

化学物質による神経分化異常の新たなリスク 評価：エピジェネティック変異原の検出系構築

宮崎大学農学部獣医学科 新井 良和

自閉症や学習障害をはじめとする発達障害は、神経細胞の分化・機能異常で生じる神経疾患である。神経疾患の多くは先天性の遺伝病と考えられているが、自閉症では疾患に関連する遺伝子変異が数百個にわたるなど、遺伝子変異のみでは神経疾患の多様な症状を説明できず、このことが疾患の有効な治療法や診断法の確立を難しくしている。近年、神経疾患は遺伝的要因と環境要因の相互作用で発症すると考えられている。環境要因の1つとして、妊娠期の母体環境中に存在する有害な化学物質の影響が懸念され、事実、妊娠期における農薬暴露や喫煙は、将来の子どもの神経疾患発症リスクを増加させる。しかし、胎児期の化学物質曝露が疾患発症にどのように結びつくのかは不明である。

エピジェネティクスは、DNA メチル化やヒストン修飾による遺伝子の発現調節機構である。エピジェネティック制御の破綻は細胞分化異常を引き起こし、がんなど様々な疾患の原因となる。近年、エピジェネティック変異を誘発する化学物質(エピ変異原)の存在が明らかにされはじめ、環境中のエピ変異原が神経分化異常の引き金になる可能性がある。しかし、どの化学物質が神経分化においてエピ変異原として作用するのか、そのリスク評価基盤は構築されていない。環境要因として神経分化に影響するエピ変異原を明らかにできれば、従来の遺伝子変異の知見とともに、神経疾患発症の理解が深まることが期待できる。研究代表者はこれまでに、マウス/ヒト多能性幹細胞(ES/iPS細胞)を用いて、エピ変異原検出系の構築に成功している。本研究ではこの方法をヒト iPS 細胞由来の神経幹細胞に外挿し、神経分化に影響するエピ変異原の検出系の構築を試みた。

農薬や重金属など計 11 種類(DEP, TCP, S-421, ニコチン, コチニン, DEHP, MEHP, Hg, Se, Cd, Pb)の化学物質について、先行研究で同定した妊婦、または臍帯血清における暴露濃度を基準に、その 10 倍量までヒト iPS 細胞由来の神経幹細胞に暴露した。エピ変異原の検出法として、研究代表者が先に確立したヘテロクロマチンを指標とする方法を用いた。なお、ヘテロクロマチン形成にはエピジェネティック修飾が関与し、核の DAPI 染色でヘテロクロマチンを簡便に可視化できる。つまり、DAPI 染色によって化学物質によるエピジェネティック変化を評価できる。染色像を蛍光顕微鏡で撮影したのち、画像解析ソフト ImageJ で核内のヘテロクロマチンのシグナル数を計測し、シグナル数の変動をもとに化学物質の影響を評価した。また、神経幹細胞への化学物質曝露に続いて、神経細胞への分化誘導を行い、化学物質による神経細胞分化への影響を検証した。なお、神経細胞への分化能評価では、神経特異的マーカーである β III-tubulin 抗

体の免疫染色を用いて、神経繊維が占める面積の変動をもとに化学物質による影響を評価した。さらに、ヘテロクロマチン形成を変化させた化学物質については、遺伝子領域の DNA メチル化状況への影響を検証した。以上より、本研究では神経幹細胞でのエピ変異原検出と、エピ変異原によって誘発される危険性のある神経分化異常をワンセットで検証する化学物質のリスク評価系の構築を目指した。

母体・臍帯血清中濃度を参考に、11 種類の化学物質をヒト iPS 細胞由来の神経幹細胞に 4 日間曝露して、DAPI 染色で核内のヘテロクロマチン状態を解析した。血清中濃度の化学物質曝露の結果、S-421 がヘテロクロマチン構造を変化させた。一方で、その他の化学物質は、コントロールの溶媒曝露群と同等のヘテロクロマチンのシグナル数を示した。さらに、血清中濃度の 10 倍量の化学物質曝露では、ヘテロクロマチンへの影響はより顕著に現れ、S-421 を含むニコチン、コチニン、DEHP、Hg がヘテロクロマチン構造を変化させた。次に、化学物質曝露による神経細胞分化への影響を検証した。化学物質をそれぞれ血清中濃度で神経幹細胞に曝露して、化学物質を除いた後に神経細胞へ分化誘導させた。分化誘導 14 日目に抗 β III-tubulin 抗体による免疫染色を行った結果、DEP、TCP、S-421、ニコチン、コチニン、DEHP 曝露が、神経繊維の面積を有意に増加させた。このことは、一部の化学物質が血清中濃度曝露で神経分化に影響をおよぼすことを示す。さらに、血清中濃度の S-421 曝露による遺伝子領域の DNA メチル化への影響を検証した。網羅的 DNA メチル化データより、神経細胞の発生・分化に関わり、神経幹細胞で低メチル化状況にある遺伝子を抽出した。COBRA 法による DNA メチル化解析の結果、S-421 曝露の神経幹細胞では、*CDH2*、*SOX10* 遺伝子座で高メチル化異常が認められた。このことは、血清中濃度曝露でヘテロクロマチン構造を変化させた S-421 は、遺伝子領域の DNA メチル化にも影響をおよぼすことを示すものである。

本研究より、母体・臍帯血清中濃度でヘテロクロマチン構造を変化させる化学物質として S-421 が同定された。また、曝露濃度依存的にヘテロクロマチン構造を変化させる化学物質の種類が増え、その多くは神経分化にも影響をおよぼすことが示された。以上より、ヒト神経幹細胞におけるエピ変異原検出系の構築に成功し、さらに、体外で神経分化異常を引き起こす化学物質のリスク濃度が明らかとなった。一方、化学物質による神経分化異常の分子メカニズムは依然として不明である。本研究では、シナプス機能に関わり、欠損によって神経発達障害に関連することが知られる *CDH2* や、神経堤や末梢神経の重要な転写因子である *SOX10* の DNA メチル化状況が、S-421 によって乱されることが示された。今後、化学物質による DNA メチル化変化と、遺伝子の機能変化の関連性を調べていくことで、化学物質に起因する神経分化異常や発達障害の発症機序解明に繋がることが期待できる。