

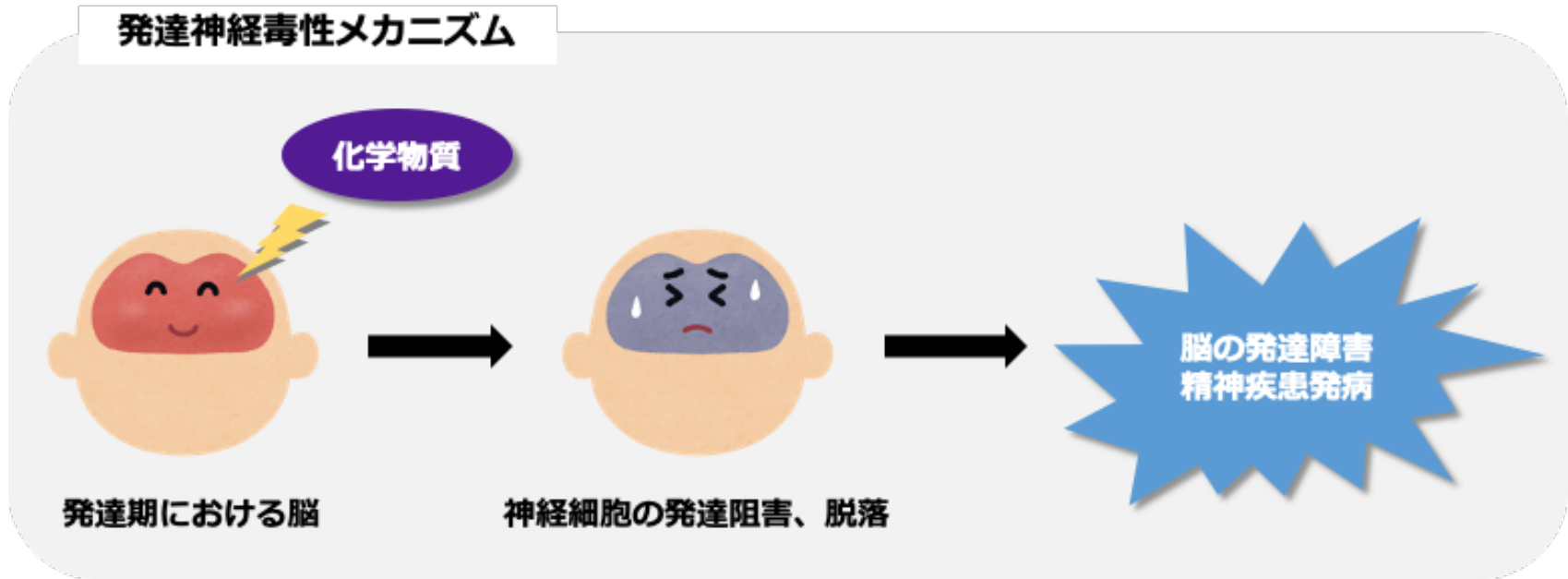
2020年 日化協LRI研究報告会

発達期神経評価指標を用いた化学物質毒性評価法の確立

広島大学大学院医系科学研究科
古武 弥一郎

2020. 8. 21 (Wed.)

研究背景



脳の発達期における化学物質の曝露は、神経回路の形成に重大な影響を与え、脳疾患の原因となり得ることが予想されることから、農薬や医薬品等が脳発達に及ぼす影響の評価は重要である

現在行われている発達神経毒性に関する試験は主として、哺乳動物における行動観察、組織影響を調べるものである（OECDテストガイドラインNo.426など）

➡しかしながら、高コスト、スループット性の低さ等、多くの課題が挙げられる

✓ **発達神経毒性を評価する簡便かつハイスループットなツールが求められている**

研究背景

- 近年、**神経突起進展**、**神経の刈り込み（神経回路の再編成）**などの神経発達メカニズムに関与する分子が次々と明らかにされている
(Lee *et al.*, 2005; Berry and Nedivi, 2017; Watanabe *et al.*, 2016)
- それらの異常が**統合失調症**や**自閉症**等の精神神経疾患の発症に関与するという報告もある(Penzes *et al.*, 2011)
- 申請者らはこれまでに、脳の興奮伝達を司るグルタミン酸受容体GluA2（AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットの1つ）の発現が、**神経細胞の高感度なマーカー**となり得ることを報告してきた
(Nakatsu *et al.*, 2009; Umeda *et al.*, 2016; Kotake, 2018)

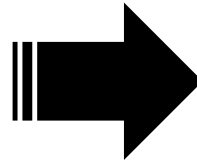


- ✓ **神経突起進展および刈り込みに関与する分子が発達神経毒性の指標になり得る**

研究背景

■ 従来の評価系

- In vivo評価系
- 大量の実験動物の犠牲
- 高コスト
- スループット性低い



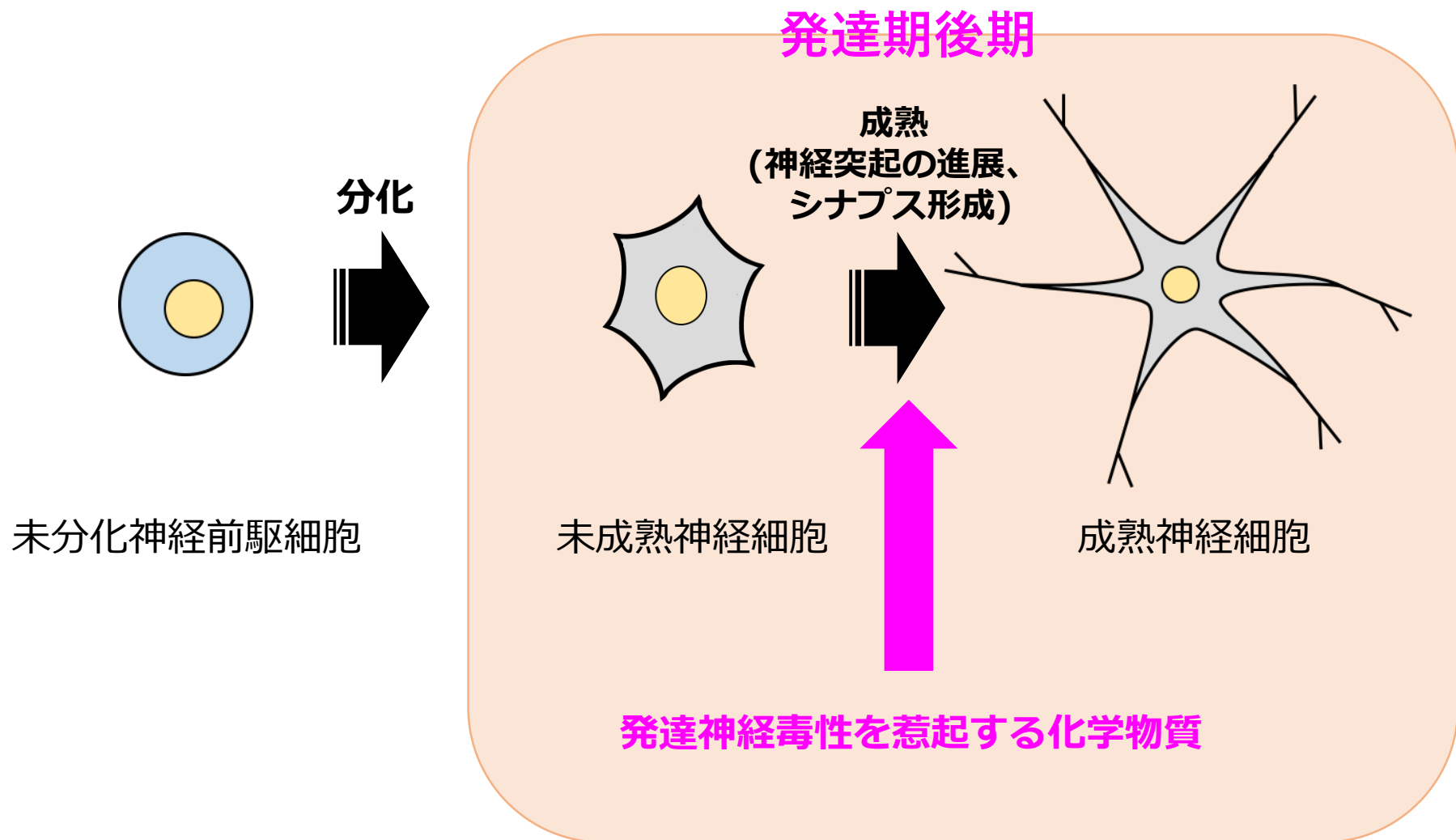
■ 求められる評価系

- In vitro評価系
- 評価の簡便さ
- 低コスト
- ハイスループットな評価系
- 動物実験の3Rに配慮した
よりヒトに近い評価系

研究目的

発達神経毒性におけるマーカー分子の有用性の検討
神経発達マーカー分子を指標としたin vitro評価系の構築

本研究でフォーカスする時期



- ✓ 神経細胞の成熟過程において影響を受けるマーカー分子を探索する

研究目標

- 1. 大脳皮質初代培養神経細胞を用いた長期培養系の確立、および11種類の発達期神経毒性指標候補の経時変化の検討**
 - ▶ Taqman™ gene expression assays、RT-PCRを用いた遺伝子解析、ウエスタンブロットティング法によるタンパク質発現解析
- 2. 発達神経毒性物質を用いた、上記マーカー分子の有用性の検討、見出したマーカー分子を用いた化学物質の発達神経毒性評価**
- 3. 2で明らかにした毒性指標のヒトでの有用性の検討（iPS細胞を用いた検討）、簡便かつハイスループットな発達神経毒性のスクリーニング系の構築
（分担研究者：国立衛研・諫田泰成先生）**

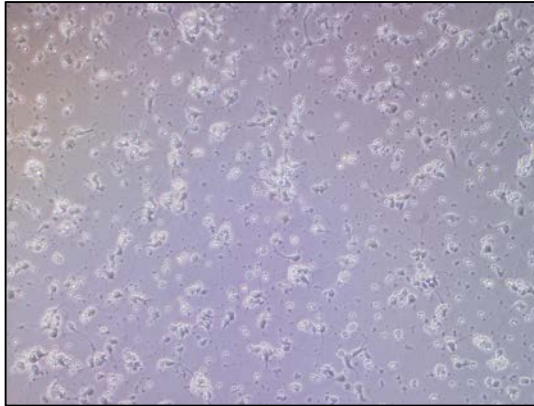
結果1

大脳皮質初代培養神経細胞を用いた長期培養系の確立

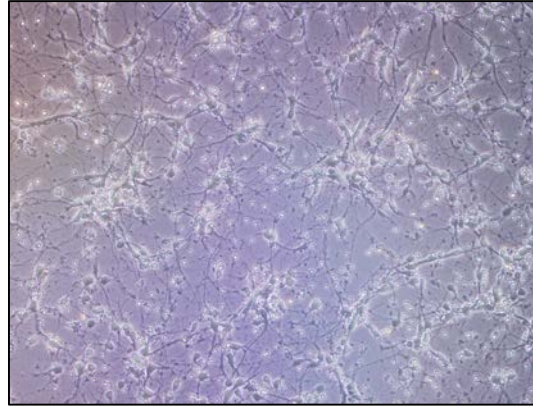
妊娠ラット18日齢
胎仔大脳皮質神経細胞単離



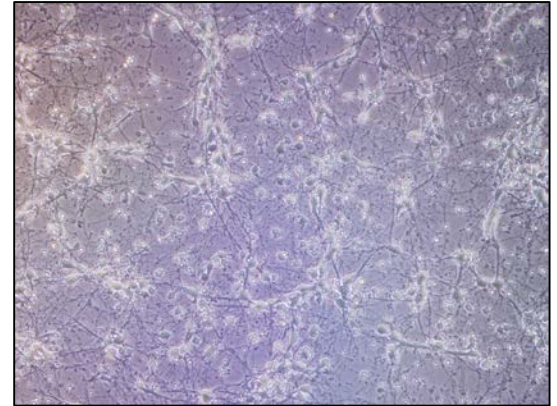
DIV1



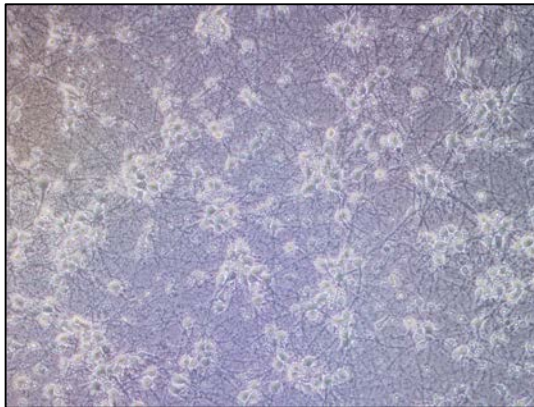
DIV4



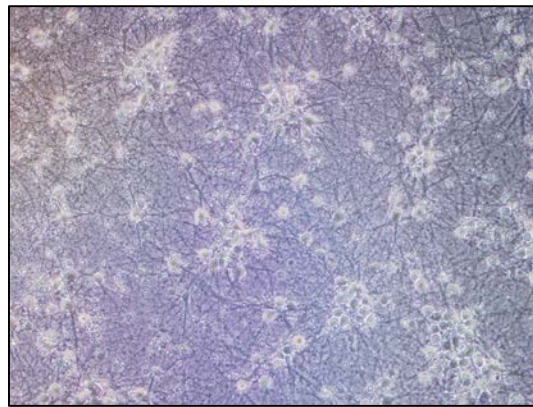
DIV7



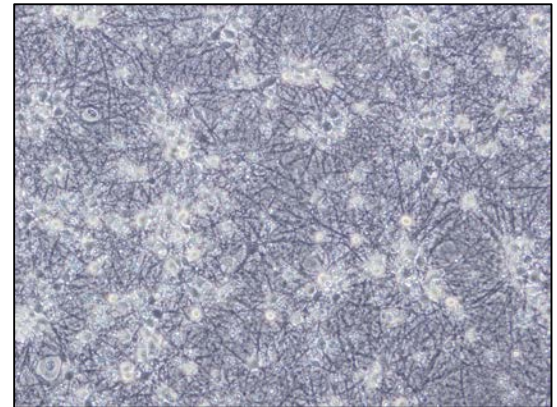
DIV10



DIV14



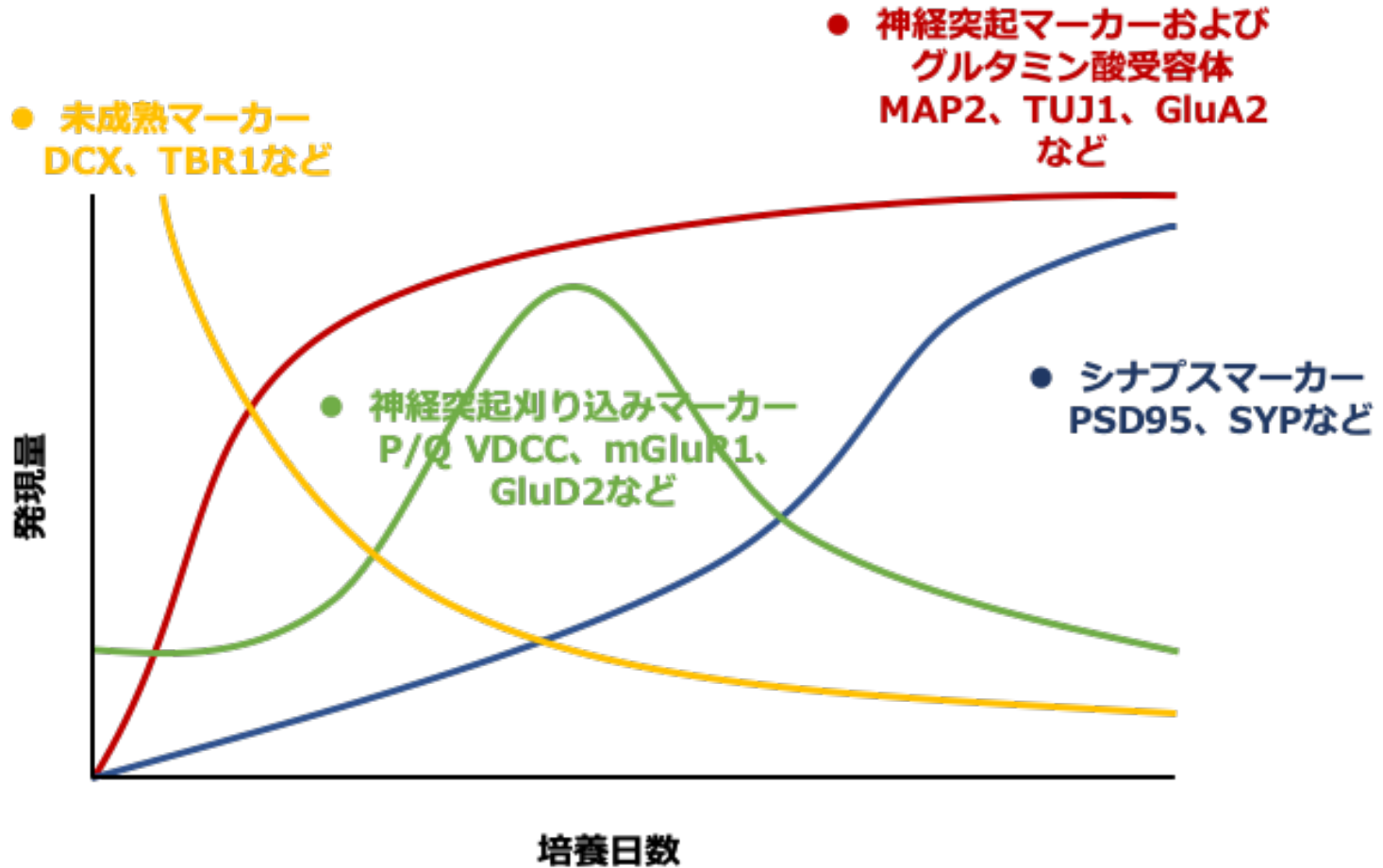
DIV21



✓ 大脳皮質初代培養神経細胞を21日間培養し、神経発達期から神経成熟期に至るまでの長期培養系を確立した

結果2 Taqman™ gene expression assaysを用いた遺伝子変動解析

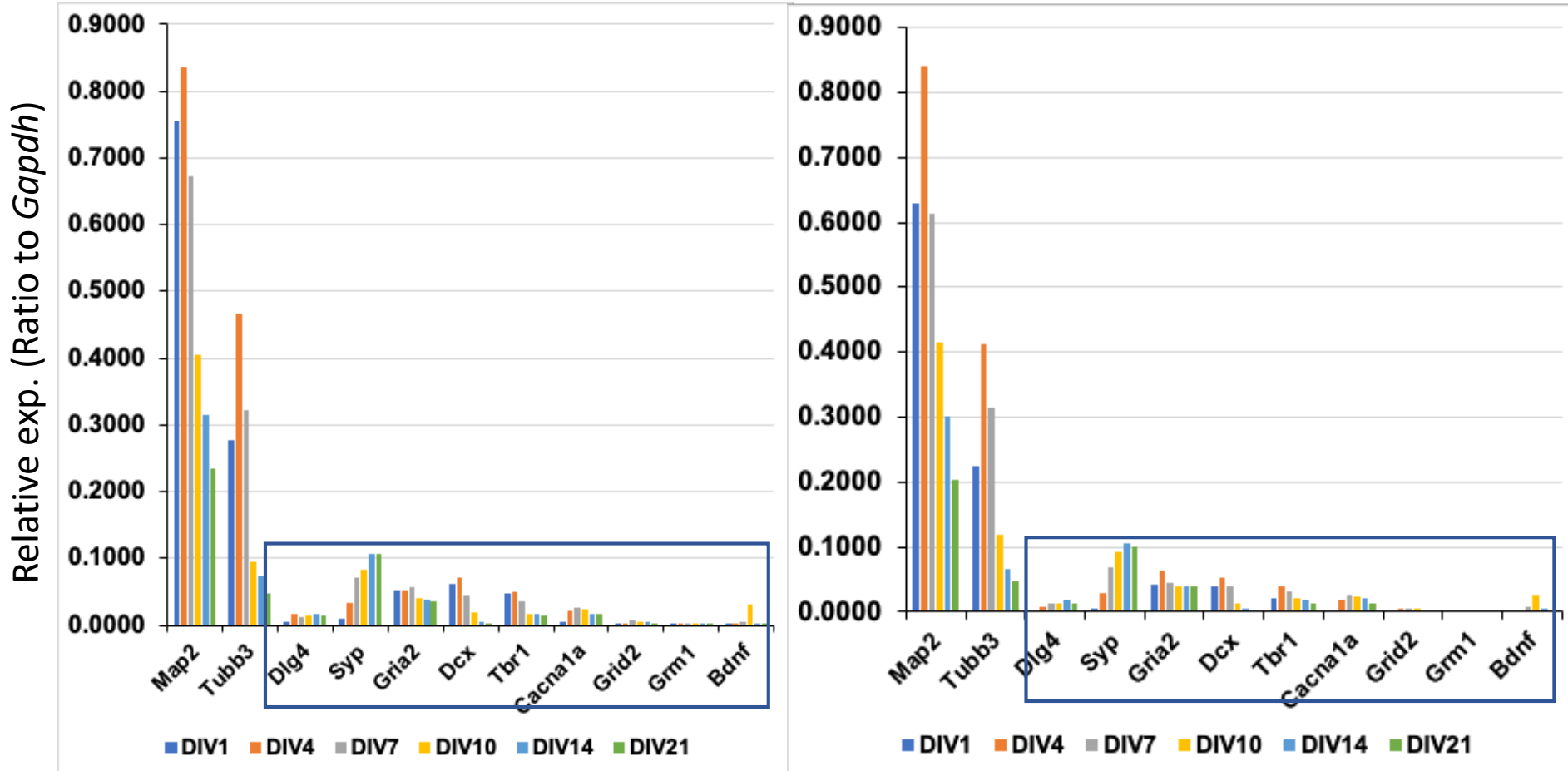
● 予想される経時変化



- ✓ 上記の10種の分子+神経栄養因子BDNFの経時的変化をTaqman™ arraysを用いて観察し、特徴的な変動をする分子を見出す

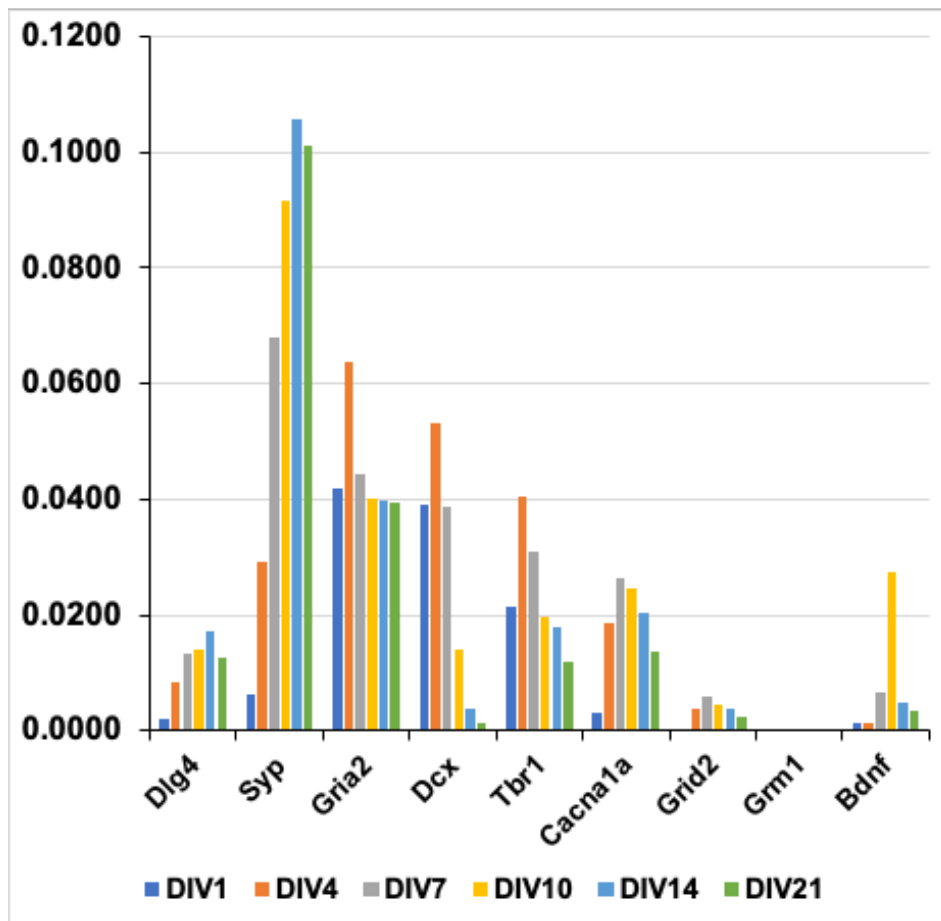
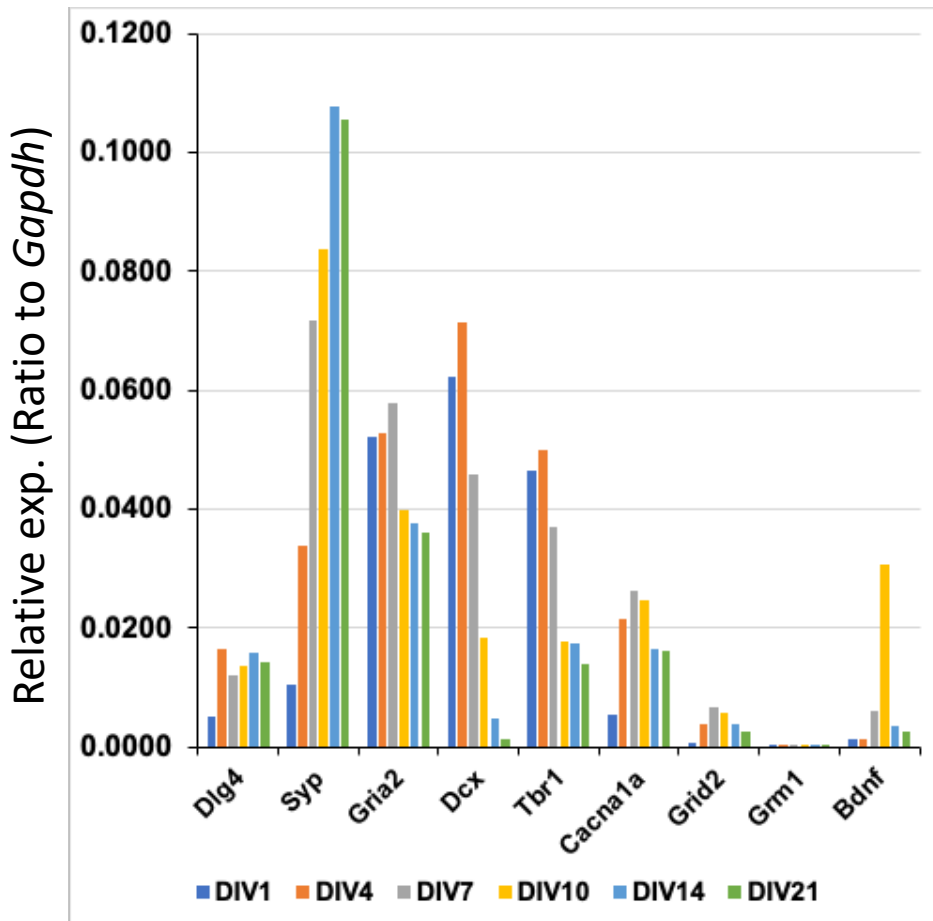
結果2 Taqman™ gene expression assaysを用いた遺伝子変動解析

- 培養1~21日目の11種類のマーカー遺伝子の変動(n=2のデータ)



結果2 Taqman™ gene expression assaysを用いた遺伝子変動解析

- 培養1~21日目の9種類のマーカー遺伝子の変動(MAP2、Tubb3を除く)



研究目標

- 1. 大脳皮質初代培養神経細胞を用いた長期培養系の確立、および11種類の発達期神経毒性指標候補の経時変化の検討**
 - Taqman™ gene expression assays、RT-PCRを用いた遺伝子解析、ウエスタンブロッティング法によるタンパク質発現解析
- 2. 発達神経毒性物質を用いた、上記マーカー分子の有用性の検討、見出したマーカー分子を用いた化学物質の発達神経毒性評価**
- 3. 2で明らかにした毒性指標のヒトでの有用性の検討（iPS細胞を用いた検討）、簡便かつハイスループットな発達神経毒性のスクリーニング系の構築
（分担研究者：国立衛研・諫田泰成先生）**