

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

**「化学物質の臨界期曝露による生殖内分泌機能の遅発影響に
視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的变化が果たす役割と閾値
に関する研究」**

**分担研究課題：新生仔マウスへの Ethynylestradiol 投与が及ぼす発育期と性成熟後
（遅発性）の影響**

- 新生仔期化学物質曝露が脳の GABA 関連物質の性差に及ぼす遅発型影響-

研究分担者： 横須賀誠 日本獣医生命科学大学

研究要旨

[目的] 化学物質の新生児期曝露が脳に及ぼす遅発型（遅発型）リスクとその客観的評価基準の確立を目的に、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの Ethynylestradiol（以下 EE）皮下投与モデルを用いて、性成熟後の脳の性差および行動学的性差に及ぼす影響の評価を行っている。これまで、成熟個体の海馬歯状回における神経細胞や支持細胞の成体細胞新生の頻度に影響は確認出来ないこと、内側視束前野（POA）における Calbindin D-28k（以下 CB）陽性細胞の分布パターンに認められる雌雄差が不鮮明化する、などの新所見を得ることに成功している。今年度は、CB 雌雄差変異に及ぼす神経解剖学的基盤の検討に加え、脳の性分化の臨界期および性成熟期までの雌雄発育への EE 投与の影響、雄マウスが成熟雌マウスに対して示す高周波数帯発声（以下 USV）への影響評価を加えて、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの高濃度 EE 単回投与が及ぼす脳の性分化へのリスク評価指標の確立を試みた。さらに、生殖機能制御の中心システムである GnRH の活動コントローラーとされるキスペプチンニューロンへの影響を検討するため、近年キスペプチン分泌の重要な制御システムであることが示されている GABA-B 受容体への遅発型影響の検討も試みた。

[方法] 生後 24 時間以内の雌雄マウス（C57BL/6J）に 20 μ g/kg（中濃度）および 2,000 μ g/kg（高濃度）の EE、対象群として EE の溶媒として使用したゴマ油を投与し、一般飼育環境下（室温 22 から 25 、湿度 40%から 60%）で飼育管理した。性成熟に達するまで、雌雄の体重の変化、雌については膣開口時期も観察した。生後 8 週齢以上に達した個体は、超音波の記録解析装置によって USV 発声の記録解析を行った。行動学的解析を終了した個体（生後 75-90 日）は、（1）免疫組織化学染色による解析を行うために経心臓法にて灌流固定を施して固定脳標本とした。内側視束前野（POA）を含む脳切片標本（厚さ 40 μ m の連続した冠状断切片）に対して Anti-Calbindin D-28k（CB）、GABA-B 受容体への特異的一次抗体を用いた免疫組織化学染色を施して POA における CB 陽性細胞および GABA-B 受容体タンパク質の分布パターンを評価した。また、（2）RT-PCR による CB および GABA-B 受容体の視床下

部における発現量を定量して比較するために、成熟マウスを断頭によって安楽死させて、PCR 解析用脳標本の採取を行った。

【結果】 生後 24 時間以内マウスへの EE 単回暴露は発育途上においても次のような影響を及ぼすことが明らかとなった。1) 対照群と比べて雌マウスの膣開口時期を早めた。それは投与濃度が高いほど早期になった。2) 生後 2 週間から 3 週間の間でのみ、EE 投与において一時的な体重増加の停滞時期があることが明らかとなった。しかし、この体重増加の停滞は離乳期前後には解消され、成熟期における EE 投与の影響は認められなかった。すなわち、生後 24 時間以内マウスへの EE 単回暴露が及ぼす体重変化への影響は授乳期における一過性の現象であることが示された。3) 発情雌認知に対する USV 発声は、雄では対照群では 90%以上の確立で雌への USV 発生が認められるのに対し、EE 高濃度 (2,000 μ g) 群および中濃度群 (20 μ g) では USV 発声が認められない個体が多数認められた。一方の雌においては、対照群および EE 中濃度群では 10%以下の確率でしか USV 発声が認められないのに対し、EE 高濃度群では 50% の確率で USV 発声が認められた。4) POA における CB 陽性細胞の分布パターンを詳細に観察したところ、EE 投与により認められる雌の CB 陽性細胞数の増加は POA における CB 陽性細胞数の増加を反映したものであり、脳の構造的 (組織的) な雌雄差の発現を誘導した結果では無いことがほぼ明らかとなった。5) 免疫組織化学染色および RT-PCR による GABA-B 受容体タンパク質および遺伝子の発現数への影響については、本報告書作成までに有意な解析を終えることが出来なかった。

【考察】 本年度におけるマウス新生仔期 (脳の性分化の臨界期) における高濃度 EE の単回暴露によるリスクは次のような評価となった。(1)雌の膣開口時期を早める。(2)雌雄に関係なく授乳期における一時的な発育遅延を誘導する。晩発性のリスク評価として、(3)雄の USV 発声を抑制する一方、雌の USV 発声を促進している。(4)POA における CB 陽性細胞の雌雄差への影響は、脳の形態学的な変化を誘導した結果ではなく、成熟脳における CB を発現する細胞の増減を晩発性に変えた結果であることがほぼ判明した。(5)キスペプチンの動態に関与する GABA-B への影響についての評価は 26 年度に持ち越しである。

EE の新生仔期暴露は、全体的には一時的な発育遅延を及ぼしながらも、生殖器に関してはむしろ発育促進に作用していることが示唆される。このことが、脳の機能的な雌雄差に影響を及ぼし、成熟後の雌雄コミュニケーションにも影響を誘導していることが明らかとなった。脳の生殖機能の発達には発育期の GABA が関与している報告がある。新生仔期の EE が一時的発育遅延と GABA システムへの影響を介して、脳の性分化やキスペプチンシステムの性差にリスクを及ぼしている可能性を確認する必要がある。

A . 研究目的

本研究は、経口避妊薬として現在も使用されている Ethynylestradiol (EE) の性

機能調節機構の成立に及ぼす晩発型(遅発型)リスクの評価基準を確立することを目的としている。ヒトにおいて遺伝的に低ゴ

ナドトロピン性性腺低形成症を示す患者で、Kisspeptin の受容体である GPR54 遺伝子の変異が認められ、これまで脳の性機能調節機構の頂点とされてきた性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) をさらに分泌制御する物質として Kisspeptin の存在が注目されている。これまで視床下部の GnRH ニューロンの神経制御には GABA による調節が重要と考えられてきたが、Kisspeptin の産生ならびに分泌制御にも GABA 系の作用が重要であることが報告されてきている。GABA は成体の中枢神経系における抑制性神経伝達物質で、GABA 受容体にはイオンチャネル型の GABA-A 受容体と代謝型の GABA-B 受容体がある。これまで GnRH ニューロンの制御には GABA-A 受容体を介した作用が重要であるとされてきた。しかし最近、GABA-B1 型受容体のノックアウトマウスにおいて内側視索前野 (MPOA) と分界状床核 (BST) における Kisspeptin をコードする *Kiss1* 遺伝子の発現に異常が誘導されることを示す報告が出された (Di Giorgio et al., 2014)。このことは、脳の性分化決定の臨界期における化学物質曝露が及ぼす晩発性リスクを正しく評価するためには、GABA-A 受容体ばかりでなく GABA-B1 受容体への影響も評価する必要性があることを示している。

これまで我々は、生後 24 時間以内の新生仔マウスへの単回高濃度 EE 投与 (2000 μ g/kg、皮下投与) モデルにおいて内側視索前野 (MPOA) に認められるカルピンジン (CB) 陽性細胞分布の性的二型に明らかかな影響が及ぶことを報告してきた。免疫組織化学による CB 陽性細胞の解析は、

GABA ニューロンのマーカーとしても利用されている。したがって、我々がこれまで明らかにしてきた脳の性分化決定の臨界期における高濃度 EE 曝露が及ぼす MPOA における CB 陽性細胞への影響は、GABA 神経系への影響を含んでいる可能性が高くなってきている。

そこで今年度は、生後 24 時間以内の新生仔マウスへの単回 EE 投与モデルを引き続き用いて、(1)MPOA における CB 免疫陽性細胞の性差へ影響の実体を組織学的に確定して、(2)RT-PCR 解析によってこの CB の性差への影響を遺伝子レベルでの確認を行い、さらに(3)MPOA と BST を含む視床下部領域における GABA-B 受容体遺伝子の発現への影響を RT-PCR で解析することを試みた。

B . 研究方法

生後 24 時間以内の新生仔雌雄マウス (C57BL/6J:日本クレアより妊娠動物を購入して日本獣医生命科学大学の実験動物施設にて出生) にゴマ油 (関東科学 NO.37036-02) に溶かした EE (0.02 μ g/kg、20 μ g/kg および 2,000 μ g/kg。全て投与量が 10 μ l/g BW になるように調整) を 10 μ l マイクロシリンジ (HAMILTON) を用いて皮下投与した。対象群として溶媒に用いたゴマ油 10 μ l/g BW を投与した。免疫組織化学による組織学的解析は、雌雄ゴマ油投与群 (対照群) 雌雄 20 μ g/kg 投与群 (EE20 群) 雌雄 2,000 μ g/kg 投与群 (EE2K 群) の計 6 群間で比較した。一方、RT-PCR による CB および GABA-B 受容体 mRNA の解析には、さらに雌雄 0.2 μ g/kg 投与群 (EE0.2 群) を加えた計 8 群間で比較した。

全ての動物は一般の飼育環境下で飼育、生後 21 日目に離乳させ、その後は雌雄別ケージで飼育した。1 ケージの匹数は 4 ~ 5 匹とした。全ての動物は、出生当日 (1 日齢 : PD1)、PD4、PD 7 に体重測定を行い、以降は 7 日間隔で 9 週齢 (PD63) まで測定した。加えて雌は PD10 から外部生殖器を観察し、同一ケージの全ての雌動物が膣開口する日まで連日観察した。

PD63-PD70 の間に、(1) 免疫組織化学用として、0.1M リン酸緩衝液 (pH.7.2) で調整した 4 %パラフォルムアルデヒドを用いて経心臓法で灌流固定し脳標本を得た。また、(2) RT-PCR 用として、断頭による安楽死で脳を摘出し、視床下部領域のみを測定サンプルとして分離して、RNA later (Quiagen) に浸漬して、mRNA 抽出処理まで -80 °C で保存した。

免疫組織化学 : 脳標本は、内側視索前野 (MPOA) を含む領域 (The mouse brain, 3rd edition, Academic Press; Figure 26-38) について、凍結ミクロトーム (Yamato) を用いて厚さ 40 μ m の連続前頭断切片を作成した。各個体とも作製した連続切片に対して 1 枚置きに Anti-Calbindin D-28k (Rabbit; Swant CB-28a, 2,000 倍希釈) による免疫組織化学染色 (二次抗体として Alexa 488; Molecular Probs-invirogen を使用) と 0.5% クレシル紫 (MERCK 1.0693.0100) によるニッスル染色を施した。標本の観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM810) および光学顕微鏡 (Zeiss Axiovision) にて行った (図 3 参照)。

RT-PCR : 脳標本からの RNA 抽出には、RNA 抽出キット RNeasy Lipid Tissue Mini Kit

(QIAGEN) を用いた。滅菌破碎用チューブ (ザルスタット) に脳標本と 1mL の QIAzol Lysis Reagent を入れてホモジェナイズした。その後は Mini Kit のプロトコールに則り RNA 抽出を行った。ゲノム DNA 除去と逆転写反応は QuantiTect Reverse Transcription (QIAGEN) を用いて行った。解析は mouse の Calbindin (CB)、mouse の GABA-B receptor1 および GABA-B receptor2 の 3 遺伝子について行った。定量用の内部標準遺伝子としては mouse の β -actin 遺伝子を用いた。QuantiTect Primer Assay (QIAGEN) を用いて、CB (Mm. Calb1.1 SG Cat.No. QT000159943)、GABA-B-R1 (Mm Gabbr1_va_2_SG Cat. No. QT. 01544109)、GABA-B-R2 (Mm Gabbr2_2_SG Cat. No. QT. 01945912)、 β -actin (Mm Actb_ 2_ SG Cat. No. QT01136772) をプライマーとした。PCR 試薬は QuanticTec SYBR GreenPCR Kits (QIAGEN) を用いた。解析は ABI7500 (サーマフィッシャー サイエントフィック社) で行った。内部標準遺伝子 (β -actin) を含む 4 遺伝子を測定してデータ解析を行った。測定は 1 サンプルにつき 3 反復で行った。サイクル数は 45 で行った。

倫理面への配慮 : 使用動物への EE 投与、体重測定、膣開口確認、安楽死作業に関しては最低限の保定時間になるように心がけた。灌流固定を施す際には、ソムノペンチール (50mg/kg BW) の腹腔内投与による深麻酔を施して痛覚が無くなったことを確認した後に行った。本実験は「日本獣医生命科学大学実験動物委員会」の審査の承認を受けて実施された (承認番号 12-94)

C . 研究結果

1) EE 投与による成長への影響

雌雄とも、体重増加を指標とした出生当日 EE 投与による発育への顕著な影響は認められなかった

2) 雌の膣開口への影響

出生当日 EE 投与は、明瞭に膣開口の時期を早める効果が認められた。しかも、その影響には濃度依存性が認められた。特に EE2000 群で顕著に認められ、早い個体では PD18 日で膣開口が観察され、離乳時にはすでに半数の雌が膣開口状態にあった (図 1)。

3) 内側視束前野 (MPOA) における Calbindon 免疫陽性細胞の分布の雌雄差への影響

マウスの MPOA における Calbindon D-28k (以下 CB) 免疫陽性細胞の分布は、雄では MPOA の中心領域に CB 免疫陽性細胞の大きな塊が観察される一方、雌の同領域ではこのような CB 陽性細胞の集合は観察できないという雌雄差が認められる。これを基本形として、新生仔期 EE 投与による成熟後の雌雄マウス MPOA における CB 免疫陽性細胞の分布パターンの変化を調べた。なお、今回、この CB 陽性細胞の塊はすべて神経細胞によって構成されていることが判明した (図 2)。

出生当日における EE 単回皮下投与によって、雄では MPOA における CB 陽性細胞の大きな塊ピークが EE 投与の濃度依存的に後方にシフトすることが判明した。一方、雌では EE 投与によって本来は CB 陽性細胞

の塊が観察されない MPOA の後方に“雄型”の CB 陽性細胞の塊が新たに発現することが判明した (図 4 から図 7)

4) 成熟後の視床下部領域の CB および GABA-B 受容体遺伝子発現量への影響

出生当日マウスへの EE 単回暴露は、特に雌の CB 遺伝子の発現量に影響を与えることが明らかとなった。0. 2 μ g/kg、20 μ g/kg、2, 000 μ g/kg の投与群で比較したところ、特に雌において濃度依存的に CB の mRNA の発現量が増加することが明らかとなった。しかし、雄ではこのような上昇は認められず、統計学的には有意な変化は認められなかったが、むしろ濃度依存的に低下する印象を与える結果であった (図 8)。

GABA-B 受容体に関しては、1 型ならびに 2 型において、EE による遅発型の影響は、雌雄共に認められなかった。

E . 結論

これまでに我々は、新生仔マウス EE 曝露は極めて短い時間で脳内への移動と濃度上昇を誘導し、この短時間の脳内 EE 曝露は成熟後の脳において海馬の神経新生に影響は及ぼさない一方、MPOA における CB 含有細胞の分布には明らかな影響を及ぼすことを示してきた。しかし、この MPOA における CB 細胞分布の変化が性機能調節神経系への EE の影響とどのような関係を持っているのかについては直接的な考察をすることが出来なかった。

近年、GnRH ニューロンの神経制御のみならず、GnRH ニューロン分泌制御に関わる Kisspeptin の産生ならびに分泌制御にも GABA の作用が重要であることが報告さ

れている。GABA 受容体にはイオンチャネル型の GABA-A 受容体と代謝型の GABA-B 受容体が存在しているが、これまでは GABA-A 受容体を介した作用にのみ注目が集まっていた。しかし、Di Giorgio らは 2014 年の論文で、GABA-B1 型受容体ノックアウトマウスの MPOA と分界状床核 (BST) で Kisspeptin をコードする *Kiss1* 遺伝子の発現に異常が誘導されることを報告した。すなわち、発育期に GABA-B 受容体に異常があると GnRH の調節に関わる Kisspeptin の発生に異常を生じることが判明したわけである。本研究の結果は、新生仔期における EE 曝露は GABA-B 受容体の発生には直接影響は及ぼさないものの、CB

などの GABA に関連した抑制性の神経回路に晩発性の影響を及ぼすことで、GABA 受容体を介した Kisspeptin 制御機構に何らかの変異を誘導し、これが生涯に渡る GnRH の分泌異常を誘導し、最終的に性機能異常を誘導するリスクが存在することを示している。

F . 研究発表

新生仔マウスの内分泌攪乱物質投与がおよぼすカルシウム結合蛋白質含有細胞の性的 2 型への影響、第 157 回日本獣医学会学術集会 講演要旨集、 P331 2014

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

膾開口が認められた日齢(雌のみ)

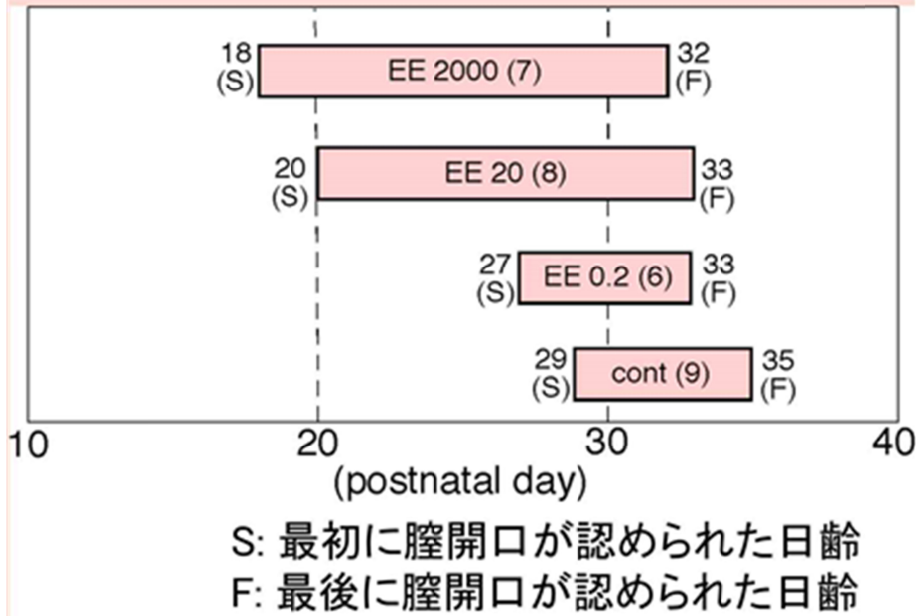


図1：出生当日新生仔マウスへのEE単回投与が及ぼす膾開口への影響。

対照群 (cont) では離乳後のPD29以降から膾開口が認められるのに対して、EE投与によって濃度依存的に膾開口を早期に示す個体が多く認められるようになる。

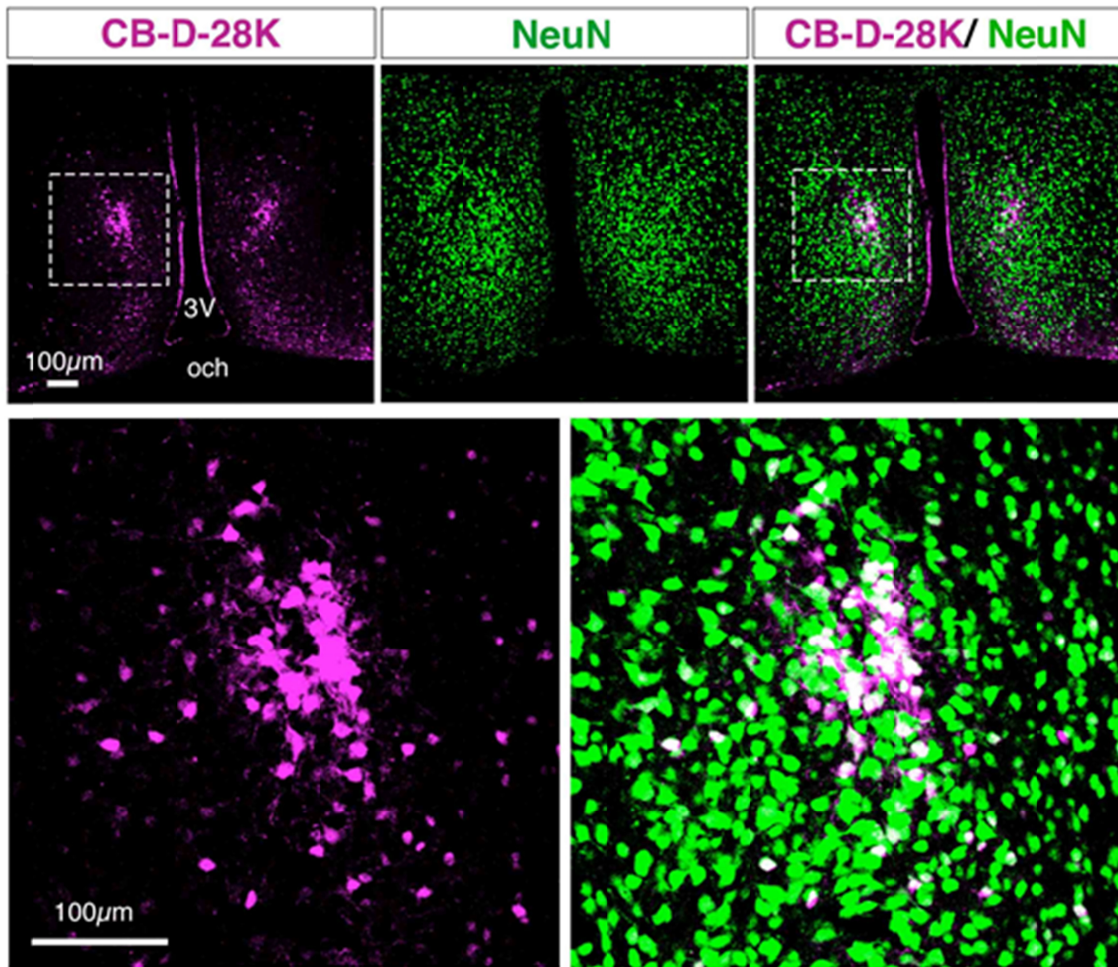


図2：内側視索前野に認められる calbindin 免疫陽性細胞は全て神経細胞である。

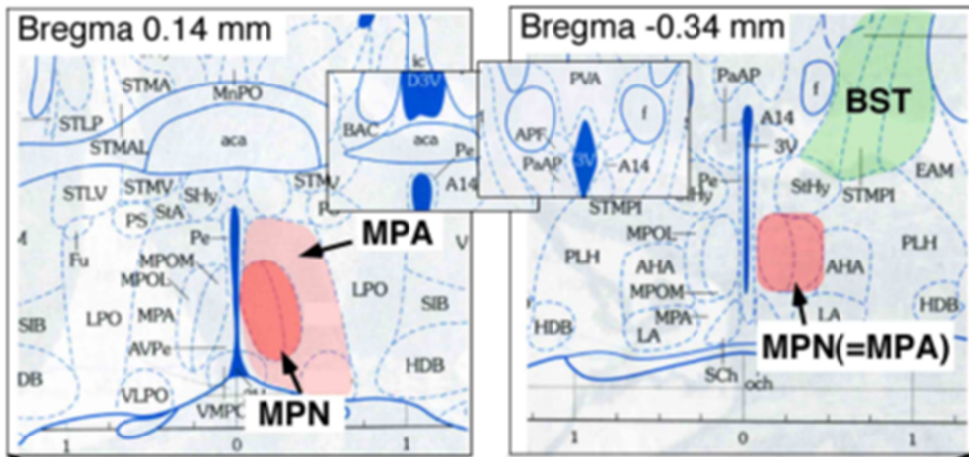
正常（対照群）雄の内側視索前野（MPOA）をもちいて、calbindin（CB）とニューロン・マーカーである NeuN に対する抗体を用いて二重免疫組織化学を行ったところ、calbindin 免疫陽性反応を持つ細胞（紫色、CB-D-28K）の全てが NeuN 免疫陽性反応（緑色、NeuN）を示した。これらのことから、MPOA に認められる CB 細胞は神経細胞であることが判明した。



Figure 30



Figure 34



Brain Section

10 section = app. 400 μ m



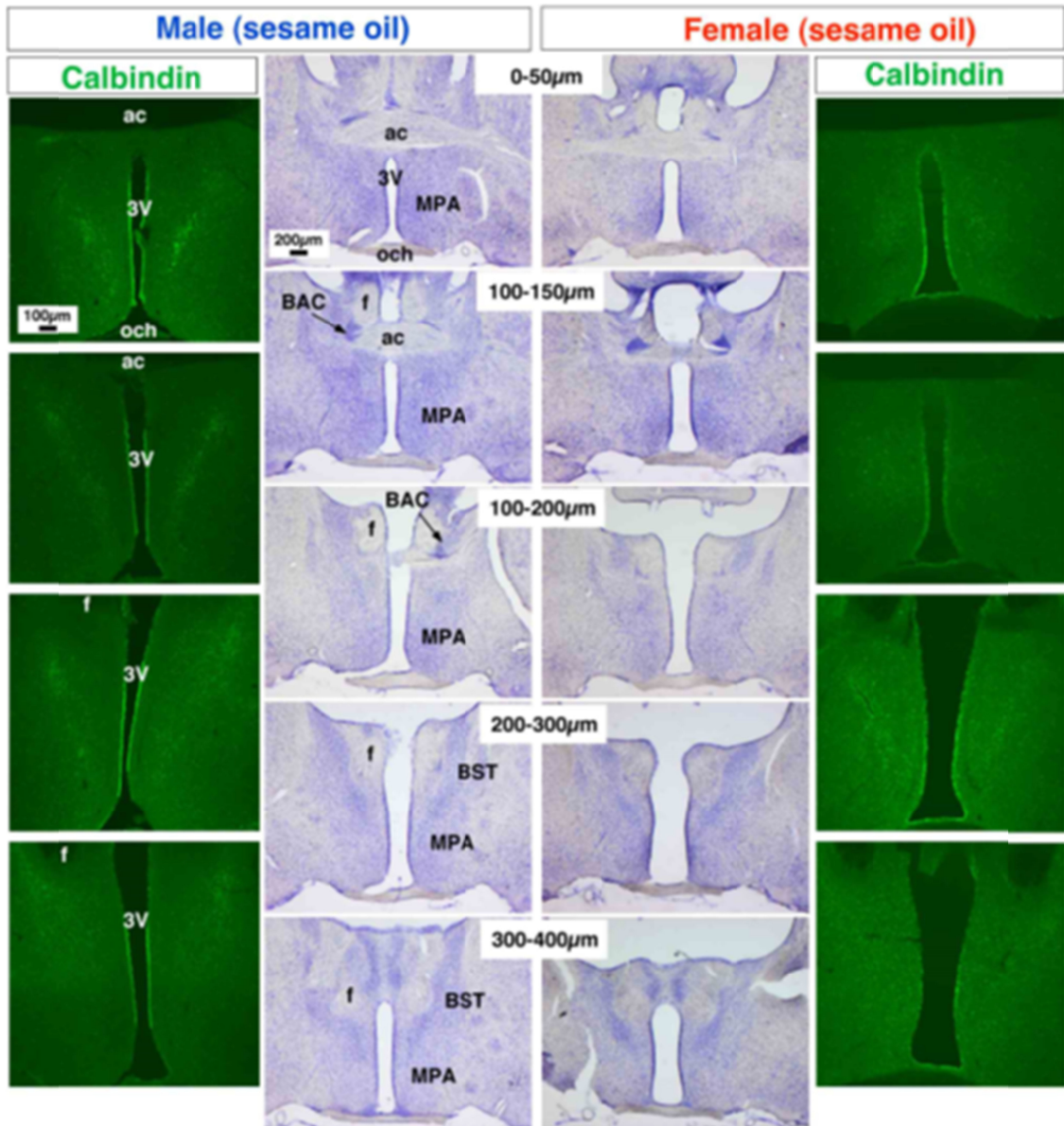


図 4: 対照群の内側視索前野における Calbindin 免疫陽性細胞の分布とニッスル染色による脳構造。

図 3 に基づいて、内側視索前野（図では MPA）を中心に含む連続切片を示してある。雄では MPA 前方に CB 免疫陽性細胞の大きな塊が観察される。緑の切片シリーズは Alexa 488 を二次抗体に使用した CB 陽性反応。中心はニッスル染色による MPA の組織構造。

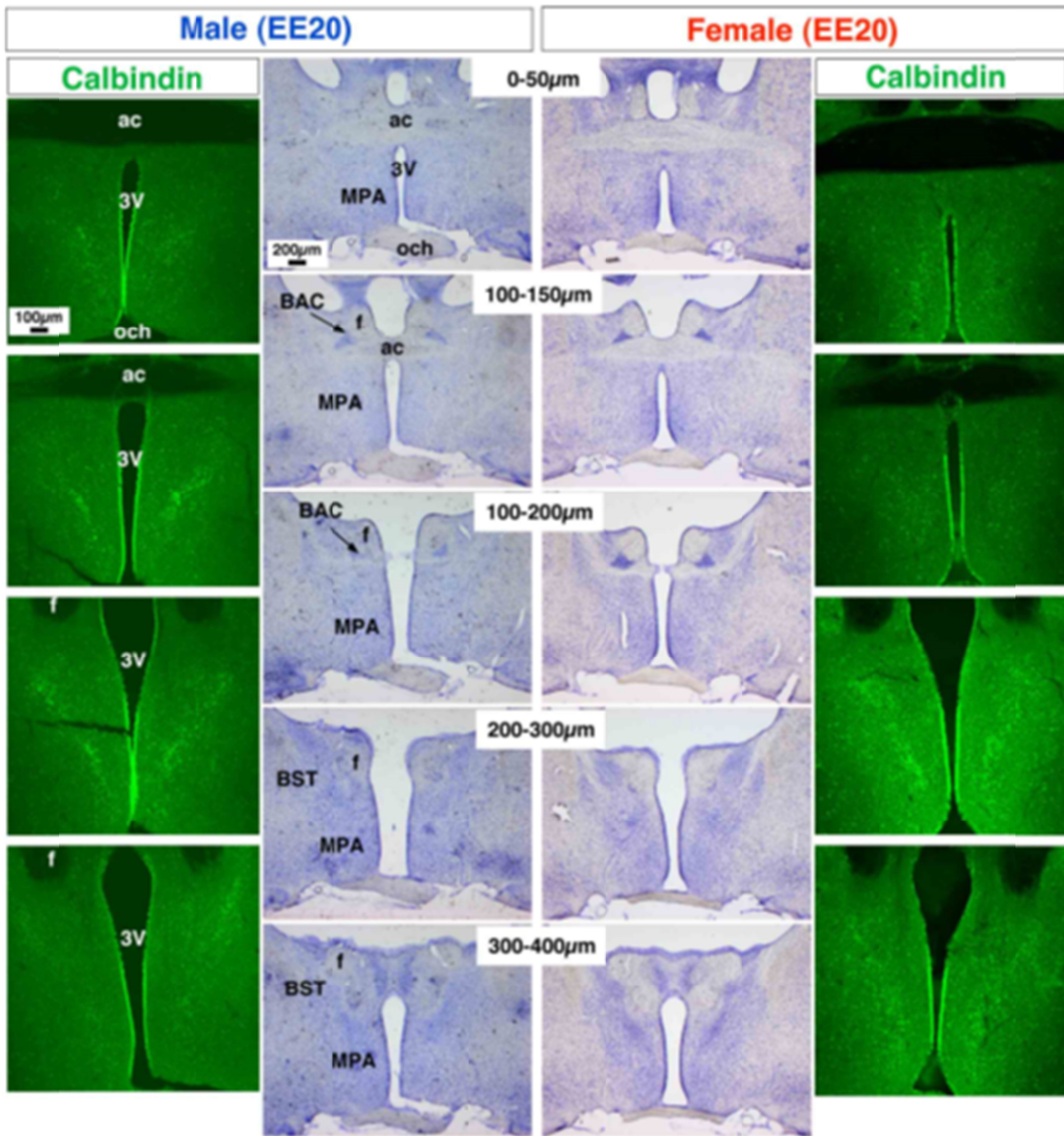


図5：新生仔期 EE20 μ g/kg 投与動物の内側視索前野における Calbindin 免疫陽性細胞の分布とニッスル染色による脳構造。

図3に基づいて、内側視索前野（図では MPA）を中心に含む連続切片を示してある。EE20 μ g/kg 投与によって、雄では MPA 前方からやや後方に CB 免疫陽性細胞の大きな塊の分布行きがシフトしていることが観察される。一方雌では、本来は存在しない MPA の後方に CB 免疫陽性細胞の大きな塊が新たに出現していることが観察される。緑の切片シリーズは Alexa 488 を二次抗体に使用した CB 陽性反応。中心はニッスル染色による MPA の組織構造。

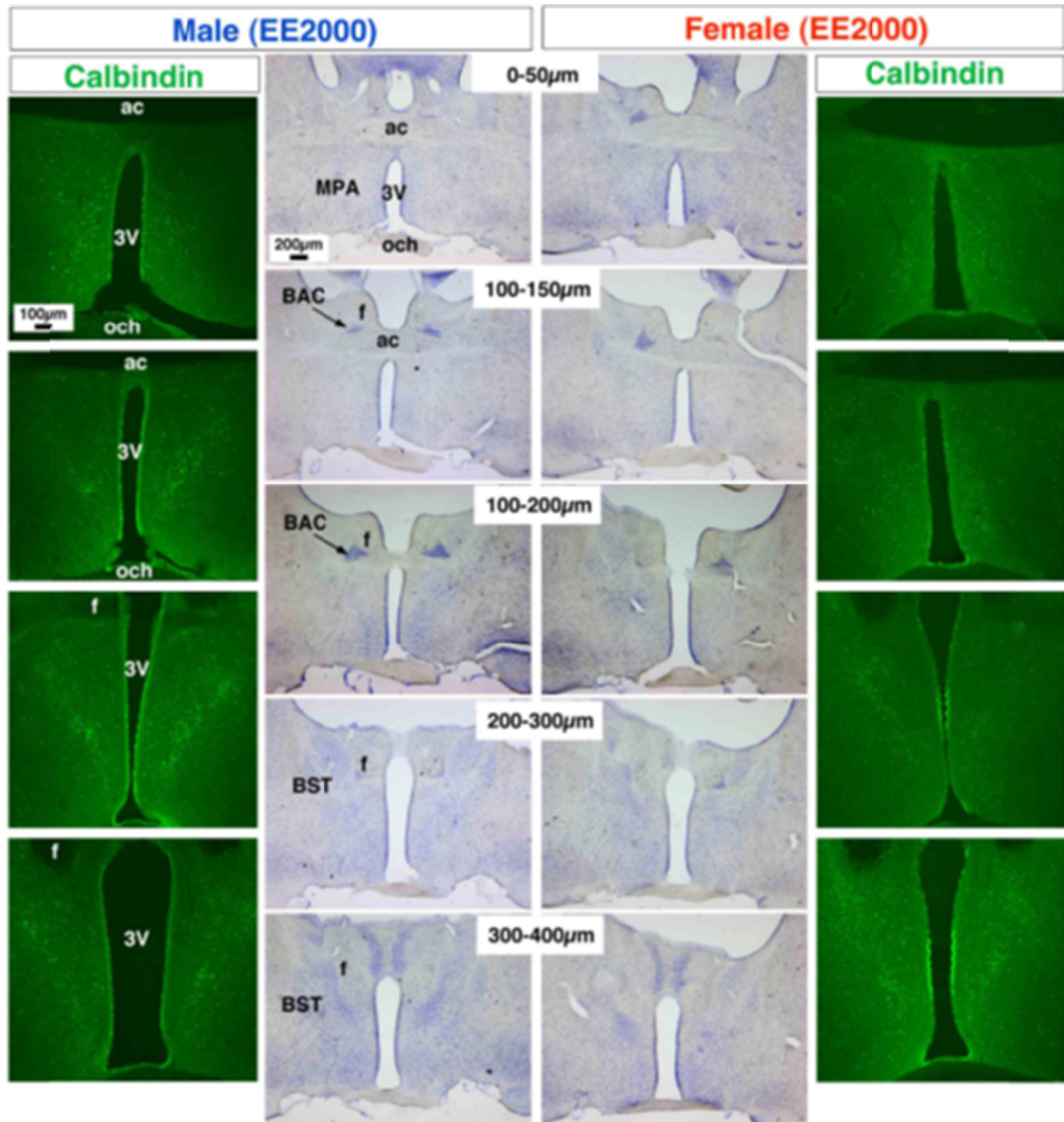


図6：新生仔期 EE2000μg/kg 投与動物の内側視索前野における Calbindin 免疫陽性細胞の分布とニッスル染色による脳構造。

図3に基づいて、内側視索前野（図ではMPA）を中心に含む連続切片を示してある。EE2000μg/kg 投与によって、EE20μg/kg 投与と同様に、雄ではMPA前方からやや後方にCB免疫陽性細胞の大きな塊の分布域がシフトし、雌では本来存在しないMPAの後方にCB免疫陽性細胞の大きな塊が新たに出現していることが観察される。緑の切片シリーズはAlexa 488を二次抗体に使用したCB陽性反応。中心はニッスル染色によるMPAの組織構造。

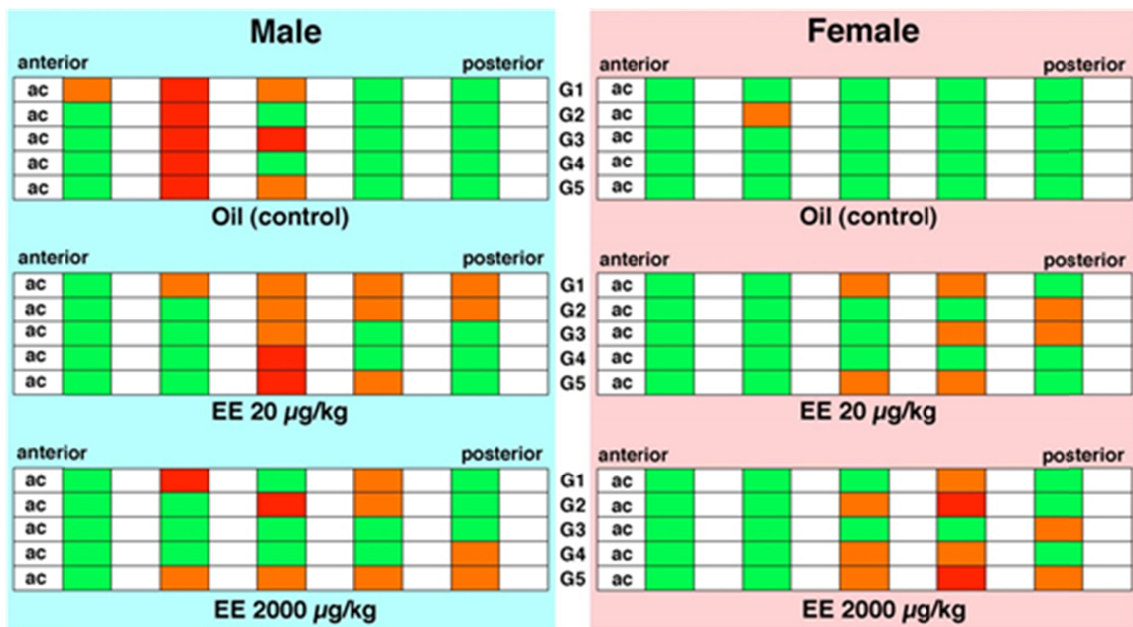


図7：生後24時間 EE 単回投与がもたらす内側視察前野の calbindin 免疫陽性細胞塊ピークの後方シフトの解析結果

EE 投与により、雄では CB 陽性細胞の塊のピークが濃度依存性に弱まることがわかる。一方の雌では、不明確であった CB の塊が MPOA の後方に出現することがわかる。赤色は CB 陽性細胞の塊のピークを含む切片、橙色は CB 陽性細胞の塊を含む切片を示す。

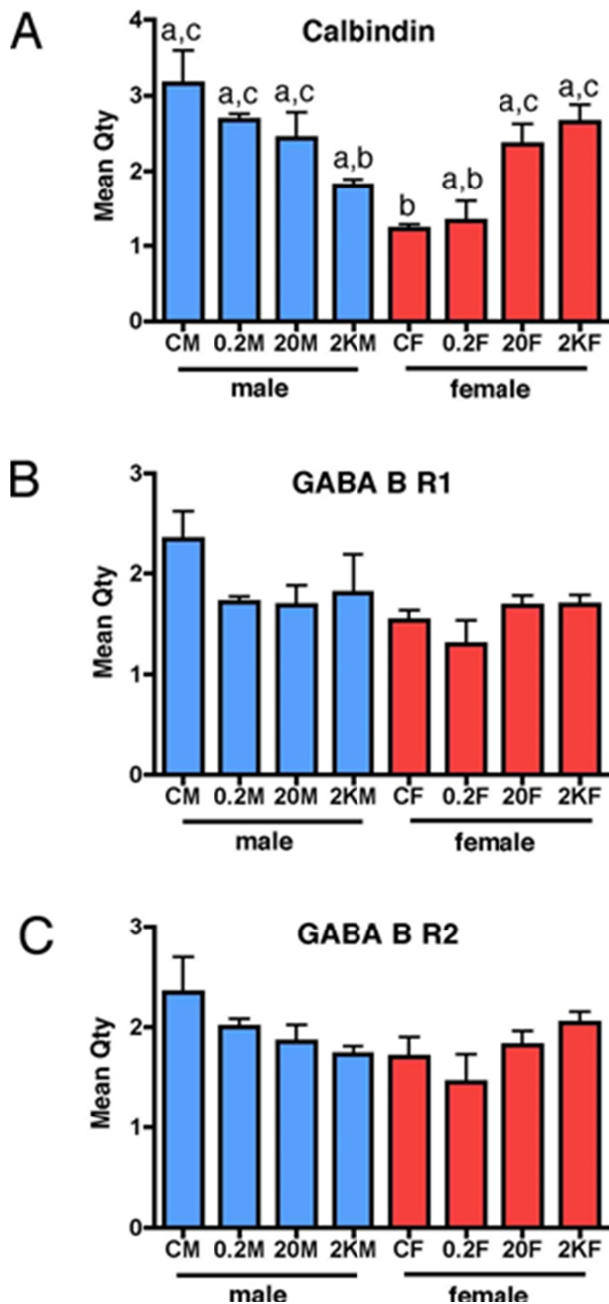


図 8 : 生後 24 時間 EE 単回投与がもたらす性成熟後の視床下部領域における calbindin、GABA-B 受容体 1 型、GABA-B 受容体 2 型の遺伝子の発現量への影響。

Calbindin は雌において EE の投与濃度依存性に遺伝子の発現量の増加が認められる。一方の雄ではそのような変化は認められない (A)。GABA-B 受容体の遺伝子は、1 型および 2 型とも、雌雄差や投与 EE 濃度による影響は認められなかった (B , C)。A において異なるアルファベットが示す群間は有意差があることを示す。

