

- A. Kashiwagi, K. Kashiwagi, H. Handa, H. Urushitani, N. Santo, O. Tooi and T. Iguchi: Development of metamorphosis assay using *Silurana tropicalis* for the detection of thyroid hormone disrupting chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, (in press).
18. Oka, T., N. Mitui, M. Hinago, M. Miyahara, T. Fujii, O. Tooi, N. Santo, H. Urushitani, T. Iguchi, Y. Hanaoka and H. Mikami: All ZZ male *Xenopus laevis* provides a clear sex reversal test for feminizing endocrine disruptors. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, (in press).
19. Watanabe, H. and T. Iguchi: Using ecotoxicogenomics to evaluate the impact of chemical on aquatic organisms. *Marine Biol.*, (in press).
20. Iguchi, T., H. Watanabe and Y. Katsu: Application of ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption in vertebrates and invertebrates. *Environ. Health Perspect.*, (in press).
21. Oda, S., N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita and T. Iguchi: Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. *Chemosphere*, (in press).
- © 22. Watanabe, H., E. Takahashi, M. Kobayashi, M. Goto and T. Iguchi: The estrogen-responsive adrenomedullin gene identified by DNA microarray analysis is directly regulated by estrogen receptor. *J. Mol. Endocr.*, (in press).
- © 23. Kato, H., T. Furuhashi, M. Tanaka, Y. Katsu, H. Watanabe, Y. Ohta and T. Iguchi: Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reprod. Toxicol.*, (in press).
24. Matsuno, T., N. Tominaga, K. Arizono, T. Iguchi and Y. Kohara: Graphical Gaussian modeling for gene association structures based on expression deviation patterns induced by various chemical stimuli. *ieice Trans. Inf. Syst.*, (in press).
- © 25. Inada, K., S. Hayashi, T. Iguchi and T. Sato: Establishment of a primary culture model of mouse uterine and vaginal stroma for studying *in vitro* estrogen effects. *Exp. Biol. Med.*, (in press).
26. Gunderson, M.P., S. Kohno, B. Blumberg, T. Iguchi and L.J. Guillette, Jr.: Up-regulation of an alligator Cyp3A gene by toxaphene and dexamethasone and its effect on plasma testosterone concentrations. *Aquat. Toxicol.*, (in press).
27. Katsu, Y., J. Myburgh, S. Kohno, G.E. Swan, L.J. Guillette Jr. and T. Iguchi: Molecular cloning of estrogen receptor α of the Nile crocodile. *Comp. Biochem. Physiol.*, (in press).
- © 28. Katsu, Y. and T. Iguchi: Tissue specific expression of *Clec2g* in mice. *Europ. J. Cell Biol.*, (in press).
29. 井口泰泉：環境ホルモン研究の新たな話題。医学のあゆみ, (印刷中).
- © 30. Grun, F., H. Watanabe, Z. Zamanian, L. Maeda, K. Arima, R. Chubacha, D.M. Gardiner, J. Kanno, T. Iguchi and B. Blumberg: Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol. Endocrinol.*, (submitted).

2. 学会発表

1. Oda, S. N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita, and T. Iguchi Genetic differences in production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. The SETAC North America 26th Annual Meeting Nov. 13-17, 2005. Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA.
2. Watanabe, H.: Ecotoxicogenomics. Annual Meeting and International Conference on Toxicogenomics-2005. Promising Next Generation Technology of Toxicogenomics in Drug and Food Safety, and Environmental Health. Oct. 30-Nov. 1, 2005, KIST, Korea.
3. Watanabe, H.: Toxicogenomics approach on endocrine disruptor issue. Toxicogenomics. Nov. 2-5, 2005, Hotel Tirol, Muju, Korea.
4. Watanabe, H. and Iguchi, T.: Tissue dependent effects of estrogenic chemicals estimated by gene expression profile. 9th ICEM Satellite meeting on toxicogenomics. Aug. 30-Sep. 2, 2005, Kauai, Hawaii
5. Iguchi, T. and Watanabe, H. Focused array for evaluation of estrogenic effect of chemicals on mice. 9th ICEM Satellite meeting on toxicogenomics. Aug. 30-Sep. 2, 2005, Kauai, Hawaii
6. Iguchi, T.: Current progress of research on endocrine disrupting chemicals-Possible mechanism of chemicals on developing animals. IWA International Conference, Tsukuba, July 14-16, 2005.
7. Iguchi, T.: Recent progress of endocrine disrupting chemical issues in Japan. JST China-Japan Collaborative Work, May 31, 2005, Tokyo.
8. Iguchi, T.: Recent progress of endocrine disrupting chemical issues in Japan and application of ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption in vertebrates and invertebrates. Nanjing Medical University, Oct. 26, 2005, China.
9. Iguchi, T.: Persistent gene expression in mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. Nanjing Medical University. Oct. 26, 2005, China.
10. Watanabe, H.: Evaluation of chemical contaminants by gene expression profiling of *Daphnia magna*. SETAC, May, 2005,
11. 井口泰泉: 内分泌かく乱物質の作用メカニズム. 鳥取大学 まなびびあ鳥取、10月9日、2005.
12. 井口泰泉: 内分泌かく乱物質(環境ホルモン)研究の進展と今後の取り組み. 信州大学工学部, 2005年10月21日, 長野.
13. Guillette, L.J. Jr. and Iguchi, T.: Sex determination in reptiles: genes, hormones and environmental contaminants. 15th International Congress of Comparative Endocrinology, Boston, May 22-27, 2005, USA.
14. Watanabe, H. Evaluation of estrogenic chemicals by gene expression profile. The endocrine society's 87th annual meeting (ENDO2005), Jun. 4-7, 2005, San Diego Endocrine Society
15. Sato, T. Differential expression of BMP2, BMP4 and growth factors in uterus and vagina of neonatal mice. The endocrine

society's 87th annual meeting (ENDO2005),
Jun. 4-7, 2005, San Diego

H. 知的所有権の取得状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ヒト骨芽細胞に対する内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

分担研究者：笹野 公伸 東北大学大学院 医学系研究科 医科学専攻
病理病態学講座 病理診断学分野 教授

研究要旨

本研究ではエストロゲン様化合物のヒト骨芽細胞（株化培養細胞）に対する影響を遺伝子レベルで検討した。培養細胞は正常ヒト骨芽細胞 hFOB を対象とし、細胞増殖について Estradiol (E2)、bisphenol A (BPA)、genistein (GEN)、diethylstilbestrol (DES) の影響を検索した。さらにマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。結果、BPA は hFOB の増殖を促したが、逆に DES は細胞死を起こし、GEN は hFOB の細胞増殖に影響を与えなかった。遺伝子発現では BPA と E2 が比較的類似した発現プロファイルを示した。ヒト骨芽細胞の細胞増殖、細胞死に対して種々の内分泌かく乱物質の与える影響を検討する本研究では内分泌かく乱化学物質がヒト成人骨組織に影響を及ぼすことを示唆するものであった。又その影響は内分泌かく乱化学物質によって質的な差を示した。

A. 研究目的

本研究ではエストロゲン様化合物の骨芽細胞（株化培養細胞）に対する影響を遺伝子レベルで検討した。

すなわち、ヒト骨組織は種々の性ステロイドホルモンの標的組織であり、内分泌かく乱化学物質の影響も強く受けると考えられるが、ヒト骨組織に対しての影響を詳細に検討した報告はない。そこで本研究ではヒト骨芽細胞を用いて代表的なエストロゲン様作用を有するとされる bisphenol A (BPA)、genistein (GEN)、diethylstilbestrol (DES) の影響を確認して、代表的な性ステロイド標的組織である骨組織に対しての内分泌かく乱物質の影響を検討する第一歩とした。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト骨芽細胞のモデルとして

株化細胞を使用した。ヒト病理組織及び実験動物を使用していないため、学内の倫理委員会の承認を必要としなかった。

B. 研究方法

ヒト骨芽細胞 hFOB を対象とし、細胞増殖について Estradiol (E2)、bisphenol A (BPA)、genistein (GEN)、diethylstilbestrol (DES) の影響を検索した。さらにマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。

すなわち、以下の方法で実験を進めた。

Chemicals

Estradiol 、 diethylstilbestrol 、 dexamethason、RU38, 486、diclofenac (以上、Sigma-Aldrich Co.)、genistein、bisphenol A (以上、和光純薬工業株式会社)、ICI 182, 780

(Tocris Cookson, Inc.)。

Human osteoblast

hFOB 1.19 [ATCC, CRL-11372, transfected with T large antigen; established by Harris SA *et al.* (1995, *J Bone Miner Res*)] を使用した。

Cell proliferation assay

細胞増殖の判定には Cell Counting Kit-8 (株式会社同仁化学研究所) を使用した。

Apoptosis assays

アポトーシスの判定には Hoechst33258 染色を行い、DNA ラダーの検出には Apoptosis Ladder Detection Kit (和光純薬工業株式会社) を用いた。

Microarray analysis

マイクロアレイを用いた解析は、五十嵐班員との共同研究で行った。RNA の抽出からデータの数値化までは五十嵐班員の下で行われた。GeneChip Human Genome 133 ver. 2.0 (Affymetrix, Inc.) を用い、各薬物の添加によって2倍以上増加した遺伝子群について、さらに、クラスター解析 (Cluster System & TreeView; Stanford University) を行った。

定量的 PCR

LightCycler System (Roche Diagnostics, GmbH) を使用した。得られた値は同サンプルのインターナルコントロール (RPL13A) の発現で補正した。

C. 研究結果

BPA は hFOB の増殖を促したが、逆に DES は細胞死を起こし、GEN は hFOB に影響を与えなかった。遺伝子発現では BPA と E2 が比較的類似した発現プロファイルを示した。

すなわち、今回用いた hFOB は、estrogen receptor (ER)

progesteron receptor が発現しており、各化合物の 72 時間添加では、E2 ($10^{-8}M$) の添加により細胞数が増加し、BPA (10^{-7} ~ $10^{-5}M$) の投与でも細胞数は増加したが、DES (10^{-8} ~ $10^{-6}M$) の添加では細胞数は減少し、GEN (10^{-7} ~ $10^{-6}M$) の添加は細胞数に影響しなかった。マイクロアレイ/クラスター解析の結果では、増殖を認めた E2 ($10^{-8}M$) と BPA ($10^{-7}M$) の添加時の遺伝子発現プロファイルが類似した。

1. bisphenol A の影響

hFOB への BPA ($10^{-7}M$) 添加について、骨芽細胞のマーカーである alkaline phosphatase (ALP) mRNA の変動を経時的 (24, 48, 72 時間) に定量的 PCR で確認したところ、24 時間添加から既に有意な増加を示した。

マイクロアレイの結果から、変動が大きかった遺伝子の中に、RAS family に関連する遺伝子が 5 つ含まれた [RAB40C (RAS oncogene family), RAB39 (RAS oncogene family), RHEBL (RAS homolog enriched in brain like 1), RIN3 (RAS and RAB interact 3), RHEB (RAS homolog enriched in brain)]。さらに collagen type13 も増加した。これらのうち RAB40C, RAB39, RHEB は E2 添加でも 2 倍以上の変動を認めた (定量的 PCR による確認を実施中)。

2. diethylstilbestrol の影響

DES (10^{-8} ~ $10^{-6}M$) の影響を経時的 (2, 4, 8, 12, 24hr) に確認した。 $10^{-8}M$ では 24hr で有意な細胞数の減少を認めた。 $10^{-7}M$ では 8hr から有意な減少を認めた。 $10^{-6}M$ では 2hr から細胞死が認められ、8hr 以降、ほとんどの細胞が死んでしまい、測定できなかった。DES 添加後 ($10^{-7}M$, 2, 4, 8, 12, 24hr) の細胞から DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、添加 4 時間後から DNA ラダー像が検出できた。同様に骨芽細胞にアポトーシスを

起こすことが知られている dexamethason (Dex; 10^{-7}M) でも DNA ラダー像が確認できたが、GEN (10^{-5}M) や BPA (10^{-5}M) では変化がなかった。さらに Dex による AP は GR blocker (RU386) で抑制できたが、DES による AP は RU386 と同様に ER blocker (ICI) でも抑制できなかった。

マクロアレイの結果ではアポトーシスに関連が深い GDF15/NAG-1 の発現に注目し、定量的 PCR にて確認を行った。DES の添加 4 時間後から GDF15 mRNA の増加が認められた。GDF15 の強力な誘導剤の diclofenac (10^{-6}M) でも同様の変化が認められた。

D. 考 察

近年、内分泌かく乱化学物質の骨組織への影響は魚類や爬虫類で注目されつつある。(Suzuki and Hattori, 2003, *Life Sci*; Lind et al., 2004, *Environ Health Perspect*) さらに、Tsukamoto ら (2004, *Biochem Pharmacol*) はトリブチルスズ化合物の添加によってマウス胎児の骨形成が妨げられることを示している。このことはヒトを含めたほ乳類の骨組織に内分泌かく乱化学物質が影響を及ぼす可能性を示唆している。

今回の研究においては、BPA は比較的低濃度 (100nM) から骨芽細胞に増殖刺激が認められた。BPA のエストロゲン受容体に対する親和性は低く、estrogenic な作用を引き起こすには高い濃度で (IC50: 約 10^{-5} - 10^{-6}M) の暴露が必要である (Nagel et al., 1997, *Environ Health Perspect*; Kuiper et al. 1997, *Endocrinology*; Blair et al., 2000, *Toxicol Sci*; Sheeler et al., 2000, *Environ Health Perspect*)。従って、今回の BPA の影響は受容体を介さない可能性が示唆され、実際、ER・の agonist の性質も持つ (Kuiper et al. 1997, *Endocrinology*) GEN では hFOB に対する作用が

まったく認められなかったことも、受容体非依存的な作用を示唆する所見である。BPA の影響と ER の関係についてはさらなる検討を実施中である。

今回、Ras oncogen family, Rab とその関連遺伝子の発現が BPA の添加によって増加した。Ras 遺伝子は cell cycle control に関与することで良く知られておるが、RAB については、vesicle transport に関係することが報告されている以外、正常、病態組織での意義は不明である (Review in Oxford & Theodorescu, 2003, *Cancer Lett*; Wennerberg et al., 2005, *J Cell Sci*) ため、骨芽細胞数の増加との関係は今後の検討課題として考えられる。また、BPA は骨芽細胞の増殖に関連することが知られている collagen type13 (Ylönen et al., 2005, *J Bone Miner Res*) の発現を増加させ、増殖刺激を促しているとし唆された。

一方、DES 添加ではアポトーシスを示したが、これも受容体非依存的な作用であった。この時、非ステロイド抗炎症剤 (NSAIDs) の Diclofenac と同様に GDF15/NAG-1 を介した経路が関係すると示唆された。GDF15/NAG-1, Growth Differentiation Factor 15/Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-activated Gene-1 は、NSAIDs によって誘導され、種々細胞にアポトーシスを起こすことが報告されている (Kim et al., 2002, *Gastroenterology*; Wilson et al., 2003, *Int J Cancer*; Jung et al., 2004, *Carcinogenesis*)。

内分泌かく乱化学物質のヒト骨組織での健康被害の報告例は無いが、過去には DES に暴露した子供に骨格成長の促進がみられ (Wattenhall et al., 1975, *J Pediatr*)、同様にエストロゲン・クリーム (Estradiol K; 製品に関する詳細は不明) を使用していた妊婦の男児に女性化乳房がみられ、同時に骨格

成長が促進したとも報告されている (Felner and White, 2000, *Pediatrics*)。すなわちヒト骨格系への影響は、種々のホルモンが関与しており、これらの結果が必ずしも骨細胞への直接影響を示す訳では無い。今回の研究では、エストロゲン様化合物が直接骨芽細胞に影響を与えることを示した。また、同じエストロゲン様化合物に分類されているものでも、骨芽細胞に対しては全く異なる作用を介した影響を与えることが確認できた。

E. 結論

ヒト骨芽細胞の細胞増殖、細胞死に対して種々の内分泌かく乱物質の与える影響を検討する本研究では内分泌かく乱化学物質がヒト骨組織に影響を及ぼすことを示唆するものであった。又その影響は化合物によって質的な差を示した。

内分泌かく乱化学物質は胎児組織、生殖器系(生殖能)、神経系に対しては重要な影響をおこす事が報告され、その健康被害に注目されている。同じく重要な性ステロイド標的組織である成人、胎児、小児の骨組織に対する影響は、他種の生物への影響から推測されているが、科学的な検証は殆ど行われていない。今回の研究では内分泌かく乱物質のヒト骨芽細胞に対しての影響の一部を明らかにすることができたが、今後、さらなるメカニズムについて詳細な検討が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1.Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, **Sasano H**, Mizuguchi H, Asano T, Oka Y.

Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 326:402-409.2005

2.Zhou J, Suzuki T, Kovacic A, Saito R, Miki Y, Ishida T, Moriya T, Simpson ER, **Sasano H**, Clyne CD. Interactions between prostaglandin E(2), liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer Research*:65:657-663. 2005

◎3.Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Blumberg B, **Sasano H**. Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology* 231:75-85. 2005

4.Cunat S, Rabenoelina F, Daures JP, Katsaros D, **Sasano H**, Miller WR, Maudelonde T, Pujol P. Aromatase expression in ovarian epithelial cancers. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.93:15-24.2005

5.Abd-Elaziz M, Moriya T, Akahira J, Nakamura Y, Suzuki T, **Sasano H**. Immunolocalization of nuclear transcription factors, DAX-1 and Ad4BP/SF-1, in human common epithelial ovarian tumors: correlations with StAR and steroidogenic enzymes in epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*. 24:153-63.2005

6.Nakamura Y, Suzuki T, Nakabayashi M, Endoh M, Sakamoto K, Mikami Y, Moriya T, Ito A, Takahashi S, Yamada S, Arai Y, **Sasano H**. In situ androgen producing enzymes in human prostate cancer. *Endocrine Related Cancer*. 2005 12:101-107.2005

◎7.Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Ishizuka M, Semba S, Gorai I, **Sasano H**. Analysis of gene expression induced by diethylstilbestrol (DES)

- in human primitive Mullerian duct cells using microarray. *Cancer Letters*.220:197-210.2005
8. Abd-Elaziz M, Moriya T, Akahira J, Nakamura Y, Suzuki T, **Sasano H**. Immunolocalization of nuclear transcription factors, DAX-1 and Ad4BP/SF-1, in human common epithelial ovarian tumors: correlations with StAR and steroidogenic enzymes in epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*.24:153-63.2005
 9. Abd-Elaziz M, Moriya T, Akahira J, Suzuki T, **Sasano H**. StAR and progesterone producing enzymes (3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cholesterol side-chain cleavage cytochromes P450) in human epithelial ovarian carcinoma: immunohistochemical and real-time PCR studies. *Cancer Science*.96:232-239. 2005
 10. Nakamura Y, Suzuki T, Inoue T, Tazawa C, Ono K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, **Sasano H**. Progesterone receptor subtypes in vascular smooth muscle cells of human aorta. *Endocrine Journal*.52:245-252.2005
 11. Seely J, Amigh KS, Suzuki T, Mayhew B, **Sasano H**, Giguere V, Laganieri J, Carr BR, Rainey WE. Transcriptional regulation of Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase (SULT2A1) by Estrogen-Related Receptor {alpha} (ERR{alpha}). *Endocrinology*. 146: 3605-3613.2005
 12. Fukuda T, Takahashi K, Suzuki T, Saruta M, Watanabe M, Nakata T, **Sasano H**. Urocortin 1, Urocortin 3/Stresscopin and Corticotropin-Releasing Factor Receptors in Human Adrenal and Its Disorders. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 90:4671-4678.2005
 13. Kariya Y, Moriya T, Suzuki T, Chiba M, Ishida K, Takeyama J, Endoh M, Watanabe M, **Sasano H**. Sex steroid hormone receptors in human skin appendage and its neoplasms. *Endocrine Journal*.52:317-325.2005
 14. **Sasano H**, Anderson TJ, Silverberg SG, Santen RJ, Conway M, Edwards DP, Krause A, Bhatnagar AS, Evans DB, Miller WR. The validation of new aromatase monoclonal antibodies for immunohistochemistry-A correlation with biochemical activities in 46 cases of breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 95:35-39.2005
 - ©15. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Niikawa H, Lu L, Miki Y, Moriya T, Hayashi S, Handa M, Kondo T, **Sasano H**. Progesterone receptor in non-small cell lung cancer--a potent prognostic factor and possible target for endocrine therapy. *Cancer Research*.65:6450-6458.2005
 16. Takahashi K, Totsune K, Saruta M, Fukuda T, Suzuki T, Hirose T, Imai Y, **Sasano H**, Murakami O. Expression of urocortin 3/stresscopin in human adrenal glands and adrenal tumors. *Peptides*. [Epub ahead of print] 2005
 17. Fukushima K, Funayama Y, Yonezawa H, Takahashi K, Haneda S, Suzuki T, **Sasano H**, Naito H, Shibata C, Krozowski ZS, Sasaki I. Aldosterone enhances 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in colonic epithelial cells in vivo. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*.40:850-857.2005
 18. Sakuma M, Akahira JI, Suzuki T, Inoue S, Ito K, Moriya T, **Sasano H**, Okamura K, Yaegashi N. Expression of estrogen-responsive finger protein (Efp) is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. [Epub ahead of print]

2005

©19.Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, Sasano H, Inoue S. Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clinical Cancer Research*.11:6148-6154.2005

©20.Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Nakata T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H. Estrogen Inhibits Cell Proliferation through In situ Production in Human Thymoma. *Clinical Cancer Research*. 11:6495-6504.2005

21.Takahashi K, Arihara Z, Suzuki T, Sone M, Kikuchi K, Sasano H, Murakami O, Totsune K. Expression of orexin-A and orexin receptors in the kidney and the presence of orexin-A-like immunoreactivity in human urine. *Peptides*. [Epub ahead of print] 2005

22.Saito S, Ito K, Suzuki T, Utsunomiya H, Akahira J, Sugihashi Y, Niikura H, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H. Orphan nuclear receptor DAX-1 in human endometrium and its disorders. *Cancer Science*.96:645-652.2005

23.Ito K, Suzuki T, Akahira J, Sakuma M, Saitou S, Okamoto S, Niikura H, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H, Inoue S. 14-3-3 $\{\sigma\}$ in Endometrial Cancer-A Possible Prognostic Marker in Early-Stage Cancer. *Clinical Cancer Research*.11:7384-7391.2005

2. 学会発表

(英文)

1.Aromatase Antibodies

H Sasano

The Third Gleneagles Conference on Endocrine Therapy in Breast Cancer
Gleneagles July 21-24 2005

©2.17beta-HSD in human breast and endometrial carcinoma **H Sasano**

Workshop on 11beta and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases:role in human disease Germany
May 9-11 2005
(邦文)

©3. ヒト骨芽細胞におけるアロマターゼ阻害剤の影響

三木康宏、鈴木貴、五十嵐勝秀、菅野純、笹野公伸

第13回日本ステロイドホルモン学会名古屋
2005. 11. 12

©4. 子宮内膜癌局所での性ステロイド代謝機構の検討：新たな内分泌治療の可能性

伊藤潔、鈴木貴、宇都宮裕貴、田村充利、永瀬智、新倉仁、林慎一、笹野公伸、八重樫伸生

第64回日本癌学会学術総会 札幌
2005. 9. 14-16

©5. アロマターゼの基礎と臨床

笹野公伸

第6回臨床腫瘍夏期セミナー 東京
2005. 7. 28-29

6. ヒト乳癌組織細胞及び周囲間質細胞におけるaromataseの発現

三木康宏、田澤智香、小野克彦、鈴木貴、笹野公伸

第6回ホルモンと癌研究会 名古屋
2005. 7. 15-16

7. 子宮内膜癌におけるPeroxisome

Proliferator-activated Receptor γ についての検討

太田恭子、伊藤潔、鈴木貴、斎藤純香、林慎一、笹野公伸、八重樫伸生

第6回ホルモンと癌研究会 名古屋
2005. 7. 15-16

8. 子宮類内膜腺癌における核内転写因子

DAX-1の発現に関する検討

- 齋藤純香、伊藤潔、鈴木貴、八重樫伸生、
笹野公伸
第6回ホルモンと癌研究会 名古屋
2005. 7. 15-16
- ◎9. 腫瘍内ホルモン代謝酵素－
EndocrinologyからIntracrinologyへの概
念の転換－
笹野公伸、三木康宏、中村保宏、鈴木貴
第6回ホルモンと癌研究会 名古屋
2005. 7. 15-16
10. 乳癌における局所ホルモン環境
-Intracrinology-
笹野公伸
第13回日本乳癌学会総会 倉敷
2005. 6. 10-11
11. 子宮内膜腺癌におけるPRA, PRBの発現と予
後に関する検討
齋藤純香、伊藤潔、鈴木貴、岡村州博、
八重樫伸生、笹野公伸
第10回日本内分泌学会東北地方会 仙台
2005. 4. 23
12. ヒト全身組織における17 β
-hydroxysteroid dehydrogenase type 12の
発現
三木康宏、櫻井信行、鈴木寿恵、
佐々木亜由美、鈴木貴、笹野公伸
第10回日本内分泌学会東北地方会 仙台
2005. 4. 23
13. ヒト非小細胞肺癌におけるプロゲステロ
ン受容体の発現意義
鈴木貴、石橋洋則、鈴木聡、森谷卓也、
林慎一、近藤丘、笹野公伸
第10回日本内分泌学会東北地方会 仙台
2005. 4. 23
14. 腺粘液性腫瘍における局所内分泌環境：免
疫組織学的検討
石田和之、森谷卓也、砂村眞琴、中村保宏、
鈴木貴、笹野公伸
- 第94回日本病理学会総会 横浜
2005. 4. 14-16
15. ヒト非小細胞肺癌におけるプロゲステロ
ン受容体の発現意義
鈴木貴、石橋洋則、鈴木聡、森谷卓也、
林慎一、近藤丘、笹野公伸
第94回日本病理学会総会 横浜
2005. 4. 14-16
16. 各種症候群における副腎腫瘍の病理
笹野公伸
第94回日本病理学会総会 横浜
2005. 4. 14-16
- H. 知的所有権の取得状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

低用量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 廣川 勝昱 東京医科歯科大学名誉教授

研究要旨

低用量の Bisphenol-A (BPA) を含む飲料水を妊娠マウス (7~14 日間) に自由摂取させ、胎仔への影響を見た。①子宮内死亡する胎仔が有意に増加した。②胎仔胸腺内の T リンパ球の増殖と分化が抑制された。③胸腺ストローマのみを分離し DNA アレイ法により BPA の影響を見た。その結果、BPA を投与された母マウスの胎仔胸腺のストローマでは、約 200 の遺伝子の発現が増強し、約 100 の遺伝子の発現の低下が認められた。④遺伝子発現の低下したものの中には、Notch-1 リガンドなどの胸腺リンパ球の増殖分化に関連する複数の遺伝子が含まれていた。⑤増強したものの中には、ER・などの複数のホルモン受容体が含まれていた。以上の結果から、母マウスに投与された低用量の BPA が胎盤を経て胎仔胸腺の発達に影響することが明らかになった。

A. 研究目的

(要約) 低用量の Bisphenol-A を妊娠マウスに投与し、胎仔免疫系に及ぼす影響を胸腺リンパ球の増殖分化の観点から明らかにする。

免疫系は感染に対する生体防御機能に加えて、神経系、内分泌系と緊密に連携しながら生体の内部環境のホメオスタシスに重要な役割を果たしている。即ち、免疫系の主役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、各種の神経伝達物質やホルモンの受容体を持ち、また各種の伝達物質やホルモンそのものを作り、神経系、内分泌系と共同作業をしている。従って、環境にある内分泌かく乱物質 (EDCs) が生体内に入れば、内分泌系をかく乱するだけでなく、免疫系の機能に影響する事は必至である。

今まで、アダルトマウスを用いての *in vivo* における EDCs の免疫系への影響、胎仔胸腺を用いた *in vitro* における EDCs

の影響を見てきたが、いずれの場合も極めて低用量で免疫系に大きな影響を及ぼすことを明らかにしてきた。今回の実験系では、低用量 EDCs の胎仔胸腺への影響を *in vivo* で見ることを目的とした。

B. 研究方法

(要約) 胎盤を経た低用量 BPA の胎仔の成長に与える影響、及び胸腺ストローマの遺伝子発現への影響を DNA アレイ法で検討した。

1. 動物：妊娠 7 日目の C57BL/6 雌マウスを購入し、実験に用いた。
2. 内分泌かく乱化学物質：Bisphenol-A (BPA, Wako:025-13541) を用いた。
3. BPA の経口投与：BPA をエチルアルコールに溶解後、アルコール 0.01% の水溶液とし、BPA 濃度が $2.5 \cdot \cdot \text{g/ml}$ の投与群と BPA を含まないアルコール 0.01% 水溶液投与のコントロール群との 2 群とし、給水瓶より自由摂取させ

た。

4. 15 日齢の胎仔胸腺を摘出しポアサイズ 8・m のフィルター上に置き、フィルターを 1.35mM デオキシグアノシン含有細胞液培養液上に浮かせ、7.5%CO₂ 存在下で 7 日間培養し胸腺リンパ球を除去し、ストローマのみにした。そのストローマを用いて、RNA を調整し、DNA アレイ (FANTOM、旭テクノグラス) 解析を行い、遺伝子発現の変動を見た。

C. 研究結果

(要約) 低用量の BPA が、子宮内死亡胎仔を増加させた。また、胎仔胸腺のストローマの遺伝子発現を大きく変動させた。

実験 A：妊娠 7 日目より 15 日目まで母マウスに BPA を含む飲料水を摂取させ、15 日目に胎仔を取り出し、BPA の影響をみた。

1. 子宮内胎仔死亡が BPA 摂取群で有意に増加した。
2. 胎仔胸腺内細胞数が BPA 摂取群で有意に減少した。
3. CD4⁻CD8⁻CD44⁺CD25⁻ (DN1) の未熟胸腺細胞の割合が BPA 摂取群で高くなった。

実験 B: 15 日目の胎仔胸腺からストローマ部分を分離し、RNA を調整して、DNA アレイにより遺伝子発現の増減を見た。

1. コントロール群と比べて、BPA 投与群で発現増加が見られた遺伝子が約 200 個、逆に発現低下した遺伝子が 100 個見られた。
2. 発現の低下した遺伝子の中には、Notch-1 リガンド、Glia maturation factor、Thymic stromal-derived lymphopoietin, receptor などの胸腺リンパ球の増殖分化に関わるものが含まれていた。
3. 発現の増強した遺伝子の中には、Estrogen Receptor、ACTH-R、TSH-R、TRH-R などがあり、胸腺ストローマが

内分泌系と深く関わっていることが示された。

4. 以上より、胎盤を経た低用量の BPA が胸腺ストローマの遺伝子発現に影響し、胎仔胸腺内の T 細胞増殖分化に影響を与えることが明らかになった。

実験 C: 低用量 BPA の免疫系への影響を長期的に追跡するため、妊娠 7 日目から離乳までの 5 週間、BPA を母体経由で摂取させたマウス現在飼育中である。離乳後も母マウスと同様に BPA を含む飲料水を自由摂取させ、低用量の BPA の長期的影響を見ることになっている。

D. 考察

低用量の BPA 摂取による子宮内胎仔死亡については昨年報告したが、飲料水中のアルコールが 1%であったため、アルコールの影響を除外できなかった。今年度はアルコール濃度を 0.01%の 100 分の 1 に減らして実験を行った。その結果、子宮内胎仔死亡は BPA を含んだ飲料水の摂取した群では、14 / 71 (19.7%) であったが、コントロールでは 0 / 70 (0%) となり、母マウスへの低濃度の BPA 投与が胎仔死亡を起こすことが明らかになった。

免疫系形成の要となる胎仔胸腺について見ると、胸腺内リンパ球の減少があり、増殖が抑制されていることが明らかになった。また、T リンパ球の分化度を見ると、最も未熟な段階にあるものが多く、分化の抑制もあることが確認された。

胸腺内における T 細胞の増殖・分化はリンパ球と胸腺ストローマの相互作用に依存している。BPA リンパ球への影響は *in vitro* の実験で既に確認した。今回は BPA の胸腺ストローマへの影響を見るために、胎仔胸腺よりストローマを分離し、BPA の影響を見た。

DNA アレイ法で、BPA に暴露されたストローマをコントロールと比べることによ

り、実に多くの遺伝子の変動のあることが分かった。

胎仔期の胸腺ストローマを用いて、PCR法で見ると、多くのホルモン受容体の発現が検出される。それらはGH、PRL、ACTH、TSHなどの下垂体ホルモンに対する受容体、アンドロゲン、エストロゲンプロゲステロンなどの性ステロイドに対する受容体、CRF、TRHなどの視床下部から放出される因子に対する受容体、グルココルチコイドに対する受容体、及び、甲状腺ホルモンに対する受容体などである。

胎仔期に低用量のBPAの暴露されると、これらの各種ホルモン受容体の発現も大きく変動した。興味あることは、エストロゲン・R、ACTH-R、TSH-R及びTRH-Rなどの発現が増強したことである。これらの遺伝子発現の変動がどのような意味を持つかについては今後の解析が必要である。

胎仔期から新生仔期にBPAに暴露されると、免疫系の中樞である胸腺に大きな影響を与えることがわかった。問題は、長期的に見た場合、これらの影響がどの程度、残るかどかであり、この点も今後の検討課題となった。

E. 結論

(要約) 低用量 BPA が子宮内胎仔死亡をもたらす、又胎仔胸腺ストローマの遺伝子発現に大きな変動を起こす事がわかった。

1. 妊娠マウスに低用量の BPA を含む飲料水を摂取させると、子宮内胎仔死亡が起こる。
2. 胎盤を経た低用量 BPA は胎仔胸腺に作用し、胸腺リンパ球の増殖の抑制と分化の抑制をもたらす。
3. 胎盤を経た低用量 BPA は胸腺ストローマに作用し、胸腺リンパ球の増殖分化に関連する複数分子の遺伝子発現を低下させる。

4. 胎盤を経た低用量 BPA は胸腺ストローマに作用し、複数のホルモン受容体の遺伝子発現を増強させる。

G. 研究発表

1. 廣川勝彦、宇津山正典。低用量内分泌かく乱物質の免疫系に及ぼす影響について (分担)。高次生命系と内分泌攪乱化学物質—生体影響の分子機構— (井口、井上編) シュプリンガー出版 2005
2. Tsunemi A, Utsuyama M, Seidler B. K. H, Kobayashi S and Hirokawa K Age-related decline of brain monoamines in mice is reversed to young level by Japanese herbal medicine. *Neurochem. Res.* 30:75-81. 2005
3. Kitagawa M, Utsuyama M, Kurata M, Yamamoto K, Yuasa Y, Ishikawa Y, Arai T and Hirokawa K. Cancer and aging: symposium of the 27th annual meeting of the Japanese society for biomedical gerontology, Tokyo Cancer Immunol. Immunother. 54:623-34. 2005
4. Mukai K, Matsuoka K, Taya C, Suzuki H, Yokozeki H, Nishioka K, Hirokawa K, Etori M, Yamashita M, Kubota T, Minegishi Y, Yonekawa H and Hajime K. Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity* 23:191-202, 2005.
5. Hasegawa M, Yamaguchi S, Aizawa S, Ikeda H, Tatsumi K, Noda Y, Hirokawa K and Kitagawa M. Resistance against Friend leukemia virus-induced leukemogenesis in DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)-deficient scid mice associated with defective viral integration at the Spi-1 and Fli-1 site. *Leuk Res.* 29:933-42,

2005

6. Fulop T, Larbi A, Wikby A, Mocchegiani E, Hiroakwa K and Pawelec G. Dysregulation of T-cell function in the elderly: scientific basis and clinical implications. *Drugs Aging*. 22:589-603, 2005
7. Abe S, Yamamoto K, Hasegawa M, Inoue M, Kurata M, Hirokawa K, Kitagawa M, Nakagawa Y and Suzuki K. Bone marrow cells of myelodysplastic syndromes exhibit significant expression of apollon, livin and ILP-2 with reduction after transformation to overt leukemia. *Leuk Res*. 29:1095-6, 2005
8. Yamaguchi S, Hasegawa M, Aizawa S, Tanaka K, Yoshida K, Noda Y, Tatsumi K, Hirokawa K and Kitagawa M. DNA-dependent protein kinase enhances DNA damage-induced apoptosis in association with Friend gp70. *Leuk Res*. 29:307-16. 2005

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究

分担研究者 山崎聖美 国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部 主任研究員

研究要旨

内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌かく乱物質のアレルギーや化学物質過敏症との関連も危惧されている。そこで、内分泌かく乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関して研究することを目的として、マクロファージの持つ機能の一つである遊走能への影響について調べた。その結果、マクロファージの遊走能は、BPA、アルキルフェノール化合物類とフタル酸エステル化合物類で変化した。以上の結果から、内分泌かく乱物質が免疫機能に影響を与えていることが示唆された。

A. 研究目的

内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌かく乱物質の免疫系への影響も危惧されている。すなわち、内分泌かく乱物質が内分泌系のみならず免疫機能へも何らかの影響を及ぼしている可能性がある。マクロファージはすべての動物に分布し、多様な機能を有する。そこで本年度は、内分泌かく乱物質がマクロファージの持つ機能の一つである遊走能への影響について調べた。さらに、細胞傷害作用にかかわる TNF α 産生についても調べた。

B. 研究方法

マクロファージ遊走能は、マウスマクロファージ様培養細胞 RAW264.7 を用い、96 穴ケモタキシスチャンバーを使用して測定した。

TNF α は ELISA により測定した。

用いた内分泌かく乱物質は、ノニルフ

エノール (NP)、ビスフェノール A (BPA)、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)、フタル酸ジエチル (DEP)、フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジシクロヘキシル (DCHP) である。

C. 研究結果

NP では 10^{-3}M ~ 10^{-4}M の濃度で遊走能が減少した。それよりもうすい濃度では、 10^{-11}M ~ 10^{-13}M で増加する傾向が見られた。TNF α は 10^{-4}M ~ 10^{-5}M 、 10^{-10}M で増加した。

BBP は 10^{-10}M 、 10^{-12} ~ 10^{-13}M の濃度では有意に遊走能が増加した。TNF α は 10^{-3}M ~ 10^{-4}M 、 10^{-8}M 、 10^{-12}M で増加した。DBP は 10^{-3} ~ 10^{-7}M 、 10^{-10} ~ 10^{-11}M 、 10^{-13} ~ 10^{-14}M で増加した。TNF α は 10^{-3} ~ 10^{-12}M で増加した。DCHP は 10^{-7}M 、 10^{-11}M で遊走能が増加した。TNF α は 10^{-3} ~ 10^{-13}M で増加した。DEHP は、 10^{-8}M 、 10^{-11} ~ 10^{-12}M の濃度では遊走能が増加した。TNF α は 10^{-3} ~ 10^{-12}M で増加した。DEP は、 10^{-12} ~ 10^{-13}M で増加

した。TNF α は 10^{-8} M、 10^{-11} ~ 10^{-13} Mで増加した。

BPAでは 10^{-5} ~ 10^{-7} M、 10^{-10} ~ 10^{-13} Mの濃度では有意に遊走能が増加した。TNF α は 10^{-3} M~ 10^{-4} M、 10^{-8} M~ 10^{-9} M、 10^{-12} Mで増加した。

D. 考察

マクロファージは自然免疫を担う細胞の1つであり、多数の表面レセプターによって異物を認識し、迅速に貪食、排除を行うとともに、炎症性サイトカインを産生する。この機構は、免疫系の中でも最も原始的なものであり、高等生物のみならず生物が広く持っているシステムである。感染防御機構において、自然免疫は感染早期の防御機構のみならず、適応免疫のTh1/Th2細胞への分化を決定する大きな要因となる。

本研究では、内分泌かく乱物質のマクロファージの活性化に対する影響を調べることを目的とし、マクロファージの遊走能について調べた。その結果、高濃度の内分泌かく乱物質はマクロファージの遊走能を低下させた。低濃度では、物質によって遊走能を逆に増加させる傾向を示すものもあった。

遊走能の低下は感染防御の低下につながると考えられる。逆に遊走能の増加は、常にマクロファージが活性化され続けることによって異物が進入した際に本来の機能が働かなくなる可能性も示している。

内分泌かく乱物質が免疫系に影響を及ぼしている例として、海棲哺乳類が大量に死亡した事件があげられる。死亡したイルカの多くは、体内に種々の化学物質

が蓄積されており、皮膚及び器官にウイルスやバクテリアの著しい日和見感染があったことが報告されている。これは化学物質が免疫機能を低下させウイルス感染に抵抗できなかったためと考えられる。また、PCBに汚染したバルト海の魚を餌として与えたアザラシに先天性及び後天性の免疫応答抑制が見られたという報告がある。汚染された海域に住むアザラシにおける免疫抑制は、細菌性及びウイルス性感染症の発症率増加の理由であると考えられている。本研究から得られた結果がこういった現象を一部裏付けているのではないかと思われる。

マクロファージはホルモン受容体を介していない経路で影響を受けていると思われる。今回の研究から、内分泌攪乱作用を疑われている化学物質が、内分泌系だけでなく免疫機能に影響を及ぼしていることが示唆された。免疫機能がどのような経路で化学物質の影響を受けるのか、その詳細なメカニズムの解明に関する研究もこれから行う必要がある。フタル酸エステル類はPPARを活性化する。マクロファージにおけるPPAR活性化とマクロファージ機能との関係についてはまだ明らかになっていないが、このような経路により影響を及ぼしている可能性もある。

今回の研究において、アルキルフェノール類、フタル酸エステル類、BPAでは、TNF α 産生、遊走能において低用量での反応が見られた。フタル酸エステル化合物はプラスチック類の可塑剤として使用されており、BPAは樹脂の原料として使用されている。ヒトは食器や食品の包装材料などを通してこれらの化合物を低用量で

日常的に摂取している可能性があり、さらなる研究が必要であると思われる。

E. 結論

本研究の結果から、低濃度の内分泌かく乱物質がマクロファージの遊走能を増加させることが明らかとなった。

すなわち、マクロファージの遊走能は、NP、BPA、BBP、DBP、DCHP、DEHP、DEP存在下で低濃度で増加した。また、TNF α 産生も増加させた。

F. 健康危険情報

健康へ及ぼす影響についてさらに継続して研究を行う必要性があるが、現段階で即危険と判断される情報は特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamazaki T, Sasaki E, Kakinuma C,
Yano T, Miura S, Ezaki O. (2005)
Increased very low density
lipoprotein secretion and gonadal
fat mass in mice overexpressing liver
DGAT1. Journal of Biological
Chemistry, 380(22):21506-21514

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

神経系初期発生における核内受容体の機能及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・部長

研究要旨

本研究は、低用量に於ける内分泌かく乱候補化学物質の神経系初期発生に対する影響を、神経幹細胞における核内受容体の機能に着目して明らかにすることを目的とする。これまでに、エストロゲンレセプター（ER）がマウス胎児の神経幹細胞に発現していることを基礎に、胎生中期に一時的に DES 暴露を受けた後期胎児脳の神経幹細胞が *ex vivo* 培養環境下で自己複製不良となることを見出した。胎生期後期胎児脳の神経幹細胞における核内受容群の発現を DNA マイクロアレイを用いて検討し、オーファンレセプターの RVR, TR4 をはじめ、COUP-TF1, GR, PPAR β , TR α など多種を確認した。今年度は、これら核内受容体群のうち甲状腺ホルモン受容体 TR α の作用を検討した結果、神経幹細胞のオリゴデンドロサイトへの分化を促進することが明らかとなった。本研究により、核内受容体群を介したシグナル伝達の中枢神経系発生機能制御への関わりについて新たな展望が開け、低用量での内分泌かく乱候補化学物質の中枢神経系への作用点を明らかにする一つの方策が得られた。

キーワード：

核内受容体、エストロゲン受容体、胎生初期暴露、神経幹細胞、自己複製、分化誘導、不可逆的变化（遅発影響）

A. 研究目的

低用量での内分泌かく乱候補化学物質の神経系初期発生に対する影響を、神経幹細胞における核内受容体の機能に着目して明らかにすることが本研究の目的である。

神経系発達において核内受容体群は、膜受容体とともに重要な機能を果たしていることが示されてきた。従来から、性的二型核に代表される脳の性分化におい

てエストロゲンシグナルの重要性が示されてきた。これは、胎生後期の所見であるのに対し、エストロゲンレセプター(ER)自体は胎生初期から脳内で発現していることが確認されていることから、早期からの機能が示唆されていた。この時期の脳は未熟な胎児神経幹細胞を多く含み、それらに ER が発現し機能している可能性が考えられるが、その研究は緒についたばかりである。

本研究では、ER を最重要標的としつつ、中枢神経系発生において発現している各種核内受容体を同定し、それらが神経系初期発生のいかなる制御機構に相補的に関与しているかを解析し、低用量に於ける内分泌かく乱候補化学物質の中枢神経系発生過程への作用点をシグナルクロストークを念頭に分子レベルで包括的且つ詳細に説明づけ、発達後の構造及び機能に対する不可逆的影響の可能性を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

核内受容体のリガンドと成り得る化学物質を妊娠マウスに投与し、胎児脳から神経幹細胞を培養に移し、それに対する影響を検討する。平行して、培養下に直接化学物質を処理した際の影響についても検討を加える。

マウス胎児神経幹細胞培養（ニューロスフェア培養）実験（NS 実験）

C57BL/6 マウス妊娠 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、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、10cm シャーレ（ヌンク社）に 10^6 個/6ml の密度で生細胞を播種する。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）の数と直径の測定、RNA 抽出および遺伝子発現検討を実施した。

マウス胎児神経上皮細胞培養（接着培養）実験（NEC 実験）

C57BL/6 マウス妊娠 14.5 日目の胎児より終脳を採取し、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、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 bFGF (10ng/ml) を添加したものをを用い、あらかじめポリ-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た 10cm シャーレ（ヌンク社）に 1 胎児分の細胞/6ml の密度で細胞を播種。4 日間培養後、ピペティングにて細胞をはがし、生細胞数をカウント後、 2×10^5 /200 μ l の細胞密度で 8well チャンバースライドに継代後、免疫染色に供した。甲状腺ホルモン T3, T4 は最終濃度 T3 30ng/mL, T4 40ng/mL にて 2 日間作用させた。

DES *in utero* 暴露実験

DES はコーンオイルに溶解し、妊娠 11.5 日目から 14.5 日目までの C57BL/6 母動物に 2 μ g/kg 連日皮下投与した。

遺伝子発現解析

マウス組織の場合は取得後速やかに組織重量の 5 倍以上の容量の RNA later に浸し、RNase を不活化した後、RLT buffer にて破砕液とした。細胞は RLT buffer に直接回収し、破砕液とした。RLT 破砕液の 10 μ l を取り、DNA 定量用蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定し、DNA 含量に応じて Bacillus 由来の 5 種類の RNA を混合した Spike RNA cocktail を RLT 破砕液に添加した。RLT 破砕液は TRIZOL で抽出し、水層を得、キアゲン社

のRNeasyキットを用いてRNAを精製した。アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全RNA 5 µg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とする。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, UTPを共存させつつcRNAを合成した。cRNAはAffymetrix社キットにて精製後、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もしくはMouse Genome 430 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、スキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアにて絶対的数値に変換し、同ソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

C. 研究結果

マウス胎生期後期胎児脳神経幹細胞に甲状腺ホルモンを作用させるとオリゴデンドロサイトへの分化が促進されることが明らかとなった。網羅的遺伝子発現解析により、甲状腺ホルモンがNotchにより制御を受けるHes1, Hes5の発現を上昇させることが判明した。

以下にその詳細を述べる。

神経幹細胞に対する甲状腺ホルモンの作用

前年度までに、NS実験において、mRNAレベルでER alpha, betaが共に発現して

いること、Percellome手法を適用したDNAマイクロアレイにて48種類の核内受容体の発現情報を得たことを報告した。中でもTRa (Thyroid hormone receptor alpha)の発現が顕著に高く、そのコピー数はCOUP-TF1に次いで2番目に多かった。そこで、今年度は甲状腺ホルモンの作用を検討した。その結果、甲状腺ホルモンT3, T4を2日間NC実験系に処理すると04, MBP陽性のオリゴデンドロサイトへの分化が顕著に促進されることが判明した。

網羅的遺伝子発現解析

甲状腺ホルモンによるオリゴデンドロサイト分化誘導に関わる遺伝子発現カスケードに関する情報を得るため、網羅的遺伝子発現解析をNEC実験材料について実施した。経時的な変化を測定するため、甲状腺ホルモン添加後、2時間、6時間、24時間、48時間のNEC実験細胞を回収し、Percellomeによる発現コピー数変換を施したDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、甲状腺ホルモン添加後24時間以降に発現値が大きく変化する遺伝子が多数認められた。この際、オリゴデンドロサイトマーカーのMyelin basic protein (MBP)の発現は24時間、48時間にかけて著しい上昇を示し、オリゴデンドロサイト分化が確認された。

また、神経幹細胞機能を制御するNotchシグナル系に於いて、Notch自身(Notch1, Notch2, Notch3)の発現が経時的に上昇することに加え、Notch活性化により発現が上昇する遺伝子であるHes1, Hes5がともに発現上昇することが明らかとなった。さらに、Notchシグナルを抑制することが