

Y 染色体遺伝子 Uty の性差形成における機能解析

井上和樹、松本高広、肥塚真実子、加藤茂明

ER α はM期特異的にE3 ligase複合体を形成する

岡田麻衣子、大竹史明、加藤茂明

ビタミン D レセプターのユビキチンリガーゼ活性の生理機能解明

朝妻知子、西川亜美、岡田麻衣子、大竹史明、加藤茂明

A h R のユビキチンリガーゼ活性の細胞周期依存的調節機構の解析

橋山幸世、大竹史明、岡田麻衣子、加藤茂明

A signal-dependent histone demethylase complex in regulation of gluconeogenic genes

Fumiaki Ohtake, Atsushi Baba, Yosuke Okuno, Shigeaki Kato

BAHD1, a novel chromatin reorganization factor regulates histone gene expression through heterochromatin formation

Saya Ito, Shun Sawatsubashi, Eriko Suzuki, Masahiko Tanabe, Shuhei Kimura, Takashi Ueda, Sally Fujiyama, Takuya Murata, Hiroyuki Matsukawa, Jinseon Lim, Ken-ichi Takeyama, Shigeaki Kato

A histone demethylase, Jmjd5, is an osteoclastogenic regulator

Min-Young Youn, Ichiro Takada, Yuuki Imai, Shigeaki Kato

【国際】

International Joint Symposium on "Cell Fate Regulation Research: Molecular Basis and Therapeutic Potentials" (2009/4/9-10, Kumamoto, Japan)

Regulated histone methylase/demethylase complexes supporting nuclear receptors
Kato, S.

The New York Academy of Sciences (NYAS), 3rd Conference on Skeletal Biology and Medicine (2009/4/29-5/2, New York, USA)

Transcriptional regulation of steroid action
Kato, S.

The 66th Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology Annual Meeting (2009/5/12-13, Seoul, Korea)

Nuclear O-glycosylation regulates histone methyltransferase activity of MLL5 during retinoic acid-induced differentiation
Kato, S.

36th European Symposium on Calcified Tissues (2009/5/23-27, Vienna, Austria)

Non-canonical Wnt signaling and the osteoblast-adipocyte lineage decision
Kato, S.

16th International Conference on Cytochrome P450 (2009/6/21-25, Okinawa, Japan)

Nuclear vitamin D receptor-regulated expression of the human CYP27B1 gene mediated the DNA methylation/demethylation
Kato, S.

The 24th Naito Conference "Nuclear Dynamics and RNA [III]" (2009/6/23-26, Sapporo, Japan)

The Role of histone modifying enzymes in gene regulation
Kato, S.

21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2009/8/2-7, Shanghai, China)

Epigenetic regulators for nuclear receptors
Kato, S.

GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis
Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, G. R., Kitagawa, H., Kato, S.

Spetses Summer school in Athenes
(2009/8/23-28, Athenes, Greece)

Regulated histone
methyltransferase/Demethyltransferase
supporting nuclear receptor function
Kato, S.

Dana-Farber Cancer Institute (Affiliated to
Harvard Medical School) Seminar (2009/9/8,
Boston, USA)

Regulated histone methyltransferases
supporting nuclear
Kato, S.

Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society
(LWPES) / European Society for Pediatric
Endocrinology (ESPE) 8th Joint Meeting
Global Care in Pediatric Endocrinology
(2009/9/9-11, New York, USA)

Biology and physiology of steroid hormone
receptor"
Kato, S.

ASBMR 31th Annual Meeting (2009/9/11-15,
Denver, USA)

A histone demethylase, Jmjd5, is an
osteoclastogenic regulator
Youn, M.-Y., Takada, I., Imai, Y., Kato, S.

EMBO Conference, Nuclear Receptor: from
molecular mechanisms to molecular
medicine (2009/9/25-29, Dubrovnik, Croatia)

Regulated histone
methyltransferase/demethylase supporting
nuclear receptor function
Kato, S.

14th Workshop on Vitamin D (2009/10/4-8,
Brugge, Belgium)

Epigenetic modifications supporting
VDRmediated gene regulations
Kato, S.

Phosphorylation of WSTF by MAPK induces
a switching between two distinct chromatin
remodeling complexes

Oya, H., Takeyama, K., Yokoyama, A., Fujiki,
R., Youn, M.-Y., Takada, I., Kato, S.,
Kitagawa, H.

A tissue-specific function by unliganded
VDR

Yamamoto, Y., Memezawa, A., Takagi, K.,
Ochiai, E., ShindoM., Kato, S.

DNA Demethylation factor, MBD4 is a key
molecule in the vitamin D metabolism

Kondo, T., Kim, M.-S., Matsumoto, T.,
Yamamoto, Y., Takeyama, K., Kato, S.

H. 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

ヒト骨芽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研究

研究分担者：笹野 公伸 東北大学大学院 医学系研究科 医科学専攻
病理病態学講座 病理診断学分野 教授

研究要旨

本研究では骨芽細胞における aryl hydrocarbon receptor (AhR) と Steroidogenesis との関連について明らかにすることを目的とした。検討には、骨芽（様）細胞（hFOB および MG-63）を用い、3-methylcholanthrene (3-MC) の影響を確認した。結果、3-MC は骨芽（様）細胞に対して aromatase および CYP1B1 の発現を増加させた（定量的 PCR および ICC）、また、hFOB の IL-1 β の発現を増加させた（Cytokine antibody array）。本検討によって、骨芽細胞において AhR はサイトカインシグナルを介し Steroidogenesis に関与することが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究では骨芽細胞における aryl hydrocarbon receptor (AhR) と Steroidogenesis との関連について明らかにすることを目的とした。

すなわち、前回我々は、AhR のヒト骨芽細胞での発現を報告した。本研究では、骨芽細胞での AhR の機能を明らかにするため、エストロゲン合成酵素 aromatase とサイトカインシグナルに注目した解析を行った。

B. 研究方法

ヒト骨芽細胞株及び骨芽細胞様細胞に対し、AhR agonist である 3-methylcholanthrene (3-MC) の影響を検討した。

すなわち、以下の方法で実験を行った。

1) 化合物

3-methylcholanthrene (3-MC、和光純薬工業)、2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid-(2-methyl-4-o-tolyl-azophenyl)-amide (AhR antagonist, Calbiochem)。溶媒はいずれに対してもジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業) を用いた。

2) ヒト正常骨芽細胞・骨芽細胞様細胞

ヒト正常骨芽細胞 hFOB 1.19 (ATCC, CRL-11372) 及び骨芽細胞様細胞（骨肉種由来株）MG-63（東北大学医用細胞資源センターより分譲）を使用した（以降、ヒト正常骨芽細胞及び骨芽細胞様細胞を骨芽（様）細胞と略す）。維持培養には通常の牛胎仔血清 (FBS) を、実験にはチャコール処理を行った FBS をそれぞれ使用した。

3) 3-MC の骨芽（様）細胞への影響

3)-1 Microarray

昨年度実施した hFOB の Microarray のデータのうち、3-MC (0.1 μ M) を添加 (72 時間後) によって変動した遺伝子群について、再解析を行った。マイクロアレイは human 1A (Agilent Technologies) を、解析には GeneSpring (Agilent Technologies) をそれぞれ使用した。

3)-2 Cytokine antibody array

hFOB に対し、3-MC (0.1 μ M) を添加し、72 時間後に培地を含む細胞破碎液を用いて 88 種のサイトカインの検出を行った。サイトカインの検出には Human Cytokine antibody array (RayBio) を使用した。

3)-3 aromatase および CYP1B1 発現解析

hFOB 及 MG-63 に対し、3-MC (0.01–1 μ M) を添加し、72 時間後に定量的 PCR にて aromatase および CYP1B1 の発現を、immunocytochemistry (ICC) にてそれぞれのタンパク発現を確認した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

3-MC は骨芽（様）細胞に対して aromatase および CYP1B1 の発現を増加させた (定量的 PCR および ICC)、また、hFOB の IL-1 β の発現を増加させた (Cytokine antibody array)。

すなわち、以下の結果が得られた。

1) Microarray 解析

hFOB において、3-MC 添加で 2 倍以上増加した遺伝子の中に、以下のサイトカインに関わる遺伝子が含まれた: interleukin 1 family, member 8 (IL1F8), interleukin 1 family, member 7 (IL1F7), oncostatin M receptor (OSMR)。さらにコラーゲンに関わる遺伝子 (COL18A1、

COL23A1) の発現増加が認められた。また、エストロゲン合成酵素 aromatase およびエストロゲン代謝酵素 CYP1B1 の発現増加が認められた (2008 年に報告済み)。

2) Cytokine antibody array 解析

hFOB に対し、3-MC の添加によって IL-1 β の発現が増加し、この増加は AhR antagonist の併用によって阻害された。その他の oncostatin M、IL-6 および IL-8 を含めたサイトカインの発現に変動はなかった。

3) aromatase および CYP1B1 発現解析

定量的 PCR での検討では、hFOB に対して 3-MC (0.1, 1 μ M) の添加によって aromatase 及び CYP1B1 の発現が増加し、この増加は AhR antagonist の併用によって阻害された。また、MG-63 においても同様の結果が得られた。ICC での検討では、hFOB に対して溶媒対照および低 (0.01 μ M) – 中 (0.1 μ M) 濃度の 3-MC 添加では aromatase および CYP1B1 の明らかな発現は認められなかった。一方、高濃度 (1 μ M) 3-MC 添加では aromatase および CYP1B1 のタンパク発現が ICC にて認められた。

D. 考察

骨組織に対する内分泌攪乱化学物質の影響について、我々は AhR の関与について検討し、骨芽細胞および破骨細胞に AhR が発現することを報告した。また、Microarray 解析からエストロゲン合成酵素 aromatase、エストロゲン代謝酵素 CYP1B1 が 3-MC の添加によって増加することを確認した [以上、笹野, 平成 20 年度井上班会議, 2008]。本検討では骨芽細胞での AhR の機能に注目した。

ヒト滑膜細胞を用いた検討では、AhR リガンド (3-MC、benzo[α]pyrene および 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) の添加によって

IL-1 β 、IL-6 および IL-8 の発現が増加することが報告されている [Tamaki A., *et al.*, *Biol Pharm Bull*, 2004; Kobayashi S., *et al.*, *Rheumatology*, 2008]。IL-1 β 、IL-6 および IL-8 はいずれも aromatase の発現誘導能を有しており、これらのサイトカインを介したエストロゲン合成の促進が考えられる。また、ヒト肺線維芽細胞において、Cigarette smoke extract が AhR を介して cyclooxygenase-2 (COX-2) および prostaglandin E2 (PGE2) の発現を誘導することが報告された [Martey CA., *et al.*, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005]。AhR を介した COX-2 の誘導経路は xenobiotic response element 依存的 [Degner SC., *et al.*, *Nutr Cancer*, 2007] な genomic pathway と、細胞内 Ca²⁺の増加に依存する [Sciullo EM., *et al.*, *Arch Biochem Biophys*, 2008] non-genomic pathway が報告されている。これら PGE2 および COX-2 も同様に、aromatase 発現を誘導することが報告されており、以上のことから骨芽細胞において AhR は、サイトカインを介してエストロゲンの局所合成に重要な役割を担っていると示唆される。

今回の検討結果からは AhR と aromatase の発現、さらには IL-1 β の発現との関係について、genomic もしくは non-genomic pathway のいずれが関与するか明らかにすることはできないが、AhR に依存してこれらの因子がタンパクレベルで増加することが明らかとなった。種々ステロイドホルモン産生酵素 [steroid sulfatase、17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)、3 β -HSD など] は aromatase 同様にサイトカインによって発現が誘導されることが報告されており [Herrmann M., *et al.*, *Ann N Y Acad Sci*, 2002]、これらのことから AhR はサイトカイン産生誘導を介し、種々の組織における Steroidogenesis に関与していると考えられ

る。

E. 結 論

本検討によって、骨芽細胞において AhR はサイトカインシグナルを介し Steroidogenesis に関与することが明らかとなった。

すなわち、骨組織に対して内分泌攪乱化学物質は、AhR を介した steroidogenesis に影響をおよぼすと考えられる。さらに、エストロゲンをはじめとするステロイドホルモンの骨組織への生理作用、骨粗鬆症に代表される病態において、AhR-サイトカインシグナルは重要な役割を担っていると示唆される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) © Miki Y, Suzuki T, Nagasaki S, Hata S, Akahira J, **Sasano H**. Comparative effects of raloxifene, tamoxifen and estradiol on human osteoblasts in vitro: estrogen receptor dependent or independent pathways of raloxifene. *J Steroid Biochem Mol Biol*;113:281-289, 2009
- 2) © Nagasaki S, Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Kitada K, Ishida T, Handa H, Ohuchi N, **Sasano H**. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 12 in human breast carcinoma: a prognostic factor via potential regulation of fatty acid synthesis. *Cancer Res*: 69:1392-1399, 2009
- 3) © Nagasaki S, Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Shibata H, Ishida T, Ohuchi N, **Sasano H**. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human breast carcinoma: Possible regulator of

- lymphangiogenesis via vascular endothelial growth factor-C expression. *Cancer Sci.* 100:639-645. 2009
- 4) Tamaki K, Moriya T, Sato Y, Ishida T, Maruo Y, Yoshinaga K, Ohuchi N, Sasano H. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis. *Cancer Sci.* 100:88-94. 2009
- 5) Sasano H., Nagasaki S, Miki Y, Suzuki T. New developments in intracrinology of human breast cancer: estrogen sulfatase and sulfotransferase. *Ann N Y Acad Sci.* 1155:76-79.2009
- 6) Nakamura Y, Hornsby PJ, Casson P, Morimoto R, Satoh F, Xing Y, Kennedy MR, Sasano H., Rainey WE. Type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) contributes to testosterone production in adrenal reticularis. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:2192-2198.
- 7) Nakamura Y, Suzuki T, Sugawara A, Arai Y, Sasano H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate carcinoma. *Pathol Int.*59:288-293.2009
- 8) Nakamura Y, Suzuki T, Arai Y, Sasano H. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 11 (Pan1b) expression in human prostate cancer. *Neoplasma.* 56:317-320.2009
- 9) Nakamura Y, Xing Y, Sasano H., Rainey WE The mediator complex subunit 1 enhances transcription of genes needed for adrenal androgen production. *Endocrinology.* 150: 4145-4153, 2009
- 10) © Nagasaki S, Miki Y, Akahira J, Suzuki T, Sasano H. Transcriptional regulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 12 by SREBP-1. *Mol Cell Endocrinol.* 307: 163-168, 2009
- 11) Loo WT, Chow LW, Suzuki T, Ono K, Ishida T, Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H. Expression of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human breast carcinoma cells and tissues. *Anticancer Res* 29: 2525-2530, 2009
- 12) © Takeyama D, Miki Y, Fujishima F, Suzuki T, Akahira JI, Hata S, Miyata G, Satomi S, Sasano H. Steroid and xenobiotic receptor in human esophageal squamous cell carcinoma: A potent prognostic factor. *Cancer Sci.* 2009 in press.

2. 学会発表

- 1) ©ヒト骨芽細胞における内分泌攪乱物質の影響：Steroid and xenobiotic receptor を介した bisphenol A の作用；三木康宏, 端 秀子, 笹野公伸, 第30回東北骨代謝研究会, 仙台市, 2009年
- 2) © Sex steroid receptors expression and hormone-induced cell proliferation in human osteosarcoma ; O. DOHI, M. HATORI, T. SUZUKI, K. ONO, M. HOSAKA, J. AKAHIRA, Y. MIKI, S. NAGASAKI, E. ITOI, H. SASANO. *55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*, Las Vegas, 2009)
- 3) ©ヒト骨組織における aryl hydrocarbon receptor の発現；三木康宏, 端 秀子, 長崎修治, 鈴木 貴, 笹野公伸. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡市, 2009年)

- 4) 卵巣癌における steroid and xenobiotic receptor の発現と臨床病理学的因子との関連についての検討；楽 暁ジ, 赤平純一, 三木康宏, 宇都宮裕貴, 伊藤 潔, 笹野公伸, 八重樫伸生. 第 82 回日本内分泌学会学術総会, 前橋市, 2008 年
- 5) 10%ホルマリン固定パラフィン包埋標本から抽出した Total RNA および microRNA の質的検討；三浦伊久美, 三木康宏, 赤平純一, 鈴木 貴, 笹野公伸, 第 98 回日本病理学会総会, 京都市, 2009 年
- 6) 卵巣癌における steroid and xenobiotic receptor の発現と臨床病理学的因子との関連についての検討；楽 暁妮, 赤平純一, 三木康宏, 宇都宮裕貴, 伊藤 潔, 笹野公伸, 八重樫伸生, 第 98 回日本病理学会総会, 京都市, 2009 年

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

研究分担者 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、10 週、20 週、30 週間投与し肝臓、脂肪組織、血清パラメータについて調べた。精巣周囲脂肪における mRNA 発現は、マクロファージ表面抗原である CD68 の発現が BPA 投与により増加していた。血清では、遊離脂肪酸濃度が BPA 投与により増加していた。BPA 摂取により脂肪組織へのマクロファージの浸潤が起こり、脂肪組織より脂肪酸が血中に放出され、肝臓に取り込まれて非アルコール性脂肪肝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、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、脂肪肝発症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、10 週、20 週、30 週間投与し肝臓、脂肪組織、血清パラメータについて調べた。

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、コントロールにはエタノール 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（エタノール最終濃度

0.01%) 投与した (各群 n=4)。投与開始から 10、20、30 週後に解剖し、肝臓、白色脂肪組織における mRNA 発現量、血中 TG、コレステロール、遊離脂肪酸、インシュリン、レプチン、アディポネクチン、MCP-1 濃度について調べた。

(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

精巣周囲脂肪における mRNA 発現は、マクロファージ表面抗原である CD68 の発現が BPA 投与により増加していた。血清では、遊離脂肪酸濃度が BPA 投与により増加していた。

すなわち、精巣周囲脂肪重量はコントロール群に比べ変化がみられなかったが、mRNA について調べたところ、アディポネクチン、MCP-1 の発現量に変化は見られなかったが、マクロファージの脂肪組織への浸潤を示す CD68 の mRNA の発現が BPA0.05 μ g/ml 投与群で 10 週後より増加していた。BPA0.005 μ g/ml、0.5 μ g/ml 投与群では 30 週後に増加していた。

血清パラメータについて調べた結果、インシュリン、アディポネクチン、レプチン、MCP-1、TG、コレステロール濃度にはコントロールと比べ BPA 投与群に変化は見られなかったが、遊離脂肪酸のうなどは BPA 投与群でコントロールに比べ増

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、肝臓へと進展する。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。本研究では日本人の食事摂取基準にあわせ、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 10、20、30 週間 BPA 投与を行った。その結果、BPA 0.05 μ g/ml 投与群で脂肪肝を発症した。1 個体あたり、BPA を約 7 μ g/kg/day 摂取し続けたことになる。

昨年度までの本研究では、肝臓における mRNA 発現について調べた。その結果、BPA 投与群の肝臓では、TG 合成にかかわる核内受容体 PPAR γ の標的遺伝子であり、肝臓への脂肪酸流入を行う CD36 の発現が増加していた。そこで、今年度は脂肪肝発症の過程を明らかにする目的で、脂肪組織における mRNA 発現および血清パラメータの解析を行った。その結果、脂肪組織ではマクロファージの浸潤を示す CD68 の発現が増加していた。さらに、血中の遊離脂肪酸濃度の増加もみられた。

したがって、マクロファージの浸潤により血中に脂肪組織より遊離脂肪酸が放出されて増加し、肝臓で脂肪酸流入を司る CD36 の発現増加し、血中遊離脂肪酸が肝臓に取り込まれ、肝臓に脂肪が蓄積したものと考えられる。

以上、本研究から、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。

E. 結論

10、20、30 週間 BPA をマウスに投与した結果、脂肪組織における CD68mRNA 発現量、血中遊離脂肪酸濃度が増加し、摂取した BPA が脂肪肝発症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、肝臓 TG 量が増加しており、肝臓においては、CD36 mRNA の発現増加、脂肪組織においては、CD68mRNA 発現増加、血中では遊離脂肪酸濃度の増加がみられた。BPA のような化学物質を意図せず摂取し、脂肪肝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と考えられる。

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

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

研究分担者 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 3 次元可視化法で解析した。脳の発達期に BPA を曝露して成獣になったラットの、海馬の神経スパイン密度は減少していた。一方、成獣の急性スライスに BPA を作用させると、神経スパインを増加させることがわかっているため、BPA 曝露の仕方によって神経への影響は大きく異なることがわかった。

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、記憶の中核である海馬の神経細胞における、内分泌かく乱化学物質ビスフェノール A（BPA）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。発達期の脳へ BPA 曝露した後、成獣になってからの変異を検出することも目的とする。海馬内の内分泌かく乱物質の存在を質量分析で定量する。

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と頭部直径の増減に対する内分泌かく乱物質の作用を画像解析する。2) 質量分析 LC-MS/MS を用いてラット海馬内の BPA 濃度を定量する。海馬から抽出した BPA は、検出感度を高めるためにピコリノイル誘導体化を行った。

（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) 脳の発達期に BPA を曝露し、成獣になったラット海馬における神経スパインを調べた。曝露手段としては、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の BPA を飲料水に混ぜて、妊娠期+胎児期+新生仔期+授乳期において母ラット（Wistar 系）に投与した（九工大・粟生研究室で作成）。ラットが 8 週齢に達した段階で灌流固定を行い、海馬 CA1 領域の神経スパイン（シナプス後部）を画像解析した。その結果、スパイン密度は非処理群の 2.42 個/ $1\mu\text{m dendrite}$ から BPA 処理群においては 2.02 個/ $1\mu\text{m dendrite}$ へと大きく減少していた。頭部の直径の太い large-head ($>0.5 \mu\text{m}$) というスパインが特に減少した。

2) 成獣ラット海馬を取り出して BPA を 2 時間作用させて神経スパインを調べた。そ

の結果、10 nM BPA や 1 nM エストラジオールは2時間で、CA1 領域の神経の樹状突起上のスパイン数を 140%程度増加させることを見出した。頭部の直径の細い small-head (0.2-0.4 μm) と middle-head (0.4-0.5 μm) というスパインが特に増加した。MAP kinase を阻害、あるいは NMDA 受容体をブロックするとこの BPA の作用は無くなった。

3) ピコリノイル誘導体化することによって質量分析の感度を大幅に改善することに成功し、海馬の BPA 濃度を定量した結果、14.6 ng/mL (64 nM)であった。これは神経可塑性を変化させるのに十分な量である。

Plasma の BPA は 109 nM (東大医堤研, BBRC, 2004) であるので、飲み水によって血中に入り、海馬に蓄積されたと考えられる。

D. 考察

脳の発達期(妊娠期+胎児期+新生仔期+授乳期)にBPAを曝露し、成獣になったラット海馬では、神経スパイン密度は大きく減少していた。これは、成獣ラット海馬においてBPAを急性的に加えた場合、スパインが増加していたのと全く異なっていた。

その理由としては、胎児期の神経細胞がネットワークを形成する際に核の受容体を介した作用で変異が生じた、と考えられる。これは主にkinaseを介してスパインを増やす急性作用とは異なるのであろう。

海馬内に64 nMのBPAが存在するのに、10 nMのBPAを外から加えてスパインが増えるというのは、一見すると矛盾に見える。しかしこれは、調製した海馬スライスが2時間以上、BPAを含まないACSFで洗い流さ

れてた為であると考えられる。実際、ACSFで洗い流して、海馬スライスに含まれるBPAを質量分析で定量したところ、濃度が0.5 nM以下に減少していた。もし洗い流さずに、取り出したばかりの海馬スライスに10 nMのBPAを添加したとしたら、上記の効果は観察されなかったと考えられる。東京大学医学部堤研究室のELISAを用いた先行研究で、血中のBPA濃度は 24.9 ng/mL (110 nM)であることから、今回測定された海馬のBPA濃度は、血流を通じて脳内に運ばれ、海馬に蓄積されたと考えられる。

E. 結論

脳の発達期にBPAを曝露して成獣になったラット海馬の神経スパイン密度は減少していた。一方、取り出した海馬スライスでは、急性的にはBPAは10 nMという低濃度で2時間程度で顕著にスパインを増加させることがわかった。このようにBPA曝露の仕方によって神経への影響は大きく異なることがわかった。この結果は、BPAなどの内分泌かく乱物質がいつ作用するか(胎児期と成熟後)によって脳への影響に重大な差が出る可能性を示唆している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mukai H., Kimoto T., Hojo Y., Kawato S., Murakami G., Higo S., Hatanaka Y. and Ogiue-Ikeda M. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus *Biochim Biophys Acta*, Special Issue of "Estrogen Action in the Brain" in press

Hojo Y., Higo S., Ishii H., Ooishi Y., Mukai H., Murakami G., Kominami T., Kimoto T., Honma S., Poirier D., and Kawato S. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus *Endocrinology* 150, 5106-5112 (2009)

Munetsuna E., Hattori M., Komatsu S., Sakimoto Y., Ishida A., Sakata S., Hojo Y., Kawato S., and Yamazaki T. Social isolation stimulates hippocampal estradiol synthesis *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 480-484 (2009)

Munetsuna E., Hojo Y., Hattori M., Ishii H., Kawato S., Ishida A., Kominami S., and Yamazaki T. Retinoic Acid Stimulates 17 β -Estradiol and Testosterone Synthesis in Rat Hippocampal Slice Cultures *Endocrinology* 150, 4260-4269 (2009)

Kimoto T., Yamada M., Ichikawa T., Honma D., Cherry R.J., Morrison I.E., and Kawato S. Digital fluorescence analysis of trafficking of single endosomes containing low-density lipoprotein in adrenocortical cells: Facilitation of centripetal motion by adrenocorticotrophic hormone *Mol Cell Endocrinol.* 307, 185-195 (2009)

Higo S., Hojo Y., Ishii H., Kominami T., Nakajima K., Poirier D., Kimoto T., and Kawato S. Comparison of sex-steroid synthesis between neonatal and adult rat hippocampus *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 62-66 (2009)

Hatanaka Y., Mukai H., Mitsuhashi K., Hojo Y., Murakami G., Komatsuzaki Y., Sato R., and Kawato S. Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 728-732 (2009)

Hojo Y., Murakami G., Mukai H., Higo S., Hatanaka Y., Ogiue-Ikeda M., Ishii H., Kimoto T., and Kawato S. Estrogen synthesis in the brain-Role in synaptic plasticity and memory *Mol Cell Endocrinol.* 290, 31-43 (2008)

Ogiue M., Tanabe N., Mukai H., Hojo Y,

Murakami G., Takata N., Tsurugizawa T., Shimohigashi Y., Honma S., Komatsuzaki Y., Kimoto T and Kawato S. Rapid Modulation of Long-term Depression and Spinogenesis by Endocrine Disrupters in Adult Hippocampal Neurons. *Brain Res Rev.*, 57, 363-375 (2008)

Hojo Y., Murakami G., Mukai H., Higo S., Hatanaka S., Ogiue-Ikeda M., Ishii H., Kimoto T. and Kawato S. Estrogen synthesis in the brain – Role in synaptic plasticity and memory. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 290, 21-43 (2008)

2. 学会発表

国際会議

1. Kawato, S., Mukai, H., Hojo, Y., Hatanaka, Y., Higo, S., Murakami, G., Y. Ooishi, Y., Kimoto, T., and Kominami, T. Rapid modulation of spines and LTD/LTP by estrogen and androgen in rat hippocampus: neuro-intracrinology, The 39th annual meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, October, 2009

2. Mukai, H., Hatanaka, Y., Sato, R., Ooishi, Y., Ogiue-Ikeda, M., Hojo, Y., Kominami, S., Kawato, S Rapid modulation of synaptic plasticity by hippocampal-derived sex-steroids, The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto International Conference Center, July, 2009

3. Hojo Y, Higo S, Mukai H, Murakami G, Kominami S, Harada N, Honma S, Kimoto T, Kawato S Neurosteroid synthesis and synaptocrinology in the hippocampal synapses The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto International Conference Center, July, 2009

4. Kawato S, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Higo S, Hatanaka Y, Kimoto T Rapid modulation of synaptic plasticity by hippocampus-derived estrogens: Synaptocrinology US/Japan Neurosteroid Symposium, Gifu, Japan, September, 2008

5. Higo S, Mukai H, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Kawato S Synaptic localization of estrogen receptor and its rapid action on synaptic plasticity of rat hippocampus US/Japan Neurosteroid Symposium, Gifu, Japan, September, 2008

6. Kawato S, Mukai H, Murakami G, Hojo Y, Hatanaka Y, Higo S, Kimoto T Rapid modulation of spines and LTD/LTP by estradiol in rat hippocampus: neuro-synaptocrinology The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, U.S.A., November, 2008

国内学会

1. 川戸佳、大石悠貴「女性ホルモンはストレスによる記憶書き込み障害を回復させる：急性効果」第47回生物物理学会年会、2009年11月
2. 向井秀夫、北條泰嗣、畑中悠佑、三橋賢司、川戸佳「新規な神経スパイン解析手法とその適用」第47回生物物理学会年会、2009年11月
3. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳「男性ホルモンによる海馬 CA1・CA3 スパインの急性的増加とその細胞内情報伝達経路の解析」第47回生物物理学会年会、2009年11月
4. 向井秀夫、畑中悠佑、釣木澤朋和、中西広典、浅島誠、川戸佳「海馬神経細胞樹状突起スパインのアクチビンによる増加効果の解析」第32回日本神経科学大会、2009年9月
5. 北條泰嗣、肥後心平、小南俊裕、向井秀夫、山崎岳、原田信広、本間誠次郎、木本哲也、川戸佳「海馬シナプスにおけるニューロステロイドの合成と局所分泌」第32回日本神経科学大会、2009年9月
6. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳「男性ホルモンによる海馬樹状突起スパインの形態変化とそのシグナル伝達経路の解析」第32回日本神経科学大会、2009年9月
7. 小松崎良将、粕谷昌寿、北條泰嗣、川戸佳「海馬神経スパインにおけるコルチコステロンによる作用の解析」第47回生物物理学会年会、2009年11月
8. 向井秀夫、畑中悠佑、釣木澤朋和、中西広典、川戸佳「海馬神経細胞樹状突起スパインのアクチビンによる増加効果の解析」第46回生物物理学会年会、2008年12月
9. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳「海馬樹状突起スパインに及ぼす男性ホルモンの急性的効果」第46回生物物理学会年会、福岡国際会議場、2008年12月
10. 向井秀夫、畑中悠介、釣木澤朋和、中西広典、川戸佳「海馬神経細胞樹状突起

スパインのアクチビンによる増加効果の解析」第31回日本神経科学大会、2008年7月

11. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳「海馬樹状突起スパインに及ぼす男性ホルモンの急性的効果」第31回日本神経科学大会、2008年7月
12. 大石悠貴、川戸佳「海馬 CA1 におけるニューロステロイドのシナプス伝達修飾の解析」第31回神経科学大会、2008年7月
13. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳「海馬樹状突起スパイン形態に及ぼす男性ホルモンの急性効果」第31回神経科学大会、2008年7月
14. 木本哲也、肥後心平、石井寛高、村上元、川戸佳「ラット海馬におけるニューロステロイドの受容体と合成酵素の発現解析」第31回神経科学大会、2008年7月
15. 北條泰嗣、肥後心平、向井秀夫、村上元、小南思郎、原田信広、本間誠次郎、木本哲也、川戸佳「海馬神経細胞シナプスにおけるニューロステロイドの合成と局所分泌」第31回神経科学大会、2008年7月
16. 村上元、佐藤怜以、釣木沢朋和、畑中悠佑、小松崎良将、北條泰嗣、向井秀夫、木本哲也、川戸佳「海馬におけるエストロゲンのスパイン制御作用」第31回神経科学大会、2008年7月

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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
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、その分子メカニズムを明らかにする。

昨年度までに、グルココルチコイド受容体アゴニスト DEX に神経幹細胞に対する増殖抑制作用があること、E₂、BPA に弱い増殖促進作用があることを見出した。今年度はこれらの物質の細胞分化に対する影響を検討した。

分化マーカーに、Nestin(神経幹細胞)、GFAP(アストロサイト)、MAP2(ニューロン)、MBP(オリゴデンドロサイト)を用い、化学物質処理後24時間時に定量RT-PCRを実施したところ、DEX単独でGFAP mRNAの誘導作用があることを見出した。その作用は、1nM以上、処理後4時間以降から検出された。ウェスタンブロットティングによる定量を行い、この作用がタンパク質レベルでも誘導されていることを確認した。そこで、GFAPプロモーター(転写開始点上流2.8kb)の配列を解析したところ、グルココルチコイド受容体結合配列(GRE)候補を3ヶ所見出した。レポーターアッセイによって、その3ヶ所を欠失した際にDEXによる誘導に変化が生じるか調べたが、変化は無いことが分かった。

一方、E₂、BPAには分化影響作用は見出されなかった。BPAについてはERに加え、ERRgに結合することが報告されているので、同様にERRgに結合するTAMについて検討したところ、弱くNestin発現を上昇させ、GFAPを低下させる傾向が認められた。

以上の結果から、核内受容体作動性物質には神経幹細胞の増殖分化に影響を与えるものが存在すること、特に、DEXには神経幹細胞の増殖を抑制する作用に加え、アストロサイト分化を促進する作用があることを見出された。

キーワード:

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

略語:DEX; Dexamethasone, GFAP; Glial Fibrillary Acidic Protein, MAP2;

Microtubule-Associated Protein, MBP; Myelin Basic Protein, E2; 17-beta estradiol, BPA;

bisphenol A, ERRg; Estrogen-Related Receptor, Gamma, TAM; Tamoxifen

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、プトレッシン、アボトランスフェリン、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 10^6 個/6ml の密度で生細胞を播種する。96 well plate を用いる場合は、 8×10^3 /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。

定量 RT-PCR

細胞に各物質を処理し一定時間後、細胞破砕液を回収し、逆転写反応を行い cDNA を作製した。各遺伝子に対する primer を用い、sybergreen により定量 PCR を実施した。Primer 配列は以下の通り。

Nestin

(FW 5'-CTGCAGGCCACTGAAAAGTT-3',
RV 5'-TCTGACTCTGTAGACCCTGCTTC),

GFAP

(FW 5'-ACAGACTTTCTCCAACCTCCAG-3',
RV 5'-CCTTCTGACACGGATTTGGT-3'),

MAP2

(FW 5'-TCTGCGAGTAAGCTGTGACC-3',
RV 5'-CTGTGAAACTTGGAGCACACA-3'),

MBP

(FW 5'-CACACACGAGAACTACCCA-3',
RV 5'-GGTGTTCGAGGTGTCAAA-3')

Western blotting

細胞に各物質を処理し 2 日後、セルスクレーパーで細胞を回収し、破砕液を調製した。

BCA 法にてタンパク質を定量し、1 レーン当たり 5ug を SDS-PAGE し、ニトロセルロース膜に転写後、抗 GFAP 抗体 (Dako)、HRP ラベル二次抗体でケミルミネッセンスを検出した。画像解析により、GFAP に対応するバンドを定量した。

GFAP promoter reporter assay

細胞にコントロールレポーターとともに各レポーターを Lipofectamine LTX で形質転換し、一晚培養したのち、各物質を処理し 24 時間後に破砕液を調製し、ルシフェラーゼ活性を測定した。コントロールレポーターの数値を用いて標準化した。

C. 研究結果

Dexamethasone に、単独でアストロサイト分化マーカー GFAP の mRNA およびタンパク質を誘導する作用があることを見出した。E₂, BPA には分化影響作用は認められず、Tamoxifen に未分化マーカーの Nestin 発現を弱く上昇させる作用が認められた。

Dexamethasone (DEX) による GFAP 発現誘導

マウス胎児神経幹細胞培養に対し、DEX を 1nM ~ 1uM まで濃度を振って添加し、24 時間後に各種分化マーカーとして、Nestin (幹細胞), GFAP (アストロサイト), MAP2 (ニューロン), MBP (オリゴデンドロサイト) の mRNA を定量 RT-PCR で測定したところ、Fig.1A) のように、DEX に濃度依存的に GFAP mRNA を誘導する作用があることが判明した。誘導作用の経時変化を検討した結果、誘導は 4 時間から認められた。一方、他の 3 種類のマーカーには有意な変化は認められなかった。

そこで、この作用がタンパク質レベルでも認められるのか、ウェスタンブロットングで定量したところ、Fig.2 のように GFAP タンパク質の誘導作用も確認された。

また、アストロサイト分化促進因子 LIF を共存させた際の GFAP 発現変化を検討した結果、増強作用が認められた (mRNA 定量結果は、Fig.3。タンパク質のデータは Fig.2 参照)。

一方で、E₂, BPA, TAM については、TAM に、1 μ M 付近で Nestin 発現を弱く上昇させる作用が見出されたのみであった (Fig.1)。

DEX による GFAP 誘導に関わるプロモーター領域の検討

GFAP プロモーター配列を調べたところ、グルココルチコイド受容体結合配列 (GRE) 候補を3ヶ所見出した。そこで、GFAP プロモーター全長を持つ GF1L と、GRE 候補を3ヶ所とも欠失する GF1LB を神経幹細胞に各々形質転換し、DEX 処理しレポーター応答を検討したところ、GRE を欠失した GF1LB でも DEX による誘導程度は変わらないという結果が得られた (Fig.4)。

よって、DEX による GFAP 発現促進作用は、配列から見出した GRE 候補に GR が結合し、直接転写を促進するというような単純な仕組みでは無い可能性が示唆された。

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って乱されると、その神経系に対する影響は不可逆かつ甚大なものとなる可能性がある。

本研究により、DEX を始めとする核内受容体作動性物質が神経幹細胞の増殖に加え分化にも影響を与えることが明らかになった。この結果は、核内受容体作動性物質のリスク評価の際には、発達期の神経系に対する影響を十分に考慮する必要があることを強調するものである。

DEX は、神経幹細胞の増殖阻害作用に加え、単独でアストロサイト分化を促進し、アストロサイト分化促進因子 LIF 作用を増強することが明らかになった。また、グルココルチコイド受容体阻害剤の Mifepristone によりデキサメタゾン作用は抑制されることも確認が取れており、DEX の作用はグルココルチコイド受容体を介していることが強く示唆される。現時点で詳細な作用メカニズムは明らかに出来ていないが、アストロサイト分化促進因子 LIF の作用を増強

することから、複合的な状況によっては DEX の作用がより低濃度で生じることが考えられる。

BPA については E₂ 同様、ごく弱く増殖を促進する傾向が認められるに留まった。分化に対する影響は今回の実験条件では認められなかった。BPA は ER を活性化することが知られているが、ERRg にも結合することが報告されている。一方で ERRg には TAM が結合し、ERRg の転写活性を阻害することが知られている。そこで、TAM 自体に分化影響が認められるかを調べたところ、未分化マーカーの Nestin 発現を弱く促進することが判明した。作用発現濃度は 1 μ M 程度であるが、TAM (分子量 387.5) の抗癌剤としての最大用量 40mg/日から、50kg のヒトでの最大血中濃度を算出すると、約 2 μ M となり、作用が認められた濃度域と重なる。よって、場合によっては TAM の作用の詳細を検討する必要があるかもしれない。

E. 結論

これまでの研究により、核内受容体作動性物質の中には神経幹細胞の増殖及び分化に対する作用を示すものがあることが示された。特に DEX は増殖阻害作用、アストロサイト分化促進作用を有することが明確に示された。なお、予備的ながら、その作用は内因性副腎皮質ホルモンであるコルチコステロン、ヒドロコルチゾールにも認められた。また、DEX はアストロサイト分化促進因子 LIF の作用を増強することも明らかになった。

グルココルチコイドはストレス等、環境の状況に応じて血中に分泌されることから、その様な状況では、LIF に限らず、様々な因子や外来性化学物質との相互作用が想定される。グルココルチコイドの神経幹細胞における、他の因子との相互作用 (増強、減弱効果) を踏まえた研究が今後必要となると考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J, Igarashi K, Gonzalez FJ, Ikuta T, Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y.

Hypersensitivity of AhR-deficient mice to LPS-induced septic shock. *Mol Cell Biol.* 2009 Dec;29(24):6391-400. [Epub 2009 Oct 12.]

Matsunaga N, Kanno J, Hamada C, Yoshimura I. An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments. *Environmetrics* 2009; 20:1-13.

Kanno J., Overview: "Children's toxicology", a renovating study field of irreversible "early exposure-delayed effects". *J Toxicol Sci.* 2009;34 Suppl 2:SP199-200.

Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J. Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. *J Toxicol Sci.* 2009;34 Suppl 2:SP279-86.

Ishimaru N, Takagi A, Kohashi M, Yamada A, Arakaki R, Kanno J, Hayashi Y. Neonatal exposure to low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance. *J Immunol.* 2009 May 15;182(10):6576-86.

2. 学会発表

菅野 純、BPA 等の低用量影響の標的「中枢神経」、第20回環境ホルモン学会講演会、2009年2月24日、東京、口演

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

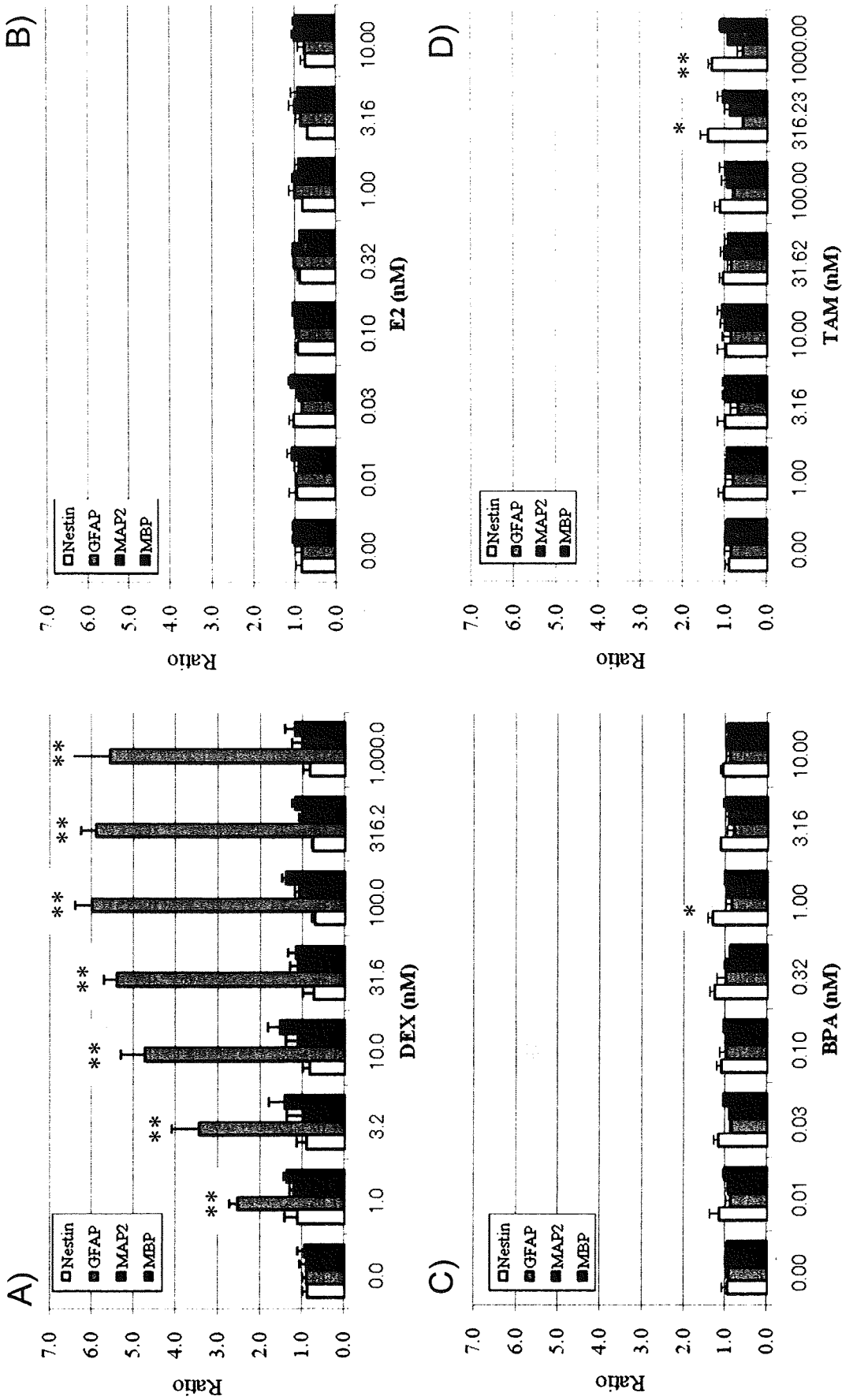


Fig. 1 核内受容体作動性物質による分化マーカー発現変化

マウス胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞分化に対する影響を検討した。

A) Dexamethasone: 1nM~1uM, B) 17-beta-estradiol: 10pM~10nM,

C) BPA: 10pM~10nM, D) Tamoxifen: 1nM~1uM

を添加し、24日間培養後、Nestin, GFAP, MAP2, MBPを定量RT-PCRにて測定した。

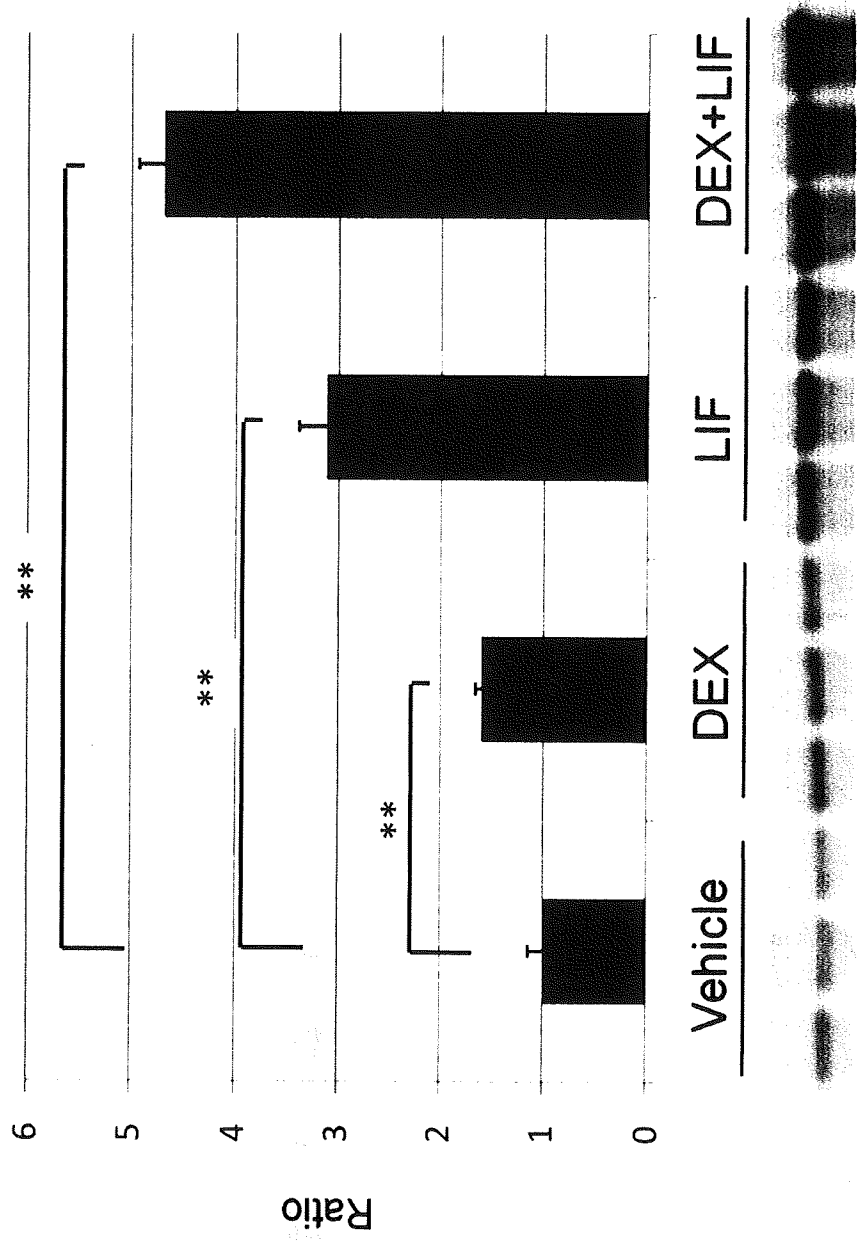


Fig. 2 DexamethasoneによるGFAPタンパク質誘導
 マウス胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞に対し、DEX (10^{-6} M), LIF (2.5ng/mL)を加え、2日間培養後、GFAPタンパク質をウェスタンブロットティングで定量した