



Abt研究成果報告報告会@20250608

父性曝露影響から捉える ネオニコチノイド系農薬の 継世代影響評価・エピゲノム毒性

神戸大学大学院農学研究科
応用動物講座 動物分子形態学分野
教授 星 信彦 (nobhoshi@kobe-u.ac.jp)

父性曝露影響から捉えるネオニコチノイド系農薬の継世代影響評価・エピゲノム毒性

ネオニコチノイド系農薬(NN)

- ①浸透性
- ②残効性
- ③神経毒性

- ・ニコチンに類似した構造
- ・昆虫のアセチルコリン受容体(nAChR)に結合

神経の持続興奮, 殺虫効果

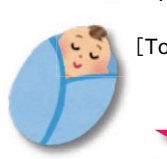
NNとnAChRの親和性
哺乳類<<昆虫
[Tomizawa & Casida, 2003]



食物中残留基準値の緩和
[厚生労働省, 2015, 2016, 2017]



日常的なNNへの曝露
[Harada et al., 2016]



尿中にNN検出
[Ikenaka et al., 2019; Ueyama et al., 2015]

NNは哺乳類のnAChRを介して, 神経興奮を引き起こす
[Kimura-Kuroda et al., 2012]

NNは哺乳類の行動・恒常性の維持に影響を及ぼす

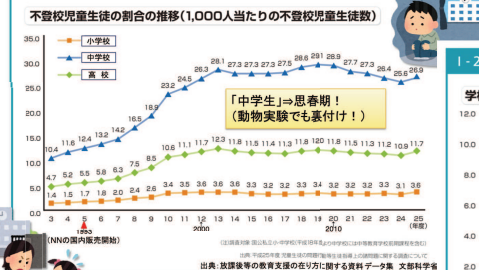
クロチアニジン(CLO)の曝露 → マウスの不安様行動増加・異常啼鳴・加齢影響
[Hirano, ...Hoshi, 2015, 2018, 2021; Hoshi, 2021; ; Maeda, ...Hoshi, 2020, 2021]

ジノテフランの胎子期～発達期曝露 → マウスへの抗うつ作用・自発運動量の増加
[Takada, ...Hoshi, 2018, 2020; Yoneda, ...Hoshi, 2018]

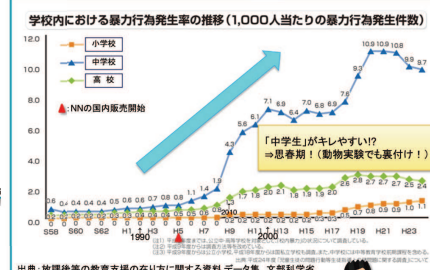
CLO経口投与 → 腸内細菌叢・胸腺の異常 & 農薬原体 & 代謝産物の胎子移行
[Onaru, ...Hoshi, 2020; Ohono, ...Hoshi, 2018; Hoshi, 2021]

哺乳類への詳細なリスク評価が急務!!!

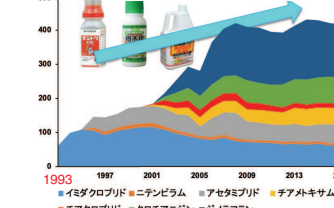
1 - 2子供たちの教育環境をめぐる現状 *8



1 - 2子供たちの教育環境をめぐる現状 *8

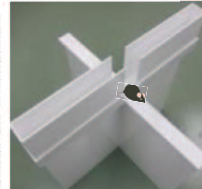


ネオニコチノイド(NN)国内出荷量

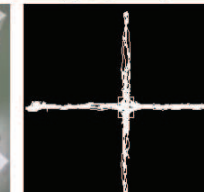


哺乳類の情動変容

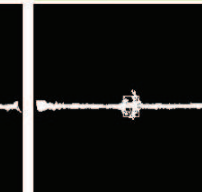
高架式十字迷路



投与なしマウス



NN投与マウス



父性曝露影響から捉えるネオニコチノイド系農薬の継世代影響評価・エピゲノム毒性

★緒言

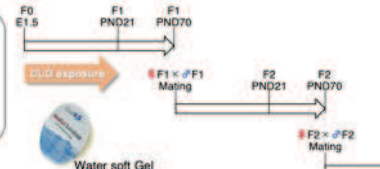
➤ DOHaDと継世代影響

(成人病胎児期発症起源説)

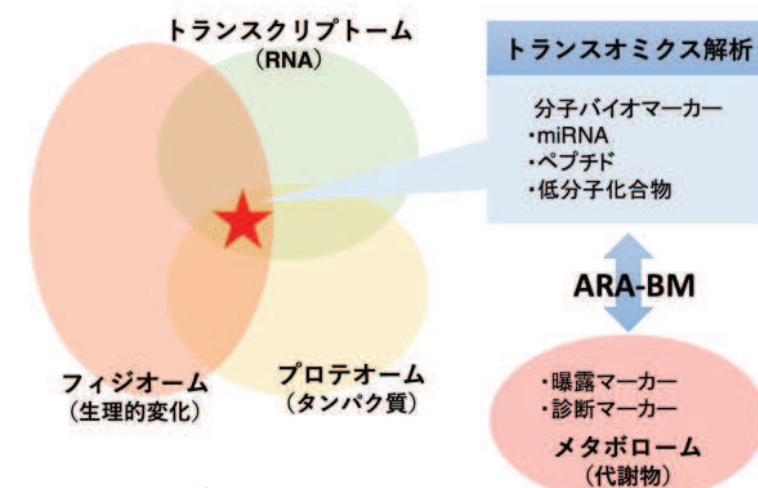
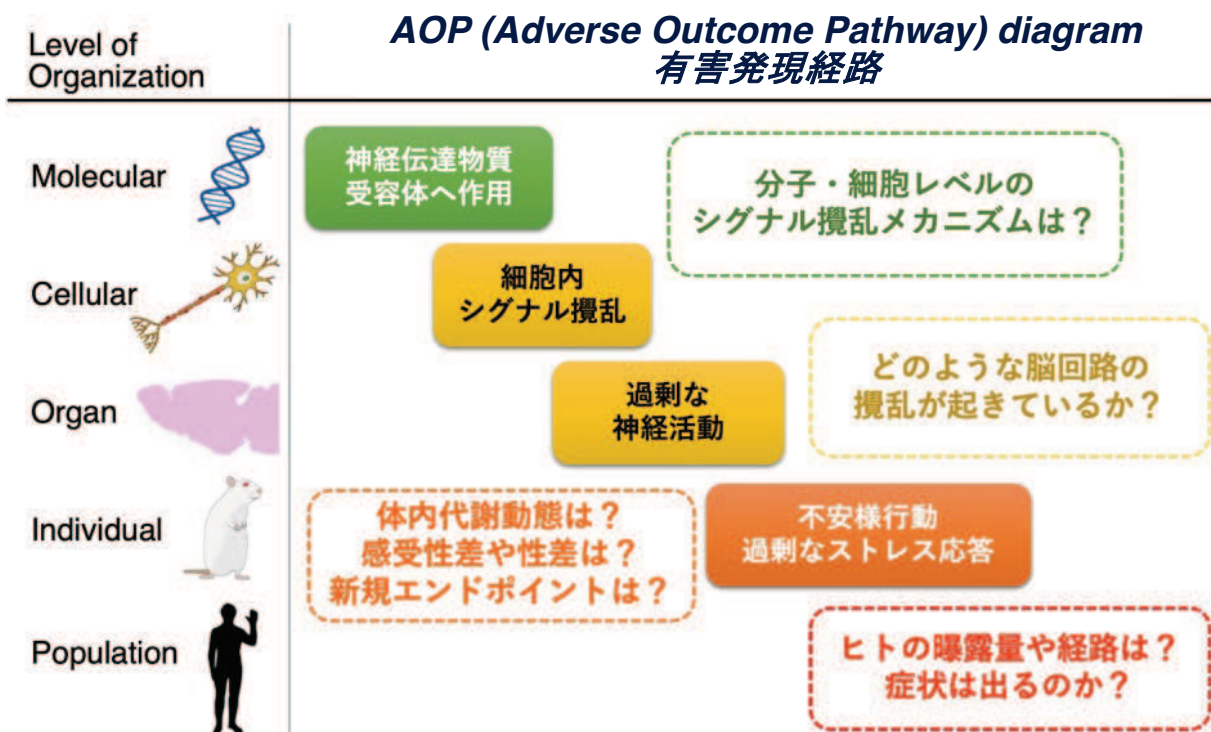
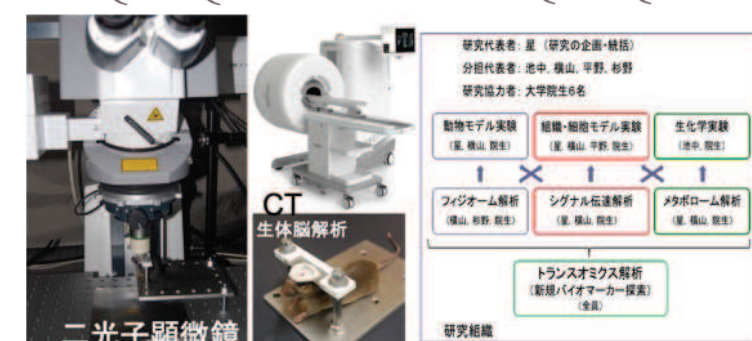
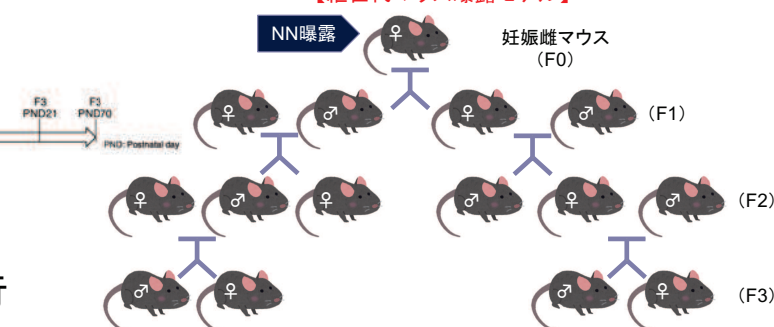
- ◆ 農薬毒性試験の無毒性量(NOAEI)濃度以下で、認知情動変容を誘発するネオニコチノイドを妊娠マウス(F₀)に曝露し、そのF₁, F₂, F₃世代に、オープンフィールド試験(OF), 高架式十字迷路試験(EPM), 高架式プラットホーム試験(EOP), 明暗往來試験, バーンズ迷路試験(BM), 新規物体認識記憶試験(NOR)等の認知情動行動テスト, あるいはストレス・アレルギー負荷を実施する(フィジオーム解析)。

◆ メタボローム・トランスオミクス解析

- ◆ 光遺伝学(オプトジェネティクス)を用いて細胞活動, シグナル伝達, 遺伝子・分子発現, を操作. 機能発現に伴う構造変化・活動を再現し, 遺伝子発現プロファイリングから, 異常行動誘発メカニズムの解明を推し進めるとともに, それらの項目ごとに定量手法を確定し, 対応する神経科学的な異常の基準値として設定する。



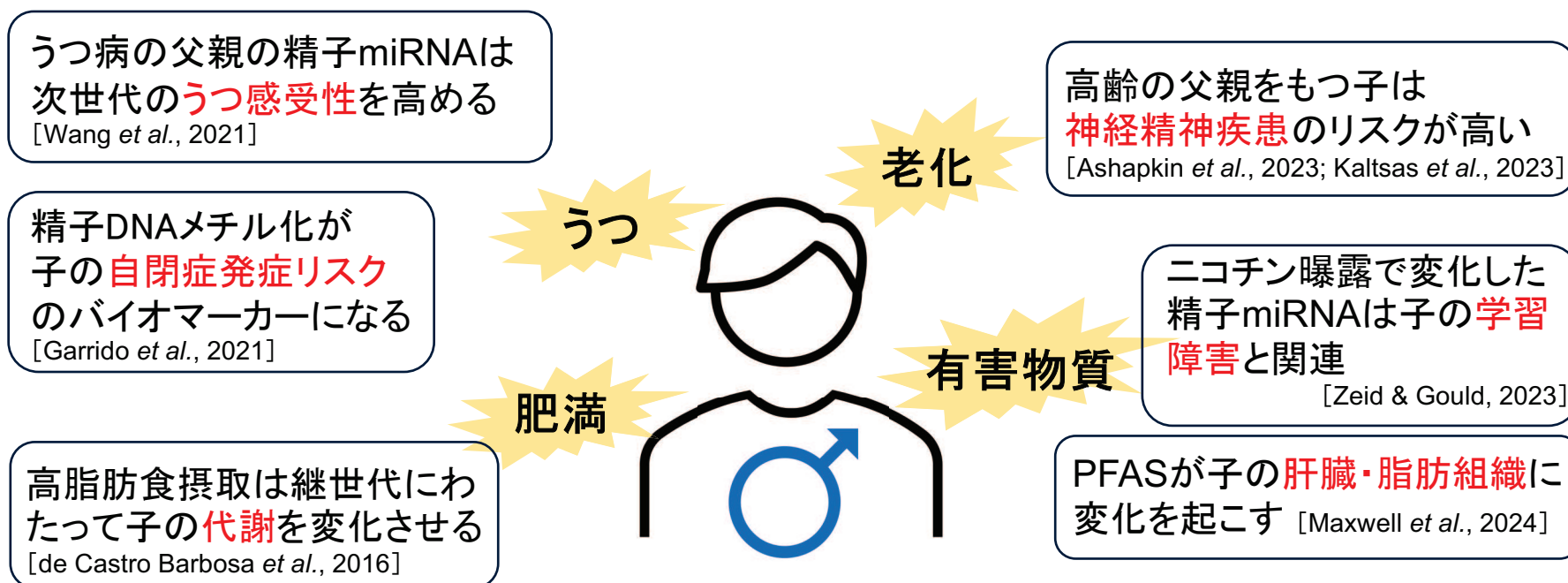
【継世代マウス曝露モデル】



- ◆ 網羅的メタボローム
➤ 変動する代謝物の洗出
- ◆ 超高感度定量的ターゲットメタボローム
➤ 極低濃度代謝物の定量的ターゲット分析

背景と目的

父親の環境要因と子の疾患リスクの関連を示す報告が増加



父親の環境要因が精子エピゲノム[※]変化を引き起こし、子孫の疾患リスクに影響

遺伝子だけで説明できない
新たな概念

※ エピゲノム: ゲノムに加えられた修飾で、後天的に変化を受ける

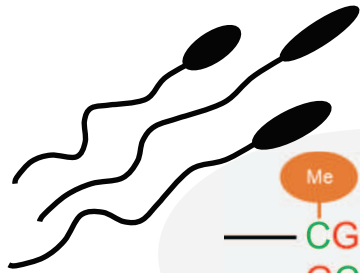
父性曝露影響の有力なメカニズム

Animal Molecular Morphology, Kobe University

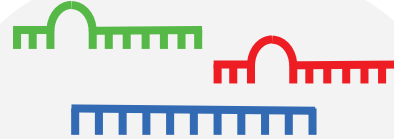
背景と目的

CLOの父性曝露による次世代影響は不明

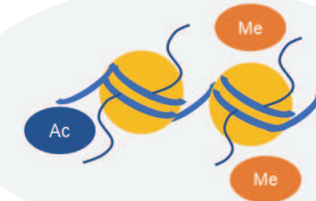
精子エピゲノム変化



DNAメチル化



ncRNA
(miRNA, siRNA, etc.)

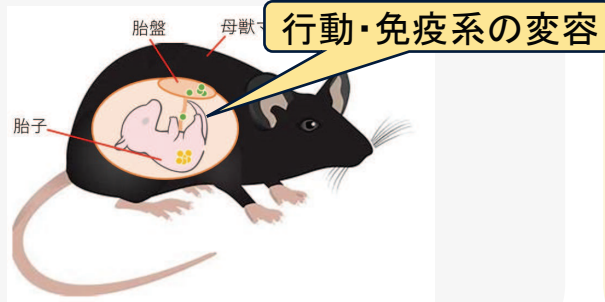


ヒストン修飾

母性曝露

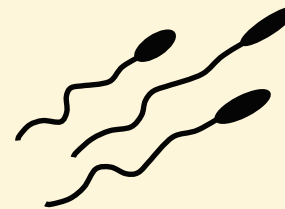
F1 胎子～幼年期曝露

F0
直接曝露



F2 生殖細胞期での曝露

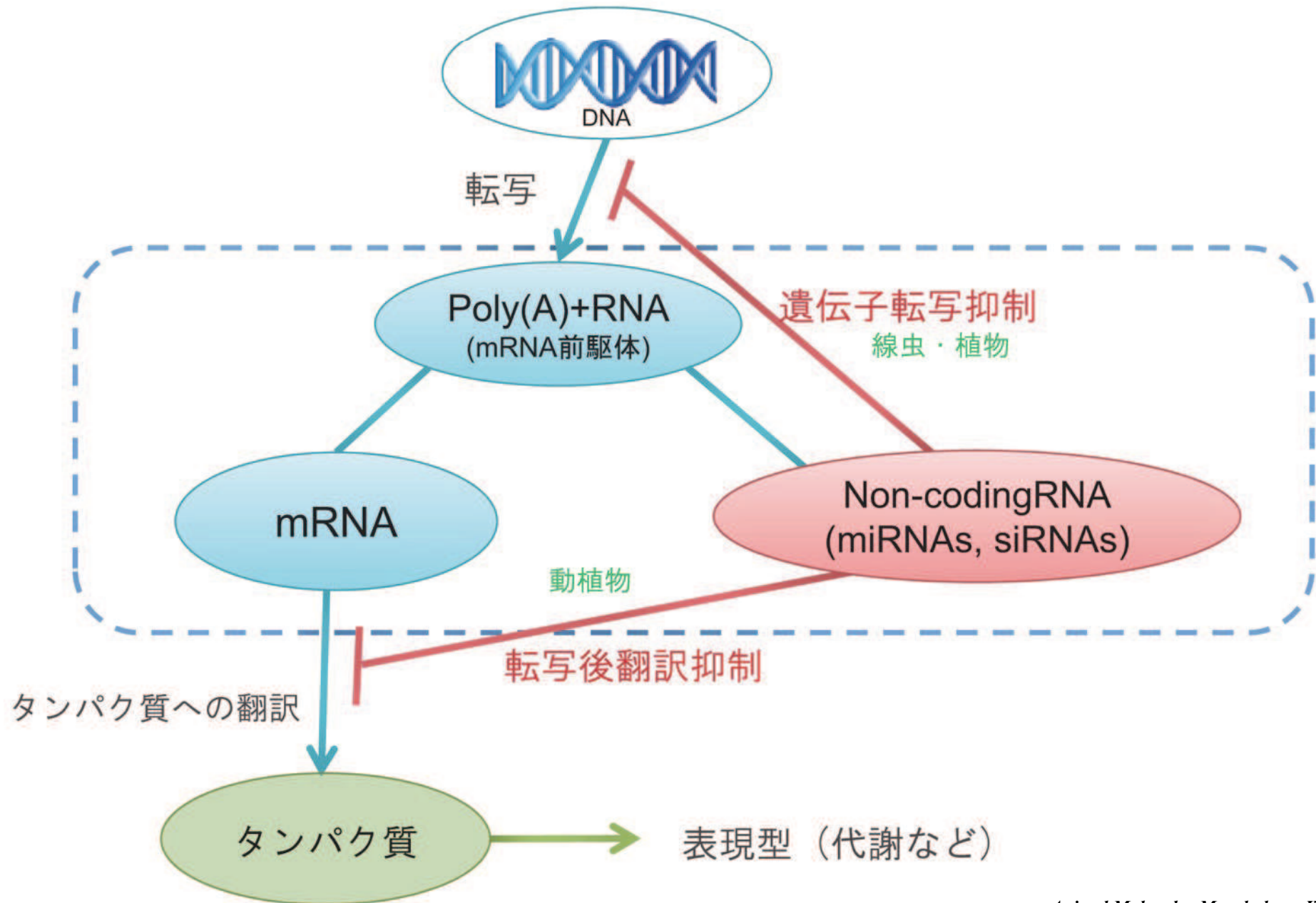
父性曝露



F0精子→ F1

- ・精子を介した曝露
- ・エピゲノム変化が有力なメカニズム
- ・ネオニコチノイド系農薬の父性曝露影響を調べた論文はほとんどない

Micro RNAとは(miRNA) ?



背景と目的

CLOの父性曝露による次世代影響は不明

父性ニコチン曝露

ネオニコチノイド系農薬同様nAChRに作用する
(ニコチン性アセチルコリン受容体)



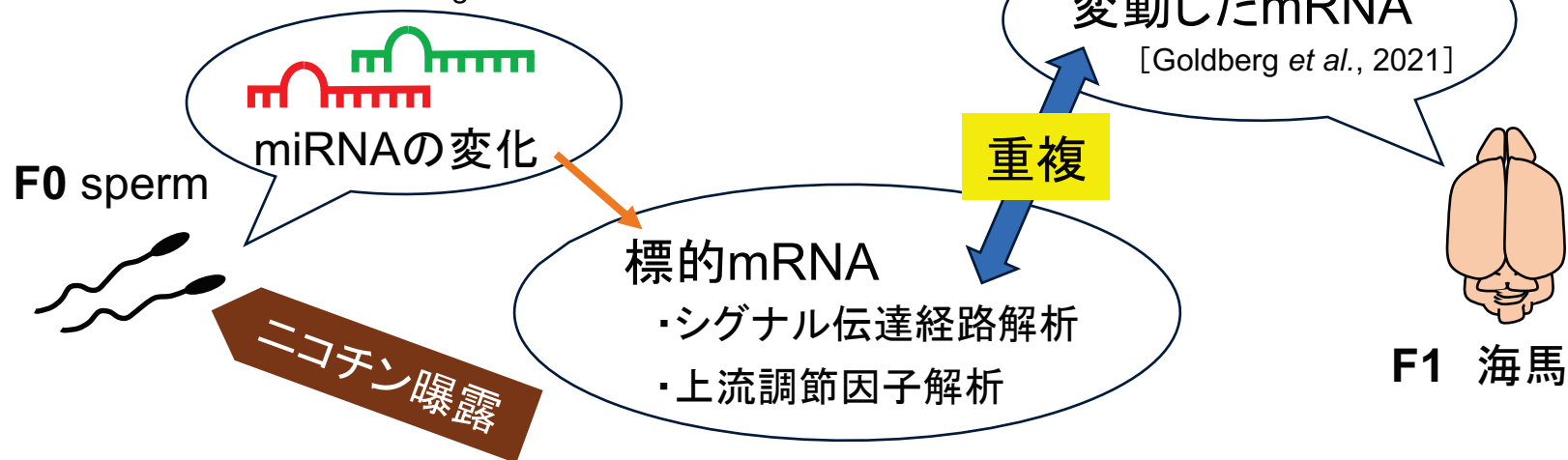
■ 継世代的に行動障害, 学習障害をもたらす

[Dai et al., 2017; Goldberg et al., 2021; McCarthy et al., 2018; Yohn et al., 2019; Zhang et al., 2020]

■ ニコチン曝露で変動した精子miRNAは子の学習障害と関連する

[Zeid et al., 2023]

miRNAは21-25塩基のnon-coding RNA



背景と目的

本研究の概要

生物学とITの両方の要素が入った生命科学の分類の一つ

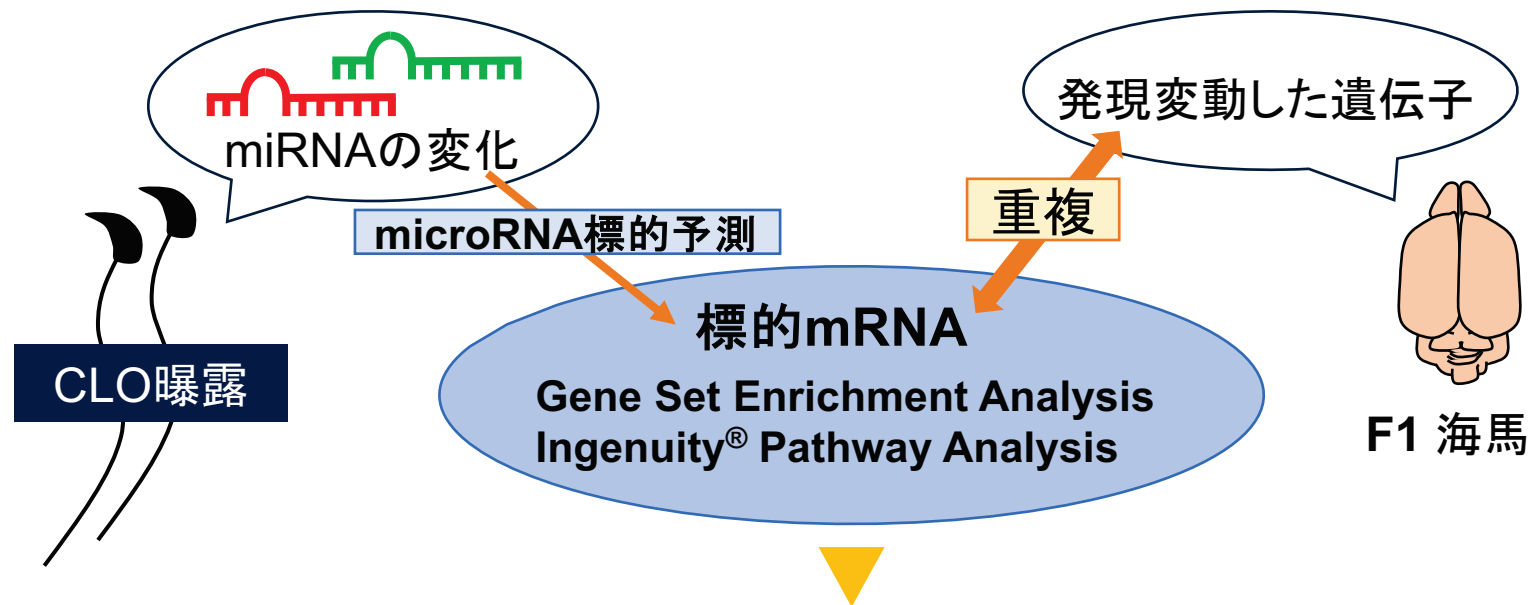
F0 (親世代)

・精子miRNA解析

バイオインフォマティク

F1 (次世代)

・脳内mRNA発現解析



バイオインフォマティクな手法を用いて
精子miRNAと次世代影響との関連性を探る

背景と目的

<目的>

NNsの一種 クロチアニジン(CLO)の父性曝露による
次世代への行動・神経系への影響を検証する



父性曝露の次世代影響と精子miRNAの関連を探索



材料と方法

供試動物：父獣マウスおよびF1雄産子 (C57BL/6N)

F0父獣

〔 対照群 (CLO 0 mg/kg/day)
投与群 (CLO 50 mg/kg/day) 〕

雄マウスCLO無毒性量
47.2 mg/kg/day

投与：CLOに6週間曝露（給水ゲル）



F1雄産子 〔 対照群
父性曝露群 〕

CLO曝露なし，通常飼育

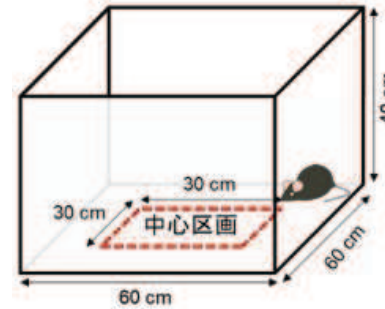
結果

F1 行動試験 (OF)

OF: オープンフィールド試験

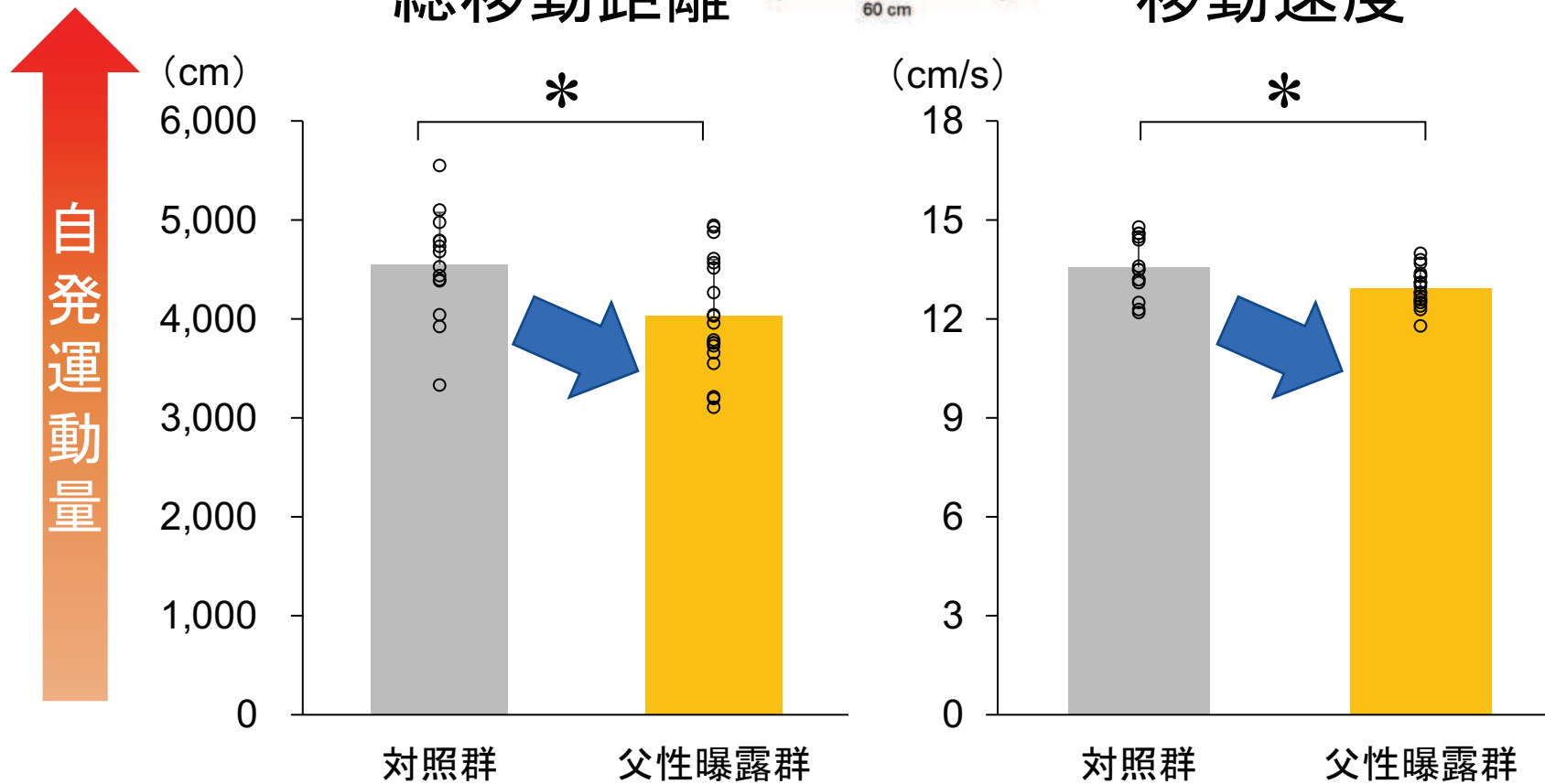
対照群: n=14, 父性曝露群: n=19

*: $P < 0.05$, Mean + SD



総移動距離

移動速度



自発運動量の減少

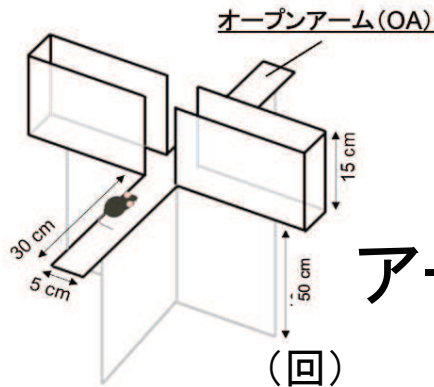
結果

F1 行動試験 (EPM)

EPM: 高架式十字迷路試験

対照群: n=13, 父性曝露群: n=17

*: $P < 0.05$, Mean + SD

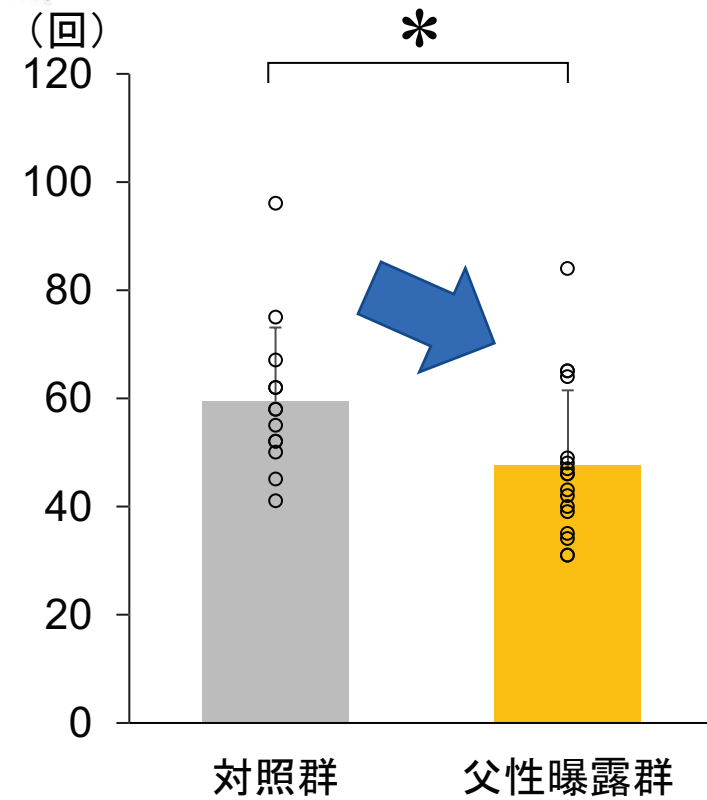
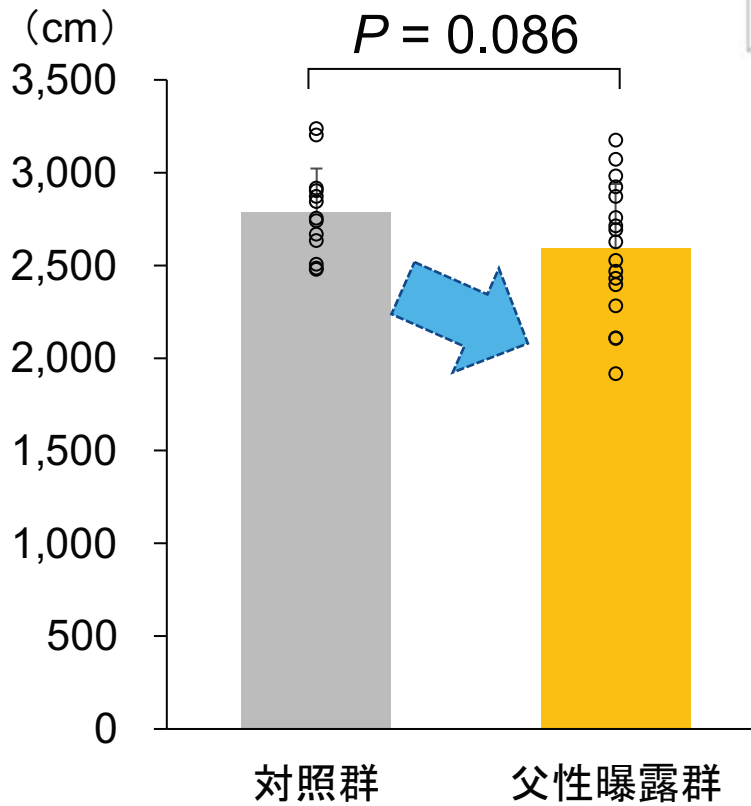


総移動距離

$P = 0.086$

アーム総侵入回数

*



自発運動量の減少

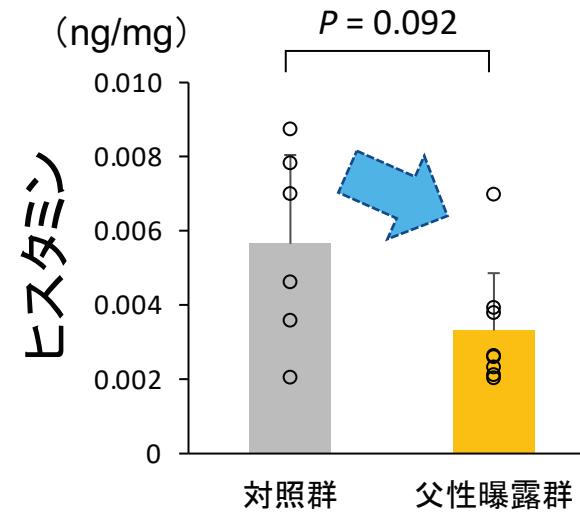
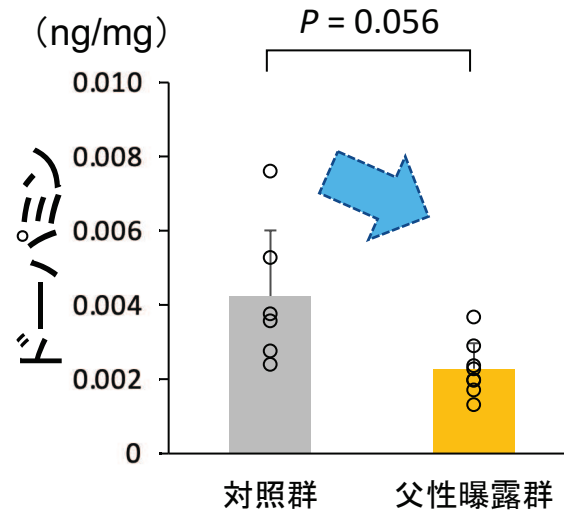
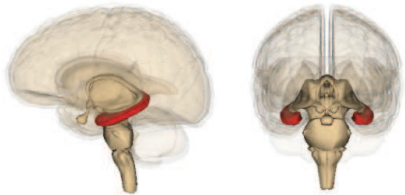
結果

F1脳 モノアミン神経伝達物質の濃度

海馬

記憶・空間学習
の司令塔

側頭葉の内側



ドーパミン

脳内で重要な働きをする神経伝達物質の一つで、運動、快感、意欲、学習、注意、ホルモン調節など、多くの生理機能に関わっている

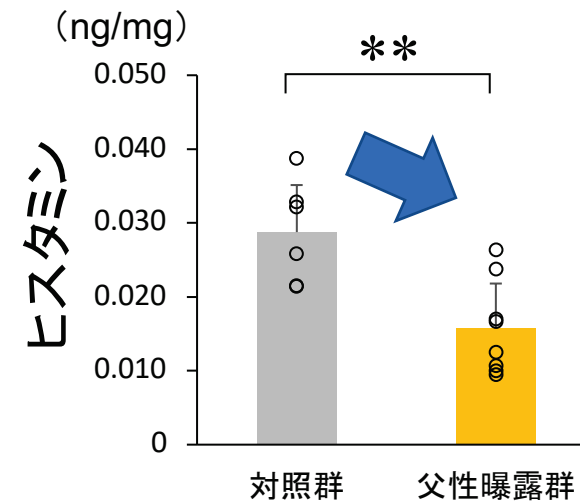
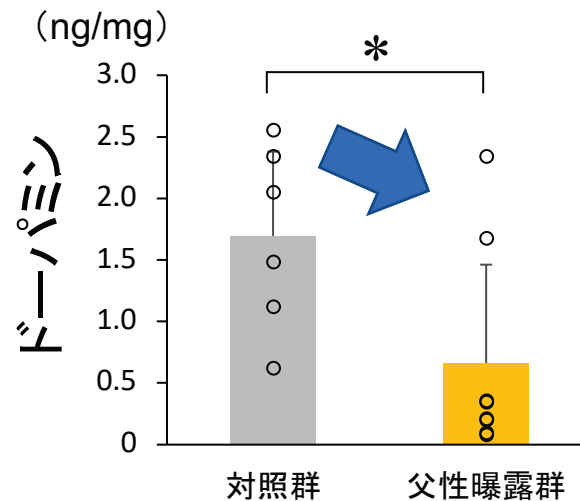
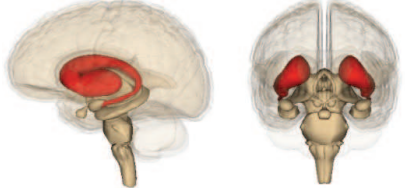
ヒスタミン

私たちの体内に存在する生理活性物質で、主に免疫反応やアレルギー反応、胃酸分泌、神経伝達などに関与

線条体

運動の制御・
意思決定・学習

前頭葉の深部



対照群: n=6, 父性曝露群: n=8, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, Mean + SD

結果

F1海馬 RNAシーケンス解析

発現**上昇**遺伝子: 233個

発現**低下**遺伝子: 148個 (Fold change > 1.5, False discovery rate < 0.1)

エンリッチメント解析 (Enrichment analysis) :

遺伝子やタンパク質などの**生物学的データのリスト(例: 発現変動した遺伝子群)に対して, 特定の機能や経路が統計的に有意に多く含まれているか(=エンリッチされているか)**を調べる解析手法

エンリッチメント解析

発現低下遺伝子群が関連する生物学的機能 上位5つ

Functions annotation	p-value	Predicted activation state	Number of molecules
Development of neural cells	1.88E-11	Decreased	35
Development of neurons	2.72E-11	Decreased	34
Developmental process of synapse	2.27E-09	Decreased	15
Morphogenesis of nervous tissue	1.92E-08	Decreased	26
Neuritogenesis	5.77E-08	Decreased	25

抑制されると予測された機能

神経系の細胞, ニューロンやシナプス, 神経突起形成に関連

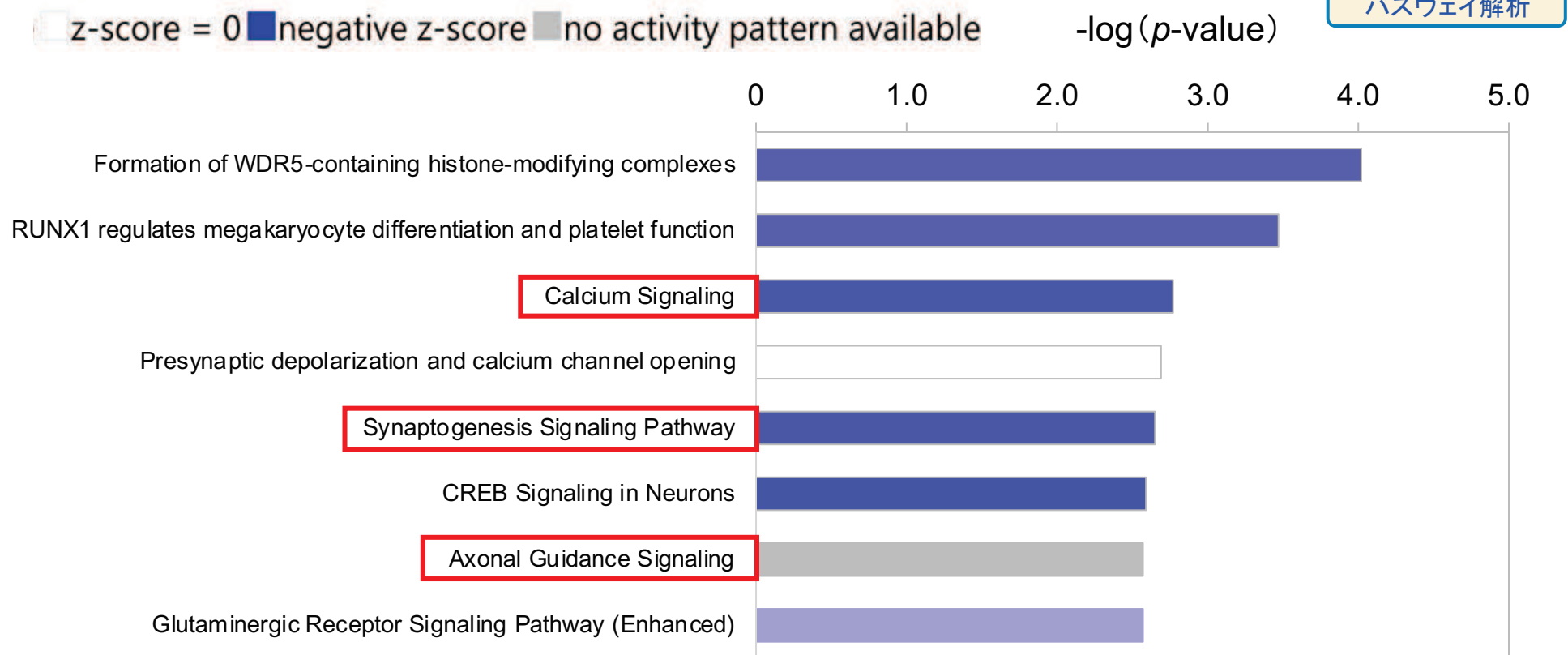
発現低下遺伝子148個のうち,
Functions annotationに含まれる
遺伝子数

結果

F1海馬 RNAシーケンス解析

パスウェイ解析 (Pathway analysis) :
遺伝子やタンパク質のリストに対して、特定の生物学的経路 (pathway) が関与しているかどうかを調べる解析手法

発現低下遺伝子群が関連すると予想された生物学的経路 上位8つ



カルシウムシグナルやシナプス形成シグナルの抑制, 軸索誘導への影響

F0

CLO父性曝露



F1

行動・神経系に影響



自発運動量の低下

海馬の遺伝子発現の変化

ドーパミン, ヒスタミンの減少

F0

CLO父性曝露



F1

行動・神経系に影響



自発運動量の低下

海馬の遺伝子発現の変化

ドーパミン, ヒスタミンの減少

精子miRNAの関与の可能性を検討する

結果

F0精子miRNAシーケンス

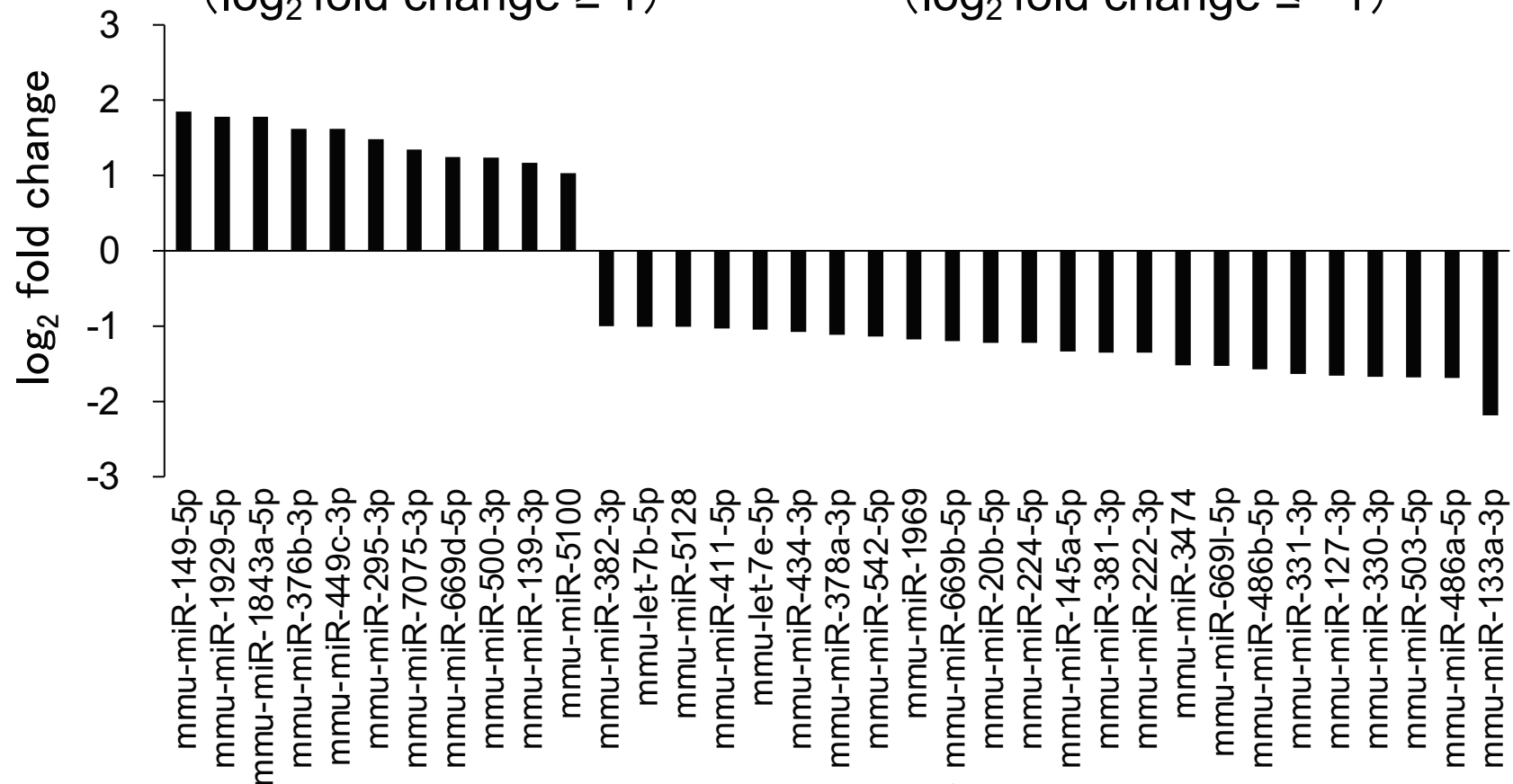
対照群と投与群との間で2倍以上の増減を変動の条件

増加miRNA: **11**

($\log_2$ fold change ≥ 1)

減少miRNA: **24**

($\log_2$ fold change ≤ -1)



35個の変動miRNAが同定

結果

標的予測 & エンリッチメント解析

Binding p -value > 0.95
データベース: TargetScan, miRDB

11 UP miRNA → 122 target mRNA

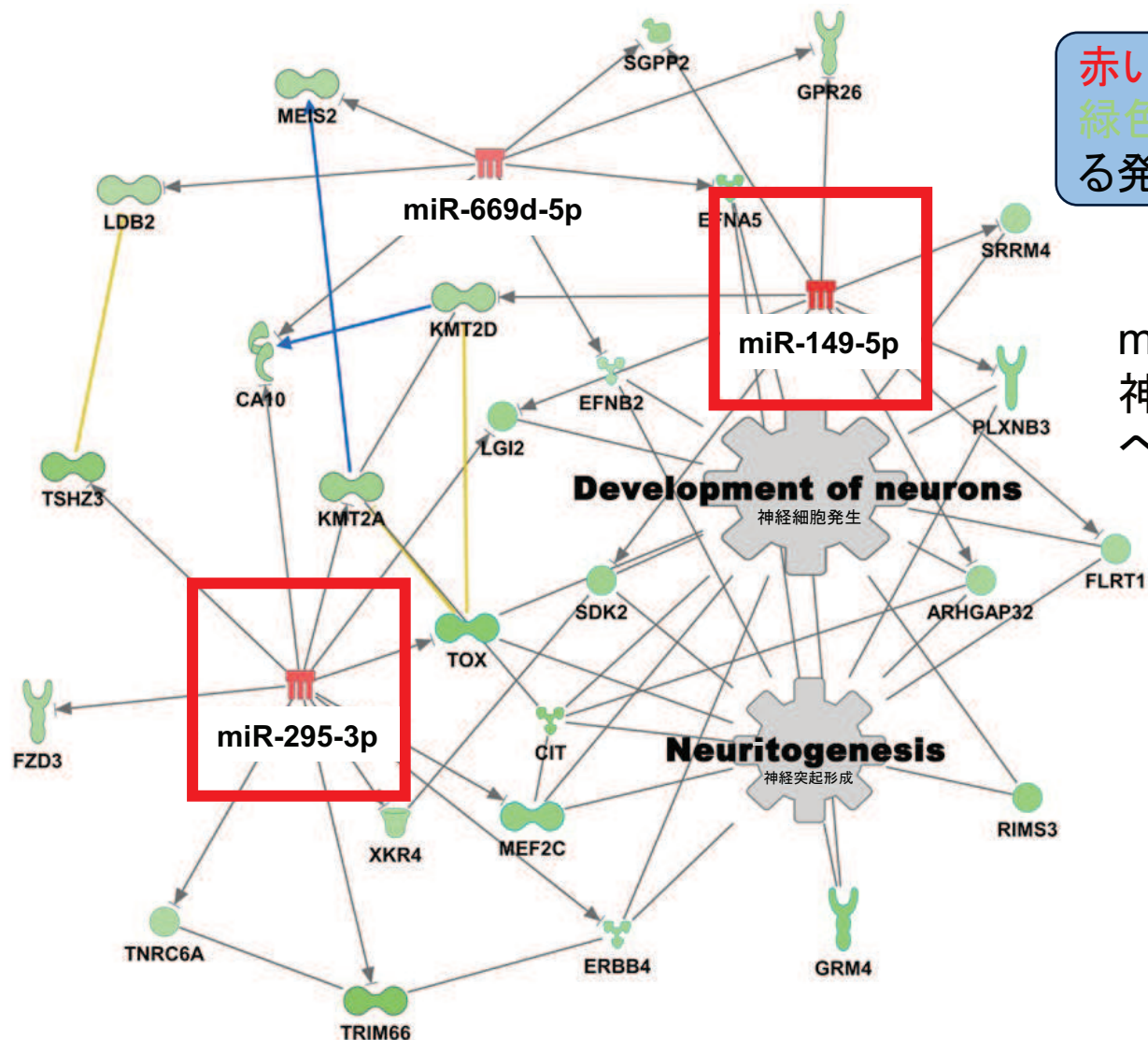
Name	Genes	p -value	adjusted p -value
Chromatin modifying enzymes	Kdm2b;Kdm7a;Jade1;Mcra1;Kmt5b	0.0138	0.113
Chromatin organization	Kdm2b;Kdm7a;Jade1;Mcra1;Kmt5b	0.0138	0.113
RAF/MAP kinase cascade	Dab2ip;Pdgfra;Pea15a;Kras;Rap1a	0.0348	0.113
MAPK family signaling cascades	Dab2ip;Pdgfra;Prkacb;Pea15a;Kras;Rap1a	0.0162	0.113
MAPK1/MAPK3 signaling	Dab2ip;Pdgfra;Pea15a;Kras;Rap1a	0.0377	0.113
Intracellular signaling by second messengers	Pdgfra;Phlpp2;Prkacb;Phc3;Pip4k2b	0.0303	0.113
Axon guidance	Prkacb;Slit2;Ephb3;Mmp9;Kras	0.0334	0.113
Nervous system development	Prkacb;Slit2;Ephb3;Mmp9;Kras	0.0339	0.113
Neuronal System	Dlgap2;Prkacb;Ncald;Gria3;Kcnb1	0.0646	0.155
Signaling by Receptor Tyrosine Kinases	Pdgfra;Prkacb;Cbl;Mmp9;Kras;Rap1a	0.0632	0.155

MAPキナーゼカスケードや軸索誘導, 神経系の発生に関連するパスウェイに多く含有

データベース: Reactome pathway

結果

F0精子の増加miRNAとF1海馬の発現低下遺伝子のネットワーク



赤いシンボルは増加したmiRNA
緑色のシンボルはF1海馬における発現低下遺伝子

miR-149-5p, 295-3p, による
神経突起形成や神経細胞発生
への影響が強調された

 :miRNA

考察

✓ 精子miRNAの変動

11 **UP** miRNA

24 **DOWN** miRNA



“MAPK シグナル”

“軸索誘導”

“神経系の発生”

に関連する遺伝子を標的とする

考察

✓ 精子miRNAの変動

11 **UP** miRNA

24 **DOWN** miRNA



“MAPK シグナル”

“軸索誘導”

“神経系の発生”

に関連する遺伝子を標的とする

- miR-290-295のクラスターは, 4-8細胞期に発現が増加する
[Tang *et al.*, 2007]

考察

✓ 精子miRNAの変動

11 **UP** miRNA

24 **DOWN** miRNA



“MAPK シグナル”

“軸索誘導”

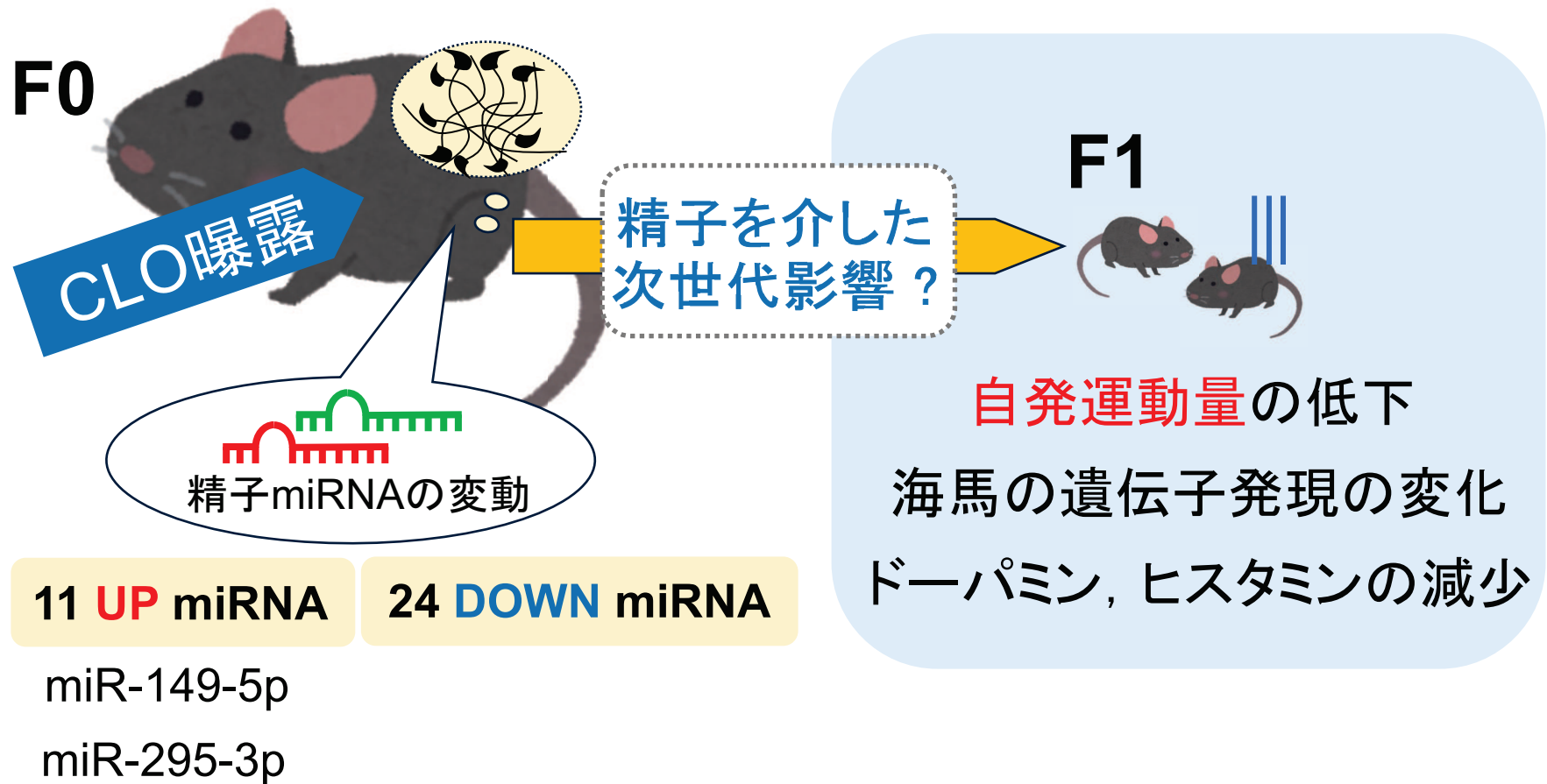
“神経系の発生”

に関連する遺伝子を標的とする

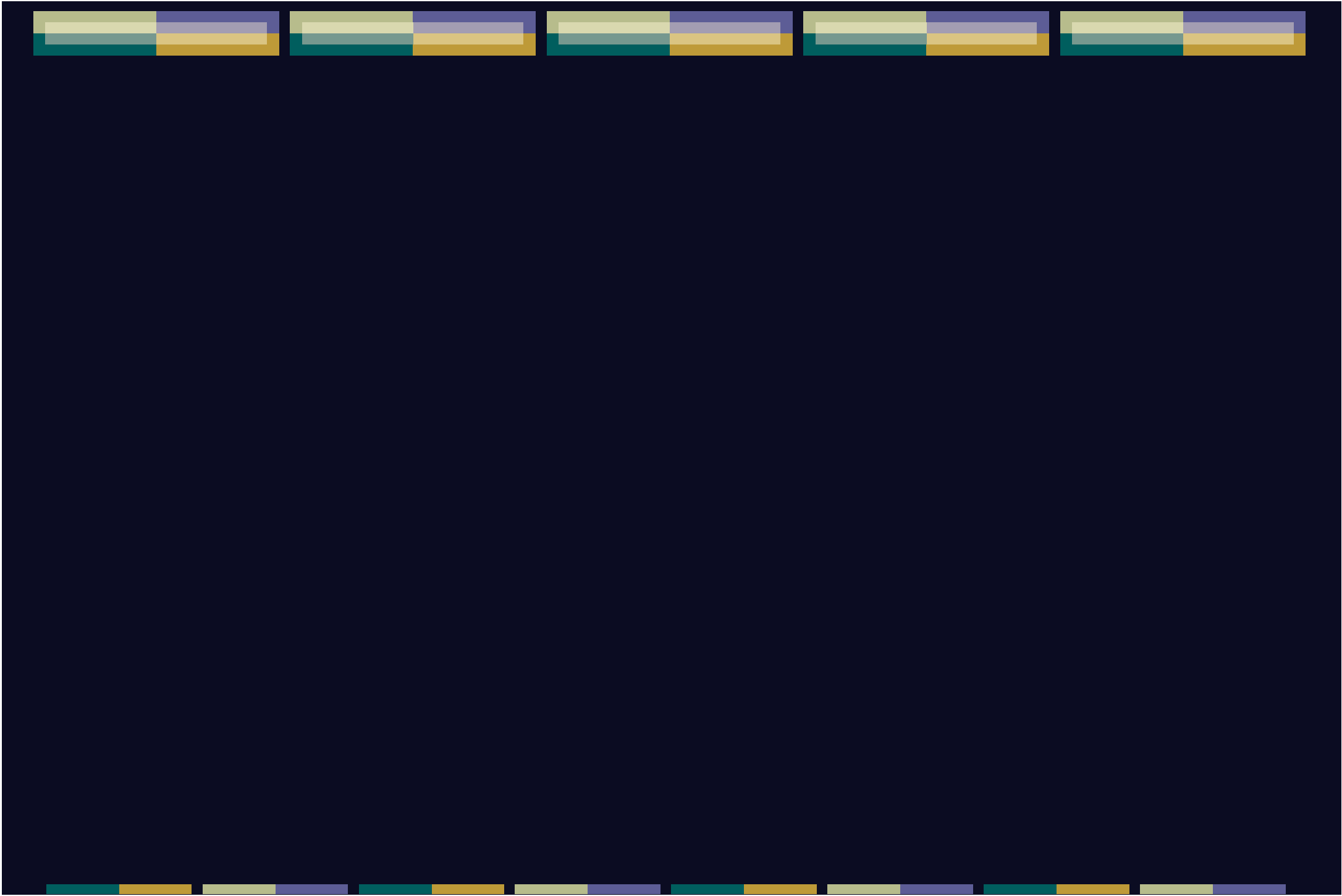
- miR-290-295のクラスターは, 4-8細胞期に発現が増加する
[Tang *et al.*, 2007]

CLO曝露によって変動する精子miRNAは
胚発生における遺伝子発現調節に関与する可能性

総括



精子miRNAの変動がCLO父性曝露による
次世代影響のメカニズムである可能性



結 語

化学合成農薬が一般に使用されるようになっておよそ70年が過ぎました。人類は漸く農薬の本当の姿を理解できるようになってきたのではないのでしょうか。

一般に胎子および新生子は成体と比べて化学物質等への感受性が極めて高く、ヒトにでも非可逆的に脳・生殖機能、さらには胸腺・腸管免疫系を障害することが示唆されています。環境中微量化学物質の作用メカニズムの解明は、分子生物学的知見をもとに新しい時代に入ったといえますが、器官形成・発達時期である胎子・新生子期での曝露が、長期にわたって非可逆的にフィードバック機構の破綻を招来する作用機序には未だ不明な点が多くあります。

さらに近年、細胞世代を超えて継承され得る、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御について研究する新たなパラダイムとして、エピゲノム毒性の領域が提唱され、環境中微量化学物質が生物に及ぼす環境エピゲノムの展開が期待されています。

「環境汚染と健康」の問題は未来(次世代)に先送りしてはならないし、「疑わしきは罰せず」ではすまされません。農薬との付き合い方を真剣に考えるときが来たと思っています。

Acknowledgment

櫻木 範明 先生(北海道大・医・産婦人科)

池中 良徳 先生(北海道大・獣医・毒性学)

和氣 弘明 先生(神戸大・名古屋大・医・解剖・分子細胞学)

古屋敷 智之 先生(京都大/神戸大・医・薬理)

菅原 照夫 先生(小樽商科大/北海道大・医・生化学)

田渕 圭章 先生(富山大・生命科学先端研究センター・ゲノム機能解析分野)

諸橋 憲一 郎先生(九州大・医・性差生命科学講座/基生研・性差生物学研究部門)

関島 恒夫先生(新潟大・自・生態系科学大講座)

菅野 美津子先生(株式会社東芝・研究開発センター)

谷田 任司先生(大阪公立大・獣医解剖学研究室)

平野 哲史先生(富山大・分子・構造解析施設)

神戸大学大学院農学研究科動物形態機能学教室員

ご質問やご意見がございましたら、以下のメールアドレスまでご連絡ください:

nobhoshi@kobe-u.ac.jp

御静聴ありがとうございました!!

If you have any questions or comments, please contact the following (nobhoshi@kobe-u.ac.jp)



ゼミ旅行@四国