

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「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」
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）
研究代表者
黒田 洋一郎（(財) 東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所 客員研究員）
主たる研究参加者
津田 正明（富山医科薬科大学 薬学部 教授）
吉川 泰弘（東京大学 大学院農学生命科学研究科 教授）
田代 朋子（青山学院大学 理工学部 教授（平成12年6月～））
鯉淵 典之（群馬大学 大学院医学系研究科 教授（平成13年4月～））
藤井 聡（山形大学 医学部 助教授（平成15年4月～））

3. 研究内容及び成果：

医学的には脳機能の微小な発達障害とされる、学習障害、注意欠陥多動性障害、高機能自閉症児が全学童の6.3%（約17人に1人：2003年文部科学省調査結果）を占めている。また、ここ50－60年間で日米等の子供の行動異常が増加しており、大きな社会問題となっている。遺伝的変異が原因とすれば人口全体への広がりには数千年を要すはずであり、何らかの環境因子に起因する事は確実と思われる。遺伝子は正常でも、環境因子による発現攪乱によって発達障害が発生し得る。子供・若者の示す知能障害・行動異常は多種多様であるが、その多様性は、胎児・新生児期脳の、どの部分の発達が、どの時期に、どの様な障害を受けたか、に起因するものと考えられる。内分泌かく乱物質の脳機能発達への影響が危惧されるが、この分野の研究は殆ど行われておらず、科学的知見が著しく不足している。また、ヒト脳高次機能に関しては、脳神経科学的にも未解明である上に、行動毒性学・毒性試験の対象外であった為、基礎的実験手法から開発する必要がある。

これらの背景から、本研究では①遺伝子・細胞・行動レベルでの解析法を開発する、②神経活動依存性遺伝子発現の脳機能発達への影響を解析する、③甲状腺ホルモンの脳機能発達への影響を解析する、④網羅的遺伝子発現解析を可能にするオリジナルDNAマイクロアレイを開発する、⑤サルを用いた次世代行動試験法を開発する、⑥内分泌かく乱物質の影響を解明する、事を目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

(1) 内分泌かく乱物質が神経活動依存性遺伝子発現のかく乱を介して脳の発達に与える影響（津田グループ）

生後の脳神経系発達は、外界刺激によって惹起される、神経活動に大きく依存している。この過程は、厳密な遺伝的プログラムに則った発生過程に対して、活動依存的な脳神経系形成過程と呼ばれ、神経活動が引金となって、準備されていた遺伝的プログラムが作動し始める過程と捉える事ができる。

脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子のCa²⁺シグナル応答性に転写因子CREBが関与している事を明らかにした。Ca²⁺シグナルで活性化される活動依存的遺伝子発現制御系が、神経機能発現に中心的な役割を果している事、アルツハイマー病やポリグルタミン病等の神経変性にも関係している事、が示唆された。神経活動依存的遺伝子発現は、複数の化合物による相加的抑制を受ける事を明らかにした。単独では無毒性濃度であっても、複数の物質が相加的に作用し、毒性発揮有効濃度に達する可能性が示唆された。

(2) 内分泌かく乱物質が甲状腺ホルモン系を介して脳の発達に与える影響（鯉淵グループ）

甲状腺ホルモン (TH) が結合した甲状腺ホルモン受容体 (TR) は、DNA上の甲状腺ホルモン応答配列 (TRE) に結合して遺伝子発現を制御している。TR介在転写活性化をルシフェラーゼ遺伝

子発現として観察するレポーター・アッセイ系を開発した。THの発達期中枢神経系への作用は臨界期に限られるが、TH感受性は転写共役因子SRC-1に支配されている事が示唆された。他の候補支配因子として、レチノイドX受容体 (RXR) 特異的結合蛋白、OVCOV1遺伝子 (ovarian cancer over expressed -1) を単離した。OVCOV1は、核内受容体非選択的転写抑制因子として機能している事が示唆された。

水酸化PCBはTR転写活性を抑制する事を明らかにした。TR転写活性抑制は、TR/TRE結合の部分的阻害による事が示唆された。ダイオキシンとコプラナー型PCBは、TH依存性遺伝子発現を阻害しない事、他のPCB類とは異なる毒性を示す事を明らかにした。低濃度 (10^{-8} M) 水酸化PCBが、神経細胞L型 Ca^{2+} チャンネルを介するカルシウム流入に影響を及ぼす事が示唆された。

(3) 遺伝子発現変動を解析するためのオリジナルDNAマイクロアレイの開発 (田代グループ)

脳機能発達関連遺伝子発現を評価する独自の「シナプトアレイ」を開発した。440遺伝子を搭載し、 $\pm 20\%$ 以上の発現比があれば高信頼度の評価が可能 (市販品の多くは2倍以上、最高性能でも $\pm 50\%$) な、安価なカスタムアレイである。シナプス形成関連遺伝子群発現のパターン解析が可能である事、シナプス形成異常の検出が可能である事、を明らかにした。甲状腺機能低下マウスの発現パターンは、生後15日で正常と大きく異なる事、4日で明瞭な差が認められる事、を明らかにした。テトロドキシンの神経活動依存性遺伝子発現への影響を解析し、発現上昇する432種、低下する14種の遺伝子を同定した。

慢性的ミトコンドリア機能阻害に起因する酸化ストレスは、様々な神経変性疾患の要因の一つと考えられている。ミトコンドリア阻害による神経毒性が疑われる物質も少なくない。ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 阻害剤に対するドーパミン・ニューロンの脆弱性、形態変化誘導濃度以下の遺伝子発現変動、を明らかにした。

(4) 環境化学物質の培養細胞系でのシナプス形成、樹状突起伸展への影響 (黒田グループ)

1) 培養大脳皮質細胞間の機能的シナプス形成への影響を評価するアッセイ系大脳皮質には脳の高次機能を支える神経回路網が集中して存在している。神経回路網形成の要となるシナプス形成の評価系として、ラット大脳皮質初代培養神経細胞の長期培養法を確立した。培養数日で神経回路網が再構築され、生体内形成回路網に類似した特性を示す。高密度シナプス形成により、ほぼ全ての細胞で Ca^{2+} 濃度の同期的振動 (synchronous oscillation) が生じ、一ヶ月以上持続する。細胞内 Ca^{2+} 振動の振動数測定により培養神経細胞間シナプス数を定量できる事、低濃度THがシナプス形成を促進する事、除草剤アミロロール等がシナプス形成を阻害する事を明らかにした。

2) マウス小脳プルキンエ細胞培養系を用いた内分泌かく乱物質アッセイ系TH欠乏症の小脳では顕著な異常が認められ、小脳の唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞の分化・発達にTHが重要な役割を果たしている事は明らかである。生後1日のマウス小脳を利用し、プルキンエ細胞培養系を確立した。プルキンエ細胞樹状突起の分化・発達にはTHが必須である事、水酸化PCB (106) がTH依存性突起伸展を顕著に阻害する事、極低濃度 5×10^{-11} Mから有意に阻害する事、異性体によって効果が異なる事 (121、159は阻害; 112、165、187は効果なし)、鯉淵らの遺伝子発現への影響と一致した結果である事、ビスフェノールA (BPA) も極低濃度で阻害する事、を明らかにした。

(5) 環境化学物質の脳機能発達に与える影響のサル等を用いた多角的評価 (吉川グループ)

行動学的評価法として、サルを用いた、母子行動試験、4段指迷路試験 (記憶学習力)、出会わせ試験 (同世代2個体の行動により社会性を評価)、アイコンタクト試験 (観察者に対する意識の定量化) を開発した。妊娠期・授乳期ダイオキシン曝露が出会わせ試験で有意な影響を示す事、妊娠後期母体血中PCB濃度と指迷路試験に弱い正の相関が認められる事、を明らかにした。ラットを被験体とした注意力測定法を開発した。周産期抗甲状腺剤投与が、学習能力には影響せず、注意力の持続性を低下させる事を明らかにした。周産期甲状腺機能低下状態が、記憶学習力低下、新奇場面・電気刺激への恐怖心の欠如、無刺激下での活動周期の変調等、注意欠陥多動性障害 (ADHD) 様行動を誘起する事を明らかにした。

サル胎仔大脳皮質由来初代神経細胞、アストロサイト、グリア細胞の無血清培養法を確立した。BPA、ノニルフェノールは神経細胞死抑制効果を示す事、Caspase-3活性阻害による事、を明らか

にした。ラット胎仔大脳皮質由来神経細胞の Ca^{2+} 濃度同期的振動はセロトニンで抑制される事を明らかにした。神経活動依存的回路網形成がセロトニンでコントロールされている可能性が示唆された。BPAの体内動態には種差が有る事、サルはラットに比べ、吸収力は数十倍高く、排泄能力は低い事、を明らかにした。

(6) 海馬での記憶・学習の分子・細胞メカニズム (藤井グループ)

長期増強 (Long-term potentiation : LTP) は記憶・学習との関係で注目されている。NMDA型グルタミン酸受容体活性化に加え、代謝型グルタミン酸受容体活性化により誘導が、アデノシン受容体活性化により抑制が掛かる事を明らかにした。ラットへの慢性的アルコール投与は、cAMP代謝、PKA活性の持続的上昇を通して、LTP誘導を促進する事が示唆された。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

「内分泌かく乱物質問題」の本質的理解には、内分泌かく乱作用の有無を判定するための適切な評価法、作用機構を解明するための研究手法が必要であるが、多くの研究分野／研究領域で両者共に決定的に不足しているのが現状である、と言っても過言ではない。とりわけ、基礎科学的にも未解明の問題を数多く含む脳神経科学分野では、評価法の開発のみならず、適切な研究手法を開発する事が緊急かつ重要な課題であると言う事ができる。各種化学物質の脳神経系発達への影響を遺伝子・細胞・個体レベルで研究する手法を数多く開発した事は、神経毒性学のみならず基礎神経科学の観点からも、極めて重要かつ大きな成果であり、高く評価される。また、神経細胞・甲状腺ホルモン・化学物質を繋げる事によって、神経毒性学に新しい道を拓いた事も高く評価される。

新規に開発された評価法／研究手法を用いて挙げられた成果は、個々には質の高い重要なものが含まれてはいるが、総体的には、謂わば、点の集まりで未だ線として繋がっていない状態の萌芽的成果と云わざるを得ない。その事が科学的インパクトを限定的に止めている原因と思われる。研究の将来展望が開け、重要な礎石が築かれた段階と思われるため、今後の進展に期待したい。成果の体系化次第では、生物学も異物応答学も書き換えられる可能性が有ろう。

研究成果は論文 (国内誌14報、国際誌91報)、学会 (国内95件、国際学会14件) 発表されている。研究の性格から特許出願はない。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

内分泌かく乱作用の研究は主として生殖ホルモン系を中心に進められて来た。「脳神経系への影響」と云う極めて重要ではあるが困難な課題に取り組み、分子・細胞・個体レベルでの研究手法を数多く開発した事は高く評価される。それらの手法は内分泌かく乱作用の研究に止まらず、神経毒性学、基礎神経科学にも大きく貢献するであろう。高感度DNAマイクロアレイは、基礎・臨床医学、発生・発達生物学の分野のみならず、子供の行動異常や社会的不適応の問題を科学的に解明して行く上でも強力な武器となろう。また、従来は心理学的研究の対象であった、サルの行動を毒性学的指標として確立しつつあり、ヒト脳高次機能への影響を正確に推定するための重要な基盤となろう。今後のさらなる進展・展開に期待したい。

本研究は、最近話題になる事の多い少年犯罪や引きこもり等との関連から、社会的・教育的にも大きな関心が持たれるものであり、一般社会から可及的速やかな「成果／回答」を求められている課題の一つであるという事ができる。しかしながら、脳神経系発達に重要な役割を果たしている甲状腺ホルモン系に対するPCBの作用を明らかにし、サルの実験でPCBの仔の脳神経系発達への影響を観察できた事は評価するが、これらの成果を余りに性急に自閉症をはじめとする臨床的問題に結びつけるべきではないと考える。現在社会で問題となっている子供の行動異常等が化学物質に起因するものか否かは、別の評価系によっても検証されなければならないであろう。学習障害、注意欠陥多動性障害、高機能自閉症との関連性は社会的にも極めて重要な問題であり、今後の進展、早期の成果達成に期待したい。

4－3. その他の特記事項 (受賞歴など)

研究期間中に、川崎勝義氏が星薬科大学薬学部講師に就任した。

チーム主催の国際シンポジウムを1回、一般向け公開シンポジウムを1回開催した。