

△FosBタンパク質を指標とした神経活動解析と胎仔期微小粒子曝露により惹起される不安様行動との関連

メタデータ	言語: jpn 出版者: 日本DOHaD研究会 公開日: 2018-03-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 横田, 理, 押尾, 茂, 武田, 健 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3308

ΔFosBタンパク質を指標とした神経活動解析と胎仔期微小粒子曝露により惹起される不安様行動との関連

○横田理^{1,2}, 押尾茂¹, 武井健^{2,3}

¹東海大学薬学部 衛生化学分野, ²東京理科大学研究推進機構 総合研究院, ³山陽小野田市立山口東京理科大学

【背景・目的】我々は、胎仔期 DEP 曝露が雄性産仔の衝動性や学習記憶に影響を及ぼすことを明らかにしてきたが、不安情動性に及ぼす影響については検討してこなかった。本研究では、胎仔期 DEP 曝露が出生後の不安様行動に及ぼす影響について検討することを目的とした。

【方法】妊娠 ICR マウスに対して DEP を、皮下投与により曝露 (DEP 1 mg / kg body weight) した。オープンフィールド試験により雄性産仔の自発運動量を、また、高架式十字迷路試験 (EPM) により不安様行動を評価した。行動試験直後、脳を氷冷下で扁桃核、視床下部室傍核、縫線核を分画し、各試料中の Serotonin 量及びその代謝物を HPLC 法により定量した。また、免疫組織化学染色により Serotonin と ΔFosB タンパク質の発現を解析した。

【結果】自発運動量は、両群とも有意な変化は認められなかった。一方、EPM において、DEP 曝露群は対照群と比べて、Open arm への侵入回数及び滞在時間の有意な減少が認められた。また、DEP 曝露群の視床下部室傍核及び背側縫線核における Serotonin 量及びその代謝物は有意な亢進を認めた。さらに、DEP 曝露マウス背側縫線核 Serotonin ニューロンでの ΔFosB タンパク質の発現亢進が観察された。

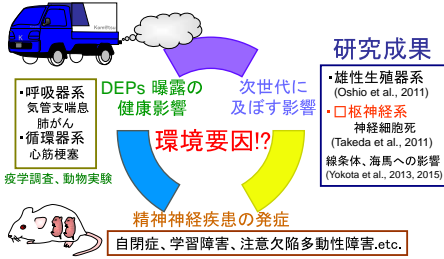
【考察】行動解析により、胎仔期 DEP 曝露が仔の不安様行動を惹起した可能性を示唆した。実際に、DEP 曝露群の脳内セロトニン量の変化は、不安様行動で認められるその変化と類似の兆候を示した。特に、DEP 曝露群の背側縫線核 Serotonin ニューロンにおける ΔFosB 発現割合が有意に増加していたことから、Serotonin ニューロン起始核の慢性的な活性化が不安様行動惹起に関与することが推察された。

背景及び目的

私たちは、ディーゼル排ガス (DE) 胎仔期曝露による雄性産仔の中樞神経系に与える影響を検討し、産仔の脳血管周囲顆粒細胞内の消化顆粒にディーゼル排気微粒子 (DEPs) 様物質が沈着することや、脳全域で末梢血管の微小梗塞を起こす所見を得ている。また、DE 胎仔期曝露により側坐核や線条体といった脳領域で Dopamine 神経機能が著しく低下することを認めている。これらのことから、胎仔期 DEPs 曝露が産仔の脳機能に様々な影響を与えることが推察された。

Serotonin 神経は不安やうつ状態を調節するなど、心の健康に重要な機能を持つことが知られている。Serotonin 神経は Dopamine 神経と相互作用し合うことにより、その機能が調節されることが知られている。しかしながら、DEPs 胎仔期曝露と不安情動性との関連性については未解明である。

私たちは、DEPs 胎仔期曝露が産仔の Serotonin 神経系に影響を及ぼし、不安様行動をはじめとした情動系に影響を及ぼすのではないかと仮説を立てた。本研究では、DEPs 胎仔期曝露による産仔の Serotonin 神経機能に対する影響について検討を行った。さらに、Serotonin 神経系と関連が深いと考えられている不安様行動との関係を検討するため Elevated plus maze test を行った。



研究成果

- 男性生殖系 (Oshio et al., 2011)
- 中枢神経系 (Takeda et al., 2011)
- 神経細胞死 (線条体、海馬への影響 (Yokota et al., 2013, 2015))

実験結果

① Spontaneous motor activity (Figure 1)

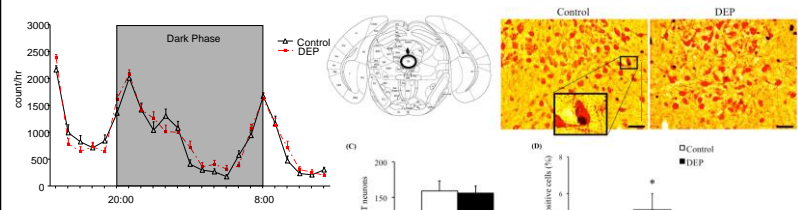


Figure 1. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles (DEPs) on spontaneous motor activity in mice. The data were expressed as time-course changes in control and DEP exposure mice. There was no difference between two groups. Each point represents the mean activity and counts for 1 hour ± standard error of 30 mice.

Figure 4. Immunohistochemical analysis of 5-HT and FosB expression in the DRN. (A) Schematic diagram of the section (DRN: -4.60 mm from the bregma). The black circle represents the area which was analyzed histochemically. (B) Expansion of (A), with images showing a representation of the immunostaining procedure that labeled 5-HT and FosB as brown and black, respectively (Left) Control, (Right) DEP. Scale bar=50 μm. (C) Each column represents the mean (±SE) number of 5-HT-positive cells in the DRN of 5 mice. (D) Each column represents the mean (±SE) rate (%) of FosB-positive cells in the 5-HT neurons in the DRN of 5 mice. *p < 0.05 vs control. Abbreviations: 5-HT, serotonin; DEP, diesel exhaust particles; DRN, dorsal raphe nucleus.

② Elevated plus maze test (Figure 2)

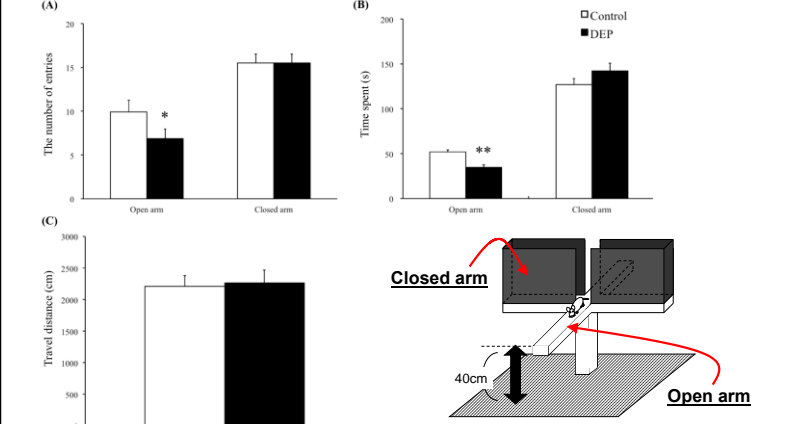


Figure 2. Effect of prenatal DEP exposure on anxiety-like responses of mice in the elevated plus maze test. (A) No effect of DEP exposure was detected for the total distance travelled, an index of locomotor activity. Each column represents the mean with standard error of 15 mice. (B) The number of open arm entries was significantly reduced in DEP-exposed mice. In contrast, the number of closed arm entries was not changed in either group. (C) The time spent in the open arms was significantly reduced in DEP-exposed mice, whereas the time spent in the closed arms was not changed in either group. *p < 0.05, **p < 0.01 vs control.

③ Measure Serotonin and its metabolites (Figure 3)

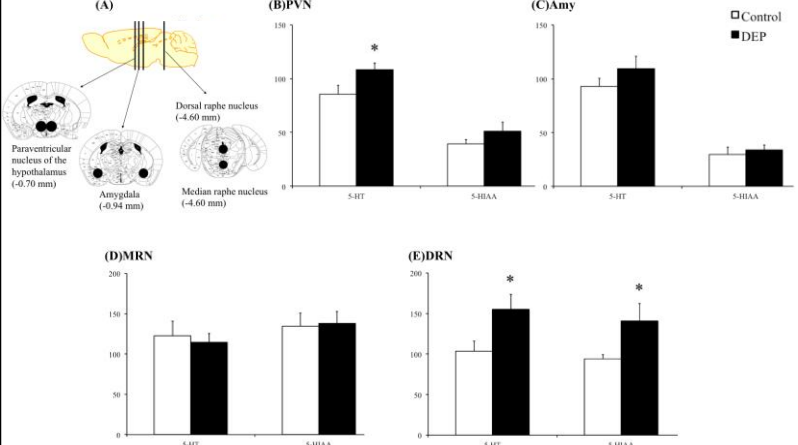
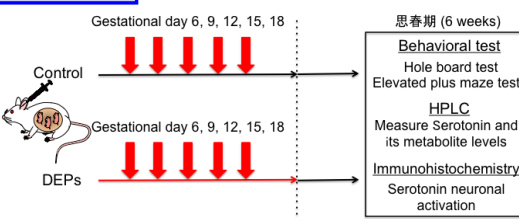


Figure 3. Effects of prenatal DEP exposure on ascending 5-HT systems in male offspring. (A) Schematic diagram of the brain. The positions of dissection were shown. (B) Prenatal exposure to DEP significantly increased 5-HT levels, but not 5-HIAA levels, in the PVN. (C, D) No effect of DEP exposure was detected in either 5-HT or 5-HIAA levels in the Amy (C) and MRN (D). (E) Prenatal exposure to DEP significantly increased both 5-HT and 5-HIAA levels in the DRN. Each column represents the mean (μg/unit) with standard error of 10 mice. *p < 0.05 vs control. Abbreviations: 5-HT, serotonin; 5-HIAA, 5-hydroxyindole-3-acetic acid; Amy, amygdala; DEP, diesel exhaust particles; DRN, dorsal raphe nucleus; MRN, median raphe nucleus; PVN, paraventricular nucleus of the hypothalamus.

実験方法



妊娠期 6, 9, 12, 15, 18 日に、1 日 1 回 200 mg/kg (計 1000 mg/kg) の DEP を ICR 妊娠マウスに皮下投与した。実験には、雄性産仔を用いた。この投与量は、中国などにおける大気環境中濃度の DE 中に含まれる DEP の濃度と近い曝露濃度となる。雄性産仔は 3 週齢時に離乳し、6 週齢より行動試験を行った。まず、自発運動量を測定し、運動量の評価を行った。次に、不安情動性を評価するために、Elevated plus maze test を行った。全てのマウスは、行動試験を行う 30 分以上前に馴化させ、行動評価は 2 名によるブラインドにより行った。続いて、行動試験後のマウス脳サンプルを摘出した。ピプラトームにより切片を作成し、標的領域 (ROI) を dissection した。分画部位は、Paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN, -0.70 mm); Amygdala (Amy, -0.94mm); Dorsal raphe nucleus (DRN, -4.60 mm); and Median raphe nucleus (MRN, -4.60 mm) の 4 領域である。この領域を電気化学検出器付 HPLC により、Serotonin 量とその代謝物を定量した。また、固定した脳サンプルより凍結切片を作成し、Serotonin と FosB に対する一次抗体とビオチン化標識した二次抗体を反応させて、DAB 法により発色した。

結論

本研究の結果、胎仔期ディーゼル排気微粒子曝露が、次世代の不安様行動を惹起することが示唆された。また、この影響は、脳内 Serotonin 神経系の変化に起因する可能性がある。さらに、Serotonin 神経系の起始核である DRN において、慢性的な Serotonin ニューロンの活性化が認められ、それが原因で投射先である PVN における Serotonin 量の亢進が認められた可能性が考えられた。

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.□