

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 中村 武志

題 目 : Studies on Molecular Mechanisms of Persistent Vaginal Abnormalities Induced by Neonatal Estrogen Exposure in Mice (出生直後のエストロゲン暴露により誘起されたマウス膣の恒久的異常に関する分子機構の研究)

### 論文要旨 :

Proliferation and differentiation of cells in female reproductive organs, the oviduct, uterus and vagina, are regulated by endogenous estrogens. *In utero* exposure to a synthetic estrogen, diethylstilbestrol (DES), induces vaginal clear-cell adenocarcinoma in humans. In mice, perinatal exposure to DES and estrogenic chemicals, results in abnormalities such as hypothalamic-pituitary-gonadal axis, polyovular follicles, uterine circular muscle disorganization and persistent vaginal epithelial cell proliferation. Most activities of estrogenic chemicals are mediated through estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and/or ER $\beta$ . However, little is known about the relative contribution of the individual ER subtypes in induction of abnormalities. I tested the effects of neonatal exposure to ER selective ligands and DES on female mice. Transactivation assays using mouse ER $\alpha$  and ER $\beta$  showed that  $10^{-10}$  M DES activated both ER subtypes and that the ER $\alpha$  agonist (propyl pyrazole triol, PPT) and the ER $\beta$  agonist (diarylpropionitrile, DPN) selectively activated their respective ERs at  $10^{-9}$  M. Neonatal female mice were injected subcutaneously with DES, PPT or DPN and the animals were examined at 13 and 15 weeks of age. Persistent estrous smears and anovulation were induced in all mice by 0.025-2.5  $\mu$ g DES and 2.5-25  $\mu$ g PPT, but not by DPN, suggesting that the observed anovulation was primarily mediated through ER $\alpha$ . Disorganization of uterine musculature and ovary-independent vaginal epithelial cell proliferation accompanied by persistent expression of EGF-related genes and interleukin-1-related genes were also mediated through ER $\alpha$ . In contrast, polyovular follicles were induced by neonatal treatment with both ER $\alpha$  and ER $\beta$ ligands, suggesting that ovarian abnormalities are mediated through both ER subtypes (chapter 1).

Perinatal exposure to natural and synthetic estrogen, induces estrogen-independent persistent proliferation of vaginal epithelium in mice. To understand the underlying mechanism of the estrogen-independent persistent vaginal changes induced by perinatal DES exposure, I examined global gene expressions in the vaginae of ovariectomized adult mice exposed neonatally to DES using microarray. I found persistent up-regulation of *Wnt4* and persistent down-regulation of *Wnt11* in the vagina of mice exposed neonatally to DES and PPT. Also, the expression of Wn4 protein in vagina is correlated to the stratification of

epithelial cells with the superficial keratinization of vagina, but not epithelial cell stratification only (chapter 2).

Moreover, cell cycle-related genes, p21, cyclin-dependent kinase inhibitor, showed up-regulation in the vagina and p21 protein was localized in the basal layer of the vaginal epithelium in mice exposed neonatally to DES and PPT. The expression of Notch receptors and Notch ligands were unchanged, however, hairy-related basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor genes, *Hes1*, *Hey1* and *Heyl* were persistently down-regulated in the vagina showing estrogen-independent epithelial cell proliferation in mice exposed neonatally to DES and PPT (chapter 3).

Female reproductive organs show organ-specific morphological changes during estrous cycles. Estrogen depletion by ovariectomy at adults results in atrophy accompanied by apoptosis in vaginal and uterine cells, while estrogen treatment following the ovariectomy elicits cell proliferation in both organs. Sequential changes in mRNA expression of Wnt and Notch signaling genes were analyzed in the vagina and uterus of ovariectomized adult mice after a single injection of 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) to understand molecular basis of differences in response to estrogen in these organs. I found estrogen-dependent up-regulation of *Wnt4*, *Wnt5a* and *p21* and down-regulation of *Wnt11*, *Hey1* and *Dll4* in the vagina, and up-regulation of *Wnt4*, *Wnt5a*, *Hey1*, *Heyl*, *Dll1*, *p21* and *p53* and down-regulation of *Wnt11*, *Hey2* and *Dll4* in the uterus. The expression of *Wnt4*, *Hey1*, *Hey2*, *Heyl*, *Dll1* and *p53* showed different patterns after the estrogen injection. Whereas, *Wnt5a*, *Wnt11*, *Dll4* and *p21* showed similar expression patterns between the vagina and uterus, suggesting that these genes are involved in proliferation of cells both organs in mice (chapter 4).

In conclusion, I confirmed that ER $\alpha$  action is essential for induction of abnormalities in the hypothalamo-pituitary-ovarian axis, and uterine and vaginal changes during critical developmental period in mice. Furthermore, I performed comprehensive analyses in the expression of Wnt- and Notch-related genes in the vagina exposed neonatally to DES. Wnt family genes or Notch family genes are one of the fundamental signalling pathways that regulate metazoan development and adult tissue homeostasis. I confirmed persistent up-regulation of *Wnt4* and *p21*, and persistent down-regulation of *Wnt11*, *Hes1*, *Hey1* and *Heyl*, and localization of Wnt4 and p21 protein in the vagina exposed neonatally to DES. I also demonstrated the difference in expression patterns of *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt11*, *Hey1*, *Hey2*, *Heyl*, *Dll1*, *Dll4*, *p21* and *p53* between the vagina and uterus after E<sub>2</sub> stimulation. Moreover, I identified the localization of Wnt4 and p21 protein in the ovariectomized adult mouse vagina exhibiting epithelial stratification after a single injection of E<sub>2</sub>. Especially, *Wnt4*, *Wnt11*, *p21* and *Hey1* showed similar trends to the vagina exposed neonatally to DES. These data might provide clues to biological function of irreversible proliferation in vaginal epithelial cells.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	中村 武志
審査委員	主査：鳥取大学 教授 太田 康彦
	副査：鳥取大学 教授 上原 正人
	副査：山口大学 教授 木曾 康郎
	副査：鳥取大学 准教授 竹内 崇師
	副査：鳥取大学 准教授 杉山 晶彦
題目	Studies on Molecular Mechanisms of Persistent Vaginal Abnormalities Induced by Neonatal Estrogen Exposure in Mice (出生直後のエストロゲン暴露により誘起されたマウス膣の恒久的異常に関する分子機構の研究)

審査結果の要旨：

女性生殖器官の細胞増殖・分化はエストロゲンによって制御されているが、1930年代に流産防止薬として処方されていた合成エストロゲン（DES）を服用した母親から生まれた女兒が、若年で膣癌を発症することが知られている。新生仔期に DES を暴露したマウスでも、成熟時に恒久的な膣上皮細胞の増殖が誘起される。本研究において、申請者は新生仔期にエストロゲンを暴露した成熟雌マウスの膣において、どのようなメカニズムで卵巣非依存の細胞増殖が誘起されているかを解明するため、発現異常が生じている遺伝子群の網羅的解析を行った。

周生期におけるエストロゲン様物質の暴露は、様々な生殖器障害を誘導する。エストロゲン受容体（ER）は $\alpha$ と $\beta$ の2つのサブタイプが知られており、これらの器官障害がどちらのER経路によるかについては、未解明な部分が多い。第1章では、新生仔雌マウスに ER $\alpha$ アゴニスト（PPT）、ER $\beta$ アゴニスト（DPN）、または両方のアゴニスト（DES）を皮下投与し、15週齢時において、卵巣、子宮および膣の組織変化を検索した。その結果、DPNではなく、PPTおよびDESを投与したマウスで、無排卵、子宮輪状筋の乱れ・縦層筋密度の減少に加えて、卵巣非依存の恒久的な膣上皮細胞増殖を認めた。これらの現象が ER $\beta$ ではなく、主に ER $\alpha$ を介した経路によって誘導されることを明らかにした。

第2章では、DNAマイクロアレイとリアルタイムPCRを用いて、細胞増殖・分化、癌化などに関与している Wnt ファミリー遺伝子群の発現変動を網羅的に解析して、このマウス成熟膣において、恒久的な *Wnt4* の発現上昇と *Wnt11* の発現減少を確認した。また、ER（ $\alpha/\beta$ ）のアンタゴニストである ICI 182,780 を用いて、*Wnt4* は ER 受容体の下流で制御

されていることを見出した。さらに免疫染色法を用いて、Wnt4 タンパク質は、細胞増殖時ではなく、ケラチン化誘導の前後に上皮細胞で発現していることを明らかにした。

第 3 章では、卵巣非依存性細胞増殖の分子機構を解明する目的で、*p21*、*p53* および Notch 関連遺伝子の発現を調べた。細胞周期に関与する遺伝子群をまとめた結果、サイクリン依存キナーゼインヒビターである *p21* の発現上昇を確認した。さらに免疫染色の結果、*p21* タンパク質は DES 暴露膺上皮基底細胞に強い発現を認めた。また、リアルタイム PCR で *p21* を標的遺伝子としている癌抑制遺伝子 *p53* の発現を調べたが、発現に顕著な変化を認めなかった。DES 暴露膺における *p21* 発現は、*p53* 非依存的に制御されていることが示唆された。さらに *p21* の下流で制御されている Notch ファミリー遺伝子の発現変動について調べ、Notch レセプター (*Notch1*、*Notch2*、*Notch3*、*Notch4*) および Notch リガンド (*Dll1*、*Dll4*、*Jagged1*、*Jagged2*) ではなく、Notch シグナルの標的遺伝子である *Hes1*、*Hey1* および *Heyl* において、DES 暴露による発現の減少を明らかにした。

第 4 章では、エストロゲン応答遺伝子の探索のため、成熟時に卵巣除去したマウスに 17 $\beta$ -エストラジオール (E<sub>2</sub>) を皮下投与して、膺または子宮で一過性に応答する遺伝子群を調べた。その結果、膺において *Wnt4*、*Wnt5a* と *p21* の発現上昇、*Wnt11*、*Hey1* と *Dll4* の発現減少を確認した。また、子宮では *Wnt4*、*Wnt5a*、*Hey1*、*Heyl*、*Dll1*、*p21* および *p53* の発現上昇、*Wnt11*、*Hey2* と *Dll4* の発現減少を確認した。膺と子宮を比較すると、*Wnt4*、*Hey1*、*Hey2*、*Heyl*、*Dll1* および *p53* の発現パターンが異なり、*Wnt5a*、*Wnt11*、*Dll4* と *p21* においては類似の傾向を示すことを明らかにした。

これらの結果により、視床下部-脳下垂体-卵巣軸や膺・子宮の恒久的な異常は、主に ER $\alpha$  によって制御されていることを明らかにした。さらに膺においては、*Wnt4* と *p21* 遺伝子の発現上昇、*Wnt11*、*Hes1*、*Hey1* と *Heyl* 遺伝子の発現減少および *Wnt4* と *p21* タンパク質の発現を確認し、膺上皮細胞の卵巣非依存性増殖にこれらの遺伝子が関与することを証明した。また、卵巣除去成熟マウスにおいても、E<sub>2</sub> を投与後に類似の *Wnt4* と *p21* タンパク質の発現があることを明らかにし、これらの遺伝子のシグナルカスケードをより詳細に調べることが、卵巣非依存性の膺上皮細胞増殖の分子機構解明に繋がることを示唆した。

以上の結果について審査員 5 名が審議し、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有すると判定した。