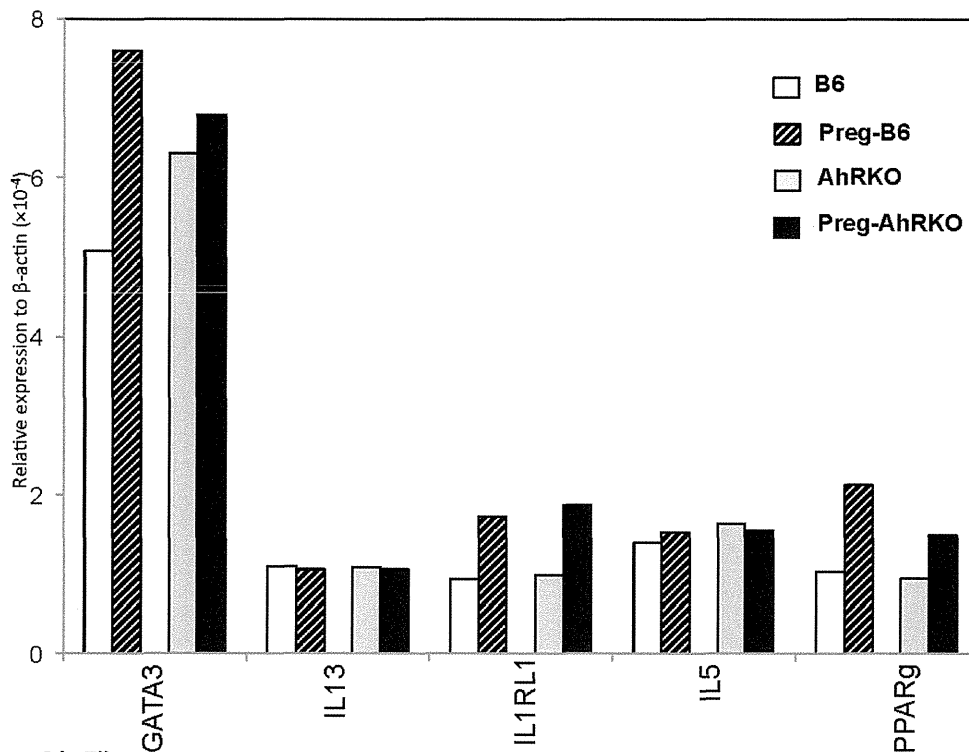


図7

Epigenetically Regulated Genes: Th2 Cells

TCDD 無添加群



TCDD 添加群

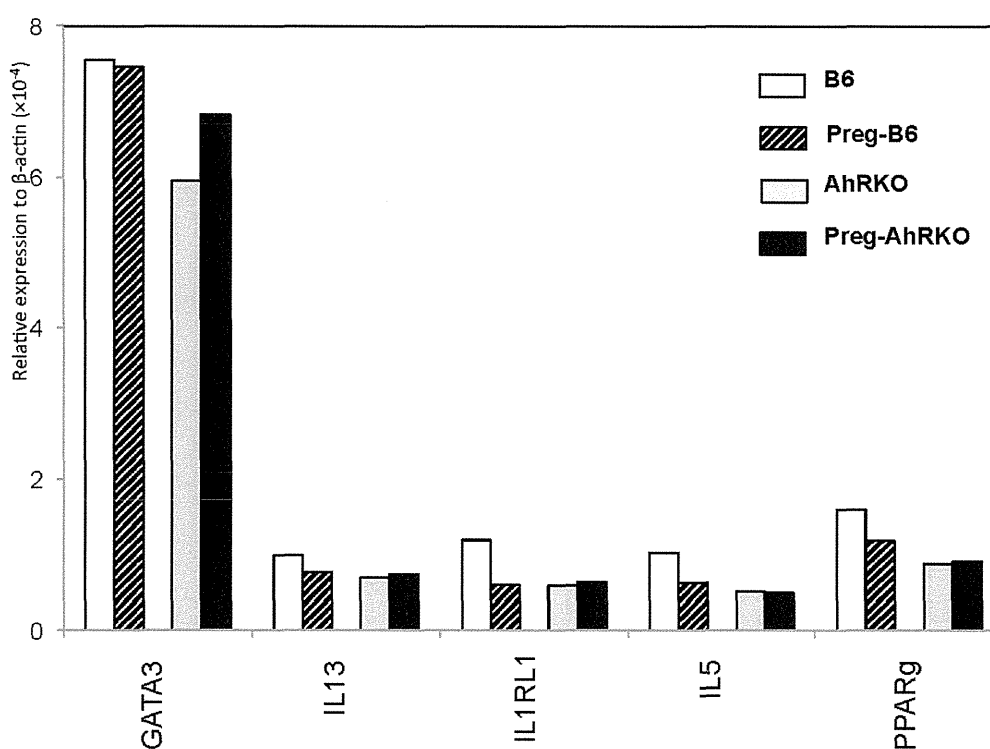
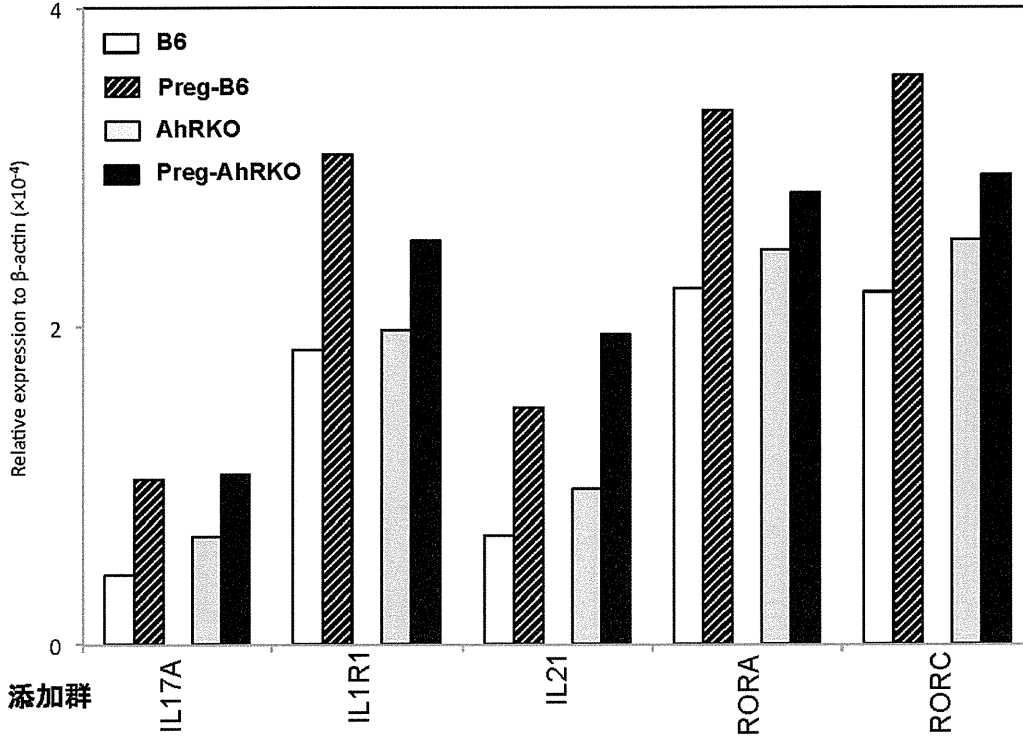


図7: 非妊娠あるいは妊娠(15日目)B6及びAhRKOマウスの胸腺組織におけるエピジェネティクス関連Th2細胞遺伝子発現。上段がTCDD非添加群(各群3匹)。下段がTCDD添加2時間後の遺伝子変化(各群3匹)。

図8

Epigenetically Regulated Genes: Th17 Cells

TCDD 無添加群



TCDD 添加群

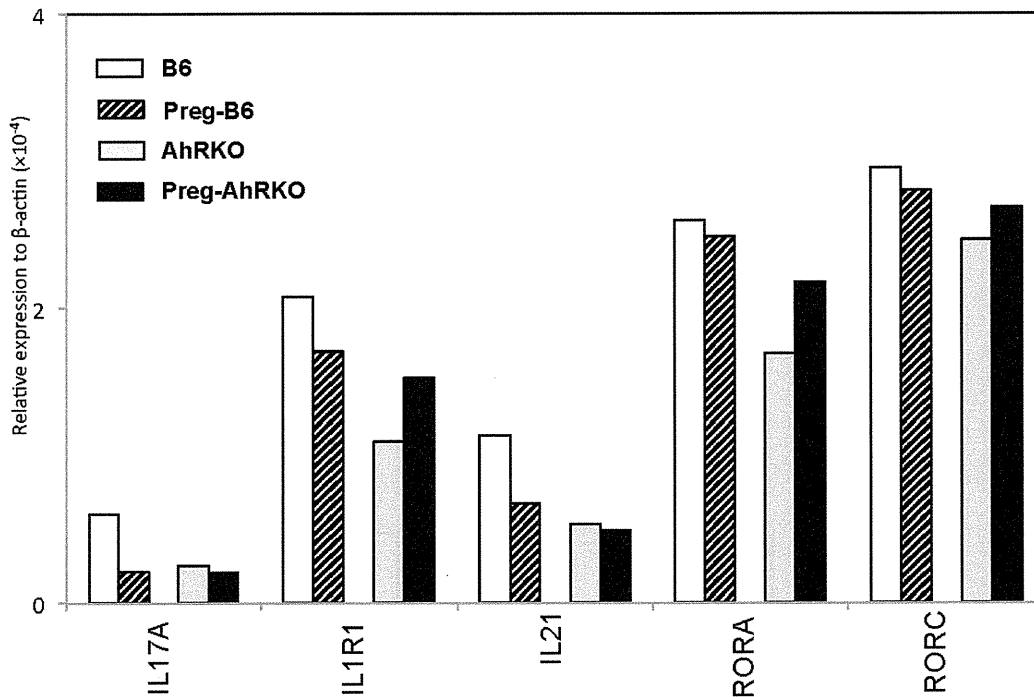
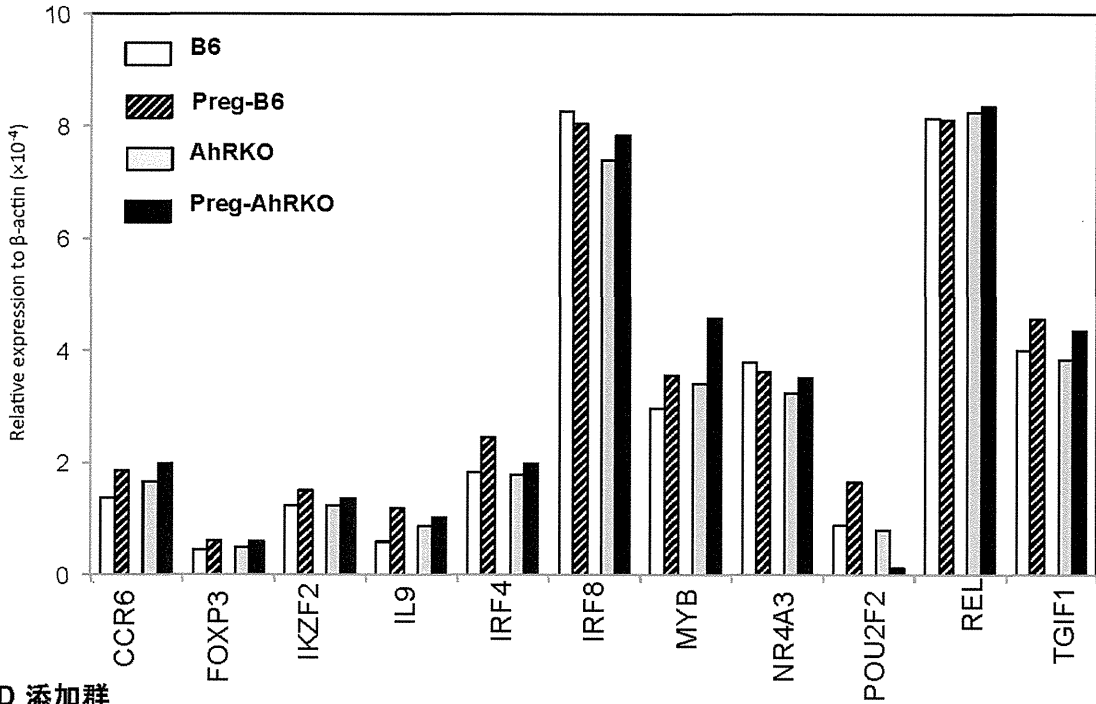


図8: 非妊娠あるいは妊娠(15日目)B6及びAhRKOマウスの胸腺組織におけるエピジェネティクス関連Th17細胞遺伝子発現。上段がTCDD非添加群(各群3匹)。下段がTCDD添加2時間後の遺伝子変化(各群3匹)。

図9

Epigenetically Regulated Genes: iTreg and nTreg cells

TCDD 無添加群



TCDD 添加群

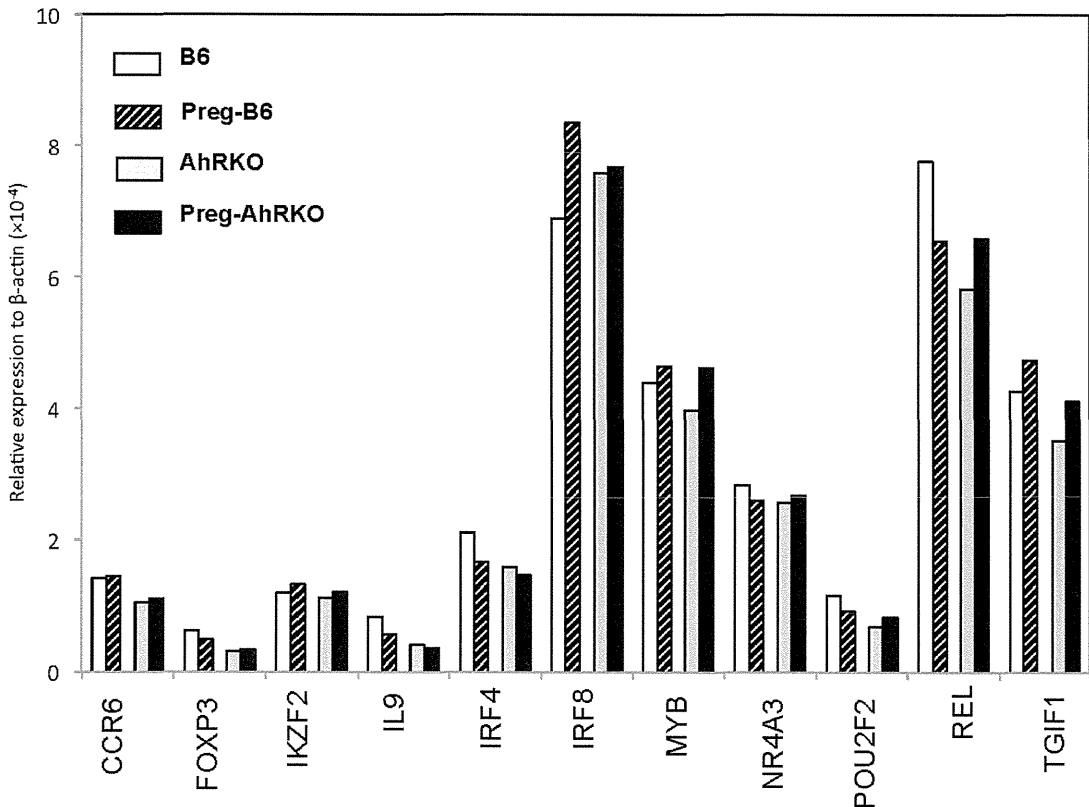


図9: 非妊娠あるいは妊娠(15日目)B6及びAhRKOマウスの胸腺組織におけるエピジェネティクス関連Treg細胞遺伝子発現。上段がTCDD非添加群(各群3匹)。下段がTCDD添加2時間後の遺伝子変化(各群3匹)。

図10

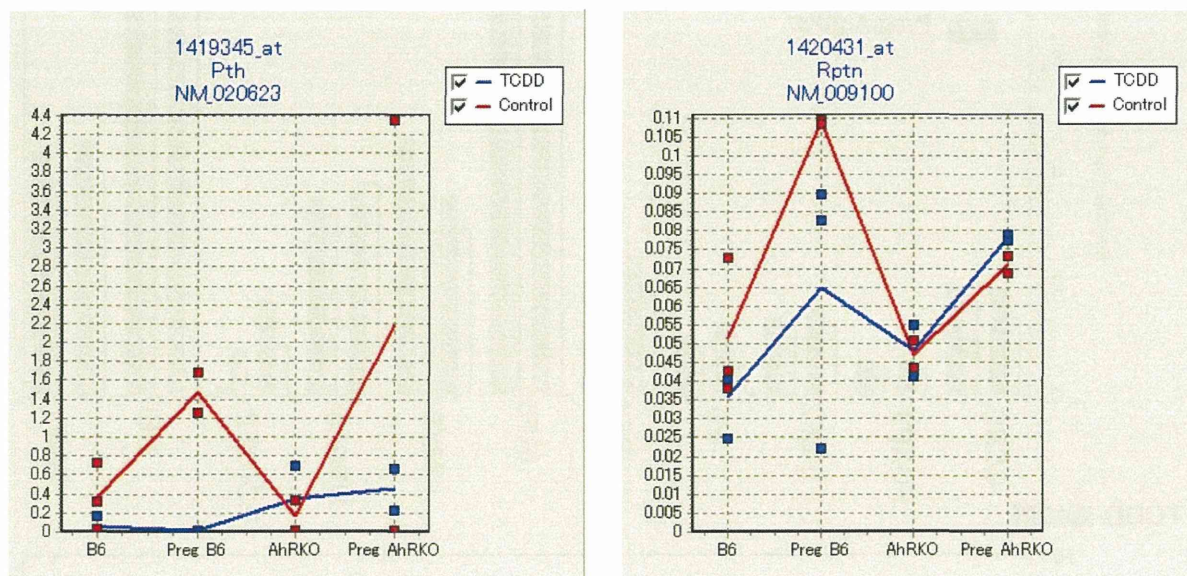


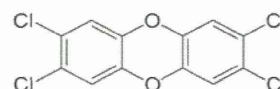
図10: 非妊娠あるいは妊娠(15日目)B6及びAhRKOマウスの胸腺組織におけるDNAマイクロアレイによる解析。赤線がTCDD非添加群(各群3匹)。青線がTCDD添加2時間後の遺伝子変化(各群3匹)。Pth: parathyrodo hormone, Pptn: Repetin

周産期化学物質低用量暴露による免疫学的評価

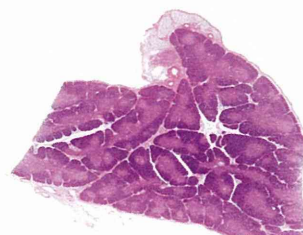
分担研究者 林 良夫(徳島大学)

研究協力者 石丸 直澄(徳島大学)
新垣 理恵子(徳島大学)
菅野 純(国立医薬品食品衛生研究所)
高木 篤也(国立医薬品食品衛生研究所)
五十嵐 勝秀(国立医薬品食品衛生研究所)

研究目的



周産期でのホルモン作動性物質の低用量暴露により、免疫システムの構築がどの段階でどのような分子機序によって異常となるかを解析する。



Feminization

Carcinogenesis

Endocrine system

Dioxin (-) Dioxin (+)

Atrophy of gonadal gland

Immune system

Environmental Hormone

Development

Prostate cancer

Breast cancer

TCDD - DMBA

Sesame Oil - DMBA

Y-axis: Tumors per Rat

X-axis: Days Post DMBA

周産期での免疫システムへの影響は？

性ホルモンと免疫システム

❖ 女性のライフステージと女性ホルモンのグラフ

女性ホルモンのバランス

0 14 28 (日)

低温期 高温期

卵胞ホルモン (エストロゲン)

黄体ホルモン (プロゲステロン)

黄体形成ホルモン (LH)

月経 卵胞期 排卵 黄体期 月経

※女性ホルモン(エストロゲン)分泌量の変化

Pyg/ml

150

100

50

0

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 (年齢歳)

幼年・少女期 思春期 成熟期 更年期 閉経期

女性ホルモンの分泌量が安定、生理も規則的になり軽微な程度に薄くなったカラダに

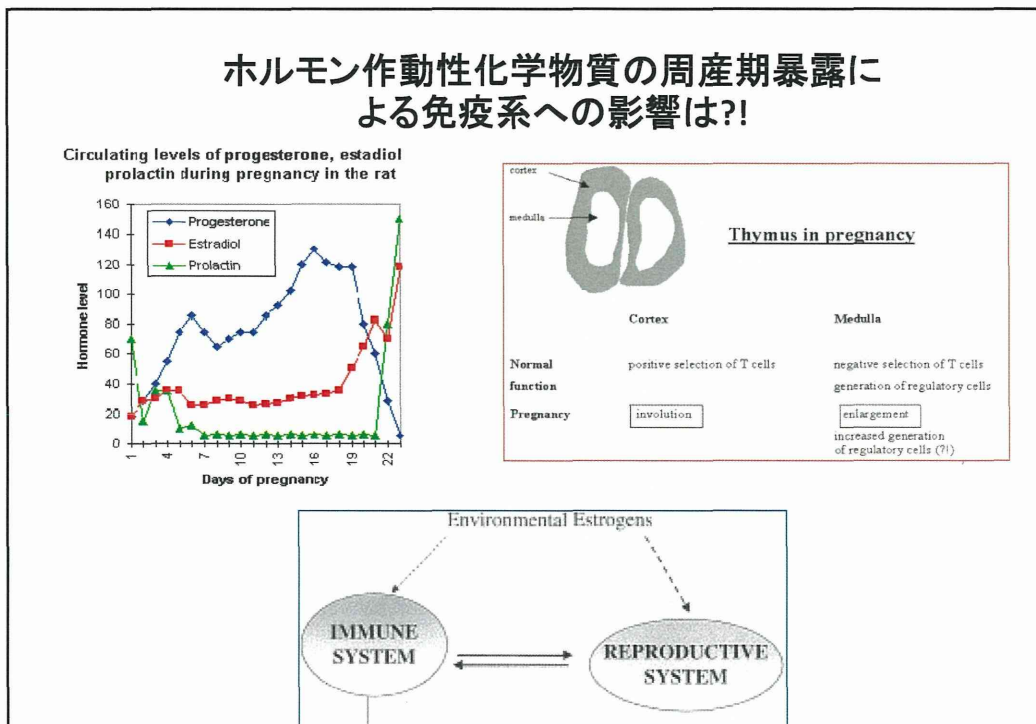
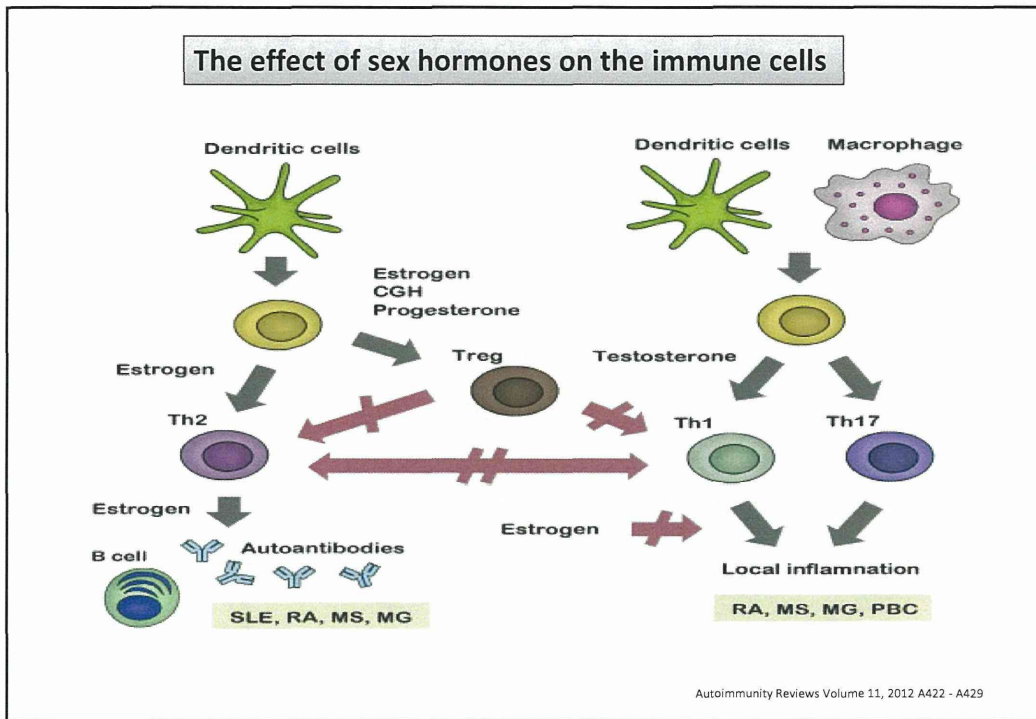
女性ホルモンの分泌量が多くなっていきますが、まだまだ不安定

35歳を過ぎると卵巣機能が衰えはじめ、女性ホルモンの量が減少していきます

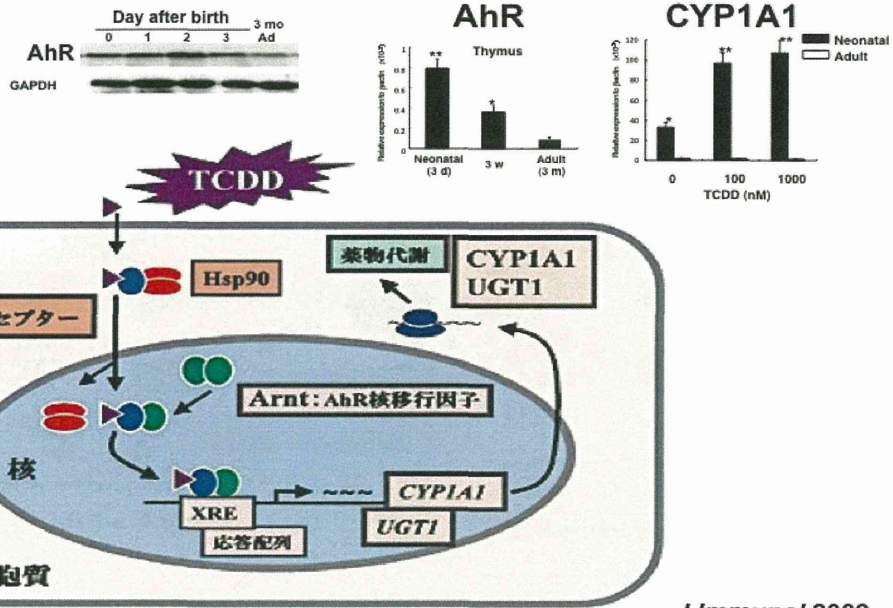
卵巣の機能が衰え、女性ホルモンの分泌が減少し閉経を迎える

閉経年齢が来る(10歳~14歳くらい)

女性ホルモンの量が減ることにより変化がすすむ



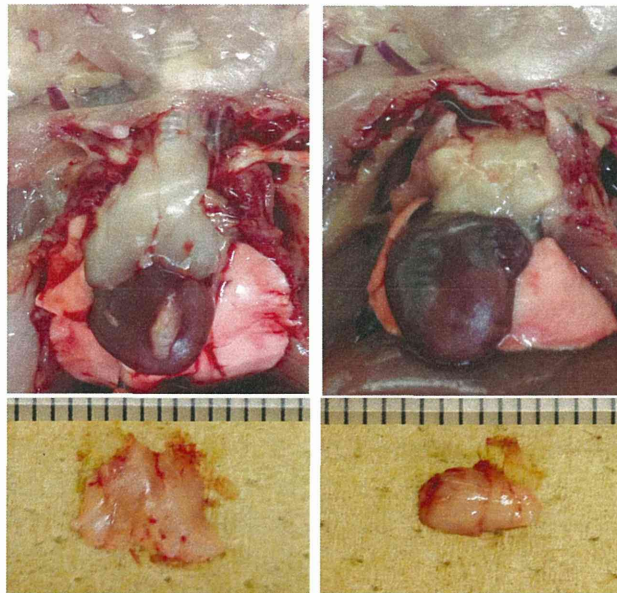
胸腺におけるAhRの発現と自己免疫



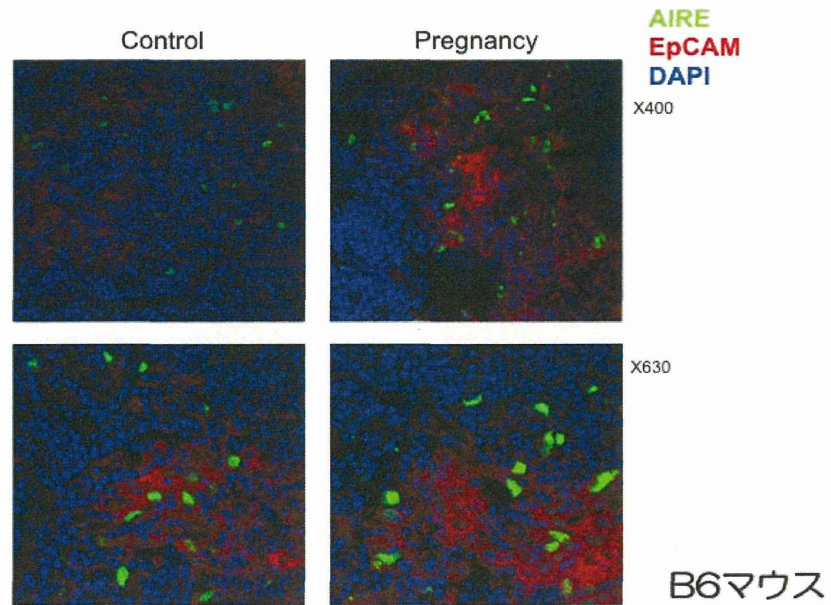
妊娠期における胸腺組織の変化

非妊娠

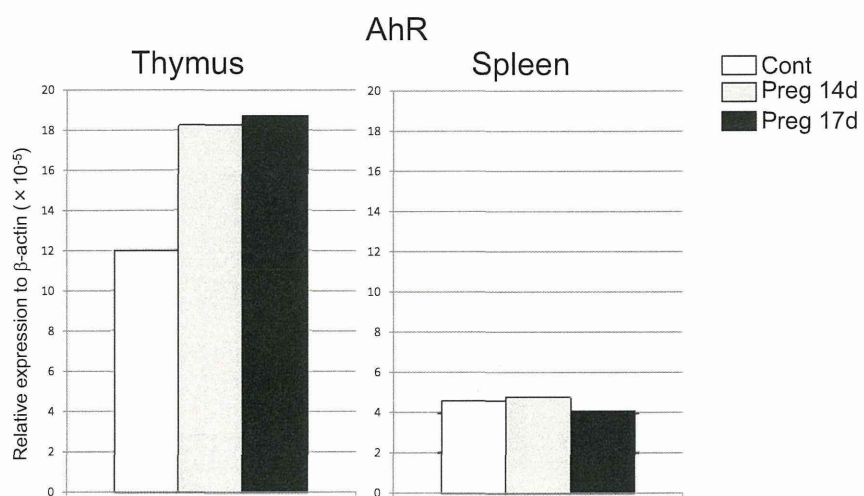
妊娠(15日目)



妊娠期における胸腺組織でのAIREの発現



妊娠期におけるAhRの発現



B6マウス (12週齢)

実験(1) 妊娠期胸腺組織へのTCDD添加による遺伝子発現解析
(*in vitro*)

(A)非妊娠B6マウス(10週齢)



(B)妊娠(15日目)B6マウス(10週齢)



(C)非妊娠AhRKOマウス(10週齢)



(D)妊娠(15日目)AhRKOマウス(10週齢)



Mouse T Helper Cell Differentiation PCR Array

RT² Profiler PCR Arrays (Quiagen) (Cat no; PAMM-501Z)

Cytokines & Receptors: Ccl11, Ccl5 (Rantes), Ccl7 (Mcp-3), Ccr3, Ccr4, Ccr6, Csf2, Il12b, Il12rb2, Il13, Il13ra1, Il17a, Il17re, Il18, Il18r1, Il18rap, Il1r1, Il1r2, Il1rl1, Il2, Il21, Il2ra, Il4, Il4ra, Il5, Il9, Tnf.

T Helper 1 Subtype Markers: Csf2, Havcr2, Igsf6, Il12b, Il18, Irf1, Socs1, Socs5, Tlr4, Tlr6, Tnf.

T Helper 2 Subtype Markers: Ccl11, Ccl5 (Rantes), Ccl7 (Mcp-3), Ccr3, Ccr4, Cebpb, Gfi1, Gpr44, Icos, Il13ra1, Il4ra, Jak1, Nfatc1, Nfatc2, Nfatc2ip, Tmed1.

Transcription Factors: Cebpb, Fosl1 (Fra-1), Foxp3, Gata3, Gata4, Hoxa10, Hoxa3, Id2, Irf4, Irf8, Maf, Nfatc1, Nfatc2, Nfatc2ip, Nr4a1, Nr4a3, Pou2f2, Rel, Rora, Rorc, Runx1 (Aml1), Runx3, Stat1, Stat4, Stat6, Zbtb7b, Zeb1.

Epigenetically Regulated Genes: Th1 Cells: Ifng, Il12rb2, Il18r1, Il18rap, Fasl (Tnfsf6), Tbx21. Th2

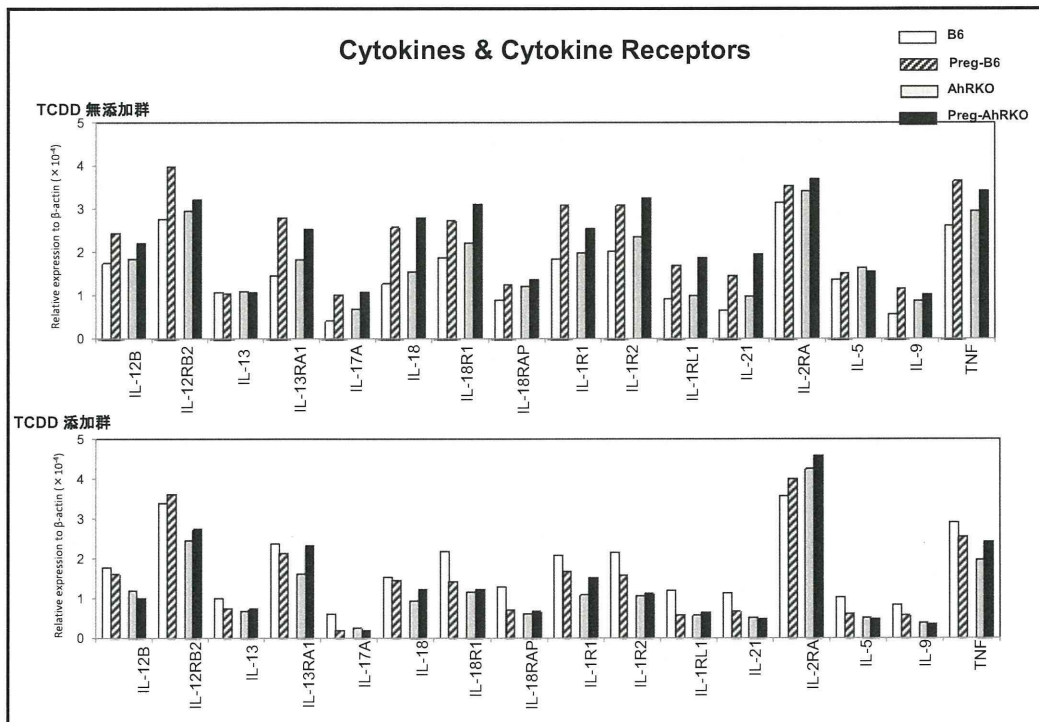
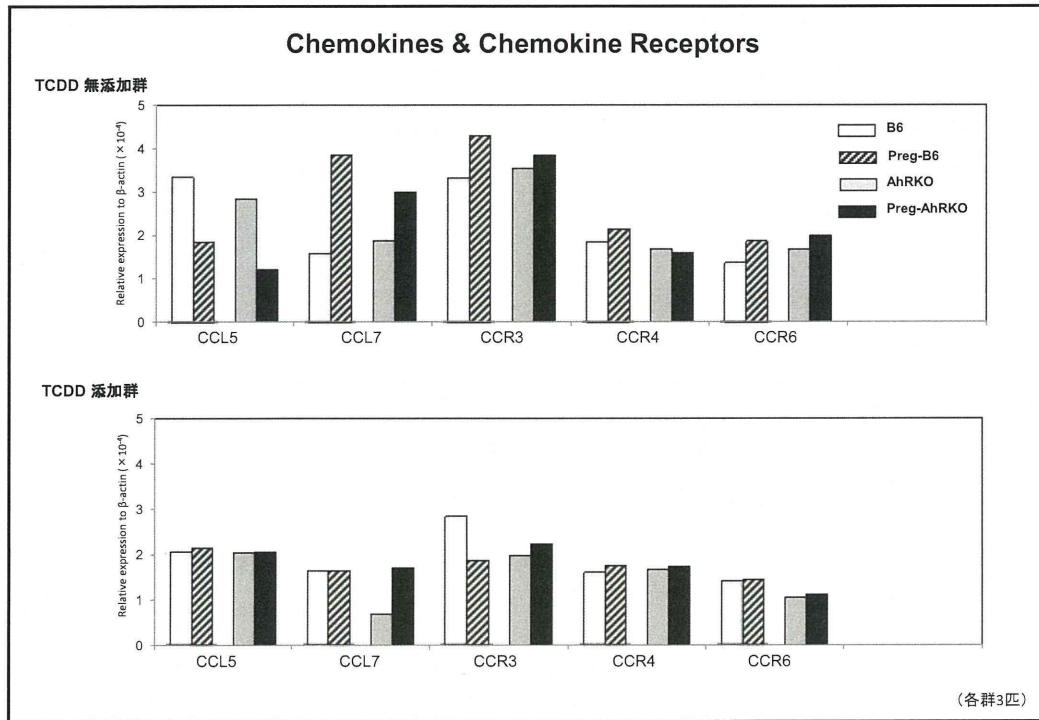
Cells: Asb2, Gata3, Il13, Il1rl1, Il4, Il5, Pparg. Th17 Cells: Il17a, Il17re, Il1r1, Il21, Rora,

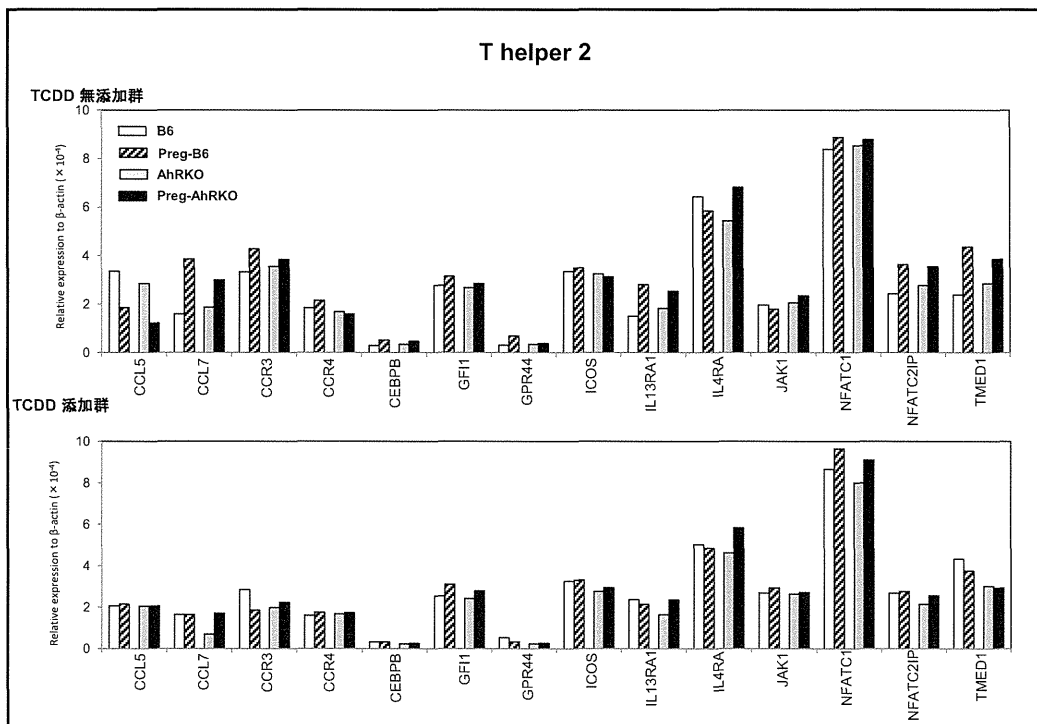
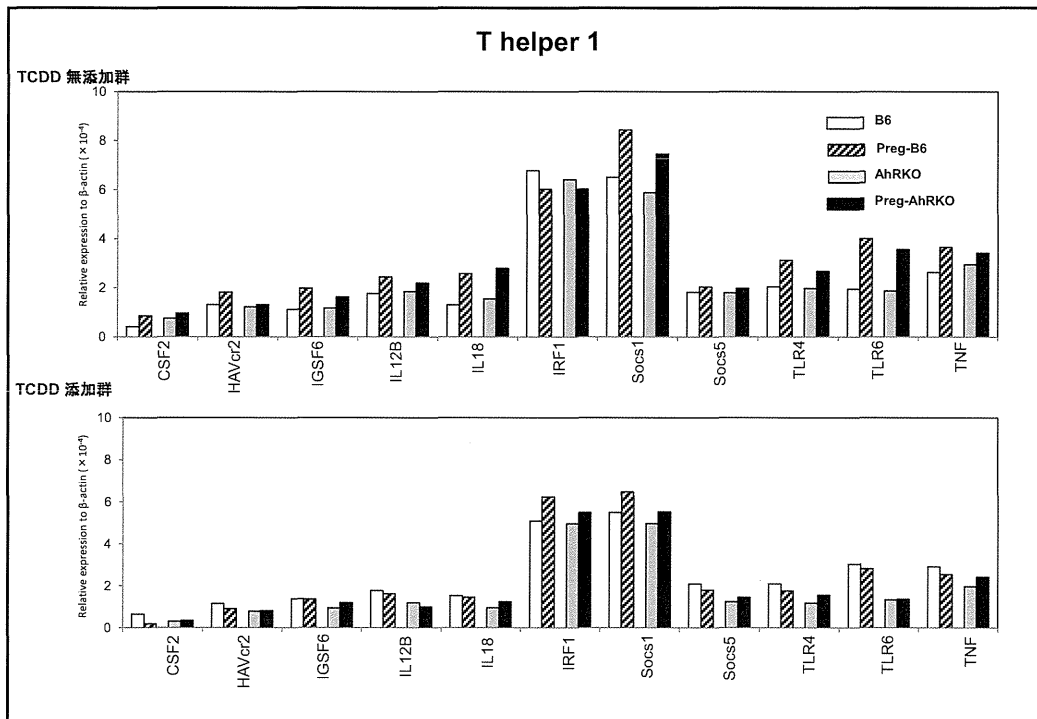
Rorc. Inducible and Natural Regulatory T (iTreg and nTreg) Cells: Ccr6, Fosl1 (Fra-1), Foxp3, Ikzf2, Il9,

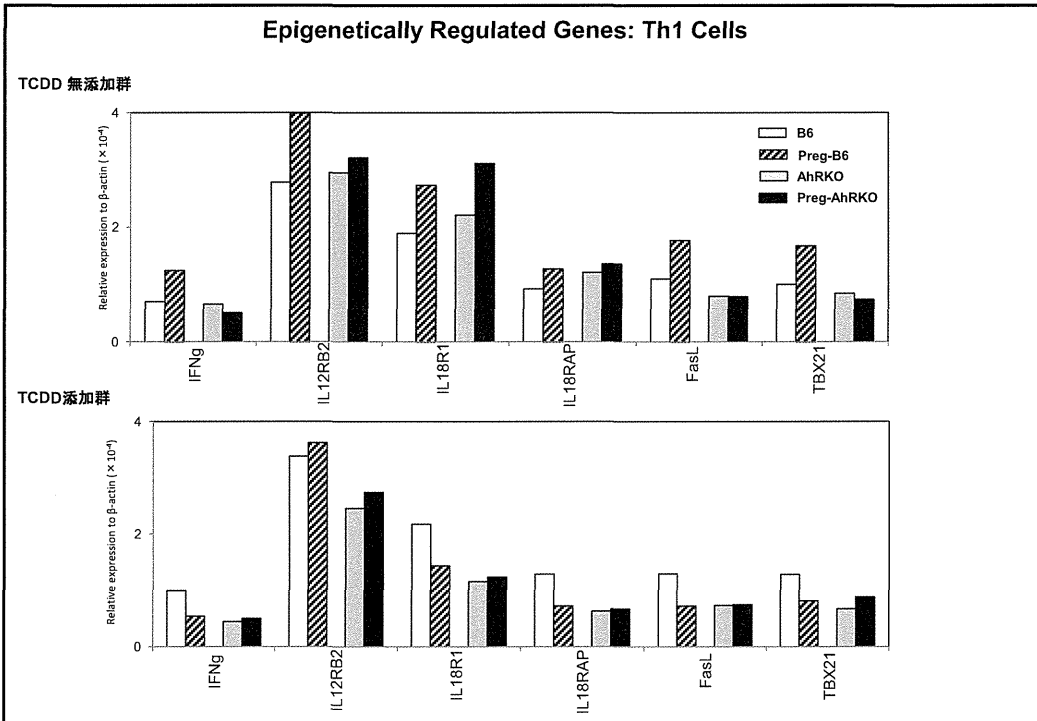
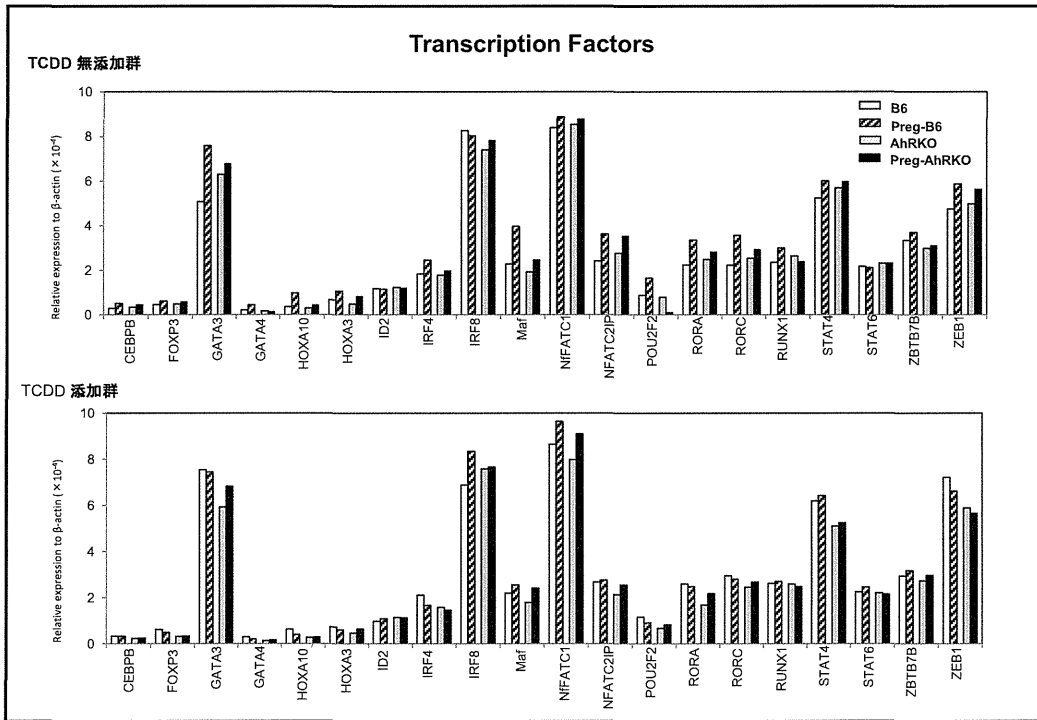
Irf4, Irf8, Myb, Nr4a1, Nr4a3, Pou2f2, Rel, Tgif1, Tnfsf11. Conventional Versus Regulatory T Cells:

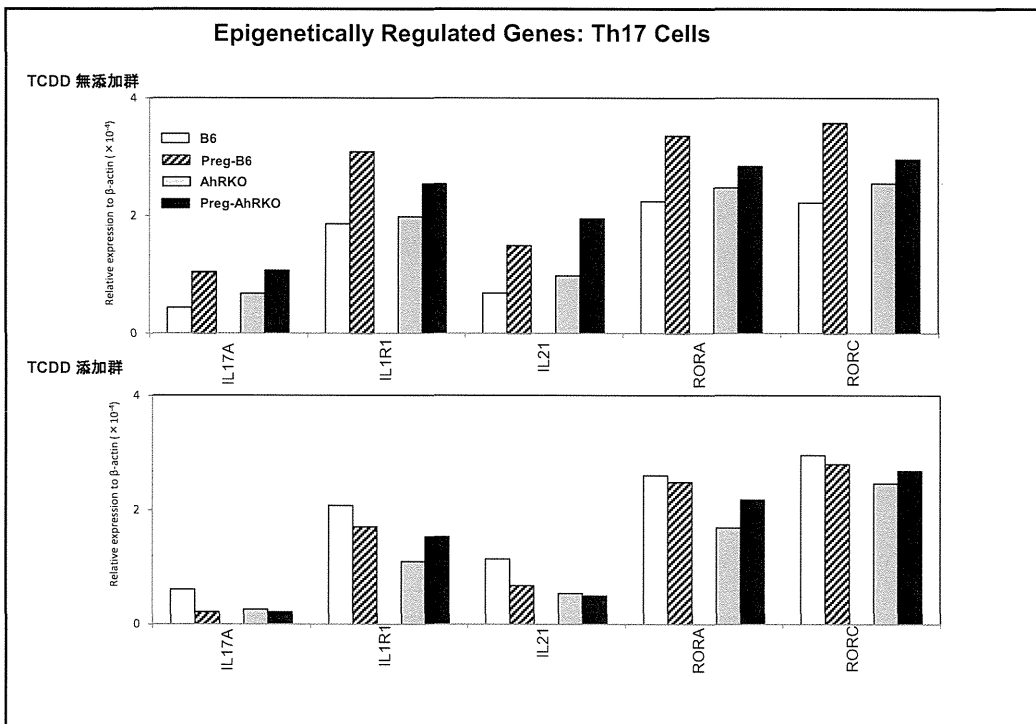
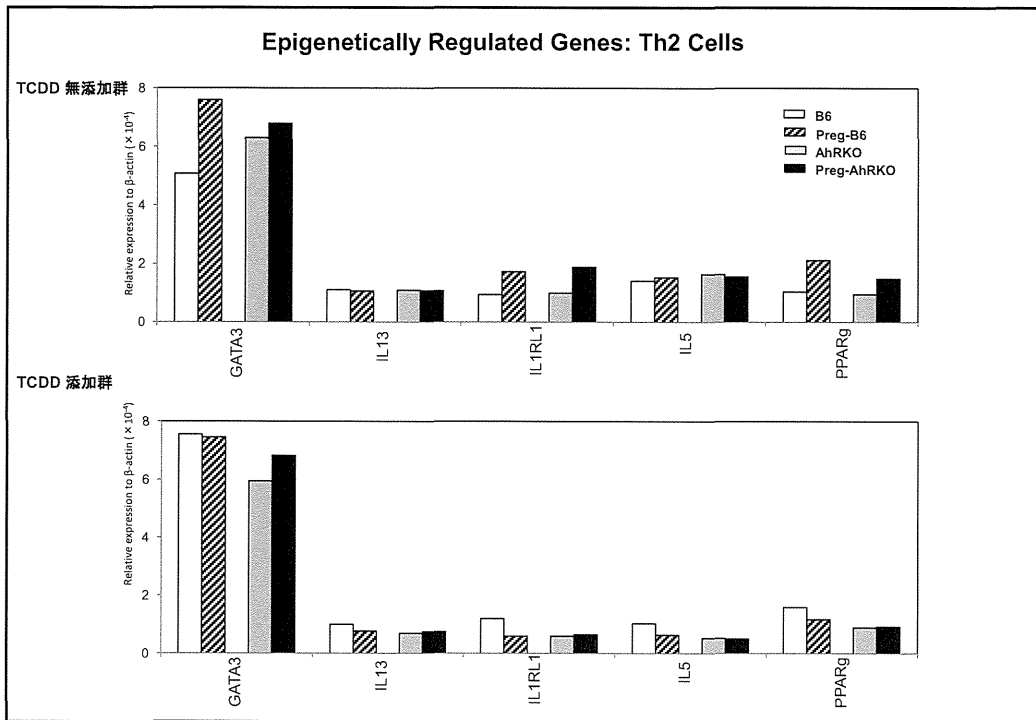
Cacna1f, Chd7, Foxp3, Gata4, Hopx, Hoxa10, Hoxa3, Id2, Ikzf2, Il1r2, Il2ra, Lrrc32, Perp, Pkd2, Tnfrsf9, Trp53inp1, Uts2, Zeb1.

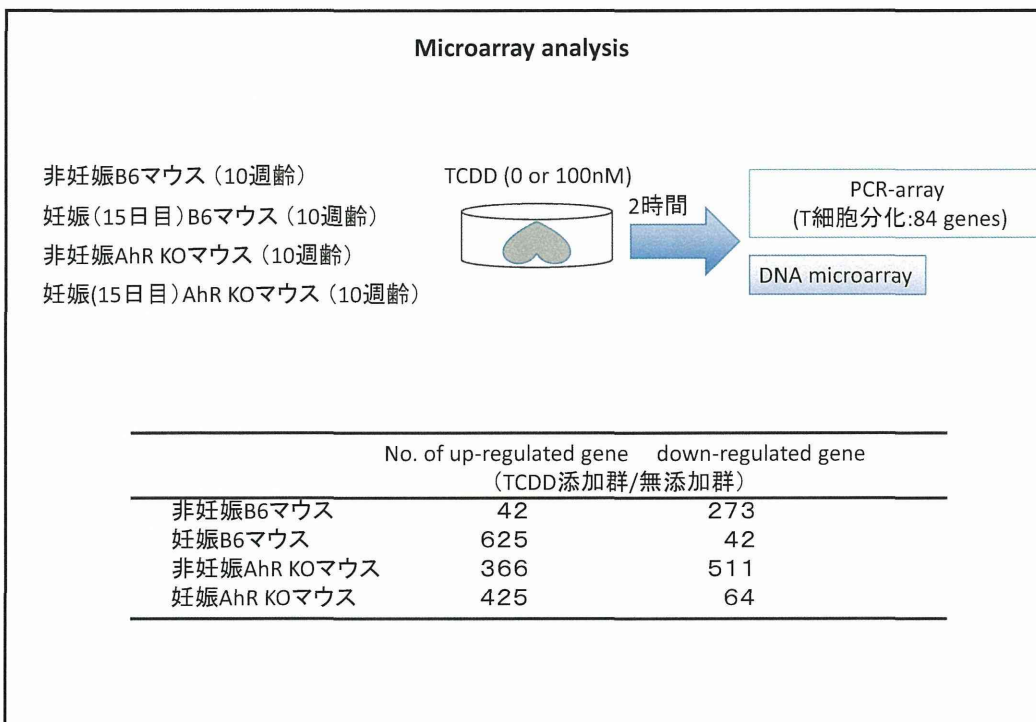
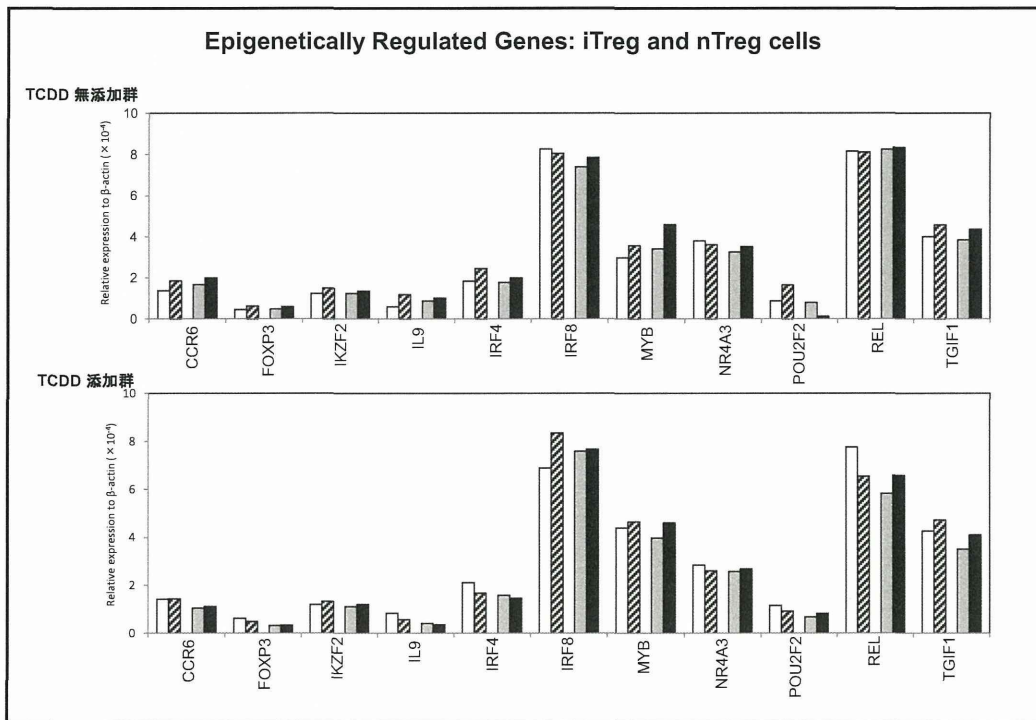
Total 84genes



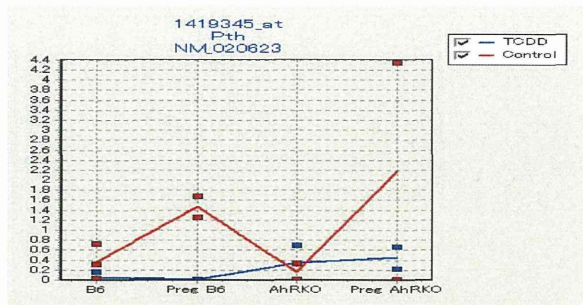




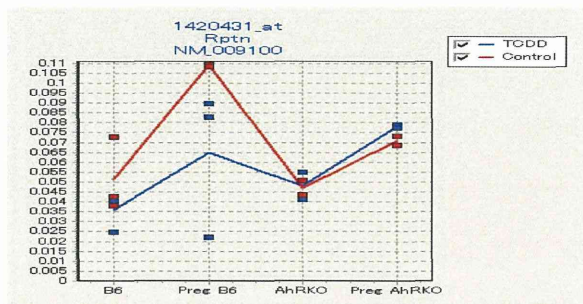




Microarray analysis



PTH : parathyroid hormone



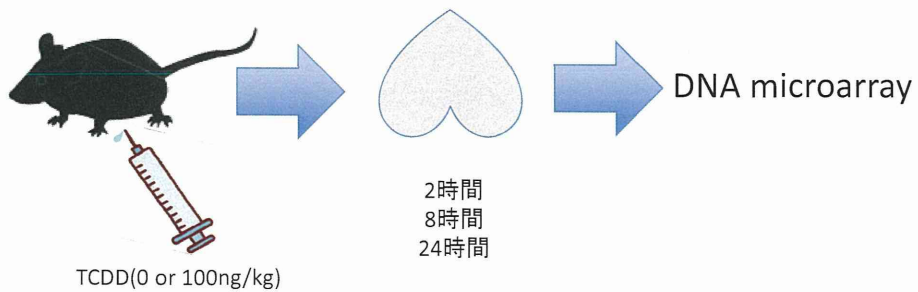
RPTN : repetin

- murine epidermal differentiation gene
- similarity to the genes of the intermediate filament-associated proteins profilaggrin and trichohyalin.

赤線がTCDD非添加群(各群3匹)。青線がTCDD添加2時間後の遺伝子変化(各群3匹)

実験(2) 妊娠期胸腺組織の *in vivo* でのTCDD投与による遺伝子発現

- (A) 非妊娠B6マウス (10週齢)
- (B) 妊娠(15日目)B6マウス (10週齢)
- (C) 非妊娠AhRKOマウス (10週齢)
- (D) 妊娠(15日目)AhRKOマウス (10週齢)



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

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
研究分担者:井口泰泉
自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授
研究協力者:宮川信一
自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究要旨

内分泌かく乱物質の発生期における影響として、晩発性あるいは継世代性の影響が示唆されてきている。未成熟な発生途上の動物に対する長期的かつ不可逆的な応答について、雌性生殖管をモデルとして、女性ホルモンと、その作用をメディエイトするシグナル因子の候補としての Pten/PI3K/Akt とのクロストークの解析を行った。雌性生殖器官において女性ホルモンシグナルの下流とされる PI3K/Akt シグナルについて、Pten を欠失した遺伝子改変マウスを解析した。その結果 PI3K/Akt シグナルは女性ホルモン存在下あるいは非存在下において異なる機能を持つことが示唆され、雌性生殖器官のホメオスタシスに対して、きわめて大切な役割を果たしていることが明らかとなった。

A. 研究目的

女性ホルモン(エストロゲン)は生体の恒常性維持、生殖、発生・分化をはじめとした様々な局面で重要な機能を果たしている。それゆえ女性ホルモンシステムの破綻は、乳がんや子宮癌、不妊、骨粗しょう症や肥満などを引き起こし、生物の様々な活動に影響を及ぼす。こうしたホルモン関連の疾患の増加は近年社会問題化しているが、その発症メカニズムは不明な点が多い。さらに近年では、内分泌かく乱物質の発生期における影響として、晩発性あるいは継世代性の影響が示唆されてきている。成熟した動物への影響はホメオスタシスに基づいた応答

により長期的な影響を示さないが、未成熟な発生途上の動物に対する長期的かつ不可逆的な応答はほとんど理解が進んでいない。

輸卵管・子宮・膣からなる雌性生殖管は、生殖の場として生物の根源に関わる役割を担っており、その細胞増殖・分化は、女性ホルモンによってダイナミックに制御されている。雌性生殖器官の細胞増殖は女性ホルモンによって一過性に、つまり女性ホルモン依存的に制御されているので、生殖器官の癌とは、いわば“女性ホルモン非依存の細胞増殖”といえる。我々は、雌性生殖器官におけるホルモンシステムの破綻モデルとして、発生途上の未成熟な時期に対する女性ホルモン

曝露と、そのホルモン応答システムの破綻について解析を進めてきた。通常マウスの膣上皮は女性ホルモン依存的な細胞増殖を示すが、出生前後の周生期ないし生後5日目までに女性ホルモンを投与すると、成熟後膣上皮はホルモン非依存的な増殖を示すようになり、加齢に伴い腫瘍化する。現在のところ、雌性生殖器官において、正常時あるいは腫瘍形成時(あるいは“女性ホルモン非依存的な細胞増殖”時)の女性ホルモンの細胞増殖や分化に対する作用をメディエイトする因子の実体やそのメカニズムは未だ明らかではない。我々はこの点において、遺伝子改変マウスをも用いた解析からアプローチしている。

我々は前年度までに、雌性生殖器官における Wnt シグナルの作用や、女性ホルモンとの相互作用について解析を行い、他の多くの成熟動物の組織のように、マウス膣組織において Wnt/ β -カテニンシグナルの亢進は腫瘍形成に関与する可能性について報告した。本年度は雌性生殖器官において女性ホルモンシグナルの下流とされる PI3K/Akt シグナルについて、Pten を欠失した遺伝子改変マウスを解析した。

B. 研究方法

生命現象の様々な局面で重要な働きを担っている PI3K/Akt シグナルの、雌性生殖器官の発生・分化への影響を、遺伝子改変マウスを使って解析するために、膣上皮細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウス(K5-Cre)と、Pten^{flox} マウスを掛け合わせ、膣上皮細胞特異的 PI3K/Akt シグナル活性化マウス(K5Cre/+;Pten^{flox/flox})を作成した。K5-Cre マウスは大阪大学竹田潤二教授との共同研究として供与されたものである。Pten^{flox} マウスはジャクソン研究所より入手した。このミュータン

トマウスの表現型は、皮膚、食道を含む消化管などに重篤な表現型があるため (Cancer Res 2003, 63:674-681)、体が小さく視床下部-下垂体-性腺系への影響も考えられる。また、長期飼育下では様々な部位で腫瘍形成が起き、そのために二次的影響も避けられないと考えられた。そこで本研究では、卵巢を6週齢で除去し、視床下部-下垂体の影響をなくした状態で解析を行った。さらに2-3ヶ月齢という比較的早期に組織を採材した。

動物実験に関しては、自然科学研究機構動物実験委員会及び自然科学研究機構組換え DNA 実験安全委員会の承認のもと、関連する法令に従い、動物愛護の精神をもって行った。

C. 研究結果

本年度は、発生期化学物質曝露が誘導する組織不可逆化の発症メカニズムを、発生期化学物質曝露によって誘導される形質の原因遺伝子の同定およびその遺伝子の発現制御メカニズムの解析という観点から、多くの組織の発生・分化、細胞増殖、癌化に寄与している Pten/PI3K/Akt 経路に注目し、雌性生殖器における、Pten/PI3K/Akt 経路の内在的な機能を、膣上皮細胞特異的 PTEN コンディショナル KO マウスを用いて解析した。なお、Pten、PI3K、Akt それぞれの機能については、図1に示した。

本研究では PI3K/Akt 経路と女性ホルモンのクロストークをより詳細に解析するために、K5 プロモーター下で PI3K/Akt 経路が構成的に活性化しているマウス(K5Cre/+;PTEN^{flox/flox} マウス; PTEN は PI3K/Akt 経路を抑制的に制御するタンパクである)の解析を行った。PI3K/Akt 経路は女性ホルモンシグナルの下流にあるとされており、したがって我々は卵巢を除去した

Pten ミュータントマウスにおいて、女性ホルモン非依存に細胞増殖及び分化が起きることを予想した。しかし卵巣除去した Pten ミュータントマウスの膣上皮は、特に suprabasal cell (基底細胞より上層の細胞)において過形成が起きており部分的に上皮層内に内胞を形成した、異常な組織像を示した(図 2)。この suprabasal cell は PAS あるいは Alcian blue 陽性であり、粘液を過剰に分泌していることが示された(図 2)。角質化細胞は見られず、各種分化マーカー解析からも、膣上皮細胞の適切な重層角質化への分化が行われていないことが明らかとなった。細胞増殖やアポトーシスを BrdU 免疫染色法及び TUNEL 法で解析したところ、細胞増殖は Pten ミュータントマウスで亢進していた。(図 3)。とくに、通常膣上皮の細胞増殖は基底膜に接した細胞しかしなが、ミュータントマウスでは基底膜を離れた細胞も BrdU を取り込んでいた(図 3)・細胞死に関してはミュータントと対照群で差は見られなかった。女性ホルモンを投与すると、膣上皮は正常に分化し、角質化した(図 4)。一方、E2 投与後 1 ヶ月放置すると、膣組織はまたもとの suprabasal cell の過形成及び粘液細胞分化が起きる。したがってこの Pten ミュータントマウスの表現型は、女性ホルモン依存的であるといえる。

Pten ミュータントマウスの異常な上皮の形態形成の原因をより詳細に調べた。mTOR は Akt の下流のシグナルであり、様々な細胞機能を制御する因子であり、ウェスタンブロットにより、ミュータントマウスでは Akt に加え mTOR のリン酸化も亢進していることがわかった(図 5)。mTOR のインヒビターであるラパマイシンを Pten ミュータントマウスに投与したところ、過形成を示す膣上皮細胞の一部が退縮したことから(図 5)、Pten ミュー

タントマウスの上皮の過形成の原因の一部は mTOR の活性化であることが示された。また、分泌細胞への分化については、MAPK のリン酸化が亢進していることが原因であることが示唆された(図 6;異常な粘液分泌と MAPK カスケードの活性化については、例えば Development 2004, 131:4955-4964)。なお、Akt や MAPK は女性ホルモン受容体 α (ER α)をリン酸化し活性化することが報告されている。実際ミュータントマウスにおいて ER α はリン酸化が亢進していたが(data not shown)、下流として考えられる細胞増殖因子の発現は対照群と比べて変化していなかった。したがって、ミュータントマウスにおける ER α リン酸化の寄与は不明である。マウス膣組織における Pten とリン酸化 Akt の発現については図 7 に示した(下記考察参照)。

D. 考察

PI3K/Akt 経路は多くの組織で腫瘍形成に寄与している経路である。特に遺伝子改変マウスを用いた解析から、皮膚を含む多くの重層扁平上皮から構成される器官での発癌が報告されている。女性生殖器官においては、女性ホルモンシグナルの下流に位置し、子宮や膣上皮の細胞増殖及び分化に関与することが我々を含む研究室から報告されている。また、新生仔女性ホルモン曝露した膣の上皮細胞では、Akt が女性ホルモン非依存にリン酸化すなわち活性化されていることを示してきた。したがって我々は Pten ミュータントマウスにおいて、女性ホルモン非依存に細胞増殖及び分化が起きることを予想していたが、卵巣除去した Pten ミュータントマウスの膣上皮は、特に suprabasal cell (基底細胞より上層の細胞)において過形成が起き