

## (O-2)

# 妊娠期のグルホシネート曝露が仔マウスの脳発達に与える影響

和泉 宏謙<sup>1</sup>、出村 舞奈<sup>1</sup>、今井 彩子<sup>1</sup>、小川 良平<sup>2</sup>、山本 拓海<sup>1</sup>、森 寿<sup>1</sup>、吉田 知之<sup>1</sup>  
(富山大学 医学部 <sup>1</sup>分子神経科学、<sup>2</sup>放射線診断・治療学)

IZUMI Hironori, DEMURA Maina, IMAI Ayako, OGAWA Ryohei, YAMAMOTO Takumi, MORI Hisashi, YOSHIDA Tomoyuki :  
Effect of maternal exposure to glufosinate ammonium on the fetal brain development

Pesticides including herbicides are used to protect crops against unwanted species. However, exposure to pesticides is potentially associated with developmental disorders in mammals including humans, because the developing brain in perinatal and childhood periods is thought to be vulnerable to adverse effects of pesticides. Previously, through synapse-formation assay with use of synapse organizer-coated beads, we reported disturbance of presynaptic differentiation in cultured neurons from fetus with maternal glufosinate ammonium (GLA) exposure. For better understanding of this synapse pathology, we examined transcriptomes of cultured neurons along with neuronal development, and found that down-regulated genes in cultured neurons with maternal GLA exposure are related to the biological process of “nervous system development” within a certain period of neuronal development. Furthermore, we detected transient decrease in parvalbumin-positive neurons at postnatal developmental stage in the medial prefrontal cortex of offspring born to GLA-exposed dams. Our results suggest that maternal GLA exposure causes a developmental delay of the fetus brain, which may be discernable in the adult stage.

### 1. 目的

農薬は、農作業労働を軽減し、農作物の生産性を向上させることで、安定した供給に結び付けるための資材である。しかしながら、近年の疫学調査を通して、妊娠期における農薬曝露が自閉スペクトラム症や注意欠陥多動性障害などの神経発達障害のリスク要因と考えられるようになってきた。

我々は、これまでに除草剤グルホシネート (GLA) を妊娠マウスに投与することで、その胎仔由来の培養神経細胞でシナプス誘導量に変化を齎すことを見出していた (図 1)。今回、このシナプス病態の理解を目的として、病態の形成過程ならびに個体レベルでの表現型について解析を行ったので報告する。

### 2. 方法

#### (1) 培養神経細胞のトランスクリプトーム解析

妊娠日を揃えるために、C57BL/6N マウスの凍結胚を偽妊娠 ICR マウスに移植し、今回の実験に供した。移植後の ICR マウスに対し、妊娠 10~18 日目まで 2 日毎に GLA (0.8 mg/kg) を経鼻投与した。コントロール群には同量の生理食塩水を投与した。妊娠 18 日目において、帝王切開で得られた胎児から培養神経細胞を調製した。培養初日を培養 0 日とし、培養 6, 10, 14 日目 (DIV6, 10, 14) において RNA を抽出し、Clariom S Array (Thermo 社) を用いてトランスクリプトーム解析を実施した。そして、得られたデータを用いて主成分分析ならびにエンリッチメント解析を実施した。

#### (2) パルブアルブミン (Pvalb) の免疫組織染色

(1) と同様にして、妊娠マウスへ GLA または生理食塩水を経鼻投与した。仔マウスの脳解析では、出産後も母マウスに対して継続的に GLA または生理食塩水を投与した。仔マウスが生後 14 日目 (PND14) ならびに生後 21 日目 (PND21) に達した時点で、深麻酔下にて脱血・パラホルムアルデヒド固定を行った。マウスの脳を摘出し、50um 厚の切片を作製して Pvalb に対する抗体を用いて免疫組織染色を実施した。Pvalb 陽性細胞の数は顕微鏡下で計測し、両群における陽性細胞数について比較・解析した。

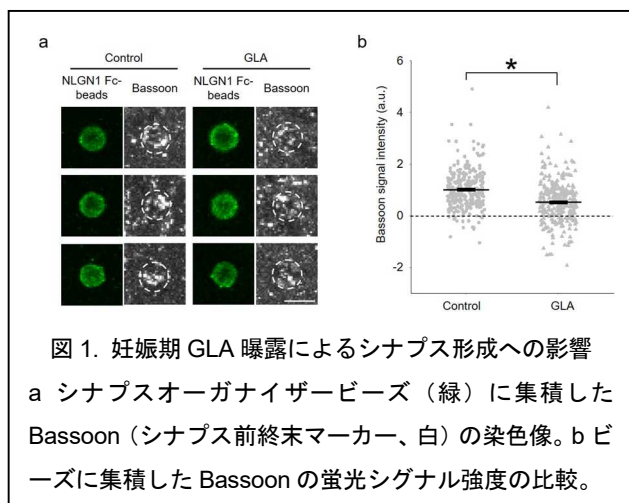


図 1. 妊娠期 GLA 曝露によるシナプス形成への影響

a シナプスオーガナイザービーズ (緑) に集積した Bassoon (シナプス前終末マーカー、白) の染色像。b ビーズに集積した Bassoon の蛍光シグナル強度の比較。

### 3. 結果

(1) 妊娠期 GLA 曝露による一過的な遺伝子発現変動  
妊娠期の GLA 曝露によるシナプス形成への影響には、どのような分子がどのようなタイミングで関わっているのかという点を明らかにするため、調製した培養神経細胞の各発達段階 (DIV6, 10, 14) でのトランスクリプトーム解析を実施した。得られたデータを用いた主成分分析の結果、コントロール群と比較して、GLA 曝露群は DIV10 においてその遺伝子発現プロファイルが一過的に大きく異なっていた (図 2 a)。そこで、DIV10 にて発現変動を示した遺伝子群を抽出し、エンリッチメント解析を実施した結果、発現減少を示した遺伝子群では、生物学的プロセスとして「神経発達」、細胞の構成要素として「シナプス」に関連する遺伝子が多く含まれていることが判った。

以上の結果は、我々がこれまでに見出していた「妊娠期の GLA 曝露がシナプス誘導量に変化を齎す」という結果を支持するものと考えられた。

#### (2) Pvalb 陽性細胞の発達への影響

母体への GLA 曝露がマウスの社会性行動に影響を与える研究報告はあるが、神経回路レベルでどのような変化が生じるかはこれまで判っていなかった。そこで、発達障害モデルでの変化が報告されている内側前頭前野での Pvalb 陽性細胞 (抑制性神経細胞の一種) に注目し、母体への GLA 曝露による Pvalb 陽性細胞の発達への影響について調べたところ、PND14 の GLA 曝露群ではその数が有意に減少していた (図 2 b,  $p < 0.05$ )。一方、PND21 ではコントロール群と同程度であったことから、Pvalb 陽性細胞の減少は生後の脳発達で一過的に生じたと考えられた。

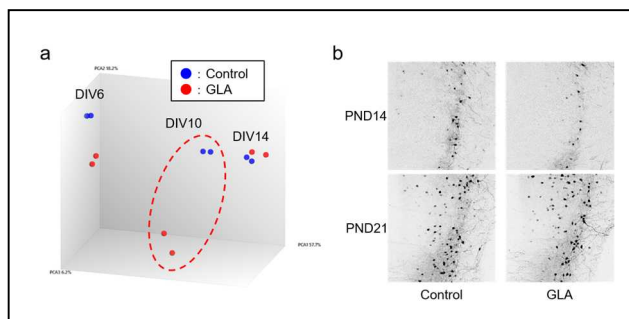


図 2. 培養神経細胞のトランスクリプトーム解析とマウス脳切片の解析

a 培養神経細胞が示す遺伝子発現プロファイルの発達に伴う変化。b マウス内側前頭前野での Pvalb 陽性細胞数の比較。

### 4. 考察

妊娠期の GLA 曝露による影響について、これまでに得られた結果を図 3 にまとめた。培養神経細胞のトランスクリプトーム解析を通して、妊娠期の GLA 曝露は神経細胞に一過的な遺伝子発現変動を齎すことが判った。この一過的な変動を示した DIV10 は培養神経細胞が同調的活動の発達を進めるタイミングに相当することから、今回の解析結果は神経回路形成に変化を齎す一端を捉えていると考えられた。一方、母体を介して GLA 曝露を受けた仔マウスについて、その脳解析を通して、PND14 における Pvalb 陽性細胞の減少を確認した。この結果は自閉スペクトラム症モデルマウスに特徴的な病理所見と合致し、神経回路網の変化に結び付くことが示唆された。また、Pvalb 陽性細胞数は成長とともにコントロール群と同程度になったことを踏まえると、GLA 曝露によって引き起こされる仔マウスの神経発達の遅延は成長とともにその差が見えなくなると考えられた。

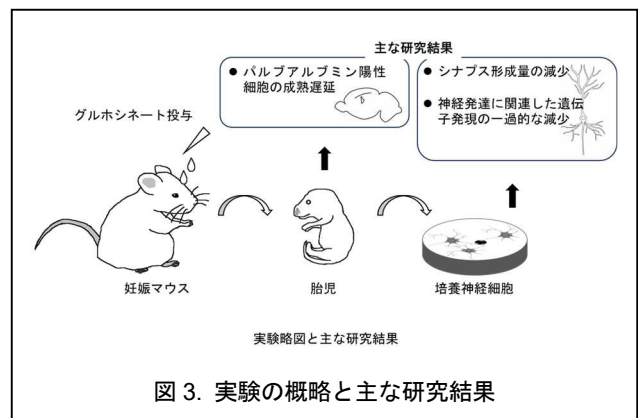


図 3. 実験の概略と主な研究結果

最近、妊娠期の農薬曝露以外にもウイルス感染や高血圧症と子どもの神経発達障害の因果関係が考えられているが、これらには共通の病態発症機序が存在する可能性があります。今後、シナプス形成の調節機能を破綻させる分子機序の解析をさらに進め、鍵となる母子間メディエーターを明らかにすることで、新たな予防・治療法の開発に役立つことが期待されます。

### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導くださいました富山大学・医学部・分子神経科学講座のスタッフの皆様、同大学・生命科学先端研究センター・田渕圭章先生、高雄啓三先生、松尾美奈さんに深謝いたします。本研究は、JSPS 科研費 (JP19K19407, 20H03350, 21H00190, 23H02585, JP23K09644) ならびに富山第一銀行奨学財団の助成を受けたものです。