

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：82648

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701070

研究課題名（和文）女性ホルモンシステムの破綻と Wnt シグナルについての解析

研究課題名（英文）Analysis for crosstalk between estrogen and Wnt signalings

研究代表者

宮川 信一（MIYAGAWA SHINICHI）

大学利用共同機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：30404354

研究成果の概要（和文）：女性ホルモンは生体の恒常性維持、生殖、発生・分化をはじめとした様々な局面で重要な機能を果たしている。本研究は、ホルモン応答システムの破綻について理解を深めるために、女性生殖器官に対する女性ホルモンと Wnt シグナルとのクロストーク作用について解析した。その結果、Wnt シグナル関連遺伝子の、クロマチン状態の正しい制御が正常胚組織の発生と分化、成熟後の細胞増殖・分化に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：An integrated network of endocrine chemicals (hormones) modulates the reproductive systems in most animals. Estrogens, one class of these endocrine hormones, are responsible for the induction of behavioral and physiological processes involving many organ systems. The female reproductive tract provides the sites for gamete fertilization, implantation and subsequent development of the embryo and delivery of the fetus. Organs in the female reproductive tract are also involved in women's health issues including androgenesis. Growth factors and ER signaling cooperate to play essential roles in cell proliferation, differentiation and tumor progression in mouse reproductive organs. Treatment of neonatal mice with diethylstilbestrol (DES) induces an estrogen-independent persistent proliferation and cornification of the vaginal epithelium, which typically results in cancerous lesions later in life. However, the mechanisms of the estrogen-dependent and -independent pathways had remained essentially unknown. We found that Wnt/beta-catenin signaling is involved in estrogen-independent phenomena in mouse vagina developmentally exposed to estrogens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：女性ホルモン、Wnt、女性生殖器官

1. 研究開始当初の背景

女性ホルモン（エストロゲン）は生体の恒常性維持、生殖、発生・分化をはじめとした様々な局面で重要な機能を果たしている。それゆえ女性ホルモンシステムの破綻は、乳がんや子宮癌、

不妊、骨粗しょう症や肥満などを引き起こし、生物の様々な活動に影響を及ぼす。こうしたホルモン関連の疾患の増加は近年社会問題化しているが、その発症メカニズムは不明な点が多い。さらに近年では、内分泌かく乱物質の発生前における影響として、晩発性あるいは継世代性の影響

が示唆されてきている。成熟した動物への影響はホメオスタシスに基づいた応答により長期的な影響を示さないが、未成熟な発生途上の動物に対する長期的かつ不可逆的な応答はほとんど理解が進んでいない。

輸卵管・子宮・膣からなる女性生殖管は、生殖の場として生物の根源に関わる役割を担っており、その細胞増殖・分化は、女性ホルモンによってダイナミックに制御されている。女性生殖器官の細胞増殖は女性ホルモンによって一過性に、つまり女性ホルモン依存的に制御されているので、生殖器官の癌とは、いわば“女性ホルモン非依存の細胞増殖”といえる。我々は、女性生殖器官におけるホルモンシステムの破綻モデルとして、発生途上の未成熟な時期に対する女性ホルモン曝露と、そのホルモン応答システムの破綻について解析を進めてきた。通常マウスの膣上皮は女性ホルモン依存的な細胞増殖を示すが、出生前後の周生期ないし生後5日目までに女性ホルモンを投与すると、成熟後膣上皮はホルモン非依存の増殖を示すようになり、加齢に伴い腫瘍化する。現在のところ、女性生殖器官において、正常時あるいは腫瘍形成時(あるいは“女性ホルモン非依存の細胞増殖”時)の女性ホルモンの細胞増殖や分化に対する作用をメディエイトする因子の実体やそのメカニズムは未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は女性生殖管をモデルとして、女性ホルモンと、その作用をメディエイトするシグナル因子の候補としての Wnt シグナルとのクロストークの解析を通じて、周生期の女性ホルモン曝露による標的器官の不可逆的かつ長期的な影響の分子生物学的基盤を明らかにすることを目指した。具体的には、

(1) 女性生殖器官に対する女性ホルモンと Wnt シグナルとのクロストーク作用を、Wnt シグナルに関連する種々の遺伝子改変マウスの表現型解析から明らかにする。

(2) 周生期女性ホルモン曝露モデルを利用して、組織発生・分化過程の未熟な個体に対する女性ホルモンの作用を理解するとともに、そのシステム破綻のメカニズムを明らかにする。

これらの解析から、組織分化のメカニズムや、その制御破綻から顕れる形質の分子生物学的基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

生命現象の様々な局面で重要な働きを担っている Wnt シグナルの、女性生殖器官の発生・分化への影響を、遺伝子改変マウスを使って解析するために、膣上皮細胞特異的に Cre 組換え酵

素を発現するマウス(K5-Cre)と、 β -catenin^{EX3} マウス(Cre が作用すると、 β -カテニンの分解に必要なセリン残基を含むエクソン 3 が切り出され、構成的活性型 β -カテニンを発現する機能獲得型ミュータント)を掛け合わせ、膣上皮細胞特異的 β -catenin 活性化マウスを作成した(K5Cre/+; β -catenin^{EX3/+})。このマウスは出生直後で致死であるため、膣組織の表現型を解析するために、胎生 18.5 日の胚から膣組織を取り出し、ヌードマウス(内在性の女性ホルモンの影響を除くために 2-3 週間前に卵巣を摘出してある)の腎臓皮膜下に移植し、約 4 週間後に移植組織片の組織学的解析を行った。なお、K5-Cre マウスは大阪大学竹田潤二教授、 β -catenin^{EX3} マウスは京都大学武藤誠教授との共同研究として供与されたものである。

周生期の女性ホルモン曝露による不可逆的かつ長期的な影響は、ジエチルスチルベストロール(DES;合成女性ホルモン)を C57B6 マウスの新生仔期(DES 3 μ g を出生日より 5 日間投与)あるいは胎児期(DES 2mg を胎生 15.5 日から 18.5 日まで、母獣に投与)に投与したマウスを用いた。必要に応じて、出生後約 8 週齢で卵巣を摘出し、組織は 10 週齢で採材した。

C57B6 マウス、ヌードマウス(Crlj:CD1-Foxn1^{nu})は、日本エスエルシー、日本チャールズリバーよりそれぞれ入手した。動物実験に関しては、自然科学研究機構動物実験委員会及び自然科学研究機構組換え DNA 実験安全委員会の承認のもと、関連する法令に従い、動物愛護の精神をもって行った。

4. 研究成果

発生期化学物質曝露が誘導する組織不可逆化の発症メカニズムを、発生期化学物質曝露によって誘導される形質の原因遺伝子の同定およびその遺伝子の発現制御メカニズムの解析を行った。特に多くの組織の発生・分化、細胞増殖、癌化に寄与している Wnt/ β -カテニン経路に注目し、女性生殖管における、Wnt/ β -カテニン経路の雌性生殖管における内在的な機能を、膣上皮細胞特異的 β -catenin 活性化マウスを用いて解析した。

本研究では遺伝子改変マウスを用いて Wnt/ β -カテニン経路の解析を試みるが、そのためには、上皮組織特異的な Cre 活性を有するマウスを用いたコンディショナルノックアウトマウス解析が不可欠である。K5-Cre マウスは、膣上皮特異的に Cre を発現するマウスである(図 1)。このマウスと β -catenin^{EX3} マウスを掛け合わせ、Wnt/ β -カテニンシグナルを構成的に活性化させた遺伝子改変マウスの膣組織を解析した。な

お、方法の項にも記したとおり、このマウスは出生後まもなく死亡するため、臍組織はヌードマウスに移植し、約 4 週間後に採材し、解析に供した。

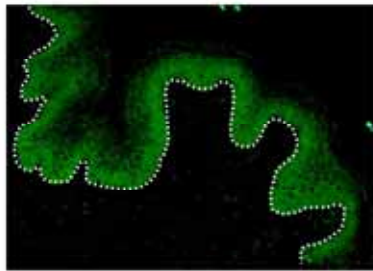


図1. K5-Creマウスの活性をRosa-egfpレポーターマウスを用いて可視化した(緑)。臍上皮全体でCreによる遺伝子組換え反応が起きていることが分かる。点線は基底膜を示している。

コントロール(対照)群の臍上皮組織は2-3層であり、薄い退縮した形態を示していた(図 2)。これは卵巣を除去した成獣マウスの表現型と概ね一致している。一方β-catenin 活性化マウスでは、上皮組織は多層化しており、また内腔は分泌物で満たされていた(図 2)。また臍本来の内腔上皮から分離した腺構造に似た形態も対照群に比べ有意に多く見られた。組織片は卵巣を除去したヌードマウスに移植しているの、この表現型は女性ホルモン非依存的であるといえる。

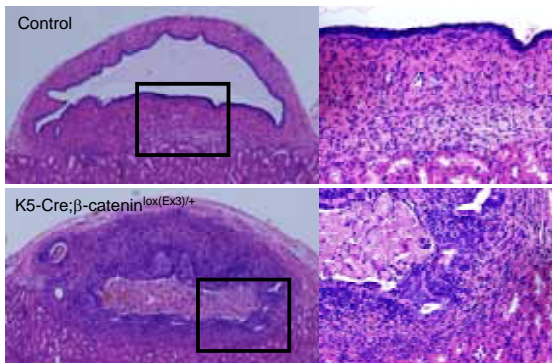


図2. 女性ホルモンがない状態では、臍上皮は2-3層の薄い状態である(上)。一方、構成的活性化β-カテニンを発現させると、女性ホルモン非存在下においても増殖・分化が起きる。(下図;内腔はケラチンなどで詰まっている)。なお、新生児致死の遺伝子改変マウスであるため、臍組織は卵巣を除去したヌードマウス腎臓皮膜下に移植したものを解析している。

細胞増殖やアポトーシスを BrdU 免疫染色法及び TUNEL 法で解析したところ、細胞増殖や細胞死ともにβ-catenin 活性化マウスでは亢進し

ていた。一方間質領域ではこれらに差は見られなかった(図 3)。

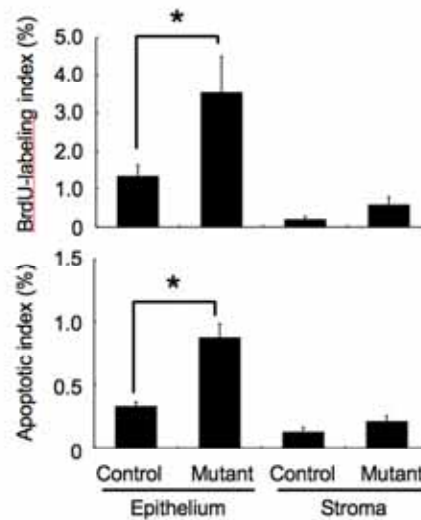


図3. 細胞増殖や細胞死をBrdU免疫染色法及びTUNEL法を指標に解析した。細胞増殖、細胞死ともに、β-カテニン活性化マウスの臍組織で亢進していた。

さらに細胞分化マーカーを用いた解析を行った。p63 は通常多層化上皮の基底細胞、あるいはそれに近い層に発現する未分化細胞マーカーである。β-catenin 活性化マウスの臍上皮では、p63 陽性細胞の領域が上方に広がっていた。また、CK1 は多層化上皮組織における分化マーカー、ロリクリンは角質化の最終分化マーカーである。これらは対照群では発現は見られない。一方β-catenin 活性化マウスでは、ごくわずかに発現が見られた。これらの組織学的マーカー解析から、β-カテニンの活性化は、少なくとも臍上皮細胞の女性ホルモン非依存的細胞増殖には十分であることがわかった。

新生仔女性ホルモン曝露によって、女性ホルモン非依存的細胞増殖誘導した臍の上皮細胞におけるβ-カテニンタンパク質の発現を解析したところ、上皮基底細胞の一部において、β-カテニンタンパク質の核への局在が見られた(図 4)。さらに、胎生期女性ホルモン曝露によって誘導した腺様疾患においても、β-カテニンタンパク質はその他の領域よりも高発現していたことから(data not shown)、臍組織における発生途上の未成熟な時期に対する女性ホルモン曝露と、そのホルモン応答システムの破綻について、Wnt/β-カテニンシグナルが関与していることが推測された。

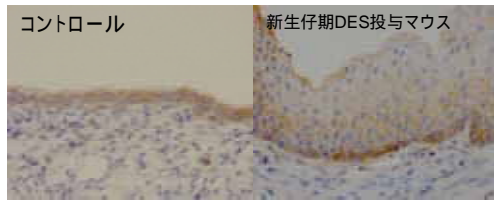


図4. 新生仔期DES投与マウス(右)及び対照群(左)の膣組織における、 β -カテニンタンパク質を免疫組織学的に解析した。新生仔期DES投与マウスの一部の基底細胞で、 β -カテニンタンパク質が蓄積されている。

以上の結果から、 β -catenin 活性化マウスの膣上皮細胞において、女性ホルモン作用非依存の細胞増殖(と一部分化)が誘導されることが明らかとなった。すなわち、 β -カテニンの活性化は女性ホルモン非依存の細胞増殖に十分である。さらに新生仔期 DES 投与マウスの膣上皮の基底細胞でも β -カテニンが蓄積していた。今後、さらなる女性ホルモン応答遺伝子や各種分化マーカーなどの発現解析から、女性ホルモンによる細胞増殖・分化状態との差異を明らかにし、異常な細胞増殖の分子メカニズムを明らかにする必要がある。

さらに、メチル化 DNA 特異的抗体とタイリングアレイを用いた ChIP-on-chip 解析を行い、周生期女性ホルモン曝露によるゲノムワイドなクロマチン状態の変化を網羅的に解析した。その過程で、Wnt/ β -カテニンシグナルの抑制因子のひとつの遺伝子のプロモータ領域のメチル化が、周生期ホルモン曝露群で亢進している可能性があるという結果を得ている。このことは、この遺伝子を含む Wnt シグナル関連遺伝子の、クロマチン状態の正しい制御が正常膣組織の発生と分化、成熟後の細胞増殖・分化に必須であること、そして不適切な時期の女性ホルモン曝露が適切なクロマチン構造変換を妨げた結果、女性ホルモン非依存の遺伝子発現と表現型を誘導することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Sato T, Iguchi T, Ohta Y.
Sequential changes in the expression of Wnt- and Notch-related genes in the vagina and uterus of ovariectomized mice after estrogen exposure. *In Vivo*. 26:899-906, 2012 査読有り

Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Mizutani T, Sato T, Takeuchi T, Iguchi T, Ohta Y.
P21 and Notch signalings in the persistently altered vagina induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice. *J Vet Med Sci*. 74:1589-1595, 2012 査読有り

Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Watanabe H, Mizutani T, Sato T, Morohashi KI, Takeuchi T, Iguchi T, Ohta Y.
WNT family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice. *Toxicology*. 296:13-19, 2012 査読有り

Miyagawa S, Matsumaru D, Murashima A, Omori A, Satoh Y, Haraguchi R, Motoyama J, Iguchi T, Nakagata N, Hui CC, Yamada G.
The role of sonic hedgehog-gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. *Endocrinology*. 152:2894-2903, 2011 査読有り

Miyagawa S, Sato M, Iguchi T.
Molecular mechanisms of induction of persistent changes by estrogenic chemicals on female reproductive tracts and external genitalia. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 127:51-57, 2011 査読有り

Ogino Y, Miyagawa S, Katoh H, Prins GS, Iguchi T, Yamada G.
Essential functions of androgen signaling emerged through the developmental analysis of vertebrate sex characteristics. *Evol Dev*. 13:315-325, 2011 査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

Miyagawa S., Ohta Y., Iguchi T.
Indispensable roles of estrogen receptor α for persistent vaginal change induced by neonatal 5 α -dihydrotestosterone exposure, Gordon Research Conference (ウェストダーバー、バーモント州、アメリカ)2012年6月5日

〔その他〕

ホームページ
<http://www.nibb.ac.jp/%7Ebioenv1/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮川 信一(MIYAGAWA SHINICHI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡

崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教
研究者番号:30404354

(2)研究分担者

(3)連携研究者