

図 3 RNA template 特異的な PCR 反応条件の決定
- HGFR signal の場合 -
(RT 反応に用いる total RNA 量の最適化)

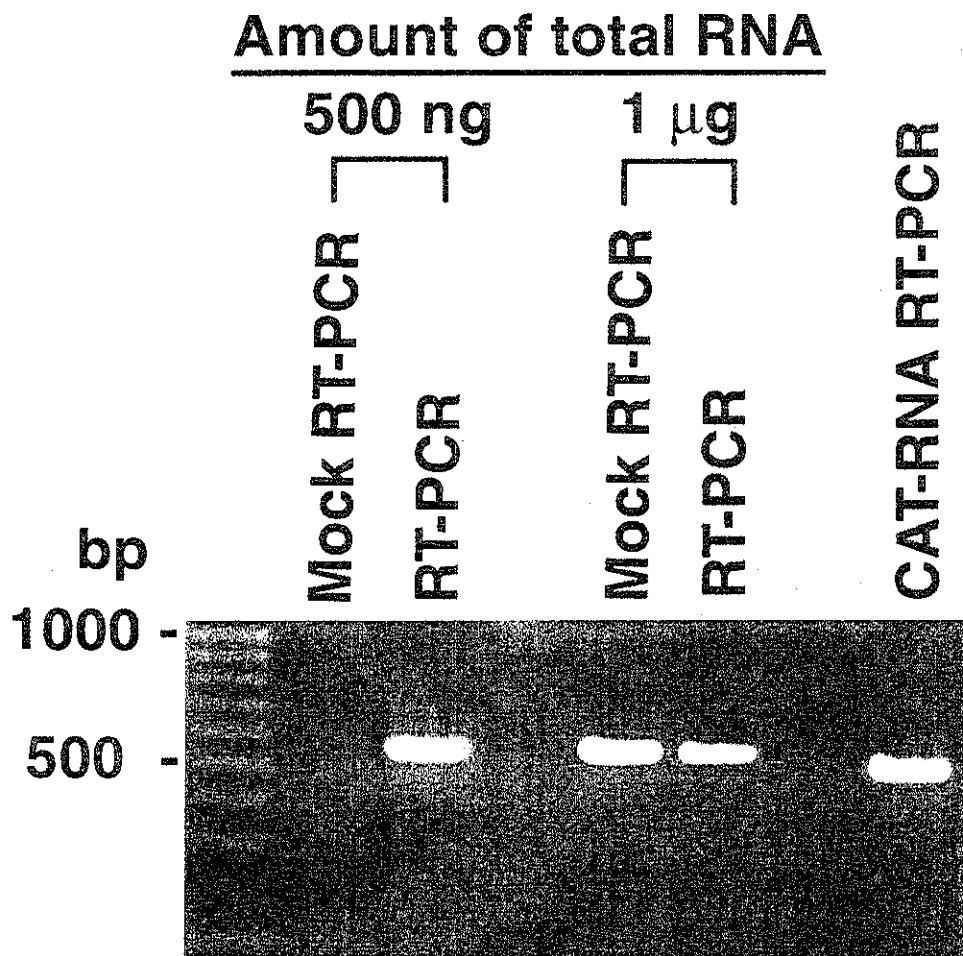
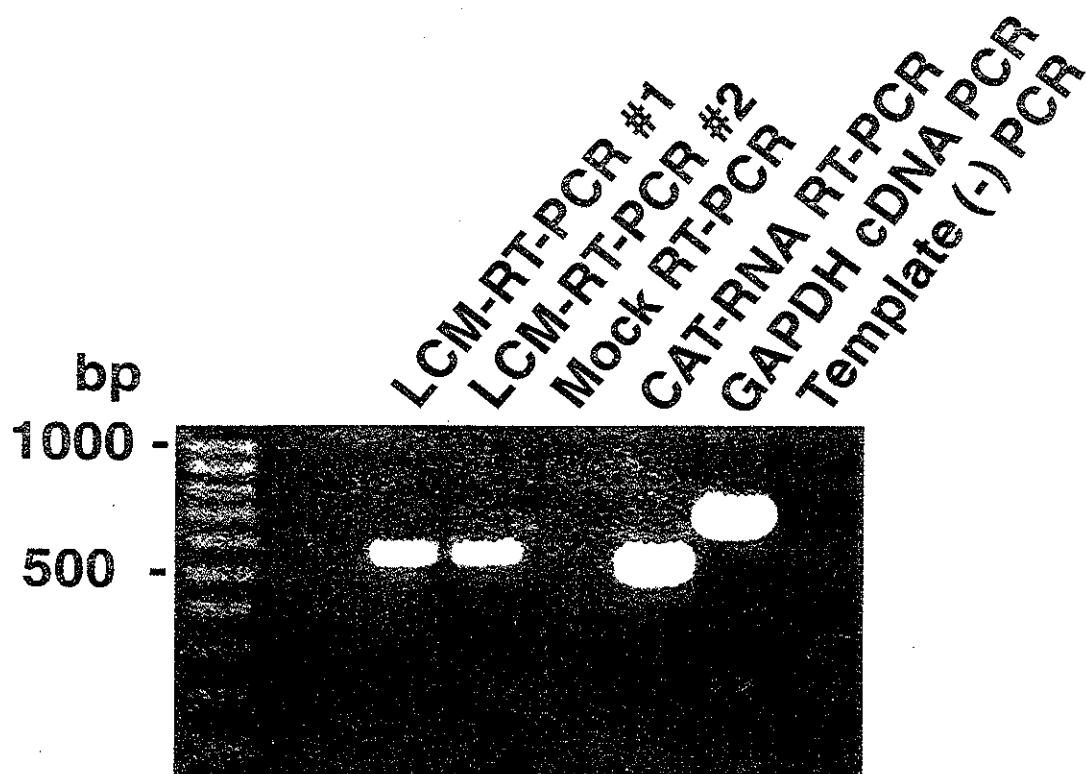


図 4 Laser Capture Microdissection により
採取した肝組織からの HGFR-RT-PCR

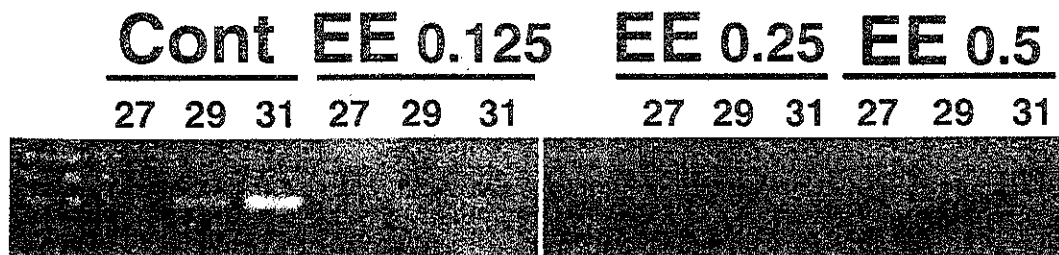


1: 46 ng total RNA

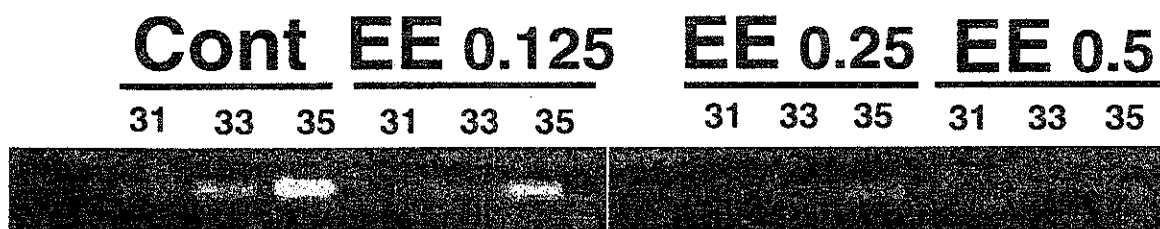
2: 15 ng total RNA

図 5 視床下部の性的二型核における RT-PCR 解析
 - 予備的検討 (1) -

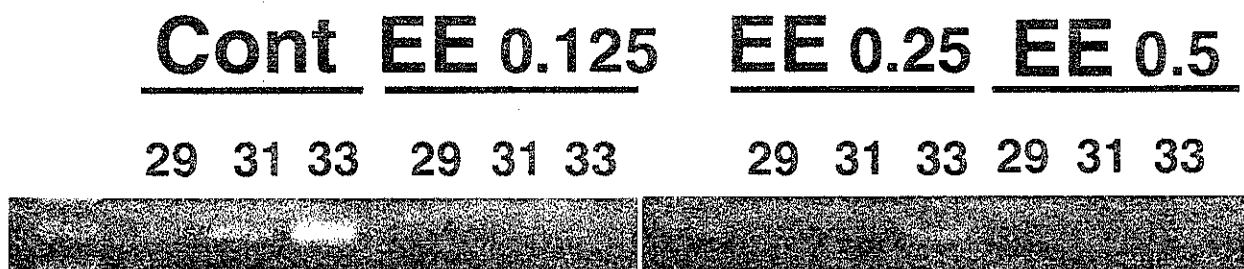
GABAT



Oxytocin



Progesterone receptor

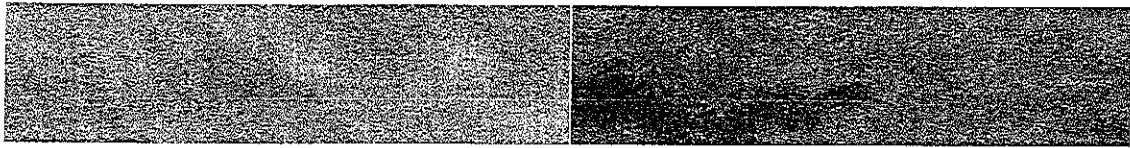


注：数字は PCR サイクル数を表す
 EE: Ethinylestradiol 投与群

図 6 視床下部の性的二型核における RT-PCR 解析
 - 予備的検討 (2) -

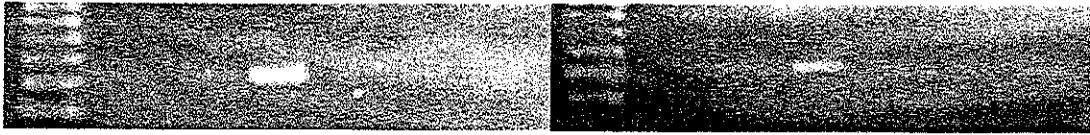
Neurotensin/Neurmedin N

Cont EE 0.125 EE 0.25 EE 0.5
 31 33 35 31 33 35 31 33 35 31 33 35



GFAP

Cont EE 0.125 EE 0.25 EE 0.5
 29 31 33 29 31 33 29 31 33 29 31 33



Bcl-x

Cont EE 0.125 EE 0.25 EE 0.5
 29 31 33 29 31 33 29 31 33 29 31 33



注：数字は PCR サイクル数を表す
 EE: Ethinylestradiol 投与群

表 1

RNA-yields and concentrations of contaminating DNA of the RNA preparation extracted from rat liver PETs

Fixative	No. of sample	RNA yield ($\mu\text{g}/\text{mg}$ wet tissue)	DNA contamination (ng/mg wet tissue)
Unfixed frozen	6	1.55 ± 0.38 †	5.85 ± 1.31
Methacarn	5	0.74 ± 0.11 *	0.78 ± 0.20 *
Acetone	5	0.82 ± 0.13 *	5.55 ± 2.29 †
Paraformaldehyde	5	0.16 ± 0.17 *,†	1.12 ± 0.55 *
Buffered formalin	5	0.30 ± 0.21 *,†	0.75 ± 0.51 *
Ufix	5	0.05 ± 0.10 *,†	0.32 ± 0.45 *
Bouin's solution	5	0.14 ± 0.14 *,†	1.88 ± 0.91 *

* Significantly different from unfixed frozen sample ($P < 0.0001$).

† Significantly different from Methacarn-fixed sample ($P < 0.005$).

表 2

Protein yields from rat liver PETs

Fixative	No. of sample	Yield of protein ($\mu\text{g}/\text{mg}$ wet tissue)
Unfixed frozen	4	179 ± 21
Methacarn	5	137 ± 26
Acetone	5	175 ± 41
Paraformaldehyde	5	19 ± 4 *,†
Buffered formalin	5	23 ± 5 *,†
Ufix	5	21 ± 5 *,†
Bouin's solution	5	111 ± 75

* Significantly different from unfixed frozen sample ($P < 0.0001$).

† Significantly different from Methacarn-fixed sample ($P < 0.0001$).

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

分担研究者 西原 真杉 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室

脳の性分化誘導因子であるグラニューリン (grn) 遺伝子に注目し、内分泌かく乱化学物質への暴露が新生ラット視床下部における遺伝子発現に与える影響を解析するための基礎研究を行った。合成エストロジェン的一种であるエチニルエストラジオール (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子あるいは新生子に移行させた。その結果雌雄新生ラット視床下部における grn 遺伝子の発現は、EE 処置により増加した。本研究の結果は grn の内分泌攪乱化学物質の標的分子としての可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

哺乳動物における性行動の発現パターンや性腺刺激ホルモンの分泌パターンには雌雄差が存在する。このような雌雄差は脳の機能的・形態的な雌雄差に起因している。ラットの場合、出生後数日の特定の時期 (臨界期) に精巣から分泌されるアンドロジェンが脳内で芳香化酵素によりエストロジェンへと代謝され、未分化な脳に作用して雄型に分化誘導することが知られている。本研究は、内分泌かく乱化学物質がこのような脳の性分化の過程にどのように作用し、生殖機能に影響を与えるかを解明しようとするものである。

B. 研究方法

我々は以前より、上皮系の細胞の成長を調節する因子として知られるグラニューリン (grn) が脳の性分化誘導因子であることを見出している。本年度は、エチニルエストラジオール (EE) などの合成エストロジェン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子あるいは新生子に移行させた際の、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することにした。処置群としては 1) 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子あるいは新生子に移行させたもの (EE 群)、2) 出生 2 日齢のラットにエストラジオールベンゾエート (EB) を 25 μ g 皮下投与したもの (EB 群)、3) 対照群 (control ; CO 群) の 3 群を設けた。

これら処置群の新生子の出生 6 日後および 10 日後に視床下部を採取し、新生ラット視床下部における grn 遺伝子発現に与える影響を検討するこ

ととした。Grn 遺伝子発現の検討には、定量的な逆転写-遺伝子増幅法 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction ; RT-PCR) 法を用いた (図 1)。

視床下部サンプル

↓
視床下部 total RNA の回収

↓
cDNA の合成

↓
PCR による DNA 増幅

- ・ 各 cDN 溶液に同量の competitor DNA を添加
- ・ グラニューリン遺伝子に対するプライマーにより増幅

↓
アガロース電気泳動

↓
エチジウムブロマイドによる染色

↓
バンド画像の取り込み

↓
デンストメトリックなバンド解析

図 1 : 定量 RT-PCR 法の概略

なおこれらの研究を行うに当たっては、東京大学農学部動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を得た上で実施している。

C. 研究結果

EE 処置により出生時の新生子の体重及び膈-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、grn 遺伝子に対するプライマーを用いた RT-PCR 法により遺伝子増幅を行っ

た。その後アガロース電気泳動を行ない、新生ラット視床下部における grn 遺伝子発現量を検討することとした。出生 6 日において、EE 群の雄ラット視床下部における grn 遺伝子発現は有意に増加した (図 2)。出生 10 日においては、EE 群の雌ラットで grn 遺伝子発現の上昇が観察された (図 3)。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 grn 遺伝子発現は増加した。

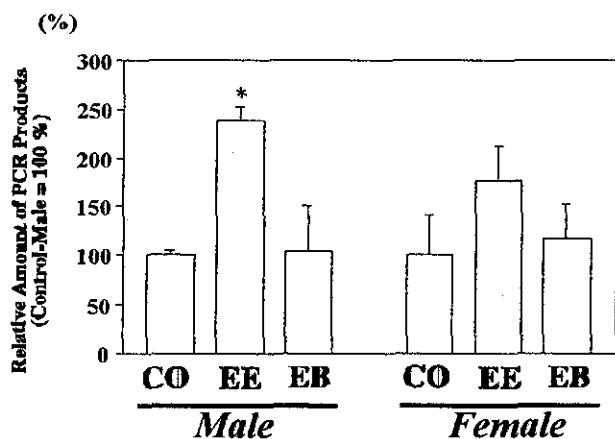


図 2: 出生 6 日齢の雌雄ラット視床下部における grn 遺伝子発現。*: $P < 0.05$ vs. CO

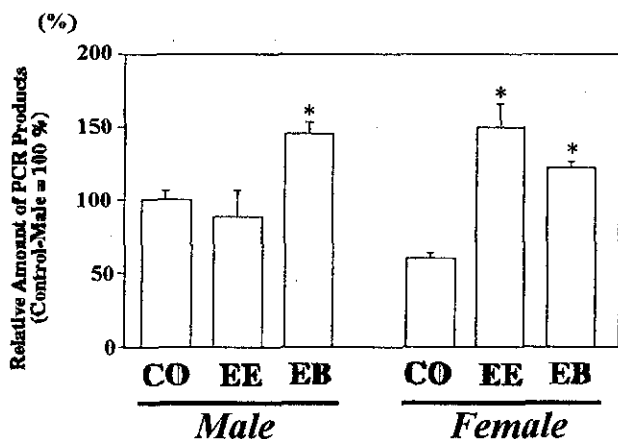


図 3: 出生 10 日齢の雌雄ラット視床下部における grn 遺伝子発現。*: $P < 0.05$ vs. CO

D. 考察

内分泌攪乱化学物質の生体への影響を評価することは緊急の課題であるが、各国ともそのための適切なパラメーターを模索しているのが現状である。我々は以前より、上皮系の細胞の成長を調節する因子として知られるグラニューリン (grn) が脳の性分化誘導因子であることを見出している。EE を母体に摂取させることによりエストロジェンが胎盤ある

いは乳汁を介してが胎子あるいは新生子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ジェンにより視床下部における grn 遺伝子の発現が誘導されることが初めて示された。

E. 結論

本研究の結果は grn の内分泌攪乱化学物質の標的分子としての可能性を示唆するものであり、今後の新生ラット中枢における内分泌かく乱化学物質の影響の検討に有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Granulin is a sex-steroid inducible gene in the hypothalamus and involved in sexual differentiation of the rat brain. Journal of Reproduction and Development, 投稿中, 2000 (鈴木らと共著)

2) Suppression of copulatory behavior by intracerebroventricular infusion of antisense oligodeoxynucleotide of granulin in neonatal male rats. Physiology & Behavior, 印刷中, 2000 (鈴木らと共著)

3) Induction of granulin precursor gene expression in neonatal hypothalamus by estrogen treatment. (鈴木らと共著) 投稿準備中

2. 学会発表

1) 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 (鈴木らと共著) 第 92 回 日本繁殖生物学会、1999 年 9 月、仙台

2) 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 (鈴木らと共著) 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

分担研究報告書

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 —培養中枢ニューロンに対する評価—

分担研究者 畠中 寛 大阪大学蛋白質研究所教授

研究要旨 ラット胎仔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ジェンのニューロンに対する生存維持作用、神経栄養因子BDNFの誘導作用を明らかにした。この結果、種々の内分泌かく乱候補化学物質の中枢神経系への*in vitro*作用を調べるスクリーニング系として初代中枢ニューロン培養系をほぼ確立した。

A. 研究目的

エストロジェン受容体の発現している脳のいくつかの領域を培養し、種々候補物質を加え、ニューロンの生存維持、機能分化あるいは可塑性への効果を調べる。ニューロンの培養は、胚および生後ラットで行うとともに、エストロジェン受容体を組み込んだモデル系の開発を試みる。このことにより、ニューロンへの直接の作用を見ることから、候補物質の神経機能への影響を短時間で測れる可能性がある。

B. 研究方法

ラット胎仔脳を摘出し、特に視床下部および海馬を切り出し、パイン法による分散培養を行った。培養後、抗エストロジェンレセプター抗体などでの染色、BDNF mRNAのRT-PCRでの定量、またニューロンの生存率をMTT法で測定した。

(倫理面への配慮)

初代培養に用いる実験動物、ラットの飼育等については実験動物利用規程に従って行っているため、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

ラット胎仔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、抗エストロジェンレセプター抗体および抗プロジェステロンレセプター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、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レセプターの発現が多い領域であるが、この領域以外でも、例えば海馬ニューロンの同様の培養でもエストロジェンレセプターは発現していた。この発現は、しかしながら低く、エストロジェンレセプターmRNA発現レベルを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、種々の領域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エストラジオールを添加し、1週間培養を行った。海馬ニューロンでは10 nMをピークに、また視床下部ニューロンでは1000 nM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の減少が、エストラジオールの添加によって、くい止められることが分かった。またこの時、エストロジェンレセプターmRNAレベルの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エストラジオール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、エストロゲンとBDNFの間には、何らかの相互作用の存在が考えられる。

今後、エストロゲンレセプターおよび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とエストロゲンレセプター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エストロジオール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

以上の結果は、エストロゲンによる培養中枢ニューロンの生存維持には、神経栄養因子が関わっていることを強く示唆している。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、エストロジェ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。本年度の研究結果から、種々の内分泌かく乱候補化学物質のin vitro中枢神経系への作用を調べるスクリーニング系がほぼ確立できたと考えている。

E. 結論

ラット胎仔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ジェンの生存維持作用、神経栄養因子の誘導作用を明らかにし、種々の内分泌かく乱候補化学物質の中中枢神経系へのin vitro作用を調べるスクリーニング系としてほぼ確立できた。

F. 研究発表

1. T. Araki, M. Yamada, H. Ohnishi, S. Sano, T. Uetsuki and H. Hatanaka, (2000) Role of phosphatase activity of Shp-2 in BDNF signaling in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, 74, 659-668.

2. N. Inamura, T. Araki, Y. Enokido, C. Nishio, S. Aizawa, and H. Hatanaka, (2000) The role of p53 in DNA strand break-induced apoptosis in organotypic slice cultures from the mouse cerebellum. *J. Neurosci. Res.*, in press.
3. K. Shimoke, S. Yamagishi, M. Yamada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1999) 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.
4. Y. Ishikawa, T. Satoh, Y. Enokido, C. Nishio, T. Ikeuchi and H. Hatanaka (1999) 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.
5. M. Yamada, H. Ohnishi, S. Sano, A. Nakatani, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1999) BDNF stimulates interaction of Shp2 with PI3-K and Grb2 in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, 73, 41-49.
6. Y. Hashimoto, Y. Abiru, C. Nishio and H. Hatanaka, (1999) Synergistic effects of BDNF and CNTF on cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal two-week-old rats. *Dev. Brain Res.*, 115, 25-32.
7. T. Yamagata, T. Satoh, Y. Ishikawa, A. Nakatani, M. Yamada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1999) 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.