

周産期曝露による影響の病理学的および分子生物学的解析

分担研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

研究要旨： 内分泌かく乱化学物質(EDCs)の発達期中枢神経系障害に関する研究課題について、周産期曝露による影響の病理形態学的及び分子生物学的解析手法を用いた *in vivo* 評価に関する研究を開始した。その評価は脳の性分化の臨界時期、および生殖活動が可能となる性成熟後の時期の2時点での解析が重要と考えられる。今年度は初年度にあたり、脳の性分化の臨界時期(新生児期)における影響に関して、視床下部に発現が予想される遺伝子の発現レベルの変動を指標として、エストロゲン化合物を用いての評価系の確立を中心に研究を進めた。

多数の組織材料について解剖学的に特定される細胞領域での遺伝子発現解析を行うためには、パラフィン包埋切片を利用するのが理想的なため、そのための基礎的検討としてパラフィン包埋しても定量的な解析が可能な品質を保ったRNAないし蛋白質を回収できる組織固定法の確立を図り、メタカーン固定法がRNA、蛋白質双方の解析に優れていることを見出した。

脳の性分化臨界時期の遺伝子発現評価系の実験方法として、ラット脳の性分化がほぼ完成する時期にあたる生後9日目(P9)に視床下部を採取し、メタカーン固定、パラフィン包埋切片を作製し、脳室周囲に存在し性的に分化することが知られている神経核(性的二型核)をレーザー光を利用した *microdissection* 法により顕微鏡下で取り出した。その部位由来のRNAを鋳型としたRT-PCRにより、プロモーター領域にエストロゲンに反応する *estrogen response element (ERE)* を有するいくつかの候補遺伝子 (*bcl-x*, *GABA transporter I*, *oxytocin*, *progesterone receptor*, *neurotensin/neuromedin N*, *GFAP*) の mRNA 発現の有無を検索した。その結果、これらの全ての遺伝子が性的二型核で発現していることを確認した。次いで、定量的なRT-PCRに向けての予備的な検討として、エストロゲン化合物を曝露した動物と無処置対照動物との間で、RT-PCRの実験条件の整備を図った。用いた材料は、*ethinylestradiol (EE)* の母体に対する最大耐量(0.5 ppm 混餌投与)を胎生期から新生児期にあたるE15~P9の間、経胎盤的・経乳的に曝露した新生ラット(P9)の視床下部とした。この予備的な検討の結果、最大耐量のEE曝露を受けた雌雄の新生児とも、P9の時点ではその神経核における形態学的変化は見られなかったが、雄の新生児においてEREを有する幾つかの遺伝子の発現低下が認められた。

この実験系は最終的には低用量域曝露のリスク評価に用いることから、更に高感度な検索法の確立が望まれる。感度をあげるための方法として、微量組織でのより確実な定量化を実現するためにPCR産物を電気泳動したバンドの濃さの定量ではなく、*plate hybridization* による高感度な定量法を組み合わせた *competitive RT-PCR* 法を開発し、この実験系への応用を現在進めている。予備的な検討の結果、無処置雄P9の性的二型核における *GABA transporter I* の mRNA 数は1340コピー/ng total RNAであった。

A. 研究目的

近年、我々の環境中に数多くの内分泌かく乱化学物質(EDCs)が見いだされ、生殖機能を含むそれらのヒトへの影響が世界的に懸念されるようになってきた。EDCsの生体への作用機構としてエストロゲン受容体(ER)を介した機

序が考えられており、その極低用量曝露によっても生体に不可逆的影響を及ぼすことが指摘されている。中枢神経系においても、胎生期より視床下部・辺縁系を中心としてERを含む性ホルモン受容体が分布しており、当然、その一部を構成する生殖機能中枢も影響を受ける可

能性が高い。特にホルモン依存的に脳の性分化を果たす周産期において EDC の曝露を受けてそれが中枢神経系内に入り込んで作用した場合、脳の正常な性分化が障害され、生後の個体の内分泌機能を含む種々の機能が影響を受ける可能性がある。本研究は、個体レベルでの脳の性分化完了時期と性成熟後の時期での評価系を用いることにより、EDCs の神経中枢への影響の本態を明らかにすることを目標とする。また、用量依存性の生物学的な作用強度を求めることにより、EDCs の低用量域での生体影響を総合的に評価することが可能となる。

最近、脳の性分化を果たす時期に過剰のエストロゲン化合物を投与すると、視床下部ニューロンのアポトーシスと生殖器に障害を起こすことが報告されている。また、ビスフェノール A の胎生期曝露により、脳内アストロサイトの細胞骨格蛋白である GFAP の遺伝子発現が、低用量から用量依存性に増加するとの報告もある。GFAP 遺伝子はそのプロモーター領域にエストロゲンに反応する配列(ERE)を持ち、個体のエストロゲンレベルに呼応してその発現の増減することが知られている。従って、発達期での EDCs 曝露により、内分泌機能の神経中枢になんらかの障害を及ぼす可能性がある。

この研究では、脳の性分化の臨界時期(新生児期)における影響を評価するために、ERE を持ち、視床下部に発現が予想される遺伝子の視床下部での発現解析を行う。それには新たに確立したパラフィン包埋切片の微量組織から遺伝子発現を定量的に検出する系と、顕微鏡下で特定の細胞をレーザー光を利用して採取する方法を組み合わせる検索を行う。そして、遺伝子発現の解析結果と性成熟後の生殖器障害の程度との関連性を比較・評価する。今年度は初年度にあたり、脳の性分化の臨界時期での遺伝子発現の変動を指標として、その評価系の確立を中心目標とした。

## B. 研究方法

まず、パラフィン包埋した組織切片上の微小領域での定量的な遺伝子発現解析を行うために、

解析可能な生体高分子を得るための組織固定法の検討を行った。正常ラットないしマウスの組織または培養 PC12 細胞のメタカーン固定・パラフィン包埋材料を脱パラフィン後、total RNA または蛋白質の抽出を行い、単位面積当たりのそれぞれの抽出量及び RT-PCR と Western blotting による RNA と蛋白質の発現解析についての妥当性の検討を行った。

遺伝子発現評価系の実験方法として、ラット脳の性分化がほぼ完成する時期にあたる生後 9 日目に視床下部を採取し、メタカーン固定、パラフィン包埋切片を作製し、脳室周囲に存在し性的に分化することが知られている神経核(性的二型核)を microdissection 法により顕微鏡下で取り出した。その部位由来の RNA を鋳型とした RT-PCR により、プロモーター領域にエストロゲンに反応する estrogen response element (ERE)を有するいくつかの候補遺伝子(bcl-x, GABA transporter I, oxytocin, GFAP, neurotensin/neuromedin N, progesterone receptor) の mRNA 発現のパターンを検索した。用いた材料は、妊娠ラットを用いてエストロゲン作用の陽性対照である ethinylestradiol (EE)の母体に対する最大耐量(0.5 ppm 混餌投与)を胎生期から新生児期にあたる E15~P9 の間、経胎盤的・経乳的に曝露した動物(P9)の視床下部とした(図 1)。定量的な RT-PCR に向けての予備的な検討として、処置動物と無処置対照動物との間で、RT-PCR の実験条件の整備を図った。そのためにも、各候補遺伝子につき、視床下部を用いた定量的 RT-PCR に必要な条件設定(RNA 量、プライマーの選択、定量に最適なサイクル数、各温度の時間、アニールの温度)などを行った。

## C. 研究結果

メタカーン固定し脱パラフィンした 10  $\mu\text{m}$  厚のラット肝組織薄切片から、多くの遺伝子について定量的な RT-PCR を適用できる量の total RNA が抽出された( $52 \pm 15 \text{ ng/mm}^2$ )。また、抽出された total RNA のクオリティーは固定・包埋の影響を受けず(図 2)、RNA 収量とそ

の中への DNA の混入の程度をいくつかの固定液で比較した結果、メタカーンが総合的に優れていた (表 1)。固定・包埋材料を用いた場合、一般的に抽出された total RNA への genomic DNA の混入は避けられないが、目的とする個々の遺伝子について RT 反応に用いる total RNA 量と、引き続く PCR のサイクル数を最適化することにより、標的遺伝子の転写産物に由来するテンプレートの選択的な増幅が可能となった (図 3)。この 2 段階のバリデーションにより、臓器ないし性特異的な発現が知られている HGF receptor,  $\alpha 2u$ -globulin 等の遺伝子の検出が可能となり、比較的大きな RNA 分子 (2kb) や、発現量の非常に少ない RNA の検出も可能であった。メタカーン固定後の切片を cresyl violet によって染色した場合でも、抽出された total RNA を用いた RT-PCR に影響を与えず、laser capture microdissection により取り出された微量組織からの RT-PCR も可能であった (図 4)。また、SDS バッファー存在下で超音波処理することにより、切片からの蛋白質抽出 ( $4.9 \pm 2.1$  mg/mm<sup>2</sup>, 10  $\mu$ m 厚のラット肝組織) と、それを用いた Western blotting による cathepsin D, CYP2E1,  $\alpha 2u$ -globulin, EGFR 等の検索した全ての蛋白質の定量的発現解析が可能となった。また、蛋白質の抽出効率も、アセトンに次いで優れていた (表 2)。

次に、生後 9 日 (P9) の無処置新生雄ラットの脳をメタカーン固定・パラフィン包埋し、その視床下部の内側視束前野に存在する性的二型核を microdissection により取り出し、ERE を有する bcl-x, GABA transporter I, oxytocin, progesterone receptor, neurotensin/neuromedin N, GFAP 等の 6 遺伝子につき RT-PCR を行ったところ、これら全ての mRNA の発現が確認された。

予備的な検討の結果、最大耐量の EE 曝露を受けた雌雄の新生児とも、P9 の時点ではその神経核における形態学的変化は見られなかったが、雄の新生児において ERE を有する幾つかの遺伝子発現低下が認められた (図 5, 6)。微量組織での高感度で、より確実な RNA の発現量の定量化を実現するために、PCR 産物を電

気泳動したバンドの濃さではなく、capture oligo による plate hybridization 法を組み合わせた competitive RT-PCR 法を開発し、この実験系への応用を現在進めている。予備的な検討の結果、無処置雄 P9 の内側視束前野の二型核における GABA transporter I の mRNA の数は 1340 コピー/ng total RNA であった。

#### D. 考察

予備的な検討結果から、EE の最大耐量 (0.5 ppm) の周産期曝露により、雄の新生児の性的二型核で、形態学的な差を認めなかったものの、エストロゲンに反応する遺伝子の発現量の低下を認めている。このことは、この神経核神経細胞の将来的なアポトーシス誘導を示唆するのか、あるいは単純に形態学では判別できない細胞機能の変化を示唆するのかは定かではない。現在、性成熟後の動物の病理組織学的検索を進めているが、0.5 ppm EE を周産期に曝露を受けた動物では、精上皮の脱落による精細管萎縮、卵巣低形成、副腎皮質の限局性過形成等、生殖器を含む内分泌器官の傷害が極く軽度であるが認められている。また、性成熟後の視床下部の変化の検索には、HE 標本では神経核構造の全体を特定しにくいこともあり、ER 等の分子指標の導入を検討している。

脳の性分化が完了する時期での視床下部における遺伝子発現解析は最終的には低用量域曝露のリスク評価に用いることから、更に高感度な検索法の確立が望まれる。感度をあげ、微量組織でのより確実な定量化を実現するために PCR 産物を電気泳動したバンドの濃さではなく、capture oligo を用いた competitive RT-PCR 法を開発し、現在、GABA transporter I, GFAP, bcl-x の各遺伝子に対する定量キットの作製を完了した。これから、順次 EE による発現の用量反応性の検討を行う予定であるが、そのための EE の周産期曝露実験 (0.5, 0.1, 0.02 ppm) は終了している。この研究の過程で確立したメタカーン固定・パラフィン包埋材料を用いた遺伝子発現解析法は、レーザー光による microdissection 法と新たに開発した高感度 competitive RT-PCR 法を組み合わせることに

より、組織中の限られた細胞領域での、複数の遺伝子発現解析が可能となる極めて画期的な方法である。

G. 知的所有権の取得状況  
特になし。

## E. 結論

今年度の研究により、パラフィン包埋切片を用いた組織中の特定領域での遺伝子発現解析を可能とする組織固定法を確立することができた。また、この成果を基に、脳の性分化完了時期での視床下部の特定神経核における遺伝子発現評価系の基礎的実験条件の検討を終了し、予備的な検討の結果、最大耐量のEE曝露を受けた雄の新生児においてEREを有する幾つかの遺伝子の発現低下を確認した。現在、高感度competitive RT-PCR法を用いての定量的解析を進めている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Shibutani, M., Uneyama, C., Miyazaki, K., Toyoda, K., Hirose, M.: Methacarn fixation, a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. Lab. Invest. 80: 199-208 (2000)

### 2. 学会発表

畝山智香子, 渋谷淳, 豊田和弘, 田村 啓, 広瀬雅雄: メタカーン固定・パラフィン包埋切片からのRNA及び蛋白質の発現レベル解析 予備的検討, 第58回日本癌学会総会, 広島, 第58回日本癌学会総会記事: P486 (1510), 9-10月, 1999

渋谷淳, 畝山智香子, 宮崎恵子, 田村 啓, 豊田和弘, 広瀬雅雄: メタカーン固定法: パラフィン包埋切片における遺伝子発現レベル解析への応用, 第128回日本獣医学会学術集会, 128回日本獣医学会学術集会講演要旨集: P131, 10月, 1999

☒ 1

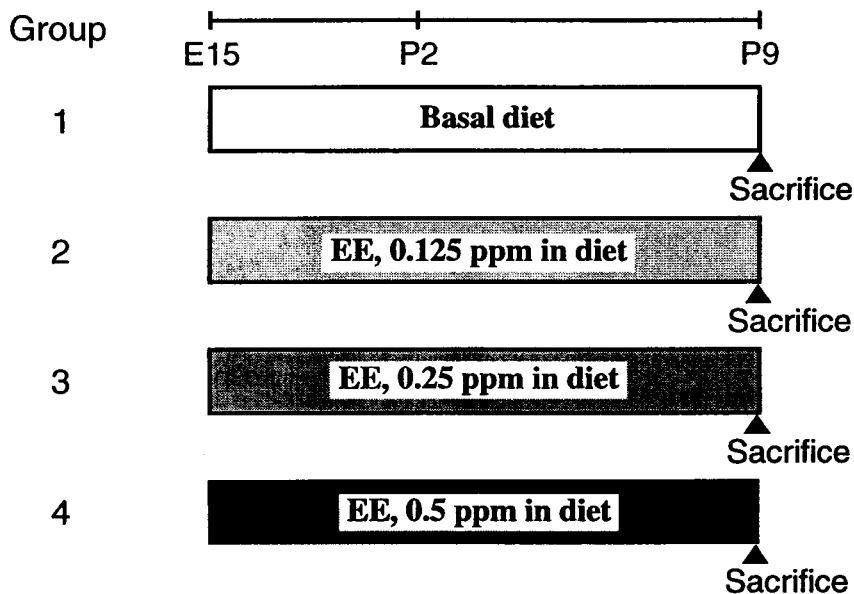
# Effect of perinatally exposed estrogen-agonists on sexually dimorphic nucleus of hypothalamus.

- A preliminary study to estimate maximum tolerable dose -

Animals: Sprague-Dawley (IGS) rats, pregnant

Parameters to be analysed:

P9: Hypothalamus fixed with Methacarn solution  
(RT-PCR: gene expression analysis)



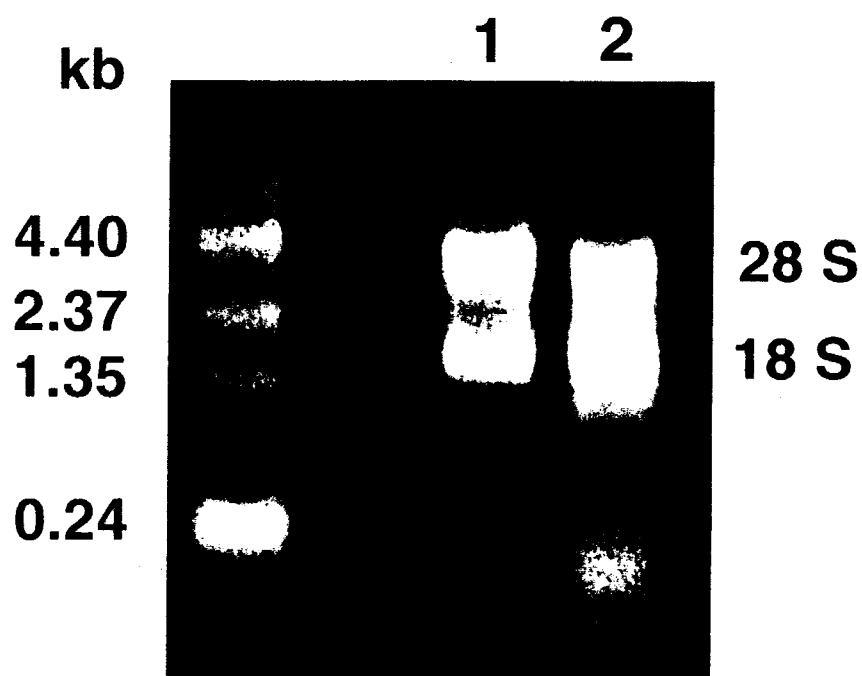
Abbreviations: EE: Ethinyl estradiol; EB: Estradiol benzoate

E0: The day when a vaginal plug is found

P1: The day when a rat gives birth

EB is dissolved in sesame oil (100 µg/ml)

図 2 メタカン固定・パラフィン包埋した PC12 細胞から抽出した total RNA のクオリティー



1. 未処置 PC12
2. メタカン固定・パラフィン包埋した PC12

図 3 RNA template 特異的な PCR 反応条件の決定  
- HGFR signal の場合 -  
(RT 反応に用いる total RNA 量の最適化)

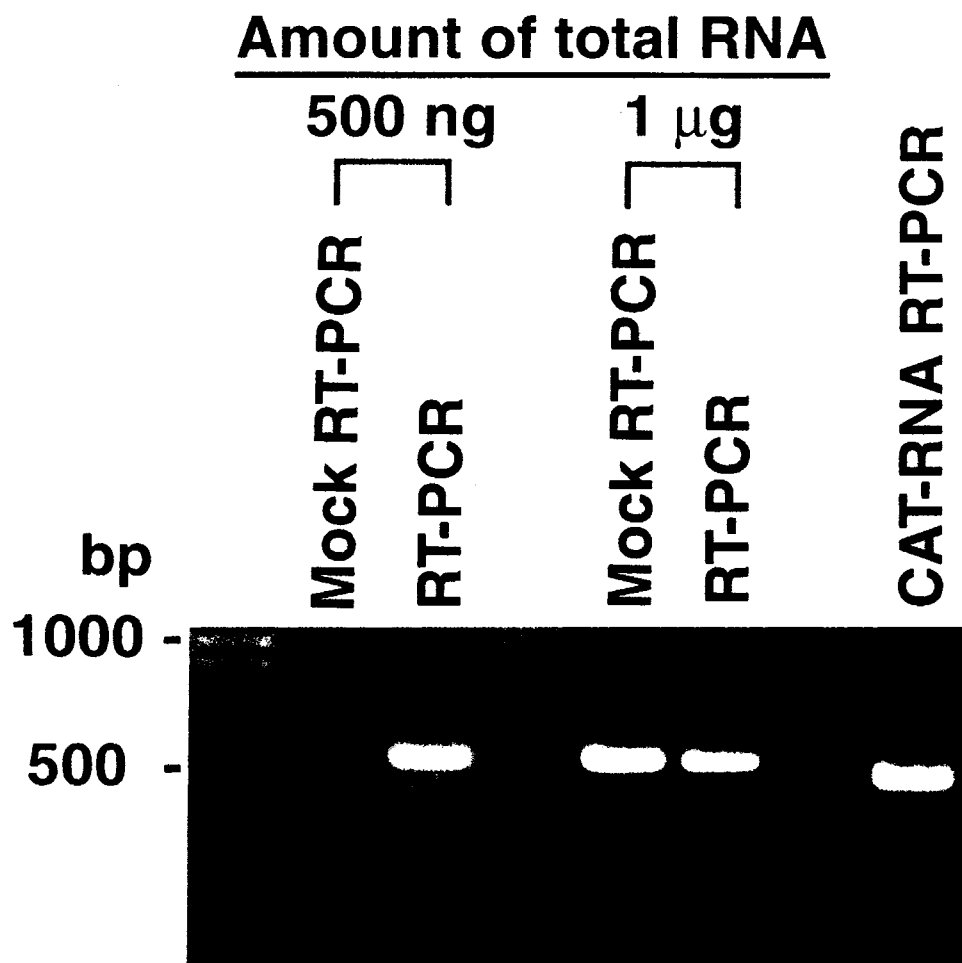
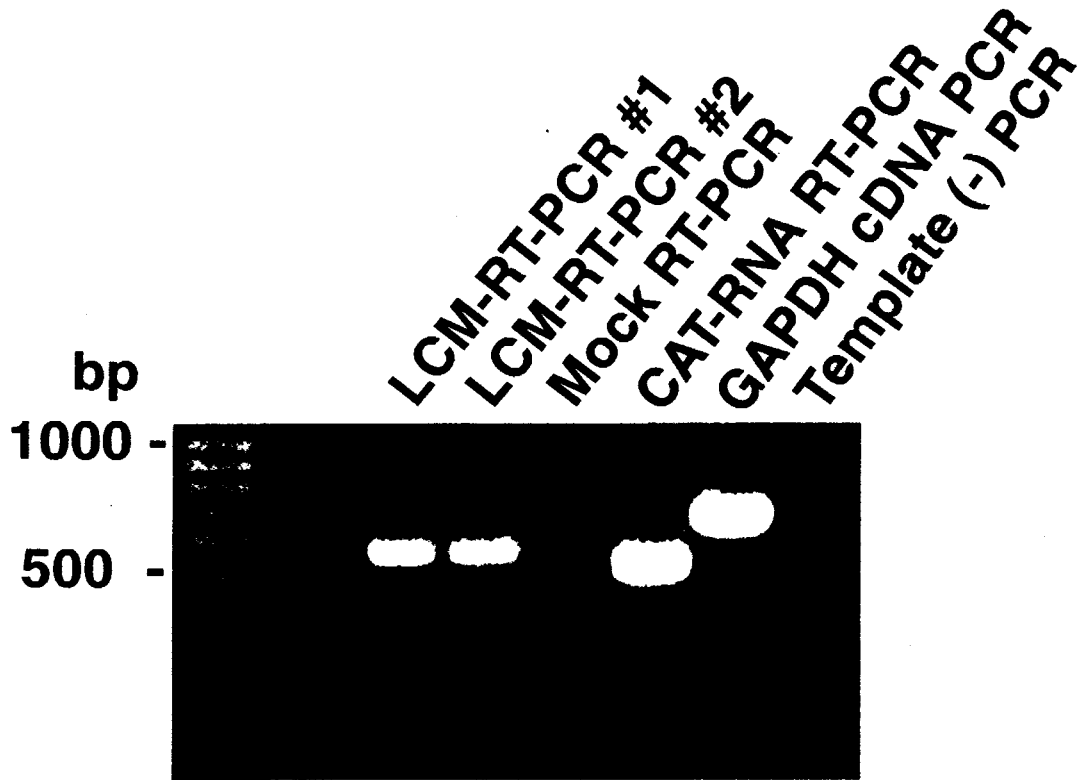


図 4 Laser Capture Microdissection により  
採取した肝組織からの HGFR-RT-PCR



# 1: 46 ng total RNA

# 2: 15 ng total RNA



図 5 視床下部の性的二型核における RT-PCR 解析  
- 予備的検討 (1) -

## GABAT

Cont EE 0.125 EE 0.25 EE 0.5  
27 29 31 27 29 31 27 29 31 27 29 31



## Oxytocin

Cont EE 0.125 EE 0.25 EE 0.5  
31 33 35 31 33 35 31 33 35 31 33 35



## Progesterone receptor

Cont EE 0.125 EE 0.25 EE 0.5  
29 31 33 29 31 33 29 31 33 29 31 33



注：数字は PCR サイクル数を表す  
EE: Ethinylestradiol 投与群

図 6 視床下部の性的二型核における RT-PCR 解析  
- 予備的検討 (2) -

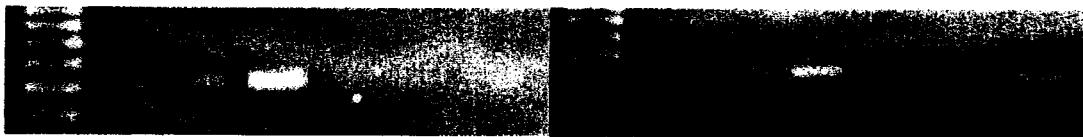
# Neurotensin/Neurmedin N

Cont EE 0.125 EE 0.25 EE 0.5  
31 33 35 31 33 35 31 33 35 31 33 35



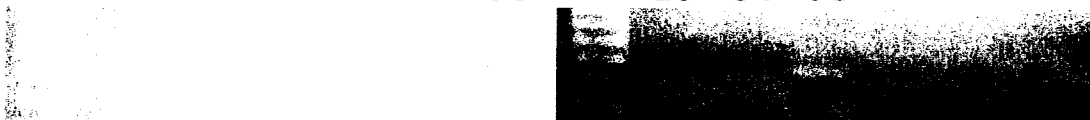
# GFAP

Cont EE 0.125 EE 0.25 EE 0.5  
29 31 33 29 31 33 29 31 33 29 31 33



# Bcl-x

Cont EE 0.125 EE 0.25 EE 0.5  
29 31 33 29 31 33 29 31 33 29 31 33



注：数字は PCR サイクル数を表す  
EE: Ethinylestradiol 投与群

表 1

**RNA-yields and concentrations of contaminating DNA of the RNA preparation extracted from rat liver PETs**

Fixative	No. of sample	RNA yield ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ wet tissue)	DNA contamination ( $\text{ng}/\text{mg}$ wet tissue)
Unfixed frozen	6	$1.55 \pm 0.38$ †	$5.85 \pm 1.31$
Methacarn	5	$0.74 \pm 0.11$ *	$0.78 \pm 0.20$ *
Acetone	5	$0.82 \pm 0.13$ *	$5.55 \pm 2.29$ †
Paraformaldehyde	5	$0.16 \pm 0.17$ *,†	$1.12 \pm 0.55$ *
Buffered formalin	5	$0.30 \pm 0.21$ *,†	$0.75 \pm 0.51$ *
Ufix	5	$0.05 \pm 0.10$ *,†	$0.32 \pm 0.45$ *
Bouin's solution	5	$0.14 \pm 0.14$ *,†	$1.88 \pm 0.91$ *

\* Significantly different from unfixed frozen sample ( $P < 0.0001$ ).

† Significantly different from Methacarn-fixed sample ( $P < 0.005$ ).

表 2

**Protein yields from rat liver PETs**

Fixative	No. of sample	Yield of protein ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ wet tissue)
Unfixed frozen	4	$179 \pm 21$
Methacarn	5	$137 \pm 26$
Acetone	5	$175 \pm 41$
Paraformaldehyde	5	$19 \pm 4$ *,†
Buffered formalin	5	$23 \pm 5$ *,†
Ufix	5	$21 \pm 5$ *,†
Bouin's solution	5	$111 \pm 75$

\* Significantly different from unfixed frozen sample ( $P < 0.0001$ ).

† Significantly different from Methacarn-fixed sample ( $P < 0.0001$ ).