

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04341

研究課題名(和文) 発達期化学物質曝露による脳内ケモカインネットワークの攪乱と神経回路網の形成不全

研究課題名(英文) Disruption of brain chemokine networks and impaired neural circuit formation due to developmental exposure to chemicals

研究代表者

石原 康宏 (Ishihara, Yasuhiro)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・教授

研究者番号：80435073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：化学物質の発達期曝露により引き起こされる発達神経障害について、脳内免疫細胞であるミクログリアおよびミクログリアが産生するケモカインに着目して、メカニズムの解明を目指した。抗てんかん薬であるバルプロ酸(VPA)を発達期に曝露すると、海馬CA1領域でミクログリアが活性化し、神経回路機能の興奮性シフトおよび成長後の行動異常が認められた。VPAで発現が上昇するケモカインCCL3を同定した。CCL3の受容体であるCCR5アンタゴニスト、マラビロクは、神経回路機能や行動異常を抑制した。従って、VPAによる発達神経毒性には、活性化ミクログリアが放出するCCL3が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、10万種類にもおよぶ化学物質が工業的に生産されているが、化学物質による神経影響も危惧されており、米国小児科学会や欧州食品安全機関が医薬品や農薬の脳の発達への影響を警告している。化学物質のリスク評価を適正に行うためには、作用メカニズムの解明が望まれる。本研究では、ミクログリア由来CCL3という発達神経毒性に關与し得る具体的な分子の同定に成功した。本研究は、ケモカインネットワークと発達神経毒性との関連を示す点で創造的であり、バイオマーカーとしての利用や受容体アンタゴニストの投与など、発達神経毒性の早期発見・予防戦略も提供する。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the mechanism underlying developmental neurotoxicity induced by exposure to chemicals during development, with a focus on microglia, immune cells in the brain, and chemokines produced by microglia. Exposure to the antiepileptic drug valproic acid (VPA) during development resulted in microglial activation in the hippocampal CA1 region, accompanied by excitatory shifts in neural circuit function and subsequent behavioral abnormalities. We identified the chemokine CCL3, whose expression is upregulated by VPA. The CCR5 (a CCL3 receptor) antagonist maraviroc suppressed neural circuit dysfunction and behavioral abnormalities. Therefore, our findings suggest that CCL3 released by activated microglia can contribute to developmental neurotoxicity induced by VPA.

研究分野：環境毒性学

キーワード：発達神経毒性 神経回路機能 ミクログリア ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

医療や産業に使われている化学物質の中には、胎児期や乳幼児期の曝露により、成長後の行動異常を引き起こすものが幾らかある。妊娠中に抗てんかん薬バルプロ酸 (VPA) を服用すると、児の知能指数低下や自閉症のリスクが上昇する。電気機器の絶縁油として使われたポリ塩化ビフェニルの胎児期曝露は生後の記憶・学習障害や社会行動の異常の原因となる。このような化学物質による発達神経毒性は、ニューロンの電気的活動や分化に焦点が当てられ研究されてきたが、メカニズムは未解明である。

脳内の免疫担当細胞であるミクログリアは、発達期に不要なスパインやシナプスを貪食除去する。最近、ミクログリアの活性化が自閉症モデルマウス (Fragile X mice) の異常行動に関与するなど (Neuroscience 246:186, 2013)、活性化したミクログリアが異常な神経回路網形成に寄与することが示されつつある。申請者は、VPA の胎児期曝露により活性化した海馬のミクログリアが、成長後の空間作業記憶の低下と反復行動 (自閉症様行動) を引き起こすことを明らかにした。また、この責任遺伝子について次世代シーケンスにより 12 個に絞り込み、これらの精査の結果、ケモカイン CCL3 (MIP-1 α) を同定した。

発達神経毒性のメカニズム解析において、サイトカインが注目されている。この理由の一つは、最近提唱された母体の炎症が児の発達と密接に関連するという Maternal immune activation 仮説である (Science 353:772, 2016)。一方、ケモカインに着目した発達神経毒性研究はほとんどない。しかしながら、ケモカイン受容体 CXCR4 の KO マウスでは小脳の顆粒細胞層の発生が異常となるなど (Nature 393:595-599, 1998) ケモカインと神経発達との関連を示した報告は少ないながら存在する。また、CCL3 やその受容体 CCR5 はプロポフォルや (Eur J Anaesthesiol 32:336, 2015) ダイオキシン (TCDD, J Environ Sci 62:92, 2017) の発達期曝露により脳内で増加することが報告されている。加えて、CCL3 以外のケモカインについても、脳内で発現が増加するとの報告が増えてきた (右表参照)。従って、脳内の CCL3 を始めとしたケモカインは、普遍性をもって発達神経毒性に寄与する可能性がある。

動物種	曝露物質	脳部位	発現上昇するケモカイン	文献
マウス	カーボンブラックナノ粒子	大脳皮質	Cxcr2, Ccr9, Cxcl1	Sci Total Environ 634:1126, 2018
マウス	ダイオキシン (TCDD)	大脳皮質	Cxcl4, Cxcl7	J Appl Toxicol 31:279, 2011
ラット	プロポフォル	大脳皮質	Ccl2, Ccl3	Eur J Anaesthesiol 32:336, 2015
ラット	TCDD	脳	CCR5	J Environ Sci 62:92, 2017
ラット	鉛	大脳皮質 海馬	CX3CL1	Toxicol Sci 95:156, 2007

2. 研究の目的

上述の背景の下、本研究では脳内免疫担当細胞であるミクログリア、さらにはミクログリアが産生するケモカインの発達神経毒性への関与を明らかにすることを目的とした。発達神経毒性モデルとして、VPA を胎児期に曝露したマウスを用いた。

3. 研究の方法

(1) 胎児期 VPA 曝露と CCL3 アンタゴニスト、マラビロクの投与

VPA を 800mg/kg の用量で胎生 11.5 日に経口投与した。この用量により、投与 3 時間後の血中濃度はおおよそ 70 μ g/mL となり、VPA の有効血中濃度域 (50 ~ 100 μ g/mL) まで上昇した。マラビロクは、生後 1 日から 21 日まで母体に飲水投与した (50mg/kg/day)。

(2) マウス行動実験

マウスが 6 週齢まで成長した後、オープンフィールド試験を実施した。以後 1 週間ごとに社会相互作用試験、Y 字迷路試験、ガラス玉覆い隠し試験を順に実施した。

(3) ミクログリア活性の評価

脳組織を固定した後にスライスし、Iba1 および CD68 によりミクログリアを染色した。Iba1 はミクログリアに発現するマーカー、CD68 は貪食能と発現が相関するとされる、ミクログリアの活性マーカーである。

(4) 神経回路機能の光計測

海馬急性スライスを作製し、膜電位感受性色素 Di-4-ANEPPS (200 μ M) をロードした。シャッファー側枝、苔状繊維、顆粒細胞層を電極で刺激し、蛍光変化を経時的に検出した。測定には富永博士が自作した顕微鏡システムを使用した (Pflügers Arch 460:875, 2010)。

(5) その他

Real-time PCR などは汎用のプロトコールに則って実施した。

4. 研究成果

胎児期 VPA 曝露マウスにおいて、ミクログリア活性を測定した。図 1 に示したように、生後 10 日齢マウスの海馬 CA1 領域において、ミクログリア細胞体の増大と CD68 の発現亢進が認められ、ミクログリアが活性化していることが明らかとなった。

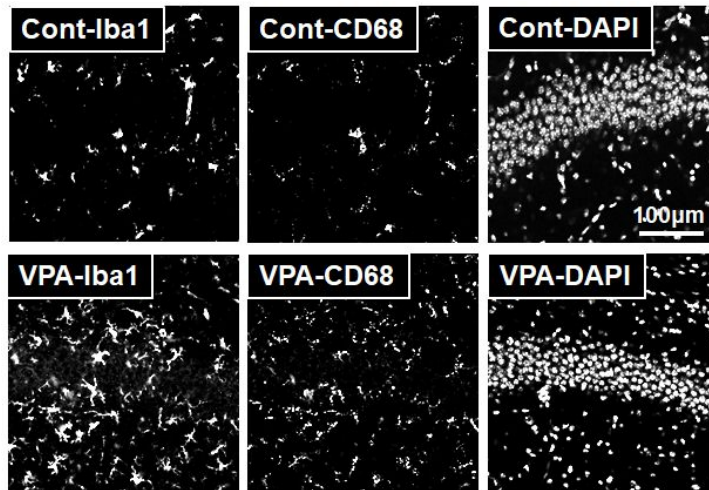


図 1. 胎児期 VPA 曝露による海馬 CA1 領域ミクログリアの活性化

次に、ミクログリア活性化が認められた 10 日齢マウスの海馬の遺伝子発現を CAGE-seq により網羅的に解析した結果、胎児期 VPA 曝露により 12 種の遺伝子の発現変化が認められた。そこで、これら 12 種の遺伝子の発現を real-time PCR により確認したところ、VPA 胎児期曝露により、ケモカイン CCL3 の発現が大きく増大することが示された (図 2A)。そこで、CCL3 の受容体である CCR5 のアンタゴニストであるマラビロクを母体に投与し、CCR5 を遮断した結果、VPA 曝露により生じる空間認知機能の低下、および、交替反応の増大がともに抑制された (図 2B)。VPA の胎児期曝露は、海馬 CA1 領域の興奮-抑制バランスを興奮側にシフトさせた一方、マラビロクによる介入は、この異常な興奮性シフトをキャンセルした (図 3)。

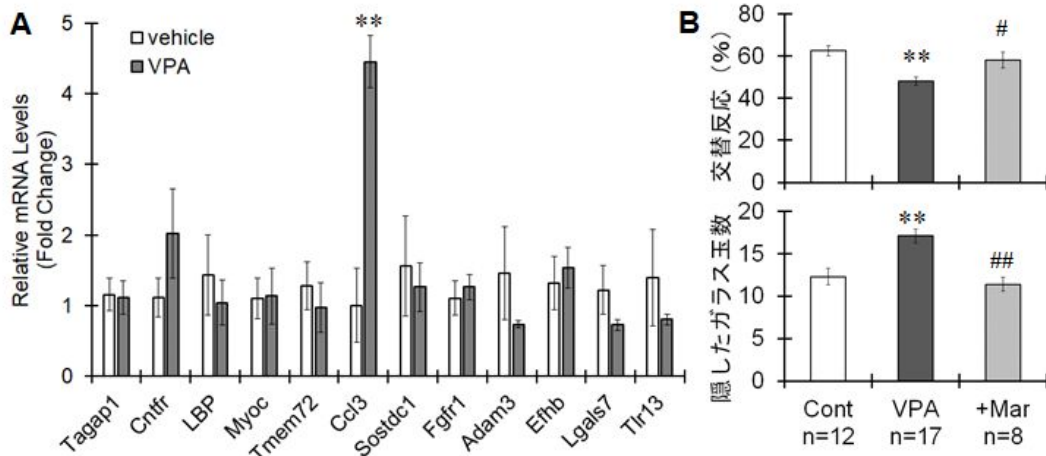


図 2. VPA 胎児期曝露による海馬 CCL3 発現の増大とその遮断による行動異常の抑制

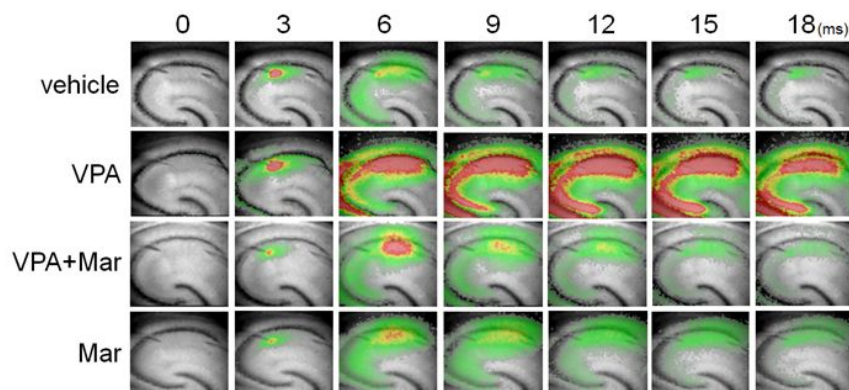


図 3. VPA 胎児期曝露による海馬 CA1 領域の興奮性シフトとマラビロクによる抑制

これらの結果より、胎児期 VPA 曝露による発達神経毒性について、VPA により発達期の海馬においてミクログリアが活性化し、ケモカイン CCL3 を放出する。その結果、脳内興奮-抑制バランスが興奮側にシフトし、空間認知機能異常や反復行動などの異常行動が発現すると考えられる（図 4）。これら行動異常は、CCR5 アンタゴニストであるマラビロクの発達期介入により抑制されたことから、CCR5 を標的とした早期介入戦略は、発達神経障害の予防・治療に奏功する可能性がある。これらの成果は、Journal of Neuroinflammation 誌に原著論文として発表し、広島大学よりプレスリリースを行った。

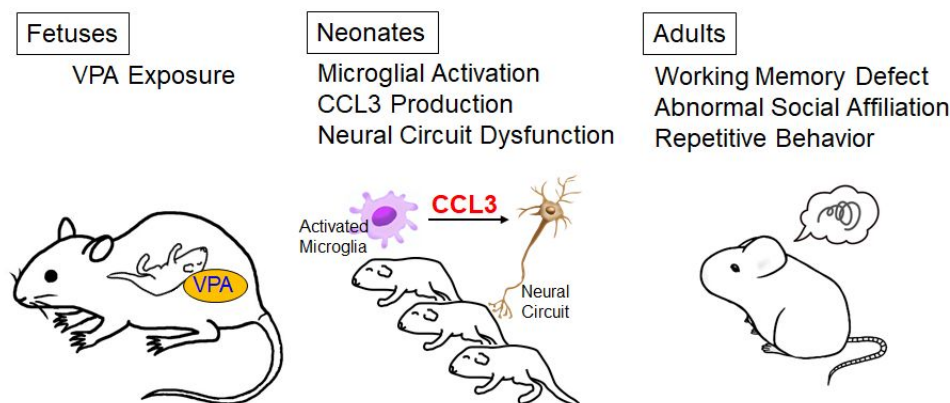


図 4. VPA 胎児期曝露により生じる発達神経毒性の推定メカニズム

また、VPA 胎児期曝露により発現が増加した CCL3 が直接ニューロンに作用し、ニューロンの電気的活動に影響しているかを調べるために、海馬急性スライスを作製し長期増強 (LTP) を観察した。組み換え CCL3 をスライスに処置したところ、LTP に変化は認められなかった（図 5）。従って、CCL3 は直接ニューロンに作用しているとは考え難く、CCL3 が神経回路機能の興奮性を誘導するニューロン以外が関与するメカニズムが示唆された。今後、CCL3 を含めて脳内ケモカインの発達期の役割について、グリア細胞を中心に調べる必要があると考えられる。

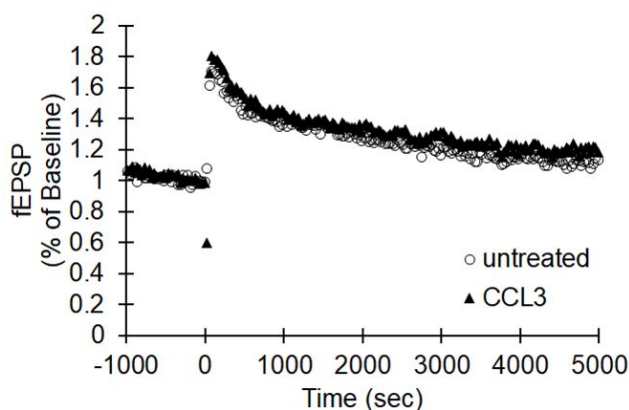


図 5. 海馬急性スライスにおける LTP の観察

VPA 胎児期曝露に加えて、イミダクロプリドの発達期曝露実験も行った。イミダクロプリドは、ネオニコチノイド系農薬の 1 つである。ネオニコチノイド系農薬は、蜂群崩壊症候群の原因と推測されたため、欧州連合では主要なネオニコチノイド系農薬の使用が禁止された。哺乳類へのネオニコチノイド系農薬曝露の影響評価には議論がある。

イミダクロプリドを発達期にマウスに曝露したところ、成長後の不安行動や社会性の低下が認められた。イミダクロプリドを曝露したマウス脳内において、ミクログリア数が減少していることを見出した。イミダクロプリド発達期曝露についても、ミクログリア影響に着目して研究を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ishihara Yasuhiro, Itoh Kouichi	4. 巻 72
2. 論文標題 Microglial inflammatory reactions regulated by oxidative stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 23 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbr.22-71	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara Yasuhiro, Honda Tatsuya, Ishihara Nami, Namba Kaede, Taketoshi Makiko, Tominaga Yoko, Tsuji Mayumi, Vogel Christoph F. A., Yamazaki Takeshi, Itoh Kouichi, Tominaga Takashi	4. 巻 19
2. 論文標題 A CCR5 antagonist, maraviroc, alleviates neural circuit dysfunction and behavioral disorders induced by prenatal valproate exposure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-022-02559-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Niidome Kouji, Taniguchi Ruri, Yamazaki Takeshi, Tsuji Mayumi, Itoh Kouichi, Ishihara Yasuhiro	4. 巻 22
2. 論文標題 FosL1 Is a Novel Target of Levetiracetam for Suppressing the Microglial Inflammatory Reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10962 ~ 10962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222010962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara Yasuhiro, Kado Sarah Y., Bein Keith J., He Yi, Pouraryan Arshia A., Urban Angelika, Haarmann-Stemmann Thomas, Sweeney Colleen, Vogel Christoph F. A.	4. 巻 3
2. 論文標題 Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Synergizes with TLR/NF- B-Signaling for Induction of IL-22 Through Canonical and Non-Canonical AhR Pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Toxicology	6. 最初と最後の頁 787360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/ftox.2021.787360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Miki, Fujikawa Masaho, Oguro Ami, Itoh Kouichi, Vogel Christoph F. A., Ishihara Yasuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of the Microglial Aryl Hydrocarbon Receptor in Neuroinflammation and Vasogenic Edema after Ischemic Stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 718 ~ 718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10040718	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vogel Christoph F. A., Lazennec Gwendal, Kado Sarah Y., Dahlem Carla, He Yi, Castaneda Alejandro, Ishihara Yasuhiro, Vogeley Christian, Rossi Andrea, Haarmann-Stemmann Thomas, Jugan Juliann, Mori Hidetoshi, Borowsky Alexander D., La Merrill Michele A., Sweeney Colleen	4. 巻 12
2. 論文標題 Targeting the Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Pathway in Breast Cancer Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 625346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.625346	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oguro Ami, Fujita Kenta, Ishihara Yasuhiro, Yamamoto Megumi, Yamazaki Takeshi	4. 巻 22
2. 論文標題 DHA and Its Metabolites Have a Protective Role against Methylmercury-Induced Neurotoxicity in Mouse Primary Neuron and SH-SY5Y Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3213 ~ 3213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22063213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Miki, Fujikawa Masaho, Oguro Ami, Itoh Kouichi, Vogel Christoph F. A., Ishihara Yasuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of the Microglial Aryl Hydrocarbon Receptor in Neuroinflammation and Vasogenic Edema after Ischemic Stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 718 ~ 718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10040718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石原 康宏
2. 発表標題 発達期化学物質曝露によるミクログリア活性化と異常神経回路網の形成
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石原 康宏
2. 発表標題 酸化ストレスによるミクログリア炎症反応の制御
3. 学会等名 第75日本酸化ストレス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 難波楓、富永貴志、石原康宏
2. 発表標題 ネオニコチノイド発達期曝露は発達期ミクログリアの急激な増殖を抑制し、興奮抑制バランスを興奮側にシフトする
3. 学会等名 第142回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原 康宏
2. 発表標題 化学物質曝露によるミクログリア活性化と異常神経回路網の形成
3. 学会等名 第94 回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishihara Y, Itoh K, Tominaga T.
2. 発表標題 Activation of microglia and excitation-inhibition imbalances in the developing hippocampus of mice prenatally treated with valproate.
3. 学会等名 GLIA IN HEALTH & DISEASE Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 難波 楓、本田 達也、石原 康宏.
2. 発表標題 ネオニコチノイド胎児期曝露による成長後の行動異常.
3. 学会等名 第61回生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>広島大学 大学院統合生命科学研究科 生命医科学プログラム 生体機能化学研究室 https://www.biomed.hiroshima-u.ac.jp/ishihara/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大島 隆幸 (Takayuki Ohshima) (10397557)	徳島文理大学・理工学部・准教授 (36102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	富永 貴志 (Takashi Tominaga) (20344046)	徳島文理大学・神経科学研究所・教授 (36102)	
研究分担者	大黒 亜美 (Ami Oguro) (20634497)	広島大学・医系科学研究科(薬)・特定准教授 (15401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	フォーゲル クリストフ (Vogel Christoph)	カリフォルニア大学デービス校・Center for Health and the Environment・Reserch Prof.	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of California, Davis		