

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基礎研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592354
 研究課題名（和文） 内分泌攪乱物質が発達期の脳ドーパミン神経系に及ぼす影響
 研究課題名（英文） Effects of endocrine disorders on developing dopaminergic system in brain
 研究代表
 光畑 智恵子（MITSUHATA CHIEKO）
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：10335664

研究成果の概要：本研究は内分泌攪乱物質が脳形成、発達時期に何らかの影響を及ぼす可能性を明らかにすることを目的に、軽度発達障害の1つである注意欠陥多動性障害において治療薬である中枢神経刺激薬の作用部位であるドーパミントランスポーター（DAT）を含むドーパミン神経系を中心に内分泌攪乱物質の1つであるビスフェノール A の作用の解析を行った。妊娠マウスに BPA を摂食させ、胎児期、並びに授乳期に BPA 暴露されたマウスを作成し、行動解析を行うと共に脳内の DAT のレベルを検討したところ、BPA 濃度依存的に自発運動量は高くなっているが、DAT の発現には明らかな差は認められなかった。そこで、13 日胎児脳より調整した初代培養神経細胞を用い、分化や細胞死への影響を検討したが、分化マーカーである MAP2 発現が BPA 濃度依存的に増加する傾向が認められた。このことから BPA 誘発による行動変容の原因の1つに MAP2 の増加が関与する可能性が窺われた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・矯正・小児系歯学

キーワード：内分泌攪乱物質、発達、ドーパミン神経

1. 研究開始当初の背景

内分泌攪乱物質の中枢神経系への影響が懸念されている。歯科用材料にも使用されて

いるビスフェノール A (BPA) やエチルエストラジオール等のエストロゲン様内分泌攪乱物質の胎児期、授乳期での暴露が精神発達、

行動様式等に影響することが危惧されており、現在学級崩壊などの問題となる軽度発達障害を引き起こす要因になっている可能性も否定されていない。

軽度発達障害の1つである注意欠陥多動性障害 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) は、小児期に発症する精神的疾患で、学童期に 5~10%の児童に認められるという報告もある。こうした児童は行動異常として過度の多動、衝動性、気分の変動、攻撃性などの行動異常症状を示し、社会的適応が難しく、歯科治療においても協力が得にくく、治療困難となる場合が多い。その原因は未だ明らかではないが、遺伝的要因の関与、さらに、ストレス、内分泌攪乱物質などの環境要因を含めた多因子の関わりが考えられている。治療の1つとして中枢刺激薬である methylphenidate(Retalin)を用いた薬剤療法が行われている。この薬物はドパミン(DA)作動性神経終末のシナプス前膜に存在し、神経興奮により放出された DA を細胞内に再取り込みすることにより神経伝達を終了される働きを持つドパミントランスポーター(DAT)に作用することから、ADHD 発症に DAT が関与する可能性が強く示唆されている。

近年、この可能性を示唆するデータが疫学調査や動物実験により報告されつつある (Javelin ら *Am J Psychiatry* 160, 1028-40, 2003, Ryan ら *Hormon and Behavior* 50, 85-93, 2006 など)。しかし ADHD 発症と DAT との関係は依然として不明な点が多い。

我々はこれまでに DAT の構造・機能・発現とその調節について研究を行って DAT 発現変化による DA 神経機能の修飾が、ADHD 発症に係る可能性を追求している。遺伝子の mRNA 3'非翻訳領域(3'-UTR)の繰り返し配列多型(VNTR)と ADHD との間に有意な係りがあることが報告されていたが、それが DAT

発現をどのように調節しているかは明らかではなかった。そこで発現解析を行ったが、その結果、大半を占める多型間では DAT 発現に差がないことを認めた。また DAT 転写調節に対するエストロゲン、BPA の影響を探索するため、DAT 遺伝子 5'上流のプロモーター候補領域を含んだプラスミドを構築し、レポーターアッセイを行った結果、いずれの領域も DAT プロモーター活性に影響しなかった。しかし、この系におけるエストロゲンを介したシグナル伝達系の役割は不明なため、DAT 遺伝子発現に対する影響の確かな根拠は未だに得られていない。

2. 研究の目的

DAT を介した DA 神経機能の修飾が、ADHD 発症に係る可能性を追求することを目的として、ストレスラーとしての環境因子が DAT 機能発現にどのような影響を起こすかを明らかにすることを目標とした。このためにひとつの可能性ある系としてエストロゲン様作用を引き起こす物質—BPA 等—が DAT 発現に及ぼす影響を研究の中心に据え、エストロゲン様物質による DAT 転写活性を調節する機序とその生理的意義、病態を明らかにするために、エストロゲン、エストロゲン様物質が結合するとされる受容体を介した DAT の発現調節を明らかにすることを目的に以下のことを検討することとした。

- 1) 従来から知られている核内受容体(ER)を介する系による DAT 転写調節について検討する。
- 2) 細胞膜上に確認されつつある新規の ER からのシグナル伝達系を介して生じる可能性のある DAT 発現調節の系についての検討を行うこととした。

3. 研究の方法

従来から知られている ER を介した転写調節について、*In vitro* の系で、DAT と同じアミントランスポーターであるノルエピネフリントランスポーター (NET) 発現 PC12 細胞を用いて、エストロゲンによるノルエピネフリン (NE) の取り込みに対する影響を調べた。

並行して *In vivo* の系で、妊娠マウスに BPA を摂食させ、胎児期、並びに授乳期に BPA 暴露されたマウスを作成し、アニメックスを用いて行動解析を行うとともに脳内の DAT を始めとしたドパミン神経系での変化を蛋白レベルで解析した。BPA 暴露を持続的に行うため、2 種類の濃度の BPA を加えた粉餌を作り、母親マウスが妊娠 11 日目から出産まで自由に摂食できるようにした。

さらにドパミン神経を含めた神経発達段階における BPA の影響をあきらかにするために 13 日目胎児脳より初代神経細胞を調整し、増殖・分化への影響について検討を行った。

4. 研究成果

In vitro の系で、DAT と同じアミントランスポーターである NET 発現 PC12 細胞を用いて、エストロゲンによるノルエピネフリンの取り込みに対する影響を調べるために 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, BPA をそれぞれ前処理 (24 時間、1 時間、10 分) した後、 $[^3\text{H}]$ NE を用いて取り込み量を調べた。上記のどの時間においてもコントロールに比べ多少の減少を認めたが大きな影響は認められなかった。さらにラット DAT stable 発現 HeLa 細胞を用いて同様の実験を行ったが、上記 NET 発現 PC 細胞で得られた結果と同様、大きな影響は認められなかった。これらの結果から BPA の細胞への影響に ER が大きく関わっている可能性は低いと考えた。し

かしながら BPA 投与による細胞死に関する報告があることから、BPA による細胞死への DAT の関与を調べるため、上記ラット DAT stable 発現 HeLa 細胞を用い、HeLa 細胞との間で BPA による細胞死に差があるかどうか調べてみたが大きな差はなかった。これらのことから BPA は DAT 特異的に作用するのではなく、脳内のネットワークを介して DA 神経系に大きな変性や細胞死を起こす可能性も示唆された。

胎児期に BPA 暴露されたマウスを用いてアニメックスを用いて行動解析を行ったところ濃度依存的に自発運動量は増加していた。しかしながら脳組織を用いて行った蛋白解析からは DAT、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) とともに明らかな差は認められなかった。以上のことから自発運動量の増加に直接的に DA 神経系が寄与していることは確認できなかった。

上記 2 つの結果より BPA は DA 神経に直接的に作用するだけでなく、脳内ネットワークを介して作用する可能性があること、またエピジェネティックに作用することを示唆することが報告されたことより、BPA の神経細胞への作用を異なった角度からさら追及するために DA 神経に分化する以前の前駆状態において BPA 暴露でどのような作用が現れるかを明らかにすることを試みた。13 日目胎児脳より調整した初代神経細胞を用いて、分化や細胞死への影響に関する実験を行った結果、低濃度 BPA 暴露により分化マーカーである MAP2 の発現は BPA 濃度依存的に増加する傾向が認められた。このことから、BPA 誘発による行動変容の原因の 1 つとして BPA を介した MAP2 の増加、すなわち神経突起の増加/伸長が関与している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

光畑 智恵子 (MITSUHATA CHIEKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10335664

(2)研究分担者

香西 克之 (KOZAI KATSUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：10178212

土肥 敏博 (DOHI TOSHIHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00034182

(3)連携研究者

北山 滋雄 (KITAYAMA SHIGEO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：80177873