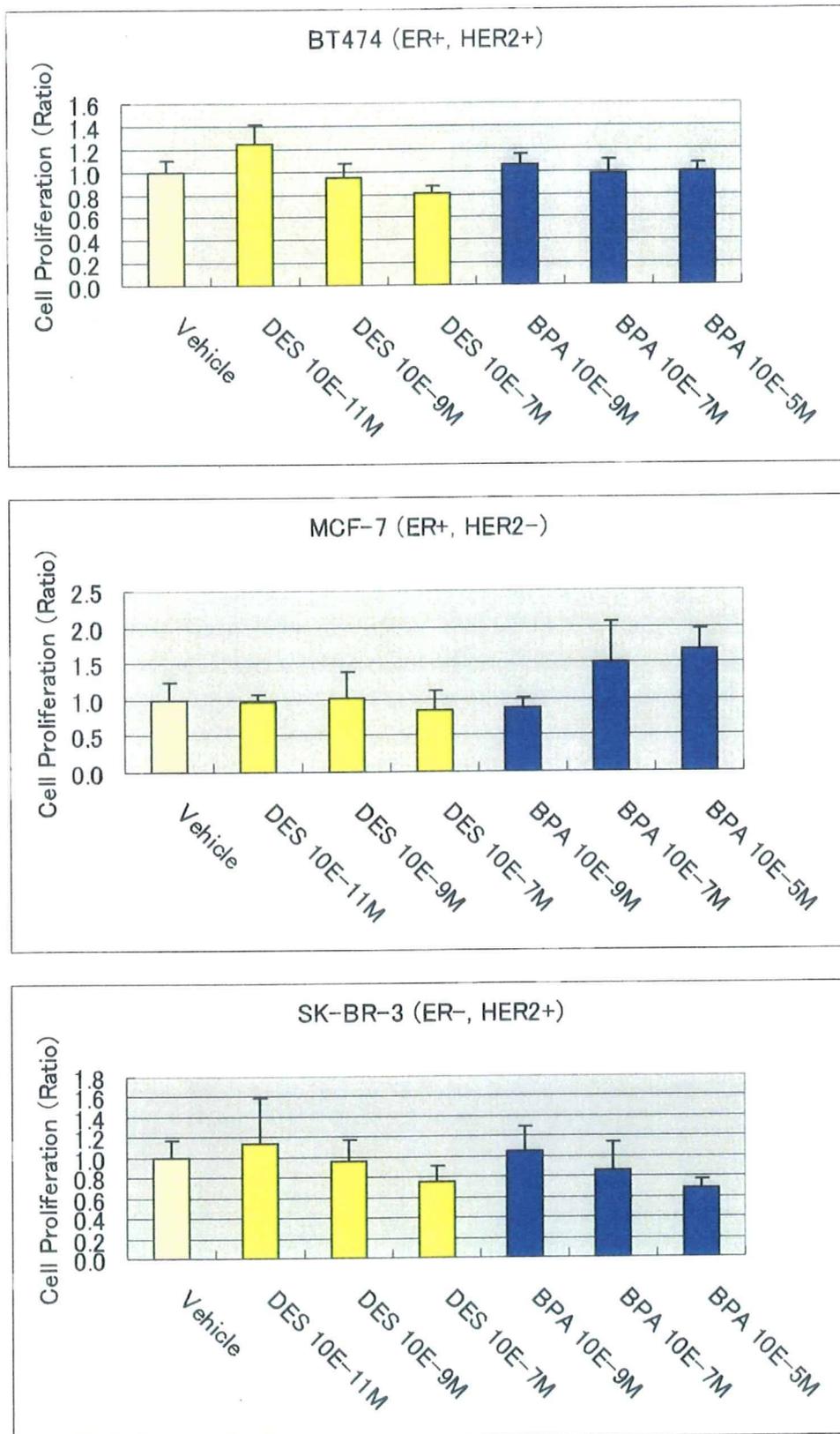


Table 3 Whole Mount 標本観察まとめ (DMBA 処置後 4 週間)

群	TEB数 (3例中)	Duct
1. Vehicle + Sham (Control)	55	Normal
2. Vehicle + DMBA (DMBA)	61	Normal
3. DES 10 μ g/kg + DMBA (DES-L)	72	Extend
4. DES 100 μ g/kg + DMBA (DES-H)	-	Thick
5. BPA 25 μ g/kg + DMBA (BPA-L)	44	Normal
6. BPA 250 μ g/kg + DMBA (BPA-H)	51	Normal

Fig.2 ヒト乳がん由来株化細胞を用いての検索



11. 確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究

分担研究者 西川 淳一 大阪大学大学院 助教授

研究要旨 核内受容体のリガンド依存的な転写活性化の分子機構に基づき、簡便に化学物質の核内受容体への作用を検出できるシステムを構築した。開発したシステムを用い、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への影響を検討した結果、有機スズ化合物が低濃度で RXR (Retinoid X Receptor) 及び PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) γ に作用することが明らかとなった。さらに詳細に有機スズ化合物のこれらの受容体への作用を解析した結果、有機スズ化合物の RXR と PPAR γ への結合様式は異なる事が明らかとなった。また、TPT (Triphenyltin) がコアクチベーター選択的な PPAR γ アゴニストである事も明らかにした。

A. 研究目的

前年度までに、化学物質の核内受容体への作用を迅速に検出できるシステムを構築し、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への影響を検討した。その結果、有機スズ化合物が低濃度で RXR 及び PPAR γ に作用することが明らかとなった。

TBT (Tributyltin) や TPT などの有機スズ化合物は多様な生物種に対して毒性を示すので、生物付着を防ぐ目的で船底塗料、漁網の防汚剤、循環水のスライム防止剤として使用されてきた。さらに、TBT については木材防腐剤としての利用もあるほか、欧米では TPT を防汚剤としてだけでなく農業として陸上で散布していた経緯もある。しかし、魚介類への残留が明らかとなり、国内では 1991 年に化審法の第一種および第二種特定化学物質に指定され、製造・使用等が規制されたが、依然として魚介類から TBT や TPT が検出されている。また、TBT や TPT は、生体中で Dibutyltin (DBT)、Monobutyltin (MBT)

あるいは Diphenyltin (DPT)、Monophenyltin (MPT) に代謝され無機スズになることが報告されており、水環境中でも分解は起きる。このことから、内分泌かく乱作用などの毒性を評価する際には、これらの分解産物についても考慮する必要がある。また、TBT や TPT 以外の有機スズ化合物として、TPT と同様の構造を持つ Tricyclohexyltin (TCHT, Cyhexatin) は、農業プリラクトンとして産業的な利用があった (1987 年に催奇形成の疑いから失効)。また、DBT は塩化ビニールおよび塩化ビニリデンポリマーの安定剤の原料、各種合成用原料、シリコン樹脂の硬化剤、生分解性プラスチックなどの製造の際に触媒としての用途がある。

これらのことから、TBT 及び TPT の代謝分解物や構造類似体についても注意を払う必要があり、表 1 に示した化合物群について RXR 及び PPAR γ への影響を検討した。

B. 研究方法

核内受容体リガンド検出系 (CoA-BAP システム)

核内受容体のリガンド結合領域を GST との融合タンパク質として、大腸菌を用いて大量に発現させ、精製した。これを 96 穴ポリスチレンプレートに固定化し、ここに化学物質とともにコアクチベーターを加えた。もし、化学物質にアゴニスト様活性があれば、核内受容体の構造変化を誘起し、コアクチベーターが結合する。コアクチベーターは、あらかじめアルカリフォスファターゼと融合させてあるので、この酵素活性を指標に、化学物質のアゴニスト活性を評価した。

供試化合物

試験に用いた化合物のリスト及び構造式を表 1 及び図 1 に示した。化合物はすべて DMSO に溶解後、終濃度 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M となるよう添加した。

C. 研究結果

19 種類の有機スズ化合物の RXR α 、RXR γ 、PPAR γ に対する影響を、CoA-BAP system を用いて調べた結果を図 2 に示した。TBT や TPT は、前年度の報告の通り、RXR や PPAR に用量依存的に強い活性を示した。これらの化合物以外にも、Tripropyltin (TPrT) や Tetra-butyltin (TetBT) は RXR に、Diphenyltin (DPT) や Tricyclohexyltin (TCHT) は PPAR に強い活性を示した。酵母 two-hybrid 法や哺乳動物細胞を用いたレポーター遺伝子試験では、有機スズ化合物の RXR と PPAR への結合性の差異は見いだせなかったが、多くの有機スズ化合物を CoA-BAP system で試験することにより、これらの結合様式に違いがあることを明らかにした。

また、PPAR についてコアクチベーターを変えて、

TPT への反応性を調べたところ、陽性コントロールとして用いた Rosiglitazone は p300、CBP、TIF2、SRC1、PGC1 等のすべてのコアクチベーターに対しリガンド依存的な活性値の上昇が観察されたのに対し、TPT は p300 や CBP を用いた時には効果を示さなかった (図 3)。また、NCoA はコレプレッサーであり、リガンドが結合していない受容体に結合しているが、リガンド濃度の上昇とともに解離することが分かる。コアクチベーターは、PPAR の構造を認識して結合する因子であることを考えると、これらの結果は Rosiglitazone が結合した状態と TPT が結合した状態で PPAR の構造が異なっている事を示唆している。

D. 考察

本研究において、多くの有機スズ化合物が、RXR や PPAR に非常に強いアゴニスト作用を有することが示唆された。有機スズ化合物は、船体に付着して船の速度を低下させるフジツボやカキ殻を殺す防汚剤として使用されてきた。非常に効果が強かったことで、世界全体で船舶の運航に必要な燃料費と船体クリーニング費など、莫大な費用が節約されたと言われている。しかし、1970年代の後半から1980年代の始めにかけてヨーロッパで貝類やカキの養殖に悪影響を及ぼすことが判明し、有機スズ化合物の生態影響に関しては古くから研究がなされてきた。その結果、有機スズ化合物は巻貝類においてインボセックス (雌の雄化現象) を引き起こす事が知られるようになった。インボセックスの誘導機構に関しては、テストステロンからエストラジオールへの変換を触媒するアロマトラーゼの阻害作用や、テストステロンの硫酸抱合阻害、神経ペプチドを介する作用が考えられてきた。しかし、本研究で見出されたような、RXR や PPAR といった核内受容体への作

用はこれまでに報告が無く、我々の発見が世界的にみても初めてである。

有機スズ化合物は、環境中あるいは生体内で分解・代謝されることが知られている。また、TBT あるいは TPT 以外の有機スズ化合物も産業的な利用があり、環境中からも検出されている。したがって、これら構造類似体でも TBT や TPT と同様に評価していく必要があると考えた。そこで、19種類の有機スズ化合物について、RXR α 、RXR γ 、PPAR γ の3種の核内受容体に対するアゴニスト作用を CoA-BAP system を用いて検討した。その結果、RXR α や RXR γ に対しては、TBT-Cl の他には、TBT-Br、TBT-H が強い活性を示した。これらは、水溶液中ではそれぞれイオン化して同一の活性化体として作用していると考えられた。また、ブチル基がプロピル基に置換した TPrT-Cl やブチル基を4つ有する TetBT もアゴニスト活性を示したが、その活性は TBT-Cl よりも弱かった。Bryan 等は、巻貝類のヨーロッパチジミボラ *Nucdla lapillus* に6種類の有機スズ化合物を投与して、それらのインボセックス誘導能を検討している。これによると、TBT が最も強く、TBT よりも弱いものの TPrT、TetBT もインボセックスを誘導すると報告している。また、この時 TPT、DBT、MBT はインボセックスの誘導はしないとしており、これらの結果は本研究での RXR α および RXR γ による結果と一致である。PPAR γ に対しては、TPT-Cl の他、TPT-OH も強い活性を示したが、これらはイオン化して同一の活性化体として作用していると考えられる。また、フェニル基を2つ有する DPT-Cl₂ が TPT-Cl と同等あるいはそれ以上の非常に強いアゴニスト活性を示した。この他、シクロヘキサン基を3つ有する TCHT-Cl も活性を示した。有機スズ化合物の生体への影響としてアロマトーゼの阻害作用が報告されているが、

PPAR γ アゴニストによりアロマトーゼの発現が抑制されるとの報告もあり、哺乳動物における PPAR γ と有機スズ化合物の関連についてもより詳細に検討する必要がある。

これまでは、核内受容体と相互作用するコアクチベーターとして TIF2 のみを用いて検討を行ってきたが、細胞内には TIF2 以外にも様々なコアクチベーターが存在し、その機能分化も報告されている。そこで、CoA-BAP system を TIF2 以外のコアクチベーターにも応用し、有機スズ化合物への応答を調べた。その結果、PPAR γ においては、Rosiglitazone および TPT の何れのアゴニストを用いた場合も、TIF2 と同じ p160 ファミリーコアクチベーターのメンバーである SRC-1 あるいは ACTR で、リガンド依存的な相互作用が観察された。また、PPAR γ に特異的なコアクチベーターとして単離された PGC1 でもリガンド依存的な相互作用が観察されたが、Rosiglitazone より TPT の方がより強く相互作用を誘導する傾向があった。しかし、興味深いことに、CBP や p300 では、リガンドによる反応性が全く異なることが明らかとなった。すなわち、Rosiglitazone や DPT をリガンドとして用いた時には、PPAR γ は p300 や CBP と強く結合したが、TPT をリガンドとした時には、PPAR γ はこれらのコアクチベーターと全く結合しなかったのである。これらの結果は、TPT はコアクチベーター選択的な PPAR γ リガンドとして働く事を示唆している。

E. 結論

- ・ 19種類の有機スズ化合物をスクリーニングした結果、RXR 及び PPAR γ は有機スズ化合物に対し異なる応答性を有することが見出された。
- ・ 新規 PPAR γ アゴニストである TPT は、p160 ファミリーや PGC1 等のコアクチベーターの PPAR γ へ

の結合は誘導するが、p300/CBP コアクチベーターの PPAR γ への結合は誘導せず、コアクチベーター選択性を持つ事を明らかにした。

F. 健康危惧情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishikawa, J. Imposex in marine gastropods may be caused by binding of organotins to retinoid X receptor. *Marine Biology*. in press.

Nakanishi, T., Nishikawa, J., Hiromori, Y., Yokoyama, H., Koyanagi, M., Takasuga, S., Ishizuka, J., Watanabe, M., Isa, S., Utoguchi, N., Itoh, N., Kohno, Y., Nishihara, T. and Tanaka, K. Trialkyltin compounds bind retinoid X receptor to alter fuman placental endocrine functions. *Mol. Endocrinol.* 19: 2502-2516 (2005)

Hirooka, T., Nagase, H., Uchida, K., Hiroshige, Y., Ehara, Y., Nishikawa, J., Nishihara, T., Miyamoto, K and Hirata, K. Biodegradation of bisphenol A and disappearance of its estrogenic activity by the green alga *Chlorella fusca* var. *vacuolata*. *Environ. Toxicol.*

Chem. 34: 1886-1901 (2005) Nishikawa, J. and Nishihara, T. Chromatin assembly factor Asf1p-dependent occupancy of the SAS histone acetyltransferase complex at the silent mating-type locus HMLa. *Nucleic Acids Res.* 33: 2742-2750 (2005)

Ohta, K., Osada, S., Nishikawa, J. and Nishihara, T. Cloning and characterization of a cDNA encoding the histone acetyltransferase MOZ (monocyclic leukemia zinc finger protein) in the rat. *J. Health Sci.* 51: 253-256 (2005)

Kanayama, T., Kobayashi, N., Mamiya, S., Nakanishi, T., Nishikawa, J. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ /retinoid X receptor (RXR) pathway. *Mol. Pharm.* 67: 766-774 (2005)

Osada, S., Nishikawa, J., Nakanishi, T., Tanaka, K., Nishihara, T. Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity. *Toxicol.*

histone acetyltransferase activity. *Toxicol. Lett.* 155: 329-335 (2005)

Nishikawa, J., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraishi, F., Horiguchi, T. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in Gastropods. *Environ. Sci. Technol.* 38: 6271-6276 (2004)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許出願

出願番号：特願2003-166686

発明の名称：核内受容体リガンド検出剤、組換えタンパク質、発現用遺伝子、組換えベクター、形質転換体、核内受容体リガンド検出方法、及び、核内受容体リガンド検出キット

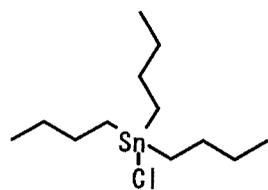
発明者：西川淳一

特許出願人：財団法人大阪産業振興機構

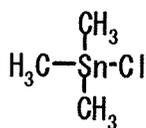
表1 試験に用いた有機スズ関連化合物

No.	Compounds	Abbrev.	CAS No.
1	Tributyltin Chloride	TBT-Cl	1461-22-9
2	Trimethyltin Chloride	TMT-Cl	1066-45-1
3	Triethyltin Bromide	TET-Br	
4	Tripropyltin Chloride	TPrT-Cl	2279-76-7
5	Trioctyltin Hydride	TOT-H	
6	Butyltin Trichloride	MBT-Cl ₃	1118-46-3
7	Dibutyltin Dichloride	DBT-Cl ₂	683-18-1
8	Tetrabutyltin	TetBT	1461-25-2
9	Tributyltin Bromide	TBT-Br	1461-23-0
10	Tributyltin Hydride	TBT-H	688-73-3
11	Tributylvinyltin	TB(v)T	
12	Triphenyltin Chloride	TPT-Cl	639-58-7
13	Phenyltin Trichloride	MPT-Cl ₃	
14	Diphenyltin Dichloride	DPT-Cl ₂	1135-99-5
15	Triphenyltin Hydroxide	TPT-OH	76-87-9
16	Tricyclohexyltin Hydroxide	TCHT	13121-70-5
17	Triphenylsilanol	TPS	791-31-1
18	Triphenylmethane	TPM	519-73-3
19	Tin chloride	Sn-Cl ₄	10025-69-1

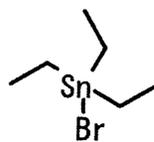
図1 試験に用いた有機スズ化合物の構造



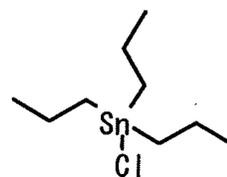
[1] TBT-Cl



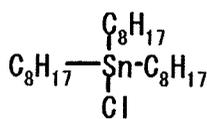
[2] TMT-Cl



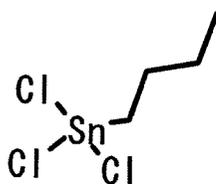
[3] TET-Br



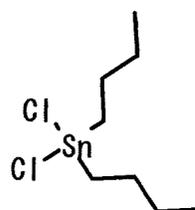
[4] TPrT-Cl



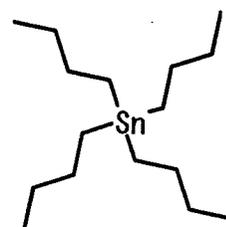
[5] TOT-Cl



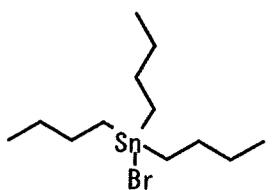
[6] MBT-Cl₃



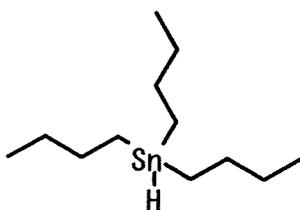
[7] DBT-Cl₂



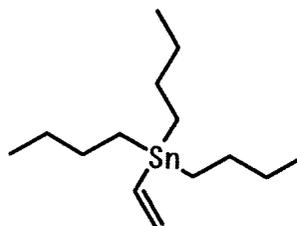
[8] TetBT



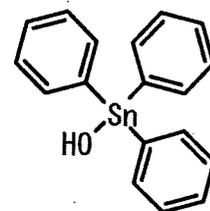
[9] TBT-Br



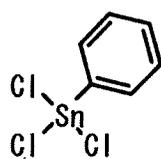
[10] TBT-H



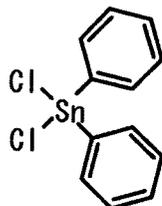
[11] TB(v)T



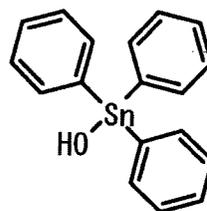
[12] TPT-Cl



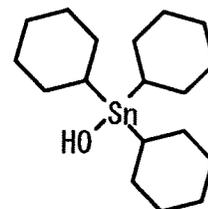
[13] MPT-Cl₃



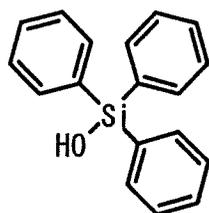
[14] DPT-Cl₂



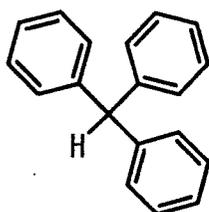
[15] TPT-OH



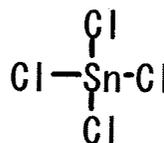
[16] TCHT-OH



[17] TPS



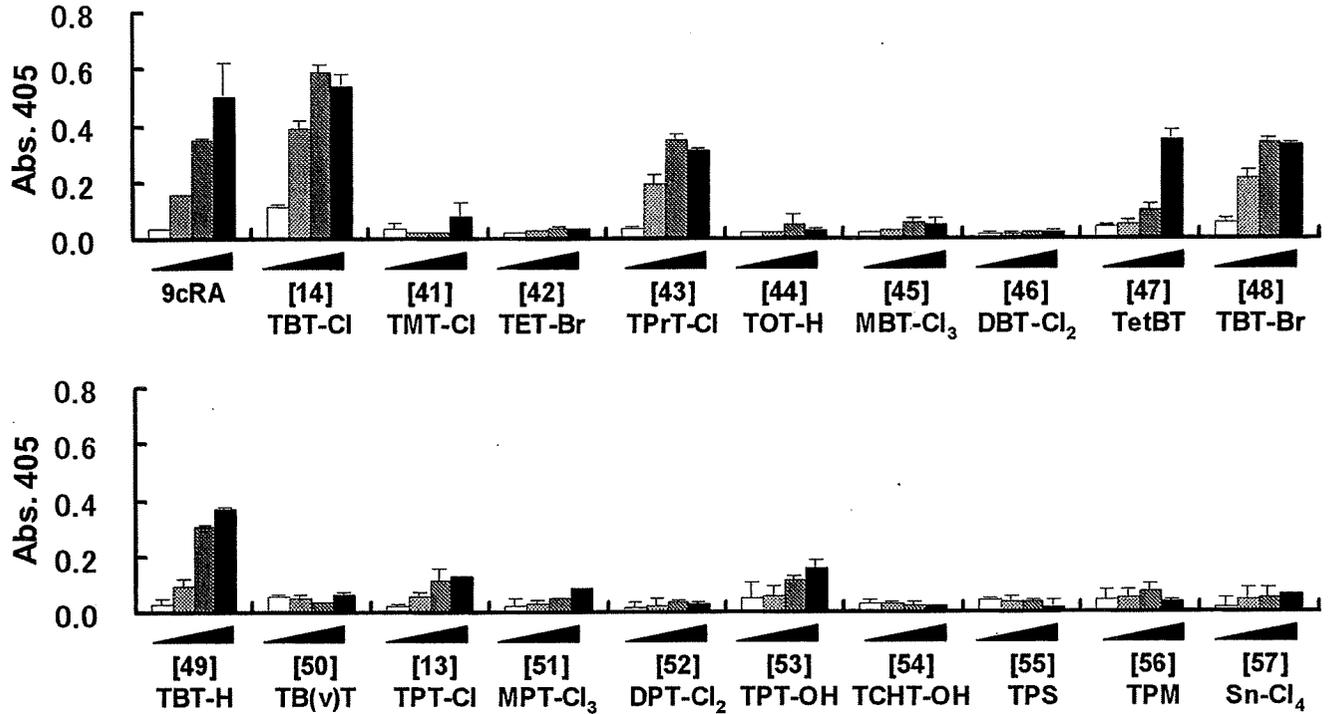
[18] TPM



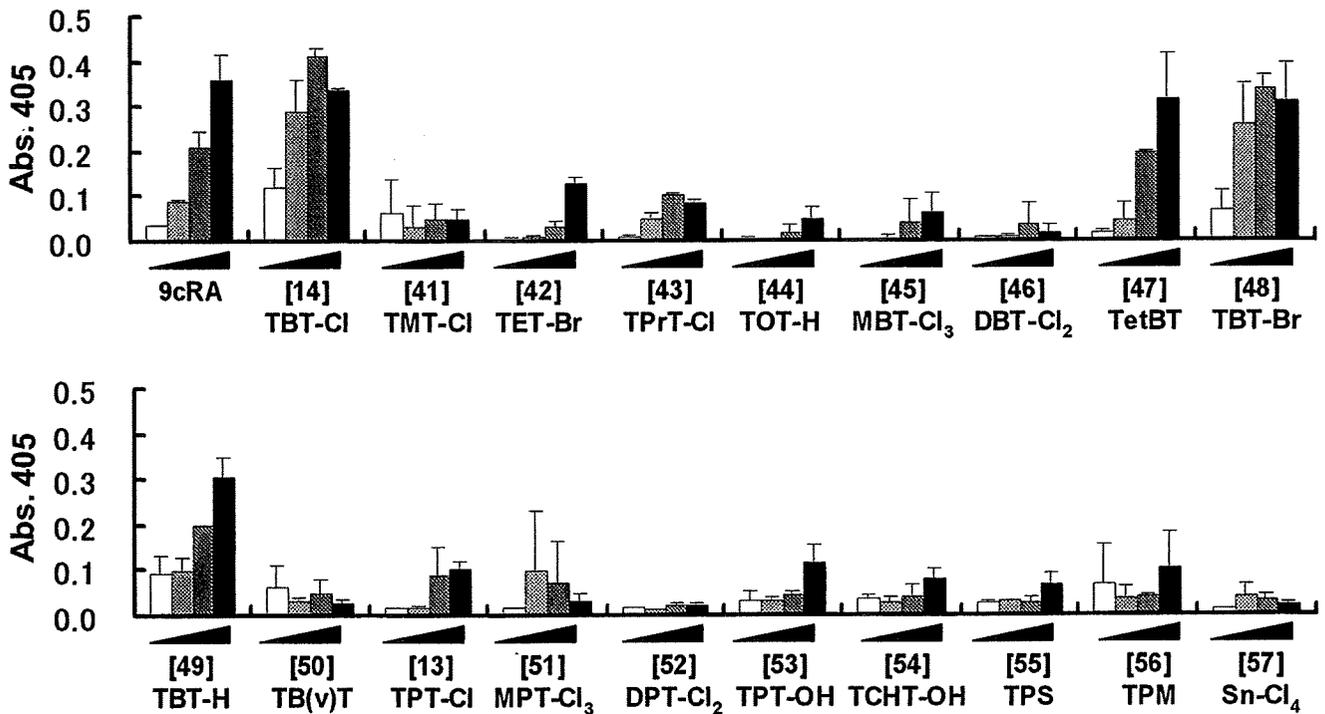
[19] Sn-Cl₄

図2 有機スズ化合物の RXR α (A), RXR γ (B), PPAR γ (C)への作用

(A) RXR α



(B) RXR γ



(C) PPAR γ

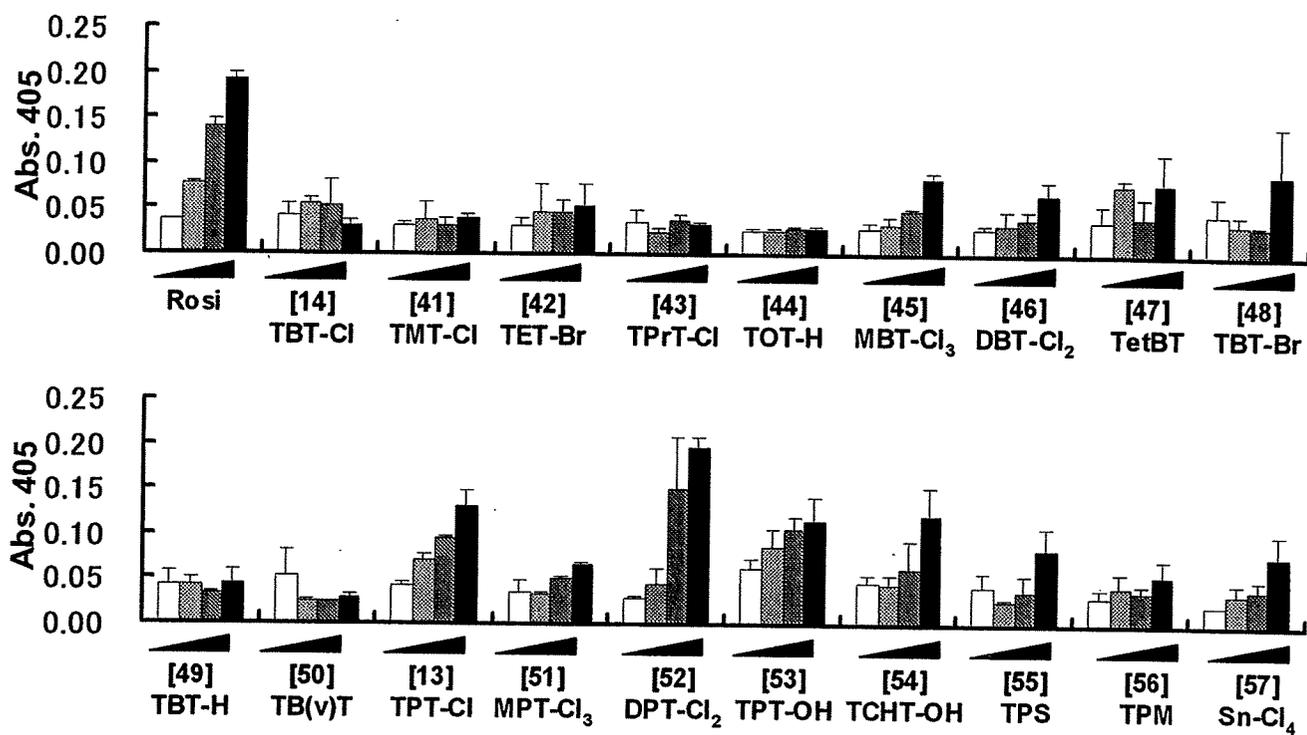
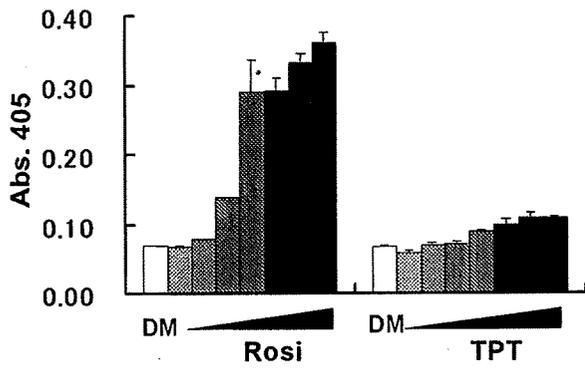
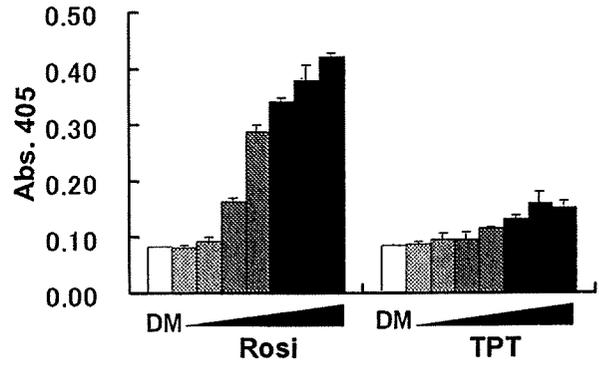


図3 TPTのコアクチベーター選択的な作用

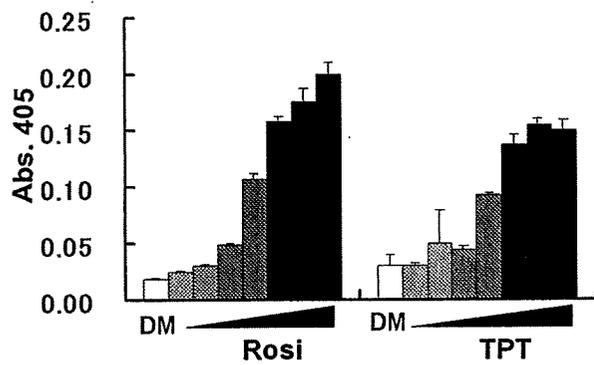
(A) hp300-BAP



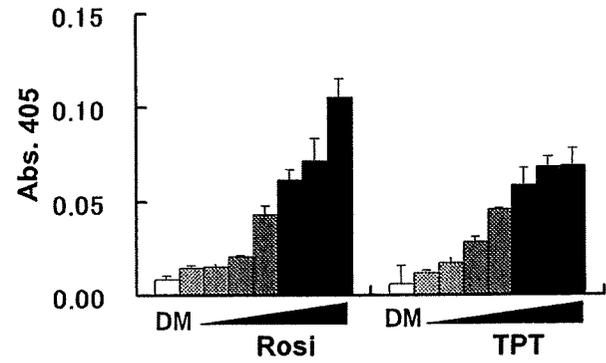
(B) hCBP-BAP



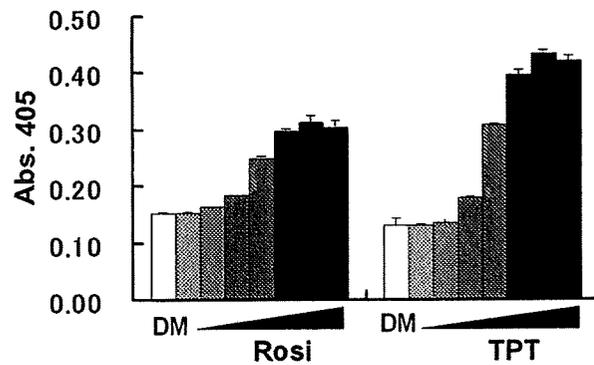
(C) hTIF2-BAP



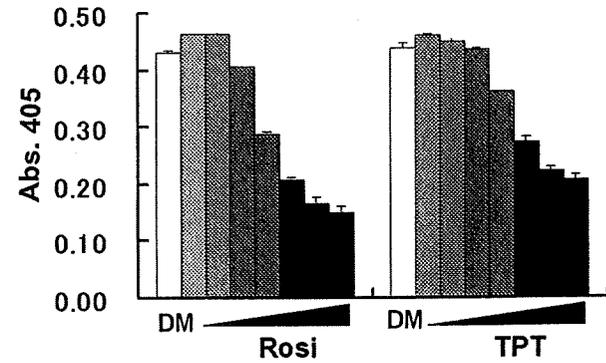
(D) hSRC1-BAP



(E) hPGC1 α -BAP



(F) hNCoR-BAP



12. 確定試験に関わる多分化能修飾メカニズム確認の為の ES 細胞分化増殖影響解析研究

分担研究者 高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨 EDCs は、種々のホルモン作用を障害することにより毒性を引き起こすことが知られている。本研究で用いる ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析にもよく用いられている。それゆえ、内分泌かく乱化学物質の解析の難しい発生初期への影響を調べる試験系として有用であると思われる。本年度は ES 細胞及び ES 細胞から形成される胚様体 (EB) に対する EDCs の遺伝子レベルでの影響解析に資するため、ES 細胞及び EB の分化開始から 7 日後まで経時的に採取したサンプルを対象に、定量的比較を正確に行うことが可能な Percellome 手法によるマイクロアレイ解析を実施し、核内受容体や分化マーカーを含む種々の遺伝子発現パターンを明らかにし、遺伝子発現の精密なデータベースを構築した。

A. 研究目的

EDCs の暴露は、エストロジェン、アンドロジェン、甲状腺ホルモン等のホルモン作用を障害することにより種々の毒性を引き起こすことが知られている。本研究で取り上げる ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析にもよく用いられている。それゆえ、EDCs の解析の難しい発生初期への影響を調べる試験系として有用であると思われる。そこで、確定試験において胎生期暴露による影響が想定される場合のメカニズム情報提供支援体制としてリスク予測に役立てるため、ES 細胞及び ES 細胞の分化により形成される胚様体 (EB) の分化過程で変動する遺伝子の精密なデータベースの構築を行った。

B. 研究方法

EDCs の ES 細胞及びその浮遊培養により形成される胚様体 (EB) の分化への影響を遺伝子レベルで解析するためには、ES 細胞及び EB の分化過程で変動する遺伝子の正常な発現パターンを明らかにしておく必要がある。

そこで、ES 細胞及び EB の分化過程で発現する遺伝子についてマイクロアレイを用いて、経時的に解析を行った。フィーダー細胞上で培養したマウス ES 細胞 (TT2) をトリプシン処理し、細胞培養用 dish 上でさらに 2 時間培養した。この操作によりフィーダー細胞を除去した ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で、最初の 2 日間は hanging drop 法 (ES 細胞 800 個/20 μ l) で、次の 5 日間は浮遊培養法で、計 7 日間培養した。その間に形成される EB の培養開始 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7 日後と 0.5 日ごとに EB を採取してプールし、サンプルとした。また、0 日のサンプルとしては上記フィーダー細胞除去後の ES 細胞 (1×10^6 個) を用いた。RNA はキアゲン社の RNeasy にて抽出、40000 以上の遺伝子発現の解析が可能なアフィメトリス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。また、その解析には定量的比較を正確に行うために、我々の開発した Percellome 手法 (細胞 1 個当たりの mRNA 絶対量を得る遺伝子発現解析手法) を用いた。

C. 研究結果

ES 細胞および EB の分化過程で発現する遺伝子を経時的にマイクロアレイにより解析した。その結果、多くの遺伝子発現の変動が見られた。その中で、EDCs の作用と関連する核内受容体遺伝子 TR(甲状腺ホルモン受容体) α 、 β 、RAR(レチノイン酸受容体) α 、 β 、 γ 、PPAR(ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体) α 、 γ 、 δ 、ER(エストロジェン受容体) α 、 β 、ERR(エストロジェン関連受容体) α 、 β 、 γ 、RXR(レチノイド X 受容体) α 、 β 、 γ 、VDR(ビタミンD受容体)、PR(プロジェストロン受容体)、AR(アンドロジェン受容体) の発現パターンについて解析した結果、ES 細胞および EB において、それぞれの核内受容体遺伝子は各遺伝子特有の発現パターンを示すことが明らかとなった。また、すでに EB の分化マーカーとして知られている遺伝子である内胚葉のマーカーの AFP(alpha fetoprotein)、TT(transthyretin)、心臓のマーカーである NKX2.5、cardiac actin、中胚葉マーカーである brachyury BMP4、外胚葉のマーカーである FGF5 等について解析したところ、内胚葉のマーカーでは EB の 3 日前後から、中胚葉マーカーについては EB の 2 日後前後から、心筋のマーカーは EB の 4 日前後から、外胚葉マーカーは EB の分化開始直後から増加するが、やがて減少するなど、それぞれ個々の遺伝子に特異的な発現パターンが見られることを明らかにした。

D. 考察

ES 細胞および EB の分化過程で発現する遺伝子を経時的にマイクロアレイにより解析した。その結果、EDCs の作用と関連する多くの核内受容体遺伝子発現の発現が確認され、それぞれ特有の発現パターンを示すことが明らかになった。その発現の生物学的意義については明らかではないが、マウス

胎児の初期胚においてもこれらの核内受容体が何らかの働きをしていることが示唆された。また、本実験で、これらの遺伝子の発現が確認されたことから、そのアゴニスト、アンタゴニストとなりうる物質の影響を調べる系として ES 細胞及び EB が適していることが示された。EB の分化マーカーについてはそれぞれの発現変動が既知の論文等で報告されているものと一致し、本試験系が解析に十分利用出来ることが示された。今後、各種ホルモンや EDCs の影響についても検索する予定である。

E. 結論

EDCs の発生初期への影響を ES/EB を用いて遺伝子レベルで解析するための定量的マイクロアレイ手法を用いた解析法を確立し、遺伝子発現のデータベースを構築した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

書籍

高木篤也、ヒト全 MHC 遺伝子導入マウス、ヒト型モデル動物、pp79-82、井上達、野田哲生、野本明男編集、シュプリンガーフェアラーク社、2002。

雑誌

Takagi A, Sekita K, Saitoh M and Kanno J: Acute, subchronic and chronic toxicity studies of a synthetic antioxidant, 2,2'-isobutylidenebis (4,6-dimethylphenol) in rat. The Journal of Toxicological Sciences, 30 (4) 275-285, 2005.

学会発表

Effects of TCDD on mouse embryonic stem

cells in culture. A. Takagi and J. KANNO.
45th Annual Meeting of Society of
Toxicology, USA, 2006年3月

マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマ
イクロアレイ解析、高木篤也、中津則之、
五十嵐勝秀、菅野純、第28回日本分子生物
学会、2005年12月、福岡

Attenuation of 2,3,7,8-
tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced
cleft palate by dimethyl sulfoxide.
Atsuya Takagi, Makoto Ema and Jun Kanno
The 25th International Symposium on
halogenated Environmental Organic
Pollutants and POPs. Canada, 2005年8
月

発生毒性解析のための無血清培地を用いた
マウス ES 細胞培養系の検討、高木篤也、菅
野純、第32回日本トキシコロジー学会学術
年会、東京、2005年6月

鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小原有弘、
本間正充、林 真、高木篤也、菅野 純、
「GeneChip による遺伝子発現解析を用いて
アリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器
特異性を予測可能か Use of the gene
expression analysis by the GeneChip for a
prediction of the target organs in
Aristolochic acid-induced genotoxicity in
mice.」第63回日本癌学会学術総会、2004
年9月29日～10月1日、福岡

Assessment of the cleft palate induction
by seven PCDD/F congeners in the mouse
fetus. Atsuya Takagi, Akihiko Hirose,
Yoko Hirabayashi, Toyozo Kaneko, Makoto
Ema and Jun Kanno, The 23^t International
Symposium on halogenated Environmental

Organic Pollutants and POPs. USA,
2003年8月

ES 細胞の遺伝子発現に及ぼす TCDD の影響。
高木篤也、五十嵐勝英、菅野純、金子豊蔵、
井上達、第29回日本トキシコロジー学会学
術年会、東京2002年6月

Effects of TCDD and polychlorinated
terphenyls (PCTs) on the development of
cleft palate in mouse embryos. Atsuya
Takagi, Toyozo Kaneko, Katsuhide
Igarashi, Jun Kanno and Tohru Inoue, The
22nd International Symposium on
halogenated Environmental Organic
Pollutants and POPs. Spain, 2002年8
月

Effects of TCDD on the gene expression in
mouse embryonic stem cells in culture.
TAKAGI, A., MATSUDA, N., KANEKO, T., KANNO,
J. and INOUE T., 米国奇形学会, 2002年6
月

H. 知的所有権の取得状況

特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

13. 確定試験に関わる生殖器制御メカニズムに基づいた

内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析

分担研究者 松島裕子 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究要旨 EDCs の生殖器制御系に対する作用を検討する確定試験系を構築するための基盤支援研究を行う。そのために本研究では生殖器制御メカニズムに関する分子レベルでの解析を行い、基盤情報として整理する。具体的には、マウスを用い、発達期と成熟期に分けて研究を進め、生殖器発達に伴う遺伝子発現変化の解析、成熟期における性周期変化に伴う生殖器遺伝子発現変化の解析を主として行い、生殖器制御メカニズムを分子レベルで解析した情報を得、基盤情報として本研究班に貢献する。本年度は、マウス雌について生後発達に伴う卵巣、子宮の遺伝子発現値を経時的かつ網羅的に得、データベース化した。その結果、卵巣機能に関わる遺伝子で ER β と同様の発現パターンを示すものが多いことが判明し、生後発達期の卵巣に於ける ER β の重要性が示唆された。

A. 研究目的

EDCs の生殖器制御系に対する作用を検討する確定試験系を構築するための基盤支援研究を行うことが本研究の目的である。そのために本研究では生殖器制御メカニズムに関する分子レベルでの解析を行い、基盤情報として整理する。具体的には、マウスを用い、発達期と成熟期に分けて研究を進め、生殖器発達に伴う遺伝子発現変化の解析、雌について成熟期における性周期変化に伴う生殖器遺伝子発現変化の解析を主として行い、生殖器制御メカニズムを分子レベルで解析した情報を得、基盤情報として本研究班に貢献する。

B. 研究方法

<生後発達期の臓器採取>

C57BL/6 雌妊娠 11 日目もしくは 13 日目の

マウスを日本エスエルシーより購入した。

PND 1、3、5、7、10、16、21、28 に卵巣と子宮を、PND 21 には他に視床下部、下垂体、膣を採取した。複数匹をプールし、各日齢 3 群のサンプルを得た。

<マウス組織からの RNA の分離精製>

組織を分離後すみやかに RNeasy kit (Qiagen 社) に浸漬し、RNase を不活化した。4°C、一晩以上静置した後、実体顕微鏡下、脂肪組織、卵管などの不要組織を除去した。RNeasy kit (キアゲン社) 添付の RLT buffer を用いて組織破砕液を調製し、DNA 定量用蛍光試薬である Picogreen を用いて、破砕液中の DNA 量を測定した。DNA 量に応じて (Spike factor=0.02 (神経組織は 0.01))、Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の mix) を添加し、TRIzol を用いて粗抽出した液を RNeasy kit を用いて全 RNA 精製した。得た全 RNA の 0.1 μ g を電気泳動し品質

を確認した。

<GeneChip 解析>

アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 4-5 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 を調製した。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 (ENZO 社) を用い、ビオチン化 CTP、UTP を共存させつつ cRNA を合成した。全て増幅回数は 1 回とした。二本鎖 DNA および cRNA 精製にはアフィメトリクス社の GeneChip sample cleanup module キットを用いた。得られた cRNA を 300-500bp となるよう断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加し GeneChip ターゲット液とした。GeneChip は MOE430 2.0 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 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、専用スキャナーでスキャンして発現値データを得た。データ解析に際しては、Spike RNA のシグナル値を元に各遺伝子のシグナル値を DNA 当たりの値、さらにはコピー数に変換した値を用い解析を行った。データ解析に用いたソフトウェアは当部にて開発したものを主に用いた。

C. 研究結果

<発達に伴う生殖器遺伝子発現変化>

PND 1、3、5、7、10、16、21、28 に 巢、子宮に加え、PND 21 は視床下部、下垂体、膣を得た。これらの臓器について、当部で開発した Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を実施した。各臓器 3 サンプルずつのデータを得た。得られたマイク

ロアレイデータは Percellome 手法により、コピー数データに変換した。そのデータを MF surface によりサーフェスデータとし、遺伝子毎に発現変化を検討した。検討した遺伝子カテゴリーは、1) ER α 、 β 、2) Progesterone receptor、3) ステロイド合成系、4) LH/FSH 系、5) Androgen receptor target、6) “Estrogen” をキーワードに含む遺伝子群、7) DNA methyltransferase、8) Oncogene、9) Cyp、10) Nuclear receptor の 10 カテゴリーである。以降でカテゴリー毎に解析した結果を記す。

1) ER α 、 β

ER α は卵巢、子宮とも出生直後から成獣レベルの発現量を示し、変動は小さかった。PND 21 では成獣に比べ下垂体での発現量は低いが、子宮、膣では成獣レベルに達していた。一方、ER β は卵巢では発達に伴い経時的に発現量が上昇し、子宮では発現が認められなかった。PND 21 での卵巢での発現量は成獣の数倍であることが判明した。

2) Progesterone receptor (PR)

ER によって発現が制御される代表的な遺伝子として PR が知られている。そこで、PR の発現変化を検討した。その結果、PR の発現変化パターンは ER α のパターンと類似しており、ER β とは異なることが判明した。

3) ステロイド合成系

コレステロールからエストロジェン合成に至る系に関わる酵素群の遺伝子発現変化を解析した。その結果、Cyp17a1 (Pregnenolone \rightarrow 17- α -OH-Pregnenolone)、Hsd3b1 (Pregnenolone \rightarrow Progesterone)、Hsd17b1 (Estrone \rightarrow Estradiol)、Cyp19a1 (aromatase: Testosterone \rightarrow Estradiol) の 4 遺伝子の発

現パターンが ER β のパターンに類似していることが判明した。

4) LH/FSH 系

PND 21 では LHb、FSHa/LHa とともに下垂体での発現が、FSH receptor は卵巣での発現が成獣レベルに達していた。LH receptor、FSH receptor は発達に伴い卵巣での発現が経時的に上昇した。

5) Androgen receptor target

加藤茂明研究室（東京大学・分子生物学研究所）との Androgen receptor knockout (ARKO) mice に関する共同研究で、ARKO が早発卵巣不全を示すことが明らかとなり、その責任遺伝子の候補として KitL、Bmp15、Gdf9、HGF を抽出している。そこで、これらの遺伝子群の発現変化を調べたところ、Bmp15、Gdf9 の PND 21 卵巣での発現が成獣より高く、卵巣発達に伴い発現が経時的に上昇する ER β 型のパターンを示した。

6) “Estrogen” をキーワードに含む遺伝子群 27 々の遺伝子について発現変化を解析した。その結果、4 遺伝子が PND 21 で成獣レベルの発現を示し、発達に伴い発現上昇する ER β 型のパターンを示した。

7) DNA methyltransferase

この発達時期における DNA メチル化の重要性について示唆を得るために、DNA methyltransferase の発現変化パターンを調べた。その結果、メチル化パターンを維持する酵素である Dnmt1、酵素活性を持たないがメチル化パターン制御への関与が報告されている Dnmt3L の発現が PND 21 で成獣レベルを示し、発達に伴い上昇する ER β 型のパターンを示した。

8) Oncogene

このカテゴリーに属する遺伝子群は 116 ヶある。その中で 4 遺伝子が ER α もしくは ER β と類似したパターンを示した。ER α 型は Rab25、Vav3、ER β 型は Lmyc1、Mos であった。

9) Cyp

TCDD で発現が誘導される Cyp1b1、Cyp2s1 に加え、Cyp11a1 の発現が ER β と類似したパターンを示した。一方、Cyp1a1 の発現は低いままとどまった。

10) Nuclear receptor

このカテゴリーに属する 48 遺伝子群について発現変化を調べたところ、 α fetoprotein の発現を制御することが報告されている Nr5a2 に加え、PPAR α 、PPAR gamma の発現が ER β と類似したパターンを示した。

D. 結果まとめと考察

雌生殖器のうち、卵巣と子宮について生後発達に伴う遺伝子発現変化の網羅的解析を行い、データベース化した。生殖器機能へ関与する個々の遺伝子の発現を調べたところ、ER α 、ER β は各々異なる発現パターンを有し、ER α は発達初期から成獣レベルの発現を示す一方、ER β は初期は発現が低く、経時的に上昇するパターンを示すことが分かった。ER target gene の一つである Progesterone receptor (PR) は ER α と似た発現パターンを示したことから、PR の発現が ER α による制御を受け、ER β は関与しない可能性が示唆された。

また、他のカテゴリーに属する遺伝子群で ER β と類似したパターンを示すものが多く見出された。このことから、発達期の卵

巢では ER β と多くの卵巣機能遺伝子発現との間に何らかの関連が存在する可能性が示唆される。但し、卵胞の成熟に伴う顆粒膜細胞の相対的増加がこの変化の背景にあることが十分に考察される。何れにせよ、エストロゲン活性を有する化学物質による卵巣発達および卵巣機能に対する影響を考察する上で ER β の挙動が考慮すべき要点であることは間違いないと考えられる。

E. 結論

発達期の卵巣、子宮の遺伝子発現変化を網羅的に捉えたデータベースを構築することに成功した。遺伝子毎の解析により、発達期卵巣での ER β の発現と類似したパターンを示す遺伝子群が多数検出された。これはこの時期の卵巣に於ける ER β の重要性を示唆している可能性があり、ER β に作用する化学物質への注意を喚起するものである。但し、より確定的な解析には、*in situ* hybridization による発現部位（発現細胞）の確定が必須となる。本結果は確定試験開発を含む、本研究班の研究全体の推進に役立つものと期待される。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

Yuko Matsuhima, Osayuki Uchida, Minoru Saitoh, Yasushi Kawasaki, Kazuo Isama, Masaaki Kaniwa, Tohru Inoue, Jun kanno, Twenty-eight day repeated dose oral toxicity test of synergist of a pyrethroid insecticide, Bull Natl

Inst Health Sci (2003)121, 040-047

2) 学会発表

松島裕子、菅野 純；マウス周産期の低用量 DES 暴露が遅発性に雌性生殖器に及ぼす影響の検討、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会（東京）、平成 17 年 6 月（2005）

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、飼料中植物性エストロゲンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の percellome 手法を用いた解析、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会（東京）、平成 17 年 6 月（2005）

小川幸男、関田清司、北嶋 聡、松島裕子、山本雅也、斉藤 実、児玉幸夫、井上 達、菅野 純、ガルシニア抽出物の安全性に関する研究、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会（東京）、平成 17 年 6 月（2005）

菅野 純、五十嵐勝秀、松島裕子、相崎健一、中津則之、トキシコゲノミックスからのアプローチ、環境ホルモン評価法の進歩と情報の蓄積、環境ホルモン学会第 15 回公演会、-平成 17 年 6 月 2 日（2005）

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

特になし

14. 確定試験に関わる神経系形成・発達メカニズムに基づいた
内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析

分担研究者 高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨 本研究の目的は、EDCs の神経系形成・発達に対する作用を明らかにするための基盤支援研究を行うことである。EDCs は神経系、特に行動に対して持続的な影響を及ぼすことが報告されており、本研究班でも特に重視されている。一方で、EDCs が細胞、分子レベルでいかなる作用を及ぼして神経系形成・発達をかく乱し、行動に影響を及ぼすかについての研究は十分とは言えず、行動影響につながる作用メカニズムを分子レベルで説明することは困難な状況にある。そこで本研究テーマでは、神経系形成・発達において中心的な役割を果たす神経幹細胞を標的に据えた解析を行い、暴露により引き起こされる作用に関する分子レベルの情報を収集し、確定試験開発の基盤研究として役立てる。本年度は、昨年度開発に成功した神経幹細胞に対する影響を定量的に検討する系として、成熟胎児神経幹細胞の自己複製能に対する影響の定量系を用い、DES (Diethylstilbestrol)、BPA (Bisphenol A)、Thyroid hormone の作用を検討した。

A. 研究目的

EDCs の神経系形成・発達に対する作用を明らかにするための基盤支援研究を行うことが本研究の目的である。本研究では、具体的な生体内標的として、神経幹細胞を取り上げる。その理由は、齧歯類をモデルにした研究で、行動に持続的な影響が生じる暴露時期が胎児期および新生児期であることが示されていること、この時期は神経幹細胞が増殖、成熟し、ニューロンやグリアなどの神経系細胞を生み出す時期であり、神経幹細胞が生体内で特に重要な役割を果たしていることが明らかであるためである。実際、この時期に母親がストレスを受けるとグルココルチコイド等のホルモンの作用を介して神経系の

正常な発達が影響を受け、ストレス過敏反応などを始めとする成熟後の行動影響が現れることが多く報告されている。その際に神経幹細胞が影響を受けており、ストレスを受けると神経幹細胞の増殖が妨げられることも報告されている。すなわち、母親を取り巻く環境の胎児神経幹細胞を標的とした影響が、子の成熟後の行動影響として現れる可能性が指摘されている。

以上、EDCs が行動影響を示す胎児期、新生児期に標的となる細胞として、その時期の主役である神経幹細胞を取り上げる必要があると考え、本研究を進めている。

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）：自己複製能定量系>

マウス C57BL/6 妊娠 11.5 日または 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し単細胞化した後、培養系に移す。培養培地 (N2/DMEM/F12 (フェノールレッド不含の DMEM/F12 培地(シグマ社製品を主に使用)にインスリン、プロゲステロン、プトレッシン、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) を添加したものをを用い、96well plate (コーニング社低接着 plate) 1well 当たり 4000 個/100uL の密度から生細胞を播種する。7 日間培養し、単細胞から形成される細胞増殖塊（ニューロスフェア）の数を数え、播種細胞数に対してプロットした。

参考（前年度研究方法）

<マウス胎児神経幹細胞培養（ニューロスフェア培養）：分化能定量系>

培養により得られたニューロスフェアをランダムに選び、分化誘導物質として、牛胎児血清 (FBS) を 1% 加えた培養培地 (N2/DMEM/F12 前出) にマイクロピペットを用いて移した。培養容器は Nunc 社のチャンバースライド (8well/slide) を用い、ポリ-L-オルニチンおよびフィブロネクチンでコーティングし、ニューロスフェア細胞が容器に接着し分化しやすい条件とした。培養期間は 1 週間とし、培養終了後、4%ホルマリン/PBS(-)にて 15 分間固定した後、各細胞系に対するマーカーを用いて免疫染色し、1 々のニューロスフェアからニューロン（マーカー：MAP2）、アストロサイト（マ

ーカー：GFAP）、オリゴデンドロサイト（マーカー：O4）のどの細胞系が生じたかを測定した。各群 20 々のニューロスフェアを数え、ニューロンを N、アストロサイトを A、オリゴデンドロサイトを O と略し、3 系統に分化したニューロスフェアは NAO、というように表記し、割合を算出した。

<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、マウス抗 O4）、二次抗体 (FITC ラベル抗マウス IgG、Texas Red ラベル抗ラット IgG, AMCA ラベル抗マウス IgM) を用い、蛍光免疫染色した。

C. 研究結果

1) DES、BPA、Thyroid hormone の胎児成熟神経幹細胞自己複製能への影響検討

神経幹細胞の特性は、神経系細胞への多分化能と、それを保持したまま増殖する自己複製能の大きく 2 種類に分けられる。そこで、本研究ではこの 2 種類の特性に対する化学物質の影響を定量的に検討可能な試験系を開発し用いている。

本年度は、BPA の胎児成熟神経幹細胞の自己複製能への影響を主に検討した。この試験系は、無血清培地中、bFGF、EGF を共存させつつ浮遊培養すると、神経幹細胞が単一細胞から分裂を繰り返すことにより、顕微鏡下容易に計数可能な細胞凝集塊（ニューロスフェア）を形成することを利用した、ニューロスフェア培養系を基本とするものである。