

研究ノート

胎生期及び授乳期海馬由来培養神経幹細胞の生存に対する
3-methylcholanthrene の影響に関する研究

木 津 良 一

同志社女子大学
薬学部・医療薬学科
教授

木下(後藤)由 佳

同志社女子大学
薬学部・医療薬学科
特別任用助手

倉 田 歩

同志社女子大学
薬学部・医療薬学科
6年次生

眞 田 法 子

同志社女子大学
薬学部・医療薬学科
特別任用助教

1. 序文

ダイオキシンはごみの不完全燃焼時に発生し、またタバコ煙、自動車の排ガスに含まれる、環境中至る所に存在する環境汚染物質である。近年、ダイオキシン類の中で最も毒性が強いとされる2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) は aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介して [Mimura *et al.*, 1997]、内分泌攪乱作用 [Halperin *et al.*, 1998]、発がん作用 [Nebert, 2004] を有することで知られている。また TCDD は、口蓋裂 [Yoon *et al.* 2000] や水腎症 [Couture-Haws *et al.*, 1991] といった奇形を誘発するほか、高次機能障害 [Powers *et al.*, 2005, Mistui *et al.*, 2006] や免疫機能障害 [Inouye *et al.*, 2003] を引き起こすことが明らかとなり、社会的な問題として関心が高まっている。

AhR は肝臓や腎臓など全身の様々な組織に

存在しており、ダイオキシン類や多環芳香族炭化水素をリガンドとして活性化する転写因子である。細胞質内の AhR はリガンドと結合すると核内へ移行し、cytochrome P450 (CYP) ファミリーである CYP1A1 や CYP1A2 等の遺伝子発現誘導を行う [Shimada *et al.*, 2002]。さらに最近、胎生期及び授乳期中に TCDD に暴露されたラットやマウスの新生動物で記憶・学習機能低下が認められた [Powers *et al.* 2005, Mitsui *et al.*, 2006]。この原因の一つとして、これら新生動物に認められた大脳皮質 [Mitsuhashi *et al.*, 2010] や小脳 [Collins *et al.*, 2008] の発達遅延が考えられた。一方、脳海馬も胎生期及び授乳期に多数存在する神経幹細胞の活発な増殖及び分化により構築される。しかしながらこれらの時期におけるダイオキシン暴露が海馬に及ぼす影響及び AhR を介すか否かについては未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、AhR アゴニストである 3-methylcholanthrene (3MC) を用い、胎生期及び授乳期マウス脳海馬由来培養神経幹細胞の生存に対する影響及び CYP1A1/1A2 の発現誘導について解析を行った。

Effects of 3-Methylcholanthrene on the Survival of Neural Stem Cells Obtained from the Hippocampus of the Mice in Prenatal and Lactational Period.

2. 方法

2-1. 動物飼育

実験動物の取り扱い、全て同志社女子大学動物実験指針に則り、同志社女子大学薬学部動物委員会規約に基づいて行った。C57BL/6J マウスを自由摂食及び摂水、気温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 及び湿度 55% で、8時から20時までの明期及び20時から翌朝8時までの暗期を持つ明暗サイクル下で飼育した。

2-2. 使用試薬・化合物

glucose、N-acetyl-L-cysteine、sodium bicarbonate、3MC は和光純薬工業（大阪）から購入した。Protease cocktail、phosphate inhibitor cocktail、3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl) 2,5-diphenyltetrazolium bomide thiazolyl blue (MTT) 試薬、insulin、penicillin、streptomycin、0.02% EDTA solution、progesterone、Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) はナカライテスク（京都）から購入した。sodium selenite、apo-transferrin は SIGMA より購入した。human epidermal growth factor (EGF) 及び human basic-fibroblast growth factor (bEGF) は Pepro Tech Ec, Inc. より購入した。Neurocult Chemical Dissociation kit は STEMCELL 社より購入した。Total RNA purification kit および KOD-PLUS ver.2 kit は TOYOBO より購入した。Prime script RT reagent kit は TaKaRa より購入した。

2-3. 胎生期及び授乳期マウス脳海馬由来培養神経幹細胞の培養

C57BL/6J 妊娠 14 日目 (E14) のマウス胎児または生後 7 日目 (P7) のマウスから脳海馬を摘出し、0.02% EDTA 酵素処理後、growth medium (DMEM/F12 containig 16.5mM glucose, 100 U/mL penicillin, 100g/mL streptomycin, 0.12% sodium bicarbonate, 20nM progesterone, 30nM sodium selenite,

25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apo-transferrin, 10ng/mL bFGF, 100ng/mL EGF) で懸濁し、ディッシュ上に播種した。37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーター内で 6 日間初代培養を行った。

2-4. 神経幹細胞の継代

培養 6 日目に得られた神経幹細胞を回収し、StemCell Technologies Inc Neurocult Dissociation kit を用いて継代を行った。

2-5. MTT assay

2-4 に準じて調製した培養細胞について、各培養日数経過後に遠心分離を行い上清除去後、MTT 試薬を添加し、37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーター内で 2 時間静置した。その後、0.04N HCl/isopropyl alcohol 混合溶液を加え、この溶液について 555 nm の吸収波長で測定した。

2-6. LDH assay

2-4 に準じて調製した培養細胞について、各培養日数経過後に遠心分離を行い、その上清を回収した物をサンプルとした。LDH 活性はサンプル、0.1mM nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) を含むリン酸カリウム溶液 (pH7.4) 及び 100mM sodium pyruvate を混合し、これを測定溶液とした。測定は 30 秒毎に 6 分までの 340nm の吸光度を測定し、その傾きから NADH の減少速度を計算し、LDH 活性 (nmol/min) を算出した。

2-7. mRNA の調製

2-4 に準じて得られた細胞に 3MC を添加し 24 時間後に細胞回収を行い、total RNA purification kit を用いて total RNA を抽出した。

2-8. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

2-7 で得られた total RNA を prime script RT reagent kit を用いて逆転写を行い、cDNA の合成を調製した。得られた cDNA から KOD-PLUS ver.2 kit 及び各種プライマー

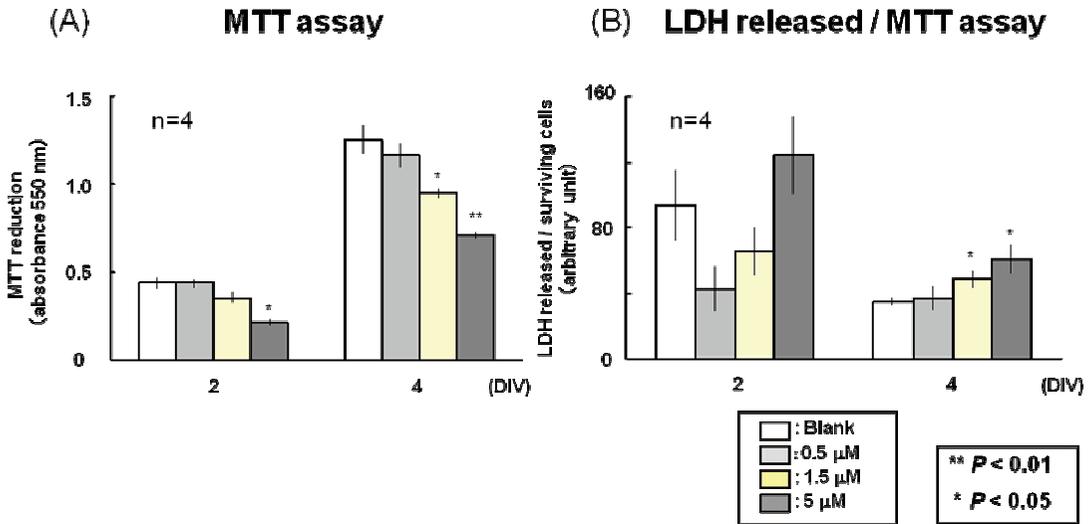


Figure 1. 胎生期海馬由来培養神経幹細胞の増殖 (A) 及び細胞死 (B) に及ぼす 3MC の効果

(CYP1A1、CYP1A2 及び β -actin) を用いて、PCR cycler により標的遺伝子 (CYP1A1、CYP1A2 及び β -actin) を増幅させた。使用したプライマー、反応条件及び PCR 生成物の長さ (bp) は、以下のとおりである。CYP1A1 (forward: CAGATGATAAGGTCATCACAG, reverse: TTGGGGATATAGAAGCCATTC, 98°C 10sec., 55°C 30sec., 68°C 30sec., 301bp)、CYP1A2 (forward: CGGAAGAGCGAGGAGATGC, reverse: TGTGTCAAAGCCAGCTCAA, 98°C 10sec., 63°C 30sec., 68°C 30sec., 330bp)、 β -actin (forward: GAGGCCAGACAAGAGAG, reverse: GGCTGGGGTGTGAAGGT, 98°C 10sec., 63°C 30sec., 68°C 30sec., 225bp)

2-9. データ解析

結果はすべて平均値 \pm 標準誤差で表示し、統計学的有意差は Student's *t*-test で判定した。

3. 結果

3-1. 胎生期海馬由来神経幹細胞の増殖及び細胞死に及ぼす 3MC の効果

胎生期由来培養神経幹細胞の増殖に対する 3MC の影響を MTT assay により解析した。

妊娠 14 日目の胎児より調製した神経幹細胞は継代直後から 3MC (0.5, 1.5, 5 μ M) を添加し、培養 2 日目及び 4 日目に MTT assay を行った。その結果、培養 2 日目では、5 μ M において生細胞数の有意な減少がみられた。また、培養 4 日目では、1.5 μ M 及び 5 μ M において濃度依存的に生細胞数の有意な減少がみられた (Figure 1A)。

次に、神経幹細胞の細胞死に対する 3MC の影響について検討した。死細胞数の指標として培養液中の LDH 活性を測定し、MTT assay の吸光度の値で補正した結果、培養 4 日目で 3MC の濃度依存的に LDH 活性の増加傾向がみられた (Figure 1B)。したがって、胎生期由来の神経幹細胞では 3MC 暴露により細胞死が引き起こされることが明らかとなった。

3-2. 授乳期由来海馬神経幹細胞の増殖と細胞死に及ぼす 3MC の効果

授乳期由来神経幹細胞の増殖に対する 3MC の影響について MTT assay により解析を行った。生後 7 日目のマウスから単離培養した神経幹細胞は継代直後から 3MC (0.5, 1.5, 5 μ M) を添加し、培養 2 日目及び 4 日目に MTT assay を行った。その結果、培養 4 日目にお

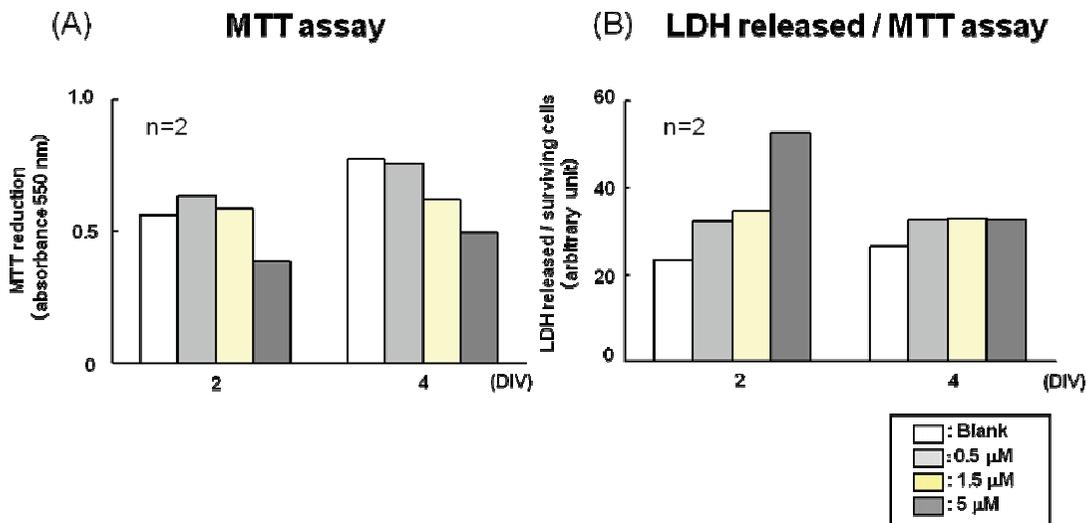


Figure 2. 授乳期海馬由来培養神経幹細胞の増殖 (A) 及び細胞死 (B) に及ぼす 3MC の効果

いて 3MC の濃度依存的に生細胞数の減少傾向がみられた (Figure 2A)。また、細胞死に対する 3MC の影響について LDH 活性を測定し、MTT assay の吸光度の値で補正した結果、培養 4 日目ではいずれの濃度においても LDH 活性に変化はみられなかった (Figure 2B)。したがって、授乳期由来の神経幹細胞は 3MC 暴露により細胞死を引き起こさないことが明らかとなった。

3-3. 3MC 暴露による胎生期海馬由来神経幹細胞の CYP1A1 及び CYP1A2 の発現

妊娠 14 日目の胎児あるいは生後 7 日目のマウスからそれぞれ脳海馬由来培養神経細胞を調製し培養 6 日目に 3MC を暴露し、24 時間後に CYP1A1 及び CYP1A2 の mRNA 発現レベルについて RT-PCR 法により解析を行った。その結果、胎生期由来の神経幹細胞において CYP1A1 及び CYP1A2 の mRNA 発現レベルの上昇はみられなかった (Figure 3A)。また、授乳期由来の神経幹細胞では CYP1A1 の発現誘導はみられたが、CYP1A2 の mRNA の発現はみられなかった (Figure 3B)。

4. 考察

胎生期及び授乳期はダイオキシンに対する感受性が非常に高い期間である [Tohyama, 2006]。本研究では、3MC が胎生期及び授乳期由来海馬神経幹細胞の細胞死を引き起こすか否かを検討した。その結果、胎生期由来神経幹細胞の細胞死を引き起こすことが明らかとなった。一方、授乳期由来神経幹細胞では、対照群と比較して 3MC 暴露群の LDH 活性は変化がみられなかったことから細胞死は引き起こさないことが明らかとなった。したがって、授乳期よりも胎生期の方が 3MC の影響を受けやすい可能性が示唆された。

また、胎生期及び授乳期に TCDD 暴露された新生動物は口蓋裂 [Yoon *et al.* 2000] や水腎症 [Couture-Haws *et al.*, 1991] などの奇形がみられることは広く知られている。これら毒性は AhR を介することが確認されている [Mimura *et al.*, 1997]。今回、胎生期海馬由来神経幹細胞に対して 3MC が細胞死を引き起こすメカニズムとして AhR が関与しているか否かを検討した。その結果、胎生期 3MC 暴露群の CYP1A1 及び CYP1A2 の mRNA 発現誘導はみられなかったが、授乳期 3MC 暴露

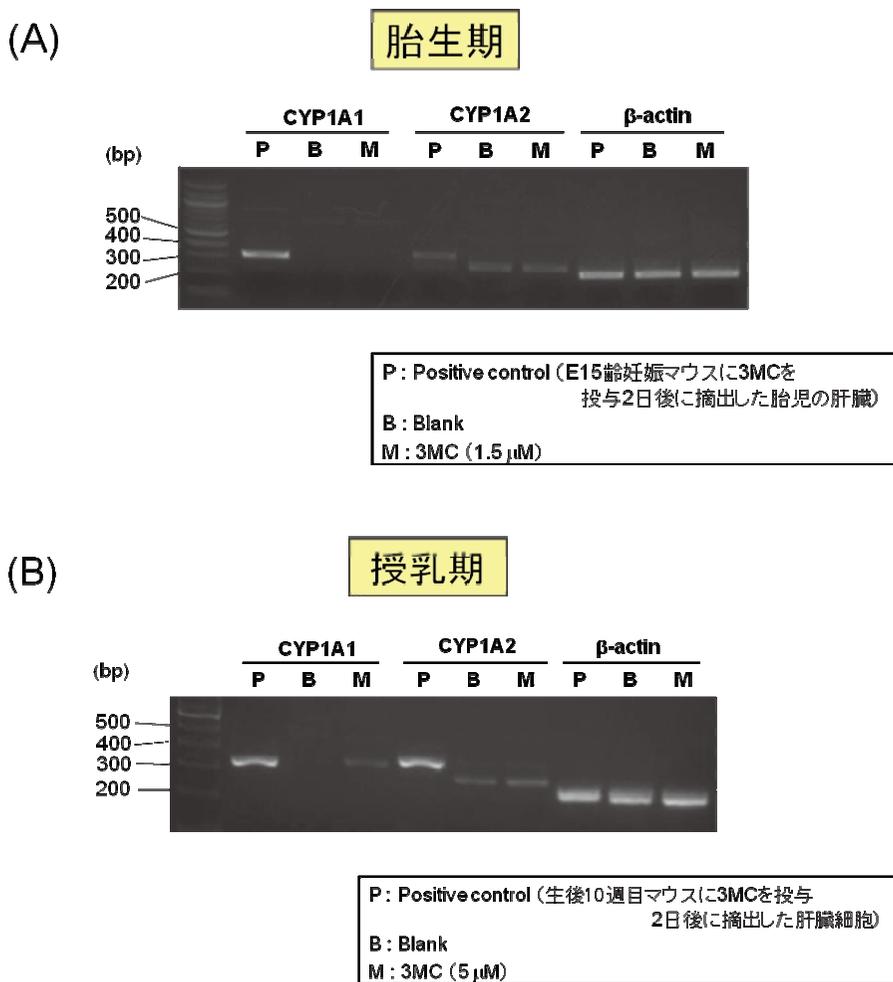


Figure 3. CYP1A1/1A2 の mRNA 発現レベルに及ぼす 3MC の効果
胎生期由来神経幹細胞 (A)、授乳期由来神経幹細胞 (B)

群の CYP1A1 の発現誘導がみられた。報告によると、ダイオキシン類の一つであるコプラナー pentachlorobiphenyl をマウスに暴露したところ、甲状腺ホルモンの攪乱作用が確認されたが、CYP1A1 の発現誘導がみられなかった [Nishimura *et al.*, 2005]。したがって、本実験の結果より胎生期 3MC 暴露による神経幹細胞の細胞死誘発に AhR を介さない可能性が考えられた。AhR は生体に広く分布しているものの、その標的遺伝子は多岐にわたる。本研究では AhR の標的遺伝子として CYP1A1 及び CYP1A2 を対象とし検討を行ったが、それ

以外の異なる遺伝子を誘導する可能性も考えられ、可能性のある標的遺伝子の誘導発現に対する検討も必要である。また、胎生期の AhR の機能についても検討余地がある。通常 AhR は heat shock protein (Hsp) 90、hepatitis B virus X-associated protein 2 (XAP2)、p23 等と複合体を形成し、細胞質に存在している [Perdew GH *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1998; Kazlauskas *et al.*, 1999]。ダイオキシン等のリガンドが AhR に結合すると Hsp90、XAP2 及び p23 と解離後、核内に移行し AhR nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマー

を形成する [Dong L *et al.*, (1996)]. これらは異物応答配列 xenobiotic responsive element (XRE) に結合し、CYP1A1 や CYP1A2 等の遺伝子の転写調節を行う。当研究室はこれまで、胎生期海馬由来神経幹細胞における Hsp90 や Arnt の発現、及び 3MC 暴露後の AhR 核内移行はみられなかったことを確認しているが、XAP2 や p23 の発現については現在検討中である。したがって、今後これら蛋白質発現を確認すると共に、AhR は胎生期でも複合体を形成しているか否かを検討する必要がある。また、授乳期由来神経幹細胞に 3MC 暴露後、CYP1A1 の発現誘導が認められたことから、胎生期と授乳期以降の AhR の機能が異なる可能性が考えられた。したがって胎生期由来神経幹細胞を神経細胞に分化させ、3MC 暴露後の CYP1A1 の発現誘導がみられるか否かについても検討し、胎生期及び授乳期以降の海馬における AhR の活性化に相違があるか否かを明らかにする必要がある。

5. 謝辞

本研究の一部は、2012 年度同志社女子大学研究助成金（個人研究）により行われた。

6. 参考文献

- Collins LL, Williamson MA, Williamson BD, Dever DP, Gasiewicz TA, Opanashuk LA, (2008) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure disrupts granule neuron precursor maturation in the developing mouse cerebellum. *Toxicol Sci*, 103 (1): 125-136
- Couture-Haws L, Harris MW, McDonald MM, Lockhart AC, Birnbaum LS (1991) Hydronephrosis in mice exposed to TCDD-contaminated breast milk: identification of the peak period of sensitivity and assessment of potential recovery. *Toxicol Appl Pharmacol*, 107 (3): 413-428
- Dong L, Ma Q, Whitlock JP Jr (1996) DNA binding by the heterodimeric Ah receptor. Relationship to dioxin-induced CYP1A1 transcription in vivo. *J Biol Chem*, 271(14): 7942-7948
- Halperin W, Vogt R, Sweeney MH, Shopp G, Fingerhut M, Petersen M (1998) Immunological markers among workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Occup Environ Med*, 55(11): 742-749
- Inouye K, Ito T, Fujimaki H, Takahashi Y, Take-mori T, Pan X, Tohyama C, Nohara K (2003) Suppressing effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci*, 74: 315-324
- Kazlauskas A, Poelinger L, Pongratz I (1999) Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem*, 274(19): 13519-13524
- Meyer BK, Pray-Grant MG, Vanden Heuvel JP, Perdew GH (1998) Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol*, 18(2): 978-88
- Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takag TN, Nakao K, Ema M, Soqawa K, Yasuda M, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells*, 2(10): 645-654
- Mitsuhashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuqu Y, Kosaki K, Takahashi T (2010) In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27 Kip1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(37): 16331-16335
- Mistui T, Sugiyama N, Maeda S, Tohyama C, Arita J (2006) Perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses contextual fear conditioning-accompanied activation of cyclic AMP response element-binding protein in the hippocampal CA1 region of male rats. *Neurosci Lett*, 398(3): 206-210
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ (2004) Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem*, 279(23): 23847-23850
- Nishimura N, Yonemoto J, Miyabara Y, Fujii-

- Kuriyama Y, Tohyama C (2005) Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *Arch Toxicol*, 79(5): 260-7
- Perdew GH (1992) Chemical cross-linking of the cytosolic and nuclear forms of the Ah receptor in hepatoma cell line 1c1c7. *Biochim Biophys Res Commun*, 182(1): 55-62
- Powers BE, Lin TM, Vanka A, Peterson RE, Juraska JM, Schantz SL (2005) Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure alters radial arm maze performance and hippocampal morphology in female AhR mice. *Genes Brain Behav*, 4(1): 51-59
- Shimada T, Inoue K, Suzuki Y, Kawai T, Azuma E, Nakajima T, Shindo M, Kurose K, Sugie A, Yamagishi Y, Fujii-Kuriyama Y, Hashimoto M (2002) Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyl in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, 23(7): 1199-1207
- Tohyama C (2006) Exposure to dioxins in the environment and their health risk. *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 61(1): 5-10
- Yoon T B, Inoue I, Kaneko T (2000) Teratological effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): induction of cleft palate in the ddT and C57BL/6 mouse. *J Vet Sci*, 1(2): 113-119