

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

高橋 美文

論文題目

マウス胎仔期 Bisphenol A 曝露が視床下部の発生に  
及ぼす影響

## I. 緒言

視床下部は自律機能の調節を行う重要な器官で、摂食飲水、性行動、睡眠、情動行動の中枢である。マウス発生期の視床下部では、胎生9日(E9)頃、神経幹細胞が第3脳室の脳室帯で増殖し、同時に神経前駆細胞が誕生する。神経前駆細胞の誕生はE12からE15をピークにおこり、E11からE18にかけて脳室帯から外側方向へ移動しながら、神経前駆体から神経細胞へ分化する。最終的な位置に到達すると、形態的、機能的に共通した神経細胞が集まって神経核となる。

ミクログリアは中枢神経系において免疫応答を担うグリア細胞で、炎症が起きると活性型となり、その機能や発現因子によってM1(細胞障害型)とM2(細胞保護型)に分類できる。近年の研究により神経発生にミクログリアも関与しており、脳の形態形成および高次脳機能の発現に寄与することがわかってきた。

Bisphenol A(BPA)は、樹脂の原材料となる合成化学物質で、レジンなどの歯科材料にも含まれており、経口でヒトに曝露する可能性がある。BPAはエストロゲン様作用をもった内分泌攪乱物質であり、化学物質に感受性の高い胎仔期では、BPA曝露によって生殖器系の形態や機能に異常を引き起こすと報告されている。しかし、視床下部の発生初期の細胞増殖や神経新生におけるBPAによる影響については不明な点が多い。

したがって、本研究は、胎仔期BPA曝露が視床下部の発生に及ぼす影響

を明らかにするために、胎仔期 BPA 曝露モデルマウスを作製し、組織学的、分子生物学的解析を行い、視床下部の発生過程における細胞増殖と細胞周期、分化への影響、さらにミクログリアへの影響について検討した。

## II. 材料および方法

8週齢 ICR マウスを購入し、9週齢に達したマウスを一晩交配させ、膣栓を確認した日を E0.5 とした。BPA はコーン油に溶解し、E6.5 からそれぞれ胎仔摘出日の E12.5、E15.5、E18.5 まで毎日正午に 1 回、0 (コーン油のみ)、20 または 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の BPA を、妊娠母獣へ強制経口投与した。1 群につき 3 個体の母獣から、各胎齢につき 9 個体の胎仔を摘出し (1 母獣あたり 3 個体の胎仔) 実験に使用した。

摘出した胎仔より脳冠状断切片を作製し、HE 染色および免疫組織染色を通常に従って行い組織学的解析を行った。免疫組織染色による解析にはそれぞれ異なる抗体を用い、陽性細胞数をそれぞれ定めた計測範囲で計測し、比較検討した。

BPA 投与群と対照群の E15.5 の胎仔から摘出した脳より視床下部のみを採取し、ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System を用いて RNA を抽出し、Nano drop を用いて濃度を測定した。定量 PCR は ABI StepOne Real Time PCR System と SYBR Fast qPCR Mix を用いて行った。

得られた実験データは統計的有意差検定のために一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を用いた。さらに多重比較 (Post-hoc test) には Dunnett's

法を用いた。定量 PCR では、student' s t-test を用いた。すべてのデータは  $p < 0.05$  を統計的有意差ありと判定した。

### Ⅲ. 結果

以下に、胎仔期 BPA 曝露によるそれぞれの解析結果を示す。

#### 1. 母獣・胎仔の体重、胎仔数への影響

BPA を強制経口投与した母獣には明らかな身体的異常や行動異常は観察されず、母獣の体重に有意な差は認められなかった。摘出した胎仔の体重ならびに 1 母獣あたりの胎仔数にも有意な差は認められなかった。

#### 2. 視床下部の形態への影響

HE 染色より、視床下部全体および脳室帯の細胞分布、位置や大きさに明らかな差は認められなかった。

#### 3. 細胞増殖への影響

増殖細胞の核に発現する Ki67 の免疫組織染色より、E12.5 の BPA 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群および、E15.5 の BPA 20、200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群で Ki67 陽性(+)細胞数の割合が有意に増加していた。

#### 4. 細胞周期への影響

E11.5 あるいは E14.5 に細胞周期にある細胞をラベリングするためにチミン類似物質である 5-Chloro-2'-deoxyuridine (CldU) を妊娠母獣に 1 回 (50 mg/kg) 腹腔内投与し、24 時間後となる E12.5 あるいは E15.5 に母獣より胎仔を摘出した。摘出した胎仔の脳冠状断切片を作製し、抗 Ki67 抗体と抗 CldU

抗体を用いた蛍光免疫二重組織染色を行った。E12.5 の BPA 200  $\mu$ g/kg 投与群、E15.5 の BPA 20、200  $\mu$ g/kg 投与群で、胎仔摘出の 24 時間前に増殖中の細胞のうち、胎仔摘出の 24 時間以内に増殖を停止した細胞の割合 (CldU+&Ki67-細胞/全 CldU+細胞) が有意に減少していた。

#### 5. 視床下部の神経細胞分化への影響

Orthopedia (Otp) および Steroidogenic factor 1 (SF1) を代表的な背側神経核および腹側神経核の神経細胞マーカーとして、それぞれの特異的抗体を用いた免疫染色により、神経分化を解析した。Otp+細胞数は E12.5 の BPA 200  $\mu$ g/kg 投与群で、SF1+細胞数は E15.5 の BPA 200  $\mu$ g/kg 投与群で、どちらも有意に減少していた。

#### 6. 神経分化関連因子の発現への影響

エストロゲン受容体 [*Estrogen Receptor (ER)  $\alpha$* 、 *$\beta$* ] は神経細胞に、*Neurogenin2 (Ngn2)* は神経幹細胞に、*Neurogenic differentiation (NeuroD)* は未熟な神経細胞に発現することから、定量 PCR 法を用いてこれらの mRNA 発現量を解析した。その結果、*NeuroD* の mRNA 発現量が E15.5 の BPA 200  $\mu$ g/kg 投与群で有意に減少していた。

#### 7. ミクログリア数への影響

ミクログリア特異的に発現する Iba1 の特異的抗体を用いた免疫組織染色により、E15.5 の視床下部において、BPA 200  $\mu$ g/kg 投与群で Iba1+細胞数が有意に増加していた。

## 8. ミクログリアの分化への影響

ミクログリアに発現する *Iba1*、M1 型に発現する *CD16* (*Fc receptor*, *FcyRIII*) および *inducible nitric oxide synthase* (*iNOS*)、M2 型に発現する *CD206* (*mannose receptor*) の mRNA 発現量を定量 PCR 法によって計測し比較した。その結果、*Iba1*、*CD16*、*CD206* の発現量が E15.5 の BPA 200  $\mu$ g/kg 投与群で有意に増加していた。

## 9. 炎症関連因子の発現への影響

M1 型由来のサイトカインである *Tumor necrosis factor  $\alpha$*  (*TNF $\alpha$* )、*Interleukin 12a* (*IL12a*)、M2 型が分泌する抗炎症性サイトカインである *Interleukin 4* (*IL4*)、神経栄養因子である *Insulin-like growth factor 1* (*IGF1*)、*Brain-derived neurotrophic factor* (*BDNF*)、さらには、神経細胞-ミクログリア間のシグナル伝達因子である *Chemokine* (*CX3C motif*) *ligand 1* (*Cx3Cl1*) および *CX3C chemokine receptor 1* (*CX3Cr1*) のそれぞれの mRNA 発現量を定量 PCR によって計測し比較した。その結果、*TNF $\alpha$* 、*Cx3Cl1*、*Cx3Cr1*、*IGF1* の発現量が E15.5 の BPA 200  $\mu$ g/kg 投与群で有意に増加し、*IL4* の発現量が投与群で有意に減少していた。

## IV. 考察

本研究において、胎仔期 BPA 曝露によって E12.5 および E15.5 の視床下部脳室帯における増殖細胞数が増加し、24 時間以内に細胞周期を脱し増殖を停止した細胞の割合は減少していた。この結果は分化する細胞の割合が

減少したことを示唆している。これらの細胞増殖および分化の異常は、細胞周期への影響とも相関していると考えられる。BPAが細胞周期制御因子の発現に影響し、細胞周期の長さを変化させることで、発生期の視床下部における細胞増殖や神経分化に異常を引き起こしている可能性が考えられる。

視床下部背側の神経細胞に発現する *Otp* は E12.5 で、腹側に発現する *SF1* は E15.5 で、BPA 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群のそれぞれの陽性細胞数が減少しており、BPA曝露に対する脆弱性に時期的な差が確認された。視床下部で神経核を構成する神経幹細胞の数や増殖期、神経細胞の分化メカニズムなどが、背側と腹側で異なることを反映し、その結果、BPAの感受性の差が生じたのではないかと考えられる。

さらに、視床下部の未熟な神経細胞に発現する *NeuroD* の発現の減少は神経細胞の発達に影響を及ぼし、神経新生の抑制や *Otp*+細胞および *SF1*+細胞の発現が減少した可能性が考えられる。

E15.5のマウス視床下部において BPA200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群で、ミクログリアの数と、ミクログリアに関連する炎症因子、シグナル伝達因子、神経栄養因子の発現量が増加していた。同時期の脳皮質ではエタノールの胎仔期曝露によって同様の影響が誘発されていることから、ミクログリアへの影響は BPAのみならず様々な化学物質の胎仔期曝露によって広く一般的に引き起こされている可能性が示された。

本研究の結果より、BPA曝露した E15.5 の視床下部ではミクログリアの

M1、M2 型の両方のマーカーの発現が増加した。これは、BPA 曝露がマイクログリアを M1、M2 型の両方に分化誘導する、あるいは胎生期のマイクログリアは免疫学的に未分化であり、M1、M2 型の両方のマーカーを発現する可能性があることから、未分化なマイクログリアの数が増加したことを反映していると考えられる。

体内に取り込まれた BPA は DNA のメチル化やアセチル化に影響することで、遺伝子発現に異常を引き起こすことが報告されている。BPA 曝露によって初期の視床下部神経発生に関連する遺伝子に異常が生じ、細胞増殖や神経分化、さらにマイクログリアへの異常が引き起こされた可能性が考えられる。

また、細胞増殖や分化の異常が、視床下部の神経核の組織に微細な構造異常を引き起こすことによって、神経ネットワークの構築に影響を及ぼし、行動異常を引き起こす可能性がある。よって、胎仔期 BPA 曝露によって引き起こされた視床下部の微細な構造異常やマイクログリアの異常が、情動行動の異常や発達障害などの高次脳機能障害の原因となる可能性が示唆される。

## V. 結論

本研究では、胎仔期 BPA 曝露モデルマウスを作製し、組織学的、分子生物学的解析によって、視床下部の発生過程における細胞増殖の亢進と細胞周期、神経分化への異常、さらにマイクログリアの増加と炎症関連因子の発



(論文内容の要旨)

No. 8

愛知学院大学

現異常が引き起こされていることを見出した。研究結果から、BPA 曝露は細胞増殖、神経分化やミクログリアの活性に影響することで、視床下部の組織構築や脳機能に異常を引き起こす可能性が示唆された。

3919.5 字 / 4000 字