

論文内容の要旨

論文提出者氏名 ファルネ かおり

論文題目 Low doses of Bisphenol A disrupt neuronal differentiation of human neuronal stem/progenitor cells.

論文内容の要旨

環境化学物質であるビスフェノール A(以後、BPA)は、国際的規制下においても微量がヒト組織から検出されている。多くの疫学調査により、母体を介した胎生期の BPA 曝露と神経行動学的異常の関連性が示唆されている。一方、胎生期における大脳皮質発生において、中間型神経前駆細胞の数及び種類の増加に基づき、皮質神経細胞数及び多様性の増大と厚いサブプレートは、ヒト特異的な現象であることが知られる。BPA の齧歯類脳に対する影響はこれまでに多くの知見が集積されているものの、低用量 BPA がヒト大脳皮質発生中期において中間型神経前駆細胞の分化に影響を与えるかは不明であった。本論文は、低用量 BPA がヒト胎児前脳由来の神経幹・前駆細胞の神経細胞分化に与える影響を明らかにするため、*in vitro* の系で、神経幹・前駆細胞、中間型前駆細胞、及び未熟神経細胞の分化について、経時的に解析することを目的とした。

胎生期 7-10 週の前脳から樹立された神経幹・前駆細胞(Neuronal stem/progenitor cells: NSPCs)を用い、2次元 *in vitro* 曝露モデルとして、低用量 BPA あるいは対照として Vehicle のみを添加した分化培地で分化培養をした。培養後(day *in vitro*: DIV) 2、4、7、あるいは 12 に、Hoechst33342 による核染色の後、4%のパラホルムアルデヒドで固定した。免疫細胞化学染色を用い、神経幹・前駆細胞マーカーとして SOX2(SRY-box 2)、中間型前駆細胞マーカーとして NHLH1、未熟神経細胞マーカーとして doublecortin(DCX)を発現する細胞数を定量した。画像取得及び定量にはイメージングサイトメトリー IN Cell Analyzer2200 を用いた。具体的には、細胞を分散培養したカバーガラス 1 枚を 1 サンプルとして、1 サンプルにつき 137 セットの画像セット(核: 青チャンネル、解析対象分子: 緑又は赤チャンネル)を取得し、播種された細胞全体の 80%(面積比)を IN Cell Analyzer2200 ソフトウェアを用いて自動定量解析した。DCX 陽性細胞については、神経細胞突起の形態学的解析として、Fiji/ImageJ のプログラムを用いて 1 細胞毎に、神経突起数(細胞体からの枝分かれ数)、神経突起長の総和、最長の神経突起長を計測した。

予備実験において、NSPCs の増殖に影響を与えず、SOX2 陽性細胞に有意差を示す BPA 濃度として 100 nM を選択し、以後の実験は 100 nM BPA を用いた。SOX2 陽性細胞数(Hoechst33342 陽性数に対する百分率)は、DIV 2, 4, 7 全ての時点で 100 nM BPA 曝露群では対照群に比し減少したが、DIV 4($P < 0.005$)及び DIV 7($P < 0.05$)で有意に減少した。NHLH1 陽性細胞数については、統計的に有意ではないものの、DIV 2, 4, 7 全ての時点において、

100 nM BPA 曝露群では対照群に比し、増加傾向を示した。DCX 陽性細胞数は、DIV 2, 4, 7 全ての時点において 100 nM BPA 曝露群では対照群に比し増加していたが、DIV 2 では有意差をみとめた($P < 0.05$)。未熟神経細胞マーカー DCX 陽性細胞数が 100 nM BPA 曝露により増加したことから、最も早期に出現する成熟神経細胞のマーカーとして、TH(tyrosine hydroxylase)の発現を解析したところ、対照群で平均 13.03%、100 nM BPA 群で平均 69.68%であった($P = 0.0889$)。形態学的解析では、神経突起数に応じて、単極性細胞、双極性細胞、及び多極細胞に分類したが、100 nM BPA 曝露群では多極性細胞の数(DCX 陽性細胞数に対する百分率)が対照群に比し有意に増加し、単極性細胞が減少していた($P = 0.0045$, χ^2 検定)。神経突起の長さに関しては、100 nM BPA 曝露による変化はみられなかった($P > 0.05$, Mann-Whitney 検定)。本論文では解析対象外であったが、100 nM BPA 曝露群の神経細胞突起は、繊細な枝分かれを高頻度に有することが特徴として観察された。

以上の結果より、低用量 BPA(100 nM)曝露がヒト胎児由来 NSPCs の神経細胞分化に与える影響として、(1)未熟神経幹細胞(SOX2 陽性細胞数)の減少、(2)中間型神経前駆細胞(NHLH1 陽性細胞数)の増加傾向、(3)未熟神経細胞(DCX 陽性細胞数)の増加、(4)単極性 DCX 陽性細胞の減少と多極性細胞 DCX 陽性細胞の増加が確認された。SOX2 は Wnt/ β -catenin と相互作用すること、さらに、Wnt シグナリングが樹状突起の形態形成を制御すると報告されていることから、Wnt/ β -catenin シグナル伝達が、神経細胞分化、突起の形態学的変化に関与した可能性が考えられた。100 nM BPA 曝露群では、対照群に比し、中間型神経細胞マーカー NHLH1 陽性細胞数の増加傾向、未熟神経細胞マーカー DCX 陽性細胞数の有意な増加、成熟神経細胞マーカー TH 陽性細胞数の増加がみられており、神経幹細胞の神経細胞への分化が促進されていることが示された。中間型神経細胞の数及び多様性の増加は、ヒトの大脳皮質発生において重要であるが、この分化過程が低用量 BPA 曝露によりかく乱される可能性が推察される。一方、疫学的に、自閉症を有する小児では健常児と比較して、前頭野皮質における神経細胞数の増加、神経細胞の形態学的変化が報告されており、BPA 曝露による発生早期の神経細胞分化の異常がその背景にある可能性が示唆され、分子メカニズムの解明が望まれる。

以上が本論文の内容であるが、低用量 BPA がヒト胎児脳の大脳皮質神経細胞分化に及ぼす *in vivo* での影響について重要な手がかりを与え得る *in vitro* 曝露モデルでのデータを示した点において、科学的に有意な研究と考える。