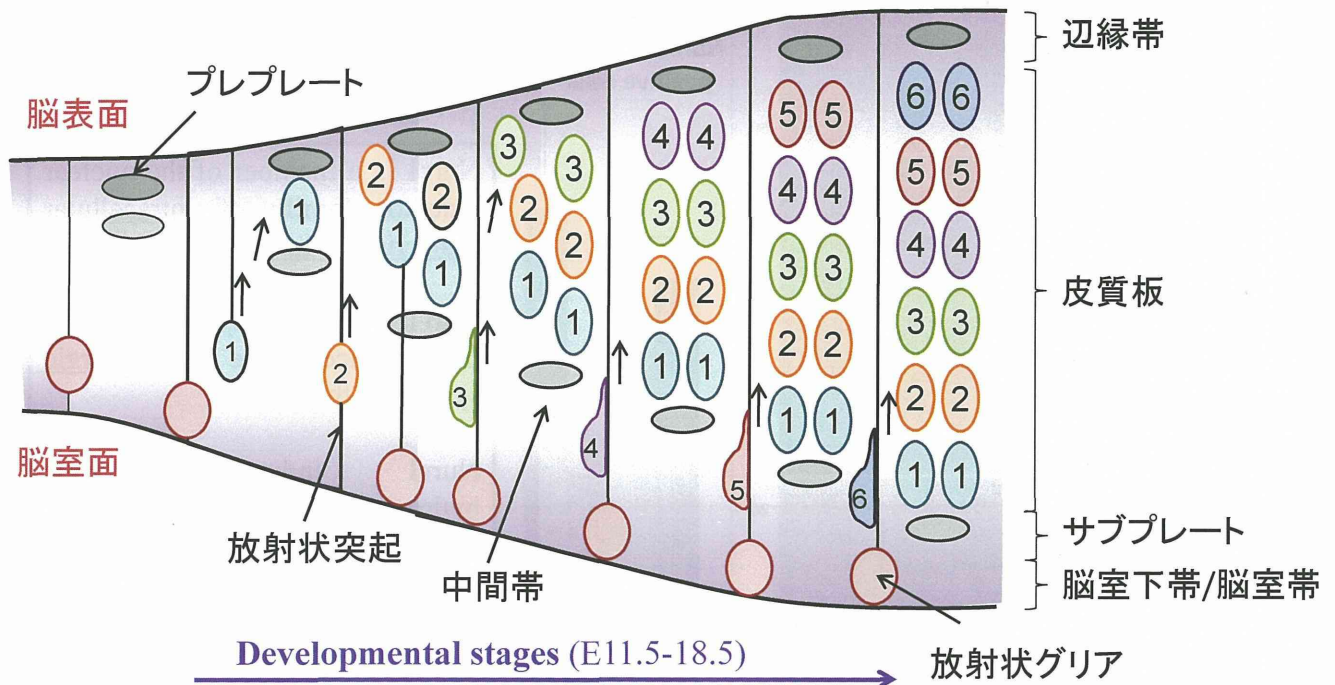


大脳皮質の正常発生

【大脳皮質を構成する神経細胞の移動様式】

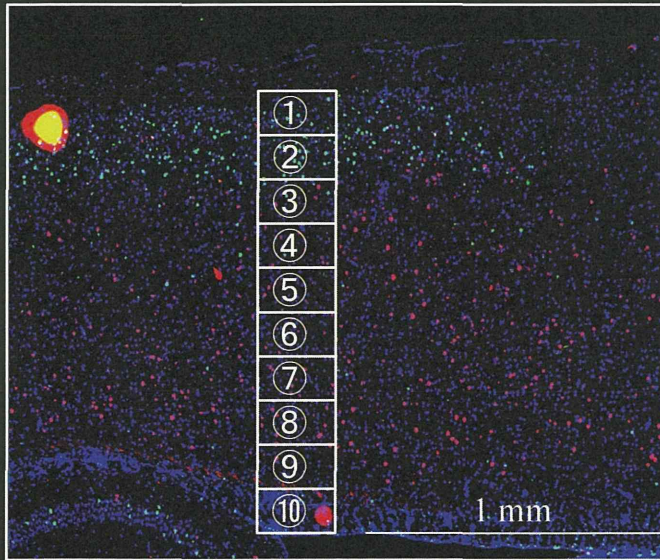


マウス終脳の発生では、神経幹細胞が細胞増殖を繰り返しながら、basal progenitorや神経細胞を産生する。この神経幹細胞は脳室面から脳表面に向かって突起を伸ばす放射状グリアで、脳室帯 (ventricular zone: VZ) や脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) において増殖や神経新生を行う。分化した神経細胞は中間帯を放射状に移動し、皮質板 (cortical plate: CP)、辺縁帯 (marginal zone: MZ) 及びサブプレート (subplate: SP) を構築する。これらの大脳皮質を構成する神経細胞はinside-outのパターンにより成熟した層構造を形成する。

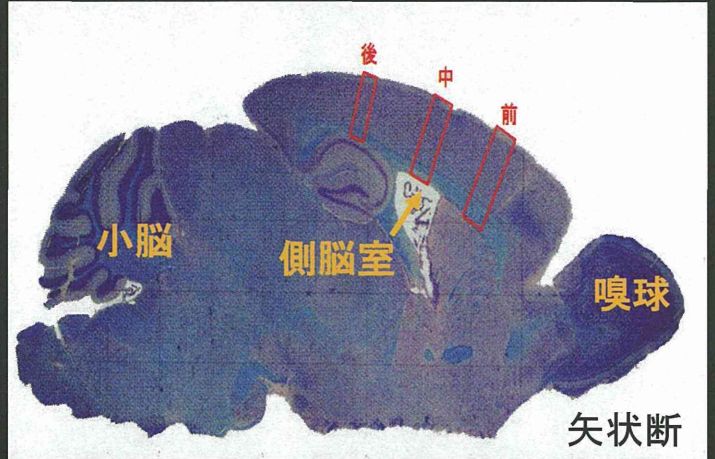
低用量ビスフェノールAが新生児大脳皮質の
神経細胞ポジショニングに及ぼす影響

PND 3, 14, 39, 120 offspring

Birth-date analysis

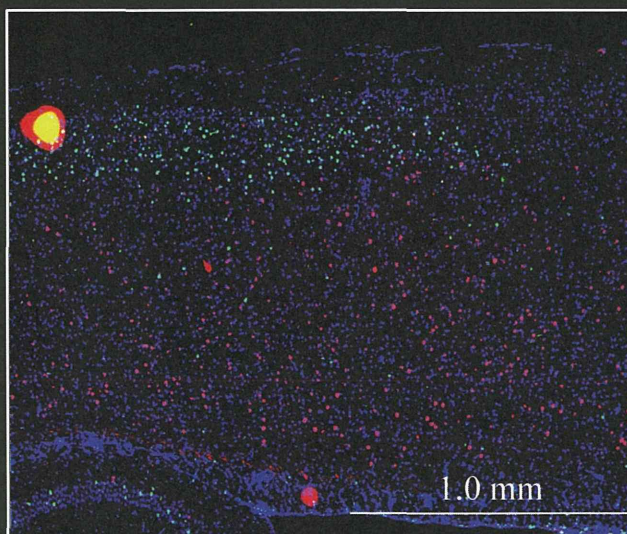


大脳皮質を脳表面から側脳室まで10等分「①～⑩」に100 μ m幅で比較する領域を設定

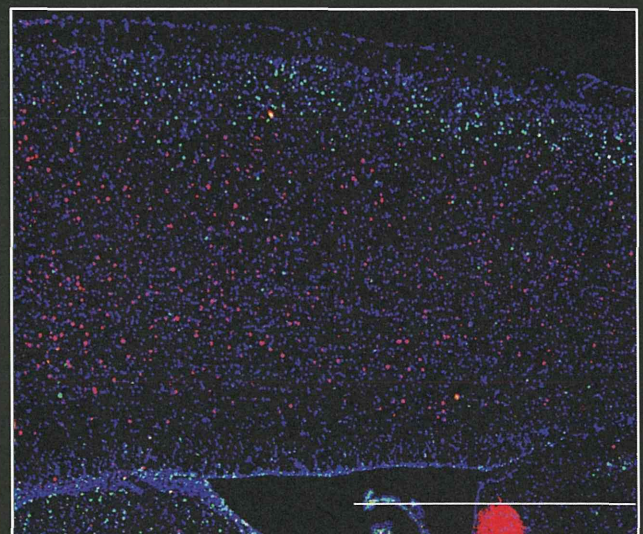


- Inside-outパターン確認
- 全細胞に対するCldU陽性細胞およびIdU陽性細胞の割合
- DAPI染色細胞・CldU陽性細胞・IdU陽性細胞の絶対数

BPA子宮内暴露のE14出生児にみられた Inside-out pattern



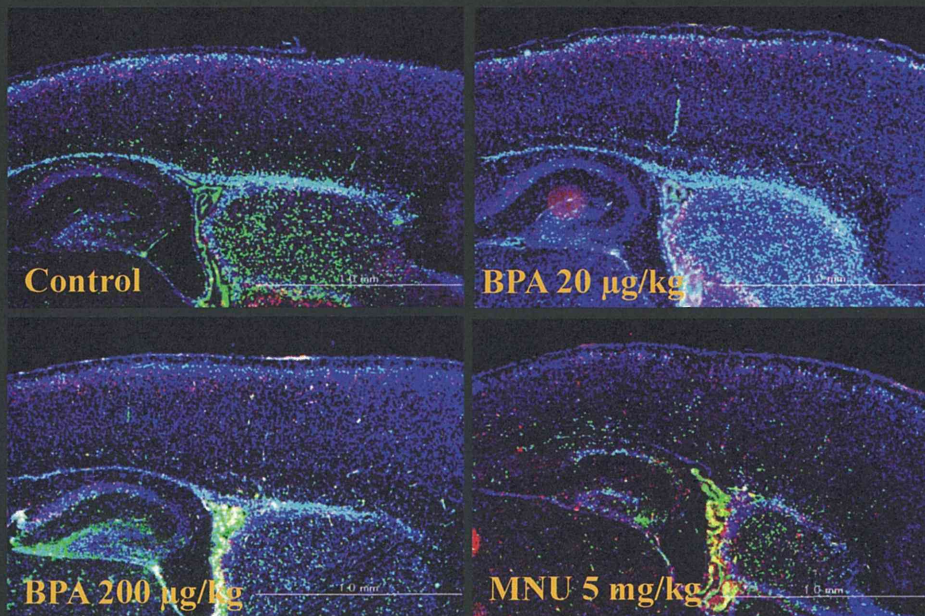
Control



BPA 200 μ g/kg/d

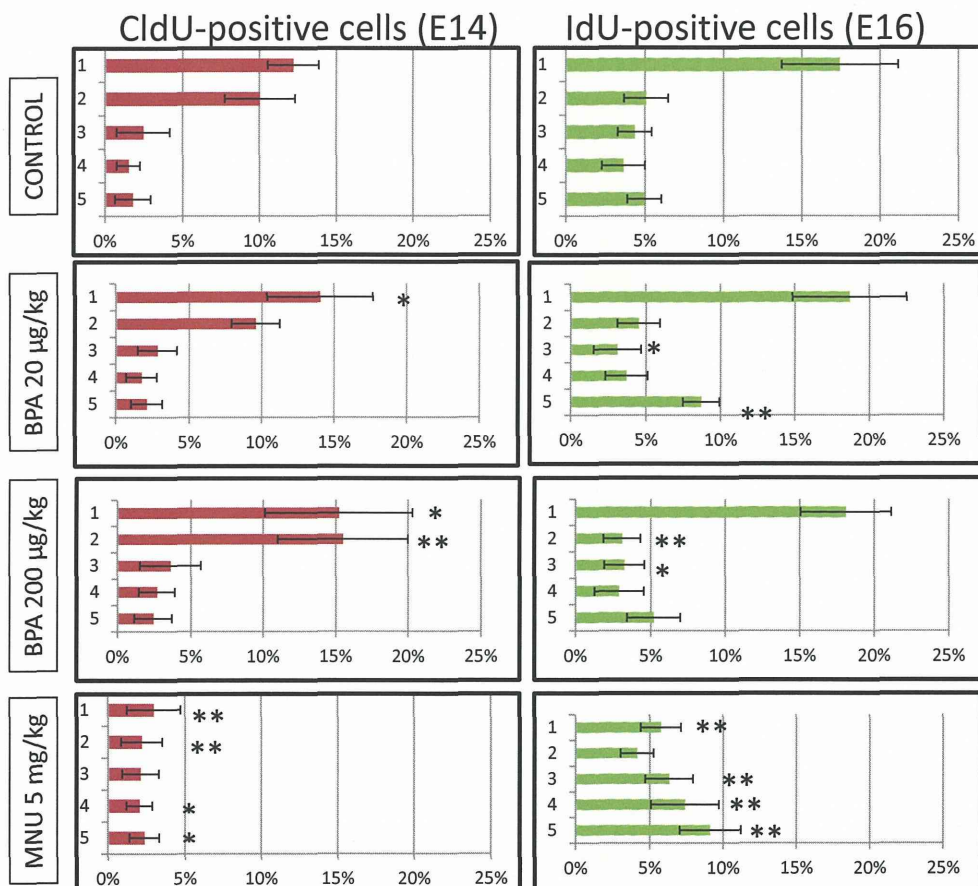
赤: ED13生まれのニューロン (CldU 陽性細胞)
緑: ED15生まれのニューロン (IdU 陽性細胞)

E14及びE16生まれの神経細胞の 新生児大鼠皮質における分布



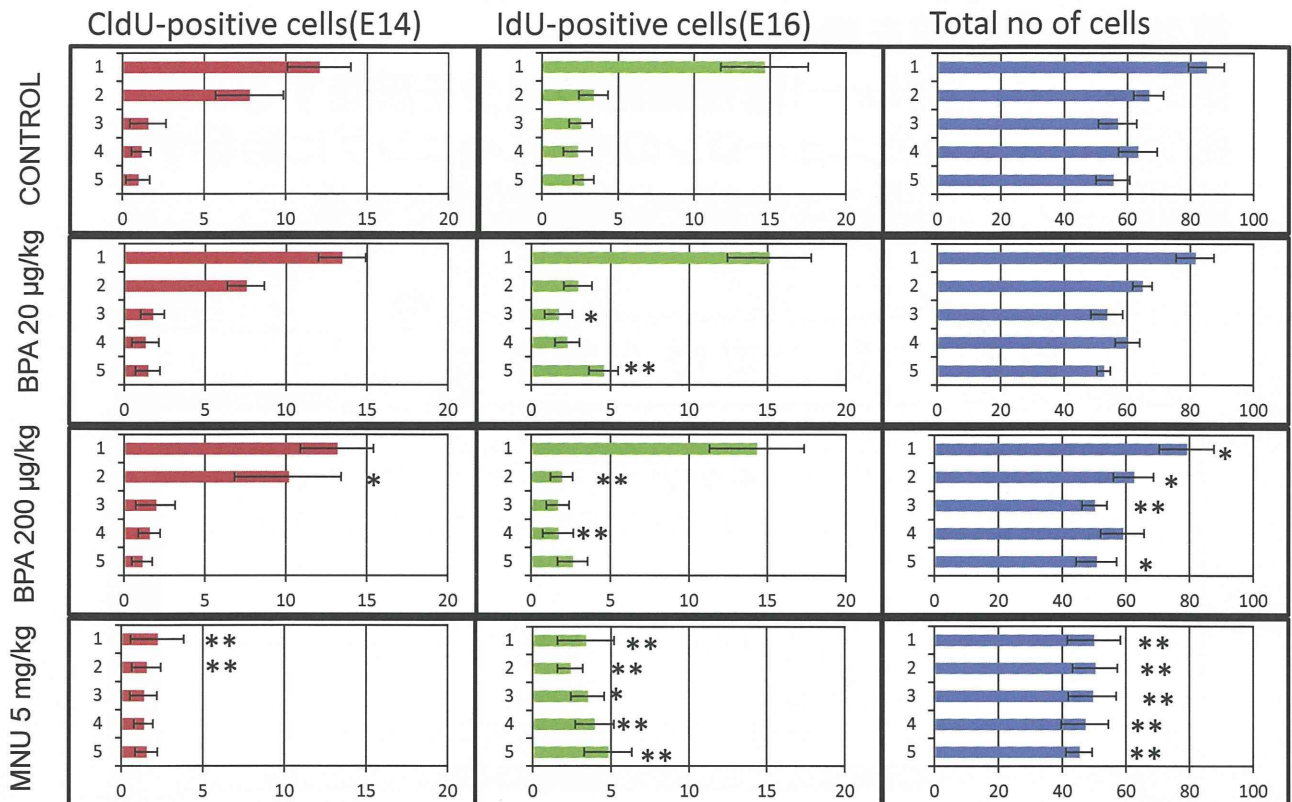
Birth-date analysisにより胎児期に生まれた神経細胞を追跡し、control及びBPA群では神経細胞の分布にinside-out patternを確認した。MNU群では著しい大脳皮質形成の異常による層構造の乱れが観察された。

胎児期に生まれた神経細胞の生後の分布



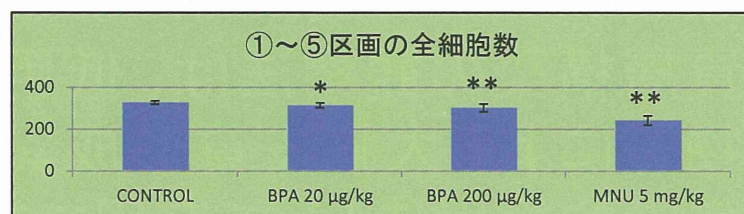
区画ごとにE14生まれとE16生まれの神経細胞の割合を求めた。BPA投与群では対照群との間に有意差が散見され、MNU投与群では著しい影響がみられた。

各区画のE14あるいはE16生まれの神経細胞数



区画ごとの全細胞数についてはBPA 200 µg/kg投与群及びMNU投与群の全ての区画において減少した(右列)。

全ての区画の細胞を合計したE14及びE16生まれの神経細胞及びDAPI染色細胞の総細胞数



BPA及びMNU投与群の全細胞数が減少した。

【平成25年度】

BPAの子宮内暴露した新生児の脳皮質

- 第6b層の低形成を誘発する
- 第6b層におけるNurr-1陽性細胞の減少を誘発する
- 胎児期に生まれたニューロンのポジショニングに影響する
- 胎児期に生まれたニューロンの数を減少させる



脳皮質の層構造異常

?

高次脳機能

脳皮質はヒトが進化の過程で最も高度に発達させてきた器官の一つであり、様々な高次脳機能を支配している。周りの環境からの様々な情報を統合し、それに応じた反応・行動を支配する中枢である。

【今後】

- 脳皮質に投射するTH陽性のドパミン作動性ニューロンの解析
- 出生児の行動を支配するネットワークの同定
- 新生児の生後間もない時期にみられる行動異常の解析

低用量BPA暴露による脳皮質の発生・発達に及ぼす影響の神経発生毒性学的評価が可能になる。

脳・神経系の影響評価研究

【平成25年度】 結論

Layer markerによる免疫組織染色及びbirth-date analysisによる脳皮質層構築の観察法は、低用量化学物質による脳皮質形成異常の組織学的検出法として有用であると考えられる。

【3年間のまとめ】

脳・神経系の影響評価研究

低用量ビスフェノールAの胎児期暴露が誘発する大脳皮質形成異常の解析

1. 低用量BPAの胎児期暴露が細胞周期の異常を引き起こすことにより、胎児大脳皮質における神経分化制御に影響を及ぼす。
2. 胎児期に生まれた神経細胞のポジショニング異常など大脳皮質にみられた異常が生後も維持される。



胎児期の低用量BPA暴露は、胎児・新生児あるいは成熟個体の脳・神経系に影響を及ぼし、その影響評価法として免疫組織化学的手法と細胞ラベリング法は有用である。

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)

(平成 25 年度)分担研究報告書

低用量暴露の標的臓器としての脳・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

研究分担者 長尾哲二 近畿大学工学部生命科学科 教授

研究協力者 福嶋伸之 近畿大学工学部生命科学科 准教授

研究要旨：マウス神経上皮細胞の神経分化モデルを用いて、ビスフェノール A およびノニルフェノールの作用を検討した。両物質とも nM オーダーで、大脳皮質神経上皮細胞から分化する神経細胞の割合は増加した。しかしながら、GABA 神経への分化は抑制された。一方、線条体および中脳由来の神経上皮細胞を用いた場合では、神経分化に対する作用は認められなかった。したがって、化学物質の神経分化に対する影響は細胞種または脳領域により異なることが示唆された。一方、昨年度報告した 3T3 線維芽細胞の酸化ストレス抵抗性上昇機構について、引き続き検討した。ビスフェノール A およびノニルフェノールを 3T3 線維芽細胞に曝露することにより、bc1-2 の発現が上昇することがわかった。両化学物質は nM オーダーで 3T3 線維芽細胞に発現しているエストロゲン受容体 GPR30 を活性化した。GPR30 を介した bc1-2 の発現と酸化ストレスへの抵抗性増加機構の解明が今後の課題である。

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。これらの研究では、母体マウスあるいは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。一方、神経系の培養細胞やがん細胞など、様々な培養細胞を用いたインビトロ実験も行われており、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。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。実際に、これらの化学物質の作用は遺伝子の転写を必要とする機構だけでなく、遺伝子の関与しない機構により生じていることも示唆されているが、その詳細は不明な点が多い。

これらのインビトロ研究では、用いられている化学物質の濃度が比較的高いことが多く、また曝露期間も短い。生物個体は周辺環境から低濃度の化学物質を長期間曝露されることがあり、神経系細胞に対する長期的な影響を詳細に検討する必要がある。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めざした。具体的には、マウス胎仔より摘出

した神経上皮細胞の神経分化モデル、株細胞であるラット PC12 細胞の神経成長因子による神経分化モデル、マウス線維芽細胞の酸化ストレスに対する抵抗性評価モデルの 3 つのインビトロ培養系を用いて低濃度化学物質の作用検討を行ってきた。さらに、化学物質の作用機構解明に結びつく検討も進めてきた。

B. 研究方法

使用した化学物質

ビスフェノール A、ノニルフェノールはナカライテスクから購入して使用した。

マウス神経上皮細胞の培養

胎生 13 日令 ICR マウス（清水実験材料）の大腦皮質、線条体および中脳を摘出し、フェノールレッド不含の Opti-MEM 培地（インビトロジェン）中でパスツールピペットを用いて機械的に単一細胞になるまで単離分散した。35mm 径のシャーレを用いて、これらの細胞を 20 ng/ml 塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF、和光純薬）、2%B27 サプリメント（インビトロジェン）を含む 1.5 ml の Opti-MEM（インビトロジェン）中で 7 日間培養した。化学物質の添加は培養開始時に行い、4 日後に培地 0.5 ml とともに化学物質を追加した。

マウス神経上皮細胞の細胞分化評価実験

神経上皮細胞塊を回収し、機械的に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 1 または 7 日間培養して細胞分化を誘導した。フォルマリン固定後、 β チューブリンタイプ 3（ β -Tub3、シグマ）、ミエリン塩基性タンパク質（MBP、Chemicom）、CD140 α （BioScience）、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD、シグマ）またはカルビンジン（Calb、シグマ）に対する蛍光免疫染色を行った。いずれもビオチン標識 2 次抗体と Alexa488

ストレプトアビジンを用いた。全細胞の検出にはローダミン標識ファロイジンを用いたアクチン染色により行った。 β -Tub3 と GAD または Calb を検出するための二重蛍光免疫染色では、まず GAD または Calb を上記の通りに蛍光染色し、続いて β -Tub3 と結合させた Alexa546 標識抗マウス IgG 抗体で蛍光染色した。非結合 Alexa546 標識抗マウス IgG 抗体はマウス IgG により吸収させた。GAD と Calb の二重蛍光免疫染色では、Calb を先に染色し、続いて GAD を蛍光染色した。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、全細胞に対する β -Tub3、CD140 α 、GAD または Calb 陽性細胞の割合を算出した。あるいは全神経細胞に対する GAD または Calb 陽性細胞、全 GAD 陽性細胞に対する Calb 陽性細胞、全 Calb 陽性細胞に対する GAD 陽性細胞の割合を算出した。実験は 1 濃度につき 2 サンプル以上で行い、同じ実験を 3 回以上実施した。

株細胞の培養

マウス線維芽細胞（Swiss/3T3）は 10%活性炭処理済ウシ胎仔血清（FCS）を含むフェノールレッド不含ダルベッコ改変イーグル培地（D-MEM、和光純薬）で培養した。化学物質の長期曝露を行う際には、細胞を 24 穴プレートに 1 穴当たり 3,000~5,000 個播種し、その 1 時間後に種々の濃度の化学物質を添加した。実験に使用するまで 3~4 日毎に継代し、化学物質の添加を継代時に行った。

ウェスタンブロットティング

3T3 線維芽細胞を用いた場合は、細胞に直接 2xSDS Laemmli 溶液を加えて抽出し、14%アクリルアミドを用いた SDS 電気泳動に使用した。泳動終了後、PVDF 膜に転写したのち、抗 Bcl-2 抗体（Santa Cruz）または α -Tubulin 抗体（DM1A、BioCarta）と反応させた。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（ナカライテスク）を用いて発光させたシグナルを X 線フィルムにて検出した。X 線フィルムへの露光は 15、60 および 180 秒の異なる時間で行い、飽和しないシグナルを ImageJ によりデジタル化して定量した。

[³⁵S]-GTP γ S 結合実験

[³⁵S]-GTP γ S 結合実験はすでに報告した方法を用いて行った。マウス GPR30 遺伝子発現 RH7777 細胞を TE 緩衝液中でホモゲナイズし、300 x g 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、沈殿を細胞膜として [³⁵S]-GTP γ S 結合実験に使用した。細胞膜 (50 μ g タンパク質量) を反応液 (0.1 nM [³⁵S]-GTP γ S、10 μ M GDP、20 mM Hepes-Na、100 mM NaCl、1 mM EDTA、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、pH7.5) に加え、32°C で 30 分間反応させた。結合した [³⁵S]-GTP γ S を GF/C ガラス繊維ろ紙を用いて回収し、放射活性を測定した。非特異的結合の測定には 100 μ M の GTP γ S を添加した。

データの統計学的解析

得られた結果は統計解析ソフト StatView を用いて分散分析を行い、多重比較検定を実施した。

C. D. 研究結果および考察

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。この細胞塊は主に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。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である。これまで本実験系を用いて、生理活性物質や化学物質の作用が検討されている。

一昨年および昨年度、ビスフェノール A を低濃度で 1 週間曝露しても神経上皮細胞の自己増殖には影響しないこと、しかしながら神経細胞への分化が促進することを報告してきた。この実験では、神経上皮細胞を単離分散、接着後 1 週間めに神経細胞の割合を調べており、上皮細胞塊へのビスフェノール曝露 1 週間の時点ですでに神経細胞への分化が促進されているかどうかは不明であった。そこで、本研究ではこの点を調べるため、接着の翌日に神経細胞の割合を求めたところ、1 nM のビスフェノール A 曝露により神経分化が促進していることが分かった (図 1)。同様にノニルフェノール 10 nM で曝露した時にも神経分化が亢進していた。これらのことは、1 週間のビスフェノール A やノニルフェノールの曝露期間中に、神経上皮細胞から神経細胞への分化がすでに促進されていたことを示している。

グリア細胞分化に対する作用を検討した。この培養系ではアストログリアへの分化はほとんど検出されないため、オリゴデンドログリアへの分化に対する影響を調べた。単離分散後 1 週間めにオリゴデンドログリア (MBP 陽性細胞) の割合を調べたところ、コントロールで約 3.9% と低い値であった (図 2A)。ビスフェノール A、ノニルフェノールの曝露による影響は観察されなかった。単離分散後翌日のオリゴデンドログリア前駆細胞 (CD140 α 陽性細胞) の割合も調べたが、いずれの物質によってもコントロールと差は見られなかった (図 2B)。したがって、これらの物質はオリゴデンドログリアへの分化には影響をしないと考えられる。

続いて、どのような種類の神経細胞への分化が影響を受けたのかを検討した。大脳皮質神経細胞の多くはグルタミン酸作動性神経細胞および GABA 作動性神経細胞である。接着による分化誘導後 1 週間で、コントロールでは全神経細胞の約 34%が GABA 作動性神経であった。1 nM のビスフェノール A、10 nM のノニルフェノールで神経上皮細胞を 1 週間曝露したところ、意外にも GABA 作動性神経細胞への分化が抑制された (図 3)。一方、グルタミン酸作動性神経細胞特異的マーカーならびにそれに対する抗体は文献的に報告されておらず、その同定は今後の課題である。今回の結果は、グルタミン酸作動性神経細胞への分化が化学物質によって促進されている可能性を示唆しているが、その詳細は不明である。また、大脳皮質における GABA 作動性神経細胞の多くは基底核隆起 (ganglionic eminence) に由来する介在性神経であることが知られている。今回、約 3 割の細胞が GABA 作動性神経細胞であったことは、用いた大脳皮質組織内に明確に分離が困難な基底核隆起が含まれていたと考えられる。今後、大脳皮質の背側部のみを用いて検討する必要がある。

カルビンジンは細胞内カルシウム濃度を調節するタンパク質であり、GABA 作動性神経細胞の一部に存在していることが報告されている。実際にカルビンジンと GAD がどの程度共存するかを検討したが、GABA 作動性神経の約 1 割にしかカルビンジンが見られなかった (図 4A)。一方、カルビンジン陽性細胞の約 3 割のみが GABA 作動性神経細胞であった。このことは、この時期には少なくともカルビンジンのみを発現している神経細胞集団が存在していることを示唆しているが、これらの細胞が抑制性神経細胞なのか興奮性神経細胞なのかは不明である。このようなカルビンジン陽性細胞への分化は、ビスフェノール A により増加した (図 4B)。また、ノニルフェノールも増加させ

る傾向を示した。

化学物質で曝露したマウス中脳および線条体神経上皮細胞の神経分化

線条体は GABA 神経細胞やアセチルコリン神経細胞が含まれる。これらの組織における神経分化に対する化学物質の作用を検討した。大脳皮質を用いた時と同じ方法を用いて、線条体神経上皮細胞を神経分化させた。コントロールでは約 90%の細胞が神経細胞であった。ビスフェノール A およびノニルフェノールを添加しても、コントロールとほぼ同じ値であった (図 5)。GABA 神経細胞の割合を調べるために、GAD 染色を行ったが、大脳皮質の場合とは異なりバックグラウンドが高く、同定することが不可能であった。また、コリン作動神経のマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼに対する免疫染色を行ったが、陽性細胞の検出が出来なかった。今後の検討課題である。

ドパミン神経細胞は情動や運動機能を調節する神経ネットワークにおいて中心的な役割を担う。ドパミン神経細胞は中脳に多く含まれることから、中脳における神経分化に対する化学物質の作用を検討した。神経上皮細胞塊から神経分化した細胞の割合は全細胞の約 15%程度であった。ビスフェノール A およびノニルフェノールを添加して神経上皮細胞を培養したところ、神経分化の抑制傾向が見られたが、有意なものではなかった (図 6)。また、ドパミン神経細胞を同定するため、チロシン水酸化酵素に対する免疫染色を行ったが、全細胞の 1%以下と極めて低く、化学物質の作用を検討することが出来なかった。神経分化の程度が未熟である可能性を検討するため、ドパミン神経の前駆細胞マーカーとなる PITX3 の検出を試みたが、同定が出来なかった。さらに、中脳を用いた標本では髄膜等に由来すると思われる非神経系細胞が多く見られ