

平成 25 年度

東京理科大学 大学院 薬学研究科 薬学専攻

学位論文

化学物質の次世代脳神経系への影響評価

—X 染色体不活性化と脳発達関連遺伝子を中心
とした新たな毒性メカニズムに関する研究

熊本 隆之

目次

| | |
|------|----|
| 略語一覧 | 3 |
| 要旨 | 5 |
| 序論 | 11 |

第一章

ディーゼル排ガス周産期曝露が脳神経系に及ぼす影響
～脳の内分泌系を中心とした影響解析～

| | |
|--------------|----|
| 第一節 研究の背景と目的 | 19 |
| 第二節 実験方法 | 23 |
| 第三節 実験結果 | 28 |
| 第四節 考察 | 38 |
| 第五節 小括 | 44 |

第二章

ディーゼル排ガス周産期曝露が脳神経系に及ぼす影響
～X染色体不活性化を中心とした影響解析～

| | |
|--------------|----|
| 第一節 研究の背景と目的 | 45 |
| 第二節 実験方法 | 46 |
| 第三節 実験結果 | 48 |
| 第四節 考察 | 59 |

| | |
|---|-----|
| 第五節 小括 | 64 |
| 第三章 | |
| X 染色体不活性化を中心としたビスフェノール A 胎仔期曝露が脳神経系に及ぼす影響 | |
| 第一節 研究の背景と目的 | 65 |
| 第二節 実験方法 | 67 |
| 第三節 実験結果 | 74 |
| 第四節 考察 | 87 |
| 第五節 小括 | 94 |
| 総括 | 95 |
| 謝辞 | 101 |
| 参考文献 | 102 |

略語一覽

| | |
|-------------|--|
| AGD | anogenital distance |
| AhR | aryl hydrocarbon receptor |
| AR | androgen receptor |
| Bdnf | brain-derived neurotrophic factor |
| BW | body weight |
| cDNA | complimental DNA |
| Cyp1a1 | cytochrome 1a1 |
| DE | diesel exhaust |
| DEP | diesel exhaust particles |
| DEPC | diethylpyrocarbonate |
| DOHaD | Developmental Origins of Health and Disease |
| ER α | estrogen receptor alpha |
| ER β | estrogen receptor beta |
| Fmr1 | fragile X mental retardation 1 |
| Gapdh | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| Gdi1 | guanosine diphospahte dissociation inhibitor 1 |
| HO-1 | heme oxygenase 1 |
| Hprt1 | hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1 |
| Mecp2 | methyl-CpG-binding protein 2 |
| MSP | methyl specific primer |
| MT-1 | metallothionein 1 |
| Nlgn3 | neuroligins 3 |
| NOAEL | no observed adverse effect level |

| | |
|-------|--|
| Ophn1 | oligophrenin 1 |
| PAH | polycyclic aromatic hydrocarbon |
| Pak3 | p21-activated kinase 3 |
| PCB | poly chlorinated biphenyl |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PM | particle matter |
| PND | post natal day |
| Ppm | parts per million |
| S.D. | standard deviation |
| Sts | steroid sulfatase |
| TR | thyroid hormone receptor |
| Tsix | X inactivation-specific transcript-antisense |
| Xist | X inactivation-specific transcript |

要旨

化学物質の次世代脳神経系への影響評価 —X 染色体不活性化と脳発達関連遺伝子を中心とした 新たな毒性メカニズムに関する研究

序論

胎児期や乳幼児期などいわゆる発達期は化学物質に対する感受性が高く、特に医薬品に対しては毒性学的研究が進んでいる。一方、環境中の化学物質曝露の発達期への影響に関してはその曝露量が微量であることから従来関心が低かったが、内分泌かく乱化学物質問題以来、注目が集まっている。発達期は脳神経系において神経発達やシナプス（神経回路）形成、高次脳機能形成などが活発に行われる時期であるが、血液脳関門が未発達であることから化学物質が移行しやすく、化学物質に対する感受性が高い時期であると考えられる。実際、学習障害や自閉症スペクトラム障害など発達障害児の増加は世界的に著しく、その原因として遺伝要因と共に化学物質曝露など環境要因が指摘されている。さらに、内分泌かく乱作用をもつ化学物質は生殖系だけでなく、脳神経系に多く局在する性ホルモン受容体を介して脳の性差や発達に影響を与えることが報告されている。

本研究は化学物質周産期曝露が次世代の脳発達に及ぼす影響を探るため、環境中に広範囲に存在し、また内分泌かく乱作用の疑われているディーゼル排ガスまたはビスフェノール A をマウスの周産期に曝露、それらの次世代における脳神経系への影響を主に遺伝子発現変動の観点から検討した。

第一章 ディーゼル排ガス周産期曝露が脳神経系に及ぼす影響～脳の内分泌系を中心とした影響解析～

大気汚染の主な原因のひとつであるディーゼル排ガス (Diesel Exhaust: DE) は、主に NO_x や SO_x などガス体、揮発性有機化合物などガス状成分、炭素の核を中心に多環芳香族炭化水素類やダイオキシン類など千種類以上の化学物質が吸着した粒子状物質からなる。その健康影響については呼吸器系や循環器系に加え生殖系への影響も報告されており、いわゆる内分泌かく乱作用が疑われている。一方、内分泌かく乱化学物質は脳神経系に影響を及ぼすことが報告されており、DE に関しても行動や脳内モノアミンなどへの影響が報告されているが、内分泌学的な影響に関する研究はほとんどない。そこで胎仔期および新生仔期の ICR 系マウスに DE 曝露 (0.3、1.0、3.0 mg/m³ を妊娠 2 から 18 日目まで一日 12 時間吸入曝露) を実施、出生後 2、5、16 日目に大脳部位を摘出、性ホルモン関連遺伝子 (ER α 、ER β 、AR、アロマターゼ)、甲状腺ホルモン関連遺伝子 (TR、BDNF、Nrgn)、ストレス関連遺伝子 (Cyp1a1、HO-1、MT-1) を測定した。その結果、ER α 、ER β 、アロマターゼの発現上昇から脳内ステロイドホルモン系、特にエストロゲン系に影響を与えている可能性が示唆された。また、甲状腺ホルモン関連遺伝子においても検討したすべての遺伝子に発現変動が認められたことから、性ホルモンに関わらない内分泌かく乱が引き起こされている可能性が示唆された。さらに、Cyp1a1 遺伝子の発現上昇から、AH 受容体を刺激する芳香族炭化水素が、また、HO-1 遺伝子の発現上昇から、酸化ストレスを引き起こす化学物質が脳内移行した可能性が考えられた。(Arch Toxicol. 83(11) 985-1000 (2009) : 論文 1)

第二章 ディーゼル排ガス周産期曝露が脳神経系に及ぼす影響～X 染色体不活性化を中心とした影響解析～

DE 曝露の脳神経系への影響は第一章で示した脳の内分泌系の他にも形態や神経行動など様々な影響が報告されている。そこで遺伝子発現変動を網羅的に解析するため

胎仔期曝露の2日齢雄出生仔において4万遺伝子を対象としたcDNAマイクロアレイを実施、Xist 遺伝子の発現が増加することを見出した。さらにリアルタイム PCR を用いて詳細な定量評価を行ったところ、Xist は雌雄ともほぼすべての測定時期において曝露濃度依存的に発現上昇していた。Xist はそのアンチセンスである Tsix とともに発生の初期段階で雌の二つある X 染色体の片方を不活性化する機能を有し、この破綻による影響は X 連鎖性遺伝子に広範囲に波及すること、雄においては X 染色体に替えがなく直接的な影響が及ぼされると考えられる。また X 連鎖性遺伝子は脳組織に多く発現、精神神経疾患に関わるなど脳機能と深く関連付けられることが明らかになっている。そこで Tsix および X 連鎖性遺伝子として Mecp2 および Hprt1、X 連鎖性だが不活性化を免れる Sts の発現変動を検討したところ、Tsix が Xist の発現変動に付随する形で増加していたが、X 連鎖性遺伝子に有意な差はなかった。以上より Xist と Tsix がバランスをとりあうことで X 染色体不活性化に関連する上述の X 連鎖性遺伝子の発現変動を回避している可能性が考えられた (J Toxicol Sci. 38(2) 245-254 (2013) : 論文 2)。なお、新生仔期曝露では同様の発現変動は認められず、胎仔期曝露がこれら発現変動に重要であり、この時期は X 染色体不活性化の行われる時期と一致していた。X 染色体不活性化は Xist と Tsix というわずかな遺伝子によって制御されるにも関わらず、影響は広範囲に波及し得ることから、化学物質の次世代影響評価に重要であり、そのメカニズムの体系化と知見の集積が必要であると考えられた。

第三章 X 染色体不活性化を中心としたビスフェノール A 胎仔期曝露が脳神経系に及ぼす影響

ポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂の原料として汎用されるビスフェノール A (Bisphenol A: BPA) はエストロゲン類似作用を持つ代表的な内分泌かく乱物質であり、また、妊婦の臍帯血中から高頻度に検出されることから胎仔への影響が懸念されている。さらに、脳形成異常や学習障害、攻撃性の増加など脳神経系へ影響を及ぼすことが近年報告されている。このメカニズムを X 染色体不活性化を指標として検討する目

的で、BPA の胎仔期曝露（0.02、50 mg/kg を妊娠 6、15 日目に経口投与）を行い雌性出生仔の 2、4 日齢、3、7 週齢に大脳部における遺伝子発現変動等を検討した。その結果、3、7 週齢で曝露濃度依存的な Xist の発現減少と Tsix の発現上昇が認められ、さらに X 連鎖性遺伝子発現として Fmr1、Nlgn3、Pak3、Gdi1 がほぼ同時期に総じて発現減少が認められた。これらの遺伝子群はより脳発達との結びつきの強いものを選択しており、Fmr1 は神経細胞での mRNA 輸送に関与する脆弱 X 症候群の原因遺伝子、Nlgn3 はシナプス同士の連結に関与する遺伝性自閉症の原因遺伝子、Pak3 はニューロン突起の伸長、Gdi1 は神経伝達物質の正常な放出の維持に関与する X 連鎖性精神遅滞の原因遺伝子である。これらの発現変動は離乳～幼児期に相当する 3 週齢時、思春期以降に相当する 7 週齢時においても見られ、むしろ成長するほど顕著な差が得られた。これらの変化と同時に性ホルモン関連遺伝子（AR、ER α 、ER β ）の mRNA 発現変動、肛門生殖器間距離の短縮、血清中エストラジオールの減少が認められ、性差への影響が示唆された。以上の変化は高濃度曝露群（50 mg/kg；米国環境保護庁の示す最小毒性量（LOAEL）に相当）で顕著に認められたが、0.02 mg/kg という極微小濃度においても作用は弱いながらも同様の傾向が示された（J Toxicol Sci. 38(3) 485-494 (2013)：論文 3）。一方、X 染色体不活性化の本体はエピジェネティクス、すなわち X 染色体の中心付近に存在する Xist RNA の LINE 配列に沿った伝播に引き続いて起こる DNA メチル化と H3・H4 のアセチル化・メチル化などヒストン修飾により X 連鎖性遺伝子は不活性化状態となり、次世代に引き継がれ再活性化されるまで Xist の集積とともに維持されることが知られている。そこで DNA メチル化レベルに着目、DNA のバイサルファイト処理を行いメチル化特異的プライマーを設計、これらに最適化した PCR で増幅後、電気泳動により測定した。Xist および Tsix、Nlgn3、Gdi1 を検討したところ、Nlgn3 の脱メチル化が認められ Xist の変動と一致していたが、他の遺伝子に変化はなく、影響は Xist および Tsix RNA（どちらもタンパク質に翻訳されず機能するノンコーディング RNA）を介したものが中心であることが示唆された。以上より、BPA 胎仔期曝露は X 染色体不活性化の不安定化と X 連鎖性遺伝子への広範な影響を

介して脳の発達に影響を及ぼし、すでに報告されている学習障害や行動異常等に関連している可能性が考えられた。

まとめ

DE 胎仔期・新生仔期曝露および BPA 胎仔期曝露は新生仔の脳の遺伝子発現を変化させ、特に性分化機構に影響を及ぼしうることが示唆された。さらに、化学物質胎仔期曝露の脳発達への影響として X 染色体不活性化を介した系が存在、Xist 遺伝子の発現変動がそのバイオマーカーとなり得ることが見出された。すなわち、Xist と Tsix 遺伝子の変化は染色体に広く影響すること、そもそも不活性化を免れる部分が約 2 割と多くそのパターンも個体によって大きく異なっていること、エピジェネティクスをその作用メカニズムとしていることから、胎生期の化学物質曝露に対する脆弱性が高く、広範囲に影響を及ぼす可能性が考えられた。

今回、脳の発達を焦点に検討を進めたが、X 連鎖遺伝子の特筆すべき性質として、脳の発達に加え精子形成や免疫機能に関わる機能を多く持ち、これらの疾病原因遺伝子が集中的に存在している点が挙げられる。したがって、なぜ一つの化学物質が脳や生殖、免疫にわたって複合的に影響を及ぼすのか統合的に説明できる可能性があり、Xist はその起点として化学物質に対するウィークポイントとなる可能性が考えられた。

論文 1

Perinatal exposure to diesel exhaust affects gene expression in mouse cerebrum.

Naomi Tsukue, Manabu Watanabe, Takayuki Kumamoto, Hirohisa Takano, Ken Takeda

Archives of Toxicology

83(11): 985-1000. 2009

論文 2

Fetal exposure to diesel exhaust affects X-chromosome inactivation factor expression in mice.

Takayuki Kumamoto, Naomi Tsukue, Hirohisa Takano, Ken Takeda, Shigeru Oshio

The Journal of Toxicological Sciences

38(2): 245-54. 2013

論文 3

Effect of fetal exposure to bisphenol A on brain mediated by X-chromosome inactivation

Takayuki Kumamoto and Shigeru Oshio

The Journal of Toxicological Sciences

38(3): 485-494. 2013

序論

胎児期や乳幼児期などいわゆる発達期は、脳神経系において、神経発達やシナプス（神経回路）形成、高次脳機能形成そして性分化などが活発に行われる時期である。哺乳類における脳の発達は、受精後に卵割を繰り返し生成された胚盤胞が成熟・分化した外胚葉が溝状に陥没（神経板）、溝の両側が上に伸びて（神経溝）互いに接触し、そのまま筒状に閉じて体内に管状の構造を形成した神経管となり、中枢神経系は閉鎖した管状構造となる。続いて神経管の頭方が膨らみ、前脳、中脳、菱脳の三つが形成される。その後、前脳は終脳と間脳に、菱脳は後脳と髄脳に分かれたのち、最終的に終脳は大腦を、後脳は橋と小脳を髄脳は延髄を分化する。そして神経幹細胞から神経細胞とグリア細胞が分化され、大腦などの皮質構造をなす場所では神経細胞は脳の中心部から皮質に向かって遊走、層状に配置されお互いをシナプスで結合する。さらに、神経細胞から軸索および樹状突起が伸長し、神経回路形成が行われる。これらの完了に前後し、脳の性分化が行われる。脳の性分化は周産期の一定の時期（臨界期）におけるアンドロゲンの有無によって不可逆的に規定されていると考えられており、脳内にアンドロゲンが存在すれば標的遺伝子発現を介して脳の雄性化に、存在しなければ雌性化する。脳の性分化の臨界期は動物種によって様々であるが、マウスの場合、出生直前から生後1週間くらいであるといわれており、この時期の環境因子が脳の性差をかく乱しうると考えられる。

一方で、発達期は血液脳関門が未発達であることから化学物質が移行しやすく、化学物質に対する感受性が高い時期であると考えられる。そのため、医薬品を中心として発達期への化学物質曝露について毒性学的研究が進んでいる。しかし、環境中の化学物質曝露の影響に関してはその曝露量が微量であり、従来の用量 - 反応曲線の考え

方では無反応用量と推定されたことなどから従来関心が低かったが、内分泌かく乱化学物質問題以来、注目が集まっている。

化学物質は血液脳関門により脳への侵入を阻止されるが、発達期における血液脳関門は未発達であるため、化学物質に曝露されると、胎児期においては経胎盤的に、新生児期においては経授乳または直接的に新生児の脳に移行する可能性がある。また、脳神経系にはエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体、アリルハイドロカーボン受容体など化学物質の標的となりうる受容体が多く発現しており、これらが脳内の情報伝達や神経細胞の調節などに重要な役割を担っている。胎児期は遺伝的プログラムの支配を受けるので、この時期の環境要因は脳神経系の発達に不可欠な遺伝子群の転写・制御に影響を及ぼし、子の神経回路網の形成を変化させ影響を及ぼすものと考えられる。

近年、学習障害や自閉症スペクトラム障害など発達障害児の増加は世界的に著しく、その原因として遺伝的要因と共に、周産期における化学物質曝露が密接に関わる可能性が指摘されており、その知見の集積や要因の探索を行い、予防策を講じることが必要とされている。その中でも、環境ストレス曝露は生活習慣病や精神神経疾患の発症と密接に関わる可能性が指摘されている。これまで、精神神経疾患や高血圧、糖尿病、脂質異常症など生活習慣病等の発症は遺伝的要因が大きいと考えられてきた。しかし、**Barker** は、子どもの生理学的な発達は母体環境に依存しており、成人病の発症は周産期（受精時、胎芽期、胎児期、乳児期）の要因により素因が形成され、出生後のマイナスの生活習慣負荷で成人病が発症するという成人病胎児期発症仮説を提唱した (**Barker and Osmond 1986**)。この仮説はオランダ飢餓の冬、すなわち 1940 年代のオランダにおいて、低栄養状態の妊婦より出生した子が、成人後に肥満のみならず、冠動脈疾患、糖尿病、精神神経疾患などが多発したとの報告を中心に多くの疫学的研究の報告がなされたことに由来する。近年では DOHaD (**Developmental Origins of Health and Disease**) 仮説という、胎児期～幼小児期の環境が成人期の慢性疾患リスクに影響を与

えるとする概念に発展し、妊娠中の栄養摂取や低出生体重に加え、化学物質曝露が糖尿病や脂質異常症、虚血性心疾患、高血圧、骨粗鬆症、悪性腫瘍、精神神経疾患等のリスク要因となることが報告されている (Barker 2007)。最近、胎児期から小児期にかけての化学物質曝露をはじめとする環境因子が妊娠・生殖、先天奇形、精神神経発達、免疫・アレルギー、代謝・内分泌系等に影響を与えているのではないかという中心仮説を解明することを目的とし、環境省は大規模疫学調査「子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査)」を開始し、妊娠期から学童期に至るまでの追跡調査を行っている。この調査の推進にあたっては、諸外国の調査や世界保健機関 (WHO) などの国際機関と連携しており、周産期環境と成長後の疾病リスクの相関性は世界的に研究が進みつつある。

周産期の化学物質環境として内分泌かく乱作用をもつ化学物質が重要であるが、その影響として、当初注目を集めた生殖系だけでなく、脳神経系に影響を及ぼす研究が数多く報告されている。著明な例としては米国五大湖周辺の妊婦において、臍帯血中 PCB (Poly Chlorinated Biphenyl) 濃度に比例して子の IQ や言語能力、記憶学習力の低下がみられたことが挙げられる。その要因としては脳神経系に多く局在する性ホルモン受容体を介することに加え、甲状腺ホルモンの阻害を介して神経発達をかく乱することも報告されている (Carpenter 2006)。同様に、ダイオキシン類、フタル酸エステルのほか、ディーゼル排ガス (Diesel exhaust: DE)、ビスフェノール A (Bisphenol A: BPA) 等について、疫学的、あるいは実験的な研究により、知能の発達や脳の性分化、行動に影響を及ぼすことが確認されている (Frye et al. 2012)。本研究では環境中に広く存在し、周産期中に曝露を受ける可能性が高い DE および BPA に焦点を当てた。

脳における内分泌かく乱作用を考える上では、その作用点としてまず性分化への影響が挙げられる。脳の性分化は、げっ歯類において周産期の脳内ステロイドホルモン環境によって制御されている。特に周産期の一定の時期 (臨界期) における精巣から

分泌されるアンドロゲンの有無によって不可逆的に規定されていると考えられており、脳内に入ったアンドロゲンはアロマターゼによりエストロゲンに変換され、エストロゲンレセプター (Estrogen receptor: ER) と結合し標的遺伝子の発現を介して神経系を雄性化すると考えられている。ER を介したシグナルがない場合、神経系は雌性化する。

これに加え、脳における内分泌かく乱の作用点としてはまた、性染色体を考えることが重要である。哺乳類では、雄は性染色体として X 染色体、Y 染色体をそれぞれ一つ、雌は X 染色体を二つ持つ。Y 染色体は小型であり、遺伝子の密度が著しく低く、胎児の未分化生殖腺が卵巣に分化するのを阻止し、精巣に分化させる精巣決定因子 SRY のほか、精子形成あるいは妊孕性などに関与する比較的少数の遺伝子が存在しているに過ぎない。一方、X 染色体は 7 番染色体の次に大きく、Y 染色体のおよそ 3 倍のサイズがあり、コードされている遺伝子 (X 連鎖性遺伝子) 数は 1,098 遺伝子と Y 染色体のそれのおよそ 14 倍あり量的にも多いことが報告されている (Ross et al. 2005)。したがって、雌は雄の二倍量の X 連鎖性遺伝子を持つことになるため、この遺伝子量を均等にする必要がある。X 染色体の不活性化とは、雌が発生の初期段階に片方の X 染色体を不活性化させ、そこにコードされている遺伝子の大部分で転写を抑制させ、X 連鎖性遺伝子量を両性間でほぼ同じくする調節機構である (別図 1)。遺伝子量補正に失敗した場合、全て胚致死となる。不活性化を受けた X 染色体 (inactive X: Xi) は凝縮し、ヘテロクロマチンを形成する。生殖細胞においては、減数分裂に先立って Xi の再活性化が起こり、卵形成の間に X 染色体は再び 2 つとなる。X 染色体の不活性化は、計数、選択、不活性化の開始と進展、そして不活性化状態の維持というステップにより完成する。Xist 遺伝子 (Xq13.2 に存在) は、X 染色体中央部の不活性化中心と呼ばれる部位 (Xq11.2-q21.1) に存在し、活性な X 染色体 (active X: Xa) では不活性であり、Xi でのみ発現する。そして、不活性化開始の主要因子として働き、不活性化の進展とともに発現量が増大して、Xi をほぼ覆いつくし、不活性化状態の維

持に関わるとされる。その後、Xist は徐々に消失するが、Xi は構造変化を維持し、転写を抑制させ続ける (Schulz and Heard 2013)。なお、Xist はいわゆる non-coding RNA であり、転写産物はタンパク質に翻訳されず、RNA のままの姿で染色体の凝縮に働く遺伝子である (Gontan et al. 2011)。

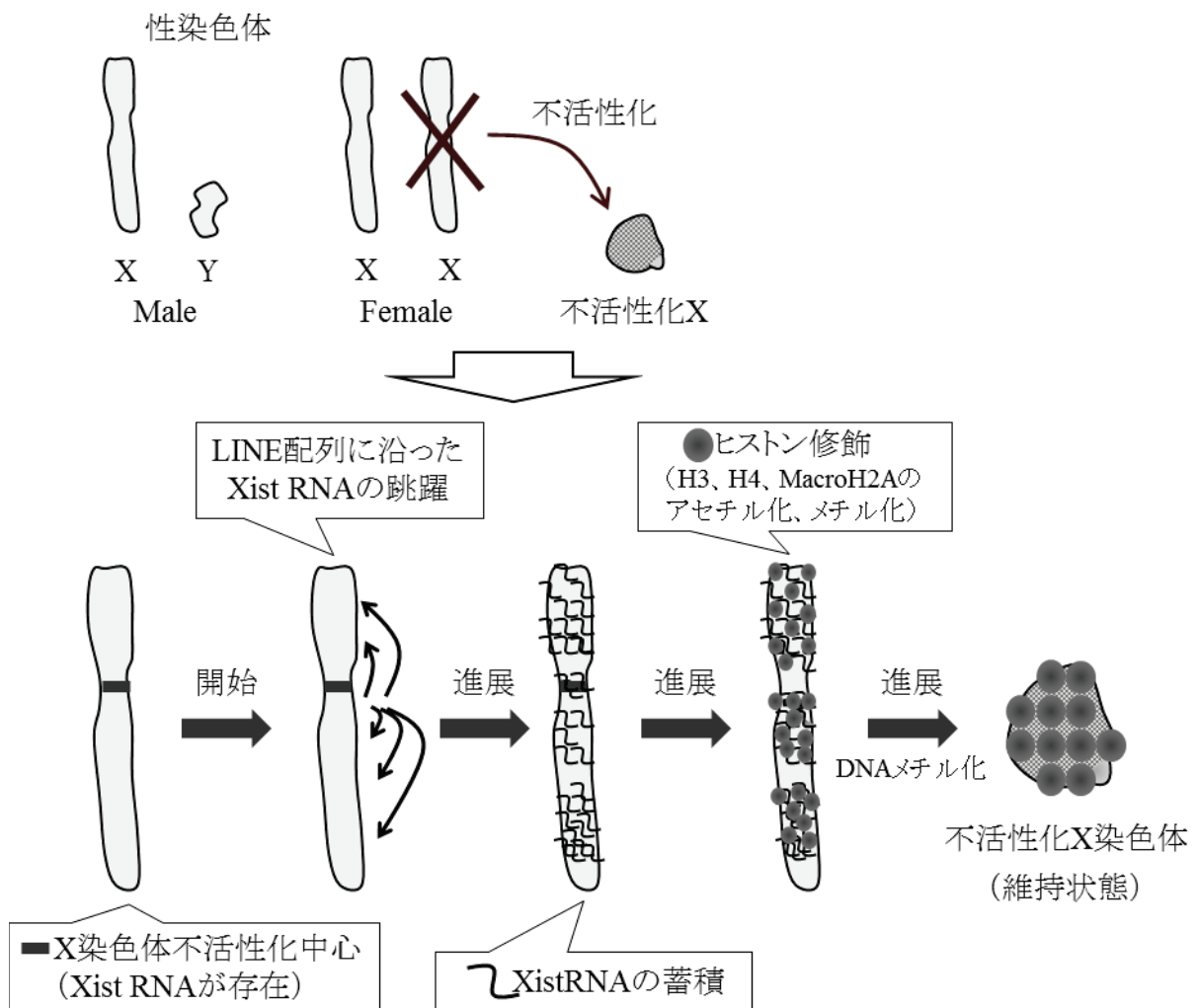
X 染色体の不活性化は、大部分の X 連鎖性遺伝子の発現制御に関与するが、その中には疾患の原因となる遺伝子の存在も数多く確認されている。X 連鎖性遺伝子の約 10% は精巣や一部の腫瘍に発現するタンパク質をコードしていること、また、常染色体に比べ多くのメンデル型遺伝病が X 染色体に起因しており、そのうちの 168 種類は 113 個の X 連鎖性遺伝子に生じた突然変異によって説明付けられる。これらに加え、X 染色体上の遺伝子は脳神経系組織に多く発現し、数々の精神神経疾患に関わるなど脳機能と深く関連付けられるものが多く含まれることが報告されている (Ross et al. 2005)。この報告では、分子機序が特定された X 染色体由来の疾病を 43 種類挙げ、そのうち、精神遅滞や自閉症などで精神疾患に関連するものとして 17 種類、滑脳症といった脳形成異常やてんかんなどを含めると、24 種類もの疾病が X 連鎖性遺伝子に関連付けられることを示している。ジョンズ・ホプキンス大学のビクトル・マキュージック博士が編纂した遺伝性疾患データベースであり、米国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information: NCBI) が随時アップデートしている OMIM データベース (Online Mendelian Inheritance in Man; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) を用いて精神遅滞原因遺伝子を検索すると 1,346 遺伝子が挙げられ、そのうち 340 遺伝子 (25.3%) が X 染色体上にある。同様に先天性疾患として 1,320 遺伝子中 336 遺伝子 (25.5%)、Multiple congenital anomaly (複合先天性疾患) 141 遺伝子中 51 遺伝子 (36.1%) が X 染色体上に存在していることが示されており、非常に大きい比率を占めている。各種精神・神経発達障害の原因となる X 連鎖性遺伝子は数多く報告されており、レット症候群 (原因遺伝子 *Mecp2*)、脆弱 X 症候群 (*Fmr1*, *Fmr2*)、Angelman 症候群 (*Ube3a*)、X 連鎖性精神遅滞 (*Ophn1*, *Pak3*, *Gdi1*, *Rps6ka3*, *Il1rap11*,

Tm4sf2, Facl4, Agtr2, Arhgef6, Slc6a8, Ftsj1, Znf4l, Dlg3) などがある。X連鎖性精神遅滞の原因遺伝子は非常に多く知られており、上記に加え90を超える遺伝子が報告され、そのマッピングは長腕からセントロメア、短腕に至るまでX染色体を網羅するほどである (Gecz et al. 2009)。精神遅滞のうち最大要因を占める XLMR (男性では人口1,000人あたり1.7人が罹患) は、文字通りX連鎖性の精神遅滞である。その他にもX連鎖 α サラセミアをはじめとする様々な発達障害や自閉症との関連が広く報告されている。これらの原因遺伝子はX染色体に広く分布しており、X染色体のどの分節にも何らかの要因が含まれ、X染色体不活性化の異常による影響が及ぶ可能性が高いと考えられる。また、X染色体に由来する性染色体異常症では、X染色体が過剰である (XXY、XXXY など) クラインフェルター症候群では認知、言語機能の遅れが、リングX染色体症候群では重度の精神遅滞を呈することが知られている。X染色体の一部が切断されそうになっているという特徴を持つ脆弱X症候群は精神遅滞の最大の原因であり、スーパー女性 (XXX、XXXX、XXXXX など) においても脳・精神機能の失調が確認されている。アンドロゲン不応症の原因となるアンドロゲン受容体もまたX連鎖性遺伝子であり、脳の性分化とも関連する。

すなわち、X連鎖性遺伝子は脳の発達や精神神経疾患との関連性が高いと考えられるが、一方で単独あるいはごく少数の遺伝子 (Xist および Tsix) で制御されること、不活性化機構はそもそも完全ではないこと (免れる部分が約2割と多く、そのパターンも個々によって大きく異なっている)、さらに、近年、化学物質の作用点としてエピジェネティクスに対する影響が数多く報告されているが、X染色体不活性化は代表的なエピジェネティクス機構であるDNAメチル化およびヒストン修飾をその作用メカニズムとしていることから、胎生期の化学物質曝露に対する脆弱性が高く、次世代の脳発達影響の作用点として重要ではないかという仮説を立てた。

以上のように、内分泌かく乱作用を示す化学物質の毒性評価は広範囲に行われてきたが、未だ確定的な解析方法は見出されておらず、最も本質的と考えられる性染色体機能に対する影響解析はほとんどなされていないのが現状である。そこで、本研究において著者は、化学物質の周産期曝露による次世代脳神経系発達に及ぼす影響に対して、従来型の内分泌系を指標とした評価に加え、X染色体不活性化機構に着目し、そのマスターレギュレーターである Xist 遺伝子を中心とした影響解析の体系化と評価を試みた。対象とした化学物質は、環境中に広範囲に存在しヒトにおいて周産期間に曝露を受ける可能性が高く、内分泌かく乱作用をもつ DE と BPA を用い、これらをマウスの周産期に曝露し、次世代における脳神経系への影響を検討した。検討項目として、内分泌かく乱の観点から脳内における内分泌関連受容体とその関連遺伝子の発現について、また、新規メカニズムとして X 染色体不活性化に着目し、その関連遺伝子発現変動について検討した。第一章では、胎児期および新生仔期 DE 曝露が次世代の脳神経系に及ぼす内分泌学的影響を性ホルモンおよび甲状腺ホルモン受容体関連遺伝子発現を中心として解析した。第二章では胎児期および新生仔期 DE 曝露が次世代の脳神経系に及ぼす影響に関して cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行い、そこで見出した知見をもとにして X 染色体不活性化因子および X 連鎖遺伝子発現への影響を解析した。第三章では胎児期 BPA 曝露が次世代の脳神経系に対する影響に関して、X 染色体不活性化、内分泌系に対する影響を解析した。

なお、本研究の実験動物を用いた全ての実験は、「東京理科大学動物実験指針」「奥羽大学動物実験指針」「国立環境研究所動物実験指針」に従って実施した。この指針は、国内の関連法令である「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、及び文部科学省により策定された「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、並びに日本学術会議が作成した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に基づき作られたものである。



別図1 X染色体不活性化機構の概念図

雌 (XX) はX染色体に由来する遺伝子量を雄 (XY)と均等にする必要があるため、発生の初期段階で片方のX染色体を不活性化させる。XistはX染色体不活性化を司る主要因子であり、不活性化の開始・進展・維持の全てに関わることでX連鎖遺伝子の発現を制御する。TsixはそのアンチセンスとしてXistの作用を抑制する。正常な不活性化にはXistとTsixの発現バランスが重要であるが、この変調はX連鎖遺伝子の幅広い変動を介し脳発達をはじめとする様々な疾病リスクを上昇させることが懸念される

第一章 ディーゼル排ガス周産期曝露が脳神経系に及ぼす影響

～脳の内分泌系を中心とした影響解析～

第一節 研究の背景と目的

大気汚染による環境汚染とその健康に及ぼす影響は、近代産業の発展とともに顕在化してきた。19世紀半ばにはすでにロンドンで特有の気象条件下で地表付近に空気が停滞することで引き起こされるいわゆるロンドン型スモッグの発生が報告されている。1952年には有名なロンドンスモッグ事件が発生、呼吸困難、チアノーゼ、発熱などを呈する人が多発し、この期間を含めた数週間の死亡者数は前年度の同時期よりも約4,000人多かった。死因の大部分は、慢性気管支炎、気管支肺炎、心臓病であり、死亡者の多くは慢性呼吸器疾患を有する高齢者であった。我が国における大気汚染の社会問題化は、1890年代の銅の精錬作業に伴う亜硝酸ガスの発生による足尾銅山の煙害に始まった。その後1960年代の高度経済成長期には、産業の重工業化に伴って極めて深刻化し、四日市ぜん息の発生や光化学スモッグの頻発など、多くの健康被害が引き起こされた。その結果、大気汚染防止法（1968年）や環境基本法（1993年）を始めとする多くの規制が実施されたことで、大気環境は大幅な改善を示しており、平成23年度調査において二酸化硫黄は環境基準達成率はほぼ100%となり、一酸化炭素も1970年から約9割減少し、環境基準値を完全に達成している。窒素酸化物も近年まで自動車排出測定局を中心に非達成が目立っていたが改善が続き、環境基準達成率はほぼ100%となっている。さらに、浮遊粒子状物質についても平成14年度まで基準値達成率は半数程度と低かったが、平成16年から22年まで達成率が概ね9割を超えるほど改善されている（環境省・平成23年度大気環境モニタリング実施結果）。窒素酸化物および浮遊粒子状物質の汚染状況が改善した要因として、1992年制定

(2007年改正)の「自動車から排出される窒素酸化物及び粒子状物質の特定地域における総量の削減等に関する特別措置法(自動車 NOx・PM 法)」が有効であったと考えられる。すなわち、両物質の主要排出源であるディーゼル車に対して、特に汚染状況が深刻であった関東および関西、中京地区の大都市圏において排出基準を厳格化したところ、窒素酸化物、浮遊粒子状物質とも過去10年間の年平均値が30~50%の低減を示し、対策前にはほとんど0%であった環境基準達成率が幹線道路に近い自動車排ガス測定局においても90%以上となるまでに改善された。さらに、わが国では平成21年10月から順次適用されるポスト新長期規制によって、ディーゼル車に加え、ガソリン車やその他燃料車においても両項目に対して世界最高水準の厳しい規制が課せられており、ディーゼル排気微粒子除去装置や窒素酸化物還元システムなどメーカーの技術革新も進行している。ところで、浮遊粒子状物質は粒子径が10 μ m以下のものを示すが、ディーゼル排気微粒子(Diesel exhaust particles: DEP)は2 μ m以下の粒子が中心となる。PM 2.5の発生要因は黄砂など一部に自然要因はあるが、ほとんどがディーゼル排気微粒子および工場のばいじん、そして二次生成粒子(窒素酸化物や硫黄酸化物、揮発性有機化合物などガス状物質が大気中で光化学反応によりアンモニアと反応し生成)と考えられている。一方、浮遊粒子状物質に比べて健康に対する影響が強いと考えられ、平成21年9月よりモニタリングの始まった粒子径2.5 μ m以下の微小粒子状物質(Particle matter 2.5: PM 2.5)の汚染状況は深刻で、環境基準達成率は27.6~29.4%と低率に留まっている。このように、我が国においてはPM 2.5を除く各種モニタリング結果は改善されてはいるものの、新興国を中心として諸外国においては、燃費がよく、機構が簡単でありかつ運搬能力の高いディーゼル車の需要は高く、その結果として浮遊粒子状物質や窒素酸化物を中心に汚染のひどい地域が多いこと、そして近年、中国大陸から飛来するPM 2.5が西日本を中心に観測される等、越境汚染の問題があり、依然としてDEによる健康影響は大きな問題となっている。

DEは主に窒素酸化物や硫黄酸化物、一酸化炭素、二酸化炭素などのガス体と、揮発性有機化合物などのガス状成分、そして粒子状成分から構成されている。大気中の

浮遊粒子状物質や窒素酸化物の約半数は自動車由来、そのほとんどが DE 由来であり、これまでの大気汚染の大きな要因であった。DEP は炭素の核を中心に多環芳香族炭化水素類 (Polycyclic aromatic hydrocarbon: PAHs) やダイオキシン類、ベンゾ[a]ピレン、各種金属酸化物など、千種類以上もの化学物質が吸着した複合物質である (別図 2)。

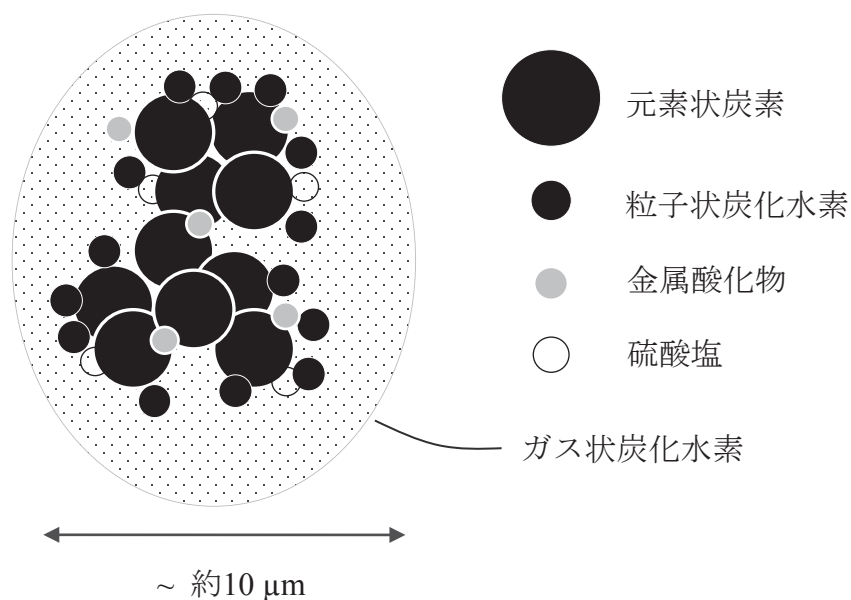
DE の生体に対する影響はこれまでに広く研究されてきており、DE 曝露を伴う職業集団や交通量の多い沿道住民に、気管支喘息など呼吸器系疾患 (Ristovski et al. 2012) や冠動脈疾患など循環器系疾患 (Hassing et al. 2009) などが高リスクで発症することが疫学調査により明らかになっている。さらに、DE 曝露と肺癌リスク増加との関係が示されたことにより、国際癌研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) は DE を Group1 (ヒトに対する発癌性が認められる) に分類した (Silverman et al. 2012)。

DEP には既述のように様々な化学物質が含まれて、そのエストロゲン様作用や抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用などが報告されており、内分泌かく乱作用が懸念されている (Takeda et al. 2004)。

Takano らは DEP の気管内投与によりダイオキシンによって誘導される薬物代謝系酵素である CYP1A1 (Cytochrome P450 1A1) が誘導されることを見出した。これは DEP 中に含まれる物質がダイオキシンと同様にアシルヒドロカーボン受容体を介した内分泌かく乱作用を示す可能性を示唆している (Takano et al. 2002)。

また近年、生殖機能への影響についても実験的研究が進み、一日精子産生量の低下や精子の運動障害、精細管の障害、精巣でテストステロンを産生するライディヒ細胞の変性 (Yoshida et al. 1999)、胎仔期での生殖腺分化に関わる Steroidogenic factor-1 (Ad4BP/SF-1) 及びミュラー管抑制因子 (Mullerian-inhibiting substance: MIS) の発現低下 (Yoshida et al. 2006)、妊娠マウスの異常分娩や雌出生マウスの性成熟や成長の異常 (Tsukue et al. 2002) などが報告されている。また、雄性生殖機能の低下は胎仔期や新生仔期に DE を吸入曝露させた仔マウスにおいても認められており (Kubo-Irie et al. 2011)、器官形成期の DE 吸入曝露が生後長期間時間経過をしても産仔の生殖能に影響を及ぼすことが判明している (Ono et al. 2007)。

以上のように、DE は内分泌かく乱作用が示されているものの、脳神経系への内分泌学的な影響については不明な点が多い。そこで本章では、胎仔期または新生仔期マウスに DE 吸入曝露を実施し、その内分泌かく乱作用について、主に関連遺伝子の発現変動の観点から検討した。検討遺伝子は先述の性ホルモン関連遺伝子として AR (androgen receptor) および ER α (estrogen receptor alpha)、ER β (estrogen receptor beta)、Aromatase、周産期の脳において性ホルモンとともに中枢神経系の発達に極めて重要な役割を果たす甲状腺ホルモン関連遺伝子として TR (thyroid hormone receptor) および Bdnf (brain-derived neurotrophic factor)、Nrgn (neurogranin)、そして DE 周産期曝露の新生仔脳への到達可能性を検討する目的で、ストレス関連遺伝子として DE 曝露のマーカーであり、またアリルハイドロカーボン受容体 (Aryl Hydrocarbon Receptor: AhR) を起点とした内分泌かく乱機構に関わる Cyp1a1、酸化ストレスなど様々なストレス因子によって誘導される HO-1 (heme oxygenase-1)、金属成分によって誘導される MT-1 (metallothionein-1) を選択した。



別図2 DEPの構造の模式図

元素状炭素を中心に様々な物質が吸着している。

第二節 実験方法

2.1 試薬類

本研究で用いた試薬は特に記載がない場合を除き、市販特級試薬を用いた。また、とくに記述がなく水と記載にある場合には、Milli-Q®水 (Automatic sanitization module、日本ミリポア、東京) を高圧蒸気滅菌したものをを用いた。

2.2 供試動物

SLC(株) (静岡) より購入した ICR 系妊娠マウスを用いた。

2.3 ディーゼル排ガス曝露

2.3.1 ディーゼル排ガス曝露装置

国立環境研究所 (つくば市) の DE 曝露室に設置された曝露チャンバーを用いた。チャンバーは 2.2 m³の立方体の上下に四角錐をのせた形状で、室温 24 ± 1 °C、湿度 60 ± 15 %に維持されている。DE は排気量 3,059 cc 四気筒のディーゼルエンジン (いすゞ社製 4JG2-type) を、回転数 1,500 rpm、トルク数 10 kg・m の回転数で運転することで発生させた。これを直径 300 mm、長さ 8.14 m の希釈トンネルに誘導し、正常空気で希釈して濃度を調節しチャンバー内に排出した。希釈率は 2 : 1 (清浄空気 4 m³:排ガス 2 m³)、燃料は標準的な軽油 (新日本石油製) を用い、その硫黄含量は 20 ppm 以下であった。チャンバー内の DEP 濃度は微粒子カウンター (柴田科学、東京、AP-632TM & MR-632) で、粒子径は低圧力アンダーセンエアサンプラー (柴田科学、東京、AN-200) で測定され、平均粒子径は 0.3 ~ 0.4 μm であった。さらに NO₂および NO 濃度は冷却化減圧式化学発光法による窒素酸化物濃度計 (Thermo Scientific, Tewksbury, MA, USA, NO-NO₂-NO_x analyzer model42)、SO₂濃度は紫外線蛍光による二酸化硫黄分析計 (Casella Measurement, Bedford, UK, ML-9850)、CO₂濃度は遠赤外線式ガス濃度測定装置

(島津製作所、京都、CGT-10-3A) で測定した。その平均値を Table 1 に示した。

2.3.2 ディーゼル排ガス曝露条件

曝露時間は 1 日 12 時間 (午後 10 時～午前 10 時) とし、期間中は毎日曝露させた。control 群は同じ形状のチャンバーで清浄空気下で飼育した。各群とも固形飼料 (日本クレア、東京、CE-II) および飲料水は自由摂取、12 時間ごとの明暗周期 (午前 7 時から午後 7 時までを明期、午後 7 時から午前 7 時までを暗期) として飼育した。なお成長に伴うばらつきを回避する目的で、5 日齢の時点で母親一匹に対する仔の匹数を雌雄 5 匹ずつ、合計 10 匹となるように揃えている。

2.3.3 胎仔期曝露

妊娠 1 日目のマウスを購入 (妊娠 0 日はプラグ陽性でチェック)、濃度 0.3、1.0、3.0 mg DEP/m³ および Control 群の 4 群に振り分け、それぞれ妊娠 2 日目 (午後 10 時より開始) から妊娠 16 日目まで曝露チャンバー内にて曝露した。その後、清浄空気下に移し、出生後 (post natal day: PND) 2、5、16 日の時点で仔を解剖に供し試料採取を行った。

2.3.4 新生仔期曝露

妊娠 14 日目のマウスを購入 (妊娠 0 日はプラグ陽性でチェック)、濃度 3.0 mg DEP/m³ および Control 群の 2 群に振り分け、それぞれ出産日 (0 日齢、午後 10 時より開始) より母仔ともに曝露内チャンバーにて曝露した。2、5、16 日齢の時点で仔を解剖に供し、試料採取を行った。

2.4 試料採取

体重測定後、ジエチルエーテル (和光純薬、東京、和光一級、052-01165) 麻酔下で心採血を行い、直ちに脳を摘出した。脳は重量測定後、大脳部を切り分け 1.5 mL

チューブに入れ、液体窒素で急冷し、用時まで-80 °C で保存した。

2.5 遺伝子発現量の解析

2.5.1 Total RNA の抽出

-80 °C に凍結していた大脳に ISOGEN (ニッポンジーン、東京、311-02501) 1 mL を加え、ホモジナイザー (日立製作所、東京、HG30) により粉砕、5 分間室温で静置した。クロロホルム (関東化学、東京、試薬特級、07278-00) 200 μ L を加え良く攪拌し、室温で3分間静置した。その後4 °C、14,500 rpm で15分間遠心し、再び室温で3分間静置した。その水層を別のチューブに移しイソプロパノール (関東化学、東京、試薬特級、32435-00) 500 μ L を加えて攪拌、室温で10分間静置しRNAを析出させた。静置後、4 °C、14,500 rpm で10分間遠心し、RNAを沈殿させた後、上澄を除去した。75 %エタノール (99.5 %エタノール : 和光純薬、大阪、試薬特級、057-00456 を精製水で希釈して使用) を加えて4 °C、14,500 rpm で5分間遠心、再度沈殿させRNAを精製させた。エタノールを除去後、キムタオルの上にチューブを逆さに立て、風乾した。最後に水を加えて total RNA 水溶液とし、-80 °C で保存した。

2.5.2 DNase 処理

4-1 により得た total RNA 水溶液を水で希釈、吸光度計 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA, GeneQuantII) を用いて濃度を 0.5 ~ 1.0 μ g / 16 μ L に調製した。1 検体あたり RQ1 DNase 10 \times Reaction Buffer (Promega, Madison, WI, USA, M198A-13573503) 2 μ L、RNasin[®] RNase Inhibitor (Promega, Madison, WI, USA, N211A-16033204) 0.5 μ L、RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA, M610A-12358515) 1 μ L、水 0.5 μ L の割合になるように Premix を調製した。これを各検体に 4 μ L ずつ加え、サーマルサイクラー (タカラバイオ、滋賀、PCR Thermal Cycler MP) を用いて 37 °C、30 分間反応させた。反応終了後、RQ1 DNase Stop Solution (Promega, Madison, WI, USA, M199A-12595403) 希釈液 23 μ L を加え、65 °C で 10 分間反応させ

て DNase を失活させた。失活処理後、検体を氷上に移し急冷した。

2.5.3 逆転写反応

1 検体あたり、Random Primer (タカラバイオ、滋賀、3801) 10 μ L、5 \times 1st Standard Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Y00146) 20 μ L、dNTP (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 402919) 25 μ L、M-MLV RTase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 28025-013) 2 μ L、DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Y00147) 1 μ L の割合になるように Premix を調製した。これを各検体に 58 μ L ずつ加え、サーマルサイクラーを用いて 37 $^{\circ}$ C で 60 分間、90 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させ cDNA を作成、氷上に移し急冷した。

2.5.4 リアルタイム PCR 法

標的遺伝子のプライマー (Forward primer および Reverse primer / 各 100 pM) を混合、3.0 pM となるよう水で希釈した。希釈プライマー 5.0 μ L、蛍光標識プローブ 2.5 μ L、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 4324020) 12.5 μ L を 1 検体分として Premix を調製した。続いて、cDNA 溶液を少量ずつ採集して検量線作成用 cDNA 原液とし、それを順次 10 倍希釈して検量線作成用の cDNA 溶液とした。検量線作成用 cDNA および合成した各検体の 5 倍希釈液をそれぞれ 5.0 μ L ずつ 96 穴 PCR 反応プレート (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 128) に注入し、そこへ先に調製した Premix を 20 μ L ずつ加えて専用シール (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 4311971) で封を施し、振盪機 (TAITEC、東京 Microincubator M-36) で 10 分間攪拌した。次にプレート用遠心機 (日立製作所、東京、Himac Centrifuge SCT5B) を用いて室温下 1,500 rpm で 5 分間遠心し、ウェル内の気泡を除去した。これを ABI PRISM 7700 Sequence Detective System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) にセットし、95 $^{\circ}$ C 5 分の熱変性 5 分の後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分を 40 サイクル行い増幅した。また内部標準遺伝子として Gapdh についても同様に操作し、同じプレート上で増幅反応を行った。Gapdh は一般的に汎用される内部標準

遺伝子であり、ICR マウスにおける使用に関しても多くの論文で示されている (Ono et al. 2007) (Yoshida et al. 2002)。データ解析には各サンプルにつき 2 ウェルを使用し、その平均値を *Gapdh* の平均値で割ることで補正を行った。なお、ここで用いたプライマーおよびプローブは、設計後、作成を Applied Biosystem 社に依頼した。測定遺伝子はストレス関連遺伝子として *Cyp1a1*、*HO-1*、*MT-1*、ステロイドホルモン関連遺伝子として *AR*、*ER α* 、*ER β* 、*Aromatase*、甲状腺ホルモン関連遺伝子として *TR*、*Bdnf*、*Nrgn* とした。その塩基配列および鎖長、PCR 産物のサイズを Table 2 に示した。

2.6 統計処理

結果は全て平均値±標準偏差 (S.D.) で示した。有意差検定は Dunnett's 検定を行った。

Table 1 Exposure chamber components

| Component | Control | 0.3 mg DEP/m ³ | 1.0 mg DEP/m ³ | 3.0 mg DEP/m ³ |
|--------------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Particles (mg/m ³) | 0.004 ± 0.00002 | 0.300 ± 0.011 | 1.000 ± 0.032 | 2.992 ± 0.048 |
| Gaseous | | | | |
| NO ₂ (ppm) | 0.119 ± 0.009 | 1.339 ± 0.088 | 4.615 ± 0.357 | 10.523 ± 0.920 |
| NO (ppm) | 0.060 ± 0.006 | 3.243 ± 0.296 | 11.748 ± 1.183 | 27.488 ± 2.004 |
| SO ₂ (ppm) | 0.024 ± 0.001 | 0.075 ± 0.003 | 0.207 ± 0.013 | 0.391 ± 0.042 |
| CO ₂ (ppm) | 651.06 ± 65.09 | 1880.61 ± 115.07 | 4922.25 ± 243.80 | 9718.31 ± 556.48 |
| CO (ppm) | 0.000 ± 0.000 | 0.858 ± 0.214 | 8.585 ± 0.928 | 24.457 ± 2.316 |

Data are mean ± S.E. of components present in the chamber. ppm: parts per million.

第三節 実験結果

3.1 体重および脳重量への影響

胎仔期曝露では、雄性出生仔において体重に有意な差はなかったが、5日齢 0.3 mg DEP/m³曝露群において脳重量の有意な減少が認められた。雌性出生仔は5日齢 0.3、3.0 mg DEP/m³曝露群に有意な体重減少が認められた。脳重量に有意な差はなかったが、体重補正を行った脳重量は5日齢 3.0 mg DEP/m³曝露群で有意な増加が認められた (Table 3)。

新生仔期曝露では、雄性出生仔において5日齢 0.3 mg DEP/m³曝露群、16日齢 0.3、1.0 mg DEP/m³曝露群で有意な体重増加がまた、16日齢 0.3 mg DEP/m³曝露群において脳重量の有意な増加が認められた。一方、体重補正を行った脳重量は16日齢 0.3、1.0 mg DEP/m³曝露群で有意な減少が認められた。雌性出生仔では16日齢 0.3 mg DEP/m³曝露群で有意な体重増加が認められ、脳重量は2日齢 1.0 mg DEP/m³曝露群で有意な減少、16日齢 0.3、1.0 mg DEP/m³曝露群で有意な増加が認められた。体重補正を行った脳重量は5日齢 0.3 mg DEP/m³曝露群で有意な減少が認められた (Table 4)。

同腹仔数および出生仔の性比に有意な差は認められなかった。

3.2 胎仔期曝露の遺伝子発現への影響

雄性出生仔について、ストレス関連遺伝子として Cyp1a1 の発現上昇 (PND2 1.0 mg DEP/m³)、MT-1 の発現変動 (PND2 3.0 mg DEP/m³で発現上昇、PND16 0.3 mg DEP/m³で発現減少) が認められた。HO-1 に有意な差は認められなかった。性ホルモン関連遺伝子として ER α (PND5 3.0 mg DEP/m³)、ER β (PND5 1.0 mg DEP/m³)、Aromatase (PND5 3.0 mg DEP/m³) の発現上昇が認められた。AR に有意な差はなかった。甲状腺ホルモン関連遺伝子として TR (PND5 0.3, 1.0 mg DEP/m³) の発現上昇が認められた。Bdnf、Neurogranin に有意な差はなかった (Table 5)。

雌性出生仔について、ストレス関連遺伝子として Cyp1a1 (PND2 3.0 mg DEP/m³)、HO-1 (PND5 1.0 mg DEP/m³) の発現上昇がみられた。MT-1 に有意な差はなかった。性ホルモン関連遺伝子として ER α (PND2 1.0, 3.0mg、PND16 0.3, 1.0 mg DEP/m³)、ER β (PND2 1.0 mg DEP/m³)、Aromatase (PND2 3.0 mg DEP/m³) の発現上昇、AR の発現減少 (PND5 0.3 mg DEP/m³) が認められた。甲状腺ホルモン関連遺伝子として TR の発現上昇 (PND2 3.0 mg DEP/m³)、Neurogranin の発現減少 (PND2 0.3 mg DEP/m³、PND5 0.3, 1.0, 3.0 mg DEP/m³) が認められた。Bdnf に有意な差はなかった (Table 6)。

3.3 新生仔期曝露の遺伝子発現への影響

雄性出生仔について、ストレス関連遺伝子として Cyp1a1 (PND5 1.0, 3.0 mg DEP/m³)、HO-1 (PND2 0.3, 3.0 mg DEP/m³、PND5 1.0 3.0 mg DEP/m³、PND16 3.0 mg DEP/m³) の発現上昇、MT-1 の発現減少 (PND5 3.0mg) が認められた。性ホルモン関連遺伝子として ER α の発現上昇 (PND2 3.0 mg DEP/m³) が認められたが、ER β 、AR、Aromatase に有意な差はなかった。甲状腺ホルモン関連遺伝子についても有意な差はなかった (Table 7)。

雌性出生仔について、ストレス関連遺伝子として Cyp1a1 の発現上昇 (PND5 3.0 mg DEP/m³)、MT-1 の発現減少 (PND2 1.0, 3.0 mg DEP/m³) がみられたが、HO-1 に有意な差はなかった。性ホルモン関連遺伝子として ER α の発現上昇 (PND2 3.0 mg DEP/m³、PND5 0.3 mg DEP/m³、PND16 1.0 mg DEP/m³) がみられたが、ER β 、AR、Aromatase に有意な差はなかった。甲状腺ホルモン関連遺伝子として Bdnf (PND2 1.0 mg DEP/m³)、Neurogranin (PND16 0.3, 1.0, 3.0 mg DEP/m³) の発現上昇、TR の発現減少 (PND5 1.0 mg DEP/m³) が認められた (Table 8)。

Table 2 PCR primer pair and probe sequences for real-time PCR

| <i>Gene</i> | Sequence (5'→3') | Length (bp) |
|---|-------------------------------|-------------|
| <i>Gapdh</i> (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GenBank NM_008084</i>) | | 176 |
| Forward primer | TGCACCACCAACTGCTTAG | 19 |
| Reverse primer | GGATGCAGGGATGATGTTC | 19 |
| Probe | CAGAAGACTGTGGATGGCCCCTC | 23 |
| <i>ERα</i> (<i>Estrogen reseptor alpha: GenBank NM_007956</i>) | | 73 |
| Forward primer | CCAGCAGTAACGAGAAAGGAAAC | 23 |
| Reverse primer | TCATTGCACACGGCACAGTA | 20 |
| Probe | TGATCATGGAGTCTGCCAAGGAGACTCG | 28 |
| <i>ERβ</i> (<i>Estrogene reseptor beta: GenBank U81451</i>) | | 125 |
| Forward primer | AGTCCGCCTCTTGGAAAGCT | 20 |
| Reverse primer | ACTTCCCCTCATCCCTGTCC | 20 |
| Probe | CCCACCATCAGCACCTCCATCCA | 23 |
| <i>AR</i> (<i>Androgen reseptor: GenBank NM_013476</i>) | | 67 |
| Forward primer | CCAGATGGCGGTCATTCAGT | 20 |
| Reverse primer | GAAGGACCGCCAACCCA | 17 |
| Probe | TTCTGGATGGGACTGATGGTATTTGCC | 28 |
| <i>Aromatase</i> (<i>GenBank D00659</i>) | | 101 |
| Forward primer | CTGTACTIONCATGTTACTTCTCGTCGC | 26 |
| Reverse primer | TCGATCTTTATGTCTCTGTCACCC | 24 |
| Probe | ATCCAGAGGTCTGAAGCAGCAATCCTG | 28 |
| <i>Cyp11a1</i> (<i>Cytochrome P450 a1: GenBank X01681</i>) | | 254 |
| Forward primer | CATTCATCCTTCGTCCCCTTC | 21 |
| Reverse primer | CACTGGTTCACAAAGACACAGCA | 23 |
| Probe | CCCACAGCACCACAAGAGATACAAGTCTG | 29 |
| <i>HO-1</i> (<i>Heme oxygenase-1: GenBank NM_010442</i>) | | 68 |
| Forward primer | GGTGATGGAGCGTCCACAG | 19 |
| Reverse primer | TGGTGGCCTCCTTCAAGG | 18 |

| | | |
|--|----------------------------|----|
| Probe | CGACAGCATGCCCCAGGATTTGTC | 24 |
| <i>MT-1 (Metallothionein-1: GenBank NM_013602)</i> | | |
| Forward primer | CTCCACCGGCGGCTC | 15 |
| Reverse primer | CGGCGCCTTTGCAGAC | 16 |
| Probe | CTGCTCCAAATGTGCCCAGGGCT | 24 |
| <i>TR (Thyroid hormone receptor: GenBank NM_178060)</i> | | |
| Forward primer | GGCAGCCATTGGAAACAGA | 19 |
| Reverse primer | CCGGCATGGAGACAATAGGT | 20 |
| Probe | AATTCCTGCCGGATGACATTGGCC | 24 |
| <i>Bdnf (Brain-derived neurotrophic factor: GenBank NM_007540)</i> | | |
| Forward primer | CGTGACAACAATGTGACTCCACT | 23 |
| Reverse primer | TGCAACCGAAGTATGAAATAACCA | 24 |
| Probe | TCAGGGTCCACACAAAGCTCTCGGAT | 26 |
| <i>Nrgn (Neurogranin: GenBank BC138511)</i> | | |
| Forward primer | GACCCTCAACACCGGCAAT | 19 |
| Reverse primer | AATATCGTCGTCTGGCTTGGA | 21 |
| Probe | AGGCGCTCTCCGTGCAGCAGTC | 22 |

Table 3 Effect of fetal exposure to diesel exhaust on body and brain weight in mice.

| Male | Controls | 0.3 mg DEP/m ³ | 1.0 mg DEP/m ³ | 3.0 mg DEP/m ³ |
|--------------|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| PND 2 | | | | |
| BW (g) | 2.24 ± 0.26 | 2.41 ± 0.21 | 2.45 ± 0.43 | 2.26 ± 0.32 |
| Brain (g) | 0.128 ± 0.012 | 0.131 ± 0.010 | 0.132 ± 0.010 | 0.126 ± 0.015 |
| Brain/BW (%) | 5.75 ± 0.40 | 5.44 ± 0.42 | 5.54 ± 0.84 | 5.62 ± 0.39 |
| PND 5 | | | | |
| BW (g) | 4.10 ± 0.42 | 3.70 ± 0.59 | 4.07 ± 0.71 | 3.77 ± 0.52 |
| Brain (g) | 0.223 ± 0.015 | 0.202 ± 0.023* | 0.223 ± 0.023 | 0.209 ± 0.019 |
| Brain/BW (%) | 5.46 ± 0.46 | 5.53 ± 0.63 | 5.56 ± 0.64 | 5.59 ± 0.52 |
| PND 16 | | | | |
| BW (g) | 8.95 ± 3.18 | 10.17 ± 1.19 | 8.79 ± 1.72 | 8.55 ± 2.02 |
| Brain (g) | 0.400 ± 0.045 | 0.421 ± 0.028 | 0.401 ± 0.033 | 0.403 ± 0.025 |
| Brain/BW (%) | 5.05 ± 1.81 | 4.17 ± 0.39 | 4.70 ± 0.79 | 4.94 ± 1.03 |
| Female | | | | |
| PND 2 | | | | |
| BW (g) | 2.32 ± 0.15 | 2.24 ± 0.28 | 2.38 ± 0.36 | 2.20 ± 0.16 |
| Brain (g) | 0.129 ± 0.008 | 0.124 ± 0.013 | 0.132 ± 0.012 | 0.126 ± 0.007 |
| Brain/BW (%) | 5.56 ± 0.28 | 5.57 ± 0.43 | 5.61 ± 0.44 | 5.74 ± 0.40 |
| PND 5 | | | | |
| BW (g) | 4.17 ± 0.45 | 3.48 ± 0.57* | 3.87 ± 0.82 | 3.49 ± 0.45* |
| Brain (g) | 0.218 ± 0.020 | 0.200 ± 0.018 | 0.212 ± 0.026 | 0.208 ± 0.014 |
| Brain/BW (%) | 5.36 ± 0.46 | 5.84 ± 0.63 | 5.58 ± 0.56 | 6.00 ± 0.54* |
| PND 16 | | | | |
| BW (g) | 9.25 ± 2.29 | 9.91 ± 1.29 | 9.07 ± 1.82 | 8.17 ± 1.67 |
| Brain (g) | 0.410 ± 0.027 | 0.408 ± 0.017 | 0.402 ± 0.020 | 0.390 ± 0.024 |
| Brain/BW (%) | 4.69 ± 1.18 | 4.17 ± 0.44 | 4.60 ± 0.91 | 4.93 ± 0.84 |

Data are mean ± S.D. *: $p < 0.05$ vs. control by Dunnett's test. BW: Body weight. Each group contained 10-14 mice.

Table 4 Effect of neonatal exposure to diesel exhaust on body and brain weight in mice.

| Male | Controls | 0.3 mg DEP/m ³ | 1.0 mg DEP/m ³ | 3.0 mg DEP/m ³ |
|--------------|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| PND 2 | | | | |
| BW (g) | 2.36 ± 0.27 | 2.44 ± 0.26 | 2.27 ± 0.31 | 2.37 ± 0.20 |
| Brain (g) | 0.137 ± 0.013 | 0.135 ± 0.010 | 0.134 ± 0.011 | 0.138 ± 0.007 |
| Brain/BW (%) | 5.86 ± 0.56 | 5.59 ± 0.36 | 5.97 ± 0.55 | 5.86 ± 0.38 |
| PND 5 | | | | |
| BW (g) | 3.76 ± 0.53 | 3.88 ± 0.66* | 3.64 ± 0.52 | 3.72 ± 0.35 |
| Brain (g) | 0.216 ± 0.017 | 0.207 ± 0.018 | 0.211 ± 0.016 | 0.217 ± 0.014 |
| Brain/BW (%) | 5.80 ± 0.54 | 5.42 ± 0.52 | 5.85 ± 0.48 | 5.87 ± 0.37 |
| PND 16 | | | | |
| BW (g) | 7.67 ± 1.26 | 9.58 ± 2.08** | 9.43 ± 1.19** | 8.52 ± 1.55 |
| Brain (g) | 0.399 ± 0.021 | 0.424 ± 0.023** | 0.417 ± 0.018 | 0.409 ± 0.023 |
| Brain/BW (%) | 5.31 ± 0.74 | 4.56 ± 0.71* | 4.47 ± 0.41** | 4.93 ± 0.80 |
| Female | | | | |
| PND 2 | | | | |
| BW (g) | 2.35 ± 0.21 | 2.30 ± 0.25 | 2.19 ± 0.31 | 2.21 ± 0.19 |
| Brain (g) | 0.137 ± 0.008 | 0.133 ± 0.010 | 0.128 ± 0.009* | 0.133 ± 0.008 |
| Brain/BW (%) | 5.86 ± 0.48 | 5.80 ± 0.35 | 5.93 ± 0.54 | 6.03 ± 0.36 |
| PND 5 | | | | |
| BW (g) | 3.34 ± 0.54 | 3.77 ± 0.63 | 3.53 ± 0.49 | 3.47 ± 0.31 |
| Brain (g) | 0.194 ± 0.053 | 0.211 ± 0.019 | 0.212 ± 0.025 | 0.208 ± 0.012 |
| Brain/BW (%) | 6.25 ± 0.65 | 5.67 ± 0.55* | 6.06 ± 0.76 | 6.03 ± 0.46 |
| PND 16 | | | | |
| BW (g) | 8.06 ± 1.23 | 9.60 ± 2.02* | 9.34 ± 1.32 | 8.94 ± 1.54 |
| Brain (g) | 0.391 ± 0.028 | 0.414 ± 0.024* | 0.418 ± 0.018* | 0.408 ± 0.024 |
| Brain/BW (%) | 4.95 ± 0.73 | 4.45 ± 0.74 | 4.53 ± 0.41 | 4.65 ± 0.76 |

Data are mean ± S.D. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control by Dunnett's test. BW: Body weight.

Each group contained 13-17 mice.

Table 5 Effect of fetal exposure to diesel exhaust on mRNA expression in male mice.

| PND 2 | Control | 0.3 mg DEP/m ³ (% of control) | 1.0 mg DEP/m ³ (% of control) | 3.0 mg DEP/m ³ (% of control) |
|-------------------------------|----------------------|--|--|--|
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 344.7 ± 94.5 | 344.0 ± 72.1 (99.8) | 540.6 ± 112.9* (156.8) | 442.9 ± 155.0 (128.5) |
| <i>HO-1</i> | 8265.0 ± 1462.3 | 8763.3 ± 362.1 (106.0) | 7302.0 ± 633.5 (88.3) | 7746.0 ± 487.8 (93.7) |
| <i>MT-1</i> | 16381.5 ± 5721.3 | 22677.0 ± 3962.0 (138.4) | 22382.5 ± 1363.6 (136.6) | 29635.8 ± 2966.4*** (180.9) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 2470.8 ± 212.8 | 2431.5 ± 394.4 (98.4) | 2411.6 ± 376.5 (97.6) | 2601.9 ± 140.2 (105.3) |
| <i>ER beta</i> | 113.6 ± 42.1 | 133.6 ± 40.2 (117.6) | 170.4 ± 107.0 (150.0) | 160.6 ± 29.7 (141.4) |
| <i>AR</i> | 934.2 ± 138.4 | 885.2 ± 180.9 (94.8) | 1004.8 ± 172.7 (107.6) | 1033.8 ± 74.3 (110.7) |
| <i>Aromatase</i> | 263.3 ± 58.0 | 254.1 ± 63.7 (96.5) | 303.0 ± 17.7 (115.1) | 263.7 ± 60.0 (100.1) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 823346.2 ± 109306.6 | 913060.2 ± 70529.2 (110.9) | 852494.8 ± 46700.4 (103.5) | 884287.0 ± 62586.6 (107.4) |
| <i>Bdnf</i> | 485.1 ± 108.1 | 465.1 ± 78.5 (95.9) | 511.7 ± 40.1 (105.5) | 542.9 ± 89.6 (111.9) |
| <i>Nrgn</i> | 414853.5 ± 88432.4 | 448480.6 ± 24465.7 (108.1) | 481988.5 ± 95225.0 (116.2) | 397786.0 ± 61276.7 (95.9) |
| PND 5 | | | | |
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 681.1 ± 203.2 | 692.6 ± 187.8 (101.7) | 796.3 ± 131.7 (116.9) | 659.5 ± 384.2 (96.8) |
| <i>HO-1</i> | 16726.3 ± 2229.9 | 19084.8 ± 1198.9 (114.1) | 18822.6 ± 2208.7 (112.5) | 16230.2 ± 619.9 (97.0) |
| <i>MT-1</i> | 65275.5 ± 13139.1 | 70320.6 ± 8613.0 (107.7) | 71611.1 ± 17441.5 (109.7) | 54590.8 ± 2940.0 (83.6) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 1095.8 ± 193.5 | 1193.6 ± 152.9 (108.9) | 1216.2 ± 182.9 (111.0) | 1550.5 ± 160.8** (141.5) |
| <i>ER beta</i> | 224.4 ± 54.8 | 245.5 ± 49.8 (109.4) | 330.3 ± 88.8* (147.2) | 316.4 ± 42.1 (141.0) |
| <i>AR</i> | 1475.3 ± 168.3 | 1403.1 ± 278.7 (95.1) | 1450.2 ± 150.6 (98.3) | 1588.7 ± 90.6 (107.7) |
| <i>Aromatase</i> | 177.6 ± 14.0 | 189.5 ± 20.2 (106.7) | 193.3 ± 27.2 (108.8) | 241.4 ± 59.2* (135.9) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 793220.3 ± 82645.1 | 954284.7 ± 44844.1* (120.3) | 905240.8 ± 153561.3* (114.1) | 939081.0 ± 72187.1 (118.4) |
| <i>Bdnf</i> | 723.2 ± 110.9 | 750.0 ± 97.6 (103.7) | 794.7 ± 104.1 (109.9) | 751.6 ± 68.3 (103.9) |
| <i>Nrgn</i> | 717516.6 ± 48708.4 | 625142.2 ± 96993.5 (87.1) | 708550.8 ± 81215.7 (98.8) | 755930.3 ± 86692.2 (105.4) |
| PND 16 | | | | |
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 122.4 ± 26.8 | 130.5 ± 26.9 (106.6) | 100.9 ± 37.7 (82.4) | 133.3 ± 51.4 (108.9) |
| <i>HO-1</i> | 6952.1 ± 749.5 | 7619.8 ± 1142.0 (109.6) | 8529.6 ± 1164.8 (122.7) | 8609.9 ± 1036.6 (123.8) |
| <i>MT-1</i> | 255778.3 ± 81960.8 | 136123.0 ± 32776.6* (53.2) | 184818.9 ± 69828.6 (72.3) | 159244.5 ± 43695.8 (62.3) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 663.6 ± 81.4 | 586.1 ± 82.4 (88.3) | 717.1 ± 67.5 (108.1) | 594.8 ± 101.9 (89.6) |
| <i>ER beta</i> | 101.9 ± 22.2 | 102.1 ± 21.7 (100.2) | 116.3 ± 32.0 (114.2) | 119.2 ± 21.7 (117.0) |
| <i>AR</i> | 4292.0 ± 434.3 | 4369.7 ± 626.9 (101.8) | 4670.1 ± 402.6 (108.8) | 4319.4 ± 352.2 (100.6) |
| <i>Aromatase</i> | 95.2 ± 14.6 | 83.9 ± 7.1 (88.1) | 103.3 ± 13.9 (108.5) | 94.0 ± 17.2 (98.7) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 441183.8 ± 100455.7 | 407878.9 ± 17390.7 (92.5) | 450240.0 ± 32763.8 (102.1) | 540065.7 ± 119801.4 (122.4) |
| <i>Bdnf</i> | 1441.4 ± 204.4 | 1460.9 ± 151.9 (101.4) | 1579.5 ± 233.2 (109.6) | 1506.3 ± 236.2 (104.5) |
| <i>Nrgn</i> | 1230501.6 ± 111725.3 | 1323928.6 ± 45117.1 (95.9) | 1459844.3 ± 164212.7 (118.6) | 1342119.9 ± 160356.4 (109.1) |

Data ($\times 10^6$) show the ratio of target mRNA expression to *Gapdh* mRNA expression (% of control), and are mean \pm S.D. for 4-6 mice per group. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control by Dunnett's test.

Table 6 Effect of fetal exposure to diesel exhaust on mRNA expression in female mice.

| PND 2 | Control | 0.3 mg DEP/m ³ (% of control) | 1.0 mg DEP/m ³ (% of control) | 3.0 mg DEP/m ³ (% of control) |
|-------------------------------|----------------------|--|--|--|
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 219.0 ± 38.8 | 232.8 ± 49.7 (106.3) | 261.7 ± 41.9 (119.5) | 418.9 ± 144.9** (191.3) |
| <i>HO-1</i> | 15738.1 ± 1977.2 | 17877.2 ± 2504.4 (113.6) | 17542.2 ± 1599.2 (111.5) | 16412.2 ± 542.7 (104.3) |
| <i>MT-1</i> | 31028.8 ± 7652.4 | 39881.3 ± 17679.5 (128.5) | 30451.5 ± 4241.1 (98.1) | 30904.9 ± 9383.9 (99.6) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 3898.3 ± 397.4 | 4484.7 ± 820.6 (115.0) | 6116.5 ± 353.2*** (156.9) | 6317.7 ± 538.7*** (162.1) |
| <i>ER beta</i> | 338.3 ± 51.7 | 366.5 ± 104.1 (108.3) | 526.2 ± 74.4* (155.5) | 400.8 ± 86.7 (118.5) |
| <i>AR</i> | 1074.0 ± 191.0 | 853.3 ± 124.6 (79.5) | 1115.0 ± 226.5 (103.8) | 1172.7 ± 115.3 (109.2) |
| <i>Aromatase</i> | 271.2 ± 26.2 | 283.4 ± 49.9 (104.5) | 326.6 ± 46.5 (120.4) | 382.5 ± 20.0*** (141.0) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 804699.2 ± 86465.6 | 815917.1 ± 80711.9 (101.4) | 870431.8 ± 107996.5 (108.2) | 975733.1 ± 108108.7* (121.3) |
| <i>Bdnf</i> | 588.1 ± 88.3 | 510.2 ± 75.9 (86.7) | 663.7 ± 70.1 (112.9) | 558.3 ± 110.5 (94.9) |
| <i>Nrgn</i> | 409322.4 ± 43936.1 | 327992.6 ± 73619.1* (80.1) | 404171.2 ± 39637.2 (98.7) | 412240.9 ± 23310.1 (100.7) |
| PND 5 | | | | |
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 789.2 ± 186.6 | 759.0 ± 209.8 (96.2) | 817.0 ± 132.5 (103.5) | 700.5 ± 162.4 (88.8) |
| <i>HO-1</i> | 15069.1 ± 1773.4 | 18273.2 ± 3314.8 (121.3) | 21505.9 ± 2470.5** (142.7) | 19051.7 ± 2032.2 (126.4) |
| <i>MT-1</i> | 64761.9 ± 10567.3 | 74465.8 ± 20783.7 (115.0) | 68817.1 ± 11263.5 (106.3) | 48374.7 ± 7004.8 (74.7) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 1916.8 ± 79.0 | 1484.1 ± 451.1 (77.4) | 1506.0 ± 259.3 (78.6) | 1628.9 ± 156.0 (85.0) |
| <i>ER beta</i> | 342.8 ± 65.5 | 351.4 ± 137.7 (102.5) | 398.6 ± 61.7 (116.3) | 432.1 ± 73.4 (126.0) |
| <i>AR</i> | 2415.9 ± 576.1 | 1388.8 ± 509.7* (57.5) | 2113.3 ± 191.8 (87.5) | 2224.0 ± 576.0 (92.1) |
| <i>Aromatase</i> | 196.4 ± 37.5 | 175.9 ± 83.4 (89.6) | 235.5 ± 61.0 (119.9) | 216.4 ± 32.5 (110.2) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 932094.7 ± 65248.6 | 998970.2 ± 56753.5 (107.2) | 935784.2 ± 89997.2 (100.4) | 1010202.0 ± 89313.6 (108.4) |
| <i>Bdnf</i> | 869.8 ± 80.8 | 567.7 ± 175.7 (65.3) | 819.1 ± 99.5 (94.2) | 812.6 ± 90.2 (93.4) |
| <i>Nrgn</i> | 1061606.8 ± 112803.0 | 765232.9 ± 57230.8*** (72.1) | 907460.0 ± 49564.2* (85.5) | 920943.8 ± 85226.5* (86.7) |
| PND 16 | | | | |
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 79.2 ± 25.4 | 125.4 ± 64.4 (158.3) | 121.4 ± 24.6 (153.3) | 96.2 ± 31.3 (121.5) |
| <i>HO-1</i> | 8102.0 ± 1000.5 | 8893.0 ± 698.1 (109.8) | 9262.7 ± 1316.4 (114.3) | 8776.5 ± 917.5 (108.3) |
| <i>MT-1</i> | 279368.6 ± 35986.8 | 321502.7 ± 105701.5 (115.1) | 332180.7 ± 220793.2 (118.9) | 218320.4 ± 19590.9 (78.1) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 624.2 ± 31.7 | 753.6 ± 81.1* (120.7) | 771.6 ± 67.4* (123.6) | 675.0 ± 88.3 (108.1) |
| <i>ER beta</i> | 125.7 ± 13.5 | 139.8 ± 19.0 (111.1) | 147.2 ± 35.7 (117.1) | 180.8 ± 33.1 (143.8) |
| <i>AR</i> | 4458.4 ± 250.1 | 4900.1 ± 906.6 (109.9) | 4764.0 ± 700.2 (106.9) | 4966.5 ± 381.0 (111.4) |
| <i>Aromatase</i> | 82.0 ± 15.4 | 88.8 ± 16.1 (108.3) | 91.4 ± 18.2 (111.5) | 99.5 ± 4.9 (121.4) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 403229.1 ± 63534.6 | 473411.2 ± 70557.5 (117.4) | 443068.4 ± 40105.0 (109.9) | 401998.8 ± 16478.9 (99.7) |
| <i>Bdnf</i> | 1201.2 ± 199.9 | 1596.1 ± 250.8 (132.9) | 1453.4 ± 281.9 (121.0) | 1529.4 ± 261.2 (127.3) |
| <i>Nrgn</i> | 1077675.1 ± 86493.6 | 1154996.6 ± 112244.4 (107.2) | 1154830.5 ± 100892.3 (107.2) | 1305482.0 ± 489353.2 (121.1) |

Data ($\times 10^6$) show the ratio of target mRNA expression to Gapdh mRNA expression (% of control), and are mean \pm S.D. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control by Dunnett's test. Each group contained 4-6 mice.

Table 7 Effect of neonatal exposure to diesel exhaust on mRNA expression in male mice.

| PND 2 | Control | 0.3 mg DEP/m ³ (% of control) | 1.0 mg DEP/m ³ (% of control) | 3.0 mg DEP/m ³ (% of control) |
|-------------------------------|---------------------|--|--|--|
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 201.0 ± 36.7 | 223.3 ± 26.9 (111.1) | 199.4 ± 24.5 (99.2) | 243.0 ± 59.9 (120.9) |
| <i>HO-1</i> | 6412.6 ± 853.6 | 7851.1 ± 213.3** (122.4) | 7009.2 ± 680.4 (109.3) | 8399.3 ± 564.5*** (131.0) |
| <i>MT-1</i> | 15344.5 ± 3921.0 | 19087.7 ± 2077.7 (124.4) | 18553.6 ± 4768.6 (120.9) | 19641.2 ± 1735.8 (128.0) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 2649.2 ± 314.4 | 2754.2 ± 387.8 (104.0) | 3074.0 ± 206.9 (116.0) | 3212.2 ± 334.2* (121.3) |
| <i>ER beta</i> | 92.5 ± 28.1 | 96.2 ± | 24.3 (104.0) | 118.9 ± 35.9 (128.5) |
| <i>AR</i> | 1058.4 ± 103.5 | 1014.5 ± 186.8 (95.9) | 1078.7 ± 85.0 (101.9) | 1101.1 ± 195.0 (104.0) |
| <i>Aromatase</i> | 235.7 ± 20.8 | 258.8 ± 45.7 (109.8) | 278.8 ± 21.3 (118.3) | 282.0 ± 48.3 (119.7) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 836854.2 ± 106794.7 | 936360.1 ± 32631.6 (111.9) | 903715.8 ± 66427.0 (108.0) | 941379.8 ± 66428.9 (112.5) |
| <i>Bdnf</i> | 548.0 ± 80.0 | 551.1 ± 55.6 (100.6) | 582.0 ± 49.7 (106.2) | 651.5 ± 112.5 (118.9) |
| <i>Nrgn</i> | 420505.0 ± 52879.3 | 423555.3 ± 53251.3 (100.7) | 412312.6 ± 37258.5 (98.1) | 463679.5 ± 39063.7 (110.3) |
| PND 5 | | | | |
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 530.5 ± 38.4 | 476.2 ± 112.7 (89.8) | 662.2 ± 81.6* (124.8) | 542.9 ± 23.1 (102.3) |
| <i>HO-1</i> | 6066.8 ± 1174.2 | 6674.4 ± 559.4 (110.0) | 8165.5 ± 694.2** (134.6) | 7684.8 ± 773.2* (126.7) |
| <i>MT-1</i> | 33911.6 ± 6136.5 | 27305.4 ± 3545.1 (80.5) | 30266.2 ± 6126.9 (89.3) | 23274.3 ± 6082.1* (68.6) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 2656.2 ± 544.9 | 3046.5 ± 331.8 (114.7) | 2872.6 ± 362.4 (108.1) | 3288.5 ± 466.2 (123.8) |
| <i>ER beta</i> | 136.1 ± 27.1 | 105.0 ± 30.3 (77.1) | 129.5 ± 12.0 (95.1) | 138.5 ± 46.2 (101.8) |
| <i>AR</i> | 1417.2 ± 400.9 | 1331.9 ± 125.6 (94.0) | 1472.3 ± 194.3 (104.0) | 1572.9 ± 208.5 (111.1) |
| <i>Aromatase</i> | 136.1 ± 27.1 | 105.0 ± 30.3 (77.1) | 129.5 ± 12.0 (95.1) | 138.5 ± 46.2 (101.8) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 762454.8 ± 145996.5 | 717414.9 ± 62281.6 (94.1) | 722014.2 ± 98438.0 (94.7) | 718272.8 ± 71306.1 (94.2) |
| <i>Bdnf</i> | 788.3 ± 145.8 | 796.4 ± 56.0 (101.0) | 862.3 ± 165.8 (109.4) | 834.9 ± 107.6 (105.9) |
| <i>Nrgn</i> | 622640.6 ± 103411.8 | 644352.5 ± 30584.7 (103.5) | 632066.8 ± 41476.1 (101.5) | 638372.6 ± 50480.3 (102.5) |
| PND 16 | | | | |
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 40.1 ± 5.4 | 31.9 ± 10.9 (79.6) | 73.0 ± 43.6 (182.1) | 52.8 ± 23.0 (131.7) |
| <i>HO-1</i> | 4748.5 ± 282.8 | 5273.4 ± 448.4 (111.1) | 5411.3 ± 523.8 (114.0) | 5684.0 ± 509.8* (119.7) |
| <i>MT-1</i> | 84304.5 ± 34977.1 | 112003.7 ± 18225.5 (132.9) | 63848.7 ± 12811.1 (75.7) | 78326.6 ± 16552.9 (92.9) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 1742.6 ± 159.1 | 1794.5 ± 249.3 (103.0) | 2106.6 ± 337.3 (120.9) | 1947.1 ± 109.7 (111.7) |
| <i>ER beta</i> | 56.2 ± 9.9 | 45.6 ± 6.4 (81.0) | 73.8 ± 15.0 (131.3) | 72.9 ± 11.6 (129.7) |
| <i>AR</i> | 4898.2 ± 1268.3 | 4900.4 ± 835.5 (100.0) | 5015.7 ± 1110.2 (102.4) | 4994.5 ± 573.2 (102.0) |
| <i>Aromatase</i> | 84.3 ± 19.5 | 87.2 ± 18.1 (103.5) | 99.9 ± 25.7 (118.6) | 83.6 ± 12.2 (99.2) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 356789.0 ± 41626.1 | 378557.2 ± 44897.8 (106.1) | 419573.1 ± 55096.4 (117.6) | 400165.2 ± 13577.8 (112.2) |
| <i>Bdnf</i> | 2209.8 ± 262.0 | 2349.8 ± 209.7 (106.3) | 2400.5 ± 275.1 (108.6) | 2178.5 ± 197.4 (98.6) |
| <i>Nrgn</i> | 1002279.9 ± 79492.1 | 1136901.4 ± 120942.9 (113.4) | 1189367.8 ± 94646.2* (118.7) | 1107322.1 ± 47042.1 (110.5) |

Data ($\times 10^6$) show the ratio of target mRNA expression to Gapdh mRNA expression (% of control), and are mean \pm S.D. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control by Dunnett's test. Each group contained 4-6 mice.

Table 8 Effect of neonatal exposure to diesel exhaust on mRNA expression in female mice.

| PND 2 | Control | 0.3 mg DEP/m ³ (% of control) | 1.0 mg DEP/m ³ (% of control) | 3.0 mg DEP/m ³ (% of control) |
|-------------------------------|---------------------|--|--|--|
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 238.9 ± 31.2 | 267.3 ± 27.5 (111.9) | 285.9 ± 43.1 (119.7) | 295.8 ± 55.9 (123.8) |
| <i>HO-1</i> | 9790.1 ± 862.5 | 10003.6 ± 618.5 (102.2) | 11938.6 ± 3081.5 (121.9) | 10592.0 ± 827.7 (108.2) |
| <i>MT-1</i> | 29474.6 ± 3070.7 | 31822.8 ± 3774.9 (108.0) | 23058.6 ± 3203.4* (78.2) | 20016.0 ± 3530.5** (67.9) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 3661.3 ± 180.2 | 3659.0 ± 443.1 (99.9) | 4310.0 ± 565.6 (117.7) | 4540.4 ± 487.7* (124.0) |
| <i>ER beta</i> | 106.6 ± 6.8 | 153.5 ± 37.4 (144.0) | 136.8 ± 43.8 (128.3) | 145.1 ± 21.1 (136.1) |
| <i>AR</i> | 842.5 ± 180.9 | 769.1 ± 110.4 (91.3) | 906.4 ± 260.6 (107.6) | 822.7 ± 117.7 (97.6) |
| <i>Aromatase</i> | 162.5 ± 29.2 | 167.1 ± 13.7 (102.9) | 187.3 ± 29.2 (115.3) | 161.9 ± 22.3 (99.6) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 814022.9 ± 76514.1 | 838041.0 ± 29636.3 (103.0) | 976755.5 ± 48610.8*** (120.0) | 873666.9 ± 50611.9 (107.3) |
| <i>Bdnf</i> | 492.1 ± 67.2 | 524.7 ± 36.0 (106.6) | 636.6 ± 44.0** (129.4) | 527.2 ± 101.1 (107.1) |
| <i>Nrgn</i> | 431984.3 ± 53175.1 | 377812.3 ± 65690.1 (87.5) | 417247.4 ± 57871.6 (96.6) | 389945.0 ± 24657.7 (90.3) |
| PND 5 | | | | |
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 223.2 ± 43.9 | 205.6 ± 7.5 (92.1) | 302.5 ± 47.4 (135.6) | 320.6 ± 99.5* (143.7) |
| <i>HO-1</i> | 8114.0 ± 778.2 | 8426.2 ± 861.5 (103.8) | 8331.8 ± 1368.3 (102.7) | 9609.2 ± 1693.6 (118.4) |
| <i>MT-1</i> | 20238.4 ± 3697.1 | 18305.7 ± 2274.8 (90.5) | 16740.7 ± 3000.7 (82.7) | 16476.7 ± 2999.1 (81.4) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 3705.2 ± 483.1 | 5331.2 ± 865.1** (143.9) | 4778.8 ± 772.3 (129.0) | 4708.4 ± 678.5 (127.1) |
| <i>ER beta</i> | 130.8 ± 39.5 | 152.3 ± 53.4 (116.4) | 143.6 ± 44.2 (109.8) | 117.4 ± 44.1 (89.7) |
| <i>AR</i> | 1624.4 ± 65.1 | 1918.6 ± 246.1 (118.1) | 1748.4 ± 273.0 (107.6) | 1955.5 ± 279.8 (120.4) |
| <i>Aromatase</i> | 221.4 ± 19.3 | 246.4 ± 26.8 (111.3) | 226.2 ± 33.4 (102.2) | 210.0 ± 39.1 (94.8) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 864256.1 ± 55160.5 | 858326.6 ± 88580.9 (99.3) | 843896.1 ± 89134.4 (97.6) | 826926.5 ± 104919.4 (95.7) |
| <i>Bdnf</i> | 970.9 ± 146.2 | 961.2 ± 123.5 (99.0) | 989.2 ± 181.1 (101.9) | 962.5 ± 62.6 (99.1) |
| <i>Nrgn</i> | 707658.7 ± 81254.2 | 793518.8 ± 111009.3 (112.1) | 730270.3 ± 104866.6 (103.2) | 767827.7 ± 37822.2 (108.5) |
| PND 16 | | | | |
| Stress-related genes | | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | 33.4 ± 11.8 | 28.2 ± 8.4 (84.5) | 45.7 ± 15.2 (136.8) | 32.1 ± 6.4 (96.2) |
| <i>HO-1</i> | 3634.8 ± 429.2 | 3752.2 ± 230.3 (103.2) | 3806.8 ± 437.8 (104.7) | 3990.2 ± 294.9 (109.8) |
| <i>MT-1</i> | 78014.4 ± 27395.2 | 85966.9 ± 26016.4 (110.2) | 82023.7 ± 12013.7 (105.2) | 71978.7 ± 25834.5 (92.3) |
| Steroid hormone-related genes | | | | |
| <i>ER alpha</i> | 1595.5 ± 73.0 | 1773.3 ± 179.8 (111.1) | 2062.6 ± 258.1** (129.3) | 1839.9 ± 186.9 (115.3) |
| <i>ER beta</i> | 60.8 ± 8.3 | 60.5 ± 8.3 (99.5) | 67.2 ± 7.1 (110.4) | 71.5 ± 22.2 (117.5) |
| <i>AR</i> | 4362.4 ± 352.5 | 4650.4 ± 853.0 (106.6) | 5488.6 ± 1100.3 (125.8) | 5457.9 ± 661.6 (125.1) |
| <i>Aromatase</i> | 87.4 ± 16.3 | 101.9 ± 18.0 (116.7) | 105.2 ± 17.0 (120.4) | 93.3 ± 17.9 (106.7) |
| Thyroid hormone-related genes | | | | |
| <i>TR</i> | 331688.1 ± 53746.3 | 355758.3 ± 38225.6 (107.3) | 378635.9 ± 37156.2 (114.2) | 368671.8 ± 24218.2 (111.2) |
| <i>Bdnf</i> | 1247.3 ± 115.5 | 1375.3 ± 222.2 (110.3) | 1488.2 ± 152.5 (119.3) | 1502.8 ± 280.7 (120.5) |
| <i>Nrgn</i> | 1028607.4 ± 87359.9 | 1161839.8 ± 90734.1* (113.0) | 1219222.6 ± 61525.2** (118.5) | 1233878.8 ± 67733.4** (120.0) |

Data ($\times 10^6$) show the ratio of target mRNA expression to *Gapdh* mRNA expression (% of control), and are mean \pm S.D. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control by Dunnett's test. Each group contained 4-6 mice.

第四節 考察

本研究において実施した DE 胎仔期曝露により体重は減少し、新生仔期曝露により増加した (Table 3)。DE 曝露による体重変化に関しては様々な知見があるが、それらは必ずしも一貫していない。例えば雌マウスに生後 7~20 日に DE 曝露すると体重が増加すること (Watanabe and Kurita 2001) が報告されている。一方、ラットに対する有鉛ガソリンを使用した自動車排ガスの曝露 (Stupfel et al. 1983) や、胎仔期および 6 ヶ月齢から 6 ヶ月間のラットへの曝露 (Mauderly et al. 1987) により体重が減少することが報告されている。本研究において、体重の変動が認められたが、その原因としては成長に影響を及ぼしうる化学物質が DE 中に多様に含まれることから、これらが複合的に影響を及ぼした可能性が考えられる。脳重量についても同様の傾向が認められたが (Table 4)、体重補正により差は消失することから (Data not shown)、脳重量変化は体重変化に相関して起こったものと考えられた。

次に、酸化ストレスに応答する細胞内ストレス応答因子として、Cyp1a1、HO-1、MT-1 の大脳における発現変動を検討し、ストレス関連遺伝子への影響をみた。DE の構成成分中、特に DEP の付着物には PAH 類や重金属類など酸素ラジカルを介し産生する物質が多く含まれており、ROS など酸化ストレスを介した生体影響メカニズムが考えられているからである (Siegel et al. 2004)。Cyp1a1 はベンゾ[a]ピレンなど PAHs によって誘導され AhR と Arnt を介した転写活性化に関与すること (Ma 2001)、さらに DEP 曝露のバイオマーカーとなる (Takano et al. 2002) ことが報告されており、また、AhR と ER のクロストークにおいても重要であることから (Beischlag and Perdeu 2005)、DEP の AhR を介した内分泌かく乱作用を連絡している可能性が考えられる。本研究において、Cyp1a1 は胎仔期曝露および新生仔期曝露、雌雄のすべてにおいて増加が認められており、おそらく DEP そのもの、あるいは構成成分である PAH 類が

胎盤を通じ、あるいは血液脳関門を通過して、新生仔の脳に到達し影響を及ぼした可能性が示唆された。一方、HO-1は酸化ストレスをはじめ、重金属や低酸素、紫外線など様々なストレス因子によって誘導されることが知られているが、脳においてもHO-1発現上昇は認知機能に関与しアルツハイマー病との関連も報告され、神経毒性との関連性が注目されている (Barone et al. 2012)。DEP中の有機成分が酸化ストレスを生じ発現誘導するという報告もあり (Ma and Ma 2002)、DEの脳における酸化ストレスの影響を知るためにはこれらの挙動を知ることが重要である。本研究において、特に雄出生仔への新生仔期曝露において顕著なHO-1の発現上昇が認められ、DEPまたはその構成成分が直接的または母乳を介して新生仔の脳へ影響している可能性が示唆された。また、DE曝露に対する感受性に雌雄差があることが示唆された。また、メタロチオネインは重金属の毒性軽減に重要であり、その代謝や活性酸素種などフリーラジカル消去に作用していることが知られている。MT-1はその代表的なサブタイプであり、種々の重金属のほか、酸化的ストレスや放射線によっても誘発されること、脳においてもこれらストレス応答に加え、神経保護や神経再生に関与することが知られている (Santos et al. 2012)。本研究の結果は複雑な発現上昇および発現減少を示し、結論を出すに至っていないが、少なくとも何らかの金属成分および酸化ストレスによる影響が引き起こされたことが示唆される。以上のストレス関連遺伝子の変化より、DEは経胎盤、母乳経由あるいは直接的に血液脳関門形成がまだ不十分である新生仔の脳内に到達し、影響を及ぼしていることが示唆された。

脳神経系において性ホルモン受容体が多く存在しており、これらが脳内の情報伝達や神経細胞の調節に重要な役割を担っていると考えられている。一方、DEの成分にはニトロフェノールやジベンゾチオフェン、あるいは分画成分そのものにもエストロゲン活性や抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用を示す物質が含まれていることが報告されている (Takeda et al. 2004)。そこで性ホルモン関連遺伝子への影響に関して、エストロゲン受容体 (ER α および ER β) およびアンドロゲン受容体、アロマター

ゼの脳における発現変動に及ぼす DE 曝露の影響を検討した。エストロゲンおよびアンドロゲンはそれぞれ核内に存在するエストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体と結合して、転写因子的に作用することで脳の性分化や中枢神経機能（記憶学習や情動・社会行動発現等）に関与することが知られている (Pfaff et al. 2005)。エストロゲンについては性周期の調節や脳の性分化、性行動を司るだけでなく、記憶学習やシナプス形成、攻撃性や情動など行動形成、神経保護など脳の発達に強く関連することが報告されている (Takahama and Shirasaki 2001)。エストロゲンは臨界期特異的に発現する α フェトプロテインと結合し直接脳内に移行できないが、アロマターゼがアンドロゲンを変換することによって脳内に供給することが知られている。脳内環境におけるこれらステロイドホルモンの不均等は脳の性分化に直接的な影響を及ぼし、その後の行動等を変容させると考えられている (Cornil et al. 2013)。エストロゲン受容体は DNA 結合ドメインの違いから ER α と ER β の二種類のサブタイプが存在しており、これらはその発現部位や配列、リガンドとの結合性に差があり、脳においては ER α も存在するが ER β が強く発現することが知られている。ER α は脳の性分化に強く関係しているが、一方で ER β は KO マウスで脳皮質形成の異常が報告され、情動・社会行動発現や認知機能など、脳の機能形成の側面がより強いと考えられている (Handa et al. 2012)。アロマターゼ (別名 Cyp19) はテストステロンおよびエストロゲンの前駆体であるアンドロステンジオンを基質にエストロゲンを合成する酵素である。エストロゲン合成の律速酵素でもあり、雌性生殖腺に限らず体内に広く局在している。脳内においても性的二型性を有する部分を中心に存在し、神経細胞からも産生され、周産期における発現変動は脳の性分化の臨界期と一致して増減することが知られている。発達期の脳の性分化に加え、発達後の性行動とも関連性が高いことが報告されている (Azcoitia et al. 2011)。本研究において、ER α および ER β 遺伝子は胎仔期・新生仔期曝露ともに雌雄の双方で発現上昇を示していた。このことから脳の性分化 (雌性化) への影響に加え、神経発達・中枢神経機能への影響が懸念される。さらに胎仔期曝露においてはアロマターゼの上昇が雌雄とも認められ、新生仔の脳内におい

てエストロゲンの過剰合成を示しているものと考えられる。一方で AR は胎仔期曝露の 5 日齢 0.3 mg DEP/m³曝露群で減少を認めるのみであったが、これもまたエストロゲン優位に関連するものである。以上より、DE は脳内のステロイドホルモン、特にエストロゲン系に影響を及ぼしており、その強度は胎仔期曝露において強いことがわかった。胎仔期は脳の形成段階であり、また不可逆的な影響を示す臨界期の段階であることから、これらの作用がより顕著に及ぼされたものと推察される。

周産期における脳の発達や神経形成には、甲状腺ホルモンとその関連遺伝子が重要であることが古くから知られている。例えば、小児における甲状腺機能低下症においては中枢神経系発達に中等度から重度の遅延が現れることが報告されている。そこで、甲状腺ホルモン受容体 (TR) および甲状腺ホルモンによって制御される神経栄養因子 Bdnf、Nrgn の大脳における発現変動に及ぼす DE 曝露の影響を検討した。サイロキシン (T4) はアストロサイト内でヨウ素化されて活性型であるトリヨードチロニン (T3) に変換され、T3 は様々なコアクチベーターやコリプレッサーと協働しながら、神経細胞の核内に存在する TR に結合することで下流の遺伝子発現や転写因子を調節するが、実験的にもアストロサイト、オリゴデンドロサイトなどグリア細胞の形態学的な発達やプルキンエ細胞の成長促進効果が報告されている (Kimura-Kuroda et al. 2002)。環境汚染物質による神経発達への影響メカニズムとしても重要であり、疫学的小児および実験的調査により、ダイオキシンや PCB、PBDEs (polybrominated diphenyl ethers) の胎児期曝露が新生仔の血中チロキシン濃度に負の相関を持つことで脳発達に影響することが報告されている (Giacomini et al. 2006; Miller et al. 2012)。性ホルモン、特にエストロゲンと関連しその作用を増強することが知られており、このことが毒性発現に関わっている可能性も考えられている (Vasudevan et al. 2002)。本研究において TR は雌雄とも有意な発現上昇を示しており、甲状腺ホルモンを介したかく乱および脳内のエストロゲン過剰合成に関わることが示唆された。

甲状腺ホルモンの関わる脳発達関連遺伝子として、脳内に強く発現し神経細胞の分化を促進させる神経栄養因子（ニューロトロフィン）ファミリーがある。Bdnfは代表的な神経栄養因子の一つであり、甲状腺ホルモンの欠損によりその発現量は低下することが確認されている（Gilbert and Lasley 2013）。NrgnはBdnfと同様にその発現は甲状腺ホルモンによって制御されており、脳に特異的に存在、樹状突起スパインにおけるシナプス可塑性に関わりその強度を強化することで神経の可塑性や記憶学習能に関与すること、この異常は統合失調症のリスク要因となりうることが報告されている（Krug et al. 2013）。本研究において、Bdnfの変動は限定的（新生仔期曝露の雌の2日齢のみで上昇）であったが、Nrgnは大きく変動し、脳の発達、とりわけ神経の可塑性や記憶学習能への影響が疑われる。胎仔期曝露と新生仔期曝露での発現変動の違いについては本研究での結果からは明確に説明しきれないが、出生仔の脳の甲状腺ホルモン環境の攪乱を介して作用していることが推察される。

なお、本研究で設定したDE曝露濃度は低濃度曝露として0.3、中濃度として1.0、高濃度として3.0 mg DEP/m³を一日12時間曝露であるが、実験結果に濃度依存性も認められるとは必ずしも言えず、むしろ低濃度群で影響が大きくなった解析結果も存在した。この要因として、DEはガス体やガス状成分、微粒子から成り、多様な化学物質を含む複合物質であること、また、主なターゲットとして設定したエストロゲンおよびアンドロゲン、甲状腺ホルモン受容体はいずれも核内受容体であり、リガンドの結合から転写活性までの間にコンフォメーション変化やコアクチベーター・コリプレッサーとの結合など様々な要因が寄与している可能性が考えられる。しかしながら、低用量群での影響が認められたことは重要な知見である。すなわち、現在の大気環境は先述の通り浮遊粒子状物質として0.020~0.022 mg/m³と改善されているものの、毒性学上の許容量としては通常用いられる100倍を安全係数として用いればこの値でも十分に低い濃度とはいえない。さらに、過去にはこの濃度に匹敵する値が観測されたことがあり（自動車排出局における年平均値は昭和49年で0.16 mg/m³、その後平成

10年まで 0.05 mg/m^3 前後を推移、都市部ではより高く東京23区では平成元年～10年は $0.06\sim 0.08\text{ mg/m}^3$ を推移していた(東京都環境白書2000)、また、新興国を中心とする海外の大都市圏においては現在でも曝露されうる濃度である(例えば、2012年の北京のPM10の年平均値は 0.11 mg/m^3 であり、時期によってはこの10倍に達する(外務省・在中国日本国大使館))ことから、国際的視点からも重要な問題であると考えられる。

第五節 小括

周産期 DE 曝露が次世代の脳神経系に及ぼす影響を遺伝子発現の観点から検討した結果、①ストレス関連遺伝子の発現変動から DE は経胎盤、経母乳あるいは直接的に新生仔の脳に到達し影響を及ぼす、その一環として AhR や酸化ストレスを介した影響を有する可能性が示唆された。②性ホルモン受容体の発現変動、特にエストロゲン合成関連遺伝子の発現上昇より脳の性分化機構への影響とエストロゲンを介した中枢神経機能への影響が示唆された。③甲状腺ホルモン関連遺伝子への影響より性ホルモンに関わらない内分泌かく乱が引き起こされている可能性が示唆された。

第二章 ディーゼル排ガス周産期曝露が脳神経系に及ぼす影響 ～X染色体不活性化を中心にした影響解析～

第一節 研究の背景と目的

DE 曝露の脳神経系への影響は、形態や神経行動など様々な研究が進みつつある。例えば、胎仔期から7週まで連続的に曝露したマウスについて、行動観察により自発運動量が有意に変動し、また、脳内伝達物質の測定によりドパミン系、セロトニン系が変動することが確認されている (Yokota et al. 2013)。行動変化については 0.17 mg DEP/m³ という低用量胎仔期曝露の発達後においても報告されている (Suzuki et al. 2010)。形態への影響として、自閉症様の病理所見が小脳においては観察されている (Sugamata et al. 2006)。また、遺伝子レベルでの影響として、マウスを高速道路のトンネルで飼育し吸入曝露させ炎症関連遺伝子の発現変動を検討し海馬における Cox2、Nos2、Nos3 等の発現上昇や嗅球における IL1 α 、IL6 等の発現減少 (Bos et al. 2012)、DEP 吸入曝露により痛覚受容体 Trpv1 や Tachykinin 受容体の発現上昇 (Costa et al. 2010)、ナノ粒子を多く含む DE の吸入曝露により NMDA 受容体や炎症関連遺伝子の Ccl3、神経栄養因子の Bdnf が海馬で増加する (Win-Shwe et al. 2012) 等の報告がある。しかしながらこれらの研究は成獣を対象とした研究であり、周産期曝露による影響は報告されていない。

したがって、DE 周産期曝露の次世代脳神経系への影響については、第一章で示した性ホルモン受容体等の変化だけでは説明しきれない部分がある。これについて、マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動の網羅的解析が有用であると考えられる。例えば 2,3,7,8-TCDD 胎仔期曝露を行ったマウス全脳のマイクロアレイ解析により既に報告されている神経行動学的な変化が炎症性細胞遊走因子を変動を介している可能性

が示唆される結果が得られたり (Mitsui et al. 2011) 、マウス大脳由来細胞のマイクロアレイ解析によりヒ素の慢性曝露がコハク酸デヒドロゲナーゼを変動させることで ROS 産生を引き起こすメカニズムが示唆される (Hong et al. 2009) など、これまで報告されてきた現象についてのメカニズムを説明する一助となっている。しかし、マイクロアレイを用いた DE 曝露についての報告はこれまで肺 (Koike et al. 2002) や心臓 (Gottipolu et al. 2009) 、肝臓 (Saber et al. 2009) についてなされてきているが、脳についての知見はまだ報告されていない。

そこで、本章では DE 周産期曝露が脳神経系に及ぼす影響についてマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動の網羅的な解析を行い、さらに発現変動のあった遺伝子について詳細な解析を行った。

第二節 実験方法

2.1 試薬類

第一章と同じため省略する。

2.2 ディーゼル排ガス曝露

国立環境研究所に設置された曝露チャンバーを用いた。DE は排気量 2,740 cc・四気筒のディーゼルエンジン (いすゞ社製 A4JB1-type) を、2,000 rpm の回転数で運転することで発生させた。胎仔期曝露は 2、5、8、16 日齢、新生仔期曝露は 16 日齢で実験に供した。他の条件は第一章と同じため省略する。

2.3 cDNA マイクロアレイ

Control 群および影響が最も顕著に出現すると考えられる 3.0 mg DEP/m³曝露群について、雄 2 日齢の大脳の Total RNA を 6 匹分ミックスし、バイオマトリックス研究所

(千葉) に送付、遺伝子の発現変動値を得た。実験は反復して二回行った。アレイは搭載遺伝子数約 4 万の Stanford type であり、Cy3 および Cy5 の蛍光発現比より解析した。なお RNA 濃度は Control 群 2.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、曝露群 2.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ であった。

2.4 遺伝子発現量の解析

リアルタイム PCR に用いたプライマーおよびプローブの塩基配列および鎖長、PCR 産物のサイズを Table 9 に示した。他については第一章と同じため省略する。

2.5 統計処理

結果は全て平均値±標準偏差 (S.D.) で示した。有意差検定は多群のものは Dunnett's 検定、2 群のもの t 検定を行った。

第三節 実験結果

3.1 胎仔期ディーゼル排ガス曝露による影響

3.1.1 体重および脳重量に及ぼす影響

体重、脳重量とも日分が進むにつれ順調に増加したが、有意な変化は認められなかった (Table 10)。

3.1.2 cDNA マイクロアレイ

対照群と比較し、反復実験の平均が 1.5 倍以上または 0.8 倍以下の発現変動のあったものを抽出したところ、1.5 倍以上の変動が見られた遺伝子は、X INACTIVE SPECIFIC TRANSCRIPT PROTEIN (Xist)、RIKEN CDNA 2310003A05 GENE (MDRWMS2 PROTEIN) および B-RAF PROTO-ONCOGENE SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE (B-raf) の 3 つであり、0.8 倍以下の遺伝子はなかった (Table 11)。

3.1.3 Xist 遺伝子の発現変動

マイクロアレイで変動の得られた Xist 遺伝子について、2、5、8、16 日齢の雌雄の脳における mRNA 発現変動をリアルタイム PCR 法により測定した。3.0 mg DEP/m³ では雌全群 (1.4~1.8 倍)、雄 2、5、8 日齢 (1.6~3.8 倍)、1.0 mg DEP/m³ では雌 2、8 日齢 (1.3~1.5 倍)、0.3 mg DEP/m³ では雌 8 日齢 (1.7 倍)、雄 5 日齢 (1.6 倍) で有意に増加した (Fig. 1)。

3.1.4 X 連鎖性遺伝子の発現変動

Xist 遺伝子の発現変動による影響をより詳細に検討する目的で、X 連鎖性遺伝子として Hprt1、Mecp2、Sts 遺伝子の発現変動を 3.0 mg DEP/m³ 曝露群においてリアルタイム PCR により検討したところ、有意な発現変動は認められなかった (Fig. 2)。

3.1.5 Tsix 遺伝子の発現変動

Xist 遺伝子及び X 連鎖性遺伝子の発現変動をより詳細に検討する目的で、Xist 遺伝子のアンチセンスである Tsix 遺伝子の発現変動を 3.0 mg DEP/m³曝露群においてリアルタイム PCR により検討したところ、雄性出生仔（8 日齢）、雌性出生仔（5、8、16 日齢）とも有意な発現上昇が認められた (Fig. 3)。

3.2 新生仔期ディーゼル排ガス曝露による影響

3.2.1 体重および脳重量に及ぼす影響

雌雄とも体重が有意に増加したが、脳重量および体重補正重量に有意な差はなかった (Table 12)。

3.2.2 Xist、Tsix および X 連鎖性遺伝子発現への影響

新生仔期 DE 曝露仔マウスの大脳について、リアルタイム PCR 法により Xist、Tsix、Hprt1、Mecp2 および Sts 遺伝子の発現変動を検討した。雄性出生仔 (Fig. 4)、雌性出生仔 (Fig. 5) とも有意な変動は認められなかった。

Table 9 PCR primer pair and probe sequences for real-time PCR

| Gene | Sequence (5'→3') | Length (bp) |
|--|-------------------------------|-------------|
| <i>Gapdh</i> (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GenBank NM_008084</i>) | | |
| Forward primer | TGCACCACCAACTGCTTAG | 19 |
| Reverse primer | GGATGCAGGGATGATGTTC | 19 |
| Probe | CAGAAGACTGTGGATGGCCCCTC | 23 |
| <i>Xist</i> (<i>X inactivation-specific transcript: GenBank L04961</i>) | | |
| Forward primer | AATGGAACGGGCTGAGTTTTAG | 22 |
| Reverse primer | TCATCCGCTTGCGTTCATAG | 20 |
| Probe | TGCACCGCCACGTATAGAGCAGTGTAAGA | 29 |
| <i>Tsix</i> (<i>X inactivation-specific transcript-antisense: GenBank NR_002844</i>) | | |
| Forward primer | CGCAATTGGTTGCTTTTATCC | 21 |
| Reverse primer | ACGGCTATTCTCGAGCCAGTT | 21 |
| Probe | TCCGCTGTGCTTCCTCGGTGTCC | 22 |
| <i>Hprt1</i> (<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1: GenBank NM_013556</i>) | | |
| Forward primer | GCTCGAGATGTCATGAAGGAGAT | 23 |
| Reverse primer | GTAATCCAGCAGGTCAGCAAAGA | 23 |
| Probe | TTGTGGCCCTCTGTGTGCTCAAGG | 24 |
| <i>Mecp2</i> (<i>Methyl-CpG-binding protein2: GenBank AF158181</i>) | | |
| Forward primer | CCAGGCTTTCTACCCCGTTT | 20 |
| Reverse primer | CTGCCCAGGTCATGGTGATC | 20 |
| Probe | CTTTTCGCTTTCTGCCAGGGCGTT | 24 |
| <i>Sts</i> (<i>Steroid sulfatase: GenBank U37545</i>) | | |
| Forward primer | GCTCGGAGCACGAGTTCCT | 19 |
| Reverse primer | TCGAGAAGCAGCCGTTGG | 18 |
| Probe | TTCCACTACTGCAACGCCTACCTGCA | 26 |

Table 10 Body and brain weights of mice exposed to diesel exhaust during fetal period.

| Male | Controls | 0.3 mg DEP/m ³ | 1.0 mg DEP/m ³ | 3.0 mg DEP/m ³ |
|--------------|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| PND 2 | | | | |
| BW (g) | 2.10 ± 0.21 | 2.40 ± 0.24 | 2.28 ± 0.22 | 2.24 ± 0.19 |
| Brain (g) | 0.125 ± 0.011 | 0.136 ± 0.005 | 0.136 ± 0.005 | 0.128 ± 0.012 |
| Brain/BW (%) | 5.98 ± 0.38 | 5.70 ± 0.41 | 5.97 ± 0.41 | 5.71 ± 0.30 |
| PND 5 | | | | |
| BW (g) | 4.15 ± 0.41 | 3.72 ± 0.373 | 3.94 ± 0.47 | 4.39 ± 1.90 |
| Brain (g) | 0.223 ± 0.002 | 0.206 ± 0.002 | 0.224 ± 0.002 | 0.213 ± 0.020 |
| Brain/BW (%) | 5.38 ± 0.36 | 5.67 ± 0.80 | 5.73 ± 0.80 | 5.80 ± 0.49 |
| PND 8 | | | | |
| BW (g) | 6.18 ± 0.63 | 5.63 ± 1.34 | 5.88 ± 0.58 | 5.54 ± 0.95 |
| Brain (g) | 0.306 ± 0.024 | 0.300 ± 0.037 | 0.311 ± 0.020 | 0.295 ± 0.029 |
| Brain/BW (%) | 4.98 ± 0.51 | 5.53 ± 1.06 | 5.31 ± 0.32 | 5.41 ± 0.55 |
| PND 16 | | | | |
| BW (g) | 11.03 ± 1.50 | 10.36 ± 1.46 | 9.55 ± 1.14 | 9.62 ± 1.38 |
| Brain (g) | 0.424 ± 0.008 | 0.425 ± 0.032 | 0.425 ± 0.014 | 0.414 ± 0.012 |
| Brain/BW (%) | 3.89 ± 0.46 | 4.16 ± 0.52 | 4.50 ± 0.54 | 4.38 ± 0.62 |
| Female | | | | |
| PND 2 | | | | |
| BW (g) | 2.24 ± 0.11 | 2.33 ± 0.28 | 2.34 ± 0.31 | 2.17 ± 0.14 |
| Brain (g) | 0.124 ± 0.003 | 0.131 ± 0.007 | 0.133 ± 0.009 | 0.126 ± 0.006 |
| Brain/BW (%) | 5.53 ± 0.31 | 5.69 ± 0.54 | 5.74 ± 0.46 | 5.82 ± 0.49 |
| PND 5 | | | | |
| BW (g) | 4.16 ± 0.56 | 3.64 ± 0.54 | 3.84 ± 0.78 | 3.43 ± 0.51 |
| Brain (g) | 0.223 ± 0.022 | 0.211 ± 0.013 | 0.213 ± 0.024 | 0.208 ± 0.015 |
| Brain/BW (%) | 5.39 ± 0.50 | 5.87 ± 0.53 | 5.64 ± 0.54 | 6.13 ± 0.64 |
| PND 8 | | | | |
| BW (g) | 5.78 ± 0.80 | 5.40 ± 1.44 | 5.66 ± 0.59 | 5.57 ± 0.56 |
| Brain (g) | 0.304 ± 0.025 | 0.288 ± 0.039 | 0.300 ± 0.022 | 0.302 ± 0.017 |
| Brain/BW (%) | 5.30 ± 0.42 | 5.55 ± 0.99 | 5.32 ± 0.36 | 5.45 ± 0.35 |
| PND 16 | | | | |
| BW (g) | 10.35 ± 1.53 | 10.30 ± 1.43 | 9.58 ± 1.60 | 8.83 ± 1.47 |
| Brain (g) | 0.417 ± 0.016 | 0.414 ± 0.017 | 0.412 ± 0.013 | 0.391 ± 0.016 |
| Brain/BW (%) | 4.09 ± 0.52 | 4.07 ± 0.49 | 4.41 ± 0.81 | 4.51 ± 0.62 |

Data are the mean ± S.D. BW: Body weight. Each group contained 6-8 mice.

Table 11 Expression changes of total RNA isolated from male mice cerebrums by microarray analysis

| Oligo-ID | Replicate 1 | Replicate 2 | Ave | Description |
|------------|-------------|-------------|------|---|
| M300019974 | 4.21 | 2.99 | 3.60 | X INACTIVE SPECIFIC TRANSCRIPT PROTEIN |
| M300000309 | 0.83 | 4.25 | 2.54 | B-RAF PROTO-ONCOGENE SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE |
| M300013841 | 1.12 | 3.23 | 2.17 | RIKEN CDNA 2310003A05 GENE (MDRWMS2 PROTEIN) |

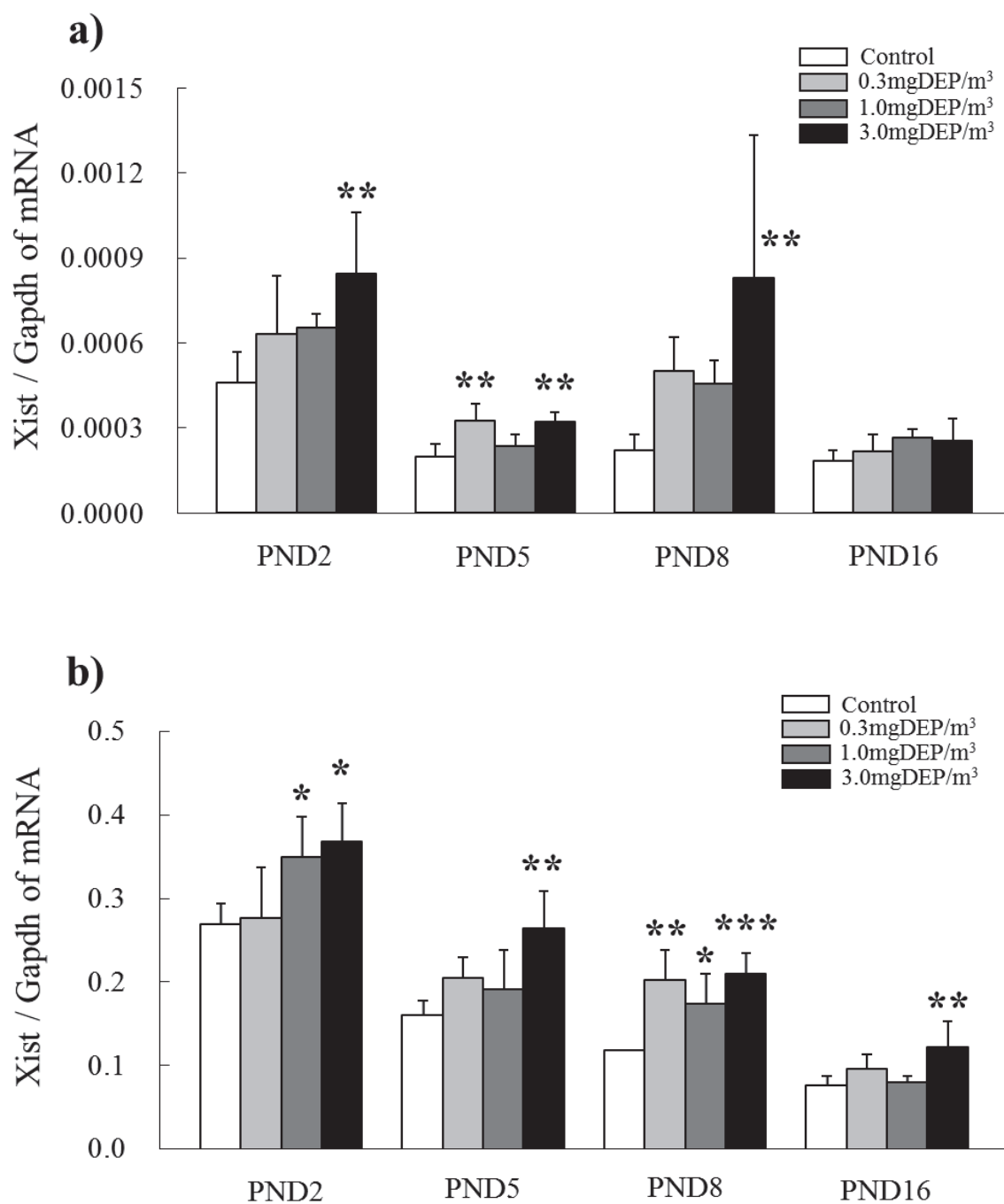


Fig. 1 Quantitative real-time PCR analysis of Xist mRNA expression. Xist expression in male (a) and female (b) mice. Means \pm S.D. are shown. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control by Dunnett's test. Each group contained 5 mice.

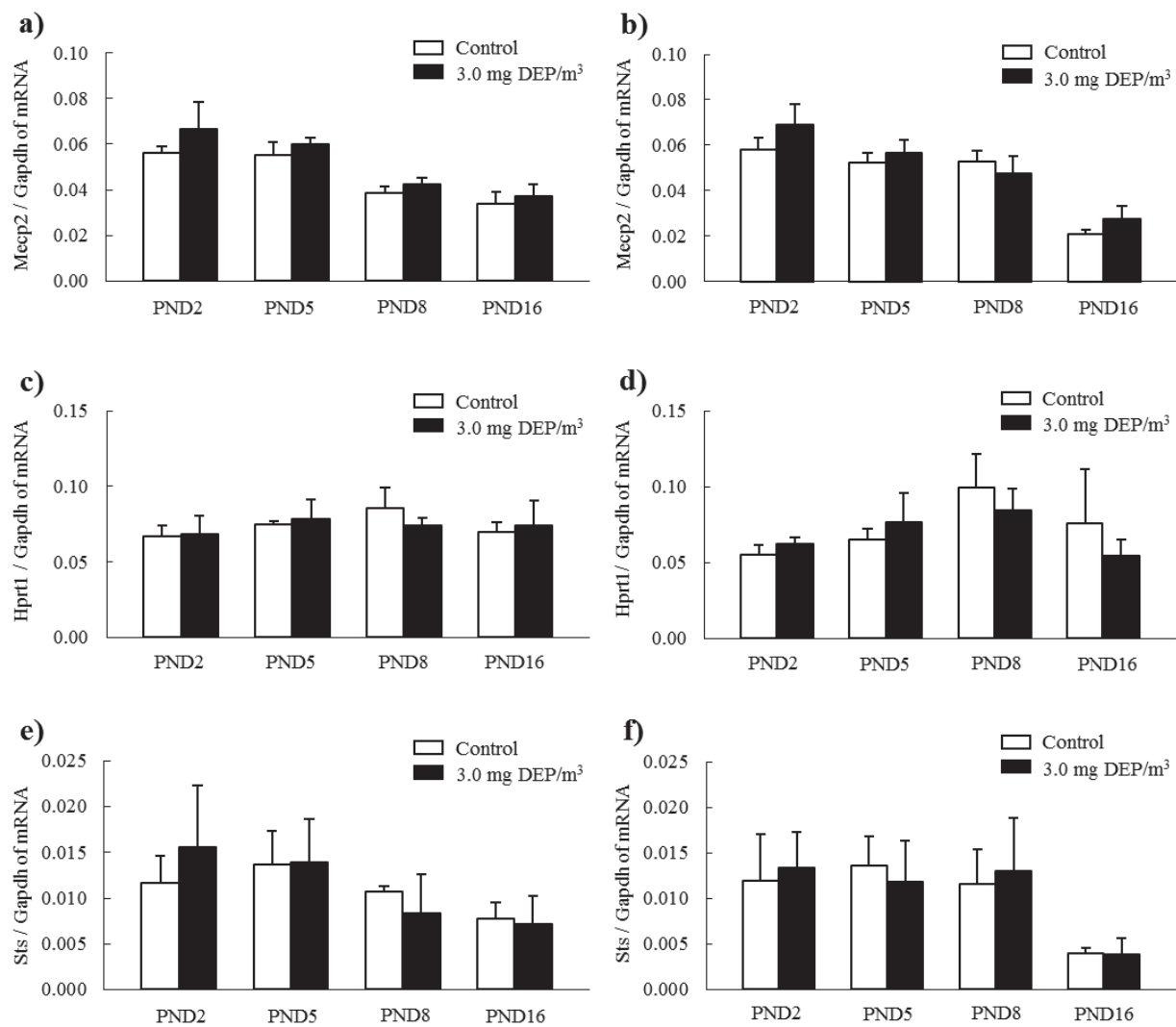


Fig. 2 Quantitative real-time PCR analysis of Mecp2, Hprt1, and Sts mRNA expression. mRNA expression of Mecp2 (a, b), Hprt1(c, d), Sts (e, f) in male (a, c, e) and female (b, d, f) mice. Open column: control group; closed column: 3.0 mg DEP/m³ exposure group. Each group contained 5 mice.

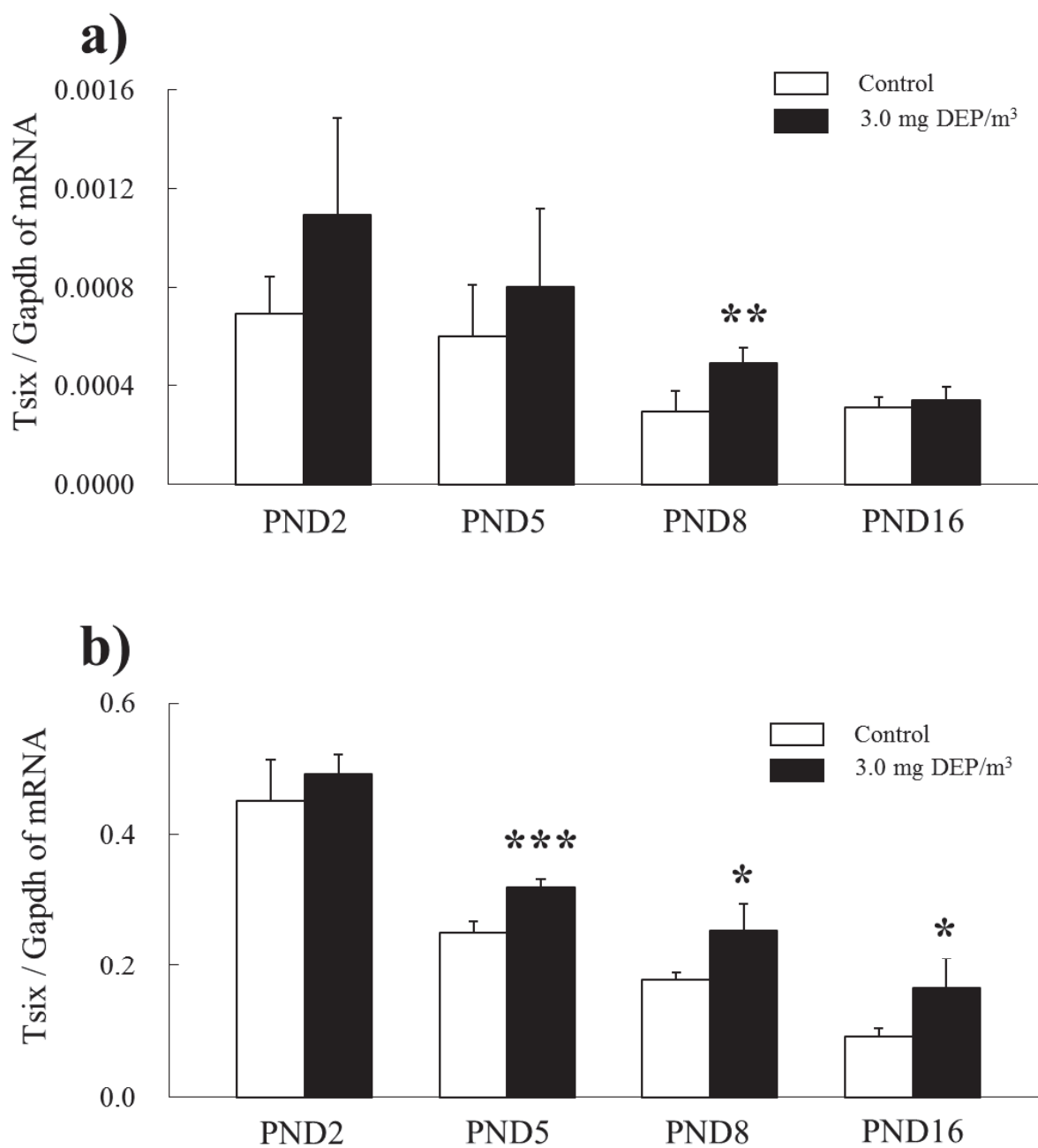


Fig. 3 Quantitative real-time PCR analysis of Tsix mRNA expression. Tsix expression in male (a) and female (b) mice. Open column: control group; closed column: 3.0 mg DEP/m³ exposure group. Means \pm S.D. are shown. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control by t -test. Each group contained 5 mice.

Table 12 Body and brain weights of mice exposed to diesel exhaust during neonatal development.

| Male | Controls | 3.0 mg DEP/m ³ |
|--------------|---------------|---------------------------|
| BW (g) | 7.69 ± 1.46 | 8.84 ± 1.11* |
| Brain (g) | 0.391 ± 0.022 | 0.411 ± 0.021 |
| Brain/BW (%) | 5.59 ± 0.74 | 4.79 ± 0.56 |
| Female | | |
| BW (g) | 7.88 ± 1.24 | 9.17 ± 1.04* |
| Brain (g) | 0.391 ± 0.028 | 0.412 ± 0.026 |
| Brain/BW (%) | 5.17 ± 0.70 | 4.45 ± 0.35 |

The data are the mean ± S.D. *: $p < 0.05$ vs. control by t -test. BW: body weight. Each group contained 8-11 mice.

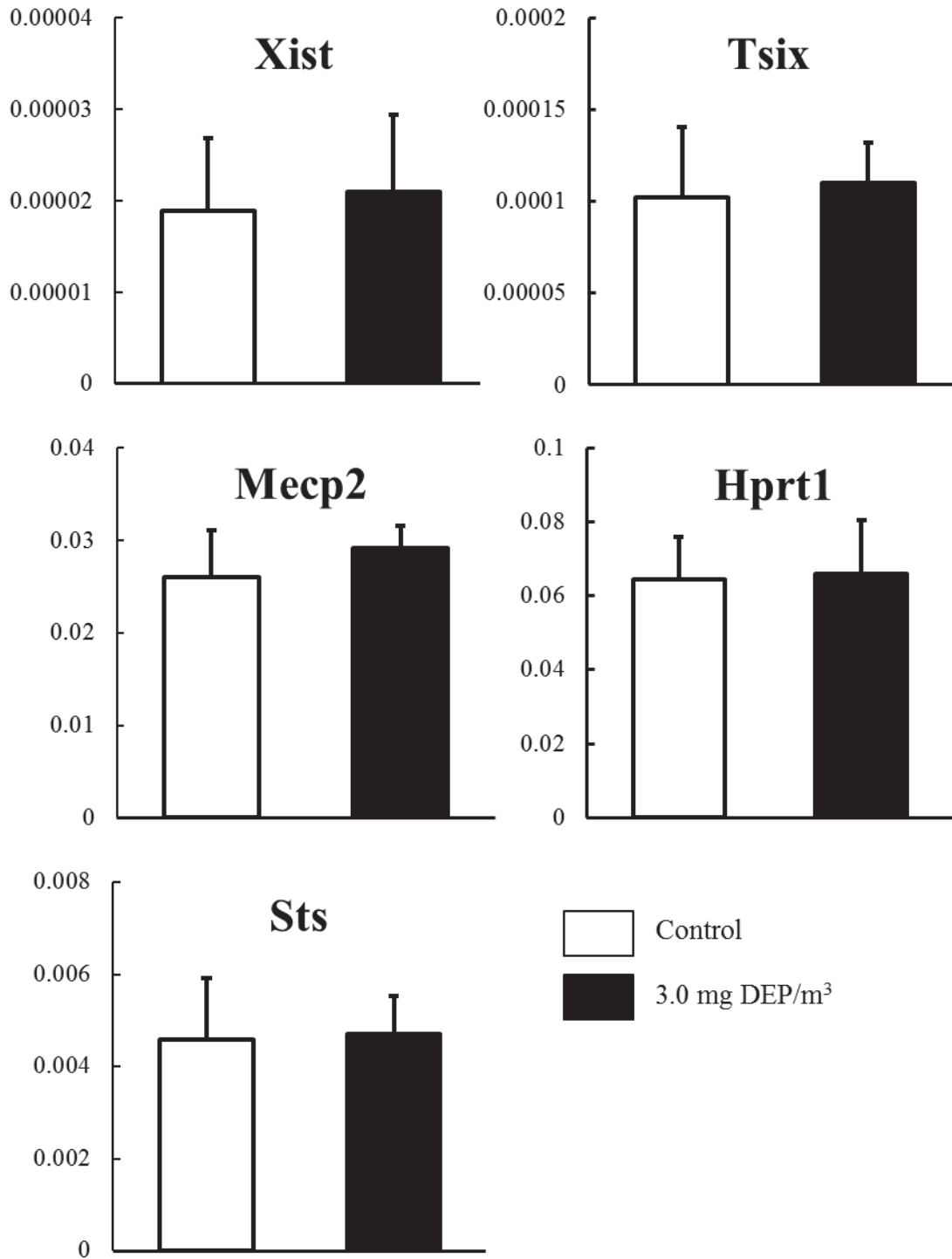


Fig. 4 Effect of neonatal exposure to diesel exhaust on mRNA expression in male mice. Open column: control group; closed column: 3.0 mg DEP/m³ exposure group. Each group contained 5 mice.

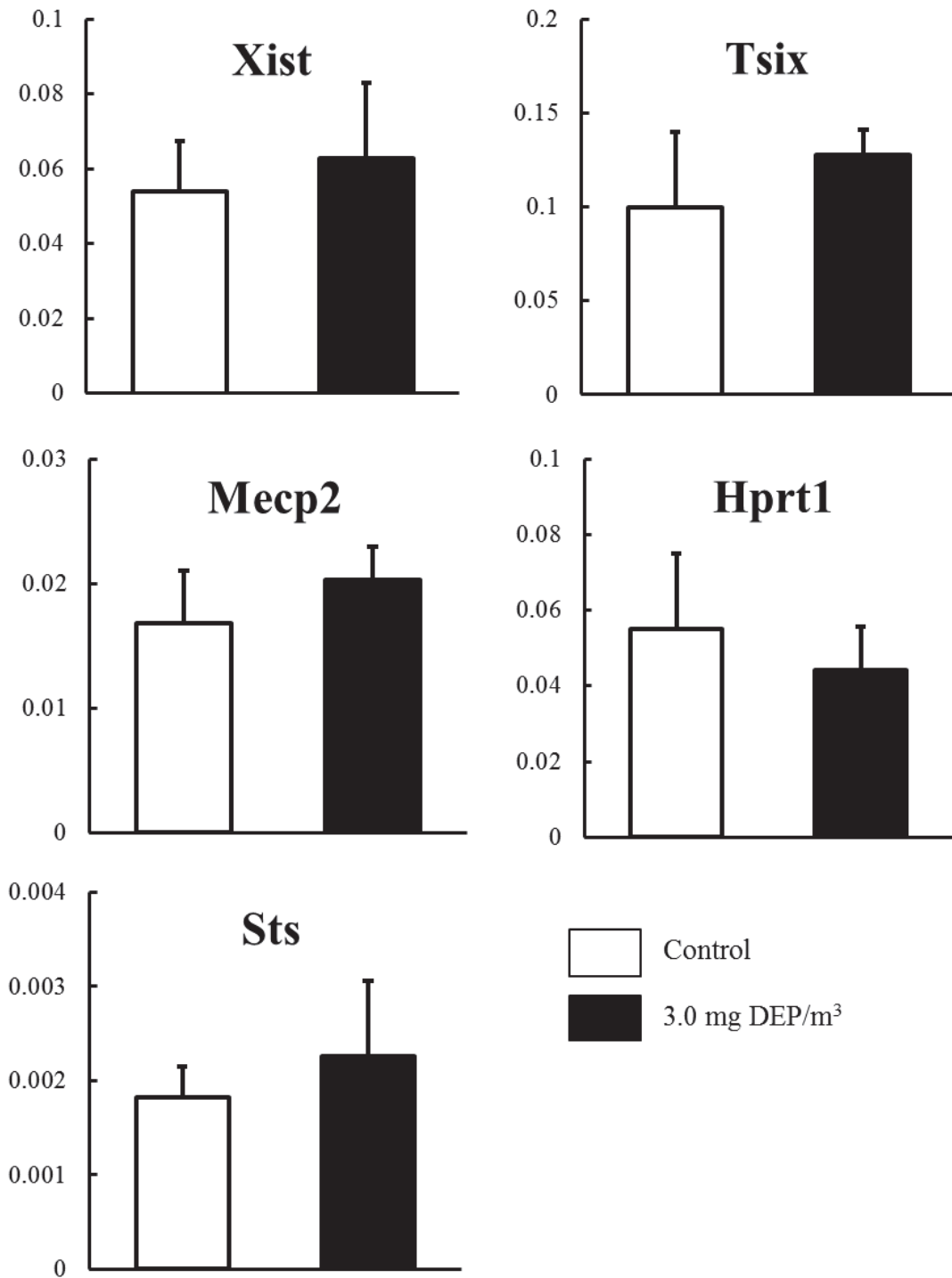


Fig. 5 Effect of neonatal exposure to diesel exhaust on mRNA expression in female mice. Open column: control group; closed column: 3.0 mg DEP/m³ exposure group. Each group contained 5 mice.

第四節 考察

本研究では、周産期の DE 曝露が脳神経系に及ぼす影響を、新生仔の脳内遺伝子、特に Xist 遺伝子の発現を中心として検討した。

体重について、胎仔期曝露では変動せず、新生仔期曝露では雌雄とも有意な増加が認められた (Table 10)。この結果は、曝露濃度による違いはあるものの第一章で行った曝露と同じような傾向であり、一定の再現性のあることが示唆された。

次に、cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動の網羅的解析を行った。今回用いたバイオマトリックス社製の cDNA マイクロアレイシステムは既に乳癌細胞において beta-catenin や CD44 など 144 遺伝子の特徴的な変化 (Uchino et al. 2010)、精神運動発達遅滞女性における 18q21.2 - q21.33 の欠損 (Kato et al. 2010)、マウス ES 細胞において 1562 の特徴的な遺伝子発現を認める (Gunji et al. 2004) など広い研究分野で用いられてきており、信頼性は高いものと思われる。

このシステムを用いて胎仔期曝露の 2 日齢雄マウス (Control および 3.0 mg DEP/m³ 曝露群) の大脳部について解析、2 回の平均値が 1.5 倍以上または 0.8 倍以下の変動を示したものを顕著な差があるものとして抽出したところ、1.5 倍以上を示したものが Xist、B-raf、Drwms2 の 3 種類、0.8 倍以下を示したものはなかった (Table 11)。B-raf は Raf キナーゼに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞シグナルを調節する役割を持つ。多くのヒトの癌において変異が認められ、近年は抗癌剤の作用ターゲットとして研究されている (Sullivan and Flaherty 2013)。Drwms (別名 Commd10: COMM domain containing 10) は、マウスだけでなくヒトや各種生物に存在し、NF-κB シグナルによる炎症誘発への関与が示唆されているが詳細については不明である (Starokadomskyy et al. 2013)。本研究において、B-raf および Drwms2 の結果はおそら

く色素標識実験でシグナル値にノイズが入ったことにより反復実験間で差異が生じたものと考えられる。一方、Xist が最も顕著に変動し、かつ反復実験で安定した発現上昇がみられたことから、発現比の上昇は信頼できる結果と考えこの遺伝子に焦点を絞り解析対象とすることとした。

Xist 遺伝子は胎生期に起きる X 染色体不活性化のマスターゲーンであり、この遺伝子の変化は X 連鎖性遺伝子全体に広く波及すること、さらに個々によってそのパターンは異なり免れる部分も多く生理機構として完全なものではないと考えられることから、化学物質胎生期曝露のウィークポイントになりうるのではないかとの仮説を立て、詳細な解析を進めた。

リアルタイム PCR を用いて Xist の mRNA 発現変動を検討したところ、雄は 2 日齢のほか、5 日齢、8 日齢において、雌は全ての日齢において曝露濃度依存的な発現上昇が認められた (Fig. 1)。2 日齢雄の有意な発現上昇 (1.83 倍) が認められており、マイクロアレイの結果の再現が確認できた。雄マウスにおいては X 染色体が 1 つしかなく、より直接的な影響が及ぼすと考えられる。実際、自閉症や知的障害は男児に多く、その要因は X 連鎖性遺伝子に関係しており、女性ではもう片方の正常な X 染色体で補える為と考えられている。また、Xist 遺伝子は常染色体に導入してもその染色体を不活性化することが報告されており (Lyon 1998)、影響が伝播しうると推察される。以上より、本来は X 染色体不活性化を必要としない雄マウス、生理的に X 染色体の不活性化が必要である雌マウスの双方において発現上昇が認められたことから、DE は次世代的に X 染色体の活性バランスをかく乱し影響を及ぼす可能性が示唆された。

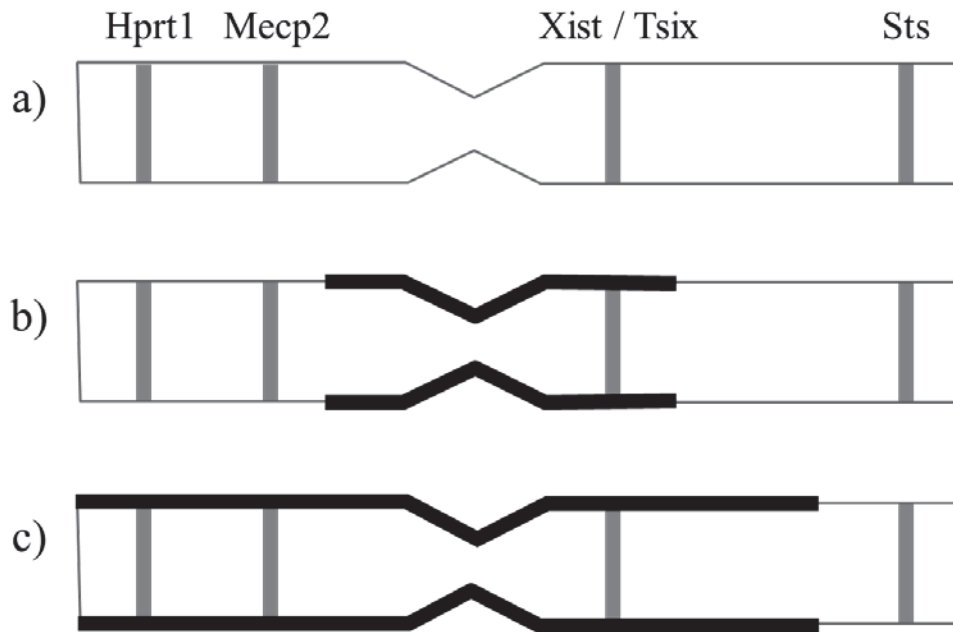
続いて、DE 胎仔期曝露は Xist の変動に基づく X 染色体不活性化の異常を介して脳発達に重要な X 連鎖性遺伝子に広く影響を及ぼすのではないかと考え、X 染色体上に存在する 3 つの遺伝子 (Hprt1, Mecp2, Sts) の発現変動を検討した。Hprt1

(Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1) と Mecip2 (Methyl-CpG-binding protein2) は、X 染色体の不活性化と連動して動く遺伝子として選択した。Hprt1 遺伝子 (Xq26 - q27.2 に存在) は精神遅滞や中枢神経障害を引き起こすレスシュ-ナイハン症候群、すなわちヒポキサンチンおよびアデニンのサルベージ経路の障害によりプリンが乳酸に分解され本来の細胞エネルギー系や信号伝達を行えなくなる疾病の原因遺伝子として知られている (Nguyen and Nyhan 2013)。Mecip2 (Xq28 に存在) は進展性の神経疾患として罹患者が多く (1 ~ 1.5 万人に一人の頻度)、主に女兒に見られる (男性は X がひとつであり致死となる) レット症候群の主要な原因遺伝子であり、X 連鎖性精神遅滞においても一定の頻度で変異が確認されている。特に脳神経発達や精神機能との関連が強く、自閉症様作用や精神発達の遅れ、コミュニケーションスキルの消失などを引き起こす。そのメカニズムとして、Mecip2 はメチル CpG 結合タンパクを産生し、他のクロマチン修飾因子をリクルートすることで転写制御を行う遺伝子であり、この異常はシナプス可塑性や神経回路形成、樹状突起スパイン増殖の異常を引き起こすことが報告されている (Castro et al. 2013)。Sts (Steroid sulfatase) 遺伝子 (Xp22.32 に存在) はステロイドサルファターゼの産生を司り、X 連鎖性魚鱗癬という重度の皮膚疾患の原因遺伝子となることが報告されている。また、X 染色体の末端部にある偽常染色体領域 (Pseudoautosomal region: PAR) と呼ばれる部位に存在し、不活性化を免れる遺伝子であることが知られている (Maltais and Poirier 2011)。これらの遺伝子発現変動は不活性化の指標として、Hprt1 と Mecip2 の減少または Sts の増加は過剰な不活性化を、Hprt1 と Mecip2 の増加または Sts の減少は不完全な不活性化を意味する。これらの模式図を別図 3 に示した。最も顕著に上昇した 3.0 mg DEP/m³曝露群においてリアルタイム PCR 法によりこれら 3 つの遺伝子の発現変動を測定したところ、有意な変動を示さず、また雌雄間の差も存在しなかったことから、DE 曝露の X 染色体の活性そのものへの関与の可能性は低いことが推察された (Fig. 2)。

X 染色体不活性化は Xist のみならず、Tsix (X inactivation-specific transcript-antisense)

遺伝子が重要な役割を担っていることが知られている。Tsix は Xq13.2 (Xist の近傍、X 染色体不活性化中心内) に存在し、Xist のアンチセンスとして、その作用を抑制する働きを持っている遺伝子として発見された (Lee and Lu 1999)。Tsix の変異は常に不活性化 X を引き起こし動物では胎生致死となること、Xist と相補しその変化は Xist の発現変動とともにクロマチン構造の改変とともに不活性化バランスに影響すること、Tsix 削除による Xist の上昇は X 染色体不活性化後終了後の細胞においても認められること、雄における Tsix の異常は本来発現しない Xist が発現し X 染色体不活性化が進行することが報告されており、Xist とバランスを取り合うことで適切な X 染色体不活性化を進行、維持しているものと考えられる (Sado et al. 2005)。また XCI の最初期の段階において、雌の二つの X 染色体のうち後に活性化 X となる方で強く発現し Xist を抑制、不活性化から保護していることから、X 染色体不活性化の選択 (どちらの X 染色体を不活性化させるか) にも関与していると考えられている (Sun et al. 2006)。そこで Tsix の発現変動をリアルタイム PCR により検討したところ、雌雄とも Xist の発現変動に追従する形で有意な発現上昇が認められた (Fig. 3)。以上より、Tsix は Xist の変動を補償するよう増加し、Xist と Tsix がバランスをとりあうことで X 連鎖性遺伝子の発現変動を回避していた可能性が示唆された。

新生仔期曝露は、胎仔期曝露群と比較することで、ライフステージにおける感受性の違いを明らかとすることを目的として行った。胎仔期曝露群と曝露した日数が近い 16 日齢の雌雄について上記の 5 遺伝子を検討したところ、Xist、Tsix とも発現変動が抑制されており、DE は新生仔期より胎仔期で強く影響を及ぼすことが示唆された (Fig. 4, 5)。X 染色体不活性化は胎仔期に起こるものあり、時期が一致していた。また、Xist は X 染色体の不活性化に付随して働き、その発現量も不活性化の完了をピークに減少することから、新生仔期より胎仔期で影響がより明確に出現したと考えられた。



別図3 Xist 遺伝子の発現と X 染色体不活性化の模式図

X 染色体不活性化の進行について、模式図を示した。(a)は不活性化開始前である。不活性化の開始とともに X 染色体不活性化中心（中央部）から Xist 遺伝子が強く発現、Xist RNA の蓄積とともに DNA メチル化、ヒストン修飾により X 連鎖性遺伝子は不活性化を受け（赤線）、その発現が抑制される(b)。Xist RNA は末端方面へ伝播し不活性化は進展、X 染色体をほぼ覆いつくす格好となる (c)。ここで、Hprt1 と Mecp2 は不活性化を受ける部位に存在し転写を抑制されるが、Sts は不活性化を免れる部位に存在し転写は抑制されない。この後、Xist RNA は発現を続け、不活性化状態の維持に関わる。

第五節 小括

胎仔期 DE 曝露により、新生仔マウスの大脳部における遺伝子発現の変動について検討を行い、雌雄とも Xist 遺伝子の DEP 濃度依存的な発現上昇を確認した (Fig. 1)。そして Xist 遺伝子が制御する、脳・精神機能との関連も深い X 染色体不活性化に着目し、Mecp2、Hprt1、Sts 遺伝子の発現量を測定したが、これらに変動は認められなかった (Fig. 2)。さらに、Xist 遺伝子に遅れて Tsix 遺伝子の発現上昇が確認されたことから、胎仔期 DE 曝露が X 染色体の活性に対して大きな影響を及ぼす可能性は低い、X 染色体の不安定性に関与している可能性が示唆された (Fig. 3)。新生仔期 DE 曝露ではすべての検討遺伝子において発現変動を示さなかったことから、胎仔期曝露がこれら発現変動に重要であり、この時期は X 染色体不活性化の行われる時期と一致していた (Fig. 4, 5)。

X 染色体不活性化は Xist と Tsix というわずかな遺伝子によって制御されるにも関わらず、影響は広範囲に波及し得ることから、化学物質の次世代影響評価に重要であり、そのメカニズムの体系化と知見の集積が必要であると考えられた。

第三章 X 染色体不活性化を中心とした

ビスフェノール A 胎仔期曝露が脳神経系に及ぼす影響

第一節 研究の背景と目的

ビスフェノール A (Bisphenol A: BPA 別名 2,2-ビス (p-ヒドロキシフェニル) プロパン、4,4' - (1-メチルエチリジン) ジフェノール、4,4' -イソプロピリデンジフェノール。分子式 $C_{15}H_{16}O_2$) は 1923 年にドイツで樹脂のコーティング用途のため生産が開始された。わが国では 1961 年に国内生産が始まり、その製造量はプラスチック樹脂の原料として急拡大し、世界で年間約 300 万トンを超えるに至っている。そのうち約 8 割はポリカーボネート樹脂として CD や DVD の基盤などの OA・光学用途、道路の防音壁などのシート・フィルム用途、約 2 割はエポキシ樹脂として缶の内面コーティングや歯科材料をはじめ、塗料や接着剤等に用いられている。その他の用途としてポリエステル樹脂の中間体、難燃剤の合成原料、塩化ビニル樹脂の添加剤等にも用いられている。1977 年に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法)」の既存化学物質安全性点検の対象となり各種試験が実施され、難分解・低濃縮性と判断されている。その後、ノニルフェノールやフタル酸エステル類とともに内分泌かく乱作用の疑いをもたれ、特に哺乳瓶や給食用食器からの溶出が懸念されていた。1998 年に環境庁 (現環境省) の環境ホルモン戦略計画 (SPEED' 98) のリストに収載された。1994 年には食品衛生法によってポリカーボネート樹脂からの溶出限度が 2.5 ppm 以下であること、2001 年には PRTR 法 (特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律) において第一種指定化学物質に指定されている。なお、哺乳瓶については 2008 年にはカナダ、2011 年には EU や中国で BPA を含む製品の使用等が禁止している。わが国においては 2013 年現在のところ禁止はされてい

ないが、厚生労働省は公衆衛生の見地から曝露をできる限り減らすことが適当であり、関係事業者に対して製品の更なる技術改良を行う等、自主的な取組を更に推進していくよう要請するとしている。上述の内分泌かく乱作用の懸念を受け、厚生労働省や環境省、経済産業省、関連研究機関等で、様々な有害性試験・環境モニタリングが行われ、また国内では社団法人日本化学工業協会のビスフェノール A 安全性研究会、海外では米国化学品製造者協会 (American Chemistry Council: ACC) の The Polycarbonate/BPA Global Group など製造者協会が調査研究を開始し、様々な科学的知見が集まりつつある。

BPA のもつエストロゲン活性については数多くの報告がなされており、BPA のフェノール構造のパラ位に疎水性炭化水素を持つ部分がエストロゲン受容体の親和性を示すことが報告されている。エストロゲン作用を検出するスクリーニング手法である子宮増殖アッセイにおいても、種差や投与条件による違いはあるものの、多くの研究で子宮重量増加およびエストロゲン活性が観察されて、実際のヒトサンプルからの検出濃度 (1 pM ~ 1 nM) においてもエストロゲン活性を持ちうることも報告されている (Welshons et al. 2006) 。一方、エストロゲンレセプターとの結合性はエストラジオールの 1/500 ~ 15,000 程度であること、エストロゲン受容体応答エレメント依存的に転写活性があるが、その作用はエストラジオールの 1/600 ~ 130,000 程度と報告され、エストロゲン受容体との結びつきは必ずしも高くなく、通常的作用機序に限らないエストロゲン作用が考えられている。近年、BPA のエストロゲン様作用の発現系として通常のエストロゲンレセプターの 100 - 1,000 倍の相互作用が示されるエストロゲン関連受容体 γ 型 (Estrogen-related receptor gamma: ERR γ) との関連性が示され、またこの受容体は胎児の胎盤や脳、前立腺に強く発現していることから胎生期影響が懸念されている (Takayanagi et al. 2006) 。なお、BPA はエストロゲンだけでなく、アンドロゲン (Lee et al. 2003) や甲状腺ホルモン (Gentilcore et al. 2013) に影響を与えている可能性が報告されている。

さらに、BPA は脳神経系へ多くの影響を及ぼすことが報告されている。すなわち、

新皮質組織の異常や性的二型性を示す青斑核のサイズ異常、探索行動や社会行動の異常、攻撃的行動の増強、不安レベルの増強、侵害行動、性差の消失や不安、うつ、警戒反応、抑圧的行動の増強、脳幹モノアミン系のかく乱、性行動異常（ロードーシス低下、拒否スコア上昇）などが報告されている。その分子メカニズムとして、神経細胞の発達期における遊走能や増殖能の減少、樹状突起スパインの減少、エストラジオールおよびテストステロンに反応して誘発されるシナプス形成の阻害、シナプスリモデリングの阻害、出生雌マウスの成熟後における黒質のチロシン水酸化酵素の免疫陽性細胞の減少、大脳皮質と視床を連絡する視床皮質路における神経回路形成異常などが報告されている。行動や遺伝子発現の異常については、周産期曝露による影響は何世代にも渡って持続されるとの報告もある (Weiss 2012)。また、疫学調査においても小児の胎生期曝露と出生後の多動、社会行動変化などの行動変化が報告されている (Braun et al. 2011)。

本章では、代表的な内分泌かく乱化学物質であり、DE と同様に環境中に幅広く存在しており、脳神経系への影響について報告も多い BPA の胎仔期曝露を実施して、X 染色体不活性化および性ホルモンへの影響を検討した。曝露濃度については、生殖・発生毒性や繁殖毒性試験により導かれる最大無毒性量 (No Observed Adverse Effect Level: NOAEL) に相当する曝露濃度として 50 mg/kg (参考；急性毒性試験による経口 LD50 は 1,600 – 5,200 mg/kg (Society 1995)) を採用するとともに、いわゆる低用量影響濃度として 0.02 mg/kg (Nagel et al. 1997) についても実施した。

第二節 実験方法

2.1 動物飼育

妊娠 1 日目の ICR 系妊娠マウス (SLC(株)、静岡) を購入、0.02、50 mg/kg および Control 群に振り分け飼育した。飼育室は奥羽大学動物舎にて室温 22 ± 1 °C、湿度 $50 \pm$

5%、明暗周期 16-hour light / 8-hour dark に保った。水はポリカーボネート容器では常温において給水中に微量ながら BPA が溶出するとの報告されていることから (Howdeshell et al. 2003)、配管から直接カートリッジフィルターを通した純水を自由摂水させることとした。飼料は固形試料 (日本クレア、東京、CE-2) を用い、自由摂食とした。なお、本研究の実験は奥羽大学動物実験委員会の承認を得て実施した (許可番号 第 41 号)。

2.2 ビスフェノール A 胎仔期曝露

妊娠 6 および 15 日目にそれぞれ経口ゾンデ針 (夏目製作所、東京、KN-348 マウス用 50 mm) を用いて胃内強制経口投与した。BPA 標準品 (関東化学、東京、05024-96) をコーンオイル (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, C8267) に溶解し、Control 群はコーンオイルのみを投与した。雌性出生仔を 2 日齢、4 日齢、3 週齢、7 週齢の時点で仔を解剖に供し試料採取を行った。Litter effect を避けるため採取はできるだけ同腹仔を避け、また成長に伴うばらつきを避けるため各ケージの匹数ができるだけ揃うようにした。

2.3 試料採取

仔は体重測定後、肛門生殖器間距離 (Anogenital distance: AGD) をデジタルノギス (新潟精機、新潟、DT-150) を用いて測定した。ジエチルエーテル (和光純薬、東京、和光一級、052-01165) 麻酔下にて注射針 (テルモ、東京、NN-2525R) を用いて心採血を行った後、直ちに脳を摘出してから、全重量を測定し、さらに大脳部を切り分け重量を測定した。直ちに 1.5 mL チューブに入れデュワー瓶 (THERMOS、東京、D-1000W) 中の液体窒素で急冷し、用時まで -80 °C で保存した。3 週齢および 7 週齢においては、採取した血液をキャピジェクト (テルモ、東京、CJ-AS) に入れ、30 分以上常温で放置後、1,200 rpm で 10 分間遠心し上清より血清を得た。

2.4 遺伝子解析

2.4.1 Total RNA の抽出

-80 °C に凍結していた大脳に ISOGEN (ニッポンジーン、東京、311-02501) 1 mL を加え、ポリトロンホモジナイザー (KINEMATICA、東京、PT1300D) により粉碎し (30,000 rpm、1 分)、5 分間室温で静置した。その後、クロロホルム (関東化学、東京、試薬特級、07278-00) 200 μ L を加え良く攪拌し、室温で 3 分間静置した。その後 4 °C、14,500 rpm で 15 分間遠心し、再び室温で 3 分間静置した。その水層を別のチューブに移しイソプロパノール (関東化学、東京、試薬特級、32435-00) 500 μ L を加えて攪拌、室温で 10 分間静置し RNA を析出させた。静置後、4 °C、14,500 rpm で 10 分間遠心し、RNA を沈殿させた後、上澄を除去した。70 %エタノール (99.5 %エタノール (和光純薬、大阪、試薬特級、057-00456) を水で希釈し使用) を加えて 4 °C、14,500 rpm で 5 分間遠心、再度沈殿させ RNA を精製させた。エタノールを除去後、キムタオルの上にチューブを逆さに立て、風乾した。最後に DEPC (Diethylpyrocarbonate) 処理水 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 46-2224) を加えて total RNA 水溶液とし、-80 °C で保存した。

2.4.2 逆転写

Total RNA をスペクトロフォトメーター (BioRad, Hercules, CA, USA, SmartSpecPlus) を用いて濃度を測定した。Total RNA は DEPC 水で 1,000 μ g / mL、最終量 7 μ L になるように調製し DyNamoTM cDNA synthesis kit (Finnzymes, Vantaa, Finland, F430L) を用いて cDNA 合成を行った。すなわち、それぞれ RT Buffer 10 μ L、Random hexamer 1 μ L、M-MuLV RTase 2 μ L を加え、サーマルサイクラー (BioRad, Hercules, CA, USA, iCycler) により 25 °C 10 分間 (Primer extension time) 、37 °C 30 分間 (cDNA synthesis time) 、85 °C 5 分間 (Reaction termination) 反応させ最終量 20 μ L の cDNA を得た。

2.4.3 リアルタイム PCR

合成した cDNA は DyNamo™ HS SYBR® Green qPCR Kit (Finnzymes, Vantaa, Finland, F400L) を用い、ABI 7500 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により遺伝子発現を定量解析した。cDNA は DEPC 水で 5 倍希釈して用い、また検量線溶液は解析する cDNA 原液を等量ずつミックスし、10 倍 5 段階希釈し、それぞれ 2 μ L ずつ 96 穴 PCR 反応プレート (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 96-Well Optical Reaction Plate) に duplicate でアプライし、プライマー (10 μ M FR mix) 1 μ L、ROX Reference 0.4 μ L、F430 Master mix 10 μ L、DEPC 水 6.6 μ L を加え、専用シーラーを用いて専用シール (ABI Optical Adhesive Covers: Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 4311971) を厳重に封入、プレートシェーカー (HP Labortechnik, Oberschleissheim, Germany, 51101) でボルテックスした後、スピンドウンし測定した。

プライマーは GenBank のシーケンス情報に基づき Primer Express software ver. 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて T_m 値は 64 ~ 66 °C (できるだけ FR は一致するよう設定)、GC 含量は 40 ~ 60 %、アンプリコンサイズは 70 ~ 200 bp、プライマーサイズは 17 ~ 25 bp となるよう設計し、インビトロジェンカスタムプライマーサービス (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で合成した (Table 13)。PCR 条件は 95 °C 15 分の後、94 °C 10 秒、60 °C 25 秒、72 °C 30 秒を 40 サイクルとした。内部標準遺伝子は Gapdh とし補正に用いた。

2.5 DNA メチル化解析

2.5.1 解析の流れ

バイサルファイト処理により、CpG 配列 (C-G 隣接配列。DNA のメチル化修飾部位) の C がメチル化されていなければ U に変換され (相補として A に変換)、メチル化されていれば C のままとメチル化状態に応じて配列を変えることができる。これについて、MSP (Methyl specific primer) 法、すなわちバイサルファイト変換後を予測したメチル化 DNA 検出用プライマー (MSP) を設計して PCR を行い、これを電気泳動することで増幅の有無を識別、メチル化状態を検討した。

2.5.2 バイサルファイト処理

2 mL チューブに得られた DNA 溶液 1.5 μg 分を加え、水で 15 μL とし、2M NaOH を 3 μL 加え室温で 15 分間静置した。亜硫酸水素ナトリウムバッファー 300 μL 加えてボルテックスし、50 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間インキュベートした。亜硫酸水素ナトリウムバッファーは水 15 mL に亜硫酸水素ナトリウム（和光純薬、大阪、試薬特級、198-01371）0.055 g を溶かし、2M NaOH で pH を 5 に合わせた。これに 100 mM ヒドロキノン溶液（水 5 mL にヒドロキノン（和光純薬、大阪、試薬特級、089-01215）0.055 g を加え、遮光状態で 50 $^{\circ}\text{C}$ で約 10 分間インキュベートし作成）を 15 μL を加えて作成した。インキュベート後、1 サンプルあたり水 490 μL 、イソプロパノール 900 μL 、3M 酢酸ナトリウムバッファー（無水酢酸ナトリウム（和光純薬、大阪、試薬特級、192-01075）24.6 g を水で 100 mL にメスアップし、酢酸で pH を 5.2 に合わせ調製） 135 μL 、エタ沈メイト（ニッポンジーン、東京、312-01791；1 μL /DNA 溶液 100 μL で使用） 4 μL を加えよくボルテックスし、4 $^{\circ}\text{C}$ 、15,000 回転で 15 分間遠心した。上澄みを除去後、70%冷エタノールでリンスして乾燥させた。これに水 135 μL 、2M NaOH 15 μL を加えて溶解し 37 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間インキュベート、さらに 3M 酢酸 Na 15 μL および 99.5%冷エタノール（和光純薬、大阪、試薬特級、057-00456）375 μL を加え、-80 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間静置した。この液を 4 $^{\circ}\text{C}$ 、15,000 回転で 15 分間遠心後、上澄みを廃棄し 70%冷エタノールでリンス、乾燥後 TE-buffer 30 μL に溶解して 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存し、調製後 3 日以内に用いた。

2.5.3 PCR 増幅

バイサルファイト処理済 DNA について、EpiTaq HS For bisulfite-treated DNA（タカラバイオ、滋賀、R110A）を用いて PCR 増幅した。すなわち、1 サンプルあたりバイサルファイト処理済 DNA 液 1.6 μL 、MSP プライマー FR mix 1.28 μL 、EpiTaq HS 0.04 μL 、10 \times Buffer 0.8 μL 、MgCl₂ 0.8 μL 、dNTP 0.96 μL 、DEPC 処理水 2.52 μL とな

るよう調製し、サーマルサイクラーで 94 °C 30 秒間、55 °C 30 秒間、72 °C 30 秒間を 40 サイクルし増幅した。増幅済 DNA は 4 °C で保存し、数日中に用いた。なお、バイサルファイト処理を行った DNA は PCR の反応性が変化することがあるが、EpiTaq はバイサルファイト処理後のウラシルを多く含む DNA に対し安定的に PCR 増幅を行えるよう最適化された PCR 酵素であり、また、マグネシウム濃度や dNTP 濃度も本条件下で増幅効率、反応特異性を損ねぬよう最適化されている。

2.5.4 MSP プライマーの作成

メチル化特異的プライマーは ABI Methyl Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用してバイサルファイト処理後のメチル化配列をあらかじめ予測、それに対応したものを 4~8 パターン作成し用いた。検討遺伝子は Xist、Tsix、Gapdh、Nlgn3 および Gdi1 とした。MSP プライマーは以下の手順により設計した。

- ① CpG 領域を $CG / Total > 50 \%$ として設定し検索、確定
 - ② 通常の PCR プライマー条件に加え、CpG 数を 3 以下に制限し MSP を検索、確定
- 作製した PCR プライマーは予備実験を行い、バンドの発現が明瞭であった 3 プライマーについて測定を進めた。これら MSP プライマーは Table 14 に示した。

2.5.5 電気泳動と DNA メチル化レベルの解析

Agarose X (ニッポンジーン、東京、312-01193) 0.5 g に 1 × TBE を 25 mL 加え、500 W のマイクロウェーブ処理により細かい気泡が出ないようになるまで溶解し、粗熱がとれた後、専用トレイでゲル化した。泳動液も 1 × TBE とした。Trizmabase (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, T1503) 30.27 g にホウ酸 (ナカライテスク、京都、電気泳動用特製試薬、05218-04) 15 g、EDTA 二水和物 (関東化学、東京、試薬特級、14097-00) 3.7 g を加え水で 1 L としオートクレーブ処理した 5 × ストック液を用時 5 倍希釈し用いた。一方で PCR 産物 10 μL に Loading Buffer 2 μL を加えてボルテックスし、ウェルにアプライした。ラダーは 20 bp DNA ラダー (タカラバイオ、滋賀、3409A) を水で

10 倍希釈し使用した。これを 100 V で 20 分間泳動し、EtBr Solution (ニッポンジー
ン、東京、315-90051) の 150 μ L / 200 mL 希釈液で 10 分間振盪後、プリントグラフを
用いてバンドの有無を確認した。これらについて各群 2 検体 3 プライマーの 6 箇所ず
つ測定し、結果については明瞭なバンド有り (メチル化) を黒丸で、バンド無し (非
メチル化) を白丸で表し DNA メチル化レベルを解析した。

2.6 血清中エストラジオールの測定

Estradiol EIA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, 582251) を用い、ELISA 法
により定量した。すなわち検量線液および血清サンプルを 50 μ L ずつ各ウェルに
duplicate でアプライし、Estradiol AChE Tracer と Estradiol EIA Antiserum を 50 μ L ずつ
加え、室温で 1 時間インキュベートした。これを wash buffer で 5 回すすぎ、Ellman's
reagent 調製液 200 μ L、EIA tracer dye 5 μ L を添加、カバーおよび振盪し室温で 90 分間
インキュベートした。これをプレートリーダー (モレキュラーデバイスジャパン、東
京、SpectoraMax 190 EXT) を用い 412 nm の波長で測定した。

2.7 統計処理

結果は全て平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) で示した。有意差検定について、DNA メチル
化解析はフィッシャー直接確率検定、他はすべて Dunnett's 検定を行った。

第三節 実験結果

3.1 体重および脳重量への影響

体重は両曝露群共に増加しており、50 mg/kg 曝露群の2日齢、4日齢、3週齢においては26~27%、7週齢においても9%の増加幅を、また、0.02 mg/kg 曝露群においても全体に増加傾向であり、3週齢において有意な増加（12%増）を示していた。脳重量は50 mg/kg 曝露群で2日齢（11%増）、4日齢（12%増）で有意な増加を示していた（Table 15）。

3.2 X 染色体不活性化因子への影響

Xist は全体に減少傾向を示し、50 mg/kg 曝露群においては3週齢（24%減）、7週齢（26%減）、0.02 mg/kg 曝露群においては7週齢（14%減）で有意な発現減少を認めた。一方でTsix は全体に増加傾向を示し、50 mg/kg 曝露群においては4日齢（64%増）、3週齢（147%増）、7週齢（246%増）で有意な発現上昇を認めた。一方、0.02 mg/kg 曝露群においては有意な差は認められなかったものの、7週齢では71%の増加を示すなど増加傾向にあった（Fig. 6）。

3.3 X 連鎖性脳発達関連遺伝子群への影響

50 mg/kg 曝露群でFmr1（3、7週齢）、Gdi1（4日齢、3、7週齢）、Nlgn3（3、7週齢）、Pak3（4日齢、3、7週齢）で有意な発現減少が認められた。一方、0.02 mg/kg 曝露群でGdi1（7週齢）、Nlgn3（7週齢）、Pak3（3、7週齢）の有意な発現減少が認められた（Fig. 7）。

3.4 DNA メチル化への影響

明瞭なバンドが得られたものをメチル化していたと判定し、メチル化（黒丸）と非メチル化（白丸）の比より検定したところ、50 mg/kg 曝露群 7 週齢で Nlgn3 の有意な脱メチル化が認められた。一方、0.02 mg/kg 曝露群では有意な差は認められなかった (Fig. 8)。Fig. 9 は Nlgn3 (7 週齢) の Control および 50 mg/kg 曝露群の電気泳動像を示している。Control-1, 2 の MSP1 および 3 に明瞭なバンドが得られメチル化していたと判定した。

3.5 性ホルモン関連遺伝子群への影響

AR は 50 mg/kg 曝露群の 2 日齢時に有意な発現上昇が認められ、7 週齢時に有意な発現減少が認められた。一方、0.02 mg/kg 曝露群で 7 週齢時に有意な発現減少が認められた。ER α は 50 mg/kg 曝露群 (4 日齢、3、7 週齢)、0.02 mg/kg 曝露群 (4 日齢、7 週齢) とともに有意な発現上昇が認められた。また、ER β は 7 週齢 50 mg/kg 曝露群で有意な発現上昇が認められた (Fig. 10)。

3.6 AGD への影響

50 mg/kg 曝露群 (4 日齢、3、7 週齢)、0.02 mg/kg 曝露群 (3 週齢) で有意に短縮し、曝露濃度依存的な変化が認められた (Fig. 11)。

3.7 血中エストロジオール濃度への影響

3 週齢で 50、0.02 mg/kg 曝露群とも有意な減少が認められた (Fig. 12)。

Table 13 PCR primer pair sequences for real-time PCR

| <i>Gene</i> | Sequence (5'→3') | Length (bp) |
|--|---------------------------------|-------------|
| <i>Gapdh</i> (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GenBank NM_008084</i>) | | 176 |
| Forward primer | TGCACCACCAACTGCTTAG | 19 |
| Reverse primer | GGATGCAGGGATGATGTTC | 19 |
| <i>Xist</i> (<i>X inactivation-specific transcript: GenBank L04961</i>) | | 70 |
| Forward primer | AATGGAACGGGCTGAGTTTTAG | 22 |
| Reverse primer | TCATCCGCTTGCGTTCATAG | 20 |
| <i>Tsix</i> (<i>X inactivation-specific transcript-antisense: GenBank NR_002844</i>) | | 86 |
| Forward primer | AGTTGTGACCGATTTGGAGGGCTTACG | 27 |
| Reverse primer | GTATGGAGTCACCAGGTTCCCAGAGAAAGAC | 31 |
| <i>Fmr1</i> (<i>Fragile X mental retardation 1: GenBank NM_008031</i>) | | 123 |
| Forward primer | TCCAATGGCGCTTTCTACAAGGCATTT | 27 |
| Reverse primer | TGGTGGGAATCTCACATCATGGAATGG | 27 |
| <i>Gdi1</i> (<i>Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1: GenBank NM_010273</i>) | | 78 |
| Forward primer | TGCCAGCACCCTGTAGAGACTGCAGAA | 28 |
| Reverse primer | TGGTCAATGGGTTCCAACAGCTCCAA | 26 |
| <i>Nlgn3</i> (<i>Neuroligins 3: GenBank NM_172932</i>) | | 91 |
| Forward primer | TGCCAACTTGGATATCGTCGCCACTT | 26 |
| Reverse primer | GGATCCATCTTCCGTGGGCACATACA | 26 |
| <i>Ophn1</i> (<i>Oligophrenin 1: GenBank NM_052976</i>) | | 83 |
| Forward primer | GACGAGCCCTGAAGACCCGAGGAA | 24 |
| Reverse primer | CACGCTGGCCGAGCCCTAACC | 21 |
| <i>Pak3</i> (<i>p21-activated kinase 3: GenBank NM_008778</i>) | | 74 |
| Forward primer | GCAGCCCACACAGGGCAGCAA | 21 |
| Reverse primer | TACTGGCTCTTTCGCTTCACGGTGGAA | 27 |
| <i>AR</i> (<i>Androgen receptor: GenBank NM_013476</i>) | | 101 |

| | | |
|---|------------------------------|-----|
| Forward primer | TGCCCATGGGTTGGCGGTCCTT | 22 |
| Reverse primer | ACATCCGAGACTTGTGCATGCGGTACT | 27 |
| <i>ERα (Estrogen reseptor alpha: GenBank NM_007956)</i> | | 112 |
| Forward primer | CCAGCTACAAACCAATGCACCATTGACA | 28 |
| Reverse primer | GGTCTTTCCGTATGCCGCCTTTCATC | 26 |
| <i>ERβ (Estrogene receptor beta: GenBank U81451)</i> | | 76 |
| Forward primer | GGCTGACAAGGAACTGGTGCACATGAT | 27 |
| Reverse primer | GTCCAACAGGCTGAGCTCCACAAAGC | 26 |

Table 14 MSP primer pair for Methyl specific PCR.

| <i>Gene</i> | | sequence (5'→3') | No. of CpG | Length (bp) |
|--|----------------|-------------------------------|------------|-------------|
| <i>Gapdh</i> (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GenBank NM_008084</i>) | | | | |
| MSP1 | Forward primer | GTGTGAACGGATTTGGTC | 2 | 18 |
| | Reverse primer | CCATTCTCGACCTTAACTATAACC | 1 | 23 |
| MSP2 | Forward primer | CGTATTTTTTTGTGTAGTGTAGTTTC | 2 | 27 |
| | Reverse primer | ACAAACTTCCCATTCTCGA | 1 | 19 |
| MSP3 | Forward primer | GATTTGGTCGTATTGGGC | 2 | 18 |
| | Reverse primer | ATAAACTTCCCGTTAATAACAACTTC | 1 | 27 |
| <i>Xist</i> (<i>X inactivation-specific transcript: GenBank L04961</i>) | | | | |
| MSP1 | Forward primer | TAGAAGTTTATAAAAATGGCGGTTC | 2 | 24 |
| | Reverse primer | TTACGTTATACCGCACCAAAA | 2 | 20 |
| MSP2 | Forward primer | GCGGGTTTTAGTTATTTGGC | 2 | 20 |
| | Reverse primer | TACCCATTTCTAACGAATTACGTC | 2 | 24 |
| MSP3 | Forward primer | TTTCGAAGTGTTTGTTTAGGTC | 2 | 22 |
| | Reverse primer | CCGCCACGTATAAAACACTAT | 2 | 21 |
| <i>Tsix</i> (<i>X inactivation-specific transcript-antisense: GenBank NR_002844</i>) | | | | |
| MSP1 | Forward primer | ACGTGAAGTATTAAGCGAAATTTAC | 3 | 25 |
| | Reverse primer | CACTTAACGTAACCTCGTCAAAAAT | 2 | 24 |
| MSP2 | Forward primer | AATGTTATTATAAATTAAGGCGAATTTTC | 2 | 28 |
| | Reverse primer | CTATTCTCGAACCAATTACGC | 2 | 21 |
| MSP3 | Forward primer | AATTGGTTCGAGAATAGTCGTATTAC | 3 | 26 |
| | Reverse primer | ACCCAACGAAACGCTTAAT | 2 | 19 |
| <i>Nlgn3</i> (<i>Neurologins 3: GenBank NM_172932</i>) | | | | |
| MSP1 | Forward primer | GTCGGGGTGTTAGGTTTT | 1 | 18 |
| | Reverse primer | CACCGATACCAAAACCAA | 1 | 18 |
| MSP2 | Forward primer | GGATATCGTCGTTATTTATATTTAGG | 2 | 26 |
| | Reverse primer | ATAATAACGATAACGTTACCGTAACT | 3 | 26 |
| MSP3 | Forward primer | CGGGTATTCGGAACGTTATATATT | 3 | 24 |
| | Reverse primer | CCTCGCCCTATTTCTTAACG | 2 | 20 |
| <i>Gdi1</i> (<i>Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1: GenBank NM_010273</i>) | | | | |
| MSP1 | Forward primer | GTTTCGTATTTTTTTGGGTTTACGA | 2 | 25 |
| | Reverse primer | ACCGCTACTTCTATCACTACCG | 2 | 22 |
| MSP2 | Forward primer | TATGCGTGATGTTTATCGGAAG | 2 | 22 |
| | Reverse primer | CCGAACCAAAAACCTCGCTATAC | 2 | 22 |
| MSP3 | Forward primer | ACGACGTTTTTCGAAAATTT | 3 | 19 |
| | Reverse primer | AACTCGCTATACAACCTAATACGATT | 2 | 26 |

Table 15 Effect of BPA exposure on body and cerebrum weights.

| PND2 | Controls | 0.02 mg/kg | 50 mg/kg |
|-----------------|---------------|---------------|-----------------|
| BW (g) | 2.17 ± 0.31 | 2.28 ± 0.32 | 2.76 ± 0.31*** |
| Cerebrum (g) | 0.088 ± 0.009 | 0.084 ± 0.008 | 0.098 ± 0.004* |
| Cerebrum/BW (%) | 4.00 ± 0.36 | 3.86 ± 0.52 | 3.66 ± 0.47 |
| PND4 | | | |
| BW (g) | 3.20 ± 0.46 | 3.25 ± 0.19 | 4.07 ± 0.25*** |
| Cerebrum (g) | 0.126 ± 0.015 | 0.127 ± 0.010 | 0.142 ± 0.005* |
| Cerebrum/BW (%) | 3.99 ± 0.67 | 3.90 ± 0.44 | 3.46 ± 0.18* |
| 3 weeks | | | |
| BW (g) | 18.70 ± 1.90 | 20.90 ± 2.30* | 23.58 ± 0.50*** |
| Cerebrum (g) | 0.314 ± 0.016 | 0.321 ± 0.014 | 0.330 ± 0.020 |
| Cerebrum/BW (%) | 1.65 ± 0.11 | 1.49 ± 0.09** | 1.4 ± 0.09*** |
| 7 weeks | | | |
| BW (g) | 31.10 ± 2.30 | 32.20 ± 1.90 | 34.00 ± 2.70* |
| Cerebrum (g) | 0.324 ± 0.018 | 0.331 ± 0.011 | 0.336 ± 0.018 |
| Cerebrum/BW (%) | 1.05 ± 0.09 | 1.02 ± 0.06 | 0.99 ± 0.05 |

Data are mean ± S.D. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control by Dunnett's test. BW: body weight. Each group contained 8-10 mice.

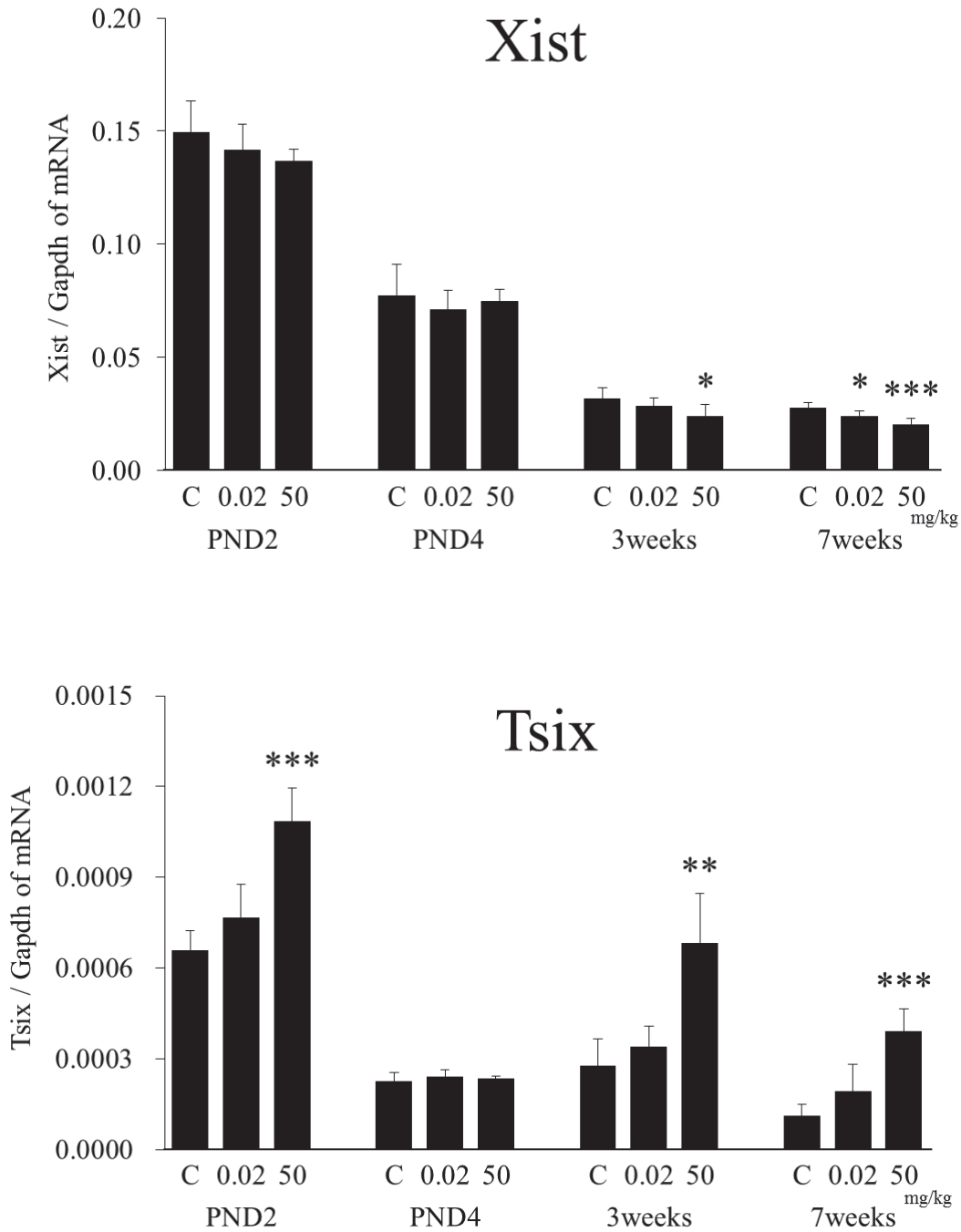


Fig. 6 mRNA expression of X-chromosome inactivation-related factors: Xist and Tsix. Data are mean \pm S.D. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control by Dunnett's test. Each group contained 5-7 mice.

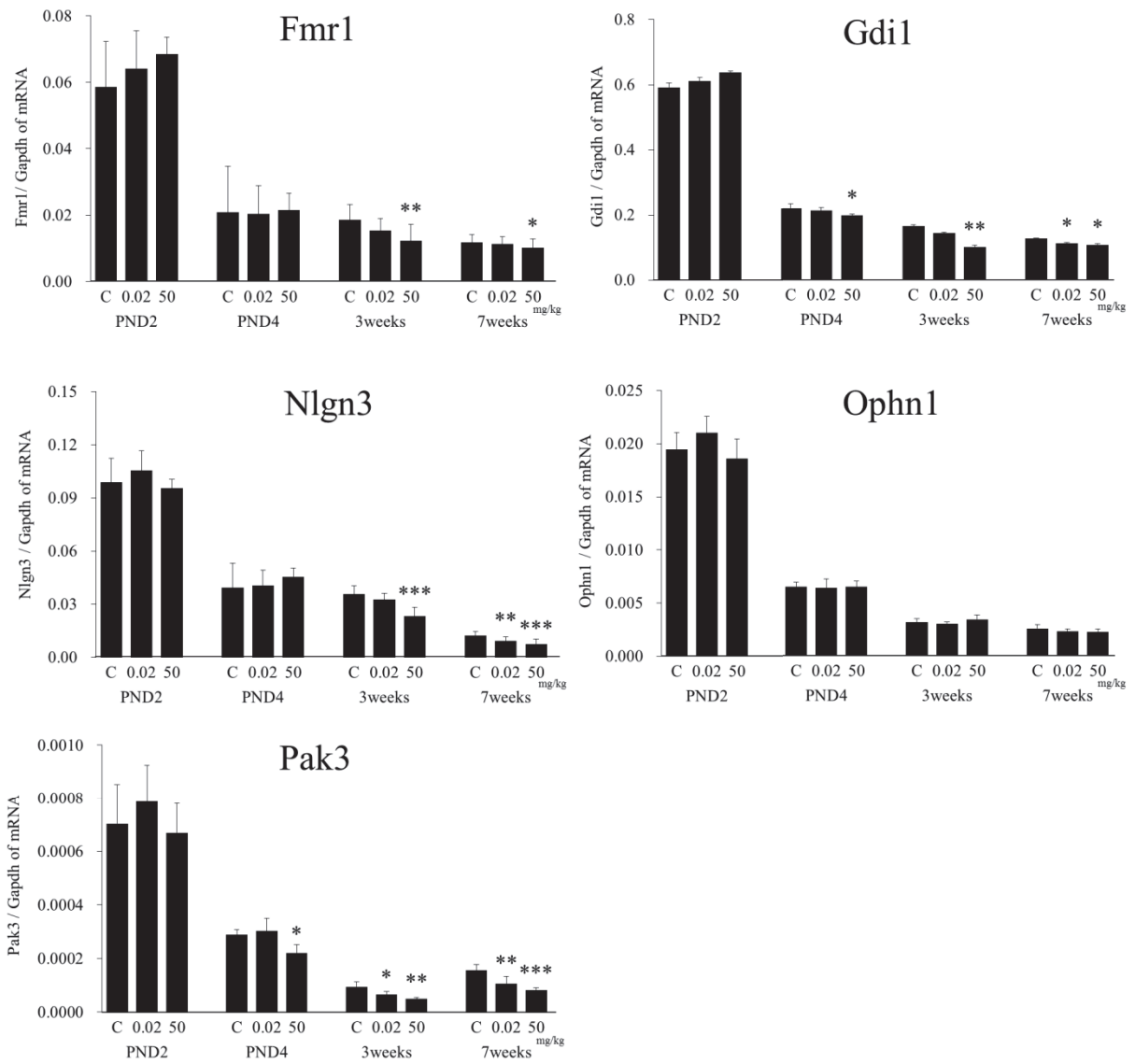


Fig. 7 mRNA expression of X-linked neurodevelopment-related genes: Fmr1, Gdi1, Nlgn3, Ophn1 and Pak3. Data are mean \pm S.D. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control by Dunnett's test. Each group contained 5-7 mice.

| | replicate | PND2 | | | | | | PND4 | | | | | | 3weeks | | | | | | 7weeks | | | | | | |
|-----------------|-----------------|------|---|-------|---|-------|---|------|---|-------|---|-------|---|--------|---|-------|---|-------|---|--------|---|-------|---|--------------|---|---|
| | | Cont | | 0.02 | | 50 | | Cont | | 0.02 | | 50 | | Cont | | 0.02 | | 50 | | Cont | | 0.02 | | 50 | | |
| Gapdh | MSP1 | ● | ○ | ● | ○ | ● | ○ | ● | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ● | ○ | ● | ● | ● | ○ | ● | ○ | ● | ○ | ● | ○ | |
| | MSP2 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ● | ○ | ○ | ● | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ● | ○ | ● | ○ | ○ | ○ | |
| | MSP3 | ○ | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ● | ● | ○ | ○ | ● | ○ | ● | ● | ● | ● | ○ | ● | ○ | ● | ○ | ● | ● | ● | |
| | Methyl/Unmethyl | 2/4 | | 2/4 | | 2/4 | | 3/3 | | 1/5 | | 1/5 | | 3/3 | | 4/2 | | 2/4 | | 3/3 | | 3/3 | | 3/3 | | |
| | % Methyl | 33 | | 33 | | 33 | | 50 | | 17 | | 17 | | 50 | | 67 | | 33 | | 50 | | 50 | | 50 | | |
| | % Control | 100 | | 100 | | 100 | | 100 | | 34 | | 34 | | 100 | | 133 | | 67 | | 100 | | 100 | | 100 | | |
| | <i>p</i> -value | - | | 0.455 | | 0.455 | | - | | 0.242 | | 0.242 | | - | | 0.379 | | 0.379 | | - | | 0.433 | | 0.433 | | |
| | | MSP1 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Xist | MSP1 | ● | ○ | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| | MSP2 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| | MSP3 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| | Methyl/Unmethyl | 3/3 | | 5/1 | | 2/4 | | 4/2 | | 2/4 | | 4/2 | | 2/4 | | 4/2 | | 3/3 | | 5/1 | | 4/2 | | 4/2 | | |
| | % Methyl | 50 | | 83 | | 33 | | 67 | | 33 | | 67 | | 33 | | 67 | | 50 | | 83 | | 67 | | 67 | | |
| | % Control | 100 | | 167 | | 66 | | 100 | | 50 | | 100 | | 100 | | 200 | | 150 | | 100 | | 125 | | 80 | | |
| | <i>p</i> -value | - | | 0.242 | | 0.379 | | - | | 0.244 | | 0.455 | | - | | 0.244 | | 0.379 | | - | | 0.409 | | 0.409 | | |
| | | MSP1 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Tsix | MSP1 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| | MSP2 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| | MSP3 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| | Methyl/Unmethyl | 1/5 | | 2/4 | | 1/5 | | 2/4 | | 1/5 | | 3/3 | | 1/5 | | 4/2 | | 3/3 | | 2/4 | | 2/4 | | 2/4 | | |
| | % Methyl | 17 | | 33 | | 17 | | 33 | | 17 | | 33 | | 17 | | 67 | | 50 | | 33 | | 33 | | 33 | | |
| | % Control | 100 | | 200 | | 50 | | 100 | | 50 | | 100 | | 100 | | 400 | | 300 | | 100 | | 100 | | 100 | | |
| | <i>p</i> -value | - | | 0.409 | | 0.545 | | - | | 0.409 | | 0.379 | | - | | 0.114 | | 0.242 | | - | | 0.455 | | 0.455 | | |
| | | MSP1 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Nlgn3 | MSP1 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| | MSP2 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| | MSP3 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| | Methyl/Unmethyl | 1/5 | | 1/5 | | 2/4 | | 1/5 | | 1/5 | | 2/4 | | 0/6 | | 2/4 | | 2/4 | | 4/2 | | 3/3 | | 0/6 | | |
| | % Methyl | 17 | | 17 | | 33 | | 17 | | 17 | | 33 | | 0 | | 33 | | 33 | | 50 | | 50 | | 0 | | |
| | <i>p</i> -value | - | | 0.545 | | 0.409 | | - | | 0.545 | | 0.409 | | - | | 0.227 | | 0.227 | | - | | 0.379 | | 0.030 | | |
| | | MSP1 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | Gdi1 | MSP1 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| MSP2 | | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| MSP3 | | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| Methyl/Unmethyl | | 1/5 | | 0/6 | | 1/5 | | 0/6 | | 2/4 | | 1/5 | | 0/6 | | 0/6 | | 0/6 | | 1/5 | | 0/6 | | 0/6 | | |
| % Methyl | | 17 | | 0 | | 17 | | 0 | | 33 | | 17 | | 0 | | 0 | | 0 | | 17 | | 0 | | 0 | | |
| <i>p</i> -value | | - | | 0.500 | | 0.545 | | - | | 0.227 | | 0.500 | | - | | 1.000 | | 1.000 | | - | | 0.500 | | 0.500 | | |

● Methylated, ○ Unmethylated. Statistics; Fisher's exact test.

Fig. 8 DNA-methylation of Gapdh, Xist, Tsix, Nlgn3 and Gdi1. Closed circle mean methylated DNA, and Open circle mean unmethylated DNA. *: $p < 0.05$ vs. control by Fisher's exact test.

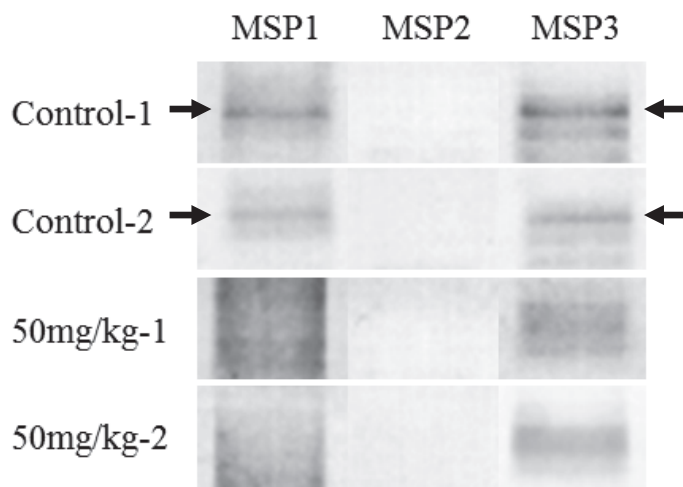


Fig. 9 Gel electrophoresis of DNA-methylation on Nlgn3 in 7weeks mice (Control vs 50 mg/kg exposure groups). Clear band (arrow) was decided as methylated DNA.

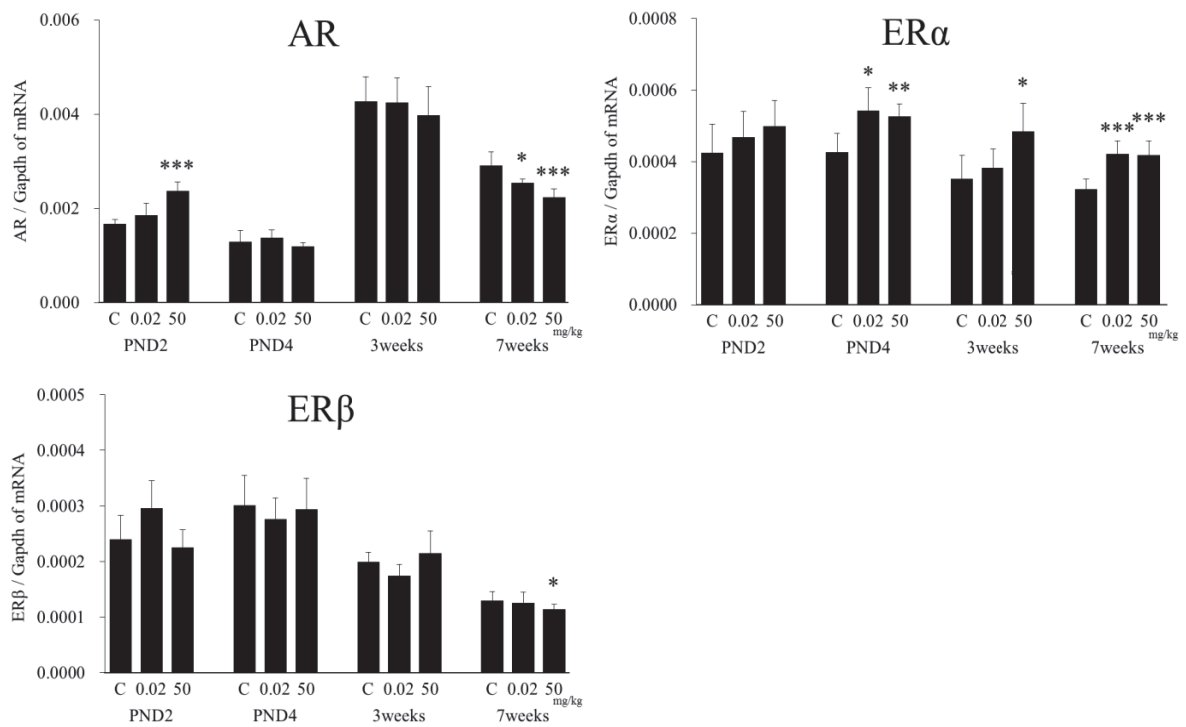


Fig. 10 mRNA expression of brain development of sex differences factors: AR, ER α and ER β . Data are mean \pm S.D. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control by Dunnett's test.

Each group contained 5-7 mice.

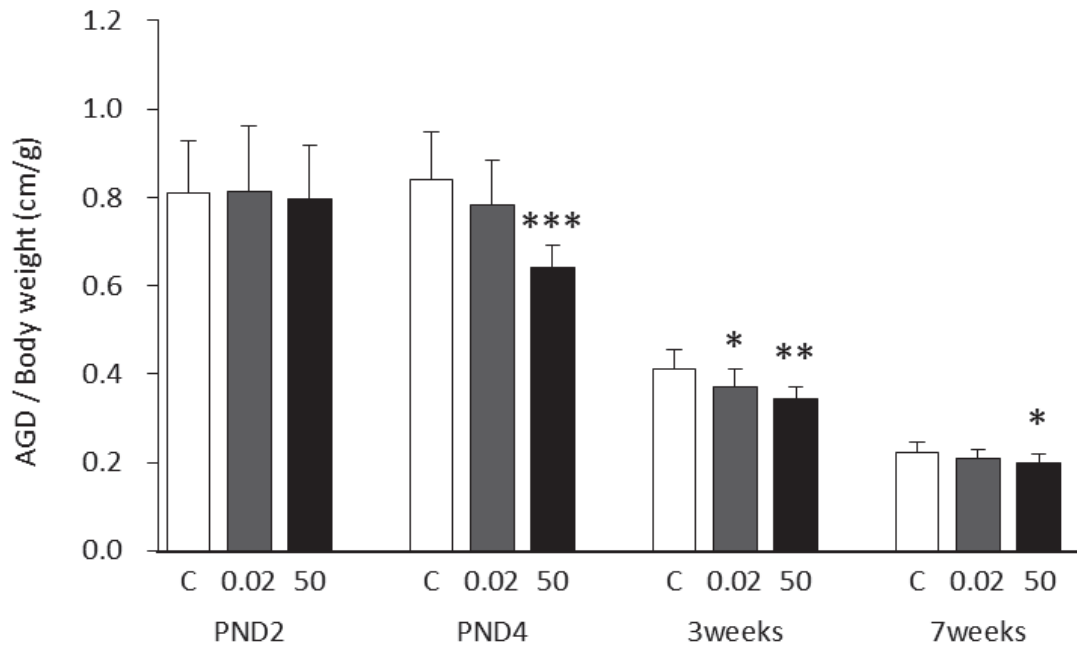


Fig. 11 Effect of BPA on the anogenital distance (AGD) per body weight. Data are mean \pm S.D. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control by Dunnett's test. Each group contained 8-10 mice.

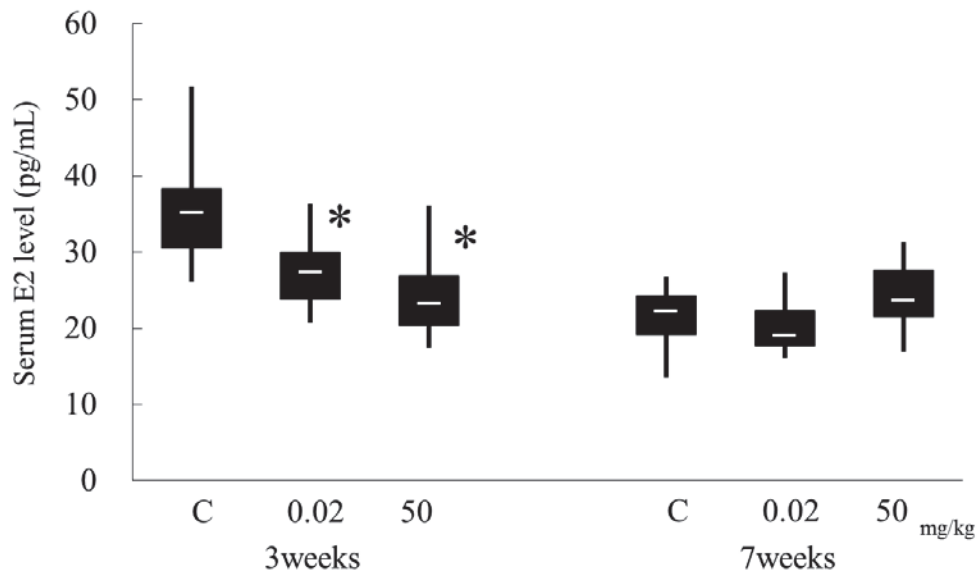


Fig. 12 Effect of BPA on serum estradiol (E2) levels. The data are presented as box plots (Central bar: 50th percentile; lower and upper bounds of the rectangle: 25th and 75th percentile; lower and upper tails: minimum and maximum). *: $p < 0.05$ vs. control by Dunnett's test. Each group contained eight to ten mice.

第四節 考察

BPA が体重変化に及ぼす影響について、必ずしも一定の見解は得られていないが、主に小児を対象とした疫学調査において、BPA の周産期曝露（臍帯血中濃度や妊婦および児童の尿中濃度）は小児期や青年期の肥満と正の相関をすることが多くの研究で報告されている (Trasande et al. 2012)。実験的にも周産期 BPA 曝露は出生仔の食物摂食やエネルギー消費を司る弓状核 (Mackay et al. 2013) や PPAR γ 活性化を介した脂質生成 (Chamorro-Garcia et al. 2012)、脂肪合成やトリグリセリド蓄積関連遺伝子 (Marmugi et al. 2012) 等への影響が報告され、脂質生成・代謝異常や摂食異常による肥満傾向がみられている。本研究においては両曝露群とも体重増加が認められており、これはこれまで報告されている BPA 曝露による肥満傾向とよく一致している。なお、体重増加は雄出生仔においても認められた (Data not shown)。脳重量については一定の見解は得られていないが、本研究においては体重増加と関連する形で増加しており、脳重量変化は体重変化に付随して起こったものと考えられた (Table 15)。

次に、Xist および Tsix の成長に伴う遺伝子発現変動を検討したところ、Xist の発現上昇と Tsix の発現減少が認められた (Fig. 6)。これらの変化は3週齢、7週齢に集中的に認められ、X染色体不活性化の維持機構への影響が示唆された。また、両因子の発現量が逆相関関係を示したことから、不活性化維持に主な作用を持つ Xist 減少に対するフィードバックとしての Tsix 上昇が推察される。なお、Tsix の2日齢での発現上昇から、進展段階への影響も懸念される。DE胎仔期曝露においては Xist、Tsix とも発現上昇を示しバランスをとりあう形となっていたが、BPA胎仔期曝露の結果は X染色体不活性化のバランスを失う方向であることから、X連鎖性遺伝子発現への影響が懸念された。

そこで、X連鎖性遺伝子について、より疾患との関連性が強く、また、生理機能が明らかである遺伝子として、Fmr1 (Fragile X mental retardation 1)、Nlgn3 (Neurologin 3)、Gdi1 (Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1)、Ophn1 (Oligophrenin1)、Pak3 (p21-activated kinase 3) を選択し、その発現変動を解析した (Fig. 7)。

Fmr1 は脆弱 X 症候群の原因遺伝子として単離された X 連鎖性遺伝子であり、神経細胞での mRNA 輸送に関与する。脆弱 X 症候群は知的障害を示す代表的な遺伝性疾患であり、発症頻度は諸説あるが、一般に男性では 1,500 人に 1 人、女性では 2,500 人に 1 人と比較的高頻度にみられ、その多くは Fmr1 の変異とみられている。Fmr1 欠損マウスでは樹状突起スパインに存在する足場タンパク質である PSD-95 (postsynaptic density-95) や神経活動依存的に誘導される Arc (Activity-regulated cytoskeletal-associated protein)、シナプス可塑性に関与する AMPA 受容体に変異を起こし、樹状突起スパインの形態やシナプス可塑性に障害が見られることが報告されている (Santoro et al. 2012)。本研究において有意な発現減少を認めたことから、神経細胞での mRNA 輸送をはじめとする脳神経系機能に加え、脆弱 X 症候群に関連する可能性が示唆された。

Nlgn3 はシナプス同士の連結に関与し、遺伝性自閉症の原因となる遺伝子である。神経シナプス接着は後シナプスに局在するニューロリギンと前シナプスに局在するニューレキシンの結合によって成立するが、Nlgn はニューロリギンおよびニューレキシンを産生する遺伝子であり、(Sudhof 2008)。サブタイプとして 4 つ確認されており (Nlgn1 - 4)、これらのうち Nlgn3 と 4 は単一の自閉症原因遺伝子として発見され、分子機能とともに精神神経疾患との関連性が数多く報告されている。この変異モデルマウスは社会行動や空間学習記憶能の変化、大脳皮質の抑制性シナプス機能の亢進、大脳皮質や海馬のシナプス機能の変化することが報告されている (Etherton et al. 2011)。マウスにおいては Nlgn3 の発現が確認されている (Mouse Genome Database ID: 2444609) ことから発現変動を検討した結果、顕著な発現減少 (50 mg/kg 曝露群においては $p < 0.001$) が認められた。このことから、BPA 胎仔期曝露は神経細胞同士の繋

ぎあわせの異常を介し、機能的なシナプス形成や正常な神経伝達物質放出、シナプスの安定化、神経回路網形成に影響を及ぼす可能性が示唆された。

Gdi1 は神経伝達物質の小胞体からの正常な放出を維持し、X 連鎖精神遅滞等に関与する遺伝子である。小胞体からの神経伝達物質の放出には Rab3A (Rab ファミリー低分子量 G タンパク質-3A) と GTP (グアニンヌクレオチド三リン酸) の複合体が重要である。この複合体は神経伝達物質で満たされたシナプス小胞に結合、神経末端のシナプス膜に輸送し、GTP が GDP となることで神経伝達物質の放出を促すが、この小胞体輸送において Rab3A と GTP の複合体の量が適切に保たれる必要があり、Gdi1 はこの量的バランスを保つ役割を果たしている。また、小胞は数限りあるため枯渇を防ぐため回収され再利用される (小胞体リサイクリング機構) が、この機構においても Gdi1 は GDP から GTP への変換に重要な機能を有していることが知られている (Stenmark 2009)。この異常は知的障害を呈し、X 連鎖性精神遅滞症候群の要因となるほか、アルツハイマー型痴呆症や II 型糖尿病、その他アテローム硬化症や嚢胞性線維症、網膜色素変性、先天性脈絡膜欠如など非常に多くの疾病の病因となっている可能性が示唆されている (Giannandrea et al. 2010)。本研究においては有意な発現減少が認められており、小胞体からの神経伝達物質の放出や小胞体リサイクリング機構への影響を介し、脳発達に影響を及ぼす可能性が示唆された。

Ophn1 は精神遅滞の原因遺伝子のひとつとして同定された X 連鎖性遺伝子であり、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho-GTPase の活性化タンパクである RhoA をコードし、その機能の欠損が X 連鎖性精神遅滞患者における病態と関連づけられることが知られている。その生理的機能として、興奮性シナプスの成熟や可塑性、後シナプスの足場タンパク質の安定化を介した樹状突起スパイン形成、前シナプスにおけるシナプス小胞の回収等に重要な役割があることが報告されている (Al-Owain et al. 2011)。本研究において有意な発現変動は認められなかったことから、Xist と Tsix の変動により推察される X 染色体不活性化への影響は、すべての X 連鎖性遺伝子を均等に变化させるのではなく、不活性化パターンの変化に作用している可能性が示唆された。

Pak3 は Ophn1 と同じく精神遅滞の原因遺伝子のひとつとして同定された X 連鎖性遺伝子であり、Rho-GTPase のうち、特に Rac タンパクの活性化への関与が報告されている。Rac は脳機能、特に神経細胞の樹状突起の構造やシナプス伝達、シナプス可塑性等に深く関係することが示唆されている。Pak3 そのもの変化によっても神経細胞の伸長や樹状突起スパイン形成に加えシナプス可塑性や長期増強、神経細胞間のシナプス伝達の異常を引き起こし、X 連鎖性精神遅滞のほか認知機能障害や統合失調症に関与すると報告されている (Kreis and Barnier 2009)。本研究においては顕著な発現減少 ($p < 0.001$) を認めており、これらシナプス形成やニューロン伸長の異常等を介して脳発達に影響を及ぼす可能性が示唆された。

X 連鎖性遺伝子群の発現変動に関して、主に 3 週齢と 7 週齢で曝露濃度依存的に有意に発現減少していた。この結果は Xist の発現変動と時期、減少パターンとも概ね一致しており、不活性化維持機構への影響を介してこれら X 連鎖遺伝子群の発現減少が生じたことが示唆された。3 週齢は離乳～幼児期に相当し、7 週齢は思春期以降に相当しており、むしろ成長するほど顕著な差が得られた。これら X 連鎖性遺伝子群への影響はシナプス形成やニューロンの伸長、シナプス同士の連結、小胞体輸送やそのリモデリング、神経伝達物質の放出など、神経回路網形成やシナプス可塑性の分子機構に影響し、これまで報告されている BPA 曝露による学習障害や行動異常等の脳発達異常に関連している可能性が示唆された。

X 染色体不活性化の本体はエピジェネティクスであることが知られている。すなわち、発生の初期段階に X 染色体の中心付近に存在する Xist RNA が染色体上の LINE 配列 (Long Interspersed Elements: 長鎖散在反復配列) に沿って伝播、染色体全体に蓄積し、それに続いて DNA CpG アイランドのメチル化とヒストン修飾 (グローバルなヒストン H4 の脱アセチル化、H3Lys9 のジメチル化、H4Lys20 のモノメチル化、H3Lys27 のトリメチル化、H2A Lys110 のユビキチン化、マクロヒストン H2A の結合等) が発生し、X 連鎖性遺伝子は不活性化状態、いわゆる Barr 体となる。不活性化状態は次世代に

引き継がれ再活性化されるまで、Xist の集積とエピジェネティカルな変化により維持されることが知られている (Pollex and Heard 2012) 。一方、近年、化学物質影響のエンドポイントとしてエピジェネティクスへの影響が相次いで報告されており、これまでに無機ヒ素の ER α プロモーター領域における DNA メチル化を減少させ癌増加に関与している可能性 (Waalkes et al. 2004) やビクロゾリンの雄の生殖細胞における DNA メチル化変化が経代的に受け継がれること (Anway et al. 2005) が報告され、ベンゼン (Bollati et al. 2007) やクロム・ニッケル (Salnikow and Zhitkovich 2008) においてもエピジェネティクスへの影響が報告されている。BPA についても比較的早い段階で報告されており、DNA メチル化レベルで毛の色が変化するアグーチマウスにおける変化に端を発し、DNA の低メチル化やヒストン H3 Lys27 のトリメチル化などが報告され (Anderson et al. 2012; Dolinoy et al. 2007) 、また、脳発達への影響との関連性も示唆されつつある (Yeo et al. 2013) 。

そこで Xist、Tsix、Nlgn3 および Gdi1 の DNA メチル化レベルを検討したところ、Xist および Tsix に変化は認められなかった。また、Nlgn3 の脱メチル化が認められたが、これは Xist の発現減少と一致していた (Fig. 8, 9) 。従って、影響は Xist および Tsix RNA (どちらもタンパク質に翻訳されず機能するノンコーディング RNA) を介したものが中心であることが示唆された。

また、BPA は代表的な内分泌かく乱化学物質であり、脳における性ホルモン受容体への影響が懸念されている。そこで ER α 、ER β および AR の発現変動を測定したところ、ER α の有意な発現上昇および AR の有意な発現変動から脳の性分化へ影響を及ぼしていることが、ER β の発現減少から情動行動やストレス反応などいわゆる社会脳構築へ影響を及ぼしている可能性が示唆された (Fig. 10) 。AR は X 連鎖性遺伝子の一つであり (従って、X 染色体の活性バランスはテストステロンの働きや性差発現においても重要であり、この変異はアンドロゲン不応症に関与する)、7 週齢での発現減少は Xist および Tsix の変動と関連している可能性が考えられる。さらに性差発現のア

ウトカムとして AGD を測定したところ、4 日齢および 3 週齢、7 週齢で有意な距離短縮が認められた (Fig. 11) 。この結果は ER α の発現上昇と時期、変動パターンとも一致しており、エストロゲンを介した雌性化への影響が示唆された。一方、血清中エストラジオール濃度は 3 週齢で有意に減少するが、7 週齢ではその差は消失するという複雑な変動を示した (Fig. 12) 。3 週齢時はエストラジオールが減少しているものの ER α の増加より感受性が増大、AGD が短縮されたこと、7 週齢時は AR の有意な減少も認められており、血清中エストラジオール濃度への影響を介さずに AGD 短縮に関わっている可能性が推察される。これらの結果は BPA のいわゆるエストロジェニックな作用と一致しており、BPA 曝露の有効性が示された。

BPA はまた、1990 年代後半に指摘されたいわゆる低用量作用問題、すなわち用量と作用の関係性が逆 U 字型反応曲線を描く問題が提起された物質でもある。化学物質の生体に対する毒性は、一般に作用の発現に閾値が存在し、用量依存的に作用が増大するシグモイド曲線を描くと考えられ、NOAEL や LD50 等の毒性指標値もこの考え方に基づいて設定されている。しかし、1997 年に Vom Saal らは BPA の生殖毒性における NOAEL を大きく下回る 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ あるいは 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ という低用量であっても、胎仔期曝露されたマウスの前立腺の重量が増加したと発表した (Nagel et al. 1997) 。低用量作用は特に周産期曝露による脳の発達への影響についても数多くの報告があり、樹状突起スパイン阻害により大脳神経発達に影響すること、運動量と探索行動、脳の性分化への影響 (青斑核の性差が消失)、不安情動性への影響、神経行動や記憶学習能低下への影響、社会行動への影響、コルチコステロン誘発性の行動への影響などが報告されている (Itoh et al. 2012) 。その後、産業界を中心とした追跡により低用量作用は確認できないという否定的報告もなされており (Cagen et al. 1999) 、現在もなお議論が続いているが、いわゆる予防原則にのっとり、前述の 2008 年カナダ政府、2011 年 EU の BPA の哺乳瓶使用禁止に至った。歯科用レジンからの溶出レベルでのエストロゲン活性の可能性も報告されている (Fleisch et al. 2010) 。

本研究において、0.02 mg/kg 曝露群においても Xist や X 連鎖性遺伝子、性ホルモン関連遺伝子の発現変動や AGD の短縮、エストラジオール濃度の変動を認めた。これらは 50 mg/kg 曝露群における変動をやや軽微にしたレベルであったが、ごく低用量においても、BPA は X 染色体不活性化を介した脳発達への影響や性差発現に影響を与えている可能性を示唆しており、今後、詳細な検討が必要であると考えられた。

第五節 小括

BPA 胎仔期曝露により、Xist およびそのアンチセンスである Tsix の発現変動が認められ、X 染色体不活性化の不安定化が生じていることが推察された (Fig. 6)。さらに、Fmr1、Gdi1、Nlgn3 および Pak3 の異常は知的障害や精神疾患と関連していることが報告されていることから、本研究で認められたこれらの遺伝子発現の変動がすでに報告されている学習障害、行動異常等に関連している可能性が考えられた (Fig. 7)。この要因を探るため、DNA メチル化レベルを検討したが、変動は限定的であり、Xist および Tsix RNA を介したもの（これらはノンコーディング RNA として作用する）が中心であることが示唆された (Fig. 8, 9)。また、性ホルモン受容体 (AR、ER α 、ER β) および AGD、エストラジオール濃度にも変化が生じたことから、BPA は脳の性分化をはじめとした性差の発現に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された (Fig. 10-12)。さらに、0.02 mg/kg 曝露群で一部の遺伝子発現や AGD に影響が確認されたことは、ごく低用量においても、BPA は Xist など X 染色体上の遺伝子群の発現や性差の発現に影響を与えている可能性を示唆しており、今後、詳細な検討が必要であると考えられた。

総括

本論文は、周産期における化学物質曝露が次世代の脳神経系に及ぼす影響を研究したものであり、従来型の内分泌系への影響解析に加えて、新たなメカニズムとして X 染色体不活性化機構を指標とすることの有用性を述べたものである。

第一章では DE 曝露が脳の内分泌系に及ぼす影響を中心に検討し、周産期曝露によって特に脳内エストロゲン関連遺伝子の発現上昇と脳内ストレス関連遺伝子の発現変動を認め、周産期 DE 曝露によって DE 中の何らかの成分が新生仔の脳に到達した可能性が高いこと、その直接的あるいは間接的な影響によって新生仔マウスの脳神経系の遺伝子発現に影響を及ぼすことが示された。

第二章では DE 曝露が脳内遺伝子発現に及ぼす影響を cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、Xist 遺伝子の変動上昇がおこることを見出した。さらにリアルタイム PCR により詳細に検討した結果、胎仔期曝露では雌雄ともに曝露濃度依存的に発現上昇することを認めた。Xist 遺伝子は発生期に起きる X 染色体不活性化を通じて X 連鎖性遺伝子の発現を司るが、検討した X 連鎖性遺伝子では有意な発現変動は認められなかった。しかしながら Xist 遺伝子のアンチセンスであり、その働きを抑制する Tsix 遺伝子の発現上昇を認めたことから、胎仔期 DE 曝露は Xist と Tsix がバランスをとりあうことで X 連鎖性遺伝子の変動を回避している可能性が示唆された。なお、新生仔期曝露においては差は認められず、曝露時期としての胎仔期が DE 曝露による Xist 系への影響について感受性が高いことが示された。これらの結果から、胎仔期 DE 曝露は X 染色体の不安定性に関与している可能性があるということ、胎生期の化学物質環境が同時期に起きる X 染色体不活性化を介して次世代に影響するという全く新しい毒性メカニズムが提示されたことにより、さらなる知見の集積が必要であると考えられた。

第三章では代表的な内分泌かく乱化学物質であり、環境中に広く存在する BPA の胎仔期曝露を実施したところ、雌出生仔の脳において Xist が有意に減少した一方で Tsix は有意に上昇し、さらに X 連鎖性遺伝子として検討した Fmr1、Gdi1、Nlgn3、Pak3 遺伝子が有意に発現減少した。これら遺伝子群はシナプス（神経回路）形成やニューロンの伸長、神経伝達物質の放出などの機能を示す分子メカニズムが明らかで、かつ X 連鎖性精神遅滞や自閉症など精神神経疾患との関連性が高いものを選択しており、先行研究で示されている学習障害や行動異常など BPA の脳神経系への影響のメカニズムとして、X 染色体不活性化機構のかく乱を介した経路が存在している可能性が示唆された。しかし、これらの遺伝子の DNA メチル化レベルの変動は限定的であったことから、影響は Xist および Tsix RNA を介したものが中心であると考えられた。また、脳の内分泌系への影響としてエストロゲンおよびアンドロゲン受容体の発現変動が認められた。血清中エストラジオール濃度の低下および肛門生殖器間距離の短縮も認められており、性ホルモンを介し性差発現に影響を及ぼしていることが示唆された。以上認められた変動の多くは 0.02 mg/kg という極めて低濃度の曝露においても部分的に変動しており、注意が必要であると考えられた。

Xist は X 染色体不活性化、すなわち発生初期段階で女性の二つある X 染色体の片方を不活性化させ、男性の発現量と同じくするメカニズムのマスタージーンとして機能するノンコーディング RNA である。また、Xist は常染色体への挿入でもその領域に存在する遺伝子発現を抑えるほど強力な作用を有し、ほぼ単独で X 染色体不活性化の選択（父由来と母由来のどちらの X を不活性化させるか）から、開始、進展、維持のすべての段階を主導し X 連鎖性遺伝子群の発現を抑制する能力があることから、Xist の変化はこの機構を攪乱し、その後の X 染色体活性の変調（選択異常によるねじれ現象、不活性化不全、パターン異常）を引き起こすと考えられる。すなわち、わずか一つの（あるいはアンチセンスである Tsix を加えて二つの）遺伝子の変化による影響が染色体全体へ波及するという点で非常に重要であると考えられる。また、ヒト女性に

においては、X 染色体上の遺伝子の約 75 %は常に不活性化されるが、約 15 %は不活性化を逃れ、残りの 10 %は一部の X 染色体だけで不活性化されることから、X 染色体上の遺伝子の活性パターンは個人により異なっており、X 染色体不活性化は広範な可変性があるものと考えられている (Carrel and Willard 2005)。なお、Xist は最近、マウス体細胞クローンの胚盤胞で異常発現し X 連鎖遺伝子群の発現を抑制していることが見出され、この正常化により X 染色体だけでなく常染色体の遺伝子発現も改善し産仔出生効率が約 10 倍上昇することが報告され (Inoue et al. 2010)、Xist の単一要因性が注目されている。

近年、BPAをはじめ DES (Diethylstilbestrol)、ビクロゾリン、メトキシクロル、ダイオキシン等の化学物質がエピジェネティクスに影響を及ぼす報告が相次いでいるが (Guerrero-Bosagna and Skinner 2012; Ji and Khurana Hershey 2012)、X 染色体不活性化はエピジェネティクスによる生命現象制御の代表的なものである。すなわち、X 染色体不活性化は Xist により誘発される DNA メチル化とヒストン修飾 (H3K4 脱メチル化、H3K9 メチル化、H3K27 脱メチル化、ヒストン脱アセチル化等) を本体としており、化学物質の作用点となりうると考えられる。

すなわち、X 染色体不活性化は胎生期に生じること、Xist および Tsix というわずかな遺伝子の変化による影響が染色体全体に波及すること、そもそも不活性化には不完全要素が多い (不活性化を免れる部分が多く、そのパターンは同一種内でも個体によって大きく異なる) こと、そしてエピジェネティクスをその作用メカニズムとしていることから、胎生期の化学物質曝露に対する脆弱性が高いのではないかと考えた。さらに、X 連鎖性遺伝子には脳組織に多く発現し、脳発達や精神神経疾患との関わりについての研究が疫学的・分子的の双方の観点から多く報告されていることから、化学物質胎児期曝露が次世代の脳神経系に及ぼす影響として、全く新しい毒性学上のメカニズムとして重要となりうると考え研究を行った。

本研究においては、DE 胎仔期曝露は Xist と Tsix の変化が同方向 (共に発現上昇) であることから X 染色体不活性化への影響を打ち消し合ったと推察されたが、一方で、

BPA 胎仔期曝露においては変化が逆方向（Xist が発現減少、Tsix が発現上昇）であることから、おそらく X 染色体不活性化の変調を介し、X 連鎖性遺伝子群に同時かつ複数、広範囲に影響を及ぼしたものと考えられた。

近年、精神神経疾患と脳内遺伝子発現について多くの研究がなされている。例えば精神遅滞は西欧諸国において有病率が 2–3 % と非常に多く、その 25–30 % は遺伝的な背景があり、そのうち 25-35% は X 染色体に原因のある X 連鎖性精神遅滞と考えられているが、その原因遺伝子として 215 もの遺伝子が疑わしいとリストアップされ、2013 年現在では 80 以上の遺伝子が確定的となっている (des Portes 2013)。同様に自閉症は非常に増え続け一種の社会的損失といえるに至っているが、その約半数は遺伝的なものと考えられ、その原因遺伝子は 2013 年現在で 526 遺伝子が挙げられている (Simons Foundation Autism Research Initiative; <https://sfari.org/>)。しかしながら両者とも単一の遺伝子の変異による発症については限定的であり、その要因として病態の多様性、そして遺伝子の複合的な作用が関連していると考えられている。X 連鎖性遺伝子上にはこれらの原因遺伝子が数多く存在する特徴を有するが、本研究により見いだされた BPA 胎仔期曝露による影響は、脳発達と機能的・臨床的に関連する X 連鎖性遺伝子群を同時かつ複数、広範囲に変動させることから、これら精神神経疾患に強く結びつく可能性がある。このことはまた、序論に示した DOHaD 説（胎生期環境が後の疾病の原因となる）を支持するものであり、既に示されている精神神経疾患発症と関連しうるものである。

今回、脳の発達を焦点に検討を進めたが、X 連鎖遺伝子の特筆すべき性質として、脳の発達に加え男性生殖機能や免疫機能に関わる機能を多く持ち、これらの疾病原因遺伝子が集中的に存在している点が挙げられる。これら 3 つの機能は高等動物においてその生存において重要な役割を果たしており、それらの機能低下や不全は種の存続が不可能となる。

生殖系に関しては、精原細胞に特異的に発現する遺伝子の解析において、36 遺伝子が同定されているが、そのうち X連鎖性遺伝子が 11 遺伝子も存在することが示され、一方、Y 染色体由来はわずか 3 遺伝子であること、X 連鎖性遺伝子には Taf71 (TBP-associated factor 71) や Nxf2 (nuclear RNA export factor 2)、Tex11 (testis-expressed gene 11)、Usp26 (ubiquitin-specific protease 26)、Akap4 (A-kinase anchor protein 4) など、精子形成や精巣の発達、運動の獲得に重要な遺伝子も含まれていることが報告されている (Wang et al. 2001; Zheng et al. 2010)。さらに、男性生殖機能の基幹となるアンドロゲン受容体もまた X 連鎖性遺伝子であり、X 染色体不活性化の異常はテストステロンへの影響も含め幅広い形で男性生殖機能に影響する可能性があると考えられる。精原細胞にも Xist および Tsix は存在し、また、男性は X 染色体の遺伝子に異常が生じると即座にその悪影響を受けるため注意が必要である。本研究においてはアンドロゲンにより正常な伸長が得られる AGD が BPA 胎仔期曝露により有意に短縮していることから、より詳細な検討が必要であると考えられる。

また、免疫機能との関連として、T 細胞の正常な成熟に必要な Il2rg (Interleukin-2 receptor gamma chain: 変異により重症複合免疫不全症となる) や B 細胞の正常な成熟に必要な Btk (Bruton's tyrosine kinase: 変異により B 細胞の前段階で成熟が止まり抗体が産生されなくなる伴性無ガンマグロブリン血症となる)、T 細胞と B 細胞のクロストークに必要な CD40L (CD40 ligand: 変異により伴性高 IgM 症候群となる) 等が存在、これら免疫疾患に加え、T リンパ球の異常や血小板減少を示すヴィスコット - オールドリッチ症候群、B 細胞の分化が異常となる X 連鎖リンパ球増殖症、そしてエイズや SLE の発症リスクとの関連性が指摘されている (Siddiqui et al. 2009)。また、一般に先天性免疫不全疾患は男児に多いことや女性の方が免疫疾患での生存率が男性よりも高いことが知られている。オスは免疫機能の脆弱性というリスクを抱える一方で、病原菌やウイルスに感染することで免疫機能を塗り変え変異をおこすことで外圧に適応する新しい免疫機能を獲得していくため X 染色体の免疫機能の半分を失った

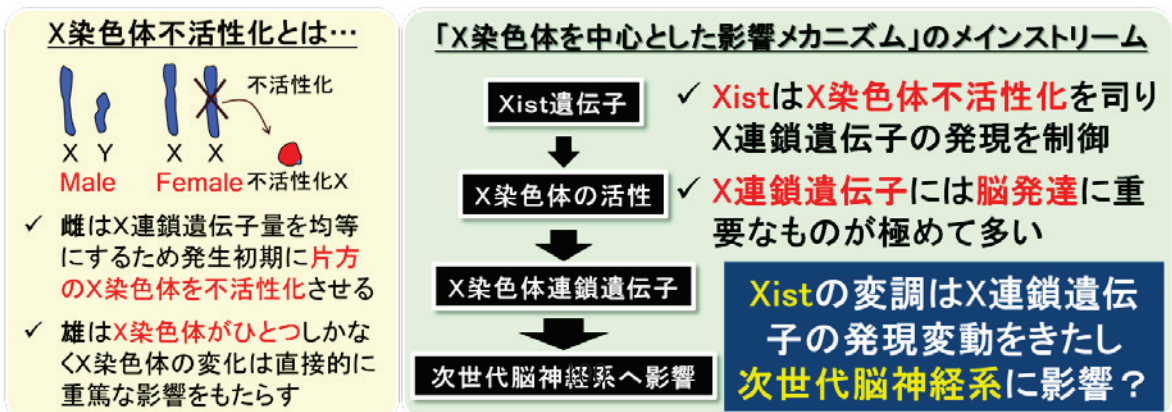
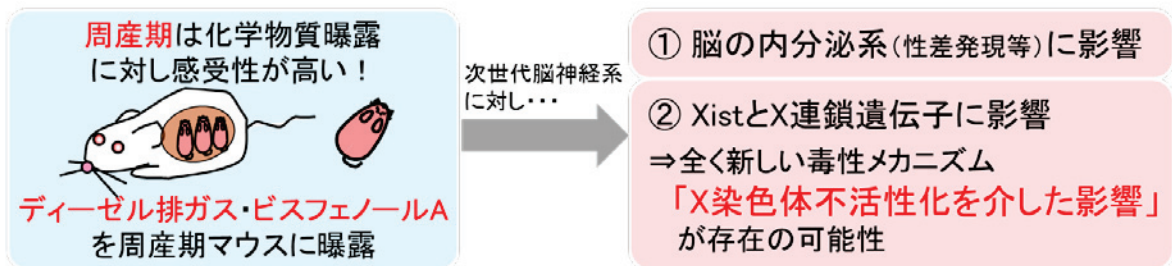
という仮説も提唱されており、さらなる検討が必要であると考えられる (Libert et al. 2010)。

これらは男性生殖機能や免疫機能への影響は、DE や BPA をはじめ、PCB やダイオキシン類、ヒ素など多くの化学物質影響の作用点として個別に報告されてきているが、X 染色体を中心とした毒性メカニズムの体系化により、なぜ一つの化学物質が脳や生殖、免疫にわたって複合的に影響を及ぼすのか統合的に説明できる可能性があり、Xist はその起点として化学物質に対するウィークポイントとなる可能性が考えられた。また、X 染色体不活性化の失調と性特異疾患との関連も示されつつあり、化学物質影響の雌雄差について性ホルモンを介するものと異なる観点から説明できる可能性も考えられた (Migeon 2006)。

以上より、DE 周産期曝露および BPA 胎仔期曝露は新生仔の脳の遺伝子発現を変化させ、脳の内分泌系として特に性差発現に影響を及ぼしうることを、さらに、化学物質胎仔期曝露の脳発達への影響として X 染色体不活性化を介した系が存在しており、Xist 遺伝子の発現変動がそのバイオマーカーとなり得る可能性が示された。

化学物質の次世代脳神経系への影響評価

～X染色体不活性化と脳発達関連遺伝子を中心とした新たな毒性メカニズムに関する研究～



【将来展望】X連鎖遺伝子は脳発達のほか免疫機能と精子形成に重要。それぞれへの影響を統合的に説明、Xistはそのバイオマーカーとして有用か

謝辞

本研究を進めるにあたり、学部、修士課程時の指導教授であり、学位論文審査の主査の労をお執りくださいました東京理科大学薬学部 武田 健 教授に深く感謝申し上げます。

また、終始一貫して御指導、御鞭撻を賜りました奥羽大学薬学部 押尾 茂 教授に深く御礼申し上げます。

学位論文審査の労をお執りくださいました副査の先生方には、多くの貴重なご助言を賜りました。記して感謝申し上げます。

DE 研究については、元 東京理科大学薬学部 机 直美 博士、渡邊 学 修士、ならびに独立行政法人 国立環境研究所（現 京都大学大学院工学研究科）高野 裕久 教授から多大なるご指導とご支援を頂きました。謹んで感謝の意を表します。

また、主な研究の場となりました奥羽大学薬学部の上野 明道 教授、佐藤 安訓 助教をはじめとする教職員の方々、衛生化学研究室の皆様と卒業生たちに深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するに当たり、独立行政法人 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業（大気中に存在する新しいタイプの内分泌攪乱物質（研究代表者・武田健）、文部科学省 学術フロンティア推進事業（ナノ粒子の健康科学（研究代表者・武田健））、独立行政法人 日本学術振興会 科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究 研究課題番号 23651054：X 染色体を中心とした新たな化学物質毒性メカニズムの体系化と影響評価システムの構築（研究代表者・熊本隆之））の支援に感謝いたします。

参考文献

- Al-Owain M, Kaya N, Al-Zaidan H, Al-Hashmi N, Al-Bakheet A, Al-Muhaizea M, Chedrawi A, Basran RK, Milunsky A. 2011. Novel intragenic deletion in OPHN1 in a family causing XLMR with cerebellar hypoplasia and distinctive facial appearance. *Clin Genet* 79(4):363-370.
- Anderson OS, Nahar MS, Faulk C, Jones TR, Liao C, Kannan K, Weinhouse C, Rozek LS, Dolinoy DC. 2012. Epigenetic responses following maternal dietary exposure to physiologically relevant levels of bisphenol A. *Environ Mol Mutagen* 53(5):334-342.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308(5727):1466-1469.
- Azcoitia I, Yague JG, Garcia-Segura LM. 2011. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience* 191:139-147.
- Barker DJ. 2007. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261(5):412-417.
- Barker DJ, Osmond C. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1(8489):1077-1081.
- Barone E, Di Domenico F, Sultana R, Coccia R, Mancuso C, Perluigi M, Butterfield DA. 2012. Heme oxygenase-1 posttranslational modifications in the brain of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* 52(11-12):2292-2301.
- Beischlag TV, Perdew GH. 2005. ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J Biol Chem* 280(22):21607-21611.
- Bollati V, Baccarelli A, Hou L, Bonzini M, Fustinoni S, Cavallo D, Byun HM, Jiang J, Marinelli B, Pesatori AC, Bertazzi PA, Yang AS. 2007. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res* 67(3):876-880.
- Bos I, De Boever P, Emmerechts J, Buekers J, Vanoirbeek J, Meeusen R, Van Poppel M, Nemery B, Nawrot T, Panis LI. 2012. Changed gene expression in brains of mice exposed to traffic in a highway tunnel. *Inhal Toxicol* 24(10):676-686.
- Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, Yolton K, Ye X, Dietrich KN, Lanphear BP. 2011. Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. *Pediatrics* 128(5):873-882.
- Cagen SZ, Waechter JM, Jr., Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Joiner RL, Shiotsuka RN, Veenstra GE, Harris LR. 1999. Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci* 50(1):36-44.
- Carpenter DO. 2006. Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health. *Rev Environ Health* 21(1):1-23.

- Carrel L, Willard HF. 2005. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434(7031):400-404.
- Castro J, Mellios N, Sur M. 2013. Mechanisms and therapeutic challenges in autism spectrum disorders: insights from Rett syndrome. *Curr Opin Neurol* 26(2):154-159.
- Chamorro-Garcia R, Kirchner S, Li X, Janesick A, Casey SC, Chow C, Blumberg B. 2012. Bisphenol A diglycidyl ether induces adipogenic differentiation of multipotent stromal stem cells through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent mechanism. *Environ Health Perspect* 120(7):984-989.
- Cornil CA, Seredynski AL, de Bournonville C, Dickens MJ, Charlier TD, Ball GF, Balthazart J. 2013. Rapid control of reproductive behaviour by locally synthesised oestrogens: focus on aromatase. *J Neuroendocrinol*.
- Costa SK, Kumagai Y, Brain SD, Teixeira SA, Varriano AA, Barreto MA, de Lima WT, Antunes E, Muscara MN, Costa SK. 2010. Involvement of sensory nerves and TRPV1 receptors in the rat airway inflammatory response to two environment pollutants: diesel exhaust particles (DEP) and 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ). *Arch Toxicol* 84(2):109-117.
- des Portes V. 2013. X-linked mental deficiency. *Handb Clin Neurol* 111:297-306.
- Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. 2007. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(32):13056-13061.
- Etherton M, Foldy C, Sharma M, Tabuchi K, Liu X, Shamloo M, Malenka RC, Sudhof TC. 2011. Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(33):13764-13769.
- Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ. 2010. Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics* 126(4):760-768.
- Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calza L, Dessi-Fulgheri F, Fernandez M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK, Panzica GC. 2012. Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J Neuroendocrinol* 24(1):144-159.
- Gecz J, Shoubridge C, Corbett M. 2009. The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X. *Trends Genet* 25(7):308-316.
- Gentilcore D, Porreca I, Rizzo F, Ganbaatar E, Carchia E, Mallardo M, De Felice M, Ambrosino C. 2013. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology* 304:21-31.
- Giacomini SM, Hou L, Bertazzi PA, Baccarelli A. 2006. Dioxin effects on neonatal and infant thyroid function: routes of perinatal exposure, mechanisms of action and evidence from epidemiology studies. *Int Arch Occup Environ Health* 79(5):396-404.
- Giannandrea M, Bianchi V, Mignogna ML, Sirri A, Carrabino S, D'Elia E, Vecellio M, Russo S, Cogliati F, Larizza L, Ropers HH, Tzschach A, Kalscheuer V, Oehl-Jaschkowitz B, Skinner C, Schwartz CE, Gecz J, Van Esch H, Raynaud M, Chelly J, de Brouwer AP, Toniolo D, D'Adamo P. 2010. Mutations in the small GTPase gene RAB39B are responsible for X-linked

- mental retardation associated with autism, epilepsy, and macrocephaly. *Am J Hum Genet* 86(2):185-195.
- Gilbert ME, Lasley SM. 2013. Developmental thyroid hormone insufficiency and brain development: a role for brain-derived neurotrophic factor (BDNF)? *Neuroscience* 239:253-270.
- Gontan C, Jonkers I, Gribnau J. 2011. Long Noncoding RNAs and X Chromosome Inactivation. *Prog Mol Subcell Biol* 51:43-64.
- Gottipolu RR, Wallenborn JG, Karoly ED, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Krantz T, Linak WP, Nyska A, Johnson JA, Thomas R, Richards JE, Jaskot RH, Kodavanti UP. 2009. One-month diesel exhaust inhalation produces hypertensive gene expression pattern in healthy rats. *Environ Health Perspect* 117(1):38-46.
- Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. 2012. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Mol Cell Endocrinol* 354(1-2):3-8.
- Gunji W, Kai T, Sameshima E, Iizuka N, Katagi H, Utsugi T, Fujimori F, Murakami Y. 2004. Global analysis of the expression patterns of transcriptional regulatory factors in formation of embryoid bodies using sensitive oligonucleotide microarray systems. *Biochem Biophys Res Commun* 325(1):265-275.
- Handa RJ, Ogawa S, Wang JM, Herbison AE. 2012. Roles for oestrogen receptor beta in adult brain function. *J Neuroendocrinol* 24(1):160-173.
- Hassing C, Twickler M, Brunekreef B, Cassee F, Doevendans P, Kastelein J, Cramer MJ. 2009. Particulate air pollution, coronary heart disease and individual risk assessment: a general overview. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 16(1):10-15.
- Hong Y, Piao F, Zhao Y, Li S, Wang Y, Liu P. 2009. Subchronic exposure to arsenic decreased *Sdha* expression in the brain of mice. *Neurotoxicology* 30(4):538-543.
- Howdeshell KL, Peterman PH, Judy BM, Taylor JA, Orazio CE, Ruhlen RL, Vom Saal FS, Welshons WV. 2003. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health Perspect* 111(9):1180-1187.
- Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang X, Ishino F, Abe K, Ogura A. 2010. Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* 330(6003):496-499.
- Itoh K, Yaoi T, Fushiki S. 2012. Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development. *Neuropathology* 32(4):447-457.
- Ji H, Khurana Hershey GK. 2012. Genetic and epigenetic influence on the response to environmental particulate matter. *J Allergy Clin Immunol* 129(1):33-41.
- Kato Z, Morimoto W, Kimura T, Matsushima A, Kondo N. 2010. Interstitial deletion of 18q: comparative genomic hybridization array analysis of 46, XX,del(18)(q21.2.q21.33). *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88(2):132-135.
- Kimura-Kuroda J, Nagata I, Negishi-Kato M, Kuroda Y. 2002. Thyroid hormone-dependent development of mouse cerebellar Purkinje cells in vitro. *Brain Res Dev Brain Res*

137(1):55-65.

- Koike E, Hirano S, Shimojo N, Kobayashi T. 2002. cDNA microarray analysis of gene expression in rat alveolar macrophages in response to organic extract of diesel exhaust particles. *Toxicol Sci* 67(2):241-246.
- Kreis P, Barnier JV. 2009. PAK signalling in neuronal physiology. *Cell Signal* 21(3):384-393.
- Krug A, Krach S, Jansen A, Nieratschker V, Witt SH, Shah NJ, Nothen MM, Rietschel M, Kircher T. 2013. The effect of neurogranin on neural correlates of episodic memory encoding and retrieval. *Schizophr Bull* 39(1):141-150.
- Kubo-Irie M, Oshio S, Niwata Y, Ishihara A, Sugawara I, Takeda K. 2011. Pre- and postnatal exposure to low-dose diesel exhaust impairs murine spermatogenesis. *Inhal Toxicol* 23(13):805-813.
- Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. 2003. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci* 75(1):40-46.
- Lee JT, Lu N. 1999. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell* 99(1):47-57.
- Libert C, Dejager L, Pinheiro I. 2010. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat Rev Immunol* 10(8):594-604.
- Lyon MF. 1998. X-chromosome inactivation spreads itself: effects in autosomes. *Am J Hum Genet* 63(1):17-19.
- Ma JY, Ma JK. 2002. The dual effect of the particulate and organic components of diesel exhaust particles on the alteration of pulmonary immune/inflammatory responses and metabolic enzymes. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 20(2):117-147.
- Ma Q. 2001. Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr Drug Metab* 2(2):149-164.
- Mackay H, Patterson ZR, Khazall R, Patel S, Tsirlin D, Abizaid A. 2013. Organizational effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on arcuate nucleus circuitry controlling food intake and energy expenditure in male and female CD-1 mice. *Endocrinology* 154(4):1465-1475.
- Maltais R, Poirier D. 2011. Steroid sulfatase inhibitors: a review covering the promising 2000-2010 decade. *Steroids* 76(10-11):929-948.
- Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, Bertrand-Michel J, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli-Lakhal L. 2012. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology* 55(2):395-407.
- Mauderly JL, Bice DE, Carpenter RL, Gillett NA, Henderson RF, Pickrell JA, Wolff RK. 1987. Effects of inhaled nitrogen dioxide and diesel exhaust on developing lung. *Res Rep Health Eff Inst*(8):3-37.
- Migeon BR. 2006. The role of X inactivation and cellular mosaicism in women's health and sex-specific diseases. *JAMA* 295(12):1428-1433.
- Miller VM, Sanchez-Morrissey S, Brosch KO, Seegal RF. 2012. Developmental coexposure to

- polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers has additive effects on circulating thyroxine levels in rats. *Toxicol Sci* 127(1):76-83.
- Mitsui T, Taniguchi N, Kawasaki N, Kagami Y, Arita J. 2011. Fetal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces expression of the chemokine genes Cxcl4 and Cxcl7 in the perinatal mouse brain. *J Appl Toxicol* 31(3):279-284.
- Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. 1997. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 105(1):70-76.
- Nguyen KV, Nyhan WL. 2013. Identification of novel mutations in the human HPRT gene. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 32(3):155-160.
- Ono N, Oshio S, Niwata Y, Yoshida S, Tsukue N, Sugawara I, Takano H, Takeda K. 2007. Prenatal exposure to diesel exhaust impairs mouse spermatogenesis. *Inhal Toxicol* 19(3):275-281.
- Pfaff D, Choleris E, Ogawa S. 2005. Genes for sex hormone receptors controlling mouse aggression. *Novartis Found Symp* 268:78-89; discussion 89-95, 96-79.
- Pollex T, Heard E. 2012. Recent advances in X-chromosome inactivation research. *Curr Opin Cell Biol* 24(6):825-832.
- Ristovski ZD, Miljevic B, Surawski NC, Morawska L, Fong KM, Goh F, Yang IA. 2012. Respiratory health effects of diesel particulate matter. *Respirology* 17(2):201-212.
- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, Burrows C, Bird CP, Frankish A, Lovell FL, Howe KL, Ashurst JL, Fulton RS, Sudbrak R, Wen G, Jones MC, Hurles ME, Andrews TD, Scott CE, Searle S, Ramsay J, Whittaker A, Deadman R, Carter NP, Hunt SE, Chen R, Cree A, Gunaratne P, Havlak P, Hodgson A, Metzker ML, Richards S, Scott G, Steffen D, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Ainscough R, Ambrose KD, Ansari-Lari MA, Aradhya S, Ashwell RI, Babbage AK, Bagguley CL, Ballabio A, Banerjee R, Barker GE, Barlow KF, Barrett IP, Bates KN, Beare DM, Beasley H, Beasley O, Beck A, Bethel G, Blechschmidt K, Brady N, Bray-Allen S, Bridgeman AM, Brown AJ, Brown MJ, Bonnin D, Bruford EA, Buhay C, Burch P, Burford D, Burgess J, Burrill W, Burton J, Bye JM, Carder C, Carrel L, Chako J, Chapman JC, Chavez D, Chen E, Chen G, Chen Y, Chen Z, Chinault C, Ciccodicola A, Clark SY, Clarke G, Clee CM, Clegg S, Clerc-Blankenburg K, Clifford K, Copley V, Cole CG, Conquer JS, Corby N, Connor RE, David R, Davies J, Davis C, Davis J, Delgado O, Deshazo D, Dharmi P, Ding Y, Dinh H, Dodsworth S, Draper H, Dugan-Rocha S, Dunham A, Dunn M, Durbin KJ, Dutta I, Eades T, Ellwood M, Emery-Cohen A, Errington H, Evans KL, Faulkner L, Francis F, Frankland J, Fraser AE, Galgoczy P, Gilbert J, Gill R, Glockner G, Gregory SG, Gribble S, Griffiths C, Grocock R, Gu Y, Gwilliam R, Hamilton C, Hart EA, Hawes A, Heath PD, Heitmann K, Hennig S, Hernandez J, Hinzmann B, Ho S, Hoffs M, Howden PJ, Huckle EJ, Hume J, Hunt PJ, Hunt AR, Isherwood J, Jacob L, Johnson D, Jones S, de Jong PJ, Joseph SS, Keenan S, Kelly S, Kershaw JK, Khan Z, Kioschis P, Klages S, Knights AJ, Kosiura A, Kovar-Smith C, Laird GK, Langford C, Lawlor S, Leversha M, Lewis L, Liu W, Lloyd C, Lloyd DM, Louseged H, Loveland JE, Lovell JD,

- Lozado R, Lu J, Lyne R, Ma J, Maheshwari M, Matthews LH, McDowall J, McLaren S, McMurray A, Meidl P, Meitinger T, Milne S, Miner G, Mistry SL, Morgan M, Morris S, Muller I, Mullikin JC, Nguyen N, Nordsiek G, Nyakatura G, O'Dell CN, Okwuonu G, Palmer S, Pandian R, Parker D, Parrish J, Pasternak S, Patel D, Pearce AV, Pearson DM, Pelan SE, Perez L, Porter KM, Ramsey Y, Reichwald K, Rhodes S, Ridler KA, Schlessinger D, Schueler MG, Sehra HK, Shaw-Smith C, Shen H, Sheridan EM, Shownkeen R, Skuce CD, Smith ML, Sotheran EC, Steingruber HE, Steward CA, Storey R, Swann RM, Swarbreck D, Tabor PE, Taudien S, Taylor T, Teague B, Thomas K, Thorpe A, Timms K, Tracey A, Trevanion S, Tromans AC, d'Urso M, Verduzco D, Villasana D, Waldron L, Wall M, Wang Q, Warren J, Warry GL, Wei X, West A, Whitehead SL, Whiteley MN, Wilkinson JE, Willey DL, Williams G, Williams L, Williamson A, Williamson H, Wilming L, Woodmansey RL, Wray PW, Yen J, Zhang J, Zhou J, Zoghbi H, Zorilla S, Buck D, Reinhardt R, Poustka A, Rosenthal A, Lehrach H, Meindl A, Minx PJ, Hillier LW, Willard HF, Wilson RK, Waterston RH, Rice CM, Vaudin M, Coulson A, Nelson DL, Weinstock G, Sulston JE, Durbin R, Hubbard T, Gibbs RA, Beck S, Rogers J, Bentley DR. 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434(7031):325-337.
- Saber AT, Halappanavar S, Folkmann JK, Bornholdt J, Boisen AM, Moller P, Williams A, Yauk C, Vogel U, Loft S, Wallin H. 2009. Lack of acute phase response in the livers of mice exposed to diesel exhaust particles or carbon black by inhalation. *Part Fibre Toxicol* 6:12.
- Sado T, Hoki Y, Sasaki H. 2005. Tsix silences Xist through modification of chromatin structure. *Dev Cell* 9(1):159-165.
- Salnikow K, Zhitkovich A. 2008. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol* 21(1):28-44.
- Santoro MR, Bray SM, Warren ST. 2012. Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. *Annu Rev Pathol* 7:219-245.
- Santos CR, Martinho A, Quintela T, Goncalves I. 2012. Neuroprotective and neuroregenerative properties of metallothioneins. *IUBMB Life* 64(2):126-135.
- Schulz EG, Heard E. 2013. Role and control of X chromosome dosage in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev* 23(2):109-115.
- Siddiqui RA, Sauermann U, Altmuller J, Fritzer E, Nothnagel M, Dalibor N, Fellay J, Kaup FJ, Stahl-Hennig C, Nurnberg P, Krawczak M, Platzer M. 2009. X chromosomal variation is associated with slow progression to AIDS in HIV-1-infected women. *Am J Hum Genet* 85(2):228-239.
- Siegel PD, Saxena RK, Saxena QB, Ma JK, Ma JY, Yin XJ, Castranova V, Al-Humadi N, Lewis DM. 2004. Effect of diesel exhaust particulate (DEP) on immune responses: contributions of particulate versus organic soluble components. *J Toxicol Environ Health A* 67(3):221-231.
- Silverman DT, Samanic CM, Lubin JH, Blair AE, Stewart PA, Vermeulen R, Coble JB, Rothman N, Schleiff PL, Travis WD, Ziegler RG, Wacholder S, Attfield MD. 2012. The Diesel Exhaust in Miners study: a nested case-control study of lung cancer and diesel exhaust. *J Natl Cancer Inst*

- 104(11):855-868.
- Society GC. 1995. Bisphenol A, BUA Report, No.203.
- Starokadomskyy P, Gluck N, Li H, Chen B, Wallis M, Maine GN, Mao X, Zaidi IW, Hein MY, McDonald FJ, Lenzner S, Zecha A, Ropers HH, Kuss AW, McGaughran J, Gecz J, Burstein E. 2013. CCDC22 deficiency in humans blunts activation of proinflammatory NF-kappaB signaling. *J Clin Invest* 123(5):2244-2256.
- Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):513-525.
- Stupfel M, Valleron AJ, Radford E. 1983. Lead, cadmium, iron, zinc, copper, manganese, calcium and magnesium in SPF male rats exposed to a dilution of automotive exhaust gas throughout their lives. *Sci Total Environ* 32(1):65-71.
- Sudhof TC. 2008. Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455(7215):903-911.
- Sugamata M, Ihara T, Sugamata M, Takeda K. 2006. Maternal exposure to diesel exhaust leads to pathological similarity to autism in newborns. *Journal of health science* 52(4):486-488.
- Sullivan RJ, Flaherty KT. 2013. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur J Cancer* 49(6):1297-1304.
- Sun BK, Deaton AM, Lee JT. 2006. A transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Mol Cell* 21(5):617-628.
- Suzuki T, Oshio S, Iwata M, Saburi H, Odagiri T, Udagawa T, Sugawara I, Umezawa M, Takeda K. 2010. In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice. *Part Fibre Toxicol* 7:7.
- Takahama K, Shirasaki T. 2001. [Endocrine disruptors and brain estrogen receptors: the current state of behavioral, neurochemical, and molecular biological studies]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 21(4):103-111.
- Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Inoue K, Yoshida S, Takeda K, Yoshino S, Yoshikawa T, Morita M. 2002. Lung expression of cytochrome P450 1A1 as a possible biomarker of exposure to diesel exhaust particles. *Arch Toxicol* 76(3):146-151.
- Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, Shimohigashi Y. 2006. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett* 167(2):95-105.
- Takeda K, Tsukue N, Yoshida S. 2004. Endocrine-disrupting activity of chemicals in diesel exhaust and diesel exhaust particles. *Environ Sci* 11(1):33-45.
- Trasande L, Attina TM, Blustein J. 2012. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA* 308(11):1113-1121.
- Tsukue N, Tsubone H, Suzuki AK. 2002. Diesel exhaust affects the abnormal delivery in pregnant mice and the growth of their young. *Inhal Toxicol* 14(6):635-651.
- Uchino M, Kojima H, Wada K, Imada M, Onoda F, Satofuka H, Utsugi T, Murakami Y. 2010. Nuclear beta-catenin and CD44 upregulation characterize invasive cell populations in non-aggressive

- MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer* 10:414.
- Vasudevan N, Ogawa S, Pfaff D. 2002. Estrogen and thyroid hormone receptor interactions: physiological flexibility by molecular specificity. *Physiol Rev* 82(4):923-944.
- Waalkes MP, Liu J, Chen H, Xie Y, Achanzar WE, Zhou YS, Cheng ML, Diwan BA. 2004. Estrogen signaling in livers of male mice with hepatocellular carcinoma induced by exposure to arsenic in utero. *J Natl Cancer Inst* 96(6):466-474.
- Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC. 2001. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet* 27(4):422-426.
- Watanabe N, Kurita M. 2001. The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect* 109(2):111-119.
- Weiss B. 2012. The intersection of neurotoxicology and endocrine disruption. *Neurotoxicology* 33(6):1410-1419.
- Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147(6 Suppl):S56-69.
- Win-Shwe TT, Yamamoto S, Fujitani Y, Hirano S, Fujimaki H. 2012. Nanoparticle-rich diesel exhaust affects hippocampal-dependent spatial learning and NMDA receptor subunit expression in female mice. *Nanotoxicology* 6(5):543-553.
- Yeo M, Berglund K, Hanna M, Guo JU, Kittur J, Torres MD, Abramowitz J, Busciglio J, Gao Y, Birnbaumer L, Liedtke WB. 2013. Bisphenol A delays the perinatal chloride shift in cortical neurons by epigenetic effects on the *Kcc2* promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(11):4315-4320.
- Yokota S, Moriya N, Iwata M, Umezawa M, Oshio S, Takeda K. 2013. Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. *J Toxicol Sci* 38(1):13-23.
- Yoshida M, Yoshida S, Sugawara I, Takeda K. 2002. Maternal exposure to diesel exhaust decreases expression of steroidogenic factor-1 and Müllerian inhibiting substance in the murine fetus. *J Health Sci* 48(4):317-324.
- Yoshida S, Sagai M, Oshio S, Umeda T, Ihara T, Sugamata M, Sugawara I, Takeda K. 1999. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl* 22(5):307-315.
- Yoshida S, Yoshida M, Sugawara I, Takeda K. 2006. Mice strain differences in effects of fetal exposure to diesel exhaust gas on male gonadal differentiation. *Environ Sci* 13(2):117-123.
- Zheng K, Yang F, Wang PJ. 2010. Regulation of male fertility by X-linked genes. *J Androl* 31(1):79-85.
- 外務省・在中国日本国大使館. 「北京市内の大気汚染について」平成 25 年 3 月 11 日.
東京都環境白書 2000. (平成 13 年 11 月・東京都発行) .