

H18 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

核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御への影響に関する研究

分担研究者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所

研究要旨

内分泌かく乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つには、性ステロイドホルモン作用のかく乱が考えられている。本研究では、核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにする。具体的には、男性、女性ホルモンレセプターの転写共役因子を同定するとともに、ダイオキシンレセプターの相互作用を解析した。その結果、この2者のレセプターが直接相互作用し、さらに蛋白質分解系を誘導することで、女性ホルモン・男性ホルモン作用がかく乱されることが明らかになった。

A. 研究目的

低容量内分泌かく乱化学物質の性生殖へ影響を及ぼす作用点を分子レベルで解明する。すなわち、性生殖作用を担う性ステロイドホルモン作用へのかく乱効果を、ホルモンレセプターの転写制御機能について調べる。これまで継続してきた性ホルモンレセプター共役因子群の同定に加え、ダイオキシンレセプターを介した女性ホルモン・男性ホルモンレセプターへの影響について検討した。

B. 研究方法

男性ホルモン、女性ホルモンレセプターの転写機能を担う転写共役因子の同定及びダイオキシンレセプターとのクロストークを検討した。すなわち、性ホルモンレセプター群に結合する転写共役因子複合体を、生化学的に精製及びその構成因子群を同定する。

また、複合体としての機能を *in vitro* 系で評価する。また、ダイオキシンレセプターとの機能的相互作用を転写レベルで検討する。

C. 研究結果

男性ホルモン及び女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子のいくつかを同定した。また、ダイオキシンレセプターと女性ホルモンレセプターが核内で会合することを見出した。すなわち、

1) ホルモン活性を規定するレセプター

転写共役因子の検索及び同定

女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子複合体として、RNA のスプライシングに関与する複合体の構成因子である SF3a p120 を含む新規転写共役因子複合体を同定した。この複合体は、女性ホルモンレセプターN 末端側の転写促進

領域に Ser¹¹⁸ のリン酸化を認識して特異的に結合し、転写機能を活性化することが分かった。また、この複合体は、女性ホルモンレセプター依存的な RNA のスプライシングにも関与し、それには女性ホルモンレセプターの Ser¹¹⁸ のリン酸化が必須であることも明らかとなった。

さらに本年度は、精子形成に関与することが示唆されているが分子機能未知である因子 RBM が女性ホルモンレセプターの転写共役因子として機能することを見出した。

2) ダイオキシンレセプターを介したエストロゲン作用かく乱の分子メカニズム

ダイオキシンレセプターとエストロゲンレセプターとの関連を検討した結果、活性化されたダイオキシンレセプターが核内に移行し、結果として、女性ホルモンレセプターと会合することを見出した。興味深いことに、エストロゲンが結合していないエストロゲンレセプターは、ダイオキシンレセプター結合により、その転写促進機能が惹起された。一方、エストロゲンが結合した状態では、ダイオキシンレセプターはその機能を抑制することが明らかとなった。また、ダイオキシンレセプターの分解に関する新規複合体の同定に成功した。

さらに本年度はこの新規複合体を解析した。その結果興味深いことに、この複合体はダイオキシンレセプターへのリガンド結合に依存的に、エストロゲンレセプターをユビキチン化することを見出した。ユビキチン化複合体の形成はリガンド依存的であった。従ってダイオキシンレセプターは、相互作用蛋白の分解促進という全く新規の分子機能を

有することが示唆された。現在、複合体形成機構の解析を進めている。

3) 新たな染色体構造調節因子複合体の同定

転写共役因子は、単独で作用することなく、複合体として機能することから HeLa 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。方法としては、ヒト ER α のリガンド結合領域 (AF-2) をエストロゲン存在で下で、プローブタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。その結果、既知の3つの転写共役因子複合体に加え、第4の転写共役因子複合体が存在することを見出した。またこの複合体はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有することも確かめ、またいくつかの構成成分も同定した。更に、この複合体群の中にはヒストンメチル化酵素活性を持つものも見出された。そこで、この酵素活性を指標にこの複合体の精製を行っている。

4) ショウジョウバエを用いた男性、および女性ホルモンレセプター転写共役因子の機能解析

性ホルモンレセプターと転写共役因子との相互作用を *in vitro* 細胞系で解析を行ってきたが、これらの結果は、必ずしも個体での現象を反映しない。そこで、ショウジョウバエにヒト AR, ER を組織特異的に発現する系の構築に成功した。下流のリポーター遺伝子は GFP を用いたので、AR/ER のリガンド依存的な転写機能は GFP の発現に振り替えられるため、結果として蛍光として観察できる。エサに性ホルモンを加えると、GFP による蛍光が観察された。また、このレセプタ

一を介した転写促進能は、ARを強制発現させたいずれの組織においても観察されている。また、ER α の Ser¹¹⁸ のリン酸化が Cdk7 によってなされており、そのリン酸化によって ER の転写活性が増強されていることをショウジョウバエの個体レベルで証明した。

D. 考察

性ホルモンレセプターには、数多くの転写共役因子及び複合体が結合することが分かった。しかしながら、これら因子複合体の中でいずれが最も重要であるかは判断できなかった。今後遺伝子ノックアウト等により、確認する必要があると思われた。また、ダイオキシンレセプターと性ホルモンレセプターが会合することから、性ホルモンかく乱作用の一つは、この分子機構を介するものと考えられた。

E. 結論

性ホルモンレセプターの転写制御能をレセプター相互作用因子の観点から検討した。すなわち、男性及び女性ホルモンレセプターに結合する新たな転写共役因子を同定し、それらが内分泌かく乱物質の標的分子候補である可能性が考えられた。また、ダイオキシンレセプターとの会合による新たな性ホルモンかく乱作用の分子機構を明らかにした。

F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は特に無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

© Shiina H, Matsumoto, T., Sato, T., Igarashi, K., Miyamoto, J., Takemasa, S., Sakari, M., Takada, I., Nakamura, T., Metzger, D., Chambon, P., Kanno, J., Yoshikawa, H., Kato, S.: Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 224-229, 2006.

© Oishi H, Kitagawa, H., Wada, O., Takezawa, S., Tora, L., Kouzu-Fujita, M., Takada, I., Yano, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: An hGCN5/TRRAP HAT complex coactivates BRCA1 transactivation function through histone modification. *J. Biol. Chem.*, 281, 20-26, 2006.

Kim MS, Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamamoto, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K., Kato, S.: 1 α , 25(OH)2D3-induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol. Endocrinol.*, 2006. (in press)

Yamaoka K, Shindo, M., Iwasaki, K., Yamaoka, I., Yamamoto, Y., Kitagawa, H., Kato, S.: Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2006. (in press)

Yamaoka K, Kim, M. S., Takada, I., Takeyama, K., Kamimura, T., Kato, S.: Culture serum-induced conversion from agonist to antagonist of a Vitamin D analog, TEI-9647. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 100, 177-183, 2006.

©Kishimoto M, Fujiki, R., Takezawa, S., Sasaki, Y., Nakamura, T., Yamaoka, K., Kitagawa, H., Kato, S.: Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications. *Endocrinol. J.*, 53, 157-172, 2006.

Yamada T, Kawano, H., Koshizuka, Y., Fukuda, T., Yoshimura, K., Kamekura, S., Saito, T., Ikeda, T., Kawasaki, Y., Azuma, Y., Ikegawa, S., Hoshi, K., Chung, U., Nakamura, K., Kato, S., Kawaguchi, H.: Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nature Medicine*, 12, 665-670, 2006.

Yamamoto K, Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Masuda, H., Kobayashi, M., Kawamura, K., Kamiya, A., Ando, J.: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nature Medicine*, 12, 133-137, 2006.

2. 学会発表

【国内】

2006年度日本農芸化学会

DEAD Box RNA helicase p72/p68 による miRNA processing の機能解析

山形 薫、福田 亨、藤山沙理、越田伊織、武山健一、松本高広、北川浩史、加藤茂明

新規ビタミン D レセプター (VDR) 相互作用因子複合体 WINAC の生体内高次機能の解析

吉村公宏、北川浩史、竹澤慎一郎、高田伊知郎、古谷善幸、八木寿人、福田 亨、山本陽子、渡辺智之、中村 貴、椎名博子、宮本純子、田中佐依子、松本高広、松岡瑠美子、加藤茂明

ビタミンKはエストロゲンと協調的に骨芽細胞形成を促進する

五十嵐庸、過足芳子、三原正朋、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明

肝臓特異的 FXR 転写共役因子複合体精製の新たな試み

馬場敦史、大竹史明、三木ひろみ、北川浩史、高田伊知郎、加藤茂明

◎細胞周期依存的な ER α の機能解析

岡田麻衣子、竹澤慎一郎、目崎善弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明

分子遺伝学的アプローチによるヒト核内レセプター新規転写共役因子 BAHD1 の機能解析

伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、鈴木絵里子、Yue Zhao、山形 薫、田辺真彦、Alexander Kouzmenko、城出裕子、多羽田哲也、加藤茂明

クロマチン構造を介したエクダイソンレセプター転写制御機構の解明に関する研究
沢津橋俊、武山健一、伊藤紗弥、鈴木絵里子、田辺真彦、趙越、山形薫、城出裕子、多羽田哲也、加藤茂明

ヒストン修飾を介した Wnt シグナルと核内レセプター PPAR γ のクロストーク分子機構の解析
高田伊知郎、須澤美幸、松本邦弘、加藤茂明

第 24 回日本骨代謝学会学術集会
骨芽細胞分化関連因子 Msx2 はビタミンKの標的遺伝子である
五十嵐庸、過足芳子、三原正朋、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明

第 79 回日本内分泌学会学術総会
ビタミンD 受容体転写制御におけるクロマチンリモデリング因子群の役割
北川浩史、藤木亮次、吉村公宏、大矢博之、加藤茂明

【国際】

Keystone Symposia (Nuclear Receptors)

E2F transcriptional activation as a potential mechanism of neurodegeneration of polyglutamine expansion androgen receptor mutants
E. Suzuki, S. Ito, S. Sawatsubashi, Y. Shirode, A. Maki, Y. Zhao, K. Yamagata, T. Furutani, A. Kouzmenko, M. Tanabe, K. Takeyama, S. Kato

(2006)

Analysis of a novel VDR interacting chromatin remodeling complex 'WINAC' in vivo
K. Yoshimura, H. Kitagawa¹, R. Fujiki, T. Matsumoto, S. Kato (2006)

Drosophila genetic system as a powerful tool for identification of novel co-regulators of human nuclear receptors
K. Takeyama, S. Ito, S. Sawatsubashi, Y. Shirode, E. Suzuki, Y. Zhao, K. Yamagata, M. Tanabe, A. Kouzmenko, S. Kato (2006)

©Modulation of estrogen signaling by dioxin receptor and associated complexes
A. Baba, F. Ohtake, S. Kato (2006)

Identification and functional analysis of cell-cycle specific co-repressor complex, Dev-CoR complex
A. Yokoyama, S. Takezawa, M. Okada, R. Fujiki, H. Kitagawa, S. Kato (2006)

Isolation of Androgen Receptor Co-regulators regulating the Alteration of Chromatin Structure Using Modified Position Effect Variegation System in Drosophila
Y. Zhao, K. Takeyama, S. Ito, E. Suzuki, S. Sawatsubashi, Y. Shirode, K. Yamagata, A. Kouzmenko, M. Tanabe, S. Kato (2006)

Bone remodeling and the roles of nuclear receptors
S. Kato (2006)

13th Workshop on Vitamin D

Ligand-induced transrepression mechanism by nuclear receptor through chromatin remodeling/modification complexes
S. Kato (2006)

Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription)

Function of co-regulator complexes for nuclear receptors
S. Kato (2006)

Identification of A Novel Co-regulator of Nuclear Receptors by *Drosophila* Genetic System

S. Ito, K. Takeyama, S. Sawatsubashi, E. Suzuki, A. Kouzmenko, Y. Zhao, K. Yamagata, M. Tanabe, Y. Shirode, T. Tabata, S. Kato(2006)

Functional analysis of ecdysone receptor-mediated transcription through alteration of chromatin structure

S. Sawatsubashi, K. Takeyama, S. Ito, E. Suzuki, M. Tanabe, Y. Zhao, K. Yamagata, Y. Shirode, T. Tabata, S. Kato (2006)

Functional analysis of a novel ATP

dependent chromatin remodeling complex 'WINAC'

H. Kitagawa, R. Fujiki, K. Yoshimura, H. Ohya, S. Kato (2006)

ASBMR 28th Annual Meeting

1 α ,25(OH)₂D₃-induced DNA methylation mediates the transrepression by VDR

M.-S. Kim, A. Murayama, R. Fujiki, K. Takeyama, S. Kato (2006)

Vitamin K stimulates osteoblastgenesis through

PXR/SXR-mediated Msx2 induction

M. Igarashi, Y. Yogiashi, M. Mihara, I. Takada, H. Kitagawa, S. Kato (2006)

International Conference on Progress in Bone and Mineral Research 2006

Bone remodeling and the roles of nuclear receptor

S. Kato (2006)

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(データベース等)

なし

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)に自由摂取させると、①子宮内死亡する胎仔が増加し、②胎仔胸腺内のリンパ球の増殖と分化が抑制され、③胸腺ストローマでは、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の発現低下が認められ、⑤ERβなどの複数のホルモン受容体遺伝子の発現増強が認められた。以上の条件下で生まれたマウスについて、誕生後も BPA 含有の飲料水を与えられた母マウスからの哺乳を受け、離乳後は BPA 含有の飲料水を 6 ヶ月間自由摂取させた。こうして、長期間低用量 BPA に暴露されたマウスを調べた結果、胸腺重量、胸腺リンパ球亜集団の構成、脾臓リンパ球の増殖能などには、対照群と比べて差がなく、免疫系への影響は認められなかった。

A. 研究目的

(要約)低用量の Bisphenol-A を胎仔期から 6 ヶ月余りマウスに投与し、免疫系に及ぼす影響を胸腺、脾臓について明らかにする。

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ー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、そして妊娠マウスに BPA 含有飲料水を摂取させた時の胎仔への影響など見てきたが、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。今回の実験は最後の実験の延長上にあり、胎仔期には胎盤を介し、誕生から離乳までは母乳を

通して、離乳後は飲料水を介して BPA に 6 ヶ月間暴露させた後、免疫系への影響を見ることを目的とした。

B. 研究方法

(要約)胎仔時から 6 ヶ月以上低用量 BPA に暴露されたマウスの胸腺・脾臓の重量、機能について免疫学的に検索した。

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 µg/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. 胸腺と脾臓を摘出し、重量を測り、ついで、細胞浮遊液を作成し、リンパ球の総数、T 細胞、B 細胞の数とそれらの亜集団の数をフローサイトメトリーで測定した。
5. 脾臓リンパ球については、anti-CD3 抗体で刺激し、増殖能を測定すると共に、その上清につ

いては、サイトカイン産生について検討した。

6. 摘出した胸腺をポアサイズ 8 μ 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、遺伝子発現の変動を見た。

C. 研究結果

(要約)今回用いた BPA は胎仔免疫系の発達を抑制する用量であったが、6 ヶ月齢のマウスの胸腺・脾臓の重量、リンパ球の構成、リンパ球の増殖能と各種のサイトカイン産生能には、BPA の影響は認められなかった。

実験 A:妊娠 7 日目より誕生後 21 日目まで母マウスに BPA を含む飲料水を摂取させ、誕生後も同じ母マウスに授乳させ、離乳後は母マウスの摂取したものと同一 BPA を含む飲料水を摂取させ、6 ヶ月後に屠殺し、実験に供した。なお対照群には離乳後 BPA を含まない、飲料水を与え、同様のプロトコールで実験を行った。

1. 胸腺と脾臓の重量は対照群と比べて、差はなかった。
2. 胸腺リンパ球について、CD4⁺T 細胞、CD3⁺T 細胞の構成、CD4/CD8 亜集団を見たが、対照群と比べて差が認められなかった。
3. 脾臓の T 細胞、B 細胞の構成についても、対照群と比べて差が認められなかった。
4. 脾臓リンパ球の anti-CD3 抗体、ConA、および LPS による刺激増殖でも、対照群と比べて差が認められなかった。
5. 脾臓リンパ球の anti-CD3 抗体による刺激増殖時のサイトカイン(IL-2, IL-4, IFN γ , IL-10) 産生でも対照群と比べて差が認められなかった。

実験 B 胸腺からストローマ部分を分離し、RNA を調整して、Real-Time-PCR により、胎仔期胸腺で変動した遺伝子を検討した。

1. 胎仔期で発現の低下した Notch-1 リガンド、Glia maturation factor β 、Thymic stromal-derived lymphopoietin, receptor などについて調べたが、

対照群と比べて差が認められなかった。

2. 胎仔期で発現の増強した Estrogen Receptor β 、ACTH-R、TSH-R、TRH-R などについて調べたが、対照群と比べて差が認められなかった。

D. 考察

母マウスに低用量の BPA を摂取させると、子宮内胎仔死亡が増加すること、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、胸腺リンパ球に關与する胸腺上皮に発現する遺伝子に変動のあることを明らかにしてきた。

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であった。

胎仔期に低用量の BPA の暴露されると、Notch-1 リガンド、Glia maturation factor β 、Thymic stromal-derived lymphopoietin, receptor などの遺伝子の発現は低下し、一方、エストロゲン β R、ACTH-R、TSH-R 及び TRH-R などの発現が増強した。

このようなマウスの誕生後、同じように、低用量の BPA 飲料水を摂取した母マウスに保育させ、離乳したあと、6 ヶ月齢まで、BPA を含む飲料水を摂取させたあと、免疫系を検索した。その結果は、検索したいずれの免疫系の指標や機能も対照群と比べて、差がないことが今回の実験で分かった。これは、胎仔期に認められた変化は修復可能なものであり、今回用いた程度の BPA に暴露されても、誕生することができれば、あとはあまり問題がないことを示していると解釈できる。

今回用いた BPA の量は、飲料水に 2.5 μ g/ml の割合で溶解したものである。東京近辺の河川で時に検出される BPA の量は 0.2 μ g/l (0.0002 μ g/ml) であるから、今回用いた BPA の濃度その約 1 万倍の濃度になり、日常の環境で暴露される量より、はるかに高い濃度である。この量で、胎仔の免疫系には影響を与えるが、その影響は誕生後に修復可能なものと考えた。

既に報告済みであるが、in vitro の胎仔胸腺器官培養系を用いて、BPA の免疫系への影響を調べ

たことがある。この in vitro の実験系では、日常の環境で暴露される量或いはそれ以下の量でも BPA の影響が検出できた。しかし、in vivo の系では、免疫系以外の系がいろいろあり、BPA による影響がたとえ出ても、修復されるものと考えられた。

E. 結論

(要約)胎仔期に影響する BPA を、さらに 6 ヶ月間投与しても、マウスの免疫系には有意な影響は与えなかった。

BPA の生体への影響を見る場合、胎仔期とその後の成熟個体では異なることが今回の実験で明らかになった。時に胎仔の死亡を起こし、また、免疫系細胞の分化異常をもたらすほどの濃度で、誕生後もそのまま BPA に暴露されても、免疫系には大きな影響が見られないことが分かった。

. 研究発表

Utsuyama M, Kikuchi Y, Kitagawa M and

Hirokawa K. Estrogen-like endocrine chemicals inhibit growth and development of t cells in fetal thymic organ culture at very low dose. Exp. Mol. Pathol. 投稿中

Satoh T, et al. Hirokawa K (15人中の12番目)

Prostaglandin D2 Plays an Essential Role in Chronic Allergic Inflammation of the Skin via CRTH2 Receptor1. J. Immunology 177: 2621-2629, 2006,

Wakabayashi A, Kumagai Y, Watari E, Shimizu M,

Utsuyama M, Hirokawa K and Takahashi H. Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. Immunol. 119:167-177, 2006.

廣川勝昱 免疫系の老化と機能回復。特に免疫力評価の重要性について。アンチエイジング医学—日本抗加齢医学会雑誌。2:302-306, 2006.

Hirokawa K. Proper assessment and restoration of immunological function for the improvement of QOL and elongation of healthy lifespan in the

elderly. Proceeding for Impact of Ageing. A common challenge for Europe and Asia. (June 7-9, 2006, Vienna.) In press.

Wakabayashi A, Utsuyama M, Hosoda T, Sato K, Takahashi H, Hirokawa K. Induction of immunological tolerance by oral, but not intravenous and intraportal administration of ovalbumin and the difference between young and old mice. J. Nutr.Health Aging. 10:183-191, 2006.

Hirokawa K, Utsuyama M, Kikuchi Y, and Kitagawa M. Trial assessment of immunological status as a whole in the elderly people and cancer patients. Landes Bioscience Immunosenescence book (Pawelec G ed) in press.

Hirokawa K. Proper assessment and restoration of immunological function for the improvement of QOL and elongation of healthy lifespan in the elderly. アンチエイジング国際シンポジウム東京2006

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・栄養研究所基礎栄養プログラム 上級研究員

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。その上、免疫機能を有するマクロファージは脂肪組織に浸潤すると脂肪組織の機能を悪化させる。そこで、内分泌かく乱物質がマクロファージを介して脂肪組織に影響を与えるか調べるために、マウスにBPAを投与し脂肪組織への影響とマクロファージの関わりについて調べた。その結果、精巣周囲脂肪組織では、脂肪細胞の肥大、機能の悪化、マクロファージの浸潤を示す遺伝子の発現が増加しており、BPA がマクロファージを介して脂肪組織に影響を与えることがわかった。

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。近年、脂肪組織にも働き、脂肪細胞の機能を悪化させることが報告された。そこで本年度は、内分泌かく乱物質がマクロファージを介して脂肪組織に影響を及ぼすか調べた。

B. 研究方法

C57BL/6 マウスにビスフェノール A(BPA) を 0.05 μ g、0.5 μ g、5 μ g/ml になるように飲料水に加え、12週間投与し脂肪組織を中心に調べた。

コントロール群には飲料水のみを与えた。

各群オス 4 匹、8 週齢より投与を開始した。投与してから 12 週後に解剖し、肝臓、白色脂肪(精巣周囲脂肪、後腹壁脂肪、腸間膜脂肪、皮下脂肪)、褐色脂肪、筋肉、脾臓、胸腺重量について調べた。さらに、Real-Time PCR を用いて各 mRNA 発現量について調べた。

C. 研究結果

コントロール群に比べて BPA 投与群に大きな変化はみられなかったが、白色脂肪組織重量及び褐色脂肪組織重量が増加する傾向にあった。また、精巣周囲脂肪組織では、脂肪細胞の増大、機能の悪化、マクロファージの浸潤を示す遺伝子の発現が増加していた。

BPA 投与群はコントロール群に比べ、体重

に有意差はなかったが、BPA 0.5 μ g/ml 投与群で増加傾向にあった。肝臓、筋肉、胸腺重量は、コントロール群、BPA0.05、0.5、5 μ g/ml 投与群で全く差がなかった。白色脂肪組織重量については、有意差はなかったが、精巣周囲脂肪及び後腹壁脂肪は 0.05、0.5、5 μ g/ml 投与群で、腸間膜脂肪及び皮下脂肪は 0.05 μ g/ml 投与群でコントロール群に比べ増加傾向にあった。褐色脂肪重量も 0.05 μ g/ml 投与群でコントロール群に比べ増加傾向にあった。

精巣周囲脂肪組織における mRNA の発現について調べたところ、aP2 は BPA5 μ g/ml 投与群で、MCP-1 は、0.5 μ g/ml 投与群で、TNF α は 5 μ g/ml 投与群で ($p=0.01$)、Leptin は BPA0.05、0.5、5 μ g/ml 投与群でコントロール群に比べて発現が増加していた。

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。マクロファージの機能は多様であり、まだ明らかにされていない機能があると考えられている。肥満した場合の脂肪組織にはマクロファージが浸潤している。近年、脂肪組織に浸潤したマクロファージは脂肪組織へ多大な影響を与えていることが明らかになった。すなわち、脂肪組織へマクロファージが浸潤し、マクロファージや

脂肪細胞から monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) が分泌され、それに続いてさらに単球が脂肪細胞に遊走してマクロファージに分化し、MCP-1 等のケモカインや TNF α 等のサイトカインを分泌するようになり、さらに単球を脂肪組織に遊走させマクロファージを脂肪組織に浸潤させるという悪循環が起こること、また、同時に脂肪組織を肥大させレプチン等のアディポネクチン産生破綻をきたしたり、脂肪細胞特異的な遺伝子の発現を変化させたりすることが明らかになった。本研究により、BPA はマクロファージを介して脂肪組織に影響を与えている可能性のあることが示唆された。

生活習慣病は過食、運動不足などのライフスタイルにより発症し、糖尿病、肥満、高血圧、高脂血症、動脈硬化症などが代表的である。動脈硬化症におけるマクロファージの浸潤とその炎症病態についてはよく知られているが、最近、肥満により誘導されるインスリン抵抗性の発症にも、脂肪組織に浸潤したマクロファージによる影響や肝臓での炎症反応の亢進など、インスリン感受性臓器での炎症が関与していることが明らかにされつつある。したがって、BPA のような内分泌かく乱物質がマクロファージを介して肥満に関与し、ひいては生活習慣病につながるような状態に陥りやすくしている可能性があるのではないかと考えられる。

E. 結論

BPA がマクロファージを介して脂肪組織に影響を与えている可能性があることが明らか

になった。

すなわち、BPA を投与したマウスの脂肪組織における mRNA の発現について調べたところ、MCP-1、TNF α といった脂肪組織へのマクロファージの浸潤を示し、さらなるマクロファージの脂肪組織への浸潤をもたらす遺伝子の発現増加、脂肪細胞肥大を示す aP2 遺伝子の発現増加、脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインの産生の脂肪組織肥大による破綻と見られるレプチン遺伝子の発現増加が見られた。

したがって、BPA のような内分泌かく乱物質がマクロファージを介して肥満に関与し、ひいては生活習慣病につながるような状態に陥りやすくしている可能性があるのではないかと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shinji Miura, Eriko Tomitsuka, Yasutomi Kamei, **Tomomi Yamazaki**, Yuko Kai, Mayumi Tamura, Kiyoshi Kita, Ichizo Nishino, and Osamu Ezaki, (2006) Overexpression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Co-Activator-1 α Leads to Muscle Atrophy with Depletion of ATP, Am J Pathology, 169(4):1129-1139

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

低用量内分泌かく乱化学物質の免疫応答制御に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 五十嵐 美德 国立がんセンター研究所・化学療法部

研究要旨

低用量の bisphenol A (BPA) のナチュラルキラーT(NKT)細胞による免疫制御機構に及ぼす影響を検討した。BPA の NKT 細胞の増殖及び Th1/Th2 サイトカイン産生バランスに対する影響を解析した。NKT 細胞は *in vitro* で BPA 10^{-8} ~ 10^{-5} M の濃度で、濃度依存的に Th2 優位なサイトカイン産生パターンを示し、NKT 細胞の Th1/Th2 バランスに影響を及ぼし、NKT 細胞の関与する疾患の発症に関連する可能性が考えられる。

A. 研究目的

低用量の bisphenol A (BPA) のナチュラルキラーT(NKT)細胞による免疫制御機構に及ぼす影響を検討した。

すなわち、エストロゲンがTヘルパー1(Th1)およびTh2産生のバランスに影響し、自己免疫疾患の発症と関連することが示唆されている。Th1およびTh2両者のサイトカインを産生し、免疫応答を制御し、自己免疫疾患の発症の抑制やアレルギーの発症に関与するNKT細胞のTh1/Th2 サイトカイン産生のバランスに及ぼすBPAの影響を明らかとすることが目的である。

B. 研究方法

BPAのNKT細胞の増殖及びTh1/Th2サイトカイン産生バランスに対する影響を解析した。

すなわち、BALB/c, C57BL/6マウス(5~6週齢)の脾細胞を BPA(10^{-10} ~ 10^{-4} M) と

α -galactosylcermid(50ng/ml)で培養し、NKT細胞の増殖についてはMTT 法およびフローサイトメーターにてNKT細胞の比率を解析した。NKT細胞の産生するTh1(IFN- γ)およびTh2(IL-4)の産生について、培養上清中のサイトカイン濃度をELISA法あるいは細胞内サイトカイン染色法によって解析した。

(倫理面への配慮)

国立がんセンター動物実験倫理委員会規定に基づき、動物実験を行なった。

C. 研究結果

NKT細胞は *in vitro* で BPA 10^{-8} ~ 10^{-5} M の濃度で、濃度依存的にTh2優位なサイトカイン産生パターンを示した。

すなわち、BPAは 10^{-8} M未満の濃度ではNKT細胞の α -GalCerに対する増殖およびサイトカイン産生に影響を及ぼさない。しかし、BPA 10^{-8} ~ 10^{-5} M

濃度では濃度依存的に細胞数の増加がBALB/cマウスにおいて認められ、C57BL/6マウスでは減少傾向であった。また、サイトカイン産生はBPAの濃度依存的にIL-4の増加およびIFN- γ の産生の低下がBALB/cマウスでより顕著に認められた。つまり、BPAの濃度依存的にTh2優位なサイトカイン産生を示した。

D. 考察

内分泌かく乱化学物質が免疫系のTh1/Th2バランスに影響を及ぼし、Th2優位な反応を引き起こすことが報告されている。Th1およびTh2両者のサイトカインを産生し免疫応答を制御するNKT細胞に対しても、内分泌かく乱化学物質が影響を及ぼし、NKT細胞の関与する自己免疫やアレルギー疾患に影響を及ぼすと考えられる。

本研究では、NKT細胞の抗原特異的な反応がBPA 10^{-8} ~ 10^{-5} Mの濃度で増殖およびサイトカイン産生に影響を及ぼすことを明らかとした。特に、BPA 10^{-8} ~ 10^{-5} Mの限られた濃度においてIFN- γ 産生の抑制とIL-4産生の亢進と相反する作用を示し、濃度依存的にTh2優位なサイトカイン産生を示すことからNKT細胞によるTh1/Th2バランス制御に影響を及ぼし、NKT細胞の関与する免疫疾患にBPAが関与する可能性が示唆された。

E. 結論

BPA 10^{-8} ~ 10^{-5} Mの濃度においてNKT細胞の抗原特異的な反応をTh2優位にすることを明らかとした。すなわちBPAが免疫応答の制御、特に、Th1/Th2バランス制御に重要な役割をするNKT細胞をTh2優位な反応に偏らせ、Th2反応が関与するアレルギー疾患などの発症に関連する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書への記載は不要)

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida M, Matsui Y, Ikarashi Y, Usui T, Osada H and Wakasugi. Antiproliferating activity of mitotic inhibitor pironetin against vindesine- and paclitaxel-resistant human small-cell lung cancer H69 cells. *Anticancer Res.* (in press)
2. Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, Ochiya T and Quinn G. Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. *Diabetologia* 2006; 49: 2948-2958.
3. © Kuwatani M, Ikarashi Y, Iizuka A, Kawakami C, Quinn G, Heike Y, Yoshida M, Asaka M, Takaue Y and Wakasugi, H. Modulation of acute graft-versus-host disease and chimerism after adoptive transfer of in vitro-expanded invariant V α 14 natural killer T cells. *Immunol Lett.* 2006; 106: 82-90.
4. ©Imataki O, Heike Y, Ishida T, Takaue Y, Ikarashi Y, Yoshida M, Wakasugi H and Kakizoe T. Efficient ex vivo expansion of

V α 24⁺ NKT cells derived from G-CSF-mobilized blood cells. J Immunother. 2006; 29: 320-327.

5. Ohashi M, Kobayashi A, Hara H, Kushida M, Miura Y, Yoshida K, Ikarashi Y, Mandai M, Kitajima M, Yoshida T and Aoki K. Allogeneic major histocompatibility complex gene transfer enhances antitumor activity of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation without exacerbating graft-versus-host disease. Clin Cancer Res 2006; 12:2208-2215.

2. 学会発表

1. 五十嵐美德、飯塚明、吉田光二、平家勇司、高上洋一、若杉尋。α-galactosylceramideを用いて体外で増殖・活性化させたNKT細胞のおよびNK細胞におけるNK細胞活性化レセプターNKG2Dの発現修飾 第65回日本癌学会学術総会 (横浜)
2. 今滝修、平家勇司、小田慶一郎、五十嵐美德、白川一男、石田秀行、高上洋一、若杉尋。胆がん患者末梢血由来V α 24陽性NKT細胞の増殖効率 第65回日本癌学会学術総会 (横浜)
3. 松井祐樹、吉田光二、五十嵐美德、臼井健朗、長田裕之、若杉尋。TaxolおよびVindesin耐性H69細胞株に対する分裂阻害剤Pironetinの抗がん活性。第65回日本癌学会学術総会 (横浜)
4. 吉田光二、松井祐樹、五十嵐美德、若杉尋。PKC β IIを発現させたHLE細胞におけるグニディマクリンのp21発現誘導を介したCdc2の活性化と発現の抑制によるG2期停止。第65回日本癌学会学術総会 (横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

研究課題名=[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於ける核内受容群の発現を DNA マイクロアレイによって検討し、オーファンレセプターの REV-ERBb (Nr1d2)、TR4 (Nr2c2) をはじめ、COUP-TF1、GR、PPARb、TRa などの発現が高いことを確認し、TRa のリガンドの甲状腺ホルモンが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を明らかとした。

今年度は、胎児脳発達に於いて重要な機能を有する核内受容体を更に見出すために、胎生 10 日から 16 日まで経時的に胎児終脳の遺伝子発現を検討した。その結果、TRa の発現が経時的に上昇すること、COUP-TF1 (Nr2f1)、LXRb (Nr1h2)、Nurr1 (Nr4a2)、Rxrb の発現が持続的に高値を示すこと、COUP-TF2 (Nr2f2)、EAR2 (Nr2f6)、Tlx (Nr2e1)、Rarg、Rxra の発現が経時的に減少することを見出した。また、この経時的な発現情報を、神経幹細胞に於ける発現情報と関連づけて考察するために、胎生 1 1 日から胎生 1 4 日の各日由来のニューロスフェア（神経幹細胞塊）の遺伝子発現を網羅的に検討した。その結果、COUPTF-1、COUPTF2、ESRRa、GR (Nr3c1)、LXRb (Nr1h2)、NGFI-Ba (Nr4a1)、Rarg、REV-ERBa (Nr1d1)、REV-ERBb (Nr1d2)、Rora、Rxra、Rxrb、Tlx (Nr2e1)、TRa、TR2 (Nr2c1)、TR4 (Nr2c2) の発現が持続的に高く、EAR2 は高い発現を保ちながら減少傾向を示し、BPA が強く結合することが最近報告された ESRRg の発現は胎児終脳で経時的に上昇し、神経幹細胞では数コピーの一定の発現を示すことが分かった。以上から、ESRRa、GR、NGFI-Ba、REV-ERBa (Nr1d1)、REV-ERBb (Nr1d2)、TR2 (Nr2c1)、TR4 (Nr2c2) は神経幹細胞特異的に高発現を示す核内受容体であることが明らかになった。

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及び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ための基盤情報が得られた。

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。

神経系発達に於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探ることを目的とする。

B. 研究方法

胎児終脳の採取、胎児脳からの神経幹細胞培養に対し、網羅的遺伝子発現解析を行い、核内受容体の発現を調べた。

マウス胎児終脳の採取

C57BL/6 マウス妊娠 10 日から 16 日まで各日、胎児終脳を採取した。1 腹当たり 4 匹をプールし、各群 3 腹採取した。

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 11.5 日から 14.5 日各日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、progesterone、putrescine、apoptosis inhibitor、selenite Na を添加したもの）には bFGF (10ng/ml) 及び EGF (25 ng/ml) を添加したものを扱い、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）から RNA を抽出し、遺伝子発現検討を実施した。

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、ピオチン化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

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、顕著に発現が高かったTRa (Thyroid hormone receptor alpha)に注目し、そのリガンドである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O4, 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。今年度は、胎児脳発達に於

いて重要な機能を有する核内受容体を更に見出すために、胎児終脳の経時的遺伝子発現解析に加え、胎齢の異なる終脳由来ニューロスフェア（神経幹細胞塊）の遺伝子発現を網羅的に検討比較した。その結果、発現が高い核内受容体群の多くは終脳、ニューロスフェアで一致したが、終脳では発現が低いにもかかわらずニューロスフェアで高いものとして、ESRRa、GR、NGFI-Ba、REV-ERBa (Nr1d1)、REV-ERBb (Nr1d2)、TR2 (Nr2c1)、TR4 (Nr2c2)が見出された。

網羅的遺伝子発現解析

神経幹細胞は発生初期には増殖のみを行い、中期からニューロンに分化する能力を獲得し、後期にグリア細胞に分化出来るようになる。そこで、本研究では発生中期の妊娠10日目から、発生後期の妊娠16日目まで経時的に胎児終脳を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行った。更に、神経幹細胞に特化した解析も実施するため、ニューロンにしか分化しない妊娠11日目から、グリアにも分化可能になる妊娠14日目まで各日ニューロスフェアを培養し、網羅的遺伝子発現解析を行った。網羅的遺伝子発現解析にあたっては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用いた。

核内受容体48種類について解析した結果、終脳に於いて、TRaの発現が経時的に上昇すること、COUP-TF1 (Nr2f1)、LXRb (Nr1h2)、Nurr1 (Nr4a2)、Rxrbの発現は持続的に高値を示すこと、COUP-TF2 (Nr2f2)、EAR2 (Nr2f6)、Tlx (Nr2e1)、Rarg、Rxraの発現は経時的に減少することを見出した。また、ニューロスフ

フェアに於いては、COUPTF-1、COUPTF2、ESRRa、GR(Nr3c1)、LXRb(Nr1h2)、NGFI-Ba(Nr4a1)、Rarg、REV-ERBa(Nr1d1)、REV-ERBb(Nr1d2)、Rora、Rxra、Rxb、Tlx(Nr2e1)、TRa、TR2(Nr2c1)、TR4(Nr2c2)は持続的に高い発現を示すこと、EAR2は高い発現を保ちながら減少傾向を有すること、BPAが強く結合することが最近報告されたESRRgの発現は、胎児終脳で経時的に上昇し、神経幹細胞では数コピーの一定の発現を示すことが分かった。エストロゲン受容体については、ERaがニューロスフェアに於いて発現低いながら一定値を保つ一方、ERbの発現はごく低いことが分かった。

よって、ESRRa、GR、NGFI-Ba、REV-ERBa(Nr1d1)、REV-ERBb(Nr1d2)、TR2(Nr2c1)、TR4(Nr2c2)は、終脳全体でみると発現は低いが発現が神経幹細胞に於いて高発現を示す核内受容体であることが分かった。

D. 考察

本研究で見出した神経幹細胞で発現が高い核内受容体の多くは、神経幹細胞に於ける機能が全く明らかにされていないが、昨年度検討したTRaの発現もニューロスフェア、すなわち神経幹細胞で持続的に高発現していたことから、これらの核内受容体が神経幹細胞機能に影響を与えうる能力を有している可能性は高い。これらの中でリガンドが同定されているのはGRのみであるが、BPAがESRRgに強く結合するという例(Toxicol Lett. 2006 Sep 3; [Epub ahead of print])を踏まえると、内分泌かく乱化学物質がリガンド未知のいわゆるオーファン核内受容体に結合し作用する可能性も考慮する必要がある。ESRRファ

ミリーについては、beta型にDES、gamma型にBPAに加え4-Hydroxytamoxifenも結合することが分かっているが、alpha型に結合する物質はまだ報告されていない。Alpha型はTRaの転写調節を行うという報告(Oncogene 1998, 17:2429-2435)もあり、今後ESRR familyに着目した解析が重要となると考えられる。

神経幹細胞の増殖、分化は、塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型(bHLH)転写因子による制御を受けている。bHLH型転写因子の中で、神経幹細胞の未分化性増殖を担うHES1に関し、エストロゲンによる発現低下が報告されている(Oncogene 2000, 19, 5951-5953)。乳癌細胞株での知見ではあるが、核内受容体と神経幹細胞機能制御の接点の1つである可能性があり興味深い。

以上の結果は、神経幹細胞に於いて核内受容体間の多岐に渡る複雑なクロストークが存在することを示唆し、1つの核内受容体系のかく乱により、他の核内受容体系にも影響が及ぶことを念頭に置いた研究の重要性を確認するものである。

E. 結論

胎児期のエストロゲン様化学物質への暴露により、神経幹細胞の自己複製能、分化能に影響が生じることが示唆された。また、胎児神経幹細胞では核内受容体TRaが高発現しており、実際に甲状腺ホルモンが作用を発揮しオリゴデンドロサイト分化を促進することが示された。神経幹細胞で特異的に高発現している核内受容体は他にもESRRa、GR、NGFI-Ba、REV-ERBa(Nr1d1)、REV-ERBb(Nr1d2)、TR2(Nr2c1)、TR4(Nr2c2)などが見出されてお

り、これらの神経幹細胞における生理機能に関する基礎的情報を明らかにし、内分泌かく乱化学物質の神経幹細胞に及ぼす影響を考察することが重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

©Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol*. 2006 20(9):2141-55 (2006)

Watanabe Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Endo M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse. *Development*. 2006 133(9):1625-34.

Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific *Mesp2* expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 103(10):3651-6.

Nakamura Y, Suzuki T, Igarashi K, Kanno J, Furukawa T, Tazawa C, Fujishima F,

Miura I, Ando T, Moriyama N, Moriya T, Saito H, Yamada S, Sasano H. PTOV1: a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta. *Pathol*. 2006 209(4):522-31 (2006)

©Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T. Per cell normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics*. 2006 Mar 29;7:64.

Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. *Mesp1*-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. *Dev Dyn*. 2006 235(2):395-402.

©Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 103(1):224-9.

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、Percellome Projectによる毒性トランスクリプトミクスの新しい試み、細胞工学、2007年1月号、株式会社秀潤社

菅野 純、毒性の高精細解析に向けてのトキ