

令和 3 年 5 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04714

研究課題名(和文) 化学物質による発達期ミクログリアの遺伝子発現修飾と異常神経回路網の形成

研究課題名(英文) Formation of abnormal neural circuit elicited by microglia with modulated gene expression exposed to environmental chemicals

研究代表者

石原 康宏 (Yasuhiro, Ishihara)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・准教授

研究者番号：80435073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胎児期バルプロ酸曝露の発達期ミクログリアおよび神経回路機能への影響を調べた。生後10日目にミクログリア活性をIba1/CD68染色により測定したところ、バルプロ酸を胎児期に曝露したマウスの海馬CA1領域で顕著な細胞体の肥大とCD68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。この時、海馬CA1領域の興奮-抑制バランスが興奮側にシフトしていた。ミノサイクリンを母体に飲水中投与したところ、ミクログリアの活性化が抑制され、興奮-抑制バランスが回復した。従って、胎児期のバルプロ酸曝露は発達期のミクログリアを活性化し、神経回路機能異常を引き起こすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、発達期のVPA曝露がミクログリア活性化を介して神経回路機能の障害や成長後の行動異常を引き起こすことを示唆した。発達期において、ミクログリアが化学物質の標的となっていることを示した点で意義があり、バルプロ酸だけでなく他の発達神経毒性を引き起こすとされる化学物質へと発展させることができる知見であると考えている。また、発達神経毒性の分子メカニズムについては不明な点が多いが、ミクログリアの関与が示されたため、ミクログリアを拠点としたメカニズムの解明や、ミクログリアに効く創薬への発展も期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to unravel the mechanism of abnormal behavior induced by valproate, focusing on microglial activation. VPA enlarged microglial cell body and up-regulated CD68 expression in hippocampal CA1 region at the age of P10 but not 6 weeks-old. The excitation-inhibition balance at the hippocampus was shifted toward to excitation especially in CA1 region by VPA treatment. Minocycline administration clearly suppressed microglial activation and the shift of excitation-inhibition balance by VPA. Taken together, activated microglia by prenatal VPA exposure can induce excitation-inhibition imbalances in hippocampus during developmental period.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ミクログリア 化学物質 発達神経毒性 神経回路機能

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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。例えば、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 (IQ) 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 (PCBs) 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、ニューロンの電氣的活動や移動 (migration) に焦点が当てられ研究されてきたが、メカニズムの大部分は未解明である。

興味深いことに、発達神経毒性を引き起こす化学物質の多くは、エピゲノムに影響することが示唆されている。VPA はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性をもち、また、DNA の脱メチル化を促進する (Epigenetics 5:730)。PCBs の毒性にも HDAC や DNA メチル化異常が関与する (Toxicol Appl Pharmacol 289:457)。化学物質の曝露 (胎児期) から毒性発現 (成長後) までの期間が長いことから、化学物質がエピジェネティクスに影響していることが支持される。

脳内の免疫担当細胞であるミクログリアは、軸索のガイダンスやスパイン/シナプスの除去により正常な神経回路網の形成に寄与する。最近、ミクログリア活性阻害薬ミノサイクリンにより、自閉症モデルマウス (Fragile X mice) の異常行動が抑制されるなど、ミクログリアと行動異常との関連が議論されている (Neuroscience 246:186)。

### 2. 研究の目的

本研究では、『化学物質がエピジェネティクスに影響して発達期のミクログリアを過剰に活性化し、異常な神経回路網が形成されることにより成長後の行動異常が生じる』との仮説を立脚し、化学物質により生じる行動異常の分子機構を明らかにすることを目的とする。まず、VPA の作用を調べ、その後、他の化学物質へと発展させる。

### 3. 研究の方法

妊娠 11.5 日目 (E11.5) の ICR マウスに 800 mg/kg の用量で VPA または vehicle (蒸留水) を経口投与した。生まれた仔をミノサイクリン未処置群、ミノサイクリン処置群に分け、ミノサイクリン処置群には出生後 1 日目 (P1) から離乳 (P21) まで 100mg/kg/day のミノサイクリンを母マウスに飲水より投与した。

各群において、仔の目の開く日より、脳発達を評価した。10 日齢 (P10) において、ミクログリア活性を Iba1 と CD68 の共染色により評価し、さらに real-time PCR により遺伝子発現を調べた。フローサイトメトリーにより、脳実質への末梢免疫細胞の浸潤を測定した。P10 脳より急性スライスを調製し、膜電位感受性色素 Di-4-ANEPPS を用いた光計測によって、神経回路機能を評価した。成長後の行動をオープンフィールド試験、Y 字迷路試験、社会相互作用試験、ガラス玉覆い隠し試験より評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 胎児期 VPA 曝露により生じる成長後の行動異常

胎児期に VPA を曝露した雄性マウスについて、6 週齢時に行動試験を行った。オープンフィールド試験において、探索行動、移動活性および中心滞在時間に有意な差は認められなかった。Y 字迷路試験を行ったところ、VPA 曝露群では交替反応が有意に低下していることが明らかになり、認知機能の異常が示唆された (図 1-A)。また、VPA 曝露群において、新奇マウスへの興味は低下していること (図 1-B)、隠すガラス玉の数が増加したことから (図 1-C)、それぞれ社会性の異常および反復行動が生じていると考えられる。

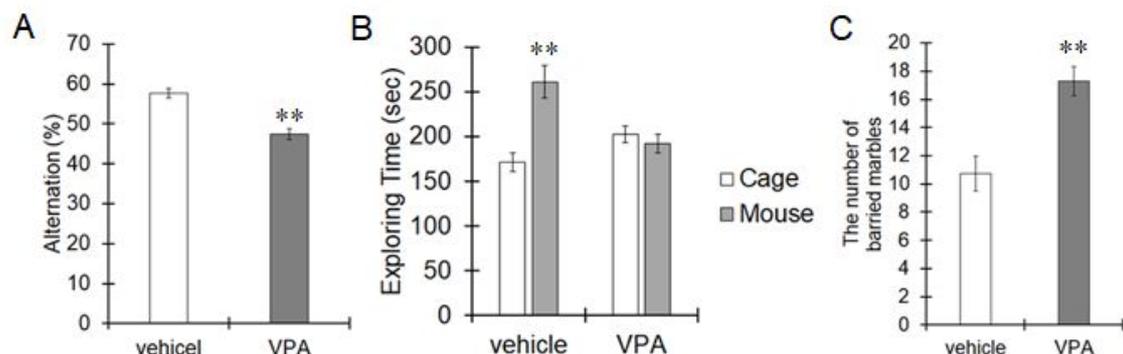


図 1. VPA 胎児期曝露による成長後の行動異常

A. Y 字迷路試験, B. 社会相互作用試験, C. ガラス玉覆い隠し試験

#### (2) VPA 胎児期曝露による発達期ミクログリアの活性化

VPA 曝露群生後 10 日齢海馬のミクログリア活性を Iba1 および CD68 染色により評価した。

海馬 CA1 領域において、Iba1 により染色されるミクログリアの形態変化が観察され、CD68 の発現が大きく増加した。一方、海馬 CA3 および歯状回( DG )領域において、Iba1、CD68 染色像の大きな違いは認められなかった。従って、VPA 胎児期曝露によって、10 日齢海馬 CA1 領域のミクログリアが活性化することが明らかとなった。尚、6 週齢マウスにおいて海馬 CA1 ミクログリアの活性化は認められなかったことから、VPA 胎児期曝露によるミクログリア活性化は発達期に限定されて生じると考えられる。

次に、ここで生じたミクログリア活性化が成長後の行動異常の原因となるか否かを検討した。ミノサイクリンはテトラサイクリン系の抗生物質であるが、ミクログリアの活性を強く抑制することが知られている (Cell Death Dis 4:e525, 2013)。そこで、ミノサイクリンを母体に飲水投与し、成長後の行動を評価した。

VPA の胎児期曝露で低下する成長後の交替行動は、ミノサイクリンの投与により vehicle 群と同程度まで回復した (図 3-A)。VPA により低下する社会性や誘導される反復行動もミノサイクリンの投与により回復した (図 3-B, C)。ミノサイクリンの投与により、VPA により誘導される海馬 CA1 領域のミクログリア活性化が抑制されることと併せて考えると、胎児期の VPA 曝露によって誘導される海馬 CA1 領域の活性化によって、成長後の行動異常が引き起こされることが示唆される。

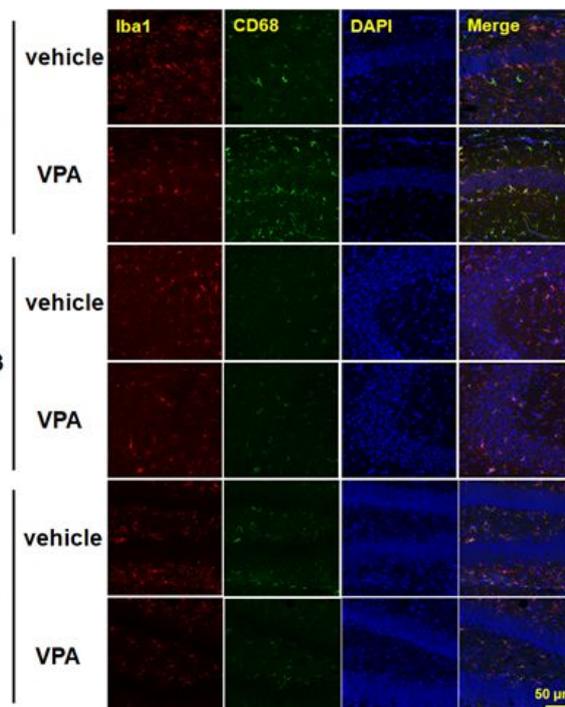


図 2 . VPA 胎児期曝露による海馬 CA1 ミクログリアの活性化

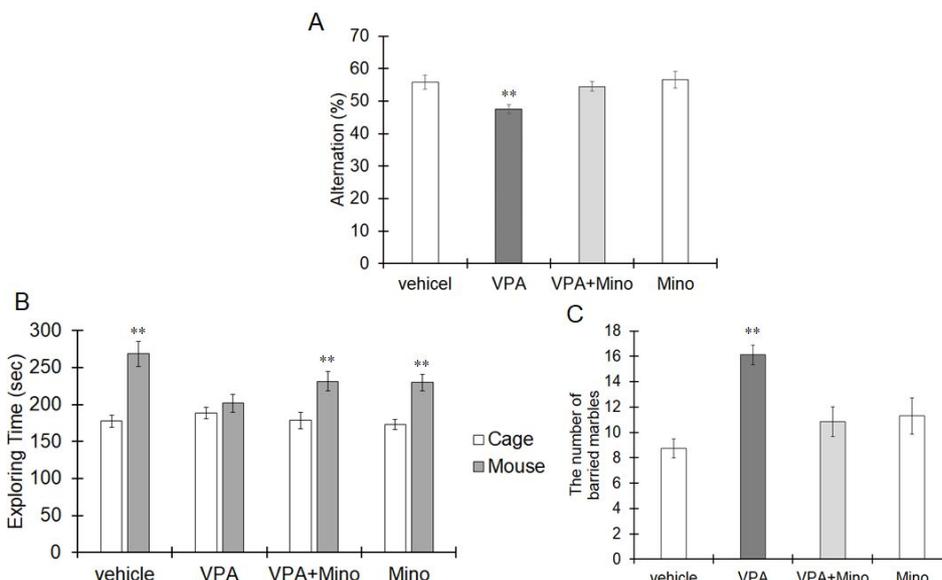


図 3 . ミノサイクリンによる胎児期 VPA 曝露誘発行動異常の回復  
A. Y 字迷路試験, B. 社会相互作用試験, C. ガラス玉覆い隠し試験

### (3) 胎児期 VPA 曝露により生じる成長後の行動異常

発達期のミクログリアは適度に活性化し、不要なシナプス(神経活動が低いシナプス)を認識して貪食除去し、正常な神経回路網の形成に役割を果たしていることが知られている (Trends Immunol. 36:605, 2015)。従って、発達期のミクログリア活性の異常は、神経回路網形成に影響することが示唆される。そこで、10 日齢マウスより急性脳スライスを調製し、膜電位感受性色素 Di-4-ANEPPS をロードして膜電位の変化を経時的に観察することによって、海馬の神経回路機能を評価した。

海馬 CA1 領域のシャプファー側枝を電気刺激すると、CA1 領域の脱分極が観察され、時間依

存的に刺激部位遠位に伝搬した（図4）。VPA 胎児期曝露マウスでは、脱分極の大きな亢進が観察された（図4）。この亢進は、CA3 苔状繊維、DG 顆粒細胞層を刺激したときにおいても観察されたが、CA1 シャッファー側枝刺激時の反応が最も強かった。ミノサイクリンを母体に投与しておく、CA1 の脱分極は大きく抑制された（図4）。以上の結果より、VPA の胎児期曝露により、海馬 CA 領域の興奮-抑制バランスが興奮側に大きくシフトしていること、このシフトは発達期に活性化するミクログリア依存性であることが示された。

尚、行動異常が生じる 6 週齢時において、光計測により神経回路機能を評価したところ、10 日齢ほど顕著ではないものの、興奮-抑制バランスの興奮側へのシフトが観察された。従って、胎児期 VPA 曝露による神経回路機能の異常は、発達期から成長後にかけて長く生じていると考えられる。

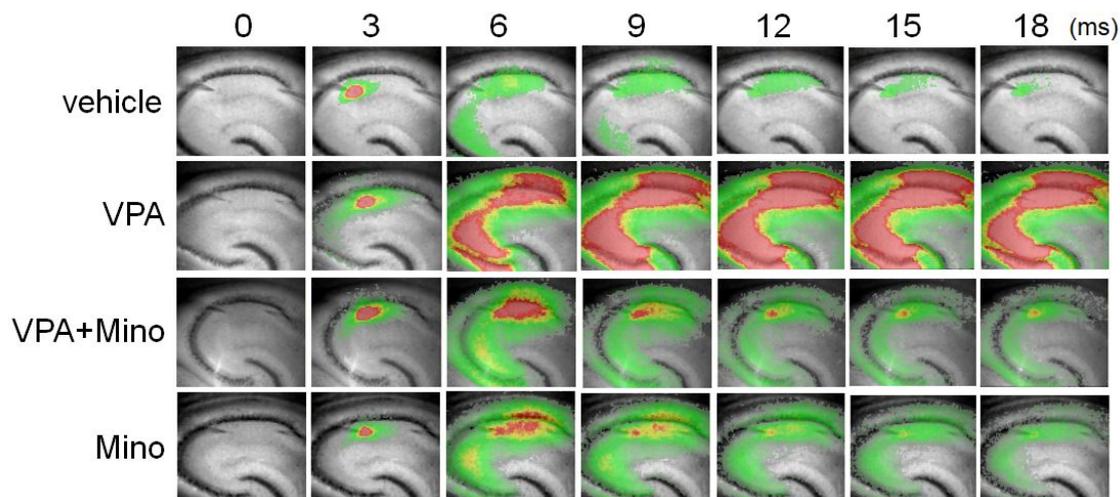


図4 . VPA 胎児期曝露によるミクログリア依存的な神経回路機能の興奮性シフト

#### (4) 胎児期 VPA 曝露マウスにおける末梢免疫性細胞浸潤の評価

神経系の病態において、マクロファージや好中球などの末梢免疫細胞の中枢神経系への浸潤が認められる。そこで、VPA 胎児期曝露マウスにおいても、末梢細胞の海馬への浸潤を、フローサイトメーターを用いて測定した。

ミクログリアとマクロファージは非常によく似た機能および遺伝子発現パターンを有しているが、ミクログリアはマクロファージと比較して CD45 の発現が低いことが知られており、この点を利用してミクログリアとマクロファージの分離検出が可能である。胎児期 VPA 曝露マウス（10 日齢）より海馬を単離し、消化酵素により細胞を分散させた後、パーコール密度勾配遠心により血球系細胞のフラクションを得た。これら細胞を CD11b、CD45 で免疫染色し、フローサイトメーターで観察した。vehicle 群と VPA 曝露群との比較において、マクロファージのポピュレーションおよびミクログリアのポピュレーションに差異は認められなかった（図5）。従って、VPA 曝露群の海馬にマクロファージの浸潤は起きていないと考えられる。また、大脳皮質を用いて同様の実験を行ったが、VPA 曝露群の大脳皮質においてもマクロファージの浸潤は認められなかった。

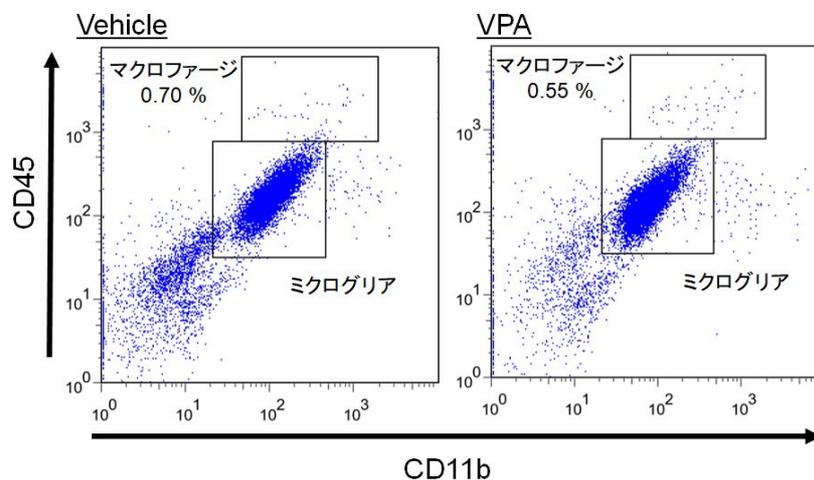


図5 . CD11b-CD45 染色によるミクログリアとマクロファージの分離検出

次に、同様の手法を用いて、マクロファージ以外の末梢免疫細胞の海馬への浸潤を評価した。即ち、好中球は CD11b-Ly6G 染色、単球は CD11b-Ly6C 染色、T 細胞は TCR $\gamma/\delta$ -TCR $\beta$  染色により分離検出した。vehicle 群 CD11b-Ly6G 染色において、図 6 に示した四角に検出された好中球のポピュレーションが 4.64%であったのに対し、VPA を胎児期曝露した海馬委においては 8.56%と約 2 倍に増加していた(図 6)。単球においても、vehicle 群において 0.63%、VPA 曝露群において 1.24%と 2 倍になっていたが、好中球と比較して絶対量が少ない傾向にあった(図 6)。T 細胞についても VPA 処置群で増加傾向になった(図 6)。

マクロファージ以外の免疫細胞については VPA 胎児期曝露により増加傾向にあったが、ミクログリアと比較して絶対数が少ないことも明らかとなった。これら末梢免疫細胞の胎児期 VPA 曝露誘発行動異常への関与を明らかにするためには、より詳細な解析が必要であると考えられる。

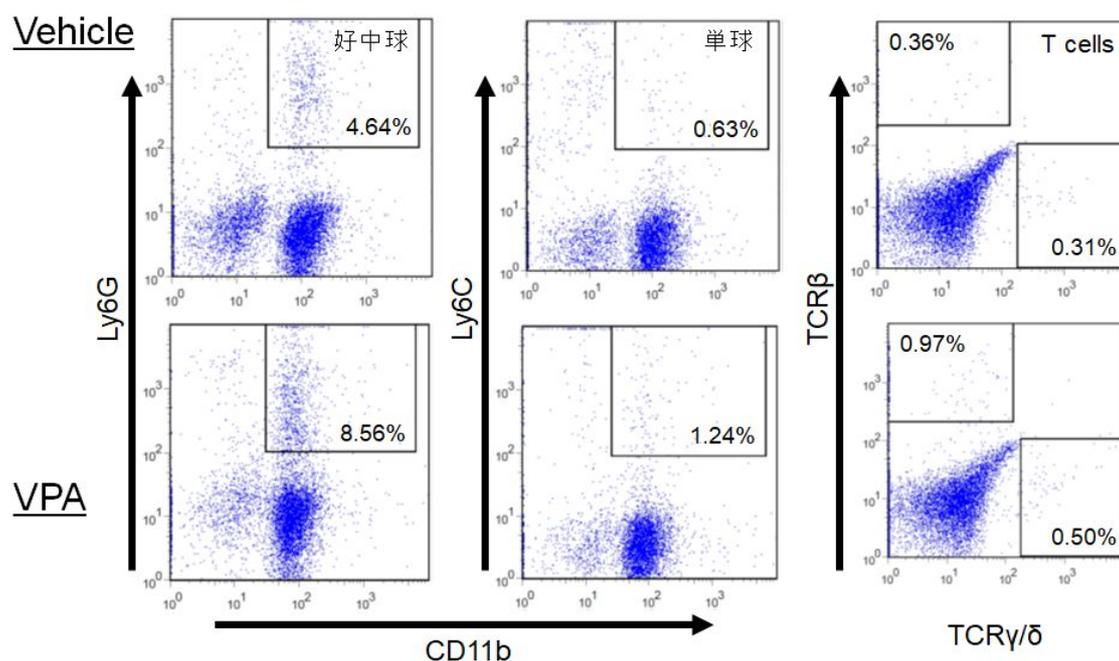


図 6 . 胎児期 VPA 曝露による末梢免疫細胞の海馬への浸潤

#### (5) 結語

本研究より、胎児期 VPA 曝露によりミクログリアが活性化し、異常な神経回路網の形成を介して成長後の行動異常を引き起こすことが示唆された。ミクログリアはメチル水銀 (J Neurochem 151:64, 2019) やヒ素 (Toxicol Appl Pharmacol 303:79, 2016) などの環境化学物質により活性化することが明らかとなっており、これらの化学物質は発達期の脳に障害を引き起こすことが知られていることから、発達神経毒性におけるミクログリアの関与を調べることは非常に重要であると考えられる。また、私たちは、ネオニコチノイド系農薬の発達期曝露によりミクログリア活性が低下するとの結果を得ており、化学物質による発達期ミクログリア活性低下とその成長後影響との関係についても興味深い。今後は胎児期 VPA 曝露により発現が変化する遺伝子を同定し、発達神経毒性の分子メカニズムの解明を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishihara Yasuhiro, Haarmann-Stemmann Thomas, Kado Norman Y, Vogel Christoph F A	4. 巻 170
2. 論文標題 Interleukin 33 Expression Induced by Aryl Hydrocarbon Receptor in Macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 404 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/toxsci/kfz114	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 該当する
1. 著者名 Ishihara Yasuhiro, Sakurai Hikaru, Oguro Ami, Tsuji Mayumi, Vogel Christoph F.A., Yamazaki Takeshi	4. 巻 193
2. 論文標題 Retinoid X receptor-mediated neuroprotection via CYP19 upregulation and subsequent increases in estradiol synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 105421 ~ 105421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2019.105421	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 該当する
1. 著者名 Ishihara Yasuhiro, Itoh Kouichi, Oguro Ami, Chiba Yoichi, Ueno Masaki, Tsuji Mayumi, Vogel Christoph F. A., Yamazaki Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Neuroprotective activation of astrocytes by methylmercury exposure in the inferior colliculus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50377-9	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 該当する
1. 著者名 Ishihara Yasuhiro, Kado Sarah Y., Hoepfer Christiane, Harel Shelly, Vogel Christoph F. A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Role of NF- $\kappa$ B RelB in Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Ligand Specific Effects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2652 ~ 2652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20112652	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 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 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 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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ishihara Y
2. 発表標題 Developmental microglial activation and postgrowth abnormal behavior induced by prenatal exposure of chemicals
3. 学会等名 The 35th Annual Meeting of KSOT/KEMS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. ISHIHARA, T. HONDA, R. TANIGUCHI, N. ISHIHARA, T. YAMAZAKI
2. 発表標題 Effects of valproate prenatal exposure on developmental microglial activity and neural circuit formation
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石原 康宏
2. 発表標題 発達期の化学物質曝露によるミクログリア活性化と成長後の行動異常
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Honda T, Ishihara Y, Ishida A, Yamazaki T.
2. 発表標題 Activation of microglia and loss of synapse in the developing hippocampus of mice prenatally treated by valproate.
3. 学会等名 Neuroscience 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本田 達也、石原 康宏、石田 敦彦、山崎 岳.
2. 発表標題 自閉症モデルマウスにおける脳発達期のミクログリアの過剰な貪食.
3. 学会等名 第58回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本田 達也、石原 康宏、石田 敦彦、山崎 岳.
2. 発表標題 自閉症モデルマウスにおけるミクログリアの過剰な活性化とシナプスの減少.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 <a href="https://www.biomed.hiroshima-u.ac.jp/ishihara/">https://www.biomed.hiroshima-u.ac.jp/ishihara/</a>
--

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

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
---------	---------