

「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

記憶学習の中心である脳海馬でチトクロムP450系が合成するニューロステロイド（女性・男性ホルモンなど）はニューロモジュレーターであり、神経活動に急性的・慢性的に作用する。我々は、海馬神経細胞のシナプス伝達が、女性ホルモンによって急性的に大きな制御を受けることを見出し、環境ホルモンがこの作用に攪乱を与えることも見出している。これは神経のシナプスにエストロゲン受容体が存在して、これを経由して数分で記憶学習に効果を発揮する、急性効果である。神経シナプス接合に対する形態変化も、急性効果として顕著に見られる。

2. 研究実施内容

1) 海馬のニューロステロイド合成活性と、環境ホルモンによる攪乱解析

海馬ニューロステロイド合成系が女性ホルモンを合成している機構を調べる為に、放射性ステロイド基質を海馬スライスに添加して代謝解析を行っている。代謝産物は、有機溶媒で抽出後、HPLCを用いて分離し解析した。その結果、コレステロール→プレグネノロン→デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)→アンドロステンジオン→テストステロン→エストラジオールという経路に加え、及びDHEA→アンドロステンジオール→テストステロン→エストラジオールという新しい経路を発見した。プレグネノロン→DHEAはチトクロムP45017 α によって触媒されており、またテストステロン→エストラジオールとアンドロステンジオン→エストロンはチトクロムP450aromによって触媒されている。これはP45017 α やP450aromの阻害剤を加えておくと、DHEAやエストラジオールの生成が大きく低下することで確認できる。DHEA→アンドロステンジオールは17 β -HSD(type 1, 3)によって触媒されている。以上の性ホルモン合成活性には雄と雌の海馬に顕著な差がない。すなわち、雄も女性ホルモンを合成し、雌も男性ホルモンを合成する。海馬のような高次脳機能を司る器官では、雄雌の差は少ないのかもしれない。以上の結果はこの分野の長年の懸案を解決した重要な結果であり、Proc. Natl. Acad. Sci (2004)に掲載された。また、堤チームとの共同研究で、BPAを暴露した母ラットから生まれた仔ラットを用いて、神経発達が攪乱された海馬内での性ステロイド合成が、変動するかどうか

を解析した。母親に与えるBPAを0.1, 1, 10, 50 mg/Lで変化させて、4週齢の仔ラットの海馬で測定した。最も低濃度0.1mg BPA投与が一番効果が顕著であり、アンドロステンジオン→テストステロン、テストステロン→エストラジオールの合成能が増加していた。

2) 海馬ニューロステロイド合成酵素系の神経局在の同定

ニューロステロイド合成酵素系の各蛋白質の抗体組織染色やWestern Blot による同定を行なった。StAR, P450scc, P45017 α , P450aromなどの酵素蛋白はCA1-CA3の錐体神経細胞とDGの顆粒神経細胞に局在していた。グリア細胞にはこれら蛋白質は少なかった。更に抗体の存在しない17 β -HSD type 1, 3, 4に関しては、RT-PCR による酵素の mRNAの同定を行った。その存在量は副腎皮質や精巣の500分の一程度であるが、海馬のみで局所的に働くことを考えると、十分な量であると思われる。

ニューロステロイド合成酵素P45017 α , P450aromが神経細胞のどの部分にあるのかを、電子顕微鏡を用いて金コロイド免疫抗体染色像を観察することで調べた結果、CA1-CA3の錐体神経細胞とDGの顆粒神経細胞のシナプス部分（軸策端末とスパインの両方）にP45017 α , P450aromが存在していることを発見した。これは、性ステロイドが神経シナプスで局所的に合成されることを鮮明に示しているため、重要な発見である。Endoplasmic Reticulum にはP45017 α , P450aromが存在していると期待していたが、短期記憶が蓄えられる神経シナプスにも局在していた。この記憶学習を行う部分に、環境ホルモンが作用することを暗示している。これまで成獣の脳には、P45017 α は存在しないと信じられていて、組織染色でも染まらず、mRNAも無いという報告ばかりであった。この為現在に至るまで、下流のエストラジオール・テストステロンなどの性ホルモンは脳で合成されるのではなく、精巣・卵巣で合成されて、血流に載って脳に到達し、神経に作用すると信じられてきた。しかし今や事実はそうではなく、脳の神経細胞でコレステロールから性ホルモンが合成されているのである。以上の結果はこの分野の長年の懸案を解決した重要な結果であり、Proc.Natl.Acad. Sci (2004)に掲載された。

3) エストロジェン受容体の神経シナプス局在の同定

海馬の神経はエストラジオールの作用を大きく受けるが、未だ世界的に、海馬の主要なグルタミン酸作動性の神経細胞（錐体細胞や顆粒細胞）にはエストロジェン受容体が存在するという明確な証明がなかった。核内受容体としてのER α すら見つかっていなかった。我々は、これまで世界中で使用されてきた著名なER α の抗体（例えば MC-20抗血清）は、不純抗体を多く含む抗血清として使用されており、卵巣や脳視床下部で染色すると67 kDaのER α に反応するが、海馬・大脳皮質・小脳などのER α が極めて少ない部位では、ER α とうまく反応せず、63kDa や 97kDaなどの未同定の蛋白に結合してしまうことを、Western Blot や電子顕微鏡を用いた免疫金抗体染色法で発見した。従ってこれまで発表されている多くの論文は、海馬スライスでの組織染色、免疫電子顕微鏡観察、単離した培養神経細胞の染色に関して深刻な間違いを含んでいる。この難問題に対して、エストロジェン受容体ER α の新しい高純度精製抗体RC-19を新たに作成して（小南グループ）、問題を解決した。RC-19抗体を用いて、同一のエストロジェン受容体ER α が海

馬神経シナプス膜分画と核内に存在することをWestern Blot で示した。海馬スライスの組織染色観察は、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を示している。グリア細胞はやはりER α が非常に少ない。神経シナプスでの局在を蛋白質サイズの分解能で解析するため、電子顕微鏡による免疫金抗体染色の解析を行い、錐体神経細胞と顆粒神経細胞のシナプス部分と核にER α が確かに局在していることを発見した。これは、エストラジオールと環境ホルモンが神経シナプスで局所的に作用出来ることを鮮明に示している。ER α のmRNAは、ラット成獣に於いて海馬に発現している（4週齢卵巣の約500分の1）。ER α のmRNAのスプライスバリエーションの探索を、各構成エクソンごとに徹底的に行ったが、全長mRNA以外にはスプライスバリエーションは存在しなかった。以上の結果は、長年にわたり謎とされてきた、海馬神経細胞へのエストラジオール作用を解明する大きな一歩となる。神経シナプスでのER α 受容体の存在が確定することで、神経シナプス伝達・記憶学習の環境ホルモンによる攪乱を分子論的に論じることがはじめて可能になった。これ等の結果をまとめて現在論文投稿中であるが、超一流誌に掲載される可能性が高い。

4) 電気生理による海馬長期増強への効果から記憶学習能を解析

電気生理はニューロステロイドの記憶学習の急性効果を測定する方法としては、最も高感度である。ラット海馬スライスを用いて、テタヌス刺激によるCA1領域での長期増強LTPを測定しながら、エストラジオールとBPA, DESの急性効果（30分間の灌流で作用させた効果）を解析した。10 nMエストラジオールはテタヌス刺激による長期増強を促進した。一方BPAは単独投与では10—100 nMで長期増強には影響を与えないが、BPAをエストラジオールに混ぜて作用させると、エストラジオールが示す長期増強の促進効果を抑制した。これに対し10 nM DESは長期増強を促進し、この効果はエストラジオールとほぼ同じであった。これらの効果はER α の阻害剤ICI 182,780で抑制された。以上の実験結果は、環境ホルモンの記憶学習への攪乱効果ははっきりと存在し、その効果は環境ホルモンの種類に強く依存して、促進・抑制の両方の効果があることを示唆している。現在は長期抑圧LTDに対するエストラジオールやDESの効果を測定している。

5) シナプス形態解析による海馬神経細胞でのエストロゲン・環境ホルモン急性効果の解析

海馬神経のシナプス結合（記憶を蓄える部位）はエストラジオールの作用を大きく受けることがわかった。海馬スライス中の単一神経に蛍光色素をマイクロインジェクションして、個々のスパイン（シナプス後細胞）を可視化する方法を確立した。海馬スライスにエストラジオールを30-120分作用させるだけで、スパイン形状が変化することを発見した。これはスパインのタイプ（mushroom、filopodia、thin、stubby）のうち長さの長いfilopodiaが増加することによる。このような短時間ではスパイン数の増加は認められなかった。1 nM エストラジオールは10 nMや0.1 nM より効果があった。NMDA受容体をブロックするとこのエストラジオール効果は消滅するので、NMDA受容体を介するCa流入が必要だと思われる。面白いことに、ビスフェノールAもエストラジオールに似

たような効果を発揮するが、現在詳しく解析中である。これらの急性効果は業界の常識を覆す全く新しいもので、論文を執筆中であるが、超一流誌に掲載される可能性が高い。今後DESやPCBも海馬スライスに作用させて、神経スパイン変化の解析を行う予定である。

6) 小脳プルキンエ神経の発達解析

小脳プルキンエ神経細胞は、新生仔脳の発達に伴い、生後20日に渡り神経細胞突起が大きく成長するので、環境ホルモンの脳発達に対する、遺伝子を介した遅い慢性的な影響を解析するのに非常に適している。1週齢のラットで、プルキンエ神経細胞の発達に及ぼす、エストラジオール・オクチルフェノール・BPAの作用を解析している。これらの薬品を、数日間に渡り小脳の周りの液に注入し作用させた後、小脳スライスを作成して、カルビンジン抗体で組織染色し、プルキンエ細胞の突起の成長を解析した。エストラジオール・オクチルフェノール及びBPAは共に、プルキンエ神経細胞突起の発達を促進し、シナプス接合部のスパインの数も増加させることがわかった。しかし同じ効果を引き起こすにはBPAやオクチルフェノールはエストラジオールの100倍の濃度を必要とした。更にこのプルキンエ神経細胞突起の発達促進効果は、エストロゲン受容体の阻害剤であるタモキシフェンで抑制された。これ等の実験で、雄雌による性差はほとんど観測されなかった。mRNA解析でエストラジオール受容体ER β は新生仔期から成獣になるまで存在していることを確認したが、ER α は新生仔期には多いが、成獣になると1/10程度になってEP β が主になる。

3. 研究実施体制

川戸グループ (この1グループのみ)

東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 (川戸佳)

研究実施項目：海馬での記憶学習攪乱の解析

概要：

内分泌攪乱物質による海馬ニューロステロイド作用への攪乱を、電気・Ca信号により可視化解析。海馬エストロゲン受容体の同定。

ニューロステロイド合成P450系の代謝活性の環境ホルモンによる攪乱の解析。

海馬や小脳の神経回路におけるニューロステロイド作用の環境ホルモンによる攪乱を解析。

* (注) 平成15年度から、P450代謝解析グループ(小南思郎)及び脳発達解析グループ(筒井和義)は独立グループ制をやめた。これは研究が進展し、川戸グループ内で同じ目標で一体的に研究することが多くなり、異なる目標を掲げて運営する独立グループ制は実態に合わなくなったためである。これ等の参加者は川戸グループに移動した。

またプローブ開発グループ(長野哲雄)は平成15年より廃止した。これは研究の進展上必要がなくなった為である。参加者はプロジェクトから離脱した。

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

- Kawato S.
Endocrine disrupters as disrupters of brain function: a neurosteroid view-point,
Enviro Sci, 11, 1-14, 2004
- Hojo Y., Hattori T., Enami T., Furukawa A., Suzuki K., Ishii H., Morrison J. H., Janssen W. G.M., Mukai H., Kominami S., Harada N., Kimoto T., and Kawato S.
Adult Male Rat Hippocampus Synthesizes Estradiol from Pregnenolone by Cytochromes P45017a and P450 Aromatase Localized in Neurons
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 865-870, 2004
- Ogiue-Ikeda M., Kawato S., Ueno S.
"The effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on long-term potentiation in rat hippocampus depends on stimulus intensity."
Brain Res 993, 222-226, 2003
- Ogiue-Ikeda M., Kawato S., Ueno S.
The Effect of transcranial magnetic stimulation on long-term potentiation in rat hippocampus.
IEEE Trans Magn 39, 3390-3392, 2003
- Shibuya K., Takata N., Hojo Y., Furukawa A., Yasumatsu N., Kimoto T., Enami T., Suzuki K., Tanabe N., Ishii H., Mukai H., Takahashi T., Hattori T., and Kawato S.
Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction, **Biochim. Biophys. Acta** 1619, 301-316, 2003
- Kawato S., Yamada M., and Kimoto T., Neurosteroids are 4th generation neuromessengers: Cell biophysical analysis of steroid signal transduction, **Adv. Biophys.** Vol.37, 1-48, 2003
- Sakamoto H, Mezaki Y, Shikimi H, Ukena K, Tsutsui K. Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell.
Endocrinology, 144:4466-4477, 2003
- Patte-Mensah C, Kappes V, Freund-Mercier M-J, Tsutsui K, Mensah-Nyagan AG. Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450side chain cleavage, in sensory neural pathways. **J. Neurochemistry**, 86:1233-1246, 2003
- Tsutsui K, Ukena K, Sakamoto H. A novel aspect of the cerebellum:

- Biosynthesis of neurosteroids in the Purkinje cell. **Cerebellum**, 2:215-222, 2003
- Tsutsui K, Sakamoto H, Ukena K. Biosynthesis and action of neurosteroids in the cerebellar Purkinje neuron. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, 85:311-321, 2003
 - Aste N, Honda S, Harada N. Forebrain fos responses to reproductively related chemosensory cues in aromatase knockout mice. **Brain Res. Bull.** 60, 191-200, 2003
 - Matsumoto T, Honda S, Harada N. Alteration in sex-specific behaviors in male mice lacking the aromatase gene. **Neuroendocrinology**, 77, 416-424, 2003
 - Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. The aromatase knockout (ArKO) mouse provides new evidence that estrogens are required for the development of the female brain. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 1007, 251-262, 2003
 - Kishimoto W, Hiroi T, Shiraishi M, Osada M, Imaoka S, Kominami S, Igarashi T, Funae Y.
Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain.
Endocrinology 145, 699-705, 2004
 - Izumi S, Kaneko H, Yamazaki T, Hirata T, Kominami S.
Membrane topology of guinea pig cytochrome P450 17alpha revealed by a combination of chemical modifications and mass spectrometry. **Biochemistry.** 42, 14663-9, 2003
 - Araki, N., T. Hatae, A. Furukawa and J. A. Swanson (2003). Phosphoinositide-3-kinase-independent contractile activities associated with Fcγ-receptor-mediated phagocytosis and macropinocytosis in macrophages. **J Cell Sci** 116(Pt 2): 247-57.
 - Tomita, S. Jiang, H. B. Ueno, T. Takagi, S. Tohi, K. Maekawa, S. Miyatake, A. Furukawa, A. Gonzalez, F. J. Takeda, J. Ichikawa, Y. Takahama, Y. T cell-specific disruption of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) gene causes resistance to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced thymic involution. **J Immunol** 171, 1102-6, 2003
 - Miyatake R., Furukawa A., Matsushita S., Higuchi S., Suwaki H.; Functional polymorphisms in the sigma1 receptor gene associated with alcoholism. **Biol Psychiatry**, 55, 85-90., 2004
 - Sekiguchi, M., Chiyo, T., Kawahara, M. and Ohta, Y.
Effects of progesterone on intracellular Ca²⁺ levels of immortalized hypothalamic neurons (GT1-7): Fluorescence Imaging Study, **Bioimages** 11, 67-73, 2003

- Chiyo, T., Yamazaki, T., Aoshika, K., Kominami, S. and Ohta, Y.
Corticosterone Enhances ACTH-induced Calcium Signals in Bovine Adrenocortical
Cells,
Endocrinology 144, 3376-3381, 2003

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0 件 (CREST研究期間累積件数：0件)