

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成27年度研究進捗評価用〕

平成24年度採択分  
平成27年3月19日現在

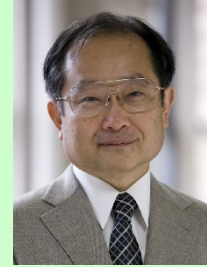
微細形態解析による発達神経毒性メカニズムの解明

Elucidation of developmental neurotoxicity mechanisms  
microstructural analysis

課題番号：24221003

遠山 千春 (TOHYAMA CHIHARU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

周産期化学物質曝露によって生じる高次脳機能異常の毒性メカニズムについては未解明である。本研究では神経細胞の微細形態に着目し、精密性・効率性の高い解析手法を開発して曝露影響の解明を進めた。曝露を受けた脳細胞の反応を組織学的・分子生物学的に調べることで、細胞レベルの反応から個体レベルの異常までをつなぎ合わせて影響解明を目指す。

研究分野： 複合新領域

キーワード： 化学物質影響、微細形態、発達神経毒性

1. 研究開始当初の背景

胎児期の低栄養状態が成人病の疾患リスクを高めるという Barker 仮説「成人病の発達期起源」は、その後の知見の充実とともに DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 学説として、広範な医学分野で受け入れられつつある。他方、栄養欠乏ではなく、放射線・化学物質や育児といった環境要因が次世代の子どもの健康の様々な側面に影響を及ぼすことが分かってきた。中でも次世代の高次脳機能への化学物質曝露影響は、他の毒性影響よりも低用量で生じることが推測されている。例えば、ダイオキシン (TCDD) 曝露が学習の障害や固執性亢進を、ビスフェノール A (BPA) 曝露が衝動性亢進を引き起こすことを、これまでに我々は報告している。次のステップとして、曝露を受ける発達期の脳細胞の反応が、時を経て成熟段階における行動異常として毒性表現型が顕れるメカニズムについての研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究では TCDD と BPA を用いて、周産期曝露が微細形態に及ぼす影響を調べ、新たな毒性指標として提示することを目的とする。微細形態変化は精神疾患患者とそのモデルマウスで近年、注目されている指標である。行動・形態レベルと細胞・分子レベルの間にある微細形態に着目することで、化学物質に対する細胞レベルの反応から個体レベルの異常までをつなぎ合わせ、正常な脳の発達が化学物質曝露により逸脱していくメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

精密性と効率性を備えた微細形態解析を実現するために、Thy1-GFP 遺伝子改変マウス（以下、Thy1 マウスと記載）への TCDD あるいは BPA 周産期曝露を行った。Thy1 マウスの脳内では GFP 標識される神経細胞が「まばら」に観察できる。Thy1 マウスは標識される細胞の種類に特異性がある。すなわち、海馬と扁桃体は観察に適する一方で、大脳皮質では標識細胞が極めて少ないために解析が困難となる。この問題を解決するため、本研究では Cre/Lox システムを応用した子宮内電気穿孔 (IUE) 法を用いることで、「まばら」に GFP 標識を行った。神経突起形態をコンピューター上で三次元再構築することで、形態の定量的解析を行った。

曝露が形態変化を引き起こすメカニズムを解明するため、TCDD の受容体であり転写調節因子として機能するアリアル炭化水素受容体 (AhR) に着目した。IUE 法により発生・発達期の脳神経細胞にて、AhR が誘導する下流シグナルが微細形態に及ぼす影響を調べた。

微細形態解析で影響が確認された脳領域に特異的な遺伝子群の発現解析を行うため、蛍光顕微鏡下で組織切片の任意の細胞 (集団) を回収し mRNA レベルを絶対定量できる LMD-qPCR 法を開発した。

4. これまでの成果

化学物質の微細形態変化が起こりうる曝露条件の検討をまず行い、次に脳でどのよう

な微細形態変化が起こりうるのか確認するなど、毒性メカニズム解明のために必要な基礎的知見を得ることに注力した。

(1) 精密性と効率性を向上させた微細形態解析を実現：Thy1 マウスならびに Cre/LoxP-IUE 法を用いて「まばら」に神経細胞を可視化し、樹状突起を三次元再構築することで定量的形態解析を実現した。海馬、扁桃体、大脳皮質など高次脳機能に関わる複数の解析可能な脳領域を対象とすることで、微細形態変化を見逃さずに捉える実験条件を確立できた。

(2) TCDD および BPA の周産期曝露は微細形態変化を引き起こす：TCDD もしくは BPA 投与マウスの産仔の脳では、1.5 歳齢にて海馬 CA1 錐体細胞の神経突起のスパイン密度の低下が観察された。次に、形態変化の発生時期を調べるため発達時期での実験を行ったところ、TCDD、BPA 共に海馬 CA1 錐体細胞において樹状突起への影響が認められた。これらの結果は若齢マウスにおける影響が 1.5 歳齢のマウスにおいて持続する可能性を示唆する。この現象は、胎児期の栄養環境のみならず周産期化学物質曝露が成人病の発症要因となるという DOHaD 学説を支持する実験結果と言える。

(3) ダイオキシン受容体下流シグナルと微細形態変化との密接な関連性が判明：EP 法により発生・発達時期の神経細胞内で恒常活性化型ダイオキシン受容体 (CA-AhR) を発現させ、AhR 下流シグナルカスケードを過剰に活性化させることができる。海馬 CA1 や大脳皮質の神経細胞を対象に実験したところ、CA-AhR 発現により樹状突起の短縮化が起こっていた。AhR 下流シグナルが樹状突起形態を制御していることが分かり、CA-AhR が TCDD 曝露による微細形態変化をシミュレートしていることが示唆された。

(4) 社会的成育環境による社会性行動の変化と遺伝子発現変化：幼少時の社会環境（育児放棄や虐待など）が社会性脳機能に影響することから、「社会環境隔離マウス」を作成し、化学物質曝露と比較検討した。隔離マウスでは競争的環境下において、通常成育マウスと比べて優位性が低下していた。さらに LMD-qPCR 法により脳領域特異的に遺伝子発現解析を行った結果、隔離マウスの海馬 CA1、扁桃体、大脳皮質では、神経活動マーカーや成長因子の遺伝子の発現量が低下していた。優位性の低下は TCDD 曝露動物においても観察されているため、これら遺伝子の発現変化は曝露動物でも起こっている可能性が高い。

## 5. 今後の計画

これまでに周産期化学物質曝露による微細形態変化を捉えることに成功し、毒性メカニズムの解析にも着手している。今後は

LMD-qPCR 法等を活用し、曝露による微細形態変化に関連する遺伝子発現変化を調べる。他の化学物質（ヒ素・農薬）曝露が微細形態に及ぼす影響を調べて毒性影響の評価指標としての汎用性・有用性を確認していく。

## 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Benner S, Endo T, Takeyama M, Tohyama C. Environmental insults in early life and submissiveness later in life in mouse models. Neuroendocrine Science. In press.
2. Kimura E, Matsuyoshi C, Miyazaki W, Benner S, Hosokawa M, Yokoyama K, Takeyama M, Tohyama C. Prenatal exposure to bisphenol A impacts neuronal morphology in the hippocampal CA1 region in developing and aged mice. Arch Toxicol. In press.
3. Benner S, Endo T, Endo N, Takeyama M, Tohyama C. Early deprivation induces competitive subordination in C57BL/6 male mice. Physiol Behav. 137: 42-52, 2014.
4. Takeyama M, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Tohyama C. Disruption of paired-associate learning in rat offspring perinatally exposed to dioxins. Arch Toxicol. 88; 789-798, 2014.
5. Yoshioka W, Endo N, Kurashige A, Haijima A, Endo T, Shibata T, Nishiyama R, Takeyama M, Tohyama C. Fluorescence laser microdissection reveals a distinct pattern of gene activation in the mouse hippocampal region. Sci Rep. 2; 783, 2012.

ホームページ等

- UTokyo Research（東京大学による研究成果の国際発信HP）  
<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/about/index.html>
- 東京大学健康環境医工学部門HP（主宰研究室の公式HP）  
<http://env-health.m.u-tokyo.ac.jp/>
- 東京大学医学部HP（広報）  
<http://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/press.html>