

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570155

研究課題名（和文） 環境ホルモンBPAによる海馬の記憶学習の攪乱の解析

研究課題名（英文） Bisphenol A disturbs hippocampal learning and memory system.

研究代表者

木本 哲也（KIMOTO TETSUYA）

東京大学・総合文化研究科・助教

研究者番号：60292843

研究成果の概要（和文）：海馬で低用量ビスフェノール A（BPA）の作用を検討した。（1）成熟ラット海馬スライスに 10 nM BPA を 2 時間作用させると樹状突起スパイン（特に middle-head：頭部直径 0.4-0.5 μm）が増加した。BPA 作用は膜受容体 ERRγ が媒介していた。MAP キナーゼ・NMDA 受容体阻害も BPA 作用を抑制した。（2）周産期に母体経路で低用量 BPA (30 μg/kg BW/day) に曝露されたラットのスパインは成長後のオスで減少した。メスでは性周期依存性変動が消失しオスに近づいた。（3）質量分析法でオスラット海馬に約 64 nM の BPA 蓄積が判明した。

研究成果の概要（英文）：Effects of low-dose bisphenol A (BPA) on the hippocampus were examined. (1) In adult rat hippocampal slices, 10 nM BPA increased dendritic spines (especially middle-head spines with head diameter of 0.4-0.5 μm) within 2h via ERRγ localized in principal neurons. Inhibitors of MAP kinases and NMDA receptors blocked the BPA effects. (2) Perinatal exposure to low-dose BPA (30 μg/kg BW/day) via dam modulated the synapse development in the pup hippocampus. In male at postnatal 8-weeks, the spine density was decreased compared with that of control. In female, perinatal BPA exposure attenuated the estrus cycle-dependent spine density changes, resulting in the disappearance of sex-related differences. (3) BPA concentration was determined in male hippocampus (approx. 64 nM) by mass-spectrometry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ビスフェノール A, 環境ホルモン, 海馬, 記憶学習, 内分泌かく乱物質, シナプス, スパイン

## 1. 研究開始当初の背景

女性ホルモン（エストロジオール：脳では雌雄によらず合成している）は神経シナプスをモジュレートして記憶機能を増強している。環境ホルモンの代表であるビスフェノール

A（BPA）の低容量効果(10 nM or 50 μg/kg 程度の投与に対する作用)はヒトなどの哺乳類の神経機能に及ぼす影響において注目されている。低容量効果は伝統的な薬物効果の検査法（マイクロモルの高濃度作用）では検

出や評価が難しいので、新しい検査法が必要とされてきた。2000年以降、日本・米国・ヨーロッパでの活発な環境ホルモンの研究で多くの事柄がわかった。我々の内分泌かく乱研究 (Kawato, 2004, Environ Sci ; Ogiue et al., 2008) を始めとする研究でも、脳神経への影響がはっきりと現れることがわかってきた。特に2008年以降、アメリカやカナダでBPAの幼児期での神経作用が熱い問題になっている。プラスチック可塑化剤BPAは哺乳瓶やプラスチックコーティングのあらゆるところから漏出するので、カナダ政府はBPAを含むプラスチック製の哺乳瓶や缶詰の使用を禁止し、米国National Toxicology ProgramもBPAの脳神経への影響に関して警告を發した。Yale Univのサル海馬のシナプス形成阻害 (Leranth et al., 2008, PNAS)、九州工業大学粟生研による神経行動実験での雌雄差の消失など、50 µg/kg程度のBPA投与は脳機能に顕著なかく乱を示している。

## 2. 研究の目的

このような世界の流れに対応して、本研究では代表的な環境ホルモン=擬似女性ホルモンであるBPAがこの神経伝達を如何に変動させるかを解析し、海馬神経での女性ホルモン作用系に対抗して、BPAなどが海馬の記憶過程や神経回路の発達に及ぼす攪乱効果を分子論的に明らかにすることを目的とした。神経内分泌学では「視床下部→脳下垂体→性腺」軸に従い、性腺から血流に乗って性ホルモンが脳に到達し、神経作用を示す機構が信じられてきた。我々の一連の研究により、この常識が変更され、海馬などの高次脳機能部位でも自分で女性・男性ホルモンを合成し、それが神経に作用している経路がわかってきた。このことを踏まえてBPAの作用経路を調べ、長い間不明であったBPAの本当の受容体を同定し、その神経シナプス作用を解明することを目的とした。さらに、本研究では周産期(胎児期後期~幼児期初期)にBPA暴露された仔ラットが成獣になった時、神経シナプスが大きく変化していることを解析することで、社会的に問題となっている子供への影響を検討した。BPAの吸収量はどうも雄雌で異なるので(雄>雌)、作用も雄雌で異なるかどうかとも検討した。

## 3. 研究の方法

BPAの海馬記憶学習機構への影響を海馬神経スパイン(海馬興奮性シナプスでは後シナプスを形成)への作用として検討した。スパイン解析では、急性海馬スライス(400 µm厚)を調製後、人工脳脊髄液中でBPAや阻害剤を2時間程度作用させてからPFA固定し、単一神経にLucifer-Yellow蛍光色素のインジェクションを行って樹状突起スパインを可視化

し、共焦点顕微鏡で3次元像を取得後に解析した。この際、我々が開発したスパイン自動解析プログラムを使用した。周産期BPA暴露の影響を検討した際には、周産期

(ED15-PND7)の母ラットにヒトのTDI

(tolerable daily intake: 50 µg/kg/day)

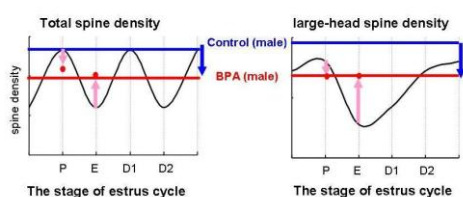
以下の低用量BPA(30 µg/kg/day)を経口投与して経胎盤及び経乳的に仔をBPA曝露し、成長後(8週齢程度)に経心的にPFAを灌流してから海馬スライスを調製し、上記と同様に樹状突起スパインを可視化して海馬神経シナプス変化を調べた。BPA濃度測定は、海馬組織からのBPA有機溶媒抽出→HPLCで粗精製→BPAのピコリノイル誘導体化→質量分析という厳密な手順で行った。

## 4. 研究成果

(1) 海馬神経スパインに対するBPAの作用とその機序を確定すべく実験と解析を進めた結果、成獣オスラットから取り出した海馬スライスに、環境濃度と同程度である10 nM程度のBPAを投与すると、海馬CA1錐体神経細胞の樹状突起上の神経スパインの密度が急性的(2時間以内)に増加するという結果が得られた。特にスパイン頭部のサイズが全体の中程度のmiddle-headスパイン(頭部直径0.4-0.5 µm)の密度が顕著に増加した。海馬でのBPAの神経スパイン増加作用がどのような受容体を介しているのかに関しては、古典的女性ホルモン受容体(ERα)を介するのではないかと推測されていたが、ERαはBPAとの結合能が非常に低いという矛盾があり、世界的に有名な難題であった。BPAのスパイン増加作用にはERα/ERβの阻害剤ICI182,780を加えても抑制がみられなかった。そこで我々は、BPAに高結合能を持つ膜受容体のestrogen-related receptor gamma (ERRγ)に着目した。ERRγ/ERα/ERβの阻害剤40H-tamoxifenでBPAのスパイン増加作用が抑制されたことからERRγが受容体であることがわかった。ERRγの下流ではMAPキナーゼ活性化され、これによってBPAの神経スパイン増加が引き起こされていることが、MAPキナーゼ阻害剤を加えることで証明できた。BPAの神経スパイン増加にはNMDA受容体も関与していることも阻害実験によって判明した。海馬ではERRγは神経の細胞体のみならずシナプス部位にも存在していることを、免疫抗体電子顕微鏡法とウエスタンブロットにより明らかにした。このシナプスにあるERRγがBPAの早い効果に関与していると考えられる。これまで培養細胞系を使った研究では、ERRγはBPAが結合してもしなくても、恒常的に活性化されているという結果であったので、世界的にはBPAは機能性受容体とはみなされていなかった。従って我々のシナプス効果において、初めてERRγがBPAの受

容体として働いていることが見つかったことは大きな意義がある。

(2) 周産期 (ED15-PND7) の母ラットに低用量 BPA (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight/day) を経口投与して経胎盤的及び経乳的に仔を BPA に曝露し、成長後 (8 週齢程度) の海馬神経シナプス変化をスパインを解析して調べた。オスでは、BPA 非曝露群のスパイン密度は 2.29 (spines/ $\mu\text{m}$  of dendrite) で、BPA 曝露群では 2.15 に減少した。特に記憶能力の高い large-head スパイン (頭部直径 0.5-1.0  $\mu\text{m}$ ) の減少が目立ち、BPA 曝露による記憶能力低下の大きな要因である可能性がある。一方、メスでは BPA 非曝露群では性周期に伴い proestrus 期 (2.33)  $\rightarrow$  estrus 期 (2.04)  $\rightarrow$  diestrus1 期 (2.33)  $\rightarrow$  diestrus2 期 (2.04) と変化するが、BPA 曝露群では proestrus 期で減少し、estrus 期で増加して、性周期に伴うスパイン密度変動が無くなるよう変化し、BPA 曝露オス (2.15) に近づいた。即ち、生殖器官等への影響が見られず危険性が低いとされてきた低用量でも、BPA の周産期曝露は成長後の海馬シナプスに顕著な影響をもたらした。現在北米や欧州でヒトの子供時代の BPA 曝露の影響が成人で現れることが問題化しているが、その考察の一助になるものと思われる。



(3) 質量分析 LC/MS/MS を用いて、成獣オスラットの海馬に約 64 nM の BPA が蓄積していることを見出した。通常環境から摂取されるナノモルの低濃度の BPA は、生殖器官では影響が目立たないが、記憶中枢の海馬の脳神経へ影響を及ぼすことをはっきり示したという意義がある。

## 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 11 件)

① Hasegawa Y, Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Kimoto T, Hojo Y, Yamazaki T, Kawato S. Bisphenol A significantly modulates long-term depression in the hippocampus as observed by multielectrode system. Neuroendocrinol. Lett., 査読: 有, 34(2), 2013, 129-134.

② Komatsuzaki Y, Hatanaka Y, Murakami G, Mukai H, Hojo Y, Saito M, Kimoto T, Kawato S.

Corticosterone Induces Rapid Spinogenesis via Synaptic Glucocorticoid Receptors and Kinase Networks in Hippocampus.

PLoS ONE, 査読: 有, 7(4), 2012, e34124, 10.1371/journal.pone.0034124

③ Tanabe N, Yoshino H, Kimoto T, Hojo Y, Ogiue-Ikeda M, Shimohigashi Y, and Kawato S.

Nanomolar dose of bisphenol A rapidly modulates spinogenesis in adult hippocampal neurons.

Mol Cell Endocrinol, 査読: 有, 351, 2012, 317-325, 10.1016/j.mce.2012.01.008

④ Hojo Y, Higo S, Kawato S, Hatanaka Y, Ooishi Y, Murakami G, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Kimoto T. Hippocampal synthesis of sex steroids and corticosteroids: essential for modulation of synaptic plasticity.

Front Neuroendocrine Sci, 査読: 有, Article 43, 2011, 10.3389/fendo.2011.00043

⑤ Barron A, Hojo Y, Muka H, Higo S, Ooishi Y, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Kimoto T, Kawato S.

Regulation of synaptic plasticity by hippocampus synthesised estradiol.

Horm Mol Biol Clin Invest, 査読: 有, 7(2), 2011, 361-375, 10.1515/hmbci.2011.118

⑥ Ooishi Y, Kawato S, Hojo Y, Hatanaka Y, Higo S, Murakami G, Komatsuzaki Y, Ogiue-Ikeda M, Kimoto T, Mukai H.

Modulation of synaptic plasticity in the hippocampus by hippocampus-derived estrogen and androgen.

J Steroid Biochem Mol Biol, 査読: 有, 131(1-2), 2012, 37-51, 10.1016/j.jsbmb.2011.10.004

⑦ Higo S, Hojo Y, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ooishi Y, Murakami G, Mukai H, Yamazaki T, Nakahara D, Anna B, Kimoto T, Kawato S.

Endogenous Synthesis of Corticosteroids in the Hippocampus.

PLoS ONE, 査読: 有, 6(7), 2011, e21631, 10.1371/journal.pone.0021631

⑧ Ooishi Y, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Hasegawa Y, Shindo T, Morrison JH, Kimoto T, Kawato S.

Estradiol Rapidly Rescues Synaptic Transmission from Corticosterone-induced Suppression via Synaptic/Extranuclear Steroid Receptors in the Hippocampus. Cereb Cortex, 査読：有, 22(4), 2011, 926-936, 10.1093/cercor/bhr164

⑨Mukai H, Hatanaka Y, Mitsunashi K, Hojo Y, Komatsuzaki Y, Sato R, Murakami G, Kimoto T, Kawato S. Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on spinogenesis. Cereb Cortex, 査読：有, 21(12), 2011, 2704-2711, 10.1093/cercor/bhr059

⑩Kimoto T, Ishii H, Higo S, Hojo Y, Kawato S. Semicomprehensive Analysis of the Postnatal Age-Related Changes in the mRNA Expression of Sex Steroidogenic Enzymes and Sex Steroid Receptors in the Male Rat Hippocampus. Endocrinology, 査読：有, 151(12), 2010, 5795-5806

⑪Mukai H, Kimoto T, Hojo Y, Kawato S, Murakami G, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. Biochim. Biophys. Acta, 査読：有, 1800, 2010, 1030-1044

[学会発表] (計 11 件)

①李香蓮, 芳野日南子, 木本哲也, 粟生修司, 川戸佳  
ビスフェノール A の周生期曝露は成獣雄雌の海馬神経シナプスを変動させる  
日本内分泌攪乱化学物質学会 第 15 回研究発表会, 2012 年 12 月 19 日, 東京大学山上会館 (東京都、文京区)

②木本 哲也, 若林 正彦, 川戸 佳  
海馬での年齢依存的な性ホルモン受容体・合成酵素遺伝子の発現変動解析  
第 50 回日本生物物理学会年会, 2012 年 09 月 24 日, 名古屋大学 東山キャンパス (愛知県、名古屋市)

③北條 泰嗣, 若林 正彦, 吉田 広太郎, 木本 哲也, 川戸 佳  
記憶・学習中枢海馬の性差は海馬で合成されるホルモンによるものである  
第 50 回日本生物物理学会年会, 2012 年 09 月 24 日, 名古屋大学 東山キャンパス (愛知県、

名古屋市)

④北條 泰嗣, 向井 秀夫, 若林 正彦, 吉田 広太郎, 山崎 岳, 木本 哲也, 川戸 佳  
ラット海馬シナプスにおけるステロイドの合成とその作用  
第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 09 月 19 日, 名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

⑤Hojo Y, Higo S, Mukai H, Harada N, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S  
Sex hormone synthesis and synaptocrinology in rat hippocampal synapses.  
第 34 回 日本神経科学大会, 2011 年 9 月 16 日, パシフィコ横浜

⑥北條泰嗣, 肥後心平, 上林正修, 向井秀夫, 木本哲也, 川戸佳  
記憶・学習中枢海馬に性差はあるか? その 3  
第 49 回 日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 18 日, 兵庫県立大学姫路書写キャンパス

⑦Hojo Y, Higo S, Uebayashi M, Yamazaki T, Harada N, Homma S, Kimoto T, Kawato S  
Is there sex difference in the hippocampus, the center of learning and memory? Part 2.  
日本生物物理学会, 2010 年 9 月 22 日, 東北大学

⑧Hatanaka Y, Sato S, Kimoto T, Kawato S  
Androgen rapidly increases the density of dendritic spines in the hippocampus via kinase pathways.  
日本生物物理学会, 2010 年 9 月 22 日, 東北大学

⑨Kimoto T, Sato S, Hatanaka Y, Mukai H, Kawato S  
Modulation of synaptic plasticity by estrogen and androgen in the hippocampus.  
日本生物物理学会, 2010 年 9 月 22 日, 東北大学

⑩北條泰嗣, 肥後心平, 向井秀夫, 原田信広, 本間誠次郎, 木本哲也, 川戸佳  
オスラット海馬シナプスにおける性ホルモンの合成と局所分泌  
日本神経科学学会, 2010 年 9 月 4 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)

⑪畑中悠佑, 佐藤怜以, 木本哲也, 川戸佳  
男性ホルモンによる海馬スパインの急性的増加とその細胞内情報伝達経路の解析  
日本神経科学学会, 2010 年 9 月 3 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木本 哲也 (KIMOTO TETSUYA)  
東京大学・総合文化研究科・助教  
研究者番号： 60292843

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：