

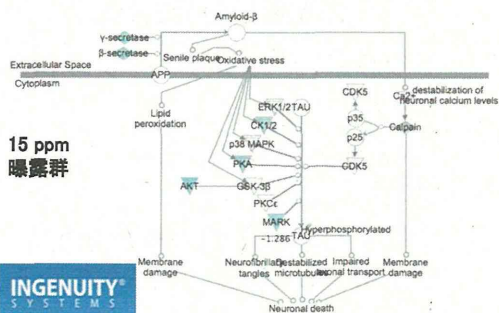
BPA曝露マウス海馬: mRNA発現解析

神経系発生-発達期のBPA曝露により、
成長後のマウス海馬に遺伝子発現抑制傾向が生じる。



遺伝子発現
 増加/抑制
 (p<0.01, ratio>1.2)

0.06 ppm 曝露群 **46/116**
 1 ppm 曝露群 **53/166**
 15 ppm 曝露群 **28/507**



神経軸索機能不全が疑われる。

遺伝子リストの重なり

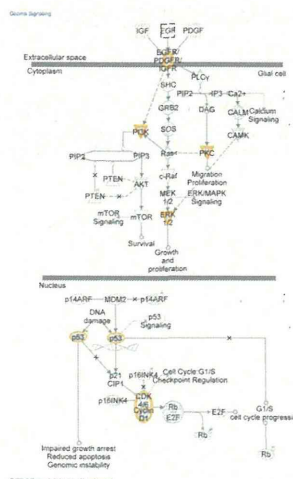
mRNA : 277遺伝子
 DNAmethylation : 702遺伝子



29遺伝子

- | | |
|--------|--------|
| ADAM15 | PRKCH |
| AUH | RELN |
| CCND1 | SDC3 |
| DNM2 | SIN3B |
| EGFR | SOX17 |
| ENPP3 | SRF |
| FLT1 | SYNJ2 |
| FXR2 | THOP1 |
| FYN | TP53 |
| GRIA1 | UBE2G2 |
| LMX1B | USP12 |
| MAPK3 | VIM |
| NTRK1 | VIPR2 |
| PARP14 | YWHAB |
| PIK3R4 | |

Glioma Signaling



まとめと考察-1

- 昨年度(タイリングアレイ)よりも測定精度が高く、網羅性にも優れた手法(次世代シーケンサー)によるDNAメチル化状況の網羅的測定を行った。
- その結果、やはり、DNAメチル化変化が示唆される結果が得られた。
- IPA解析から、神経機能に関連する機能カテゴリーが抽出された。
- 遺伝子発現変化の網羅的解析からも神経細胞機能不全が推察される結果が得られている。
- ビスフェノールAによるエピジェネティック影響の存在を示唆する結果として注目される。

25

まとめと考察-2

- DNAメチル化影響の持続性を踏まえると、成長後、影響が重篤化する可能性が考えられる。
- 曝露終了後、更に時間が経過した際の行動影響の検討も視野に入れた検討を行う。

26

妊娠後期のビスフェノールA暴露による遅発性行動影響に関する研究

研究分担者 岩野 英知

酪農学園大学 獣医学類 准教授

研究要旨

妊娠期のビスフェノールA (BPA) 暴露は胎仔に悪影響を及ぼし、その仔の成熟後の行動異常が報告されている。これまでに我々は、妊娠後期にBPAの代謝物であるBPA-GAが胎盤通過により胎仔へ移行することや、さらに移行したBPA-GAがBPAに再活性化される可能性があることを報告してきた。またさらに妊娠期のBPA暴露は、胎仔期の脳の葉酸代謝系を攪乱する可能性があることもみいだしてきた。そこで本研究では、妊娠後期のみBPA暴露が、出生成熟後の行動に影響を与えるのか、その場合葉酸の摂取量により行動影響に差が出るのかを検証した。

A. 研究目的

BPAはこれまでエストロゲン活性が注目され、BPAの研究の多くはエストロゲン活性に関連づけて報告されてきた。我々は、胎仔にBPAが移行・蓄積しても、そのBPA量はごく微量であることとBPAのエストロゲン活性は微弱であることから、これまで報告されているような悪影響がエストロゲン作用によるものだけとは考えられず、何か他の作用点があるのではないかと考えた。

BPAによる次世代個体への影響として、近年はエピジェネティクス機序への影響が注目されている。特に、アグーチマウスを用いた研究では、妊娠期のBPA暴露により、新生仔のメチル化レベルが低下し、その影響は、葉酸、メチル化供与体を与える事で、メチル化レベルが回復したとの報告がある。以上の点を踏まえ、本年度は、特に以下の3点に絞り、研究を行った。

1) 妊娠後期の暴露のみで行動に影響が現れるのか?

妊娠11日から18日のみに母親に経口投与し、子供が成長後、不安行動試験にてBPAの影響を評価した。

2) 葉酸量の違いによって、BPA影響がかわるのか?

餌に含まれる葉酸量を変えた場合の影響を評価した。

3) 安全域の上限(0.05mg/kg/day)で影響はでないのか?

餌や投与の違いにより、低容量のBPAでも影響がでるのか評価した。

B. 研究方法

交配2週間前から低葉酸餌(11ug/kg)と高葉酸餌(260ug/kg)、通常餌(260ug/kg)を給餌し、妊娠11~18日齢の間、BPAを胃内強制投与した(高BPA:10mg/kg/day 低BPA:50ug/kg/day、BPA無し:オリブオイルのみ)。出生後、3週齢までは、それぞれの群で同様の餌を給餌し、その後全ての群で通常餌にて10週齢まで飼育し、行動試験(高架式十字迷路試験)を行った。

本実験は、酪農学園大学動物実験委員会にて審査、受理され、適切な実験計画のもとに行われた。

C. 研究結果

低葉酸餌においては、BPA投与により、不安行動が増強されやすく、低容量のBPA投与によっても不安行動が増強された。その不安行動は、葉酸添加だけでは回復せず、葉酸以外の栄養素もBPAの影響に関与していることが示唆された。

D. 考察

妊娠後期のみの BPA 暴露で成熟後の不安行動が増強された事は、以下の点に関与していると考えられる。

①我々が報告してきた胎盤通過による胎仔への移行が関与するため、胎盤が発達する妊娠後期に移行しやすい。

②妊娠後期は、神経系の発達時期であり、BPA の影響が行動に現れやすい

母親が低葉酸餌を摂食していると、不安行動が増強されたが、葉酸量を増やすだけでは不安行動は完全に改善されず、葉酸以外の他の栄養素も関連していることが示唆された。

E. 結論

BPA の感受性が高い時期は、妊娠後期である可能性があり、その影響は、子供の成熟後の不安行動を増強することが示唆された。母親の栄養状態（葉酸不足や、その他の栄養素の過不足）により、BPA の影響が増強される事が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表（本研究に関わる主なもの 3 編に◎を付けてください）

1) 書籍

なし

2) 雑誌

①Komatsu T, Iwano H, Ebisawa M, Watabe A, Endo Y, Hirayama K, Taniyama H, Kadosawa T. Pathological classification of canine mammary tumor based on quantifying mRNA levels of hormonal receptors, SATB1, and snail in tissue and fine needle biopsy samples. *J Vet Med Sci*(2012), 74(6):719-26

②Higuchi, H., Ito, E., Iwano, H., Oikawa, S. and Nagahata, H. Effects of vitamin E

supplementation on cellular α -tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves 2012 *Can J. Vet Res* (2012),

③Fukumoto S, Hanazono K, Komatsu T, Iwano H, Kadosawa T, Uchide T. L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) Expression in Canine Mammary Gland Tumors. *J Vet Med Sci.* (2012), Nov 22.

④Suzuki K, Higuchi H, Iwano H, Lakritz J, Sera K, Koiwa M, Taguchi K. Analysis of trace and major elements in bronchoalveolar lavage fluid of Mycoplasma bronchopneumonia in calves. *Biol Trace Elem Res.* (2012), Feb;145(2):166-71.

2. 学会発表（発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入）

1) 獣医学会

① ○岩野英知、柳沢梨沙、對馬澄人、井上博紀、横田博：ビスフェノールA 暴露による次世代影響機序について、第 154 回日本獣医学会学術集会（2012 年 9 月 14-15 日）

2) 環境ホルモン学会

② ○岩野英知、大谷尚子、須田光紫、柳沢梨沙、種村健太郎、井上博紀、横田博：妊娠後期におけるビスフェノールA 暴露による次世代影響機序、環境ホルモン学会第15回研究発表会（2012年12月18 - 19 日）

③ ○奥山大輔、加藤美保、光石和馬、鈴木千鶴、細川佳純、岩野英知、井上博紀：ラット肝灌流モデルを用いた、ビスフェノールF代謝・動態の雌雄差、環境ホルモン学会第15回研究発表会（2012年12月18 - 19日）

④ ○村上由里子、細川佳純、奥山大輔、鈴木千鶴、光石和馬、岩野英知、井上博紀：Multidrug Resistance Associated Protein 2 を介したビスフェノールF 抱合体の輸送、環境ホルモン学会第15回研究発表会（2012年12月18 - 19日）

- ⑤ ○光石和馬、村上由里子、奥山大輔、細川佳純、鈴木千鶴、岩野英知、井上博紀： 妊娠ラット肝臓における、ビスフェノールF代謝動態の解明、環境ホルモン学会第15回研究発表会（2012年12月18 - 19日）
- ⑥ ○米田倫子、加藤由季、細川佳純、佐々木千尋、樺沢阿子、岩野英知、井上博紀： ラット反転腸管を用いたビスフェノールA関連物質の吸収と動態、環境ホルモン学会第15回研究発表会（2012年12月18 - 19日）
- ⑦ ○佐々木千尋、塚原千恵、奥山大輔、細川佳純、加藤美保、岩野英知、井上博紀： ラット肝灌流モデルを用いたビスフェノールA関連物質の抱合活性比較、環境ホルモン学会第15回研究発表会（2012年12月18 - 19日）
- ⑧ ○鈴木千鶴、岩野英知、大谷尚子、柳沢梨沙、西川美宇、井上博紀： 妊娠後期のビスフェノールA曝露による胎仔脳核酸合成系中間代謝物の変化、環境ホルモン学会第15回研究発表会（2012年12月18 - 19日）
- ⑨ ○大谷尚子、岩野英知、須田光紫、柳沢梨沙、種村健太郎、井上博紀、横田博： 妊娠後期ビスフェノールA曝露による次世代個体の行動への影響、環境ホルモン学会第15回研究発表会（2012年12月18 - 19日）
- ⑩ ○柳沢梨沙、岩野英知、大谷尚子、須田光紫、井上博紀、横田博： 胎仔腸におけるビスフェノールAグルクロン酸抱合体の動態、環境ホルモン学会第15回研究発表会（2012年12月18 - 19日）
- ⑪ ○井上博紀、奥山大輔、光石和馬、村上由里子、細川佳純、鈴木千鶴、佐々木千尋、岩野英知： 臓器灌流モデルを用いた、ラット体内におけるビスフェノールAおよびビスフェノールF代謝動態の比較、環境ホルモン学会第15回研究発表会（2012年12月18 - 19日）
- H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他

妊娠後期のビスフェノールA暴露による遅発性行動影響に関する研究

岩野英知
酪農学園大・獣医生化学



ビスフェノールA

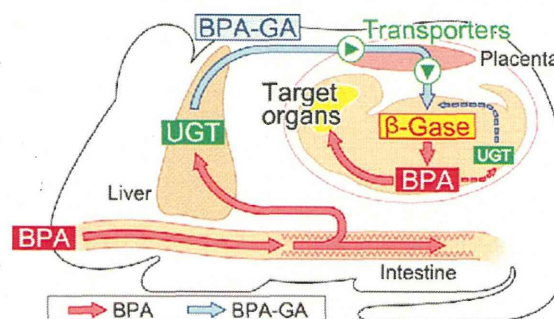
速やかに代謝(抱合)される化学物質が、
なぜ次世代の高次機能に影響を及ぼすのか



BPAの次世代影響における代謝動態研究

1) 母体・胎仔におけるBPAの代謝動態

1. 微量ではあるがBPA-GA(代謝物)として胎盤を通過
2. 胎仔側でのBPA再活性化(元のBPAになる)
3. 胎仔では、BPAの代謝能力が低い



(Nishikawa et al. *Environ Health Perspect.* 2010)

BPAの次世代影響の重要な論点

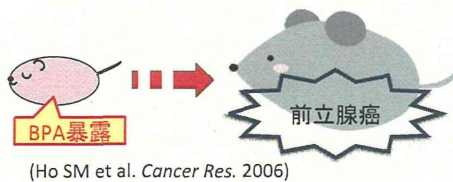
- 1) 母体一胎仔間のBPA代謝動態
 1. 微量ではあるがBPA-GA(代謝物)として胎盤を通過
 2. 胎仔側でのBPA再活性化(元のBPAになる)
 3. 胎仔では、BPAの代謝能力が低い

微量なBPAがエストロゲン活性により本当に胎仔に悪影響するだろうか？

- 2) 作用点はどこか？
葉酸代謝への影響(ジェネティック、エピジェネティック)
- 3) 作用時期はいつか？
胎盤の発達する妊娠後期がクリティカルな時期か？
- 4) 表現系への影響は？
社会性行動への影響があるのか？

BPAによるエピジェネティック調節(葉酸代謝)への影響

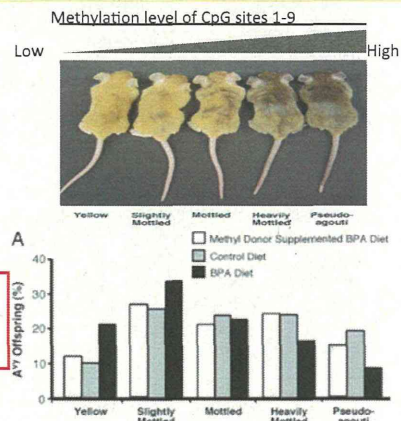
1)
新生子期にBPA暴露を受けたマウスの成体期での前立腺上皮内の腫瘍化が有意に増加！(PDE4D4遺伝子が低メチル化状態)



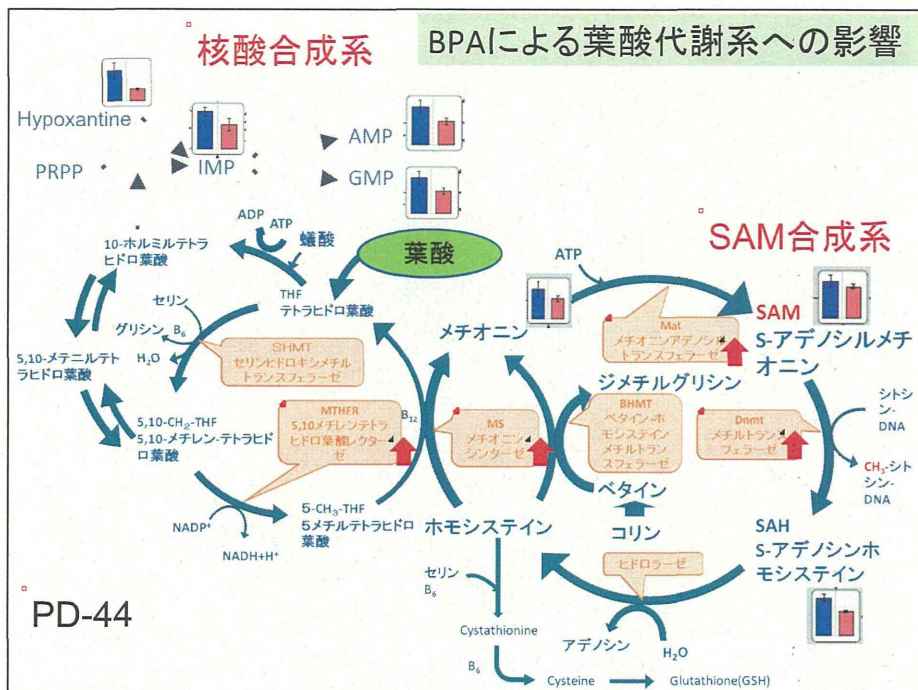
BPAの新たな作用点としてDNAのメチル化を乱すのでは？

低メチル化、葉酸

2)
アグーチマウスへの母へBPAを投与すると、低メチル化が引き起こされ、毛色に変化。葉酸添加餌により回復



(Dana C. Dolinoy et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007)



BPA投与が葉酸代謝に影響

通常餌の葉酸量: 260 μ g/餌100g
 人の葉酸摂取量の約 **100**倍 (体重換算)
 厚生労働省: 日本人の食事摂取基準より (265 μ g/day)

低葉酸餌の葉酸量: 11 μ g/餌100g

低葉酸餌 & BPA投与により
低メチル化状態

遺伝子発現に影響?

次世代行動影響試験

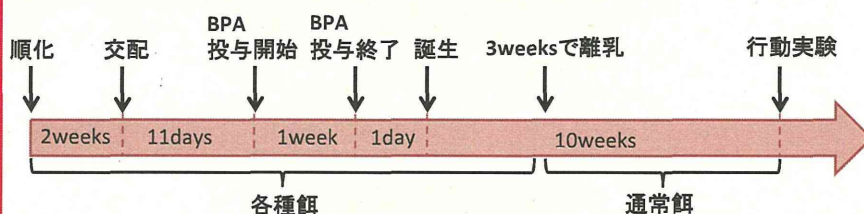
- ◆ 妊娠後期の暴露のみで影響はできるのか？
 - ⇒妊娠11日から18日に経口投与
 - ⇒BPAは不安行動の影響が報告されている
 - ⇒高架式十字迷路試験で検討
- ◆ 葉酸量の違いによって、BPA影響がかわるのか？
 - ⇒餌に含まれる葉酸量を変えた
- ◆ 安全域の上限(0.05mg/kg/day)で本当に影響はでないのか？

材料と方法

- ①通常餌+コントロールオイル群
- ②通常餌+BPAオイル群 (0.05mg/kg/day)
- ③通常餌+BPAオイル群 (10mg/kg/day)
- ④低葉酸餌+コントロールオイル群
- ⑤低葉酸餌+BPAオイル群(0.05mg/kg/day)
- ⑥低葉酸餌+BPAオイル群(10mg/kg/day)
- ⑦高葉酸餌+コントロールオイル群
- ⑧高葉酸餌+BPAオイル群 (0.05mg/kg/day)
- ⑨高葉酸餌+BPAオイル群 (10mg/kg/day)

葉酸をできるだけ少なく
なるようにした餌
葉酸11 μg /餌100g

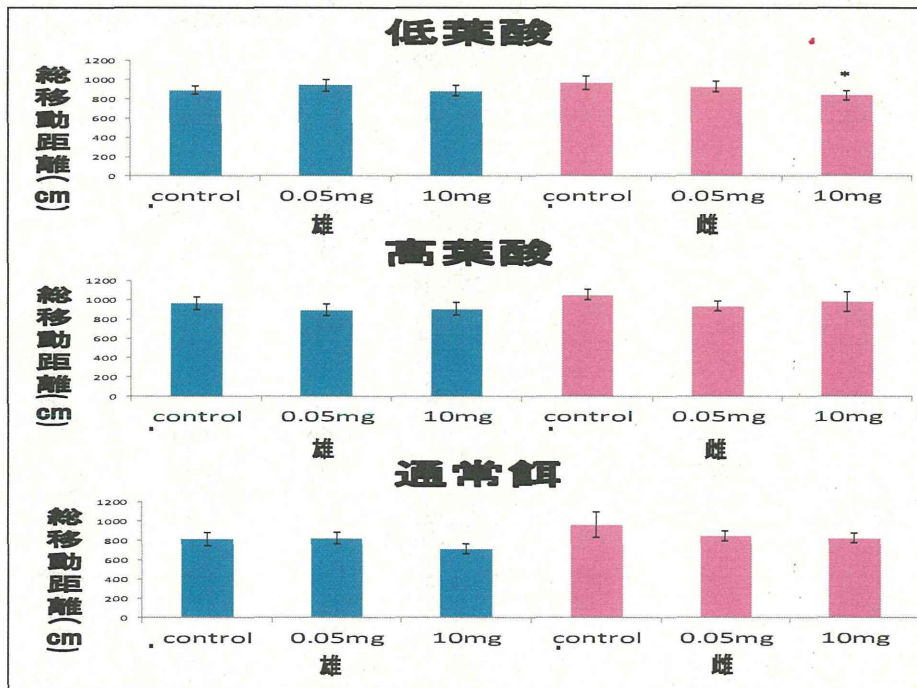
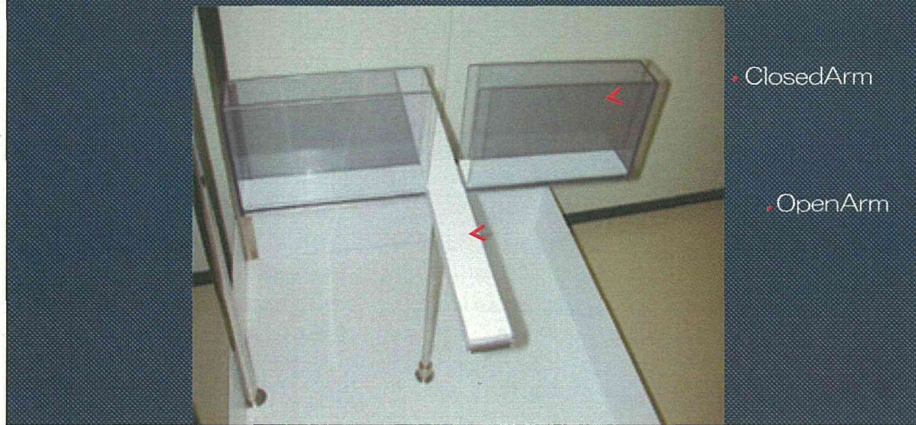
低葉酸餌に葉酸が通常餌
と同量になるよう葉酸を
添加した餌
葉酸260 μg /餌100g

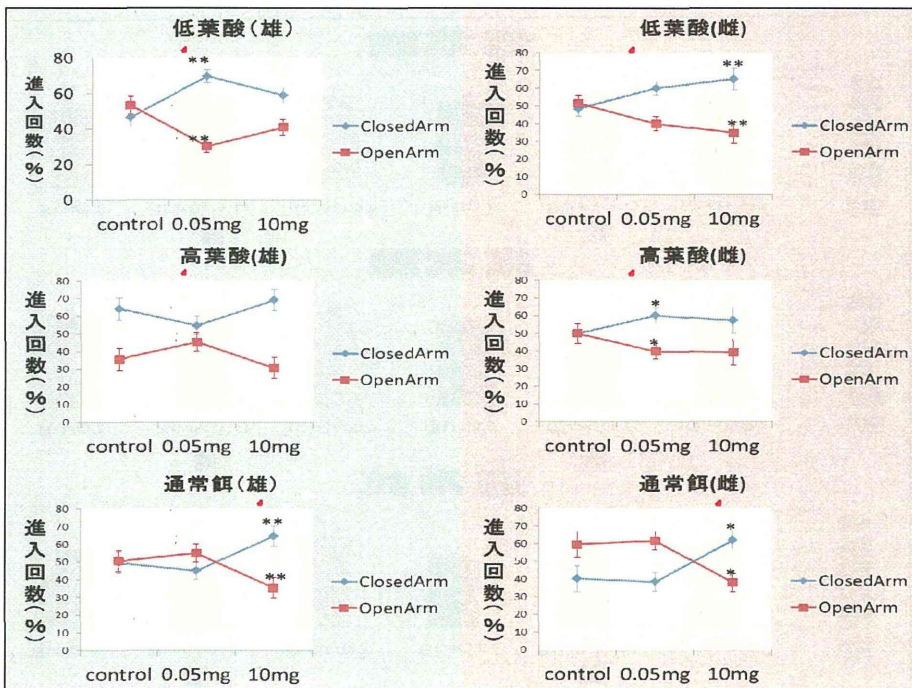
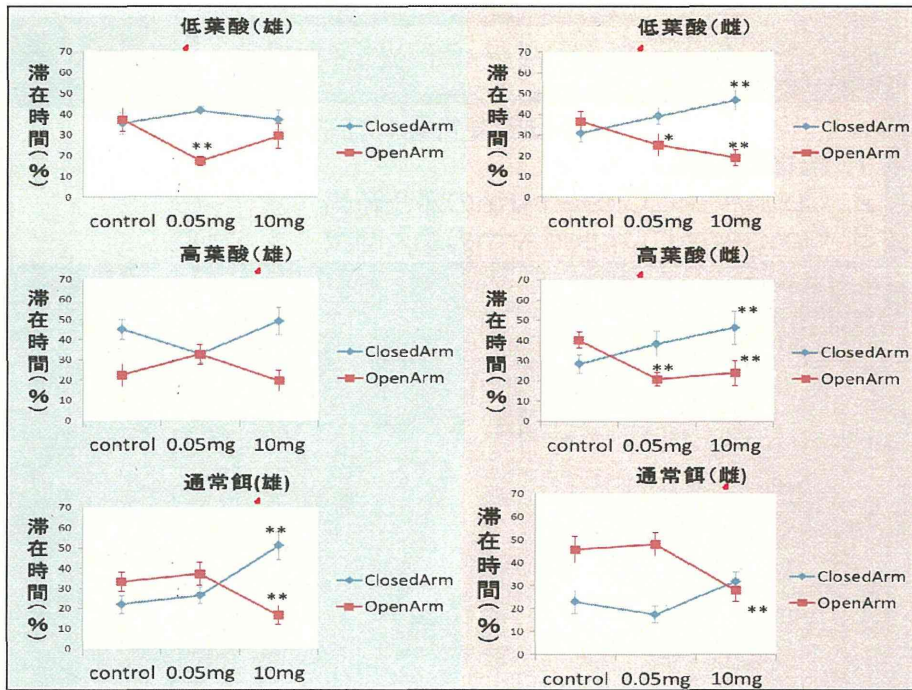


高架式十字迷路試験

★不安関連行動評価法★

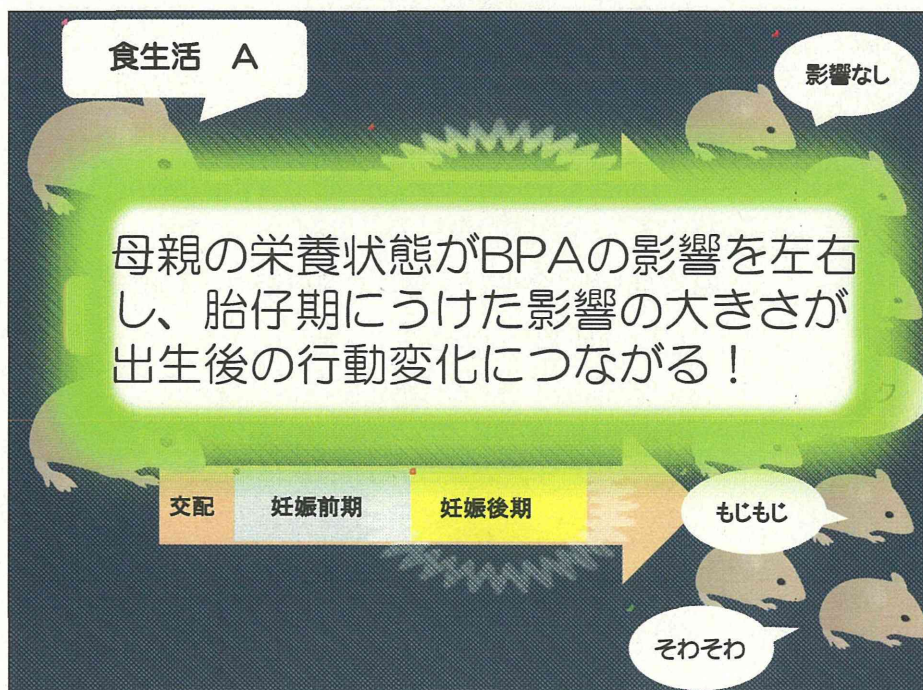
1. 総移動距離
2. OpenArmとClosedArmの滞在時間
3. OpenArmとClosedArmの進入回数





考察

- 妊娠後期のみのBPA暴露で成熟後の不安行動が増強され、我々が報告してきた胎盤通過による胎仔への移行が関与するのではないかと考えられた。
- BPAの低容量暴露でも母親の栄養摂取の状態によっては、明らかな不安行動が増強されることが示唆された。
- 低葉酸餌では、不安行動が増強されやすいが、葉酸量添加だけでレスキューされず、他の栄養素の関連が示唆された。



次年度に向けて

1. 遅発行動影響について

- ①妊娠前期(0~10)と妊娠後期(11~18)の投与で行動影響に差があるのか?
今年度と同様の試験(低葉酸餌、通常餌の各餌給餌)を妊娠0~10日でBPAの投与を行い、10週齢にて行動試験を行う。

2. 行動影響に関連する遺伝子発現の変化を捉える捉えたい

行動試験を行った後の個体にて、脳内での遺伝子発現変化を解析する。

- ①マイクロアレイ
- ②不安行動に関連ある因子
(オキシトシン、バソプレッシン関連ほか)

平成24年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
神経系発生-発達期の化学物質暴露による遅発中枢影響解析に基づく
統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究（H23-化学一般-004）

分担研究報告書

分担研究課題：「情動認知行動異常発現メカニズムの解明」
—エストロゲン受容体 α 欠失マウスの脳における遺伝子発現プロファイル—

研究分担者 北嶋 聡

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

研究要旨

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、特に胎児や子どもへの化学物質暴露による遅発性の情動認知行動異常を今後の行政施策へ反映させる必要性を考慮し、標準プロトコールの確立、及び客観的評価指標の提案を目指す中、網羅的遺伝子発現変動解析によって、「情動認知行動異常に至る分子メカニズム」を明らかにする事を目的とする。本研究班では、情動認知行動異常の客観的評価指標の為の基準点として、特徴的な異常を示す遺伝子改変マウス等が位置付けられ、この中でも、既に情動認知行動異常等を同定済みである複数のエストロゲン受容体（ER）関連遺伝子改変マウスに着目している。

今年度（平成24年度）は、この目的遂行の為に、成熟期の雄性ER α 欠失マウスの脳3部位（大脳皮質、海馬、脳幹）のサンプルについて、網羅的に遺伝子発現変動をを解析し、野生型のものと比較・検討した。その結果、野生型と比較しER α 欠失マウスの大脳皮質、海馬及び脳幹では、それぞれ776（増加：9、減少：767）、21（増加：8、減少：13）及び1,125（増加：483、減少：642）プローブセット（ps）の有意な発現変動が認められた。各部位における解析の結果、ER α 欠失マウスの大脳皮質では、RARシグナル伝達が低下し記憶障害が誘発する可能性、また神経活動の活性化及び概日リズムが乱れる可能性が示唆された。海馬では野生型マウスとの違いは見いだせなかったが、脳幹では、大脳皮質の場合と同様に、神経活動の活性化及び概日リズムが乱れる可能性が示唆された。ER α 欠失マウスにおいて、概日リズムが乱れる可能性、及びその大脳皮質において、RARシグナル伝達が低下する可能性が示唆されたが、これまでにこうした報告はなく新規の発見と考える。脳におけるRARシグナル伝達の低下により記憶障害が誘発されるとの報告があることから、今後さらに、RARシグナルとER α 及び、大脳皮質と脳幹で共通して変化が認められた概日リズムとER α のシグナルネットワークとの関連に着目した検討により、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

A. 研究目的

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、特に胎児や子どもへの化学物質暴露による遅発性の情動認知行動異常を今後の行政施策へ反映させる必要性を考慮し、標準プロトコールの確立、及び客観的評価指標の提案を目指す中、網羅的遺伝子発現変動解析によって、「情動認知行動異常に至る分子メカニズム」を明らかにする事を目的とする。

本研究班では、情動認知行動異常の客観的評価指標の為の基準点として、特徴的な異常を示す遺伝子改変マウス等が位置付けられ、この中でも、既に情動認知行動異常等を同定済みである複数のエストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスに着目している。今年度 (平成 24 年度) は、この目的遂行の為に、成熟期 (15 週齢) の雄性 ER α 欠失マウスの脳 3 部位 (大脳皮質、海馬及び脳幹) のサンプルについて、Percellome 法により網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。

B. 研究方法

マウスの系統は C57BL/6NcrSlc (日本エスエルシー) を用いた。ER α 欠失マウスは、Pierre Chambon 教授 (フランス、ルイパスツール大学) より供与いただいた。比較に際し、野生型マウスと ER α 欠失マウスは同腹のものを使用した。

遺伝子発現変動解析に際しては、15 週齢の成熟期マウスの脳 3 部位 (大脳皮質、海馬、脳幹) (午前 10 時) (各 n=4) について、Percellome 法 (遺伝子発現値の絶対化手法) (Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006) による網羅的遺伝子発現解析をマイクロア

レイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて検討した。この際、我々が独自に開発した「MF analyzer」を用いて網羅的に解析した。脳 3 部位は、氷冷下にて左脳につき、小脳、脳幹部、海馬、大脳皮質の順に採取することにより得た (右脳はホルマリン固定した)。

有意差の検定は、Student の t 検定によりおこない、P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値 \pm 標準偏差 (SD) にて示した。

Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晩浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出に当たっては、RNAlater を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ

cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 19 年 4 月版)」。

C. 研究結果及び考察

C-1: 野生型及び ER α 欠失マウスの遺伝子発現の脳各部位間の比較:

脳各部位について、野生型と比較し、ER α 欠失マウスの場合に、発現が有意に変動 (増加及び減少) する遺伝子 (プローブセット: ps) 数を検討したところ以下のとおりとなった。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき、大脳皮質、海馬及び脳幹において、それぞれ 1.0、0.7 及び 0.8 コピー以上のものを採用した。

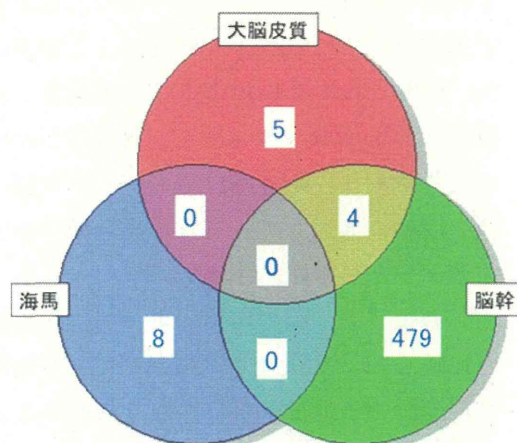
大脳皮質: 9 ps (増加)、767 ps (減少)

海馬: 8 ps (増加)、13 ps (減少)

脳幹: 483 ps (増加)、642 ps (減少)

次いで、大脳皮質、海馬及び脳幹において、有意に変動した遺伝子の集合関係を検討したところ、図 1 のベン図の通りとなった。

A



B

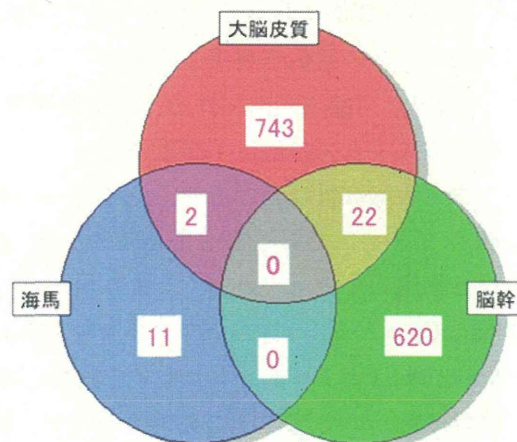


図 1 脳各部位について、野生型と比較し、ER α 欠失マウスの場合に、発現が有意に増加(A)あるいは減少(B)する遺伝子数 (ベン図で表記した)

脳 3 部位に共通して、発現が有意に変動した遺伝子はなく、ER α (=Esr1) 遺伝子が抽出されてくるべきであるが、この理由は、海馬における Esr1 遺伝子の発現が、野生型と ER α 欠失マウス間で、有意差がなかった為であり、実際 Esr1 遺伝子は、大脳皮質と脳幹に共通して、有意な発現減少を示す遺伝子として抽出された。

このように、脳の部位によって、野生型と比較し ER α 欠失マウスにおいて、有意に発現変動する遺伝子が、かなり異なることが明らかとなったため、部位ごとに分けて解析する事とした。

C-2 : 脳各部位における、野生型及び ER α 欠失マウスの遺伝子発現の比較 :

C-2-1 : 大脳皮質における、野生型及び ER α 欠失マウスの遺伝子発現の比較 :

まず大脳皮質における ER α ともう一つの ER サブタイプである ER β 遺伝子の発現、及び各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、野生型と ER α 欠失マウスとの比較を検討したところ、ER α 遺伝子は、ER α 欠失マウスで有意な発現減少が認められた。ER β 遺伝子については検出限界以下 (1 コピー以下) であった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これ

らのことから大脳皮質においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER α 欠失マウスとで同程度である可能性が示唆された。この内、ER α である Esr1 及びニューロンマーカーである Mtap2 遺伝子の発現について図 2 に示す。

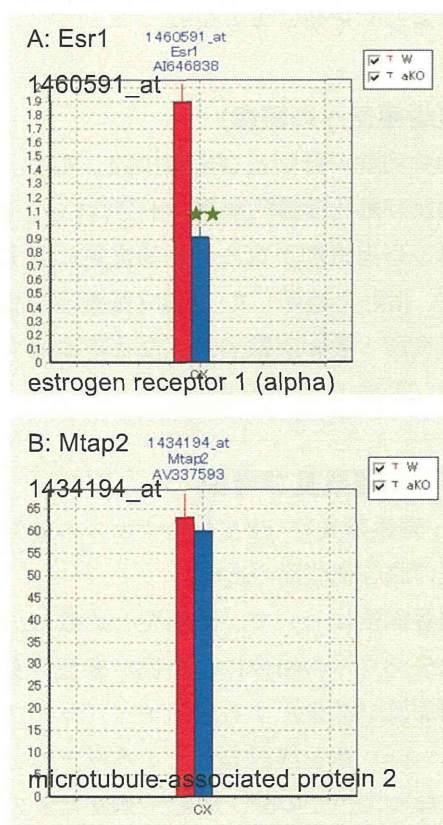


図 2 大脳皮質における、Esr1 (A) 及びニューロンマーカー Mtap2 遺伝子 (B) の発現変動

野生型 : 赤、ER α 欠失マウス : 青 (n=4、
 平均値 \pm 標準偏差、** : P<0.01)

大脳皮質において、野生型マウスと比較し ER α 欠失マウスにおいて、発現が有意に

増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、9及び767 psであった。

増加分9 psについてPubMedを利用し検索したところ、神経系との関連が示唆される遺伝子として、Sgk1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1) 遺伝子が見いだされた。この遺伝子は、初期応答遺伝子(Immediate early gene: IEG)のひとつであるが、他の関連遺伝子の発現変動が認められなかったため、関連するネットワークへの影響の可能性は低いものと考えられる。したがって、ER α シグナルあるいは神経系との関連が示唆される遺伝子は、現時点では見いだせなかった。

他方、減少分767 psについてPubMedを利用し検索したところ、エストロゲンシグナルネットワーク及びRARシグナルネットワークを見いだす事ができた。これらのネットワークは、市販のIngenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)によっても抽出された。エストロゲンシグナルネットワークが抽出されたことは、野生型とER α 欠失マウスとの本比較解析手法の妥当性を示すものと考えられる。

RARシグナル関連遺伝子として具体的には、Aldh1a2 (aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2) (=RALDH2) (レチナールの酸化によりレチノイン酸を作る酵素)、Retsat (retinol saturase (all trans retinol 13,14 reductase)) (=retinol saturase) (all-trans-13,14-デヒドロレチノールからall-trans-レチノールを作る酵素)、Crabp2 (cellular retinoic acid binding protein II) (細胞内レチノイン酸結合タンパク質 II)、Rarres2 (retinoic acid receptor responder (tazarotene

induced) 2)、Nr2f2 (nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2) (=COUPTFII) 及び Cdk7 (cyclin-dependent kinase 7 (homolog of Xenopus M015 cdk-activating kinase)) 遺伝子を見いだす事ができた。このことから、ER α 欠失マウス的大脑皮質では、RARシグナル伝達が低下する可能性が示唆されるが、これまでにこうした報告はなく、新規の発見と考えられる。

この点、前脳においてコンディショナルに、ドミナントネガティブなRAR α を強制発現するマウスを用いた解析により、脳におけるRARシグナル伝達の低下により、記憶障害(社会的記憶及び空間記憶)が誘発されるとの報告があることから(Nomoto M et al, Mol Brain 5:8-, 2012)、ER α 欠失マウスにおいて、この機序を介して記憶障害が誘発される可能性がある。加えて、RAR β -RXR β , RAR β -RXR γ , RXR β -RXR γ ダブルミュータントマウスでは、自発運動能が低下するという報告(Krezel W et al, Science. 279:863-867, 1998)から、ER α 欠失マウスにおいて自発運動能が低下する可能性が示唆された。RARシグナル伝達の低下機序の一つとして、細胞内にレチノイン酸を輸送するCrabp2遺伝子の発現低下が考えられた。そこで、Crabp2遺伝子の発現制御につき検索したところ、エストロゲンが直接、転写活性化させるとの報告(Li XH and Ong DE, J Biol Chem 278: 35819-35825, 2003)が見いだされた。この事は、ER α シグナルとRARシグナルとが関連する事を示しており、Crabp2遺伝子の発現低下はエストロゲン濃度の低下により引き起こされた可能性が考えられたが、成熟期の雄性ER α 欠

失マウスの血清中エストロゲン濃度は野生型と変わらないとする報告 (Emmen JM and Korach KS, *Gynecol Endocrinol* 17: 169-176, 2003) を考慮すると、脳内の局所におけるエストロゲン濃度の低下に起因する可能性が考えられた。今後、特に記憶障害の観点から、ER α シグナルと RAR シグナルとの関連を検討する必要があるものと考ええる。

この RAR シグナル関連遺伝子の内、Crabp2 及び Rarres2 遺伝子の発現について図 3 に示す。

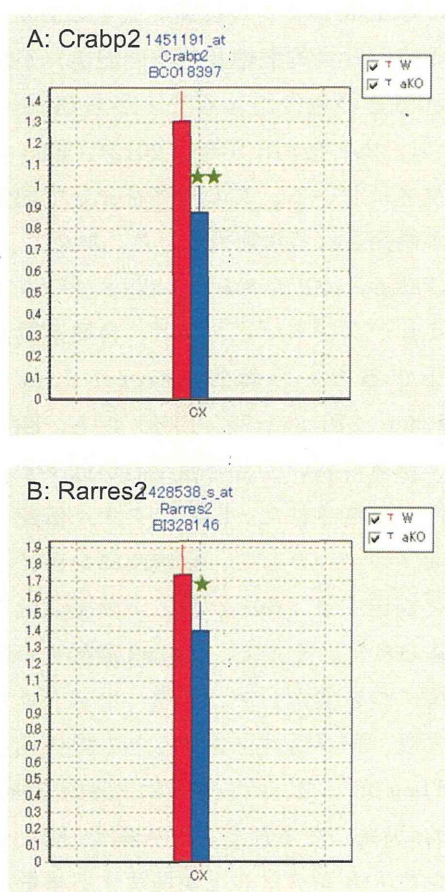


図 3 大脳皮質において、野生型マウスと比較し ER α 欠失マウスにおいて、有意に発現減少が認められた、RAR シグナル関連遺伝子 Crabp2 (A) 及び Rarres2 (B) 遺伝子の発現変動

野生型：赤、ER α 欠失マウス：青 (n=4、平均値±標準偏差、*:P<0.05, **: P<0.01)

一方、RAR シグナル以外の有意に発現減少を示す遺伝子につき、神経系との関連が示唆される遺伝子として、カリウムチャネル、グルタミン酸受容体、セロトニン受容体及び概日リズムの関連遺伝子が、その他のものとして、アンドロゲン受容体 (Ar)、メチル CpG 結合タンパク (MBD) の関連遺伝子が見いだされた。

具体的には、カリウムチャネルでは、Kcnh3、Kcnb1、Kctd15、Kctd21、Kena6、Kctd4 及び Kctd9 遺伝子が見いだされ、グルタミン酸受容体では、Grin3a (glutamate receptor ionotropic, NMDA3A) 及び Grid2 (glutamate receptor, ionotropic, delta 2) が、セロトニン受容体では Htr1d (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D) 遺伝子が見いだされた。概日リズム関連遺伝子では、Clock、Arntl (= Bmal1) 及び Fbx13 遺伝子が見いだされた。MBD 関連遺伝子では、Mbd2、Mbd4 及び Gatad2b 遺伝子が見いだされた。

活性化により、膜の過分極が誘発されるカリウムチャネル遺伝子の発現が減少していることから、ER α 欠失マウスの大脳皮質では、神経活動が活性化している可能性が示唆された。興奮性の神経伝達に関わるグル