

図13. 全ての区画の細胞を合計したE14及びE16生まれの全神経細胞及びDAPI染色細胞を合わせた総細胞数
BPA及びMNU投与群の全細胞数が減少した。

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 23～25 年度) 総合研究報告書

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、株細胞であるラット PC12 細胞の神経分化モデル、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を検討した。ビスフェノール A およびノニルフェノールを nM オーダーで 1 週間曝露したとき、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。同様の処理を PC12 細胞にした場合では、神経成長因子による分化が抑制された。したがって、化学物質の神経分化に対する影響は細胞種により異なることが示唆された。一方、ビスフェノール A およびノニルフェノールの 3T3 線維芽細胞への曝露は、細胞の酸化ストレスに対する抵抗性を増加させるとともに、bc1-2 の発現を上昇させた。両化学物質は nM オーダーで 3 種類の細胞に共通して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) の大脳皮質、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増殖評価実験

7 日間培養したマウス神経上皮細胞塊にブロモデオキシウリジン溶液 (BrdU、ロッシュ) を 1/500 量添加し、さらに 4 時間培養した。神経上皮細胞を回収し 1%B27 を含む 250 μ l の Opti-MEM 中で 200 μ l ピペットチップを用いて分散した。あらかじめポリリジンコートした 96 穴プレートに 1 穴当たり 1 μ l の細胞分散液を加え、1%B27 サプリメントを含む Opti-MEM 中で 2 時間培養し細胞を接着させた。2 M 塩酸を含む 70%エタノールで細胞を固定し、抗 BrdU 抗体を用いた ELISA (ロッシュ) により DNA への BrdU 取込み量を定量した。細胞分散液 100 μ l から回収された全 DNA 量を用いて、BrdU 取込み量を標準化した。

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) およびラット副腎髄質クロム親和性腫瘍細胞 (PC12) を用いた。3T3 細胞は 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。PC12 細胞は 10%FCS および 5%ウマ血清を含む D-MEM 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。

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 12 mm 径のカバーガラスに約 1,000 個/400 μ l の細胞濃度で播種した。翌日、無血清 D-MEM で 1 回洗浄し、100 ng/ml

の神経成長因子 (2.5S NGF、アロモネ) を含む無血清 D-MEM でさらに 3 日間培養した。細胞をフォルマリンで固定し、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。実験は 1 濃度につき 2 サンプルで行い、同じ実験を 3 回以上実施した。

細胞増殖評価実験

化学物質を曝露した 3T3 線維芽細胞を 96 穴プレートに 1 穴当たり約 1,000 個/100 μ l の細胞濃度で播種し、2 日間培養した。細胞数は Cell counting kit-8 (CCK-8、同人化学) を用いて測定した。培養翌日の細胞数を 100% としてその後の細胞数を相対的に表した。実験は 1 濃度につき 3 サンプル以上で行い、同じ実験を 3 回実施した。

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 1 穴当たり約 1,000 個/100 μ l の細胞濃度で播種した。あるいは 48 穴プレートを用いた場合は約 3,000 個/150 μ l で播種した。翌日、無血清 D-MEM で細胞を洗浄し、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 CCK-8 を用いて測定した。実験は 1 濃度につき 3 サンプル以上で行い、同じ実験を 3 回以上実施した。

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 x g 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。以下に記した GPR30 過剰発現細胞株を用いた場合は、

細胞膜を調製した。細胞を TE 緩衝液 (20 mM トリス、1 mM EDTA) 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、沈殿を細胞膜画分として SDS 電気泳動に使用した。泳動終了後、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、抗ホスホ Erk1/2 抗体、抗 Erk1/2 抗体 (いずれも BD バイオサイエンス)、抗 Bcl-2 抗体 (Santa Cruz)、抗メチル化ヒストン H3 (Lys9) (MAB Institute)、抗 DYKDDDDK 抗体 (和光純薬)、抗 α -Tubulin 抗体 (DM1A、BioCarta) 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 (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。

GPR30 過剰発現細胞株の作成

マウス GPR30cDNA をマウス大脳皮質 RNA より RT-PCR にて単離し、pFLAG-CMV1 ベクターに挿入した。続いて、FLAG-GPR30 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。

[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。

RT-PCR

細胞からの全 RNA の抽出には Tri Reagent (シグマ) を用いた。全 RNA (1 μ g) を DNase (インビトロジェン) で処理し、続いて oligo-d(T) プライマーおよび Reverse Transcriptase (ロッシュ) を用いて cDNA を作製した。cDNA はミリ Q 水を添加し全量 80 μ l とし、そのうち 1.25 μ l を PCR に使用した。使用したプライマーは表 1 のとおりである。遺伝子の増幅には GoTaq DNA ポリメラーゼ (プロメガ) を用いた。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。増幅された遺伝子産物を 1.5% のアガロース電気泳動により分離し、臭化エチジウムにより可視化した。

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

マウス大脳皮質神経上皮細胞の増殖に対する化学物質曝露の効果

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 (図 1)。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。そこで本研究では、まず最初にビスフ

ェノール A の神経上皮細胞の自己増殖に対する作用を検討した。

胎令 13 日のマウス大脳を分散単離し、bFGF とともに 10 pM~100 nM のビスフェノール A 存在下で 1 週間培養した。培養最終日に BrdU を取込ませ DNA への BrdU 取込み量を比較したところ、化学物質非添加のコントロール細胞と比べて、いずれの濃度のビスフェノール A も BrdU 取込み量に影響を及ぼさなかった (図 2)。10 nM のノニルフェノールもまた無作用であった。これらのことから、今回検討した濃度ならびに曝露期間では神経上皮細胞の自己増殖能に影響しないことが示された。

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

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。100 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 β -Tub3 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、明確な濃度依存性は見られないものの、1 および 100 nM において神経分化促進作用が認められた (図 3A)。また、10 nM のノニルフェノールも同程度の神経分化促進作用を示した。

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を調べた。 β -Tub3 は神経分化直後から発現する分子であり、幼弱な神経細胞の同定のためにも広く用いられる。 β -Tub3 陽性細胞の割合は神経上皮細胞をビスフェノール A に 1 週間曝露した翌日にはすでに増加していた (図 3B)。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細胞（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 4A）。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細胞前駆細胞（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 4B）。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。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（図 5）。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。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、今回その同定は行わなかった。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 6）。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。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 7A）。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。

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 7B）。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。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 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。ビスフェノール A またはノニルフェノール存在下で PC12 細胞を NGF

により神経分化させると、神経突起伸長の抑制が生じることが報告されている。我々もビスフェノール A およびノニルフェノールを用いて同様の検討を行ったところ、両者が PC12 細胞の神経分化を抑制する結果を得た (図 8)。このことはビスフェノール A が NGF シグナル経路に抑制的に作用していることを示唆しているが、それが直接的なのか二次的に作用しているのかは不明である。

この点を検討するために、PC12 細胞をビスフェノール A で曝露した後、ビスフェノール A 非存在下で NGF を添加し、神経分化に対する影響が生じるかどうかを調べた。ビスフェノール A を 5 μM の濃度で 3 日間前処理したところ、NGF と同時投与したときと同様に PC12 細胞の神経分化の抑制が認められた (図 9)。さらに低濃度長期曝露の作用を検討するために、PC12 細胞を 100 pM~100 nM のビスフェノール A で 1 ヶ月曝露した。この細胞に NGF を加えて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した (図 10A、B)。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ても、神経分化の抑制が認められた (図 10C)。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 10D)。同様の神経分化抑制は 100 pM~100 nM のノニルフェノールを処理した細胞においても生じた (図 11)。興味あることに、1 週間の曝露後に 1 週間の休業期間に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 12)。このことは化学物質曝露により PC12 細胞内において神経分化抑制に関わる機構が長期的に、少なくとも 1 週間は持続していることを示唆している。ビスフェノール A やその他の化学物質がエピジェネティックな遺伝子発現効果を生じることが示されているため、今後この点を明らかにする必要があると言える。

化学物質による神経分化の抑制が PC12 細胞の NGF に対する細胞内情報伝達経路の活動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 13)。

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。1 nM のビスフェノール A、10 nM のノニルフェノールで 1 ヶ月曝露した 3T3 線維芽細胞の増殖は、曝露しなかったコントロール細胞のそれとほぼ同程度であった (図 14A)。また、いずれの化学物質で曝露しても、細胞形態にコントロールと差異はなく、さらに、接触阻害の消失やコロニー形成などの形質変化も見られなかった (図 14B)。

酸化ストレスによる細胞死に対してビスフェノール A の長期曝露がどのような影響を及ぼすのかを調べた。酸化ストレスの誘発は過酸化水素の添加により行った。過酸化水素は広く使用されているラジカル発生源であり、これで細胞を処理するとミトコンドリアの傷害、細胞膜脂質の過酸化、DNA の切断などが生じ、最終的に細胞死に至る。血清存在下では過酸化水素の作用が十分に現れないため、無血清下で実験を行った。まず用いる過酸化水素の濃度を定めるため、無血清培地で培養した 3T3 線維芽細胞に 3~300 μM の過酸化水素を添加し細胞死の程度を調べた。濃度に依存した細胞死が認められ、その時の EC₅₀ 値は 30 μM であった (図 15)。0.1~100 nM のビスフェノール A で 1 ヶ月曝露した 3T3 線維芽細胞を 30 μM の過酸化水素で処理をしたとき、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 (図 16A)。1~100 nM のノニルフェノールで曝露した 3T3 線維芽細胞においても過酸化水素誘発細胞死に対する抵抗性が観察された (図 16B)。これに対してビスフェノール A の 1 日曝露ではそのような酸化ストレス抵抗性が観察されなかった (図 16C)。

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。これらのことから、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 Bcl-2 の発現が上昇しているかどうかを調べた。1 ヶ月の曝露後、Bcl-2 の発現をウエ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 17)。

続いて、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 18)。一般に、ヒストンメチル化は転写抑制に関与していることから、Bcl-2 の発現抑制に関わっている可能性が考えられる。以上のことから、ビスフェノールやノニルフェノールがヒストンメチル化を変動させ、Bcl-2 の発現を調節し、酸化ストレスに対する抵抗性を変化させていることが考えられる。

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受容体およびエストロゲン受容体関連受容体遺伝子の発現

ビスフェノール A やノニルフェノールの標的分子としてエストロゲン受容体 (ER α 、ER β および GPR30) およびエストロゲン受容体関連受容体 (ERR γ) が知られている。本研究で使用した大脳皮質神経上皮細胞、PC12 細胞、3T3 線維芽細胞において、これらの遺伝子が発現しているかどうかを RT-PCR により調べた。

まず、エストロゲン受容体遺伝子 (Esr1、Esr2 および Gpr30) の発現を調べた。胎令 13 日大脳皮質において Esr1 の発現が認められたが、7 日間神経上皮細胞を細胞塊で培養すると消失した (図 19)。ビスフェノール A で処理を

した細胞塊においても Esr1 の発現は認められなかった。Esr2 の遺伝子発現もまた同様に 7 日間の培養により消失し、ビスフェノール A は発現に影響しなかった。これに対して Gpr30 の発現は胎令 13 日大脳皮質のみならず 7 日間の細胞塊培養においても維持されており、ビスフェノール A 処理で顕著な発現変動も認められなかった。PC12 細胞では Esr2 および Gpr30 の発現が認められた (図 19)。3T3 線維芽細胞では、Esr1 および Esr2 のいずれも検出されず、Gpr30 の発現のみ認められた (図 19)。

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、エストロゲン受容体関連受容体 γ (ERR γ) が同定された。ERR には他のアイソフォームとして ERR α および ERR β が知られている。これらがビスフェノール A を結合することは知られていないが、3 種の受容体遺伝子 (それぞれ Esrr α 、Esrr β 、Esrr γ) の発現を RT-PCR により調べた。Esrr のいずれのアイソフォームも、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 19)。PC12 細胞では Esrr α の発現が認められた。3T3 線維芽細胞では、Esrr α および Esrr β の発現が認められた。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。

GPR30 発現細胞の確立と 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、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。上記の結果より、ビスフェノール A が作用を示した 3 種類の細胞には GPR30 が共通して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 を発現する細胞株を作成した。我々の研究室が保有する細胞約 10 種類において内在性 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 細胞の亜株において 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。得られた GPR30 発現 RH7777 細胞は、コントロールベクターを発現する細胞と同様の細胞形態を示した (図 20)。

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。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。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

マウス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を検討した。ビスフェノール A およびノニルフェノールは nM オーダーで神経分化に影響を及ぼすことが示されたが、その作用は細胞種や脳の領域により異なることが示唆された。一方、ビスフェノール A およびノニルフェノールの 3T3 線維芽細胞への曝露は、細胞の酸化ストレスに対する抵抗性を増

加させるとともに、エピヘネティックな遺伝子発現変動を引き起こすこと、bcl-2 の発現を上昇させることが分かった。

本研究においてインビトロ培養モデルが低濃度の化学物質の作用を評価する上で有用であることが示された。しかしながら、その作用機序や標的分子の同定には至らなかった。今後これらの課題を明らかにすることが、より簡便なモデルの確立に役立つと期待される。

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

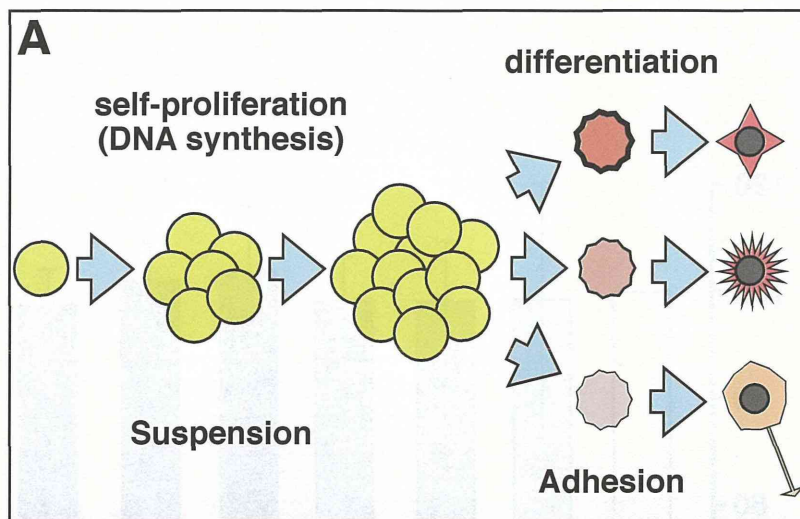


図1 マウス胎仔大脳皮質由来の神経上皮細胞塊の培養
 (A) 神経上皮細胞塊の培養の模式図。神経上皮細胞を浮遊培養することにより細胞塊が形成される。この細胞塊は自己複製能を持つ神経上皮細胞から構成される。これを単一細胞にして接着性基質上で培養すると、神経細胞ならびにグリア細胞に分化する。(B) 胎生13日令マウス大脳皮質の神経上皮細胞を5日間培養して形成された細胞塊の位相差顕微鏡写真。

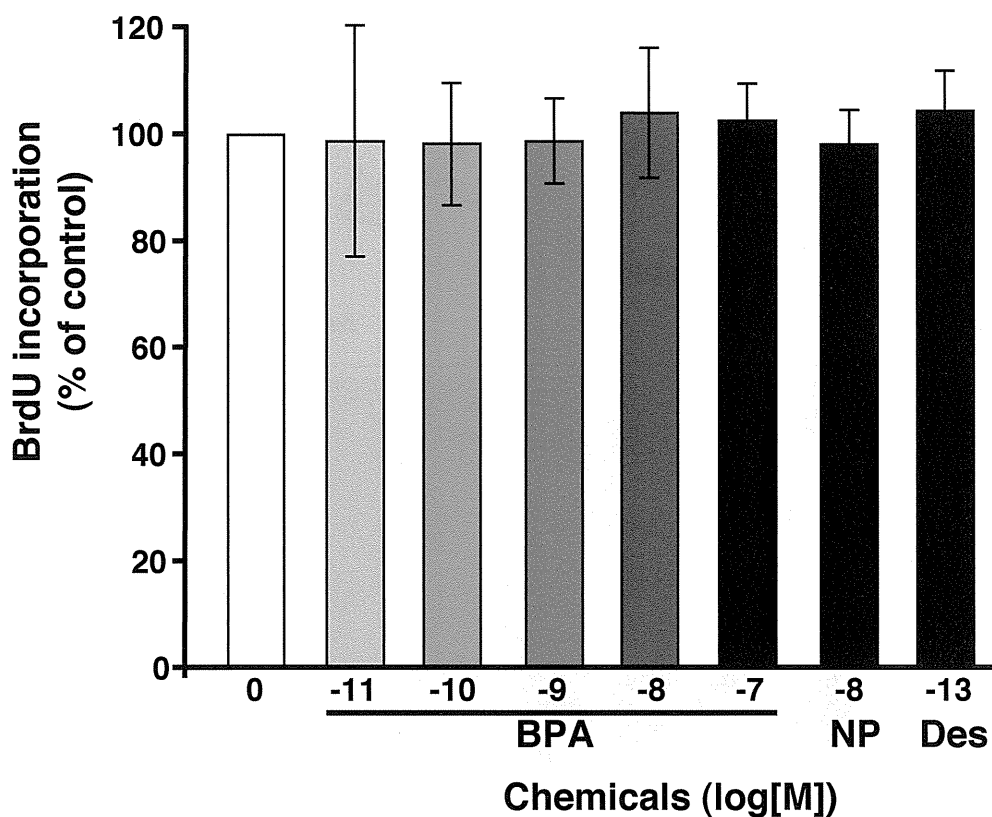
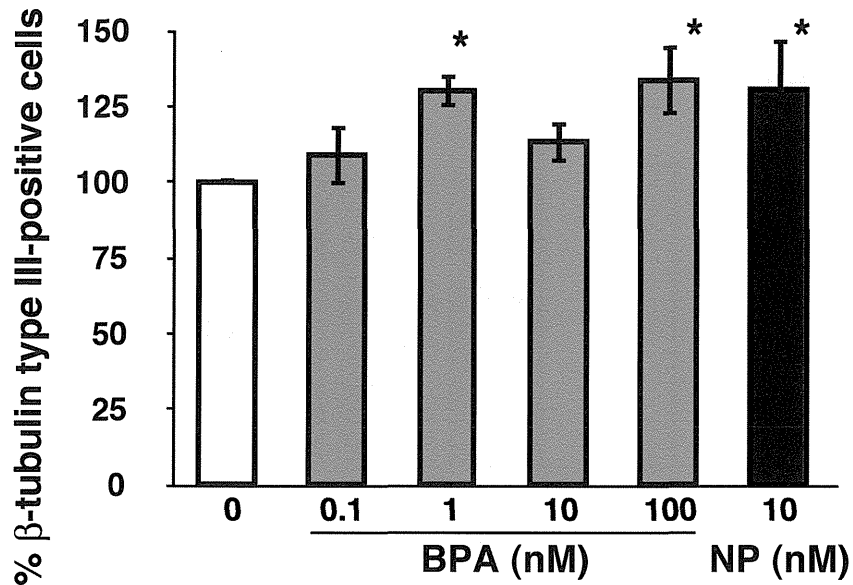


図 2 大脳皮質由来神経上皮細胞におけるブロモデオキシウリジン (BrdU) 取込み。マウス胎仔大脳皮質より神経上皮細胞を調製し、種々の濃度の化学物質 (BPA; ビスフェノール A、NP; ノニルフェノール、DES ; ジエチルスチルベストロール) 存在下で 7 日間培養を行った。培養最終日に BrdU を加え取込み量を測定した。細胞から調製した DNA 量により補正し、化学物質を加えない細胞塊の BrdU 取込み量 / 全 DNA 量を 100% として相対表記した。

(A)



(B)

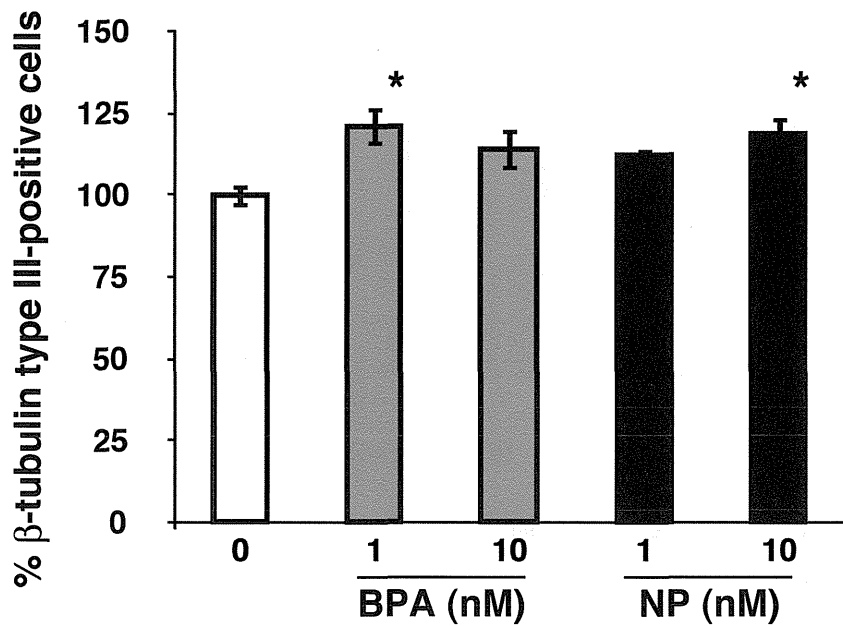


図 3 大脳皮質上皮細胞の神経分化 (A) 大脳皮質上皮細胞を 0.1~100 nM のビスフェノール A (BPA) または 10 nM のノニルフェノール (NP) 存在下で 1 週間培養したのち、単離分散して神経分化を誘導した。7 日後に β tubulin type III 陽性細胞の割合を算出し、コントロールを 100%として表した。コントロールの神経細胞の割合は $36.1 \pm 8.7\%$ であった。結果は 3 例の平均 \pm 標準誤差である。*; $p < 0.05$ vs コントロール (B) 大脳皮質上皮細胞を 1 または 10 nM のビスフェノール A (BPA)、1 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

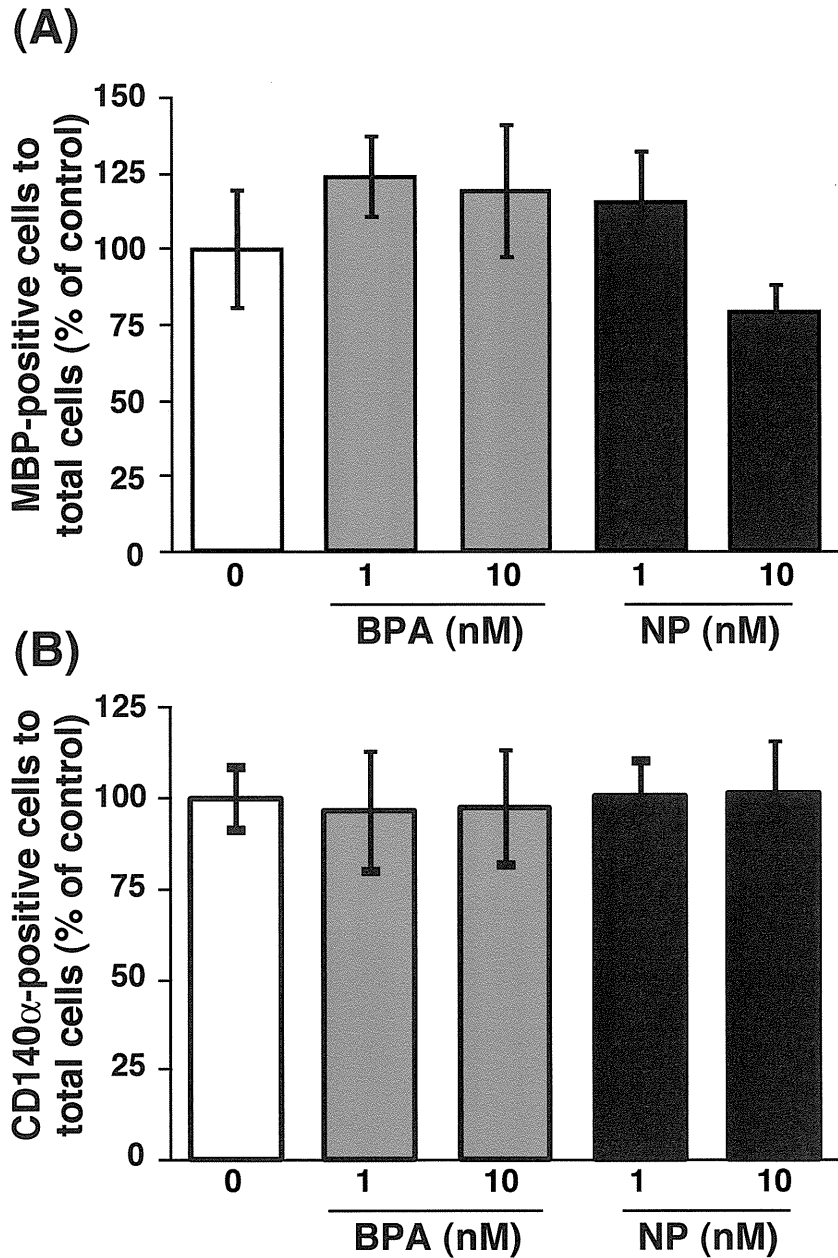
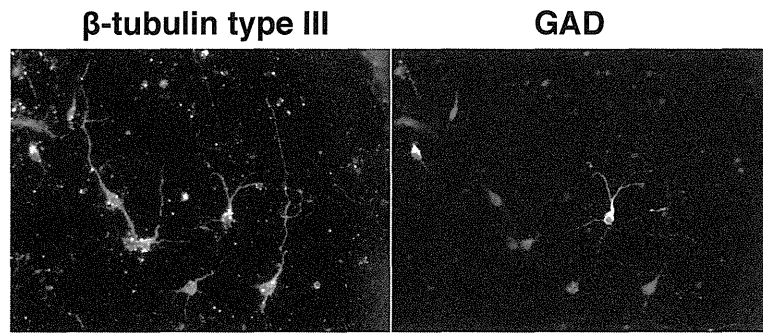


図 4 大脳皮質上皮細胞のグリア分化 (A) 大脳皮質上皮細胞を 1 または 10 nM のビスフェノール A (BPA) または 1 または 10 nM ノニルフェノール (NP) 存在下で 1 週間培養したのち、単離分散して細胞分化を誘導した。1 週間培養後、全細胞に対する myelin basoc protein (MBP) 陽性細胞の割合を算出し、コントロールを 100%として表した。コントロールでは MBP 陽性細胞の割合は $3.9 \pm 0.8\%$ であった。結果は 3 例の平均 \pm 標準誤差である。(B) 大脳皮質上皮細胞を 1 または 10 nM のビスフェノール A (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)

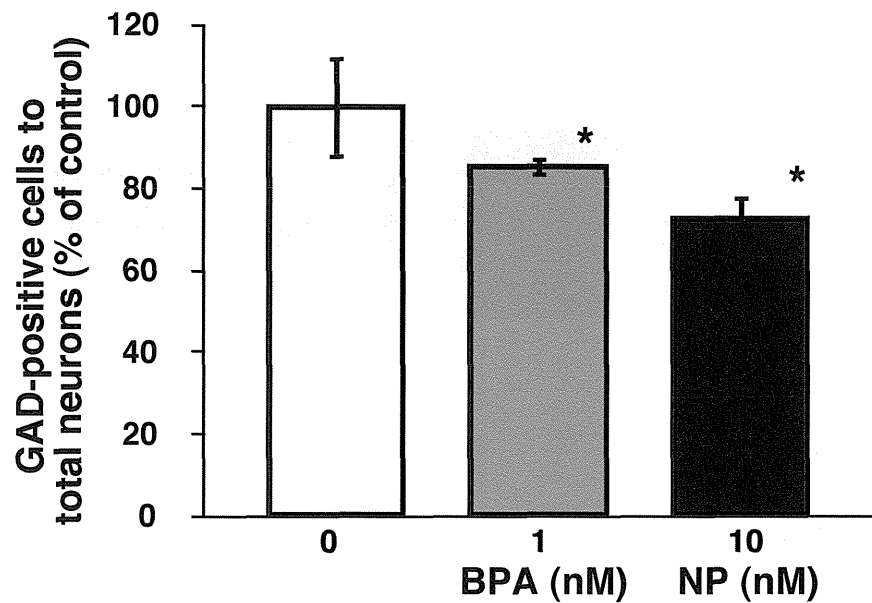


図 5 大脳皮質上皮細胞の GABA 神経への分化 (A) β -tubulin type III と GAD の二重蛍光免疫染色像 (B) GABA 神経への分化に対する作用 大脳皮質上皮細胞を 1 nM のビスフェノール A (BPA) または 10 nM のノニルフェノール (NP) 存在下で 1 週間培養したのち、単離分散して神経分化を誘導した。7 日後に全神経細胞に対するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 陽性細胞の割合を算出し、コントロールを 100% として表した。コントロールでは GABA 神経の割合は $33.6 \pm 4.2\%$ であった。結果は 4 例の平均 \pm 標準誤差である。

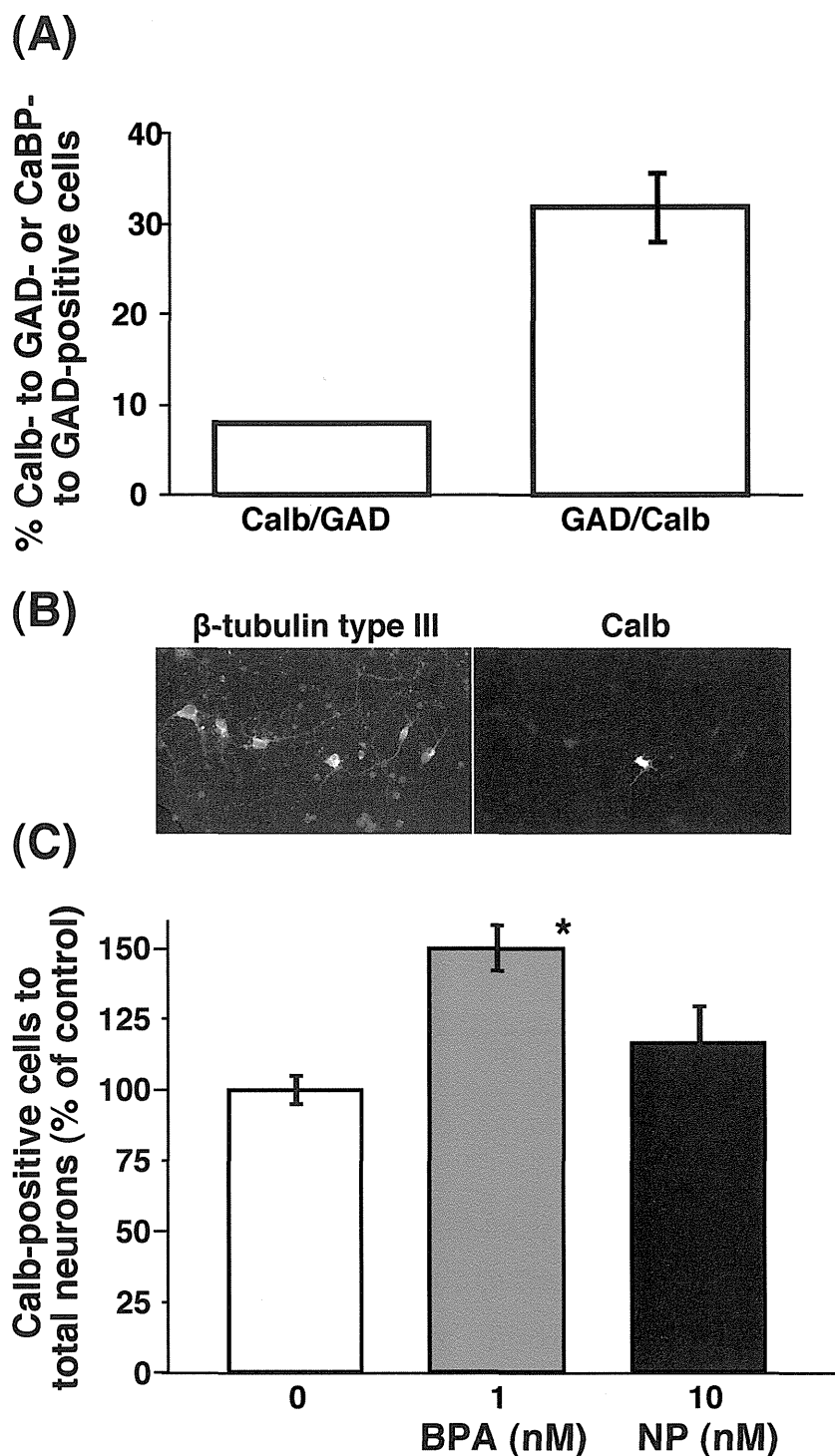


図 6 大脳皮質上皮細胞のカルビンジン神経への分化 (A) 神経細胞のカルビンジン (Calb) およびグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 陽性細胞の割合 大脳皮質上皮細胞を 1 週間培養したのち、単離分散して神経分化を誘導した。7 日後に GAD 陽性神経細胞に対する Calb 陽性細胞の割合、および Calb 陽性細胞に対する GAD 陽性細胞の割合を算出した。結果は 3 サンプルの平均 \pm 標準偏差である。(B) β -tubulin type III と Calb の二重蛍光免疫染色像 (C) 大脳皮質上皮細胞を 1 nM のビスフェノール A (BPA) または 10 nM のノニルフェノール (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。

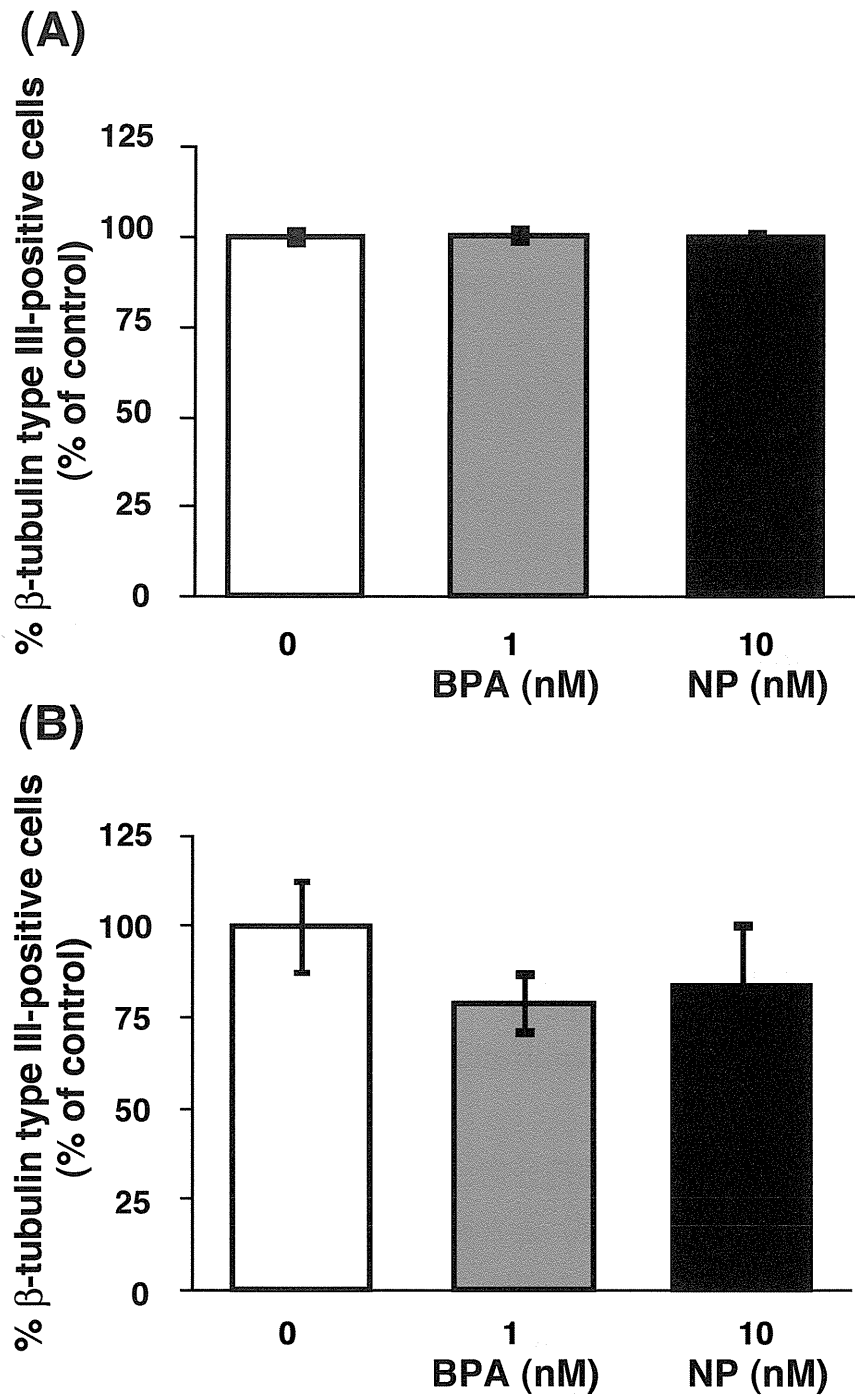


図 7 線条体および中脳上皮細胞の神経分化 (A、B) 線条体 (A) または中脳 (B) 由来上皮細胞を 1 nM のビスフェノール A (BPA) または 10 nM のノニルフェノール (NP) 存在下で 1 週間培養したのち、単離分散して神経分化を誘導した。7 日後に全細胞に対する神経細胞の割合を算出し、コントロールを 100%として表した。線条体および中脳における神経細胞の割合はそれぞれ 89.6 ± 1.6 および $15.0 \pm 2.0\%$ であった。結果は 3 または 4 例の平均 \pm 標準誤差である。

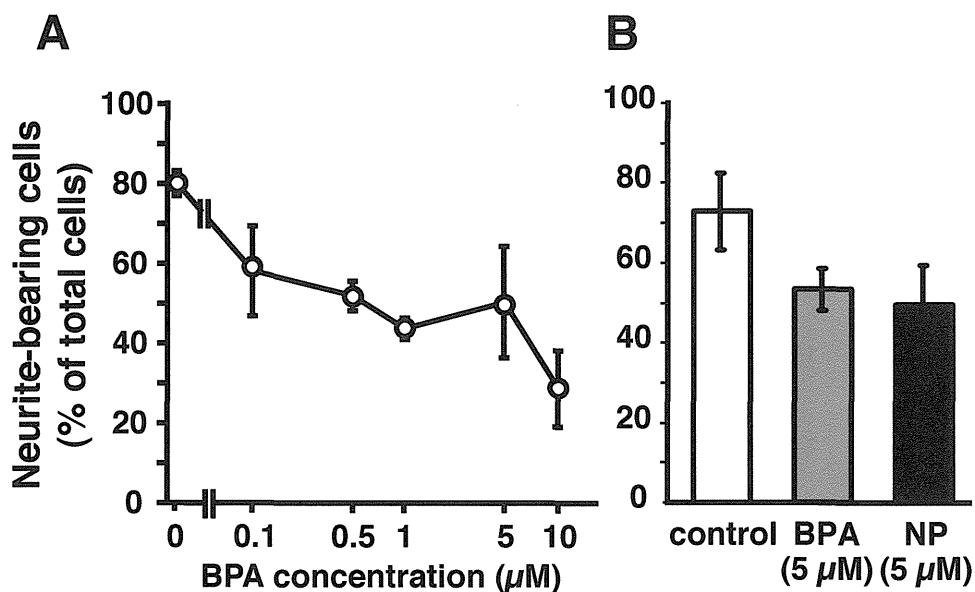


図 8 PC12 細胞の神経分化 (A) PC12 細胞に 0.1~10 μM のビスフェノール A (BPA) とともに NGF を添加し神経分化を誘導した。(B) PC12 細胞に BPA (5 μM) またはノニルフェノール (NP、5 μM) とともに NGF を添加し神経分化を誘導した。細胞体よりも長い神経突起を有する細胞を数え、全細胞に対する割合を算出した。1 回の実験について 2 例ずつ行い、それぞれで 100~150 個の細胞について調べた。この実験を 3 回繰り返し、平均 \pm 標準誤差として表した。

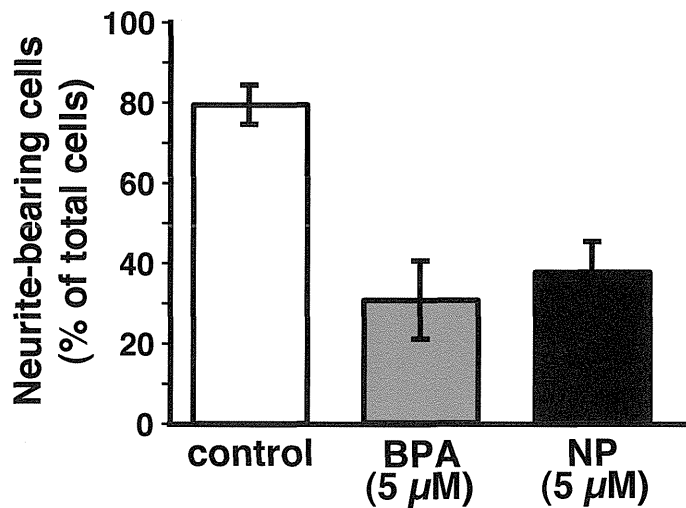
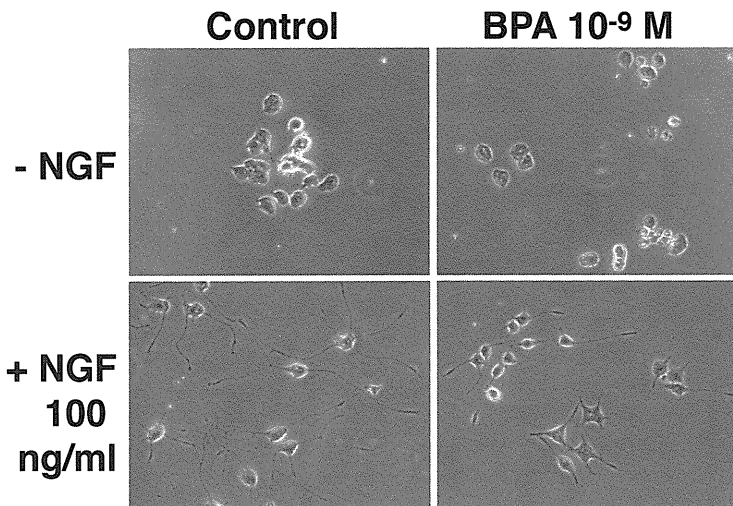
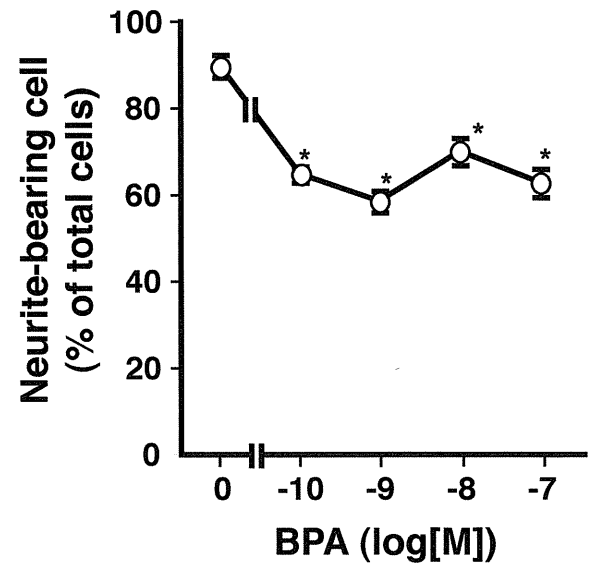


図 9 PC12 細胞の神経分化 PC12 細胞をビスフェノール (BPA) またはノニルフェノール (NP) 存在下で 3 日間培養したのち、無血清培地にて NGF により神経分化を誘導した。細胞体よりも長い神経突起を有する細胞を数え、全細胞に対する割合を算出した。1 回の実験について 2 例ずつ行い、それぞれで 100 ~150 個の細胞について調べた。この実験を 3 回繰り返し、平均 ± 標準誤差として表した。

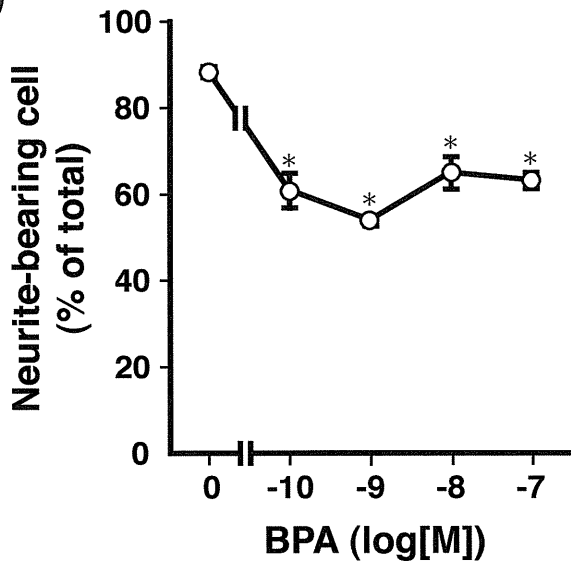
(A)



(B)



(C)



(D)

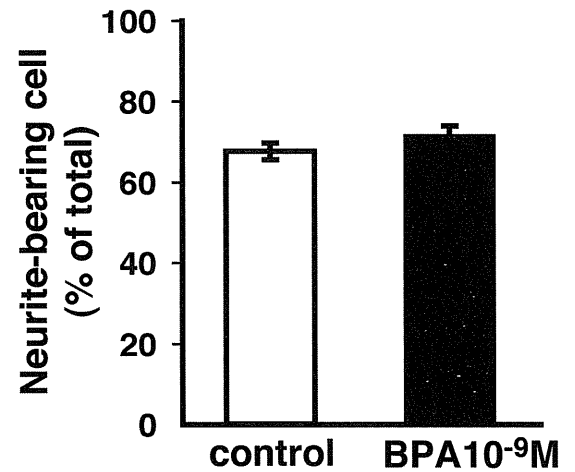


図 10 (A) PC12 細胞の細胞形態 PC12 細胞をビスフェノール A (BPA) 存在下で 1 ヶ月間培養したのち、無血清培地にて NGF 存在下あるいは非存在下でさらに 3 日間培養した。(B~D) PC12 細胞の神経分化に対するビスフェノール A の作用 PC12 細胞を 0.1~10 nM のビスフェノール A (BPA) 存在下で 1 ヶ月間 (B) または 1 週間 (C) 培養したのち、無血清培地にて NGF により神経分化を誘導した。あるいは 1 nM の BPA で 1 日間培養し、神経分化を誘導した。細胞体よりも長い神経突起を有する細胞を数え、全細胞に対する割合を算出した。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 ± 標準誤差として表した。*; $p < 0.05$ vs コントロール。

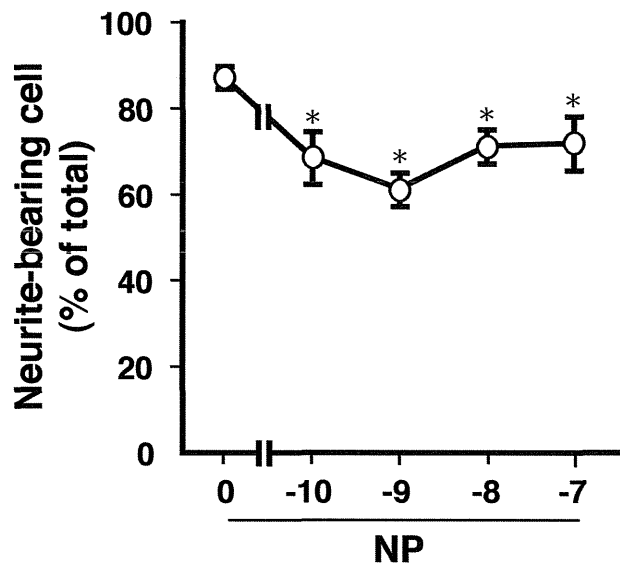


図 11 PC12 細胞の神経分化 PC12 細胞を 0.1~10 nM のノニルフェノール (NP) で 1 週間培養したのち、無血清培地にて NGF により神経分化を誘導した。細胞体よりも長い神経突起を有する細胞を数え、全細胞に対する割合を算出した。1 回の実験について 2 例ずつ行い、それぞれで 100~150 個の細胞について調べた。この実験を 3 回繰り返し、平均 ± 標準誤差として表した。*;p<0.05 vs コントロール。