

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部 室長

研究要旨

高次生命系に対する内分泌かく乱化学物質の影響をみる一環として、神経系に着目する際にもっとも重要な視点は 2 つある。1. もっとも未成熟な神経細胞である神経幹細胞への影響、2. 生物学的関連性のはっきりした現象として捉えられる Window 効果、低用量問題などの神経影響である。研究の性格上、前者で基礎的な研究法を立ち上げ、後者において生物学的に重要な変化をみる。さらに軸として、エストロゲンレセプター α 、 β の発現についてみると、双方は発生・分化の段階でそれぞれ異なった発現、特異な役割が知られている。そこで、それらの過程でのエストロゲンレセプタースプライシングバリエーションの発現に着目し、さしあたりのツールとしてエクソン全長の RT-PCR-Southern Blotting 法と各エクソン個別のプライマーの構築を進めている。

A. 研究目的

高次生命系としての神経系に対する内分泌かく乱化学物質の影響のうち、本研究では胎生期における神経発生と分化に焦点を絞った。これは、胎生期において、内分泌かく乱化学物質の影響が不可逆的であることが懸念されていること、また、この時期の血液脳関門が未発達であるため母体経由で容易に内分泌かく乱化学物質の影響を受けることが危惧され点に基づいている。

高次生命系に対する内分泌かく乱化学物質の影響をみる一環として、神経系に着目する際にもっとも重要な視点は 2

つある。1. もっとも未成熟な神経細胞である神経幹細胞への影響、2. 生物学的関連性のはっきりした現象として捉えられる Window 効果、低用量問題などの神経影響である。研究の性格上、前者で基礎的な研究法を立ち上げ、後者において生物学的に重要な変化をみる。さらに軸として、エストロゲンレセプター α 、 β の発現についてみると、双方は発生・分化の段階でそれぞれ異なった発現、特異な役割が知られているので、それらのスプライシングバリエーションに着目して、さしあたりのツールとしてエクソン全長の RT-PCR と各エクソン個別のプライマー

の構築を進めている。

このようにして、高次生命系としての神経系の細胞分化に対するエストロゲン受容体の発現と機能修飾の分子機構を解析し、内分泌かく乱化学物質の影響とその作用機構を明らかにする。

B. 研究方法

1. 初代神経幹細胞培養系を用いた内分泌かく乱化学物質の影響の検討

マウス初代神経幹細胞培養系を確立するため、準備段階として、脳の実験の分野において技術的に進んでいるラットを用いた培養法の検討を行った。Wistar 系妊娠 (13, 15, 17 日目) ラットの胎児の脳新皮質の初代培養を行い、分化マーカーによる免疫染色及び RT-PCR 法によるエストロゲンレセプター α および β の発現を検討した。

2. RT-PCR 法を用いたエストロゲンレセプター検出系の確立

マウスエストロゲンレセプターのスプライシングバリエーションの構成を検討するため、エクソン全長の PCR 法として、マウスのエストロゲンレセプター α について、エクソン 1 末端とエクソン 8 最上流部のプライマーを用いた PCR を行い、その泳動産物を膜にトランスファーし、エクソン 2 からエクソン 7 を含むプローブを用いて、サザンブロッティングを行っ

た。

また、将来の個々エクソン解析のためのツールとして、欠損が予想されるエクソン 2 から 7 について、個別に del 2、del 3、del 4、del 5、del 6、del 7 の PCR プライマーセットを作製し、シーケンシングと組み合わせ、スプライシングバリエーションの存在を検討した。

C. 研究結果

1. 初代神経幹細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響の検討

胎生 13, 15, 17 日目のそれぞれの大脳新皮質の初代培養を行い、神経幹細胞のマーカーである nestin とニューロンのマーカーである MAP-2、グリア細胞のマーカーである GFAP の抗体を用い免疫染色を行った。各ステージにおける陽性細胞のポピュレーションは、培養初日では、MAP-2 陽性細胞は胎生 13 日では 26%、15 日では 31%、17 日では 48% と増加が見られ、この時期のニューロンへの分化が盛んに起きていることが観察された (図 1)。また、RT-PCR 法によると胎生 15 日及び 17 日日の大脳皮質初代培養細胞にはエストロゲンレセプター α および β の発現が検出された (図 2)。現在この実験系のマウスでの検討及び、内分泌かく乱化学物質添加の影響を検討している。

2. RT-PCR 法を用いたエストロジェンレセプター検出系の確立

生後 40 日齢の雌マウス大脳、海馬、視床下部、小脳について、エクソン 1 からエクソン 8 のプライマーで RT-PCR 反応を行い、得られた産物に対するエクソン 2 からエクソン 7 のプローブによるサザンブロット法で解析した結果、ワイルドタイプの全長バンド以外に、スプライシングバリエーションと思われる複数のバンドを検出した (図 3)。

個別のエクソン欠損スプライシングバリエーション PCR プライマーにより得られた産物は、予想されるマウスエストロジェンレセプター α (del 2, del 3, del 4, del 5) 及びマウスエストロジェンレセプター β (del 3, del 4, del 5, del 6, del 7) であることをシーケンシングにより確認した。この系を用いて、C57BL/6 雌マウスの生後 40 日齢の大脳、海馬、視床下部、小脳及び胎生 17 日の雌胎児の大脳、中脳、小脳におけるエストロジェンレセプターのスプライシングバリエーションの発現を検討したところ、各部位において、エストロジェンレセプターのスプライシングバリエーションが存在することを明らかにし得た (図 4, 5)。

D. 考察

今後、エストロジェンレセプターのス

プライシングバリエーションの発現検出系としての long PCR-Southern 法を expression アレイとして用い、内分泌かく乱化学物質に関する研究において重要と思われる諸問題、すなわち window 問題、低用量問題などに適用して、今後の研究の焦点を定めていく。現在、胎生期のマウスに DES を暴露した胎児脳を用いて、アレイ系が、薬物に対しての評価系となるかを検討しつつある。本研究では、神経幹細胞の分化過程におけるエストロジェン様作用物質の影響の検討とエストロジェンレセプターのスプライシングバリエーションの発現変化の検索を平行して押し進めている。今後の見通しとして、両者を比較しながら決定的な焦点を定めた後、long PCR-Southern 法で重要であると絞り込んだバンド群について発現遺伝子を同定していく。また、必要に応じて cDNA アレイによる発現遺伝子変化などの研究とも組み合わせてゆく。

E. 結論

ラット大脳新皮質の初代培養を行い、神経幹細胞のマーカーである nestin とニューロンのマーカーである MAP-2、グリア細胞のマーカーである GFAP の抗体を用い免疫染色を行った。また、RT-PCR 法により胎生 15 日及び 17 日の大脳皮質初代培養細胞にエストロジェンレセプ

ター α および β の発現を検出した。

マウスエストロジェンレセプター α のスプライシングバリエーションの検出系として、マウス成獣脳の各部位から得られた total RNA についてエクソン 1 からエクソン 8 のプライマーで RT-PCR 反応を行い、得られた泳動産物に対するエクソン 2 からエクソン 7 のプローブによるサザンブロッティングでスプライシングバリエーションと思われる複数のバンドを検出した。また、マウスエストロジェンレセプター α 及び β の各エクソンの発現を個別に検出する PCR 法を確立し、成獣及び胎生期のマウス脳の各部位においてエストロジェンレセプターのスプライシングバリエーションが存在することを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

菅野 純 内分泌攪乱のメカニズムを考慮した生物試験 医学のあゆみ 190(7-8):751-752, 1999

2. 学会発表

1) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Conformational changes on ER α induced by endocrine disrupting chemicals (EDCs). Keystone symposia, 2000

2) 佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上 達 : Pentachlorophenol の肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連 : 第 58 回日本癌学会総会、広島(平成 11 年 9 月 29 日～10 月 1 日)

3) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Mechanism based high through put screening method for endocrine disrupting chemicals (EDCs) using bio-sensor. 2nd European Workshop 99 International Molecular Toxicology 1999

4) 松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井上 達, 卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン枯渇期間と子宮肥大反応の関係について、日本内分泌攪乱化学物質学会第 2 回研究発表会 1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

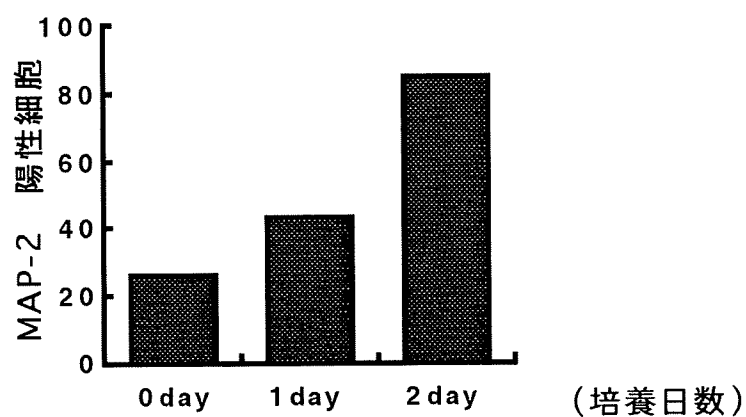
なし

3. その他

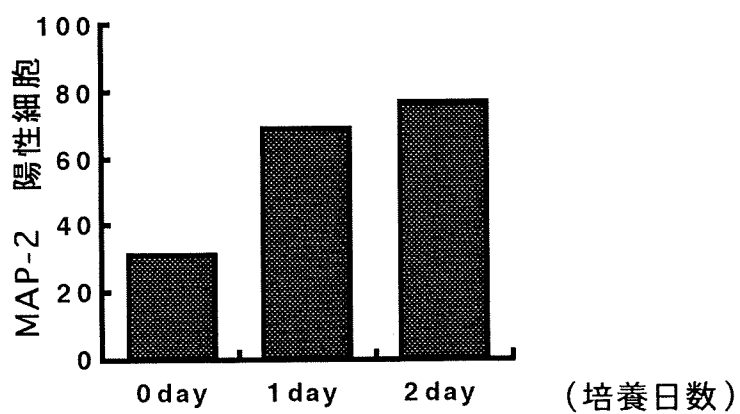
なし

図1 ラット大脳新皮質初代培養系における
ニューロン細胞の割合

E 13



E 15



E 17

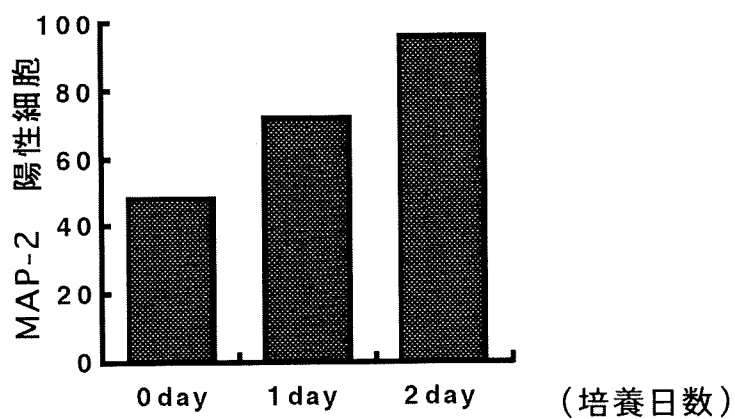
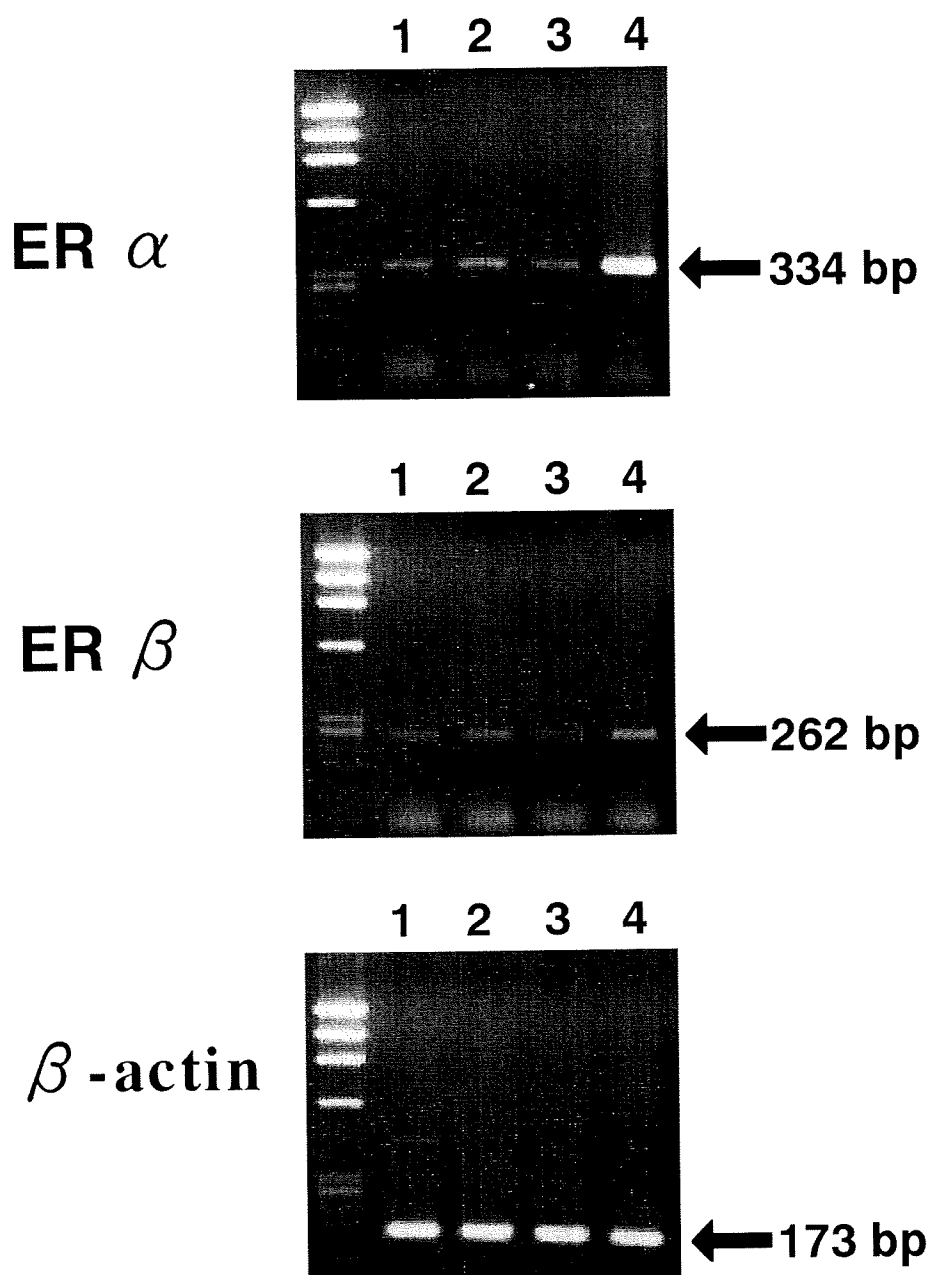


図2

RT-PCR法によるラット大脳新皮質初代培養細胞
におけるエストロゲンレセプターの発現の検出



Lane 1. cortex (adult female rat)
Lane 2. E15 neocortex
Lane 3. E17 neocortex
Lane 4. ovary (adult female rat)

図3 C57BL/6マウス 40日齢の脳におけるmER α
スプライシングバリエアントの発現（薬物未投与基礎データー）

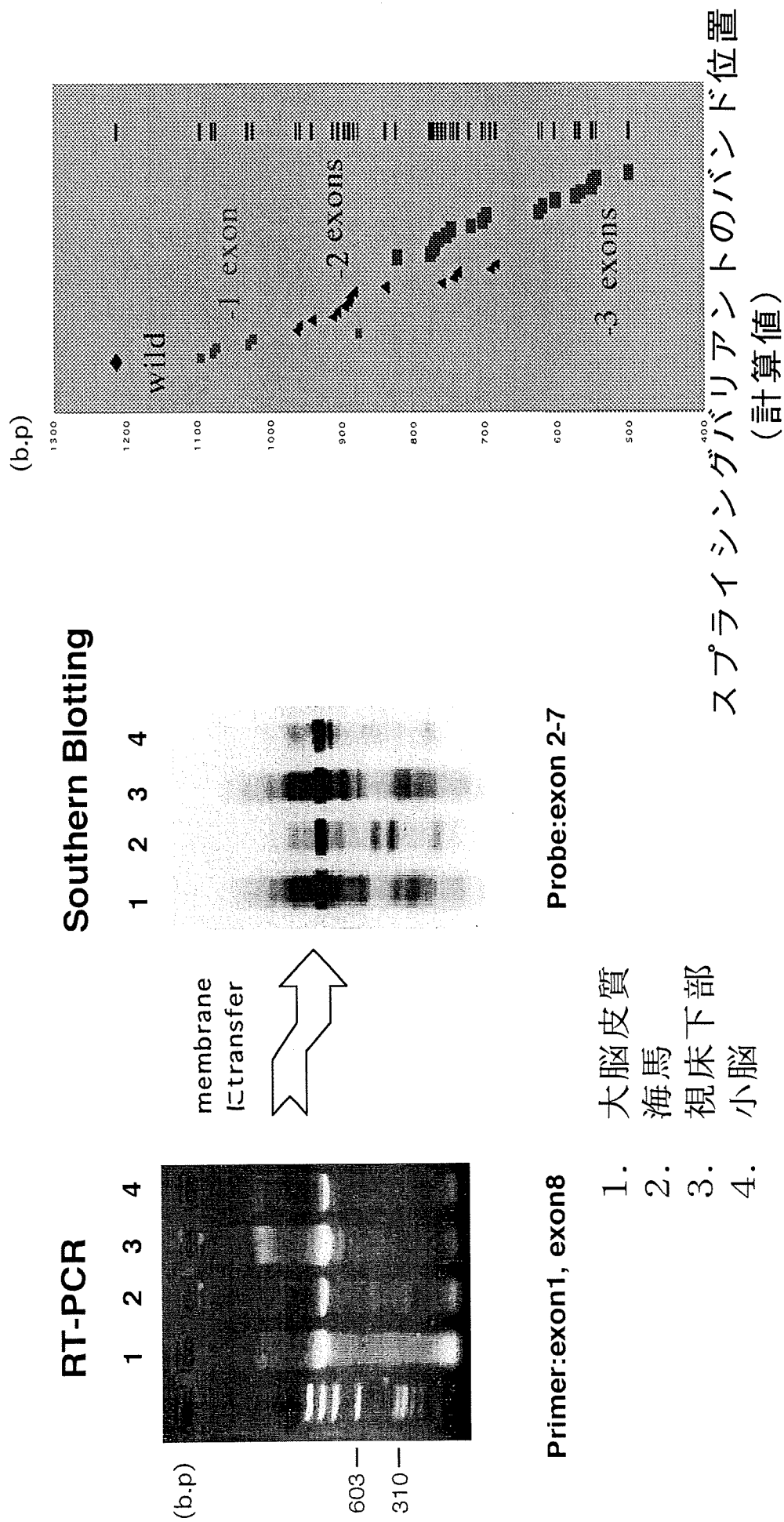
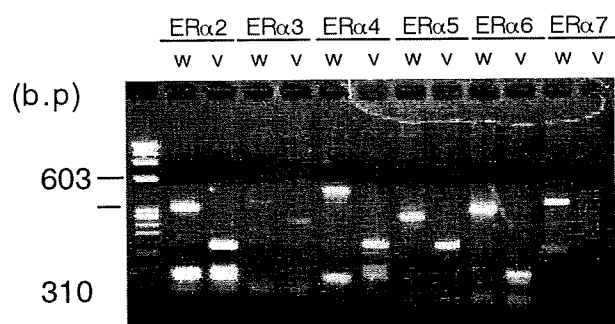
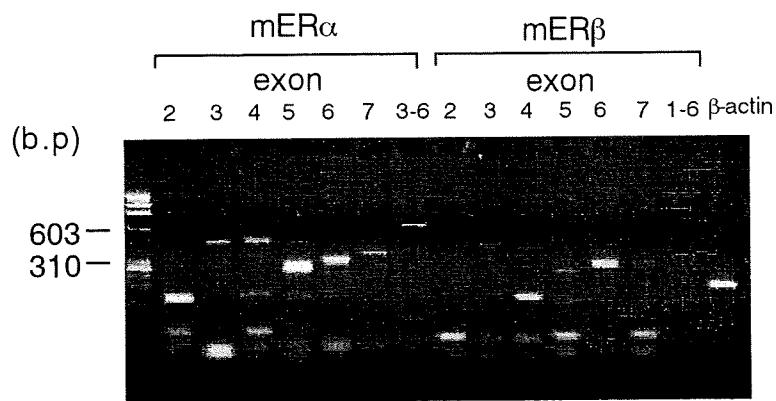


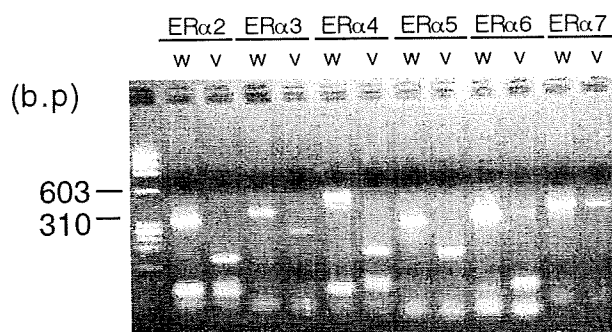
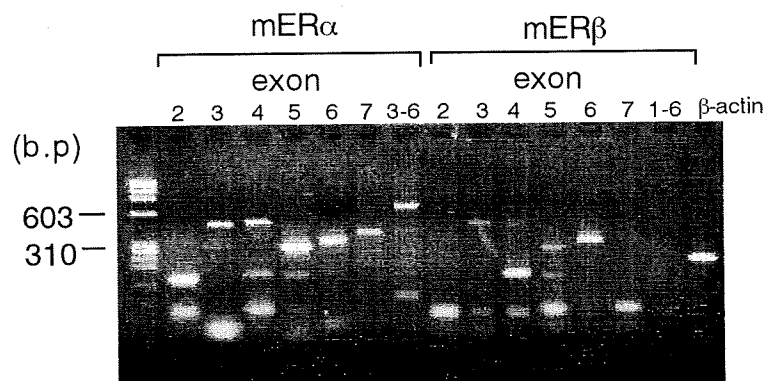
図4

RT-PCR法によるマウス脳（40日齢）の エストロゲンレセプターの発現の解析-1-

大脳



海馬

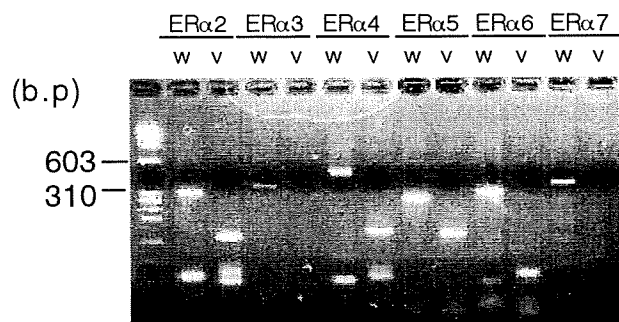
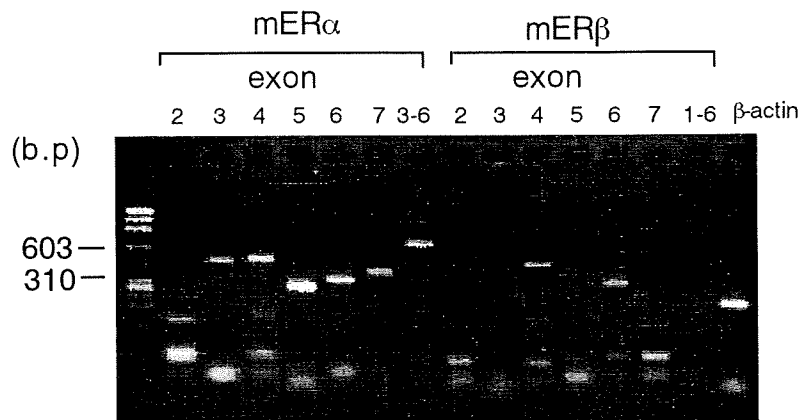


w:wild estrogen receptor,
v:splicing variant estrogen receptor

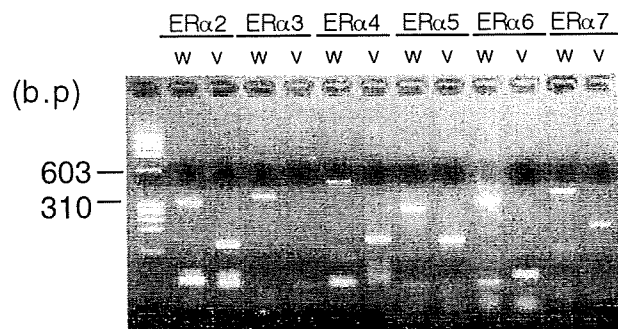
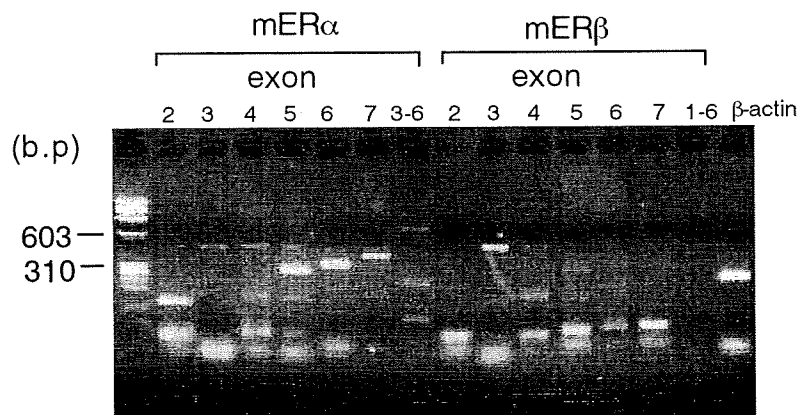
図5

RT-PCR法によるマウス脳（40日齢）の エストロゲンレセプターの発現の解析-2-

視床下部



小脳



w:wild estrogen receptor,
v:splicing variant estrogen receptor

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 広川勝昱 東京医科歯科大学 大学院医学系研究科
感染免疫病理 教授

研究要旨

合成エストロジェンのジエチルスチルベストロール（DES）を用いて、マウスの免疫系に与える影響を検討した。急性投与実験では胸腺萎縮、脾臓T細胞の減少と増殖能の低下が見られ、その変化は♂に比べて♀にやや顕著であった。また、若老間の比較では老齢マウスにおける影響の方が大きかった。一方、餌に微量のDESを混ぜる慢性投与実験では、胸腺の萎縮は急性投与実験と同様に見られた。DESの大量急性投与の場合のみならず、長期間のDES微量経口投与の場合でも免疫系に明らかな影響が見られることが分かった。また、その影響は性、月齢により異なることも明らかになった。

A. 研究目的

免疫系は感染に対する生体防御機構として働くと共に、内部環境のホメオスターシスを維持する上で重要な役割を果たしている。ホメオスターシスの維持においては、免疫系は神経系と内分泌系との緊密な総合作用をしながらその役割を果たしている。免疫系の主要構成細胞であるリンパ球は抗体やサイトカインを作るだけでなく、エンドルフィンなどの神経伝達物質や各種下垂体ホルモンを産生し、それらに対する受容体も持っている。リンパ球はステロイドは作らないが、副腎皮質ホルモンや性ホルモンに対する受容体を持ち、ステロイドの影響を受けることができるようになっている。従って、内分泌かく乱化学物質が免疫系に影響を及ぼすことは必至である。

本実験ではエストロジェン作用をもつ合成ホルモンであるジエチルスチルベストロール（DES）を用い、マウスを用いてその免疫系への影響を検討した。DESの生体への影響はその催奇性効果などの報告にあるように、胎児期から成長期にかけて見た報告は多い。そこでここでは、対象を老年期に絞り、低下しつつある免疫系にDESがどのような影響を及ぼすかを検討した。

B. 研究方法

動物：C57BL/6マウス（♂/♀）3ヶ月齢、

18ヶ月齢の4群を用いた。

内分泌かく乱剤：Diethylstilbesterol (DES)。
投与方法：急性投与実験；高用量(15mg/ Kg)、低用量(3mg/ Kg)を腹腔内投与で1回×5日。慢性投与実験ではDES微濃度(0.44μg/ Kg)と少濃度(4μg/ Kg)添加粉末飼料を3ヶ月間給餌。

検索日：最終投与後2日目に屠殺し、各臓器を採取し検索した。

検索項目

- A) 体重と臓器重量（胸腺、脾臓、肝、腎、精巣、卵巣、副腎）
- B) フローサイトメトリー 胸腺 (CD4/ CD8)、脾臓(Thy- 1/ B220, CD4/ CD8, ナイフ/ メリ-, NK/ CD3)
- C) リンパ球の増殖能 T細胞増殖能 (anti- CD3MoAb, Con A), B細胞増殖能 (LPS)
- D) 抗SRBC抗体産生能 (PFC法)
- E) NK細胞活性

C. 研究結果

1) DES腹腔内投与による急性影響：性別と月齢別比較（表－1）。

初年度には若齢マウスのオスとメスを用いて、低用量 (3mg/ kg) と高用量 (15mg/ kg) のDESを5日間連続腹腔内投与し、その影響を見た。その結果低容量で十分な影響が見ら

れることが分かったので、本年度は低容量を老齢マウスに投与した場合の影響を検索し、性別と年齢別で比較検討した。

a) 体重と免疫系以外の臓器重量。

体重はDES投与後軽度増加する傾向が若齢の雌雄ともに認められたが、老齢では変化がなかった。副腎の重量もDES投与後軽度増加する傾向が若齢の雌雄ともに認められたが、老齢では雌では増加するが、雄では減少した。若齢雄の精巣の重さには大きな変化はなかったが、雌の卵巣の増加は有為な増加を示した。しかし、老齢になると雄の精巣は萎縮し、雌の卵巣は増加傾向を示した。腎臓の重量は若齢では増加傾向を示したが、老齢では変化が見られなかった。肝臓の重量は若齢では雌雄ともに増加したが、老齢になると雌では増加するが、雄では減少した。若齢雌において子宮の腫大が認められたが、老齢ではむしろ減少傾向が見られた。

b) 胸腺と脾臓

DES投与により胸腺の著しい萎縮が性、月齢に拘わらず認められた。フローサイトメトリでみると、その胸腺萎縮はCD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ (DP) 細胞の減少として認められた。

脾臓の重量は胸腺とは逆に増加傾向を示し、それは若齢の雌雄と老齢の雄に明瞭であったが、老齢の雌では認められなかった。

c) 脾臓における細胞亜集団

胸腺に萎縮が見られた如く、脾臓のT細胞は性・月齢に関わらず減少することが分かった。T細胞の亜集団であるCD4⁺T細胞やCD8⁺T細胞についても同様の減少が見られた。しかし、CD4⁺T細胞の中のナイーブT細胞 (CD45^{high}CD44^{low}) とメモリーT細胞 (CD45^{low}CD44^{high}) の亜集団ではDES投与後の変化が異なり、ナイーブT細胞は増加傾向を示すのに対して、メモリーT細胞は減少傾向を示した。この傾向は老齢雄では見られたが、雌では見られなかった。B細胞についても減少傾向が性、月齢に関わりなく見られた。

d) 脾臓T細胞の増殖能

脾T細胞のin vitroにおける増殖能は性、月齢に関わらず抑制された。脾B細胞のin

vitroにおける増殖能は若齢雄では増加したが、若齢雌と老齢の雌雄では抑制された。

e) 脾臓における免疫機能

羊赤血球(SRBC)に対する抗体産生能は若齢では性に関わらず抑制された。加齢により抗体産生能は10分1以下に低下するが、老齢雄マウスではDES投与により軽度増加を示した。

YAC-1細胞を用いた非特異的なNK活性は若齢では雌雄いずれの場合も増加傾向を示したが、老齢ではむしろ減少傾向を示した。

2) DES添加飼料摂取による慢性影響：性別と月齢別比較 (表-2)

今回の給餌法によるDESの3ヶ月間の総摂取量を概算すると低容量添加飼料では0.1 μg/マウス、高用量添加飼料では1.0 μg/マウスとなった。これは急性変化をみた腹腔内投与量の100分の1から1000分の1という微量であった。因みに妊婦の血清中のエストロゲン値は10ng前後である。

a) 体重と免疫系以外の臓器重量。

体重は若齢では変化がなかったが、老齢では性、摂取量に関わらず軽度増加した。副腎には性、月齢、用量に関わらず変化がなかった。精巣については月齢に関わらず減少、卵巣については月齢に関わらず、増加傾向が見られた。腎は若齢の雄と老齢の雌で用量に関わらず増加傾向、若齢の雌と老齢に雄では変化がなかった。肝は若齢では高用量では不変であったが、低容量で減少傾向が時られた。老齢では雌において増加傾向が見られた。

b) 脾臓と胸腺

胸腺は若齢雄と老齢雌で明らかな減少が見られ、他では不変であった。しかし、CD4⁺8⁺のダブルポジティブ細胞はいずれの群においても減少し、胸腺は萎縮傾向にあることが窺えた。

c) 脾臓における細胞亜集団

胸腺の萎縮傾向とは異なり、脾臓T細胞の増加傾向が若齢の雌雄と老齢の雌に見られた。老齢の雄ではむしろ減少傾向であった。B細胞は一部を除いて減少傾向を示した。CD4⁺T細胞の中のナイーブT細胞 (CD45^{high}CD44^{low}) は若齢では急性影響の場合と同

様に増加傾向を示したが、老齢雌では減少、雄では不変傾向であった。メモリーT細胞 (CD45^{low}CD44^{high}) は減少か不変傾向を示したが、老齢雌では増加傾向を示した。NK細胞は若齢では性、用量に関わらず減少傾向を示し、老齢雌では逆に増加傾向を示した。

d) 脾臓T細胞の増殖能

抗CD3抗体による増殖能では若齢で不変、老齢雄では減少傾向を示した。

e) 脾臓における免疫機能

羊赤血球(SRBC)に対する抗体産生能は若齢の雌雄と老齢雄で増加傾向を示した。

D. 考察

合成エストロゲンのDESの免疫系に及ぼす影響をマウスをモデルとして行った。腹腔内に5日間投与する急性実験では胸腺萎縮、脾臓T細胞の減少とその増殖能の低下という免疫系の抑制が認められ、その影響は雄より雌の方がやや顕著であった。腹腔内投与量より $10^2 \sim 10^3$ のオーダー少ない量を餌に混じて3ヶ月間与えた慢性実験でも、胸腺の萎縮は明瞭に認められたが、免疫機能の低下については検出できなかったが、老齢ではむしろ軽度ながら機能亢進が認められた。

ごく少量のDESを長期間与える慢性投与実験でも、胸腺を中心とした免疫系に影響を及ぼすことが分かった。しかし、その影響を老齢マウスで見ると、必ずしも抑制効果ばかりではなく、免疫系の一部の細胞集団や機能は逆に亢進することが分かった。

このようにDESの免疫系への影響がその投与量、性、年齢により変化することは、免疫系の細胞に発現するDESの受容体の量、種類およびその下流にあるシグナル伝達系の違いと想定される。今後は免疫系の細胞に発現するエストロゲン受容体について、その量、種類、および加齢変化について検討したい。

E. 結論

DESの大量投与の急性実験、および長期間の微量投与のいずれにおいても胸腺を中心とした免疫系への影響が認められた。その影響はDESの用量、マウスの性と月齢により異なる

ことが明らかになった。

F. 業績目録

1. Wakikawa A, Utsuyama M, Wakabayashi A, Kitagawa M and Hirokawa K. Age-related alteration of cytokine production profile by T cell subsets in mice: A flow cytometric study. *Exp. Gerontol.* 34:231-242, 1999
2. Hirokawa K. Age-related change in signal transduction of T cells. *Exp. Gerontol.* 134:7-18, 1999
3. Ishiyama N, Utsuyama M, Kitagawa M and Hirokawa K. Immunological enhancement with a low dose of cyclophosphamide in the aged mice. *Mech. Age. Dev.* 111:1-12, 1999
4. Wu J, Zen Y-x and Hirokawa K. Signal pathway of mitogen-induced Ca²⁺ activated K⁺ current in young and aged T cell clones of C57BL/6 mice. *Cell. Signalling* 11:391-398, 1999
5. Wakabayashi A, Utsuyama M, Hosoda T, Sato K and Hirokawa K. Differential effect of oral administration of antigens on antibody response by host age: induction of tolerance in young mice but enhancement in old mice. *Mech. Age. Dev.* 109:191-201, 1999.
6. Ohashi T, Hanabuchi S, Kato H, Koya Y, Takemura F, Hirokawa K, Yoshiki T, Tanaka Y, Fujii M and Kannagi M: Induction of adult T cell leukemia-like lymphoproliferative disease and its inhibition by adoptive immunotherapy in T cell deficient nude rats inoculated with syngeneic human T cell leukemia virus type-1-immortalized cells. *J. Virol.* 73:P-p, 1999
7. Taniguchi K, Kohsaka H, Inoue N, Terada Y, Ito H, Hirokawa K and Miyasaka N. Induction of p16INK4a senescence gene as a novel therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nature Medicine* 5:760-767,

1999

8. Wakikawa A, Utsuyama M,
Wakabayashi A, Kitagawa M and
Hirokawa K. Vitamin E enhances the
immune functions of young but not old
mice under restraint stress.
Exp.Gerontol. 34:853- 862,1999

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

G. 知的所有権の取得状況

なし

1. 特許取得

表一 1 : DES 腹腔内投与による急性影響 : 対象群との比較

	若 齢		老 齢	
	♂	♀	♂	♀
体重	↑	↑	⇒	⇒
副腎	↑	↑	↓	↑
性腺	⇒	↑	↓	↑
腎	↗	↑	⇒	⇒
肝	↑	↑	↓	↑
胸腺	↓	↓	↓	↓
DN	↑	↑		
DP	↓	↓		
CD4SP	↑	↑		
CD8SP	↑	↑		
脾臓	↑	↑	↑	⇒
Thy1	↓	↓	↓	↓
CD4	↓	↓	↓	↓
CD8	↓	↓	↓	↓
B220	↓	↘	↓	↓
Naive	↑	↑	↑	↗
Memory	↓	↓	↓	⇒
NK	↗	↓	↓	↓
NKT	↓	↑	↓	↓
T α β	↓	↓	↓	↓
免疫機能				
PFC	↓	↓	↑	↓
ConA	↓	↓	↓	↓
PHA	⇒	↓	↓	↓
LPS	↑	↓	↓	↓
NKLYsis	↑	↑	↓	↘

マウスは若齢、3ヶ月齢。老齢は18ヶ月齢を使用した。

↗ (微増) ↘ (微減) ⇒ (不変) ↑ (増) ↓ (減)

表一 2 微量 DES 添加飼料給餌による慢性実験

	Young				Old			
	♂		♀		♂		♀	
	高	低	高	低	高	低	高	低
体重	⇒	⇒	⇒	⇒	↗	↗	↗	↗
副腎	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒
性腺	↓	↘	↗	↗	↘	↘	↗	↗
腎	↗	↗	⇒	⇒	⇒	⇒	↗	↗
肝	⇒	↓	⇒	↘	⇒	⇒	↗	↗
胸腺	↓	↓	⇒	⇒	⇒	⇒	↓	↓
DN	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
DP	↘	↘	↓	↓	↘	↘	↓	↓
CD4SP	↗	↗	↑	↑	↗	↗	↗	↗
CD8SP	↗	↗	⇒	⇒	↗	↗	⇒	⇒
脾臓	↑	↑	↑	↑	↘	⇒	↑	↑
Thy1	↑	⇒	↑	↑	↑	↑	⇒	↘
B220	↓	↓	⇒	↓	↓	↓	↘	⇒
Naive	↑	↑	↑	↗	⇒	↗	↘	↘
Memory	↘	↘	⇒	↘	⇒	⇒	↗	↗
NK	↘	↘	↘	↘	⇒	⇒	↗	↗
NKT	↗	↗	⇒	↑	↗	⇒	⇒	⇒
免疫機能								
PFC	↗	⇒	⇒	↗	↗	↗	⇒	⇒
NKLysis	↘	↘	↘	↗	↘	↘	↘	↘
α CD3	⇒	⇒	⇒	⇒	↘	↘	⇒	⇒

マウスは若齢、3ヶ月齢。老齢は18ヶ月齢を使用した。

↗ (微増) ↘ (微減) ⇒ (不変) ↑ (増) ↓ (減)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質による抗原提示細胞分化、機能への影響の解析

分担研究者 松島 綱治 東京大学大学院医学系研究科社会医学専攻衛生学教授

研究要旨

内分泌攪乱化学物質が免疫系におよぼす影響、特に樹状細胞を標的とした考察を加えるに当たり、その前段階として、生理的状态でのヒト単球由来樹状細胞、マウス骨髓造血前駆細胞由来樹状細胞の生物学的及び免疫学的特徴を検討した。ヒト単球由来樹状細胞では SAGE 法により MHC クラス II 関連の遺伝子が発現の上位を占めた。また樹状細胞への分化に伴って発現上昇する遺伝子に TARC があり、この細胞がアレルギー性疾患のような、Th2 優位の免疫学的疾患発症に大きく関与する可能性が示唆された。マウス骨髓造血前駆細胞由来樹状細胞は分化誘導後 6 日目に異なる表現型を持つ $CD11b^{-}/dull$ $CD11c^{+}$ 及び $CD11b^{+/high}$ $CD11c^{+}$ の未熟樹状細胞に分化し、ヒト造血前駆細胞からの分化パターンと類似していた。しかし、TGF- β の存在下では先述の 2 つの細胞群への分化は抑制され、マクロファージ様細胞へ選択的に分化した。この細胞は GM-CSF と TNF- α との再培養下 5 日目でランゲルハンス様細胞へ分化し、骨髓前駆細胞から樹状細胞へ分化する第三の経路であると想定された。また未熟、成熟樹状細胞両者とも CCR7 が発現し、SLC による走化遊走活性を有する機能的受容体であると思われた。

A. 研究目的

内分泌攪乱化学物質が人体に及ぼす影響が昨今問題となっているが、これまで疫学的考察が問題提起した段階に留まり、その障害メカニズムの詳細な解明はこれから課題である。今後は神経系、内分泌系、免疫系という相互のシステム統合体との観点からの考察が殊に重要である。そこで我々は免疫学的手法を用い、免疫系、特に免疫応答を調節する担い手として最近注目されている樹状細胞に焦点を絞り、内分泌攪乱化学物質が及ぼす影響を検討する。樹状細胞とは抗原提示能を司るプロフェッショナルな細胞集団で、この細胞に取り込まれた各種抗原を B 細胞、T 細胞へ抗原提示して免疫寛容、

免疫応答を誘導する。樹状細胞は免疫系の要となる細胞集団に他ならない。我々は現在までにヒト及びマウスの樹状細胞の培養系を樹立し、樹状細胞の生物学的特性、免疫学的特性を分析するためのツールとして多用している。即ち、ヒトでは末梢血単球から granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、interleukin-4 (IL-4)、及び tumor necrosis factor- α (TNF- α) 添加し、樹状細胞に分化させた。また、マウスではマウス骨髓由来 Lin 陰性 c-kit 陽性の造血前駆細胞から GM-CSF、stem cell factor (SCF) 及び TNF- α 添加培養下 10-14 日に成熟樹状細胞へ分化誘導した。そこで

我々はこの確立された系を用い、内分泌攪乱化学物質が樹状細胞へ及ぼす影響を評価することを課題とした。樹状細胞の機能評価するためには、先ず1) 生理的な状態での機能評価、具体的に云えば、樹状細胞の遺伝子発現パターン、MHC クラス II 発現状態、ケモカイン受容体の発現状況、抗原提示能、貪食能を掌握した上で、2) 各種内分泌攪乱化学物質存在下で、先述の樹状細胞機能を示唆する各種パラメーターを指標にどのような変化を示すか、と段階的にプロジェクト完遂を計画しており、本年度は特に1) の項で述べた、生理的状态下での樹状細胞に焦点を絞り、研究を遂行した。内分泌攪乱化学物質が免疫系に及ぼす影響を詳細なメカニズムにまで溯った研究は希少であり、この成果が自己免疫疾患を筆頭とした、成因不明の免疫学的疾患との相関性を推論し、疫学的考察に新たなパラダイムを提唱する可能性を秘めている。

B. 研究方法

日本血液センターへ献血提供の意志表示をした健常者から採取したヒト末梢血単核細胞から密度勾配法により単核球のみを分離し、MACS (Miltenyi Biotec, Beergisch, Germany) を用いて CD14 (LeuM3; Becton Dickinson, San Jose, CA) 陽性細胞をプラスチックプレートへ撒き、付着能を以って単球とみなし、樹状細胞分化への前駆細胞とした。GM-CSF (Kirin Brewery Co, Ltd, Tokyo, Japan)、IL-4 (Ono Pharmaceutical Co, Ltd, Osaka, Japan)、及び TNF- α 刺激により分化した樹状細胞の mRNA を抽出し、SAGE 法

を用いて同細胞に発現する遺伝子群を探索した。また表面マーカーの解析は CD1a (HI149, Pharmingen, San Diego, CA)、HLA-DR (4C3; Pharmingen)、CD33 (B8.12.2; Immunotech, Marseille Cedex, France)、CD40 (Pharmingen)、CD80 (MAB104; Beckman-Coulter, Fullerton, CA)、CD83 (HB13a; Coulter)、CD86 (2331; Pharmingen) を対象とした。

C57/B6 マウス (日本クレア、8~10 週齢、♀) の骨髓から密度勾配法で単核球を分け、セルソーター ELITE (Beckman-Coulter, Fullerton, CA) により Lin 陰性 c-kit 陽性骨髓前駆細胞を分離、GM-CSF (Basic Research Institute of Toray, Kanagawa, Japan)、stem cell factor (SCF) (Basic Research Institute of Toray, Kanagawa, Japan) 及び TNF- α 存在下で14日まで培養した。細胞表面解析には CD11b、CD11c、Ia (全て Pharmingen) を用いた。また RT-PCR 法によりケモカイン受容体発現を検討し、機能的受容体と想定される場合は、そのリガンドによる遊走能試験をマイクロチャンバーにて実施した。また抗原提示能を評価する目的で、MLR 試験は以下のように実施した。Allogenic なマウス脾臓由来単核球から T 細胞のみを分離し、樹状細胞と混合培養し、数日後 MTT 法にて細胞増殖活性を評価した。貪食能に関しては FITC-デキストラン (Sigma Chemical Co, Ltd, St. Louis, MO) を取り込ませフローサイトメーター

で評価した。またランゲルハンス細胞誘導目的に TGF- β (R&D System, Minneapolis, MN) をこの培養系に加え、分化経路への影響を調べた。

C. 研究結果

ヒト単球由来樹状細胞での mRNA は発現頻度順に、HLA-DR invariant chain、Ferritin L-chain、HLA-DR α chain であり、以下は別表に記す。このプロファイル中、樹状細胞への分化により転写促進された mRNA は gelsolin、TARC、lysosomal acid lipase 等であり、また逆に転写抑制された mRNA は MRP-14、MRP-8、Ficolin-1 等であった。

マウスの系では、分化誘導刺激後 6 日目に CD11b⁻/_{dull}CD11c⁺ 及び CD11b^{+/high}CD11c⁺ の異なる表現系を示す未熟樹状細胞群へ分かれ、14 日目には成熟樹状細胞へと分化した。分化に伴い CCR7 の発現が増強し、SLC による遊走活性が評価できた点から CCR7 は樹状細胞の遊走能に関与する機能的受容体であると推測された。また、TGF- β 添加により造血前駆細胞から先程の CD11b⁻/_{dull}CD11c⁺ 及び CD11b^{+/high}CD11c⁺ の未熟樹状細胞への分化が抑制され、培養後 10 日目にマクロファージ様の細胞に分化した。この細胞は GM-CSF と TNF- α との再培養にてランゲルハンス様細胞へ分化したことから、マウス骨髄由来造血前駆細胞から樹状細胞へ分化する第三の経路と想定された。

D. 考察

樹状細胞は様々な臓器に分布し、その異質性が樹状細胞への細胞生物学的及び免疫学的理解を困難にしている。我々が

施行した SAGE 法は以下の理由により各種樹状細胞を特徴化する点において有用な解析方法となり得る。従来の遺伝子検索の方法はノザンブロット、RT-PCR、ディファレンシャル・ディスプレイ法等のように限定した遺伝子のみしか解析できず、細胞が発現する遺伝子相互間の量的関係を把握するのは極めて困難であった。しかし SAGE 法により同時に多くの遺伝子の発現をモニターでき、遺伝子相互の発現量の差を的確に評価できる点で他方の追従を許さない。

単球由来樹状細胞では当初の予想通り MHC クラス II 関連の遺伝子が上位を占めた。分化により発現量が上昇した遺伝子としてケモカインに属する TARC がある。Th2 タイプのリンパ球に発現する CCR4 陽性細胞に対する走化遊走活性があり、この単球由来樹状細胞がアレルギー疾患のような Th2 タイプの優位な病態で大きな役割を演じることが示唆された。アレルギー性疾患と環境との接点は新たな予防法及び治療への応用を考慮する上で極めて重要と思われ、内分泌攪乱化学物質がアレルギー疾患に及ぼす影響が樹状細胞を通して観察できるかも知れない。

ヒトでは CD34 陽性造血前駆細胞からの樹状細胞分化経路は確立されているが、マウスでは実験操作技術の困難さが理由となり、研究進展が滞っていた。けれどもノックアウトマウス等の生体工学マウスを多用する免疫学の分野ではマウスは必須のツールであるため、樹状細胞への分化経路を早急に解明することが望まれていた。マウス造血前駆細胞は途中で 2 系統へ分化する点で、ヒトと類似する分

化経路を維持している。またヒトで単球由来樹状細胞からランゲルハンス細胞に分化する必須のファクターは TGF- β であるという認識のもとで、マウスの系で検討した結果、ヒト同様にE-カドヘリン強陽性のランゲルハンス様細胞へ分化した。またケモカイン受容体 CCR7 の発現も大枠でヒトと共通している。ヒトでは未熟樹状細胞では CCR6、漸次成熟するに伴い、CCR7 の発現量が上がってくるのであるが、マウスでは未熟、成熟を問わず CCR7 が発現しており、CCR6 は両群で発現が観察できない点から種差に基づく相違、或いは我々が培養後6日目以前に未熟樹状細胞と呼ぶに相応しい細胞群の存在が示唆される。この CCR7 はそのリガンドである SLC による走化遊走活性が認められたので、機能的なケモカイン受容体と判断できる。

間質に存在する Interstitial DC は抗原を取りこんだ後、2次リンパ組織であるリンパ節へ遊走し、T細胞領域に存在するナイーブT細胞と相互作用し、免疫応答を誘導する。リンパ節中のHEV(高内皮細静脈)はSLCが高発現しており、その欠損マウスである *plt/plt* マウスではリンパ節が欠落する点からDCが2次リンパ組織へ遊走するためにSLC/CCR7は必須のレパートリーであると想定できる。樹状細胞にとっては異物の取り込み、T細胞との物理的接触かどちらのプロセスに支障があっても正常な免疫機能を発揮することが困難であり、内分泌攪乱化学物質がこの2点を修飾するか否か評価する必要があるだろう。

E. 結論

ヒト単球由来樹状細胞およびマウス骨髓由来造血前駆細胞から分化する樹状細胞の免疫生物学的な特徴を明らかにした。今後は、様々な内分泌攪乱化学物質の影響下でこれら細胞群がどのような挙動を示すか現在検討中である。

研究発表

1. Inadera, H., Sekiya, T., Yoshimura, T., and Matsushima, K. (2000) *Endocrinology* **141**, 50-59
2. Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H. Y., Yamazaki, N., and Matsushima, K. (1999) *Blood* **94**(3), 837-44
3. Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H. Y., Nagai, S., Yamazaki, N., and Matsushima, K. (1999) *Blood* **94**(3), 845-52
4. Zhang, Y., Zhang, Y. Y., Ogata, M., Chen, P., Harada, A., Hashimoto, S., and Matsushima, K. (1999) *Blood* **93**(4), 1208-20
5. Ogata, M., Zhang, Y., Wang, Y., Itakura, M., Zhang, Y. Y., Harada, A., Hashimoto, S., and Matsushima, K. (1999) *Blood* **93**(10), 3225-32
6. Murai, M., Yoneyama, H., Harada, A., Zhang, Y., Vestergaard, C., Guo, B.,

- Suzuki, K., Asakura, H., and Matsushima, K. (1999) *J Clin Invest* **104**: 49-57.
7. Zhang, Y., Zhang, Y., Yong, Y., Ogata, M., Hashimoto, S.-i., Onai, N., and Matsushima, K. (1999) *Blood* (in press)
8. Betsuyaku, T., Liu, F., Senior, R. M., Haug, J. S., Brown, E. J., Jones, S. L., Matsushima, K., and Link, D. C. (1999) *J Clin Invest* **103**(6), 825-32
9. Yamada, T., Hisanaga, M., Nakajima, Y., Kanehiro, H., Aomatsu, Y., Ko, S., Kin, T., Nishio, K., Sho, M., Nagao, M., Harada, A., Matsushima, K., and Nakano, H. (1999) *Surgery* **125**(3), 304-14
10. De Benedetti, F., Pignatti, P., Bernasconi, S., Gerloni, V., Matsushima, K., Caporali, R., Montecucco, C. M., Sozzani, S., Fantini, F., and Martini, A. (1999) *J Rheumatol* **26**(2), 425-31
11. Wada, T., Furuichi, K., Sakai, N., Shimizu, M., Segawa, C., Kobayashi, K., Mukaida, N., Kasahara, T., Matsushima, K., and Yokoyama, H. (1999) *Nephrol Dial Transplant* **14**(1), 76-80
12. Tsuji, H., Mukaida, N., Harada, A., Kaneko, S., Matsushita, E., Nakanuma, Y., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Kobayashi, K., and Matsushima, K. (1999) *J Immunol* **162**(2), 1049-55
13. Takizawa, H., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Kohyama, T., Desaki, M., Kasama, T., Kobayashi, K., Nakahara, K., Yamamoto, K., Matsushima, K., and Kudoh, S. (1999) *J Immunol* **162**(8), 4705-11
14. Furukawa, Y., Matsumori, A., Ohashi, N., Shioi, T., Ono, K., Harada, A., Matsushima, K., and Sasayama, S. (1999) *Circ Res* **84**(3), 306-14
15. Sansonetti, P. J., Arondel, J., Huerre, M., Harada, A., and Matsushima, K. (1999) *Infect Immun* **67**(3), 1471-80
16. Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P. W., Matsushima,