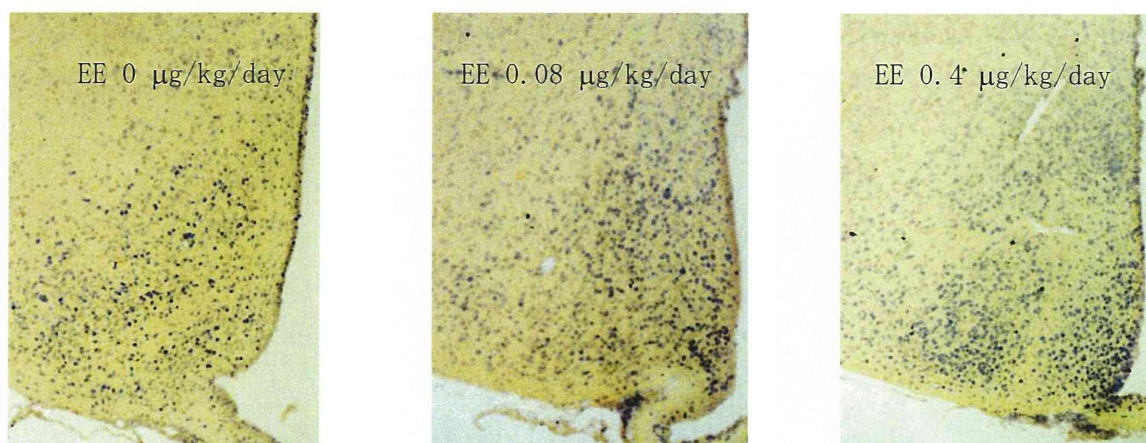


図7 視床下部弓状核(ARC)における *kiss1* 遺伝子 (青色顆粒) およびエストロゲン α 受容体 (*ER α* , 赤色顆粒)の double-labelled *in situ* hybridization

A. 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた13週齢雌ラット



<i>Kiss1</i> expressing cells	1032	953	1838
Co-expression with <i>ERα</i>	433	616	552

B. *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット

Kiss1 $-/-$



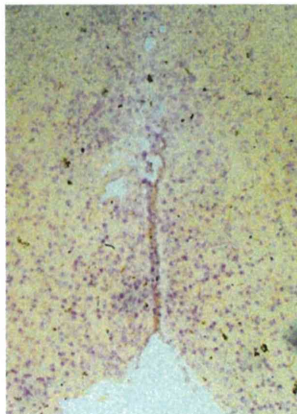
図8 視床下部前腹側脳室周囲核(AVPV)における *kiss1* 遺伝子 (青色顆粒) およびエストロゲン α 受容体 ($ER\alpha$ 、赤色顆粒)の double-labelled *in situ* hybridization

A. 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた13週齢雌ラット

EE 0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$



EE 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$



EE 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$



Kiss1 expressing cells 41
Co-expression with $ER\alpha$ 30

20
8

21
12

B. *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット

Kiss1 $-/-$

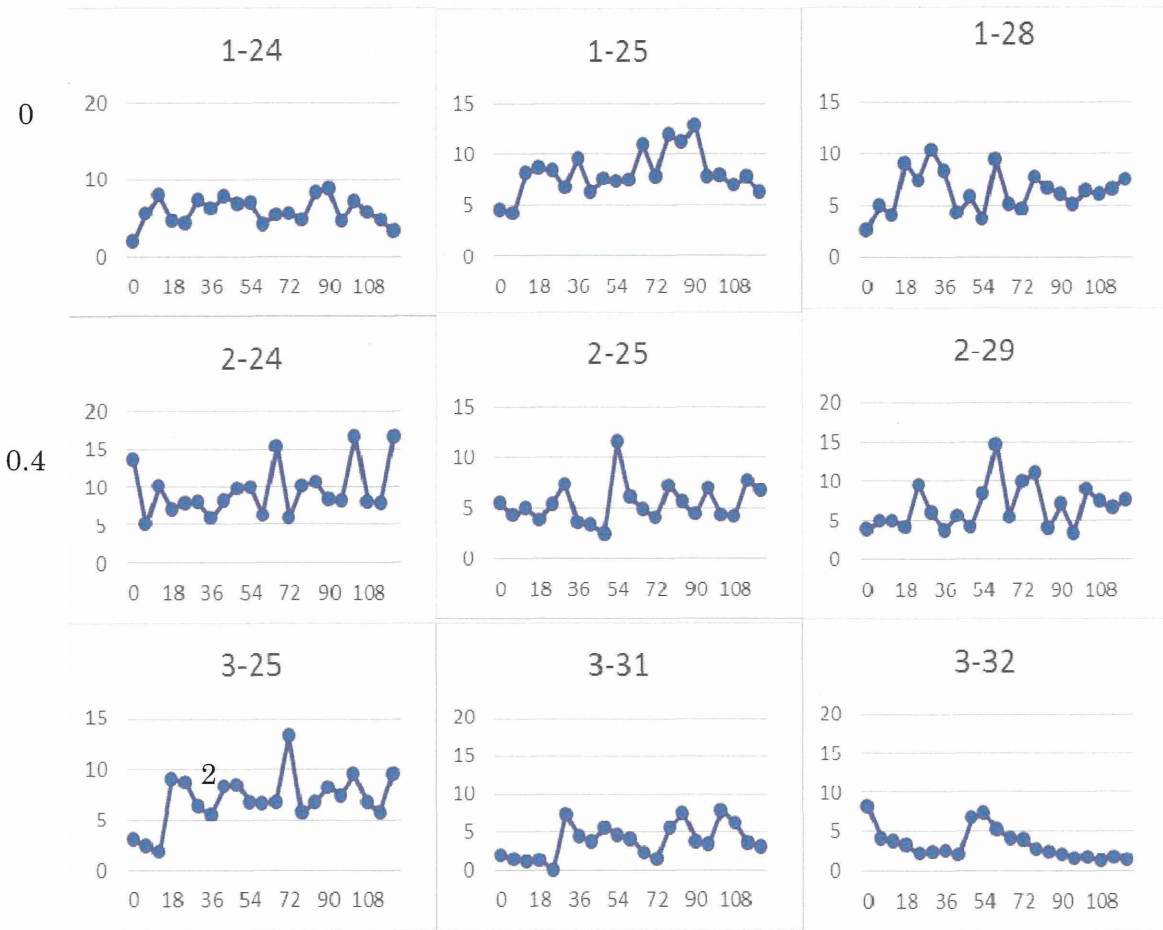


C. 成熟ラットの子宮



図9 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた雌ラットの14週齢におけるパルス状LH分泌 (実験2)

EE
($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

化学物質の臨界期曝露による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的变化が果たす役割と閾値に関する研究

分担研究課題： 遅発影響の発現機序検索。特に遅発影響をもたらす視床下部の制御部位の優位性に関する内分泌学の全般に関わるアプローチ
-エストロジェンの新生児期曝露による雌ラットの卵細胞制御遺伝子発現に対する影響-

研究分担者：渡辺 元 東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門教授

研究協力者：永岡 謙太郎 東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門助教

白田賢人 東京農工大学 獣医生理学教室

張浩林 東京農工大学 獣医生理学教室

研究要旨

本研究は、エストロジェン様作用をもつ化学物質の新生児期曝露により起こる遅発性影響の機序を解明することを目的として行った。モデル物質としてエチニル・エストロジェン (EE) を出生後 24 時間以内の雌ラットに単回皮下投与した。1 日齢から 21 日までの性成熟前の卵巣について、アポトーシスと細胞増殖に焦点を当て、形態学的解析と遺伝子解析を行った。その結果、新生児卵巣の卵細胞に存在する pro-apoptosis protein である Bid3 が卵巣の発達に重要である可能性が示唆された。その結果、新生児卵巣の pro-apoptosis protein である Bid3 を抑制し、その結果として形態学的に観察された多卵性卵胞が増加した可能性が考えられた。従って、EE の新生児期曝露は生後直後から卵巣のアポトーシスを誘発する可能性が示唆された。しかし今回の検索結果からは卵巣の細胞増殖に EE 新生児期曝露による影響は認められなかった。

A. 研究目的

約 20 年前の 2001 年に World Wildlife Federation (WWF) が内分泌攪乱物質 (EDCs) に関する最初の会合を開いた [1]。EDCs には合成あるいは天然の様々な化学物質が含まれ、その多くはエストロジェン作用を示す [1]。哺乳動物においてエストロジェンは胎子の発生過程において様々な器官の発達に影響を及ぼすことから、EDCs が胎子期あるいは新生児期の感受期に曝露されること

によって生殖に関与する内分泌及び神経系に障害が生じる [4]。

齧歯類では胎子期末期から新生児初期にかけて脳の性分化が起きることが知られている [5]。雄では精巣から分泌されるアンドロジェンが血液脳関門を通過し、神経細胞が発現する芳香化酵素によってエストラジオールへと変換される [6]。このエストラジオールが雄脳の正常な性分化には必要不可欠である。メスでは発育途上の卵巣からエストラジオールが分泌されるが、 α -fetoprotein と結合するため血液脳関門を

ほとんど通過できない[7]。α-fetoprotein と結合しない合成エストロゲン製剤は出生前後に曝露されれば雌の脳性分化に影響すると予想される。

また EE の新生児期曝露は卵巣にも影響を及ぼす可能性が平成 25 年まで研究結果より明らかとなった。そこで平成 26 年度は EE 新生児期曝露による発達期の卵巣への影響に焦点を絞り研究を行った。とくにアポトーシスと細胞増殖について解析した。

B. 研究方法

2.1 実験動物と飼育環境

Wistar-Imamichi ラットを 1 4 時間明 10 時間暗の明暗条件、温度 25 ± 2 °C、湿度 50 ± 10 % の条件で飼育した。餌(MR-Breeder, Nosan Corporation, Yokohama, Japan)および水は自由に摂取させた。

2.2 実験方法

新生児期エストロゲン様物質曝露によるラット卵巣への発達に対する影響とその機序

In vivo 実験として、生後 0 日齢の

Wistar-Imamichi ラットにエチニルエストラジオール (EE) 200 µg/kg を皮下投与し、生後 1, 3, 7, 14, 21 日齢(PND1,3,7,14, and 14)にて卵巣を採取し、アポトーシスと細胞増殖に焦点を当てた組織学的検索とマイクロアレイ解析を実施し卵巣における標的遺伝子について検索した。

マイクロアレイ解析の結果は RTPCR にて遺伝子の発現を確認した。

組織学的解析においては 3 切片作製し、卵胞数を測定した。卵細胞周囲の顆粒層細胞が扁平なのは原始卵胞、立方状である場合は一次卵胞と判断された。顆粒層細胞がない場合は前原始卵胞と判断した。

In vitro 実験として、生後 0 日齢の

Wistar-Imamichi ラットの卵巣を採取し、低・中・高用量のエチニルエストラジオール (EE) とともに培養し、翌日に卵巣について検索した。

実験計画を図 1,2 に示した。

(倫理面への配慮)

東京農工大学動物実験指針に基づき実験を行った。

C. 研究結果

アポトーシスに関連した検索

In vivo 実験のマイクロアレイ解析の結果、EE 投与により発現が増加していた遺伝子は、Calb3, Mmp7, Tnfip6, Imp1 等であり、減少していた遺伝子は、Sepp1, CA3, Bid3(Hrk), Fxyd7 であった(図 2)。このうち、Hrk はアポトーシスに関連する遺伝子である。

RTPCR の結果、EE 投与群では Bcl2 関連遺伝子として、Bid3 と Puma が 1 および 3 日齢において有意に低下していた。しかし 7 日齢ではいずれも対照群より高値を示した(図 3,4)。

組織学的に卵胞数については対照群と投与群での差は認められなかった(図 5)、Bid3 の免疫組織学的染色を実施したところ、1 日齢において EE 投与群では対照群より弱い発現であった(図 6)。1 日齢の EE 投与群では TUNEL 陽性細胞数が減少していた(図 7,8)。21 日齢の卵巣の組織学的検索において、EE 投与群では多卵性卵胞が有意に増加してきた(図 9)。

In vitro 実験の結果、前述の the in vivo 実験と同様、EE 投与により Puma and Bid3 の発現低下が認められた(図 10)。

細胞増殖に関連した卵巣の検索

1日齢から21日齢までの卵巣の細胞増殖について PCNA を指標に検索した(図 11)。

まず対照群では、1日齢では PCNA は原始卵胞の卵細胞のみに観察された。3日齢では PCNA は原始卵胞の卵細胞、一次卵胞の顆粒層細胞に観察された。7日齢では PCNA は、原始卵胞の卵細胞と顆粒層細胞、一次卵胞の卵細胞と顆粒層細胞、二次卵胞の卵細胞と顆粒層細胞に認められた。21日齢では PCNA は、原始卵胞の卵細胞と顆粒層細胞、一次卵胞の卵細胞と顆粒層細胞、二次卵胞の卵細胞と顆粒層細胞に認められた。前胞状卵胞と胞状卵胞の卵細胞、顆粒層細胞および莢膜細胞に観察された。

EE 投与群において PCNA の変化は投与による大きな差は認められなかった。現在、細胞増殖に関するマイクロアレイ解析中である。

D. 考察

アポトーシスに関連した解析結果より以下の2点が明らかになった。まず、新生児卵巣の卵細胞に存在する pro-apoptosis protein である Bid3 が卵巣の発達に重要である可能性が示唆された。また、EE はこの新生児卵巣の pro-apoptosis protein である Bid3 を抑制し、その結果、多卵性卵胞が増加した可能性が考えられた。

今後の予定として、EE 投与による HrK 経路のアポトーシスについて確認を行う。HrK の ShRNA を卵巣とともに incubate し、その形態とアポトーシスについて検索し、EE 投与との比較を行う。

細胞増殖に関連した検索より、EE の新生児期曝露は投与21日までの卵巣重量と細胞増殖に関しては影響しないと考えられた。

今後、以下の点について検索予定である(図 12,13)。

1. EE 新生児期曝露したラットの生後 1,3,7,14 および 21 日の性的 2 型核 SDN-POA の検索を行う。SDN-POA 部をニッスル染色と calbindin 染色を実施して検索する。また SDN-POA サイズの小型化に伴い増加が報告されている Nell2 と大型に伴い増加が報告されている Somatostatin の遺伝子解析を行う。また Nestin および SOX2 染色により神経幹細胞の変化についても検索する。
2. 性成熟前後の EE 投与による kisspeptin, GnRH、GnIH および GnRH の変化について検索する。

E. 結論

エチニル・エストロジェン (EE) を出生後 24 時間以内の雌ラットに単回皮下投与した。1日齢から21日までの性成熟前の卵巣について、アポトーシスと細胞増殖に焦点を当て、形態学的解析と遺伝子解析を行った。その結果、新生児卵巣の卵細胞に存在する pro-apoptosis protein である Bid3 が卵巣の発達に重要である可能性が示唆された。その結果、新生児卵巣の pro-apoptosis protein である Bid3 を抑制し、その結果として形態学的に観察された多卵性卵胞が増加した可能性が考えられた。しかし今回の検索結果からは卵巣の細胞増殖に EE 新生児期曝露による影響は認められなかった。

参考文献

1. Andrew K. Hotchkiss, Cynthia V. Rider, Chad R. Blystone, Vickie S. Wilson, Phillip C. Hartig, Gerald T. Ankley, Paul M. Foster, Clark L. Gray, and L. Earl Gray. Fifteen Years after "Wingspread"-Environmental Endocrine Disrupters and Human and Wildlife Health: Where We are Today and Where We Need to Go. *Toxicological Science* 2008; 105: 235-259.
2. Mohd Yusoff Nurulnadia, Jiro Koyama, Seiichi Uno, Asami Kito, Emiko Kokushi, Eugene Tan Bacolod, Kazuki Ito, Yasutaka Chuman. Accumulation of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in the polychaete *Paraprionospio* sp. From the Yodo River mouth, Osaka Bay, Japan. *Environ Monit Assess* 2013; DOI 10.1007/s10661-013-3466-y.
3. Michael E. Baker, Doris E. Vidal-Dorsch, Cataldo Ribecco, L. James Sprague, Mila Angert, Narimene Lekmine, et al. Molecular Analysis of Endocrine Disruption in Hornyhead Turbot at Wastewater Outfalls Southern California Using a Second Generation Multi-Species Microarray. *Genomic Analysis of Endocrine Disruption* 2013; Volume8: Issue9.
4. Ryo Ohta, Hideo Ohmukai, Hideki Marumo, Tomoko Shindo, Tomoko Nagata, Hiroshi Ono. Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low-dose diethylstilbestrol. *Reproductive Toxicology* 2012; 34: 323-330.
5. Janice M. Juraska, Cheryl L. Sisk, Lydia L. DonCarlos. Sexual differentiation of the

adolescent rodent brain: Hormonal influences and developmental mechanisms. *Hormones and Behavior* 2013; 64: 203-210.

6. Andrea C. Gore. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2008; 29: 358-374.
7. Christelle De Mees, Jean-Francois Laes, Julie Bakker, Johan Smits, Benoit Hennuy, Pascale Van Vooren et al. Alpha-Fetoprotein Controls Female Fertility and Prenatal Development of the Gonadotropin-Releasing Hormone Pathway through an Antiestrogenic Action. *Molecular and Cellular Biology* 2006; 2012-2018.

F. 研究発表

1. 論文

- 1) Samir H, Sasaki K, Ahmed E, Karen A, Nagaoka K, El Sayed M, Taya K, Watanabe G. Effect of a single injection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and human chorionic gonadotropin (hCG) on testicular blood flow measured by color doppler ultrasonography in male Shiba goats. *J Vet Med Sci.* 2015 Feb 10.
- 2) Nagaoka K, Zhang H, Arakuni M, Taya K, Watanabe G. Low expression of the antibacterial factor L-amino acid oxidase in bovine mammary gland. *Anim Sci J.* 2014 Dec;85(12):976-80. doi: 10.1111/asj.12237.
- 3) Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH-surge level in female rats. *J Vet Med Sci.* 2014 Aug;76(8):1105-10.
- 4) Nozawa K, Nagaoka K, Zhang H, Usuda K, Okazaki S, Taya K, Yoshida M, Watanabe G.

Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats. *Reprod Toxicol.* 2014 Jul;46:77-84

2. 学会発表

市村亮平、高橋美和、森川朋美、Pramod Dhakal、井上薫、前田潤、臼田賢人、吉田緑、渡辺元 Ethynyl estradiol 臨界期曝露による遅発影響に先行する視床下部キスペプチンニューロンの異常。

第 29 回下垂体研究会(2014 年 8 月)

- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
無し

Experiment design

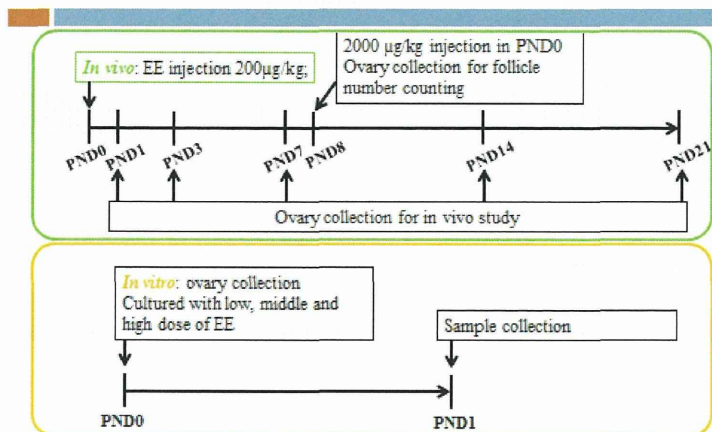


図 1 実験計画

Microarray

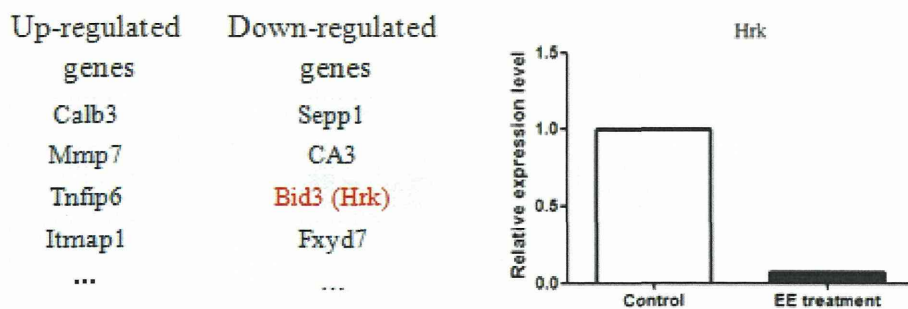


図 2 マイクロアレイの結果

Real time PCR-*in vivo*

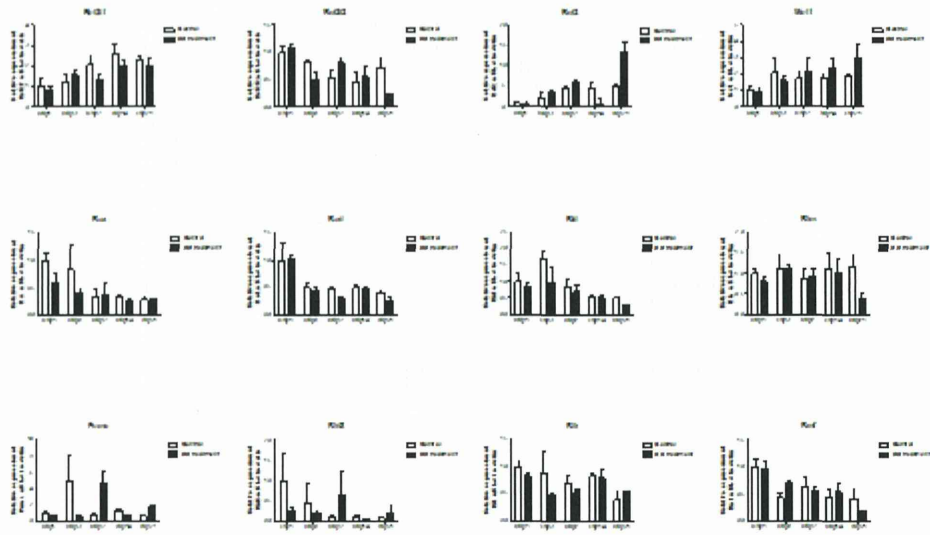


図 3 RTPCR 結果 1(アポトーシス関連)

Real time PCR-*in vivo*

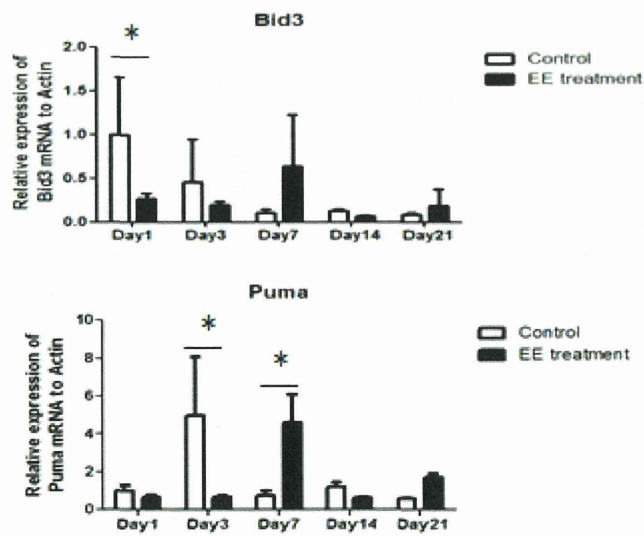


図 4 *in vivo* 実験における RTPCR 結果 2(アポトーシス関連)

Histology

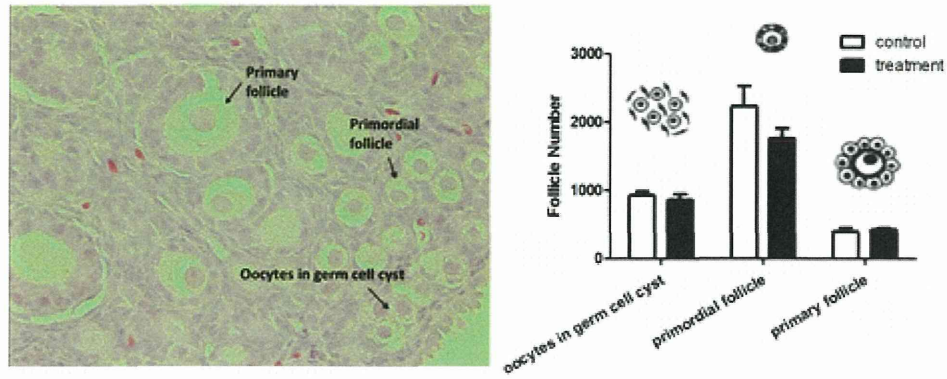
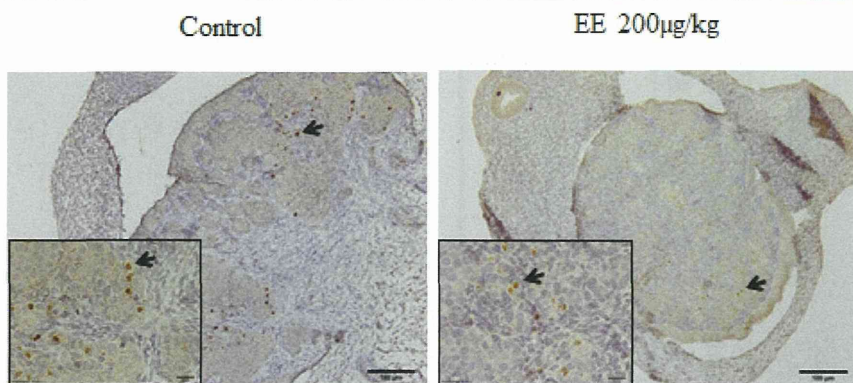


図 5 卵巣の組織像

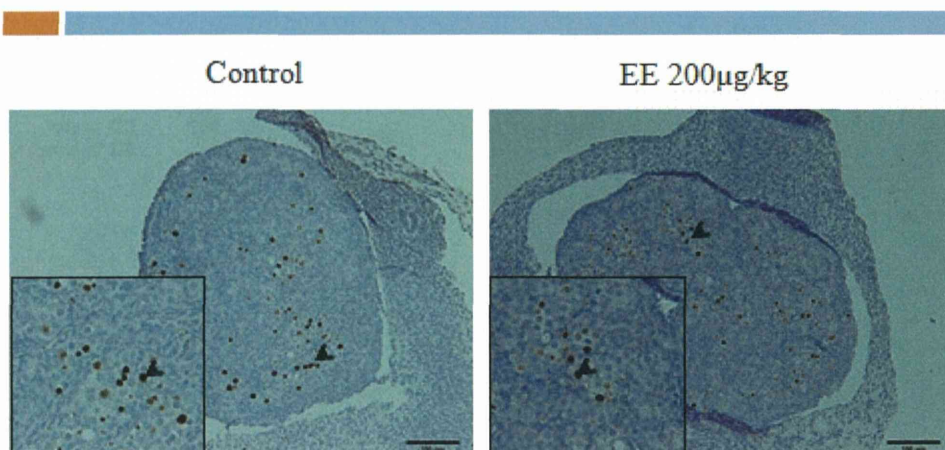
Immunohistochemistry-Hrk localization



Hrk localized in oocytes of PND1 ovary

図 6 in vivo 実験における卵巣の Hrk 免疫組織学的染色

TUNEL staining in Ovary of PND 1



Oocyte apoptosis is inhibited by EE treatment

図 7 in vivo 実験における卵巣像(TUNEL 染色)

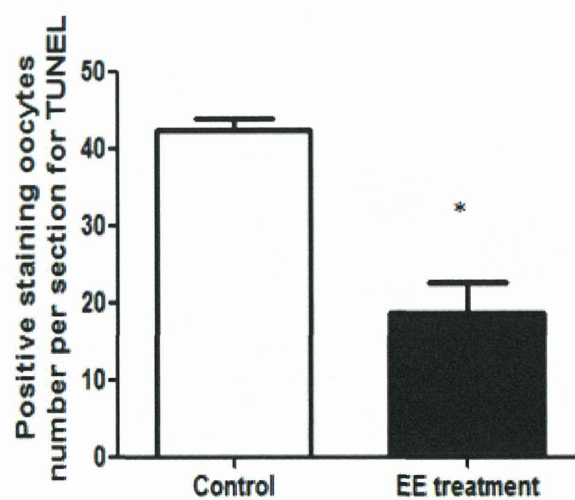
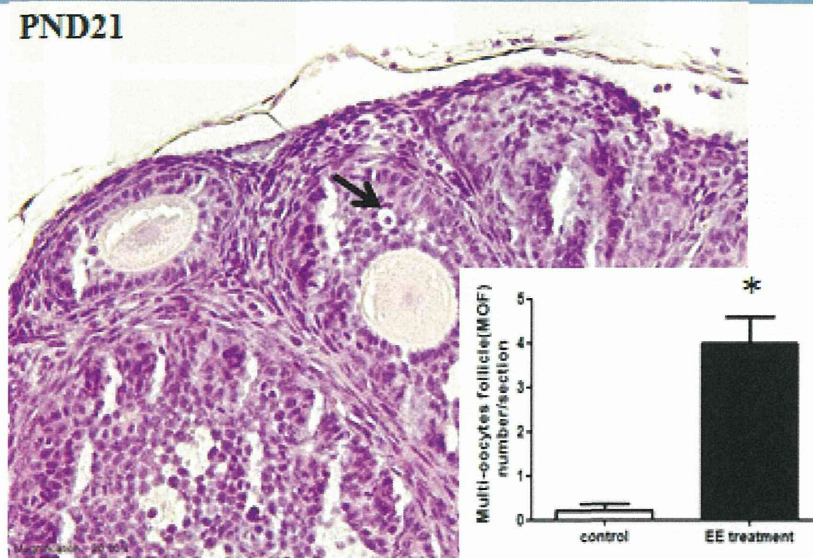


図 8 in vivo 実験における TUNEL 陽性細胞数

Histology—EE treatment ovary in PND21

PND21



Some oocytes are still existing in the ovary to form Multi-oocytes follicle

図9 卵巣の組織像と多卵胞細胞数

Real time PCR-*in vitro*

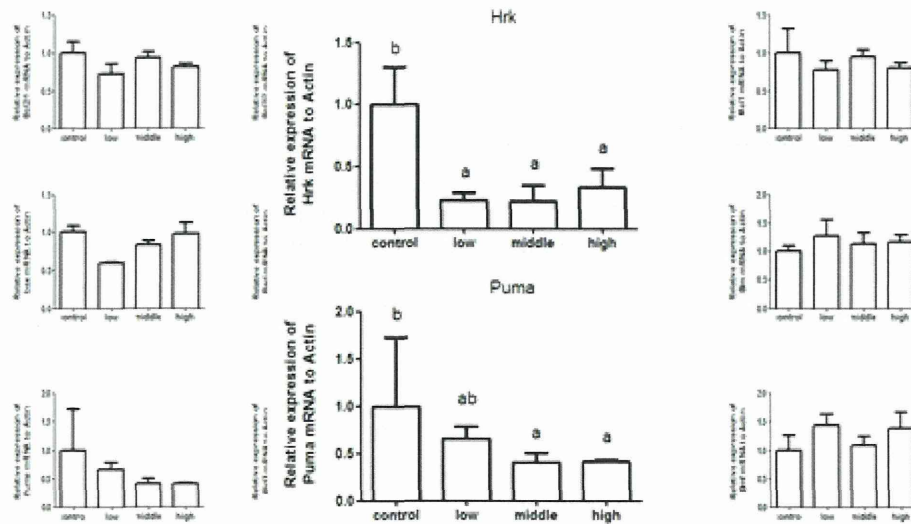
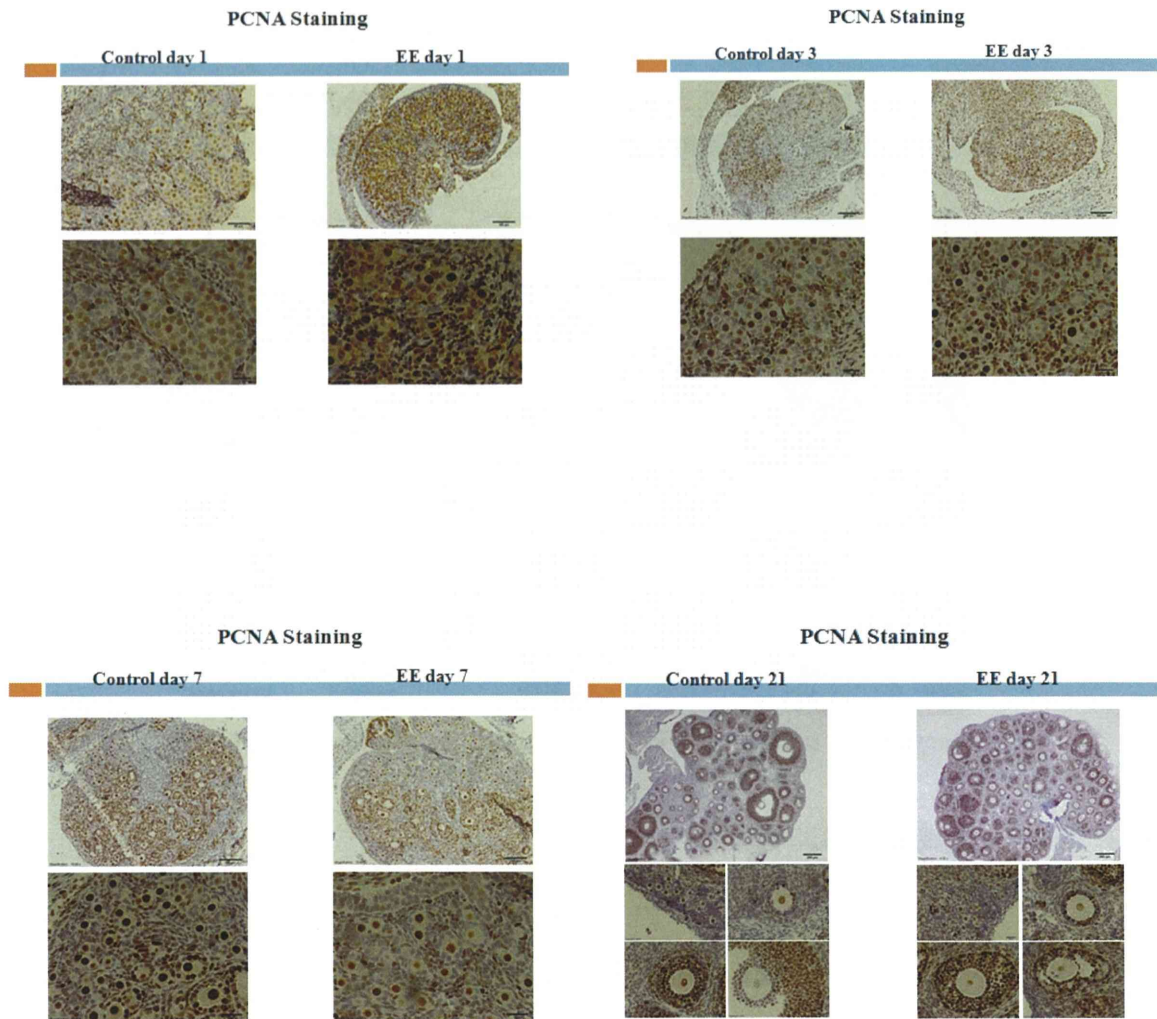


図10 *in vitro* 実験における RTPCR 結 1(細胞増殖関連)



PCNA localization

	Primordial follicle		Primary follicle		Secondary follicle			Preantral follicle			Antral follicle			Interstitial cell	
	GC	O	GC	O	GC	O	TC	GC	O	TC	GC	O	TC		
Day 1	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+
Day 3	-	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+
Day 7	-	+	+	+	+	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+
Day 21	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-

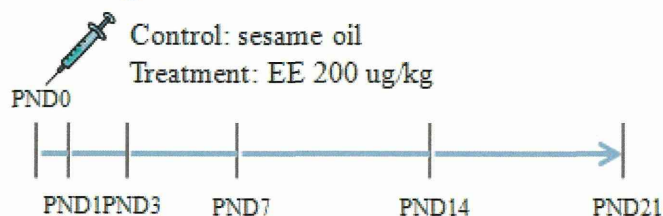
NA: No Available; +: Positive; -: Negative
GC: Granulosa cell; TC: Theca cell O: Oocytes

There is no too much difference of PCNA staining between control ovary and EE treatment ovary.

図 11 PCNA 染色結果とそのまとめ

The Influence of EE on Sexual Dimorphic Nuclei Development

Experiment design:



1. Morphology of SDN-POA area in control and treatment groups
(Nissl staining; Calbindin staining)

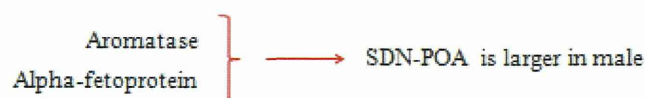
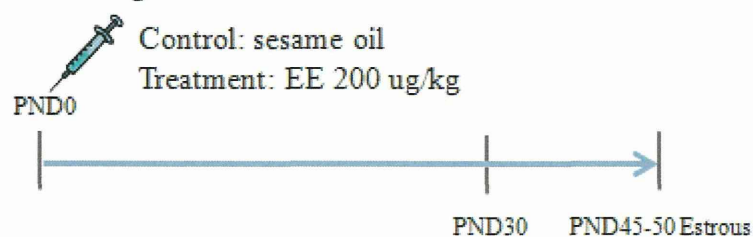


図 11 今後の予定 1.

The Influence of EE on Kisspeptin, GnRH and GnIH in Peripuberty

Experiment design:



1. The expression change of kisspeptin in AVPV and ARC area
The expression change of GnRH in POA area
The expression change of GnIH in DMH area
2. The epigenetic change of kisspeptin, GnRH and GnIH genes

図 12 今後の予定 2

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

「化学物質の臨界期曝露による生殖内分泌機能の遅発影響に
視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的変化が果たす役割と閾値
に関する研究」

分担研究課題：新生仔マウスへの Ethynylestradiol 投与が及ぼす発育期と性成熟後
（遅発性）の影響

- 新生仔期化学物質曝露が脳の GABA 関連物質の性差に及ぼす遅発型影響-

研究分担者： 横須賀誠

日本獣医生命科学大学

研究要旨

【目的】化学物質の新生児期曝露が脳に及ぼす晩発型（遅発型）リスクとその客観的評価基準の確立を目的に、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの Ethynylestradiol（以下 EE）皮下投与モデルを用いて、性成熟後の脳の性差および行動学的性差に及ぼす影響の評価を行っている。これまで、成熟個体の海馬歯状回における神経細胞や支持細胞の成体細胞新生の頻度に影響は確認出来ないこと、内側視束前野（POA）における Calbindin D-28k（以下 CB）陽性細胞の分布パターンに認められる雌雄差が不鮮明化する、などの新所見を得ることに成功している。今年度は、CB 雌雄差変異に及ぼす神経解剖学的基盤の検討に加え、脳の性分化の臨界期および性成熟期までの雌雄発育への EE 投与の影響、雄マウスが成熟雌マウスに対して示す高周波数帯発声（以下 USV）への影響評価を加えて、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの高濃度 EE 単回投与が及ぼす脳の性分化へのリスク評価指標の確立を試みた。さらに、生殖機能制御の中心システムである GnRH の活動コントローラーとされるキスペプチンニューロンへの影響を検討するため、近年キスペプチン分泌の重要な制御システムであることが示されている GABA-B 受容体への遅発型影響の検討も試みた。

【方法】生後 24 時間以内の雌雄マウス（C57BL/6J）に 20 μ g/kg（中濃度）および 2,000 μ g/kg（高濃度）の EE、対象群として EE の溶媒として使用したゴマ油を投与し、一般飼育環境下（室温 22 $^{\circ}$ C から 25 $^{\circ}$ C、湿度 40% から 60%）で飼育管理した。性成熟に達するまで、雌雄の体重の変化、雌については膣開口時期も観察した。生後 8 週齢以上に達した個体は、超音波の記録解析装置によって USV 発声の記録解析を行った。行動学的解析を終了した個体（生後 75-90 日）は、（1）免疫組織化学染色による解析を行うために経心臓法にて灌流固定を施して固定脳標本とした。内側視束前野（POA）を含む脳切片標本（厚さ 40 μ m の連続した冠状断切片）に対して Anti-Calbindin D-28k（CB）、GABA-B 受容体への特異的二次抗体を用いた免疫組織化学染色を施して POA における CB 陽性細胞および GABA-B 受容体タンパク質の分布パターンを評価した。また、（2）RT-PCR による CB および GABA-B 受容体の視床下

部における発現量を定量して比較するために、成熟マウスを断頭によって安楽死させて、PCR 解析用脳標本の採取を行った。

【結果】 生後 24 時間以内マウスへの EE 単回暴露は発育途上においても次のような影響を及ぼすことが明らかとなった。1) 対照群と比べて雌マウスの膣開口時期を早めた。それは投与濃度が高いほど早期になった。2) 生後 2 週間から 3 週間の間でのみ、EE 投与において一時的な体重増加の停滞時期があることが明らかとなった。しかし、この体重増加の停滞は離乳期前後には解消され、成熟期における EE 投与の影響は認められなかった。すなわち、生後 24 時間以内マウスへの EE 単回暴露が及ぼす体重変化への影響は授乳期における一過性の現象であることが示された。3) 発情雌認知に対する USV 発声は、雄では対照群では 90%以上の確立で雌への USV 発声認められるのに対し、EE 高濃度 (2,000 μ g) 群および中濃度群 (20 μ g) では USV 発声が認められない個体が多数認められた。一方の雌においては、対照群および EE 中濃度群では 10%以下の確率でしか USV 発声が認められないのに対し、EE 高濃度群では 50% の確率で USV 発声が認められた。4) POA における CB 陽性細胞の分布パターンを詳細に観察したところ、EE 投与により認められる雌の CB 陽性細胞数の増加は POA における CB 陽性細胞数の増加を反映したものであり、脳の構造的 (組織的) な雌雄差の発現を誘導した結果では無いことがほぼ明らかとなった。5) 免疫組織化学染色および RT-PCR による GABA-B 受容体タンパク質および遺伝子の発現数への影響については、本報告書作成までに有意な解析を終えることが出来なかった。

【考察】 本年度におけるマウス新生仔期 (脳の性分化の臨界期) における高濃度 EE の単回暴露によるリスクは次のような評価となった。(1) 雌の膣開口時期を早める。(2) 雌雄に関係なく授乳期における一時的な発育遅延を誘導する。晩発性のリスク評価として、(3) 雄の USV 発声を抑制する一方、雌の USV 発声を促進している。(4) POA における CB 陽性細胞の雌雄差への影響は、脳の形態学的な変化を誘導した結果ではなく、成熟脳における CB を発現する細胞の増減を晩発性に変えた結果であることがほぼ判明した。(5) キスペプチンの動態に関与する GABA-B への影響についての評価は 26 年度に持ち越しである。

EE の新生仔期暴露は、全体的には一時的な発育遅延を及ぼしながらも、生殖器に関してはむしろ発育促進に作用していることが示唆される。このことが、脳の機能的な雌雄差に影響を及ぼし、成熟後の雌雄コミュニケーションにも影響を誘導していることが明らかとなった。脳の生殖機能の発達には発育期の GABA が関与している報告がある。新生仔期の EE が一時的発育遅延と GABA システムへの影響を介して、脳の性分化やキスペプチンシステムの性差にリスクを及ぼしている可能性を確認する必要がある。

A. 研究目的

本研究は、経口避妊薬として現在も使用されている Ethynylestradiol (EE) の性

機能調節機構の成立に及ぼす晩発型 (遅発型) リスクの評価基準を確立することを目的としている。ヒトにおいて遺伝的に低ゴ

ナドトロピン性性腺低形成症を示す患者で、Kisspeptin の受容体である GPR54 遺伝子の変異が認められ、これまで脳の性機能調節機構の頂点とされてきた性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) をさらに分泌制御する物質として Kisspeptin の存在が注目されている。これまで視床下部の GnRH ニューロンの神経制御には GABA による調節が重要と考えられてきたが、Kisspeptin の産生ならびに分泌制御にも GABA 系の作用が重要であることが報告されてきている。GABA は成体の中樞神経系における抑制性神経伝達物質で、GABA 受容体にはイオンチャネル型の GABA-A 受容体と代謝型の GABA-B 受容体がある。これまで GnRH ニューロンの制御には GABA-A 受容体を介した作用が重要であるとされてきた。しかし最近、GABA-B1 型受容体のノックアウトマウスにおいて内側視索前野 (MPOA) と分界状床核 (BST) における Kisspeptin をコードする *Kiss1* 遺伝子の発現に異常が誘導されることを示す報告が出された (Di Giorgio et al., 2014)。このことは、脳の性分化決定の臨界期における化学物質曝露が及ぼす晩発性リスクを正しく評価するためには、GABA-A 受容体ばかりでなく GABA-B1 受容体への影響も評価する必要性があることを示している。

これまで我々は、生後 24 時間以内の新生仔マウスへの単回高濃度 EE 投与 (2000 μ g/kg、皮下投与) モデルにおいて内側視索前野 (MPOA) に認められるカルビンジン (CB) 陽性細胞分布の性的二型に明らかかな影響が及ぶことを報告してきた。免疫組織化学による CB 陽性細胞の解析は、

GABA ニューロンのマーカーとしても利用されている。したがって、我々がこれまで明らかにしてきた脳の性分化決定の臨界期における高濃度 EE 曝露が及ぼす MPOA における CB 陽性細胞への影響は、GABA 神経系への影響を含んでいる可能性が高くなってきている。

そこで今年度は、生後 24 時間以内の新生仔マウスへの単回 EE 投与モデルを引き続き用いて、(1)MPOA における CB 免疫陽性細胞の性差へ影響の実体を組織学的に確定して、(2)RT-PCR 解析によってこの CB の性差への影響を遺伝子レベルでの確認を行い、さらに(3)MPOA と BST を含む視床下部領域における GABA-B 受容体遺伝子の発現への影響を RT-PCR で解析することを試みた。

B. 研究方法

生後 24 時間以内の新生仔雌雄マウス (C57BL/6J: 日本クレアより妊娠動物を購入して日本獣医生命科学大学の実験動物施設にて出生) にゴマ油 (関東科学 NO. 37036-02) に溶かした EE (0.02 μ g/kg、20 μ g/kg および 2,000 μ g/kg。全て投与量が 10 μ l/g BW になるように調整) を 10 μ l マイクロシリンジ (HAMILTON) を用いて皮下投与した。対象群として溶媒に用いたゴマ油 10 μ l/g BW を投与した。免疫組織化学による組織学的解析は、雌雄ゴマ油投与群 (対照群)、雌雄 20 μ g/kg 投与群 (EE20 群)、雌雄 2,000 μ g/kg 投与群 (EE2K 群) の計 6 群間で比較した。一方、RT-PCR による CB および GABA-B 受容体 mRNA の解析には、さらに雌雄 0.2 μ g/kg 投与群 (EE0.2 群) を加えた計 8 群間で比較した。

全ての動物は一般の飼育環境下で飼育、生後 21 日目に離乳させ、その後は雌雄別ケージで飼育した。1 ケージの匹数は 4 ~ 5 匹とした。全ての動物は、出生当日 (1 日齢:PD1)、PD4、PD 7 に体重測定を行い、以降は 7 日間隔で 9 週齢 (PD63) まで測定した。加えて雌は PD10 から外部生殖器を観察し、同一ケージの全ての雌動物が膣開口する日まで連日観察した。

PD63-PD70 の間に、(1) 免疫組織化学用として、0.1M リン酸緩衝液 (pH. 7.2) で調整した 4%パラフォルムアルデヒドを用いて経心臓法で灌流固定し脳標本を得た。また、(2) RT-PCR 用として、断頭による安楽死で脳を摘出し、視床下部領域のみを測定サンプルとして分離して、RNA later (Quiagen) に浸漬して、mRNA 抽出処理まで-80°Cで保存した。

免疫組織化学：脳標本は、内側視索前野 (MPOA) を含む領域 (The mouse brain, 3rd edition, Academic Press; Figure 26-38) について、凍結ミクロトーム (Yamato) を用いて厚さ 40 μ m の連続前頭断切片を作成した。各個体とも作製した連続切片に対して 1 枚置きに Anti-Calbindin D-28k (Rabbit; Swant CB-28a, 2,000 倍希釈) による免疫組織化学染色 (二次抗体として Alexa 488; Molecular Probes-invitrogen を使用) と 0.5% クレシル紫 (MERCK 1.0693.0100) によるニッスル染色を施した。標本の観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM810) および光学顕微鏡 (Zeiss Axiovision) にて行った (図 3 参照)。

RT-PCR：脳標本からの RNA 抽出には、RNA 抽出キット RNeasy Lipid Tissue Mini Kit

(QIAGEN) を用いた。滅菌破砕用チューブ (ザルスタット) に脳標本と 1mL の QIAzol Lysis Reagent を入れてホモジェナイズした。その後は Mini Kit のプロトコールに則り RNA 抽出を行った。ゲノム DNA 除去と逆転写反応は QuantiTect Reverse Transcription (QIAGEN) を用いて行った。解析は mouse の Calbindin (CB)、mouse の GABA-B receptor1 および GABA-B receptor2 の 3 遺伝子について行った。定量用の内部標準遺伝子としては mouse の β -actin 遺伝子を用いた。QuantiTect Primer Assay (QIAGEN) を用いて、CB (Mm. Calb1.1 SG Cat. No. QT000159943)、GABA-B-R1 (Mm Gabbr1_va_2_SG Cat. No. QT. 01544109)、GABA-B-R2 (Mm Gabbr2_2_SG Cat. No. QT. 01945912)、 β -actin (Mm Actb_2_ SG Cat. No. QT01136772) をプライマーとした。PCR 試薬は QuanticTec SYBR GreenPCR Kits (QIAGEN) を用いた。解析は ABI7500 (サーモフィッシャー サイエンティフィック社) で行った。内部標準遺伝子 (β -actin) を含む 4 遺伝子を測定してデータ解析を行った。測定は 1 サンプルにつき 3 反復で行った。サイクル数は 45 で行った。

倫理面への配慮：使用動物への EE 投与、体重測定、膣開口確認、安楽死作業に関しては最低限の保定時間になるように心がけた。灌流固定を施す際には、ソムノペンチール (50mg/kg BW) の腹腔内投与による深麻酔を施して痛覚が無くなったことを確認した後に行った。本実験は「日本獣医生命科学大学実験動物委員会」の審査の承認を受けて実施された (承認番号 12-94)

C. 研究結果

1) EE 投与による成長への影響

雌雄とも、体重増加を指標とした出生当日 EE 投与による発育への顕著な影響は認められなかった

2) 雌の膣開口への影響

出生当日 EE 投与は、明瞭に膣開口の時期を早める効果が認められた。しかも、その影響には濃度依存性が認められた。特に EE2000 群で顕著に認められ、早い個体では PD18 日で膣開口が観察され、離乳時にはすでに半数の雌が膣開口状態にあった (図 1)。

3) 内側視束前野 (MPOA) における Calbindon 免疫陽性細胞の分布の雌雄差への影響

マウスの MPOA における Calbindon D-28k (以下 CB) 免疫陽性細胞の分布は、雄では MPOA の中心領域に CB 免疫陽性細胞の大きな塊が観察される一方、雌の同領域ではこのような CB 陽性細胞の集合は観察できないという雌雄差が認められる。これを基本形として、新生仔期 EE 投与による成熟後の雌雄マウス MPOA における CB 免疫陽性細胞の分布パターンの変化を調べた。なお、今回、この CB 陽性細胞の塊はすべて神経細胞によって構成されていることが判明した (図 2)。

出生当日における EE 単回皮下投与によって、雄では MPOA における CB 陽性細胞の大きな塊ピークが EE 投与の濃度依存的に後方にシフトすることが判明した。一方、雌では EE 投与によって本来は CB 陽性細胞

の塊が観察されない MPOA の後方に“雄型”の CB 陽性細胞の塊が新たに発現することが判明した (図 4 から図 7)

4) 成熟後の視床下部領域の CB および GABA-B 受容体遺伝子発現量への影響

出生当日マウスへの EE 単回暴露は、特に雌の CB 遺伝子の発現量に影響を与えることが明らかとなった。0.2µg/kg、20µg/kg、2,000µg/kg の投与群で比較したところ、特に雌において濃度依存的に CB の mRNA の発現量が増加することが明らかとなった。しかし、雄ではこのような上昇は認められず、統計学的には有意な変化は認められなかったが、むしろ濃度依存的に低下する印象を与える結果であった (図 8)。

GABA-B 受容体に関しては、1 型ならびに 2 型において、EE による遅発型の影響は、雌雄共に認められなかった。

E. 結論

これまでに我々は、新生仔マウス EE 曝露は極めて短い時間で脳内への移動と濃度上昇を誘導し、この短時間の脳内 EE 曝露は成熟後の脳において海馬の神経新生に影響は及ぼさない一方、MPOA における CB 含有細胞の分布には明らかな影響を及ぼすことを示してきた。しかし、この MPOA における CB 細胞分布の変化が性機能調節神経系への EE の影響とどのような関係を持っているのかについては直接的な考察をすることが出来なかった。

近年、GnRH ニューロンの神経制御のみならず、GnRH ニューロン分泌制御に関わる Kisspeptin の産生ならびに分泌制御にも GABA の作用が重要であることが報告さ