

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

研究分担報告書(平成 19-20 年度)

低用量核内受容体作動性化学物質の免疫応答制御に及ぼす影響に関する研究

研究分担者 五十嵐 美德 国立がんセンター研究所・がん宿主免疫研究室 主任研究官

研究要旨

低用量の bisphenol A (BPA) の T ヘルパー1(Th1)/Th2 サイトカイン産生バランス制御に及ぼす影響を検討した。BPA の NKT 細胞の Th1/Th2 サイトカイン産生バランス異常が抗原提示細胞(APC)によるのか *in vitro* で解析した。BPA による Th2 優位な NKT 細胞のサイトカイン産生は APC に非依存性であった。BPA は NKT 細胞に直接的に影響を及ぼし、Th2 優位な免疫応答を誘導し、Th1/Th2 サイトカインバランスを攪乱したと考えられる。

A. 研究目的

bisphenol A (BPA) の NKT 細胞の T ヘルパー (Th) 1/Th2 産生バランス異常の誘導のメカニズムを解明する。

BPA は NKT 細胞のサイトカイン産生バランスを攪乱し、Th2 優位にする。BPA によるサイトカイン産生異常が NKT 細胞に対する直接的な影響なのか抗原提示細胞を介した間接的な影響かについて検討した。

B. 研究方法

BPA の NKT 細胞の Th1/Th2 サイトカイン産生バランス異常が抗原提示細胞 (APC) によるのか *in vitro* で解析した。

BALB/c マウス (オス 5~6 週齢) の脾細胞を α -galactosylceramide (α -GalCer) および BPA (10^{-6} ~ 10^{-4} M) を加えて培養した。また、抗原提示細胞 (APC) を刺激する目的で LPS を加えて BPA と培養した。培養上清中の IFN- γ , IL-4,

IL-10, IL-12 のサイトカインの産生について ELISA 法にて解析した。

(倫理面への配慮)

国立がんセンター動物実験倫理委員会規定に基づき、動物実験を行なった。

C. 研究結果

BPA による Th2 優位な NKT 細胞のサイトカイン産生は APC に非依存性であった。

BPA は *in vivo* 及び *in vitro* で α -GalCer 刺激による NKT 細胞のサイトカイン産生を IL-4 (Th2) 優位にする。BPA (10^{-6} ~ 10^{-4} M) は α -GalCer 存在下では Th1 反応を抑制する IL-10 あるいは Th1 反応を促進する IL-12 の産生に影響を及ぼさなかった。また、LPS 刺激により APC は IL-10 および IL-12 産生するが、BPA の影響は認められなかった。

D. 考察

内分泌かく乱化学物質が免疫系の Th1/Th2

バランスに影響を及ぼし、Th2優位な反応を引き起こし、アレルギーの発症と関連することが報告されている。核内受容体作動性化学物質が免疫系のTh1/Th2バランスに影響を及ぼし、Th2優位な反応を引き起こし、アレルギーの発症と関連することも報告されている。分担研究者はBPAのTh1/Th2バランスに及ぼす影響およびアレルギーとの関連性について、解析するために、Th1およびTh2両者のサイトカインを産生し、そのバランス制御に重要な役割を果たすNKT細胞を中心に解析し、BPAによってNKT細胞のサイトカイン産生がTh2優位になることを *in vivo* 及び *in vitro* で明らかにしてきた。また、NKT細胞はアレルギー疾患の発症にも関与することが報告されていることから、内分泌かく乱化学物質のNKT細胞の機能に及ぼす影響を解析することは、NKT細胞が各種の免疫疾患の発症や抑制に関与することから、BPAはNKT細胞に作用し、NKT細胞が関与する免疫疾患や異常、特にTh2優位なアレルギーに関与することが示唆されたのでBPAが直接的にNKT細胞に影響を及ぼすのか、あるいはAPCなどを介して間接的にNKT細胞のTh1/Th2バランスに影響を及ぼすのかについて検討した。*in vitro* では、BPAはAPCのIL-10及びIL-12産生に影響を及ぼさないことから、NKT細胞自身が直接的にBPAによってTh2優位に産生する細胞に偏向することが示唆された。BPAが *in vitro* では何らかの機序でNKT細胞の増殖を促進することから、NKT細胞が増殖あるいは成熟の過程でBPAによって選択的にTh2に偏向したNKT細胞を増殖させる可能が考えられる。

次に、 α -GalCerによる刺激によって通常、NKT細胞はTh1あるいはTh2タイプへの極性化

は誘導されなかった。しかしながら、BPAが *in vitro* の実験系でNKT細胞のTh2タイプへの極性化に影響を与えたことから、内分泌かく乱化学物質の免疫系、特にTh1/Th2バランスに及ぼす影響を高い感度で評価する実験系であると考えられた。

α -GalCer投与によるIgE産生が、BPAが投与量によって増加する傾向にあることから、BPAがNKT細胞を介したアレルギーの発症と関連することが推測された。

E. 結論

BPAはTh2優位なNKT細胞のサイトカイン産生を誘導し、Th1/Th2バランス制御に影響を及ぼした。

BPAはNKT細胞に直接的に影響を及ぼし、Th2優位な免疫応答を誘導し、Th1/Th2サイトカインバランスを攪乱したと考えられる。

BPAはTh1/Th2バランス制御に重要な役割を果たすNKT細胞をTh2優位なサイトカイン産生に偏らせるが、この反応はAPCに対する影響ではなく、むしろNKT細胞に直接的に影響していることが示唆された。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書への記載は不要)

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawamura T, Takeda K, Kaneda H, Matsumoto

- H, Hayakawa Y, Raulet DH, Ikarashi Y, Kronenberg M, Yagita H, Kinoshita K, Abo T, Okumura K and Smyth MJ. NKG2A inhibits iNKT cell activation in hepatic injury. *J Immunol*. 2009 Jan;182(1):250-8
2. ©Imataki O, Heike Y, Makiyama H, Iizuka A, Ikarashi Y, Ishida T, Wakasugi H and Takaue y. Insufficient ex vivo expansion of V α 24⁺ natural killer T cells in malignant lymphoma patients related to the suppressed expression of CD1d molecules on CD14⁺ cells. *Cytotherapy*. 2008, 10: 497-506.
3. Chen S, Ndhlovu LC, Takahashi T, Takeda K, Ikarashi Y, Kikuchi T, Murata K, Pandolfi PP, Riccardi C, Ono M, Sugamura K, Ishi N. Co-inhibitory roles for glucocorticoid-induced TNF receptor in CD1d-dependent natural killer T cell. *Eur J Immunol*. 2008; 38: 2229-2240.

特になし

3. その他

特になし

2. 学会発表

1. 急性graft-versus-host 病(GvHD)マウスモデルにおけるドナー細胞の *in vivo* 蛍光イメージング解析 第70回日本血液学会総会 (京都) 2008年10月11日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

核内受容体作動性化学物質の海馬記憶過程に及ぼす影響

研究分担者 川戸佳 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻教授

研究要旨：

内分泌かく乱化学物質の作用を、脳海馬の神経系を対象に 3 次元可視法で解析した。ある種の内分泌かく乱化学物質は、海馬スライス中のこの神経 3 次元可視化解析で、神経スパインの数が、変化することを見出した。脳の発達期に BPA を曝露して成獣になったラットの、海馬の神経スパイン密度は減少していた。一方、成獣の急性スライスに BPA を作用させると、神経スパインを増加させた。海馬スライスの電気生理解析では、これ等の物質がシナプス伝達の長期抑圧を強化したり、弱体化する急性効果を見出した。エストロジェンの効果と比較して検討したが、これら内分泌かく乱化学物質は、海馬神経に発現しているエストロジェン受容体を介して作用している可能性が高く、BPA 曝露の仕方によって神経への影響は大きく異なることがわかった。

A. 研究目的

17 β -エストラジオール（女性ホルモン）は神経細胞の可塑性に効果がある。内分泌かく乱物質は血流に乗って 1 時間程度で脳に到達し、作用する。本研究において我々は、記憶の中核である海馬の神経細胞に対する、内分泌かく乱化学物質の、シナプス可塑性に対する作用を解明することを目的とする。作用の情報伝達経路の解明を目指して、エストロゲン受容体 ER α , ER β の下流の蛋白質リン酸化酵素経路や、内分泌かく乱化学物質特有の受容体も探索することも目的とする。発達期の脳へ BPA 曝露した後、成獣になってからの変異を検出することも目的とする。海馬内の内分泌かく乱物質の存在を質量分析で定量する。

B. 研究方法

1) ラット海馬のスライスを用いて、単

一神経に蛍光色素をマイクロインジェクションして可視化し、神経スパインの密度の増減に対する内分泌かく乱物質の急性作用を画像解析する。

2) 質量分析 LC-MS/MS を用いてラット海馬内の BPA 濃度を定量する。海馬から抽出した BPA は、検出感度を高めるためにピコリノイル誘導体化を行った。

3) 海馬スライスでエストロゲン受容体や内分泌かく乱物質の受容体の分布を探る。

（倫理面への配慮）

全ての動物実験は東京大学の定める基準に従って行い、適切に管理された飼育環境の実現や実験に際しての麻酔等によって、動物に無用な苦痛を与えないよう配慮した。

C. 研究結果

1) 脳の発達期に BPA を曝露し、成獣にな

ったラット海馬における神経スパインを調べた。曝露手段としては、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の BPA を飲料水に混ぜて、妊娠期+胎児期+新生仔期+授乳期において母ラット(Wistar系)に投与した(九工大・粟生研究室で作成)。ラットが 8 週齢に達した段階で灌流固定を行い、海馬 CA1 領域の神経スパイン(シナプス後部)を画像解析した。その結果、スパイン密度は非処理群の 2.42 個/ $1\mu\text{m dendrite}$ から BPA 処理群においては 2.02 個/ $1\mu\text{m dendrite}$ へと大きく減少していた。頭部の直径の太い large-head ($>0.5 \mu\text{m}$) というスパインが特に減少した。

2) 成獣ラット海馬を取り出して BPA を 2 時間作用させて神経スパインを調べた。その結果、10 nM BPA や 1 nM エストラジオールは 2 時間で、CA1 領域の神経の樹状突起上のスパイン数を 140%程度増加させることを見出した。頭部の直径の細い small-head (0.2-0.4 μm) と middle-head (0.4-0.5 μm) というスパインが特に増加した。MAP kinase を阻害、あるいは NMDA 受容体をブロックするとこの BPA の作用は無くなった。

3) ピコリノイル誘導体化することによって質量分析の感度を大幅に改善することに成功し、海馬の BPA 濃度を定量した結果、14.6 ng/mL (64 nM)であった。これは神経可塑性を変化させるのに十分な量である。Plasma の BPA は 109 nM (東大医堤研, BBRC, 2004) であるので、飲み水によって血中に入り、海馬に蓄積されたと考えられる。

4) 環境ホルモンである BPA の high affinity 受容体として Estrogen-related receptor protein γ (ERR γ)の海馬での発現を

調べた。その結果、海馬の CA1、CA3、DG の神経細胞に ERR γ が発現していることを見出した。ERR γ は Western ブロットでシナプス膜画分(PSD)にも発現していることも確認した。ERR γ は脳の中でも海馬に特に多く、視床下部には少なかった。

D. 考察

脳の発達期(妊娠期+胎児期+新生仔期+授乳期)にBPAを曝露し、成獣になったラット海馬では、神経スパイン密度は大きく減少していた。これは、成獣ラット海馬においてBPAを急性的に加えた場合、スパインが増加していたのと全く異なっていた。その理由としては、胎児期の神経細胞がネットワークを形成する際に核の受容体を介した作用で変異が生じたと考えられる。これは主にkinaseを介してスパインを増やす急性作用とは異なるのであろう。

海馬内に64 nMのBPAが存在するのに、10 nMのBPAを外部から加えてスパインが増えるというのは、一見すると矛盾に見える。しかしこれは、調製した海馬スライスが2時間以上、BPAを含まないACSFで洗い流されてた為であると考えられる。実際、ACSFで洗い流して、海馬スライスに含まれるBPAを質量分析で定量したところ、濃度が0.5 nM以下に減少していた。もし洗い流さずに、取り出したばかりの海馬スライスに10 nMのBPAを添加したとしたら、上記の効果は観察されなかったと考えられる。東京大学医学部堤研究室のELISAを用いた先行研究で、血中のBPA濃度は 24.9 ng/mL (110 nM)であることから、今回測定された海馬のBPA濃度は、血流を通じて脳内に運ばれ、

海馬に蓄積されたと考えられる。

E. 結論

脳の発達期にBPAを曝露して成獣になったラット海馬の神経スパイン密度は減少していた。一方、取り出した海馬スライスでは、急性的にはBPAは10nMという低濃度で2時間程度で顕著にスパインを増加させることがわかった。このようにBPA曝露の仕方によって神経への影響は大きく異なることがわかった。この結果は、BPAなどの内分泌かく乱物質がいつ作用するか（胎児期と成熟後）によって脳への影響に重大な差が出る可能性を示唆している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hojo Y., Higo S., Ishii H., Ooishi Y., Mukai H., Murakami G., Kominami T., Kimoto T., Honma S., Poirier D., and Kawato S. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus **Endocrinology**150, 5106-5112 (2009)

Munetsuna E., Hattori M., Komatsu S., Sakimoto Y., Ishida A., Sakata S., Hojo Y., Kawato S., and Yamazaki T. Social isolation stimulates hippocampal estradiol synthesis **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 379, 480-484 (2009)

Munetsuna E., Hojo Y., Hattori M., Ishii H., Kawato S., Ishida A., Kominami S., and Yamazaki T. Retinoic Acid Stimulates 17 β -Estradiol and Testosterone Synthesis in Rat Hippocampal Slice Cultures **Endocrinology.** 150, 4260-4269 (2009)

Kimoto T., Yamada M., Ichikawa T., Honma

D., Cherry R.J., Morrison I.E., and Kawato S. Digital fluorescence analysis of trafficking of single endosomes containing low-density lipoprotein in adrenocortical cells: Facilitation of centripetal motion by adrenocorticotrophic hormone **Mol Cell Endocrinol.** 307, 185-195 (2009)

Higo S., Hojo Y., Ishii H., Kominami T., Nakajima K., Poirier D., Kimoto T., and Kawato S. Comparison of sex-steroid synthesis between neonatal and adult rat hippocampus **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 385, 62-66 (2009)

Hatanaka Y., Mukai H., Mitsuhashi K., Hojo Y., Murakami G., Komatsuzaki Y., Sato R., and Kawato S. Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 381, 728-732 (2009)

Hojo Y., Murakami G., Mukai H., Higo S., Hatanaka Y., Ogiue-Ikeda M., Ishii H., Kimoto T., and Kawato S. Estrogen synthesis in the brain-Role in synaptic plasticity and memory **Mol Cell Endocrinol.** 290, 31-43 (2008)

Ogiue M., Tanabe N., Mukai H., Hojo Y., Murakami G., Takata N., Tsurugizawa T., Shimohigashi Y., Honma S., Komatsuzaki Y., Kimoto T and Kawato S. Rapid Modulation of Long-term Depression and Spinogenesis by Endocrine Disrupters in Adult Hippocampal Neurons. **Brain Res Rev.**, 57, 363-375 (2008)

Hojo Y., Murakami G., Mukai H., Higo S., Hatanaka S., Ogiue-Ikeda M., Ishii H., Kimoto T. and Kawato S. Estrogen synthesis in the brain – Role in synaptic plasticity and memory. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 290, 21-43 (2008)

2. 学会発表

国際会議

1. Kawato, S., Mukai, H., Hojo, Y., Hatanaka, Y., Higo, S., Murakami, G., Y. Ooishi, Y., Kimoto, T., and Kominami, T. Rapid modulation of spines and LTD/LTP by estrogen and androgen in rat hippocampus: neuro-intracrinology, The 39th annual

meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, October, 2009

2. Mukai, H., Hatanaka, Y., Sato, R., Ooishi, Y., Ogiue-Ikeda, M., Hojo, Y., Kominami, S., Kawato, S Rapid modulation of synaptic plasticity by hippocampal-derived sex-steroids, The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto International Conference Center, July, 2009

3. Hojo Y, Higo S, Mukai H, Murakami G, Kominami S, Harada N, Honma S, Kimoto T, Kawato S Neurosteroid synthesis and synaptocrinology in the hippocampal synapses The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto International Conference Center, July, 2009

4. Kawato S, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Higo S, Hatanaka Y, Kimoto T Rapid modulation of synaptic plasticity by hippocampus-derived estrogens: Synaptocrinology US/Japan Neurosteroid Symposium, Gifu, Japan, September, 2008

5. Higo S, Mukai H, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Kawato S Synaptic localization of estrogen receptor and its rapid action on synaptic plasticity of rat hippocampus US/Japan Neurosteroid Symposium, Gifu, Japan, September, 2008

6. Kawato S, Mukai H, Murakami G, Hojo Y, Hatanaka Y, Higo S, Kimoto T Rapid modulation of spines and LTD/LTP by estradiol in rat hippocampus: neuro-synaptocrinology The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, U.S.A., November, 2008

国内学会

1. 川戸佳、大石悠貴「女性ホルモンはストレスによる記憶書き込み阻害を回復させる：急性効果」第47回生物物理学学会年会、2009年11月

2. 向井秀夫、北條泰嗣、畑中悠佑、三橋賢司、川戸佳「新規な神経スパイン解析手法とその適用」第47回生物物理学学会年会、2009年11月

3. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳「男性ホルモンによる海馬CA1・CA3スパインの急性的増加とその細胞内情報伝達経路の解析」第47回生物物理学学会年会、2009年11月

4. 向井秀夫、畑中悠佑、釣木澤朋和、中

西広典、浅島誠、川戸佳「海馬神経細胞樹状突起スパインのアクチビンによる増加効果の解析」第32回日本神経科学大会、2009年9月

5. 北條泰嗣、肥後心平、小南俊裕、向井秀夫、山崎岳、原田信広、本間誠次郎、木本哲也、川戸佳「海馬シナプスにおけるニューロステロイドの合成と局所分泌」第32回日本神経科学大会、2009年9月

6. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳「男性ホルモンによる海馬樹状突起スパインの形態変化とそのシグナル伝達経路の解析」第32回日本神経科学大会、2009年9月

7. 小松崎良将、粕谷昌寿、北條泰嗣、川戸佳「海馬神経スパインにおけるコルチコステロンによる作用の解析」第47回生物物理学学会年会、2009年11月

8. 向井秀夫、畑中悠佑、釣木澤朋和、中西広典、川戸佳「海馬神経細胞樹状突起スパインのアクチビンによる増加効果の解析」第46回生物物理学学会年会、2008年12月

9. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳「海馬樹状突起スパインに及ぼす男性ホルモンの急性的効果」第46回生物物理学学会年会、福岡国際会議場、2008年12月

10. 向井秀夫、畑中悠介、釣木澤朋和、中西広典、川戸佳「海馬神経細胞樹状突起スパインのアクチビンによる増加効果の解析」第31回日本神経科学大会、2008年7月

11. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳「海馬樹状突起スパインに及ぼす男性ホルモンの急性的効果」第31回日本神経科学大会、2008年7月

12. 大石悠貴、川戸佳「海馬CA1におけるニューロステロイドのシナプス伝達修飾の解析」第31回神経科学大会、2008年7月

13. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳「海馬樹状突起スパイン形態に及ぼす男性ホルモンの急性効果」第31回神経科学大会、2008年7月

14. 木本哲也、肥後心平、石井寛高、村上元、川戸佳「ラット海馬におけるニューロステロイドの受容体と合成酵素の発現解析」第31回神経科学大会、2008年7月

15. 北條泰嗣、肥後心平、向井秀夫、村上元、小南思郎、原田信広、本間誠次郎、木本哲也、川戸佳「海馬神経細胞シナプスにおけるニューロステロイドの合成と

局所分泌」第 31 回神経科学大会、2008 年 7 月

16. 村上元、佐藤怜以、釣木沢朋和、畑中悠佑、小松崎良将、北條泰嗣、向井秀夫、木本哲也、川戸佳「海馬におけるエストロゲンのスパイン制御作用」第 31 回神経科学大会、2008 年 7 月

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書(平成19-21年度)

研究課題名=[神経系初期発生における核内受容体の機能及び
核内受容体作動性化学物質の低用量影響に関する解析]

研究分担者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・部長

研究要旨

本研究は、神経幹細胞の増殖分化に対する核内受容体作動性化学物質の影響を、低用量域を考慮しつつ明らかにするものである。そのために、マウス胎児神経幹細胞の *in vitro* 培養系を用い、増殖分化影響を検討し、その分子メカニズムを明らかにする。

まず、胎児神経幹細胞を未分化状態を保って安定して *in vitro* 培養可能とする Austin Smith らの NS cell 培養法を導入し、その再現と保持される未分化状態の特性の確認を終了した。

次に、siRNA による遺伝子発現抑制法、及びクロマチン免疫沈降法の本 NScell 培養条件への適用を行い、その条件を確立した。また、48 種類の核内受容体のうち、発現量が微量な例として、PPAR γ について、免疫染色法により、神経幹細胞の核及び細胞質に発現していることを明らかにした。

次いで、Bisphenol A (BPA) 等のエストロゲン受容体結合性を有する化学物質の作用を検討し、17- β -estradiol (E_2), BPA に 32pM 以上で増殖促進作用があること、Genistein に 3 μ M 以上で増殖抑制作用が、Daidzein に 100nM から 3 μ M までは増殖促進作用、より高濃度で抑制作用があることを明らかにした。また、グルコルチコイド受容体アゴニスト Dexamethasone (DEX) の増殖抑制作用に対し、アンタゴニストの Mifepristone が逆に促進作用 (3 μ M 以上では阻害作用) を示すことを確認した。更に Dihydrotestosterone (DHT) に 32pM 以上で増殖促進作用があること、レチノイン酸が 1nM 以上で抑制作用を示すこと、3-methylcholanthrene は 32 μ M 以上で促進作用があること、を明らかにした。DEX については、LIF 刺激による GFAP 蛋白発現を促進する作用があることを明らかにした。

グルコルチコイド受容体アゴニスト DEX に神経幹細胞に対する増殖抑制作用があること、 E_2 , BPA に弱い増殖促進作用があることを見出した。そこで、これらの物質の細胞分化に対する影響を検討した。

分化マーカーに、Nestin (神経幹細胞), GFAP (アストロサイト), MAP2 (ニューロン), MBP (オリゴデンドロサイト) を用い、化学物質処理後 24 時間時に定量 RT-PCR を実施したところ、DEX 単独で GFAP mRNA の誘導作用があることを見出した。その作用は、1nM 以上、処理後 4 時間以降から検出された。ウェスタンブロッティングによる定量を行い、この作用がタンパク質レベルでも誘導されていることを確認した。そこで、GFAP プロモーター (転写開始点上流 2.8kb) の配列を解析したところ、グルコルチコイド受容体結合配列 (GRE) 候補を 3 ヶ所見出した。レポーターアッセイによって、その 3 ヶ所を欠失した際に DEX による誘導に変化が生じるか調べたが、変化は無いことが分かった。

一方、 E_2 , BPA には分化影響作用は見出されなかった。BPA については ER に加え、ERR γ に結合することが報告されているので、同様に ERR γ に結合する TAM について検討したところ、弱く Nestin 発現を上昇させ、GFAP を低下させる傾向が認められた。以上の結果から、核内受容体作動性物質には神経幹細胞の増殖分化に影響を与えるものが存在すること、特に、DEX には神経幹細胞の増殖を抑制する作用に加え、アストロサイト分化を促進する作用があることが示唆された。

キーワード:

神経幹細胞、核内受容体、増殖分化、Bisphenol A、グルココルチコイド受容体
略語: DEX; Dexamethasone, GFAP; Glial Fibrillary Acidic Protein, MAP2;
Microtubule-Associated Protein, MBP; Myelin Basic Protein, E2; 17-beta estradiol, BPA;
bisphenol A, ERRg; Estrogen-Related Receptor, Gamma, TAM; Tamoxifen

A. 研究目的

神経系が正常に初期発生を遂げるためには、神経幹細胞が正常に増殖分化することが必要である。一方、網羅的遺伝子発現解析により、神経幹細胞に様々な核内受容体の mRNA が発現していることが明らかになっており、核内受容体の神経幹細胞における調節機能の重要性が示唆される。そこで本研究では、神経幹細胞の増殖・分化における核内受容体の機能の解明と核内受容体作動性化学物質の影響を、低用量域を考慮しつつ検討する基礎研究を行う。

B. 研究方法

マウス胎児神経幹細胞を *in vitro* 培養し、核内受容体を化学物質で刺激もしくはその発現を抑制した際の増殖、分化への影響を検討することを企画した。

マウス胎児神経幹細胞培養実験

(NS cell 培養)

C57BL/6 マウス妊娠 14.5 日の胎児より終脳を分離し、トリプシンもしくはピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培養培地 (N2/DMEM/F12 (シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、プレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの)) に、bFGF (10ng/ml) 及び EGF (10 ng/ml) を添加し、10cm シャーレ (ヌンク社) に 10^6 個/6ml の密度で生細胞を播種する。96 well plate を用いる場合は、 8×10^3 /well の細胞密度とする。化学物質は Tocris 社もしくは Calbiochem 社から購入し用いた。

免疫染色

細胞を 4%パラフォルムアルデヒドにて 15 分間固定後、ウサギ抗 GFAP 抗体 (DAKO 社) にて

蛍光免疫染色した。同時に細胞核をヘキスト色素にて染色した。

定量 RT-PCR

細胞に各物質を処理し一定時間後、細胞破砕液を回収し、逆転写反応を行い cDNA を作製した。各遺伝子に対する primer を用い、sybergreen により定量 PCR を実施した。Primer 配列は以下の通り。

Nestin

(FW 5'-CTGCAGGCCACTGAAAAGTT-3',
RV 5'-TCTGACTCTGTAGACCCTGCTTC),

GFAP

(FW 5'-ACAGACTTTCTCCAACCTCCAG-3',
RV 5'-CCTTCTGACACGGATTTGGT-3'),

MAP2

(FW 5'-TCTGCGAGTAAGCTGTGACC-3',
RV 5'-CTGTGAAACTTGGAGCACACA-3'),

MBP

(FW 5'-CACACACGAGAACTACCCA-3',
RV 5'-GGTGTTCGAGGTGTCACAA-3')

Western blotting

細胞に各物質を処理し 2 日後、セルスクレーパーで細胞を回収し、破砕液を調製した。BCA 法にてタンパク質を定量し、1 レーン当たり 5ug を SDS-PAGE し、ニトロセルロース膜に転写後、抗 GFAP 抗体 (Dako)、HRP ラベル二次抗体でケミルミネッセンスを検出した。画像解析により、GFAP に対応するバンドを定量した。

GFAP promoter reporter assay

細胞にコントロールレポーターとともに各レポーターを Lipofectamine LTX で形質転換し、一晚培養したのち、各物質を処理し 24 時間後

に破碎液を調製し、ルシフェラーゼ活性を測定した。コントロールレポーターの数値を用いて標準化した。

C. 研究結果

平成19年度は、まず、胎児神経幹細胞を未分化状態を保って安定して *in vitro* 培養し解析に用いるために、NS cell 培養法の導入を試みた。

NS cell 培養法

NS cell 培養法は *in vitro* で未分化状態を保って無制限に神経幹細胞を培養できる方法として最近 Austin Smithらにより開発されたものである (PLOS Biology 2005;3:9:e283)。一方、従来の方法では培養を続けるうちに少しずつ分化が進み未分化状態を保てないという問題があった。胎生11日、14日の胎児終脳から神経上皮細胞を分離し、bFGFと同時にEGFを添加して培養するNS cell 培養法を試したところ、ともに少なくとも10回以上未分化状態を保ったまま継代可能であることを確認した。また、培養した細胞の分化能を調べるために、LIF刺激によるアストロサイト分化をGFAP蛋白質の発現上昇を指標に調べ、初代培養直後と変わらない応答能を有していることを確認した (Fig.1)。

siRNAによる遺伝子発現抑制条件の確立

次に、核内受容体機能解析に役立つ重要な技術としてsiRNAによる遺伝子発現抑制法の神経幹細胞への適用を試みた。Dharmacon社のシステムを用い、細胞導入試薬及びその量、抑制効果発現までの時間などの条件検討を行った結果、解析に適用可能なレベルの遺伝子発現抑制を達成できる条件を確立した。具体的には、LIFによるアストロサイト分化シグナル伝達において必須なLIFのco-receptorであるgp130の発現抑制に伴うGFAP mRNA発現低下を指標に検討し、gp130が実際に発現抑制され、GFAPも同様に抑制されることを確認した (Fig.2)。

クロマチン免疫沈降法の適用

また、核内受容体が実際に特定の遺伝子プロモーターに結合しているかを調べるために今後必須となるクロマチン免疫沈降法の導入を進め、それが実施可能であることを確認した。具体的には、LIF刺激に伴い、転写因子STAT3が核に移行し、GFAPやSTAT1のプロ

モーターに結合する現象を捉えられるか検討し、LIF刺激に応じたSTAT3のGFAP, STAT1プロモーターへの結合を確認した (Fig.3)。

PPAR γ の神経幹細胞における発現

48種類の核内受容体のうち、本研究では内因性もしくは外因性のリガンドが既知の核内受容体は化学物質標的としての優先度が高いものと考えている。PPAR γ は内因性リガンドとして不飽和脂肪酸の一種である15d-PGJ2が同定され (Cell, 83: 803-812, 1995)、外因性リガンドとして糖尿病治療薬として用いられているチアゾリジン類が知られている。結晶構造解析からPPAR γ のリガンド結合空間は他の核内受容体ファミリーよりも広いことが明らかになり (Nature, 395: 137-143, 1998)、様々な構造の化学物質をリガンドとすることが可能であると考えられている。よって、PPAR γ に結合する化学物質は多々存在する可能性があり、PPAR γ は標的としての重要性が高いと考えられる。そこで、第一段階として、PPAR γ が神経幹細胞に発現しているかを免疫染色法により調べた。胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞において、神経幹細胞マーカーのnestinとPPAR γ の二重染色を行った結果、PPAR γ がnestin陽性細胞に発現していること、その発現は核に加え細胞質にも認められることが明らかになった (Fig.4)。

平成20年度は、E₂、BPAを始めとする様々な核内受容体作動性物質に神経幹細胞増殖影響が認められた。また、Dexamethasoneに、LIF刺激によるGFAP蛋白質の発現を促進する作用があることが示された。

エストロゲン受容体結合性を有する化学物質の神経幹細胞増殖に対する影響

昨年度導入した、胎児神経幹細胞を未分化状態を保って安定して *in vitro* 培養するNS cell 培養法 (PLOS Biology 2005;3:9:e283)を用い、エストロゲン受容体結合性化学物質の神経幹細胞に対する影響を検討した。NS cell 培養は96well plateで行い、ニューロスフェア形成後、17-beta-estradiol (E₂)、Bisphenol A (BPA)、Genistein (GEN)、或いはDaidzein (DAI)を共存させ、増殖に対する影響を調べた。培養開始後7日目に細胞内ATP量を指標に増殖程度を定量したところ、E₂及びBPAに32pMから増殖促進作用があること、

GEN は低濃度では弱い増殖促進作用を示し、3 μ M 以上では強い増殖抑制作用を示すこと、DAI は 100nM から 3 μ M までは濃度依存的に増殖促進作用を示すが、それ以上の濃度では抑制作用を示すことを明らかにした (Fig.1)。

核内受容体結合性を有する他の化学物質の影響

昨年度、グルココルチコイド受容体アゴニスト Dexamethasone (DEX) に増殖抑制作用があることを明らかにした。本年度は、アンタゴニストの Mifepristone の作用を検討したところ、1nM \sim 1 μ M までの濃度で増殖促進作用を示すことが確認された。一方、3 μ M 以上では増殖阻害作用を示した (Fig.2B)。

アンドロジェン受容体活性化の影響を Dihydrotestosterone (DHT) により検討したところ、32pM から増殖促進作用があることが示された (Fig.2C)。

神経細胞分化誘導作用 (増殖抑制作用) があることが知られているレチノイン酸の作用が本培養系で増殖抑制物質として検出されるか検討したところ、1nM からの抑制作用が確認された (Fig.2D)。10 μ M では未分化細胞が消失したためか、細胞はほぼ死滅しているように見えた。

昨年度神経幹細胞における蛋白質発現を確認した AhR について、その活性化の影響を 3-methylcholanthrene (3-MC) を用いて検討したところ、300nM までは無影響であるが、32 μ M 以上で増殖促進作用があることが明らかになった (Fig.2E)。

DEX の GFAP 発現促進効果

DEX については、増殖抑制作用がある一方、グルココルチコイド受容体のノックダウンにより増殖が促進されること (昨年度成果) に加え、アンタゴニストの Mifepristone にも増殖促進作用があることが示された。すなわち、グルココルチコイド受容体活性化は増殖抑制に、阻害は促進につながるという結果である。一方で、ニューロスフェア培養の過程で、DEX を共存させることにより、細胞の付着性が増すことがあることを示す観察結果も得られ、増殖以外

の作用、特に分化促進作用があることが示唆された。そこで、アストロサイト分化刺激作用を持つ LIF (Leukemia inhibitory factor) を、通常用いられる 80ng/mL よりも薄い濃度の 2.5ng/mL で作用させた神経幹細胞系に、DEX を 10^{-8} M (IC₅₀ 付近) もしくは 10^{-6} M (検討した最高濃度) 加え、3 日間培養した後、アストロサイトマーカーの GFAP 蛋白質を蛍光免疫染色し観察した。その結果、LIF 単独刺激に比べ、DEX はどちらの濃度でも明らかに GFAP 蛋白質発現を上昇させた (Fig.3)。その際、細胞の形態に変化が認められ、LIF 単独刺激群に比べ、多数の突起を有する細胞が多く見られた (Fig.4)。一方、DEX のみを加えた場合には、GFAP を弱く発現する細胞が極低い頻度で認められるに留まった。すなわち、DEX は単独ではアストロサイト分化を誘導する作用は弱い、LIF 等の分化刺激因子の作用を強める働きがあると考えられた。

平成 21 年度は、Dexamethasone に、単独でアストロサイト分化マーカー GFAP の mRNA およびタンパク質を誘導する作用があることを見出した。E₂、BPA には分化影響作用は認められず、Tamoxifen に未分化マーカーの Nestin 発現を弱く上昇させる作用が認められた。

Dexamethasone (DEX) による GFAP 発現誘導

マウス胎児神経幹細胞培養に対し、DEX を 1nM \sim 1 μ M まで濃度を振って添加し、24 時間後に各種分化マーカーとして、Nestin (幹細胞)、GFAP (アストロサイト)、MAP2 (ニューロン)、MBP (オリゴデンドロサイト) の mRNA を定量 RT-PCR で測定したところ、Fig.1A) のように、DEX に濃度依存的に GFAP mRNA を誘導する作用があることが判明した。誘導作用の経時変化を検討した結果、誘導は 4 時間から認められた。一方、他の 3 種類のマーカーには有意な変化は認められなかった。

そこで、この作用がタンパク質レベルでも認められるのか、ウェスタンブロットングで定量したところ、Fig.2 のように GFAP タンパク質の誘導作用も確認された。

また、アストロサイト分化促進因子 LIF を共

存させた際の GFAP 発現変化を検討した結果、増強作用が認められた (mRNA 定量結果は、Fig.3。タンパク質のデータは Fig.2 参照)。

一方で、 E_2 、BPA、TAM については、TAM に、1 μ M 付近で Nestin 発現を弱く上昇させる作用が見出されたのみであった (Fig.1)。

DEX による GFAP 誘導に関わるプロモーター領域の検討

GFAP プロモーター配列を調べたところ、グルココルチコイド受容体結合配列 (GRE) 候補を3ヶ所見出した。そこで、GFAP プロモーター全長を持つ GF1L と、GRE 候補を3ヶ所とも欠失する GF1LB を神経幹細胞に各々形質転換し、DEX 処理しレポーター応答を検討したところ、GRE を欠失した GF1LB でも DEX による誘導程度は変わらないという結果が得られた (Fig.4)。

よって、DEX による GFAP 発現促進作用は、配列から見出した GRE 候補に GR が結合し、直接転写を促進するというような単純な仕組みでは無い可能性が示唆された。

D. 考察

神経系初期発生においては神経幹細胞の増殖、分化が正常に制御されることが必要であり、それが化学物質により乱されることによる影響は大きいことが予想される。網羅的遺伝子発現解析により、48 種類の核内受容体のうち、リガンド既知の受容体では Thyroid hormone receptor や Glucocorticoid receptor などの mRNA 発現が高いことが示唆されている。発現が高いことが直接その受容体が神経幹細胞において重要な機能を有していることを示すものではないが、無視できない知見である。実際、Thyroid hormone receptor については、甲状腺ホルモンが神経幹細胞のオリゴデンドロサイト分化を促進することが明らかになっている。今後、Glucocorticoid receptor が神経幹細胞において化学物質標的として考慮すべき機能を有しているか検討する必要がある。

PPAR γ は内因性リガンドに加え、チアゾリジン類などの外因性リガンドが明らかになっている核内受容体であるが、脳における機能についてはよく分かっていない。一方、その結晶構

造解析から、リガンド結合空間が他の核内受容体ファミリーよりも広いことが明らかになっており、様々な構造の化学物質が結合する可能性が示唆されている。

神経系初期発生においては、神経幹細胞の増殖、分化が正常に制御されなければならない。それが化学物質により乱されることによる影響は、発達中であるが故に不可逆的な甚大なものとなる可能性が指摘される。各種の核内受容体作動性物質が神経幹細胞増殖、或いは分化へ影響を与えるという本年度の結果を踏まえ、今後さらに詳細な解析を行う必要がある。

第2年度はまず、エストロゲン受容体結合性を有する化学物質に増殖促進作用があることを示した。GEN や DAI は高濃度では増殖抑制作用を示したが、これはこれらの物質のチロシンキナーゼ阻害活性に起因する可能性を考慮する必要がある。すなわち、本培養系では bFGF と EGF による増殖刺激が必須であるが、両受容体はチロシンキナーゼファミリーに属し、高濃度の GEN や DAI には両受容体チロシンキナーゼ活性を阻害する作用があるためである。エストロゲン受容体過剰活性化が原因である可能性も考慮しつつ検討を進めた。

BPA は、検討した最低濃度の 32pM 以上で増殖促進作用を示し、1 μ M で増殖阻害作用を示さなかった。また、同様の増殖促進は E_2 においても認められた。BPA には弱いエストロゲン受容体結合活性があることが報告されている。よって、まずエストロゲン受容体を中心に作用メカニズムを探るが、通常の結合アッセイやレポーターアッセイでの BPA の EC_{50} ・ IC_{50} が E_2 に比して3~4桁高いという知見とは合致せず、むしろ E_2 と同等な濃度で作用した可能性が示唆された。

エストロゲン受容体以外の核内受容体作動性化学物質数種類についてその作用を調べた結果、昨年度明らかにした DEX に加え、DHT、3-MC、レチノイン酸にも作用があることが分かった。

DHT は 32pM の低濃度に於いても増殖促進効果を示すという予想外に強い活性を持つ

ており、今後その作用メカニズムを詳細に検討する必要があると考える。

3-MC の作用は 10 μ M 以上の高濃度で認められたものであるが、作用自体は強い。他の AhR リガンドにも共通する作用であるかを低濃度域を踏まえて検討する一方、その作用メカニズムを明らかにする必要がある。

DEX については、LIF 刺激による GFAP 蛋白の発現を促進する作用も有することが明らかとなった。今後、それが mRNA 発現上昇を介しているか検討し、その結果を踏まえ詳細なメカニズム解析に移る。

神経系初期発生においては、神経幹細胞の増殖、分化が正常に制御されなければならない。それが化学物質によって乱されると、その神経系に対する影響は不可逆かつ甚大なものとなる可能性がある。

本研究により、DEX を始めとする核内受容体作動性物質が神経幹細胞の増殖に加え分化にも影響を与えることが明らかになった。この結果は、核内受容体作動性物質のリスク評価の際には、発達期の神経系に対する影響を十分に考慮する必要があることを強調するものである。

DEX は、神経幹細胞の増殖阻害作用に加え、単独でアストロサイト分化を促進し、アストロサイト分化促進因子 LIF 作用を増強することが明らかになった。また、グルココルチコイド受容体阻害剤の Mifepristone によりデキサメタゾン作用は抑制されることも確認が取れており、DEX の作用はグルココルチコイド受容体を介していることが強く示唆される。現時点で詳細な作用メカニズムは明らかに出来ていないが、アストロサイト分化促進因子 LIF の作用を増強することから、複合的な状況によっては DEX の作用がより低濃度で生じることが考えられる。

BPA については E₂ 同様、ごく弱く増殖を促進する傾向が認められるに留まった。分化に対する影響は今回の実験条件では認められなかった。BPA は ER を活性化することが知られているが、ERRg にも結合することが報告されている。一方で ERRg には TAM が結合し、ERRg の転写活性を阻害することが知られてい

る。そこで、TAM 自体に分化影響が認められるかを調べたところ、未分化マーカーの Nestin 発現を弱く促進することが判明した。作用発現濃度は 1 μ M 程度であるが、TAM (分子量 387.5) の抗癌剤としての最大用量 40mg/日から、50kg のヒトでの最大血中濃度を算出すると、約 2 μ M となり、作用が認められた濃度域と重なる。よって、場合によっては TAM の作用の詳細を検討する必要があるかもしれない。

E. 結論

神経幹細胞において核内受容体が重要な役割を有していること、すなわち神経幹細胞が核内受容体作動性化学物質の標的であることが示されてきた。神経幹細胞に対し核内受容体作動性物質が様々な作用を示すことでは、BPA については、それが低濃度でも増殖促進作用を示すことがわかった。次いで、Dexamethasone に、単独でアストロサイト分化マーカー GFAP の mRNA およびタンパク質を誘導する作用があることを見出した。E₂, BPA には分化影響作用は認められず、Tamoxifen に未分化マーカーの Nestin 発現を弱く上昇させる作用が認められた。

Dexamethasone (DEX) による GFAP 発現誘導マウス胎児神経幹細胞培養に対し、DEX を 1nM~1 μ M まで濃度を振って添加し、24 時間後に各種分化マーカーとして、Nestin (幹細胞), GFAP (アストロサイト), MAP2 (ニューロン), MBP (オリゴデンドロサイト) の mRNA を定量 RT-PCR で測定したところ、Fig. 1A) のように、DEX に濃度依存的に GFAP mRNA を誘導する作用があることが判明した。誘導作用の経時変化を検討した結果、誘導は 4 時間から認められた。一方、他の 3 種類のマーカーには有意な変化は認められなかった。

そこで、この作用がタンパク質レベルでも認められるのか、ウェスタンブロッティングで定量したところ、Fig. 2 のように GFAP タンパク質の誘導作用も確認された。

また、アストロサイト分化促進因子 LIF を共存させた際の GFAP 発現変化を検討した結果、増強作用が認められた (mRNA 定量結果は、Fig. 3。タンパク質のデータは Fig. 2 参照)。

一方で、E₂, BPA, TAM については、TAM に、1μM 付近で Nestin 発現を弱く上昇させる作用が見出されたのみであった (Fig.1)。

GFAP プロモーター配列を調べたところ、グルココルチコイド受容体結合配列 (GRE) 候補を3ヶ所見出した。そこで、GFAP プロモーター全長を持つ GF1L と、GRE 候補を3ヶ所とも欠失する GF1LB を神経幹細胞に各々形質転換し、DEX 処理レポーター応答を検討したところ、GRE を欠失した GF1LB でも DEX による誘導程度は変わらないという結果が得られた

これまでの研究により、核内受容体作動性物質の中には神経幹細胞の増殖及び分化に対する作用を示すものがあることが示された。特に DEX は増殖阻害作用、アストロサイト分化促進作用を有することが明確に示された。なお、予備的ながら、その作用は内因性副腎皮質ホルモンであるコルチコステロン、ハイドロコルチゾールにも認められた。また、DEX はアストロサイト分化促進因子 LIF の作用を増強することも明らかになった。

グルココルチコイドはストレス等、環境の状況に応じて血中に分泌されることから、その様な状況では、LIF に限らず、様々な因子や外来性化学物質との相互作用が想定される。グルココルチコイドの神経幹細胞における、他の因子との相互作用 (増強、減弱効果) を踏まえた研究が今後必要となると考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J, Igarashi K, Gonzalez FJ, Ikuta T, Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y.

Hypersensitivity of AhR-deficient mice to LPS-induced septic shock. *Mol Cell Biol.* 2009 Dec;29(24):6391-400. [Epub 2009 Oct 12.]

Matsunaga N, Kanno J, Hamada C, Yoshimura I. An experimental design for

judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments. *Environmetrics* 2009; 20:1-13.

Kanno J., Overview: "Children's toxicology", a renovating study field of irreversible "early exposure-delayed effects". *J Toxicol Sci.* 2009;34 Suppl 2:SP199-200.

Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J. Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. *J Toxicol Sci.* 2009;34 Suppl 2:SP279-86.

Ishimaru N, Takagi A, Kohashi M, Yamada A, Arakaki R, Kanno J, Hayashi Y. Neonatal exposure to low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance. *J Immunol.* 2009 May 15;182(10):6576-86.

2. 学会発表

菅野 純、BPA 等の低用量影響の標的「中枢神経」、第20回環境ホルモン学会講演会、2009年2月24日、東京、口演

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書(平成 19-21 年度)

核内受容体作動性化学物質の中枢影響に関する研究

研究分担者 粟生修司 九州工業大学大学院生命体工学研究科 教授

研究要旨

核内受容体作動性化学物質の中枢影響を行動およびニューロンレベルで解明し、評価法を確立することを目的とした。核内受容体作動性化学物質を発達期に曝露し、その影響を各種行動評価試験で調べ、さらに電気生理学的、神経化学的に検討した。環境中に存在する核内受容体作動性化学物質は性依存的に探索行動やストレス対処行動、体重のセットポイントに影響を及ぼし、情動行動については性非依存的に影響を及ぼした。大脳辺縁系への影響が認められた。次いで、核内受容体作動性化学物質のヒト中枢影響評価に利用できる「実験動物を用いた神経行動学的評価法」の確立を目的とした。核内受容体作動性化学物質を妊娠期、周産期、授乳期に曝露し、その影響を神経行動学的にラットおよびマウスで比較検討した。環境中に存在する核内受容体作動性化学物質はオープンフィールド行動や情動行動、体重に対して、ラットでは性依存的・時間非依存的に影響を及ぼし、マウスでは性非依存的・時間依存的に影響を及ぼした。モノアミン系を介する作用機序が示唆された。サルでも評価系の構築を図った。核内受容体作動性化学物質はオープンフィールド行動や情動行動、群れ行動に対して影響を及ぼすが、ラットでヒトとほぼ類似の影響を検出できた。サルにおける胎生期曝露の実験は長期の実験が必要となるが、幼弱ザルと成熟ザルを比較することで代替評価できる可能性があり、鼻腔投与による性認知、性志向性、性行動および社会行動評価系を確立した。

A. 研究目的

核内受容体作動性化学物質のヒト中枢影響評価に利用できる「実験動物を用いた神経行動学的評価法」の確立を目的とした。すなわち、ビスフェノールA (BPA)、の妊娠期、周産期、授乳期曝露の各種行動や体重に及ぼす影響をラットおよびマウスで比較検討した。社会行動の評価では、BPA および 1-ブロモプロパン (1-BP) の群れ行動の影響を調べた。サルでは評価系の構築のため、ポジティブコントロールとさいてテストステロンを用い、さらに生殖系とエネルギー代謝系に作

用する核内受容体作動性化学物質候補物質である 2-buten-4-olide の性行動、性認知行動、社会行動に及ぼす影響を調べた。

B. 研究方法

核内受容体作動性化学物質を妊娠期、周産期、授乳期に曝露し、その影響を神経行動学的にラットおよびマウスで比較検討した。すなわち行動評価においては、活動性や探索行動の評価にオープンフィールド試験、不安情動の評価に高架十字迷路試験、回避学習の評価に受動的回避学習試験、う

つ反応の評価に強制水泳試験、攻撃行動や警戒反応の評価に侵入者試験を用いた。さらに4匹のラットをオープンフィールドに置き、群れ行動を評価した。曝露手段としては、50ppbのBPAを飲料水に混ぜて母ラットあるいは母マウスに投与した。1-BPは母ラットを曝露チェンバーに1日6時間置き、20日間700ppmの濃度で曝露した。一部のラットは曝露母ラットから生まれた仔ラットを対照群の母ラットに、対照母ラットから生まれた仔ラットを曝露群母ラットに里子に出し、体重変化を評価した。サルではモンキーチェア上に被験ザルを置き、雄ザルまたは雌ザルに対するレバー押し行動を評価した。またサルの視覚的性嗜好性や性弁別機能をレバー押し行動で評価した。曝露手段としては、BPAを飲料水に混ぜて母ラットあるいは母マウスに投与した。1-BPは母ラットを曝露チェンバーに1日6時間置き、20日間700ppmの濃度で曝露した。サルではポジティブコントロールとしてテストステロンを鼻腔内投与し、2-buten-4-olideは筋注で投与した。

実験はすべて「九州工業大学大学院生命体工学研究科における動物実験に関する指針」に基づいて行った。

C. 研究結果

環境中に存在する核内受容体作動性化学物質は性依存的に探索行動やストレス対処行動、体重のセットポイントに影響を及ぼし、情動行動については性非依存的に影響を及ぼした。大脳辺縁系への影響が認められた。

また環境中に存在する核内受容体作動性化学物質はオープンフィールド行動や情動

行動、体重に対して、ラットでは性依存的・時間非依存的に影響を及ぼし、マウスでは性非依存的・時間依存的に影響を及ぼした。モノアミン系を介する作用機序が示唆された。すなわちラットにおいて、BPAの妊娠期、周産期、授乳期曝露のすべてで探索行動の性分化を障害した。マウスでは授乳期曝露では雌の活動性が低下し、周産期曝露では雄の活動性が低下した。また周産期、授乳期とも雄の攻撃行動を示す個体数が有意に減少したが、妊娠期曝露では8週齢においてだけ攻撃性の増加が認められた。BPAは濃度選択的に雌の体重を抑制し、雄の体重を増加した。マウスの体重は変化しなかった。

1-BPの妊娠期曝露は探索行動の性分化障害と体重の抑制を引き起こすが、体重の抑制は、対照母ラットに授乳させた曝露仔ラットでは認められず、体重抑制には、胎児期の曝露に加えて曝露母ラットによる授乳が影響していることがわかった。1-BPはラットの群れ行動には影響しなかったが、群れ環境では雌の雄化だけでなく雄の雌化を引き起こして活動性の性分化を障害した。

ラットの群れ行動に対してBPAはこれまでのところ明確な影響が認められないが、1-BPは雌雄とも個体間距離を有意に増加させた。また同腹・同ケージ同士の群れにすると雄への影響が増強され、雌への影響は減弱した。また、1-BPは個別状態では雌の活動性を抑制するが、群れ状態にすると雄の活動性を上昇させた。

テストステロンを雌ザルに鼻腔内投与すると、性的活動性を示す雄ザルに対して、雌ザルのレバー押し行動が高進し、性行動も促進した。性的活動性を示さない雄ザルに対しては、影響出現が遅延し、雌ザルに

対しては、闘争行動が増加した。

2-B40 はマウスのマウンティング回数を減少させ、射精までの潜時を短縮させるが、サルにおいては性弁別の正答率が向上した。食物弁別の正答率は変化しなかった。サルのマスターベーションに対しても影響しなかった。

D. 考察

低濃度の BPA やフタル酸は主として雄に作用し、行動の雌化を引き起こす。最近、性分化に核内受容体であるエストロゲン受容体だけでなく、アンドロゲン受容体も関与していることが明らかになっており、低濃度の核内受容体作動性化学物質の中枢影響はアンドロゲン受容体を介する抗アンドロゲン作用と思われる。またうつ反応などの情動行動に及ぼす影響は性非依存的に引き起こされる。核内受容体作動性化学物質の中枢影響については性依存的な影響と非依存的な影響が認められるが、発達期の曝露時期によりその発現の仕方が異なる。また動物種でも異なっている。膜受容体の関与も示唆されており、評価法の確立が重要な課題である。

フロン代替化合物の 1-ブロモプロパン (1-BP) は生殖系への影響も報告されており、成熟脳への影響が報告されている。400ppm および 700ppm の胎生期曝露で行動の性分化を障害し、さらに海馬の興奮性が抑制されるが、長期増強には影響しないことが明らかになった。海馬のカルモジュリンキナーゼ II にも影響が認められ、これまでの研究で海馬や扁桃体が *in vivo* だけでなく *in vitro* の条件でも影響が検出されている。モノアミン系だけでなく大脳辺縁系も高感

受性部位であることが示唆され、その細胞機構の解明が今後の課題である。

ラットにおいては投与時期に依存せずに妊娠期、周産期、授乳期すべて低濃度の BPA は主として雄に作用し、行動の雌化を引き起こす。一方マウスでは行動の性差が著明でなく、作用の方向も同じ場合が多いが、投与時期により、雌のほうが感受性が高い場合がある。また 1-BP は主として雌に作用し、雌の雄化を誘発する。最近、性分化に核内受容体であるエストロゲン受容体だけでなく、アンドロゲン受容体も関与していることが明らかになっており、低濃度の核内受容体作動性化学物質の中枢影響はアンドロゲン受容体を介する抗アンドロゲン作用と思われる。またうつ反応などの情動行動に及ぼす影響は性非依存的に引き起こされるが、曝露時期により影響を受ける行動指標が異なる。核内受容体作動性化学物質の中枢影響については性依存的な影響と非依存的な影響が認められるが、発達期の曝露時期によりその発現の仕方が異なる。また動物種でも異なっている。ラットでは性依存的・時間非依存的に作用し、マウスでは性非依存的・時間依存的に作用する

核内受容体作動性化学物質の中枢影響として示唆されている行動の中性化、不安・うつの増強、学習障害、社会行動異常、母性行動異常、薬物依存性の高進などが、ヒトでも認められる障害として社会問題化している。エストロゲン受容体アンタゴニストで消失しない場合も認められ、複数の標的が想定される。ヒトでの評価法の確立が急務であるが、ヒトでの実験的アプローチは不可能なため、動物実験による複合作用や高感受性グループの抽出、個体ごとの評価

ができる方法論を確立する必要がある。

核内受容体作動化学物質のヒトへの中枢影響として可能性があるのは、1) 行動の中性化、2) 不安・うつの増強、3) 学習・記憶障害、4) 薬物依存やその他の嗜癖行動、5) 自閉症・コミュニケーション障害などの社会機能異常、6) 母性行動異常、7) 性同一性障害・性志向性異常を含む生殖障害、8) 肥満および摂食障害であり、これらはすべて社会問題化している。

これまでの研究で、ラットは上記のヒトへの影響ときわめてよく似た影響を受けることが明らかになった。核内受容体作動性化学物質の標的はエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体、PPA 受容体、レチノイド受容体などが示唆されているが、核内受容体から細胞、組織、器官、個体、集団（社会）の各レベルで複数の標的がネットワーク化されて、影響を及ぼしあっている。各レベルで複雑な応答ネットワークをもっているにもかかわらず、共通の発現系を有しているのも事実で、さまざまな物質が異なる標的を介して類似の影響を示している。

ヒトへの中枢影響のメカニズムを解明する上で、サルはきわめて重要な位置を占めているが、実験的な解析はまだ不十分である。高等動物になるほど核内受容体に依存する神経の可塑性は発達の後期にずれ込んでいることから、思春期前の幼弱サルは核内受容体に高い感受性を有している可能性があり、実験期間の短縮をもたらす可能性がある。今年度の研究で鼻腔投与が中枢影響を見る上で有用であることがわかり、レバー押し行動を用いることで定量的な評価が可能であることも示唆された。ナシヨナ

ルリソースプログラムで幼弱サルの供給が確立されつつあるので、今後有用な実験的アプローチが期待される。

E. 結論

核内受容体作動化学物質の発達期曝露は耐用 1 日摂取量以下の濃度でも中枢神経系に作用し、性依存的あるいは性非依存的に非生殖行動に影響を及ぼす。

1) ラットおよびマウスで明確な種差があり、ラットでは性依存的・時間非依的に作用し、マウスでは性非依存的・時間依的に作用することが明らかになった。

2) 環境中に存在する核内受容体作動性化学物質はオープンフィールド行動や情動行動、体重に対して、ラットでヒトと類似の非生殖行動の性分化障害、うつ・不安の増大、雄の多動、雄の体重増加と雌の体重減少を引き起こした。

3) テストステロンを雌ザルに鼻腔内投与すると、性的活動性を示す雄ザルに対して、雌ザルのレバー押し行動が高進し、性行動も促進した。性的活動性を示さない雄ザルに対しては、影響出現が遅延し、雌ザルに対しては、闘争行動が増加した。

以上、核内受容体作動化学物質の発達期曝露は耐用 1 日摂取量以下の濃度でも中枢神経系に作用し、ヒトで示唆されている中枢影響と類似の影響を起こすことが主としてラットで明らかになった。また群れ行動も影響を受けることが明らかになった。サルを用いた評価は困難な点が多いが、鼻腔投与方法とレバー押し行動を利用することが学習機能や、性志向性、性行動および社会行動を評価できることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. ©Masuda A, Aou S. (2009) Social transmission of avoidance behavior under situational change in learned and unlearned rats. PLoS One. 2009 Aug 27;4(8):e6794
2. Oomura Y, Aou S, Fukunaga K. (2009) Prandial increase of leptin in the brain activates spatial learning and memory. Pathophysiology. 2009 Jul 14. [Epub ahead of print]
3. Tsuruoka T, Fujimoto T, Shiota N, Monda M, Fueta Y, Ishidao T, Hori H, Aou S. Positive and negative effects of environmental chemicals on brain functions in rodents. BrainIT IV 2010 in press
4. ©Masuda A, Narikiyo, K, Shiota, N, Aou S. Acquisition and extinction of avoidance response by social interaction in rat. Brain-Inspired IT. Springer 2010 in press
5. Inoue T, Lukats B, Fujimoto T, Moritake K, Karadi Z, Aou S. Category recognition in the monkey orbitofrontal cortex. Brain-Inspired IT. Springer 2010 in press
6. Sonoo S, Aou S, Horio K, Tamukoh H, Koga T, Shimo N, Yamakawa T, Emotional behavior and expression based on a neural network model of amygdala, Brain-Inspired IT. Springer 2010 in press
7. 粟生修司 (2009) 環境ホルモンと脳の性差. Clinical Neuroscience 27, 1128-1129

2. 学会発表

1. Oomura Y, Aou S, Fukunaga K, Sasaki K (2009) Orexin impairs spatial learning and memory. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto Jul27-Aug 1
2. Masuda A, Aou S (2009) Social learning for avoiding behavior in rats. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto Jul27-Aug 1
3. Aou S, Monda M, Kanemaru A, Fujimoto T, Kubo K (2009) Chemical

impacts on neurobehavioral developments: time-, sex- and species dependency. . The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto Jul27-Aug 1

4. Fujimoto T, Kubo K, Aou S, Nishikawa Y (2009) Low dose bisphenol A: a potential factor of psychological illness. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto Jul27-Aug 1
5. Aou S, Kanemaru A, Monda M, Narikiyo K, Fujimoto T (2009) Species-, Sex- and time-dependent neurobehavioral effects of bisphenol A. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sept 16-18
6. Masuda A, Aou S (2009) Behavioral effect of excitotoxic lesion of medial frontal cortex on social transmission of avoidance in rats. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sept 16-18
7. Narikiyo K, Shiota N, Aou S (2009) Dopaminergic activities of the nucleus accumbens in limited-access-induced fat overeating in rats. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sept 16-18
8. 金丸愛、門田誠、増田明、成清公弥、
笛田由紀子、石田尾徹、保利一、粟
生修司 (2009) 1-ブロモプロパンの
胎生期曝露はラットの集団時の行動
を修飾する 環境ホルモン学会

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他 (データベース等)

なし