

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570074

研究課題名(和文)生殖機能調節システムに対する性ホルモン様環境化学物質の作用機構の統合的解明

研究課題名(英文)The study of the effects of endocrine disruptors on the hypothalamus-pituitary-gonad axis

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・教授

研究者番号：40295506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体における生殖機能調節システムに対する性ホルモン様環境化学物質の作用機構を明らかにするために、新生仔期に合成エストロゲンを投与された成熟メスマウスにおける脳下垂体前葉ホルモン遺伝子とタンパク発現を調べた。その結果、性腺刺激ホルモン産生に関してオス、メスの中間型の傾向を示すことが明らかとなった。さらに、卵巣除去すると卵巣からの抑制が解除されたことから、卵巣による制御も受けていることも分かった。各器官における遺伝子発現変化を調べるために、新生仔マウスに合成エストロゲンまたは合成アンドロゲンを投与し、視床下部と生殖腺における遺伝子発現変化を網羅的に調べ、機能解析のために器官培養系を確立した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effects of endocrine disruptors on the hypothalamus-pituitary-gonad axis, LH-secreting gonadotropes and the expression of genes involved in the synthesis and secretion of gonadotropins in the anterior pituitary of neonatally diethylstilbestrol (DES) mice were examined. The percentage of LH-secreting gonadotropes in the medial area of 90-day-old neoDES females was significantly lower than that of 90-day-old neoOil females. Ovariectomy increased the expression of the alpha subunit of glycoprotein hormones, FSH beta subunit and Lhb subunit both in neoOil and neoDES females, suggesting that the anterior pituitary of neoDES female mice is regulated by ovarian hormones via negative feedback. These results suggest that LH-secreting gonadotropes in the female mice are not only directly affected by neoDES but also are influenced by the masculinization of the hypothalamus. That is, neonatal DES exposure can masculinize or defeminize the hypothalamus of female mice.

研究分野：生殖生物学

キーワード：環境化学物質 エストロゲン 卵巣 脳下垂体 性腺刺激ホルモン

1. 研究開始当初の背景

(1) エストロゲン受容体には型と型があり、それぞれのノックアウトマウスを用いた解析から、通常のエストロゲン作用は型を介していることが分かっている。一方型は、卵巣、前立腺に多く発現しているが、その生理的機能については未解明である。

(2) 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、卵巣において多卵性卵胞の多発、間質組織の肥厚、膣上皮の不可逆的増殖、子宮上皮の重層扁平化などが引き起こされる。

(3) エストロゲン受容体ノックアウトマウスを用いたこれまでの解析から、出生直後の性ホルモン投与による多卵性卵胞の誘導にはエストロゲン受容体 が、卵胞成長の抑制にはエストロゲン受容体 が関与していることが明らかになっている。

(4) 一方、エストロゲン受容体 を介して脳下垂体や視床下部の機能低下が引き起こされた結果、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ことを見いだした。このとき、脳下垂体前葉での黄体ホルモン遺伝子の発現量は減少していた。

以上の結果より、新生仔期のマウスに性ホルモンを投与すると、エストロゲン受容体、 を介した直接的影響と、エストロゲン受容体 を介した脳下垂体や視床下部の機能低下による間接的な生殖機能への影響、の2つがあることが分かった。

2. 研究の目的

新生仔期の性ホルモン、環境化学物質投与がマウス視床下部-脳下垂体-生殖腺軸に与える影響を個体レベルで理解するために、エストロゲン受容体 α 、 それぞれを介した作用を、ノックアウトマウスを用いて解析する。性ホルモン、環境化学物質投与後の遺伝子発現変化を、各器官ごとに網羅的に解析し、いくつかの遺伝子については DNA メチル化状態を調べる。以上の研究により、生体における生殖機能調節システムに対する性ホルモン様環境化学物質の作用機構を、エピジェネティクスの観点も含めて統合的に解明する。

3. 研究の方法

(1) 環境化学物質を新生仔期エストロゲン受容体 または ノックアウトマウスに投与し、視床下部-脳下垂体-生殖腺における遺伝子発現、形態学的な影響を、各器官ごとに網羅的に調べる。これにより、エストロゲン受容体、 それぞれを介した作用を遺伝子レベル、形態的レベルで明らかにする。

(2) 合成エストロゲン投与により卵巣、膣に

おいてインヒビンの高発現が誘導される。ヒト前立腺ガンではインヒビン遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状態に変化が生じていることが報告されているため、インヒビンプロモーター領域の DNA メチル化状態を調べる。また、(1)で変化した遺伝子のうち、エピジェネティックな制御を受けている可能性のある遺伝子について、プロモーター領域の DNA メチル化状態を解析する。これにより、環境化学物質が特定の遺伝子に対し、エピジェネティックな影響を及ぼしているのかを明らかにする。

(3) 環境化学物質投与による影響は直接的作用か、間接的作用かの解析

環境化学物質を投与された新生仔マウスの脳下垂体、生殖腺を正常マウスの腎皮膜下に移植し、正常環境下での形態的变化や遺伝子発現量を経時的に調べる。また、脳下垂体や卵巣の器官培系に環境化学物質を添加し、*in vitro*での形態的变化、遺伝子発現変化を調べる。これにより、環境化学物質による作用を、直接的、間接的、両方の作用、の3つに分類する

4. 研究成果

(1) 合成エストロゲンまたは合成アンドロゲンを新生仔期マウスに投与し、視床下部と生殖腺における遺伝子発現変化を網羅的に調べた。いくつかの候補遺伝子群について、エストロゲン受容体 または ノックアウトマウスを用いて発現変化を調べた。さらに、合成エストロゲン投与による卵巣内の遺伝子発現変化のうち、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。これらのシグナリングを阻害すると多卵性卵胞が誘導されることが報告されているが、合成エストロゲンとの関連は不明であった。器官培養した新生仔マウス卵巣に合成エストロゲンを添加して Notch シグナリングおよび HH シグナリングの活性化を調べたところ、有意な遺伝子発現変化は認められなかった。一方、Notch シグナリング阻害剤の添加では多卵性卵胞は誘導されなかったが、HH シグナリングの阻害剤添加により多卵性卵胞は有意に増加した。以上の結果から、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、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。

(2) インヒビン 鎖遺伝子について、器官培養したマウス新生仔卵巣に合成エストロゲンを添加したところ、生体に投与した時と同様に発現量が増加した。またこの作用は、エストロゲン受容体 ノックアウトマウス卵巣を用いた器官培養系では起きなかったことから、合成エストロゲンはエストロゲン受容体 を介してインヒビン 鎖遺伝子の発

現変化を引き起こすことが分かった。しかし、培養液へインヒピンまたはアクチピン受容体拮抗剤を添加した後に、正常マウス腎皮膜下に移植しても多卵性卵胞は誘導されなかったことから、インヒピンの高発現と合成エストロゲン曝露による卵胞形成の攪乱および多卵性卵胞誘導との関係は不明である。

(3)成熟マウス脳下垂体前葉において、性腺刺激ホルモンの産生は新生仔期の合成エストロゲン投与により抑制傾向にあった。これまでの報告から、新生仔期に合成エストロゲンを投与されたメスマウスの視床下部はオス型となっていると考えられていたが、脳下垂体前葉ホルモン産生の傾向は、オス、メスの中間型であった。さらに、正常マウスと同様に、卵巣除去すると卵巣からの抑制が解除されたことから、卵巣による制御も受けていることが明らかとなった。また脳下垂体前葉の器官培養系も確立し、合成エストロゲンによる性腺刺激ホルモンの遺伝子に対する直接的な影響も明らかにした。さらに、卵巣のステロイド合成に関する酵素の発現調節機構を調べるために、卵巣莢膜細胞の初代培養系を確立し、脳下垂体ホルモンによる遺伝子発現変化を *in vivo* と *in vitro* の両方で解析したところ、*in vivo* では hCG により抑制されるのに対し、*in vitro* では LH による発現増加が続いていた。これらの結果は、卵巣における脳下垂体前葉ホルモンによるステロイド合成調節機構において、莢膜細胞と顆粒膜細胞の密接な相互作用があることを示している。

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 9 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*, in press. 査読有
PMID: 26020796
2. Ishikawa M., Murai E., Hashiguchi Y., 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. 査読有
doi: 10.1177/1535370213519722
3. Kakuta H., A. Matsushita, K. Arikawa, T. Iguchi and T. Sato: Cholesterol homeostasis in the ovaries of neonatally diethylstilbestrol-treated mice. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 121: 94-101, 2013. 査読有
doi: 10.1055/s-0033-1333780
4. Katoh T., S. Hayashi, T. Iguchi and T. Sato:

Epithelial-stromal interactions in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *In Vivo*, 27: 333-337, 2013. 査読有
PMID: 23606688

5. 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. 査読有
doi: 10.1016/j.reprotox.2011.10.013
 6. Nakajima T., T. Iguchi and T. Sato: Hedgehog signaling plays roles in epithelial cell proliferation in the neonatal mouse uterus and vagina. *Cell Tissue Res.*, 348: 239-247, 2012. 査読有
doi: 10.1007/s00441-012-1350-7
 7. Nakamura T., S. Miyagawa, Y. Katsu, H. Watanabe, T. Mizutani, T. Sato, K.-I. Morohashi, T. Takeuchi, T. Iguchi and Y. Ohta: 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
doi: 10.1016/j.tox.2012.02.010
 8. Nakamura T., S. Miyagawa, Y. Katsu, T. Mizutani, T. Sato, T. Takeuchi, T. Iguchi and Y. Ohta: 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
PMID: 22850433
 9. Nakamura T., S. Miyagawa, Y. Katsu, T. Sato, T. Iguchi and Y. Ohta: 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
PMID: 23160670
- [学会発表](計 12 件)
1. Kakuta H. and T. Sato: Regulation of Cyp17a1 expression in the theca cell of mice *in vivo* and *in vitro*. The 97th Annual meeting of the Endocrine Society, San Diego, U.S.A., March, 2015.
 2. Terauchi K.J. and T. Sato: Induction of Polyovular follicles by diethylstilbestrol and notch signaling pathway in the ovary of neonatal mouse. The 97th Annual meeting of the Endocrine Society, San Diego, U.S.A., March, 2015.
 3. Shimizu Y. and T. Sato, Synthesis of retinoic acid and its signaling in the mouse ovary. The 97th Annual meeting of the Endocrine Society, San Diego, U.S.A., March, 2015.
 4. Nishizawa H., Kohno S., Guillette Jr L.J., Miyagawa S., Iguchi T. and T. Sato T:

Reproductive abilities in mice neonatally exposed to 17 α -hydroxyprogesterone caproate. The 39th Annual meeting of Japan Society for Comparative Endocrinology, Okazaki Japan, November, 2014.

5. Terauchi K. and T. Sato: Induction of polyovular follicles by diethylstilbestrol and notch signaling pathway in the neonatal mouse ovary. The 39th Annual meeting of Japan Society for Comparative Endocrinology, Okazaki Japan, November, 2014.
6. 清水優貴, 角田華子, 佐藤友美: 卵巣内におけるレチノイン酸の働きについて. 日本動物学会第 85 回大会, 仙台, 2014 年 9 月.
7. 角田華子, 佐藤友美: ゴナドトロピンによるマウス卵巣ステロイド合成の制御機構について. 日本動物学会第 85 回大会, 仙台, 2014 年 9 月.
8. Kohno, S., Sato, T., Miyagawa, S., Newman, R., Iguchi, T. and Guillette L.J. Jr. Altered estrogenic responsiveness in the adult mouse transcriptome following neonatal exposure to 17 α -hydroxyprogesterone caproate. 34th Annual Meeting of the Society for Maternal-Fetal Medicine, New Orleans, LA, U.S.A., February, 2014.
9. 中島忠章, 佐藤友美, 友岡康弘: レチノイン酸シグナルによる子宮間質の運命決定. 日本動物学会第 84 回大会, 岡山, 2013 年 9 月.
10. 重田祐利, 佐藤友美: マウス卵巣における濾胞形成時の顆粒膜細胞増殖と基底膜の変化. 日本動物学会第 84 回大会, 岡山, 2013 年 9 月.
11. 中島忠章, 井口泰泉, 佐藤友美: 胎仔期から成熟期にかけての子宮と膣の分化におけるレチノイン酸シグナルの役割. 日本動物学会第 83 回大会, 大阪, 2012 年 9 月.
12. 谷本祐樹, 佐藤友美: 新生仔期マウスの子宮と膣におけるエストロゲン受容体 α (ER α)の役割. 日本動物学会第 83 回大会, 大阪, 2012 年 9 月.

〔図書〕(計 1 件)

1. Takei Y., Ando H. and Tsutsui K. (eds.) Handbook of Hormones, Elsevier, 2015.

〔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：
出願年月日：
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
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：