

研究ノート

PC12 細胞の神経様細胞への分化に対する 3-メチルコランスレン及びベンゾ[*a*]ピレンの影響

¹木津良一 ²木下由佳
³中西彩香 ³平沼敦美 ⁴眞田法子

¹同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・教授

²同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・特別任用助手

³同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・5年次生

⁴同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・特別任用助教

Effect of 3-methylcholanthrene and benzo[*a*]pyrene on the differentiation of PC12 cells to neuron-like cells.

¹Ryoichi Kizu ²Yuka Kinoshita
³Ayaka Nakanishi ³Atsumi Hiranuma ⁴Noriko Sanada

¹Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Professor

²Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Adjunct assistant

³Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Doshisha Women's College of Liberal Arts, A fifth-year undergraduate

⁴Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Assistant professor

1. 序文

ダイオキシンは、ポリ塩素化ジベンゾ-*p*-ジ
オキシン、ポリ塩素化ジベンゾフラン及びコプ
ラナー PCB の各同族体の総称であり、環境中
に普遍的に存在する有害環境汚染物質である。
ダイオキシンの有害作用については、最も毒性
が強い 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin
(2,3,7,8-TCDD) を中心にして活発に研究され
ており、内分泌攪乱 [Helperin *et al.*, 1998]、
口蓋裂 [Yoon *et al.*, 2000]、水腎症 [Couture-
Haws *et al.*, 1991]、発がん [Nebert, 2004]、
高次機能障害 [Powers *et al.*, 2005] などとい
った多様な有害作用を引き起こすことが明らか

されている。

近年、2,3,7,8-TCDD の中枢神経への有害作
用についても注目されている。胎生期及び授乳
期中に 2,3,7,8-TCDD を曝露されたラットやマ
ウスの新生動物で記憶・学習機能障害が見られ、
2,3,7,8-TCDD を曝露された新生動物の大脳皮
質 [Powers *et al.*, 2005] や小脳 [Mitsui *et al.*,
2006] の発達遅延が認められることが報告さ
れた。胎生期・授乳期中の脳内では多数存在す
る神経幹細胞の増殖すると共に、神経細胞や各
種グリア細胞に分化することにより脳が構築さ
れる。したがって、これら時期の神経幹細胞の
増殖及び分化が影響を受けると中枢神経系の発
達障害や機能障害につながる可能性がある。

2,3,7,8-TCDD により神経幹細胞の増殖抑制 [Mitsuhashi *et al.*, 2010] や細胞死 [Collins *et al.*, 2008] が引き起こされることが報告されたが、神経幹細胞から神経細胞への分化に対する影響については未だ報告がない。そこで本研究では、ダイオキシンが神経細胞への分化に対する影響について知見を得る目的で、ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞の神経様細胞への分化に及ぼす影響を検討した。

2,3,7,8-TCDD をはじめとするダイオキシンの有害作用の多くは、核内受容体の一つであるアрил炭化水素受容体 (AhR) を介して発現される。AhR は全身の殆どの臓器に発現しており、ダイオキシン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。なお、化学物質の安全管理上の問題から本研究では、ダイオキシン代替化合物として強力な AhR リガンドである 3-メチルコランスレン (3MC)、ベンゾ [a] ピレン (BaP) を用いて研究を行った。

2. 方法

2-1 使用試薬・化合物

PC12 細胞は理化学研究所から購入した。3MC は和光純薬工業から購入した。penicillin、streptomycin、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)、はナカライテスクから購入した。

2-2 PC12 細胞の培養

ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞は、37°C、5% CO₂-95% 空気、湿度飽和の条件下で培養した。細胞の継代・維持には基本培地 [DMEM—10% horse serum (HS) —10% fetal bovine serum (FBS) —100 U/mL penicillin—100 U/mL streptomycin]、分化実験には分化培地 (DMEM—1% HS—0.5% FBS) を用いた。

2-3 PC12 細胞の分化に及ぼす 3MC 及び BaP の影響

PC12 細胞を分化培地に懸濁しディッシュに

播種した。24 時間後に NGF (1, 2, 5, 10, 20 または 50 ng/mL) を単独または AhR リガンド 3MC (0.5, 1.5 μM) あるいは BaP (0.5, 1.5 μM) と共に添加して培養を続けた。NGF 添加 4 日後に、顕微鏡下で細胞数を計数すると共に神経突起の有無を確認した。伸長した神経突起の長さが細胞体の直径より長いものを分化細胞 (differentiated PC12; dPC12 細胞) と定義し、全細胞数あたり dPC12 細胞の割合を算出した。

2-5 データ解析

統計学的有意差は Student's t-test で判定し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

3. 結果及び考察

3-1 PC12 細胞の分化に対する 3MC 及び BaP の影響

ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞における神経突起伸長に及ぼす 3MC と BaP の影響について検討した。PC12 細胞は神経栄養因子の一つである nerve growth factor (NGF) 存在下で神経突起が伸長する性質を持ち [Greene *et al.*, 1976]、これまで神経幹細胞様のモデル細胞として多くの研究に用いられている。

まず最初に、神経突起伸長における NGF の濃度依存性ならびに培養時間依存性について検討した。その結果を図 1 に示した。図 1(a) は、NGF 非存在下及び存在下で 4 日間培養した後の PC12 細胞の顕微鏡画像である。NGF の存在下において PC12 細胞は神経突起を伸長させることが確認できた。以後の研究においては伸長した神経突起の長さが細胞の直径より長いものを分化細胞 (dPC12 細胞) とし、全細胞数あたり dPC12 細胞の割合を分化率の指標とした。

図 1(b) は、分化率の NGF 濃度依存性及び培養時間依存性を検討した結果である。分化率はいずれの NGF 濃度においても経日的に増加する傾向が見られたが、NGF 濃度が 10 ng/mL 以上で顕著であった。一方、NGF 濃度 10 ng/

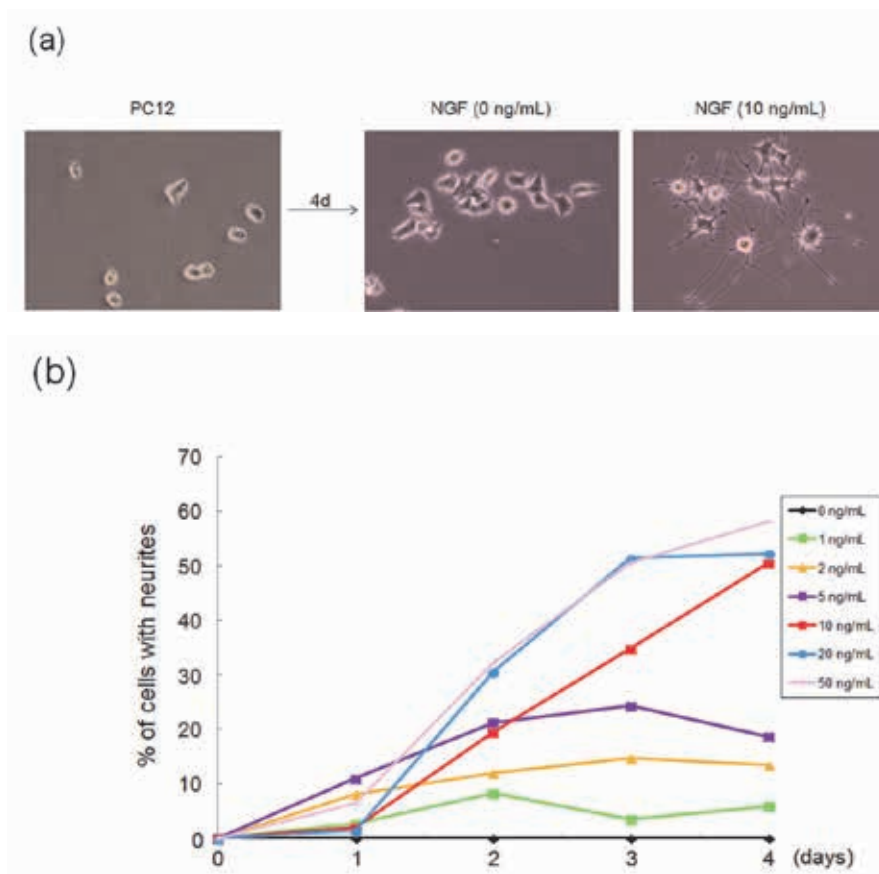


図1 NGFによるPC12細胞の (a) 神経突起伸長及び (b) その分化率

mL以上では分化率が50%で飽和する傾向も見られた。以上の結果から、PC12細胞の分化に対する3MC及びBaPの影響を検討するにあたり、NGF濃度は10 ng/mL、培養日数は4日と定めた。以上の検討結果を基に、3MC及びBaPの濃度を0.5または1.5 μ Mとし、分化に対する影響を検討した。その結果を図2に示した。3MC [図2(a)]とBaP [図2(b)]のいずれにおいても被験物質存在下で分化率が有意に低下し、3MCとBaPがPC12細胞の分化を阻害することが明らかとなった。

胎生期・授乳期にダイオキシンを曝露された新生ラットの記憶・学習機能低下が認められている [Powers *et al.*, 2005, Mitsui *et al.*, 2006] が、最近成体期にTCDDを投与されたマウスの記憶・学習機能低下を引き起こすことが報告

された [Latchney *et al.*, 2013]。Latchneyらは記憶・学習を司る海馬内の神経幹細胞が神経細胞へと分化する過程で、TCDDによる神経細胞への分化を抑制することを明らかにした。その詳細なメカニズムはまだ明らかになっていないが、胎生期では神経幹細胞が豊富に存在することから、胎生期の神経幹細胞が神経細胞へと分化する過程でもダイオキシンが分化を抑制する可能性は十分に考えられる。今回、神経様細胞の分化モデルとして知られるPC12細胞を用いた。このPC12細胞にはAhRを発現していることが認められており [Sanchez-Martin *et al.*, 2010]、当研究室でも確認している。そこでNGF誘発性PC12細胞神経突起伸長に対する3MCあるいはBaPの影響を検討したところ、dPC12細胞への分化率を抑制したことを明ら

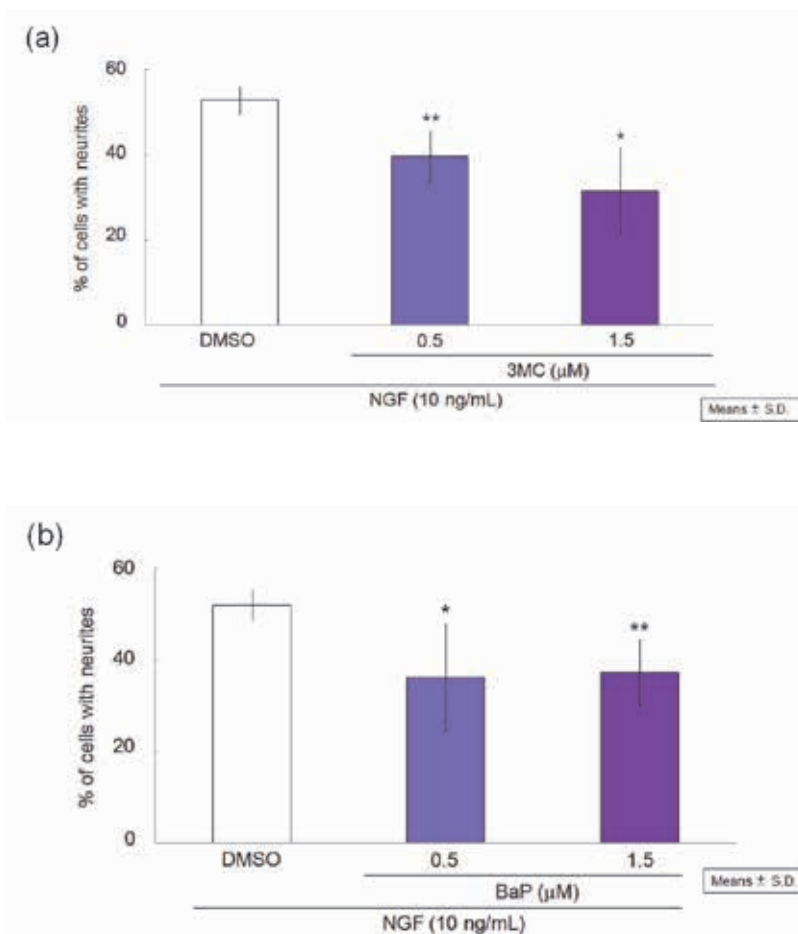


図2 NGFによるPC12細胞の分化に対する(a)3MC及び(b)BaPの影響
 NGF濃度：10 ng/mL、培養日数：4日、データ：平均±SD (n=3-4)
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

かにした。一方、NGFによるPC12細胞のdPC12細胞への分化にはNGFによるextracellular signal-regulated kinase (ERK)の活性化が関わっていることが報告されている[Vossler *et al.*, 1997, Oda *et al.*, 2007]。3MCおよびBaPがPC12細胞の分化を抑制する機構の一つとしてERKの活性化抑制が考えられた。

4. 結論

3-メチルコランズレン及びベンゾ[a]ピレンはPC12細胞の神経突起伸長を抑制した。

5. 謝辞

本研究の一部は、2014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。

参考文献

- Collins LL, Williamson MA, Thompson BD, Dever DP, Gasiewicz TA and 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 and 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
- Greene LA and Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73 (7): 2424-2428
- Halperin W, Vogt R, Sweeney MH, Shopp G, Fingerhut M and Petersen M (1998) Immunological markers among workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Occup Environ Med*, 55 (11): 742-749
- 木津良一、木下（後藤）由佳、倉田歩、眞田法子（2013）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、同志社女子大学総合文化研究所紀要第 30 巻 162-168
- Latchney SE, Hein AM, O'Banion MK, DiCiccio-Bloom E and Opanshuk LA (2013) Deletion or activation of the aryl hydrocarbon receptor alters adult hippocampal neurogenesis and contextual fear memory. *J Neurochem*, 125 (3): 430-445
- Mitsunashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K and Takahashi T (2010) *In utero* exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (37): 16331-16335
- Mitsui T, Sugiyama N, Maeda S, Tohyama C and 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 and 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
- Oda T, Kume T, Katsuki H, Niidome T, Sugimoto H and Akaike A (2007) Donepezil potentiates nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Pharmacol Sci*, 104 (4): 349-354
- Powers BE, Lin TM, Vanka A, Peterson RE, Juraska JM, and 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
- Reynolds BA, Tetzlaff W and Weiss S (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocyte. *J Neurosci*, 12 (11): 4565-4574
- Sanchez-Martin FJ, Fernandez-Salaquero PM and Merino JM (2010) 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis in neural growth factor (NGF)-differentiated pheochromocytoma PC12 cells. *Neurotoxicology*, 31 (3): 267-276
- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*, 89 (1): 73-82
- Yoon TB, Inoue I and 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