

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 20 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]

研究分担者 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対する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明らかにするものである。そのために、マウス胎児神経幹細胞の *in vitro* 培養系を用い、増殖分化影響を検討し、影響メカニズムを明らかにする。

本年度は、Bisphenol A (BPA) 等のエストロゲン受容体結合性を有する化学物質の作用を検討し、17-beta-estradiol (E<sub>2</sub>), BPA に 32pM 以上で増殖促進作用があること、Genistein に 3uM 以上で増殖抑制作用が、Daidzein に 100nM から 3uM までは増殖促進作用、より高濃度で抑制作用があることを明らかにした。次に、昨年度明らかにしたグルコルチコイド受容体アゴニスト Dexamethasone (DEX) の増殖抑制作用に対し、アンタゴニストの Mifepristone が逆に促進作用 (3uM 以上では阻害作用) を示すことを確認した。更に Dihydrotestosterone (DHT) に 32pM 以上で増殖促進作用があること、レチノイン酸が 1nM 以上で抑制作用を示すこと、3-methylcholanthrene は 32uM 以上で促進作用があること、を明らかにした。DEX については、LIF 刺激による GFAP 蛋白発現を促進する作用があることを明らかにした。

以上、本年度は各種の核内受容体作動性化学物質の神経幹細胞影響を示す実例を得た。今後、その影響を更に調べると共に、影響メカニズムの解明を進める。

**キーワード:**

神経幹細胞、核内受容体、増殖分化、Bisphenol A、グルコルチコイド受容体

**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、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調節機能の重要性が示唆される。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の解明と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 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、10cm シャーレ (ヌンク社) に 10<sup>6</sup> 個/6ml の密度で生細胞を播種する。96 well plate を用いる場合は、8x10<sup>3</sup>/well の細胞

密度とする。化学物質は Tocris 社もしくは Calbiochem 社から購入し用いた。

### 免疫染色

細胞を 4%パラフォルムアルデヒドにて 15 分間固定後、ウサギ抗 GFAP 抗体(DAKO 社)にて蛍光免疫染色した。同時に細胞核をヘキスト色素にて染色した。

## C. 研究結果

E<sub>2</sub>、BPA を始めとする様々な核内受容体作動性物質に神経幹細胞増殖影響が認められた。また、Dexamethasone に、LIF 刺激による GFAP 蛋白質の発現を促進する作用があることが示された。

### エストロゲン受容体結合性を有する化学物質の神経幹細胞増殖に対する影響

昨年度導入した、胎児神経幹細胞を未分化状態を保って安定して *in vitro* 培養する NS cell 培養法(PLOS Biology 2005;3:9:e283)を用い、エストロゲン受容体結合性化学物質の神経幹細胞に対する影響を検討した。NS cell 培養は 96well plate で行い、ニューロスフェア形成後、17-beta-estradiol (E<sub>2</sub>)、Bisphenol A(BPA)、Genistein(GEN)、或いは Daidzein (DAI)を共存させ、増殖に対する影響を調べた。培養開始後 7 日目に細胞内 ATP 量を指標に増殖程度を定量したところ、E<sub>2</sub> 及び BPA に 32pM から増殖促進作用があること、GEN は低濃度では弱い増殖促進作用を示し、3uM 以上では強い増殖抑制作用を示すこと、DAI は 100nM から 3uM までは濃度依存的に増殖促進作用を示すが、それ以上の濃度では抑制作用を示すことを明らかにした (Fig.1)。

### 核内受容体結合性を有する他の化学物質の影響

昨年度、グルココルチコイド受容体アゴニスト Dexamethasone (DEX) に増殖抑制作用があることを明らかにした。本年度は、アンタゴニストの Mifepristone の作用を検討したところ、

1nM~1uM までの濃度で増殖促進作用を示すことが確認された。一方、3uM 以上では増殖阻害作用を示した (Fig.2B)。

アンドロゲン受容体活性化の影響を Dihydrotestosterone(DHT)により検討したところ、32pM から増殖促進作用があることが示された (Fig.2C)。

神経細胞分化誘導作用(増殖抑制作用)があることが知られているレチノイン酸の作用が本培養系で増殖抑制物質として検出されるか検討したところ、1nM からの抑制作用が確認された (Fig.2D)。10uM では未分化細胞が消失したためか、細胞はほぼ死滅しているように見えた。

昨年度神経幹細胞における蛋白質発現を確認した AhR について、その活性化の影響を 3-methylcholanthrene(3-MC)を用いて検討したところ、300nM までは無影響であるが、32uM 以上で増殖促進作用があることが明らかになった (Fig.2E)。

### DEX の GFAP 発現促進効果

DEX については、増殖抑制作用がある一方、グルココルチコイド受容体のノックダウンにより増殖が促進されること(昨年度成果)に加え、アンタゴニストの Mifepristone にも増殖促進作用があることが示された。すなわち、グルココルチコイド受容体活性化は増殖抑制に、阻害は促進につながるとの結果である。一方で、ニューロスフェア培養の過程で、DEX を共存させることにより、細胞の付着性が増すことがあることを示す観察結果も得られ、増殖以外の作用、特に分化促進作用があることが示唆された。そこで、アストロサイト分化刺激作用を持つ LIF (Leukemia inhibitory factor)を、通常用いられる 80ng/mL よりも薄い濃度の 2.5ng/mL で作用させた神経幹細胞系に、DEX を 10<sup>-8</sup>M (IC<sub>50</sub> 付近)もしくは 10<sup>-6</sup>M (検討した最高濃度)加え、3 日間培養した後、アストロサイトマーカーの GFAP 蛋白質を蛍光免疫染色し観察した。その結果、LIF 単独刺激に比べ、DEX はどちらの濃度でも明らかに GFAP 蛋白発現を上昇させた (Fig.3)。その際、細胞

の形態に変化が認められ、LIF 単独刺激群に比べ、多数の突起を有する細胞が多く見られた(Fig.4)。一方、DEX のみを加えた場合には、GFAP を弱く発現する細胞が極低い頻度で認められるに留まった。すなわち、DEX は単独ではアストロサイト分化を誘導する作用は弱い、LIF 等の分化刺激因子の作用を強める働きがあると考えられた。

#### 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なければならない。それが化学物質により乱されることによる影響は、発達中であるが故に不可逆的な甚大なものとなる可能性が指摘される。各種の核内受容体作動性物質が神経幹細胞増殖、或いは分化へ影響を与えるという本年度の結果を踏まえ、今後さらに詳細な解析を行う必要がある。

本年度はまず、エストロゲン受容体結合性を有する化学物質に増殖促進作用があることを示した。GEN や DAI は高濃度では増殖抑制作用を示したが、これはこれらの物質のチロシンキナーゼ阻害活性に起因する可能性を考慮する必要がある。すなわち、本培養系では bFGF と EGF による増殖刺激が必須であるが、両受容体はチロシンキナーゼファミリーに属し、高濃度の GEN や DAI には両受容体チロシンキナーゼ活性を阻害する作用があるためである。今後、エストロゲン受容体過剰活性化が原因である可能性も考慮しつつ検討を進める。

BPA は、検討した最低濃度の 32pM 以上で増殖促進作用を示し、1uM で増殖阻害作用を示さなかった。また、同様の増殖促進は  $E_2$  においても認められた。BPA には弱いエストロゲン受容体結合活性があることが報告されている。よって、まずエストロゲン受容体を中心に作用メカニズムを探るが、通常の場合結合アッセイやレポーターアッセイでの BPA の  $EC_{50} \cdot IC_{50}$  が  $E_2$  に比して3~4桁高いという知見とは合致せず、むしろ  $E_2$  と同等な濃度で作用した可能性が示唆された。

エストロゲン受容体以外の核内受容体作動性化学物質数種類についてその作用を調べた結果、昨年度明らかにした DEX に加え、DHT、3-MC、レチノイン酸にも作用があることが分かった。

DHT は 32pM の低濃度に於いても増殖促進効果を示すという予想外に強い活性を持っており、今後その作用メカニズムを詳細に検討する必要があると考える。

3-MC の作用は 10uM 以上の高濃度で認められたものであるが、作用自体は強い。他の AhR リガンドにも共通する作用であるかを低濃度域を踏まえて検討する一方、その作用メカニズムを明らかにする必要がある。

DEX については、LIF 刺激による GFAP 蛋白の発現を促進する作用も有することが明らかとなった。今後、それが mRNA 発現上昇を介しているか検討し、その結果を踏まえ詳細なメカニズム解析に移る。

#### E. 結論

これまでの研究により、神経幹細胞に対し核内受容体作動性物質が様々な作用を示すことを示した。BPA については、それが低濃度でも増殖促進作用を示すことがわかり、今後、分化に対する影響の有無を早急に明らかにし、脳に対する作用、特に神経系初期発生における低用量影響を考察する。BPA は ERRg(Estrogen receptor related receptor gamma)に結合することが報告されているがこの増殖作用との関係は現段階では不明である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sanosaka, T., Namihira M., Asano H., Kohyama J., Aisaki K., Igarashi K., Kanno J., Nakashima K., Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells.,

Neuroscience. 2008 Aug 26;155:780-8

John Peterson Myers, Frederick S. vom Saal, Benson T. Akingbemi, Koji Arizono, Scott Belcher, Theo Colborn, Ibrahim Chahoud, D. Andrew Crain, Francesca Farabollini, Louis J. Guillette, Jr., Terry Hassold, Shuk-mei Ho, Patricia A. Hunt, Taisen Iguchi, Susan Jobling, Jun Kanno, Hans Laufer, Michele Marcus, John A. McLachlan, Angel Nadal, Jörg Oehlmann, Nicolás Olea, Paola Palanza, Stefano Parmigiani, Beverly S. Rubin, Gilbert Schoenfelder, Carlos Sonnenschein, Ana M. Soto, Chris E. Talsness, Julia A. Taylor, Laura N. Vandenberg, John G. Vandenberg, Sarah Vogel, Cheryl S. Watson, Wade V. Welshons, and R. Thomas Zoeller, Why Public Health Agencies Cannot Depend upon 'Good Laboratory Practices' as a Criterion for Selecting Data: The Case of Bisphenol A doi: 10.1289/ehp.0800173 (available at <http://dx.doi.org/>) Online 23 October 2008

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. (2007), 24:131-8.

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. (2007) 24:178-98.

## 2. 学会発表

荒瀬 栄樹、石井 健一郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、小倉 友二、今村 哲也、吉尾 裕子、有馬 公伸、菅野 純、杉村 芳樹、ビスフェノールA経胎盤投与によるマウス泌尿生殖洞でのSF1発現誘導、第96回日本泌尿器科学会総会、2008年4月25-27日、横浜

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋聡、菅野 純、エストロゲン受容体(α型)ノックダウンマウスの神経行動解析、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月27日、東京、ポスター

## 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

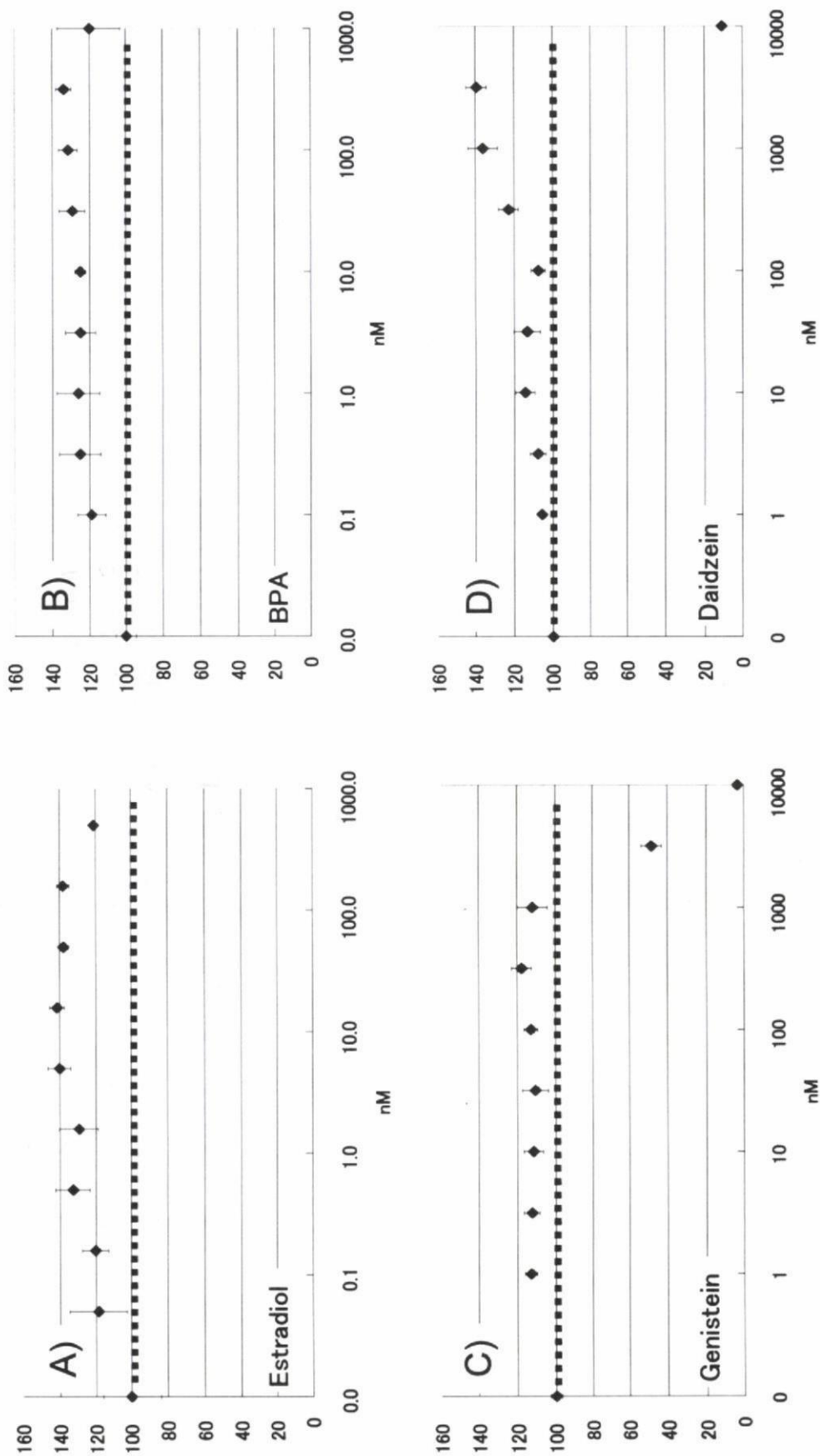


Fig. 1 エストロゲン受容体結合性を有する化学物質の影響

マウス胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞増殖に対する影響を検討した。

A) 17-beta-estradiol: 50pM~500nM, B) Bisphenol A: 100pM~1000nM,

C) Genistein: 1nM~10uM, D) Daidzein: 1nM~10uM

を添加し、7日間培養後、細胞内ATP量を測定した。

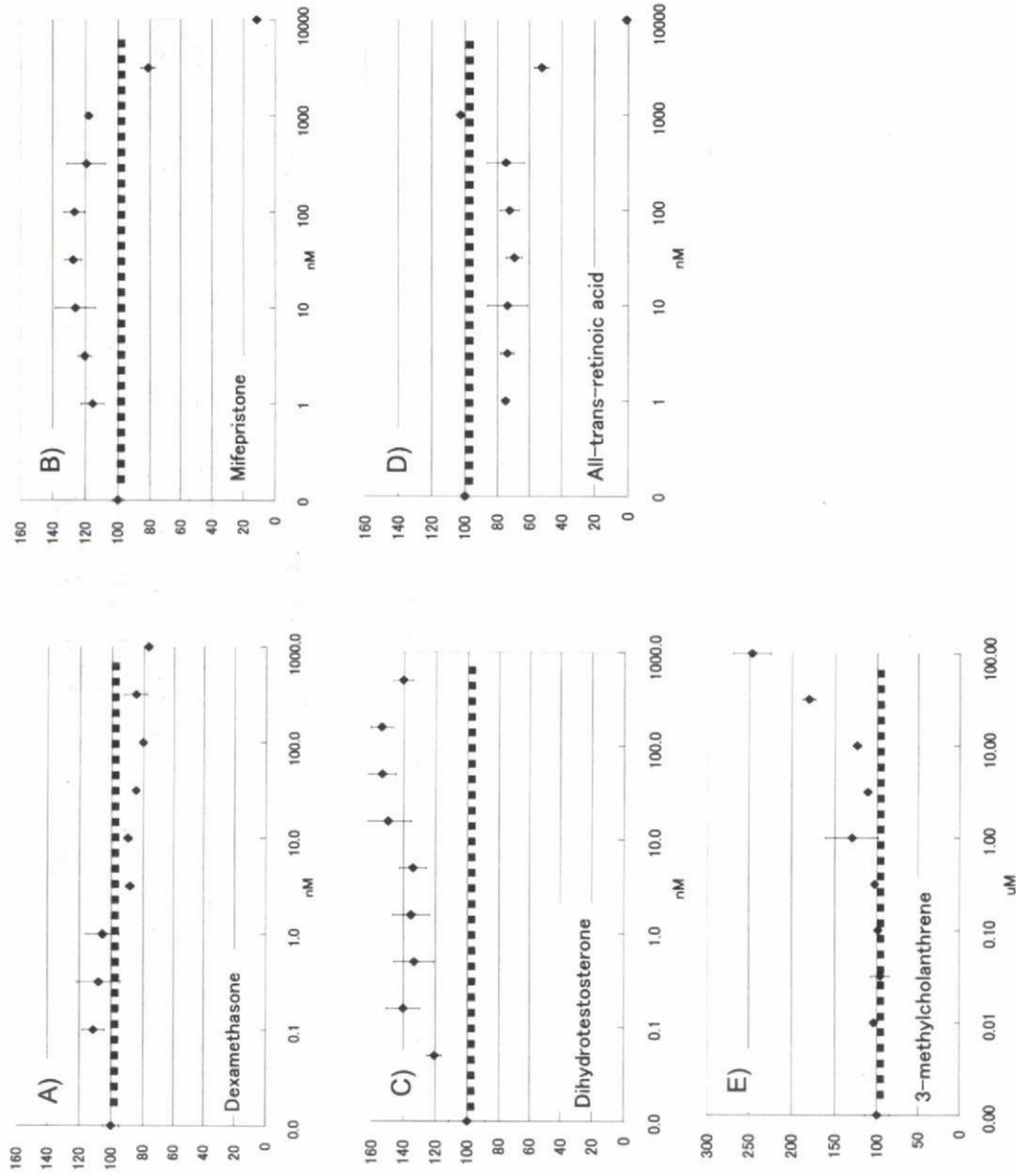


Fig. 2 核内受容体結合性を有する化学物質の影響

マウス胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞増殖に対する影響を検討した。

A) Dexamethasone: 100pM~100nM, B) Mifepristone: 1nM~10uM,

C) Dihydrotestosterone: 32pM~500nM, D) All-trans-retinoic acid: 1nM~10uM,

E) 3-methylcholanthrene: 10nM~100uM

を添加し、7日間培養後、細胞内ATP量を測定した。

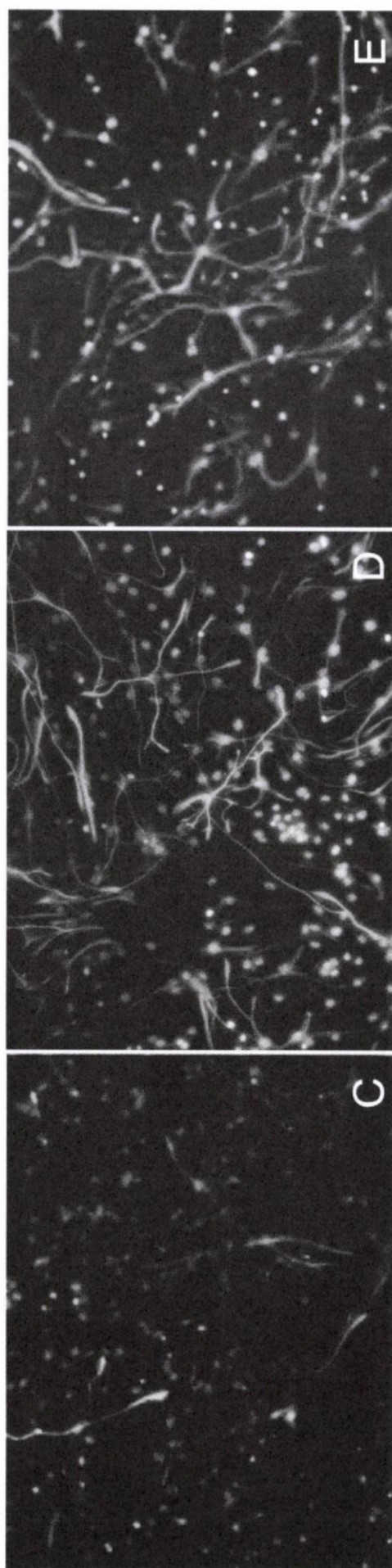
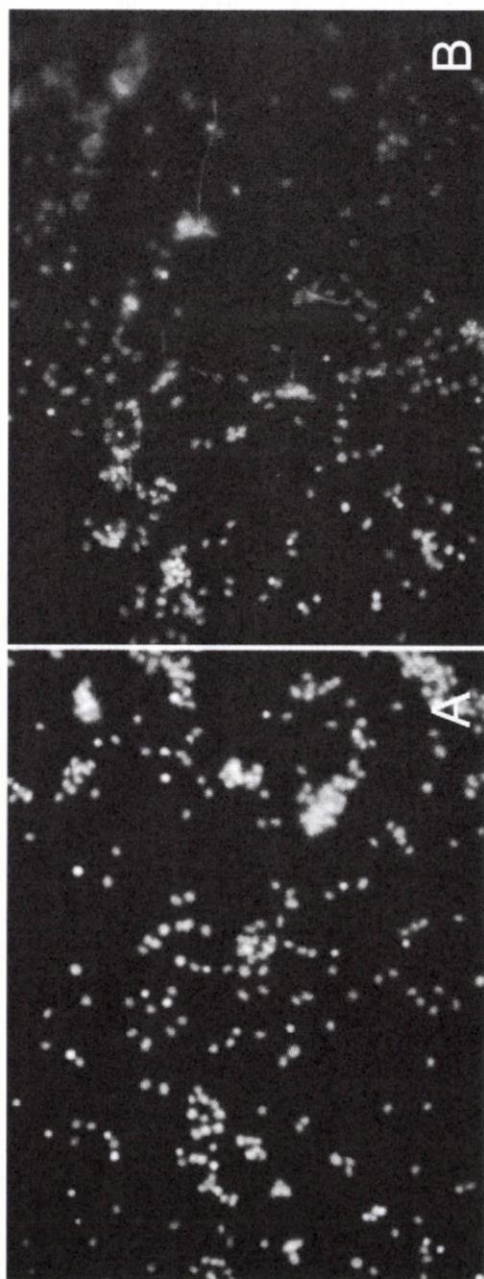


Fig.3 Dexamethasone (DEX) のGFAP発現促進効果

マウス胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞に対するDEXの効果を検討した。

(A) vehicle, (B) DEX  $10^{-6}$ M, (C) vehicle+LIF 2.5ng/mL, (D) DEX  $10^{-8}$ M+LIF 2.5ng/mL, (E) DEX  $10^{-6}$ M+LIF 2.5ng/mLにて、96well plateにて3日間培養し、アストロサイトマーカーのGFAP蛋白 (Red)を免疫染色した。核はヘキスト染色(Blue)した。

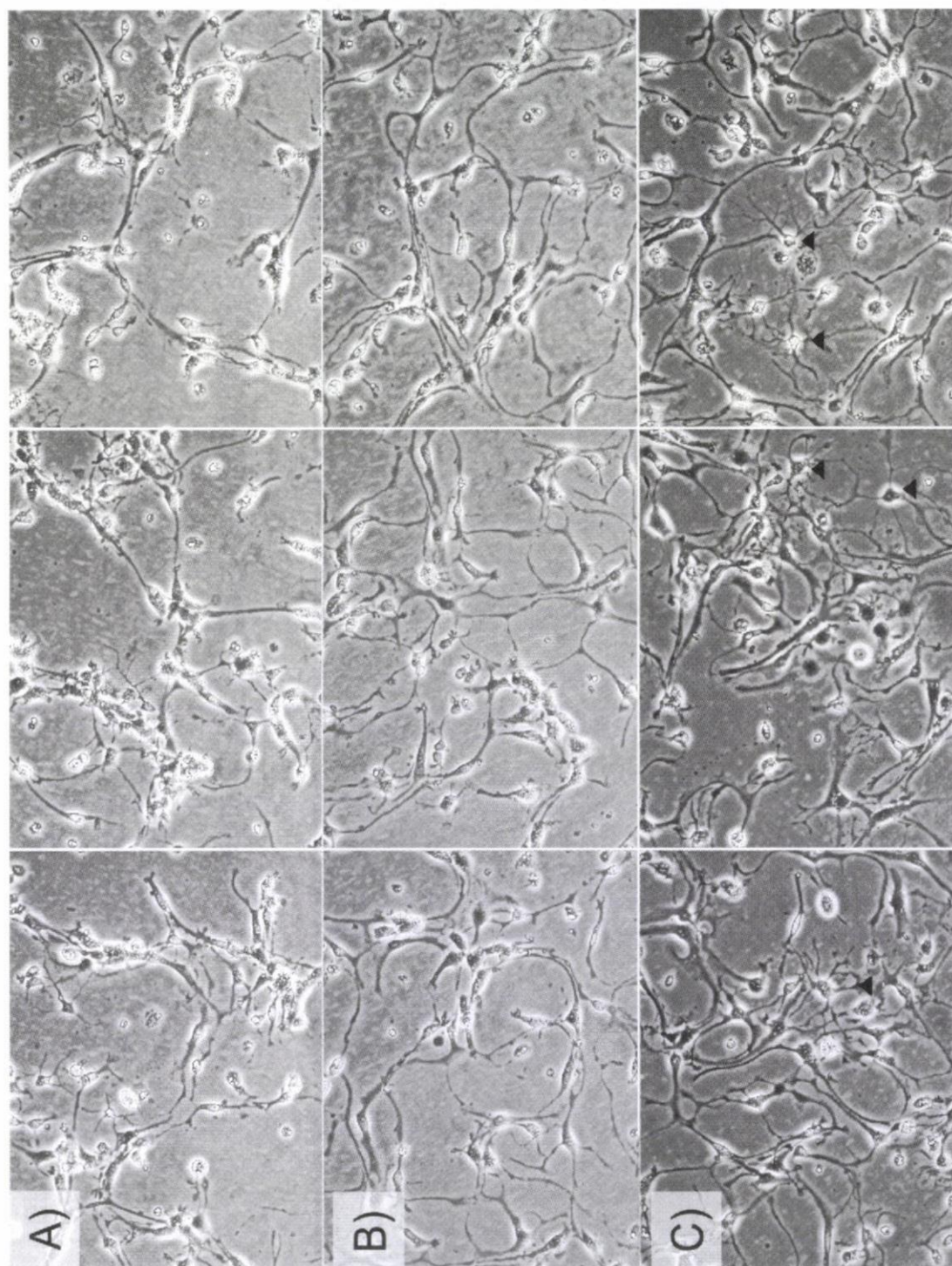


Fig.4 Dexamethasone (DEX) 添加群に見られる形態変化

マウス胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞に対するDEXの効果を検討した。  
 (A) vehicle, (B) vehicle+LIF 2.5ng/mL, (C) DEX  $10^{-6}$ M+LIF 2.5ng/mL を添加し、6cm dishに  
 て2日間培養した。DEX添加群で多数の突起を有する細胞が多く見られている(赤矢頭)。



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

研究分担報告書

核内受容体作動性化学物質の中樞影響に関する研究

研究分担者 栗生修司 九州工業大学大学院生命体工学研究科

研究要旨

核内受容体作動性化学物質のヒト中枢影響評価に利用できる「実験動物を用いた神経行動学的評価法」の確立を目的とした。核内受容体作動性化学物質を妊娠期、周産期、授乳期に曝露し、その影響を神経行動学的にラットおよびマウスで比較検討した。環境中に存在する核内受容体作動性化学物質はオープンフィールド行動や情動行動、体重に対して、ラットでは性依存的・時間非依存的に影響を及ぼし、マウスでは性非依存的・時間依存的に影響を及ぼした。モノアミン系を介する作用機序が示唆された。

A. 研究目的

核内受容体作動性化学物質のヒト中枢影響評価に利用できる「実験動物を用いた神経行動学的評価法」の確立を目的とした。すなわち、ビスフェノールA(BPA)、の妊娠期、周産期、授乳期曝露の各種行動や体重に及ぼす影響をラットおよびマウスで比較検討した。1-ブロモプロパン(1-BP)の探索行動、群れ行動および体重への影響も調べた。

B. 研究方法

核内受容体作動性化学物質を妊娠期、周産期、授乳期に曝露し、その影響を神経行動学的にラットおよびマウスで比較検討した。すなわち行動評価においては、活動性や探索行動の評価にオープンフィールド試験、不安情動の評価に高架十字迷路試験、回避学習の評価に受動的回避学習試験、うつ反応の評価に強制水泳試験、攻撃行動や警戒反応の評価に侵入者試験を用いた。さらに4匹のラットをオープンフィールドに

置き、群れ行動を評価した。曝露手段としては、50ppbのBPAを飲料水に混ぜて母ラットあるいは母マウスに投与した。1-BPは母ラットを曝露チェンバーに1日6時間置き、20日間700ppmの濃度で曝露した。一部のラットは曝露母ラットから生まれた仔ラットを対照群の母ラットに、対照母ラットから生まれた仔ラットを曝露群母ラットに里子に出し、体重変化を評価した。

実験はすべて「九州工業大学大学院生命体工学研究科における動物実験に関する指針」に基づいて行った。

C. 研究結果

環境中に存在する核内受容体作動性化学物質はオープンフィールド行動や情動行動、体重に対して、ラットでは性依存的・時間非依存的に影響を及ぼし、マウスでは性非依存的・時間依存的に影響を及ぼした。モノアミン系を介する作用機序が示唆された。すなわちラットにおいて、BPAの妊娠期、周

産期、授乳期曝露のすべてで探索行動の性分化を障害した。マウスでは授乳期曝露では雌の活動性が低下し、周産期曝露では雄の活動性が低下した。また周産期、授乳期とも雄の攻撃行動を示す個体数が有意に減少したが、妊娠期曝露では 8 週齢においてだけ攻撃性の増加が認められた。BPA は濃度選択的に雌の体重を抑制し、雄の体重を増加した。マウスの体重は変化しなかった。

1-BP の妊娠期曝露は探索行動の性分化障害と体重の抑制を引き起こすが、体重の抑制は、対照母ラットに授乳させた曝露仔ラットでは認められず、体重抑制には、胎児期の曝露に加えて曝露母ラットによる授乳が影響していることがわかった。1-BP はラットの群れ行動には影響しなかったが、群れ環境では雌の雄化だけでなく雄の雌化を引き起こして活動性の性分化を障害した。

#### D. 考察

ラットにおいては投与時期に依存せずに妊娠期、周産期、授乳期すべて低濃度の BPA は主として雄に作用し、行動の雌化を引き起こす。一方マウスでは行動の性差が著明でなく、作用の方向も同じ場合が多いが、投与時期により、雌のほうが感受性が高い場合がある。また 1-BP は主として雌に作用し、雌の雄化を誘発する。最近、性分化に核内受容体であるエストロゲン受容体だけでなく、アンドロゲン受容体も関与していることが明らかになっており、低濃度の核内受容体作動性化学物質の中枢影響はアンドロゲン受容体を介する抗アンドロゲン作用と思われる。またうつ反応などの情動行動に及ぼす影響は性非依存的に引き起こ

されるが、曝露時期により影響を受ける行動指標が異なる。核内受容体作動性化学物質の中枢影響については性依存的な影響と非依存的な影響が認められるが、発達期の曝露時期によりその発現の仕方が異なる。また動物種でも異なっている。ラットでは性依存的・時間非依的に作用し、マウスでは性非依存的・時間依的に作用する

核内受容体作動化学物質の中枢影響として示唆されている行動の中性化、不安・うつの増強、学習障害、社会行動異常、母性行動異常、薬物依存性の高進などが、ヒトでも認められる障害として社会問題化している。エストロゲン受容体アンタゴニストで消失しない場合も認められ、複数の標的が想定される。ヒトでの評価法の確立が急務であるが、ヒトでの実験的アプローチは不可能なため、動物実験による複合作用や高感受性グループの抽出、個体ごとの評価ができる方法論を確立する必要がある。

#### E. 結論

核内受容体作動化学物質の発達期曝露は耐用 1 日摂取量以下の濃度でも中枢神経系に作用し、性依存的あるいは性非依的に非生殖行動に影響を及ぼす。ラットおよびマウスで明確な種差があり、ラットでは性依存的・時間非依的に作用し、マウスでは性非依存的・時間依的に作用することが明らかになった。評価対象に応じて動物種を選択することでより効率の良い評価ができることが期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. ©Inoue T, Hasegawa T, Takara S, Lukáts B, Mizuno M, Aou S (2008) Categorization of biologically significant objects, food and gender, in rhesus monkeys. I: Behavioral Study, *Neurosci Res*, 61, 70-78
2. ©Tsuruoka T, Fujimoto T, Shiota N, Monda M, Fueta Y, Ishidao T, Hori H, Aou S. Positive and negative effects of environmental chemicals on brain functions in rodents. *Brain-Inspired IT*. Springer 2008 in press
3. Sonoo S, Horio K, Aou S, Yamakawa T, An emotional expression model inspired by amygdala, *International Journal of Innovative Computing, Information and Control*, in press
4. ©Masuda A, Narikiyo, K, Shiota, N, Aou S. Acquisition and extinction of avoidance response by social interaction in rat. *Brain-Inspired IT*. Springer 2008 in press
5. Inoue T, Lukats B, Fujimoto T, Moritake K, Karadi Z, Aou S. Category recognition in the monkey orbitofrontal cortex. *Brain-Inspired IT*. Springer 2008 in press
6. Sonoo S, Aou S, Horio K, Tamukoh H, Koga T, Shimo N, Yamakawa T, Emotional behavior and expression based on a neural network model of amygdala, *Brain-Inspired IT*. Springer 2008 in press
7. 塩田昇, 成清公弥, 増田明, 鶴岡朋子, 粟生修司 (2008) セルフケアの神経機構: グルーミングにおけるラット前頭前野のセロトニン・ドーパミン動態. 福岡県立大学看護学部紀要

### 2. 学会発表

1. Lukáts B, Inoue T, Mizuno M, Lénárd L, Oomura Y, Karádi Z, Aou S (2008) Electrophysiological-neurochemical-behavioral studies of integrative mechanisms of the macaque orbitofrontal cortex using visual category discrimination task. *J Physiol Sci* 58 (suppl) 第 85 回日本生理学会大会 3

月 25-27 日、東京

2. Hangodi O, Lukáts B, Inkó P, László K, Lénárd L, Oomura Y, Aou S (2008.3) Behavioral role of orexin-A in the amygdaloid body. *J Physiol Sci* 58 (suppl) 第 85 回日本生理学会大会 3 月 25-27 日、東京
3. 藤本哲也、久保和彦、粟生修司、西川泰央 (2008) 周産期中枢システムを標的とした極微量ビスフェノール A の多面的影響. 第 85 回日本生理学会大会 3 月 25-27 日、東京
4. Narikiyo K, Shiota N, Aou S (2008) Nucleus accumbens dopamine underlie development of fat overeating in rats. *International Behavioral Neuroscience*, June 17-22,
5. 園尾聡、粟生修司、堀尾恵一、古賀崇了、下尚紀、山川烈 (2008) 扁桃体モデルによる情動発現. 電子情報通信学会総会大会, 平成 20 年 3 月 18-21 日, 北九州
6. 粟生修司、成清公弥、塩田昇 (2008) ラット過食嗜癖モデルにおける側坐核ドーパミン動態. 第 49 回日本心身医学会総会 平成 20 年 6 月 12, 13 日、札幌
7. ©Monda M, Tsuruoka T, deCatanzaro DA, Aou S (2008) Behavioral effects of postnatal exposure to low dose bisphenol A in CD-1 mice. *Neurosci Res* 第 31 回日本神経科学大会, 平成 20 年 7 月 9 日~7 月 11 日, 東京
8. Moritake K, Inoue I, Fujimoto T, Lukats B, Mizuno M, Aou S (2008) Visual discrimination of gender in rhesus monkeys: global feature or specific cues? *Neurosci Res* 第 31 回日本神経科学大会,

平成 20 年 7 月 9 日～7 月 11 日, 東京

9. Fujimoto T, Inoue T, Sakai K, Lukats B, Mizuno M, Aou S (2008) 2-buten-4-olide, fasting-induced appetite suppressant, improves visual discrimination of biologically significant objects in monkeys. 第 31 回日本神経科学大会, 平成 20 年 7 月 9 日～7 月 11 日, 東京
10. Masuda A, Ohta Y, Hashimoto A, Aou S, Natsume K (2008) Weekly development of synaptic actions during high  $K^+$ -induced epileptiform activity in rat hippocampal slices. 第 31 回日本神経科学大会, 平成 20 年 7 月 9 日～7 月 11 日, 東京
11. 粟生修司、成清公弥、塩田昇 (2008) 摂食障害モデル動物における側坐核ドーパミンの嗜癖的特性. 第 4 回日本摂食障害学会 平成 20 年 9 月 20～21 日, 東京)
12. ◎粟生修司、門田 誠、金丸 愛、藤本哲也、久保和彦 (2008) ビスフェノール A の性依存的及び非依存的な中枢影響. 第 11 回環境ホルモン学会、東京 平成 20 年 12 月 13, 14 日

#### 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

[マイクロアレイ基盤整備] 遺伝子発現の網羅的検索とインフォマティクスの確立

研究分担者 五十嵐 勝秀 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究要旨

本研究は、当研究班での相互的関連研究分野に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、核内受容体作動性化学物質に関連する遺伝子の網羅的発現解析を行い、各班員の研究の基盤を支えることを目的とする。実際には、各班員との協議の下、共同研究を行い検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析結果を班員にフィードバックする。

今年度実施中の共同研究は、加藤班員との肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関する ChIP on Chip 解析である。また、ChIP 後 DNA の増幅方法に T7 RNA polymerase を用いたリニア増幅法が適していることを確認し、今後の基盤技術として導入した。

A. 研究目的

本研究は、当研究班での相互的関連研究分野に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、核内受容体作動性化学物質に関連する遺伝子の網羅的発現解析を行い、各班員の研究の基盤を支えることを目的とする。

すなわち、核内受容体はリガンド依存的転写因子として特定の遺伝子（群）を発現させ、胎生期には形態形成プログラムをも制御する。この遺伝子発現カスケードは、臓器ごとにその発生・発達段階により多種多様であると考えられる。例えば、核内受容体活性化物質の *in vivo* 試験として従来から行われている子宮肥大試験や Hershberger 試験における比較的単純な endpoint でさえ、幾重かの反応カスケードの結果であると考えられる。このカスケードの解析は容易ではないが、進歩の著しい DNA マイクロアレイ技術を導

入することにより包括的かつ迅速な検討を行う方法が得られることが示されている。そこで本研究では、DNA マイクロアレイ技術を当班で活用可能とし、各班員が実施中の研究を網羅的遺伝子発現解析の側面からサポートする体制を整える。

B. 研究方法

各班員との協議の下、共同研究を行い、検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析結果を班員にフィードバックする。

すなわち、各班員からの検体からの RNA 分離精製

生体組織を採取後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化する。その際、臓器の場合は厚さが 5mm 以下となるように細切する。その後、RNA 抽出操作までは -80°C にて保

存する。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製し、破碎液の 10 $\mu$ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定する。DNA 含量に応じ、Spike cocktail (Bacillus 由来の RNA 5 種類を濃度を変えてあらかじめ混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出する。一部を電気泳動し RNA の純度および分解の有無を検討した。以上のステップのうち、生体組織分離と RNA later への浸漬までを共同研究先の班員が実施し、その後のステップを当方で実施する。

#### Genechip 解析

全 RNA 5  $\mu$ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、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 とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP 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 となるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。ハイブリダイゼーションは 45 $^{\circ}$ C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得る。データは当方で開発した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する。

#### ChIP on Chip 解析

班員がクロマチン免疫沈降 (ChIP: Chromatin

Immunoprecipitation) により得た DNA サンプルを必要量まで増幅し、3' 末端にビオチンラベルを入れ、Affymetrix promoter 1.0R array にハイブリシ、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得る。データは Genomatix 社の Chipinspector 及び Genomatix suite を利用して解析する。

#### C. 研究結果

本年度は、加藤茂明班員と、肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関する ChIP on Chip 解析を実施中である。また、基盤技術改良のために、ChIP 後の DNA 増幅方法の比較検討を行い、T7 RNA polymerase によるリニア増幅法を現時点で最もノイズが少ない方法として用いることが可能となった。

すなわち、

肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関する ChIP on Chip 解析 (加藤班員)

ファルネソイド X 受容体 (FXR) 複合体精製により FXR 新規転写共役因子として加藤先生の研究室で同定された、PHF2/ARID5B 複合体の肝臓に於ける標的遺伝子を網羅的に解析するために、ChIP on Chip による検討を行った。PHF2/ARID5B 複合体形成はグルカゴン依存的であり、グルカゴン依存的な FXR 転写活性に対するコアクチベーターとして機能すること、グルカゴン依存的にヒストン H3K9 の脱メチル化を促進し、FXR 標的遺伝子の発現を誘導すること、PHF2 の発現量は一定であるも

の、グルカゴン下流のPKAによってリン酸化され、複合体形成とプロモーター結合が促進されること、さらに肝臓においても、PHF2は絶食依存的にFXR標的遺伝子のSHP(胆汁酸代謝)、PEPCK(糖新生)のプロモーターにリクルートされることが、加藤研究室により明らかにされている。

ChIP on chip解析実施にあたっては、PHF2がゲノムワイドでグルカゴン(または絶食)依存的に代謝関連遺伝子上に落ちてくること、またそれと平行して、ヒストンH3K9メチル化修飾が減少していることを示すこと、をさしあたりの目標とした。

絶食、摂食条件のマウス肝臓からPHF2抗体でChIPしたDNAサンプルを受け取り、PCR法を用いたアフィメトリクス社公開プロトコールに従い、Promoter arrayにハイブリするために必要な量まで増幅したところ問題なく増幅されたので、PHF2結合が確認されているSHPプロモーター領域に対するPCRによって、増幅に偏りが生じていないか検討したところ、同じサンプルでも増幅実験のロットによって偏りが生じることが明らかになった。そこで、同一サンプルについて複数の増幅反応を行い、増幅後に偏りの有無を検討し、問題のないものを選び、Promoter arrayにハイブリし、生データを得た。得られたデータをGenomatix社のChipinspector及びGenomatix suiteにより解析した結果、PHF2が絶食条件依存的に代謝遺伝子群のプロモーターにリクルートされること、そのプロモーターにはFXR結合配列が認められることなど、ゲノムワイドにFXR/PHF2/ARID5B複合体が代謝関連遺伝子プロモーターにリクルートされることを示すデータが得られた。

一方で、アフィメトリクス社公開プロトコールによる増幅に伴う偏りへの対応に手間取り、ヒストンH3K9メチル化についてのChIP on Chip解析は実施が遅れている。

#### ChIP後のDNA増幅方法の比較検討

アフィメトリクス社公開のChIP後のDNA増幅方法は増幅に伴う偏りが生じることが多く、また、ノイズレベルも大きいと考えられた。そこで、現時点で実施可能な以下の3種類のChIP後のDNA増幅方法を比較検討した。1)アフィメトリクス社法(以下、Affy法)、2)Whole genome amplification法(以下、WGA法)、3)T7 RNA polymeraseによるリニア増幅法(以下、TLAD法)。

サンプルとしては、マウス神経幹細胞のゲノムDNAをメチル化シトシンを標的に免疫沈降したものをを用い、増幅前後でメチル化シトシン含有断片の濃縮状態が維持されるか検討した。

WGA法はシグマアルドリッチ社から販売されているゲノムDNA増幅キットを用いた方法であり、FarnhamらによりChIP on Chip解析用に推奨されている(Biotechniques, 2006 41:577-580)。一方、TLAD法は増幅の偏りは少ないものの、増幅量が低いことが指摘されている(アフィメトリクステクニカル)。結果は、WGA法もAffy法同様、同じサンプルでも増幅実験のロットによって偏りが生じるというものであり、TLAD法では偏りは生じないものの、増幅量が十分ではないというものであった。

そこで、TLAD法を複数回繰り返すことによって必要な増幅量を得られるか検討したところ、3回増幅することで必要な5~9ugのDNAを得るこ

とが出来ることが分かった。増幅後の偏りも問題ないレベルであり、今後、TLAD法を用いた解析が実施可能であると判断した。

#### D. 考察

加藤班員との共同研究において、PHF2複合体が絶食条件依存的に代謝関連遺伝子群のプロモーター領域にリクルートされることがゲノムワイドに確認された。また、基盤技術改良として、TLAD法がChIP後のDNAの増幅方法として使用可能であることを確認出来た。今後のChIP on Chip解析ではTLAD法を用いることでノイズの少ないデータが得られ、解析精度が増すことと考えられる。

ChIP on Chip解析は網羅的遺伝子発現解析を補助する解析ツールとして重要である。特定の転写因子のゲノムDNAへの結合やヒストン修飾状況、DNAメチル化状態の解析に用いることが出来、化学物質の生体影響メカニズム解析に有力な情報をもたらす手法である。今年度の研究により、ChIP on Chip解析の精度を向上させる目処がいたので、来年度以降の共同研究に有効活用していきたい。

#### E. 結論

本研究は、網羅的ゲノム解析手法を用いることで、各班員の研究方向決定に影響を与える情報を短期間のうちに得ることを狙いとして実施しており、今年度も有用な結果を得ることが出来た。

すなわち、網羅的ゲノム解析手法は、発現解析として数万の遺伝子の発現を迅速に検討するこ

とに加え、クロマチン免疫沈降と組み合わせることで転写因子やヒストン修飾、DNAメチル化などのクロマチン制御メカニズムを網羅的に解析することを可能とする有効な技術である。本研究で示されてきたようにこの技術は、既知の情報から推測することが困難な新たな情報を提供してくれる可能性を秘めた解析手法であり、明確な表現型を伴って影響が現れることが少ない化学物質の作用を、その作用メカニズムに立ち入って解析する際に今後も有力な手法となる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells. Sanosaka T, Namihira M, Asano H, Kohyama J, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J, Nakashima K. *Neuroscience*. 155:780-788, 2008.

Cellular distributions of molecules with altered expression specific to the tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. Takahashi M, Shibutani M, Woo GH, Inoue K, Fujimoto H, Igarashi K, Kanno J, Hirose M, Nishikawa A. *Carcinogenesis*. 29:2218-2226, 2008.

##### 2. 学会発表

SF-1 遺伝子発現のエピジェネティック制御に与える内分泌攪乱物質の影響 板倉寛, 五十嵐勝秀, 松島裕子, 相崎健一, 菅野純, 村松正明, 佐藤憲子, 第二回日本エピジェネティクス研究会年会, 2008年5月, 静岡

シックハウス指針値レベルの経気道暴露による遺伝子発現変化のPercellome解析 五十嵐勝秀, 小川幸男, 笠井辰也, 長野嘉介, 北嶋聡, 相崎健



一、菅野純，第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会，2008 年 6 月，東京

◎ ビスフェノール A 経胎盤曝露によりマウス泌尿生殖洞で発現変動する性分化関連遺伝子群の同定 荒瀬栄樹・，石井健一郎，五十嵐勝秀，相崎健一，小倉友二，今村哲也，吉尾裕子，有馬公伸，菅野純，杉村芳樹，第 13 回日本生殖内分泌学会，2008 年 11 月，大阪

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

資 料

[講演抄録：特別講演]

化学物質リスクと生殖医療

国際医療福祉大学大学院教授、医療法人財団順和会山王病院-院長  
堤 治

様々な化学物質リスクの問題が存在するが、生殖医療に携わる者として野生動物に生殖異変を引き起こしているといわれる環境ホルモン（内分泌攪乱物質）には関心をもっている。その中でもビスフェノール A (BPA) は食品と接触する物質への使用や生殖発生毒性が注目されており、本特別講演では我々のデータを中心にヒトへの汚染や生殖機能や婦人科疾患との関連を探り、低用量作用の検出法として利用可能と思われる初期胚培養系を紹介し、さらに最近の研究成果を報告したい。

ヒト血清中、臍帯血および体外受精で得られた卵胞液中からは BPA が検出され、卵子や胎児が汚染されていることが明らかになった。妊娠末期の羊水中ビスフェノール A 濃度も  $1.1 \pm 1.0$  ng/ml であったが、妊娠中期の羊水において  $8.3 \pm 8.9$  ng/ml と他の体液に比べて有意に高い濃度が得られた。また BPA のヒト血中濃度は男性の方が女性よりも有意に高値であり、その濃度は UDP-glucuronosyl transferase (UGT) 活性を介し性差が存在することや婦人科疾患と関連することを明らかにした。

汚染評価に初期胚発育モデルを提唱し、BPA の添加では、2 細胞期胚から胚盤胞への発育率では 1-3nM では促進効果が観察され、逆に 100 $\mu$ M では有意に低下した。エストロゲンのレセプターレベルの拮抗剤であるタモキシフェンの同時添加は、1-3nM の促進効果および 100 $\mu$ M の抑制効果ともにエストロゲンのレセプターレベルの拮抗剤であるタモキシフェンの同時添加でそれぞれの効果がキャンセルされた。マウス初期胚には ER $\alpha$  は 8 細胞期以降、ER $\beta$  は桑実胚以降に再び発現し胚盤胞で増加する。BPA の作用は初期胚に発現する ER $\alpha$ 、ER $\beta$  を介するものと推測している。

[講演抄録：話題提供]

ミジンコの性決定機構の解明

自然科学研究機構 基礎生物学研究所 岡崎統合バイオセンター  
加藤泰彦、小林かおる、渡邊肇、井口泰泉

生物において、性決定と生殖は根源的な問題であり、古くから様々な研究が進められてきた。性決定のメカニズムは性染色体による遺伝的な性決定（遺伝性決定）と環境による性決定（環境性決定）の2つに大別される。近年の分子生物学的手法の進展によりモデル生物を中心として、遺伝性決定の詳細が遺伝子レベルで明らかにされつつある。一方で、多くの生物がとっている環境性決定は、単に生殖だけでなく生物の進化や生態を考える上でも重要な位置を占めているが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。

湖沼等に生息し甲殻類に属するミジンコは、環境性決定を行う代表的な生物である。ミジンコは通常単為生殖によりメスの卵のみを産む。ところが、短日化、個体密度の上昇等で環境が悪化するとオスを産生し、有性生殖へと生殖戦略を変更する。当研究室ではミジンコの環境性決定に着目した研究を進めており、これまでに以下のことを明らかにした。

- 1) 環境ストレスのみならず、幼若ホルモンのアナログを産卵前に曝露することで性を100% オスに決定できることから、一連の性決定の中で幼若ホルモンが重要な因子であることを発見した。この発見により、我々は人為的にミジンコの性を決定することが可能となった。
- 2) 昆虫の性決定を行う DM domain タンパク質 doublesex (DSX) のオーソログを2種類 (DSX1、DSX2) 単離した。両遺伝子共に、cDNA 構造は雌雄で同一であるが、発生開始直後からオスで mRNA が高発現することを見出した。これは、スプライシングによる mRNA の構造の雌雄差が直接性決定につながる昆虫の DSX 遺伝子とは異なり、ミジンコでは mRNA 量の雌雄差が性決定に重要である可能性を示唆するものであった。
- 3) これまでミジンコで行われていなかった二重鎖 RNA の微量注入による RNA 干渉法を確立した。この手法を用いて、オスの DSX1、及び DSX2 遺伝子の mRNA 量を減少させた結果、興味深いことに DSX1 遺伝子の RNA 干渉により生殖腺に卵巢が形成されただけでなく、性差を示す器官が全てメス化した。これは、DSX1 遺伝子がミジンコの性決定遺伝子であることを示すものである。

以上の結果から、ミジンコにおいては幼若ホルモンが直接、または間接的に DSX1 遺伝子の発現を上昇させることにより、オスの産生を誘導すると予想される。