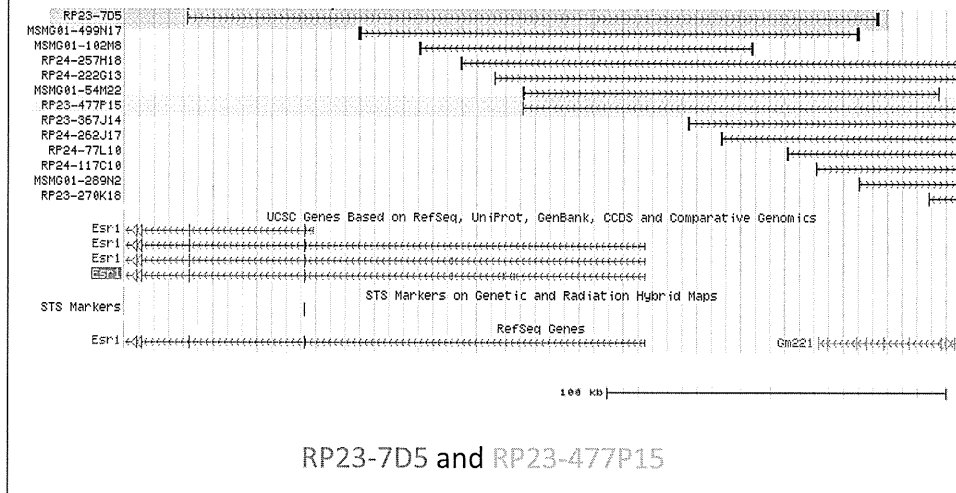
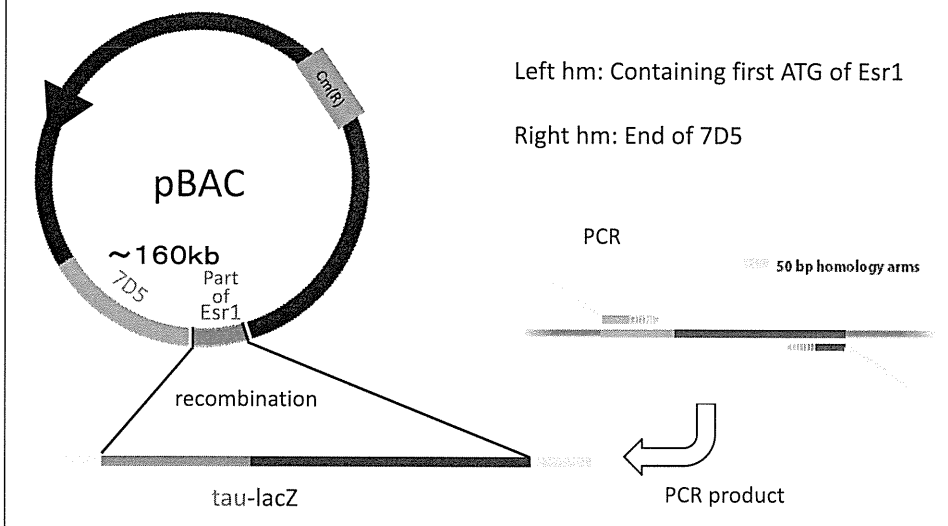


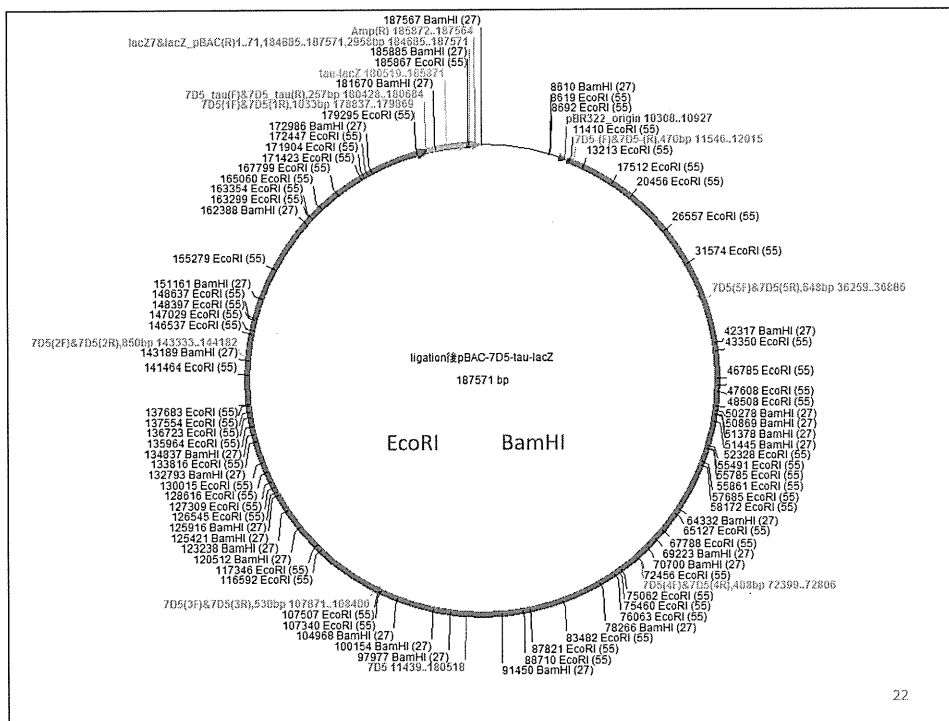
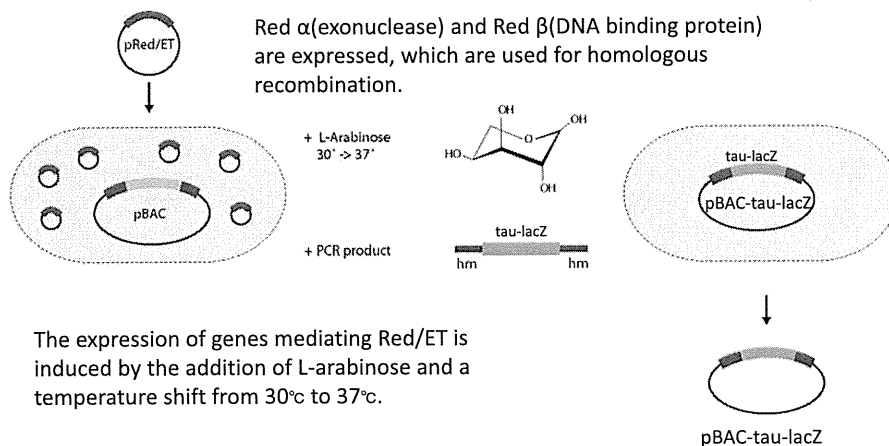
BAC clone selection

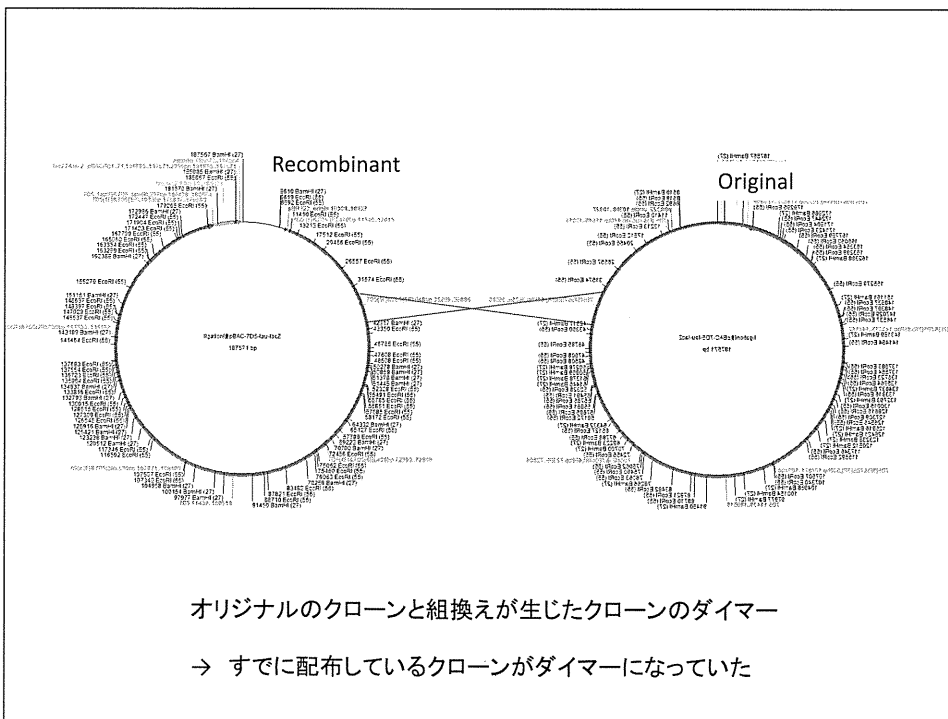
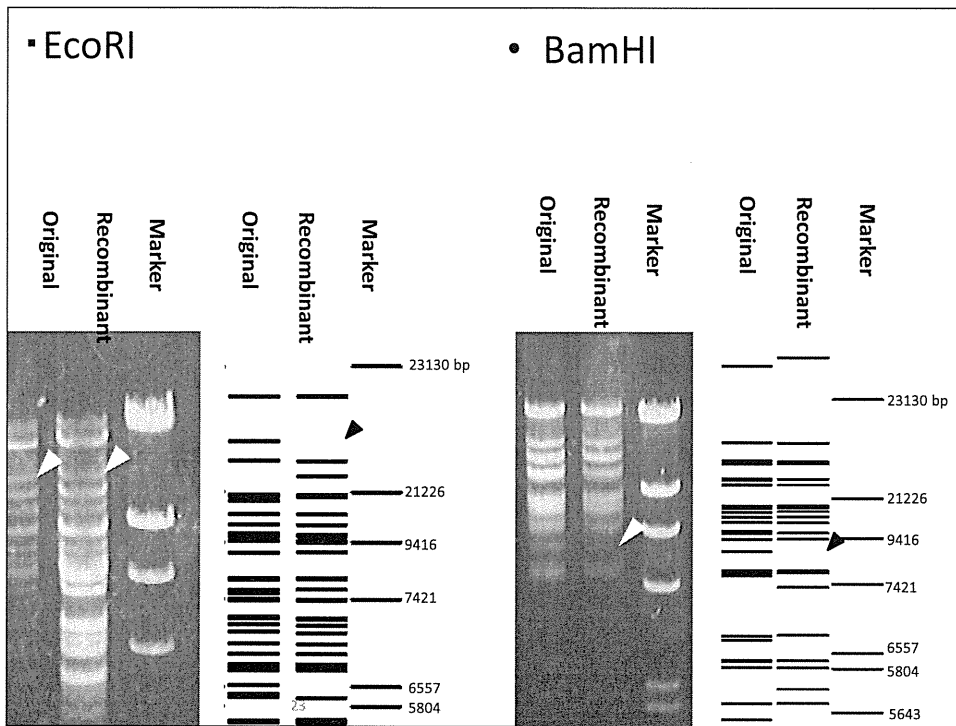


Design of homology arms and primer



Construction of ER tau-lacZ fused gene



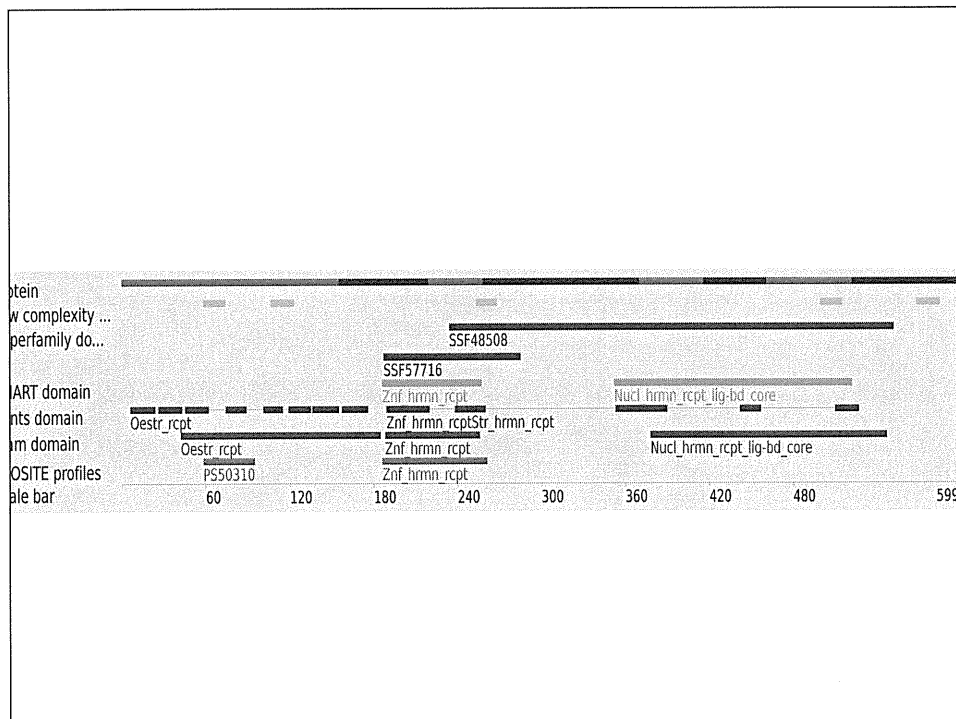


研究の流れ

1. ER α 遺伝子を含むBACクローンの選択と取得
2. BACクローンにレポーター遺伝子を挿入
3. トランスジェニックマウスの作製
4. レポーター遺伝子の発現の確認
TGラインの選択
5. 胎児期のBPAおよびエストロゲン曝露
6. 曝露マウスにおけるレポーター遺伝子の発現の確認

ER α ノックアウトマウスの利用

関連遺伝子のBAC-レポーターTGマウスの構築など



Studies of Sexual Differentiation of the Brain and Behavior in Wistar Rats Exposed Via Drinking Water to Low Doses of BPA (≤ 1.5 mg/kg d)

Study	Exposure time/dose	Endpoint	BPA effect
Kubo et al. (2001) NTP-A EU (2008)	GD 0-PND 21 0 and 1.5 mg/kg d Drinking water	Reproductive organ weights	No effect
		Hormones (LH, FSH, and E_2/T)	No effect
		Brain: SDN-POA, Volume	Cont: sex diff BPA: sex diff
		Brain: Locus Coeruleus Volume, cell #	Cont: sex diff BPA: no sex diff
Fujimoto et al. (2006) NTP-A EU (2008)	GD 13-PND 0 0 and 15 μ g/kg d Drinking water	Behavior: Exploratory	Cont: sex diff BPA: no sex diff
		Behavior: Passive avoidance	Cont: sex diff BPA: sex diff
		Behavior: Forced Swim	Cont: sex diff BPA: no sex diff
		Behavior: Elevated Plus maze	Cont: no sex diff BPA: no sex diff

問題点: どの程度エストロゲン曝露影響と共通しているか?
 -ビスフェノールA とジエチルstilbestロールとの比較
 エストロゲン受容体がどの程度関与しているか?
 -レポーターマウスの解析、ノックアウトマウスの解析
 -エストロゲン受容体を対象としたスキームで十分かを検証-

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究

- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、

それに基づく試験スキームの最適化 -

(H23-化学-一般-002)

分担研究報告書

周産期化学物質低用量暴露による免疫影響評価

研究分担者 林 良夫 徳島大学副理事、客員教授

研究協力者 石丸直澄 徳島大学大学院教授

研究要旨

ダイオキシンなどの化学物質は、生体に様々な影響を与えることがよく知られているが、どの時期にどのような経路で暴露されることによって生体への影響が生じるのかは全く不明である。本研究では、周産期における母体に及ぼす化学物質の免疫システムへの影響について検討を加えた。妊娠期における胸腺組織でのダイオキシンの細胞内受容体である Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の mRNA が非妊娠期において上昇していた。さらに、妊娠期の胸腺組織では Autoimmune regulator (AIRE) の mRNA 発現およびタンパク発現も上昇することが判明した。また、アロマターゼノックアウトマウスの胸腺組織では AhR の mRNA 発現が対照に比較して亢進していた。一方で、AhR を介した T 細胞分化に関するエピジェネティクス解析を行うと、AhR ノックアウトマウスの胸腺組織における Th1 および Th2 関連遺伝子での DNA メチル化が対照マウスと比較して変化していたことから、AhR を介した T 細胞分化にエピジェネティクスな影響が大きく関与する可能性が示された。

A. 研究目的

本研究では、周産期における環境ホルモンを主体とした化学物質の低用量暴露によって、子どもあるいは母体の免疫システムに与えられる異常に関してマウスを用いて分子メカニズムを詳細に検討することにより、周産期における化学物質の免疫系への安全性を評価する。妊娠期あるいは非妊娠期における正常マウスを用いることにより、免疫細胞の各分画での AhR シグナルと性ホルモンとの関係を明

らかにする。また、性ホルモンとの関係を明瞭にするために、アロマターゼノックアウトマウス、卵巣摘出マウスを用い、胸腺組織における AhR の発現を確認する。さらに、胸腺細胞における AhR を介した反応が DNA のメチレーションなどエピジェネティクスにどの程度関係しているのかを AhR ノックアウトマウスを用いてスクリーニング的に検討する。

B. 研究方法

1) マウス

AhRノックアウトマウス、アロマターゼノックアウトマウス、C57BL/6マウスを当施設にてSPF (specific pathogen-free)下で繁殖飼育した。徳島大学遺伝子組換え実験規則及び動物実験委員会規則に従った研究を進めた。

2) フローサイトメトリー解析

各群における全てのマウスから頸部リンパ節、胸腺および脾臓を摘出し、ホモジナイズ、溶血、洗浄後各種抗体 (CD4, CD8; e-Biosciences) と反応させた後に 3%パラホルムアルデヒドにて固定したのち細胞自動解析装置 (FACSCanto, BD) にて解析した。

4) Real-time PCR 法

脾臓から Thy1.2 抗体及びマグネットビーズを用いて T 細胞を分離し、トライゾールにて Total RNA を調整した。また、各組織に関してもトライゾール及びホモジナイザーによって total RNA を分離した。逆転写反応後、PTC-200 DNA Engine Cycler 装置 (MJ Research, Waltham, MA) を用い、下記プライマーにて各 mRNA を定量化した。AIRE; F:5'-TCTGCTAGTCACGACCCTGTTC-3', R:5'-GGCGTGACATGCTCTGGAT-3', AhR; F: 5'-ACATAACGGACGAAATCCTGACC-3', R:

5'-TCAACTCTGCACCTTGCTTAGGA-3', β-actin; F:5'-GTGGGCCGCTCTAGGCA-3', R:5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3

5) DNA エチル化検出

胸腺細胞及び脾臓細胞から CD4 陽性 T 細胞を調整し (CD4 enrichment kit, Stem

cell)、DNA を抽出した (DNeasy, Qiagen)。キアゲン社の EpiTect Methyl qPCR System を用い、メチル化された CpG 配列は切断できないメチル化感受性制限酵素反応を応用し、リアルタイム PCR 法によって DNA メチル化を定量化する。T helper cell differentiation, signature panel を利用し、24 個のヘルパー T 細胞の分化に関わる転写因子やサイトカイン遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態の定量化を試みた。

C. 研究結果

妊娠期における末梢免疫システム:

雌 B6 マウス (10 週齢) を雄マウスと mating させ、プラーグを確認後、15 日目におけるリンパ節及における T 細胞分画をフローサイトメーターにて検討すると、非妊娠対照マウスと比較して、妊娠マウスでは CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞ともにその割合が有意に増加していることが判明した (図 1A)。また、脾臓に置いても、妊娠マウスの CD4 陽性細胞及び CD8 陽性細胞は有意に増加していた (図 1A)。また、制御性 T 細胞のマーカーである Foxp3 陽性 CD4 陽性細胞について検討すると、リンパ節、脾臓ともに対照マウスと比較して有意に減少していることが明らかとなった (図 1B)。

妊娠期における AhR の発現:

シェーグレン症候群モデルマウスの妊娠期にダイオキシンを投与することにより、出産後に自己免疫疾患が誘導され、胸腺におけるダイオキシンの影響が大きかったことから (平成 22 年度報告)、妊娠期における胸腺組織でのダイオキシン受容体である AhR の mRNA 発

現を検討した。非妊娠 B6 マウスにおける胸腺組織における AhR の発現に比べ、妊娠 14 日目で約 52% の増加、妊娠 17 日目で約 56% の増加が認められた(図 2A)。一方、脾臓における AhR の発現には対照群と妊娠群で有意な差は確認できなかった(図 2A)。

妊娠期における AIRE の発現:

胸腺における T 細胞の選択に重要な因子となる自己抗原遺伝子の発現を調節することが知られている AIRE は自己免疫疾患発症機序を知る上で極めて重要な転写因子である。妊娠期における AIRE の mRNA 発現を検討すると、非妊娠対照群マウスと比較して、妊娠 14 日目で約 89% の増加、妊娠 17 日目で約 78% の有意な増加が認められた(図 2B)。さらに、タンパクレベルで AIRE の発現を検討するために対照マウスと妊娠 14 日目のマウスにおける胸腺組織の凍結切片を用い、AIRE、胸腺髄質上皮細胞のマーカーである EpCAM 及び DAPI による 3 重蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察すると、胸腺髄質に限局して、対照群、妊娠群ともに観察され、AIRE 陽性細胞数には両群で大きな差は見られないが、AIRE び蛍光強度は妊娠群で大きくなっていることから、タンパクレベルでも妊娠期に AIRE の発現が上昇していることが示された(図 3)。

アロマターゼノックアウトマウスの胸腺組織における AhR の発現

周産期において母体の女性ホルモン量は大きく変動する。そこで、エストロジェンの合成に重要な酵素であるアロマターゼ遺伝子ノックアウトマウスの胸腺組織における AhR の mRNA

発現を検討すると、対照マウスと比較して有意に AhR の発現が亢進していることが判明した(図 4A)。アロマターゼノックアウトは唾液腺、涙腺に自己免疫疾患が発症することが判明しているため、胸腺組織における AIRE 発現を検討したところ、アロマターゼノックアウトマウスと対照マウスとの間で有意な差は観察されなかった(図 4B)。

AhR ノックアウトマウスの胸腺細胞における免疫関連遺伝子の DNA メチル化

ダイオキシンの投与により晩発性に自己免疫疾患が誘導され、胸腺細胞における AhR を介した免疫異常が示唆されることをすでに報告していることから、胸腺細胞における AhR の発現の有無によるエピジェネティックな変動を検討するために、AhR ノックアウトマウスの胸腺細胞における T 細胞分化関連遺伝子の DNA メチル化について解析した。解析した遺伝子を表 1 に示す。CD4 陽性胸腺細胞を用いて DNA を抽出し、メチル化感受性制限酵素による DNA メチル化をサイクル数から換算し、Hypermethylated DNA fraction (HM)、Unmethylated DNA fraction (UM)、Intermediatedly methylated DNA fraction (IM) の割合(%)を算出した。検出可能であった遺伝子とそれぞれのメチル化の割合を表 2 に示す。対照群と AhR ノックアウト群で、メチル化に差があった遺伝子は Th1 関連遺伝子である Eomes、Th2 関連遺伝子である Pparg であり、Eomes では AhR ノックアウトマウスで HM の DNA メチル化が対照に比較して低下していた(図 5A)。Pparg に関しては AhR ノックアウトマウスにて対照群よりも

DNA メチル化が亢進していた(図 5B)。その他の遺伝子では大きな差は確認できなかった(表 2、図 5C)。

D. 考察

ダイオキシンなどの環境ホルモンの生体への影響として、発癌、奇形などがよく知られているが、免疫系への正確な影響に関しては報告が少ない。我々はすでに、新生時期に低容量のダイオキシンの暴露により、出生後晩発性に自己免疫性病変が誘導されることを報告した(J Immunol 182:6576, 2009)。さらに、シェーグレン症候群モデルマウスを用いて、妊娠後期でのダイオキシンの暴露が母体側にも自己免疫性病変の発症に影響を及ぼすことを見いだしている(未公表データ/厚生労働科学研究費補助金事業平成 22 年度報告済み)。

今年度の研究では、周産期におけるダイオキシンの生体内での受容体である AhR を介した免疫反応を中心に検討した。妊娠期における免疫システムは女性ホルモンの急激な減少により、大きく変化することが知られている。本研究において、妊娠期のマウスと対照マウスの末梢 T 細胞の影響として、妊娠により T 細胞分化は亢進するものの、制御性 T 細胞の末梢での割合が減少することから、免疫システムの制御機構に影響を及ぼす可能性が示された。

妊娠期の AhR に発現が亢進していたことから、ダイオキシンの感受性も高くなっている可能性が示された。AIRE の発現に関しては、AIRE ノックアウトマウスでは多臓器に自己免疫病変が観察されることが知られているが、妊娠期においては逆に AIRE の発現亢進が確認された。この点に

関してはさらに AIRE に関連した臓器特異的な自己抗原の発現に関しても検討する必要がある。

アロマターゼノックアウトマウスに関しては、加齢的に涙腺、唾液腺に自己免疫性病変が観察されることから、性ホルモンと免疫システムとの関係が報告されている。本年度の研究において、アロマターゼノックアウトマウスの胸腺組織における AhR の mRNA 発現が亢進していたことから性ホルモンと胸腺における環境ホルモンとの関係が示唆される。

AhR を介した免疫細胞を司る遺伝子のエピジェネティックな変化の有無に関して AhR ノックアウトマウスの胸腺細胞を用いて網羅的に検討すると、大きな変化はないものの、Th1 及び Th2 に関連した遺伝子の DNA メチル化がノックアウトマウスと対照マウスで増減が見られた。このことは胸腺における T 細胞分化に AhR を介した DNA メチル化制御機構の存在が示唆された。今後、AhR を介した DNA メチル化と性ホルモンの影響あるいは自己免疫疾患との関係をさらに究明する必要がある。

E. 結論

妊娠期における胸腺細胞の AhR を介した分化制御機構が存在することが明らかとなった。さらに、アロマターゼ及び性ホルモンと AhR シグナルがリンクすることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E and Noji S. Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice. *Dev Growth Differ* 53:48-54, 2011
- Lei Y, Ripen AM, Ishimaru N, Ohigashi I, Nagasawa T, Jeker LT, Bösl MR, Holländer GA, Hayashi Y, Malefyt RW, Nitta T, Takahama Y. XCL1-mediated medullary accumulation of thymic dendritic cells contributes to thymic development of regulatory T cells. *J Exp Med*. 208:383-394, 2011.
- Watanabe M, Ishimaru N, Ashrin MN, Arakaki R, Yamada A, Ichikawa T, Hayashi Y. A novel DC therapy with manipulation of MKK6 gene on nickel allergy in mice. *PLoS One* 6:e19017, 2011.
- Ishimaru N, Yamada A, Nitta T, Arakaki R, Lipp M, Takahama Y, Hayashi Y. CCR7 with S1P1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3+ regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy. *Am J Pathol* 180:199-208, 2012
- 石丸直澄、井澤俊、林良夫 RANKLとFasによる免疫応答の制御 臨床免疫・アレルギー科 55:142-147, 2011
- 林良夫、新垣理恵子、石丸直澄 Sjögren 症候群 日本内科学会雑誌 100: 1262-1268, 2011
2. 学会発表
- 石丸直澄、山田安希子、新垣理恵子、林良夫 自己免疫疾患の病態におけるメモリーCD8陽性T細胞の役割、第100回日本病理学会総会、2011年4月、横浜
- 松本一真、石丸直澄、新垣理恵子、山田安希子、田中栄二、林良夫:関節リウマチ病態における破骨細胞を介したT細胞活性化機構の解析、第100回日本病理学会総会、2011年4月、横浜
- 新垣理恵子、石丸直澄、山田安希子、林良夫:エストロゲン欠乏によって誘導されるシェーグレン症候群病態増強へのTh17細胞の関与、第100回日本病理学会総会、2011年4月、横浜
- Meinar Nur Ashrin, Megumi Watanabe, Rieko Arakaki, Akiko Yamada, Tetsuo Ichikawa, Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru: Analysis of Immune Responses to Metal using Murine Nickel Allergy Model. 第40回日本免疫学会総会・学術集会、2011年12月、千葉
- Ritsuko Oura, Rieko Arakaki, Masahiro Hiasa, Akiko Yamada, Eiji Tanaka, Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. In vivo T cell apoptosis via interaction with CD11b+ macrophages in Fas-deficient host. 第40回日本免疫学会総会・学術集会、2011年12月、千葉
- Kazuma Matsumoto, Rieko Arakaki, Akiko Yamada, Masahiro Hiasa, Ritsuko Oura, Akihiko Iwasa, Eiji

Tanaka, Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. Hyperfunctions of osteoclasts in pathogenesis of rheumatoid arthritis in MRL/lpr mice. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 12 月、千葉

Akihiko Iwasa, Rieko Arakaki, Akiko Yamada, Eiji Tanaka, Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. A critical role of aromatase in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 12 月、千葉

Rieko Arakaki, Akiko Yamada, Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. Th17 cells on the development of Sjogren's syndrome in estrogen deficient NOD mice. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 12 月、千葉

Masahiro Hiasa, Rieko Arakaki, Akiko Yamamoto, Ritsuko Oura, Kenzo Asaoka, Masahiro Abe, Toshio Matsumoto, Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. A novel role of NFkB relB in bone remodeling. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 12 月、千葉

なし
3. その他
なし
図の説明

図 1 : 対照マウスと妊娠 (14 日目) B6 マウス (10 週齢) の頸部リンパ節及び脾臓におけるリンパ球の CD4/CD8 分画をフローサイトメーターにて解析した。

図 2 : 非妊娠、妊娠 14 日目及び妊娠 17 日目 B6 マウス (12 週齢) の母体の胸腺及び脾臓における AhR、AIRE の mRNA 発現を定量 PCR にて検討した。

図 3 : 対照及び妊娠 14 日目の B6 マウス (12 週齢) の胸腺組織 (凍結組織) における AIRE の発現を 3 重染色による共焦点顕微鏡にて解析した。

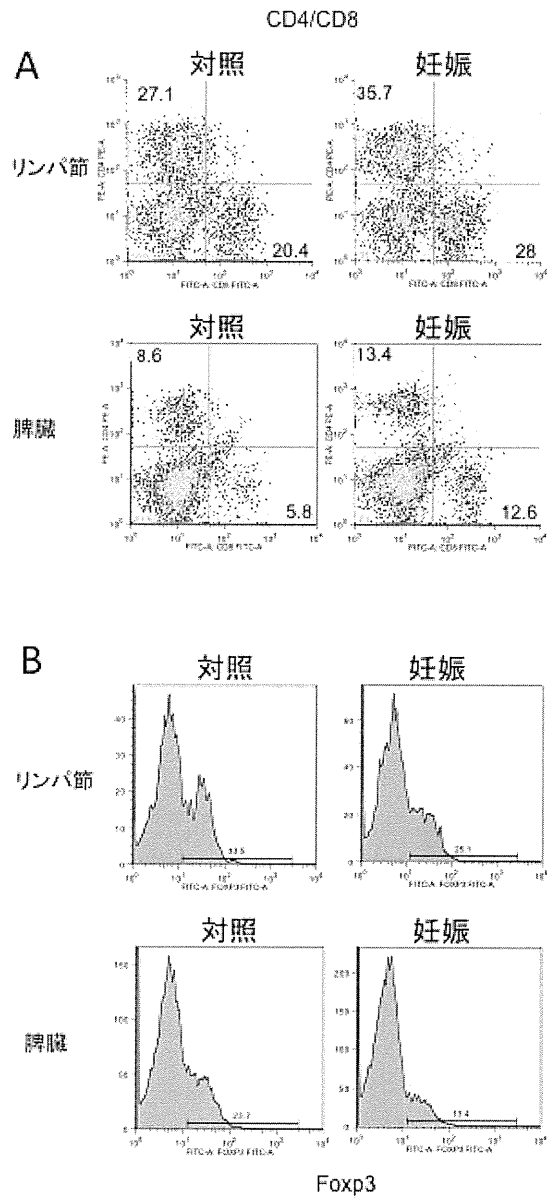
図 4 : アロマターゼノックアウトマウス及び対照マウスの胸腺組織と脾臓における AhR、AIRE の mRNA 発現を定量 PCR 法にて検討した。

図 5 : AhR ノックアウト及び対照マウスの胸腺 CD4 陽性 T 細胞の Th に関する遺伝子の DNA メチル化を定量した。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 (出願中)
なし
2. 実用新案登録

図1



2

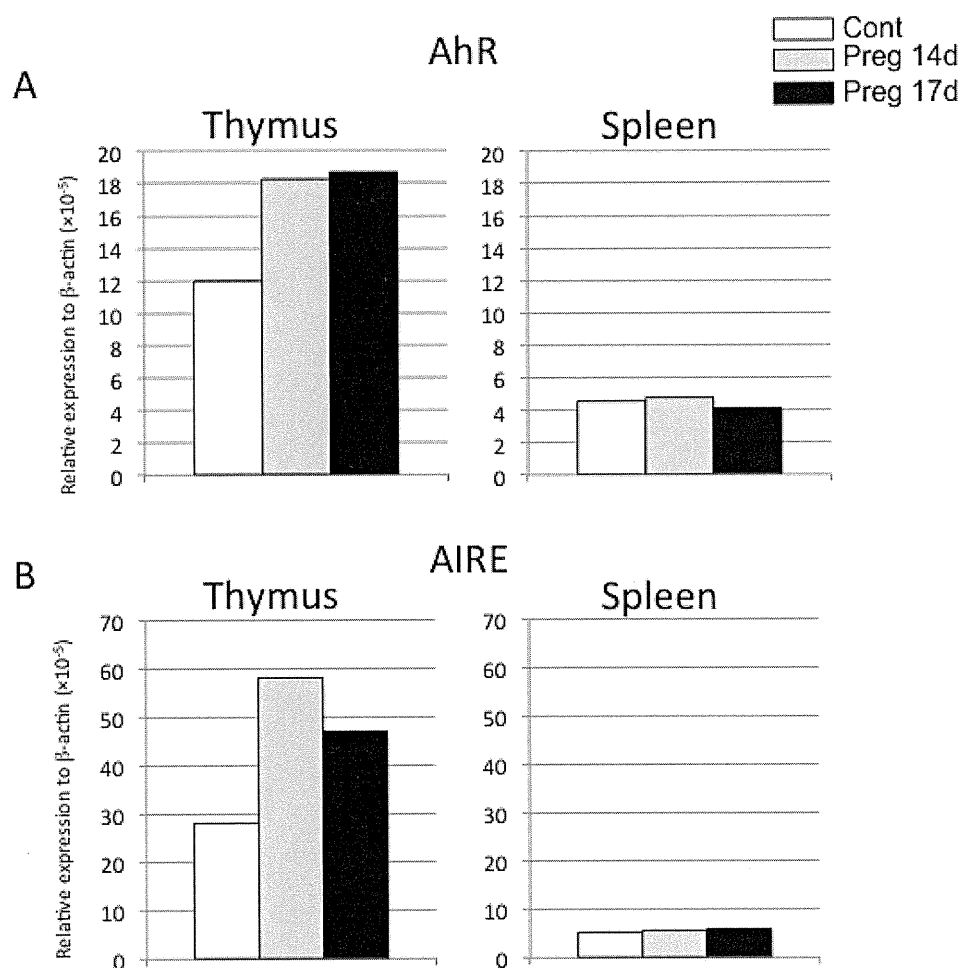
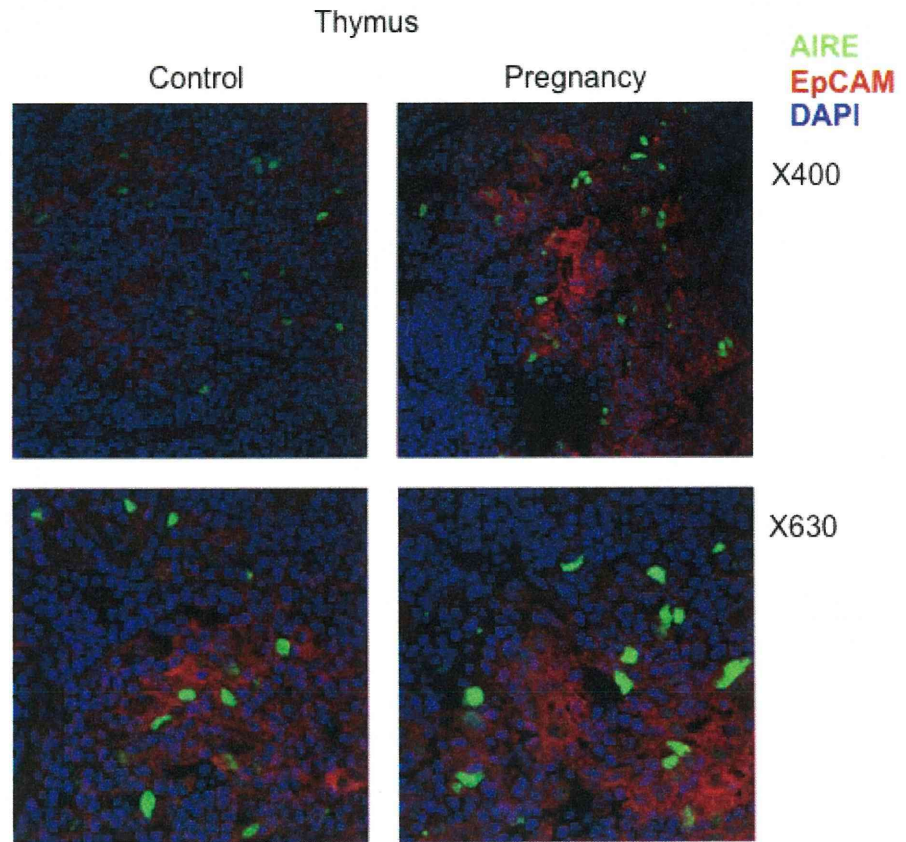
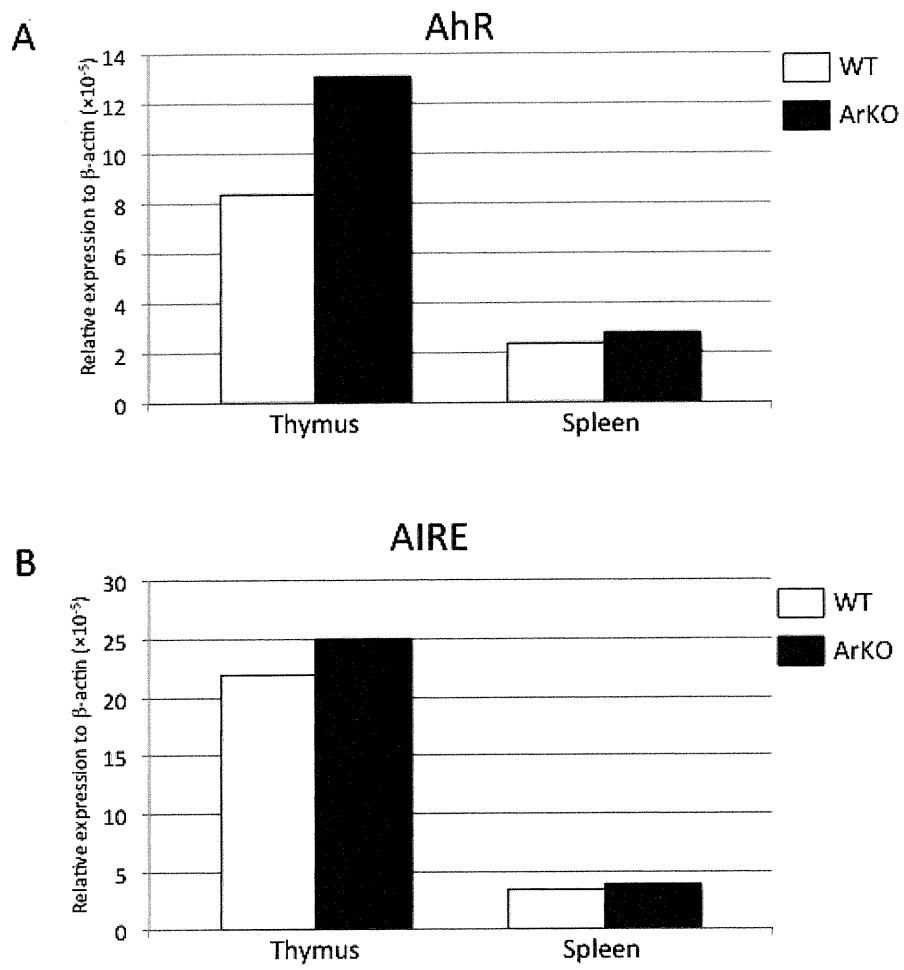


图3



☒4



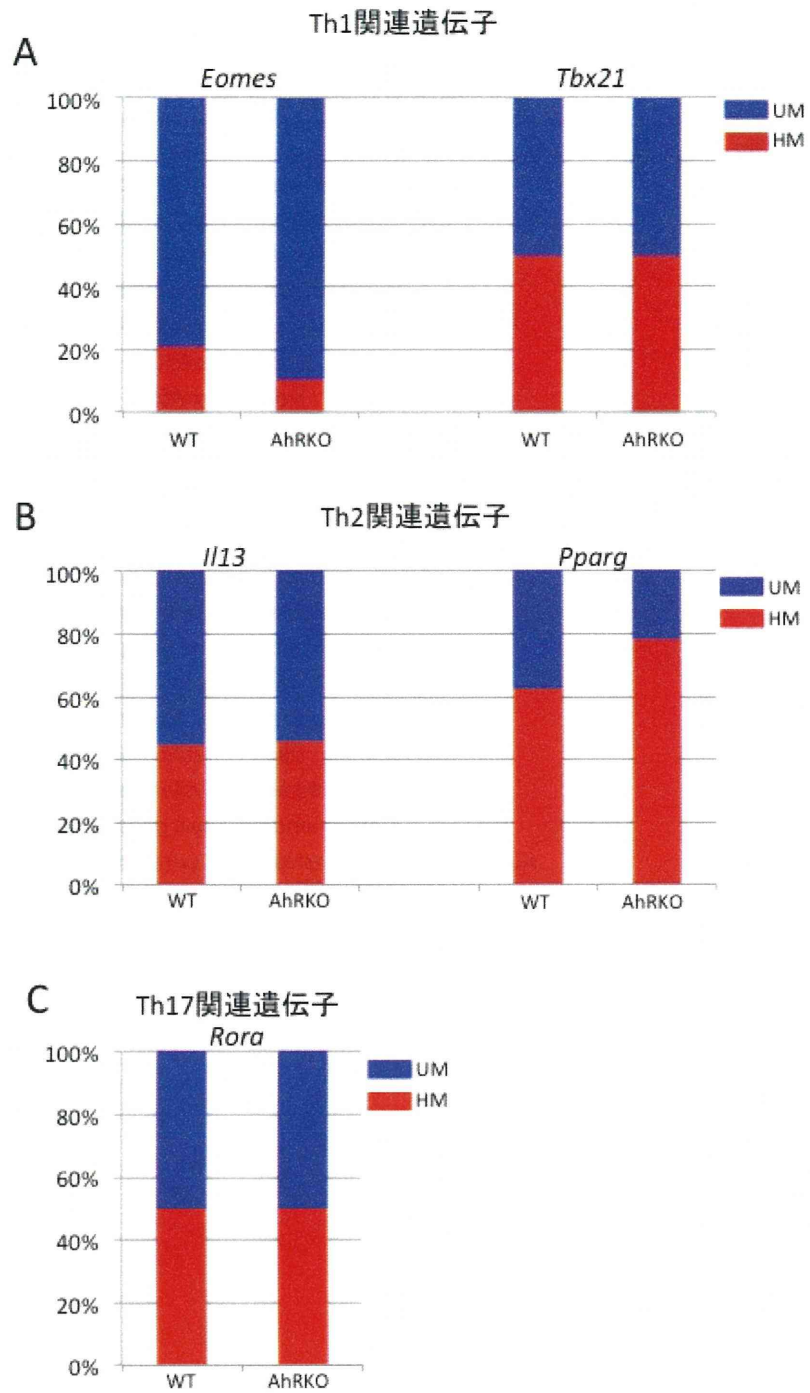


表1.T細胞分化関連遺伝子

遺伝子名(略)	
Chd7	Chromodomain helicase DNA binding protein 7
Eomes	Eomesodermin homolog (Xenopus laevis)
Fosl1	Fos-like antigen 1
4930412O13Rik	RIKEN cDNA 4930412O13 gene
Gata4	GATA binding protein 4
Hoxa10	Homeobox A10
Hoxa5	Homeobox A5
Id2	Inhibitor of DNA binding 2
Il13	Interleukin 13
Irf4	Interferon regulatory factor 4
Irf8	Interferon regulatory factor 8
Lrrc32	Leucine rich repeat containing 32
Myb	Myeloblastosis oncogene
Nr4a3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
Perp	PERP, TP53 apoptosis effector
Pkd2	Polycystic kidney disease 2
Pou2f2	POU domain, class 2, transcription factor 2
Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
Rel	Reticuloendotheliosis oncogene
Relb	Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B
Rora	RAR-related orphan receptor alpha
Tbx21	T-box 21
Tgif1	TGFB-induced factor homeobox 1
Tnfsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11

表2.DNAメチル化

	WT				KO		
	HM (%)	UM (%)	IM (%)		HM (%)	UM (%)	IM (%)
Chd7	50	50	0		50	50	0
Eomes	20.7	79.3	0		10.61	89.39	0
Fosl1	23.7	76.3	0		24.06	75.94	0
Gata4	17.16	82.84	0		15.8	84.2	0
Hoxa10	50	50	0		50	50	0
Id2	50	50	0		50	50	0
Id3	44.89	55.11	0		45.82	54.18	0
Id4	50	50	0		49.09	50.91	0
Irf8	0.4	99.6	0		0.89	99.11	0
Nr4a3	50	50	0		50	50	0
Perp	38.71	61.29	0		29.35	70.65	0
Pkd2	66.14	33.86	0		74.54	25.46	0
Pou2f2	50	50	0		50	50	0
Pparg	62.88	37.12	0		78.11	21.89	0
Rel	17.98	82.02	0		13.21	86.79	0
Rora	50	50	0		50	50	0
Tbx21	50	50	0		50	50	0
Tgif1	50	50	0		50	50	0
Tnfsf11	71.5	28.5	0		76.94	23.06	0

HM:Hypermethylated DNA fraction

UM:Unmethylated DNA fraction

IM: Intermediatedly methylated DNA fraction

周産期低用量暴露による免疫学的評価

徳島大学大学院口腔分子病態学分野

分担研究者 林 良夫
研究協力者 石丸直澄

自己免疫疾患は多因子疾患である

