

of toxicities of herbicides using short-term chronic tests of alga, daphnid and fish. In: Herbicides, In-Tech. (in press).

2. 学会発表

勝義直, 松原和純, 松田洋一, 鳥羽通久, 岡香織, 太田康彦, 井口泰泉「爬虫類のエストロゲン受容体の単離と種・リガンド特異性の解析」日本動物学会第 82 回大会, 旭川市大雪クリスタルホール, 2011 年 9 月 21-23 日.

岡香織, 太田康彦, 井口泰泉, 勝義直「アメリカアリゲーターのコルチコイド受容体の単離と機能解析」日本動物学会第 82 回大会, 旭川市大雪クリスタルホール, 2011 年 9 月 21-23 日.

宮川信一, 平川育美, 小林亨, 勝義直, 井口泰泉「メダカ精巣卵誘起時における遺伝子発現解析」日本動物学会第 82 回大会, 旭川市大雪クリスタルホール, 2011 年 9 月 21-23 日.

中島忠章, 井口泰泉, 佐藤友美 新生仔期マウスの子宮分化に働く因子の探索」日本動物学会第 82 回大会, 旭川市大雪クリスタルホール, 2011 年 9 月 21-23 日.

平川育美, 勝義直, 荻野由紀子, 太田康彦, 宮川信一, 井口泰泉「環境化学物質に対する魚類エストロゲン受容体の種特異性」日本動物学会第 82 回大会, 旭川市大雪クリスタルホール, 2011 年 9 月 21-23 日.

秋山美穂, 高橋英也, 荻野由紀子, 宮川信一, 御興真穂, 井口泰泉, 坂本竜也, 坂本浩隆 「メダカ脳におけるアンドロゲン受容体の発現と局在」日本動物学会第 82 回大会, 旭川市大雪クリスタルホール, 2011 年 9 月 21-23 日.

角谷絵里, 井口泰泉, 荻野由紀子「オオミジンコのエクジクジステロイド生合成関連遺伝子群の単離及び発現解析」日本動物学会第 82 回大会, 旭川市大雪クリスタルホール, 2011 年 9 月 21-23 日.

豊田賢治, 宮川一志, 小田重人, 宮川信一, 荻野由紀子, 鑑迫典久, 加藤泰彦, 渡邊肇, 井口泰泉 「オオミジンコ *Daphnia magna* の

性決定期における幼若ホルモン応答遺伝子の網羅的解析」日本動物学会第 82 回大会, 旭川市大雪クリスタルホール, 2011 年 9 月 21-23 日.

宮川一志, 井口泰泉, 三浦徹「ミジンコ *Daphnia pulex* における捕食者カイロモンに応じた胚発生過程の変化」日本動物学会第 82 回大会, 旭川市大雪クリスタルホール, 2011 年 9 月 21-23 日.

Kato, Y., Shiga, Y., Tokishita, S., Kobayashi, K., Yamagata, H., Iguchi, T. and Watanabe, H.: Development of an RNA interference method in the cladoceran *Daphnia magna*. 第 34 回分子生物学会, パシフィコ横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.

Iguchi, T.: Amphibian development, growth and reproduction assay using *Xenopus tropicalis* and *in vitro* estrogen receptor transactivation assay. International Society of Amphibian and Reptilian Endocrinology (ISAREN 2011), University of Michigan, Ann-Arbor (USA), July 11-13, 2011.

Kohno, S., Katsu, Y., Ohta, Y., Iguchi, T. and Guillelte, L.J.Jr.: Sex reverse induced by the specific agonist of estrogen receptor. International Society of Amphibian and Reptilian Endocrinology (ISAREN 2011), University of Michigan, Ann-Arbor (USA), July 11-13, 2011.

Guillelte, L.J.Jr. and Iguchi, T.: Symposium 7: Sex determination and differentiation. The Inaugural Meeting of the North America Society for Comparative Endocrinology (NASCE 2011), University of Michigan, Ann Arbor (USA), July 13-16, 2011.

Iguchi, T.: Endocrine disruption in invertebrates: Sex determination of *Daphnia magna*. 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors (Denmark), April 26-29, 2011.

Iguchi, T. and Kawashima, Y.: Endocrine disrupters issues in Japan. 2nd International Conference on Endocrine Disruptors, Holiday Inn Frankfurt Airport (Germany), June 7-8, 2011.

Iguchi, T.: Estrogens and sex determination: Cross-species investigations with alligators, medaka, and Daphnia. Mid-Continent Ecology Division, Duluth, MN (USA), September 13-15, 2011.

Iguchi, T.: Harmonizing and optimizing fish testing methods: the OECD framework project. National BioResource Project-Medaka-The 1st Strategic Meeting for Medaka Research. Okazaki (Japan), November 23-24, 2011.

井口泰泉「内分泌かく乱物質研究の最新の動向」, 関西大学先端技術シンポジウム, 関西大学, 2011 年 1 月 14 日.

井口泰泉「オオミジンコの性分化機構」, 琉球大学熱帯生物圏研究センター共同利用研究会, 動物の性決定機構, 2011 年 2 月 23-24 日

井口泰泉、宮川信一「毒性とエピジェネティクス」第 28 回日本医学会総会, 東京, 2011 年 4 月 8-10 日.

井口泰泉「化学物質と環境」, 東京医科歯科大学, 自然環境と人間社会, 2011 年 5 月 17 日.

井口泰泉「内分泌かく乱物質の生物影響に関する研究」, 日本動物学会第 82 回大会、旭川, 2011 年 9 月 21-23 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

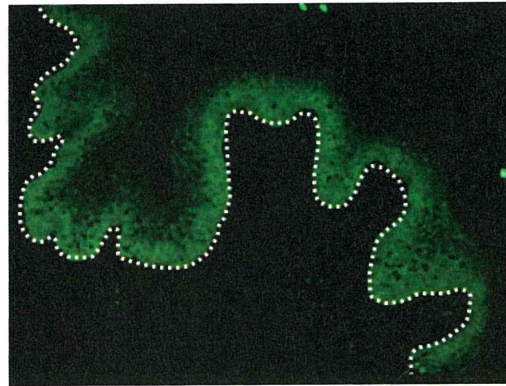


図1. K5-Creマウスの活性をRosa-egfpレポーターマウスを用いて可視化した(緑)。腔上皮全体でCreによる遺伝子組換え反応が起きていることが分かる。点線は基底膜を示している。

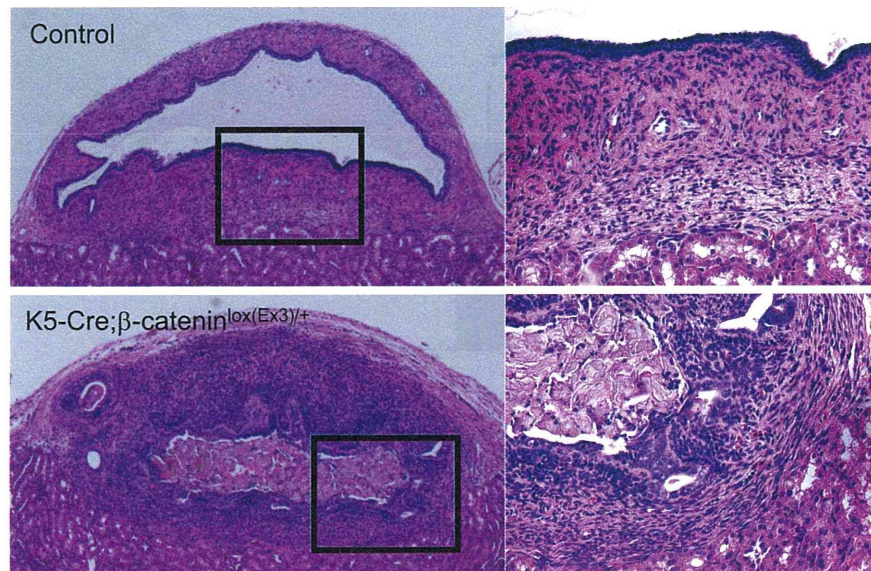


図2. 女性ホルモンがない状態では、膣上皮は2-3層の薄い状態である(上)。一方、構成的活性化β-カテニンを発現させると、女性ホルモン非存在下においても増殖・分化が起きる。(下図;内腔はケラチンなどで詰まっている)。なお、新生児致死の遺伝子改変マウスであるため、膣組織は卵巣を除去したヌードマウス腎臓皮膜下に移植したものを解析している。

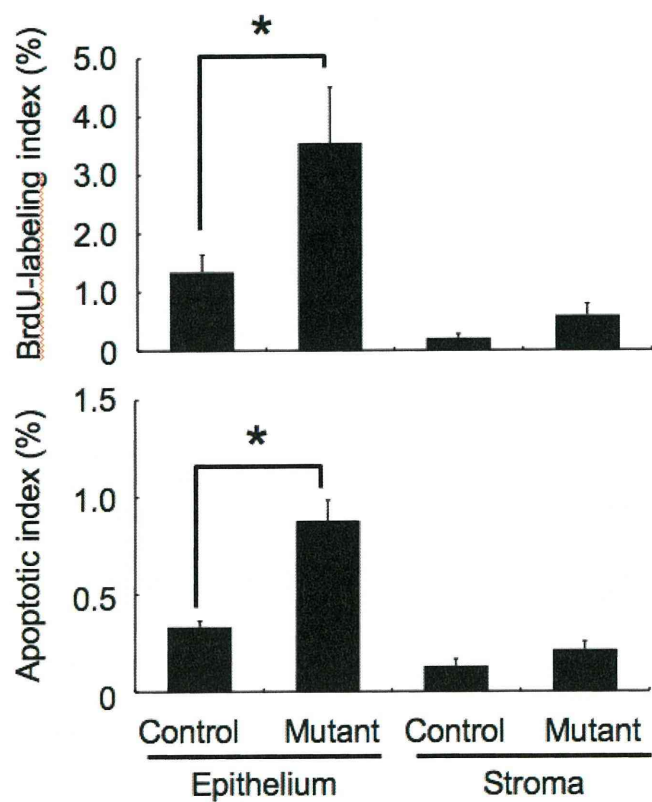


図3. 細胞増殖や細胞死をBrdU免疫染色法及びTUNEL法を指標に解析した。細胞増殖、細胞死ともに、 β -カテニン活性化マウスの腫組織で亢進していた。

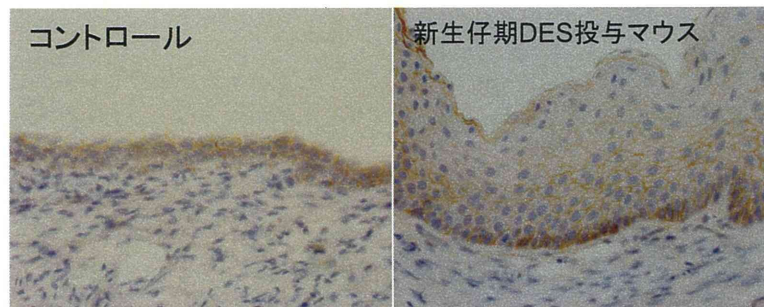


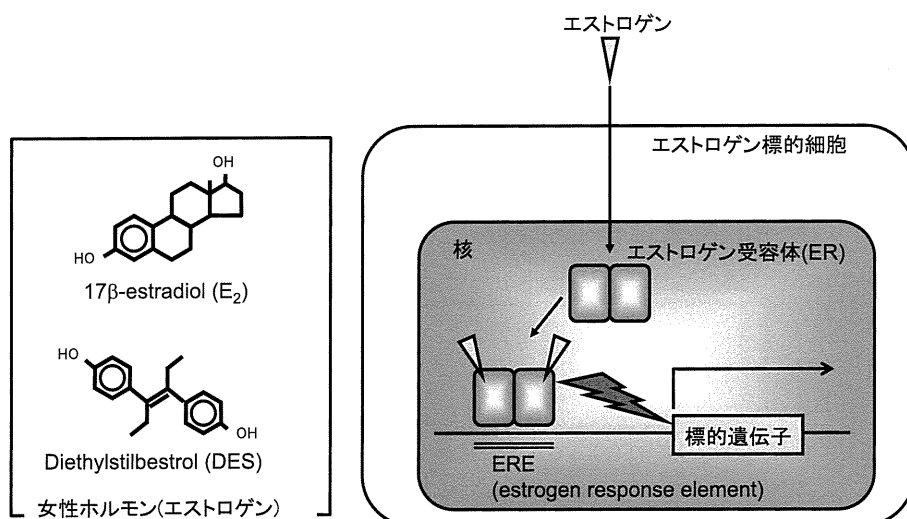
図4. 新生仔期DES投与マウス(右)及び対照群(左)の膣組織における、 β -カテニタンパク質を免疫組織学的に解析した。新生仔期DES投与マウスの一部の基底細胞で、 β -カテニタンパク質が蓄積されている。

マウス雌性生殖器官の女性ホルモンシステムと その破綻の分子機構

井口泰泉 宮川信一

自然科学研究機構
基礎生物学研究所
岡崎統合バイオサイエンスセンター

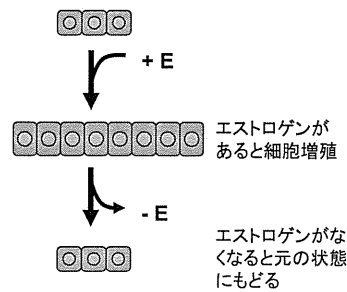
エストロゲンの作用機構



エストロゲンは標的細胞(エストロゲン受容体=ERを持つ細胞)で転写因子であるERと結合し、様々な遺伝子の転写を活性化する。その結果、様々な遺伝子が発現し、体内の生殖機能などが調節される

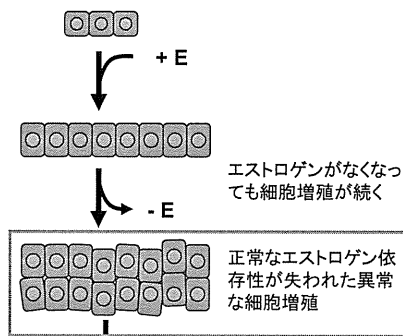
エストロゲン依存性と非依存性（例; 雌性生殖器官の細胞増殖）

エストロゲン依存性



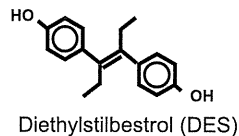
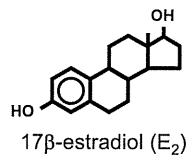
通常、生殖器官(輸卵管、子宮、膣)の細胞増殖・分化はエストロゲンによって調節されている。(例えば女性の月経周期による子宮の変化は血中のエストロゲン濃度に依存している)

エストロゲン非依存性



乳癌、子宮癌、膣癌など

周生期エストロゲンによる組織不可逆化(DES シンドローム)



1938 DESの合成 (Dodds et al., *Nature*, 141: 247-248, 1938)

1945 - 1976 : 流産防止剤として妊婦に処方

- 安全で効果があるとして、正常な妊婦にも処方された
- 処方された妊婦の総数は不明であるが、世界中では2-8 百万人と推定されている。

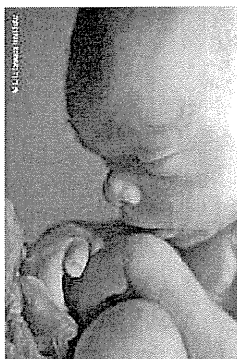
1962 : 出生直後のエストロゲン投与によるマウス膣の前癌病変 (Takasugi, Bern and DeOme: *Science*, 138: 438-439, 1962)

1971 : 悪影響 (Herbst et al., *N. Engl. J. Med.*, 284: 878-881, 1971)

- 胎児期に曝露を受けた女性で低頻度ながら膣癌が発症
- 高頻度で、男性、女性ともに生殖器官の機能異常

胎児期の影響が大人で現れる

内分泌かく乱と胎児の発達



大人での病気のいくつかは胎児期の環境によりプログラムされている証拠が増えている。

胎児期にDESの投与を受けた女性の例

“Fetal Basis of Adult Disease”

SPECIAL CONTRIBUTION

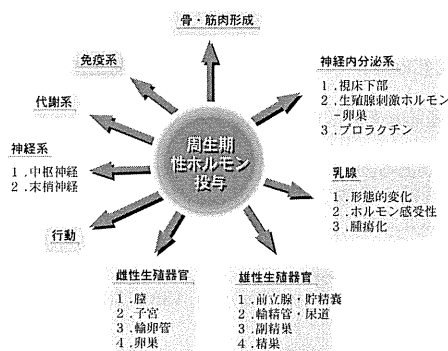
Fertil. Steril. 2008.

Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing

D. Andrew Cruin, Ph.D.,^a Sarah J. Janssen, M.D., Ph.D., M.P.H.,^b Thea M. Edwards, Ph.D.,^c Jerrold Heindel, Ph.D.,^d Shuk-mei Ho, Ph.D.,^e Patricia Hunt, Ph.D.,^f Taisen Iguchi, Ph.D.,^g Anders Juul, M.D.,^h John A. McLachlan, Ph.D.,ⁱ Jackie Schwartz, M.P.H.,^j Niels Skakkebaek, M.D.,^h Ana M. Soto, M.D.,^k Shanna Swan, Ph.D.,^l Cheryl Walker, Ph.D.,^m Teresa K. Woodruff, Ph.D.,ⁿ Tracey J. Woodruff, Ph.D., M.P.H.,^j Linda C. Giudice, M.D., Ph.D.,^o and Louis J. Guillette, Jr., Ph.D.^e

^a Maryville College, Maryville, Tennessee; ^b Natural Resources Defense Council, San Francisco, California; ^c Department of Zoology, University of Florida, Gainesville, Florida; ^d National Institute of Environmental Health Sciences, Division of

新生児期DES 投与マウスモデル

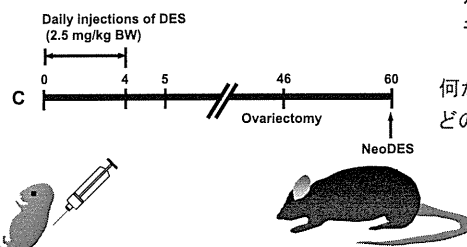


新生児期DES 投与マウスモデル(生殖器官)

- ・ 臨界期がはっきりしている
生後3日(組織分化の決定時期と同じ)
- ・ 高い再現性
- ・ わかりやすいエンドポイント
組織学的に明らか
- ・ 組織自律的
他の器官の影響を受けていない
- ・ BPAなどでも誘導できる
- ・ ヒトでの例

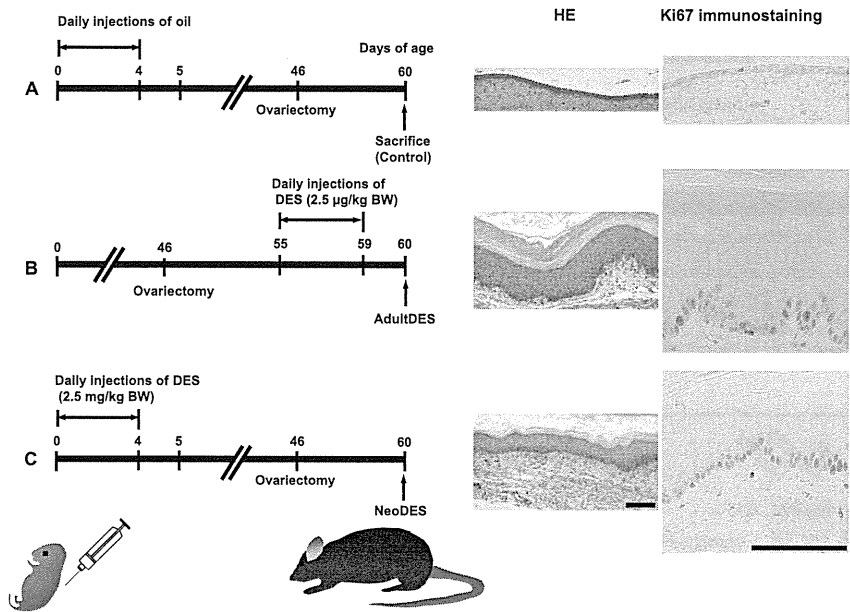


化学物質の発生発達期個体への遅発性影響の普遍的なメカニズムを提案

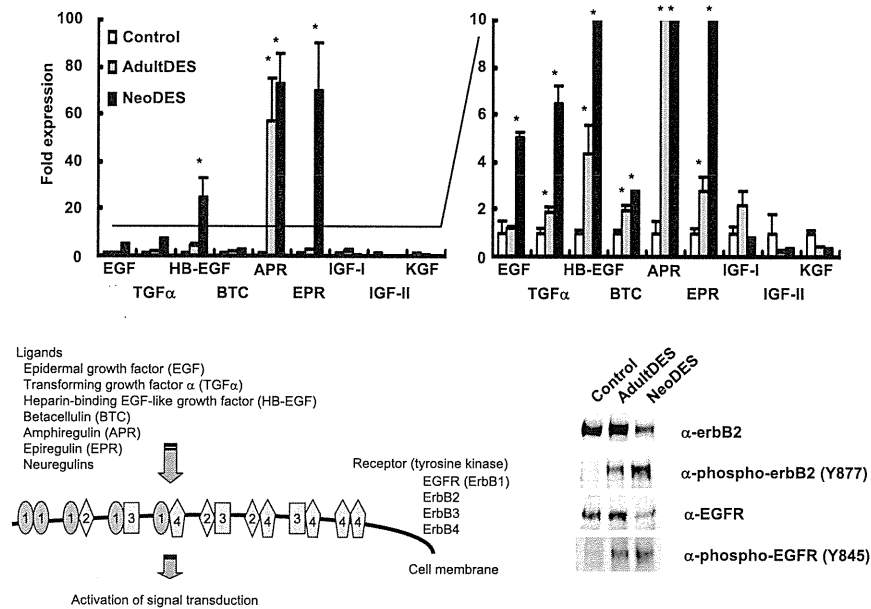


何が起きているのか?
どのようにして起きるのか?

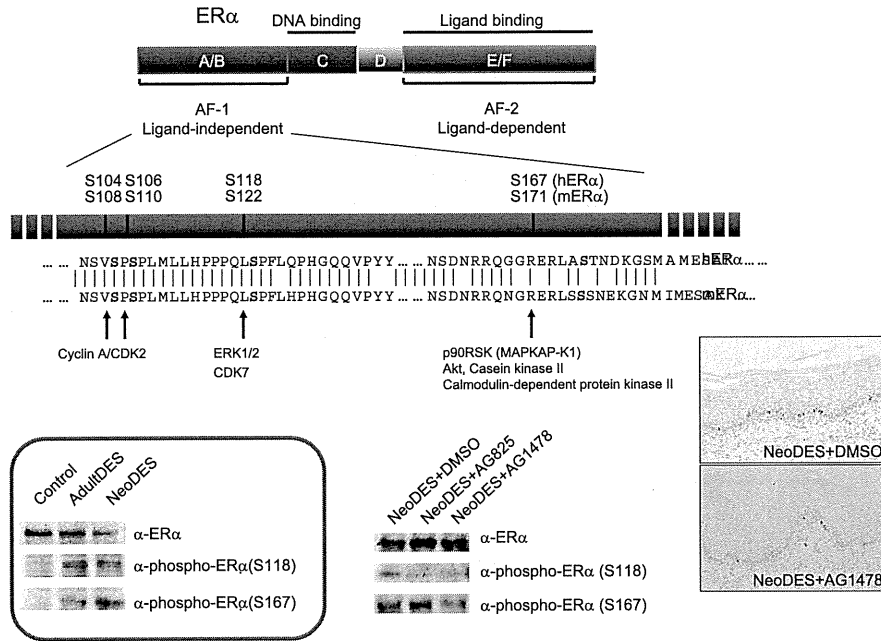
Histological Changes and Ki67 Immunostaining in Mouse Vagina Induced by Neonatal DES



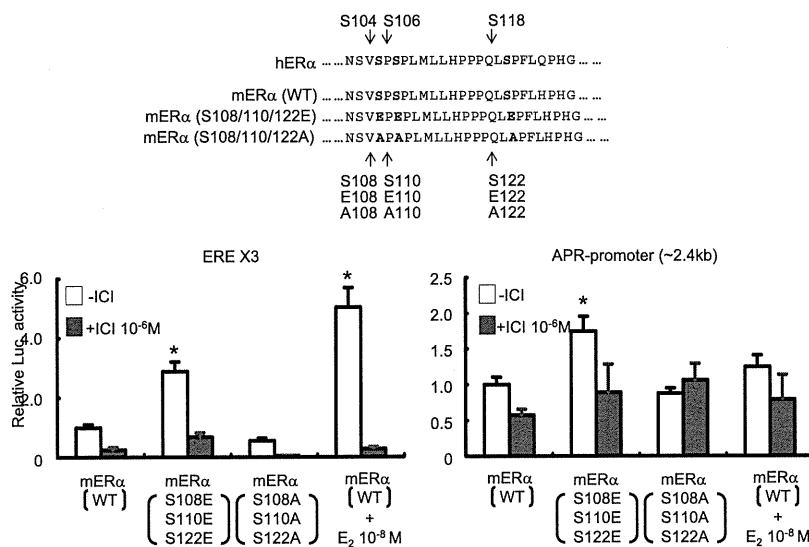
Estrogen-induced growth factor expression in mouse vagina



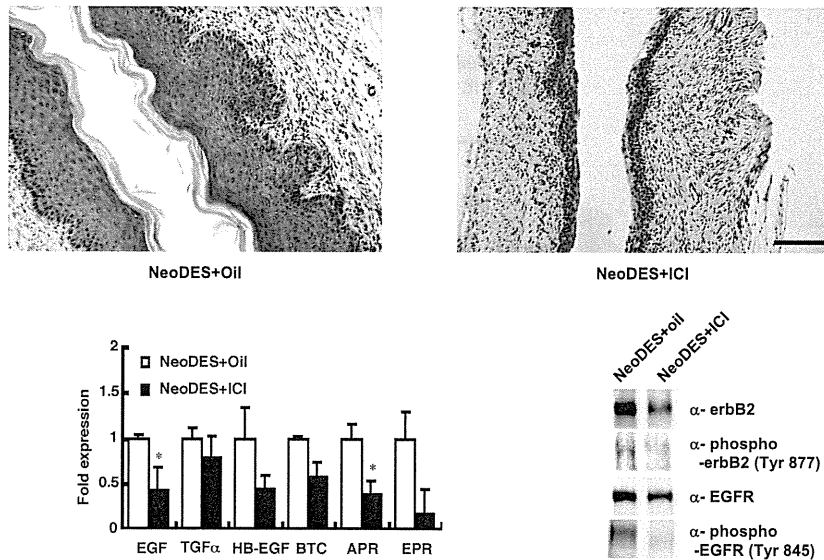
ER α phosphorylation induced by EGF in mouse vagina



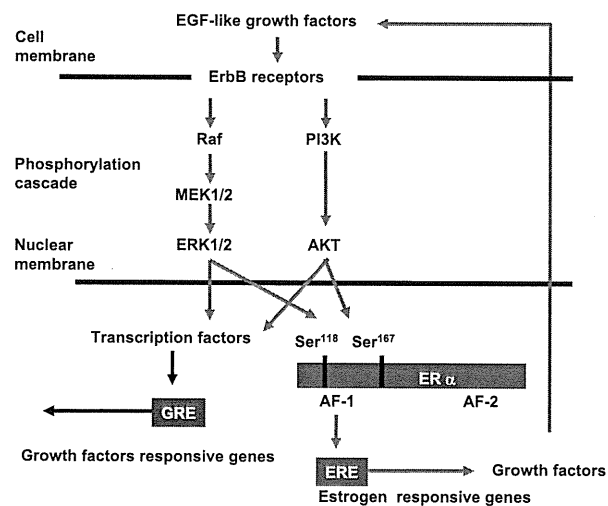
Constitutive active (CA) mER α induced estrogen responsive/amphiregulin reporter activity

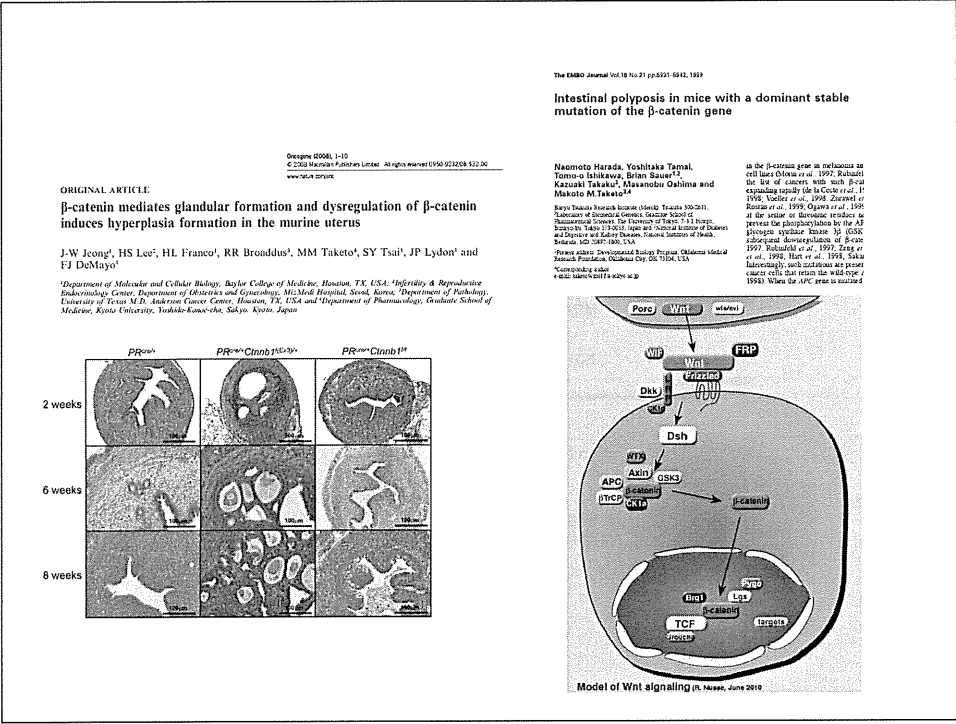
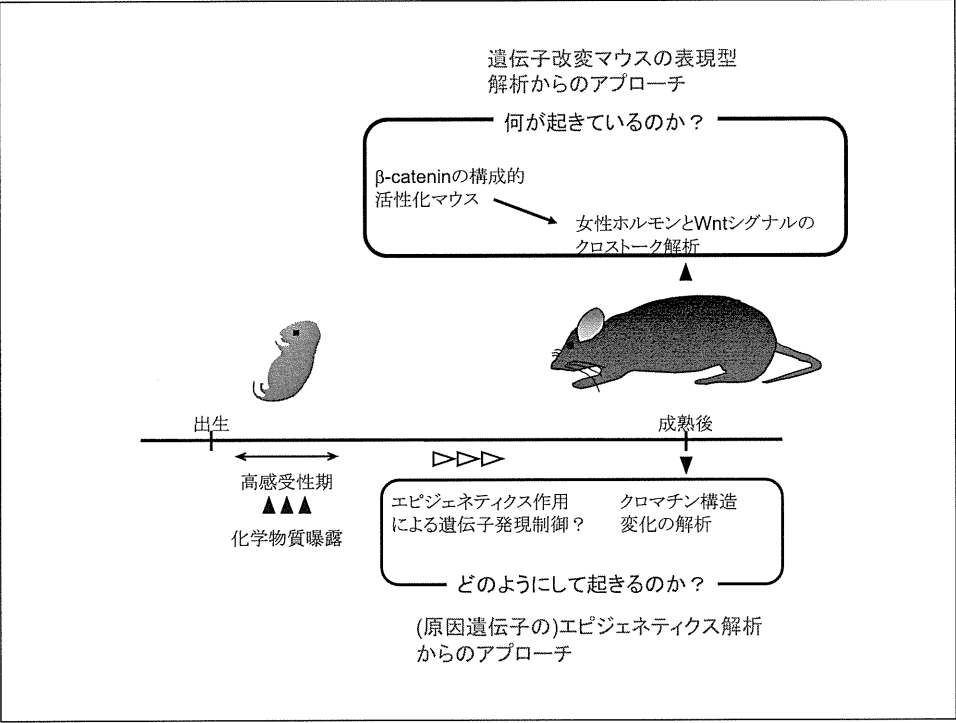


Effects of ICI administration on neoDES mouse vagina

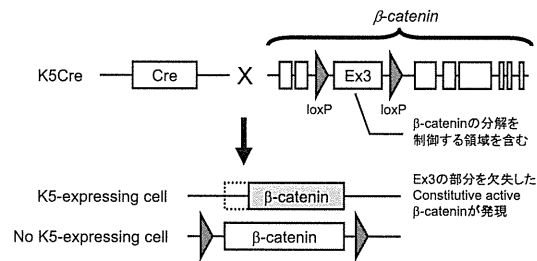


Hypothetical model for the estrogen-independent ER and growth factors activation pathway in mouse vagina





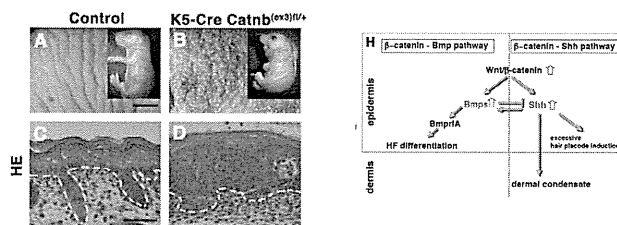
Effects of constitutive active β -catenin in mouse vagina



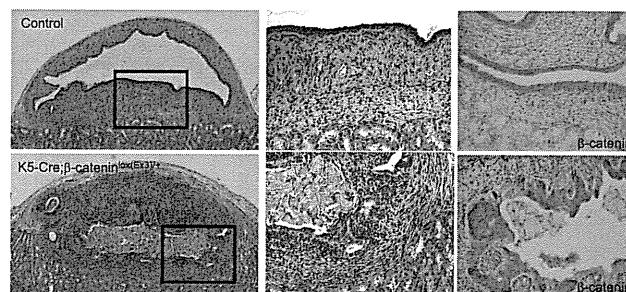
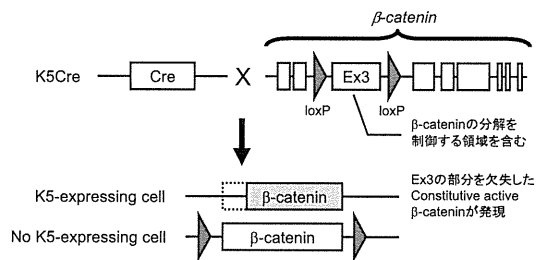
Development 136, 367-372 (2009) doi:10.1242/dev.021295

Embryonic hair follicle fate change by augmented β -catenin through Shh and Bmp signaling

Kentaro Suzuki^{1,2}, Yuji Yamaguchi³, Mylah Villacorte^{1,2}, Kenichiro Mihara¹, Masashi Akiyama⁴, Hiroshi Shlimizu⁴, Makoto M. Taketo⁵, Naomi Nakagata¹, Tadasuke Tsukiyama⁶, Terry P. Yamaguchi⁷, Walter Birchmeier⁸, Shigeaki Kato⁹ and Gen Yamada^{1,2,*}

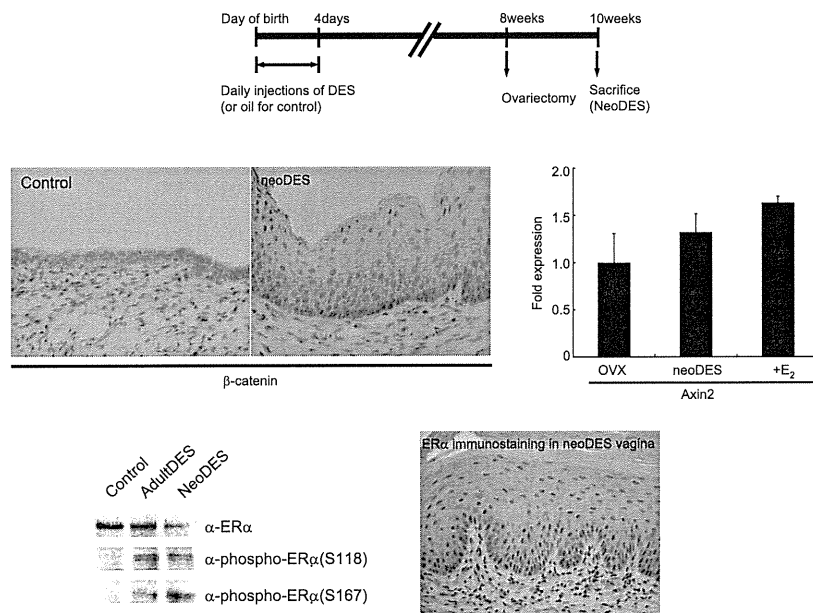


Effects of constitutive active β -catenin in mouse vagina

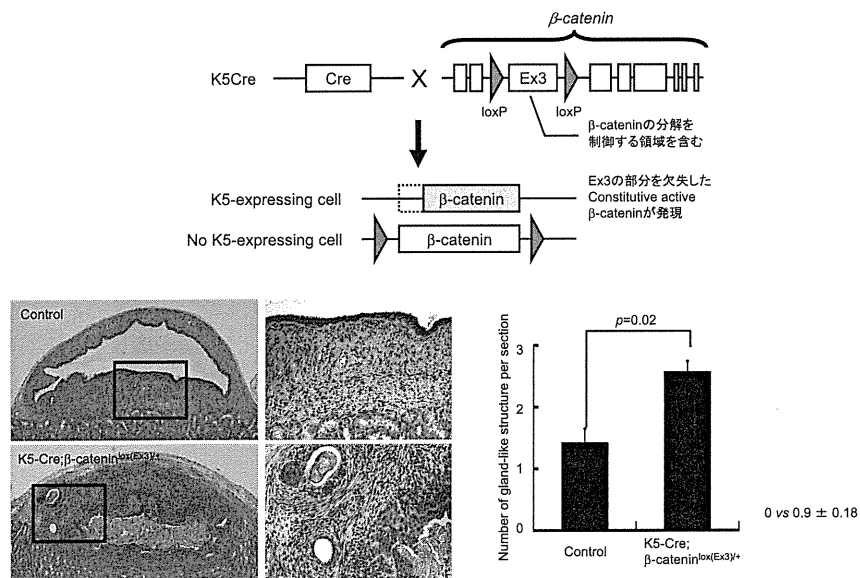


K5Cre/+ (♂) X β -catenin^{Ex3/Ex3} (♀) → E18.5で帝王切開、腔組織をヌードマウス腎臓皮膜下(卵巣は除去しておく)に移植、3〜4週間後に採材、組織学的解析へ

β -catenin expression in neoDES mouse vagina



Effects of constitutive active β -catenin in mouse vagina



Roles of p63 in the diethylstilbestrol-induced cervicovaginal adenosis

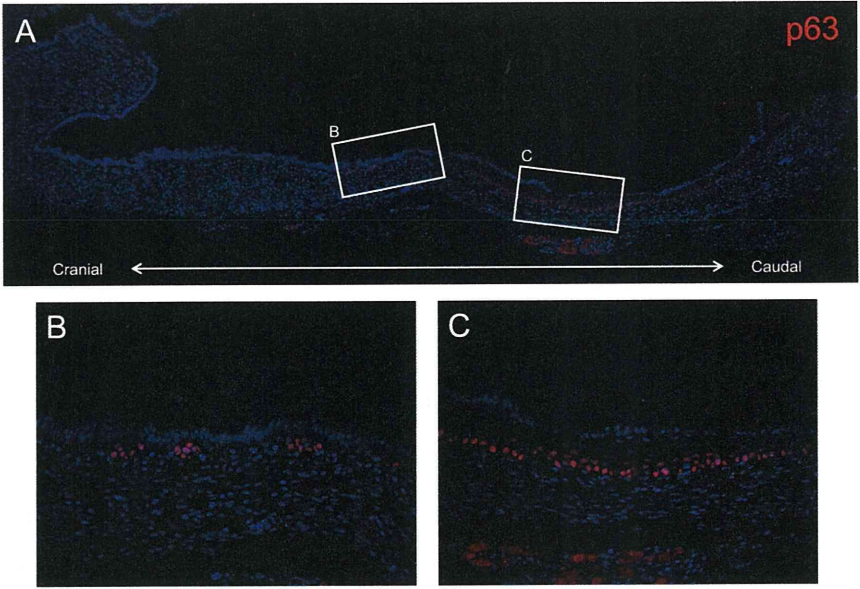
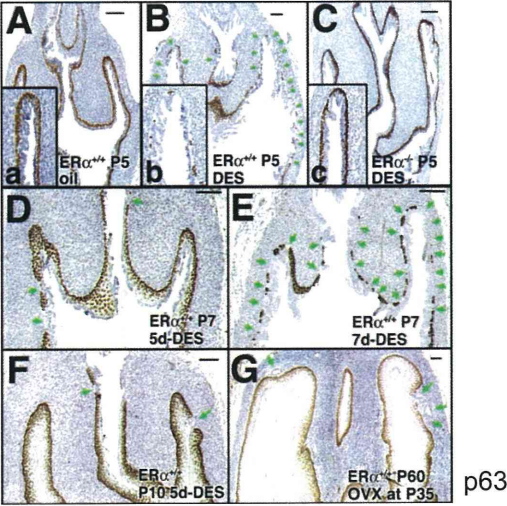
Takeshi Kurita^{1,*}, Alex A. Mills² and Gerald R. Cunha¹

¹Department of Anatomy, University of California, San Francisco, CA 94143-0452, USA

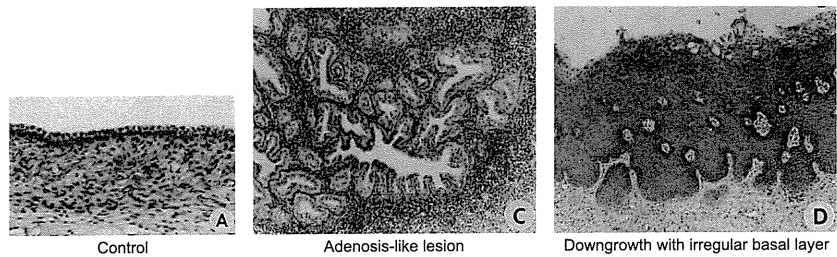
²Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 11724, USA

*Author for correspondence (e-mail: tkurita@ucsf.edu)

Accepted 15 December 2003

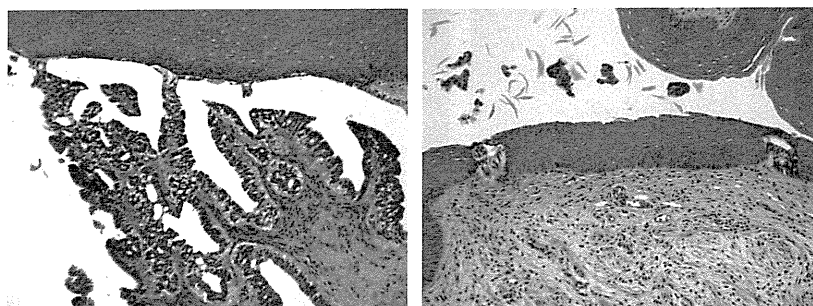
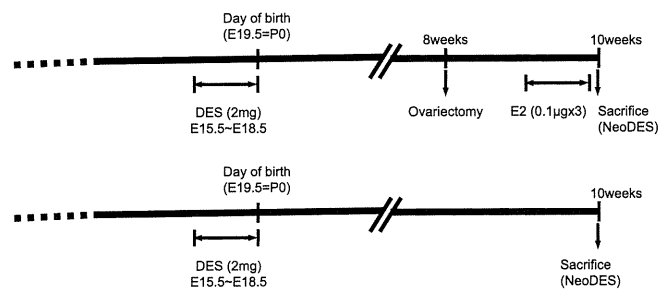


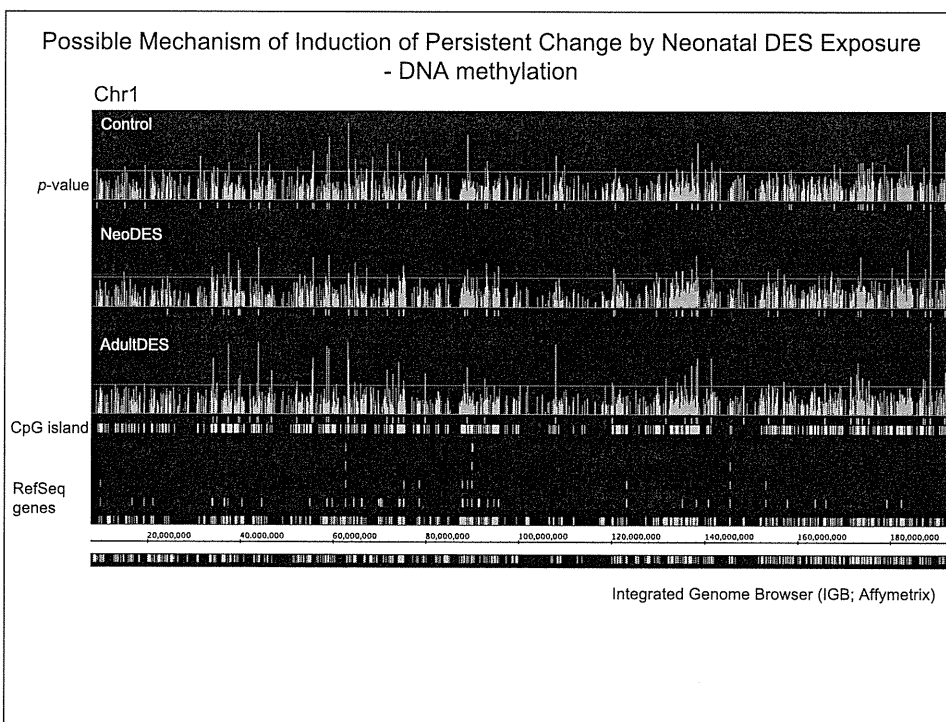
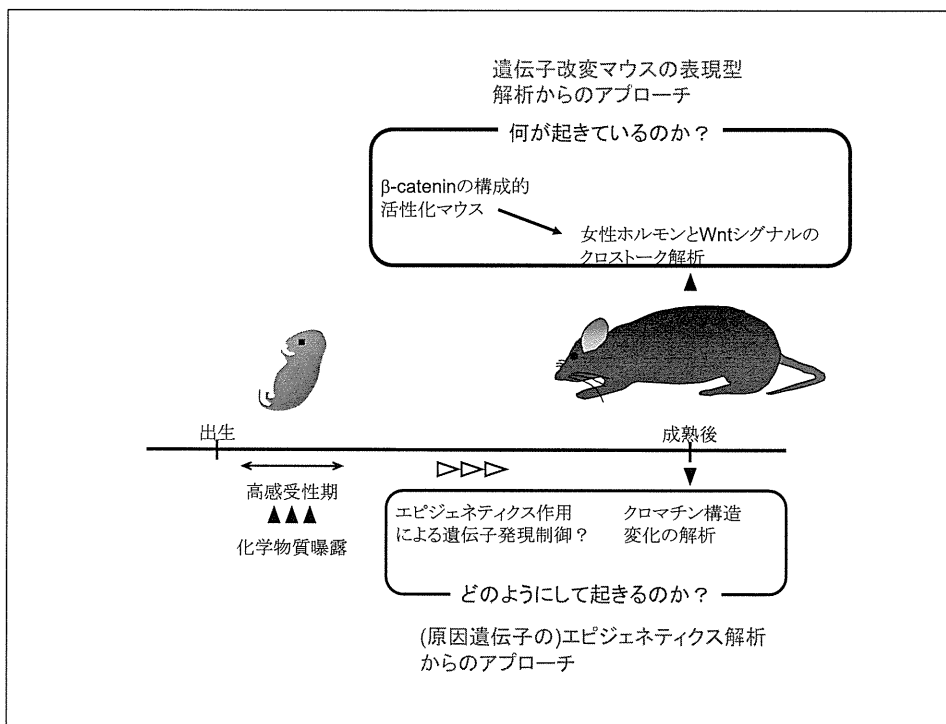
Vaginal abnormalities by prenatal DES-exposure in mouse vagina



Ozawa et al., 1991 (58) 167-175

Vaginal abnormalities by prenatal DES-exposure in mouse vagina





謝辞

菅野 純 先生（国立医薬品食品衛生研究所）
五十嵐 勝秀 先生（国立医薬品食品衛生研究所）
渡邊 肇 先生（大阪大学）

竹田 潤二 先生（大阪大学）
武藤 誠 先生（京都大学）
加藤 茂明 先生（東京大学）
山田 源 先生（和歌山県立医科大学）

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

化学物質による遅発影響標的分子としての mRNA 修飾機構の解析、及び OECD/WHO 対応

研究分担者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

研究協力者 高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 室長

五十嵐勝秀 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部主任研究官

安彦行人 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部主任研究官

研究要旨

これまでの研究で ES/EB(胚様体)培養系において non-coding RNA の Malat-1 が低濃度 (1nM)で増加することをマイクロアレイ解析の実験で観察した。この BPA により増加する Malat-1 遺伝子の発現機構を調べるため、BAC クローンから Malat-1 遺伝子上流 9k を含む Malat-1 遺伝子のプロモーター解析用ベクターの構築を行った。また、Malat-1 を含む EB で増加した遺伝子発現の用量反応性を調べるため、ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で、天井培養法で培養し、BPA を 0.1、1、10、100nM の濃度で添加し、24 時間後に形成された EB を対象に定量 PCR を行った。その結果、100nM で ESR1 及び ERRG の有意な増加が認められた。

A. 研究目的

本研究は、胚様体(EB)において、低濃度 BPA で発現が増加することを見出した non-coding RNA の Malat-1 を中心に解析し、以って、エストロゲン様物質による遅発影響の分子標的としての mRNA 修飾機構を明らかにするものである。また、太田研究分担員と共に先行研究で培った「齧歯類生涯試験法」の検証研究を並行し、OECD の「拡張一世代試験」の完成を促すとともに、厚労省「試験スキ-

ーム」の拡充を提案する。

B. 研究方法

1. Malat-1 遺伝子発現のプロモーター解析
ゲノム配列データベースから、Malat-1 遺伝子(転写産物コード領域)の上流約 10kb はヒトとマウスの間で保存性が高いことが分かっている。この領域に、BPA に応答して Malat-1 発現を上昇させる制御配列が存在する可能性は高い。今年度は BPA による