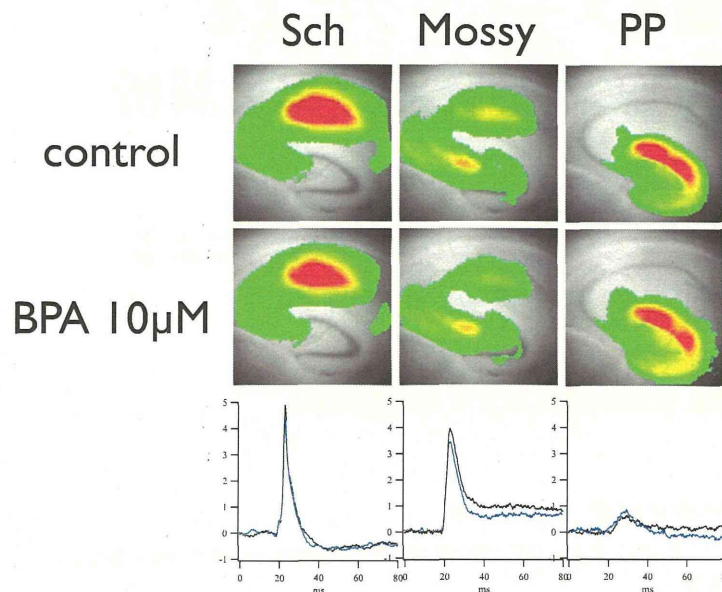
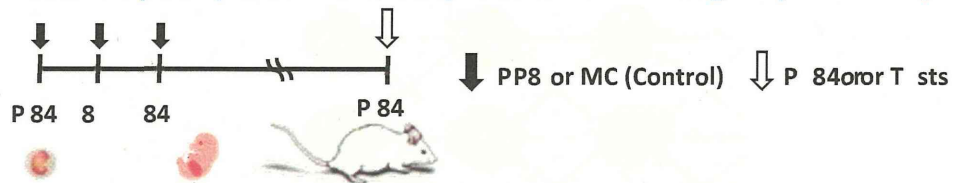


幼若動物(2週令)でのBPAの急性影響

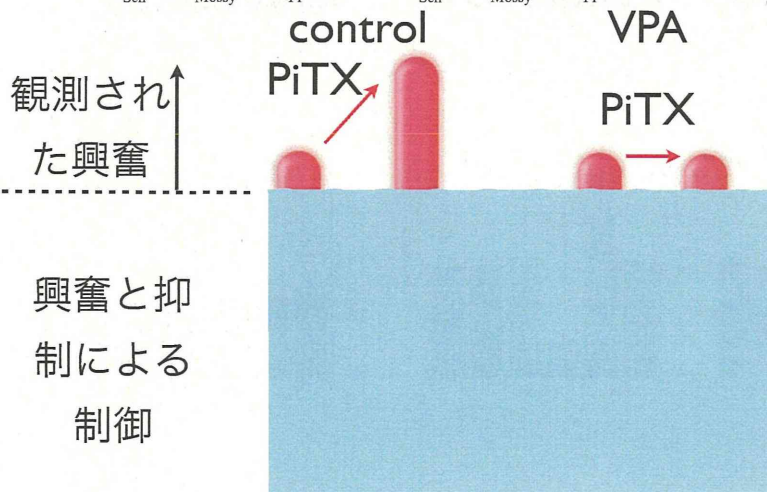
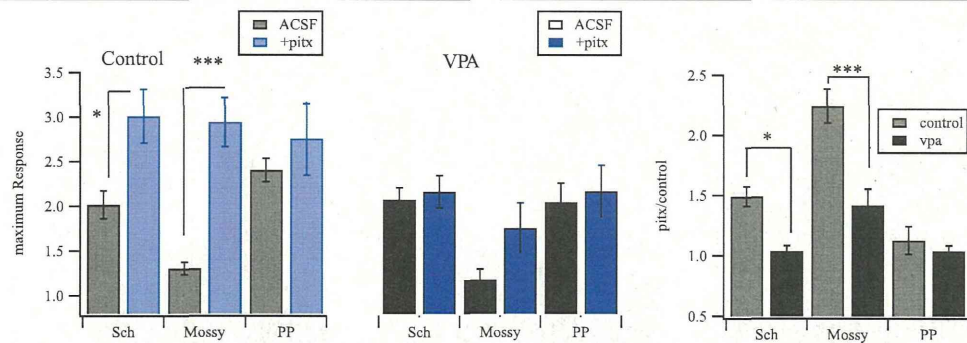
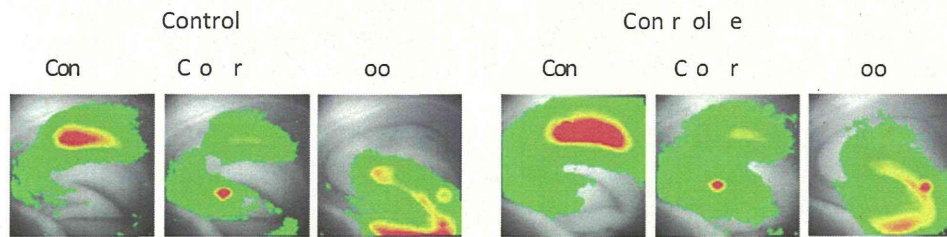
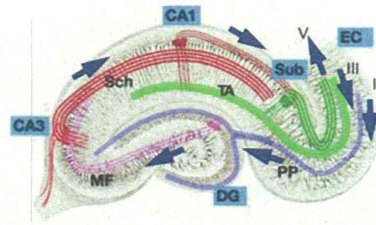


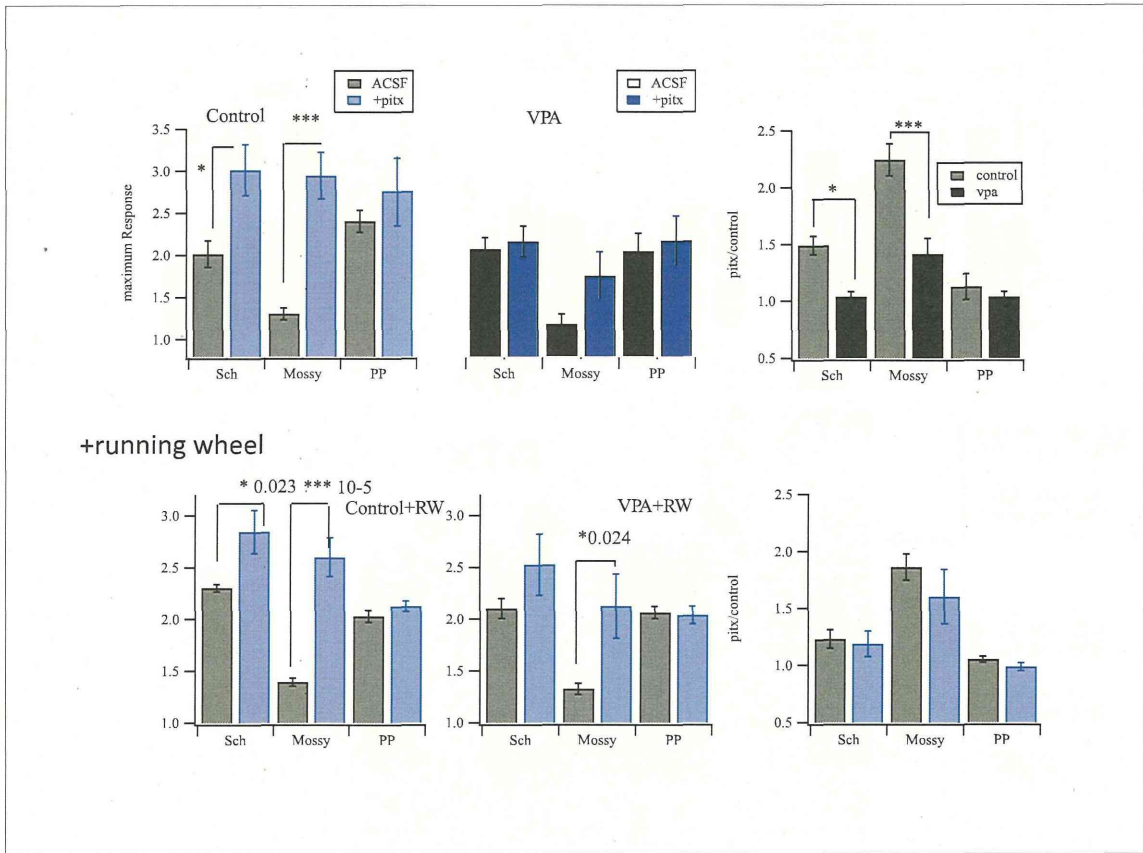
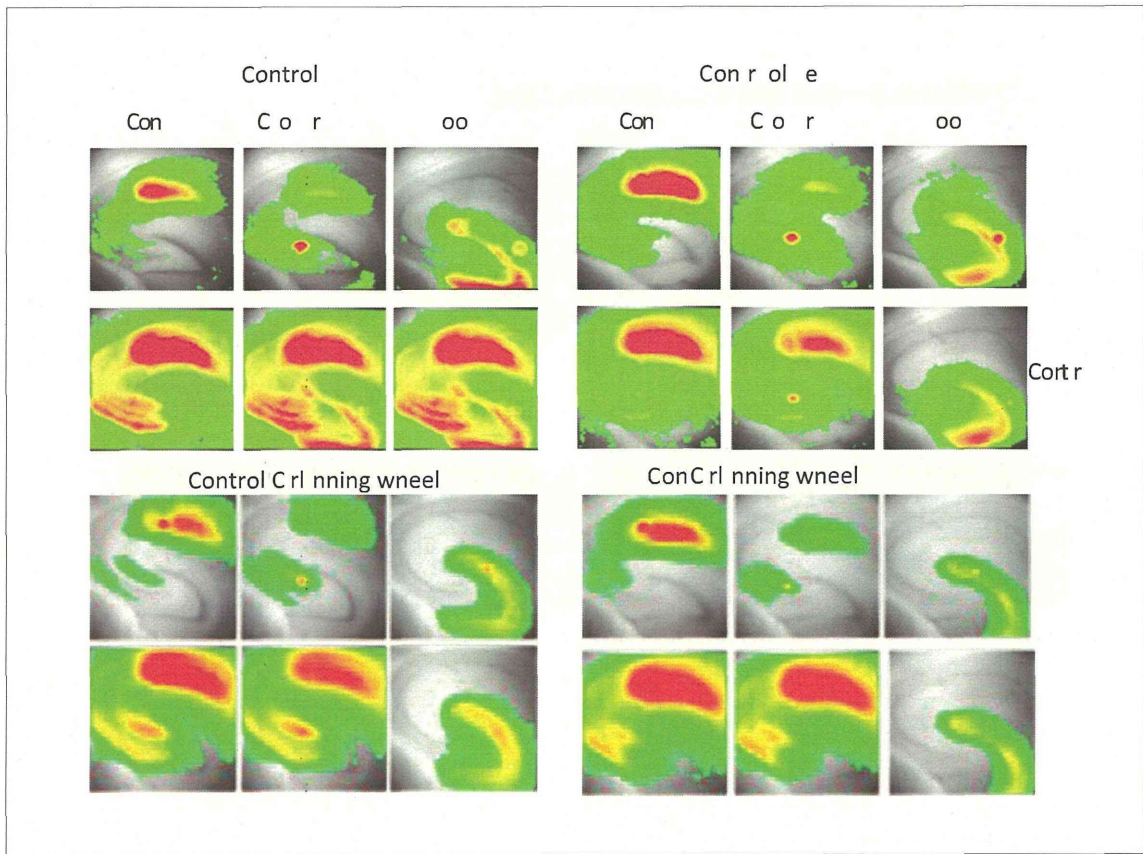
PP84 rpos (mrt r8rbt (fitrts m l 4rnmg 4n(m mory



Test Name	Behaviors Assessed	Results
Open Field	general activity level, gross locomotor activity, exploration habits	total distance, center time, move episode, distance per movement
Light/Dark Transition	anxiety-like	dark distance, dark time, transition, light distance, light time, latency to enter light
Elevated Plus Maze	anxiety-like	total distance, open time, close time, open entry, close entry, total entry
Pre-pulse Inhibition	sensorimotor gating	pre 90db/120db, pre 95db/120db, pre 100db/120db
Tail Suspension	depression	immobility time
Contextual/Cued Fear Conditioning	learning and memory	conditioning, contextual, cued
Y-Maze Alternation	learning and memory	correct alternation

バルプロ酸の発生一発達期投与による神経回路変化





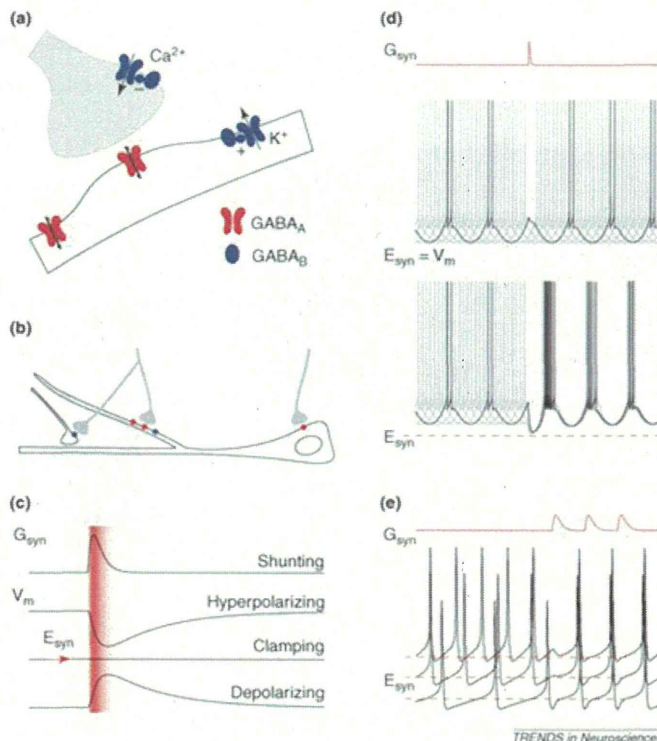
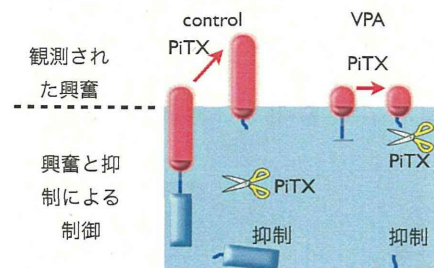
抑制の働き方と機能

INMED/TINS special issue Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations

Edward O. Mann and Ole Paulsen

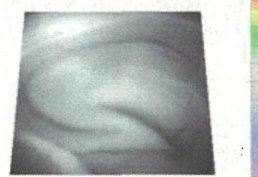
Department of Physiology, Anatomy and Genetics, Parks Road, Oxford, OX1 3PT, UK

Kinetics of GABAA receptor-mediated events. The synaptic conductance change (G_{syn}) responsible for shunting is short lasting, whereas the time course of the associated membrane potential effect is determined by the membrane time constant of the postsynaptic neuron. The effect on membrane potential can be depolarizing, hyperpolarizing or clamping, depending on the relation between the actual membrane potential (V_m) and the reversal potential of the GABAA receptor-gated conductance (E_{syn}).

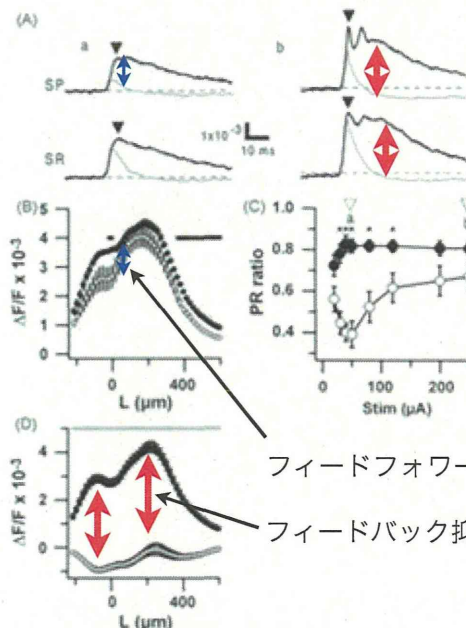
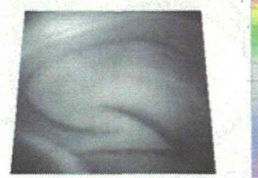


抑制系の検出

normal solution



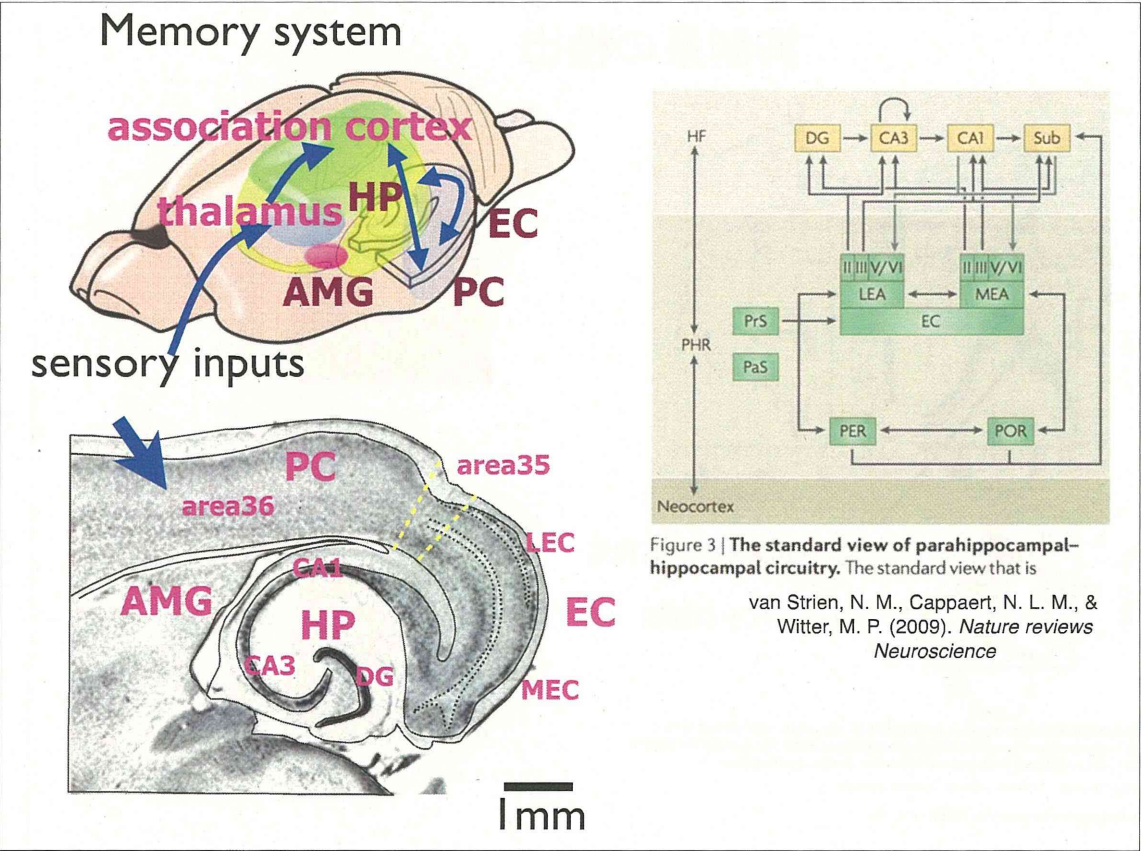
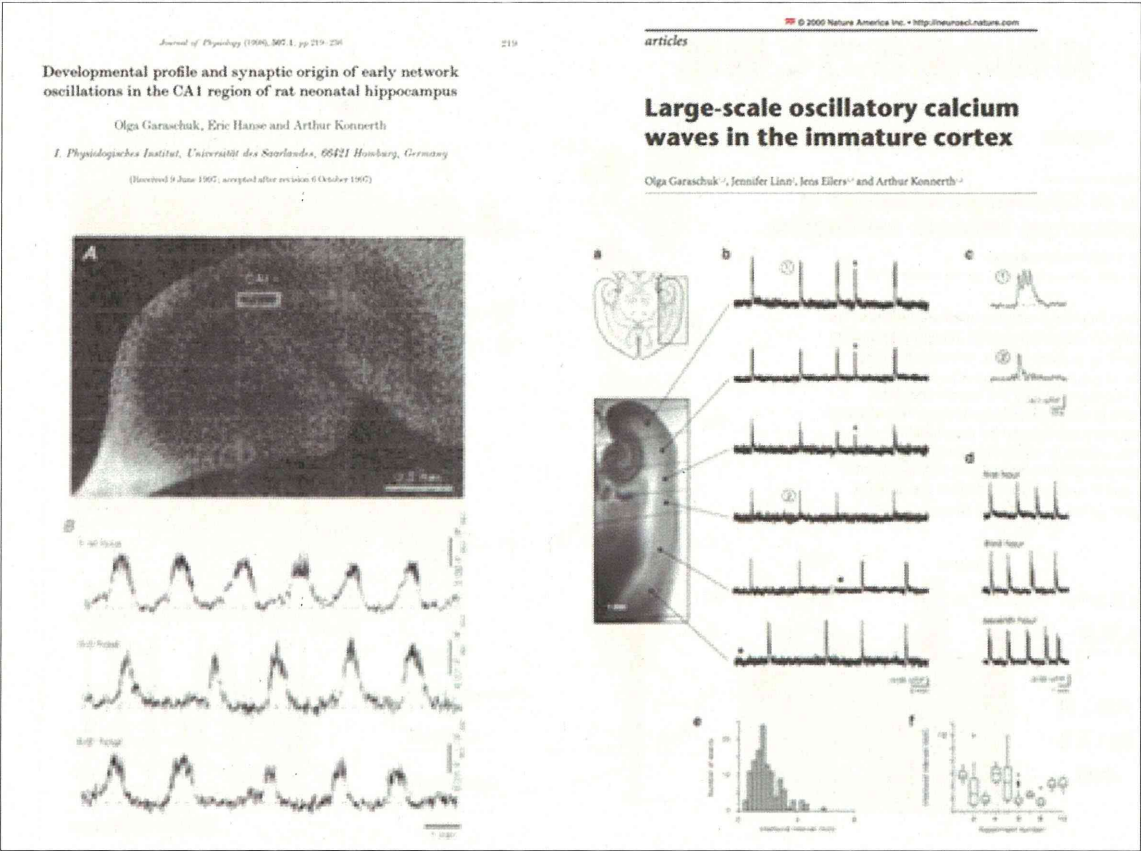
+ PITX

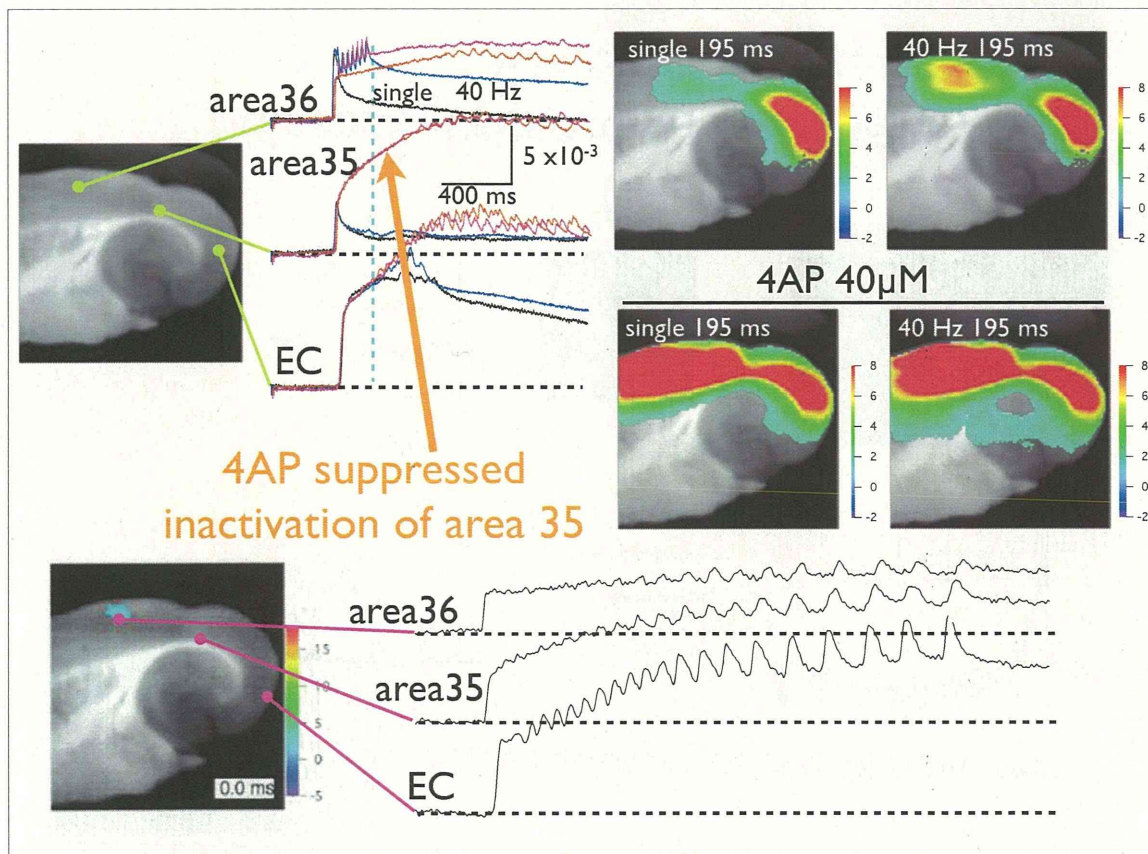
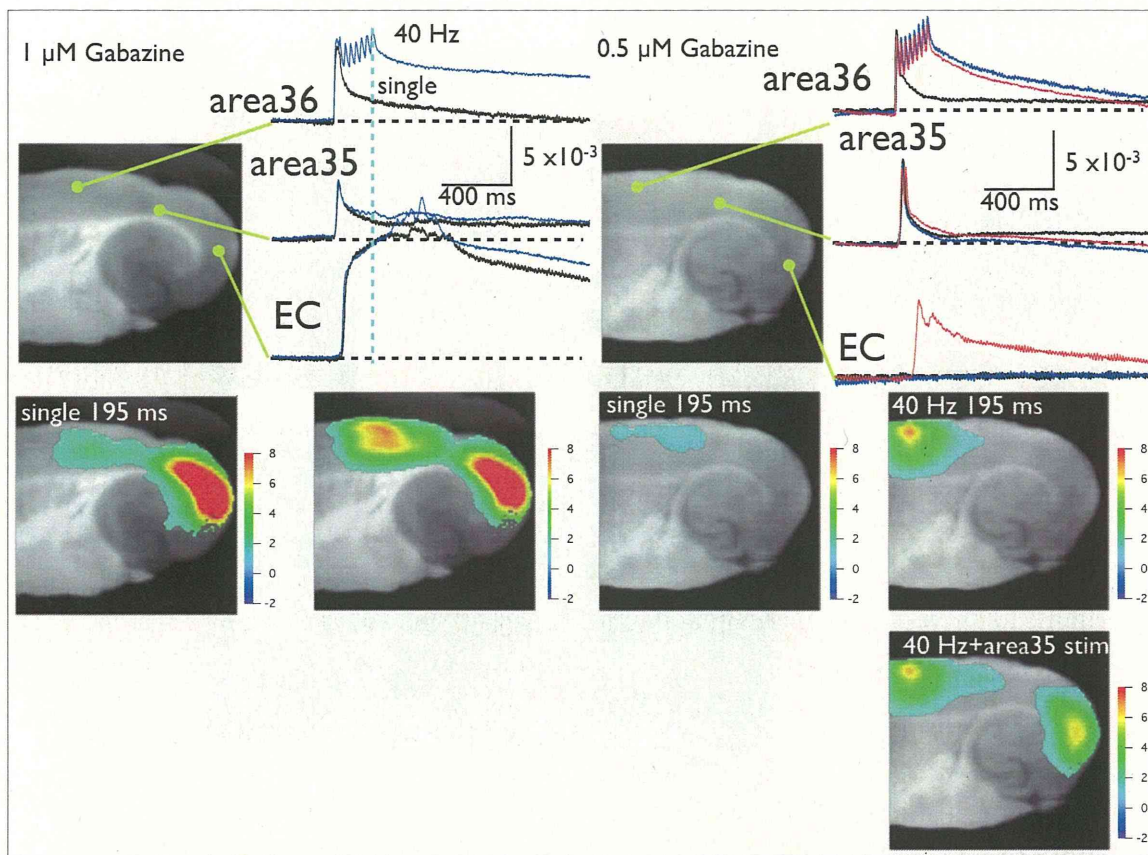


Membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells probed with voltage-sensitive dye optical imaging in rat hippocampal slices reveal the impact of GABA_A-mediated feed-forward inhibition in signal propagation

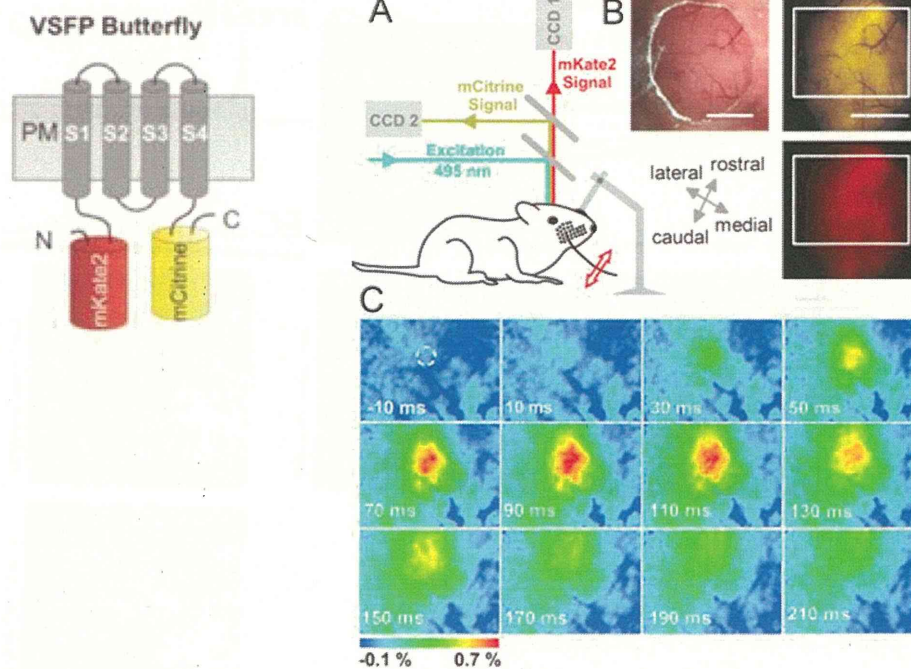
Yoko Tominaga ^{4,5}, Michinori Ichikawa ^{4,5}, Takashi Tominaga ^{4,5,6}

Neuroscience Research 64 (2009) 152–161

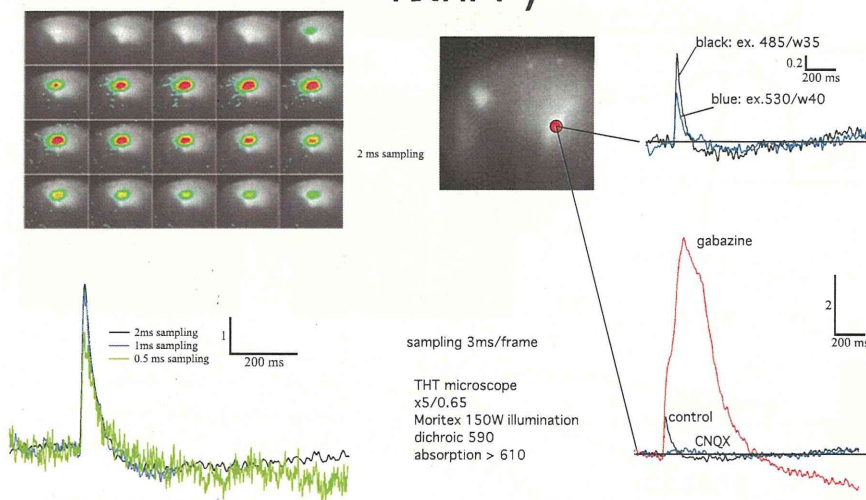




[1] W. Akemann, H. Mutoh, A. Perron, Y. Kyung Park, Y. Iwamoto, and T. Kröpfel, "Imaging Neural Circuit Dynamics with a Voltage-Sensitive Fluorescent Protein.," *J Neurophysiol* (2012) [doi:10.1152/jn.00452.2012].



New technology Noltt ge nensgyve Fluorescent Protegn NNnFP)

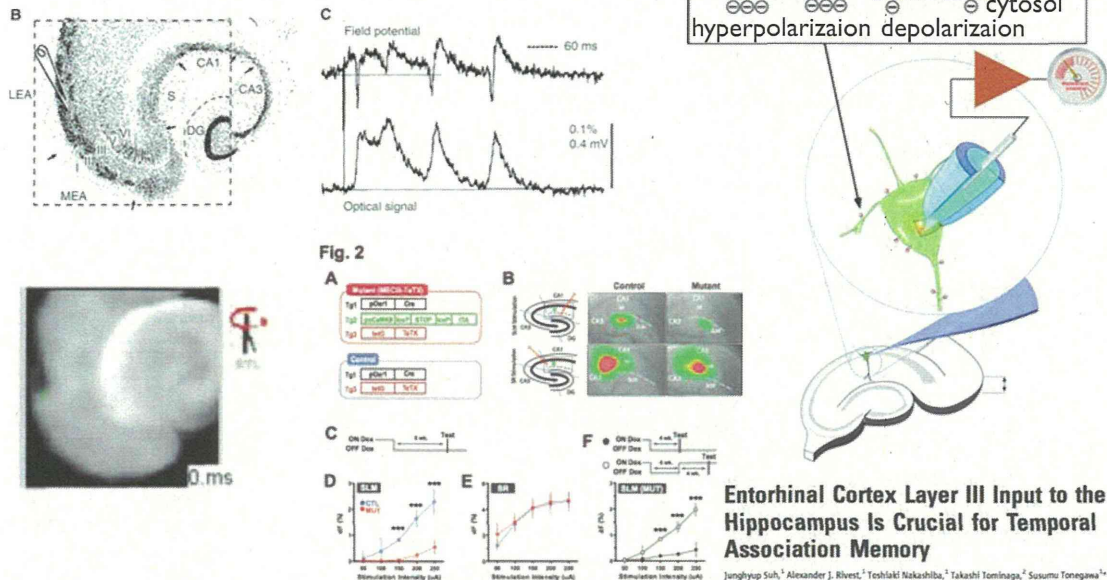


海馬錐体細胞の神経細胞特異的な膜電位応答の記録

Entorhinal-Hippocampal Interactions Revealed by Real-Time Imaging

Toshio Iijima,* Menno P. Witter, Michinori Ichikawa, Takashi Tominaga, Riichi Kajiwara, Gen Matsumoto

SCIENCE • VOL. 272 • 24 MAY 1996



www.sciencemag.org SCIENCE VOL 334 9 DECEMBER 2011

1415

情動認知行動毒性評価系確立のための 神経回路異常の機能解析と光計測

1. 光計測法は抑制系の活動を調べるのに適している。
2. 抑制系は広い領野にわたる神経活動の同期などで働いている。
3. 広い領域にわたる神経活動同期にはイメージング法が適している。
4. 特に発生発達期にはGABAによる抑制系による同期的な活動がおこっている。
5. パルプロ酸のような発生発達期での神経回路形成に遅発性の影響を与えるものはこの幼若期特異的な神経活動に影響している可能性がある。
6. 光計測は広い範囲の同期的神経活動を定量的に調べることができる
7. 手法として、VSFPを導入することは重要である。

発生-発達期ビスフェノールA 暴露による脳構築異常解析

研究分担者 中島 欽一

奈良先端科学技術大学院大学 教授

研究要旨：本年度の研究では、膣栓確認直後から離乳時（生後 28 日）にかけ、マウスにビスフェノール A (BPA) を飲料水により投与し、28 日目の産仔マウス脳切片の免疫染色による解析を行った。その結果、妊娠 14 日目の増殖細胞から分化したニューロンの局在に異常がみられ、また、大脳皮質、特に脳梁におけるアストロサイト数の減少が観察された。

A. 研究目的

脳・神経系は主要な 3 つの細胞種、ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトによって構成されるが、これらは共通の神経幹細胞から産生され、互いに密接に連携しながら高度な情報処理機能を発揮する。そのためには胎児期から成体における神経幹細胞から各種細胞への分化・成熟が時空間的に精妙に制御される必要がある。これが破綻した場合、これまでも重度な神経疾患や機能障害に至ることが数多く示されているがその原因の詳細については不明な点が多い。本分担者はこれまで、遺伝子配列変換を伴わずに遺伝子発現を制御する「エピジェネティクス」機構が、神経幹細胞の運命決定に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。そこで本研究では、細胞に対し DNA メチル化変化などを誘導することが知られる環境化学物質ビスフェノール A (BPA) に着目し、発生-発達期ビスフェノール A 暴露による脳構築異常の解析とその原因を幹細胞制御の観点から明らかにする。

B. 研究方法

本年度の研究では、膣栓確認直後から離乳時（生後 28 日）にかけ、飲料水（15 ppm）にて BPA をマウスへ与えた。また増殖性細胞をラベルするため、BrdU（100 mg/kg）を妊娠 14 日目マウスへ投与、生後 28 日目に脳を取り出し固定した。40 mm の切片を作成後、増殖細胞マーカー（BrdU）、ニューロンマーカー（NeuN）、アストロサイトマーカー（GFAP、S100b）、に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は奈良先端科学技術大学院大学の動物倫理委員会の規定に基づき行うものである。

C. 研究結果

昨年報告したように、妊娠 6 日目から 15 日目まで BPA に暴露されたマウス胎仔脳では、コントロールマウス脳には、明らかな差は認められなかったものの、膣栓確認直後から BPA を投与した場合、次のような異常がみられた。1) 胎生 14 日目に増殖しておりその後ニューロンへと分化した細胞は BPA 曝露により減少し、皮質内での局在はより分散していた。アストロサイトについては、特に脳梁において、その数の減少が見られた。

D. 考察

受精後～胎性 3 日にかけて、ゲノム DNA 全体に渡り脱メチル化が生じる。その後体細胞においては、急激な再メチル化が誘導される。昨年度は胎性 6 日目からの投与を行ったが、この時期、体細胞ゲノムは既にメチル化パターンがほぼ確立されており、使用した 15 ppm という BPA 濃度ではメチル化変動を誘導するには不十分だったものと思われる。これを受け、本年度は膣栓確認直後から BPA 投与を行ったため、今回報告するような異常がみられたものと考えられる。さらに、胎生 14 日目終脳由来神経幹細胞を用いた *in vitro* の解析において、BPA 添加によってアストロサイトへの分化抑制

が見られたことから、生後 28 日目脳で見られたアストロサイト数の減少は、BPA による神経幹細胞からアストロサイトへの分化が抑制されたためである可能性が示唆された。

E. 結論

以上のように、今回 BPA は神経幹細胞の分化を攪乱することを示唆する結果が得られた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表（本研究に関わる主なもの 3 編に◎を付けてください）

1) 書籍

該当なし。

2) 雑誌

<原著論文>

1. Saito A., Kanemoto S., Kawasaki N., Asada R., Iwamoto H., Oki M., Miyagi H., Izumi S., Sanosaka T., Nakashima K. & Imaizumi K. Unfolded protein response, activated by OASIS family transcription factors, promotes astrocyte differentiation. **Nature communications** 3, 967 (2012).
2. Fujimoto Y., Abematsu M., Falk A., Tsujimura K., Sanosaka T., Juliandi B., Semi K., Namihiro M., Komiya S., Smith A. & Nakashima K. Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. **Stem Cells** 30, 1163-1173 (2012).

<総説>

1. 佐野坂司、中島欽一 (2012) 多能性幹細胞からの神経分化 脳神経科学イラストレイテッド (印刷中)

2. 藤元祐介、中島欽一 (2012) ヒト iPS 細胞由来神経上皮様幹細胞移植による脊髄損傷治療. 実験医学. Vol. 30 No. 12, 1944-1947
3. 堅田明子、中島欽一 (2012) 幹細胞分化制御の鍵を握るエピジェネティクス. 細胞 8, vol. 44, No. 9, 11-14
4. 上菌直弘、松田泰斗、中島欽一 (2012) エピジェネティックな神経幹細胞制御と脊髄損傷治療への応用. Vol. 30, No. 18, 2932-2938

2. 学会発表

(国内学会)

1. 波平昌一[○]、野口浩史、田中友規、佐野坂司、辻村啓太、中島欽一：Role of the maintenance DNA methyltransferase in embryonic neural stem cells、第85回日本生化学会大会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、2012年12月14日-16日
2. 藤元祐介、精松昌彦、Anna Falk Austin Smith 小宮節郎、中島欽一：ヒトiPS細胞由来神経上皮様幹細胞移植による脊髄損傷治療、第27回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋国際会議場、2012年10月26-27日
3. 中島欽一：神経幹細胞移植による損傷脊髄機能の修復、WalkAgain2012 再生医療と脳科学、東京国際交流館、2012年10月6日（シンポジウム）
4. 中嶋秀行[○]、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一：神経幹細胞におけるRett症候群原因遺伝子産物MeCP2の機能解析、第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月18-21日
5. 村尾直哉[○]、松田泰斗、古関明彦、波平昌一、中島欽一：マウス脳におけるNP95発現細胞の解析、第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月18-21日
6. 辻村啓太[○]、深尾陽一郎、江頭良明、藤原正幸、入江浩一郎、中嶋秀行、高森茂雄、中島欽一：発達障害原因因子MeCP2によるmicroRNA生合成を介した神経機能制御、第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月18-21日

7. 石川寛[○]、波平昌一、竹林浩秀、中島欽一：グリア細胞の分化と発達における DNAメチル化の役割、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ、仙台国際センター、2012年7月24-27日
 8. 赤土正一[○]、田中友規、波平昌一、野口浩史、五十嵐勝秀、辻村啓太、中島欽一：ニューロンの発達及び興奮毒性神経細胞死制御におけるDNMT1の機能解析、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ、仙台国際センター、2012年7月24-27日
 9. 中島欽一[○]：神経系細胞におけるメチル化DNA結合タンパク質MeCP2の新規機能、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ、仙台国際センター、2012年7月24-27日
 10. 武藤哲司、佐野坂司、伊藤慧、中島欽一[○]：発生期神経幹細胞の分可能獲得における酸素濃度の影響、第39回日本毒性学会学術年会、仙台国際センター、2012年7月17日
 11. Yuniarti N., Juliandi B., Sanosaka T., Nakashima K.：ANTENATAL EXPOSURE TO SUBEROYLANILIDE HYDROXAMIC ACID PROMOTES NEUROGENESIS AND ALTERS NEURAL PROGENITOR CELL FATE SPECIFICATION IN THE DEVELOPING BRAIN, ISSCR 2012、パシフィコ横浜、2012年6月13-15日
 12. Sanosaka T., Namihira M., Nakashima K.：MENINGEAL CELLS INDUCE ASTROCYTE DIFFERENTIATION OF NEURAL STEM CELLS, ISSCR 2012、パシフィコ横浜、2012年6月13-15日
 13. Chai M. C., Juliandi B., Sanosaka T., Nakashima K.：IDENTIFICATION OF HDAC-MEDIATED MECHANISMS FOR THE TEMPORAL SWITCHING OF CORTICAL NEURON SPECIFICATION, ISSCR 2012、パシフィコ横浜、2012年6月13-15日
 14. Matsuda T., Juliandi B., Murao N., Namihira M., Kawai T., Akira S., Nakashima K.：REGULATION OF ADULT MOUSE NEURAL STEM CELLS BY TLR9 MEDIATED SIGNALING, ISSCR 2012、パシフィコ横浜、2012年6月13-15日 (ポスター)
 15. 佐野坂司[○]、波平昌一、中島欽一：Meningeal cells regulate astrocytic differentiation in the embryonic mouse brain、第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会、神戸国際会議場、2012年5月28-31日
 16. 野口浩史[○]、波平昌一、田中友規、佐野坂司、中島欽一：DNA-methyltransferase 1 functions as a suppressor of neuronal differentiation in late-gestational neural stem cells、第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会、神戸国際会議場、2012年5月28-31日
 17. 堅田明子[○]、中島欽一、Paola Sassone-Corsi：ヒストンメチルトランスフェラーゼMLL1は概日リズムを司る時計遺伝子群の発現に必須な場を制御する、第6回日本エピジェネティクス研究会年会、学術総合センター、2012年5月14-15日
 18. 村尾直哉[○]、松田泰斗、古関明彦、波平昌一、中島欽一：マウス脳におけるNP95発現細胞の解析、第6回日本エピジェネティクス研究会年会、学術総合センター、2012年5月14-15日
 19. 中島欽一[○]：神経幹細胞におけるエピジェネティクス機構を介した遺伝子と取巻く環境の相互作用、第6回日本エピジェネティクス研究会年会、学術総合センター、2012年5月14-15日
- 〈国際学会〉
1. Matsuda, T., Murao, N., Juliandi, B., Namihira, M., Kawai, T., Akira, S., **Nakashima, K.**：TLR9-signaling regulates neurogenesis in the adult mouse hippocampus. NEUROSCIENCE 2012, New Orleans, October 13-17, 2012
 2. Fujimoto, Y., Abematsu, M., Falk, A., Tsujimura, K., Sanosaka, T., Juliandi, B., Semi, K., Namihira, M., Komiyama, S., Smith, A., **Nakashima, K.**：Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human iPS cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. NEUROSCIENCE

- 2012, New Orleans, October 13, 2012
3. **Nakashima, K.:** Interplay between genes and the environment via epigenetic mechanisms in neural stem cells. The 3rd Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Diseases/The 7th Annual Conference of Asian Epigenome Alliance/Genome Medicine Workshop on Epigenetic(-omic)s in Diseases, Shanghai, China, April 19-22, 2012
- H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）
1. 特許取得
該当なし。
 2. 実用新案登録
該当なし。
 3. その他
特になし

平成23年3月4日
H24年度種村班班会議
東京国際フォーラム

発生-発達期におけるビスフェノールA 暴露による脳構築異常解析

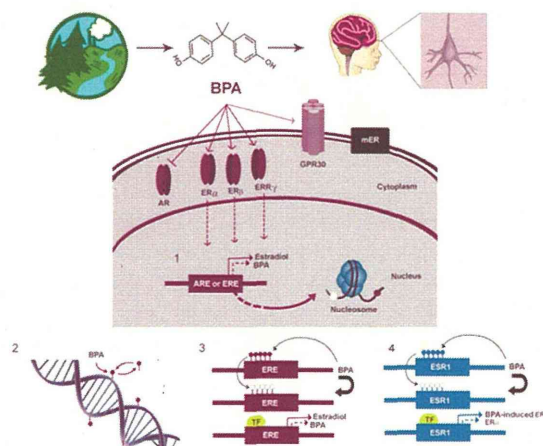
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科
分子神経分化制御研究室

中島 欽一

NAIST

1

ビスフェノールA (BPA)



- Endocrine disrupting chemicals
- Estrogen agonist, Androgen antagonist
- Wide ranging effects on brain (**neocortical development**), genome (**DNA methylation**) and behavior (**social behavior, learning and memory**)
- (i) weakly activate $Er\alpha$, $Er\beta$ and $ERR-\gamma$
- (ii) DNA methylation agent

Wolstholme et al., *Horm Behav*, 2011

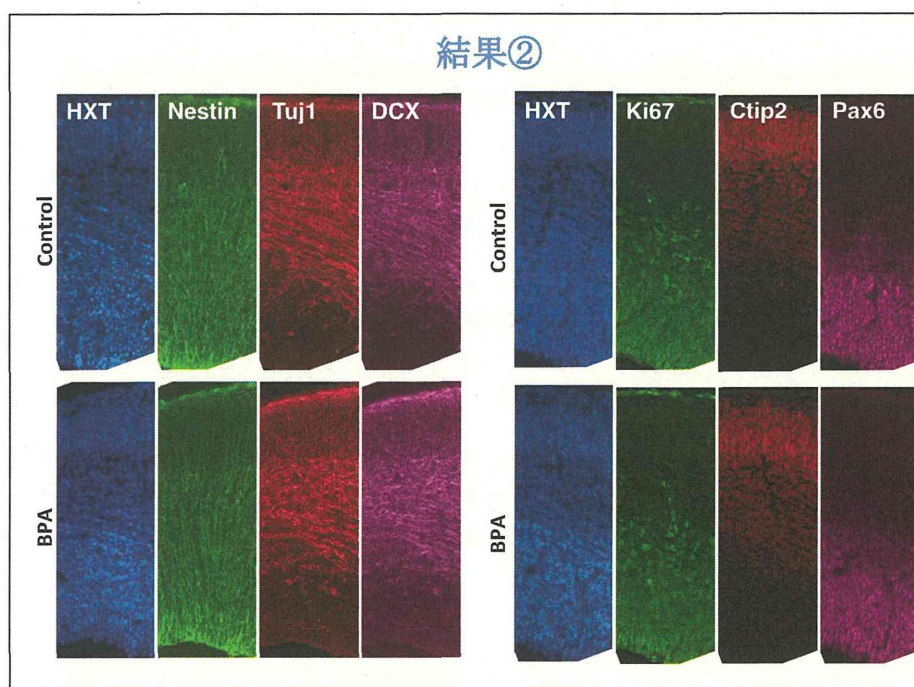
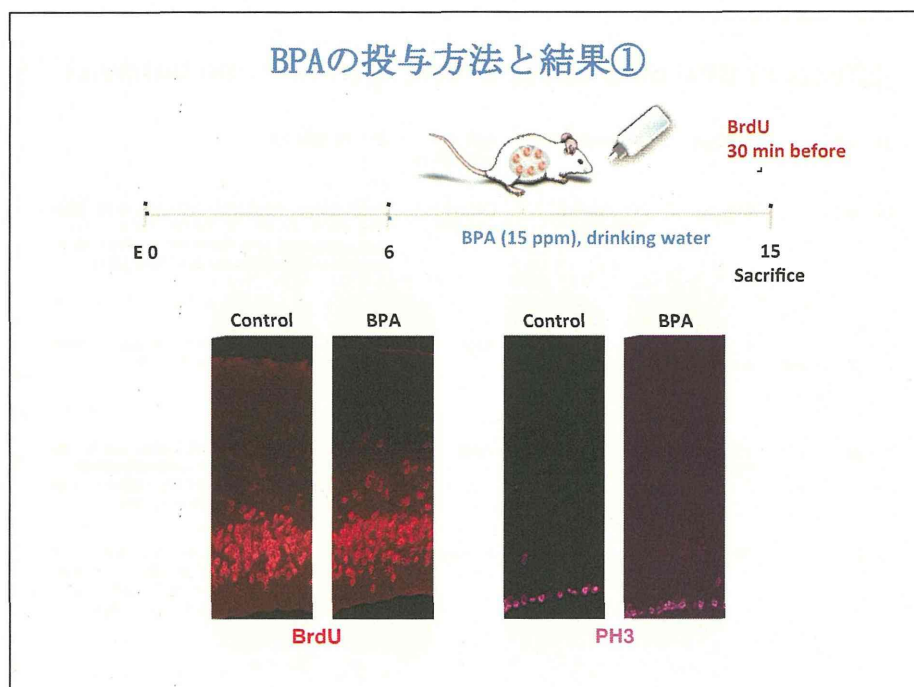
Effects of BPA on brain structure, genome and behavior

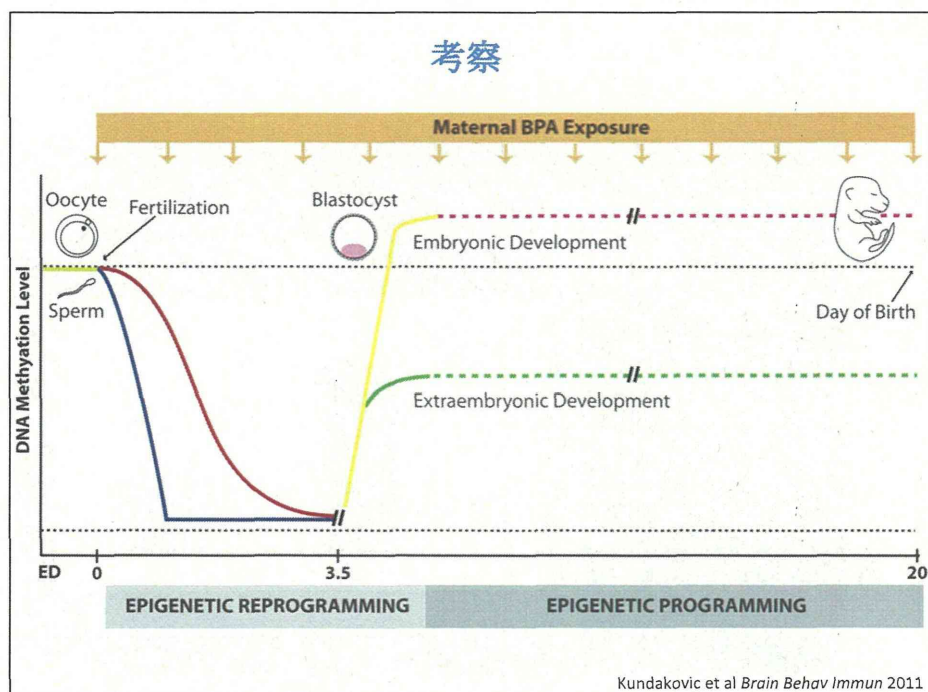
Animal	Dosage	Administration	Age of collection	<i>In vivo</i> effects
Mouse	20 µg/kg	S.c. Injection, E0.5, daily	Embryonic and adult	Accelerated neuronal differentiation and migration during neocortex development, malpositioning and abnormal trajectories of neurons in adult (Nakamura <i>et al.</i> , 2006, 2007).
Rat (ovariectomized)	40, 120, and 400 µg/kg	S.c. Injection, single dose (adult)	Adult	Inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis (MacLusky <i>et al.</i> , 2005)
Mouse	0.05, 0.5, 5, 50 mg/kg/d	Oral gavage (E7 – P21)	Adult	Impaired learning-memory , proposed to be related to the concomitant down-regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits and ERβ in the hippocampus (Xu <i>et al.</i> , 2010).
Mouse	20 µg/kg	S.c. Injection, E0.5, daily	Embryonic	BPA can cause both hyper- and hypomethylation at the promoter-associated CGIs of multiple unique loci, resulting in aberrant gene expression (Yaoi <i>et al.</i> , 2008)

The big test for BPA

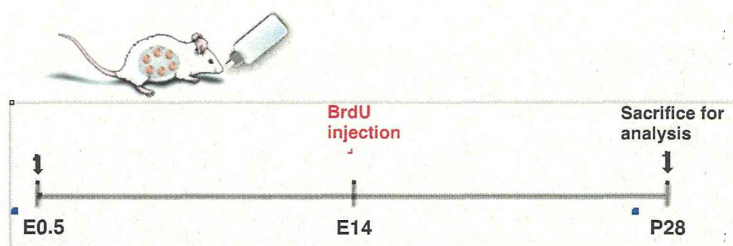
- High degree of variability in the dosing regimen in published reports
- Critical windows of vulnerability: timing of exposure.
- Tissue-specific responses
- **Most controversial issue:** injection of the chemical under the animals' skin, rather than giving it orally, as humans would generally be exposed

(Brendan Borrell, *Nature*, 2010)



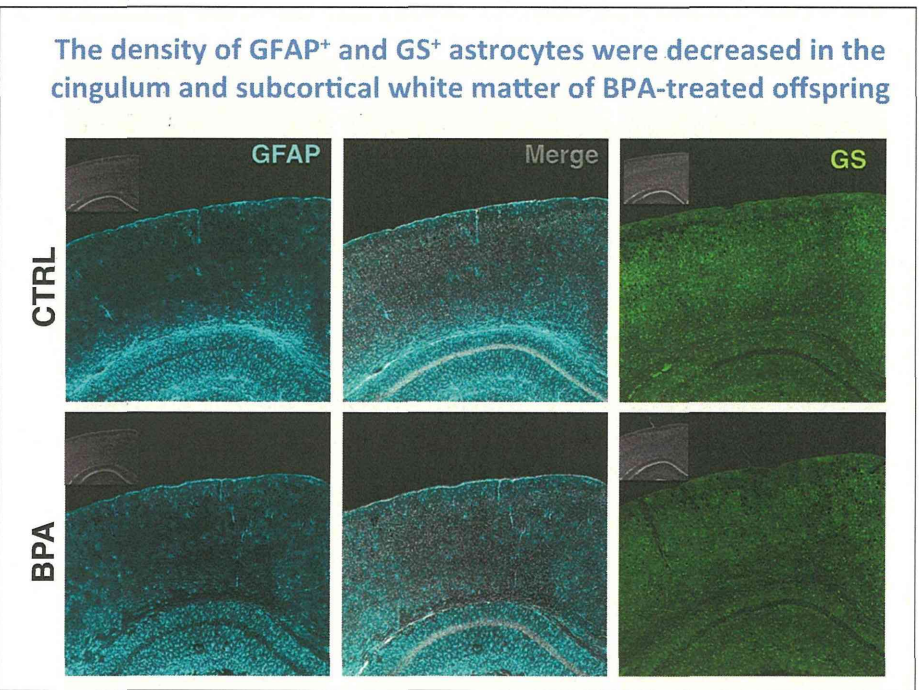
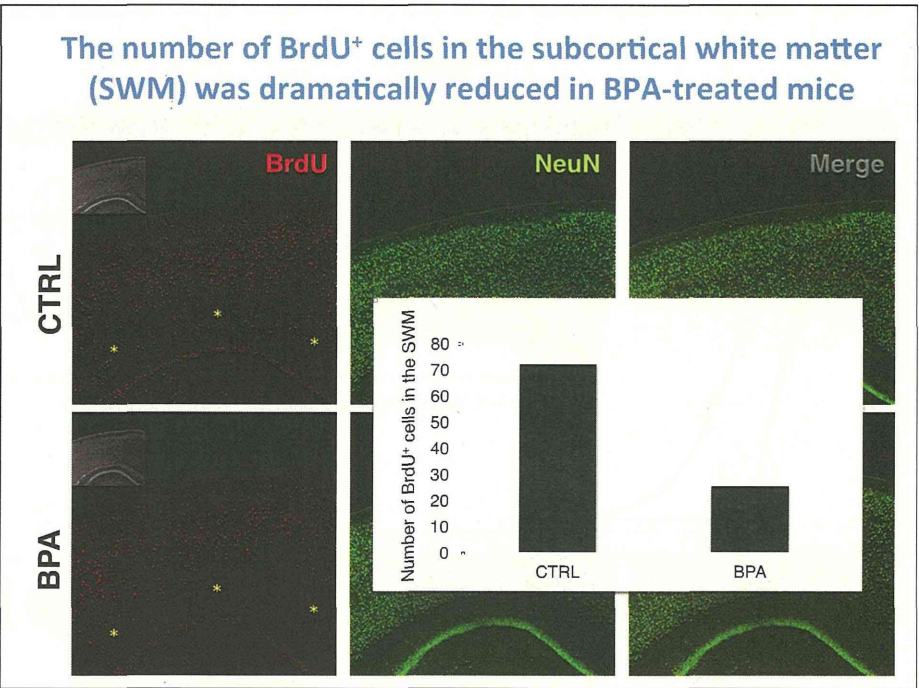


In vivo experimental scheme for BPA administration

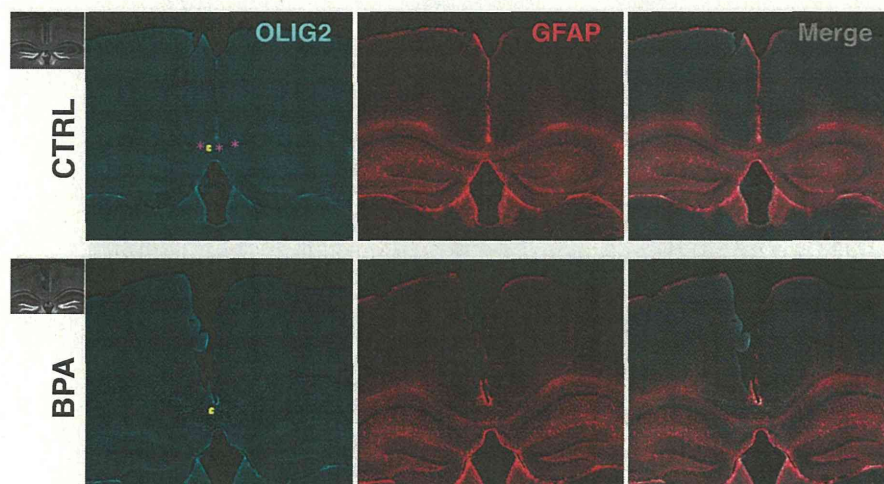


E: Embryonic
P: Postnatal

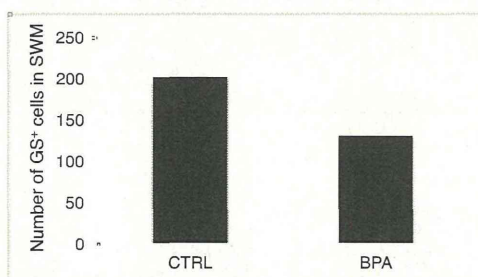
Route of administration	For BPA-exposed group, BPA stock solution was added into drinking water .
Dosage / Concentration	Final concentration in drinking water: 15 ppm , concentration of BPA intake per day/mouse is estimated to be approximately 75 µg .
Course of administration	E0.5 until P28



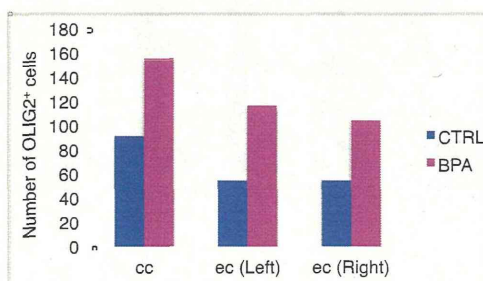
BPA treatment led to increased thickness of corpus callosum, concomitant with increased number of cells expressing oligodendrocyte lineage marker, OLIG2



BPA treatment markedly reduced region specific-GFAP⁺ and GS⁺ astrocytes, accompanied with increased OLIG2⁺ cells



SWM: subcortical white matter
(Including corpus callosum and external callosum)



cc: corpus callosum
ec: external callosum

