

「内分泌かく乱物質」
平成12年度採択研究代表者

川戸 佳

(東京大学大学院 総合文化研究科 教授)

「脳ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン」

1. 研究実施の概要

脳内でチトクロムP450系が合成するニューロステロイド(女性ホルモン、ストレスステロイドなど)は第4世代情報伝達物質であり、神経伝達に急性的に作用する。脳神経細胞の情報伝達や神経ネットワーク構築は、ニューロステロイドや性器官・副腎から分泌される性ホルモン・ステロイドによって大きな制御を受けるので、女性ホルモン類似環境ホルモン(ビスフェノール、DES、PCB、有機スズ、ダイオキシンなど)が、脳の記憶・学習や新生児期の神経ネットワーク構築に大きな攪乱を与えるはずで、これを解明する。

記憶学習の中心である海馬神経の膜上の受容体を経由して数分で効果を発揮する、急性効果(持続性有り)に重点を置いて解析する。発育期の脳での効果は重要。脳の性分化の決定にも脳内のステロイドが関与している?かもしれない。

核受容体を経由する慢性型の作用ではなく、細胞膜上の受容体を経由して数分で効果を発揮する、急性効果(持続性有り)に重点を置いて解析する。エストラジオール(女性ホルモン)をはじめとするステロイド型ホルモンは海馬神経のグルタミン酸受容体に直接作用する。海馬錐体細胞にはエストラジオールの核受容体は無いので、エストラジオール膜受容体を介してのNMDA受容体と、MAPK経路が主な作用部位ではないか。ニューロステロイドの作用は、脳海馬の記憶学習の効率化/劣悪化に大きな役割を果たす。女性ホルモン類似環境ホルモンは脳血液関門を越えて、脳に作用出来る。女性ホルモン類似環境ホルモンが、核受容体ではなく膜上の受容体を介して、記憶学習の中枢である海馬への急性作用を発揮する現象を捉え、分子機構を解析する。鳥のさえずり中枢の新生に代表されるように、胎児/新生児期のみならず成熟した個体中の脳でも脳細胞は神経幹細胞から新生しており、この際エストラジオールが神経発火交信を促進し、神経細胞保護効果で、ネットワーク形成を促進する。従って、女性ホルモン類似環境ホルモンが脳ネットワーク形成を攪乱するはずである。

2. 研究実施内容

1) 環境ホルモンと女性ホルモンの急性効果を、海馬スライスの電気生理イメージ

ングで測定解析を行う。

海馬スライスでEPSPと長期増強を測定すると、エストラジオールは急性的にEPSPや長期増強を大幅に促進するが、ビスフェノールAやDESなどはほとんど影響しないと思われる。両者の作用部位が同じなので、阻害効果がわかるだろう。急激的な作用部位はエストラジオールの膜上に受容体だろう。核受容体を經由する慢性効果以外の、重要な環境ホルモン効果の分子機構を解明する。

2) エストラジオール膜上受容体から下流のカスケード反応を電気生理で同定する。

a) 膜上受容体 srcチロシンリン活性化 NMDA受容体チロシンリン酸化 Ca流入増加 長期増強がかかりやすくなる、という経路を電気生理でCA1神経細胞の興奮性シナプス後細胞電位EPSPを観測しながら、阻害剤とリン酸化認識抗体を用いて確定する。更に、

b) エストラジオール膜上受容体 src MAP kinase 神経細胞保護という経路で作用し、脳細胞を保護することで結果的に記憶学習能を高めるよう作用する。この経路のどこを環境ホルモンが阻害するかを検討する。

3) 脳の各部スライスや神経培養細胞を用いて、環境ホルモンの影響を検出する為の、構造が複雑でなくて感度の良い、新型多電極刺激測定装置を開発する。

4) 海馬神経細胞では、エストラジオールの膜上受容体刺激で、急性的にCaスパイク信号が発生する。ビスフェノールAによる刺激でも同様のCaスパイク信号が発生し、ビスフェノールAはエストラジオールの膜上受容体に作用していると思われる。海馬のcDNAライブラリを用いて、COS細胞に遺伝子発現して、エストラジオール刺激でCa信号を発した細胞のみを選択するという手法で、活性測定スクリーニングを行い、エストラジオールの膜上受容体のcDNAを同定する。この受容体がビスフェノールAやDESの作用部位であるかどうか確かめる。

また、この受容体がNMDA受容体と同一であるかどうか興味深い。

5) 海馬神経では、チトクロムP450scc チトクロムP45017 α 3 β -HSD 17 β -HSD チトクロムP450arom の経路で内在性コレステロール プレグネノロン DHEA テストステロン エストラジオールが合成される。HPLCを用いて[³H] DHEAからの代謝を調べ、アンドロステンジオン、テストステロン、エストラジオールの量がトリブチルスズやダイオキシンの作用でどう変化するか解析する。これらは海馬神経のP450aromの発現を抑えることでテストステロン エストラジオール変換を阻害して、テストステロンを過剰にして海馬の男性化を起すだろうか？

P450aromやP45017 α の発現もWestern Blotting やmRNA量で調べる。

6) ラットやマウスの海馬に環境ホルモンを打ち込み、Water Maze、電気ショッ

ク避難テストなどの神経行動学実験を行う。コントロール動物や、ニューロステロイドを海馬に打ち込んだ動物との対比を解析する。

3．主な研究成果の発表（論文発表）

無し