

The Study on Adverse Genetic Effects of Endocrine Disruptor Bisphenol A in the Mouse Central Nervous System

杉山, 真季子

<https://hdl.handle.net/2324/1931712>

出版情報：九州大学, 2017, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名 : 杉山 真季子

論 文 名 : The Study on Adverse Genetic Effects of Endocrine Disruptor
Bisphenol A in the Mouse Central Nervous System
(内分泌攪乱物質・ビスフェノール A のマウス中枢神経系における遺
伝学的な悪影響に関する研究)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネートプラスチックやエポキシ樹脂の原料として世界中で広く用いられている。このような BPA を原料にする化学製品は、我々の身の回りではほ乳瓶、食品や飲料の容器、子供のおもちゃ、スーツケース、点滴用チューブ、メガネのレンズ、CD・DVD などのプラスチック製品や水道管をつなぐ強力接着剤として非常に多岐にわたる。しかし、熱処理や劣化による加水分解によって BPA が漏出すると、皮膚や口を通して我々の体内に取り込まれることになる。ここ 20 年で、こうした BPA 暴露による様々な悪影響が次々と報告され、代表的な内分泌攪乱物質の一つとなっている。BPA は核内受容体の一つであるエストロゲン受容体 (ERs) に結合すると報告されたが、その結合や活性化能は非常に弱い。2006 年には別の核内受容体・エストロゲン関連受容体 (ERRs) の一つ、ERR γ に BPA が非常に強く結合することが判明したが、ERR γ はリガンドがなくても非常に高い活性を持つ自発活性化型核内受容体である。また、ERR γ は脳に多く発現しており、発達や分化に重要である。しかしながら、ERR γ は BPA が結合すると一種の BPA 貯蔵庫となること、ERR γ ・BPA 結合体は代謝的に安定になることなどから、BPA 暴露による中枢神経系での悪影響が強く懸念される。

中枢神経系への悪影響について、多くの報告がある。例えば、BPA 暴露によってマウスは多動性を示すという報告がある。しかし一方で、低活動性になるという報告もある。こうした矛盾した報告が数多い背景には、短期間の BPA 投与で、短期間の行動テストを実施した結果報告であるというように、非常に制限された条件設定での実験であることが判明した。そこで本研究では、BPA 暴露の悪影響について真正な評価、解析には、継続的な BPA 暴露環境中から定常的な行動異常があるかを解析することが重要であるとの観点から動物実験をデザインし、分析することとした。この際、特に、行動異常に本質的に関わる遺伝学的な変化を適正に追跡し、解析することにした。本博士論文では、以下のような章立てに従って、研究の経緯および結果を記述した。

第 1 章では、BPA のマウスの脳における悪影響を解析するにあたって、マウス脳内の核内受容体 ERs と ERRs の mRNA の発現量、及びその転写活性を評価した。さらに近年 BPA の代替物として注目されている新世代ビスフェノールについてその受容体応答性を試験した。その結果、マウス脳内に ERs や ERRs が確かに発現し、BPA がこれらに対して活性を示すことが証明された。このように、マウスが BPA 暴露実験のモデル動物として利用できることを確認し、また ERs・ERRs を介して BPA が中枢神経系に影響を及ぼす可能性が非常に高いことを示した。

第 2 章では、BPA のマウス中枢神経系への悪影響を行動科学的に、また分子生物学的に評価した。まず、飼料、及び飲料水から暴露する BPA 濃度を算定した。それぞれ 10 mg/kg 体重/日を目標に投与して測定した結果、摂取量は全体で 25 mg/kg 体重/日であった。継続的な BPA 暴露による行

動への定常的な影響を評価するために、行動活動量は幼若期から成体期まで約 3～4 ヶ月間、常時に測定した。その結果、BPA 暴露の有無にかかわらず、一部のマウスは成長とともに活動量が増加するものの、ほとんどのマウスは終生一定した活動量を示すことが判明した。そして、活動量実測の結果、平均活動量は BPA 暴露によって有意に増加し、多動性症状になることが判明した。この症状は雌マウスでより著明であった。この多動性症状は、体内時計のシグナル伝達機構が影響を受けたためと考えられ、概日リズム振動体・視交叉上核 (SCN) で機能する一連の神経ペプチドとその受容体について調べた。その結果、メスでは活動量を抑制するアルギニンバソプレシン (AVP) の mRNA 発現量が有意に減少しており、これはオスでは見られなかった。反対に、オスでは活動量を促進するニューロメディン U (NMU) が有意に増加していたが、メスでは変化していなかった。また、AVP mRNA、及び NMU mRNA のアイソフォームの発現様式が BPA 暴露によって著しく影響を受けることが判明した。こうして BPA 暴露によって、雌雄で異なる脳内神経ペプチド遺伝子 mRNA の発現量が変化し、それを起因として行動異常を引き起こしている可能性が強く示唆された。さらに、AVP と非常に類似した構造を持ち、また遺伝子位置も相互に隣接しているオキシトシン (OXT) の mRNA 発現量も大きく変化していた。この AVP と OXT 遺伝子の間に $ERR\gamma$ が結合し、特に AVP mRNA の発現を制御する可能性が示された。

第 3 章では、近年 BPA と自閉症との関連が注目されていることから、BPA 暴露マウス脳内の自閉症関連遺伝子への影響について調べた。遺伝子発現量を測定したところ、ほとんどが BPA 暴露によって胎仔期の発現日齢リズムが 1 日早くなっていることが判明した。特に、神経分化遺伝子の抑制に働くタンパク質の発現量が低下しており、その働きが適正に行えない可能性が示された。さらに、神経分化の時期を早めてしまうような遺伝子発現の変化が見られた。神経発達の早熟については未解明なことが多いが、脳形成異常など、脳神経系への悪影響が報告されており、BPA 暴露がこれらを強く促進する可能性が示された。

第 4 章では、BPA が特異的に強く結合する核内受容体 $ERR\gamma$ の転写制御について網羅的に解析した。 $ERR\gamma$ の胎仔期の発現量を測定したところ、15 日目に最も多く発現していたため、この日齢のマウス胎仔脳を用いてクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を行なった。その結果、 $ERR\gamma$ はゲノム上で約 48,000 カ所に結合し、そのおよそ半数が遺伝子の 10 kb 以内にあることが判明した。これらのうち、マウス核内受容体 49 種の遺伝子について詳しく調べたところ、遺伝子の周辺に $ERR\gamma$ がリクルートされるものが 28 種あった。そもそも核内受容体遺伝子は、二重らせん構造のプラス鎖に存在するものとマイナス鎖に存在するものがあり、今回ヒットした 28 種の遺伝子にその偏りはなく、それぞれ 14 種ずつあった。なかでも $ER\beta$ 遺伝子はその上流にだけでなく、遺伝子内にも、下流にも $ERR\gamma$ がリクルートされることが判明した。すなわち、 $ERR\gamma$ が結合するエレメント・ERRE を持つエンハンサー領域は遺伝子上流、内部、下流にも存在し、また、一つの領域に ERRE が複数存在するものや重複しているものも発見された。こうして、 $ERR\gamma$ はマウス胎仔脳における遺伝子発現における主要な転写因子として多様な役割を果たす可能性が示唆された。

本研究において、BPA 暴露マウスのほとんどは多動性症状を示すこと、さらに、その悪影響の分子科学的な原因が雌雄で異なることが初めて示された。特に、BPA 暴露は中枢神経系の遺伝子に対して mRNA の発現量や発現リズムを変化させ、突然変異も起こすことが判明した。このように、遺伝子発現における BPA 暴露の具体的な分子科学的な影響が解析されたのは初めてのことであり、今後、その分子メカニズムの解明が強く期待される。