

氏名（本（国）籍）	板 橋 恵（石川県）
主指導教員氏名	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	獣医博甲第437号
学位授与年月日	平成27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	ニューロン新生を指標とした脳発達リスク評価法の確立に関する研究
審査委員	主査 東京農工大学 教授 下田 実 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 渋谷 淳 副査 岐阜大学 教授 柳井 徳磨 副査 岐阜大学 教授 西川 秋佳

学位論文の内容の要旨

化学物質の暴露による乳幼児健康影響として懸念される神経毒性は発生機序を含めて不明な点が多く、現行の神経発生毒性試験ガイドラインでは発達神経毒性の病理発生に関連した評価方法が定まっていない。本研究では、神経発生毒性評価のエンドポイントのひとつとして、海馬歯状回に生じるニューロン新生に着目した発達神経毒性評価の体系化を図ることを目的とし、ニューロン新生の異なる過程を傷害する物質に対する顆粒細胞系譜の標的性と γ -aminobutyric acid (GABA) 性介在ニューロンの反応性を検討した。

第1章では、増殖細胞に対して選択的な殺作用を示すアルキル化剤であるメチルニトロソ尿素 (MNU) をラットに対して胎齢後期の一時期（胎齢 18–20 日）に、0, 1, 3 mg/kg 体重の割合で暴露した。その結果、germinal matrix における TUNEL 陽性アポトーシス数が MNU の高用量群で増加した。生後 21 日目の児動物の顆粒細胞層下帯 (subgranular zone, SGZ) では、高用量群で顆粒細胞系譜の後期に存在する doublecortin (Dcx) 陽性細胞と proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性増殖細胞の数が減少した。また生後 3 日目に bromodeoxyuridine (BrdU) を投与し、生後 21 日目に BrdU 陽性細胞の分布を検討した結果、MNU 暴露により BrdU 陽性細胞のうち Dcx 陽性にとどまる細胞が顆粒細胞層で増加した。海馬歯状回門では calbindin 陽性介在ニューロン数が増加した。生後 77 日目には SGZ で Dcx 陽性細胞数の変動は消失したが、PCNA 陽性増殖細胞数が増加した。以上より、胎齢後期の一時期での MNU 暴露は、投与時においてニューロン前駆細胞のアポトーシス及び細胞周期の休止に基づくニューロン新生の遅延を誘発し、離乳時に見出された type-3 前駆細胞や未熟顆粒細胞の減少と細胞増殖性の可逆的な減少はそれらを反映した現象であることが示唆された。離乳時の海馬歯状回門での calbindin 陽性介在ニューロンや生後 77 日目の SGZ での細胞増殖活性の増加は、MNU に誘発されたニューロン新生傷害に対する代償性変化であると考えられた。影響が可逆的なことから、MNU は神経幹細胞ではなく高い

増殖活性を持つ前駆細胞を標的とする可能性が考えられた。

第2章では、軸索近位端傷害物質であるイミノジプロピオニトリル(IDPN)について、ラットを用いた妊娠期・授乳期暴露(胎齢6日目から生後21日目)を0, 67, 200 ppmの割合で飲水に混じて行った。その結果、IDPN暴露によるSGZでの顆粒細胞系譜の細胞数に変動は認められなかったが、歯状回門では、高用量群でparvalbumin陽性介在ニューロンとreelin陽性介在ニューロン、リン酸化TrkB陽性ニューロンが減少した。顆粒細胞層においては、低用量群、高用量群共にニューロンの活動に依存した神経可塑性の維持に機能する前初期遺伝子であるArcとc-Fosの発現細胞が増加した。さらに、高用量群で介在ニューロンの成長因子であるBdnfとreelinの受容体であるVldlのmRNAが発現減少した。高用量群の歯状回門においてシナプス小胞蛋白であるsynaptophysinの染色強度に変化は認められなかったが、苔状細胞や錐体細胞のシナプス形成部位である歯状回分子層やCA3の放線状層では、軸索を構成する中間径フィラメントであるneurofilamentのheavy polypeptideの免疫染色強度が減少した。観察された変動は生後77日目にすべて消失した。これらの結果より、IDPNの発達期暴露は顆粒細胞系譜の分化後期の細胞を標的とし、これらの細胞に可逆的な神経可塑性の抑制を誘発し、それがBDNFの発現減少を導いたものと考えられた。これによりparvalbumin陽性介在ニューロンやreelin陽性介在ニューロン数の減少、さらには苔状細胞やCA3の錐体細胞の軸索可塑性の抑制を引き起こしたものと考えられた。

第3章では、げっ歯類の中樞や末梢神経にミエリン空胞化を誘発することが知られているヘキサクロロフェン(HCP)のラットを用いた妊娠期・授乳期暴露(胎齢6日目から生後21日目)を0, 100, 300 ppmの割合で飼料に混じて行った。児動物では生後21日に300 ppm群のみでコリン作動性神経路である海馬采を含む中樞神経の中程度～重度に及ぶミエリン空胞化を認めた。この群ではさらにSGZでT box brain 2陽性細胞が可逆的に減少し、アポトーシスが増加した。歯状回門ではcholinergic receptor, nicotinic, polypeptide beta 2(Chrn2)陽性細胞数が減少し、Chrn2およびB-cell CLL/lymphoma 2(Bcl2)のmRNAの発現も減少した。生後77日には海馬采のほとんどのミエリン空胞化は軽減しており、それ以外の変化は全て回復した。これらの結果により、発達期のHCP暴露により、児動物の海馬SGZにおいてミトコンドリア経路を介したアポトーシスによるtype-2b陽性中間前駆細胞の可逆的な減少を誘発する可能性を見出した。更に、このニューロン新生傷害は中隔海馬経路の重度なミエリン空胞化に起因したコリン作動性ニューロンのGABA性介在ニューロンに対する入力破綻が原因である可能性が見出された。

以上より、異なる神経毒性標的性を示す神経毒性物質を用いて母動物を介する発達期暴露を行い、SGZにおける顆粒細胞系譜の分布、増殖およびアポトーシスならびに海馬歯状回におけるGABA性介在ニューロンの分布を検索した結果、各毒性物質の標的細胞が児動物のニューロン新生の形成過程にも存在することが見出された。今回の検討により、海馬歯状回の顆粒細胞系譜や歯状回門の介在ニューロンは、異なる機序の神経毒性物質を広くカバーし、それらの発達神経毒性を見出す上で感度の高い有用な解析対象であることを見出した。また今回用いたニューロン新生評価手法は病理発生を基盤とした解析であり、小規模で実際的な高精度評価系の確立に有用な解析手段となり得ることが期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、神経発生毒性評価のエンドポイントのひとつとして、海馬歯状回に生じるニューロン新生に着目した発達神経毒性評価の体系化を図ることを目的とし、ニューロン新生の異なる過程を傷害する物質に対する顆粒細胞系譜の標的性とγ-aminobutyric acid

(GABA) 性介在ニューロンの反応性を検討した。

学位論文の第 1 章では、増殖細胞に対して選択的な殺作用を示すアルキル化剤であるメチルニトロソ尿素 (MNU) をラットに対して胎齢後期の一時期に暴露した。その結果、胎齢後期での MNU 暴露は、投与時においてニューロン前駆細胞のアポトーシス及び細胞周期の休止に基づくニューロン新生の遅延を誘発し、離乳時に見出された type-3 前駆細胞や未分化顆粒細胞の減少及び細胞増殖性の可逆的な減少はそれらを反映した可能性を見出した。離乳時の海馬歯状回門での calbindin 陽性の介在ニューロンの増加や生後 77 日目の顆粒細胞層下帯 (SGZ) での細胞増殖増加も見出し、MNU に誘発されたニューロン新生傷害に対する代償性変化であることを示唆した。影響が可逆的なことから、MNU は神経幹細胞ではなく高い増殖活性を持つ前駆細胞を標的とする可能性を示した。

学位論文の第 2 章では、軸索近位端傷害物質であるイミノジプロピオニトリル (IDPN) について、ラットを用いた妊娠期・授乳期暴露実験を行った。その結果、IDPN の発達期暴露は顆粒細胞系譜の分化後期の細胞を標的とし、これらの細胞に可逆的な神経可塑性の抑制により BDNF の下方制御を引き起こしたと考えられた。このような変化が、同時に見出された parvalbumin 陽性細胞あるいは reelin 陽性細胞数の減少、さらには苔状細胞や CA3 錐体細胞における軸索可塑性の抑制を引き起こしたものと結論づけた。

学位論文の第 3 章では、げっ歯類の中樞や末梢神経にミエリン空胞化を誘発するヘキサクロロフェン (HCP) のラットを用いた妊娠期・授乳期暴露実験を行った。その結果、児動物の海馬 SGZ において type-2b 陽性中間前駆細胞の可逆的な減少を見出し、それはミトコンドリア経路を介したアポトーシスによる可能性を見出した。更に、このようなニューロン新生の傷害は中隔海馬経路の重度なミエリン空胞化に関係したコリン作動性ニューロンの GABA 性介在ニューロンに対する入力破綻が原因であることを見出した。

以上より、海馬歯状回の顆粒細胞層系譜や歯状回門の介在ニューロンは、異なる機序の神経毒性物質を広くカバーし、それらの発達神経毒性を見出す上で感度の高い有用な解析対象であることを見出した。また今回用いたニューロン新生評価手法は病理発生を基盤とした解析であり、小規模で実際的な高精度評価系の確立に有用な解析手段となり得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 : *N-Methyl-N-nitrosourea during late gestation results in concomitant but reversible progenitor cell reduction and delayed neurogenesis in the hippocampus of rats*

著 者 名 : Itahashi, M., Wang, L., Shiraki, A., Abe, H., Tanaka, T., Murakami, T., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicology Letters

巻・号・頁・発行年 : 226 (3) : 285-293, 2014

- 2) 題 目 : *Maternal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile targets late-stage differentiation of hippocampal granule cell lineages to affect brain-derived neurotrophic factor signaling and interneuron subpopulations in rat offspring*

著 者 名 : Itahashi, M., Abe, H., Tanaka, T., Mizukami, S., Kikuchi, Y., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Journal of Applied Toxicology

巻・号・頁・発行年 : In press

- 3) 題 目 : Maternal exposure to hexachlorophene targets intermediate-stage progenitor cells of the hippocampal neurogenesis in rat offspring via dysfunction of cholinergic inputs by myelin vacuolation
著 者 名 : Itahashi, M., Abe, H., Tanaka, T., Mizukami, S., Kimura, M., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 328C : 123-134, 2015

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Aberrant activation of ubiquitin D at G₂ phase and apoptosis by carcinogens that evoke cell proliferation after 28-day administration in rats
著 者 名 : Taniai, E., Yafune, A., Hayashi, H., Itahashi, M., Hara-Kudo, Y., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Science
巻・号・頁・発行年 : 37 (6) : 1093-1111, 2012
- 2) 題 目 : Induction of ovarian toxicity in a subchronic oral toxicity study of citrinin in female BALB/c mice
著 者 名 : Hayashi, H., Itahashi, M., Taniai, E., Yafune, A., Sugita-Konishi, Y., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Science
巻・号・頁・発行年 : 37 (6) : 1177-1190, 2012
- 3) 題 目 : Reversible effect of maternal exposure to chlorpyrifos on the intermediate granule 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
巻・号・頁・発行年 : 35 : 125-136, 2013
- 4) 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
巻・号・頁・発行年 : 38 : 25-36, 2013
- 5) 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

- 6) 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
巻・号・頁・発行年 : 38 (3) : 403-413, 2013
- 7) 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
巻・号・頁・発行年 : 38 (3) : 415-424, 2013
- 8) 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
巻・号・頁・発行年 : 26 (2) : 119-129, 2013
- 9) 題 目 : Global DNA methylation screening of liver in piperonyl butoxide-treated mice in a two-stage hepatocarcinogenesis model
著 者 名 : Yafune, A., Kawai, M., Itahashi, M., Kimura, M., Nakane, F., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicology Letters
巻・号・頁・発行年 : 222 (3) : 295-302, 2013
- 10) 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.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 136 (1) : 154-165, 2013
- 11) 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.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 38 (5) : 679-688, 2013
- 12) 題 目 : Ochratoxin A induces karyomegaly and cell cycle aberrations in renal tubular cells without relation to induction of oxidative stress responses in rats

著 者 名 : Taniai, E., Yafune, A., Nakajima, M., Hayashi, S.M., Nakane, F., Itahashi, M.
and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicology Letters

巻・号・頁・発行年 : 224 (1) : 64-72, 2014

- 13) 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

- 14) 題 目 : Transient suppression of late-stage neuronal progenitor cell differentiation in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to nicotine

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

学術雑誌名 : Archives of Toxicology

巻・号・頁・発行年 : 88 (2) : 443-454, 2014

- 15) 題 目 : A non-joint tissue biphasic synovial sarcoma in a dog

著 者 名 : Takimoto, N., Suzuki, K., Ogawa, T., Segawa, R., Hara, S., Itahashi, M., Kimura, M., Iwasaki, N., Nishifuji, K. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Journal of Comparative Pathology

巻・号・頁・発行年 : 150 (2-3) : 204-207, 2014

- 16) 題 目 : Maternal single injection of *N*-methyl-*N*-nitrosourea to cause microcephaly in offspring induces transient aberration of hippocampal neurogenesis in mice

著 者 名 : Takimoto, N., Wang, L., Itahashi, M., Ogawa, T., Segawa, R., Hara, S., Murakami, T., Suzuki, K. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicology Letters

巻・号・頁・発行年 : 226 (1) : 20-27, 2014

- 17) 題 目 : Expression alterations of genes on both neuronal and glial development in rats after developmental exposure to 6-propyl-2-thiouracil

著 者 名 : Shiraki, A., Saito, F., Akane, H., Takeyoshi, M., Imatanaka, N., Itahashi, M., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicology Letters

巻・号・頁・発行年 : 228 (3) : 225-234, 2014

- 18) 題 目 : Downregulation of immediate-early genes linking to suppression of neuronal plasticity in rats after 28-day exposure to glycidol

著 者 名 : Akane, H., Saito, F., Shiraki, A., Takeyoshi, M., Imatanaka, N., Itahashi, M., Murakami, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicology and Applied Pharmacology

卷・号・頁・発行年 : 279 (2) : 150-162, 2014

19) 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

卷・号・頁・発行年 : 34 (12) : 1389-1399, 2014