

内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する実験的研究
—培養中枢ニューロンに対する評価—

分担研究者 畠中 寛 大阪大学蛋白質研究所教授

研究要旨 ラット胎仔視床下部および海馬から分離したニューロンの分散培養系を確立した。この系に対するエストロジェンのニューロンに対する生存維持作用、神経栄養因子BDNFの誘導作用を明らかにした。この結果、種々の内分泌かく乱候補化学物質の中枢神経系へのin vitro作用を調べるスクリーニング系として初代中枢ニューロン培養系をほぼ確立した。

A. 研究目的

エストロジェン受容体の発現している脳のいくつかの領域を培養し、種々候補物質を加え、ニューロンの生存維持、機能分化あるいは可塑性への効果を調べる。ニューロンの培養は、胚および生後ラットで行うとともに、エストロジェン受容体を組み込んだモデル系の開発を試みる。このことにより、ニューロンへの直接の作用を見ることから、候補物質の神経機能への影響を短時間で測れる可能性がある。

B. 研究方法

ラット胎仔脳を摘出し、特に視床下部および海馬を切り出し、パパイン法による分散培養を行った。培養後、抗エストロジェンレセプター抗体などでの染色、BDNF mRNAのRT-PCRでの定量、またニューロンの生存率をMTT法で測定した。

(倫理面への配慮)

初代培養に用いる実験動物、ラットの飼育等については実験動物利用規程に従って行っているため、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

ラット胎仔視床下部から分離したニューロンの分散培養系を確立した。この系で胎生19日齢ラット視床下部ニューロンを1週間血清培養し、抗エストロジェンレセプター抗体および抗プロジェステロンレセプター抗体で免疫組織染色した。その結果、両抗体ともに、核に強い染色が見られる細

胞が多く培養されていた。これら抗体に陽性な細胞は、形態的にほとんどがニューロンと思われ、アストロサイト様の細胞ではなかった。視床下部ニューロンは特にこれらレセプターの発現が多い領域であるが、この領野以外でも、例えば海馬ニューロンの同様の培養でもエストロジェンレセプターは発現していた。この発現は、しかしながら低く、エストロジェンレセプターmRNA発現レベルをRT-PCR法で測定してみた結果、視床下部ニューロンに比べてはるかに低いものであった。

次に、種々の領野ニューロンの培養下での生存におよぼすエストロジェンの効果を調べる目的で、海馬および視床下部ニューロンの分散培養を行い、ニューロンの生存が損なわれる無血清培養下でエストラジオールを添加し、1週間培養を行った。海馬ニューロンでは10 nMをピークに、また視床下部ニューロンでは1000 nMでわずかな生存維持効果が認められた。またこの時、神経細胞の生存に関与すると考えられている神経栄養因子の一つBDNFに注目し、そのmRNAレベルの変動をRT-PCR法を用いて定量した。その結果、生育に適さない培養下では低下してゆくBDNF mRNAの減少が、エストラジオールの添加によって、くい止められることが分かった。またこの時、エストロジェンレセプターmRNAレベルの変化は認められなかった。一方、ニューロンの生存が図られている血清培養条件下でエストラジオールの添加を行ったところ、BDNF mRNAレベルは増加する傾向を示した。これらの結果は、エストロジェンによるニューロンの生存維持が、エストロジェ

ンそのものの直接作用とは断定できず、BDNF発現を促す間接的な効果である可能性を示している。いずれにせよ、エストロジェンとBDNFの間には、何らかの相互作用の存在が考えられる。

今後、エストロジェンレセプターおよびBDNFの両mRNA発現細胞を特定するため、培養細胞系でのin-situ hybridizationを行う予定である。この予備実験として、まずBDNFとエストロジェンレセプターのラット遺伝子のクローニングを行った。その結果各々のサブクローンがとれ、現在調製中である。またスライス培養系を立ちあげエストロジオールの影響を検討中である。現在、胎生19日齢ラット視床下部のスライス培養として2週間の長期培養が可能である。

D. 考察

以上の結果は、エストロジェンによる培養中枢ニューロンの生存維持には、神経栄養因子が関わっていることを強く示唆している。神経栄養因子は、ニューロンの生存維持のみならず、神経機能の可塑的な調節制御にも関与していることから、エストロジェンのシナプス可塑性へおよぼす効果についても今後の検討が必要である。本年度の研究結果から、種々の内分泌かく乱候補化学物質のin vitro中枢神経系への作用を調べるスクリーニング系がほぼ確立できたと考えている。

E. 結論

ラット胎仔視床下部および海馬から分離したニューロンの分散培養系を確立した。この系に対するエストロジェンの生存維持作用、神経栄養因子の誘導作用を明らかにし、種々の内分泌かく乱候補化学物質の中枢神経系へのin vitro作用を調べるスクリーニング系としてほぼ確立できた。

F. 研究発表

1. T. Araki, M. Yamada, H. Ohnishi, S. Sano, T. Uetsuki and H. Hatanaka, (2000) Role of phosphatase activity of Shp-2 in BDNF signaling in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, 74, 659-668.

2. N. Inamura, T. Araki, Y. Enokido, C. Nishio, S. Aizawa, and H. Hatanaka, (2000) The role of p53 in DNA strand break-induced apoptosis in organotypic slice cultures from the mouse cerebellum. *J. Neurosci. Res.*, in press.
3. K. Shimoke, S. Yamagishi, M. Yamada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1999) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Dev. Brain Res.*, 112, 245-253.
4. Y. Ishikawa, T. Satoh, Y. Enokido, C. Nishio, T. Ikeuchi and H. Hatanaka (1999) Generation of reactive oxygen species, release of L-glutamate and activation of caspase are required for the high oxygen-induced apoptosis of embryonic hippocampal neurons in culture. *Brain Res.*, 824, 71-80.
5. M. Yamada, H. Ohnishi, S. Sano, A. Nakatani, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1999) BDNF stimulates interaction of Shp2 with PI3-K and Grb2 in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, 73, 41-49.
6. Y. Hashimoto, Y. Abiru, C. Nishio and H. Hatanaka, (1999) Synergistic effects of BDNF and CNTF on cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal two-week-old rats. *Dev. Brain Res.*, 115, 25-32.
7. T. Yamagata, T. Satoh, Y. Ishikawa, A. Nakatani, M. Yamada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1999) Brain-derived neurotrophic factor prevents superoxide anion-induced death of PC12h cells stably expressing TrkB receptor via modulation of reactive oxygen species. *Neurosci. Res.*, 35, 9-17.