

*Esrra*および *Esrrβ*の発現が認められた。

GPR30 発現細胞の確立

ビスフェノール A をはじめとする化学物質の作用には、上述したエストロゲン受容体ならびにエストロゲン受容体関連遺伝子の関与が示唆されている。GPR30 は細胞膜に存在する受容体であり、ビスフェノール A により活性化されることが示唆されているが、その詳細は不明な点も多い[24, 25]。昨年度の結果では、GPR30 はビスフェノール A が作用を示した 3 種類の細胞に共通に発現していることが分かった。そこで GPR30 を介した作用を検討するために、GPR30 を発現する細胞株の作成に着手した。ほぼ全ての細胞において内在性 GPR30 遺伝子の発現が認められたが、ラット肝臓がん由来の RH7777 細胞の垂株において GPR30 の発現が非常に低いことを見出した。これを用いて GPR30 を過剰発現する細胞株を作成した(図 9)。

D. 考察

神経上皮細胞の自己増殖と神経分化

神経細胞が誕生する時期の脳には神経上皮細胞が多量に含まれており、これらを一度分散単離して成長因子存在下で浮遊培養することにより、自己増殖能を有する神経上皮細胞からなる細胞塊が形成される

[15, 17-19]。このとき成長因子とともに様々な因子を加え、自己増殖に対する当該因子の影響を調べることができる。さらにその後の神経細胞やグリア細胞への分化を定量評価することにより、神経上皮細胞分化への影響を分子および細胞レベルで明らかにすることが可能となる。今回の検討では、神経上皮細胞をビスフェノール A で処理をしたとき、神経分化の促進が認められた。このことは、ビスフェノール A が神経上皮細胞塊の培養中に、神経上皮細胞から神経前駆細胞への形質変換を促進している可能性を示唆している。われわれの結果と同様の報告が、Nakamura らによりされている[26]。彼らは、妊娠マウスへビスフェノール A を投与したとき、胎仔マウスの大脳皮質神経上皮細胞への BrdU 取込みは非投与群のそれと差異が認められなかったが、神経分化が促進されることを見出している。

PC12 細胞の神経分化抑制

PC12 細胞は NGF により交感神経様細胞に形態ならびに形質が変化する。これまで複数の報告において、ビスフェノール A およびノニルフェノールが PC12 細胞の神経分化を抑制することが示されている[7, 8]。われわれもまた、ほぼ同等の抑制作用を見出し、昨年度報告した。また、NGF で分化を誘発するよりも前に、1 週間から 1 ヶ月の間、

これらの化学物質で曝露をしても、同様の神経分化抑制が認められた。NGF の作用は NGF 受容体の活性化に引き続いて生じる情報伝達経路、なかでも Erk1/2 の活性化がよく知られている。化学物質の前処理が Erk1/2 の活性化に対して顕著な変化を示さなかったことは、すくなくとも NGF 受容体から Erk1/2 の活性化までは影響を受けていないことを示唆している。

化学物質の曝露後に休薬期間を設けたところ、PC12 細胞の神経分化抑制が見られた。このことは、化学物質の作用は細胞に記憶されていること示唆している。化学物質の作用の記憶は、エピジェネティックな変化が生じていることを想像させるため、現在、ヒストンのメチル化やアセチル化が PC12 細胞において生じているかどうかを検討している。

ビスフェノール A が PC12 細胞の神経分化に対して抑制的であるのに対して、神経上皮細胞の神経分化に対しては促進的であった。このことはビスフェノール A の神経分化に対する作用が細胞の種類により異なることを示している。神経前駆細胞におけるエストロゲン受容体やエストロゲン受容体関連受容体の発現の差異が、作用の違いをもたらしている可能性が考えられる。

酸化ストレス誘発細胞死に対する抵抗性

3T3 線維芽細胞は取り扱いが非常に簡便な細胞であり、細胞内情報伝達経路の解析、酸化ストレス応答、細胞のがん化などのメカニズム研究によく用いられている。本実験では細胞死に及ぼす影響を検討するため過酸化水素により細胞死を誘発させた。過酸化水素は細胞内の多様な分子や器官に対して酸化ストレスを与え、最終的に細胞を死に至らせる。またこれらの反応には細胞内情報伝達系の変動も関与しており、キナーゼ経路の活性化などが報告されている[27, 28]。低濃度のビスフェノール A およびノニルフェノールで前処理をした 3T3 線維芽細胞は、過酸化水素処理により生じる細胞死に対して抵抗性を獲得したことは、PC12 細胞の場合と同様に、両化学物質の作用が過酸化水素による細胞傷害活性化経路を直接抑制するものではないと考えられる。すなわち、細胞自身に酸化ストレス抵抗性を示す分子や情報伝達経路が恒常的に亢進している可能性が考えられる。過酸化水素により MAP キナーゼである JNK を介した経路の活性化が報告されている。われわれの予備検討では、過酸化水素処理によりリン酸化 JNK レベルの上昇は認められず、さらに化学物質によっても JNK のリン酸化に変化が生じなかった。今後さらに検討する予定である。

今回、化学物質の処理によりヒストン H3

の 9 番めリジン残基のメチル化が減少していることが認められた。ヒストンの修飾は遺伝子発現を変化させる、エピジェネティックな調節機構として知られており、実際にエストロゲン受容体を介したヒストン修飾が報告されている。したがって、このような変化が細胞死に関わる分子の発現を変化させている可能性が考えられる。興味あることに、エストロゲンやビスフェノール A による Bcl-2 発現制御やヒストン修飾が報告されている[21, 29-31]。われわれの予備検討においても、Bcl-2 の発現増加が認められており、上記の考えを支持するが、さらに詳細な検討を進める必要がある。さらに、ヒストン修飾として、他のリジン残基のメチル化やアセチル化なども知られており、これらの修飾についても今後検討する予定である。化学物質によるヒストン修飾が普遍的、受容体特異的に生じるのであれば、ヒストン修飾を指標にして化学物質の簡易評価系確立が可能となるかもしれない。

GPR30 発現細胞

近年、ビスフェノール A が DNA メチル化やヒストン化学修飾を変動させることが指摘されている[20, 32]。このようなエピジェネティックな変化が臓器および時期特異的遺伝子の発現を変化させ、その結果、神経系を含む様々な臓器の発達や機能に影響をも

たらしていることが示唆されている。

この課題に対する解決の糸口は化学物質の受容機構の解明と考えられる。ビスフェノール A もノニルフェノールも核内受容体である ER α および ER β に結合するのみならず、アゴニストとして作用する[33, 34]。さらに近年見出された、細胞膜のエストロゲン受容体と考えられている GPR30 にもアゴニストとして作用することが報告されている[35, 36]。また、エストロゲン関連受容体 (Esrr α , Esrr β , Esrr γ) の存在やエストロゲン受容体を介さない作用の報告もあり[37]、これらの化学物質の受容機構は混沌としている。しかしながら、昨年度ならびに今年度の検討では、神経上皮細胞では GPR30、Esrr α 、Esrr β および Esrr γ が、3T3 線維芽細胞では GPR30、Esrr α および Esrr β が、PC12 細胞では ER β 、GPR30 および Esrr α が発現していたことから、化学物質の作用は少なくとも ER α を介したものではないと考えられる。ビスフェノール A およびノニルフェノールの神経分化抑制作用、細胞死抑制作用が ER β 、GPR30 あるいは Esrr を介しているのかどうかを明らかにするために、これら受容体の発現細胞、アンタゴニストの使用や遺伝子発現のノックダウンなどを取り入れた実験を進める必要がある。具体的には、今回作成した GPR30 発現 RH7777 細胞や 3T3 線維芽細胞および PC12 細胞の GPR30 ノッ

クダウン細胞を用いて、ビスフェノール A や
ノニルフェノールが GPR30 を介して作用す
るのかどうかを検討していく。また、同様の
検討を Esrra、Esrrβ、Esrrγについても実
施していく。

E. 結論

ビスフェノール A の低濃度(10 pM~100
nM)の長期曝露(1 週間以上)はマウス大脳
皮質神経上皮細胞の神経分化、PC12 細胞
の神経分化や 3T3 線維芽細胞の酸化スト
レスによる細胞死に影響を及ぼすことが示
された。PC12 細胞の化学物質の影響は細
胞に記憶されていた。3T3 線維芽細胞では
化学物質の処理によりヒストン修飾が変動
していることが示された。これらの分子機構
を明らかにする一環として GPR30 発現細胞
を作成した。今後の化学物質の簡便な評
価系確立に役立てる。

F. 研究発表

なし(平成 25 年度予定)

G. 知的財産

なし

参考文献リスト

1. Richter, C.A., et al., In
vivo effects of bisphenol A
in laboratory rodent studies.

- Reproductive Toxicology, 2007.
24(2): p. 199-224.
2. Kubo, K., et al., Exposure to
bisphenol A during the fetal
and suckling periods disrupts
sexual differentiation of the
locus coeruleus and of
behavior in the rat.
Neuroscience Letters, 2001.
304(1-2): p. 73-76.
3. Kubo, K., et al., Low dose
effects of bisphenol A on
sexual differentiation of the
brain and behavior in rats.
Neuroscience Research, 2003.
45(3): p. 345-356.
4. Nakamura, K., et al.,
Prenatal and lactational
exposure to low-doses of
bisphenol A alters brain
monoamine concentration in
adult mice. Neuroscience
Letters, 2010. 484(1): p. 66-
70.
5. Nakamura, K., et al.,
Prenatal exposure to
bisphenol A affects adult
murine neocortical structure.
Neuroscience Letters, 2007.
420(2): p. 100-105.
6. Aoki, M., et al., Nonylphenol
enhances apoptosis induced by
serum deprivation in PC12
cells. Life Sciences, 2004.
74(18): p. 2301-2312.
7. Seki, S., et al., Bisphenol-A
suppresses neurite extension
due to inhibition of
phosphorylation of mitogen-
activated protein kinase in
PC12 cells. Chemico-
Biological Interactions, 2011.
194(1): p. 23-30.

8. Bevan, C.L., et al., The endocrine-disrupting compound, nonylphenol, inhibits neurotrophin-dependent neurite outgrowth. *Endocrinology*, 2006. 147(9): p. 4192-4204.
9. Imamura, L., et al., Additional repression of activity-dependent c-fos and BDNF mRNA expression by lipophilic compounds accompanying a decrease in Ca²⁺ influx into neurons. *Neurotoxicology*, 2005. 26(1): p. 17-25.
10. Kudo, C., et al., Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of the caspase cascade and regulation of the cell cycle. *Journal of Neurochemistry*, 2004. 88(6): p. 1416-1423.
11. Le, H.H., et al., Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters*, 2008. 176(2): p. 149-156.
12. Miyatake, M., et al., Dynamic changes in dopaminergic neurotransmission induced by a low concentration of bisphenol-A in neurones and astrocytes. *Journal of Neuroendocrinology*, 2006. 18(6): p. 434-444.
13. Negishi, T., et al., Inhibition of staurosporine-induced neuronal cell death by bisphenol A and nonylphenol in primary cultured rat hippocampal and cortical neurons. *Neuroscience Letters*, 2003. 353(2): p. 99-102.
14. Okada, M., et al., Estrogen stimulates proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells through different signal transduction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010. 11(10): p. 4114-4123.
15. Okada, M., et al., Effects of estrogens on proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells. *Biomedical Research-Tokyo*, 2008. 29(3): p. 163-170.
16. Wetherill, Y.B., et al., In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 2007. 24(2): p. 178-198.
17. Fukushima, N., et al., Lysophosphatidic acid stimulates neuronal differentiation of cortical neuroblasts through the LPA₁-G_{i/o} pathway. *Neurochemistry International*, 2007. 50(2): p. 302-307.
18. Camarillo, C. and R.C. Miranda, Ethanol exposure during neurogenesis induces persistent effects on neural maturation: Evidence from an ex vivo model of fetal cerebral cortical neuroepithelial progenitor maturation. *Gene Expression*, 2008. 14(3): p. 159-171.

19. Moses, D., et al., Murine embryonic EGF-responsive ventral mesencephalic neurospheres display distinct regional specification and promote survival of dopaminergic neurons. *Experimental Neurology*, 2006. 199(1): p. 209-221.
20. Kundakovic, M. and F.A. Champagne, Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain Behavior and Immunity*, 2011. 25(6): p. 1084-1093.
21. Svtelisl, A., et al., H3K27 demethylation by JMJD3 at a poised enhancer of anti-apoptotic gene BCL2 determines ERalpha ligand dependency. *EMBO J*, 2011. 30(19): p. 3947-61.
22. Okada, H., et al., Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect*, 2008. 116(1): p. 32-8.
23. Takayanagi, S., et al., Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett*, 2006. 167(2): p. 95-105.
24. Revankar, C.M., et al., A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 2005. 307(5715): p. 1625-1630.
25. Vivacqua, A., et al., The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 2006. 20(3): p. 631-646.
26. Nakamura, K., et al., Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of bisphenol A. *Journal of Neuroscience Research*, 2006. 84(6): p. 1197-1205.
27. WANG, X., MARTINDALE, Jennifer L., LIU, Yusen and HOLBROOK, Nikki J., The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem. J.*, 1998. 333,: p. 291-300.
28. Luo, H.R., et al., At as a mediator of cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. 100(20): p. 11712-11717.
29. Doherty, L.F., et al., In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Horm Cancer*, 2010. 1(3): p. 146-55.

30. Singh, S. and S.S. Li, Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates. *Int J Mol Sci*, 2012. 13(8): p. 10143-53.
31. LaPensee, E.W. and N. Ben-Jonathan, Novel roles of prolactin and estrogens in breast cancer: resistance to chemotherapy. *Endocr Relat Cancer*, 2010. 17(2): p. R91-107.
32. Dolinoy, D.C., D. Huang, and R.L. Jirtle, Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. 104(32): p. 13056-13061.
33. Kuiper, G., et al., Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 1997. 138(3): p. 863-870.
34. Kuiper, G., et al., Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 1998. 139(10): p. 4252-4263.
35. Thomas, P., et al., Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 2005. 146(2): p. 624-632.
36. Thomas, P. and J. Dong, Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2006. 102(1-5): p. 175-179.
37. Lee, Y.M., et al., Estrogen receptor independent neurotoxic mechanism of bisphenol A, an environmental estrogen. *Journal of Veterinary Science*, 2007. 8(1): p. 27-38.

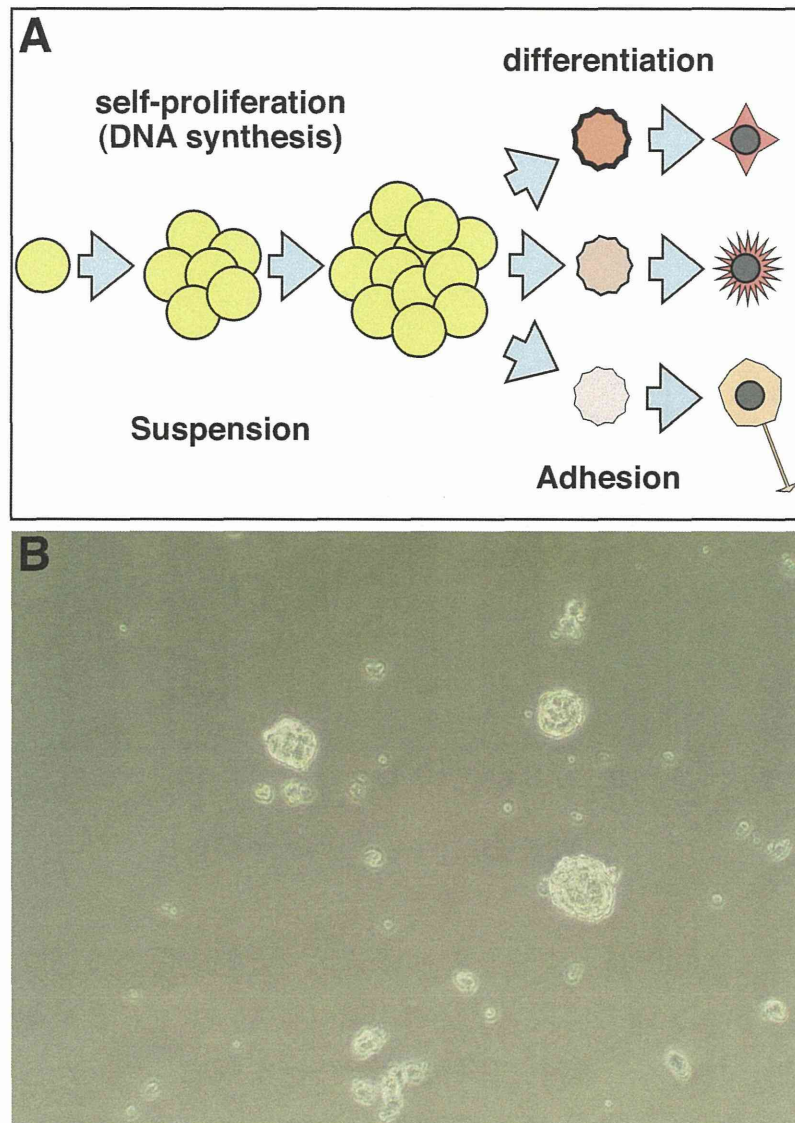


図1 マウス胎仔大脳皮質由来の神経上皮細胞塊の培養
 (A) 神経上皮細胞塊の培養の模式図。神経上皮細胞を浮遊培養することにより細胞塊が形成される。この細胞塊は自己複製能を持つ神経上皮細胞から構成される。これを単一細胞にして接着性基質上で培養すると、神経細胞ならびにグリア細胞に分化する。(B) 胎生13日令マウス大脳皮質の神経上皮細胞を5日間培養して形成された細胞塊の位相差顕微鏡写真。

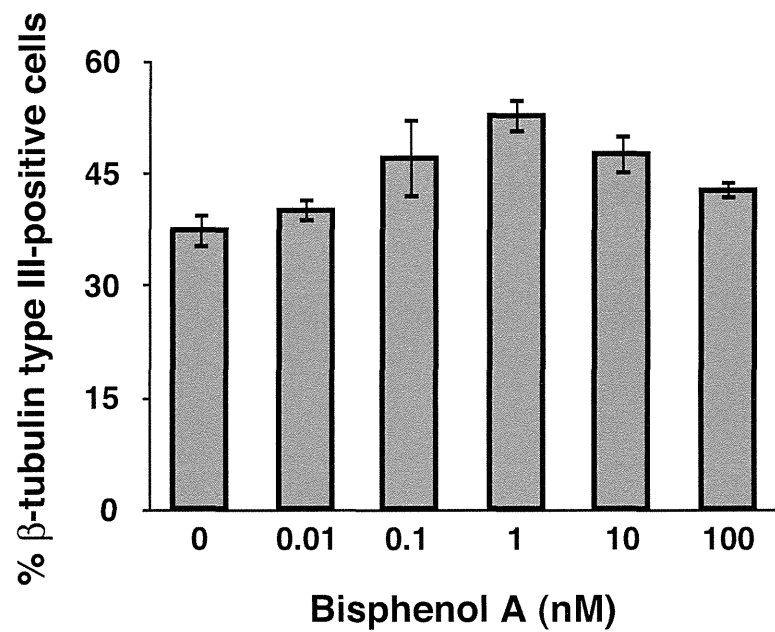


図 2 大脳皮質上皮細胞の神経分化 大脳皮質上皮細胞を 10^{-11} ~ 10^{-7} M のビスフェノール A (BPA) 存在下で 1 週間培養したのち、単離分散して神経分化を誘導した。7 日後に β tubulin type III 陽性細胞の割合を算出した。結果は 3 例の平均 \pm 標準誤差である。

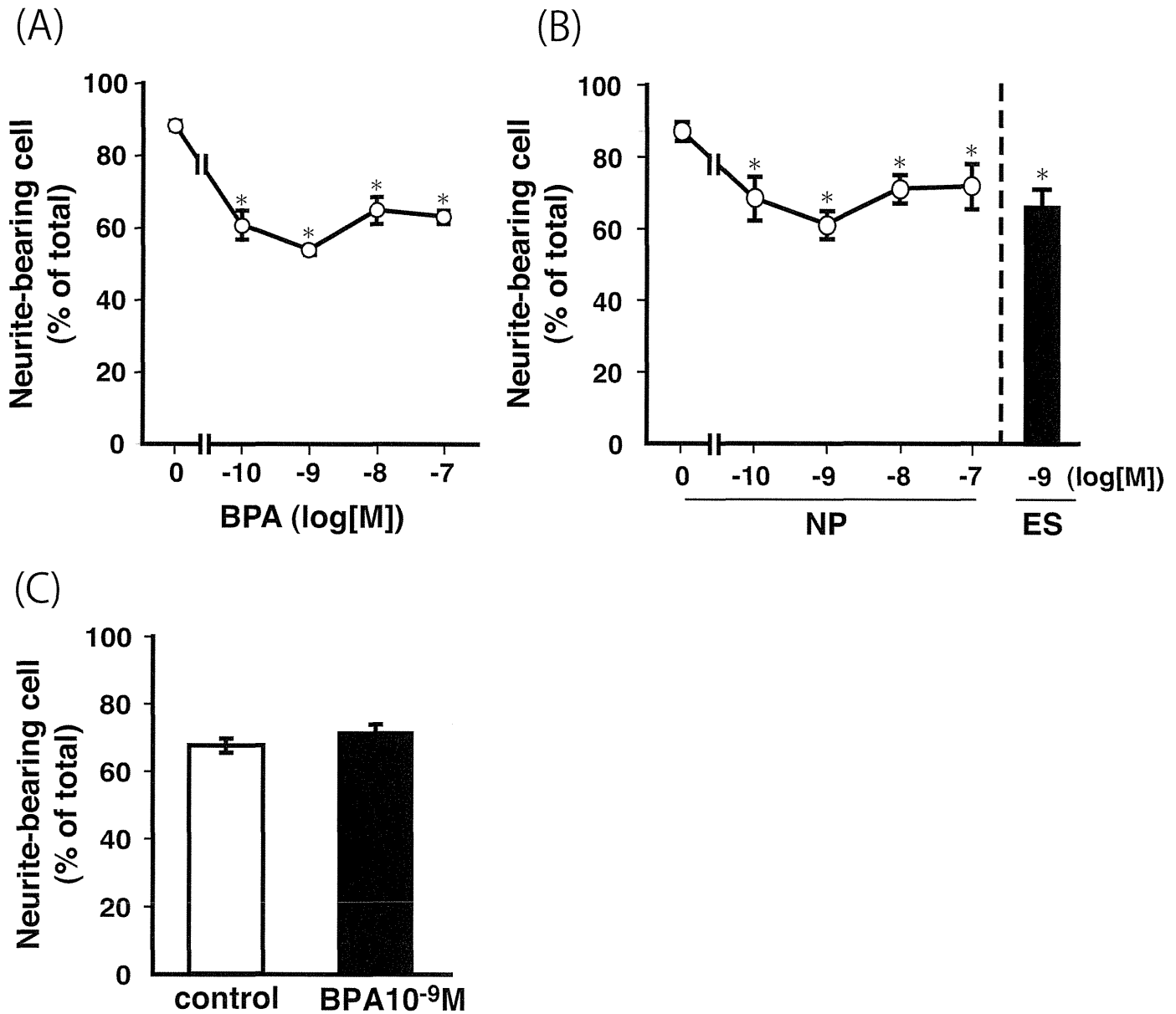


図3 PC12細胞の神経分化 (A、B) PC12細胞を 10^{-9} ~ 10^{-7} MのビスフェノールA (BPA、A)、ノニルフェノール (NP、B)、または 10^{-9} Mの β エストラジオール (ES、B)で1週間培養したのち、無血清培地にてNGFにより神経分化を誘導した。(C) PC12細胞を 10^{-9} MのBPAで1日培養したのち、無血清培地にてNGFにより神経分化を誘導した。細胞体よりも長い神経突起を有する細胞を数え、全細胞に対する割合を算出した。1回の実験について2例ずつ行い、それぞれで100~150個の細胞について調べた。この実験を3回繰り返す、平均 \pm 標準誤差として表した。
*; $p < 0.05$ vs コントロール。

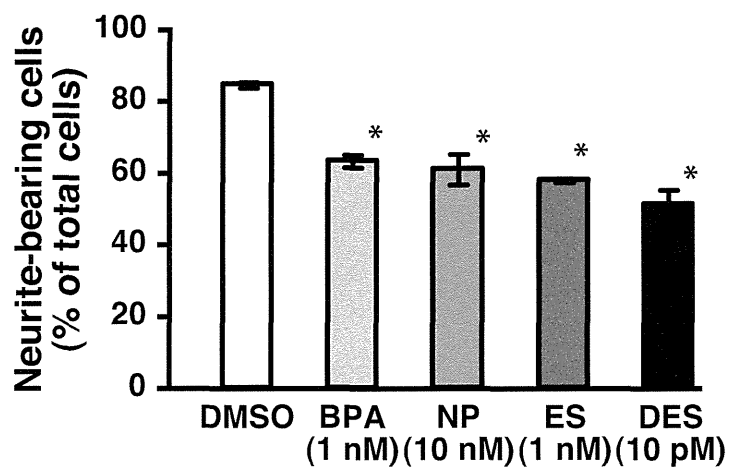


図4 PC12細胞の神経分化 PC12細胞を 10^{-9} MのビスフェノールA (BPA)、 10^{-8} Mのノニルフェノール (NP)、 10^{-9} Mの β エストラジオール (ES) または 10^{-11} Mのジエチルstilbestロールで1週間培養したのち、1週間休薬させ、その後に無血清培地にてNGFにより神経分化を誘導した。細胞体よりも長い神経突起を有する細胞を数え、全細胞に対する割合を算出した。1回の実験について2例ずつ行い、それぞれで100~150個の細胞について調べた。この実験を3回繰り返し、平均 \pm 標準誤差として表した。*; $p < 0.05$ vs コントロール。

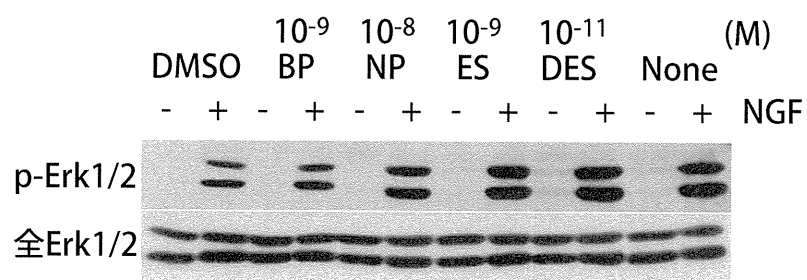


図5 PC12細胞におけるErkリン酸化 PC12細胞をビスフェノールA (BP)、ノニルフェノール (NP)、βエストロロール (ES) またはジエチルstilベストール (DES) で1週間曝露した後、50 ng/mlの神経成長因子 (NGF) で15分刺激し、リン酸化Erk1/2 (p-Erk1/2) および全Erk1/2を検出した。

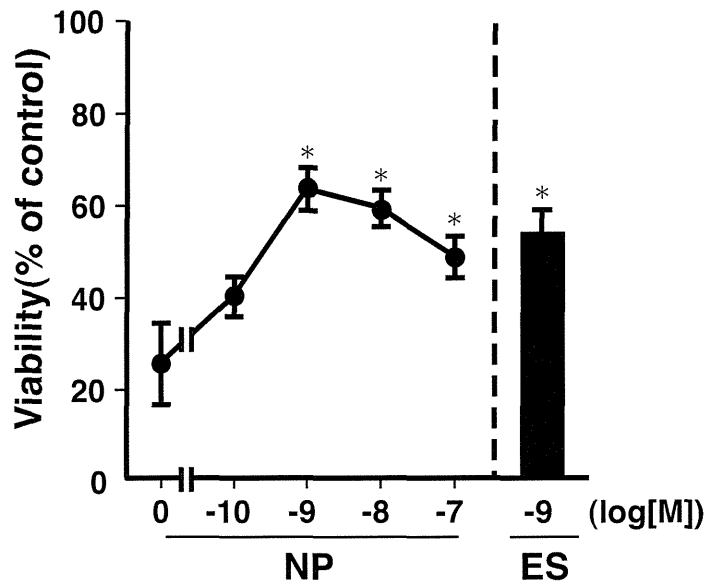


図 6 3T3 線維芽細胞における過酸化水素誘発細胞死に対するノニルフェノール (NP) または β エストラジオール (ES) の長期曝露の効果 3T3 線維芽細胞を 0 または $10^{-10} \sim 10^{-7}$ M の BPA または 10^{-9} M の ES で 1 週間培養し、無血清下で $10 \mu\text{M}$ の過酸化水素を添加した。2 日後に細胞数を測定し、過酸化水素を加えない細胞数を 100% として相対表記した。得られたデータは平均 \pm 標準誤差で表した。1 回の実験につき 3~4 例実施し、これを 4 回以上繰り返した。*; $p < 0.05$ vs コントロール。

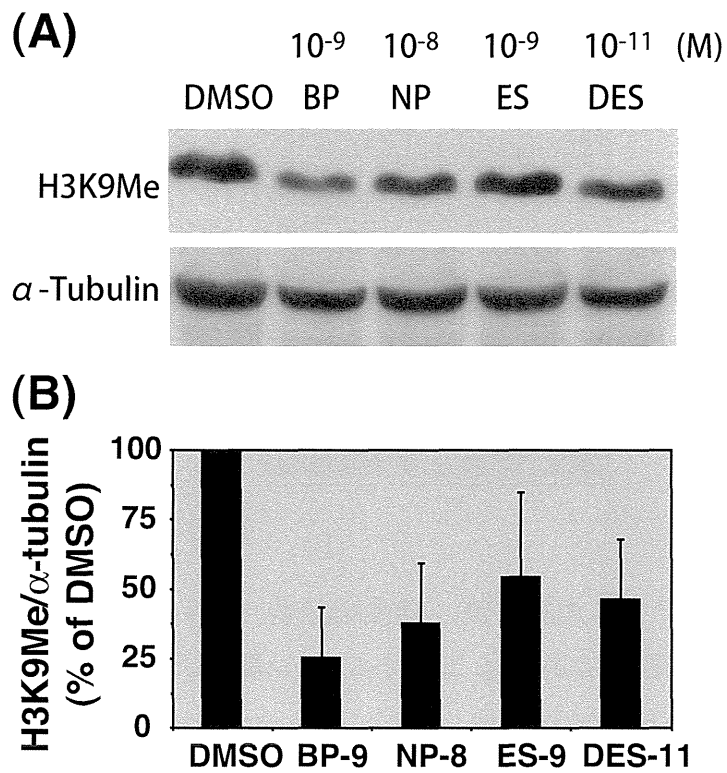


図7 3T3線維芽細胞におけるヒストンのメチル化
 (A) 3T3線維芽細胞をビスフェノールA (BP)、ノニルフェノール (NP)、 β エストラジオール (ES) またはジエチルstilbestロール (DES) で1週間曝露した後、メチル化ヒストンH3を検出した。(B)メチル化ヒストン量の相対比 3回の実験の平均±標準誤差を表している。

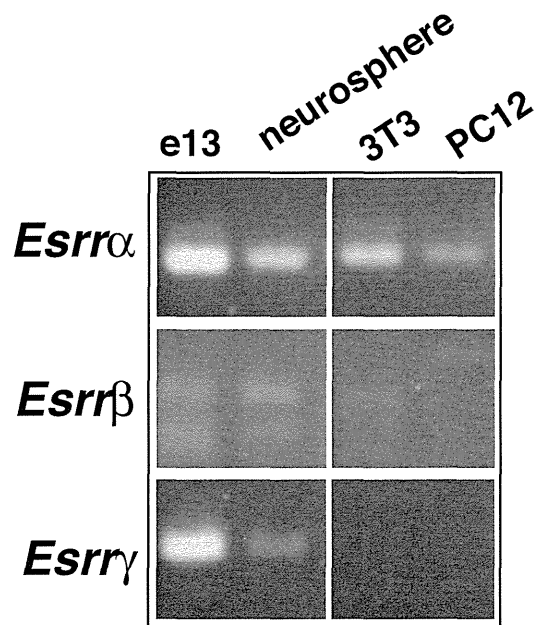


図 8 e13 マウス大脳皮質、神経細胞塊、3T3 線維芽細胞および PC12 細胞におけるエストロゲン関連受容体 *Esrrα*、*Esrrβ* および *Esrrγ* の発現。

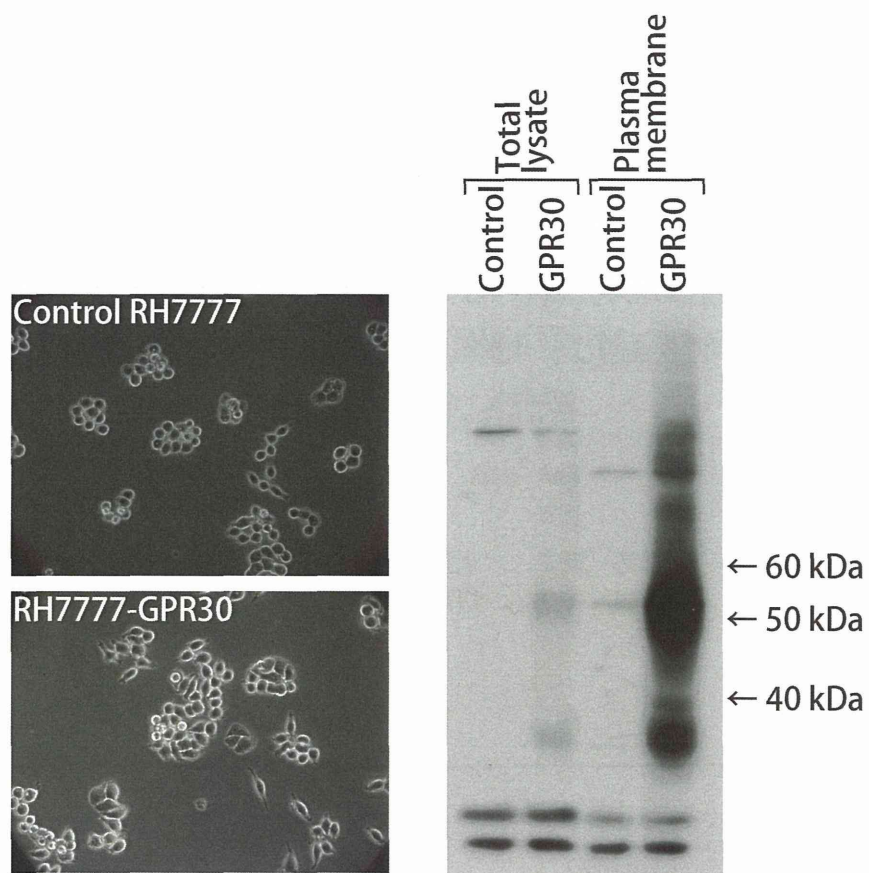


図 9 GPR30 発現細胞の確立 (A) Control RH7777 細胞および GPR30 発現 RH7777 細胞の位相差顕微鏡写真。(B) GPR30 の細胞膜上における発現。細胞抽出液および細胞膜画分における GPR30 の発現を抗 FLAG 抗体を用いて検出した。

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-

2. 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

長尾 哲二 近畿大学理工学部 生命科学科
福嶋 伸之 近畿大学理工学部 生命科学科

培養細胞の機能の変化

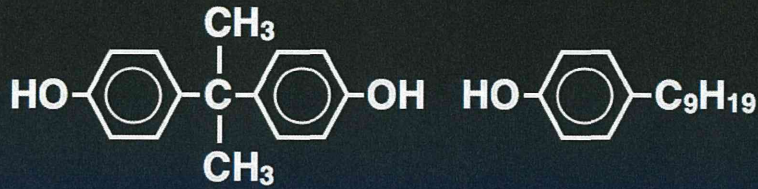


＊化学物質の作用機序

＊標的分子の同定



評価系の確立



Bisphenol A (BPA) Nonylphenol (NP)

- ▶ラット副腎髄質クロム親和性腫瘍細胞 (PC12細胞)
- ▶マウス大脳皮質由来神経幹細胞
- ▶マウス線維芽細胞 (Swiss 3T3細胞)

BPAおよびNPの作用

★PC12細胞モデル
 ★神経幹細胞モデル (神経分化)
 ★3T3線維芽細胞の細胞死実験系

★作用機序
 ★標的分子

★インビトロ評価系の確立

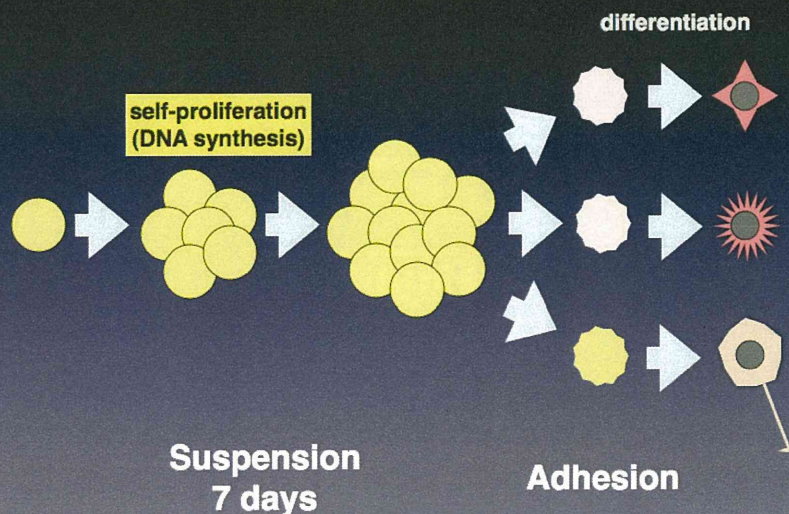
神経系細胞における BPAまたはNPのin vitro作用

- ・スタウロスポリンによる海馬、大脳皮質神経細胞の細胞死の抑制
- ・副腎髄質、PC12からのカテコールアミン分泌促進
- ・小脳顆粒細胞におけるc-fos発現抑制
- ・PC12、大脳皮質細胞の細胞死を誘発
- ・大脳皮質細胞のオリゴデンドログリア分化を促進
- ・PC12細胞の分化を抑制

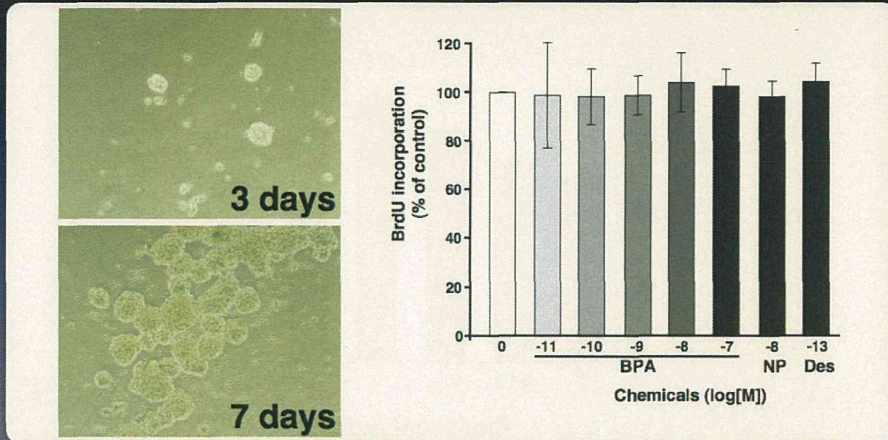
H23年度報告

- ・大脳皮質神経上皮細胞の自己増殖 (BrdU取込) 一無作用
- ・PC12細胞の神経分化-----抑制

神経上皮 (幹) 細胞培養系 Neurosphere culture



低濃度化学物質で前処理した 神経上皮細胞のBrdU取込み量



H23報告

神経上皮 (幹) 細胞培養系 Neurosphere culture

