

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

内分泌かく乱化学物質の生体影響 に関する研究

— 特に低用量効果・複合効果・作用機構について —

(H13—生活—013)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

井 上 達

平成15（2003）年4月

目 次

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究

—特に低用量効果・複合効果・作用機構について—…………… 1

井上 達

II. 分担研究報告書

I. プロジェクト課題研究

【総括】プロジェクト課題研究…………… 19

関澤 純

免疫系、性分化を中心とした内分泌かく乱化学物質による低用量影響の可能性と
複合効果についての検討…………… 25

関澤 純

低用量ビスフェノールA (BPA)のヒト体内動態と神経-甲状腺機能および行動に
対する影響の生物学的蓋然性について…………… 36

井藤 悦朗

低用量 estrogenic chemicals による前立腺重量、発育などに対する
影響の研究…………… 39

杉村 芳樹

低用量暴露による遺伝子発現、タンパク発現データの解析によるホメオスタシス
の検討…………… 41

福島 昭治

甲状腺ホルモンかく乱物質に対する感受性の動物種差の解明…………… 44

加藤 善久

II. 基盤研究

【生殖・ステロイド代謝】

雌性生殖器官への作用メカニズムの解明…………… 51

井口 泰泉

【生殖・ステロイド代謝】

ヒト成人及び胎児組織における SXR の発現に関する研究…………… 54

笹野 公伸

【免疫】

低容量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…………… 69

廣川 勝昱

【免疫】

内分泌かく乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究…………… 72

山崎 聖美

【神経】

核内受容体・コファクター複合体の新規作用機構及び複合体形成に
おける内分泌かく乱物質の低用量影響に関する解析…………… 75

垣塚 彰

【神経】

神経系初期発生におけるエストロゲンレセプターの機能および内分泌
かく乱物質の低用量影響に関する解析…………… 81

菅野 純

【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に関する研究…………… 89

加藤 茂明

【核内レセプター】

ステロイド受容体発現調節機構およびその内分泌かく乱物質低用量影響に関する研究.....	93
藤本 成明	

【マイクロアレイ基盤整備】

遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立.....	102
五十嵐勝秀	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	111
---------------------------	-----

[別添資料]

IV. 調査報告

低用量ビスフェノールA (BPA)のヒト体内動態と神経-甲状腺機能および行動に対する影響の生物学的蓋然性について.....	121
井藤 悦朗	

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

平成 14 年度 総括研究報告書

研究課題名=内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究-特に低用量効果・複合効果・作用機構について-（ H13-生活-013 ）

主任研究者 井上 達

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・センター長

研究要旨

環境中の化学物質の内、内分泌作用を示すホルモン様化学物質（HAC）と、その延長線上で内分泌障害性を示す内分泌かく乱化学物質（EDC）の異同は、それらの核内レセプター作用を中心とした受容体原性効果に端を発する諸機構が明らかになるに従って、いわゆる低用量問題と呼ばれる作用閾値の存在の如何、相乗・相加作用の如何、及び反応の線形・非線形等の解明・解決の課題へと収束しつつある。

本研究ではこのために、1）現在存在する低用量作用関連の情報（米・欧での低用量問題討議で用いられた未発表データを含む）を調査収集し検討するとともに、2）これまで進めてきた高次生命系を中心とした生体影響研究の側からの能動的な基盤研究での低用量影響の実態を併行して研究することにより、その可能性の如何とあり得る背景機構を明らかにする。低用量効果が試験管内分子反応としてその実態が種々追認されているのに対して、ほとんどの個体レベル反応でそうした結果が見られない事実に鑑みて、こうした乖離現象を引き起こす背景と実態的な障害の如何の追求についても実験的検討を行う。あわせて、当班班員を含むこの領域で相次いで発見されているシグナル伝達修飾因子について、それらが持つシグナルの大幅なバイアスもしくはリプレスに関する影響の研究に格段の重点をそそぎ、低用量問題の科学的認識に齟齬を生ずることなく、認識基盤を整備するよう研究を推進する。

尚、1）のリスク調査研究の初年度における検討の結果、調査に関しては、一応の区切りが付き、他方、低用量作用メカニズムの科学的検証に関する実験的検討の必要性が生じたため、1）に関する班の構成員を改組し、第2年度以降はプロジェクト体制として、引き続き文献検索とデータベースの作成ならびに、課題実験を実施した。2）については、変更なく進行した。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属における職名（50音順）

五十嵐 勝秀	国立医薬品食品衛生研究所毒性部 主任研究官
井口 泰泉	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所生命環境研究領域 教授
井藤 悦朗	(社)日本化学物質安全情報センター (JETOC) 調査部課長
垣塚 彰	京都大学大学院生命科学研究科（高次生命科学専攻高次生体統御学講座高次生体統御学分野） 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
加藤 善久	静岡県立大学・薬学部 講師
菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部 部長
笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理学講座 教授
杉村 芳樹	三重大学医学部泌尿器科学 教授
関澤 純	国立医薬品食品衛生研究所化学情報部 室長
廣川 勝昱	東京医科歯科大学医学部感染免疫病理学講座 教授
福島 昭治	大阪市立大学大学院医学研究科 教授
藤本 成明	広島大学原爆放射能医学研究所予防腫瘍研究分野 助教授
山崎 聖美	国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部 主任研究員

A. 研究目的

環境中のホルモン様作用を示す化学物質及びそれらの作用の延長線上で引き起こされる、いわゆる内分泌かく乱障害発生の可能性に関する研究の進展は、分子間相互作用の微視的レベルでの低用量効果や反応修飾（バイアスあるいはリプレスなど）の実態を実験的に明らかにして行くに従って、この問題の論理的危惧を却って深める結果となった。他方、多世代試験を始めとする多くの巨視的レベルでの検討結果は、低用量作用が必ずしも認められないことを示しつつある。

本研究は、実験的事実関係の相互の乖離に対して、そうした現象を引き起こす背景と、

実態的な障害性の相互関係を探り、この問題の本質的解決を目指すものである。

B. 方法

第1に低用量問題を構成する因子毎に国内外のデータおよび鍵となる試験研究項目を収集し検討した。またそれらの結果に直結する、必要な実験課題についても重点的に推進した。平行して第2にこれまで行ってきた高次生命系を中心に、実験的に低用量問題の背景を追求した。

I. プロジェクト課題研究は、関澤が責任者となり、初年度の調査研究、すなわち情報、生殖・発生、および発がん一般、発がん-発生影響等の調査テーマに沿った既

存データの調査研究を改組し、実験的課題を設定して検証する方向を強化した。平成14年度は平成13年度に検討した結果を踏まえ、以下の要領に従って文献調査・データベース作成と、新たな若干の実験課題について継続的あるいは新規的に調査研究を行った。

(1) 調査研究

Medline 医学文献データベースを用いて最近の免疫系および性分化関連の低用量研究報告、および BPA に関する報文の検索を行った。IPCS (International Programme on Chemical Safety : 国際化学物質安全性計画) による内分泌かく乱化学物質に関する科学的な評価である "Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors" を参考にした。文献検索の不備を補完するため、第5回内分泌かく乱化学物質問題に関する国際シンポジウムおよび SCOPE/IUPAC International Symposium on Endocrine Active Substances and Supplementary Workshop 発表論文から、関連テーマについて発表した論文も調査した。

(2) 実験課題の検証

(A) ラットを用いた2段階発がん試験のプロモーション段階に α -BHC に曝露し実験開始13週目にラットを屠殺、肝を検査した。

(B) 出生直後の雄マウスに DES0.5 μ g を投与し、60日後に前立腺の腹葉と後側葉を微小解剖、腺管分枝構造の形態測定と組織学的検討を行った。生長初期前立腺にお

けるエストロゲン受容体 (ER- α および ER- β) の発現を免疫染色にて検討した。

(C) ddy マウス、Syrian ハムスター、Wistar ラット、Hartley モルモット、Gunn ラットに、PentaCB、HexaCB と KC500 を腹腔内投与し、投与4日後に血清中甲状腺ホルモン濃度、 T_4 消失クリアランス、肝ミクロソームの抱合活性および特異的ペプチド抗体を用いた UGT 分子種の発現量、肝臓中メチルスルホン代謝物と水酸化体濃度を測定した。

II. 基盤研究では、低用量問題の背景となりうる機構の解明に向けての研究を進めた。

【生殖・ステロイド代謝部門】

井口泰泉は、マウス生殖腺の分化および精子、卵形成への内分泌かく乱化学物質の影響および低用量影響を研究した。

1) エストロゲン及びエストロゲン様作用を持つ化学物質の投与後の時間を変えて、マウス子宮での発現誘導および発現抑制遺伝子の解析

2) 化学物質の低用量影響の遺伝子レベルでの検討

笹野公伸は、低用量影響を含む内分泌かく乱物質曝露とヒト性ステロイド代謝との関連性の解明を行った。

1) STS, EST の活性、発現動態に対する内分泌かく乱物質の影響の検索

2) 低用量、長期曝露に関係すると考えられる SXR のヒト組織における発現動態の検討

【免疫部門】

廣川勝彦は、低用量内分泌かく乱化学物質

の免疫系に及ぼす影響を研究した。

1) マウス胎仔胸腺の器官培養系を用いた低用量の内分泌かく乱化学物質の胸腺リンパ球分化過程への影響検討

2) 成熟マウス脾臓T細胞増殖系を用いた低用量内分泌かく乱化学物質のシグナル伝達系への影響の検討

山崎聖美は、

1) 遅延型過敏症反応における内分泌かく乱物質の影響について検討

2) 内分泌かく乱物質の細胞内における作用メカニズムの解明

【神経部門】

垣塚 彰は、核内受容体・コファクター複合体の新規作用機構及び複合体形成における内分泌かく乱物質の低用量影響を解析した。

1) 新規コファクター群によって活性化される孤児受容体の機能をトランスジェニックマウスの表現型からの推測と証明

2) 標的遺伝子の活性化に対して、内分泌かく乱物質の低用量効果の解析

菅野 純は、神経系初期発生におけるエストロゲンレセプターの機能および内分泌かく乱化学物質の低用量影響を研究した。

1) エストロゲンレセプターの神経幹細胞における発現検討

DES 胎生期暴露により神経幹細胞において発現変化する遺伝子の同定

【核内レセプター部門】

加藤茂明は、核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御への影響を検討した。

1) 男性ホルモンレセプターの生体内機能の解析

2) 男性ホルモンレセプター、女性ホルモンレセプターに相互作用する転写共役因子複合体の精製・同定、及びクロマチン修飾活性の検討、これら因子の低用量内分泌かく乱化合物の作用点としての可能性の検討

藤本成明は、ステロイド受容体発現調節機構に注目し、

1) 新生児期ラットの低用量テストステロン暴露による前立腺エストロゲン受容体(ER)発現への影響検討

2) ラット ER β の上流遺伝子構造の決定と機能解析

【マイクロアレイ基盤整備】

五十嵐勝秀は低用量レベル作動性の遺伝子検索に関する横断的試験サービスを行い、II. 基盤研究における研究の進展に応じ、その進行をサポートする研究を実施した。

C. 結果

I. プロジェクト課題研究

(1) 文献調査の結果および考察

(A) IPCS の”Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors”は、「内分泌かく乱物質」と、「内分泌系をかく乱する可能性のある物質」を区別し、「内分泌かく乱とは生体レベルでの事象である」ことを明確にした。さらに、内分泌かく乱自体を有害影響とはみなさず有害な影響につながるかも知れない機能上の変化とし、化学物質による生体機能かく乱の可能性について考察する上の要

点を次のように整理した。

- 成体における曝露ではホメオスタシスにより補償され有意な影響は認められないであろう。
- 内分泌系が形成途上にある時期の曝露では機能、刺激また抑制シグナルへの感受性に不可逆的な変化を引き起こす可能性がある。
- 生体は異なる発達段階や異なる季節の同レベルの内分泌系シグナルに対して異なる反応を示す可能性がある。
- 種々の内分泌系間のクロストークにより予測されなかった内分泌系に影響が起きる可能性がある。
- インビトロの実験結果を生体レベルのホルモン活性にあてはめるには慎重でなければならない。

(B) 低用量曝露による免疫影響については、DES 投与 C57BL/6 マウスの免疫機能パラメータが動物の週令と性に依存して複雑に変化し、周産期ラットへの低用量の2,3,7,8-TCDD による免疫系への影響は思春期の脾臓において明瞭だったが、アリルハイドロカーボン受容体経由の CYP1A1 発現に無関係と考えられることが知られた。TCDD 投与マウスでは脾臓 T 細胞の障害が示された。

IL-1 刺激 MCF-7 細胞の MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) 産生系に、 17β -エストラジオール、ビスフェノール A、ノニルフェノールを添加し MCP-1 産生が濃度依存的に抑制されたが、この作用はエストロゲン受容体(ER)を介さ

ず MCP-1 遺伝子領域の NF- κ B サイトを介するものだった。

PCB 類によるほ乳類の免疫系への標的として成熟 T 細胞が前駆細胞から分化を遂げる胸腺上皮が推定され、またヒトの胸腺組織はゲッシ類の胸腺組織とほぼ同程度の TCDD 感受性を持つことが示された。

(C) 性分化について外因性の抗アンドロゲン物質による動物の生殖発達への影響のレビューがあり、プラスチック工場作業者の症例対照研究では、ポリ塩化ビニルに曝露された作業員における精上皮腫のオッズは約 6 倍高く、フタル酸エステルの寄与が疑われた。非精上皮腫の症例が増加しつつあり、鉱夫、皮革製造、食品飲料製造、光熱水道関連作業従事者のオッズはそれぞれ 12.39, 4.60, 3.20, 3.15 倍高かった。

2-Bromopropane により男性には精子数減少、女性には卵胞刺激ホルモンの高値を伴う無月経などが見られ、DES に類似した 4,4'-Diaminostilbene-2,2' disulfonic acid 製造にたずさわる男性に血中テストステロンの低下とインポテンツが見られた。DES 曝露母親から生まれた娘は脳の性分化に影響を受けると見られ性的な関係を良く保てない。性分化プロセス中にアンドロゲン物質に曝露すると女性の男性化が起こり、プロゲステンは抗アンドロゲンとして不完全な男性生殖器を生じさせる。ステロイド合成を阻害する aminoglutethimide に子宮内曝露を受けた女性は男性化する。テストステロン投与により成熟雄ラットによる精子形成に U 字型の用量-反応関係を示

すことは良く知られてきた。ある種のアンドロゲン受容体(AR)リガンドは低濃度で抗アンドロゲン作用を示すが高濃度でアンドロゲン作用を示す。

ビスフェノール A が甲状腺ホルモン受容体やソマトスタチン受容体関与の影響を示し、マウス雄の精巣精子生産だけでなく生殖能力を低用量で低下させるという報告があり、作用メカニズムと用量-反応の面からさらに詳細な検討が必要と考えられる。

生理的なホメオスタシスによる逆U字現象発現に関しビスフェノール A 投与により脳下垂体前葉における ER α と β の発現の増加などの報告もあり、用量に関連したレセプター発現の制御について実証的な研究が待たれる。

脳内の性分化を決定づけるホルモン作用メカニズムは出生前後のクリティカルな時期に起きると考えられるが、動物においては出生初期のアンドロゲン曝露が脳と行動の性分化に影響を及ぼすことはほぼ確かと思われたが、ヒトにおいては間性の治療に生後1-6ヶ月のテストステロン投与が有効か否かを結論できるだけの証拠はなく、症例対照研究の必要性がある。

ラット視索前野の脳室周辺核の前腹方での ER β mRNA 発現が生後7, 14, 21, 35, 60日目の雌において雄に比べて顕著に多く観察され、ドパミン、ペプチド、オピオイド作動性神経およびグルタミン酸受容体サブユニットの性的二形性が示されているが、この部位に障害を起こすと臆における恒常的な発情状態を招く。ER β mRNA はこの

部位に ER α mRNA と同時に発現しており、ER β が ER α とヘテロダイマーを形成することにより、ER α 応答遺伝子の発現を抑制している可能性がある。

精巣から時期依存的に適度な濃度のアンドロゲン、抗ミュレリアンホルモン、インスリン様因子が生成することで、雄化が進行するが、アンドロゲン受容体が発現しているにも関わらずホルモン抵抗性の症例からコレギュレータにおける障害が示唆され、また Wnt ファミリーの発生関連シグナル分子が卵巣におけるミュラー管の発達とライディッヒ細胞の分化に役割を果たしているらしい証拠も見つかっている。

(D) 多種の外因性エストロゲン物質への複合曝露による影響の可能性について酵母スクリーンアッセイ(YES)系を用い、天然の17 β -エストラジオールと11種類の外因性エストロゲン物質を17 β -エストラジオールのそれぞれ2.5万倍、5万倍、10万倍量で併用投与した系で、活性は相加的なものとして計測されると報告された。しかしこのデータからヒトの現実の曝露状況に外挿するには、試験で用いられた個々の成分濃度と現時点でのヒトの曝露レベルと比較することがまず必要である。たとえばこれら11種類の外因性エストロゲン物質のうち、ゲニステインについてはNOECは0.038 μ M、EC₀₁は0.086 μ Mとされているが、他の外因性エストロゲン物質に比べてはるかに高レベルで日本人に摂取され血中濃度も高いが遊離体と硫酸抱合体を含めた場合で0.008 μ M。その他の抱合体も入れた合計では0.276 μ Mというレベルである。

もっとも高濃度で曝露されていると考えられ、活性も強いとされるゲニステインがこのレベルであった。他の外因性エストロゲンの曝露レベルは、さらに数オーダー低いと考えられ本インビトロ系での加算性データが生体レベルにそのまま適用可能であるとしても、その濃度は実際の曝露レベルにほど遠い可能性が大きい。

またインビトロ系では、レセプターに独立に結合し作用すると思われた個々の成分による影響が、インビトロ系に組み込まれていないコアクチベータとの相互作用やアрилヒドロカーボンレセプターなど他のレセプターとのクロストークや、生体におけるフィードバックメカニズムの存在下でも起こりうるかが検証される必要がある。

卵巣切除マウスを o,p'-DDT, β -HCH (β -hexacyclohexane) に低濃度曝露した時に、子宮上皮および膈上皮の厚さは血中濃度の対数に比例して増加し、かつ増加を示し、最も低い血中濃度は一般市民におけるそれらの濃度とほぼ同じレベルであると報告されたが、引用された日本人の β -HCH 血中濃度(0.7-5.5 ng/mL)は 1986-88 年のデータで、マウスで子宮上皮や膈上皮の肥厚をもたらした最小濃度(22-42ng/mL)に比べてほぼ 1 オーダー低かった。またこの系は卵巣切除によりフィードバックコントロールなどのホメオスタシスが作用しない動物であった。

(E) ビスフェノール A について昨年度報告

では主として生殖・発生影響データを基にリスクベネフィット分析を行ったが、その後 2003 年はじめにかけて新たな知見が追加された。これらは人の組織(母体血、臍帯血、羊水、尿など)中のビスフェノール A 濃度および吸収・体内動態など曝露に関する報告と、インビボおよびインビトロの試験系での神経・行動への影響および甲状腺ホルモンへの影響などを見たものである。

前者については分析法(ELIZA 法と、LC/MS あるいは GC/MS 法)の感度と特異性(抱合体と遊離体の分別や、交差反応性)の問題があるが、おおむね ppb(ng/mL)前後の値であった。体内動態に関しては、ヒトでの投与試験ではグルクロン酸抱合体として速やかに排泄され、腸肝循環するゲッシ類に比べてより蓄積の可能性は低いとされた。

後者については、社会行動の変化や行動における性差の消失、あるいは海馬切片でのグルタミン酸による細胞毒性の増強など興味深いデータではあるが、標準化されていない試験系での観察であり、その意義と再現性について検証して、リスク評価につなげる必要があると考えられる。

(2) 実験課題の検証

(A) 福島昭治: diethylnitrosamine をイニシエーターとする発がん二段階法を用いて α -BHC のラット肝発がん作用を検討したところ、高用量投与では肝前がん病変である glutathione S- transferase placental form 陽性細胞巢の発生を促進し、低用量投与では抑制した。また、酸化ストレス

マーカーの 8-hydroxydeoxy guanosine 生成は α -BHC 500 ppm で増加し、0.1, 1, 50 ppm では減少した。CYP2B1 蛋白量は低用量で減少傾向を示し、GST-P 陽性細胞巢の結果は、 α -BHC の発がん作用にホルミシス現象があることを示した。

(B) 杉村芳樹：出生直後の雄マウスに3日間 DES0.5 μ g を投与し、60 日後に前立腺の腹葉と後側葉を微小解剖して形態測定と組織学的検討を行い、DES 投与群では前立腺腺管分枝形態発生は著しく抑制され、一部では異常な結節状の変化を認めた。ER の免疫染色により、生後初期のマウス前立腺間質細胞に ER- α が存在するので、前立腺発生初期の DES 曝露により間質細胞の ER 経路で長期にわたる影響を及ぼすことが示唆された。

(C) 加藤善久：マウス、ハムスター、ラット、モルモットに PentaCB、HexaCB および KC500 を投与し、total T₄ 総トリヨードサイロニン濃度の低下、肝 UGT1A1/6 の誘導、各 PCB の代謝能における動物種差の存在を示した。マウスの HexaCB、モルモットの KC500 投与時の血清中 total T₄ 濃度の低下には、肝 UGT1A1/6 誘導が関与している可能性が示めされた。マウス、ハムスター、ラットに PentaCB および KC500 の投与時の低下には、別の作用機序が関与している可能性が示唆された。

II. 基盤研究

【生殖・ステロイド代謝部門】

井口泰泉：エストロゲンおよびエストロ

ジェン作用を持つ化学物質の、卵巣摘出成熟マウス子宮に対する影響を、マイクロアレイ法を用いて解析し、数十種類のエストロゲン応答遺伝子を同定し、リアルタイム PCR を用いて、発現変動を確認した。低用量のエストロゲンおよびエストロゲン活性をもつ物質による変動遺伝子を明らかにするための基礎ができた。

笹野公伸：ステロイドホルモンや医薬品等の生体内外の様々な物質と結合する steroid and xenobiotic receptor (SXR) は成人及び胎児の肝、腎、肺、小腸、大腸に発現が認められ、cytochrome P450 3A (C3A)、C3A5、multidrug resistance 1 (MDR1) は他の組織にも広く分布していたが、SXR が発現している組織において有意に高い発現量を示した。肝臓における SXR の発現量は、胎児期から0歳で低く、その後増加して30-50歳でプラトーに達し、60-80歳では胎児期の値まで減少した。C3A4、MDR1 についても同様であった。

【免疫部門】

廣川勝昱：内分泌かく乱化学物質として DES、17 β -Estradiol、Bisphenol A、p-n-Octylphenol、BBP の低用量を in vitro の系に添加し胸腺細胞の分化・増殖に与える影響を検討し、高酸素下胎仔胸腺組織培養 (HOS-FTOC) 系での未熟胸腺細胞の分化・増殖が前年度の報告より更に低用量添加によっても抑制された。

山崎聖美：ある種の内分泌かく乱物質が 10⁻⁷M 付近の濃度でリンパ球のマイトジェン刺激による IL-2、IL-10、IFN- γ といっ

たサイトカイン産生を増強することを明らかにした。

【神経部門】

垣塚 彰:①PGC-1 とよく似た分子(ERRL1 と命名)が孤児受容体の一つである ERR(estrogen receptor-related receptor) を特異的に活性化する蛋白性のリガンドとして働くことを見いだした。②ドーパミンニューロンの発生に必須である核内受容体 Nurr1 を特異的に活性化する低分子化合物を同定することに成功した。

菅野 純:エストロジェンレセプター α 、 β ともに個々の神経幹細胞に発現していることを、神経前駆細胞マーカーの一つ Nestin陽性細胞と2重染色されることにより示した。胎生期のDES暴露により神経幹細胞機能障害が生じる際に、神経幹細胞において発現変化し、その変化が不可逆的に持続する遺伝子群をGenechipを用いて同定した。

【核内レセプター部門】

加藤茂明:核内レセプター転写共役因子の複合体の精製法を確立し、新たな染色体構造調節因子複合体の同定に成功した。

藤本成明:ラット、マウス前立腺の ER β はテストステロン(T)およびエストロジェンにより発現調節を受けていることを明らかにした。ER β mRNA の遺伝子上流域の構造を明らかにし、そこにプロモータ活性があることが示した。

【マイクロアレイ基盤整備】

五十嵐勝秀:導入したDNAマイクロアレイ技術を用いた基盤研究班の横断的な研究サポ

ートの実施を行った。具体的には、笹野公伸班員とヒト平滑筋細胞に対するエストロジェン作用、井口泰泉班員とマウス新生児視床下部に対するDES影響、藤本成明班員とラット下垂体細胞株に対するエストロジェン作用、の共同研究を行った。

D. 考 察

I. プロジェクト課題研究

(1)文献調査については、「結果と考察」として「結果」の項に記載した。

(2)実験課題の検証

(A)低用量暴露による遺伝子発現、タンパク発現データの解析によるホメオスタシスの検討(福島昭治)

GST-P 陽性細胞巢の結果から、 α -BHCの発がん作用にはホルミシスの現象があることが判明した。GST-P 陽性細胞の発生に8-OHdGの形成が強く関連していると考えられるが、50 ppmにおけるそれらの逆相関関係については今後の検討が必要である。現在、RT-PCR および cDNA マイクロアレイを用いて CYP450 の発現を詳細に検討中である。

(B)低用量 estrogenic chemicals による前立腺重量、発育などに対する影響の研究(杉村芳樹)

生長初期の前立腺におけるエストロゲン暴露の及ぼす影響には、直接作用あるいは脳下垂体系によるフィードバックによる間接的な作用機構があり複雑である。本研究では生長初期のマウス前立腺において合成エストロゲン剤であるDESの短期投与によ

り生長後に重篤な病変を来すことがあらためて示された。とくに、前立腺増殖機構において重要である腺管分枝形態発生が著しく抑制されるとともに異常腺管構造の発生を促したことから、エストロゲンに前立腺に対する催奇形作用が示唆された。Singhら (J.Endocrinology, 1999) は同様の実験を行い DES 5 μg の2日間の投与により生長後の腹葉において、約37%の腺管分枝形態発生の抑制と異常形態の発生を報告している。我々は1/10量のDESを3日間投与したが、ほぼ同様の結果が得られたが、とくに後側葉においては上皮細胞の異型のみならず腺管の融合および異常分枝など腺管構造自体の異常を誘導した。今後さらに低用量のエストロゲン剤の作用についての検討が必要と考えられ、目下検討中である。なお、エストロゲン作用が直接的に前立腺に作用するためにはエストロゲン受容体が必須であると考えられ、免疫組織学的に検討したが、生直後においてはER- α は間質細胞に存在するが上皮にはER- β のみが存在することが示され、エストロゲン作用は間質細胞を介して前立腺の異常形態発生を促す機構が考えられた。この研究システムによるエストロゲン受容体とくにER- β の作用については今後さらに検討が必要である。

(C) 甲状腺ホルモンかく乱物質に対する感受性の動物種差の解明 (加藤善久)

本実験の結果から、PentaCB、HexaCB及びKC500投与による血清中 total T_4 、total T_3 濃度の低下及び3種のPCBの代謝

において、マウス、ハムスター、ラット、モルモット間に明白な種差があることが示された。また、KC500投与後いずれの動物においても、 T_4 の血中からの消失速度は対照群より増加することが示された。

一般に、血清中 T_4 濃度の低下の要因として、甲状腺濾胞上皮細胞における T_4 の合成系の抑制、 T_4 のグルクロン酸抱合をはじめとする T_4 の代謝系の促進などいくつかのメカニズムのかく乱が考えられる。また、 T_4 の代謝を促進する主なUDP-GT分子種は、UGT1A1及びUGT1A6であることが報告されている。今回、 T_4 -UDP-GT活性は、マウスにHexaCB投与後、あるいはモルモットにKC500投与後にのみ有意に増加した。これらの結果から、マウスにHexaCBを投与した時、あるいはモルモットにKC500を投与した時の血清中 T_4 濃度の低下には、肝臓のUDP-GT(UGT1A1及びUGT1A6)の誘導による T_4 の代謝促進による T_4 の消失を含むことが示唆された。

PCBのOH体は血中 T_4 の輸送タンパクである transthyretin(TTR)と結合すること、さらに、そのことが T_4 の血中での標的器官への輸送を阻害し、血中 T_4 濃度を低下させる一因となる可能性があることが報告されている。これらのことから、マウス、ハムスター、ラット及びモルモットにおいてPentaCB、HexaCBあるいはKC500投与による血清中 T_4 濃度の低下の一因は、OH-PCBとTTRとが結合することによる可能性が考えられる。特に、KC500を投与したモルモットではPCBのOH体の生成量が

著しく多いことから、KC500 投与モルモットにおける血清中 T_4 濃度の低下には、肝臓の UDP-GT の誘導による T_4 の代謝促進に加えて、OH-PCB と TTR との結合が T_4 低下の一因となっている可能性が考えられる。

すでに、我々は、3-及び 4-MeSO₂-PentaCB、及び 3-MeSO₂-HexaCB などの 7 種類の MeSO₂-PCBs は、UGT1A1/6 を誘導することにより、血中 T_4 の代謝を亢進し、血中 T_4 濃度の低下を引き起こすことを報告している。そこで、3 種の動物の PCB 投与による血清中 T_4 濃度の低下に MeSO₂ 代謝物が寄与しているか否かを検討した。しかし、3 種の PCB 投与後の各動物の血清中 T_4 濃度の低下と肝臓中 MeSO₂ 代謝物濃度との間に相関が見られなかった。

Wistar 系ラット及び Gunn ラットに PentaCB 及び KC500 を投与後、血清中 total T_4 濃度は両ラットとも同程度に著しく低下した。この時、Wistar 系ラットにおいて T_4 -UDP-GT 活性及び UGT1A の発現量は顕著に増加した。一方、Gunn ラットでは T_4 -UDP-GT 活性の変化及び UGT1A の発現は全く認められなかった。これらの結果から、UDP-GT の発現や活性上昇が見られない Gunn ラットでも T_4 濃度の低下が惹起されることが明らかとなり、この低下は UDP-GT 非関与の別の作用機序によることが強く示唆された。このことから、Wistar 系ラットに PentaCB 及び KC500 を投与した時の血清中 T_4 濃度の低下においても、肝臓の UDP-GT 活性の増加以外に別の作用機序が関与している可能性が考えられる。

II. 基盤研究

【生殖・ステロイド代謝】

雌性生殖器官への作用メカニズムの解明
(井口泰泉)

エストロゲンによって発現変動する遺伝子では、エストロゲン投与後の時間経過によって、遺伝子発現プロファイルがどのように変化するかを知る必要がある。また、子宮と同じミューラー管に由来する膈での、エストロゲン応答性遺伝子を解析し、子宮との差を比較することにより、組織依存的なエストロゲン応答遺伝子を解析することが可能と思われる。さらに、エストロゲン様物質の曝露およびエストロゲン受容体(α あるいは β)ノックアウトマウスを用いた発現変動遺伝子の解析を行うことにより、エストロゲン受容体を介している反応であるか、別の系を介した反応かを明確にできる可能性がある。いずれにしろ、エストロゲン応答遺伝子のデータベースの構築が必要である。さらに、臨界期内外でのエストロゲン応答遺伝子の解析から、臨界期の分子生物学的な意味づけをする必要がある。出生直後のエストロゲン投与によって誘導される、エストロゲン非依存性の不可逆化膈での遺伝子解析は、増殖因子系の遺伝子のエストロゲン非依存的な発現、それに引き続いて起る細胞周期の開始機構をも視野に入れて解析を継続している。

ラット胎児でのミューラー管では、主として子宮に分化する部分の解析を行ってきたが、輸卵管での局部的組織分化に関連したホルモン受容体発現、輸卵管特異タンパクの発現などの解析も重要である。

ヒト成人及び胎児組織における SXR の発現に関する研究 (笹野公伸)

チトクローム P-450 (CYP) は生体外の薬物・異物や生体内のステロイドなどの物質を代謝し、生体の防御に努めている酵素群である。CYP3A サブファミリーは 150 種類以上もの薬物の代謝に関わることが知られており、CYP3A サブファミリーが生体防御に非常に重要な役割を担っていることが示唆される。ヒトにおける CYP3A は少なくとも 3A4、3A5 及び 3A7 の 3 種類が知られている。CYP3A4 は成人肝臓及び小腸の CYPs の 30%、70%をそれぞれ占めている。しかし、胎児期において CYP3A4 の発現はほとんど認められないことが報告されており、今回データ提示はしていないが、我々の研究においてもその mRNA の発現は胎児期から出生直後まで低い傾向にあった。胎児期では CYP3A7 が重要な役割を担っており、成人では逆にこの酵素の発現はほとんど認められない。CYP3A5 は腎臓に普遍的に発現しているという報告もあるが、我々の定量的 PCR での検索では必ずしも腎臓での発現は高くなかった。CYP3A5 の発現はおよそ 20%のヒトの肝ミクロゾームに存在するという報告例から、非常に個体差が大きいことが示唆される。一方、P-糖タンパク (P-gp) は MDR1 遺伝子によってコードされており、その過剰発現が多発性耐性の癌細胞に認められている。さらに腎近位尿細管、脳毛細血管、肝細胞、消化管上皮細胞などの正常組織においても発現が認め

られ、異物や代謝産物を生体外に排出するトランスポーターとして機能している。CYP3A mRNA/タンパク及び MDR1/P-gp はともに薬物動態に深く関わる組織において発現しており、本研究においても発現量の多い組織は一致した。また、その基質においても非常にオーバーラップする点が多い。

SXR はマウス PXR (Pregnane X Receptor) に類似するヒトの核内レセプターとして、1998 年に B. Blumberg らによってクローニングされた。SXR は CYP3A 及び MDR1 の上流領域に位置するレスポンスエレメント (DR3 及び ER6) に結合し、その転写を活性化する。SXR は肝臓、小腸及び大腸に発現することが知られていたが、マウス PXR はさらに腎臓や肺にも発現し、ヒトにおいても今回、新たに腎臓とわずかであるが肺にも発現が認められた。腎臓及び肺は肝臓や消化管と同様に薬物代謝や排出に関与する組織であり、実際にこれら組織での CYP3A 及び MDR1 mRNA の発現が高いことが確認できた。また、本研究ではさらに胎児期においても成人と同組織に SXR mRNA の発現が認められ、CYP3A 及び MDR1 mRNA の発現も高かった。これらのことから、SXR による代謝・排泄に関する制御システムが肝臓、消化管と同じく、腎臓及び肺にも備わっており、それは胎児期からすでに発現、機能していることが示唆された。今回、胎児の肝臓においては SXR mRNA の発現が低く、同様に CYP3A4、MDR1 の発現が低いことが観察されたこと

からも、両遺伝子と SXR が密接に関与していることが考えられる。

本研究では、SXR の発現は発達・加齢の影響を受けることが確認された。肝臓においては、SXR mRNA の発現が低かった胎児期-0 才児及び老齢期に CYP3A4 及び MDR1 mRNA の発現も低いなど、SXR と制御を受ける因子の動向に類似点が認められた。消化管においては、小腸では 20-30 才代で SXR mRNA 発現のピークであったのに対して、大腸ではむしろ胎児期や 0 才児で高い結果となり、同じ消化管でもその発現状況には解離が見られた。消化管における CYP3A4 mRNA の発現は成人の小腸と比較するとかなり低い値であったが、大腸では胎児期の方が 20 倍程度高い値であった。MDR1 については成人小腸で高く、成人大腸、胎児小腸/大腸での発現は低かった。これらのことから、胎児消化管は小腸と同様の代謝能が大腸にも備わっており、成人になると小腸における代謝能が際立ち、大腸では衰退して機能分担が確立されると考えられた。腎臓においては胎児期に SXR mRNA の発現が高く、出生後はほとんど変動認められなかった（データには示していない）。このことから腎臓においては CYP3A4 より MDR1 との関係が示唆されるが、胎児期での動向が異なり、さらなる検討が必要である。また、腎臓においては LCM によってその遺伝子レベルでの局在を明らかにした。成人と胎児では SXR mRNA の局在が一部異なり、このことから発生に伴って SXR の発現意義が異なってくるのかも

知れないと考えられる。肺においては胎児期：14-15 週で発現が高く、その後増減するが一定の傾向は認められなかった。CYP3A4 も同様の変動が確認されたが、MDR1 は胎児期は低値であった。肺においては組織内の環境が出生前後で劇的に変動するため、SXR の発現とその意義に対する影響について、詳細な検討が必要であるとも考えられた。

【免疫】

低用量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（廣川勝彦）

胎生 15 日齢 C57BL/6 マウス胎仔胸腺用いた器官培養システム（HOS-FOOC）により、1nM 以下の低容量の EDCs の免疫系への影響を検出できる事が明らかになった。

その結果 EDCs による抑制が未熟胸腺細胞の早期の分化段階に作用していることが分かった。

今後は EDCs による胸腺リンパ球の抑制の機構を細胞レベルで調べる必要があると考えている。

内分泌かく乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究（山崎聖美）

NP、BPA、BBP、DBP といった内分泌かく乱物質が $10^{-7}M$ 付近の濃度でリンパ球のマイトジェン刺激による IL-2、IL-10、IFN- γ といったサイトカイン産生を増強することが明らかになった。リンパ球のマイトジェン刺激によるサイトカイン産生には

幾つかのチロシンキナーゼによるタンパク質のチロシンリン酸化が関与していることが知られている。ヒト T リンパ球系細胞である Jurkat 細胞において、内分泌かく乱物質単独でもいくつかのタンパク質のチロシンリン酸化がおこることが観察されたことから、サイトカイン産生増強においてもこれらタンパク質のチロシンリン酸化がかかわっているものと推測される。培養乳がん細胞においても E2 刺激により ERK1 及び ERK2 がチロシンリン酸化を受けることが報告されている。15 分ほどでこのような現象がみられることから、メカニズムについては解明されていないが、エストロゲンレセプターに結合してさらに ERE に結合した結果とは考えられない。リンパ球においてもジェノミックな反応を介さずに作用している可能性がある。

【神経】

核内受容体・コファクター複合体の新規作用機構及び複合体形成における内分泌かく乱物質の低用量影響に関する解析 (垣塚 彰)

本年度の研究により、ERRL-1 が蛋白性リガンドとして、ERRL-1 に結合し、生理機能を発揮することが判明した。この結果は今後内分泌かく乱化学物質の神経影響を考える上で、低分子性のリガンドのみならず、蛋白性のリガンドも考慮に入れるべきであることを示している。

神経系初期発生におけるエストロジェン

レセプターの機能および内分泌かく乱化学物質の低用量影響に関する解析 (菅野 純)

今年度までの検討により、ER alpha、ER betaが神経幹細胞においてmRNAレベル、蛋白質レベルともに発現していること、特に蛋白質レベルでは神経幹細胞マーカーの一つであるNestin蛋白質の発現している細胞でER alpha、betaも共発現していることを確認した。ニューロン及びアストロサイトにおいてER alpha、betaが発現していることはよく知られている事実であることを踏まえると、ER alpha、betaは神経系の未分化な細胞から分化した細胞まで広く発現している蛋白質であると改めて位置づけることができる。これまで胎生期中枢神経系に於けるER alpha、betaの機能の解析は、性的2型核などの性分化に関わる中枢神経系発生の比較的后期における神経細胞分化の時期にほぼ限られていたが、本研究により、更に初期の未分化な神経幹細胞を対象にした分化制御、自己複製制御にER alpha、betaがいかに関わっているかを明らかにすることが、内分泌かく乱物質の低用量影響解明のための基盤研究として意味のあるものとなったと考える。

Genechipを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、*in utero* DES暴露により、細胞分化に関わる遺伝子の発現 (post-mitotic neural gene-1, PDGF receptor) が上昇し、cell cycle, cell signal, EGF receptor等、自己複製に関わると考えられる遺伝子の発現が減少していることが明らかとなった。

すなわち、DESはER受容体を介すると推定される何らかの機構により、神経幹細胞を分化しやすい状態に保つ作用を持つことが予想される。よって、in utero DES暴露により、神経幹細胞の自己複製能の抑制と同時に、潜在的分化能の促進によるさらなる自己複製能の低下が加わり、ex vivo培養における自己複製障害として現れ、ニューロスフェア径が増加できなくなったものと考えられる。

また、興味深い遺伝子として Selenium binding protein (Lp56)の発現の低下が挙げられる。ニューロスフェア培養時に細胞の保護の目的でセレンを加えていることから、この発現低下はDES影響によりニューロスフェア形成が不良になることと相関している可能性があるからである。さらに、c-fos, VEGF, Egr1等、子宮を始めとする他の臓器においてestrogenによって発現が誘導されることが知られている遺伝子の発現が低下していること、estrogenと作用の一部を共有することが判明しているinsulin系シグナルに関わるIGFBP-2遺伝子の発現が低下していることは、in utero DES暴露により、本来estrogenによって誘導されるべき遺伝子群が誘導されない状態に固定されている可能性が示唆され、胎児期のエストロゲンシグナルのかく乱による影響を検討する上で興味深い。これらin utero DES暴露により遺伝子発現に影響が生じるメカニズムとして、プロモーター部位の修飾状況変化の可能性があり、今後検討すべきポイントであると考えられる。

なお、胎児体内では実際には何らかのホメオスタシス維持機構あるいは発生プログラム監視機構が働き、それにより外来性刺激影響の緩和が起こっている可能性がある。ここで得られた低濃度DESの神経幹細胞に対する影響は、そのような緩和機構が取り除かれたin vitro実験環境で増幅された結果である可能性は考慮しておかなければならない(In vivoとの比較を進めれば、ホメオスタシス維持機構の解析にも繋がると思われる)。

【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に関する研究（加藤茂明）

現在採用している生化学的アプローチから、組織特異的なホルモン活性を規定する共役因子の性状を明らかにできると期待している。今後は、同定した転写共役因子群が核内レセプターを介した転写制御能において、内分泌かく乱物質の標的分子か否かを検討する予定である。

ステロイド受容体発現調節機構およびその内分泌かく乱物質低用量影響に関する研究（藤本成明）

エストロゲン作用を持つ内分泌かく乱化学物質の低用量作用メカニズムには、その受容体の発現変化が関与していると考えられる。そこで、本研究では、低用量作用の基礎要因としてERの発現変化とその調節機構を明らかにすることを目