

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09180

研究課題名(和文) 環境化学物質によるドーパミン神経系疾患のDOHaD仮説検証

研究課題名(英文) Evaluation of DOHaD hypothesis of chemical-caused dopaminergic disorder

研究代表者

石堂 正美 (Ishido, Masami)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・シニア研究員

研究者番号：60211728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまでに明らかにされてきた環境化学物質によるドーパミン神経系に起因する2つの行動毒性の関連性をDOHaD仮説に基づき検証した。すなわち、環境化学物質によるドーパミン神経系の発達障害の結果としての多動性障害とドーパミン神経変性疾患の結果としての寡動症であるパーキンソン病との関連性をラットモデルを用いて調べた。また、時系列的に両者の変曲点を明らかにし、その分子機序をトランスクリプトーム法により明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Barker博士のDOHaD仮説によれば成人期の疾患の原因は幼少期にあるとする。本研究では当該仮説を環境化学物質ロテノンによるドーパミン神経系疾患について検討した。具体的には新生期ラットのロテノン曝露による多動性障害が老齢期のパーキンソン病の症状を呈するかを調べた。その結果、ロテノンの曝露時期によってその行動特性が変化することが明らかになった。生後5日での曝露により多動性障害が著しく、3～4週齢での曝露によりパーキンソン病の症状を呈することが明らかになった。

こうしたことは環境化学物質の健康リスク評価において曝露時期の要因も考慮しなければならないことを示している。

研究成果の概要(英文)：Through detailed reconstructions of neonatal and medical histories of birth cohorts in UK, Dr. David Barker proposed the concept that parameters of fetal, infant, and childhood growth may be predictors of disease in later life. In the case of dopaminergic deficit in the development, one could assume that it might result in Parkinson's disease in the adulthood since the etiology of the disease is the selective loss of dopaminergic neurons.

Rotenone causes two behavioral phenotypes, hyperactivity or hypoactivity. They were created by different timing of chemical exposure, suggesting that there would be a temporal turning point of two behavioral phenotypes. Therefore, we examine a turning point of these behavioral phenotypes by measuring the spontaneous motor activity. We estimate the turning point would be around between three weeks and four weeks of age in the rat dopaminergic neurodegeneration. Gene set enrichment analysis extracts a cytokine network in both rat models.

研究分野：健康リスク評価

キーワード：環境化学物質 DOHaD 発達障害 神経変性疾患 ドーパミン神経系

## 1. 研究開始当初の背景

過去に見られた「胎児性水俣病」のような環境に起因した重篤な疾病は姿を消したが、今日の環境に起因した物理化学的因子による胎児や新生児への影響は依然懸念されている。大人には無影響と思われる微量の環境因子も、生体防御系の未熟な胎児・新生児への影響は無視できなくなっているという指摘である。曝露条件により、それらの影響が直ぐ現れたり、大人になってから晩発性に現れたりするが、この時期がリスク形成期と呼ばれている。今日のヒトの精神神経疾患の中で環境化学物質との因果関係が明白に特定された疾患はこれまでになく、米国五大湖近辺の汚染魚類を大量に摂取した妊婦の子供の認知能の遅延や行動発達異常が報告されているものが、今日の曝露様式に見られる低濃度での慢性影響はよくわかっていない。

一方、動物実験により環境化学物質による発達期中枢神経系への影響の報告が近年相次いでいる。たとえば、青班核の形態異常、大脳皮質の層構造異常、探索行動異常、恐怖・痛みへの反応異常、空間学習の異常や多動性障害などであるが、これらの報告は、微量な環境化学物質でも生体防御系の未熟な発達期の(長期)曝露は、個体レベルでの大きな影響として現れうることを示している。

今日の環境化学物質は微量でかつ慢性的に曝露しているという特徴を有し、その発達期中枢神経系への曝露影響を評価するとき、胎児の脳形成及び発達を司る神経幹細胞の研究が重要になってきている。このような背景において近年、注意欠陥多動性障害や自閉症の小児が増加し、その病因の一つに環境に由来する様々な化学物質との関連性が指摘されて来ているが、これらの疾患は、場にふさわしくない多動性、衝動性、不注意、他人とのコミュニケーションが困難なことなどを特徴としている。

私たちは、こうした点を疾患モデル動物を用いて検討してきた。採用したモデル系は、1976年 Shaywitz 博士らが報告した多動性障害モデルラットである。このモデル系を用いて内分泌かく乱化学物質を評価した。いくつかの内分泌かく乱化学物質は、運動を司るドーパミン神経系の発達障害をもたらし、4～5週齢でラット多動性障害を惹起することを報告してきた。続いて、ドーパミン神経毒とされる農薬も同様な結果をもたらし、内分泌かく乱化学物質のドーパミン神経毒性作用を実証してきた。

一つの環境化学物質が少なくとも3つの神経疾患の病態(小児 ADHD, 大人 ADHD, パーキンソン病)をラットで再現される。こうした状況から一つの仮説が浮上する、DOHaD (Developmental origins of health and disease) 仮説である。DOHaD 仮説に立脚すると、子供の時期にドーパミン神経に損傷を負うことが引き金となり、その後のドーパミン神経が加速度的に脱落していくと仮定する。その結果、60歳前後では生存しているドーパミン神経は20%以下に減少するためパーキンソン病を発症するのであると推測される。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでに明らかにされてきた環境化学物質によるドーパミン神経系に起因する2つの行動毒性の関連性を DOHaD 仮説に基づき検証する。すなわち、環境化学物質によるドーパミン神経系の発達障害の結果としての多動性障害とドーパミン神経変性疾患の結果としての寡動症であるパーキンソン病との関連性をラットモデルを用いて調べる。また、時系列的に両者の変曲点を明らかにし、その分子機序をトランスクリプトーム法により明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1 ドーパミン神経毒性化学物質の新生期曝露による多動性障害モデルラットの作成と長期影響モニタリング

1) 市販の妊娠 Wistar ラットを購入し、ドーパミン神経毒である農薬ロテノン(0～3 mg/kg)はオリーブオイルに懸濁した。生後5日齢に体重を約10gの仔ラットを選別して、全量30μLを経口投与した。投与後、母親に戻し、3週齢で離乳した。5週齢から Supermex (室町機械(株))を用いて自発運動量の測定を開始した。防音箱の明暗は12時間サイクルに設定した。若年期の多動性障害を確認できたラットを選別し、長期モニターに供した。

2) ドーパミン神経系の発達障害は、カテコールアミン合成酵素に対する抗体を用いて確認した。摘出した脳組織を10%ホルムアルデヒド溶液に浸漬し、固定した。固定した脳組織はパラフィンブロックにした。5μm程度の脳切片を得、脱パラフィン後、通常の免疫染色工程を実施した。1次抗原抗体反応は低温で16時間以上行った。中脳黒質の力

テコールアミン合成酵素の染色が低下していることを確認した。

## II. ドーパミン神経毒性化学物質の成熟期曝露によるパーキンソン病モデルラットの作成と行動毒性発現変曲点の推定 及び 各モデルのトランスクリプトームの比較による分子機序の解明

1) 老年期ドーパミン神経変性疾患であるパーキンソン病モデルラットを Greenamyre 研究室の方法 (Nat. Neurosci 2000, 3: 1301) に従って作成した。市販の成熟 Wistar ラットを購入した。ロテノン (0~3mg/kg) をアルゼット浸透圧ポンプに充填し皮下に埋め込み曝露した。ロテノンは、DMSO と PEG300 を 1:1 に混合した溶液に懸濁し、浸透圧ポンプに充填する前に同組成溶液に一晩平衡化した。Supermex を用いて自発運動量を測定し、寡動が確認し、本データを上記 1) の判定に供した。また、脳組織を摘出し、ドーパミン神経変性を免疫組織染色法で確認するとともに、次のトランスクリプトーム解析に供した。

ドーパミン神経系の変性は、カテコールアミン合成酵素に対する抗体と TUNEL 陽性反応法を用いて確認した。摘出した脳組織を 10%ホルムアルデヒド溶液に浸漬し、固定した。固定した脳組織はパラフィンブロックにした。5µm 程度の脳切片を得、脱パラフィン後、通常の免疫染色工程を実施した。1次抗原抗体反応は低温で 16 時間以上行った。中脳黒質のカテコールアミン合成酵素の染色が低下していることを確認した。

また、TUNEL 法は、脱パラフィン後、室温で proteinase K を処理した。続いて特異酵素の存在下、蛍光標識した dUTP を断片化した DNA に取り込ませる。取り込みを蛍光顕微鏡下観察し神経変性を確認した。

TUNEL 陽性細胞が少ないときは、脳内炎症性サイトカインの定量を実施した。全脳を摘出後、中脳部位を得た。中脳をたんぱく質分解酵素阻害剤存在下溶解した。遠心分離後不要画分を除き、Bio-Plex システム (BioRad 社) で様々なサイトカインを定量した。

2) ロテノン (0 ~ 3 mg/kg) の生後 5 日齢曝露のほかに、生後 2 週齢或いは 4 週齢で曝露し、Supermex による自発運動量の測定を上記の要領で実施した。多動から寡動への変曲する曝露時期を推定した。

3) 各実験系の各モデルから得られた中脳組織の DNA アレイ法を実施した。摘出した中脳は液体窒素の中で急冷凍した。全 RNA を市販の RNeasy 等のキットを用いて抽出した。分解していない RNA を用いて cDNA を作成後、ビオチン標識 cRNA を作成した。この標識 cRNA を断片化後 GeneChip Rat Genome 230 (Affymetrix 社) とハイウリダイズした。得られた Chip で遺伝子発現変動の有無を定量化した。更に、得られた各トランスクリプトームデータをたとえばパスウェイ・スタジオ (Aradne Genomics 社) を用いてパスウェイ解析に供し、その分子機序を推定した。

また、各モデル間の遺伝子発現変動に相関があるかどうかは、R などの統計ソフトを利用し回帰分析、主成分分析などの解析を実施した。

## 4. 研究成果

### 1.

ドーパミン作動性化学物質のラット成熟期曝露はドーパミン神経変性をきたし、寡動の行動異常をきたす。従来より報告されてきている実験モデル系ではあるが、化学物質によるドーパミン神経変性を免疫組織法と TUNEL 法で確認した。更に、DNA アレイ法を実施したところ、MHC 遺伝子の発現が亢進しその遺伝子産物も黒質に発現更新することを新たに見出した。また、Bio-Plex 法により様々なサイトカインのタンパク量を定量した。その結果、調べたサイトカイン (IL-2, IL-4, IL6, IL-10, IL-17, IL-18, TNF) の発現量は全体的に減少傾向を示したが、TNF- $\alpha$  の発現減少は統計学的に有意であった。

### 2.

生後 5 日齢から 3 週齢までの期間でのロテノンの単回曝露は、ラットの多動性障害をもたらすが、4 週齢及び 7 週齢での曝露はラットの寡動性障害をきたした。つまり、行動特性の変曲点は 3 週齢から 4 週齢の間にあるものと推測された。また、単一化学物質ロテノンによる多動性障害ラットとパーキンソン病モデルラットにおける遺伝子発現プロファイルは全く異なったが、遺伝子セットエンリッチメント解析では両者ともにサイトカインネットワークを描き出した。

### 3.

ロテノンを幼若期ラットに経口曝露し、長期モニタリングによりパーキンソン病

症状である寡動がもたらされるか再度実施した。市販の妊娠 Wistar ラットを購入し、ドーパミン神経毒である農薬ロテノン(1、3 mg/kg)はオリーブオイルに懸濁した。生後 5 日齢に体重を約 10 g の仔ラットを選別して、全量 30  $\mu$ L を経口投与した。投与後、母親に戻し、3 週齢で離乳した。5 週齢から Supermex(室町機械(株))を用いて自発運動量の測定を開始した。防音箱の明暗は 12 時間サイクルに設定した。若年期の多動性障害を確認できたラットを選別し、約 63 ~ 71 週間モニターに供した。その結果、ラット多動性障害は 8 週齢で見られ、対照ラットのそれより約 1.3 倍亢進していた。その後、パーキンソン病の行動面での症状である寡動が惹起されるか 71 週間モニターを続けた。しかしながら、行動面においては統計的な有意差は見られなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Masami Ishido	4. 巻 313
2. 論文標題 Chemical nature of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) - related chemical subfamily	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 137495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2022.137495	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 Masami Ishido	4. 巻 9
2. 論文標題 De novo transgenerational inheritance of male rat hyperactivity by rotenone	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 111-1115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Masami Ishido	4. 巻 7
2. 論文標題 Electromagnetic fields (EMF) facilitate cell migration and BrdU incorporation during an EMF-sensitive phase in a rat neurosphere assay in vitro.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 253-257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Masami Ishido	4. 巻 6
2. 論文標題 A carrier protein is essential for action of silver nanoparticles in an animal experiment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 277-279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 M. Ishido	4. 巻 5
2. 論文標題 The temporal turning window for rat behavioral phenotypes by rotenone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fund. Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 195-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 M. Ishido	4. 巻 19
2. 論文標題 An Overview of Development of Quantitative Neurotoxicity Testing In vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Applied Life Sci. Intl.	6. 最初と最後の頁 2394-1103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 石堂正美	4. 巻 30
2. 論文標題 超低周波電磁界の神経幹細胞に及ぼす影響評価に関する研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 磁気と健康	6. 最初と最後の頁 20-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ishido Masami, Suzuki Junko, Masuo Yoshinori	4. 巻 266
2. 論文標題 Neonatal rotenone lesions cause onset of hyperactivity during juvenile and adulthood in the rat	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 42 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2016.12.008	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11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石堂正美
2. 発表標題 エネルギー毒性
3. 学会等名 第94回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石堂正美
2. 発表標題 ADHD関連化学物質の生化学的基盤
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masami Ishido
2. 発表標題 DNA methylation profiles in the striatum of hyperactive rats.
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masami Ishido
2. 発表標題 CNV in silver nanoparticle-primed hyperactive rats
3. 学会等名 EuroTox2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masami Ishido
2. 発表標題 Transgeneration of environmental chemicals-primed rat hyperactivity
3. 学会等名 次世代脳プロジェクトシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Ishido
2. 発表標題 De novo inheritance of environmental chemicals-primed rat hyperactivity
3. 学会等名 第41回日本神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Ishido
2. 発表標題 Transgeneration of environmental chemicals-primed rat hyperactivity
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Ishido
2. 発表標題 Transgeneration of environmental chemicals-primed rat hyperactivity
3. 学会等名 次世代脳プロジェクトシンポジウム
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 石堂正美
2. 発表標題 環境化学物質によるラット多動性障害の病態解析
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Ishido
2. 発表標題 Inheritance of environmental chemicals-primed rat hyperactivity
3. 学会等名 第91回日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石堂正美
2. 発表標題 A temporal turning point of two behavioral phenotypes
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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