

*Commun.*, **327**, 933-938, 2005.

Takada, I., Suzawa M., Kato, S.: Nuclear receptors as targets for drug development: crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and cytokines in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 184-189, 2005.

Kato, S., Fujiki, R., Kitagawa, H.: Chapter 17, Promoter targeting of vitamin D receptor through a chromatin remodeling complex. In Vitamin D, 2nd Edition, ed. by Feldman, D., Pike, J.W., Glorieux, F.H., Elsevier, Inc., San Diego, CA, pp. 305-312, 2005.

Capuano, P., Radanovic, T., Wagner, C. A., Bacic, D., Kato, S., Uchiyama, Y., St-Arnaud, R., Murer, H., Biber, J.: Intestinal and renal adaptation to a low Pi-diet of type II Na-Pi-cotransporters in VDR and 1  $\alpha$ -OHase deficient mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **288**, C429-C434, 2005.

Meindl, S., Rot, A., Hoetzenecker, W., Kato, S., Cross, S., Elbe-Burger, A.: Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *Br. J. Dermatol.*, **152**, 231-241, 2005.

© Wada-Hiraike, O., Yano, T., Nei, T., Matsumoto, Y., Nagasaka, K., Takizawa, S., Oishi, H., Arimoto, T., Nakagawa, S., Yasugi, T., Kato, S., Taketani, Y.: The DNA mismatch repair gene hMSH2 is a potent coactivator or oestrogen receptor  $\beta$ . *Br. J.*

*Cancer*, **92**, 2286-2291, 2005.

Fan, W., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Sato, T., Kawano, H., Kato, S., Nawata, H.: Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes*, **54**, 1000-1008, 2005.

Saito, H., Maeda, A., Ohtomo, S., Hirata, M., Kusano, K., Kato, S., Ogata, E., Segawa, H., Miyamoto, K., Fukushima N.: Circulating FGF-23 is regulated by  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and phosphorus *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 2543-2549, 2005.

Bando, T., Sekine, K., Kobayashi, S. M., Watabe, A., Rump, A., Tanaka, M., Suda, Y., Kato, S., Morikawa, Y., Manabe, T., Miyajima, A.: Neuronal leucine-rich repeat protein 4 functions in hippocampus-dependent long-lasting memory. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 4166-4175, 2005.

Nakagawa, K., Kawaura, A., Kato, S., Takeda, E., Okano, T.:  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis*, **26**, 429-440, 2005.

Nakagawa, K., Sasaki, Y., Kato, S., Kubodera, N., Okano, T.: 22-Oxa- $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits

metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Carcinogenesis*, **26**, 1044-1054, 2005.

Kallay, E., Bises, G., Bajna, E., Bieglmayer, C., Gerdenitsch, W., Steffan, I., Kato, S., Armbrecht, H. J., Cross, H. S.: Colon-specific regulation of vitamin D hydroxylases-a possible approach for tumor prevention. *Carcinogenesis*, **26**, 1581-1589, 2005.

Yamamoto, K., Uchida, E., Urushino, N., Sakaki, T., Kagawa, N., Sawada, N., Kamakura, M., Kato, S., Inouye, K., Yamada, S.: Identification of amino acid residue of CYP27B1 responsible for binding of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> whose mutation causes vitamin D-dependent rickets type I. *J. Biol. Chem.*, **280**, 30511-30516, 2005.

Inoue, Y., Segawa, H., Kaneko, I., Yamanaka, S., Kusano, K., Kawakami, E., Furutani, J., Ito, M., Kuwahata, M., Saito, H., Fukushima, N., Kato, S., Kanayama, H., Miyamoto, K.: Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism. *Biochem. J.*, **390**, 325-331, 2005.

## 2. 学会発表

### 【国内】

#### 平成17年度年度日本農芸化学会大会

◎ER $\alpha$ の細胞周期依存的機能の解析.

岡田麻衣子、竹沢慎一郎、目崎善弘、高田伊知郎、加藤茂明.

◎ポリグルタミン鎖伸長異常アンドロゲンレセプターによって引き起こされる神

経変性はRb/E2F-1転写調節機能の抑制化により回復する.

鈴木絵里子、武山健一、伊藤沙弥、沢津橋 俊、城出裕子、真木彰郎、山形 薫、趙 越、Alexander Kouzmenko、相垣敏郎、多羽田哲也、加藤茂明.

ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY の分子機能解析.

盛 真友、松本高広、秋本千央、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転写共役因子の探索と機能解析.

武山健一、伊藤紗弥、沢津橋 俊、城出裕子、鈴木絵里子、真木彰郎、趙 越、山形 薫、Alexander Kouzmenko、田辺真彦、多羽田哲也、加藤茂明.

non-canonical Wnt pathway による核内レセプターPPAR $\gamma$ 転写抑制機構の解析.

高田伊知郎、須沢美幸、松本邦弘、加藤茂明.

クロマチンリモデリング複合体 WINAC におけるシグナル依存的調節機構の解析.

大矢博之、藤木亮次、目崎喜弘、北川浩史、高田伊知郎、加藤茂明.

#### 第28回日本分子生物学会

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.

◎選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) 結合エストロゲン受容体転写制御機構の解析.

目崎喜弘、神津 円、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明.

クロマチンリモデリング複合体 WINAC におけるシグナル依存的調節機構の解析.

大矢博之、藤木亮次、吉村公宏、目崎喜弘、北川浩史、高田伊知郎、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.

◎ユビキチン化を介したダイオキシン受容体のエストロゲン・シグナル制御.

大竹史明、馬場敦史、藤井義明、加藤茂明.

新規クロマチンリモデリング複合体 WINAC を介した、リガンド依存性ビタミンD レセプター転写抑制機構の解明.

藤木亮次、金 美善、佐々木康匡、吉村公宏、北川浩史、加藤茂明.

◎ER $\alpha$ の細胞周期依存的な ER $\alpha$ の機能解析.

岡田麻衣子、竹沢慎一郎、目崎喜弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明.

ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY の分子機能解析.

盛 真友、松本高広、秋本千央、加藤茂明.

### 第23回日本骨代謝学会

間葉系幹細胞における核内レセプター PPAR $\gamma$  転写機能制御機構の解析.

高田伊知郎、須沢美幸、松本邦弘、加藤茂明.

◎アンドロゲンの骨増強作用は破骨細胞内ARを介して発揮される.

中村 貴、中道裕子、東 由明、福田亨、落合鋭士、加藤茂明.

DNA メチル化制御による 1 $\alpha$  (OH) ase 遺伝子の活性型ビタミンD 依存的な転写制御機構の解明.

金 美善、村山明子、武山健一、加藤茂明.

### 【国際】

#### EMBO Conference 2005

Ligand-induced transrepression mechanism by nuclear receptor through chromatin remodeling/modification complexes.

S. Kato, A. Murayama, M.-S. Kim, R. Fujiki, H. Kitagawa.

1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ -induced transrepression on 1 $\alpha$ -hydroxylase gene promoter is mediated by chromatin remodeling through WINAC.

R. Fujiki, M.-S. Kim, Y. Sasaki, H. Kitagawa, S. Kato.

#### ASBMR 27<sup>th</sup> Annual Meeting

◎ Differentiation switch of mesenchymal stem cells through suppression of PPAR $\gamma$  function by NLK.

I. Takada, M. Suzawa, S. Takezawa, Y.

Yogiashi, Y. Mezaki, M. Igarashi, S. Kato.

*Chem.*, **281**, 20-26, 2006.

©Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts.

T. Nakamura, T. Watanabe, Y. Nakamichi, Y. Azuma, K. Yoshimura, T. Matsumoto, T. Fukuda, E. Ochiai, D. Metzger, P. Chambon, T. Sato, S. Kato.

Kim, M.-S., Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamamoto, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K., Kato, S.: 1 $\alpha$ , 25(OH) $_2$ D $_3$  -induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol. Endocrinol.*, 2007. (in press)

The 2<sup>nd</sup> Advanced Bone and Joint Symposium

©The function of steroid receptors in bone. S. Kato.

Takezawa, S., Yokoyama, A., Okada, M., Fujiki, R., Iriyama, A., Yanagi, Y., Ito, H., Takada, I., Kishimoto, M., Miyajima, A., Takeyama, K., Umesono, K., Kitagawa, H., Kato, S.: A cell cycle-dependent co-repressor for photoreceptor cell-specific nuclear receptor (PNR). *EMBO J.*, 2007. (in press)

2006 年度

©Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, 2007. (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.*, 2007. (in press)

© 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.

Memezawa, A., Takad, I., Takeyama, K., Igarashi, M., Ito, S., Aiba, S., Kato, S., Kouzmenko, A.P.: Id2 gene targeted crosstalk between Wnt and retinoid signaling regulates proliferation in human keratinocytes. *Oncogene*, 2007. (in press)

© 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.*

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.
- ©Li, M., Hener, P., Zhang, Z., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.*, **103**, 11736-11741, 2006.
- ©Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Okabe, T., Nomura, M., Daitoku, H., Fukamizu, A., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H.: IGF1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of FOXO1 with androgen receptor. *J. Biol. Chem.*, 2007. (in press)
- © Tateishi, Y., Sonoo, R., Sekiya, Y., Sunahara, N., Kawano, M., Wayama, M., Hirota, R., Kawabe, Y., Murayama, A., Kato, S., Kimura, K., Yanagisawa, J.: Turning off estrogen receptor beta-mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 7966-7976, 2006.
- Katsu, Y., Kohno, S., Oka, T., Mitsui, N., Tooi, O., Santo, N., Urushitani, H., Fukumoto, Y., Kuwabara, K., Ashikaga, K., Minami, S., Kato, S., Ohta, Y., Guilette, L. J. Jr., Iguchi, T.: Molecular cloning of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ; ESR1) of the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **257-258**, 84-94, 2006.
- Yokota, K., Shibata, H., Kurihara, I., Kobayashi, S., Suda, N., Murai-Takeda, A., Saito, I., Kitagawa, H., Kato, S., Saruta, T., Itoh, H.: Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. *J. Biol. Chem.*, 2007. (in press)
- Ma, Y., Khalifa, B., Yee, Y. K., Lu, J., Memezawa, A., Savkur, R. S., Yamamoto, Y., Chintalacheruvu, S. R., Yamaoka, K., Stayrook, K. R., Bramlett, K. S., Zeng, Q. Q.,

Chandrasekhar, S., Yu, X. P., Linebarger, J. H., Iturria, S. J., Burris, T. P., Kato, S., Chin, W. W., Nagpal, S.: Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *J. Clin. Invest.*, **116**, 892-904, 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 $\alpha$ 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  $\gamma$  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. Shiode, A. Maki, Y. Zhao, K. Yamagata, T. Furutani, A. Kouzmenko, M. Tanabe, K. Takeyama, S. Kato.

Analysis of a novel VDR interacting chromatin remodeling complex 'WINAC' in vivo.

K. Yoshimura, H. Kitagawa, R. Fujiki, T. Matsumoto, S. Kato.

*Drosophila* genetic system as a powerful tool for identification of novel co-regulators of human nuclear receptors

K. Takeyama, S. Ito, S. Sawatsubashi, Y. Shiode, E. Suzuki, Y. Zhao, K. Yamagata, M. Tanabe, A. Kouzmenko, S. Kato.

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

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.

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. Shiode, K. Yamagata, A. Kouzmenko, M. Tanabe, S. Kato.

Bone remodeling and the roles of nuclear receptors.

S. Kato.

13<sup>th</sup> Workshop on Vitamin D

Ligand-induced transrepression mechanism by nuclear receptor through chromatin remodeling/modification complexes.

S. Kato.

Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription)

Function of co-regulator complexes for nuclear receptors.

S. Kato.

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. Shiode, T. Tabata, S. Kato.

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. Shiode, T. Tabata, S. Kato.

Functional analysis of a novel ATP dependent chromatin remodeling complex

‘WINAC’.

H. Kitagawa, R. Fujiki, K. Yoshimura, H. Ohya, S. Kato.

ASBMR 28<sup>th</sup> Annual Meeting

1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-induced DNA methylation mediates the transrepression by VDR.

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

Vitamin K stimulates osteoblastogenesis through PXR/SXR-mediated Msx2 induction.

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

International Conference on Progress in Bone and Mineral Research 2006

Bone remodeling and the roles of nuclear receptor.

S. Kato.

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

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)  
分担研究報告書

低用量内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究

廣川 勝 昱  
東京医科歯科大学

研究要旨:妊娠マウスに Bisphenol-A(BPA)を含む飲料水を自由摂取させ、胎仔、新生仔の免疫系への影響を検討した。BPA により、胎仔子宮内死亡が増加し、生まれる新生仔数は減少した。15日齢胎仔と新生仔の免疫系では胸腺ストローマの胸腺リンパ球増殖に関わる遺伝子の発現抑制が起こり、胸腺内リンパ球増殖分化の抑制が起こった。このような条件下で生まれた仔マウスに母親の乳を通して、また離乳後は飲料水に混ぜて BPA を投与し、6ヶ月齢、12ヶ月齢に免疫系への影響を調べた。胸腺・脾臓におけるリンパ球の数、亜集団構成、増殖能、及びサイトカイン産生のいずれにおいても、対照群と比し、有意な変化はなく、胸腺ストローマにおける胸腺リンパ球に関わる遺伝子発現の変動も見られなかった。胎仔の死亡を誘発し、胎仔胸腺リンパ球の増殖分化に影響する濃度の BPA を含む飲料水であっても、免疫系の発達には大きな影響を与えないことが、マウスを用いた実験で明らかになった。

A. 研究目的

(要約)低用量 Bisphenol-A を含む飲料水を用い、胎仔、新生仔、アダルトマウスの免疫系への影響を調べた。

これまでの *in vivo* 及び *in vitro* の実験において、EDCs が未熟胸腺リンパ球の増殖・分化過程を抑制することを明らかにしてきた。本実験では、EDCsの未熟胸腺への影響を *in vivo* において見るために、母体に Bisphenol A(BPA)を投与し、その胎仔免疫系への影響を、胸腺を中心に検討した。

B. 研究方法

(要約)妊娠マウス、アダルトマウスでは飲料水を用いて、新生仔期には授乳により、BPA を投与し、胎仔の発達と胎仔～アダルトマウスの免疫系への影響を調べた。

1. 動物:妊娠確認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 (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. 摘出した胸腺をポアサイズ 8µm 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%CO<sub>2</sub> 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。
5. 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。
6. 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。

C. 研究結果

(要約)低用量の BPA が、子宮内死亡胎仔を増加させた。また、胎仔胸腺のストローマの遺伝子発現を大きく変動させた。しかし、その条件下で生まれたマウスの免疫系には生後12ヶ月間大きな異常は認められなかった。

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

1. BPA による子宮内胎仔死亡。子宮内胎仔死亡は BPA を含んだ飲料水を摂取した群では、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 BPA 投与が胎仔死亡を起こすことが明らかとなった。
2. BPA 摂取群で、胸腺リンパ球の増殖・分化に障害が起こり、細胞数が有意に減少した。

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

1. コントロール群と比べて、BPA 投与群で発現増加が見られた遺伝子が約 200 個、逆に発現低下した遺伝子が 100 個見られた。
2. 発現の低下した遺伝子の中には、Notch-1 リガンド、Glia maturation factor  $\beta$ 、Thymic stromal-derived lymphopoietin, receptor などの胸腺リンパ球の増殖分化に関わるものが含まれていた。
3. 発現の増強した遺伝子の中には、Estrogen Receptor  $\beta$ , ACTH-R, TSH-R, TRH-R などがあり、それらの発現が BPA により影響されることが明らかになった。

実験 C: 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、12 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<sup>+</sup>T 細胞、CD3<sup>+</sup>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 $\gamma$ , 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 D: 実験 C において、胸腺からストローマ部分を分離し、RNA を調整して、RT-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  $\beta$ 、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  $\beta$ , 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が明らかになった。

また、同じ実験で、胎仔期の胸腺ストローマを見ると、Notch-1 リガンド、Glia maturation factor  $\beta$ 、Thymic stromal-derived lymphopoietin, receptor などの遺伝子発現は低下し、一方、エストロゲン $\beta$ R、ACTH-R、TSH-R 及び TRH-R などの発現が増強することが分かった。

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授乳させ、離乳後は BPA を含む飲料水を摂取させたあと、12 ヶ月齢で、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、あとは大きな問題が残ら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 $\mu$ 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 $\mu$ g/l (0.0002  $\mu$ 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ると、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、BPA による影響が胎仔期には検出されても、修復されるものと考えられた。

## E. 結論

(要約) 子宮内胎仔死亡をもたらし、又胎仔胸腺ストローマの遺伝子発現に変動をもたらし、胸腺萎縮を起こす事ほどの BPA を飲料水等に混ぜて12ヶ月暴露したが、アダルトマウスの免疫系には大きな影響が認められなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Endo T, Abe S, Hirokawa K. et al. Expression of IAP family proteins in colon cancers from patients with different age groups. *Cancer Immunol. Immunoth.* 53:770-776, 2004

Nakai D, Shimizu T, Hirokawa K, et al. coq7/clk-1 regulates mitochondrial respiration and the generation of reactive oxygen species via coenzyme Q. *Aging Cell.* 3:273-81. 2004

Okada Y, Ito Y, Hirokawa K. et al. Lewy bodies in the sinoatrial ganglion: clinicopathological studies. *Pathol.Int.* 54:682-687, 2004

Suzuki J, Ikeda T, Hirokawa K. et al. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms. *BBRC.* 314:1021-7, 2004

Seidler H, Utsuyama M, Hirokawa K et al. Expression level of Wnt signaling components possibly influences the biological behavior of colorectal cancer in different age groups. *Exp.Mol.Pathol.* 76:224-244, 2004

Hirokawa K and Utsuyama M. Search for factors determining early decline of thymic function. *Geriatr.Gerontol.Int.*:4:S251-253, 2004.

廣川勝彦、宇津山正典。低用量内分泌かく乱物質の免疫系に及ぼす影響について(分担)。高次

生命系と内分泌攪乱化学物質－生体影響の分子機構－(井口、井上編)シュブリンガー出版 2005

Hirokawa K, Utsuyama M and Makinodan T.

Immunity and Aging. In Principle and Practice of Geriatric Medicine (Pathy MSJ ed). In press

Kitagawa M, Utsuyama M, Kurata M, Yamamoto K, Yuasa Y, Ishikawa Y, Arai T and Hirokawa K. Cancer and aging: symposium of the 27th annual meeting of the Japanese society for biomedical gerontology, Tokyo Cancer Immunol. Immunother. 54:623-34. 2005

Tsunemi A, Utsuyama M, Seidler B.K.H, Kobayashi S and Hirokawa K Age-related decline of brain monoamines in mice is reversed to young level by Japanese herbal medicine. *Neurochem. Res.* 30:75-81. 2005

Mukai K, Matsuoka K, Taya C, Suzuki H, Yokozeki H, Nishioka K, Hirokawa K, Etori M, Yamashita M, Kubota T, Minegishi Y, Yonekawa H and Hajime K. Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity* 23:191-202, 2005.

Hasegawa M, Yamaguchi S, Aizawa S, Ikeda H, Tatsumi K, Noda Y, Hirokawa K and Kitagawa M. Resistance against Friend leukemia virus-induced leukemogenesis in DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)-deficient scid mice associated with defective viral integration at the Spi-1 and Fli-1 site. *Leuk Res.* 29:933-42, 2005

Fulop T, Larbi A, Wikby A, Mocchegiani E, Hiroakwa K and Pawelec G. Dysregulation of T-cell function in the elderly: scientific basis and clinical implications. *Drugs Aging.* 22:589-603, 2005

Abe S, Yamamoto K, Hasegawa M, Inoue M, Kurata M, Hirokawa K, Kitagawa M, Nakagawa Y and Suzuki K. Bone marrow cells of myelodysplastic syndromes exhibit significant

- expression of apollon, livin and ILP-2 with reduction after transformation to overt leukemia. *Leuk Res.* 29:1095-6, 2005
- Yamaguchi S, Hasegawa M, Aizawa S, Tanaka K, Yoshida K, Noda Y, Tatsumi K, Hirokawa K and Kitagawa M. DNA-dependent protein kinase enhances DNA damage-induced apoptosis in association with Friend gp70. *Leuk Res.* 29:307-16. 2005
- 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.
- 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
- 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.
- 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況なし。

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

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。そこで、内分泌かく乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関して研究することを目的として、マクロファージの遊走能及び TNF $\alpha$  産生への影響について調べた。その結果、マクロファージの遊走能は、BPA、アルキルフェノール化合物類とフタル酸エステル化合物類で変化した。一方、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ている可能性があることがわかった。

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。そこで、内分泌かく乱物質がマクロファージ遊走能への影響、さらに、細胞傷害作用にかかわる TNF $\alpha$  産生について調べた。さらに、近年、マクロファージは脂

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、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及ぼす影響についても調べた。

B . 研究方法

1 ) マクロファージ機能への影響

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

TNF $\alpha$ は ELISA により測定した。

用いた内分泌かく乱物質は、ノニルフェノール(NP)、ビスフェノール A(BPA)、フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)、フタル酸ジエチル(DEP)、フタル酸ジブチル(DBP)、フタル酸ブチルベンジル(BBP)、フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)である。

## 2) マクロファージを介した脂肪組織への影響

C57BL/6 マウスにビスフェノール A(BPA)を 0.05 $\mu$ g、0.5 $\mu$ g、5 $\mu$ 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 を用いて脂肪組織における各 mRNA 発現量について調べた。

## C. 研究結果

### 1) マクロファージ機能への影響

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

BBP は  $10^{-10}$ M、 $10^{-12}$  ~  $10^{-13}$ M の濃度

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

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

## 2) マクロファージを介した脂肪組織への影響

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 $\mu$ 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、BPA 0.05、0.5、5 $\mu$ 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 $\mu$ g/ml 投与群で、腸間膜脂肪及び皮下脂肪は 0.05 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ g/ml 投与群で、MCP-1 は、0.5 $\mu$ g/ml 投与群で、TNF $\alpha$  は 5 $\mu$ g/ml 投与群で (  $p=0.01$  ), Leptin は BPA0.05、0.5、5 $\mu$ 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、異物を認識し、迅速に貪食、排除を行うとともに、炎症性サイトカインを産生する。この機構は、免疫系の中でも最も原始的なものであり、高等生物のみならず生物が広く持っているシステムである。感染防御機構において、自然免疫は感染早期の防御機構のみならず、適応免疫の Th1 / Th2 細胞への分化を決定する大きな要因となる。

内分泌かく乱物質のマクロファージの活性化に対する影響について調べた結果、高濃度の内分泌かく乱物質はマクロファージの遊走能を低下させたが、低濃度では、物質によっては遊走能を逆に増加させる傾向を示すものもあった。

遊走能の低下は感染防御の低下につ

ながると考えられる。遊走能の増加は、常にマクロファージが活性化され続けることになり、異物が進入した際に本来の機能が働かなくなる可能性がある。

内分泌かく乱物質が免疫系に影響を及ぼしている例として、海棲哺乳類が大量に死亡した事件があげられる。死亡したイルカの多くは、体内に種々の化学物質が蓄積されており、皮膚及び器官にウイルスやバクテリアの著しい日和見感染があった。これは化学物質が免疫機能を低下させウイルス感染に抵抗できなかったためと考えられる。本研究から得られた結果がこういった現象を一部裏付けているのではないかと思われる。

マクロファージはホルモン受容体を介していない経路で影響を受けていると考えられる。フタル酸エステル類は PPAR を活性化する。マクロファージにおける PPAR 活性化とマクロファージ機能との関係についてはまだ明らかになっていないが、この経路で影響を及ぼしている可能性もある。

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 $\alpha$ 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を破綻させ、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が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。

今回の研究において、アルキルフェニール類、フタル酸エステル類、BPA では、TNF $\alpha$ 産生、遊走能において低用量での反応が見られた。また、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が示唆された。フタル酸エステル化合物はプラスチック類の可塑剤として使用されており、BPA は樹脂の原料として使用されている。ヒトは食器や食品の包装材などを通してこれらの化合物を低用量で日常的に摂取している可能性があり、さらなる研究が必要であると思われる。

#### E . 結論

本研究の結果から、低濃度の内分泌かく乱物質がマクロファージの遊走能を増加させることが明らかとなった。すなわち、マクロファージの遊走能は、NP、BPA、BBP、DBP、DCHP、DEHP、DEP 存在下で低濃度で増加した。また、TNF $\alpha$ 産生も増加させた。

また、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 $\alpha$ 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

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

Miura S, Tomitsuka E, Kamei Y, **Yamazaki T**, Kai Y, Tamura M, Kita K, Nishino I, and Ezaki O.(2006) Overexpression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ Co-Activator-1 $\alpha$  Leads to Muscle Atrophy with Depletion of ATP, Am J Pathology, 169(4):1129-1139

### 2 . 学会発表

なし

## H . 知的所有権の取得状況

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、神経幹細胞に於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した。

平成 16 年度に、胎生後期胎児脳の神経幹細胞に於ける核内受容体群の発現を 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た。平成 17 年度は、TRa のリガンドである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、及びその際に生じる遺伝子発現変化を網羅的に明らかとした。平成 18 年度は、胎児終脳遺伝子発現の経時変化検討に加え、ニューロスフェア（神経幹細胞塊）遺伝子発現の経時変化検討を行い、ESRRa、GR、NGFI-Ba、REV-ERBa (Nr1d1)、REV-ERBb (Nr1d2)、TR2 (Nr2c1)、TR4 (Nr2c2) が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を明らかにした。

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に役立つ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、神経幹細胞に於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於いてエストロゲンシグナルの重要性が示されてきた。これが、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むことから、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。

本分担研究は、ER を含む中枢神経系発生において発現している各種核内受容体について、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した。

## B. 研究方法

胎児終脳及び胎児脳から分離培養した神経幹細胞培養に対し、①神経幹細胞に於ける核内受容体群の発現、②甲状腺ホルモンによるオリゴデンドロサイト分化誘導、③核内受容体発現の経時的解析を行った。

以下にその具体的な方法を記す。

### 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。

### マウス胎児神経上皮細胞培養（接着培養）実験 (NEC 実験)

C57BL/6 マウス妊娠 14.5 日目の胎児より終脳を採取し、ピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培地 (N2/DMEM/F12 (シ

グマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、プトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの)) に bFGF (10ng/ml) を添加したものを、あらかじめポリ-L-オルニチン及びフィブロネクチンでコーティングした 10cm シャーレ (ヌンク社) に 1 胎児分の細胞/6ml の密度で細胞を播種。4 日間培養後、ピペッティングにて細胞をはがし、生細胞数をカウント後、 $2 \times 10^5$ /200 $\mu$ l の細胞密度で 8well チャンバースライドに継代後、免疫染色に供した。甲状腺ホルモン T3, T4 は最終濃度 T3 30ng/mL, T4 40ng/mL にて 2 日間作用させた。

### 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 には bFGF (10ng/ml) 及び EGF (25 ng/ml) を添加したものを、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。その後、7 日間培養し、単細胞に由来する細胞増殖塊 (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 (アンピオン株式会社) に浸し、RNase を不活化した後、RLT buffer にて破砕液とした。培養サンプルは RLT buffer に直接回収し、破砕液とした。RLT 破砕液の 10 $\mu$ 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。Affymetrix 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 (Affymetrix 社キット) を用い、ビオチン化 CTP, UTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp になるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には 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

### 神経幹細胞に於ける核内受容体群の発現

本分担研究開始までに、胎生 14.5 日のマウス胎児脳から培養した神経幹細胞に於いて、mRNA レベルで ER alpha, beta が共に発現していることを、alpha 及び beta に特異的な primer を用いた PCR により確認していた。これを背景に、同じ胎生 14.5 日のマウス胎児脳培養神経幹細胞に於ける核内受容体の発現を、Percellome 手法を適用した DNA マイクロアレイ手法にて検討し、核内受容体群の発現に関する情報を得た。オーファンレセプターの

RVR, TR4 に加え、COUP-TF1, GR, PPARb, TRa などが高発現していることが分かった。ER は alpha, beta ともにそれらの受容体より発現が相対的に低かった (図 1)。

### 甲状腺ホルモンによるオリゴデンドロサイト分化誘導

次に、これらの中で 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 日間処理すると O4 (O antigen 4), MBP (Myelin Basic Protein) 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。そこで、甲状腺ホルモンによるオリゴデンドロサイト分化誘導に関わる遺伝子発現カスケードに関する情報を得るため、網羅的遺伝子発現解析を実施した。経時的な変化を測定するため、甲状腺ホルモン添加後、2 時間、6 時間、24 時間、48 時間で細胞を回収し、Percellome による発現コピー数変換を施した DNA マイクロアレイ解析を行った。

その結果、甲状腺ホルモン添加後 24 時間以降に発現値が大きく変化する遺伝子が多数認められた。まず、オリゴデンドロサイトマーカーの Myelin basic protein (MBP) の発現が 24 時間、48 時間にかけて著しい上昇を示し、オリゴデンドロサイト分化促進が確認された (図 2A)。次に、神経幹細胞機能を制御する Notch シグナル系に関して、Notch 自身 (Notch1, Notch2, Notch3) の発現が経時的に上昇する (図 2B) ことに加え、Notch 活性化により発現が上昇する遺伝子である Hes1, Hes5 がともに発現上昇することが明らかとなった (図 2C)。更に、Notch シグナルを抑