

平成21年 5月29日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790107  
 研究課題名（和文） 環境ホルモンの脳かく乱作用の発現を予防する環境因子の同定とその分子機構の解明  
 研究課題名（英文） The elucidation of environmental factor and molecular mechanism preventing expression of brain disrupting actions caused by endocrine disruptor  
 研究代表者  
 副田 二三夫（SOEDA FUMIO）  
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教  
 研究者番号：10336216

研究成果の概要：環境ホルモンのプロトタイプであるジエチルスチルベストロールを妊娠マウスに暴露すると生まれた仔マウスは学習障害を起こす。この学習障害を修復させる環境因子を探索したところ、通常の飼育ケージより広いケージに遊具を配置したエンリッチな環境が学習障害の修復に必須であることがわかった。このエンリッチ環境による修復効果の分子機構を解明するためプロテオミクスの手法などを用いて解析したところ、神経活動に關与する数種の脳内分子がエンリッチ環境による修復効果に何らかの形で關与する可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	420,000	3,220,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：エンリッチ環境、予防薬学、環境化学物質、学習・記憶、プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

化学物質の内分泌かく乱作用に関する知見は、いわゆる環境ホルモン問題が起こった1998年に比べ集積されつつあるが、現在に至るまで、ヒトにおいて内分泌かく乱作用が確認された化学物質はない。この原因のひとつとして環境ホルモンの作用メカニズムが明確でないことが挙げられる。

これまでに研究代表者らは、マウスの胎仔期後期に環境ホルモンのプロトタイプといわれるジエチルスチルベストロール(DES)を低用量暴露すると、学習機能が阻害され、脳

内のシナプス関連分子であるリン酸化型Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII (pCaMKII)が増加することを見出し、環境ホルモンの脳かく乱作用を確実に検出できる実験系を確立した。さらに研究代表者らは、通常よりも広い飼育ケージにトンネルや回転車などの遊具を配置した、いわゆるエンリッチ環境で、DES暴露マウスを離乳後3週間飼育したところ、上述した学習障害やpCaMKIIの増加がともに消失するという極めて画期的な知見を見出した。これらのことから、環境ホルモンによる脳かく乱作用は、何

らかの環境因子により修復されることが示唆され、さらに、その修復メカニズムを解明することにより、脳かく乱作用の作用メカニズムも追究できるのではないかと考えた。しかし、どのようなメカニズムでDES暴露による脳かく乱作用を修復させているのかについては、現在のところ全く不明である。

エンリッチ環境が脳に与える影響は複雑であると考えられており、環境因子の違いにより個体が影響を受ける脳領域は異なることが示唆されている。また、アルツハイマー病やハンチントン舞踏病のモデルマウスをエンリッチ環境で飼育した場合と運動負荷のみを与えた場合とでは、個体の行動や脳内分子の発現レベルが異なることも報告されており、脳機能障害の修復メカニズムは、環境因子の違いにより異なることが予想される。そこで研究代表者は、脳かく乱作用の修復メカニズムを本質的に解明するためには、まず、研究代表者らが見出したエンリッチ環境による脳かく乱作用の修復に必須である環境因子を明確にし、その環境因子により脳かく乱作用を修復させる分子メカニズムを調べることが重要であると考え、本研究を計画するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らがこれまでに見出した、環境ホルモンDESの脳かく乱作用がエンリッチ環境飼育により消失するという知見に基づき、脳かく乱作用の修復メカニズムの一端を解明するものである。まず、行動科学的手法を用いてDES暴露による脳かく乱作用の修復に必須である環境因子を明らかにする。次いで、その環境因子が神経活動マーカーなどの脳内分子の発現レベルを変動させるのか否か、変動させるとすれば、それは飼育期間のどの時期で最も顕著であるのかについても明らかにする。さらに、これらの知見を基にプロテオミクスを行い、DES暴露による脳かく乱作用の修復に関与する分子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳かく乱作用の修復に必須な環境因子の同定

妊娠マウスの口腔内にDES (0.1 $\mu$ g) を1日1回7日間(胎仔期11-17日目)暴露した。出生した仔マウスは、離乳(生後21日目)の時点で、オスマウスを以下の6群(スタンダード環境、広い環境(エンリッチ環境から遊具を取り除いた環境)、運動刺激の環境、認知刺激の環境、視覚刺激の環境、体性感覚刺激の環境)に無作為に分け、3週間の環境飼育を行った。その後、受動的回避反応試験を行い、広い環境、運動刺激の環境、認知刺激の環境、視覚刺激の環境、体性感覚刺激の

環境でそれぞれ飼育したマウスの受動的回避反応をスタンダード環境飼育群と比較し、それぞれの環境因子がDES暴露マウスの学習機能を向上させるか否かを調べた。もし、いずれの環境因子もDESの脳かく乱作用の修復に関与しなかった場合は、エンリッチ環境のような複合的な環境が脳かく乱作用の修復に必須である環境とした。また、脳かく乱作用を修復する環境因子が複数存在した場合は、それらを組み合わせた環境飼育とエンリッチ環境飼育を行い、脳かく乱作用の修復効果を比較検討することで、最終的に脳かく乱作用の修復に必須である環境因子を同定した。

### (2) 脳かく乱作用の修復に必須な環境飼育による脳内分子の発現レベルの解析

正常マウスをスタンダード環境、または脳かく乱作用の修復に必須な環境で1、2、3週間飼育した。その後、脳海馬を取り出し、total RNAの抽出後、Real time RT-PCR法により、神経活動マーカーや脳内分子のmRNAレベルを測定した。

### (3) 脳かく乱作用の修復に必須な環境飼育によるDES暴露マウスの脳プロテオーム解析

(1)と同様にDES暴露マウスを作成し、離乳の時点で、オスマウスを無作為にスタンダード環境または脳かく乱作用の修復に必須な環境で飼育した。その後、受動的回避反応試験を行い、脳海馬を取り出した。その後、タンパク調製、二次元電気泳動、銀染色を行い、変動タンパク質のスポットを画像解析ソフト(phoretix 2D Advanced, Nonlinear Dynamics社)を用いて解析した。変動を認めたスポットは、ゲルからスポットを切り出し、トリプシン消化、脱塩処理、濃縮などの操作によりペプチド溶液を回収し、ペプチドマスフィンガープリント法により変動タンパク質を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) 脳かく乱作用の修復に必須な環境因子の同定

① スタンダード環境に比べ、広い環境で飼育したDES暴露マウスは学習機能の向上が認められ、DES暴露による学習障害の修復にはエンリッチ環境の中でも広い環境が関与していることが示唆された。

② 広い環境とエンリッチ環境の違いを比較検討したところ、受動的回避反応試験の獲得試行において反応潜時に違いが認められ、スタンダード環境やエンリッチ環境に比べ、広い環境で飼育したマウスの反応潜時は長いことがわかった。飼育ケージの床面積の広い方が不安になりやすいという既報や、本研究の獲得試行で観察された脱糞行動の様子

から、エンリッチ環境に比べ、広い環境で飼育した DES 暴露マウスは、情動が不安定になっている可能性が考えられた。

③ ①、②より、環境ホルモン DES の脳かく乱作用の修復には、エンリッチ環境のような複合的な環境が必須であることが明らかとなった。

(2) 脳かく乱作用の修復に必須な環境 (エンリッチ環境) 飼育による脳内分子の発現レベルの解析

① 神経活動マーカーである *c-fos*、脳由来神経栄養因子である BDNF の発現レベルは、1 週間および 2 週間のエンリッチ環境飼育では、スタンダード環境飼育に比べ有意な変動を認めなかった。しかし、3 週間のエンリッチ環境飼育により有意な変動を認めた。このことから、エンリッチ環境飼育による DES 暴露マウスの脳かく乱作用の修復作用は、その飼育期間に比例して増大する可能性が考えられた。

② 内向き整流性カリウムイオンチャネルの中で、G 蛋白質共役型内向き整流性カリウムイオンチャネルのひとつである GIRK2 の発現レベルは、スタンダード環境飼育群に比べ、エンリッチ環境飼育群で有意に増加した。また、その増加は飼育期間に比例して増大した。

③ 以前、研究代表者らが DES の脳かく乱作用の発現に関与することを見出した mtHSP70 の発現レベルは、正常マウスにおいては、エンリッチ環境飼育による影響は受けないことがわかった。

(3) 脳かく乱作用の修復に必須な環境 (エンリッチ環境) 飼育による DES 暴露マウスの脳海馬プロテオーム解析

① 画像解析の結果、発現タンパク質のスポット総数は、スタンダード環境飼育群とエンリッチ環境飼育群の間に有意な変動を認めなかった。

② 上述した mtHSP70 は、DES 暴露によりその発現レベルが増加することをプロテオーム解析により明らかにしている。本研究で行った DES 暴露マウスのプロテオーム解析の結果、mtHSP70 の発現レベルは、スタンダード環境飼育群に比べ、エンリッチ環境飼育群で減少した。

③ スタンダード環境飼育群とエンリッチ環境飼育群の間で発現レベルの著しい変動を示した分子は 4 つ存在し、そのうちのひとつは Aarih1 と同定された。この分子はエンリッチ環境飼育により減少するタンパク質であり、その詳細な機能は不明であるが、既報においてこの分子はユビキチンリガーゼ (E3) として作用する可能性、神経細胞を用いた実験において、この分子は酸化ストレスの影響を受けやすいことが報告されている。

以上、本研究で得られた成果は、世界に先駆けて環境ホルモンの脳かく乱作用の修復メカニズムの一端を明らかにしたものであり、今後の脳かく乱作用の発現の予防や治療に関する研究基盤の構築に貢献し得ると考えられる。

#### 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 3 件)

① F. Soeda, E. Hirakawa, M. Inoue, T. Shirasaki, K. Takahama. Effect of enriched environment rearing on the expression level of GIRK channel in the hippocampus of mice. J. Health Sci. 査読無 54(Suppl):218 (2008)

② F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama. The search of the environmental factor preventing expression of brain disrupting action caused by prenatal DES exposure in mice. J. Health Sci. 査読無 53(Suppl):196 (2007)

③ F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama. Studies on the brain disrupting action caused by DES exposure in mice -ameliorating effect of enriched environment and related molecules in the brain. The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of Endocrine Disrupters Research Program and Abstracts 査読無 10:141 (2007)

[学会発表] (計 4 件)

① 高濱 和夫、副田 二三夫、白崎 哲哉 エンリッチ環境効果をもたらす要因の探索 環境福祉学会第 4 回年次大会 2008 年 11 月 9 日 東京大学医学部鉄門記念講堂

② 副田 二三夫、平川 恵美、井上 雅子、白崎 哲哉、高濱 和夫 脳海馬における GIRK チャネルの発現レベルに対するエンリッチ環境飼育の影響 フォーラム 2008 衛生薬学・環境トキシコロジー 2008 年 10 月 18 日 熊本市民会館

③ 副田 二三夫、白崎 哲哉、高濱 和夫 DES 曝露マウスの脳かく乱作用に関する研究 -エンリッチ環境飼育効果と関連脳内分子環境ホルモン学会 2007 年 12 月 10 日 大宮ソニックシティ

④ 副田 二三夫、白崎 哲哉、高濱 和夫 胎仔期 DES 曝露マウスの脳かく乱作用の発現を予防する環境因子の探索 フォーラム

2007 衛生薬学・環境トキシコロジー 2007  
年 11 月 2 日 アピオ大阪

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/eisei/demh/main.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

副田 二三夫 (SOEDA FUMIO)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教  
研究者番号：10336216

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

高濱 和夫 (TAKAHAMA KAZUO)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授  
研究者番号：80150548

白崎 哲哉 (SHIRASAKI TETSUYA)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授  
研究者番号：30264047