

称号及び氏名	博士（獣医学）	井澤 敬子
学位授与の日付	平成28年8月31日	
論文名	Studies on Histopathological Characteristics and Alterations of miRNA Expression in Chemically Induced Rat Neurotoxicity Models (化学物質誘発性神経障害ラットモデルの病理組織学的特徴および miRNA 発現変動に関する研究)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	中村 洋一
	副査	竹内 正吉

論文要旨

緒言

神経系は、生命維持、言語、運動機能など生体にとって重要な役割を担うが、再生能力の低い組織であることから、神経組織の障害が生体に与える影響は甚大である。近年、化学物質による健康影響に対する人々の関心が高まるにつれ、化学物質の安全性評価の重要性は高くなっている。安全評価において、化学物質の神経組織に対する影響は重篤な毒性とみなされ、特に農薬に対しては、安全性試験のガイドライン上、様々な神経毒性試験が要求されている。そのために、神経毒性を有する可能性のある化学物質の開発は、開発する企業にとって経済的および時間的に大きな負担となる。そこで、開発の早期に、神経毒性を見極めることが重要となるが、現状、定型的な安全性試験において、神経毒性を検出できる手段は神経症状観察や病理学的検査に限られ、神経毒性を評価する有用な手段、例えばバイオマーカーなどの開発が求められている。

マイクロ RNA (**mi RNA**) は、蛋白質をコードしない **25** 塩基前後の機能性 RNA であり、遺伝子を翻訳レベルで調節し、様々な生命現象に係わる。神経組織において、**mi RNA** は、発達、機能、病理発生などあらゆる現象に関与することが知られ、近年、化学物質による神経毒性の発現にも関与することが報告されているが、いまだ不明な点が多い。**mi RNA** は、組織特異的な発現に加え、組織や血液

中で高い安定性を有することから、バイオマーカーとしての有用性が期待されている。

本研究では、標的部位の異なる 3 種の神経毒性物質により誘発したラットの神経障害モデルを用いて、神経毒性に関与する血液および神経組織中の **mi RNA** を探索した。また、詳細な病理組織学的解析を行い、**mi RNA** 変動と神経毒性病変との関連を調べた。第 1 章では神経細胞体を標的とするトリメチルスズにより誘発したモデルを作出し、血清中 **mi RNA** バイオマーカーの探索および脳組織中 **mi RNA** 解析を行い、病理組織変化との関連を調べた。第 2 章および第 3 章では、それぞれ軸索および髄鞘を標的とする 3,3'-イミノジプロピオニトリルおよびヘキサクロロフェンにより誘発したモデルを用い、第 1 章で得られた血清中バイオマーカー候補 **mi RNA** の汎用性を検証するとともに、病理組織学的特徴および脳組織における **mi RNA** 変動を解析した。一連の研究により化学物質誘発神経障害モデルの神経組織病変の病理学組織学的特徴を明らかにするとともに、神経組織傷害に関連する血液マーカー **mi RNA** および神経病変に関わる組織中 **mi RNA** を見出すことができた。

【第 1 章】 トリメチルスズ投与神経障害ラットモデルの解析

トリメチルスズ (TMI) は、プラスチック用安定剤や殺菌剤などとして使用された有機スズ化合物であり、ヒトや動物の中樞神経に選択的神経細胞死を誘発する。本章では TMI をラットに単回強制経口投与 (0, 6, 9, 12 mg/kg) し、神経症状観察および病理組織学的解析を行い、脳中および血清中の **mi RNA** 発現変動を解析した。

第 1 節 投与量設定およびバイオマーカー候補 **mi RNA** の探索

TMI 投与予備実験 (TMI 0, 9, 12 mg/kg 単回投与) を行い、投与後 7 日の血清を用いて、神経組織に高発現することが知られる 7 種の **mi RNA** (**mi R-124a**、**mi R-219**、**mi R-330-5p**、**mi R-384-3p**、**mi R-384-5p**、**mi R-9**、**mi R-9***) の発現変動を調べた。その結果、**mi R-9*** および **mi R-384-5p** の発現が投与群で上昇し、バイオマーカー候補と考えられた。

第 2 節 詳細な **mi RNA** 発現解析～神経症状および病理組織学解析との関連～

TMI を単回投与 (0, 6, 9, 12 mg/kg) したラットにおいて、振戦や過敏などの神経症状が投与後 2 日以降に 9 mg/kg 以上の群で認められた。また、海馬を主として神経細胞死が、6 および 9 mg/kg 群では投与後 4 日より、12 mg/kg 群では投与後 1 日より認められた。免疫組織化学染色により、アストロサイトおよびミクログリアの肥大および増数が認められ、グリア細胞反応を伴うことが分かった。第 1 節で見出した **mi R-9*** および **mi R-384-5p** の血清中における発現変動を経時的に調べたところ、海馬の神経細胞死の発現と一致してこれらの **mi RNA** の発現が上昇し、これらの **mi RNA** は神経細胞体の傷害を反映するマーカーになり得ると考えられた。血清中における発現上昇のメカニズム

として、傷害を受けた脳から逸脱した可能性が考えられた。また、マイクロアレイによる海馬組織における **mi RNA** 発現変動の網羅的解析を行い、**RT-PCR** 法による検証を行った結果、シナプスの形態や機能を制御する **mi R-132** および神経保護作用に関連する **mi R-21** 発現が上昇傾向を示した。これらの **mi RNA** の **TMT** 誘発による神経細胞傷害への関与が示された。

【第2章】 3,3'-イミノジプロピオニトリル投与ラットモデルの病態解析

3,3'-イミノジプロピオニトリル (IDPN) は工業的な合成中間体であり、近位軸索神経症を引き起こす。本章では **IDPN** をラットに **3, 7** および **14** 日間強制経口投与 (**0, 20, 50, 125 mg/kg**) し、神経症状観察および病理組織学的解析を経時的に行い、脳中および血清中の **mi RNA** 発現の変動を検討した。第1章で見出した神経毒性マーカー候補である **mi R-9*** および **mi R-384-5p** のバイオマーカーとしての汎用性を検証した。

第1節 神経症状および病理組織学的解析

IDPN 125 mg/kg 投与群において、投与後 **9** 日以降に失調性歩行や後肢麻痺などの神経症状が認められた。また、橋・延髄を中心に軸索の腫大が、**125 mg/kg** 群で投与後 **7** 日以降に、**50 mg/kg** 群で投与後 **14** 日に認められた。免疫組織化学染色の結果、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、アストロサイトの形態や数に差は見られず、グリア細胞反応を伴わないことが分かった。

第2節 mi RNA 発現解析

IDPN 投与群において **mi R-9*** および **mi R-384-5p** の血清中発現変動は見られなかった。また、橋・延髄組織を用いてマイクロアレイによる網羅的な **mi RNA** 発現解析および **RT-PCR** 法による検証を行った結果、**mi R-547*** の有意な発現増加が確認され、**IDPN** 誘発軸索病変に関与することが示された。

【第3章】 ヘキサクロロフェン投与ラットモデルの病態解析

ヘキサクロロフェン (HCP) は石鹼や液体洗剤などの抗菌物質や農業用の殺菌剤・殺虫剤として広く使用された化学物質であり、動物において髄鞘を標的とした神経病変を引き起こす。本章では **HCP** をラットに **1, 3** および **7** 日間連続強制経口投与 (**0, 4, 12, 35 mg/kg**) し、神経症状観察および病理組織学的解析を行い、脳中および血清中の **mi RNA** 発現変動を解析した。第1章で見出した神経毒性マーカー候補である **mi R-9*** および **mi R-384-5p** のバイオマーカーとしての汎用性を検証した。

第1節 神経症状および病理組織学的解析

HCP 35 mg/kg 投与群において、失調性歩行や後肢麻痺などが投与後 **5** 日以降に認められ、投与後 **1** 日に大脳や小脳の白質に空胞が認められ、特に脳梁および小脳白質で顕著であった。投与後 **3** 日以降では病変の分布の拡大が見

られた。免疫組織化学染色の結果、投与群においてミエリン塩基性蛋白の染色性が空胞周囲でやや増加したが、空胞以外の領域では、差は見られず、ニューロフィラメント、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアにも明らかな差は見られなかった。よって、HCPによる髄鞘の空胞において、ミエリン塩基性蛋白および軸索が比較的保たれており、グリア細胞反応を伴わないことが示された。

第2節 miRNA 発現解析

HCP 投与群の血清において、血清中 **mi R-9*** および **mi R-384-5p** の発現変動は見られなかった。また、小脳組織を用いて、**mi RNA** の網羅的な発現をマイクロアレイにより解析し **RT-PCR** 法により検証したが、特異性のある **mi RNA** 変動は見出せなかった。

【まとめ】

本研究では、ラットを用いた化学物質誘発性の神経病変の病理組織学的解析に加え、神経毒性のバイオマーカーとなり得る **mi RNA** の探索および汎用性を検討し、以下の成績を得た。

1. **TMI** 投与ラットモデルの血清において、神経に高発現することが知られる **mi R-9*** および **mi R-384-5p** の発現が上昇し、神経毒性のマーカー候補と考えられた。
2. **TMI** 投与により、海馬を主とした神経細胞死に加えグリア細胞反応が生じた。**mi R-384-5p** および **mi R-9*** の血清中発現上昇は海馬の神経細胞死の発現と一致することが示され、神経細胞体傷害のマーカーになり得ることが示された。
3. **TMI** 投与による海馬病変の形成に **mi R-132** および **mi R-21** が関与することが示された。
4. **IDPN** 投与ラットモデルでは、主に橋・延髄に、グリア細胞反応を伴わない軸索腫大が生じることが分かった。
5. **IDPN** 投与による橋・延髄における軸索病変の形成に **mi R-547*** が関与することが示された。
6. **HCP** 投与ラットモデルでは、小脳を中心とした白質の髄鞘に、グリア細胞反応を伴わない空胞化が生じることが分かった。
7. **mi R-384-5p** および **mi R-9*** は、**IDPN** および **HCP** ラットモデルでは変動しないことが分かり、これらの **mi RNA** は神経細胞体を標的とする神経毒性の血清中バイオマーカーになると考えられた。

この一連の研究で得られた病理組織所見や **mi RNA** 解析結果は、化学物質の神経組織の毒性病変の評価や神経毒性のメカニズム解明において有用な情報を提供する。

審査結果の要旨

神経系は、生体にとって重要な中枢機能を担うが、再生能力の低い組織であることから、神経組織の障害が生体に与える影響は甚大である。近年、化学物質による健康影響、特に神経毒性に対する人々の関心が高まっている。それゆえに、安全性試験のガイドライン上、様々な神経毒性試験が要求されており、化学物質を開発する企業にとって、神経毒性の発現は、経済的および時間的に大きな負担となっている。そこで、神経毒性を評価する有用な手段、例えばバイオマーカーなどの開発が求められているが、現状、あまり進んでいない。近年、**non-coding RNA** の一種である **25 塩基前後のマイクロ RNA (mi RNA)** が、その組織特異的発現および体液中における高い安定性を有する特性から、バイオマーカーとして注目されている。**mi RNA** が神経毒性の発現にも関与することが報告されているが、毒性発現機序や神経病理学的変化との関連など、未だ不明な点が多い。

本研究では、標的部位の異なる **3 種**の神経毒性物質により誘発した神経障害ラットモデルを用いて、血清および神経組織中の **mi RNA** の解析と詳細な病理組織学的変化を検討し、**mi RNA** 変動と神経毒性病変との関連を調べるとともに、神経毒性のバイオマーカー候補となる得る血清中 **mi RNA** の探索を試みている。

第 1 章では、神経細胞体を標的とするトリメチルスズ (**TMT**) の単回経口投与により誘発した神経障害ラットモデルを用いて、血清中 **mi RNA** バイオマーカーの探索と脳組織中 **mi RNA** 解析を行うとともに、神経症状や病理組織変化との関連を調べている。**TMT** を投与したラットにおいて、振戦や過敏などの神経症状に加え、海馬を中心とした神経細胞死およびグリア細胞反応が認められた。また、海馬の神経細胞死の発現時期と一致して神経組織中に高発現することが知られる **mi R-9*** および **mi R-384-5p** の発現が血清中にて上昇することが分かり、これらの **mi RNA** が **TMT** 誘発神経細胞死のバイオマーカーになり得る可能性を提示している。さらに、海馬組織において、シナプスの形態や機能を制御するとされている **mi R-132** および神経保護作用に関連するとされている **mi R-21** の発現上昇を明らかにし、**TMT** 誘発の神経病変形成との関わりが示されている。

第 2 章では、軸索を標的とする **3,3'-イミノジプロピオニトリル (IDPN)** の反復経口投与により誘発した神経障害ラットモデルを用いて、病理組織学的特徴および脳組織における **mi RNA** 変動を解析している。**IDPN** を投与したラットにおいて、失調性歩行や後肢麻痺などの神経症状に加えて、橋・延髄を中心に軸索の腫大が認められた。また、橋・延髄組織において、**mi R-547*** が有意に増加しており、**IDPN** 誘発の軸索病変と関連することを示している。第 1 章で得られた **TMT** 投与による血清中バイオマーカー候補 **mi RNA (mi R-9* および mi R-384-5p)** の汎用

性を調べているが、IDPN モデルでは、これらの mi RNA の血清中での変動はみられなかった。

第 3 章では、髄鞘を標的とするヘキサクロロフェン (HCP) の反復経口投与により誘発した神経障害ラットモデルを用いて、病理組織学的特徴および脳組織における mi RNA 変動を解析している。その結果、HCP を投与したラットにおいて、失調性歩行や後肢麻痺などの神経症状に加えて、主に脳梁や小脳白質の髄鞘に空胞が認められた。しかし、小脳組織において、特異性のある mi RNA 発現変動は得られなかった。第 1 章で得られた TMT 投与による血清中バイオマーカー候補 mi RNA (mi R-9*および mi R-384-5p) の汎用性を調べているが、IDPN モデル同様に、HCP モデルにおいても、これらの mi RNA の血清中での変動はみられなかった。すなわち、TMT モデルにおけるこれらの血清中 mi RNA の上昇は神経細胞死に特異的であることを提示している。

本研究成果は、標的部位の異なる神経毒性を有する 3 種の化学物質による特徴的な組織変化を神経病理学的に詳細に解析するとともに、神経細胞死に特異的なバイオマーカー候補となり得る血清 mi RNA の存在を新たに提示している。この成果は、獣医学・医学、特に毒性病理学分野の研究の新たな展開に資するものであり、最終試験の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。