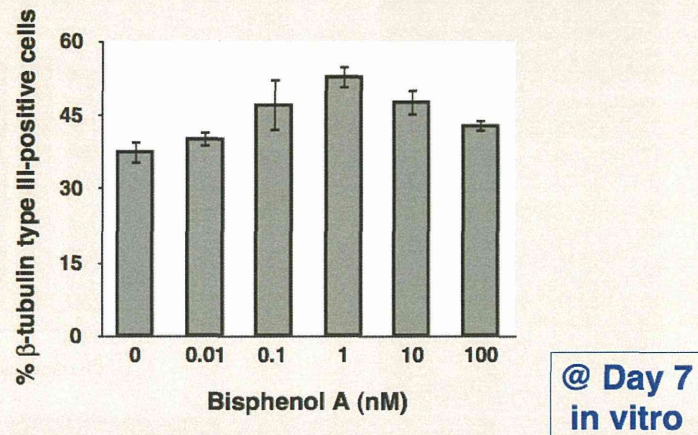
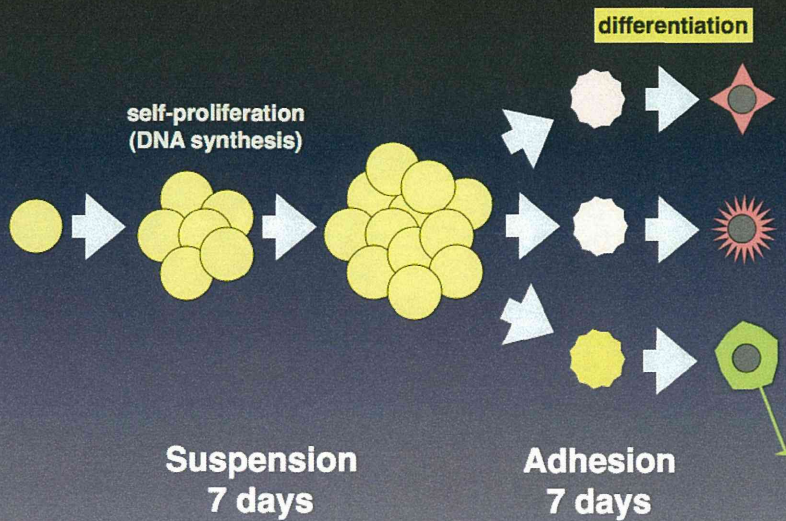


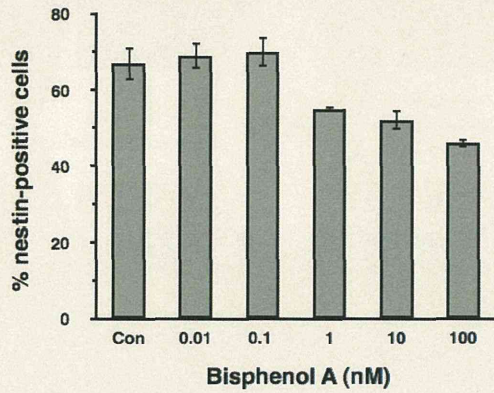
## 低濃度BPAで前処理した 神経上皮細胞の神経分化



## 神経上皮細胞培養系 Neurosphere culture

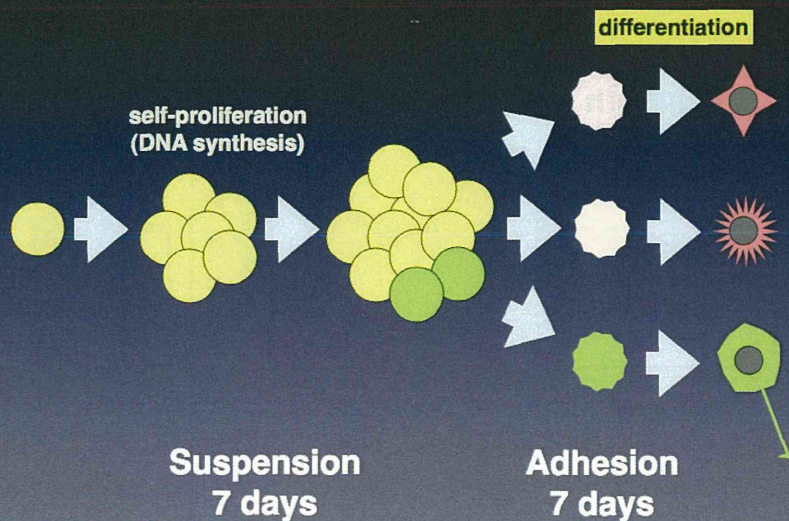


## 低濃度BPAで前処理した神経上皮細胞塊内の ネスチン陽性細胞の割合（予備検討）

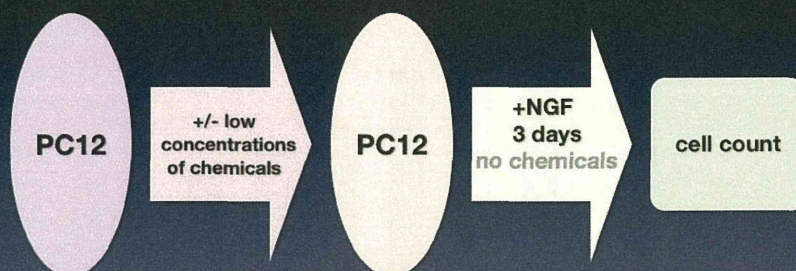


@ Day 0  
in vitro

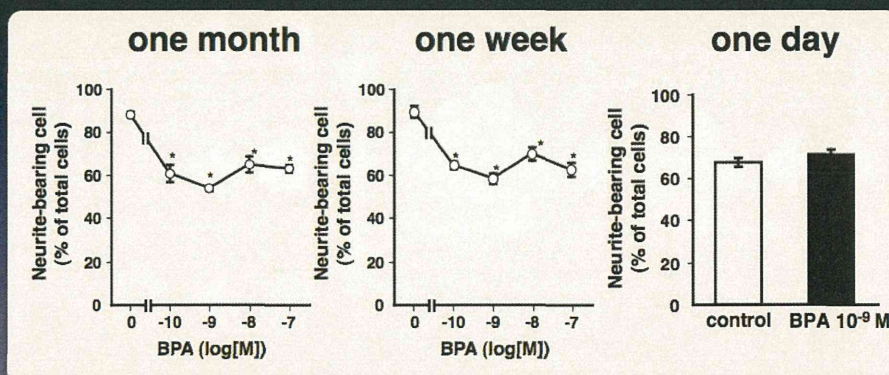
## 神経上皮細胞培養系 Neurosphere culture



## PC12細胞の神経分化の評価

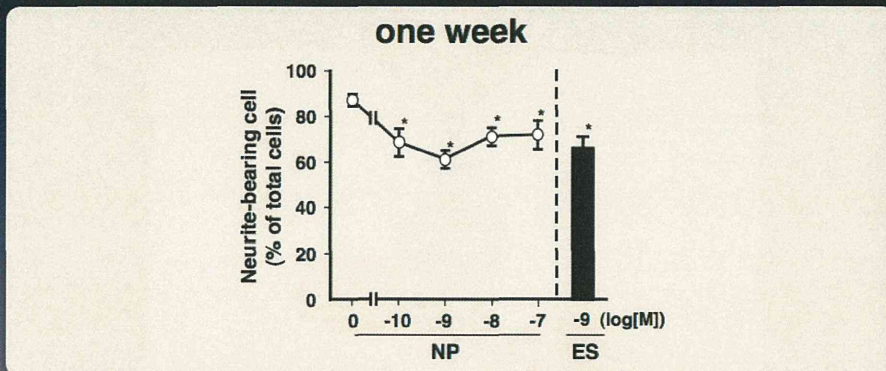


## 低濃度BPAで前処理した PC12細胞の神経分化

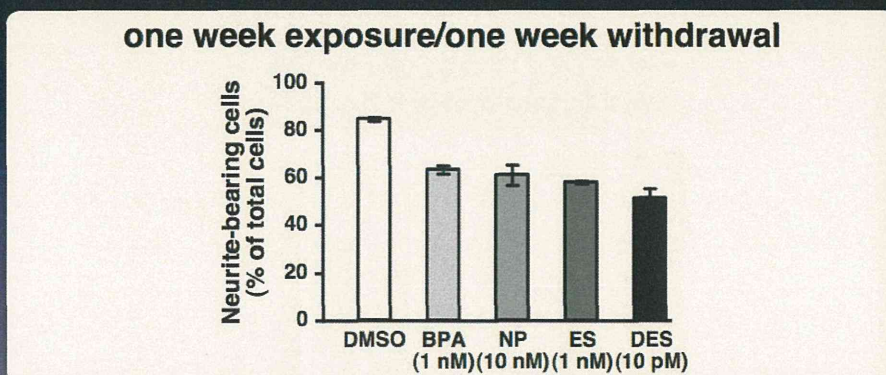


H23報告

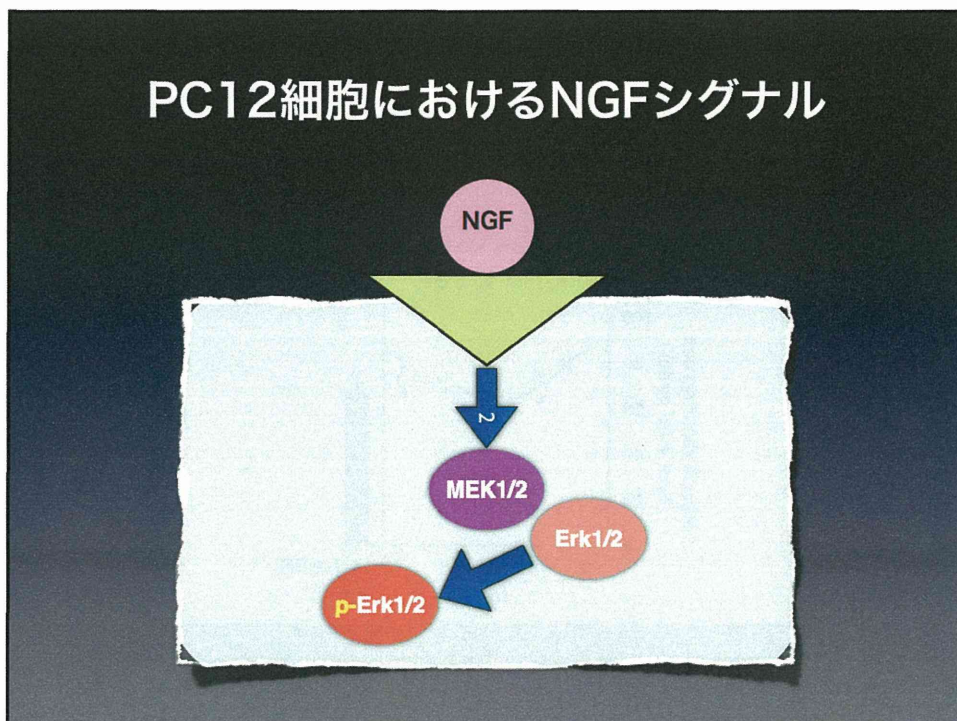
## 低濃度NPで前処理した PC12細胞の神経分化



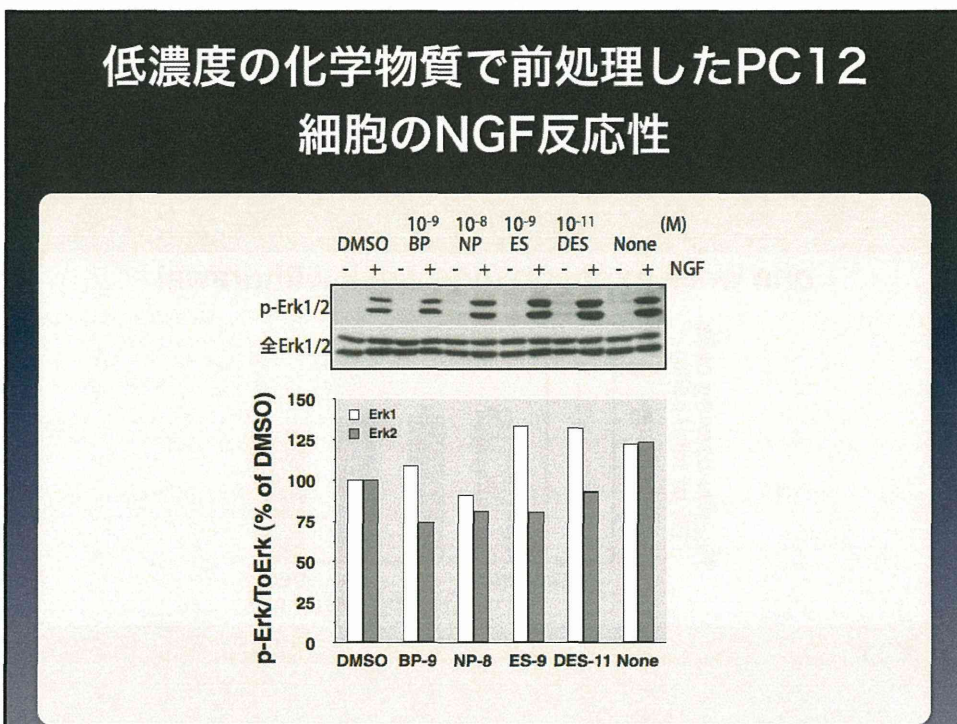
## 低濃度の化学物質で前処理したPC12 細胞を休薬したときの神経分化



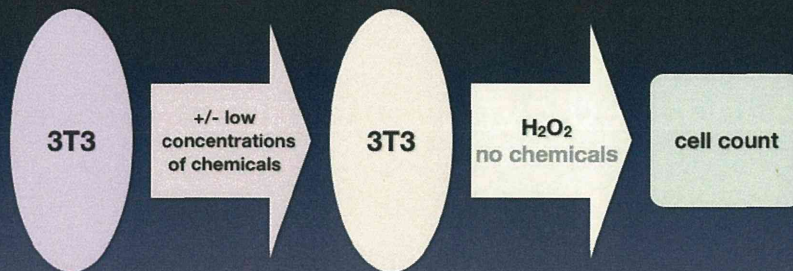
## PC12細胞におけるNGFシグナル



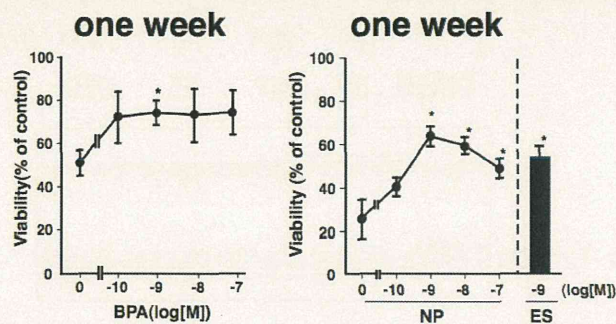
## 低濃度の化学物質で前処理したPC12細胞のNGF反応性



## 3T3線維芽細胞を用いた評価



## 低濃度化学物質で前処理した3T3 線維芽細胞の過酸化水素誘発細胞死



左；H23報告

## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death

- JNK活性化
- PI3K-Akt-GSK3 $\beta$ 経路活性化
- Bcl-2による抑制

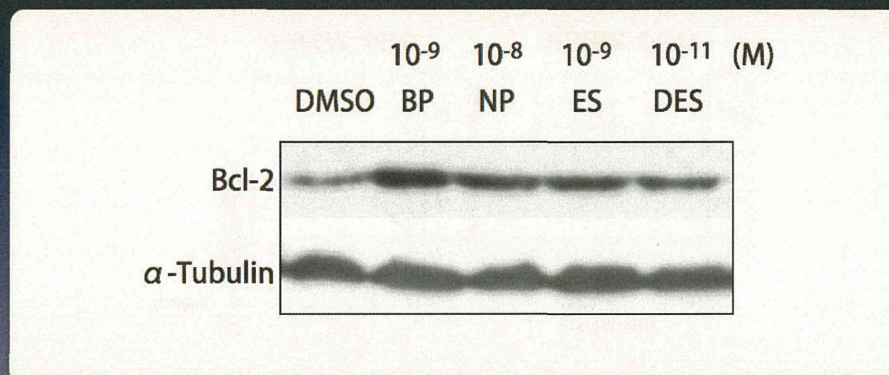
## BPA-induced cytoprotection

- Bcl-2発現誘導

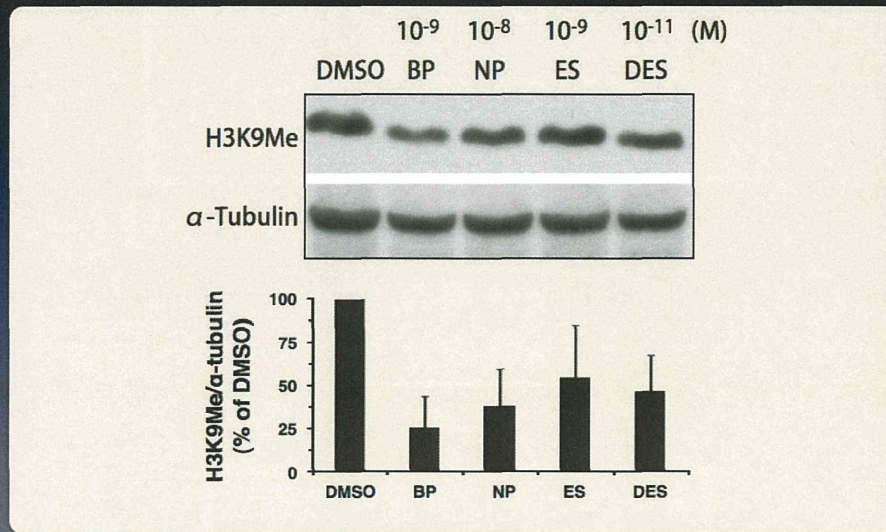
## BPA-induced epigenetic changes

- Histoneメチル化
- Histone methyltransferase発現誘導

## 低濃度化学物質で前処理した3T3線維芽細胞におけるBcl-2発現（予備検討）



## 低濃度化学物質で前処理した3T3線維芽細胞におけるメチル化ヒストン



## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death

- JNK活性化
- PI3K-Akt-GSK3 $\beta$ 経路活性化
- Bcl-2による抑制

## BPA-induced cytoprotection

- Bcl-2発現誘導

## BPA-induced epigenetic changes

- Histoneメチル化、アセチル化
- Histone修飾酵素の発現



## BPAおよびNPの作用

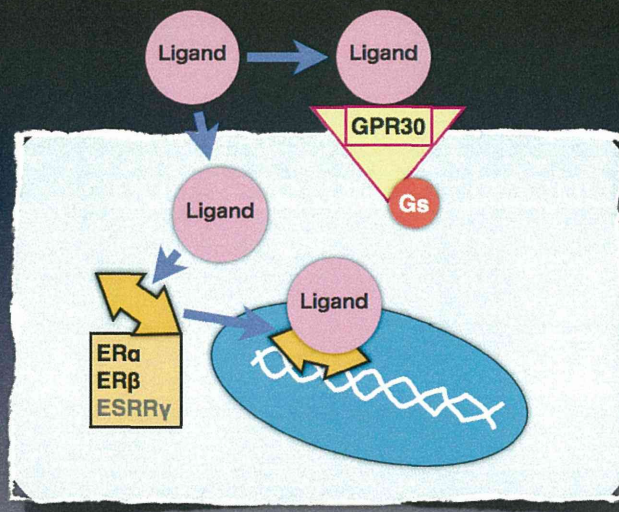
- ★PC12細胞モデル
- ★神経幹細胞モデル（神経分化）
- ★3T3線維芽細胞の細胞死実験系

- ★作用機序
- ★標的分子

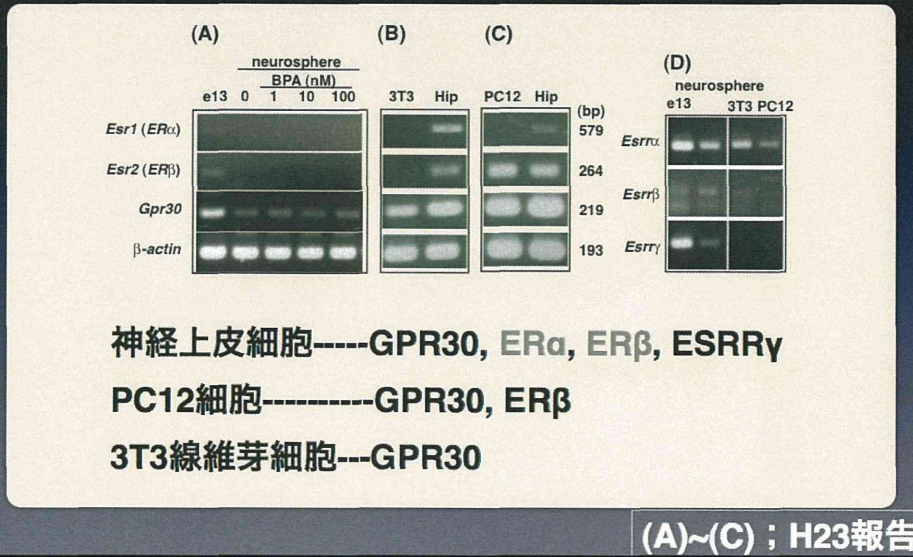
・ヒストン修飾

- ★インビトロ評価系の確立

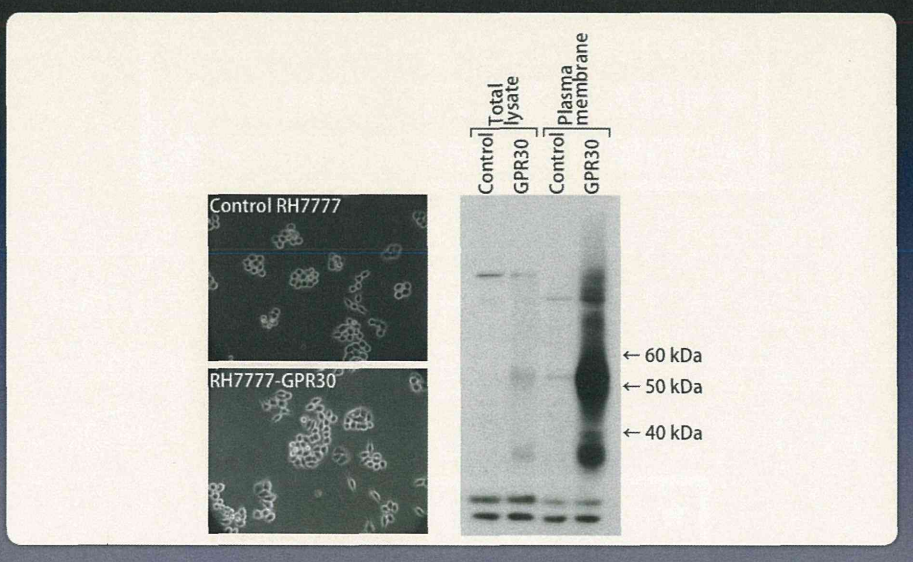
## エストロゲン受容体



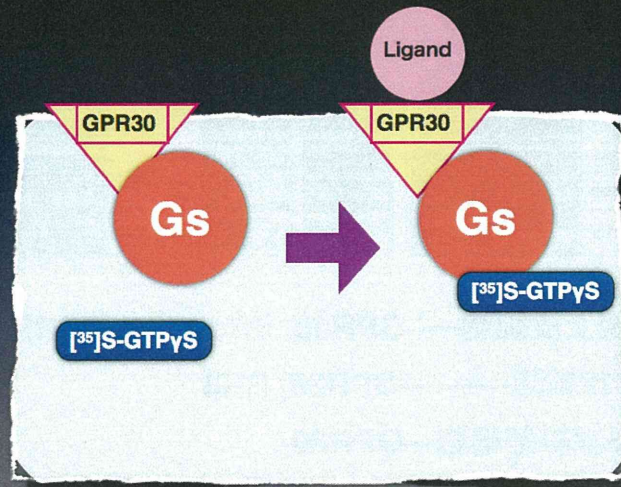
## エストロゲン受容体、エストロゲン関連受容体の遺伝子発現



## GPR30発現細胞の確立



## GPR30の活性化評価法



## BPAおよびNPの作用

- ★PC12細胞モデル
- ★神経幹細胞モデル（神経分化）
- ★3T3線維芽細胞の細胞死実験系

- ★作用機序
- ★標的分子

- アゴニスト
- アンタゴニスト
- GPR30活性化
- ヒストン修飾

- ★インビトロ評価系の確立

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

Tau 融合エストロゲン受容体レポーターマウスを用いた化学物質の神経標的解析

研究分担者 渡邊 肇 大阪大学 教授

## 研究要旨

化学物質に対する高感受性が考えられる子どもへの有害性発現メカニズムの解明を目的として、エストロゲン受容体遺伝子の発現部位を可視化したマウスを作製する。新生仔期にビスフェノール A やエストロゲン様化学物質の暴露を行い、神経系を中心としてエストロゲン受容体発現細胞の変化を解析することにより、発生・発達期の脳が示す高感受性の作用メカニズムを明らかにする。

### A. 研究目的

化学物質の子どもへの影響は、高感受性であること、長期的な影響が懸念されることなどから、その作用メカニズムの解明と対策が重要な課題である。このためには比較的良好に知られた化学物質影響をモデルとしてその作用メカニズムを解明する必要がある。本研究では、すでに多くの報告がなされているビスフェノール A をはじめとするエストロゲン様化学物質およびエストロゲンの子どもへの影響をモデルとして解析を行う。

化学物質の中でも、ビスフェノールは、世界中での生産量が多いこと、非常に低用量での影響が報告されていることから、特に高い関心を集めている。しかしビスフェノールを含むエストロゲン様化学物質は性成熟や性周期に影響を及ぼすという報告が多くなされているものの、その作用機序については明確なモデルさえ提出

されておらず、現象論に終始しているのが現状である。

そこで本研究では、こうした既知の現象を統合的に理解するためにエストロゲン様化学物質の新生児期における有害性発現メカニズムを明らかにする。このためにエストロゲン受容体遺伝子の発現部位を可視化したマウスを作製する。新生仔期にビスフェノール A やエストロゲン様化学物質の暴露を行い、神経系を中心としたエストロゲン受容体発現部位の解析を行うことにより、発生・発達期の脳が示す高感受性の作用メカニズムを明らかにし、試験スキームの最適化に資する。

### B. 研究方法

本研究では、新生児期のエストロゲン暴露影響をエストロゲン受容体の時空間的、機能的な解析から明らかにするために、エストロゲン受

容体遺伝子の制御下に  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子を挿入したマウスを利用する。これにより本来エストロゲン受容体を発現している組織、部位を正確に明らかにするだけでなく、新生児期のエストロゲン暴露による発現状態の変化を明らかにすることができる。

このため、エストロゲン受容体遺伝子の上流を含む BAC クローンを用い、エストロゲン受容体のコード領域を  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子に置換した遺伝子改変マウスを利用する。これによりエストロゲン受容体の発現部位を細胞レベルで明らかにすることが可能となる。

さらに神経系における解析を容易にするために、tau 遺伝子を融合させた  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子を導入し、エストロゲン受容体を発現している神経線維の投射を明らかにする。ビスフェノール A またはエストロゲン等を暴露した場合、神経系への影響も多く報告されているが、この遺伝子改変マウスを用いることにより、エストロゲン受容体の発現部位の変化を解析すると同時に、神経投射の変化を明らかにすることが可能となる。

これにより、新生児期のエストロゲン暴露が及ぼす影響をエストロゲン受容体の時空間的な変化、機能的な変化から解析することが可能であり、暴露により観察されるエストロゲン応答の変化の原因を明らかにすることができる。

(倫理面への配慮)

動物実験については、大阪大学大学院工学研究科動物実験委員会の承認を得ている。またトランスジェニックマウス作製を含む組換え DNA 実験については、大阪大学大学院工学研究科組換え DNA 実験委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果 および D. 考察

UCSC ゲノムデータベースを検索し、マウス BAC ライブラリーからエストロゲン受容体  $\alpha$  遺伝子の上流域を含む BAC クローンを選択した。レポ

ーター遺伝子をインフレームで挿入するために、翻訳開始 ATG コドンを含むクローン、RP23-7D5 を選択し、ライフテクノロジー社から入手した。一方、レポーター遺伝子は、神経軸索を可視化することを目的として tau-lacZ を用いることとした。

tau 遺伝子はウシ由来の N 末端側 383 アミノ酸を含む領域で大腸菌由来の  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子とインフレームで融合しており、この融合遺伝子の下流には SV40 由来のポリ A シグナルを配している。

この tau-lacZ 遺伝子については、UCSD の Thomas 教授から分与を受けた。

BAC クローンに tau-lacZ レポーター遺伝子を組込むために、Red/ET 相同組換え法 (GeneBridges 社) を用いた。BAC 側の挿入予定部位の配列を合成し、tau-lacZ レポーター遺伝子の両末端に PCR 法によって融合させたのちに、この DNA 断片をリコンビナーゼと共に RP23-7D5BAC クローンを有する大腸菌に導入した。薬剤耐性を指標として、最終的に RP23-7D5BAC クローンに tau-lacZ レポーター遺伝子が挿入されたクローンを得た。

得られたクローンを大量精製し、塩基配列を確認したところ、予定通りの組換えが生じており、エストロゲン受容体  $\alpha$  遺伝子の翻訳開始 ATG 以下が tau-lacZ に置換されていることを確認した。一方、6 塩基切断型の制限酵素数種類を用いて、詳細な制限酵素地図を作製し全体の構造を確認したところ、tau-lacZ 遺伝子由来の DNA 断片が確認されただけでなく、本来相同組換えによって除去されたはずの DNA 断片の存在も確認されたことから、BAC クローンが二量体となって存在していることが明らかになった。この二量体と RP23-7D5BAC クローンをパルスフィールドゲル電気泳動で解析したところ、ほぼ同等の大きさを示していたことから、もともと配布している RP23-7D5BAC クローンがすでに二量体と

なっていることが推察された。これらは制限酵素 *P1-SceI* で切断すると単量体となり、*tau-lacZ* 組換えクローンとオリジナルの *RP23-7D5* クローンに分けることができ、現在この組換え単量体が大腸菌に再導入しクローン化を進めると同時に、一方で環状のままインジェクションを行いトランスジェニックマウスの作製を進め、解析を行っている。

構築したプラスミドについては、347 個の *CD-1* マウス受精卵にインジェクションし、253 個を移植、25 匹の仔を得た。これらの仔について、PCR によりトランスジーンを確認したところ、2 系統に構築した遺伝子が導入されていることが確認できた。これら 2 系統について交配を行ったところ、トランスジーンについては、正常な割合で仔に伝搬したことから、問題なく生殖系列に導入されていることが確認できた。

さらにこれらマウスのメスについて、成獣についてサンプリングを行い、*LaxZ* 活性を *X-gal* によって *in situ* で評価した。その結果、卵巣、子宮など本来エストロゲン受容体の発現が強く観察される部位において、強い *LacZ* 活性が見られた。また脳においても *LacZ* の発現が観察され、現在その発現部位の詳細な検討を進めている。

またこれら一連のトランスジェニックマウス作製と並行して、新生児期のエストロゲン暴露とその解析法のセットアップを進めており、トランスジェニックマウスが取得できれば、速やかに解析できる体制を整えている。

一方、新生児期の *BPA* やエストロゲン暴露の長期的な影響を解析するために、*ルシフェラーゼ* をレポーター遺伝子とし、その上流にエストロゲン応答配列を反復して有するトランスジェニックマウスを岐阜薬科大学から導入した。新生児期エストロゲン暴露マウスではさまざまな影響が報告されており、例えば膈上皮ではエストロゲン非依存的な細胞増殖、性周期については連続発情が観察されている。これはあたかもエ

ストロゲンとエストロゲン受容体の関係が破綻したかの現象であるが、その詳細は未解明のままであり、エストロゲン受容体がエストロゲン非存在下で機能しうるのか否かについても明確になっていない。このエストロゲン応答配列を有するレポーターマウスを併用することで、エストロゲン受容体の機能的な解析を進める予定である。

## E. 結論

エストロゲン受容体遺伝子の制御領域 180kB を含む *BAC* クローンに *tau-lacZ* レポーター遺伝子を組み込んだプラスミドを作製し、*CD-1* マウス受精卵にインジェクションすることにより、*tau-lacZ* レポーター遺伝子導入マウスを 2 系統作製した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1.

Dose-related estrogen effects on gene expression in fetal mouse prostate mesenchymal cells.

Taylor JA, Richter CA, Suzuki A, Watanabe H, Iguchi T, Coser KR, Shioda T, Vom Saal FS. *PLoS One*. 2012;7(10):e48311. doi: 10.1371/journal.pone.0048311. Epub 2012 Oct 29. PMID: 23144751

#### 2.

Wnt family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice.

Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Watanabe H, Mizutani T, Sato T, Morohashi K, Takeuchi T, Iguchi T, Ohta Y.

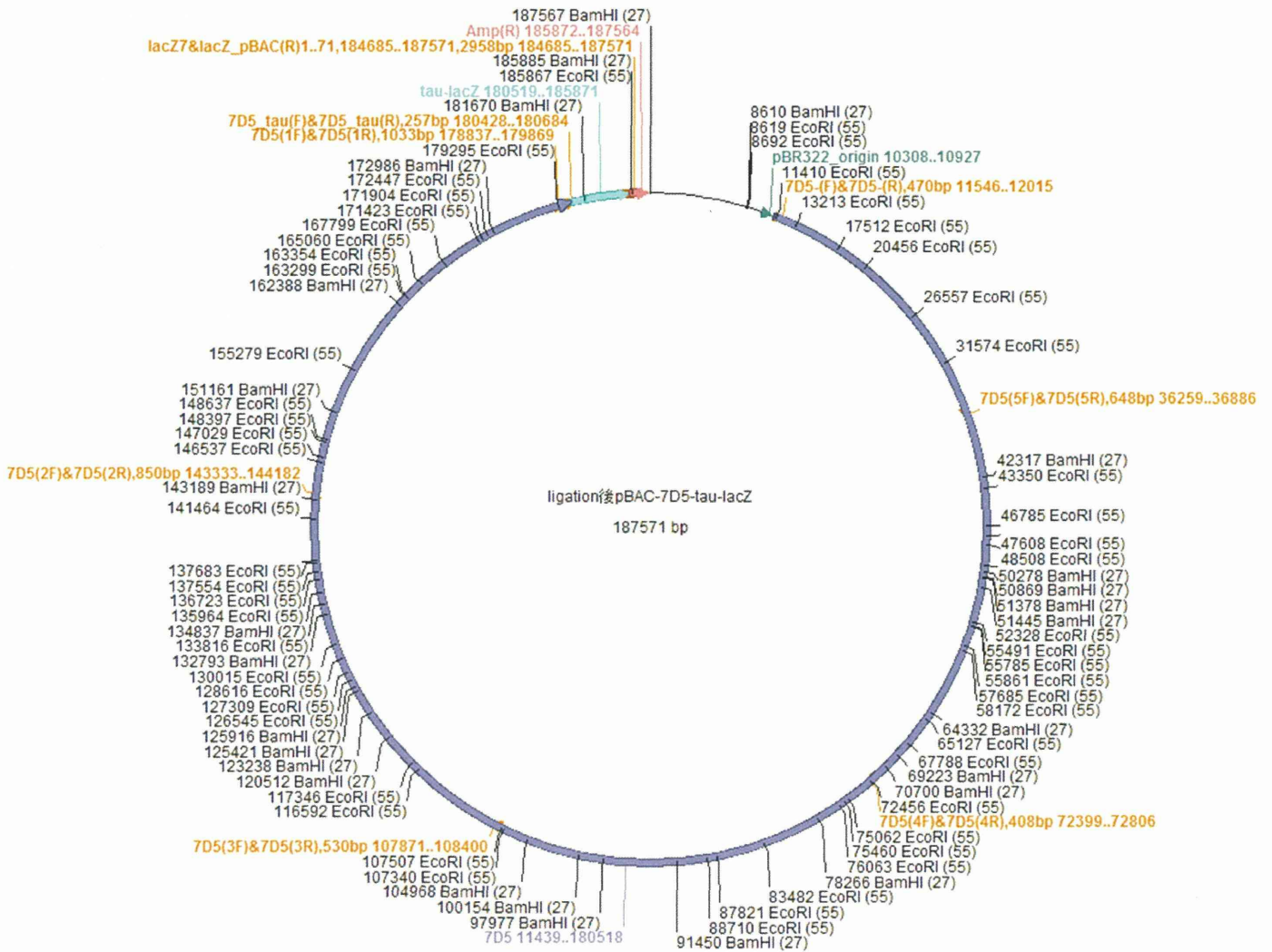
Toxicology. 2012 Jun 14;296(1-3):13-9. Epub  
2012 Mar 21. PMID: 22445810

3.  
Involvement of gonadotropins in the induction  
of hypertrophy-hyperplasia in the  
interstitial tissues of ovaries in neonatally

diethylstilbestrol-treated mice.

Kakuta H, Tanaka M, Chambon P, Watanabe H,  
Iguchi T, Sato T.

Reprod Toxicol. 2012 Jan;33(1):35-44. Epub  
2011 Nov 12. PMID: 22100434



CD-1 マウスに導入した tau-lacZ 遺伝子の構造

# Tau融合エストロゲン受容体 レポーター マウスを用いた 化学物質の神経標的解析

大阪大学大学院工学研究科  
生命先端工学専攻  
渡邊 肇

## 研究目的

エストロゲンおよびエストロゲン様作用を有する化学物質を、新生児期マウスに暴露し、エストロゲン受容体の量的、機能的変化を明らかにすることにより、幼若期特有の有害性発現のメカニズムを遺伝子レベルから明らかにする。



## 発生・発達期における脳に対するBisphenol Aの 低用量暴露により成長後に誘発される「遅発影響」

Studies of BPA Effects on Sex-Differentiation and BPA Sex-Specific Effects on Behavior Using 40 µg/kg d Dose by o.i. in SD Rats

Study	Exposure period dose	Endpoint age at assessment	Findings
<i>Prenatal or postnatal exposure</i>			
<b>Farabollini et al. (2002)</b> NTP-A EU (2008)	Pregnancy or lactation (cross fostered) 40 µg/kg d o.i.	Socio sexual behavior, PND 100	↑ latency to intromission (pre) ↑ number of intromissions (post) ↑ genital sniffing (pre)
<b>Aloisi et al. (2002)</b> NTP-A EU (2008)	Pregnancy or lactation (cross fostered) 40 µg/kg d o.i.	Pain response. PNW 22	↑ limb flexion (pre) ↓ paw jerk (post)
<i>Prenatal and postnatal exposure</i>			
<b>Farabollini et al. (1999)</b> NTP-A EU (2008)	Pregnancy and lactation 40 µg/kg d; or GD 14-PND 6 400 µg/kg d o.i.	Exploration, (holeboard) anxiety (elevated plus maze) PND 85	↓ head dipping ↓ activity ↓ anxiety
<b>Dessi-Fulgheri et al. (2002)</b> NTP-A EU (2008)	Pregnancy and lactation 40 µg/kg d; or GD 14-PND 6 400 µg/kg d o.i.	Juvenile social interaction, 8 factors derived from PCA of behavior scoring PND 25, 35, 45	↑ play directed to females ↓ low intensity mating behavior ↓ sociosexual exploration males ↑ sociosexual exploration females ↓ social interest
<b>Della Seta et al. (2005)</b> NTP-A <b>Porrini et al. (2005)</b> EU (2008) NTP-A <b>Adriani et al. (2003)</b> NTP-A EU (2008)	Pregnancy and lactation; 40 µg/kg d o.i. Pregnancy and lactation; 40 µg/kg d o.i. Pregnancy and lactation 40 µg/kg d o.i.	Maternal behavior PND 3, 4; PND 8, 9 Social behavior of female offspring PND 35,45, 55 Novelty preference PND 30-45 Activity PND 35-45 Impulsive behavior "adult" Amphetamine response "adult"	↓ duration licking grooming pups ↑ social/nonsoc explore ↓ play with males ↓ social grooming ↓ females ↑ males and females ↓ males and females ↓ males
<b>Della Seta et al. (2006)</b> NTP-A EU (2008)	PND 23-30 40 µg/kg d o.i.	Male social and sexual behavior PND 45, 90	↓ latency to intromission

PCA, principal components analysis; o.i., oral instillation; PND, postnatal day; GD, gestation day; BPA, bisphenol A.

### 発生・発達期の脳に対する 低用量暴露により成長後に 誘発される「遅発影響」

#### End points:

Socio sexual behavior  
Maternal behavior  
Pain response  
Anxiety  
Juvenile social interaction  
Novelty preference

Estrogenic?

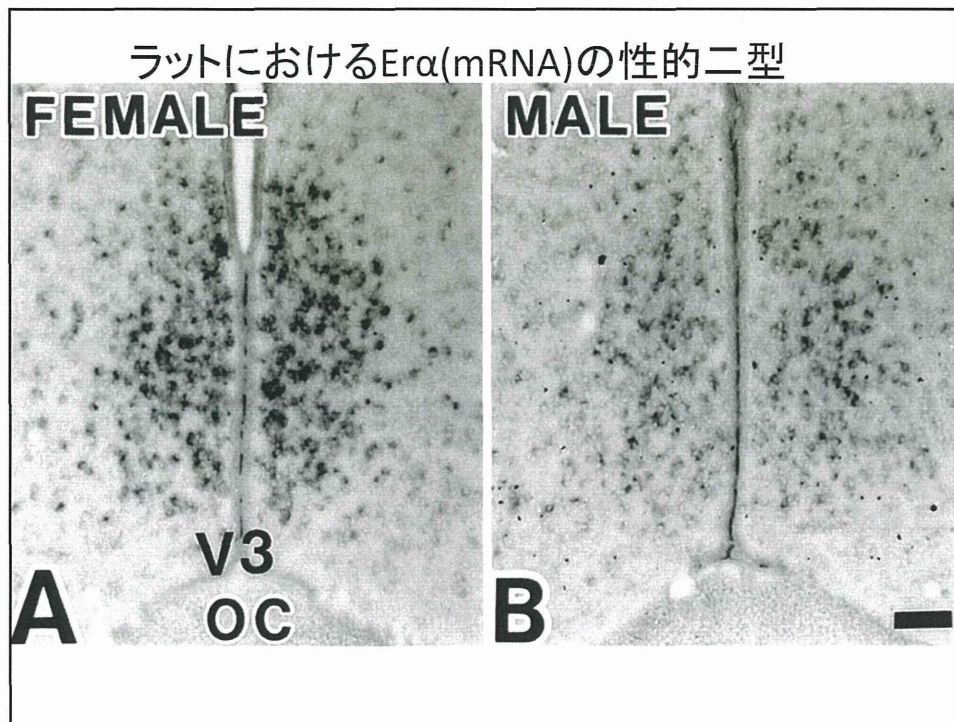
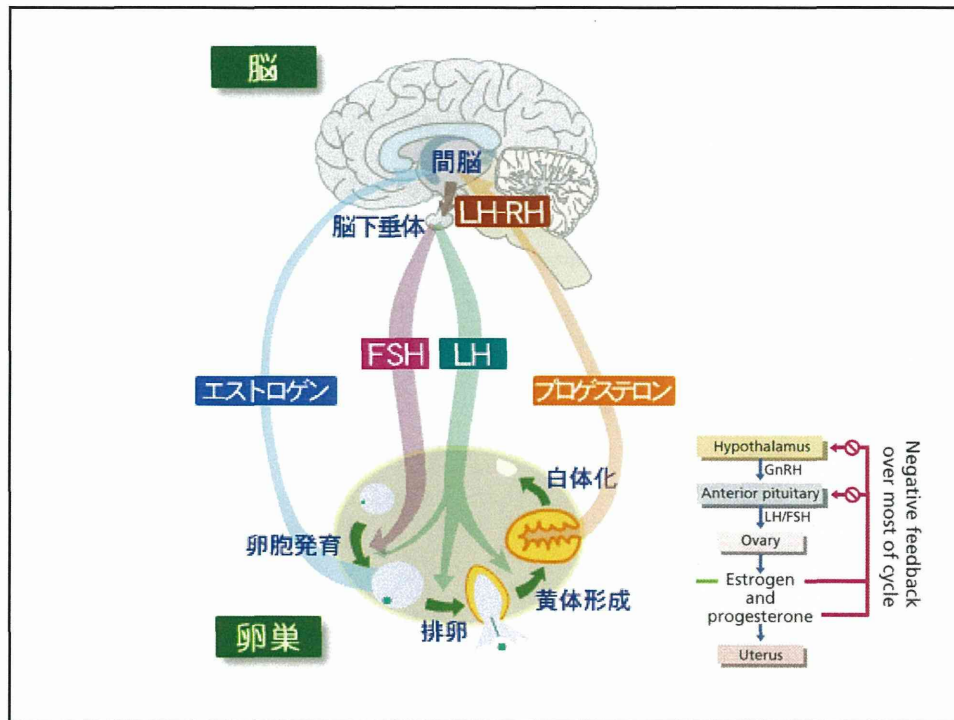


Non estrogenic??

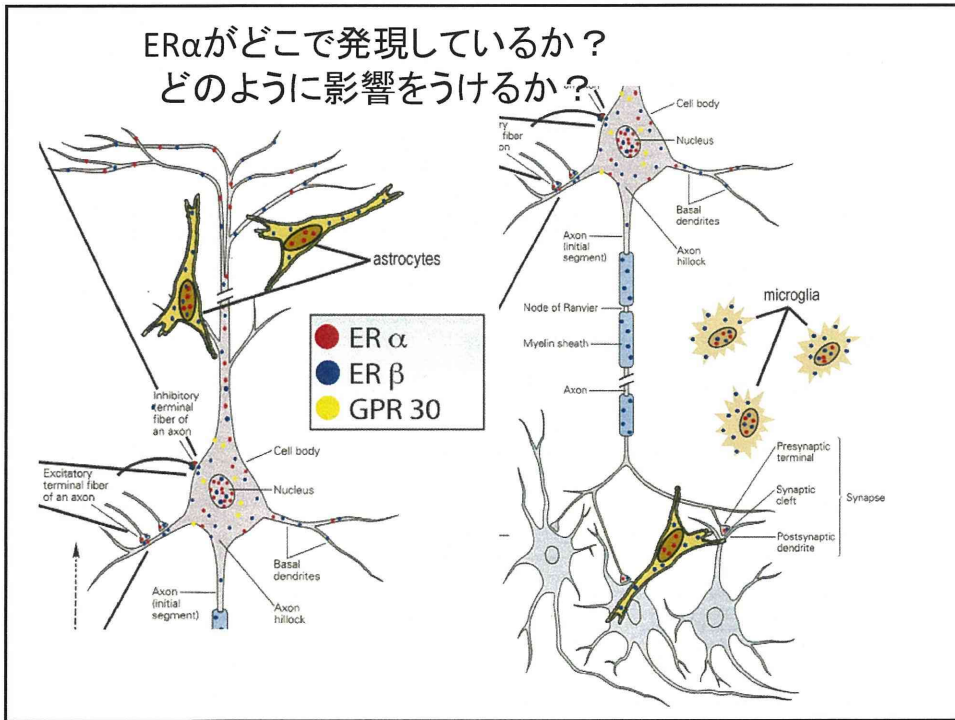
問題点: どの程度エストロゲン曝露影響と共通しているか?  
エストロゲン受容体がどの程度関与しているか?

その作用機序は?

—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—



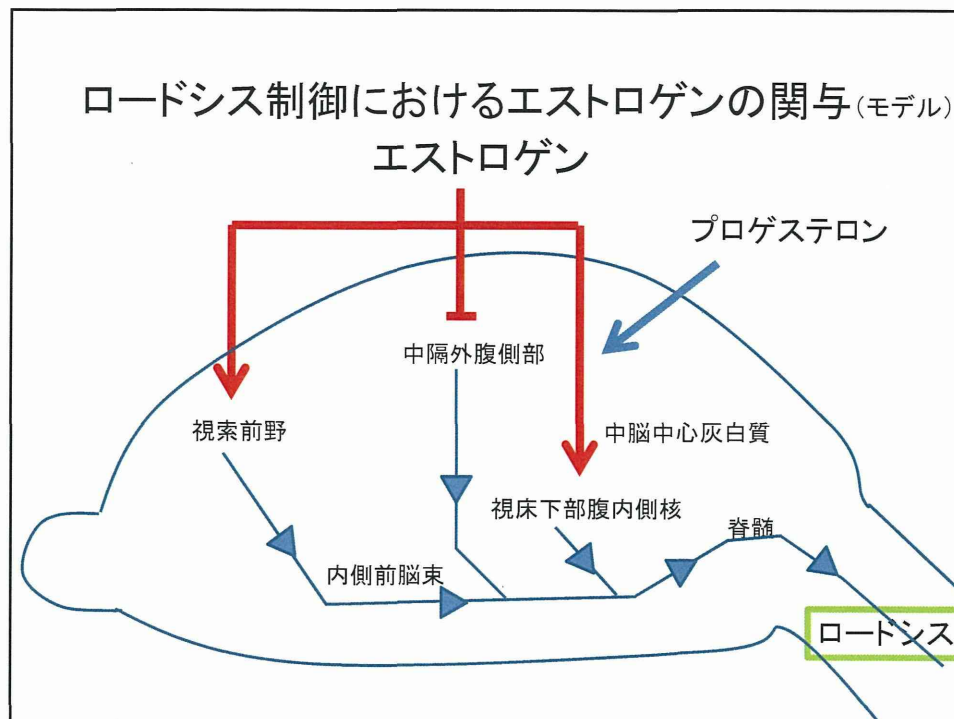
ER $\alpha$ がどこで発現しているか？  
 どのように影響を受けるか？



ER $\alpha$ が発現する細胞、投射を  
 明らかにする

エンドポイントとの関連性

エストロゲン曝露による影響



## ER $\alpha$ が発現する細胞、投射を 明らかにする

- BACの利用
  - 挿入位置の影響を受けない安定な発現
  - 本来の発現パターンに近い時空間的な発現
- レポーター遺伝子の利用
  - 発現細胞を可視化可能 (βガラクトシダーゼ)
- タグの利用
  - Tau遺伝子との融合により軸索を可視化  
(神経投射の可視化)