

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23681010

研究課題名(和文) 内分泌攪乱化学物質のヒトにおけるリスク評価へ向けた脳発達影響評価系の確立と応用

研究課題名(英文) Establishment of assay systems for risk assessment of exposure to endocrine disrupting chemicals in human developing brain

研究代表者

根岸 隆之(Negishi, Takayuki)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：80453489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,200,000円、(間接経費) 6,360,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「ヒトにおける内分泌攪乱化学物質の曝露リスク評価」を前提とした脳神経系発達における化学物質の影響評価系の確立を試みた。ここでは化学物質の影響評価に繫用されるラットとカニクイザルを用いることで種差の評価を行い、同時に個体レベルの実験(in vivo)と細胞レベルの実験(in vitro)を組み合わせることで生物学的蓋然性の評価を加えることをめざし研究を行った。本研究の成果から、ラットとカニクイザルには甲状腺ホルモンや化学物質の感受性に関し程度だけでなく質的にも種差が存在することが明らかとなった。また、化学物質の影響に際し個体レベルと細胞レベルの評価を一貫して行うことの重要性を明示した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish an effective assay system using experimental animals for the risk assessment of exposure to endocrine disrupting chemicals in developing human. In the present assay system, rats (*Rattus norvegicus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) were introduced as useful experimental animals to evaluate any species difference between rodent and primate in the responses to a specific chemical. In addition, this study tried to produce any biologically reliable and accurate information about the adverse effects of chemical exposure, combining in vitro (using living animals) and in vivo (using primary cultured cells) study. This study revealed that there were remarkable species differences between monkeys and rats in the response to thyroid hormone deficiency and exposure to synthetic compounds. Furthermore, the combination of in vivo and in vitro studies succeeded in producing the biologically reliable information about the effects of the compound tested.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 放射線・化学物質影響評価

キーワード：内分泌かく乱化学物質 サル ラット 神経毒性 発達毒性

1. 研究開始当初の背景

当時から現在でもそうであるが、内分泌攪乱化学物質など環境中に存在する化学物質のヒトにおける曝露リスク、特に発達期にある胎児の曝露リスクについて関心が集まっている。それは発達期というものが身体を構築する特別な時期でありその時期の狂いは生後とりかえすことのできないものだからである。最も程度の重いものは外形の奇形という形で明らかとなるが、現在はそうではないものにも懸念がもたれている。つまり出生後ただちに目に見える異常では無く成熟した後に顕在化するもの(肥満、糖尿病等)や外見上は異常の見えない発達障害、あるいはある程度成長しないと診断できない精神疾患等に関する発達期の化学物質曝露のリスクである。このような影響に関してはその時間軸上の問題や世界中の人が化学物質に汚染しているため対象群の設定が困難であるといった問題のため疫学的評価が非常に難しい。そこでマウス・ラット等の実験動物を用いた発達期の影響評価が重要となっている。しかしながら、ヒトの発達とマウス・ラットのそれは生物学的にかなりの相違点があるのは事実であり、げっ歯類を用いて得られた知見をそのままヒトにあてはめることの困難さは実際に行っている研究者の皆が感じていることであり、社会のこの問題に関心の高い方々もそう感じるところである。従って内分泌攪乱化学物質などが外からは見えない脳の発達に与える影響を考えるに際し、ヒトにおけるリスク評価を前提とした試験系の確立が望まれている。

2. 研究の目的

本研究ではヒトにおけるリスク評価により有用な情報を提供できる影響評価系を確立するためにカニクイザルという実験用霊長類を評価系にくみこむことで種差の壁を低くし、かつ *in vivo* と *in vitro* での評価を組み合わせることでより生物学的蓋然性の高い情報を提供するという二つのストラテジーの実践に挑戦した。ここでは脳発達に着目し、以下の三つの課題に集中した。

- 1) カニクイザルにおける脳発達とその発達に内分泌系が果たす役割の理解
- 2) *in vivo* と *in vitro* を組み合わせた影響評価系の応用
- 3) ヒトにおける曝露リスク評価のための生体脳に近い細胞を用いた *in vitro* 脳発達影響評価系の確立

3. 研究の方法

・カニクイザルの脳発達

カニクイザルの脳発達を分子生物学的に精査するため、胎齢 80 日、110 日、140 日、加えて生後 30 日、60 日、90 日、4 歳のカニクイザルの脳組織について免疫組織化学および Western blotting 法により脳発達に重要なタンパク質群の発現量を評価した。

・発達期甲状腺ホルモン欠乏カニクイザル

カニクイザル新生仔に対し、生後直後より母体経路で甲状腺ホルモン合成阻害剤であるメチマゾールを投与することにより甲状腺ホルモン欠乏カニクイザルを作成し、生後 60 日後に脳各部位を採取し免疫組織化学および Western blotting 法によりタンパク質発現解析を行った。

・ラット由来初代培養神経系細胞

生後 1 日目の Wistar ラット大脳皮質および小脳より神経細胞およびアストロサイトの初代培養を行った。

・カニクイザル由来初代培養神経系細胞

胎齢 80 日のカニクイザル大脳皮質より神経細胞およびアストロサイトの初代培養、小脳よりアストロサイトの初代培養を行った。

・ヒト由来初代培養アストロサイト

Lonza 社よりヒト由来初代培養アストロサイトを購入し、継代により増殖させて実験に供した。

4. 研究成果

・カニクイザル脳発達の分子生物学的評価

脳発達に重要なタンパク質 31 種類(分化マーカー、細胞種マーカー、シナプス関連タンパク質、神経伝達物質合成関連タンパク質、神経伝達物質受容体等)について発達期 7 時点(胎齢 80 日、110 日、140 日、加えて生後 30 日、60 日、90 日、4 歳)の大脳皮質(前頭葉皮質、帯状皮質) 線条体、海馬、小脳について免疫組織化学と Western blotting 法を用いてタンパク質発現解析を行いカニクイザルの脳発達マップの作製に成功した。さらなる評価対象を追加して学術雑誌に報告する予定である。

・発達期甲状腺ホルモン欠乏がカニクイザル脳発達に与える影響

カニクイザルにおいて発達期甲状腺ホルモン欠乏は神経細胞の神経突起形成等に重要でありかつ神経細胞のマーカーとしても利用される微小管関連タンパク質である MAP-2 の発現を減少させ、その局在パターンも異常を示すことを明らかにした。また、抑制性神経伝達物質である GABA の合成酵素やその受容体の発現パターンにも影響を与えることを明らかにした。一方、マウス、ラットにおいても発達期甲状腺ホルモン欠乏の影響を評価してきたが、これと比較するとマウス、ラットでは MAP-2 の発現に影響は見られなかった。さらにマウス、ラットでは海馬において甲状腺ホルモン欠乏の影響が顕著にみられたのに対し、カニクイザルでは少なくとも評価した項目については海馬における影響は見られなかった。これらの事実はげっ歯類とカニクイザルでは脳内における甲状腺ホルモン感受性のパターンが異なっていることを示し、甲状腺ホルモンが脳発達に重要であることは変わらずともその影響の最終的表現型は異なる可能性がある。

・*in vivo* と *in vitro* を組み合わせた影響評

価系の応用-有機ヒ素化合物曝露による脳発達攪乱-

有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸 (DPAA) はヒトにおいて小脳症状を主徴とする神経症状を引き起こすことが知られ、さらに発達期の曝露により精神遅滞や多動を惹起する可能性が指摘された。そこでこの化学物質を本研究で確立を目指す評価系に適用した。まず成熟したカニクイザルおよびラットに DPAA を曝露したところカニクイザルではミオクローヌスが見られ、ラットでは歩行異常および一過性の多動がみられた。ラット小脳由来神経系細胞の初代培養を用いた *in vitro* において DPAA は神経内分泌系の情報伝達物質である脳内ペプチドの発現異常を引き起こすことを明らかにした。そこでこの脳内ペプチドを産生する細胞種の同定を試みたところアストロサイトが DPAA の影響を受ける細胞であることが明らかとなった。そこでアストロサイトのみからなる培養系で DPAA の影響を評価し、同様にペプチド放出異常がおきることを確認した。さらに生体ラットに DPAA 曝露した場合も小脳においてこれらのペプチドの発現異常が生じていることを明らかにした。一方でカニクイザル小脳由来のアストロサイトやヒト由来のアストロサイトーマ (株化細胞) でも同様に評価を試みたが、少なくとも DPAA の細胞毒性についてはこの二つの細胞種はラットアストロサイトと比較すると抵抗性を示した。またペプチド発現パターンもラットのそれとは異なるものであった。これらの情報はこのラットアストロサイトでの結果をヒトでのそれと直結することの難しさを示唆している。ついで生後直後から DPAA に曝露することで発達期における影響評価を行ったところ、成熟ラットと同様に一過性の多動を示したうえ、発達期 DPAA 曝露は非可逆的な学習記憶障害を示した。

・生体脳に近い細胞を用いた *in vitro* 脳発達影響評価系の確立

本研究課題の特色のひとつは実験用霊長類であるカニクイザルを *in vitro* で用いることである。胎齢 80 日という時期が初代培養を行うのに最適であることを過去に明らかにしたため、ここでは 80 日齢胎仔より得られる神経系細胞の初代培養を行った。さらに化学物質が神経突起伸長に与える影響を評価する系を確立するため GFP 発現神経細胞の作製や培養前に蛍光色素を取り込ませてから播種することで特定の細胞を可視化しライブイメージングする方法の確立を試みた。また先述の通り、DPAA のアストロサイトに対する影響に関してラットとカニクイザルの種差の評価も行った。またここでは *in vitro* 影響評価系として各種神経系細胞 (神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア) についてラット・サルの培養細胞の樹立および安定供給の方法を模

索してきた。一方、ヒトにおけるリスク評価を考える場合にヒト由来の細胞で実験を行うべきと考えるが、これまではどうしても腫瘍由来の株化細胞にたよらざるを得なかった。もちろん株化細胞から得られる分子生物学的知見の重要性に異論はないが、この細胞における反応が生体の反応と相同かと言われると疑念がおきるのも事実である。そこで最近購入可能になったヒト由来アストロサイトを本影響評価系にとりいれることを試み、培養を行い試験系に提供し得る状態を整えた。利用する際の問題点としてはその増殖性、形態学的特徴がラット (由来個体) によって著しく異なっており、この系を用いる場合も複数のラット由来の細胞で影響評価を行う必要性を感じた。また、神経細胞についてもヒト iPS 細胞から分化誘導させた神経細胞を本評価系に取り組みことでより有用な評価系とすることが今後の目標であり、現在培養中である。

本研究課題の遂行により、これまで主にマウス・ラット等のげっ歯類を用いて行われてきた化学物質の脳発達影響評価に関する研究領域にカニクイザルという実験用霊長類の導入を達成し、さらに部分的ではあるがヒトの細胞も取り入れることに成功した。本研究課題で言いたかったことは「カニクイザルで実験を行えばヒトでのリスクがわかる」ということではなく「げっ歯類と霊長類との間にあるかもしれない種差をしっかりと評価することでヒトにおけるリスクを考える際に有用な情報を提供したい」ということである。もちろん、ヒトにおける *in vivo* 実験は不可能であり、かつカニクイザルですら *in vivo* での実験はそのコストおよび労力から安易にできるものではないため、*in vitro* で種差の有無を評価しその差が少ないのならげっ歯類の *in vivo* の結果を持ってかつその *in vitro* の情報を踏まえてヒトにおける適切なリスク評価ができると考えられる。これが本研究課題から得られた結論であり、目標を達成できたと考える。本研究課題の課題名は「内分泌攪乱化学物質のヒトにおけるリスク評価へ向けた脳発達影響評価系の確立と応用」であり、方向性を示すことに成功したが、将来的にはこれを土台としてヒトにおけるリスク評価に用いる影響評価系の確立を目指すべきと考える。

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 11 件)

Ito T, Morita T, Yoshida K, Negishi T, Yukawa K. Semaphorin 3A-Plexin-A1 signaling through ERK activation is crucial for Toll-like receptor-induced NO production in BV-2

microglial cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 33:1635-42, 2014. (査読有)

Ito T, Yoshida K, Negishi T, Miyajima M, Takamatsu H, Kikutani H, Kumanogoh A, Yukawa K. Plexin-A1 is required for Toll-like receptor-mediated microglial activation in the development of lipopolysaccharide-induced encephalopathy. *International Journal of Molecular Medicine*. 33:1122-30, 2014. (査読有)

Sawano E, Takahashi M, Negishi T, Tashiro T. Thyroid hormone-dependent development of the GABAergic pre- and post-synaptic components in the rat hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 31:751-61, 2013. (査読有)

Negishi T, Matsunaga Y, Kobayashi Y, Hirano S, Tashiro T. Developmental subchronic exposure to diphenylarsinic acid induced increased exploratory behavior, impaired learning behavior, and decreased cerebellar glutathione concentration in rats. *Toxicological Sciences*. 136:478-86, 2013. (査読有)

Umehara M, Negishi T, Maehara Y, Nakao Y, Kimura J. Stereochemical analysis and cytotoxicity of kulokekahilide-2 and its analogues. *Tetrahedron*. 69:3045-53, 2013. (査読有)

Sawano E, Negishi T, Aoki T, Murakami M, Tashiro T. Alterations in local thyroid hormone signaling in the hippocampus of the SAMP8 mouse at younger ages: association with delayed myelination and behavioral abnormalities. *Journal of Neuroscience Research*. 91:382-92, 2013. (査読有)

Umehara M, Negishi T, Tashiro T, Nakao Y, Kimura J. Structure-related cytotoxic activity of derivatives from kulokekahilide-2, a cyclodepsipeptide in Hawaiian marine mollusk. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. 22:7422-5, 2012. (査読有)

Negishi T, Takahashi M, Matsunaga Y, Hirano S, Tashiro T. Diphenylarsinic acid increased the synthesis and release of neuroactive and vasoactive peptides in rat cerebellar astrocytes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 71:468-79, 2012. (査読有)

Toyoshima Y, Sekiguchi S, Negishi T, Nakamura S, Ihara T, Ishii Y, Kyuwa S,

Yoshikawa Y, Takahashi K. Differentiation of neural cells in the fetal cerebral cortex of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Comparative Medicine*. 62:53-60, 2012. (査読有)

Iwasaki Y, Negishi T, Inoue M, Tashiro T, Tabira T, Kimura N. Sendai virus vector-mediated brain-derived neurotrophic factor expression ameliorates memory deficits and synaptic degeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*. 90:981-9, 2012. (査読有)

Yoshikawa T, Moriyama A, Kodama R, Sasaki Y, Sunagawa T, Okazaki T, Urashima A, Nishida Y, Arima A, Inoue A, Negishi T, Yoshikawa Y, Ihara T, Maeda H. Fetal and neonatal goiter in cynomolgus monkeys following administration of the antithyroid drug thiamazole at high doses to dams during pregnancy. *Journal of Toxicological Pathology*. 24:215-22, 2011. (査読有)

[学会発表](計14件)

根岸 隆之、松永 友貴、小林 弥生、平野 靖史郎、田代 朋子、発達期ジフェニルアルシン酸曝露による行動異常と小脳における酸化ストレス、Neuro2013、2013年6月20日、京都国際会館

澤野 恵梨香、根岸 隆之、田代 朋子、老化促進モデルマウス(SAMP8)の発達期脳における2型脱ヨード化酵素の減少と行動異常：局所的甲状腺ホルモン低下の原因とその影響、Neuro2013、2013年6月20日、京都国際会館

岩谷 可南子、澤野 恵梨香、根岸 隆之、田代 朋子、老化促進モデルマウス(SAMP8)海馬におけるGABA作動性神経伝達機構の発達過程、Neuro2013、2013年6月20日、京都国際会館

根岸 隆之、平野 靖史郎、田代 朋子、ラット小脳由来アストロサイトにおけるジフェニルアルシン酸による神経・血管作動性ペプチドの放出、第40回日本毒性学会学術年会、2013年6月17日、幕張メッセ

Matsunaga Y, Kudo T, Kojima H, Negishi T, Tashiro T. Early vascular impairment in the hippocampus leads to synaptic and cognitive dysfunction in diabetic Goto-Kakizaki rats、第55回日本神経化学会、2012年10月1日、神戸、神戸コンベンションセンター(国際会議場)

Sawano E, Negishi T, Tashiro T. Alterations in local thyroid hormone metabolism in the hippocampus of the

senescence-accelerated SAMP8 mice at younger ages、第 55 回日本神経化学会、2012 年 10 月 1 日、神戸、神戸コンベンションセンター（国際会議場）

Mouri M, Negishi T, Tashiro T. Alterations in neuronal maturation in a rat model of autism induced by fetal thalidomide exposure、第 55 回日本神経化学会、2012 年 9 月 30 日、神戸、神戸コンベンションセンター（国際会議場）

Yasumoto F, Takamura Y, Nishijo H, Negishi T. The morphological analysis of primary cultured monkey cortical neurons、第 55 回日本神経化学会、2012 年 9 月 30 日、神戸、神戸コンベンションセンター（国際会議場）

松永 友貴、工藤 尊、小島 悠、根岸 隆之、田代 朋子、2 型糖尿病モデル・GK ラット海馬における毛細血管の低形成と記憶・学習障害、日本生化学会関東支部例会、2012 年 6 月 23 日、群馬大学、昭和キャンパス

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) 海馬における若齢期の脳内甲状腺ホルモン代謝の変化、日本生化学会関東支部例会、2012 年 6 月 23 日、群馬大学、昭和キャンパス

澤野 恵梨香、菊間 慎平、錦 美樹、根岸 隆之、田代 朋子、老化促進モデルマウス (SAMP8) の若齢期における局所的な甲状腺ホルモン代謝の変化：ミエリン形成遅滞および行動異常との関連、第 54 回 日本神経化学会、2011 年 9 月 27 日、石川県、山代温泉、瑠璃光

松永 友貴、錦 美樹、宇野 健史、根岸 隆之、田代 朋子、2 型糖尿病モデル・GK ラット海馬における微小血管の低形成及びアストロサイトの形態異常、第 54 回 日本神経化学会、2011 年 9 月 26 日、石川県、山代温泉、瑠璃光

毛利 政文、沖重 愛佳、根岸 隆之、田代 朋子、サリドマイド誘発型自閉症モデルラットにおける MeCP2 標的遺伝子群の発現変化、第 54 回 日本神経化学会、2011 年 9 月 26 日、石川県、山代温泉、瑠璃光

小柳 洸志、田代 寛典、根岸 隆之、田代 朋子、大脳皮質由来初代培養神経細胞のシナプス形成に対する低濃度トリブチルスズの抑制作用、第 54 回 日本神経化学会、2011 年 9 月 26 日、石川県、山代温泉、瑠璃光

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根岸 隆之 (NEGISHI TAKAYUKI)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：80453489