

胎生 19 日齢ラット海馬ニューロンを分散培養し、血清存在下で 1 日培養後、無血清培地に交換した。血清除去刺激 24 時間後、約 70% の細胞は細胞死を起こした。この条件下でエストラジオールを 0、3、10、30 μ M 添加したところ、濃度依存的に血清除去による細胞死抑制効果が観察された (図 1)。同様の生存維持作用を各内分泌かく乱化学物質についても検討した。その結果、estrogenic な生理活性を持つといわれる内分泌かく乱化学物質 Bisphenol A および 4-Nonylphenol は 1 μ M で生存維持効果が認められた (図 2)。また、Anti-estrogenic な生理活性を持つといわれる Tamoxifen、4-

Hydroxytamoxifen は 3 μ M で認められた (図 3)。次にこの生存維持効果への培地添加物 (TIP) の関与を調べた。トランスフェリン (T) 5 μ g/ml、インシュリン (I) 5 μ g/ml、プロゲステロン (P) 20 nM の添加実験を行った結果、エストラジオールのみでは生存維持効果は僅かであったが、インシュリンによりその効果が著しく増強された。この時、インシュリンのみでは生存維持効果は全く見られなかった (図 4)。同様の増強効果は IGF-I などの神経栄養因子に対しても見られた (図 5)。また、内分泌攪乱化学物質 Bisphenol A、4-Nonylphenol、Tamoxifen および 4-Hydroxytamoxifen でも神経栄養因子に対する増強効果が認められた。このことは、エストロゲンや内分泌かく乱化学物質が何らかの細胞内シグナル伝達経路を介して神経栄養因子の生理機能を変化させていることを予想させた。

そこで最後にエストラジオールならびに内分泌攪乱化学物質のインシュリンとの相乗効果がどのような細胞内シグナル伝達経路を介しているかについて解析をおこなった。その結果、それぞれ MAP キナーゼと PI3 キナーゼ経路の特異的阻害剤である U0126 および LY294002 により、エストロゲンとインシュリンによる生存維持効果が顕著に阻害された (図 6)。この効果はエストラジオールや内分泌攪乱化学物質による神経栄養因子効果の増強効果が細胞内 MEK 及び PI-3 kinase の系を活性化することによって行われていることを示唆している。

D. 考察

今回我々は、ラット胎仔海馬ニューロンの血清除去による細胞死評価系を用いることでエストロゲンや内分泌攪乱化学物質がニューロンの生存を一部抑制し、さらにインシュリンや IGF-1 などの神経栄養因子によるニューロンの生存維持作用を著しく増強することを初めて明らかにした。

古くからの研究により、脳神経系の分化発達や維持に神経栄養因子が重要な役割を演じていることが知られている。特に発達期の脳神経系では、神経栄養因子によるニューロンの生と死の調節が「適切」に行われることが、ニューロンネットワークや脳構造の形成にとって不可欠であることが知られている。今回我々の得た結果は、内分泌攪乱化学物質が発達期における神経栄養因子の生理作用を乱すことにより、正常な脳神経系の構造異常や機能障害を引き起こす可能性を示し

た点で重要である。これらは内分泌かく乱化学物質による発達期中枢神経系障害への新たな作用メカニズムとして注目される。今後、生存維持効果に限らず神経栄養因子による神経突起やニューロトランスミッター放出に対する影響についても検討する必要もあるであろう。細胞内分子メカニズムについてはインシュリンレセプターまたは IGF-1 レセプターの下流を介するシグナル伝達分子とのクロストークが最も有力と考えられ、今後の実験で明らかにする必要がある。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質の中枢ニューロンに対する *in vitro* の評価系を確立することは緊急の課題である。今回我々が示した評価系は、ニューロンの生存に与える内分泌かく乱化学物質の作用機構を解析する上で有用となることが期待される。また、神経栄養因子とのクロストークは、これまで知られていなかった内分泌かく乱化学物質の脳神経系における標的を新たに示した点で重要なものと考えられる。特にそれらの細胞内シグナル伝達経路を分子レベルで解析していく必要がある。

F. 研究発表

1. Murai, M., Enokido, Y., Inamura, N., Yoshino, M., Nakatsu, Y., van der Horst, G.T., Hoeijmakers, J.H., Tanaka, K., Hatanaka, H. (2001) Early postnatal ataxia and abnormal cerebellar development in mice lacking Xeroderma pigmentosum Group A and Cockayne syndrome Group B DNA repair genes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 13379-13384.

2. Inamura N, Enokido Y, Hatanaka H (2001) Involvement of c-Jun N-terminal kinase and caspase 3-like protease in DNA damage-induced, p53-mediated apoptosis of cultured mouse cerebellar granule neurons. Brain Res. 904, 270-278.

図1 エストラジオールによるニューロンの生存維持効果

横軸のエストロゲンの濃度に対しそれぞれの培養時間後のMAP2陽性生存細胞数を表した

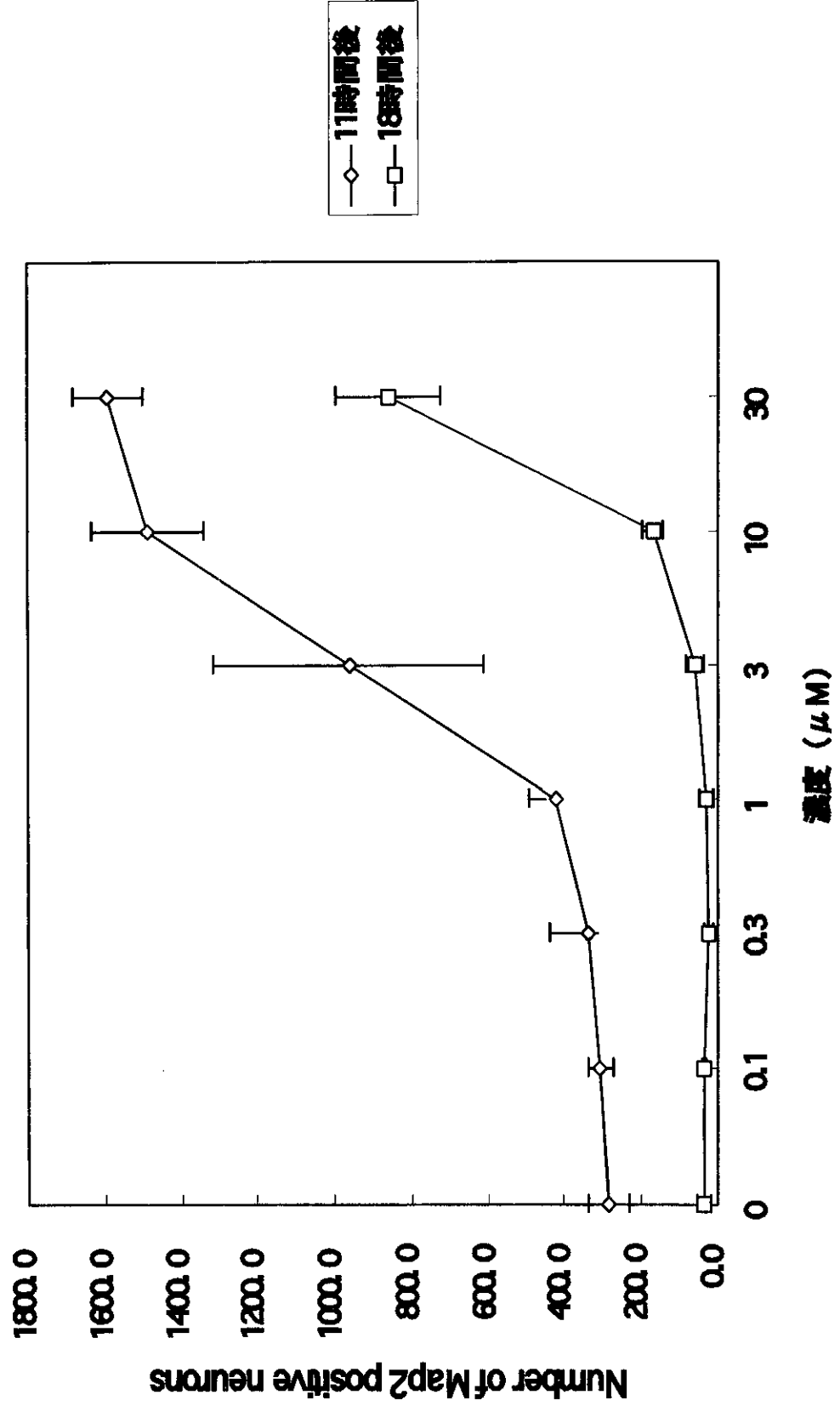


図2 Estrogenicな内分泌かく乱化学物質による生存維持効果

グラフ中の四角点はエストラジオール30 $\mu\text{g/ml}$ での生存維持効果

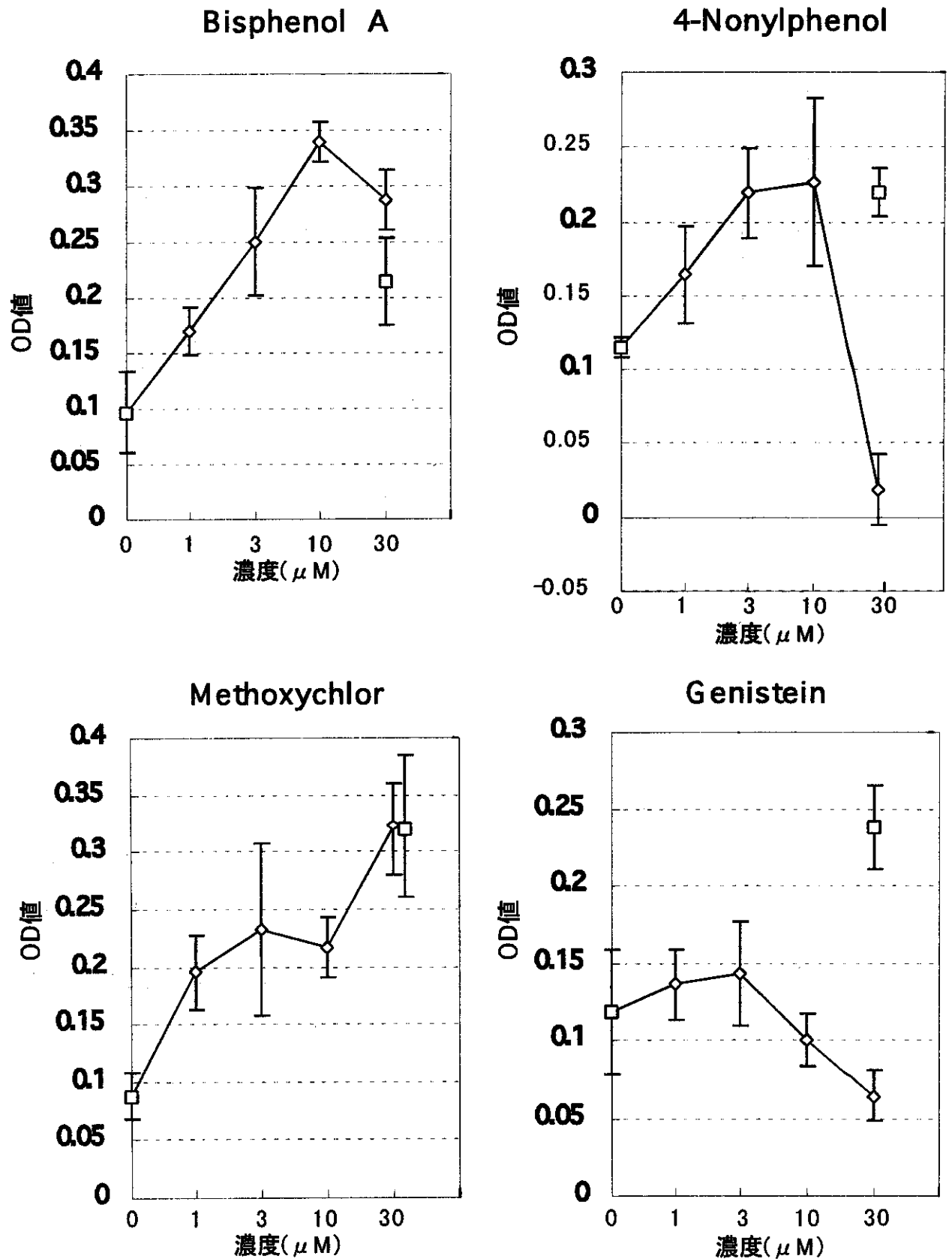


図3 Anti-Estrogenicな内分泌かく乱化学物質による生存維持効果

グラフ中の四角点はエストラジオール30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での生存率

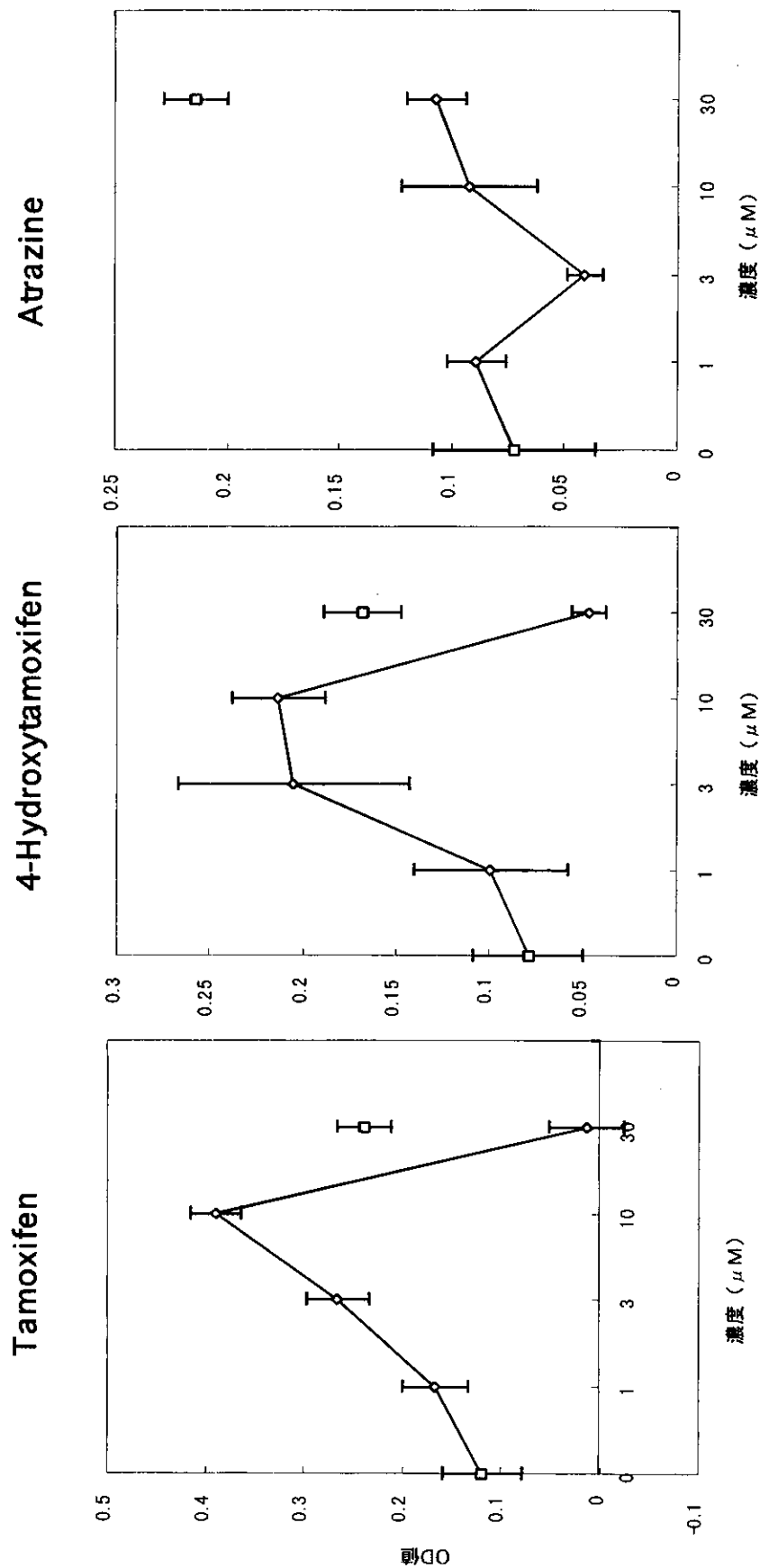


図4 エストラジオールによるインシュリンの生存維持効果の増強

T: トランスフェリン (5 μ g/ml) I: インシュリン (5 μ g/ml) P: プロゲステロン (20 nM)

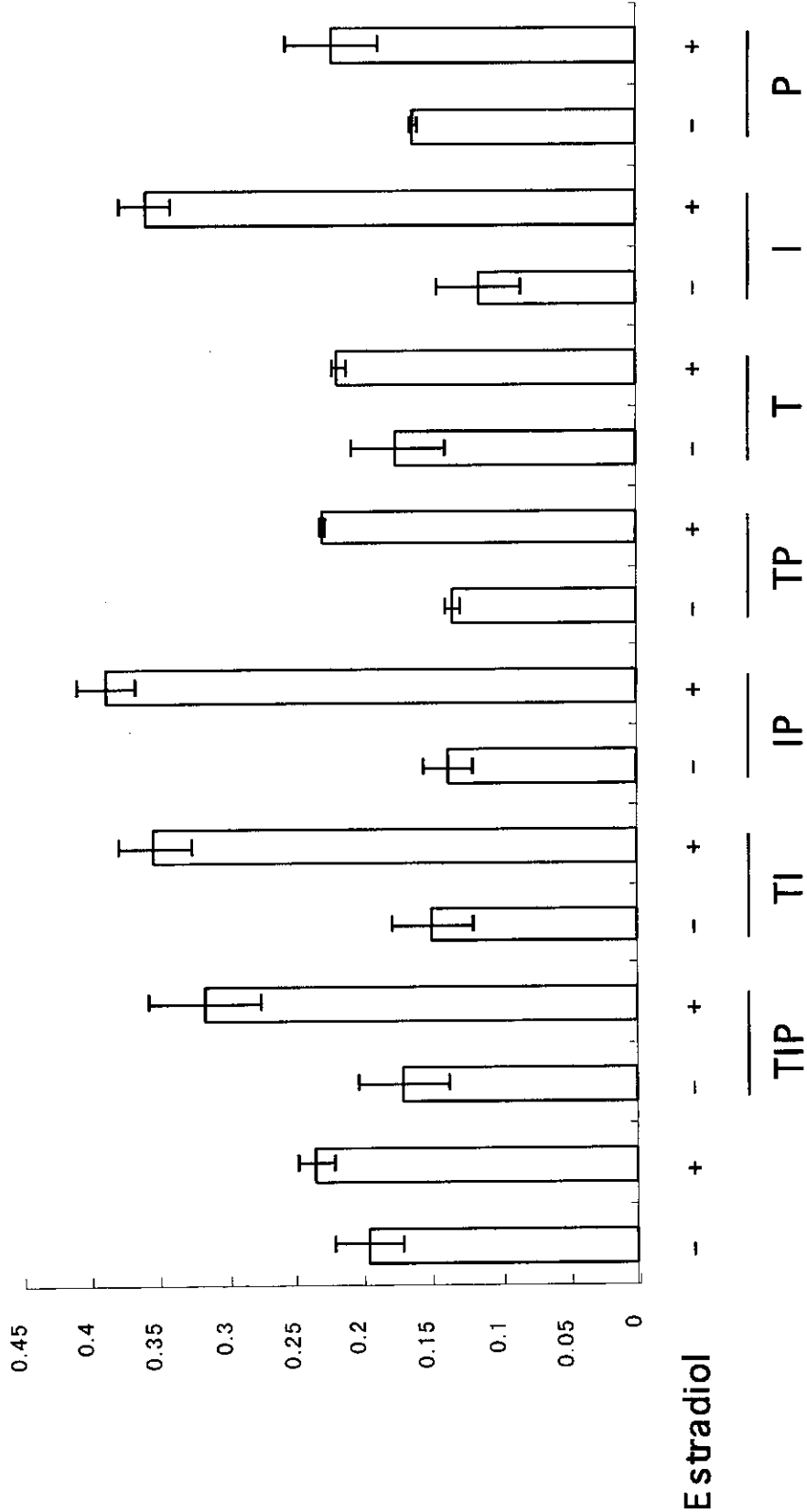


図5. エストラジオールとともにニューロンの生存維持効果を増強する神経栄養因子

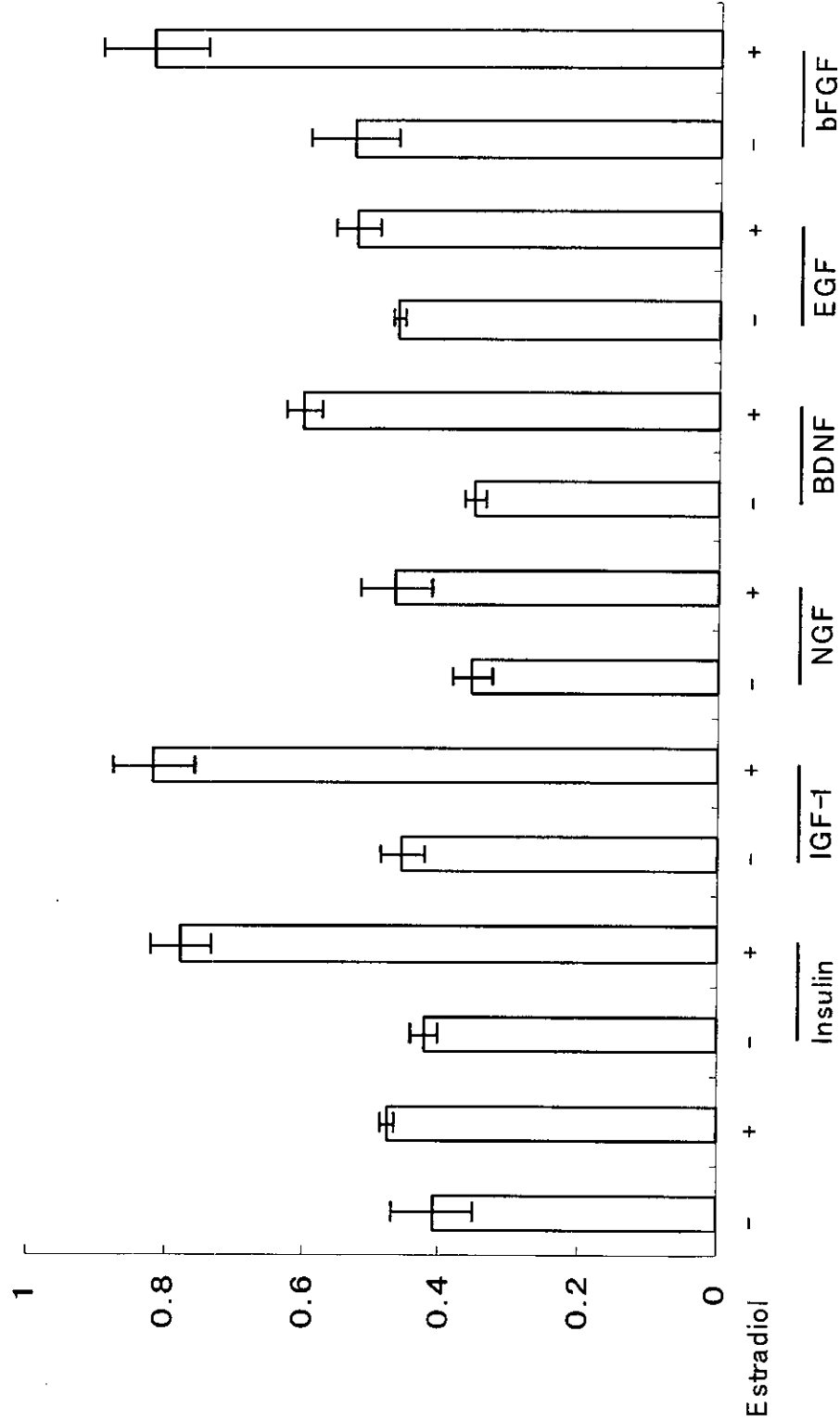
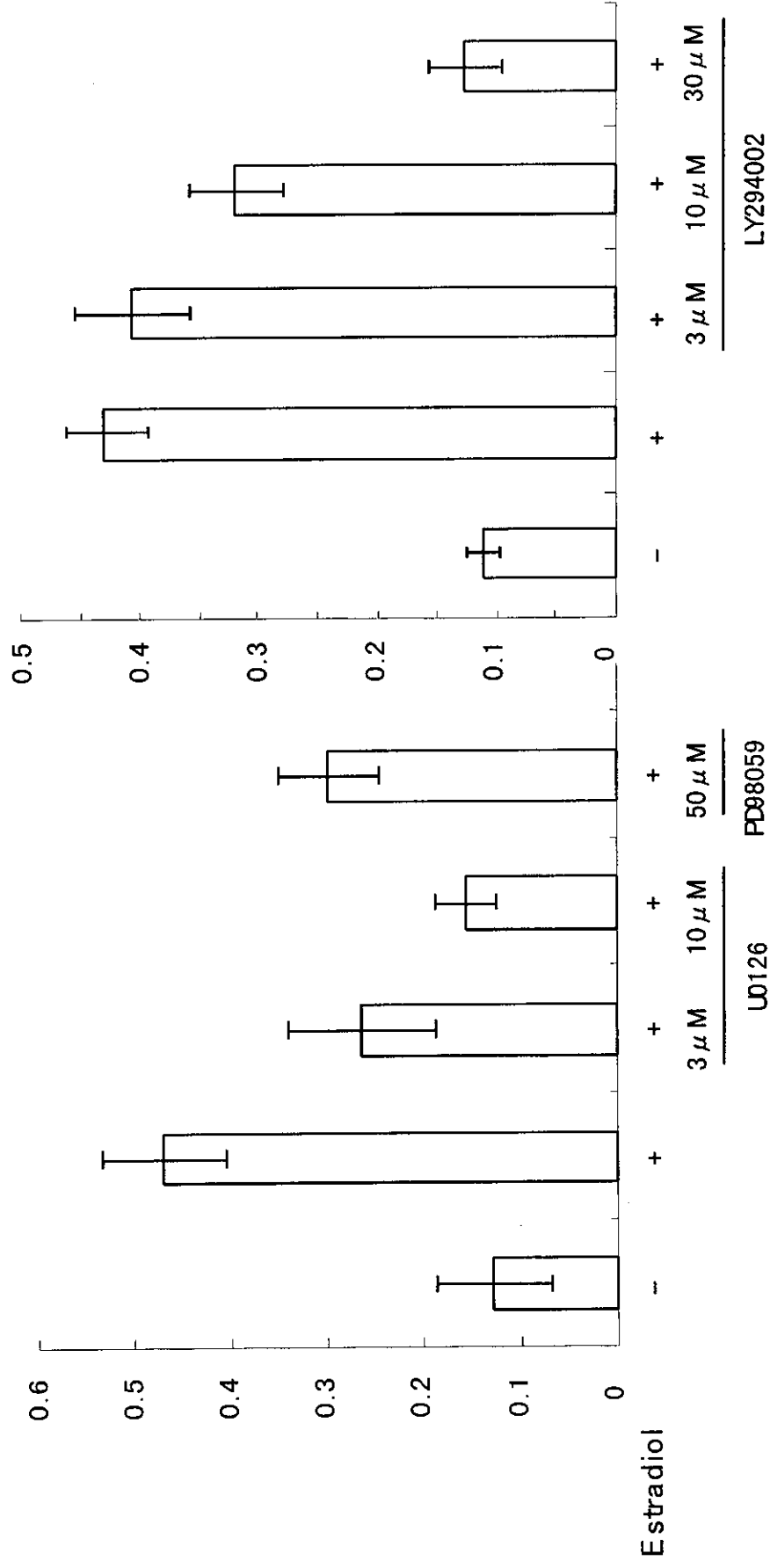


図6. MEK及びPI-3 kinase 阻害剤の効果



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Uneyama C., Shibutani, M., et al.	Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens.	J. Histochem. Cytochem.			in press
Shibutani, M., Uneyama C.	Methacarn a fixation tool for multipurpose genetic analysis from paraffin-embedded tissues.	Methods Enzymol.			in press
Shibutani, M., Uneyama C., et al.	Application of methacarn fixation for genetic analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens.	Toxicogenomics			in press
Suzuki M, Nishihara M., et al.	Induction of granulin precursor gene expression by estrogen treatment in neonatal rat hypothalamus.	Neurosci. Letters	297	199-202	2001
Suzuki M, Nishihara M.	Estrogen affects gene expression of estrogen receptors, androgen receptor, and aromatase in the neonatal rat hypothalamus.	J. Reprod. Dev.	48	17-23	2002
Suzuki M, Nishihara M.:	Granulin precursor gene; a sex-steroid inducible gene involved in sexual differentiation of the rat brain.	Mol. Genet. Metab.	75	31-37	2002
Yokoi, T., Asai, K. et al.	Developmental changes and localization of mouse brain serine proteinase mRNA and protein in mouse brain.	Neurosci. Letters			(in press)
Yoneda, K., Asai, K. et al.	Regulation of aquaporin-4 expression in astrocytes.	Mol. Brain. Res.	89	94-102	2001
Yamamoto, N., Asai, K. et al.	Alteration in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation.	Mol. Brain Res.	90	26-38	2001
Miyachi, T., Asai, K. et al.	Interleukin-1 β induces the expression of lipocortin 1 mRNA in cultured rat cortical astrocytes.	Neurosci. Res.	40	53-60	2001
Nakanishi, K., Asai, K. et al.	Recurrent subthreshold electrical activities of rat neocortical neurons progress during long-term culture.	Neurosci. Letters	304	85-88	2001
Moikawa, M., Asai, K. et al.	Isolation and characterization of a new immortal rat astrocyte with a high expression of NGF mRNA.	Neurosci. Res.	39	205-212	2001
Kataoka, H., Asai, K. et al.	Alpha-fetoprotein producing gastric cancer lacks transcription factor ATEF1.	Oncogene	20	869-873	2001
Aoyama, M., Asai, K. et al.	Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants.	Cancer Lett.	164	51-60	2001
Higashida, H., Asai, K. et al.	Cyclic ADP-ribose as a potential second messenger for neuronal Ca^{2+} signaling.	J. Neurochem.	76	321-331	2001
Fujita, M., Asai, K. et al.	Regulation of rat hippocampal neural cadherin in the kainic acid induced seizures.	Neurosci. Letters	297	13-16	2001
Katano, H., Asai, K. et al.	A metabotropic glutamate receptor antagonist, α -methyl-4-carboxyphenylglycine, attenuates immediate early gene mRNA expression following traumatic injury in cultured rat cortical glial cells.	Neurosci. Letters	306	101-105	2001

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yamamoto, N., Asai, K. et al.	Differential regulation of aquaporin expression in astrocytes by protein kinase C.	Mol. Brain Res.	95	110-116	2001
Nishiwaki, A., <u>Asai, K.</u> et al.	Expression of glia maturation factor during retinal development in the rat.	Mol. Brain Res.	95	103-109	2001
Murai, M., <u>Enokido, Y.</u> et al.	Early postnatal ataxia and abnormal cerebellar development in mice lacking Xeroderma pigmentosum Group A and Cockayne syndrome Group B DNA repair genes.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	98	13379-13384	2001
Inamura, N., <u>Enokido, Y.</u> et al.	Involvement of c-Jun N-terminal kinase and caspase 3-like protease in DNA damage-induced p53-mediated apoptosis of cultured mouse cerebellar granule neurons.	Brain Res.	904	270-278	2001