

平成 31 年 4 月 25 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06706

研究課題名(和文)環境化学物質による「ストレス脆弱性」発現メカニズムの解明とバイオマーカーの確立

研究課題名(英文)Elucidation of underlying mechanism of onset of stress vulnerability by environmental chemicals to explore biomarkers

研究代表者

平野 哲史(Hirano, Tetsushi)

富山大学・研究推進機構 研究推進総合支援センター・助教

研究者番号：70804590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環境化学物質曝露時に観察される「ストレス脆弱性」状態の発現メカニズムを解明するとともに、曝露初期の変化を検出可能な新規バイオマーカーの確立を目的とした。哺乳類の脳神経系への影響が懸念されるネオニコチノイド系農薬を曝露したマウスにおいては、新規環境において多様な神経行動学的影響がみられ、一部の脳領域において神経細胞数が変化することを示した。加えて、ヒト神経芽細胞腫を用いた実験から、曝露初期に細胞内へのカルシウム流入が見られ、関連する遺伝子発現の変化を誘導することが明らかになった。これらの結果から神経細胞における特定の遺伝子発現変化が新規バイオマーカーの候補となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、哺乳類へ及ぼす影響に関するデータが不足している農薬のリスク評価に対し、新たな知見を提供することで毒性学および予防医学的において多大な波及効果をもたらす。また、本研究の応用により、「化学物質が高次脳機能に対して影響を及ぼすのか否か」を簡便かつ高感度に検出可能な新規リスク評価法の開発が期待でき、将来的な実験動物の使用数削減等にも繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although the disruptions of stress responses are involved in stress-related mental disorders such as depression and anxiety disorder, it still remains unknown how environmental factors make us vulnerable to stress. The purpose of this study is to elucidate the underlying mechanism of onset of stress vulnerability by environmental chemicals and to explore new biomarkers.

Our study demonstrated that a neonicotinoid pesticide, clothianidin induced various stress-related behavioral changes of mice in a novel environment in addition to increasing the number of neural cells in particular areas of brain. We also found that clothianidin evoked the transient intracellular calcium flux in human neuroblastoma SH-SY5Y cells immediately after exposure and induced changes of the gene expression profile. Taken together, the alteration of gene expression in neural cells could be new biomarkers to detect risks of environmental chemicals.

研究分野：毒性学

キーワード：環境化学物質 ストレス脆弱性 ネオニコチノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、社会問題となっているうつ病や不安障害を含むストレス関連精神疾患増加の原因としては、生来の遺伝的要因に加えて、化学物質曝露や養育環境等の環境要因が挙げられる。これらの疾患は「一定レベルの心理的ストレス曝露に対して過剰な反応を示す」高感受性集団において発症しやすいため、その病態モデルとして個々の素因に様々な環境要因が複合し、閾値を越えた際に初めて症状が顕在化する「ストレス脆弱性仮説」が支持されている [Ingram and Luxton, 2005]。しかし、環境要因が実際に「ストレスに対する脆弱状態」を発現させるメカニズムには不明な点が多く、適切な解析モデルは存在していない。

1990年代に開発されたネオニコチノイド系農薬は、昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChRs) を標的としたアゴニスト作用を示す。しかしながら、ネオニコチノイドは哺乳類の神経細胞に対しても nAChRs を介して異常興奮を惹起することが報告された [Kimura-Kuroda et al., 2012]。nAChRs は脳全域に発現し、コリン作動性神経伝達を司るのみならず、神経発生や分化、シナプス形成等に関与するため、ネオニコチノイドが非標的生物の脳神経系に及ぼす不測の影響が懸念されている。我々はこれまでに新規環境化学物質の一例として本農薬に着目し、哺乳類の神経行動機能に及ぼす影響を精査する中で、毒性試験における無毒性量以下の曝露によりマウスの不安様行動や特徴的なストレス関連行動 (負の情動応答とされる異常啼鳴) や、ストレス応答関連脳領域の過剰な活性化がみられる等の所見を得てきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、近代特有の環境要因である化学物質が引き起こす「ストレス脆弱性」の発現メカニズムを解明することである。ネオニコチノイド系農薬曝露マウスや培養神経細胞をモデルとし、個体から組織、細胞、分子レベルにおいて、曝露初期にどのような応答が起きているのかを明らかにすることで新規バイオマーカーの探索を目指す。

3. 研究の方法

(1)動物モデルを用いた環境化学物質の影響評価およびメカニズム解析

発達中の神経系へ及ぼす影響を明らかにするため、マウスの発達期にあたる 3-8 週齢にかけてネオニコチノイド系農薬の 1 種ジノテフランを曝露し、成獣となったマウスに対し各種行動試験や組織学的解析による影響評価を行った。また、本農薬が脳神経系に及ぼす影響に関する知見を深めるため、ネオニコチノイド系農薬の 1 種クロチアニジンが及ぼす行動学的影響における性差や週齢差を検討した。さらに、妊娠期における曝露が胎子へ移行するかどうかを検証するため、クロチアニジンを投与した妊娠マウスを用いて、母獣および胎子組織中の体内動態を比較した。

(2)培養細胞モデルを用いた環境化学物質の影響評価およびメカニズム解析

マウス神経芽細胞腫 (Neuro-2a) やヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) 等を培養神経細胞モデルとして上述のネオニコチノイド系農薬を曝露し、細胞数、細胞内カルシウム濃度、MAPK のリン酸化状態等に着目した機能的影響評価を行った。また、神経分化における影響を評価するため、レチノイン酸や脳由来神経栄養因子の存在下において分化誘導を行い、ネオニコチノイド系農薬が神経突起の伸長に及ぼす影響を評価した。

(3)網羅的遺伝子発現解析を用いた新規バイオマーカー候補因子の探索

培養細胞モデルについて、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現プロファイルの変化を検証した。また、データベースから取得した既存のアレイデータ等と比較することで新規バイオマーカーの候補となる因子の抽出を試みた。

4. 研究成果

(1)動物モデルを用いた環境化学物質の影響評価およびメカニズム解析

ジノテフラン曝露マウスにおいては、オープンフィールド試験において多動症状を示すと同時に、強制水泳試験やテールサスペンション試験において、うつ様行動の減少がみられた。加えて、中脳において Tyrosine hydroxylase および 5-hydroxytryptamine 陽性を示すドーパミンおよびセロトニン産生細胞が増加していることが明らかになった。以上の結果から、神経細胞が標的となること、分化・発達期の脳における影響が強く示唆された [雑誌論文, ; 学会発表,] (図 1)。

一方で、クロチアニジン単回投与によってみられる行動学的変化については、雌マウスは雄マウスに比べて影響が顕在化しにくいこと、ならびに、

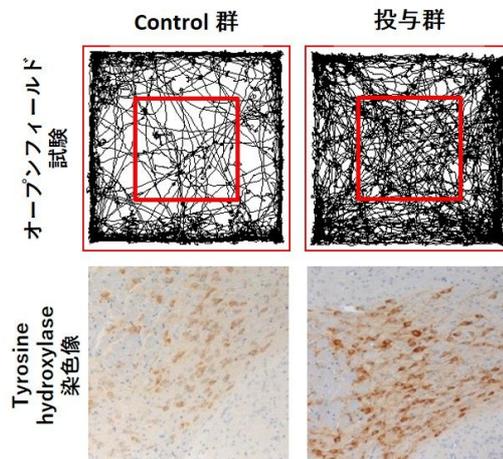


図1. ジノテフラン発達期曝露による多動症状とドーパミン産生細胞数の増加

depression-related phenotype in juvenile mice.

Takada T, Yoneda N, Hirano T, Yanai S, Yamamoto A, Mantani Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Tabuchi Y, Hoshi N

The Journal of veterinary medical science 80(4) 720-724 2018 年 4 月

doi: 10.1292/jvms.18-0022

The mechanisms underlying the effects of AMH on Müllerian duct regression in male mice.

Yamamoto A, Omotehara T, Miura Y, Takada T, Yoneda N, Hirano T, Mantani Y, Kitagawa H, Yokoyama T, Hoshi N

The Journal of veterinary medical science 80(4) 557-567 2018 年 4 月

doi: 10.1292/jvms.18-0023

NOAEL-dose of a neonicotinoid pesticide, clothianidin, acutely induce anxiety-related behavior with human-audible vocalizations in male mice in a novel environment.

Hirano T, Yanai S, Takada T, Yoneda N, Omotehara T, Kubota N, Minami K, Yamamoto A, Mantani Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Hoshi N

Toxicology letters 282 57-63 2018 年 1 月

doi: 10.1016/j.toxlet.2017.10.010

Prenatal and early postnatal NOAEL-dose clothianidin exposure leads to a reduction of germ cells in juvenile male mice.

Yanai S, Hirano T, Omotehara T, Takada T, Yoneda N, Kubota N, Yamamoto A, Mantani Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Hoshi N

The Journal of veterinary medical science 79(7) 1196-1203 2017 年 7 月

doi: 10.1292/jvms.17-0154

[学会発表](計 16 件)

平野哲史, 星 信彦, 田淵圭章. ネオニコチノイド系農薬が哺乳類の脳神経系に及ぼす影響に関する包括的リスク評価. 環境ホルモン学会第 20 回研究発表会, シンポジウム 1「リスク研究の新展開」; 2017 Dec 11; 神戸.

高田 匡, 米田直起, 大成果乃子, 大野周嗣, 久保静花, 杉田晁佑, 宮田結佳, 平野哲史, 万谷洋平, 横山俊史, 北川 浩, 星 信彦. 環境ストレスおよびネオニコチノイド系農薬ジノテフランの複合影響評価; 環境ホルモン学会第 20 回研究発表会; 2017 Dec 11; 神戸.

米田直起, 高田 匡, 大成果乃子, 大野周嗣, 久保静花, 杉田晁佑, 宮田結佳, 平野哲史, 万谷洋平, 横山俊史, 北川 浩, 星 信彦. 発達期におけるネオニコチノイド系農薬曝露により引き起こされたドーパミン神経系の攪乱を伴う多動; 環境ホルモン学会第 20 回研究発表会; 2017 Dec 11; 神戸.

田淵圭章, 轟 勇人, 鈴木信雄, 平野哲史, 竹内真一, 椎葉倫久, 近藤 隆, 長谷川英之. マウス MC3T3-E1 前骨芽細胞様細胞に対する低出力パルス超音波の効果. 日本超音波医学会第 91 回学術集会; 2018 Jun 8-10; 神戸.

田淵圭章, 柚木達也, 古澤之裕, 平野哲史, 鳥越美沙子, 皆川沙月, 林 篤志. ヒト子宮頸がん HeLa 細胞の温熱誘導細胞障害における BAG3 の役割. 日本ハイパーサーミア学会第 35 回大会; 2018 Aug 31-Sep 1; 福井.

大野周嗣, 大成果乃子, 久保静花, 坂田奈那美, 杉田晁佑, 宮田結佳, 高田 匡, 平野哲史, 万谷洋平, 横山俊史, 石塚真由美, 池中良徳, 星 信彦. 浸透性農薬とその代謝産物の胎子移行量の解明. 第 161 回日本獣医学会学術集会; 2018 Sep 11-13; つくば.

宮田結佳, 大成果乃子, 大野周嗣, 久保静花, 杉田晁佑, 高田 匡, 前田瑞稀, 中西怜稀, 平野哲史, 万谷洋平, 横山俊史, 星 信彦. ネオニコチノイド系農薬が老齢動物に及ぼす影響. 第 161 回日本獣医学会学術集会; 2018 Sep 11-13; つくば.

大成果乃子, 大野周嗣, 久保静花, 中西怜稀, 荒井真也, 杉田晁佑, 宮田結佳, 高田 匡, 前田瑞稀, 平野哲史, 万谷洋平, 横山俊史, 星 信彦. ネオニコチノイド系農薬における哺乳動物への免疫毒性の検証. 第 161 回日本獣医学会学術集会; 2018 Sep 11-13; つくば.

久保静花, 宮田結佳, 大成果乃子, 大野周嗣, 杉田晁佑, 前田瑞稀, 高田 匡, 平野哲史, 万谷洋平, 横山俊史, 星 信彦. 浸透性農薬の行動影響の性差. 第 161 回日本獣医学会学術集会; 2018 Sep 11-13; つくば.

田淵圭章, 柚木達也, 古澤之裕, 平野哲史, 鳥越美沙子, 皆川沙月, 林 篤志. がん細胞の温熱誘導細胞死における BAG3 の役割. 第 91 回 日本生化学会大会; 2018 Sep 24-26; 京都.

田淵圭章, 轟 勇人, 鈴木信雄, 平野哲史, 竹内真一, 椎葉倫久, 長谷川英之. 低出力パルス超音波の細胞応答. 平成 30 年度第 4 回アコースティックイメージング研究会; 2018 Dec 13; 千葉.

平野哲史, 皆川沙月, 古澤之裕, 柚木達也, 横山俊史, 星 信彦, 田淵圭章. ネオニコチノイド系農薬クロチアニジンはヒト神経芽細胞腫において Ca²⁺シグナルのかく乱を引き起こす. 第 21 回環境ホルモン学会研究発表会; 2018 Dec 15-16; 東京.

大野周嗣, 大成果乃子, 久保静花, 坂田奈那美, 平野哲史, 万谷洋平, 横山俊史, 石塚真由美, 池中良徳, 星 信彦. 母子間移行における浸透性農薬およびその代謝産物の定量的な解明. 第 21 回環境ホルモン学会研究発表会; 2018 Dec 15-16; 東京.

久保静花, 宮田結佳, 大成果乃子, 大野周嗣, 高田 匡, 平野哲史, 横山俊史, 星 信彦 . 無毒性量のネオニコチノイド系農薬曝露による行動影響の性差 . 第 21 回環境ホルモン学会研究発表会 ; 2018 Dec 15-16 ; 東京 .

宮田結佳, 久保静花, 大野周嗣, 前田瑞稀, 荒井真也, 中西怜稀, 高田 匡, 平野哲史, 横山俊史, 星 信彦 . ネオニコチノイド系農薬が老年動物に及ぼす影響 . 第 21 回環境ホルモン学会研究発表会 ; 2018 Dec 15-16 ; 東京 .

Nobuhiko Hoshi, Tetsushi Hirano, Yoshinori Ikenaka, Shuji Ohno, Kanoko Onaru, Shizuka Kubo, Mizuki Maeda, Yuka Miyata, Kosuke Sugita, Mayumi Ishizuka, Youhei Mantani, Toshifumi Yokoyama. Adverse effects on cognitive-emotional behavior and immune system function in experimental animals administered a NOAEL-dose of neonicotinoids. 2019 Mar 20. Hokkaido University.

〔その他〕

ホームページ等

researchmap – 平野哲史

<https://researchmap.jp/thirano0128/>

富山大学 生命科学先端研究支援ユニット ゲノム機能解析研究室

<http://www.lsrc.u-toyama.ac.jp/mgrc/html/laboratory.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。