

氏名(本(国)籍)	中 島 康 太(埼玉県)
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557号
学位授与年月日	令和2年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1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	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
審査委員	主査 東京農工大学 准教授 佐々木 一 昭 副査 帯広畜産大学 教授 古 林 与志安 副査 岩手大学 教授 佐 藤 洋 副査 東京農工大学 教授 渋谷 淳 副査 岐阜大学 准教授 酒 井 洋 樹

学位論文の内容の要旨

本研究では、未だ知見に乏しいかび毒による発達神経毒性について、かび毒の高感受性時期と考えられる胎児期・乳幼児期における発達神経毒性のハザード同定を目的として、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影響評価を実施した。評価部位として、海馬における神経新生に着目し、かび毒による毒性標的性とその機序、無毒性量及び影響の回復性の有無を明らかにした。更にトリコテセン系かび毒である T-2 トキシンの発達神経毒性評価の際に抗酸化分子であるメタロチオネイン(MT)-I/II 陽性細胞の増加を認めため、かび毒による酸化ストレスに起因する発達脳の傷害性に対する細胞反応性の解明も目的として、MT の発現特性を明らかにした。

第1章では、*Penicillium* 属菌種が産生するシトレオビリジン (CIT) を選択し、1, 3, 10 ppm の濃度で妊娠マウスに妊娠6日目から出産後21日目の離乳時まで混餌投与して児動物への神経新生影響を解析した。離乳時には、海馬の顆粒細胞層下帯 (SGZ) での弱い神経幹細胞の減少と神経前駆細胞の増殖を見出した。歯状回門では、神経新生抑制を示唆する calbindin 1 陽性介在ニューロンの減少と、神経前駆細胞増殖に対する BDNF-TRKB 経路の活性化の関与を示唆する somatostatin 陽性介在ニューロンの増加と神経成長因子シグナル遺伝子の発現増加を見出した。神経新生制御系の遺伝子発現変動から、神経幹細胞の減少に対する代償性変化として parvalbumin (PVALB) 発現介在ニューロンの機能抑制を導き出した。シナプス可塑性に機能する ARC を発現する顆粒細胞の増加、歯状回門の AMPA 型グルタミン酸受容体の遺伝子発現や発現細胞の増加も見出し、CIT による ARC 媒介シナプス可塑性の増加に伴う AMPA 型受容体膜輸送亢進の可能性を導き出した。成熟後では、神経新生制御系の遺伝子発現変化が離乳時の結果と逆転し、CIT の神経新生障害に対する恒常性維持機能の発動を明らかにした。以上の結果を踏まえて、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を 1 ppm (0.13–0.51 mg/kg 体重/日) と導き出すことができた。

第2章では、*Fusarium* 属菌種が産生するトリコテセン系のジアセトキシシルペノール (DAS) を選択し、0.6, 2.0, 6.0 ppm の濃度で妊娠マウスに CIT と同じ期間混餌投与して児動物の神経新生を解析した。その結果、DAS は離乳時に神経幹細胞から type-3 までの神経前駆細胞を広範に減少させ、その機序として酸化的 DNA 損傷によるアポトーシスと、PVALB 陽性介在ニューロンの減少による type-2 神経前駆細胞の分化抑制を見出している。一方、成熟時には、顆粒細胞系譜の変化は全て回復したが、ARC 陽性顆粒細胞数は減少した。歯状回門ではニューロンの移動や分化に関わる *reelin* 陽性介在ニューロンが増加したものの、それらの幼若化は認められなかったことから、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を導き出した。以上より、DAS は酸化ストレスによる細胞傷害から顆粒細胞系譜の分化を抑制して、可逆的に神経新生障害を誘発することを明らかにし、児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量を 0.6 ppm (0.09-0.29 mg/kg 体重/日) と導き出すことができた。

第3章では、既に T-2 トキシン曝露により酸化ストレスに起因した海馬神経新生障害と共に、その部位で酸化ストレス除去及び神経保護作用の知られている MT-I/II を発現する細胞の増加が見出されたことに着目して、T-2 トキシン曝露マウスで 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、曝露終了時には海馬歯状回の SGZ 及び門部、大脳皮質、脳梁、小脳で MT-I/II 陽性細胞数の増加を見出した。二重染色の結果、MT 発現細胞は SGZ では GFAP 及び SOX2 と共発現したが、TBR2, DCX 及び NeuN とは共発現しなかった。他の脳部位では GFAP のみが共発現した。海馬歯状回では *Mt2*, *Il1a* 及び *Il1r1* の遺伝子発現が増加した。以上の結果から、海馬歯状回では T-2 トキシンにより誘導された酸化ストレスに反応して IL-1 シグナリングが作動した結果、酸化性ストレスに起因する神経新生障害に対する保護作用として type-1 神経幹細胞が MT-II を上方制御した可能性が見出された。その他の脳部位でアストロサイトが酸化ストレスに対する保護作用として MT-I/II 陽性細胞を増加させることを明らかにした。また、MT-I/II 発現細胞の増数は成熟後では認められず、T-2 トキシンに由来する酸化ストレスからの回復が示唆された。

以上より、検索した二つの異なる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、酸化ストレスの増加や介在ニューロンへの影響が障害の主体であること、障害の回復に向けた複数の脳内機構の存在も明らかとなった。これらの研究成果により、リスク評価に資する毒性資料に乏しいこれらのかび毒の発達神経毒性のハザードが世界で初めて同定されたこととなり、かび毒に対する安全性を考慮した食品の安全確保に資するものと期待できる。また、アストロサイトのみならず神経幹細胞においても、MT が酸化ストレスに対する保護作用に機能することを見出した。神経幹細胞での発現増加は世界で初めて見出された知見であり、神経幹細胞とアストロサイトにおいて GFAP は共通形質であることから 今後、MT 発現制御機構に対する GFAP の関わりを明らかにすることで、神経幹細胞における神経保護作用の解明に一石を投じる可能性がある。

審査結果の要旨

本研究では、かび毒の高感受性集団と考えられる胎児・乳幼児に対するリスク評価に資するために、かび毒の発達神経毒性に関するハザード同定を第一の目的として、神経毒性が懸念されるかび毒についてマウスを用いた母動物への混餌曝露による発達期曝露実験を実施した。既に確立している海馬神経新生を発達神経毒性の高感度エンドポイントとし、毒性の標的、機序を明らかにするとともに無毒性量及び回復性についても明らかにした。

更にトリコテセン系かび毒である T-2 トキシンの発達神経毒性評価の際に抗酸化分子であるメタロチオネイン(MT)-I/II 陽性細胞の増加を認めたため、かび毒による酸化ストレスに起因する発達脳の傷害性に対する細胞反応性の解明を第二の目的として、MT の発現特性を明らかにした。

第 1 章では、穀物汚染が危惧されるシトレオビリジンについて、海馬神経新生への影響を検討した結果、曝露終了時において神経新生の制御系である GABA 性介在ニューロンを標的とした傷害性に起因する軽度の神経新生異常を見出し、無毒性量を導き出した。影響は成熟後に回復し、その回復性に恒常性維持機構の作動の関与を見出した。

第 2 章では、主に穀物での汚染が認められるジアセトキシシルペノールについて、海馬神経新生への影響を検討した結果、神経幹細胞から神経前駆細胞を標的とした可逆的な神経新生の傷害性を見出し、GABA 性介在ニューロンの減数による分化抑制と酸化的 DNA 損傷に起因するアポトーシス増加が関与することを明らかにし、無毒性量を導き出した。

第 3 章では、既に T-2 トキシンの曝露により酸化ストレスに起因した海馬神経新生障害と共に、新生部位で MT-I/II 陽性細胞の増加が見出されたことに着目して、脳の複数の部位での誘導の詳細について検討している。その結果、T-2 トキシンの海馬の神経新生部位では type-1 神経幹細胞、その他の脳部位ではアストロサイトが、酸化ストレスに対する保護作用として MT を発現増加させることを明らかにした。

以上より、検索した二つの異なる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、酸化ストレスの増加や介在ニューロンへの影響が障害の主体であること、障害の回復に向けた複数の脳内機構の存在も明らかとなった。これらの研究成果により、リスク評価に資する毒性資料に乏しいこれらのかび毒の発達神経毒性のハザードが世界で初めて同定されたこととなり、かび毒に対する安全性を考慮した食品の安全確保に資するものと期待できる。また、アストロサイトのみならず神経幹細胞においても、MT が酸化ストレスに対する保護作用に機能することを見出した。神経幹細胞での発現増加は世界で初めて見出された知見であり、神経幹細胞とアストロサイトにおいて GFAP は共通形質であることから、今後、MT 発現制御機構に対する GFAP の役割の解析により、神経幹細胞における神経保護作用の解明に一石を投じる可能性がある。

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 of citreoviridin transiently affects hippocampal neurogenesis targeting multiple regulatory functions in mice
著 者 名 : Nakajima, K., Masubuchi, Y., Ito, Y., Inohana, M., Takino, M., Saegusa, Y., Yoshida, T., Sugita-Konishi, Y. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Food and Chemical Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 120 : 590–602, 2018

- 2) 題 目 : Developmental exposure of mice to T-2 toxin increases astrocytes and hippocampal neural stem cells expressing metallothionein
著 者 名 : Nakajima, K., Tanaka, T., Masubuchi, Y., Ito, Y., Kikuchi, S., Woo, G.H., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Neurotoxicity Research
巻・号・頁・発行年 : 35(3) : 668–683, 2019

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Identification of epigenetically downregulated *Tmem70* and *Ube2e2* in rat liver after 28-day treatment with hepatocarcinogenic thioacetamide showing gene product downregulation in hepatocellular preneoplastic and neoplastic lesions produced by tumor promotion
著 者 名 : Mizukami, S., Yafune, A., Watanabe, Y., Nakajima, K., Jin, M., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicology Letters
卷・号・頁・発行年 : 266 : 13–22, 2017
- 2) 題 目 : Differential effects between developmental and postpubertal exposure to *N*-methyl-*N*-nitrosourea on progenitor cell proliferation of rat hippocampal neurogenesis in relation to COX2 expression in granule cells
著 者 名 : Watanabe, Y., Nakajima, K., Mizukami, S., Akahori, Y., Imatanaka, N., Woo, G.H., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 389 : 55–66, 2017
- 3) 題 目 : Late effect of developmental exposure to glycidol on hippocampal neurogenesis in mice: Loss of parvalbumin-expressing interneurons
著 者 名 : Kawashima, M., Watanabe, Y., Nakajima, K., Murayama, H., Nagahara, R., Jin, M., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Experimental and Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 69(7) : 517–526, 2017
- 4) 題 目 : Downregulation of TMEM70 in rat liver cells after hepatocarcinogen treatment related to the Warburg effect in hepatocarcinogenesis producing GST-P-expressing proliferative lesions
著 者 名 : Mizukami, S., Watanabe, Y., Nakajima, K., Hasegawa-Baba, Y., Jin, M., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 159(1) : 211–223, 2017
- 5) 題 目 : Downregulation of UBE2E2 in rat liver cells after hepatocarcinogen treatment facilitates cell proliferation and slowing down of DNA damage response in GST-P-expressing preneoplastic lesions
著 者 名 : Mizukami, S., Watanabe, Y., Saegusa, Y., Nakajima, K., Ito, Y., Masubuchi, Y., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicology and Applied Pharmacology
卷・号・頁・発行年 : 334 : 207–216, 2017
- 6) 題 目 : Aberrant epigenetic gene regulation in GABAergic interneuron subpopulations in the hippocampal dentate gyrus of mouse offspring following developmental exposure to hexachlorophene
著 者 名 : Watanabe, Y., Abe, H., Nakajima, K., Ideta-Otsuka, M., Igarashi, K., Woo,

G.H., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicological Sciences

巻・号・頁・発行年 : 163(1) : 13–25, 2018

- 7) 題 目 : Developmental exposure to aluminum chloride irreversibly affects postnatal hippocampal neurogenesis involving multiple functions in mice
著 者 名 : Inohana, M., Eguchi, A., Nakamura, M., Nagahara, R., Onda, N., Nakajima, K., Saegusa, Y., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 164(1) : 264–277, 2018
- 8) 題 目 : A case of rapid recurrence of apocrine ductal carcinoma originating from the oral scent gland of a Richardson's ground squirrel (*Urocitellus richardsonii*)
著 者 名 : Eguchi, A., Inohana, M., Nakamura, M., Nagahara, R., Itahashi, M., Nakajima, K., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 31(3) : 189–193, 2018
- 9) 題 目 : Expression characteristics of genes hypermethylated and downregulated in rat liver specific to nongenotoxic hepatocarcinogens
著 者 名 : Ito, Y., Nakajima, K., Masubuchi, Y., Kikuchi, S., Saito, F., Akahori, Y., Jin, M., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 169(1) : 122–136, 2019
- 10) 題 目 : Aberrant epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis of mouse offspring following maternal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile
著 者 名 : Tanaka, T., Nakajima, K., Masubuchi, Y., Ito, Y., Kikuchi, S., Ideta-Ohtsuka, M., Woo, G.H., Yoshida, T., Igarashi, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 44(2) : 93–105, 2019
- 11) 題 目 : Ameliorating effect of postweaning exposure to antioxidant on disruption of hippocampal neurogenesis induced by developmental hypothyroidism in rats
著 者 名 : Tanaka, T., Masubuchi, Y., Okada, R., Nakajima, K., Nakamura, K., Masuda, S., Nakahara, J., Maronpot, R.R., Yoshida, T., Koyanagi, M., Hayashi, S. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 44(5) : 357–372, 2019
- 12) 題 目 : Twenty-eight-day repeated oral doses of sodium valproic acid increases neural stem cells and suppresses differentiation of granule cell lineages in adult hippocampal neurogenesis of postpubertal rats
著 者 名 : Watanabe, Y., Nakajima, K., Ito, Y., Akahori, Y., Saito, F., Woo, G.H., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学术雑誌名 : Toxicology Letters

卷・号・頁・発行年 : 312 : 195-203, 2019