

「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、男性ホルモンなど）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、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經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。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、NMDA受容体に作用する経路や、神経シナプス数の増大を引き起こしている経路を解明する。このようにして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、速やかに脳に作用出来る。環境ホルモンが、エストラジオールの受容体を介して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。発育期の脳での効果は重要で、脳の性分化の決定や脳神経系の発達には性腺や脳内のステロイドが大きく関与しているはずなので、環境ホルモンが脳神経ネットワーク発育を攪乱するだろう。更に胎児/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再生を促進するだろう。従って、女性ホルモン類似環境ホルモンが脳神経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

脳記憶学習の中枢である海馬の神経伝達に対する、環境ホルモンの攪乱作用を研究している。

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。

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、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た。代謝産物は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→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、アンドロステンジオン→エストロン→エストラジオール

ルという2つの経路を発見した。プレグネロン→DHEAは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P450aromによって触媒されていた。アンドロステンジオン→テストステロンとエストロン→エストラジオールは17 β -HSDによって触媒されている。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を確認した。

ビスフェノールAを暴露した母ラットから生まれた仔ラットを用いて、DHEAからのテストステロンやエストラジオール合成が、変動するかを解析している。4週齢の仔ラットに於いて、最も低濃度0.1mg BPA投与が一番効果が顕著であり、テストステロンとエストラジオールの合成能が低下していた。また未同定のステロイド合成が増加していた。

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RT-PCR によるこれら酵素 (17 β -HSDも含む) の mRNAの同定にも成功した。副腎皮質や精巢の300分の一程度であった。電子顕微鏡を用いて金抗体染色を行うことで、上記の神経細胞のシナプス中にP45017 α , P450aromが分布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。神経シナプスで環境ホルモンが作用することを暗示している。

3) エストロジェン受容体の神経シナプス局在の同定

脳海馬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、海馬神経細胞にはエストロジェン核受容体ER α すら見つかっていなかった。これは視床や扁桃体など内分泌を司り、エストロジェン核受容体ER α がはっきりと存在する神経細胞と、記憶学習をつかさどる海馬の神経細胞との大きな差だと認識されてきた。我々は苦難の研究の結果、これまで世界中で使用されてきた著名なER α の抗体は、全て不純抗体を多く含む抗血清であり、卵巣や脳視床下部では67kDa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 と反応せず、97kDaなどの未同定の蛋白に結合してしまうことをWestern Blot や電子顕微鏡金抗体染色法で発見した。これまで発表された多くの論文は間違いであることを示す結果である。この難問題を解決するため、新しいエストロジェン受容体ER α の精製抗体を新たに作成することで、問題を解決するところにたどり着いた。本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 で確かめた。凍結スライス組織染色法で光学顕微鏡を用いて、ER α の抗体に反応する蛋白がCA1-CA3の錐体神経細胞とDGの顆粒神経細胞に局在することを解析している。神経シナプスでの局在を解析するため、シナイ山医科大学との共同研究を行っている。凍結スライスを金抗体で染色後埋抱して電子顕微鏡で観測することで、海馬神経シナプスと核にER α 蛋白が局在することを見つけることが出来るであろう。ER α のmRNAは海馬全体に多く発現している (卵巣の10分の一) ことを確認したので、現在ER α のin situ hybridization実験の準備を進めている。

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。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・記憶学習への攪乱を分子論的に論じることがはじめて可能になる。このシナプスER α がビスフェノールAの作用部位であると予測して実験を進めている。基質結合解析法でエストラジオールとビスフェノールAのシナプス膜上ER α との結合を証明する実験データが出ている。

4) Ca信号イメージング解析による海馬神経細胞での信号伝達の解析

エストラジオールやビスフェノールAによる神経細胞への急性効果をCa信号で解析した。Ca信号の顕微視化解析を単離培養した海馬神経細胞で行い、10 nM、100 nMのエストラジオールやビスフェノールAの添加で両者ともに、10秒以内に急性的なCa信号が発生することを確認した。BSA-エストラジオールでも同様のCa信号を発生するので膜上ER α が関与している。このCa信号は核受容体ER α の阻害剤ICIで抑制された。Ca信号を発生するエストラジオールとビスフェノールAの濃度は10 nM—100 nMとほとんど差はない。この結果は、核受容体ER α に対する結合・作用濃度ではエストラジオールが1 nM程度なのに対し、ビスフェノールAは10000 nM程度と1万倍も弱い、のと非常に異なる。膜ER α は、ビスフェノールAの作用が核受容体ER α より増強されている点が大きな特徴であり、脳神経に作用する際には作用効果が大きく、攪乱効果が格段に強いと推測される。

5) 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

雄の海馬スライスを用いて、CA1の長期増強を測定して、エストラジオールとビスフェノールAの急性効果(20分の作用効果)を測定した。10 nMエストラジオールはWistar, Sprague Dawley ラット共に、4週齢・12週齢のラットで、長期増強を増強することが確認できた。一方ビスフェノールAは100 nMでも長期増強には影響を与えないが、ビスフェノールAとエストラジオールを共存させると、エストラジオールが示す長期増強の増強効果を抑制した。10 nM DESは長期増強を増強する効果がエストラジオールより大きいことがわかった。以上の実験は、環境ホルモンの記憶学習への攪乱効果が存在し、その効果はさまざまであることを示唆している。

6) 海馬スライス培養を用いた神経ネットワークへの影響

海馬神経のシナプス結合はエストラジオールの作用を大きく受ける。海馬スライス培養にエストラジオールを4日間作用させると、シナプス接合をになうスパイン数が増加する。これは単一の神経細胞に蛍光色素をマイクロインジェクションし、共焦点レーザー顕微鏡で解析する方法による結果である。これはシナプス膜に局在するER α 蛋白への作用によるものであろう。ビスフェノールA・プロゲステロン・オクチルフェノールを海馬スライス培養に作用させて、神経のシナプス結合の変化を解析する準備中である。

7) 神経行動実験

母親にエストラジオールを暴露して生まれた仔ラットでは、空間学習を検討するWater Mazeの成績を調べると、4週齢では対照群と差がないが、7週齢以降の成獣になると改善された。これと良い相関を持って、電気生理で調べた海馬スライスの長期増強も、4週齢

では対照群と差がないが、7週齢以降の成獣になると増強された。

母親にビスフェノールAを低濃度暴露して生まれた仔ラットでは、13週齢の成獣になると対照と比べて、雄のWater Mazeの成績が下がり、変化のない雌の成績に近ずいた。

8) 小脳プルキンエ神経の発達解析

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・プロゲステロン・オクチルフェノール・ビスフェノールAの作用を解析した。脳に穴を開けて小脳に液を直接数日間に渡り注入した後、小脳スライスを抗体組織染色し、プルキンエ細胞の突起の成長を解析した。エストラジオールとオクチルフェノール及びビスフェノールA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りことを発見した。しかし同じ効果を示すのにビスフェノールAやオクチルフェノールの濃度はエストラジオールの100倍を必要とした。更にこのプルキンエ神経細胞突起の発達促進効果は、いずれもエストロゲン受容体ER β の阻害剤であるタモキシフェンで抑制された。小脳はER α は非常に少ない。

3. 研究実施体制

急性作用解析グループ

- ①研究分担グループ長 川戸佳（東京大学大学院総合文化研究科、教授）
- ②・内分泌攪乱物質による海馬のニューロステロイド作用への攪乱を、電気生理やCaイメージングにより生物物理的に解析する。長期増強の攪乱、シナプスの受容体を介するCa信号の攪乱。
 - ・神経シナプスでのステロイド受容体の同定と機能の解析
 - ・海馬におけるニューロステロイド合成の解析

P450代謝解析グループ

- ①研究分担グループ長 小南思郎（広島大学総合科学部、教授）
- ②ニューロステロイド合成P450系の代謝活性を如何に攪乱するか解析

脳発達解析グループ

- ①研究分担グループ長 筒井和義（広島大学総合科学部、教授）
- ②小脳神経回路発達に対する攪乱解析。特にプルキンエ細胞。

プローブ開発グループ

- ①研究分担グループ長 長野哲雄（東京大学大学院薬学系研究科、教授）
- ②P450活性やNO発光測定の新規プローブの開発

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

- T. Takahashi, T. Kimoto, N. Tanabe, T. Hattori, N. Yasumatsu, S. Kawato,
“Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated
Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons.” J. Neurochem (2002), 83,

1441-1451

- N. Takata, K. Shibuya, M. Okabe, T. Nagano, H. Kojima, S. Kawato,
“Pregnenolone sulfate acutely enhances NO production in the rat hippocampus:
digital fluorescence study using NO reactive dye.” *Bioimages* (2002) 10, 1-8
- K. Shibuya, N. Takata, Y. Hojo, A. Furukawa, N. Yasumatsu, T. Kimoto, T.
Enami, K. Suzuki, N. Tanabe, H. Ishii, H. Mukai, T. Takahashi, T. Hattori, S.
Kawato, “Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which
are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction.” *Biochim.
Biophys. Acta* (2003) 1619, 301-316
- Kawato S, Hojo Y, Kimoto T, “Histological and metabolism analysis of P450
expression in the brain.” *Methods Enzymol* (2002) 357, 241-249
- C. Orikasa, Y. Kondo, S. Hayashi, B.S. McEwen, and Y. Sakuma, “Sexually
dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral
periventricular nucleus of the rat preoptic area: Implication in luteinizing
hormone surge” *Proc. Soc. Nat. Acad. Sci., USA*, (2002) 99, 3306-3311
- M.M. Adams, S.E. Fink, R.A. Shah, W.G.M. Janssen, S. Hayashi, T.A. Milner,
B.S. McEwen, and J.H. Morrison, “Estrogen and aging impact the subcellular
distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats” *J.
Neurosci.* (2002) 22, 3608-3614
- H. Sakamoto, K. Ukena and K. Tsutsui “Dendritic spine formation in response
to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in
rats.” *Neurosci. Lett.* (2002) 322, 111-115.
- M. Matsunaga, K. Ukena and K. Tsutsui “Androgen biosynthesis in the quail
brain.” *Brain Res.* (2002) 948, 180-185.
- M. Takase, K. Ukena and K. Tsutsui “Expression and localization of
cytochrome P45011b, also mRNA in the frog brain.” *Brain Res.* (2002) 950,
288-296.
- Y. Inai, K. Nagai, K. Ukena, T. Oishi and K. Tsutsui “Seasonal changes in
neurosteroids in the urodele brain and environmental factors inducing their
changes.” *Brain Res.* (2003) 959: 214-225
- K. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, H. J. Majima, and T. Nagano,
“Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive
Oxygen Species and Distinguish Specific Species” *J. Biol. Chem.* (2003) 278,
3170-3175
- S. Ueno, M. Tsukamoto, T. Hirano, K. Kikuchi, M. K. Yamada, N. Nishiyama, T.
Nagano, N. Matsuki, and Y. Ikegaya, “Mossy Fiber Zn²⁺ Spillover Modulates
Heterosynaptic N-methyl-D-aspartate Receptor Activity in Hippocampal CA3

Circuits" J. Cell Biology (2002) 158, 215-220

- T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, and T. Nagano, "Improved Fluorescent Probes for Zinc, ZnAFs, Suitable for Biological Applications" J. Am. Chem. Soc. (2002) 124, 6555-6562
- H. Yamada, N. Gohyama, S. Honda, T. Hara, N. Harada, and K. Oguri, "Estrogen-dependent regulation of the expression of hepatic Cyp2b and 3a isoforms: Assessment using aromatase-deficient mice" Toxicol. Appl. Pharmacol. (2002) 180, 1-10
- L. Plumari, C. Viglietti-Panzica, F. Allieri, S. Honda, N. Harada, "Changes in the arginine-vasopressin immunoreactive systems in male mice lacking a functional aromatase gene" P. Absil, J. Balthazart, and G. C. Panzica, J. Neuroendocrinol. (2002) 14, 1-13
- J. Bakker, S. Honda, N. Harada, and J. Balthazart, "The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of Sociosexual behaviors in adulthood", J. Neurosci. (2002) 22, 9104-9112
- A. Owaki, A. Takamasa, T. Yamazaki, and S. Kominami, "Membrane reconstitution of recombinant guinea pig cytochrome P45017a and the effect of site-directed mutagenesis on androgen formation" Steroid Biochemistry and Molecular Biology (2002) 81, 255-262

(2) 特許出願

無し