

本研究は、培養細胞とトランスジェニックマウスを用いた研究であり、倫理的な問題点は極めて低い。

C. D. 研究結果と考察

I. PGC-1 (PPAR γ coactivator-1) 類似蛋白質PGC-2の同定と解析

これまで同定されたてきたほとんどの核内受容体のコファクターは、すべての組織に発現するユビキタスな因子であるが、唯一、PGC-1 (PPAR γ coactivator-1) のみが、褐色脂肪細胞に特異的なコファクターであることが明らかになっている。さらに、このPGC-1は、寒冷刺激によって発現誘導がかかるという性格をもち、この点も他のコファクターの性質と際だった対照をなす。

我々は、白色脂肪細胞に誘導が可能な3T3 L1細胞の脂肪細胞への分化の過程でPGC-1の発現がほとんど認められないことを見いだした。このことは、PGC-1がPPAR γ の重要なコファクターであるとする考えに反するものであるが、おそらく、PGC-1類似分子がその任をはたすと考えた。実際、ESTサーチで複数のPGC-1類似シーケンスを見つけ、そのうちの一つ(PGC-2と命名)の全長cDNAをクローニングした。予測どおり、PGC-2は、3T3 L1細胞のみならずOb1771細胞や10T1/2細胞の脂肪分化の過程で発現誘導がかかることが判明した。

次に、PGC-2がPPAR γ のコファクター

として働くかどうかを解析した。予測に反して、培養細胞をつかった転写アッセイでは、PGC-2がPPAR γ のコファクターとして働くとする考えを支持する結果は得られなかった。また、このときのコントロール実験で、PGC-1は単独でPPAR γ の転写を活性化する能力があることを見いだした。上述したように、PGC-1は寒冷刺激で発現誘導を受けるという性質をもち、このことを考えあわせ、PGC-1ファミリー蛋白質は、コファクターというよりもそのもの自信が発現調節を受け、核内受容体の蛋白性のリガンドとして働くのではないかを考えるに至った。そこで、ERなどのリガンドが知られている受容体やPPARをはじめとする種々の孤児受容体に対してPGC-1及びPGC-2が蛋白性リガンドして、転写活性化を示すかどうかを解析した。

予想通り、両者は核内受容体の蛋白性リガンドして機能し得ることが判明した。PGC-1は、PPAR α 、PPAR γ のみならずERやHNF4などの複数の受容体を活性化し、一方、PGC-2は一つのサブファミリー受容体群のみに対して蛋白性リガンドとして働くことを明らかにした。

II. PGC-1、PGC-2のトランスジェニックマウスでの強制発現

PGC-1ファミリー蛋白質が核内受容体の蛋白性リガンドであると想定し、これら蛋白質を過剰に発現させるトランスジェニックマウスを作製・解析し

た。発現を制御するプロモーターには阪大の宮崎らが作製したユビキタスに強力な発現をもたらすCAGプロモーターをもちいた。両者のマウスとも従来のトランスジェニックマウスと同じぐらいの頻度で生まれてきた。

1) PGC-1トランスジェニックマウスの解析

PGC-1マウスのうち数匹が生後しばらくして死亡した。これらの死亡したマウスは痩せており、PGC-1が褐色脂肪細胞に発現して、エネルギーの消費と熱産生に関わるuncoupling proteinの発現を亢進させるというこれまでの報告とよく符合する結果である。実際、同腹の野生型マウスと基礎エネルギーの消費量を比較したところ、その亢進が観察された。さらに、褐色脂肪や筋肉においてミトコンドリア数の顕著な増加が観察され、形態的にもシステルナの著明な増加が認められ、そのために、エネルギー消費が高進したものと推測された。

ミトコンドリアは、活性酸素の主たる産制場所であり、また、近年細胞死においても重要な役割を果たすことが示されている。PGC-1マウスは種々の臓器でミトコンドリアの数の著しい増加を認めており、今後、ミトコンドリアの生体内での役割を解析する上で、重要なモデルマウスとなることが期待される。

2) PGC-2トランスジェニックマウスの解析

PGC-2マウスはPGC-1マウスに比して、さらに、痩せが顕著であった。しかしながら、ミトコンドリア数の増加は認められず、別の要因が想定された。高脂肪食をあたえてもPGC-2マウスは、肥満を示さず、また、このときレプチンやインスリンの増加も軽度であり、また、血中グルコースの上昇も弱く、抗糖尿病作用を示した。さらに、遺伝性の肥満マウスKKAYとの掛け合わせでも、肥満を示さなかった。以上の結果は、PGC-2がリガンドとなる核内受容体を活性化させることが、抗糖尿病作用につながることを強く示唆しており、今後の肥満・糖尿病研究に新たな視点を提供するものである。

E. 結論

PGC-1及びPGC-2は、寒冷等の環境の変化で誘導される蛋白質で、核内受容体の蛋白質（プロテイン）リガンドとして働くことが明らかとなり、特に、これまで孤児受容体として分類されてきた複数の受容体様蛋白質がこれらの蛋白質リガンドで活性化を受けることが初めて示された。さらに、PGC-1及びPGC-2を発現させたトランスジェニックマウスの表現型のいくつかのものが、標的となる(孤児)受容体に想定されている機能高進として説明が可能であり、プロテインリガンドは、これまで知られていない新しい核内受容体の活性化機構として、生体内でも機能していることが示された。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Kamei, Y., Fujitani, Y., Ohizumi, H., Kawada, T., Miyoshi, M. & Kakizuka, A. Activation of the adaptive thermogenesis program in PGC-1 transgenic mice. (in preparation)
- 2) Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y., Fujikake, N., Matsukage, A., & Kakizuka, A. Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegenerations in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* (in press), 2002
- 3) Nakamoto, M., Nakano, S., Kawashima, S., Ihara, M., Nishimura, Y., Shinde, A., & Kakizuka, A. Unequal crossing-over in unique PABP2 Mutations: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Archives Neurology* (in press), 2002
- 4) Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., Nakadate, K., Ohsawa, Y., Kamei, Y., Popiel, A. H., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y., Uchiyama, Y., Hori, S., & Kakizuka, A. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to

neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 8: 977-984, 2001

- 5) Yamamoto, Y., Hasegawa, H., Tanaka, K., & Kakizuka, A. Isolation of neuronal cells with high processing activity for the Machado-Joseph disease protein. *Cell Death Differ.* 8: 871-873, 2001
- 6) Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., & Fujita, T. Initial process of polyglutamine aggregate formation in vivo. *Genes Cells*, 6: 887-897, 2001
- 7) Maeda, H., Hori, S., Nishitoh, H., Ichijo, H., Ogawa, O., Kakehi, Y., & Kakizuka, A. Tumor growth inhibition by arsenic trioxide (As₂O₃) in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 61: 5432-5440, 2001

2. 学会発表 (招待講演分)

1. 垣塚 彰「異常蛋白質の凝集と神経細胞の空胞形成・細胞死をつなぐ分子の同定」 「脳を知る」・「脳を守る」合同シンポジウム：脳の機能とその異常 平成13年4月28日、国立京都国際会館 (京都)
2. 垣塚 彰「神経変性疾患における新しい細胞死シグナリング：異常蛋白質から空胞形成・細胞死への分子機構」 第3回先端技術セミナー 平成13年5月21日、ワシントンホテル (東京)
3. 垣塚 彰「神経細胞死の新しい分子

機構：空胞形成を伴う細胞死」第54回日本細胞生物学会ワークショップ：アポトーシス誘導と阻害の分子細胞生物学的な展開 平成13年5月30日、長良川国際会議場（岐阜）

4. 垣塚 彰「神経細胞死の新しい分子機構：異常蛋白質から空胞形成・細胞死へのシグナリング」第7回生化学セミナー 平成13年6月8日、広島大学医学部（広島）

5. 垣塚 彰「神経細胞死の新しい分子機構：異常蛋白質から空胞形成・細胞死へのシグナリング」第3回京都大学大学院生命科学研究科シンポジウム 平成13年7月3日、京大会館（京都）

6. 垣塚 彰「ポリグルタミン病発症の分子機構」第28回生体分子科学討論会 平成13年7月6日、金沢大学医学部記念館（金沢）

7. 垣塚 彰「神経細胞死の新しい分子機構：異常蛋白質から空胞形成・細胞死への分子シグナル」第5回心臓血管病カンファレンス 平成13年7月14日、ホテルグランヴィア京都（京都）

8. 垣塚 彰「神経細胞死の新しい分子機構：異常蛋白質から空胞形成・細胞死への分子シグナル」第19回大分Brain Science Conference 平成13年8月3日、大分県医師会館（大分）

9. 垣塚 彰「神経細胞死の新しい分子機構：異常蛋白質から空胞形成・細胞死への分子シグナル」平成13年度生理学研究所研究会 平成13年8月8日、生理学研究所（岡崎）

10. 垣塚 彰「神経細胞死の新しい分子機構：異常蛋白質から空胞形成・細胞死への分子シグナル」先端脳夏のワークショップ 平成13年8月22日、NASPAニューオータニ（越後湯沢）

11. 垣塚 彰「神経細胞死の新しい分子機構：異常蛋白質から空胞形成・細胞死への分子シグナル」第24回日本神経科学 第44回日本神経化学合同大会 平成13年9月27日、国立京都会議場（京都）

12. 垣塚 彰「ポリグルタミン病発症の分子機構」第24回日本分子生物学会年回 平成13年12月9日、パシフィコ横浜（横浜）

13. 垣塚 彰「神経細胞死の新しい分子機構：異常蛋白質から空胞形成・細胞死への分子シグナル」平成13年度特定領域研究(B)公開シンポジウム「蛋白質分解の最前線」平成13年12月21日、京都大学医学部芝蘭会館（京都）

G. 知的所有権の取得状況

特願2000-0171957「糖尿病におけるインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法」平成12年8月22日 出願

研究課題名=[神経系初期発生におけるエストロジェンレセプターの機能および
内分泌かく乱化学物質の低用量影響に関する解析]

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

本研究は、エストロジェンレセプターの神経系初期発生における機能を解析し、低用量内分泌かく乱化学物質の影響を、分子レベルで解明することを目的とする。

エストロジェンレセプターが神経幹細胞に発現していることを、mRNA レベル、蛋白質レベルで明らかにした。胎生期の DES 暴露により、神経幹細胞機能障害が生じること、神経幹細胞からアストロサイトへの分化を DES が促進することを明らかにした。

本研究により、エストロジェンレセプターを介したシグナル伝達機構が中枢神経系発生機能制御に関わる分子機構ついて新たな展望が開け、低用量内分泌かく乱化学物質の中枢神経系への作用点を分子レベルで明確にすることが可能となると期待される。

A. 研究目的

本研究は、エストロジェンレセプターの神経系初期発生における機能を解析し、低用量内分泌かく乱化学物質の影響を、分子レベルで解明することを目的とする。

本研究により、エストロジェンレセプターを介したシグナル伝達機構が中枢神経系発生に関わるいかなる機能制御に寄与しているかを解析する新たな展望が開け、低用量内分泌かく乱化学物質の中枢神経系への作用点を分子レベルで明確にすることが可能となる。

B. 研究方法

【マウス胎児神経幹細胞培養(ニューロスフ

ェア培養)】

マウス C57BL/6 妊娠 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し、ピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培養培地(N2/DMEM/F12 (シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、ブトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの))には bFGF (10ng/ml) および EGF (25 ng/ml) を添加し、 10^6 個/6ml の密度で細胞を 10cm シャーレ(ヌンク社)に移す。7日間培養し、形成される凝集塊(ニューロスフェア)の数と直径を測定した。

【マウス胎児神経上皮細胞培養(接着培

養)】

マウス C57BL/6 妊娠 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し、ピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培地 (N2/DMEM/F12 (シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、ブトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの)) に bFGF (10ng/ml) を添加し、あらかじめポリ-L-オルニチン、フィブロネクチンでコーティングした 10cm シャーレ (ヌンク社) に 1 胎児分の細胞 /3ml の密度で細胞を播種。4 日間培養し、ピペッティングにて細胞をはがし、生細胞数をカウント後、 1.2×10^5 /500 μ l の細胞密度で 4well チャンバースライドに継代。神経幹細胞の増殖検討には bFGF を、ニューロンへの分化検討には因子を添加せず、アストロサイトへの分化検討には LIF と BMP2 を添加し、2 日間培養した。その際、各濃度の DES を共存させ未分化状態の維持および分化に対する影響を、各細胞種に対するマーカー蛋白質に対する免疫染色を用いて検討した。

【免疫染色】

チャンバースライドから培地を除き、4%ホルマリン/PBS(-)にて 15 分間固定し、一次抗体 (マウス抗 nestin, マウス抗 MAP2, ラット抗 GFAP)、二次抗体 (FITC ラベル抗マウス IgG、Texas Red ラベル抗ラット IgG) を用い、蛍光免疫染色した。同時に核を Hoechst 染色し、全細胞数計数に用いた。

【DES *in utero* 暴露】

DES はコーンオイルに溶解し、妊娠 11 日目

から 14 日目まで 2 μ g/kg 連日皮下投与した。

【定量 RT-PCR 解析】

形成されたニューロスフェアを回収し、ISOGEN (日本ジーン社) を用い、全 RNA を抽出した。得た全 RNA をキアゲン社の RNeasy キットを用いて精製した。アプライドバイオシステムズ社 (ABI 社) の RNA PCR kit を使用し、添付のプロトコールに従って oligo dT をプライマーに用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型に ABI 社の TaqMan universal PCR Master Mix を用い、ABI PRISM7700 にて定量 PCR を実施した。プライマー、TaqMan プローブは ABI 社の PrimerExpress を用いて設計した。

【Genechip 解析】

形成されたニューロスフェアを回収し、ISOGEN (日本ジーン社) を用い、全 RNA を抽出した。得た全 RNA をキアゲン社の RNeasy キットを用いて精製した。アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 5 μ g を T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (アフィメトリクス社キット) を用い、ビオチン化 CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はキアゲン社の RNeasy キットにて精製後、300-500bp になるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip にはマウス MGU74Av2 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45 $^{\circ}$ C にて 16 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプト

アビジンにて染色し、スキャンしてデータを得た。結果はシリコンジェネティクス社の Genespring を用いて解析した。

C. 研究結果

(1) 神経幹細胞におけるエストロゲンレセプターの発現

ほ乳類の脳は雌型がデフォルトであり、雄型脳は、自身の精巣が発達するに伴って分泌されるテストステロンが、脳内でアロマトーゼの作用でエストロゲンに変換され、その作用によって形成されると考えられている。テストステロンの分泌が起こるのは、マウスでは胎生 16 日頃からとされ、従来エストロゲンシグナルの脳神経系発達に対する影響の検討は、主にこの時期を含む胎生後期から新生児期を対象に行われてきた。一方で、エストロゲンレセプター(ER)は胎生初期から脳内で発現していることが明らかにされており、その点からは、胎生初期の時期にも ER が脳発達において機能している可能性が指摘される。胎生初期は未熟な神経幹細胞が多く含まれる時期であり、ER が神経幹細胞において何らかの機能を果たしている可能性が考えられる。

そこで我々は、胎児神経幹細胞に ER が発現しているかどうかについて、mRNA レベル (Fig.2)、蛋白質レベル (Fig.1) で検討した。神経幹細胞は、マウス C57BL/6 胎生 14.5 日の終脳からニューロスフェア培養したものを用いた。ニューロスフェアは、神経系の細胞がシャーレ壁面に接着しない条件で bFGF および EGF を添加し分化を抑えつつ培養することで形成される凝集塊で、未分化な神経幹細胞を

多く含むとされている。実際、形成されたニューロスフェアを神経幹細胞のマーカーである Nestin 蛋白質で染色し、陽性であることを確認している (Fig.1)。ニューロスフェアを接着可能な条件で培養し分化させ、ニューロンのマーカーである MAP2、アストロサイトのマーカーである GFAP にて免疫染色し、培養したニューロスフェアからニューロン、アストロサイトが分化することを確認している (data not shown)。ER の蛋白質レベルでの発現検討は、ニューロスフェアに対し、抗 ER α 抗体で免疫染色することで検討した。ER α の発現は Phycoerythrin ラベル抗ラビット IgG にて検出した。その結果、Fig.1 に示すように、nestin 陽性のニューロスフェアにおいて ER α の発現を確認した。次に、mRNA レベルでの発現を調べるために、ニューロスフェアから全 RNA を回収し、Nestin, MAP2, GFAP, ER α , ER β について TaqMan PCR を実施した。Fig.2 に示すように、Nestin, GFAP, ER α , ER β の発現が確認された。逆転写反応の際に逆転写酵素を加えないネガティブコントロール (RT(-)) では増幅が得られないことを確認している。MAP2 に関しては、ニューロスフェアにおいて発現していないためか、RT(+), RT(-) ともにほぼ変わらない低い増幅が得られた (data not shown)。以上より、神経幹細胞において、ER α が蛋白質レベル、mRNA レベルともに発現していること、ER β が mRNA レベルで発現していることを確認した。ER β の蛋白質レベルでの発現は現在検討中である。

(2) DES *in utero* 暴露影響検討

胎生初期のエストロゲン作用の攪乱が胎児神経幹細胞に対して影響を及ぼすか検討するために、妊娠11日目から15日目まで母体にDES 2.0 µg/kgを連日皮下投与し、胎生15日目に胎児終脳を分離し、 10^6 個/6ml/10cm径シャーレの細胞密度で巻き込み、ニューロスフェア培養した。この細胞密度は、個々のニューロスフェアが単一の細胞に由来すると考えられる密度である。7日間の培養後、形成されたニューロスフェアの数をその直径毎に区別して数えた。その結果、in utero DES投与を受けた胎児由来のニューロスフェアは、Vehicle投与胎児由来のニューロスフェアに比べ、径の分布が小径側に移っていた (Fig.3, Fig.4)。In uteroでDESに暴露されることにより、胎児終脳中の神経幹細胞の増殖に影響が生じた可能性が示唆される。また、ニューロスフェア培養する際にはDESは存在していないにも関わらず、In utero暴露の影響が持続するような結果を得たことから、in utero暴露に伴い神経幹細胞に不可逆的な遺伝子発現変化が生じている可能性があり、今後の検討を要する。

(3) DES in vitro 暴露影響検討

DES が神経幹細胞の機能に直接影響するか否かを検討するために、胎生14.5日目の終脳から神経上皮細胞 (nestin 陽性率9割以上の未分化な細胞) を培養増殖させ、以下の3条件、(1) bFGF を加え未分化状態を維持する、(2) bFGF を除き、主にニューロンに分化させる、(3) LIF および BMP2 を加えることによりアストロサイトに分化させる、に置いて DES を

10^{-14} ~ 10^{-6} M 共存させさらに2日間培養し、Nestin (神経幹細胞)、MAP2 (ニューロン)、GFAP (アストロサイト) の各マーカーについて免疫染色し、陽性率を算出した。その結果、DES は未分化状態の維持、ニューロン分化に対しては大きな影響を及ぼさなかったが、アストロサイトへの分化を促進する結果が得られた (Fig.5)。すなわち、DES を加えない条件ではGFAP の陽性率は約60%であったが、DES を加えると陽性率は上昇した。 10^{-14} M の添加ですでに陽性率が上昇しており、一旦 10^{-12} M で陽性率は無添加の状態にまで低下した。 10^{-11} M 以上の濃度では加えた濃度に依存して陽性率が上昇した。 10^{-12} M でなぜ無添加の状態にまで陽性率が下降するかについてはさらに検討を要する。

(4) Genechip 解析

In utero DES 暴露による神経幹細胞への影響の検討結果は、DES により胎児神経幹細胞に不可逆的な影響が生じていることを示唆している。その影響の可能性、および影響のメカニズムを明らかにするために、網羅的な遺伝子発現解析を行った。用いたシステムはアフィメトリクス社の Genechip である。形成されたニューロスフェアから全RNAを抽出し、アフィメトリクス社のプロトコールに従ってターゲット液とした。Chip は MGU74A version2 (既知遺伝子6000, EST6000が配置された chip) を用い、ハイブリダイゼーション、洗浄染色を経て、蛍光シグナルをスキャンし数値データをファイルとして得た。得たデータの解析は Genespring (シリコンジェネティクス社) を用いて行った。そ

の結果、Fig.6 に示すように、in utero DES 暴露により全体的に遺伝子発現が抑制されていた。発現が変動した遺伝子群の中から重要な機能を果たすと考えられる遺伝子を選択するために、神経幹細胞に特異的な発現を示す遺伝子で DES 暴露により逆の方向に増減を示した遺伝子を選択することとした。Fig.7 に示したように、胎児終脳全体と形成されたニューロスフェアとの遺伝子発現を比較し、ニューロスフェアに特異的に発現している遺伝子群を調べ、終脳に対し2倍以上の発現差のある遺伝子を抽出した。ニューロスフェアと終脳では大きく遺伝子発現が異なっており、それらの遺伝子群について Fig.6 で得られた変動遺伝子のデータを見直し、表1に DES により発現低下した遺伝子群(ニューロスフェアで終脳全体より高い発現を示す)、表2に DES により発現上昇した遺伝子群(ニューロスフェアで終脳全体より低い発現を示す)をまとめた。表1から、発現低下した遺伝子群には、CycB1, Cdc25, CycA, Cdc2 など細胞周期を制御する遺伝子群が多いことが判明した。すなわち、遺伝子発現解析からは DES in utero 暴露により、細胞周期を制御する遺伝子群の発現が不可逆的に低下し、ニューロスフェア形成に影響している可能性が示唆される。表2から、発現上昇した遺伝子群には、Lysozyme M, Metalloelastase, PC6 などのプロテアーゼ群が多く含まれることが判明した。特に PC6 は BMP4 (アストロサイト分化を促進する増殖因子)を活性化する PACE4 と相同性の高い遺伝子であり、神経幹細胞分化、特にアストロサイトへの分化において役割を果たしていることが

想定され注目される。

D. 考察

今回の検討結果より、ERが神経幹細胞で発現していること、発生期DES暴露は神経幹細胞の増殖分化に影響を与えること、DESは神経幹細胞からのアストロサイト分化を促進することが明らかとなった。また、網羅的な遺伝子発現解析により、in utero DES暴露に伴い、発現抑制される遺伝子の方が多く、細胞周期制御に関連する遺伝子が多いこと、誘導される遺伝子にはプロテアーゼ類が多いことがわかった。これらの結果から、ERは脳形成過程初期から機能していると考えられ、我々は以下のような可能性を考えている。(1)胎生初期から脳性分化の方向付けがERを介して開始されている。(2)胎生初期においては脳性分化は開始されておらず、その段階におけるERを介したシグナルは、中枢神経系の形成維持に関わっている。これらの可能性を踏まえ、今後内分泌攪乱化学物質の胎生期暴露が神経幹細胞に及ぼす影響の解析を進める必要がある。

また、DES を in utero 投与すると、その後 DES 無添加条件下で培養しても、神経幹細胞内の遺伝子発現に影響が生じていた。このことは、DES 暴露により神経幹細胞に不可逆的な遺伝子発現変化が生じている可能性を示唆するものである。不可逆的な遺伝子発現変化のメカニズムとして、DES 暴露により、ER を介し、神経幹細胞内の一群の遺伝子のプロモーター部位のメチル化が変化している可能性が考えられ、今後の検討を要する。

なお、胎児体内では実際には何らかのホメオスタシス維持機構あるいは発生プログラム監視機構が働いていることが考えられ、それらによる外来性刺激による影響の緩和が起こっている可能性がある。ここで得られた低濃度でのDESの神経幹細胞に対する影響は、そのような緩和機構が取り除かれた実験環境で増幅された可能性があると考ええる。実際のintactな状態での暴露影響に関しては、遺伝子発現解析を含む手法を用いたさらなる検討が必要であると考ええる。

E. 結論

神経幹細胞内でERが発現していることは、脳発生初期に内分泌かく乱化学物質に暴露されることにより、ERシグナルのかく乱を介し、神経幹細胞機能に影響が生じる可能性を示唆するものである。その影響の可能性として、神経幹細胞の増殖能、アストロサイトへの分化制御のかく乱が考えられる。今後それらを踏まえつつ、神経幹細胞を対象とした研究をさらに進め、神経系発生においてERがいかなる機能制御を司っているかについて明らかにする必要がある。それにより、低用量内分泌かく乱化学物質の神経系への作用点を分子レベルで明確にすることが可能となると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 松島裕子、井上達、菅野純 子宮肥大反応の特性について 第28回日本トキシコロジー学会、東京、2001

2. 菅野純、松永信人、吉村功 子宮肥大試験等、実験動物を用いた相加相乗性の検討の際の統計解析 第28回日本トキシコロジー学会、東京、2001

3. 高木篤也、菅野純、井上達 ES細胞の分化に及ぼすTCDDの影響 第28回日本トキシコロジー学会、東京、2001

4. 霍艶、平林容子、川崎靖、児玉幸夫、金子豊蔵、菅野純、井上達 Is Nr12 involved in benzene metabolic pathway? 第28回日本トキシコロジー学会、東京、2001

3. 知的所有権の取得状況

A. 特許取得

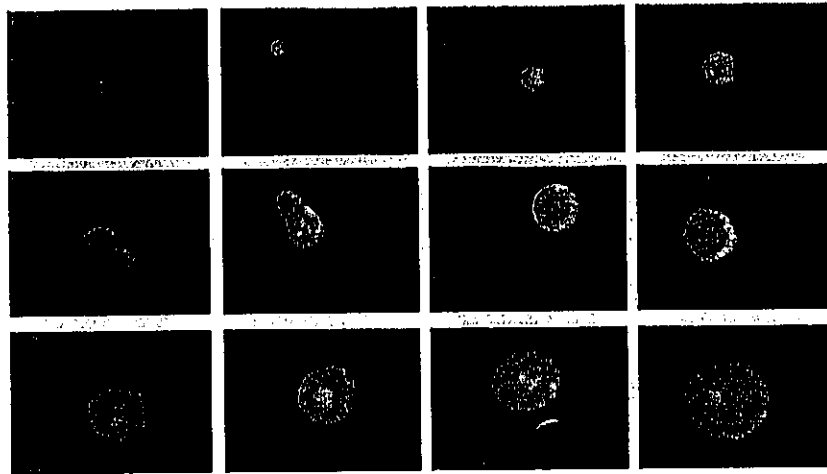
なし

B. 実用新案登録

なし

C. その他

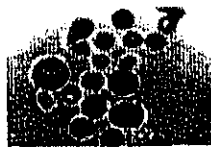
なし



Green: Nestin
Red: ER alpha

Fig. 1 : 神経幹細胞におけるERの発現

マウス胎生14.5日目の胎児より終脳細胞をニューロスフェア培養し、7日後に神経幹細胞マーカーとして Nestinを抗Nestinモノクローナル抗体、ER α を抗ER α ポリクローナル抗体で、各々FITCラベル抗マウスIgG、Texas Redラベル抗ラットIgGで染色した。



Neurosphere



RNA抽出



Q-PCR

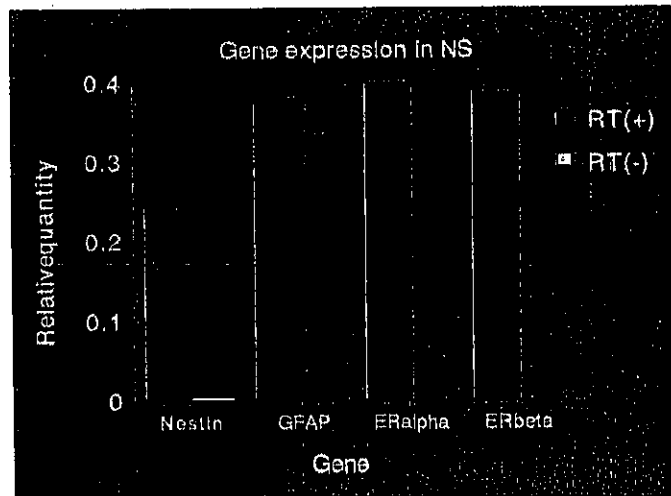
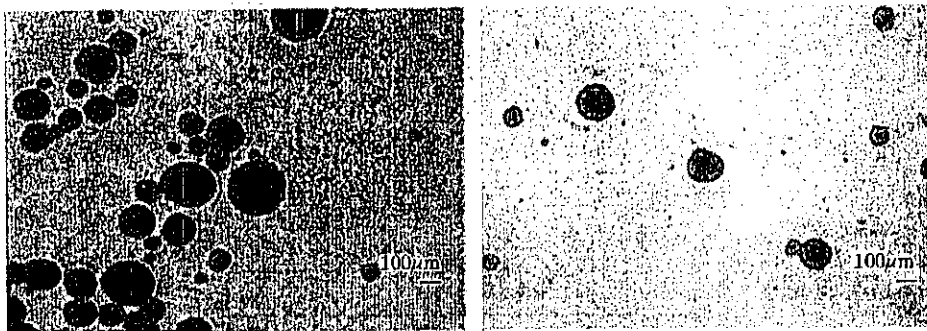


Fig. 2 神経幹細胞におけるER α , β mRNAの発現

ニューロスフェアより全RNAを抽出し、oligo dTプライマーで逆転写しcDNAに変えた後、Nestin, MAP2, GFAP, ERalpha, ERbetaに対するプライマーおよびTaqMan probeにて定量PCRを実施した。



Vehicle

DES

Fig. 3 DES *in vivo* 暴露の神経幹細胞に対する影響

胎生11日～15日までDESを2µg/kg/day母体皮下に投与し、胎児終脳よりニューロスフェア培養を行った。培養後7日に形成されたニューロスフェア像を示す。DES投与された胎児終脳細胞から形成されたニューロスフェアはvehicle処理胎児終脳細胞から形成されたものより径が小さい。

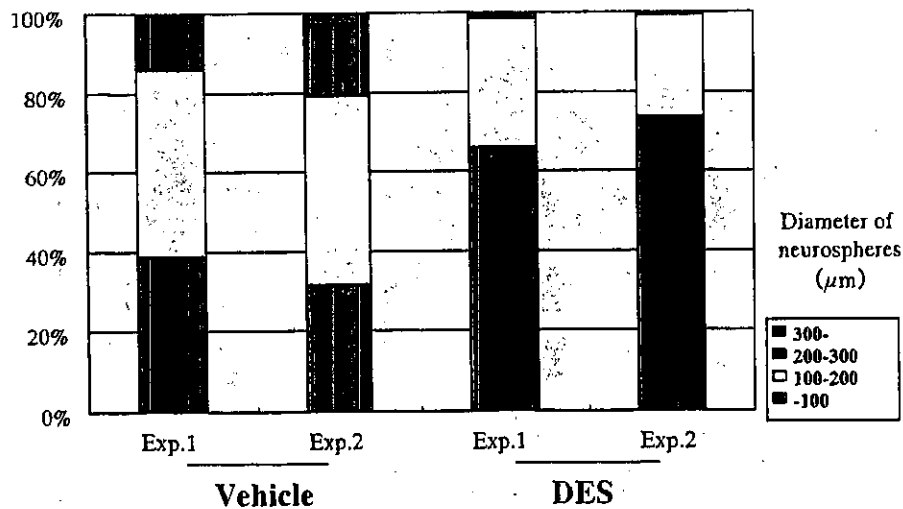


Fig. 4 DES *in vivo* 暴露の神経幹細胞に対する影響

Fig. 3に示したDES *in vivo* 暴露により形成されるニューロスフェアをその直径毎に分類して計数し、全体に対する百分率でグラフ化した。

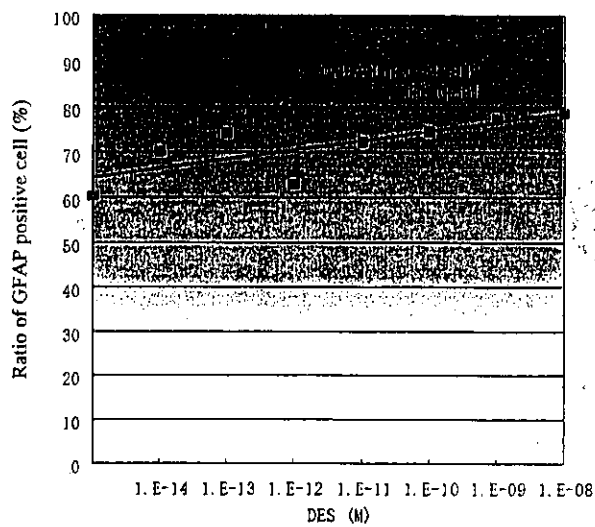


Fig. 5 DES *in vitro* 暴露のアストロサイト分化に対する影響

胎生14.5日目の胎児終脳より神経上皮細胞を培養し、LIF、BMP2によりアストロサイトへ分化させる際に各濃度のDESを添加した。分化培養2日目にアストロサイトのマーカーであるGFAPを免疫染色し、陽性細胞の割合としてグラフ化した。

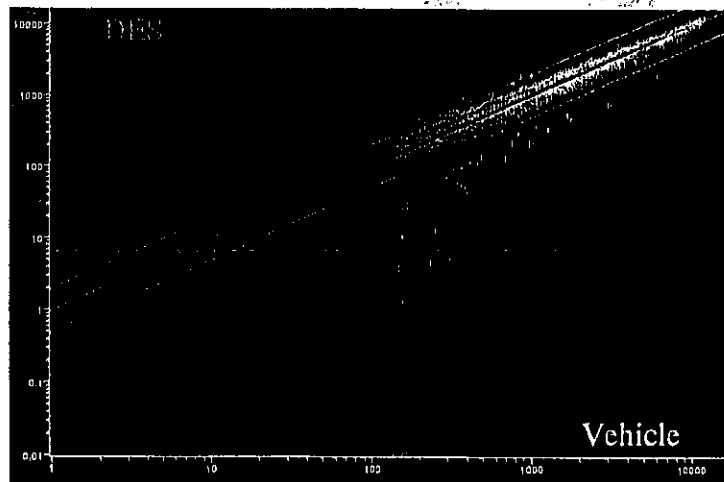


Fig. 6 DES *in vivo* 暴露ニューロスフェア遺伝子発現変化

Fig. 3に示したDES *in vivo* 暴露により形成されたニューロスフェアから全RNAを抽出し、Genechip (MGU74Av2) で検出した。Vehicleと比較したscatter plotを示す。他にニューロスフェアと胎児終脳の遺伝子発現を比較し、神経幹細胞特異的発現を示す遺伝子群を検索した (data not shown)。

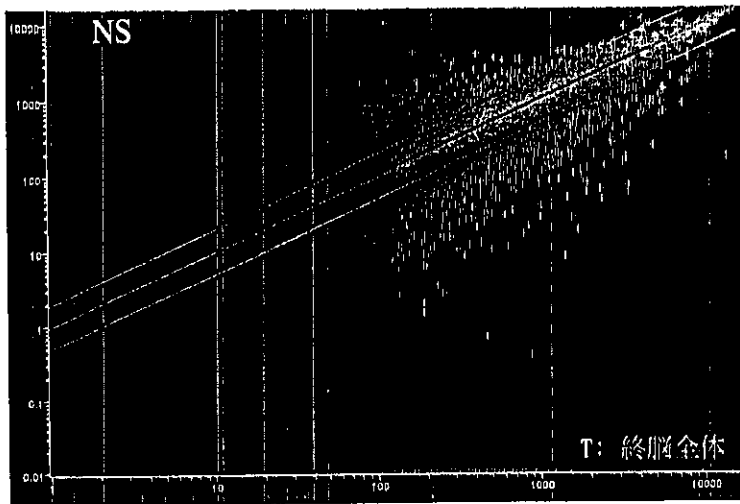


Fig. 7 神経幹細胞特異的発現遺伝子の検索

神経幹細胞にて特異的に発現している遺伝子群を同定するために、ニューロスフェアの遺伝子発現と胎生14.5日の胎児終脳全体の遺伝子発現をGenechipを用いて比較した。

表1 DESにより発現低下した遺伝子群

DES処理により発現が2倍以上低下した遺伝子群で、神経幹細胞（ニューロスフェア）で発現が2倍以上高い遺伝子を示した。

		DES NS	NS-T					
EST	AW061324	0.5	154.4	309.4	2.7	1056.6	387.8	
EST	AA681898	0.5	103.7	210.0	4.4	1165.4	263.2	similar to Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2
CRBP1	360367	0.5	54.7	115.6	6.8	996.4	144.9	cellular retinol binding protein 1
aykl	180932	0.5	42.8	91.1	2.6	291.3	114.1	centrosome separation kinase
cycB1	164713	0.4	77.5	184.2	5.1	1167.3	250.9	cyclin B1
Mpg	010420	0.4	25.6	68.4	2.7	231.0	85.7	Damageを受けた塩基を認識し、糖結合を切断し除去
Ramp2	A1250490	0.4	39.3	106.5	3.5	472.3	133.5	Receptor activity modifying protein 2 (calcitonin receptor-like receptorの活性化に必須)
Cdc25	116926	0.3	23.1	77.2	5.4	524.5	96.8	cdc25 phosphatase
CycA	175493	0.3	69.0	246.2	3.4	1050.3	306.5	cyclin A2
Topo-2	101915	0.2	19.8	80.2	8.4	646.8	100.5	DNA relaxing enzyme
FoxM1	Y11245	0.2	18.5	90.5	4.6	516.1	113.5	cyclin B1の発現を上昇させるという報告あり
CDC2	338724	0.2	14.0	74.5	7.1	665.5	93.4	p34 CDC2
Gl13	136255	-0.1	-2.9	51.0	3.3	214.7	65.0	Shhの下流転写因子。KOで大脳皮質の萎縮
4E-BP2	075530	-0.3	-18.0	60.7	5.7	437.1	76.1	eIF-4E binding protein

表2 DESにより発現上昇した遺伝子群

DES処理により発現が2倍以上上昇した遺伝子群で、神経幹細胞（ニューロ
スフェア）で発現が2倍以上低い遺伝子を示した。

Gene Name	Accession	DES	NS	NS-T	NS-T	Notes		
Mincopontin precursor	X13986	3.4	319.2	83.3	0.3	32.7	116.9	osteonpointinと相同性あり。OsteonpointinはERαで発現制御される
Lzm	M21050	3.3	78.4	23.6	0.0	0.6	29.6	lysozyme M Prion感染脳で発現上昇
Metalloelastase	MH2831	3.0	77.1	25.4	0.3	8.6	31.9	macrophageの浸潤に必須なプロテアーゼ
EST	AF124470	2.5	387.1	153.4	0.0	6.4	182.3	27-32 days Hippocampus
gp49	M65027	2.3	81.8	35.1	0.0	-2.7	44.0	an Ig-like receptor with inhibitory properties on mast cells and natural killer cells
PC6	D12619	2.1	58.9	28.8	0.3	12.3	36.1	PAC6A (BMP4を活性化するプロテアーゼ)と相同性の高い蛋白

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

核内レセプターの転写共役因子は、最近になって複合体を形成することが明らかになっている。現在までに、ヒストンアセチル化酵素(HAT)活性を有し CBP-p300、p160 ファミリーを含む複合体と、HAT 活性を持たない DRIP/TRAP 複合体の2種が存在する。いずれの複合体も多くの核内レセプターに作用することから、核内レセプター共通の転写共役因子複合体と考えられる。

1. ショウジョウバエを用いた男性ホルモンレセプター転写共役因子の機能解析

性ホルモンレセプターと転写共役因子との相互作用を *in vitro* 細胞系で解析を行ってきたが、これらの結果は、必ず

しも個体での現象を反映しない。そこで、ショウジョウバエにヒト AR を組織特異的に発現する系の構築に成功した。下流のリポーター遺伝子は GFP を用いたので、AR のリガンド依存的な転写機能は GFP の発現に振り替えられるため、結果として蛍光として観察できる。エサにアンドロゲンを加えると、GFP による蛍光が観察された。また、この AR を介した転写促進能は、AR を強制発現させたいずれの組織においても観察されている。このハエのラインに、更に CBP 欠損変異体 (Nejire) のハエラインを掛け合わせたところ、蛍光は半減した。このことは、AR も ER α 、ER β 同様に CBP/p300 を必須な転写共役因子であることを証明するものであった。次に転写共役因子遺伝子を欠損したハエライン群とヒト AR を発現するハエを掛け合わせることで、当該転写共役因子のヒト AR に対する生体内機能を探った。その結果、DRIP/TRAP 複合体構成因子に変異のあるハエにおいては、ヒト AR の機能に著しい低下がみられたことから、この複合体が生体内で AR の機能に必須であることが分かった。

2. ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定

昨年までの本研究課題において、ER 特異的な転写共役因子(p68、p72)の同定及び機能解析を行ってきた。更に既知転写共役因子複合体との相互作用を検索した結果、CBP-p300、p160 ファミリーを含む複合体と相互作用することを明らかにした(Watanabe et al., 2001)。しかしながら、この結果のみで ER の組織特異的機能

は説明できない。そこで HeLa 細胞核抽出液より、新たな転写共役因子複合体の精製を試みた。その結果 TRRAP 及び GCN5 を含む複合体が ER にリガンド依存的に結合することが分かった。更にこの複合体は、ER のみならず AR や VDR などの他の核内レセプターにも作用することが判明し、第 3 のクラスの新たな転写共役因子複合体と考えている(Yanagisawa et al., submitted)。現在、この複合体の転写制御機能における役割を解析しているところである。

3. 新たな転写共役因子複合体同定の試み

転写共役因子は、単独で作用することなく、複合体として機能することから HeLa 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。方法としては、ヒト ER α のリガンド結合領域 (AF-2) をエストロゲン存在で下で、プローブタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。その結果、既知の 2 つの転写共役因子複合体に加え、第 3 の転写共役因子複合体が存在することを見出した。またこの複合体はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有することも確かめ、またいくつかの構成成分も同定した。

現在この複合体の他の構成成分を同定しているところである。

C. 考察及び結論

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核内レセプターを介した転写制御能において、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. Mezaki, Y., Yoshida, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: N-terminal activation function is dominant in ligand-dependent transactivation of medaka estrogen receptor α in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 763-768, 2001.
2. Van Cromphaut, S. J., Dewerchin, M., Hoenderop, J. G. J., Stockmans, I., Van Herck, E., Kato, S., Bindels, R. J. M., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R., Carmeliet, G.: Doudenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13324-13329, 2001.
3. Kallay, E., Pietschmann, P., Toyokuni, S., Bajna, E., Hahn, P., Mazzucco, K., Bieglmayer, C., Kato, S., Cross, H. S.: Characterization of a vitamin D receptor knockout mouse as a model of colorectal hyperproliferation and DNA damage. *Carcinogenesis*, 22, 1429-1435, 2001.
4. Yagishita, N., Yoshizawa, T., Yamamoto, Y., Sekine, K., Uematsu, Y., Murayama, H., Nagai, Y., Krezel, W., Chambon, P., Matsumoto, T., Kato, S.: Aberrant growth plate development in VDR/RXR γ double null mutant mice. *Endocrinology*, 142, 5332-5341, 2001.
5. Yamamoto, Y., Wada, O., Suzawa, M., Yogiashi, Y., Yano, T., Kato, S., Yanagisawa, J.: A tamoxifen responsive estrogen receptor alpha mutant D351Y shows reduced tamoxifen-dependent interaction with corepressor complexes. *J. Biol. Chem.*, 276, 42684-42691, 2001.
6. Yahata, T., Shao, W., Endoh, H., Hur, J., Coser, K. R., Sun, H., Ueda, Y., Kato, S., Isselbacher, K. J., Brown, M., Shioda, T.: Selective coactivation of estrogen-dependent transcription by CITED1 CBP/p300-binding protein. *Genes Dev.*, Oct. 1st, 2001 (in press).
7. Kitanaka, S., Takeyama, K., Murayama, A., Kato, S.: The molecular basis of vitamin D-dependent rickets type I. *Endocrine J.*, 48, 427-432, 2001.
8. Inui, N., Murayama, A., Sasaki, S., Suda, T., Chida, K., Kato, S., Nakamura, H.: Correlation between 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene expression in alveolar macrophages and the activity of sarcoidosis. *Am. J. Med.*, 110, 687-693, 2001.
9. Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Arao, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Ogawa, S., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., Kato, S.: A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor

- α coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, 20, 134-1352, 2001.
10. Masuyama, R., Nakaya, Y., Tanaka, S., Tsurukami, H., Nakamura, T., Watanabe, S., Yoshizawa, T., Kato, S., Suzuki, K.: Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice. *Endocrinology*, 142, 494-497, 2001.
11. Sasagawa, S., Kato, S.: A nuclear receptor screening method using a steroid receptor coactivator-1 fragment in a yeast two-hybrid system. *Anal. Biochem.*, 289, 295-297, 2001.
12. Kato, S.: Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer*, 8, 3-9, 2001.
13. Li, M., Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Skin abnormalities generated by temporally-controlled RXR α mutations in adult mouse epidermis. *Nature*, 407, 633-636, 2000.
14. Adachi, M., Takayanagi, R., Tomura, A., Imasaki, K., Kato, S., Goto, K., Yanase, T., Ikuyama, S., Nawata, H.: Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N. Engl. J. Med.*, 343, 856-862, 2000.
15. Kodera, Y., Takeyama, K., Murayama, A., Suzawa, M., Masuhiro, Y., Kato, S.: Ligand-type specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J. Biol. Chem.*, 275, 33201-33204, 2000.
16. Suzuki, K., Yamanishi, K., Mori, O., Kamikawa, M., Andersen, B., Kato, S., Toyoda, T., Yamada, G.: Defective terminal differentiation and hypoplasia of the epidermis in mice lacking the Fgf 10 gene. *FEBS Lett.*, 481, 53-56, 2000
17. Ohuchi, H., Hori, Y., Yamasaki, M., Harada, H., Sekine, K., Kato, S., Itoh, N.: FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 277, 643-649, 2000.
18. Yamamoto, A., Hashimoto, Y., Kohri, K., Ogata, E., Kato, S., Ikeda, K., Nakanishi, M.: Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J. Cell Biol.*, 150, 873-879, 2000.
19. Arai, Y., Kuriyama, R., Kayama, F., Kato, S.: A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch. Biochem. Biophys.*, 380, 228-236, 2000.
20. Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kobayashi, Y., Takeyama, K., Endoh, H., Yanagisawa, J.: Molecular mechanism of a

- cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes to Cells*, 5, 593-601, 2000.
21. Kato, S.: The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J. Biochem.*, 127, 717-722, 2000.
22. Haraguchi, R., Suzuki, K., Murakami, R., Sakai, M., Kamikawa, M., Kengaku, M., Sekine, K., Kawano, H., Kato, S., Ueno, N., Yamada, G.: Molecular analysis of external genitalia formation: the role of *fibroblast growth factor (Fgf)* genes during genital tubercle formation. *Development*, 127, 2471-2479, 2000.
23. Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300 Mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor α and β by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, 275, 15645-15651, 2000.
24. Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, 14, 889-899, 2000.
25. 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*, 141, 1317-1324, 2000.
26. Endre, B., Kato, S., DeLuca, H. F.: Metabolism of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in vitamin D receptor-ablated mice in vivo. *Biochemistry*, 39, 2123-2129, 2000.
27. Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Mori, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300/CBP Acts as a coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 269, 410-414, 2000.
28. 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.*, 267, 311-316, 2000.
29. Hasegawa, Y., Fujii, K., Yamada, M., Igarashi, U., Tachibana, K., Tanaka, T., Onigata, K., Nishi, Y., Kato, S., Hasegawa, T.: Identification of novel human *GH-1* gene polymorphisms that are associated with growth hormone secretion and height. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 1290-1295, 2000.
30. 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.
31. Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S.,