

機関番号：24303

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20310036

研究課題名 (和文) エピジェネティクスと神経細胞移動に注目したビスフェノール A 胎生期曝露の影響解析研究課題名

(英文) Studies on the effects of prenatal exposure to bisphenol A in mouse brain, with special reference to neuronal migration and epigenetic alterations

研究代表者

伏木 信次 (FUSHIKI SHINJI)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：80150572

研究成果の概要 (和文)：

胎生期から授乳期にかけてのマウスに低用量ビスフェノール A を曝露させることによって、行動異常、脳内モノアミン量の変動が惹起された。DNA のメチル化変動の網羅的検索により、本来発生段階特異的に変動を示す遺伝子が標的となり、プロモーター配列領域の転写開始点近傍の CpG island にメチル化変動が生じることを明らかにした。また胎生期大脳皮質形成過程における神経細胞の遊走促進の細胞メカニズムとして BPA 曝露が細胞遊走の直線性を高めることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：

We demonstrated that prenatal and lactational exposure to bisphenol A (BPA) affected fetal brain development, resulting in disturbed murine behavior accompanied with disrupted neurotransmitter system, including monoamines, in the postnatal development period and in adult mice. We also demonstrated that epigenetic alterations in promoter-associated CpG islands might underlie some of the effects on brain development after exposure to BPA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：内分泌かく乱物質、ビスフェノール A、マウス、神経細胞移動、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

ビスフェノール A (以下、BPA と略す) はプラスチック素材として環境中に広く存在する化学物質であり、一般人の血中、臍帯血、羊水等から検出される。「環境ホルモン」としての位置づけから従来生殖・内分泌系への影響に注目が集まっていたが、近年中枢神経系への影響に関する実験的報告が次第に蓄

積され、総合的な研究の必要性が叫ばれていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では私たちがこれまでに報告してきたマウス胎生期への低用量 BPA 曝露の影響解析 (*J Neurosci Res*:2006, *Neurosci Lett*:2007, *Brain Dev*:2007) を基盤として、脳機

能への影響評価に有用な指標となる神経伝達物質濃度の測定や個体レベルでの学習・行動への影響を解析するとともに、BPAの脳に対する作用メカニズム解明に迫るべく、神経細胞分化・移動の *in vitro* タイムラプス解析ならびに DNA メチル化に注目したエピジェネティック修飾の詳細な解析を行おうとする本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) BPA に胎生期曝露されたマウスの生後における行動学的・神経化学的解析
膣栓確認後から妊娠マウス ICR/Jcl に BPA を投与 (20 µg/kg/day 皮下注射) し、出生後は授乳期間中 (生後 3 週まで) 母マウスに継続して BPA を投与した。

この方法で作製したマウスを生後 3 週ならびに 11 週の時点で、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路、Morris 水迷路、集団型全自動行動・記憶学習測定システム Intellicage を用いて解析した。BPA 投与群と非投与群間で、各行動バッテリーで得られたパラメータに関して比較解析した。

生後 3 週ならびに生後 11 週の時点で行動実験後、その脳を、大脳皮質体性感覚野、基底核、視床下部/視索前野、視床、背側縫線核、黒質に分けて切り出し凍結、その後、ホモゲナイズののち、神経伝達物質として、ドパミン(DA)、ドパミン代謝産物である

3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、セロトニン (5-HT; 5-hydroxytryptamine)、ならびにその代謝産物である 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) を HPLC (high-performance liquid chromatography) により定量し、BPA 投与群と非投与群間で各物質の濃度に関して比較解析した。

(2) 胎生期大脳皮質神経細胞移動への BPA の影響を評価する組織培養系の確立と影響解析

膣栓確認後から妊娠マウス ICR/Jcl に BPA を投与 (20 µg/kg/day 皮下注射) し、胎齢 12.5 (E12.5) にて胎仔全脳を取り出し、アガロースゲルに包埋後、200µm 厚の冠状断切片を作製した。冠状断切片を Oregon Green 標識用溶液に浸漬・洗浄のちガラスボトムディッシュに移しゲルにて包埋、観察用チャンバーに固定し、倒立型共焦点レーザー顕微鏡にて、37°C/5% CO₂ の環境下で培養を継続し、その間に観察面と直交する方向 (Z 方向) に約 30 断面、12 分毎に 24 時間にわたって画像を取得した。取得画像における細胞遊走については画像解析ソフトウェアとプラグインソフトウェアを用いて追跡し記録、遊走する細胞毎に LabVIEW (NIH) を用いて解析した。

(3) 胎生期 BPA 曝露の DNA メチル化への影

響を評価解析するための網羅的解析

(1) に記載した方法で作製したマウス胎児を胎齢 12.5、14.5、16.5 日で取り出し、大脳皮質を切り出し凍結、そののち DNA を抽出。抽出した DNA に対して、メチル化感受性酵素 Not I を用いた RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning) 法を実施した。同時に BPA 非投与群胎児からも DNA を抽出し、RLGS 法を適用し、BPA 投与群と非投与群のプロファイルを比較した。両群間でスポット強度の変化を示したスポットからクロニングを行うことにより、DNA メチル化に変化をきたした遺伝子を同定した。同定した遺伝子に関しては、遺伝子内のどの領域でメチル化の変化をきたしているかを解析した。また組織特異的メチル化を調べるために同時に取り出した胎児肝を用いて RLGS による解析を実施し、脳で見出されたスポットとの比較を行った。BPA 投与によって DNA メチル化の変動を示した遺伝子の発現が BPA 投与によって亢進あるいは低下しているかどうかを BPA 曝露群の胎生期大脳皮質と非曝露群大脳皮質より抽出した mRNA を対象とする定量 RT-PCR 法によって調べた。

4. 研究成果

(1) BPA に胎生期曝露されたマウスの生後における行動学的・神経化学的解析
高架式十字迷路テストでは生後 3 週齢において、オープンフィールドテストでは生後 10 週齢において、BPA 曝露群にて、総走行距離 (total distance) が有意に減少し、マウスの運動活性の低下が示された。その他のバッテリーでは有意差は得られず、不安、探索行動には性差、投与による差異は認められなかった。Morris の水迷路テストでは、空間認知機能・学習機能には性差、BPA 曝露による差異は認められなかった (図 1)。

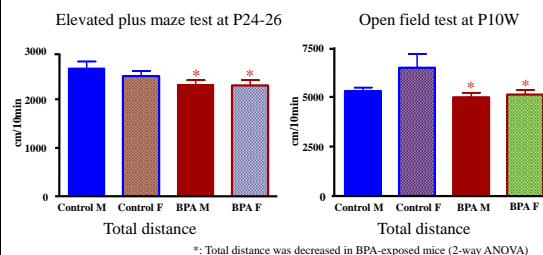


図 1. 行動実験結果

神経伝達物質として、脳内モノアミン量を HPLC にて定量した。生後 3 週齢および生後 14-15 週齢マウスの脳から、大脳皮質体性感覚野、基底核、視床下部/視索前野、視床、背側縫線核、黒質を切り出し、モノアミンとしてドパミン(DA)、その代謝産物である DOPAC、セロトニン(5HT)、その代謝産物で

ある 5HIAA を定量した。その結果、基底核、黒質、背側縫線核など脳の複数の部位で、生後 14-15 週齢の BPA 曝露群において、DA、その代謝産物である DOPAC、5HT、その代謝産物である 5HIAA が有意に増加していた (図 2)。

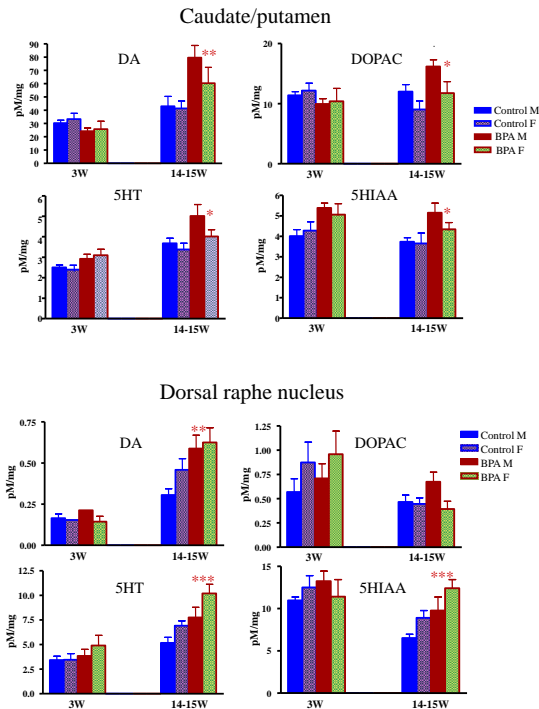


図 2. 脳内モノアミン定量

以上のことから、胎生期、授乳期における低用量 BPA 曝露は、出生後の幼若期、成熟期において、活動の低下を引き起こすとともに、脳内モノアミン量のかく乱を惹起することが示された。

(2) 胎生期大脳皮質神経細胞移動への BPA の影響を評価する組織培養系の確立と影響解析

Oregon Green により蛍光標識された E12.5 のマウス大脳皮質を対象として、放射状の遊走を示す細胞に着目し、コントロール群については 89 細胞を、BPA 投与群に関しては 83 細胞を解析に供した。

細胞の平均遊走速度を算出したところ、BPA 投与群の細胞では $30.9 \pm 1.5 \mu\text{m/h}$ 、コントロール群では $29.4 \pm 1.5 \mu\text{m/h}$ であり、両者間に統計学的有意差は見られなかった。次に、遊走細胞の軌跡のばらつきの程度を解析した。遊走細胞の細胞体の軌跡のばらつきは、細胞が脳室帯において遊走を開始した地点を開始点、軟膜面近傍において遊走を終了した地点を終了点、開始点と終了点を結んだ直線を基準直線として、基準直線からの距離を各時点において算出し、その標準偏差を求め、ノ

ンパラメトリック t 検定を用いて統計解析した。その結果、コントロール群と比較して BPA 投与群では細胞体軌跡のばらつきが有意に減少していた。この結果は、BPA 投与群においては放射状遊走における総移動距離が短いことを意味している。つまり、平均遊走速度にはコントロール群と BPA 投与群に明らかな差がなくとも、BPA 投与群では遊走開始点から終了点までの総移動距離が短いために、コントロール群よりも早く目的地に到達することが示唆された。

(3) 胎生期 BPA 曝露の DNA メチル化への影響を評価解析するための網羅的解析

Genome-wide methylation status of gene areas associated with CpG islands

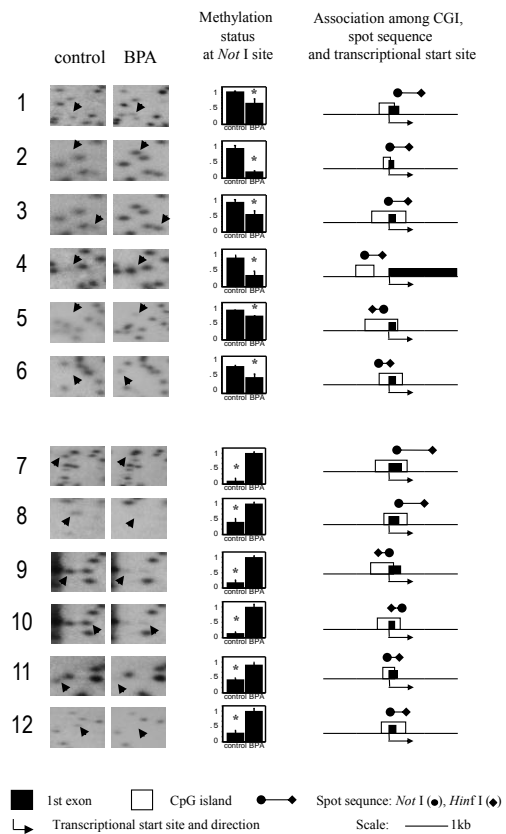


図 3. RLGS スポットクローニングによる遺伝子領域決定と DNA メチル化部位の同定

BPA 曝露群と対照群のそれぞれ異なる胎齢 (E12.5、E14.5、E16.5) の前脳からゲノム DNA を抽出し RLGS 法に供した。対応するスポットの濃度を比較し、BPA 曝露群と対照群との間で変化のあるものを抽出した。その結果、総計 2500 スポットのうち BPA 曝露群と対照群間で変動したスポットは 55 個 (2.2%) であり、その中で 19 個 (0.8%)、13 個 (0.5%)、7 個 (0.3%) が、各々 E12.5、E14.5、E16.5 特異的

に BPA 曝露による影響としての変動を示した。55 個の中 16 個(0.6%)は複数胎齢日で変動した。発生段階特異的に変動を示したスポットは 75 個見られたが、BPA 曝露により変動したスポットの中で 37 個は本来発生段階特異的に変動するスポットであった。このことから BPA は発生段階特異的な遺伝子を高率に標的とする可能性が示された E12.5 に変動したスポット 13 個について各スポットから遺伝子クローニングと塩基配列の同定を行ったところ、すべてがタンパクをコードする遺伝子領域に存在し、そのうち 12 個の Not I 切断端は機能的遺伝子の転写単位 5' 端に隣接した CGI の中に位置した。またメチル化感受性定量 PCR 法を用いて、Not I 認識切断部位におけるメチル化変動が、スポットシグナルの変動と対応することが確認できた(図 3)。すなわち、BPA 曝露によって、プロモーター配列領域の転写開始点近傍にある CGI にメチル化変動が生じることによって、機能遺伝子転写の ON/OFF を制御している可能性が示唆された。

さらに、メチル化変動を示した遺伝子が実際に遺伝子発現レベルにおいても変動しているかどうかを二つの遺伝子(Vps52, LOC72325)に関して定量的 PCR 法によって調べたところ、E12.5 において、BPA 曝露によって両遺伝子ともにその発現が亢進していた(図 4)。

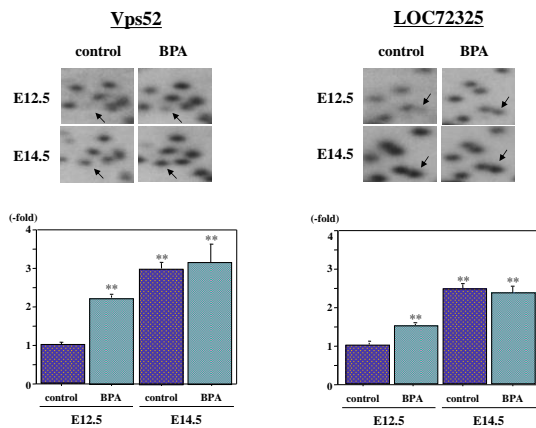


図 4. DNA メチル化の変動と遺伝子発現の相関

この二つの遺伝子のスポット上での変化は濃度の増加、すなわち DNA メチル化の減少であり、遺伝子発現の亢進と対応するものであった。

このような網羅的解析によって、妊娠中の母体への BPA 曝露がマウス胎仔前脳のエピゲノムに多様な変化を与えること、すなわち、複数の遺伝子プロモーターに関連した CGI でのメチル化、脱メチル化双方をもたらすことを初めて明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Itoh K, Yaoi T, Fushiki S. Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development. *Neuropathology*. 2012 Jan 12. doi: 10.1111/j.1440-1789.2011.01287.x. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22239237.

② Nakamura K, Itoh K, Dai H, Han L, Wang X, Kato S, Sugimoto T, Fushiki S.

Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters adult mice behavior. *Brain Dev*. 2012 Jan; 34(1): 57-63.

③ Han L, Itoh K, Yaoi T, Moriwaki S, Kato S, Nakamura K, Fushiki S. Prenatal and lactational exposure to bisphenol A in mice alters expression of genes involved in cortical barrel development without morphological changes. *Acta Histochem Cytochem*. 2011 Feb 26;44(1):25-33.

④ Nakamura K, Itoh K, Yoshimoto K, Sugimoto T, Fushiki S. Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters brain monoamine concentration in adult mice. *Neurosci Lett*. 2010 Oct 22;484(1):66-70.

⑤ Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, Fushiki S. Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Nov 21;376(3):563-7.

[学会発表] (計 3 件)

① 伊東恭子. 環境化学物質の胎生期曝露と脳形成障害. シンポジウム「脳形成障害とオミックス」、第 52 回日本神経病理学会総会学術研究会、2011 年 6 月 3 日、京都市。

② 森脇三造、伊東恭子、中村恵子、外崎円、丹藤創、伏木信次. ビスフェノール A がマウス大脳皮質神経細胞遊走に及ぼす影響の解明: タイムラプス蛍光イメージングを用いて. 第 52 回日本神経病理学会総会学術研究会、2011 年 6 月 3 日、京都市。

③ 中村恵子、伊東恭子、細井創、伏木信次. ビスフェノール A の脳神経系形成過程に及ぼす影響—皮質遠心性ニューロンのゴルジ法による解析. 2010 年 5 月 22 日、福岡市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伏木 信次 (FUSHIKI SHINJI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：80150572

(2) 研究分担者

伊東 恭子 (ITO KYOKO)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80243301

矢追 毅 (YAOI TAKESHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：40311914