

## 2014年度大学共同研究 研究成果概要

研究課題：脳の活動及び発達に影響を及ぼす環境化学物質の分子レベルでの機序解明

研究期間：2014年4月1日～2015年3月31日

研究代表者：理工学部（生命医化学科）教授 今岡 進

研究分担者：理工学部教授（人間システム工学科） 工藤 卓

研究分担者：理工学部教授（生命医化学科） 佐藤 英俊

### はじめに

内分泌攪乱化学物質（環境ホルモンともいう）は男性ホルモンや女性ホルモン系すなわち生殖系に影響を与え、自然界の生態系に大きな影響を与えられてきた。一方で、環境化学物質による汚染と子供の発達、特に知能発達遅延の危険性が危惧されだしてから長い間、最近日本でも環境省がエコチル調査を開始し、環境汚染と子供の発達遅延との関係が明らかにされつつある。申請者は実験動物を使用した共同研究から胎児の時に環境科学物質であるビスフェノール A (BPA) に暴露されると、多動性などが起こることを明らかにしている。BPA はペットボトルなどのプラスチック容器に保存された飲料や水道水など広く環境中で検出される内分泌攪乱化学物質であり、申請者のこれまでの研究において、そのターゲット因子として PDI や HIF を明らかにしている。PDI は新しく合成されたタンパク質やストレスにより編成したタンパク質を正常な構造にするために働く重要な因子であり、ヒトのアルツハイマー病やパーキンソン病でその機能が低下することで、変性タンパク質が上昇することが明らかにされている。HIF は本来低酸素応答に関わる因子として発見されたものであるが、最近では、がんの増殖や転移、発生過程における、循環器系や神経系形成に重要であることが報告されている。一方で、環境化学物質は細胞の酸化ストレスを増強し、糖尿病などの罹患発症リスクを上昇させるとの報告もある。

先に述べたように、BPA およびその類縁体化合物は PDI や HIF の機能阻害をすること。BPA が動物の胎児の脳機能や発達に影響を及ぼすこと。当該研究の共同研究者である人間システム工学科の工藤教授とのこれまでの共同研究によって、工藤教授の得意とするラット胎児海馬細胞を用いて、神経伝達を電気的に測定する方法において、BPA は海馬細胞の神経伝達を顕著に阻害した。生命科学科の佐藤准教授との共同研究では、ラマン分光法によって BPA が ES 細胞分化に何らかの影響を及ぼすことを見いだしている。これらの研究成果は、BPA のような環境化学物質が脳神経発達や脳機能に影響を及ぼすことを強く示唆するものであるが、まだ、その機構には未知な部分が多い。そこでこれらの点と点の成果を線で結んで体系化し、環境化学物質による脳への影響を解明することを目的とする。一方で、環境化学物質が引き起こす酸化ストレスや低酸素応答阻害のメカニズムを解明し、細胞分化やがんや糖尿病発症への影響を明らかにすることを目指す。

## 研究成果の概要

環境化学物質は様々な形で生体への影響を及ぼす。その中で特に代表的なものは内分泌攪乱作用で、すでに明らかにされているものとしては性ホルモン受容体を介した性発達の攪乱作用である。プラスチックの可塑剤等に用いられ環境中に比較的高い濃度で存在する BPA はエストロゲン様作用や甲状腺ホルモン様作用が報告されているが、それぞれの受容体への結合は、本来のエストロゲンや甲状腺ホルモンよりきわめて低いことが明らかになっており、BPA やその類縁体がなぜこのような作用を示すのかは不明であった。

研究代表者らもラット脳下垂体由来細胞 GH3 を用いて検討した。GH3 細胞は甲状腺ホルモン T3 によって T3 受容体依存的に成長ホルモン GH を分泌すると考えられている。GH3 細胞に BPA を添加しても GH の分泌は見られなかった。一方で GH3 細胞に T3 と BPA を同時に添加すると T3 のみを添加した場合に比べて、GH 分泌に上昇が見られた。一方で、GH3 細胞に PDI を過剰に発現すると、T3 による GH 発現が抑制されることが明らかになっており、この研究においても確認した。この現象のメカニズムとして、研究代表者らも明らかにしているが、T3 が PDI に結合することでトラップされ、細胞中の濃度が低下して、T3 の効果が低下すると考えられていた (PDI のリザーバー説)。本研究においてこのメカニズムについて詳細な検討を行ったところ、PDI による甲状腺ホルモン受容体 (TR) の活性阻害には PDI のイソメラーゼ活性中心が必要であり、甲状腺ホルモンとの結合は関係ないことが明らかとなった。T3 による甲状腺ホルモンの活性化には redox factor-1 (ref-1) による還元が必要で PDI は ref-1 を酸化していた。一方で BPA や T3 様の構造を持つ化合物は PDI の酸化活性を阻害した。すなわち、TR に結合しない化合物でも PDI と結合して、その酸化活性を阻害すれば、TR の活性を促進することができるというきわめて重要な新しい知見を得ることができた (図 1)。

さらに核内因子である SP-1 は糖尿病などの酸化ストレス条件下で活性化され、様々な因子の発現を誘導することが知られているが、この因子による発現抑制現象を見出し、そのメカニズムについて検討した。その結果これまで報告されているメカニズムでは、遺伝子上の SP-1 結合サイトに SP-1 が結合することで

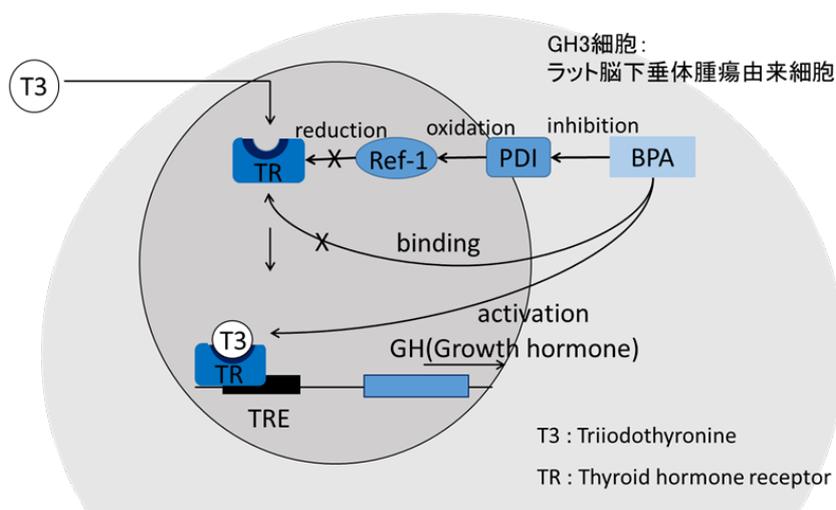


図1 PDIによるTRの不活性化とBPAによる活性化

その遺伝子の転写が促進されるようになって

いるが、本研究において、そのサイトに同様に転写活性化因子である新たな因子AP-2alphaが結合するがSP-1が活性化してそこに結合することでAP-2alphaの結合が阻害されて、転写抑制が起こるといふこれまでにない新しいメカニズムの解明に至った。このことは酸化ストレスが引き起こす細胞への影響の新たなメカニズムとして注目される。がんや発生過程において、低酸素状態や酸化ストレス状態が引き起こされると報告されているが、これらの過程に関わる新たなメカニズムの解明につながると考えている。

BPA がラット副腎髄質由来褐色細胞 (PC12) の樹上突起伸長に与える影響を検討した。PC12 は神経成長因子 (NGF) 刺激により神経細胞様に分化し、樹状突起を伸長させることが知られている。NGF 刺激と同時に  $50 \mu\text{M}$  BPA を添加し、24 時間後に細胞の突起伸長を観察し測定を行った (図 2, 3)。その結果、BPA 存在下では細胞の突起伸長がコントロールに比べて抑制されることが示された。さらに、BPA 構造の二つのメチル基を水素に置換したビスフェノール F (BPF) では、突起伸長の抑制は見られなかった。一方で、BPA のヒドロキシル基がオ-メチル基に置換されたジメチルビスフェノール A (DMBPA) は、濃度  $50 \mu\text{M}$  において BPA よりも強い突起伸長の抑制効果を持つことが示された。これらの結果は BPA の二つのメチル基とそれを挟むベンゼン環が、PC12 の樹状突起伸長の抑制に重要であることを示唆している。この PC12 を用いたアッセイ系は、短時間での神経毒性の評価に有用であると考えられる。

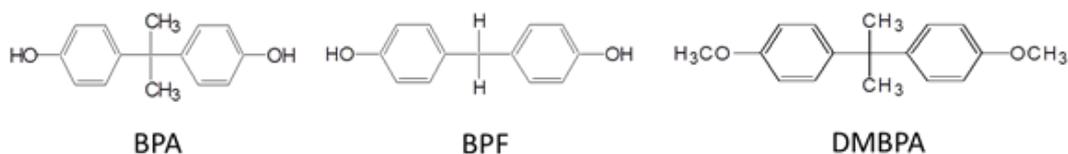


図2 BPA類縁体の構造

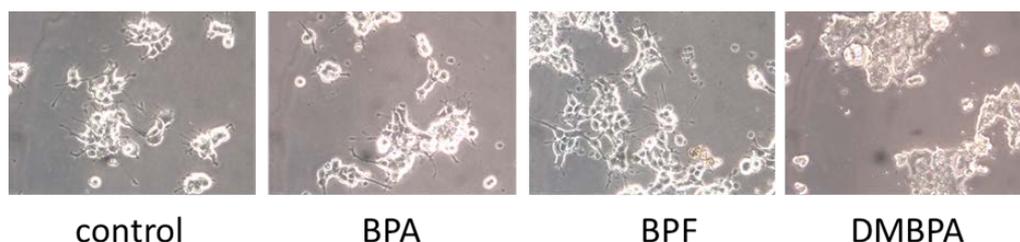


図3 BPA類縁体のPC12細胞神経突起形成への影響

長期に渡る神経ネットワークの培養及び電位計測には、安定した計測環境が必要であるため、細胞外電位多点計測皿 (MED) により電位を計測した (図 4, 5)。MED は底面に 64 個の微小平面電極を備えており、その電極アレイ上に神経細胞 (30 万個) を一定エリア内 (直径 7 mm のリング, 面積約  $38.5 \text{ mm}^2$ ) に培養し、神経細胞のネットワークを自己組織的に構築させた。領域を制限して高密度 (約  $7800 \text{ cells/mm}^2$ ) に細胞を培養することで、人工的環境下で安定して神経ネットワークの電気活動を計測した。 $50 \mu\text{M}$  以上の BPA 濃度で実験を行った場合、正規化発火数は BPA 濃度と暴露時間に依存して減少することが明らかになった。神経回路網に対して BPA を一時的に暴露させた場合、神経回路網の培養日数に依存した変化が確認された (図 6 に典型的な神経発火測定の例を示す)。

特に、20-30 DIV の神経回路網に対して BPA は強く作用し、元の培養液に置換しても正規化発火数は元の値よりも低い値であった。これらの結果から BPA は神経回路網に対して、発達段階に依存して強く作用する事が示唆された。BPA 存在下における活動頻度の減少機構は、BPA によって GABA<sub>A</sub> 受容体が亢進し神経回路網の活動を抑制した事が予想される。また、これらの培養日数の異なる神経回路網において、BPA 暴露後の発火数が元の程度に戻るかどうかという違いは、神経回路網の結合の程度に依存すると予想される。例えば、20 DIV ~ 30 DIV 程度培養した神経回路網と 50 DIV 以上培養した神経回路網における、電気刺激に対する出力は明確に異なる事が示唆されており、その背景には神経回路網の構造的変化が関わっていると予想される。本研究で用いた 50 DIV 以上の神経回路網のように神経細胞間の入出力関係が構造的に明確な場合においては、BPA 除去後の自発的活動が神経回路網を伝搬していくことで、神経回路網の活動頻度が元の程度まで回復したと考えられる。

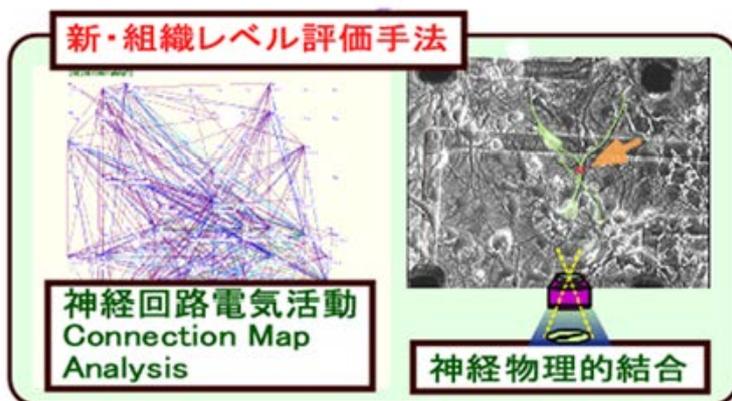
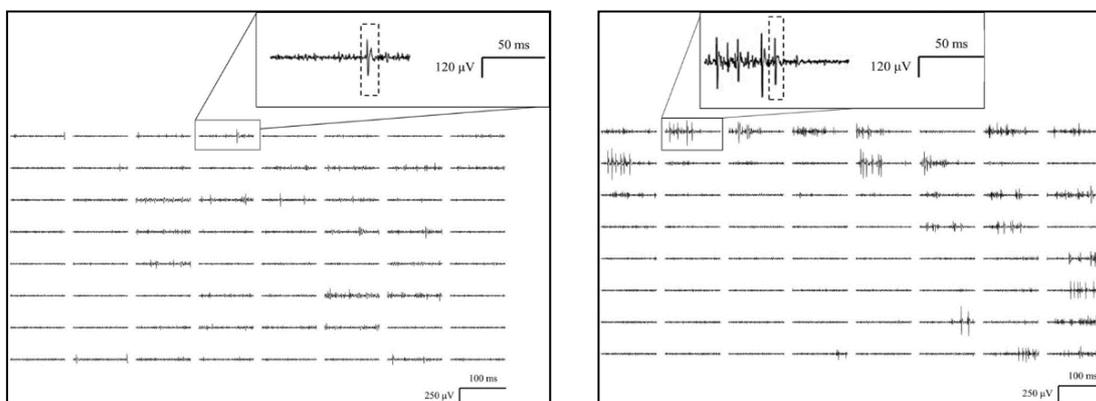


図4 神経回路網への毒性評価の概略図

異なる神経回路網において、BPA 暴露後の発火数が元の程度に戻るかどうかという違いは、神経回路網の結合の程度に依存すると予想される。例えば、20 DIV ~ 30 DIV 程度培養した神経回路網と 50 DIV 以上培養した神経回路網における、電気刺激に対する出力は明確に異なる事が示唆されており、その背景には神経回路網の構造的変化が関わっていると予想される。本研究で用いた 50 DIV 以上の神経回路網のように神経細胞間の入出力関係が構造的に明確な場合においては、BPA 除去後の自発的活動が神経回路網を伝搬していくことで、神経回路網の活動頻度が元の程度まで回復したと考えられる。



図5 新・組織レベル評価手法



BPA投与

コントロール

図6 BPAの神経回路網への影響

マウス ES 細胞から再現した発生過程での神経発達モデルとラマンスペクトル解析後の成分分析結果を示す (図 7)。高い確率で神経細胞へと分化する。本モデルを培養開始 3 日目に BPA

に 24 時間暴露し、その後の発達状況を解析した。10, 100  $\mu\text{M}$  の濃度の暴露で、培養 10 日目の細胞に変化が生じることが分かった。10  $\mu\text{M}$  の細胞の 1 つが正常細胞に判別されているが、この細胞は正常細胞データセットの分散の中心近くに判別されている。細胞

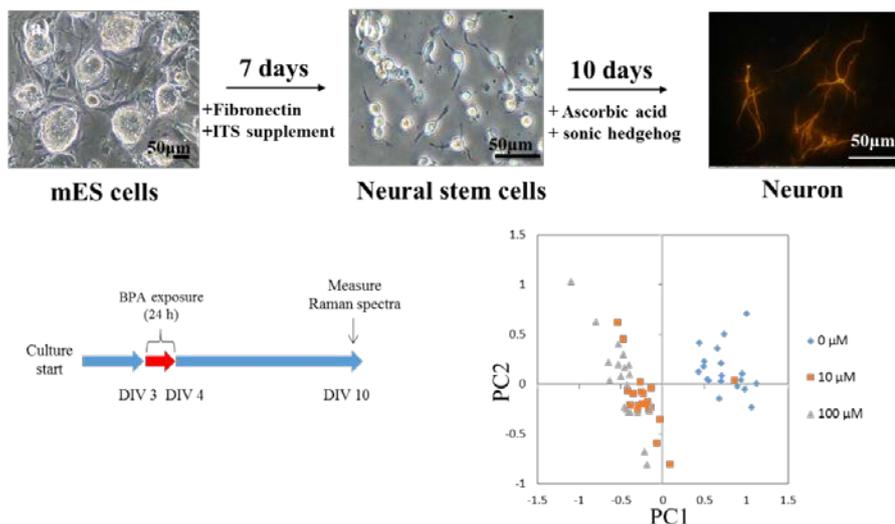


図7 マウスES細胞から再現した発生過程での神経発達モデル

への影響の生じ方がスイッチ

を入れるようにデジタル的であることから、BPA は 1 つ、または極少数のシグナル系を阻害することにより、細胞に影響していることが示唆される。

細胞の長期培養系を用いて、90 日目までの培養とラマンスペクトルの解析に成功した。ラマンスペクトルの解析から、神経細胞は大きく 3 段階の発達をすることが分かる。培養 10 日目までが最初の段階で、シグナルを出さない初期神経細胞と考えられる。10-50 日目までは次の段階で、自発的に細胞が発火する (電気シグナルを発する)。50 日以降は最終段階で、この頃になると培養系内の細胞が同期して規則的なシグナルを発するようになる。胎児から若年時の神経発達モデルとして用いることができる。BPA の影響についてはさらなる解析が必要である。

## 研究成果の公表

### 発表論文

1. Oguro A., Kobayashi Y., and Imaoka S. Protein factors and chemical compounds regulating hypoxic or oxidative stress responses. Personalized Medicine Universe, 2015, in press.
2. Okumura M., Kadokura H., Hashimoto S., Yutani K., Kanemura S., Hikima T., Hidaka Y., Ito L., Shiba K., Masui S., Imai D., Imaoka S., Yamaguchi H. and Inaba K. Inhibition of the functional interplay between ER oxidoreductin-1 alpha (Ero1alpha) and protein disulfide isomerase (PDI) by the endocrine disruptor bisphenol A. J. Biol. Chem. 289, 27004-27018, 2014.
3. Miyake Y., Hashimoto S., Sasaki Y., Kudo T., Oguro A., and Imaoka S. Endoplasmic reticulum protein (ERp) 29 binds as strongly as protein disulfide isomerase. Chem. Res. Toxicol. 27, 501-506, 2014.