

**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、エストロゲ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・エストロゲン (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ゲン作用を示す [1]。哺乳動物においてエストロゲ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期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ゲ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、 $\alpha$ -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  $25 \pm 2$ 、湿度  $50 \pm 10\%$  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)  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$  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, Tnfrsf6, 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・エストロゲン (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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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

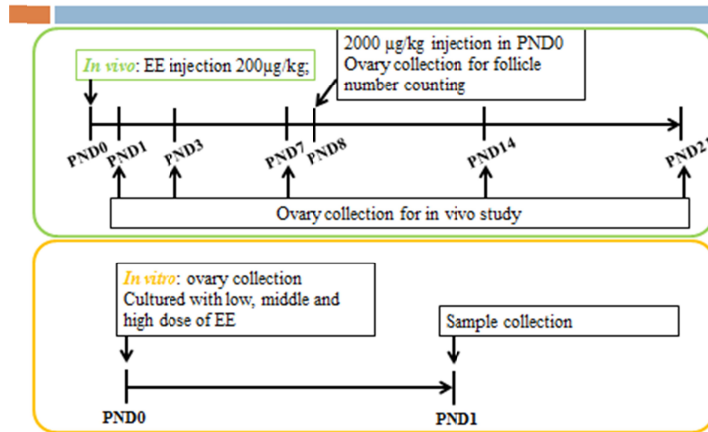


図 1 実験計画

## Microarray

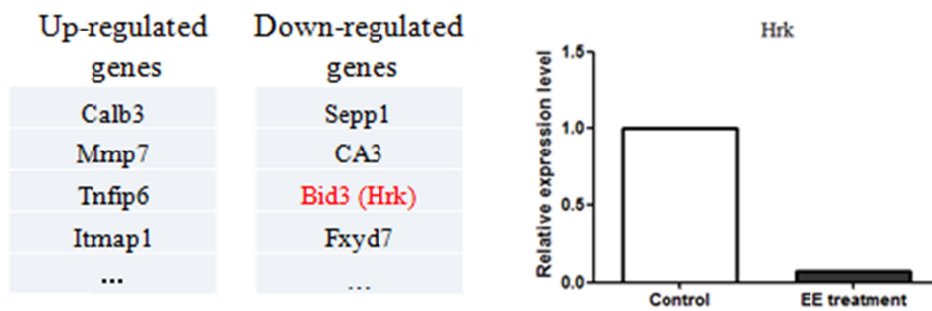


図 2 マイクロアレイの結果



### Real time PCR-*in vivo*

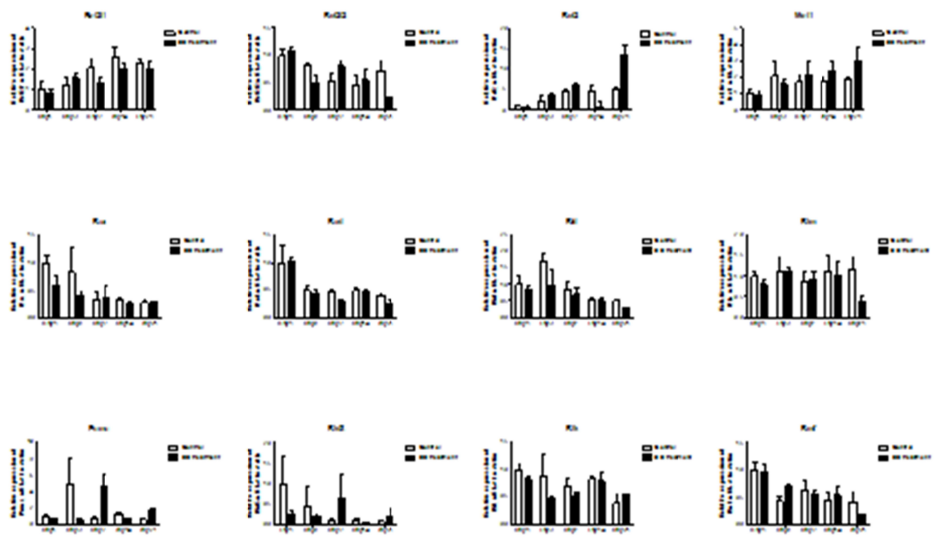


図 3  
RTPCR 結果 1(アポトーシス関連)

### Real time PCR-*in vivo*

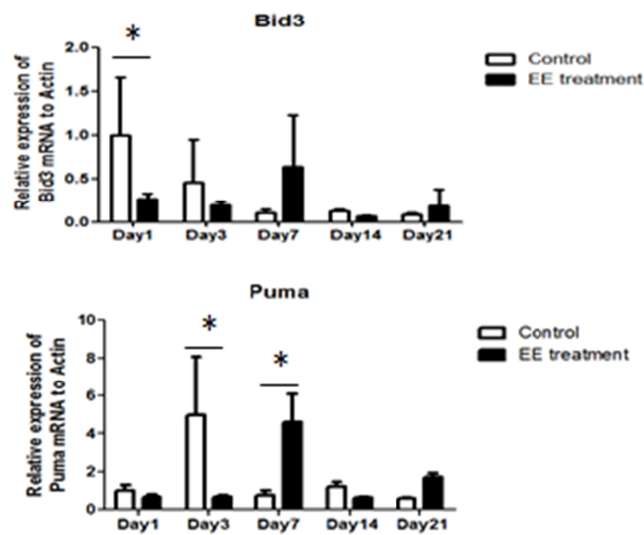


図 4 *in vivo* 実験における RTPCR 結果 2(アポトーシス関連)

## Histology

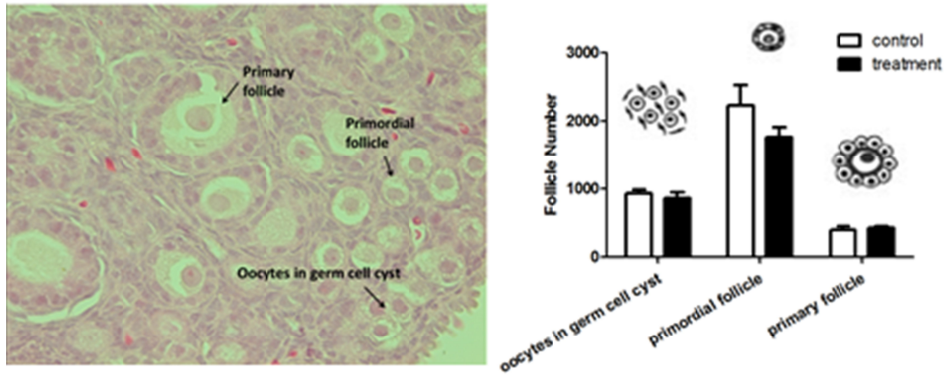
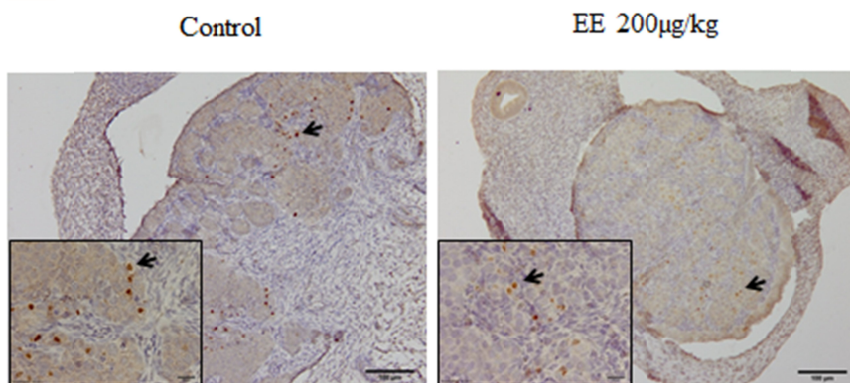


図 5 卵巣の組織像

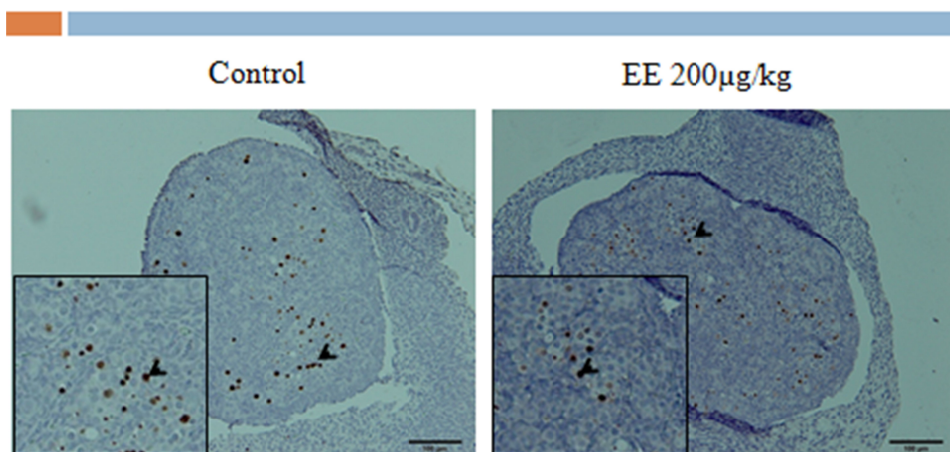
## Immunohistochemistry-Hrk localization



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)

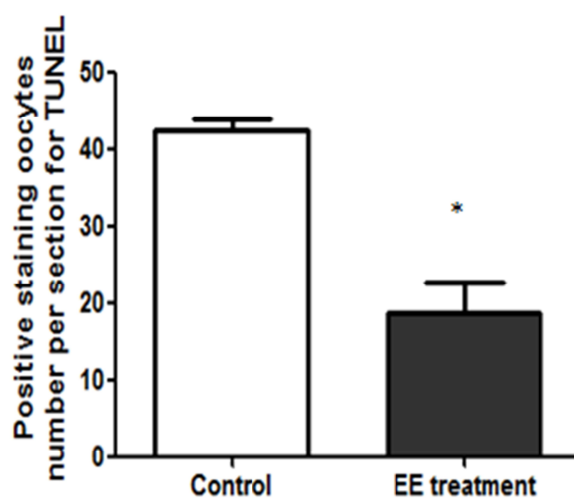
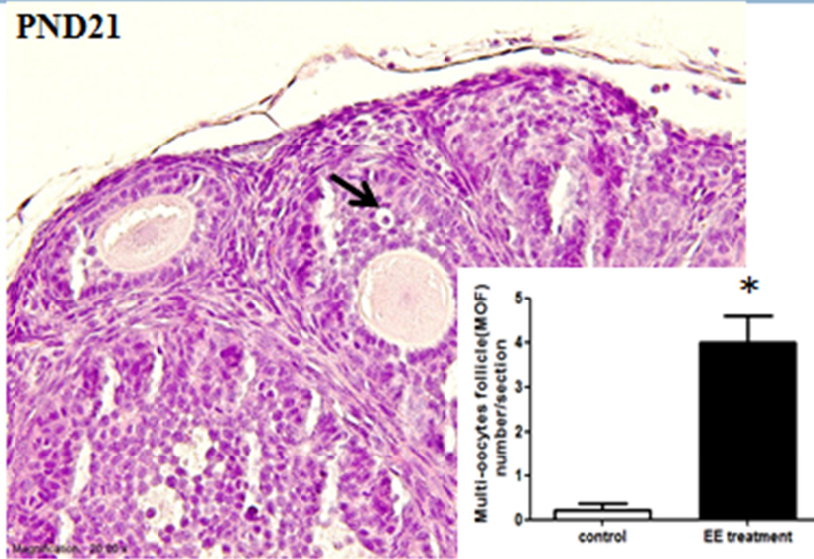


図 8 in vivo 実験における TUNEL 陽性細胞数

## Histology—EE treatment ovary in PND21



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

図 9 卵巣の組織像と多卵胞細胞数

## Real time PCR-*in vitro*

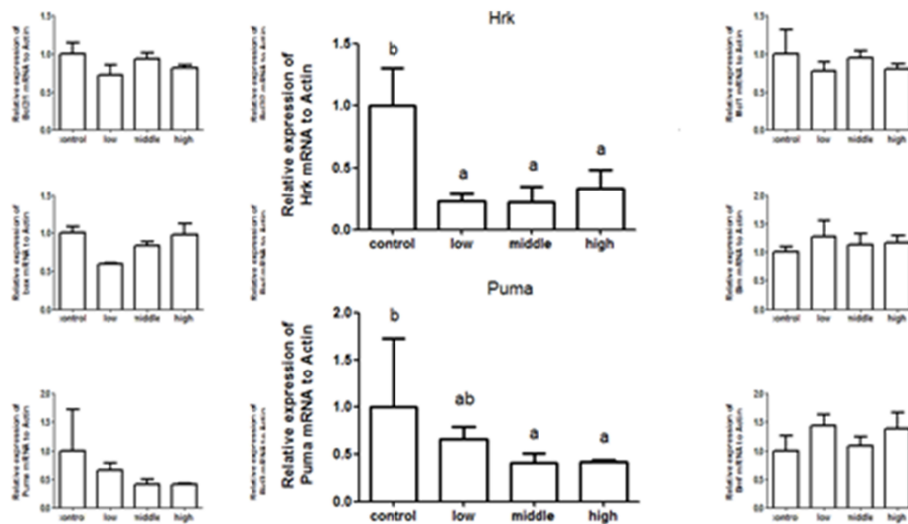
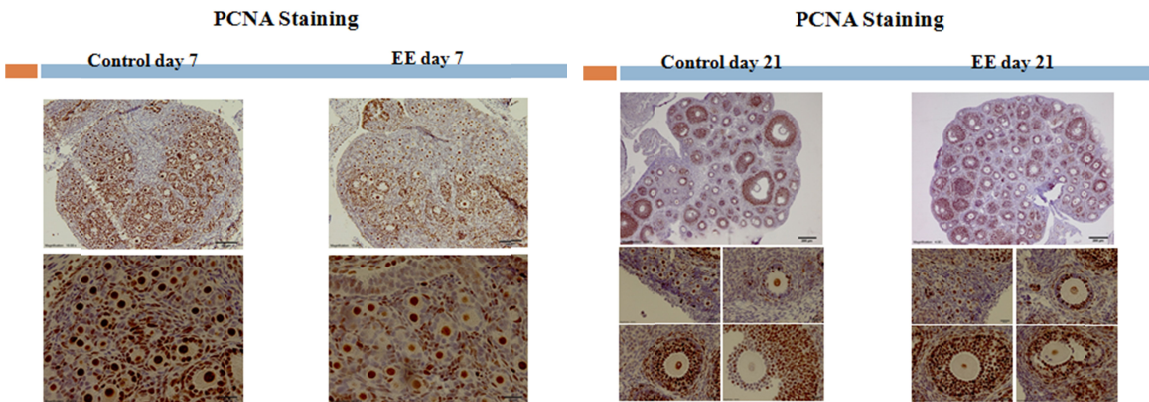
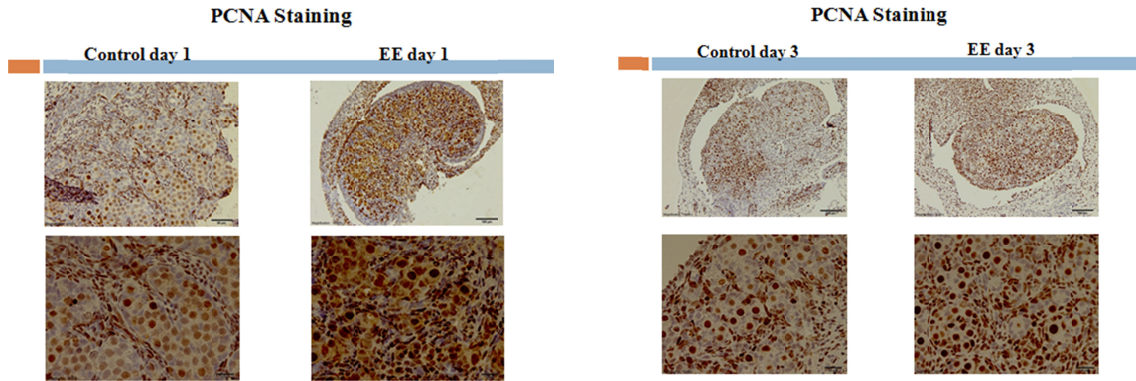


図 10 *in vitro* 実験における RTPCR 結 1(細胞増殖関連)





**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

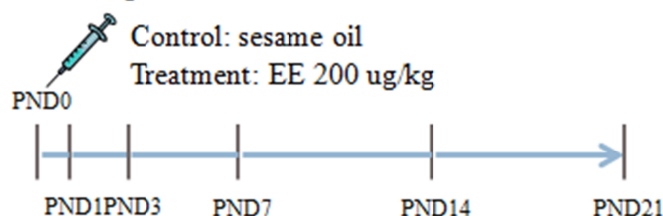
There is no too much difference of PCNA staining between control ovary and EE treatment ovary.

図 11  
果とそのまとめ

PCNA 染色結

## The Influence of EE on Sexual Dimorphic Nuclei Development

Experiment design:



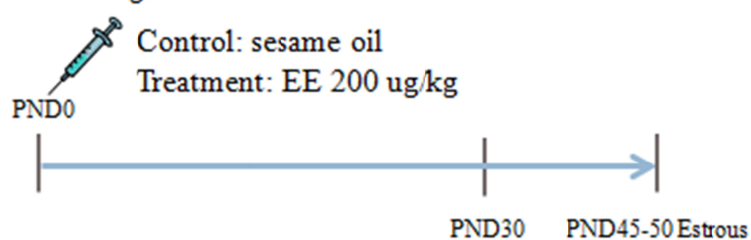
1. Morphology of SDN-POA area in control and treatment groups  
(Nissl staining; Calbindin staining )



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





