

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26241016

研究課題名(和文) ヒトGWASデータに基づいたAhr発達神経毒性の分子機構の解明

研究課題名(英文) GWAS-based analysis of molecular basis of AhR developmental neurotoxicity.

研究代表者

掛山 正心 (KAKEYAMA, Masaki)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：30353535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,900,000円

研究成果の概要(和文)：ダイオキシンは芳香族炭化水素受容体(AhR)を介して致死毒性や催奇形性、免疫毒性を示すことが明らかとなっているが、発達神経毒性におけるAhRの関与は未だ明確な結論が出ていない。そこでダイオキシン影響の検出に成功した独自開発の行動課題を用いて解析した結果、AhR遺伝子欠損マウスはダイオキシンを曝露しなくとも、ダイオキシン胎仔期曝露に類似した社会行動異常を示すという結論を得た。恒常的活性型AhR遺伝子を導入した神経細胞では細胞移動や神経突起の伸展に異常が生じていることも明らかとなった。以上の結果から、AhRは脳機能発現の重要分子であるがゆえに、ダイオキシンの影響が脳に顕われやすいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Maternal exposure to a low dose of dioxin in rodents have been reported to disrupt high cognitive and socio-emotional functions of offspring even in a dose. We have also reported that the mice who exhibited abnormal socio-emotional behaviors after dioxin exposure showed the imbalanced brain activities between medial prefrontal cortex and amygdala. Consistently, a human birth cohort study indicated a low-level of prenatal exposure to dioxin-like PCB exhibited a preference for the upright biological motion (BM) over inverted BM, indicating that prenatal exposure to dioxin like compounds impairs the development of social functioning. Although it is well known that dioxin affect lethal, teratogenic and immuno-toxicities via the aryl hydrocarbon receptor (AhR), it is unclear yet whether such AhR signaling is involved in developmental neurotoxicity. We also found that AhR have an important role in brain function.

研究分野：予防医科学・応用生理学

キーワード：神経科学 社会医学 トランスレーショナルリサーチ 有害化学物質 行動神経内分泌学 行動神経科学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

五大疾病の一つである精神疾患は、病因・病態のメカニズムに不明点が多く、根本治療が困難な重要テーマの一つである。発症には様々な内的・外的要因が寄与するとされ、その一つに胎児期における有害化学物質の曝露があることは、毒性学分野だけでなく精神医学領域からも指摘されている。実際に過剰な曝露を受けた集団では、ダイオキシン類の発達期曝露量と注意欠如多動症(ADHD)や精神遅滞発症率との間に相関が示されている。ところが、一般環境レベルの曝露量と精神疾患との関連性は不明確な状態が続いており、科学的根拠の提示が待たれている。すなわち、「こころの健康からの逸脱」を曝露影響のエンドポイントとして、科学的根拠に基づいたダイオキシン曝露の影響評価を行うことが緊急の課題と言える。

掛山らはこれまでに、ラット・マウスを用い、ごく低用量のダイオキシン類の胎児曝露の影響を調べてきた。ダイオキシン毒性は視床下部機能だけでなく、大脳皮質機能にも強く顕れること、単純な(餌場を覚えるような)記憶機能には影響のない低用量ダイオキシン曝露により、高次認知機能が障害されること、ごく低用量のダイオキシンが脳の活動性異常と認知・社会行動異常を引き起こすことを明らかにしてきた。

動物毒性実験の成果を受け、出生コホートにおいて、特に社会性に注目して乳幼児の発達調査を進めている。これまでに、PCB類の中でもダイオキシン様毒性をもつPCB118について、その臍帯血中濃度が高いほど、人間の動き映像(biological motion)に対する関心が低い(注視時間が短い)ことを見出した。Biological motionの注視時間は、社会的なものへの関心の強さを示す指標の一つであり、典型例としては、自閉スペラム症(ASD)当事者では注視時間が短いことが知られている。すなわち我々の知見は、一般環境レベルのダイオキシン様PCBの曝露が「こころの健康な発達」を逸脱させる可能性を強く示唆するものである。

2. 研究の目的

われわれはこれまでの知見を総合し、「AhRは脳発達形成の重要分子であるがゆえに、ダイオキシン毒性が脳に顕われやすい」という仮説を設定し、ダイオキシン類の低用量曝露影響に関するヒト出生コホート研究ならびにマウス毒性試験において、

ダイオキシン曝露が精神疾患発症、「こころのひずみ」の問題のリスク因子であるかを明らかにすることを目的とした。AhRを中心に、ダイオキシン類に対する感受性を左右する遺伝子多型を検索し、ダイオキシン感受性と、毒性表現型(あるいは精神神経症状)に直接関わる遺伝子との関係性をマウス *in vivo* 実験により検証することで、AhR発達神経毒性の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

行動評価尺度： 個々の評価尺度は構築済みである。本研究では、ヒト出生コホートならびにマウス毒性試験に実用化した。例えば、脳活動の評価は「行動柔軟性課題」では、ヒトとマウスに共通して前頭皮質が活性化することを改めて確認した。脳・行動尺度と胎児期ダイオキシン曝露量との相関を検証した。

出生コホート研究： 既に開始している出生コホートにおいて、ダイオキシン類ならびに重金属類の臍帯血中濃度を測定した。新生児運動の解析や乳幼児視線計測など、客観的かつ定量的評価を体系化・マニュアル化し、コホート調査に実装した。General Movements (GM) 測定、視線計測検査、生活習慣、胎児愛着尺度(PAI)、Parental bonding instrument (PBI)日本語版、エジンバラ産後うつ病尺度(EPDS)、うつ病自己評価尺度(CES-D)、Mother-to-Infant Bonding Scale 日本語版、自尊感情尺度(RSES)、愛着行動チェックリスト(ABCL)、乳幼児自閉症チェックリスト(M-CHAT)等を行なった。少数例を対象とした網羅解析(高速シーケンス、マイクロアレイ)、定量的詳細解析(定量的qPCR・パイロシーケンス・ターゲットシーケンス)を行なった。

マウス実験： 胎児期における低用量のダイオキシン(2,3,7,8-TCDD。以下、TCDDと略す)曝露マウスを用いて生体試料の回収・解析を行った。また、AhR遺伝子欠損マウスを用いた解析を行なった。解析項目としては、IntelliCage全自動集団型マウス行動試験装置を用いた「行動柔軟性課題」、「競争環境モデル課題」、「集団化課題」等を実施した。

ヒト研究とマウス実験の融合的アプローチ： AhRを中心としたヒトゲノム解析を行った。(1)AhR毒性に関与するもの、(2)

行動表出に関わるもの、(3)AhR を介した毒性の感受性に関わるものを想定し、通常の関連性解析のほか、多型情報を遺伝子毎ならびに伝子座毎に統合整理し、種間比較を行った。

4. 研究成果

出生コホート研究： 出生コホートにおいて、臍帯血を採取した新生児に対して運動解析、視線計測を実施し、その際にだ液試料を採取した。同時に母親に対して生活習慣やうつ病事故評価尺度、児の発達に関する質問紙調査を行なった。臍帯血試料の一部を用いて臍帯血中化学物質の測定を行い、各評価指標との関連を解析した結果、Biological motion の注視時間はダイオキシン様 PCB 類濃度とのみ有意な相関を示し、重金属類濃度とは相関しないことから（図 1）、PCB 類濃度と行動指標との関連性が高いことが示唆された。

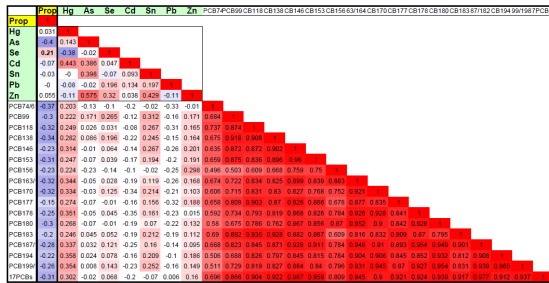


図 1. 臍帯血中 PCB と行動の相関行列

マウス実験： ダイオキシンは芳香族炭化水素受容体(AhR)を介して致死毒性や催奇形性、免疫毒性を示すことが明らかとなっているが、発達神経毒性における AhR の関与は未だ明確な結論が出ていない。そこでダイオキシン影響の検出に成功した独自開発の行動課題を用いて解析した結果、AhR 遺伝子欠損マウスはダイオキシンを曝露しなくとも、ダイオキシン胎仔期曝露に類似した社会行動異常を示すという結論を得た。

ヒト研究とマウス実験の融合的アプローチ：

また我々はヒト社会性に関する実験調査の中で、AhR 遺伝子上に、感情識別能力の有意な低下を示す一塩基多型を見出した。この遺伝子多型は、我々の日本人コホートでは約 1/3 の確率で出現するが、欧米の報

告例では 1/100 程度の出現率でしかないので、その関連性を見逃されていた可能性がある。ヒト由来培養細胞系で検討したところ、この遺伝子多型はダイオキシン感受性にも関係することが明らかとなってきた。胎仔脳子宮内電気穿孔(IUE)法による検討でも、恒常的活性型 AhR 遺伝子を導入した神経細胞では細胞移動や神経突起の伸展に異常が生じていることも明らかとなってきた。

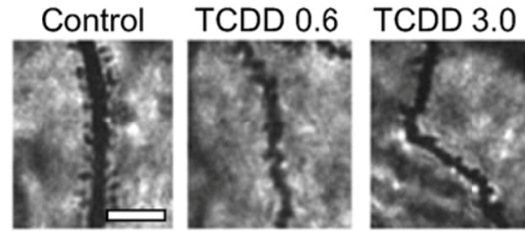


図 2. TCDD 曝露による海馬スパイン密度の低下 (Kimura et al., 2015 より転載)。

以上の結果から、AhR は脳機能発現の重要分子であるがゆえに、ダイオキシンの影響が脳に顕われやすく、ダイオキシン発達神経毒性の少なくとも一部は、AhR を介した毒性であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Benner S, Endo T, Endo N, **Takeyama M (責任著者)**, Tohyama C (責任著者). 2014, Early deprivation induces competitive subordination in C57BL/6 male mice. *Physiology & Behavior* 137:42-52. 査読有 . doi: 10.1016/j.physbeh.2014.06.018.
2. Kimura E, Matsuyoshi C, Miyazaki W, Benner S, Hosokawa M, Yokoyama K, **Takeyama M (責任著者)**, Tohyama C (責任著者). 2015, Prenatal exposure to bisphenol A impacts neuronal morphology in the hippocampal CA1 region in developing and aged mice. *Archives of Toxicology* 90:691-700. 査読有 . doi: 10.1007/s00204-015-1485-x.
3. Benner S, Endo T, **Takeyama M (責任著者)**, Tohyama C. 2015, Environmental insults in early life and submissiveness later in life in mouse models. *Frontiers in Neuroscience* 9:91. 査読有 .

doi: 10.3389/fnins.2015.00091.

4. Takamura T, **Nishitani S**, Suegami T, Doi H, **Takeyama M**, Shinohara K. 2015, Developmental changes in the neural responses to own and unfamiliar mother's smiling face throughout puberty. *Frontiers in Neuroscience* 9:200. 査読有 . doi: 10.3389/fnins.2015.00200.
5. Kimura E, Kubo K, Matsuyoshi C, Benner S, Hosokawa M, Endo T, Ling W, Kohda M, Yokoyama K, Nakajima K, **Takeyama M**, Tohyama C. 2015, Developmental origin of abnormal dendritic growth in the mouse brain induced by in utero disruption of aryl hydrocarbon receptor signaling. *Neurotoxicology and Teratology* 52(Pt A):42-50. 査読有 . doi: 10.1016/j.ntt.2015.10.005.
6. Benner S, **Takeyama M**, Endo T, Yoshioka W, Tohyama C. 2015, Application of NeuroTrace staining in the fresh frozen brain samples to laser microdissection combined with quantitative RT-PCR analysis. *BMC Research Notes* 8:252. 査読有 . doi: 10.1186/s13104-015-1222-9.
7. Ishii K, Kubo K, Endo T, Yoshida K, Benner S, Ito Y, Aizawa H, Aramaki M, Yamanaka A, Tanaka K, Takata N, Tanaka KF, Mimura M, Tohyama C, **Takeyama M (責任著者)**, Nakajima K. 2015, Neuronal Heterotopias Affect the Activities of Distant Brain Areas and Lead to Behavioral Deficits. *Journal of Neuroscience* 35:12432-12445. 査読有 . doi: 10.1523/JNEUROSCI.3648-14.2015.
8. Aung KH, Kyi-Tha-Thu C, Sano K, Nakamura K, Tanoue A, Nohara K, **Takeyama M**, Tohyama C, Tsukahara S, **Maekawa F**. 2016, Prenatal Exposure to Arsenic Impairs Behavioral Flexibility and Cortical Structure in Mice. *Frontiers in Neuroscience* 10:137. 査読有 . doi: 10.3389/fnins.2016.00137.
9. Kimura E, Endo T, Yoshioka W, Ding Y, Ujita W, **Takeyama M**, Tohyama C. 2016, In utero and lactational dioxin exposure induces Sema3b and Sema3g gene expression in the developing mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 47:108-113. 査読有 . doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.048.

〔学会発表〕（計 14 件）

1. 岡田 絢・遠藤 俊裕・遠藤 千春・掛山 正心、タッチスクリーン装置を用いたマウス行動抑制試験法の開発. 第 37 回日本神経科学大会.2014 年 9 月 11 日、横浜パシフィコ(神奈川県)
2. 遠藤のぞみ・宇治田和佳・遠山千春・掛山正心、生育環境の異なるマウスにおける新規行動解析システムによる集団飼育下行動の検討. 第 37 回日本神経科学大会.2014 年 9 月 11 日～13 日、横浜パシフィコ(神奈川県)
3. **Maekawa F, Htet Aung K, Sano K, Nakamura S, Tanoue A, Takeyama M., Tohyama C., Nohara K, Tsukahara S.** Prenatal arsenic exposure impaired behavioral flexibility and morphology of corex in mice. 9th World Congress International Brain Research Organization. 2015/07, Rio de Janeiro, Brazil.
4. 掛山正心、「マウスを用いた前頭野依存性行動モデル：高次学習から実行機能へ」第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会シンポジウム.2015 年 9 月 24 日、タワーホール船堀(東京)(招待)
5. 掛山正心、「環境と脳：ダイオキシン毒性実験からみた高次脳機能発達」第 42 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会 2015 年 9 月 18 日、仙台市戦災復興記念館(仙台)(招待)
6. ベナー 聖子・尾藤 晴彦・掛山 正心・山末 英典、「集団内行動の定量化に基づくオキシトシン効果判定指標の網羅的探索：マウスを用いた予備的検討結果」第 42 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会 2015/09、仙台.
7. 掛山正心、「高次脳機能の健康を阻害する幼少期の環境要因と遺伝的要因」第 86 回日本衛生学会学術総会、2016/05 月 11 日旭川市民文化会館(旭川)（招待）
8. Masaki Takeyama.Introduction of symposium: Mouse social behavior, environmental and genetic factors. 第 39 回日本神経科学大会. 2016 年 7 月 20 日パシフィコ横浜(横浜)（招待）
9. 掛山正心．脳発達における AhR の役割とダイオキシン発達神経毒性．環境

ホルモン学会第 19 回研究発表会、2016 年 12 月 8 日、文部科学省研究交流センター2F(つくば)。(招待)

10. 掛山正心、「ASD 病態と OXT の薬効メカニズム解明を目指した齧歯類モデル動物の行動解析技術」次世代脳プロジェクト 2016 年冬のシンポジウム AMED 企画シンポジウム、2016/12 月 19 日一橋大学(東京)。(招待)
11. Waka Ujita, Nozomi Endo, Daisuke Ichikawa, Toki Saito, Hiroshi Oyama, Masaki Kakeyama. Early weaning induces high-dominance social behavior of mice under group-housed conditions. 第 39 回日本神経科学大会、2016 年 7 月 20 日パシフィコ横浜(横浜)
12. 宇治田和佳・遠藤のぞみ・小山博史・掛山正心. マウス早期離乳が成熟期における集団内社会性行動に及ぼす影響. 第 25 回日本行動神経内分泌研究会. 2016 年 9 月 13 日、ホテル・サンミ倶楽部(熱海)
12. 牧野友祐・岡田絢・遠藤俊裕・等々力博恵・遠藤のぞみ・掛山正心. タッチスクリーン型オペラント実験装置によるマウス Go/NoGo 課題の開発. 第 25 回日本行動神経内分泌研究会. 2016 年 9 月 13 日日、ホテル・サンミ倶楽部(熱海)
13. 京相和貴・宇治田和佳・若菜茂晴・遠藤のぞみ・掛山正心. Grin1 ミュータントマウスの社会性行動の解析. 第 25 回日本行動神経内分泌研究会. 2016 年 9 月 13 日、ホテル・サンミ倶楽部(熱海)

〔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://www.waseda.jp/prj-riems/ikiban-a/>

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(平成 27 年 3 月まで)
早稲田大学・人間科学学術院・教授(平成
27 年 4 月から)

研究者番号: 30353535

(2) 研究分担者

西谷正太 (NISHITANI, Shota) (平成 26
年度)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
助教

研究者番号: 50448495

若菜 茂晴 (WAKANA, Shigeharu) (平成
27 年度~平成 28 年度)

理化学研究所・バイオリソースセンター マ
ウス表現型解析開発チーム・チームリーダ
ー

研究者番号: 90192434

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

ベナー 聖子 (BENNER, Seico)

木村 栄輝 (KIMURA, Eiki)

遠藤 のぞみ (ENDO, Nozomi)

宇治田 和佳 (UJITA, Waka)

遠藤 俊裕 (ENDO, Toshihiro)

岡田 絢 (OKADA, Aya)

牧野 友祐 (MAKINO, Yusuke)

京相 和貴 (KYOSO, Kazuki)

等々力 博恵 (TODORIKI, Hiroe)

前川 文彦 (MAEKAWA, Fumihiko)

遠山 千春 (TOHYAMA, Chiharu)

小山 博史 (OYAMA, Hiroshi)