

研究課題名

化学物質のシグナル毒性を検出するための in vivo イメージング技術の開発

～Arc-Cre/ ERT²;Ai14 マウスを用いた脳の攪乱領域の可視化法

研究代表者

池中 良徳

北海道大学大学院獣医学研究院附属動物病院トランスレーショナルリサーチ推進室 教授

拠点对応教員

野見山 桂

研究目的

一部の化学物質は、脳内の受容体に作用する事で細胞の情報伝達を攪乱する“シグナル毒性”を示し、予期せぬ影響を引き起こす。特に発達期は、神経幹細胞から神経およびグリア細胞への分化起点が多数存在し、また神経細胞間のネットワーク形成およびその再編がダイナミックに行われるため、脳機能形成において重要な時期である。本研究では、これまでの毒性試験では検出できなかった、シグナル毒性を起因とする脳機能ネットワーク攪乱を高感度に検出するため、新たなイメージング技術の確立を目指す。

本研究では特に、化学物質により攪乱される脳領域の可視化・同定を目指し、cFos-Cre または Arc-Cre/ ERT²;Ai14 トランスジェニックマウスを用いた新たなイメージング技術を確立する。本トランスジェニックマウスは、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) を投与した時点の活性化細胞を標識するよう設計されている。神経活動の増加に伴って発現した CreER が 4-OHT の投与により活性化されて核内に移行し、Cre/loxP システムによる遺伝子組換えが起こって、赤色蛍光タンパク質 tdTomato が持続的に発現する。すなわち、4-OHT を投与した時点で神経活動が増加している

細胞を tdTomato により標識し、組織学的解析等によって、これを発見することができる。本研究においては、このマウスに曝露試験を実施し、組織学的検査を行うことにより、モデル化合物の曝露によって活性化する脳領域や神経細胞を同定する。さらに、tdTomato を発現する代わりにアポトーシスを誘導するよう設計されたマウスを使用して行動試験などを実施することにより、同定された脳領域の機能を明らかにする。また、同定された領域を中心に、メタボローム解析やトランスクリプトーム解析をはじめとしたオミクス解析を実施する事により、活性化の原因を追究する。

本研究では、モデル化合物として、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストであるネオニコチノイドに着目し、主に急性投与時における神経活動の攪乱を検出する計画である。

研究方法

C57BL/6 マウスについて、対照群、およびネオニコチノイドの一つである Acetamiprid 投与群の二つに分けた。投与方法は経口投与とし、Acetamiprid の投与濃度は、マウスにおける NOAEL である 20mg/kg とした。投与から 30 分後に高架式 0 字迷路を実施した後、脳を採材して、LC/MS/MS によりモノアミン濃度を分析した。

また、Arc-Cre/ER^{T2};Ai14 トランスジェニックマウスについて、行動試験と同様の投与方法および濃度を用いて化学物質を投与した後、投与 1 時間後に 4-OHT を投与した。マウス脳内における蛍光タンパク質の発現を約 1 ヶ月間待った後、脳を採材して凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡によって観察した。

研究内容

成果 1：Acetamiprid が行動および脳の各領域のモノアミン濃度に与える影響

ネオニコチノイドの一つである Acetamiprid を NOAEL で C57BL/6 マウスに投与した結果、Dopamine、3-MT および Serotonine で対照群と比べて有意に脳中濃度が増加する事が明らかになった (図 1)。

更に、高架式0字迷路におけるオープンアームでの滞在時間と脳中モノアミン濃度の相関を調べた結果、対照群の海馬において、ヒスタミン濃度が高いほど滞在時間が短い、すなわち不安様行動とヒスタミン濃度との間に強い正の相関が認められた。また、Acetamidridを投与する事で、線条体において海馬と同様の相関が観察された（図2）。

腹側海馬は不安に関与することが知られており、ラットにおいて、ヒスタミンのマイクロインジェクションによって不安様行動が増加するとの報告もある（Rostami et al., 2006）。また、ネオニコチノイドの投与によって、ラットの線条体ドーパミン濃度が増加することも知られており（de Oliveira et al., 2010）、今回の結果はこれらを反映している可能性がある。

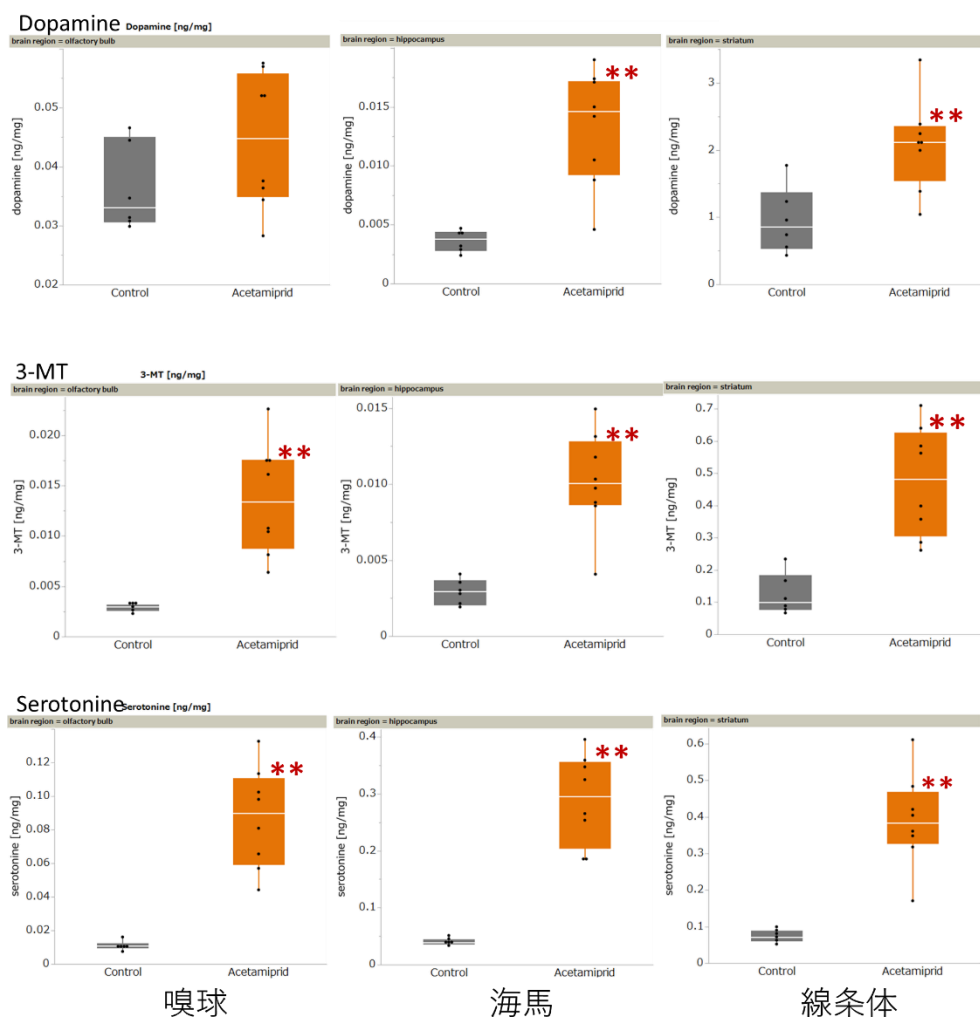


図1：Acetamidrid投与による脳中モノアミン類の濃度変化

Histamine / time in open arms (%)

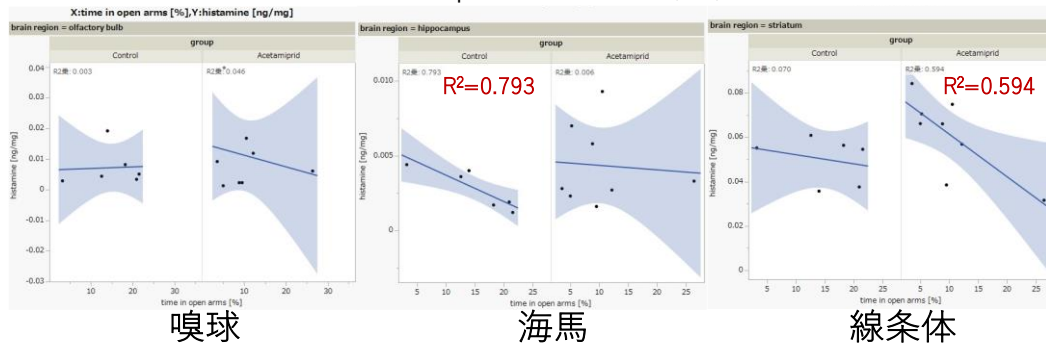


図 2：オープンアームでの滞在時間とヒスタミン濃度の関係

成果 2：Arc-Cre/ERT²;Ai14 トランスジェニックマウスを用いた脳の活性部位の特定～特に海馬に着目した解析～

本研究では、不安様行動と脳中モノアミン濃度の中に相関が観察された海馬に特に着目し、Acetamidrid 投与による脳の活動性神経細胞の変化を明らかにすることを試みた。図 3 は海馬領域における対照群と Acetamidrid 投与群の蛍光顕微鏡による観察像を示している。Acetamidrid を投与する事により、背側海馬の CA1 領域において活性化細胞が減少し、歯状回において増加していることが明らかになった。

不安に関与することが広く知られているのは腹側海馬であるが、背側海馬は主に空間記憶に関与することが知られている。しかし、背側海馬 CA1 領域にアセチルコリンエステラーゼ阻害薬であるフィゾスチグミンを投与すると、高架式十字迷路におけるオープンアームでの滞在時間や進入回数が増加する、すなわち不安様行動が減少することが知られており (Degroot and Treit, 2002)、背側海馬も不安に関与すると考えられる。

歯状回については、ラットにおける背側歯状回の疑似的な損傷は不安様行動を減少させるが、腹側では有意な変化は認められないとする報告もある (Weeden et al., 2015)。歯状回は様々な脳領域からの入力を受け、CA1 領域などの他の海馬領域に伝達する役割を持つため、本研究において認められた歯状回の活性化は、他の脳領域からの入力の増加を示している可能性がある。

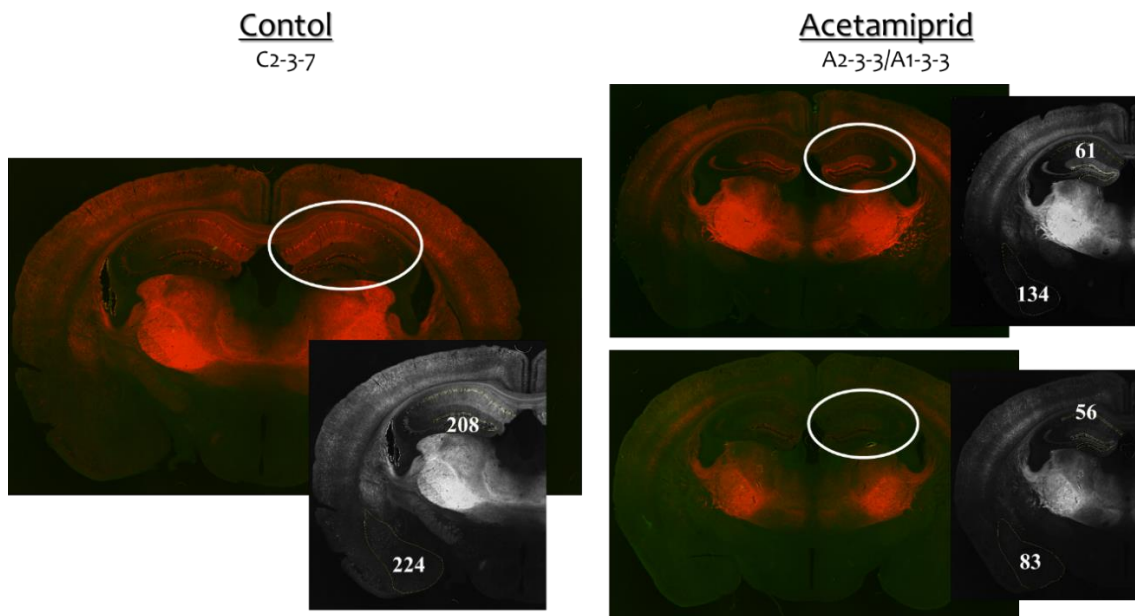


図 3 : Arc-Cre/ ERT²;Ai14 トランスジェニックマウスを用いた脳の活性部位の特定～海馬領域における、対照群および Acetamidrid 投与群の比較～

成果発表

1. 平井杏梨, 山崎凌, 小林篤史, 木村享史, 野見山桂, 新聞秀一, 中山翔太, 石塚真由美, 池中良徳. 質量分析を用いたモノアミン神経伝達物質の高感度検出. 第49回日本毒性学会学術年会. 札幌コンベンションセンター, 北海道. 2022年6月30日～7月2日 (ポスター).
2. Hirai, A., Sugio, S., Nomiya, K., Shuuichi Shimma, Hirano, T., Nakayama, M.M. S., Ishizuka, M., Wake, H., Ikenaka, Y. Sensitive Detection of Activity Changes in the brain by the Neonicotinoids. 6th International Chemical Hazard Symposium & 6th Symposium of Japan Society for Environmental Chemistry, Hokkaido-Tohoku Branch. Hokkaido University (hybrid). 12-13th January 2023 (Oral).

今後の問題点

どちらの実験においても、まだ個体数が十分に確保できていない状態であり、より再現性の高いデータを取っていくためには、個体数を増やす必要がある。

また、現在はそれぞれの実験系を独立して実施しており、成果 1 で示した実験では高架式 0 字迷路試験を実施してから採材を行ってモノアミン濃度を測定しているが、成果 2 で示した実験では高架式 0 字迷路試験は実施しておらず、投与からの時間も異なる。今後はより条件を揃え、2つの実験の結果を比較できるような系で実験を実施していくことが必要であると考える。

ニコチン性アセチルコリン受容体には複数のサブタイプが存在するため、行動に影響を与える機序を明らかにするためには、サブタイプ選択的アゴニストやアンタゴニストを投与することも重要であるといえる。