

学 位 論 文 要 約

氏 名 中 島 康 太

題 目 かび毒のマウスを用いた脳発達リスク評価に関する研究

かび毒は農作物を汚染し、食物を介して人や産業動物に健康被害を引き起こすことが知られており、国際的に極めて重要な危険物質とされている。かび毒による健康被害を防ぐためには規格基準の策定が急務であり、その根拠となる幅広い毒性学的情報が求められている。本研究では、未だ知見に乏しい発達神経毒性について、かび毒の高感受性集団である胎児・乳幼児に対するリスク評価を目的とし、神経毒性影響の懸念されるかび毒を対象とした発達期曝露実験を行った。評価部位として、海馬における神経新生に着目し、かび毒による発達神経毒性の標的、機序を明らかにするとともに無毒性量および可逆性について検討した。更にかび毒の発達期神経新生障害に対する酸化ストレスの関与について関連指標の発現変動の観点から検討した。

第1章では、*Penicillium* 属菌種が産生して穀物汚染が危惧されているシトレオビリジン (CIT) を評価対象とし、1, 3, 10 ppm の濃度で妊娠マウスに妊娠6日目から生後21日目の離乳時まで混餌投与し、雄児動物の海馬歯状回における神経新生障害性を検討した。その結果、離乳時には、10 ppm で神経新生部位である顆粒細胞層下帯 (SGZ) での神経幹細胞の減少と神経前駆細胞の増殖を示唆する弱い変化が認められた。歯状回門では、calbindin 1 陽性介在ニューロン数が減少し、神経新生への影響が示唆された。対照的に、歯状回門において somatostatin 陽性介在ニューロン数が増加し、神経成長因子シグナルの *Bdnf* および *Ntrk2* の発現増加が認められたことから、神経前駆細胞増殖に対する BDNF-TRKB シグナル伝達の促進が示唆された。神経新生の外部制御システムの遺伝子発現変化を認め、神経幹細胞の減少に対する代償性変化として GABA 作動性介在ニューロン、特に parvalbumin (PVALB) 陽性介在ニューロンの機能が抑制され、神経幹細胞の増殖および分化促進に寄与していることが示唆された。3 ppm 以上でシナプス可塑性に機能する ARC 陽性の成熟顆粒細胞が増加し、10 ppm で歯状回門の AMPA 型グルタミン酸受容体 GRIA1 陽性細胞数の増加に加えて *Gria2* および *Gria3* の発現が増加したことから、ARC 媒介シナプス可塑性の増加に伴う AMPA 型受容体膜輸送の亢進が示唆された。出生後77日では、*Grin2d* を除く神経新生制御システムの全ての遺伝子発現の変化が離乳時の結果と比較して逆転し、CIT 発達期曝露による神経新生障害に対する恒常性維持機能の発動が示唆された。NMDA 型グルタミン酸受容体遺伝子の *Grin2a* と *Grin2d* は共に発現低下し、それらを発現する GABA 作動性介在ニューロン機能が抑制を受けることにより神経発生を正常なレベルに調整していることが示唆された。CIT 発達期曝露による児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は、1 ppm (0.13-0.51 mg/kg 体重/日) と判断された。

第2章では、*Fusarium* 属のかびにより産生されるトリコセン系かび毒であり、主に穀物での汚染が広く認められ、DNA や蛋白質の合成阻害作用と共に催奇形性が知られているジアセトキシシルペノール (DAS) を対象とし、0.6, 2.0, 6.0 ppm の濃度で妊娠マウスに妊娠6日目から生後21日目の離乳時まで混餌投与した。その結果、児動物では6.0 ppm

で雌雄共に生後に断続的な体重の低値を認め、離乳時には体重および脳重量は低値を示し、脳重量低値は生後 77 日目まで持続した。雄児動物での海馬神経新生を解析した結果、離乳時に 2.0 および 6.0 ppm で SGZ における顆粒細胞系譜のうち、GFAP 陽性細胞、SOX2 陽性細胞、TBR2 陽性細胞、DCX 陽性細胞の減少に加えて、6.0 ppm で TUNEL (アポトーシス)、metallothionein (MT-I/II ; 酸化ストレス)、 γ -H2AX (二本鎖 DNA 切断) および malondialdehyde (MDA ; 酸化ストレス) のそれぞれに陽性の細胞が増加し、歯状回門では PVALB 陽性介在ニューロンが減少した。さらに、6.0 ppm では *Gria3*, *Grin2a* とアセチルコリン受容体である *Chrna7* の発現が減少した。また、二本鎖 DNA 切断関連遺伝子の発現変動なしに、酸化ストレス関連 DNA 修復遺伝子の *Ogg1*, 細胞周期関連遺伝子の *Parp1* および幹細胞制御系遺伝子の *Kit* の発現が減少した。以上の結果から、DAS は type-1 神経幹細胞から type-3 までの神経前駆細胞を広範に減少させ、その機序の一部に神経幹細胞から初期の神経前駆細胞にかけての酸化ストレスに関連する DNA 損傷によるアポトーシスと PVALB 陽性介在ニューロンによる type-2 前駆細胞の分化抑制の関与が示唆された。また、細胞周期関連遺伝子群 (*Cdkn2a*, *Rb1*, *Trp53*) は発現減少し、DNA 損傷に対する脆弱性の増加が示唆された。一方、成熟時には、顆粒細胞系譜の変化は全て回復したものの、歯状回では 6.0 ppm で ARC 陽性顆粒細胞は減少し、歯状回門では 2.0 および 6.0 ppm でニューロンの移動や分化に関わる reelin (RELN) 陽性細胞が増加した。また、RELN 関連遺伝子 (*Itsn1*) が発現増加し、RELN 陽性細胞の幼若化は認められなかったことから、RELN 陽性細胞の増加は神経幹細胞の減少と ARC を介したシナプス可塑性の減少に対する代償性反応である可能性が考えられた。これらの結果から、DAS が酸化ストレスによる細胞傷害を誘発して顆粒細胞系譜の分化を抑制することにより、海馬の神経新生に対し可逆的な障害を引き起こしたことが示唆された。児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は 0.6 ppm (0.09-0.29 mg/kg 体重/日) と判断された。

第 3 章では、既に報告のある T-2 トキシンのマウス発達神経毒性研究および第 2 章の DAS のマウス発達神経毒性研究より、トリコセン系かび毒の神経毒性における酸化ストレス関与が示唆されたため、酸化ストレス除去および神経保護作用の知られている MT-I/II の発現について T-2 トキシンの曝露マウス (0, 1, 3, 9 ppm, 混餌) で検索し、MT-I/II 発現細胞を特定し、それらの発現増加の意義を検討した。その結果、離乳時には 9 ppm で海馬歯状回の SGZ および門部、大脳皮質、脳梁、小脳で MT-I/II 陽性細胞数が増加した。GFAP 陽性細胞と IBA1 陽性細胞数を検討した結果、GFAP 陽性細胞は、小脳で増加したが SGZ では減少し、その他の脳部位では変動を示さなかった。IBA1 陽性細胞は、すべての部位で変動しなかった。MT 発現細胞を特定するための MT-I/II との二重染色では、SGZ では GFAP および SOX2 と共発現したが、TBR2、DCX および NeuN とは共発現しなかった。他の脳部位では GFAP と共発現した。海馬歯状回での遺伝子発現解析では、*Mt2*, *Ill1 α* および *Ill1 γ* が発現増加した。これらの結果から、海馬歯状回では type-1 神経幹細胞が MT を発現し、神経新生障害に対する保護的作用が示唆された。また、遺伝子発現解析と先行研究での MDA 陽性細胞増加の結果から、MT は炎症性メディエーターおよび酸化ストレスにより誘導されたと考えられた。他の脳部位で認められた MT-I/II 陽性細胞はアストロサイトであり、T-2 トキシンの誘導された酸化ストレスに反応した発現増強であると判断された。

以上より、異なる 2 種のかび毒についてマウスの発達期曝露を行い、児動物の SGZ における顆粒細胞系譜および歯状回における GABA 作動性介在ニューロンの分布を検索した結果、各かび毒はいずれも可逆的な発達神経毒性を示し、それぞれ異なる様式の障害性であることが見出された。障害の機序として、酸化ストレスの上昇、顆粒細胞および介在ニューロンへの神経伝達物質や脳神経由来因子によるシグナル伝達低下が関与していると考えられ、酸化ストレス関連タンパクである MT-I/II の酸化ストレスに応じた脳部位特異的

な発現細胞の増加も認められた。本研究により発達期の海馬における神経新生がかび毒による発達期神経毒性の新たな標的となることが明らかとなった。その毒性は特に胎児・乳幼児における曝露を考慮した基準策定に際して留意すべきであり、かび毒に対する安全性を考慮した安全確保に資することが期待される。

学 位 論 文 要 約

氏 名 NAKAJIMA, Kota

題 目 Risk Assessment Study on Developmental Neurotoxicity of Mycotoxins
using Mice
(かび毒のマウスを用いた脳発達リスク評価に関する研究)

Mycotoxins are known to cause health hazard on human and farm animals due to contamination with various crops. Because their extremely hazardous material profile, establishment of standards formulation to control mycotoxin levels in foods and foodstuff is imperative, and broad range of toxicological information in each mycotoxin is required. In the present study, to assess the risk of mycotoxin-induced developmental neurotoxicity, maternal exposure effect of mycotoxins was examined. For this purpose, this study focused on hippocampal neurogenesis which occurs in the dentate gyrus during postnatal life, and analyzed the target cells in granule cell lineages and interneuron subpopulations after developmental exposure to mycotoxins in rodents. The present study further examined the responsible mechanism, reversibility and no observed adverse effect level (NOAEL) in each mycotoxin examined. The involvement of oxidative stress was also examined in association the disruptive neurogenesis by mycotoxins from the viewpoint of the expression changes of related markers.

In chapter 1, to investigate the developmental exposure effect of citreoviridin (CIT) on postnatal hippocampal neurogenesis, pregnant ICR mice were dietary exposed to CIT at 0, 1, 3 and 10 ppm from gestation day 6 to postnatal day (PND) 21 on weaning. Offspring were maintained through PND 77 without CIT exposure. Male offspring were analyzed for hippocampal neurogenesis. At 10 ppm on PND 21, weak changes suggestive of neural stem cell reduction and progenitor cell proliferation were observed in the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus. The number of hilar calbindin 1⁺ interneurons reduced, suggesting an influence on neurogenesis. In contrast, the number of hilar somatostatin⁺ interneurons increased and neurotrophic factor-related *Bdnf* and *Ntrk2* transcripts upregulated in the dentate gyrus, suggesting a facilitation of BDNF-TRKB signaling for progenitor cell proliferation. Transcript expression changes of an outside regulatory system suggested suppressed function of GABAergic interneurons, especially of parvalbumin (PVALB)⁺ interneurons for compensation on neural stem cell reduction. At \geq 3 ppm, the number of synaptic plasticity-related ARC⁺ mature granule cells increased, and at 10 ppm, the number of hilar AMPA glutamate receptor GRIA1⁺ cells increased and *Gria2* and *Gria3* upregulated, suggesting an operation of AMPA receptor membrane trafficking on the increase of ARC-mediated synaptic plasticity. On PND 77, all the transcript expression changes of the neurogenesis regulatory system except for *Grin2d* were inverted, suggesting an operation of a homeostatic mechanism on CIT-induced disruptive neurogenesis. Simultaneous downregulation of NMDA glutamate receptor genes, i.e., *Grin2a* and *Grin2d*, suggests suppression of GABAergic interneuron function to adjust neurogenesis at the normal level. The NOAEL of CIT for offspring neurogenesis was determined to be 1 ppm, translating to 0.13–0.51 mg/kg body weight/day of maternal oral exposure.

In chapter 2, to investigate the developmental exposure effect of diacetoxyscirpenol (DAS) on postnatal hippocampal neurogenesis, pregnant ICR mice were provided a diet containing DAS at 0, 0.6, 2.0, or 6.0 ppm from gestational day 6 to day 21 on weaning after delivery. Offspring were maintained through PND 77 without DAS exposure. On PND 21, neural stem cells (NSCs) and all subpopulations of proliferating progenitor cells were suggested to decrease in number in the SGZ at ≥ 2.0 ppm. At 6.0 ppm, increases of SGZ cells showing TUNEL⁺, metallothionein (MT)-I/II⁺, γ -H2AX⁺ or malondialdehyde⁺, and transcript downregulation of *Ogg1*, *Parp1* and *Kit* without changing the level of double-stranded DNA break-related genes were observed in the dentate gyrus, suggesting an induction of oxidative DNA damage of NSCs and early-stage progenitor cells leading to their apoptosis. *Cdkn2a*, *Rb1* and *Trp53* downregulated transcripts, suggesting an increased vulnerability to the DNA damage. Hilar PVALB⁺ GABAergic interneurons decreased the number and *Grin2a* and *Chrna7* downregulated, suggesting a suppression of type-2-progenitor cell differentiation. On PND 77, hilar interneurons immunoreactive for RELN, a molecule related to neuronal differentiation and migration, increased the numbers at ≥ 2.0 ppm, and RELN-related *Itsn1* transcripts upregulated and ARC⁺ granule cells decreased at 6.0 ppm. Increased RELN signals may be ameliorating response to the decreases of NSCs and ARC-mediated synaptic plasticity. These results suggest that DAS reversibly disrupts hippocampal neurogenesis by inducing oxidative cellular injury and suppressed differentiation of granule cell lineages. The NOAEL of DAS for offspring neurogenesis was determined to be 0.6 ppm, translating to 0.09–0.29 mg/kg body weight/day of maternal oral exposure.

Previous study reported that developmental exposure to T-2 toxin caused transient disruption of the hippocampal neurogenesis targeting neural stem cells (NSCs) and early-stage progenitor cells involving oxidative stress on weaning in mouse offspring. In chapter 3, to investigate the toxicological relevance of MT-I/II, molecules function on removing oxidative stress and neuronal protection, in animals exposed developmentally to T-2 toxin at 0, 1, 3 and 9 ppm in diet, male offspring were analyzed for immunohistochemical expression changes and their cellular identity in brain regions. MT-I/II⁺ cells increased in the SGZ of the dentate gyrus and cerebral cortex at ≥ 3 ppm and in the hilus of the dentate gyrus, corpus callosum, and cerebellum at 9 ppm on PND 21, suggestive of operation of cytoprotective function against oxidative stress throughout the brain. Double immunohistochemistry analysis revealed MT-I/II⁺ SGZ cells to be NSCs and MT-I/II⁺ cells in other brain regions to be astrocytes as toxicity targets of T-2 toxin. Phosphorylated STAT3⁺ cell numbers increased only in the cerebellum in parallel with the increase of GFAP⁺ astrocytes at 9 ppm, suggesting a STAT3-mediated transcriptional GFAP upregulation in cerebellar astrocytes. In the dentate gyrus, *Il1a*, *Il1r1*, and *Mt2* increased transcripts at 9 ppm, suggesting activation of the IL-1 signaling cascade, possibly causing MT-II upregulation. These results suggest that an operation of cytoprotective function against T-2 toxin-induced oxidative stress throughout the brain. MT-I/II⁺ SGZ cells were revealed to be NSCs and MT-I/II⁺ cells in other brain regions were revealed to be astrocytes as toxicity targets of T-2 toxin.

In conclusion, by means of the evaluation on the distribution changes of granule cell lineages in the SGZ and GABAergic interneuron in the dentate hilus, this study revealed that two mycotoxins examined induced reversible developmental neurotoxicity showing different pattern of affection. In addition, it was found involvement of elevated oxidative stress in the SGZ, decreased signaling of neurotransmitters or neurotrophins to granule cells or interneurons to contribute to disruption of neurogenesis by maternal exposure to mycotoxins. Thus, it can be concluded that the hippocampal neurogenesis is a novel target endpoint of developmental mycotoxin toxicity and toxicological data of this study is expected to provide valuable information for risk assessment of these mycotoxins on infantile population.

