

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00572

研究課題名(和文) 神経発生発達毒性におけるミクログリアの形態・機能異常の発現とその意義

研究課題名(英文) Neurodevelopmental toxicities of chemicals are related to an increased microglial activation and neuroinflammation in the neocortex

研究代表者

長尾 哲二 (NAGAO, Tetsuji)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：30351563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：化学物質曝露に起因する発生中の脳の異常におけるミクログリアの関与には未だ不明な点が多い。そこで神経発生毒性物質ビスフェノールAあるいはバルプロ酸を感受期に母動物に投与し、発生中大脳皮質の器質的異常を解析して、ニューロン新生の促進・抑制とニューロン移動・分布の異常を認めた。大脳皮質の組織異常の原因としてミクログリアに着目し、amoeboid型ミクログリアと炎症性サイトカイン増加、M1/M2ミクログリアバランスの乱れを認めた。抗炎症剤併用投与により炎症因子の発現が減少した。このことは神経炎症を抑制すると化学物質曝露による神経発生毒性の発現を予防できる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、化学物質曝露を原因とする発達障害に罹患した子どもの増加の可能性が懸念されている。化学物質は日々進化し、多くの新規物質が開発されて、それは新たな化学物質に子どもたちが曝露していることにほかならない。つまり、化学物質曝露による神経発生毒性機序を明らかにし、その予防法を確立することは急務である。神経発生毒性においてミクログリアに着目した病態解明を行うことで、脳内炎症と発生毒性との関連について新たな知見を見出すことができる。特に発生・発達毒性は発症してしまうと治療することは困難なため予防が重要である。そこで本研究では脳内炎症を標的とした新たな予防法の確立を目指した点に意義がある。

研究成果の概要(英文)：Microglia are the immune cells of the central nervous system (CNS), play a critical role in its development and are involved in neural stem cells proliferation, differentiation, and migration in the developing CNS. To evaluate the microglial morphology and the gene expression of pro-inflammatory cytokines in the neocortex, mice were exposed to BPA or VPA at the critical period. Offspring exposed showed an increased number of amoeboid-type microglia, a microglial differentiation disruption, and an abnormal expression of genes encoding pro-inflammatory factors. The abnormalities induced by VPA exposure were ameliorated by co-treatment with anti-inflammatory drug. The findings suggest that the cytoarchitecture of the neocortex can be restored via treatment with anti-inflammatory agents that target microglial abnormalities and neuroinflammation. Anti-inflammatory therapeutics may provide a novel preventive approach for the abnormalities after the exposure to chemicals.

研究分野：神経発生毒性学、化学物質影響科学

キーワード：神経発生発達毒性 化学物質曝露 ミクログリア 炎症因子 ミクログリア活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳の発生・発達の異常は個体が成熟した後に精神疾患や神経変性疾患の原因となる可能性がある。脳の発生・発達過程における微小な構造異常は、神経機能の成熟にしたがってその歪みが蓄積し、結果として高次脳機能の異常を引き起こす。発生・発達期には莫大な数の神経幹細胞がダイナミックに活動して高次脳機能の基盤が形成される。この過程において、僅かなピースのずれや欠損、重複が機能的な大きな歪みに繋がる。形態的には正常に見えてもネットワークレベルでの異常が潜在しており、それが発達障害や高次脳機能障害などの疾患を引き起こす可能性がある。それらの異常を誘発する原因には、遺伝子異常などの内的要因と化学物質曝露などの外的要因がある。Philippe らの総説 (*Lancet Neurol* 13: 1114, 2014) では、神経発生・発達における化学物質曝露による影響は深刻な状態にあり、潜在的に多くの高次脳機能障害の原因となっていることを報告している。胎児期、新生児期の脳は、脳血管関門等の防御機能が不十分であることから、多くの化学物質に曝されていることに加え、ダイナミックに形が変化している脳は化学物質曝露に対して感受性が高く脆弱である。つまり、化学物質の曝露は脳の発生・発達に重篤な影響を及ぼしており、その影響を適切に評価し、曝露を規制することは特に次世代を担う子どもの発育にとっても急務である。

我々は様々な化学物質が大脳皮質の発生において組織構築や神経投射に異常を引き起こし、高次脳機能にも影響していることを報告した (*Sci Rep* 7: 4934, 2017, *J Appl Toxicol* 39: 877, 2019)。その中で興味深いことに、ミクログリアの数や活性に異常があることを見出した。ミクログリアは、卵黄嚢由来のグリア細胞であり食作用等の免疫応答を担っている。さらにはシグナル伝達にも関与しており、発生期の脳では神経幹細胞の増殖や細胞死、神経新生、細胞移動などを制御している。近年の研究により、発生期のミクログリアの欠損は大脳皮質の特定の神経細胞の生存に関わることが報告されている (*Nat Neurosci* 16: 543, 2013)。つまり、ミクログリアは脳の発生・発達の様々な局面で重要な役割を果たしており、その機能異常が発達障害の原因の一つであると考えられる。しかし、化学物質曝露に起因する先天異常におけるミクログリアの関与については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

現代社会において化学物質の胎児期・新生児期曝露による神経発生・発達毒性は深刻な状態にあり、発達障害の潜在的な原因となっている可能性がある。脳神経系の免疫を担うミクログリアは正常な大脳皮質の発生において神経幹細胞の調節や維持に関与している。しかし、化学物質の胎児期あるいは新生児期曝露によって発生・発達中の脳に炎症が誘発されると、ミクログリアの異常な活性化が引き起こされる。そこで、神経発生・発達毒性を示す既知の化学物質の臨界期曝露モデルマウスを用いて、脳内炎症とそれにより引き起こされるミクログリアの異常な活性化による神経発生・発達毒性の発症を明らかにし、予防法の確立への寄与を目指した。

3. 研究の方法

(1) 化学物質曝露モデルマウスを用いた神経発生・発達毒性の検出：弱いエストロゲン作用を有するビスフェノール A (BPA) を、あるいは神経管閉鎖障害を引き起こす抗てんかん薬バルプロ酸 (VPA) をマウス母動物に投与してモデル児動物を作成し、脳の器質的異常を解析した。すなわち、BPA 実験では、BPA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を ICR マウスの妊娠 (GD) 6 日～分娩後 21 日まで連続して強制的に経口投与した。エストロゲン陽性対照として合成エストロゲン剤ジエチルstilbestrol (DES) 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を同様に投与した。生後 (PND) 22 日出生児大脳皮質について胎齢 (E) 13 日あるいは E16 生まれの IdU あるいは CldU によりラベルしたニューロンの分布を脳表面から脳室面まで 10 区画に分けて解析した (birth-date analysis)。VPA 実験では GD12 に VPA 400 mg/kg を単回皮下注射し、E14 胎児の大脳皮質におけるニューロン新生を cell cycle exit 法により、あるいは自然分娩で得た PND14 出生児大脳皮質について、E14 あるいは E16 生まれのニューロンの分布を解析した。なお動物の扱いは、近畿大学動物実験倫理規定に基づいて行い、苦痛を極力軽減した。

(2) ミクログリア活性変動：大脳皮質における神経細胞形態異常の確認後に、その原因としてミクログリアに着目した。大脳皮質におけるミクログリアの数や形態の異常を免疫組織染色により評価した。すなわち、ミクログリアマーカー Iba1、M1 活性 (細胞障害型) マーカー CD11b、M2 活性 (細胞保護型) マーカー CD206 の発現を観察した。さらにミクログリアの活性化は、脳内炎症由来のサイトカイン等の液性因子によるシグナル伝達を介して行われることから、これらの因子に対して mRNA 発現を解析した。すなわち、CD11b、CD206 mRNA などに併せ、炎症性サイトカイン *IL-1 β* 、*TNF- α* 、*IL-6* mRNA 発現を解析した。

(3) 抗炎症薬の併用による神経炎症の抑制：化学物質曝露により引き起こされる脳内炎症を抑制することでミクログリアの異常な活性化を防ぎ、神経発生・発達毒性の予防法の確立を目指した。例えば、胎児期のアルコール曝露により引き起こされる胎児性アルコール症候群は、顔面奇形、低体重に加え ADHD 等の発達障害を症状とする先天性疾患である。その発症の原因の一つに、脳内炎症によるミクログリアの活性化が報告されている。このことは、アルコール特有のものではなく、様々な化学物質の胎児期曝露によって広く起きる可能性は十分にある。そこで、胎児期の VPA 曝露により脳内炎症が起きているか否かを確認した後に脳内炎症を抑制することでミクログリアの異常を抑え、神経発生・発達毒性の発症を予防することを目指した。具体的には、GD12

に VPA 400 mg/kg を単回皮下注射し、GD11～15 に PPAR γ agonist の抗炎症剤 (II 型糖尿病治療薬) pioglitazone 12.5 mg/kg/day を連日経口投与して PND14 出生児大脳皮質においてミクログリアの異常を調べた。

4. 研究成果

(1) 大脳皮質における形態学的変化: BPA の胎児期あるいは新生児期曝露実験では、皮質板の肥厚 (過形成) と神経幹/前駆細胞の減少が観察され、これら細胞の分化するタイミングが早まることで神経新生を促進すると同時に細胞周期が短くなり、結果として増殖能が低下することをこれまで明らかにした (*Toxicology* 323: 51, 2014)。本研究では神経細胞の移動障害など大脳皮質の層構造に着目した解析をまず Nissl 染色により観察した結果、第 VIb 層の低形成がみられた。さらに PND22 出生児について、大脳皮質を脳表面から脳室までを 10 区画に birth-date analysis を行った結果、BPA 群の E13 生まれのニューロンの割合および E16 生まれのニューロンの割合はいずれも対照群と比較して増加し、ニューロン分布に影響がみられた (図 1)。その結果、BPA 群の E13 生まれのニューロン数と E16 生まれのニューロン数が対照群と比較して増加した。VPA 実験では、E14 胎児の大脳皮質において、神経新生の促進がみられ、また PND14 出生児における birth-date analysis でも E14 および E16 生まれのニューロンの割合に VPA 群と対照群との間に差がみられ、全ニューロン数が VPA 群において増加したことから、ニューロンの移動に障害のあることが示された。

(2) ミクログリアの形態異常: BPA 実験では、出生児の大脳皮質において BPA 群および DES 群では amoeboid 型ミクログリア数が増加した。BPA 群および DES 群とも CD11b 陽性ミクログリアが増加した。また、炎症性サイトカイン IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 については、BPA 群においていずれの因子も mRNA 発現は増加した。VPA 実験でも PND14 出生児において、VPA 群で amoeboid 型ミクログリアが増加し、CD11b 免疫陽性ミクログリアも増加した。BPA 群、VPA 群とも CD206 免疫陽性細胞数は対照レベルであった。その結果、M1/M2 のバランスが崩れた。M1 活性マーカー CD11b、CD86、CD16 mRNA および炎症性サイトカイン IL-1 β 、TNF- α mRNA の発現が増加した。

(3) 神経炎症の抑制: VPA の臨界期曝露により PND14 出生児大脳皮質に誘発されたミクログリアの活性亢進が抗炎症薬 pioglitazone 併用投与により抑制されることを認めた。Amoeboid 型ミクログリア数および CD11b 陽性細胞の割合は抗炎症薬により対照レベルにまで減じたことを認めた。さらに、抗炎症薬の投与により M1 活性マーカー CD11b、CD86、CD16 および炎症性サイトカインのいずれの因子も mRNA 発現は対照レベルに減じた (図 2)。

(4) 研究結果の考察

実験結果から次の 5 点が考察された。

発生・発達過程の化学物質曝露により大脳皮質において微細構造の異常がみられ、成熟後の高次脳機能障害の一因であると考えられた。また微細構造の異常が誘発された脳内では炎症性サイトカインの発現プロファイルが変化し、病態脳形成に免疫系異常が関与している可能性が示唆された。

神経細胞の移動と定着の過程に障害が起こると、正常とは異なる場所に神経細胞が集積する。神経細胞の移動や定着のタイミングを決定しているのは大脳皮質内で環境因子として供給されるサイトカインなどである。そのためサイトカインの発現や機能制御の不全が脳の発生・発達と大きく関わると考えられた。

胎児期や新生児期など高感受期の化学物質曝露は神経新生あるいは神経細胞の移動と分布などに異常を引き起こし、それが一因をなしてミクログリアに影響を及ぼしていることが示唆された。すなわち化学物質の高感受期投与が神経細胞の移動障害を引き起こしたことから、免疫系に関わる因子が大脳皮質神経細胞層の構築に影響を及ぼすことが考えられた。

胎児期、新生児期においてミクログリアの異常な増加や活性化が認められ、また、ミクログリアの活性に関連するサイトカインにも影響が確認された。これらの異常は、大脳皮質の発生において細胞増殖に異常を誘発し、組織構築や神経投射に影響を及ぼし、さらには新生児期、成熟期の活動量の亢進、いわゆる多動といった行動異常の原因となる可能性を示唆した。抗炎症薬の併用により、化学物質曝露により引き起こされたミクログリアの活性異常や炎症

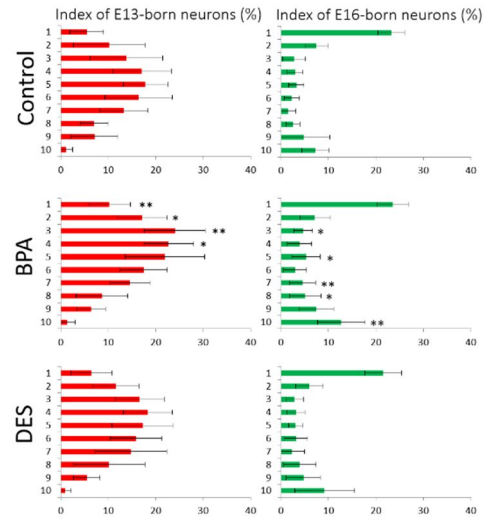


図 1 胎齢13日あるいは胎齢16日生まれニューロンの生後22日大脳皮質における分布

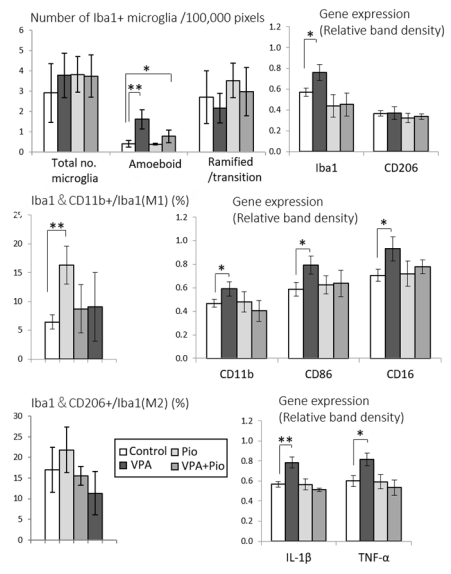


図 2 VPA曝露後の異常mRNA発現とミクログリアの形態に及ぼすpioglitazone併用投与の効果

因子の発現異常が正常レベルに回復した。

(5) 成果の位置づけ

現在多くの新規化学物質が開発されており、それは新たに化学物質に胎児や子どもたちが曝露していることにほかならない。化学物質の曝露は脳の発生・発達に重篤な影響を及ぼしており、その影響を適切に評価し規制することは特に次世代を担う子どもの発育にとっても急務である。そのためにも化学物質曝露による神経発生・発達毒性の発症機構を明らかにし、その予防法を確立することは喫緊の務めである。ミクログリアは発生期の大脳皮質に局在し、正常な発生においても様々な役割を果たす。また細胞障害や炎症などの有事においても活性化することで免疫応答を担っている。化学物質曝露が神経発生異常の原因となる何らかの微細な障害を引き起した際に、ミクログリアがその事態の収拾を担う。あるいはミクログリアに異常が生じた場合には、そのことが神経発生・発達毒性の原因となっている可能性がある。本研究では神経発生・発達毒性の原因としてミクログリアに着目し、化学物質曝露により引き起こされた神経炎症が抗炎症薬により抑制されたことを示したことは、神経発生・発達毒性とミクログリアの活性異常に関わりがあることを強く示唆する。

<引用文献>

- Ryvlin P, Cross JH, Rheims S. Epilepsy surgery in children and adults. *Lancet Neurol*, (2014) 13:1114-1126. doi:10.1016/S1474-4422(14)70156-5
- Komada M, Hara N, Kawachi S, Kawachi K, Kagawa N, Nagao T, Ikeda Y. Mechanisms underlying neuro-inflammation and neurodevelopmental toxicity in the mouse neocortex following prenatal exposure to ethanol. *Sci Rep*, (2017) 10: 4934. doi:10.1038/s41598-017-04289-1
- Nakayama A, Yoshida M, Kagawa N, Nagao T. The neonicotinoids acetamiprid and imidacloprid impair neurogenesis and alter the microglial profile in the hippocampal dentate gyrus of mouse neonates. *J Appl Toxicol*, (2019) 39: 877-887. doi:10.1002/jat.3776
- Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci*, (2013) 16: 543-51. doi:10.1038/nn.3358
- Komada M, Itoh S, Kawachi K, Kagawa N, Ikeda Y, Nagao T. Newborn mice exposed prenatally to bisphenol A show hyperactivity and defective neocortical development. *Toxicology*, (2014) 323: 51-60. doi:10.1016/j.tox.2014.06.009

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakayama Akira, Yoshida Manami, Kagawa Nao, Nagao Tetsuji	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 The neonicotinoids acetamiprid and imidacloprid impair neurogenesis and alter the microglial profile in the hippocampal dentate gyrus of mouse neonates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jat.3776	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kagawa Nao, Nagao Tetsuji	4. 巻 38
2. 論文標題 Neurodevelopmental toxicity in the mouse neocortex following prenatal exposure to acetamiprid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 1521 ~ 1528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jat.3692	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukushima Nobuyuki, Nagao Tetsuji	4. 巻 29
2. 論文標題 Exposure to bisphenol A affects GABAergic neuron differentiation in neurosphere cultures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 712 ~ 717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000001021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukushima Nobuyuki, Nagao Tetsuji	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Exposure to bisphenol A affects GABAergic neuron differentiation in neurosphere cultures.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000001021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakagomi Madoka, Suzuki Emako, Saito Yoshiaki, Nagao Tetsuji	4. 巻 38
2. 論文標題 Endocrine disrupting chemicals, 4-nonylphenol, bisphenol A and butyl benzyl phthalate, impair metabolism of estradiol in male and female rats as assessed by levels of 15 -hydroxyestrogens and catechol estrogens in urine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 688 ~ 695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.3574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komada Munekazu, Hara Nao, Kawachi Satoko, Kawachi Kota, Kagawa Nao, Nagao Tetsuji, Ikeda Yayoi	4. 巻 7
2. 論文標題 Mechanisms underlying neuro-inflammation and neurodevelopmental toxicity in the mouse neocortex following prenatal exposure to ethanol	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-04289-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 萩野大、萩原央記、南武志、長尾哲二、巽純子
2. 発表標題 子宮内メチル水銀曝露した児マウスにおける第三脳室上衣細胞繊毛運動低下について
3. 学会等名 日本先天異常学会第58回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hagino H, Hagiwara T, Tatsumi J, Nagao T, Minami T.
2. 発表標題 Developmental exposure to methyl mercury decreased ciliary movement of ependymal cells in the third ventricle of mice.
3. 学会等名 The 8th International Congress of ASIAN Society of Toxicology (ASIATOX 2018). (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋野大、萩原央記、南武志、長尾哲二、巽純子
2. 発表標題 子宮内メチル水銀曝露した児マウスにおける第三脳室上衣細胞繊毛運動低下について
3. 学会等名 日本先天異常学会第58回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hagino H, Hagiwara T, Tatsumi J, Nagao T, Minami T.
2. 発表標題 Developmental exposure to methyl mercury decreased ciliary movement of ependymal cells in the third ventricle of mice.
3. 学会等名 The 8th International Congress of ASIAN Society of Toxicology (ASIATOX 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 駒田致和、高橋美文、長尾哲二、池田やよい
2. 発表標題 胎児期低用量ビスフェノールA曝露は炎症を伴うミクログリアの異常を誘発する
3. 学会等名 日本先天異常学会第57回学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	福嶋 伸之 (FUKUSHIMA Nobuyuki) (10254161)	近畿大学・理工学部・准教授 (34419)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	駒田 致和 (KOMADA Munekazu) (90523994)	近畿大学・理工学部・講師 (34419)	
研究 協力者	加川 尚 (KAGAWA Nao) (80351568)	近畿大学・理工学部・准教授 (34419)	