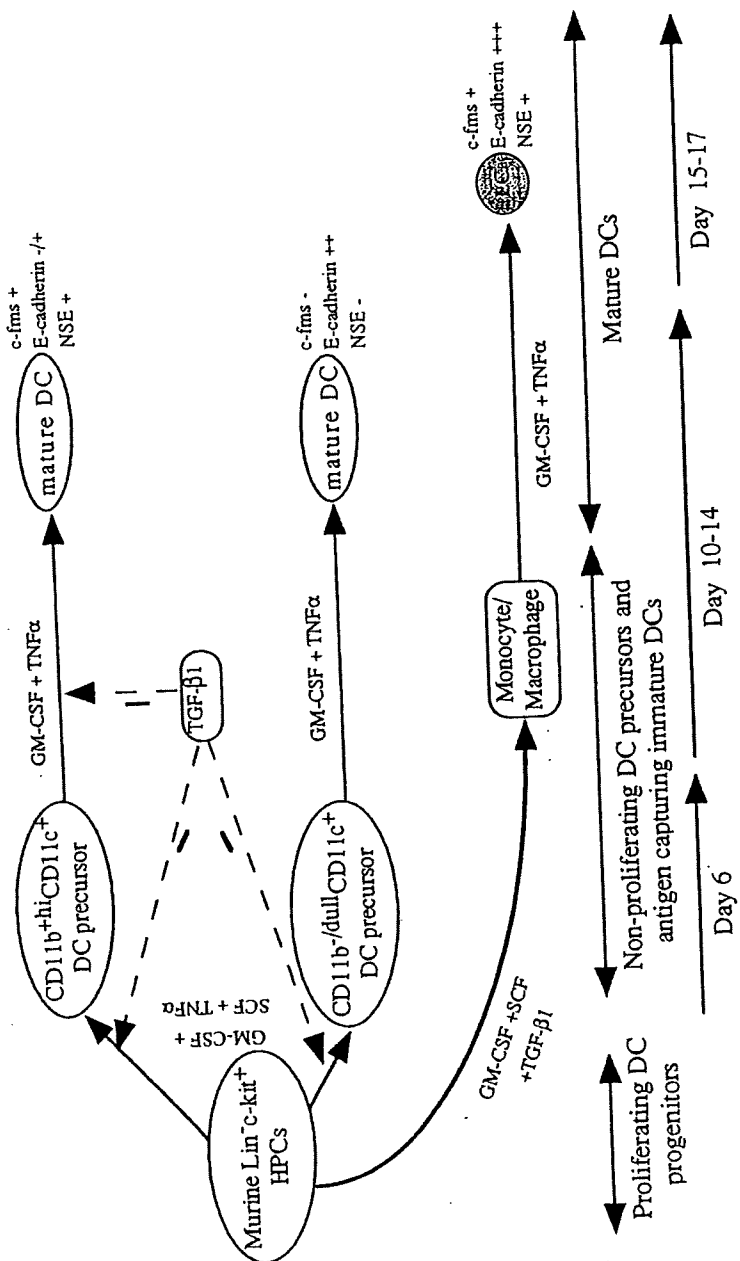


- K., and Yoshie, O. (1999) *Antimicrob Agents Int Immunol* **11**(1), 81-8
17. Ono, K., Matsumori, A., Furukawa, Y., Igata, H., Shioi, T., Matsushima, K., and Sasayama, S. (1999) *Lab Invest* **79**(2), 195-203
18. Sar, B., Oishi, K., Wada, A., Hirayama, T., Matsushima, K., and Nagatake, T. (1999) *Antimicrob Agents Chemother* **43**(4), 794-801
- 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



A schematic DC differentiation model in vitro from Lin⁻ c-kit⁺ HPCs and the regulating role of TGF-β1. HPCs develop into mature DCs through four stages: proliferating DC progenitor cells, nonproliferating DC precursors, antigen capturing immature DCs, and mature DCs. The cytokine combination of GM-CSF + SCF + TNFα can induce the generation of mature DCs from murine Lin⁻ c-kit⁺ HPCs through two unrelated differentiation pathways: CD11b⁺hiCD11c⁺ and CD11b⁻/dullCD11c⁺ DC precursors that can be clearly identified at day 6 of culture. In response to GM-CSF + TNFα, both the DC precursor subsets can independently differentiate at day 10 to 14 into mature DCs with distinct phenotype based on the expression of c-fms mRNA, NSE activity, and E-cadherin. TGF-β1 significantly inhibited the generation of CD11b⁻hiCD11c⁺ and CD11b⁺hiCD11c⁺ DC precursors from GM-CSF + SCF + TNFα-stimulated Lin⁻ c-kit⁺ HPCs at day 6 of culture. TGF-β1 could also suppress DC maturation from CD11b⁺hiCD11c⁺, but not CD11b⁻/dullCD11c⁺ DC precursors at day 12 to 14. In collaboration with GM-CSF + SCF, TGF-β1 induced Lin⁻ c-kit⁺ HPCs to differentiate solely into monocytes/macrophages. These cells could further differentiate at day 15 to 17 of culture into LC-like DCs expressing high levels of E-cadherin, abundant c-fms, and NSE activity, which obviously differs from CD11b⁻hiCD11c⁺ and CD11b⁺hiCD11c⁺ DC precursor-derived mature DC subsets.

Table 1. Transcript Profiles in Human Monocyte-Derived DCs

Abundance (%)	Tag Sequence	GenBank Match (accession no.)
1.66	G TTCACATTA	HLA DR invariant chain (P33) (X00497)
1.45	CCCTGGGTTC	Ferritin L-chain (D14523)
1.17	GGGCATCTCT	HLA-DR α chain (V00523)
0.85	TTGGTGAAGG	Thymosin β 4 (M17733)
0.79	CCTGTAATCC	Multiple match
0.76	TGCCCTGCACC	Cystatin C (X05607)
0.75	CAAGCATCCC	No match
0.75	TTGGTCCTCT	Ribosomal protein L41 (AF02844)
0.68	TTGGGGTTTC	Ferritin H-chain (AF026844)
0.57	GTGAAACCCC	Multiple match
0.56	CTAAGACTTC	No match
0.54	GTGACCACGG	No match
0.52	CCACTGCACT	Multiple match
0.48	GGGAAATCG	Thymosin β 10 (M92381)
0.45	GTTGTGGTTA	β -2 microglobulin (AB021288)
0.44	TGTGTTGAGA	Elongation factor α 1 subunit (X16871)
0.42	CCCATCGTCC	Cytochrom c oxidase (X55654)
0.42	TTCATACACC	No match
0.35	GTGAAACCCCT	Multiple match
0.33	TCCAAATCGA	Vimentin (X56134)
0.33	TGGGTGAGCC	Cathepsin B (M14221)
0.32	TTGGCCAGGC	Multiple match
0.32	CACAAACGGT	Ribosomal protein S27 (U57847)
0.30	AGCCCTACAA	No match
0.29	GGCTGGGGCC	Profilin (J03191)
0.29	CACCTAATTG	No match
0.26	CTGACCTGTG	MHC class I (M54883)
0.26	ACTTTTCAA	No match
0.26	TGGTGTGAG	Ribosomal protein 18S (X69150)
0.25	GGAGGTGGGG	Granulin (M75161)
0.25	TGTACCTGTA	α Tubulin (K00558)
0.24	TGATTTCACT	No match
0.22	TGCACGTTTT	Ribosomal protein L32 (X03342)
0.22	TCACCGGTCA	Gelsolin (X04412)
0.22	CCTCAGGATA	No match
0.22	ATGGCTGGTA	LLR ep3 (X17206)
0.21	GGCACAAAGG	TARC (D43767)
0.21	GCCTGCTGGG	Phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase (X71973)
0.21	AGAAGTGTC	Lysosomal acid lipase (Z31690)
0.21	TTCCTTCTT	MHC class II β chain (X03028)
0.21	CCAGAACAGA	Ribosomal protein L30 (X79238)
0.21	CCTAGCTGGA	Peptidyl-prolyl-cis transisomerase A (AA011066)
0.21	TAGGTTGTCT	Translationally controlled tumor protein (X16064)
0.20	GTGCTGAATG	Myosin alkali light chain (M22920)
0.19	AGGCTACGGA	23-kD highly basic protein (X56932)
0.19	ACGCAGGGAG	Heat shock protein 90 (D87666)
0.19	GCTTTATTG	β Actin (X00351)
0.19	AAAACATTCT	No match
0.18	CCCCCTGGAT	Growth factor inducible 2A9 gene (M14306)
0.18	TGAAAACACTAC	MHC class II α chain (X00457)

The top 50 transcripts expressed in DCs are listed. The tag sequence represents the 10-bp SAGE tag. Probable GenBank matches are listed. More information is available on the Internet at <http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp/SAGE.html>.

Table 2. Transcripts increased in Human Monocyte-Derived DCs

Fold	Tag Sequence	n*			GenBank Match (accession no.)
		Mono	GM	DC	
125	TCACCGGTCA	0	72	125	Gelsolin (X04412)
122	GGCACAAAGG	0	1	122	TARC (D43767)
61	AGAAGTGTCC	2	79	121	Lysosomal acid lipase (Z31690)
47	AGCCACCGCA	2	2	94	No match
41	CGTGAGCCAC	0	10	41	No match
40	GCCTGCAGTC	0	4	40	Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2 (AB006534)
36	GCCCTGAAAG	0	3	36	No match
35	TTGGAACAAT	0	0	35	No match
34	CCTCTGGGCA	0	0	34	No match
33	AACGGGGCCC	0	117	33	MDC (U83171)
33	CCAAGACTTC	0	3	33	No match
32	CAGCTATTTTC	0	15	32	Fatty acid binding protein homologue (M94856)
31	TFACTTCCCC	0	5	31	EST (AA927388)
31	CTTTCAGATG	0	0	31	Platelet-type phosphofructokinase (D25328)
30	TTGAGACCTC	1	0	30	Factor XIII subunit α (M14539)
28	CTGTTAGTGT	2	20	55	Malate dehydrogenase (U20352)
25	TGTCACAGCC	0	64	25	Acid phosphatase type 5 (X14618)
25	TCTTGATTTA	0	31	25	α -2 macroglobulin (M11313)
23	CCCCCGTAAT	0	3	23	EST (A1203963)
22	ATGGAAGTCT	0	6	22	Inositol polyphosphate 5-phosphatase (X98429)
21	CTAAAAAAA	0	9	21	No match
21	CAAGCATCCC	21	166	430	No match
20	TGTGAACAAC	0	1	20	EST (A1001049)
20	ACTCACCTTA	0	0	20	EST (AA742376)
20	GATACAGCCA	0	0	20	CD23 (M14766)
20	ACCCAGGGTA	0	19	19	EST (N30858)
19	CTGATCTCCA	0	5	19	No match
19	TTTGCTCTCC	2	3	37	Vinculin (M33308)
18	GATGACCCCC	0	34	18	No match
18	GCCTACCCGA	0	15	18	GA733-1 (X13425)
18	CCCTCGGTCC	0	3	18	No match
18	AACGAGGAAT	0	2	18	No match
18	CTATATTTTT	0	1	18	Cathepsin C (X87212)
18	AAGGGATGCT	0	0	18	MCP-4 (U46767)
17	AAGATTGGTG	0	32	17	CD9 (M38690)
17	CCCAAGCTAG	1	9	17	HSP27 (X54079)
17	CCGGCGTGG	0	5	17	EST (R49492)
17	GGTGTGCTTG	0	1	17	EST (AF055021)
17	AGTGCAAGGC	0	0	17	No match
17	CCTCACTACC	0	0	17	EST (A1288509)
17	TGCAGAAGAA	0	0	17	Multiple match
16	TGGCGTACGG	3	7	48	No match
16	GCCAGCCCAG	1	4	16	Zinc finger protein (X97548)
16	GGTCCCTTAC	0	4	16	EST (A1343615)
16	TGTACCTGTA	9	61	140	No match
16	TGGCCCCAGG	6	1,515	93	Apolipoprotein C-1 (X00570)
15	TTTTCTGAAA	0	6	15	Thioredoxin (J04026)
15	CTCTGTAAGT	0	0	15	Metalloproteinase (L23808)
15	GGAGGCAGGA	0	0	15	No match
15	ATGAGCTGAC	7	105	104	Cystatin B (L03558)

The 50 transcripts displaying the biggest increase in expression in DCs are listed by fold induction. The tag sequence represents the 10-bp SAGE tag. The most probable GenBank matches are listed. n indicates the number of times the tag was identified. Fold changes in expression were calculated as described in Fig 2. More information is available on the Internet at <http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp/SAGE.html>.

Abbreviations: Mono, monocytes; GM, GM-CSF-induced macrophages.

*In this table, the tag numbers are 57,560, 57,463, and 58,540 from Mo, GM-M ϕ , and DCs, respectively.

Table 3. Transcripts Decreased in Human Monocyte-Derived DCs

Fold	Tag Sequence	n*			GenBank Match (accession no.)
		Mono	GM	DC	
532	GTGGCCACGG	1,064	47	2	MRP-14 (M21064)
287	TACCTGCAGA	287	0	0	MRP-8 (X06234)
244	CCCACAACCT	244	3	0	Ficolin-1 (S80990)
105	GCACCAAAGC	105	19	0	MIP-1 α (D00044)
97	TGGAAGCACT	97	0	0	IL-8 (Y00787)
84	TGGTCCAGCG	84	10	0	CD14 (AA971438)
77	CTTGACATAC	77	0	1	CL100 mRNA for protein tyrosin phosphatase (X68277)
66	GGAAAAGTGG	66	10	1	α 1 antitrypsin (X01683)
65	GGCCACGTAG	65	2	0	D component of complement (A1073930)
65	GCTGTTGCCG	65	22	1	Ribosomal protein S20 (AA969927)
63	TCTACACGTG	63	0	0	Properdin
63	CTGATGGCGA	63	0	0	No match
55	CTGTACTTGT	55	0	0	GOS3 (L49169)
51	TGGAAAGTGA	51	0	0	c-fos (V01512)
48	CTGACTTG TG	48	10	1	MHC class I HLA-B (M14539)
46	ACATTTCCAA	46	0	0	GOS2 (M69199)
44	TCACAGCTGT	88	5	2	B-cell translocation gene 1 (A1096550)
44	ATGGTGGGGG	44	0	1	Tristetraproline (M63625)
44	TTGGCAGCCC	44	19	1	Ribosomal protein L27a (H73560)
34	TGGGCAGCTG	34	2	0	Ribosomal protein S9 (AA833617)
33	TTGCGTGTGT	33	20	0	Protein phosphatase PAC-1 (AA922462)
31	CTCCATCCAG	31	1	0	G-CSF receptor (M59819)
31	AGTGACACGTG	31	0	0	Ribosomal protein L29 (R36372)
31	GGCCAGGACT	31	0	0	Formyl peptide receptor 1 (M60627)
27	CCCTGAGGCC	27	0	0	EST (A1148871)
27	GTCCCCCAA	27	2	1	EST (A1217285)
27	GTGGGCCACG	25	0	0	No match
25	GCCGCCATCT	70	20	3	Protein disulfide isomerase (U79278)
23	CTGTTGGCAT	112	16	5	Ribosomal protein L21 (U14967)
22	ACCATTCTGC	21	1	0	Interferon-inducible mRNA (X02490)
21	ACTTTAATGA	21	3	0	C5a anaphylatoxin receptor (M62505)
21	AATTAATTA	21	11	0	Multiple match
21	GCCGCCGTGC	20	0	0	No match
20	GGTAGCCAC	20	7	1	EST (A1093040)
20	CTTTTTC CCC	19	0	1	CD48 (M59904)
19	CTFGGGATGT	19	4	0	EST (AA865970)
19	ATGGAGCGCA	37	11	2	TNFR2 (U52165)
19	TAGCCCCCTG	18	0	0	TNF (M10988)
18	TTGGAGCACT	18	0	0	EST (AA724726)
18	TTTCTGTATG	18	0	0	HISTONE H3.3 (A1033898)
18	ACGCTCTCGA	18	2	1	CD37
18	ATGGCTTGGT	18	6	0	40S ribosomal protein S2 (AA064604)
17	TAATGCTAAA	17	0	0	Helix-loop-helix basic phosphoprotein (L13463)
16	TGAAGTAACA	48	0	3	Translation factor SUI1 homolog (R15861)
16	GGGAAACAGG	48	2	3	EST (AA970435)
16	TGAGTCTGGC	16	0	1	EST (W63798)
16	GCGACAGCTC	16	8	1	Ribosomal protein L30 (M94314)
16	GCTGAACCGC	79	18	5	EST (A1024982)
15	TGTTTTCATA	15	1	0	No match
15	CTCACTTTT	15	0	0	NF-IL6 β (M83667)

The 50 transcripts displaying the largest decrease in expression in DCs are listed by fold reduction. n indicates the number of times the tag was identified. Conditions are as described in Fig 2. More information is available on the Internet at <http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp/SAGE.html>.

*In this table, the tag numbers are 57,560, 57,463, and 58,540 from Mo, GM-M ϕ , and DCs, respectively.

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

マウス生殖腺の分化および精子、卵形成への
内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

分担研究者 井口 泰泉 横浜市立大学・理学部・機能科学科教授

研究要旨

マウスの胎仔期あるいは出生直後にジエチルスチルベストロール (DES)、ビスフェノール A(BPA)を投与し、卵巢を摘出し、臍を組織学的に検討した。胎仔期での投与では DES 投与のみでエストロゲン非依存の臍上皮の多層化が誘起されたが、出生直後の投与では大量の DES、BPA ともにエストロゲン非依存の臍上皮の増殖と、多卵性卵胞が誘起された。さらに、妊娠期に投与した BPA は 30 分で胎児の血中、脳、肝臓、子宮、精巣に移行した。

A. 研究目的

ポリカーボネート樹脂原料の BPA は、内分泌攪乱化学物質のうちの一つで、in vitro、in vivo ともにエストロゲン様作用を示す。一方、DES を周生期の雌マウスに投与すると、高頻度で多卵性卵胞の形成を誘起し、加齢とともに子宮や臍の腫瘍化が知られている。そこで、BPA の周生期マウスへの影響を明らかにするために DES をポジティブコントロールとして、胎仔期と新生仔期に投与して、どのような影響が顕れるかを組織学的に解析した。

B. 研究方法

A 胎仔期の処理

臍栓の確認日を妊娠 0 日とし、妊娠

10 日目から 18 日目までの 9 日間、母親マウスの体重 30g あたり 0.0002 から 2 μg の DES と、300 および 3000 μg の BPA を皮下に投与し、マウス生殖器官への影響を調べた。30 日齢で卵巢除去手術を行い、40 日齢で生殖器官を組織学的に観察する群と、卵巢摘出は行わず 70 日齢まで臍スメアの観察を行い、さらに正常な雄マウスと交配させ群を作成した。

B 新生仔期の処理

出生日から 5 日間、0.3、3 μg の DES と 15、150 μg の BPA を投与し、30 日齢で卵巢除去手術を行った後、40 日齢と 90 日齢の生殖器官を組織学的に観察した。

C 胎仔への BPA の移行

妊娠17日目のマウスの皮下にBPA、3000 µg/30 g 体重、を投与し、30分、1、2、3、6、12、24時間後に、母胎の血中、肝臓、脳、胎盤、および、胎仔の血中、肝臓、脳、子宮、精巣中のBPAを測定した。

C. 研究結果

胎仔期の投与では、高濃度のDES処理群で卵巣除去処理後も子宮や膈の上皮細胞の多層化が確認された。しかし、BPA処理群では卵巣に依存しており、卵巣摘出により子宮および膈の上皮は退化的な組織像を示した。40日齢の黄体形成率はDES処理群で低く、2 µg DES処理群では無排卵になり不妊であった。BPAでは半数が黄体を形成しており、90日齢では80%以上が受胎した。また、DES、BPA処理群ともに、生まれた仔の数や性比は対照群と差がなかった。40日齢の雌において、体重当たり的大腿骨の長さには有意な差は見られなかったが、300 µg BPA処理群と卵巣除去後の0.02 µg DES処理群では大腿骨におけるカルシウム含有量に有意な減少が見られた。また30日齢の雄で、300 µg BPA処理群と2 µg DES処理群においては、体重、体重当たり的大腿骨の長さ、大腿骨におけるカルシウム含有量は有意に減少していたが、60日齢ではこの差はなくなっていた。

新生仔期の投与では、40、90日齢ともに卵巣を除去した、DESとBPA 150 µg処理群では、膈上皮の多層化や細胞分裂率の増加、高頻度の多卵性卵胞がみられた。また90日齢では、DES処理群は無排卵になり、BPAの処理群でも黄体形成率は低かった。

妊娠17日目の母親の皮下にBPAを投与すると、30分で母親の組織はもとより、胎仔の組織へのBPAの移行が確認された。さらに肝臓と胎盤では、投与後3時間から24時間の間のBPA量は、ピーク時よりは減少しているもののほぼ一定レベルに保たれていた。

D. 考察

胎仔期での処理では、高濃度のDESでのみ生殖器官に卵巣非依存の不可逆的な影響を及ぼした。BPAは母親から胎仔組織への移行は確認したが、組織学的な変化は誘起しなかった。新生仔期では高濃度のBPAも不可逆的な影響を及ぼすことがわかった。このことから、マウス生殖器官は、発達過程で発生時期特異的なエストロゲン感受性を持ち、この時期のホルモン環境によってその後の発達が阻害されることが考えられる。

E. 結論

BPAの影響を、卵巣非依存の膈上皮の増殖、多卵性卵胞の誘起、不妊を中心に考えると、胎仔期での影響よりも

新生仔期での影響が強くあらわれることが明らかとなった。さらに、本研究の様なエンドポイントを誘起するには大量のBPAが必要である。

F. 研究発表

1. Iguchi, T. and T. Sato: Endocrine disruption and developmental abnormalities of female reproduction. *Am. Zoologist*, (in press).
2. Yamamura, Y., K. Sayama, Y. Takeda, A. Matsuzawa, T. Iguchi and Y. Ohta: Further study of methallothionein expression in transplantable mouse mammary tumors. *Anticancer Res.* (in press).
3. Yamamura, Y., K. Sayama, Y. Takeda, A. Matsuzawa, T. Iguchi and Y. Ohta: Differences in methallothionein expression in transplantable mouse mammary tumor lines. *Cancer Lett.*, 138: 167-174, 1999.
4. Cunha, G.R., J.-G. Forsberg, R. Golden, A. Haney, T. Iguchi, R. Newbold, S. Swan and W. Welshons: New approaches for estimating risk from exposure to diethylstilbestrol. *Environ. Health Perspect.*, 107 (Suppl. 4): 625-630, 1999.
5. Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T. and Fujita, K.: Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environ. Res.*, 48: 1-17, 1999.
6. Hirabayashi, H., T. Sato, S. Kohno, M. Tanaka, S. Kobayashi, Y. Ohta and T. Iguchi: Apoptotic cell death in artificially induced deciduoma of pseudopregnant mice. *Anat. Rec.*, 254: 205-213, 1999.
7. Fukazawa, Y. and T. Iguchi: Effects of steroid hormones and growth factors on the development of the male mouse reproductive tract *in vitro*. *Zool. Sci.*, 16: 153-160, 1999.

2. 学会発表

1. Suzuki, A., Sugihara, A. and Iguchi, I.: Developmental effects of diethylstilbestrol and bisphenol A on reproductive organs in female mice. 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回大会、神戸、アブストラクトD64, 1999.
2. Uchida, K., Kobayashi, Y., Sato, T., Ohta, Y. and Iguchi, T.:

- Effects of estrogenic compounds on osteogenesis of mice in utero. 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回大会、神戸、アブストラクト D65, 1999.
3. 内田薫、佐藤友美、太田康彦、井口泰泉：マウス胎仔の骨形成に対する女性ホルモンの影響. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 15, 1999.
 4. 鈴木敦子、佐藤友美、太田康彦、井口泰泉：胎児期に投与されたエストロゲン様化学物質の雌マウス生殖器官への影響. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 15, 1999.
 5. 杉原秋香、佐藤友美、太田康彦、井口泰泉：出生直後のマウス雌性生殖器官に対するエストロゲン様化学物質の影響. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 15, 1999.
 6. 漆谷博志、佐藤友美、井口泰泉：マミチヨグのエストロゲン受容体遺伝子のクローニング及び発生段階での発現変化について. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 14, 1999.
 7. 岡田晃宣、佐藤友美、井口泰泉：出生前の雌ラット生殖輸管細胞の増殖及び EGF の発現. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 15, 1999.
 8. 河野郷通、藤目誠、上島孝久、井口泰泉：ニホンアマガエルの皮膚での水分吸収量の性差と下垂体後葉ホルモン受容体発現量. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 8, 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

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

初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用に関する研究

分担研究者 鈴木勝士 日本獣医畜産大学・獣医生理学教室 教授

研究要旨

発育鶏卵に極微量のエストロン(E1)を投与し、胚盤葉下層の受容体の活性化と細胞死の誘導、発生かく乱の機序を解明するため、投与法を改善し、卵殻切開後、直視下で孵卵時（ステージ10）の鶏胚に投与しより正確に投与部位を特定できる方法に変えた。異常発生が再現されたので、E1の多段階投与により用量反応相関を確認した。孵卵0、1、2日の胚からERmRNAの検出に成功し、発生に伴う発現増加が確認された。ホルマウント標本作製の準備が完了した。

A. 研究目的

初期発育鶏卵に極微量のエストロン(E1)を投与し、胚盤葉下層の受容体の活性化と細胞死の誘導、発生かく乱の機序を解明するとともに、発生初期過程での転写調節のかく乱による異常発生がウィンドウ効果として発現していることを確認する必要がある。

B. 研究方法

白色レグホン種の産卵後24時間以内の有精卵を(株)日本生物材料センターより購入した。有精卵を1回の実験で10個用い、孵卵器（ベビー孵卵器A型：昭和孵卵器製）内の所定の10カ所に置き、温度37±0.5℃、湿度80%以上、1時間に1回転卵の

条件で48時間孵卵した。孵卵開始48時間後に鶏胚を摘出し70%エタノールにて固定した。固定後、実体顕微鏡下で鶏胚の形態学的観察を行った。

500pgまたは5ng/embryoのE1を鶏受精卵に投与し、48時間孵卵して鶏胚の発生状況につき対照と比較した。投与部位をより正確にするため、卵殻の一部を円鋸を用いて切開し、直視下で胚直下の卵黄内に1μl/g卵重の割合でE1溶液または溶媒溶液を投与した。投与後切開部位をサランラップで閉鎖、シリコンゴム（KE3475T:信越化学製）でシールし、上述の条件で孵卵した。胚盤葉下層の消失、胚の管様構造への変形、重複胚奇形、神経管形成の異常などの有無および胚発

生の遅延（体節数低下）を指標として形態学的に検討した。孵卵直前（ステージ10）、孵卵後24および48時間の無処置胚から総mRNAを抽出し、RTPCR法によりERmRNAを増幅し、2%アガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色によってcERmRNAを確認した。

（倫理面への配慮）

材料が鶏胚であるため、特に配慮しなかった。

C. 研究結果

表1（別紙）に用量を変えて得られた発生異常の成績を示す。孵卵48時間で、対照群(n=27)には、異常胚は観察されず、体節数は平均 12.7 ± 3.5 (SD)で、7から18の範囲に分布した。昨年度と同じ濃度の500pg/embryo群(n=34)では、61.7%に何らかの発生異常が認められ、4例(11.8%)に胚盤葉下層の欠落があった。体節数は平均 11.1 ± 4.3 で、0から18の範囲に分布した。胚盤葉下層の欠落以外の異常は、重体奇形(3例)、頭部のみあるいは心臓と神経管のみ発生(2例)、神経管の未閉鎖(3例)、神経管の変形、短縮、体節の配列異常など(9例)であった。5ng/embryo群(n=11)では、45.5%の胚に何らかの異常が見られ、体節数は平均 7.5 ± 3.1 で0から12の範囲に分布した。この群では、異常の内訳は、頭部の分裂、変形、神経管の蛇行や短縮(4例)であった。代表的な事例を図1～2に示す。

体節数は用量相関的に減少していた。形態異常の重篤度については投与群間で異なっているようには見えなかった。

孵卵0、24及び48時間後の胚からのmRNAのRTPCRによるcERmRNAの増幅により、いずれの発生時期にもcERmRNAが発現していることが確認された。定性的には、cERmRNAの発現量は発生の進行につれ増加するようには見えなかった(図4)。

D. 考察

昨年度実施した、卵殻に小孔を開け、そこからハミルトンシリンジで卵黄中央に投与する方法では、投与液は胚盤葉下層の卵黄側に移動して接触することを確認したが、到達に要する時間、投与液の分布する範囲等が制御できない。したがって、今回は卵殻を円鋸で切開し、卵殻及び卵殻膜を一部除去して、直視下で胚を確認し、胚直下にハミルトンシリンジを刺入して投与を行った。今回の対照群の成績から、この方法で孵卵しても発生停止などの悪影響はないこと、48時間で達する通常の発生段階に到達することが確認された。

今回の500pg/embryoの投与は、昨年度の投与と同等の量の投与に相当する。胚盤葉下層の欠落および異常胚の出現率は、昨年の場合と同じと考えられた(それぞれ $\chi^2=0.2427$ 、 0.2237)。したがって、昨年の成績が再現されたと考えられた。

今年の実験群では、10倍高い用量でも

同様な異常の発生が認められた。異常発生率は 500pg/embryo 群と差がなかった(胚盤葉下層の欠落 $\chi^2=0.4729$; 異常胚 $\chi^2=0.5734$)。これらの異常出現が E1 濃度に対して既に飽和しているのか否か確認するためさらに高濃度での実験が必要であると考えられた。

一方で、体節数の減少には、明らかな用量相関関係が認められた。術者の不注意によりデータとして扱うことのできなかった低用量群(500pg/embryo 群の約 1/20)の 200 例以上の成績では、少数の軽度な尾部の湾曲が見られたのみで、体節数には対照群との間に差はなかった。この実験については再度実施する必要があるが、E1 の胚発生攪乱作用には閾値がある可能性が示唆された。

マウスの初期胚では、Na/K ATPase、ラミン A、B、ラミニン、ウボモルリン、ギャップジャンクション蛋白、PDGF、TGF β ファミリーの nodal、チミジンキナーゼ、カタラーゼ、Cu Zn スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、MnSOD、グルタチオンペルオキシダーゼなどに加えて、アンテナペディアとパイソラックスクラスに属する多数の Hox 遺伝子が発現していることが報告されている。これまでに E1 で引き起こされた異常は、体軸の分裂、体節の配列異常、神経管閉鎖不全などボディプランに影響が及んだことを示唆している。

ステージ 10 の鶏胚は哺乳類の肺胞の発生階と相同である。ERmRNA 発現につ

いては、ヒト受精卵で卵巣顆粒膜細胞から移動したものとして、鶏胚では孵卵 4、5 日で検出されたとの報告がある。孵卵 2 日以前に検出の報告はまだない。今後、上述のボディプラン関連遺伝子の発現と ER の関係を明らかにする必要がある。今回見られた異常は、途中経過が未解明ではあるが、ER が E1 によって活性化され、胚盤葉下層の消失、ボディプランの攪乱に関与している遺伝子群の遺伝子発現に影響を及ぼしていることを示唆するものである。

これまでのところ、投与群で 100% の胎児に発現する異常はまだとらえられていない。さらに高い用量でそのような現象が見られなかった場合には、反応の個体差の原因を確かめる必要が生じる。特に、胚盤葉下層の初期発生に対する制御的役割を調べるには、この現象が 100% 生じる条件を確立する必要がある。

E. 結論

500ng および 1ng/embryo の E1 をステージ 10 の鶏胚直下の卵黄に投与すると、約 10% の胚で胚盤葉下層の欠落、約 40~60% の胚に二重体、神経管閉鎖不全など体軸のゆがみを生じる。またステージ 10、孵卵後 24 及び 48 時間後の胚で、RT-PCR 法により、ERmRNA の発現が確認され、発生の進行に伴って ERmRNA の発現増加が示唆された。これらの発生攪乱は外来性の E1 が ER を活性化させ、関係する遺伝子発現を変調するために生

じたと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki H, Fukaya S, Saito K, and Suzuki K (2000) Mapping of a locus on rat chromosome 11 responsible for osteochondrodysplasia(ocd). Mammalian Genome (in submission)
2. Akimoto T, Suzuki H, Arai Y, Nakama K and Suzuki K (2000) A locus responsible for dominant hairless gene (Ht) is located on rat chromosome 10. Experimental Animal (accepted)
3. 鈴木勝士(1999) エストロンの初期鶏胚の発生に及ぼす影響、内分泌攪乱物質学会ニュースレター、4: 2-3.
4. Suzuki H, Kokado M, Saito K, Kunieda T and Suzuki K (1999) A locus responsible for hypogonadism (hgn) is located on rat Chromosome 10, Mammalian Genome 10(11):1106-1107.
5. 板垣昌志、阿部省吾、阿部栄、酒井淳一、鈴木勝士(1999) 乳牛の潜在性乳房炎と乳頭口異常の関連、日本獣医師会雑誌 52(9) 561-564.
6. 鈴木勝士(1999)環境ホルモンと獣

医師の役割、アニマリタリアン、vol.9:1.

1. 学会発表

1. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士 (2000) マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位 (第2報)、電子情報通信学会、ME とバイオサイバネティクス研究会
2. 斉藤賢一、雑賀寿和、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一(1999)マイクロ波照射がウサギおよびサルのおよぼす影響、電気学会計測研究会 IM99-66 p39-42
3. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一(1999)EI および ddY マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、電気学会計測研究会 IM99-65 p.33-37
4. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、内堀雅隆、横山修一、辻 隆之(1999)先天性癲癇モデル動物(EI Mouse)の睡眠時脳波における加齢に伴う変化、第31回成長談話会大会(抄録p22)
5. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)EI および ddY マウスの脳硬膜上からの短潜時聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、第127回日本獣医学会
6. 深谷幸代、鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、井出雅子、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)骨軟骨形成不全症(ocd/ ocd)ラットの原因遺伝子は

- 第11染色体上に存在しD11Mgh3と連鎖している、第127回日本獣医学会
7. 醍醐久美、鈴木浩悦、中宮英次郎、八木未央、岡田美香、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索：hgn 遺伝子の雌表現型におよぼす影響の評価、第127回日本獣医学会
 8. 太田千春、徳力剛、高須正規、平林美紀、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)腎低形成症の腎不全状態の基礎的評価、第127回日本獣医学会
 9. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、新井豊、八木未央、竹中基郎(1999)鶏胚でのエストロンによる発生かく乱とエストロゲンレセプター mRNA の発現、第127回日本獣医学会
 10. 鈴木浩悦、中宮英次郎、醍醐久美、岡田美香、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索：連鎖するマーカーの整列化とマウス11番染色体上での位置の推定、第127回日本獣医学会
 11. 尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、小川実幸、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程におけるテネイシンとNCAMの発現分布、第127回日本獣医学会
 12. Saito, K., H. Suzuki and K. Suzuki (1999) Adverse developmental effects of low intensity radio frequency radiation at 428MHz on chick embryo. 2nd joint international symposium of Congenital Anomalies in Korea. (10/1~10/2: chunchon)
 13. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索、日本アンドロロジー学会
 14. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央(1999)鶏胚でのエストロゲンレセプター mRNA の発現とエストロンによる発生かく乱、第39回日本先天異常学会
 15. 斉藤賢一、醍醐久美、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)直流磁場照射のマウス胎子におよぼす影響、第39回日本先天異常学会
 16. 小川実幸、尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程にみられる上皮細胞の増殖とアポトーシス、第2回日本組織工学会
 17. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラットの第10染色体上に存在する精巢形成不全症病因遺伝子の探索：高度に連鎖するマーカーの検索とマウス第11染色体上での位置の推定、第46回日本実験動物学会
 18. 中宮英次郎、鈴木浩悦、醍醐久美、

八木美央、平林美紀、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)ラット 10 番染色体上に存在する精巢形成不全症病因遺伝子の探索：病因遺伝子周辺のマップ作成、第 126 回日本獣医学会

なし

19. 松倉克仁、鷺巣 誠、倉繁裕美、尼崎 肇、中條真二郎、清水一政、浦川紀元、鈴木勝士(1999)犬糸状虫感染犬の肺動脈病変形成に対するアンギオテンシン変換酵素阻害薬およびアンギオテンシン・受容体拮抗薬の効果、第 126 回日本獣医学会

20. 岩間良子、小川実幸、日比佐知子、尼崎 肇、鷹栖雅峰、福島正則、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程における上皮プラコード領域での上皮細胞の増殖と移動、第 126 回日本獣医学会

21. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウスの脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位、ME とバイオサイバネティクス研究会、信学技報 Technical Report of IEICE, MEB98-126

G. 知的所有権の取得状況

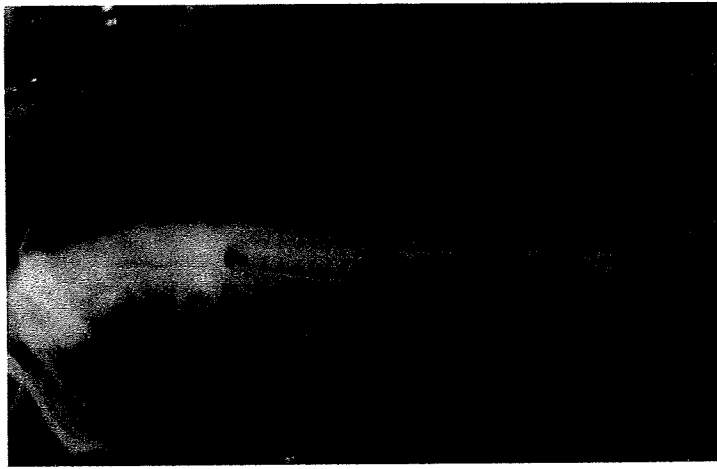
1. 特許取得

なし

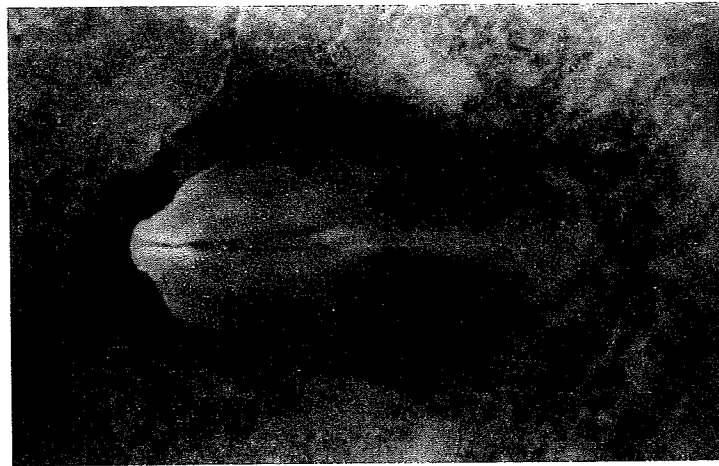
2. 実用新案登録

なし

3. 実用新案登録



图一 1 正常发生鸡胚



图一 2 发生延迟鸡胚 I



图一 3 发生延迟鸡胚 II



図-4 形態異常鶏胚I (神経管の蛇行)

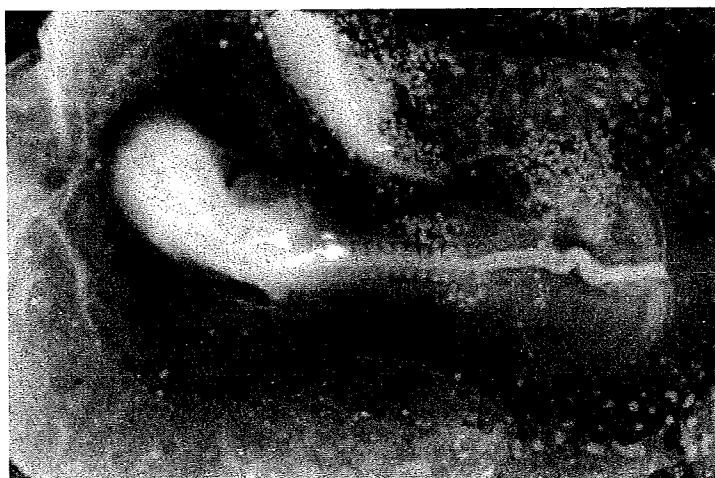


図-5 形態異常鶏胚II (神経管の蛇行)



図-6 形態異常鶏胚III (二重鶏胚)



図-7 胚盤葉下層欠落

表1 48時間孵卵で見られた体節数と異常の内訳

	卵数	体節数	S. D.	n=	正常胚数	異常胚数	異常率	胚盤葉下層
対照群 DMSO投与	27	12.70	3.45	27	27	0	0%	0
実験群 Estrone投与 500pg/embryo	34	11.07	4.27	30	13	17	57%	4
5ng/embryo	11	7.50	3.06	10	6	4	40%	1

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

性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明に関する研究

分担研究者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所 教授

研究要旨

内分泌かく乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つには、性ステロイドホルモン作用のかく乱が考えられている。性ステロイドホルモンは核内レセプターを介した標的遺伝子群の転写制御によりその作用を現す。本研究では、核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにする。具体的には、男性、女性レセプターの転写促進領域の同定、及びこれらレセプターの転写共役因子を同定する。

A. 研究目的

核内レセプターを有する脂溶性ホルモンは、各組織において特徴ある生理活性を示す。このような組織特異的な生理作用はレセプターの生体内局在のみでは説明できず、むしろレセプターの細胞種特異的な機能によると考えられるようになっている。このような組織特異性は、最近核内レセプターと相互作用する核内共役因子群が担うものと考えられている。従って、本研究では内分泌かく乱物質の標的分子としての転写共役因子の機能を探るものである。共役因子は、核内レセプターと基本転写因子群とを仲介し、転写制御に必須な構成因子と考えられているため、組織特異的なホルモン作用の理解にはこの共役因子の同定と性状解析は必須と考えられる。そこで本アプローチでは、特に組織特異的な作用が知られる性ステロイドホルモン（エストロゲン：女性ホルモン、アンドロゲン：男性ホル

モン）共役因子を中心に据える。

B. 研究方法及び結果

1. 核内性ステロイドホルモンレセプターの機能領域と機能制御

転写制御因子である核内レセプターは、2つの転写促進領域をレセプタータンパクN末端とC末端に有すると言われている。しかしながら、ホルモン結合によるレセプターの構造変化とそれに関わるこれら2つの領域の機能的な相互作用や、これに関与する共役因子との相互作用は全く不明である。またこれらの転写促進領域は各種キナーゼによりリン酸化されることで、転写促進活性が変わることがわかっている。そこで、エストロゲンレセプター（ER α 、ER β ）をモデルとして、ER分子内でのリガンド依存的な構造変化とタンパク内相互作用を、昨年度はこれらの相互作用と既知核内レセプター共役因子（SRC-1/TIF2/AIB1、

p300/CBP) と女性ホルモンレセプター (TRAP/DRIP220) の相互作用を中心に調べ p300/CBP は N 末側転写促進能に関与することを明らかにした。

2. ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定

上述した共役因子として既に同定されたものには、転写を促進する co-activator と転写を抑制する co-repressor の存在が知られている。しかしながらこれら既知共役因子群はレセプター種固有のものではなく、多くは数種のレセプター間で共有するものが多い。そこでレセプター種 [ER、アンドロゲンレセプター (AR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR)、ビタミン D レセプター (VDR)] 固有の共役因子の検索・同定を、酵母 two-hybrid 法を用いた cDNA スクリーニング、及び生化学的手法を用いて行った。その結果、ER の N 末端側の転写促進領域 (AF-1) に結合する p68 を細胞核抽出液より精製・クローニングした。p68 は cDNA クローニングの結果、RNA ヘリケースの 1 種であることが判明し、AR、MR、VDR への効果についても調べたところ全く効果がなく、ER α 特異的であることが判明した。

FIG.1-2

C. 考察及び結論

現在、同様の手法により p72 RNA ヘリケースを同定しており、それらの性状解析を急いでいる。以上のアプローチから、組織特異的なホルモン活性を規定する共役因子の性状を明らかにできると期

待している。

今後は同定した転写共役因子群が内分泌かく乱物質の標的分子か否かを検討する予定である。

D. 研究発表

1. 発表論文 (原著)

1. Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, 2000 (in press).

2. Tai, H., Kubota, N., Kato, S.: Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen-dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000 (in press).

3. Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., Seino, Y.: Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, 2000 (in press).

4. Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., Kato, S.: FGF10 is essential for the limb and lung formation. *Nature Genetics*, 21, 138-141, 1999.

5. Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1049-1055, 1999.