

北川浩史、加藤茂明

第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会

レチノイン酸誘導性血球分化を制御する核内受容体転写共役因子群の探索

藤木亮次、赤石葉月、北川浩史、加藤茂明

ビタミンD一位水酸化酵素遺伝子の活性型ビタミンD依存的な転写抑制解除にはDNA脱メチル化機構が関与する

金美善、高田伊知郎、武山健一、加藤茂明

エストロゲン応答 miRNA 発現のプロファイリング

山形 薫、鈴木絵里子、沢津橋 俊、伊藤紗弥、藤山沙理、田辺真彦、上田 崇、村田拓哉、趙 越、松川紘之、武山健一、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、目崎喜弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明

オープン核内受容体 TLX の、転写共役因子複合体の同定による転写抑制機構の解明

横山 敦、竹澤慎一郎、北川浩史、加藤茂明

グルカゴン/PKA シグナル依存的な FXR 新規転写共役因子複合体の解析

馬場敦史、大竹史明、高田伊知郎、加藤茂明

染色体構造変換を介した新規転写共役抑制因子の探索と機能解析

伊藤紗弥、沢津橋 俊、鈴木絵里子、趙越、山形 薫、田辺真彦、木村周平、上田崇、藤山沙理、村田拓哉、松川紘之、武山健一、加藤茂明

Identification of MDC1 that enhances androgen receptor transactivation

Yue Zhao, Ken-ichi Takeyama, Shun

Sawatsubashi, Saya Ito, Eriko Suzuki, Kaoru Yamagata, Yuko Shirode, Masahiko Tanabe, Shuhei Kimura, Sari Fujiyama, Takashi Ueda, Takuya Murata, Hiroyuki Matsukawa, Alexander P. Kouzmenko, Shigeaki Kato

酸化還元刺激によるグルココルチコイドレセプター転写制御メカニズムの解析

山岡育子、北川浩史、秋本千央、加瀬郁子、目崎善弘、清水崇史、加藤茂明

遺伝学的アプローチとプロテオミクスを連携した新規活性化クロマチン構造調節因子の網羅的探索と機能解析

藤山沙理、沢津橋 俊、鈴木絵里子、伊藤紗弥、田辺真彦、趙 越、木村周平、上田崇、山形 薫、村田拓哉、松川紘之、武山健一、加藤茂明

ダイオキシン受容体による脂肪細胞分化抑制作用機構の解明

三木ひろみ、大竹史明、高田伊知郎、藤井義明、加藤茂明

Y染色体遺伝子TSPYと男性ホルモン受容体の機能的相互作用の解析

秋本千央、上田 崇、山岡育子、井上和樹、松本高広、盛 真友、北川浩史、加藤茂明

ERR α 新規転写共役因子の同定と解析

松山玲子、高田伊知郎、北川浩史、矢野哲、加藤茂明

未知クロマチンバウンダリー制御因子の新たな探索法確立の試み

鈴木絵里子、沢津橋 俊、伊藤紗弥、趙越、山形 薫、田辺真彦、木村周平、藤山沙理、上田 崇、村田拓哉、松川紘之、Alexander Kouzmenko、武山健一、加藤茂明

第27回日本内分泌学会

核内受容体を介する細胞内情報伝達機構に関する研究

加藤茂明

第95回日本泌尿器科学学会総会

前立腺におけるアンドロゲンレセプターの高次機能解析

武政(高橋)さゆり、渡辺資之、松本高広、北村唯一、加藤茂明

第25回日本骨代謝学会

性ホルモン受容体群の骨組織での高次機能

加藤茂明

間葉系幹細胞における PPAR γ と Non-canonical Wnt シグナルのクロストーク分子機構の解析

高田伊知郎、三原正朋、松本邦弘、加藤茂明

エストロゲンの骨量維持機構は Fas Lignd シグナルを介した破骨細胞寿命の調節である

今井祐記、中村 貴、竹田 秀、福田 亨、山本陽子、高岡邦夫、松本高広、加藤茂明

【国際】

Salk/Nature/Ipsen Foundation Symposium on Biological Complexity: Diseases of Transcription

©Transcriptional pathways in the treatment of bone disease

Kato, S.

The 4th International Nuclear Receptor Meeting in Japan

Functional regulation of nuclear steroid hormone receptors through protein degradation

Kato, S.

2nd Conference on Skeletal Biology and Medicine

Transcriptional regulation of steroid action

Kato, S.

Bregenz Summer School on Endocrinology

Interactions between dioxin (AhR) and estrogen receptors

Kato, S.

6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences

Functional regulation of nuclear steroid

hormone receptors through protein degradation

Kato, S.

ASBMR 29th Annual Meeting

Consequences of a selective VDR knock out in the osteoblast

Kato, S.

Derepression of CYP27B1 gene expression mediates DNA-demethylation

Kim, M.-S., Takada, I., Takeyama, K., Kato, S.

EMBO Conference 2007

A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical WNT signaling suppresses PPAR-gamma function

Takada, I., Mihara, M., Kato, S.

Dioxin (Ah) receptor assembles a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase complex

Ohtake, F., Takada, I., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.

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

核内受容体作動性化学物質の免疫担当細胞やマクロファージ、
脂肪細胞への影響に関する研究

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

核内受容体に作用する化学物質がマクロファージなどの免疫担当細胞に及ぼす影響について調べる。C57BL/6 マウスに総エネルギー比 30%の脂肪を含むエサを与え、さらにビスフェノール A(BPA)を 0.005 μ g、0.05 μ g、0.5 μ g/ml になるように飲料水に加え、30週間投与し、肝臓、脂肪組織について調べた。BPA 投与群では、脂肪組織重量、肝臓 TG 量が増加しており、肝臓においては、TG 合成にかかわる核内受容体 PPAR γ やその標的遺伝子 CD36、マクロファージの浸潤や炎症マーカーである TNF α 、CD68 などの mRNA の発現が増加していた。BPA 摂取により非アルコール性脂肪性肝炎にいたる可能性が示唆された。

A. 研究目的

核内受容体に作用する化学物質がマクロファージなどの免疫担当細胞に及ぼす影響について調べる。すなわち、核内受容体に作用するある種の化学物質はマクロファージ機能に影響し、脂肪組織機能を悪化させ肥満へ導き、肝臓に脂肪を蓄積させ非アルコール性脂肪性肝炎（nonalcoholic steatohepatitis : NASH）を発症させる。肥満や脂肪肝は糖尿病、生活習慣病発症へつながる。そこで、特に意図せず摂取している核内受容体に作用する化学物質として考えられる BPA のマクロファージ機能、肥満、脂肪肝に与える影響について検討した。

B. 研究方法

C57BL/6 マウスに総エネルギー比 30% (30en%) の脂肪を含むエサを与え、さらにビスフェノール A(BPA)を 0.005 μ g、0.05 μ g、0.5 μ g/ml になるように飲料水に加え、30週間投与し肝臓、脂肪組織について調べた。

すなわち、C57BL/6 マウス（♂7週齢）に脂肪 30en%のエサを与え、さらに、コントロールには EtOH 0.01%の飲料水を、ビスフェノール A(BPA)投与群には、BPA 0.005 μ g、0.05 μ g、0.5 μ g/ml になるように飲料水に加え（EtOH 最終濃度 0.01%）投与した（各群 n=4）。30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、腎臓、脾臓、胸腺重量、肝臓トリグリセライド (TG) 量について調べた。さらに、Real-Time PCR を用いて各組織における mRNA 発現量について調べた。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、国立健康・栄養研究所倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

BPA 投与群では、脂肪組織重量、肝臓 TG 量が増加しており、肝臓においては、TG 合成にかかわる核内受容体 PPAR γ やその標的遺伝子 CD36、マクロファージの浸潤や炎症マーカーである TNF α 、CD68 などの mRNA の発現が増加していた。

すなわち、体重、肝臓、精巣周囲脂肪、褐色脂肪、筋肉、腎臓、脾臓重量はコントロール群と BPA 投与群に差はみられなかったが、後腹壁脂肪は BPA0.05 μ g、0.5 μ g/ml 投与群で、腸間膜脂肪、皮下脂肪重量は BPA0.05 μ g/ml 投与群でコントロール群より有意に増加していた。肝臓 TG 量は、BPA 投与群で増加傾向にあり、BPA0.05 μ g/ml 投与群はコントロール群に比べ有意に増加していた。

肝臓における mRNA の発現について調べた結果、BPA 投与群では、脂肪合成にかかわる核内受容体 PPAR γ 1、PPAR γ 2、PPAR γ の標的遺伝子であり脂肪酸の流入を行う CD36、マクロファージの浸潤及び炎症マーカーである TNF α の発現が増加

傾向にあった。脂肪酸の β 酸化にかかわる MCAD、マクロファージの浸潤及び炎症マーカーである CD68 の発現は BPA 0.05 μ g/ml 投与群で有意にコントロール群に比べ増加していた。

D. 考察

脂肪肝はメタボリックシンドロームの初発症状である。特に、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) はメタボリックシンドロームの肝における表現型といわれ、肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣を背景に発症する。NAFLD の約 1 割は NASH へ、そしてさらに肝硬変、肝癌へと進展する。さらに、日本人中年男性において、NASH は II 型糖尿病の危険因子であるとの報告もある。本研究は日本人の食事摂取基準に則り総エネルギーに対し脂質エネルギー比率が 30%であるエサをマウスに食べさせて行った。その結果、BPA 0.05 μ g/ml 投与群で脂肪肝を発症した。およそ、7 μ g/kg/day 摂取し続けたことになる。したがって、BPA のような化学物質を意図せず摂取し、脂肪肝あるいは肥満、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。

今年度は 30 週という長期投与を行ったため、脂肪肝を発症させることができたが、脂肪合成にかかわる核内受容体、酵素等の遺伝子発現の変化は重度の脂肪肝を発症した割には小さかった。もう少

し早期に、脂肪肝発症の段階で遺伝子発現変化をみる必要があると思われる。

H. 知的所有権の取得状況
なし

E. 結論

BPA 投与群では、脂肪組織重量、肝臓 TG 量が増加した。マクロファージによる炎症性マーカーも増加しており、摂取した BPA が肥満や脂肪肝に関与していることが示された。すなわち、BPA 投与群、特に BPA 0.05 μ g/ml 投与群では、脂肪組織重量、肝臓 TG 量が増加しており、肝臓においては、核内受容体 PPAR γ や CD36、TNF α 、CD68 などの mRNA の発現が増加していた。BPA のような化学物質を意図せず摂取し、脂肪肝あるいは肥満、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, Nakamori A, Sasaki E, Wada S, Ezaki O, Fish oil prevents sucrose-induced fatty liver but exacerbates high-safflower oil-induced fatty liver in ddY mice, *Hepatology*, (2007) in press.

2. 学会発表

和田智史、山崎聖美、中森明子、佐々木江梨子、川野因、江崎治、ゾンデ投与によるアルコール性脂肪肝発症モデルマウスの作製、第 61 回日本栄養・食糧学会大会：2007 年 5 月 20 日、京都

低用量核内受容体作動性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 美徳 国立がんセンター研究所・化学療法部 主任研究官

研究要旨

低用量の bisphenol A (BPA) の T ヘルパー1(Th1)/Th2 サイトカイン産生バランス制御に及ぼす影響を検討した。BPA は *in vitro* では Th2 優位な NKT 細胞のサイトカイン産生を誘導し、*in vivo* では NKT 細胞の Th2 優位なサイトカイン産生の増強及び IgE 産生の減少傾向が認められた。BPA は Th2 優位な NKT 細胞のサイトカイン産生を誘導し、Th1/Th2 バランス制御に影響を及ぼし、Th2 優位な NKT 細胞の関与する疾患の発症に関連する可能性が示唆された。

A. 研究目的

低用量の bisphenol A (BPA) の T ヘルパー1(Th1)/Th2 サイトカイン産生バランス制御に及ぼす影響を検討した。

すなわち、核内受容体作動性化学物質が Th1/Th2 産生のバランス異常やそれに伴うアレルギーの発症と関連することが示唆されている。BPA の免疫系への影響、特に Th1/Th2 サイトカインバランスを制御する NKT 細胞に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

BPA の Th1/Th2 サイトカイン産生バランスに及ぼす影響を *in vitro* 及び *in vivo* で解析した。

すなわち、BALB/c マウス(オス5週齢)の脾細胞を NKT 細胞に特異的な脂質抗原である α -galactosylceramid (α -GalCer) で刺激すると

同時に BPA (10^{-10} ~ 10^{-6} M) を加えて培養し NKT 細胞の増殖効率及び NKT 細胞の産生する Th1 (IFN- γ) および Th2 (IL-4) サイトカインの産生について ELISA 法にて解析した。また、BPA (30~3,000 μ g/kg body) を 4 日間、投与後の血清中のサイトカイン及び α -GalCer をさらに投与した後の血中の IgE を測定した。

(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

BPA は *in vitro* では Th2 優位な NKT 細胞のサイトカイン産生を誘導し、*in vivo* では NKT 細胞の Th2 優位なサイトカイン産生の増強及び IgE 産生の減少傾向が認められた。

すなわち、*in vitro* では BPA (10^{-8} ~ 10^{-5} M) は

α -GalCerの刺激によるNKT細胞のIL-4産生およびIL-4:IFN- γ 比の増加する作用が認められた。つまり、BPAの濃度依存的に α -GalCerによってNKT細胞のサイトカイン産生のバランスをTh2優位に変化させた。BPA投与によるin vivoでのNKT細胞のサイトカイン産生に及ぼす影響について解析した結果、 α -GalCer投与により血中IL-4及びIFN- γ 両者のサイトカイン産生の増加が認められた。また、このサイトカイン産生の増加はTh2優位な傾向を示した。つまり、BPA投与によって、NKT細胞のTh2を優位なサイトカイン産生能の亢進が認められた。

BPAの投与によって血中IgE濃度の変化は認められなかった。しかし、 α -GalCerの投与によるIgE産生の増強作用は、むしろ抑制される傾向であった。

D. 考察

核内受容体作動性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し、アレルギーの発症と関連することが報告されている。BPAのTh1/Th2バランスに及ぼす影響およびアレルギーとの関連性について、解析するために、Th1/Th2バランス制御に重要な役割を果たすNKT細胞のBPAの及ぼす影響について解析した。

α -GalCerによる抗原刺激ではNKT細胞はTh1あるいはTh2タイプへの極性化は誘導されない。しかし、BPAはin vivo及びin vitroでNKT細胞のTh2タイプへの極性化に影響を与えた結果は、核内受容体作動性化学物質がTh1/Th2バランスに影響を及ぼすことが示唆された。またNKT細胞を用いた実験系は高い感度で核内受容体作動性化学物質のTh1/Th2バランスに対する影響を評価するシステムであると考えられる。

BPAがNKT細胞をTh2優位なサイトカイン産生を誘導することから、in vivoでは α -GalCerによるIgE産生の増強が期待されたが、結果はむしろ、BPA投与によりIgE産生の抑制が認められた。in vivoではBPの投与によりNKT細胞のTh2サイトカイン産生に加え、IFN- γ 産生の亢進も認められるために、IFN- γ によって α -GalCer誘導のIgE産生が抑制された可能性が考えられる。

NKT細胞が各種の免疫疾患の発症や抑制に関与することから、BPAはNKT細胞に作用し、in vitro及びin vivoにおいてTh2優位なサイトカイン産生を示したことからTh2優位な疾患の発症と関与する可能性が示唆された。

E. 結論

BPAはTh2優位なNKT細胞のサイトカイン産生を誘導し、Th1/Th2バランス制御に影響を及ぼした。

すなわちBPAは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優位なNKT細胞の関与する疾患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. Iizuka A, Ikarashi Y, Yoshida M, Heike Y, Takeda K, Quinn G, Wakasugi H, Kitagawa M, and Takaue Y. Interleukin (IL)-4 promotes T helper 2 biased-Natural Killer T (NKT) cell expansion, which is regulated

by NKT cell-derived interferon- γ and IL-4.
Immunology. 2007; 123:100-107.

2. 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*. 2007; 27:729-736.

2. 学会発表

1. Chen S, Takahashi T, Takeda K, Ikarashi Y, Kikuchi T, Sugamura K, Ishi N. Co-inhibitory roles for Glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR) in CD1d-dependent natural killer T cell.

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 19 年度 分担研究報告書

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
核内受容体作動性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、神経幹細胞の増殖、分化における核内受容体の機能に着目し、核内受容体作動性化学物質の影響を低用量域を考慮しつつ検討することを目的とする。

マウス胎児神経幹細胞を *in vitro* 培養し、核内受容体を化学物質で刺激もしくはその発現を抑制した際の増殖、分化への影響を検討する。

まず、胎児神経幹細胞を未分化状態を保って安定して *in vitro* 培養可能とする Austin Smith らの NS cell 培養法を導入し、その再現と保持される未分化状態の特性の確認を終了した。次に、siRNA による遺伝子発現抑制法、及びクロマチン免疫沈降法の本 NScell 培養条件への適用を行い、その条件を確立した。また、48 種類の核内受容体のうち、発現量が微量な例として、PPAR γ について、免疫染色法により、神経幹細胞の核及び細胞質に発現していることを明らかにした。

今後、PPAR γ 活性化物質の一つ Troglitazone を用いた低用量域を考慮した神経幹細胞増殖・分化影響の解析及び、PPAR γ mRNA 発現の siRNA による抑制影響の解析を進め、PPAR γ 作動性化学物質の神経系初期発生影響を明らかにする。

キーワード：

神経系初期発生、神経幹細胞、核内受容体、増殖、分化、PPAR γ

A. 研究目的

神経系が正常に初期発生を遂げるためには、神経幹細胞が正常に増殖分化することが必要である。一方、分担研究者による網羅的遺伝子発現解析により、神経幹細胞に様々な核内受容体の mRNA が発現していることが明らかになっており、核内受容体の神経幹細胞における機能が示唆される。そこで本研究では、神経幹細胞の増殖、分化における核内受

容体の機能に着目し、核内受容体作動性化学物質の影響を低用量域を考慮しつつ検討する基礎研究を行う。

B. 研究方法

マウス胎児神経幹細胞を *in vitro* 培養し、核内受容体を化学物質で刺激もしくはその発現を抑制した際の増殖、分化への影響を検討する。

マウス胎児神経幹細胞培養実験

(NS cell 培養)

C57BL/6 マウス妊娠 11.5 日もしくは 14.5 日の胎児より終脳を分離し、トリプシンもしくは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、プロゲステロン、ブトレッシン、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) 及び EGF (10 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。96 well plate を用いる場合は、 4×10^4 /well の細胞密度とした。

siRNA 処理

Dharmacon 社の siRNA システムを用いた。siRNA の神経幹細胞への導入は DharmaFECT を用いた。LIF 刺激の 2 日前に siRNA を導入した。

クロマチン免疫沈降

細胞を 1%パラフォルムアルデヒドにて固定後、核を抽出し、クロマチンを酵素により 200-1000bp の断片とし、抗 STAT3 抗体 (サンタクルーズ社) によりクロマチン免疫沈降した。GFAP 及び STAT1 のプロモーター上、STAT3 結合配列を含む配列を増幅する PCR primer を用い、沈降の程度を検討した。

免疫染色

細胞をパラフォルムアルデヒドにて 15 分間固定後、抗 nestin マウスモノクローナル抗体 (ケミコン社)、抗 PPAR γ ウサギポリクローナル抗体 (サンタクルーズ社) にて蛍光免疫染色した。

C. 研究結果

NS cell 培養法

まず、胎児神経幹細胞を未分化状態を保って安定して *in vitro* 培養し解析に用いるために、NS cell 培養法の導入を試みた。NS cell 培養法は *in vitro* で未分化状態を保って無制限に神経幹細胞を培養できる方法として最近 Austin Smith らにより開発されたものである (PLOS Biology 2005:3:9:e283)。一方、従来の方法では培養を続けるうちに少しずつ分化が進み未分化状態を保てないという問題があった。胎生 11 日、14 日の胎児終脳から神経上皮細胞を分離し、bFGF と同時に EGF を添加して培養する NS cell 培養法を試したところ、ともに少なくとも 10 回以上未分化状態を保ったまま継代可能であることを確認した。また、培養した細胞の分化能を調べるために、LIF 刺激によるアストロサイト分化を GFAP 蛋白質の発現上昇を指標に調べ、初代培養直後と変わらない応答能を有していることを確認した (Fig. 1)。

siRNA による遺伝子発現抑制条件の確立

次に、核内受容体機能解析に役立つ重要な技術として siRNA による遺伝子発現抑制法の神経幹細胞への適用を試みた。Dharmacon 社のシステムを用い、細胞導入試薬及びその量、抑制効果発現までの時間などの条件検討を行った結果、解析に適用可能なレベルの遺伝子発現抑制を達成できる条件を確立した。具体的には、LIF によるアストロサイト分化シグナル伝達において必須な LIF の co-receptor である gp130 の発現抑制に伴う GFAP mRNA 発現低下を指標に検討し、gp130 が実際に発現抑制され、GFAP も同様に抑制されることを確

認した (Fig. 2)。

クロマチン免疫沈降法の適用

また、核内受容体が実際に特定の遺伝子プロモーターに結合しているかを調べるために今後必須となるクロマチン免疫沈降法の導入を進め、それが実施可能であることを確認した。具体的には、LIF 刺激に伴い、転写因子 STAT3 が核に移行し、GFAP や STAT1 のプロモーターに結合する現象を捉えられるか検討し、LIF 刺激に応じた STAT3 の GFAP, STAT1 プロモーターへの結合を確認した (Fig. 3)。

PPAR γ の神経幹細胞における発現

48 種類の核内受容体のうち、本研究では内因性もしくは外因性のリガンドが既知の核内受容体は化学物質標的としての優先度が高いものと考えている。PPAR γ は内因性リガンドとして不飽和脂肪酸の一種である 15d-PGJ2 が同定され (Cell, 83: 803-812, 1995)、外因性リガンドとして糖尿病治療薬として用いられているチアゾリジン類が知られている。結晶構造解析から PPAR γ のリガンド結合空間は他の核内受容体ファミリーよりも広いことが明らかになり (Nature, 395: 137-143, 1998)、様々な構造の化学物質をリガンドとすることが可能であると考えられている。よって、PPAR γ に結合する化学物質は多々存在する可能性があり、PPAR γ は標的としての重要性が高いと考えられる。そこで、第一段階として、PPAR γ が神経幹細胞に発現しているかを免疫染色法により調べた。胎生 14 日胎児終脳由来神経上皮細胞において、神経幹細胞マーカーの nestin と PPAR γ の二重染色を行った結果、PPAR γ が nestin 陽性細胞に発現していること、その発現は核に加え細胞

質にも認められることが明らかになった (Fig. 4)。

D. 考察

神経系初期発生においては神経幹細胞の増殖、分化が正常に制御されることが必要であり、それが化学物質により乱されることによる影響は大きいことが予想される。網羅的遺伝子発現解析により、48 種類の核内受容体のうち、リガンド既知の受容体では Thyroid hormone receptor や Glucocorticoid receptor などの mRNA 発現が高いことが示唆されている。発現が高いことが直接その受容体が神経幹細胞において重要な機能を有していることを示すものではないが、無視できない知見である。実際、Thyroid hormone receptor については、甲状腺ホルモンが神経幹細胞のオリゴデンドロサイト分化を促進することが明らかになっている。今後、Glucocorticoid receptor が神経幹細胞において化学物質標的として考慮すべき機能を有しているか検討する必要がある。

PPAR γ は内因性リガンドに加え、チアゾリジン類などの外因性リガンドが明らかになっている核内受容体であるが、脳における機能についてはよく分かっていない。一方、その結晶構造解析から、リガンド結合空間が他の核内受容体ファミリーよりも広いことが明らかになっており、様々な構造の化学物質が結合する可能性が示唆されている。今年度の研究により、PPAR γ 蛋白質が神経幹細胞に発現していることが明らかになったので、今後、増殖、分化における機能を、アゴニストである Troglitazone や、siRNA 法を用い検討し明

らかにする。それにより、PPAR γ 作動性物質が神経幹細胞に作用することが明らかになった場合には、その影響を個体レベルで解析することも検討する。

E. 結論

これまでの研究により、神経幹細胞において核内受容体が重要な役割を有していること、すなわち神経幹細胞が核内受容体作動性化学物質の標的であることが少しずつ示されてきている。今後は、多様な化学物質が結合する可能性のある PPAR γ が神経幹細胞において実際に重要な機能を有しているかどうかを早急に明らかにする。その結果を踏まえ、神経幹細胞に対する核内受容体作動性化学物質の影響に関する基礎的な解析を続ける。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

© Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 130:811-823, 2007.

© Kato Y, Ikushiro S, Takiguchi R, Haraguchi K, Koga N, Uchida S, Sakaki T,

Yamada S, Kanno J, Degawa M. A novel mechanism for polychlorinated biphenyl-induced decrease in serum thyroxine level in rats. *Drug Metab Dispos*, 35:1949-1955, 2007

© Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*, 24:178-198, 2007

© Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, Farabollini F, Guillette LJ Jr, Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Keri RA, Knudsen KE, Laufer H, Leblanc GA, Marcus M, McLachlan JA, Myers JP, Nadal A, Newbold RR, Olea N, Prins GS, Richter CA, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness CE, Vandenberg JG, Vandenberg LN, Walser-Kuntz DR, Watson CS, Welshons WV, Wetherill Y, Zoeller RT. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*, 24:131-138, 2007

Takahashi Y, Yasuhiko Y, Kitajima S, Kanno J, Saga Y. Appropriate suppression

of Notch signaling by Mesp factors is essential for stripe pattern formation leading to segment boundary formation. *Dev Biol*, 304:593-603, 2007.

Morimoto M, Sasaki N, Oginuma M, Kiso M, Igarashi K, Aizaki K, Kanno J, Saga Y. (2007) The negative regulation of Mesp2 by mouse Ripply2 is required to establish the rostro-caudal patterning within a somite. *Development*, 134:1561-1569, 2007

Takahashi Y, Takagi A, Hiraoka S, Koseki H, Kanno J, Rawls A, Saga Y. Transcription factors Mesp2 and Paraxis have critical roles in axial musculoskeletal formation. *Dev Dyn*, 236:1484-1494, 2007

Baniasadi S, Chairoungdua A, Iribe Y, Kanai Y, Endou H, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J. Gene expression profiles in T24 human bladder carcinoma cells by inhibiting an L-type amino acid transporter, LAT1. *Arch Pharm Res*, 30:444-452, 2007.

Aisaki K, Aizawa S, Fujii H, Kanno J, Kanno H. Glycolytic inhibition by mutation of pyruvate kinase gene increases oxidative stress and causes apoptosis of a pyruvate kinase deficient cell line. *Exp Hematol*, 35:1190-1200, 2007.

Nakatsu N, Nakamura T, Yamazaki K, Sadahiro S, Makuuchi H, Kanno J, Yamori T. Evaluation of action mechanisms of toxic chemicals using JFCR39, a panel of human cancer cell lines. *Mol Pharmacol*. 2007 Aug 16

2. 学会発表

菅野 純、Chemosphere-Biosphere Interaction 解析ツールとしての Percellome Toxicogenomics、第34回日本トキシコロジー学会学術年会 特別講演 2007年6月27日、東京

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津 則之、菅野 純、モデル催奇形性物質を用いた発生トキシコゲノミクス (Percellome 手法) 解析、第34回日本トキシコロジー学会学術年会、2007年6月27-29日、東京

五十嵐 勝秀、種村健太郎、中津 則之、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質によるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした Percellome 解析、第34回日本トキシコロジー学会学術年会、2007年6月27-29日、東京

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project and its possible contribution to 3R's, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences(WC6: 第6回国際動物実験代替法会議) (Aug. 21-25, 2007), Aug. 23, Tokyo Oral

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体 α 型の非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳機能解析、第24回日本疾患モデル学会総会、2007年8月31日-9月1日、つくば、口演

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Kodama Y, Takagi A, Kitajima S, TCDD-TCDF COMPARISON OF THE MOUSE LIVER TRANSCRIPTOME BY PERCELLOME ANALYSIS - A SEARCH FOR TEF GENE BY TIME AND DOSE-DEPENDENT RESPONSES -, Dioxin 2007(Sep2-7, 2007) Sep. 4, 2007, Tokyo Oral

菅野 純、相崎健一、中津則之、北嶋 聡、児玉幸夫、小川幸男、Percellome Toxicogenomics for the Development of Mechanism-based Predictive Toxicology 第66回日本癌学会総会、シンポジウム「がん創薬におけるイノベーション」 2007年10月3日、横浜、口演

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project for Predictive Toxicology, 8th International ISSX meeting (Oct.9-12, 2007) Oct 9 short course speaker, Sendai

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体 (α 型) 非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳高次機能解析 第100回日本繁殖生物学会大会、2007年10月19-22日、東京

五十嵐勝秀、北嶋聡、種村健太郎、菅野純、エストロゲン受容体 α 型の妊娠維持への関与 第100回日本繁殖生物学会大会、2007年10月19-22日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama, Yukio Ogawa, PERCELLOME TOXICOGENOMICS PROJECT FOR MECHANISM BASED PREDICTIVE TOXICOLOGY: AN APPROACH TO MINIMISING TOXICITY IN DRUG DEVELOPMENT. The 1st Asia Pacific Regional Meeting (APISSX) of International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), December 3-6, 2007, invited speaker

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

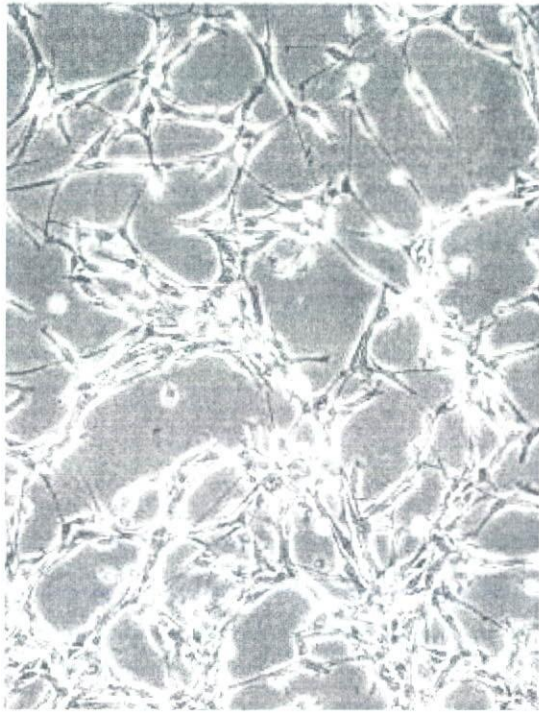
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

A)



B)

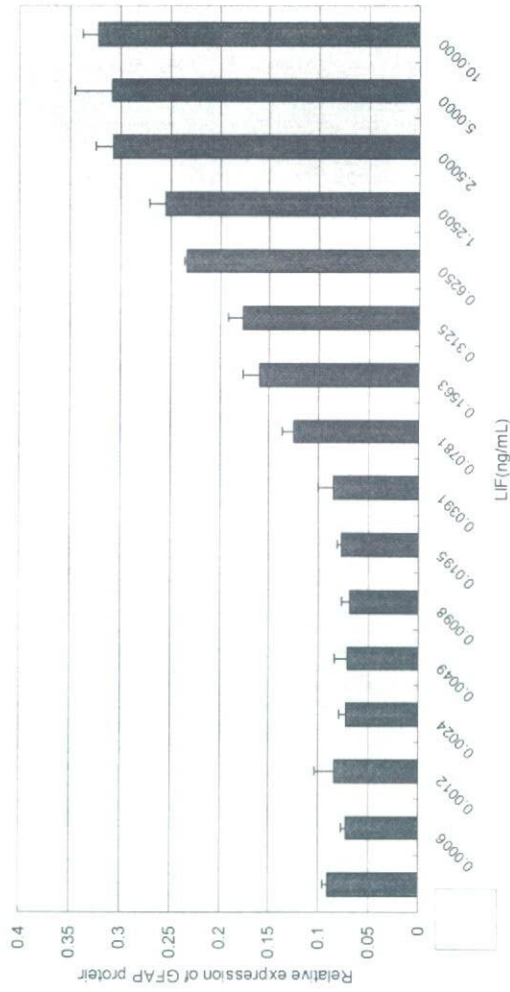


Fig.1 NS cell培養法

- A) 胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞をbFGF, EGFともに10ng/mL 添加した条件で培養した。継代数5回。
- B) A)の細胞にLIFを添加し、24時間後のGFAP 蛋白質発現をcell ELISA法により測定した。NS cellがLIFに対する応答、すなわちアストロサイト分化能力を保持していることが確認された。

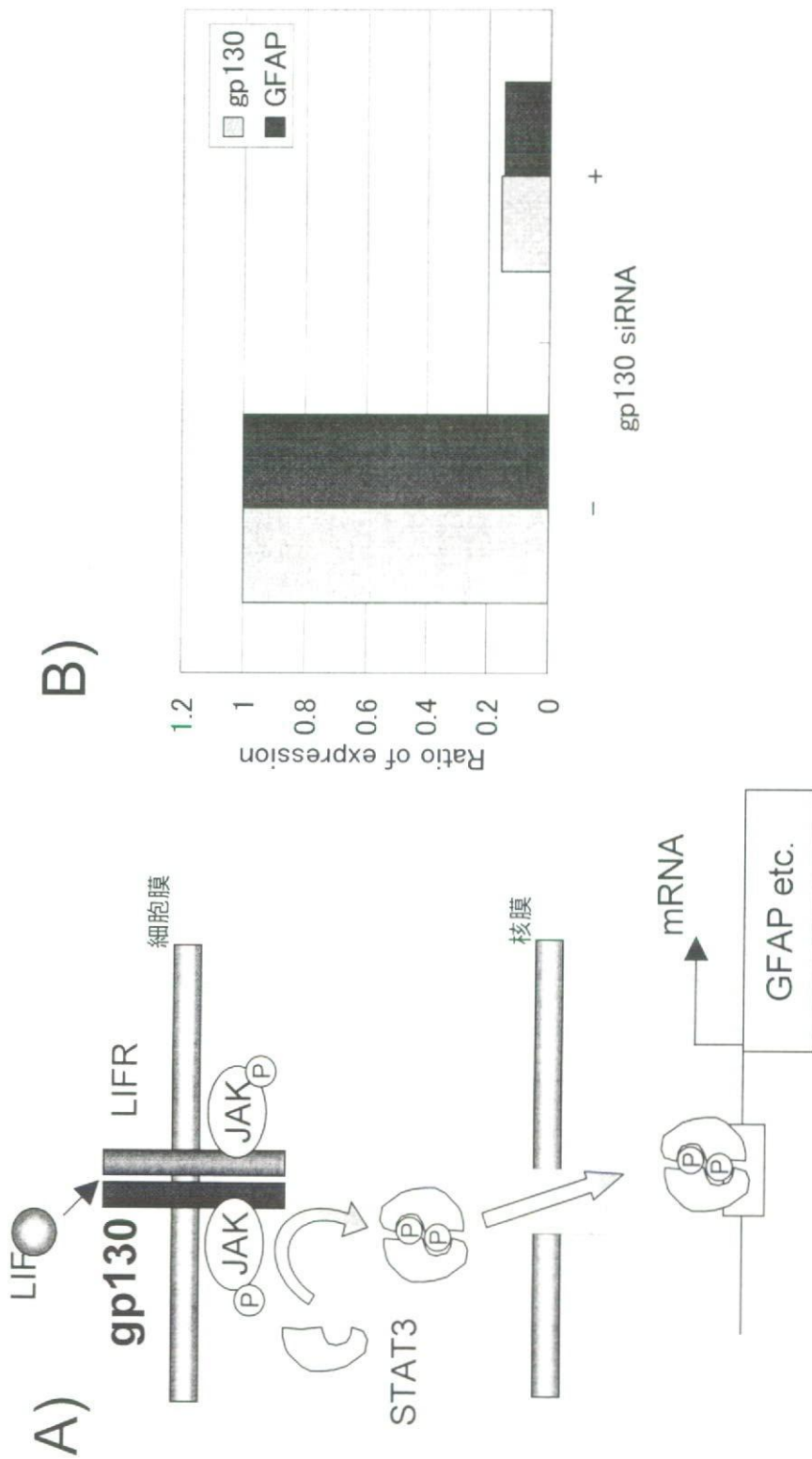


Fig.2 胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞に対するsiRNA手法の適用

- A) LIFによる神経幹細胞アストロサイト分化シグナル伝達系の模式図。LIFのco-receptorであるgp130の発現をsiRNAにて抑制し、LIF応答、すなわちGFAPの発現上昇が抑制されるか検討した。
- B) LIF刺激1日後におけるgp130, GFAP mRNA発現。gp130 siRNAにより、gp130の発現が低下し、それに伴いGFAP発現が低下することが確認された。

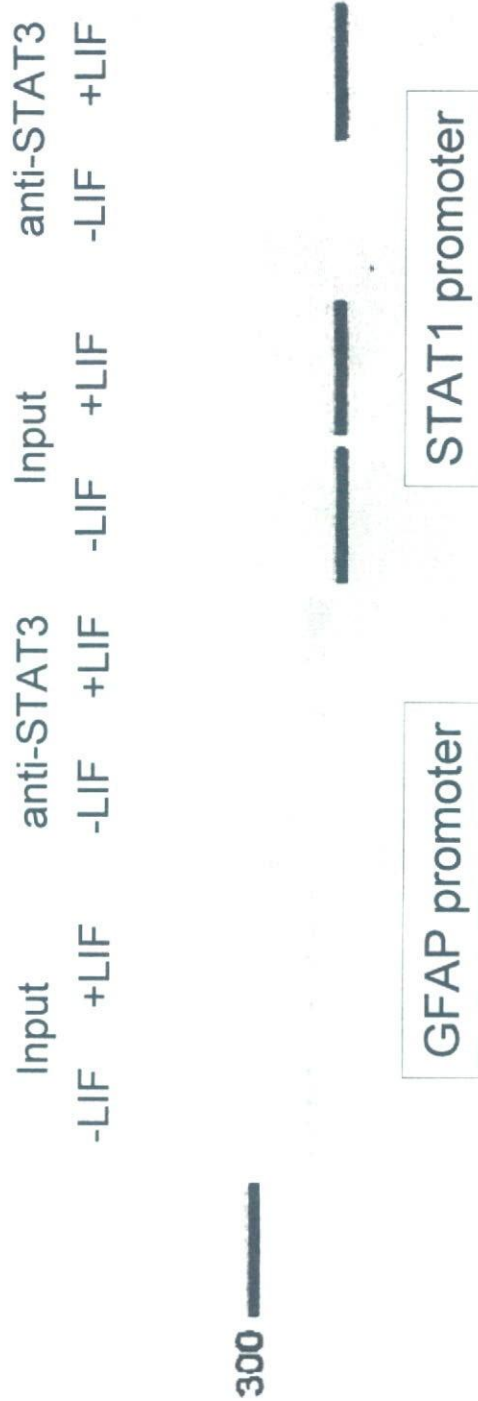
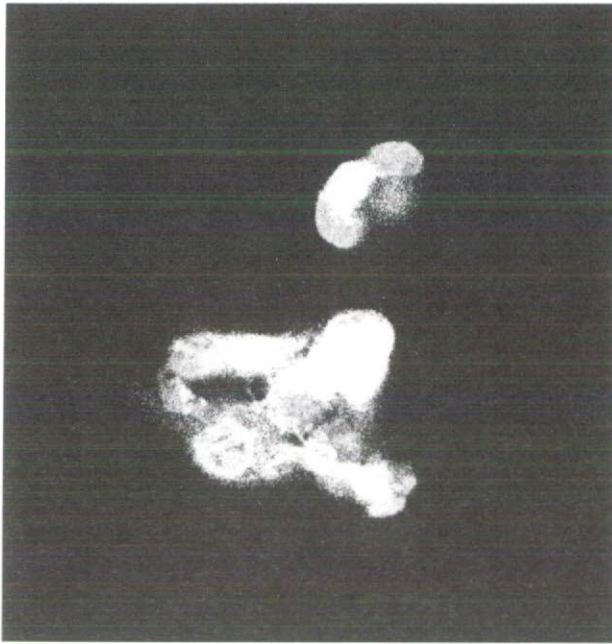
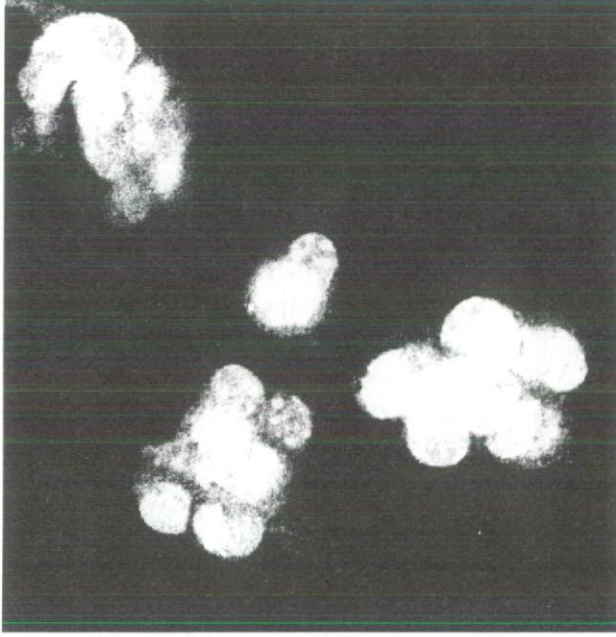


Fig.3 胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞に対するクロマチン免疫沈降法の適用

細胞をLIFで30分間刺激した後、1%パラホルムアルデヒドにて固定し、核を抽出後、酵素によりクロマチンを断片化し、抗STAT3抗体でクロマチン免疫沈降を行った。GFAP及びSTAT1のpromoter上に存在するSTAT3結合配列付近をPCRにて増幅し、LIF刺激依存的なSTAT3結合を確認した。



Isotype control



Anti-PPARg

Fig.4 胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞におけるPPARgの発現
神経幹細胞マーカーのNestin(green)とPPARg(red)を二重染色した。
核はヘキスト染色(Blue)した。PPARgが細胞質、核の両方に確認された。

核内受容体作動性化学物質の海馬記憶過程に及ぼす影響

分担研究者 川戸佳 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻教授

研究要旨：

内分泌かく乱化学物質の作用を、脳海馬の神経系を対象に解析した。ある種の内分泌かく乱化学物質は、海馬スライス中の神経 3 次元可視化解析で、神経スパインを増加させることを見出した。海馬スライスの電気生理解析では、これ等の物質がシナプス伝達の長期抑圧を強化したり、弱体化する急性効果を見出した。エストロジェンの効果と比較して検討したが、これら内分泌かく乱化学物質は、海馬神経に発現しているエストロジェン受容体を介して作用している可能性が高い。

A. 研究目的

17 β -エストラジオール（女性ホルモン）は神経細胞の可塑性に効果がある。内分泌かく乱物質は血流に乗って1時間程度で脳に到達し、作用する。本研究において我々は、記憶の中樞である海馬の神経細胞に対する、内分泌かく乱化学物質の、シナプス可塑性に対する作用を解明することを目指す。更に情報伝達経路の解明を目指して、エストロゲン受容体 ER α , ER β の下流の蛋白質リン酸化酵素経路や、内分泌かく乱化学物質特有の受容体も探索することも目的とする。

B. 研究方法

1) ラット海馬のスライスを用いて、単一神経に蛍光色素をマイクロインジェクションして可視化し、神経スパインの密度の増減に対する内分泌かく乱物質の急性作用を画像解析する。2) ラット海馬のスライスを用いて電気生理学的手法で、神経シナプス伝達の調節作用を解析する。

3) 海馬スライスでエストロゲン受容体や内分泌かく乱物質の受容体の分布を探る。
(倫理面への配慮)

全ての動物実験は東京大学の定める基準に従って行い、適切に管理された飼育環境の実現や実験に際しての麻酔等によって、動物に無用な苦痛を与えないよう配慮した。

C. 研究結果

1) 成獣ラット海馬で、10 nM ビスフェノール A (BPA), 1 nM DES、10 nM エストラジオールは2時間以内で、CA1 領域の神経の樹状突起上のスパイン（シナプス後部）数を増加させることを画像解析で確認した。頭の直径の細い thin type というスパインが特に増加した。所が CA3 領域ではエストラジオールはスパイン密度を低下させた。2) ラット海馬神経のシナプス伝達の長期抑圧（long-term depression; LTD）に対して内分泌かく乱化学物質及びエストラジオールの作用が顕著で、これを電気生理学的測定によって解析した。その