

## エストロゲン様化学物質による Staurosporine 誘発神経細胞死の阻害

根岸隆之<sup>1,3</sup>、石井寿幸<sup>1</sup>、久和茂<sup>1</sup>、吉川泰弘<sup>1,3</sup>、黒田洋一郎<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻実験動物学教室

<sup>2</sup> 東京都神経科学総合研究所分子神経生物学研究部門

<sup>3</sup>CREST,JST

近年、内分泌攪乱化学物質が生殖器系ばかりでなく中枢神経系発達に対しても影響を与える可能性が指摘されている。特にビスフェノール A は齧歯類において胎生期低濃度暴露により次世代の一般行動、育児行動等に影響を与えることが明らかにされている。一方、正常な中枢神経系の発達は細胞の増殖、移動、分化そしてプログラム細胞死によって厳密に制御されている。我々は、神経細胞死に対する影響を検討する目的で、初代培養神経細胞においてエストラジオール(E<sub>2</sub>)、ビスフェノール A(BPA)、およびノンニルフェノール(NP)の暴露が Staurosporine 誘発神経細胞死に与える影響を検索した。

胎齢 18 日ラット胎仔から得た大脳皮質、海馬由来神経細胞を血清およびフェノールレッドを含まない培養液で培養した。培養 4 日目に E<sub>2</sub>(1nM、10 μM)、BPA(10 μM)、NP(10 μM)を 24 時間暴露したのち、Staurosporine(100nM)により神経細胞死を誘発し 24 時間後の培養上清中 LDH を測定することにより神経細胞死を定量化した。また神経細胞死誘発後 6 時間における Caspase-3 の活性を定量化した。

大脳皮質由来神経細胞において BPA(10 μM)は有意な細胞死抑制効果を示したのに対し E<sub>2</sub>(1nM、10 μM)は効果が無かった。また NP(10 μM)は若干の細胞死抑制効果を示した。海馬由来神経細胞においては E<sub>2</sub>(1nM、10 μM)、BPA(10 μM)は有意な細胞死抑制効果を示した。また NP(10 μM)は若干の細胞死抑制効果を示した。細胞死誘発 6 時間後の Caspase-3 活性を定量化した結果、大脳皮質由来神経細胞において BPA(10 μM)および NP(10 μM)暴露は有意に Staurosporine による Caspase-3 活性の上昇を抑制した。海馬由来神経細胞では E<sub>2</sub>(1nM)、BPA(10 μM)および NP(10 μM)暴露が有意に Caspase-3 活性上昇を抑制した。さらに大脳皮質、海馬由来神経細胞において低濃度 BPA(10nM)も同様に有意に Caspase-3 の活性上昇を抑制した。

本実験の結果より、BPA および NP は Staurosporine による神経細胞死に対し Caspase-3 の活性上昇の阻害を伴う細胞死抑制効果を示した。

### Inhibitory effect of estrogenic chemicals on staurosporine-induced cell death of primary cultured cortical and hippocampal neurons

Takayuki Negishi<sup>1,3</sup>, Yoshiyuki Ishii<sup>1</sup>, Shigeru Kyuwa<sup>1</sup>, Yasuhiro Yoshikawa<sup>1,3</sup>, Yoichiro Kuroda<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Department of Molecular and Cellular Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Japan

<sup>3</sup>CREST,JST

We examined whether estrogenic chemicals could influence neuronal cell death, since programmed cell death was a major event during normal central nervous system (CNS) development. Primary cultured cortical and hippocampal neurons prepared from E18 rats were maintained in serum-free medium without phenol red. At 4 days in culture, estradiol (E<sub>2</sub>) (1nM and 10μM), bisphenol A (BPA) (10μM), and nonyphenol (NP) (10μM) were added to the culture medium. At 24 hr after exposure, neuronal cell death was induced by staurosporine (100nM), and LDH release for 24 hr was measured. Caspase-3 activity was assessed at 6 hr after staurosporine application. In cortical neurons, BPA (10μM) significantly inhibited staurosporine-induced LDH release, and NP slightly inhibited. However, E<sub>2</sub> showed no inhibitory effect. In hippocampal neurons, E<sub>2</sub> (1nM and 10μM), and BPA (10μM) significantly inhibited staurosporine-induced LDH release, and NP (10μM) slightly inhibited. In cortical neurons, BPA (10μM) and NP (10μM) significantly inhibited staurosporine-induced caspase-3 activity increase. In hippocampal neurons, E<sub>2</sub> (1nM), BPA (10μM) and NP (10μM) significantly inhibited staurosporine-induced caspase-3 activity increase. Furthermore, low dose BPA (10nM) also showed inhibitory effect against staurosporine-induced caspase-3 activity increase in both cortical and hippocampal neurons. These results suggest that inhibition of programmed neuronal cell death during normal development by estrogenic chemicals may cause an irreversible abnormal development of the mammalian CNS.