

氏名（本（国）籍）	市 村 亮 平（埼玉県）
推 薦 教 員 氏 名	東京農工大学 教授 渡 辺 元
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博乙第149号
学位授与年月日	平成29年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	新生児期エストロゲン曝露によるキスペプチンニューロンの発達障害および雌性生殖器における遅発性影響に関する研究
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 渡 辺 元 副査 帯広畜産大学 教授 石 井 利 明 副査 岩 手 大 学 教 授 佐 藤 洋 副査 東京農工大学 教 授 渋 谷 淳 副査 岐 阜 大 学 教 授 志 水 泰 武

学位論文の内容の要旨

哺乳類の脳では、新生児期に大量のエストロゲン作用を有する物質に曝露されると、成熟後の性行動や生殖機能における不可逆性の障害（脱雌性化）を誘発することが知られている。また、小量曝露でも性周期の早期停止に特徴づけられる様々な遅発性の生殖機能障害（遅発影響）が生じることが報告されており、新生児期におけるエストロゲン類の曝露による生殖内分泌系の発達への影響が古くから懸念されてきた。遅発影響の発現機序については、これまでの研究報告から、視床下部の排卵制御機構に何らかの異常をきたしていることが示唆されているが、その影響が遅発性に生じるメカニズム、特にキスペプチンニューロンの変化については未だ明らかになっていない。そこで申請者は、遅発影響の発現機序と遅発影響におけるキスペプチンニューロンの関与を明らかにするため、新生児期にエストロゲン類を曝露したラットにおけるキスペプチンニューロンの変化について様々な角度から検証を行った。

第1章では、新生児期に17エチニルエストラジオール(EE)を曝露されたラットで、young adult 期（性周期停止前）における、視床下部キスペプチンニューロンおよびLHサージ分泌の詳細な検索を行った。その結果、新生児期にEEを曝露したラットでは、LHサージのピーク時間の遅延とサージ面積の減少、ならびに視床下部キスペプチンニューロンのAVPVにおけるKiSS1 mRNAの発現低下がみられ、同時にKiSS1 mRNA陽性細胞におけるER α 共発現率の低下も認めた。これらのAVPV特異的な変化は、視床下部-下垂体-性腺軸におけるLHサージ制御機構の機能障害を示唆しており、遅発性に発現する「性周期の早期停止」の原因となる変化であると考えた。また、これらの神経内分泌系における変化が、遅発影響誘発ラットおよび老齢ラットの双方で認められ、遅発影響と生殖機能の老化に伴ってみられる変化が類似してことを明らかにした。また、これらの変化がいずれも性周期の変化に先

駆けて生じていたことから、LH サージの減弱や KiSS1 mRNA の低下といった神経内分泌系の変化が、「性周期の早期停止」に代わる遅発影響の早期指標として利用できる可能性を示した。

第2章では、エストロゲンの新生児期曝露による遅発影響の感受期を明らかにするため、生後0、5、10および14日の新生児ラットにEEを曝露し、視床下部キスペプチンニューロンの変化と遅発影響の発現の有無について詳細に検索した。その結果、生後0、5および10日齢にEE 20 μ g/kgを曝露した群では、生後11週齢に遅発影響の指標であるKiSS1 mRNAの発現低下、KiSS1陽性細胞数の減少およびLHサージの減弱傾向が認められた。上述の群では、これらの変化と相関して異常性周期の早期発現も認められ、新生児期に曝露したEEによる遅発影響が発現していると考えられたが、生後14日齢にEEを曝露した群ではこれらの一連の変化が明らかではなかった。以上の結果から、ラットでは新生児早期（生後0～10日齢）が外因性のエストロゲンに対する遅発影響の感受期であり、そのエンドポイントは新生児後期（生後14日齢前後）に存在しているものと推察した。

第3章では、SERMの新生児期曝露による遅発影響および視床下部キスペプチンニューロンにおけるKiSS1発現への影響について検証した。その結果、生後0日齢のラットへのRLX 10 mg/kgまたはTMX 10 mg/kgの投与により、young adult期においてLHサージの減弱、AVPVにおけるKiSS1 mRNA発現の低下およびKiSS1陽性細胞数の減少、ならびに加齢に伴う性周期停止の早期化が認められ、SERMの新生児期曝露が他のエストロゲン物質と同様に、キスペプチンニューロンの発達障害とこれに引き続く遅発影響を誘発することを明らかにした。これに加え、TMX10群ではFSH濃度の低下およびARCにおけるKiSS1陽性細胞数の減少がみられ、TMXの新生児期曝露による脳の雄性化が示唆された。子宮肥大試験におけるSERMのエストロゲン／抗エストロゲン活性の検証では、子宮におけるRLXおよびTMXのエストロゲン活性と、エストロゲン併用時のTMXによる抗エストロゲン活性がみられたが、いずれのSERMもキスペプチンニューロンのKiSS1発現には影響を及ぼさなかったことから、SERMのエストロゲン活性は組織に対する特異性だけでなく年齢依存的な側面も有している可能性を示唆した。

以上の結果から申請者は、遅発影響の発現メカニズムには視床下部キスペプチンニューロンの発達障害が深く関与しており、その本質は、生殖機能老化と類似した性成熟後の神経内分泌系の機能低下であると考えた。また、遅発影響の感受期は、ラットではヒトの妊娠第3期に相当する生後0日から10日齢前後であり、これまで想定されていたより後期の曝露でも潜在的な影響が生じるリスクを明らかにした。また、遅発影響がSERMを含む様々なエストロゲン活性を有する化学物質に共通したハザードであり、特にSERMの生殖発生に対するリスクについてはより慎重な検証が必要であることを明らかにした。

審 査 結 果 の 要 旨

哺乳類の脳では、新生児期に大量のエストロゲン作用を有する物質に曝露されると、成熟後の性行動や生殖機能における不可逆性の障害を誘発し、曝露が小量では様々な遅発性の生殖機能障害が生じると報告されている。遅発影響の発現機序については未だ明らかになっていなかった。

本研究は、遅発影響の発現機序とキスペプチンニューロンの関与を明らかにするため、新生児期にエストロゲン類を曝露したラットにおけるキスペプチンニューロンの変化について検証を行ったものである。

第1章では、新生児期に17エチニルエストラジオール（EE）を曝露されたラットの性周期停止前における、視床下部キスペプチンニューロンおよびLHサージ分泌の検索を行った。

その結果、LH サージのピーク時間の遅延とサージ面積の減少、ならびに視床下部キスペプチンニューロンの AVPV における KiSS1 mRNA の発現低下がみられ、KiSS1 mRNA 陽性細胞における ER α 共発現率低下も認められた。これらの変化が、老齢ラットでも認められたことから、遅発影響が「生殖機能老化の早期化」を意味することを示唆した。

第2章では、遅発影響の感受期を明らかにするため、生後異なる日齢の新生児ラットに EE を曝露し、視床下部キスペプチンニューロンの変化と遅発影響の発現の有無について検索した。その結果、ラットでは生後 0～10 日齢が遅発影響の感受期であり、その感受期のエンドポイントは生後 14 日齢前後に存在していることを示した。

第3章では、SERM の遅発影響について検証した。その結果、SERM のエストロゲン活性は組織に対する特異性だけでなく年齢依存的な側面も有している可能性を示唆した。

上記のように申請者は、遅発影響の発現メカニズムには視床下部キスペプチンニューロンの発達障害が深く関与しており、その本質は、生殖機能老化とも類似した神経内分泌系の機能低下であることを示した。また、遅発影響の臨界期は、ラットではこれまで想定されていたより後期の曝露でも潜在的な影響が生じるリスクがあることを明らかにした。さらに SERM の生殖発生に対するリスクについてはより慎重な検証が必要であることを示した。この研究が内分泌攪乱物質の遅発影響のメカニズム解明に非常に意義があるものと認める。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として充分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Prior attenuation of KiSS1/GPR54 signaling in the anteroventral periventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol in female rats
著 者 名 : Ichimura, R., Takahashi, M., Morikawa, T., Inoue, K., Maeda, J., Usudab, K., Yokosuka, M., Watanabe, G. and Yoshida, M.
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 51 : 145–156, 2015
- 2) 題 目 : The critical hormone-sensitive window for the development of delayed effects extends to 10 days after birth in female rats postnatally exposed to 17 α -ethynylestradiol
著 者 名 : Ichimura, R., Takahashi, M., Morikawa, T., Inoue, K., Kuwata, K., Usuda, K., Yokosuka, M., Watanabe, G. and Yoshida, M.
学術雑誌名 : Biology of Reproduction
巻・号・頁・発行年 : 93(2) : 1–11, 2015
- 3) 題 目 : Neonatal exposure to SERMs disrupts neuroendocrine development and postnatal reproductive function through alteration of hypothalamic kisspeptin neurons in female rats
著 者 名 : Ichimura, R., Takahashi, M., Morikawa, T., Inoue, K., Kuwata, K., Usuda, K., Yokosuka, M., Watanabe, G. and Yoshida, M.
学術雑誌名 : NeuroToxicology
巻・号・頁・発行年 : 56 : 64–75, 2016

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Disruption of Smad-dependent signaling for growth of GST-P-positive lesions from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model
著 者 名 : Ichimura, R., Mizukami, S., Takahashi, M., Taniai, E., Kemmochi, S., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicology and Applied Pharmacology
巻・号・頁・発行年 : 246(3):128-140, 2010
- 2) 題 目 : Predominant role of the hypothalamic-pituitary axis, not the ovary, in different types of abnormal cycle induction by postnatal exposure to high dose *p-tert*-octylphenol in rats
著 者 名 : Yoshida, M., Katashima, S., Tahahashi, M., Ichimura, R., Inoue, K., Taya, K. and Watanabe, G.
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 57:21-28, 2015
- 3) 題 目 : The impact of neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol on the development of kisspeptin neurons in female rats
著 者 名 : Takahashi, M., Ichimura, R., Inoue, K., Morikawa, T., Watanabe, G. and Yoshida, M.
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 60:33-38, 2016