

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07132

研究課題名(和文)生殖機能中枢に対する性ホルモン様環境化学物質の作用機構

研究課題名(英文)Effects of endocrine disruptors on the HPG axis of neonatal mice

研究代表者

佐藤 友美 (Sato, Tomomi)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・教授

研究者番号：40295506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス視床下部における新生仔期の性ホルモン投与の作用メカニズムを理解するために、出生直後に合成エストロゲンを投与された雌マウス視床下部における遺伝子発現変化を網羅的に調べたところ、多くのGタンパク共役型受容体(GPR)経路に関わる遺伝子群の発現量の変動を見いだした。また、マウス視床下部弓状核においてGnRHのパルス発生機構に関与していると考えられているニューロキニンBについて、出生直後の性ホルモン投与による影響を免疫組織化学染色法により調べたが、対照群と比べて大きな変化はなかった。

研究成果の概要(英文)：In the mouse ovary, neonatal exposure to estrogens or endocrine disruptors result in reproductive abnormalities including anovulation, hypertrophy-hyperplasia of the interstitial tissues and induction of polyovular follicles due to the alterations of hypothalamus-pituitary-axis. Our previous reports show that neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure causes defeminization in the hypothalamus of female mice, however, the regulation of the pituitary gonadotropins is different from that in male mice. To investigate the effects of neonatal exposure to DES on the hypothalamus, immunohistochemistry of neurokinin B and estrogen receptor was performed in DES-treated mice. In addition, microarray analysis revealed that neonatal DES treatment induced changes in the gene expression of the hypothalamus.

研究分野：生殖生物学

キーワード：エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

出生前後のマウスへ性ホルモンや環境化学物質を投与すると、視床下部-脳下垂体系の恒久的な変化に伴い無排卵となり、多卵性卵胞の多発や卵巣間質組織の肥厚などが引き起こされる。性ホルモンや環境化学物質は、エストロゲン受容体(ER) α を介して視床下部の脱雌性化を引き起こし、その結果、卵巣におけるステロイド合成能が低下して間質細胞に脂肪滴が貯留していく(1)。一方、脳下垂体前葉での黄体ホルモン遺伝子の発現量は、正常メスだけでなく正常オスよりも減少していた(2)。さらに、卵巣を除去するとゴナドトロピン遺伝子の発現は増加したことから、卵巣によるネガティブフィードバック機構は働いていると考えられる(2)。以上のことから、新生仔期に性ホルモンを投与されたメスマウス視床下部は、正常なオス型とも異なる性質(中間型)を持つと考えられる。

キスペプチンシステムはGnRHニューロンを制御していると考えられており、出生直後のエストロゲン様化学物質投与により、メスマウス視床下部弓状核と前腹側室周囲核におけるキスペプチンの発現量が減少しオス型に近づくことが分かっている(3)。また、視床下部へのエストロゲン様化学物質投与は、ER α を介してキスペプチン発現量に影響を及ぼすことが分かっている(3)。一方ER β 型は、卵巣、前立腺に多く発現しているが、新生仔期視床下部において発現量に性差があることが報告されていることから(4)、性ホルモンや環境化学物質は、ER β を介して視床下部に作用する可能性も考えられる。

2. 研究の目的

エストロゲン様作用をもつ環境化学物質曝露による生殖機能中枢への影響を明らかにすることを目的として、次の2つの実験を行う。

(1) 新生仔期に性ホルモンを投与されたメスマウス視床下部におけるキスペプチンの発現量変化や経時的变化を調べる。

(2) 新生仔期に性ホルモンを投与されたメスマウス視床下部は、正常オスマウスとも異なる中間型の性質をもつ可能性があるため、視床下部において、ER α 、ER β それぞれを介した作用を網羅的に解析する。

3. 研究の方法

(1) 新生仔期マウスへの性ホルモン投与による視床下部神経内分泌細胞の形態、性的二型核への影響を調べるために、マウス新生仔へ合成エストロゲンを投与し、3ヶ月齢で脳を固定し、パラフィン切片を用いたエストロゲン受容体アルファおよびニューロキニンBの免疫組織化学染色を行った。

(2) マウス視床下部における新生仔期の性ホルモン投与の作用メカニズムを理解するために、出生直後に合成エストロゲンを投与された5日齢の雌マウス視床下部からRNA

を抽出し、マイクロアレイにより網羅的な遺伝子発現変化を調べ、無処理マウスと比較した。

(3) 出生直後に合成エストロゲンを投与された5日齢の雌マウス卵巣からRNAを抽出し、マイクロアレイにより網羅的な遺伝子発現変化を調べ、無処理マウスと比較した。

4. 研究成果

(1) マウス視床下部弓状核では、キスペプチンニューロン細胞体がニューロキニンBおよびダイノルフィンを共発現しており、これらの神経ペプチドがGnRHのパルス発生機構に関与していると考えられている。そこで、弓状核におけるニューロキニンBに対する出生直後の性ホルモン投与による影響を調べた。3ヶ月齢の正常メスマウスを用いて、パラフィン切片を用いたER α およびニューロキニンBの免疫組織化学染色法を確立し、視床下部弓状核においてER α およびニューロキニンBの陽性細胞を確認した。次に、出生直後に合成エストロゲンを投与されたマウス視床下部について、免疫組織化学染色を同様に行ったが、ニューロキニンBの染色像に大きな変化はなかった。

また、キスペプチン遺伝子プロモーター下流にGFPを導入した遺伝子改変マウスの作製を行った。

(2) マイクロアレイにより雌マウス視床下部における遺伝子発現変化を網羅的に解析した結果、成熟マウスへのエストロゲン投与(5)や出生日の単回投与(6)の結果とは全く異なり、多くのGタンパク共役型受容体(GPR)経路に関わる遺伝子群の発現量が変動していた。また、いくつかの転写因子の発現量が変化していたが、Kiss1遺伝子の発現は変化していなかった。新生仔期メスマウス視床下部において、性ホルモン投与直後に発現が変化した遺伝子のなかに、脱雌性化に関与するものが含まれていると考えられる。

(3) 出生直後のマウスに合成エストロゲンまたは溶媒を投与し、卵巣における遺伝子発現の変動を網羅的に解析したところ、1.5倍または1/2以下に変動する遺伝子を多数見いだした。また約50種類の転写因子および転写調節因子の発現変動を見いだした。さらに、NotchシグナリングおよびHHシグナリングの役割について、新生仔マウス卵巣の器官培養系を用いて調べた。その結果、合成エストロゲンの下流にNotchシグナリングおよびHHシグナリングが存在する可能性は低いが、HHシグナリングは独自の経路によって多卵性卵胞を誘導することが分かった。また、卵母細胞のアポトーシスに関わる因子について、新生仔マウス卵巣の器官培養系を用いて阻害剤添加により調べたところ、合成エストロゲン投与により卵母細胞のアポトーシスが抑制される際に関与するカスパーゼの候

補を見いだした。さらに、新生仔期マウスに ER β のアゴニストを投与したところ、多卵性卵胞が誘導されることを見いだした。これらの結果から、出生直後のマウス卵巣において、合成エストロゲンは顆粒膜細胞に存在する ER β を介して卵細胞のアポトーシスを抑制、遺伝子発現を変化させることにより、卵母細胞 - 体細胞間相互作用をかく乱し、多卵性卵胞を誘導していると考えられる。この作用は卵巣に直接的であり、視床下部-脳下垂体系の変化によるものではないことが明らかとなった。

<引用文献>

1. Kakuta H., M. Tanaka, P. Chambon, H. Watanabe, T. Iguchi and T. Sato: Involvement of gonadotropins in the induction of hypertrophy-hyperplasia in the interstitial tissues of ovaries in neonatally diethylstilbestrol-treated mice. *Reprod. Tox.*, 33: 35-44, 2012.
2. Ishikawa M., E. Murai, Y. Hashiguchi, T. Iguchi and T. Sato: Effects of diethylstilbestrol (DES) on luteinizing hormone-producing cells in the mouse anterior pituitary. *Exp. Biol. Med.*, 239: 311-319, 2014.
3. Patisaul HB, Todd KL, Mickens JA, Adewale HB. Impact of neonatal exposure to the ER α agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. *Neurotoxicology*. 30: 350-357, 2009.
4. Cao J, Patisaul HB. Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and Kiss1 in neonatal male and female rats. *J Comp Neurol*. 519:2954-77, 2011.
5. Yang JA, Stires H, Belden WJ, Roepke TA. The Arcuate Estrogen-Regulated Transcriptome: Estrogen Response Element-Dependent and -Independent Signaling of ER α in Female Mice. *Endocrinology*, 158: 612-626, 2017.
6. Sakakibara M, Uenoyama Y, Minabe S, Watanabe Y, Deura C, Nakamura S, Suzuki G, Maeda K, Tsukamura H. Microarray analysis of perinatal-estrogen-induced changes in gene expression related to brain sexual differentiation in mice. *PLoS One*, 8: e79437, 2013.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{ 雑誌論文 } (計 4 件)

1. Nakajima T., Y. Tanimoto, M. Tanaka, P. Chambon, H. Watanabe, T. Iguchi and T. Sato: Neonatal estrogen receptor β is important in the permanent inhibition of epithelial cell proliferation in the mouse uterus.

- Endocrinology*, 156: 3317-3328, 2015.
10.1210/en.2015-1012 査読有
2. Terauchi K.J., Y. Shigeta, T. Iguchi and T. Sato: Role of Notch signaling in granulosa cell proliferation and polyovular follicle induction during folliculogenesis in the mouse ovary. *Cell Tissue Res.*, 365: 197-208, 2016.
10.1007/s00441-016-2371-4 査読有
3. Nakajima T., T. Iguchi and T. Sato: Retinoic acid signaling determines the fate of uterine stroma in the mouse Müllerian duct. *PNAS*, 113: 14354-14359, 2016.
10.1073/pnas.1608808113 査読有
4. Sato T., H. Kim, H. Kakuta and T. Iguchi: Effects of 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile on induction of polyovular follicles in the mouse ovary. *In Vivo*, 32: 19-24, 2018.
doi:10.21873/invivo.11199 査読有

{ 学会発表 } (計 9 件)

1. 清水優貴, 佐藤友美: マウス卵巣におけるレチノイン酸の役割について. 日本動物学会第 86 回大会, 新潟, 2015 年 9 月.
2. 角田華子, 佐藤友美: 卵巣莢膜細胞におけるゴナドトロピン(GTH)による Cyp17a1 の発現調節機構について. 日本動物学会第 86 回大会, 新潟, 2015 年 9 月.
3. Kakuta H. and T. Sato: Regulation of Cyp17a1 expression in mouse ovarian theca cells in vivo and in vitro. The Society for Endocrinology BES 2015, Edinburgh, UK, November, 2015.
4. Kakuta H. and T. Sato: The regulation of Cyp17a1 expression in mouse ovarian theca cells in vivo and in vitro. The Ovarian Club VI, Barcelona, Spain, November, 2015.
5. Sato T.: Effects of developmental exposure to diethylstilbestrol on female reproductive organs of mice. The 63rd NIBB Conference, Okazaki, November 2015.
6. Terauchi J.K. and T. Sato: Hedgehog signaling regulates folliculogenesis in the neonatal mouse ovary. The 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan, Okinawa, November, 2016.
7. Kitai T., H. Nishizawa, T. Iguchi, L.J. Guillette, S. Kohno and T. Sato: Multigenerational effects of 17 α -hydroxyprogesterone caproate on mouse reproduction. The 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan, Okinawa, November, 2016.
8. Kakuta H., T. Sato: The regulation of Cyp17a1 expression in theca cells isolated from PCOS model mice. The 50th Annual meeting of Society for the Study of Reproduction, Washington DC, U.S.A., July, 2017.

9. 佐藤友美, 中島忠章: マウス生殖腺および附属器官の分化・発達機構. 日本組織細胞化学会第58回学術集会シンポジウム, 松山, 2017年9月.

(4)研究協力者 ()

〔図書〕(計 2 件)

1. Sato T., T. Iguchi and S. Mohapatra: Vagina: Cell Biology, Encyclopedia of Reproduction., 2018.

2. Ogino Y., S. Tohyama S., S. Kohno, K. Toyota, G. Yamada, R. Yatsu, T. Kobayashi, N. Tatarazako, T. Sato, H. Matsubara, A. Lange, C.R. Tyler, Y. Katsu, T. Iguchi, S. Miyagawa: Functional distinctions associated with the diversity of sex steroid hormone receptors ESR and AR. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., *in press*.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 友美 (SATO Tomomi)
横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・教授
研究者番号 : 40295506

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :