

学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 号	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

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、内分泌系自律機能の最高中枢である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。

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) に分類できるが、近年の研究より神経発生にミクログリアも関与し、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。胎生期のエタノール曝露がミクログリアに異常を引き起こし、脳の発生に影響することが報告されているが、BPA 曝露による影響についてはほとんど報告がない。

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

胎生(E)6.5 から毎日 1 回 BPA を妊娠母獣へ強制経口投与し、摘出した胎仔より脳冠状断切片を作製して、神経細胞増殖および分化について組織学的解析を行った。さらに、胎仔の視床下部における関連因子の発現を定量 PCR により解析した。

Ⅲ. 結果

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 μ g/kg 投与群および、E15.5 の BPA 20、200 μ g/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 μ g/kg投与群、E15.5のBPA 20、200 μ 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 μ g/kg投与群で、SF1+細胞数はE15.5のBPA 200 μ 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) α , β*] 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 μ 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 μ 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 μ 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 α (TNF α)*、*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 α* 、*Cx3Cl1*、*Cx3Cr1*、*IGF1* の発現量が E15.5 の BPA 200 μ 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

胎仔期 BPA 曝露による増殖細胞の増加および神経分化の減少は、細胞周期への影響とも関連していると考えられる。これは、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た。さらに、*NeuroD* の mRNA 発現量の減少および Otp+細胞および SF1+細胞の発現の減少は、神経新生および神経分化の抑制に関連する可能性が考えられた。

ミクログリア数と、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。これらの結果から、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、神経細胞の増殖や分化、さらにミ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た。

また、細胞増殖や分化の異常は、視床下部の神経核の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、本研究で明らかとなった胎仔期 BPA 曝露による発生初期の視床下部の微細な構造異常やミクログリアの異常は、生後の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た。

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、さらにミクログリアの増加と炎症関連因子の発

(内 容 の 要 約)

No. 6

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。