

## 【結果】

ネオニコチノイド類の単回強制経口投与によって、末梢神経影響が消失した後に、行動異常が認められた。

主たる異常は、記憶異常であり、神経新生能低下と対応していると考えられた。  
また幼若期投与群の行動異常は、「情動異常を伴う記憶異常」と考えられた。

## 【結論】

ネオニコチノイド農薬には従来の試験法からは想定することが難しい、  
行動異常(毒性)を引き起こす危険がある。

今後、分子レベル解析を含め、より詳細な神経科学的検証を加えるとともに、  
毒性発現に至るメカニズム解明が必要である。

H27 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

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、  
その毒性学的評価系構築に資する研究  
(H27-化学-一般-007)

分担研究課題：行動柔軟性/抑制課題試験の開発と毒性評価への応用

研究分担者 掛山 正心 早稲田大学 教授

【研究要旨】

マウスを対象とした行動柔軟性課題と行動抑制課題について検討した。行動柔軟性課題は本事業（H20-化学-一般-010）において作成したものを、無機ヒ素の曝露実験に適用し試験法の妥当性検証と修正を行った。通常の空間認知課題では影響の顕われない低用量の無機ヒ素曝露の仔マウスにおいて行動柔軟性の低下を認め、行動柔軟性課題は認知・情動機能を鋭敏に検出する評価手法であることが明らかとなった。次に行動柔軟性課題をもとに、タッチスクリーン型オペラント実験箱を用いた行動抑制課題の開発に着手した。

A. 研究目的

発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することが本研究の目的である。具体的には、マウスを用いての行動解析試験の成績を定量的な値として項目ごとに記録し、異常の定義を行う。項目ごとに定量化手法を決定し情動認知行動「毒性基準値」に対応する個々の神経科学的「異常基準値」を設定する。本年度は、認知機能ならびに情動機能の評価手法について検討した。

B. 研究方法

本年度はマウスを対象とした行動柔軟性課題と行動抑制課題について検討した。

行動柔軟性課題

行動柔軟性課題は本事業（H20-化学-一般-010）において作成したものを、集団型全自動行動・学習測定システム IntelliCage (New Behavior社, Zurich) (Galsworthy, Amrein, Kuptsov, Poletaeva, Zinn, Rau, Vyssotski, & Lipp, 2005) を用いたもので、マウスの皮下に ID チップを埋め込むことで、最大 16 匹のマウスを同じケージ内で飼育しながら、個々の動物の試験成績を自動

測定することができる。ケージの 4 隅にはオペラント・チャンバー（コーナー・チャンバー）が設置され、ノーズ・ポーク反応により報酬となる飲水が提示される。我々が開発した行動柔軟性課題は、2 つのコーナー・チャンバー間を往復させる行動系列の獲得を伴う空間学習（behavioral sequencing task）と、その後の反復逆転課題からなる（Endo *et al.*, Behav. Brain Res. 2011、H20-化学-一般-010 の成果）。

ヒ素曝露実験による行動柔軟性課題の検証

疫学調査により、環境中に存在する無機ヒ素は比較的低濃度曝露であっても IQ や認知機能の低下を引き起こすことが疫学調査結果から報告されている。そこで本研究では、発達期マウスに無機ヒ素を曝露し、後発的に行動にどのような異常が起こるか検討することで、行動柔軟性課題の妥当性検証と修正を行った。

妊娠 C3H マウス 8 日目から 18 日目まで、母マウスの飲水中に亜ヒ酸ナトリウム NaAsO<sub>2</sub> (85 ppm) を添加することで発達期無機ヒ素曝露群を作製した。飲水中に無機ヒ素を加えない母体から出生した仔を対照群として用いた。マウスが 60 週令に達した後、IntelliCage を用いて、マウスの行動量、飲水量、行動パターンの解析を行うと共に、空間学習試験と行動柔軟性試験により行動異常

の検出を試みた。

行動試験終了後、脳を固定し、ゴルジ染色による大脳前辺縁皮質における神経突起長やスパイン数を計測した。

#### タッチスクリーン型行動抑制課題の開発

行動柔軟性課題をもとに、よりヒトへの外挿性を高める課題を開発するため、タッチスクリーン型オペラント実験箱を用いた行動抑制課題を開発することとした。

スクリーン映像を用いた視覚弁別課題はマウスではこれまで不可能とされてきた。しかし数年前に Nature Protocol 誌(8:1961-84., 2013)で発表された「Bussey 装置」によりマウスでも視覚課題ができることが明らかとなった。本研究ではまず、「Bussey 装置」よりもさらにマウスの視覚課題成績が向上した新規のオペラント箱を作成することとした。

(倫理面への配慮)

早稲田大学ならびに研究協力機関(国立環境研究所、東京大学)の動物実験委員会、遺伝子組み換え実験委員会等の関連委員会の審査のもと、各機関長承認を得た上で研究を行った。日本学術会議動物実験に関する詳細指針に基づき、飼養及び保管条件を厳守、苦痛の軽減、動物数と動物へのストレスを最小限にすること、安楽死の方法に配慮して実験を行った。

### C. 研究結果

#### 行動柔軟性課題

この課題は全自動試験装置を用いて行われており、我々が作成したプログラムをインストールすることで、他の研究機関でもすぐに用いることができる。これまでに国内外の大学や研究所等に提供してきたが、そのうち3割ほどの研究機関では実験成績が一定しておらず、実験室の必要条件や管理に関する実験マニュアルの作成が求められていた。今回、経験者の指導のもと、同装置を初めて使用する大学院生がマニュアルをもとに作業を行い、成功することができた。すなわち同課題は、一般的なマウス飼育管理の経験をもつ担当者が実務作業を行うことが可能であることが実証された。

#### ヒ素曝露実験による行動柔軟性課題の検証

対照群と発達期無機ヒ素曝露群間で、行動量、飲水量、行動パターンに違いは認められなかった。

また、空間学習能力にも違いは認められなかった。

一方、行動柔軟性試験では、発達期無機ヒ素曝露群において、有意に適応力の低下が認められた(図1)。

また、行動柔軟性との関連が報告されている大脳前辺縁皮質では、スパイン数には群間で違いは認められなかったが、発達期無機ヒ素曝露群で有意に神経突起長の低下が認められた(図2)。このような結果は、発達期無機ヒ素曝露群では、大脳前辺縁皮質における神経突起長低下が行動柔軟性の異常を誘導している可能性を示唆している。

#### タッチスクリーン型行動抑制課題の開発

これまでに作成したオペラント箱により、図形の単純弁別課題で正答率90%以上を達成し、行動抑制課題のプログラム作成も開始した。

### D. 考察

#### 行動柔軟性課題

IntelliCage装置は16匹のマウスの同時測定が可能であり、本研究により実験マニュアルも整備することができた。一台につき1000万円程度と高価であるが、理論上は作業員一名で飼育管理を含めて30台を管理することができるので、一人あたり一年あたり4800匹の行動解析が可能となる。ハイスループット試験系として普及を期待したい。

#### ヒ素曝露実験による行動柔軟性課題の検証

行動柔軟性課題については、これまでにダイオキシン等の曝露実験により、他の毒性指標よりも低用量の周産期曝露により行動柔軟性が低下することを明らかにしてきたが、今回は同試験法を無機ヒ素の曝露実験に適用し、その試験法の妥当性検証と修正を行った。通常的空間認知課題では影響の顕われない低用量の無機ヒ素曝露の仔マウスにおいて、行動柔軟性課題における有意な適応力低下を見出したことから、行動柔軟性課題は認知・情動機能を鋭敏に検出する評価手法であることが明らかとなった。

### E. 結論

発生発達期における化学物質の低用量曝露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出する上で、行動柔軟性課題

の適用と行動抑制課題の開発をさらに進めるべきである。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Aung KH, Kyi-Tha-Thu C, Sano K, Nakamura K, Tanoue A, Nohara K, Kakeyama M, Tohyama C, Tsukahara S, Maekawa F. Prenatal Exposure to Arsenic Impairs Behavioral Flexibility and Cortical Structure in Mice. *Frontiers in Neuroscience* 10, 137(eCollection), 2016.

##### 2. 学会発表

掛山正心、「マウスを用いた前頭野依存性行動モデル：高次学習から実行機能へ」第45回日本神経精神薬理学会・第37回日本生物学的精神医学会シンポジウム 2015/09、東京。

Maekawa F, Htet Aung K, Sano K, Nakamura S, Tanoue A, Kakeyama M., Tohyama C., Nohara K, Tsukahara S. Prenatal arsenic exposure impaired behavioral flexibility and morphology of coretex in mice. 9th World Congress International Brain Research Organization. 2015/07, Rio de Janeiro, Brazil.

掛山正心、「環境と脳：ダイオキシン毒性実験からみた高次脳機能発達」第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会 2015/09、仙台。

ベナー聖子・尾藤晴彦・掛山 正心・山末英典、「集団内行動の定量化に基づくオキシトシン効果判定指標の網羅的探索：マウスを用いた予備的検討結果」第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会 2015/09、仙台。

#### H. 知的財産所有権の出願・登録状況

該当なし

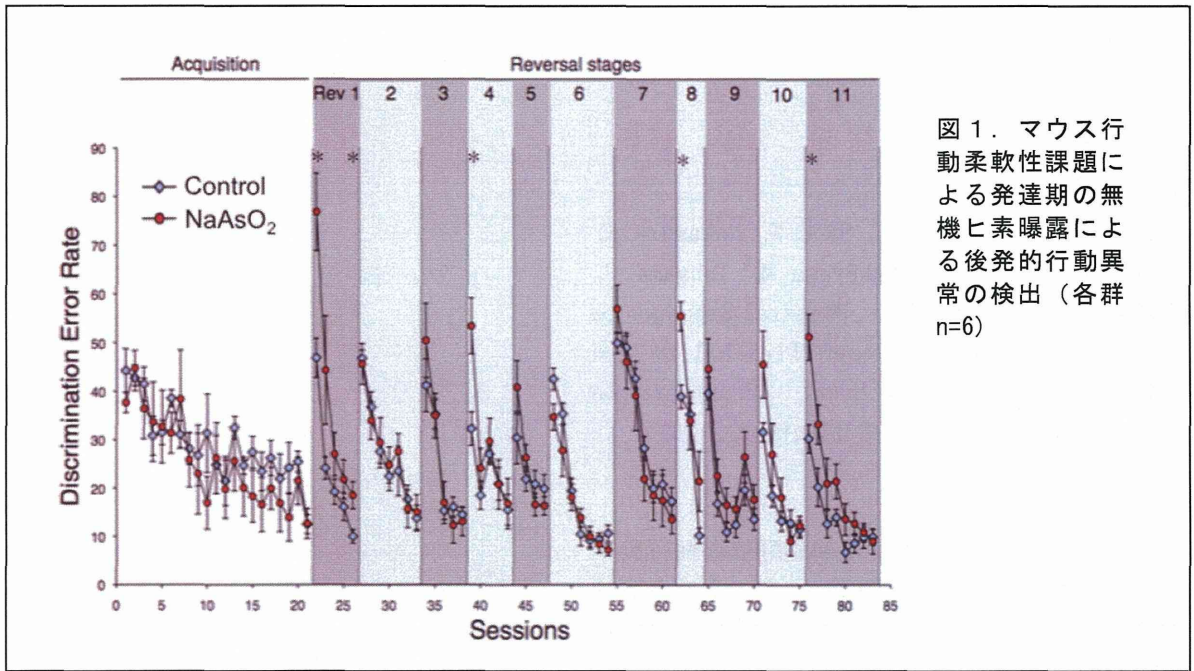
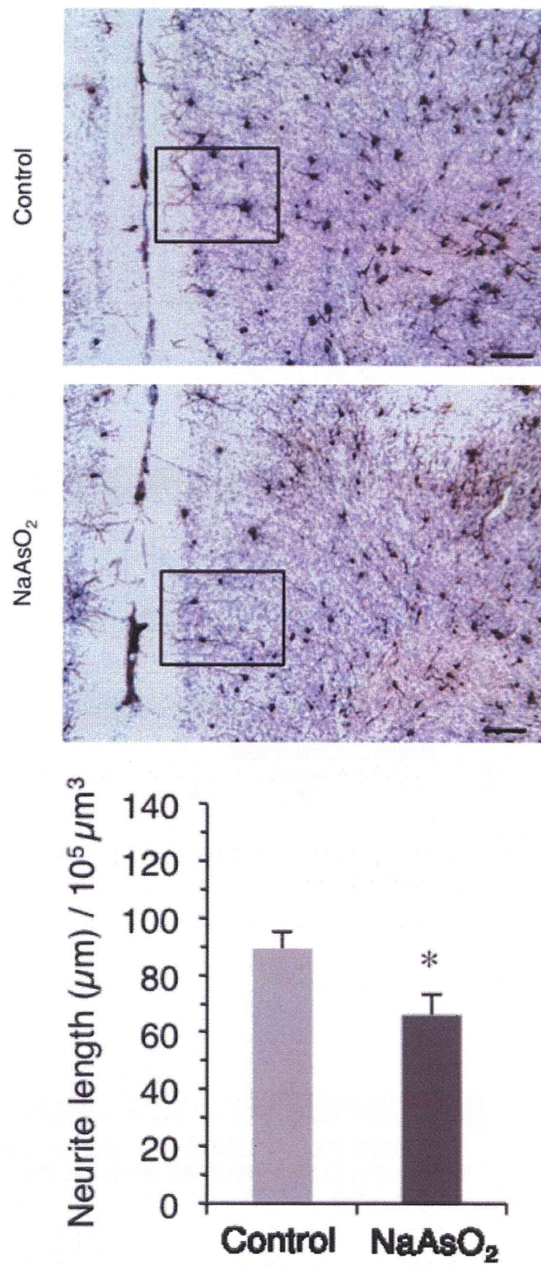


図1. マウス行動柔軟性課題による発達期の無機ヒ素曝露による後発的行動異常の検出 (各群 n=6)

図 2. 発達期と素曝露による神経突起長の低下



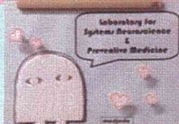


平成27年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
 発生・発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経  
 行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に  
 資する研究（H27-化学一般-007）  
 平成27年度班会議 2016.03.09

**HUM**  
 人間科学部

**成果報告 2**  
**行動柔軟性/抑制課題試験の開発と毒性評価への応用**

掛山 正心  
 早稲田大学人間科学学術院  
 予防医科学・応用生理学研究室



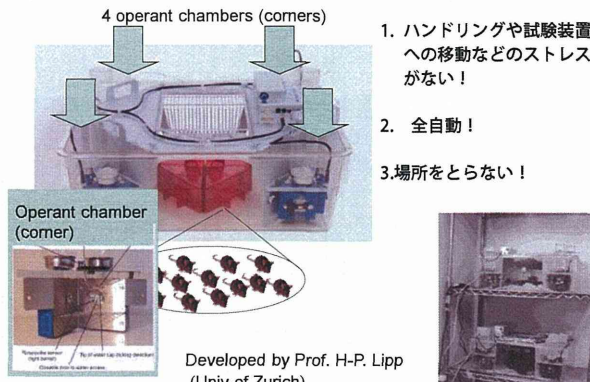
【背景】H20—化学—一般-010において、集団型全自動行動測定システムIntelliCageを用いた行動柔軟性課題を開発

4 operant chambers (comers)

1. ハンドリングや試験装置への移動などのストレスがない！
2. 全自動！
3. 場所をとらない！

Operant chamber (comer)

Developed by Prof. H-P. Lipp (Univ of Zurich)



【背景】初期学習（単純空間学習）

二つのコーナーを往復する行動系列をマウスに習得させる

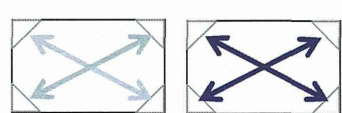
**Rewarded**  
 Alternate  
 Re-entry

**Non-Rewarded**  
 Rewarded  
 Alternate  
 Re-entry

| Sessions | Mouse ID | 1 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
|----------|----------|---|----|----|----|----|-----|
| 1        | 1        |   |    |    |    |    |     |
|          | 2        |   |    |    |    |    |     |
|          | 3        |   |    |    |    |    |     |
|          | 4        |   |    |    |    |    |     |
|          | 5        |   |    |    |    |    |     |
| 7        | 1        |   |    |    |    |    |     |
|          | 2        |   |    |    |    |    |     |
|          | 3        |   |    |    |    |    |     |
|          | 4        |   |    |    |    |    |     |
|          | 5        |   |    |    |    |    |     |

H20—化学—一般-010の成果 (BehavBrain Res 221:172-181, 2011)

反復逆転課題（行動柔軟性課題）



H27年度本研究の成果(0)

**実験マニュアルが完成**  
 経験者の指導のもと、同装置を初めて使用する大学院生がマニュアルをもとに作業を行い、成功

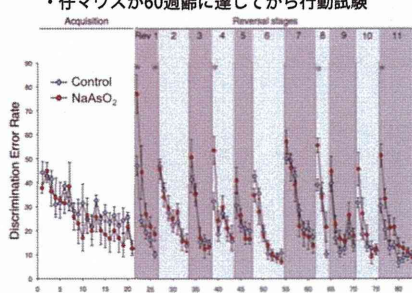
→理論上は作業員一名で飼育管理を含めて4800匹/年の行動解析が可能

本年度成果(1)

発達期無機ヒ素暴露マウスにおいて、遅発性の行動柔軟性の低下があることを確認

- 妊娠8～18日の母マウスの飲み水中に85mgppのNaAsO<sub>2</sub>を添加
- 仔マウスが60週齢に達してから行動試験

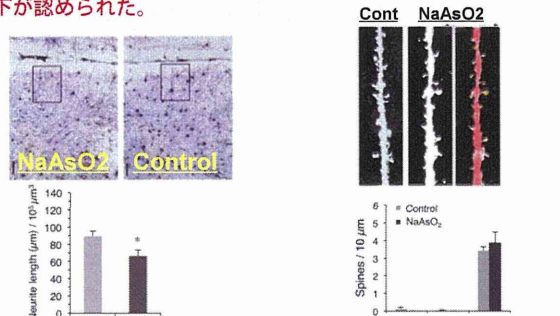
単純な記憶機能（空間学習）には影響のない曝露量で、行動柔軟性が低下することがわかった。



Minor Revision 対応中 (Frontiers in Neuroscience)

本年度成果(1)

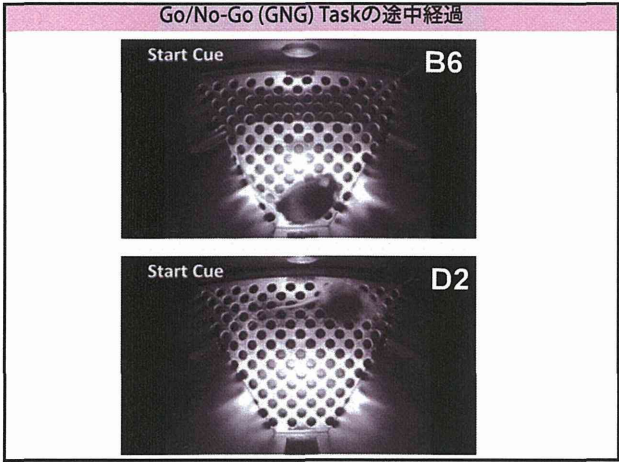
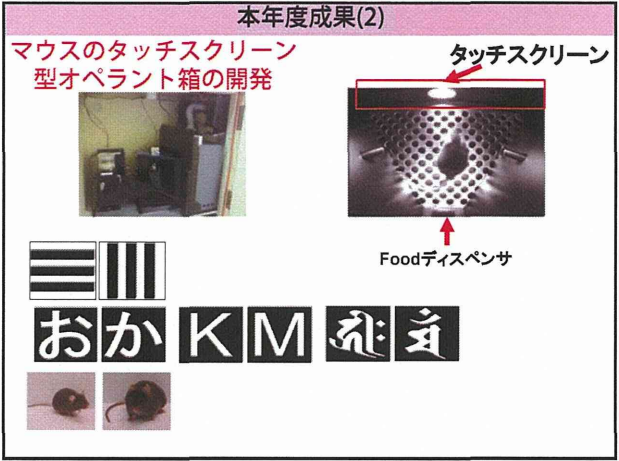
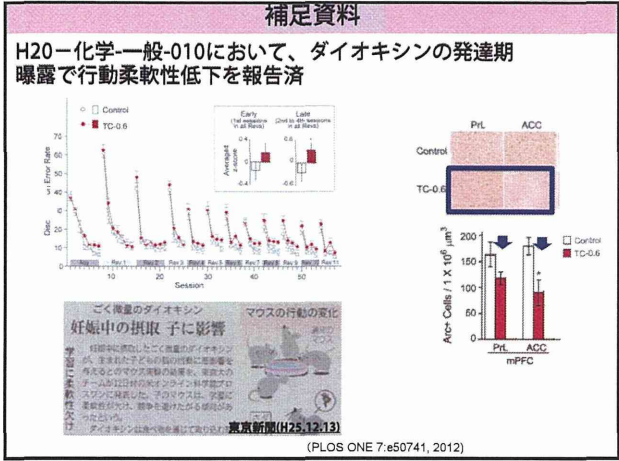
行動柔軟性低下を示した発達期無機ヒ素曝露マウスでは、関連が報告されている大脳前辺縁皮質において神経突起長の低下が認められた。



Neurite length (µm) / 10<sup>3</sup>µm<sup>2</sup>

Spines / 10 µm

(Aung et al., 2016より改変)



**まとめ**

成果0. IntelliCage課題の実験マニュアル作成  
 成果1. 無機ヒ素の発達期曝露影響を確認 (論文revise中)  
 成果2. タッチスクリーン型マウスオペラント実験箱を開発

今後行うこと

1. タッチスクリーン型課題の開発
  - 注意持続試験(H28)
  - GO/NoGo試験(H28)
2. 行動課題の適用と信頼性を高める作業
  - 曝露動物の作成(H28)と適用(H29)
  - 遺伝的モデルマウスでの検証(H28~H29)
  - 学会発表、論文文化

日本衛生学会シンポジウム講演 (5月、旭川)  
 日本神経科学会シンポジウム (7月、横浜)  
 日本精神神経薬理学会シンポジウム講演 (7月、ソウル)



H27 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

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、  
その毒性学的評価系構築に資する研究  
(H27-化学-一般-007)

分担研究課題：「エストロジェン受容体遺伝子改変マウスの解析、  
遺伝子発現解析と異常基準値の設定」  
-エストロゲン受容体 $\alpha$ 置換マウスの脳における遺伝子発現プロファイル-

研究分担者 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

【研究要旨】

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、情動認知行動異常を呈するエストロジェン受容体遺伝子改変マウス2種(国立医薬品食品衛生研究所毒性部にて独自に作出した)を、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるが、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、脳における網羅的遺伝子発現変動解析を行う。

平成27年度(今年度)は、エストロゲン(ER) $\alpha$ 遺伝子座に、ER $\alpha$ cDNAと牛成長ホルモン由来の3'-UTRをつなげたものを、相同組換えにより遺伝子導入し、独自に作製したER $\alpha$ 受容体遺伝子置換マウス(以降、このホモ型をER $\alpha$ KIと記載)を使用し、脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)について網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。ER $\alpha$ KIマウスにおけるER $\alpha$ の発現は野生型の20-25%であり、したがってER $\alpha$ KIマウスはER $\alpha$ ノックダウンマウスと考える事ができる。また、ER $\alpha$ cDNAと置換していることから、理論上、ER $\alpha$ のスプライシングバリエーションが発現できないマウスと考える事ができる。情動認知行動解析結果から、ER $\alpha$ KIマウスは、音-連想記憶及び空間-連想記憶に障害が認められることが確認されている。

遺伝子発現変動解析の結果、野生型と比較し、ER $\alpha$ KIマウスの大脳皮質、海馬及び脳幹では、それぞれ283(増加:168、減少:115)、972(増加:908、減少:64)及び230(増加:205、減少:25)プローブセット(ps)の有意な発現変動が認められた。脳3部位に共通して、発現が有意に増加した遺伝子は4つ(5 ps: Sgk1, Adat2, Nfkb1a, Ruffy2)、他方、減少した遺伝子はER $\alpha$ (Esr1)を含む2つ(2 ps: Igh-6, Esr1)であった。各部位における解析の結果、ER $\alpha$ KIマウスの大脳皮質では、神経系の障害に関わるシグナルネットワークは現時点で認められないが、多くのSlcトランスポーターの発現変動が認められ、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進していること、また発現増加遺伝子のプロモーター解析(*in silico*)の結果、Esr1が上位にリストアップされたことから、ERシグナルが活性化している可能性が示唆された。海馬

では、GABA、アセチルコリン、グルタミン酸、アドレナリン受容体の発現が増加し、K<sup>+</sup>チャンネルとCa<sup>2+</sup>チャンネル遺伝子の発現が増加することから、興奮性・抑制性双方の神経伝達が亢進していること、また大脳皮質と同様に、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進し、ERシグナルが活性化している可能性が示唆された。一方、脳幹では、神経系の障害に関わるシグナルネットワークは現時点で認められなかった。

他方、先行研究におけるER $\alpha$ 欠失マウスの大脳皮質、海馬及び脳幹における解析の結果、大脳皮質において、RARシグナル伝達の低下、神経活動の活性化および概日リズムが乱れることが示唆され、海馬では神経系の障害に関わるシグナルネットワークは認められないが、脳幹では神経活動が活性化および概日リズムが乱れる可能性が示唆された。そこで、ER $\alpha$ 欠失マウスとER $\alpha$ KIマウスにおける解析結果を比較すると、ER $\alpha$ KIマウスの脳では、RARシグナルおよび概日リズム関連遺伝子の発現変動は、野生型のものと有意な差が認められないため、ER $\alpha$ 欠失マウスとER $\alpha$ KIマウスにおける情動認知行動異常の差（情動障害）は、大脳皮質におけるRARシグナル伝達の低下、あるいは大脳皮質および脳幹における概日リズムが乱れることが関係していることが示唆された。また、ER $\alpha$ KIマウスは、ER $\alpha$ ノックダウンマウスと考えることができるが、今回の解析結果からは、ER $\alpha$ シグナルがむしろ活性化していることが示唆された。この点、多くのER $\alpha$ のスプライシングバリエントが、ER $\alpha$ の効果に対してdominant-negativeな影響を有することが報告されていることから、ER $\alpha$ のスプライシングバリエントが発現できないER $\alpha$ KIマウスでは、野生型と比較し、ER $\alpha$ シグナルが亢進していることが推察された。

#### A. 研究目的

本研究全体の目的は、平成20年度に開始した先行研究（H20-化学一般-009）にて、周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の神経毒性試験法では同定困難な情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉え、次の研究（H23-化学一般-004）では、それらが毒性指標として定量評価できるものであることを示したが、これらを背景に、発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することで

ある。

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、情動認知行動異常を呈するエストロゲン受容体遺伝子改変マウス2種（国立医薬品食品衛生研究所毒性部にて独自に作出した）を、特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるが、この異常行動誘発メカニズムの解明を目的として、脳における網羅的遺伝子発現変動解析を行う。

今年度（平成27年度）は、この目的遂行の為に、成熟期（48週齢）の雄性ER $\alpha$ KIマウスの脳3部位（大脳皮質、海馬及び脳幹）のサンプルについて、Percellome法により網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。

## B. 研究方法

マウスの系統は C57BL/6NCrSlc (日本エスエルシー)を用いた。ER $\alpha$ KI マウスは、エストロゲン(ER)  $\alpha$  遺伝子座に、ER $\alpha$  cDNA と牛成長ホルモン由来の 3' -UTR をつなげたものを、相同組換えにより遺伝子導入し、独自に作製した ER $\alpha$ KI を使用した。ER $\alpha$ KI マウスのホモ型における ER $\alpha$  の発現は野生型の 20-25%であり、したがって ER $\alpha$ KI マウスは ER $\alpha$  ノックダウンマウスと考える事ができる。また、cDNA を導入していることから理論上、ER $\alpha$  のスプライシングバリエーションが生じないこととなる。加えて、ER $\alpha$ KI マウスは、音-連想記憶及び空間-連想記憶に障害が認められることが確認されている。

遺伝子発現変動解析に際しては、48 週齢の成熟期マウスの脳 3 部位 (大脳皮質、海馬、脳幹) (午前 10 時) (各 n=4) について、Percellome 法 (遺伝子発現値の絶対化手法) (Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006) による網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて検討した。この際、我々が独自に開発した「MF analyzer」を用いて網羅的に解析した。脳 3 部位は、氷冷下にて左脳につき、小脳、脳幹部、海馬、大脳皮質の順に採取することにより得た (右脳はホルマリン固定した)。

有意差の検定は、Student の t 検定によりおこない、P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差 (SD) にて示した。

### Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晩浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出に当たっては、RNAlater を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用い

て破碎液を調製した。得られた破碎液の 10  $\mu$ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

### GeneChip 解析

全 RNA 5  $\mu$ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。

### (倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「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程 (平成 19 年 4 月版)」。

## C. 研究結果及び考察

C-1: 野生型及び ER $\alpha$ KI マウスの遺伝子発現の脳各部位間の比較:

脳各部位について、野生型と比較し、ER $\alpha$ KI マウスの場合に、発現が有意に変動(増加及び減少)する遺伝子 (プローブセット:

ps) 数を検討したところ以下のとおりとなった。この際、細胞 1 個あたりの発現コピー数につき、大脳皮質、海馬及び脳幹において、それぞれ 1.0、0.7 及び 0.8 コピー以上のものを採用した。

大脳皮質：168 ps (増加)、115 ps (減少)  
 海馬：908 ps (増加)、64 ps (減少) 脳幹：205 ps (増加)、25 ps (減少)

3 部位に共通して増加した遺伝子として 4 つ (5 ps: Sgk1, Adat2, Nfkb1a, Ruffy2)、他方、減少した遺伝子として、ER $\alpha$  (Esr1) を含む 2 つ (2 ps: Igh-6, Esr1) が得られた。野生型と ER $\alpha$  遺伝子の発現量が減少している ER $\alpha$  KI マウスとの比較であるため、ER $\alpha$  (=Esr1) 遺伝子が抽出されてきたのは妥当と考える。

次いで、大脳皮質、海馬及び脳幹において、有意に変動した遺伝子の集合関係を検討したところ、図 1 のベン図の通りとなった。

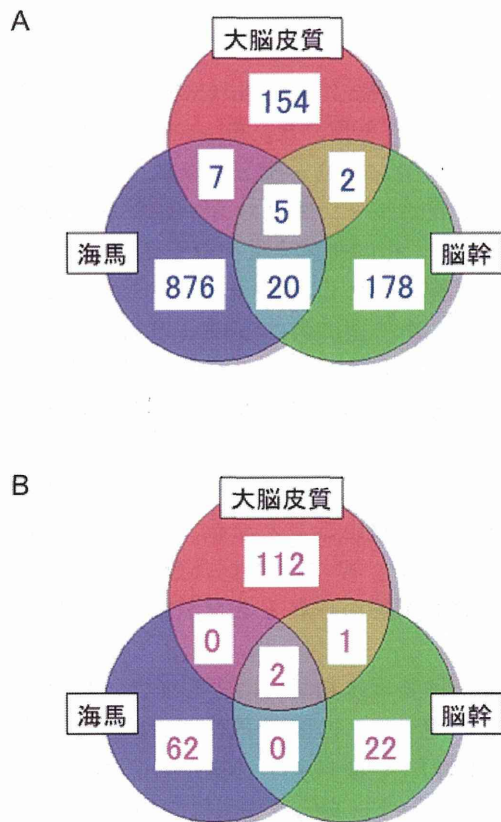


図 1 脳各部位について、野生型と比較し、ER $\alpha$  KI マウスの場合に、発現が有意に増加 (A) あるいは減少 (B) する遺伝子数 (ベン図で表記した)

脳の部位によって、野生型と比較し ER $\alpha$  KI マウスにおいて、有意に発現変動する遺伝子が、かなり異なることが明らかとなったため、部位ごとに分けて解析する事とした。

C-2 : 脳各部位における、野生型及び ER $\alpha$  KI マウスの遺伝子発現の比較 :

C-2-1 : 大脳皮質における、野生型及び ER $\alpha$  KI マウスの遺伝子発現の比較 :

まず大脳皮質における ER $\alpha$  ともう一つの ER サブタイプである ER $\beta$  遺伝子の発現、及び各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、



Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、野生型と ER $\alpha$  KI マウスとの比較を検討した。ER $\alpha$  遺伝子 (=Esr1) は、ER $\alpha$  KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER $\beta$  遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから大脳皮質においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER $\alpha$  KI マウスとで同程度である事が示唆された。

なお、G タンパク質共役受容体的一种であり形質膜上に存在するエストロゲン受容体である Gpr30 遺伝子の発現変動は認められなかった。

大脳皮質において、野生型マウスと比較し ER $\alpha$  KI マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、168 及び 115 ps であった。

増加分 168 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。ただし、多く (13 ps) の Slc トランスポーター遺伝子の発現増加が認められた。具体的には、Slc1a2 (GLT-1)、Slc2a12 (GLUT12)、Slc4a2 (AE2)、Slc6a11、Slc14a1、Slc16a2 (MCT8)、Slc16a9 (MCT9)、Slc17a6 (VGLUT2)、Slc24a4 (NCKX4)、Slc25a25 (APC3)、Slc26a8 (TAT1)、Slc29a4 (ENT4) 及び Slc43a2 (LAT4) 遺伝子であり、この内、Slc1a2 はグルタミン酸トランスポーターであり、Slc17a6 は小胞性グルタミン酸トランスポーターである。Slc1a2 と Slc17a6 遺伝子の発現変動について図 2 に示す。

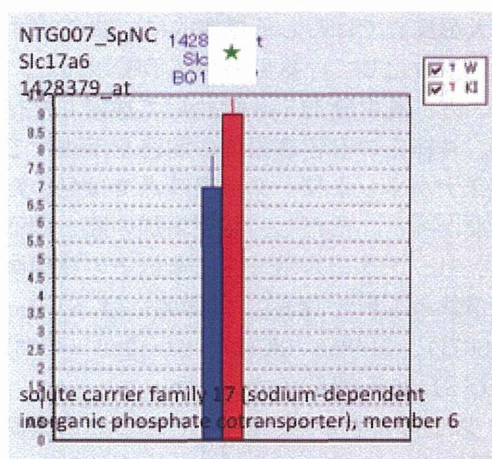
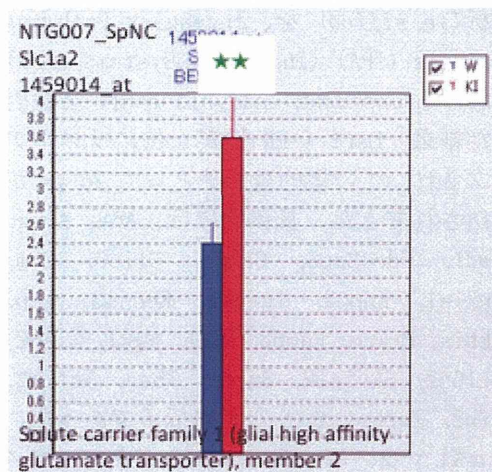


図 2 大脳皮質において、野生型マウスと比較し ER $\alpha$  KI マウスにおいて、有意に発現増加が認められた、Slc1a2 (上段) 及び Slc17a6 遺伝子 (下段) の発現変動

野生型：赤、ER $\alpha$  KI マウス：青 (n=4、平均値±標準偏差、\*:P<0.05, \*\*:P<0.01)

Slc トランスポーターは、ATP のエネルギーを利用しないものであるが、ATP のエネルギーを利用する Abc トランスポーターは Abcc1 の 1 ps のみ発現増加が認められた。なお、2 種 (Kend3 及び Kenj13) と、種類は少ないが K<sup>+</sup>チャネルの発現増加が認められた。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター

解析 (*in silico*) を、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) における Upstream Analysis を用いて検討した結果、Esr1 (=ER $\alpha$ ) が上位にリストアップされ、この標的遺伝子として 26 ps が抽出されてきた。具体的には、Ace, Arsg, Brwd1, Cdc42ep3, Cebpd, Clic6, Cpm, Csnk1a1, Enpp2, Igfbp2, Kcnj13, Lbp, Nfkb1a, Prked, Ramp3, Rdh5, Sgk1, Siah2, Slc16a2, Slc2a12, Sulf1, Tbcd, Tcf7l2, Tgfb2, Tgfbr1 及び Ttr 遺伝子であった。ER $\alpha$  KI マウスは、ER $\alpha$  ノックダウンマウスであるが、この結果からは、ER $\alpha$  KI マウスの大脳皮質ではむしろ機能的に、ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。

一方、減少分 115 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。ただし、発現増加の際と同様に、Slc トランスポーター遺伝子の発現減少が認められた (4 ps)。具体的には、Slc1a4 (ASCT1)、Slc8a2 (NCX2)、Slc12a6 (KCC3) 及び Slc35a5 遺伝子であった。

以上のことから、ER $\alpha$  KI マウスの大脳皮質においては、野生型マウスと比較し、多くの Slc トランスポーターの発現が増加 (一部、発現が減少) していることから、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進し、また発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子として ER $\alpha$  が抽出されてきたことから、むしろ ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。

C-2-2 : 海馬における野生型及び ER $\alpha$  KI マウスの遺伝子発現の比較 :

海馬における ER $\alpha$  ともう一つの ER サブタイプである ER $\beta$  遺伝子の発現、及び各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、野生型と ER $\alpha$  KI マウスとの比較を検討した。ER $\alpha$  遺伝子 (=Esr1) は、ER $\alpha$  KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER $\beta$  遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのことから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER $\alpha$  KI マウスとで同程度である事が示唆された。

なお、G タンパク質共役受容体の一種であり形質膜上に存在するエストロゲン受容体である Gpr30 遺伝子の発現変動は認められなかった。

海馬において、野生型マウスと比較し ER $\alpha$  KI マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、908 及び 64 ps であった。

増加分 908 ps について、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、興奮性・抑制性双方の神経伝達の亢進が示唆された。具体的には、抑制性の GABA 受容体 (Gabbr3 及び Gabra4 遺伝子)、興奮性のグルタミン酸受容体 (Grin3a)、アドレナリン受容体 (Adra2a 及び Adrbk2 遺伝子) およびアセチルコリン受容体 (Chrna4 遺伝子) の発現増加が認められた。この内、Gabbr3 及び Grin3a 遺伝子の発現変動について図 3 に示す。

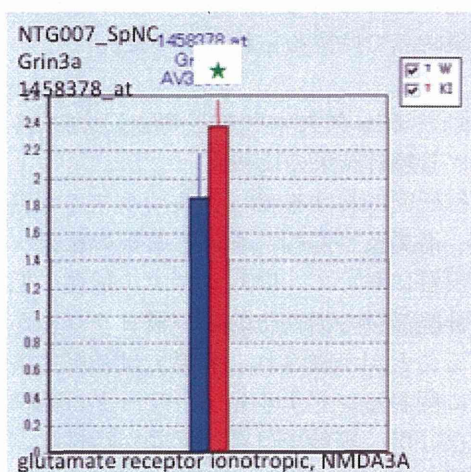
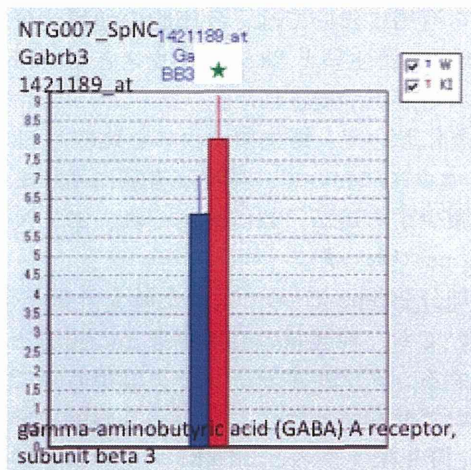


図 3 海馬において、野生型マウスと比較し ER $\alpha$  KI マウスにおいて、有意に発現増加が認められた、Gabrb3 (上段) 及び Grin3a 遺伝子 (下段) の発現変動

野生型：赤、ER $\alpha$  KI マウス：青 (n=4、平均値 $\pm$ 標準偏差、\*:P<0.05, \*\*: P<0.01)

また、過分極を示唆する K<sup>+</sup>チャネル遺伝子 (4 ps) の発現増加が認め、具体的には、Kenj8、Kenk4、Kctd18 及び Kcnd3 遺伝子であった。一方、脱分極を示唆する Ca<sup>2+</sup>チャネル遺伝子 (4 ps) の発現増加が認め、具体的には、Cacng8、Cacnb1、Cacna2d1、Cacna2d1 及び Cacng8 遺伝子であった。以上のことから、興奮性・抑制性双方の神経伝達が亢進している可能性が示唆された。

また大脳皮質の場合のように、多く (16 ps) の Slc トランスポーター遺伝子の発現増加が認められた。具体的には、Slc1a2 (GLT-1)、Slc1a4 (ASCT1)、Slc2a4rg-ps、Slc4a8 (NDCBE)、Slc7a6 (y+LAT2)、Slc7a6os、Slc7a11 (xCT)、Slc9a3r2、Slc11a2 (DMT1)、Slc20a2 (PiT-2)、Slc25a29 (ORNT3)、Slc25a36 (PNC2)、Slc35a5、Slc35b3 (PAPST2)、Slc52a2 及び Slco2a1 遺伝子であった。一方、Abc トランスポーターは Abcd2 及び Abcd4 の 2 ps のみ発現増加が認められた。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) における Upstream Analysis を用いて検討した結果、Esr1 (=ER $\alpha$ ) が最上位にリストアップされ、この標的遺伝子として 77 ps が抽出されてきた。具体的には、Abhd2、Anapc5、Ap3b1、Ar、Atgl3、Avp、Bcl6、Bmp2、Casp8ap2、Cblc、Cdc42bpb、Cenpu、Crim1、Ddit4、Dusp5、Dyrk2、Fgf12、Gadd45b、Gnaq、Gopc、Gygl、Hook2、Hsd17b7、Inip、Jak1、Jak3、Kif3b、Kif5b、Klhl124、Kpnb1、Laptm5、Madd、Mark1、Mdm4、Myo6、Nfkbia、Nfyb、Nipsnap1、Nov、Nrcam、Onecut2、Ophn1、Pcbd1、Pcdhb4、Pdk4、Pdlim5、Pias1、Plcb1、Plxna2、Ppp1r3c、Ppp5c、Pten、Ptk2、Rab27a、Rabep1、Relb、Robo1、Rock1、Rp2、Sesn1、Sgk1、Skp2、Slc1a4、Slc25a36、Slc7a11、Spry4、Star、Stx6、Sufu、Tax1bp1、Terf2、Tfrc、Th、Tirap、Tjp2、Tsc22d3、Vezf1、Wasf2 及び Ypell 遺伝子であった。ER $\alpha$  KI マウスは、ER $\alpha$  ノックダウンマウスであるが、この結果からは、ER $\alpha$  KI マウスの大脳皮質ではむしろ機能的に、ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。

また、記憶形成に関わる Creb1 も上位にリストアップされ、この標的遺伝子として 41 ps が抽出されてきた。具体的には、Akt3、



Apold1, Aqp11, Atf1, Avp, Bhlhe40, Cacna2d1, Camkk2, Capn5, Ccnj1, Cdh8, Cdk14, Ciart, Crim1, Errfil, Fam46a, Flt1, Gadd45b, Gadd45g, Gpr12, Hla-A, Homer1, Itgbl1, Klf7, Marcksl1, Mcl1, Mdgal, Nptx2, Nrpl, Plxna2, Rbm, Robo1, Sema4a, Sgk1, Sh3kbp1, Star, Tfrc, Th, Thop1, Ypel1 及び Zfp948 遺伝子であった。このことは、神経伝達が亢進した結果、ER $\alpha$  KI マウスの海馬では記憶形成に関わる Creb1 が活性化する可能性が示唆された。

一方、減少分 64 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。

以上のことから、ER $\alpha$  KI マウスの海馬においては、野生型マウスと比較し、GABA、アセチルコリン、グルタミン酸、アドレナリン受容体の発現増加が認められたことから、興奮性・抑制性双方の神経伝達が亢進していることが示唆され、また多くの Slc トランスポーターの発現が増加していることから、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進し、加えて発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子として ER $\alpha$  が抽出されてきたことから、むしろ ER シグナルが活性化している可能性が示唆された。

C-2-3: 脳幹における、野生型及び ER $\alpha$  KI マウスの遺伝子発現の比較:

脳幹における ER $\alpha$  ともう一つの ER サブタイプである ER $\beta$  遺伝子の発現、及び各細胞の分化マーカー、つまり Mtap2 と Mapt (ニューロン)、Gfap (アストロサイト)、Mag と Mbp (オリゴデンドロサイト)、Nes (神経幹細胞) の各遺伝子の発現について、野生型と ER $\alpha$  KI マウスとの比較を検討した。ER $\alpha$  遺伝子 (=Esr1) は、ER $\alpha$  KI マウスで有意な発現減少が認められた。他方、ER $\beta$  遺伝子の発現は有意な差が認められなかった。各分子マーカーについては、いずれも有意な差が認められなかった。これらのこ

とから海馬においては、各細胞の増殖・分化程度は、野生型と ER $\alpha$  KI マウスとで同程度である事が示唆された。

海馬において、野生型マウスと比較し ER $\alpha$  KI マウスにおいて、発現が有意に増加または減少する遺伝子数はそれぞれ、205 及び 25 ps であった。

増加分 205 ps について、また減少分 25 ps についても、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークは現時点では見いだせなかった。したがって脳幹において、野生型マウスと ER $\alpha$  KI マウスとの間に変化が認められるシグナルネットワークは、現時点では認められなかった。

C-2-4: ER $\alpha$  欠失マウスと ER $\alpha$  KI マウスにおける解析結果の比較:

先行研究における ER $\alpha$  欠失マウスの大脳皮質、海馬及び脳幹における解析の結果、大脳皮質において、RAR シグナル伝達の低下、神経活動の活性化および概日リズムが乱れることが示唆され、海馬では神経系の障害に関わるシグナルネットワークは認められないが、脳幹では神経活動が活性化および概日リズムが乱れる可能性が示唆された。したがって、ER $\alpha$  KI マウスと ER $\alpha$  欠失マウスにおける解析結果を比較すると、RAR シグナル伝達の低下および概日リズムが乱れる事が大きな相違点となる。

そこで ER $\alpha$  KI マウスの脳3部位における RAR シグナルおよび概日リズム関連遺伝子の発現変動を再解析したところ、いずれの関連遺伝子も、野生型のものと有意な差が認められなかった。このことから、ER $\alpha$  欠失マウスと ER $\alpha$  KI マウスにおける情動認知行動異常の差(情動障害)は、大脳皮質における RAR シグナル伝達の低下と大脳皮質および脳幹における概日リズムが乱れることが関係していることが示唆された。

他方、ER $\alpha$  KI マウスは、ER $\alpha$  の発現が低下した ER $\alpha$  ノックダウンマウスと考えるこ



とができるが、今回の解析結果からは、少なくとも大脳皮質と海馬において、ER $\alpha$ シグナルがむしろ活性化していることが示唆された。この点、多くのER $\alpha$ のスプライシングバリエントが、ER $\alpha$ の効果に対して dominant-negative な影響を有することが報告されていることから (Taylor SE ら、Cancer Lett 288(2): 133-148, 2010)、ER $\alpha$ のスプライシングバリエントが発現できない ER $\alpha$ KI マウスでは、野生型と比較し、ER $\alpha$ シグナルが亢進していることが推察された。

大脳皮質および海馬において、多くのSlcトランスポーター遺伝子の発現変動が認められた事から、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進していることが示唆されたが、この事が、神経系における障害に関わるか否かは現時点では不明である。

#### D. 結論

各部位における解析の結果、ER $\alpha$ KI マウスの大脳皮質では、神経系の障害に関わるシグナルネットワークは現時点で認められないが、多くのSlcトランスポーターの発現変動が認められ、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が亢進していること、また発現増加遺伝子のプロモーター解析 (in silico) の結果、Esr1が上位にリストアップされたことから、ERシグナルが活性化している可能性が示唆された。海馬では、GABA、アセチルコリン、グルタミン酸、アドレナリン受容体の発現が増加し、K<sup>+</sup>チャンネルとCa<sup>2+</sup>チャンネル遺伝子の発現が増加することから、興奮性・抑制性双方の神経伝達が増進していること、また大脳皮質と同様に、細胞内外のイオンや有機物質の輸送が増進し、ERシグナルが活性化している可能性が示唆された。一方、脳幹では、神経系の障害に関わるシグナルネットワークは現時点で認められなかった。

先行研究におけるER $\alpha$ 欠失マウスと、ER $\alpha$ KI マウスにおける解析結果を比較すると、

ER $\alpha$ KI マウスの脳では、ER $\alpha$ 欠失マウスの場合に認められたRARシグナルおよび概日リズム関連遺伝子の発現変動は、野生型のものと有意な差が認められないため、ER $\alpha$ 欠失マウスとER $\alpha$ KI マウスにおける情動認知行動異常の差(情動障害)は、大脳皮質におけるRARシグナル伝達の低下、あるいは大脳皮質および脳幹における概日リズムが乱れることが関係していることが示唆された。また、ER $\alpha$ KI マウスは、ER $\alpha$ ノックダウンマウスと考えることができるが、今回の解析結果からは、ER $\alpha$ シグナルがむしろ活性化していることが示唆された。この点、多くのER $\alpha$ のスプライシングバリエントが、ER $\alpha$ の効果に対して dominant-negative な影響を有することが報告されていることから、ER $\alpha$ のスプライシングバリエントが発現できないER $\alpha$ KI マウスでは、野生型と比較し、ER $\alpha$ シグナルが亢進していることが推察された。

今後特に、エストロゲンと、RARシグナルあるいは概日リズムのシグナルネットワークとの関連に着目した検討に加え、ER $\alpha$ のスプライシングバリエントの機能に着目することにより、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

[Satoshi Kitajima](#), Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX2015) (2015. 6. 24), Jeju, Korea

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純  
医療現場への還元に向けた Percellome  
Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的  
バイオマーカー抽出研究  
第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6. 29)

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、  
高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、  
菅野 純  
シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露  
の際の海馬における Percellome 法による吸  
入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解  
析  
第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6. 30)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡  
Percellome Toxicogenomics における動的  
バイオマーカー (Dynamic Biomarker) のカタロ  
グ化とその毒性予測利用  
第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 7. 1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi  
Aisaki, Percellome Toxicogenomics for  
Mechanistic Analysis Towards Chronic  
Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose  
Study, 51st Congress of the European  
Societies of Toxicology (EUROTOX2015)  
(2015. 9. 15), Porto, Portugal

種村健太郎、古川祐介、斉藤洋克、白形芳樹、  
原健士朗、北嶋 聡、菅野 純  
幼若期マウスへのネオニコチノイド系農薬  
投与による神経行動毒性発現  
第 18 回環境ホルモン学会 (2015. 12.)

#### G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

2016年3月2日(水)13:45~16:40  
東京国際フォーラム G604室

平成27年度厚生労働科学研究補助金(化学物質リスク研究事業、H27-化学一般-007)  
発生-発育期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究

分担研究課題名

エストロゲン受容体遺伝子改変マウスの解析、  
遺伝子発現解析と異常基準値の設定

—エストロゲン受容体α置換マウスの脳における  
遺伝子発現プロファイル—  
(行動異常標準マウス脳の遺伝子発現解析)

北嶋 聡

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

平成27年度本分担研究

エストロゲン受容体遺伝子改変マウスの解析、  
遺伝子発現解析と異常基準値の設定

—エストロゲン受容体α置換マウスの脳における  
遺伝子発現プロファイル—

本分担研究の目的

網羅的遺伝子発現変動解析によって  
「情動認知行動異常に至る分子メカニズム」を明らかにする事

↓

•Perclom法による網羅的遺伝子発現変動解析

•本研究では、情動認知行動異常の客観的評価指標の為の基準点として、特徴的な異常を示す遺伝子改変マウス等が位置付けられている

⇒特に、情動認知行動異常等を同定済みである、複数のエストロゲン受容体(ER)関連遺伝子改変マウスに着目

平成27年度本分担研究

網羅的遺伝子発現変動解析:

成熟期の雌性ERαKIマウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)

⇨ 野生型マウスと比較 (採取:午前10時) (各n=4)

⇨ 情動・認知行動解析の結果との比較検討

ERαKIマウス:  
ERα遺伝子座に、ERα cDNAと牛成長ホルモン由来の3'-UTRをつなげたものを、相同組換えにより遺伝子導入し、独自に作製したERα受容体遺伝子置換マウス(野生型マウスとERβ欠失マウスは同腹のものを使用)

ERαKIマウスのホモ型におけるERαの発現は野生型の20~25%  
→ERαKIマウスは、ERαノックダウンマウス

ERαKIマウスは、ERαスプライシングバリエーションがつかれない(理論上)

ERαKIマウスは、音-連想記憶及び空間-連想記憶に障害

ERα遺伝子の発現量は様々な生体反応に影響を及ぼす可能性が高い

ERα遺伝子座の3'-UTRは、  
ERα遺伝子の発現量を調節しているものと考えられる

ERα遺伝子座の3'-UTRを、牛成長ホルモン遺伝子のものに  
置換したマウスを相同組換えにより作製(ERαKI)

Wild type — ERα ORF — ERα 3'-UTR —

ERαKI — ERα ORF — Bovine GH 3'-UTR —

It is well known that male ERαKO mice are infertile, but male ERαKI mice are fertile (Igarashi et al.).

生後のERαKIマウス脳の生化学解析

|                   |       |       |       |       |       |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| W: wild type mice | 1W    | 2W    | 3W    | 12W   |       |
| okl: ERαKI mice   | W_aki | W_aki | W_aki | W_aki | W_aki |

生後の雌性ERαKIマウスのERαの発現は、野生型よりも低い(20~25%) = ERαノックダウンマウス

男性ERαKIマウス(2週齢)において神経軸索の発達および髄鞘形成の遅延が認められる

情動認知行動解析

OF: OF-DIS (distance traveled), OF-C% (stay at center area), OF-N (moving episode)

LD: LD-L-TIME (time spent in light zone), LD-N (number of transition), LD for L (time spent for 1st transit)

EP: EP-DIS (distance traveled), EP-OPEN-TIME (time spent in open arm area), EP-ENT (number of entry in arms)

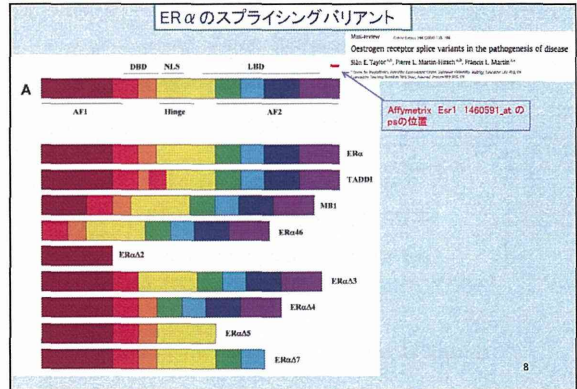
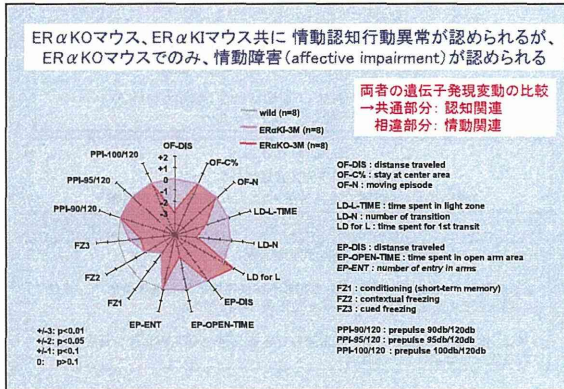
FZ: FZ1 (conditioning (short-term memory)), FZ2 (contextual freezing), FZ3 (cued freezing)

PPI: PPI-100/120, PPI-85/120, PPI-90/120

PPH-90/120: prepulse 90db/120db  
PPH-85/120: prepulse 85db/120db  
PPH-100/120: prepulse 100db/120db

++3: p<0.01  
+2: p<0.05  
+1: p<0.1  
0: p>0.1





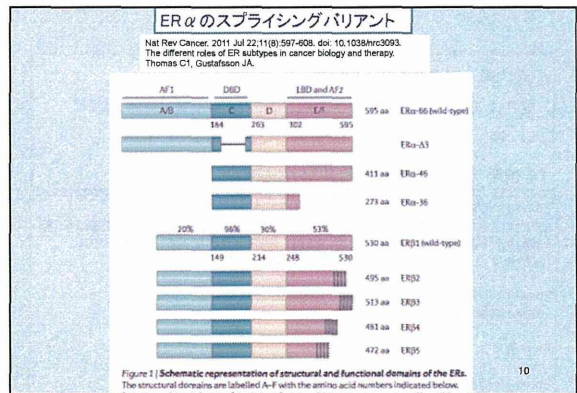
ERαのスプライシングバリエント—発現部位と機能—

総じて dominant-negative のものが多い

Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease  
 Sha E Taylor<sup>1,2</sup>, Pierre L. Maron-Krasniq<sup>1,2</sup>, Haseem L. Masud<sup>1,2</sup>  
 1: Cancer Research UK, Centre for Cancer Cell Reprogramming Studies, Cancer Research UK, London, UK  
 2: Cancer Research UK, Centre for Cancer Cell Reprogramming Studies, Cancer Research UK, London, UK

| ERα variant      | Brain | Testis | Prostate | Colon | Uterus | Small Intestine | Stomach | Esophagus | Bladder | Thyroid | Salivary Gland | Heart | Adipose | Subcutaneous | Other |
|------------------|-------|--------|----------|-------|--------|-----------------|---------|-----------|---------|---------|----------------|-------|---------|--------------|-------|
| ERα              |       |        |          |       |        |                 |         |           |         |         |                |       |         |              |       |
| ERαΔ1            |       |        |          |       |        |                 |         |           |         |         |                |       |         |              |       |
| ERα-46           |       |        |          |       |        |                 |         |           |         |         |                |       |         |              |       |
| ERα-36           |       |        |          |       |        |                 |         |           |         |         |                |       |         |              |       |
| ERα1 (wild-type) |       |        |          |       |        |                 |         |           |         |         |                |       |         |              |       |
| ERα2             |       |        |          |       |        |                 |         |           |         |         |                |       |         |              |       |
| ERα3             |       |        |          |       |        |                 |         |           |         |         |                |       |         |              |       |
| ERα4             |       |        |          |       |        |                 |         |           |         |         |                |       |         |              |       |
| ERα5             |       |        |          |       |        |                 |         |           |         |         |                |       |         |              |       |
| ERα7             |       |        |          |       |        |                 |         |           |         |         |                |       |         |              |       |

スプライシングバリエントができないとERαシグナルが亢進する可能性



先行研究

平成24年度

成熟期の雄性ERα欠失マウスの脳3部位 (大脳皮質、海馬、脳幹) での野生型

- 大脳皮質
  - RARシグナル伝達が低下
  - 神経活動が活性化
  - 概日リズムが乱れる (RAR関連遺伝子、カルウムチャンネル、グルタミン酸受容体、セロトニン受容体、概日リズム関連遺伝子、アンドロゲン受容体、メチルOpg結合タンパク(MBD)関連遺伝子)
- 海馬
  - 野生型と変化なし
- 脳幹
  - 概日リズムが乱れる
  - 神経活動が活性化 (概日リズム関連遺伝子、セロトニン受容体、カルウムチャンネル、グルタミン酸受容体、GABA受容体、アンドロゲン受容体)

