

令和元年10月21日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00626

研究課題名(和文)ビスフェノールAが引き起こす神経細胞の形態変化を起点とした生体機能への影響評価

研究課題名(英文)Analysis of the effects on neural differentiation during presence of bisphenol A

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：商品の包装や食器などの製品に含まれるビスフェノールA(BPA)は、内分泌攪乱物質(環境ホルモン)であり内在性ホルモンの機能を阻害し、個体に異常を引き起こすことが知られている。よって、生体へのリスク評価が急務となっている。本研究では、モデル神経細胞PC12細胞やラット培養神経細胞に対しBPAを添加し、その後の細胞の形態的变化を観察した。また、この時の細胞内では、ヒストンH3のアセチル化とNeuroD1の発現の上昇が起こることを見出した。以上から、BPAの作用は、神経への分化の進行は妨げないが、発生初期段階における脳神経細胞の軸索の伸長度が低下させ、脳の発達に重大な影響を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋汚染をもたらす原因物質の一つとして、ペットボトルなどに使用されているプラスチックが挙げられる。このプラスチックには、可塑剤としてビスフェノールA(BPA)が含まれている。海洋中や飲料を含む食品の包装などには、BPAが溶出している。つまり、我々は、常にBPAを摂取していることになるため、BPAの人体への影響を評価する必要がある。本研究では、分子・細胞レベルで脳への悪影響を評価したことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：Bisphenol A (BPA) is included in plastics as a plasticizer widely. BPA is an endocrine disrupting chemical (EDC) that promotes a female-inducing phenotype in genital organs via estrogen receptors. BPA is a typical EDC that can cross the blood-brain barrier (BBB) due to its hydrophobic character, and neurons or glial cells can be affected in a BPA-specific manner. In cell-based assays, we also discovered that BPA is an inducer of neurite outgrowth in PC12 cells when we add lower dose. A molecular analysis showed that acetylation of histones was led to epigenetic regulation of gene expression. Based on these results, we suggest that intracellular signaling caused by BPA is mediated via the histone modification to extend the neurites.

研究分野：環境神経化学

キーワード：内分泌かく乱物質 ビスフェノールA PC12細胞 大脳皮質神経細胞 神経突起 軸索 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

女性ホルモン様の作用を有し、生体の内分泌系を攪乱する物質は、一般に環境ホルモンと呼ばれている。これまでに、雄性生体の雌性化(メス化)が問題とされてきた。そして、フェノール類(アルキルフェノール類等)、PCB、有機塩素系殺虫剤、フタル酸エステル、イソフラボン等に女性ホルモンの一つであるエストロゲン様の作用があり、その結果、メス化を引き起こしていることが明らかになっている。また、ピンクロゾリン、フルタミド系医薬品、芳香族アミン等は、男性ホルモンの受容体に対して拮抗作用を示し、その結果、メス化することも知られるようになった。

さらに、多くの環境ホルモンは、肝臓での解毒化作用を免れ、主として血液中や脂質が豊富な組織に蓄積し、生殖細胞を含め多くの細胞を死滅させることも知られるようになった。これは、環境ホルモンが女性ホルモンとして働く以外に、細胞死(アポトーシス)の分子機構も制御していることを示している(Sasaya et al., Apoptosis-inducing activity of endocrine-disrupting chemicals in cultured PC12 cells. *Advances in Biological Chemistry*, 2, 92-105, 2012)。その中でもアルキルフェノール類に属するビスフェノール A (BPA) は、プラスチック製品の可塑剤として広く利用されており、我々の生活用品として、ペットボトル容器にも使用されている。そして、BPA は、このペットボトル容器の水溶液中(水、ジュース、お茶など)に多量に溶け込んでいることが明らかになっている。BPA の化学的特徴として、脂溶性が高いことが挙げられ、摂取後は、体の様々な器官へと運ばれ、体内に蓄積することが知られている。そして、BPA が女性ホルモン活性を有するといった理由から、生殖器官に対する影響が主として明らかにされてきた。しかし、BPA の化学的特徴である脂溶性の高さを考えると、BPA は細胞膜の透過も容易であり、脂質含量が高い脳へも移行し、脳内の神経細胞に影響を及ぼすことが考えられる。事実、これまでの研究成果として、モデル神経細胞である PC12 細胞に対し BPA を添加すると、その細胞は、分化状態が初期の僅かに神経突起を伸長させた、細長い形状の幼若神経細胞様に形態変化することを発見している。この知見を出発点とし、BPA が及ぼす人体の影響を分子・細胞生物学的に解析した新たな知見が得られると考えられる。

## 2. 研究の目的

ビスフェノール A (BPA) は、プラスチック製品の可塑剤としてペットボトルなどの我々の生活用品に汎用されている。また、プラスチック製品から BPA が溶出し、我々の体内に経口摂取されていることも分かっている。ところが、BPA は環境汚染物質(環境ホルモン)としても広く知られている物質であり、いわゆる“メス化”との関連性が指摘されている。一方、私の研究では、BPA には神経細胞に対して、神経突起伸長の作用や、細胞体の形態変化を引き起こす作用があることを見出ししてきた。それらの知見から新たな知見を得るために、本研究では、BPA が引き起こすそれらの細胞内分子機構の解析や、神経細胞が有する神経回路への作用を分化マーカーなどに対する抗体を用いた免疫染色を行った解析を実施する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養用培地の調整と培養方法

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM: Sigma 社) 500 ml に対して、10% fetal bovine serum (FBS: PAA 社) 及び 0.1% Penicillin-Streptomycin (PS: Gibco 社) を添加した培地 5/5DMEM を細胞培養用培地とした。一方、DMEM に 0.1% PS のみを添加したものを、BPA を添加する培地である serum-free DMEM 培地 (SF-DMEM) とした。PC12 細胞は、75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ中で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 気相下、5/5DMEM を用いて単層培養した。培養大脳皮質神経細胞は、ニューロベサル培

地を PC12 細胞と同様に添加物を加えて細胞培養用培地とした。そして、直径 6 cm の dish 中、37°C と 5%CO<sub>2</sub> 気相条件下で単相培養した。

#### ( 2 ) 細胞サンプルの調整と神経突起長の測定

4%パラホルム溶液で神経細胞を固定化した後、倒立型位相差顕微鏡(キーエンス社)を用いて細胞の様子を観察すると同時に写真として画像を保存した。画像は、顕微鏡に付属の解析ソフトに取り込ませ、細胞体から伸長している神経突起の根本(細胞体の表面を 0 μm とする点)から伸長している最先端までの長さを直線的に測定した。尚、湾曲している場合には、湾曲部分を複数の短い直線として補正し、数値化した。

#### ( 3 ) western blotting による特定タンパク質の変動解析

BPA 添加後の細胞の細胞抽出液を lysis buffer で溶解させた後、超音波破砕機で処理した。そのサンプルを遠心分離 (15,000 rpm、25 分) で上清のみを得た。次に、サンプルのタンパク質量を定量するためにローリー法により、750 nm の吸光度の測定値からタンパク質濃度を算出した。その後、アクリルアミド電気泳動を行い、サンプル中のタンパク質群を分離し、PVDF 膜に転写した。その PVDF 膜は、10%スキムミルクに浸し、4 時間で 1 晩静置した。スキムミルクに浸した PVDF 膜は 60 分振盪後に、一次抗体によって 2 時間反応を行った。同様に二次抗体を 1 時間反応させた後、発光基質と発光反応させることにより目的のタンパク質を Image Quant LAS4010 (GE ヘルスケア社) で検出した。

### 4 . 研究成果

( 1 ) 私は、それらの作用以外に、細胞死を引き起こす BPA の濃度以下では、PC12 細胞を培養した際、神経突起の伸長作用があることを昨年度に見出している。この現象についても再現性を幾度も確認した ( 図 1 )。

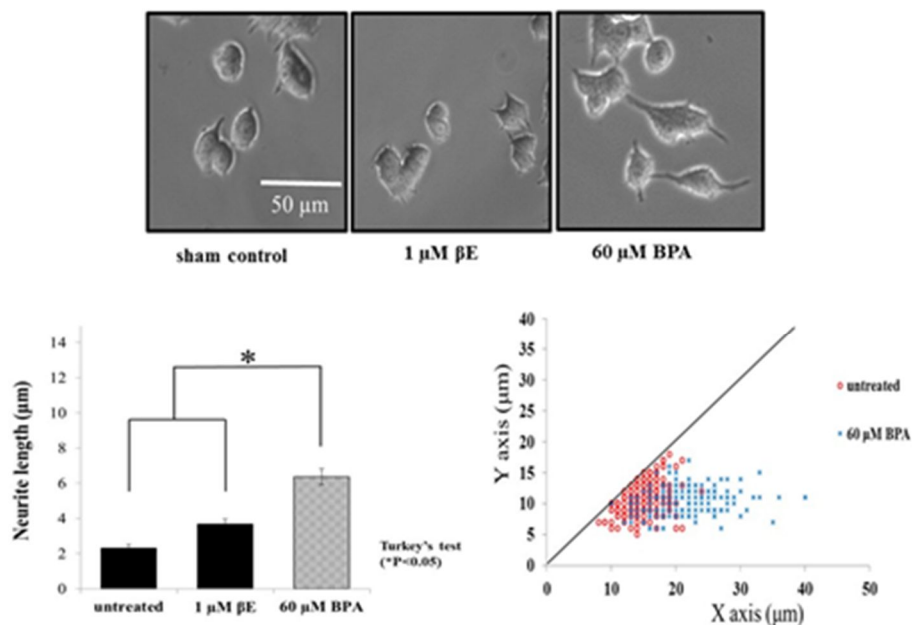


図 1 : PC12 細胞における BPA の神経突起伸長作用

更に、初代培養大脳皮質神経細胞に於いては、100 μM で有意な神経突起の伸長作用を有することも観察した。神経突起は、大まかに樹状突起と軸索に分類されることから、本年度は、伸長した突起がどの突起に分類され、それがどの様に変化するのかを解析した。その結果、BPA 添加

後 48 時間と 72 時間後に細胞を固定し、成熟神経細胞の樹状突起や軸索を免疫染色後にそれぞれの長さを測定した結果、神経突起全体では有意な伸長作用の増加が観察されたのに対し、軸索の伸長は抑制されていることが分かった。これらの結果は、BPA が胎児期における神経細胞が有する軸索の形成過程が途中段階で止まってしまい、正しくシナプス結合を形成できなくなることが予測される。逆に、発生のかなり初期の段階では、段階の神経細胞に運命決定された後にも樹状突起の神経突起の伸長を促進し、正しくシナプス結合が形成されずに活動電位のコントロールが出来なくなるとも予測される。この結果は、知覚神経などで受け取った信号を活動電位として脳神経へ伝播させることを阻害することを意味していることから、感覚、運動、行動に異常を表す様な疾患を惹起する可能性を示唆している。

(2) 細胞内の遺伝子発現の変化は、当然ながら細胞の形態変化にも影響を与える。その結果として、分化マーカーとなる遺伝子が知られている。本研究では、未成熟な神経細胞(未成熟ニューロン)のマーカーとして NeuroD1 と DCX、成熟した神経細胞(成熟ニューロン)のマーカーとして III-Tubulin と Synapsin1 を採用し、免疫染色によって発生過程のどの段階にあるかを解析した。この実験では、PC12 細胞を完全に未分化な細胞(未成熟ニューロンでも成熟ニューロンでもない細胞)とし、BPA によって神経突起を伸長させる分化を解析した。そして、培養大脳皮質神経細胞(E17)を未成熟ニューロンからの分化とした解析を行った。その結果、PC12 細胞を用いた実験では、BPA を添加した細胞群では、未成熟ニューロンのマーカーが添加 24 時間後と 48 時間後で有意に発現上昇していた。一方、成熟ニューロンのマーカーは、ほぼ変化がない(有意な変化がない)状況であった。そして、培養大脳皮質神経細胞(E17)を用いた実験では、BPA 添加 24 時間後と 48 時間後共に、神経前駆細胞マーカーの発現は上昇していた。未成熟ニューロンマーカーの発現は、control と比較して減少傾向であった。また、成熟ニューロンのマーカーの発現は、抑制されていた。

以上の結果から、BPA は、神経細胞への分化を誘導するが、その後の発生過程は途中で終了し、不完全な神経細胞のまま発生過程を進行させる作用を有していることが明らかになった。今後、ラットを用いた動物実験によって BPA の発生過程における作用が現れるのかを解析する必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

K. Matsuura, H. Maruoka, K. Shimoke, Possible neuronal toxin involving in plastics discarded in river or the ocean. *Clinical Pharmacology & Pharmaceutics*, 7, 1000187, (2018). 査読有

K. Matsuura, R. Yamazoe, H. Maruoka K. Shimoke, Epigenetic Regulation by Bisphenol A as a Neuronal Morphogen. *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*, 7(4), 1000e128 (2017). 査読有

K. Shimoke, Epigenetic Regulation: Neurite Outgrowth by Hormonal or Chemical Mechanisms in PC12 Cells, *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*, 6(5), 1000123, (2016). 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

松浦玖実, 丸岡弘規, 下家浩二, Bisphenol A が引き起こす軸索の伸長抑制作用とその細胞内分子機構, 第 71 回日本生化学会, 京都, (2018).

松浦玖実, 山添亮輔, 下家浩二, Bisphenol A が神経細胞に与える形態変化とその作用機構

の分子生物学的解析, ConBio2017, 神戸, (2017).

松浦玖実, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, Bisphenol A attenuates neuronal differentiation in cerebral cortical neurons, 第60回日本神経化学会, 仙台 (2017).

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, Regulation mechanisms of expression of Nr4a1 gene related with neurite outgrowth, 第59回日本神経化学会, 福岡 (2016).

〔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：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。