

Malat-1 遺伝子発現機構解析のため、この上流域を含むルシフェラーゼベクターの構築を行った(図1参照)。

2.ES/EB 培養系におけるBPA 応答遺伝子の定量 PCR 法を用いた用量反応解析

これまでにBPA (1nM)をES/EB 培養系に添加することにより、Malat-1 遺伝子を含め、複数の遺伝子が増加することを見出した。これら遺伝子発現の用量反応性を確認するため定量 PCR を実施した。ES 細胞を LIFを除いたES培地で、天井培養法で培養し、その期間中 DMSO(final 0.1%)に溶解したBPAを0.1、1、10、100nMの濃度で添加した。培養開始 24 時間後、形成されたEBを採取した。1サンプルに144個のEBを用いた。Total RNAをキアゲン社のRNAeasyにて抽出、逆転写反応後、BPAの標的受容体として知られているESR1(estrogen receptor 1)、ERRG(estrogen related receptor gamma)とMalat-1の3種のプライマー(下記に配列を示す)を用いてABI社の定量PCR装置PRISM7900HTにて定量PCRを行った。なお、これとマイクロアレイの結果を対応させるため、アフィメトリクス社のGene Chip Mouse Genome 430 2.0の該当遺伝子のプローブセット内にPCRプライマーを設計した。

プライマー配列

<ESR1>

F:5'-ATG CCC ACC GCC TTC ATG CC-3'

R:5'-GCC CTC TGC TTC CGG GGG TA-3'

<ERRG>

F:5'-GGA AGA CCC TCG CCG TGC AG-3'

R:5'-TGC CTT GGT GGA GGT CTG CCT-3'

<Malat-1>

F:5'-TGG AGG CTG ACC AGA GCA GTT T-3'

R:5'-CAA GGC CGA CCT TCA AAC TAG AAC C-3'

解析には定量的比較を正確に行うために、下記の5種のspikeの検量線用プライマー(Bacillus subtilis RNAsequence)を用いて我々の開発したPercellome手法(細胞1個当たりのmRNA絶対量を得る遺伝子発現解析手法)を適用した。

<AFFX-TrpX-3_at>

F:5'-TTC TCA GCG TAA AGC AAT CCA-3'

R:5'-GCA AAT CCT TTA GTG ACC GAA TAC C-3'

< AFFX-DapX-3_at>

F:5'-TCA GCT AAC GCT TCC AGA CC-3'

R:5'-GGC CGA CAG ATT CTG ATG ACA-3'

< AFFX-PheX-3_at >

F:5'-GCC AAT GAT ATG GCA GCT TCT AC-3'

R:5'-TGC GGC AGC ATG ACC ATT A-3'

< AFFX-LysX-3_at >

F:5'-CCG CTT CAT GCC ACT GAA TAC-3'

R:5'-CCG GTT CGA TCC AAA TTT CC-3'

< AFFX-ThrX-3_at >

F:5'-CCT GCA TGA GGA TGA CGA GA-3'

R:5'-GGC ATC GGC ATA TGG AAA C-3'

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、当該施設の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用など苦痛の少ない方法を用いる。

C. 研究結果

1. Malat-1 遺伝子発現のプロモーター解析

C57BL/6 マウスの Malat-1 遺伝子およびその上流・下流領域を含む BAC (細菌人工染色体) クローン (RP23-9E19) を In vitro 社から入手し、Malat-1 上流 9kb を制限酵素 EcoRI および NheI で切り出してレポーターベクター pGL4-23 (プロメガ社) に挿入し、ベクターを構築した (図2)。

2. ES/EB 培養系における BPA 応答遺伝子の定量 PCR 法を用いた用量反応解析

ESR1、ERRG の定量 PCR の結果、BPA の 100nM の添加により、それぞれ有意な発現増加が認められ、10nM 以下の用量で増加傾向が認められた (図3)。なお、Malat-1 については現在、解析を行っている。

OECD 関連では、内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関する OECD/EDTA 第三回アドバイザグループ会合 (2011.12.12-13 於 パリ) に出席し、厚生労働科学研究の進捗を報告した。

D. 考察

レポーター (Malat1-luciferase) を構築することが出来たので、今後、このレポーターを ES 細胞等の適切な培養細胞系に導入し、BPA 添加によりルシフェラーゼ活性が上昇することを確認する。データベース上に報告されているシグナル応答配列候補の情報等も参考に、組み込んだ Malat1 上流配列に点変異や欠失を導入し、BPA 応答に関わる配列の詳細な同定を目指す。BPA の ES/EB 系における ESR1、ERRG の定量 PCR の結果、BPA の 100nM の添加により、それぞれ有意な発現増加が認められ、10nM 以下の用量で増加傾向が認められた。このことから BPA が ES/EB 培養系においてこれら受容体の発現増加を起こすことが明らかとなった。他の研究者により、マウス胎児前立腺間葉系細胞に対して BPA は ESR1 と AR (androgen receptor) の発現増加を起こすことが報告されている (Environ Health Perspect, 115, 902, 2007)。AR に関してはこれまでのマイクロアレイの結果、1 日後から、発現増加が認められることを確認しており (図4)、前立腺だけでなく、初期胚においてもこれらのホルモン受容体の発現誘導を BPA が起こしている可能性が示唆された。今後、低用量域でのこれら遺伝子の発現をさらに検討するとともに、未分化な ES 細胞においても同様の結果が認められるか検討する予定である。

E. 結論

Malat1 遺伝子上流 9kb 含むレポーターベクターを構築した。ES/EB に対する BPA の影響を定

量 PCR 用いて解析した結果、ESR1 及び ERRG の有意な増加が見られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato S., GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature*. 2011 Nov 27. doi: 10.1038/nature10656.

Fujimoto N, Kitamura S, Kanno J., Androgen dependent transcription of a mouse prostatic protein gene, PSP94: Involvement of estrogen receptors., *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Nov;127(3-5):301-6.

Matsukura H, Aisaki K, Igarashi K, Matsushima Y, Kanno J, Muramatsu M, Sudo K, Sato N., Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells., *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 26;412(2):366-72.

Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Okada M, Imai Y, Ni M, Meyer CA, Igarashi K, Kanno J, Brown M, Kato S., PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B., *Nat Cell Biol*. 2011 Jun;13(6):668-75.

Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y., Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus., *Biol Reprod*. 2011 Apr;84(4):734-42.

2. 学会発表

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、パーセローム(Percellome)法を用いた定量的トランスクリプトミクスによる遺伝子発現ネットワーク描出による毒性解析の試み、第 34 回日本高血圧学会総会 SHR 学会合同シンポジウム(2011.10.22)(宇都宮)、口演

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、中枢神経系の発生-発達期における神経活動かく乱による遅発性中枢影響解析—幼若期雄マウスへのアセフェートによる成熟後の脳高次機能障害について—、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会(2011.7.13) (横浜)、口演

種村健太郎、五十嵐勝秀、佐藤英明、菅野 純、発生・発達期のビスフェノール A 暴露による遅発中枢影響解析、第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー(2011.7.8) (仙台)、ポスター

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

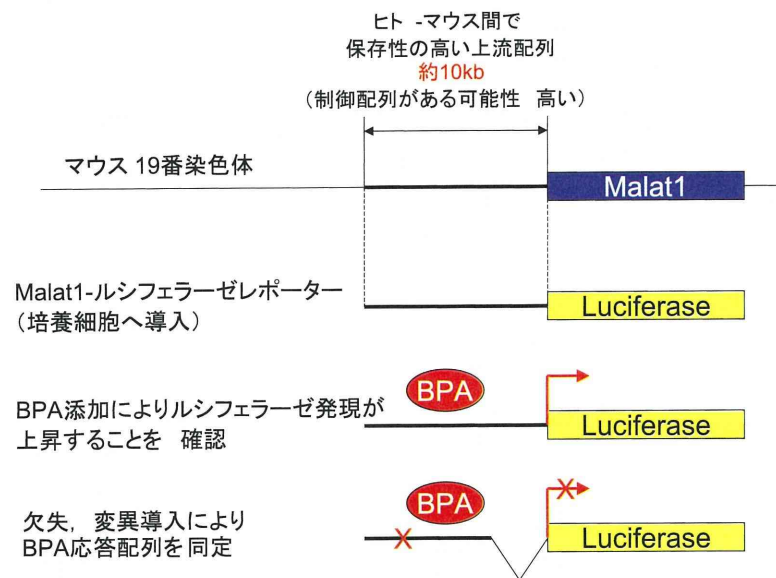
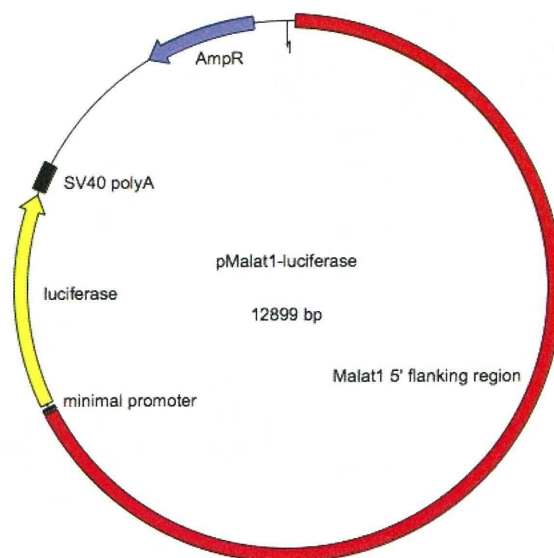


図 1. Malat-1-ルシフェラーゼレポーターの構成とそのアッセイ法の概略



Plasmid name: pMalat1-luciferase
Plasmid size: 12899 bp
Constructed by: Yukuto YASUHIKO
Construction date: 2012/02/08
Comment&Reference:

図 2. 構築された Malat-1-ルシフェラーゼレポーターの構造

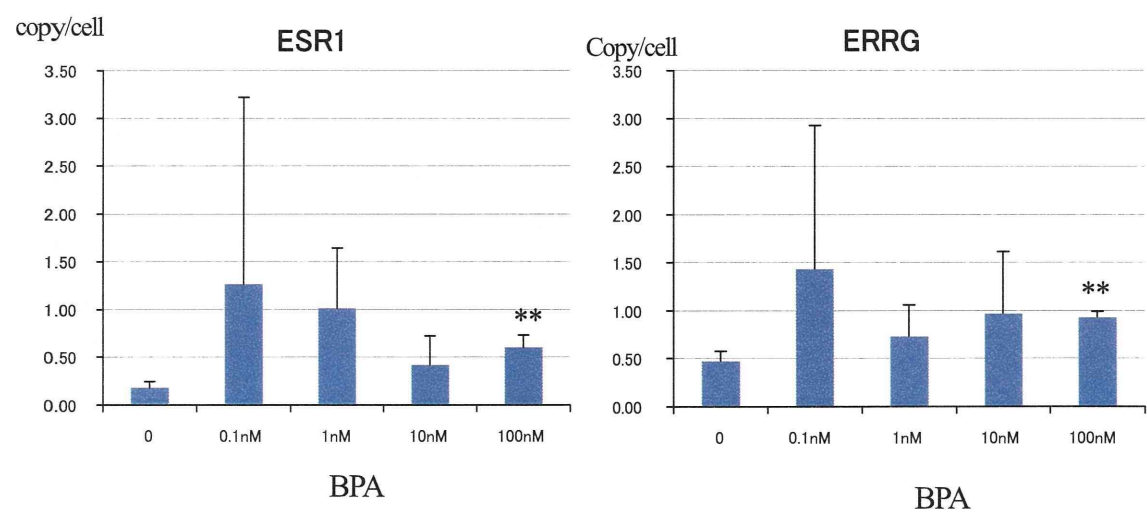


図 3. ES/EB 培養系における BPA 添加による ESR1 及び ERRG の定量 PCR 結果

**; $p < 0.01$

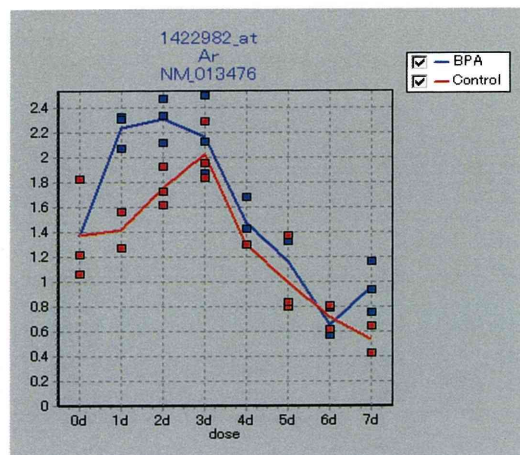


図 4.ES/EB 分化過程での Androgen receptor の発現変動(マイクロアレイ解析の結果より)
縦軸は遺伝子発現量 (copy/cell)

平成23年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：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)

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

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

菅 野 純
高 木 篤 也
五十嵐 勝秀
安 彦 行 人

平成23年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：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)

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

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

菅 野 純
高 木 篤 也
五十嵐 勝秀
安 彦 行 人

OECD関連:

2011年12月12～13日(パリ) 内分泌かく乱化学物質の試験
及び評価に関するOECD/EDTA第三回アドバイザーグループ
会合に出席し、厚生労働科学研究の進捗を報告した。

4

MHLW (Ministry of Health Labour and Welfare)
Endocrine Disruptor Committee:
Screening and Testing Scheme for Endocrine
Disrupting Chemicals

Introduction of recent activities on EDC by
MHLW Science Research Fund

Jun Kanno, MD, PhD,
Division of Cellular and Molecular Toxicology,
Biological Safety Research Center,
National Institute of Health Sciences, Tokyo.

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

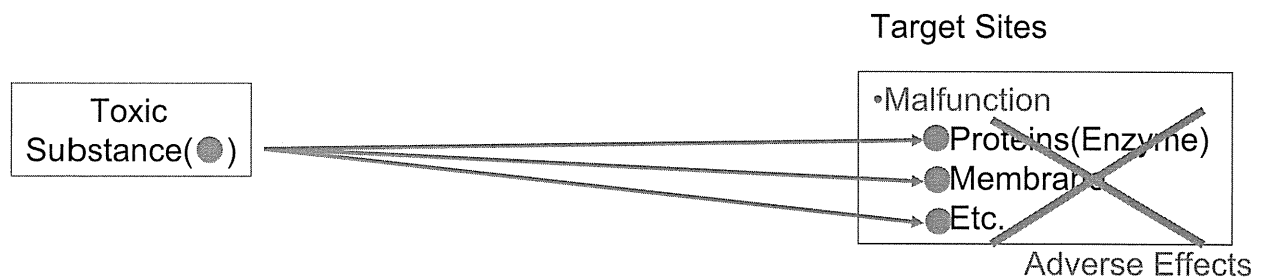
A Paradigm-Shift in Toxicology

| Traditional (Regular) Toxicology | Receptor-Mediated Toxicology | Dose-Range |
|---|---|--|
| <p>Regular Toxicity (Membrane damage, Enzyme damage, etc.)</p> <p>NOEL of Trad Tox</p> | <p>AR system (antagonist) H</p> <p>ER system (agonist) UT</p> | <p>$10^{-6} - 10^{-7} \text{ M}$</p> <p>$10^{-9} - 10^{-10} \text{ M}$</p> |

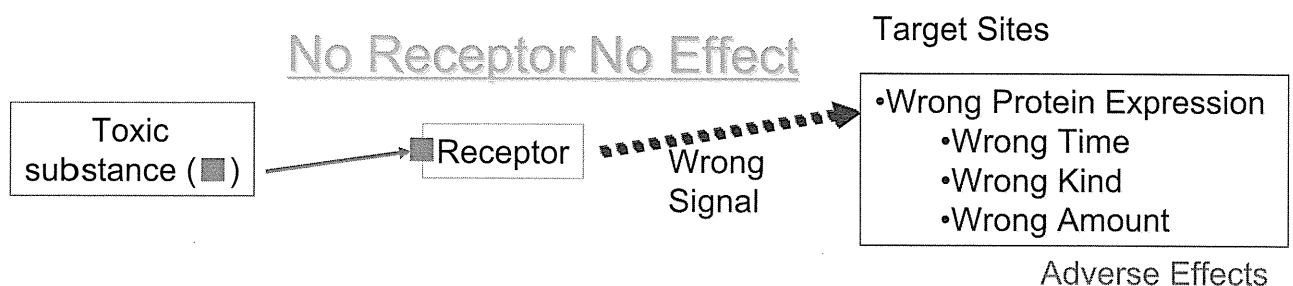
Reference : Oral contraceptive -- EE = ca. $0.5 \mu\text{g/kg/day}$
(P=1.0mg/tab EE=0.035mg/tab)

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

Traditional Toxicity



Receptor-Mediated Toxicity = Signal Toxicity



OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

7

THE POSTNATAL DEVELOPMENT OF THE VISUAL CORTEX AND THE INFLUENCE OF ENVIRONMENT

Nobel lecture, 8 December 1981

by

TORSTEN N. WIESEL

Harvard Medical School, Department of Neurobiology,
Boston, Massachusetts, U.S.A.

David H. Hubel & Torsten N. Wiesel "for their discoveries concerning information processing in the visual system"

.... The design of these experiments was undoubtedly influenced by the observation that children with congenital cataract still have substantial and often permanent visual deficits after removal of the cataract and proper refraction.....

OECD-EDTA-AG 2011-1

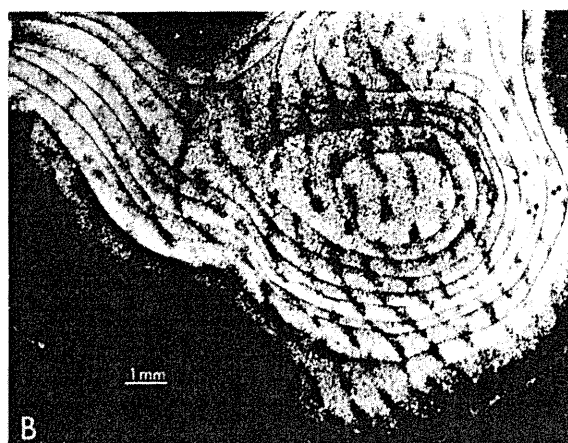


Fig. 3. Dark field autoradiographs of monkey striate cortex following injection of ³H-proline in the vitreous of one eye 2 weeks before.

A: Normal monkey, a montage of a series of tangential sections through layer IVC. The light stripes, representing the labelled eye columnus, are separated by gaps of the same width representing the other eye. B: Monocularly deprived monkey, again a montage from a series of tangential sections through layer IVC. Same monkey as in Fig. 1, right, and Fig. 2, which had the right eye closed at 2 weeks for 18 months. The input from the normal eye is in form of expanded bands which in places coalesce, obliterating the narrow gaps which represent the columns connected to the closed eye.

8

THE POSTNATAL DEVELOPMENT OF THE VISUAL CORTEX AND THE INFLUENCE OF ENVIRONMENT

Nobel

by

TOR

Harv

Bost

Toxicological Interpretation
= Pure Signal Toxicity

No direct cytotoxic/cytocidal stimulation

Inappropriate signal input during critical period

Children with congenital cataract still have substantial and often permanent visual deficits after removal of the cataract and proper refraction.....

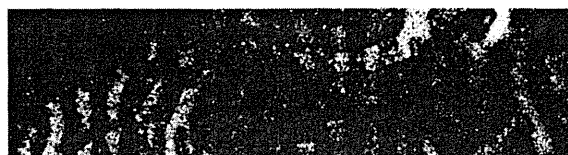
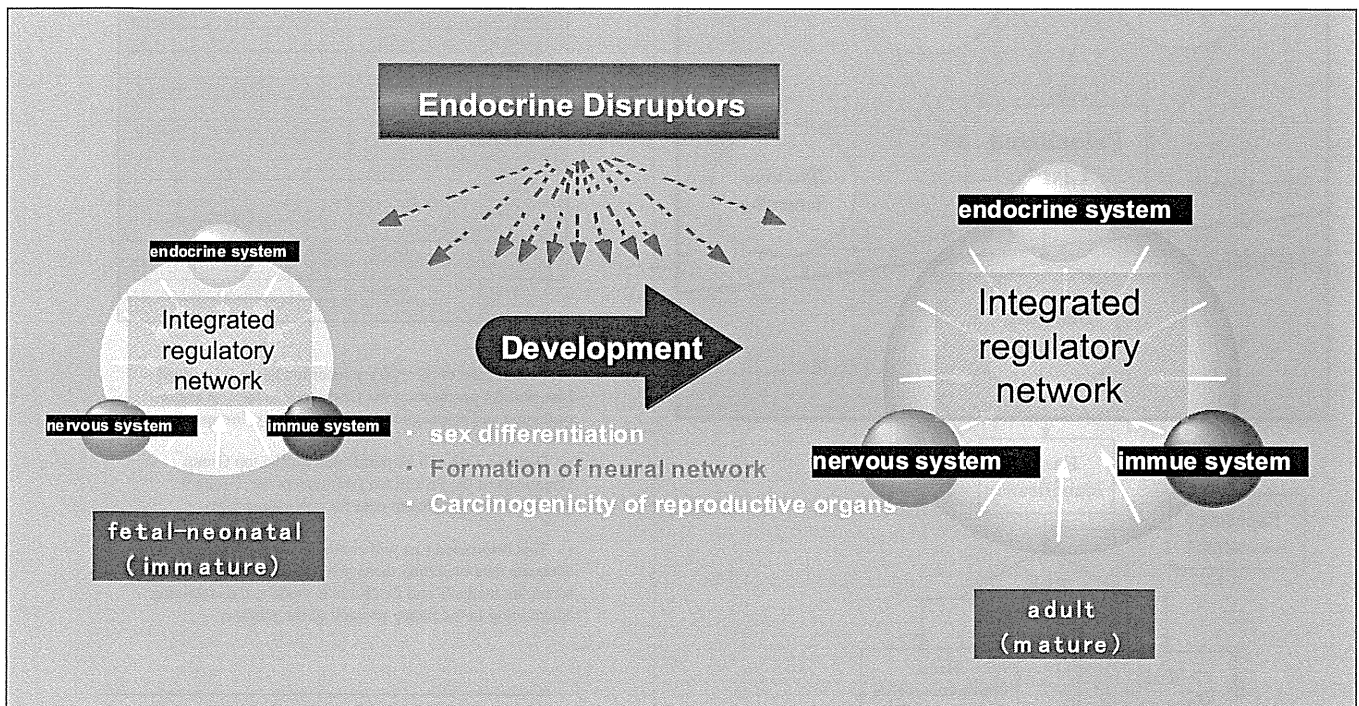


Fig. 3. Dark field autoradiographs of monkey striate cortex following injection of ³H-proline in the vitreous of one eye 2 weeks before.

A: Normal monkey, a montage of a series of tangential sections through layer IVC. The light stripes, representing the labelled eye columnus, are separated by gaps of the same width representing the other eye. B: Monocularly deprived monkey, again a montage from a series of tangential sections through layer IVC. Same monkey as in Fig. 1, right, and Fig. 2, which had the right eye closed at 2 weeks for 18 months. The input from the normal eye is in form of expanded bands which in places coalesce, obliterating the narrow gaps which represent the columns connected to the closed eye.

OECD-EDTA-AG 2011-1

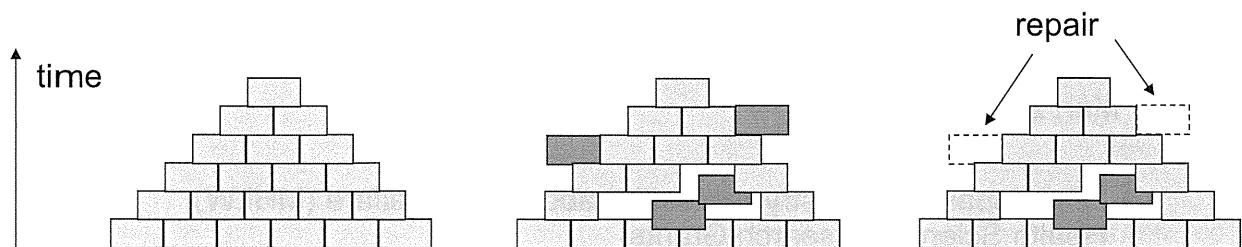
Sensitive time window and adverse effects



OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

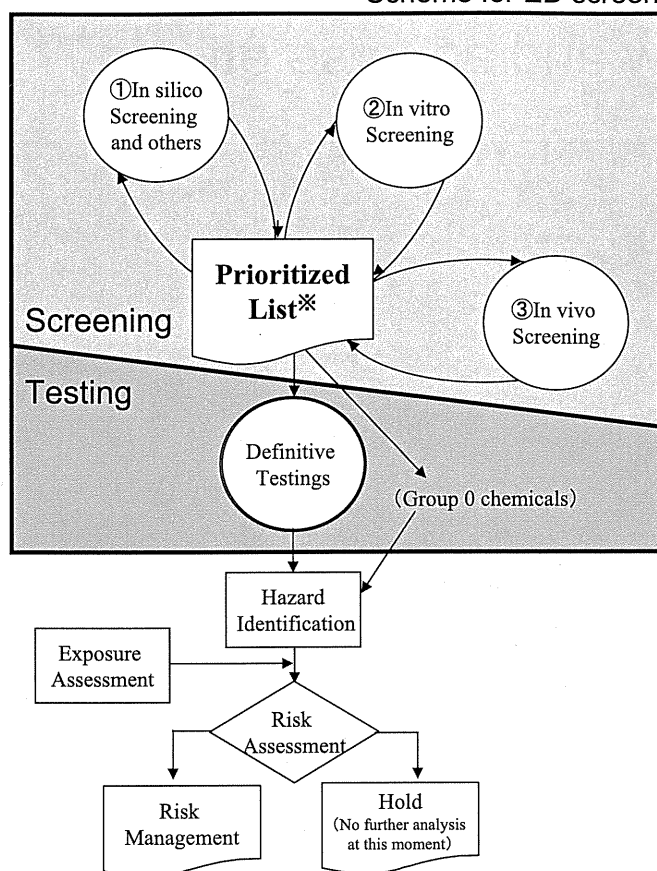
Characteristics of signal toxicity in embryo/fetus, neonate and children

- **Target:**
 - Neuronal system, Immune system, Endocrine system (under neuro)
- **Key**
 - Systems that keep MEMORY = Stepwise build up of the system
 - Disruption during building up cannot be perfectly repaired
 - Level of disruption (toxicity)
 - Cell death (loss) level [non-receptor mechanism]
 - Non-cell death level => Wiring defect / circuit defect [receptor-mediated]



OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

Scheme for ED screening and testing (MHLW)



※ Priority List of Chemicals to Submit to Detailed Testing for Risk Assessment (the Prioritized List)

| Priority Groups | Compound Name | In silico Screening and others* | In vitro Screening | In vivo Screening |
|--|---------------|---------------------------------|--------------------|-------------------|
| Group 0 (Sufficient data for Risk Assessment) | ○○○ | *** | *** | *** |
| Group 1 (In vitro - Positive) | ○○○ | *** | Positive** | Positive |
| Group 2 (In vitro - Negative) | ○○○ | *** | Positive | Negative |
| Group 3 (In vitro - Positive) | ○○○ | *** | Positive | |
| Group 4 (In vitro - Negative) | ○○○ | *** | Negative | |
| Group 5 (No in vitro and in vivo data) | ○○○ | *** | | |
| Group 6 (No available data) | ○○○ | | | |

• Test Results of ①~③ are recorded to the Prioritized List, and the positions of the Chemicals in the List are re-evaluated and re-assigned to proper priority Groups.

• Detailed Test will be performed for the top Group Chemicals of the Prioritized List (except for Group 0 chemicals with sufficient data for risk assessment).

• This Prioritized List will continuously incorporate adequate data including those generated by newly developed screening methods and mechanistic studies, thus retaining adaptability to the future revision of the scheme.

*: Others include background information from literatures
 **: Positivity/Negativity can be substituted by measured values including IC50, EC50, etc.

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

The Scheme

- Since 1998, multiple Research Groups have been funded for studying EDCs issue by MHLW*
- MHLW Screening and Testing Scheme for Endocrine Disrupting Chemicals (2002 (ver.1) and 2005 (ver. 2).
- Endorsed by the Advisory Committee on Health Effects of Endocrine Disruptors.
<http://www.nihs.go.jp/edc/english/edc.html>
- Three Progress Reports by the Committee are Issued (in Japanese)
 - Nov. 1998
 - Dec. 2001
 - Mar. 2005

*The Japanese Ministry of Health Labour and Welfare (MHLW)
 Health Science Research Grants.

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

The Endocrine Disruptor Page - Windows Internet Explorer

http://www.nihs.go.jp/edc/english/edc.html

ファイル(E) 編集(E) 表示(V) お気に入り(A) ツール(I) ヘルプ(H)

☆ ☆ The Endocrine Disruptor Page

The Endocrine Disruptor Page

HOME SITEMAP
Chemical Safety Office
Evaluation and Licensing Division
Pharmaceutical and Food Safety Bureau
Ministry of Health, Labor and Welfare

JAPANESE

Last updated date: May 1, 2009

Contents

- HOME
- Advisory Committee
- Actions
 - Scheme
 - Overview
- FAQs
- Reports, etc.
- Links
- Contact

■ Endocrine disruptors

Some chemical substances commonly found in our environment and possible to enter the human body have been found to have hormonal activities. It has also been pointed out that other substances may have hormone-like activities although definitive evidence has not yet been obtained. The concern about endocrine disruptors has thus arisen.

Wildlife studies and findings from endocrinology, endocrine toxicology and reproductive toxicology have indicated that substances with hormonal activities can affect the endocrine system of organisms, which may lead to health problems of individuals, the entire or partial populations, or their offspring. The Ministry of Health, Labor and Welfare has recognized this problem as a major task and established in April 1998 the Advisory Committee on Health Effects of Endocrine Disruptors, which reports to the Director of the then Environmental Health Bureau, to clarify the problem and investigate the action mechanisms of the substances. The Advisory Committee have since been promoting a wide range of studies for that purpose in cooperation with relevant agencies and research institutes.

FAQs
Shortcut to FAQs

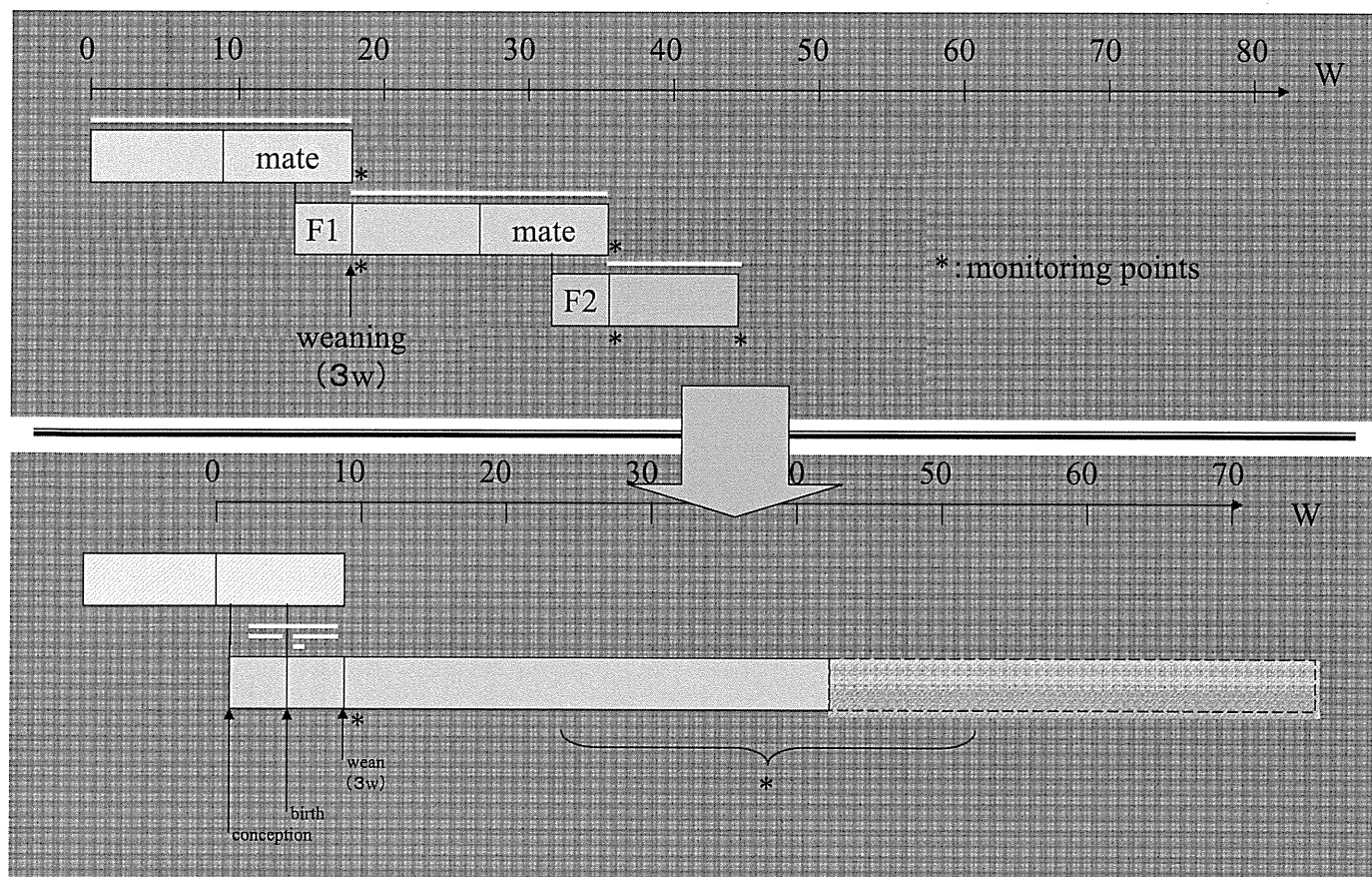
Q.2 What are the endocrine disruptors?

Q.4 How different are environmental hormones from endocrine disruptors?

Q.5 What problems do endocrine disruptors cause?

Q.6 Which substances are thought to be endocrine disruptors?

Q.8 What effects are endocrine disruptors expected to exert?



MHLW Studies (partial)

- Endocrine studies
 - Childrens health studies (incl. embryo/fetus)
- Neurobehavioral studies (cognitive, emotional)
 - Qualitative
 - Mechanistic
 - Quantitative

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

Endocrine Studies

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

- Shimotoono Group (2008~2010)
 - Human nuclear receptor 48 kinds,
 - Binding assay
 - Antibody-sensing method to measure conformation change
 - Reporter gene assay
 - Two-hybrid
 - Bisphenol AF, B, C2, E, Z; Binding
 - Halogenated BPA, Activation/ inhibition
- Makino Group (2008-2010)
 - Human sample analysis;
 - Maternal blood/ urine, cord blood, amniotic fluid, vernix caseosa
 - In vitro epigenome: Murine ES/ Human iPS
 - IVF solution contaminants

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

- Yoshida Group (2010-2012)
 - Critical Period exposure Delayed effect
 - EE PND 0~1, s.c. (mice)
 - EE>0.02 µg/kg; uterus hypertrophy/ irregular cycling/ mammary gland effect
- Usami Group (2010-2012)
 - *In vitro/ ex vivo* Method development
 - Neural crest migration system
 - Cerebral sagittal section culture
 - Human EC derived neuronal stem/ progenitor cell

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

• Nagao Group (2011~13)

– *In vivo* Low dose targets (neuro/ immuno)

- Developing brain, Time-lapse thymidine labeling/ differentiation markers: cortical layer structure modification
- KI mouse: Visualization of ER-positive neurone dendrite/axon (Tau-ER mouse)
- Molecular targets in immune system

– Delayed effect targets

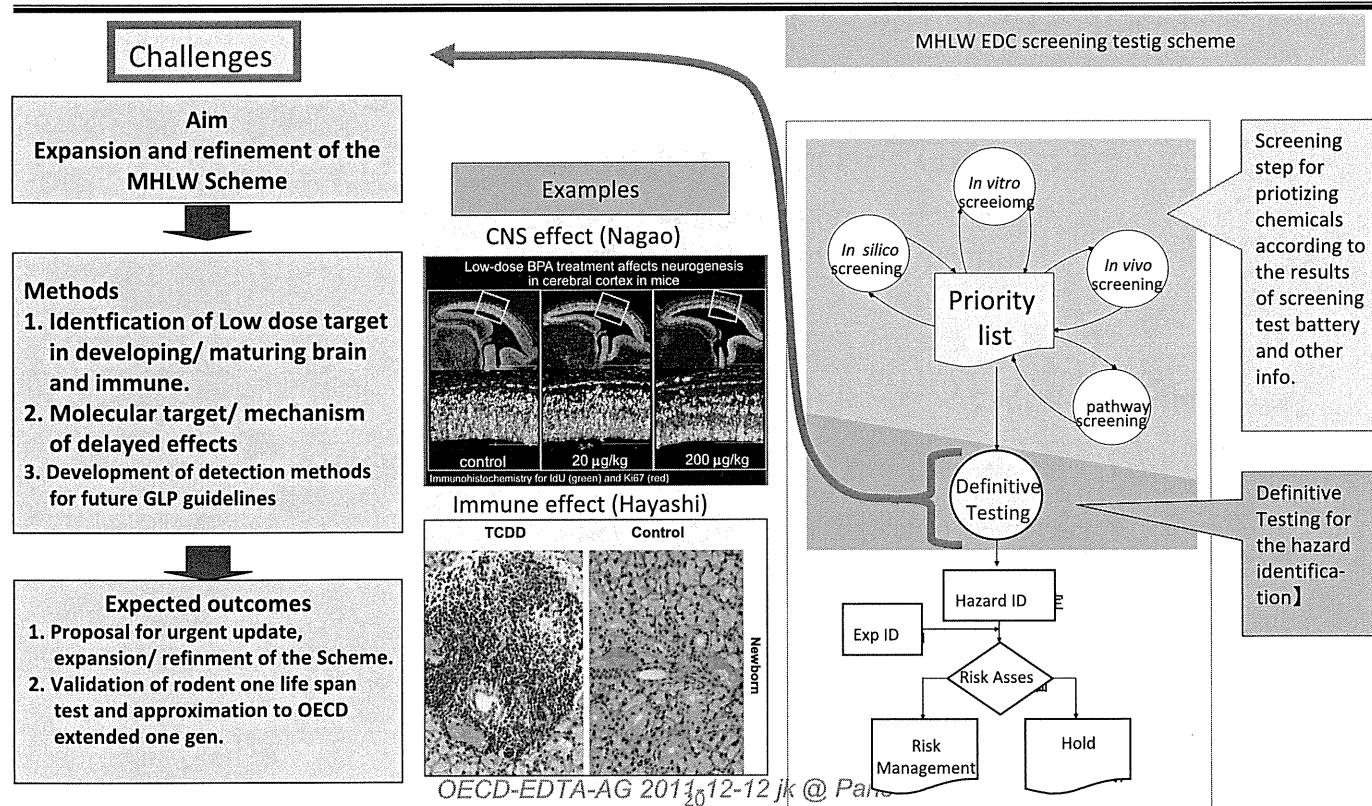
- Female reproductive tract cancer: Estrogen/ Wnt signal crosstalk by ERKO conditional beta catenine KI
- *In vitro* ES, neurospheroid differentiation by low dose BPA: non-coding RNA
- One life span test for EDC low dose detection. Further refinement

– OECD

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

2011-2013 Studies on the Assessment of Children's effect of Chemicals: **Identification of the targets for high susceptibility of developing/ maturing brain and immune system, and optimization of the EDC Screening/Testing Scheme**

Led by Prof. Tetsuji Nagao, Laboratory of Mammalian Development, Kinki University



OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

Neuro-behavioral Studies

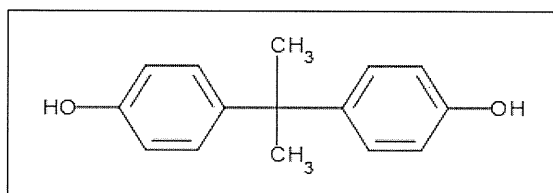
- Kitajima Group (2008-2010),
- Tanemura Group (2011-2012)
- Kakeyama Group (2008-2010)
- Nabeshima Group (2008-2010)
- Narita Group (2009-2011)
- Fujioka Group (2010-2012)

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

Kitajima Group & Tanemura Group

Mating to weaning, drinking water

BPA 0 ppm, 0.06 ppm, 1 ppm, or 15 ppm was given to dams, and offspring was monitored at 12-14 weeks of age for delayed neurobehavioral changes.



Conversion to mg/kg/day*

0.06 ppm → 0.006 mg/kg/day

1 ppm → 0.1 mg/kg/day

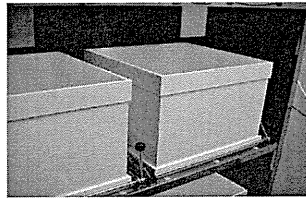
15 ppm → 1.5 mg/kg/day

*Assumption: 1/10 of body weight is consumed

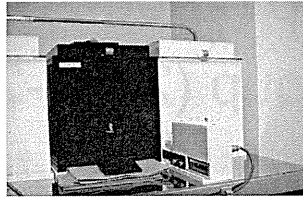
OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

Tanemura *et al.*
unpublished data

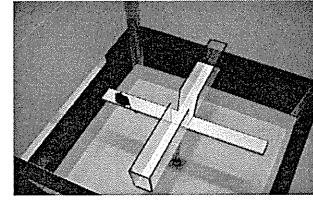
Neurobehavioral test battery (NIHS Div Cell Mol Tox)



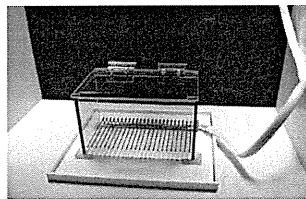
Open field



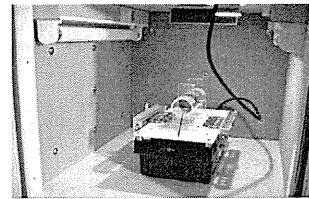
Light-dark



Elevated plus maze



Fear conditioned



Prepulse inhibition

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

Tanemura *et al.*
unpublished data

Current strategy

- Continual development of Definitive Testing(s)
 - Established/ routinely used methodology
 - Additional new methodology
- Mechanistic studies on receptor mediated toxicity/ signal toxicity
 - Stages: developmental and maturation
 - new methods for definitive testing
 - new methods for screening tests
 - to make the in vitro test validation “faster and easier”
 - Signaling pathways
 - ER (alpha / beta) + 46
 - Genomic/ Non-genomic (phosphorylation: MAP kinase)
 - GPR30 (erk, etc)
 - Cross Talk: AhR (GR, AR), Wnt
 - Mechanisms of “irreversibility/transgeneration”
 - Epigenetics (DNA methylation/ Histone modification)
 - Non-coding RNAs

OECD-EDTA-AG 2011-12-12 jk @ Paris

平成23年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：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)

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

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

菅 野 純

高 木 篤 也

五十嵐 勝秀

安 彦 行 人

目 的

本研究は、胚様体において、低濃度BPAで発現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「齧歯類一生涯試験法」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。