

遺伝子導入効率を補正するために、内部標準として β -galactosidase を発現するプラスミドも同時に遺伝子導入し、活性を測定した。

供試化合物

化合物はすべて DMSO に溶解後、培地に添加する際には DMSO 濃度が 1%以下になるようにした。

C. 研究結果

様々な化学物質の SXR への作用

内分泌かく乱作用が疑われる、Bisphthalate、Dibutyl phthalate、Dieldrin、Fenvalerate、Methoxychlor について、SXR の転写能を活性化するかについて検討した。肝腫瘍細胞の HepG2 に SXR を強制発現させ、外来異物応答配列 (Xenobiotic Response Element; XRE) をルシフェラーゼ遺伝子上流につないだレポーター遺伝子を用いて用量依存的な転写活性化を調べた。その結果、ポジティブコントロールとして用いた Rifampicin に加えて、ここで調べた全ての化学物質が、濃度依存的な転写活性化を示した (Fig. 1)。活性の強さは、Rifampicin、Fenvalerate、Dibutyl phthalate、Methoxychlor、Bisphthalate、Dieldrin の順であった。しかし、程度の差こそあれ、多くの化学物質が SXR に作用する事が確かめられた。

SXR による NF κ B 活性の抑制

HepG2 は、肝臓由来細胞であるので、最初に内因性の SXR の活性について検討した。Fig. 2A に示したように、SXR を導入していない細胞では Rifampicin

濃度依存的な転写の活性化はほとんど起こらず、HepG2 には機能ある SXR がほとんど発現していないことが推察された。

次に、HepG2 に NF κ B のサブユニットである p65 を発現させ、そこに同時に SXR も発現させた時の NF κ B を介する転写活性を調べた。その結果、Rifampicin の濃度依存的に NF κ B 活性の低下が観察され、さらにこの活性阻害は SXR を細胞に導入した時にのみ起こった (Fig. 2B)。このことは、SXR が何らかの方法で NF κ B の活性を抑制していることを示唆している。

NF κ B による SXR 活性の抑制

次に、SXR と NF κ B の関係をさらに明らかにする目的で、NF κ B の大量発現が SXR の活性にどう影響するか調べた。Fig. 3A に示したように、NF κ B サブユニットの p65 は、NF κ B 応答配列を上流につないだルシフェラーゼ遺伝子の活性を顕著に増加させる。一方、TNF α は、細胞膜上に存在する受容体を介して I κ B を不活性化して、NF κ B を核内に移行させることが知られている。HepG2 細胞においても、内因性の NF κ B (Fig. 2A の 0 ng のカラム) は I κ B によって抑制されており、TNF α の添加は I κ B の抑制を解除し、NF κ B の活性を約 3 倍増加させた。しかし、p65 を強制発現させると、TNF α 依存的な転写の活性化は観察されなくなる。これは、I κ B に結合していない NF κ B が細胞内に大量に存在するようになるためと考えられる。この条件で、SXR のリガンド依存的な転写の活性化を観察した (Fig. 3B)。

その結果、興味あることに、p65 の量依存的に SXR の活性が抑制されたのである。前項の実験結果と合わせて考えると、SXR と NFκB は相互にその転写活性化能を抑制する関係にあることを示唆している。

D. 考察

薬物投与による免疫系の抑制は、かなり古くから研究されてきたテーマである。これまで、この現象は単に薬剤の一般的な毒性の結果と考えられてきたが、最近の研究から核内受容体を介した、特異的なメカニズムが存在するとの実験結果が示されるようになってきた。実際、結核の治療薬として使われてきた Rifampicin は、代表的な SXR のリガンドであるが、同時に免疫抑制剤としての適応もある。同様に、SXR のリガンドとして働く抗痙攣薬の phenytoin の副作用の一つに免疫抑制作用がある。これらのことは、薬物受容体による免疫系の抑制を示唆している。

実際、本研究により、SXR と免疫系のキーレギュレーターである NFκB は相互に抑制的な関係にあることが分かった。つまり、化学物質の投与により活性化された SXR は、NFκB の活性を抑制することにより免疫抑制作用を示し、逆に感染症やアレルギーにより活性化された NFκB は SXR の活性を抑制するところにより薬物代謝を阻害すると考えられる。Fig. 1 にも示したように、SXR が多くの内分泌かく乱物質をリガンドにすることを合わせて考えると、内分

泌かく乱物質による免疫毒性は、部分的には SXR を介していることが予想される。

一方、SXR が誘導する CYP 系酵素は、外来異物だけではなく内因性ステロイドの代謝にも関わっている。つまり、体内に取り込まれた化学物質は SXR を活性化し、その結果誘導された CYP 系酵素がステロイド代謝系を変え、内分泌系がかく乱される可能性も考えられる。

このように、SXR は多種多様な化学物質をリガンドとし、内分泌系、免疫系等に影響を与える可能性があり、今後の研究が必要であると考えられた。

E. 結論

- 内分泌かく乱作用が疑われている化学物質の多くが SXR を活性化する。
- SXR は、NFκB の活性を抑制する。
- NFκB は、SXR の活性を抑制する。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Horiguchi, K., Arai, S., Nishihara, T. and Nishikawa, J. AIB1 promotes DNA replication by JNK repression and Akt activation during cellular stresses. *J. Biochem.* 140: 409-419 (2006)

Hari, S., Nishikawa, J., Horiguchi, K., Iida, M. and Nishihara, T. Anti-androgenic activity of n-nitrosodibenzylamine, n-nitrosodiphenylamine and n-nitrosodicyclohexylamine. *J. Health Sci.* 52: 522-531 (2006)

Nakanishi, T., Hiromori, Y.,
Yokoyama, H., Koyanagi, M., Itoh, N.,
Nishikawa, J. and Tanaka, K.
Organotin compounds enhance 17 β -
hydroxysteroid dehydrogenase type 1
activity in human choriocarcinoma
Jar cells: potential promotion of
17 β -estradiol biosynthesis in human
placenta. *Biochem. Pharmacol.* 71:
1349-1357 (2006)

Nishikawa, J. Imposex in marine
gastropods may be caused by binding
of organotins to retinoid X receptor.
Marine Biology. 149: 117-124 (2006)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況
なし

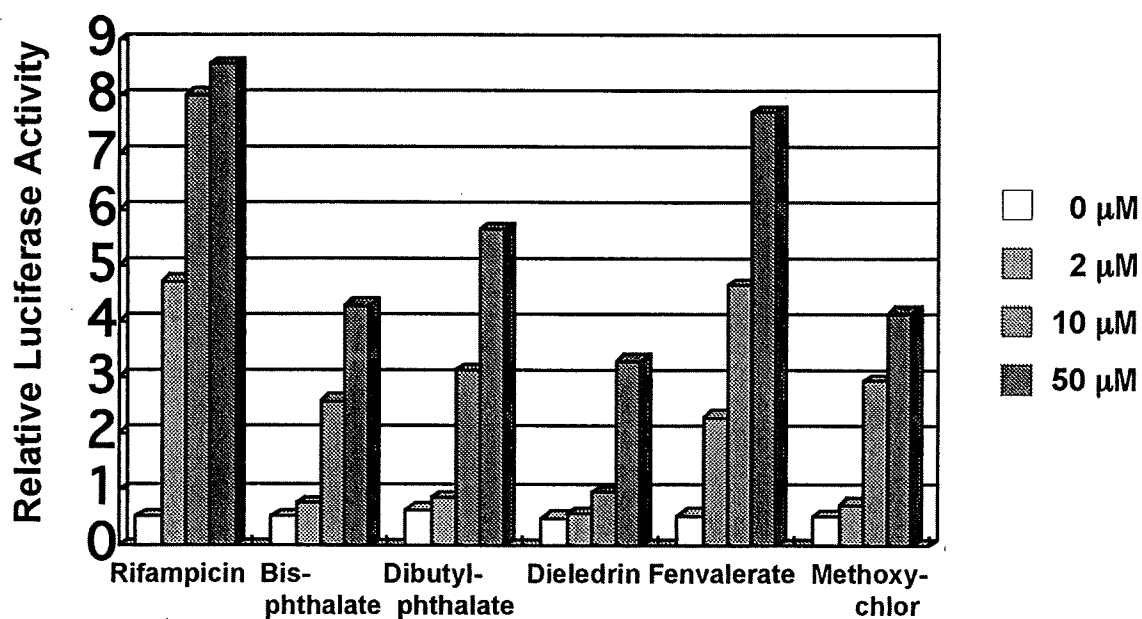


Fig.1 Various chemicals are ligands for SXR

HepG2 cells were cotransfected with pCDG1-hSXR and pXRE-luc. Cells were treated with suspected endocrine disruptors as indicated concentrations.

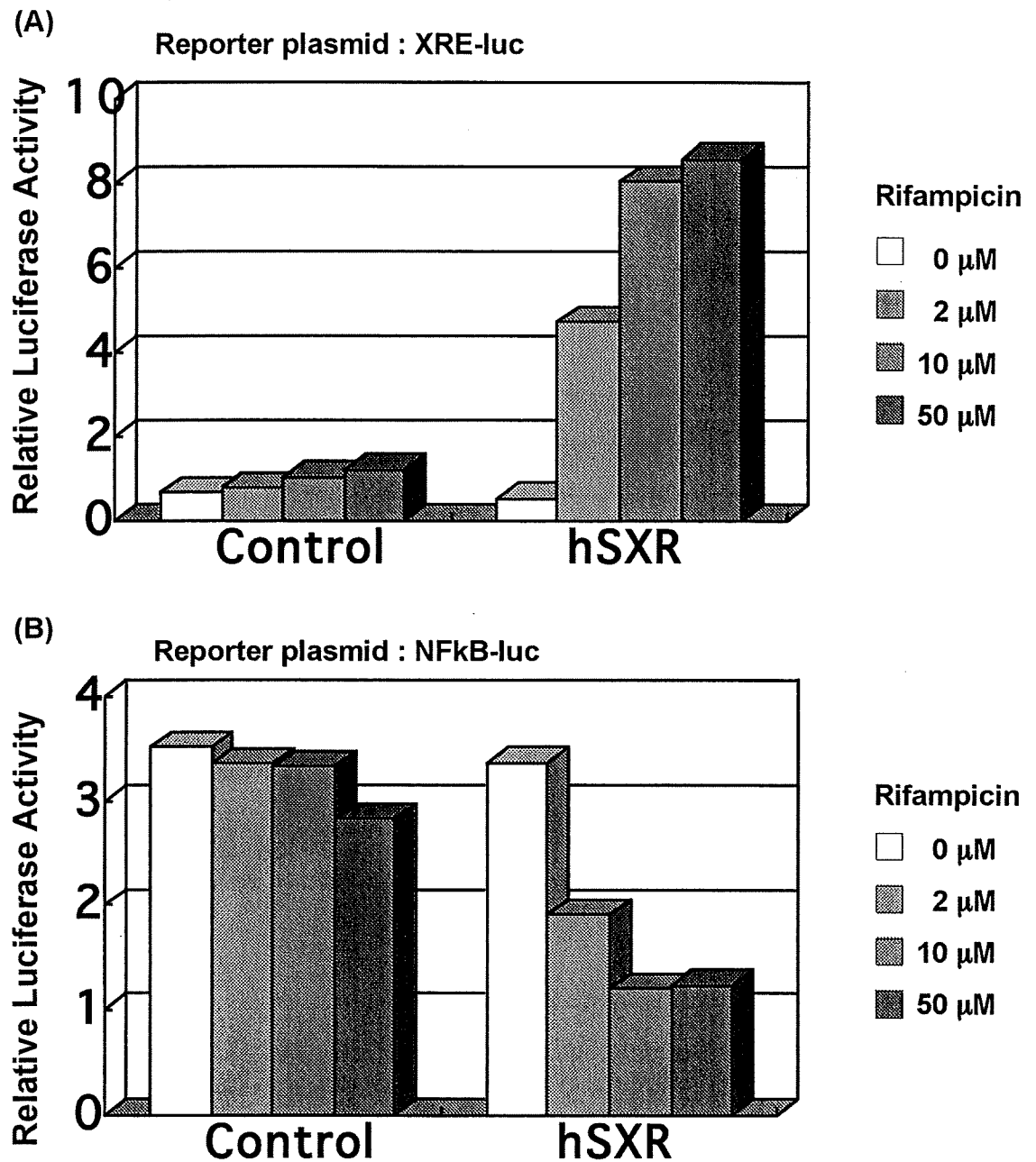


Fig.2 Rifampicin represses NFkB-dependent transcription in SXR-dependent manner. (A) HepG2 cells were cotransfected with pXRE-luc and either indicated plasmid (GAL4-VDR was used as control). (B) HepG2 cells were cotransfected with NFkB subunit p65, NFkB-dependent reporter plasmid (NFkBx3-Luc) and either indicated plasmid. Cells were treated with rifampicin at the indicated concentration 24 hours before the luciferase assay.

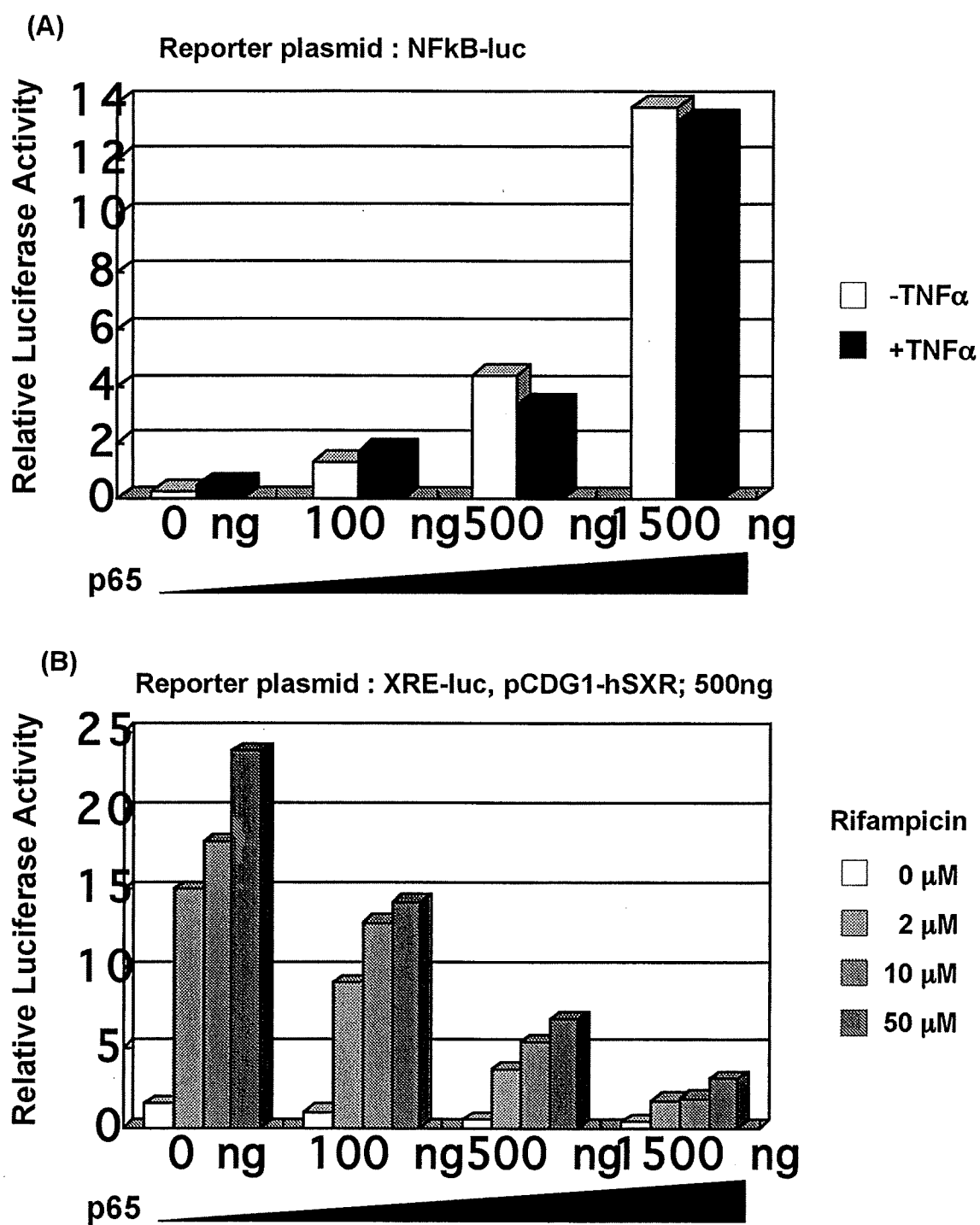


Fig.3 Dose-dependent inhibition of SXR activity by p65. (A) HepG2 cells were cotransfected with NFkB-luc and increasing amount of p65 expression plasmid. Transfected cells were treated with DMSO or 10 ng/ml TNF α . (B) HepG2 cells were cotransfected with XRE-luc and increasing amount of p65 at 0.2:1, 1:1, or 1:5 ratios with SXR. Transfected cells were treated with indicated amount of Rifampicin.

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 安全性生物試験研究センター 毒性部 室長

研究要旨

内分泌かく乱化学物質は、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。

18 年度は ES 細胞及び ES 細胞から形成される胚様体 (EB) に対する内分泌かく乱化学物質の遺伝子レベルでの影響解析に資するため、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 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行い、遺伝子発現の精密なデータベースを完成させるとともに、種々の核内受容体の遺伝子発現パターンを明らかにした。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の暴露は、エストロゲン、アンドロゲン、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、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。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

内分泌かく乱化学物質の 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(1×10⁶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クス社の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。同じ実験を独立して計2回実施した。これにより各タイムポイントのサンプル数を2とした。

(倫理面への配慮)

特になし。

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、内分泌かく乱化学物質の作用と関連する核内受容体遺伝子ER(エストロゲン受容体)α、β、ERR(エストロゲン関連受容体)α、β、γ、PR(プロゲステロン受容体)、AR(アンドロゲン受容体)、TR(甲状腺ホルモン受容体)α、β、VDR(ビタミンD受容体)、PPAR(ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体)α、δ、γ、RAR(レチノイン酸受容体)α、β、γ、RXR(レチノイドX受容体)α、β、γ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した(Fig. 1)。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)、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、Cerberus、Goosecoid、Flt-1等について解

析したところ、内胚葉のマーカーではEBの5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、心臓のマーカーはEBの4.5日前後から、増加するなど、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、内分泌かく乱化学物質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、前年度に作製されたEB分化遺伝子のデータベースと今回の結果が同様であったことから、本手法が解析に十分利用出来ることが示された。今後、各種ホルモンや内分泌かく乱化学物質の影響についても検索する予定である。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質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

1. 論文発表

Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み、菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、細胞工学、26、71-77、2007

2. 学会発表

Percellome 手法を用いたマウス ES 細胞分化系における分化マーカー遺伝子の発現パターンの解析、高木篤也、北嶋聡、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、2006 年 7 月、名古屋

Global gene expression profiling in mouse embryonic stem cells and embryoid bodies.

A. TAKAGI, S. KITAJIMA, N. NAKATSU, K. IGARASHI, K. AISAKI AND J. KANNO、20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006 年 6 月、京都

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

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、2005 年 6 月、東京

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

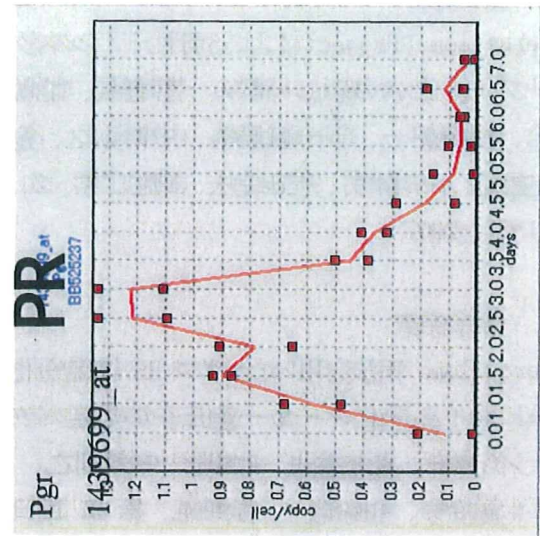
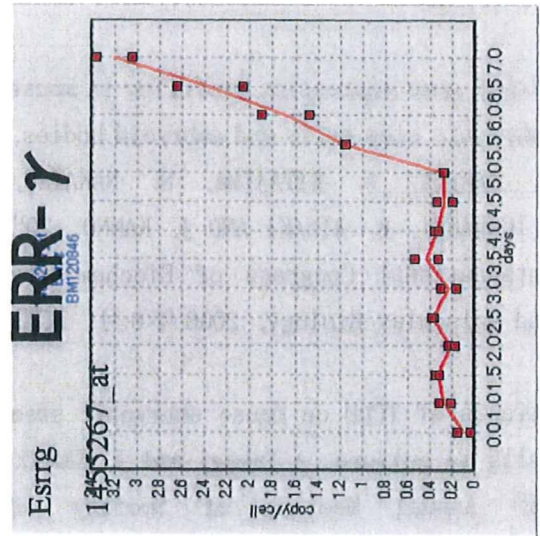
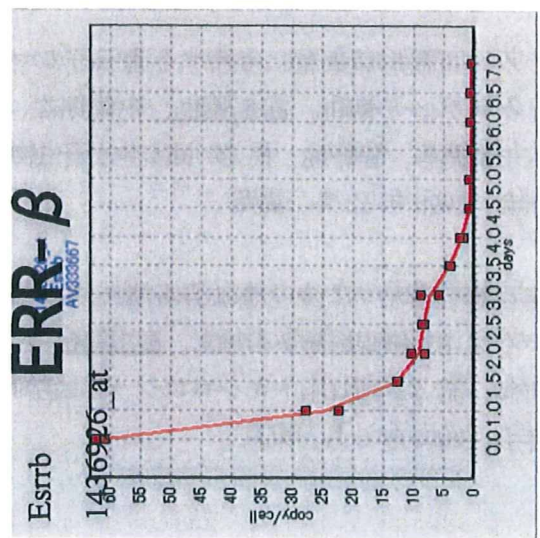
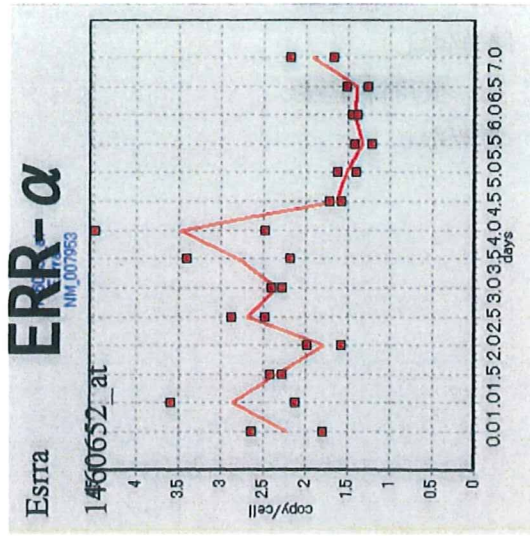
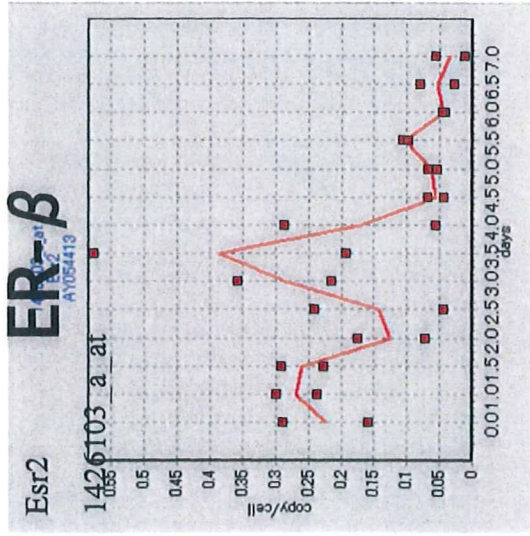
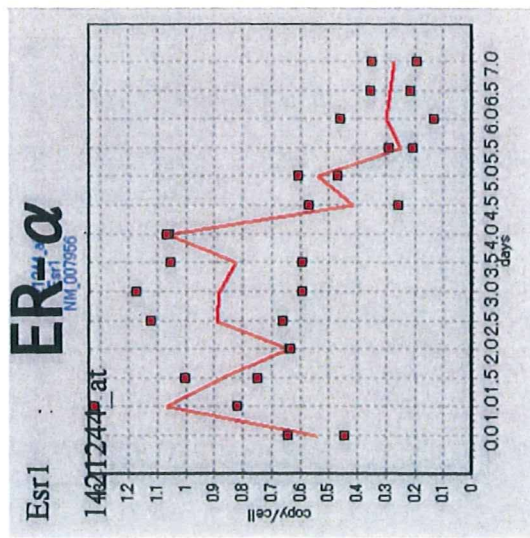


図1-1. EBの分化過程での核内受容体の遺伝子発現の変化

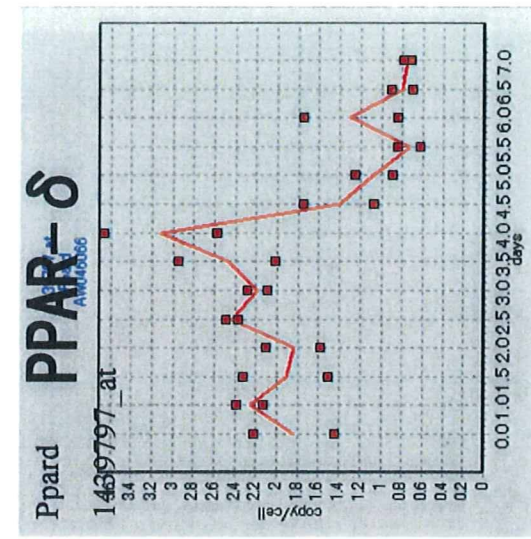
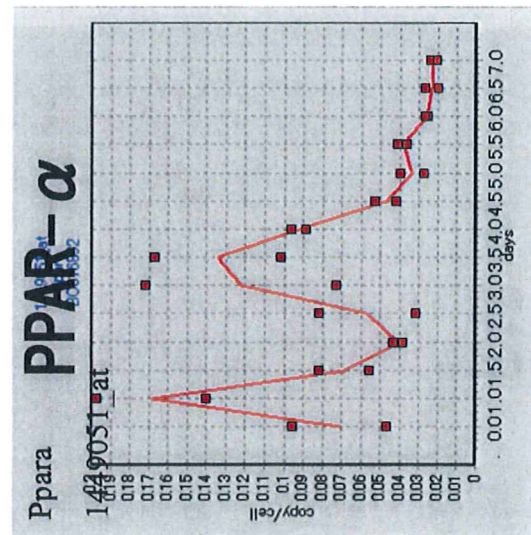
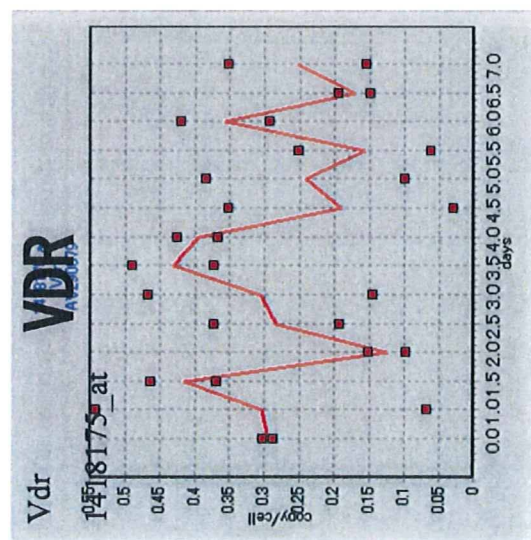
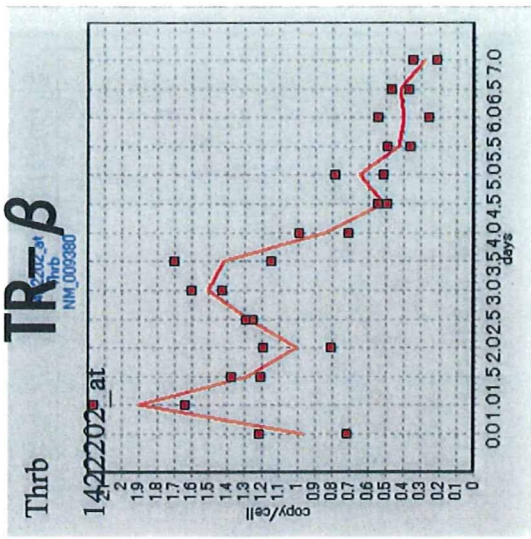
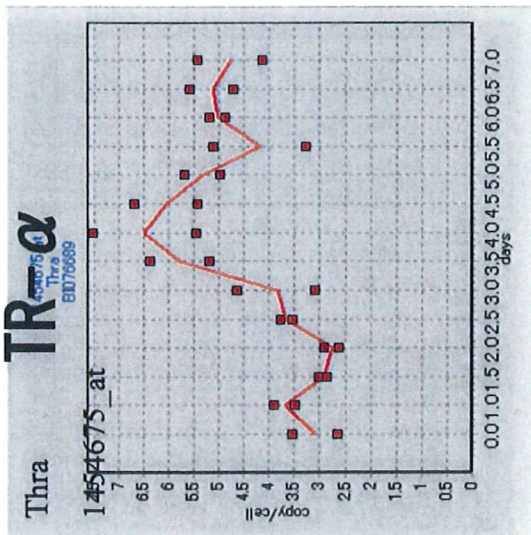
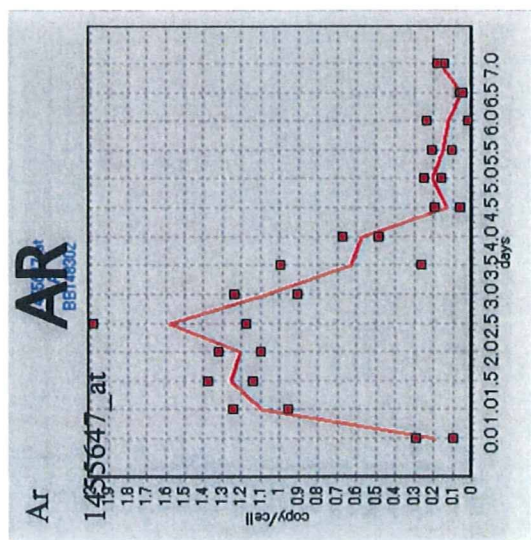


図1-2. EBの分化過程での核内受容体の遺伝子発現の変化

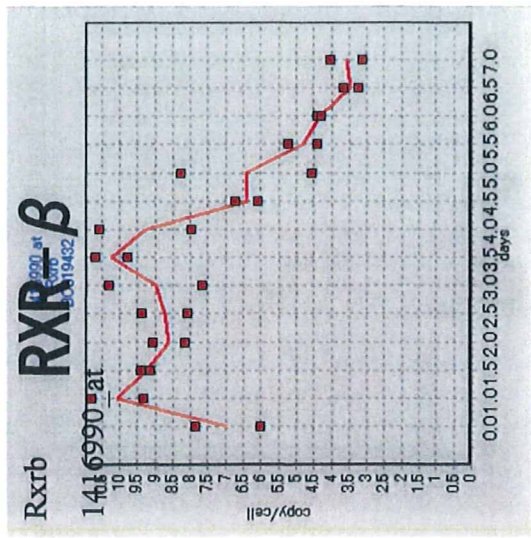
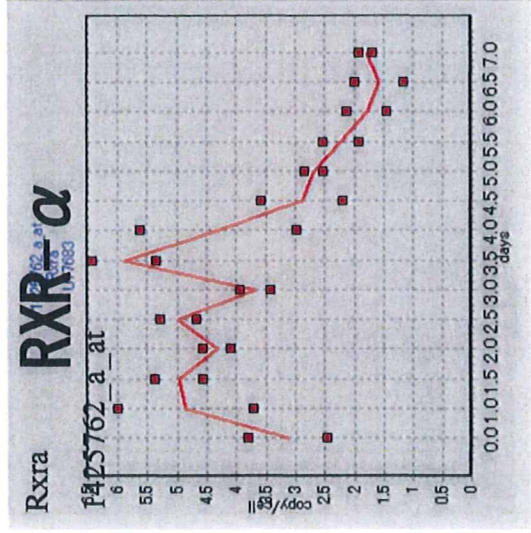
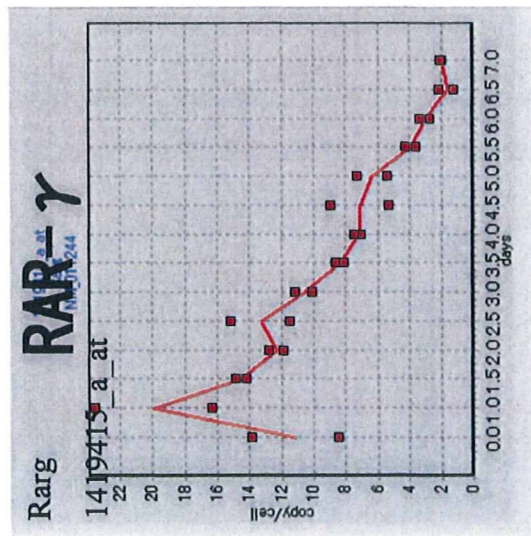
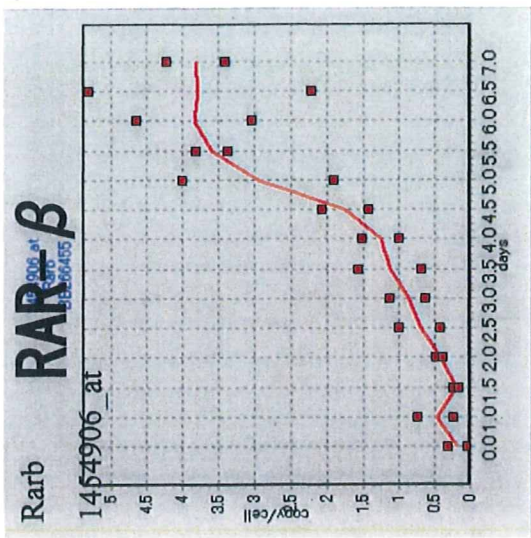
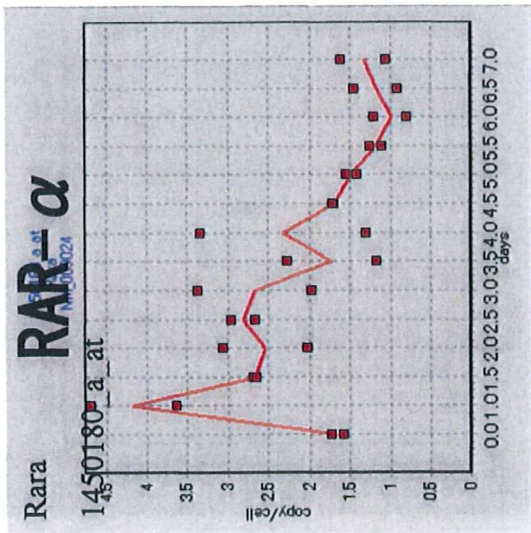
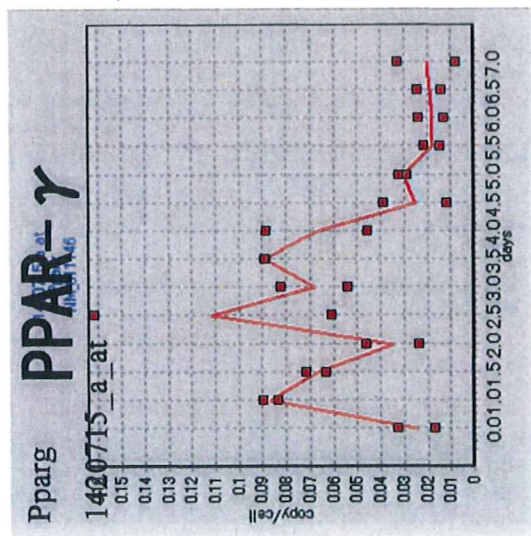


図1-3. EBの分化過程での核内受容体の遺伝子発現の変化

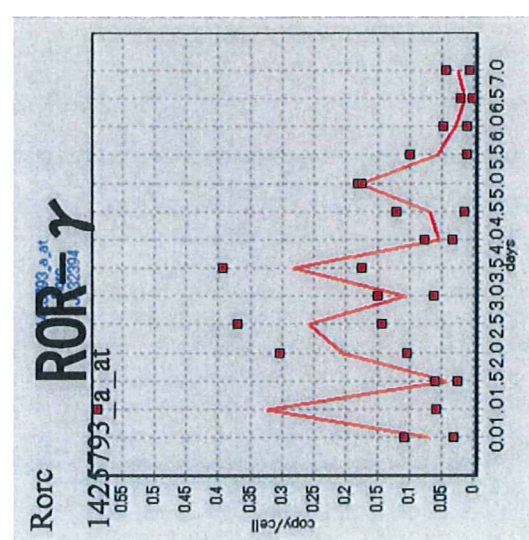
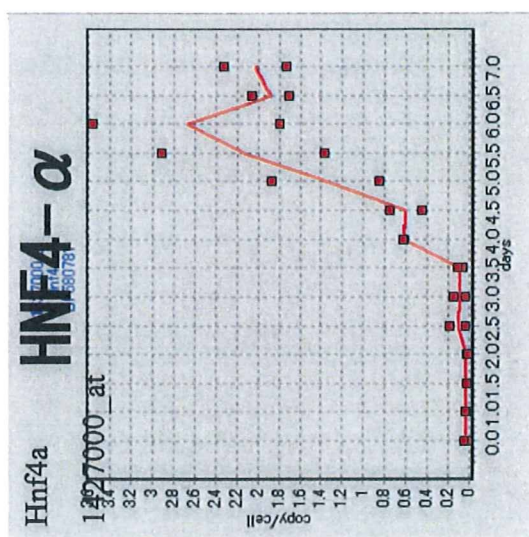
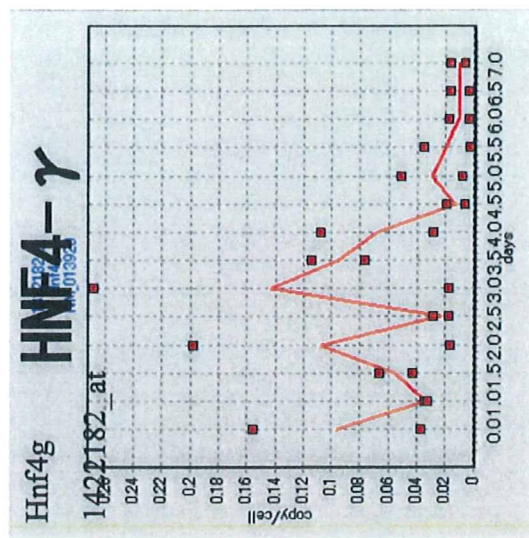
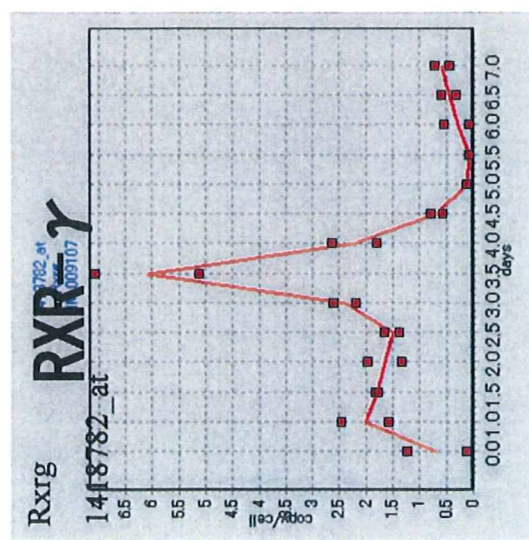
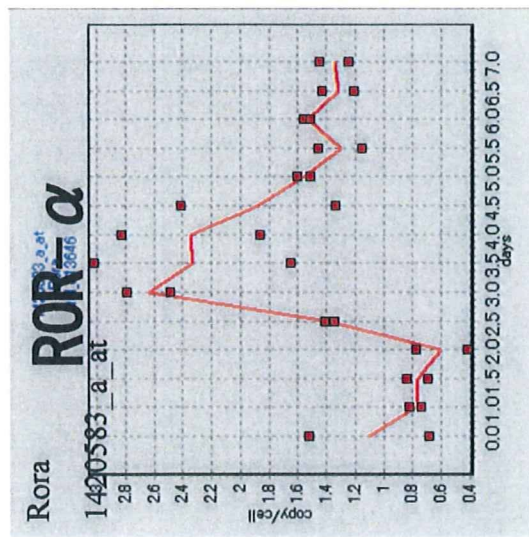
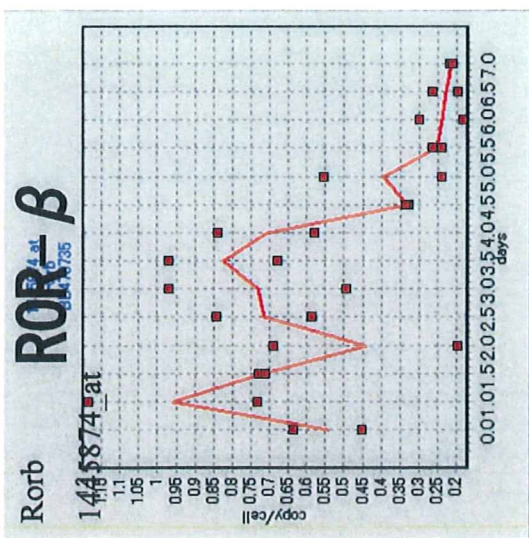


図1-4. EBの分化過程での核内受容体の遺伝子発現の変化

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 安全性生物試験研究センター 毒性部 主任研究官

研究要旨

本研究では内分泌かく乱化学物質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、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、これまでに構築したマウス雌についての網羅的遺伝子発現データベース（基盤データベース）を活用することで、生殖器障害メカニズム解析を効率的に進めることが可能であるか検討するため、我々が作製したエストロゲン受容体改変マウス（ α 遺伝子座に全長型の cDNA をノックインしたマウス (ERaKI mouse)）を解析した。ERaKI mouse 雌は妊娠維持不良を示し、妊娠 12.5 日目には胎児が全例死亡する。そこで、ERaKI mouse の妊娠 10 日目の子宮、胎盤に於ける遺伝子発現を網羅的に解析し、基盤データベースで性周期に伴う発現変化が捉えられた血管新生制御遺伝子を調べたところ、Adrenomedullin (ADM) が子宮、胎盤共に低下傾向、Cyr61 は胎盤で低下傾向にあることが分かった。ADM、Cyr61 共にノックアウトすることで胎盤不全による妊娠維持不良が報告されていることから、ERaKI mouse における妊娠維持不良への関与が示唆された。更に、増殖性細胞数を反映すると考えられ、発情期に子宮で発現ピークを持つことが基盤データベースから明らかになった Prominin1 の発現が ERaKI mouse で半減していた。よって、ERaKI mouse 子宮は妊娠維持に必要な細胞増殖応答を行えない可能性が示唆された。以上、今年度の研究により、本研究によって構築した基盤データベースの雌生殖器障害メカニズム解析における有用性が示された。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質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

<エストロゲン受容体 α 遺伝子 cDNA ノックインマウス>

本マウスは、エストロゲン受容体 α の全長型 cDNA を同遺伝子座の exon1 (開始コドンを含む) にノックインしたマウスである (投稿準備中)。ホモ型の雌を野生型雄と交配させると妊娠 12 日目には胎児が全例死亡することが判明している。

<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 lysis buffer (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 (Qiagen 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

<エストロゲン受容体 α 遺伝子 cDNA ノックインマウス (ERaKI mouse) 妊娠維持不良について>

ERaKI mouse の妊孕性検討過程で、本マウス雌が妊娠維持不良を示すことが判明した。明らかな不良を示す時期及び胎児が死亡する時期を特定するため、妊娠 7.5 日目から 12.5 日目まで経時的に開腹し観察したところ (図 1)、妊娠 9.5 日目当たりからマクロ的にも胎児発育不良が認められ、妊娠 10.5 日目に大部分の胎児死亡が、妊娠 12.5 日目に全例死亡が確認された。発育不良の

時期と胎盤発達の時期が重なることから、同時期の胎盤組織切片を検討したところ、妊娠 10.5 日目の胎盤において、ラビリンス構造発達不全が認められた (図 2)。

ERaKI mouse 雌を、生殖器障害を有するモデルマウスと位置づけ、その障害メカニズムを、本研究で構築した基盤データベースを活用することで、効率的に解析できるか検証した。

<網羅的遺伝子発現解析>

ERaKI mouse 雌の妊娠維持不良メカニズム検討のために、妊娠 10.5 日目の子宮、胎盤を選び、Percellome 手法を用い網羅的に遺伝子発現を解析した。野生型と比較したところ、発現変化は胎盤よりも子宮に於いて大きかった (図 3)。

たり、性周期に伴う遺伝子発現変化データベースを随時参照した。

まず、組織切片解析により胎盤ラビリンス構造発達不全が疑われたため、その過程に関与しうる遺伝子群として血管新生制御遺伝子群に注目した。その結果、性周期に伴い発現変動する血管新生制御遺伝子として、Adrenomedullin(ADM)、Cyr61、VEGF-A が選択された (図 4)。ERaKI マウスにおけるこれらの発現を調べたところ、ADM が子宮、胎盤共に低下傾向、Cyr61 は胎盤で低下傾向にあることが分かった (図 5)。ADM、Cyr61 共にノックアウトすることで胎盤不全による妊娠維持不良が報告されていることから、これらの発現変化がエストロゲン受容体 α cDNA ノックインマウスにおける妊娠維持不良に関与していることが示唆された。

次に、ERaKI 子宮での発現変化が大きい

ことに注目し解析したところ、発現上昇遺伝子群として Ovgpl (Oviductal glycoprotein1)、Ptgs2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2)、Clca3 (Chloride channel calcium activated 3)、Itgpl (Immunoresponsive gene 1) の 4 々に加え、Immunoglobulin 遺伝子群が選択された (図 6)。

Ovgpl、Ptgs2、Clca3、Itgpl はいずれも性周期において発現変動を示す遺伝子であり、発情期もしくは発情後期に発現ピークを有していた。また、プロモーター解析の結果、これらのプロモーターにはエストロゲン受容体の結合部位やプロゲステロン受容体結合部位が存在し、これらの発現が実際にホルモン制御を受けていることが示唆された。

Immunoglobulin 遺伝子群には性周期における大きな変動は認められず、ERaKI 子宮に於けるこれらの発現上昇は子宮への B 細胞浸潤を示唆しているものと考えられた。

発現低下遺伝子群としては、prolactin like protein family が選択された。Prolactin like protein family のゲノム上の位置を調べたところ、これらは 13 番染色体にクラスター上に存在しており、これらの発現が共通のエンハンサーの支配下にあることが示唆された。

さらに、性周期データベースから子宮で発現変動を示す遺伝子の中に Prominin1 が存在した。そのピークは発情期であった。ERaKI 子宮での Prominin1 発現は約半分に低下していた (図 7)。Prominin1 は血液幹細胞、神経幹細胞等、幹細胞膜表面に発現することが報告されていることから、

Prominin1 の発現は子宮での増殖性細胞数を反映している可能性があると考え、この結果は ERaKI 子宮が十分な増殖応答を示すことができないため、妊娠維持不良となっている可能性が示唆された。

以上、基盤データベースを活用することで、ERaKI mouse 雌の妊娠維持不良メカニズムを効率的に解析することが出来た。この結果は、生殖器障害メカニズム検討に於いて、基礎情報を与える基盤データベースが非常に有効であることを示すものである。

D. 考察

今年度は、これまでに構築したマウス雌についての網羅的遺伝子発現データベース、生殖器障害メカニズム検討に有効活用できることを示すため、我々が作製した ERaKI mouse を解析した。その結果、基盤データベースを参照することで、ERaKI mouse に於ける発現変化の意義を効率的に考察することができた。特に、Prominin1 の発現低下などは基盤データベースの情報が無ければ着目し得ないデータであり、詳細なメカニズム解析研究の方向性を与える重要な情報を得ることが出来た。

以上、本研究で構築した基盤データベースは生殖器障害メカニズム検討に有用なツールであることが実証された。

E. 結論

本研究では、内分泌かく乱化学物質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目的とし、基盤データベース構築を主に進め、今年度の研究でその有用性を検証した。そ

の結果、本研究の研究目的は概ね達成し得たと考えられる。今後この基盤データベースを有効活用し、確定試験系の構築がなされることを期待する。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

なし

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 16 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 16 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）、

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、飼料中の植物エストロゲンがトランスクリプトームに及ぼす影響、環境ホルモン学会第 8 回研究発表

会、2005年9月27-29日、東京

山本雅也、松島裕子、五十嵐勝秀、井上 達、
菅野 純；子宮におけるエストロジェン
反応遺伝子の発現変化の経時的解析、第124
回日本薬学会年会（大阪・WTC コスモタワ
ー）、平成16年3月（2004）

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

なし

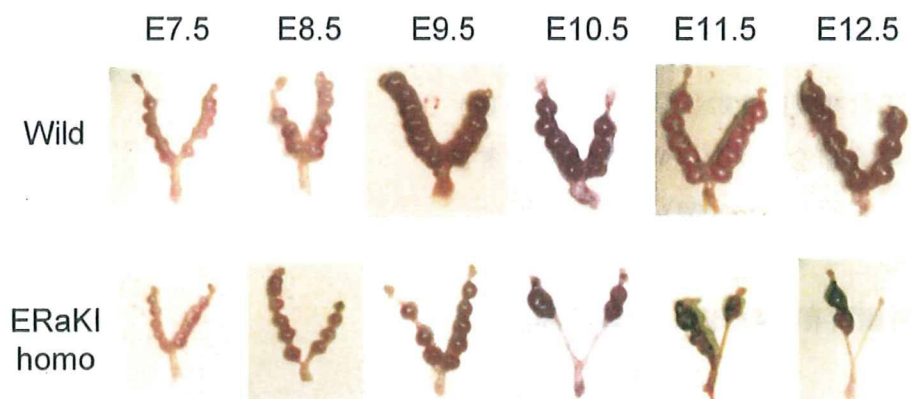


図1 ERaKIマウス雌妊娠維持不良

野生型及びERaKI homoマウス雌を野生型雄と交配し、妊娠7.5日目から12.5日まで経時的に開腹し、妊娠子宮、卵巣を撮影した。マクロ的にも不良が確認されるのは妊娠9.5日目以降であった。妊娠12.5日目にはERaKI homo子宮内で胎児は全例死亡していた。

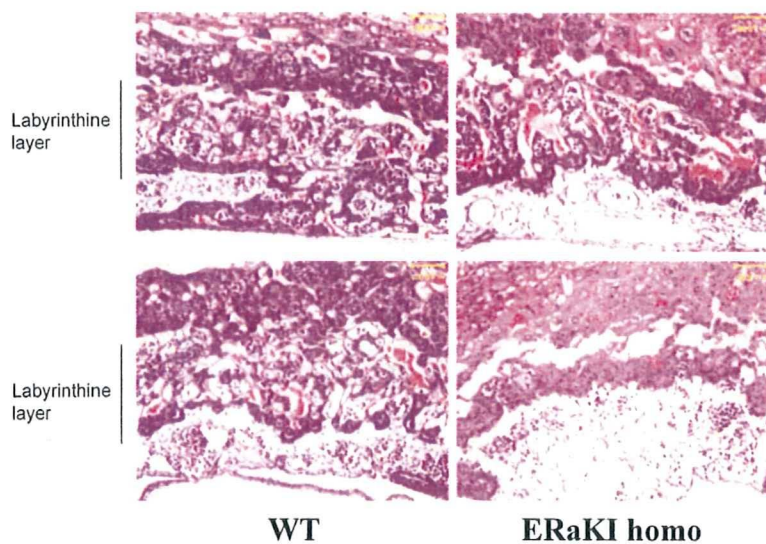


図2 ERaKIマウス胎盤組織切片

妊娠10.5日目における胎盤組織切片。HE染色。野生型(WT), ERaKI homo共に2例ずつ示した。ERaKI homoにおいて、Labyrinthine layerの発達不全が認められる。

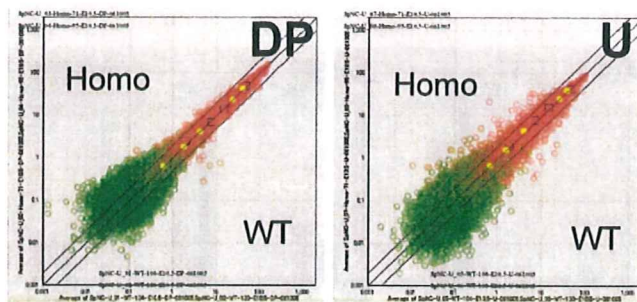


図3 ERaKI mouse子宮、胎盤の網羅的遺伝子発現解析

妊娠10.5日目の胎盤(DP)、子宮(U)における遺伝子発現を網羅的に解析した(Percellome methodを適用)。横軸に野生型、縦軸にERaKI mouseのデータをスクエアープロットに描いた。胎盤より子宮の方で発現変化が大きいことが分かる。

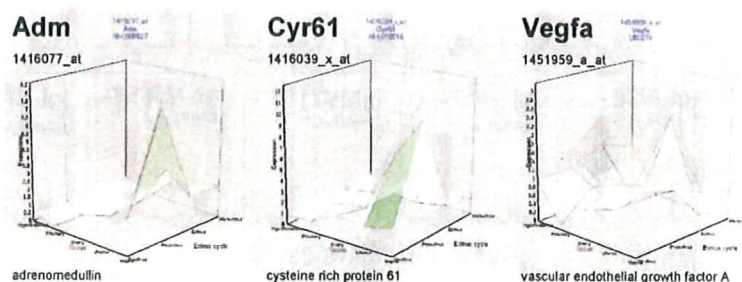


図4 性周期に伴う遺伝子発現変化

視床下部、下垂体、卵巣、子宮、膣の5臓器の性周期(間期、発情前期、発情期、発情後期)における遺伝子発現を3次元サーフェス図にプロットした。縦軸は発現コピー数。示した3遺伝子はどれも血管新生制御作用を持つことが分かっている。どれも発情前期に発現ピークがある。