

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名「脳ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン」

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

川戸 佳 (東京大学大学院総合文化研究科 教授)

主たる研究参加者

小南 思郎 (広島大学総合科学部 教授)

筒井 和義 (広島大学総合科学部 教授)

長野 哲雄 (東京大学大学院薬学系研究科 教授(～平成15年3月))

3. 研究内容及び成果

従来の神経内分泌学の常識では、ステロイドホルモンは性腺や副腎皮質で合成され、血流に乗って標的臓器である脳内に到達し、作用すると理解されていた。しかし、記憶を司る海馬ではチトクロムP450酵素系に依って独自に脳ニューロステロイドとしての男性・女性ホルモンが合成され、それらの性ホルモンが神経伝達や神経シナプス回路を急性的に変動させる可能性が示唆されている。

脳神経細胞の情報伝達や神経ネットワーク構築は、脳ニューロステロイドや性腺・副腎から分泌される性ホルモンに依って大きな制御を受けているため、性ホルモン類似の内分泌かく乱物質が脳の記憶・学習や神経ネットワーク構築に急性的・慢性的に悪影響を与える可能性が危惧される。

これらの背景から、本研究では下記の事項を明らかにする事を目標とした。①記憶を司る海馬は独自に脳ニューロステロイドとしての女性・男性ホルモンを合成している、②女性ホルモンは神経シナプス膜上に局在する受容体を介して作用し、神経伝達や神経シナプス回路を急性的(1時間程度内)に変動させる、③内分泌かく乱物質はこのような女性ホルモン作用を急性的に攪乱する。

本研究の成果概要は以下の通りである。

(1)海馬でのニューロステロイド合成と急性作用解析(川戸グループ)

1)海馬での脳ニューロステロイド合成と内分泌かく乱物質の作用

成獣ラット海馬スライスを用い、下記の性ホルモン合成・代謝経路が存在し、性差が無い事を明らかにした。

女性ホルモン合成経路:コレステロール→プレグネノロン→デヒドロエピandroステロン→androステンジオール(乃至はandroステンジオン)→テストステロン→エストラジオール

男性ホルモン代謝経路:テストステロン→ジヒドロテストステロン→3 α 、5 α -androスタンジオール

ビスフェノールA(BPA)0.1mg/L胎仔期曝露で、仔ラット海馬のandroステンジオン→テストス

テロン、テストステロン→エストラジオール合成能が亢進する事を明らかにした。

2) 海馬ニューロステロイド合成酵素系の神経局在

ニューロステロイド合成酵素系がCA1-CA3領域の錐体神経細胞とDG領域の顆粒神経細胞に局在している事、P450 (17 α)、P450aromはシナプス部分に局在している事、を明らかにした。これらは、性ステロイドが記憶を貯蔵する神経シナプスでも局所的に合成されている事を示しており、従来の神経内分泌学の常識を覆す重大な発見である。「神経シナプス分泌学」とも言うべき新しい概念を提唱した。

3) エストロゲン受容体(ER)の神経シナプス局在

海馬で性ホルモンが合成されている以上受容体が存在するはずであるが、錐体細胞や顆粒細胞にERが存在する事は未だ証明されていない。従来世界中で用いられてきた抗ER α 抗血清は、ER α の極めて少ない部位ではER α とは反応せず、他の蛋白と結合する事を明らかにした。高純度精製抗ER α 抗体RC-19を作成し、ER α がCA1-CA3錐体神経細胞とDG顆粒神経細胞に分布している事を明らかにした。

密度勾配遠心で厳密に精製した細胞質、核画分を用い、ER α (67kDa)が海馬神経シナプス膜画分、核内、細胞質に存在する事を明らかにした。長年謎とされて来た海馬神経細胞への女性ホルモン作用を解明する大きな一歩であり、内分泌かく乱物質が神経シナプスで局所的に作用し得る事を強く示唆している。

4) 女性ホルモン／内分泌かく乱物質の急性効果

ラット海馬スライスを用い、長期増強(LTP:記憶する過程)、長期抑圧(LTD:記憶を忘れる過程)への急性効果(30分～1時間での効果)を解析し、エストラジオール(E2:1～10nM)、ジエチルスチルベストロール(DES:1～10nM)、ビスフェノールA(BPA:100nM)がLTDを促進する事を明らかにした。過去に報告されている様々な測定系での「核内受容体を介する遺伝子発現で比較すると、BPAの活性はE2の約一万分の一程度である」という結果とは大きく異なる。内分泌かく乱物質がシナプス伝達攪乱作用を有し、脂溶性物質の急性的作用は、遺伝子発現を介する作用よりも攪乱効果が格段に強く現れる可能性が強い事を示唆している。

5) スパイン密度・形態変化による急性効果の解析

海馬スライス中の単一神経に蛍光色素を導入して可視化する方法を開発し、E2の2時間処理でCA1のスパイン(シナプス後部)密度が増加し、形状が変化する事、4つのタイプのスパインの内thinスパインが選択的に増加する事、1～100nMの低濃度E2、DES、BPAで非常に良く似た効果が認められる事、ER α を介する作用である事を明らかにした。MAPKinase経路が働いている事が示唆された。E2はCA3スパイン(CA3ではthornと呼ばれる)密度を大きく低下させる事を明らかにした。E2や内分泌かく乱物質の作用は、脳の領域や神経回路の違いで異なる可能性が強い事が示唆された。

(2) P450代謝解析と分子生物学(小南グループ)

フェニトロチオン、トリブチルスズ(TBT)、トリフェニルスズ、ジブチルスズ、ノニルフェノールは、

野生生物体内存在量以下の濃度でコルチゾル合成を阻害する事を明らかにした。TBTは、ウシ副腎皮質培養細胞において、3種のP450転写を特異的に阻害して副腎皮質ホルモン合成を阻害する事を明らかにした。TBTは、低濃度(100nM)では海馬E2合成を活性化し、高濃度では阻害する事を明らかにした。TBTは、ER α mRNAには影響を与えずER β mRNA量を増大させる事、レチノイドX受容体(RXR α)を介する作用である事を明らかにした。

また、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)活性を阻害する事を明らかにした。

(3) 小脳神経回路発達の解析(筒井グループ)

小脳はコレステロールを基に、プレグネノロン、プレグネノロン硫酸エステル等の様々な脳ニューロステロイドを合成している事を明らかにした。プレグネノロン硫酸エステルはシナプス情報伝達を調節する情報伝達調節因子としての作用を有し、その作用は急性的である事を明らかにした。細胞膜受容体を介したnon-genomic作用である事が示唆された。

プロゲステロンとE2はプルキンエ細胞樹状突起伸長促進作用を有する事、スパインとスパイン・シナプス形成を誘導する事、核内受容体を介した作用である事、を明らかにした。ER β を介する作用である事が示唆された。BPA、オクチルフェノール(OP)は、E2の100倍の濃度で、E2と類似のプルキンエ細胞樹状突起伸長促進作用を有する事を明らかにした。ERを介する作用である事が示唆された。

(4) 新規プローブ開発(長野グループ)

海馬のNO合成酵素検出プローブを作成し、NO発生を実時間で2次元的可視化する方法を開発した。硫酸プレグネノロンがNO発生を促進する事を明らかにした。

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

大脑海馬で女性・男性ホルモンが合成されている事を、合成酵素系のシナプス局在と生合成経路と合わせて示した。また、神経シナプスに女性ホルモン受容体ER α が存在し、女性ホルモンが記憶・学習に密接に関与しており、その作用は膜受容体を介した急性的作用である事を示した。これらの知見は、他の研究者による追試で確認出来れば、従来の定説を覆すものであり、インパクトの高い画期的な成果といえよう。新規性の高い知見に関しては、多面的に証拠を積み重ねて証明する事が重要と考えられるが、信念と粘り強い研究で確かな成果に結びつけた事は高く評価される。今後、国内外の脳神経科学者によってこの成果が利用、検証され、未だ十分には理解されていない、脳における性ホルモンの生物学的意義・重要性が明らかにされる事を期待したい。

研究成果は一流の国際誌を中心に多数(国際誌85報、国内誌10報)報告されている。学会発表も活発に行われ、主要なもののみでも国際学会38件、国内学会67件に及んでいる。比較的小規模なチームとしては十分な成果発表数といえよう。海外での招待講演も数多く、世界的に注目されている事を示しているといえよう。

また、脳神経科学分野の一流の研究者との共同研究も活発に実施されており、今後のさらなる展開が期待される。内分泌かく乱物質の評価法に関連する特許が国内3件、海外1件出願されている事も評価に値する。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

当初の研究目標を略全て達成したといえ、高く評価される。女性ホルモン、ビスフェノールA等の内分泌かく乱物質が脳神経系に影響を及ぼしている事が示され、膜受容体を介する急性的作用が示唆された事は、内分泌かく乱物質の作用機構理解に新たな視点を導入するものとして、極めて重要な成果である。また、遺伝子発現を介する長期的／不可逆的影響とは別に、環境汚染物質の急性的影響をも考慮すべき事を示唆している。社会的にも重要な問題を提起しているものと考えられ、今後のさらなる展開を期待したい。

脳ニューロステロイド及び内分泌かく乱物質の急性的作用を証明するために意図された研究であるが、その成果は、内分泌かく乱物質の作用機構理解に新たな視点を導入したばかりでなく、従来の神経内分泌学の枠内に納まらない、謂わば「神経シナプス内分泌学」ともいうべき、新たな研究分野を切り拓きつつある。ステロイドホルモンの情報伝達が、「核内受容体と遺伝子発現」という伝統的な枠組みから脱却して一大発展を遂げる事を期待したい。また、脳が合成する性ホルモンが神経栄養因子としても作用している事が示唆されており、神経栄養因子分野の研究に革新をもたらすと共に、脳神経分野の臨床に科学的基礎を提供するものとして、今後のさらなる発展を期待したい。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

特になし。