

機関番号：32601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20310037

研究課題名 (和文) 環境化学物質の発達神経毒性：

トキシコゲノミックなアプローチによる評価法の確立

研究課題名 (英文) Developmental neurotoxicity of environmental chemicals:

Development of an evaluation method through toxicogenomic approach

研究代表者

田代 朋子 (TASHIRO TOMOKO)

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：50114541

研究成果の概要 (和文)：効率的な発達神経毒性評価法の確立を目指し、独自に作成したマイクロアレイを用いて、毒性機構の異なる二つの化学物質、トリブチルスズ (TBT) とサリドマイド、の経世代曝露による発達期ラット脳の遺伝子発現変化を解析した。独自アレイには、生後発達期の脳で大きく発現変化する遺伝子を約 450 種類に対する 45 塩基長プローブを搭載した。二つの化学物質で、感受性の高い脳内部位や発現変化する遺伝子の種類が大きく異なったが、いずれの場合もその発達神経毒性を感度良く捉えることができた。

研究成果の概要 (英文)：In order to develop an efficient method to evaluate developmental neurotoxicity of chemicals, we analyzed gene expression changes in the brain of rats fetally exposed to tributyl tin (TBT) or thalidomide using original oligonucleotide microarrays. About 450 developmentally regulated genes were selected experimentally, and gene-specific 45-mer oligonucleotide probes were spotted onto microarrays. The results showed that sensitivity of brain regions and gene groups were significantly different between the 2 chemicals, indicating that neurotoxicity arising from 2 different mechanisms could be effectively detected and distinguished by this method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 ・ 放射能・化学物質影響科学

キーワード：環境、神経科学、発生・分化、マイクロアレイ、発達神経毒性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) TBT については、成熟ラットの曝露実験

より、免疫毒性および神経毒性が指摘されていたが、作用機構は不明で、発達期の脳に対

する影響は調べられていなかった。また培養細胞を用いた実験から、ミトコンドリア機能阻害、細胞膜での塩素イオン・チャネル作用などの作用機構が提唱されていた。サリドマイドについては、胎生初期の単回曝露により、生後に脳内セロトニン濃度上昇や行動異常が検出され、「自閉症モデルラット」として注目されていた。

(2) DNA マイクロアレイを用いて化学物質による遺伝子発現の変化を網羅的に調べ、その影響および作用メカニズムを特定するトキシコゲノミックな方法は、効率的な毒性評価法として期待されていたが、感度、定量性、コスト、膨大なデータの解析などに課題が多く、発がん性評価には使われているものの、複雑な構造と機能を持つ中枢神経系に対する影響を個々の化学物質で調べる現実的な方法とはなり得ていなかった。

## 2. 研究の目的

独自の DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を中心に、発達期の脳に対する化学物質の影響を鋭敏かつ効率的に評価する方法を開発する。そのために、実験的に約 450 種類の評価遺伝子の更なる絞込みを行うとともに、異なる毒性メカニズムが想定される TBT とサリドマイドの胎生期曝露による影響を実際にこのアレイで調べることにより、評価遺伝子の妥当性、有効性を確認する。

## 3. 研究の方法

(1) 化学物質胎生期曝露ラットの作成：胎生期-生後初期トリブチルスズ (TBT) 曝露ラットは、妊娠 2 日目から出産後 3 週まで、母ラットに 25 または 125 ppm の TBT クロライドを混餌投与して作成した。TBT を含まない餌を与えた親から生まれた仔を対照群とした。生後 3 週で離乳後は、TBT を含まない餌に切り替えて生後 6 週まで飼育後、一部に

ついては生後 6 週～9 週まで再度 TBT を含む餌に替えて再曝露を行った。生後 1、2、3、6、9 週の各時点の仔ラット (♂) から、大脳皮質、中脳、および海馬を採取した。

サリドマイド曝露ラットは、成田らの方法 (Narita et al., Int. J. Dev. Neurosci., 2005) に従い、妊娠 9 日目ラットにサリドマイド(500mg/kg)を単回強制経口投与して作成した。溶媒に用いたアラビアガム水のみを投与し、対照群を作成した。生まれた仔ラット (♂) から、生後 7、14、20、30、40 日の各時点で大脳皮質および海馬を採取した。

(2) 独自 DNA マイクロアレイの作製：シナス構造遺伝子、神経活動依存性遺伝子、細胞死やミトコンドリア機能に関与する遺伝子など、約 450 を選び (一部は培養系で実験的に選定)、それぞれに特異的な 45 塩基長のプローブ配列を選定し、合成した。高精度アレイヤーを用いて、これらのプローブを特殊コーティングしたスライドガラス (日清紡、Carbostation) 上にスポットティングした。

(3) マイクロアレイによる遺伝子発現解析：胎生期曝露動物の各個体より採取した脳組織から Trizol 試薬を用いて total RNA を抽出し、cRNA 増幅法により蛍光色素 (Cy3 または Cy5) 標識 RNA を得た。実験ごとに、使用する各時点の対照群の Cy5 標識 RNA を等量混合し、標準 RNA とし、Cy3 標識実験群 RNA との競合ハイブリダイゼーション法により、遺伝子発現解析を行った。データは、アレイ上の 6 種類の標準遺伝子 (*rpL3*, *rpL13a*, *rpL22*, *rpL23*, *Ppia*, *ubiquitin1e*) の値を用いて標準化した。

(4) リアルタイム PCR 法による確認：各個体、各組織の total RNA から逆転写によって cDNA を作製し、各遺伝子に特異的なプライマーと蛍光インターカラー Sybr Green I を用いてリアルタイム PCR を行った。*Ppia* または

$\beta$ -actin を内部標準遺伝子としてデータを標準化した。

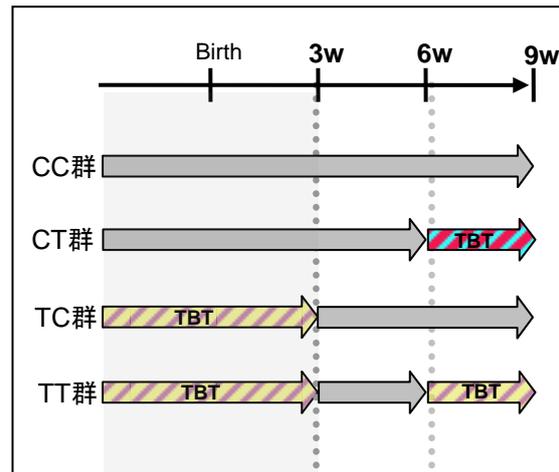
(5) 行動解析：TBT 曝露ラットについては、9 週齢の時点で、オープンフィールド・テストにより行動解析を行った（本研究費で購入した動物行動解析システムを使用）。

(6) 初代 培養神経細胞：胎齢 18 日ラット大脳皮質由来神経細胞を血清入り培地で 2 日間培養して生着させた後、無血清培地に交換すると同時に一定濃度の TBT を添加してさらに 4 日間培養した。

#### 4. 研究成果

(1) TBT の発達神経毒性：妊娠ラットに TBT を混餌投与することにより、経世代曝露ラットを作成し、生後 1、2、3、6 週の大脳皮質および中脳における遺伝子発現を独自のマイクロアレイ (450 遺伝子プローブ) を用いて正常ラットと比較検討するとともに、発現変化を検出した遺伝子についてはリアルタイム PCR 法による確認を行った。その結果、①大脳皮質より中脳に大きな変化が見られること、②発現変化するのは主としてミトコンドリア電子伝達系複合体および細胞内カルシウム濃度調節に関与する遺伝子であること、③中脳では、生後 3 週で離乳後は TBT を含まない通常の餌に切り替えても、6 週齢の時点でなお持続的な影響が残ること、を明らかにした。

さらに、生後 3 週までの発達期の経世代曝露と成熟後の曝露を比較するとともに、発達期の曝露が成熟後の再曝露に与える影響を調べるために、図に示すように生後 6 週～9 週での曝露実験を追加し、非曝露群 (CC 群)、成熟後曝露群 (CT 群)、発達期曝露群 (TC 群)、再曝露群 (TT 群) の 4 群を作成した。9 週齢の時点で 4 群を比較した結果、④中脳における



図：発達期および成熟後 TBT 曝露実験のプロトコル

チロシン水酸化酵素の遺伝子発現レベルは、CC 群を 1 として、CT 群で 68%、TC 群で 48%、TT 群で 25%であった。ドパミン輸送体 *dat* については TT 群のみ他に比較して有意に発現低下していた。また、⑤オープンフィールド・テストにおいても、CT 群は CC 群と比べて差がなかったが、発達期曝露を受けた 2 群 (TC 群、TT 群) では行動量に低下傾向がみられた。

以上のように、発達期の TBT 曝露の方が成熟後の曝露より影響が大きいこと、発達期に曝露を受けた動物が成熟後に再曝露した場合はさらに影響が大きくなること、が確認できた。

(2) 初代培養神経細胞に対する TBT の毒性：この系では  $1\mu\text{M}$  程度の TBT で細胞死が誘発されるが、これは NAC で抑制できることから、酸化ストレスによるものと考えられる。

(3) サリドマイドの発達神経毒性：胎生 9 日目サリドマイド曝露ラット (THA 群) では、成熟後 (生後 50 日 ; P50) の時点で海馬セロトニン濃度が高値を示すこと、縫線核におけるセロトニン神経細胞・細胞体の分布に正常とは異なる偏りがみられること、からセロトニン神経系の発達異常が示唆されていた。そこで、セロトニン神経の投射先である大脳皮

質および海馬における発達期の遺伝子発現を独自のマイクロアレイを用いて非曝露対照群(CTL群)のそれと比較した。

P7、P14、P20、P40の4時点で、THA、CTL両群のそれぞれ3個体の大脳皮質および海馬から個別に抽出したRNAを用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行ったところ、各時点での3個体間の再現性は良く、海馬よりも大脳皮質において両群の発現プロファイルに顕著な差が見られたため、以後の解析は大脳皮質に集中して行った。

大脳皮質では、P20でもっとも両群の差が大きかった(表)。P20はCTL群では遺伝子発現の転換期であり、多くの遺伝子がreference RNA(すべての時点の平均値に相当)に比べて発現上昇または低下を示したが、THA群ではこのような発達期特有の変化が見られなかったためである。

THA/CTL	P7	P14	P20	P40
発現上昇 (>1.5)	8	2	38	7
発現低下 (<0.67)	5	0	46	16

表: CTL群に比較してTHA群で±50%の発現変化のみられた遺伝子数

P20のTHA群とCTL群で発現差のみられた主な遺伝子は、(a) ミエリン構成タンパクの遺伝子、(b) ポストシナプス足場タンパクの遺伝子、(c) 細胞骨格およびその調節タンパクの遺伝子、であった。これらの遺伝子の発現変化はリアルタイムPCR法でも確認された。なかでもミエリン構成タンパクの遺伝子は、THA群で協調した発現上昇を示した。

以上のように、正常群とTHA群の差は生後20日の時点でもっとも顕著であることが分かった。正常群ではこの時点で、それまで上昇していた突起伸展やシナプス形成に必要な遺伝子の発現が低下に転じ、ミエリン形成

やシナプス成熟に関わる遺伝子の発現が上昇する。THA群ではこのようなはっきりした変化が起こらず、シナプス形成の時間的なずれが示唆される。また、ミエリン形成がより早く進んでいる可能性が示唆される。

(4) 焦点を絞った独自アレイの有効性: TBTおよびサリドマイド曝露動物の遺伝子発現解析の結果は、今回用いたような焦点を絞ったマイクロアレイが、発達期脳における化学物質の時期特異的、部位特異的影響を明らかにし、毒性メカニズムの違いを識別する上で効率的な道具となることが確認できた。多様な化学物質をこのような方法で分類することで、作用機序ごとに大きく発現変化する特徴的な遺伝子群を特定し、さらに評価遺伝子のセットを絞り込めるものと期待される。

#### 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5件)

①Kawaai K, Tominaga-Yoshino K, Urakubo T, Taniguchi N, Kondoh Y, Tashiro H, Ogura A, **Tashiro T.** “Analysis of gene expression changes associated with long-lasting synaptic enhancement in hippocampal slice cultures after repetitive exposures to glutamate.” 査読有 J Neurosci. Res. 2010 Oct; 88(13): 2911-22.

②Asakawa H, Tsunoda M, Kaido T, Hosokawa M, Sugaya C, Inoue Y, Kudo Y, Satoh T, Katagiri H, Akita H, Saji M, Wakasa M, Negishi T, **Tashiro T,** Aizawa Y. “Enhanced inhibitory effects of TBT chloride on the development of F1 rats.” 査読有 Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2010 May; 58(4): 1065-73.

③Leterrier JF, Kurachi M, **Tashiro T,** Janmey PA. “MAP2-mediated in vitro

interactions of brain microtubules and their modulation by cAMP.” 査読有  
Eur. Biophys. J. 2009 Apr;38(4):381-93.  
④Takahashi M, Negishi T, Imamura M, Sawano E, Kuroda Y, Yoshikawa Y, Tashiro T. “Alterations in gene expression of glutamate receptors and exocytosis-related factors by a hydroxylated-polychlorinated biphenyl in the developing rat brain.” 査読有 Toxicology 2009 Mar 4;257(1-2):17-24.  
⑤Kawaai K, Hisatsune C, Kuroda Y, Mizutani A, Tashiro T, Mikoshiba K. “80K-H interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptors and regulates IP3-induced calcium release activity.” 査読有 J. Biol. Chem. 2009 Jan 2; 284(1):372-80.

[学会発表] (計 21 件)

①Uno T., Ishibashi Y., Takahashi M., Negishi T, Tashiro T. “Analysis of gene expression profiles in the hippocampus and cerebellum of the Goto-Kakizaki rat, and animal model of type 2 diabetes” (10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry • October 18, 2010, Phuket)  
②Negishi T, Oyanagi K., Takahashi M., Imai N., Ihara T., Tashiro T. “Investigation of cerebral development in cynomolgus monkey-histological and biochemical analyses” (10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry • October 18, 2010, Phuket)  
③Sawano E., Negishi T, Tashiro T. “Local thyroid hormone metabolism in the hippocampus of senescence-accelerated

SAMP8 mice” (10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry • October 18, 2010, Phuket)

④Oyanagi, K., Negishi, T., Tashiro, T. “Effects of thyroid hormone on the survival and neurite outgrowth of cultured cerebellar granule cells” (10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry • October 19, 2010, Phuket)

⑤澤野 恵梨香、根岸 隆之、田代 朋子 「学習記憶障害を特徴とする老化促進モデルマウス SAMP8 海馬における甲状腺ホルモン代謝の変化」(Neuro2010・2010年9月3日神戸コンベンションセンター)

⑥小柳 洸志、根岸 隆之、田代 朋子 「培養小脳顆粒細胞における甲状腺ホルモン T4 の細胞死および神経突起伸展に及ぼす影響」(Neuro2010・2010年9月3日神戸コンベンションセンター)

⑦根岸 隆之、高橋 理貴、小柳 洸志、大西 大空、平野 靖史郎、田代 朋子 「小脳アストロサイトにおけるジフェニルアルシン酸による酸化ストレスと神経ペプチドおよび血管作動性ペプチドの産生」(Neuro2010・2010年9月4日神戸コンベンションセンター)

⑧角田 正史、竹内 裕紀、吉岡 良祐、根岸 隆之、池内 龍太郎、峽戸 孝也、細川 まゆ子、菅谷 ちえ美、田代 朋子、相澤 好治 「周産期トリブチルスズ曝露による、成熟後の F1 ラットの神経毒性：遺伝子発現と行動学試験を指標として」(Neuro2010・2010年9月4日神戸コンベンションセンター)

⑨澤野 恵梨香、中森 裕介、根岸 隆之、田代 朋子 「学習記憶障害を特徴とする SAMP8 海馬における甲状腺ホルモン関連遺伝子の発現変化」(第 25 回 老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会・2010年7月9日金沢大学

サテライト・プラザ)

⑩宇野 健史、石橋 瑛、高橋 理貴、根岸 隆之、田代 朋子「2 型糖尿病モデル・GK ラットの脳におけるホモシステイン代謝の変化」

(第 52 回日本神経化学会・2009 年 6 月 23 日 伊香保ホテル天坊)

⑪根岸 隆之、高橋 理貴、小柳 洸志、大西 大空、平野 靖史郎、田代 朋子「小脳顆粒細胞におけるジフェニルアルシン酸による酸化ストレスと細胞死」(第 52 回日本神経化学会・2009 年 6 月 22 日 伊香保ホテル天坊)

⑫降旗 千恵、渡辺 貴志、猪狩 寛子、嘉山 巧、鴻野 貴司、鈴木 孝昌、太田 浩良、野村 靖幸、田代 朋子「SAMP8 海馬と脈絡叢における Ttr と App の発現」(第 52 回日本神経化学会・2009 年 6 月 22 日 伊香保ホテル天坊)

⑬河合 克宏、富永一吉野 恵子、谷口 直子、御子柴 克彦、小倉 明彦、田代 朋子「繰り返しグルタミン酸刺激誘発性の長期神経可塑性に伴う遺伝子発現変化の解析」(第 52 回日本神経化学会・2009 年 6 月 22 日 伊香保ホテル天坊)

⑭小柳 洸志、高橋 理貴、根岸 隆之、田代 朋子「培養小脳顆粒細胞における低カリウム誘発細胞死に対する甲状腺ホルモン T4 の細胞保護作用」(第 52 回日本神経化学会・2009 年 6 月 22 日 伊香保ホテル天坊)

⑮澤野 恵梨香、高橋 理貴、船津 尚子、木村 洋人、根岸 隆之、田代 朋子「GABA 神経伝達機構の発達における甲状腺ホルモンの役割」(第 52 回日本神経化学会・2009 年 6 月 23 日伊香保ホテル天坊)

⑯角田 正史、若佐 美佳、浅川 秀雄、高橋 理貴、根岸 隆之、峽戸 孝也、細川 まゆ子、菅谷 ちえ美、井上 葉子、相澤 好治、田代 朋子「ラット脳の発達に対するトリブチル

スズ曝露の影響に関する二世世代トキシコジェノミック研究」(第 52 回日本神経化学会・2009 年 6 月 24 日 伊香保ホテル天坊)

⑰河合 克宏、久恒 智博、田代 朋子、御子柴 克彦「新規相互作用蛋白質 80K-H によるイノシトール 3 リン酸受容体のカルシウム放出活性制御」(第 51 回日本神経化学会・2008 年 9 月 13 日 富山国際会議場)

⑱若佐 美佳、今村 誠、吉岡 良祐、高橋 理貴、根岸 隆之、角田 正史、相澤 好治、田代 英夫、田代 朋子「トリブチルスズ経世代曝露による発達期脳の遺伝子発現変化」(第 51 回日本神経化学会・2008 年 9 月 13 日 富山国際会議場)

⑲小柳 洸志、高橋 理貴、根岸 隆之、田代 朋子「初代培養ラット小脳顆粒細胞における低カリウム誘発細胞死に対する内因性グルタミン酸の役割」(第 51 回日本神経化学会・2008 年 9 月 13 日 富山国際会議場)

⑳高橋 理貴、根岸 隆之、澤野 恵梨香、田代 朋子「LPS 誘導末梢性炎症による脳内甲状腺ホルモンシステムの変化」(第 51 回日本神経化学会・2008 年 9 月 12 日 富山国際会議場)

㉑田代 朋子、山村 尚志、鏡田 大輔、宮城 祐介、成田 正明 「胎生期サリドマイド曝露ラット大脳皮質におけるセロトニン・システムの生後発達異常」(第 51 回日本神経化学会・2008 年 9 月 13 日 富山国際会議場)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田代 朋子 (TASHIRO TOMOKO)  
青山学院大学・理工学部・教授  
研究者番号：50114541

### (2) 研究分担者

根岸 隆之 (NEGISHI TAKAYUKI)  
青山学院大学・理工学部・助教  
研究者番号：80453489