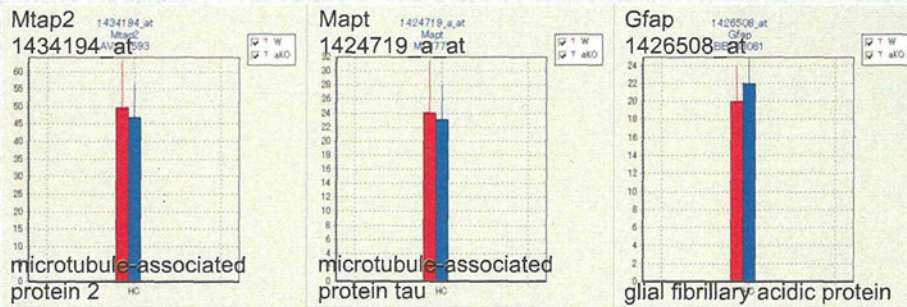


海馬

野生型とER α 欠失マウスとの比較

各細胞の分化マーカー遺伝子の発現：
ニューロン(Mtap2、Mapt)、アストロサイト(Gfap)、
オリゴデンドロサイト(Mag、Mbp)、神経幹細胞(Nes)

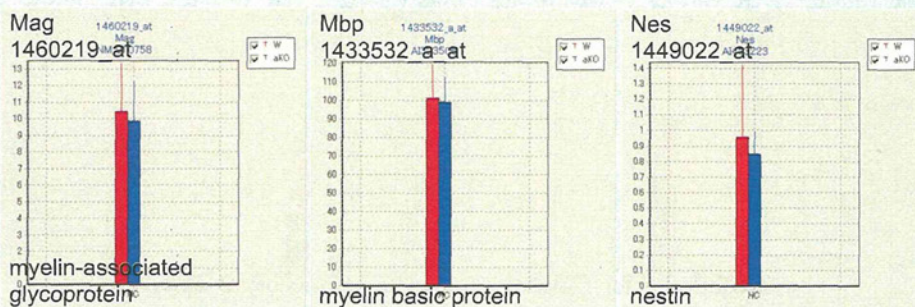


31

海馬

野生型とER α 欠失マウスとの比較

各細胞の分化マーカー遺伝子の発現：
ニューロン(Mtap2、Mapt)、アストロサイト(Gfap)、
オリゴデンドロサイト(Mag、Mbp)、神経幹細胞(Nes)



- ・各分化マーカー：有意差なし
- ・各細胞の増殖・分化程度は、野生型とER α 欠失マウスとで同程度である事が示唆された

海馬

野生型とER α 欠失マウスとの比較

ER α 欠失マウスにおいて、野生型マウスと比較し発現が有意に、

増加: 8 ps

減少: 13 ps

→ Pubmed検索

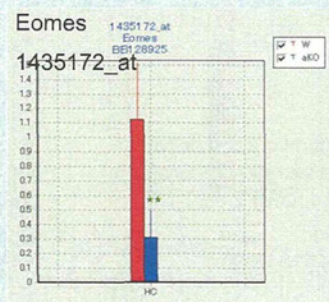
→ 野生型マウスとER α 欠失マウスとの間に違いが認められる
シグナルネットワークは、現時点では認められない

細胞一個あたりの発現コピー数条件: 0.7コピー以上

33

海馬

Eomes遺伝子: ER α 欠失マウスにおいて、発現が有意に減少



赤: 野生型
青: ER α 欠失マウス

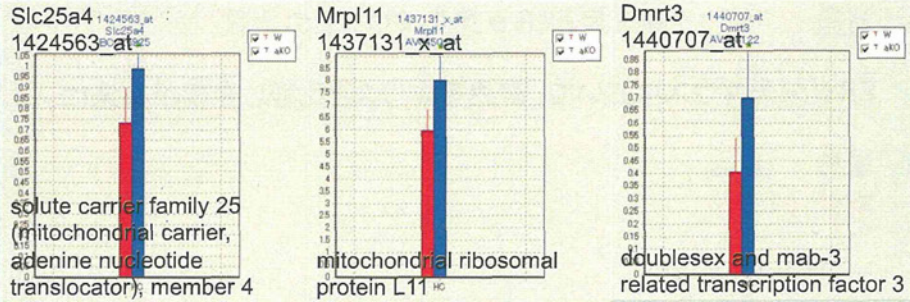
- ・SVZでのニューロン新生の主要制御因子
- ・脳での欠失マウスにおいて、海馬での脳室下領域 (subventricular zone; SVZ) における前駆細胞が減少

→ Eomes遺伝子の発現減少により、SVZでのニューロン新生が抑制される可能性
→ 他の関連遺伝子の発現変動が認められないため、この可能性は低い

17

海馬において、発現が有意に増加する遺伝子(例)

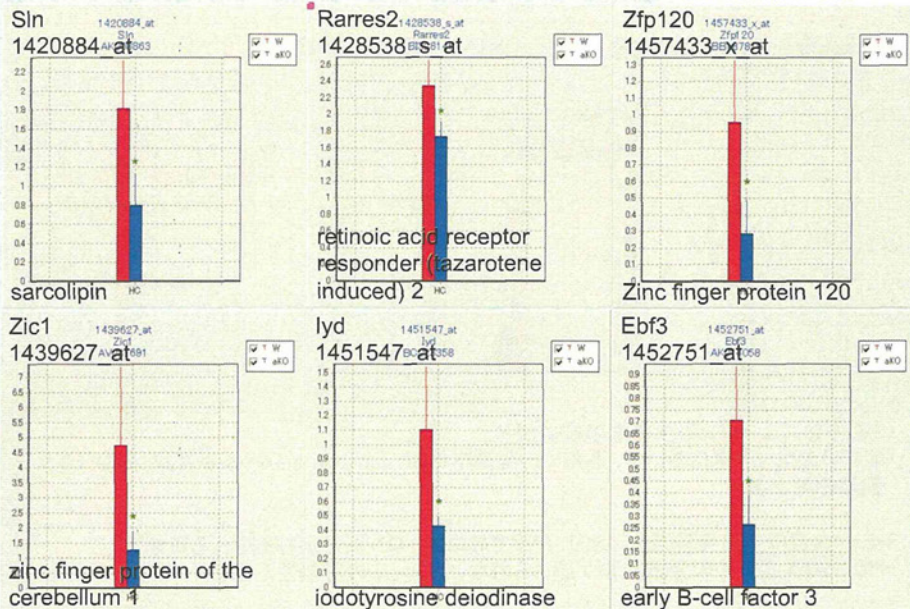
シグナルネットワークは見いだせなかった



35

海馬において、発現が有意に減少する遺伝子(例)

シグナルネットワークは見いだせなかった



海馬

野生型とER α 欠失マウスとの比較

ER α 欠失マウスにおいて、野生型マウスと比較し発現が有意に、

増加: 8 ps

減少: 13 ps

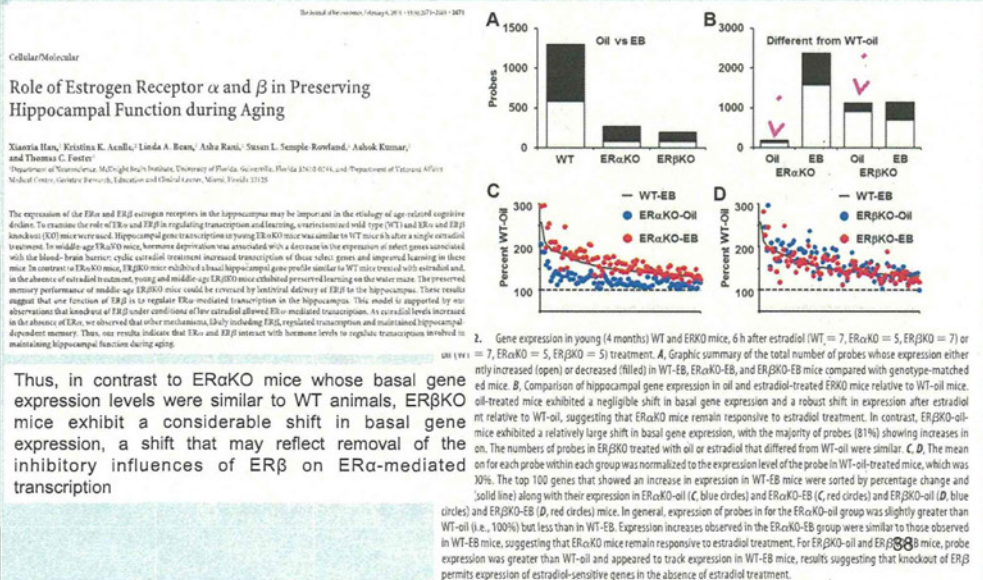
→ Pubmed検索

→ 野生型マウスとER α 欠失マウスとの間に違いが認められる
シグナルネットワークは、現時点では認められない

細胞一個あたりの発現コピー数条件: 0.7コピー以上

37

海馬の遺伝子発現は、野生型とER α 欠失マウス間に大差はないという報告 → ER β 欠失マウスでは大きな差



野生型とER α 欠失マウスとの比較

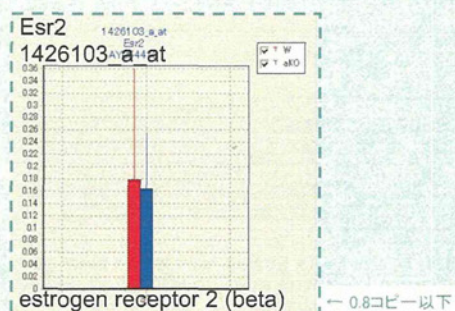
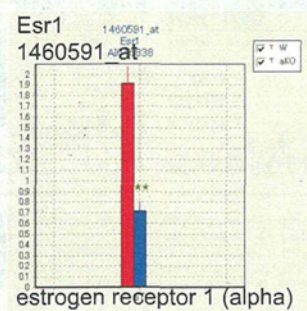
脳幹

39

脳幹

野生型とER α 欠失マウスとの比較

ER α とER β 遺伝子の発現



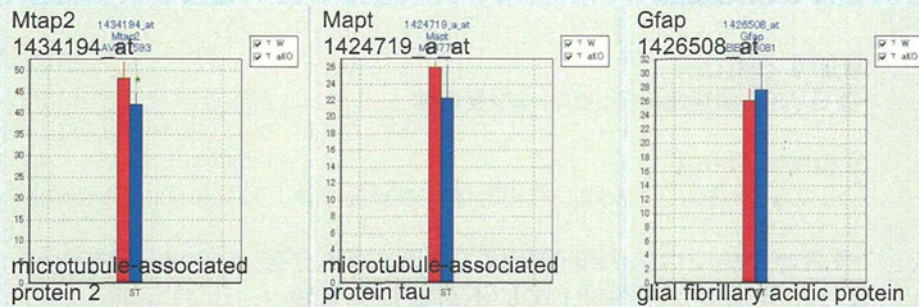
ER α の発現は有意に減少(半減以上)

40

脳幹

野生型とER α 欠失マウスとの比較

各細胞の分化マーカー遺伝子の発現：
ニューロン(Mtap2、Mapt)、アストロサイト(Gfap)、
オリゴデンドロサイト(Mag、Mbp)、神経幹細胞(Nes)

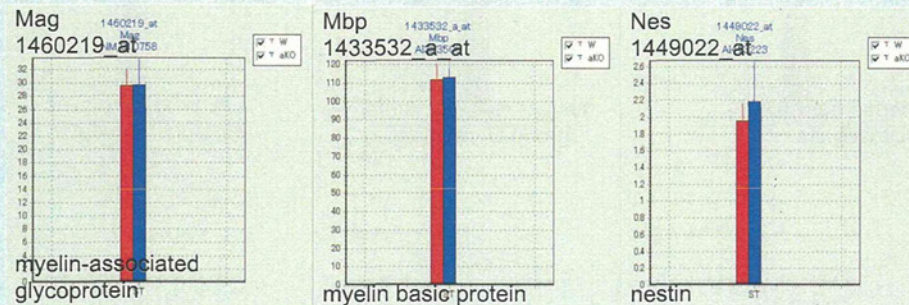


41

脳幹

野生型とER α 欠失マウスとの比較

各細胞の分化マーカー遺伝子の発現：
ニューロン(Mtap2、Mapt)、アストロサイト(Gfap)、
オリゴデンドロサイト(Mag、Mbp)、神経幹細胞(Nes)



- ・各分化マーカー： Mtap2の有意な発現減少、Maptでは有意差なし
- ・各細胞の増殖・分化程度は、野生型とER α 欠失マウスとで同程度である事が示唆された

脳幹

野生型とER α 欠失マウスとの比較

ER α 欠失マウスにおいて、野生型マウスと比較し発現が有意に、

増加: 483 ps

減少: 684 ps

→ Pubmed検索

増加する遺伝子:

・概日リズム関連遺伝子、セロトニン受容体

減少する遺伝子:

・カリウムチャネル、グルタミン酸受容体、GABA受容体、及びアンドロゲン受容体

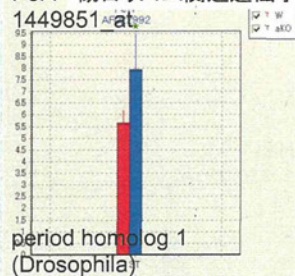
→ER α 欠失マウスの脳幹では、概日リズムが乱れている可能性、また神経活動が活性化している可能性を示唆

細胞一個あたりの発現コピー数条件: 0.8コピー以上

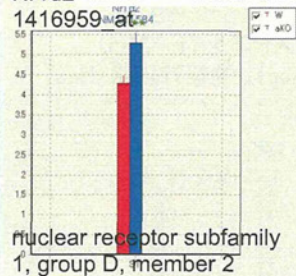
43

脳幹において、発現が有意に増加する遺伝子

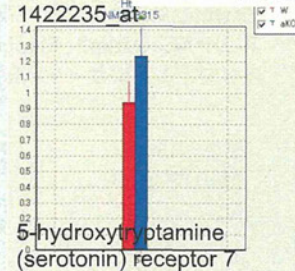
Per1 概日リズム関連遺伝子



Nr1d2 概日リズム関連遺伝子

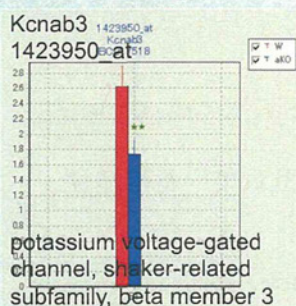
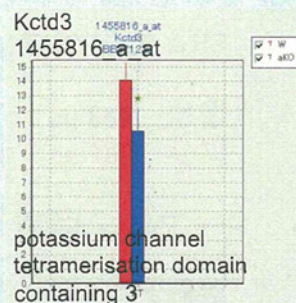
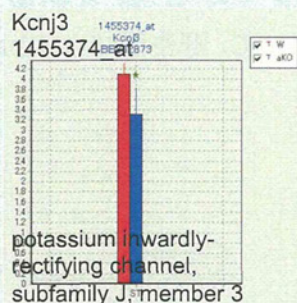
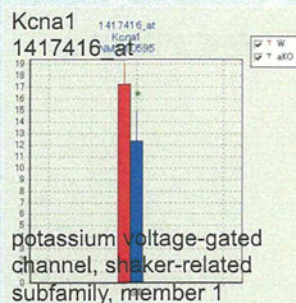


Htr7 セロトニン受容体



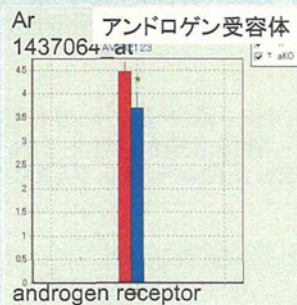
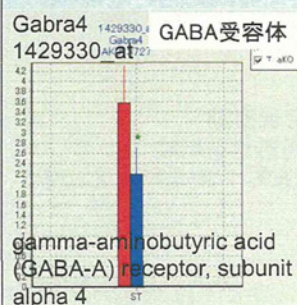
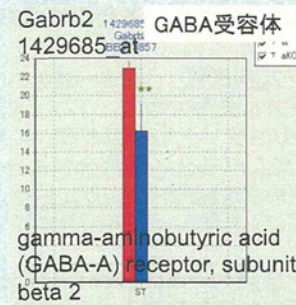
44

脳幹において、発現が有意に減少するカリウムチャネル遺伝子



45

脳幹において、発現が有意に減少する遺伝子



46

脳幹

野生型とER α 欠失マウスとの比較

ER α 欠失マウスにおいて、野生型マウスと比較し発現が有意に、

増加: 483 ps

減少: 684 ps

→ Pubmed検索

増加する遺伝子:

・概日リズム関連遺伝子、セロトニン受容体

減少する遺伝子:

・カリウムチャネル、グルタミン酸受容体、GABA受容体、及びアンドロゲン受容体

→ER α 欠失マウスの脳幹では、概日リズムが乱れている可能性、
また神経活動が活性化している可能性を示唆

細胞一個あたりの発現コピー数条件: 0.8コピー以上

47

まとめ: 成熟期の雄性ER α 欠失マウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)サンプルの網羅的に遺伝子発現変動解析→野生型のものと比較・検討

・**大脳皮質** (>細胞一個あたり1.0コピー)

ER α 欠失マウス: 776 (増加:9、減少:767) psの有意な発現変動

RARシグナル伝達が低下し記憶障害が誘発する可能性、神経活動の活性化及び概日リズムが乱れる可能性を示唆

(RAR関連遺伝子、カリウムチャネル、グルタミン酸受容体、セロトニン受容体、概日リズム関連遺伝子、アンドロゲン受容体、メチルGpG結合タンパク(MBD)関連遺伝子)

・**海馬** (>細胞一個あたり0.7コピー)

ER α 欠失マウス: 21 (増加:8、減少:13) psの有意な発現変動

野生型マウスとER α 欠失マウスとの間に違いは、現時点では認められない

・**脳幹** (>細胞一個あたり0.8コピー)

ER α 欠失マウス: 1,125 (増加:483、減少:642) psの有意な発現変動

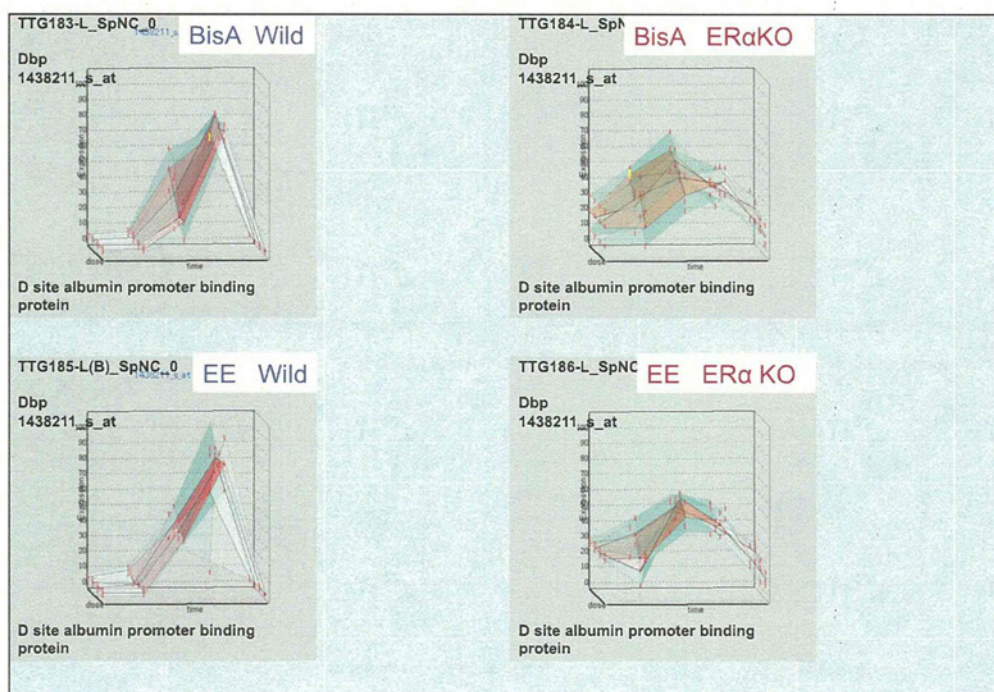
概日リズムが乱れる可能性及び、神経活動が活性化している可能性を示唆

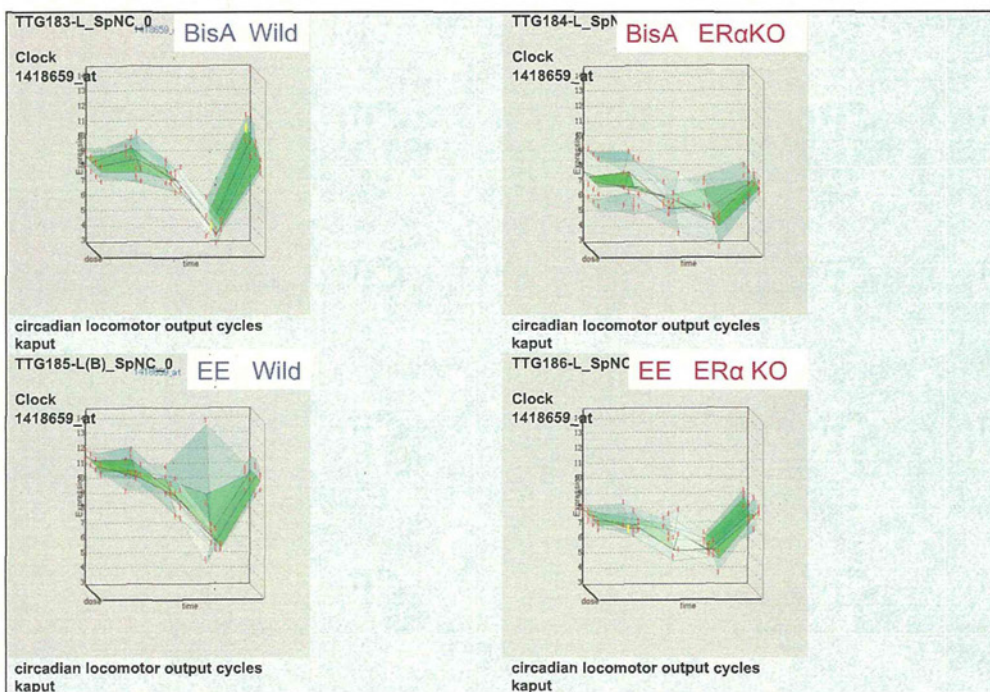
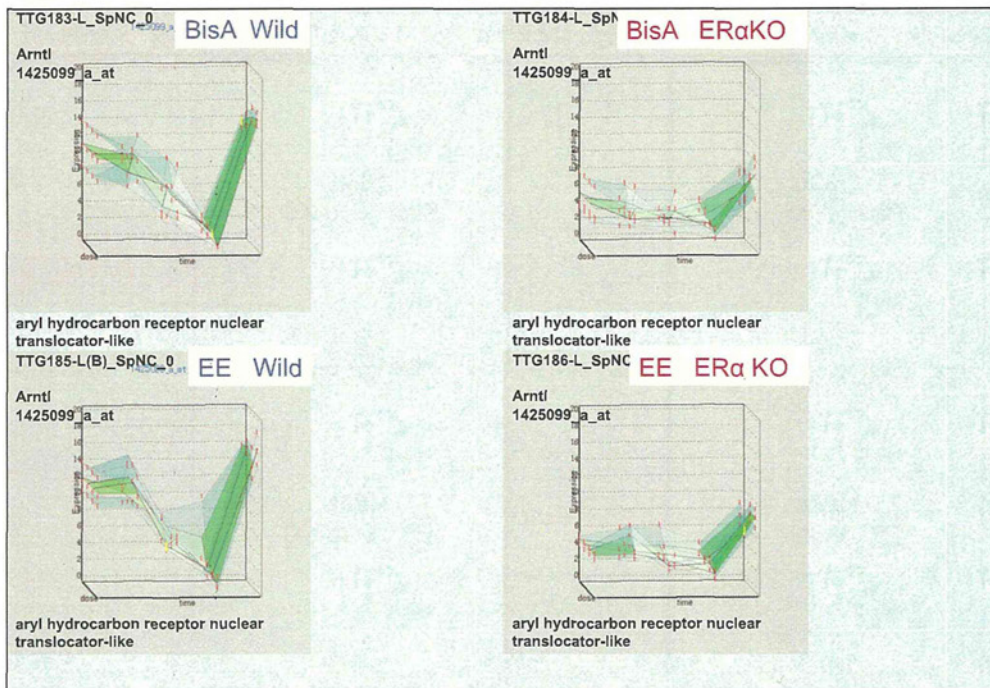
(概日リズム関連遺伝子、セロトニン受容体、カリウムチャネル、グルタミン酸受容体、GABA受容体、アンドロゲン受容体)

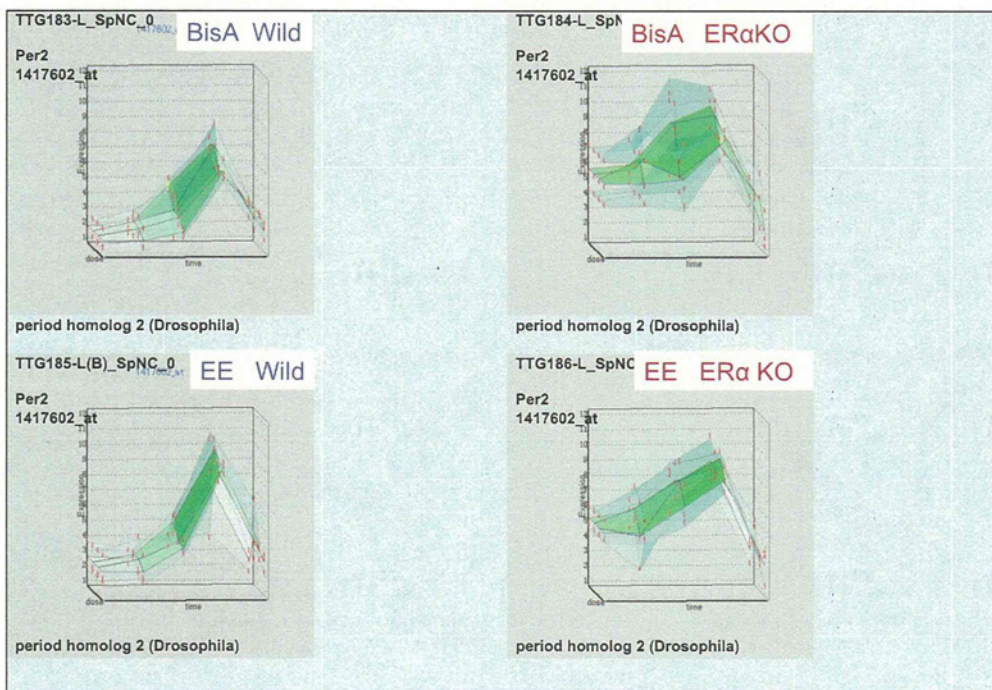
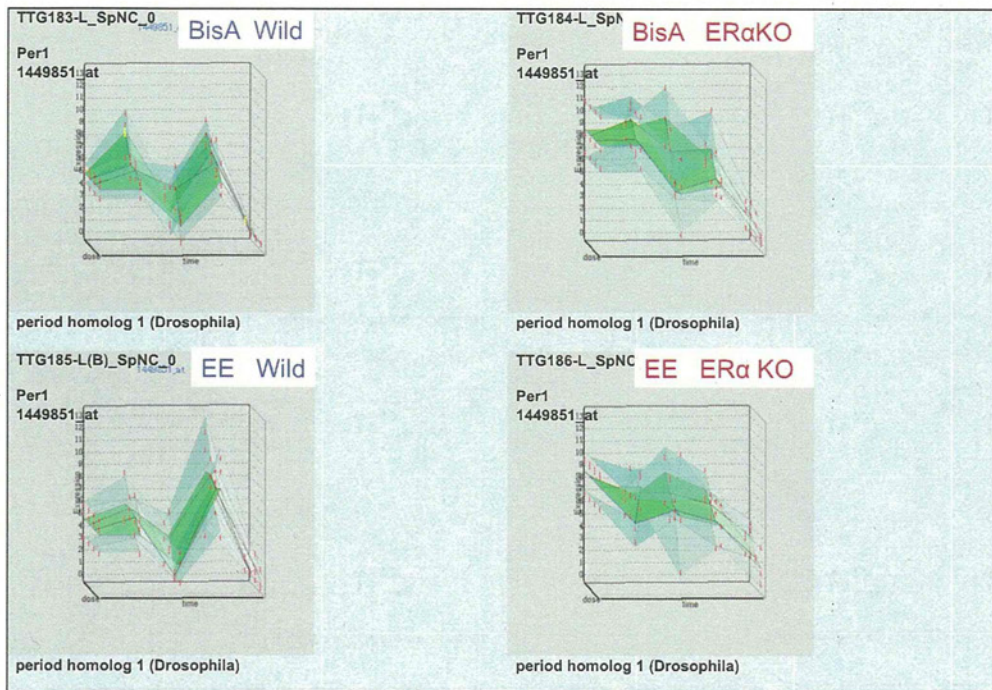
・**アンドロゲン受容体の発現**: 大脳皮質及び脳幹において低下

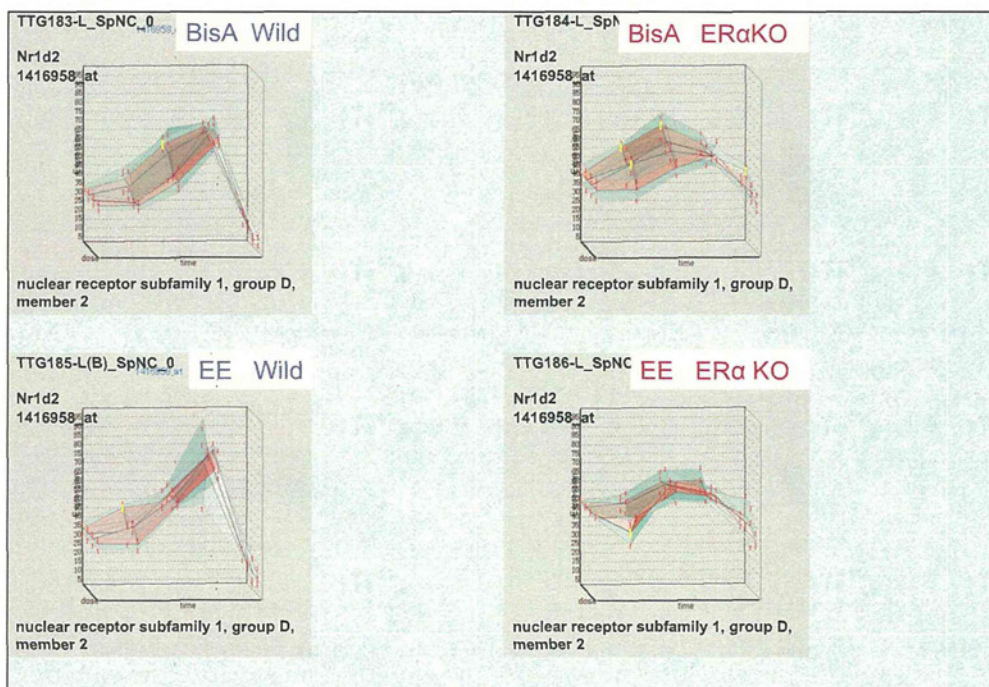
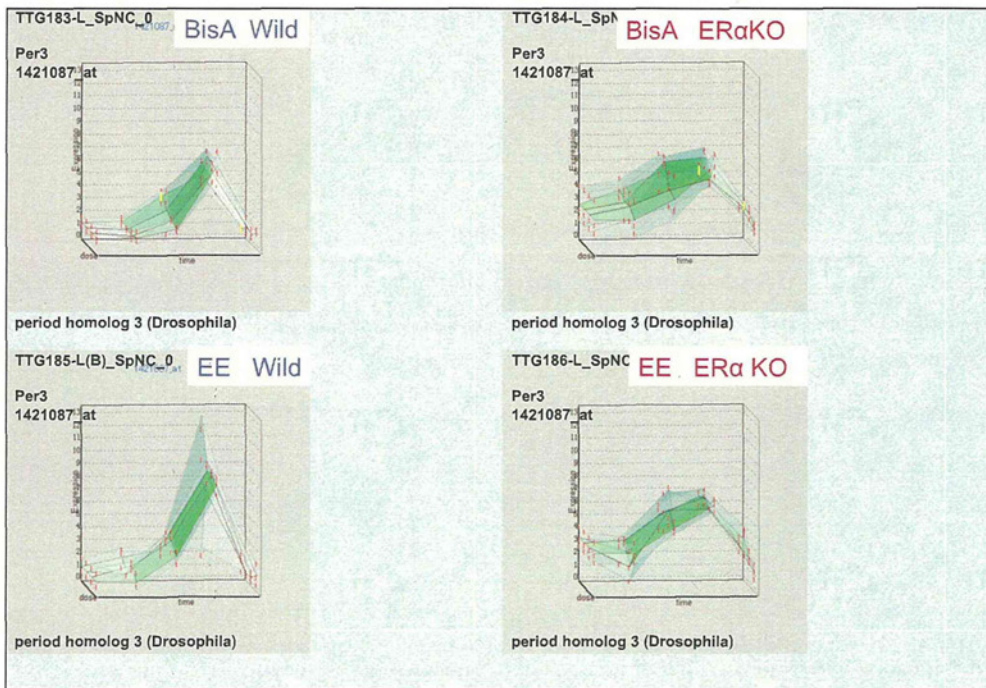
Circadian Rhythm 関連遺伝子の、野生型とER α 欠失マウスとの発現変動比較 成熟期・肝

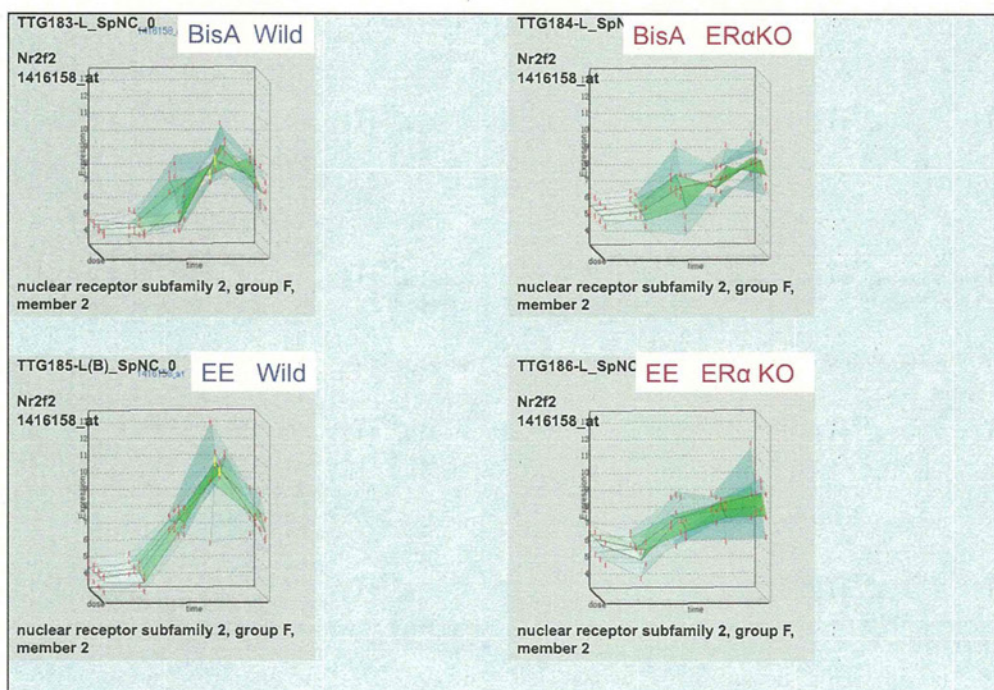
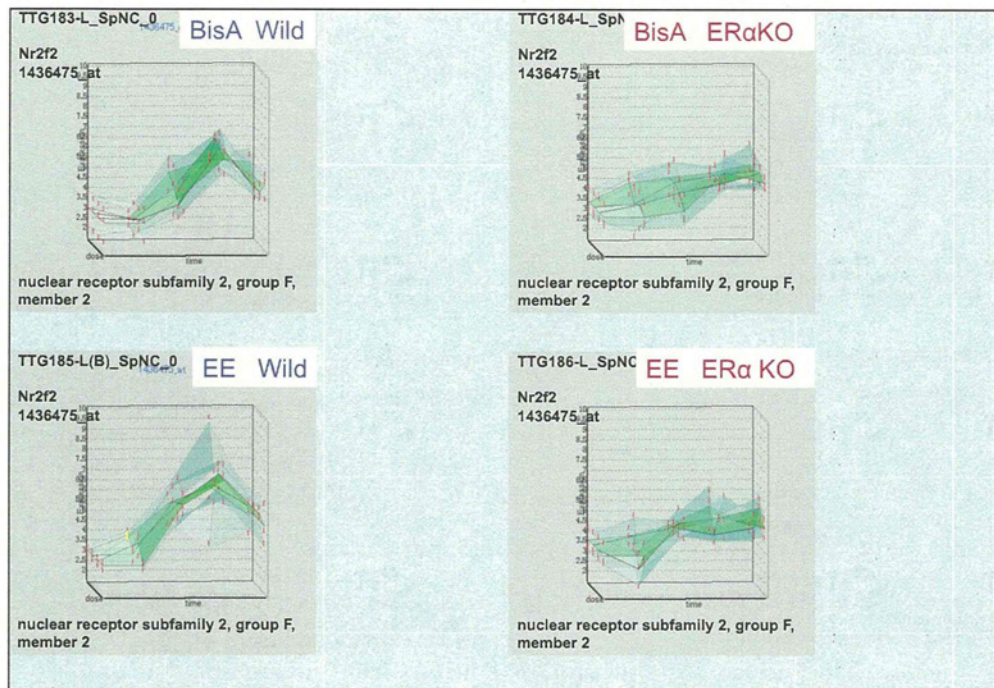
TTG183L BisA Wild	TTG184L BisA ER α KO
TTG185L EE Wild	TTG186L EE ER α KO

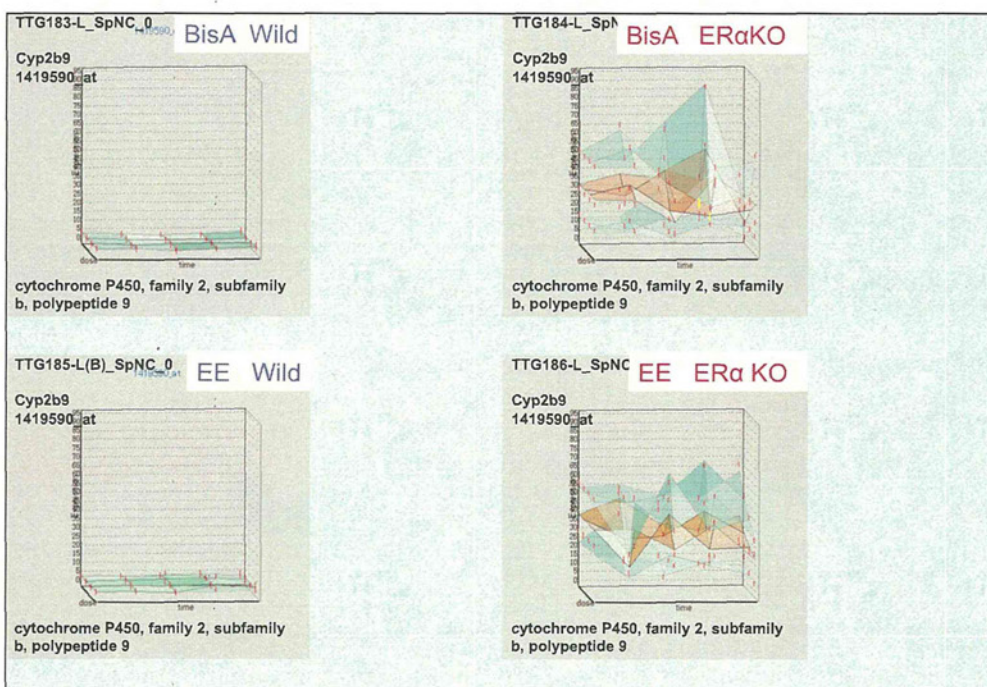
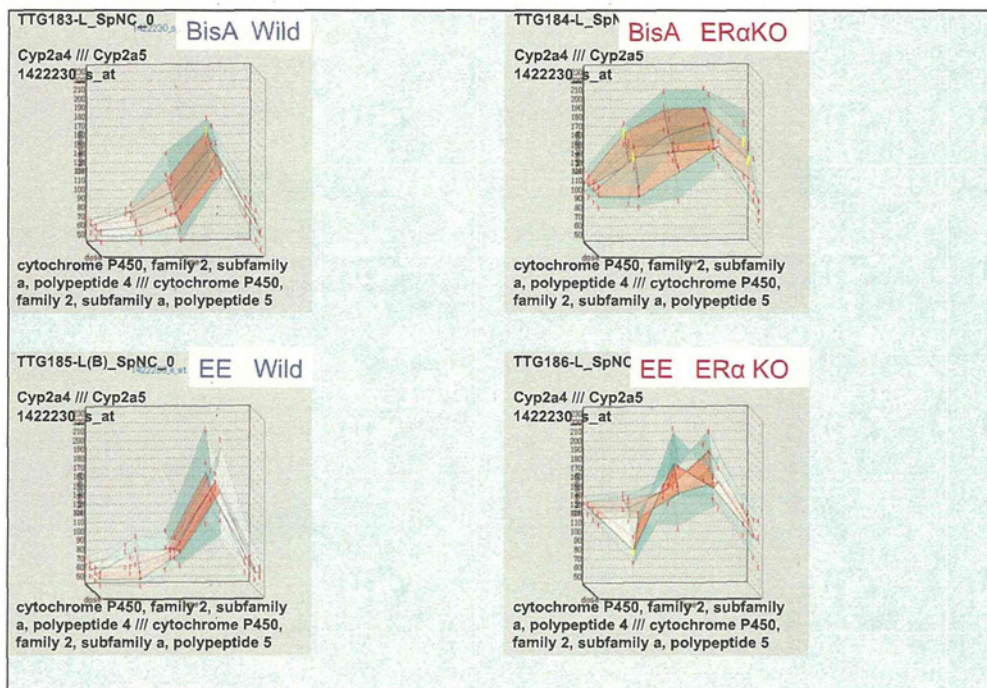


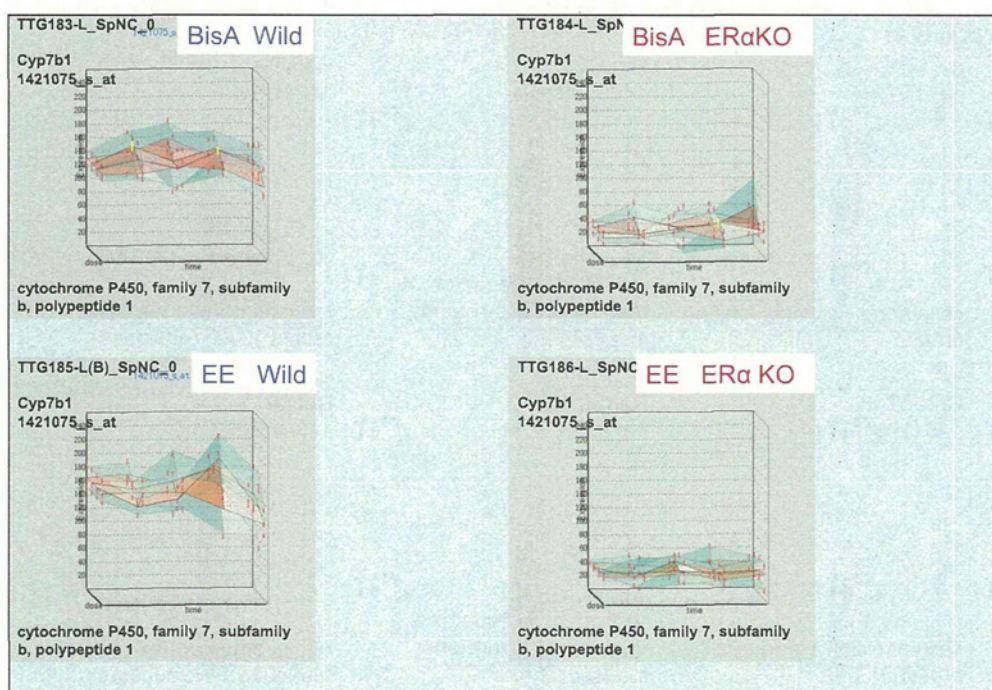
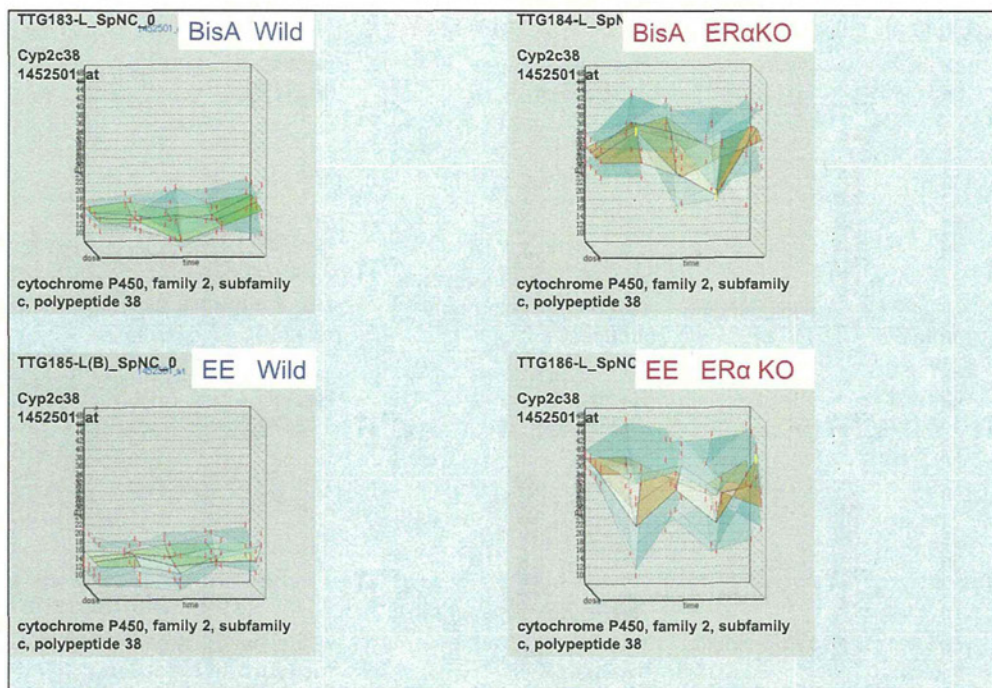


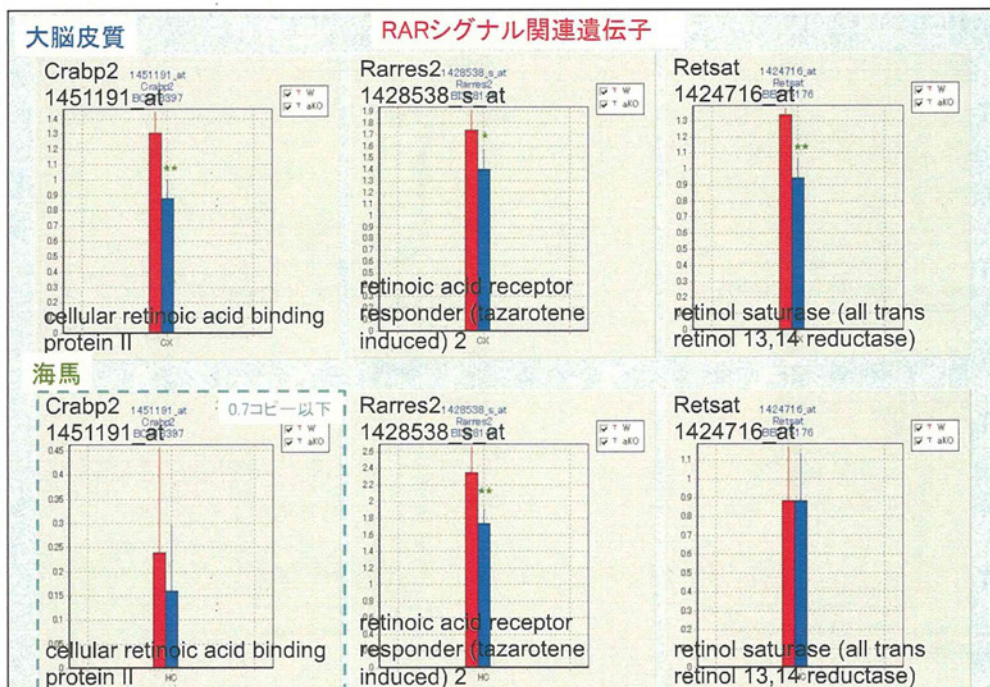
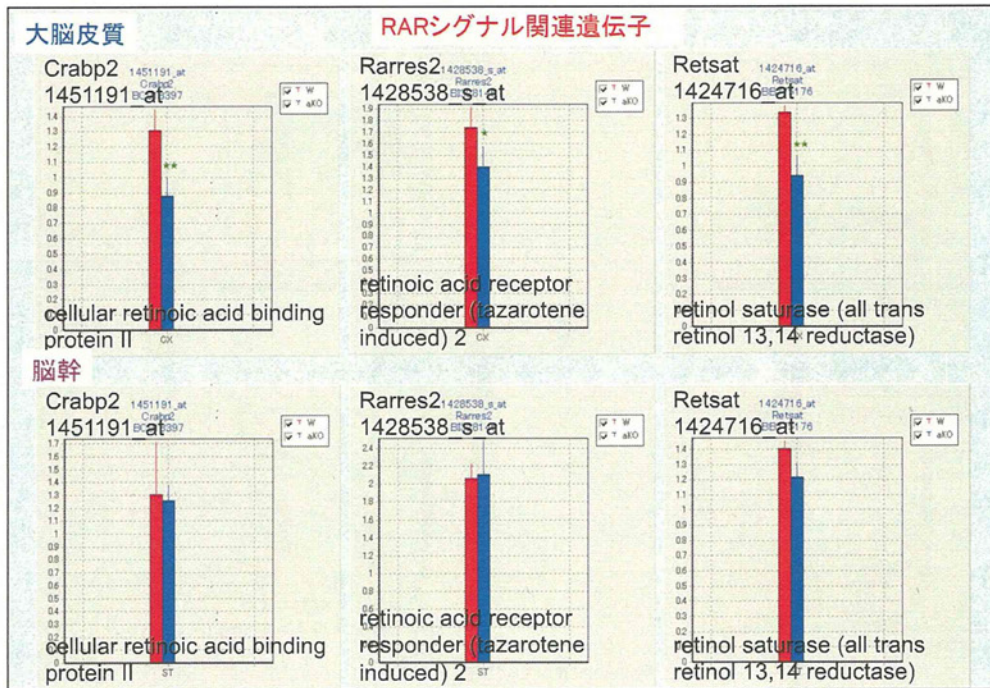












今後、
欠失マウスにおいて記憶異常が報告されるRARシグナル及び概日リズムと、ER α シグナルネットワークとの関連に着目した検討により、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される

65

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担報告書

発生-発達期ビスフェノール類の暴露による遅発行動影響と中枢解析

研究代表者 種村健太郎

東北大学大学院農学研究科 准教授

【研究要旨】

化学物質の早期暴露による遅発中枢影響をスコア化する目的でエストロジェン受容体遺伝子改変マウスの行動様式を解析した。その結果、異常の基準値設定としての有用性を見いだした。また発生-発達期におけるビスフェノールA暴露による遅発中枢影響を明らかにする目的で、マウスに交配から離乳期まで飲水投与（妊娠期は経胎盤暴露、授乳期は経母乳暴露）し、成熟後に行動解析、遺伝子発現解析を行った。その結果、不安関連行動の逸脱を伴う学習記憶異常が生じていることが示唆された。また網羅的遺伝子発現解析から、GABA 受容体シグナル影響が推測された。

A. 研究目的

先行研究において、胎生期及び幼若期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の成熟マウスへの投与による神経毒性試験法（所謂、FOB:機能観察総合評価）からは想定困難な遅発性の情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、加えて対応する神経科学的物証、及びその分子メカニズムの一端を捉えた。

この神経系の発生-発達期における神経伝達物質受容体を介した神経シグナルかく乱について特筆されるのは、直接的な細胞障害を惹起しないレベルの神経作動性化学物質暴露が、微細な脳構造形成不全や神経回路構築異常を誘発し、成長後に情動認知行動異常として顕在化する事である。

そこで本研究では、上記の遅発性の情動認知行動異常を今後の行政施策へ反映させる必要性を考慮し、標準プロトコルの確立、及

び客観的評価指標の提案を目指す。

そのため、特徴的な異常を示す遺伝子改変マウス等を普遍的な基準点と位置付け、情動認知行動及びこれに対応する神経科学的物証項目（微細形態、タンパク発現・遺伝子発現、神経回路機能等）の異常所見をスコア化し、神経作動性化学物質による異常を基準点との「スコア差」として客観的に記述し評価する方法の提案を目的とする。

具体的には、複数のエストロジェン受容体（ER）関連遺伝子改変マウスの呈する行動様式を基準点とし、NACsとしては、ER 結合性化学物質として理解されているジエチルスチルベストロール（DES）、ビスフェノールA（BPA）、及びビスフェノールAF（BPAF）を取り上げる。本年度は、エストロジェン受容体（ER）関連遺伝子改変マウスを用いた行動解析と、特にBPAF についての周産期暴露による遅発中枢影響解析を行う。

B. 研究方法

エストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスとして、雄 ER α KO マウス、及び雄 ER β KO マウスを用いた。生後 12 週齢から 13 週齢 (約生後 3 ヶ月齢) にかけて、オープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験を組み合わせたバッテリー式行動解析を行い、同腹の野生型雄マウスの示す行動様式からの逸脱度は t-test によって検定した。

C57BL/6NCrSlc マウス (日本エスエルシー) を実験に用いた。BPAF の投与は、交配から離乳時 (4 週齢時) まで飲水投与とし、遮光プラスチック製給水ビンを使用した。給水ビンは週 2 回 (月木または火金曜日) 交換した。BPAF 投与液の作製にあたっては、まず BPA のエタノール溶解液を作製し、これを水道水中にエタノールの最終濃度が 0.01% となるように添加した。BPAF の用量は 0、10、100ppm に設定した。離乳時に雄のみをランダムに選別し、1 ケージに 4 匹ずつ群飼いと、生後 12 週齢から 13 週齢にかけて、オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験を行った。生後 15 週齢時に、大脳、及び海馬について、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析 (パーセローム法による) を行い、Ingenuity Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行った。また、特に神経細胞突起について形態解析を行った

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

エストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスの行動解析の結果、①雄 ER α KO (+/-) マウスは、行動様式異常は認められなかったが、②雄 ER α KO

(-/-) マウスにおいては、オープンフィールド試験における総移動量の低下、明暗往来試験における明所滞在時間及び明暗往来数の減少、高架式十字迷路試験における開放部滞在時間の減少とともに、条件付け学習記憶試験における学習記憶異常が認められた。一方で、③雄 ER β KO マウス (+/-) では、明暗往来試験における明暗往来数の減少とともに、条件付け学習記憶試験における記憶異常が認められ、④雄 ER β KO マウス (-/-) においても同様の行動異常が認められた (t-test、 $p < 0.05$)。

周産期 BPAF 暴露マウス (雄) の行動解析の結果、10 ppm 暴露群に、行動異常は認められなかったが、100ppm 暴露群に、オープンフィールド試験における総移動量の増加とともに、中央部滞在時間の減少傾向が認められた。また明暗往来試験からは暗所滞在時間の延長傾向が認められた。さらに条件付け学習記憶試験から、海馬依存性の高いとされる、場所連想記憶の異常が明らかとなった (t-test、 $p < 0.05$)。BPAF 暴露マウスの大脳及び海馬の網羅的遺伝子発現解析からは、BPA 暴露群 (昨年度施行) にて顕著であった遺伝子発現抑制傾向 ($p < 0.01$ 、 $\text{ratio} > 1.1$) は特に認められないものの、100ppm 暴露群の大脳において、GABA 受容体シグナル影響が生じていることが示唆された。

D. 考察

神経作動性化学物質による遅発性の行動異常を基準点との「スコア差」として客観的に記述し評価する方法として、遺伝子改変マウスの利用が期待できることが示された。今後、遺伝子改変マウスのみならず、行動異常誘発化学物質の利用によって、基準点を増やすことによって、「スコア」としての頑強性の向上が望まれる。

行動解析結果から、BPAF 暴露による遅発神経影響として、不安関連行動の逸脱を伴う学習記憶異常が生じていることが示唆された。これは、「不安が大きい」状態を包括している可能性が高く、遺伝子発現