

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460258

研究課題名(和文) 脳の形態形成と性分化における性ホルモンの意義

研究課題名(英文) The role of sex hormones in brain morphogenesis and sex differentiation

研究代表者

駒田 致和 (Komada, Munekazu)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：90523994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン受容体は脳内の神経細胞、あるいはミクログリアに発現し、その活性を制御している。また、脳内のアロマトラーゼによって変換される神経ステロイドが脳の発生・発達に関与している。本研究課題では、エストロゲン産生酵素の発現を調節するSF-1が大脳皮質に発現し、脳由来のエストロゲンが神経細胞の増殖や分化、移動を制御していることを示した。さらに、エストロゲン様作用をもつ化学物質の胎児期曝露による毒性を評価し、視床下部の組織構築の異常と炎症を伴うミクログリアの増加を検出した。つまり、エストロゲンは神経細胞あるいはミクログリアに作用することで脳の適切な発生・発達に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Estrogen receptors express in the neurons and microglia in the brain and regulate their activity. Neurosteroids are converted by aromatase and are involved in the development and maturation of the brain. In the study, we showed that SF-1, regulated the expression of estrogen-producing enzyme, were expressed in the neocortex and the brain derived estrogen controlled the proliferation, differentiation, and migration of neurons. In addition, toxicity evaluation by the prenatal exposure of estrogenic chemical substances resulted in the abnormalities in the hypothalamus construction, brain-inflammation, and increase of microglia. We suggest that estrogen signaling act on the neurons and microglia, and contribute to the proper development of brain.

研究分野：解剖学

キーワード：エストロゲン 神経新生 大脳皮質 視床下部 ビスフェノールA ミクログリア Steroidogenic factor-1

1. 研究開始当初の背景

(1) 性ステロイドホルモンの脳の正常発生・発達への関与については多くの優れた先行研究により、性分化による性的二型の形成をはじめ、神経細胞の増殖や分化、生存、移動など様々な役割を果たしていることが知られている。特にエストロゲンはその受容体が神経細胞やグリア細胞に発現しており、その活性を制御している。ステロイドホルモンは主に生殖腺で産生され脳に作用しているが、脳内でもアロマトラーゼなどの変換酵素によって産生され、脳ステロイドとして作用していることが報告されている。

(2) エストロゲン様の作用をもつ化学物質は、エストロゲン受容体に結合しシグナルを攪乱することから環境ホルモンと呼ばれている。これらの化学物質の胎児期曝露は、脳の発生、発達に重篤な影響を引き起こすことが懸念されている。生殖毒性などを引き起こす濃度よりもより低用量で毒性作用を中枢神経系で引き起こすことが報告されていることから、その毒性機序を明らかにすることは急務である。

(3) 大脳皮質をはじめとする脳の各領域は、胎児期に莫大な数の神経細胞が産生される。適切な数の神経細胞が正しい位置に配列することで神経ネットワークが形成され高次脳機能が支配されている。この時期の脳は化学物質などの環境要因に脆弱であり、その影響は生命の危機に直結するものに留まらず、微細な構造異常を引き起こすことで発達期の発達障害や成熟後の神経疾患の原因となることが懸念されている。

(4) 中枢神経系の免疫機能を司るグリア細胞であるミクログリアは、マウスにおいては胎生8日頃に胎盤の造血幹細胞から産生され、脳内へと移行する。その後分裂を繰り返し、生後爆発的にその数を増やし、活性に応じて形態を変化させることが知られている。大きく分類すると、活性型は球形の Amoeboid 型

をしており、休止型は小さな核と多数の突起をもつ Ramified 型をしている。また活性型と休止型の間中型である Transition 型も存在する。また、炎症時にはサイトカインなどの炎症因子によって、細胞傷害型の M1 型と細胞保護型の M2 型に分化し、組織や個体の保護、あるいは細胞の保護作用を行っている。

発生・発達期の正常時においては、ミクログリアは神経細胞の増殖や生存、移動に関与している。さらにシナプスの可塑性や神経ネットワークの構築の制御も行っていることから、脳の正常な形態形成や高次脳機能に重要な役割を果たしている。

2. 研究の目的

(1) ステロイドホルモンの変換酵素であるアロマトラーゼが脳内に発現していることがすでに報告されている。そのエストロゲン変換酵素の産生を制御している核内受容体の Steroidogenic Factor-1 (SF-1) はこれまで脳内においては視床下部の腹内側核に限局して発現していることが知られている。我々の予備的検討により、SF-1 が大脳皮質にも発現していることが示唆されたことから、大脳皮質の発生期における SF-1 シグナルの役割を明らかにするとともに、生殖腺ではなく脳内で産生されるエストロゲンの機能についても解析する。

(2) 脳を構成する神経細胞やグリア細胞にはエストロゲン受容体が発現しており、エストロゲンシグナルによってそれらの活性が制御されている。エストロゲン様作用をもつ環境ホルモンはこれらの細胞に作用し、その活性に異常を引き起こすことで組織構築や機能発現に影響していると考えられる。特に、ビスフェノール A (BPA) の胎児期曝露は大脳皮質の組織構築に異常を引き起こすことが報告されており、成熟後にも学習障害、雌雄行動や生殖行動などの行動異常が誘発される。また、曝露により肝臓等に炎症を引き起こすことも報告されている。そこで、本研

究課題では BPA の胎児期曝露が引き起こす組織構築の異常を明らかにすることで、高次脳機能異常の原因を明らかにするとともに、発生・発達期の脳内で神経炎症を伴うミクログリアの異常について詳細な解析をする。

3. 研究の方法

(1) 胎児期の脳皮質形成における SF-1 シグナル、さらには脳内エストロゲンの役割を明らかにするために、SF-1 ノックアウトマウスを用いて脳皮質の組織構築の異常を解析した。細胞増殖や神経分化について解析するために、神経幹細胞のマーカーとして Ki67、Pax6、Nestin、中間前駆細胞のマーカーとして Tbr1、神経細胞のマーカーとして Doublecortin、NeuN の免疫組織染色を行った。次に、神経幹細胞の細胞周期や神経分化への影響をチミジン類似物質である CldU、IdU のラベリング法を用いて解析した。これらの異常の原因を明らかにするために、RT-qPCR を行いエストロゲン関連因子、アロマターゼ、神経分化関連因子の発現異常について解析した。

(2) 生殖行動の高次中枢である視床下部の発生におけるエストロゲンシグナルの影響を明らかにするために、また、環境ホルモンによる神経発生毒性を評価するために、20、200g/kg/day の BPA の胎児期強制曝露モデルマウスを作成し、その異常について評価した。視床下部については、その形態を精査すると共に、細胞増殖への影響を評価するために Ki67 による免疫染色を行った。また、と同様に CldU を用いて神経新生についても解析を行った。さらに、神経細胞の運命決定について解析するために、視床下部腹側神経細胞のマーカーとして SF-1、背側神経細胞のマーカーとして OTP の免疫染色を行った。これらの異常の原因因子を特定するために、エストロゲン関連因子と神経分化制御因子の発現異常を RT-qPCR を用いて解析した。

(3) BPA の胎児期曝露が脳内で炎症やミク

ログリアの活性に及ぼしている影響を明らかにするために、用いた BPA 胎児期曝露モデルマウスを用いて、その異常について解析した。ミクログリアの数や形態をマーカーである Iba1 を用いた免疫染色によって解析した。さらに遺伝子発現については、ミクログリア関連因子、炎症因子、神経栄養因子、神経細胞 ミクログリアシグナル伝達因子について RT-qPCR を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) SF-1KO マウスの脳皮質発生における表現型について解析したところ、神経幹細胞の増加が観察された。この異常は、神経幹細胞の細胞周期の延長と、細胞周期を逸脱するタイミングが遅くなることによって引き起こされていることを明らかにした。さらには、神経細胞が脳室面で分化し、脳表面まで移動する際にガイド役として働く、神経幹細胞の放射状突起の形成異常も観察された。これらの事から、SF-1KO マウスの脳皮質において、神経幹細胞の細胞周期と神経分化のタイミング異常が引き起こされ、さらには分化した神経細胞の移動にも影響が及ぼされることによって、脳皮質の層構造の形成異常が引き起こされることを明らかにした。

さらに、これらの異常の原因を明らかにするために RT-PCR を用いて遺伝子発現について解析したところ、アロマターゼとエストロゲンレセプター の発現に異常が見られた。つまり、SF-1 の発現を抑制することで、脳皮質における脳内エストロゲンシグナルに異常が生じ、神経分化や移動の異常を引き起こしていることを明らかにした。

(2) BPA の胎児期曝露モデルマウスを用いて視床下部形成における毒性影響を評価した。特に視床下部の神経新生が起こる胎生 12 日~18 日に着目し、細胞増殖や神経新生、神経細胞の運命決定について解析を行った。その結果、細胞増殖の増加と神経新生の抑制が観察された。また SF-1 と Otp の発現解析を

行ったところ SF-1 陽性神経細胞が減少していた。さらにこれらの異常の原因因子を同定するために、神経分化関連因子とエストロゲンシグナル関連因子について RT-PCR を用いて発現解析を行った。その結果、神経新生に関わる NeuroD の発現が減少していることが分かった。SF-1 にはメチル化異常によるエピジェネティックな遺伝子発現攪乱作用があることが報告されている。つまり、エストロゲン様作用だけでなくエピジェネティックな作用により遺伝子発現の異常を誘発し、視床下部の組織構築に影響している可能性を示した。

(3) BPA の胎児期曝露は の視床下部だけでなく、研究代表者らのこれまでの解析により大脳皮質の形態形成や、高次脳機能にも異常を誘発することが報告されている。その神経発生・発達毒性の発現メカニズムを明らかにするために、脳内炎症とミクログリアに着目した。ミクログリアの形態や数を解析したところ、その数が増加していた。さらに、ミクログリア関連因子や炎症因子の発現を RT-PCR を用いて解析したところ、脳内で炎症が起き、ミクログリア関連因子の発現が増加していた。さらに、シグナル伝達因子や神経栄養因子の発現も亢進しており、脳内炎症によってミクログリアの数や活性が亢進していた。以上の事から、BPA の胎児期曝露は脳内炎症を伴うミクログリアの異常を誘発しており、これらは中枢神経系の組織構築や神経ネットワークの構築にも影響する可能性がある。また、他の化学物でも同様の神経毒性が見られることから、化学物質の胎児期曝露による神経発生・発達毒性の新たな指標と成り得る可能性を示した。

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 10 件)

Ikeda Y, Tagami A, Komada M, Takahashi

M, Expression of Kisspeptin in gonadotrope precursors in the mouse pituitary during embryonic and postnatal development and in adulthood. 査読有, Neuroendocrinology, 2016, Equb ahead of print

DOI:10.1159/000453398

Komada M, Gendai Y, Kagawa N, Nagao T, Prenatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs development of the mouse neocortex. 査読有, Toxicol. Lett., 2016, 30: 69-79

DOI:10.1016/j.toxlet.2016.07.019

Nagai M, Minegishi K, Komada M, Tsuchiya M, Kameda T, Yamada S, Extraction of DNA from human embryos after long-term preservation in formalin and Bouin's solutions. 査読有, Congenit. Anom., 2016, 56: 112-118

DOI:10.1111/cga.12148

Yagi H, Oka Y, Komada M, Xie MJ, Noguchi K, Sato M, Filamin A interacting protein plays a role in proper positioning of callosal projection neurons in the cortex. 査読有, Neurosci. Lett., 2016, 612: 18-24

DOI:10.1016/j.neulet.201511.049

Komada M, Takahashi M, Ikeda Y, Involvement of SF-1 in neurogenesis and neuronal migration in the developing neocortex. 査読有, Neurosci. Lett., 2016, 600: 85-90

DOI:10.1016/j.neulet.2015.06.005

Okamoto M, Iguchi T, Hattori T, Matsuzaki S, Koyama Y, Taniguchi M, Komada M, (他 13 名), DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1 through control of Ndel1 dual-phosphorylation. 査読有, J. Neurosci., 2015, 35: 2942-2958

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5029-13.2015

Nagao T, Kawachi K, Kagawa N, Komada M, Neurobehavioral evaluation of mouse newborns exposed prenatally to low-dose bisphenol A. 査

読有, J. Toxicol. Sci., 2014, 39: 231-235

Komada M, Itoh S, Kawachi K, Kagawa N, Ikeda Y, Nagao N, Newborn mice exposed prenatally to bisphenol A show hyperactivity and defective neocortical development. 査読有, Toxicology, 2014, 2: 51-60

DOI:10.1016/j.tox.2014.06.009

Yagi H, Nagano T, Xie MJ, Ikeda H, Kuroda K, Komada M, (他7名), Filamin A-interacting protein (FILIP) is a region-specific modulator of myosin 2b and controls spine morphology and NMDA receptor accumulation. 査読有, Sci. Rep., 2014, 4: 6353

DOI:10.1038/strp06353

〔学会発表〕(計9件)

駒田致和、長尾哲二、池田やよい、胎児期のエタノール曝露は大脳皮質の構造異常の原因となる脳内炎症とミクログリアの異常活性を誘発する、2017、第122回日本解剖学会学術集会(長崎県・長崎市・長崎大学医学部)

駒田致和、長尾哲二、池田やよい、胎児期エタノール曝露は大脳皮質の構造異常に因る行動異常を誘発する、2016、第58回歯科基礎医学会学術集会(北海道・札幌市・札幌コンベンションセンター)

駒田致和、河内宏太、井藤早紀、原奈央、長尾哲二、池田やよい、胎児期のエタノール曝露は大脳皮質のミクログリアの活性異常に因る形態異常と行動異常を誘発する、2016、第43回日本毒性学会学術年会(愛知県・名古屋市・ウインクあいち)

駒田致和、長尾哲二、池田やよい、胎児期のエタノール曝露は大脳皮質の構造異常の原因となる脳内炎症とミクログリアの異常活性を誘発する、2016、第121回日本解剖学会学術集会(福島県・郡山市・ビックパレットふくしま)

駒田致和、河内宏太、井藤早紀、原奈央、長尾哲二、池田やよい、胎児期のエタノール曝露は大脳皮質の形態学・行動学的異常を誘発する、2015、第55回日本先天異常学会学術集会・第38回日本小児遺伝学会学術集会(神奈川県・横浜市・パシ

フィコ横浜)

駒田致和、河内宏太、井藤早紀、原奈央、長尾哲二、池田やよい、胎児期のエタノール曝露は大脳皮質のミクログリアの活動異常に因る形態異常と行動異常を誘発する、2015、第42回日本毒性学会学術集会(石川県・金沢市・ホテル日航金沢)

駒田致和、井藤早紀、長尾哲二、池田やよい、Bisphenol Aの胎児期曝露はマウス新生児にHyperactiveと大脳皮質の形成異常を誘発する、2015、第120回日本解剖学会学術集会(兵庫県・神戸市・神戸コンベンションセンター)

駒田致和、長尾哲二、池田やよい、菅野純、胎児期低用量ビスフェノールA曝露は発生・発達期の脳皮質に形態・機能的異常を誘発する、2014、第17回環境ホルモン学会研究発表会(東京都・文京区・東京大学)

駒田致和、井藤早紀、長尾哲二、池田やよい、胎児期低用量ビスフェノールA曝露による大脳皮質の発生・成熟における影響の発生毒学的評価、2014、第41回日本毒性学会学術年会(兵庫県・神戸市・神戸コンベンションセンター)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

駒田 致和 (KOMADA, Munekazu)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：90523994

(2)研究分担者

池田 やよい (IKEDA, Yayoi)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：00202903

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし