

|            |  |       |       |
|------------|--|-------|-------|
| 氏名         | NANG THINN THINN HTIKE   |       |       |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（理学）   |       |       |
| 学位記号番号     | 博理工甲第 1069 号   |       |       |
| 学位授与年月日    | 平成 29 年 9 月 22 日   |       |       |
| 学位授与の条件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当   |       |       |
| 学位論文題目     | Effects of Environmental Chemicals on Brain Development and Their Sex Differences（脳発達に対する環境化学物質の影響とその性差） |       |       |
| 論文審査委員     | 委員長  | 准教授   | 塚原 伸治 |
|            | 委員   | 連携教授  | 堀口 敏宏 |
|            | 委員   | 連携准教授 | 前川 文彦 |
|            | 委員   | 教授    | 小林 哲也 |
|            | 委員   | 准教授   | 坂田 一郎 |

## 論文の内容の要旨

Several environmental chemicals are suspected to exert deleterious effects on development of the brain, which may result in an increased risk of neurodevelopmental disorders. Arsenic is one of the environmental toxicants that disrupt brain development. According to a long-term prospective study of survivors of arsenic poisoning from the Morinaga milk incident in Japan, arsenic poisoning during infancy leads to a risk of mortality from neurological diseases in adulthood. However, the mechanisms of developmental neurotoxicity of arsenic are not completely understood. Tris-(2,6-Dimethylphenyl) phosphate (TxP), a flame retardant, is recently recognized as a pollutant in house dust in United States and Japan. It is suspected that TxP has an adverse effect on sex steroid-dependent sexual differentiation of the brain because of the endocrine-disrupting actions of TxP. The present study aimed to determine the mechanisms responsible for the developmental neurotoxicity of arsenic and examine whether developmental exposure to TxP affects the sexual differentiation of the brain.

It has been demonstrated that arsenic induces apoptotic cell death in neurons and disrupts neurogenesis. Astrocytes are other target cells of arsenic in the developing brain. In primary cultured astrocytes, sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ) exposure alters the cell cycle by inducing unscheduled S phase entry. In the present study, the fate of astrocytes exposed to  $\text{NaAsO}_2$  was examined. Astrocytes exposed to  $\text{NaAsO}_2$  died after unscheduled S phase entry. However,  $\text{NaAsO}_2$  did not increase the amount of nucleosomes generated from DNA fragmentation and failed to alter the expression of molecules relevant to unscheduled S phase entry coupled apoptosis. These findings suggest that  $\text{NaAsO}_2$  affects the cell cycle and viability of astrocytes by inducing unscheduled S phase entry coupled with cell death that may be caused by mechanisms other than apoptosis.

There is a sex difference in the prevalence of neurodevelopmental disorders, indicating that sex is a biasing factor for pathogenesis of neurodevelopmental disorders. The developmental neurotoxicity of environmental chemicals may be different between sexes. To assess the sex-bias in  $\text{NaAsO}_2$  toxicity to astrocytes, the effects of  $\text{NaAsO}_2$  on the proliferation and cytoskeletal gene expression of primary cultured astrocytes in both sexes were examined. The proliferation and cytoskeletal gene expression of astrocytes were decreased by  $\text{NaAsO}_2$ , but the  $\text{NaAsO}_2$  effects did not

differ between sexes. However, astrocytes exhibit sex differences in the proliferation and cytoskeletal gene expression independently of NaAsO<sub>2</sub> exposure.

To determine the effects of TxP on the sexual differentiation of the brain, the morphology of the sexually dimorphic nuclei was examined in mice exposed to TxP during the developing period. The effects of TxP exposure on the morphology of the sexually dimorphic nuclei differed between sexes. TxP more effectively affected the sexually dimorphic nuclei of female mice. The sexually dimorphic nuclei of female mice were masculinized by developmental exposure to TxP.

In conclusion, the present study showed that NaAsO<sub>2</sub> exposure induces unscheduled S phase entry coupled with cell death in astrocytes. The toxic effects of NaAsO<sub>2</sub> on astrocytes may have no sex-bias, although astrocytes have a sex difference in cellular property. The present study also showed that developmental exposure to TxP affects the sexual differentiation of the brain by altering the morphology of the sexually dimorphic nuclei in sex-specific manner. Sex is a biasing factor to alter the effects of TxP exposure on brain development.

## 論文の審査結果の要旨

Nang Thinn Thinn Htike 氏の学位論文について、学位論文審査委員会は平成29年7月31日に理学部3番教室において公開で発表会を開催し、論文の内容を審査した。以下に審査結果の概要を記す。

我々を取り巻く環境には様々な化学物質が存在し、その中にはヒトの健康に影響を及ぼす恐れがある物質も含まれる。化学物質の曝露による健康リスクを低減するには、化学物質の毒性を評価し、毒性のメカニズムを明らかにすることが重要である。発達途上にある胎児や小児は、化学物質に対する感受性が成人に比べて高く、曝露の影響を受けやすい。特に、脳に対する影響は、神経発達障害や精神疾患を引き起こすことが懸念されている。ヒ素は発達神経毒性がある物質の一つであり、ヒ素に汚染された地下水を飲料水として摂取した子供の認知機能が低下することが明らかになっている。神経細胞に対するヒ素の毒性に関する研究は進んでいるが、グリア細胞に対する毒性は不明な点が多い。脳発達の過程には性差があり、幾つかの神経発達障害の発症率には性差がみとめられる。脳は発達期の精巣から分泌されるテストステロンの作用により男性化（雄性化）し、ホルモンが作用しないと女性化（雌性化）する。これらのことから、化学物質の曝露影響には性差が生じる場合があり、特に内分泌かく乱作用を有する化学物質の脳発達への影響は性別で異なると考えられる。難燃剤として工業製品に含まれる TxP（りん酸トリス(2,6-ジメチルフェニル)）には内分泌かく乱作用があるが、脳発達に対する影響は不明である。本研究では、グリア細胞の一種であるアストロサイトに対するヒ素の影響と毒性発現機序、さらに、発達期に TxP を曝露した雌雄マウスの脳の性分化への影響が検討された。本論文に記述される主な研究成果は以下の通りである。

第一章では、本論文の研究の背景が記述されている。発達期に曝露する化学物質に対する脳の脆弱性、化学物質の発達神経毒性や内分泌かく乱作用等に関する研究知見が記されるとともに、本研究の目的が述べられている。

第二章には、マウスの大脳皮質に由来するアストロサイトの培養系を用いて、アストロサイトの細胞周期と生存性に対するヒ素化合物の一つである亜ヒ酸ナトリウムの影響を検討した研究結果が記載されている。細胞周期を可視化する蛍光タンパク質プローブである Fucci を発現するアストロサイトのライブイメージング解析から、亜ヒ酸ナトリウムを含む培養液で培養されたアストロサイトでは、G1 期から S 期への移行が通常の細胞周期よりも早まり、最終的に細胞死が起こることが明らかになった。この細胞死のメカニズムを明らかにするため、アポトーシスの際に生じるヒストン結合 DNA 断片の量、アポトーシスあるいは細胞周期制御に関連する各種分子（p53、Gm36566、E2F1、E2F4、p21）の mRNA 量を調べた。その結果、DNA 断片量と mRNA 量は亜ヒ酸ナトリウムの影響を受けないことが分かった。以上の結果から、ヒ素曝露によって誘導される S 期移行後の細胞死はアポトーシス以外のメカニズムによって引き起こされることを考察している。

第三章では、アストロサイトに対するヒ素の毒性に性差があるか否か検討した結果が記述されている。実験では、雌雄マウスの大脳皮質に由来するアストロサイトの培養系を用いて、細胞骨格を形成する中間径フィラメント（GFAP、vimentin、synemin、nestin）の発現に対する亜ヒ酸ナトリウムの影響が調べられた。その結果、これらの中間径フィラメントの発現は亜ヒ酸ナトリウムによって用量依存的に抑制されたが、その効果には性差がみとめられなかった。このことから、少なくともアストロサイトの細胞骨格に対するヒ素の毒性影響には性差がないことが明らかになった。しかし、ヒ素曝露の有無に関わらず、GFAP の発現は雄マウスのアストロサイトにおいて、synemin の発現は雌マウスのアストロサイトにおいて高いことが明らかになり、アストロサイトの細胞骨格には性差があることを記している。

第四章では、脳の性分化に対する TxP の影響を明らかにするため、発達期に TxP を曝露した雌雄マウスの性的二型核を組織学的に解析した結果が示されている。解析領域は、分界条床核主核 (BNSTp) とカルビンディナー性的二型核 (CALB-SDN) と呼ばれる性的二型核であり、どちらも雄優位な形態学的な性差がみられる。脳を雄性化する精巣由来のテストステロンは脳内で芳香化され、エストラジオールとして働くので、TxP 曝露の影響と比較するためエストラジオールの曝露も併せて検討している。その結果、エストラジオールを曝露した雌マウスの BNSTp と CALB-SDN は雄性化し、これと同様に、TxP を曝露した雌マウスの BNSTp と CALB-SDN は雄性化した。一方、雄マウスでは、性的二型核に対するエストラジオール曝露の影響は見られず、TxP も性的二型核の雄性化を阻害しなかった。以上の結果は、TxP には脳を雄性化するエストラジオール（芳香化テストステロン）と類似の作用があり、発達期の TxP 曝露は脳の性分化に影響を及ぼすことを示すものである。

第五章では、得られた研究成果をもとに、化学物質の神経毒性と内分泌かく乱作用、性別による化学物質の影響の違いに関する総合的な考察がなされ、今後の展望が述べられている。

以上のように、本論文は、アストロサイトに対するヒ素毒性と毒性発現機構の一端を明らかにし、内分泌かく乱作用が疑われる TxP の脳の性分化に対する影響を初めて証明したものである。これらの研究成果は、筆頭著者として *Frontiers in Neuroscience* 誌に掲載されており、また、共著者として一報の論文が *General and Comparative Endocrinology* 誌に受理されている。以上のことから、学位論文審査委員会は本論文を博士（理学）の学位授与に相応しいものと判断し、学位論文の審査を合格と判定した。