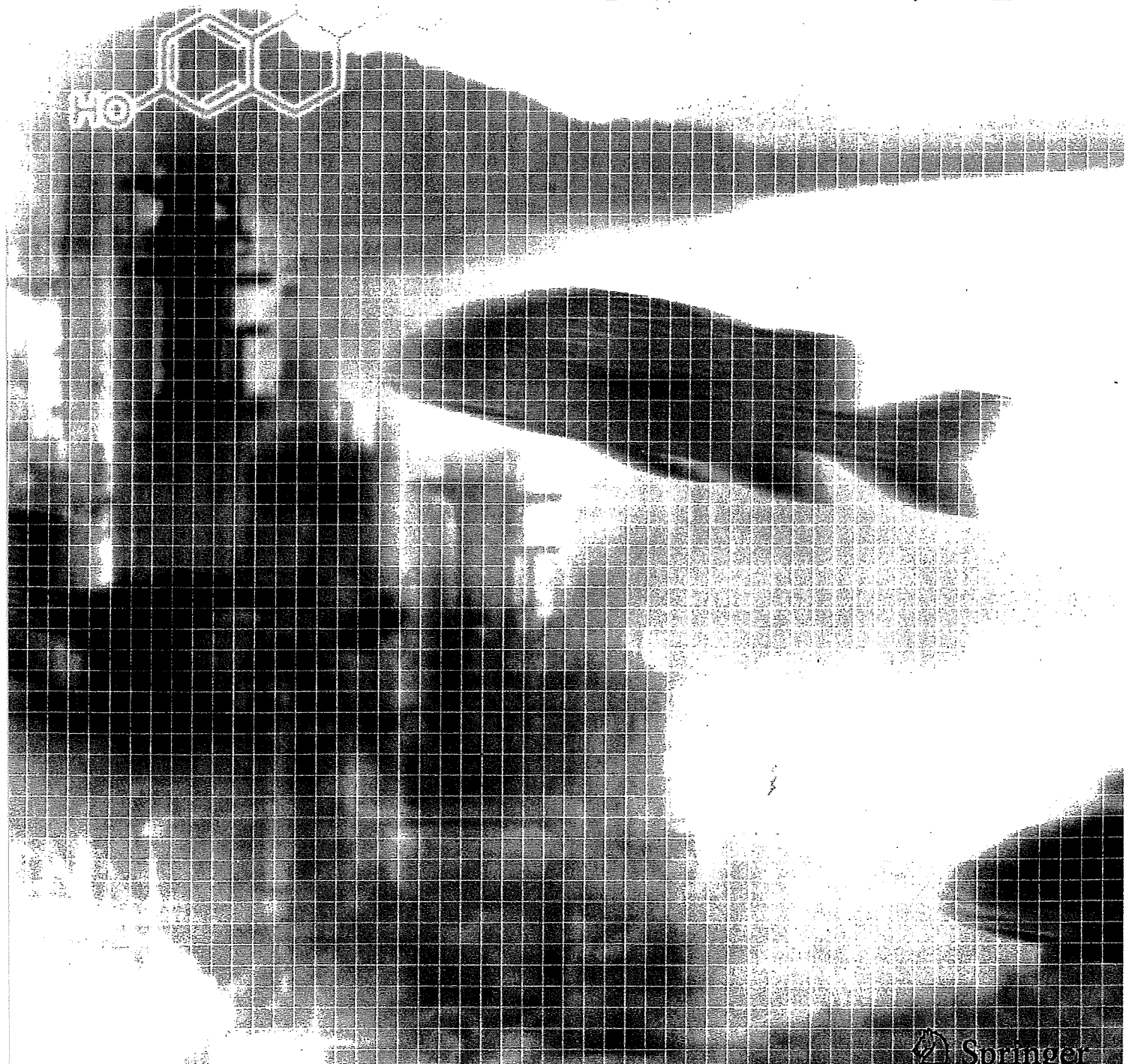


SPRINGER REVIEWS

井上 達 / 井口泰泉 編

生体統御システムと 内分泌攪乱



Springer

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，

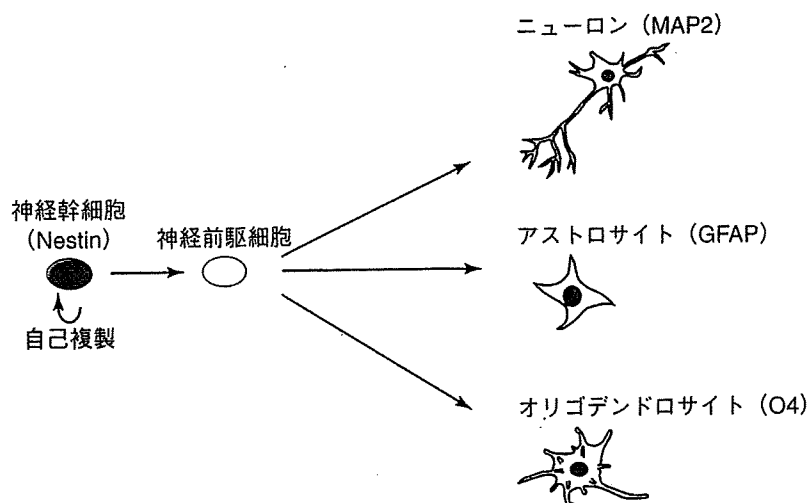


図2・1 神経幹細胞の自己複製と分化．神経幹細胞は，未分化な状態を保ったまま自己複製し，神経系を構成する3種類の細胞(ニューロン，アストロサイト，オリゴデンドロサイト)に分化する幹細胞である．おのおのの細胞には特異的なマーカータンパク質が同定されている(かっこ内に示した)．

“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

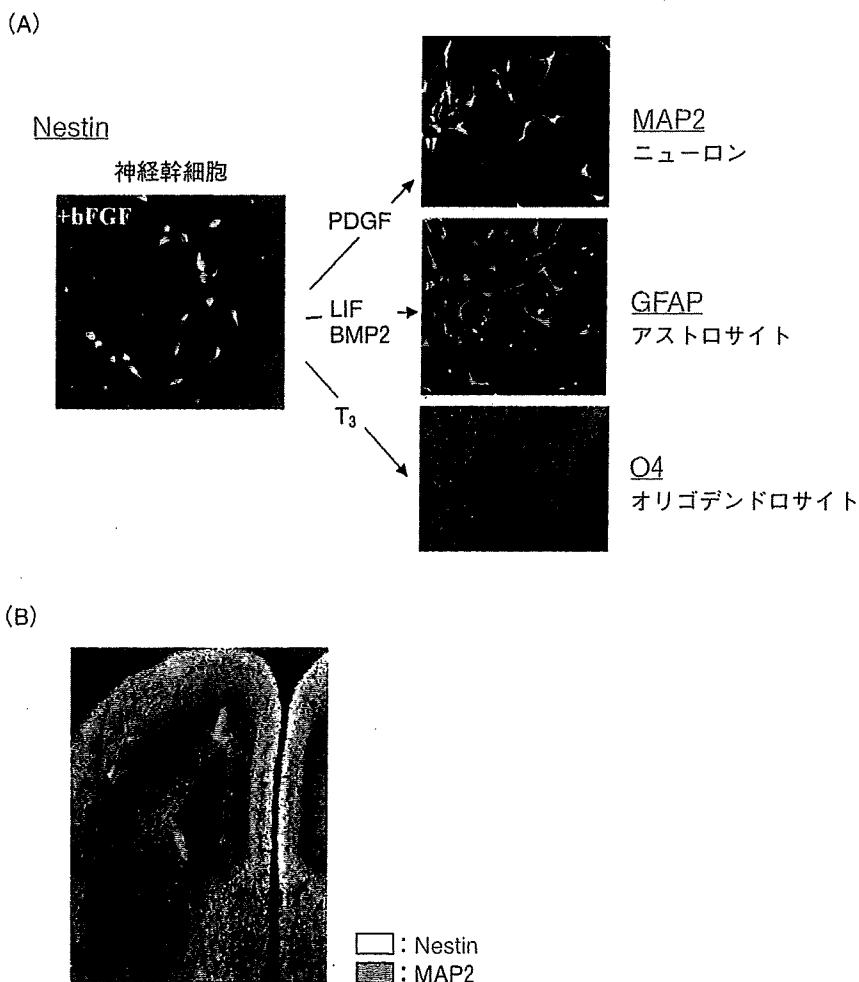


図2・2 神経幹細胞分化を誘導する因子と胎児脳におけるNestin, MAP2の発現。(A) *in vitro*培養下、Nestin陽性の神経幹細胞は特定の細胞外因子に反応し、各種細胞に分化する。PDGFはニューロンへの分化、LIFやBMP2はアストロサイトへの分化、甲状腺ホルモン T_3 はオリゴデンドロサイトへの分化を促進する。(B)胎生14.5日の脳におけるNestin, MAP2の発現。側脳室周囲領域はNestin陽性の細胞(中央の陰の部分)で占められ、皮質側はMAP2陽性細胞(外縁部)で占められている(口絵7)。

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^[1]。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、外因性影響を受ける可能性が高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^[7]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。

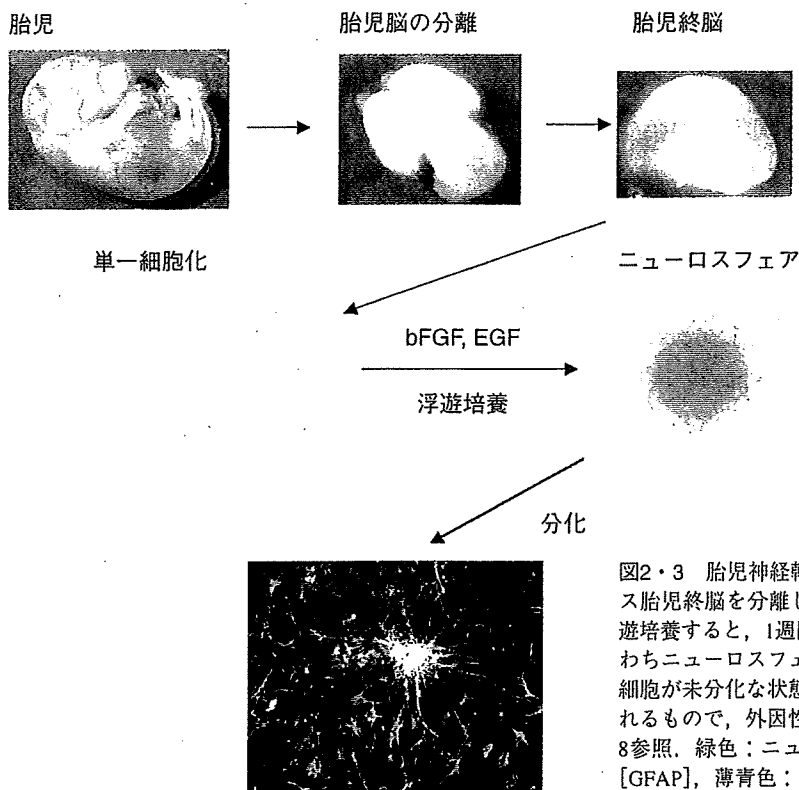


図2・3 胎児神経幹細胞の培養(ニューロスフェア法)。マウス胎児終脳を分離し単一細胞化した後, bFGF, EGF存在下浮遊培養すると, 1週間ほどで単クローン性の細胞凝集体, すなわちニューロスフェアが得られる。ニューロスフェアは単一細胞が未分化な状態を保ったまま自己複製することで形成されるもので, 外因性刺激により, 神経系の3種類の細胞(口絵8参照, 緑色:ニューロン[MAP2], 赤色:アストロサイト[GFAP], 薄青色:オリゴデンドロサイト[O4])に分化する。

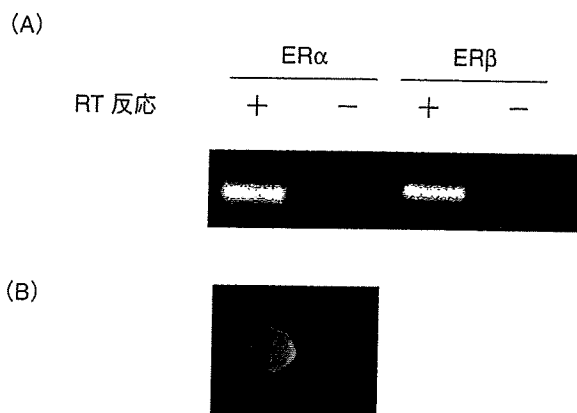


図2・4 神経幹細胞におけるER α , ER β の発現。(A) mRNA検出。ニューロスフェアより抽出した全RNAをオリゴdTで逆転写し、ER α , ER β 特異的なプライマーでPCRした。ER α , ER β ともにニューロスフェアに発現していることが示された。(A)タンパク質検出。ニューロスフェアをNestin((口絵9参照：緑色), ER α (口絵9参照：赤色)に対する抗体で免疫染色した。Nestin陽性のニューロスフェアでER α の発現が検出された。(B)タンパク質検出。ニューロスフェアをNestin(緑色), ER α (赤色)に対する抗体で免疫染色した。Nestin陽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

白)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 17β -エストラジオ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る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。

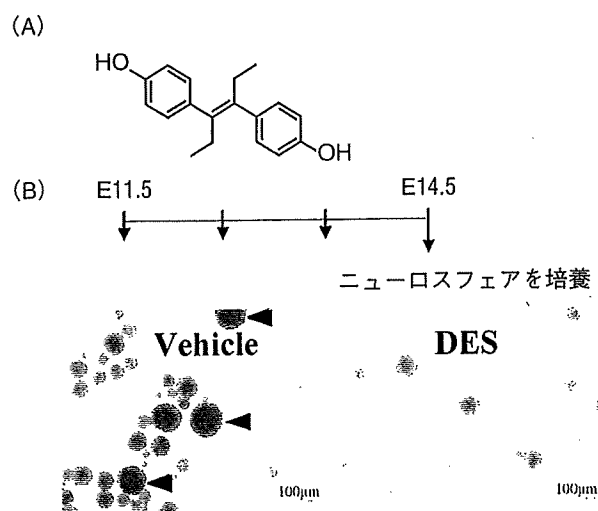


図2・5 胎生期神経幹細胞に対するDESの影響。(A) DESの化学構造, (B)胎生期DES *in utero*曝露による胎児終脳神経幹細胞に対する影響の検討。DESをマウス胎生11.5日から14.5日まで連日2 μ g/kg dam body weight/day投与し、胎児終脳からニューロスフェアを得た。DES投与群では溶媒対照投与群にみられるような径の大きいニューロスフェアの形成が阻害されていた。

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

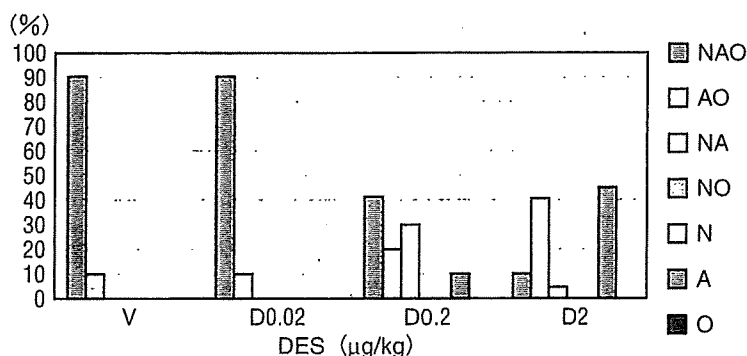


図2・6 DESの神経幹細胞分化に対する影響。図2・5と同様のスケジュールでDESに曝露した胎児終脳から形成されたニューロスフェアの分化能を調べた。bFGF, EGF存在下で未分化状態を保って浮遊培養したニューロスフェアを、コーティングした容器に移し、ウシ胎仔血清1%を加え1週間培養することで分化させた結果をグラフにまとめた。グラフ中の略号は以下を示す。N:ニューロン, A:アストロサイト, O:O4. たとえば、NAOはニューロン(N), アストロサイト(A), オリゴデンドロサイト(O)の3種類の細胞に分化したニューロスフェアを示す。Vehicle群(V)およびDES 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 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，器質的变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一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.

生体統御システムと内分泌攪乱

定価(本体5,800円+税)

発行 2005年5月27日
編集 井上 達 (いのうえとおる) / 井口 泰泉 (いぐちたいせん)
発行者 平野 皓正
発行所 シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社
〒113-0033 東京都文京区本郷3丁目3番13号
TEL (03) 3812-0757 (営業直通)
印刷所 株式会社シナノ
〈検印省略〉許可なしに転載、複製することを禁じます。
落丁本、乱丁本はお取り替えます。

ISBN 4-431-71112-0 C3045
©Springer-Verlag Tokyo 2005
Printed in Japan

<http://www.springer-tokyo.co.jp>



Carcinogenesis and Modification of Carcinogenesis, 2005: 135-151 ISBN: 81-308-0059-4
Editors: Takuji Tanaka and Hiroyuki Tsuda

9

Uterine carcinogenesis based on estrogen or metabolite driven pathways in the Donryu rat

Midori Yoshida¹ and Akihiko Maekawa²

¹Department of Pathology, ²Director, Sasaki Institute, 2-2 Kanda-Surugadai Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

Abstract

Endometrial adenocarcinomas of the uterine corpus have been increasing in incidence in many developed countries and are a leading cause of cancer death. In the Donryu rat strain, cancers of the endometrium develop spontaneously or can be induced which possess many morphological, endocrinological and molecular similarities to those of human lesions, especially of endometrioid type. The goal of this chapter is to propose 3 different pathways of endometrial carcinogenesis based on mechanisms established using our 2-stage model in the Donryu rat: one driven by a relatively high 17- β

Correspondence/Reprint request: Dr. Midori Yoshida, Department of Pathology, Sasaki Institute, 2-2 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. E-mail: midoriy@sasaki.or.jp

estradiol(E2) status; the second by excess estrogens or estrogenic compounds; and the third by estrogen metabolites or catechol estrogens. In addition, examples of agents exhibiting promotion or inhibition effects on uterine carcinogenesis with each pathway are also presented. The data covered in this chapter provide compelling evidence that the Donryu rat model is a powerful tool for elucidation of mechanisms which can be extrapolated to human uterine cancer.

Introduction

Endometrial adenocarcinomas in the uterine corpus have been increasing in women of many developed countries and are now a leading cause of cancer death. With sub-classification based on epidemiological, clinico-pathological and molecular findings, endometrial adenocarcinomas are divided into endometrioid adenocarcinomas and serous carcinomas, the former, most common type, being considered to be estrogen driven [1]. In rodents also, estrogens are considered to play a crucial role in uterine carcinogenesis [2-7]. While naturally occurring endometrial adenocarcinomas are generally very rare in rats, Maekawa and co-workers [8,9] have described a high-incidence of spontaneous uterine endometrial adenocarcinomas in aged Donryu rats and established a rat model with particular morphological and endocrinological similarities to the human case, in particular regarding endometrioid adenocarcinomas [1]. This chapter focuses on the analysis of uterine endometrial carcinogenesis based on estrogen or estrogen metabolite driven pathways using the Donryu rat model, with discussion of its implications for human cancer prediction and/or prevention.

Spontaneous occurring endometrial adenocarcinomas in Donryu rats, and their morphological and endocrinological features

Maekawa and co-workers [8] first found a high-occurrence of spontaneous uterine endometrial adenocarcinomas in aged Donryu rats (Table 1), and their subsequent analyses with this strain have established many morphological and endocrinological similarities to the human case, as described in detail below.

In middle-aged Donryu female rats (approximately 10 months of age, and equivalent to the menopausal phase in women) ovarian dysfunction, characterized by anovulation and consequently abnormal estrous cyclicity, starts to increase with time and most rats eventually show a persistent estrus (PE) status on examination of vaginal cytology (Table 2). Simultaneously, focal atypical hyperplasias of the glandular epithelium begin to develop in the uteri which exhibit morphological similarities to endometrial adenocarcinomas

Table 1. Incidence data (%) for histological findings in the uterine, ovarian and vaginal epithelium of Donryu and F344 rats [modified from ref. 5].

	Strain	
	Donryu (94)#	F344 (146)#
<i>Uterus</i>		
Adenocarcinoma	35.1	4.1
<i>Ovary</i>		
Cyst	23.4*	8.2
Absence of corpus luteum	57.4*	7.5
Absence of follicles	2.1	8.2
Atrophy	24.5	15.8
<i>Vagina</i>		
Cornification	23.4*	7.5
Mucification	27.7*	79.5

No. of rats *, Significantly different from F344 rats ($P < 0.01$, χ^2 -test)

Table 2. Sequential change in the incidence of persistent estrus in female Donryu and F344 rats [3].

Strain	Incidence(%) in rats						
	4	5	6	8	10	12	15 (months of age)
Donryu	0	17*	32**	64**	87**	88**	85**
F344	0	0	2	0	6	11	4

*;**, Significantly different from the F344 case ($p < 0.05$ and 0.01 , respectively)

and increase in both number and size with time, finally giving rise to a 30 to 50% incidence of adenocarcinomas at 24 months of age [8, 9]. Therefore, the atypical hyperplasias are recognized as precursors of endometrial adenocarcinomas and have been classified into 3 stages, slight, moderate and severe (Figure 1). Slight hyperplasias are characterized by localized proliferation of glandular epithelial cells with no or slight cellular atypia in the endometrium, while moderate examples have moderately atypical cells and severe hyperplasias feature irregular groupings of atypical glandular epithelial cells, often morphologically indistinguishable from those in well-differentiated adenocarcinomas. The adenocarcinomas themselves are diagnosed on the basis of invasion of atypical glandular epithelial cells and are characterized by tubular/glandular growth, with twist or cribriform patterns, into the muscularis and/or the serosa. They are subdivided into well, moderately and poorly differentiated types with reference to the degree of morphological atypia and depth of invasion: limited to the uterus, invading into the serosa and/or the

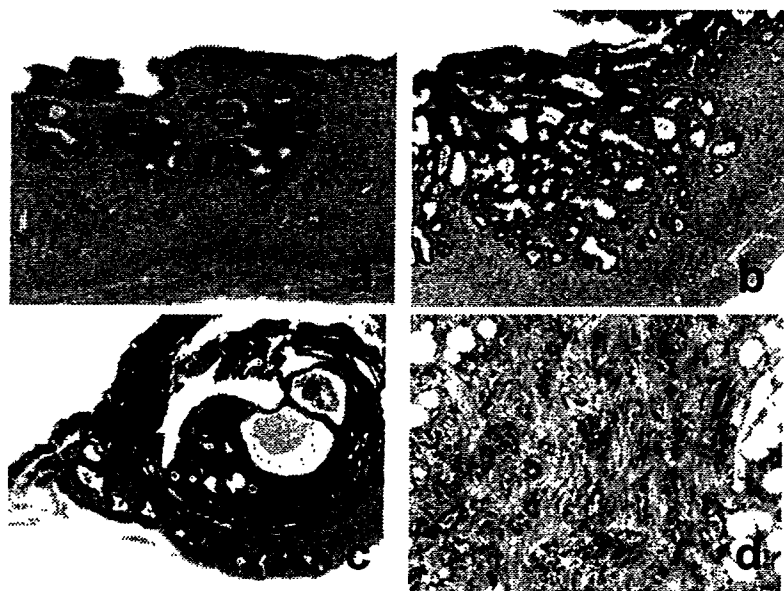


Figure 1. Uterine proliferative lesions. a, Atypical hyperplasia, slight. b, Atypical hyperplasia, severe. c, Endometrial adenocarcinoma, well-differentiated. d, Endometrial adenocarcinoma, poorly-differentiated.

surrounding adnexae, and with distant metastasis, in accordance with the simplified FIGO histopathological grades for human uterine cancers [10].

Another characteristic feature related to uterine cancer in this strain is an early occurrence of ovarian hormonal imbalance leading to elevation of serum E2 levels relative to progesterone (P), for example as compared to F344 strain rats [5, 8] (Table 3). This imbalance is morphologically detectable as atrophic ovaries with small polycystic atretic follicles and loss of corpora lutea manifested as PE status in vaginal cytology. PE appears from 4 months of age in Donryu rats and is prevalent in most animals at 11 months of age when other rat strains are still capable of reproduction. Long term exposure to a high E2:P ratio is also known to increase the risk of endometrial adenocarcinoma development in women.

In Donryu rats, ER α is consistently expressed in aged normal epithelia as well as the various degrees of atypical hyperplasia and well- and moderately differentiated adenocarcinomas, and the intensity is similar in all these cases.

Table 3. Changes in mean plasma estrogen: progesterone (E2:P) ratios in F344 and Donryu rats [5].

Strain	No of rats/months	10 ⁻³ × E2/P for rats aged (months)				
		1.5	6	8	10	12
Donryu	5-9	3.83	3.31	2.57	3.20	4.92
F344	4-11	2.52	3.99	1.54	2.10	0.96

In addition, expression homogeneous in proliferative lesions. In clear contrast, no antibody binding is detected in any of the poorly-differentiated adenocarcinomas. Thus, the ER α expression in normal endometrial epithelium in the aged uteri, uterine atypical hyperplasias and well-differentiated adenocarcinomas suggests that up-regulation is not necessary for stimulation by estrogens. The loss of ER α in poorly-differentiated adenocarcinomas is linked with estrogen-independent growth of implanted tumors, as has been established for human endometrial adenocarcinomas, with no effects of hormone therapy on advanced malignancies [12, 13].

Establishment of a uterine endometrial adenocarcinoma model using Donryu rats

Based on the morphological and endocrinological similarities of uterine cancers in Donryu rats to those in women, a 2-stage uterine carcinogenesis model was established by Makeawa and his co-workers to detect promoting or preventive effects of test-chemicals [14]. As the first step of this model (Figure 2), female Donryu rats at 10 or 11 weeks of age are treated with *N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine* (ENNG) at the concentration of 20mg/kg dissolved in polyethylene glycol, introduced into a unilateral uterine horn via vagina using a stainless steel catheter for initiation. Then the rats are exposed to test materials for 12 months. At 15 months of age, the animals are sacrificed to determine incidences or multiplicities of uterine neoplastic lesions for comparison with control (ENNG initiation only) data. The intrauterine treatment with a single dose of ENNG results in earlier development and higher yields of endometrial adenocarcinomas, as well as precursor lesions, compared with intact Donryu females not receiving carcinogen (Table 4) [14]. The tumorigenesis is specific to the uterus and no other organs are affected and this 2-stage uterine carcinogenesis model has proven to be useful for detection of promotive or preventive effects of test materials [2, 15-17]. In an attempt to enhance uterine carcinogenesis in this model, ENNG at 10mg/kg body weight

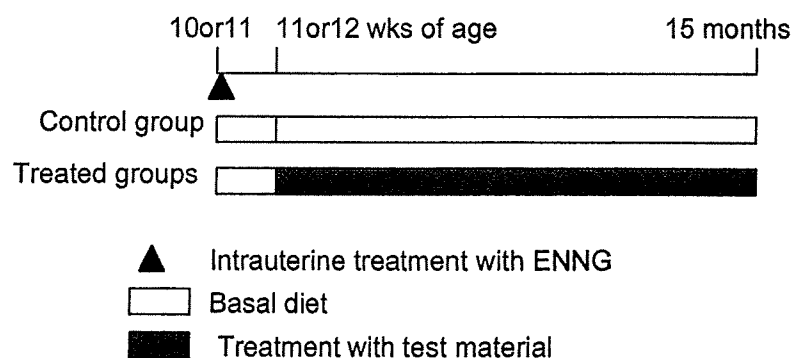


Figure 2. Protocol for the 2-stage uterine carcinogenesis model using Donryu rat.

was administered to Donryu rats once a week 4 times. The repeated treatment with ENNG succeeded in increasing the incidence of endometrial adenocarcinomas, but concurrently induced serious bleeding into the lumina of the uteri or abdominal cavity from hematomas or angiosarcomas (Table 5). In addition, associated exfoliation of endometrial epithelium resulted in difficulty of detailed histopathological analysis.

Table 4. Sequential changes in the uterine endometrium of Donryu rats after ENNG treatment [Modified ref. 14].

	3	6	9	12	15(months of age)
<i>Control group</i>					
Number of rats examined	4	4	4	8	30
Hyperplasia					
Slight	0	0	0	1	7
Moderate	0	0	0	0	6
Severe	0	0	0	1	0
Adenocarcinoma	0	0	0	0	0
<i>ENNG-treated group</i>					
Number of rats examined	6	6	6	8	49
Hyperplasia					
Slight	0	1	2	1	7
Moderate	0	0	1	1	7
Severe	0	0	1	2	6
Adenocarcinoma	0	0	1	4	24

Table 5. Comparison of data for uterine adenocarcinomas and hematomas, and cause of death, with repeated ENNG treatment.

	Repeated ENNG treatment
Number of rats examined	29
<i>Incidence of uterine lesions</i>	
Uterine hematoma	9
Endometrial adenocarcinoma	16
Angiosarcoma	5
<i>Cause of death</i>	
Uterine hematoma	8
Endometrial adenocarcinoma	10
Uterine stromal sarcoma	3
Uterine angiosarcoma	4
Uterine choriocarcinoma	1
Mammary tumor	1
Leiomyosarcoma in small intestine	1
Pneumonia	1

Relatively high E2 status driven uterine carcinogenesis

The simplest pathway for uterine carcinogenesis in the Donryu rat model is relatively high estrogen status (elevated E2:P ratio)-mediated (Figure 3). The early occurrence of ovarian hormonal imbalance leading to elevation of serum E2 levels relative to P as compared to other rat strains, a characteristic of Donryu rats, was described above. This imbalance is morphologically reflected in atrophic ovaries with small polycystic atretic follicles and lack of corpora lutea showing vaginal cornification or a PE status of vaginal cytology. In contrast, other rat strains such as Sprague-Dawley or Fisher 344 rats demonstrate corpus luteum predominant ovaries with increasing age, with vaginal mucification and only low incidences of endometrial adenocarcinomas [5]. This ovarian hormonal imbalance and the associated changes in ovarian morphology with cystic follicles and lack of corpus lutea are crucial for rat uterine carcinogenesis.

One example of promoting effects is provided by concurrent oral administration of ethylenethiourea (ETU) and sodium nitrate, which was found to cause an early occurrence of PE (Table 6) and enhance endometrial adenocarcinoma development at the termination (Table 7) [16]. In this study, the rats were initiated by *N-ethyl-N-nitrosourea* (ENU) and its profile of uterine endometrial adenocarcinoma development was very similar to that initiated with ENNG [16]. As an example of inhibitory effects, long-term dietary treatment with hydroxymatairesinol (HMR), a lignan derived from spruce trees, delayed the occurrence of PE (Table 8) and also exerted an inhibitory effect on uterine carcinogenesis in this rat model (Table 9) [15].

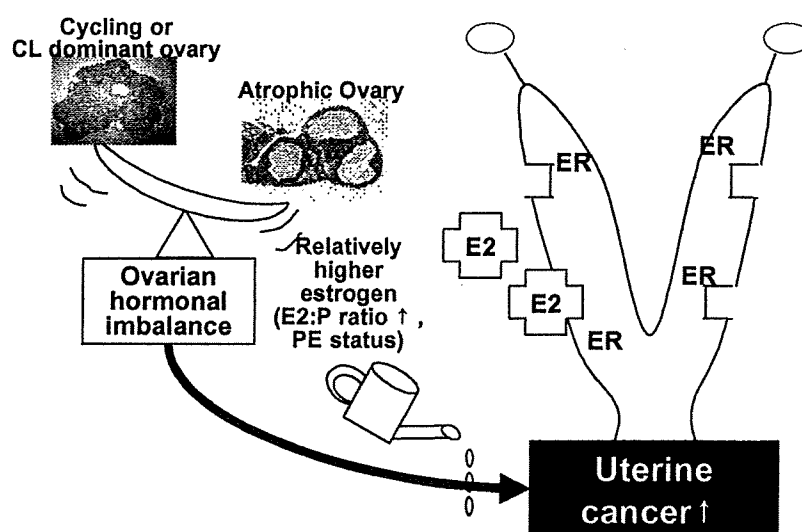


Figure 3. Relatively high E2 driven pathway of uterine carcinogenesis using the rat model. CL, Corpus luteum; PE, persistent estrus; E2, 17 β -estradiol; P, progesterone; ER, estrogen receptor.

Table 6. Sequential changes in the incidence of persistent estrus [Modified ref.16].

Group	Incidence (%) of persistent estrus				
	3	4	5	6	7 (months of age)
Control	0	0	50.0	87.5	87.5
ETU+sodium nitrate	0	44.4	66.6	77.8	87.5
ETU+sodium nitrate+ENU	0	80.0	80.0	80.0	80.0

Control, Oral administration of distilled water once a week by stomach tube without ETU+sodium nitrate, Concurrent oral administration of ETU(80mg/kg) and sodium nitrate (56mg/kg) in distilled water once a week by stomach tube.

ETU+sodium nitrate+ENU, Concurrent oral administration of ETU(80mg/kg) and sodium nitrate (56mg/kg) in distilled water once a week by stomach tube after ENU initiation (15mg/kg) into the uteri instead of ENNG treatment.

Estrous cycles were checked monthly in 8-10 rats in each group by vaginal smear.

Table 7. Uterine proliferative lesions at the termination [Modified ref.16].

Group	Control	ENU	ETU+ Sodium nitrate	ENU+ETU Sodium nitrate
No. of rats examined	21	21	31	37
<i>Endometrial hyperplasia</i>				
Slight	4	1	12	2
Moderate	1	10*	6	9
Severe	1	1	7	5
<i>Endometrial adenocarcinoma</i>	0	6*	4	21**

Control, Oral administration of distilled water once a week by stomach tube.

ENU, intrauterine treatment with ENU (15mg/kg) instead of ENNG

ETU+sodium nitrate, Concurrent oral administration of ETU(80mg/kg) and sodium nitrate (56mg/kg) in distilled water once a week by stomach tube.

ETU+sodium nitrate+ENU, Concurrent oral administration of ETU(80mg/kg) and sodium nitrate (56mg/kg) in distilled water once a week by stomach tube after ENU initiation (15mg/kg) into the uteri instead of ENNG treatment.

*,**, Significantly different from the control group (p<0.05 and p<0.01, respectively)

Table 8. Delay of persistent estrus by hydroxymatairesinol(HMR) dosing [15].

Group	Mean week of age of persistent estrus start
Control-conventional diet (CRF-1)	30.3±1.2
Control-basal diet (1324 diet alone)	32.1±1.3
200 ppm HMR in basal diet	35.4±1.6*
600 ppm HMR in basal diet	35.3±1.6*

Values are mean±SEM, for n=25, 27, 27, and 26 rats in the groups, respectively. Means of 200 and 600 ppm HMR in basal diet groups are significantly different (*p<0.05) from both control values.