

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：

**化学物質の臨界期曝露による視床下部キスペプチンの変化と遅発影響の閾値の関連性**

研究分担者：吉田 緑	所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部
研究協力者：市村亮平	所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部
研究協力者：森川朋美	所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部

**研究要旨**

新生児期臨界期曝露による遅発影響の視床下部部位特異的な変化を観察するため、新生児期に遅発影響量エチニルエストラジオール（EE）曝露雌ラットでは、遅発影響の長期指標である性周期異常に先行して視床下部前方に存在する性周期制御中枢 AVPV を検索したところ、kiss1 mRNA 発現低下とキスペプチンニューロン数の低下と続く LH サージの低下が認められ、また AVPV キスペプチンニューロンのエストロゲン(ER) $\alpha$  受容体数も減少した。これらの AVPV の kiss1 mRNA 発現低下や LH サージ低下は閉経相当時期の雌ラットに加齢性変化に類似していた。しかし同様の検索を卵胞発育中枢(視床下部後方)である ARC について行ったが、kiss1 mRNA 発現およびキスペプチンニューロン数に変化は認められなかった。

また遅発影響と閾値とくに遅発影響の感受性時期の閾値について視床下部 AVPV と ARC のキスペプチンの変化と、性周期観察を指標に検索したところ、遅発影響は性周期を指標に生後 10 日まで持続し、生後 14 日曝露では観察されないと考えられた。

次年度は、遅発影響と受容体との関連性についての検討を開始し、selective estrogen receptor modulator(SERM)新生児期曝露による遅発影響の可能性とその機序について解析を行う予定である。

**A . 研究目的**

化学物質臨界期曝による遅発影響は成熟後に至って生殖機能障害が顕在化し、その機序も不明なため化学物質リスク評価上の重大な懸念である。キスペプチンニューロンは近年発見された神経ペプチドであるが、エストロゲン受容体(ER) を有すること、エストロゲンポジティブフィードバック機構により性周期制御中枢である視床下部前方に位置する前腹側室周囲核(APVA)およびネガティブフィードバック機構による卵胞発育制御中枢である弓状核(ARC)に存在す

るといふ部位特異的分布から、このキスペプチンニューロンがこれらの制御機能の中心的役割を果たしていることが解明されつつある。遅発影響についても視床下部の変化が有意であると推測され、平成 22 年から 24 年に実施した本研究課題関連研究において、高橋らは、遅発影響誘発量のエストロゲン新生児期曝露によるキスペチン低下を見出したが、部位特異性については特定できなかった。そこで本研究は、遅発影響による部位特異性の明確化は、遅発影響の機序解明と指標の科学的根拠に極めて重要で

あるという認識のもと、遅発影響の部位特異的变化に焦点を絞って研究を行っている。また化学物質のリスク評価上、遅発影響と閾値(投与量および投与時期)の存在の明確化も重要である。

本研究の目的は主として以下の2点である。

1. 雌において化学物質の臨界期曝露による遅発影響が視床下部キスペプチンニューロンのいずれの制御部位に依存するのか部位特異性を明らし、遅発影響中枢なのか化学物質の生殖機能の遅発影響の核となる機序を解明する。

2. 遅発影響の閾値とくに検査時期による閾値を明らかにし化学物質リスク評価に資することを旨とする。

## B. 研究方法

### 1. 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響がLHサージおよび視床下部キスペプチンニューロンに及ぼす海峽の解析(図1)

雌 Donryu ラットに合成エストロゲンであり本研究の共通検索物質であるエチニルエストラジオール(EE)を生後1日齢に遅発影響発現量の0.2(EE0.2)、20  $\mu$ g/kgbw (EE20)、遅発影響非発現量 EE0.02  $\mu$ g/kgbw(EE0.02)を単回皮下投与した。またこれらの遅発影響による変化とヒトの閉経期に相当する性周期が維持する middle aged rat (Middle(N))と、性周期がすでに回帰せず持続発情を示す雌ラット(Middle (PE))と比較した。これらのラットは単回投与後、膣開口の制背墊をチェックし、その後は実験期間を通じて性周期を持続的に観察した。対照群を含む各群の一部の動物については、正常性周期を回帰する young adult(10週齢)において卵巣を摘出後、エチニルベンゾエート(EB)3日間皮下投与、プロゲステロン1回皮下投与により人工的 LHサージを誘発し、血中 LH および FSH 値をラジオイムノアッセイ法にて測定した。またこの LHサージ前後の視床下部キスペプチンの変化を検索するため午前11時から午後7時まで経

時的に AVPV を含む視床下部前方と、ARC を含む視床下部後方における kiss1mRNA 遺伝子および関連遺伝子の変化を RTPCR 法により解析し、さらに AVPV および ARC における kiss1 遺伝子発現細胞数を in situ hybridization 法(ISH)にて、kiss1 遺伝子と ER、c-fos 遺伝子共発現数を ISH と免疫組織化学的手法を用いて測定した。Middle age 群については、22週齢の動物を用いて同様の測定を実施した。EE 曝露した残りの動物については22週齢まで性周期観察を行い、生殖器系について病理組織学的検査を実施した。

### 2. 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索(図2)

遅発影響を誘発するエストロゲン曝露に対して、生後どの時期まで感受期を有するか検討するため、生後1日以内(PND0)、5日齢(PND5)、10日齢(PND10)および14日齢(PND14)を雌 Wistar Hannover ラットに EE20  $\mu$ g/kg bw 単回皮下投与し、正常性周期を回帰する young adult(10週齢)を用いて視床下部前方と後方のキスペプチンニューロンの変動と LHサージを上述の実験1と同じ方法で検討した。また残りの動物について持続的に40週齢まで性周期を観察し、生殖器系増加は病理組織学的解析を実施した。

### (倫理面への配慮)

本研究における実験動物の使用は、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成17年法律第68号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号)厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日厚生労働省通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成19年6月1日日本学会会議)、遺伝子

組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律(平成 15 年法律第 97 号)、特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律(平成 16 年法律第 78 号)及び感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(平成 10 年法律第 114 号)等の主旨に則り、作成され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定および分担研究者が各々所属する機関に設定された動物委員会の規定等に基づき実施されたものであり、関連法令などを遵守して行われた。

## C. 結果

### 1. 新生児期エストロゲン曝露による選発影響が LH サージおよび視床下部キスペプチンニューロンに及ぼす海峡の解析

#### 1) LH サージ

LH サージ日(排卵前日の発情前期に相当)の 1:00 から 19:00 までの LH サージ変動および LH 値のピークである 16:00 における血中 LH 比較を図 3 にしめた。

対照群では LH サージが 16:00 をピークに認められた。EE0.2 以上の群ではサージのピークが用量依存性の低下が認められ、EE20 群では有意であった。EE0.02 群では対照群と同様であった。Middle (N)では EE20 群より低下しており、Middle (PE)ではサージピークは認められなかった。

#### 2) 視床下部 AVPV および ARC における Kiss1 遺伝子発現および関連遺伝子発現の部位特異性

前述の LH 測定と同時期に視床下部の AVPV および ARC について解析したところ、AVPV の Kiss1mRNA は対照群において、LH サージ日の 11 時から増加し、16:00 でピークを示した。このような増加は卵巣摘出動物では認められなかった。このような Kiss1mRNA 発現増加は 14:00 およびピーク時の 16:00 とともに EE20 群で低下し、この結果は Middle (N)群と同様であった(図

4)。しかし ARC においてこのような Kiss1mRNA の変化は認められなかった(図 5)。KiSS1 関連遺伝子である KiSSIR、ER $\alpha$  および c-fos の RTPCR による遺伝子発現について AVPV および ARC とともに変化は認められなかった。

ISH 法による解析結果を図 6~8 に示す。ISH により AVPV における KiSS1mRNA 陽性細胞(同遺伝子を発現するキスペプチンニューロン)の数が、EE20 および Middle(N)群で有意に低下し、さらに ER $\alpha$  との二重染色の結果では、Kiss1mRNA 陽性細胞における ER $\alpha$  陽性細胞数が EE20 および Middle(N)群で有意に減少した。c-fos 陽性細胞については Middle (PE)群のみで KiSS1mRNA 陽性細胞における発現率増加が観察された。ARC において変化は認められなかった。

### 2. 新生児期エストロゲン曝露による選発影響の感受期の検索

本実験において体重には投与時期による変化は認められなかった。性周期観察(図 9)では、PND0 の EE 曝露群では 17 週齢以降対照群に比し有意な早期異常性周期が認められ、この結果は今までの同系統ラットの成績と同様であった。PND5 および PND10 の EE 曝露群では PND0 より遅れ、19 週齢から 20 週齢でほぼ同時に有意な早期異常性周期を示した。PND14 の EE 曝露群では 25 週齢から 34 週齢まで対照群より異常性周期を示す動物が多い傾向が観察されたが、有意差はなく、実験を終了した 40 週齢における異常性周期発現率は対照群と同様であった。性周期異常に先立ち Young adult である 10 週齢で実施した人工的 LH サージ誘発および視床下部 KiSS1 遺伝子解析結果では、LH サージのピークである 16:00 における LH レベルは PND0, 5, 10 いずれにおいても有意に低下していた。PND14 群では変化は認められなかった(図 10)。AVPV の KiSS1mRNA も同様 PND0, 5, 10 の EE 曝露群では発現が低下しており、PND0 から PND10 にかけてその低下は緩やかとなった。PND14 では変化は認めら

れなかった。ARC では KiSS1 の変化は認められなかった(図 11)。しかし、AVPV において KiSS1 関連遺伝子(GnRH1, KiSS1R, ER )の発現変化は認められなかった(図 12)。ISH 法による解析も、RTPCR の結果と同様、KiSS1mRNA を示す細胞数の用量依存性の低下が認められた(図 13)。

また本実験では膣開口に投与時期による変化が認められた(図 14)。開口時期が、PND10,14 の EE 群で早期化し、開口時の体重を比較しても低値であった。膣開口翌日から数日以内の生殖器系臓器を病理組織学的に検索したところ、PND10,14 日齢の卵巢発育はその他の群と同様であり、黄体形成はなかった。また膣上皮や間質における形態学的異常および ER 陽性細胞数にも差は認められなかった。

#### D . 考察

##### 1. 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響が LH サージおよび視床下部キスペプチンニューロンに及ぼす海峡の解析

**血中 LH サージの結果より、遅発影響発現量**  
新生児期曝露雌ラットでは、性周期異常に先駆けて、遅発影響発現量では性周期を制御する LH サージの低下が認められた。

**2. 視床下部 AVPV および ARC における Kiss1 遺伝子発現および関連遺伝子発現の部位特異性の解析結果より、遅発影響発現量**  
新生児期曝露雌ラットでは、性周期異常に先駆けて AVPV における KISS1mRNA の発現低下が認められたが、ARC では KiSS1 発現の変化は認められなかった。ISH 解析の結果より、RTPCR では脳に捉えられなかったが、遅発影響発現量曝露群ではキスペプチンニューロンにおける ER 発現率が低下しており、AVPV では KiSS1mRNA だけでなく、ER の発現にも変化があることが示された。RTPCR 結果との差については、脳内には多くの ER が存在するため、AVPV における変化を見いだせなかったと推察される。

これらの結果から得られた遅発影響のメカ

ニズム予想図を図 9 に示す。

##### 2. 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索の解析結果より、PND0、

5、10 の EE 曝露群では異常性周期の早期発現が認められ、PND5,10 は PND0 より遅れて異常性周期を示した。PND0,5,10 群ではピーク時(16:00)における LH サージ低下が認められた。また AVPV における kiss1mRNA 発現および陽性細胞数の低下も同様に PAND0, 5,10 群で認められたが、曝露時期が遅くなるにつれ、低下は緩やかとなる用量依存性の変化を示した。今回の実験の結果より遅発影響の曝露時期の閾値は生後 10 日までは明らかに続いているが、徐々に感受性が弱くなっていくと考えられた。生後 14 日曝露では明らかな影響は今回の指標からは認められなかったが性周期異常の早期化傾向も示唆され、上述のように臨界期が徐々に減衰すると考えられることから、遅発影響の臨界時期は 14 日に近いところまで存在する可能性もある。

PND10,14 の EE 群で観察された膣開口早期化については、排卵していなかったことから、卵巢内の E2 レベル増加の結果ではなく原因は不明であるが、これらの時期の EE 曝露により膣上皮の ER の感受性が変化した可能性も管がられた。今後の検討が必要である。

平成 27 年度の計画として、組織特異的なエストロゲン活性を有する化合物(Selective estrogen receptor modulators)を用いて新生児期曝露により遅発影響が発現するか検討する予定である。

#### E . 結論

今までの研究結果および本年度実施した新生児期エストロゲン曝露による遅発影響が LH サージおよび視床下部キスペプチンニューロンに及ぼす海峡の解析これらの結果から、遅発影響のメカニズム予想図を **図 15** に示す。遅発影響では、LH サージ発現時にキスペプチン発現の機能的変化(低下が主)が生じており、遅発影響の重要な標的は視

床下部前方に位置する AVPV であると考えられた。またキスペプチンの変化は、遅発影響検出の早期指標となる可能性が示された。

EE 曝露時期による閾値については、視床下部 AVPV と ARC のキスペプチンの変化と、性周期観察を指標に検索したところ、遅発影響は性周期を指標に生後 10 日まで持続し、生後 14 日曝露では観察されないと考えられた(図 16)。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

1. Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M. Inhibitory Potential of Postnatal Treatment with Cyclopamine, a Hedgehog Signaling Inhibitor, on Medulloblastoma Development in Ptch1 Heterozygous Mice. *Toxicol Pathol.* 2014. 42(8):1174-87
2. Dixon D, Alison R, Bach U, Colman K, Foley GL, Harleman JH, Haworth R, Herbert R, Heuser A, Long G, Mirsky M, Regan K, Van Esch E, Westwood FR, Vidal J, Yoshida M. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. *J Toxicol Pathol.* 2014; 27(3-4 Suppl):1S-107S.
3. Kamata S, Yamamoto J, Kamijo K, Ochiai T, Morita T, Yoshitomi Y, Hagiya Y, Kubota M, Ohkubo R, Kawaguchi M, Himi T, Kasahara T, and Ishii I: Dietary deprivation of each essential amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014;58(6):1309-21.

4. Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Maeda J, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M. Prior attenuation of KiSS1/GPR54 signaling in the anteroventral periventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol in female rats. *Reproductive Toxicol.* 2015. Online first

( 投稿中 )

1. Taketa Y, Inoue K, Takahashi T, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Midori Yoshida. Inhibitory Effects of Sulpiride but not Ethylene Glycol Monomethyl Ether on Endometrial Carcinogenicity in Donryu Rats. *Journal of Applied Toxicology.* Minor revised
2. Yoshida M, Suzuki S, Tahahashi M, Ichimura R, Inoue K, Taya K, Watanabe G. Predominant role of the hypothalamus, not the ovary in different types of abnormal cycle induction by postnatal exposure to high dose p-tert-octylphenol in rats. *Reproductive Toxicology.* Minor revised.

### 2. 学会発表

1. 市村亮平 ,高橋美和 ,森川朋美 ,Pramod Dhakal ,井上 薫 ,前田 潤 ,吉田 緑 ,渡辺 元 : EE の臨界期曝露による遅発影響が LH サージおよび kiss1 mRNA 発現に及ぼす影響 . 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会 ( 2014.1 )
2. Yoshida M, Ichimura R, Inoue K, Watanabe G\*, Takahashi M : Disruption in the hypothalamus neonatally exposed to p-tert octylphenol is essential for induction of early occurrence of persistent estrus, a

feature of delayed effect in rats. 53rd  
Annual Meeting of the Society of  
Toxicology ( 2014.3 )

3. 市村亮平 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 41 回  
日本毒性学会学術年会 (2014.7)
4. 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, 井上  
薫, 臼田賢人, 渡辺 元、吉田 緑：  
Ethynylestradiol の新生時期曝露による  
遅発影響の感受性期の検索 .第 31 回日  
本毒性病理学会総会および学術集会  
( 2015.1 )
5. Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T,  
Inoue K, Maeda J, Usuda K, Yokosuka M,  
Watanabe G, Yoshida M. Prior attenuation  
of KiSS1/GPR54 signaling in the  
anteroventral periventricular nucleus is a  
trigger for the delayed effect induced by  
neonatal exposure to  
17alpha-ethynylestradiol in rats. (54th  
Annual Meeting of the Society of  
Toxicology ( 2015.3 )

**G . 知的財産権の出願・登録状況**  
なし

## Materials & methods

### 試験デザイン

キスペプチンニューロンが**遅発影響のターゲット**になっている可能性を検証し、**早期指標**としての可能性を検討する

動物：Donryuラット（♀）

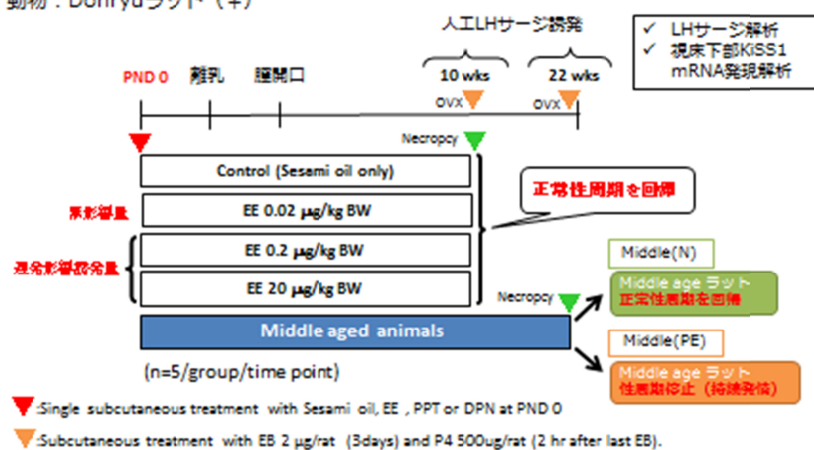


図 1 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響がLHサージおよび視床下部キスペプチンニューロンに及ぼす海峡の解析の実験デザイン

## Materials & methods

**PURPOSE:** Duration of sexual window open – susceptible period to single neonatal exposure to estrogens to induce delayed effects in rats  
**ANIMAL SPECIES:** rat      **STRAIN:** Wistar Hannover      **SEX:** female      **AGE OF START:** Postnatal day 0-14 (Offspring)  
**No. of ANIMALS:** 40 rats      **DURATION OF EXP:** 5.5 months (24weeks)

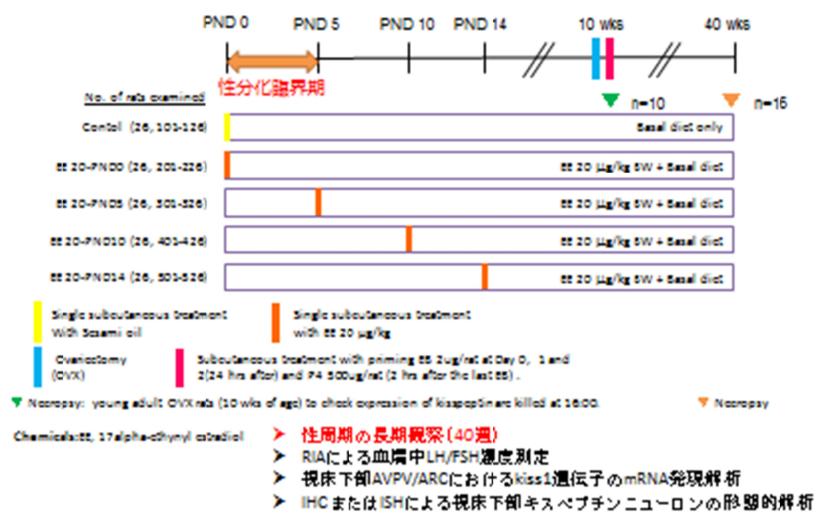


図 2 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索の実験デザイン



## Results(LHサージ)

性周期異常に先駆けて、性周期を制御するLHサージの低下が認められた

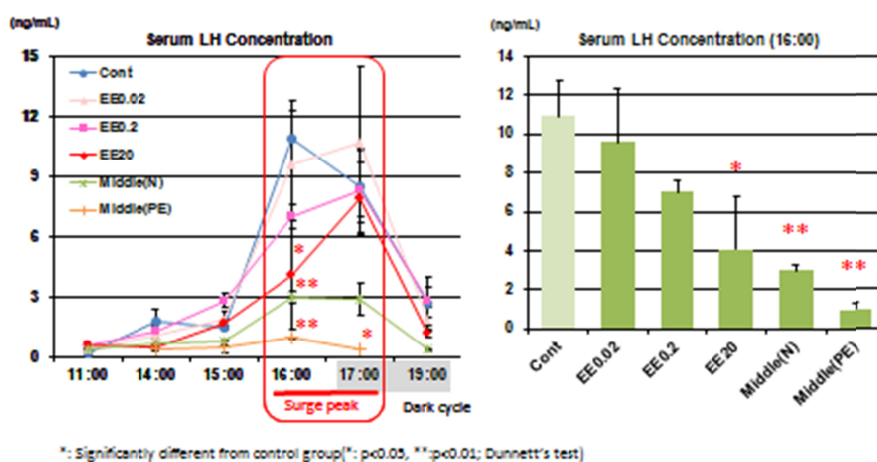


図3 LHサージの結果

## Results(Kiss1 mRNA発現/AVPV)

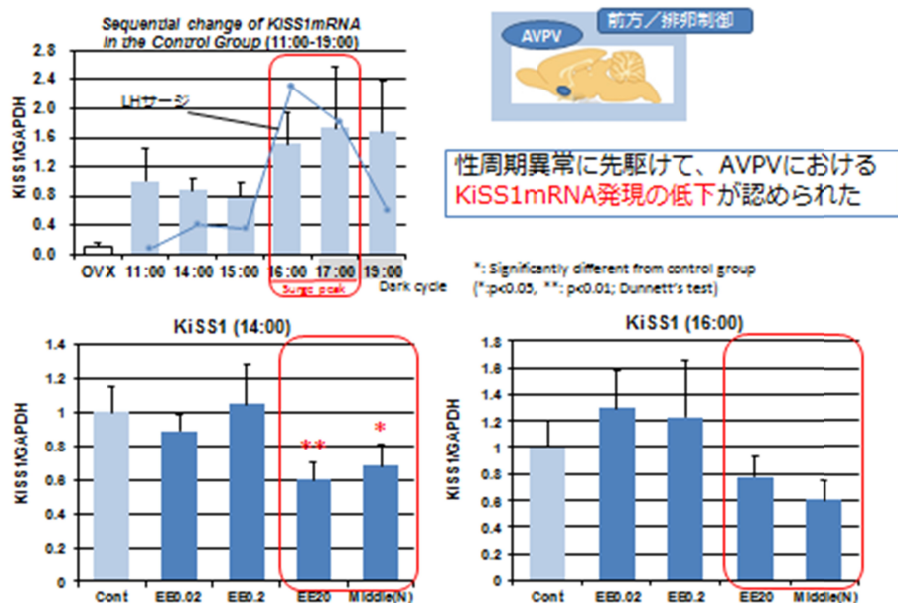


図4 視床下部AVPVにおけるKiss1遺伝子発現(RTPCR)

## Results(Kiss1 mRNA発現/ARC)

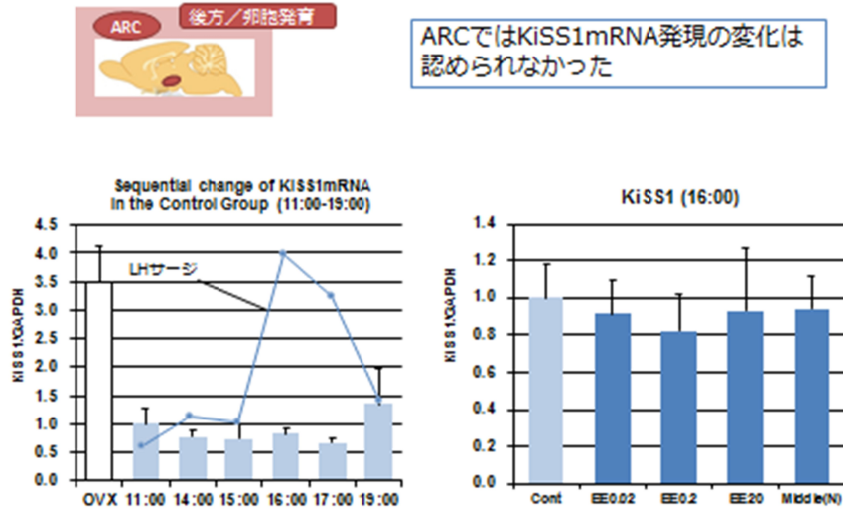


図5 視床下部 ARC における Kiss1 遺伝子発現

## Results(Kiss1 in situ hybridization/AVPV)

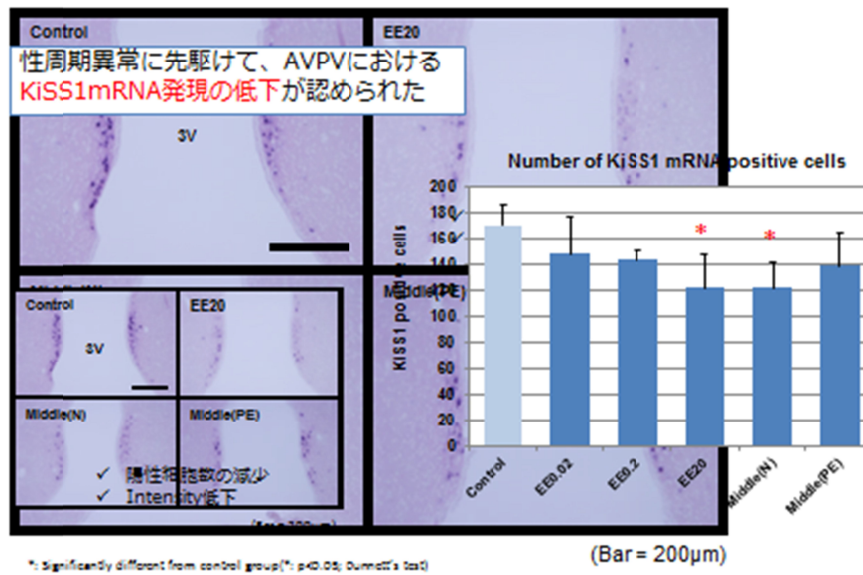


図6視床下部AVPVにおけるKiss1陽性細胞数の変化

### Results(KiSS1/ER $\alpha$ 二重染色)

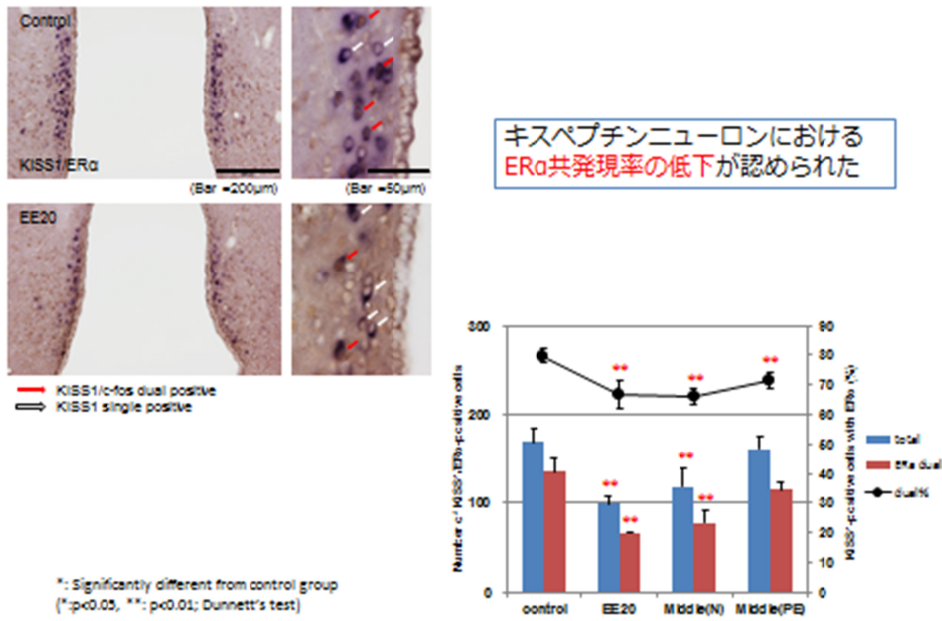


図7 視床下部 AVPV における Kiss1 陽性細胞数と ER の共発現率

### Results(KiSS1/c-fos二重染色)

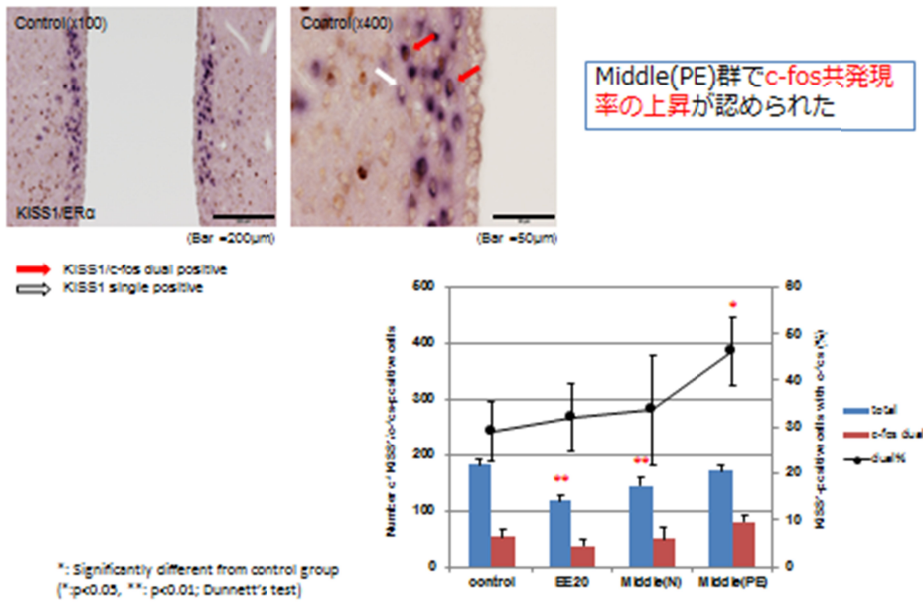


図8 視床下部 AVPV における Kiss1 遺伝子発現と c-fos 陽性細胞の共発現率

## Results (性周期)

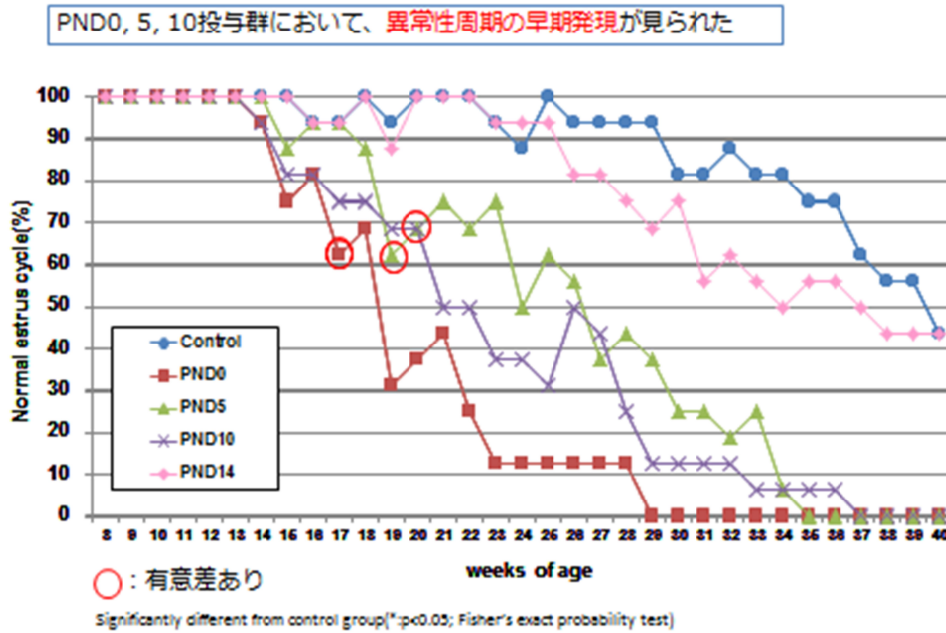


図9 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索における性周期観察

## Results (LH/FSH濃度)

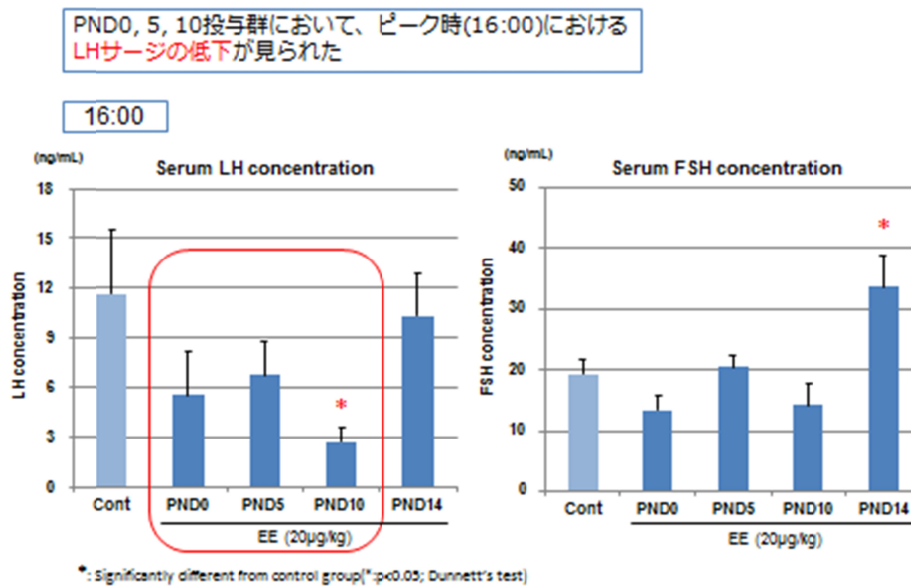


図10 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索におけるLHサージ

## Results (KiSS1 mRNA発現/AVPV, ARC)

PND0, 5, 10投与群において、AVPVにおける  
KiSS1 mRNA発現の低下が見られた

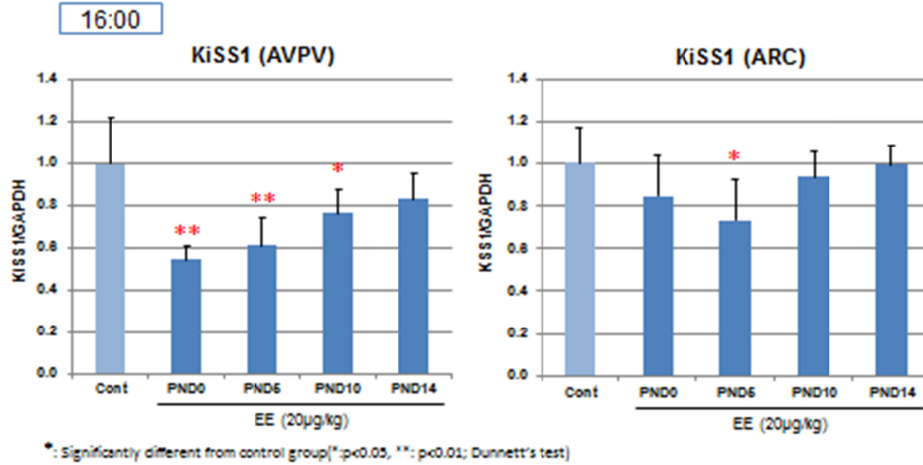


図11 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索におけるAVPVのKiSS1 mRNA 発現

## Results (KiSS1関連遺伝子発現/AVPV)

KiSS1関連遺伝子の発現  
変動は認められなかった

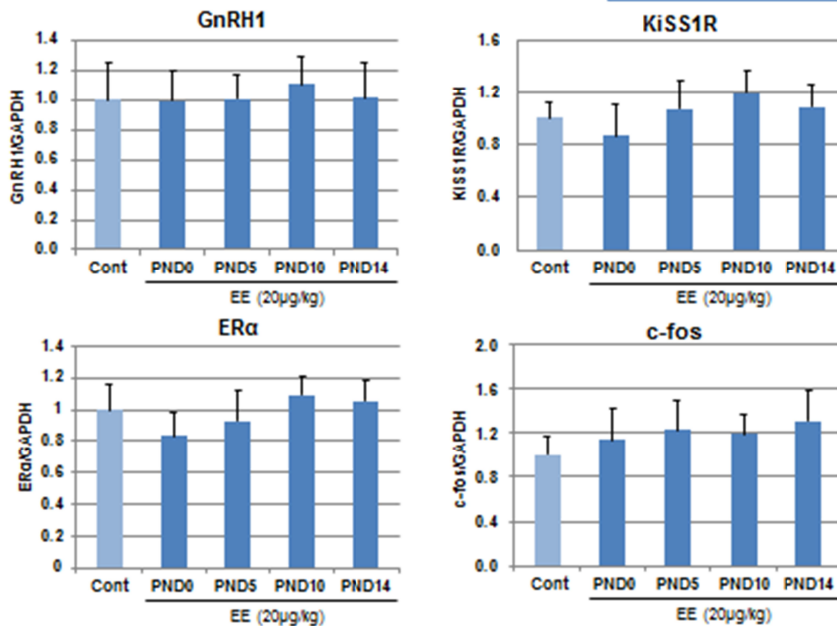


図12 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索におけるAVPVのKiSS1関連遺伝子 mRNA 発現



## Results (KiSS1 in situ hybridization/AVPV)

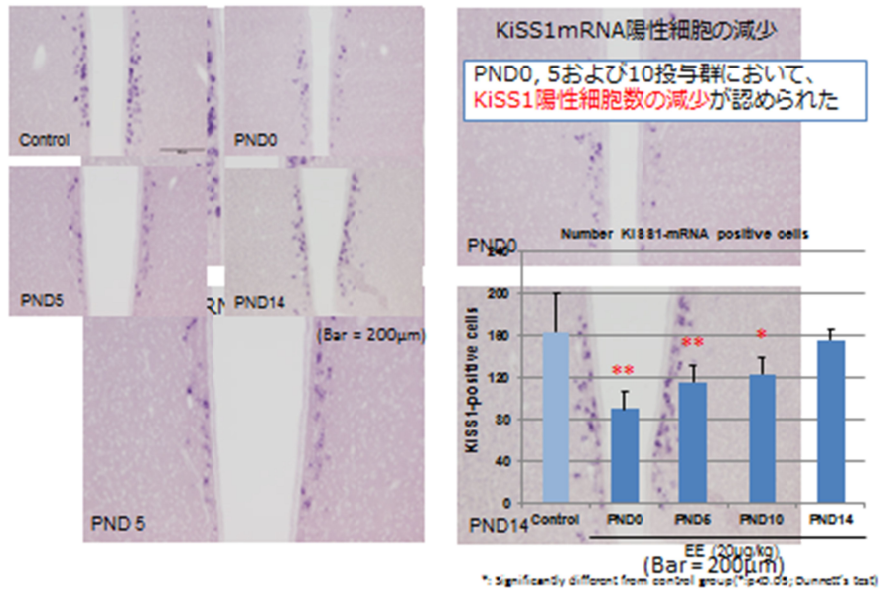


図13 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索におけるAVPVのKiSS1陽性細胞数の変化

## Results (膣開口)

Group	Mean day and BW of vaginal opening				
	Control	PND0	PND5	PND10	PND14
relative day	29.3	30.4	28.2	24.5**	24.7**
SD	2.2	2.1	1.6	1.3	1.1
BW	79.2	83.6	74.8*	58.2**	57.1**
SD	9.2	9.7	13.5	6.2	4.1

PND10, 14投与群において  
膣開口の早期化が認められた

\*: Significantly different from control group; \*p<0.05, \*\*p<0.01; Dunnett's test

➢ 卵巣発育は同日齢の正常  
個体と変化なし

➢ 排卵は起きておらず、  
黄体の形成も認められない

➢ 膣上皮・間質におけるERα  
発現に差なし  
→ERαの感受性の変化?

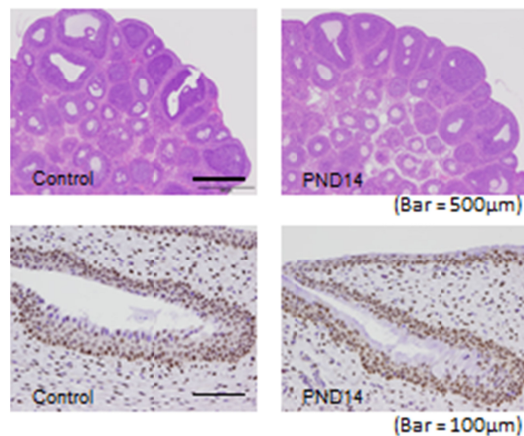


図14 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索における膣開口の変化

Discussion (想定される遅発影響の発現のメカニズム)

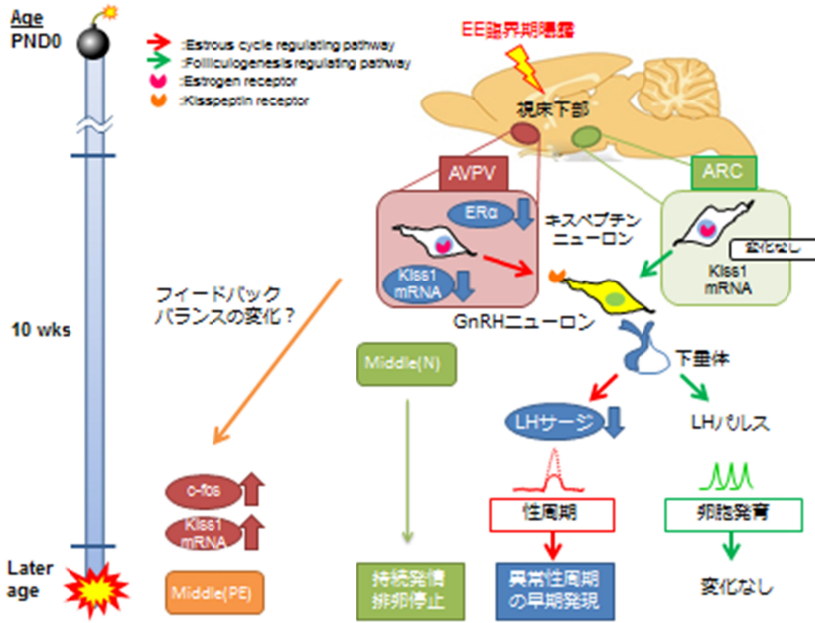


図15 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響がメカニズム予想図

Discussion (遅発影響の感受期)

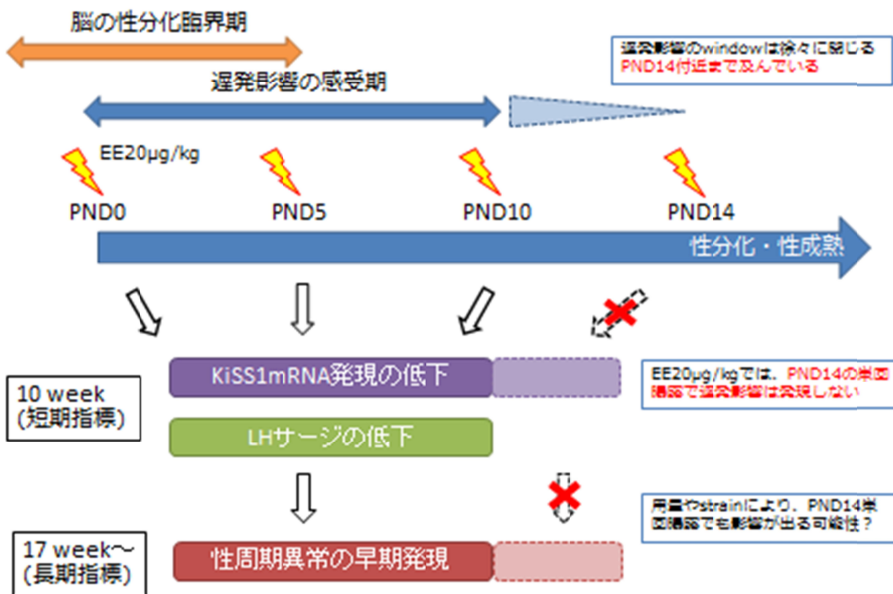


図16 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期のまとめ



