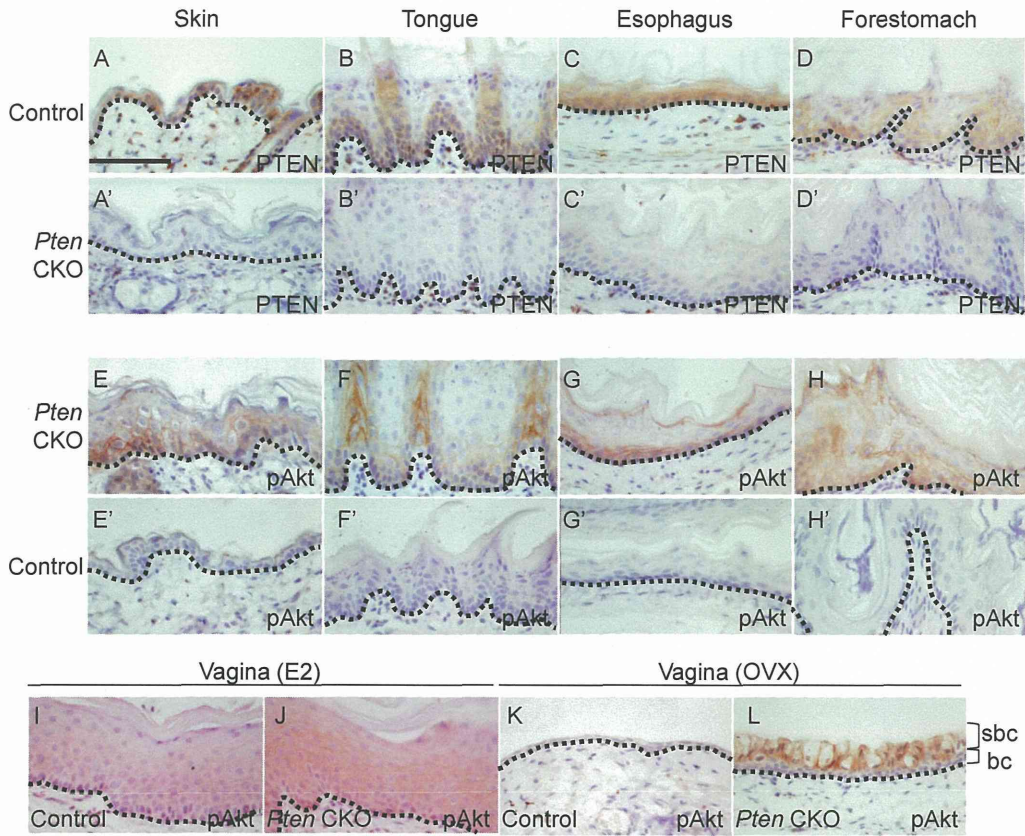


膾組織における上皮特異的*Pten* CKOの表現型

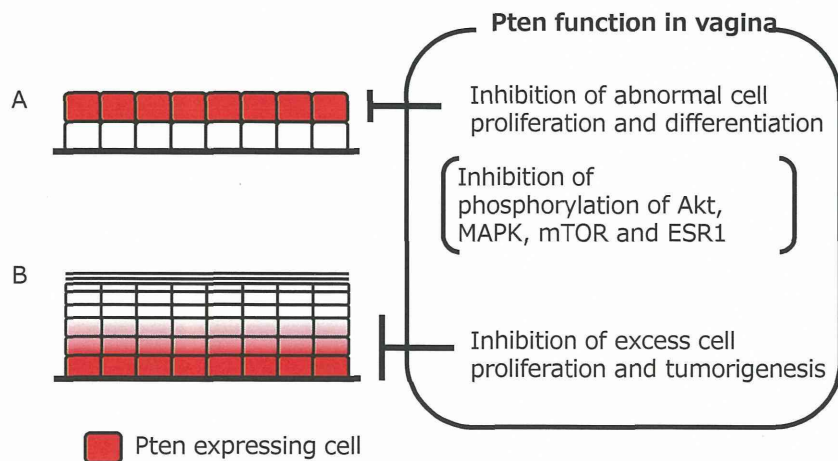


膾組織における上皮特異的*Pten* CKOの表現型

*Pten*の不活性化 (PI3K-Aktの活性化)は、

- ・ エストロゲン非存在下では、膾上皮suprabasal cellにおいて、粘液細胞化を伴う過形成を誘導する
- ・ エストロゲン存在下では、他の重層扁平上皮と同様に角質化上皮の過形成

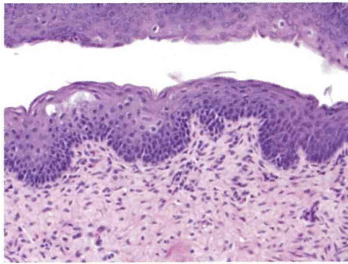
*Pten*の役割は、エストロゲンの有無によって異なる



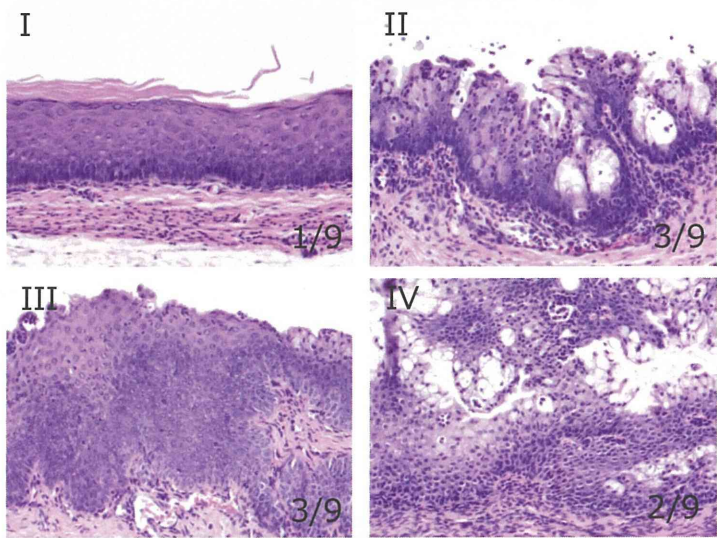
ホメオスタシスを司る重要な因子である*Pten*を欠損した個体の、発生途上の個体に対する遅発性影響を解析

全て新生児期にDES処理した
アダルトOVXマウス

Control

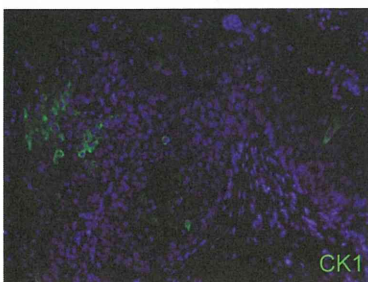
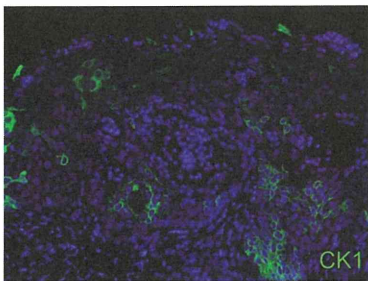


Pten mutant

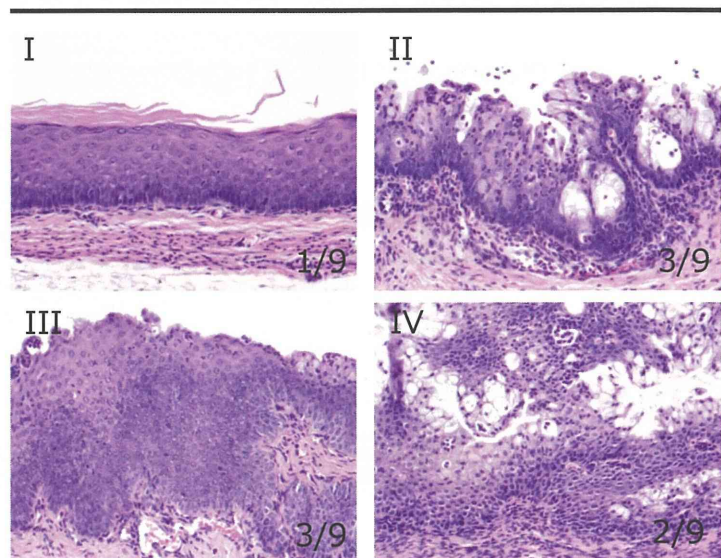


Type IIIはさまざまな異常な病変が見られる

Pten mutant

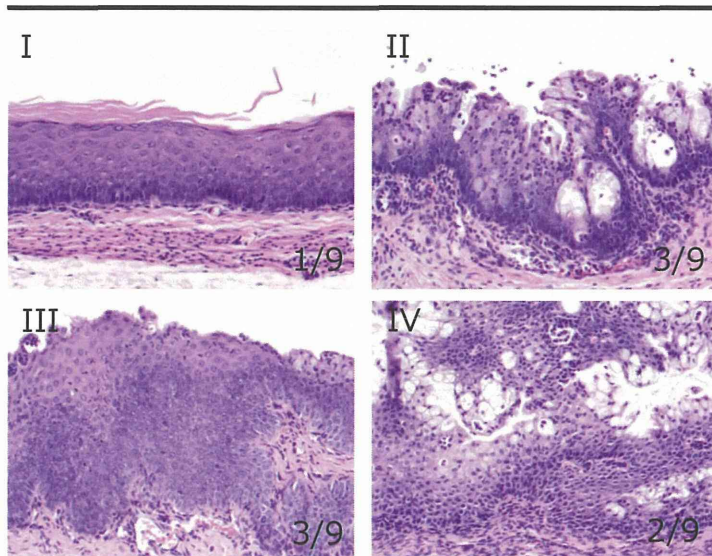
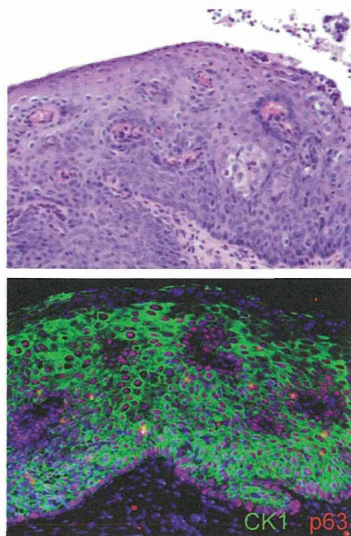


CK1発現が弱い=未分化



Type IIIはさまざまな異常な病変が見られる

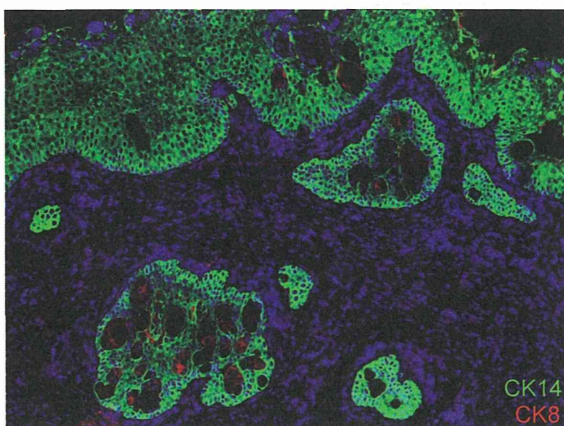
Pten mutant



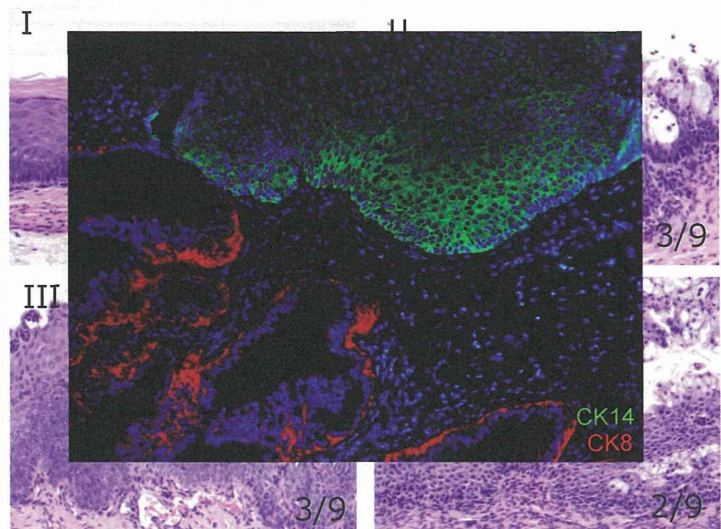
新生児期のDES投与の影響 + Ptenの欠損による影響 (= 過剰なPI3K/Aktシグナル活性化) により、より重篤な症状が顕れる

通常 (野生型マウス) におけるDESの発生影響は、Ptenの不活性化によるものではない

Pten mutant
— Prenatal DES treatment —



腺疾患? 3/9 (個体)



Cunhaらの組織貼替え実験① ~上皮-間質相互作用~

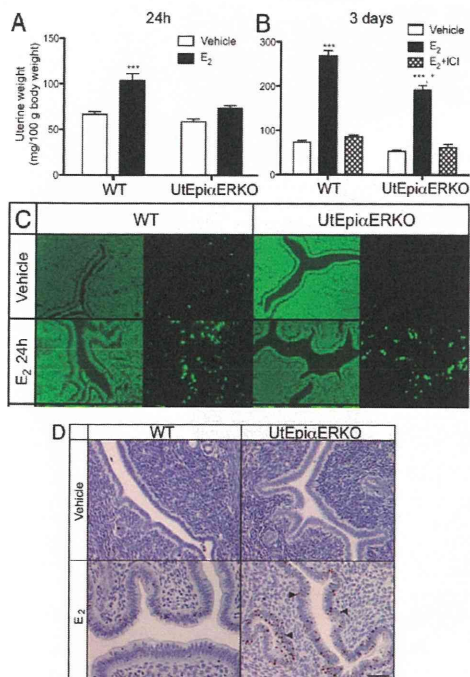
Uterine epithelial estrogen receptor α is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses

Wipawee Winuthayanon¹, Sylvia C. Hewitt², Grant D. Orvis³, Richard R. Behringer⁴, and Kenneth S. Korach^{1*}

¹Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC 27709; ²Developmental Biology Program, Sloan-Kettering Institute, York Avenue, New York, NY 10095; and ³Department of Genetics, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030

Edited by R. Michael Roberts, University of Missouri, Columbia, MO, and approved September 17, 2010 (received for review May 7, 2010)

19272-19277 | PNAS | November 9, 2010 | vol. 107 | no. 45



Estrogen receptor- α expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice

Yuxin Feng¹, David Manka¹, Kay-Uwe Wagner¹, and Sohaib A. Khan^{2*}

¹Department of Cell and Cancer Biology, Vontz Center for Molecular Studies, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH 45267; and ²Eppley Institute for Research in Cancer and Allied Diseases and the Department of Pathology and Microbiology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-0805

14718-14723 | PNAS | September 11, 2007 | vol. 104 | no. 37

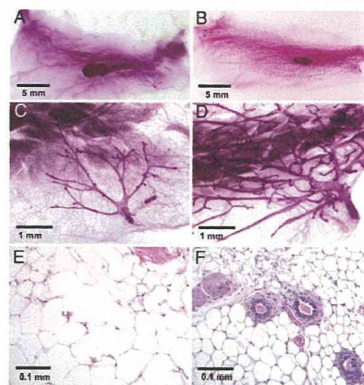
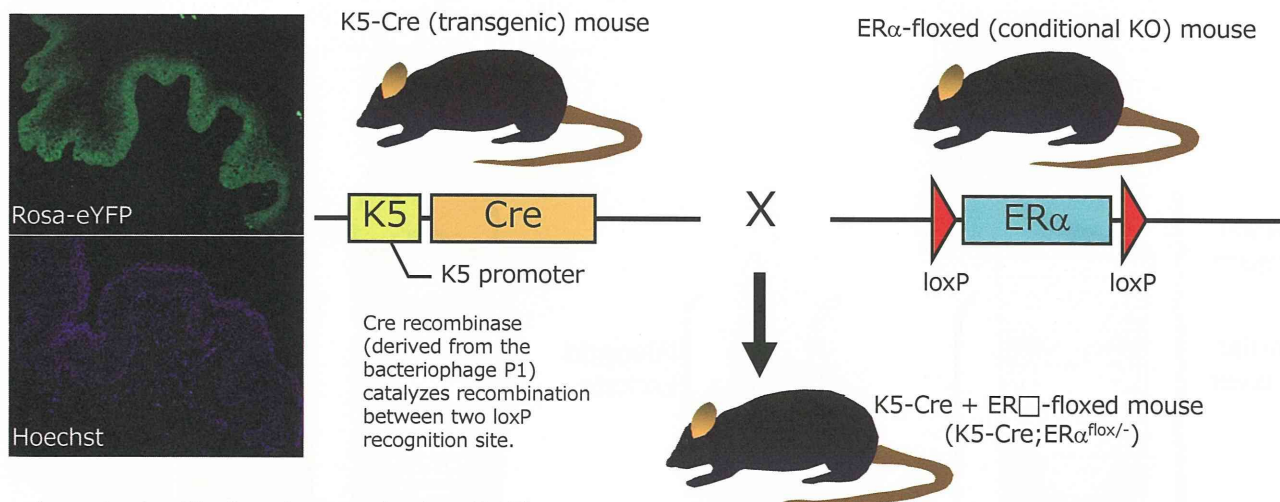


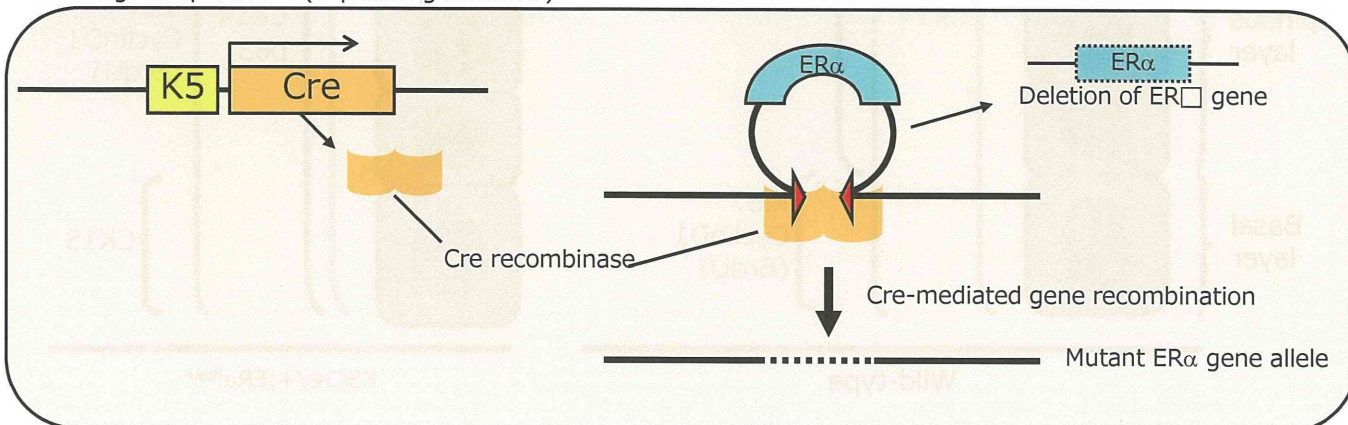
Fig. 2. ER α is required for mammary gland development. Whole mounts of mammary glands (A–D) and H&E staining (E and F) from mature virgin MMTV-ERKO mice (A, C, and E) and ER α ^{fl/fl} mice (B, D, and F). In ER α ^{fl/fl}, but not MMTV-ERKO mice, the no. 4 inguinal mammary fatpad was fully occupied by the developed epithelial network.

乳腺では上皮のER α が、その細胞増殖に必須であり、組織貼替え実験の結果と矛盾している... 膺では？

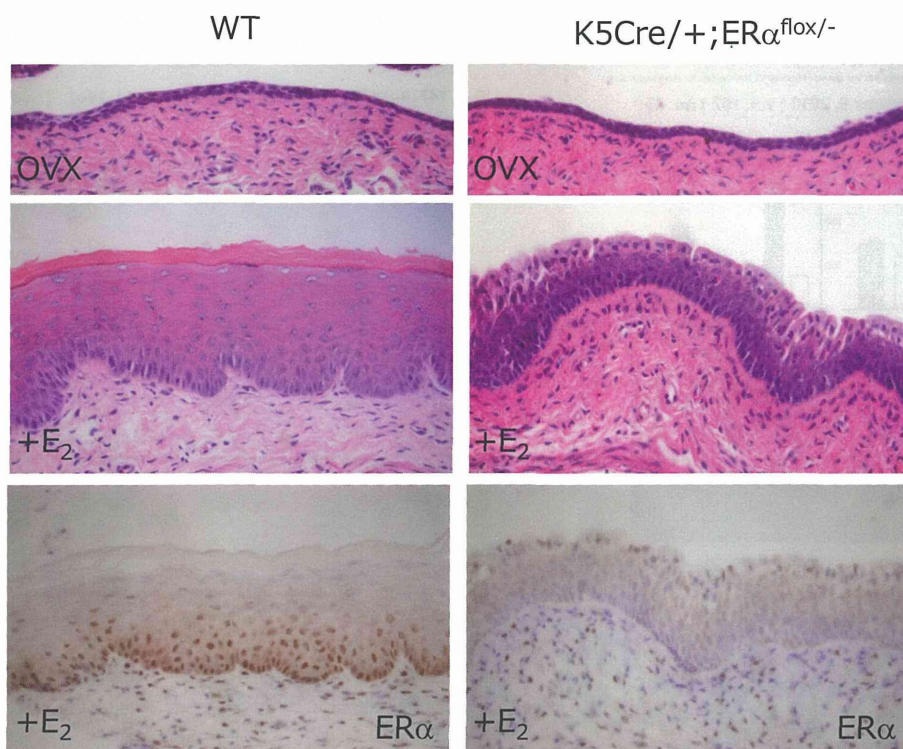
上皮特異的ER α CKOマウス



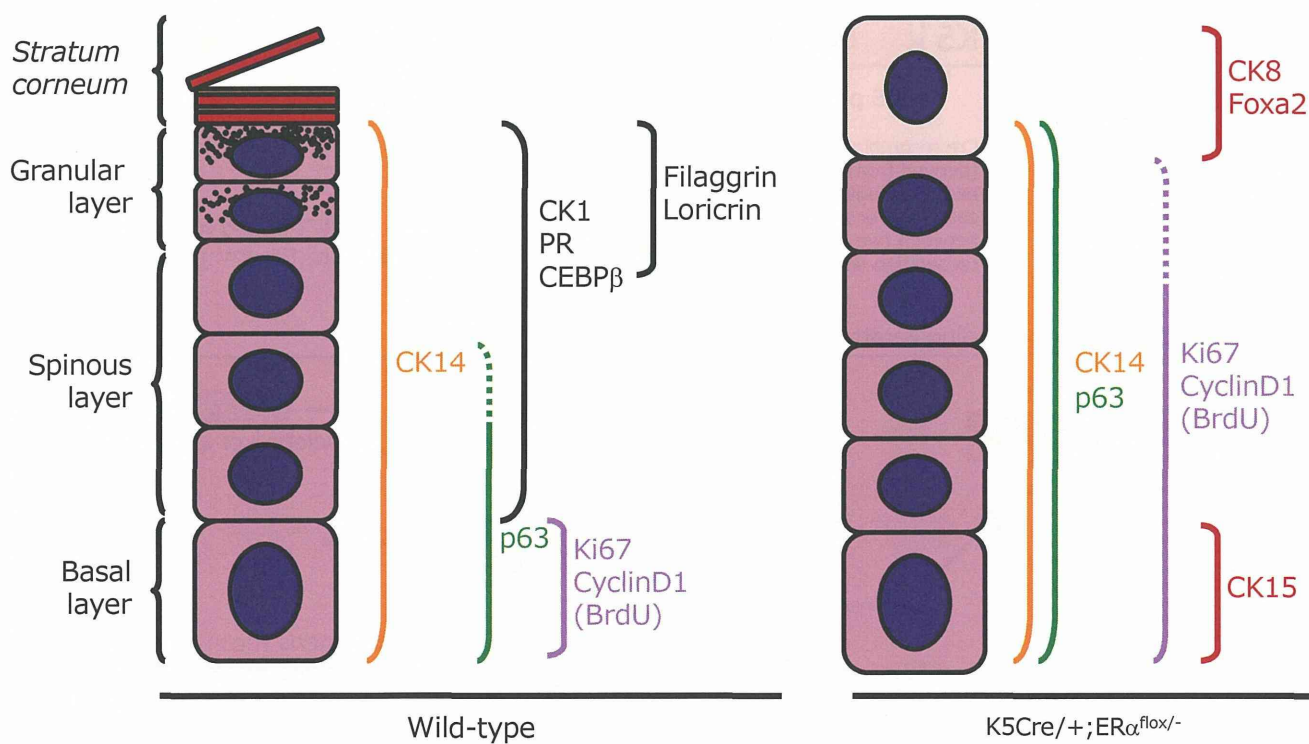
In vaginal epithelium (expressing keratin 5)



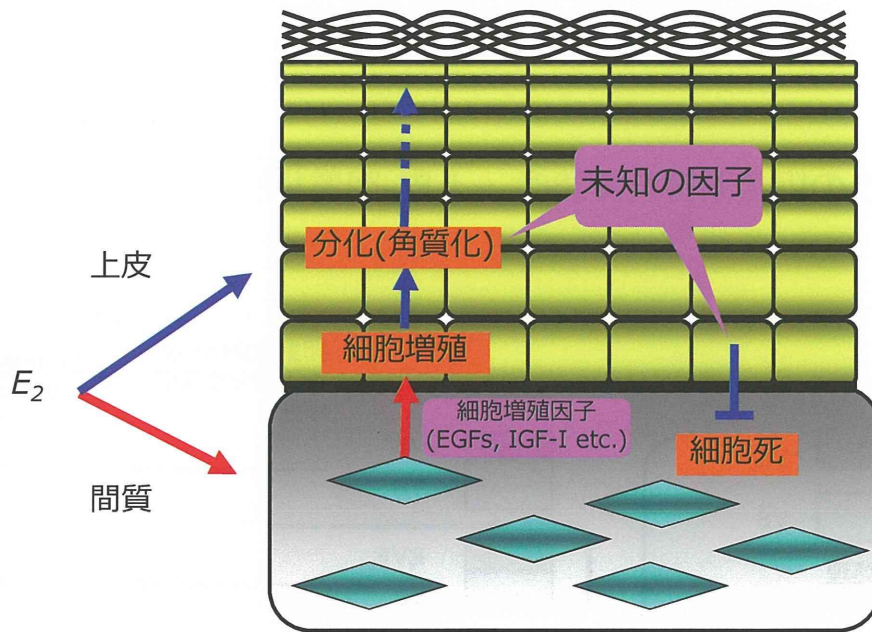
上皮特異的ER α CKOマウスの表現型



Schematic representation of normal and K5ERCKO mouse vaginal epithelium with expression profile of molecular markers

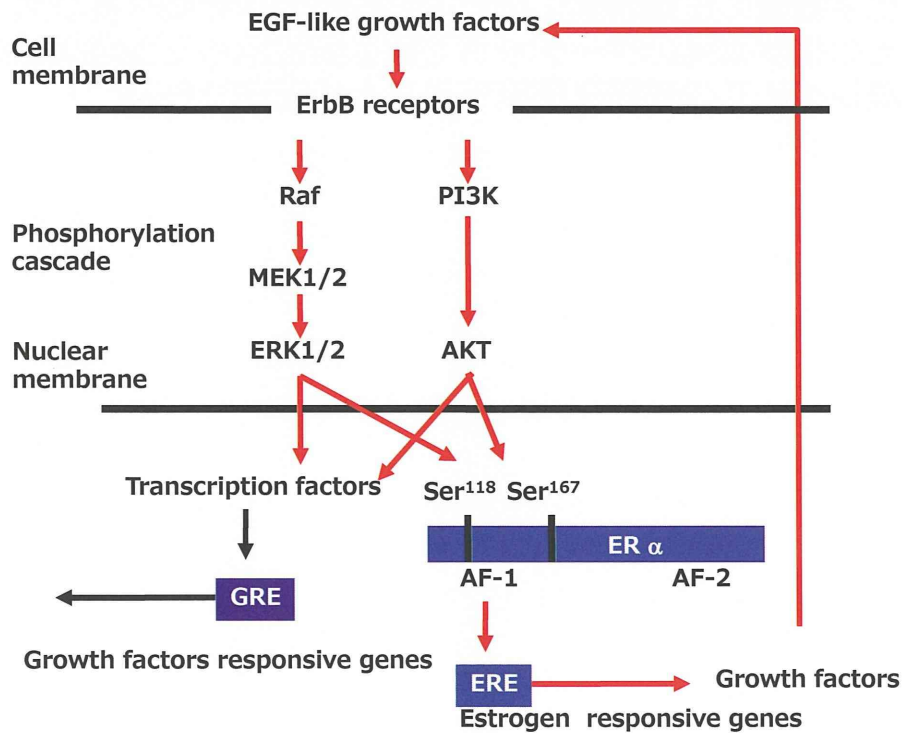


腔組織におけるER α の作用機序についての仮説



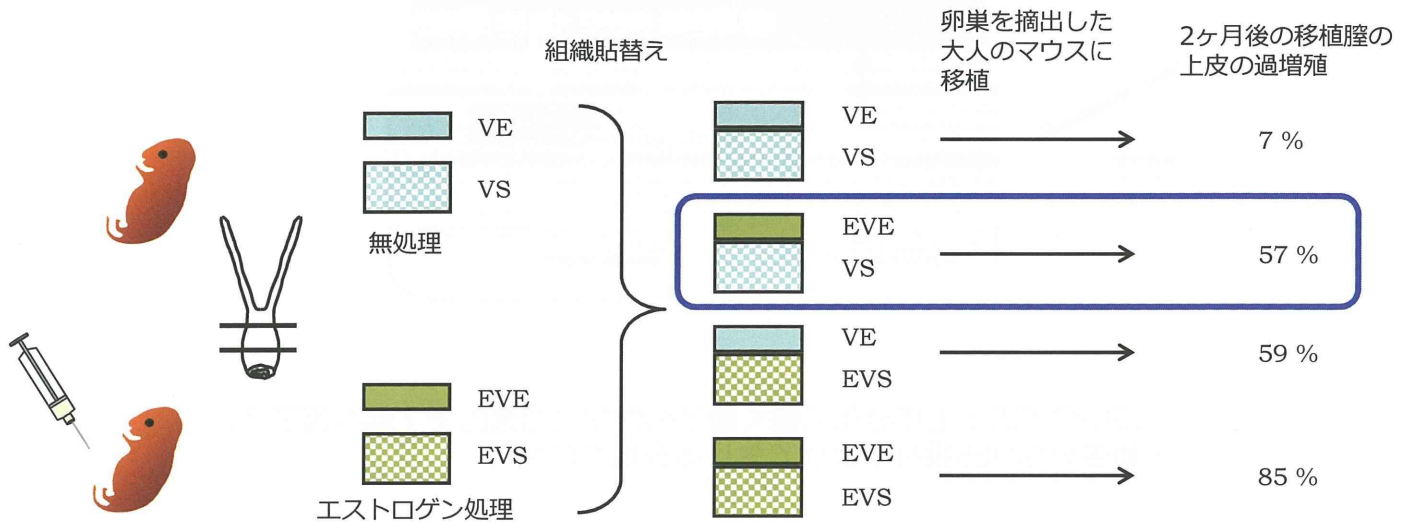
- ER α の下流で上皮分化に働く因子の同定 (増殖因子? 転写因子?)
- 新生児期DES投与によって生じる表現型の解析

腔組織におけるER α の作用機序についての仮説



周生期DES曝露ではER α が細胞増殖因子とその下流のMAPKやAKTシグナルによって、リガンド非依存に活性化されている

Cunhaらの組織貼替え実験② ~上皮-間質相互作用~



Cunha et al., 1977 Dev Biol 56: 52-67

化学物質の生殖器官に対する晩発性影響を調べるうえで、その化学物質のターゲットである女性ホルモン受容体の組織レベルでの役割を解析することは重要である

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 毒性部部长

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。Malat-1 遺伝子の機能解析のための CRISPR 法による同遺伝子ノックアウトマウスの作製を行いキメラマウスを得た。Wild 及び CRISPR 法で作製した Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞 (KO) に対する BPA の影響解析の結果、Wild に対しては、BPA は添加 2 日後に EB のサイズを増加させた。マイクロアレイデータのパスウェー解析では 2 日目に細胞増殖に関連する遺伝子群の増加が認められ、BPA が EB の分化初期に Malat-1 の作用と関連性をもって増殖促進に働いたことが示唆された。この作用は KO には誘発されなかった。他方、KO は BPA 添加 8 日後に用量依存的な萎縮像が見られた。この作用は Wild に対しては認められないことから、Malat-1 が BPA の毒性に対して防御的に働いている可能性が示唆された。Malat-1 の上流 9kb、下流 3.6kb を含むルシフェラーゼ・レポーターベクターを構築、ES 細胞に導入し BPA 反応性を検討した結果、抑制傾向が認められた。妊娠中に BPA を投与し、胎生 14 日の胎児を対象に Malat-1 の *in situ* hybridization を実施した結果、本条件下では変化は認められなかった。

A. 研究目的

本研究は、胚様体 (EB) において、低濃度ビスフェノール-A (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。

B. 研究方法

1. 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

を行った。ターゲティングベクターを構築し、相同組み替え ES 細胞を得た。また、今年度は新たに遺伝子 targeting の効率が高いことが知られる CRISPR 法を導入して、ノックアウトマウスの作製を行った (図 1)。

2. Malat-1 欠失 ES 細胞を用いた BPA の影響解析

上記 CRISPR 法によるノックアウトマウス作製過程で得られた Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞に対する BPA の影響を解析した。BPA (1、10、100、1000nM) を DMSO (final 0.1%) に溶解し、LIF を除いた ES 培地に添加した。Wild 及び Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞を、最初の 2 日間は天井培養法、次の 6 日間は浮遊培養法にて計 8 日間培養した。培養開始から 2 日間隔で EB を採取し、形態を観察した。

3. 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。Malat-1 遺伝子発現機構解析のため、この上流及び下流域を含むルシフェラーゼ発現ベクターの構築を行い、ES 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを実施した。

4. BPA 暴露マウス胎児における Malat-1 の *in situ* hybridization 法

による発現検索

マウス組織に於る Malat-1 遺伝子発現の高感度検出を Veritas 社の QuantiGene 法を用いて実施した。その結果、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。次いで、長尾哲二研究班班長が実施した実験、即ち、BPA 20、200 μ g/kg を C57BL/6J マウスの妊娠 0~13 日に強制経口投与し、妊娠 14 日に帝王切開により胎児をサンプリングしたものを得た。なお、胎児は雌雄判別し、雄胎児を使用した。同様に BPA を交配開始時から C57BL/6Ncr 妊娠マウスに 0.1、1、10ppm の濃度で飲水投与し (10、100、1000ug/kg BW/day に相当)、胎生 14.5 日の時点で胎児をサンプリングした。これらから得た胎児全身の矢状断組織切片について、Malat-1 probe を用いた *in situ* hybridization を実施した。なお、胎児の雌雄は Y 染色体遺伝子に対する PCR genotyping によって確認した。

(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 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を行った。得られた相同組み

替え ES 細胞を aggregation し、キメラマウスが得られたが、germline transmission は確認出来なかった。そこで、新たに CRIPPR 法を導入し、相同組み替え ES 細胞を得た。このうち 3 クローンを用いて aggregation を行ったが、2 クローンではキメラ率の高いマウスは得られなかった。1 クローンからはキメラ率の高いマウスが得られた。現在、germline transmission を確認中である。

2. Wild 及び Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞 (KO) を用いた BPA の影響解析

培養開始から 2 日間隔で形成された胚葉体 (EB) を採取し、形態を観察した。BPA は添加 2 日後に Wild の ES 細胞の EB のサイズを増加させることが明らかとなった (図 2)。これに関連して、以前に実施したマイクロアレイデータのパスウェー解析では 2 日目に細胞増殖に関連する遺伝子群の減少が認められ、特に、AKAP9、ATRX、CENPE、ESCO1、SMC2、SMC4、WNK など染色体分離に関与する遺伝子が多く含まれていた (図 3、4)。この増加反応は KO には誘発されなかった。他方、KO に対しては BPA 添加 8 日後に用量依存的な萎縮像の増加が見られ (図 5、6)、特に 1000nM BPA 添加群で顕著であった (図 7)。この反応は Wild には見られなかった。

3. Malat-1 遺伝子のプロモーター解析

5' 側 9kb と 3' 側 3.6kb を両方組み込んだルシフェラーゼ reporter を導入した ES 細胞を用いてプロモーター解析を実施した。BPA で活性の低下傾

向が認められたが、用量依存性は明らかではなかった (図 8)。

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

Veritas 社の QuantiGene 法を用いて BPA を妊娠期に投与した 14 日のマウス雄胎児頭部矢状断面の Malat-1 発現の検討を行った結果、BPA 投与による影響は認められなかった (図 9)。同様に BPA を交配開始時から C57BL/6 妊娠マウスに 0.1、1、10ppm の濃度で飲水投与した (10、100、1000 μ g/kg BW/day に相当する。胎生 14.5 日の時点の胎児において全身を調べた結果、明らかな BPA の影響は認められなかった (data not shown)。

5. 厚労省「試験スキーム」の拡充。

今年度は OECD 関連の活動は無かったが、今後の活動に備えるべく情報収集を行った。

D. 考察

Malat-1 ノックアウトマウス作製のために新たに CRISPR 法を導入し、効率よく相同組み替え体を得ることに成功した。現在、キメラマウスが生まれ germline transmission を確認中である。

Wild 及び Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞を用いた BPA の影響解析の結果、Wild において BPA は添加 2 日後に EB のサイズを増加させた。マイクロアレイデータのパスウェー解析では 2 日目に細胞増殖に関連する遺伝子群の増加が認められ、特に、AKAP9、ATRX、CENPE、

ESCO1、SMC2、SMC4、WNK など染色体分離に関与する遺伝子が多く含まれていた。このことから、BPA が EB の分化初期に増殖促進に働いたことが示唆された。また、BPA 添加 8 日後には Malat-1 ホモ欠失 EB で用量依存的に萎縮している様な像が見られた。一方、Wild の EB ではそのような変化は認められなかったことから、Malat-1 が BPA の毒性に対して防御的に働いている可能性が示唆された。これに関しては、現在遺伝子レベルでの解析を進めている。

5' 側 9kb と 3'側 3.6kb を両方組み込んだ reporter を導入した ES 細胞を用いてプロモーター解析を実施した結果、BPA で活性の低下傾向が認められたが、用量依存性は明らかではなかった (図 8)。これまでに EB の系では Malat-1 の発現は増加していた。相反する結果の可能性として今回使用したゲノム上には BPA に反応する領域が含まれていなかったことが考えられた。一方、EB での Malat-1 の増加は RNA 分解の抑制など遺伝子の転写増加によらない機序である可能性も考えられた。今後さらに検討する必要がある。BPA を妊娠期に投与した 14 日のマウス雄胎児頭部矢状断面の malat-1 発現の検討を行った結果、BPA 投与による影響は認められなかった。同様に BPA を交配開始時から C57BL/6 妊娠マウスに 0.1、1、10ppm の濃度で飲水投与した胎生 14.5 日の時点の胎児において全身を調べた結果、明らかな BPA の影響は認められなかった。EB の系では分化開始 1 日目より BPA により Malat-1 は増加しており、より早期の胎児で今後検索を進める。

E. 結論

CRISPR 法による Malat-1 ノックアウトマウス作製を行いキメラマウスを得た。Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞を用いた解析から Malat-1 は BPA に対し防御的に働いている可能性が示唆された。Malat-1 の上流 9kb、下流 3.6kb を含むレポーターベクターを構築、ES 細胞に導入し BPA による反応性を検討した結果、減少傾向が認められた。妊娠期に BPA を投与し、胎生 14 日の胎児を対象に Malat-1 の *in situ* hybridization を実施した結果、本条件下では変化は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shirode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, Takeuchi JK, Kanno J, Bonewald LF, Imai Y, Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice. Bone. 2013 60C:68-77.doi: 10.1016/j.bone.2013.12.005. [Epub ahead of print]

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, Kodama

- Y., Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci.* 2013 38(4):643-54.
- Si Y, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Imai Y Autoimmune regulator, Aire, is a novel regulator of chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* ;2013 437(4):579-84.
- Takahashi Y, Yasuhiko Y, Takahashi J, Takada S, Johnson RL, Saga Y, Kanno J, Metameric pattern of intervertebral disc/vertebral body is generated independently of Mesp2/Ripply-mediated rostro-caudal patterning of somites in the mouse embryo. *Dev Biol.* 2013 380(2):172-84. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.05.020.
- Fujimoto, N, Takagi, A, Kanno, J, Neonatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the mRNA expression of prostatic proteins in C57BL mice. *J Toxicol Sci.* 2013 38(2):279-83.
- Okubo Y, Sugawara T, Abe-Koduka N, Kanno J, Kimura A, Saga Y, Lfng regulates the synchronized oscillation of the mouse segmentation clock via trans-repression of Notch signalling. *Nat Commun.* 2012 3:1141. doi: 10.1038/ncomms2133.
2. 学会発表
- Jun Kanno, Progress in Japanese Percellome Project and incorporation of TGP data, 11th International Conference of Environment Mutagens (11th ICEM), (2013.11.4) , Fos do Iguassu, Brazil, invited
- Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics, A Quantitative and Comprehensive Approach for Basic and Applied Toxicology. ICT2013 The XIII International Congress of Toxicology, (2013.7.2), Seoul, Korea, distinguished lecture
- 菅野 純, "Percellome Project ケミカルバイオロジーの視点からのトキシコゲノミクス—Percellome Projectの進捗とその応用性—", 第40回日本毒性学会学術年会、(2013.6.18)、千葉、シンポジウム
- 菅野 純、網羅的絶対量化遺伝子発現解析による外来物質生体影響の動的ネットワークマーカー抽出:Percellome Project、第102回日本病理学会総会、(2013.6.7)、札幌、シンポジウム
- Jun Kanno, Percellome toxicogenomics for more comprehensive and quantitative toxicology-extending the analysis among different organs and different species, the workshop on Moving Forward in Human Cancer Risk Assessment in the Genomics Era 2.0, (2013.5.16), Paris, France, invited

菅野 純、受容体シグナル毒性としての内分泌かく乱化学物質の影響について、第86回日本内分泌学会学術総会、(2013. 4. 26)、仙台、教育講演 (招待)

Katsuhide Igarashi, Noriko Moriyama, Kentaro Tanemura, Maki Otsuka, Yusuke Furukawa, Hirotsugu Asano, Kinichi Nakashima and Jun Kanno, Glucocorticoid Receptor (GR) enhances the astrocytic differentiation of neural stem cells via LIF-STAT3-GFAP pathway by a ligand dependent binding of GR to STAT3 at the STAT3 responsive element of GFAP promoter, 15th International Congress on Hormonal Steroids and Homones & Cancer (2012.11.16) Kanazawa, poster

Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Kentaro Tanemura, Endocrine disruptor as receptor mediated signal toxicity. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Homones & Cancer (2012.11.16) Kanazawa, invited

Jun Kanno, Humanized Steroid and

Xenobiotic Receptor Mouse by homologous knock-in of the human Steroid and Xenobiotic Receptor Ligand Binding Domain." the 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (2012.3.15) San Francisco, USA, poster

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

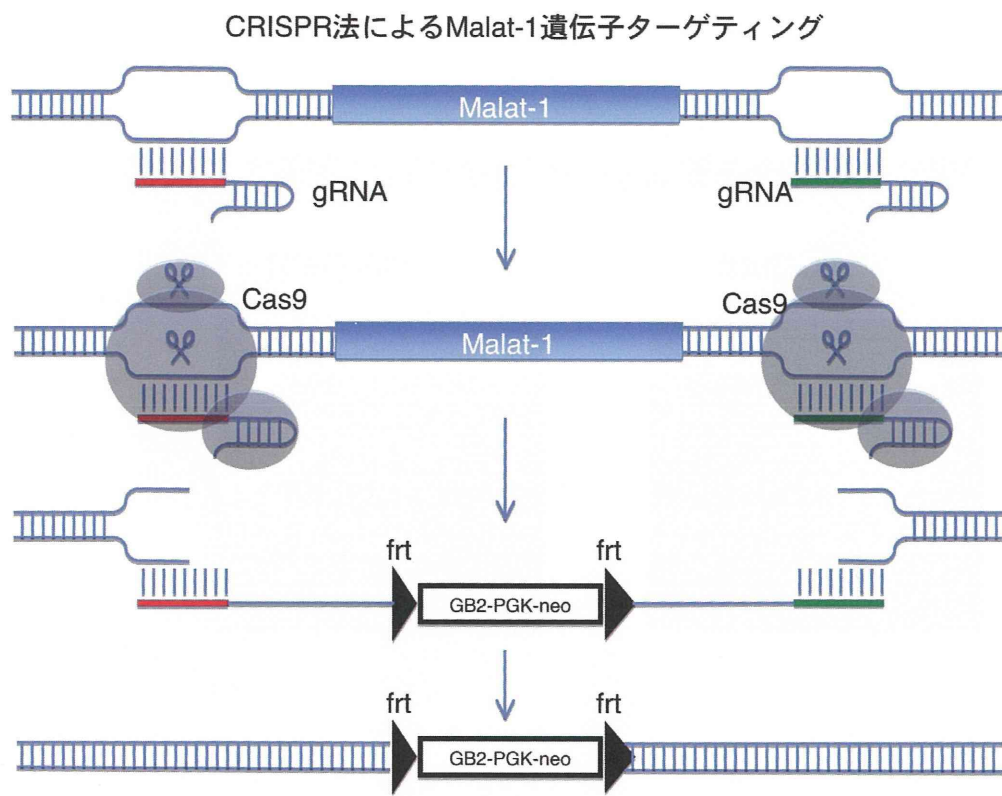


図 1. 標的 DNA 結合ガイド RNA (gRNA) とエンドヌクレアーゼ Cas9 により Malat-1 遺伝子部分をネオマイシン耐性遺伝子と置換することにより完全に欠損させる。さらに、導入されたネオマイシン耐性遺伝子も最終的に DNA 組み替え酵素にて除去される。

Wild ES細胞から形成されたEBの実体顕微鏡写真（2d）

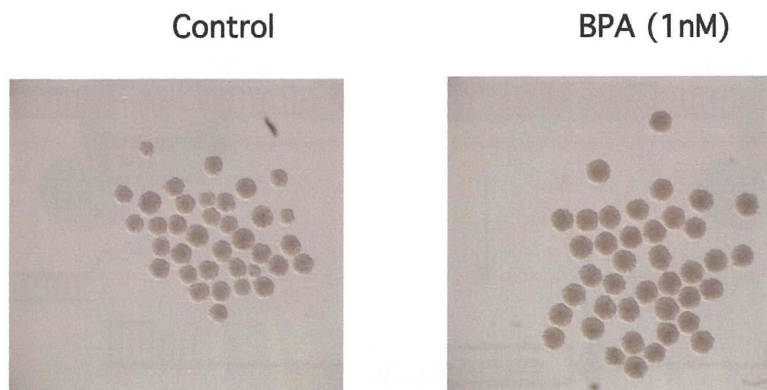


図 2. Wild ES 細胞から天井培養開始 2 日後に形成された EB の実体顕微鏡写真
1nM の BPA 添加によりサイズが増大している。

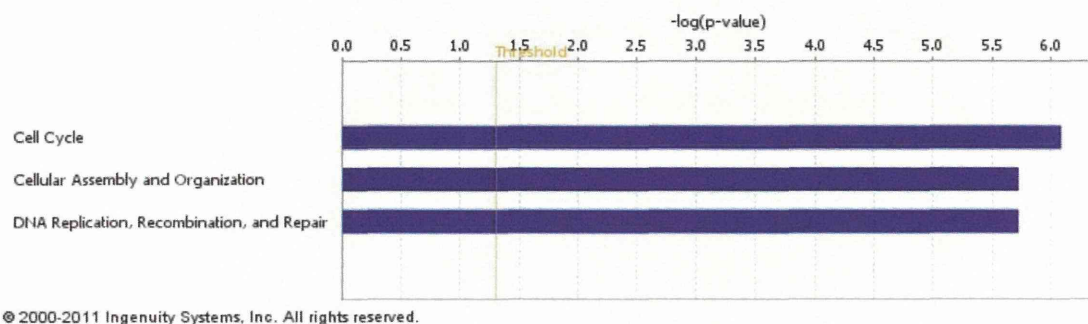


図 3. Wild ES 細胞に 1nM の BPA 添加 2 日後に形成された EB の増加遺伝子をパスウェー
ー解析した結果細胞増殖、DNA 複製に関するパスウェーが抽出された。

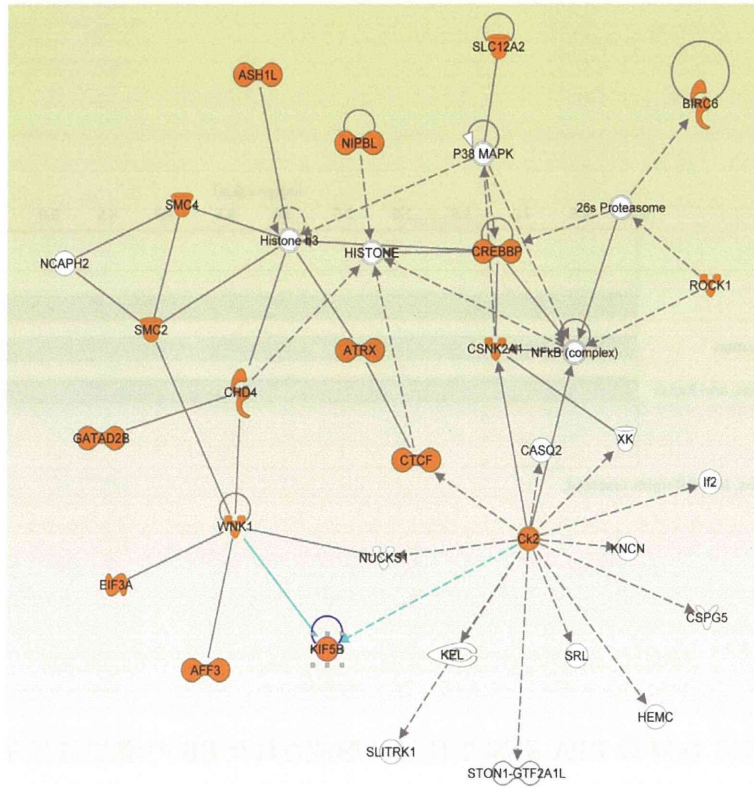


図 4. Wild ES 細胞に 1nM の BPA 添加 2 日後に形成された EB の増加遺伝子をパスウェー
一解析 (続き)

個別の遺伝子の関連を検索した結果、AKAP9、ATRX、CENPE、ESCO1、SMC2、SMC4、WNK など染
色体分離に関与する遺伝子が多く含まれていた。

Wild EBの実体顕微鏡写真 (8d)

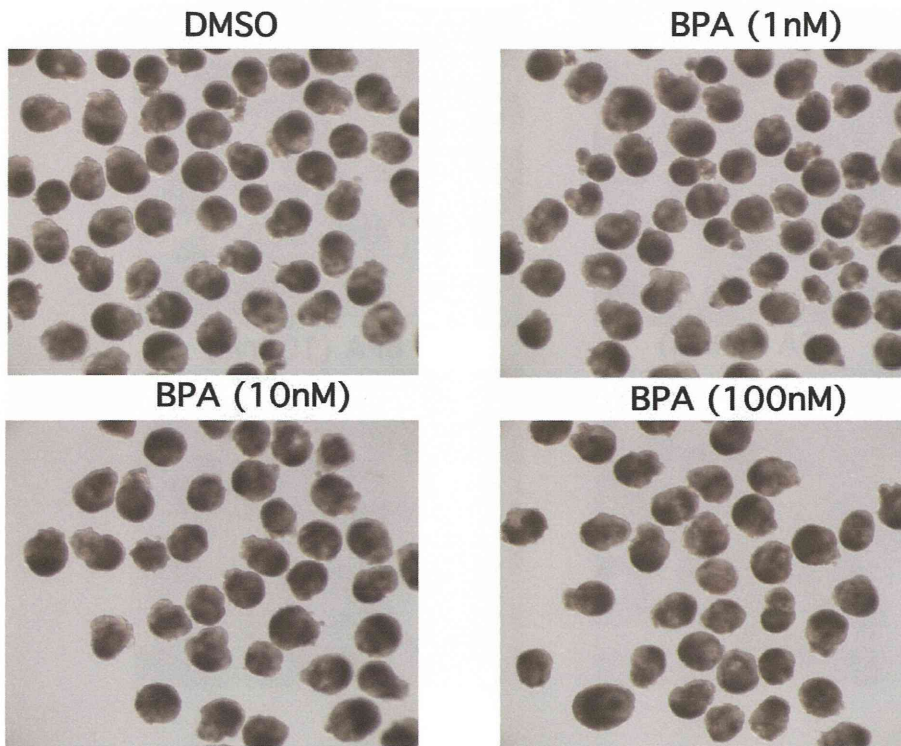


図 5. Wild ES 細胞に BPA 添加 8 日後に形成された EB の実体顕微鏡写真

Malat-1 ホモ欠失 EBの実体顕微鏡写真 (8d)

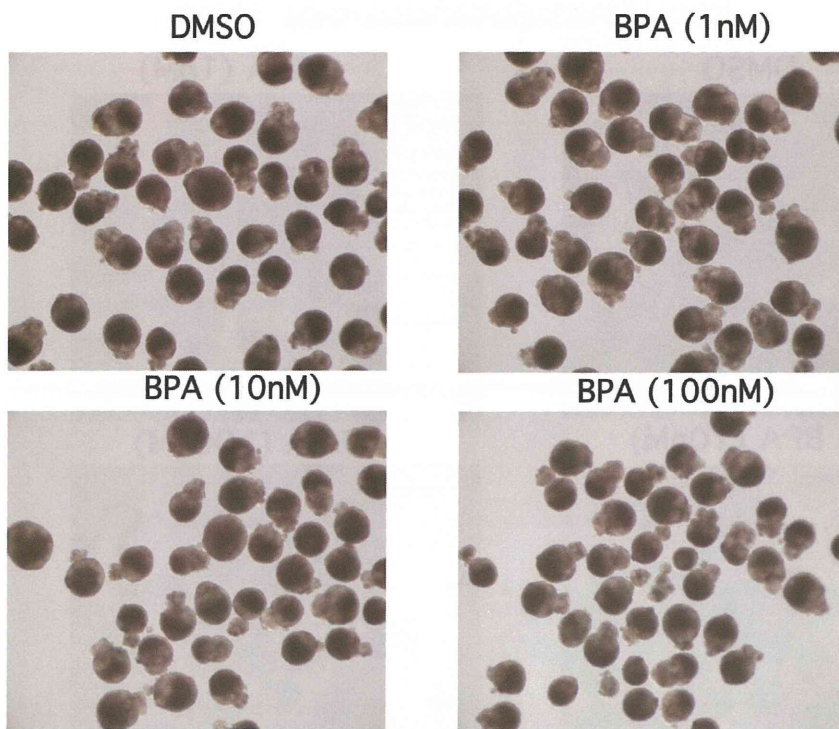


図 6. Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞、BPA 添加 8 日後の EB の実体顕微鏡写真