

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24221003

研究課題名(和文) 微細形態解析による発達神経毒性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of developmental neurotoxicity by micro-morphological analysis

研究代表者

遠山 千春 (Tohyama, Chiharu)

筑波大学・医学医療系・客員教授

研究者番号：10150872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 166,800,000円

研究成果の概要(和文)：低用量の環境化学物質(ダイオキシン、ビスフェノールA、無機ヒ素など)への周産期曝露によって成熟期に高次脳機能(記憶・学習、情動、社会性等)異常が生じることがヒトや実験動物において報告されている。本研究において、曝露動物において発達期における神経細胞の微細形態(樹状突起の長さ、複雑性、スパイン密度等)の異常が生じていること、その背景には遺伝子発現異常を伴う場合があること、さらに超音波発声行動が、乳児期マウスの脳機能の新規の毒性影響指標となりうることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Perinatal exposure to low-dose environmental chemicals, including dioxin, bisphenol A, and inorganic arsenic, has been shown to induce abnormalities in higher brain function (learning, memory, emotion, and sociality) in humans and laboratory animals.

In the present study, we showed that abnormalities in micro-morphology of neurons (dendrite length and complexity, spine density and so on), as well as abnormal gene expression in some cases, were present at the developing stage of exposed animals, and that ultrasonic vocalization behavior could be a novel toxicity endpoint of brain function of mouse neonates.

研究分野：環境保健学

キーワード：発達神経毒性 微細形態 高次脳機能 ダイオキシン ビスフェノールA ヒ素 アリール炭化水素受容体 内分泌かく乱作用

1. 研究開始当初の背景

胎児期の低栄養状態が成人病の発症リスクを高めるとの Barker 仮説は、知見の充実とともに DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 学説として、医学の広範な分野で受け入れられてきた。他方、DOHaD 仮説とは別に、放射線・化学物質といった環境要因が次世代の子どもの健康に影響を及ぼすことが独立に研究され、数多くの研究報告がなされてきた。とりわけ、母体や胎児に顕著な毒性が引き起こされない条件において、生後に化学物質曝露の影響が顕れることが、DOHaD 仮説との文脈において重要な意味をもつ。発達期の脳は、血液脳関門の機能が整備されておらず、極めて感受性が高いことが知られている。したがって、化学物質への周産期曝露によって、次世代の高次脳機能への影響と他の毒性影響よりも低用量で生じる可能性が高い。ダイオキシン (TCDD) の周産期曝露を受けたマウスが成熟した後に学習・記憶障害、固執性亢進、社会性異常を、ビスフェノール A (BPA) の周産期曝露が衝動性亢進を引き起こすことを、我々は報告してきた。周産期曝露を受けたマウスの発達期と成熟期の脳を対象にして、細胞・組織レベルの影響を捉え、発達期の変化とその延長線上に位置する成熟期の行動異常とをつなぎ合わせる毒性メカニズムの研究は、発達神経毒性に関する毒性評価法の確立のみならず、DOHaD 学説における化学物質の意義を明らかにする上でも極めて重要である。

近年、発達障害や認知症の患者やモデルマウスにおいて、個々の神経細胞がもつ微細な形態変化が相次いで報告されており、病態理解を深める上で重要な組織学的指標として注目を集めている。化学物質曝露が引き起こす発達神経毒性においても、微細形態変化は重要な評価指標になると考えられる。神経細胞の脱落や神経線維束の投射異常など、細胞集団レベルでの曝露影響については研究が進められている一方で、微細形態変化についてはほとんど調べられていなかった。

2. 研究の目的

本研究では環境化学物質である TCDD と BPA、無機ヒ素などを対象物質とし、母体や胎児に顕著な悪影響を引き起こさないが、生後に行動異常を引き起こす実験条件を用いて、周産期曝露が微細形態に及ぼす影響を検討する。曝露に伴って生じる神経細胞の形態変化の特徴を調べる。毒性の表現型としての微細形態変化を引き起こす分子メカニズムの解明にも着手する。そして、発達段階の微細形態変化がどのような行動異常に結びつくのか調べるため、新規行動試験系の構築とともに具体的な行動異常を明らかにする。微細形態を出発点とし、分子・細胞・組織・行動レベルの変化を包括的に評価し、正常な脳の発達が化学物質曝露により逸脱していく発達神経毒性

の統合的理解を目指す。

3. 研究の方法

神経細胞の微細形態を解析するため、脳組織中の神経細胞を染色するゴルジ染色法および「まばら」に GFP を発現する神経細胞をもつ Thy1-GFP 遺伝子改変マウス (以下、Thy1-GFP マウスと記載)、そして胎仔あるいは新生仔マウスの脳細胞に遺伝子導入を行う *in vivo* 電気穿孔法 (以下 *in vivo* EP 法と記載) を用いた。ゴルジ染色と Thy1-GFP マウスは化学物質曝露実験にて、*in vivo* EP 法は微細形態変化を引き起こす分子シグナルを調べるために用いた。

染色や蛍光タンパク質により標識した神経細胞は顕微鏡画像をパソコンの NeuroLucida ソフトウェアに映し出し、微細形態をトレースし、三次元再構築することで定量的形態解析を行った。

TCDD の受容体であるアリール炭化水素受容体 (AhR) が誘導する下流シグナル伝達経路と微細形態との関連を調べるため、アゴニスト非存在下でも AhR シグナルを誘導することができる恒常活性型 AhR (CA-AhR) を用いた。*In vivo* EP 法により CA-AhR を神経細胞に発現させ、AhR シグナルの活性化が神経細胞の分化に及ぼす影響を調べた。

微細形態変化が行動に及ぼす影響を評価するため、発達期マウスの超音波発声 (泣き声) を行動指標とした。母獣ならびに同腹仔から隔離した生後 3~12 日目の発達期マウスを 30°C に設定したホットプレート上に置き、低温刺激下で惹起される超音波を測定した。

4. 研究成果

まずは化学物質曝露による微細形態変化を捉え、次に微細形態変化を引き起こす分子メカニズムの検証、そして微細形態変化がどのような行動異常に繋がるのか調べた。

(1) 化学物質の周産期曝露が微細形態に及ぼす影響

正確に微細形態を計測するため、神経細胞を「まばら」に可視化する方法としてゴルジ染色ならびに Thy1-GFP マウスを用いた。TCDD あるいは BPA の周産期曝露を受けたマウスが 1.5 歳齢になってから脳を採取し、ゴルジ染色して樹状突起から突き出たスパイン構造の密度を計測した。その結果、記憶・学習機能を担う海馬においてスパイン密度の低下が観察された (図 1)。また TCDD 曝露については情動機能を担う扁桃体においてもスパイン密度の低下が起きていた。さらに、胎仔期にヒ素の曝露を受けたマウスを用いて、成熟段階の脳をゴルジ染色し、微細形態を解析したところ、樹状突起の長さが減少していた。これらの結果から、周産期の化学物質環境が生後の成熟段階において神経細胞の微細

形態変化となって顕れることが、複数の化学物質において認められた。

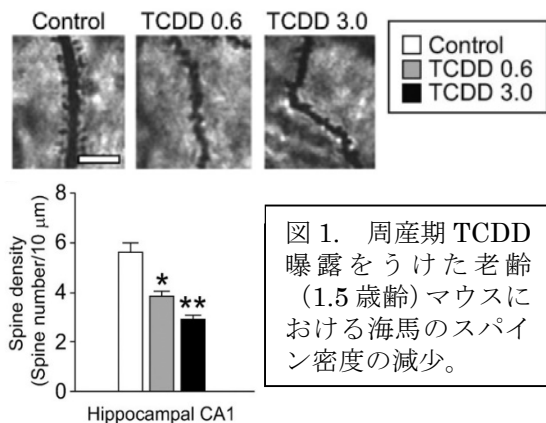


図 1. 周産期 TCDD 曝露を受けた老齢 (1.5 歳齢) マウスにおける海馬のスパイン密度の減少。

次に、成熟期において観察された異常がどの時点で生じているかを検討するため、発達段階の微細形態における TCDD あるいは BPA の影響を調べた。GFP を発現する神経細胞が「まばら」に生じる Thy1-GFP マウスに曝露を行い、樹状突起の形態解析を行った。TCDD 曝露を受けた生後 14 日目のマウスでは、海馬ならびに扁桃体の神経細胞の樹状突起の長さの変化が認められた。BPA 曝露では、生後 21 日目に海馬の神経細胞にて樹状突起の複雑度の低下が起きていた(図 2)。

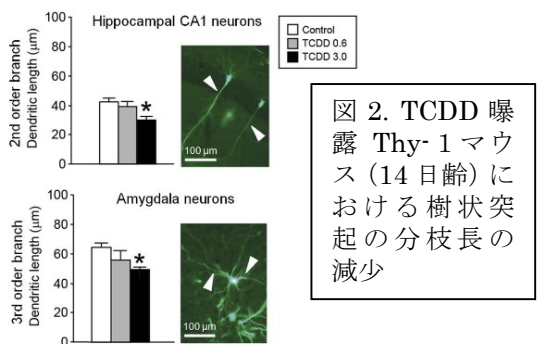


図 2. TCDD 曝露 Thy-1 マウス (14 日齢) における樹状突起の分枝長の減少

さらに、胎仔期での曝露影響を捉えるため、樹状突起伸長に先立って起こる神経細胞移動について調べた。In vivo EP 法により蛍光タンパク質を発現させて神経細胞を標識し、BPA 曝露が脳皮質の神経細胞分布パターンに及ぼす影響を調べた。その結果、BPA 曝露群では対照群と比べて脳皮質の表層部の分布率が低下、深層部の分布率が増加しており、細胞移動の遅れを示唆する結果が得られた。他方、TCDD 曝露の場合には神経細胞移動への顕著な影響は観察されなかった。

これらの結果から、化学物質曝露が発達期脳の微細形態や細胞移動に異なるメカニズムで影響を及ぼし、正常な神経回路の構築を阻害していること、そして発達期に生じた微細形態レベルの変化は成熟段階になっても残っていることが明らかとなった。

(2)微細形態変化を引き起こす分子シグナル伝達経路

TCDD は、TCDD 受容体であるアリール炭化水素受容体 (AhR) を活性化し、AhR 下流のシグナルをかく乱することで様々な毒性影響を引き起こすことが知られている。そこで、神経細胞内部で AhR シグナルを人為的に誘導することで微細形態の変化が引き起こされるとの仮説を検証した。In vivo EP 法により、リガンド非存在下でも AhR シグナルを誘導できる恒常活性型 AhR (CA-AhR) の遺伝子をもつベクターを蛍光タンパク質 (GFP または tdTomato) 遺伝子のベクターとともに胎仔期・新生仔期の神経細胞に発現させた(図 3)。

この実験では、興奮性神経細胞のモデルとして海馬ならびに大脳皮質の錐体細胞を対象とし、抑制性神経細胞のモデルとして嗅球の顆粒細胞を対象として、それぞれ CA-AhR を

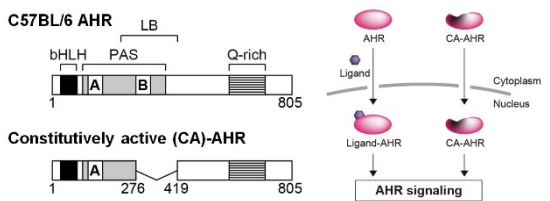


図 3. (左)C57BL/6 系統マウスの AhR と恒常活性型 AhR(CA-AhR)のタンパク質構造の模式図。(右)AhR は TCDD などのリガンドと結合することで核移行が可能となるが、CA-AhR はリガンドが無くても核へ移行し、下流シグナル伝達経路を誘導することができる。

発現させた。In vivo EP 処置を施したマウスの生後発達期 (7~21 日齢) に脳を摘出し、蛍光タンパク質標識細胞の微細形態解析を行った。その結果、大脳錐体細胞では、先端及び基底樹状突起の長さの減少、複雑性の減少が、CA-AhR 群で生じていた (図 4)。また、嗅球顆粒

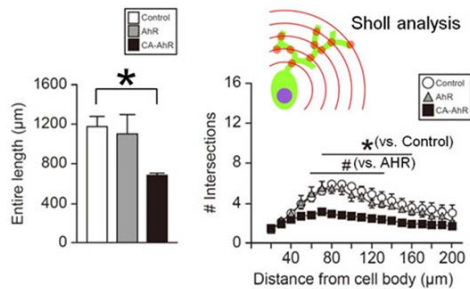


図 4. CA-AhR 発現による生後 14 日齢マウスの大脳錐体細胞における樹状突起の長さ (左) および複雑性 (右) の異常。

細胞においては CA-AhR 群で 先端及び基底樹状突起の長さの減少が生じていた (図 5)。これら AhR シグナル伝達経路の活性に起因する樹状突起の形態変化は、TCDD 曝露によって生じる微細形態への影響を反映している可

能性が高い。

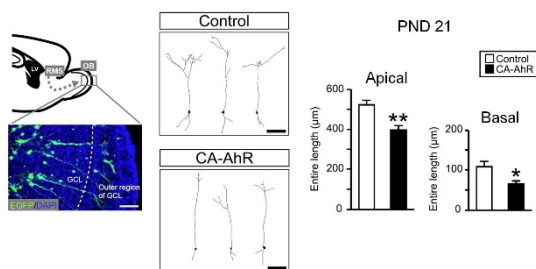


図 5. CA-AhR 発現による生後 21 日齢マウスの嗅球顆粒細胞における樹状突起の長さの異常。

さらに CA-AhR の影響を高感度共焦点顕微鏡システムを用いて詳しく調べたところ、CA-AhR を発現させた嗅球顆粒細胞では樹状突起スパインの密度が低下していた (図 6)。

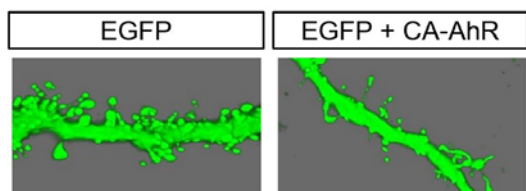


図 6. CA-AhR 発現による生後 14 日齢マウスの嗅球顆粒細胞における樹状突起の三次元再構築画像。EGFP のみ発現した神経細胞では樹状突起から突き出したスパインに富んでいるが、CA-AhR を発現させることでスパイン密度が顕著に低下した。

この結果は、TCDD 曝露マウスの成熟期に観察されたスパイン密度の低下が、AhR シグナルの恒常的活性化に伴い発達段階の時点ですでに生じており、この低下状態はマウスが成長した後も継続していることを示唆していると言える。

加えて、低用量 TCDD 曝露では細胞移動異常は生じないが、CA-AhR による過剰なシグナル誘導により細胞移動の異常が引き起こされることが分かった。他方、神経突起変化は TCDD 曝露でも観察されたことから、微細形態の変化は低用量 TCDD 曝露に対して鋭敏な指標となることが示された。

TCDD 曝露による微細形態変化において、AhR シグナル以外の関与を調べるため、曝露マウス (生後 1~21 日齢) の脳を用いて遺伝子の発現解析を行った。生後 3 日齢マウスの脳から抽出した mRNA を用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、曝露マウスの脳ではセマフォリン遺伝子群の発現変化が認められた。このうち Sema3b ならびに Sema3g は定量 PCR によっても発現増加が確認された。セマフォリンは樹状突起や軸索などの神経突起の伸長を制御しており、正常な微細形態の構築に必要な不可欠な遺伝子群である。したがって、セマフォリン遺伝子の発現変化は TCDD 曝露による微細形態変化を遺伝子発現の観点から裏付けた

と言える。また、セマフォリン遺伝子の発現量増加は肝臓、腎臓、肺、脾臓では認められなかったため、脳は他の臓器組織と比べて感受性が高い、あるいは脳特異的な毒性シグナルが存在する可能性を示唆する結果と言える。

これらの結果から、神経細胞内部で誘導された AhR シグナルが樹状突起の成長や細胞分布パターンに影響を及ぼすことが明らかとなった。加えて、セマフォリン遺伝子群の関与を示唆する結果も得ることができた。TCDD 曝露と微細形態変化とを結びつける分子メカニズムの一端が明らかとなった。

(3)TCDD 曝露による乳児期マウスの行動異常
先述の通り、TCDD の曝露により乳児期の脳における微細形態ならびにセマフォリン遺伝子発現の変化が観察され、これら分子・組織レベルの変化は乳児期の時点ですでに行動レベルの異常が生じている可能性を強く示唆する。ところが、この時期のマウスは運動機能が未発達であり、成熟個体を対象とした行動試験系を適用することは不可能である。そのため、発達神経毒性評価において、乳児期における行動レベルの知見は自発運動量などに限られており、脳機能を反映した評価は皆無に等しい。近年、自閉症スペクトラム障害 (ASD) モデルマウスにおいて、乳児期の超音波発声の異常が報告され、脳機能を反映した行動指標として注目されている。そこで本研究では、TCDD 曝露による微細形態変化の毒性学的意義を明確にするために、曝露が乳児期マウスの超音波発声に及ぼす影響を調べた。微細形態変化が観察された時と同じ曝露条件のマウスを作製し、生後 3~12 日目の乳児期マウスの超音波を測定した。その結果、曝露マウスでは対照群と比べて発声時間や発声回数の低下が認められた。また、仔マウスが発した超音波の波形を比較したところ、下降型の波形の割合は TCDD 曝露の影響が無かったが、弓型と波型の割合が曝露マウスでは低下しており、曝露により複雑な音声を発しにくくなっていることが分かった。しかし、組織切片による解析から、声帯組織には TCDD 曝露による病理的变化は認められず、超音波発声変化の原因は声帯組織の構造異常によるものではないことを確認した。以上、乳児期の超音波発声が発達神経毒性評価の有用な指標となりうることを見いだした。

【結論】

本研究によって、環境化学物質 (TCDD、BPA、無機ヒ素等) への周産期曝露が発達期ならびに成熟期マウスの脳の神経細胞の樹状突起の長さ・複雑性・スパイン密度などの微細形態変化を引き起こすことが明らかとなった。特に TCDD 曝露モデルにおいて、微細形態変化には AhR シグナルならびにセマフォリン遺伝子が関与することが示唆された。さらに、TCDD 曝露は乳児期に超音波発声行動の異常を引き起こすことが明らかとなり、超音波発

生行動が乳児期マウスの脳機能の新規の毒性影響指標となりうることを示された。これらの結果は化学物質への周産期曝露による脳微細構造変化が、成長後の脳の高次脳機能と結びつくこと、そして化学物質曝露環境がDOHaD学説のモデルとなることを示唆している。

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 14 件)

1. Kimura E, Tohyama C. Embryonic and postnatal expression of aryl hydrocarbon receptor mRNA in mouse brain. *Frontiers in Neuroanatomy*. 11: 4, 2017. doi: 10.3389/fnana.2017.00004. 査読有
2. Kimura E, Kubo K, Endo T, Nakajima K, Takeyama M, Tohyama C. Excessive activation of AhR signaling disrupts neuronal migration in the hippocampal CA1 region in the developing mouse. *The Journal of Toxicological Sciences*, 42: 25-30, 2017. 査読有
3. Tohyama C. Developmental neurotoxicity test guidelines and perspectives. *The Journal of Toxicological Sciences*, 41 (Special Issue): SP69-SP79, 2017. 査読有
4. Kimura E, Endo T, Yoshioka W, Ding Y, Ujita W, Takeyama M, Tohyama C. In utero and lactational dioxin exposure induces Sema3b and Sema3g gene expression in the developing mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476: 108-113, 2016. 査読有
5. Kimura E, Ding Y, Tohyama C. AhR signaling activation disrupts migration and dendritic growth of olfactory interneurons in the developing mouse. *Scientific Reports*, 6: 26386, 1-11, 2016. doi: 10.1038/srep26386. 査読有
6. Sano K, Isobe T, Yang J, Win-Shwe TT, Yoshikane M, Nakayama SF, Kawashima T, Suzuki G, Hashimoto S, Nohara K, Tohyama C, Maekawa F. In utero and lactational exposure to acetaminophen induces abnormalities in socio-sexual and anxiety-related behaviors of male mice. *Front Neurosci*. 3:10:228, 2016. doi: 10.3389/fnins.2016.00228. 査読有
7. Aung KH, Kyi-Tha-Thu C, Sano K, Nakamura K, Tanoue A, Nohara K, Takeyama M, Tohyama C, Tsukahara S, Maekawa F. Prenatal exposure to arsenic impairs behavioral flexibility and cortical structure in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 10: 137, 2016. doi: 10.3389/fnins.2016.00137. 査読有
8. Ling W, Endo T, Kubo K, Nakajima K,

Takeyama M, Tohyama C. In utero bisphenol A exposure induces abnormal neuronal migration in the cerebral cortex of mice. *Frontiers in Endocrinology*, 7: 7, 2016. doi: 10.3389/fendo.2016.00007. 査読有

9. Kimura E, Matsuyoshi C, Miyazaki W, Benner S, Hosokawa M, Yokoyama K, Takeyama M, Tohyama C. Prenatal exposure to bisphenol A impacts neuronal morphology in the hippocampal CA1 region in developing and age mice. *Archives of Toxicology*, 90, 691-700, 2016. 査読有
10. Kimura E, Kubo K, Matsuyoshi C, Benner S, Hosokawa M, Endo T, Ling W, Kohda M, Yokoyama K, Nakajima K, Takeyama M, Tohyama C. Developmental origin of abnormal dendritic growth in the mouse brain induced by in utero disruption of aryl hydrocarbon receptor signaling. *Neurotoxicology and Teratology*, 52 (Pt A): 42-50, 2015. 査読有
11. Benner S, Takeyama M, Endo T, Yoshioka W, Tohyama C. Application of NeuroTrace staining in the fresh frozen brain samples to laser microdissection combined with quantitative RT-PCR analysis. *BMC Res Notes*. 20:8:252. 2015. doi: 10.1186/s13104-015-1222-9. 査読有
12. Takeyama M, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Tohyama C. Disruption of paired-associate learning in rat offspring perinatally exposed to dioxins. *Archives of Toxicology*, 88: 789-798, 2014. 査読有

[学会発表] (計 36 件)

1. Eiki Kimura, Chiharu Tohyama. In utero and lactational TCDD exposure impairs ultrasonic vocalization of neonatal mice. Society of Toxicology (56th Annual Meeting and ToxExpo), Baltimore, USA, March 12–16, 2017.
2. Kimura E, Tohyama C. Significance of AHR signaling on the mammalian brain development. AHR Conference 2016, Rochester, USA, Aug 3–6, 2016.
3. Kimura E, Kubo K, Endo T, Ling W, Nakajima K, Takeyama M, Tohyama C. Constitutive activation of AhR signaling disrupts dendritic growth and cellular migration of cortical pyramidal neurons in the developing mouse brain. Society of Toxicology (55th Annual Meeting and ToxExpo), New Orleans, USA, March 13–17, 2016.
4. Kimura E, Ding Y, Takeyama M, Tohyama C. AhR activation and TCDD exposure impair dendritic morphology

- in the developing olfactory bulb. The 51st Congress of the European Societies of Toxicology, Porto, Portugal, Sep 13–16, 2015.
5. Tohyama C. Novel methods to study how environmental factors affect the developing rodent brain. The 7th International Congress of Asia Society of Toxicology, Jeju Island, Korea, June 23-26, 2015.
 6. Ding Y, Kimura E, Takeyama M, Tohyama C. Activation of AhR signaling and perinatal TCDD exposure impair neuronal morphology in the developing olfactory bulb. The 7th International Congress of Asia Society of Toxicology, Jeju Island, Korea, June 23-26, 2015.
 7. Kimura E, Ding Y, Takeyama M, Tohyama C. Perinatal TCDD exposure impairs dendritic growth of granule cells in the mouse olfactory bulb during brain development. Society of Toxicology (SOT) 54th Annual Meeting and ToxExpo, San Diego, USA, March 22–26, 2015.
 8. Kimura E, Kubo K, Endo T, Ling W, Nakajima K, Takeyama M, Tohyama C. Activation of AhR signaling pathway regulates dendritic growth in the developing mice. Neuroscience 2014 (The Annual Meeting of the Society for Neuroscience), Washington DC, USA, Nov 15–19, 2014.
 9. Ling W, Endo T, Miyazaki W, Kimura E, Kubo K, Nakajima K, Takeyama M, Tohyama C. Abnormal neuronal migration and behavior in mice exposed *in utero* to Bisphenol A. Society of Toxicology (SOT) 53rd Annual Meeting and ToxExpo, Phoenix, USA, March 10–14, 2014.
 10. Kimura E, Miyazaki W, Matsuyoshi C, Takeyama M, Tohyama C. Exposure to bisphenol A during gestation alters neuronal morphology in the hippocampus of mouse offspring. Soule, Korea, The XIII International Congress of Toxicology, June 30–July 4, 2013.
 11. Ling W, Endo T, Miyazaki W, Kimura E, Kubo K, Nakajima K, Takeyama M, Tohyama C. Perinatal Exposure to Bisphenol A Affects Cortical Development and Induces Impulsive Behavior in Mice. The XIII International

ongress of Toxicology, Soule, Korea, June 30–July 4, 2013.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠山 千春 (TOHYAMA, Chiharu)
 筑波大学・医学医療系・客員教授
 研究者番号：10150872

(2)研究分担者

渡辺 知保 (WATANABE, Chiho)
 東京大学大学院・医学系研究科・教授
 研究者番号：70220902

(3)連携研究者

仲嶋 一範 (NAKAJIMA, Kazunori)
 慶應義塾大学・医学部・教授
 研究者番号：90280734

掛山 正心 (KAKEYAMA, Masaki)
 早稲田大学・人間科学学術院・教授
 研究者番号：30353535

前川 文彦 (MAEKAWA, Fumihiko)
 国立環境研究所・環境リクス・健康研究センター・主任研究員
 研究者番号：40382866

(4)研究協力者

木村栄輝 (KIMURA, Eiki)
 筑波大学・医学医療系・研究員
 研究者番号: 90710054