

Fig. 2 低用量4-OHTの胎児期曝露はニューロンの発現領域を拡大する

終脳背側を形成する神経細胞の分布を神経細胞の初期マーカーであるNeural Class III  $\beta$ -tubulin (Tuj1)の免疫組織染色を用いて解析した。対照群と比較して5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の群では陽性領域が拡大した(矢印)。グラフでは陽性領域を占める割合(%:陽性領域/終脳背側全体)を算出している。

Scale bar: 200  $\mu\text{m}$ 、\*\* $p < 0.01$

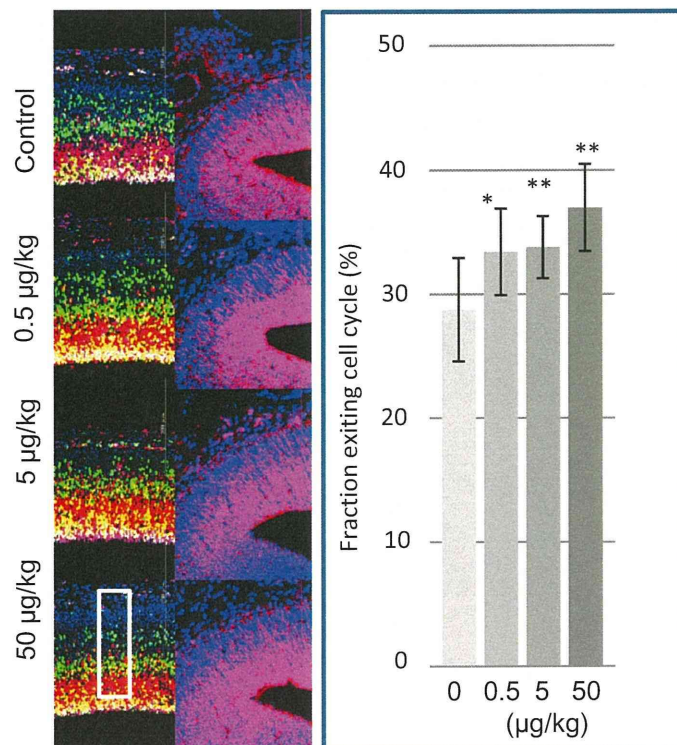


Fig. 3 低用量4-OHTの胎児期曝露はニューロン新生を促進する(Cell Cycle Exit)

皮質板過形成およびニューロン発現領域拡大がみられたことからニューロン新生増加に原因があると考え、ニューロンに分化した細胞の割合を比較した。ED13.5でIdUを投与し、24hr後のED14.5でIdUとKi67の二重染色を行った。この時点で分化している細胞はIdU+/Ki67- (緑)で示され、その細胞の割合を比較した。対照群と比較して、すべての4-OHT群では分化した細胞(緑)が顕著に増加した。グラフでは分化した細胞(緑)の割合(%:陽性細胞数(緑)/全体数(緑+黄))を示している。また、Nestin陽性の放射状突起は4-OHT群と対照群で差はみられなかった。

Scale bar: 200 µm、\* p<0.05 \*\* p<0.01

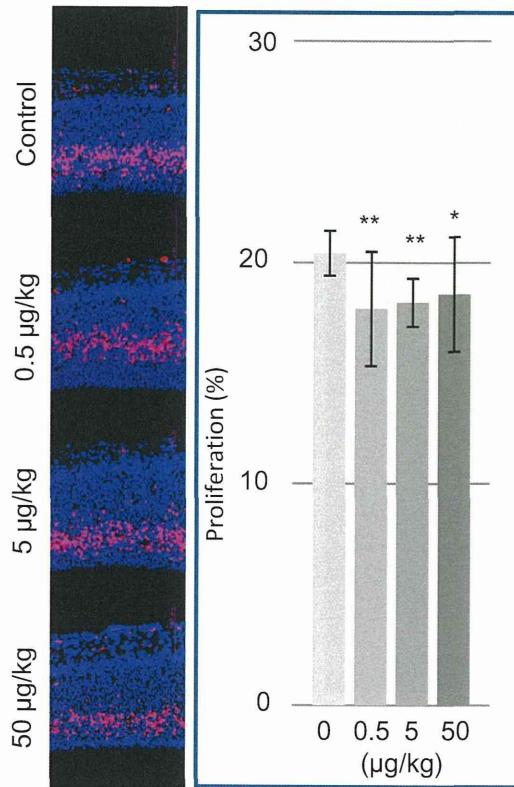


Fig. 4 低用量4-OHTの胎児期曝露は神経幹細胞増殖能を低下させる

ニューロン新生の促進がみられたことから、神経幹細胞増殖能への影響の有無を確認するため、CldU取り込み実験を行った。CldU投与1時間後に胎児脳を摘出した。脳室帯、脳室下帯において発現がみられ、CldU陽性細胞数の割合は、すべての4-OHT群において有意に低下した。Scale bar: 200 µm、\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

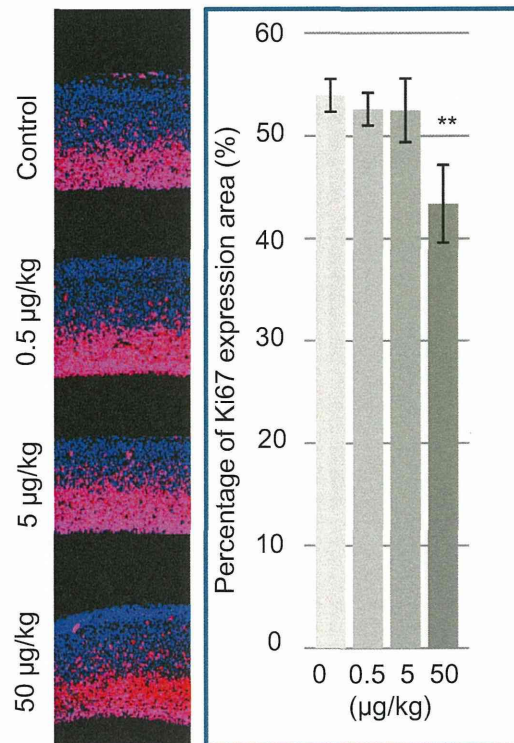


Fig. 5 低用量4-OHTの胎児期曝露は細胞幹細胞発現領域を減少させる

ED14.5における細胞増殖の割合を解析した。細胞増殖のマーカーとして細胞周期に発現する蛋白Ki67を用いて免疫染色を行った。対照群と比較して50 µg/kg群において有意に減少していることが示された。

Scale bar: 200 µm \*\* $p < 0.01$

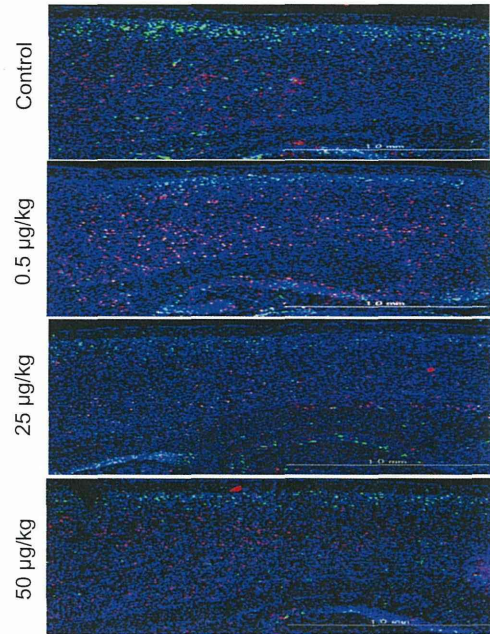


Fig. 6 分化した神経細胞の局在  
ED13にCldU、ED15にIdUを投与してそれぞれED13あるいはED15生まれのニューロンを標識し、ニューロンの移動を追跡し、生後14日における数と位置を解析した。その結果、いずれの群においてもED15生まれのニューロン(赤)がED13生まれのニューロン(緑)よりも上層に位置するinside-outのパターンをとることが確認された。

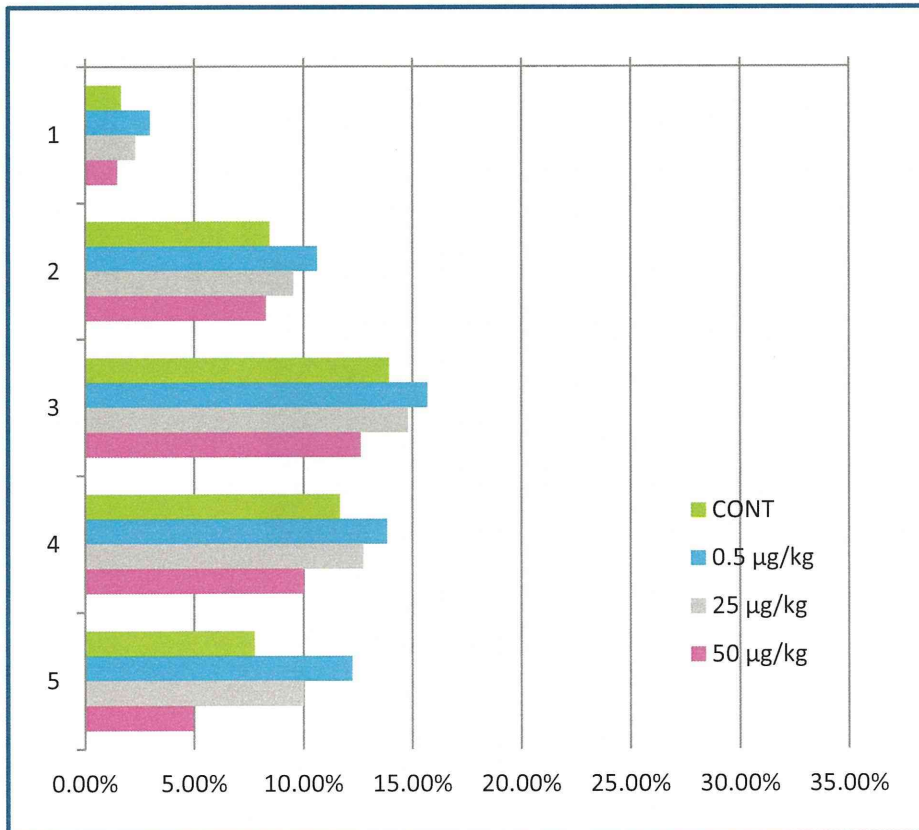


Fig.7 ED13生まれのニューロン(赤)の割合 (Birth-date analysis)

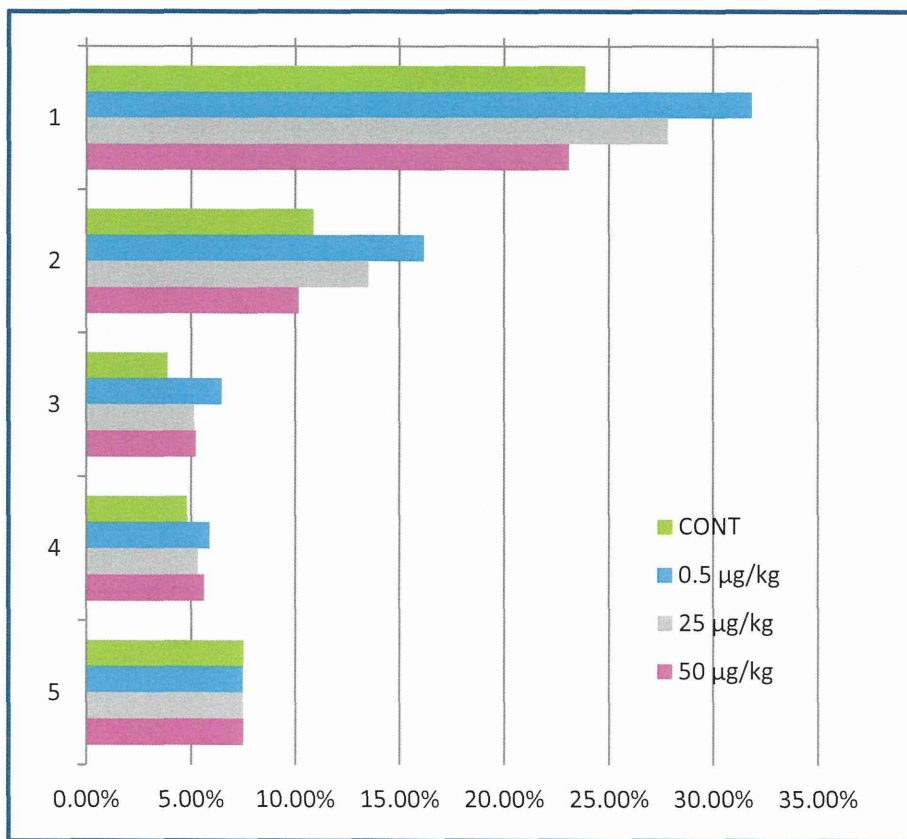


Fig. 8 ED15生まれのニューロン(緑)の割合 (Birth-date analysis)

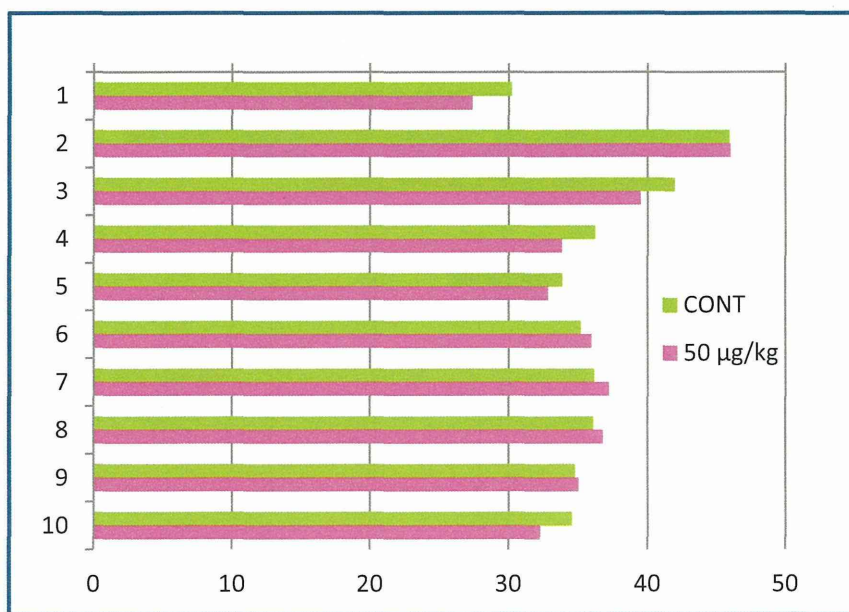


Fig. 9 ED13.5およびED15.5生まれのニューロン数



平成24年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業  
化学物質の子どもへの影響評価に関する研究  
－発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と  
それに基づく試験スキームの最適化－ (H23-化学-一般-002)

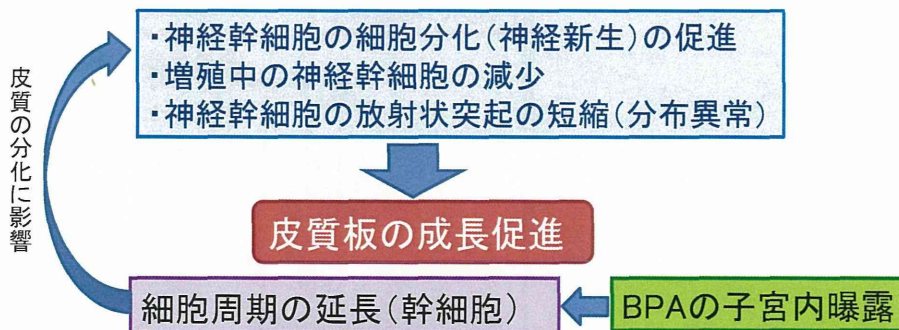
## -低用量曝露の標的臓器としての神経系への影響評価系の確立-

### 1. 低用量4-hydroxytamoxifenの胎児期曝露が誘発する大脳皮質形成異常の解析

長尾 哲二 近畿大学理工学部 生命科学科・発生  
駒田 致和 徳島大学薬学部 薬学科・臨床薬学

#### 【昨年度成績】

#### 低用量BPAの子宮内曝露が大脳皮質発生に及ぼす影響



・TCDD子宮内曝露が細胞周期の制御に影響を及ぼす。(Mitsuhashi *et al.* 2010)  
(細胞周期調節蛋白p27<sup>Kip1</sup>の発現を誘導して細胞周期を延長/空間記憶能の障害)

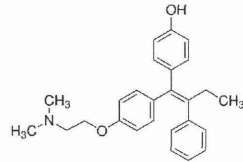
#### 【今後の課題】

・BPAでみられた異常が生後も維持され、神経機能の発達などに影響しているか(高次脳機能の発達障害?): 継続中

・BPAによる異常は他の化学物質でもみられるのか: 平成24年度

## 【今年度の研究課題】

### 4-Hydroxytamoxifen: 4-OHT

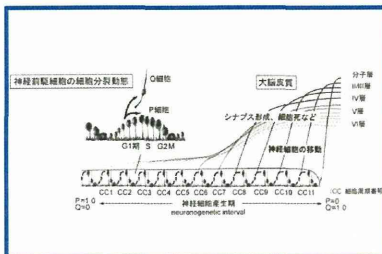


分子式:  $C_{26}H_{29}NO_2$   
 分子量: 387.51  
 CAS番号: 68392-35-8

- ・乳がん治療薬(化学療法剤)タモキシフェンの代謝産物である。
- ・親化合物よりも強力なエストロゲンアゴニスト/アンタゴニスト作用を示す。
- ・脂質過酸化の膜内インヒビターとしての活性を有する。
- ・**ERR  $\gamma$  にBPAと同じくらい強く結合する。**  
(DESよりも5倍ほど強い)
- ・ $E_2$ はERに結合しERR  $\gamma$  に結合しない。
- ・**ERR  $\gamma$  は胎児脳及び胎盤において強く発現する。**
- ・動物実験の報告(生殖・発生毒性)は殆どない。

低用量BPAの子宮内曝露がマウス大脳皮質の神経新生に重篤な影響を及ぼすことを報告した(Komada *et al.* 2012)。→低用量4-OHTの子宮内曝露により引き起こされる大脳皮質形成における神経分化制御異常について解析する。

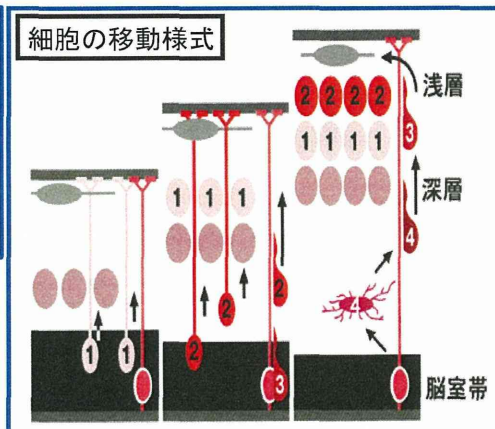
### 大脳皮質を形成するニューロンの産生メカニズム



・脳室面に局在する神経幹細胞はエレベーター運動(細胞体の上下運動: INM)を繰り返し、適切な時期に神経細胞に分化し、脳表面に向かって移動を始める。

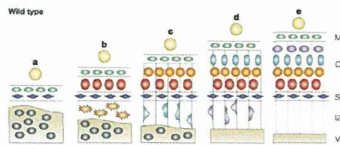
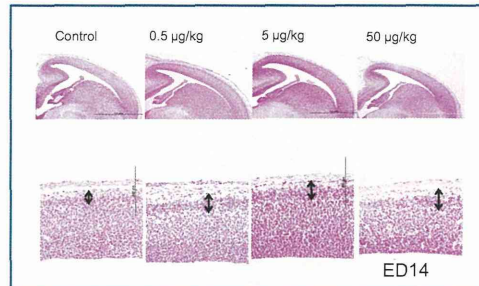
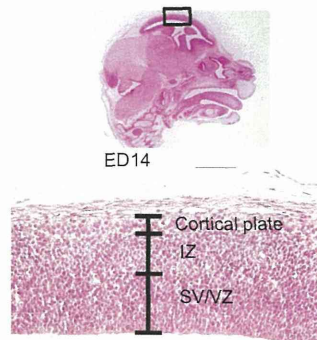
・細胞によって分裂する回数、分化するタイミングは決まっている。

### 大脳皮質の層構造の形成メカニズム



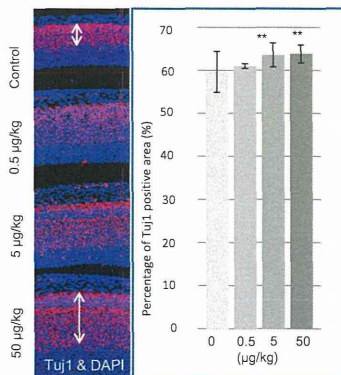
・**Inside-out pattern**: 遅く生まれた神経細胞が早く生まれた神経細胞を追い越して上層に局在する→大脳皮質の6層構造が形成される。

## 低用量4-OHTの胎児期曝露は皮質板の過形成を誘導する



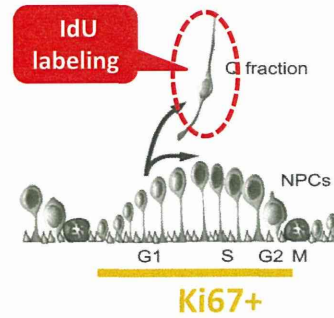
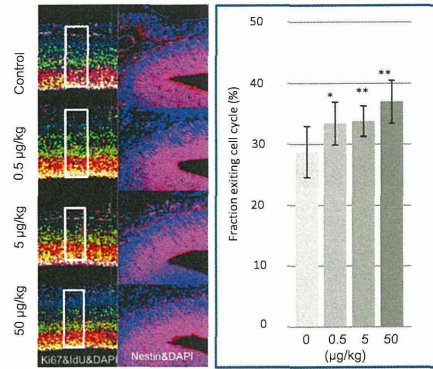
低用量4-OHTの胎児期曝露による終脳背側の形態学的異常をED14マウス胎児を用いて解析した。対照群と比較して0.5 µg/kg以上の群では皮質板(矢印)の促進が進んでいる。Scale bar: 200 µm

## 低用量4-OHTの胎児期曝露はニューロンの発現領域を拡大する(神経新生を促進する)



終脳背側を形成する神経細胞の分布を神経細胞の初期マーカーであるNeural Class III  $\beta$ -tubulin (Tuj1)の免疫組織染色を用いて解析した。対照群と比較して5 µg/kg以上の群では陽性領域が拡大した(矢印)。グラフでは陽性領域を占める割合(%:陽性領域/終脳背側全体)を算出している。\*\*p<0.01

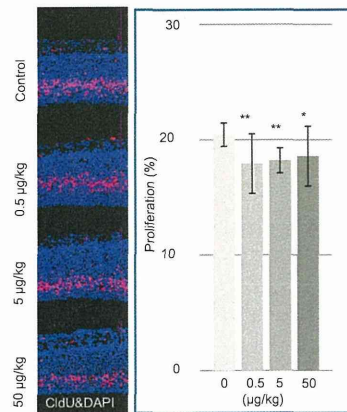
## 低用量4-OHTの胎児期曝露は Cell Cycle Exitを促進する



**IdU labeling=Cell cycle exit**  
細胞周期を出た(分化したニューロン)をラベルしてその割合を評価する。

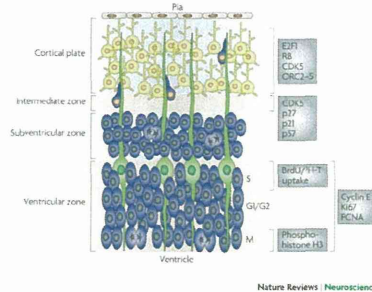
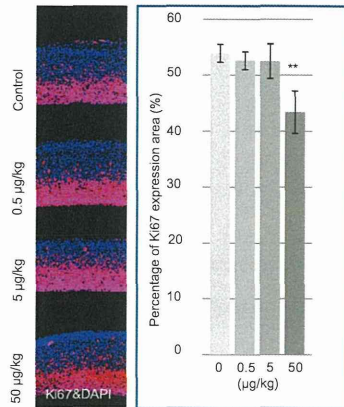
皮質板過形成およびニューロン発現領域拡大がみられたことからニューロン新生亢進に原因があると考え、ニューロンに分化した細胞の割合を比較した。ED13でIdUを投与し、24hr後のED14でIdUとKi67の二重染色を行った。この時点で分化している細胞はIdU+/Ki67-(緑)で示され、その細胞の割合を比較した。対照群と比較して、すべての4-OHT群では分化した細胞(緑)が顕著に増加した。グラフでは分化した細胞(緑)の割合(%:陽性細胞数(緑)/全体数(緑+黄))を示している。また、Nestin陽性の放射状突起は4-OHT群と対照群で差はみられなかった。 \* p<0.05 \*\* p<0.01

## 低用量4-OHTの胎児期曝露は神経 幹細胞増殖能を低下させる



ニューロン新生の促進がみられたことから、神経幹細胞増殖能への影響の有無を確認するため、CldU取り込み実験を行った。CldU投与1時間後に胎児脳を摘出した。脳室帯、脳室下帯において発現がみられ、CldU陽性細胞数の割合は、すべての4-OHT群において有意に低下した。 \*p<0.05 \*\*p<0.01

## 低用量4-OHTの胎児期曝露は終脳背側における 神経幹・前駆細胞の細胞増殖を抑制する



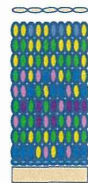
増殖中の細胞の検出  
Ki67、Phospho histone H3、  
チミジン類似物質 (BrdU、CldU、IdU)

Cell cycle exitが促進されることによって、神経幹細胞の増殖にも影響が引き起こされる可能性がある。そこでED14.5における細胞増殖の割合を解析した。細胞増殖のマーカーとして細胞周期に発現する蛋白Ki67を用いて免疫染色を行った。対照群と比較して50 μg/kg群において有意に減少していることが示された。\*\* $p < 0.01$

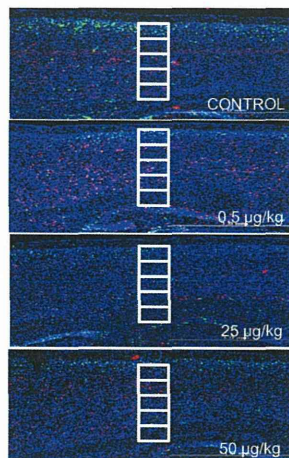
## 低用量4-OHTの胎児期曝露は神経細胞の 移動に影響を及ぼさない(生後14日)

脳が正しく機能するためには、神経細胞が適切な場所に配置されることが重要

【正常な脳】 整然とした6層構造  
【脳障害】 大脳皮質6層構造の乱れ

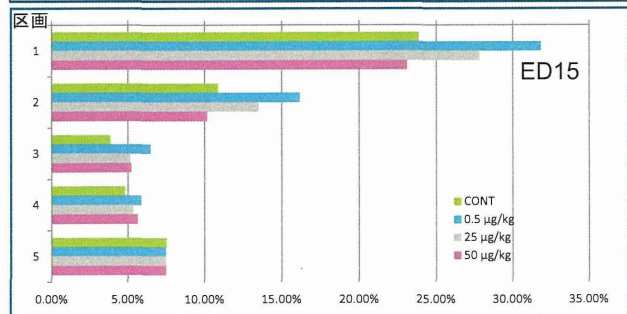
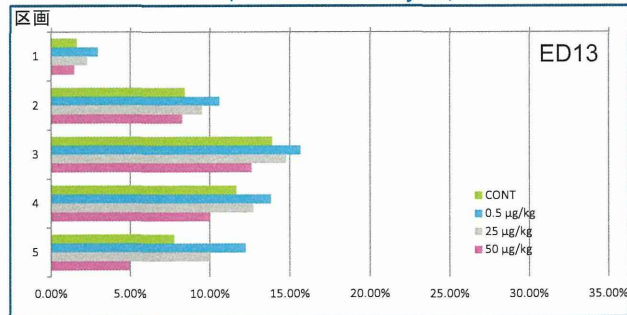


神経細胞移動の異常は様々な脳疾患につながる

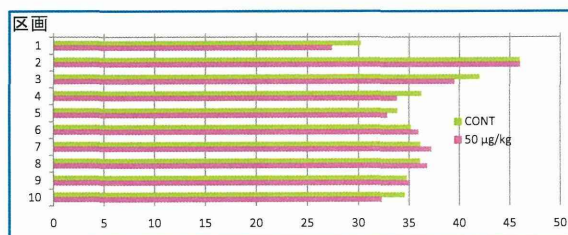


ED13にCldU、ED15にIdUを投与してそれぞれED13あるいはED15生まれのニューロンを標識し、ニューロンの移動を追跡し、生後14日における数と位置を解析した。その結果、いずれの群においてもED15生まれのニューロン(緑)がED13生まれのニューロン(赤)よりも上層に位置するinside-outのパターンが確認された。

## ED13あるいはED15生まれのニューロンの割合 (Birth-date analysis)



## ED13およびED15生まれのニューロン数



## Conclusion

4-Hydroxytamoxifenの胎児期曝露 (0.5~50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )

- 皮質板の過形成  
→終脳背側の神経新生の促進により誘発される
- 神経幹・前駆細胞の減少  
→神経新生の促進による

これらのphenotypeはbisphenol Aの胎児期曝露の場合と同様に、IPCの細胞周期の異常(細胞周期の延長)により誘発されるのか。

### 【Next Plan】

- この異常は生後も維持され、行動や発達の障害に関与するのか。  
→遅発影響の有無
- 細胞周期の異常を引き起こす分子メカニズムの解明  
→細胞周期調節蛋白p27<sup>Kip1</sup>発現異常(TCDD胎児期曝露では確認)

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
化学物質の子どもへの影響評価に関する研究  
- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、  
それに基づく試験スキームの最適化 -  
(H23-化学-一般-002)  
分担研究報告書

研究課題名 ; 低濃度化学物質で曝露した培養細胞の機能に関する研究

研究分担者 氏名 所属 職名 長尾 哲二 近畿大学理工学部 教授  
研究協力者 氏名 所属 職名 福嶋 伸之 近畿大学理工学部 講師

研究要旨 低濃度(10 pM-100 nM)のビスフェノール A をマウス大脳皮質神経上皮細胞に 1 週間曝露すると、神経分化が促進された。一方、副腎髄質クロム親和性細胞を同濃度のビスフェノール A やノニルフェノールで 1 週間曝露すると、神経成長因子による神経分化は抑制された。この作用は化学物質の処理を 1 週間止めても認められた。3T3 線維芽細胞を同様に長期間曝露したときには、酸化ストレスによる細胞死の抑制が認められた。これらの細胞ではメチル化ヒストンの低下が認められた。神経上皮細胞には *Esrra*、*Esrrβ* および *Esrrγ* が、PC12 細胞には *Esrra* が、3T3 線維芽細胞には *Esrra* および *Esrrβ* が発現していた。今後、ビスフェノール A の長期間曝露が引き起こす作用の分子機構を検討していく。

#### A. 研究目的

これまで、生体発達や生殖機能に影響を及ぼすとされているビスフェノール A やノニルフェノールが神経系に対して多様な作用を示すことが報告されている[1]。これらの研究では、妊娠マウスやラットに化学物質を投与した場合、誕生した次世代マウスあるいはラットに行動異常や脳組織学的な変化が生じることが示されている[2-5]。一方、神経系の培養細胞を用いたインビトロ実験も行われており、神経細胞の生存やその機能に影響を及ぼすことが報告されている[6-16]。このようなインビトロ研究は、化学

物質の作用機構を明らかにするだけでなく、化学物質の標的分子の同定とそれを活用した評価法の開発に結びつくために非常に重要なものと言える。

本研究では中枢神経系細胞の分化モデルを用いて低濃度化学物質の作用を調べるとともに、新たなインビトロ評価系の確立を最終的な目標としている。昨年度は、PC12 細胞ならびにマウス線維芽細胞を用いて化学物質の作用検討を行い、低濃度のビスフェノールまたはノニルフェノールが PC12 細胞の神経分化に対して抑制的に働くこと、マウス線維芽細胞の酸化ストレス抵



抗性を変動させることを報告した。本年度は、マウス大脳皮質神経細胞の神経分化に対するこれらの化学物質の作用の検討も開始した。さらに、化学物質の作用機構解明に結びつく実験に着手した。

## B. 研究方法

### マウス神経上皮細胞の培養

胎生 13 日令 ICR マウスの大脳皮質を摘出し、機械的に単一細胞になるまで単離分散した。塩基性繊維芽細胞成長因子、上皮細胞成長因子、B27 サプリメントを含む Opti-MEM 中で 7 日間培養し、細胞塊を形成させた。化学物質の添加は培養開始時に行い、4 日後に追加した。

### マウス神経上皮細胞の神経分化評価実験

神経上皮細胞塊から単離分散させた細胞を、ポリリジンコートしたカバーガラスに播種し、さらに 7 日間培養して神経分化を誘導した。 $\beta$ -チューブリンタイプ 3 に対する蛍光免疫染色を行った。無作為に選んだ 5 つ以上の視野で合計 100 個以上の細胞を観察し、全細胞数に対する $\beta$ -チューブリンタイプ 3 陽性細胞の割合を算出した。

### 株細胞の培養

マウス線維芽細胞 (Swiss/3T3) および PC12 細胞を用いた。3T3 線維芽細胞は

10%ウシ胎仔血清 (FCS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (D-MEM、和光純薬) で培養した。PC12 細胞は 10%FCS および 5%ウマ血清を含む D-MEM で培養した。いずれの細胞も 3 または 4 日毎に継代し、化学物質を添加した。

### PC12 細胞の神経分化評価実験

化学物質で曝露した PC12 細胞を、あらかじめポリリジンコートしたカバーガラスに播種した。翌日、100 ng/ml の神経成長因子を含む無血清 D-MEM に交換し、さらに 3 日間培養した。細胞をホルマリンで固定し、位相差顕微鏡下、細胞体直径よりも長い突起を持つ細胞を神経分化した PC12 細胞と見なして数えた。無作為に選んだ 5 つ以上の視野で合計 100 個以上の細胞を観察し、全細胞数に対する神経分化した細胞の割合を算出した。

### 細胞死評価実験

化学物質で曝露した細胞を 96 穴プレートに播種した。翌日、無血清 D-MEM で細胞を洗浄し、100  $\mu$ l の無血清 D-MEM にてさらに 2 日間培養した。無血清 D-MEM に交換して 1 時間後に過酸化水素を添加して細胞死を誘導した。細胞数は Cell counting kit-8 を用いて測定した。

## ウエスタンブロッティング

PC12 細胞を細胞抽出緩衝液(50 mM トリス、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100、プロテアーゼ阻害剤カクテル)で抽出し、15,000 xg で 5 分間遠心した。得られた上清に 4xSDS Laemmli 溶液を加えて 14%アクリルアミドを用いた SDS 電気泳動に使用した。3T3 線維芽細胞を 2xSDS Laemmli 溶液で抽出し、14%アクリルアミドを用いた SDS 電気泳動に使用した。PVDF 膜に転写したのち、1 次抗体と反応させた。1 次抗体には、抗アセチル化ヒストン H3 (Lys9)、抗メチル化ヒストン H3 (Lys9)、抗アセチル化ヒストン H3 (Lys56)、抗 Bcl-2 抗体、抗ホスホ Erk1/2 抗体、抗 Erk1/2 抗体を用いた。続いて、パーオキシダーゼ標識 2 次抗体と 1 時間反応させ、ケミルミワンスーパーを用いて抗原を検出した。

## RT-PCR

細胞から全 RNA の抽出を行い、RT-PCR に用いた。増幅反応は 95°C、1 分の熱変性に続いて、95°C、30 秒、56°C、30 秒、72°C、60 秒のサイクルを 35 回繰り返すことにより行った。

## GPR30 過剰発現細胞株の作成と GPR30 発現確認

マウス GPR30 遺伝子に FLAG タグを融合

させた DNA をレトロウイルス作製用ベクター S001 に挿入した。このベクターは IRES により GFP を発現する構成となっている。作成された S001-GPR30 をパッケージング細胞フェニックスに導入し、レトロウイルスを産生させた。得られたウイルスをラット RH7777 細胞に感染させ、GFP 発現を指標として細胞のクローニングを行った。GPR30 の発現確認は、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより行った。細胞抽出液は細胞抽出緩衝液(50 mM トリス、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100)で可溶化して作成し、ウエスタンブロッティングに使用した。細胞膜の作成のために、TE 緩衝液中で細胞をホモゲナイズし、300 xg で 5 分間遠心した。得られた上清をさらに 27,000 x g で 20 分間遠心し、沈殿を細胞膜画分としてウエスタンブロッティングに使用した。抽出液、細胞膜画分ともに 1 レーン当たり 50 µg タンパク量を泳動した。

## C. 研究結果

### 化学物質で曝露したマウス大脳皮質神経上皮細胞の神経分化

マウス胎令 12-13 日は大脳皮質形成初期にあたり、この時期の大脳は自己増殖能の盛んな神経上皮細胞を多く含む。この細胞を単一にして成長因子存在下、非接着性のプラスチックシャーレ内で培養すると、

自己複製が進行し浮遊細胞塊が形成される。この細胞塊は自己増殖能を維持した神経上皮細胞を含んでいるが、プラスチックシャーレ上に接着させて培養すると神経細胞およびグリア細胞に分化する(図 1)。これらの事実から細胞塊培養系は神経上皮細胞の自己増殖や神経分化の調節機構を調べる有用な実験系として広く用いられ、さらに生理活性物質や化学物質の作用が検討されている[15, 17-19]。昨年度、ビスフェノール A の神経上皮細胞の自己増殖に対する作用を調べたが、10 pM~100 nM の濃度で神経上皮細胞を 1 週間曝露しても自己増殖には影響を及ぼさないことが分かった。そこで本年度は、神経上皮細胞の神経分化に影響が生じるのかどうかを検討した。10 pM~100 nM のビスフェノール A で1週間処理をした神経上皮細胞塊を単離分散して基質上に接着させ、続けて7日間化学物質非存在下で培養を行った。神経細胞特異的な $\beta$ -チューブリンタイプ 3 に対する免疫染色を行い神経分化の程度を評価したところ、1 nM をピークにした、ベル型の神経分化促進作用が認められた(図 2)。

#### 化学物質を曝露した PC12 細胞の神経分化

PC12 細胞は NGF により神経分化するため、その調節機構の検討や分化に影響する物

質の評価に広く用いられている。昨年度の研究では、PC12 細胞を 100 pM~100 nM のビスフェノール A で 1 ヶ月間曝露し、NGF を加えてビスフェノール A 非存在下で分化誘導を行ったところ、神経分化した PC12 細胞の割合が有意に低下することがわかった。本年度は曝露時間を変えて同様の実験を行った。ビスフェノール A で 1 週間曝露した PC12 細胞を神経分化誘導させたところ、神経分化の抑制が認められた(図 3)。同程度の低下は 100 pM~100 nM のノニルフェノールや 1 nM の $\beta$ エストラジオールを処理した細胞においても生じた(図 3)。しかしながら、ビスフェノール A の曝露時間が1日間では神経分化の抑制は見られなかった(図 3)。興味あることに、1 週間の曝露後に 1 週間の休薬期間をおいて分化誘導させたところ、神経分化の抑制が認められた(図 4)。

化学物質による神経分化の抑制が PC12 細胞の NGF に対する反応性の低下によるものかどうかを検討するため、NGF 刺激により引き起こされる Erk1/2 のリン酸化反応を調べた。しかしながら、ビスフェノール A、ノニルフェノール、エストロゲンまたはジエチルstilbestrolの曝露は、NGF による Erk1/2 のリン酸化に顕著な影響を示さなかった(図 5)。

### 3T3 線維芽細胞の機能に対する化学物質の影響

化学物質の評価を比較的簡便に行うには、取り扱い易い細胞を用いた簡素な実験系を確立することが重要である。このため 3T3 線維芽細胞を用いた細胞増殖および細胞死を指標としてビスフェノール A およびノニルフェノールの影響を検討した。昨年度、3T3 線維芽細胞をビスフェノール A で 1 ヶ月間曝露しても細胞増殖には影響がないことが示された。過酸化水素による細胞死に対する、ビスフェノール A の長期曝露の影響がどのようなものであるのかを検討したところ、ビスフェノール A の濃度に依存した、しかしながらベル型の細胞死抑制作用が見られた。そこで、本年度は引き続きノニルフェノールで処理した 3T3 線維芽細胞も同様の酸化ストレス抵抗性を示すかどうかを調べた。100 pM~100 nM のノニルフェノールまたは 1 nM の  $\beta$  エストラジオールで 1 週間曝露した細胞は顕著な細胞死抵抗性を示した(図 6)。

ビスフェノールによるエピジェネティックな遺伝子発現調節が示唆されている[20]。そこで、3T3 線維芽細胞を用いて、ヒストン修飾が化学物質により影響を受けるのかどうかを調べた。ビスフェノール A、ノニルフェノール、エストロゲンまたはジエチルstilbestロールで 1 週間曝露した 3T3 線維芽細胞

では、ヒストン H3 の 9 番目のリジンにおけるメチル化が低下していることが認められた(図 7)。興味深いことに、エストロゲン受容体を介したエピジェネティックな Bcl-2 発現制御が報告されている[21]。そこで、細胞死抑制に関わる Bcl-2 分子の発現検討を予備的に行った。コントロール細胞と比較して、ビスフェノール A、ノニルフェノール、 $\beta$  エストラジオールまたはジエチルstilbestロールで 1 週間曝露した細胞では、Bcl-2 の発現が増加していることが認められた(図示せず)。

### 神経上皮細胞、PC12 細胞および 3T3 線維芽細胞におけるエストロゲン関連受容体遺伝子の発現

昨年度、本研究で使用した細胞における、エストロゲン受容体 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、GPR30 の遺伝子発現を調べた。近年ビスフェノール A に対して高親和性に結合する受容体として、エストロゲン関連受容体 $\gamma$ (Esrr $\gamma$ )が同定された[22, 23]。そこで、Esrr $\alpha$ ならびに Esrr $\beta$ 、Esrr $\gamma$ の遺伝子(それぞれ Esrr $\alpha$ 、Esrr $\beta$ 、Esrr $\gamma$ )の発現を RT-PCR により調べた。Esrr のいずれのサブタイプも、胎令 13 日大脳皮質において発現が認められ、その発現は神経上皮細胞塊においても維持されていた(図 8)。PC12 細胞では Esrr $\alpha$ の発現が認められた。3T3 線維芽細胞では、