

氏名(本(国)籍)	赤根 弘 敏(山梨県)
推薦教員氏名	東京農工大学 教授 渋谷 淳
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博乙第128号
学位授与年月日	平成26年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	グリシドールを例としたニューロン発達指標の確立による 神経毒性評価に関する研究
審査委員	主査 東京農工大学 教授 渋谷 淳 副査 帯広畜産大学 教授 古林 与志安 副査 岩手大学 教授 御領 政 信 副査 東京農工大学 教授 下田 実 副査 岐阜大学 教授 柳井 徳 磨

学位論文の内容の要旨

成熟動物に現れる神経毒性は、複数のパラメーターで得られた結果に対する総合的評価が必要であり、しばしば毒性判断が困難な場合がある。一方、ラットを用いる発達期神経毒性試験の現行ガイドライン(OECD TG426)では、評価に多くの時間と動物を要するため、より効率的な評価システムの構築が求められている。海馬歯状回顆粒細胞層下帯(SGZ)におけるニューロン新生は、神経幹細胞の自己複製、前駆細胞の増殖や分化、神経突起形成やシナプス形成などの成熟過程を含むため、軸索末端やシナプトソームを標的とする神経毒性物質の標的となり得ると考えられる。また、遺伝子発現プロファイリングは、毒性機序に関連する網羅的情報を獲得する手段となりうるが、中枢神経組織は解剖学的な構成が精緻で部位特異性が高いため、特定脳部位における遺伝子発現解析には、抽出分子の高い品質かつ発現量の忠実性を適える、迅速で正確な組織採材法の開発が必要である。本研究では神経発達指標を利用した新規の神経毒性評価手法の確立を目指し、海馬でのニューロン新生に着目し、神経毒性物質による障害性、さらに28日間反復投与試験の枠組みでの発達神経毒性を示唆する影響の検出性を検討した。また、遺伝子発現プロファイリングに先立ち、網羅的発現解析に適う組織採材法を検討した。

第1章では、組織採材法の検討のため、ラット全脳をメタカーン固定後、特定脳部位を採取し、抽出した total RNA 及びポリペプチドの品質及び発現データの忠実性を評価した。その結果、メタカーン固定組織は網羅的発現解析に十分な total RNA 及びポリペプチドの高い品質を保持した。マイクロアレイにおける遺伝子発現量の個体間のばらつきは小さく、二次元電気泳動におけるポリペプチドの発現量は未固定組織と同等であり、ポリペプチドのメタカーン液への溶出性は非常に低かった。以上の結果より、メタカーン全脳固定を利用した本採材法は、遺伝子及びたんぱく質の網羅的発現解析に有用であることが明らかになった。

第2章では、神経毒性物質としてグリシドールを選択し、妊娠ラットに暴露し、成熟動物(母動物)における神経障害性と発達期の海馬ニューロン新生への影響を検索した。子動物の SGZ における

顆粒細胞系譜の分布、細胞増殖及びアポトーシスならびに歯状回門の介在ニューロン分布を免疫組織化学的に検索し、帯状回、脳梁、海馬歯状回及び小脳皮質における網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、母動物に歩行異常がみられ、中枢及び末梢神経系での軸索障害を見出した。子動物では、軸索、神経突起及び髄鞘の形成ならびにシナプス伝達関連遺伝子の発現量変動が各脳部位で確認され、神経回路の可塑性への影響が示唆された。一方、SGZで dihydropyrimidinase-like 3 (TUC-4) 陽性未熟顆粒細胞の可逆的な減少が見出された。また、歯状回門では calretinin 陽性または未熟な reelin 陽性の γ -aminobutyric acid (GABA) 性介在ニューロンの増加が成熟後までみられ、継続したニューロン新生や移動異常を反映した変化と示唆された。以上より、グリシドールは成熟動物での軸索障害と共通した機序により、未熟顆粒細胞の新生神経末端を標的としたニューロン新生の後期過程の障害を誘発することが推察された。

第3章では、5週齢の雄ラットにグリシドールを28日間反復投与し、SGZにおけるニューロン新生影響の検出可能性を検討した。第2章と同様に海馬歯状回の免疫組織化学的検索を行った。また、脳部位特異的な網羅的遺伝子発現解析を行い、変動のみられた分子の発現分布を免疫組織化学的に解析した。その結果、中枢及び末梢神経系で軸索障害を誘発し、網羅的発現解析によって軸索及びシナプス機能関連遺伝子の発現量変動が各脳部位で確認され、その多くで減少を示した。また、発現量の減少がみられた前初期遺伝子にコードされる Arc, Fos 及び Jun を発現するニューロンが帯状回、小脳皮質及び海馬歯状回で減少した。これらの変動はグリシドール暴露への反応として、神経可塑性の抑制を示唆するものと考えられた。一方、SGZでの doublecortin 及び TUC-4 陽性である type-3 前駆細胞から未熟顆粒細胞の減少で示されるニューロン新生後期過程の障害ならびに reelin 及び calretinin 陽性 GABA 性介在ニューロンの増加が見出された。

以上、メタカーンを用いた全脳固定法は、げっ歯類を用いた脳部位特異的な発現解析に有用であると判断された。この新規組織採材法により、発達期及び成熟動物におけるグリシドールの神経毒性機序を反映する標的遺伝子プロファイルが得られた。発達期暴露によって、グリシドールはニューロン新生後期過程における発達中の神経突起に対して、成熟したニューロンの軸索と共通の標的を持つことが推測され、ニューロン新生が発達神経毒性物質の標的となること、また成熟動物の神経に対する毒性物質がニューロン新生に影響を及ぼすことが示唆された。また、28日間毒性試験において SGZ での神経突起形成時期を標的としたニューロン新生後期の障害が発達期暴露試験と同様に検出された。以上より、神経発達指標を利用した本解析手法は、28日間毒性試験の枠組みでの成熟及び発達期神経毒性物質の簡便な検出に有用な手段となることが期待される。

審査結果の要旨

本研究では特定脳部位の網羅的遺伝子発現プロファイリング及び海馬のニューロン新生障害性の分子指標を基盤とした解析を通じ、神経発達障害の観点からのラットを用いた新規神経毒性評価手法の確立を目指した。

第1章では、特定脳部位での発現プロファイリングに先立ち、網羅的発現解析に適う組織採材法を検討した。その結果、メタカーン全脳固定を組み合わせた採材法により、total RNA 及びポリペプチドの品質、それらのマイクロアレイ及び二次元電気泳動における発現量の忠実性は高く保持されることが明らかとなった。以上より、本採材法は遺伝子及びたんぱく質の網羅的発現解析に有用であると判断された。

第2章では、グリシドールのラットを用いた発達期暴露実験を行った。その結果、母動物の中枢及び末梢神経系での軸索障害を見出した。一方、子動物での遺伝子発現プロファイリングにより神経回路の可塑性への影響が示唆され、海馬歯状回で未熟顆粒細胞の可逆的な減少を見出した。以上より、グリシドールは成熟動物での軸索障害と共通した機序により、未熟顆粒細胞の新生神経末端を標的としたニューロン新生の後期過程の障害を誘発す

ることが推察された。

第3章では、グリシドールの成熟動物への28日間投与実験を行った。その結果、各脳部位で軸索及びシナプス機能関連遺伝子の発現量が減少し、さらに帯状回、小脳皮質または海馬歯状回で前初期遺伝子にコードされる Arc, Fos 及び Jun を発現するニューロンの減少を見出し、これらの結果は神経可塑性の抑制を示唆するものと考えられた。また、海馬歯状回での神経突起形成時期を標的としたニューロン新生後期の障害が発達期暴露時と同様に検出された。

以上より、メタカーン全脳固定を組み合わせた脳組織の採材法は、げっ歯類を用いた脳部位特異的な発現解析に有用と判断され、本法を用いてグリシドール暴露による発達期及び成熟動物での遺伝子発現プロファイルが獲得された。また発達期暴露及び28日間投与試験を通して、神経毒性物質による成熟動物及び発達期のニューロン新生に対する同様の影響を検出したことより、神経発達指標を利用した本解析手法は28日間毒性試験の枠組みでの成熟及び発達期神経毒性物質の簡便な検出に有用な手段となることが期待される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Methacarn as a whole brain fixative for gene and protein expression analyses of specific brain regions in rats
著 者 名 : Akane, H., Saito, F., Yamanaka, H., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Morita, R., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 38 (3) : 431-443, 2013
- 2) 題 目 : Glycidol induces axonopathy by adult-stage exposure and aberration of hippocampal neurogenesis affecting late-stage differentiation by developmental exposure in rats
著 者 名 : Akane, H., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Itahashi, M., Ohishi, T., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 134 (1) : 140-154, 2013
- 3) 題 目 : Glycidol induces axonopathy and aberrations of hippocampal neurogenesis affecting late-stage differentiation by exposure to rats in a framework of 28-day toxicity study
著 者 名 : Akane, H., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Itahashi, M., Abe, H. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicology Letters
巻・号・頁・発行年 : 224 (3) : 424-432, 2014
- 4) 題 目 : Gene expression profile of brain regions reflecting aberrations in nervous system development targeting the process of neurite extension of rat offspring exposed developmentally to glycidol
著 者 名 : Akane, H., Saito, F., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Itahashi, M., Wang, L. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Journal of Applied Toxicology
巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Adolescent hyperactivity of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation periods in rats
著 者 名 : Ohishi, T., Wang, L., Akane, H., Shiraki, A., Sato, A., Uematsu, M., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 37 (2) : 345-352, 2012
- 2) 題 目 : Reversible aberration of neurogenesis targeting late-stage progenitor cells in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to acrylamide
著 者 名 : Ogawa, B., Wang, L., Ohishi, T., Taniai, E., Akane, H., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 86 (5) : 779-790, 2012
- 3) 題 目 : Developmental exposure to manganese chloride induces sustained aberration of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of mice
著 者 名 : Wang, L., Ohishi, T., Shiraki, A., Morita, R., Akane, H., Ikarashi, Y., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 127 (2) : 508-521, 2012
- 4) 題 目 : Twenty-six-week oral toxicity of diheptyl phthalate with special emphasis on its induction of liver proliferative lesions in male F344 rats
著 者 名 : Nakane, F., Kunieda, M., Shimizu, S., Kobayashi, Y., Akane, H., Akie, Y., Saito, A., Noguchi, M., Kadota, T. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 37 (3) : 527-537, 2012
- 5) 題 目 : Cellular distribution of cell cycle-related molecules in the renal tubules of rats treated with renal carcinogens for 28 days:relationship between cell cycle aberration and carcinogenesis
著 者 名 : Taniai, E., Hayashi, H., Yafune, A., Watanabe, M., Akane, H., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 86 (9) : 1453-1464, 2012
- 6) 題 目 : Similar distribution changes of GABAergic interneuron subpopulations in contrast to the different impact on neurogenesis between developmental and adult-stage hypothyroidism in the hippocampal dentate gyrus in rats
著 者 名 : Shiraki, A., Akane, H., Ohishi, T., Wang, L., Morita, R., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 86 (10) : 1559-1569, 2012

- 7) 題 目 : Reversible aberration of neurogenesis affecting late-stage differentiation in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to manganese chloride
著 者 名 : Ohishi, T., Wang, L., Akane, H., Shiraki, A., Goto, K., Ikarashi, Y., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 34 (3) : 408-419, 2012
- 8) 題 目 : Reversible effect of maternal exposure to chlorpyrifos on the intermediate granular cell progenitors in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring
著 者 名 : Ohishi, T., Wang, L., Akane, H., Itahashi, M., Nakamura, D., Yafune, A., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 35 : 125-136, 2013
- 9) 題 目 : Increased cellular distribution of vimentin and ret in the cingulum of rat offspring after developmental exposure to decabromodiphenyl ether or 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane
著 者 名 : Fujimoto, H., Woo, G-H., Morita, R., Itahashi, M., Akane, H., Nishikawa, A. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 26 (2) : 119-129, 2013
- 10) 題 目 : Liver tumor promoting effect of orphenadrine in rats and its possible mechanism of action including CAR activation and oxidative stress
著 者 名 : Morita, R., Yafune, A., Shiraki, A., Itahashi, M., Ishii, Y., Akane, H., Nakane, F., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 38 (3) : 403-413, 2013
- 11) 題 目 : Enhanced liver tumor promotion activity in rats subjected to combined administration of phenobarbital and orphenadrine
著 者 名 : Morita, R., Yafune, A., Shiraki, A., Itahashi, M., Akane, H., Nakane, F., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 38 (3) : 415-424, 2013
- 12) 題 目 : Reversible effect of developmental exposure to chlorpyrifos on late-stage neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus in mouse offspring
著 者 名 : Wang, L., Ohishi, T., Akane, H., Shiraki, A., Itahashi, M., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 38 : 25-36, 2013
- 13) 題 目 : Suppressive effect of liver tumor-promoting activities in rats subjected to combined administration of phenobarbital and piperonyl butoxide
著 者 名 : Morita, R., Yafune, A., Shiraki, A., Itahashi, M., Akane, H., Nakane, F., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.

學術雜誌名 : The Journal of Toxicological Sciences

卷・号・頁・発行年 : 38 (5) : 679-688, 2013

14) 題 目 : Aberration in epigenetic gene regulation in hippocampal
neurogenesis by developmental exposure to manganese chloride in
mice

著 者 名 : Wang, L., Shiraki, A., Itahashi, M., Akane, H., Abe, H., Mitsumori,
K. and Shibutani, M.

學術雜誌名 : Toxicological Sciences

卷・号・頁・発行年 : 136 (1) : 154-165, 2013