

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目

Environmental disruptors hinder brain development
—role of estrogen receptor alpha in the postnatal exposure to bisphenol A

環境汚染化学物質が脳の発達に及ぼす影響
—哺乳期ビスフェノール A 曝露のエストロゲン受容体の役割について—

氏名： 許 曉彬

「環境ホルモン」もしくは「内分泌かく乱物質」とは、外界に広く存在し、生物の生命活動とともに体内に取り込まれて、本当のホルモンの働きをかく乱したり、阻害したりして、生体の生殖と発育という基本的な機能に障害を与える。脳神経系の発生、発達過程においてもさまざまなホルモンのレセプターが発現しており、ホルモンは脳の性分化、性行動や知能の発達に関与している。内分泌かく乱化学物質の1つである bisphenol A (BPA) は、phenol と acetone との縮合反応により合成され、主にポリカーボネート樹脂の原料としてプラスチック製の食品容器や歯科用医療品など広く使用され、加熱により容易に溶出することが知られていることから、その安全性の確認が必要とされている。BPA は甲状腺ホルモンレセプターと結合し、下流の遺伝子の転写を抑制するという報告があり、さらに、*in vivo* の実験で妊娠期および哺乳期 BPA に曝露された仔ラットの血中甲状腺ホルモンレベルが低下し、生後14日目に脳中甲状腺ホルモン応答因子 RC3/neurogranin の発現量は少ないと示唆されている。一方、BPA は MCF-7 ヒト乳癌細胞の増殖を促したり、プロゲステロン受容体を誘導したりエストロゲン作用をすることが明らかにされている。そのほか行動実験によって、環境中に存在している濃度の BPA に胎児期に曝露されたラットにおける多動と空間学習障害を示すことも既に報告されている。しかしながら、BPA が神経系の発達に影響し、成年後の行動異常を起こす分子機序は

ほとんどわかっていないのが現状である。本研究では、胎児期から哺乳期にかけて BPA に曝露されたラットを使って、発達期の海馬(ステロイドホルモンに反応し、行動と学習に深く関与している部位)の核内レセプター関連因子の発現量と成年後の行動と学習を検討し、可能である甲状腺ホルモンレセプター経路とエストロゲンレセプター経路について考察した。

(1) 胎児期および哺乳期 BPA 曝露による雄仔ラットの異常: 新生期の血中甲状腺ホルモンの低下と成年期の行動障害

BPA (0.01、0.1、1、50mg/L) を妊娠11日目から産後3週まで母ラットに投与して、生まれた仔ラットについて、6週齢で open field test (行動テスト)を行った。雌仔ラットにおいては、BPA 投与はいずれの濃度でも顕著な異常が認められなかった(本来行動量が雄より高い水準を呈している)。一方、各濃度の中で低濃度曝露群(特に0.1mg/L)の雄仔ラットでは、不安、多動がより強く認められ、雌仔ラットの行動量に近づくようになった。高濃度曝露(50mg/L)の雄仔ラットでは多少の変化が見られたが、低濃度群より変化は少なかった。さらに、10週齢時に Morris water maze (水迷路テスト)により観察したところ、やはり低濃度投与群の雄ラットでは空間学習・記憶の障害が見られたが、雌仔ラットでは認めなかった。成人ラットに同じ濃度の BPA を投与したところ、顕著な行動の変化・空間学習障害は見られなかった(未発表データ)。これらのデータにより、行動・空間学習記憶においては雌よりも雄仔ラットへの影響が大きいことと胎児及び乳幼児期は内分泌かく乱物質の影響を受けやすいことが示唆された。

母ラットと仔ラットの血中の甲状腺ホルモン(Free T₄, FT₄)を測定した。0.1mg/L 群の母親は出産の日(P₀)と産後7日目(P₇)に血中の甲状腺ホルモンは対照群より低値(P_{P₀}<0.05, P_{P₇}<0.05)であった、高濃度(50mg/L)群の母ラットでは P₇ により低 FT₄ の傾向が見られたが、有意差はなかった(P_{P₇}=0.056)。0.1mg/L 群の雄仔ラットは P₇ に一過性の高い血中 FT₄ 値が見られた(P_{P₇}<0.05), P₂₁ に低い FT₄ を呈した(P_{P₂₁}=0.054)。50mg/L 群の雄仔ラットは P₂₁ に有意な低い FT₄ が見られた(P_{P₂₁}<0.05)。各濃度群の雌仔ラットでは有意差はなかった。胎

児期および哺乳期BPA曝露は母ラットと雄仔ラットの甲状腺機能をかく乱することがわかった。さらに、0.1mg/L群の雄仔ラットの海馬中の甲状腺ホルモン受容体(THR α とTHR β)、その下流応答因子 RC3/neurogranin と SRC-1(steroid hormone receptor cofactor 1)の発現量を検討した。THR s と RC3/neurogranin はともに有意な変化は認められなかったが、SRC-1の発現量は対照群より多かった(P_{P5} <0.05, P_{P7} <0.05)。以上の結果により、BPA かく乱作用の経路は THR 経路ではなく、他のステロイドホルモンレセプター経路が示唆されている。

(2) 哺乳期 BPA 曝露による雄仔ラットの異常: 新生期海馬のエストロゲン受容体(ER)発現量の変化と成年後の行動障害

上述したように、BPA 曝露に対して雄と雌に顕著な性差がみられたということから、性ホルモンレセプター経路の関与が示唆された。BPA のエストロゲンに類似した化学構造により、今回は特異的なエストロゲン受容体の拮抗剤 ICI182 780 (ICI、核内 ER の機能に必要である dimer 構造の形成を妨害する)を用い、エストロゲン受容体の経路を検討した。

BPA (0.1mg/L) を生まれてから産後3週まで母ラットに投与して、生まれた雄仔ラットについて、6週齢で open field test、10週齢で Morris water maze を行った。BPA 投与群は多動と空間学習・記憶障害がみられたが、BPA+ICI 群では対照群と比べ有意な差はなかった。ICI 投与は BPA のかく乱作用を抑制したことで BPA の ER 経路の関与が推察された。

新生仔期の海馬について、ER α とその下流応答因子 NMDA receptor 2D (NR2D) の mRNA の発現量を調べた。出産後7日目に対照群で強く発現していた ER α が BPA 曝露群では強く見られず、11日目に遅れて強く発現することを認めた。BPA+ICI 群は対照群と同じパターンを示した。一方、ER β はほとんど発現が認められなかった。ER α の活性の高いリン酸化タイプ P-ER(ser118)は P7 には、対照群と BPA+ICI 群で強く見られ、BPA 群では弱く発現していた。しかし、P11 には BPA 群は他の各群とともにリン酸化を認められなかった。発達中の海馬では ER α の活動はごく狭い期間に限定されていることが明らかになった。BPA 群で遅れた ER α の発現量のピークはその重要な臨界期から外れることによって、不可逆的な発達障害をきた

すことが示唆された。

光学顕微鏡を用いた海馬スライスの組織染色観察によって、ER α が CA1-CA3 の錐体神経細胞と DG の顆粒神経細胞に分布することが示された。神経細胞内での局在を解明するため、共焦点顕微鏡による NeuN と ER α の二重染色の解析を行った。生後一週間から11日目まで、細胞質と核ともに ER α が確かに局在していることを認めた。細胞質に存在する量は核内より多く見られた。この結果は、この時期に ligand は細胞質と核内に局在していることを示唆していた。さらに、最近、細胞膜と細胞質に存在する ER の機能に dimer の構造も必要であるという報告があった。ICI の投与は BPA のかく乱作用を classic pathway と non-classic pathway の二つ経路で抑制する可能性がある。BPA 群で down-regulated NR2D と増加した SRC-1 の mRNA の発現量 BPA は ER の Classic pathway を作用すると思われるが、non-classic pathway の存在も否定できない。

記憶を蓄える部位である、神経スパインの形成への BPA の影響を in vitro で調べた。胎児の海馬の神経細胞を取り出し(妊娠18日目)、E2 (10^{-10} M)が入った培養液で培養し、3日間後(出産日に相当)に ICI (10^{-8} M) と BPA (10^{-8} M)を加え、6日後に GFP-actin の DNA を持つ Virus を用い培養細胞に感染させ、24時間後蛍光顕微鏡で神経細胞のスパインを観察した。BPA 群ではスパインの密度がより低く、特に Thin-type スパインの数は少なくなった。減少したスパインの数とともに synapse にカバーされた面積も小さくなった。Thin-type スパインが将来の神経シナプスを形成することは多くの他の研究から示唆されており、新しい記憶の場所の候補である。BPA はこのスパインの形成を阻害し、長期の記憶障害を起こすことが示唆された。

本研究は環境ホルモン BPA 曝露による発達中の脳のホルモンレセプター関連因子の変化から、成年後の行動分析までセットして行った最初の研究であり、初めに BPA のかく乱作用の classic pathway を確に証明したが、一方、non-classic pathway の経路の可能性もあるので、それを解明するのは今後の課題である。