

「内分泌かく乱物質」

平成11年度採択研究代表者

黒田 洋一郎

(東京都神経科学総合研究所 客員研究員)

「内分泌かく乱物質の脳神経系機能発達への影響と毒性メカニズム」

1. 研究実施の概要

[研究のねらい]

内分泌かく乱物質が遺伝子発現のかく乱などを介して脳神経系の機能発達にも影響を与えることが憂慮される。学力低下やADHD（注意欠陥多動性障害）など最近の日本における青少年の知能発達・行動発達の異常を考慮しつつ、神経科学の最先端の知識・研究方法を駆使して、分子・細胞・個体レベルで実験的研究を行い、脳の機能発達に毒性を持つ環境化学物質の解明を行い、リスク評価のため機能スクリーニング系脳機能発達の評価系を開発し、それを支える分子メカニズムや毒性メカニズムの解明のための基礎データの積み上げを行う「ねらい」を持つ。

[研究の概要と成果]

I. 脳でのトキシコジェノミックス：甲状腺ホルモン依存性と神経活動依存性の遺伝子発現のかく乱研究とPCB類による遺伝子発現の抑制

周産期での甲状腺ホルモンの低下が生まれてきた子供に重い知能発達障害を起こすことはクレチン症で明らかだったが、かく乱対象としての甲状腺ホルモン系の研究、甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現のかく乱する環境化学物質の解明、ことに脳の機能発達との関わりの研究は著しく遅れていた。また記憶・学習などの脳高次機能の発達に関しては、外界からの入力刺激に伴う神経活動依存性の遺伝子発現も重要で、脳だけで問題になる攪乱対象である。社会的要請である多数の化学物質の脳機能発達への影響を評価する簡便なスクリーニング系の開発や毒性メカニズムの研究のためにも、まずin vitroの新しい実験系の開発が急務と考えた。分子（遺伝子）レベルでは遺伝子発現のかく乱が発達障害の基本メカニズムであることは明らかだったので、さまざまな遺伝子発現アッセイ系を開発した。

本年度の当チームの研究で甲状腺ホルモン依存性の脳での遺伝子発現への影響をアッセイする実験系の開発に成功し、それを直接阻害する環境化学物質としてPCB、水酸化PCBが判明した。カネミ油症事件と同様の台湾でのPCB混入事故で、被曝した母親から生まれた子供の知能指数（IQ）が平均約6ポイント低下したという報告もあり、今後PCB類の脳機能発達への毒性の全容の解明が重要になった。

II. オリジナルDNAマイクロアレイ，サルを用いた知能・行動発達評価系を始めとする新しい実験系（スクリーニング・評価系）の開発とダイオキシンの影響

トキシコジェノミックスで広い範囲での応用が期待できるDNAマイクロアレイ、ことに「脳機能発達用に最適化したオリジナルなDNAマイクロアレイ」の開発を目指し、高い定量性をもったDNAマイクロアレイ・システム作製に成功した。また細胞レベルでは、大脳皮質神経細胞間のシナプス形成や小脳プルキンエ細胞の樹状突起伸展などの培養下での神経細胞分化・発達系を利用し、水酸化PCBが神経細胞の発達、ことに樹状突起伸展を阻害することが確立した。さらに個体（行動）レベルでは、最近米国や日本で増加した注意欠陥多動性障害（ADHD）や自閉症など、従来の毒性実験では対象と考えられなかった行動発達障害との関連の有無が憂慮されていることから、ヒトの高次な行動への影響が最大限検出できる実験動物として、サルを用いた新しい行動学実験系の開発を特に重視した。

本年度はサルを用いた知能発達、行動発達への影響を見る実験系も所定のもので全て立ち上がり研究が進んだ。ことに母ザルへのダイオキシン（2、3、7、8、TCDD）投与が、子サルの学習機能発達にはあまり影響を与えないという興味深いデータが得られた。

III. シナプス形成など脳の機能発達についての分子神経生物学的基礎研究

ヒトの行動も脳内でのシナプス形成の時間的空間的特異性に基づいて出来上がった神経回路の特性によって決定されている。分子（遺伝子）・細胞レベルの毒性メカニズムの研究は、遺伝子の情報を中心にさらに有効な簡便なスクリーニング系の開発にも結びつく重要なもので、それにはシナプスの形成・発達についての分子神経生物学的基礎知識が必須である。この分野は脳神経科学でも未開拓、かつ脳での再生医療の可否にもかかわる最先端の分野で、戦略的基礎研究としてシナプス発達の観察法の開発、細胞骨格や各種脳内受容体・G蛋白などのプロテオミクスを中心に布石を打ち、着実な成果を上げた。

[今後の見通し]

チーム内の共同研究および広島大学安田グループとのダイオキシンの脳機能発達への影響の共同研究は既に活発に行われているが、今後、甲状腺ホルモン系とPCB類を中心に、各グループ間の各階層での共同実験がtop down、bottom upの両方向で、ネットワーク的にひろがることが予想され、順調な研究の進展が期待できる。

また理研と共同で行いつつあるオリジナルで高い定量性を持つDNAマイクロアレイ“Synapto array”の開発も着実に進み、Ver2、Ver3．．．と、より高度なものへと“進化”しつつある。

当チーム内では出来ない興味深い研究、たとえば各種PCB異性体と脳発達毒性との関係、ダイオキシン類とPCB類の遺伝子発現への影響の異同などは、同じCRESTの遠山チームとの共同実験が予定されている。また脳での遺伝子発現の網羅的解析には同じCRESTの宮本チームとの共同実験の予定がある。

残る問題は、最近心配されている子供たちの知能・行動発達の異常と内分泌かく乱物質の関連の有無についての科学的データのさらなる蓄積であるが、本年度当チームの研究で、遺伝子・細胞レベルでは既にPCB類の脳機能発達への障害を示すデータは増加しており、

エンド・ポイントとしての発達・行動学実験が必須となる。このようなヒトの社会的行動を含む微妙な脳の機能発達を観察する心理・行動学実験は、げっ歯類では不可能で、サルを使った実験が重要となる。本研究チームの当初計画での予算が実際には約半額に削減されてしまったため、最も研究費を必要とするサル行動実験の規模を縮小せざるを得なかった。本年度になり、遺伝子発現や神経細胞レベルでPCBの毒性が明白になったこと、PCBの環境への拡がりや母体への蓄積は1960年代より継続しており、日本でもPCBは我々の身のまわりの環境にまだ大量に残っており、PCB投与の次世代サルの行動学実験を徹底的に行う必要性が、研究の流れからいっても、社会的要請からも高くなっているが、十分な予算がない。既に母子行動実験、出会わせ実験、アイ・コンタクト実験など社会性を見るサル行動実験系は立ち上げてある。当初計画でも、このレベルまでPCBの遺伝子・細胞レベルの毒性研究が進展し、BPAだけでなくPCBのサル投与実験が必要となることは想定されていなかったもので、予算面での特別の配慮が切望される。

2. 研究実施内容

I. 鯉淵典之（群馬大学医学部・生理）グループ

甲状腺ホルモンに依存する遺伝子発現に対する化学物質の影響を簡便にアッセイする新しい実験系を開発し、低濃度のPCBや水酸化PCBが甲状腺ホルモンによって調節されている遺伝子発現をかく乱する、という重要な結果を見いだした。（図1）

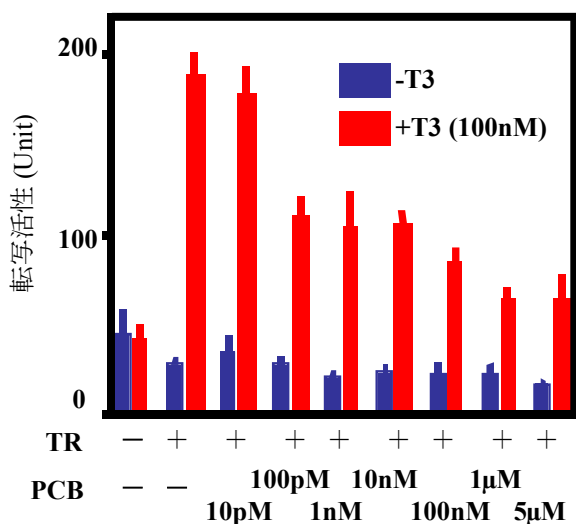


図1 脳でのトキシコジェノミックスの一例 PCBは甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現を抑制する。新しいレポーター・ジーン・アッセイ系を開発した。細胞はCV1を用い、ルシフェラーゼ遺伝子の上流域に甲状腺ホルモン応答配列を有するレポータープラスミドと甲状腺ホルモン受容体 (TRβ) 遺伝子を含む発現ベクターを導入し、甲状腺ホルモン (T3) やPCBを投与24時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。低用量 (pMオーダー) のPCBで甲状腺ホルモン (T3) 依存性の遺伝子発現が、有意に阻害されている。

II. 田代朋子（青山学院大学理工学部・生化学）グループ

新しいコンセプトによるDNAマイクロアレイの作成を目指し、脳の機能発達に関連した遺伝子（オリゴヌクレオチド）の選択により、次世代の「脳機能発達用オリジナル・アレイ」の開発を行い、従来のもより著しく高い定量性（±20%）を持つ“Synapto array” Version 1が完成した。これを用い、甲状腺ホルモンの低下や脳の発達段階による脳内遺伝子群の発現変化の検出に成功した。

III. 津田正明（富山医科薬科大学薬学部・分子神経生物）グループ

記憶・学習など脳の高次機能の発達に重要な、神経活動依存性の遺伝子発現がペルメトリン、DDTなどによって抑制されることを明らかにした。また複合汚染を想定し、両者を同時投与すると相加効果が認められた。また活動依存性遺伝子発現の分子メカニズムの一部を明らかにした。

IV. 黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所・分子神経生物）グループ

培養神経細胞を用い、大脳皮質神経細胞間でのシナプス形成や小脳プルキンエ細胞での樹状突起の伸展を指標に新しい定量的な実験系を開発した。いずれも微量の甲状腺ホルモンが正常発達に必須であることを明らかにした。樹状突起伸展は、遺伝子発現を阻害するのとほぼ同じ低濃度の水酸化PCBにより阻害された。

V. 吉川泰弘（東京大学大学院・生命科学・実験動物）グループ

げっ歯類を用いた、コンピュータによるビデオ画像解析によって行動パターンを判断させるシステム、注意力を測定するシステム、サルを用いた指迷路学習テストなど、新しい行動学実験系を開発した。BPA投与された次世代ラットでは、投与量、発達ステージ、雌雄などで異なる、グルーミング行動の増加や学習行動異常が観察された。広島大学安田グループとの共同実験でダイオキシン（2、3、7、8、TCDD）投与の母ザルから生まれた子ザルの、知能・行動発達への影響を新しく開発した行動学実験系で解析した。ダイオキシン投与は次世代サルの指迷路学習テスト成績には有意な影響を与えなかった。（図2）

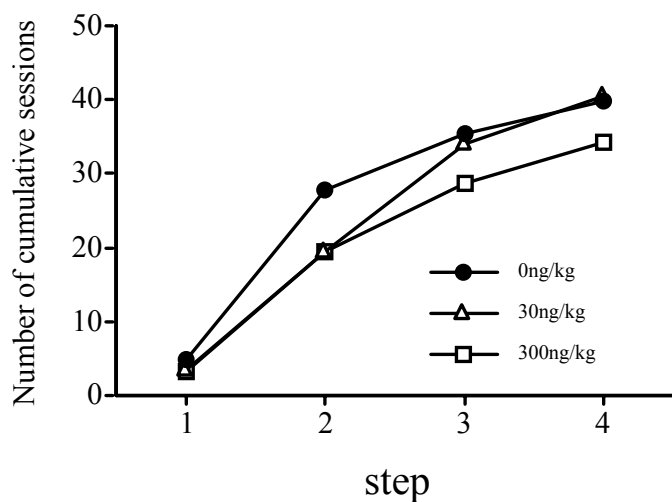


図2 次世代サルの知能・行動発達の評価系の一例

ダイオキシンはサルを用いた指迷路学習テストでは有意な障害を示さない。母ザルの周産期にダイオキシン（2、3、7、8、TCDD）を0、30、300ng/kg体重、投与した。生後約1年の子ザルで指迷路テストを行った。縦軸は学習基準達成までに必要としたセッション数（多いほど学習成績が悪い）。横軸は指迷路の困難度を変化させた指標。ダイオキシン高用量投与群（300ng/kg）でも無添加（0ng/kg）コントロール群より学習成績が悪くなっていない。（むしろ良くなっているようにも見えるが有意ではない！！）

3. 研究実施体制

黒田グループ

- ① 研究分担グループ長：黒田 洋一郎（東京都神経科学総合研究所、客員研究員）
- ② 研究項目：培養神経細胞系を用いた脳機能発達アッセイ

鯉淵グループ

- ① 研究分担グループ長：鯉淵 典之（群馬大学医学部、教授）

- ② 研究項目：脳でのトキシコジェノミックス（甲状腺ホルモン依存性の遺伝子発現への影響を指標にしたスクリーニング・甲状腺ホルモン受容体系と脳機能発達）

津田グループ

- ① 研究分担グループ長：津田 正明（富山医科薬科大学薬学部、教授）
② 研究項目：脳でのトキシコジェノミックス（神経活動依存性の遺伝子発現への影響を指標にしたスクリーニングと毒性分子メカニズム）

田代グループ

- ① 研究分担グループ長：田代 朋子（青山学院大学理工学部、教授）
② 研究項目：脳機能発達用オリジナル“Synapto array”をはじめとする高い定量性を持った新しいDNAマイクロアレイの開発

吉川グループ

- ① 研究分担グループ長：吉川 泰弘（東京大学大学院農学生命科学科、教授）
② 研究項目：サルなどを用いた知能発達、行動発達実験・評価系の開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Kuroda Y, Effects of endocrine disruptors on brain development - development of novel assay systems for risk assessment-, *Environmental Sciences* 10, Supplement (2003) 023-033
- Iwasaki T, Miyazaki W, Takeshita A, Kuroda Y, Koibuchi N. Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone-induced transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 299 (3): 384-8
- Kimura-Kuroda J, Nagata I, Negishi-Kato M, Kuroda Y. Thyroid hormone-dependent development of mouse cerebellar Purkinje cells in vitro. *Develop. Brain Res.* 2002, vol.137, 55 -65.
- Tabuchi, A., Sakaya, H., Kisukeda, T., Fushiki, H. and Tsuda, M., Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I, *J Biol Chem* (2002) 277 (39) 35920-31.
- Negishi T, Ishii Y, Kawamura S, Kuroda Y, Yoshikawa Y, Cryopreservation and primary culture of cerebral neurons from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) *Neuroscience Letters*, 2002 (328(1)) pp 21-24.
- Takeshita A, Taguchi M, Koibuchi N, Ozawa Y. 2002. Putative role of the orphan receptor SXR in the mechanism of CYP3A4 inhibition by xenobiotics. *J Biol Chem* (2002) 277 (36) 32453-8.
- Yoshioka K, Hosoda R, Kuroda Y, Nakata H. Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains. *FEBS Lett* (2002) 531(2): 299-

- Tabuchi A, Funaji K, Nakatsubo J, Fukuchi M, Tsuchiya T, Tsuda M.
Inactivation of aconitase during the apoptosis of mouse cerebellar granule neurons induced by a deprivation of membrane depolarization. *J Neurosci Res* (2003) 71(4): 504-15
- Shimokawa N, Okada J, Haglund K, Dikic I, Koibuchi N, Miura M. Past-A, a novel proton-associated sugar transporter, regulates glucose homeostasis in the brain. *J Neurosci* 22 (21) 9160-5
- Yoshioka, K., Saitoh, O. and Nakata, H. Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine A₁ and P2Y₁ receptors in living cells. *FEBS Lett.* 523 (2002) 147-151.

(2) 特許出願

なし