

実験動物を用いた中枢神経系の発生・発達における化学物質のリスク評価には、わずかな毒性学的変化を検出することが可能な形態学的指標により明確に定量する試験系や器質的变化を評価する手法の構築が必要である。そこで本研究では、中枢神経系の発生・発達において重要な細胞増殖と神経新生を高感度に定量できる免疫組織学的評価手法の構築を目的とした。正常な中枢神経系の発生・発達には、適切な時期に適切な数の細胞が増殖し、神経細胞に分化することが必須である。特に脳の器官形成期には膨大な細胞が増殖・分化・移動するため、わずかな発生学的歪みが形態学的・脳機能学的な異常に繋がる。そこで、ビスフェノール A (BPA) を用いて免疫組織化学的に細胞の増殖と神経新生の変化を、細胞数の増減により評価するという新たな組織学的手法の確立を試みた。

内分泌攪乱化学物質である BPA は広く樹脂原料として用いられており、ポリカーボネート性のプラスチックを製造する際のモノマーや、エポキシ樹脂の原料、さらにはポリ塩化ビニルの可塑剤として用いられている。ポリカーボネートは耐久性に優れており、哺乳瓶を含む食品の容器等に用いられており、またエポキシ樹脂は歯科治療用の歯の詰め物や缶詰の内側の被覆にも用いられている。ヒトに対しても、エストロゲン、アンドロゲン、副腎皮質ホルモン様の作用を示すことが示唆されている。実験動物を用いた研究においては、胎児期の低用量 BPA 暴露が神経分化の促進や神経細胞移動の異常を引き起こし、大脳皮質の発生に異常を引き起こすことが知られていることから、本研究課題では、低用量 BPA の胎児期暴露マウスを主なモデルとし、細胞数という明確な数値で大脳皮質の発生・発達の過程でみられる変化を評価できる手法が、リスク評価手法としては極めて有用であることを明らかにする。

B. 研究方法

1. 低用量化学物質暴露による胎児大脳皮質発生に及ぼす影響の検討

1-1. 動物と飼育条件

8 週齢の C57BL/6J マウス (日本 SLC、吹田市) を、SPF 環境下 (明暗周期: 12 時間 (午前 7 時—

午後 7 時)、温度: $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度: $55 \pm 5\%$) にて飼育した (近畿大学の実験動物飼育規定に準拠)。給水瓶はテフロン被膜を施したものを使用した。2 週間の馴化の後、雌雄 1:1 で交配を行い、12 時間後に膣栓が確認できたものを実験に使用した。膣栓が確認できた日を胎生 0 日 (E0) とした。

1-2. 投与液と投与計画

BPA (2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane 4,4'-isopropylidenediphenol, CAS no. 80-05-7, Sigma Aldrich) をコーンオイルで溶解し、E8~13 に連続して強制経口投与した (投与液は、濃度を $\pm 10\%$ で調整し、調整後 5 日以内に使用した。また毎日ほぼ一定の時間の PM12:00 に投与した)。予備検討として、 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ あるいは $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ の BPA を E8~13 に連続強制経口投与した。E14 に帝王切開により得られた胎児の組織学的解析を行ったところ、 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では皮質板 (Cortical plate: CP) の過形成などの組織学的異常は検出されなかった。これに対して、 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では大脳皮質の形成異常が確認された。これらの結果に基づき、本研究では $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ の BPA を用いて、まず胎児期暴露による大脳皮質形成異常の発症メカニズムの解明を目指した。先行研究では妊娠ラットに $6 \mu\text{g}/\text{kg}$ の BPA を強制経口投与した場合、胎児血清中に $4\text{--}5 \mu\text{g}/\text{L}$ の BPA が検出されたことを報告している (Yoshida et al. 2004)。さらに、 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ の投与では胎児体重の低値や産児数の減少が報告されている (Cagen et al. 1999)。これらの成績は、 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ の BPA を妊娠マウスに投与する実験系において胎児に胎盤を経由して BPA が到達し、胎児発生に何らかの影響を及ぼすことを示唆する。

次いで、BPA と同様に ERR γ に強く結合することが報告されている 4-hydroxytamoxifen (4-OHT, Sigma) の大脳皮質形成に及ぼす影響を検討するため、4-OHT を 0.5% CMC-Na 溶液で懸濁し、E8~13 に連続して背部皮下投与した。投与量は $0.5\text{--}50 \mu\text{g}/\text{kg}$ とした。方法は BPA の場合と同様に行った。

1-3. 胎児重量の測定と組織サンプルの作製

妊娠マウスの E14 に帝王切開により胎児を摘出した。組織学的解析には子宮口から近いものを優

先して使用したが、その根拠は、生殖器系、内分泌系、生殖機能の成熟、性周期や行動学的解析により胎児の子宮内位置の違いによるこれら指標における変化が検出されないため、胎児の子宮内位置は胎児発生及び生後の発達・成熟に影響を及ぼさないことが報告されているからである (Nagao et al. 2004)。E14 に胎児重量と頭部の大きさを測定した後、胎児は PLP 固定液を用いて 4°C で固定して PBS で洗浄した。パラフィン切片は 5 μm 、凍結切片は 10 μm の厚さで作成し、免疫組織化学染色に用いた。

1-4. 免疫組織化学染色

1 次抗体は以下のものを用いた。Mouse monoclonal anti-neural class III β -tubulin (Tuj1: Covance) : 神経細胞のマーカー、rabbit monoclonal anti-Ki67 (Lab vision) : 増殖中の細胞のマーカー、rat monoclonal anti-BrdU (CldU) (Oxford Biotechnology) 、 mouse monoclonal anti-BrdU (IdU) (Becton Dickinson) 、 rabbit polyclonal anti-Tbr2 (Abcam) : IPC に発現する転写因子、 rabbit polyclonal anti-Pax6 (Covance) : RGC に発現する転写因子、 mouse monoclonal anti-Nestin (BD pharmingen) : RGC の放射状突起のマーカー、2 次抗体には Alexa 568、488 を共役させた抗体を用いて、蛍光免疫組織染色を行った。対比染色として、DAPI による核染色を行った。

1-5. CldU と IdU の取り込み実験

胎児生体内で S 期の細胞をラベリングするために、CldU (MP biomedical Inc.) と IdU (Sigma) を腹腔内投与し、CldU の場合は投与後 24 時間、IdU は投与後 1 時間が E14 になるように胎児を摘出した。CldU と IdU 陽性細胞を免疫組織化学染色により検出し、大脳皮質原基における陽性細胞の数や分布を定量した。

1-6. 細胞周期解析 (cell cycle length & cell cycle exit)

IPC (中間前駆細胞、Intermediate progenitor) の cell cycle length を定量するために、IdU を投与し 1 時間後に摘出した胎児を用いて、IPC の

マーカーである Tbr2 と IdU の二重染色を行った。すべての Tbr2 陽性細胞のうち、IdU と共発現している細胞の割合を求め、その比を BPA 暴露群と対照群との間で比較することにより cell cycle length を比較することができる。その比が小さいほど、Tbr2 陽性の IPC の細胞周期は長いことを示している。

Cell cycle exit を定量するために、CldU を投与し 24 時間後に摘出した胎児を用いて、増殖中の細胞のマーカーである Ki67、RGC (Radial glia cells) のマーカーである Pax6、IPC のマーカーである Tbr2 との二重染色を行った。すべての CldU 陽性細胞のうち、Ki67 との二重染色では終脳背側全体の、Pax6 と Tbr2 では SVZ (subventricular zone) の上部において CldU 陽性かつ Ki67、Pax6、Tbr2 陰性の細胞の割合を比較した。なお、これらの細胞は、それぞれの細胞において細胞周期を出て分化した細胞を示している。

1-7. Cell cycle exit、cell cycle length、増殖の解析における細胞数の定量

免疫組織化学染色による陽性細胞を定量するために、組織学的に一致する切片に対して 2 か所の測定部位 (100 μm 幅) を決定し、すべての細胞数 (DAPI 染色細胞) と、それぞれの陽性細胞数を数えて Student t-test を行った。

2. 胎児期低用量化学物質暴露が新生児大脳皮質の層構築に及ぼす影響の検討

2-1. 動物と飼育条件

1-1 と同様

2-2. 投与液と投与計画

BPA を 0.5% CMC-Na 溶液で懸濁し、E6~18 に連続して強制的に経口投与した。毎日ほぼ一定の時間 (PM12:00~12:15) に投与した。投与量は 2、20 及び 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とした。対照群は無処置動物を用いた。また、陽性対照として既知の神経発生毒性物質のメチルニトロソ尿素 (MNU、Sigma) を E13 (マウスにおける小頭症誘発の臨界期に相当) に 5 mg/kg 腹腔内投与した。いずれの妊娠動物も自然分娩にて出生児を得た。出生日 (分娩日) を出生 0 日 (P0) とした。

また、神経細胞の分布を観察するために、E14

に CldU 50 mg/kg を、E16 に IdU 50 mg/kg を、それぞれ腹腔内投与し大脳皮質における増殖中の細胞を標識した。

2-3. 組織サンプルの作製

P3 に雄 3 匹、雌 3 匹の新生児を断頭により放血致死させて大脳を摘出し、PLP 固定液を用いて 4℃ で固定して PBS で洗浄した。常法により、海馬の形態などを基準に矢状断の同レベルのパラフィン切片 (5 μm の厚さ) を作成し、以下の一般染色による組織観察及び蛍光免疫組織化学染色を行った。

2-4. 大脳皮質の組織観察

HE 染色及び Nissl 染色を用いた一般染色により大脳皮質の層構造の異常の有無を観察した。

2-5. 免疫組織化学染色

2-5-1. Layer marker を用いた大脳皮質層構造の解析

Layer marker による免疫染色に先駆け、HE 染色及び Nissl 染色を用いた一般染色により大脳皮質を観察した。次いで、layer marker には第 6b 層のマーカーとして Nurr1 及び CTGF、4/5 層のマーカーとして Tle4、2/3/4 層のマーカーとして Cux1 を用いた (以下参照)。以下の layer marker を用いて大脳皮質の各層を染色して層構造の異常の有無を解析するために蛍光免疫組織染色を行った。Anti-CTGF (Layer 6b) Santa Cruz (Sc14939)、Anti-Nurr1 (Layer 6b) R&D System (AF 2156)、Anti-Foxp2 (Layer 6) Abcam (ab 36788)、Anti-Cux1 (Layer 2, 3, 4) Santa Cruz (Sc1 3024)、Anti-Tie4 (Layer 4) Santa Cruz (Sc1 3377)

2-5-2. Birth-date analysis による神経細胞分布の解析

本解析法により特定の時期 (E14 と E16) に生まれたニューロンが、生後間もない (P3) 新生児の大脳皮質のどの層を形成しているかを明らかにした。1 次抗体には、rat monoclonal anti-BrdU (CldU) (Oxford Biotechnology)、mouse monoclonal anti-BrdU (IdU) (Becton Dickinson)。2 次抗体には Alexa 568、488 を共役させた抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行った。対比染色とし

て、DAPI による核染色を行った。次いで大脳皮質を 3 部位 (前・中・後) に分けて、それぞれの部位については 100 μm の幅で脳室面から脳表面までを 5 等分 (①~⑤) した。区画ごとにそれぞれの陽性細胞数、DAPI 染色細胞数をカウントした。

C. 研究結果

1. 低用量化学物質暴露による胎児大脳皮質発生、特に神経新生に及ぼす影響

1-1. BPA の胎児期暴露は皮質板の過形成を誘導する

低用量 BPA の胎児期暴露による大脳皮質発生への影響を解析するために、妊娠マウスに対して E8~13 (マウスにおける大脳皮質の器官形成期) に 200 μg/kg の用量で連日、強制経口投与を行った。E14 に帝王切開により胎児を摘出して生死と性別を確認後、生存胎児については重量と頭部長 (前後長と左右幅) を測定した。その結果、対照群との間に胎児生存率、重量、頭部長に差はみられず、さらに性差も確認されなかった。

胎児切片に HE 染色を行い病理組織学的に観察したところ、BPA 投与群において皮質板の過形成が観察された (図 1)。BPA 投与による神経新生への影響を解析するために、TuJ1 (neuron-specific class III β-tubulin) の発現領域を調べたところ、TuJ1 を発現している皮質板が肥厚していることが示された。中村らは低用量の BPA の胎児期暴露により、神経新生や神経移動が亢進するために大脳皮質の発生に異常が引き起こされたことを報告した (Nakamura et al. 2006)。我々の結果はこの先行研究の結果と一致し、BPA の胎児期投与は神経新生の亢進による皮質板の過形成を誘導することを示した。

1-2. BPA の胎児期暴露は神経幹・前駆細胞の cell cycle exit を促進する

大脳皮質の発生において適切に制御された細胞周期は重要である。そこで、BPA 投与による神経新生の促進の原因を明らかにするために、神経幹・前駆細胞の cell cycle exit について増殖中の細胞に発現する核タンパクである Ki67 とチミジン類似物質である CldU を 24 時間前に投与することで増殖中の細胞をラベリングし、蛍光免疫二

重染色による解析を行った。Ki67 と CldU が共発現している細胞は 24 時間前 (E13) も胎児摘出時 (E14) も増殖中の細胞であることを示しており、Ki67 陰性かつ CldU 陽性の細胞はラベリングした 24 時間前は増殖中であるが、胎児摘出時は細胞周期を出ている (cell cycle exit) ことを示す (図 2)。Cell cycle exit はこの細胞の割合を比較することにより解析を行う。その結果、BPA 投与群で cell cycle exit の割合が対照群と比較して増加していることが明らかになった。すなわち、皮質板の過形成は神経幹・前駆細胞の分化が促進されて誘導されたことを示す。また、Ki67 と CldU が共発現している細胞は SVZ/VZ の深層に留まっており、分布に異常がみられた。これは、細胞周期に関連して細胞の核が脳室面から脳表面に向かって上下運動をする RGC のエレベーター運動に影響しているためではないかと考え、放射状突起の状態について Nestin 抗体を用いた免疫染色によって解析した。その結果、BPA 投与群では対照群と比較して放射状突起が短くなっており、これが原因で Ki67 陽性細胞や Ki67 と CldU の共発現している細胞の分布に異常が引き起こされていることが示唆された。

1-3. BPA の胎児期暴露は増殖中の神経幹・前駆細胞の減少を誘導する

神経新生の促進は、神経幹・前駆細胞の増殖に影響を及ぼしている可能性があるため、増殖中の細胞のマーカーである Ki67 の抗体を用いて免疫組織染色を行った (図 3)。E14 において Ki67 陽性細胞の割合が有意に BPA 投与群において減少し、神経新生のタイミングが早くなることによって神経新生が促進されており、結果として増殖中の神経幹・前駆細胞が減少していることが示された。

1-4. BPA の胎児期暴露は特に中間前駆細胞 (IPC) に作用する

マウスにおいても大脳皮質の発生においては、SVZ/VZ に大きく分けて自己複製能、神経新生能、遺伝子発現の異なる 3 種類の神経幹・前駆細胞 (RGC、IPC、oRGC) が存在する (Molnar et al. 2011)。BPA の胎児期暴露がこれらの細胞の数や比率に影響を及ぼすか否かを、それぞれの細胞のマーカー

の発現 [RGC-Pax6 (RGC に発現する転写因子)、IPC-Tbr2 (IPC に発現する転写因子)] を用いて解析した (図 4)。その結果、主に VZ に局在する RGC は BPA 投与群と対照群の間で有意な差はみられないが、SVZ に分布する IPC は BPA 投与によりその数が有意に減少した。これらの結果は、BPA 投与は特に IPC の維持に影響を及ぼしている可能性を示している。

1-5. BPA の胎児期暴露は RGC と IPC の分化を促進する

大脳皮質の発生において、RGC から IPC あるいは神経細胞へ分化、また IPC から神経細胞へ分化する。IPC は主にヒトの進化の過程において高度に発達させてきた大脳皮質の第 2、3 層の投射神経を産生することから、大脳皮質の進化に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、RGC や IPC の分化に BPA の胎児期投与が影響を及ぼすか否かを、チミジン類似物質を用いた cell cycle exit により解析した。CldU 投与 24 時間後の皮質板と SVZ の上層において、CldU を発現し Pax6 あるいは Tbr2 を発現していない細胞は、それぞれ細胞周期を出て分化した RGC あるいは IPC であると定義した (図 5)。解析の結果、RGC と IPC のいずれも BPA の胎児期投与により、分化した細胞の割合が増加していることが明らかになった。すなわち、BPA の胎児期投与により IPC と RGC はいずれも cell cycle exit が促進されていることが明らかになった。

1-6. BPA の胎児期暴露は IPC の細胞周期を延長させる

IPC が減少した原因が、細胞周期が長くなることで増殖が抑えられたことに起因しているかと仮定し、細胞周期の長さを解析した。IdU をサンプリング (E14) の 1 時間前に投与し、IdU 抗体と Tbr2 抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行った。細胞周期の長さはすべての Tbr2 陽性細胞と S 期にある Tbr2 陽性細胞 (IdU と Tbr2 の共発現している細胞) の割合で算出することが可能であり、その割合が少ないほど細胞周期は長くなっている (図 6)。BPA 投与群では明らかに細胞周期が延長しており、細胞周期が長くなることによって IPC の自己複製が

減少し、IPC の数が減少したことが示された。

1-7. 4-OHT の胎児期暴露は BPA と同様に大脳皮質発生に影響を及ぼす。

4-OHT の胎児期投与は皮質板の過形成を引き起こすことを認めた。この表現型は、BPA の胎児期投与と同様に神経幹細胞の神経新生の促進により起こり、それに伴う神経幹細胞の減少が観察された。これらの異常の原因が細胞周期の延長にあることも認めた。

2. 胎児期低用量化学物質暴露が新生児大脳皮質の層構築に及ぼす影響

2-1. 大脳皮質の病理組織変化

HE 染色及び Nissl 染色を用いた一般染色により、BPA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の P3 新生児の大脳皮質層、特に第 6b 層の低形成が観察された (図 7)。

2-2. 大脳皮質層構造の変化の確認

Nissl 染色により、特に第 6b 層の低形成が観察されたことから、layer marker を用いた免疫組織染色を行った。その結果、BPA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において Nurr1 陽性細胞が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に減少した (図 8)。Cux1 陽性細胞及び Tle4 陽性細胞については MNU 投与群においてそれぞれ有意 (いずれも $p < 0.01$) に減少あるいは増加したが、BPA 投与群と対照群との間には統計学的有意差はなかった (図 9)。

2-3. 大脳皮質における神経細胞分布

2-3-1. Inside-out pattern

Birth-date analysis により特定の時期に生まれた神経細胞が、生後間もない新生児の大脳皮質のどの層を形成しているかを明らかにした。その結果、対照群において遅生まれの細胞 (E16 生まれの神経細胞) が早生まれの細胞 (E14 生まれの神経細胞) の上層に位置する、いわゆる「inside-out」のパターンを取っていることを確認した。同様に BPA 投与群においても inside-out のパターンを取っていることが確認できた。MNU 5 mg/kg 投与群では E14 及び E16 生まれの細胞が無秩序に局在して層構造の著明な乱れが確認できた (図 10)。

2-3-2. 大脳皮質の全細胞に対する神経細胞の割合

E14 生まれの神経細胞の割合を区画 (①~⑤) ごとに対照群と比較した結果、BPA 投与群に有意差が散見されたが、神経細胞の分布に大きな差はみられなかった。一方、MNU 5 mg/kg 投与群では対照群と比較して著しい変化がみられたことから E14 生まれの神経細胞の移動と分布に障害が生じていることが明らかとなった (図 11)。

同様に E16 生まれの神経細胞の割合を区画 (①~⑤) ごとに対照群と比較した結果、BPA 投与群に有意差が散見されたが神経細胞の分布に大きな差はみられなかった。一方、MNU 5 mg/kg 投与群において対照群と比較して著しい変化がみられたことから E16 生まれの神経細胞の移動と分布に障害が生じていることが明らかとなった (図 11)。

以上から MNU 5 mg/kg の胎児期投与 (E13) は E14 及び E16 生まれの神経細胞の分布に異常を誘発するが、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までの BPA の胎児期投与は E14 及び E16 生まれの神経細胞の分布に軽微な変化を及ぼすが、層構造の異常など大きな影響は及ぼさないことが示唆された。

2-3-3. 陽性細胞の数

E14 生まれの神経細胞の数は対照群において区画①、②に多く存在していることを確認した。BPA 投与群において同様の傾向がみられたが、大脳皮質のいずれの観察部位においても減少傾向にあった。MNU 投与群ではいずれの観察部位においても陽性細胞数は著しく減少し、区画①~⑤に均一にわずかに存在していることを確認した (図 12)。また、E16 生まれの神経細胞の数は対照群において区画①に多く存在していることを確認した。BPA 投与群において同様の傾向がみられたが大脳皮質のいずれの観察部位においても減少傾向にあった。MNU 5 mg/kg では区画①~⑤に点在していることが確認できた (図 12)。さらに区画ごとの全細胞数については、BPA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群および MNU 投与群ともほぼ全区画において対照群と比較して減少した (図 12)。

区画①~⑤の細胞について、E14 及び E16 生まれの全神経細胞および DAPI 染色細胞を合わせた総細胞数を求めた (図 13)。その結果、BPA (20、

200 µg/kg) 及び MNU 投与群の全神経細胞数に有意な減少が確認された。

D. 考察

これまでの研究では、ICR 妊娠マウスに BPA (20 µg/kg) を皮下注射すると、胎児において神経新生と移動の促進を誘導することが報告されていたが (Nakamura et al. 2006)、本研究において、C57BL/6J マウスを用いた BPA (20 µg/kg) の強制経口投与では E14 において、神経幹細胞の神経新生や増殖に影響はみられなかった。この結果の違いは、マウスの系統差による BPA への感受性の違いや、投与経路による違いであると考えられる。また、別の研究では、BPA 200 µg/kg を子宮内暴露すると胎児重量あるいは産児数が減少するものの、20 µg/kg ではこれらの異常はみられなかった (Cagen et al. 1999) ことが報告されている。我々の成績においても、組織学的な異常 (細胞周期、増殖、分化の異常) は 200 µg/kg の投与では誘発されたものの、20 µg/kg の投与では確認できなかった。

内分泌攪乱物質である BPA は神経幹細胞の神経新生を促進し、増殖を抑制する作用がある。BPA はヒトのエストロゲン受容体 (ER) に結合し、ホルモン様作用を示すことや (Krishnan et al. 1993)、ヒトのアンドロゲン受容体 (AR) のアゴニスト (Xu et al. 2005) であり、またヒトの ER 関連受容体 γ (ERR γ) に結合すること (Takayanagi et al. 2006) が報告されている。ER や AR は齧歯類において発生中の脳の広い領域で発現しており (Matsuda et al. 2008, Zsarnovszky and Belcher 2001)、特にエストロゲンは発生の過程において、神経栄養因子として分化促進作用を持つことが知られており、ER α や ER β は大脳皮質の発生の過程において重要な役割を果たしていることが報告されている (Beyer 1999)。ER β ノックアウトマウスを用いた解析では、ER β が神経細胞の移動や分化、生存に重要な役割をもつことを示している (Wang et al. 2003)。また、BPA が ER α の発現量を増加させることも報告されており (Bromer et al. 2010)、BPA はエストロゲン活性を増強することにより、ER の発現を促進し、標的遺伝子の発現を異常に制御している可能性が考えられる。現在、我々

は今回報告した異常とエストロゲンや ER との関連を調べており、我々の作製した BPA 暴露モデルにおけるエストロゲンの下流の因子の発現の変化についても解析を行っている。

さらに、BPA は甲状腺ホルモン (T3) と同様にジスルフィドイソメラーゼ (PDI) に結合するが (Horii et al. 2006)、甲状腺ホルモンは正常な大脳皮質の形成、なかでも細胞構築や神経ネットワークの形成に重要である (Cuevas et al. 2005)。甲状腺ホルモン受容体 α と β は大脳皮質や海馬に発現しており (Di Liegro 2008)、BPA はこれらの酵素や受容体に作用し、そのシグナルを増強させることにより大脳皮質の発生に影響している可能性がある。

本研究では、BPA は RGC と IPC の増殖を抑制し、分化を促進しているが、ER β は E16 においては終脳背側の深層に発現している (Fan et al. 2006) ことから、RGC や IPC において発現している可能性が考えられる。さらに、エストロゲンシグナルは RGC や IPC の stem cell niche の維持に重要であることが報告されており (Wang et al. 2003)、BPA は ER のアゴニストとして働き、エストロゲンシグナルを異常に促進することによって神経新生を促進している可能性がある。

近年の細胞動態、形態、遺伝子の発現パターンの解析により、発生期の大脳皮質において RGC、IPC および oRGC の 3 種類の似た特徴を持つ神経幹・前駆細胞が同定されている。RGC は脳室面に主に分布し、対称分裂により自己複製を、非対称分裂によって神経細胞を産生している (Molnar et al. 2011)。IPC は RGC の非対称分裂によって産生され、転写因子である Tbr2 を発現し、主に SVZ に分布する (Noctor et al. 2004)。IPC は主に発生後期に大脳皮質の第 2、3 層の投射ニューロンを産生し、また大脳皮質の進化における増大においても重要である。本研究から、BPA の暴露は IPC の神経新生に影響し、大脳皮質の発生に影響を与えていることから、特にヒトの脳の発生におけるリスク評価においては、IPC の異常を評価することは非常に重要であると考えられる。

BPA 暴露は神経新生に関与する遺伝子の発現に影響することが考えられる。basic helix-loop-helix (bHLH) を持つ転写因子は、活性型と抑

制型の両方があり、抑制型には Hes1 や Hes5 があり、主に神経幹細胞の維持やグリア新生に関与している。活性型は Mash1、Mash2、Ngn2 が存在し、神経新生の活性化に関与している。Nakamura らによると、BPA 暴露により E14 において Mash1 と Ngn2 の発現が促進されており (Nakamura et al. 2006)、我々も未発表であるが今回報告したモデルマウスにおいて Mash1 の発現が E14 において増加していることを確認している。BPA は bHLH の活性型の転写因子によって Mash1 や Ngn2 の発現を活性化し、神経新生を促進している可能性がある。

低用量 BPA で得られた実験的証拠を他の化学物質においても確認するために、BPA と同様に ERR γ に強く結合することが報告されている 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) を用いて低用量影響について神経新生を中心に検討し、BPA と同様に 4-OHT は、皮質板の肥厚と神経幹/前駆細胞を減少させることを確認した。

次いで、神経細胞の移動障害など大脳皮質の層構造に着目した解析を新生児について行った結果、低用量の BPA 胎児期投与により、生後間もない新生児の大脳皮質の層構造に異常がみられた。チミジン類似物質を用いた birth-date analysis では明らかな変化は確認されなかったが、各層ごとの解析あるいはより細かく領域分けをした本解析法を行えば有意な差が捉えられる可能性があると考えられる。Layer marker により確認された異常は層の欠如などの大きなものではなく、低形成あるいは減少など微細なものであったが、胎児期の低用量 BPA 暴露が生後の大脳皮質の層構築に影響を及ぼしている証拠を本検査法により得た。但し、新生児で見られた大脳皮質の層の器質的異常が新生児期あるいはその後の成熟動物の行動など高次脳機能に影響しているか否かを判断することは本研究では難しいが、まず新生児期の自発行動を支配するネットワークを同定し、その自発行動の異常の原因となる脳の器質的及び機能的異常の検出を目指すことは重要である。そのため、我々は現在、大脳皮質に投射する tyrosine hydroxylase 陽性のドーパミン作動性ニューロンの変化を解析しており、さらに新生児の生後間もない時期に見られる行動の異常、例えば新生児特有の振戦 (tremors) の亢進などについて電子上皿天秤の tare 機能を

応用した新生児行動試験法を開発中である。これらの試みから、低用量 BPA 暴露による大脳皮質発生・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と考えられる。

E. 結論

高感度免疫組織学的手法とチミジン類似物質を用いた細胞ラベリング法を用いて、低用量 BPA の胎児期暴露は皮質板の過形成 (肥厚) および RGC の放射状突起の短縮を引き起こすことを認めた。この表現型は神経幹細胞の神経新生の促進により起こっており、それに伴う神経幹細胞の減少が観察された。これらの異常の原因は細胞周期の延長にあり、低用量 BPA の胎児期暴露は細胞周期の異常を引き起こすことにより、大脳皮質の分化に影響していることを明らかにした。さらに新生児大脳皮質の第 6b 層の低形成と神経細胞の移動に及ぼす BPA の影響を layer marker を用いた解析と birth-date 解析により明らかにした。これらのことから、本研究にて適用した免疫組織化学染色法及び細胞ラベリング法を用いた検査法は、胎児・新生児あるいは成熟動物の大脳皮質の発生・発達あるいは成熟における神経分化や細胞増殖あるいは層の構築ならびにニューロン移動・分布に対する低用量化学物質暴露の神経発生毒性を検出する組織学的試験法として有用であると判断した。

F. 研究発表

1. 論文

Nagao T, Kawachi K, Kagawa N, Komada M. Neurobehavioral evaluation of mouse newborns exposed prenatally to low-dose bisphenol A. *J Toxicol Sci*, (2014) *in press*

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*

Kagawa N, Saito Y, Nagao T.

Early to middle gestational exposure to diethylstilbestrol impairs the development of labyrinth zone in mouse placenta. *Cong Anom*. (2014) doi: 10.1111/cga.12031.

Nagao T, Komada M, Kagawa N.

Newly developed mouse newborn behavioral testing

method for evaluating the risk of neurotoxicity of environmental toxicants. *J Appl Toxicol* (2013) 33:1514-1519

Nagao T, Kagawa N, Saito Y, Komada M. Developmental effects of oral exposure to diethylstilbestrol on mouse placenta. *J Appl Toxicol* (2013) 33:1213-1221

Komada M, Asai Y, Morii M, Matsuki M, Sato M, Nagao T. Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology* (2012) 295 (1-3):31-38

Komada M, Asai Y, Morii M, Matsuki M, Sato M, Nagao T. Low-dose bisphenol A is related to the acceleration of neurogenesis in the developing cerebral cortex of mouse embryos. *Cong Anom* (2012) 52, 20

Nagao T, Kagawa N, Saito Y, Komada M. Effects of oral exposure to diethylstilbestrol on placental development in mice. *Cong Anom* (2012) 52, 16

Nagao T, Takada N, Onoda N. Transgenerational teratogenesis by prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals. *Gene Environ* (2011) 33:50-60

2. 学会発表

河内宏太、長尾哲二
低用量ビスフェノール A はマウス大脳皮質異常と新生児行動異常を誘発する。
環境ホルモン学会第 16 回研究発表会 東京、12 月 12～13 日、2013 年

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、6 月、2013 年

Komada M, Nagao T. Behavioral abnormalities and neocortical structure anomalies in newborn mice induced by chemical exposure during the embryonic period. The Japanese Teratology Society 53rd Annual Meeting, Osaka, July 21-23, 2013

長尾哲二、井藤早紀、正見寛子、駒田致和
低用量ビスフェノール A のマウス子宮内曝露は新生児の出生直後の活動量に影響を及ぼす。
環境ホルモン学会第 15 回研究発表会 東京、12 月 18～19 日、2012 年

溝端 彩、森佳奈美、駒田致和、長尾哲二
胎児期 4-ヒドロキシタモキシフェン曝露はマウス大脳皮質形成を障害する。
環境ホルモン学会第 15 回研究発表会 東京、12 月 18～19 日、2012 年

駒田致和、浅井泰子、守井見奈、松木美知枝、佐藤 真、長尾哲二
胎児期低用量ビスフェノール A 曝露は大脳皮質形成において神経新生を促進する。
日本先天異常学会第 52 回学術集会 東京、7 月 6～8 日、2012 年

長尾哲二、加川 尚、斎藤義明、駒田致和
合成エストロゲン剤のマウス胎盤傷害性と胚致死作用
日本先天異常学会第 52 回学術集会 東京、7 月 6～8 日、2012 年

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

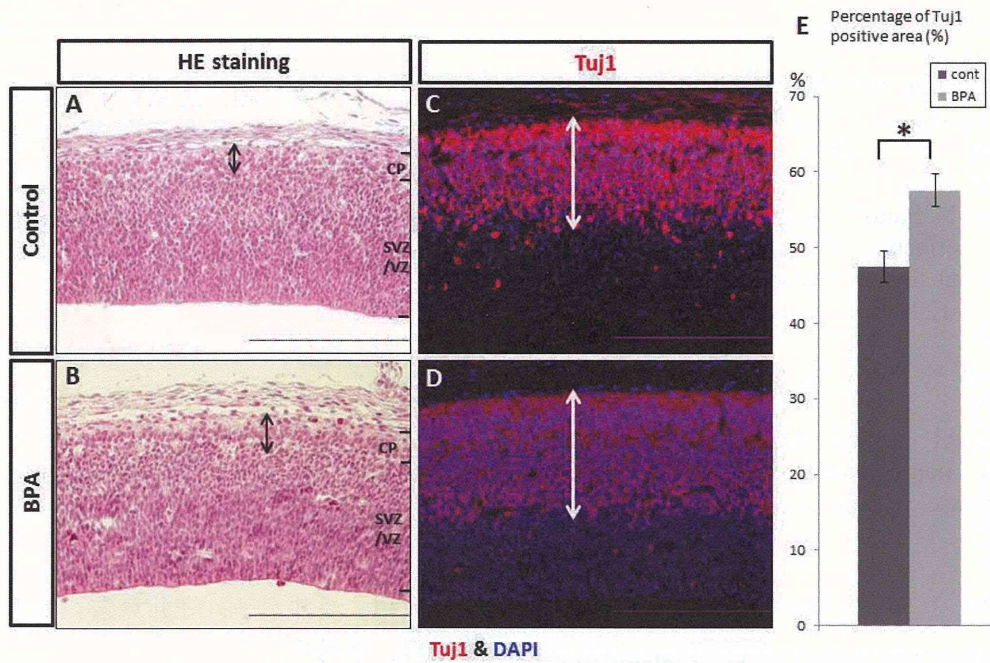


図1. BPAの胎児期暴露は皮質板の過形成と神経新生の促進を誘導する

E14の対照群(A)とBPA投与群(B)胎児の終脳矢状断切片に対してHE染色を行った。BPA投与群で皮質板の過形成が認められた(黒矢印)。同じ切片を用いてanti-neuron specific class III beta tubulin (Tuji1)の免疫組織染色を行った(C, D)ところ、BPA投与群において陽性領域が拡張した(E, BPA: $57.6 \pm 2.11\%$ 対照: $47.5 \pm 2.09\%$ $P < 0.05$)。Scale bar=200 μm

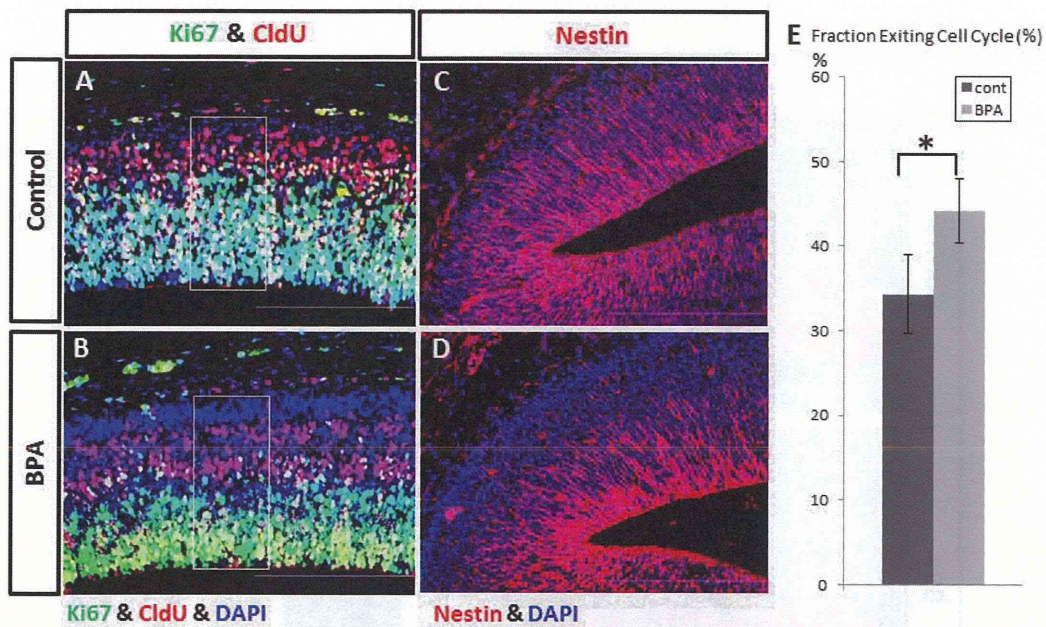


図2. BPAの胎児期暴露はcell cycle exitを促進し、神経幹・前駆細胞の数を減少させる

神経幹・前駆細胞のCell cycle exitを解析するために、E14.1にCldUを投与し、24時間後にサンプリングした胎児に対して、anti-Ki67とanti-CldUの免疫組織染色を行った(対照:A, BPA:B)。Cell cycle exitの割合を比較するために、すべてのCldU陽性細胞(赤+黄)における細胞周期を出た細胞(赤, CldU+/Ki67-)の割合を算出した。細胞は、100 μ mの幅の領域(白枠)で行い、BPA投与群で増加した(対照:34.3 \pm 4.7% BPA:44.1 \pm 3.8% P<0.01)。E14の胎児終脳の矢状断に対して、anti-Nestinを用いた免疫組織染色を行った。Nestin陽性の放射状突起はBPA投与群で対照群と比べ、縮小した。Scale bar=200 μ m

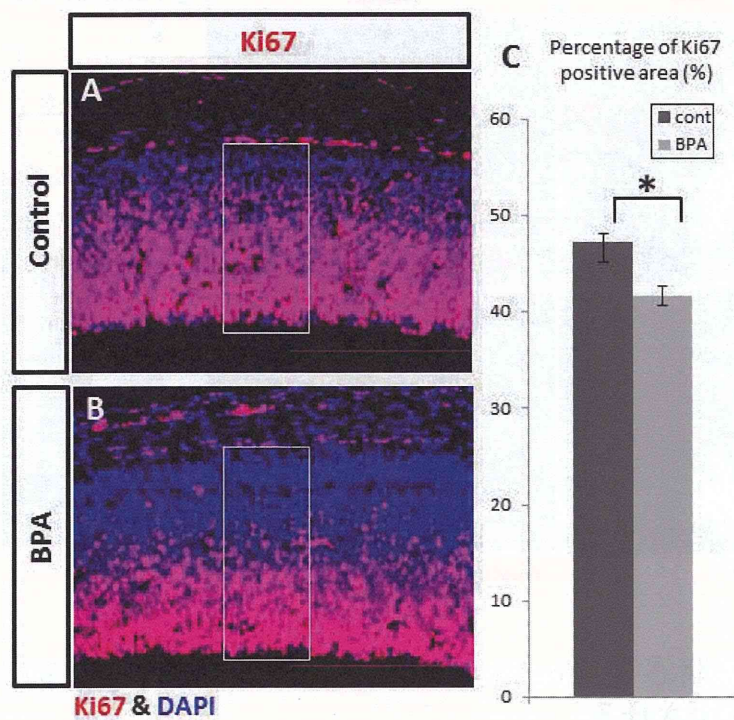


図3. BPA暴露により終脳背側における神経幹・前駆細胞の細胞増殖は抑制される

E14の胎児終脳に対してanti-Ki67の免疫組織染色を行った(対照:A BPA:B)。Ki67は終脳背側のSVZ/VZの増殖中の細胞に発現しており、100 μ m幅の領域(白枠)で陽性細胞の割合を比較した。BPA投与群で陽性細胞の割合が減少した(対照:47.2 \pm 1.0% BPA:41.6 \pm 1.0% P<0.01)。Scale bar=200 μ m

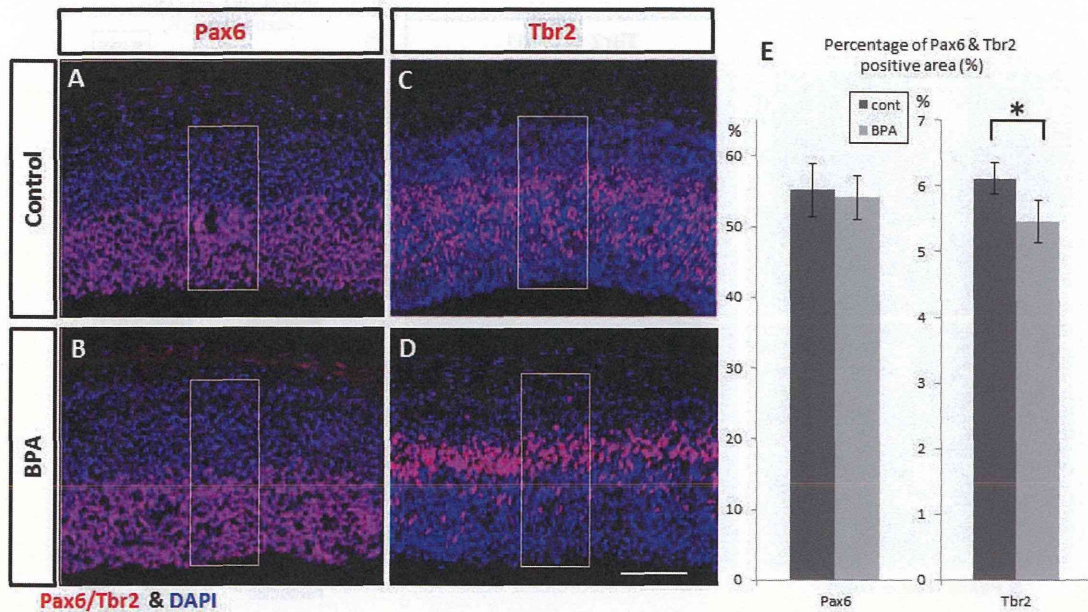


図4. BPAの胎児期暴露は中間前駆細胞を減少させるが、放射状グリアには影響しない

E14の胎児終脳の冠状断切片に対してanti-Pax6 (A, B)とanti-Tbr2 (C, D)を用いた免疫組織染色を行った。VZに局在する放射状グリアはPax6陽性であり、SVZにおけるTbr2陽性細胞は中間前駆細胞である。陽性細胞の数を100 μmの幅(白枠)で定量したところ、Pax6陽性の放射状グリアの数には影響はみられなかったが(E, 対照: 55.1 ± 3.8% BPA: 54.1 ± 3.1%)、Tbr2陽性の中間前駆細胞の数が明らかに減少した(E, 対照: 6.12 ± 0.24% BPA: 5.46 ± 0.32% P < 0.05)。Scale bar = 200 μm

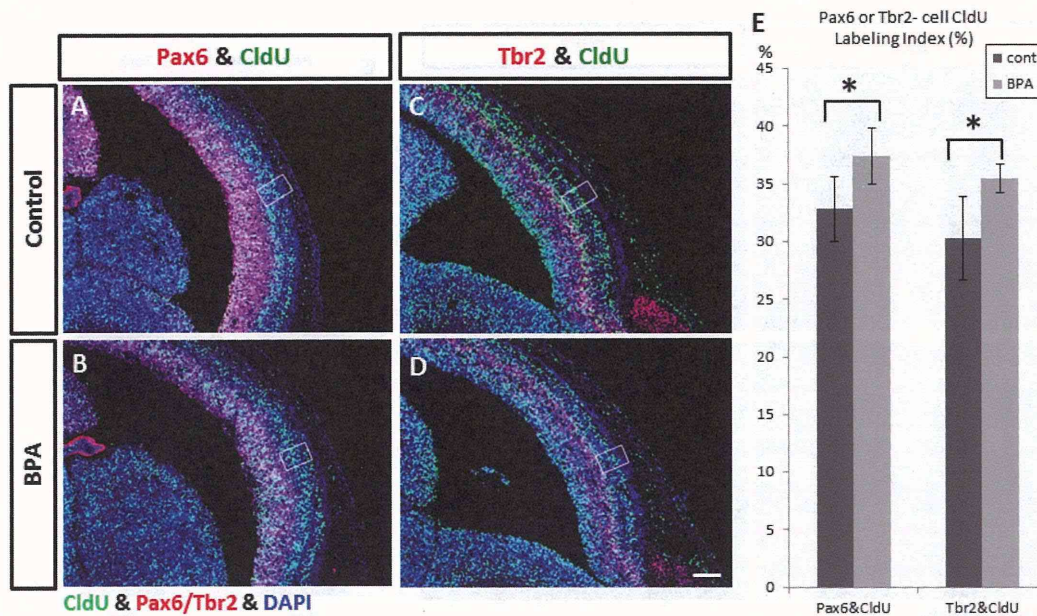


図5. BPAの胎児期暴露は中間前駆細胞と放射状グリアの分化を促進する

RGCとIPCの分化について解析するために、サンプリングの24時間前にCldUを投与し、E14の胎児終脳の矢状断切片に対してanti-Pax6とanti-CldU (A, B)、anti-Tbr2とanti-CldU (C, D)の二重染色を行った。RGCから分化した細胞はCldU陽性かつPax6陰性で緑色に染色された細胞、IPCから分化した細胞はCldU陽性かつTbr2陰性で緑色に染色された細胞として区別することができる。陽性細胞の数を100 μmの幅(白枠)でSVZ(RGCの場合)とSVZの上層で定量したところ、RGCにおいても(E 対照:32.8±2.89% BPA:37.4±2.4% P<0.01)、IPCにおいても(E 対照:30.3±3.7% BPA:35.7±1.2% P<0.01)増加した。Scale bar=200 μm

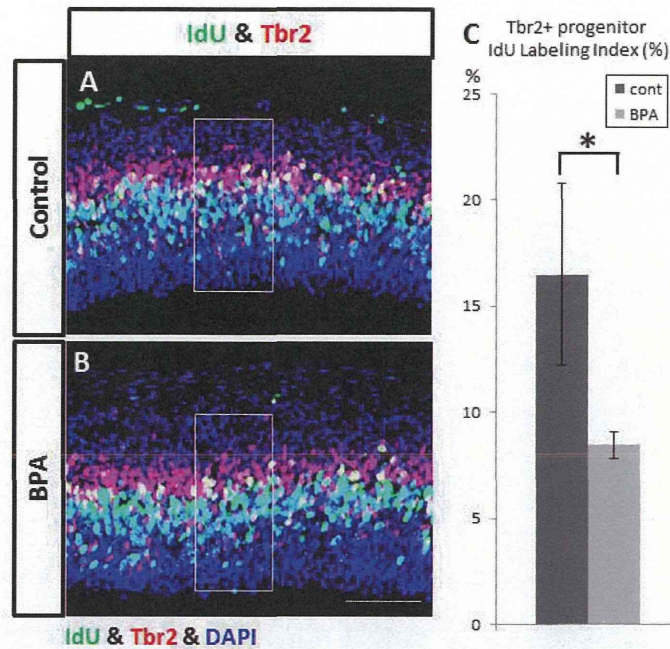


図6. BPAの胎児期暴露は中間前駆細胞の細胞周期を延長する

IPCの細胞周期の長さについて解析するために、サンプリングの1時間前にIdUを投与し、E14の胎児終脳の矢状断切片に対して、anti-Tbr2とanti-IdU (A, B)の二重染色を行った。IPCの細胞周期の長さはTbr2陽性細胞におけるIdUとTbr2の共発現している細胞の割合で比較することができる。この割合が小さくなるほど細胞周期は長くなっていることを示す。陽性細胞の数を100 μm の幅(白枠)で定量したところ、BPA投与群において細胞周期が長くなっていることが明らかになった(C 対照: $16.5 \pm 4.3\%$ BPA: $8.4 \pm 0.6\%$ $P < 0.01$)。Scale bar=200 μm

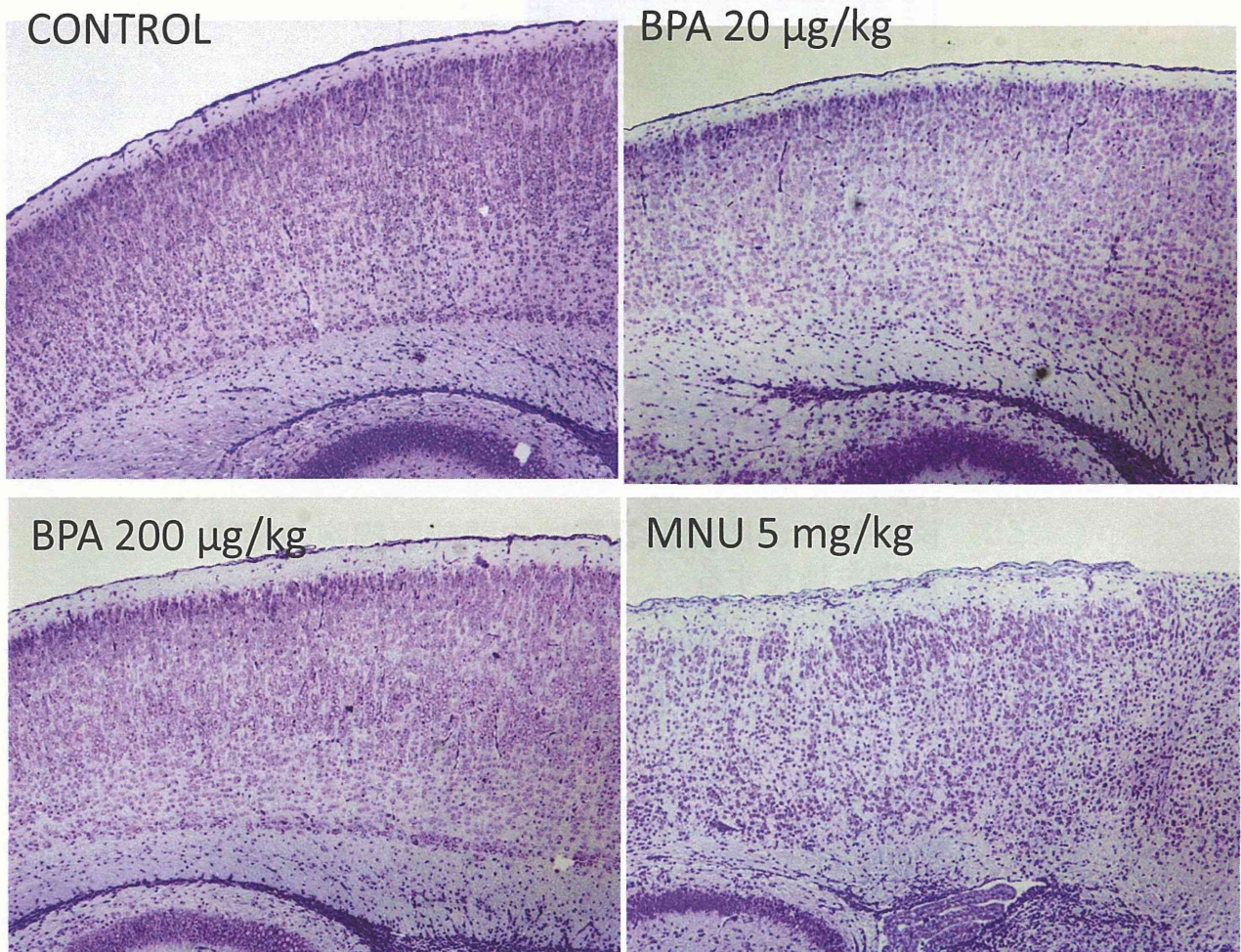


図7. 胎児期BPA投与による生後3日新生児の脳皮質(Nissl染色)
BPA 200 μg/kg投与群において脳皮質層第6b層の低形成が観察された。

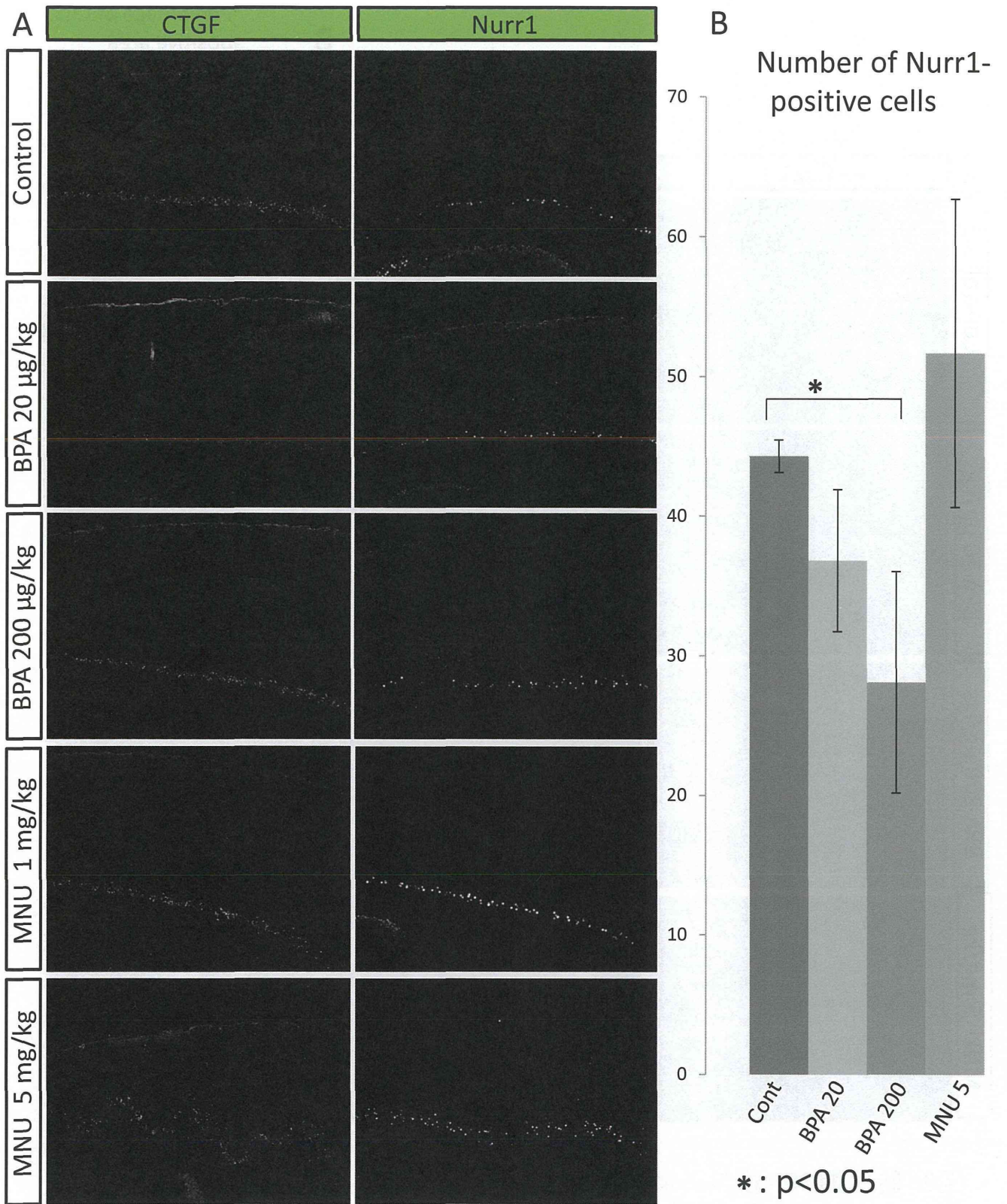


図8. 胎児期BPA投与による生後3日新生児のlayer markerによる大脳皮質解析 (CTGF, Nurr1)

BPA 200 µg/kg投与群においてNurr1陽性細胞が有意に減少した。

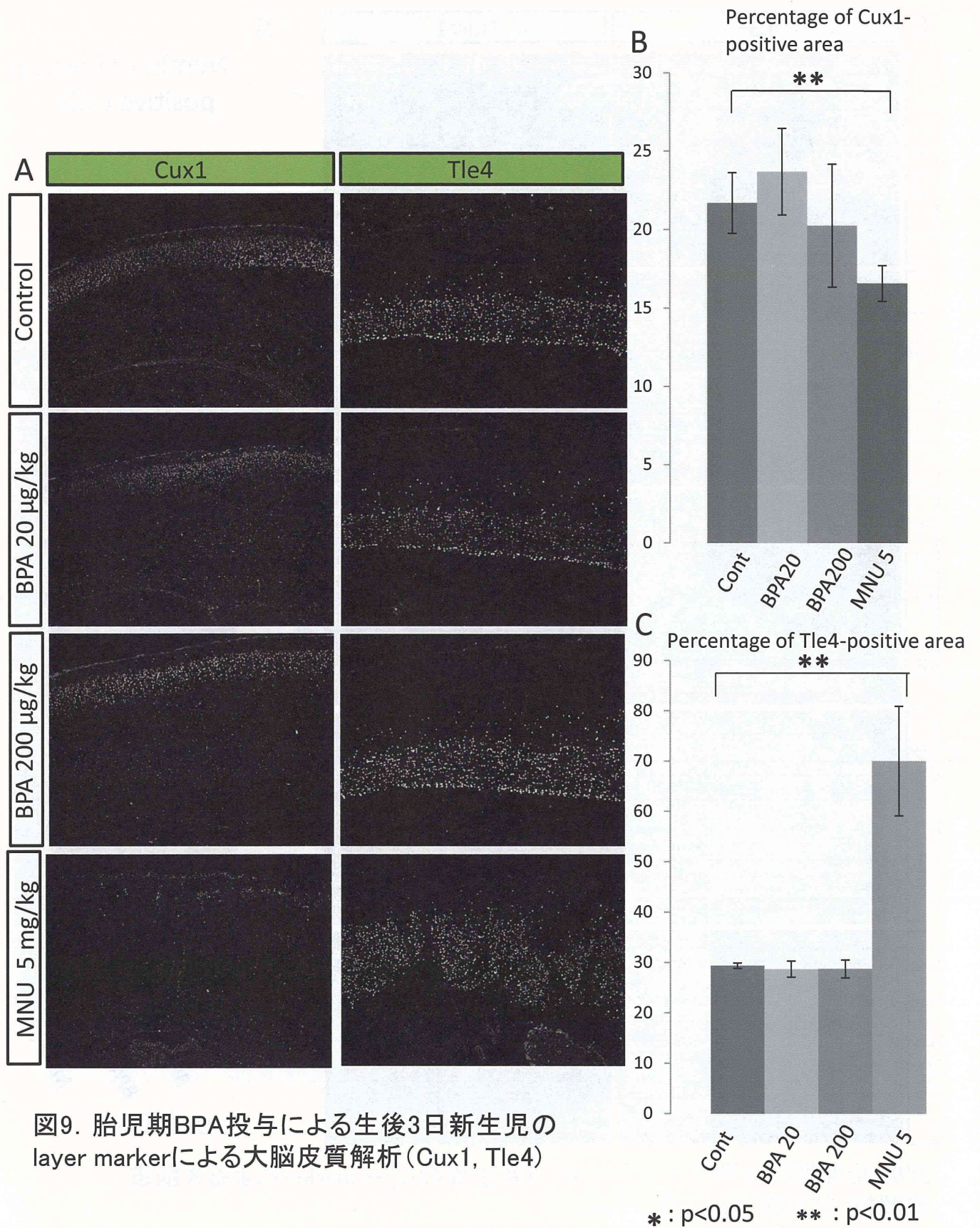


図9. 胎児期BPA投与による生後3日新生児の layer markerによる大脳皮質解析 (Cux1, Tle4)

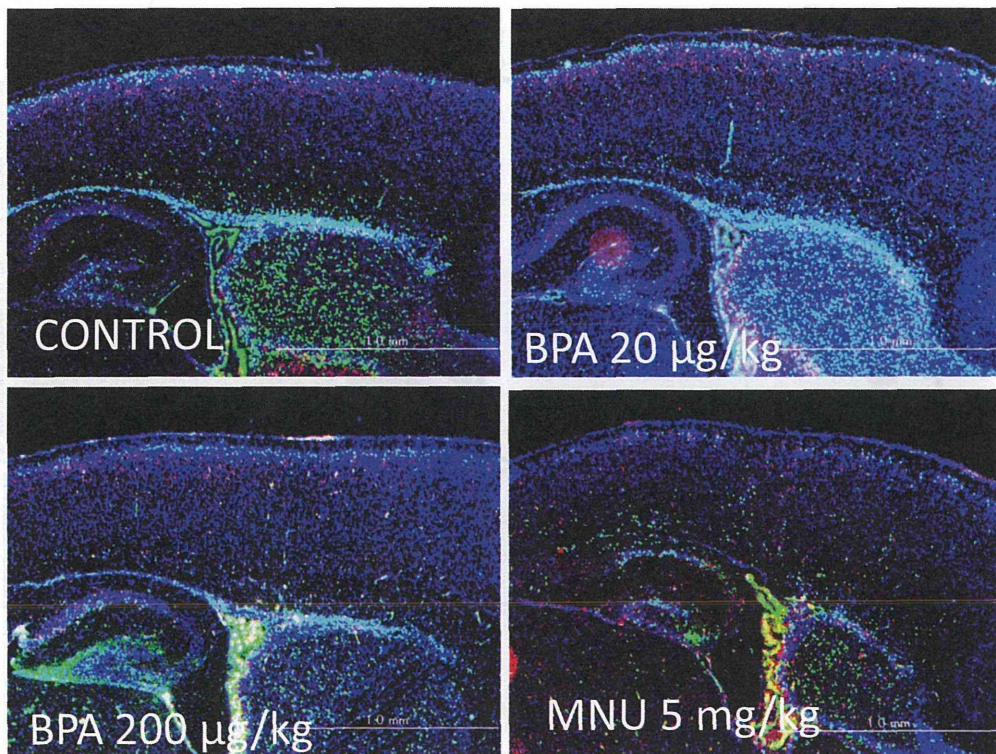


図10. E14及びE16生まれの神経細胞の生後3日新生児の
 大脳皮質における分布

Birth-date analysisにより胎児期生まれの神経細胞を追跡し、対照群及び
 BPA投与群では神経細胞の分布にinside-out patternを確認した。MNU投与
 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。

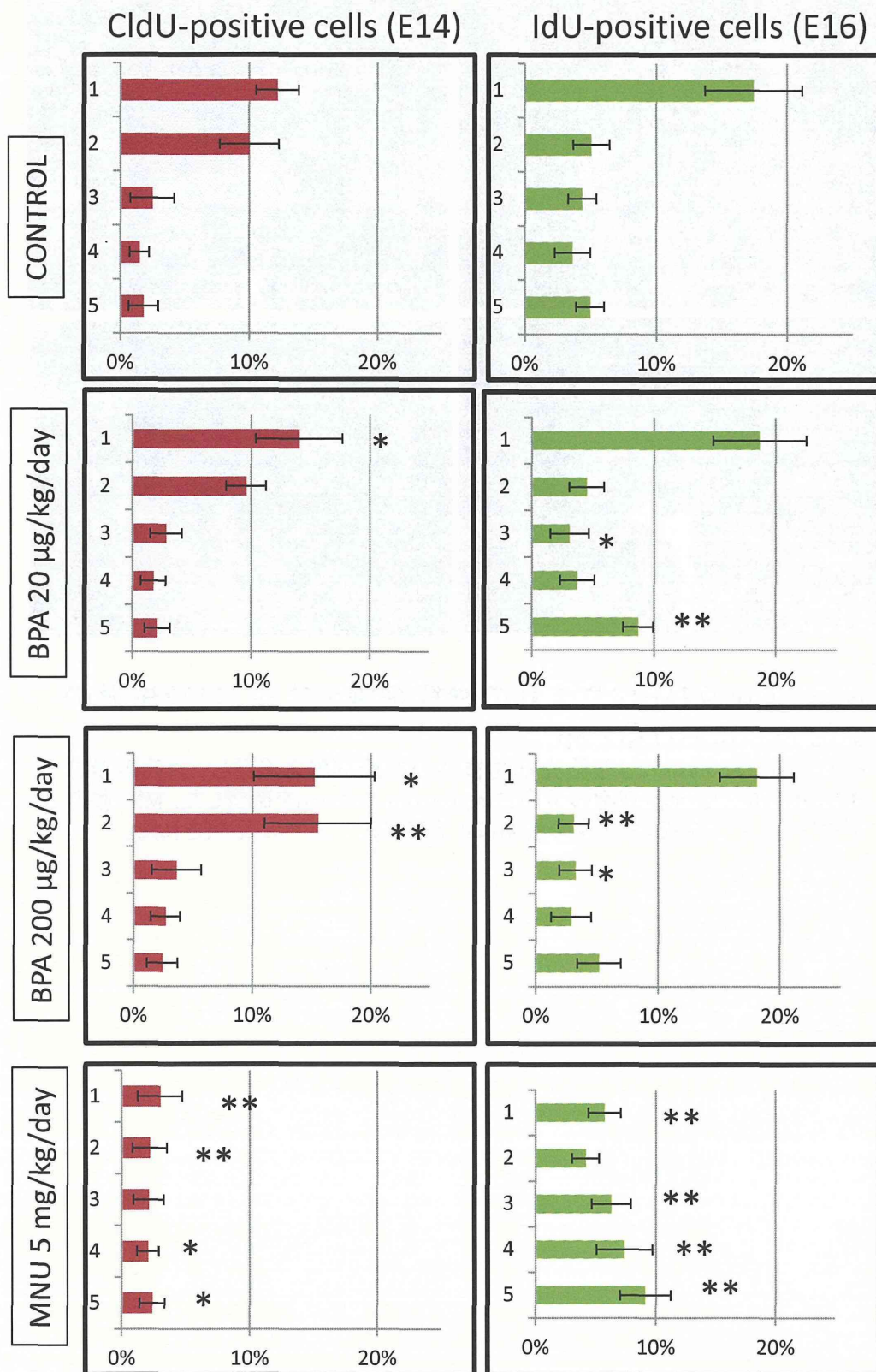


図11. Birth-date analysisによる神経細胞の分布

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。

CldU-positive cells(G14) IdU-positive cells(E16)

Total no of cells

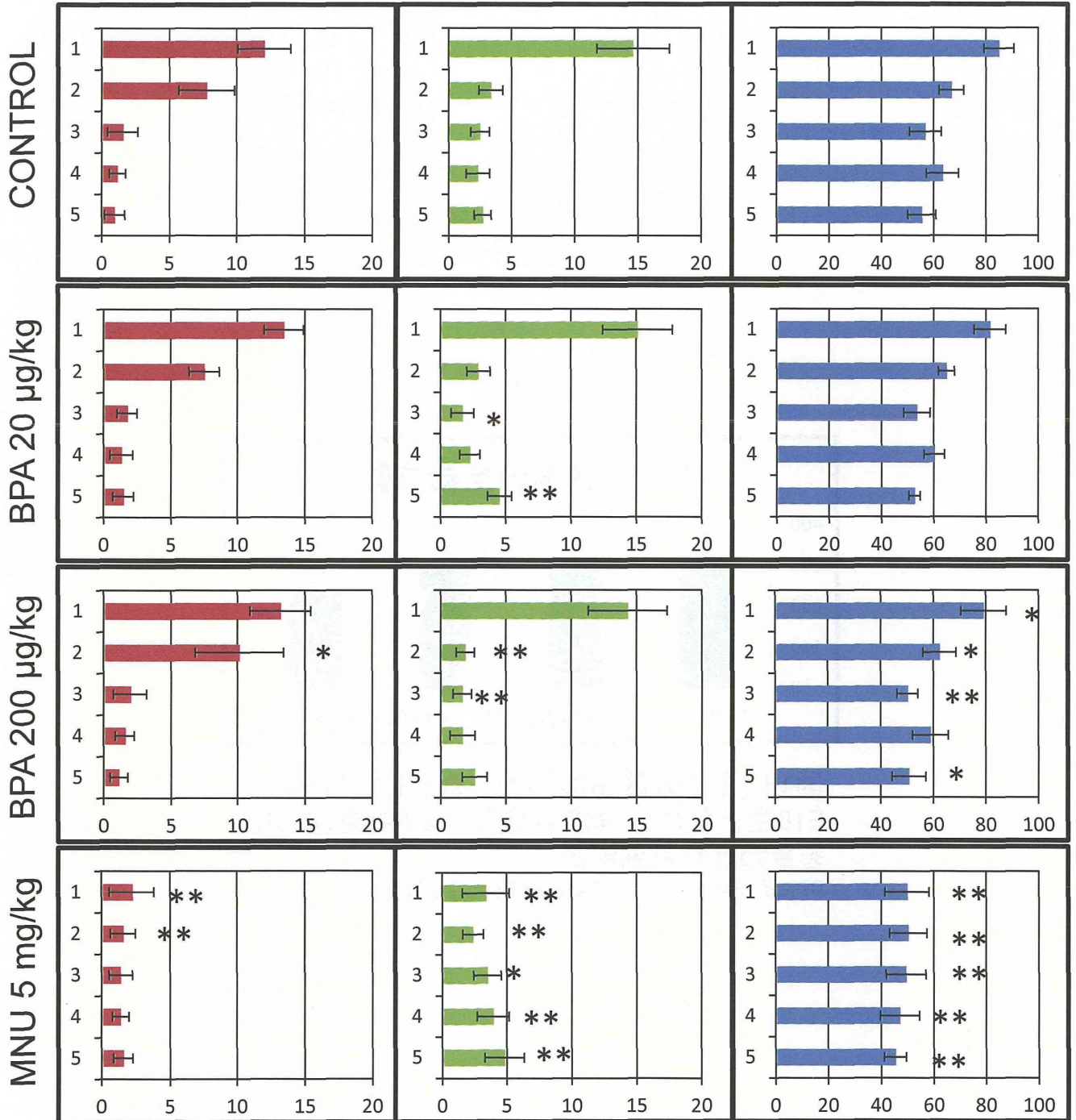


図12. Birth-date analysisを用いたE14あるいはE16生まれの各区画の神経細胞数

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)。