

定量的行動試験をもとにした顕微鏡解析による 発達神経毒性の分子標的の同定

Microscopic analysis based on the quantitative behavioral tests in rodents for identification of the molecular target of developmental neurotoxicity

掛山 正心 (KAKEYAMA MASAKI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教



研究の概要

定量性・再現性の極めて高い独自の行動試験を出発点として、新たな顕微鏡解析により行動—組織—分子レベルのイベントをリンクさせ、発達時系列をおって化学物質曝露と「こころ」の問題の因果関係を解析する。行動変化に直結した、毒性の分子標的の同定をめざす。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：有害化学物質、神経科学、解剖学、行動学、環境政策

1. 研究開始当初の背景

母体が影響を受けない低用量曝露によって次世代の脳の発達に影響が顕れることが懸念されている。子どもの「こころ」の健全な発達は万人の願いであり、化学物質曝露との因果関係の解明、ならびに影響の程度の科学的評価が要求されている。しかし「こころ」の問題は評価が難しく、発達神経毒性全般において、動物毒性試験の結果がリスク評価の根拠データとなるケースは極めて少ない。わずかに例があるのは病理組織学的検査の結果であるが、重度の精神症状・行動異常を示す統合失調症やうつ病等のヒト患者において病理組織学的な異常を見出すのが困難な現状を考えると、病理学的検査の精度向上に加えて、行動異常そのものを捉える行動試験をもとにした影響評価が望ましいと言えよう。しかし、OECDテストガイドライン等の標準化されたものは実験者による目視観察が主体であり、試験結果に定量性が伴わないものが多い。大学等の研究機関で行われる場合でも、行動試験に特化した研究室・研究者によるケースが多く、遺伝子や蛋白発現といった生化学的解析による科学的裏付けが伴わないことが多く、また別の研究機関では行動試験そのものが再現できないこともしばしばである。

2. 研究の目的

本研究では、定量性・再現性の極めて高い

独自の行動試験を出発点として、新たな顕微鏡解析により行動—組織—分子レベルのイベントをリンクさせ、発達時系列をおって化学物質曝露と「こころ」の問題の因果関係解析する。「ネズミの行動変化がヒトの場合、どのような意味を持つのか」を科学的に説明し、個体レベルの影響に直結した分子マーカーを同定することを目的とする。

3. 研究の方法

独自の行動試験バッテリーを用いて行動試験を行った動物の脳サンプルが本研究の出発点である。すでに行動レベルで影響が確認されているダイオキシン、メチル水銀等を対象として発達期の低用量曝露を受けた動物の行動試験直後の脳サンプルを用い、行動試験に伴い活性化する神経細胞（集団）と曝露影響を受ける神経細胞（集団）を同定、Immuno-LMD法を用いた遺伝子発現解析により行動試験に関わる神経細胞と曝露影響を受ける神経細胞に特異的な分子イベントを特定する。個体レベルの曝露影響に直結する神経細胞（集団）に焦点を絞ることで、微細形態学解析と大脳発生時期の解析も含めた顕微鏡解析を行う。行動試験の時期から曝露時期（大脳発生時期）まで発達時系列を遡って解析することで、行動試験での分子イベントと曝露時点の分子イベントにリンクさせる。

4. これまでの成果

化学物質曝露により、大脳皮質と皮質下領域が特に影響を受けやすいことが明らかとなってきた。そこで我々は、新たな毒性指標として「皮質-皮質下機能アンバランス」が重要であることを提起し、皮質-皮質下領域に焦点を絞り、毒性の分子標的の探索・同定作業を進めている。

皮質機能とは、前頭葉を中心として認知学習・判断・自己制御を行う統合的調節機能であり、皮質下機能とは、扁桃体や線条体、海馬など大脳基底核により、快・不快の感情を調節し欲望・欲求を生み出す脳機能である。皮質-皮質下機能アンバランスは、自閉症や躁うつ病患者等でみられると同時に、通常のライフステージにおいても、特に進学期、思春期・就職、結婚、更年期・高齢期などの状況変化の際に特に、感情の制御の問題とともに **quality of life (QOL)** を左右する表現型として顕れやすい。例えば更年期は性腺機能低下に伴って皮質下機能が低下することで心の問題が生じやすくなり、思春期は皮質機能が未熟な上に皮質下機能の成熟が加速度的に進むことで問題行動が顕れやすくなる。疾患とは定義されない「軽微な問題」行動であっても、近年増加している自殺、ひきこもり、いじめ、少年犯罪、ニートなど、社会的損失の大きな問題につながる重要課題である。

化学物質曝露により行動異常が認められたマウスの脳を用い、顕微鏡レベルでの遺伝子発現解析を行った結果、約 20 個の遺伝子が曝露により変動することを新たに見出した。また発達期の脳解析でも同様に複数の遺伝子ならびに蛋白を見出した。それらのヒトにおける遺伝子多型を調べたところ、行動指標と有意に相関する遺伝子を複数個同定した。

5. 今後の計画

(1) 複数の化学物質に対して大脳皮質と皮質下領域の感受性が高いこと、すなわち、これら脳部位は毒性メカニズムが異なっているにもかかわらず影響が顕れやすいことを明らかにし、「皮質-皮質下機能アンバランス」が新たな毒性概念として重要であることを本研究において明示したい。

(2) 胎仔期における脳の影響解析を継続し、大脳発生期における影響表現型を同定する。このための新たな顕微鏡解析技術も確立する。

(3) これまでに、行動レベル（成熟期）の解析、大脳発生過程（胎仔期）の解析から複数の毒性分子標的の候補遺伝子を得ている。標的分子の探索を継続するとともに、候補分子の授乳期から性成熟にかけての発達時系

列解析を進める。

(4) 候補分子のヒトにおける遺伝子多型を調べ、興味深い知見を得たので、ヒト・サンプルにおける解析・検証も継続する。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

1. Sato M, Kitaguchi T, Numano R, Ikematsu K, **Takeyama M**, Murata M, Sato K, Tsuboi T. The small GTPase Cdc42 modulates the number of exocytosis-competent dense-core vesicles in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420:417-421, 2012.
2. Tse D, Takeuchi T, **Takeyama M**, Kajii Y, Okuno H, Tohyama C, Bito H, Morris RG. Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science* 333:891-895, 2011.
3. Endo T, Maekawa F, Vöikar V, Haijima A, Uemura Y, Zhang Y, Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K, Wolfer DP, Yada T, Tohyama C, Lipp HP, **Takeyama M**. Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behavioural Brain Research* 221:172-181, 2011.
4. **掛山正心**, 萩島旭, 遠藤俊裕, 遠山千春. ヒトの健康リスクへの適用を目指した齧歯類を用いる新たな行動毒性試験の開発. *動物心理学研究* 61:33-42, 2011.
5. Koike-Kuroda Y, **Takeyama M**, Fujimaki H, Tsukahara S. Use of live imaging analysis for evaluation of cytotoxic chemicals that induce apoptotic cell death. *Toxicology In Vitro* 24:2012-2020, 2010.
6. Haijima A, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, **Takeyama M**, Tohyama C. *In utero* and lactational exposure to low doses of chlorinated and brominated dioxins induces deficits in the fear memory of male mice. *Neurotoxicology* 31:385-390, 2010.

ホームページ等

<http://env-health.m.u-tokyo.ac.jp/member/kake.html/research>