

学 位 論 文 要 約

氏 名 白 木 彩 子

題 目 抗甲状腺剤を用いた一般毒性試験の枠組みでの発達神経毒性評価
指標の確立に関する研究

胎児期および小児期は、化学物質に対する曝露状況や感受性が異なることから、農薬や一部の化学物質で発達神経毒性試験が実施されている。しかし、発達期神経毒性試験の現行のガイドライン (OECD TG426, US EPA OPPTS 870.6300) では、1物質の評価に多くの時間と動物を必要とするため、より効率的な評価システムの構築が求められている。海馬歯状回の顆粒細胞層下帯 (SGZ) では、生後に始まり、成熟後も生涯にわたり続くニューロン新生が行われており、その過程で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現象が生じている。そのため、SGZにおけるニューロン新生は様々な毒性機序の神経毒性物質の標的となる可能性に加え、成熟動物への発達神経毒性物質の曝露によっても障害を受ける可能性がある。マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングは、疾患や化学物質の曝露による毒性発現の機序に関連する網羅的な情報、さらに毒性評価に適用できる細胞指標を獲得する手段となりうる。しかし、現状ではニューロン新生障害に関して、発達期・成熟期ともに網羅的な遺伝子発現解析を取り入れた研究がほとんどなされていない。また、甲状腺ホルモンは脳の発達や生後の機能に必要不可欠であり、ラットにおいて、発達期甲状腺機能低下による脳の発達障害が多数報告されている。そこで本研究は、神経発達を様々な機序で障害する抗甲状腺剤のプロピルチオウラシル (6-propyl-2-thiouracil: PTU) を用いてラット発達期曝露実験および28日間反復投与実験を行い、海馬歯状回におけるニューロン新生障害影響とともに、海馬歯状回を含む複数の脳部位での遺伝子発現プロファイルを比較し、成熟期動物を用いた一般毒性試験の枠組みでの発達神経毒性評価法を確立することを目標として網羅的な指標開発を行った。

第1章では、ラットに対し胎齢6日目から生後21日目の離乳時までPTUの0, 1, 3, 10 ppmの濃度での母動物への飲水投与による発達期曝露実験を行い、離乳時及び成熟時でのSGZにおけるニューロン新生に与える影響を検討した。その結果、生後21日目の雄子動物において、10 ppm群でglial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性のtype-1幹細胞、3 ppm以上群でpaired box 6 (PAX6) 陽性のtype-1からtype-2前駆細胞およびdoublecortin (DCX) 陽性のtype-2bから未熟顆粒細胞が減少した。さらに歯状回門における γ -aminobutyric acid (GABA) 性介在ニューロンに関して、10 ppm群でsomatostatin (SST) 陽性細胞、3 ppm以上群でreelin (RELN) およびcalbindin-D-29K (CALB2) が増加、parvalbumin (PVALB) 陽性細胞が減少した。PAX6陽性細胞数の減少およびCALB2, SST陽性細胞数の増加は生後77日目でも持続していた。これらの結果より、PTUのラット発達期曝露がSGZにおける分化初期段階からの不可逆的なニューロン新生障害を誘発することが推察された。

第2章では、成熟期動物の海馬歯状回におけるニューロン新生障害の検出性を検討する目的で、生後5週齢のラットに対するPTUの0, 0.1 および10 mg/kgの経口用量での28日間反復投与を行い、海馬歯状回におけるニューロン新生に与える影響を検討した。その結果、SGZにおいて10 mg/kg群でDCX陽性細胞数が減少し、歯状回門において10 mg/kg群でRELN陽性細胞数、0.1 および10 mg/kg群でSST陽性細胞数が増加した。これらの結

果より、発達期曝露と比べると影響は小さかったものの、成熟期動物への曝露によっても海馬歯状回 SGZ におけるニューロン新生が障害を受け、顆粒細胞系譜および GABA 性介在ニューロンの指標を用いた免疫組織化学染色により、障害を検出できる可能性が示された。

第 3 章では、発達神経毒性の病理学的メカニズムを反映する標的遺伝子プロファイルを特定する目的で、PTU の発達期曝露実験および 28 日間反復投与実験で得られた脳サンプルを用い、構造や機能の異なる海馬歯状回、大脳皮質、脳梁、小脳の 4 部位について、マイクロアレイによる脳部位特異的な網羅的遺伝子発現解析を行った。脳部位ごと、および曝露時期ごとの遺伝子発現プロファイルの比較により、発達神経毒性を鋭敏に反映する脳部位および、障害指標候補遺伝子の獲得を目指した。その結果、発達期曝露では検索した全ての脳部位で神経の発達や分化、細胞移動、シナプスの機能および軸索形成に対する障害を示唆する遺伝子群が変動した。特に、エフリンシグナリング系や GABA 性介在ニューロン指標の遺伝子は複数の部位で共通して変動した。また、ミエリン形成障害やグリアの発達障害を示唆する遺伝子群が、脳梁および大脳皮質に限局して変動した。一方、28 日間反復投与では、エフリンシグナリング系を含む神経発達に関わる遺伝子群は海馬歯状回と大脳皮質、ミエリン形成に関わる遺伝子群は海馬歯状回で発現変動を示し、特に発達期曝露と共通の変動遺伝子は海馬歯状回で多く認められた。これらの結果より、甲状腺機能低下による障害標的候補遺伝子として、ニューロンの移動や分化に関わる *Eph family gene* や *Robo3*, GABA 性介在ニューロン指標の *Reln*, *Pvalb* および *Calb2*, ミエリン形成に関わる *Mbp* および *Plp1*, グリア発達に関わる *Vim*, *Gfap* および *Ret* を獲得した。また、28 日間反復投与試験の枠組みで遺伝子発現により発達神経毒性を評価する上では、海馬歯状回の感受性が高いことが示唆された。

第 4 章では、第 3 章で得られた発達神経毒性を反映する遺伝子発現プロファイルから、免疫組織化学的解析により簡便に評価可能な障害指標分子の探索を行った。その結果、発達期曝露実験の雄子動物において、シナプスの可塑性に関わる分子としては、3 ppm 以上群で海馬歯状回の cyclooxygenase-2 および Eph receptor A4 (EPHA4) 陽性顆粒細胞数、10 ppm 群で activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC) 陽性顆粒細胞数が減少した。生後 77 日齢では、EPHA4 および ARC 陽性顆粒細胞数は増加した。EPHA4 陽性ニューロンは、生後 21 日目および 77 日目の大脳皮質でも 3 ppm 以上群で減少した。また、GABA 性介在ニューロン指標について、生後 21 日目の大脳皮質で、10 ppm 群で RELN および CALB2 陽性細胞数が増加し、3 ppm 以上群で PVALB および NPY 陽性細胞数が減少した。小脳においても、10 ppm 群で RELN および SST 陽性細胞数が増加し、3 ppm 以上群で PVALB 陽性細胞数が減少した。これらの変動の多くは生後 77 日目でも持続していた。ミエリン形成関連分子としては、生後 21 日目の 3 ppm 以上群で、脳梁および大脳皮質における myelin basic protein の染色性が低下した。グリア発達関連分子としては、生後 21 日目の脳梁において、1 ppm 以上群で vimentin, 10 ppm 群で GFAP 陽性の未熟なアストロサイトが増加し、1 ppm 以上群で oligodendrocyte transcription factor 2 陽性グリア細胞が減少した。しかし、28 日間反復投与実験においては、これらの分子はいずれも免疫染色による差は見出せなかった。これらの結果より、発達期曝露実験では、シナプス可塑性、GABA 性介在ニューロン、ミエリン形成およびグリア発達に対する障害性について、免疫組織化学的解析により評価可能な分子を見出したものの、海馬歯状回のニューロン新生障害に関連した GABA 性介在ニューロンの変動以外、成熟動物への曝露による障害性を評価する上では有用でないと考えられた。

以上より、一般毒性試験の枠組みで発達神経毒性を評価するにあたっては、海馬歯状回が評価部位として高感受性であることが網羅的な遺伝子発現解析から示唆された。さらに、SGZ における顆粒細胞系譜および歯状回門における GABA 性介在ニューロン指標の免疫

組織化学的解析により,ニューロン新生に対する影響が評価可能であることが示唆された。また,発達神経毒性実験によって,網羅的遺伝子発現解析よりシナプス可塑性,ミエリン形成およびグリア発達障害の指標候補分子が得られ,これらの分子の免疫組織化学的評価が現行の試験の精度向上に貢献できることが期待される。さらに,GABA性介在ニューロン指標が複数の脳部位で発達神経毒性物質の不可逆的な影響を評価する上で有用であることが示唆された。

学 位 論 文 要 約

氏 名 SHIRAKI, Ayako

題 目 Studies on the Development of Developmental Neurotoxicity Markers
in the Framework of General Toxicity Study Using Anti-thyroid
Agents

(抗甲状腺剤を用いた一般毒性試験の枠組みでの発達神経毒性
指標の確立に関する研究)

Developmental neurotoxicity testing is a field that is in need of a rapid screening system because testing one chemical with the current guidelines, i.e., OECD Test Guideline 426 and US EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.6300, is time consuming and requires hundreds of animals to conduct one study. Therefore, more efficient screening system is necessary to be established. In the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus, adult neurogenesis of granular cells starts postnatally and continues throughout life. The process of the hippocampal neurogenesis consists of self-renewal of stem cells and production of progenitor cells, proliferation and differentiation of progenitor cells, and maturation involving neurogenesis and synaptogenesis of granule cell lineages. Therefore, hippocampal neurogenesis is a possible target of many neurotoxicants targeting these processes by both developmental and adult-stage exposure. On the other hand, gene expression profiling using microarrays provides global view of tissue-specific changes on the mechanisms underlying diseases or toxicity following chemical exposure and also offers opportunity to obtain new cellular markers applicable for toxicity testing. However, there have been only a few studies dealing with neurotoxic changes in the adult neurogenesis employing global gene expression profiling tool at both developmental and adult stages.

Thyroid hormones are crucial for both normal brain development and adult brain function. In rat developmental hypothyroidism model, aberrant brain growth and impairment in brain structures and functions involving both neuronal and glial differentiation have been reported. The present study was undertaken to establish an efficient system to detect developmental neurotoxicity in the framework of a 28-day regular toxicity study using rat hypothyroidism models. To this end, I used propylthiouracil (PTU), an anti-thyroid agent, to induce hypothyroidism and compared the pattern in the aberration in neurogenesis in the hippocampal SGZ and the gene expression profiles in multiple brain regions including the dentate gyrus between the developmental and adult-stage hypothyroidism.

In chapter 1, I investigated the effect of developmental hypothyroidism on the hippocampal neurogenesis at the weaning and adult stage. Pregnant rats were given drinking water containing PTU at 0 (control), 1, 3, and 10 ppm from gestational day 6 until weaning on postnatal day (PND) 21. For examination of developmental neurotoxicity, I analyzed the distribution of granule cell lineages in the SGZ and γ -aminobutyric acid (GABA)ergic interneurons in the hilus of the hippocampal dentate gyrus in offspring on PND 21 and PND 77. On PND 21, there were fewer glial fibrillary acidic protein (GFAP)⁺ type-1 stem cells, paired box 6 (PAX6)⁺ type-1 to type-2 progenitor cells, and doublecortin (DCX)⁺ type-2b to immature granule cells in the SGZ at ≥ 3 or 10 ppm. Regarding GABAergic interneuron subpopulations, there were more reelin (RELN)⁺ cells

and calbindin-D-29K (CALB2)⁺ cells at ≥ 3 ppm and somatostatin (SST)⁺ cells at 10 ppm, and fewer parvalbumin (PVALB)⁺ cells at ≥ 3 ppm in the dentate hilus of offspring. Decrease in number of PAX6⁺ cells in the SGZ and increase in number of CALB2⁺ and SST⁺ cells were sustained until PND 77. These results suggested that developmental exposure to PTU induces irreversible impairment in hippocampal neurogenesis from the early stage of granule cell lineage.

In chapter 2, I investigated the effect of adult-stage hypothyroidism on the hippocampal neurogenesis in the framework of 28-day repeated oral dosing study. For this purpose, PTU was orally administered to 5-week-old male rats at 0, 0.1 and 10 mg/kg by gavage for 28 days. The distribution of granule cell lineages in the SGZ and GABAergic interneurons in the hilus of the hippocampal dentate gyrus were analyzed. As a result, there were fewer DCX⁺ cells in the SGZ, but more RELN⁺ and SST⁺ cells in the dentate hilus at 10 mg/kg. These results suggested that hippocampal neurogenesis is sensitive to adult-onset hypothyroidism and may be useful for detection of developmental neurotoxicity in the framework of 28-day repeated dosing study.

In chapter 3, brain region-specific global gene expression profiling was performed to obtain target gene profile related to pathological mechanisms of developmental neurotoxicity. Brain samples were those obtained in chapters 1 and 2, and four brain regions were selected to cover cerebral and cerebellar tissues, i.e., the parietal cortex (cerebral cortex), corpus callosum, hippocampal dentate gyrus and cerebellar vermis. As a result, developmental PTU exposure caused gene expression alterations related to neuronal development, cell migration, synaptic function and axonogenesis in all brain regions examined. Characteristically, gene expression profiles suggestive of affection of ephrin signaling and glutamate transmission were obtained in multiple brain regions. Gene clusters suggestive of suppression of myelination and glial development were specifically detected in the corpus callosum and cerebral cortex. On the other hand, adult-stage PTU exposure caused expression alterations in genes related to neural development in the cerebral cortex and hippocampal dentate gyrus, and in genes related to myelination in the hippocampal dentate gyrus. In the corpus callosum and cerebellar vermis, only a few gene populations in these gene clusters showed expression changes. From these results, genes related to neuronal development involving *Eph* family genes, *Robo3* and GABAergic interneuron markers, glial cell differentiation involving *Vim*, *Gfap* and *Ret*, and myelination involving *Mbp* and *Plp1*, were obtained as possible targets of hypothyroidism-induced developmental neurotoxicity. In addition, in the framework of 28-day repeated dosing study, hippocampal dentate gyrus was suggested to show high sensitivity to detect developmental neurotoxicity.

In chapter 4, I searched the sensitive immunohistochemical parameters of developmental neurotoxicity following developmental PTU-exposure, as well as those in the 28-day toxicity study of adult animals. Candidate target molecules were selected from gene expression profiles obtained in chapter 3. Regarding molecules related to synaptic plasticity, decrease in number of cyclooxygenase-2⁺ cells and Eph receptor A4 (EPHA4)⁺ cells at ≥ 3 ppm and activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC)⁺ cells at 10 ppm were observed in the hippocampal dentate gyrus of offspring on PND 21. On PND 77, number of EPHA4⁺ cells and ARC⁺ cells were increased at ≥ 3 ppm and 10 ppm, respectively. Number of EPHA4⁺ cells was also decreased in the cerebral cortex of offspring on PND 21 and PND 77 at ≥ 3 ppm. Regarding GABAergic interneuron markers in developmental exposure study, increase in number of RELN⁺ cells and CALB2⁺ cells at 10 ppm and decrease in number of PVALB⁺ cells and NPY⁺ cells at ≥ 3 ppm were observed in the cerebral cortex of offspring on PND 21. Increase in number of RELN⁺ cells and SST⁺ cells at 10 ppm and decrease in number of PVALB⁺ cells at ≥ 3 ppm were also observed in the cerebellum. Most of these distribution changes of GABAergic interneuron subpopulations

observed in the cerebral cortex and cerebellum were sustained on PND 77. Regarding molecules related to myelination, immunoreactive intensity of myelin basic protein was decreased in the corpus callosum and cerebral cortex of offspring on PND 21 at ≥ 3 ppm. Regarding molecules related to glial cell development, immature astrocytes immunoreactive for vimentin at ≥ 1 ppm and GFAP at 10 ppm were increased, and oligodendrocytes immunoreactive for oligodendrocyte lineage transcription factor 2 at ≥ 1 ppm were decreased in the corpus callosum of offspring on PND 21. On the other hand, distributions of these molecules were not changed in animals administrated PTU at adult-stage. In summary, sensitive immunohistochemical parameters suggestive of aberration in synaptic plasticity, GABAergic interneuron subpopulations, myelinations and glial cell development were obtained by developmental PTU exposure study, while these parameters were not sensitive for detecting developmental neurotoxicity in adult-stage exposure study, except for GABAergic interneuron subpopulations in association with hippocampal neurogenesis.

In the present study, results of global gene expression profiling after adult-stage PTU exposure study suggested the hippocampal dentate gyrus to be the most sensitive region for evaluation of developmental neurotoxicity in the framework of general toxicity study. In addition, immunohistochemistry against granule cell lineage at the SGZ and GABAergic interneuron markers in the hilus of hippocampal dentate gyrus were useful for evaluation of effects of developmental neurotoxicants on hippocampal neurogenesis after adult-stage exposure. On the other hand, in the developmental PTU exposure study, global gene expression profiling revealed candidate target molecules, which reflect affection of synaptic plasticity, myelination and glial cell development. Immunohistochemistry of these molecules may contribute to improve sensitivity of current developmental neurotoxicity testing. In addition, immunohistochemical analysis of GABAergic interneuron markers was suggested to be sensitive to evaluate irreversible effect of developmental neurotoxicants in the multiple brain regions.