

図 12 PC12 細胞の神経分化 PC12 細胞を 1 nM のビスフェノール A (BPA) または 1 nM のノニルフェノール (NP) で 1 週間培養したのち、1 週間休薬させ、その後に無血清培地にて NGF により神経分化を誘導した。細胞体よりも長い神経突起を有する細胞を数え、全細胞に対する割合を算出した。1 回の実験について 2 例ずつ行い、それぞれで 100~150 個の細胞について調べた。この実験を 3 回繰り返し、平均 ± 標準誤差として表した。*; $p < 0.05$ vs コントロール。

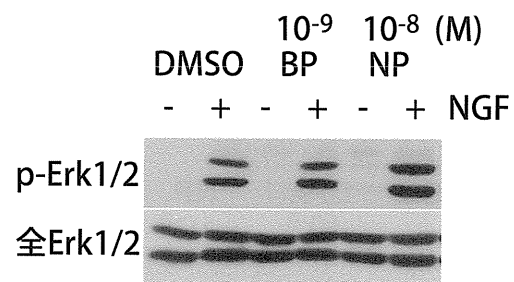


図13 PC12細胞におけるErkリン酸化 PC12細胞をビスフェノールA (BP)、ノニルフェノール (NP)、 β エストラジオール (ES) またはジエチルスチルベストール (DES) で1週間曝露した後、50 ng/mlの神経成長因子 (NGF) で15分刺激し、リン酸化Erk1/2 (p-Erk1/2) および全Erk1/2を検出した。

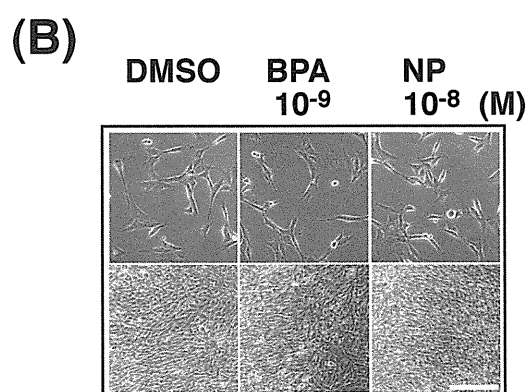
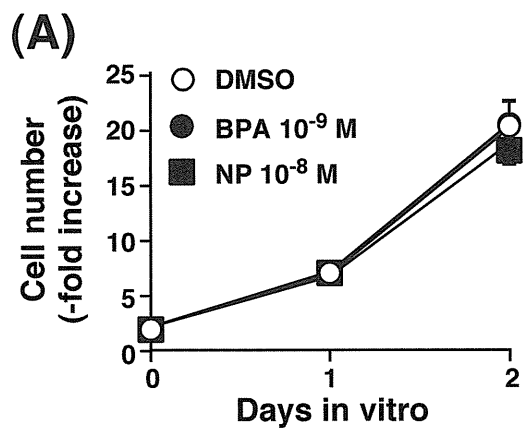


図 14 3T3 線維芽細胞の成長に対するビスフェノール A およびノニルフェノールの長期曝露の効果 3T3 線維芽細胞を 1 nM のビスフェノール (BPA) または 10 nM のノニルフェノール (NP) 存在下で 1 ヶ月培養した。その後それぞれの物質非存在下で 2 日間培養し細胞数を計測した。(B) 低密度培養下 (上段) およびコンフルエント到達後 (下段) の 3T3 線維芽細胞の位相差写真。細胞を低密度およびコンフルエント後 2 日間培養し、写真を撮影した。スケールバー;78 μm (上段)、250 μm (下段)。

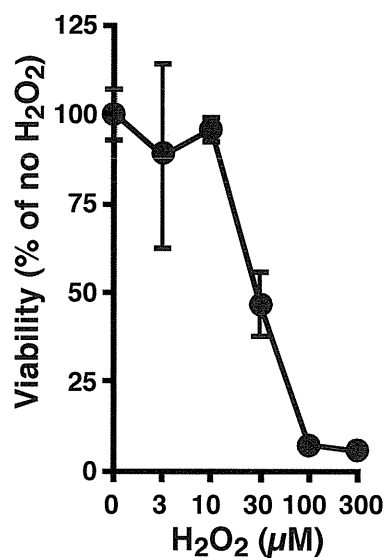


図 15 3T3 線維芽細胞の生存に対する過酸化水素の作用 3T3 線維芽細胞を無血清下で種々の濃度の過酸化水素に曝露し、翌日の細胞数を測定した。過酸化水素を加える直前の細胞数を 100%とし、過酸化水素処理をした細胞数を相対表記した。

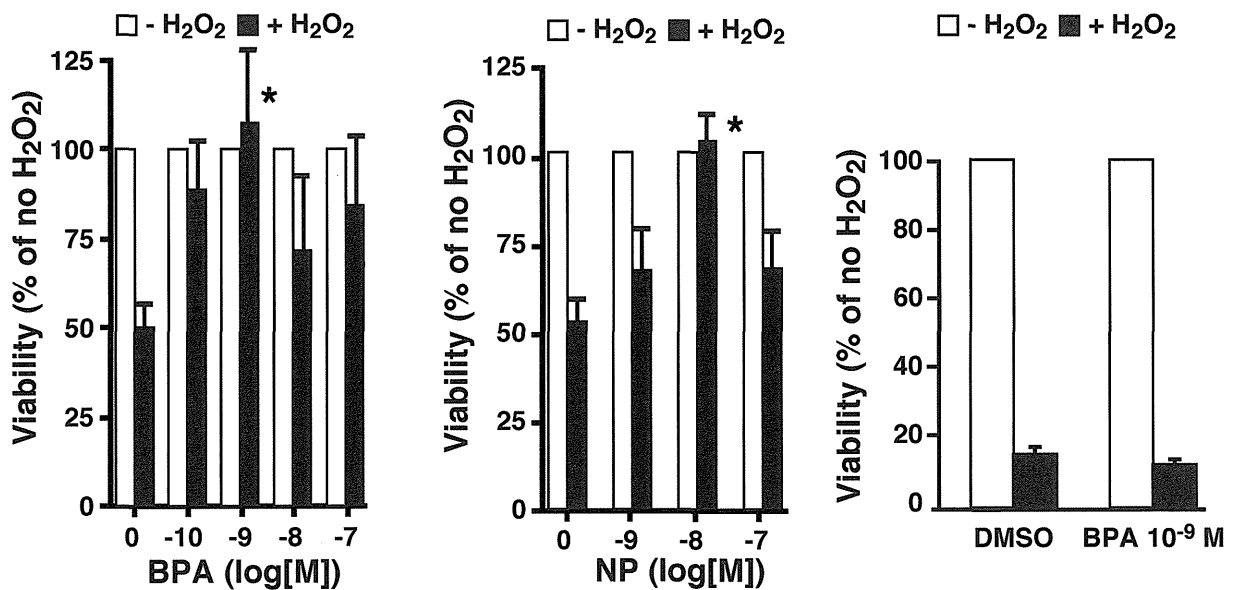


図 16 3T3 線維芽細胞における過酸化水素誘発細胞死に対するビスフェノール A (BPA) またはノニルフェノール (NP) の長期曝露の効果 (A) 3T3 線維芽細胞を 0~100 nM の BPA で 1 ヶ月培養し、無血清下で 30 μ M の過酸化水素を添加した。2 日後に細胞数を測定し、過酸化水素を加えない細胞数を 100%として相対表記した。得られたデータは平均 \pm 標準誤差で表した。1 回の実験につき 3~4 例実施し、これを 4 回以上繰り返した。*; $p < 0.05$ vs コントロール。(B) 3T3 線維芽細胞を 0~100 nM のノニルフェノール (NP) で 1 週間培養し、無血清下で 30 μ M の過酸化水素を添加した。2 日後に細胞数を測定し、過酸化水素を加えない細胞数を 100%として相対表記した。得られたデータは平均 \pm 標準誤差で表した。1 回の実験につき 3~4 例実施し、これを 4 回以上繰り返した。*; $p < 0.05$ vs コントロール。(C) 3T3 線維芽細胞を 1 nM の BPA で 1 日培養し、無血清下で 30 μ M の過酸化水素を添加した。2 日後に細胞数を測定し、過酸化水素を加えない細胞数を 100%として相対表記した。得られたデータは平均 \pm 標準誤差で表した。1 回の実験につき 3~4 例実施し、これを 3 回繰り返した。

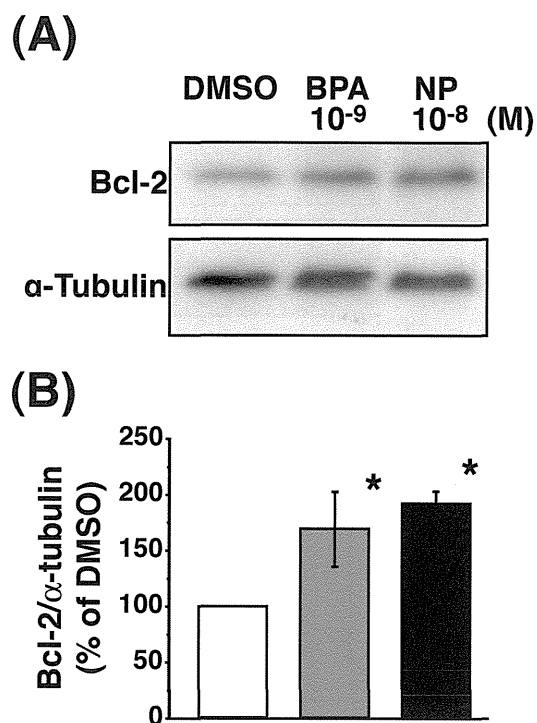


図17 3T3線維芽細胞におけるBcl-2の発現 (A)3T3線維芽細胞をビスフェノールA(BPA)、ノニルフェノール(NP)で1ヶ月曝露した後、Bcl-2を検出した。(B) α チューブリンとの相対値を算出し、コントロールの値を100%として表した。
*; $p < 0.05$ vs コントロール。

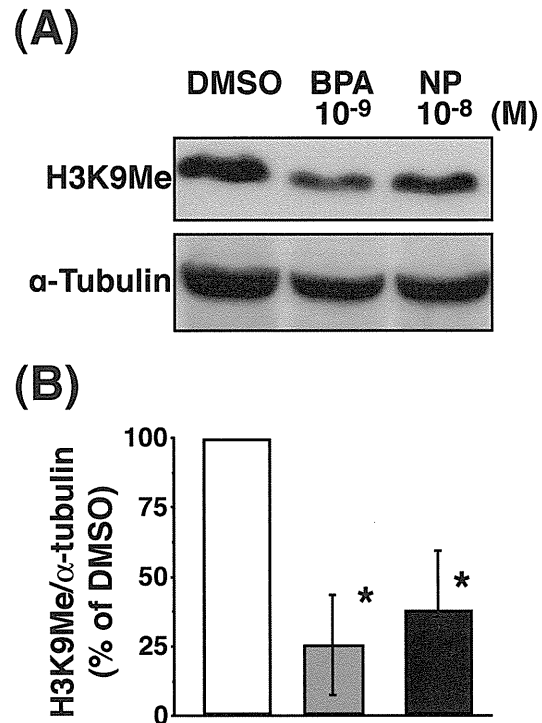


図18 3T3線維芽細胞におけるBcl-2の発現 (A) 3T3線維芽細胞をビスフェノールA (BPA)、ノニルフェノール (NP) で1ヶ月曝露した後、メチル化ヒストンを検出した。(B) α チューブリンとの相対値を算出し、コントロールの値を100%として表した。*; $p < 0.05$ vs コントロール。

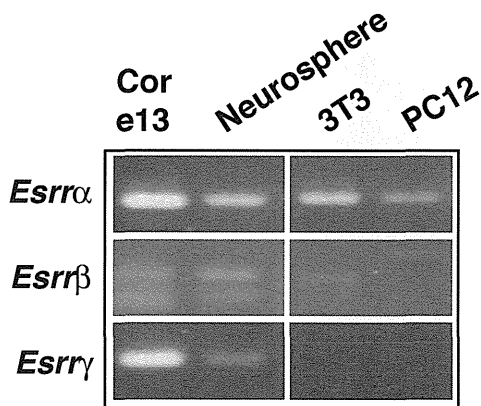
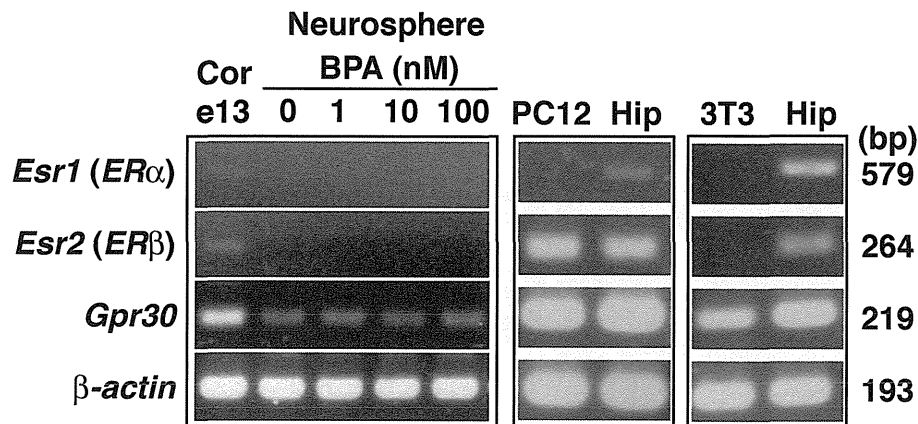


図 19 大脳皮質神経上皮細胞由来細胞塊、PC12 細胞、マウス 3T3 線維芽細胞におけるエストロゲン受容体遺伝子およびエストロゲン関連受容体遺伝子の発現 0~100nM のビスフェノール A (BPA) 存在下で 7 日間培養した神経上皮細胞塊、胎生 13 日令マウス大脳皮質 (Cor e13)、PC12 細胞、3T3 線維芽細胞および海馬 (Hip) より RNA を調製し、RT-PCR に使用した。大脳皮質、海馬は陽性対照として使用した。

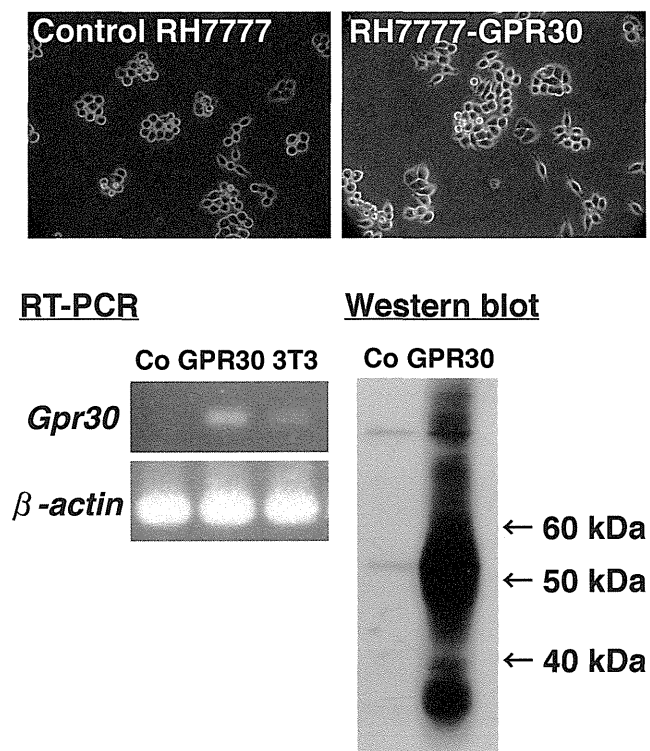


図 20 GPR30 発現細胞の確立 (A) Control RH7777 細胞および GPR30 発現 RH7777 細胞の位相差顕微鏡写真。(B) GPR30 の発現。RT-PCR および細胞膜画分を用いたウエスタンブロットにより検出した。

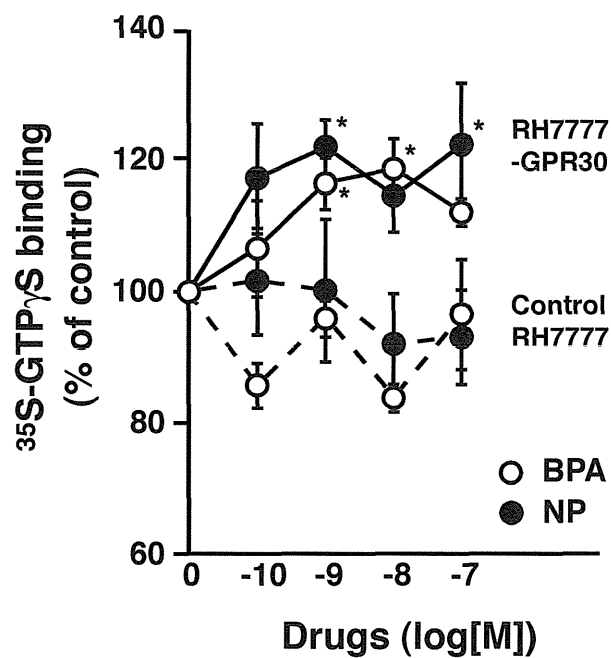


図 21 ビスフェノールおよびノニルフェノールの GPR30 活性化作用 細胞膜に [³⁵S]-GTPγS を添加し、その結合量をコントロールに対する比率で表した。

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)

(平成 23～25 年度) 総合研究報告書

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した。エストロゲン受容体遺伝子の発現制御領域を含む約 180kb のゲノム領域を単離し、エストロゲン受容体遺伝子を β ガラクトシダーゼ遺伝子に置換したトランスジェーンを作製し、CD-1 マウスの受精卵にインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを 2 系統作製した。この β ガラクトシダーゼ遺伝子には tau 遺伝子が融合されており、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の解析が可能となるようにデザインした。作製したマウスにおける β ガラクトシダーゼ遺伝子の発現部位を X-gal 染色により確認したところ、生殖器、脳を含めてその発現が確認された。

A. 研究目的

本研究では、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曝露を行い、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曝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 β 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曝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 β 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。

β ガラクトシダーゼ遺伝子産物を染色することで、容易に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 β ガラクトシダーゼ遺伝子に融合させ、エストロゲン受容体を発現している神経線維の投射の追跡を可能にする。tau 遺伝子は微小管タンパク質に結合することから、tau 遺伝子を融合させた β ガラクトシダーゼは軸索を輸送され、発現細胞の神経投射を解析することが可能となる。ビスフェノール A またはエストロゲン等を曝露した場合、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曝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、曝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)

本研究においては組換え DNA 実験が含まれるが、これは大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会で承認を受けており、動物実験については、大阪大学大学院工学研究科実験動物委員会で承認を受けている。

C. 研究結果

UCSC ゲノムデータベース (<http://genome.ucsc.edu/>) 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 α 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、RP23-7

D5 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 β ガラクトシダーゼ (lacZ) 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 tau 遺伝子は微小管に結合し、神経細胞においては軸索内を輸送されることから、エストロゲン受容体を発現している神経細胞については、その繊維を染めることが可能となる。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 RP23-7 D5BAC 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 RP23-7 D5BAC 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 (図 1)。

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 α 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 RP23-7 D5BAC 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 RP23-7 D5BAC クローンがすでに二量体となることが推察された。

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 系統についてそれぞれ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。

これらのマウスの成獣（8 週齢）について種々の組織から切片を作成、もしくはホルマウントによる X-gal 染色を行い、X-gal 発現部位を確認した。メスマウスの卵巣、子宮、膈などにおいて非常に強い発現が見られたのみならず、脳内では視床下部腹内側核、海馬の一部などにおいてその発現が見られた（図 2）。これらの X-gal シグナルが検出された部位は、今までに知られているエストロゲン受容体発現部位と一致していることから、このトランスジェニックマウスにおいては、X-gal シグナルがエストロゲン受容体の発現を忠実に反映していると考えられた。

このトランスジェニックマウスを用いて、雌雄における視床下部腹内側核における X-gal シグナルを比較したところ、メスにおけるシグナルが多数、かつ強く観察された。このことから、脳内におけるエストロゲン受容体発現の性的二型についても X-gal シグナルの差として検出できることが明らかになった。

一方、新生児期に DES 曝露したマウスにおいては、その X-gal シグナルが弱くなる傾向が得られている。基本的なプロトコールとしては、生後 0 日から 4 日までの 5 日間に合成

エストロゲンを曝露し、成熟後卵巣を摘出し、脳における lacZ の発現を解析している。このことは、新生児期のエストロゲン曝露がエストロゲン受容体発現の時空間的な変化を誘起していることを示唆しており、曝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できる可能性がある。

D. 考察

本研究においてエストロゲン受容体発現細胞を簡便に可視化可能なマウスを作製することができた。このマウスにおける lacZ 陽性細胞の部位は今までに知られているエストロゲン受容体発現部位を反映しているように観察されたが、*in situ* ハイブリダイゼーションなどにより、mRNA の発現パターンとの整合性を確認する必要がある。またニッスル染色などの染色法や免疫染色を併用し、X-gal シグナル陽性細胞について明確にする必要がある。

一方、脳内における X-gal シグナルについては、その再現性の確認と定量的な比較を行う必要がある。特に雌雄差、曝露による差などが示唆されたが、相互の差異を定量的に比較する必要がある。特に、DES 曝露による影響について再現性を確認し、その感受性のある時期、用量を明確にすることが可能になれば、BPA を含みその他の化学物質影響を定量的に評価することが可能になるとと思われる。

今後の展開

新生児期におけるビスフェノール A などの暴露を行い、X-gal シグナルの発現に及ぼす影響を明らかにする。これにより、ビスフェノール A をはじめとする、いわゆる遅発影響を誘起する低用量曝露における、エストロゲン受容体の関与を明らかにする。エストロゲン受容体が関与している場合には、エストロゲン受容体発現に着目した新たな試験スキームを提言できる。

将来的には、エストロゲン陽性細胞を標識可能なことから、これらの細胞を選択しエピジェネティック変化等について解析が可能となる。またコンディショナルノックアウトマウス等により、新生児期のエストロゲン受容体発現を抑制することにより、遅発性影響の分子メカニズム解明の有力な手段となる。

一方、エストロゲン受容体が関与していないことが明らかになった場合は、従来のエストロゲン受容体とアンドロゲン受容体を中心とした「試験スキーム」では不十分であることを提言できる。この場合には、候補となる標的遺伝子について、本研究と類似の標的細胞を可視化したトランスジェニックマウス等を作製することにより、分子メカニズムの解明と同時に新たな「試験スキーム」の提言につなげることが可能となる。

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. Vesnarinone Suppresses TNF α mRNA Expression by Inhibiting Valosine-Containing Protein.

Hotta, K., Nashimoto, K., Yasumura, E., Suzuki, M., Azuma, M., Izumi, Y., Shima, D., Nabeshima, R., Hiramoto, M., Okada, A., Sakata-Sogawa, K., Tokunaga, M., Ito, T., Ando, H., Sakamoto, S., Kabe, Y., Aizawa, S., Imai, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, H. and Handa, H. (2013)

Mol Pharmacol. 83: 930-938.

2. 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

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. and Sato, T. (2012) Reprod Toxicol. 33: 35-44.

4. 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) 14; 296: 13-9. Epub 2012 Mar 21. PMID: 22445810)

5. Erythropoiesis is regulated by the transcription elongation factor Foggy/Spt5 through gata1 gene regulation.

Taneda, T., Zhu, W., Cao, Q., Watanabe, H., Yamaguchi, Y., Handa, H. and Wada, T. (2011) Genes Cells. 16: 231-42.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

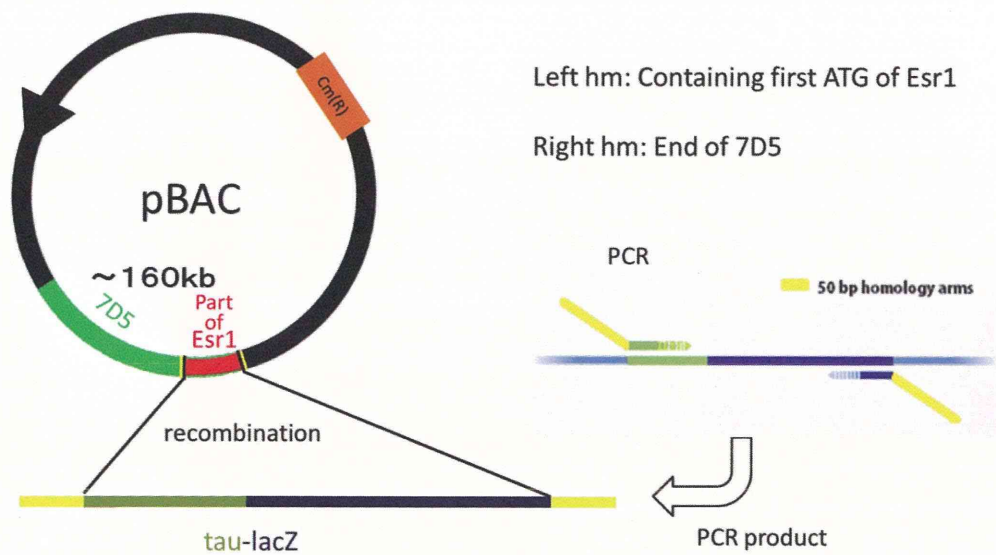


図1 3AC7D5-tau-lacZ の模式図

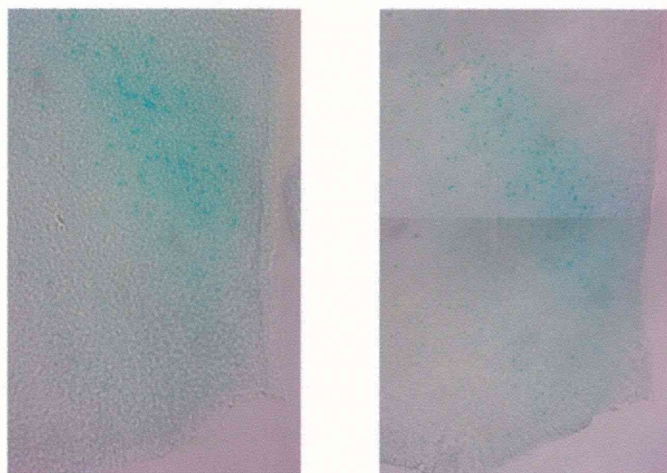


図2 medial preoptic nucleus
 内側視索前核

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）

（平成 23～25 年度）総合研究報告書

周産期低用量暴露による免疫影響評価

研究分担者 林 良夫	徳島大学・名誉教授
研究協力者 石丸直澄	徳島大学大学院・教授
新垣理恵子	徳島大学大学院・助教
菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長
高木篤也	国立医薬品食品衛生研究所・毒性部動物管理室長
山田耕一	徳島大学大学院博士課程・大学院生

研究要旨

ダイオキシンなどの化学物質は、生体に様々な影響を与えることがよく知られているが、どの時期にどのような経路で暴露されることによって生体への影響が生じるのかは全く不明である。本研究では、周産期における母体に及ぼす化学物質の免疫システムへの影響について検討を加えた。妊娠期における胸腺組織でのダイオキシンの細胞内受容体である Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の mRNA が非妊娠期において上昇していた。さらに、妊娠期の胸腺組織では Autoimmune regulator (AIRE) の mRNA 発現およびタンパク発現も上昇することが判明した。また、アロマターゼノックアウトマウスの胸腺組織では AhR の mRNA 発現が対照に比較して亢進していた。一方で、AhR を介した T 細胞分化に関するエピジェネティクス解析を行うと、AhR ノックアウトマウスの胸腺組織における Th1 および Th2 関連遺伝子での DNA メチル化が対照マウスと比較して変化していたことから、AhR を介した T 細胞分化にエピジェネティクスな影響が大きく関与する可能性が示された。妊娠マウスの胸腺組織での免疫関連因子の mRNA 発現に関しては、IL-4、IFN- γ 、T-bet、NF- κ B2、CXCR7 などの発現が有意に亢進していた。また、妊娠後期における胸腺組織での遺伝子発現の変動に関しては、非妊娠マウスの胸腺組織に対して有意に上昇した遺伝子は549個で、有意に低下していた遺伝子は52個であった。さらに、妊娠マウスへのダイオキシンの腹腔内投与により胸腺組織においても遺伝子発現の網羅的解析を進めている。

A. 研究目的

周産期における環境ホルモンを主体とした化学物質の低用量暴露によって、子どもあるいは母体

の免疫システムに与えられる異常に関してマウスを用いて分子メカニズムを詳細に検討することにより、周産期における化学物質の免疫系への安

全性を評価する。

平成 23 年度には、妊娠期あるいは非妊娠期における正常マウスを用いることにより、免疫細胞の各分画での AhR シグナルと性ホルモンとの関係を明らかにする。また、性ホルモンとの関係を明瞭にするために、アロマトラーゼノックアウトマウス、卵巣摘出マウスを用い、胸腺組織における AhR の発現を確認する。さらに、胸腺細胞における AhR を介した反応が DNA のメチレーションなどエピジェネティクスにどの程度関係しているのかを AhR ノックアウトマウスを用いてスクリーニング的に検討する。

平成 24 年度では、前年度の研究結果を踏まえ、さらに詳しく妊娠期における胸腺での免疫関連遺伝子のエピジェネティクスな変動を確認するとともに、ダイオキシンの暴露による胸腺組織の *in vitro* での遺伝子の変化を網羅的に解析することにより、母体側の免疫システムへの影響を評価する。

平成 25 年度では、周産期における低用量暴露が引き起こす各種の遅発影響を明らかにするため、妊娠後期における胸腺組織での遺伝子変化に着目し、ダイオキシン(TCDD)の暴露による免疫関連遺伝子の動態と晩発性の免疫異常に関して考察を加える。

B. 研究方法

1) マウス

AhRノックアウトマウス、アロマトラーゼノックアウトマウス、C57BL/6マウスを当施設にて SPF (specific pathogen-free) 下で繁殖飼育した。徳島大学遺伝子組換え実験規則及び動物実験委員会規則に従った研究を進めた。

2) フローサイトメトリー解析

各群における全てのマウスから頸部リンパ節、胸腺および脾臓を摘出し、ホモジナイズ、溶血、洗浄後各種抗体 (CD4, CD8; e-Biosciences)

と反応させた後に3%パラホルムアルデヒドにて固定したのち細胞自動解析装置 (FACSCanto, BD) にて解析した。

4) Real-time PCR 法

脾臓から Thy1.2 抗体及びマグネットビーズを用いて T 細胞を分離し、トライゾールにて Total RNA を調整した。胸腺組織に関してもトライゾールまたは RNA Later (Sigma Aldrich, St Luis, MA) 及びホモジナイザーによって total RNA を分離した。逆転写反応後、PTC-200 DNA Engin Cycler 装置 (MJ Research, Waltham, MA) を用い、下記プライマーにて各 mRNA を定量化した。AIRE: forward, 5'-TCTGCTAGTCACGACCCTGTTC-3', reverse, 5'-GGCGTGACATGCTCTGGAT-3'; AhR: forward, 5'-ACATAACGGACGAAATCCTGACC-3', and reverse, 5'-TCAACTCTGCACCTTGCTTAGGA-3'; IL-2: forward, 5'-CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA-3', reverse, 5'-TCCAGAACATGCCGCAGAG-3'; IL-4: forward, 5'-TCTCATGGAGCTGCAGAGACTCT-3', reverse, 5'-TCCAGGAAGTCTTTTCAGTGATGTG-3'; IL-17: forward, 5'-CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC-3' and reverse, 5'-AGCTTTCCCTCCGCATTGACACAG-3'; IL-10: forward, 5'-ATCGATTTCTCCCCTGTGAA-3', reverse, 5'-TGTCAAATTCATTCATGGCCT-3'; IFN- γ : forward, 5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3' and reverse, 5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'; TGF- β : forward, 5'-GACCGCAACAACGCCATCTAT-3' and

reverse, 5'-GGCGTATCAGTGGGGGTCAG-3';
T-bet: forward,
5'-CCTGTTGTGGTCCAAGTTCAAC-3' and
reverse,
5'-CACAAACATCCTGTAATGGCTTGT-3';
GATA-3: forward,
5'-GACTTGCCAGAAAGGCAGAC-3', and
reverse, 5'-AAAGAGGTCACCACCCACAG-3';
ROR γ t: forward,
5'-GCGGAGCAGACACACTTACA-3', and
reverse, 5'-TTGGCAAACCTCCACCACATA-3';
Foxp3: forward,
5'-CCCAGGAAAGACAGCAACCTT-3', and
reverse, 5'-TTCTCACAACCAGGCGAGTTG-3';
CCR7: forward,
5'-AGGGGAGCCAGAGCTATGTA-3', and
reverse, 5'-TGTGTACTCCGTTTCCCACA-3';
CXCR7: forward,
5'-GGTCAGTCTCGTGCAGCATA-3', and
reverse, 5'-GTGCCGGTGAAGTAGGTGAT-3';
CXCR4: forward, 5'-
TCAGTGGCTGACCTCCTCTT-3', and reverse,
5'-TTTCAGCCAGCAGTTTCCTT-3'; AhR:
forward,
5'-ACATAACGGACGAAATCCTGACC-3' and
reverse,
5'-TCAACTCTGCACCTTGCTTAGGA-3';
MCP-1: forward,
5'-CTGGATCGGAACCAAATGAG-3', and
reverse, 5'-TGAGGTGGTTGTGGAAAAGG-3';
NF- κ B1: forward,
5'-ATGGCAGACGATGATCCCTA-3' and
reverse, 5'-TAGGCAAGGTCAGAATGCAC-3';
NF- κ B2: forward,
5'-ACCTTTGCTGGAAACACACC-3', and
reverse, 5'-TCATGGAGACCCATGTCAGA-3';
TNF- α , forward,
5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3', and

reverse, 5'-AGATGATCTGAGTGTGAGGG-3';
IL-1 β : forward,
5'-TGATGAGAATGACCTGTTCT-3', and
reverse, 5'-CTTCTTCAAAGATGAAGGAAA-3';
 β -actin: forward,
5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3' and
reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAG
GGGGG-3'.

5) DNA エチル化検出

胸腺細胞及び脾臓細胞から CD4 陽性 T 細胞を調整し (CD4 enrichment kit, Stem cell)、DNA を抽出した (DNeasy, Qiagen)。キアゲン社の EpiTect Methyl qPCR System を用い、メチル化された CpG 配列は切断できないメチル化感受性制限酵素反応を応用し、リアルタイム PCR 法によって DNA メチル化を定量化する。T helper cell differentiation, signature panel を利用し、24 個のヘルパー T 細胞の分化に関わる転写因子やサイトカイン遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態の定量化を試みた。

6) PCR アレイ (T 細胞妊娠期における胸腺組織への TCDD 暴露による影響を網羅的な遺伝子発現解析によって検討した。妊娠後期 (妊娠 15 日目)、対照マウス (B6 マウス) あるいは AhRKO マウスの胸腺組織に *in vitro* で TCDD (100 nM) を添加し、2 時間組織培養を行った。mRNA 抽出後、84 個の T 細胞分化関連遺伝子発現に関して PCR アレイによって解析した。

7) DNA マイクロアレイ

さらに、網羅的遺伝子発現を検討するために DNA マイクロアレイを実施した。一方、*in vivo* での TCDD 暴露による妊娠期の胸腺組織への影響を検討するために、妊娠期 (妊娠 15 日目) のマウスあるいは対照マウスへの TCDD の投与を行い、胸腺組織を用いて DNA マイクロアレイを実施した。妊娠マウスあるいは非妊娠マウスの胸腺組織における免疫関連遺伝子の

mRNA を定量 RT-PCR 法にて解析を行った。さらに、胸腺組織における妊娠による遺伝子変化について DNA マイクロアレイ法によって網羅的な解析を実施した。TRIZOL reagent (Gibco BRL、Rockville、MD)を用いて、添付プロトコールに従い全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA を 400 ng (濃度は 80 ng/ μ l) 以上になるように調整し、ラベル化 cRNA を合成し、フラグメント化、ハイブリダイゼーション、洗浄を行い、データの処理・解析を行った。解析に用いたスライドは、マウスに対応している Whole Genome 遺伝子発現アレイ 4 \times 44 k (4 サンプル / 1 スライド) (Agilent technologies、Santa Clara、CA) で行った。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会および国立医薬品食品衛生研究所において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。

C. 研究結果

妊娠 B6 マウスと非妊娠 B6 マウスにおける体重、脾臓重量及び胸腺重量を計測したところ、妊娠によって体重の増加、脾臓の重量の有意な増加に対して、胸腺重量の低下が見られた (図 1)。

雌 B6 マウス(10 週齢)を雄マウスと mating させ、プラーグを確認後、15 日目におけるリンパ節及における T 細胞分画をフローサイトメーターにて検討すると、非妊娠対照マウスに比較して、妊娠マウスでは CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞ともにその割合が有意に増加していることが判明した (図 2A)。また、脾臓に置いても、妊娠マウスの CD4 陽性細胞及び CD8 陽性細胞は有意に増加していた(図 2A)。また、制御性 T 細胞のマーカ

ーである Foxp3 陽性 CD4 陽性細胞について検討すると、リンパ節、脾臓ともに対照マウスに比較して有意に減少していることが明らかとなった(図 2B)。

CD11 陽性樹状細胞は妊娠マウスで対照マウスに比較して約 1.7 倍であった (図 3)。CD11c 陰性 CD11b 陽性マクロファージ分画に関しても妊娠によって約 1.6 倍に増加していることが分かった (図 3)。

胸腺における T 細胞の分化についてフローサイトメーターにて検討すると、CD4⁺CD8⁻ (DN)、CD4⁺CD8⁺ (DP)、CD4⁺ (CD4SP)、CD8⁺ (CD8SP) の分画において妊娠マウスと対照マウスでの差は見られなかった (図 4)。また、DN 分画における T 細胞の初期分化を CD44 と CD25 分子を用いて検討したところ、CD44⁺CD25⁻(DN1)で妊娠により約 30%増加し、CD44⁺CD25⁺(DN2) 、 CD44⁺CD25⁺(DN3) 、 CD44⁺CD25⁻(DN4)では両者に大きな差はなくそれぞれ妊娠マウスにおいて 10%程度の減少が観察された (図 4)。Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の胸腺での分化に両者に差はなかった (図 4)。

シェーグレン症候群モデルマウスの妊娠期にダイオキシンを投与することにより、出産後に自己免疫疾患が誘導され、胸腺におけるダイオキシンの影響が大きかったことから(平成 22 年度報告)、妊娠期における胸腺組織でのダイオキシン受容体である AhR の mRNA 発現を検討した。非妊娠 B6 マウスにおける胸腺組織における AhR の発現に比べ、妊娠 14 日目で約 52%の増加、妊娠 17 日目で約 56%の増加が認められた(図 5A)。一方、脾臓における AhR の発現には対照群と妊娠群で有意な差は確認できなかった(図 5A)。

胸腺における T 細胞の選択に重要な因子となる自己抗原遺伝子の発現を調節することが知られている AIRE は自己免疫疾患発症機序を知る上で極めて重要な転写因子である。妊娠期にお

る AIRE の mRNA 発現を検討すると、非妊娠対照群マウスと比較して、妊娠 14 日目で約 89% の増加、妊娠 17 日目で約 78% の有意な増加が認められた(図 5B)。さらに、タンパクレベルで AIRE の発現を検討するために対照マウスと妊娠 14 日目のマウスにおける胸腺組織の凍結切片を用い、AIRE、胸腺髄質上皮細胞のマーカである EpCAM 及び DAPI による 3 重蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察すると、胸腺髄質に限局して、対照群、妊娠群ともに観察され、AIRE 陽性細胞数には両群で大きな差は見られないが、AIRE び蛍光強度は妊娠群で大きくなっていることから、タンパクレベルでも妊娠期に AIRE の発現が上昇していることが示された(図 6)。

周産期において母体の女性ホルモン量は大きく変動する。そこで、エストロジェンの合成に重要な酵素であるアロマターゼ遺伝子ノックアウトマウスの胸腺組織における AhR の mRNA 発現を検討すると、対照マウスと比較して有意に AhR の発現が亢進していることが判明した(図 7A)。アロマターゼノックアウトは唾液腺、涙腺に自己免疫疾患が発症することが判明しているため、胸腺組織における AIRE 発現を検討したところ、アロマターゼノックアウトマウスと対照マウスとの間で有意な差は観察されなかった(図 7B)。

ダイオキシンの投与により晩発性に自己免疫疾患が誘導され、胸腺細胞における AhR を介した免疫異常が示唆されることをすでに報告していることから、胸腺細胞における AhR の発現の有無によるエピジェネティックな変動を検討するために、AhR ノックアウトマウスの胸腺細胞における T 細胞分化関連遺伝子の DNA メチル化について解析した。解析した遺伝子を表 1 に示す。CD4 陽性胸腺細胞を用いて DNA を抽出し、メチル化感受性制限酵素による DNA メチル化をサイクル数から換算し、Hypermethylated DNA fraction (HM)、Unmethylated DNA fraction (UM)、Intermediatedly methylated DNA fraction (IM) の

割合(%)を算出した。検出可能であった遺伝子とそれぞれのメチル化の割合を表 2 に示す。対照群と AhR ノックアウト群で、メチル化に差があった遺伝子は Th1 関連遺伝子である Eomes、Th2 関連遺伝子である Pparg であり、Eomes では AhR ノックアウトマウスで HM の DNA メチル化が対照に比較して低下していた(図 8A)。Pparg に関しては AhR ノックアウトマウスにて対照群よりも DNA メチル化が亢進していた(図 8B)。その他の遺伝子では大きな差は確認できなかった(表 2、図 8C)。

T 細胞の分化過程でエピジェネティクスな変化が知られている遺伝子群に関して検討すると、Th1 細胞関連では、B6 マウスでは妊娠に伴って Ifng、IL-12rb2、Fasl、Tbx21 の発現が増加するが AhRKO マウスでは変化が見られなかった(図 9)。IL-18r1、IL-18rap は B6、AhRKO マウスともに妊娠によって発現の亢進が確認された(図 9)。TCDD の添加によって、それらの遺伝子の変動に差異が見られなくなることが判明した(図 9)。

Th2 細胞関連でのエピジェネティクスな変化が知られている遺伝子に関しては、B6 マウスでの妊娠により Gata3 の発現が亢進するが、TCDD の添加によりその差異は観察されなくなった(図 10)。B6、AhRKO マウスともに妊娠に伴って IL-1r1、Pparg の発現が亢進するが、TCDD の添加によってそれらの遺伝子発現の亢進は認められなくなった(図 10)。

Th17 細胞関連でのエピジェネティクスな変化が知られている遺伝子に関しては、B6、AhR マウスともに妊娠に伴って IL-17a、IL-1r1、IL-21、Rora、Rorc の発現が亢進するが、TCDD の添加によってそれらの遺伝子発現亢進は見られなくなった(図 11)。

制御性 T 細胞(iTreg, nTreg)関連でのエピジェネティクスな変化が知られている遺伝子に関しては、B6、AhRKO マウスともに妊娠期に Ccr6、IL9、Ifn4、Myb、Pou2f2 の発現が増加するが、TCDD