

20020787

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

エストロゲンによる周生期脳インプリンティングを中心とした、  
個体レベルでの核内受容体シグナル検出系の確立に関する研究

平成 15 年度 総括・分担 研究報告書

主任研究者

北海道大学大学院獣医学研究科 石塚真由美

分担研究者

北海道大学大学院獣医学研究科 藤田正一

北海道大学大学院獣医学研究科 数坂昭夫

平成 15 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告

エストロゲンによる周生期脳インプリンティングを中心とした、個体レベルでの核内受容体  
シグナル検出系の確立

石塚 真由美 -----2

### II. 分担研究報告

#### 1. ERE-レポーター遺伝子コンストラクトの作成

石塚 真由美 -----12

#### 2. 視床下部および精巣のエストロゲン及びテストステロン産生酵素の性差と 環境化学物質の影響の検討

石塚 真由美 藤田 正一 数坂昭夫 -----15

#### 3. 周生期の脳神経細胞における環境化学物質の影響

ービスフェノール A 周生期曝露による行動への影響ー

石塚 真由美 藤田 正一 -----23

#### 4. 周生期の脳神経細胞における環境化学物質の影響

ービスフェノール A 曝露後の小脳マイクロアレイ解析ー

石塚 真由美 数坂 昭夫 -----29

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

-----39

厚生労働科学研究費補助金 (萌芽的先端医療技術推進研究事業)

総括研究報告書

エストロゲンによる周生期脳インプリンティングを中心とした、  
個体レベルでの核内受容体シグナル検出系の確立

主任研究者 石塚真由美

北海道大学大学院獣医学研究科 助手  
(環境獣医科学講座)

研究要旨

生体は農医薬品、環境汚染物質の多くに対して、特に周生期に高い感受性を持っており、この時期の外來化学物質への曝露は不可逆的な毒性影響を引き起こすことが懸念されている。中でも内分泌攪乱化学物質としてエストロゲン作用を持つ化学物質への曝露は、周生期ステロイドホルモンによる脳インプリンティングを阻害し、正常な性分化を攪乱することが報告されている。周生期における脳インプリンティングには、アロマターゼによるテストステロン→エストラジオールの変換が不可欠である。しかし、この時期に生成された脳エストロゲンの標的因子は不明な点が多い。また、多くの医薬品・環境化学物質に関して、神経培養細胞を用いた曝露実験では、神経細胞に対する毒性影響は検出することができるが、周生期における脳インプリンティングへの影響や、シトクロム P450 (CYP) などの薬物代謝酵素による生体内代謝、ホルモン受容体の発現や活性化機構の臓器別の違いを考慮した、*in vivo* での環境化学物質の毒性を検出することはできない。

そこで、本研究では、エストロゲン結合サイト下流にレポーター遺伝子を結合し、ゲノムに導入することで、エストロゲンによる転写活性化を個体レベルで検出することができるトランスジェニック動物を作成し、エストロゲンの周生期における生理的機能解明と共に、*in vivo* で医薬品・環境化学物質の毒性影響を検出する系を確立することを目的とした。今年度は ERE (estrogen response element) -レポーター遺伝子導入カセットを調製し、トランスジェニック動物作成段階まで研究を進めることができた。

また、環境化学物質の周生期曝露が脳神経の発達にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするため、ラットを胎生仔期・新生仔期に低濃度の内分泌攪乱化学物質ビスフェノール A に曝露し、脳の発達や行動に対する影響を調べた。妊娠 1 日目から離乳期まで、母ラットに、連続でビスフェノール A を飲水投与(約 1.5mg/kg/day)し、得られたオス及びメスの仔ラットについて、生後 13 日齢から、自発運動量測定器 SCANET を用いて定期的に自発運動量

などを測定した。胎仔期・新生仔期のビスフェノール A 低濃度曝露によって、新生仔期のオスラットでは自発運動量が増加することが分かった。

一方、周生期のエストロゲン・アンドロゲン曝露が神経細胞アポトーシスの調節を行っていることも報告されている。そこで、cDNA マイクロアレイ法を用いて、ビスフェノール A などエストロゲン作用を持つ環境汚染物質によってその発現が変動する脳神経系の遺伝子群を解析した。ビスフェノール A 曝露によって、G 蛋白質  $\alpha$  及び  $\beta$  サブユニットの発現量が増加していた。 $\alpha$  は  $G_i$  (inhibiting) に比べ、 $G_s$  (stimulating) 蛋白の発現量が顕著に増加していた。また、神経伝達物質受容体の中で、ドパミン D2、D4 受容体、ニコチン性やムスカリン性アセチルコリン受容体の発現量も増加することが示された。ビスフェノール A 曝露のオスラット小脳では、ホスホリパーゼ C の発現量は変わっていなかったが、カルモジュリン発現量は顕著に減少していた。また、bcl-2、bax、caspase3 などのアポトーシス関連遺伝子もその発現レベルが変動しており、周生期の環境化学物質への曝露が脳神経細胞の増殖に影響を与える可能性が明らかとなった。

分担研究者 藤田正一 北海道大学・大学院獣医学研究科 教授 (環境獣医科学講座・毒性学教室)

分担研究者 数坂昭夫 北海道大学・大学院獣医学研究科 助教授 (環境獣医科学講座・毒性学教室)

#### A. 研究目的

生体は農医薬品、環境汚染物質の多くに対して、特に周生期に高い感受性を持っており、この時期の外来化学物質への曝露は不可逆的な毒性影響が懸念されている。中でも内分泌攪乱化学物質としてエストロ

ゲン作用を持つ化学物質への曝露は、周生期ステロイドホルモンによる脳インプリンティングを阻害し、正常な性分化を攪乱することが報告されている。

周生期において脳インプリンティングには、アロマターゼによるテストステロン→エストラジオールの変換が不可欠である。しかし、この時期に生成された脳エストロゲンの標的因子は不明な点が多い。また、多くの医薬品・環境化学物質に関して、神経培養細胞を用いた曝露実験では、神経細胞に対する毒性影響は検出することができるが、周生期における脳インプリンティングへの影響や、シトクロム P450 (CYP) などの薬物代謝酵素による生体内代謝、ホルモン受容体の発現や活性化機構の臓器別の

違いを考慮した、in vivo での環境化学物質の毒性を検出することはできない。

そこで、本研究では、エストロゲン結合サイト下流にレポーター遺伝子を結合し、ゲノムに導入することで、エストロゲンによる転写活性化を個体レベルで検出することができるトランスジェニック動物を作成し、エストロゲンの周生期における生理的機能解明と共に、in vivo で医薬品・環境化学物質の毒性影響を検出する系を確立することを目的とする。また、本研究によって、エストロゲンのみならず、アンドロゲンや甲状腺ホルモンなど、核内受容体による幅広いホルモンホメオスタシス維持機構への、医薬品や環境化学物質の影響を検出する系の基礎を確立することができる。

## B. 研究方法

エストロゲンによる脳インプリンティングに対する医薬品や環境化学物質の毒性は未知数であり、スクリーニングが行われている例は少ない。これは、個体レベルでのアッセイ系が確立していないことが主な原因として挙げられる。また、エストロゲンの周生期脳神経系における標的因子も不明である。本研究では、これらの点について解決するため、トランスジェニック動物の作成を試みた。また周生期の環境化学物質への曝露が脳神経の発達にどのような影響を与えるのかを調べるため、妊娠動物を環境化学物質に曝露させ、行動に及ぼす影響や遺伝子発現レベルの変動について明ら

かにすることを目的として、以下の研究を行った。

### 1. レポーター遺伝子の作成

レポーター遺伝子としてルシフェラーゼおよび LacZ 遺伝子を組み込んだベクターを作成し、トランスジェニック動物の作成に最適な ERE (estrogen response element) 配列の連結数や、ERE の種類などを検討する。ERE 配列については、プロゲステロン受容体やピテロジェニン上流域のエンハンサー領域に位置する ERE を中心に、in vivo でレポーターアッセイを行う際にどの配列が最も適しているのかについて検討を行う。

### 2. 視床下部性的二型核および精巣に発現する性ステロイド産生酵素の性差と環境化学物質の影響

ラットのステロイド  $5\alpha$ 還元酵素 type2 およびアロマトラーゼの塩基配列から特異的なプライマーを設計した。妊娠 20 日齢のラットのオス及びメスから RNA を抽出し、real-time PCR 7700 (ABI) を用いて各ステロイドホルモン産生酵素の mRNA 発現量を定量した。また、ラット未成熟オスにフタル酸エステルであるジエチルヘキシルフタル酸を 0、100mg、1000mg/kg/day で 5 日間経口投与し、精巣におけるテストステロン代謝活性にどのような影響を及ぼすのかを解析した。

### 3. 周生期における環境化学物質曝露が脳神経に与える影響の解明

#### ①ビスフェノール A 周生期曝露による行動への影響

妊娠 6 日目からビスフェノール A (5mg/L) 濃度で飲料水に混ぜ、ラットに毎日経口投与(コントロール群 4 匹、ビスフェノール A 群 4 匹)した。生後 1 日目でラット新生仔の匹数を調整し、1 腹メス 4 匹、オス 4 匹に調整し、生後 7 日目から、自発運動量および探索行動量の測定を SCANET を用いて定期的に行った。

#### ②ビスフェノール A 周生期曝露脳のマイクロアレイ解析

妊娠 6 日目からビスフェノール A (0.25mg/kg) あるいはコントロールとしてコーンオイルをラットに毎日経口投与(コントロール群 4 匹、ビスフェノール A 群 4 匹)した。生後 1 日目でラット新生仔の匹数を調整し、1 腹メス 4 匹、オス 4 匹に調整し、生後 7 日目に新生仔から脳(小脳)を採取し、RNA 抽出を行って、コントロール群とビスフェノール A 曝露群の脳(各 4 匹分を pool)において発現量に差のある mRNA を解析した。解析には、クロンテック RAT TOXICOLOGY Ver1.0 グラスアレイを用い、GSI Lumonics ScanArray 4000 によってスキヤニングした。

#### ③ビスフェノール A が小脳細胞の初代培養に与える影響

細胞増殖に対するビスフェノール A の影響を調べるために、生後 2 日齢のラット新生仔から小脳細胞を採集し、DMEM によってポリリジンコートディッシュを用いて初代培養を行った。ビスフェノール A はプレ培養 2 日後に 100nM、100uM の濃度で曝露し、細胞増殖率を WST-1 法によって測定した。また、増殖したグリア細胞のマーカー蛋白 GFAP (glial fibrillary acid protein) 発現量を、GFAP 抗体を用いてウェスタンブロット法により定量した。

#### (倫理面への配慮)

ヒトの組織及び動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。

### C. 研究結果

#### 1. ERE レポーターカセットを組み込んだトランスジェニック動物の作成

エストロゲン受容体結合配列をプロモーター・エンハンサー領域にもつ遺伝子は、プロゲステロン受容体やピテロジェニンが報告されている。そこで、ヒト・プロゲステロン受容体上流域 ERE をルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれているレポーターベク

ターPGL3 (プロメガ) に組み込んだところ、ヒト乳癌細胞 MCF7 を用いたレポーターアッセイでは、エストロゲンだけではなく、甲状腺ホルモンによっても転写活性が上昇することが分かった。一方、ピテロジェニン上流のエストロゲン応答配列はGATCCCGCAGGTCA CAGTGACCTGを利用した。ピテロジェニン ERE を 1×、2×、3×、4×、5×配列連結させたところ、MCF7 を用いたレポーターアッセイにおいて、3×ERE で最も高い転写活性を示した。

現在、3×ERE-laxZ に TK プロモーターを連結させたカセットを用いて 200 個の前核期卵に導入し、トランスジェニック動物を作成している。

## 2. 視床下部性的二型核および精巣に発現する性ステロイド産生酵素の性差と環境化学物質の影響

### ①SDN-POA における性ホルモン産生酵素の発現量の性差

周生期のアロマターゼ発現量はオスで高い傾向を示したが、顕著な性差は認められなかった。また、同時期のステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素発現量はメスで高い傾向を示した。しかし、有意な性差は認められなかった。

### ② 精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素群への環境化学物質の影響

ジエチルヘキシルフタル酸暴露によって血中テストステロン濃度は減少した。精巣における 5 $\alpha$ 還元酵素活性は、ジエチルヘキシルフタル酸暴露によって上昇するこ

とが明らかとなった。また、ジエチルヘキシルフタル酸暴露は精巣のアロマターゼ mRNA 発現レベルを減少させることが明らかとなった。

## 3. 周生期における環境化学物質曝露が脳神経に与える影響の解明

### ①ビスフェノール A 周生期曝露による行動への影響

飲水投与ビスフェノール A 曝露によって、仔ラットのオス、メスともに体重や産仔数に変化は見られなかった。しかし、ビスフェノール A 曝露群では、オス・メスともに eyelid-opening の早期化が観察された。また、生後 7 日目の視床下部重量について、ビスフェノール A 曝露群とコントロール群との間に差は見られなかったが、小脳重量はオスで有意に減少していた。

SCANET を用いた運動量の測定から、胎仔期・新生仔期のビスフェノール A 低濃度曝露によって、新生仔期のオスラットでは自発運動量が増加することが分かった。しかし、メスでは自発運動量に変化がなかったため、ビスフェノール A 曝露によって、この時期の運動量の性差が消失することが明らかとなった。また、性成熟期の 49 日齢では、オスラットの自発運動量及び探索行動が減少することが明らかとなった。この減少は、その後、aging にともなって消失することも明らかとなった。メスでは、ビスフェノール A による自発運動量及び探索行動の変化は観察されなかった。

## ②ビスフェノール A 周生期曝露脳のマイクロアレイ解析

ビスフェノール A を曝露した生後 7 日目の新生オスラットの小脳において、発現量が減少する遺伝子は、約 50 種、発現レベルが上昇する遺伝子は約 120 種が同定された。

今回の解析では、ビスフェノール A 曝露によって、小脳に発現する G 蛋白質  $\alpha$  及び  $\beta$  サブユニットの発現量が増加していた。 $\alpha$  は Gi (inhibiting) に比べ、Gs (stimulating) 蛋白質の発現量が顕著に増加していた。また、神経伝達物質受容体の中で、ドパミン D2、D4 受容体、ニコチン性やムスカリン性アセチルコリン受容体の発現量も増加することが示された。

ビスフェノール A 曝露のオスラット小脳では、カルモジュリン発現量は顕著に減少していた。カルモジュリン結合性の ras ファミリー・Kir (kinase-inducible ras-like) の発現量は変わらず、PKC (protein kinase C) や同じく ras ファミリーである Rin (ras-like protein in neurons) の発現量は増加していた。また、NMDA (N-methyl-D-aspartate receptor) 受容体 2A、2B、AMPA (3H-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate) 受容体、GluR2 (glutamate receptor 2) 発現量に変動は見られなかった。

一方、ビスフェノール A の曝露によって、mGluR (metabotropic glutamate receptor) のうち、mGluR 2、mGluR 5、mGluR 6、mGluR 7 の発現量は増加してい

たが、小脳に分布の多い GluR1 の発現量に変化は見られなかった。

## ③小脳初代培養に対するビスフェノール A 曝露の影響

初代小脳培養細胞 (グリア細胞) では、ビスフェノール A の曝露によって細胞増殖が抑制されることが示された。グリア細胞の中でアストロサイトのマーカー蛋白である GFAP 発現レベルは、蛋白量あたりでは変動は見られなかった。

## D. 考察

### 1. トランスジェニック動物の作成

プロゲステロン受容体上流域の ERE では、エストロゲンだけではなく、甲状腺ホルモンに対しても転写活性を有することから、本研究で使用するレポーターカセットにはビテロジェニン上流域の ERE 配列を使用することにした。また、ERE 数を変えて行ったレポーターアッセイ実験から、MCF7 において、3×ERE で最も高い転写活性を示した。そこで、3×ERE にプロモーターを連結した。TK プロモーターの下流に lacZ 遺伝子コーディング領域と polyA 及びイントロンを組み込んだ。

現在、200 個の前核期卵に入れ、トランスジェニック動物を作成している。

### 2. 視床下部性的二型核および精巣に発現する性ステロイド産生酵素の性差

#### ①SDN-POA における性ホルモン産生酵素の発現量の性差



今回の結果から、これまでの報告とは異なり、胎生期ラットの視床下部におけるアロマターゼやステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素の発現レベルには有意な性差は認められなかった。アロマターゼ/ステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素の mRNA 発現レベル比は、オスで高い傾向を示したが、同様に有意な性差は認められなかった。従って、脳インプリンティングには、酵素群の発現レベルや活性ではなく、周生期のテストステロン量の性差が重要である可能性が考えられた。

## ② 精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素群への環境化学物質の影響

ジエチルヘキシルフタル酸曝露結果によって、精巣でエストロゲン産生酵素であるアロマターゼ mRNA 発現レベルが減少することが分かった。これまでの報告と今回の報告を合わせ、精巣におけるテストステロン生合成・異化代謝酵素群は、フタル酸エステル（ジエチルヘキシルフタル酸：DEHP 及びジブチルフタル酸 DBP）によって影響を受けることが考えられた。

## 3. ビスフェノール A 曝露による脳神経の発達や行動への影響

### ① ビスフェノール A 曝露による行動への影響

エストロゲン曝露によって、eyelid-opening の早期化が報告されている。また、eyelid-opening には明らかに性差が存在し、メスはオスよりも早期である。したがって、今回ビスフェノール A 曝露で同様の

結果が得られたのは、エストロゲン作用によるものと考えられた。

また、生後 13 日齢のオスでは、ビスフェノール A 投与群はコントロール群に比べて、有意な自発運動量の増加が見られた。また、オス及びメス自発運動量には性差が存在するが、オスでは、精製熟時の 49 日齢において、ビスフェノール A 投与群はコントロール群に比べて、有意に自発運動量および探索行動量が増加した。オスで観察されたいずれの変化も、メスでは顕著ではなかった。従って、胎生仔期・新生仔期のビスフェノール A への曝露が、特に雄において、新生仔期のホルモンによる脳インプリンティングを変化させる可能性が考えられた。

### ② ビスフェノール A 曝露による小脳発現遺伝子への影響

ビスフェノール A の曝露によって、アセチルコリンやドパミンなどの神経伝達に影響がある可能性が考えられた。実際、in vitro 実験では、ビスフェノール A 曝露によって、アセチルコリンによるチャネル活性化・細胞膜脱分極が阻害されることが報告されている。

一方、ビスフェノール A 曝露によって、生後 7 日目の小脳では、アポトーシスを誘発する bax などの遺伝子発現が増加していた。これまで、グリア細胞において、bax 活性化はアポトーシスを引き起こすことが報告されている。また、カルモジュリンの発現も顕著に減少していた。ラットグリア

由来細胞や PC12 細胞において、カルモジュリン機能の抑制が、アポトーシスを誘発することも報告されている。従って、ビスフェノール A 曝露で周生期の神経細胞の正常な分化・発育に影響がある可能性が考えられた。

## E. 結論

1. レポーター遺伝子コンストラクトの作成  
エストロゲンの genomic なシグナル検出には、ピテロジェニン ERE を用いる方がより特異的であり、また ERE 数は 3 連結で最も高い転写活性を示した。

2. 周生期脳インプリンティングに関する酵素群の性差と環境化学物質の影響

アロマターゼ発現レベルが高いことが報告されている胎生 20 日齢のラットでは、アロマターゼおよびステロイド  $5\alpha$ 還元酵素の mRNA 発現レベルに顕著な性差は見られなかった。一方、環境化学物質への曝露が、周生期脳インプリンティングに重要な精巢のテストステロンの生合成・代謝酵素の発現や放出に影響を与えることが示唆された。

3. ビスフェノール A の周生期曝露による脳神経への影響

ビスフェノール A の胎仔期及び新生仔期曝露は、新生仔期及び性成熟期のラットの自発運動量及び探索行動に影響を与えることが分かった。これらの行動の変化には性差が見られることから、周生期のホルモ

ンによる脳インプリンティング機構に、ビスフェノール A が影響を及ぼしている可能性が考えられた。また、ビスフェノール A 曝露群は生後 7 日齢において、小脳重量の減少が観察された。体重への重量比について、視床下部には影響は見られなかった。そこで、生後 7 日齢のラット小脳を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、カルモジュリンや bax 遺伝子の発現量が減少していることが明らかとなった。また、小脳初代培養細胞にビスフェノール A を曝露したところ、細胞増殖が抑えられることが明らかとなった。従って、この時期の環境化学物質への曝露は、正常な脳神経の発達に影響を与える可能性が明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. The effect of bisphenol A on the behavior following uterus and lactational exposure. (投稿準備中)

Ishizuka M, Kim Eun-Young, Iwata H, Tateishi Y, Shimamoto Y, Yoon Seok-Joo, Maruyama Y, Chiba I, Ibrahim SZ, Kazusaka A, Fujita S. The effect of bisphenol A on the cerebellum development in neonatal male rats following uterus and lactational exposure. (投稿中)

Ishizuka M, Yonemoto J, Tohyama C, Sone H. Perinatal Exposure to Low Doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Alters Sex-dependent Expression of Hepatic CYP2C11 and 5 $\alpha$ -reductase. (投稿中)

Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats. Arch Toxicol. (in press)

Sakamoto KQ, Nakai K, Aoto T, Yokoyama A, Ushikoshi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Cytochrome P450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. Chemosphere. 2003 May;51(6):491-500.

Sakamoto KQ, Kunisue T, Watanabe M, Masuda Y, Iwata H, Tanabe S, Akahori F, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Accumulation patterns of polychlorinated biphenyl congeners and organochlorine pesticides in Steller's sea eagles and white-tailed sea eagles, threatened species, in Hokkaido, Japan.

Environ Toxicol Chem. 2002 Apr;21(4):842-7.

Chiba I, Sakakibara A, Iwata TH, Ishizuka M, Tanabe S, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S. Hepatic microsomal cytochrome p450s and chlorinated hydrocarbons in largha and ribbon seals from Hokkaido, Japan: differential response of seal species to Ah receptor agonist exposure. Environ Toxicol Chem. 2002 Apr;21(4):794-806.

## 2. 学会発表

1) 第 133 回日本獣医学会 (平成 14 年春)

① 妊馬ホルモン・Equilenin による異物代謝酵素の誘導

② マウス海馬におけるビスフェノール A 投与の影響

2) 北海道薬物作用談話会

雌性ホルモンが Ah レセプター介在性・非介在性 CYP1A サブファミリー発現機構に及ぼす影響

3) 環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会  
Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats

4) 14<sup>th</sup> International symposium on  
microsomes and drug oxidations  
Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)  
Regulates levels of P450 and their  
metabolic activities in rat testis  
microsomes

5) 第135回日本獣医学会

①マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウ  
ロボルフィリン生成の制御機構—鉄による  
効果—

② Down-regulations of expressions of  
PPAR-alpha and AhR target genes by AhR  
and PPAR-alpha ligands, respectively

3. 総説

石塚真由美、藤田正一 「化学物質による  
野生生物及び生態系への影響とは」化学物  
質と環境 2003 58:7-10

4. 著書

石塚真由美、岩田久人、藤田正一：トキシ  
コロジー7 章 環境毒性（日本トキシコロ  
ジー学会）2002（290-303）

板倉隆夫、石塚真由美、藤田正一：シトク  
ロム P450（講談社サイエンティフィック）  
印刷中

藤田正一「臨床薬物代謝化学」（廣川書  
店）印刷中

Ishizuka M. Yamamoto Y. Takada A.  
Kazusaka A. Fujita S. The loss of  
enzyme activities by a single amino  
acid substitution of a newly cloned  
rabbit CYP2D isozyme, CYP2D24.  
International Congress Series. 2002  
1223:121-126

厚生労働科学研究費補助金 (萌芽的先端医療技術推進研究事業)  
分担研究報告書

ERE-レポーター遺伝子コンストラクトの作成

主任研究者 石塚真由美

北海道大学大学院獣医学研究科  
環境獣医科学講座 助手

研究要旨

生体は農医薬品、環境汚染物質の多くに対して、特に周生期に高い感受性を持っており、この時期の外来化学物質への曝露は不可逆的な毒性影響が懸念されている。中でも内分泌攪乱化学物質としてエストロゲン作用を持つ化学物質への曝露は、周生期ステロイドホルモンによる脳インプリンティングを阻害し、正常な性分化を攪乱することが報告されている。しかし、エストロゲンによる脳インプリンティングに対する医薬品や環境化学物質の毒性は未知数であり、スクリーニングが行われている例は少ない。これは、個体レベルでのアッセイ系が確立していないことが主な原因として挙げられる。

本研究では、エストロゲン結合サイト下流にレポーター遺伝子を結合し、ゲノムに導入することで、エストロゲンによる転写活性化を個体レベルで検出することができるトランスジェニック動物を作成することを目的とする。また、エストロゲンの周生期における生理的機能解明と共に、*in vivo* で医薬品・環境化学物質の毒性影響を検出する系を確立することを目的とする。本研究によって、エストロゲンのみならず、アンドロゲンや甲状腺ホルモンなど、核内受容体による幅広いホルモンホメオスタシス維持機構への、医薬品や環境化学物質の影響を検出する系の基礎を確立することができる。

本年度は、レポーターに用いるコンストラクトの作成を行った。ERE (estrogen response element) として、エストロゲン特異的に転写活性を示すピテロジェニン 5' 上流エンハンサー域を用いた。プロモーターとして、TK プロモーターを利用し、lacZ を連結させたカセットを調製した。

A. 研究目的

哺乳類では周生期脳のステロイドホルモンへの曝露が性成熟後の性行動を決定し

ていることが明らかとなっている。従って、この時期の内分泌攪乱化学物質への曝露は、ステロイドホルモンによる脳インプリンティングを阻害し、正常な性分化や性成熟後の性行動を攪乱することが懸念される。これまでの研究においても、ダイオキシン類など環境化学物質への周生期における曝露が、脳に発現するアロマターゼやステロイド5 $\alpha$ 還元酵素の活性や発現レベルを変動させ、性ホルモンによる脳インプリンティングに影響を与えることが示唆されている。

周生期における脳インプリンティングには、アロマターゼ (CYP19) によるテストステロン $\rightarrow$ エストラジオールの変換が不可欠である。しかし、この時期に生成された脳エストロゲンの標的因子は不明な点が多い。また、多くの環境化学物質に関して、神経培養細胞を用いた曝露実験では、神経細胞に対する毒性影響は検出することができるが、周生期における脳インプリンティングへの影響や、シトクロム P450 (CYP) などの薬物代謝酵素による生体内代謝、ホルモン受容体の発現や活性化機構の臓器別の違いを考慮した、*in vivo* での環境化学物質の毒性を検出することはできない。従って、エストロゲンの周生期における生理的機能解明と共に、*in vivo* で環境化学物質の毒性影響を検出する系を確立することが必要である。

環境化学物質の内分泌攪乱作用スクリーニングは、最も簡便な方法として培養細胞を用いたレポーターアッセイなどが挙げられる。しかし、培養細胞において、核内

受容体結合配列下流にレポーター遺伝子を連結させたプラスミドを transient に導入する従来のレポーターアッセイ法では、臓器・細胞によって異なる環境化学物質の毒性影響を、細胞レベルでのエンドポイントでしか検出することができない。環境化学物質は生体内で CYP などの代謝酵素によって代謝を受けるため、その毒性発現は、従来のレポーターアッセイでは網羅しきれないことが考えられる。実際、薬物代謝酵素によって代謝を受けたビスフェノール A など環境化学物質が、エストロゲン受容体との結合性を増強することが報告されている。また、核内受容体であるホルモン受容体に関しては、既に、由来する臓器・細胞によって、転写に関与する共役因子などその活性化機構が異なることが報告されている。従って、環境化学物質毒性評価に関しては、クリアランスや代謝的活性化機構、さらに臓器・細胞別の受容体活性化機構をも含めた、個体レベルでの毒性スクリーニング手法の確立が不可欠である。そこで、本研究では、エストロゲン結合サイト下流にレポーター遺伝子を結合し、ゲノムに導入することで、エストロゲンによる転写活性化を個体レベルで検出することができるトランスジェニック動物を作成し、環境化学物質に関して、これらの要素を含めた個体レベルでのレポーターアッセイを行う系を確立することを目的とする。

## B. 研究方法

レポーターコンストラクトの作成

レポーター遺伝子としてルシフェラーゼおよび LacZ 遺伝子を組み込んだベクターを作成し、トランスジェニック動物の作成に最適な ERE (estrogen response element) 配列の連結数や、ERE の種類などを検討する。ERE 配列については、プロゲステロン受容体やピテロジェニン上流域のエンハンサー領域に位置する ERE を中心に、in vivo でレポーターアッセイを行う際にどの配列が最も適しているのかについて検討を行う。

#### (倫理面への配慮)

ヒトの組織及び動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。

#### C. 結果

エストロゲン受容体結合配列をプロモーター・エンハンサー領域にもつ遺伝子は、プロゲステロン受容体やピテロジェニンが報告されている。そこで、血液ゲノムからクローニングしたヒト・プロゲステロン受

容体上流域 ERE をルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれているレポーターベクターPGL3 (プロメガ) に組み込んだところ、ヒト乳癌細胞 MCF7 を用いたレポーターアッセイでは、エストロゲンだけではなく、甲状腺ホルモンによっても転写活性が上昇することが分かった。一方、ピテロジェニン上流域のエストロゲン応答配列はGATCCCGCAGGTCACAGTGACCTGを利用した。ピテロジェニン ERE を1×、2×、3×、4×、5×配列連結させたところ、MCF7 を用いたレポーターアッセイにおいて、3×ERE で最も高い転写活性を示した。

#### D. 考察

プロゲステロン受容体上流域の ERE では、エストロゲンだけではなく、甲状腺ホルモンに対しても転写活性を有することから、本研究で使用するレポーターカセットにはピテロジェニン上流域の ERE 配列を使用することにした。また、ERE 連結数を変えて行ったレポーターアッセイ実験から、MCF7 において、3×ERE で最も高い転写活性を示した。そこで、3×ERE にプロモーターを連結した。TK プロモーターの下流に lacZ 遺伝子コーディング領域と polyA 及びイントロンを組み込んだ。現在、200 個の前核期卵に入れ、トランスジェニック動物を作成している。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

視床下部および精巣のエストロゲン及びテストステロン  
産生酵素の性差と環境化学物質の影響の検討

主任研究者 石塚真由美 北海道大学大学院獣医学研究科  
環境獣医科学講座 助手

分担研究者 藤田正一 北海道大学・大学院獣医学研究科  
環境獣医科学講座 教授

分担研究者 数坂昭夫 北海道大学・大学院獣医学研究科  
環境獣医科学講座 助教授

研究要旨

胎生子期・新生仔期のラットあるいはマウスの視床下部では、ステロイドホルモンによるインプリンティングが起り、性成熟後の性行動が調節されていることが分かっている。周生期には、オスの精巣からテストステロンが一時的に放出され、この雄性ステロイドホルモンが脳に到達することで、視床下部に発現する CYP19（アロマターゼ）がテストステロンをエストロゲンに変換し、エストロゲン受容体などを介して脳のインプリンティングが行われている。この時期のアロマターゼ発現はオスで活性が高く、また、アロマターゼの発現がテストステロンを含むアンドロゲンによって誘導されるとの報告もある。テストステロンはステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素によって、よりアンドロゲン活性の強いジヒドロテストステロンに変換される。しかし、RT-PCR を用いたプレ実験では、この時期の視床下部におけるアロマターゼ発現量に性差は認められなかった。そこで、組織的に性差が顕著である SDN-POA（sexually dimorphic nucleus of the preoptic area：性的二型核）における、エストロゲン産生酵素アロマターゼ、及び、アンドロゲン産生酵素であるステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素について、mRNA 発現レベルの定量を行った。

また、精巣から放出されるテストステロンは、周生期脳インプリンティングに不可欠である。しかし、環境化学物質への曝露がテストステロン産生酵素の活性や発現量に影響を与える可能性は考えられる。そこで、内分泌攪乱化学物質の一つであるフタル酸エステルをラ



ットに投与し、精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素への影響について調べた。フタル酸エステル曝露群では、血中テストステロン濃度が減少し、また、精巣に発現するテストステロン代謝酵素の発現及び活性を変動させることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

胎生仔期・新生仔期のラットあるいはマウスの視床下部では、ステロイドホルモンによるインプリンティングが起り、性成熟後の性行動が調節されていることが分かっている。周生期には、オスの精巣からテストステロンが一時的に放出され、それが脳に到達することで、視床下部に発現する CYP19 (アロマターゼ) がテストステロンをエストロゲンに変換することで脳のインプリンティングが行われている。この時期のラット脳に BBB (blood-brain barrier) は形成されていない。しかし、血中に大量に発現する $\alpha$ -フェトプロテインによってエストロゲンがトラップされ、テストステロンのみが脳に到達すると考えられている。また、この時期のアロマターゼ発現はオスで活性が高く、さらに、アロマターゼがテストステロンを含むアンドロゲンによって誘導されるとの報告もある。テストステロンはステロイド  $5\alpha$ 還元酵素によって、よりアンドロゲン活性の強いジヒドロテストステロンに変換される。しかし、これまでの研究では、視床下部セクションにおいて RT-PCR を用いこれらの性ホルモン産生酵素の発現量を半定量したところ、プレ実験では、この時期の視床下部に

おけるアロマターゼ発現量に性差は認められなかった。

視床下部において、SDN-POA (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area) はメスよりもオスにおいて顕著に大きく、この部位の性差は神経細胞のアポトーシスがテストステロン-エストラジオールによって抑制されることが原因と考えられている。そこで、この SDN-POA において、エストロゲン産生酵素アロマターゼ、及び、アンドロゲン産生酵素であるステロイド  $5\alpha$ 還元酵素について、mRNA 発現レベルの定量を行った。

一方で、周生期のステロイドホルモンによる脳インプリンティングは、精巣からのテストステロン放出が重要であることが分かっている。ダイオキシン類などの環境化学物質への曝露は、血中のホルモン濃度を変動させることが報告されている。また、ビスフェノール A やフタル酸エステルのような環境化学物質は、肝臓や子宮に発現するステロイド  $5\alpha$ 還元酵素やアロマターゼの発現を変動させることが報告されている。そこで、テストステロンの生合成・分泌の主要臓器である精巣において、環境化学物質の一つフタル酸エステル曝露がステロイドホルモン代謝酵素群にどのような影響を与えるのかを調べた。

## B. 研究方法

### 1. SDN-POA における性ホルモン産生酵素の発現量の性差

ラットのステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素 type2 およびアロマトラーゼの塩基配列から特異的なプライマーを設計した。妊娠 20 日齢のラットのオス及びメスから RNA を抽出し、real-time PCR 7700 (ABI) を用いて各ステロイドホルモン産生酵素の mRNA 発現量を定量した。

### 2. 精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素群への環境化学物質の影響

未成熟オスラットにフタル酸エステルであるジエチルヘキシルフタル酸を 0、100mg、1000mg/kg/day で 5 日間経口投与し、精巣におけるテストステロン代謝活性にどのような影響を及ぼすのかを調べた。テストステロン生合成に関与する 17 $\beta$ HSD、活性型テストステロンジヒドロテストステロン生合成に関与するステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素、また、テストステロンを水酸化し、テストステロンのクリアランスに関与する CYP3A 及び CYP2C11、テストステロンをエストロゲンに変換するアロマトラーゼ (アロマトラーゼ) などについて発現や代謝活性を HPLC-UV やウェスタンブロッティング法、RT-PCR 法を用いて測定した。血中テストステロン濃度は ELISA 法により解析した。

(倫理面への配慮)

ヒトの組織及び動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。

## C. 結果

### 1. SDN-POA における性ホルモン産生酵素の発現量の性差

#### ①アロマトラーゼ mRNA 発現量

図にアロマトラーゼの胎生 20 日齢のオス及びメスの mRNA 発現量を示した。この時期のアロマトラーゼ発現量はオスで高い傾向を示したが、顕著な性差は認められなかった (Figure 1)。

#### ②ステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素 mRNA 発現量

図にステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素の胎生 20 日齢のオス及びメスの mRNA 発現量を示した。この時期のステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素発現量はメスで高い傾向を示した。しかし、有意な性差は認められなかった (Figure 1)。

### 2. 精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素群への環境化学物質の影響

ジエチルヘキシルフタル酸暴露によって血中テストステロン濃度は減少した

(Figure 3)。そこで、精巣においてテストステロン生合成に関与する  $17\beta$ HSD 活性を測定した。これまで  $17\beta$ HSD 発現が減少するとの報告があったが、今回の結果では、 $17\beta$ HSD 活性に大きな変化は認められなかった。テストステロンを水酸化する CYP3A、CYP2C11 の発現量及び活性はジエチルヘキシルフタル酸曝露で増加していた。

$5\alpha$  還元酵素はテストステロンをよりアンドロゲン受容体への結合性が強いジヒドロテストステロンに変換する。ジヒドロテストステロン感受性は精巣よりも前立腺で顕著とされている。また、肝臓においても  $5\alpha$  還元酵素が発現することが報告されている。今回の結果から、精巣における  $5\alpha$  還元酵素活性は、ジエチルヘキシルフタル酸曝露によって上昇することが明らかとなった (Figure 4)。しかし、肝臓における  $5\alpha$  還元酵素活性はジエチルヘキシルフタル酸によって変動を受けなかった。

アロマターゼは P450 分子種のひとつで、アンドロゲンをエストロゲンに変換する。アロマターゼノックアウトマウスは性行動に不可欠であり、また、精巣のエストロゲンは精子形成・維持に重要であることが最近の研究で報告されている。今回の結果では、ジエチルヘキシルフタル酸曝露は精巣のアロマターゼ mRNA 発現レベルを減少させることが明らかとなった (Figure 5)。

#### D. 考察

#### 1. SDN-POA における性ホルモン産生酵素の発現量の性差

胎生 18-20 日齢の視床下部においてアロマターゼ発現はピークを迎えるが、その発現パターンは精巣からのテストステロン周生期放出 (テストステロンシャワー) とリンクしていると考えられている。発生初期の神経に分布するアロマターゼはアンドロゲン曝露で発現が誘導されるとの報告もあるが、アロマターゼ 5' 上流域にはアンドロゲン受容体結合サイトは見つかっておらず、アロマターゼの誘導機序については不明な点が多い。

今回の結果から、これまでの報告とは異なり、胎生期ラットの視床下部におけるアロマターゼやステロイド  $5\alpha$  還元酵素の発現レベルには有意な性差は認められなかった。アロマターゼ/ステロイド  $5\alpha$  還元酵素の mRNA 発現レベル比は、オスで高い傾向を示したが (Figure 2)、同様に有意な性差は認められなかった。従って、脳インプリンティングには、酵素群の発現レベルや活性ではなく、周生期のテストステロン量の性差が重要であると考えられた。

#### 2. 精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素群への環境化学物質の影響

ジエチルヘキシルフタル酸曝露結果によって、精巣でエストロゲン産生酵素であるアロマターゼ mRNA 発現レベルが減少することが分かった。フタル酸エステルは PPAR(peroxisome-proliferator activated receptors)の中でも、特に PPAR $\alpha$  に結合

し、CYP4A など、脂肪酸代謝酵素をはじめとするその標的遺伝子の転写を活性化する。一方、ゼブラフィッシュでは、アロマターゼの 5' 領域に PPAR $\alpha$  結合サイトが存在し、実験動物に対する PPAR $\alpha$  リガンド WY-14643 の投与はアロマターゼ発現レベルを上昇させることが分かっている。ジエチルヘキシルフタル酸は PPAR $\alpha$  のリガンドであるが、その代謝物 MEHP (モノエチルヘキシルフタル酸) はアロマターゼ発現レベルを転写レベルで抑制することが報告された。また、PPAR $\gamma$  リガンド thiazolidinediones の一種 troglitazone はエストロゲン産生酵素・アロマターゼのプロモーター領域において、PPAR  $\gamma$  を介して、アロマターゼの転写活性を阻害することが報告されている。従って、PPAR $\alpha$  リガンドが代謝を受け、代謝物が PPAR $\gamma$  など他の PPAR isoform に結合し、その機能を活性化・あるいは阻害してステロイド生合成あるいはその代謝に影響を及ぼす可能性が考えられる。

また、これまでの報告と今回の報告を合わせ、精巣におけるテストステロン生合成・異化代謝酵素群は、フタル酸エステル (ジエチルヘキシルフタル酸: DEHP 及びジブチルフタル酸 DBP) によって図のような影響を受けることが考えられた (Figure 6)。

## E. 結論

胎生仔期でアロマターゼ発現レベルが高い胎生 20 日齢のラットでは、アロマタ

ーゼおよびステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素の mRNA 発現レベルに性差は見られなかった。

一方、環境化学物質への曝露が、周生期脳インプリンティングに重要な精巣のテストステロンの生合成・代謝酵素の発現に影響を与えることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats. Archives of Toxicology (in press)

### 2. 学会発表

1) 第 133 回日本獣医学会 (平成 14 年春)

① 妊馬ホルモン・Equilenin による異物代謝酵素の誘導

② マウス海馬におけるビスフェノール A 投与の影響

2) 北海道薬物作用談話会

雌性ホルモンが Ah レセプター介在性・非介在性 CYP1A サブファミリー発現機構に及ぼす影響

3) 環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会