

学 位 論 文 要 約

氏 名 阿部 一

題 目 脱髄誘発性機序に起因する神経発達障害に関する包括的な評価法の確立に関する研究

成熟動物に現れる神経毒性は、機能学的・神経病理学的な評価により検出可能である一方、多様な検査項目の総合評価が必要なことから、毒性判断が困難となる場合がある。また、発達神経毒性は未知な点が多く、ラットを用いた発達神経毒性試験ガイドライン（OECD TG426）でも、長期間かつ大規模な動物試験の実施が要求されるため、簡便かつ効率的な評価系の確立が求められている。発達期の脳では、神経幹細胞の自己複製、増殖及び分化に加えて、軸索伸長やシナプス形成、髄鞘形成などの成熟段階も含まれるため、脳の発達障害を生じさせる作用点が多数存在すると考えられる。また、これらの神経発達過程と成熟神経の生存・維持過程は共通の分子機序に従っている場合が多い。従って、成熟神経に対する神経毒性物質は、発達神経毒性を誘発する可能性が高い。生後に始ま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発達の全ての段階を包含しており、さらに成熟後もニューロン新生は継続するため、発達期と成熟期の両ステージで発達神経毒性物質あるいは成熟神経の毒性物質の標的となる可能性がある。また、マイクロアレイ解析に代表される遺伝子発現プロファイリング手法は、毒性発現に関連した分子の網羅的情報を獲得する手段として有効である。本研究では、神経細胞の髄鞘への標的性に焦点を当て、髄鞘毒性物質による発達神経毒性のプロファイルを明らかにし、免疫組織化学的解析ないし mRNA 発現解析による評価指標の確立を図る。また、一般毒性試験の枠組みで、髄鞘毒性に起因する発達神経毒性検出の可能性を探る。その目的で、髄鞘毒性物質として成熟動物への曝露により脱髄を誘発するクプリゾン（CPZ）を用いて、その発達期曝露による海馬歯状回でのニューロン新生過程に対する障害性、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検出の可能性についてニューロン新生をエンドポイントとして検討した。また、複数の脳部位での網羅的遺伝子発現解析による発達期での髄鞘形成障害及び成熟期での髄鞘傷害（脱髄）に関連した神経毒性の遺伝子発現プロファイルを構築し、得られた発現プロファイルを基に免疫組織化学的解析が可能な毒性指標分子の探索を行った。

第1章では、妊娠ラットに対する混餌による CPZ の妊娠期および離乳時までの授乳期曝露を行い、母動物の髄鞘傷害性及び子動物の髄鞘形成障害性と海馬ニューロン新生への影響評価を行った。その結果、最高用量の0.4%群の母動物で大脳帯状回及び小脳髄質に軽度の髄鞘空胞化が認められ、小脳髄質及び海馬歯状回門では IBA1 陽性小膠細胞及び GFAP 陽性星状膠細胞の集簇が認められた。子動物については明らかな髄鞘傷害性は観察されなかったが、小脳髄質の低形成及び海馬歯状回門における NG2 陽性希突起膠細胞前駆細胞数の減少が離乳時の生後21日目に0.4%群で認められた。子動物の SGZ における顆粒細胞系譜では、生後21日目の0.4%群で TBR2 陽性細胞数の減少と TUNEL 陽性アポトーシス数の増加が認められた。歯状回門では、0.4%群で reelin 陽性介在ニューロン数の増加とリン酸化 TRKB 陽性介在ニューロン数の減少が認められた。さらに同群では、顆粒細胞層においてニューロンの活動に依存したシナプス可塑性の維持に機能する前初期遺伝子である ARC

及び FOS 陽性細胞数が減少した。生後 21 日目の海馬歯状回における real-time RT-PCR を用いた mRNA の発現解析では, *Bdnf*, *Chrna7* の発現低下及び *Casp12*, *Bcl2l1l* の発現上昇が 0.4%群で認められた。これら生後 21 日目に認められた全ての変化は, 生後 77 日目には消失した。以上の結果より, CPZ の発達期曝露は SGZ の顆粒細胞系譜と歯状回門の介在ニューロンへのコリン作動性神経入力 of 減少を誘発し, これにより分化中期の前駆細胞の小胞体ストレス経路を介したアポトーシスが誘導されて type-2 前駆細胞の減少を引き起こすことが示された。この変化には, 顆粒細胞から分泌される BDNF の減少に伴う介在ニューロンの成長抑制とともに, 希突起膠細胞産生障害に伴う介在ニューロンの髄鞘機能維持の障害に引き続く神経伝達障害が影響していると考えられた。また, 顆粒細胞層における前初期遺伝子発現細胞の減少は, CPZ 曝露に対する反応としての神経可塑性の抑制を示唆し, これによりもたらされる新生ニューロンの移動異常に対して介在ニューロンでの *reelin* 産生が増加しているものと考えられた。

第 2 章では, 5 週齢の雄性 SD ラットに CPZ を 28 日間反復投与し, 一般毒性試験の枠組みでの髄鞘毒性物質による海馬歯状回におけるニューロン新生への影響評価の可能性を, 第 1 章と同様に免疫組織学的手法を用いることにより検討した。その結果, 発達期曝露実験で認められた変化に加えて, SGZ では DCX 陽性細胞数及び PCNA 陽性細胞数の減少と SOX2 陽性細胞数及び cleaved caspase3 陽性アポトーシス数の増加が用量相関的に認められた。さらに, 顆粒細胞層における NeuN 陽性細胞数及び CHRNA7 陽性細胞数の減少が認められた。一方, *reelin* 陽性介在ニューロン数には変化が認められなかった。海馬歯状回における real-time RT-PCR 解析においても発達期曝露と同様の結果が得られた。以上の結果より, CPZ の成熟動物への 28 日間反復投与により海馬におけるニューロン新生障害性を見出し, それは発達期曝露とほぼ同様の機序により引き起こされることが示された。これにより, 一般毒性試験の枠組みで髄鞘毒性物質によるニューロン新生障害が検出可能であることが見出された。

第 3 章では, 第 1, 2 章の脳サンプルを用いて, 脳部位特異的 (海馬, 脳梁, 大脳皮質及び小脳皮質) な網羅的遺伝子発現解析を行い, 各脳部位で得られた発現プロファイルを基に候補分子の発現分布を免疫組織化学的に解析し, 神経毒性及び発達期神経毒性の評価に有用な分子指標の同定を行った。その結果, 発達期曝露では軸索伸長, 神経突起, 髄鞘形成又はシナプス伝達関連遺伝子の発現変動が各脳部位で認められ, 特に大脳皮質特異的に髄鞘形成関連遺伝子群の発現が低下した。一方, 脳梁では希突起膠細胞の成熟を促進する *KI* 遺伝子の著しい発現上昇が認められた。免疫組織化学的には大脳皮質の深部領域における CNPase 陽性希突起膠細胞数の減少と脳梁での *KLOTHO* 陽性希突起膠細胞数の増加を検出し, CPZ 発達期曝露によるグリア新生への影響とこれに対する *KLOTHO* を介した保護反応が皮質と髄質とで異なる可能性が示唆された。さらに海馬歯状回では, 歯状回門における *GRIA1* 及び *GRIN2A* 陽性介在ニューロン数の減少と顆粒細胞層における *COX2* 陽性ニューロン数の減少を検出し, CPZ によるグルタミン酸作動性神経回路及び神経可塑性への影響が示唆された。28 日間曝露では, 髄鞘形成, 炎症反応, 免疫応答又はアポトーシス関連遺伝子群の発現変動が各脳部位で認められ, 免疫組織化学的に *CD68* 陽性小膠細胞及び *MT (I and II)* 陽性小膠細胞の増加または集簇を脳梁及び小脳髄質で検出し, CPZ による脱髄誘発機序には炎症反応の亢進が関与している可能性が示唆された。一方, 発達期曝露とは対照的に, 28 日間反復投与では脳梁における *KLOTHO* 陽性希突起膠細胞数の減少を見出し, *KLOTHO* を介した希突起膠細胞の成熟化の阻害が, 成熟動物における CPZ の脱髄誘発機序に関与している可能性が示唆された。

以上, CPZ のラット発達期曝露により, 海馬歯状回におけるニューロン新生障害性を見出し, 成熟動物に対する髄鞘毒性物質が発達神経毒性物質であることを明らかとした。ま

た、28日間反復投与試験においても髄鞘毒性物質による発達期曝露試験と同様のニューロン新生障害性を検出できることを明らかとした。さらに、網羅的遺伝子発現解析により発達神経毒性または髄鞘毒性を反映する標的遺伝子発現プロファイルを獲得した。これらの成果により、28日間反復投与試験の枠組みでの海馬歯状回を用いたニューロン新生の影響評価は髄鞘形成障害に起因する発達神経毒性の検出に有効であり、獲得した標的遺伝子発現プロファイルの利用は、髄鞘毒性機序及び髄鞘毒性物質に起因する発達神経毒性機序の解明に有用であると判断された。さらに、プロファイリングの結果得られた分子は、髄鞘毒性物質による発達神経毒性検出の有効な免疫組織化学的検出指標になるものと判断された。

学 位 論 文 要 約

氏 名 ABE, Hajime

題 目 Studies on Establishing a Novel Evaluation Method for Developmental Neurotoxicity through the Mechanism Giving Rise to Demyelination
(脱髄誘発性機序に起因する神経発達障害に関する包括的な評価法の確立に関する研究)

According to the current OECD test guidelines, developmental neurotoxicity studies are time consuming and require large numbers of animals to evaluate the toxicity of one chemical. Thus, a novel efficient screening system is necessary to be established. Neuron development consists of multistep processes, including a self-renewal of stem cells, proliferation, migration and differentiation of progenitor cells, and maturation involving neuritogenesis, synaptogenesis and myelinogenesis. Therefore, these developmental processes may be vulnerable to various types of adult neurotoxicants. In addition, these processes during neuronal development and those involved in neuronal survival and maintenance of mature neuron share similar common molecular mechanisms. Therefore, adult-type neurotoxicants are likely to induce developmental neurotoxicity. Of note, because neurogenesis in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus includes all stages of neuronal development, and continues throughout postnatal life, adult-type neurotoxicants may target hippocampal neurogenesis at both developmental and adult stages. Gene expression profiling using microarray analysis is effective method to obtain the molecular changes associated with the mechanisms underlying toxicity development following chemical exposure. In the present study, I focused on the myelinogenesis or myelin sheath maintenance of neurons as a target mechanism to affect developing nervous system for the purpose to establish suitable evaluation parameters of developmental neurotoxicity by means of immunohistochemical and gene expression analyses using rats. Furthermore, I searched the possibility for detection of developmental neurotoxicity induced by myelin toxicants in a framework of general toxicity study. For this purpose, I selected cuprizone (CPZ) as a demyelinating agent in rodents, and examined the developmental exposure effect on neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus using rats. Then, I investigated the possibility whether affection of neurogenesis can be detected in a framework of 28-day repeated dose toxicity study using postpubertal rats. Furthermore, I identified target gene profile for neurotoxicity in relation with disruption of myelinogenesis or myelin degeneration using comprehensive gene expression analysis in various brain regions, and examined availability of obtained molecules by means of immunohistochemical analysis.

In chapter 1, I selected cuprizone (CPZ) as a demyelinating agent in rodents, and examined its effect on developmental hippocampal neurogenesis in rat offspring using pregnant rats supplemented with 0 (controls), 0.1, or 0.4% CPZ in the diet from gestational day 6 to day 21 after delivery. As a result, 0.4% CPZ-exposed dams showed slight white matter vacuolation in the cingulum and medial cerebellar nucleus of the cerebellum. 0.4% CPZ-exposed dams also showed accumulation of Iba1⁺ microglia and GFAP⁺ astrocytes in the hippocampal dentate hilus and medial cerebellar nucleus of the cerebellum. Although offspring did not show white matter vacuolation in any brain region in any CPZ-exposed group on postnatal day (PND) 21, male offspring had a decreased density of NG2⁺ oligodendrocyte progenitor cells in the dentate hilus and in the area of the cerebellar medulla in the presence of 0.4% CPZ on PND 21. With regard to neurogenesis-related parameters, offspring had decreased TBR2⁺ progenitor cells and increased TUNEL⁺

apoptotic cells, which was accompanied by upregulation of *Casp12* and *Bcl2l1l* in the SGZ and increased reelin⁺ interneurons in the dentate hilus at 0.4% CPZ on PND 21. In addition, 0.4% CPZ caused decrease of p-TRKB⁺ interneurons in the dentate hilus, which was accompanied by downregulation of *Bdnf* and *Chrna7* in the dentate gyrus. Moreover, granule cell expressing gene products of immediate-early genes, i.e., *Arc* and *Fos*, were decreased at this dose. All changes observed in CPZ-exposed offspring on PND 21 disappeared on PND 77. These results suggest that developmental exposure to CPZ induces a decrease of cholinergic inputs to granule cell lineages and interneurons in the dentate gyrus and decreases the number of type-2 progenitor cells via endoplasmic reticulum-mediated apoptosis pathway in the SGZ. These changes might be due to growth suppression of interneurons associated with reduction of BDNF secretion from granule cells. Aberration of myelin function in interneurons due to insufficiency in the production of oligodendrocytes, and subsequent impairment of nerve conduction may also be involved in the disruption of neurogenesis. Increase in reelin-expressing interneurons may compensate against impaired granule cell migration and/or correct positioning due to decreased immediate early gene-mediated neuronal plasticity.

In chapter 2, I investigated the possibility whether similar effect on neurogenesis in the SGZ can be induced by CPZ exposure in a framework of 28-day toxicity study using postpubertal rats. CPZ was orally administered to 5-week-old male rats at 0, 120 or 600 mg/kg in corn oil by gavage for 28 days. As a result, in addition to the changes observed in the developmental exposure study of CPZ, decreases of DCX⁺ progenitor cells and PCNA⁺ proliferating cells and increase SOX2⁺ progenitor cells were observed in the SGZ in a dose-dependent manner. In addition, 600 mg/kg CPZ increased the number of cleaved caspase-3⁺ apoptotic cells in the SGZ. Moreover, dose-dependent decreases of NeuN⁺ postmitotic neurons and CHRNA7⁺ neurons were observed in the dentate granule cell layer. On the other hand, CPZ-exposure did not alter the reelin-expressing interneuron subpopulations in the dentate hilus. These results suggest detection of aberrant hippocampal neurogenesis in a framework of repeated 28-day oral dose toxicity study of CPZ. The effects of CPZ on neurogenesis were essentially similar to those observed with developmental exposure study. Thus, it is suggest that developmental neurotoxicity by myelin toxicants can be detected in a framework of general toxicity study.

In chapter 3, to capture the target gene profile for the evaluation of neurotoxicity and developmental neurotoxicity, I performed region-specific global gene expression profiling at four brain regions, i.e., hippocampal dentate gyrus, corpus callosum, cerebral cortex and cerebellar vermis, using rat brain samples examined in chapter 1 and 2. Moreover, to obtain markers for developmental neurotoxicity or adult-type neurotoxicity, immunohistochemical analysis of candidate molecules with regard to the distribution changes in immunoreactive cell populations was performed by selection of genes based on the obtained gene expression profiles. As a result, developmental exposure to CPZ induced expression alterations of genes related to neurogenesis, axonogenesis, synaptic transmission and myelinogenesis in the four brain regions. Especially, transcript downregulation of genes related to myelinogenesis were found in a brain region-specific fashion in the cerebral cortex. On the other hand, a strong increased transcript level in *Kl*, which promotes oligodendrocyte progenitor cell maturation, was detected in the corpus callosum. Immunohistochemically, decreased density of CNPase⁺ oligodendrocytes in the cerebral cortex and increased density of KLOTHO⁺ oligodendrocytes in the corpus callosum were detected. These results suggest that developmental CPZ exposure affects oligodendrocyte lineage maturation and the Klotho-mediated protective response against CPZ toxicity is different between the cortex and medulla. In the dentate gyrus, decreased number of GRIA1⁺ and GRIN2A⁺ hilar interneurons and COX2⁺ granule cells were detected, suggestive of suppression of the glutamatergic signals and neuronal plasticity by developmental CPZ exposure. In the 28-day exposure study, CPZ induced expression alterations of genes related to myelinogenesis, inflammatory reaction, immune response and apoptosis in the four brain regions. Immunohistochemically, increases in the number of CD68⁺ microglia and MT (I+II)⁺ microglia in the corpus

callosum and in the cerebellar vermis were detected. These microglial activation suggests that enhancement of immune response associated with myelin injury by CPZ exposure. In contrast to the developmental exposure study, 28-day exposure decreased the density of KLOTHO⁺ oligodendrocytes in the corpus callosum, suggestive of inhibition of KLOTHO-mediated oligodendrocyte maturation that may be responsible mechanisms for induction of demyelination by postpubertal CPZ exposure in rats.

In conclusion, a series of studies conducted here have revealed that developmental CPZ exposure to rats causes aberrations in neurogenesis of the hippocampal dentate gyrus, and thus adult-sensitive myelin toxicants can exert developmental neurotoxicity. Similar to developmental exposure study, aberrations in hippocampal neurogenesis by myelin toxicants could be detected in 28-day repeated dose toxicity study. Moreover, target gene profiles were obtained in terms of developmental neurotoxicity and myelin toxicity using global gene expression analysis. These results suggest that evaluation method of neurogenesis using the hippocampal dentate gyrus in a framework of 28-day repeated dose toxicity study is effective for detection of developmental neurotoxicity through the mechanism to inhibit myelination. It is considered that use of target gene profiles obtained here are versatile for elucidating the mechanisms myelin toxicity and developmental neurotoxicity mechanisms based on myelin toxicants. Furthermore, it is also judged that obtained molecules can be used as suitable immunohistochemical markers for detection of developmental neurotoxicity by myelin toxicants.