

たため、ドパミン神経系への分化に対する作用を検討するには、実験系の改良が必要と思われる。

化学物質で曝露したマウス 3T3 線維芽細胞の増殖と細胞死

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 線維芽細胞の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てきた。これらの実験から、化学物質で長期曝露した 3T3 線維芽細胞は過酸化水素ストレスに対する抵抗性を増加させていることが分かった。

過酸化水素による細胞死は、Bcl-2 のような抗アポトーシス分子の発現を増加させることにより抑制されることが知られている。興味あることに、エストロゲンやビスフェノール A が Bcl-2 の発現を制御することが報告されている。また、これらの物質がヒストン修飾を変化させることが示されているが、Bcl-2 の発現がヒストン修飾により調節されることも報告されている。実際に、昨年の報告において、ビスフェノール A、ノニルフェノールを曝露した 3T3 線維芽細胞においてヒストンメチル化が低下していることを示した。今年度は、これらの化学物質が Bcl-2 の発現を上昇させるかどうかを調べた。1 ヶ月の曝露後、Bcl-2 の発現をウェスタンブロットで検出し、 α -チューブリンで相対量を求めたところ、いずれの化学物質の曝露においても有意な Bcl-2 の発現上昇が認められた (図 7)。

GPR30 の活性化

ビスフェノール A をはじめとする化学物質の作用には、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。本研究で使用しているマウス神経上皮細胞および 3T3 線維芽細胞に

は、細胞膜受容体 GPR30 が共通して発現していることをすでに報告している。そこで GPR30 を介した作用を検討するために、GPR30 を発現する細胞株を作成した。この細胞株を用いてビスフェノール A やノニルフェノールが実際に GPR30 を活性化するかどうかを検討した。GPR30 の活性化は $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S の結合能を調べることで評価した。コントロール細胞の細胞膜に 0.1~100nM の化学物質を添加しても、 $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S の結合量は上昇せず、むしろやや低下の傾向を示した (図 8)。これに対して、GPR30 発現細胞の細胞膜を用いたところ、ビスフェノール A もノニルフェノールも $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S の結合を促進した。

GPR30 はGsと関連し、cAMPの産生を促進することが報告されている。実際にビスフェノール A も GPR30 を発現させた乳がん細胞において cAMP 産生を亢進させる。神経系の細胞では、cAMP 経路は酸化ストレスによる細胞死を保護するが、これには Bcl-2 の発現亢進が関与していることが示されている。また、ケラチノサイトではエストロゲンが GPR30 を介して Bcl-2 の発現を亢進し、酸化ストレス抵抗性を上昇させることが示されている。3T3 線維芽細胞において見られたビスフェノール A やノニルフェノールの酸化ストレス抵抗性の増加に、GPR30 や cAMP を介した情報伝達経路が関与しているかどうか、今後明らかにする必要がある。この課題解決のため、ゲノム編集ツールである Cripsr を利用して、GPR30 を欠損させた 3T3 線維芽細胞を作製している。

E. 結論

ビスフェノール A およびノニルフェノールとも nM オーダーで、大脳皮質の神経分化を促進したが、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。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、3T3 線維芽細胞ではビスフェノール A およびノニルフェノールの曝露は bcl-2 の発現を上昇させた。また、両化学物質はエストロゲン受容体 GPR30 を活性化した。GPR30 を介した bcl-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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishimura Y, Nakai Y, Tanaka A, Nagao T, Fukushima N.

Long-term exposure of 3T3 fibroblast cells to endocrine disruptors alters sensitivity to oxidative injury. *Cell Biol. Intl.* (2014) *in press*

2. 学会発表

福嶋 伸之、西村 侑華、長尾 哲二

神経系細胞への低濃度ビスフェノール A の長期曝露は神経分化に影響を及ぼす Neuro2013
京都 2013 年 6 月 (抄録 316 ページ)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

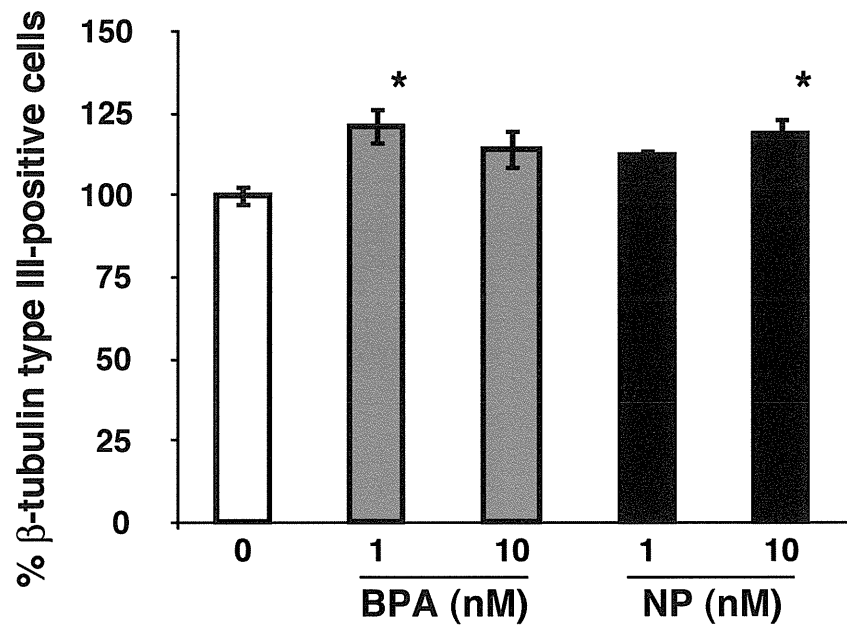
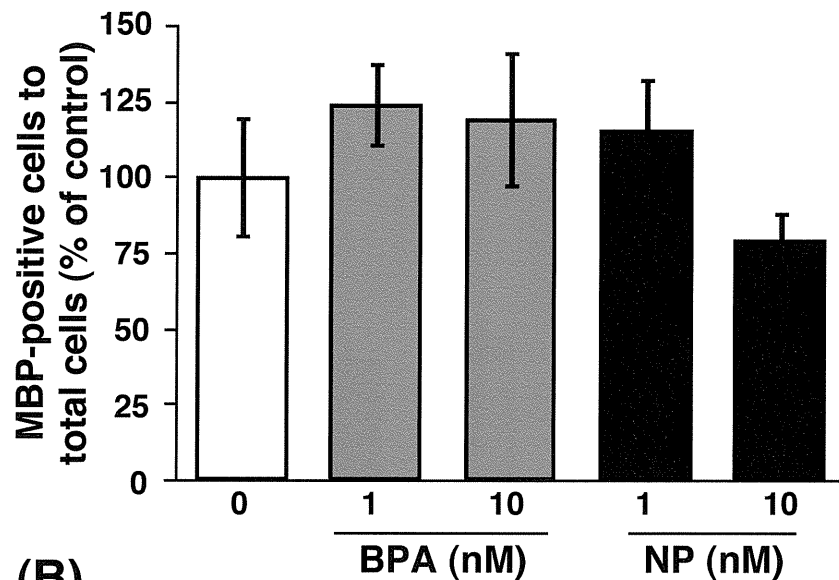


図 1 大脳皮質上皮細胞の神経分化 大脳皮質上皮細胞を 1 または 10 nM のビスフェノール A (BPA)、1 または 10 nM のノニルフェノール (NP) 存在下で 1 週間培養したのち、単離分散して神経分化を誘導した。翌日、全細胞に対する β tubulin type III 陽性細胞の割合を算出し、コントロールを 100% として表した。コントロールの神経細胞の割合は $46.9 \pm 1.7\%$ であった。結果は 3 例の平均 $\pm$ 標準誤差である。*; $p < 0.05$ vs コントロール

(A)



(B)

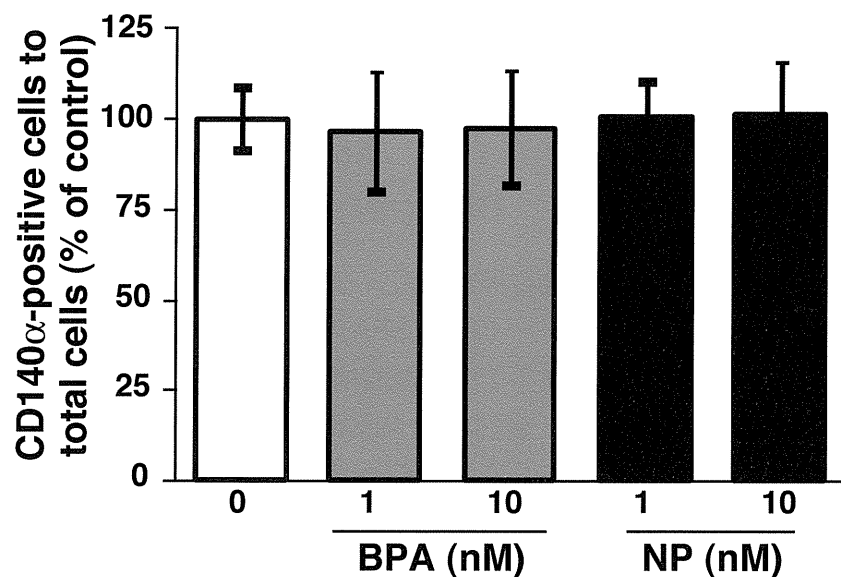
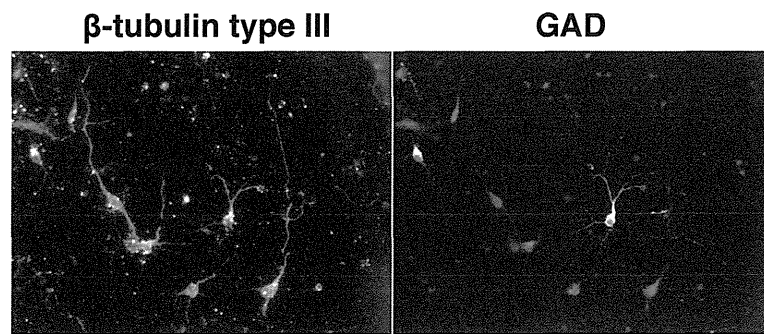


図 2 大脳皮質上皮細胞のグリア分化 (A) 大脳皮質上皮細胞を 1 または 10 nM のビスフェノール A (BPA) または 1 または 10 nM ノニルフェノール (NP) 存在下で 1 週間培養したのち、単離分散して細胞分化を誘導した。1 週間培養後、全細胞に対する myelin basoc protein (MBP) 陽性細胞の割合を算出し、コントロールを 100%として表した。コントロールでは MBP 陽性細胞の割合は $3.9 \pm 0.8\%$ であった。結果は 3 例の平均 $\pm$ 標準誤差である。(B) 大脳皮質上皮細胞を 1 または 10 nM のビスフェノール A (BPA) または 1 または 10 nM ノニルフェノール (NP) 存在下で 1 週間培養したのち、単離分散して細胞分化を誘導した。翌日、CD140 α 陽性細胞の割合を算出し、コントロールを 100%として表した。コントロールでは CD140 α 陽性細胞の割合は $24.2 \pm 2.2\%$ であった。結果は 3 例の平均 $\pm$ 標準誤差である。

(A)



(B)

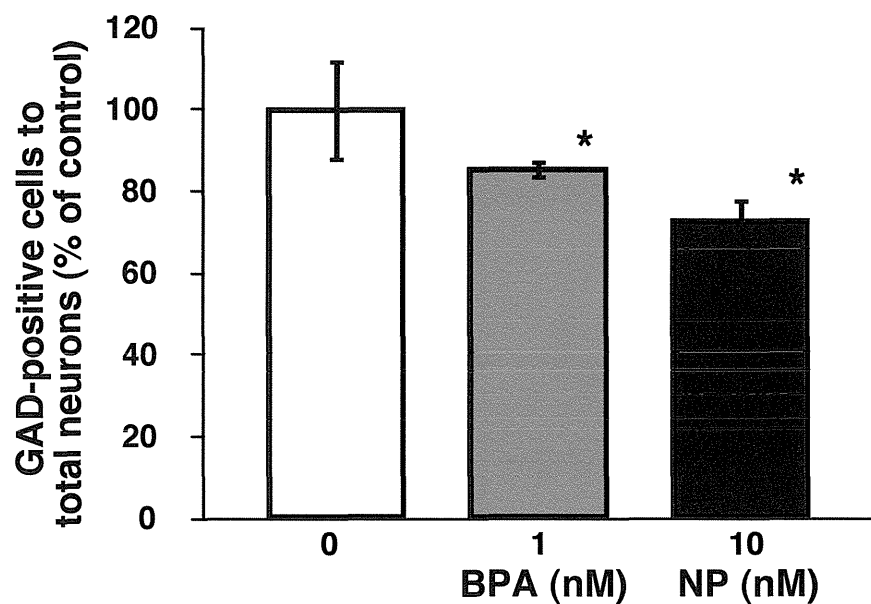


図 3 大脳皮質上皮細胞の GABA 神経への分化 (A) β -tubulin type III と GAD の二重蛍光免疫染色像 (B) GABA 神経への分化に対する作用 大脳皮質上皮細胞を 1 nM のビスフェノール A (BPA) または 10 nM のノニルフェノール (NP) 存在下で 1 週間培養したのち、単離分散して神経分化を誘導した。7 日後に全神経細胞に対するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 陽性細胞の割合を算出し、コントロールを 100% として表した。コントロールでは GABA 神経の割合は $33.6 \pm 4.2\%$ であった。結果は 4 例の平均 $\pm$ 標準誤差である。

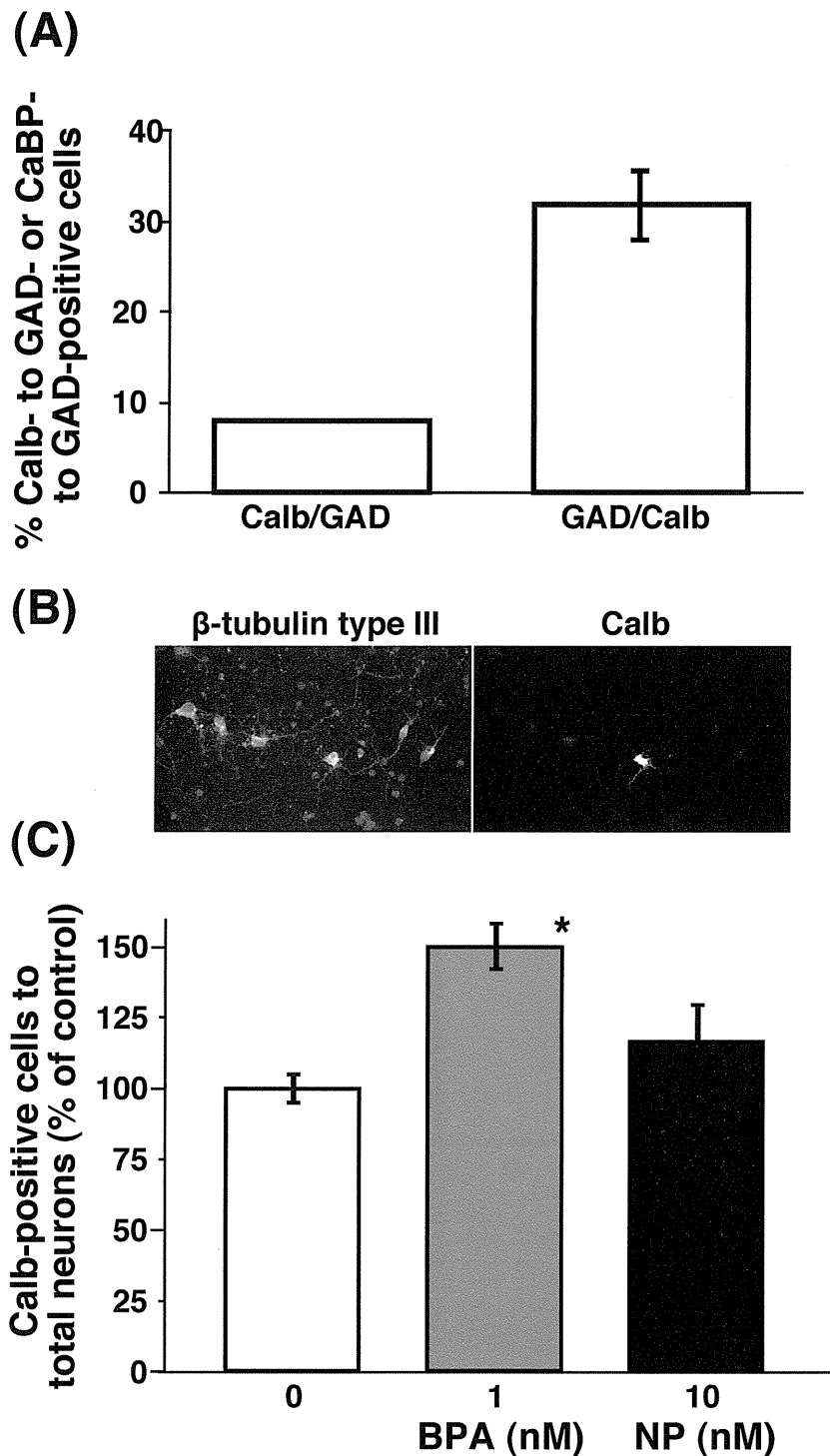


図 4 大脳皮質上皮細胞のカルビンジン神経への分化 (A) 神経細胞のカルビンジン (Calb) およびグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 陽性細胞の割合 大脳皮質上皮細胞を 1 週間培養したのち、単離分散して神経分化を誘導した。7 日後に GAD 陽性神経細胞に対する Calb 陽性細胞の割合、および Calb 陽性細胞に対する GAD 陽性細胞の割合を算出した。結果は 3 サンプルの平均 $\pm$ 標準偏差である。(B) β -tubulin type III と Calb の二重蛍光免疫染色像 (C) 大脳皮質上皮細胞を 1 nM のビスフェノール A (BPA) または 10 nM のノニルフェノール (NP) 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 日後に全神経細胞に対する Calb 陽性細胞の割合を算出し、コントロールを 100% として表した。コントロールでは Calb 神経の割合は $5.7 \pm 0.3\%$ であった。結果は 3 例の平均 $\pm$ 標準誤差である。結果は 3 例の平均 $\pm$ 標準誤差である。

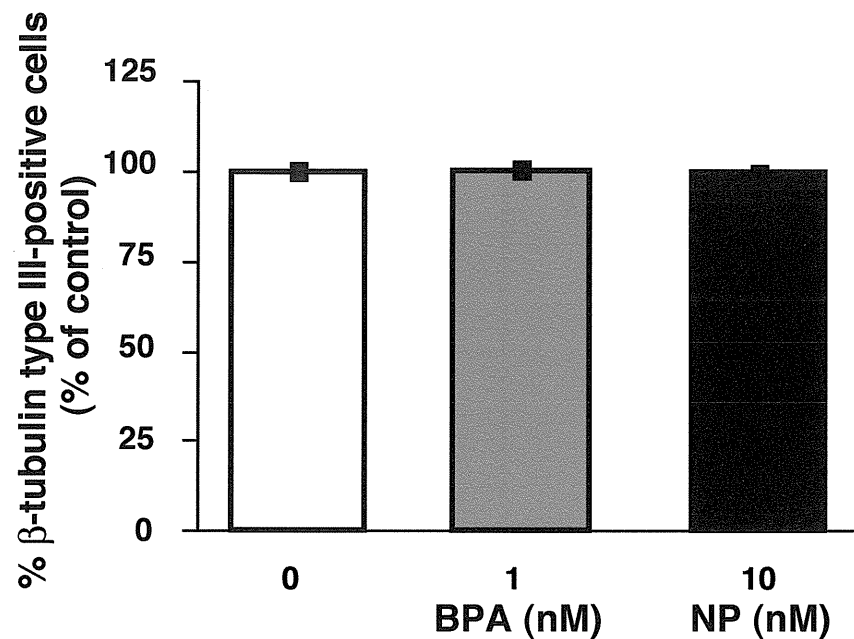


図 5 線条体上皮細胞の神経分化 線条体由来上皮細胞を 1 nM のビスフェノール A (BPA) または 10 nM のノニルフェノール (NP) 存在下で 1 週間培養したのち、単離分散して神経分化を誘導した。7 日後に全細胞に対する神経細胞の割合を算出し、コントロールを 100% として表した。線条体における神経細胞の割合は $89.6 \pm 1.6\%$ であった。結果は 3 例の平均 $\pm$ 標準誤差である。

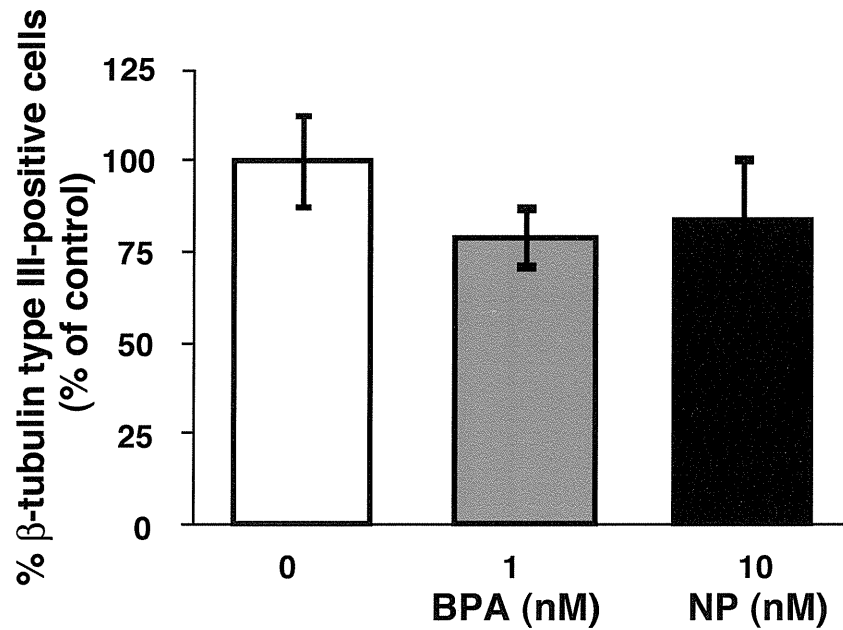
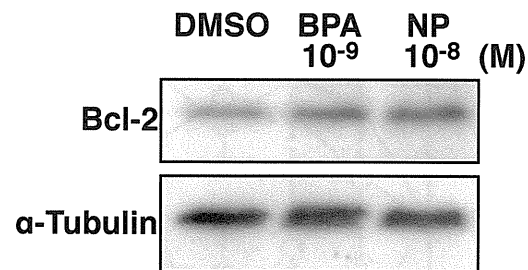


図 6 中脳上皮細胞の神経分化 中脳由来上皮細胞を 1 nM のビスフェノール A (BPA) または 10 nM のノニルフェノール (NP) 存在下で 1 週間培養したのち、単離分散して神経分化を誘導した。7 日後に全細胞に対する神経細胞の割合を算出し、コントロールを 100%として表した。中脳における神経細胞の割合は $15.0 \pm 2.0\%$ であった。結果は 4 例の平均 $\pm$ 標準誤差である。

(A)



(B)

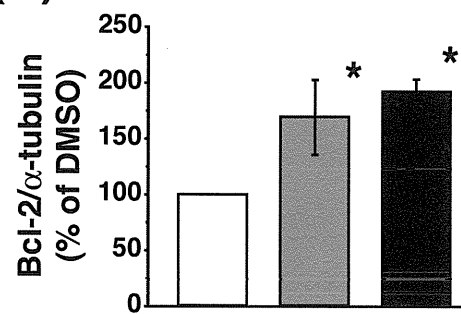


図7 3T3線維芽細胞におけるBcl-2の発現 (A)3T3線維芽細胞をビスフェノールA (BPA)、ノニルフェノール (NP) で1ヶ月曝露した後、Bcl-2を検出した。(B) α チューブリンとの相対値を算出し、コントロールの値を100%として表した。*; $p < 0.05$ vs コントロール。

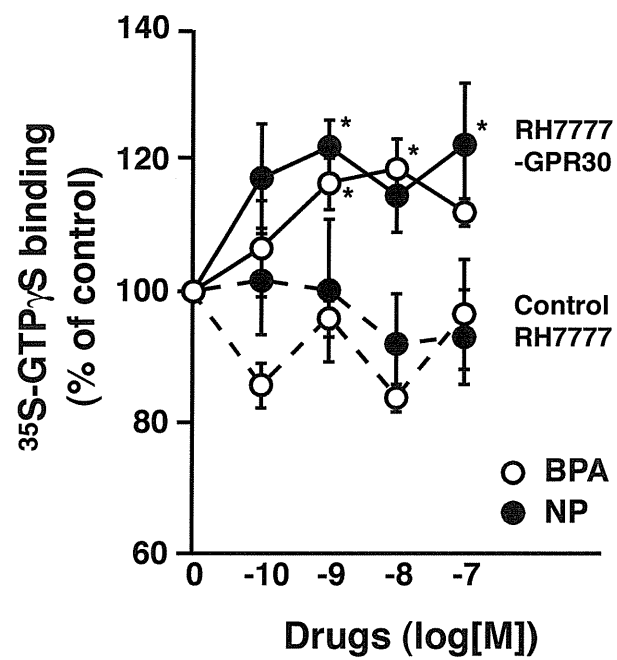


図 8 ビスフェノールおよびノニルフェノールの GPR30 活性化作用 細胞膜に $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S を添加し、その結合量をコントロールに対する比率で表した。

平成25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
福島 伸之	近畿大学理工学部	生命科学科

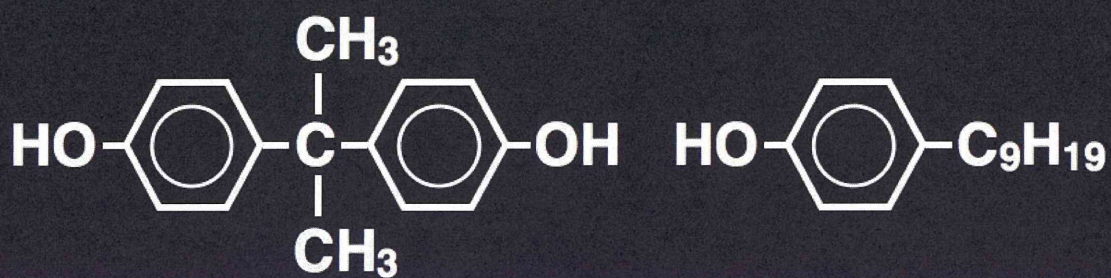
培養細胞の機能の変化



✧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)

BPAおよびNPの作用評価

- ★PC12細胞モデル（神経分化）
- ★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

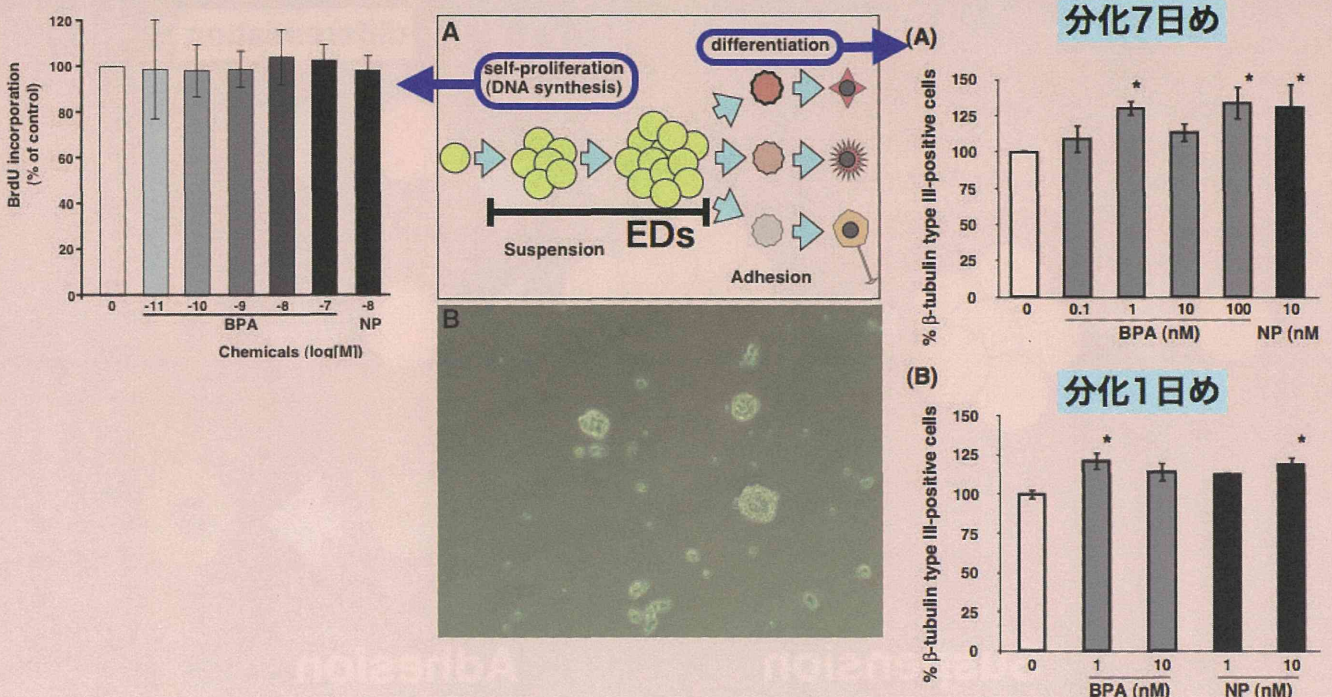
神経系細胞における BPAまたはNPのin vitro作用

- ・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

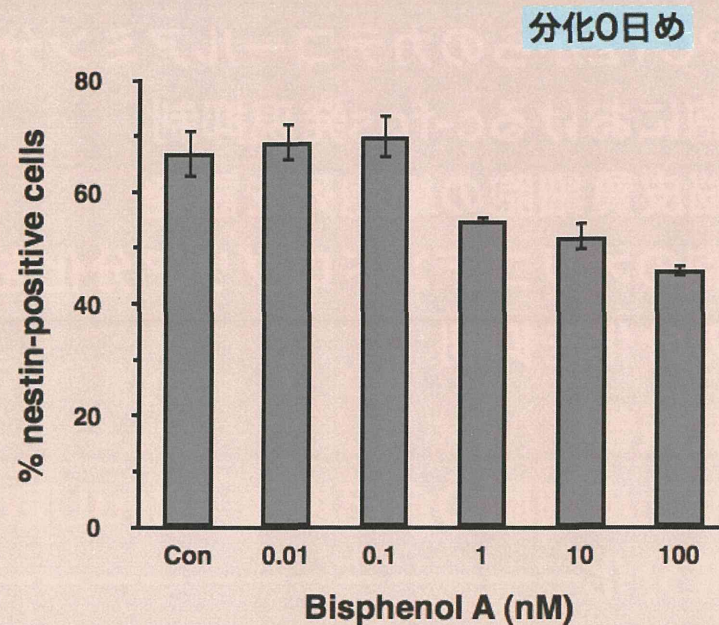
H23・24年度報告

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

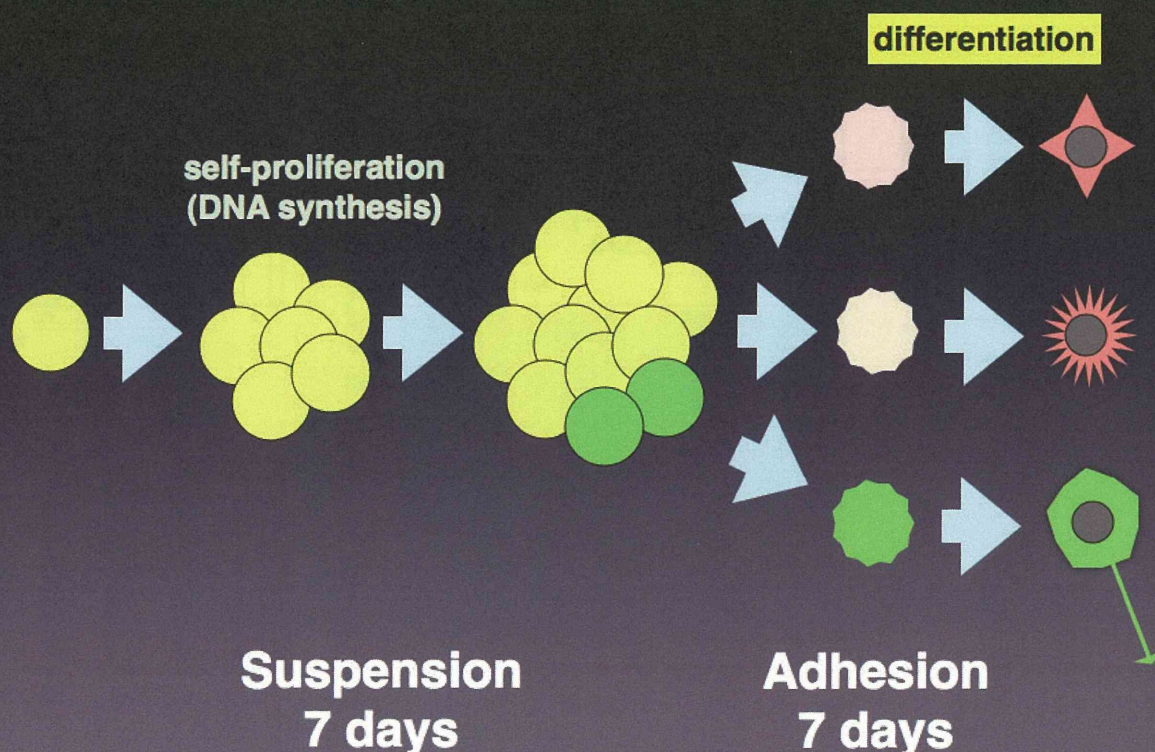
神経上皮（幹）細胞培養系を 用いた化学物質の作用評価



低濃度BPAで前処理した神経上皮細胞塊内の ネスチン陽性細胞の割合（予備検討）

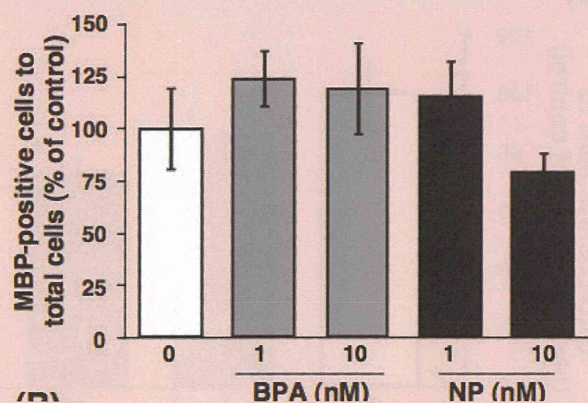


神経上皮細胞培養系 Neurosphere culture

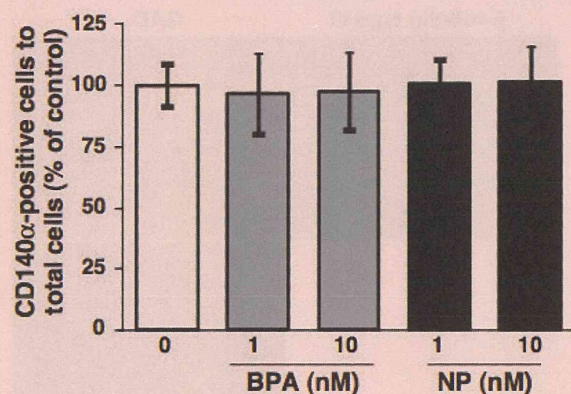


低濃度BPAまたはNPで前処理した神経上皮細胞からオリゴデンドログリアへの分化

分化7日め；オリゴデンドログリア



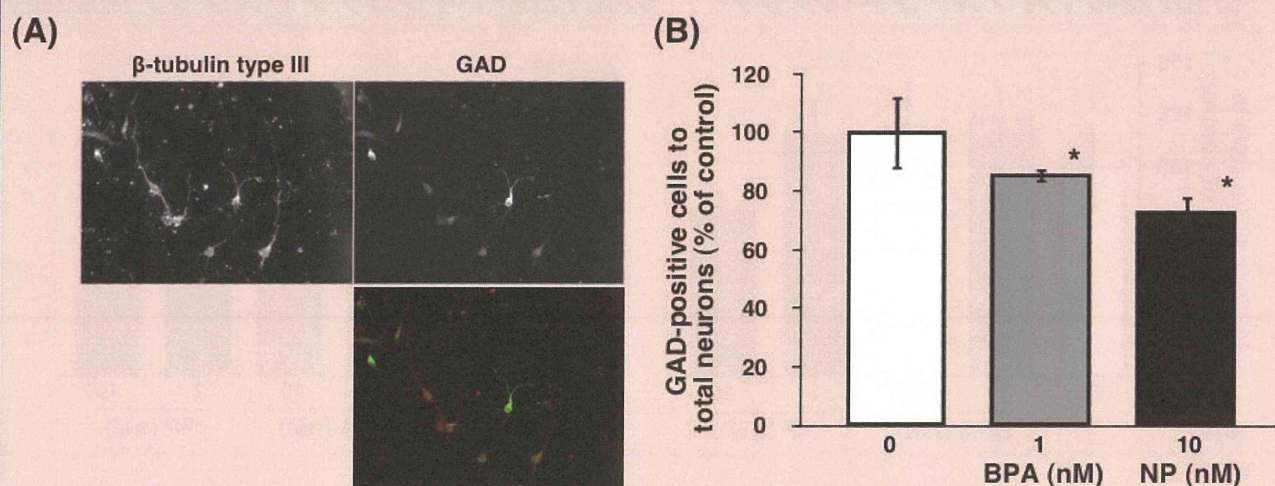
分化1日め；オリゴデンドログリア前駆細胞



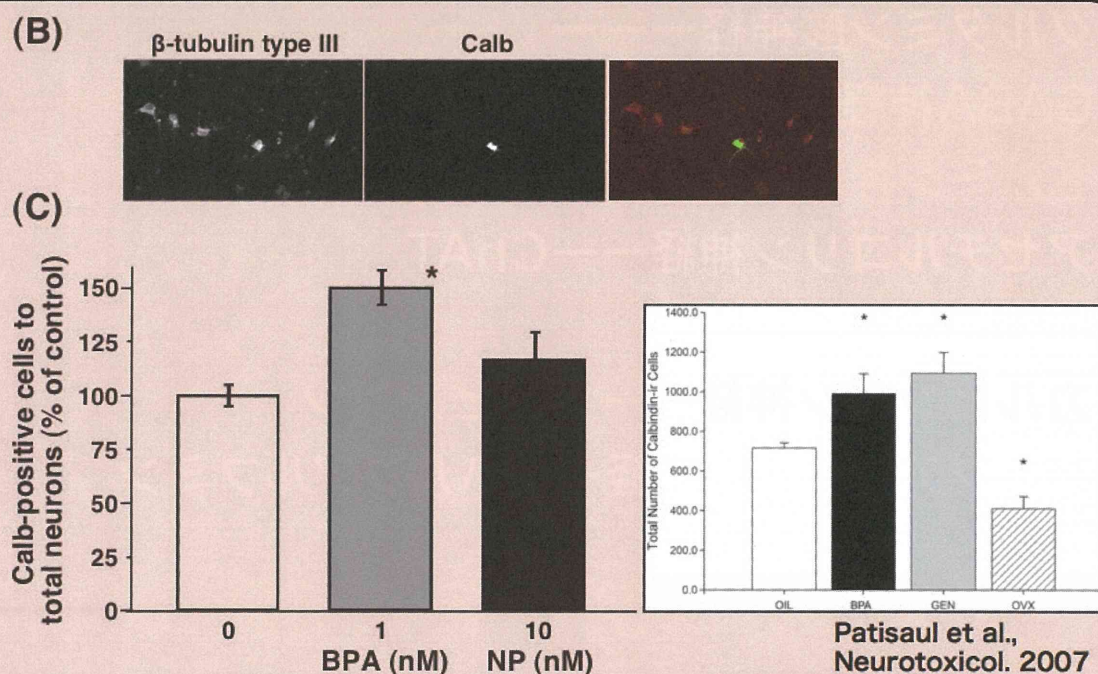
BPAまたはNPにより影響を受ける神経細胞の同定

- ・グルタミン酸神経——
- ・GABA神経———GAD
- ・ドパミン神経———TH
- ・アセチルコリン神経——ChAT
- ・カルビンジン神経——カルビンジン
- ・パルブアルブミン神経——パルブアルブミン

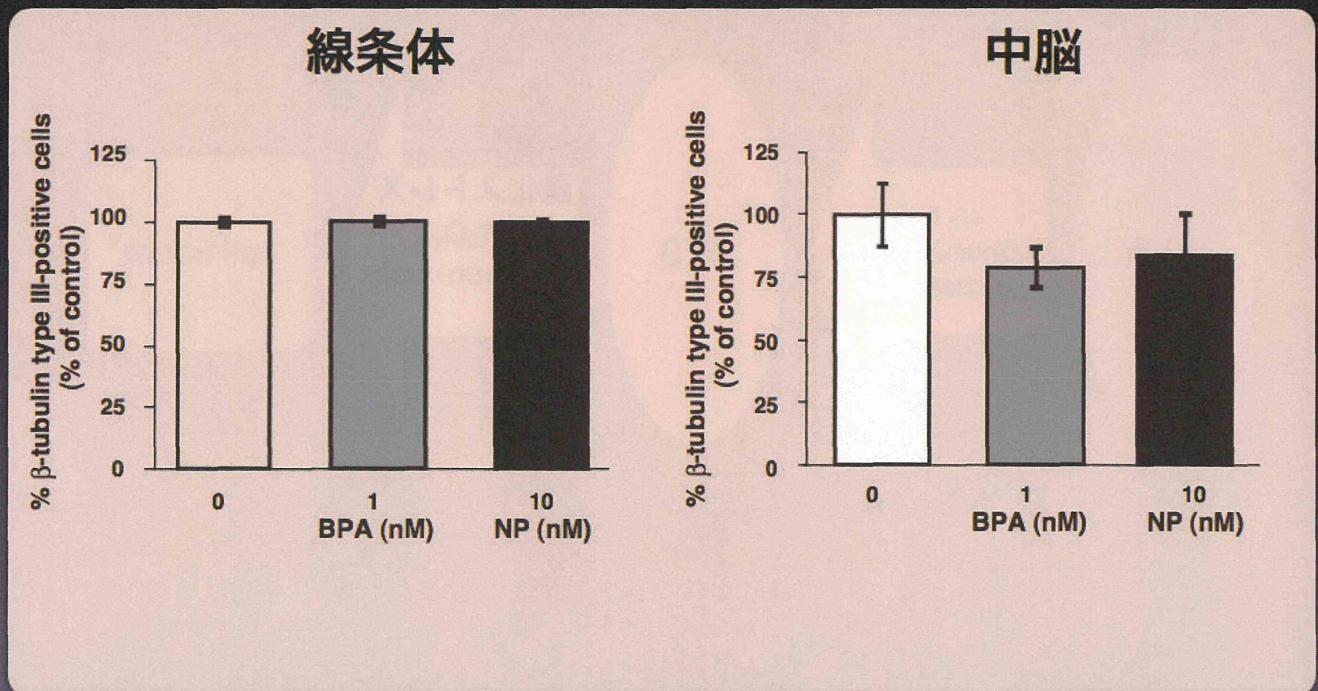
低濃度BPAまたはNPで前処理した神経上皮細胞からGABA神経への分化



低濃度BPAまたはNPで前処理した神経上皮細胞からカルビンジン神経への分化



低濃度BPAまたはNPで前処理した線条体および中脳神経上皮細胞からの神経分化



神経上皮（幹）細胞培養系を用いた化学物質の作用評価

大脳皮質神経上皮細胞の自己増殖——影響無

大脳皮質神経分化——————促進

・GABA神経への分化——————抑制

・カルビンジン神経への分化————促進

線条体、中脳における神経分化——影響無

課題

➡大脳皮質背側部の使用

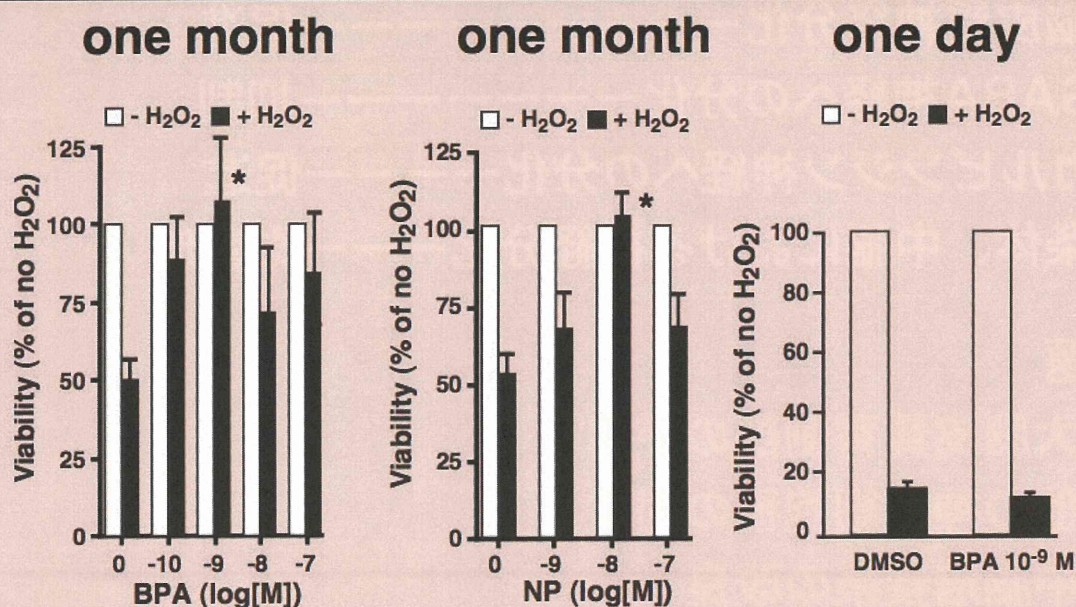
➡他の神経細胞種の同定

➡中脳培養系の改良

3T3線維芽細胞の細胞死実験系を用いた評価



低濃度化学物質で前処理した3T3線維芽細胞の過酸化水素誘発細胞死



H₂O₂-induced cell death

- Bcl-2による抑制

BPA-induced cytoprotection

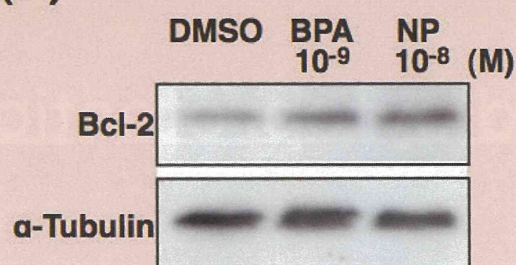
- Bcl-2発現誘導

BPA-induced epigenetic changes

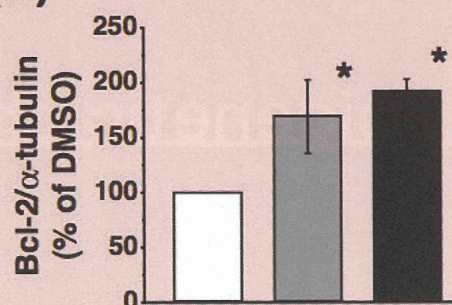
- Histoneメチル化

低濃度化学物質で前処理した3T3線維芽細胞におけるBcl-2発現

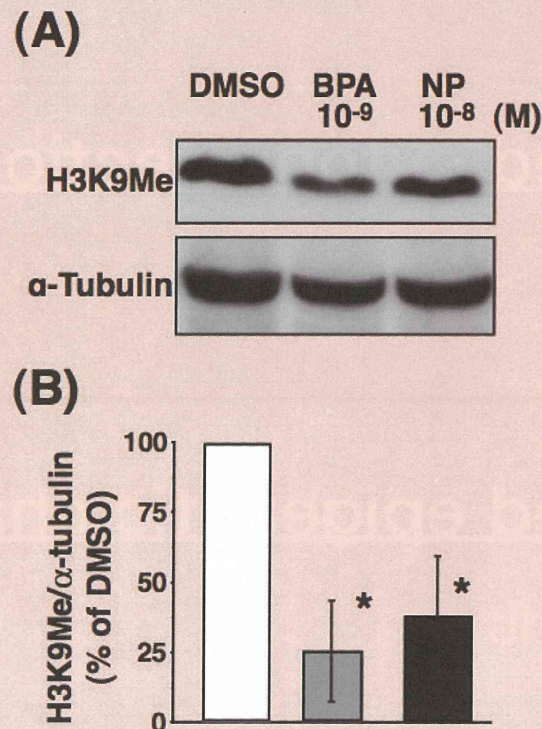
(A)



(B)



低濃度化学物質で前処理した3T3線維芽細胞におけるメチル化ヒストン



H₂O₂-induced cell death

- Bcl-2による抑制

BPA-induced cytoprotection

- Bcl-2発現誘導

BPA-induced epigenetic changes

- Histoneメチル化