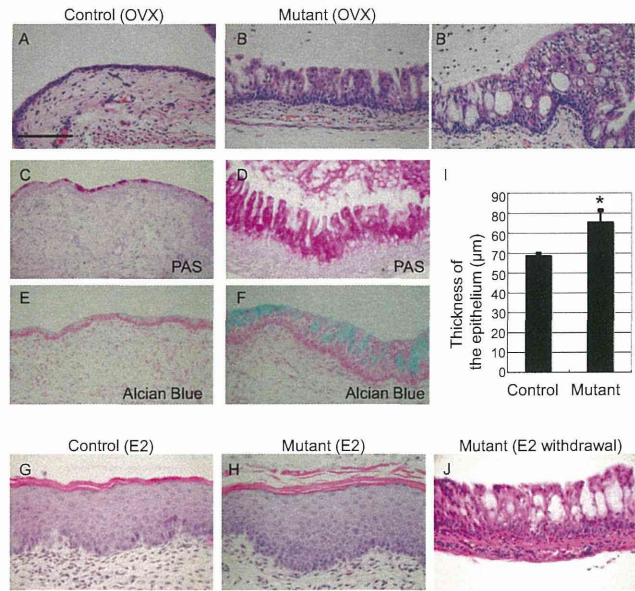
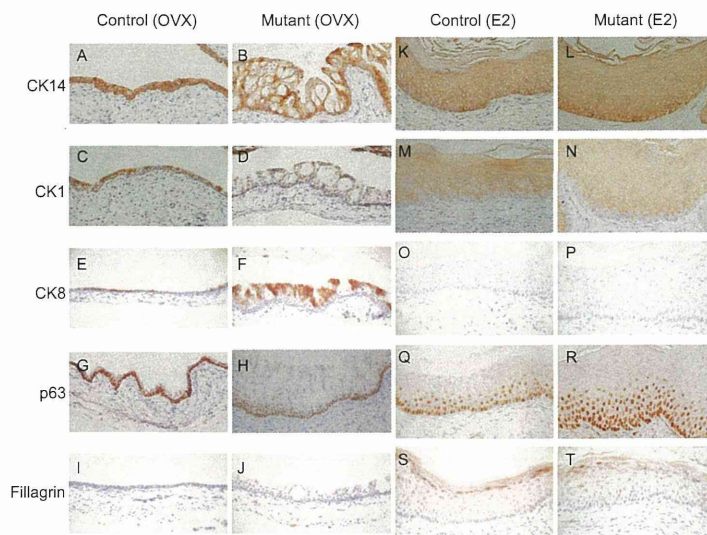


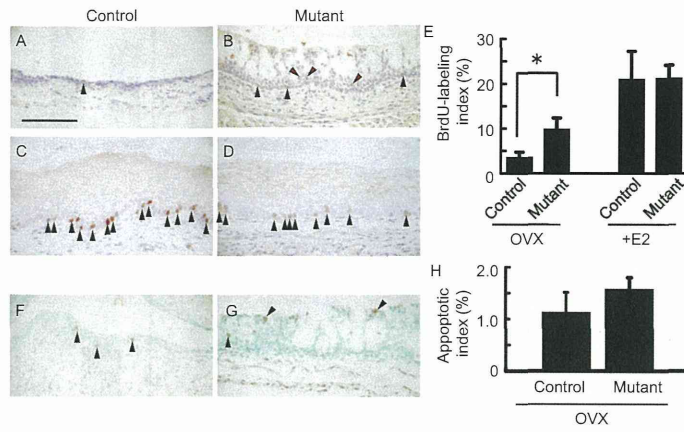
*Effect of epithelial cell-specific inactivation of Pten on the mouse vagina*



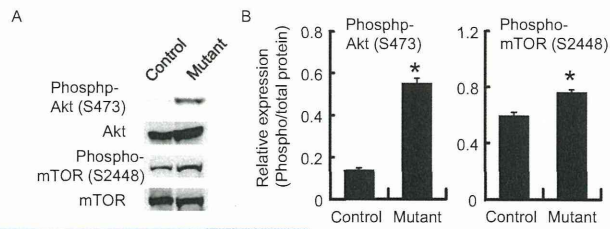
*Expression pattern of cell differentiation marker in mouse vagina*



*Pten* mutation leads to cell proliferation but not contribute to cell survival in mouse vagina



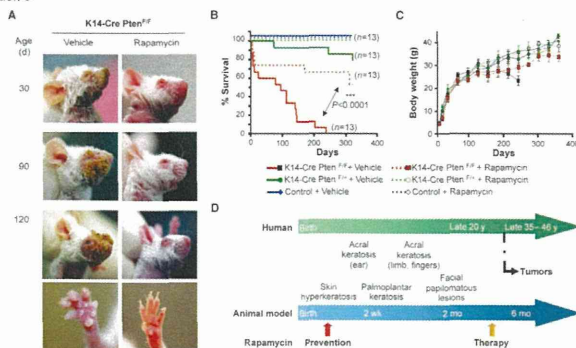
*mTOR* activation is associated with hyperplasia in mouse vagina



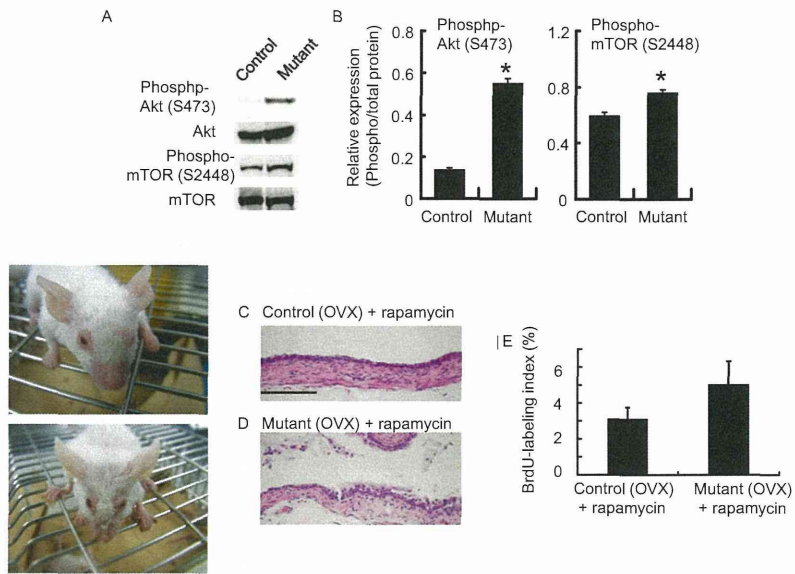
Research Article  
**Chemoprevention and Treatment of Experimental Cowden's Disease by mTOR Inhibition with Rapamycin**  
 Cristiane H. Squarize, Rogerio M. Castillo, and J. Silvio Gutkind

*Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH, Bethesda, Maryland*

Cancer Res 2008 (68) 7068-



*mTOR activation is associated with hyperplasia in mouse vagina*



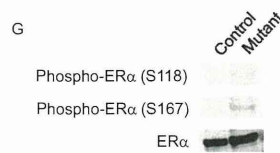
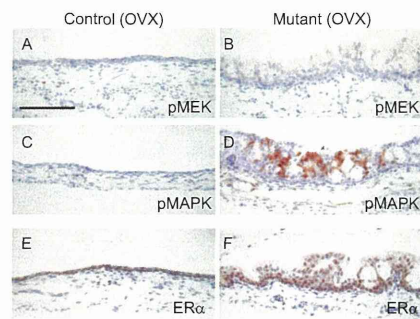
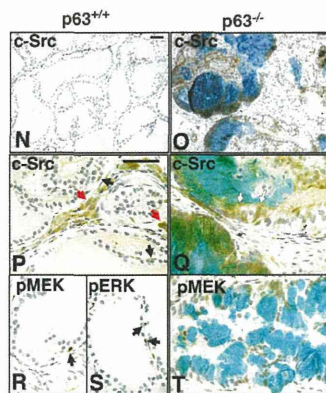
*Pten mutation results in MAPK and ER $\alpha$  phosphorylation*

Research article Development 2004 (131) 4955-

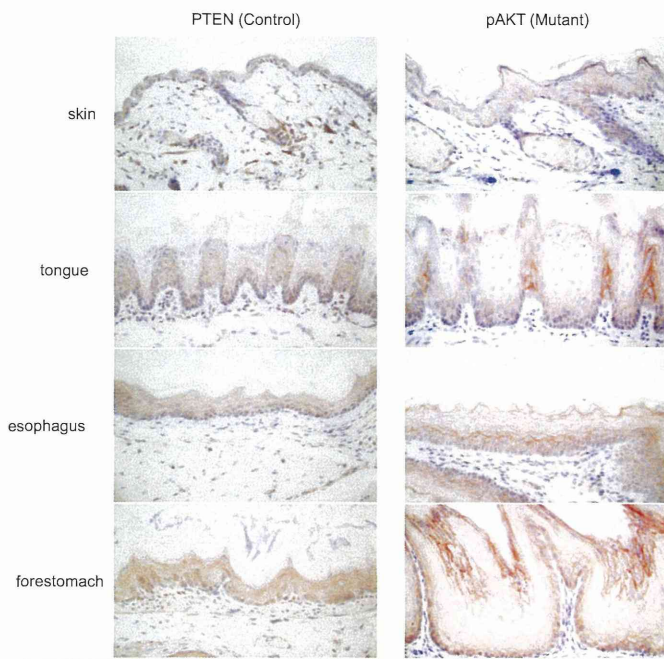
**Role of p63 and basal cells in the prostate**

Takeshi Kurita<sup>1,\*</sup>, Roanna T. Medina<sup>1</sup>, Alea A. Mills<sup>2</sup> and Gerald R. Cunha<sup>1</sup>

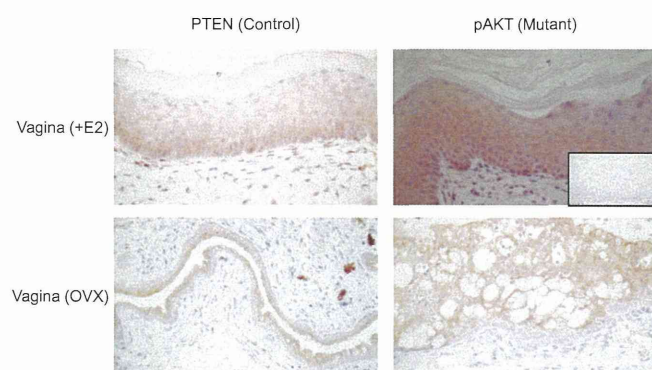
<sup>1</sup>Department of Anatomy, University of California, San Francisco, CA 94143-0452, USA  
<sup>2</sup>Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 11724, USA



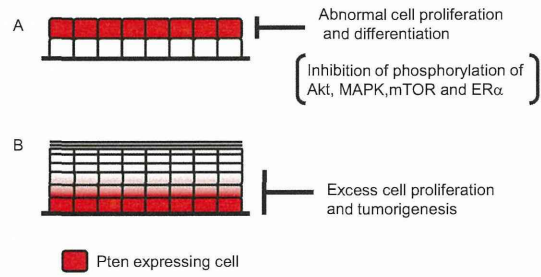
Localization of *Pten* expression in the control and phospho-Akt expression in the *Pten* mutant mice



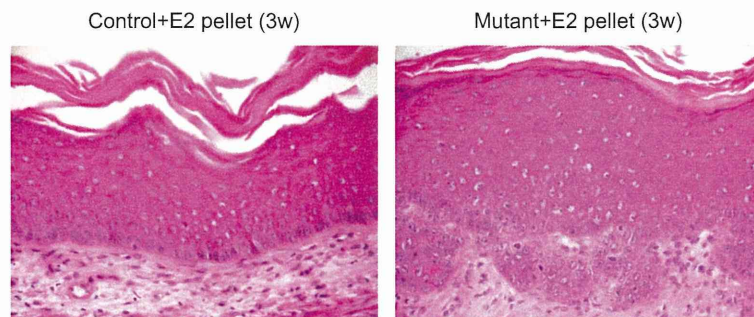
Localization of *Pten* expression in the control and phospho-Akt expression in the *Pten* mutant mice



*Pten expression and its regulation of homeostasis for mouse vagina*



*Prolonged E2 exposure results in downgrowth with an irregular basal layers in the mutants*



#### まとめ

Ptenの不活性化 (PI3K-Aktの活性化)は、膾上皮膚suprabasal cellにおいて、異常な粘液の産生を伴う過形成を誘導する(他の扁平重層上皮と異なる)

Ptenの不活性化 (PI3K-Aktの活性化)は、膾上皮膚細胞の完全な細胞増殖・分化を誘導するには不十分である

膾上皮膚におけるPtenの役割は、エストロゲンの有無によって異なる(一つの組織において、Ptenの機能がエストロゲンの有無で異なる)

(環境化学物質に対するPten-PI3K-Akt経路の反応?どのようにクロストーク?)

研究課題名: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 毒性部室長

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) 培養系において低濃度(1nM)BPA 投与により non-coding RNA の Malat-1 が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 Malat-1 遺伝子の発現増加現象の分子機構を調べるため、BAC クローンから転写開始点上流 9kb 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。並行して Malat-1 遺伝子の機能解析のための同遺伝子ノックアウトマウスの作製の為のターゲティングベクターを構築し、相同組み替え ES 細胞を2クローン得た。Malat-1 遺伝子の *in situ* hybridization を行った結果、マウス胎児脳で高発現が確認された。これらの試験系を確立し、BPA の影響解析を実施する。

## 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 発現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。

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。初年度は BPA による 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)。本年度は Malat-1 の上流に加えて、下流を含むベクターの構築、半減期の短いルシフェラーゼを用いたベクターの構築を行い、Cos-7細胞及びES細胞を用いたBPA用量作用関係を検討するルシフェラーゼアッセイを実施した。

## B.研究方法

### 1.Malat-1 遺伝子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

### 2.Malat-1 ノックアウトマウスの作製

Malat-1 発現増加の意義を明らかにするため、Malat-1 ノックアウトマウスの作成

を開始した。

### 3. Malat-1 の *in situ* hybridization 法の検討

マウス組織での malat-1 遺伝子発現の高感度検出法として Veritas 社の QuantiGene 法を用いて検討を行った。

(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 vitrogen 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)。次いで、5'側を sequential に短くしていき、ルシフェラーゼ活性に寄与している部位の同定を行った。5'側は 2.2kb まで短くしても非常に高いルシフェラーゼ活性を示したが、0.5kb まで短くすると活性は消失した。Malat-1 は 3'側にも進化的保存性の高い領域が 6kb ほどあるが、この部位はルシフェラーゼ活性を上昇させなかった。5'側 9kb と 3'側 6kb を両方組み込んだ reporter を導入した ES 細胞では、5'側のみの場合に比べ、レポーター活

性は4割程度低かった。(図3)。

2. Malat-1 発現増加の生物学的意味を明らかにするため、Malat-1 ノックアウトマウスの作成のためのターゲティングベクターを構築し(図4)、相同組み替え ES 細胞を2クローン得た。

### 3. Malat-1 の *in situ* hybridization 法の検討

Veritas 社の QuantiGene 法を用いてマウス胎児の malat-1 発現の検討を行った結果、胎児の脳組織の核にシグナルが特に強く発現していることを確認した(図5)。

4. 厚労省「試験スキーム」の拡充に関連し、米国 NIEHS における内分泌かく乱化学物質研究費研究班成果発表会にコメンテータとして参加し、情報収集と情報交換を行う。また、OECDの拡張型第一世代繁殖試験をサポートするための TG443 に付随するガイドンスドキュメント 151(GD151)の内容に関する意見交換を本年度も実施した。以上の活動を基盤に、厚労省「試験スキーム」の拡充に関わる厚労省検討会の活動について化学物質安全対策室との調整を開始した。

米国国立環境衛生科学研究所ビスフェノール A 研究費取得者研究会 (NIEHS BPA Grantee Research Meeting) (非公開) (日時:2013年1月29日、30日、会場:ノースカロライナ州リサーチトライアングルパークNIEHS 一階講堂)に招待され、米国における内分泌かく乱化学物質、特に低用量問題に関する研究の状況を視察した。ここ数カ



月で論文投稿を行う予定の未発表データを中心に発表とディスカッションが行われた。企画、司会は、Program Officer の Jerry Heindel 氏 (元 NIEHS 生殖毒性研究者)。研究内容は大きく、人暴露評価研究(疫学的研究を含む)と、In vivo 低用量毒性研究(動物実験を含む)とからなる。

後者は、BPA の周産期暴露(早期暴露)～遅発影響に沿ったプロトコールでの研究が殆ど全てで、これは、我々の進めている方向性と一致していた。メカニズムも、Epigenetics、即ち、DNA メチル化、ヒストンアセチル化などの DNA 修飾にその機構を求めている点も同一である。用量は、前立腺などは BPA 1~10 $\mu$ g/kg 体重付近での有害性の報告が中心。この濃度は、ER $\alpha$  を介したシグナル毒性として計算上容易に想定される用量域である。成熟個体に対する生殖毒性などは更に上の用量で有害影響を観測している。ただし、シグナル毒性という観点からの一般化は遅れている印象があり、標的によりなぜ用量域

が違うのかという、シグナル毒性の概念からは自明と思われる論議が行われていました。現象論のみの論議から脱し、Epigenetics に関わる物証を伴って評価できるところに来たところであるという認識は共通している。逆に言うと、受容体の同定の段階がスキップされていて、投与と有害事象発現を繋ぐ遺伝子発現制御に目が向いている結果である。この部分については、我々の方が理論的には綺麗に研究を進めているところである。

使用している技術の項目は、高速シーケンサーによる DNA メチル化測定、プロモーターチップなど各種新チップ使用、そこから IPA など有料インフォマティクスサイトの情報から絞り込んで、Bisulfite 法でメチル化部位確定、等、我々と同等

であるが、量的には若干米国に先を越されていた。論議の中で、「BPA を測定できない(尿など)のに、影響が明らかに表れること」があると複数の研究者が指摘。尚、BPA の標的は多岐にわたり、乳腺、前立腺、中枢神経、その他、心血管系、肥満・代謝病、免疫(喘息)まで及ぶ。

暴露の方は、症例数は少ないものの、胎児肝を直接測ったり、ボランティアによる PK、尿、血清の測定など。暴露源のひとつに、感熱紙(スーパーなどのレジの紙: 日本では非使用)からの経皮、間接経口暴露が一つのトピックになっていた(感熱紙に BPA や代替の Bisphenol S のモノマーが顔色剤として大量に塗布されている)。

日本で、OECD 等、国際的な対応を取るには、エピジェネティクス研究と、それによる網羅的な標的受容体同定(明らかに、エストラジオールと違う作用がある、また、代替品の BPS や BPF が異なった標的を持つことが想定されている)の研究の組織的な推進が必要であろう。

#### D. 考察

レポーター (Malat1-luciferase) を構築し、Cos-7 細胞及び ES 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行った結果、Malat-1 上流 2.2kb と 0.5kb の間に、発現に必須の promoter が存在する可能性が示唆された。また、9kb から 5.5kb へ短縮した際も活性が半分程度に低下したことから、この領域に、必須ではないが発現の増強に関わる enhancer が存在する可能性が示唆された。5' 側 9kb と 3' 側 6kb を両方組み込んだ reporter が 5' 側のみの場合に比べて 4 割程度活性が低かったことから、3' 側は抑制配列を含んでいる可能性が示唆された。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 Malat-1 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。Malat-1 ノックアウトマウス作製のためのターゲティングベクターが完成し、ES 細胞に導入して、相同組み替えクローンを既に得ており、現在、キメラマウスを作成中である。Malat-1 の *in situ* hybridization の系が確立されたので、今後、BPA 投与の malat-1 発現影響について明らかにする。

## E. 結論

Malat1 遺伝子上流 9kb を含むレポーターベクター、Malat-1 遺伝子ノックアウトマウス作製のための相同組み替え ES 細胞、Malat-1 の *in situ* hybridization の系の確立を済ませ、来年度初頭までにノックアウトマウスの作成を急ぎ、当初の予定どおりの解析を目指す。並行して、OECD 等国際的な活動との連携を図る活動を継続する。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ohta R, Takagi A, Ohmukai H, Marumo H, Ono A, Matsushima Y, Inoue T, Ono H, Kanno J., Ovariectomized mouse uterotrophic assay of 36 chemicals., J Toxicol Sci. 2012 Oct;37(5):879-89.

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

## 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

## H. 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

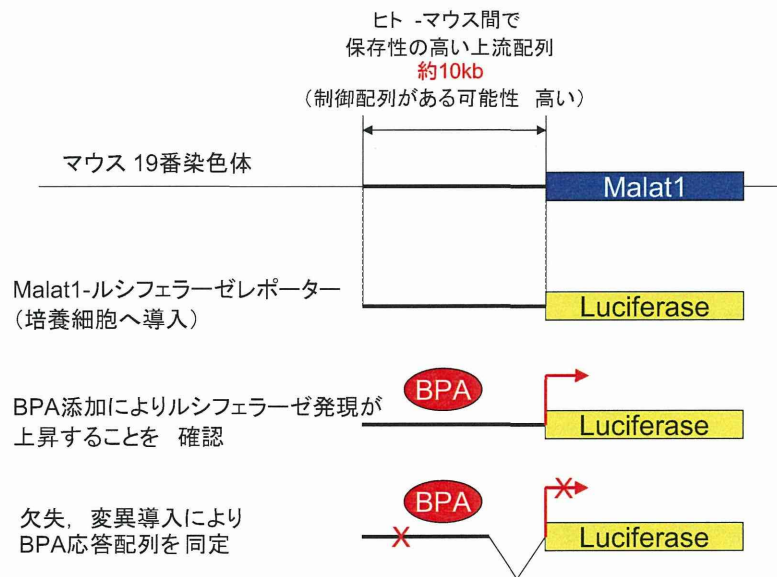
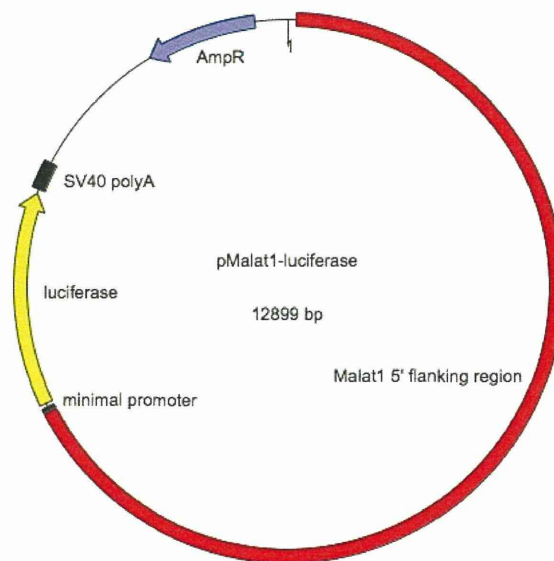


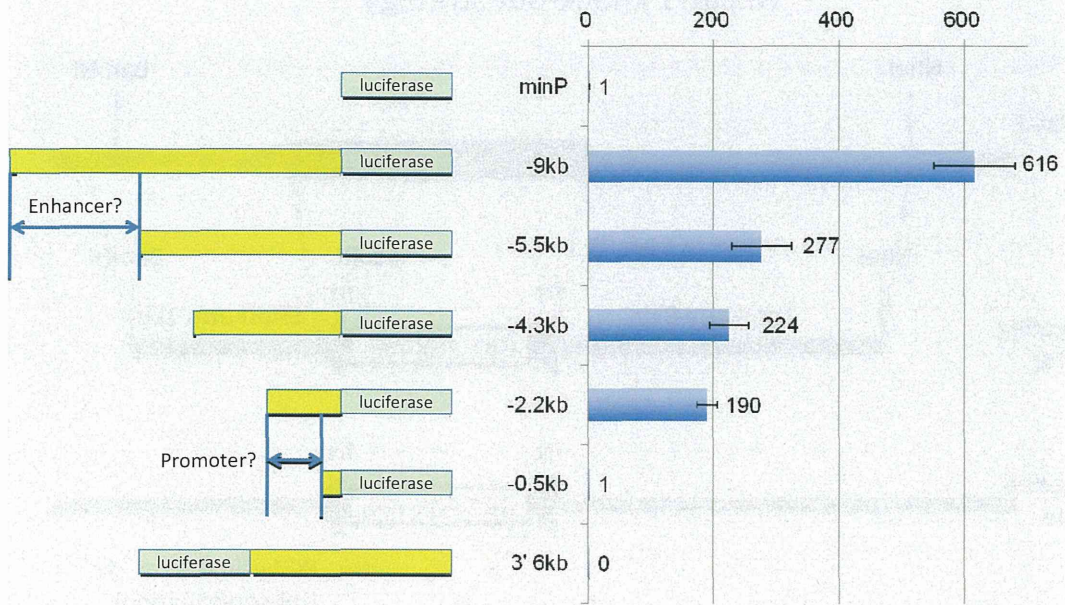
図 1. Malat-1-ルシフェラーゼレポーターの構成とそのアッセイ法の概略



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

Sequential dissection of 5'- and 3'- flanking sequence of Malat-1 (COS-7)



Sequential dissection of 5'- and 3'- flanking sequence of Malat-1 (ES cell line TT2)

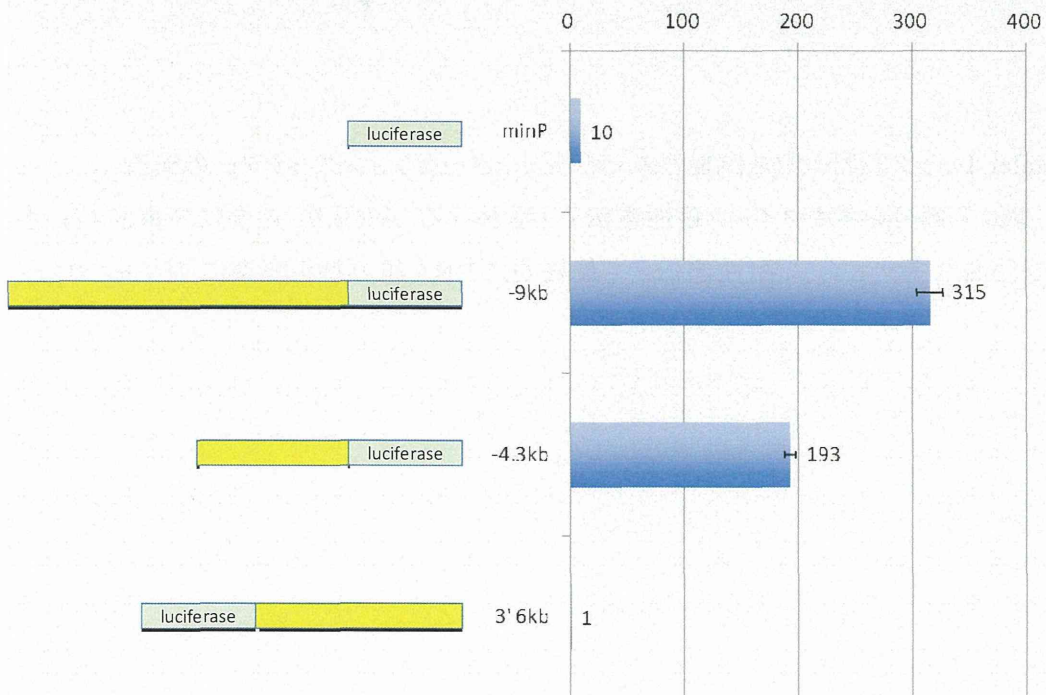


図 3. Cos-7 細胞 (上) 及び ES 細胞 (下) を用いたルシフェラーゼアッセイの結果

### Malat-1 knock-out strategy

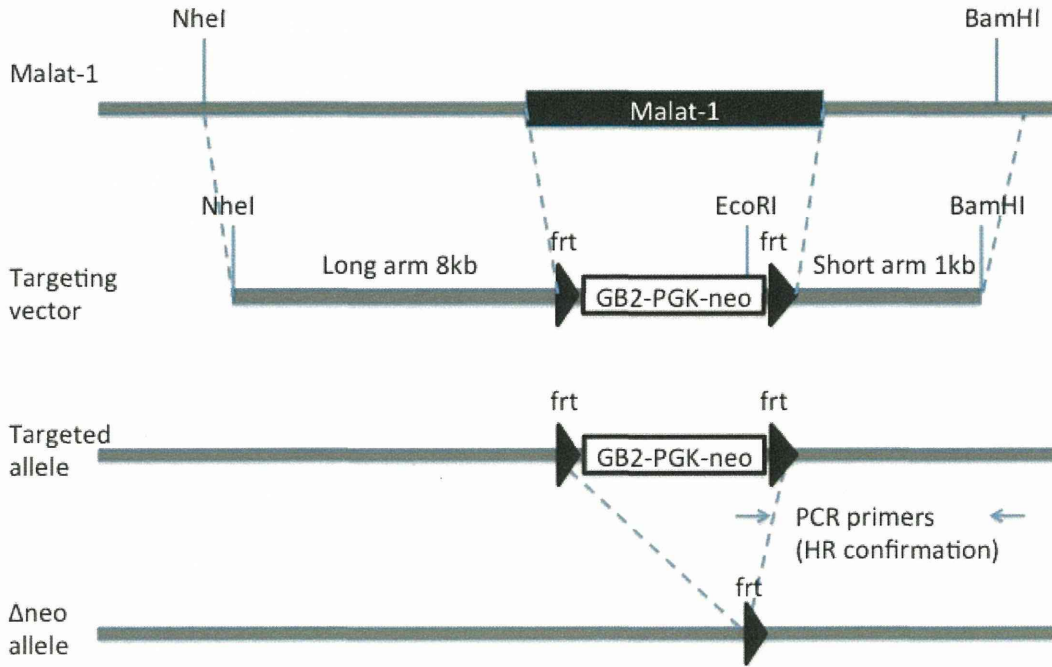


図 4. Malat-1 ノックアウトマウス作製の戦略とターゲティングベクターの構造  
 Malat-1 遺伝子部分をネオマイシン耐性遺伝子と置換することにより、完全に欠損させる。さらには、導入されたネオマイシン耐性遺伝子も最終的に DNA 組み替え酵素にて除去される。

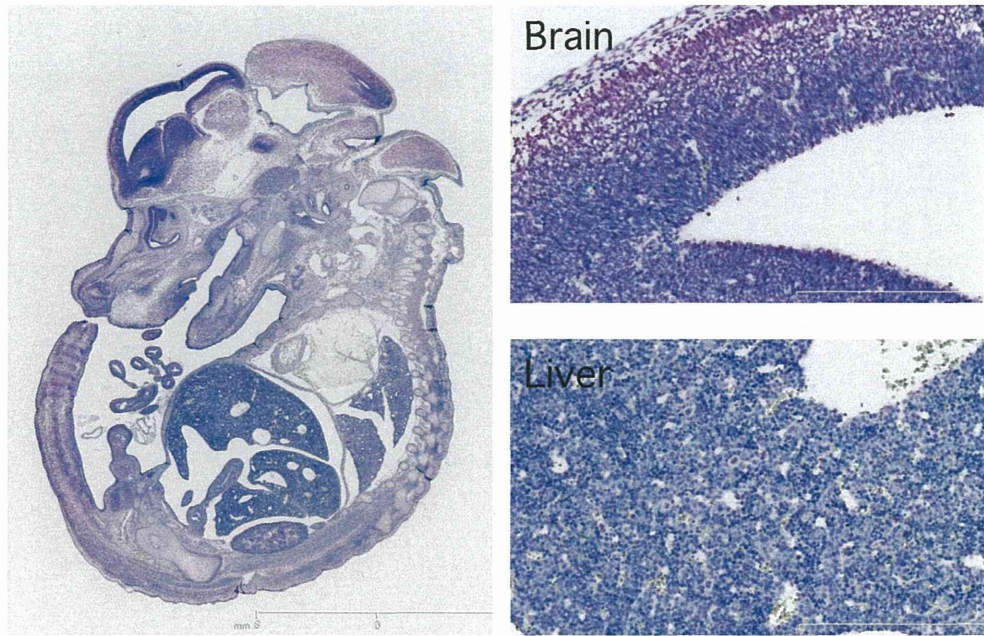


図 6.胎生 14.5 日のマウス胎児における malat-1 遺伝子の in situ hybridization 結果

平成24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 次

- ◆ Malat-1を中心とした遅発影響の分子標的解析研究
- ◆ OECD/WHO対応、厚労省検討会「試験スキーム」の拡充等



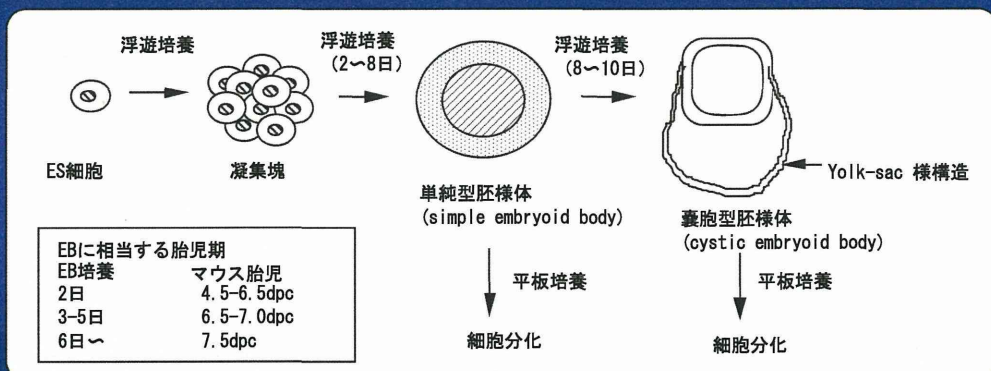
## 目的

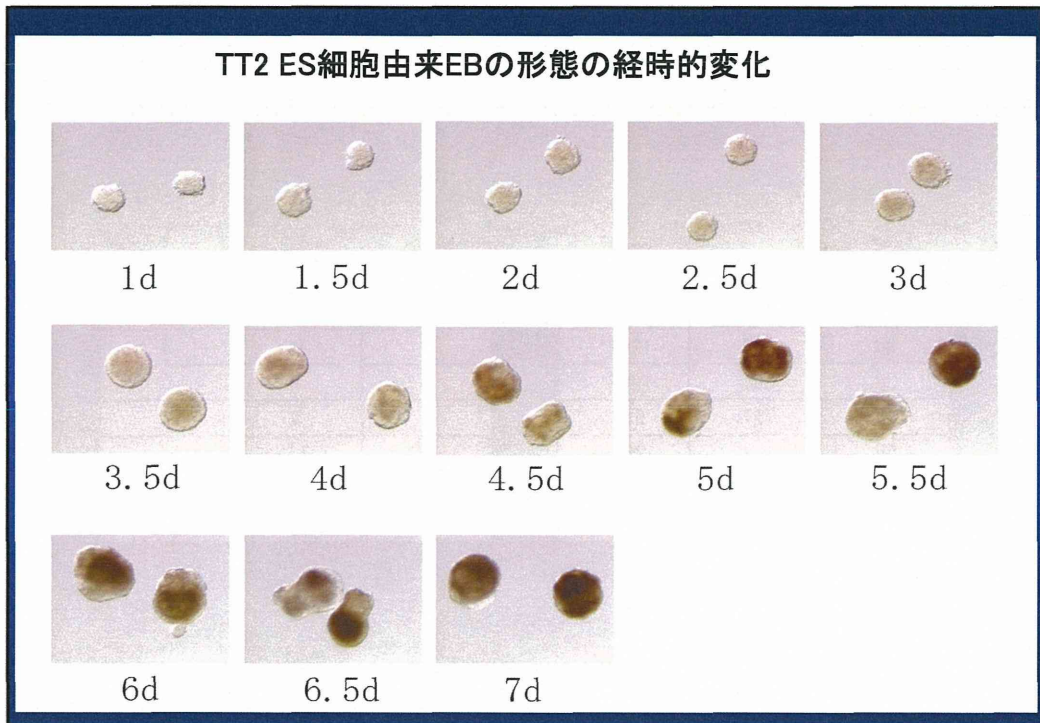
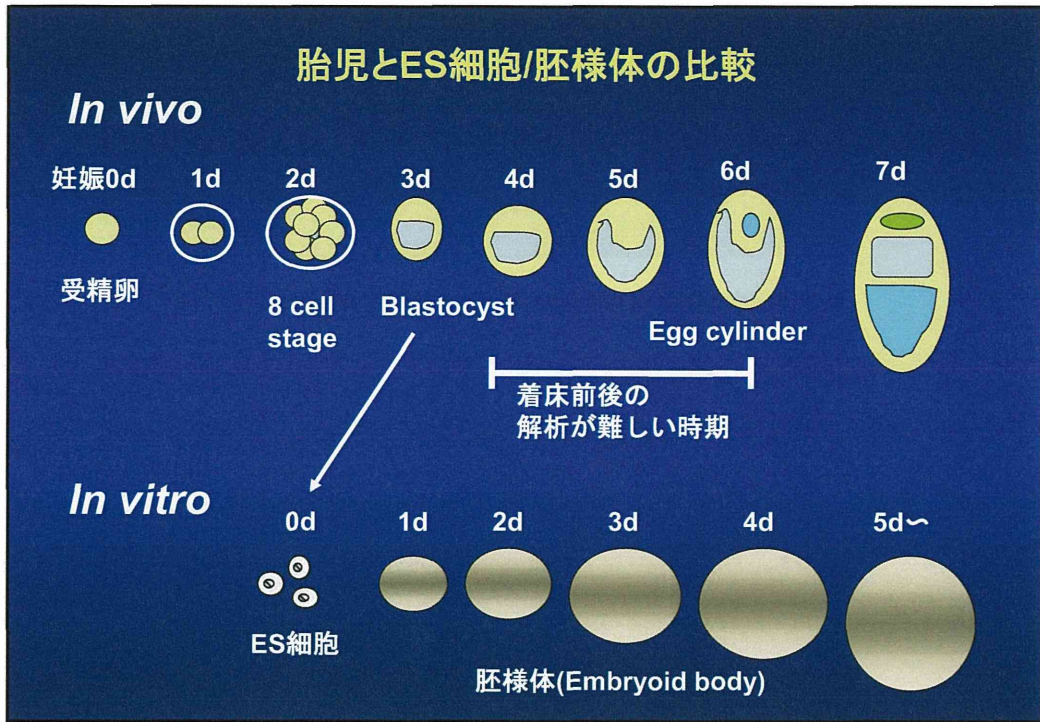
本研究は、ES細胞から形成された胚様体において、低濃度BPAで発現増加することを見出したnon-coding RNAのMalat-1遺伝子の発現増加の分子機構、in vivoでの標的臓器、ならびに発現増加の毒性学的意義を分子生物学的手法、発生工学的手法を用いて明らかにする。

このアプローチにより、化学物質の子どもへの影響評価に関する研究、特に発生・発達期の高感受性組織における責任標的の同定と、そこに低用量域において作用する化学物質の特性の一般化の端緒を得る。

## ES細胞と胚様体(Embryoid body)

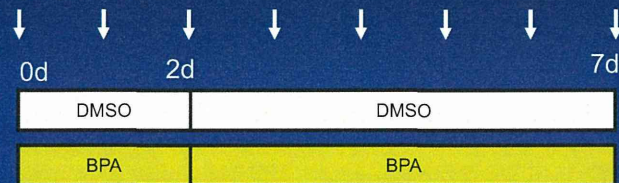
ES細胞の天井培養によるEBの形成





## 実験プロトコール

- ・細胞: ES 細胞 (TT2)
- ・培養: 7日間の浮遊培養



- ・培地: LIF(-)のES細胞培養用培地
- ・化合物: Bisphenol-A (1nM)
- ・溶媒: DMSO (final 0.1%)
- ・サンプリング: 0日(ES)と、1日目から1日ごとに7日目までのEmbryoid body (EB)を採取し、それぞれ独立に実験を行った。
- ・測定: アフィメトリクス社のGene Chip Mouse Genome 430 2.0 Arrayを用いて遺伝子発現解析。  
解析には定量的比較を正確に行うために、Percellome法を用いた。

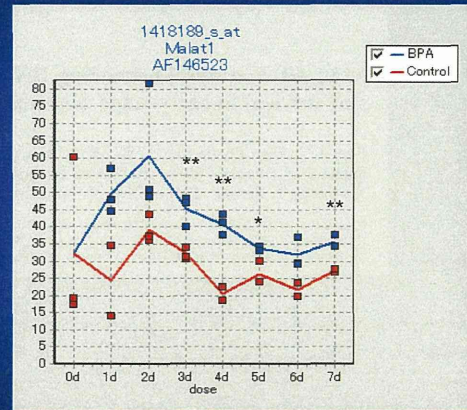
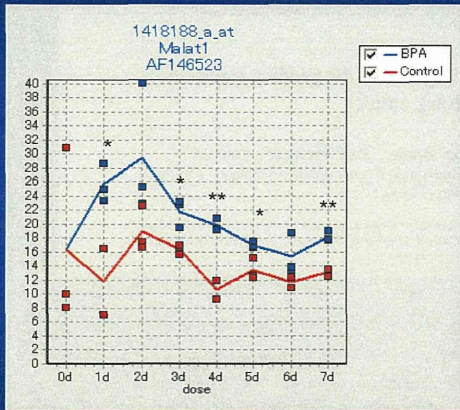
## 有意に変動した遺伝子数

	Up	Down
1d	3880	217
2d	426	1208
3d	361	1909
4d	757	612
5d	1016	364
6d	290	874
7d	9647	89

Time point	Up	Down
7	0	0
6	0	0
5	1	0
4	5	3
3	77	21
2	1673	300
1	12775	4598

45101 probe set中、 $p < 0.05$

## Malat-1遺伝子の発現増加

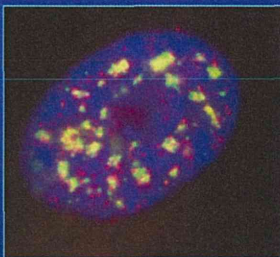


## Malat-1遺伝子

(Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1)

- ・転移性肺がん細胞で発現が高い遺伝子として発見された(2003)。
- ・核スペckルに存在するnon-coding RNAでスプライシング因子と共存し、スプライシングを制御していると考えられている。

Malat-1遺伝子の核内局在



human fibroblast  
Malat1 (red)  
SC35  
スプライシング因子

BMC Genomics, 8,  
39, 2007より

ES/EB分化系でのSC35(sfrs2)の発現パターン

