

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870445

研究課題名(和文) ヒト胎児脳由来神経前駆細胞を用いた神経分化におけるAhR・Arntの機能解明

研究課題名(英文) Function of AhR and Arnt in Neural Differentiation using Human Neural Progenitor Cell Line.

研究代表者

宮崎 航 (Miyazaki, Wataru)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90512278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ダイオキシン、PCBなどの環境化学物質の胎生期曝露は脳発達に大きな影響を及ぼすことが示唆されているが、ヒトの神経分化に対する影響の解析は十分でない。本研究では、ダイオキシンの作用点として知られるAhRならびにArntの神経分化における機能を解明し、これらを介した化学物質曝露影響について研究を行った。その結果、AhR/Arntをノックダウンしたヒト胎児由来神経前駆細胞の神経系への分化が阻害されることが観察された。また、脳発達にかかわる甲状腺ホルモン受容体：TRとAhR/Arntとの関係について解析し、TRとArntは相互に結合し、TR標的遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Several researchers have reported that Environment chemicals, such as dioxins and PCBs, cause adverse effects on human brain development. These effects may be caused through dioxin receptor (AhR)-Arnt complex, but the function of Ahr-Arnt complex on brain development, especially neural differentiation, has not been clarified sufficiently. In this study, we used human fetal brain derived neural progenitor cell line and investigated the function of Ahr-Arnt complex on neural differentiation. Moreover, the relationships between Ahr-Arnt complex and thyroid hormone receptor(TR) were also analyzed. The knock-down of AhR/Arnt caused the changes of several neural markers. Moreover, AhR and Arnt participated the TR mediated transcription and gene expression. These results suggested that AhR and Arnt has important roles in human neural differentiation, and also affect the function of several transcriptional factors including TR.

研究分野：神経毒性学

キーワード：環境化学物質 脳発達 神経分化

### 1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン (TCDD)、PCB をはじめとする環境化学物質の母親を介した胎生期曝露は脳発達を含め胎児に大きな影響を及ぼし、実験動物やヒトの疫学調査など多くの研究から成人・成獣時に変化をもたらすことが明らかにされている (Jacobson JL et al., N Engl J Med. 335(11):783-739 など)。申請者はこれまで、脳発達・成熟の変化による学習・認知・情動機能などへの影響について実験動物や分子レベルでの検証を行っている。上記をはじめとする化学物質の曝露研究を踏まえ、ヒトに対する化学物質曝露影響の解明・予測に生かしていくことは有益・肝要であるため、環境化学物質のヒトへのリスクアセスメントを見据えたヒト由来の試料を用いた環境化学物質の影響の検証は必要不可欠であるが、特に脳発達に関しては十分に行われていない。これまで環境化学物質、特にダイオキシンの作用はアрил炭化水素受容体：AhR/ AhR 核内移行因子：Arnt を介する経路が主であるとされ、神経細胞において AhR は記憶・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. 111(3):777-89.) また、線虫を用いた研究では神経突起の接続調節 (刈り込み) に AhR が必要であることが示されている (Huang X et al., Development. 131(4):819-28. など)。そこで申請者はヒト胎児脳由来神経前駆細胞株を用いた神経系細胞への分化過程における化学物質の曝露影響について、ダイオキシン類の受容体として知られる AhR ならびに Arnt に注目し研究を行った。

### 2. 研究の目的

in vitro、in vivo でのそれぞれの曝露研究から環境化学物質の毒性影響評価が行われ

ているが、ヒトへの評価を見据えた in vitro と in vivo の関連や統合の検証も不十分である。また、AhR および Arnt に関してはダイオキシン類の毒性発現の主経路とされているにもかかわらず、特に神経分化や脳発達における本来の機能についての解析は不十分である。そこで申請者は、脳発達における AhR/Arnt 本来の働きがダイオキシン類曝露時にどのように変化するかを念頭に置き、本研究において細胞ならびに動物を用いた AhR および Arnt の機能解析を行い、それらの関連性を評価しながら、最終的にヒトへのリスク評価法につながる基礎データを提供する。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず、ヒト胎児脳由来神経前駆細胞を用い、AhR・Arnt の機能解析を行い、その後研究の進捗状況と期間を確認しながら実験動物を用いた in vivo での確認・精査を行う予定で行った。

(1) ヒト胎児由来神経前駆細胞株の AhR および Arnt のノックダウン

ヒト胎児脳由来神経前駆細胞株を用いて、AhR および Arnt のノックダウン実験を行った。それぞれもしくは双方をノックダウンした後に神経系への分化を開始し、AhR および Arnt の有無における分化への変化を観察した。

(2) ChIP アッセイの確立と ChIP-seq

クロマチン免疫沈降法およびゲノムシークエンス法 (ChIP-seq 法) を行うにあたり、AhR・Arnt を用いた ChIP アッセイの確立を行った。さらにこれらの成果から、ChIP-seq を行った。

(3) 甲状腺ホルモン受容体：TR と AhR/Arnt の関連の検証

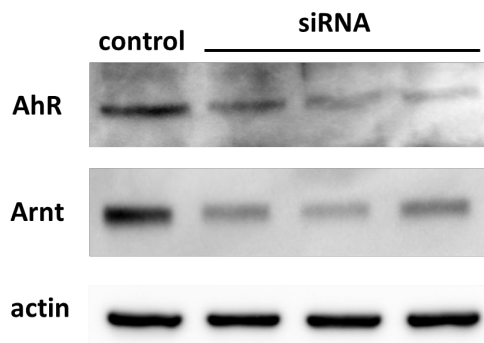
これまで、AhR・Arnt が、甲状腺ホルモン受容体：TR を介する転写に大きく関わることを見出している。TR は脳発達にも

重要な役割を果たすことから、本研究ではさらに TR と AhR・Arnt の相互の関係性ならびに、甲状腺ホルモン受容体標的遺伝子の発現変化を解析した。

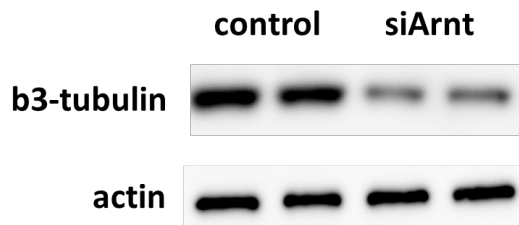
#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト胎児由来神経前駆細胞株の AhR および Arnt のノックダウン

ヒト胎児脳由来神経前駆細胞株 RencellVM 細胞を用い、分化開始前に AhR および Arnt の特異配列をターゲットとした siRNA を遺伝子導入し、ノックダウン実験を行った。その結果、AhR/Arnt どちらにおいてもノックダウンが確認された。



さらに、ノックダウンした後に神経系への分化を開始し、分化開始後3日目にタンパクを回収し、ウエスタンブロットにて神経系細胞マーカーの発現を観察したところ、特に siArnt 群において beta3-tubulin や GFAP などの発現の減少が認められた。



一方、ノックダウンによる神経分化の変化が認められたため、AhR と Arnt の過剰発現による影響についても検証したが、特に有意な変化は認められなかった。

##### (2) ChIP アッセイの確立と ChIP-seq

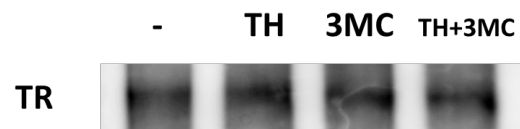
クロマチン免疫沈降法およびゲノムシー

クエンス法 (ChIP-seq 法) を行うにあたり、AhR・Arnt を用いた ChIP アッセイの確立を進めた。その結果、AhR は抗体をはじめとする各条件を検討したが、信頼に足る ChIP アッセイを確立することができなかった。一方、Arnt については信頼性の高い ChIP アッセイを行うことができたため、さらに ChIP-seq を行った。

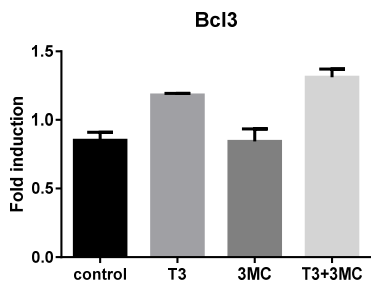
ChIP-seq データについて解析したところ、特異的な DNA 配列への結合を示す結果が認められず、抗体をはじめとする条件は ChIP アッセイに耐えうるものだったが、ChIP-seq のシグナルを得るには不十分であったと考察した。

##### (3) 甲状腺ホルモン受容体と AhR/Arnt の関連の検証

これまで、TR を介した転写における AhR および Arnt の関連について、Arnt 存在下では甲状腺ホルモンによる TR を介する転写が増強され、AhR ならびに AhR リガンド (3メチルコラントレン:3MC) がさらに加わると、その増強が抑えられることを確認している。そこで TR の転写において、Arnt が深く関わっていると予想し、Arnt と TR の結合についてヒト肝臓由来 HepG2 細胞を用いて、免疫沈降法にて解析を行った。その結果、TR と Arnt は甲状腺ホルモン:TH、3MC の有無にかかわらず、常に結合していることが認められた。



さらに、TR 標的遺伝子の発現変化について、同様に TH および 3MC の添加し解析した。その結果、予想に反し、TH と 3MC を同時に添加した際には、TR 標的遺伝子の増強が認められた。



(4) まとめ

以上の結果から、AhR および Arnt はヒトの神経細胞の分化に深く関わり、また、TRなどの核内受容体・転写因子と相互に作用することが認められた。これらのことから、化学物質の中枢神経系の神経分化ならびに発達に対する影響は AhR ならびに Arnt を介して、さらには他の関連する因子のかく乱によって引き起こされることが予想される。

本研究の成果は、ダイオキシンなどの作用点と考えられていた AhR および Arnt の、神経分化における機能を新たに示すものであり、これからの環境化学物質影響解析に有益な情報となるだろう。さらに研究を進め、さらなる解明を目指したい。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 航 (MIYAZAKI, Wataru)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 90512278