

氏名(本(国)籍)	阿部 一 (秋田県)
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)
学位記番号	獣医博甲第455号
学位授与年月日	平成28年3月14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	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
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

学位論文の内容の要旨

成熟動物に現れる神経毒性は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)でも大規模な動物試験の実施が要求されるため、より効率的な評価系の確立が求められている。生後に始まる海馬歯状回顆粒細胞下帯(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、成熟後も継続するため、発達期と成熟期の両ステージで神経毒性物質の標的となる可能性がある。また、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、髄鞘毒性物質の発達期暴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を検討した。また、網羅的遺伝子発現解析により、発達期での髄鞘形成障害及び成熟期での髄鞘傷害に関連した神経毒性の遺伝子発現プロファイルの構築と、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、脱髄誘発物質であるクプリゾン(CPZ)を妊娠ラットに暴露し、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、母動物の帯状回及び小脳髄質での軽度の髄鞘空胞化と、小脳髄質及び海馬歯状回門での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。子動物では明らかな髄鞘傷害性は認められなかったが、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。海馬歯状回門では, *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。さらに顆粒細胞層では、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 mRNA の発現解析では, *Bdnf*, *Chrna7* の発現減少及び *Casp12*, *Bcl2l1l* の発現上昇が認められた。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 の発達期暴露は 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の減少を誘発し、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 暴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 週齢の雄ラットに CPZ を 28 日間反復投与し、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、発達期暴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 mRNA の発現解析においても第 1 章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、それは発達期暴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示された。

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を探索した。その結果、発達期暴露では軸索伸長、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 発達期暴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* 陽性細胞数の減少と顆粒細胞層における *COX2* 陽性細胞数の減少を検出し、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 日間暴露では、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* 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 による髄鞘障

害性と炎症・免疫応答の関連性が示唆された。

以上、髄鞘毒性物質 CPZ のラット発達期暴露により、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暴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構築し、免疫組織化学的解析が可能な神経毒性指標分子を獲得した。これらの成果は、髄鞘毒性物質の神経毒性・発達神経毒性検索の重要なエンドポイントを示すものと考えられ、簡便で検出力の高い神経毒性評価法の確立に有用な指針を与えるものと期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、神経毒性発現機序を基盤とした包括的な神経毒性評価手法を確立することを目的とし、髄鞘毒性物質の発達期および成熟期暴露における海馬ニューロン新生に対する影響評価と、網羅的遺伝子発現解析を通じた髄鞘傷害又は髄鞘形成障害に関連した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目指した。

第 1 章では、成熟動物において脱髄を誘発するクプリゾン (CPZ) の発達期暴露実験を行った。その結果、母動物及び子動物の脳において、髄鞘傷害性あるいは髄鞘形成障害性が確認され、子動物の海馬歯状回顆粒細胞層下帯 (SGZ) での分化中期の前駆細胞を標的としたニューロン新生障害を見出した。この障害には、海馬歯状回へのコリン作動性神経伝達障害とこれに関連した小胞体経路を介したアポトーシスの亢進や BDNF シグナル経路の抑制に伴う介在ニューロンの成長抑制が影響していると考えられた。以上より、CPZ の発達期暴露により発達期の動物に対す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にした。

第 2 章では、CPZ の成熟動物への 28 日間反復投与実験を行った。その結果、海馬歯状回 SGZ における分化中期から後期の前駆細胞を標的としたニューロン新生障害性を見出し、その機序は発達期暴露とほぼ同様であることが示された。以上より、28 日間反復投与試験の枠組みで髄鞘毒性物質 CPZ による発達神経毒性の検出が可能であることが明らかとなった。

第 3 章では、CPZ の発達期暴露及び成熟期暴露における複数の脳部位を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、発達期暴露後の子動物では、ニューロン新生、髄鞘形成又はシナプス伝達に関わる遺伝子の発現変動が脳の各部位で認められ、免疫組織化学的分子指標として、CNPase, KLOTHO, GRIA1, GRIN2A 及び COX2 を見出し、これらが髄鞘形成障害性、神経伝達障害性又は神経可塑性の抑制を予測する有用な分子指標となり得ることが示された。成熟期暴露では、髄鞘形成及び炎症反応に関わる遺伝子の発現量の変動が各脳部位で検出され、成熟動物での脱髄誘発性を予測する免疫組織化学的分子指標として CD68 及び MT を見出した。

以上、髄鞘毒性物質 CPZ の発達期及び成熟動物のニューロン新生に対する共通の影響を検出し、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が、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ることが示された。また、網羅的遺伝子発現解析により獲得した標的遺伝子発現プロファイル及び免疫組織化学的分子指標の利用は、髄鞘毒性物質の神経毒性・発達神経毒性の迅速かつ検出力の高い評価方法

になり得ると期待される。

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 : Developmental exposure to cuprizone reduces intermediate-stage progenitor cells and cholinergic signals in the hippocampal neurogenesis in rat offspring
著 者 名 : Abe, H., Tanaka, T., Kimura, M., Mizukami, S., Imatanaka, N., Akahori, Y., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicology Letters
巻・号・頁・発行年 : 234 (3) : 180-193, 2015
- 2) 題 目 : Cuprizone decreases intermediate and late-stage progenitor cells in hippocampal neurogenesis of rats in a framework of 28-day oral dose toxicity study
著 者 名 : Abe, H., Tanaka, T., Kimura, M., Mizukami, S., Saito, F., Imatanaka, N., Akahori, Y., Yoshida, T. and Shibutani M.
学術雑誌名 : Toxicology and Applied Pharmacology
巻・号・頁・発行年 : 287 (3) : 210-221, 2015
- 3) 題 目 : Developmental cuprizone exposure impairs oligodendrocyte lineages differentially in cortical and white matter tissues and suppresses glutamatergic neurogenesis signals and synaptic plasticity in the hippocampal dentate gyrus of rats
著 者 名 : Abe, H., Saito, F., Tanaka, T., Mizukami, S., Hasegawa-Baba, Y., Imatanaka, N., Akahori, Y., Yoshida, T. and Shibutani M.
学術雑誌名 : Toxicology and Applied Pharmacology
巻・号・頁・発行年 : 290 (1) : 10-20, 2016

既発表学術論文

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 題 目 : The JFFMA assessment of flavoring substances structurally related to menthol and uniquely used in Japan
著 者 名 : Mirokuji, Y., Abe, H., Okamura, H., Saito, K., Sekiya, F., Hayashi,

S. M., Maruyama, S., Ono, A., Nakajima, M., Degawa, M., Ozawa, S.,
Shibutani, M. and Maitani, T.

学術雑誌名 : Food and Chemical Toxicology

巻・号・頁・発行年 : 64 : 314-321, 2014

- 4) 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

- 5) 題 目 : Promoter-region hypermethylation and expression downregulation of *Y1* (Yin yang 1) in preneoplastic liver lesions in a thioacetamide rat hepatocarcinogenesis model

著 者 名 : Abe, H., Ogawa, T., Wang, L., Kimura, M., Tanaka, T., Morita, R., Yoshida T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicology and Applied Pharmacology

巻・号・頁・発行年 : 280 (3) : 467-474, 2014

- 6) 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 : 328 : 123-134, 2015

- 7) 題 目 : Developmental hypothyroidism abolishes bilateral differences in sonic hedgehog gene control in the rat hippocampal dentate gyrus

著 者 名 : Tanaka, T., Wang, L., Kimura, M., Abe, H., Mizukami, S., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicological Sciences

巻・号・頁・発行年 : 144 (1) : 128-137, 2015

- 8) 題 目 : Exposure to $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ during development induces activation of microglial and perivascular macrophage populations in the hippocampal dentate gyrus of rats

著 者 名 : Abe, H., Ohishi, T., Nakane, F., Shiraki, A., Tanaka, T., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Journal of Applied Toxicology

巻・号・頁・発行年 : 35 (5) : 529-535, 2015

- 9) 題 目 : Relationship between brain accumulation of manganese and aberration of hippocampal adult neurogenesis after oral exposure to manganese chloride in mice

著 者 名 : Kikuchihara, Y., Abe, H., Tanaka, T., Kato, M., Wang, L., Ikarashi, Y., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicology

巻・号・頁・発行年 : 331 : 24-34, 2015

- 10) 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., Kikuchihara, Y., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Journal of Applied Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 35 (8) : 884-894, 2015
- 11) 題 目 : The Japan Flavour and Fragrance Materials Association's (JFFMA) safety assessment of acetal food flavouring substances uniquely used in Japan
著 者 名 : Okamura, H., Abe, H., Hasegawa-Baba, Y., Saito, K., Sekiya, F., Hayashi, S.M., Mirokuji, Y., Maruyama, S., Ono, A., Nakajima, M., Degawa, M., Ozawa, S., Shibutani, M. and Maitani, T.
学術雑誌名 : Food Additives and Contaminants: Part A
卷・号・頁・発行年 : 32 (9) : 1384-1396, 2015