

平成 11 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

研究課題名 内分泌かく乱化学物質の人の健康への影響のメカニズム等に関する調査研究 新旧表

下線部修正

新	旧	修正理由
<p>厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業） 分担研究報告書</p> <p>性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明に関する研究</p> <p>分担研究者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所 教授</p> <p>研究要旨（略）</p> <p>A.（略）</p> <p>B. 研究方法及び結果</p> <p>1.（略）</p> <p>2. ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定（略）</p> <p>p68 は cDNA クローニングの結果、RNA ヘリケースの 1 種であることが判明し、AR、MR、VDR への効果についても調べたところ全く効果がなく、ERα 特異的であることが判明した。(FIG.1-2)</p> <p>C~D（略）</p> <p><u>(削除)</u></p> <p><u>FIG.1</u></p> <p><u>FIG.2</u></p>	<p>厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業） 分担研究報告書</p> <p>性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明に関する研究</p> <p>分担研究者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所 教授</p> <p>研究要旨（略）</p> <p>A.（略）</p> <p>B. 研究方法及び結果</p> <p>1.（略）</p> <p>2. ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定（略）</p> <p>p68 は cDNA クローニングの結果、RNA ヘリケースの 1 種であることが判明し、AR、MR、VDR への効果についても調べたところ全く効果がなく、Era 特異的であることが判明した。(FIG.1-3)</p> <p>C~D（略）</p> <p><u>FIG.1</u></p> <p><u>FIG.2</u></p> <p><u>FIG.3</u></p>	<p>旧 FIG. 1 については、該当の論文が撤回されたため削除。</p>

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

研究課題名=内分泌かく乱化学物質の人の健康への影響のメカニズム等に関する調査研究

主任研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部部长

研究要旨

内分泌かく乱化学物質問題を包括的に把握するために、本研究は、高次生命系としての神経・内分泌・免疫それぞれのネットワークに対する諸影響を横軸に置き、発生・生殖と時間との両軸から検討した。また、以上の各要素相互の連携を司るシグナル伝達系を解析する必要性から、①核内レセプターとその共役転写因子、②エストロゲン受容体とセカンドメッセンジャーの相互作用、③ステロイド代謝活性機構をも併せて検討した。加えて、近年、進歩の著しいcDNA マイクロアレイ技術の内分泌かく乱化学物質研究への導入を試みた。これらの研究過程で集積される科学情報および研究結果の統合（データベース化）と成果の出版をすすめている。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属における職名

垣塚 彰 大阪バイオサイエンス研究所 部長
 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 室長
 広川勝彦 東京医科歯科大学大学院・医学系研究科 教授
 松島綱治 東京大学大学院・医学系研究科 教授
 井口泰泉 横浜市立大学理学部 教授
 鈴木勝士 日本獣医畜産大学 教授
 加藤茂明 東京大学分子細胞生物学研究所・分子生物部門 教授
 藤本成明 広島大学原爆放射能医学研究所 助教授
 笹野公伸 東北大学大学院・医学系研究科 教授

A. 研究目的

本研究の目的は、内分泌かく乱化学物質のヒトの健康への影響のメカニズムを探究し、以って毒性評価にかかわる知的

基盤を整備するために、同物質に関連する核内受容体・細胞間シグナル分子ネットワークを解明することにある。
 内分泌かく乱化学物質の生物影響とし

て最も危惧されているのが、その生殖への影響である。しかし、その生殖に関わる受容体、シグナル伝達物質、制御メカニズムは、いずれも複雑な系を形成しており、全てが解明されているわけではない。緊急性を帯びる内分泌かく乱化学物質のリスク評価においては、現状で速やかに測定可能な標的臓器におけるホルモン受容体への結合、転写活性、増殖活性等の試験からのデータが利用される。しかし、内分泌かく乱化学物質が受容体、シグナル伝達系を介して生体に影響するという特徴を考慮すると、多種多様なシグナル伝達分子種と当該化学物質の相互作用に注目したメカニズム解析によって得られるデータが無ければ、生殖への影響の精密な評価は困難である。本研究におけるシグナル伝達分子種を共有する免疫系、神経系、内分泌系、及び生殖発生系での核受容体、細胞内シグナル伝達ネットワークに関する研究からなる分子生物学に基礎をおいた総合的なアプローチは以上の基盤を形成するものとなる。加えて、近年、進歩の著しい cDNA マイクロアレイは、大量の発現遺伝子の解析を迅速に進める手だてを現実のものとし、総合的な遺伝子発現カスケードを解析するツールとなることが期待される。そこで、本年度より内分泌かく乱化学物質 (EDCs) に応答する遺伝子を機能別に整理し、いわば EDC-トキシコゲノミクスデータベースを構築する課題を設定することとした。

B. 研究方法

研究方法は以下の通りである。

1) 高次系ネットワーク：神経 ポリグルタミン神経毒性のリスクファクターとしての内分泌かく乱物質の解析 (垣塚)

神経系に発現する新規の核内受容体のコファクターを同定し、核内受容体と新規コファクターの相互作用における内分泌攪乱物質の作用を解析した。

神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響 (菅野)

1. 初代神経幹細胞培養系を用いた内分泌かく乱化学物質の影響の検討

マウス初代神経幹細胞培養系を確立するため、準備段階として、脳の実験の分野において技術的に進んでいるラットを用いた培養法の検討を行った。Wistar 系妊娠 (13, 15, 17 日目) ラットの胎児の脳新皮質の初代培養を行い、分化マーカーによる免疫染色及び RT-PCR 法によるエストロジェンレセプター α および β の発現を検討した。

2. RT-PCR 法を用いたエストロジェンレセプター検出系の確立

マウスエストロジェンレセプターのスプラシングバリエーションの構成を検討するため、エクソン全長の PCR 法として、マウスのエストロジェンレセプター α について、エクソン 1 末端とエクソン 8 最上流部のプライマーを用いた PCR を行

い、その泳動産物を膜にトランスファーし、エクソン 2 からエクソン 7 を含むプローブを用いて、サザンブローディングを行った。

また、将来の個々エクソン解析のためのツールとして、欠損が予想されるエクソン 2 から 7 について、個別に del 2、del 3、del 4、del 5、del 6、del 7 の PCR プライマーセットを作製し、シーケンシングと組み合わせ、スプライシングバリエーションの存在を検討した。

2) 高次系ネットワーク：免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (広川)

C57BL/6 マウス (♂/♀) 3 ヶ月齢、18 ヶ月齢に Diethylstilbesterol (DES) を 1. 急性投与実験；高用量(15mg/ Kg)、低用量(3mg/ Kg)を腹腔内投与で 1 回 x 5 日、2. 慢性投与実験；比較的 low 用量を二用量(0.44 μg/ Kg、4 μg/ Kg)添加粉末飼料として 3 ヶ月間給餌、で投与した。これらについて、A) 体重と臓器重量 (胸腺、脾臓、肝、腎、精巣、卵巣、副腎)、B) フローサイトメトリー 胸腺 (CD4/ CD8)、脾臓 (Thy-1/ B220, CD4/ CD8, ナイブ/ メリ、NK/ CD3)、C) リンパ球の増殖能 T 細胞増殖能 (anti-CD3MoAb, Con A)、B 細胞増殖能 (LPS)、D) 抗 S R B C 抗体産生能 (PFC 法)、E) NK 細胞活性 を検討した。

内分泌かく乱化学物質による抗原提示細胞分化、機能への影響の解析 (松島)

C57/B6 マウスの骨髄から密度勾配法で単核球を分け、セルソーターにより Lin 陰性 c-kit 陽性骨髄前駆細胞を分離、GM-CSF、stem cell factor (SCF) 及び TNF-α 存在下で 14 日まで培養し、CD11b、CD11c、Ia などの細胞表面マーカーの発現を解析した。また、ヒト末梢血単核細胞から密度勾配法により単核球のみを分離し、MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch, Germany) を用いて CD14 陽性細胞をプラスチックプレートへ撒き、付着能を以って単球とみなし、樹状細胞分化への前駆細胞とした。GM-CSF、IL-4、及び TNF-α 刺激により分化した樹状細胞の mRNA を抽出し、SAGE 法を用いて同細胞に発現する遺伝子群を探索した。

3) 高次系ネットワーク：生殖

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (井口)

マウスの胎児期あるいは出生直後にジエチルスチルベストロール (DES)、ビスフェノール A (BPA) を投与し、卵巣を摘出し、臍を組織学的に検討した。また、妊娠 17 日目のマウスの皮下に BPA を投与し、30 分、1、2、3、6、12、24 時間後に、母胎の血中、肝臓、脳、胎盤、および、胎仔の血中、肝臓、脳、子宮、精巣中の BPA を測定した。

初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの

発生障害作用に関する研究 (鈴木)

500pg または 5ng/embryo の E1 を鶏受精卵に投与し、48 時間孵卵して鶏胚の発生状況につき対照と比較、胚盤葉下層の消失、胚の管様構造への変形、重複胚奇形、神経管形成の異常などの有無および胚発生の遅延 (体節数低下) を指標とした形態学的な検討を行った。また、孵卵直前 (ステージ 10)、孵卵後 24 および 48 時間の無処置胚から総 mRNA を抽出し、RT-PCR 法により ERmRNA の発現を検討した。

4) 核内レセプター

性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明 (加藤)

レセプター種 [ER、アンドロゲンレセプター (AR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR)、ビタミンDレセプター (VDR)] 固有の共役因子の検索・同定を、酵母 two-hybrid 法を用いた cDNA スクリーニング、及び生化学的手法を用いて行った。

ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討 (藤本)

NIH/3T3 細胞に PG5-hER α または β と、(AP-1)₆-luc または (ERE)₃-luc をコトランスフェクションして、その E₂、タモキシフェン、ICI に対する応答を比較した。また、この系で、BPA、MC、HCH、DDD、DBA、ゲニスタインによる AP-1 応答と ERE 応答を ER α を介する場合と

ER β を介する場合で比較検討した。

5) ステロイド代謝活性機構

ヒト組織における性ステロイド代謝酵素と受容体の検索に関する研究 (笹野)

ヒト胎児組織の各臓器を用いておける 17 β -HSD1 と 17 β -HSD2 の 17 β -HSD 1 及び 2 の酵素活性や発現を検討した。

6) 内分泌かく乱化学物質に関する文献収集評価に関する研究 (菅野)

研究成果のデータベース化と、社会への還元を本学会議で得られた成果をモノグラフとして出版する事により具体化する。

7) 内分泌かく乱研究整備

神経に対する内分泌かく乱化学物質研究-cDNA マイクロアレイによる発現遺伝子解析 (井上、他)

cDNA マイクロアレイ技術導入と運用のための予備的な検討を行った。また、高次生命系解析の中心となる神経に焦点を当て、外来性ホルモン様作用物質 DES の影響について、内因性ホルモン様作用物質 estradiol の作用と比較しつつ基本的に window 効果に照準を定めた実験系へのこのシステムの活用を試みた。

C. 研究結果

1) 神経

ポリグルタミン神経毒性のリスクファ

クターとしての内分泌かく乱物質の解析 (垣塚)

神経機能におよぼす内分泌ホルモンが作用する場合に関与すると考えられる核内受容体の新規コアクティベーターを同定した。このコアクティベーターは、これまでに褐色脂肪に特異的な PPAR γ のコアクティベーターとして同定された PGC1 と最もホモロジーが高いため PGC2 と銘々した。PGC2 は、卵巣・子宮・精巣さらには神経にも発現が確認でき、エストロゲン受容体(ER)とリガンド依存性の結合を示した。また、高濃度のゲニスタインによって ER と PGC2 の相互作用が誘導されたが、ビスフェノール、ノニルフェノールにそのような活性は認められなかった。

神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱 化学物質の影響 (菅野)

1. 初代神経幹細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響の検討

胎生 13, 15, 17 日目のそれぞれの大脳新皮質の初代培養を行い、神経幹細胞のマーカーである nestin とニューロンのマーカーである MAP-2、グリア細胞のマーカーである GFAP の抗体を用い免疫染色を行った。各ステージにおける陽性細胞のポピュレーションは、培養初日では、MAP-2 陽性細胞は胎生 13 日では 26%、15 日では 31%、17 日では 48% と増加が見られ、この時期のニューロンへの分化が盛んに起きていることが観察さ

れた。また、RT-PCR 法によると胎生 15 日及び 17 日日の大脳皮質初代培養細胞にはエストロジェンレセプター α および β の発現が検出された。現在この実験系での、内分泌かく乱化学物質添加の影響を検討している。

2. RT-PCR 法を用いたエストロジェンレセプター検出系の確立

生後 40 日齢の雌マウス大脳、海馬、視床下部、小脳について、エクソン 1 からエクソン 8 のプライマーで RT-PCR 反応を行い、得られた産物に対するエクソン 2 からエクソン 7 のプローブによるサザンブロット法で解析した結果、ワイルドタイプの全長バンド以外に、スプライシングバリエーションと思われる複数のバンドを検出した。さらに、胎生期に DES を暴露した胎児脳を用いて、このアレイ系が薬物に対しての評価系となるかを検討しつつある。

個別のエクソン欠損スプライシングバリエーション PCR プライマーにより得られた産物は、予想されるマウスエストロジェンレセプター α (del 2, del 3, del 4, del 5) 及びマウスエストロジェンレセプター β (del 3, del 4, del 5, del 6, del 7) であることをシーケンシングにより確認した。この系を用いて、C57BL/6 雌マウスの生後 40 日齢の大脳、海馬、視床下部、小脳及び胎生 17 日の雌胎児の大脳、中脳、小脳におけるエストロジェンレセプターのスプライシングバリエーションの発現を検討したところ、各部位において、エ

ストロジェンレセプターのスプライシングバリエーションが存在する結果を得た。

2) 免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (広川)

腹腔内に5日間投与する急性実験では胸腺萎縮、脾臓T細胞の減少とその増殖能の低下という免疫系の抑制が認められ、その影響は雄より雌の方がやや顕著であった。腹腔内投与量より $10^2 \sim 10^3$ のオーダー少ない量を餌に混じて3ヶ月間与えた慢性実験でも、胸腺の萎縮は明瞭に認められたが、免疫機能の低下については検出できなかったが、老齢ではむしろ軽度ながら機能亢進が認められた。

ごく少量のDESを長期間与える慢性投与実験でも、胸腺を中心とした免疫系に影響を及ぼすことが分かった。しかし、その影響を老齢マウスで見ると、必ずしも抑制効果ばかりではなく、免疫系の一部の細胞集団や機能は逆に亢進することが分かった。

内分泌かく乱化学物質による抗原提示細胞分化、機能への影響の解析 (松島)

マウス骨髄前駆細胞は、樹状細胞へ分化過程で、分化誘導刺激後6日目に $CD11b^{+}dull^{+}CD11c^{+}$ 及び $CD11b^{+}high^{+}CD11c^{+}$ の異なる表現系を示す未熟樹状細胞群へ分かれ、14日目には成熟樹状細胞へと分化した。このとき分化に伴いCCR7の発現が増強した。TGF- β 添加では、造血前駆

細胞から先程の $CD11b^{+}dull^{+}CD11c^{+}$ 及び $CD11b^{+}high^{+}CD11c^{+}$ の未熟樹状細胞への分化が抑制され、培養後10日目にマクロファージ様の細胞に分化した。また、ヒト末梢血単球の樹状細胞への分化時における遺伝子発現の変化をSerial Analysis of Gene Expression(SAGE)法により系統的に解析したところ、樹状細胞への分化によりgelsolin、TARC、lysosomal acid lipase等のmRNAの転写促進され、MRP-14、MRP-8、Ficolin-1等のmRNA転写抑制されることを見いだした。

尚、当研究については、内分泌かく乱化学物質との相互作用についての研究としての展望が見られないので、上段の成果を持って、研究は終了することとした。

1. 発生・生殖

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (井口)

胎仔期での投与ではDES投与のみでエストロゲン非依存の膣上皮の多層化が誘起されたが、出生直後の投与では大量のDES、BPAともにエストロゲン非依存の膣上皮の増殖と、多卵性卵胞が誘起された。さらに、妊娠期に投与したBPAは30分で胎児の血中、脳、肝臓、子宮、精巣に移行した。

初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用に関する研究 (鈴木)

投与方法を改善し、卵殻切開後、直視下で孵卵時(ステージ10)の鶏胚に投与し

より正確に投与部位を特定できる方法に変えた。異常発生が再現されたので、硫酸エストロンの多段階投与により用量反応相関を確認した。孵卵 0、1、2 日の胚から ERmRNA の検出に成功し、発生に伴う発現増加が確認された。ホールマウント標本作製の準備が完了した。

2. 核内レセプター

性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明 (加藤)

ERのN末端側の転写促進領域 (AF-1) に結合する p68 を細胞核抽出液より精製・クローニングした。p68 は cDNA クローニングの結果、RNA ヘリケースの 1 種であることが判明し、AR、MR、VDR への効果についても調べたところ全く効果がなく、ER α 特異的であることが判明した。

ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討 (藤本)

ERE 部位と AP-1 部位によるエストロゲン応答を、ER α と ER β の間で比較検討したところ、ERE を介する応答は、両受容体の間で差がないのに対し、AP-1 を介するエストロゲン応答は α 型のみでみられた。内分泌かく乱物質において ERE または AP-1 の応答性を見ると、全て弱いエストロゲン型として作用していた。

5) ステロイド代謝活性機構 ヒト組織における性ステロイド代謝酵素

と受容体の検索に関する研究 (笹野)

脳、心臓、肺、副腎においては 17 β -HSD1、肝臓、消化管、腎臓においては 17 β -HSD2 が優位に発現していた。また、胃の表層上皮細胞と、小腸及び大腸の吸収上皮細胞に 17 β -HSD2 発現を認めた。

2. 文献収集・評価

内分泌かく乱化学物質に関する文献収集 評価に関する研究 (総括班)

本班研究によりもたらされた研究結果の集積を開始した。また、国際的データベースである、GEDRI (THE GLOBAL ENDOCRINE DISRUPTOR RESEARCH INVENTORY) への登録を開始した。これと並行して、科学研究モノグラフの刊行の準備を開始した。

7) 内分泌かく乱研究整備 神経に対する内分泌かく乱化学物質研究 -cDNA マイクロアレイによる発現遺伝 子解析 (井上、他)

マウス脳に関連する遺伝子をピンコンタクト法でプロットしたチップをアッセイに使えるよう準備を進めた。また、mRNA として、ハイブリダイゼーションに必要な量を見積もり、最低 10 マイクログラム (mRNA) という概算をえて、システムの運用のメドを得た。妊娠時に DES 投与された各成長段階マウスの脳について、mRNA の分離、蓄積を行い、

現在、mRNA の cDNA の逆転写反応を終了し、チップの選択とハイブリダイゼーションの条件検討を行っている。

D. 考察

シグナル伝達分子種を共有する神経系、内分泌系、免疫系、およびその複雑な制御系に支配された生殖・発生過程、そして核内レセプターを介したシグナル伝達そのものに関する研究からなる多角的なアプローチにより、高次生命系の立場からの内分泌かく乱化学物質のヒトの健康への影響のメカニズムの解明のための知見が集積されつつある。また、こららの研究を支援するために、早急に取り組むべき課題として近年、進歩の著しい cDNA マイクロアレイを内分泌かく乱化学物質研究への導入を試みた。内分泌かく乱化学物質は複雑な反応系を介していることが予想されるが、cDNA マイクロアレイシステムによる解析で反応メカニズム解明のための有力な情報を得られることが期待できる。

このように、本研究班では、内分泌かく乱化学物質のヒトの健康への影響のメカニズムを個体発生から成体での内分泌機能への影響に至るまでの広い範囲を視野に入れ、生命科学の立場から探求している。こうした視点に立った本年度の当班における研究の成果は、内分泌かく乱化学物質問題に関する 9 省庁連絡会のカバーする研究企画の中でも他にみられない特異な位置を占めており、この問題で

の近い将来における国際的な Scientific Assessment の際にも高い貢献をなすものと期待される。また、その学際的性格は本研究の有効性を更に際立たせるものと結論される。

今後、さらに基礎的研究として、詳しく検討し、また、内分泌かく乱化学物質に関する文献収集・評価を実施することで、最終的には総合領域すなわち高次生命系の発生・維持機構とそれに関わる組織特異的機能制御における核内レセプター分子の発現と機能修飾の分子メカニズムを系統的な解明を目指したい。

E. 結論

本研究班では、内分泌かく乱化学物質問題を包括的に時間軸を考慮に入れつつ、高次生命系としての神経・内分泌・免疫ネットワークに対する影響を解析する立場から、神経、免疫、および発生・生殖について検討した。また、そのネットワークのシグナル伝達系に対する影響を解析する立場から、核内レセプターとその共役転写因子およびエストロゲン受容体とセカンドメッセンジャーとの相互作用、ステロイド代謝活性機構を検討した。加えて、近年、進歩の著しい cDNA マイクロアレイを内分泌かく乱化学物質研究への導入を試みた。また、これらの研究過程で集積される科学情報および研究結果のデータベース登録及び出版準備を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshida K, Inoue T, Hirabayashi Y, et al.: Calorie restriction and spontaneous hepatic tumors in C3H/He mice, *J Nutrition, Health and Aging*, 1999, 3:121-126

2) Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki Ji, Inoue T: MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126(15):3437-47, 1999.

3) Kurata H, Liu CB, Valkova J, Koch AE, Yssel H, Hirabayashi Y, Inoue T, Yokota T, Arai Ki.: Recombinant adenovirus vectors for cytokine gene therapy in mice. *Allergy Clin Immunol*, 103: 471-84, 1999.

2. 学会発表

1) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Conformational changes on ER α induced by endocrine disrupting chemicals (EDCs). *Keystone symposia*, 2000

2) K.Sai, B.L. Upham, K. -S. Kang, R. Hasagawa, J.E.Trosko, T.Inoue, Pentachlorophenol inhibits gap junctional intercellular

communication in rat liver epithelial cells. 1999 International Gap junction Conference Gwatt, Switzerland (August 28 ~ September 2, 1999)H/He

3)佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上 達 : Pentachlorophenol の肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連 : 第58回日本癌学会総会、広島(平成11年9月29日~10月1日)

4)平林容子、高木篤也、児玉幸夫、菅野純、黒川雄二、井上達 : Mn-SOD 遺伝子導入マウス骨髄細胞での紫外線抵抗性 : 第58回日本癌学会総会、広島(平成11年9月29日~10月1日)

5) K.Sai, J.E.Trosko, T.Inoue: Pentachlorophenol-induced down-regulation of gap junctional intercellular communication was ameliorated by (-)-epigallocatechin gallate in rat liver epithelial cells. *Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell Communication*, Ann Arbor, Michigan (Oct.17-20,1999)

6) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Mechanism based high throughput screening method for

endocrine disrupting chemicals
(EDCs) using bio-sensor. 2nd
European Workshop 99
International Molecular Toxicology
1999

7) 松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井
上 達、卵巣摘出ラットにおけるエスト
ロゲン枯渇期間と子宮肥大反応の關係に
ついて、日本内分泌攪乱化学物質学会第

2回研究発表会 1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

ポリグルタミン神経毒性のリスクファクターとしての内分泌かく乱物質の解析

分担研究者 垣塚 彰（財）大阪バイオサイエンス研究所 研究部長

研究要旨

神経機能におよぼす内分泌ホルモン及び内分泌攪乱化学物質の作用を解析する過程で、脳内核内受容体の新規核内受容体コファクターを同定した。このコファクター（PGC-2と名命）は、エストロゲン受容体(ER)等の核内受容体とリガンド依存性の結合を示した。また、高濃度のゲニスタインによって ER と PGC-2 の相互作用が誘導されたが、ビスフェノール、ノニルフェノールにそのような活性は認められなかった。

一方、ポリグルタミンが核内で凝集し、SEK1-JNK の細胞死シグナルを活性・伝達している部位が PML body であることを明らかにした。

A. 研究目的

我々は、これまでに、ハンチントン舞踏病(HD)や Machado-Joseph 病(MJD)の原因遺伝子産物に共通に含まれる伸長したポリグルタミンが神経細胞を変性・死滅させることを示してきた。本研究では、ポリグルタミンを発現させる培養神経細胞系・トランスジェニックマウスを作成し、それらの実験系を用いて、核内受容体・そのコファクター・そのリガンド及び攪乱物質が神経変性の増悪因子として作用する可能性を検討し、その分子機構を解析することを目的とする。

B. 研究方法

(1) テトラサイクリン等の薬剤で遺伝子発現をコントロール出来るシステムを利用し、同調してポリグルタミンを発現させる神経細胞株の樹立を試みる。そして、ポリグルタミンの発現によって引き起こされる神経細胞の形態・細胞死の生化学的な解析を行う。

(2) 上記の培養細胞をもちいて、種々の内分泌攪乱物質を培養系に添加し、その細胞死の増強及び阻害効果を定量的に解析し、内分泌かく乱物質がポリグルタミンが引き起こす神経変性に及ぼす影響の解析を行う。

(3) 神経系に発現する新規の核内受容体のコファクターを同定し、核内受容体と新規コファクターの相互作用における内分泌攪乱物質の作用を解析する。

(4) 上記の実験と並行してポリグルタミンを神経に特異的に発現させる種々のトランスジェニックマウスを作成し、培養細胞で効果を認めた内分泌かく乱物質が神経変性に及ぼす影響を in vivo で解析する。

本研究は、主に培養神経細胞を用いた研究であり、倫理的な問題点は極めて低い。

C. 研究結果

背景

研究分担者は、1989年～1992年の米国留学時より、核内受容体の研究に参加し、核内受容体のうち特にレチノイン酸受容体の研究において数々の業績を挙げてきた。1992年に帰国後は、核内受容体の一つであるアンドロゲン受容体の変異がもたらす球脊髄性筋萎縮症の研究にヒントを得て、神経変性疾患の研究を開始した。そして1994年に神経難病 Machado-Joseph 病の原因遺伝子を同定し、この疾患が、球脊髄性筋萎縮症やハンチントン舞踏病と同じく、原因遺伝子内の CAG の繰り返し配列の異常な伸長によって引き起こされることを見いだした。これらの原因遺伝子は、それぞれがコードする蛋白質は全く異なっていたが、原因遺伝子内の CAG の繰り返しが共通にポリグルタミンリピートに翻訳される。研究分担者はこのことに着目し、これまでに、伸長したポリグルタミンリピートを培養細胞に発現させると細胞がアポトーシスに陥ることを見だし、また、マウスの小脳の神経細胞に発現させると小脳の神経細胞が脱落し小脳失調を示すことを明らかにしてきた。

一方、近年大きな社会問題となっている内分泌かく乱物質は、その多様な作用が推測されているが、いまだ分子機構の解明に繋がる詳細な解析はなされていない。特に神経系の

影響に関しては、適当な実験系が無いことが解析を遂行する上で大きな障害となっている。本研究では、研究分担者がこれまでに行ってきた神経変性疾患の解析系と研究分担者の別の得意分野である核内受容体に関する経験を融合させ、内分泌かく乱物質の神経機能及び神経変性疾患における役割を、とりわけ伸長したポリグルタミンによって引き起こされる細胞死のリスクファクターとしての可能性を含めて解析し、内分泌かく乱物質の新たな作用とその作用点を分子レベルで明らかにすることを目指していく。

結果の詳細

I. PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) 類似蛋白質、PGC-2 の解析

1) PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) 類似蛋白質、PGC-2 の同定

神経系にはエストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR) などのリガンドが判明している核内受容体から Nurr1 をはじめとする多くのオーファン受容体が発現しており、神経系に於いて、核内受容体が脳の高次機能や脳神経系の疾患の病態を修飾する可能性が示唆されている。一方、核内受容体は共通のコファクターを利用し、標的遺伝子の転写の活性化を促すことが示されてきた。そのようなコファクターの中で、1998年に PPAR γ の coactivator として同定された PGC-1 は、唯一、褐色細胞等の特定の細胞に限局した発現をするコファクターであるという点で、他のコファクターと趣を異にしている。遺伝子ファミリーの恒として、このよ

うな場合、PGC-1 と異なる発現様式を取るであろう PGC-1 類似因子が存在する可能性が推測され、特に神経系に発現するそのような類似因子の存在を仮定し、EST データベースサーチを行ったところ複数の PGC-1 とホモロジーをもつ遺伝子断片が存在していた。そのうちの 하나가、脳において比較的是っきりとした発現が認められたため、この遺伝子を PGC-2 と名付け、全長 cDNA を単利し、解析を行うことにした。

PGC-2 は全長 1014 アミノ酸からなり、分子全体にわたり PGC-1 との相同性を示した (図 1)。PGC-1 同様 C 末端部分に RNA 結合モチーフを含み、その部分で最も高いホモロジー (52%) を示した。PGC-1 が PPAR γ と相互作用する領域及び N 末部分でも、それぞれ 47%、41% の相同性を保っていた。また、N 末部分には核内受容体コファクターに核内受容体と相互作用するモチーフとして報告されている LXXLL モチーフが 2 つ存在していた。

2) PGC2 の発現部位の解析

ノザンブロットィングを用いた解析の結果、予測通り PGC-2 は、組織間で異なる発現を示し、脳の他にも心臓、腎臓、脂肪細胞に比較的強い発現があり、卵巣・子宮・精巣等の性ホルモンに関わる臓器にも発現が認められた。一方、肝臓や膵臓の発現はわずかであることが判明した。これまでに報告されていたように、褐色脂肪細胞での PGC-1 の発現は寒冷刺激により顕著に増強されたが、同様な発現誘導は PGC-2 には観察されなかった。

しかし、脂肪細胞の分化に伴い、PPAR γ 同様の発現誘導が PGC-2 において観察された。

3) PGC-2 と核内受容体のリガンド依存性の相互作用の解析

PGC-2 は、ER、甲状腺ホルモン受容体(TR)、レチノイン酸受容体(RAR)とリガンド依存性の相互作用を示すことが、酵母 two-hybrid 法と GST pull down アッセイで確認できた。一方、PGC-2 と PPAR γ の相互作用はリガンド非存在下でも検出されたが、その相互作用は PPAR γ リガンドのチアゾリン誘導体を添加する事でさらに増強された。PGC-2 と PPAR γ の相互作用では、PGC-1 の場合と異なり中央部分の PPAR γ binding 領域ではなく、N 末にある LXXLL モチーフの内の一つが関わるということが明らかになった。一方、このモチーフに変異を導入した場合にも RAR 等とのリガンド依存性の相互作用は維持されており、PGC-2 では PPAR γ と他の受容体との結合部位を使い分けていることが判明した。

4) PGC-2 と ER の相互作用に及ぼす内分泌攪乱物質の効果

PGC-2 と ER のリガンド依存性の相互作用を two-hybrid 法で定量的に測定する系で、各種内分泌攪乱物質が、PGC-2 と ER の相互作用を誘導するかどうかについて検討した (図 2 a)。このアッセイでは、約高濃度のゲニスタインによって ER と PGC-2 の相互作用が誘導されたが、ビスフェノール、ノニルフェノールにそのような活性は認められ

なかった。

また、ER のコアクティベーターとして解析が進んでいる SRC-1 と ER の相互作用をコントロールとして用い解析を行った (図 2b)。

このアッセイでは、約高濃度のゲニスタインによって ER と PGC-2 の相互作用が誘導されたが、ビスフェノール、ノニルフェノールにそのような活性は認められなかった。

II. ポリグルタミン発現 PC12 細胞の解析

1) ポリグルタミンの核内凝集部位としての PML body の同定

ポリグルタミンが核内で凝集し、SEK1-JNK の細胞死シグナルを伝達している部位が PML body であることを明らかにした。PML body は、研究分担者が、急性前骨髄球性白血病(APL)の原因となる PML-RAR の細胞内標的部位として同定した核内のサブドメインである。また、近年報告された Pml 遺伝子のノックアウトの解析から、PML or PML body は、UV、インターフェロン、TNF、Fas、セラミド等が引き起こす細胞死に極めて重要な役割を果たすことが示されている。SEK1 や JNK はいろいろなストレスに応答して活性化されることが示されている。例えば NaCl 等の高浸透圧刺激で SEK1 は細胞質全体で強く活性化される。しかしこのような場合、必ずしも細胞死に至る訳ではない。したがって、このような結果を総括的に考えると、PML body は細胞死シグナルを伝達する重要な場となっている可能性が考えられる。この可能性の検証を次に計画している。

2) ポリグルタミンが引き起こす細胞死における各種核内受容体リガンドの効果の解析

ポリグルタミンが引き起こす細胞死に各種核内受容体のリガンドやビスフェノール・ノニルフェノール等の物質の効果を検討したが、明らかな効果は観察されなかった。

D. 考察

本年度の研究では、複数の核内受容体とリガンド依存性に相互作用する PGC-1 類似因子 PGC-2 を同定することに成功した。この分子は、従来のいわゆる核内受容体のコファクターと異なり、組織特異的な発現や分化に伴う発現の変化を示す点でも PGC-1 と似通っている。脳での発現や複数の受容体との相互作用を手がかりに、脳機能や神経疾患と関わりを解析していきたい。

我々の解析で、これまで機能不明の核内のサブドメインとして同定されていた PML body が細胞死シグナルを伝える場として機能している可能性が生じてきた。PML body には核内受容体を含む多くの転写因子のコファクターである CBP が存在することも報告されている。残念ながら、これまでに調べた各種核内受容体のリガンド類では、ポリグルタミンが引き起こす細胞死に対し、明らかな抑制・増強効果を示す物質を同定するには至らなかった。しかし、細胞死が引き起こされる場所が CBP 等が存在する PML body であることから、核内受容体を同時に発現させた場合等について、今後、もう少し解析を進めていきたい。

E. 結論

新規核内受容体のコファクター PGC-2 を同定し、高濃度のゲニスタインによって ER と PGC-2 の相互作用が誘導されることを酵母 two-hybrid 法で見いだした。

ポリグルタミンが核内で凝集し、SEK1-JNK の細胞死シグナルを伝達している部位が PML body であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 発表論文

1) Sanchez, I., Xu, C.-J., Juo, P., Kakizuka, A., Blenis, J., & Yuan, J. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 22: 623-633, 1999

2) Yasuda, S., Inoue, K., Hirabayashi, M., Higashiyama, H., Yamamoto, Y., Fuyuhiko, H., Komure, O., Tanaka, F., Sobue, G., Tsuchiya, K., Hamada, K., Sasaki, H., Takeda, K., Ichijo, H., & Kakizuka, A. Triggering of neuronal cell death by accumulation of activated SEK1 on nuclear polyglutamine aggregations in PML bodies. *Genes to Cells* 4: 743-756, 1999

2. 学会等発表 (招待講演分)

1) 垣塚 彰

ポリグルタミン病

浜松医科大学精神科セミナー

1月18日, 浜松医科大学 (静岡)

2) 垣塚 彰

遺伝性神経変性疾患に共通する発症の分子機構の解明を目指して

生命工学工業技術研究所セミナー

1月29日, 生命工学工業技術研究所 (茨城)

3) 垣塚 彰

遺伝病 京都大学医学研究科大学院講義「遺伝医学」

2月9日, 京都大学医学研究科 (京都)

4) 垣塚 彰

遺伝性神経変性疾患発症の分子機構

第3回関西遺伝子医療研究会「生体への遺伝子導入と治療への展望」2月27日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪)

4) 垣塚 彰

異常蛋白質の蓄積から見た神経変性疾患

国立循環器病センター COE シンポジウム「生体内情報伝達とその制御」3月11日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪)

5) 垣塚 彰

ポリグルタミン病とアポトーシス

第25回日本医学会総会

4月4日, 東京国際フォーラム (東京)

6) 垣塚 彰

神経変性疾患と細胞死

第3回細胞死研究会

6月26日, テレビ愛媛 EBC ホール (愛媛)

7) 垣塚 彰

ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死の分子解析 第5回 Tanabe Medical Frontier Conference

7月10日, 軽井沢プリンスホテル (軽

井沢)

8) 垣塚 彰

神経変性の分子機構：神経の死に係わる遺伝子と生化学を探して 京都大学大学院生命科学研究所シンポジウム

7月15日, 京大会館(京都)

9) 垣塚 彰

ポリグルタミン病における神経細胞死の分子メカニズム 第35回千里神経懇話会「神経細胞死と神経変性疾患」7月19日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪)

10) 垣塚 彰

神経変性疾患に共通する分子機構解明を目指して: ポリグルタミン病の解析から 第3回分子血管リモデリング研究会

8月19日, 経団連ゲストハウス(静岡)

11) 垣塚 彰

神経変性疾患に共通する普遍的分子機構を求めて 兵庫県立高齢者脳機能研究センター学術講演会 9月3日, 兵庫県立高齢者脳機能研究センター(兵庫)

12) 垣塚 彰

神経変性疾患発症の分子機構解析と治療への展望 滋賀医科大学第3内科セミナー

9月9日, 滋賀医科大学(滋賀)

13) 垣塚 彰

ポリグルタミン病における神経細胞死のメカニズム 第42回日本神経化学会

9月17日, 広島国際会議場(広島)

14) 垣塚 彰

神経変性疾患の総括的な治療にむけての戦略 ゲノム創薬フォーラム 9月28日, 日本薬学会会長井記念館ホール(東京)

15) 垣塚 彰

癌とアポトーシス 第58回日本癌学会総会

9月30日, 広島国際会議場(広島)

16) 垣塚 彰

神経変性疾患と細胞死 第72回日本生化学会 10月7日, パシフィコ横浜(横浜)

17) 垣塚 彰

ポリグルタミン病発症の分子機構 第12回千里ライフサイエンスセミナー 10月15日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪)

18) 垣塚 彰

ポリグルタミン病発症機構の分子解析と予防・治療戦略の構築を目指して 第6回鳥取大学医学部遺伝子医療セミナー

10月22日, 鳥取大学(鳥取)

19) 垣塚 彰

神経変性疾患と細胞死 大阪大学蛋白質研究所セミナー「細胞死の分子機構」

11月5日, 大阪大学蛋白質研究所(大阪)

20) 垣塚 彰

ポリグルタミン病の分子病態機構 第2回名古屋大学医学部 COE 公開シンポジウム「神経変性疾患と悪性腫瘍の分子医学」

11月11日, 鶴友会館(名古屋)

21) 垣塚 彰

疾患と遺伝子 東京医科歯科大学歯学部講義 11月12日, 東京医科歯科大学(東京)

22) 垣塚 彰

神経変性疾患と神経細胞死の分子メカニズム 学術シンポジウム「アルツハイマー病のバイオロジー」

11月20日, 都市センター(大阪)

23) 垣塚 彰

モデル動物によるトリプレットリピート病の
解明 第5回ヒューマンサイエンス総合研究
セミナー「創薬へ向けたモデル動物研究の最
前線」11月24日, 東條会館ホール(東
京)

24) 垣塚 彰

遺伝性神経変性疾患の分子解析

荒木千里記念脳外科症例検討会歳末講演会

12月11日, 大阪商工会議所(大阪)

G. 知的所有権の取得状況

特になし

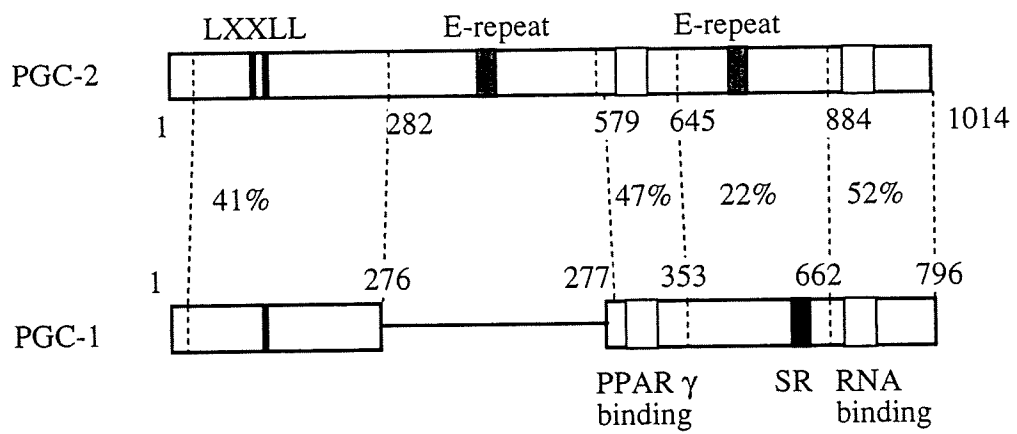
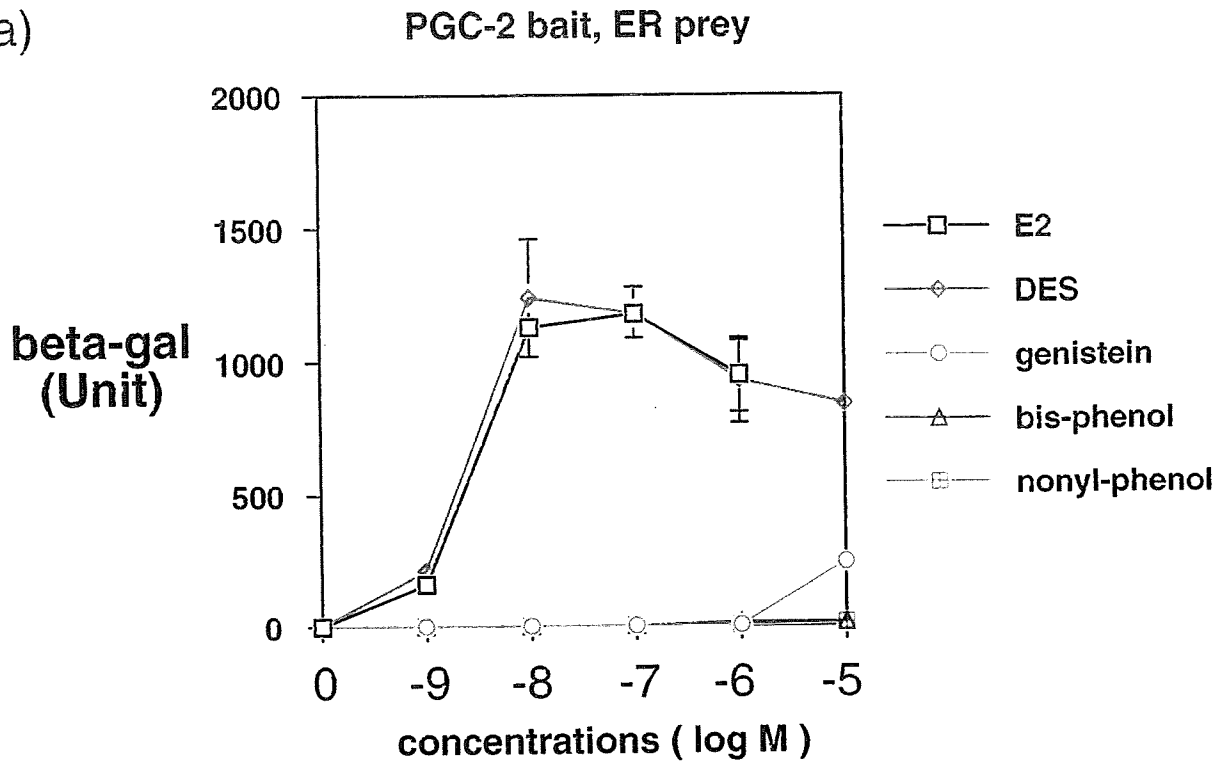


図1 PGC-1 とPGC-2 の構造の比較

a)



b)

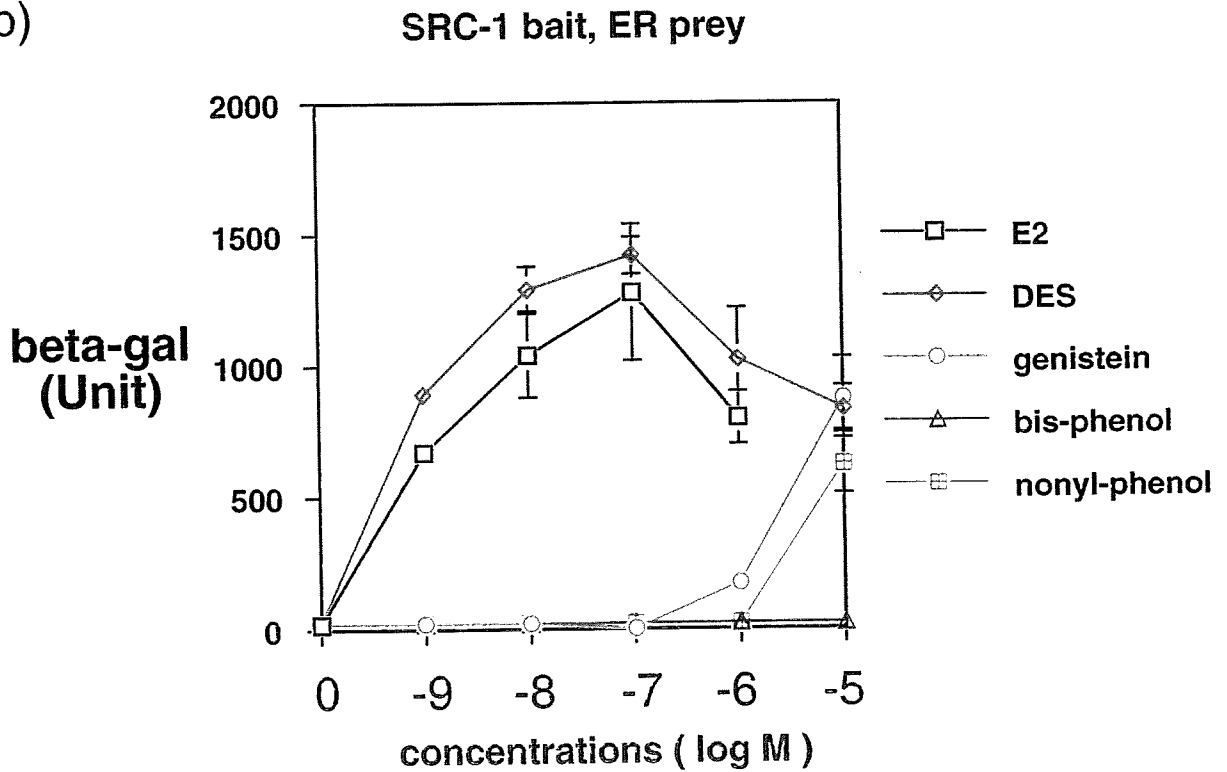


図2 酵母two-hybrid 法を用いたエストロゲン受容体とPGC-2(a)と SRC-1(b) のリガンド依存的相互作用の解析。