

学 位 論 文 要 旨

氏 名	片山 誠一
題 目	幼若ラット子宮の <i>Wnt</i> 及び Hedgehog 関連遺伝子の発現における エストロゲン様活性物質の影響に関する研究 (Study of the effects of estrogenic compounds on the expression of <i>Wnt</i> and Hedgehog-related genes in the uterus of immature female rats)

近年、環境中に存在する様々な化学物質の内分泌攪乱作用が、動物の生殖及び形態の異常を引き起こすのではないかと危惧されている。内分泌攪乱物質として疑われている多くはエストロゲン様活性を有しており、エストロゲン・レセプター ($ER\alpha$ 及び $ER\beta$) を経由する細胞内の情報伝達系を攪乱させるものと考えられている。しかし、分子レベルにおける詳細な機構については不明な点が多い。 ER はリガンド誘導性の転写因子として働き、標的遺伝子の発現を制御すると推察されている。したがって、エストロゲン様活性物質による遺伝子発現の変化を捉えることは、生理的な機能に及ぼす内分泌攪乱物質の影響を理解する上で不可欠である。特に、フィードバック機構の欠如している幼若動物の子宮は、これらの影響が鋭敏に現れる。そこで本研究では、子宮における様々な遺伝子の発現量に及ぼすエストロゲン様活性物質の影響を追究した。

まず、雌の幼若ラットに ER アゴニストである 17α -ethynyl estradiol (EE, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を単回経口投与し、real time RT-PCR 法を用いて種々の遺伝子発現量を経時的に測定した。その結果、既知のエストロゲン標的遺伝子である complement C3 及び *Igf1* の mRNA 発現量は、著しく増加した。これに対して、 $ER\alpha$, $ER\beta$ を含む性ステロイドホルモン・レセプター遺伝子の mRNA 発現量は、EE 投与後 24 から 48 時間で減少した。さらに、器官発生や形態形成に深く関わっている *Wnt4*, *Wnt5a* 及び *Wnt7a* の発現量も 24 及び 48 時間後に減少した。特に、*Wnt7a* の減少量は著しく、24 時間後には対照群(溶媒のみ)の 15% にまで低下した。*Wnt* の下流に位置している *Amhr2* 及び *Bmp4* (β -catenin/TCF 標的遺伝子) の発現量も *Wnt7a* と同様に減少した。

次に、*Wnt* と同じく形態形成に関与しているヘッジホッグ遺伝子 (*Ihh*, *Dhh*) 及びヘッジホッグ標的遺伝子 (*Ptc1*, *Gli1*, *COUP-TFII*) の発現量に及ぼす ER サブタイプ選択的アゴニスト及び ER アンタゴニストの影響を検討するため、EE (0.3-3 $\mu\text{g}/\text{kg}$), propyl pyrazole triole (PPT, $ER\alpha$ 選択的アゴニスト, 10 mg/kg), diarylpropionitrile (DPN, $ER\beta$ 選択的アゴニスト, 10 mg/kg) または ICI 182,780 (ER アンタゴニスト, 1 mg/kg) を単回投与した。その結果、幼若ラットの子宮において、EE 投与後の *Ihh*, *Dhh* 及び *Ptc1* mRNA の発現量は、用量依存的に減少した。この反応は、EE とともに ICI 182,780 を投与すると抑制されることから、 ER を介する反応と考えられた。PPT の投与は、DPN に比べ、*Ihh*, *Dhh*, *Ptc1*, *Gli1* 及び *COUP-TFII* の転写を強く抑制した。

以上の結果から、エストロゲン様活性物質は既知のエストロゲン標的遺伝子の発現を促進させるのみならず、性ステロイドホルモン・レセプター遺伝子や *Wnt* 及び β -catenin/TCF 標的遺伝子の発現量を減少させることが明らかになった。さらに、これらの物質はヘッジホッグ遺伝子及びヘッジホッグ標的遺伝子の発現にも影響を及ぼし、その作用は主に $ER\alpha$ を介しているものと示唆された。したがって、内分泌攪乱物質の多くはこれらの遺伝子発現量を低下させることで、形態形成の過程、すなわち組織・器官の形や大きさ、相互の配列を決定するプロセスに変化を及ぼすものと推察された。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Seiichi Katayama
題 目	Study of the effects of estrogenic compounds on the expression of <i>Wnt</i> and Hedgehog-related genes in the uterus of immature female rats (幼若ラット子宮の <i>Wnt</i> 及び Hedgehog 関連遺伝子の発現におけるエストロゲン様活性物質の影響に関する研究)

Environmental estrogenic compounds have the potential to cause reproductive and developmental effects through disruption of estrogen receptor (ER) α and ER β signaling pathways. ERs regulate the expression of specific target genes as ligand-induced transcriptional factors to exert various physiological functions. Therefore, it is considered that the characterizations of the gene expression change by estrogenic stimuli provide important clues for understanding the influence of the estrogenic compounds.

In this study, to characterize the effects of an ER agonist on the gene expressions in the uterus, immature female rats were administered once with 17 α -ethynyl estradiol (EE, 3 μ g/kg), a potent ER agonist. The focus of this study was on 4 categories of sex steroid hormone receptor genes: well-known estrogen target genes; *Wnt* genes; and β -catenin/TCF target genes. *ER α* , *ER β* , *PR*, and *AR* mRNAs were downregulated from 24 to 48 h after EE administration. Complement C3 and *Igf1* mRNAs were markedly induced after EE administration. Although the time courses of *Wnt4*, *Wnt5a*, and *Wnt7a* mRNA status varied until 12 h after EE administration, all of them were simultaneously downregulated at 24 and 48 h. The remarkable downregulation of *Wnt7a* mRNA in response to EE was considered to be important to understand the various uterine phenomena affected by ER agonists. In the β -catenin/TCF target genes, the downregulation of *Amhr2* and *Bmp4* mRNA after EE administration appeared to be closely related to the downregulation of *Wnt7a*. The upregulation of cyclin D1 and follistatin mRNA at the early phase after EE administration was considered to have been affected by the upregulation of *Wnt4*.

Furthermore, to investigate the effects of ER subtype-selective agonists and an ER antagonist on the expression of Hedgehog genes (*Ihh*, *Dhh*) and Hedgehog target genes (*Ptc1*, *Gli1*, *COUP-TFII*) in the uterus, immature female rats were administered once with EE (0.3-3 μ g/kg), propyl pyrazole triole (PPT, an ER α -selective agonist, 10 mg/kg), diarylpropionitrile (DPN, an ER β -selective agonist, 10 mg/kg), or ICI 182,780 (an ER antagonist, 1 mg/kg). Expression of mRNA for *Ihh*, *Dhh*, and *Ptc1* was dose-dependently downregulated by EE in the uterus of immature rats, mediated by ER as confirmed by coadministration of ICI 182,780. PPT downregulated the transcription of *Ihh*, *Dhh*, *Ptc1*, *Gli1*, and *COUP-TFII*, indicating that expression of these genes was regulated by the ER α -dependent pathway. DPN also downregulated the transcription of *Ihh* and *Dhh*, although the effect was weaker than that of PPT, indicating that the regulation of uterine *Ihh* and *Dhh* transcription was also affected by the ER β -dependent pathway.

These results suggest that: (1) an ER agonist influences not only the mRNA expression of sex steroid hormone receptor genes and well-known estrogen target genes, but also *Wnt* genes and β -catenin/TCF target genes in the uterus of immature rats; and (2) the expression of Hedgehog genes and Hedgehog target genes is predominantly regulated via the ER α -dependent pathway in the uterus of immature rats.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	片山 誠一
審査委員	主査 宮崎大学 教授 芦澤 幸二
	副査 宮崎大学 助教授 續木 靖浩
	副査 琉球大学 教授 仲田 正
	副査 鹿児島大学 教授 吉田 光敏
	副査 鹿児島大学 教授 岡本 新
審査協力者	
題 目	<p>Study of the Effects of Estrogenic Compounds on the Expression of <i>Wnt</i> and Hedgehog-Related Genes in the Uterus of Immature Female Rats</p> <p>(幼若ラット子宮の<i>Wnt</i>及びHedgehog関連遺伝子の発現におけるエストロゲン様活性物質の影響に関する研究)</p>
<p>近年、環境中に存在する様々な化学物質の内分泌攪乱作用が、動物の生殖及び形態の異常を引き起こすのではないかと危惧されている。内分泌攪乱物質として疑われている多くはエストロゲン様活性を有しており、エストロゲン・レセプター (ERα 及び ERβ) を経由する細胞内の情報伝達系を攪乱させるものと考えられている。しかし、遺伝子レベルにおける詳細な機構については、これまでほとんど明らかにされていなかった。ER はリガンド誘導性の転写因子として働き、標的遺伝子の発現を制御すると推察されている。したがって、エストロゲン様活性物質による遺伝子発現の変化を捉えることは、生理機能に及ぼす内分泌攪乱物質の影響を理解する上で不可欠である。特にフィードバック機構の欠如している幼若動物の子宮は、これらの影響が鋭敏に現れる。本研究は、内分泌攪乱物質の作用機構を遺伝子レベルで解明するため、子宮における様々な遺伝子の発現量に及ぼすエストロゲン様活性物質の影響を追究したものである。</p> <p>著者はまず、雌の幼若ラットに ER アゴニストである 17α-ethynyl estradiol (EE, 3 μg/kg) を単回経口投与し、real time RT-PCR 法を用いて種々の遺伝子発現量を</p>	

経時的に測定した。その結果、既知のエストロゲン標的遺伝子である complement C3 及び *Igf1* の mRNA 発現量が、著しく増加することを確認した。これに対して、*ER α* 、*ER β* を含む性ステロイドホルモン・レセプター遺伝子の mRNA 発現量は、EE 投与後 24 から 48 時間で減少することを見出した。さらに、器官発生や形態形成に深く関わっている *Wnt4*、*Wnt5a* 及び *Wnt7a* の発現量も 24 及び 48 時間後に減少することを明らかにした。特に、*Wnt7a* の減少量は著しく、24 時間後には対照群（溶媒のみ）の 15%にまで低下していた。*Wnt* の下流に位置している *Amhr2* 及び *Bmp4* (β -catenin/TCF 標的遺伝子) の発現量も *Wnt7a* と同様に減少することを明らかにした。

次に著者は、*Wnt* と同じく形態形成に関与しているヘッジホッグ遺伝子 (*Ihh*、*Dhh*) 及びヘッジホッグ標的遺伝子 (*Ptc1*、*Gli1*、*COUP-TFII*) に着目し、これらの遺伝子の発現量に及ぼす ER サブタイプ選択的アゴニスト及び ER アンタゴニストの影響を検討した。使用したアゴニスト及びアンタゴニストは、EE (0.3-3 μ g/kg)、propyl pyrazole triole (PPT, *ER α* 選択的アゴニスト, 10 mg/kg)、diarylpropionitrile (DPN, *ER β* 選択的アゴニスト, 10 mg/kg) 及び ICI 182,780 (*ER* アンタゴニスト, 1 mg/kg) である。その結果、幼若ラットの子宮において、EE 投与後の *Ihh*、*Dhh* 及び *Ptc1* mRNA の発現量は、用量依存的に減少することを明らかにした。この反応は、EE とともに ICI 182,780 を投与すると抑制されることから、*ER* を介する反応と考えられた。加えて、PPT の投与は DPN に比べ、*Ihh*、*Dhh*、*Ptc1*、*Gli1* 及び *COUP-TFII* の転写を強く抑制することを見出した。

これらの結果から、エストロゲン様活性物質はこれまで知られているエストロゲン標的遺伝子の発現を促進させるのみならず、性ステロイドホルモン・レセプター遺伝子や *Wnt* 及び β -catenin/TCF 標的遺伝子の発現量を減少させることが明らかになった。さらに、これらの物質はヘッジホッグ遺伝子及びヘッジホッグ標的遺伝子の発現にも影響を及ぼし、その作用は主に *ER α* を介しているものと示唆された。したがって著者は、内分泌攪乱物質の多くがこれらの遺伝子発現量を低下させることで、形態形成の過程、すなわち組織・器官の形や大きさ、相互の配列を決定するプロセスに変化を及ぼすものと推察している。

以上のように本研究は、最新の遺伝子解析の手法を駆使して、内分泌攪乱物質が動物の生殖異常を引き起こす機構をはじめて明らかにしたものであり、動物生殖生理学上極めて価値のある業績であると認める。さらに、これらの知見は環境中の様々な内分泌攪乱物質の毒性を予測する新たな指針を示したものである。したがって審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分に価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏 名	片山 誠一		
審査委員	主査	宮崎大学	教授 芦澤 幸二
	副査	宮崎大学	助教授 續木 靖浩
	副査	琉球大学	教授 仲田 正
	副査	鹿児島大学	教授 吉田 光敏
	副査	鹿児島大学	教授 岡本 新
審査協力者			
実施年月日	平成 18 年 12 月 27 日		
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）		<input type="checkbox"/> 答・筆答	
<p>主査並びに副査の5名は、平成18年12月27日（水）の公開審査会において、学位申請者本人に対して学位申請論文の内容について説明を求め、その研究内容と関連事項について試問を行った。具体的には、次ページ（No.2）のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は、学位申請者が鹿児島大学大学院連合農学研究科博士課程修了者としての学力並びに識見を持つものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資質を有するものと判定した。</p>			

学位申請者
氏 名

片山 誠一

【質問 1】子宮の細胞はどのような細胞から構成されているのか？子宮から total RNA を抽出しているが，子宮組織は多くの細胞種から構成されており，比較した遺伝子発現はどの細胞種によるものなのか？

【回答 1】ラットの子宮は，内膜上皮，腺上皮，間質及びそれらを取り囲む筋層から構成されている。本研究では迅速なスクリーニング・テストにも対応できるように，子宮全体から RNA を抽出しているため，病理組織学的変化を含めた個々の細胞における発現変化は評価していない。しかし，例えば *Wnt7a* 及び *Ihh* は内膜，*Wnt4* 及び *Wnt5a* は内膜及び間質の両方に発現していることが報告されており，本研究でもそれらの細胞で変化したものと考えている。

【質問 2】EE を投与することによって，子宮のどの部位が肥大したのか？重量増加に寄与する部分はどこか？

【回答 2】今回の実験の観察時間帯（投与後 48 時間以内）では，子宮内膜及び間質の肥大が顕著に認められる。特に，重量増加に寄与しているのは，間質の肥大である。

【質問 3】EE の投与期間を延長したら，遺伝子発現に違いは見られるのか？

【回答 3】例えば *Wnt7a* 及び *Ihh* 遺伝子について，EE の単回投与後 24 時間と 3 日間反復投与後 24 時間（OECD での子宮肥大試験の国際バリデーションの条件に相当）の遺伝子発現変化が，ほぼ同じであるという結果を既に得ている。これ以上の長期間投与の影響は分からない。

【質問 4】特殊化した系を選んだために，このような反応が出たのではないかとヒトや家畜を含めた広範な動物で，内分泌攪乱物質が同じように反応すると思うか？

【回答 4】本研究で選択した動物の条件（特に系統及び日齢）は，エストロゲン様作用を評価するために広く用いられ，国際的にも認められているものである。本研究の結果は，「特別な動物種」で起こることを意味しているのではない。性成熟が始まる前の「体内の（細胞周囲の）エストロゲンレベルが低い動物」で比較すれば，種を超えて見られるものと考えられる。

【質問 5】幼若個体をアッセイ系として使用しているが，成体個体との差異が大変大きいのではないか？

【回答 5】成体では，体内のエストロゲンレベルが高いこと，またフィードバック機構が働くことから，幼若個体との反応の差異は大きい。しかし，本研究は，内分泌攪乱化学物質の成体への影響を評価することが目的ではなく，あくまでも性成熟が始まる前の「体内の（細胞周囲の）エストロゲンレベルが低い」動物で行うことに意義がある。

【質問 6】本研究で使用したプライマーがターゲット遺伝子を本当に標的としているのか証明がないのではないか？

【回答 6】本プライマーで増幅のアンプリコンが他の遺伝子と相同性のないこと（設計した遺伝子のみ）に相同性がある）を公共のデータベースで確認している。

【質問 7】天然のエストロゲンを使って実験をしなかった理由は？EE と天然のエストロゲンとの間で遺伝子発現に違いは見られるか？

【回答 7】経口投与で影響が評価できない物質は、モデル化合物として向いていない。経口投与で十分なエストロゲン作用が発揮できる合成エストロゲンの EE とは異なり、天然のエストロゲンは経口投与では代謝されてしまい効力が得られない。しかし、ER への結合親和性から天然エストロゲンの投与後に見られる遺伝子発現変化は、EE で再現できると考えられる。

【質問 8】性ステロイドホルモン・レセプター遺伝子の mRNA 発現量も減少しているが、その理由は？

【回答 8】性ステロイドホルモン・レセプター遺伝子に限らず、本研究で得られた遺伝子の mRNA 発現量の減少の理由についてはよく分かっていない。しかし、現在、転写を抑制するタイプの転写因子の発現がエストロゲンによって増加するのではないかと想定し、検討中である。

【質問 9】遺伝子の発現量とタンパク質の合成量は平行に動いているか？

【回答 9】今回最も注目した Wnt 関係について抗体が作製しにくいタイプのタンパク質であったこともあり、タンパク質に関する実験は行っていない。おそらく、遺伝子発現とタンパク質の合成量とでは、タイムラグがあると考えられる。したがって、タンパク質レベルでの変化を捉えるためには、サンプルを採取する最適時間を検討し直す必要があるだろう。

【質問 10】最近、ジャンクと呼ばれる遺伝子に大切な役目があることが分かってきたが、今回の遺伝子はどうなのか？

【回答 10】今回、評価対象とした遺伝子は、ジャンクとは関係ない。

【質問 11】ER alpha と ER beta は、ほかの動物（例えば家畜など）でも同じように確認できるのか？ともに ER として働いているわけであるが、その大きな違いは何か？局在部位も同じと考えて良いのか？

【回答 11】ER alpha と ER beta は、種を超えて保存されているため、当然、家畜も含めて確認できる。しかし、ER alpha と ER beta の局在部位及びその存在比率は異なり、子宮では ER alpha が優位であるが、卵巣や前立腺では ER beta も高発現している。ER beta は ER alpha の機能を抑制的に制御していると考えられている。

【質問 12】ヘッジホッグ関連遺伝子に対する影響を見る場合は EE の投与量を変化させているのに対して、Wnt の実験では単独の投与量のみで実験を行っている。その理由は？

【回答 12】実際には、Wnt の実験でも同様の実験を行っている。0, 3, 1 及び 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で EE を投与し、用量反応性を確認している。その結果、明確なエストロゲン様作用を示す用量として、EE の 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ という用量を選択した。

【質問 13】ラットの系を違えたら、遺伝子発現量にも変化が見られるのか？

【回答 13】ラットの系統によって、エストロゲンに対する応答性が異なることが知られており、例えばエストロゲンに対する反応が鈍いとされている F344 系を用いた場合、本研究で用いた SD (IGS) 系のラットの結果とは異なるものとなるだろう。