

表1. 出生直後にDESおよびBPAを投与されたマウスの卵巢非依存性閉経は胎盤の増厚及び胎盤の老化を伴う。

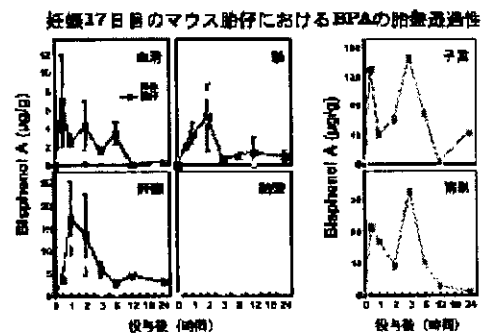
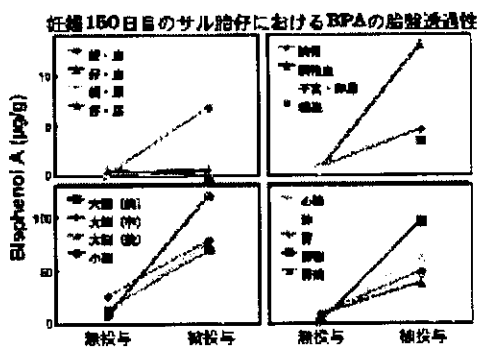
Treatments	40 days of age			90 days of age		
	No. of mice	No. of mice showing vaginal stratification (%)	No. of mice showing vaginal cornification	No. of mice	No. of mice showing vaginal stratification (%)	No. of mice showing vaginal cornification
Control	7	0	0	8	0	0
DES 0.3 µg	7	6 (85.7)	2 (28.6)	10	10 (100)	4 (40)
DES 3 µg	7	7 (100)	2 (28.6)	10	9 (90)	3 (30)
BPA 15 µg	7	0	0	9	0	0
BPA 150 µg	7	4 (57.1)	0	10	4 (40)	0

DES, diethylstilbestrol; BPA, bisphenol-A. Control mice were injected with the sesame oil only.

表2. 出生直後にDESおよびBPAを投与されたマウスの性周期の変化

Treatments	No. of mice	No. of mice showing			No. of mice with CL (%)	Estrus cycles in 30 days	Duration of an estrus cycle	Total estrus days
		normal cycle	persistent estrus (%)	persistent diestrus (%)				
Control	10	10 (100)	0	0	10 (100)	4.2 ± 0.3	6.8 ± 0.6	9.5 ± 0.8
DES 0.3 µg	10	0	10 (100)	0	0	0	0	27.7 ± 0.9*
DES 3 µg	10	0	10 (100)	0	0	0	0	28.0 ± 1.2*
BPA 15 µg	10	7 (70)	0	3 (30)	7 (70)	4.1 ± 0.4	6.9 ± 0.8	6.8 ± 1.7
BPA 150 µg	10	6 (60)	1 (10)	3 (30)	6 (60)	5.0 ± 0.4	6.2 ± 0.6	7.6 ± 2.3

DES, diethylstilbestrol; BPA, bisphenol-A. Control mice were injected with sesame oil only. \*P<0.05, vs. Control



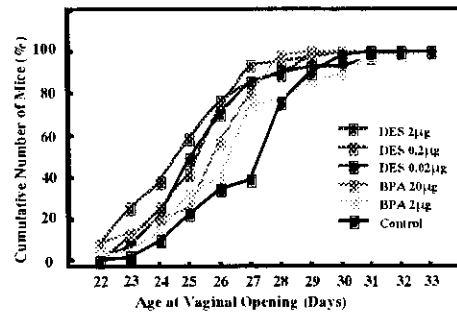
### Vaginal opening

Treatments (µg/kg)	Number of mice	Vaginal opening	
		Age at vaginal opening (day)	Body weight at vaginal opening (g)
Control	49	27.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	25.6 ± 0.3
DES 0.02	41	26.0 ± 0.3 <sup>**</sup>	20.6 ± 0.3 <sup>**</sup>
DES 0.2	41	25.7 ± 0.5 <sup>**</sup>	20.5 ± 0.2 <sup>**</sup>
DES 2	48	25.2 ± 0.3 <sup>**</sup>	20.4 ± 0.3 <sup>**</sup>
BPA 2	48	26.9 ± 0.3	21.5 ± 0.4 <sup>**</sup>
BPA 20	51	26.0 ± 0.3 <sup>**</sup>	21.4 ± 0.2 <sup>**</sup>

<sup>a</sup> Mean ± SE.

<sup>\*\*</sup> or <sup>\*\*</sup> Significantly different from the control at p<0.05 or 0.01.

### Vaginal Opening



### Body weight of female offspring

Treatments (µg/kg)	Number of Mice	Body weight (g)			
		Day 0 <sup>b</sup>	Day 11	Day 22	Day 40
Control	49	1.65 ± 0.04 <sup>a</sup>	8.3 ± 0.3	17.4 ± 0.2	33.7 ± 0.3
DES 0.02	41	1.82 ± 0.11	7.3 ± 0.2	15.5 ± 0.3 <sup>**</sup>	32.9 ± 0.3 <sup>*</sup>
DES 0.2	43	1.77 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.3 <sup>*</sup>	15.3 ± 0.2 <sup>**</sup>	32.7 ± 0.3 <sup>*</sup>
DES 2	48	1.77 ± 0.03 <sup>a</sup>	7.8 ± 0.2	16.2 ± 0.3 <sup>*</sup>	33.1 ± 0.4
BPA 2	48	1.75 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.3 <sup>*</sup>	15.6 ± 0.3 <sup>**</sup>	33.2 ± 0.4
BPA 20	48	1.71 ± 0.02	7.8 ± 0.2	16.1 ± 0.3 <sup>**</sup>	32.1 ± 0.3 <sup>**</sup>

<sup>a</sup> Mean ± SE.

<sup>b</sup> Body weight on day 0 was calculated on 61 control females, 54 DES 0.02, 65 DES 0.2, 55 DES 2, 61 BPA 2 and 68 BPA 20 µg/kg treated females.

<sup>\*</sup> or <sup>\*\*</sup> Significantly different from the control at p<0.05 or 0.01.

### Vaginal smear from vaginal opening for 30days

Treatments (µg/kg)	Number of mice	Age of first estrous phase (days)	Length of estrous cycle (days)	Estrous phase (days)	Diestrus phase
Control	49	27.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.2	16.2 ± 0.6	16.6 ± 0.2
DES 0.02	41	26.5 ± 0.4 <sup>**</sup>	6.2 ± 0.5 <sup>**</sup>	19.7 ± 0.6 <sup>**</sup>	8.2 ± 0.6 <sup>**</sup>
DES 0.2	43	26.4 ± 0.4 <sup>**</sup>	7.4 ± 0.5 <sup>**</sup>	20.3 ± 0.5 <sup>**</sup>	7.2 ± 0.5 <sup>**</sup>
DES 2	48	25.6 ± 0.3 <sup>**</sup>	7.0 ± 0.6 <sup>**</sup>	20.5 ± 0.7 <sup>**</sup>	7.3 ± 0.7 <sup>**</sup>
BPA 2	48	27.3 ± 0.3	5.8 ± 0.3 <sup>**</sup>	19.2 ± 0.5 <sup>**</sup>	8.5 ± 0.4 <sup>**</sup>
BPA 20	51	26.7 ± 0.3 <sup>*</sup>	5.4 ± 0.3 <sup>**</sup>	17.7 ± 0.2	9.9 ± 0.6

<sup>a</sup> Mean ± SE.

<sup>\*</sup> or <sup>\*\*</sup> Significantly different from the control at p<0.05 or 0.01.

### 3. 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 広川勝いく 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

分子免疫病理 教授

#### 研究要旨

内分泌系のホルモンの中で、どれが免疫系に影響を及ぼすかを調べる目的で、まず、免疫系の発現するホルモン受容体を検索した。その中で、エストロゲン受容体 $\alpha$ が免疫系の細胞に広く発現する事が解った。次に、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。大量急性投与実験及び飼料に混ぜて長期間微量投与する実験を行った。その結果、胸腺萎縮、脾臓T細胞の数などに明らかな影響が見られ、その影響の程度は性、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易いようになっている。従って、環境にある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ゲ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。ここでは、免疫系にまどを絞り、DESの影響を検索し、その影響が性と年齢によりどの様に異なるかを検討した。

#### B. 研究方法

1. 動物：C57BL/6 マウス (♂/♀)  
3ヶ月齢、18ヶ月齢の4群を用いた。
2. 内分泌かく乱剤：  
Diethylstilbesterol (DES)。
3. 投与方法：
  - a) 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 x 5日間行った。
  - b) 慢性投与実験；微濃度(0.44 $\mu$ g/ Kg)と少濃度(4 $\mu$ g/ Kg)のDES添加粉末飼料を3ヶ月間

給餌した。

最終投与後2日目に屠殺し、各臓器を採取し検索した。

#### 4. 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/ メリー, 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

#### 5. mRNA の発現

胸腺・脾臓等の組織から one-step 法にて、total RNA を調整し、各種ホルモン受容体のプライマーを用いて、RT-PCR 法によりホルモン受容体の発現の有無を検索した。

#### 6. 検索したホルモン受容体

Androgen, Thyroid hormone, CRF, Prolactin, Glucocorticoid, GRH, Acetylcholine, Progesterone, VIP, Substance P, TSH, ACTH, Estrogen, Growth hormone, Oxytocin。

### C. 研究結果

#### 1) 免疫組織におけるホルモン受容体の発現 (表-1、図-1(a)、(b))

胸腺について、14種類のホルモン或いは神経伝達物質の発現を RT-PCR 法で調べたところ、Glucocorticoid, Growth hormone, Progesterone, Androgen, Estrogen, Substance P,

Acetylcholine などに対する受容体の発現が認められた。これらの物質の中で、環境中に存在する可能性が高いのは Estrogen Receptor (ER)であるので、その発現を更に詳しく検索した。ER には $\alpha$ と $\beta$ があるが、ER  $\alpha$ のみが、胸腺、脾臓、胸腺リンパ球、脾臓のT細胞・B細胞、樹状細胞、食細胞などに発現されていることがわかった (図-1)。これらの結果から、本実験で用いた、Diethylstilbesterol (DES)が免疫系の各種の細胞に広く作用し得ることが示唆された。

#### 2) DES 腹腔内投与による急性影響：性別と月齢別比較

若齢マウスのオスとメスを用いて、低用量 (3mg/kg) と高用量 (15 mg/kg) の DES を5日間連続腹腔内投与し、その影響を見た。その結果低容量でも十分な影響が見られることが分かった。そこで低容量 (3 mg/kg) を若齢と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(表-2)

体重は DES 投与後軽度増加する傾向が若齢のメスオス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メスオスともに認められたが、老齢ではメスでは増加するが、オスでは減少した。若齢オスの精巣の重さには大きな変化はなかったが、メスの卵巣の増加は有意な増加を示した。しかし、老齢になるとオスの精巣は萎縮し、メス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メスオスともに増加したが、老齢になるとメスでは増加するが、オスでは減少した。若齢メス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 (表-2、図-2)

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ーで見ると、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、それは若齢のメスオスと老齢のオスに明瞭であったが、老齢のメスでは認められなかった。

#### c) 脾臓における細胞亜集団 (表-2、図-2)

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。この傾向は老齢オスでは見られたが、メス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 (表-2)

脾 T 細胞の *in vitro* における PHA,

Con A による増殖能は性、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オスでは増加したが、若齢メスと老齢のメスオスでは抑制された。

#### 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、老齢オスマウスでは 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 活性は若齢ではメスオス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。

#### 3) DES 添加飼料摂取による慢性影響：性別と月齢別比較

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約  $0.1\mu\text{g}$  ( $0.098\sim 0.149$ ) / マウス、高用量添加飼料では約  $1.0\mu\text{g}$  ( $0.988\sim 1.536$ ) / 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  $10\text{ng}$  前後である。

#### a) 体重と免疫系以外の臓器重量(表-3)

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。腎は若齢のオスと老齢のメスで用量に関わらず増

加傾向、若齢のメスと老齢にオスでは変化がなかった。肝重量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見られた。老齢ではメスにおいて肝重量の増加傾向が見られ、これは急性変化と同じ傾向であった。

b) 脾臓と胸腺 (表-3、図-3)

胸腺は若齢オスと老齢メスで明らかな減少が見られ、他では不変であった。しかし、 $CD4^+CD8^+$ 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 (表-3、図-3)

胸腺の萎縮傾向とは異なり、脾臓T細胞数の増加傾向が若齢のメスオスと老齢のオスに見られた。老齢のメス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、老齢メスでは減少、オス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、老齢メス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、老齢メスでは逆に増加傾向を示した。

d) 脾臓T細胞の増殖能 (表-3)

抗CD3抗体によるT細胞の増殖能は若齢オス、メス及び老齢メスで不変、老齢オスでは減少傾向を示した。

e) 脾臓における免疫機能 (表-3、図-3)

羊赤血球(SRBC)に対する抗体産生能

は若齢のメスオスと老齢オス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。腹腔内に大量のDES (3mg/Kg) を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た。その影響はオスよりメスの方がやや顕著であった、性別、年齢で大きな差は認められなかった。

腹腔内投与量より $10^4\sim 10^3$ 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は、最終的な投与合計量は低容量添加飼料給餌群では約 $0.1\mu\text{g}$  (0.098~0.149) / マウス、高用量添加飼料給餌群では約 $1.0\mu\text{g}$  (0.988~1.536) / マウスとなった。これは3ヶ月間の投与総量であるから、1日あたりにすると約 $1\text{ng}$  / マウス及び約 $10\text{ng}$  / マウスという量である。人の妊娠末期血清中のEstrogen値 ( $E1+E2+E3$ ) は最大でも $50\text{ng/ml}$  であるので、DES添加飼料給餌実験では、極めて低濃度のDESが長期間投与された場合の影響を見ている事になる。その様にごく少量のDESを長期間与える慢性投与実験でも、諸臓器や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、その影響はオスメスの性差と若老の月齢差があることが解った。

体重は老齢マウスにおいて、オスメスに拘わらず増加傾向を示した。性腺について見ると、メスマウスでは若老に拘わらず、卵巣の肥大が起こるが、オスでは萎縮傾向を示した。胸腺は若齢オスと老

齢メスで萎縮傾向が見られたが、若齢メスと老齢オスでは変化がなかった。但し、胸腺細胞の中のダブルポジティブ細胞 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) について見ると、いずれの場合も減少傾向を示した。興味あることは、脾臓の T 細胞数の増加と B 細胞数の減少が老齢メスマウスを除いて、見られた事である。T 細胞の増殖能は老齢のオスでは減少傾向が見られたが、他では変わりがなかった。抗体産生能には減少は見られず、老齢メスを除いて、増加傾向を示した。

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

免疫系の各種の細胞に Estrogen 受容体(ER $\alpha$ )が発現されていることが解った。DES を大量投与した急性実験、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. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tamura T, Kunimatsu T, Yee, S-T, Igarashi O, Utsuyama M, Tanaka S, Miyazaki S, Hirokawa K and Nariuchi H. Molecular mechanism of the

impairment in activation signal transduction in CD4<sup>+</sup> T cells from old mice. *Int. Immunol.* 12:1205-1215, 2000

2. 広川勝いく. 老化とストレスと免疫機能 日本病理学会会誌 89: 21-40、 2000
3. Utsuyama M and Hirokawa K. Differential effect of diethylstilbestrol on the immune system of young and old mice. In preparation.

表-1 : 胸腺と脾臓Tリンパ球における各種ホルモン受容体の発現

ホルモン受容体	3m thymus	12m thymus	3m resting T	18m resting T	3m stim. T	3m stim.B
Androgen R	+	+	+	-	+	-
Thyroid Hormone R $\beta$	-	+	+	-	+	+
Prolactin R long form	+	+	+	+	+	+
Glucocorticoid R	+	+	+	+	+	+
TRH-R Type I	+	+	+	+	+	+
GnRH	-	-	-	-	-	-
Acetylcholin R $\alpha$	+	+	+	+	+	+
Progesterone R	+	-	-	+	+	+
Substance P R	+	-	-	-	-	+
VIP R	+	-	-	-	+	-
TSH R	+	+	+	+	+	+
Oxytocin R	n d	-	+	+	-	+
ACTH R	+	+	+	+	+	+
ER $\alpha$	+	+	+	+	+	+
ER $\beta$	-	-	-	-	-	-
GAPDH	+	+	+	+	+	+



表一 2 : 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	↑	↑	ND	ND
DP	↓	↓	ND	ND
CD4SP	↑	↑	ND	ND
CD8SP	↑	↑	ND	ND
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) ND (未検査)

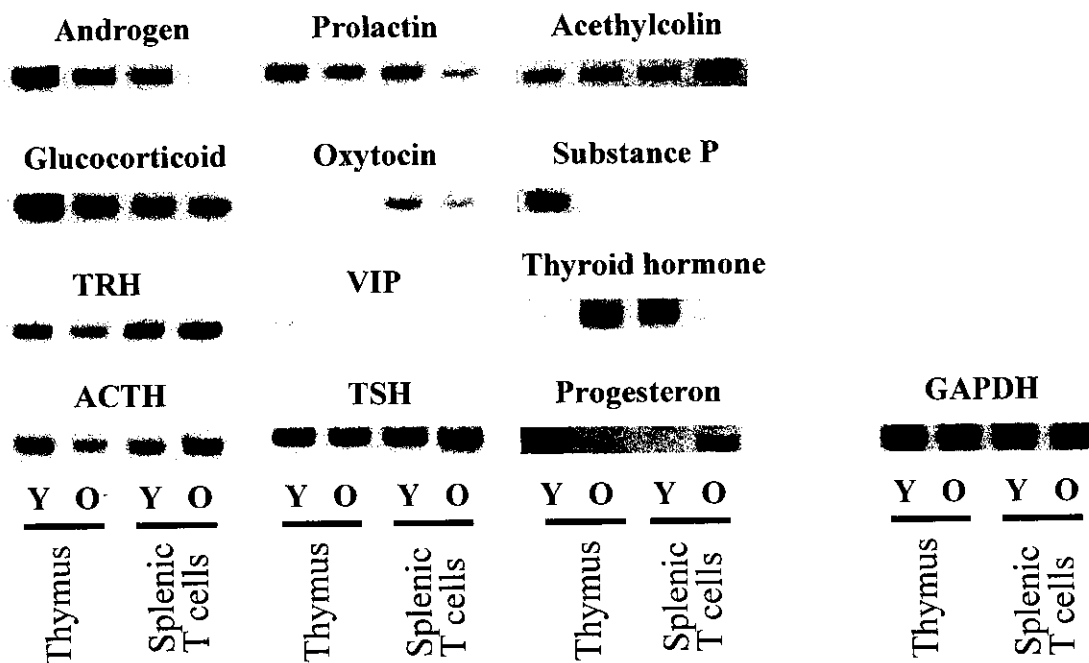
表-3 微量 DES 添加飼料給餌による慢性実験

	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	⇨	⇨	⇨	⇨	↘	↘	⇨	⇨

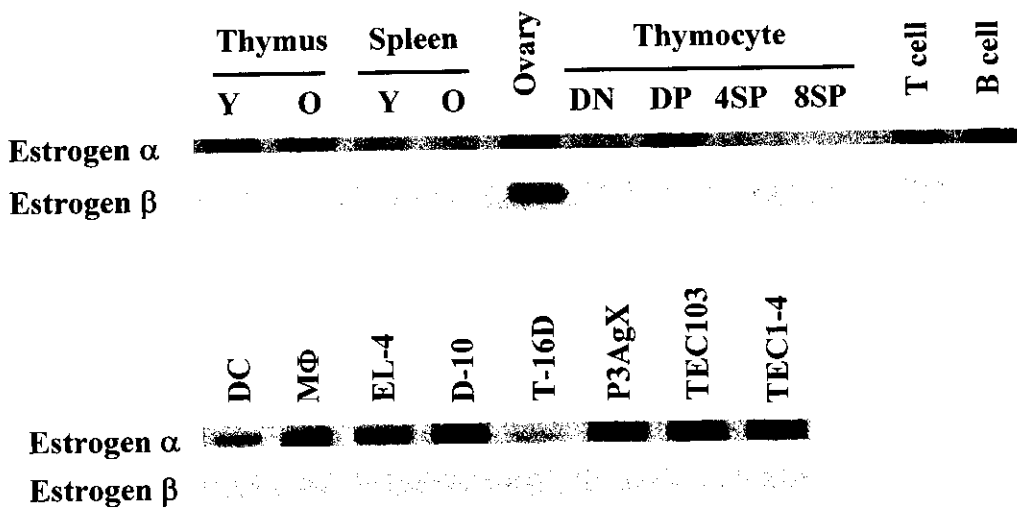
マウスは若齢、3ヶ月齢。老齢は18ヶ月齢を使用した。

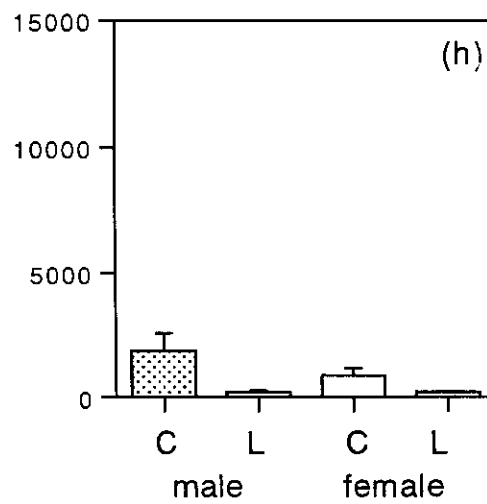
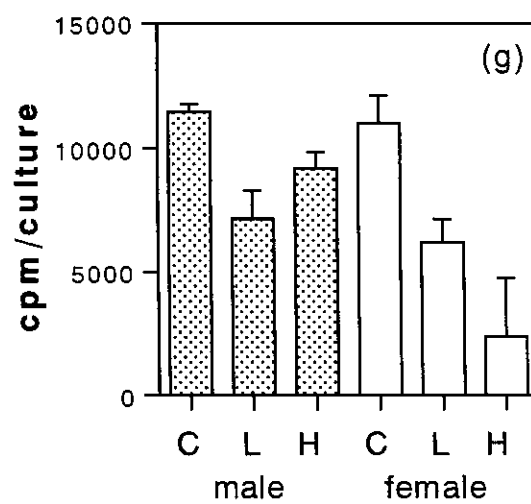
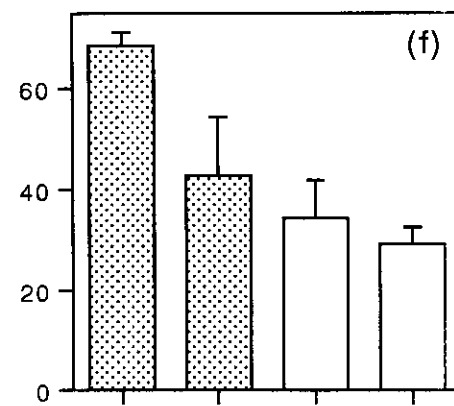
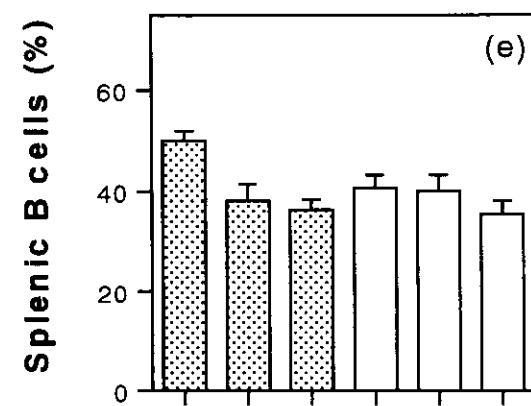
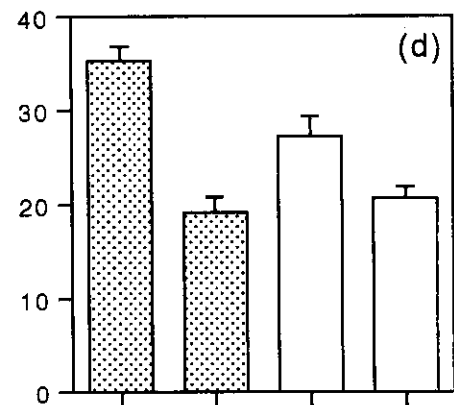
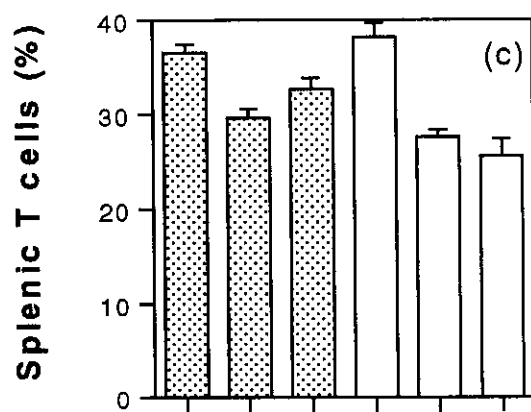
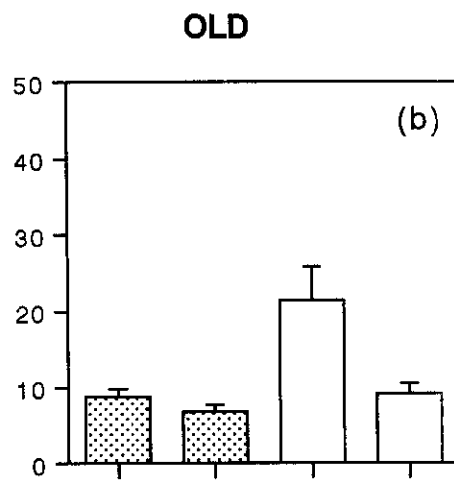
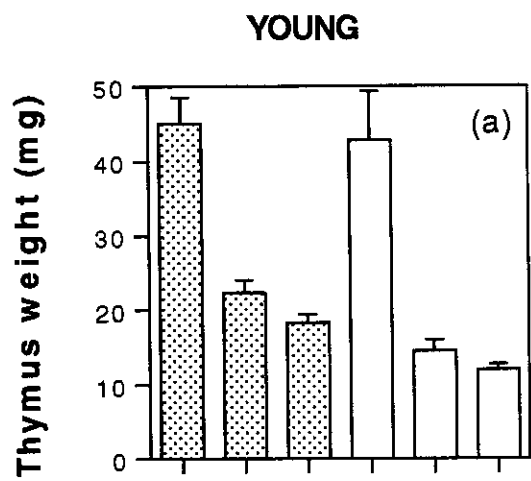
↗(微増) ↘(微減) ⇨(不変) ↑(増) ↓(減)

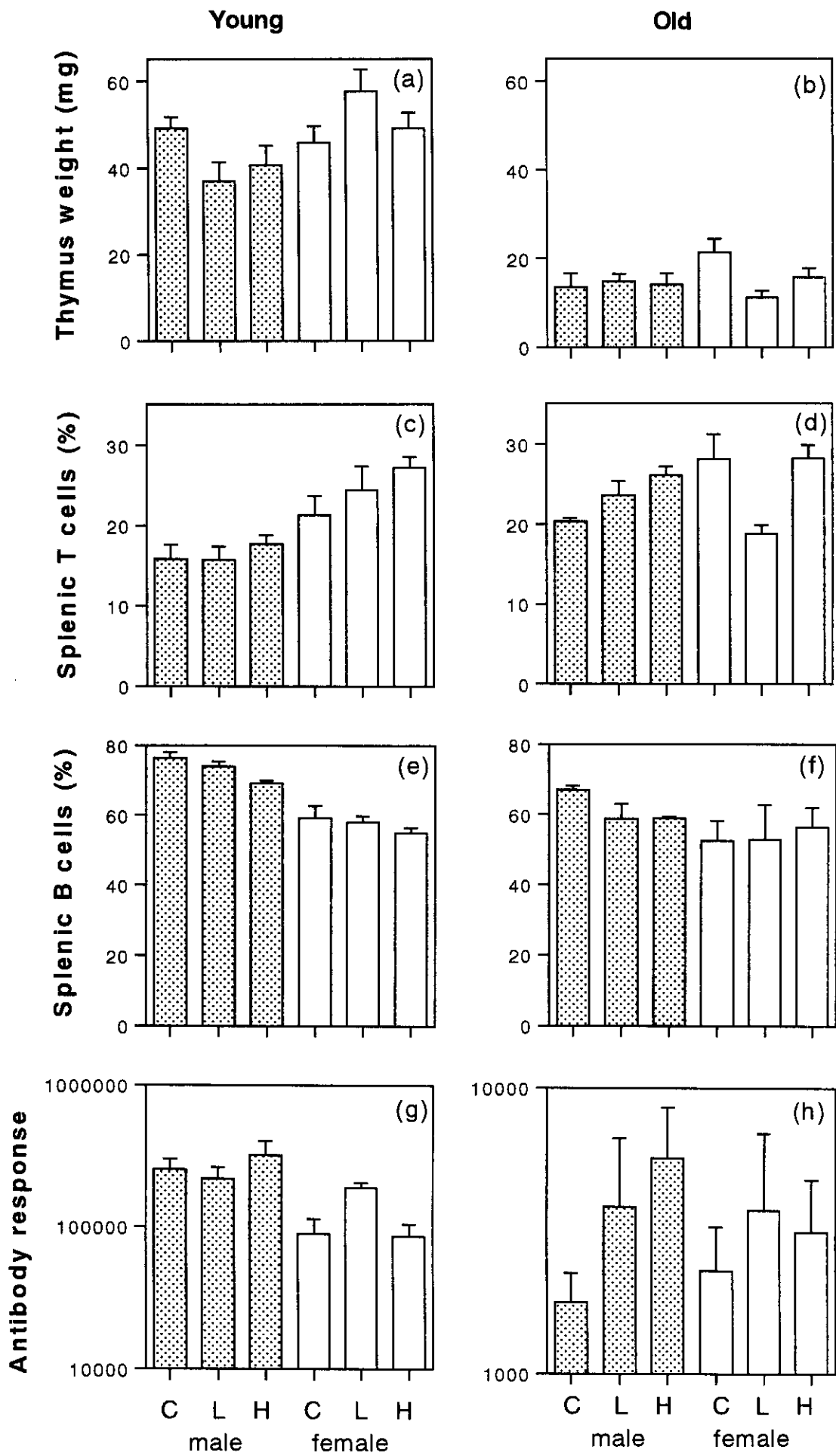
(a) 胸腺および脾臓T細胞における各種ホルモンレセプターの発現



(b) Estrogen Receptor の組織、細胞、培養細胞株における発現







#### 4. 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

マウスエストロゲンレセプター (mER) のスプライシングバリエント検出のための RT-PCR 法を検討し、mER  $\beta$  について、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、del5 を半定量する方法を確立した。この方法によって、低用量の DES を暴露した雌胎児全脳について調べた結果、mER del5、 $\beta 2$  の発現が、無処理群に比べわずかに上昇するという結果を得た。

##### A. 研究目的

胎児期や新生児期における性ホルモンやホルモン様物質の暴露の結果、ラットの性的二型核の形成異常や成熟後の性行動異常などが起こることが知られており、このような機序による内分泌かく乱化学物質の脳神経系への影響が懸念されている。脳では、胎生初期からエストロゲンレセプターが発現しており、このことから内分泌かく乱化学物質が特異的なレセプターを介して、本来の生体内のホルモンによる正常な発生・分化に影響をおよぼすことが考えられている。そのメカニズムとして、エストロゲン様内分泌かく乱化学物質がエストロゲンレセプターそのものの発現やリン酸化に影響したりする可能性などと並んで、エストロゲンレセプタースプライシングバリエントの発現に影響し、ドミナントネガティブもしくはポジティブに働くことでレセプ

ターシグナルを質的にかく乱することが考えられる。本研究では、マウスエストロゲンレセプター (mER) のスプライシングバリエントの発現変化に着目し、神経系の発生・分化期における内分泌かく乱化学物質の影響と、エストロゲン様作用物質の作用メカニズムの解析を行った。

##### B. 研究方法

1. RT-PCR 法を用いたエストロゲンレセプター検出系の確立

##### 1) 全スプライシングバリエント検出法

mER のスプライシングバリエントの構成を検討するため、エクソン全長の PCR 法として、mER  $\alpha$  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転写し、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

プロテイングを行った。cDNA には、マウス 8 週齢卵巣より抽出した RNA を逆転写し用いた。

## 2) 特定スプライシングバリエント検出法

脳で高い発現を示す  $\beta$  型について、そのリガンド結合部位であるエクソン 5 に着目し、エクソン 4 とエクソン 6 のプライマーを用いて PCR を行った (図 1)。この部位には、エクソン 5 を欠いた del 5 以外にエクソン 5 と 6 の間に 54bp 挿入された mER  $\beta$  のロングフォーム ( $\beta 2$ ) が存在する。また、予備検討の結果、これらスプライシングバリエントの発現が微量なことがわかったので、検出感度を上昇させるために、PCR 産物のサザンブロッティングをエクソン 4 をプローブに用いて行った。各々のバンドの濃さは、Image Gauge (FUJIFILM) を用いて数値化した。

## 2. 暴露

DES (0.02、0.2、2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) をコーンオイルに溶解し、C57BL/6 マウス妊娠 11 日齢から 8 日間連日皮下投与し、胎生 18 日に胎児全脳を摘出した。total RNA を抽出し、同腹の胎児を雄雌別にプールし、逆転写反応により得られた cDNA を PCR 反応に用いた。

## 研究結果

### 1. RT-PCR 法を用いた mER スプライシ

### ングバリエントの発現の検討

#### 1) 全スプライシングバリエント検出法

マウス 8 週齢の卵巣の cDNA を鋳型として PCR 条件の検討を行った。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、PCR 時のアニーリング温度を検討した結果、各アニーリング温度でバンドのパターンがランダムになった。これらのバンドの DNA シークエンスを検討した結果、すべて mER スプライシングバリエントではなく、プライマー配列を含む PCR 副産物であった。以上の結果より、全スプライシングバリエント検出法の構築は困難であると判断し、特定スプライシングバリエント検出法の構築に移行した。

#### 2) mER $\beta 2$ , del 5 スプライシングバリエントの半定量

エクソン 4 とエクソン 6 に PCR プライマーを設定し、 $\beta 2$ 、エクソン 5 を欠く del 5 を検出する系を検討した。このプライマーによりスプライシングバリエントの検出を試みたところ、検出可能な PCR サイクルは 40 以上であった。定量的な PCR 増幅域は 30 サイクル以下であると考えられたので、サザンブロッティングを併用し検出感度の上昇を試みたところ、約 100 倍検出感度を上昇させることに成功した (図 2)。各バンドの特異性も DNA シークエン

スを検討することにより確認した。

さらに PCR サイクルなど、半定量法としての条件検討を行い、サイクル数 28 で半定量可能との結果を得(図 3)、以下の実験に用いた。

## 2. 胎生期低用量内分泌かく乱化学物質暴露の雌胎児全脳における mER $\beta$ 2, del5 スプライシングバリエント発現量の検討

上記に示した方法により、マウス胎生 11 日から 8 日間連日 DES 低用量 (0.02、0.2、2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) 投与した胎生 18 日のマウス雌全脳における mER スプライシングバリエントの発現を検討した結果、無処理群に比べ del5 の発現がわずかに増加しているものが認められた。また、 $\beta$ 2については、ばらつきがあるが、DES 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  で発現の上昇が認められた(図 4)。

### D. 考察

本研究で第一に試みたのは、スプライシングバリエント発現の全体像を把握できる long PCR Southern 法の開発であった。しかし、スプライシングバリエントの発現が極めて微量なため、この方法では特異的な PCR 増幅が困難であると判断し、本系の構築は保留とした。そこで、第二の方法として、個々のスプライシングバリエントを検出する方法に切り

替え、スプライシングバリエントの機能面から脳において高い発現を示す mER  $\beta$  型のリガンドバインディングドメインであるエクソン 5 に着目し、検出系の構築を進めた。最初に、mER  $\beta$  del5 特異的なプライマーの設計を試みたが、ワイルドタイプのみもつ mER  $\beta$  cDNA を鋳型として用いても非特異的な増幅が認められた。この原因は、ワイルドとスプライシングバリエントの DNA 配列の高い相同性によるものと考えている。このため、スプライシングバリエント特異的プライマーによる PCR 法をあきらめ、ワイルド、スプライシングバリエントを同時に増幅させる PCR プライマーの構築を行った。Tm 値を最適化したプライマーセットを用い、PCR Buffer の pH、アニーリング温度など様々な条件検討を行った結果、最適化した条件のもとでも、バリエント検出のためには 40 サイクル以上の増幅反応が必要で発現量は極めて微量であることがわかった。そこで、PCR による非定量的な増幅を避けるため、検出感度の上昇を行った。まず、逆転写反応の改良を図り、逆転写酵素の検討、鋳型とする total RNA 量の検討を行い、最適化した。また、PCR 産物のサザンブロッティングを行うことで、PCR 単独に比べ、飛躍的に感度を上昇させた。これらの検討の結果、微量にしか存在しないスプライシン



グバリアントの半定量法の確立に成功した。

この方法を用いて、内分泌かく乱化学物質に関する研究において重要性が指摘されている、低用量問題を踏まえた解析を行った。その結果、DES 低用量暴露により、胎児脳において mER del5、 $\beta 2$  のスプライシングバリアントの発現は、無処理群に比べ、わずかではあるが、いくつかのサンプルで発現量の増加が認められた。この結果については、さらなる検証が必要であるが、低用量 DES 暴露によるスプライシングバリアントの発現変化を示唆する結果である。発現量の増加が微量であった原因は、全脳の total RNA を鋳型として用いたため、脳の特定期位での顕著な変化が平均化された可能性を考えている。また、胎生 18.5 日の脳を total RNA サンプルとしたが、脳の分化過程は、出生後しばらくの間続くので、それらの時期に変化をおこしている可能性もあり、サンプルとする脳の部位や、投与量、タイムコースを追った検討を今後進める必要があると考える。

また、神経幹細胞培養系などの in vitro の実験系を用い、神経幹細胞分化のそれぞれのステップにおけるスプライシングバリアントの発現変化や、内分泌かく乱化学物質の影響の解析を行うことで、本研究で示唆した内分泌かく乱化学物質に

よるエストロゲンレセプタースプライシングバリアント変動現象の神経系発達に及ぼす影響のより詳細な解析を行うことができるものと考えている。

## E. 結論

マウスエストロゲンレセプター (mER) のスプライシングバリアント検出のための様々な PCR 法を検討し、mER  $\beta 2$ , del5 を半定量する方法を確立した。この方法を用いて、胎児期低用量 DES 暴露の雌胎児全脳において mER  $\beta 2$ , del 5 の発現量が増加することを示唆する結果を得た。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kanno J. :In vivo test for endocrine disruptors , Nippon Rinsho. Reciew Dec;58(12):2495-2501, 2000
2. Sai K, Kanno J., Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T.: Prevention of the down-regulation of gap junction intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol.. Carcinogenesis. 21(9):1671-

1676, 2000

## 2. 学会発表

1. Ono A., Kanno J., and Inoue T.,: Molecular aspects of functional differences among estrogen receptor ligands, 11th International Congress of Endocrinology, 2000
2. Kanno J., Igarashi K., Ono A., Takeyoshi M., Takatsuki M., Kubo A., Itai A., and Inoue T., : Estrogen receptor alpha point mutation altered responses to flavones in the reporter assay, 11th International Congress of Endocrinology, 2000

3. 松島裕子、井上 達、菅野 純:  
17 $\beta$ -estradiol の思春期前ラット  
投与における子宮肥大反応につ  
いて-内分泌かく乱作用を照準と  
した経世代試験改良のための考  
察, 日本内分泌攪乱化学物質学  
会第3回研究発表会 2000

## 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 エストロゲンレセプター-b2, d5 検出  
PCRプライマーの設計

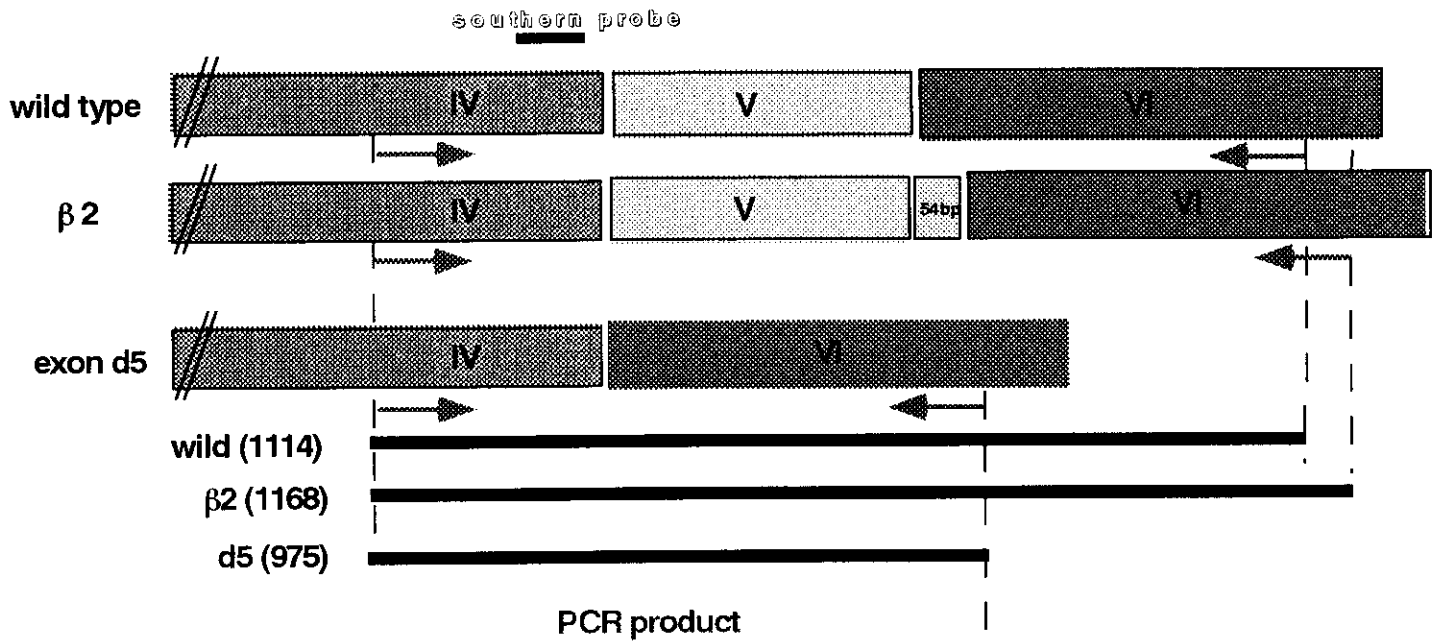


図2 RT-PCR Southern Blotting 法

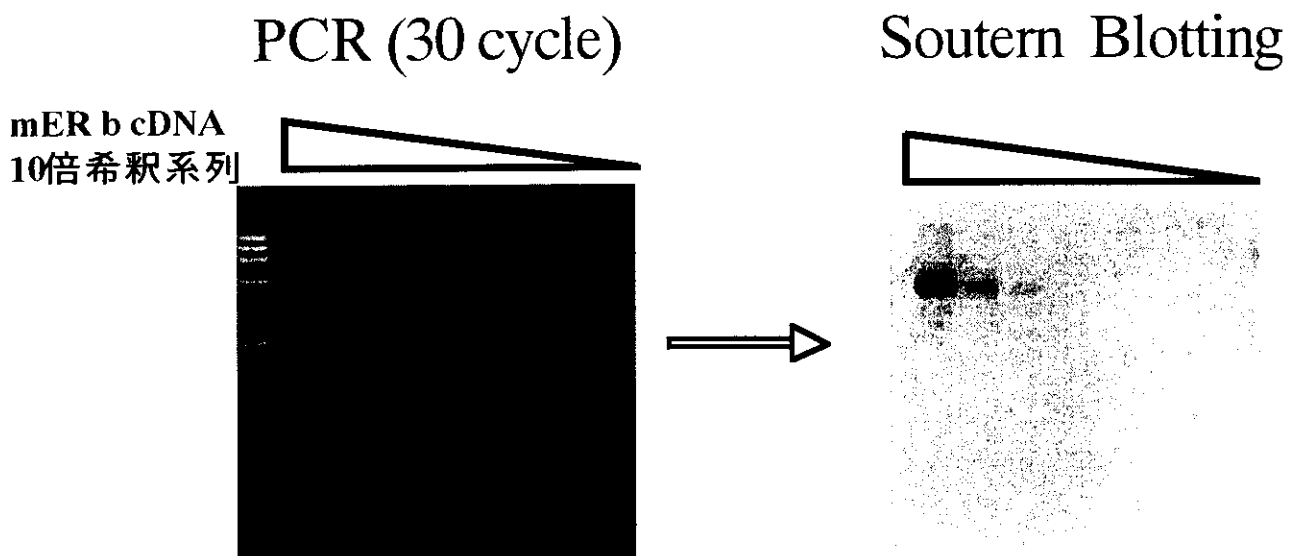


図3 mER  $\beta$ 2, d5の半定量

