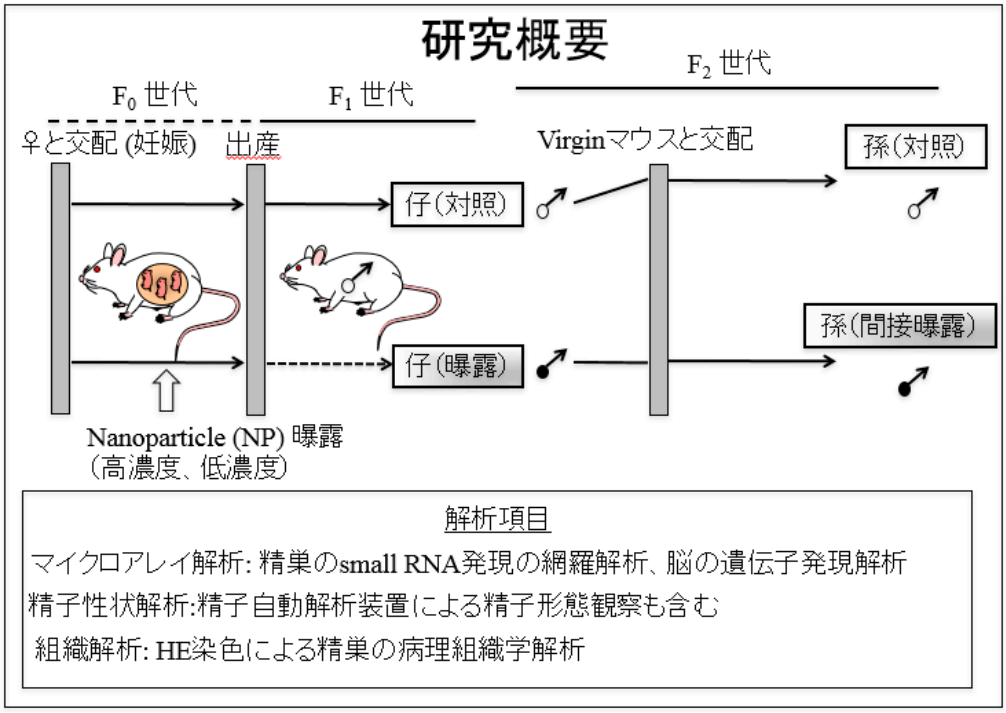
| 110　多世代・経世代影響の非侵襲的バイオマーカーの探索 | 横田　理 |
|---|---|

**【目的】**近年、環境ストレスにより生じる多世代・経世代影響に関する研究報告がなされているが、「本当にそのような現象が起こりえるのか？また、そのメカニズムの実体は何なのか？」という疑問に対する答えは明確にされていない。私たちはこれまでに超微小粒子の妊娠期曝露により生じる仔マウス（F1 世代）の脳神経と雄性生殖に及ぼす影響を解明してきた。特に、雄性生殖への影響は、様々な種類の超微小粒子曝露で共通の所見を認めている。生殖細胞は次世代に遺伝情報をつなぐ唯一の細胞であることから、この点に着目し、本研究課題では、超微小粒子胎仔期曝露が仔（F1 世代）の雄性生殖系に及ぼす影響を明らかにすること、さらに、直接曝露を受けていない孫（F2 世代）の脳神経機能に及ぼす影響を明らかにすることを目指し、多世代・経世代影響に関する重要な分子マーカーを探索するべく研究に着手した。

**【方法】**銀ナノ粒子を高濃度（50 μg : High 群）、低濃度（5 μg : Low 群）、対照（溶媒投与群）に分け、気管内投与を妊娠マウスに行った。雄性産仔 (F1 世代) の精子性状に及ぼす影響を sperm class analyzer により解析した。また、F2 世代大脳皮質と海馬の遺伝子発現解析は、マイクロアレイ解析により網羅的に評価を行った。

**【結果】**まず、F1 世代雄マウスの精子性状解析を行ったところ、曝露により精子の細胞死の割合並びに形態異常が多く認められた。精巣組織所見では顕著な変化は認められていないものの、詳細な定量解析を現在進めているところである。一方で、Gene chip を用いて、F2 世代雄マウスの大脳皮質と海馬での遺伝子発現変化を解析したところ、海馬では行動異常に関連する遺伝子群の発現変化を網羅的に捉えた。しかし、大脳皮質では曝露による顕著な変化を認めることができなかった。すなわち、脳領域ごとで異なる結果が得られ、雄性生殖細胞系列から次世代の脳領域への transgenerational effect の詳細に関して、今後明らかにする必要がある。現在、生殖細胞のエピゲノム解析を進めており、transgenerational epigenetic inheritance に関連し得る分子マーカーの同定を試みている。

超微小粒子（ナノ粒子）曝露により生じる多世代・経世代影響の概念図



# 110. 多世代・経世代影響の非侵襲的バイオマーカーの探索

横田　理

*奥羽大学 薬学部 衛生化学分野

Key words：transgenerational epigenetic inheritance，nanotoxicology，male germ cell，brain

## 緒　言

過去 15 年間（平成 11 年と 26 年）を比較すると、我が国の精神･神経疾患の患者数の増加は著しく、特に、認知症と診断される患者数は約 4.5 倍（68 万人）、うつ病を含む気分障害は約 2.5 倍（112 万人）それぞれ増加しており大きな社会問題となっている（患者調査）。その原因の一つとして、大気環境汚染、特に、浮遊粒子状物質 $PM_{2.5}$（2.5 ㎛以下の微小粒子）の健康影響が危惧されている。$PM_{2.5}$曝露と脳神経疾患発症との関連に関する報告もなされており［1］、早急な対策が必要と考える。

一方で、私たちは、$PM_{2.5}$よりもさらに小さいナノサイズ（100 nm 以下）の超微小粒子の胎仔期曝露の次世代影響について解析を進めてきた。具体的には、マウス胎仔期ディーゼル排気微粒子（DEP）曝露を実施し、雄性産仔の脳神経及び生殖器に及ぼす影響について研究してきた。その過程で、包括的に行動解析を行い、自発運動量の低下並びに衝動的行動の増加［2］、不安様行動の惹起［3］、学習記憶の低下［4］などを明らかにした。また、これらの行動異常の背景となる 8 つの脳領域を分画し、モノアミン神経系の伝達異常と神経可塑性に関わる海馬グルタミン酸受容体の発現低下を明らかにした［2，4］。さらに、酸化チタンナノ粒子曝露によって精巣組織での微粒子の蓄積や組織形態学的な異常、精子奇形率の亢進も観察した［5］。

近年、環境ストレスなどにより胎仔期環境において生殖細胞系列の受けたダメージが引き金となって、多世代影響が起こり得るという報告がなされている［6］ものの、一定のコンセンサスは得られておらず、また、その詳細なメカニズムも未解明であることから、私たちは超微小粒子胎仔期曝露の実験系で得られた成果をもとに、多世代影響の実体を解明するべく本研究を着手するに至った。本研究では、肺胞に沈着し、血流に乗って全身に運ばれやすいと考えられている、15～20 nm サイズの超微小粒子の胎仔期（F0 世代）曝露を行い、仔（F1 世代）の雄性生殖系列の解析と孫（F2 世代）の大脳皮質と海馬の遺伝子発現変化に焦点を当てて多世代影響の可能性を検証した。本研究では、F1 世代の精子性状の悪化を明らかにし、マイクロ RNA（miRNA）の発現変化を見いだすことができた。また、F2 世代海馬において行動と深く関連する遺伝子群の発現変化を明らかにした。現在、世代間影響に寄与したと考えられる、miRNA 発現を同定中である。

## 方　法

### 1. 実験動物および超微小粒子曝露方法

粒径分布の狭い（15～20 nm）銀ナノ粒子（AgNP：Cat no.NP-AG-11-30）を使用し、生理食塩水で段階希釈を行い、高濃度（500 μg/mL：High 群）と低濃度（50 μg/mL：Low 群）の 2 段階の濃度を調整した。これらの溶液は、1 ヶ月間室温に静置しても安定した状態で分散していることが明らかになった（図 1）。この高分散 AgNP 懸濁液は、ICR 妊娠マウスに投与する直前に調整した。投与は、吸入曝露の系を想定し、ハロタン吸入麻酔下にて気管内投与を行った。投与量は 0.1 mL とした。AgNP 高濃度、低濃度、対照には生理食塩水を、妊娠期 7 日目と 14 日目に投与した。出生仔（F1 世代）を飼育し、12 週齢の時に、肛門生殖突起間距離（AGD）、体重ならびに雄性生殖器重量を測定し、摘出した臓器は-80℃にて解析まで保存した。また、解剖の 1 週間前に、それぞれの群の F1 雄マウスは、新た

*現在の所属：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

に購入した virgin 雌マウスと交配させ、F2 世代を作出した。F2 世代は、3 週齢と 6 週齢（大脳皮質と海馬摘出）で解剖を行った。摘出した大脳皮質と海馬を−80℃にて解析まで保存した。

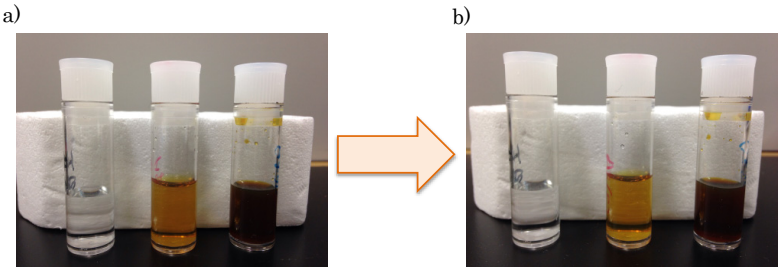



図 1. 銀ナノ粒子の調整と分散安定性

a）左から生理食塩水、50 μg/mL 銀ナノ粒子、500 μg/mL 銀ナノ粒子の調整後の様子を示している。

b）調整後、28 日経過したそれぞれの溶液の様子を示している。

**2. F1 世代雄性生殖系列の解析（胎仔期超微小粒子曝露の次世代影響）**

解剖にて採取した精巣上体尾部より精子培養液中で精子懸濁液を調整し、37℃下で精子性状解析（細胞死、運動率、形態）を行った。また、精巣組織を固定した後、パラフィン包埋を行い、ミクロトームにより超薄切片を作成し、PAS 染色により病理組織学解析を行った。さらに、凍結保存していた精巣サンプルは、small RNA 画分を含んだ状態で核酸抽出を行い、Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 Array により、miRNA の網羅的発現解析を行った。

**3. F2 世代脳神経機能の解析（胎仔期超微小粒子曝露の多世代影響）**

F2 世代は、3 週齢の雄マウス大脳皮質と海馬の核酸抽出を行い、Affymetrix GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array により、mRNA の網羅的発現解析を行った。

## 結　果

**1. 胎仔期銀ナノ粒子曝露が F1 世代雄性生殖および精子性状に及ぼす影響**

F1 世代雄マウスの解剖時の体重は、対照：45.3±5.2 g、Low：44.4±2.2 g、High：44.8±2.6 g となり、曝露による変化は認められなかった。また、凝固腺重量、精巣重量、精巣上体重量においても、曝露による変化は検出されなかった。しかし、AGD においては、対照：16.4±1.1 cm、Low：15.0±0.9 cm*、High：14.5±1.1 cm**となり、濃度依存的に AGD が小さくなることが明らかとなった。Data の表記は（平均値±SD）とした。一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer 法により平均値を比較した。アスタリスクは 5 %有意水準で対照群と差ありとした。

次に、精子性状解析を行ったところ、精子の生存率は、対照：41.9±5.0 %、Low：31.0±6.2 %**、High：35.3±8.1 %と Low 群でのみ生存率の有意な低下が認められた（図 2）。精子運動率は現在解析中である。

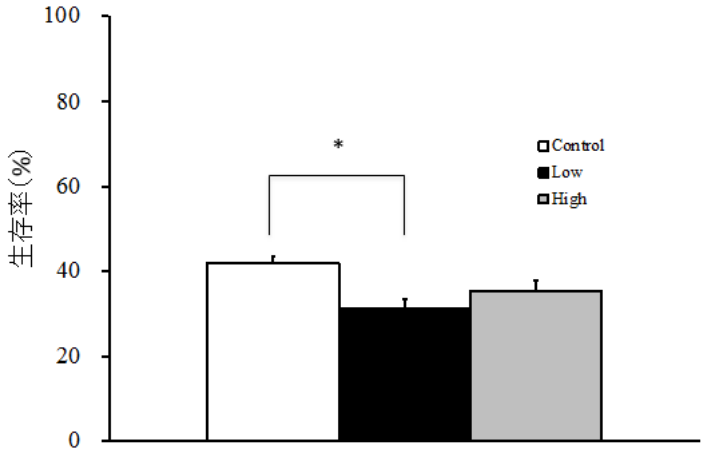



図 2.　F1 世代マウス精子の生存率

図は左から、Control 群、Low 群、High 群の結果を示している。縦軸は生存率を示している。Data の表記は（平均値±SE）とした。一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer 法により平均値を比較した。アスタリスクは 5 %有意水準で対照群と差ありとした。

**2.　F1 世代雄マウス生殖細胞系列の形態解析**

精子性状の解析結果に加え、精子形態についても解析を行った。その結果、Low 群、High 群において対照の精子形態と比較すると正常形態率が有意に低下することが明らかとなった（図 3）。また、曝露により Hook less という対照には見られない特徴的な形態異常を発見できた。次に、精子形成に影響が生じていることから精巣に着目して解析を行った。マウス精巣の病理組織学解析の結果では、曝露により顕著な病理所見は観察されなかったが（図 4）、現在、精細管ごとに詳細な定量評価を行っている。

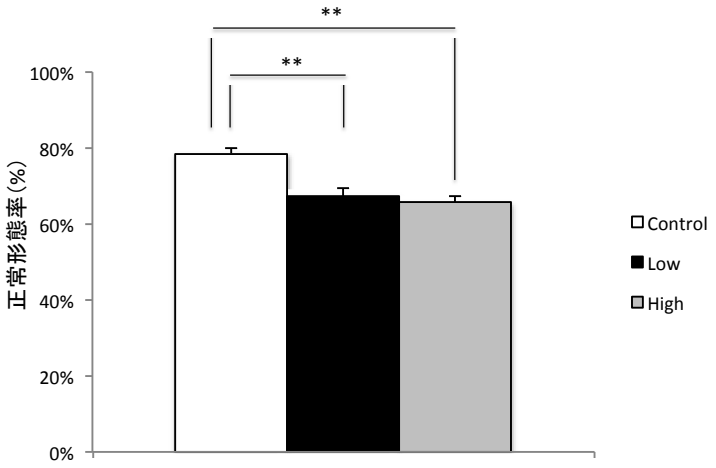



図 3.　F1 世代マウス精子の正常形態率

図は左から、Control 群、Low 群、High 群の結果を示している。縦軸は精子の正常形態率を示している。Data の表記は（平均値±SE）とした。一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer 法により平均値を比較した。アスタリスクは 5%有意水準で対照群と差ありとした。

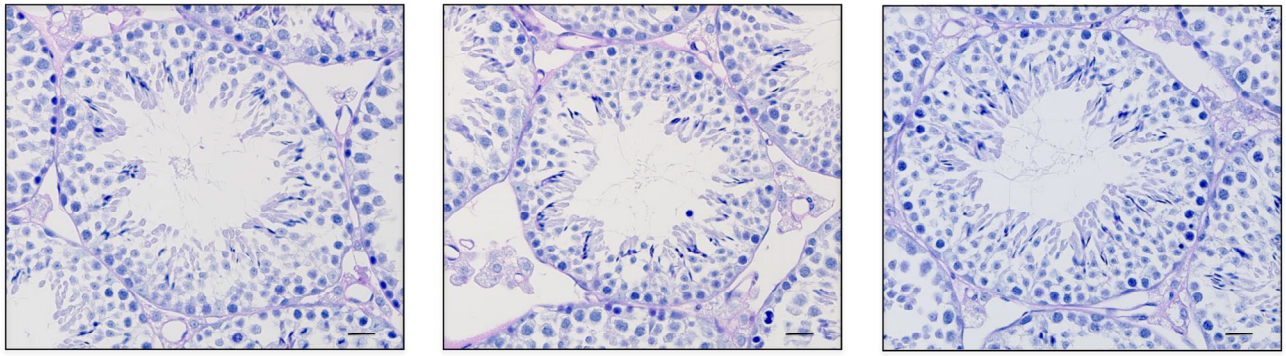



図 4. F1 世代マウス精巣組織

図は左から、Control 群、Low 群、High 群の精巣組織を表している。Scale bar = 20 μm である。

**3. F1 世代雄マウス生殖細胞系列のマイクロ RNA（miRNA）発現解析**

Low vs. Control、High vs. Control において、各群 N = 3 以上の独立したサンプルで解析したところ、Low vs. Control において、student t test で $P < 0.05$ かつ 曝露により 2 倍以上に有意な発現亢進が認められた miRNA は 6 個抽出された。その他のデータは現在解析中である。同時に、対照群と比較して High 群の、有意な発現亢進あるいは低下した miRNA の機能解析を進めているところである。

**4. F2 世代雄マウス大脳皮質と海馬のトランスクリプトーム解析**

Low vs. Control、High vs. Control において、各群 N = 3 以上の独立したサンプルで解析を行った。海馬では、High vs. Control において、Kcnj13 や Tshz2 など 13 個の遺伝子で 1.5 倍以上の発現亢進、11 個の遺伝子で 1.5 倍以下の発現低下が認められた。また、Low vs. Control では、Kcnj13 や Calb2 など 33 個の遺伝子で 1.5 倍以上の発現亢進、13 個の遺伝子で 1.5 倍以下の発現低下が認められた。一方で、大脳皮質では、曝露による遺伝子発現変化は認められたものの、海馬で得られた結果とは対照的に変動した数は少なかった。

海馬において、曝露により変動が認められた遺伝子群より、z-score と p-value を用いて有意に抽出された Gene Ontology（GO）term は、behavioral response to nicotine、adult behavior、locomotory behavior、regulation of acetylcholine secretion、acetylcholine secretion、acetylcholine transport、calcium ion binding、acetate ester transport、plasma membrane part、cell surface、neurotransmitter binding、synaptic transmission など、行動や神経伝達物質と深く関連する term が多く抽出された。

## 考　察

本研究の遂行により、胎仔期 AgNP 曝露は、曝露を直接受けていない F2 世代の海馬に影響を及ぼす可能性を見いだすことができた。しかしながら、大脳皮質には影響が認められず、海馬に影響が認められた理由については、今後、詳細に検証を行う必要があると考える。また、今回のデータは、遺伝子発現変動の観点から考えられる結果であり、行動解析、組織学解析、電気生理学解析などの脳機能解析と組み合わせて、多世代影響のリスク評価を進めていく予定である。F2 世代の影響の本体は、F1 世代の雄性生殖系列の影響の痕跡以外には考えられない。従って、今回の解析で F1 世代の精子性状の悪化やそれに伴う miRNA 発現変化は、F2 世代の遺伝子発現制御を行っているのか、in silico により現在解析中である。予想と反したのは、遺伝子発現変動の数の観点からではあるが、F2 世代の Low 群の方が High 群よりも影響を受けていることになる。超微小粒子のリスク評価で注意するべきことの一つは、重量濃度依存的な影響

ではなく表面積や表面状態に影響が左右されることが多いとされていることから、電子顕微鏡を用いて、超微小粒子の低濃度と高濃度の詳細なキャラクタライズを行い、生理食塩水による希釈により投与の際に AgNP の分散に細かい変化が生じたのか否かを調べる必要があると考える。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、奥羽大学薬学部衛生化学分野の押尾茂と大分県立看護科学大学看護学部生体反応学研究室の市瀬孝道である。本研究の遂行に多大なご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

## 文　献

1) Heusinkveld HJ, Wahle T, Campbell A, Westerink RHS, Tran L, Johnston H, Stone V, Cassee FR, Schins RPF. Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. Neurotoxicology. 2016 Sep;56:94-106. DOI: 10.1016/j.neuro.2016.07.007.

2) Yokota S, Moriya N, Iwata M, Umezawa M, Oshio S, Takeda K. Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. J Toxicol Sci. 2013 Feb;38(1):13-23.DOI: 10.2131/jts.38.13

3) Yokota S, Oshio S, Takeda K. In utero exposure to diesel exhaust particles induces anxiogenic effects on male offspring via chronic activation of serotonergic neuron in dorsal raphe nucleus. J Toxicol Sci. 2016;41(5):583-93. DOI: 10.2131/jts.41.583.

4) Yokota S, Sato A, Umezawa M, Oshio S, Takeda K. In utero exposure of mice to diesel exhaust particles affects spatial learning and memory with reduced N-methyl-D-aspartate receptor expression in the hippocampus of male offspring. Neurotoxicology. 2015 Sep;50:108-15. DOI: 10.1016/j.neuro.2015.08.009.

5) Kubo-Irie M, Uchida H, Mastuzawa S, Yoshida Y, Shinkai Y, Suzuki K, Yokota S, Oshio S, Takeda K: Dose-dependent biodistribution of prenatal exposure to rutile-type titanium dioxide nanoparticles on mouse testis. Journal of Nanoparticle Research. 2014;16:2284-2286. DOI: 10.1007/s11051-014-2284-7

6) Heard E, Martienssen RA. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. Cell. 2014 Mar 27;157(1):95-109. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.045.