

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部 室長

研究要旨

マウス初代神経幹細胞培養系を神経細胞分化のモデル系として確立するため、マウス神経幹細胞の取得法について検討し、神経幹細胞集団ニューラルボール法（友岡ら、1991年）を採用した。また、エストロゲンレセプターのスプライシングバリエントを検出する RT-PCR 法を確立した。この過程でマウスエストロゲンレセプターにヒトエストロゲンレセプターと同様のスプライシングバリエントが存在することを未報告のもの発見も含めて確認した。このものが、神経細胞の生理的分化、ひいては異常な分化の検出の指標となる可能性についてその足がかりを得た。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の生物影響として最も危惧されている問題は、その生殖及び胎児への影響である。しかし、内分泌かく乱化学物質のヒトに対するこのような影響は、科学的な作用メカニズムが解明されなければ、予想することも困難である。我々は、内分泌かく乱化学物質の影響のうちで、胎生期のある特定の時期にのみエストロゲンに対し高感受性をしめす現象「estrogen window hypothesis」に着目した。神経幹細胞実験系における神経細胞の分化を指標とすることにより、これを「estrogen window hypothesis」のモデル実験系として、発生、分化におけるエストロゲン及び内分泌かく乱化

学物質の影響とその作用機構を明らかにしようとするのが本研究の目的である。

B. 研究方法

高次生命系としての神経系に対する内分泌かく乱化学物質の影響のうち、本研究では胎生期における神経発生と分化に、特に着目した。これは、胎生期の脳は、血液脳関門がまだ未発達の時期にあり、母体経路で容易に内分泌かく乱化学物質の影響を受けることが懸念されているためである。

神経分化のモデル系としては、マウス神経幹細胞培養系を用いた。現在、神経幹細胞取得技術は、徐々に確立されつつある状態であるが、複数の方法が報告さ

れている。そこで、マウス神経幹細胞の取得法について、どれが適当であるか検討した。この中から本研究では、神経管類似の球形の細胞塊いわゆる神経幹細胞集団としてのニューラルボール系について検討した。この系は、単細胞培養のみならず、神経管類似の構築の中での増殖分化が検討できる系として、分化指標に形態変化を用いることが出来る可能性を本研究では重視した。

また、神経発生、分化における内分泌かく乱化学物質の影響の検討として、エストロゲンレセプターの発現、特にそのスプライシングバリエーションに着目した。本研究では、まず、エストロゲンレセプターのスプライシングバリエーションを検出する RT-PCR 法の確立を試みた。最初に、癌研究で知見の多いヒトエストロゲンレセプターバリエーションに対してプライマーの設計、PCR の条件検討を行った。それを基礎として、マウスエストロゲンレセプターのスプライシングバリエーションを検出する RT-PCR 法を検討した。

## C. 研究結果

### 1. 初代神経幹細胞培養系の樹立法の検討

胎生 10.5~11.5 日マウス胎仔の脳組織より得られた細胞は神経幹細胞集団いわゆるニューラルボールと呼ばれるもので、プラスチックシャーレで培養 7 日目には、ニューロン様に分化したものや、グリア細胞様に分化した細胞がみられた。

今回は実験法に関する予備的な実験であり、今後は、分化した細胞が、ニューロン細胞やグリア細胞であるか、特異的マーカーを使って確認する。また、今後神経幹細胞特異的マーカーを用いたセルソーティングにより、神経幹細胞を分離する方法も検討する予定である。

### 2. RT-PCR 法を用いたエストロゲンレセプター検出系の確立

ヒトエストロゲンレセプター $\alpha$ の exon2, exon3, exon4, exon5, exon6, exon7 の各エクソンを個別に検出できる RT-PCR 法を確立した。また、exon2 と exon3 など 2 つのエクソン間での PCR を行い、未知のスプライシングバリエーションが存在するかを検出するための PCR プライマーの設計、及び RT-PCR 条件を検討した。複数のバンドが見られた場合は、ノーザンブロッティングとダイレクトシークエンシングにより、新たなスプライシングバリエーションであることを確認する計画である。

同様な方法で、マウスエストロゲンレセプター $\alpha$ の各エクソンを検出できる RT-PCR 法を確立した。マウス子宮には、エストロゲンレセプターのスプライシングバリエーションが存在することを明らかにした。この結果は、マウスエストロゲンレセプターにヒトエストロゲンレセプターと同様のスプライシングバリエーションが存在することを示している。引き続き、現在、1. マウス子宮、2. マウス脳、3. ニューラルボールについても、

その発現を検討している。手技の若干の改良を含め、今後これらについてさらに詳しく検討していく予定である。

#### D. 考察

内分泌かく乱化学物質に関する研究は、その社会的重要性から、緊急性を帯びた問題として扱われており、内分泌かく乱化学物質のリスク評価においては、現状で速やかに測定可能な標的臓器におけるホルモン受容体への結合、転写活性、増殖活性等の試験が国際的に取り組まれている。しかし、本研究のようなそのメカニズム解明を意図したプロジェクトは少ない。また、本研究でとりあげる、神経形成期における内分泌かく乱化学物質の発生、分化に対する影響への取り組みは、その重要性は認識されているものの、国際的にも国内的にもいくつかのグループがその問題に関する研究を着手しはじめた段階である。

引き続き平成 11 年度は、今年度確立した実験系と検出系を用い、胎生期のマウスに内分泌かく乱化学物質を暴露し、神経発生や分化過程におけるエストロジェンの影響、外来性エストロジェン様物質の影響を解析する。平成 12 年度はそれらのエストロジェン受容体の発現と分子構造に及ぼす影響について検討し、外来性エストロジェン様物質と内因性エストロジェン様物質で作用に相違がないかを明らかにすることを検討していく予定である。

#### E. 結論

マウス初代神経幹細胞培養系を神経細胞分化のモデル系として確立するため、マウス神経幹細胞の取得法について検討し、神経幹細胞集団ニューラルボール法が有効であることが示された。また、エストロジェンレセプターのスプライシングバリエーションを検出する RT-PCR 法の確立し、マウスエストロジェンレセプターにヒトエストロジェンレセプターと同様のスプライシングバリエーションが存在することを示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

菅野 純、相賀 裕美子、井上 達 化学物質の生物毒性試験 -内分泌障害性を中心に- 組織培養工学24 H10年7月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について -生物学的立場から-

有機合成化学協会誌57(1) H11年1月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質の生物影響

ファルマシア35 H11年3月

##### 2. 学会発表

井上達、菅野純 内分泌障害性化学物質 (endocrine disruptors) の検出の為の新しい試み。第14回日本毒性病理学会 H10年2月

菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向。ポリオレフィン等衛生協議会安全性セミナー H10年3月

井上 達、菅野 純 内分泌攪乱物質とは何か。内分泌攪乱物質をめぐる生活と食の安全についての国際シンポジウム H10年6月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から- 第169回有機合成化学協会懇談会 H10年7月

井上 達、菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向 ポリ衛協会報 3 H10年8月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 平成10年度化工誌ニュース委員会第1回研究会 H10年10月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から-学術情報センター軽井沢公開ワークショップ パネルディスカッション H10年10月

宮城恵理、松島裕子、平林容子、井上 達、菅野 純 内分泌かく乱化学物質 (Xenoestrogen)高感度検出系としての卵巣摘出マウスのエストロゲン反応性の経時変化 第15回日本疾患モデル学会 H10年11月

菅野 純 動物の生態と内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) について パネルディスカッション 第25回環境保全・公害防止研究発表会 H10年11月

菅野 純、Kyung-Sun Kang、武木田薫、宮城恵理、斉藤 実、松島裕子、山本雅也、平林容子、金子豊蔵、井上 達 内分泌かく乱化学物質におけるin vitro試験系のin vivo 試験に対する代替性 第12回日本動物実験代替法学会 H10年11月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について 第9回安科研学術講演会 H10年12月

菅野 純、山本雅也、松島裕子、西岡暢彦、宮城恵理、Byung-Il Yoon 内分泌かく乱物質の短期in vivo試験系について 日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究会 H10年12月

小野 敦、山本雅也、高木敦也、菅野 純、井上 達 Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs) (Celebrating the 10th Anniversary of the AACR Special Conferences in Cancer Research) H11年1月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 第26回建築物環境衛生管理全国大会 H11年1月