

「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

((財)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LD（学習障害）、ADHD（注意欠陥多動性障害）、高機能自閉症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環境化学物質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。

昨年度までの当チームの研究で神経活動依存性および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ペルメトリン、DDT、DES、PCB、水酸化PCBが判明した。甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現へのPCB類の影響をダイオキシンや他のPCB異性体について調べたダイオキシンやダイベンゾフランは阻害しないこと、その毒性の分子メカニズムから、甲状腺ホルモン系が、エストロゲン系と大きく異なっていることを示した。

また、多数の化学物質を迅速にスクリーニングする実験系を確立し、農薬などの環境化学物質の中で記憶・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をかく乱するものがあるか検討した。また活動依存性遺伝子発現の分子メカニズムをさらに詳しく明らかにした。

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）の開発と環境化学物質の影響

昨年度までに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、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が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。

本年度は新しい脳機能解析用DNAマイクロアレイ・「シナプトアレイ」を改良し、搭載遺伝子プローブを増やし、ver. 4とし、新しい技術を使い感度を大幅に上げることに成功した。

またラット、サルの母親への無投与による低用量バックグラウンド実験とBPA、PCBなどの投与実験による次世代行動への影響の観察実験を開始した。

[今後の見通し]

昨年度までに、当初目標としていた他に新たに追加したものなど主要な実験系のすべての立ち上げと、PCB、殺虫剤、農薬を始めとする内分泌かく乱物質一部環境化学物質の毒性検出に成功した。すなわち、重要な成果として、脳の機能発達に必須の甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現の低濃度PCB類による攪乱、脳内神経活動依存性遺伝子発現の殺虫剤・農薬などによる攪乱や、低濃度PCB類による神経細胞の分化・発達阻害が判明した。既に立ち上げた主要な実験系を用いて、学習障害（LD）、注意欠陥多動性障害（ADHD）自閉症など脳の機能発達障害への内分泌かく乱物質の影響の可能性について、「現実に日本人全体の体内（脳内）にかなりの量が蓄積しているPCB類のうち、どのPCB異性体・代謝物がどの程度の毒性を持ち、複合汚染として存在している殺虫剤、農薬などと共に、それらがどのようにLD、ADHD、自閉症の症状（ことに、この3つの脳発達障害児で共通に見られ、ときに併存する子ども毎の症状の複雑なばらつきheterogeneityやcomorbidityについて）と関連しているか」を中心に、遺伝子発現、神経細胞分化・発達、学習・社会性など行動レベルと脳の階層性に基づく各レベル毎に研究を進め、日本人全体の脳機能発達へ

のPCBや殺虫剤・農薬などの影響を査定するリスク評価に必要な、基礎毒性データを定量的に入手する。

2. 研究実施内容（主要なもの）

I. 鯉淵典之（群馬大学医学部・生理）グループ

甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現へのPCB類の影響をダイオキシンや他のPCB異性体について調べ、その毒性の分子メカニズムから、甲状腺ホルモン系が、エストロゲン系と大きく異なっていることを示した。

II. 田代朋子（青山学院大学理工学部・生化学）グループ

新しい脳機能解析用DNAマイクロアレイ・「シナプトアレイ」を改良し、搭載遺伝子プローブを増やし、ver.4とし、新しい技術を使い感度を大幅に上げることに成功した。

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

多数の化学物質を迅速にスクリーニングする実験系を確立し、農薬などの環境化学物質の中で記憶・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をかく乱するものがあるか検討した。また活動依存性遺伝子発現の分子メカニズムをさらに詳しく明らかにした。

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甲状腺ホルモンが調節している分子メカニズムをグリア細胞の関与を含めて明らかにした。

V. 吉川泰弘（東京大学大学院・生命科学・実験動物）グループ

ラット、サルの子母への無投与による低用量バックグラウンド実験とBPA、PCBなどの投与実験により次世代行動への影響の観察実験を開始した。

VI. 藤井聡（山形大学・医学部生理）グループ

記憶・学習で重要なシナプス可塑性ことに長期増強（LTP）長期抑圧（LTD）の分子メカニズムを明らかにした。

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

藤井グループ

- ① 研究分担グループ長：藤井聡（山形大学医学部、助教授）
- ② 研究項目：記憶・学習でのシナプス可塑性の生理・分子メカニズム

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

黒田グループ

- 黒田洋一郎 子どもの行動異常・脳の発達障害と環境化学物質汚染：PCB、農薬などによる遺伝子発現のかく乱 科学、73 1234-1243 (2003)
- 田代朋子、黒田洋一郎 トキシコジェノミックスと新しいDNAマイクロアレイ 科学、74, 28-30 (2004)
- 黒田洋一郎 現代日本での「毒」問題-身近な毒の知識を得るシステムを 科学、74, 16-17 (2004)
- Kuroda Y. Effects of Endocrine Disruptors on Brain Development -Development of Novel Assay Systems for Risk Assessment- Environ. Sci. 10 023-033 (2003)
- Nakata, H., Yoshioka, K. and Saitoh, O.: Hetero-oligomerization between adenosine A₁ and P2Y₁ receptors in living cells: Formation of ATP-sensitive adenosine receptors. *Drug Development Research* 58:340-349 (2003)
- Nakata, H.: Stimulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) pathway by suramin with concomitant activation of DNA synthesis in cultured cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308:744-753 (2004)
- Kamiya, T., Saitoh, O., Yoshioka, K. and Nakata, H.: Oligomerization of adenosine A_{2A} and dopamine D₂ receptors in living cells. *Biochem. Biophys.*

Res. Commun. 306: 544-549(2003)

- Yoshioka, K. and Nakata, H.: Purinergic receptor complex: generating adenine nucleotide-sensitive adenosine receptors. *J. Pharmacol. Sci.* 94:88-94 (2004)
- Yoshioka, K., Hosoda, R., Kuroda, Y. and Nakata, H. : Hetero-oligomerization of adenosine A₁ receptors with P2Y₁ receptors in rat brains. *FEBS Lett.* 531:299-303(2002)
- Masuho, I., Itoh, M., Itoh, H., and Saitoh, O. The mechanism of membrane-translocation of RGS8 induced by Ga expression. *J. Neurochem.* 88,161-168
- Saitoh, O. and Odagiri, M. RGS8 expression in developing cerebellar Purkinje cells. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 309, 836-842(2004)
- Saitoh, O., and Kubo, Y. Biochemical and physiological properties of regulator of G protein signaling 8. in: *Recent Research Developments in Biophysics and Biochemistry (Research Signpost)* 3, 269-289 (2003)
- Saitoh, O., Masuho, I., Itoh, M., Abe, H., Komori, K., and Odagiri, M. : Distribution of regulator of G protein signaling 8 (RGS8) protein in the cerebellum. *THE CEREBELLUM* 2, 154-160(2003)
- Midori Kato-Negishi, Kazuyo Muramoto, Masahiro Kawahara, Ritsuko Hosoda, Yoichiro Kuroda, Masumi Ichikawa.: Bisculline induces synapse formation on primary cultured accessory olfactory Bulb neurons. *European J Neuroscience* (2003) 18 : 1343-1352
- Shi-ichi Kawakami, Kazuyo Muromoto, Masumi Ichikawa, Yoichiro Kuroda.: Localization of microtubule-associated protein (MAP)1B in postsynaptic Desities of the rat cerebral cortex. (2003) 23: 887-894

津田グループ

- Tabuchi, A., Funaji. K., Nakatsubo, J., Fukuchi, M., Tsuchiya, T. and Tsuda, M., Inactivation of aconitase during the apoptosis of mouse cerebellar granule neurons induced by a deprivation of membrane depolarisation. *J. Neurosci. Res.* 71 504-515. (2003)
- Kawahara, M., Kato-Negishi, M., Hososda, R., Imamura, L., Tsuda, M. and Kuroda, Y., Brain-derived neurotrophic factor protects cultured rat hippocampal neurons in alminum maltolate neurotoxicity. *J. Inorg. Biochem.* 97 124-31. (2003)
- Konoha, K., Imamura, L., Tsuda, M. and Kawahara, M., Alminum maltolate inhibits brain-derived neurotrophic factor-induced intracellular free calcium elevations in cultured rat hippocampal neurons. *Biomed. Res.*

Elements 14 290-2. (2003)

- 津田正明 脳由来神経栄養因子BDNFと記憶・学習、*ファルマシア* 39 945-949. (2003)
- 津田正明 細胞内カルシウムによる神経栄養因子の発現調節機構：神経栄養因子-その新しい展開, *Clinical Neuroscience* 22 257-9. (2004)

吉川グループ

- Negishi T, Kawasaki K, Takatori A, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on the behavior of offspring in F344 rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2003; 14: 99-108.
- Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Primary culture of cortical neurons, type-1 astrocytes, and microglial cells from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) fetuses. *Journal of Neuroscience Methods* 2003; 131: 133-140.
- Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Inhibition of staurosporine-induced neuronal cell death by bisphenol A and nonylphenol in primary cultured rat hippocampal and cortical neurons. *Neuroscience Letters* 2003; 353: 99-102.
- Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Endogenous dopamine maintains synchronous oscillation of intracellular calcium in primary cultured-mouse midbrain neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2004; 24: 51-61.

鯉淵グループ

- Haglund K, Shimokawa N, Szymkiewicz I, Dikic I. Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12191-12196.
- Koibuchi N, Ohta M, Miyazaki W, Jingu H, Yousefi B, Shimokawa N, Iwasaki T, Okada J. : The effect of thyroid hormone on gene expression in the developing nervous system, and the influence of endocrine disrupters in its process. (2003) *Environ Sci* 10: 35-42.
- Koibuchi N, Jingu H, Iwasaki T, Chin WW. : Current perspectives on the role of thyroid hormone in growth and development of cerebellum. (2003) *Cerebellum* 2: 279-289.
- 鯉淵典之 セットポイント (2003) *カレントセラピー* 21: 86
- 鯉淵典之、ユセフィ ベヘナヅ、邱春紅、神宮久香、梅津元昭：甲状腺ホルモン作

用解析のための動物モデル (2003) ホルモンと臨床 51: 867-874.

- Qiu C-H, Ohe M, Koibuchi N, Matsuzaki S.: Apoptosis in the epididymal epithelium of adult male golden hamster exposed to diethylstilbestrol. (2004) *J Histochem Cytochem* 52: 187-192
- 鯉淵典之, 岩崎俊晴: 内分泌攪乱物質の甲状腺ホルモン系への影響 (2004) *現代化学* 396: 62-66.

藤井グループ

- Fujii, S., Mikoshiba, K., Kuroda, Y., Ahmed, T.M., Kato, H., Cooperativity between activation of metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in the induction of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Neuroscience Research* 46 (2003) 509 - 521.
- Fujii, S., Sasaki, H., Mikoshiba, K., Yamazaki, Y., Kuroda, Y., Ahmed, T.M., Kato, H., A chemical LTP induced by co-activation of metabotropic and N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in hippocampal CA1 neurons. *Brain Research*, 999(1) (2004) 20-28.
- 藤井聡、黒田洋一郎: 記憶と時間、*Brain medical*, 15 (2003) 163-1

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数: なし