

培養下での神経細胞ネットワークの機能発達 ～内分泌攪乱化学物質の脳発達への影響を調べる *in vitro* アッセイ系～

川原 正博、黒田洋一郎

東京都神経科学総合研究所

「培養下での神経細胞ネットワークの機能発達」と題した我々の研究についてお話したいと思います。前の演者が話されたように、環境中の化学物質が影響を及ぼすのは生殖系だけではなくありません。性ホルモン受容体は中枢神経系に多数存在しており、ホルモンが脳の発達に重要な役割を果たしています。従って、脳は内分泌攪乱化学物質が影響を發揮するもう一つの重要なターゲットである可能性があります。実際、最近の研究では様々な環境内化学物質が脳の機能に影響を及ぼすことが明らかになっています。五大湖で PCB 類に曝露した小児は知的発達の障害を呈しています。油症では、乳幼児に認知障害が観察されています。また、除草剤や殺虫剤とパーキンソン病との関係が報告されていますし、エストラジオール（女性ホルモン）や植物エストロゲンによるアルツハイマー病の防止に関する研究が数多くあります。更に、鉛、アルミニウム、スズなどの金属は、神経系に様々な悪影響を及ぼします。

妊娠から乳児期に至る脳の発育段階では、ニューロンが分化してシナプスによって接続される複雑なネットワークを形成し始めます。このシナプスの形成と可塑性が学習と記憶の分子メカニズムの基礎になっています。この図では、脳の重量とシナプスの密度が発達中に変化することを明らかにします。これらの変化は、ほぼ 3 歳までに生じます。環境内化学物質は、母体や母乳を介してまたは他の環境中の汚染源から乳幼児の脳に侵入します。残念ながら、この時期には血液脳関門の発達が十分ではありませんし、大部分の内分泌攪乱化学物質は脂肪親和性があり、容易に血液脳関門を通過します。乳幼児の肝臓と腎臓の機能は完全でないため、これらの化学物質は代謝されず、排泄されません。これらの結果を考えると、環境内化学物質が乳幼児の脳に入り、この重要な期間に脳機能のネットワークの発達に影響を及ぼしている高い可能性があります。

我々の目標は、どのような環境内化学物質が、どのように脳機能の発達に影響を及ぼすかを調べることです。この目的のため、シナプス形成の *in vitro* スクリーニングシステムを開発することが重要になってきます。我々は、カルシウムイメージング法、免疫組織化学的観察、シナプス特異的遺伝子発現などの方法を用いて、ラットの大脳皮質、小脳視床下部の初代培養ニューロン間のシナプス形成を評価しました。次に、ニューロンの発達に必須とされる甲状腺ホルモンを培養ニューロンに投与し、シナプス形成に対する影響を調査しました。次に、我々は甲状腺ホルモンによるシナプス形成能を指標に用いて、ニューロンの発達を攪乱する化合物を同定することを計画しました。

我々は既にラット大脳皮質ニューロンの長期培養システムを開発しています。胎齢 18 日目のラット胚の脳から大脳皮質の摘出と分離を行い培養しました。3~7 日後に培養中のニューロンは神経突起を伸ばしてシナプス接合部を形成し始めます。神経伝達物質の受容体またはニューロンマーカータンパク質の発現も同じ時期に生じます。*In vitro* で 170 日（約 5 カ月）後の培養ニューロンを MAP2（微小管結合タンパク質 2；ニューロンマーカータンパク質）に対する抗体と抗シナプトフィジン（シナプス前終末に局在するシナプスマーカータンパク質）で染色しました。レーザー共焦点顕微鏡分析は、ニューロンのプロセスと培養ニューロンの細胞体上の成熟したシナプス（点状構造）の存在を明らかにします。我々の初代培養ニューロン系は、ニューロン特異的特性を備えているといった利点があり、1 カ月以上維持することができます。我々の脳には、刺激性や抑制性シナプスなど様々なタイプのシナプスが存在し、多数のシナプスが複雑な神経回路網を形成しています。ここに示した画像は、3 週間培養したニューロンを MAP2 の抗体と NMDA 受容体（刺激性神経伝達物質の受容体であり、そして刺激性シナプスのシナプス後に局在する）の抗体で免疫染色してレーザー共焦点顕微鏡で観察したものです。他のニューロンは抗 MAP2 および抗 GAD（抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素）で染色しました。従って、ラット大脳皮質の培養ニューロンは *in vivo* 脳と同様な様々なタイプのシナプスを発現することがわかります。我々はこれらのシナプスのタイプ、数、および分布を分析することが可能です。

また、我々は、カルシウムイメージング法を使用してシナプス数を判定するための機能分析システムも開発しています。我々はカルシウムに感受性を示す蛍光色素 Fura 2 で培養ラット大脳皮質ニューロンを染色し、高

感度ビデオカメラを装備した蛍光顕微鏡で観察しました。スライドは培養ニューロンの細胞内カルシウム濃度の擬似カラー画像を示しています。このシステムを使用して、我々は同時に多数のニューロン細胞内カルシウム濃度の時空的变化を観察することができました。培養 7 日後、培養ニューロンは細胞内カルシウム濃度の自然発生的な周期的変化を呈します。ここに示した 1 から 7 の番号を表示したニューロンは、未刺激の細胞内カルシウム濃度の周期的な変化を示しています。細胞内カルシウム濃度のこのような自然発生的な振動性の変化は、ほとんどのニューロンの間で同期していました。スライドのニューロン (V) は同時に観察した膜電位を示しています。細胞間のカルシウム濃度のこのような周期的変化は、シナプスの発火によるもので、恐らくは、ごく微細な EPSPs に由来すると考えられています。細胞内カルシウム濃度のこのような自然発生的で同期した変化は培養ニューロンの発達中に現れ、培養 7 日後では、ほぼすべてのニューロンが同期したカルシウム振動を発現します。通常、周波数は 1 分間に 3 から 4 スパイクです。また、我々は、電子顕微鏡検査により培養ニューロンの間のシナプスを観察し、同時にシナプスの数を数えました。興味深い事に、カルシウム振動の周波数と電子顕微鏡検査で数えたシナプス数は強力に相関していました。従って、我々はシナプス形成を簡便に判定することができ、この周波数を観察することによってシナプス数を推定することができます。

スライドは我々の研究戦略の概要を示しています。培養ニューロンでは、まず神経突起の伸展が現れ、次いで興奮性シナプスが形成され、その後、抑制性シナプスが形成されることが広く受け入れられています。興奮性シナプスの形成と抑制性シナプスの形成にバランスがとれていることが機能ニューロンネットワークの発達にとってきわめて重要です。我々は、培養ニューロンに様々な化学物質を投与し、カルシウムイメージングと免疫組織化学分析を用いて、シナプスの機能および形態学的な発達を観察することを試みました。このシステムを使用して、最初我々はシナプス形成に対する甲状腺ホルモンの影響を調査しました。次に、甲状腺ホルモンがシナプス形成を促進したことを確認した後、我々は甲状腺ホルモンと相互作用すると共に甲状腺関連シナプスの形成を攪乱する化合物を調べました。

ゾラー博士と鯉淵博士が報告されたとおり、甲状腺ホルモンは脳の発達で様々な重要な役割を果たしています。T3 や T4 のような甲状腺ホルモンが、中枢神経系において細胞増殖および細胞の生存、神経突起の変化、シナプス形成、再分化、細胞骨格の作用を誘発することを示した証拠がますます増えています。更に、クレチン病などの重度の甲状腺不全が精神遅滞が特徴的に見られます。母親と乳幼児の双方に見られる甲状腺機能亢進症は、神経と知的発達の永久的な不全をもたらします。最近の研究は、甲状腺ホルモンと ADHD (注意欠陥多動性障害) の関係を示唆しています。

我々は、血清を加えない環境下で培養を始めてから 3 日目に、培養皮質ニューロンに甲状腺ホルモン T3 と T4 を投与しました。培養 8 日後に、細胞間のカルシウム濃度の変化を観察しました。これは無作為に選択した 4 つのニューロンの細胞間に存在するカルシウム濃度の典型的なパターンです。これらの実験条件では、培養ニューロンは毎分 2 から 3 本のスパイクを有する同期した自然発生的なカルシウム変化を示します。しかし、T3 または T4 を投与すると、この周波数が顕著に増大し、さらに高頻度で同期したスパイクが生じました。しかし、観察中に甲状腺ホルモンを短期的に投与すると変化は全く見られませんでした。従って、甲状腺ホルモンはシナプス伝達ではなくシナプス形成に影響を及ぼしています。カルシウム振動の周波数の上昇は、T3 または T4 の用量に依存していました。さらに、甲状腺ホルモンが実際にシナプス形成を促進させることを確認するため、我々は免疫組織化学分析法を用いてシナプスを形態学的に観察しました。シナプシン I はシナプス前のタンパク質の一つであり、優れたシナプスマーカータンパク質として広く用いられています。我々は、培養ニューロンを抗 MAP2 (赤) と抗シナプシン I (緑) で多重免疫染色し、レーザー共焦点顕微鏡で観察しました。これら緑の点状の免疫活性の変化はシナプスを示すもので、これらのシナプスは甲状腺ホルモンを投与したニューロンで著しく増加しました。シナプシン I の増大はウエスタンブロット法でも確認されました。これらの結果は、甲状腺ホルモンが培養ニューロンの間のシナプス形成を実際に促進しており、この促進がカルシウム振動の周波数により量的に判定できることを示唆しました。

現在、我々はシナプス形成を評価するための分析システムを確立し、スクリーニングが可能になっています。従って、我々は様々な化学物質と甲状腺ホルモンを培養ニューロンに同時に投与しました。1 週間後、我々はカルシウム振動を観察し、これらの化学物質が甲状腺ホルモンで誘発されたシナプス形成に影響を及ぼすかどうかを評価しました。このスクリーニングアッセイは現在進行中です。しかし、このプロセス中に、複数の化

化合物が甲状腺ホルモン性のシナプス形成を抑制することが明らかになりました。例えば、抗甲状腺機能を有する薬剤であるアミオダロンは、T4 で誘発された周波数の増大を顕著に抑制します。更に、除草剤のアミトロールは、甲状腺ホルモンで誘発されたカルシウム振動の増大を抑制しました。しかし、この実験条件では、アミトロールまたはアミオダロンの投与自体はカルシウム振動に影響を及ぼしませんでした。

甲状腺ホルモンがシナプス形成を促進させる基礎となっている分子的機序についても我々の研究対象としています。甲状腺ホルモンは様々な経路に影響を及ぼしている可能性があります。しかし、現在我々は MAP1B (微小管結合タンパク質 1B) に注目しています。我々は既に MAP1B のリン酸化反応が培養皮質ニューロンの間のシナプス形成に必須であることを明らかにしています。プロテインキナーゼの抑制物質である k-252b は、タンパク質の細胞外ドメインのリン酸化反応を抑制しますが、シナプス形成を遮断することが明らかにされました。MAP1B は ecto-型のプロテインキナーゼのリン酸化反応プロセスに関与しています。元来 MAP1B は細胞骨格タンパク質であり、そのため、多くの人々は MAP1B が細胞内に局在するものと考えていました。しかし、我々は、このタンパク質が膜貫通領域を有し、シナプス後のエリアに局在することを確認しています。従って、我々は MAP1B の発現に対する甲状腺ホルモンの作用を調査し、MAP1B の mRNA レベルをノーザンブロット法で分析しました。同一の実験条件において T3 または T4 への 24 時間曝露により MAP1B の誘導が引き起こされた後には、エストラジオールは MAP1B の発現に影響を及ぼしませんでした。さらに、我々の協力者である富山医科薬科大学の津田博士のグループは甲状腺ホルモンで誘発されるシナプトフィジンなどの様々な遺伝因子の発現について研究しています。

シナプス形成に対する甲状腺ホルモンの作用は脳皮質のみではありません。これは我々の共同研究者永田博士と木村-黒田博士の結果です。同博士らは甲状腺ホルモンを小脳のプルキンエ細胞に投与し、レーザー共焦点顕微鏡検査法で形態学的変化を観察しました。プルキンエ細胞の樹状突起はカルビンジン D28 の抗体とシナプシン I の抗体で染色されました。双方の染色部は甲状腺ホルモンにより成長が促進されました。また、抗カルビンジン抗体で染色したプルキンエ細胞の樹状突起部を画像定量分析で比較し、甲状腺ホルモンが用量依存的に樹状突起の延長部の成長を促進することを発見しました。さらに、広く知られた内分泌攪乱化学物質であるビスフェノール A は、甲状腺ホルモンで誘発されたプルキンエ細胞樹状突起の延長を著しく抑制します。

最後に、我々が行っている別の *in vitro* ニューロンモデルの開発の方法についてお話します。現在、我々は脳皮質と小脳の影響を調査しています。しかし、視床下部が主に感情や行動に関連していることを考慮すると、視床下部のニューロンも内分泌を攪乱する環境内化学物質の標的になる可能性があります。

不死性視床下部性ニューロン (GT 1-7 細胞) はマウス視床下部性ニューロンから得られます。*In vivo* で視床下部性ニューロンを模倣する GT 1-7 細胞の特性により、GT 1-7 細胞は神経内分泌システムの研究のための優れたツールとなっています。従って、我々はビスフェノール A および他のいくつかの内分泌攪乱化学物質を GT 1-7 細胞に投与し、細胞の生育能力と形態学的変化を観察しています。

結論ですが、我々は、カルシウムイメージングと免疫組織化学分析を使用した培養ニューロンの間のシナプス形成を評価するための *in vitro* スクリーニングシステムを開発しました。このシステムを使用することにより、甲状腺ホルモンが脳皮質ニューロンのシナプス形成および培養小脳プルキンエ細胞の樹状突起の発現と延長を促進することを明らかにしました。

甲状腺ホルモンによるシナプス形成の促進を指標として用いることにより、我々はニューロンの発達に影響を及ぼす複数の化合物をスクリーニングしました。我々の結果は、中枢神経系の培養ニューロンは、これらの環境内化学物質によって誘発される神経毒性の実際的なスクリーニングと分子的機序の研究の有用なツールとなることを示しています。本研究は科学技術振興事業団の戦略的基礎研究推進事業の支援を受けています。

質疑応答

鯉淵：どうもありがとうございます。ディスカッションの時間を取りたいと思います。質問はございませんか？はい、どうぞ。

質問：今はカルシウムイメージングを見た細胞は、完全に神経細胞だけで培養されているのでしょうか。

川原：大脳皮質神経細胞の場合、当初はグリア細胞も入っておりますが、培養中に無血清条件にしておりますので、観察しております状態ではグリア細胞はほとんど残っておらず神経細胞のみであると考えられます。また、fura-2 による細胞内カルシウム濃度イメージでは、グリア細胞はあのようにくっきりとは見えませんので、あの条件で見ているのはニューロンだけであると考えられます。

質問：私が少し興味があるのは、神経細胞の同期ということで、神経細胞はカルシウムの振動が同期するということですが、視床下部由来の GT1-7 細胞では、必ずしもシナプスの連絡がなくとも同期するというお話があると思うのですが、そのあたりはどのようにお考えでしょうか。

川原：視床下部の GT1-7 細胞の場合には、ギャップ・ジャンクションによる同期活動であるといわれています。今後、シナプス形成だけでなく、ギャップ・ジャンクションに対する作用も今後検討していこうと考えています。ただし、少なくとも大脳皮質ニューロンや海馬ニューロンに関しては、ギャップ・ジャンクションはこれまで電顕観察等で見つかっておりません。

鯉淵：他に質問はありませんか？はい、どうぞ。

質問：私はシナプス形成が甲状腺ホルモンに促進されたり、刺激されたりする現象に関心があります。しかし、エストラジオールなどの他のステロイドホルモンのシナプス形成に対する影響を調査したことがありますか？この現象は甲状腺ホルモンに特異的なものでしょうか？

川原：ご質問ありがとうございます。それは興味深いですね。私は同じく大脳皮質ニューロンにエストラジオールや他のエストロゲン関連ホルモンを投与

しました。しかし、顕著な影響は見られませんでした。

また、タモキシフェンや抗エストロゲン薬も投与いたしました。タモキシフェンは、視床下部と海馬でアポトーシス様の神経細胞死を生じさせましたが、大脳皮質では見られないという結果を得ております。従って、恐らく、甲状腺ホルモンとエストロゲン関連ホルモンの影響は、少なくとも大脳皮質ニューロンでは異なると考えています。

質問：どうもありがとうございます。

川原：どうもありがとうございます。

鯉淵：プルキンエ細胞の分枝の BPA 作用に関しては、プルキンエ細胞もニューロステロイド類を生成するので、BPA は、甲状腺ホルモン作用の抑制ではなく、プルキンエ細胞が生成するニューロステロイド濃度の抑制や変更を通して作用している可能性があります。

川原：ご指摘有り難うございます。その機序は非常に興味深いですが、少なくとも現在のところ、まだ申し上げるような結果を持っておりません。今後、ご指摘のメカニズムを含めて多くの可能性を考慮する必要がありますので検討したいと考えております。

鯉淵：ありがとうございます。他に質問はありませんか？ちょっと時間が遅れています。ご静聴ありがとうございました。