

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

高次生命系に対する内分泌かく乱化学物質の影響をみる一環として、神経系に着目する際にもっとも重要な視点は 2 つある。1. もっとも未成熟な神経細胞である神経幹細胞への影響、2. 生物学的関連性のはっきりした現象として捉えられる Window 効果、低用量問題などの神経影響である。研究の性格上、前者で基礎的な研究法を立ち上げ、後者において生物学的に重要な変化をみる。さらに軸として、エストロゲンレセプター $\alpha$ 、 $\beta$ の発現についてみると、双方は発生・分化の段階でそれぞれ異なった発現、特異な役割が知られている。そこで、それらの過程でのエストロゲンレセプタースプライシングバリエーションの発現に着目し、さしあたりのツールとしてエクソン全長の RT-PCR-Southern Blotting 法と各エクソン個別のプライマーの構築を進めている。

A. 研究目的

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焦点を絞った。これは、胎生期において、内分泌かく乱化学物質の影響が不可逆的であることが懸念されていること、また、この時期の血液脳関門が未発達であるため母体経由で容易に内分泌かく乱化学物質の影響を受けることが危惧され点に基づいている。

高次生命系に対する内分泌かく乱化学物質の影響をみる一環として、神経系に着目する際にもっとも重要な視点は 2

つある。1. もっとも未成熟な神経細胞である神経幹細胞への影響、2. 生物学的関連性のはっきりした現象として捉えられる Window 効果、低用量問題などの神経影響である。研究の性格上、前者で基礎的な研究法を立ち上げ、後者において生物学的に重要な変化をみる。さらに軸として、エストロゲンレセプター $\alpha$ 、 $\beta$ の発現についてみると、双方は発生・分化の段階でそれぞれ異なった発現、特異な役割が知られているので、それらのスプライシングバリエーションに着目して、さしあたりのツールとしてエクソン全長の RT-PCR と各エクソン個別のプライマー

の構築を進めている。

このようにして、高次生命系としての神経系の細胞分化に対するエストロジェン受容体の発現と機能修飾の分子機構を解析し、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する。

## B. 研究方法

### 1. 初代神経幹細胞培養系を用いた内分泌かく乱化学物質の影響の検討

マウス初代神経幹細胞培養系を確立するため、準備段階として、脳の実験の分野において技術的に進んでいるラットを用いた培養法の検討を行った。Wistar 系妊娠 (13, 15, 17 日目) ラットの胎児の脳新皮質の初代培養を行い、分化マーカーによる免疫染色及び RT-PCR 法によるエストロジェンレセプター $\alpha$  および  $\beta$  の発現を検討した。

### 2. RT-PCR 法を用いたエストロジェンレセプター検出系の確立

マウスエストロジェンレセプターのサブライシングバリエーションの構成を検討するため、エクソン全長の PCR 法として、マウスのエストロジェンレセプター $\alpha$  について、エクソン 1 末端とエクソン 8 最上流部のプライマーを用いた PCR を行い、その泳動産物を膜にトランスファーし、エクソン 2 からエクソン 7 を含むプローブを用いて、サザンブロッティングを行っ

た。

また、将来の個々エクソン解析のためのツールとして、欠損が予想されるエクソン 2 から 7 について、個別に del 2、del 3、del 4、del 5、del 6、del 7 の PCR プライマーセットを作製し、シーケンシングと組み合わせ、サブライシングバリエーションの存在を検討した。

## C. 研究結果

### 1. 初代神経幹細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響の検討

胎生 13, 15, 17 日目のそれぞれの脳新皮質の初代培養を行い、神経幹細胞のマーカーである nestin とニューロンのマーカーである MAP-2、グリア細胞のマーカーである GFAP の抗体を用い免疫染色を行った。各ステージにおける陽性細胞のポピュレーションは、培養初日では、MAP-2 陽性細胞は胎生 13 日では 26%、15 日では 31%、17 日では 48% と増加が見られ、この時期のニューロンへの分化が盛んに起きていることが観察された (図 1)。また、RT-PCR 法によると胎生 15 日及び 17 日目の脳皮質初代培養細胞にはエストロジェンレセプター $\alpha$  および  $\beta$  の発現が検出された (図 2)。現在この実験系のマウスでの検討及び、内分泌かく乱化学物質添加の影響を検討している。

## 2. RT-PCR 法を用いたエストロジェンレセプター検出系の確立

生後 40 日齢の雌マウス大脳、海馬、視床下部、小脳について、エクソン 1 からエクソン 8 のプライマーで RT-PCR 反応を行い、得られた産物に対するエクソン 2 からエクソン 7 のプローブによるサザンブロッティング法で解析した結果、ワイルドタイプの全長バンド以外に、スプライシングバリエーションと思われる複数のバンドを検出した (図 3)。

個別のエクソン欠損スプライシングバリエーション PCR プライマーにより得られた産物は、予想されるマウスエストロジェンレセプター  $\alpha$  (del 2, del 3, del 4, del 5) 及びマウスエストロジェンレセプター  $\beta$  (del 3, del 4, del 5, del 6, del 7) であることをシーケンシングにより確認した。この系を用いて、C57BL/6 雌マウスの生後 40 日齢の大脳、海馬、視床下部、小脳及び胎生 17 日の雌胎児の大脳、中脳、小脳における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の発現を検討したところ、各部位において、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が存在することを明らかにし得た (図 4, 5)。

### D. 考察

今後、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の発現検出系としての long PCR-Southern 法を expression アレイとして用い、内分泌かく乱化学物質に関する研究において重要と思われる諸問題、すなわち window 問題、低用量問題などに適用して、今後の研究の焦点を定めていく。現在、胎生期のマウスに DES を暴露した胎児脳を用いて、アレイ系が、薬物に対する評価系となるかを検討しつつある。本研究では、神経幹細胞の分化過程におけるエストロジェン様作用物質の影響の検討と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の発現変化の検索を平行して押し進めている。今後の見通しとして、両者を比較しながら決定的な焦点を定めた後、long PCR-Southern 法で重要であると絞り込んだバンド群について発現遺伝子を同定していく。また、必要に応じて cDNA アレイによる発現遺伝子変化などの研究とも組み合わせてゆく。

### E. 結論

ラット大脳新皮質の初代培養を行い、神経幹細胞のマーカーである nestin とニューロンのマーカーである MAP-2、グリア細胞のマーカーである GFAP の抗体を用い免疫染色を行った。また、RT-PCR 法により胎生 15 日及び 17 日の大脳皮質初代培養細胞にエストロジェンレセプ

ター $\alpha$ および $\beta$ の発現を検出した。

マウスエストロゲンレセプター $\alpha$ のスプライシングバリエーションの検出系として、マウス成獣脳の各部位から得られた total RNA についてエクソン 1 からエクソン 8 のプライマーで RT-PCR 反応を行い、得られた泳動産物に対するエクソン 2 からエクソン 7 のプローブによるサザンブロッティングでスプライシングバリエーションと思われる複数のバンドを検出した。また、マウスエストロゲンレセプター $\alpha$ 及び $\beta$ の各エクソンの発現を個別に検出する PCR 法を確立し、成獣及び胎生期のマウス脳の各部位において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示した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

菅野 純 内分泌攪乱のメカニズムを考慮した生物試験 医学のあゆみ 190(7-8):751-752, 1999

### 2. 学会発表

1) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Conformational changes on ER $\alpha$  induced by endocrine disrupting chemicals (EDCs). Keystone symposia, 2000

2) 佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上 達 : Pentachlorophenol の肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連 : 第 58 回日本癌学会総総会、広島(平成 11 年 9 月 29 日~10 月 1 日)

3) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Mechanism based high through put screening method for endocrine disrupting chemicals (EDCs) using bio-sensor. 2<sup>nd</sup> European Workshop 99 International Molecular Toxicology 1999

4) 松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井上達、卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン枯渇期間と子宮肥大反応の関係について、日本内分泌攪乱化学物質学会第 2 回研究発表会 1999

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

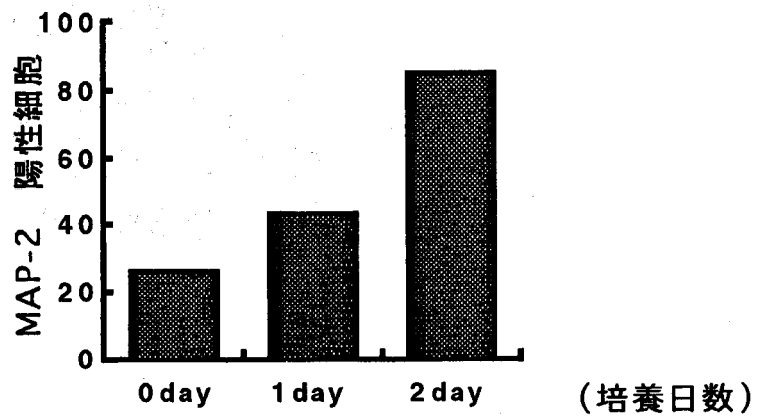
なし

### 3. その他

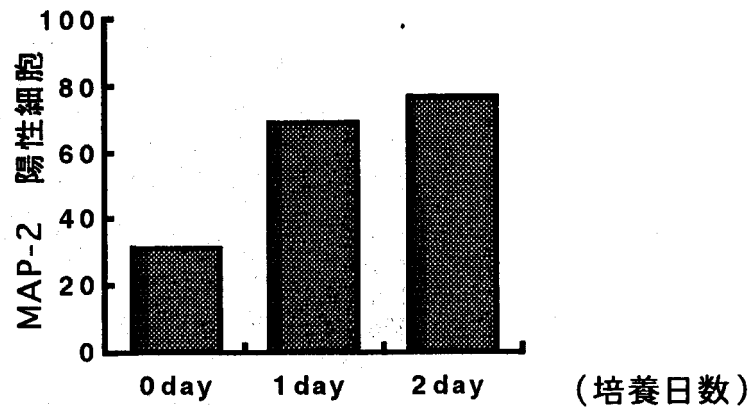
なし

図1 ラット大脳新皮質初代培養系におけるニューロン細胞の割合

E 13



E 15



E 17

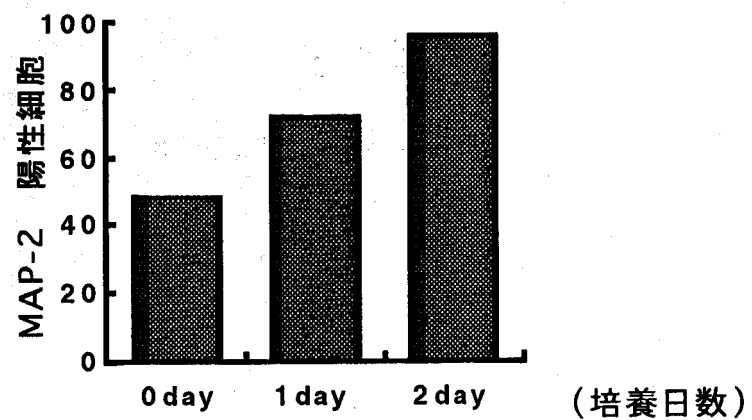
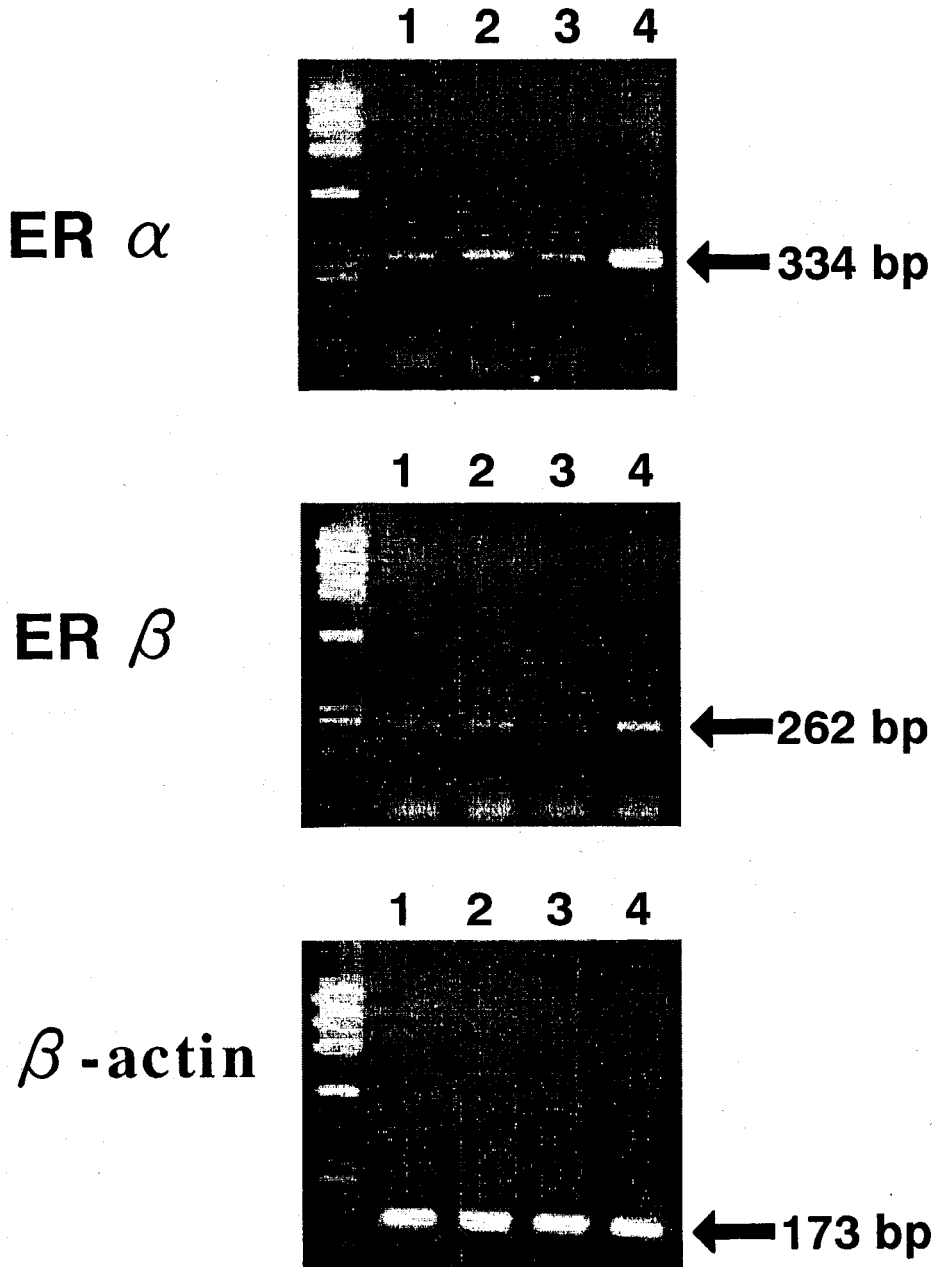


図2

RT-PCR法によるラット大脳新皮質初代培養細胞  
におけるエストロゲンレセプターの発現の検出



Lane 1. cortex (adult female rat)  
Lane 2. E15 neocortex  
Lane 3. E17 neocortex  
Lane 4. ovary (adult female rat )

図3 C57BL/6マウス 40日齢の脳におけるmER  $\alpha$   
 スプライシングバリエアントの発現 (薬物未投与基礎データ)

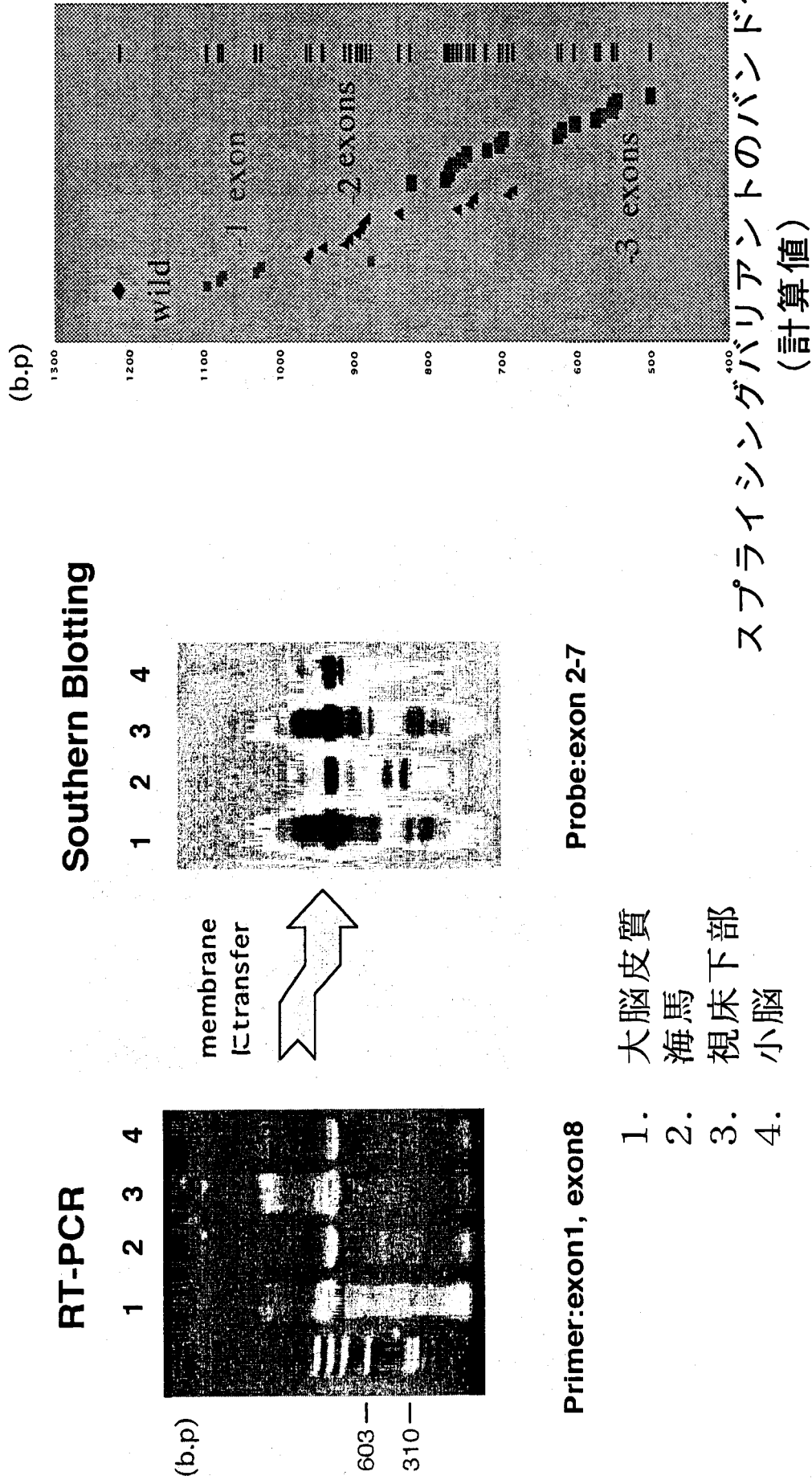
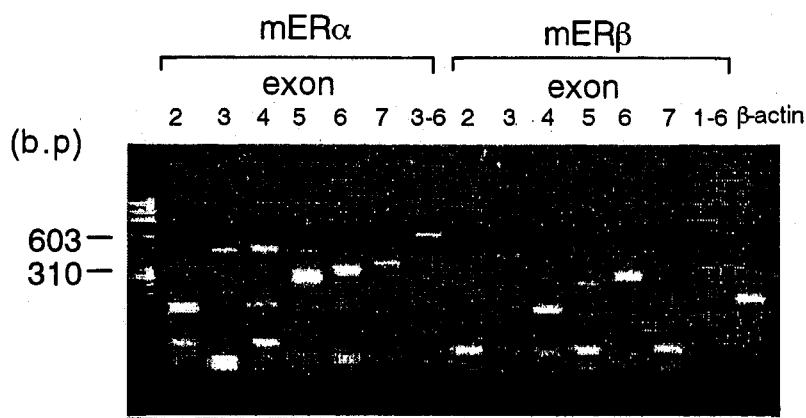


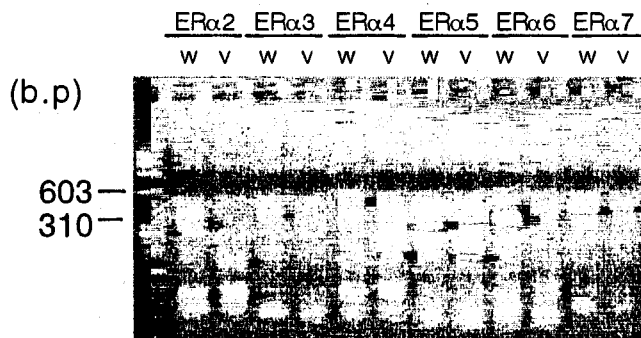
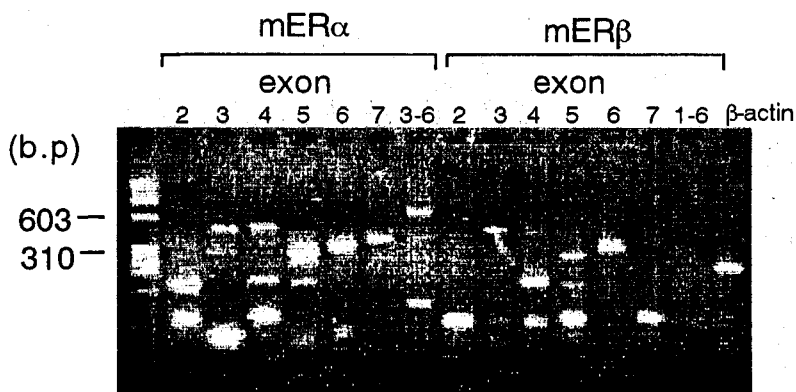
図4

RT-PCR法によるマウス脳（40日齢）の  
エストロゲンレセプターの発現の解析-1-

大脳



海馬

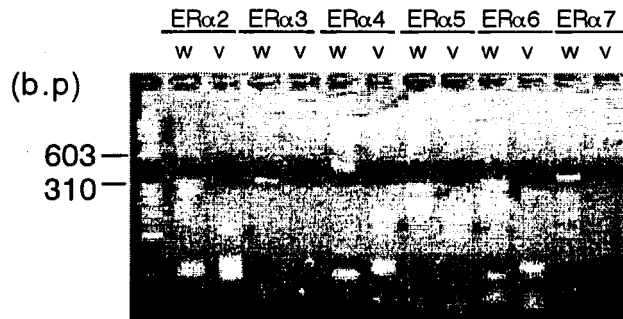
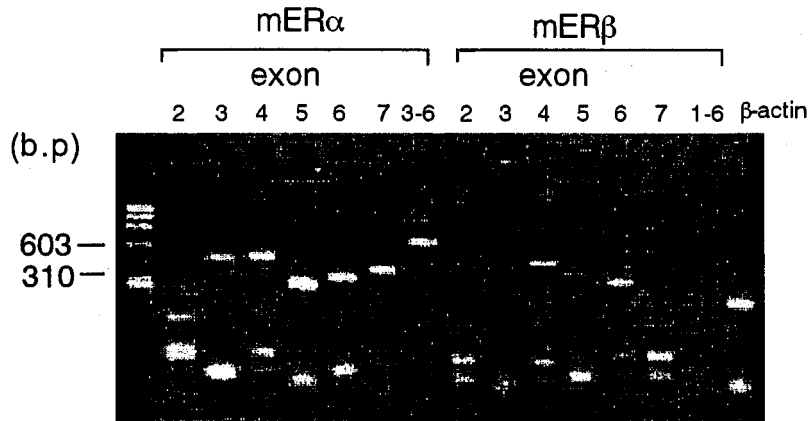


w:wild estrogen receptor,  
v:splicing variant estrogen receptor

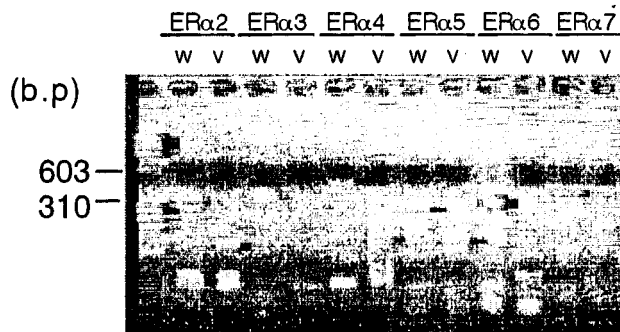
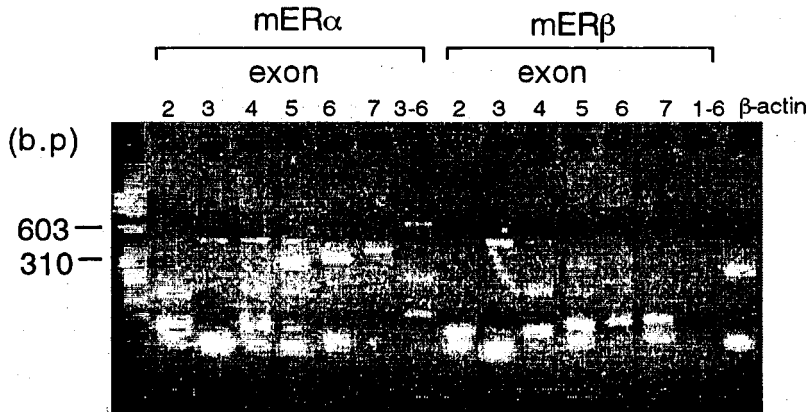


**図5**  
**RT-PCR法によるマウス脳（40日齢）の**  
**エストロゲンレセプターの発現の解析-2-**

**視床下部**



**小脳**



w:wild estrogen receptor,  
v:splicing variant estrogen receptor