

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340047

研究課題名(和文) 飼育環境による、化学物質に対する中枢神経保護システムへの影響

研究課題名(英文) Effect of housing conditions on neurotoxicity of chemicals

## 研究代表者

山崎 岳 (Yamazaki, Takeshi)

広島大学・総合科学研究科・教授

研究者番号：30192397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 離乳後のラットを単独飼育、ケージあたり2匹、大型ケージに10匹で6週間飼育し、脳への影響を調べた。単独飼育では自発運動量が増加したが、海馬のニューロン数などに差異は生じなかった。その後神経毒のトリメチルスズを投与したところ、1週間後には、単独飼育、10匹飼育ではニューロンの脱落数が多く、脳の脆弱性が増加していた。単独飼育では海馬のBDNF含量が低下しており、これがその原因の一つであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： Wistar male rats on postnatal day 28 were divided into three groups: isolated, pair housed, and enrichment environment group. After 6 weeks socially isolated housing, hippocampal BDNF content was significantly lower than that in pair-housed rats. Housing conditions did not affect on pyramidal cell numbers in the hippocampus. Injection of trimethyltin induced decrease in pyramidal cell numbers in hippocampus, which was significantly lower in isolated and enriched environment rats than pair-housed rats. Trimethyltin injection significantly increased locomotor activity of pair-housed rats, but not affected on isolated and enriched rats after the 7 days. Socially isolated housing condition reduced BDNF contents but not affected on the cell number in the hippocampus. Pyramidal cells in the hippocampus were more damaged in isolated rats than pair-housed after trimethyltin injection. Increase in vulnerability of hippocampus might be caused by decrease in BDNF.

研究分野：環境学

キーワード：海馬 飼育環境 社会的孤独 トリメチルスズ BDNF

## 1. 研究開始当初の背景

脳は、障害から自身を保護するシステムを備えている。例えば、エストラジオールなどの神経保護ステロイドやBDNFのような神経保護ペプチドを脳内で合成し、さらにミクログリアなどの細胞免疫系による保護システムも加わって、化学物質による神経毒性にもある程度抵抗性がある。

飼育環境は、げっ歯類の脳に大きな影響を与える。離乳直後のラットやマウスを1ケージに1匹ずつで単独飼育すると、不可逆的な学習障害や攻撃性の増加が観察される。逆に遊具の豊富な大型ケージに10匹程度入れた豊かな環境で育てると、通常のケージに2~3匹入れた場合と比較して脳重量や空間記憶能力が亢進される。

飼育環境は、中枢神経の障害保護システムにも影響を与える。我々は、海馬のステロイドホルモン合成活性が、ラットの発達期の飼育環境によって大きな影響を受けることを見出し、それにより飼育環境が海馬の化学物質に対する脆弱性に影響を与える可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

(1) 発達期ラットの飼育環境が、脳の神経保護システムに与える影響を明らかにする。

一般的な毒性試験では、化学物質投与後のラットやマウスは単独飼育される場合が多い。同じ飼育条件のコントロール群と比較するので毒性の有無は検出できるが、脳の感受性が飼育環境によって影響を受けていると、毒性の程度の評価は不正確になる。特に神経毒性についてのNO(A)ELの値などに影響する可能性がある。

そこで、発達期の飼育環境の影響を解析する。

(2) 飼育環境が脳の神経保護システムに与える影響の、分子機構の解析

発達期の飼育環境は、脳の神経保護システムのどの因子にどのような影響を与えるかを、分子レベルで明らかにする。神経保護システムとしては、ステロイド、ペプチド、アストログリアといった因子が存在する。BDNなどの因子の発現が影響されるのか、各因子が独立して作用するのか、それぞれの因子の変動と保護作用の強さの変動など、様々な情報が得られることが期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) 発達期ラットの飼育環境が、脳の神経保護システムに与える影響の解析

3種の異なる環境で飼育したラットに対し、海馬への選択的神経毒であるトリメチルスズを投与する。海馬の機能を行動実験で、神経のダメージやミクログリアの挙動を免疫組織染色で数値化し、化学物質に対する感受性の変動を定量的に解析する。

(2) 飼育環境が脳の神経保護システムに与える影響の、分子機構の解析

ステロイドホルモン合成の阻害剤を投与して、上記(1)と同様の実験を行う。海馬内の神経保護因子の挙動をモニターすることで、飼育環境による神経保護作用の変動へのステロイドホルモンの寄与を解析し、保護システムのネットワークを分子レベルで明らかにする。

## 4. 研究成果

離乳後のラットを3種の異なる環境(単独飼育、ケージあたり2匹での飼育、大型ケージで遊具と共に10匹で飼育)で6週間飼育した後、トリメチルスズを腹腔内投与した。投与後のラットは攻撃的になったので、すべて単独飼育で1週間飼育した。

単独飼育群、2匹飼育群では、体重低下、

副腎重量の増加、自発運動量の亢進が見られた。これらは既報にあるトリメチルスズ毒性と一致する。また、両飼育群間に有意差は見られなかった、しかし10匹飼育群では体重や副腎重量の変化が生じず、毒性への抵抗性が見られた。これは、飼育環境が毒物作用に影響を与えるという知見である。

さらに、投与1週間後に海馬のニューロン数を計測すると、CA3領域でニューロンの脱落が見られ、単独飼育群、10匹飼育群、2匹飼育群の順に減少が大きかった。10匹飼育群でもニューロンへの細胞毒性は2匹飼育群より増加しており、体重変化などで見られた毒性への抵抗性はここでは観察されなかった。単独飼育群は、トリメチルスズによる海馬毒性が顕著に増強しており、これは昨年見出したBDNFの含量の変化に起因していることが示唆された。

上記の実験結果より、飼育環境はトリメチルスズのような毒物の作用に、大きな影響を与える事が示された。毒性の増強という視点で見ると、神経への影響と、体重変動や副腎重量への影響とで異なる効果が見られた。

#### 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19件)

1. Ishihara Y, Itoh K, Ishida A, Yamazaki T. Selective estrogen-receptor modulators suppress microglial activation and neuronal cell death via an estrogen receptor-dependent pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 145:85-93 (2015). (査読有)
2. Ishihara Y, Takemoto T, Ishida A, Yamazaki T. Protective actions of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone on oxidative neuronal injury induced by organometallic compounds (Review Article). *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2015:343706 (16 page) (2015). (査読有)
3. Hasegawa Y, Hojo Y, Kojima H, Ikeda M, Hotta K, Sato R, Ooishi Y, Yoshiya M, Chung BC, Yamazaki T, Kawato S. Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal

neurons: Involvement of kinase networks. *Brain Res.* 1621:147-161 (2015). (査読有)

4. Hirano T, Yoshikawa R, Harada H, Harada Y, Ishida A, Yamazaki T. Long noncoding RNA, CCDC26, controls myeloid leukemia cell growth through regulation of KIT expression. *Mol Cancer*. 14:90 (15 page) (2015). (査読有)
5. Senga Y, Ishida A, Shigeri Y, Kameshita I, Sueyoshi N. The Phosphatase-Resistant Isoform of CaMKI, Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase I $\delta$  (CaMKI $\delta$ ), Remains in Its "Primed" Form without Ca<sup>2+</sup> Stimulation. *Biochemistry*. 54:3617-30 (2015). (査読有)
6. Takemoto T, Ishihara Y, Ishida A, Yamazaki T. Neuroprotection elicited by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor released from astrocytes in response to methylmercury. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 40:199-205 (2015). (査読有)
7. Ishihara Y, Takemoto T, Itoh K, Ishida A, Yamazaki T. Dual role of SOD2 induced in activated microglia: increased tolerance to oxidative stress and convergence of inflammatory responses. *J. Biol. Chem*. 290:22805-22817 (2015). (査読有)
8. Ishihara Y, Fujitani N, Kawami T, Adachi C, Ishida A, Yamazaki T. Suppressive effects of 17 $\beta$ -estradiol on tributyltin-induced neuronal injury via Akt activation and attenuation of oxidative stress in rat hippocampal slices. *Life Sci*. 99:24-30 (2014). (査読有)
9. Baba T, Otake H, Sato T, Miyabayashi K, Shishido T, Wang CY, Shima Y, Kimura H, Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, Ohkawa Y, Suyama M, Chung BC, Morohashi K. Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Nat Commun*. 5:3634 (13 page) (2014). (査読有)
10. Munetsuna E, Hattori M, Yamazaki T. Stimulation of estradiol biosynthesis by tributyltin in rat hippocampal slices. *Endocr Res*. 39:168-172 (2014). (査読有)
11. Mukuda T, Koyama Y, Hamasaki S, Kaidoh T, Furukawa Y. Systemic angiotensin II and exercise-induced neurogenesis in adult rat hippocampus. *Brain Res*. 1588:92-103 (2014) (査読有)
12. Oki K, Kopf PG, Campbell WB, Luis Lam M, Yamazaki T, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP. Angiotensin II and III Metabolism and Effects on Steroid Production in

the HAC15 Human Adrenocortical Cell Line. *Endocrinology* 154:214-221 (2013). (査読有)

13. **Ishihara Y**, Kawami T, **Ishida A**, **Yamazaki T**. Allopregnanolone-mediated protective effects of progesterone on tributyltin-induced neuronal injury in rat hippocampal slices. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 135:1-6 (2013). (査読有)

14. **Yamazaki T**, Yamamoto M, **Ishihara Y**, Onizaki M, Komatsu S, Munetsuna E, **Ishida A**, Kawato S, Mukuda T. De novo synthesized estradiol protects against methylmercury-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal slices. *Pros One*. 8:e55559 (7 page) (2013). (査読有)

15. **Ishihara Y**, Itoh K, Mitsuda Y, Shimada T, Kubota T, Kato C, Song SY, Kobayashi Y, Mori-Yasumoto K, Sekita S, Kirino Y, **Yamazaki T**, Shimamoto N. Involvement of brain oxidation in the cognitive impairment in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease: Non-invasive measurement of the brain redox state by magnetic resonance imaging. *Free Radic Res*. 47:731-739 (2013). (査読有)

16. Hasegawa Y, Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Kimoto T, Hojo Y, **Yamazaki T**, Kawato S. Bisphenol A significantly modulates long-term depression in the hippocampus as observed by multi-electrode system. *Neuro Endocrinol Lett*. 34:129-134 (2013). (査読有)

17. **Ishida A**, Tsumura K, Oue M, Takenaka Y, Shigeri Y, Goshima N, **Ishihara Y**, Hirano T, Baba H, Sueyoshi N, Kameshita I, **Yamazaki T**. An active C-terminally truncated form of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase-N (CaMKP-N/PPM1E). *BioMed Res. Int*. 2013:134813 (10 page) (2013). (査読有)

18. Matsumura S, Ohta T, Takahashi T, **Yamazaki T**, Takahashi K, Kurachi H. Non-sex cord-stromal ovarian tumors frequently produce and secrete estrogen in postmenopausal women: impact on bone metabolism and abnormal endometrial histology. *J Clin Endocrinol Metab*. 98:2775-2782 (2013).. (査読有)

19. **Mukuda T**, Hamasaki S, Koyama Y, Takei Y, Kaidoh T, Inoué T. Candidate of organum vasculosum of the lamina terminalis with neuronal connections to neurosecretory preoptic nucleus in eels. *Cell Tissue Res*. 353:525-538. (2013) (査読有)

〔学会発表〕(計15件)

1. 櫻井光、石原康宏、石田敦彦、山崎 岳 ニューロステロイド合成と神経保護作用の

レチノイドX受容体アゴニストによる亢進 第23回ステロイドホルモン学会学術集会 2016年1月15日 倉敷市

2. 山崎 岳、石原康宏、大山 勉、椋田崇生、小山友香、石田敦彦 孤独環境はラット海馬のBDNF量を低下させトリメチルスズによる神経毒性を増加させた第38回日本神経科学大会 2015年7月28日~31日神戸市

3. 櫻井光、石原康宏、山崎 岳 脳のステロイド合成を人為的に増減する内外環境応答・代謝酵素研究会(招待講演) 2015年7月18日~19日旭川市

4. 櫻井光、石原康宏、石田敦彦、山崎 岳 レチノイドX受容体アゴニストによるステロイド合成酵素発現上昇と神経保護作用 第127回日本薬理学会近畿部会 2015年6月26日 岐阜市

5. **Yamazaki T**, **Ishihara Y**. De novo synthesis of neuroprotective steroids. 19<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P450 (招待講演、国際学会) 2015年6月12日~15日 東京

6. 石原康宏、山崎 岳 有機スズによる酸化的神経障害とその内因性防御因子としてのニューロステロイド 日本薬学会 第135年会 2015年3月25日~28日 神戸市

7. 竹本拓矢、石原康宏、石田敦彦、山崎 岳 神経毒に対するアストロサイト適応応答のメカニズム解析 日本薬学会第135年会 2015年3月25日~28日 神戸市

8. **Yamazaki T**, **Ishihara Y**, Yamamoto M. Neuroprotection by de novo synthesized estradiol and brain converted allopregnanolone in cultured rat hippocampus. 8<sup>th</sup> International Meeting STEROIDS and NERVOUS SYSTEM (国際学会) 2015年2月14日~18日 TORINO, Italy

9. 竹本拓矢、石原康宏、石田敦彦、山崎 岳 神経毒に対するアストロサイト適応応答とその神経保護作用 日本薬学会 中国四国支部大会 2014年11月8日~9日 広島市

10. **Yamazaki T**, **Ishihara Y**. Protective functions of P450s in rat hippocampus. 12<sup>th</sup> International Symposium on Cytochrome P450, P450 Biodiversity and Biotechnology (招待講演、国際学会) 2014年9月24日~28日 京都

11. Ishihara Y, Yamazaki T. A physiological role of Mn-SOD induced by inflammatory stimuli in microglial cells. 17<sup>th</sup> Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (国際学会) 2014年3月23日～26日 京都市
12. 富士谷法子、石原康宏、石田敦彦、山崎 岳 性ステロイドホルモンによる神経保護作用 - 虚血再灌流モデル系 - 第21回ステロイドホルモン学会学術集会 2013年11月16日 大阪市
13. 石原康宏、山崎 岳 トリブチルスズによる酸化的神経障害とステロイドホルモンの神経保護作用 メタルバイオサイエンス研究会(招待講演) 2013年9月26日～27日 静岡市
14. 山崎 岳、石原康宏、富士谷法子 ニューロステロイドによる神経保護作用 第86回日本生化学会大会(招待講演) 2013年9月11日～13日 横浜市
15. Yamazaki T, Ishihara Y, Kawami T, Ishida A. Neuronal injury and oxidative stress induced by tributyltin in rat hippocampal cultured slices 第36回日本神経科学大会 2013年6月20日～23日 京都市

〔図書〕(計1件)

1. Yamazaki T, Ishihara Y. Neurosteroids: regional steroidogenesis. *Fifty Years of Cytochrome P450 Research*. 153-173 Springer Japan (2014).

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ishiyasu/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山崎 岳 (YAMAZAKI TAKESHI)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授  
研究者番号：30192397

### (2) 研究分担者

石田 敦彦 (ISHIDA ATSUHIKO)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授  
研究者番号：90212886

石原 康宏 (ISHIHARA YASUHIRO)

広島大学・大学院総合科学研究科・助教  
研究者番号：80435073

椋田 崇生 (MUKUDA TAKAO)

鳥取大学・医学部・講師  
研究者番号：60346335