

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340104

研究課題名(和文)ビスフェノールAがエストロゲン受容体を介して示す神経突起伸長作用の生物学的意味

研究課題名(英文)The biological meaning of neurite outgrowth via bisphenol A and its receptor

研究代表者

下家 浩二 (SHIMOKE, KOJI)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：10351496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、BPAという環境ホルモンによる神経細胞死の研究過程で偶然に神経突起伸長作用を発見したことがきっかけとなり、その生物学的意義を解明するために開始された。研究開始当時は、所謂、“メス化”のみが研究の対象であったため、BPAが地球上の生物における脳神経系への新たなリスクファクターとなり得るのかが興味の対象となった。解析の結果、神経細胞に対し、突起伸長作用を有する他に細胞体が双極化することが分かった。また、これらの作用は、ヒストンH3内の14番目のリシン残基がアセチル化することにより引き起こされることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This research has been performed because of finding the neurite extending effect of bisphenol A(BPA), which belongs to endocrine disrupting chemicals. The research by others has been remitted to the sexual effect although ours focus on neurons. The results are that BPA induced neurite outgrowth with bipolarization on soma through histone H3 modification (acetylation) on specific lysine residue.

研究分野：神経科学

キーワード：bisphenol A PC12細胞 大脳皮質神経細胞 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

内分泌攪乱物質（環境ホルモンとも呼ばれる）による汚染は個体の成長や生殖に関与する内性ホルモンを阻害し、発生・成長の過程及び恒常性維持に深刻な異常を引き起こすとして問題視されている。特に、微量でも生物の恒常制維持機構に直接作用する環境ホルモンの特性が生物界に及ぼす影響は甚大であると考えられる。環境ホルモンの一種であるビスフェノール A (BPA) は、日本におけるプラスチック製品の原料として広く利用されている化学物質である。近年、毒性が無く加工食品の包装物として使用が認められていた BPA の溶出基準値よりも極めて低濃度で生体に影響を及ぼすことが報告されている。特に、BPA が経口摂取を通じて生物体内に取り込まれた場合、その化学的特性から血液脳関門 (BBB) を通過し、脳神経系に作用することが強く懸念されている。さらに、BPA の毒性作用機構について、正常な発生においても必要なヒストンの修飾と DNA のメチル化を介したエピジェネティックな分子機構を介して神経細胞に異常な作用を有する可能性があるとして注目されつつある。

本研究は、BPA という環境ホルモンによる神経細胞死の研究過程で偶然に神経突起伸長作用を発見したことがきっかけとなり、その生物学的意義を解明するために開始された。研究開始当時は、所謂、“メス化”のみが研究の対象であったため、BPA が地球上の生物における脳神経系への新たなリスクファクターとなり得るのかが興味の対象となった。

2. 研究の目的

本研究は、BPA が脳神経系の細胞に作用するかを分子・細胞レベルで作用しているかを見出し、生物に対してどのような意義が有るのかを探求することを目的としている。具体的には、BPA 添加後の細胞が神経突起伸長作用を有する Nr4a ファミリー遺伝子の発現が上昇するのか神経分化作用を有する NeuroD1 が発現上昇するのかを確認する。また、その遺伝子発現上昇作用がエピジェネティックな分子機構を介しているかを解析することを目的とする。

3. 研究の方法

<PC12 細胞の培養>

PC12 細胞は Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Sigma D-5796) 500 ml に対して、Horse Serum (HS) (Thermo Sr-0035C) と Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO 10437-028) をそれぞれ 25ml、Penicillin-Streptomycin (GIBCO 15070-063) を 0.5 ml、0.5 M HEPES を 10 ml 添加した培地 (5/5DMEM) を PC12 細胞培養用培地として用いた。また、5/5 培地に HS と FBS を添加しないものを Serum-Free

DMEM 培地 (SF-DMEM) とした。PC12 細胞は、75cm² 培養フラスコで 37、5% CO₂ 気相条件下で継代培養した。

<RT-PCR>

PC12 細胞を 6 cm-diameter dish に 0.5×10⁵ cells/cm² となるように播種した。翌日、細胞培養液をアスピレーターを用いてすべて除去し、各種薬剤を目的の濃度に調製して細胞に添加した。目的時間培養後、細胞を ISOGEN (Nippongene, Japan) を用いて回収し、フェノール-クロロホルム抽出を行って、Total RNA を回収した。cDNA は ReverTraAce qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて精製した。

<初代大脳神経細胞の培養>

分散培養を行うために胎生 17 日目の母親ラット由来の胎児ラットを母体の子宮から摘出し、胎児ラットの脳内の髄膜の剥離を行い、大脳皮質神経組織層を分離した。分離した組織を 4.5ml 1×HBSS (GIBCO 14185-052) と 0.5ml 10×Trypsin (GIBCO 15050-046) の混合液に加えて、37 の浴槽で 25 分間酵素反応させた。その後、酵素反応を止めるために 1ml の FBS を加え、室温で 2 分間 800 rpm で遠心処理した。アスピレーターで細胞の上澄み液を全て吸引し、500 ml Dulbecco's modified eagle's medium nutrient mixture F-12 HAM (Sigma D-8437) に対して 50 ml Serum, Fetal Bovine, BSE Tested, EC Approved を添加し、調製した DF 培地を大脳皮質神経細胞に 20 ml 加えた。細胞調製液をセルストレーナー (Falcon 352350) で通過させた後に、細胞数をカウントし、目的の細胞密度に希釈して分散培養を行った (Day In Vitro 0 : DIV0)。Plating した細胞は 37、5% CO₂ 気相条件下で培養を行った。1 晩培養後、細胞培養液をアスピレーターですべて除去し、24.4 ml Neurobasal (GIBCO 21103-049)、0.0625 ml GlutaMAX (GIBCO 35050-061)、0.5 ml B27 supplement (GIBCO 17504-044) 混合培地に交換し、目的の試薬を添加した (DIV1)。

4. 研究成果

これまでの実験結果から、BPA は高濃度で神経細胞のアポトーシス作用を引き起こすが、60 μM 程度の濃度で神経突起伸長作用を示すことを明らかにしている。本研究では、BPA が神経突起伸長だけでなく細胞体の形態を双極化させる作用をも有することを見出した。つまり、1つの細胞当たりの神経突起の数は、2本になる (図 1)。この結果は、脳内で緻密に構成されている神経回路形成に対して何らかの影響を及ぼす可能性を示唆している。次に、BPA の作用の分子機構を解明するため、PC12 細胞やラット培養大脳皮質神経細胞に対して以下の解析を行い、成果を挙げた。(1) 60 μM BPA

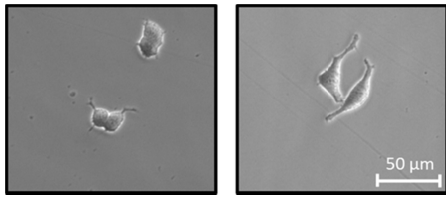


図 1

を 24 時間添加した後の形態的变化の様子を、タイムラプス型位相差顕微鏡を用いて観察した。その結果、無添加細胞群と比較して BPA 添加細胞群では有意な神経突起の伸長と、細胞体の長径と短径比率の変化(双極化)が観察された。また、その双極化は、BPA 添加後 4~8 時間に急激に進行することが分かった。この事実を、PC12 細胞だけではなく、ラット胎児 (E17) 由来の培養大脳皮質神経細胞でも同様であるかどうかを解析した。その実験では、100 μM BPA を培養大脳皮質神経細胞に暴露させたところ、24 (DIV2)、48 (DIV3)、72 (DIV4) 時間培養後にそれぞれ無添加群より有意な神経突起

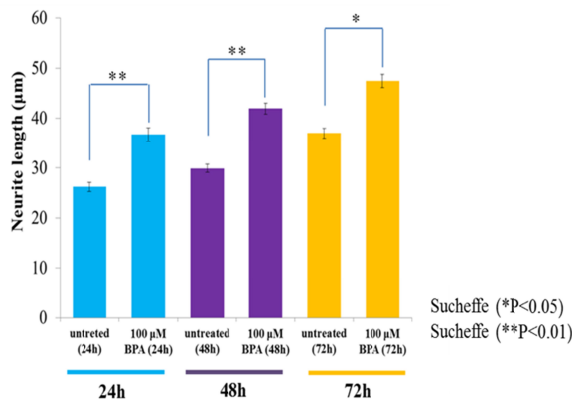


図 2

の伸長が観察された(図2)。さらに、BPA を 72 (DIV4) 時間暴露させたときには、無添加細胞群と比較して、神経突起の枝分かれの本数と 1 細胞当りに伸長している神経突起の本数が有意に低い値を示すことを見出した。(2) BPA による作用が、特定の遺伝子発現の変化を介し、エピジェネティックな発現制御を行っていることを作業仮説とし、PC12 細胞に対する DNA 側のエピジェネティックな作用の解析を行った。まず、DNA メチル基転移酵素 (Dnmt) 阻害剤である decitabine を添加する実験を行った。その結果、BPA と decitabine を PC12 細胞に共添加すると、BPA 単独添加時と比較して神経突起伸長度は変化しないことが分かった。よって、BPA が有する神経突起伸長作用は DNA のメチル化による遺伝子の発現制御機構を介していないことが示唆された。従って、PC12 細胞に対する BPA のヒストン側の作用の解析を行った。特異的なリシン残基のアセチル化の抗体 (H3K14) やトリメチル化の抗体 (H3K4、H3K9、H3K27) を用い

た Western blotting の結果、ヒストン H3K14 の経時的なアセチル化の亢進が確認された。しかし、神経細胞の発達や分化の制御に関わることが知られているヒストン H3K4、9、27 のトリメチル化は検出されなかった(図3)。さらに、培養大脳皮質神経

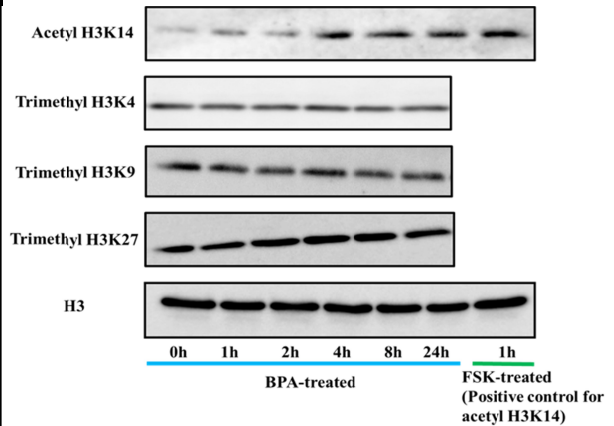


図 3

細胞を用いた胎生期の神経細胞における神経突起伸長による神経回路の形成に関わる NeuroD1 の発現変動を解析したところ、ヒストン H3K14 のアセチル化と同様のタイムコースで NeuroD1 の発現を上昇させることが明らかになった。(3) BPA 暴露による Nr4a ファミリー遺伝子の発現変動を解析した。BPA 添加後、Nr4a ファミリー遺伝子の mRNA を特異的に検出する primer セットを用い、RT-PCR を用いて解析した。その結果、発現は変動していないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- (1) R. Yamazoe, Y. Nishihata, K. Nakagawa, H. Aoyama, K. Shimoke, Genomic control of upregulation of GRP78 expression for promotion of neurite elongation and attenuation of cell death via PKA-mediated signaling in PC12 cells, *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics*, 4(4), 150-154, 2015.
- (2) K. Shimoke, Endocrine disrupting chemicals - inducers of epigenetic gene expression and enhancers of cell death in neurons, *Journal of Bioengineering and Biomedical Sciences*, 6(1), e122, 2015.
- (3) T. Tomioka, H. Maruoka, H. Kawa, R. Yamazoe, D. Fujiki, K. Shimoke, T. Ikeuchi, The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces neurite outgrowth in PC12 cells via the epigenetically regulated expression of the nur77 gene. *Neuroscience Research*, 88,

〔学会発表〕(計 23 件)

- (1) 島山恵利花, 津村風帆, 井戸大記, 丸岡弘規, 富岡拓磨, 山添亮輔, 下家浩二, Forskolin によって誘導される PC12 細胞の神経突起伸長と最初期遺伝子 *nur77* を介した発現機構の詳細, BMB2015, 2015 年 12 月 4 日, 神戸国際会議場, 兵庫.
- (2) 山添亮輔, 山本宇晃, 富岡拓磨, 丸岡弘規, 下家浩二, *nur77* ファミリー遺伝子の発現はヒストン修飾によるエピジェネティックな分子制御機構を介している, BMB2015, 2015 年 12 月 2 日, 神戸国際会議場, 兵庫.
- (3) 谷尾啓介, 津村風帆, 島山恵利花, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, Forskolin による神経突起伸長を誘導する *nur77* 遺伝子上流の転写活性制御機構, BMB2015, 神戸国際会議場, 2015 年 12 月 2 日, 兵庫.
- (4) 松浦玖実, 青山大輝, 藤枝聡志, 山添亮輔, 玄古宗一郎, 水井利幸, 小島正巳, 下家浩二, Bisphenol A による神経突起伸長における細胞内分子機構の解析, BMB2015, 2015 年 12 月 2 日, 神戸国際会議場, 兵庫.
- (5) K. Shimoke, R. Yamazoe, T. Tomioka, K. Tsumura, Y. Nishihata, H. Maruoka, T. Ikeuchi, Involvement of specific *nur77* family genes during neurite outgrowth induced by forskolin and a histone deacetylase inhibitor in PC12 cells, 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 19 Oct. 2015, Chicago, USA.
- (6) 山添亮輔, 西畑慶紀, 津村風帆, 島山恵利花, 富岡拓磨, 丸岡弘規, 下家浩二, Relevance between the expression of *nur* family genes and the neurite outgrowth through the histone modification, 日本神経化学会, 2015 年度大会, 2015 年 9 月 13 日, 大宮ソニックシティ, 埼玉.
- (7) 青山大輝, 藤枝聡志, 玄古宗一郎, 松浦玖実, 山添亮輔, 水井利幸, 小島正巳, 下家浩二, Neurite outgrowth and bipolarization in PC12 cells and cerebral cortical neurons induced by a low concentration of bisphenol A, 日本神経化学会, 2015 年 9 月 13 日, 大宮ソニックシティ, 埼玉.
- (8) K. Shimoke, T. Tomioka, H. Maruoka, T. Ikeuchi, Up-regulation of *Nur77* by HDAC inhibitors is important for neurite outgrowth, 1st International Summit on Clinical Pharmacy, 3 Dec. 2014, Los Angeles, USA.
- (9) 西畑慶紀, 富岡拓磨, 丸岡弘規, 上里新一, 下家浩二, 各種 HDAC 阻害剤による *Nur77* 遺伝子の発現上昇と神経突起伸長の相関性の比較解析, 第 37 回日本分子生物学会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜, 神奈川.
- (10) 津村風帆, 島山恵利花, 中川一馬, 丸岡弘規, 下家浩二, dbcAMP による神経突起伸長を誘導する *nur77* 遺伝子上流の転写活性制御機構, 第 37 回日本分子生物学会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜, 神奈川.
- (11) 島山恵利花, 富岡拓磨, 山添亮輔, 丸岡弘規, 池内俊彦, 下家浩二, dbcAMP で誘導される神経突起伸長における最初期遺伝子の発現機構の解析, 第 37 回日本分子生物学会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜, 神奈川.
- (12) 青山大輝, 篠崎遼太, 玄古宗一郎, 藤枝聡志, 水井利幸, 小島正巳, 下家浩二, 低濃度 Bisphenol A による PC12 細胞と大脳皮質神経細胞への神経突起伸長への形態的变化作用, 第 37 回日本分子生物学会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜, 神奈川.
- (13) K. Shimoke, T. Tomioka, H. Aoyama, Y. Nishihata, H. Maruoka, T. Ikeuchi, Induced expression of *Nor1* is not important for neurite outgrowth in PC12 cells, 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 15 Nov. 2014, Washington DC, USA.
- (14) 富岡拓磨, 津村風帆, 西畑慶紀, 森田有貴, 山添亮輔, 丸岡弘規, 池内俊彦, 下家浩二, *nur77* ファミリー遺伝子の発現と神経突起伸長作用との関連性, 第 87 回日本生化学会, 2014 年 10 月 15 日, 京都国際会議場, 京都.
- (15) K. Shimoke, T. Tomioka, H. Aoyama, Y. Nishihata, H. Maruoka, T. Ikeuchi,

Tricostatin A induces neurite outgrowth via expression of Nur77 in PC12 cells. World Congress on Neurotherapeutics, 5 Sept.2014, Basel, Switzerland.

(16) T. Tomioka, H. Aoyama, R. Yamazoe, H. Kawa, H. Maruoka, T. Ikeuchi, K. Shimoke, The molecular mechanism of TSA on neurite outgrowth, 第8回日本エビジェネティクス研究会, 2014年5月26日, 東京大学, 東京.

(17) 青山大輝, 豊田雄資, 藤枝聡志, 池内俊彦, 下家浩二, Bisphenol AによるPC12細胞の神経突起伸長におけるNGFとの形態的比較解析, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月4日, 神戸国際会議場, 兵庫.

(18) K. Shimoke, H. Maruoka, Y. Hirata, D. Fujiki, S. Uesato, T. Ikeuchi, Histone deacetylase inhibitor (K-350) promotes neurite outgrowth and cell survival via histone H3 modification in neurons. 43rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, 12 Nov.2013, San Diego, USA.

(19) 藤木大地, 豊田雄資, 西畑慶紀, 青山大輝, 上里新一, 池内俊彦, 下家浩二, 新規HDAC阻害剤K-350による神経突起伸長作用の解析, 第86回日本生化学会, 2013年9月12日, パシフィコ横浜, 神奈川.

(20) 伏水貴穂, 豊田雄資, 池内俊彦, 下家浩二, PUMAとBimの発現上昇を介した小胞体ストレス誘導型アポトーシスの誘導とその抑制機構, 第86回日本生化学会, 2013年9月12日, パシフィコ横浜, 神奈川.

(21) 中川一馬, 樽谷和馬, 岡野太一, 藤田亜弓, 下家浩二, 池内俊彦, PC12細胞における小胞体ストレス誘導型アポ

トーシスのforskolinによる抑制機構, 第86回日本生化学会, 2013年9月12日, パシフィコ横浜, 神奈川.

(22) 富岡拓磨, 山添亮輔, 河広倫, 丸岡弘規, 下家浩二, 池内俊彦, HDAC阻害剤で誘導される神経突起伸長におけるnur77遺伝子発現の解析, 第86回日本生化学会, 2013年9月12日, パシフィコ横浜, 神奈川.

(23) Y.Toyoda, H.Maruoka, D.Fujiki, S.Uesato, T. Ikeuchi, K. Shimoke, Prevention of tunicamycin-mediated apoptosis and induction of neurite by HDAC inhibitors in PC12 cells, 第56回日本神経化学会, 2013年6月23日, 京都国際会議場, 京都

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下家 浩二 (SHIMOKE, Koji)
関西大学・化学生命工学部・教授
研究者番号: 10351496

(2) 研究分担者

池内 俊彦 (IKEUCHI, Toshihiko)
関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号： 20093362
(平成25年度～平成26年度まで分担者)

(3)連携研究者
()

研究者番号：