

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590676

研究課題名（和文） 環境因子による多動性障害のエピジェネティック解析

研究課題名（英文） Epigenetic analyses of hyperactivity by environmental factors

研究代表者

石堂 正美（ISHIDO MASAMI）

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・主任研究員

研究者番号：60211728

研究成果の概要（和文）：

環境化学物質の次世代影響が懸念されている。そこで、本研究ではこの点を環境化学物質によるラット多動性障害モデルを例に検討した。最初に、多動性障害のラット(F0)から多動性障害のF1が得られるかを検討した。また、運動がエピジェネティックに調節されるかをエピジェネティック修飾剤を用いて検討した。その結果、多動性障害はエピジェネティックな影響を受けることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

It has been concerned that environmental chemicals might affect their effects over generation. Therefore, we examined this sense using rotenone models of hyperactive rat. Breeding female hyperactive rats with male ones produced hyperactive rats. Epigenetic modifying reagents altered rat motor activity as seen in rotenone-exposed rats. DNA array analyses indicated the pesticide altered the level of the molecules which are consisted of dopaminergic transduction pathway.

Thus, our study strongly suggests that motor activity could be regulated by epigenetics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

1

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：環境化学物質、脳神経疾患、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

WHOによる国際疾病分類基準あるいはそれを引き継ぎアメリカ精神医学学会が作成した診断の手引書により診断基準がかなり整理され、注意欠陥多動性障害(ADHD)や自閉症の子供が増加してきていることが明らかになってきている。米国ではおよそ3-7%とする報

告が多い(我が国でも、その実態調査が行われてきているが、学級担任以外の専門家による詳細な結果は公表されていない)。これらの疾患は、学童期の不注意、多動性、衝動性を特徴とし、成人してからも他人とのコミュニケーションの困難さを有する。いずれも脳の器質的障害と考えられており、社会的に大き

な問題となっている。一方、環境化学物質が脳神経系の機能に影響を及ぼす可能性が指摘され始めているが、その詳細については未だ不明なところが多い。子供の脳が最も発達する時期である妊娠中や授乳期に環境化学物質が子宮内暴露や母乳によって摂取される可能性は充分考えられる。実際、PCB に曝露した地域の子供の IQ が低いという報告やヒトの臍の緒や胎盤より、重金属や種々の環境化学物質が検出されている事実から、母親から胎児に環境化学物質が移行し、胎児の脳・神経系に影響を及ぼしている可能性が極めて大きい。しかしながら、発生・発達期の脳・神経系が環境化学物質の曝露したときの詳細な影響については今なお不明な点がある。

こうした状況の中で、上記の点を科学的根拠をもって論じるために、環境化学物質を発達期のラット脳に曝露したときに生じる脳の発達障害を行動学的に探索するスクリーニングの系を開発することから始めた。多動性モデルラットは、ドーパミン神経変性試薬により作成できることが報告されていることから、これを陽性コントロールとして用いた。環境化学物質の効果は、陽性コントロールの効果と比較することにより判定した。その結果、たとえばビスフェノール A などの環境ホルモンや農薬は、ADHD や自閉症に見られる多動性障害の原因物質になり得ることを証明した。

一方、ヒトの ADHD や自閉症の原因は全く明らかにされていない。しかしながら、ヒトのこれらの疾患は、神経系の発達障害でしかも多因子性としてとらえられている。つまり、遺伝的素因と環境因子の相互作用に起因すると考えられてきている。更に、環境因子は、エピジェネティックな作用を有している可能性が報告されるようになった。

2. 研究の目的

これまでの環境化学物質の健康リスク評価は、成人の生理学に基づいて行われてきているが、小児の生理学に基づいたリスク評価の体系は全く整備されておらず、それに向けての着手が急務である。環境化学物質による小児への影響に関する疫学調査も実施され、その影響を懸念する発表がなされてきているからである。

近年、環境に存在する化学物質による発達期中枢神経系への影響についての動物実験の報告が相次いでいる。こうした中、私たちはラット多動性障害について報告してきている。多動性障害は多因子性疾患としてとらえられてきており、遺伝的素因と環境因子の何らか

の相互作用によるものと考えられてきている。そこで、本研究では環境化学物質によるラット多動性障害のエピゲノムからのアプローチによりその遺伝メカニズムを解析した。

3. 研究の方法

環境化学物質によるラット多動性障害のエピジェネティック解析は、第一にその遺伝性を交配実験により明らかにした。次に、その遺伝性がエピジェネティックであることをエピジェネティック修飾剤により検討するとともに、DNAアレイ法で解析した。

(1) 多動性障害ラットの多世代交配と遺伝様式の解析

雄性多動性障害ラット(F0)を野生型雌性ラット(9週齢前後)と交配した。プラグが確認されたら雄を隔離し、出産を待った。F1が4~5週齢あるいは8~10週齢に達したとき、それぞれの自発運動量を測定する。自発運動量は、移所行動の他に立ち上がりや身繕いなどの行動を含めて測定した。12時間サイクルの明暗を設定し、防音箱内で実施した。F1の雄性多動性障害ラットを同定した後に15週齢前後で野生型雌性ラット(9週齢前後)と交配した。F1の雌性にも多動性障害を観察されたときは、F1雄性多動性障害ラットと交配した。同様に、出産したF2が4~5週齢あるいは8~10週齢に達したとき、それぞれの自発運動量を測定した。

上記同様に、多動性障害ラット同士の交配も実施した。

(2) DNAアレイ法による遺伝子発現変動の解析

環境化学物質の投与により作製した疾患モデルラットの分子病態を遺伝子レベルで網羅的に解析するために、DNA一般アレイ法を用いた。コントロールラット脳及び疾患モデルラット脳の線条体と黒質を摘出し、total RNAを抽出後cDNAに逆転写し、市販のアレイシートとハイブリダイゼーションした。両者を比較することにより遺伝子発現の変動と遺伝パターンを比較検討した。

4. 研究成果

(1) 多動性障害ラット(F0)の作製

生後5日齢の雄性及び雌性ラットに3mg/kgロテノン単回経口投与した。21日齢まで授乳を続け、4週齢より自発運動量の測定を開

始した。21 週齢まで測定を繰り返し、対照ラットの自発運動量と比較しながら雄・雌それぞれ最も自発運動量の高いラットを選別し、次世代への影響評価に供した。

(2) 多動性障害ラットの多世代交配と遺伝様式の解析

22 週齢で雄性多動性障害ラット (F0) と雌性多動性障害ラット (F0) を交配した。2 系統 (ここで A 系統、B 系統とする) を作製した。A 系統より雄 8 匹雌 4 匹を得、B 系統より雄 6 匹、雌 5 匹を得た。上記 1. 同様に 21 日齢まで授乳を続け、4 週齢より自発運動量の測定を開始した。

その結果、11 週齢における雄性 F1 の自発運動量がより亢進する傾向を示した。

(3) エピジェネティック修飾試薬を用いた陽性試験：

エピジェネティック修飾試薬の慢性曝露 (3mg/kg/日) を行うために、浸透圧カプセルをラットの皮下に埋め込み、曝露後、自発運動量を測定した。その結果、ラットの自発運動量が有意に亢進することが明らかになった。この系を更に時系列を拡大して実施すると、本修飾剤により、自発運動量が低下することが明らかになった。すなわち、ラットの自発運動量の調節は、エピジェネティックな作用によって行われることが初めて明らかになった。また、ターニングポイントが存在することは、実験系の時系列を厳密に設定しないとデータがばらつきやすくなることを示唆している。

(4) DNA アレイ法を用いたロテノンによるラット多動性障害の分子機構の解析

生後 5 日齢の雄性ラットにロテノンを曝露し、多動性障害をきたしたラットの中脳より RNA 抽出し、DNA アレイ法に供した。ロテノンを曝露していないラット中脳を対照とした。対照ラット中脳における遺伝子発現量を基準に 2 倍以上の変動を統計的に有意とし解析した。その結果、運動を司るドーパミン神経情報伝達経路を修飾する分子の遺伝子が有意に変動した。

つまり、これまでの本研究の知見と今回の成績から、ラットの運動がエピジェネティックな影響を受ける可能性が示唆された。

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 8 件)

- ① M. Ishido, Y. Masuo, *et al.* Rat hyperactivity by bisphenol A, but not by its derivatives, 3-hydroxy-bisphenol A or bisphenol A 3,4-quinone. *Toxicol. Lett.* 査読有, 206, 2011, 300-305,
- ② J. Suzuki and M. Ishido, Transcriptome of tributyltin- induced apoptosis of the cultured rat mesencephalic neural stem cells. *Toxicol.* 査読有, 287, 2011, 61-68,
- ③ Y. Masuo and M. Ishido, Neurotoxicity of endocrine disruptors: possible roles in the etiology of developmental and neurodegenerative disorders. *J. Toxicol. Environ. Health.* 査読有, 14, 2011, 346-369,
- ④ M. Ishido, Activation of STAT3 by PACAP during PACAP-promoted neurite out growth of PC12 cells. *J. Mol. Neurosci.* 査読有, 42, 2010, 349-358,
- ⑤ M. Ishido, Evaluation of neurotoxicity of environmental chemicals using neural stem cells and neuroblastoma cells. *Animal Cell Technol.* 査読有, 16, 2010, 43-46,
- ⑥ M. Ishido, Quantitative analyses of inhibitory effects of bisphenol A on neural stem-cell migration using a neurosphere assay in vitro. *J. Health Sci.* 査読有, 56, 2010, 175-181,
- ⑦ M. Ishido, Effects of *p*-nitrotoluene on cultured mesencephalic neural stem cells, *J. Health Sci.* 査読有, 55, 2009, 114-118,
- ⑧ M. Ishido, Environmental contributions to attention deficit hyperactivity disorders, *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, 査読なし, 2009, 223-228,

[学会発表] (計 18 件)

- ① 石堂正美、等
ラット多動性障害に及ぼす内分泌攪乱化学物質ビスフェノール A 中枢代謝物の影響、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 17 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 増尾好則、寺崎正紀、森田昌敏、石堂正美
ラットの多動はビスフェノール A により惹起されるが、代謝産物では惹起されない。第 54 回日本神経化学学会大会、2011 年 9 月 28 日、瑠璃光 (石川県)

- ③ 石堂正美
環境化学物質の分配係数と神経発生毒性評価
第 20 回日本 Cell death 学会学術集会、
2011 年 7 月 29 日、東京大学（東京都）
- ④ M. Ishido
Nuclear localization of annexin I during TNF-mediated apoptosis TNF2011, May 16, 2011, Himeji.
- ⑤ M. Ishido
Biological effects of electro-magnetic fields on human breast cancer MCF-7 cells.
International and Inter-disciplinary workshop on novel phenomena in integrated complex. Oct. 15, 2010 Kyoto
- ⑥ 石堂正美
PACAP による PC12 細胞突起伸展における様々な遺伝子発現の時系列的動態解析
第 33 回日本神経科学大会、2010 年 9 月 2 日、神戸国際会議場（兵庫県）
- ⑦ 石堂正美
ヒト乳癌細胞における 50Hz 電磁界曝露による転写ネットワーク解析
第 69 回日本癌学会、2010 年 9 月 22 日、大阪国際会議場（大阪府）
- ⑧ M. Ishido, J. Suzuki, and Y. Masuo
Neurodegeneration of dopaminergic neurons in the orally administered bisphenol A-caused hyperactive rats. 包括脳ネットワーク・ワークショップ、2010 年 7 月 28 日、札幌芸文館（北海道）
- ⑨ 石堂正美
In vitro における神経幹細胞移動の分子モニターリングと環境化学物質の影響評価
第 5 回日本分子イメージング学会、2010 年 5 月 22 日、ピアザ淡海（滋賀県）
- ⑩ 石堂正美、鈴木純子
神経幹細胞を活用した環境化学物質の定量的神経系発生毒性評価法
iPS・ES・体性幹細胞 Forum、2010 年 6 月 29 日、秋原原 UDX（東京都）
- ⑪ 鈴木純子、石堂正美
ラット培養神経幹細胞を活用した環境化学物質の影響評価
日本内分泌攪乱化学物質学会第 12 回研究発表会、2009 年 12 月 7 日、東京大学（東京都）
- ⑫ M. Ishido
Neurodegeneration of dopaminergic neurons by an environmental risk factor, 19th World Congress of Neurology, Oct. 29, 2009, Bangkok, Thailand,
- ⑬ M. Ishido
Temporal dynamics of gene expression during PACAP-induced PC12 cell differentiation
The 9th International symposium on VIP, PACAP and related peptides, Oct. 8th, 2009 Kagoshima
- ⑭ M. Ishido
Inhibitory effects of melatonin on synergistically IGF-1-and bisphenol A-induced proliferation of MCF-7 cells.
第 68 回日本癌学会、2009 年 10 月 1 日、パシフィコ横浜（神奈川県）
- ⑮ 石堂正美、鈴木純子
ロテノンによる *in vitro* 神経幹細胞移動阻害
第 32 回日本神経科学学会、2009 年 9 月 16 日、名古屋国際会議場（愛知県）
- ⑯ 鈴木純子、石堂正美
p-Nitrotoluene models of rat Parkinsonism
第 32 回日本神経科学学会、2009 年 9 月 16 日、名古屋国際会議場（愛知県）
- ⑰ 石堂正美、鈴木純子
環境化学物質によるラット神経幹細胞のアポトーシス誘導
第 18 回日本アポトーシス研究会学術集会、2009 年 8 月 1 日、長崎大学（長崎県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石堂 正美 (ISHIDO MASAMI)
独立行政法人国立環境研究所・環境リスク
研究センター・主任研究員
研究者番号：60211728

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

増尾 好則 (MASUO YOSHINORI)
東邦大学・理学部・教授
研究者番号：60301553