

表 6 T4 特異的に down-regulate したネットワークのサマリー

Pathway

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	Lysophospholipid receptor signaling pathway	37.45	0.098	0.211
2	Beta-amyloid metabolism	27.574	0.057	0.333
3	mGluR signaling pathway	18.728	0.049	0.194
4	Somatostatin signaling pathway	18.205	0.041	0.263
5	NPY receptor signaling pathway	15.826	0.033	0.308
6	Galanin signaling pathway	13.791	0.024	0.429
7	Prostanoid receptor signaling pathway	11.627	0.033	0.154
8	Dopamine receptor signaling pathway	11.207	0.024	0.25
9	Melanocortin receptor signaling pathway	7.831	0.016	0.25
10	Vasopressin signaling pathway	7.481	0.016	0.222

Gene Ontology

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	G-protein coupled receptor protein signaling pathway (GO:0007186)	264.919	0.639	0.19
2	cell surface receptor linked signal transduction (GO:0007166)	219.463	0.75	0.098
3	second-messenger-mediated signaling (GO:0019932)	143.476	0.347	0.223
4	signal transduction (GO:0007165)	137.128	0.813	0.05
5	G-protein signaling, coupled to cyclic nucleotide second messenger (GO:0007187)	130.574	0.271	0.31
6	cyclic-nucleotide-mediated signaling (GO:0019935)	130.062	0.271	0.307
7	cell communication (GO:0007154)	118.707	0.833	0.043
8	di-, tri-valent inorganic cation homeostasis (GO:0030005)	85.455	0.201	0.246
9	elevation of cytosolic calcium ion concentration (GO:0007204)	85.429	0.153	0.431
9	cytosolic calcium ion homeostasis (GO:0051480)	85.429	0.153	0.431

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

超高速分析法の比較解析と評価に関する調査研究
分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部部長

研究要旨

本研究班では、内分泌かく乱化学物質問題の解明に向けた厚生労働省の「試験スキーム」に沿って要求される順位付けの為の大規模スクリーニングを進めるとともに、内分泌かく乱化学物質を始めとする、核内受容体を標的とする化学物質について分子間相互作用への影響や遺伝子発現への影響など生体作用の科学的根拠に関わる諸要因に関する基礎的研究を進め、そのメカニズムに立脚した受容体標的毒性物質の評価研究への応用を目指している。本年度は、これまでに得られている大規模スクリーニング結果の比較解析を行い、その結果についてOECDにおける内分泌かく乱化学物質の試験・評価プログラム(EDTA)タスクフォースにおける第3回 VMG-NA(非動物試験検証管理グループ)会議及びこれに関連する会議等において本邦及び本研究班における取り組みとして報告するとともに、エストロゲン受容体レポーター遺伝子スクリーニング系及び *in silico* スクリーニング系については、OECD を中心とした内分泌かく乱物質評価法の国際的なガイドライン化を目指した枠組みにおけるバリデーション候補として提案を行った。

A. 研究目的

本研究に先立つ研究において、これまでに我々は、内分泌かく乱化学物質 HTPS としてエストロゲン受容体 α および β (ER α) レポーター遺伝子導入 Hela 細胞系及び *in silico* スクリーニング手法としての ER α 及び β 受容体ドッキングモデル構築を行い、実際に大規模スクリーニングを実施し HTPS 系としての検証を進めてきた。その研究成果は、厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」における「試験スキーム」の提案の基礎データ、及び内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会・中間報告追補における試験スキーム中のスクリーニング試験前2段階に関する試験法及びその評価に資する関連データとなっている。

上述の「試験スキーム」におけるスクリーニングの位置付けは、各種のスクリーニング試験をバッテリー試験として実施し、後に続く確定試験

に供する物質の優先順位を決めることにある。それぞれ特色の異なる試験を組み合わせることで評価することにより、得られる優先順位リストは、常に最新の科学的知見に基づき更新され、取りこぼしの無いスクリーニングを行うことを可能とする。本研究班では、これまでに構築した各スクリーニング手法間の比較解析による検証と精度の向上をさらに進めるとともに、パスウェイスクリーニング、分子間相互作用解析等によるスクリーニングスキームの拡充を目的として研究を進めて、これらの研究結果により有用な新規スクリーニング手法の構築を進めている。

一方、内分泌かく乱物質の問題解決に向けた取り組みは、欧米諸外国においても進められており、その評価基準やガイドライン策定は、国際的な強調のもとに行われるべきである。我が国及び国際的なガイドライン及び評価基準策定における、スクリーニング試験法の評価基準

として、自然、あるいは人の生活の環境中に存在している、既に何らかの内分泌学的生体影響が自然、実験を問わず報告されている化学物質を当面の陽性対象物質群として、それらの影響の機序、或いは、影響の強度が十分な精度で観測可能であることが挙げられる。本研究では、各国のリスクアセスメントにおけるスクリーニング系の開発状況について情報収集や情報交換を行うとともに、本研究班における各スクリーニング手法からの結果の比較解析を行い、我々の研究成果のうち、内分泌かく乱化学物質のスクリーニング系としての評価基準を満たすものを、国際的・国内的なバリデーション(有効性確認)、あるいはその前段階のプレ・バリデーションの対象となる手法としてガイドライン化を念頭に国内外で提案することを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、これまでに得られている大規模スクリーニング結果の比較解析を行い、その結果について、OECD の内分泌かく乱物質の試験・評価プログラム(EDTA)タスクフォースにおける第3回 VMG-NA(非動物試験検証管理グループ)会議及びこれに関連する会議等において本邦及び本研究班における取り組みとして報告するとともに、各国のリスクアセスメントにおけるスクリーニング系の開発状況について情報収集と情報交換を行った。また本研究班における成果のうちエストロゲン受容体レポーター遺伝子スクリーニング系及び *in silico* スクリーニング系については、OECD を中心とした内分泌かく乱物質評価法の国際的なガイドライン化を目指した枠組みにおけるバリデーション候補として提案を行った。

C. 研究結果

OECD では、内分泌かく乱化学物質の問題解決に向けて、内分泌かく乱化学物質の試験・評価プログラム(EDTA)タスクフォースを設置し検討を進めている。本研究班において構築し

検証を進めている各スクリーニング手法は、いずれも EDTA により示されている OECD conceptual framework for the testing and assessment of endocrine disrupting chemicals の Level 2 に相当する。第3回 VMG-NA では、OECD における内分泌かく乱化学物質スクリーニング手法のガイドライン化に向けて、参加各国代表がそれぞれの国における研究開発状況について発表し討議した。わが国では、レポーター遺伝子系の開発及びバリデーション結果について、*in silico*スクリーニング系(QSAR)系の現在の開発状況等に関して厚生労働省・経済産業省の共同で、また厚生労働省では独自に開発を進めている cell free スクリーニング系等の報告をあわせ発表を行った。その他、細胞を用いたスクリーニング系における代謝系の利用やビテロゲニンアッセイについて DRP (draft review paper) の作成が行われており、それぞれ担当者より中間報告がなされた。そのうち、細胞を用いたスクリーニング系における代謝系の利用に関しての DRP の中間報告として Dr. Walter (ベルギー) が、S9 の利用が有用であるとの報告を行った。これに関して、我々はすでに Hela レポーター細胞系において S9 の利用を検討しており、その結果から化合物ごとに処理時間の最適化をしなければいけないなど標準プロトコール化は難しいとの結論を得ているとコメントした。

本研究班で開発を進めているスクリーニング系のうちレポーター遺伝子アッセイ系については、もともと米国が提案した化学物質の内分泌かく乱作用の有無の可能性を検討する方法の有用性を確認する事から開始されたが、系の構築は我が国が先行しており、これまでに構築した4受容体(ER α 、ER β 、AR、TR)系のうち国内における多施設バリデーションが終了している ER α 恒常発現 Hela 細胞を用いた系については、国内バリデーション結果を 2ndVMG-NA においてすでに報告している。今回のミーティングにおいては、日本が報告した多施設バリデ

ーションの結果について「Validated」と言えるかが議論の対象となり、標準プロトコルを作るのに必要なデータがそろっているかどうかについて電話会議などにより検討することとなった。この検討メンバーは、3rd VMG-NA 会議に出席者より募り、米国 EPA や ICCVAM 及び Health CANADA の代表が努めることになった。検討の結果、十分なデータがあると判断された場合には、ガイドライン化に向け Scientific Peer Review を実施することとなった。一方、*in silico*スクリーニング法について我々は、十分な事前調査から従来から汎用され、米国 EPA 等において採用している CoMFA 法を初めとする一連のリガンド構造解析・回帰モデル型の手法を避け、敢えて、受容体-リガンド相互作用を計算するドッキング法によるスクリーニング系の開発を進めている。前者は、特定のリガンドの活性測定値に基づいたリガンド分子の形状に関わる統計学的な分析を行う。そのために、受容体の分子構造が未知の系に対しても検討を加えることができる特徴を有する。反面、統計分析に資するデータを作出するためにどのような化合物を「教師」として用いるかにその予測性能が依存する、言い換えると、用いた教師化合物に類似した構造の化合物にしか適応できない傾向が強い。これに対しドッキング法では、受容体の構造が既知である必要があることや、相互作用計算理論が複雑かつ完璧ではなく、計算自体も煩雑になる傾向がある、という制限があるが、有利な点としては「教師」化合物を用いることがないため、予想する化合物の構造的制限がほとんど無い点があげられる。これまでの解析から、特定の構造を有する類似化合物群における結合活性の予測精度については、リガンド分子形状ごとに予測を行う統計学的手法のほうが優れるが、実際に、ドッキング計算による活性予測値と幾つかの *in vitro*スクリーニング測定系による実測値との照合の結果、偽陰性を排除する予測閾値を設定することにより、偽陽性を容認するスクリーニングの立場からは、利

用可能であることが示されている。この点については、今回の VMG-NA に先立って行われた内分泌かく乱物質 QSAR タスクグループのミーティングにおいても報告している。また、QSAR 系のバリデーションについては、QSAR タスクグループにおいて、今後、他の系(バインディングアッセイやレポーター遺伝子アッセイ)の結果が入手可能な化合物を対象に各 QSAR 手法間の比較を行う予定となっている。

D. 考察

これまでに得られている大規模スクリーニング結果の比較解析を行い、その結果について OECD における内分泌かく乱化学物質の試験・評価プログラム(EDTA)タスクフォースにおける第3回 VMG-NA(非動物試験検証管理グループ)会議及びこれに関連する会議等において報告した。エストロゲン受容体レポーター遺伝子スクリーニング系及び *in silico*スクリーニング系について、OECD を中心とした内分泌かく乱化学物質評価法の国際的なガイドライン化を目指した枠組みにおけるバリデーション候補として提案を行い、レポーター遺伝子アッセイ系について、我が国より報告した ER α 恒常発現 Hela 細胞を用いた系の国内バリデーション結果について、OECD ガイダンス化に向けたレビューを進めることとなった。レポーター遺伝子アッセイ系の構築は我が国が先行しており、本研究班および我が国における研究成果が国際的に評価されたものと考察される。一方、*in silico*スクリーニング系については、QSAR タスクグループを中心に、まずは他のスクリーニング系の結果が入手可能な化合物を対象に各 QSAR 手法間の比較を行う予定である。現在、提案されている手法はいずれも統計学的手法を用い、特定構造の化合物についての予測精度は我々のドッキング法よりも優れるが、偽陽性を容認するスクリーニングの立場からは予想する化合物の構造的制限がほとんど無い我々の手法のほうがむしろ有用であると考察された。

E. 結論

本研究班では、内分泌かく乱化学物質問題の解明に向けた厚生労働省の「試験スキーム」に沿って要求される順位付けの為の大規模スクリーニングをすすめるとともに、スクリーニングスキームの拡充を目的として、パスウェイスクリーニング、分子間相互作用解析等の応用による、核内受容体の生体作用メカニズムに立脚した有用な新規スクリーニング手法の構築を進めている。一方、内分泌かく乱化学物質の問題解決に向けた取り組みは、欧米諸外国においても進められており、その評価基準やガイドライン策定は国際的な強調のもとに行われるべきである。我々はこれまでの研究成果のうち、スクリーニング手法としての基準を満たすものを、国際的・国内的なバリデーション(有効性確認)、あるいはその前段階のプレ・バリデーションの対象となる手法としてガイドライン化を念頭に国内外で提案し、それぞれ評価を得ている。現在、OECD に提案している各スクリーニング系については引き続き大規模スクリーニングによる独自を進めるとともに、本研究班において開発されるスクリーニング手法についても、適時、国際ガイドライン化に向けた提案を積極的に行う必要があると結論付けられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

五十嵐勝秀、菅野 純: 内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞分化に及ぼす影響、生体統御システムと内分泌攪乱、シユープリンガー・フェアラー東京 2005年 p79-88

学会発表

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ジェ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 (2005.7)

H. 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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
五十嵐勝秀 菅野 純	内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞分化に及ぼす影響		生体統御システムと内分泌攪乱	Springer-Verlag Tokyo	東京	2005	79-88
板井昭子 佐藤陽美	KeyMolnet-ポストゲノム時代の新しい情報統合プラットフォームとネットワーク解析		遺伝子医学MOOK2 疾患プロテオミクスの最前線	メディカルドゥ	東京	2005	140-145

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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.	J. Toxicol. Sci.	30	275 - 285	2005
Asano, K., Ono, A, Hashimoto, S, Inoue, T, and Kanno, J	Screening of endocrine disrupting chemicals using a surface plasmon resonance sensor.	Anal Sci.	20	611 - 616	2004
Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Kato TA, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K	Nitrogen-substitution effect on in vivo mutagenicity of chrysene.	Mutat Res.	5;586 (1)	1-17	2005 Sep
Sato H, Ishida S, Toda K, Matsuda R, Hayashi Y, Shigetaka M, Fukuda M, Wakamatsu Y, Itai A,	New approaches to mechanism analysis for drug discovery using DNA microarray data combined with KeyMolnet.	Curr. Drug Dis. Technol.,	2(2),	89-98	2005

2. 内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞分化に

及ぼす影響

五十嵐勝秀・菅野 純

2. 1. 要旨

神経幹細胞は自己複製能と多分化能，すなわち神経細胞，グリア細胞(アストロサイト，オリゴデンドロサイト)といった神経系を構成する3種類のすべての細胞に分化する能力をもつ幹細胞である。神経幹細胞は胎児の脳形成および発達を司るのみならず，成熟後の脳にも存在し神経新生を行っている。一方，脳内にはエストロゲン受容体を始めさまざまな核内受容体が発現していることから，内分泌攪乱化学物質の脳に対する影響が研究されているが，神経幹細胞に標的を定めた研究例は少ない。本章ではまず神経幹細胞について概説し，次に核内受容体，特にエストロゲン受容体と神経幹細胞のかかわりに関する研究について紹介し，われわれがジエチルベストロール(DES)を用いて得た研究結果にもふれる。

2. 2. 神経幹細胞と神経幹細胞分化を誘導する因子

神経幹細胞は哺乳類の中枢神経系に存在する幹細胞で，未分化な状態を保ったまま増殖する自己複製能と，複数の種類の細胞(ニューロン，アストロサイト，オリゴデンドロサイト)に分化する多分化能を併せもつ細胞である(図2・1)。発生期の脳には神経幹細胞が多数存在し，脳の形成・発達を担っているが，成熟後の脳にも神経幹細胞は見出され，神経新生を行い，脳機能維持に寄与していると考えられている。神経幹細胞の存在が初めて実験的に確認されたのは，Weissらによる，

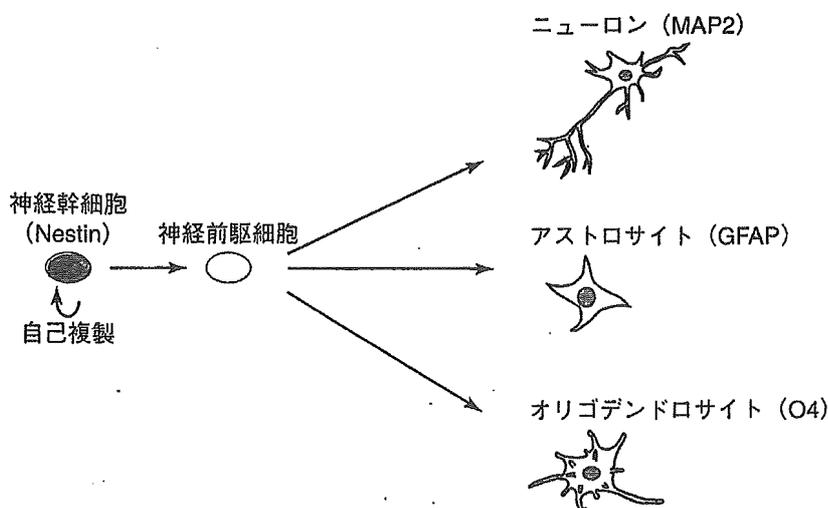


図2・1 神経幹細胞の自己複製と分化。神経幹細胞は，未分化な状態を保ったまま自己複製し，神経系を構成する3種類の細胞(ニューロン，アストロサイト，オリゴデンドロサイト)に分化する幹細胞である。おのおのの細胞には特異的なマーカータンパク質が同定されている(かっこ内に示した)。

“ニューロスフェア (neurosphere) 法” という培養法を用いた研究によってである (図2・3参照)^[1]. ニューロスフェアは, 脳神経組織細胞を単一細胞化した後, basic fibroblast growth factor (bFGF) と epidermal growth factor (EGF) の存在下浮遊培養することにより, 1週間程度後に形成される単クローン性の細胞凝集塊である. ニューロスフェアを構成する細胞は, 神経幹細胞に特異的な中間径線維タンパク質であるNestin陽性の細胞が主で, 形成されたニューロスフェアを再度分散し浮遊培養すると, 単一細胞から再びニューロスフェアが形成されることから, これらの細胞が自己複製能を有していると考えられている. また, ニューロスフェアを接着性の容器に移して血清などの存在下で培養するとニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトを産生する多分化能を示す.

神経幹細胞からの分化を誘導する細胞外因子については, ニューロンへの分化を促す因子として platelet derived growth factor (PDGF), アストロサイトへの分化を促す因子として leukemia inhibitory factor (LIF) と bone morphogenic protein (BMP), オリゴデンドロサイトへの分化を促進する因子として甲状腺ホルモン (T_3) が同定されている^[2] (図2・2A, 口絵7参照). これらのなかで特に, LIFとBMPによるアストロサイトへの分化促進作用に関して, それぞれの下流で活性化される転写因子 Stat3とSmad1が, アストロサイト特異的遺伝子の1つである glial fibrillary acidic protein (GFAP) 遺伝

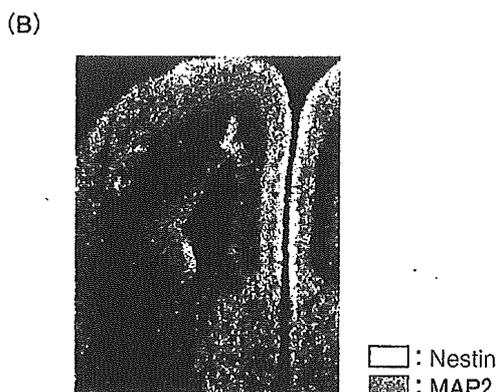
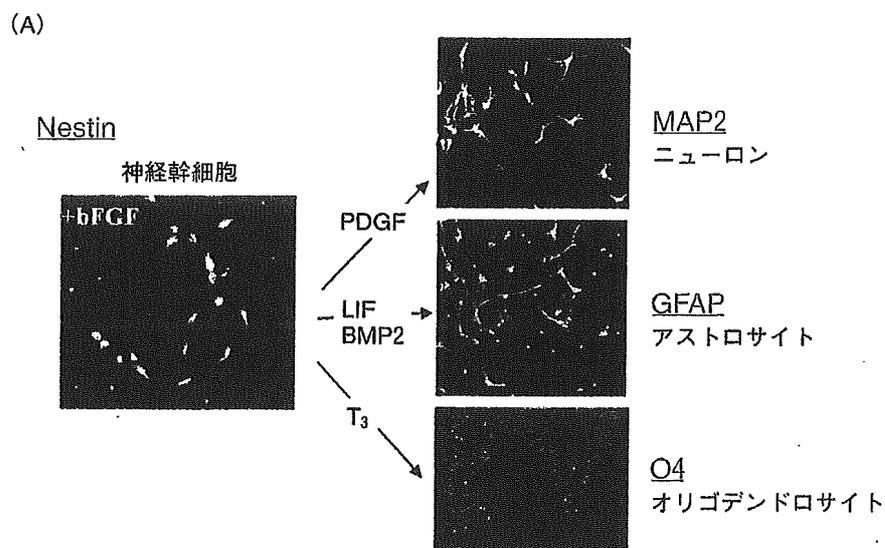


図2・2 神経幹細胞分化を誘導する因子と胎児脳におけるNestin, MAP2の発現. (A) *in vitro*培養下, Nestin陽性の神経幹細胞は特定の細胞外因子に反応し, 各種細胞に分化する. PDGFはニューロンへの分化, LIFやBMP2はアストロサイトへの分化, 甲状腺ホルモン T_3 はオリゴデンドロサイトへの分化を促進する. (B) 胎生14.5日の脳におけるNestin, MAP2の発現. 側脳室周囲領域はNestin陽性の細胞 (中央の陰の部分) で占められ, 皮質側はMAP2陽性細胞 (外縁部) で占められている (口絵7).

子のプロモーター領域上でp300タンパク質を介した複合体を形成し、直接的にGFAP発現を誘導することが明らかにされている^[3]。LIFとBMPは相乗的にアストロサイト分化を促進するが、その相乗効果を説明する分子実体がこの転写因子複合体なのである。

以上のように、神経幹細胞は細胞外因子によって分化制御される細胞であり、細胞外因子のシグナルは最終的に神経幹細胞内の特定の転写因子群に到達する。一方で、内分泌攪乱化学物質は、転写因子である核内受容体が細胞内標的である。このことから、内分泌攪乱化学物質が転写制御機構を介し、神経幹細胞に何らかの影響を及ぼすことが予想される。

2. 3. 胎児神経幹細胞と成体神経幹細胞

現在、発生初期の神経誘導によって形成される神経板・神経管を構成する神経上皮細胞が、神経幹細胞そのものであると考えられている。

発生初期に神経幹細胞は増殖を繰り返すが、胎児にはこの時点ですでに頭部から尾部にかけてHoxをはじめとする転写因子群の発現の組み合わせパターンを伴う領域化が起こっており、神経幹細胞自体もその存在部位によって異なる性質を獲得している^[4,5]。すなわち、神経幹細胞はヘテロな集団であり、自己複製能と多分化能を有するという点では共通の性質をもつが、発生初期にすでに個性をもっており、増殖速度も異なっていると考えられている。また、胎児期の神経幹細胞には通常予想されるのとは異なる性質がある。すなわち、神経幹細胞は始めはニューロンにのみ分化する能力を有しているにすぎず、そのため発生初期はニューロンが優先的に産生される時期が続く。産生されたニューロンは定まった位置に移動し、神経核や層構造を形成する。発生中期から後期にかけて神経幹細胞はアストロサイトやオリゴデンドロサイトといったグリア細胞にも分化する能力を獲得し、ニューロンに加えてグリア細胞を産生し、脳の形成発達が進む。このような、発生に伴って多能性を獲得していくという性質が胎児神経幹細胞の特徴である^[6]。

一方、神経幹細胞は成体の脳においても存在することが示されている^[7-11]。すなわち、海馬をはじめとする成体の脳のさまざまな領域から、bFGF、EGFに反応し、ニューロスフェアを形成する細胞が同定されている。神経幹細胞の局在については、脳室を直接取り囲む上衣層(ventricular zone, VZ)もしくはVZのすぐ内側の上衣下層(subventricular zone, SVZ)に存在するという2つの説が唱えられている^[12,13]。いずれにせよ、成体の神経幹細胞は脳室の周囲領域に存在していると考えられている。しかし、成体の神経幹細胞と胎児神経幹細胞とが、どの程度異なった性質を有しているかはほとんど明らかになっていない。

2. 4. 核内受容体の神経幹細胞における機能

内分泌攪乱化学物質の標的はそのほとんどが核内受容体である。よって、神経幹細胞で発現し機能している核内受容体は内分泌攪乱化学物質研究において重要な対象と考えられる。しかし、これまで神経幹細胞と核内受容体とを関連づけて研究された例は少ない。

そのなかで最近、オーファン受容体の1つTLXが成体神経幹細胞の未分化性の維持に必須であるという報告が、米国ソーク研究所のEvansらのグループによりなされた^[14]。マウスにおけるTLXの発現は胎生初期から認められ、中期にピークを迎え、出生直後にはいったん消失する。その後発現は上昇し、成体の脳では高い発現が保たれる。TLXのノックアウトマウスを用いた解析により、TLXを欠く成体の神経幹細胞は増殖せず、TLXを再度導入することで増殖能を回復すること、TLXは転写抑制因子として働き、アストロサイト特異的遺伝子であるGFAPの発現を抑制することで神経幹細胞の未分化性を保っていることが示された。

TLXはオーファン受容体でありリガンドが不明であることから、この結果をすぐに内分泌攪乱化学物質と結びつけて考えることはできないが、核内受容体による神経幹細胞機能の制御の例として注目される。

エストロゲン受容体については、イタリアのMaggiらのグループによるヒト神経芽細胞腫細胞株SK-N-BEを用いた研究がある。TGF α による細胞増殖刺激が、エストロゲン受容体 α 型を強制発現させることで分化刺激に変換されることが報告されている^[15]。この場合、発現したエストロゲン受容体 α 型は、TGF- α により活性化されたStat3と結合し、分化を促進するとのモデルが提唱されている。また、Maggiらは2004年のKeystone Symposiaにて、エストロゲンは成体脳に作用し、脳室周囲領域の細胞によるBrdUの取り込みを促進すること、その領域でエストロゲン受容体 α 型依存的にProthymosin α の発現を上昇させること、Prothymosin α のアンチセンスRNAを脳室内に投与してその発現を抑制するとBrdUの取り込みが低下し、エストロゲンによって誘発されるロードーシス反応(雌の受容反応)が抑制されることを報告した。彼女らは、成体の神経幹細胞はエストロゲンに反応し増殖すると考えている。さらにTanapatらにより、エストロゲンはラット成体脳海馬における神経新生を促進することも報告されている^[16]。すなわち、雌の卵巣を除去すると海馬において新生される神経幹細胞の数が減少し、エストロゲンを投与すると回復することが示されている。加えて、Brannvallらは、神経幹細胞にエストロゲン受容体 α 型、 β 型ともに発現しており、分化能の制御にかかわっているとの報告をした^[17]。しかし、彼らは神経幹細胞マーカーの発現を検討していないことから、その報告ではエストロゲン受容体が神経幹細胞を含む領域で発現していることを示したにとどまっている。

次に神経幹細胞と核内受容体、特にエストロゲン受容体に関するわれわれのデータを紹介したい。

2. 5. エストロゲン受容体の神経幹細胞における発現

身のまわりの化学物質のうち、ホルモン活性が報告されているものにはエストロゲンアゴニスト様作用、あるいはアンドロゲンアンタゴニスト作用を有するものが多いことが知られている。特にエストロゲン受容体系は、ピコモル(10^{-12} M)の低い濃度域で作動することから、外因性影響を受けやすいことが考えられる。われわれは、エストロゲン受容体を重要な標的として位置づけ、まず神経幹細胞での発現を検討した。神経幹細胞が豊富な胎生14.5日のマウス終脳を分離し(図2・3、口絵8参照)、ニューロスフェアを形成させ、RNAを抽出した後、RT-PCRによってエストロゲン受容体 α 型および β 型のmRNA発現を調べた。図2・4(口絵9参照)に示すように、どちらの型の受容体もニューロスフェア内で発現していることが確認された。なお、データは示さないが、同じRNAにおけるNestinの発現も検出されている。さらに、 α 型についてはタンパク質レベルでもニューロスフェア細胞に発現していることが確認されている(図2・4B)。これらのことから、前述のラットでの報告^[17]とともに、エストロゲン受容体は胎児神経幹細胞において発現していることが強く示唆される。この事実は、内分泌攪乱化学物質が胎児神経幹細胞に対して何らかの作用を発揮する可能性を示唆するものである。

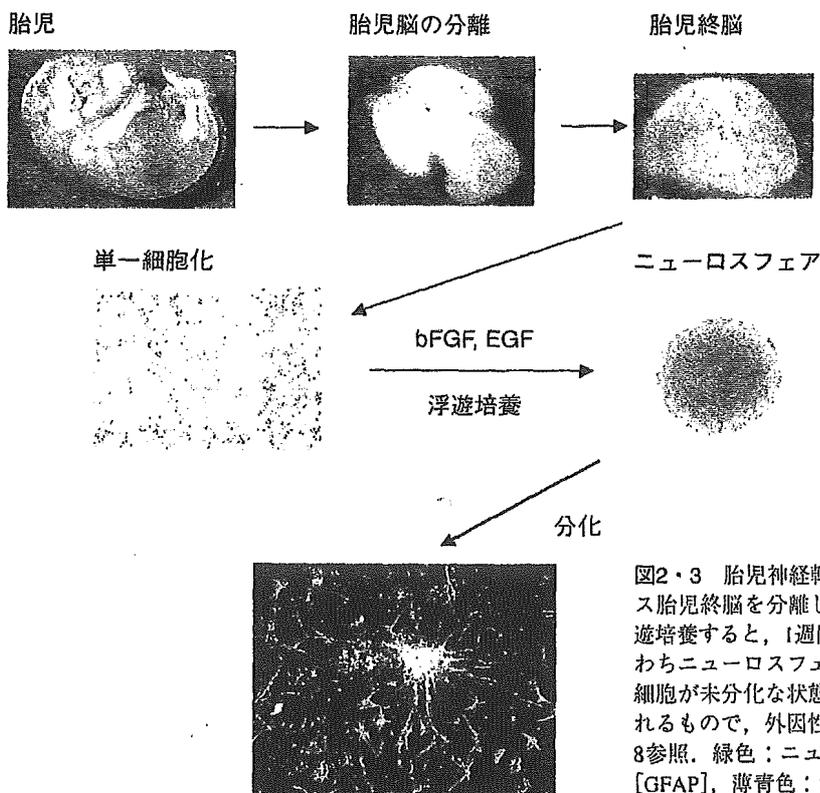


図2・3 胎児神経幹細胞の培養(ニューロスフェア法)。マウス胎児終脳を分離し単一細胞化した後、bFGF, EGF存在下浮遊培養すると、1週間ほどで単クローン性の細胞凝集体、すなわちニューロスフェアが得られる。ニューロスフェアは単一細胞が未分化な状態を保ったまま自己複製することで形成されるもので、外因性刺激により、神経系の3種類の細胞(口絵8参照、緑色：ニューロン[MAP2]、赤色：アストロサイト[GFAP]、薄青色：オリゴデンドロサイト[O4])に分化する。

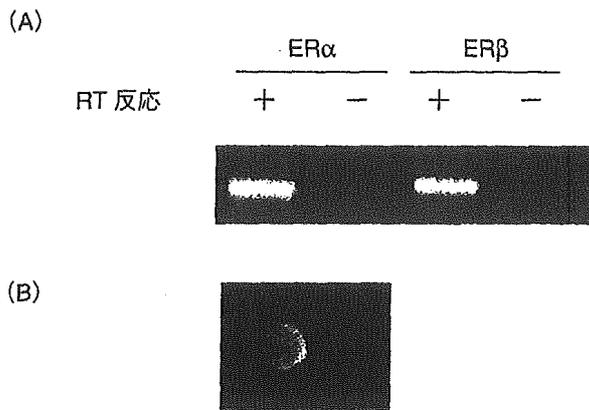


図2・4 神経幹細胞におけるER α , ER β の発現。(A) mRNA検出, ニューロスフェアより抽出した全RNAをオリゴdTで逆転写し, ER α , ER β 特異的なプライマーでPCRした。ER α , ER β ともにニューロスフェアに発現していることが示された。(A)タンパク質検出, ニューロスフェアをNestin((口絵9参照: 緑色), ER α (口絵9参照: 赤色)に対する抗体で免疫染色した。Nestin陽性のニューロスフェアでER α の発現が検出された。(B)タンパク質検出, ニューロスフェアをNestin(緑色), ER α (赤色)に対する抗体で免疫染色した。Nestin陽性のニューロスフェアでER α の発現が検出された。

2. 6. 内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞分化・増殖に対する影響をモニターする方法 —— 神経系細胞種特異的マーカーとニューロスフェア法 ——

神経幹細胞に対する影響を調べるためには, 脳内または培養下で神経幹細胞を含む神経系の細胞を正確に同定する技術と, 神経幹細胞の増殖能・分化能を評価する技術が必要である。

前者の目的には, 神経幹細胞および分化した細胞に特異的なマーカータンパク質が利用されている(図2・2参照)。神経幹細胞のマーカーとして汎用されているのはNestinであり, ニューロンはMAP2, アストロサイトはGFAP, オリゴデンドロサイトはO4が用いられている。Nestinは中枢神経系前駆細胞の中間径線維タンパク質の主要な構成成分である。その神経幹細胞における特異的な発現を利用し, 岡野らはNestinのプロモーター下流にEGFPを接続したトランスジェニックマウスを用い, 神経幹細胞をFACS (fluorescence activated cell sorting)により分離できることを報告している^[18]。MAP2は, ニューロンの中間径線維タンパク質に結合し, 中間径線維タンパク質の集合を促進することが知られているタンパク質である。GFAPは中枢神経系でおもにアストロサイトに発現が検出される中間径線維タンパク質である。O4はI型およびII型のオリゴデンドロサイトによって形成されるスルファチド(硫脂質)で, ミエリンの構成脂質である。

一方, 後者の目的である神経幹細胞の増殖・分化能を評価する方法としては, 1) 単一細胞から細胞凝集塊(ニューロスフェア)を形成する自己複製能を調べる方法(ニューロスフェア法)や, 2) ニューロスフェアの多分化能を調べる方法がある。以下にそれらの方法の概略を示す。

- 1) 神経幹細胞の機能の1つである自己複製能を反映する指標であるニューロスフェアの大きさの検討: 胎児終脳(胎生11.5日から14.5日曝露)からbFGF, EGF存在下, 1週間培養することにより形成されるニューロスフェアについて, その径の分布を計測する。溶媒対照群で直径200 μm 以上のものが20%程度存在する条件下で, 曝露群との比較を行う。
- 2) 神経幹細胞の分化能に対する胎内曝露の影響の検討: 胎内曝露胎児由来(胎生11.5日から14.5

日)のニューロスフェアを20個取り, 容器に接着させ血清存在下1週間培養し, MAP2, GFAP, O4の抗体を用いた三重染色によってニューロスフェアの3系統への分化を半定量的に測定する. 溶媒対照群では, NAO (Neuron, Astrocyte, Oligodendrocyte), すなわち, 3種類の細胞すべてに分化するニューロスフェアが90%を占める条件下で, 検体投与群におけるNAOの割合の変化, 2種類の細胞にしか分化しないものや, 1種類の細胞にのみ分化するものの割合の変化をもって神経幹細胞分化能への影響とする.

2. 7. DESの神経幹細胞自己複製能に対する影響

われわれはDES(ジエチルstilbestロール)を内分泌攪乱化学物質のモデル化合物に選び(DESは17 β -エストラジールと同等のエストロゲン活性を有するが, 血漿タンパク質との結合が比較的弱いことが知られ, そのため胎児影響が強調されることが考えられる), その胎生期曝露による神経幹細胞への影響を検討した.

神経幹細胞がさかんに増殖する時期であると同時にそれらにエストロゲン受容体や, Hoxをはじめとする分節マーカーが順次発現する胎生11.5日から14.5日の神経管形成中期におけるエストロゲン影響を検討する目的で, 母親体重1 kgあたり2 μ gのDESを母獣の皮下に3日間反復投与した. 胎生15日目に胎児終脳を採取し, 前述の方法によりニューロスフェアを得た.

まず, 神経幹細胞の機能の1つである自己複製能を反映する指標であるニューロスフェアの大きさについて検討した結果, 図2・5に示すように, DESに曝露された胎児終脳から形成されたニューロスフェアはその径が小さく, 溶媒対照群で見られるような直径300 μ mを超えるサイズのものは形成されないことが明らかとなった. この結果はDESが胎児脳において神経幹細胞の自己複製能に影響する可能性があることを示唆するものであると考えられる.

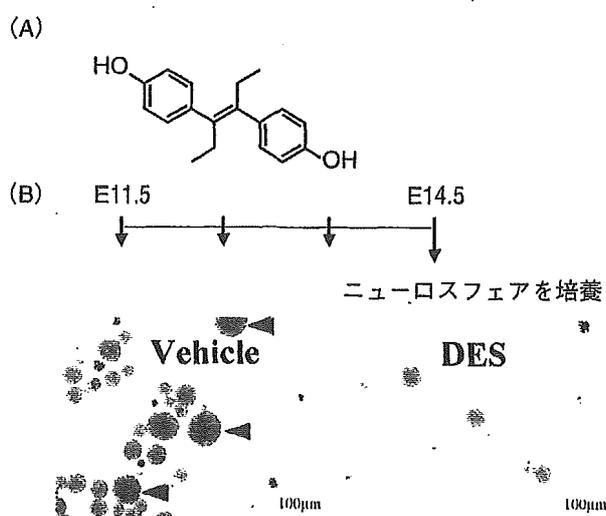


図2・5 胎生期神経幹細胞に対するDESの影響. (A) DESの化学構造, (B)胎生期DES *in utero*曝露による胎児終脳神経幹細胞に対する影響の検討. DESをマウス胎生11.5日から14.5日まで連日2 μ g/kg dam body weight/day投与し, 胎児終脳からニューロスフェアを得た. DES投与群では溶媒対照投与群にみられるような径の大きいニューロスフェアの形成が阻害されていた.

2. 8. DESの神経幹細胞分化に対する影響

次に、DES曝露胎児由来のニューロスフェアの分化能について検討した(図2・6)。DES曝露胎児由来のニューロスフェアを20個取り、容器に接着させ血清存在下1週間培養し、MAP2, GFAP, O4の抗体を用いた三重染色によって分化程度を検討した。Vehicle投与群では、NAO, すなわち、3種類の細胞すべてに分化するニューロスフェアが90%を占めたのに対し、DES 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与した群ではNAOの割合は低下し、2種類の細胞にしか分化しないものや、1種類の細胞にのみ分化するものの割合が増えていた。特に、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群ではアストロサイトにのみ分化するものが40%以上を占めた。

以上のことから、胎内DES曝露により、胎児の神経幹細胞の自己複製能および分化能の両方に影響が生じることが明らかとなった。殊に、胎児脳から細胞を分離し、ニューロスフェアを得る1週間の培養期間中の培養液中にはDESが存在していないにもかかわらず、これらの影響が観測されたことから、DESの神経幹細胞に対する作用は一過性のものではなく持続する性質のものであることが示唆された。そのメカニズムは現在不明であるが、1週間の培養期間中には、神経幹細胞はおおよそ10回の分裂を繰り返していると計算されることから、われわれはDNAメチル化などのエピジェネティックなメカニズムが関与している可能性を考えている。

2. 9. まとめ

以上紹介してきたように、内分泌攪乱化学物質は発生・発達の過程で、内分泌系、免疫系と共に

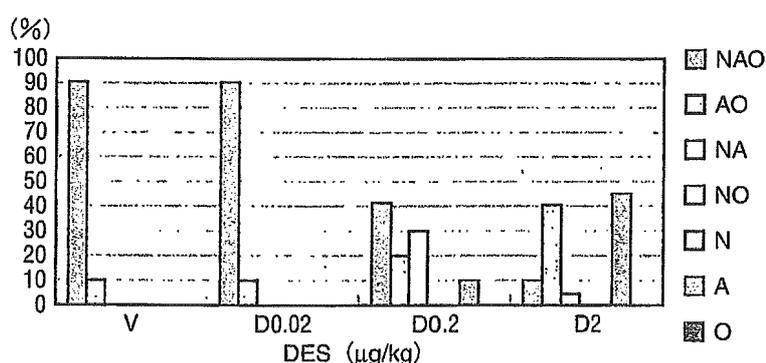


図2・6 DESの神経幹細胞分化に対する影響。図2・5と同様のスケジュールでDESに曝露した胎児終脳から形成されたニューロスフェアの分化能を調べた。bFGF, EGF存在下で未分化状態を保って浮遊培養したニューロスフェアを、コーティングした容器に移し、ウシ胎仔血清1%を加え1週間培養することで分化させた結果をグラフにまとめた。グラフ中の略号は以下を示す。N:ニューロン, A:アストロサイト, O:O4。たとえば、NAOはニューロン(N), アストロサイト(A), オリゴデンドロサイト(O)の3種類の細胞に分化したニューロスフェアを示す。Vehicle群(V)およびDES 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群(D0.02)では、3種類の細胞に分化したニューロスフェア(NAO)が90%を占めたのに対し、DES 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (D0.2)以上の群では、3種類の細胞に分化するニューロスフェアの割合は減り、アストロサイトにのみ分化するもの(A)の割合が増える傾向があった。

神経系、殊にその基幹となる神経幹細胞の機能にも影響を与える可能性があり、その影響を具体的に検討する研究が徐々に展開して来ている。エストロゲン受容体が神経幹細胞に発現していること、オーファン受容体であるTLXが成体神経幹細胞に発現し、少なくとも成体においてはその未分化性の維持に必須であること、甲状腺ホルモン T_3 が神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化を促進しうることなどが、内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞への影響の可能性を具体的に示しつつある例である。しかし、その影響が実際にどのような表現形として、何時どこに現れるのかは現在不明な点が多い。よって、これらの影響の分子メカニズムに踏み込んだ解析から表現型を見定めていく方策と、器質の変化としては捕らえにくい行動異常などの機能障害を詳細に検討する方策との両面からのアプローチが今後重要となろう。分子メカニズムの面からは、一時的な曝露によるエピジェネティックな変化が、何回もの細胞分裂を経た後にまで影響を及ぼす可能性が示唆されており、機能障害の詳細の解明とともにリスク評価の観点からも重要な毒性学的検討課題の1つであると考えられる。

参考文献

1. Reynolds, B.A., W. Tetzlaff, and S. Weiss, A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 1992. **12**(11): p. 4565-74.
2. McKay, R., Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 66-71.
3. Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., Taga, T., Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science*, 1999. **284**(5413): p. 479-2.
4. Suslov, O., Kukekov, V., Ignatova, T., and Steindler, D. (2002). Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14506-14511.
5. Hitoshi, S., Tropepe, V., Ekker, M., and van der Kooy, D., Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. *Development*. 2002 Jan;129(1):233-44, 2002. **129**: p. 233-244.
6. Qian, X., Shen, Q., Goderie, S., He, W., Capela, A., Davis, A., and Temple, S., Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron*, 2000. **28**: p. 69-80.
7. Reynolds, B.A. and S. Weiss, Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992. **255**(5052): p. 1707-10.
8. Temple, S. and A. Alvarez-Buylla, Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol.*, 1999. **9**: p. 135-141.
9. Gage, F., Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000, 2000. **287**: p. 1433-1438.
10. Gould, E., Reeves, A., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C., and Fuchs, E., Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1999. **96**: p. 5263-5267.
11. Eriksson, P., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A., Nordborg, C., Peterson, D., and Gage, F., Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.*, 1998. **4**: p. 1313-1317.
12. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A., Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 1999. **97**(6): p. 703-16.
13. Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisen, J., Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 1999. **96**(1): p. 25-34.
14. Shi, Y., Chichung Lie, D., Taupin, P., Nakashima, K., Ray, J., Yu, R. T., Gage, F. H., and Evans, R. M., Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature*, 2004. **427**(6969): p. 78-83.

15. Ciana, P., Ghisletti, S., Mussi, P., Eberini, I., Vegeto, E., and Maggi, A., Estrogen receptor alpha, a molecular switch converting transforming growth factor-alpha-mediated proliferation into differentiation in neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 2003. **278**(34): p. 31737-44.
16. Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, A. J., and Gould, E., Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*, 1999. **19**(14): p. 5792-801.
17. Brannvall, K., L. Korhonen, and D. Lindholm, Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Neurosci*, 2002. **21**(3): p. 512-20.
18. Sawamoto, K., et al., Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J Neurosci.*, 2001. **21**: p. 3895-3903.

疾患 プロテオミクスで 病気を治せるか プロテオミクスの 最前線

【編集】 戸田年総

(東京都老人総合研究所)

荒木令江

(熊本大学大学院医学薬学研究部)

small domain



株式会社 メディカルドウ

編集者プロフィール



戸田年総 (とだ としお)

東京都老人総合研究所 主任研究員
プロテオーム共同研究グループリーダー

- 1975年 大阪大学理学部化学科卒業
1977年 大阪大学大学院理学研究科生物化学専攻前期(修士)課程修了
東京都老人総合研究所生化学部基礎第二研究室助手
1988年 大阪大学理学博士(学位取得)
東京都老人総合研究所分子生物学部門研究員
1988～1989年 カリフォルニア大学サンフランシスコ校皮膚科学教室客員研究員
1993年 財団法人東京都老人総合研究所分子生物学部門主任研究員
1998年 財団法人東京都老人総合研究所遺伝子情報部門次席・主任研究員
2002年 財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団
東京都老人総合研究所プロテオーム共同研究グループリーダー

<賞>

- 1983年 第22回日本電気泳動学会尾玉賞受賞『マイクロコンピューターを用いたセルロースアセテート膜二次元電気泳動法に関する一連の研究』

<学会役員>

- 日本電気泳動学会常務理事
日本ヒトプロテオーム機構理事
日本基礎老化学会評議員



荒木令江 (あらい のりえ)

熊本大学大学院医学薬学研究部
先端生命医療科学科成育再建・移植医学講座
腫瘍医学分野 講師

- 1982年 九州大学農学部農芸化学科卒業
1984年 九州大学大学院農学研究科修士課程修了
1985年 米国ボストン大学医学部生化学教室研究員
1987年 熊本大学医学部生化学教室研究員
1992年 医学博士号取得
熊本大学医学部生化学教室助手
1996年 熊本大学医学部腫瘍医学講座助手
2002年 熊本大学医学部腫瘍医学講座講師
2003年 熊本大学大学院医学薬学研究部腫瘍医学分野講師
(大学院医学教育部・医学部腫瘍医学分野講師兼任)

<学会役員>

- 日本ヒトプロテオーム学会理事, 日本生化学会, 日本癌学会, 日本蛋白質科学会,
米国蛋白質科学会 (The Protein Society), 米国生物科学会 (FASEB)

遺伝子医学MOOK ②

疾患 プロテオミクス の最前線

-プロテオミクスで 病気を治せるか-

定価: 6,000円 (本体 5,714円+税)
2005年3月26日 第1版第1刷発行

編集 戸田年総・荒木令江

発行人 大上 均

発行所 株式会社 メディカル ドゥ

〒550-0004 大阪市西区靱本町1-6-6 大阪華東ビル

TEL. 06-6441-2231/FAX. 06-6441-3227

E-mail: home@medicaldo.co.jp

URL: http://www.medicaldo.co.jp

振替口座 00990-2-104175

印刷 報栄印刷株式会社

©MEDICAL DO CO., LTD. 2005 Printed in Japan

・本書の複製権・翻訳権・上映権・頒布権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は株式会社メディカルドゥが保有します。

・ (株)日本著作出版権管理システム委託出版物

本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつと事前に、(株)日本著作出版権管理システム(電話 03-3817-5670, FAX 03-3815-8199)の許諾を得てください。

ISBN4-944157-32-0

4. KeyMolnet -ポストゲノム時代の新しい 情報統合プラットフォームとネットワーク解析-

板井昭子・佐藤陽美

プロテオミクスの解析のみならず、ゲノミクス、創薬、医学、ライフサイエンス研究のあらゆる場面で有用な情報統合プラットフォーム「KeyMolnet」を開発した。今や技術の進歩により、一度に膨大な量のデータを手にすることができる。しかし、この宝の山から意味のあるデータを取り出し、それらを生物学的機能に結びつけることのできる、真のデータマイニング⁴⁾ツールは今のところ存在していない。

本稿では、分子間の関係に注目し、それらと疾患、医薬品、生体现象を有機的に結びつけた新しい概念のツールKeyMolnetを用いたネットワーク解析を紹介する。

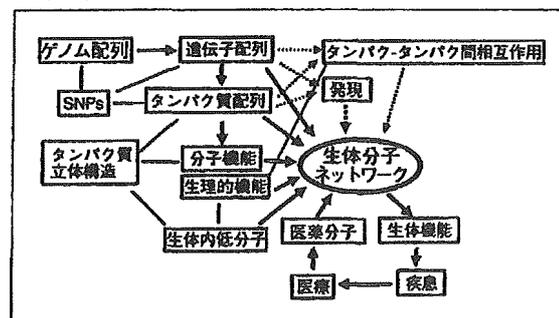
はじめに

「観察」から始まった伝統的なライフサイエンス研究は、近年、まずは「配列」からというゲノムワイドなパラダイムへと変化した。今や分析手法や技術の革新的な進歩と網羅的解析により、一度に膨大なデータの山を手に入れることができるようになったわけである。現在、最も簡便にそれらを可能にする手段は、DNAマイクロアレイではないだろうか。いかなる局面においても遺伝子発現情報、特にその網羅的情報は有用には違いない。しかし、当然のことながら網羅的であっても遺伝子発現情報だけでは生体分子の機能は解明できない。生体分子の機能の解明にはタンパクの発現や修飾情報が必須であり、さらにはゲノム、プロテオーム、そしてあらゆる生物情報をつなぐネットワークが必要である(図1)。現在のところ、電子化、固定化されたネットワークや、いわゆるテキストマイニング⁵⁾で集められた不確かな情報か

らネットワークを作り上げる手法は登場しているが、それらは解析手段には至っていない。

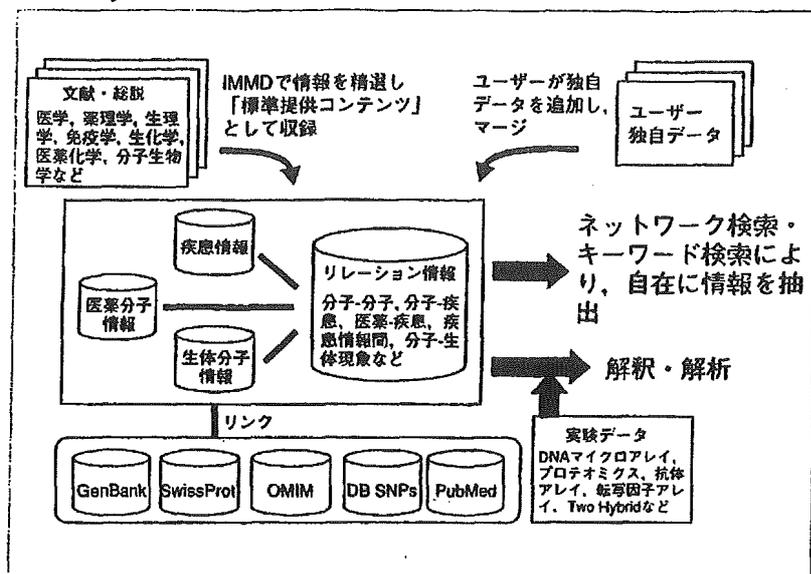
そこで、本稿ではKeyMolnetを用いたDNAマイクロアレイデータと生体现象の間のメカニズム解析へのアプローチ法、さらにはプロテオミクスデータ解析への応用とデータ統合、これらを用いた疾患、医薬品のメカニズム解析への可能性について述べる。

図1 様々な生物情報の関わり



データマイニング、プロテオミクス、DNAマイクロアレイ、プロテオーム、
トランスクリプトーム、ネットワーク解析、drug target、シグナル伝達

図② KeyMolnetの全体像



この系における生体現象のメカニズムを探ろうという方針である。注目した分子(群)を始点に、アポトーシスそれ自体を終点に設定することにより、ネットワークを生成させることができる。また「アポトーシス誘導または促進に関与する分子」を終点として指定すると、より詳細な検討も可能となる。

ここではアポトーシスに関与する分子 caspase-3 に至るネットワークを描かせてみることにする。

I. KeyMolnetとは

分子ネットワーク, 疾患情報, 医薬情報からなるコンテンツと, それらの間を縦横無尽に行き来し, 検索できるソフトウェアからなる。情報はすべて研究者が総説・文献を読み下し, KeyMolnet 独自に編まれたものであり, それらから自在にリアルタイムでネットワークを生成することができる(図②)。

II. DNA マイクロアレイデータの解析

12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) 作用下, ヒト急性骨髄性白血病細胞株 HL-60 をマクロファージ様に分化させた際の, 時系列を伴った DNA マイクロアレイデータ [データおよびデータ処理法 (FUMI 理論) 提供: 国立医薬品食品衛生研究所] を KeyMolnet を用いて解析した¹³⁾。この系では, アポトーシスが起ることがよく知られている¹⁴⁾。そこで, KeyMolnet を用いて, 得られたデータからアポトーシス誘導のメカニズムを探ることとした。HL-60 に TPA を作用させ, 1, 3, 9 時間後にコントロールと比較し, 2 倍以上発現亢進した分子をそれぞれ抽出し, これらの分子からアポトーシス誘導に至るパスウェイを調べることにし,

この実験では3つの時系列に伴った3セットのネットワークが得られるが, まずは遺伝子発現の網羅的解析にふさわしい生命現象のメカニズムの概観を試みる。すなわち, これら3つの時系列ネットワークを網羅すべく OR 演算機能を用いると, この系における caspase-3 に至るネットワークを概観することができるのである。KeyMolnet と DNA マイクロアレイデータを用いて, この系で起こった生命現象「アポトーシス」をまず実験データと caspase-3 により集約させ, さらに時空間で俯瞰させたわけである。この OR 演算により得られたネットワークに 1, 3, 9 時間後の数値データ (コントロールと比べた発現量比, fold change) をインポートして色づけ表示すると, 時間の経過とともに, caspase-3 に向かってアポトーシスという現象が収束していく様がネットワーク上で視覚化できる(図③)。実際, ヒト白血病細胞株 U937 では TPA により caspase-3 の活性化が起こり, アポトーシスが誘導される¹⁵⁾。さらに詳細なネットワーク解析を行うためには, 上記のように3つの時系列による3セットのネットワークを描画させた後(図④, 例: 1 時間後のネットワーク), この系における caspase-3 を介したアポトーシス誘導メカニズムのうちで重要と考えられる経路, すなわちネットワークの共通部分