

なる。試験管内でチューブリン (1 mg/ml) と MAP2 (0.05 mg/ml) を再構成 (20 mM MES、80 mM NaCl、2 mM EGTA、0.1 mM EDTA、1mM MgCl₂、1 mM GTP、pH 6.75) し、37°Cの加温により重合反応を介しさせ、345 nm の吸光度の経時変化を 15 分間測定した (図 12)。

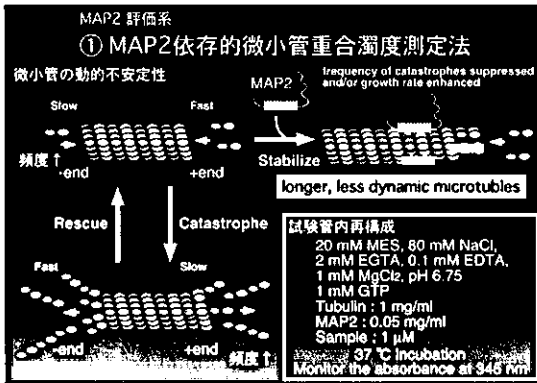


図 12 : MAP2 依存的微小管重合濁度測定法

3. 海馬神経細胞突起測定

ラット 17 日胚の海馬より常法に従いトリプシン処理により細胞を分散、調整した。5% FBS、5% HS、0.1% メルカプトエタノールを含む DMEM / F-12 培地にて懸濁し、 1×10^5 cells/cm² の細胞密度でポリオルニチンコートカバーガラスに播種した。培養 1 日後の cytosine β -D-arabinoside 処置により神経細胞以外の増殖性細胞の除去を行った。培養開始 2 日目に各神経ステロイド、化学物質を処置し、処置後 1 日後に樹状突起、軸索のマーカである MAP2 及び tau の免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。細胞体からの樹状突起数、突起伸展長を測定

した。各処置群について細胞数 200 個以上を観察し、測定した (図 13)。



図 13 : 海馬神経細胞樹状突起計測法

4. 受動的回避型学習試験法

ddY 雄性マウスの脳室内に各神経ステロイド、化学物質を投与し、投与 1 日後にステップスルー型の受動的回避学習試験装置を用いて、暗室に入ると電気刺激が与えられることをトレーニングし学習させた。トレーニングの 48 時間後に学習試験として暗室に入るまでの潜時を測定した。潜時のカットオフタイムは 300 秒と設定した。

II. 新規細胞膜 G 蛋白質連関型受容体

1. 肥満細胞脱顆粒応答測定

肥満細胞株化細胞のラット好塩基性白血病細胞 RBL-2H3 を用いた。測定は肥満細胞分泌顆粒に含まれる β -hexosaminidase 遊離をその酵素活性を指標として測定した。細胞をコラーゲンコートした 24 well プレートに 1×10^5 cells/well の密度で播種し、Gi シグナルを活性化する quercetin (30 μ M) 処置下で 2 日間培養した。培養

液を HEPES-Tyrode 液に置換し、薬物処置を行い 10 分後の培養上清を回収した。上清中の分泌 β -hexosaminidase 酵素反応を行いプレートリーダーにて OD₄₀₅ を測定した(図 14)。

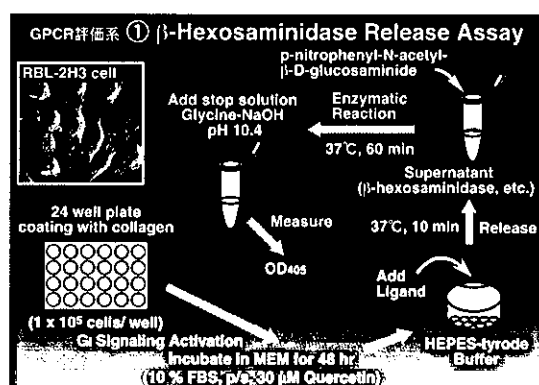


図 14: β -ヘキソサミン遊離測定

2. 細胞内カルシウム濃度測定

RBL-2H3 細胞の培養液を $2 \mu\text{M}$ Fura-2-AM を含む HEPES 溶液 (pH7.4) に置換し 45 分間インキュベーションし、Fura-2 細胞内に取り込ませた。HEPES 溶液で洗浄後、2 波長励起光によるイメージングを行い、リガンド処置後の細胞内カルシウム濃度上昇と反応細胞数の計測を行った。

3. Gq α 蛋白質発現抑制

Gq α サブユニットのアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ODN、5'-ATGGACTCCAGAGT-3') とミスセンスオリゴヌクレオチド (MS-ODN、5'-AGTGACCTCAGGAT-3') 前処置を発現抑制は抗 G_{q11} 蛋白質のウエスタンブロットにより確認した。

4. 受容体結合実験

細胞膜を通過しない牛血清アルブミンに PROG 及び FITC を共有結合したリガンド (PROG-BSA-FITC) を固定 RBL-2H3 細胞と室温にて 120 分間インキュベート後、共焦点蛍光顕微鏡により観察した。

5. 疼痛過敏応答測定

生理食塩水に溶解したリガンドを ddY 雄性マウス右後肢足蹠皮下に投与した際に観察される Biting (右後肢へのかみつき)、Licking (右後肢をなめる) といった行動を侵害反応とみなし、投与後 0-10 分間における侵害反応時間を計測した (ABL テスト)。

6. 血管透過性亢進作用

マウスをペントバルビタール (50 mg/kg , i. p.) で麻酔し、 50 mg/kg のエバンスブルー色素溶液を尾静脈に投与した。エバンスブルーは血中アルブミンと結合する性質を有しており血管透過性の指標として用いられる。エバンスブルー投与後 10 分後にリガンドを右後肢足蹠皮下に投与し、左後肢には対照として生理食塩水を投与した。阻害薬はリガンド投与 5 分前に足蹠に投与した。30 分後にマウスの安楽死を行い、後肢皮膚組織を採取した。採取組織を風乾し、ホルムアミド処置 (55°C 、24 時間) によりエバンスブルーを抽出し、OD₇₅₀ にて測定した。

(倫理面の配慮)

本実験の実験動物に対する取り扱い

は、動物愛護及び管理に関する法律（昭和48年法第105号、平成11年一部改正）及び長崎大学における実験動物指針に則り進められ、動物愛護上の配慮に問題はない。

C. 研究結果

神経ステロイドのG蛋白質連関型細胞膜受容体機能解析と内分泌かく乱物質の作用機序と変調解析

末梢に存在する肥満細胞が神経ステロイドの作用によりヒスタミン遊離を介した知覚神経興奮を起こすという背景（図15）を基に、既に研究分担者が脳神経細胞に存在を確認している神経ステロイドG蛋白質連関型細胞膜受容体のモデル実験として肥満細胞株RBL-2H3細胞に対する脱顆粒応答反応について神経ステロイドの作用検討を行った。

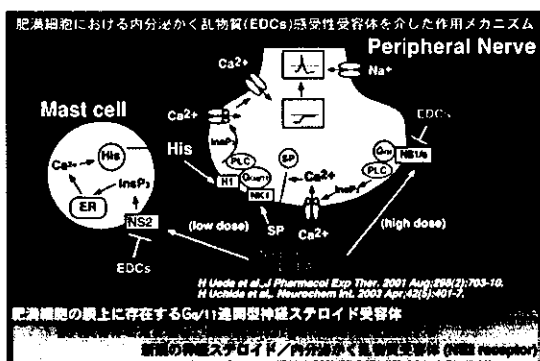


図15：肥満細胞における作用

神経ステロイドによる脱顆粒応答反応：

デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) で刺激すると 0.1 nM から 1 μM の濃度範囲において用量依存的な脱顆粒応答反応が認められた。また、その硫酸抱合体 (DHEAS) とプレグネノロン硫酸抱合体 (PREGS) についても同様の結果が得られた。次に DHEAS (濃度：1 μM) による反応を経時的に解析すると、添加後 5 分後に顕著な反応が確認され 10 分後に最大反応が観察された。細胞形態、生存活性には無影響であった。一方、プロゲステロン (PROG：1 μM) 及びエストロゲン (E₂：1 μM) は脱顆粒反応を引き起こさなかったが、DHEAS、PREGS の反応に対して拮抗した。また、それらにウシ血清アルブミンを共有結合させた細胞膜を透過しないリガンドである PROG-BSA、E₂-BSA でも同様の拮抗作用が得られた。このことは、DHEAS、PREGS の作用標的分子が細胞膜上に存在することを強く示唆するものである。

神経ステロイドによる脱顆粒応答反応情報伝達解析

DHEAS による脱顆粒応答反応の情報伝達機構を、各種阻害剤にて解析した。DHEAS の作用は、Gi 蛋白質の ADP-リボシル化により不活性化する百日咳毒素 (100 ng/ml) では無影響であったが、ホスホリパーゼ C (PLC) の阻害剤である U-73122 (100 nM) によって顕著に抑制された。U-73122 の不活性体である U-73343 は無影響であった。さらに、PLC の下流で働くイノシトール 3 リン酸 (IP₃) に着目して IP₃ の受容体からカルシウム放出遮断薬である Xestospongin C (1 μM) の影響を検

討したところ、DHEAS の作用を有意に抑制した。よって、DHEAS による脱顆粒応答は百日咳毒素非感受性であり、PLC の活性化とそれに続く細胞内カルシウム濃度の上昇が関与することが示唆された (図 16)。

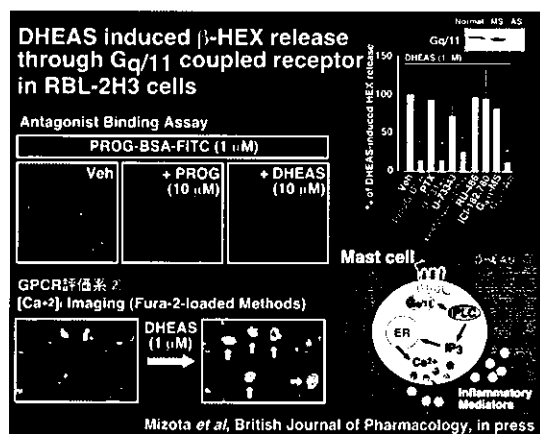


図 16 : DHEAS による脱顆粒応答反応

神経ステロイドの MAP2 依存的微小管重合能解析と内分泌かく乱物質の作用機序と変調作用による分類

脳で合成され作用するステロイドのプレグネロン (PREG) が微小管結合蛋白質の一つである MAP2 に結合するとの報告を受け、各種神経ステロイドが MAP2 に対して作用を有するかどうかを解析すると共に、内分泌かく乱化学物質の新規作用点としてこの MAP2 に着目した。

神経ステロイドによる MAP2 依存的微小管重合能に対する調節作用：

MAP2 依存的微小管重合に対する神経ステロイド (PREG、DHEA、PROG) の作用を濁度測定法を用いて測定した。

それぞれ 1 μM における反応を測定したところ、PREG は微小管重合量を約 3 倍に上昇させた (重合促進)。DHEA は単独で重合を阻害した (重合抑制)。それぞれの濃度依存性を測定したところ、50 nM から有意な作用が測定された。一方、PROG は単独作用は有していなかったが、PREG による重合促進、DHEA による重合抑制作用を阻害した (重合拮抗阻害)。また、PROG は PREG の重合促進作用の反応濃度曲線を高濃度側にシフトさせ、競合的な作用であることが示唆された (図 17)。

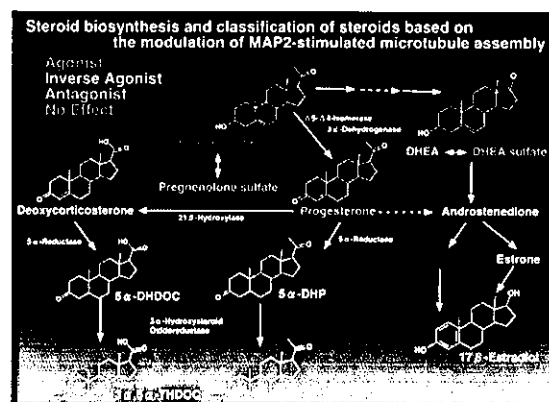


図 17 : 神経ステロイドの作用分類

MAP2 はチューブリンと結合してリング構造を形成する。MAP2 がチューブリンの重合を促進するのは、このリング構造が重合の核として働くのとチューブリンの脱重合による「反り」を物理的に阻害するという 2 点が挙げられる。微小管重合が平衡化した状態に PREG を処置すると更に重合量は増加したが、DHEA 処置では平衡化した微小管重合量の減少はみられなかった。このことは、DHEA の重合抑制作用は脱重

合促進によるものではないことを意味すると同時に、神経ステロイドによる微小管重合調節は微小管の核形成を制御しているものと考えられる(図18)。また、他の微小管重合蛋白質であるTau存在下でも微小管重合は促進されるが、この重合反応にはいずれの神経ステロイドも無影響であった。

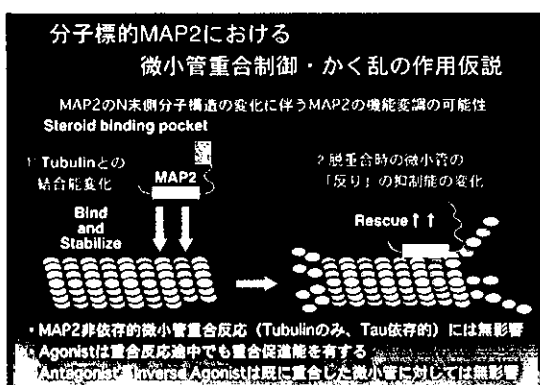


図18：MAP2における微小管重合制御
かく乱の作用仮説

内分泌かく乱化学物質によるMAP2依存的微小管重合能の変調：

被験物質のうちビスフェノールA (BPA) 及びノニルフェノール (NP) のMAP2依存的微小管重合作用に対する影響を濁度測定法を用いて測定した(濃度: $1\mu\text{M}$)。BPAは単独作用を有していなかったが、PREGによる重合促進作用を阻害し、PROGと同様の重合拮抗阻害を示す化合物に分類された。NPは単独で微小管重合をほぼ完全に阻害し、重合抑制型の化合物に分類された。また、MAP2への結合部位が神経ステロイドと競合的であることを確認した。BPA及びNP共に神経ステロイド

と同様にTau依存的微小管重合反応には無影響であった。

樹状突起伸長に対する神経ステロイドの作用：

ラット17日胚海馬神経細胞の神経突起伸長に対する神経ステロイドの作用を検討した。MAP2は情報の入力に関与する樹状突起の微小管形成に関与し、樹状突起マーカーとして用いられる。通常、培養開始4日の樹状突起の長さは細胞体より $7\mu\text{m}$ であるが、*in vitro* において微小管重合促進作用を示したPREG処置した場合は、その長さが $15\mu\text{m}$ と約2倍に突起伸長が促進された。また、この効果は 10 nM から確認された。細胞体からの樹状突起数も未処置細胞が平均1本であるのに対し、PREG処置細胞においては平均3本に増加した。PROGは*in vitro*の系と同様に単独では樹状突起伸長に対して無影響であったが、PREGによる樹状突起伸長促進作用及び、突起数増加作用を濃度依存的に抑制した。PREGおよびPROGとも軸索伸長に関しては無影響であることを軸索のマーカーであるTauの免疫染色にて確認した。神経ステロイドの樹状突起に対する作用が核内受容体を介するかを検討した。エストロゲン受容体、PROG受容体の拮抗薬であるICI182780、MifepristoneによってPREGの促進作用は阻害されず、この作用がノンジェノミック作用であることが示唆された。他の受容体を介する作用としてPREGSがNMDA受容体に作用することが知られている。しかしながら、PREG

の突起伸展作用は NMDA 受容体拮抗薬の D-AP5、MK-801 によって阻害されなかったことから硫酸体が作用しているのではないことが証明された。なお、硫酸体は微小管重合に対し拮抗阻害し、樹状突起伸展作用に対しても拮抗阻害することを確認している。PROG の拮抗阻害作用は、細胞内に移行しない PROG-BSA では観察されなかった。BSA 標識体が微小管重合に対して未標識体と同様に作用することを確認している。

高分子量の MAP2 は多数のリン酸化部位が存在し、リン酸化は微小管重合活性を著しく低下させることが知られている。PREG、PROG 処置の海馬神経細胞のリン酸化 MAP2 量をウエスタンブロット法により確認したが、リン酸化 MAP2 量には変化がみられなかった。

樹状突起伸長に対する内分泌かく乱化学物質の作用：

MAP2 依存的微小管重合能の変調作用を有することが確認された BPA 及び NP の培養海馬神経細胞の樹状突起伸長に対する作用を検討した。BPA は PROG と同様に樹状突起伸長に対しては無影響であったが、PREG (1 μ M) による樹状突起伸長促進作用や突起数増加作用を 1 μ M から濃度依存的に抑制した。一方、NP は 1 μ M で単独で樹状突起伸長をほぼ完全に抑制し、この抑制効果は PREG あるいは PROG により濃度依存的に抑制された。これら 2 種の内分泌かく乱化学物質の効果は、神経ステロイドの効果と同様に MAP2 のリン酸化には無影響であり、また、核

内受容体拮抗薬では阻害されなかった。軸索伸長に対してはやはり無影響であることを確認している。

マウス学習行動に対する神経ステロイド、及び内分泌かく乱化学物質の効果：

培養海馬神経細胞において単独で樹状突起伸長を抑制した NP においてマウスの学習行動への影響を検討した。ステップスルー型の受動的回避学習試験装置を用いて解析を行った。対照群の潜時は 250 秒程度であるのに対し、マウス脳室内に NP (10 nmol) を投与した群では潜時が 100 秒程度に減少し、学習機能の低下が観察された。この学習機能の低下は PREG あるいは PROG を NP と同時に投与することにより 10 nmol から用量依存的に潜時が延長し学習効果が改善された。しかしながら、細胞膜非透過性の PROG-BSA では、NP 投与により低下した学習能に対する改善効果はみられなかった。以上の結果から、MAP2 依存的な微小管重合を調節することにより、神経細胞の形態や高次中枢神経機能に対して内分泌かく乱化学物質が変調作用を示す可能性が示唆された (図 19)。

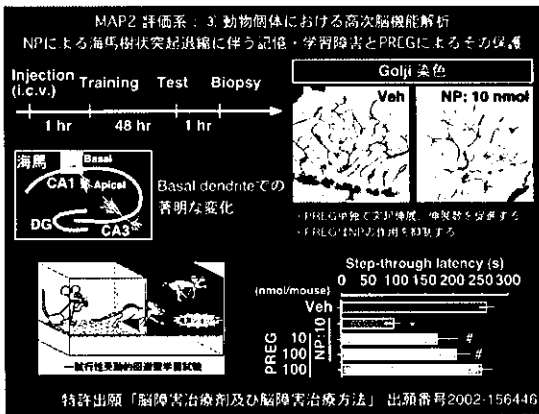


図 19：MAP2 評価系

確立評価系による被験化学物質の作用分類と順位付け

昨年度までに構築したMAP2評価系、受容体モデル評価系において8種類の被験化学物質(図20)について質的・量的な順位付けを行った。

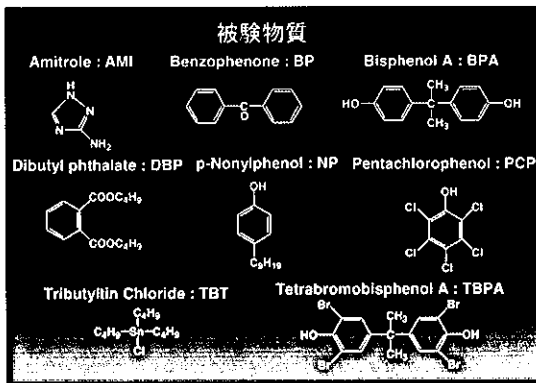


図 20：被験物質

1. MAP2 評価系

内分泌かく乱化学物質による MAP2 依存的微小管重合変調の作用分類

被験物質の MAP2 依存的微小管重合に対する影響を濁度測定法にて測定した(濃度：1 μM)。殆どの化学物質が神経ステロイドの作用分類と同様

に重合促進・抑制とその作用に対する拮抗的な作用を有し分類されることが明らかとなった(図21)。作用化学物質は神経ステロイドと同様にTau蛋白質依存的微小管重合には無影響であった。

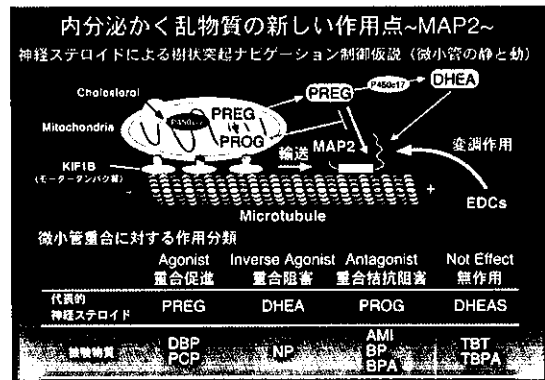


図 21：内分泌かく乱化学物質の新しい作用点

樹状突起伸長の変調：

初代培養海馬神経細胞の樹状突起伸長に対しても、重合反応に対応した促進及び抑制作用が観察された(濃度：1 μM)。また、細胞体からの突起伸展数は伸展長と同方向性であることも明らかとなった。軸索伸長に対してはやはり無影響であることを確認している。重合反応において無影響であったTBTは、神経細胞毒性を有しており、細胞死を誘導した。

2. G 蛋白質関連型受容体モデル評価系

DHEAS による脱顆粒応答反応抑制能による順位付け

殆どの被験物質は単独作用(濃度：1 μM)を有さなかったが、DHEAS(濃

度：1 μM) に対して拮抗作用を有した (図 22)。単独作用を有した TBT についてより詳細な検討を行った。

DHEASによる脱顆粒反応拮抗阻害効果		
被験物質	阻害割合(%)	作用強度順位
AMI	54.55	6
BP	49.83	7
BPA	81.95	4
DBP	59.83	5
NP	88.95	1
PCP	87.01	2
TBT	N.D	単独作用有り
TBPA	84.10	3

図 22 : DHEAS による脱顆粒反応拮抗阻害効果

TBT による脱顆粒応答反応：

TBT による脱顆粒応答反応の情報伝達機構を、各種阻害剤を用いて解析した。Gi 蛋白質を ADP-リボシル化により不活化する百日咳毒素 (100 ng/ml) は無影響であった。DHEAS の作用を阻害した PLC の阻害薬である U-73122 (100 nM)、PLC の下流で働く IP₃ 受容体からのカルシウム放出遮断薬である Xestospongic C (1 μM) も無影響であったことから DHEAS の受容体を介した作用様式と異なることが示された。

TBT による細胞内カルシウム動員：

TBT による細胞内カルシウム濃度解析をしたところ、TBT (1 μM) 添加によりほぼ全細胞が顕著な細胞内カルシウム上昇を示した。カルシウム濃度は TBT 添加後すぐに上昇し始め、1 分後最大レベルに達し、10 分以上維持さ

れた。この持続的上昇は、細胞外カルシウムをキレートする EGTA (1 mM) では抑制されなかったが、小胞体のカルシウムストアを枯渇させる Thapsigargin (1 μM) によってほぼ完全に抑制されたことから、TBT は何らかの作用により小胞体からカルシウムを放出させることが明らかとなった。TBT による脱顆粒応答反応は EGTA では阻害出来ないが、細胞内カルシウムをキレートする BAPTA-AM 処置 (50 μM) により有意に抑制することも確認している。

末梢疼痛過敏応答測定と血管透過性亢進測定による細胞-個体間相関評価：

ABL テストにより被験物質が疼痛反応を有するか否かを測定した (一昨年に BPA と NP の DHEAS の疼痛反応抑制を確認済み)。化学物質 3 fmol 投与により、TBT のみが疼痛反応を誘発した。10 fmol の BPA と NP は等量の DHEAS 投与による血管透過性の亢進を約 50% 抑制した。これらの結果は細胞の肥満細胞の脱顆粒応答反応と相関するものであった。

D. 考察

以上より様々な内分泌かく乱化学物質が分子標的に基づいて内在性作用物質である神経ステロイドの生理的作用を変調し、単独のかく乱性を有することが明らかとなった。MAP2 依存的小管重合を変調させ、樹状突起の構築に影響を与えることから神経細

胞の形態や高次中枢神経機能に対してかく乱作用を有する可能性が示唆された。微小管重合調節作用と高次脳機能が連関することが明らかとなり、化学物質の中枢神経系の作用のプロファイルを作製することで今後、化学物質の安全性に対して簡便に再評価できる測定評価系となる可能性が考えられる。膜受容体を標的とした測定において、個体と細胞の応答性が相関することから、肥満細胞を用いた脱顆粒応答反応測定系が受容体への作用を反映する良きモデル評価系であることが示された (図 23)。

今後、受容体を同定し、生体における組織発現分布・変化などの知見を得ると共に生理機能と連関した知見を得ることが重要となる。また、同定した受容体を用いて、より精密且つ高感度な測定系を構築することが課題である。

E. 結論

中枢神経系における内分泌かく乱物質の新たなノンジェノミック標的分子として微小管結合蛋白質 MAP2、細胞膜 Gq 蛋白質連関型受容体を見出した。化学物質はこれら標的分子の内在性作用物質である神経ステロイドの作用を模倣、又は変調させることを明らかとし、このかく乱作用が個体レベルで反映されることを確認した。化学物質の同定と順位付けの動物実験の代替評価法として作用標的分子に対する簡便な評価系を開発した。MAP2 依存的微小管重合測定法とモデル評価系としての肥満細胞脱顆粒応答測定法である。本評価法によりジェノミック作用とは異なる視点での化学物質の新しい量的・質的な順位付けが可能となった。

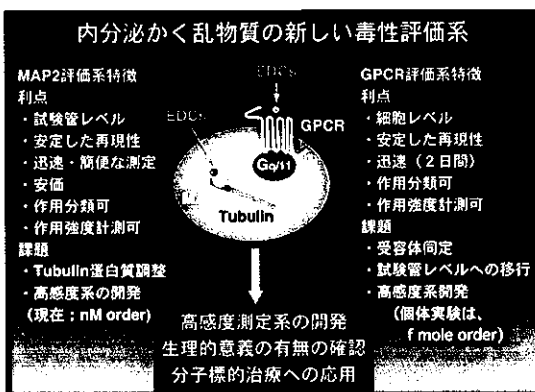


図 23: 内分泌かく乱物質の新しい毒性評価系

4. アフリカツメガエルおよびヒト肝癌細胞を用いる方法

研究要旨

ビスフェノール A (BPA) は内分泌かく乱化学物質の一つと考えられ、弱いながらもエストロゲン様作用があることが明らかにされている。最近 BPA が、甲状腺ホルモン(T3)と結合することが知られている protein disulfide isomerase (PDI) と結合することが明らかにされ、BPA の非エストロゲン様作用が注目されている。そこで、ヒトの肝癌細胞である Hep3B およびアフリカツメガエルに BPA を添加してその影響を検討した。Hep3B は、低酸素下で培養すると HIF-1 が働いて赤血球増殖因子であるエリスロポエチン(EPO)を発現し、低酸素応答の研究にはよく使用されている。低酸素応答遺伝子としてはこの他に、血管内皮増殖因子 VEGF やドパミン合成酵素チロシンヒドロキシラーゼなどがあり、さらには発生過程でもこの応答反応は重要と考えられている。BPA は低酸素下において Hep3B の EPO 発現を顕著に抑制した。メカニズムを詳しく検討したところ、細胞質では HIF-1 α はシャペロンタンパク質である HSP90 と結合し安定化されているが、BPA がこの結合を阻害し、HIF-1 α を不安定化、分解の方向へ進行させることを明らかにした。HSP90 はエストロゲン受容体などの安定化にも関わっており、BPA の新しいメカニズムでの内分泌かく乱作用が示唆された。アフリカツメガエルによる検討では、受精卵、原腸胚 (stage 10.5)、幼生期 (stage 53) を用いた。受精卵に BPA を添加したところ 25 μ M で動物極側にアポトーシスが観察された。さらに神経板形成に遅延が見られた。原腸胚に BPA を添加したところ、尾芽胚において目や頭部の形成に遅延が見られた。メカニズムを検討したところ、BPA が Notch signal を阻害、特に家族性アルツハイマー病の原因遺伝子である presenilin を阻害している可能性が示唆された。今回の検討から、BPA が作用する新しいタンパク質因子が見つかり、これが神経系発生過程において、ホルモン合成などに重要な影響を及ぼしている可能性が示唆された。幼生期においては尾部の消失すなわちアポトーシスが、T3 によって誘起される。BPA の添加で一部尾部の消失促進が観察されたが、個体差が大きかった。以上の検討から、これらの表現形や発現遺伝子をマーカーとした内分泌かく乱化学物質の新しい評価法の基礎が確立された。

A. 研究目的

BPA は内分泌かく乱化学物質の一つ 考えられ、性ホルモンとの相互作用が詳しく検討されているが、その作用はと
でエストロゲン様の作用を持つと考

でも弱いと報告されている。最近、胎児期からの甲状腺の機能低下によって知能低下が引き起こされるクレチン症が 15 年間で3倍に増加しているという報告があり、母体への内分泌かく乱化学物質暴露が原因とも言われている。さらに、BPA は発生過程で様々な重要な働きをしていると考えられているレチノイドの受容体の発現を低下させる。また、培養細胞を用いた研究で、カルシウムチャンネルと相互作用することでドパミンを放出させる作用があることも報告されている。さらに実験動物を用いた検討で母胎が内分泌かく乱化学物質に暴露されると生まれてきた仔に学習障害や多動性が現れるとの報告もある。そこで、本研究では、内分泌かく乱化学物質の一つである BPA の神経系形成過程のホルモン合成に関わる新規相互作用タンパク質を明らかにして、それをマーカーとした新規評価法の確立を目指す。

最近中枢神経系の形成に必要であることが明らかになった赤血球増殖ホルモンであるエリスロポエチン (EPO) は細胞の低酸素応答によって発現誘導される。また、神経伝達物質ドパミンの合成酵素チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 遺伝子も低酸素応答性である。これらのホルモンや因子の発現における BPA の影響を検討した。低酸素応答過程鍵因子は HIF-1 で、HIF-1 が活性化されて EPO や TH 遺伝子の発現調節領域に結合することでこれらの遺伝子の発現が調節される。HIF-1 は HIF-1 α と Arnt のヘテロダイマー

として働く。これらの因子をマウスにおいてノックアウトすると、胎生致死になることから、発生過程においても重要な働きをしていることが予測されている。一方、元々 Arnt はダイオキシンの受容体 AhR と結合する因子として見いだされたものであり、HIF-1 α の系と AhR の系のクロストークも最近問題となっている。ヒトの肝癌細胞 Hep3B は低酸素応答の研究にはよく利用される細胞で、低酸素下で顕著な EPO 誘導が起こる。この系に BPA を添加したところ低酸素下で顕著な EPO 誘導抑制が見られた。そこで、この阻害メカニズムの解析と低酸素応答阻害による内分泌かく乱化学物質評価法の確立を検討した。

一方、内分泌かく乱化学物質の発生過程への直接的な影響を調べるため、アフリカツメガエル受精卵、原腸胚 (stage 10.5)、幼生期 (stage 53) を用いて検討した。アフリカツメガエルの胚発生は観察が容易で、さらに短期間での検討が可能である。受精卵への影響は初期胚発生過程のモデルである。また、中期発生過程として、神経系形成が始まる原腸胚期に BPA を添加して、中枢神経系形成がほぼ完了する尾芽胚期での表現形を調べた。幼生期 (オタマジャクシ) の尾部消失すなわちアポトーシスには甲状腺ホルモン (T3) およびその受容体 (β タイプ) が重要な働きをすることが明らかにされている。そこで、この系を利用して BPA が甲状腺ホルモンと相互作用をすかどうか検討することとした。さらに、この系が確立すれば、これまであ

まり有効な方法がない甲状腺ホルモン様物質のスクリーニングにも応用できると考えられる。

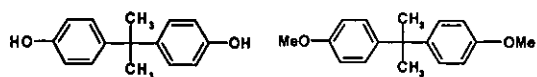
B. 研究方法

(1) 肝癌細胞 Hep3B の低酸素応答に対する BPA の影響とその評価法の確立

0.1% FCS を含む DMEM 培地中で Hep3B を一晚培養の後、酸素吸着剤であるアネロパックによって低酸素状態を作成し、37°C で 6 時間培養した。そこへ BPA およびその誘導体 (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) を添加して検討した。窒素気流下で Isogen を用いて RNA を回収の後、逆転写酵素で cDNA に変換し RT-PCR を行った。 β -actin, HIF-1 α , ARNT, NPR, EPO の各プライマーを合成して PCR を行った。

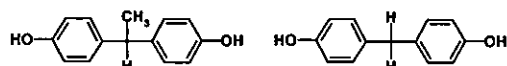
(2) BPA 誘導体の合成

図 24 に示した BPA のフェノール性の水酸基をメチル化したもの (BPA-OMe) を合成した。BPE, BPF は購入した。



bisphenol A (BPA)

BPA-OMe



bisphenol E (BPE) bisphenol F (BPF)

図 24 : ビスフェノール A (BPA) とその誘導体

(3) アフリカツメガエルの初期発生過程に及ぼす BPA の影響

アフリカツメガエルの成体の雌に胎盤性性刺激ホルモン (ゲストロン) を背部皮下注射し、16°C, 6 時間、23.5°C, 6 時間でホルモン誘導し産卵させた。産卵させた未受精卵は、直ちに雄から摘出した精巣と懸濁し、人工授精させた。受精卵は、チオグリコール酸ナトリウムでゼリー層を除去の後、受精卵または原腸胚 (stage 10.5) で BPA およびその誘導体 (1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M) を添加して飼育を行った。尾芽胚 (stage 40) まで各発生段階について顕微鏡で形態変化を観察した。さらに、各ステージで RNA を単離し、脳・神経系 (中脳及び目 : pax-6、前脳 : otx-2、後期神経系 : nrp-1、初期神経系 : sox-2, N-tubulin、接着因子 : N-CAM, N-cadherin)、中胚葉マーカー (MyoD)、内胚葉マーカー (sox-17 α) 遺伝子について RNA レベルでの変化を RT-PCR で調べた。

(4) オタマジヤクシの変態に及ぼす BPA の影響

アフリカツメガエルのオタマジヤクシは 53 stage のものを業者から購入し使用した。各群 5 匹ずつのオタマジヤクシの飼育水槽に BPA (0 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 100 μ M) および甲状腺ホルモン T3 (10 nM, 100 nM) さらに BPA+T3 (0.1 μ M+10 nM, 10 μ M+100 nM) を添加して 1 週間飼育した。1 週間後形態変化を観察するとともに、尾部から DNA を回収して、アガロース電気泳動によって、DNA の断片化を調べ

た。

C. 研究結果

(1) 肝癌細胞 Hep3B の低酸素応答に対する BPA の阻害効果と阻害メカニズム

低酸素下における Hep3B の EPO 誘導は BPA 添加によって、完全に阻害された (図 25)。その誘导体である BPE, BPF では阻害効果は BPA に比べて少なく、BPF ではほとんど見られなかった。一方、BPA は AhR を介して異物代謝酵素 CYP1A1 も誘導した。この誘導効果には BPA, BPE, BPF において顕著な差は見られなかった。低酸素下の Hep3B 細胞への BPA 添加によって、HIF-1 α の mRNA の発現には差がなかったが、Western blotting によってタンパク質レベルで HIF-1 α の低下が起こっていた (図 25)。

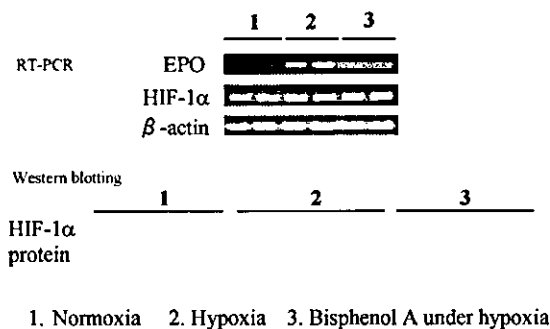


図 25 : BPA による EPO 誘導阻害

HIF-1 α は通常酸素濃度では、そのプロリン残基が水酸化され、それを VHL というユビキチン化酵素が認識して、プロテアゾームによって代謝されて

いる。低酸素下ではプロリンの水酸化が阻害されて、HIF-1 α が安定化して、核内移行する。この結果から BPA は何らかのメカニズムで低酸素下の HIF-1 α の安定化を阻害していると考えられた。VHL 欠損細胞である 786-O 細胞は通常酸素下でも HIF-1 α の分解が起こらず、EPO の発現が見られる。ここに BPA を添加すると EPO の発現が抑制され、このことから BPA は HIF-1 α をユビキチン化以外の経路で分解していることが推測された。最近、HIF-1 α がシャペロンタンパク質である HSP90 によって安定化されているという報告がなされた。そこで、低酸素培養した Hep3B のホモジェネートに HIF-1 α 抗体を添加して免疫沈降した (図 26)。

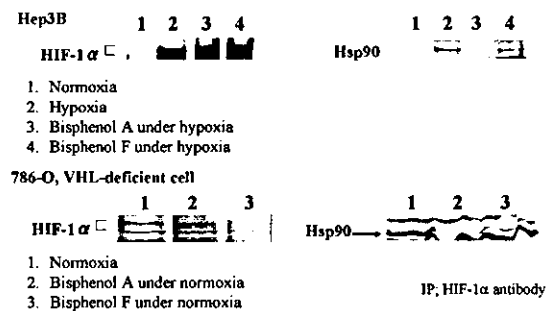


図 26 : BPA による HSP90 機能阻害

沈降物を Western blot して HSP90 の抗体で染色したところ、BPA を添加しないものでは HSP90 が検出されたが、BPA を添加したものでは検出されなかった。さらに阻害効果のなかった BPF では HSP90 が検出された。このことは、BPA が HSP90 と結合することで、HIF-1

α を不安定化し、これまで明らかになっていない経路で分解されていることを示唆している。さらに、同様の EPO 誘導抑制効果が、*in vivo* で起こるかどうかを、調べるため妊娠ラットに BPA を投与して、胎児の脳および肝臓での遺伝子発現を検討した。胎児の脳では HIF-1 α の顕著な発現が見られた。さらに、同様の EPO 誘導抑制効果が、*in vivo* で起こるかどうかを、調べるため妊娠ラットに BPA を投与して、胎児の脳および肝臓での遺伝子発現を検討した。胎児の脳では HIF-1 α の顕著な発現が見られた。BPA は胎児脳における EPO の発現を抑制した。一方、胎児肝臓において CYP1A1 を誘導した。

(2) アフリカツメガエル受精卵における BPA の影響

初期発生過程における BPA の影響を検討するためにアフリカツメガエル受精卵に BPA を添加して検討した。BPA 50 μ M 以上の添加では、卵が死亡した。BPA 25 μ M の濃度では動物極側にアポトーシスらしき表現形が見られ、DNA を単離して調べると断片化が観察された。BPA 10 μ M の添加で、卵の分割は正常に起こったが神経胚の段階で神経板形成に遅延が見られた。BPA 1 μ M では、見かけ上異常は認められなかった。そこで、この原因を明らかにする目的で様々な遺伝子の誘導を検討した。まず、神経板形成に最も重要と考えられる E-cadherin と N-cadherin の発現を検討したが BPA 添加による抑制は見られなかった。そこで、低酸素応答性の遺伝子について検討したとこ

ろ、NPR や HIF-1 α については変化がなかったが、VEGF の mRNA 発現量に顕著な低下が見られた。BPA 1 μ M の添加では、表現型としては顕著な変化は観察されなかったが、VEGF はすでに低下傾向にあった。

(3) アフリカツメガエル原腸胚における BPA の影響

アフリカツメガエルの原腸胚に、BPA, BPE, BPF を添加した。BPA は 50 μ M で尾芽胚の段階で背骨の湾曲、頭部および目の形成抑制が観察された(図 27)。

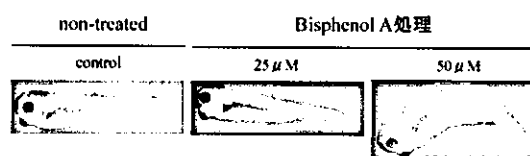


図 27 : 尾芽胚における BPA の影響

一方、BPE, BPF についてはこの濃度でほとんど外形変化はなかった。この傾向は、先の Hep3B を用いたときの低酸素応答抑制とよい相関があった。そこで、尾芽胚期における脳や目などの発現マーカーを調べた。その結果、中脳及び目のマーカーである pax-6、前脳のマーカーである otx-2、接着因子 N-CAM の各遺伝子発現に顕著な抑制が見られた。一方、後期神経系マーカー nrp-1、初期神経系マーカー sox-2、N-tubulin、中胚葉マーカー MyoD、内胚葉マーカー sox-17 α 遺伝子についてはその発現に変化が見られなかった。

神経系の発達は chordin によって引き起こされる。そこで animal cap assay を用いて chordin を添加し、N-CAM, pax6 誘導についての BPA の影響を調べたが、ほとんど阻害効果は見られなかった。最近 pax6 や神経系形成に必要な ESR1 の発現調節には Notch signal 系が関わっていることが報告された。そこで、これについて検討した (図 28)。

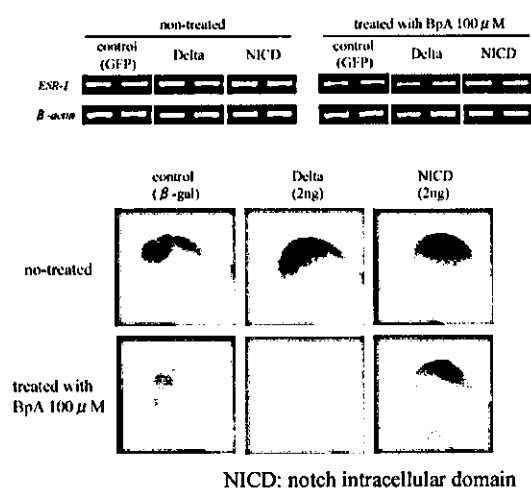


図 28 : BPA による Notch signal 阻害

Notch の ligand である Delta を添加しても BPA による pax6 や ESR1 の抑制は、回復しなかったが、Notch の核内移行ドメイン (NICD) を添加すると、抑制は回復された。このことから BPA は Notch signal の ligand 結合反応かまたは ligand が結合したのち Notch から Presenilin が NICD を切り出す部分を阻害している可能性が示唆された。

(4) アフリカツメガエル幼生 (オタマジャクシ) 尾部消失における BPA の影響

高濃度の BPA (50 μ M, 100 μ M) ではオタマジャクシに衰弱が見られ、死亡するものもあった。低濃度においては弱いながら T3 と同じ効果すなわち尾部の消失や四肢の出現が見られた。尾部の DNA を単離して、アガロース電気泳動で分析したところ、T3 および BPA を投与したものについては DNA の断片化が観察され、アポトーシスが起きていることが示された。一方、T3 と BPA の両方を投与したものについては若干抑制が見られる傾向にあったが、個体差が大きく明らかな変化は見いだせなかった。

D. 考察

ヒト肝癌細胞 Hep3B を用いた検討から、BPA はシャペロンタンパク質である HSP90 に結合することで、EPO などのホルモン (サイトカイン) の発現を抑制していることが明らかとなった (図 29)。

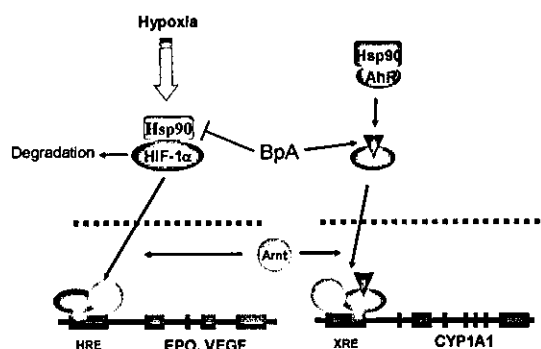


図 29 : BPA の低酸素応答阻害メカニズム

BPA は HSP90 と結合することで HIF-1 α を不安定化、分解の促進へ導く。これはユビキチン化酵素の欠損している細胞でも起こることから、プロテアゾーム系以外の分解系が働いている可能性が示唆された。また、BPA は Hep3B 細胞において、CYP1A1 という薬物代謝酵素を誘導することから、ダイオキシンと同じように Ah 受容体に結合している可能性も示唆された。さらに、*in vivo* 実験で、BPA を投与した妊娠ラットの胎児脳でも EPO 発現の顕著な低下が見られた。HSP90 は様々な核内因子あるいはステロイドホルモン受容体に結合することが報告されている。例えばエストロゲンレセプターの安定化にも関与していることが明らかにされ、HSP90 の機能阻害剤である Geldanamycin を投与するとエストロゲンレセプターの分解が起こり、これによって細胞のエストロゲンに対する応答が消失する。今回の検討およびこれらの報告から、内分泌かく乱化学物質のシャペロンタンパク質機能阻害によるホルモンかく乱という新しい機構の可能性が明らかにできた。これは、またこのシャペロンタンパク質機能阻害によるホルモンかく乱の系を用いた内分泌かく乱化学物質の新しい評価系の基礎にもなると考えている。

アフリカツメガエル胚を用いた検討では BPA が Notch signal 系を阻害しているという新しい機構を見いだした (図 30)。

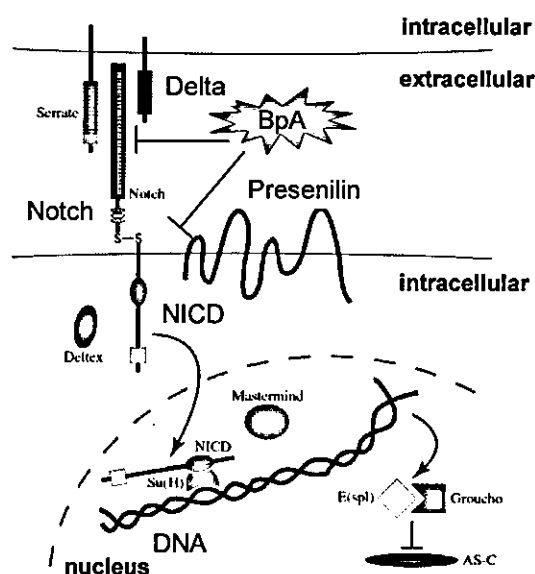


図 30 : BPA の Notch signal 阻害メカニズム

Notch signal は、一回膜貫通型の Notch タンパク質と先に述べたように Delta などの ligand と、そして Notch の細胞内ドメインの NICD で構成されている。ligand の結合によって Presenilin という酵素が働いて NICD が切り出されて、核内に移行し、核内因子として働く。BPA はこの過程を阻害した。現在の検討では Presenilin の活性を阻害している可能性が高い。Presenilin は家族性のアルツハイマー病の原因遺伝子であることが最近明らかにされ、Presenilin の遺伝的な活性低下はアルツハイマー病の原因となる。このことから、BPA が Presenilin 活性阻害をすれば、何らかの精神活動を阻害する可能性が示唆される。一方で、エストロゲン依存性の癌では Notch signal とエストロゲン受容体を介する系にクロストーク

が見られ、それぞれが複雑に関わっていることが報告されている。現在、これらについては十分解明が進んでいないが、今回見いだした事実から、この分野の研究が深まると考えている。さらに、このアフリカツメガエルの胚を用いる評価系が、上記阻害メカニズムを解明することで、一般的な内分泌かく乱化学物質の評価系に発展できる可能性を示唆している。

E. 結論

今回ヒト肝癌細胞を用いて、BPA の HSP90 結合による核内因子あるいはホルモン受容体機能阻害を見いだした。これはこれまで報告されていない新しい機構によるホルモンかく乱メカニズムであり、内分泌かく乱化学物質の新しい評価系となりうる。アフリカツメガエル胚を用いた検討では、BPA の Notch signal 阻害という新しい作用を見いだした。Notch signal は神経系形成には重要な因子で、BPA によって尾芽胚の目や頭部の形成抑制が起こることから、この系も *in vivo* での内分泌かく乱化学物質評価系になりうる。しかし、これについては今後さらに機構を明らかにしていく必要がある。

BPA の中枢神経系への作用機序

1. BPA の脳神経系形成に及ぼす影響

研究要旨

Protein disulfide isomerase (PDI) は estradiol、3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3) などのホルモンと、内分泌かく乱化学物質のひとつである Bisphenol A (BPA) が競合的に結合するサイトを持つ。BPA が発生期中枢神経系に及ぼす作用を、PDI の脳での発現と大脳皮質形成、終脳における神経発生関連遺伝子発現の変動に着目して調べた。胎生初期からの低用量 BPA 曝露は、終脳において神経発生に関わる数種の遺伝子発現の変動を惹起するとともに、組織学的には終脳壁、海馬、視床などにおける PDI 発現の増強をきたし、神経前駆細胞の増殖、神経細胞の遊走、分化に影響を及ぼす可能性が示唆された。

A. 研究目的

PDI は主に粗面小胞体に存在し、estradiol、3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3) などのホルモンと内分泌かく乱物質のひとつである BPA が競合的に結合するサイトを持つ。そこで、本研究では PDI の発達期脳神経系における発現パターンを明らかにするとともに、BPA 曝露が発生期の脳神経系形成に及ぼす影響を、PDI の脳での発現変動と大脳皮質形態形成、終脳における神経発生関連遺伝子発現の変動に着目して調べた。

B. 研究方法

妊娠マウス (ICR) に胎生 0 日から連日、皮下注射によって BPA (0g/kg/day、20 μ g/kg/day) を投与し、胎生 12.5 日、14.5 日、16.5 日、

18.5 日で胎仔終脳を摘出、total RNA を回収したのち、マウス由来の約 3 万種の遺伝子断片を対象とするマイクロアレイ解析を実施し、発現変動を示した遺伝子群に関して定量 PCR を行った。同様に作製した妊娠マウス (ICR) に、胎生 12.5 日、14.5 日、16.5 日、18.5 日に 5-bromo -2'-deoxyuridine (BrdU, 12.5mg/kg) を腹腔内単回投与し、1 時間後あるいは 2-3 日後に胎児脳を摘出、4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定後パラフィン包埋切片を作成し、免疫組織化学的染色を施行した。一次抗体として、抗 PDI 抗体 (船江教授より恵与 1:500)、抗 BrdU 抗体 (1:10000)、抗 Histone H3 抗体 (1:100)、抗 Musashi 抗体 (1:200)、抗 Nestin 抗体 (1:500)、抗 TUJ1 抗体 (1:5000)、抗 MAP2 抗体 (1:1000) を用いた。以上を BPA 投与群、非投与群で比較した。

C. 研究結果

cDNA マイクロアレイ解析では、検索した3万種の遺伝子の約2%に2倍以上の発現変動が見られ、神経発生、分化に関連する興味ある遺伝子が見出された。その中で、神経幹細胞の分化を決定する Numb、そのリガンドである Lnx ファミリーなどの発現変動が定量 PCR で確認された。免疫組織化学的には、PDI の発現は BPA 投与群において、E12.5 日から E16.5 日にかけて背側終脳壁の皮質板表層、サブプレート、中間層、海馬 CA 領域で増強し、皮質板では PDI 免疫染色性の radial pattern がより明瞭であった。終脳壁における BrdU 陽性細胞密度は、BPA 投与群において全層（脳室層、中間層、皮質板）で E12.5 日から E14.5 日で増加しており、神経前駆細胞の増殖が亢進するとともに、神経細胞遊走の時期がより胎生早期に移行する傾向が見られた。さらに、中間層における TUJ1 陽性の投射線維の束形成がより明瞭であった。以上より、胎児への BPA 曝露は、分子レベル、組織レベル双方において正常の脳形成に影響を及ぼすことが示唆された。

D. 考察

胎生初期からの低用量 BPA 曝露により、発生期終脳における神経発生関連遺伝子の変動が見られた。一方、PDI は胎生早期から発生期脳組織に発現し、主として遊走中から遊走後の分化、成熟しつつある神経細胞胞体、突起に

強く見られるが、胎児脳への BPA 曝露は、発生期終脳壁での PDI 発現の増強をきたした。さらに、E12.5 日から E14.5 日での神経前駆細胞の増殖、神経細胞の遊走が亢進するとともに、神経細胞への分化、投射線維の発達がより促進する傾向が見られた

E. 結論

胎生初期からの胎児脳への BPA 曝露は、終脳での神経発生関連遺伝子の変動を引き起こすとともに、組織レベルでは、大脳皮質、間脳での PDI の発現増強ならびに神経前駆細胞増殖、分化、遊走後の神経細胞成熟に影響を及ぼす可能性が示唆された。

2. BPA が胎仔の脳発達に与える影響

研究要旨

妊娠中および新生仔期のビスフェノール A (BPA) が仔の脳、ことに記憶や認知の中枢である海馬の発達におよぼす影響について検討した。妊娠 4 週間前から BPA 1mg/L を含む飲料水で飼育した母マウスから生まれた仔マウスの中枢神経系について検討した。BPA 暴露群の脳では神経細胞の密度 (DNA 量/蛋白量) は高くなっていた。また、これらの仔脳の海馬錐体細胞のエストロゲン受容体 α ($ER\alpha$) の発現は出生直後から認められ、海馬は BPA の影響をこうむる部位であることが判明した。しかし $ER\alpha$ の発現には BPA 暴露の影響は受けなかった。また、海馬のシナプス形成の指標として synaptophysin の発現を検討した。synaptophysin は生後 4 日目ころから発現し始め、生後 10-15 日目にピークに達した。BPA 暴露群と対照群でこれらの発現にも差異はみられず、BPA が海馬のシナプス形成に影響を与える積極的な結果は得られなかった。また、BPA に曝露された新生仔の TSH 値は正常であった。

A. 研究目的

ビスフェノール A (BPA) は環境ホルモンの一つである。発達期に脳が BPA 暴露を受けたラットは成長すると、自発運動量や探索行動量が増加することが報告されている。これらの結果から、発達期の BPA 暴露が注意欠陥多動障害や自閉症の原因になるのではないかと推測した報告もある。しかし、BPA が中枢神経系に及ぼす機序については十分解明されていない。

ところで、BPA はエストロゲン受容体 (ER) や T3 結合蛋白である Protein disulfide isomerase (PDI) を介して作用を及ぼすことが報告されている。本研究では妊娠中や新生仔期の BPA 暴露が仔の脳、ことに記憶や認知と言った高次脳機能の中枢である海馬の発達

におよぼす影響について検討した。

B. 研究方法

ラット海馬における $ER\alpha$ の発現を免疫組織化学的方法と Western blot 法にて検索した。

次に、ICR-JCL 系マウスを用い、BPA 1mg/L を含む飲料水を 4 週間以上投与したのち妊娠させ、妊娠期間中および仔の飼育期間も同量の BPA を含む飲料水で飼育した母マウスから生まれた仔マウスを実験群、正常飲料水で飼育された母マウスから生まれた仔マウスを対照群とした。(1) 両群各 12 匹の生後 5、8、13 日目の脳重 (大脳 + 脳幹 + 小脳, wet weight) と大脳 (大脳皮質 + 線状体 + 海馬) の DNA 量、蛋白量