μM あるいは5 μM の亜ヒ酸ナトリウム曝露群における SCAT3 発現 Neuro2A の形態と Venus および ECFP の発現には顕著な変化はみられなかった。しかし、10 μM の亜ヒ酸ナトリウムを曝露した SCAT3 発現 Neuro2A では、曝露後、細胞体が徐々に収縮し、ECFP の蛍光シグナルが Venus の蛍光シグナルに比べて相対的に強くなった。10 μM の亜ヒ酸ナトリウムを曝露した SCAT3 発現 Neuro2A の ECFP/Venus 蛍光強度比は、曝露開始後300分以後から対照群に比べて増加する傾向があった。しかし、曝露開始後150-300分、330-480分、510-660分の期間における ECFP/Venus 蛍光強度比の平均値を統計学的に解析した結果、蛍光強度比に対する亜ヒ酸ナトリウムの有意な影響はみとめられなかった。

以上の結果から、Neuro2A の細胞死を誘導しない低濃度の亜ヒ酸ナトリウムは同細胞の神経突起の伸長を抑制することが示された。培養神経細胞の神経突起伸長に対する亜ヒ酸ナトリウムの抑制作用は既に報告があ

る。この報告によれば、数 μM の亜ヒ酸ナトリウムを72から120時間曝露すると神経突起の形成が用量依存的に阻害される。他方、本研究では、亜ヒ酸ナトリウムを曝露して5時間(300分間)以内に同等の毒性を検出することができた。これは、ライブイメージングを活用した *in vitro* 試験法が、従来手法よりも短期間で高精度に化学物質の毒性を調べることが可能であることを示している。

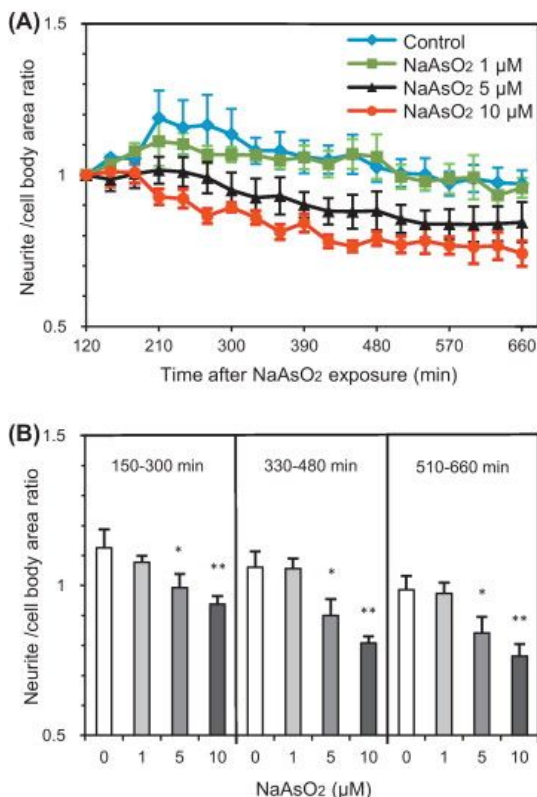


図2. SCAT3 発現 Neuro2A の神経突起に対する亜ヒ酸ナトリウム曝露の影響

(A) 神経突起/細胞体面積比の経時変化

(B) 曝露期間における神経突起/細胞体面積比の平均値 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs NaAsO₂ 0 μM)

DEHP を曝露した SCAT3 発現 Neuro2A をライブイメージングした結果、100 μM の DEHP を曝露した細胞の形態は、曝露時間が経過するにつれて徐々に縮小した。また、ECFP および Venus の蛍光強度は変化し、ECFP/Venus の蛍光強度比は、DEHP 曝露開始後12時間より上昇をはじめた。曝露開始後16.5から24時間における蛍光強度比の平均値は、100 μM の DEHP 曝露群において、対照群よりも有意に高かった。一方、1あるいは10 μM の DEHP を曝露した SCAT3 発現 Neuro2A における細胞形態および ECFP/Venus 蛍光強度比は対照群と違いはなかった。このことから、DEHP (100 μM) は、Neuro2A のカスパーゼ活性を高め、アポトーシス細胞死を誘導する毒性作用があることが示された。

(2) 被験物質の毒性発現機序に関する検討 細胞骨格関連遺伝子の発現に対する亜ヒ酸ナトリウムの影響

SCAT3 発現 Neuro2A のライブイメージング解析から、亜ヒ酸ナトリウムは Neuro2A の神経突起伸長を抑制することが明らかになった。次に、神経突起伸長を抑制する亜ヒ酸ナトリウムの毒性発現機序を明らかにするため、神経突起の構築に関わる細胞骨格の遺伝子発現に対する亜ヒ酸ナトリウムの影響を調べた。その結果、NF-L および NF-M の mRNA 発現レベルは、亜ヒ酸ナトリウムの曝露量依存的に増加した。反対に、タウおよびチュープリンの mRNA 発現レベルは曝露量依存的に減少した。NF-H、MAP2、およびアクチンの mRNA レベルは亜ヒ酸ナトリウム曝露により変化しなかった。以上のことから、亜ヒ酸ナトリウムは神経突起に関連する数種の細胞骨格に影響を及ぼし、神経突起伸長を抑制することが示唆された。

DEHP の毒性発現における 1 型ヘムオキシゲナーゼの関与

DEHP を曝露した Neuro2A における HO-1 mRNA 量を測定した結果、100 μ M の DEHP 曝露は HO-1 mRNA レベルを有意に増加させることが明らかになった。しかし、1 あるいは 10 μ M の DEHP を曝露した Neuro2A では HO-1 mRNA レベルの増加はみとめられなかった。

siRNA を遺伝子導入した SCAT3 発現 Neuro2A をライブイメージングした結果、HO-1 のノックダウンにより DEHP の毒性効果が阻害されることを示された(図3)。対照核酸配列の siRNA を導入した細胞では、DEHP (100 μ M) の曝露により ECFP/Venus 蛍光強度比は増加した。しかし、HO-1 siRNA を導入した細胞では、DEHP による ECFP/Venus 蛍光強度比の増加はみられなかった。

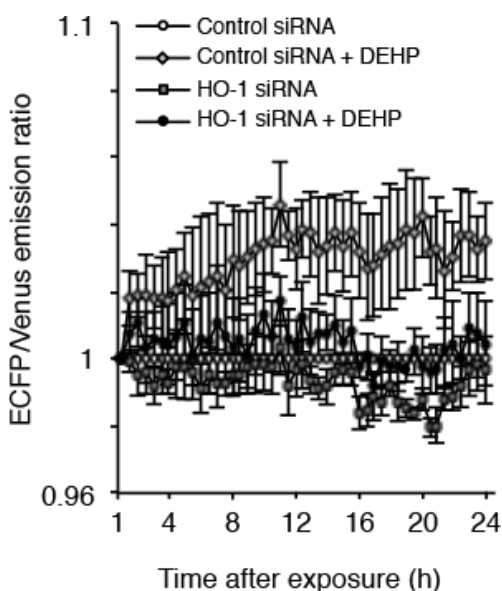


図3. SCAT3 発現 Neuro2A の ECFP/Venus 蛍光強度比に対する DEHP 曝露の影響と HO-1 ノックダウンの効果

以上の結果から、DEHP 曝露によって発現が上昇する HO-1 が Neuro2A の細胞死を誘導する DEHP の毒性を仲介する分子であることが示唆された。

(3) マウスの脳内神経細胞に対する亜ヒ酸ナトリウムの発達期曝露の影響

ゴルジ染色標本を光学顕微鏡で観察した結果、前辺縁皮質におけるゴルジ染色神経細胞の神経突起は、亜ヒ酸ナトリウムの発達期曝露により短くなっていることがわかった。対照群と亜ヒ酸ナトリウム曝露群の神経突起の長さを比較すると、曝露群の神経突起の長さは対照群よりも有意に短かった。マウスを用いた *in vivo* 曝露試験の結果は、Neuro2A を用いた *in vitro* 曝露試験の結果と整合しており、ライブイメージングを活用した *in vitro* 試験法が発達神経毒性評価に有効であることを支持している。

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 9 件)

Kyaw Htet Aung, Tin-Tin Win-Shwe, Kanaya M, Takano H, Tsukahara S: Involvement of hemoxygenase-1 in di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced apoptosis of Neuro-2a cells. *Journal of Toxicological Sciences*, 39, 217-229, 2014. (査読あり)

チョウ テツ アウン, 塚原 伸治: ライブイメージングを活用した *in vitro* 神経毒性試験法の開発. *化学工業*, 64, 281-286, 2013. (査読なし)

Maekawa F, Tsuboi T, Oya M, Kyaw Htet Aung, Tsukahara S, Pellerin L, Nohara K: Effects of sodium arsenite on neurite outgrowth and glutamate AMPA receptor expression in mouse cortical neurons. *Neurotoxicology*, 37, 197-206, 2013. (査読あり)

Kyaw Htet Aung, Kurihara R, Nakashima S, Maekawa F, Nohara K, Kobayashi T, Tsukahara S: Inhibition of neurite outgrowth and alteration of cytoskeletal gene expression by sodium arsenite. *Neurotoxicology*, 34, 226-235, 2013. (査読あり)

Tin-Tin-Win-Shwe, Kunugita N, Yoshida Y, Nakajima D, Tsukahara S, Fujimaki H: Differential mRNA expression of neuroimmune markers in the hippocampus of infant mice following toluene exposure during brain developmental period. *Journal of Applied Toxicology*, 32, 2, 126-134, 2012. (査読あり)

〔学会発表〕(計 38 件)

Kyaw Htet Aung, Kurihara R, Nakashima S, Maekawa F, Nohara K, Kobayashi T, Tsukahara S: Live imaging analysis of sodium arsenite -induced inhibition of neurite outgrowth in Neuro-2a cells. 第 12 回分子予防環境医学研究会大会, つくば, 2013 年 2 月 1-2 日.

前川文彦, 坪井貴司, 塚原伸治, 野原恵子: 無機ヒ素による神経細胞の AMPA 型グルタミン酸受容体発現抑制. 第 12 回分子予防環境医学研究会大会, つくば, 2013 年 2 月 1-2 日.

Kyaw Htet Aung, Kurihara R, Nakashima S, Nohara K, Kobayashi T, Tsukahara S: Evaluation of sodium arsenite-induced inhibition of neurite outgrowth by live imaging and alteration of cytoskeletal gene expression in Neuro-2a cells. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, October 13-17, 2012.

Maekawa F, Tsuboi T, Tsukahara S, Nohara K: Impairment of glutamate AMPA receptor expression by sodium arsenite is related to the neurite suppression in mouse cortical neurons. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, October 13-17, 2012.

前川文彦, 坪井貴司, 塚原伸治, 野原恵子: マウス神経細胞において無機ヒ素が AMPA 型グルタミン酸受容体発現に与える影響. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 2012 年 9 月 18-21 日.

Kyaw Htet Aung, Kurihara R, Nakashima S, Nohara K, Kobayashi T, Tsukahara S: Live imaging analyses for evaluation of the effects of sodium arsenite and hydroxylated polychlorinated biphenyls on the viability and neurite outgrowth in Neuro-2a cell. Neuroscience 2012, Nagoya, September 18-21, 2012.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

塚原 伸治 (TSUKAHARA, Shinji)
埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号 : 90318824

(2)研究分担者

前川 文彦 (MAEKAWA, Fumihiko)
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員
研究者番号 : 40382866