

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659120

研究課題名（和文）環境汚染化学物質による中枢神経系に対する影響の多角的評価法の構築

研究課題名（英文）Development of evaluation methods for effects of environmental chemicals on the central nervous systems

研究代表者

齋藤 健 (Saito Takeshi)

北海道大学・大学院保健科学研究院・教授

研究者番号：40153811

研究成果の概要（和文）：環境汚染化学物質の中枢神経系への影響を把握でき、かつその作用機構の解明に直結する評価法の確立を試みた。本研究により、DNA 切断を定量できる測定法を開発した。DNA 切断評価に加え、アポトーシス関連蛋白の定量を併せて行い、フタル酸ジエステル、パラベン類、ステビオサイドなど、良く利用される化学物質のアポトーシス誘導能に対する影響評価を行った。さらに、PC12 細胞を用いて環境汚染化学物質による神経系の分化に対する影響評価系を確立した。加えて、金属とキレートされた金属によるアポトーシス誘導能の評価系の構築も行った。

研究成果の概要（英文）：We developed evaluation methods for effects of environmental chemicals on the central nervous systems. First of all, the method for the quantification of DNA damage by chemicals in tissues and cultured cells was developed. Using the method, we evaluated apoptotic effects of diethyl phthalate parabens and a stevioside. Secondly, we developed an evaluation method for effects of chemicals on cell differentiation in PC12 cells. In addition, the evaluation method to detect apoptosis induced by metals and chelated metals was developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境保健、環境汚染化学物質、中枢神経系、影響評価法、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、環境汚染化学物質の影響の一つとして内分泌攪乱作用が報告され、環境汚染化学物質の性ホルモン様作用を介する影響について多くの研究が行われてきている。しかし、

毎日 5 千種以上という飛躍的に増加する新たな化学物質の種類や量、有害作用の多様性、生体の感受性などを考慮して、化学物質の生体影響を評価しかつ予防するためには、現在の内分泌攪乱作用に対する対策だけでは不

十分であり、環境汚染化学物質の多面的な生体影響を明らかにすることが重要であると考へ、環境汚染化学物質の生体影響、特に性ホルモン様作用以外の生体影響に関する研究に積極的に取り組んできた。具体的には、(1) 神経系の機能分化、組織形成期に必須であるアポトーシス（プログラムされた死）に対する環境汚染化学物質の影響  
(2) 脳の記憶・学習機能の発現に密接に関わる神経突起の伸長に対する化学物質の影響

など、環境汚染化学物質による生体影響、特に中枢神経系の分化、機能発現への影響を明らかにしてきた。ごく最近になって、世界的にも、環境汚染化学物質の生体影響として、中枢神経系への影響が注目されるようになってきた。これらの今日までの取り組みに加え、胎児期、乳幼児期は組織形成のために分化が盛んに行われる形成期であり、この時期における環境汚染化学物質のもつ潜在的な危険性を考えるとき、環境汚染化学物質の胎盤透過性を評価し、かつ環境汚染化学物質が胎生期および乳幼児期における器官形成から機能発現・保持に至る各過程に与える影響を多角的に評価でき、その障害機構の解明と予防対策に直結する評価系を構築することが、予防医学上最も重要な研究テーマである。

## 2. 研究の目的

本研究では、飛躍的に増加する新たな化学物質の種類や量、有害作用の多様性、生体の感受性などを考慮し、環境汚染化学物質の作用機構として、性ホルモン系に対する作用だけでなく新たな作用機構の解明をも包括できる評価法の確立を念頭に置き、環境汚染化学物質の影響を最も受けやすい胎生期および乳幼児期の中枢神経系を対象として、環境汚染化学物質の中枢神経の分化・組織形成、機能発現に対する影響を包括的に把握でき、かつその作用機構の解明に直結する評価法の確立をはかることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) DNA 切断の定量によるアポトーシス誘導評価法の開発とその応用

①DNA : genomicDNA は、ラットの精巣あるいは神経細胞のモデル細胞である PC12 細胞より抽出した。アポトーシスの誘導は、培養液中の栄養因子である Fetal Bovine Serum の除去 (FBS (-)) 条件での培養および化学物質添加によった。DNA 切断の指標として、電気泳動による DNA のラダー状の切断の観察および TUNEL 法を応用した定量法を開発して行った。

②アポトーシス関連蛋白の測定

アポトーシス関連蛋白の定量には、western blotting 法を用いた。

(2) 環境汚染化学物質による神経系の分化、組織形成に対する影響評価系の確立

神経細胞の分化のモデル細胞として知られる PC12 細胞を用いて、NGF 非存在下 (未分化の状態) あるいは NGF 存在下 (分化過程で神経突起の伸長開始) で PC12 細胞に環境汚染化学物質を暴露し、その分化能への影響を測定した。

(3) 銅単独およびキレート銅による神経細胞死の評価機構の構築

①細胞は、神経細胞のモデル細胞である PC12 細胞を用いた。銅、生姜科ウコン由来のポリフェノールおよび銅-ポリフェノール (1:1) を最終濃度 0 から 100mM 添加し、24 時間培養後、細胞を採取し試料とした。

②細胞死の測定

ネクローシスの測定

ネクローシスは、サイトゾール中に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性により測定した。アポトーシスは、DNA 断片化の測定キットを用いて測定した。

③アポトーシス関連蛋白の測定

アポトーシス関連蛋白の定量には、western blotting 法を用いた。

④銅濃度の測定

細胞中の銅濃度は、誘導結合プラズマ質量分析装置を用いて測定した。

## 4. 研究成果

(1) DNA 切断の定量によるアポトーシス評価法の開発とその応用

①TUNEL 法による DNA 切断の定量法の開発

従来の TUNEL 法は、組織染色で使用され、主に定性に使用されてきた。本研究により、制限酵素による DNA 切断量を用いて検量線を引くことにより、DNA 切断を定量できる測定法を開発した。さらに、96 穴のプレートを用いることにより、同時多検体の定量が可能となった。本研究法と電気泳動によるラダー状の DNA 切断を組み合わせることにより、アポトーシスによる DNA 切断を評価する系の構築が可能となった。

②種々の化学物質による PC12 細胞のアポトーシス誘導への影響評価

上述の DNA 切断の評価に加え、アポトーシス関連蛋白の定量を併せて行い、可塑剤として使用されるフタル酸ジエステル、化粧品の防腐剤として使用されるパラベン類、甘味料として使用されるステビオサイドなど、良く利用される化学物質のアポトーシス誘導能に対する影響評価を行った。

i) 可塑剤として使用されるフタル酸ジエステルは、単独で、PC12 細胞にアポトーシスを誘導しないが、FBS (-) により誘起されたアポトーシスを増強することが明らかになった。

その機序として、ミトコンドリアからのチトクローム *c* のリリースを介したカスパーゼ-3 の活性化が示唆された。

ii) 化粧品の防腐剤として使用されるパラベン類は、アポトーシスの誘導能および FBS(-) により誘起されるアポトーシスに対する影響は弱い、メチルパラベンは、誘起されたアポトーシスに対して若干の増強作用があることが明らかになった。

iii) 甘味料として使用されるステビオサイドは、単独で、PC12 細胞にアポトーシスを誘導しないが、FBS(-) により誘起されたアポトーシスを増強することが明らかになった。その機序と関連して、アポトーシス促進因子である Bax の上昇とミトコンドリアからのチトクローム *c* のリリースが検出された。

(2) 環境汚染化学物質による神経系の分化、組織形成に対する影響評価系の確立

内分泌攪乱作用があり、中枢神経系への影響が懸念されている Bisphenol-A が中枢神経系に及ぼす影響を検出するために、PC12 細胞の分化 (神経突起の伸長) に及ぼす影響を検討した。その結果、Bisphenol-A は、神経突起伸長を抑制することが明らかとなった。さらに、その作用機構を明らかにするために、シグナル伝達の変動を検討した結果、Bisphenol-A による、神経突起伸長の抑制は、ERK と CREB のリン酸化の阻害により引き起こされることが明らかになった。これらの知見より、中枢神経系の分化、組織形成に対する化学物質の影響評価は、PC12 細胞を用いて、神経突起の伸長の計測と、MAPK、JNK、ERK などのシグナル伝達系の変動を詳細に検討することで可能となることが強く示唆された。

(3) 銅単独およびキレート銅による神経細胞のアポトーシス誘導の評価系の開発

我々はごく最近の研究により、PC12 細胞において、銅とポリフェノールのキレートにより、銅単独と比較してより強くアポトーシスを誘導すること、さらにアポトーシス誘導経路が異なっていることを明らかにした。すなわち、銅単独添加で誘導されるアポトーシスには、主にミトコンドリアからのチトクローム *c* の放出を介したカスパーゼの活性化経路が関与し、銅結合ポリフェノールによるアポトーシス誘導機構は、細胞内に取込まれた銅と銅結合蛋白である CCS および XIAP の相互作用により、最終的にアポトーシス阻止に重要な XIAP 蛋白の分解を誘導する経路によることが示された。これらの知見は、金属単独およびキレートされた金属によるアポトーシス誘導に関与する蛋白を用いた作用機序に直結する評価系の構築に極めて有効であり、さらなる進展が期待できる。

## 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 10 件)

①Sun Y, Guo Z, Iku S, Saito T and Kurasaki M: Diethyl phthalate enhances expression of SIRT1, DNMT3a and DNMT3b during apoptosis in PC12 Cells. Journal of Applied Toxicology, 2013 in press (査読有) doi: 10.1002/jat.2816.

②Sato S, Mukai Y and Saito T: Quercetin intake during lactation modulates the AMP-activated protein kinase pathway in the livers of adult male rat offspring programmed by maternal protein restriction. Journal of Nutritional Biochemistry. 24:118-123, 2013 (査読有) doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.03.007

③Kato E., Yamane S., Nomura R., Matsumoto K, Tashima K., Horie S., Saito T., Fujino H., Murayama T.: Dysfunction of neurogenic VIP-mediated relaxation in mouse distal colon with dextran sulfate sodium-induced colitis. Pharmacological Research, 65: 204-212, 2012 (査読有) doi: 10.1016/j.phrs.2011.09.004.

④Egawa M, Aoki K, Sun Y, Hosokawa T, Saito T and Kurasaki M: Effects of parabens on apoptosis induced by serum-free medium. Journal of Environmental Science and Health, part B, 47:196-204, 2012 (査読有) doi: 10.1080/03601234.2012.634341.

⑤Takahashi K, Sun Y, Yanagiuchi I, Hosokawa T, Saito T, Komori M, Okino T and Kurasaki M: Stevioside enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. Toxicology Mechanisms and Methods, 22: 243-249, 2012 (査読有) doi: 10.3109/15376516.2012.658978.

⑥Sun Y, Takahashi K, Saito T, Hosokawa T, Kurasaki M: Diethyl phthalate enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 111:113-119, 2012 (査読有) doi: 10.1111/j.1742-7843.2012.00869.x.

⑦Kurasaki M, Sun Y, Komori, M, Miyajima M, Hosokawa T and Saito T: Measurement of DNA damage by terminal deoxynucleotidyl transferase reaction. Advances in Biological Chemistry, 2: 243-247, 2012 (査読有)

DOI: 10.4236/abc.2012.23030

⑧Toyomura K, Saito T, Emori S, Matsumoto I, Kato E, Kaneko M, Okuma Y, Nakamura H and Murayama T: Effects of Hsp90 inhibitors, geldanamycin and its analog,

on ceramide metabolism and cytotoxicity in PC12 cells. *Journal of Toxicological Sciences*, 37: 1049-1057, 2012 (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.1049>

⑨ Seki S, Aoki M, Hosokawa T, Saito T, Masuma R, Komori M and Kurasaki M: Bisphenol-A suppresses neurite extension due to inhibition of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in PC12 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 194: 23-30, 2011 (査読有)

doi: 10.1016/j.cbi.2011.08.001.

⑩ Yasuda M, Yustiawati, Suhaemi M Syawal, Sikder, MT, Hosokawa T, Saito T, Tanaka S. and Kurasaki M: Metal concentrations of river water and sediments in West Java, Indonesia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87(6): 669-73, 2011 (査読有)

doi: 10.1007/s00128-011-0411-z

[学会発表] (計 21 件)

① Yongkun Sun et al.: Changes of Epigenetic Factors in Apoptotic Status Induced by Copper in PC12 Cells. 8th International Copper Meeting 'Copper in Biology' 9.30-10.5, Hotel Calabona, (Italy) 2012.

② Md. Tajuddin Sikder et al.: Correlation of dissolved metals with physico-chemical parameter of the major rivers in Dhaka, Bangladesh. International Symposium on Wild Fire and Carbon Management in Peat-Forest in Indonesia, 9.13-14, Hotel Novotel Bogor, (Indonesia) 2012.

③ Yongkun Sun et al.: Effects of Consumption of Green Tea during Lactation on Epigenetic Factors in Female Infants of Pregnancy Rats with Low-protein Diet. The 6th International Niigata Symposium on Diet and Health, 10.16-17, TOKI MESSE (Japan) 2012.

④ Masato Tanaka et al.: Effect of quercetin intake during lactation on the AMPK activation in the hypothalamus of adult male rat offspring programmed by maternal protein restriction. The 6th International Niigata Symposium on Diet and Health, 10.16-17, TOKI MESSE (Japan) 2012.

⑤ Masato Tanaka et al.: Humic acid induces the endothelial NO synthase activation via Hsp90 upregulation in human umbilical vein endothelial cells. International Symposium on Wild Fire and Carbon Management in Peat-Forest in Indonesia, 9.13-14, Hotel Novotel Bogor, (Indonesia)

2012.

⑥ 田中将登: 正常ヒト臍帯血管内皮細胞におけるフミン酸の eNOS リン酸化機構の解明. 第 23 回微量元素学会, 2012, 7. 5, (砂防会館, 東京)

⑦ 田中将登: 正常ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるフミン酸の炎症促進作用の検討. 第 82 回日本衛生学会 2012. 3. 25, (京都大学, 京都)

⑧ 孫永混: 妊娠期緑茶投与の出産仔エピゲネチック因子に及ぼす影響. 第 82 回日本衛生学会. 2012. 3. 25, (京都大学, 京都)

⑨ Sikder Md. Tajuddin et al.: 不可溶化  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  シクロデキストリンを用いた溶液中カドミウムの除去. 第 82 回日本衛生学会. 2012. 3. 25, (京都大学, 京都)

⑩ 孫永混: 妊娠期緑茶投与の出産仔エピゲネチック因子に及ぼす影響. 第 82 回日本衛生学会. 2012. 3. 25, (京都大学, 京都)

⑪ 宮島美貴: 加齢及び老化に伴う大脳皮質内での抗酸化酵素 Prx の回路異常, 第 82 回日本衛生学会. 2012. 3. 25, (京都大学, 京都)

⑫ 西村亮: 銅取り込みによる CCS-XIAP 分解を介した銅混合クルクミンのアポトーシス増強作用, 第 82 回日本衛生学会. 2012. 3. 25, (京都大学, 京都)

⑬ Nishimura R et al.: Curcumin and copper binding curcumin induced apoptosis in PC12 cells via mitochondrial pathways. 3rd International Symposium on Trace Elements & Health May 24-27, 2011 - Caja Murcia (Spain).

⑭ Kihara, Y et al.: Mechanism of toxicity on human vascular endothelial cells by humic acid obtained from tropical peatland. 3rd International Symposium on Trace Elements & Health May 24-27, 2011 - Caja Murcia (Spain).

⑮ Kihara Y et al.: General water quality and Toxicity of humic acid in tropical peatland, Central Kalimantan. 3rd International Workshop on "Wild Fire and Carbon Management in Peat-Forest in Indonesia", Aquarius Boutique Hotel, September 22-24, Indonesia (2011)

⑯ Tanaka M. et al.: Effects of humic acid on eNOS activities in human umbilical vein endothelial cells. 3rd International Workshop on "Wild Fire and Carbon Management in Peat-Forest in Indonesia", Aquarius Boutique Hotel, September 22-24, Indonesia (2011)

⑰ 西村亮: PC12 細胞におけるクルクミンの細胞死誘導に対する銅の制御機構, 第 81 回日本衛生学会, 2011. 3. 26, (昭和大学, 東京)

⑱ 北村昌彦: 豊平川河川水中のホウ素濃度および細胞培養系を用いたホウ素の生体影響

評価. 第 21 回日本微量元素学会, 2010. 7. 3,  
(京都大学, 京都)

⑱齋藤 健:老化促進モデルマウス SAMP10 の  
脳内テトラハイドロバイオプテリン (BH4)  
代謝の変動, 第 21 回日本微量元素学会, 2010.  
7. 3, (京都大学, 京都)

⑳西村亮:各種ウコン中のクルクミノイドお  
よび微量元素含有量の分析と関連性の検討  
第 80 回日本衛生学会, 2010. 5. 10, (仙台  
国際センター, 仙台)

㉑堀尾由香莉:PC12 細胞を用いたアスパルテ  
ームのリスク評価. 第 80 回日本衛生学会,  
2010. 5. 10, (仙台国際センター, 仙台)

[図書] (計 1 件)

齋藤 健 他、講談社サイエンティフィック、  
公衆衛生学 社会・環境と健康 第 3 版 村  
松 幸、中山健夫 編 2011, pp136 - pp143

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 健 (SAITO TAKESHI)  
北海道大学・大学院保健科学研究院・教授  
研究者番号: 40153811

### (2) 研究分担者

細川 敏幸 (HOSOKAWA TOSHIYUKI)  
北海道大学・高等教育推進機構・教授  
研究者番号: 00157025

藤田 博美 (FUJITA HIROYOSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 60142931

山内 太郎 (YAMAUCHI TARO)  
北海道大学・大学院保健科学研究院・教授  
研究者番号: 70345049

蔵崎 正明 (KURASAKI MASAACKI)  
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・  
助教  
研究者番号: 80161727