

平成11年度厚生科学研究費補助金  
生活安全総合研究事業報告

内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系  
障害に関する実験的研究 (H11-生活-020)

主任研究者 加藤 泰治  
名古屋市立大学医学部分子医学研究所

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書（平成11年度）

内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する実験的研究

主任研究者 加藤 泰治

名古屋市立大学医学部分子医学研究所 教授

研究要旨： 内分泌かく乱化学物質(EDCs)の胎生期ないし乳児期曝露による内分泌機能中枢に与える影響のリスク評価を目的として、ラットを用いた個体レベルでの *in vivo* 評価研究と、神経中枢の個々の細胞機能単位に関する *in vitro* 評価研究に着手した。11年度は、両評価研究ともエストロジェン化合物を陽性対照として評価系の確立に努めた。

*In vivo* 評価研究は脳の性分化過程および性成熟後の生殖機能に与える影響を主眼として、視床下部・下垂体軸、生殖器系の機能と形態の評価を予定しているが、11年度は、脳の性分化の臨界時期での視床下部における性分化関連遺伝子ないしエストロジェンに反応する遺伝子群の発現解析を中心にそれらの評価系の確立に努めた。具体的には、まず ethinylestradiol (EE)等の陽性対照物質を妊娠ラットに経口投与した結果、新生児の体重及び性分化の異常が確認された。このような新生ラット視床下部では脳の性分化誘導因子である *granulin* 遺伝子の発現増加を認め、EDCsによる視床下部影響の分子指標としての可能性が示唆された。また、パラフィン包埋組織切片からの定量的な遺伝子発現解析を可能にする組織固定法としてメタカーン固定法を見出し、メタカーン固定・パラフィン包埋した新生ラット（生後9日）の視床下部から、*microdissection* 法により採取された性的二型核での、EREを有する6遺伝子 *progesterone receptor*, *bcl-x*, *oxytocin*, *GABA transporter I*, *GFAP*, *neurotensin/neuromedin N* の mRNA 発現を確認した。これらの遺伝子につき、*plate hybridization* 法を利用した高感度の *competitive RT-PCR* 法をほぼ確立しているが、予備的な検討の結果、最大耐量のEE曝露を受けた出生雄ラットの視床下部でいくつかの遺伝子の発現低下を認めた。

*In vitro* 評価研究は血液・脳関門 (B-BB)、アストロサイトおよび視床下部・辺縁系に分布するニューロンに与える影響の評価系の確立を図った。具体的なモデルとして、独自に開発・確立した *in vitro* B-BB モデル、アストロサイトモデル、ニューロンの各種初代培養系が挙げられ、それぞれ独自の検出指標を導入して、神経中枢の各構成要素に対するEDCsの影響の検出・評価系に充てた。まずB-BB評価系では、その安定供給を図るためにウシ脳毛細血管内皮細胞の不活化を行った。また、*In vitro* B-BB モデルで水チャネルとして重要と考えられている *aquaporin-4 (AQP4)* を検出指標とするために、そのウシ cDNA のクローニングを行った。EDCsがB-BBを構成する細胞の遺伝子発現を変化させるかどうかの基礎的な情報を得るために、ヒト脳毛細血管内皮細胞においてDNA *micro array* 法を使い、低用量の *estradiol* 曝露による遺伝子発現の変化を検討した結果、エストロジェン受容体ではなく、*estrogen-related receptor* の発現を見出した。アストロサイトの評価に関しては、エストロジェンおよび一部のEDCsを作用させた時のAQP4の発現変化を調べたところ、いずれも無処置に較べ約2倍の発現レベルの増加を認めた。ニューロン評価系では、ラット発達期視床下部ニューロンの分散培養系を確立し、既に確立している海馬の分散培養系に較べ、エストロジェン受容体およびプロゲステロン受容体の発現レベルが高いことを確認した。更に、それらのニューロンの生存におよぼす *estradiol* の影響を検索した結果、海馬ニューロンでは10 nMをピークに、視床下部ニューロンでは1000 nMでわずかな生存維持効果を確認した。またこの時、

神経細胞の生存に関与すると考えられている神経栄養因子の一つBDNFに注目し、そのmRNAレベルの変動をRT-PCR法を用いて検索した。その結果、生育に適さない培養条件下では低下してゆくBDNF mRNAが、estradiolの添加によってくい止められることが判明した。一方、ニューロンの生存が図られている血清培養条件下でestradiolの添加を行ったところ、BDNF mRNAレベルは増加する傾向を示した。これらの結果は、エストロゲンによるニューロンの生存維持が、エストロゲンそのものの直接作用とは断定できず、BDNF発現を促す間接的な効果である可能性を示している。またスライス培養系を立ちあげestradiolの影響を検討中である。現在、胎生19日齢ラット視床下部のスライス培養として2週間の長期培養系を確立している。以上より、種々のEDCsの中樞神経系へのin vitro作用を調べるスクリーニング系はほぼ確立できたと考えられる。

#### 分担研究者

加藤 泰治

名古屋市立大学医学部分子医学研究所 教授

渋谷 淳

国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長

西原真杉

東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授

畠中 寛

大阪大学蛋白質研究所 教授

用した場合、脳の正常な性分化が障害され、生後の個体の内分泌機能を含む種々の機能が影響を受ける可能性がある。最近、ラットを用いた実験で、脳の性分化を果たす時期に過剰のエストロゲン化合物を投与すると、視床下部ニューロンのアポトーシスと生殖器に障害を起こすことが報告されている。また、ビスフェノールAの胎生期曝露により、脳内アストロサイトの細胞骨格蛋白であるGFAPの遺伝子発現が、低用量から用量依存性に増加するとの報告もある。GFAP遺伝子はそのプロモーター領域にエストロゲンに反応する配列(ERE)を持ち、個体のエストロゲンレベルに呼応してその発現の増減することが知られている。従って、発達期でのEDCs曝露により、内分泌機能の神経中枢になんらかの障害を及ぼす可能性がある。

本班研究においては、個体レベルでのin vivo評価系と神経中枢の各構成要素に対する細胞レベルでのin vitro評価系を用いることにより、EDCsの神経中枢への影響の本態を明らかにすることを目標とする。また、検索化学物質を統一していくつかの代表的な物質について用量依存性の生物学的な作用強度を求めることにより、EDCsの低用量域での生体影響を総合的に評価することが可能となる。このことにより、EDCsに対する社会的不安を緩和することができ、また新たなEDCsのスクリーニングにも迅速に対応できる。

この班研究のin vivo評価系では、従来の内分泌

#### A. 研究目的

近年、我々の環境中に数多くの内分泌かく乱化学物質(EDCs)が見いだされ、生殖機能を含むそれらのヒトへの影響が世界的に懸念されるようになってきた。EDCsの生体への作用機構としてエストロゲン受容体(ER)を介した機序が考えられており、その極低用量曝露によっても生体に不可逆的影響を及ぼすことが懸念されている。中枢神経系においても、胎生期より視床下部・辺縁系を中心としてERを含む性ホルモン受容体が分布しており、当然、その一部を構成する生殖機能中枢も影響を受ける可能性が高い。特にホルモン依存的に脳の性分化を果たす周産期においてEDCの曝露を受けてそれが中枢神経系内に入り込んで作

泌機能および病理形態の検索のみならず、脳の性分化の臨界時期において、分担研究者らにより見いだされた脳の性分化誘導因子 granulin (grn) 遺伝子の発現解析の他、視床下部の性的に分化することが知られている性的二型核での ERE を持つ遺伝子の発現レベルの定量的解析を行う。この部位特異的な遺伝子発現解析にはパラフィン包埋切片を利用した検出系と、顕微鏡下で特定の細胞をレーザー光を利用して採取する方法を組み合わせることで検索を行う。そして、遺伝子発現の解析結果と性成熟後の生殖器障害の程度との関連性を比較・評価する。また、成熟動物の生殖機能は視床下部の GnRH パルスジェネレーターにより制御されているので、最近確立した神経活動モニターシステムを用いて、性成熟後の生殖機能の評価に充てる。In vitro 評価系においては、血液・脳関門(B-BB)およびニューロン、グリア細胞の各々に与える影響を検索する。B-BB の評価系として、微量の EDCs の脳内移行を迅速に測定するための独自の in vitro モデルを開発した。また、グリア細胞への直接作用の評価系として、ラット胎児脳アストロサイトや不死化した培養アストロサイトを樹立し、GFAP などのアストロサイトの機能遺伝子を解析する系を確立している。ニューロンの検索系として、ER の発現している脳領域を培養し、ニューロンの生存維持、機能分化あるいは可塑性への EDCs の直接的な効果を検索する実験系を確立している。このような一種のスクリーニング系を応用した EDCs のニューロンないしはアストロサイトへの直接作用はまだ調べられていない。

## B. 研究方法

In vivo 評価研究においては、11年度は脳の性分化の臨界時期での視床下部における性分化関連遺伝子ないしエストロゲンに反応する遺伝子群の

発現解析を中心にそれらの評価系の確立に努めた。具体的には、まず ethinylestradiol (EE)等の陽性対照物質を母ラットに経口投与し、胎盤あるいは乳汁を経由して胎児あるいは新生児に移行させた際の、新生ラット視床下部における grn 遺伝子の発現への影響を検討した。実験群として、最大耐量の EE を妊娠ラットに経口投与し、胎盤あるいは乳汁を経由して胎児あるいは新生児に移行させた群、出生2日齢のラットに estradiol benzoate (EB) を 25 $\mu$ g 皮下投与した群、及び無処置対照群の3群を設けた。これらの群の新生児の出生6日後および10日後に視床下部を採取し、grn 遺伝子発現に与える影響を competitive RT-PCR 法を用いて検索した。

また、脳室周囲の内側視束前野に存在する性的二型核でのエストロゲンに転写制御されることが知られている遺伝子の発現解析を行うにあたり、まず、パラフィン包埋した組織切片上の微小領域での定量的な発現解析の可能な生体高分子を得るための組織固定法の検討を行った。すなわち、正常ラットないしマウスの組織または培養 PC12 細胞のメタカーン固定・パラフィン包埋材料を脱パラフィン後、total RNA または蛋白質の抽出を行い、単位面積当たりのそれぞれの抽出量及び RT-PCR と Western blotting による RNA と蛋白質の発現解析についての妥当性の検討を行った。その結果この組織固定法の有用性が確認されたことから、ラット脳の性分化がほぼ完成する時期にあたる生後9日目に視床下部を採取し、メタカーン固定・パラフィン包埋切片を作製し、視床下部の性的二型核をレーザー光を利用した microdissection 法により顕微鏡下で取り出した。その部位由来の RNA を鋳型とした RT-PCR により、プロモーター領域にエストロゲンに反応する estrogen response element (ERE)を有するいくつかの候補遺伝子 (bcl-x, GFAP, GABA

transporter 1, neurotensin/nneuromedin N, oxytocin, progesterone receptor) の mRNA 発現の有無を検索した。次いでエストロゲン作用の陽性対照である EE の母体に対する最大耐量 (0.5 ppm 混餌投与) を胎生期から新生児期にあたる E15~P9 の間、経胎盤的・経乳的に曝露した動物(P9)の視床下部を用いて、定量的な RT-PCR に向けての予備的な条件設定 (RNA 量, プライマーの選択, 定量に最適なサイクル数, 各温度の時間, アニールの温度など) を行なった。

In vitro 評価研究の B-BB 評価系においてはまず、脳毛細血管内皮細胞の培養が難しいため、その安定供給を図る目的で、ウシ脳毛細血管内皮細胞(BBEC)の不死化を行った。すなわち、ウシ脳より単離した BBEC に、SV40 large T 抗原を発現するプラスミド pSV3-neo をリン酸カルシウム共沈法にて導入し、neomycin (400 µg/ml) により selection を行った。得られたクローンの中より、脳毛細血管内皮細胞の特性である、高アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、紡錘状の形態、Ac-LDL の取り込み、tight-junction 様構造、multi-drug resistance gene および glucose transporter1 の発現、を示すものを選択し、クローン t-BBEC-117 細胞を得た。その細胞についてラットアストロサイトの条件培地および既知のアストロサイト産生因子 (bFGF, VEGF, IL-6, GDNF) が、上記の脳毛細血管内皮細胞の特性をさらに誘導するか検討した。一方、EDCs の B-BB における標的遺伝子を探索する目的で、低濃度のエストロゲンに曝露したときのヒト脳毛細血管内皮細胞における遺伝子発現の micro array による検索を行った。すなわち、ヒト脳毛細血管内皮細胞を大日本製薬社より購入し、2 回継代後に、estradiol  $1 \times 10^{-12}$  M を 24 時間作用させ、抽出した RNA について GenomeSystem 社に解析を依頼した。

次に、B-BB の水チャネルとして重要と考えられている aquaporin-4 (AQP4) について、その遺伝子のクローニングをウシ脳 cDNA library をスクリーニングして行った。その結果、得られたクローンで 5' 側に alternative splicing の存在することが分かったので、genomic DNA を使い、それらの exon-intron boundary についても検討した。

次いで、ラットアストロサイトにおける EDCs の AQP4 遺伝子発現に与える影響を検索する目的で、ラットアストロサイトを胎齢 18 日の胎児より分離・培養し、1 回継代後に培養液中に estradiol ( $1 \times 10^{-9}$  M), ビスフェノール A ( $1 \times 10^{-9}$  M), 4-ノニルフェノール ( $1 \times 10^{-9}$  M), フタル酸ジイソノニル ( $1 \times 10^{-9}$  M) を 6 時間作用させた後に RNA 抽出し、RT-PCR 法にて AQP4 mRNA の発現量の変化を測定した。

ニューロンの評価系に関して、まず、ラット胎児脳を摘出し、視床下部および海馬を切り出し、パパイソ法による分散培養を行った。培養後、抗 ER 抗体などでの染色、BDNF mRNA の RT-PCR での定量、また MTT 法によるニューロンの生存率の測定を行った。

倫理面への配慮として、主な動物投与実験は混餌投与により行い、動物の苦痛を最小限にとどめた。また、動物はすべてネンプタル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺するため、動物に与える苦痛は最小限にとどめた。ニューロンやアストロサイト培養系等の初代培養に用いる実験動物は利用規程に従って用い、In vitro B-BB モデル培養系は不死化した細胞を用いたため、倫理面についての問題はない。

### C. 研究結果

In vivo 評価系においてまず、EE 処置により出生時の新生ラットの体重及び膻-肛門間隔などの性分化の異常が観察された。さらに各処置群の出

生 6 日と 10 日齢の新生ラット視床下部から total RNA を回収し, gm 遺伝子に対する competitive RT-PCR を行ない, gm 遺伝子発現量を検討した結果, 出生 6 日において, EE 群の雄ラット視床下部でその発現の有意な増加を認めた。出生 10 日においては, EE 群の雌ラットで gm 遺伝子発現の上昇が観察された。EB 処置は, 出生 6 日後では変化なかったが, 出生 10 日後では雌雄ともに gm 遺伝子発現の増加を認めた。

次に, 視床下部の性的二型核における遺伝子発現検索のための組織固定法の検討を行ったところ, メタカーン固定し脱パラフィンした 10  $\mu\text{m}$  厚のラット肝組織薄切片から, 多くの遺伝子について定量的な RT-PCR を適用できる量の total RNA が抽出された ( $52 \pm 15 \text{ ng/mm}^2$ )。また, 抽出された total RNA のクオリティーは固定・包埋の影響を受けず, RNA 収量とそこへの DNA の混入の程度をいくつかの固定液で比較した結果, メタカーンが総合的に優れていた。固定・包埋材料を用いた場合, 一般的に抽出された total RNA への genomic DNA の混入は避けられないが, 目的とする個々の遺伝子について RT 反応に用いる total RNA 量と, 引き続き PCR のサイクル数を最適化することにより, 標的遺伝子の転写産物に由来するテンプレートの PCR による選択的な増幅が可能となった。この 2 段階のバリデーションにより, 臓器ないし性特異的な発現が知られている HGF receptor,  $\alpha 2\text{u-globulin}$  等の遺伝子の検出が可能となり, 比較的大きな RNA 分子(2kb)や, 発現量の非常に少ない RNA の検出も可能であった。メタカーン固定後の切片を cresyl violet によって染色した場合でも, 抽出された total RNA を用いた RT-PCR に影響を与えず, microdissection 法により取り出された微量組織からの RT-PCR も可能であった。また, SDS バッファー存在下で超音波処理することにより, 切片

からの蛋白質抽出 ( $4.9 \pm 2.1 \mu\text{g/mm}^2$ , 10  $\mu\text{m}$  厚のラット肝組織)と, それを用いた Western blotting による cathepsin D,  $\alpha 2\text{u-globulin}$ , CYP2E1, EGFR 等の検索した全ての蛋白質の定量的発現解析が可能となった。また, 蛋白質の抽出効率も, アセトンに次いで優れていた。このような結果を踏まえて, メタカーン固定した生後 9 日 (P9) の無処置新生雄ラットの視床下部性的二型核を microdissection により取り出し, ERE を有する bcl-x, GABA transporter I, oxytocin, GFAP, progesterone receptor, neurotensin /neuromedin N 等の 6 遺伝子につき RT-PCR を行ったところ, それら全ての mRNA の発現が確認された。更に, 予備的な検討の結果, 最大耐量の EE 曝露を受けた雌雄の新生児とも, P9 の時点では無処置動物に比較して, その神経核における形態学的変化は見られなかったものの, 雄の新生児において ERE を有する幾つかの遺伝子の発現低下が認められた。微量組織での高感度で, より確実な RNA の発現量の定量化を実現するために, PCR 産物を電気泳動したバンドの濃さではなく, plate hybridization による比色法を組み合わせた高感度な competitive RT-PCR 法を開発し, この実験系への応用を現在進めている。この方法を用いた予備的な検討の結果, 無処置雄 P9 の内側視床前野の二型核における GABA transporter I の mRNA の数は 1340 コピー/ng total RNA であった。

In vitro 評価系においては, まず BBEC の不死化を行ったところ, 42 クローンを得ることができた。そのうち t-BBEC-117 細胞は, 高アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性, 紡錘状の形態, Ac-LDL の取り込み, tight-junction 様構造, multi-drug resistance gene および glucose transporter I の発現を示し, 脳毛細血管内皮細胞の特性を有していることが判明した。ラットアス

トロサイトの条件培地および既知のアストロサイト産生因子 (bFGF, VEGF, IL-6, GDNF) を t-BBEC-117 に作用させ, ALP 活性の変化および L-glucose の透過性の変化を観察したところ, bFGF でもって ALP 活性の上昇, L-glucose の透過性の低下が観察された。ラットアストロサイトの条件培地中にも bFGF は含まれていることから, bFGF によって t-BBEC-117 の脳毛細血管内皮細胞としての特性がより強く誘導されることが分かった。また, t-BBEC-117 とアストロサイトを共培養することにより, L-glucose の permeability が低下した。次に, 低濃度のエストロジェンに曝露した際のヒト脳毛細血管内皮細胞における遺伝子発現を microarray で検索したところ, ER の発現がほとんどなく, estrogen-related receptor が多く発現していることが判明した。

ウシ AQP4 cDNA をクローニングしたところ, 2種類の mRNA の存在することが分かり, long form は 323 アミノ酸をコードし, short form は, 301 アミノ酸をコードしていた。アミノ酸レベルでヒト, ラット, マウスと 93% 以上の相同性があった。また, genomic DNA を使って, exon-intron boundary を検討したところ, 5'側の2つの exon が, 別々に使用されて転写が開始されていることが判明した。次いで, ラットアストロサイトに estradiol, ビスフェノール A, 4-ノニルフェノール, フタル酸ジイソノニルを作用させたところ, 6 時間後の時点で, どの化学物質においても AQP4 mRNA の発現量は約 2 倍に増加した。

ニューロンの評価系においては, ラット胎児視床下部から分離したニューロンの分散培養系を確立した。この系で胎生 19 日齢ラット視床下部ニューロンを 1 週間血清培養し, 抗 ER 抗体および抗プロジェステロン受容体抗体で免疫組織染色した。その結果, 両抗体ともに, 核に強い染色が見られる細胞が多く培養されていた。これら抗体に陽性

な細胞は, 形態的にほとんどがニューロンと思われる, アストロサイト様の細胞ではなかった。視床下部ニューロンは特にこれら受容体の発現が多い領域であるが, この領野以外でも, 例えば海馬ニューロンの同様の培養でも ER は発現していた。この発現は, しかしながら低く, ER の mRNA レベルを RT-PCR 法で測定してみた結果, 視床下部ニューロンに比べてはるかに低いものであった。次に, 種々の領野ニューロンの培養下での生存におよぼすエストロジェンの効果を調べる目的で, 海馬および視床下部ニューロンの分散培養を行い, ニューロンの生存が損なわれる無血清培養下で estradiol を添加し, 1 週間培養を行った。その結果, 海馬ニューロンでは 10nM をピークに, また視床下部ニューロンでは 1000nM でわずかな生存維持効果が認められた。またこの時, 神経細胞の生存に関与すると考えられている神経栄養因子の一つ BDNF に注目し, その mRNA レベルの変動を RT-PCR 法を用いて定量した。その結果, 生育に適さない培養下では低下してゆく BDNF mRNA が, estradiol の添加によって, くい止められることが判明した。この時, ER の mRNA レベルに変化は認められなかった。一方, ニューロンの生存が図られている血清培養条件下で estradiol の添加を行ったところ, BDNF mRNA レベルは増加する傾向を示した。これらの結果は, エストロジェンによるニューロンの生存維持が, エストロジェンそのものの直接作用とは断定できず, BDNF 発現を促す間接的な効果である可能性を示している。いずれにせよ, エストロジェンと BDNF の間には, 何らかの相互作用の存在が考えられる。今後, ER および BDNF の両 mRNA 発現細胞を特定するため, 培養細胞系での *in situ* hybridization を行う予定である。この予備実験として, まず BDNF と ER のラット遺伝子のクローニングを行った。その結果各々のサブクローンが

とれ、現在調製中である。またスライス培養系を立ちあげestradiolの影響を検討中である。現在、胎生 19 日齢ラット視床下部のスライス培養として2週間の長期培養が可能である。

#### D. 考察

平成11年度は *in vivo* および *in vitro* の評価系ともエストロゲン化合物を用いて、その曝露条件の検討と各種検出系の確立に努めた。*In vivo* 評価研究は脳の性分化過程および性成熟後の生殖機能に与える影響を主眼として、視床下部・下垂体軸、生殖器系の機能とそれらの形態学的な評価を予定しているが、11年度は脳の性分化の臨界時期での視床下部における性分化関連遺伝子ないしエストロゲンに反応する遺伝子群の発現解析を中心にそれらの評価系の確立に努めた。その結果、まずEEを母体に摂取させることによりエストロゲンが胎盤あるいは乳汁を介して胎児あるいは新生児に移行することが確認され、さらに、このような経路で移行したエストロゲンにより視床下部における *gm* 遺伝子発現の誘導が初めて示された。*Gm* 遺伝子は、分担研究者らにより脳の性分化誘導因子をコードしている遺伝子として見出されたが、EDCsの周産期曝露による視床下部性分化に与える影響の評価指標としての可能性が期待される。

エストロゲンに反応する遺伝子の脳性分化完了時期における発現検索に関しては、予備的な検討結果から、EEの最大耐量(0.5 ppm)の周産期曝露により、雄の新生児の性的二型核で、形態学的な差を認めなかったものの、エストロゲンに反応する遺伝子の発現量の低下を認めている。このことが、この神経核神経細胞の将来的なアポトーシス誘導を示唆するのか、あるいは単純な形態学では判別できない微妙な細胞機能の変化を示唆するのかは現時点では不明である。現在、性成熟

後の動物の病理組織学的検索を進めているが、0.5 ppm EEを周産期に曝露を受けた動物では、精上皮の脱落による精細管萎縮、卵巣低形成、副腎皮質の限局性過形成等、生殖器を含む内分泌器官の傷害がごく軽度ながら認められている。また、性成熟後の視床下部の形態学的な変化の検索には、HE標本では神経核構造の全体を特定しにくいこともあり、ER等の分子指標の導入を検討している。

性的二型核での遺伝子発現解析は最終的には低用量域曝露のリスク評価に用いることから、更に高感度な検索法の確立が望まれる。感度をあげ、微量組織でのより確実な定量化を実現するためにPCR産物を電気泳動したバンドの濃さによる定量ではなく、capture oligoを用いたplate hybridizationによる高感度な定量法を組み合わせたcompetitive RT-PCR法を開発し、現在、GABA transporter I, GFAP, *bcl-x*の各遺伝子に対する定量キットの作製を完了し、EEによる発現の用量反応性の検討を行う予定である。そのためのEEの周産期曝露実験(0.5, 0.1, 0.02 ppm)は終了している。この研究の過程で確立したメタカーン固定・パラフィン包埋材料を用いた遺伝子発現解析法は、レーザー光によるmicrodissection法と新たに開発した高感度competitive RT-PCR法を組み合わせることにより、組織中の限られた細胞領域での、複数の遺伝子発現解析が可能となる極めて画期的な方法である。

*In vitro* 評価研究に用いたモデルとして、独自に開発・確立した*in vitro* B-BBモデル、アストロサイトモデル、ニューロンの各種初代培養系が挙げられ、エストロゲン化合物を用いてのEDCsの評価指標をほぼ確立している。*In vitro* B-BB評価系に関して、ウシ脳毛細血管内皮細胞を不死化して得られたt-BBEC-117は脳毛細血管内皮細胞としての特性を有しており、今後*in*



in vitro B-BB モデルに利用することができると考えられた。今後は、この細胞を利用し、EDCs の B-BB に与える影響を詳細に検討する予定である。一方、低濃度のエストロゲン曝露により、ヒト脳毛細血管内皮細胞は estrogen-related receptor を多く発現していることが micro array 解析により判明した。EDCs が、この receptor を介して作用している可能性もあり、今後の検討課題と考えられた。

B-BB を構成するもう一つの細胞であるアストロサイトについて、水チャネルである AQP4 の発現が estradiol およびビスフェノール、4-ノニルフェノール、フタル酸ジイソノニルで変化することが分かり、EDCs が B-BB の機能を変化させる可能性が示唆された。今後 micro array 法などを用い、この系でのエストロゲンおよび EDCs による遺伝子発現変化の検討を予定している。

培養中枢ニューロンの EDCs 検索系の開発に伴い、エストロゲンによるニューロンの生存維持には、神経栄養因子の関わっている可能性が見出された。神経栄養因子は、ニューロンの生存維持のみならず、神経機能の可塑的な調節制御にも関与していることから、エストロゲンのシナプス可塑性へおよぼす効果についても今後の検討が必要である。

以上の結果を基に、12年度は in vitro 評価系では、検出系の確立に伴い多数の検体をスクリーニングする系としての実験系の整備を図り、社会的に重要性の高い候補物質（ビスフェノールA、メトキシクロール、ジェニステイン、ジイソノニルフタレート）につき解析を開始し、次いでエストロゲン作用を中心に内分泌かく乱作用の疑われているその他の化学物質につき in vitro のスクリーニングを始める。In vivo 評価系では、社会的重要性及び in vitro の結果をもとに代表的な化学物質を選定して性分化の臨界時期と性成熟後の

時期での検索を進める予定である。性成熟後の生殖中枢の評価には、病理形態学的手法の他に、既に独自に開発した GnRH パルスジェネレーターの神経活動の解析法を充てる予定である。

## E. 結論

EDCs の胎生期ないし乳児期曝露による内分泌機能中枢に与える影響のリスク評価を目的として、ラットを用いた個体レベルでの in vivo 評価研究と、神経中枢の個々の細胞機能単位を対象とした in vitro 評価研究に着手した。11年度は、両評価研究ともエストロゲン化合物を陽性対照として評価系の確立に努めた。

In vivo 評価研究において得られた成果として、まず gm 遺伝子の EDCs の標的分子としての可能性が見出され、今後の新生ラットにおける内分泌中枢のかく乱影響の指標としての可能性が開かれた。また、脳の性分化完了時期での視床下部特定神経核での遺伝子発現評価系の基礎的実験条件の検討はほぼ終了し、予備的な検討の結果、高用量の EE を作用させた出生雄ラットの性的二型核で、いくつかの遺伝子の mRNA 発現の低下を確認している。

In vitro 評価研究において得られた成果としては、まず B-BB 評価系については、不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞株を樹立し、今後の安定供給を可能とした。また、ウシ AQP4 の cDNA をクローニングし、この遺伝子の発現解析が可能となった。次に、EDCs により、脳毛細血管内皮細胞およびアストロサイトの遺伝子発現が変化する可能性を見出した。ニューロンへの影響の解析系では、ラット胎児視床下部および海馬から分離したニューロンの分散培養系を確立した。この系に対するエストロゲンの生存維持作用、神経栄養因子の誘導作用を明らかにした。以上より、種々の EDCs の中枢神経系への in vitro 作用を調べる

スクリーニング系はほぼ確立できたと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Hodgson, M.E., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsuda, T., Katsuya, H., Miura, Y., Asai, K., Kato, T.: Induction of Blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci. Res.* 35: 155-164 (1999).

Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Fujita, K., Miura, Y., Asai, K., Tsuda, T., Katsuya, H., Kato, T. : Molecular cloning of two bovine aquaporin-4 cDNA isoforms and their expression in brain endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1489: 389-394 (1999).

Yoneda, K., Yamamoto, N., Asai, K., Sobue, K., Fujita, Y., Fujita, M., Mase, M., Yamada, K., Tada, T., Miura, Y., Kato, T. : Regulation of aquaporin-4 expression in astrocytes. (Submitted).

Shibutani, M., Uneyama, C., Miyazaki, K., Toyoda, K., Hirose, M.: Methacarn fixation, a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. *Lab. Invest.* 80: 199-208 (2000).

Araki, T., Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S., Uetsuki, T., Hatanaka, H. : Role of phosphatase activity of Shp-2 in BDNF signaling in cultured cerebral cortical neurons.

*J. Neurochem.* 74, 659-668 (2000).

Inamura, N., Araki, T., Enokido, Y., Nishio, C., Aizawa, S., Hatanaka, H. : The role of p53 in DNA strand break-induced apoptosis in organotypic slice cultures from the mouse cerebellum. *J. Neurosci. Res.* (in press).

Shimoke, K., Yamagishi, S., Yamada, M., Ikeuchi, T., Hatanaka, H.: Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Dev. Brain Res.*, 112, 245-253 (1999).

Ishikawa, Y., Satoh, T., Enokido, Y., Nishio, C., Ikeuchi, T., Hatanaka, H.: Generation of reactive oxygen species, release of L-glutamate and activation of caspase are required for the high oxygen-induced apoptosis of embryonic hippocampal neurons in culture. *Brain Res.*, 824, 71-80 (1999).

Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S., Nakatani, A., Ikeuchi, T., Hatanaka, H. : BDNF stimulates interaction of Shp2 with P13-K and Grb2 in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, 73, 41-49 (1999).

Hashimoto, Y., Abiru, Y., Nishio, C., Hatanaka, H. : Synergistic effects of BDNF and CNTF on cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal two-week-old rats. *Dev. Brain Res.* 115, 25-32 (1999).

Yamagata, T., Satoh, T., Ishikawa, Y., Nakatani,

A., Yamada, M., Ikeuchi T., Hatanaka, H.: Brain-derived neurotrophic factor prevents superoxide anion-induced death of PC12h cells stably expressing TrkB receptor via modulation of reactive oxygen species. *Neurosci. Res.*, 35, 9-17 (1999).

Suzuki, M., Nishihara, M., et al. : Granulin is a sex-steroid inducible gene in the hypothalamus and involved in sexual differentiation of the rat brain. *J. Reprod. Dev.* (submitted)

Suzuki, M., Nishihara, M., et al. : Suppression of copulatory behavior by intracerebroventricular infusion of antisense oligodeoxynucleotide of granulin in neonatal male rats. *Physiology & Behavior* (in press).

## 2. 学会発表

畝山智香子, 渋谷淳, 豊田和弘, 田村 啓, 広瀬雅雄: メタカーン固定・パラフィン包埋切片からの RNA 及び蛋白質の発現レベル解析 予備的検討, 第58回日本癌学会総会, 広島, 第58回日本癌学会総会記事: P486 (1510), 9-10月, 1999

渋谷淳, 畝山智香子, 宮崎恵子, 田村 啓, 豊田和弘, 広瀬雅雄: メタカーン固定法: パラフィン包埋切片における遺伝子発現レベル解析への応用, 第128回日本獣医学会学術集会, 128回日本獣医学会学術集会講演要旨集: P131, 10月, 1999

Ymamoto, N., Sobue, K., Yoneda, K., Miura, Y., Asai, K., and Kato, T. Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors.

Society for Neuroscience 29th Annual Meeting October 23-28, 1999, Miami Beach, U.S.A.

山本直樹, 祖父江和哉, 米田和広, 三浦 裕, 浅井清文, 加藤泰治: アストロサイト産生因子による血液脳関門形質発現の誘導, 第42回日本神経化学会 1999.9.15.-17. 広島

山本直樹, 祖父江和哉, 米田和広, 三浦 裕, 浅井清文, 加藤泰治: 血液脳関門形成を促すアストロサイト産生因子の同定, 第63回日本生化学会中部支部例会 1999.5.14. 三重

鈴木正寿, 西原真杉ら: 新生雄ラット脳室内へのグラニューリンアンチセンス DNA 投与による雄性行動の発現抑制, 第92回日本繁殖生物学会, 1999年9月, 仙台

鈴木正寿, 西原真杉ら: 脳の性分化誘導因子としてのグラニューリン遺伝子の単離とその機能解析, 第128回日本獣医学会学術集会, 1999年10月, 熊本

G. 知的所有権の取得状況  
特になし。

平成11年度厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）  
（分担）研究報告書

血液脳関門及びグリア細胞への影響のin vitro評価  
（主任）研究者 加藤 泰治 名古屋市立大学医学部教授

研究要旨

内分泌かく乱物質（EDCs）の血液脳関門（blood-brain barrier: B-BB）への影響を検討するにあたり、脳毛細血管内皮細胞を安定供給する目的で、ウシ脳毛細血管内皮細胞の不死化を行った。また、B-BBで水チャネルとして重要と考えられているAquaporin-4（AQP4）のウシcDNAのクローニングを行った。EDCsが、B-BBを構成する細胞の遺伝子発現を変化させるかどうか基礎的な情報を得るために、ヒト脳毛細血管内皮細胞において、DNA micro array法を使い、estrogenによる遺伝子発現の変化を検討した。また、アストロサイトについては、estrogen および一部のEDCsを作用させたときのAQP4の発現変化を調べたところ、約2倍に増加した。

加藤泰治・名古屋市立大学医学部分子医学研究所生  
体制御部門・教授

A. 研究目的

血液脳関門（blood-brain barrier: B-BB）は脳への物質の移行を制限し、中枢神経系の恒常性を維持する機構として知られている。内分泌かく乱物質（EDCs）の中枢神経系への影響を検討するにあたって、EDCsがB-BBをどの程度通過しうるか、そして、EDCsがB-BBそのものの特性を変化させるものか、把握しておく必要がある。申請者らは、すでに、ウシ脳毛細血管内皮細胞（BBEC）とラットアストロサイトを共培養することにより、培養系を利用したB-BBモデル（in vitro B-BBモデル）を確立しているが、脳毛細血管内皮細胞の採取は難しく、今後、実験を進めるにあたって、脳毛細血管内皮細胞を安定供給する必要がある。今年度は、ウシ脳毛細血管内皮細胞の不死化を行い、in vitro B-BBモデルに利用できるかどうか検討した。また、B-BBで水チャネルとして重要と考えられているAquaporin-4（AQP4）のウシcDNAのクローニングを行った。一方、EDCsが、B-BBを構成する細胞の脳毛細血管内皮細胞とアストロサイトの遺伝子発現を変化させるかどうか基礎的な情報を得るために、ヒト脳毛細血管内皮細胞において、DNA micro array法を使い、estrogenによる遺伝子発現の変化を検討した。また、アストロサイトについては、Estrogen および一部のEDCsを作用させたときにAQP4の発現がどのように変化するか検討した。

B. 研究方法

- 1, ウシ脳毛細血管内皮細胞（BBEC）の不死化  
すでに申請者らが確立している方法でウシ脳より単離したBBECに、SV40 large T 抗原を発現するプラスミドpSV3-neoをリン酸カルシウム共沈法にて導入した。Neomycin（400 $\mu$ g/ml）によりselectionを行った。得られたクローンの中より、脳毛細血管内皮細胞の特性、（1）高アルカリフォスファターゼ（ALP）活性、（2）紡錘状の形態、（3）Ac-LDLの取り込み、（4）Tight-junction様構造、（5）multi-drug resistance gene およびglucose transporter 1の発現を示すものを選択した。
- 2, 方法1で得られたクローンt-BBEC-117細胞についてラットアストロサイトの条件培地および既知のアストロサイト産生因子（bFGF、VEGF、IL-6、GDNF）が、上記の脳毛細血管内皮細胞の特性をさらに誘導するか検討した。
- 3, ウシAquaporin-4遺伝子のクローニング  
ウシ脳cDNA Libraryをスクリーニングし、AQP4 cDNAをクローニングした。5'側にalternative splicingが存在することが分かったので、genomic DNAを使い、alternative splicing部位のexon-intron boundaryについても検討した。
- 4, ヒト脳毛細血管内皮細胞における遺伝子発現のmicro arrayによる検索  
ヒト脳毛細血管内皮細胞を大日本製薬社より購入、2回継代後に、estrogen  $1 \times 10^{-12}$ を24時間作用させ、作用させていないコントロール細胞とともにRNAを抽出、GenomeSystem社に解析を依頼し

た。

5, EDCsがラットアストロサイトにおけるAQP4遺伝子発現に与える影響

ラットアストロサイトを胎齢18日の胎仔より培養し、1回継代後に培養液中にEstrogen ( $1 \times 10^{-9}$ )、ビスフェノール ( $1 \times 10^{-9}$ )、4-ノニルフェノール ( $1 \times 10^{-9}$ )、フタル酸ジイソノニル ( $1 \times 10^{-9}$ ) を6時間作用させた後、RNAを抽出した。RT-PCRにて、AQP4 mRNAの発現量の変化を検討した。

### C. 研究結果

1, BBECの不死化を行ったところ、42クローンを得ることができた。そのうちt-BBEC-117細胞は、

(1) 高アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、  
 (2) 紡錘状の形態、 (3) Ac-LDLの取り込み、  
 (4) Tight-junction様構造、 (5) multi-drug resistance gene および glucose transporter 1の発現を示し、脳毛細血管内皮細胞の特性を有していることが判明した。そこで、以降は、このt-BBEC-117を用いて実験を進めた(Fig. 1A)。

2, ラットアストロサイトの条件培地および既知の

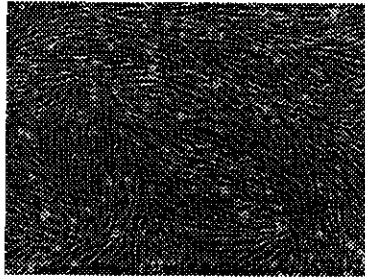


Figure 1A. t-BBEC-117 顕像

アストロサイト産生因子 (bFGF、VEGF、IL-6、GDNF) をt-BBEC-117に作用させ、ALP活性の変化およびL-glucoseの透過性の変化を観察したところ、bFGFでもってALP活性の上昇、L-glucoseの透過性の低下が観察された。ラットアストロサイトの条件培地中にもbFGFは含まれていることから、bFGFによってt-BBEC-117の脳毛細血管内皮細胞としての特性がより強く誘導されることが分かった。また、t-BBEC-117とアストロサイトを共培養することにより、L-glucoseのpermeabilityが低下した(Fig. 1B)。

3, ウシAQP4 cDNAをクローニングしたところ、2種類のmRNAが存在することが分かり、long formは323アミノ酸をコードし、short formは、301アミノ酸をコードしていた。アミノ酸レベルでヒト、ラット、マウスと93%以上の相同性があった(Fig. 2)。また、genomic DNAを使って、exon-intron boundaryを検討したところ、5'側の2つのexonが、別々に使用されて転写が開始されていることが判明した。

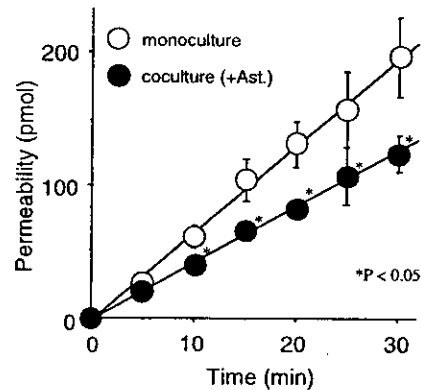


Figure 1B. L-glucose permeability

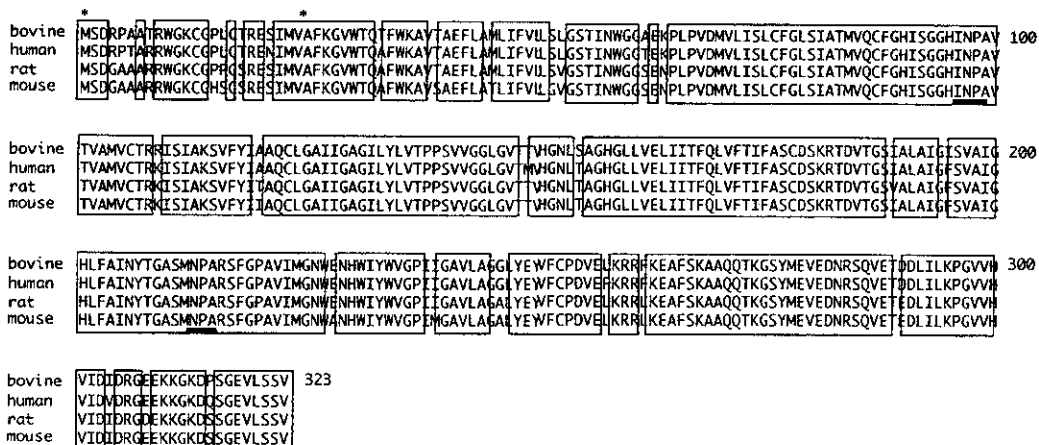


Figure 2. Comparison of amino acid sequence of bovine AQP4 with those of human rat, and mouse AQP4. Open squares indicate residues in the human, rat, and mouse sequences that are identical to those in the bovine sequence. Two potential initiation sites, Met1 and Met23, are indicated by asterisks and two sites of NPA motif are underlined.

4, ヒト脳毛細血管内皮細胞における遺伝子発現を micro array で検索したところ、estrigen receptor の発現がほとんどなく、estrogen related receptor が多く発現していることが判明した。

5, ラットアストロサイトにestrogen、ビスフェノール、4-ノニルフェノール、フタル酸ジイソノニルを作用させたところ、6時間後の時点で、どの試薬においてもAQP4 mRNAの発現量は約2倍に増加した。

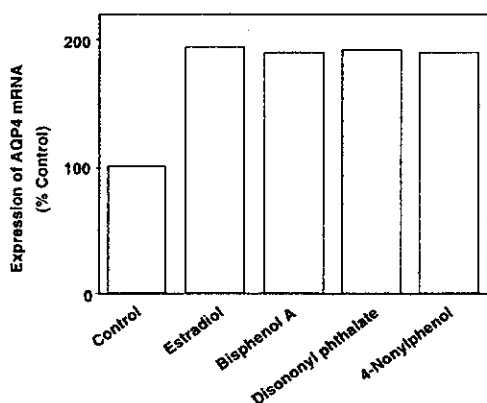


Figure 3. Expression of AQP4 mRNA stimulated by EDCs

#### D. 考察

1, ウシ脳毛細血管内皮細胞を不死化して得られたt-BBEC-117は脳毛細血管内皮細胞としての特性を有しており、今後 in vitro B-BBモデルに利用することができると考えられた。今後は、この細胞を利用し、EDCsのB-BBに与える影響を詳細に検討したい。

2, ヒト脳毛細血管内皮細胞はestrogen related receptorを多く発現していることが判明した。EDCsが、このreceptorを介して作用している可能性もあり、今後の検討課題と考えられた。

3, B-BBを構成するもう一つの細胞であるアストロサイトについて、水チャネルであるAQP4の発現がestrogenおよびビスフェノール、4-ノニルフェノール、フタル酸ジイソノニルで変化することが分かり、EDCsがB-BBの機能を変化させる可能性が示唆された。今後microarray法などを用い、estrogenおよびEDCsによる遺伝子発現変化を検討していきたいと考えている。

#### E. 結論

1, 不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞株を樹立し、今後の安定供給が可能となった。

2, ウシAQP4のcDNAをクローニングした。

3, EDCsにより、脳毛細血管内皮細胞およびアストロサイトの遺伝子発現が変化する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1, 論文発表

1. Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Hodgson, M.E., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsuda, T., Katsuya, H., Miura, Y., Asai, K., Kato, T. Induction of Blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci. Res.* 35(1999)155-164.

2. Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Fujita, K., Miura, Y., Asai, K., Tsuda, T., Katsuya, H., Kato, T. Molecular cloning of two bovine aquaporin-4 cDNA isoforms and their expression in brain endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1489(1999)389-394.

3. Yoneda, K., Yamamoto, N., Asai, K., Sobue, K., Fujita, Y., Fujita, M., Mase, M., Yamada, K., Tada, T., Miura, Y., Kato, T. Regulation of aquaporin-4 expression in astrocytes. (Submitted).

##### 2, 学会発表

1. Yamamoto, N., Sobue, K., Yoneda, K., Miura, Y., Asai, K., and Kato, T. Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Society for Neuroscience 29th Annual Meeting* October 23-28, 1999, Miami Beach, U.S.A.

2. 山本直樹、祖父江和哉、米田和広、三浦 裕、浅井清文、加藤泰治  
アストロサイト産生因子による血液脳関門形質発現の誘導  
第42回日本神経化学会 1999.9.15.-17. 広島

3. 山本直樹、祖父江和哉、米田和広、三浦 裕、浅井清文、加藤泰治  
血液脳関門形成を促すアストロサイト産生因子の同定  
第63回日本生化学会中部支部例会 1999.5.14. 三重

## 分担研究報告書(平成11年度)

### 周産期曝露による影響の病理学および分子生物学的解析

分担研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

研究要旨： 内分泌かく乱化学物質(EDCs)の発達期中枢神経系障害に関する研究課題について、周産期曝露による影響の病理形態学的及び分子生物学的解析手法を用いた *in vivo* 評価に関する研究を開始した。その評価は脳の性分化の臨界時期、および生殖活動が可能となる性成熟後の時期の2時点での解析が重要と考えられる。今年度は初年度にあたり、脳の性分化の臨界時期(新生児期)における影響に関して、視床下部に発現が予想される遺伝子の発現レベルの変動を指標として、エストロゲン化合物を用いての評価系の確立を中心に研究を進めた。

多数の組織材料について解剖学的に特定される細胞領域での遺伝子発現解析を行うためには、パラフィン包埋切片を利用するのが理想的なため、そのための基礎的検討としてパラフィン包埋しても定量的な解析が可能な品質を保ったRNAないし蛋白質を回収できる組織固定法の確立を図り、メタカーン固定法がRNA、蛋白質双方の解析に優れていることを見出した。

脳の性分化臨界時期の遺伝子発現評価系の実験方法として、ラット脳の性分化がほぼ完成する時期にあたる生後9日目(P9)に視床下部を採取し、メタカーン固定、パラフィン包埋切片を作製し、脳室周囲に存在し性的に分化することが知られている神経核(性的二型核)をレーザー光を利用した *microdissection* 法により顕微鏡下で取り出した。その部位由来のRNAを鋳型としたRT-PCRにより、プロモーター領域にエストロゲンに反応する *estrogen response element (ERE)* を有するいくつかの候補遺伝子 (*bcl-x*, *GABA transporter I*, *oxytocin*, *progesterone receptor*, *neurotensin/neuromedin N*, *GFAP*) の mRNA 発現の有無を検索した。その結果、これらの全ての遺伝子が性的二型核で発現していることを確認した。次いで、定量的なRT-PCRに向けての予備的な検討として、エストロゲン化合物を曝露した動物と無処置対照動物との間で、RT-PCRの実験条件の整備を図った。用いた材料は、*ethinylestradiol (EE)* の母体に対する最大耐量(0.5 ppm 混餌投与)を胎生期から新生児期にあたるE15~P9の間、経胎盤的・経乳的に曝露した新生ラット(P9)の視床下部とした。この予備的な検討の結果、最大耐量のEE曝露を受けた雌雄の新生児とも、P9の時点ではその神経核における形態学的変化は見られなかったが、雄の新生児においてEREを有する幾つかの遺伝子の発現低下が認められた。

この実験系は最終的には低用量域曝露のリスク評価に用いることから、更に高感度な検索法の確立が望まれる。感度をあげるための方法として、微量組織でのより確実な定量化を実現するためにPCR産物を電気泳動したバンドの濃さの定量ではなく、*plate hybridization* による高感度な定量法を組み合わせた *competitive RT-PCR* 法を開発し、この実験系への応用を現在進めている。予備的な検討の結果、無処置雄P9の性的二型核における *GABA transporter I* の mRNA 数は1340コピー/ng total RNAであった。

#### A. 研究目的

近年、我々の環境中に数多くの内分泌かく乱化学物質(EDCs)が見いだされ、生殖機能を含むそれらのヒトへの影響が世界的に懸念されるようになってきた。EDCsの生体への作用機構としてエストロゲン受容体(ER)を介した機

序が考えられており、その極低用量曝露によっても生体に不可逆的影響を及ぼすことが指摘されている。中枢神経系においても、胎生期より視床下部・辺縁系を中心としてERを含む性ホルモン受容体が分布しており、当然、その一部を構成する生殖機能中枢も影響を受ける可

能性が高い。特にホルモン依存的に脳の性分化を果たす周産期において EDC の曝露を受けてそれが中枢神経系内に入り込んで作用した場合、脳の正常な性分化が障害され、生後の個体の内分泌機能を含む種々の機能が影響を受ける可能性がある。本研究は、個体レベルでの脳の性分化完了時期と性成熟後の時期での評価系を用いることにより、EDCs の神経中枢への影響の本態を明らかにすることを目標とする。また、用量依存性の生物学的な作用強度を求めることにより、EDCs の低用量域での生体影響を総合的に評価することが可能となる。

最近、脳の性分化を果たす時期に過剰のエストロゲン化合物を投与すると、視床下部ニューロンのアポトーシスと生殖器に障害を起こすことが報告されている。また、ビスフェノール A の胎生期曝露により、脳内アストロサイトの細胞骨格蛋白である GFAP の遺伝子発現が、低用量から用量依存性に増加するとの報告もある。GFAP 遺伝子はそのプロモーター領域にエストロゲンに反応する配列(ERE)を持ち、個体のエストロゲンレベルに呼応してその発現の増減することが知られている。従って、発達期での EDCs 曝露により、内分泌機能の神経中枢になんらかの障害を及ぼす可能性がある。

この研究では、脳の性分化の臨界時期(新生児期)における影響を評価するために、ERE を持ち、視床下部に発現が予想される遺伝子の視床下部での発現解析を行う。それには新たに確立したパラフィン包埋切片の微量組織から遺伝子発現を定量的に検出する系と、顕微鏡下で特定の細胞をレーザー光を利用して採取する方法を組み合わせる検索を行う。そして、遺伝子発現の解析結果と性成熟後の生殖器障害の程度との関連性を比較・評価する。今年度は初年度にあたり、脳の性分化の臨界時期での遺伝子発現の変動を指標として、その評価系の確立を中心目標とした。

## B. 研究方法

まず、パラフィン包埋した組織切片上の微小領域での定量的な遺伝子発現解析を行うために、

解析可能な生体高分子を得るための組織固定法の検討を行った。正常ラットないしマウスの組織または培養 PC12 細胞のメタカーン固定・パラフィン包埋材料を脱パラフィン後、total RNA または蛋白質の抽出を行い、単位面積当たりのそれぞれの抽出量及び RT-PCR と Western blotting による RNA と蛋白質の発現解析についての妥当性の検討を行った。

遺伝子発現評価系の実験方法として、ラット脳の性分化がほぼ完成する時期にあたる生後 9 日目に視床下部を採取し、メタカーン固定、パラフィン包埋切片を作製し、脳室周囲に存在し性的に分化することが知られている神経核(性的二型核)を microdissection 法により顕微鏡下で取り出した。その部位由来の RNA を鋳型とした RT-PCR により、プロモーター領域にエストロゲンに反応する estrogen response element (ERE) を有するいくつかの候補遺伝子 (bcl-x, GABA transporter 1, oxytocin, GFAP, neurotensin/neuromedin N, progesterone receptor) の mRNA 発現のパターンを検索した。用いた材料は、妊娠ラットを用いてエストロゲン作用の陽性対照である ethinylestradiol (EE) の母体に対する最大耐量 (0.5 ppm 混餌投与) を胎生期から新生児期にあたる E15~P9 の間、経胎盤的・経乳的に曝露した動物 (P9) の視床下部とした (図 1)。定量的な RT-PCR に向けての予備的な検討として、処置動物と無処置対照動物との間で、RT-PCR の実験条件の整備を図った。そのためにもまず、各候補遺伝子につき、視床下部を用いた定量的 RT-PCR に必要な条件設定 (RNA 量、プライマーの選択、定量に最適なサイクル数、各温度の時間、アニールの温度) などを行った。

## C. 研究結果

メタカーン固定し脱パラフィンした 10  $\mu\text{m}$  厚のラット肝組織薄切片から、多くの遺伝子について定量的な RT-PCR を適用できる量の total RNA が抽出された ( $52 \pm 15 \text{ ng/mm}^2$ )。また、抽出された total RNA のクオリティーは固定・包埋の影響を受けず (図 2)、RNA 収量とそ



の中への DNA の混入の程度をいくつかの固定液で比較した結果、メタカーンが総合的に優れていた (表 1)。固定・包埋材料を用いた場合、一般的に抽出された total RNA への genomic DNA の混入は避けられないが、目的とする個々の遺伝子について RT 反応に用いる total RNA 量と、引き続き PCR のサイクル数を最適化することにより、標的遺伝子の転写産物に由来するテンプレートの選択的な増幅が可能となった (図 3)。この 2 段階のバリデーションにより、臓器ないし性特異的な発現が知られている HGF receptor,  $\alpha 2u$ -globulin 等の遺伝子の検出が可能となり、比較的大きな RNA 分子 (2kb) や、発現量の非常に少ない RNA の検出も可能であった。メタカーン固定後の切片を cresyl violet によって染色した場合でも、抽出された total RNA を用いた RT-PCR に影響を与えず、laser capture microdissection により取り出された微量組織からの RT-PCR も可能であった (図 4)。また、SDS バッファー存在下で超音波処理することにより、切片からの蛋白質抽出 ( $4.9 \pm 2.1$  mg/mm<sup>2</sup>, 10  $\mu$ m 厚のラット肝組織) と、それを用いた Western blotting による cathepsin D, CYP2E1,  $\alpha 2u$ -globulin, EGFR 等の検索した全ての蛋白質の定量的発現解析が可能となった。また、蛋白質の抽出効率も、アセトンに次いで優れていた (表 2)。

次に、生後 9 日 (P9) の無処置新生雄ラットの脳をメタカーン固定・パラフィン包埋し、その視床下部の内側視束前野に存在する性的二型核を microdissection により取り出し、ERE を有する bcl-x, GABA transporter I, oxytocin, progesterone receptor, neurotensin/neuromedin N, GFAP 等の 6 遺伝子につき RT-PCR を行ったところ、これら全ての mRNA の発現が確認された。

予備的な検討の結果、最大耐量の EE 曝露を受けた雌雄の新生児とも、P9 の時点ではその神経核における形態学的変化は見られなかったが、雄の新生児において ERE を有する幾つかの遺伝子発現低下が認められた (図 5, 6)。微量組織での高感度で、より確実な RNA の発現量の定量化を実現するために、PCR 産物を電

気泳動したバンドの濃さではなく、capture oligo による plate hybridization 法を組み合わせた competitive RT-PCR 法を開発し、この実験系への応用を現在進めている。予備的な検討の結果、無処置雄 P9 の内側視束前野の二型核における GABA transporter I の mRNA の数は 1340 コピー/ng total RNA であった。

#### D. 考察

予備的な検討結果から、EE の最大耐量 (0.5 ppm) の周産期曝露により、雄の新生児の性的二型核で、形態学的な差を認めなかったものの、エストロジェンに反応する遺伝子の発現量の低下を認めている。このことは、この神経核神経細胞の将来的なアポトーシス誘導を示唆するのか、あるいは単純に形態学では判別できない細胞機能の変化を示唆するのかは定かではない。現在、性成熟後の動物の病理組織学的検索を進めているが、0.5 ppm EE を周産期に曝露を受けた動物では、精上皮の脱落による精細管萎縮、卵巣低形成、副腎皮質の限局性過形成等、生殖器を含む内分泌器官の傷害が極く軽度であるが認められている。また、性成熟後の視床下部の変化の検索には、HE 標本では神経核構造の全体を特定しにくいこともあり、ER 等の分子指標の導入を検討している。

脳の性分化が完了する時期での視床下部における遺伝子発現解析は最終的には低用量域曝露のリスク評価に用いることから、更に高感度な検索法の確立が望まれる。感度をあげ、微量組織でのより確実な定量化を実現するために PCR 産物を電気泳動したバンドの濃さではなく、capture oligo を用いた competitive RT-PCR 法を開発し、現在、GABA transporter I, GFAP, bcl-x の各遺伝子に対する定量キットの作製を完了した。これから、順次 EE による発現の用量反応性の検討を行う予定であるが、そのための EE の周産期曝露実験 (0.5, 0.1, 0.02 ppm) は終了している。この研究の過程で確立したメタカーン固定・パラフィン包埋材料を用いた遺伝子発現解析法は、レーザー光による microdissection 法と新たに開発した高感度 competitive RT-PCR 法を組み合わせることに

より、組織中の限られた細胞領域での、複数の遺伝子発現解析が可能となる極めて画期的な方法である。

#### E. 結論

今年度の研究により、パラフィン包埋切片を用いた組織中の特定領域での遺伝子発現解析を可能とする組織固定法を確立することができた。また、この成果を基に、脳の性分化完了時期での視床下部の特定神経核における遺伝子発現評価系の基礎的実験条件の検討を終了し、予備的な検討の結果、最大耐量のEE曝露を受けた雄の新生児においてEREを有する幾つかの遺伝子の発現低下を確認した。現在、高感度competitive RT-PCR法を用いての定量的解析を進めている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shibutani, M., Uneyama, C., Miyazaki, K., Toyoda, K., Hirose, M.: Methacarn fixation, a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. Lab. Invest. 80: 199-208 (2000)

##### 2. 学会発表

畝山智香子, 渋谷淳, 豊田和弘, 田村 啓, 広瀬雅雄: メタカーン固定・パラフィン包埋切片からのRNA及び蛋白質の発現レベル解析 予備的検討, 第58回日本癌学会総会, 広島, 第58回日本癌学会総会記事: P486 (1510), 9-10月, 1999

渋谷淳, 畝山智香子, 宮崎恵子, 田村 啓, 豊田和弘, 広瀬雅雄: メタカーン固定法: パラフィン包埋切片における遺伝子発現レベル解析への応用, 第128回日本獣医学会学術集会, 128回日本獣医学会学術集会講演要旨集: P131, 10月, 1999

G. 知的所有権の取得状況  
特になし。

☒ 1

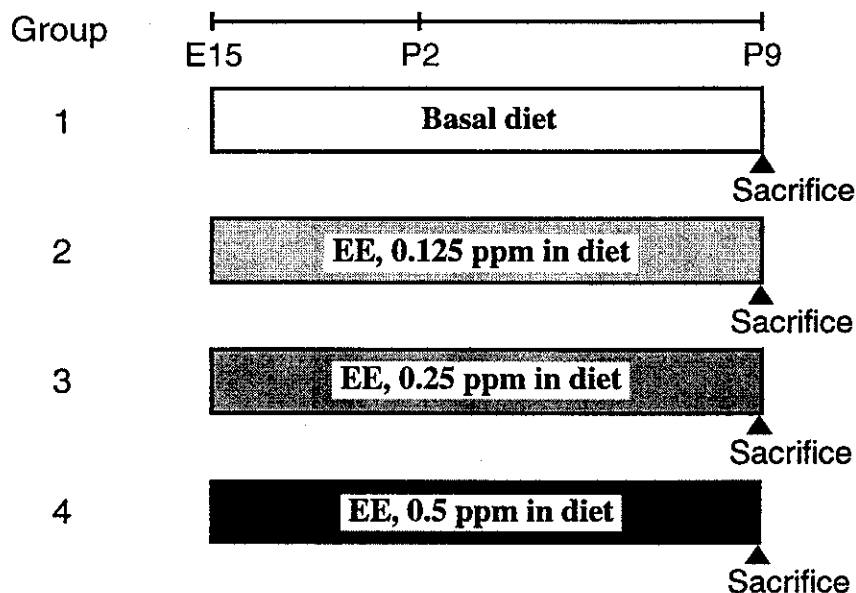
## Effect of perinatally exposed estrogen-agonists on sexually dimorphic nucleus of hypothalamus.

- A preliminary study to estimate maximum tolerable dose -

Animals: Sprague-Dawley (IGS) rats, pregnant

Parameters to be analysed:

P9: Hypothalamus fixed with Methacarn solution  
(RT-PCR: gene expression analysis )



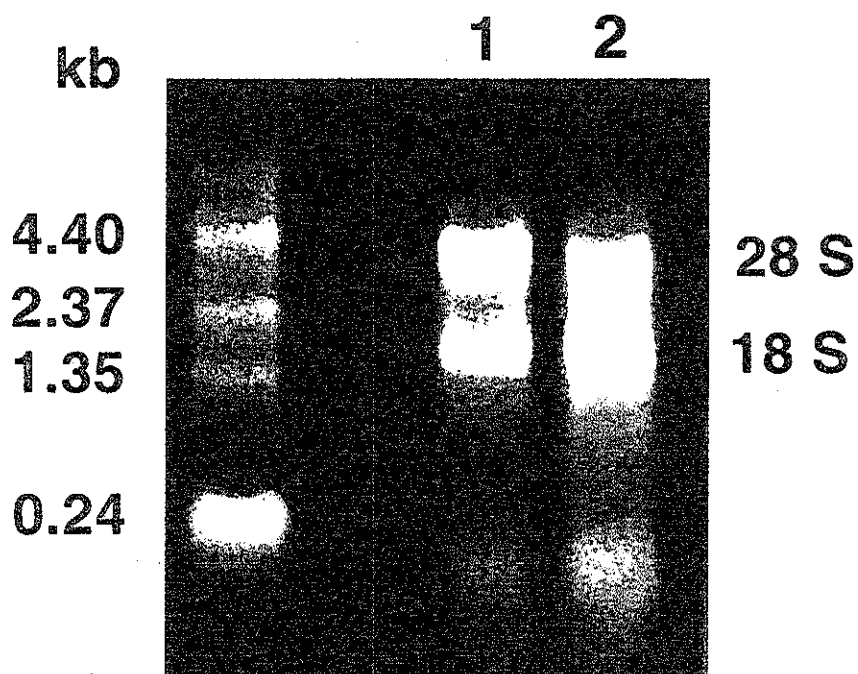
Abbreviations: EE: Ethinyl estradiol; EB: Estradiol benzoate

E0: The day when a vaginal plug is found

P1: The day when a rat gives birth

EB is dissolved in sesame oil (100 µg/ml)

図 2 メタカン固定・パラフィン包埋した PC12 細胞から抽出した total RNA のクオリティー



1. 未処置 PC12
2. メタカン固定・パラフィン包埋した PC12