

20030645

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 16 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 -----3

### II. 分担研究報告

1. テストステロンによる neonatal インプリンティング時のステロイド代謝酵素の変動  
—in vivo におけるステロイド代謝経路の変動—

石塚 真由美 藤田 正一 網田 丈二 -----12

2. テストステロンによる neonatal インプリンティング時のステロイド代謝変動  
—グリア細胞におけるステロイド代謝経路の変動—

石塚 真由美 数坂 昭夫 網田 丈二 -----17

3. neonatal インプリンティング時の視床下部における環境化学物質の影響  
—ビスフェノール A のステロイドホルモン生合成経路への影響—

石塚 真由美 数坂 昭夫 網田 丈二 -----23

4. 視床下部におけるエストロゲン標的遺伝子のスクリーニング

石塚 真由美 網田 丈二 -----27

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----33

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、アロマトラ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。これまでの研究において、我々は、ERE-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を作成を試みている。また、テストステロンによる脳 neonatal インプリンティングに関し、ステロイド代謝への影

響を調べると同時に、変動する遺伝子群を mRNA レベルで解析・スクリーニングした。Neonatal インプリントングによって発現パターンが変動する GABA やシヌクレインなどを同定した。

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 (環境獣医学講座・毒性学教室)

研究協力者 網田丈二 (環境獣医学講座・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医薬品・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は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 *tangent* 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医薬品・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。医薬品や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ヒスフェノール 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、医薬品・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、医薬品および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。

本研究では、エストロゲン攪乱作用のスクリーニングを行うことを目的の一つとしているが、当然、確立された手法を用いて、アンドロゲンや甲状腺ホルモンなど、周生期に不可欠な内分泌ホメオスタシス系への影響評価に応用することができる。また、個体を用いた評価手法のため、レポーター遺伝子の検索によって、周生期のみならず、成熟後や老化過程での影響に関して

もスクリーニングを行うことが可能である。周生期におけるエストロゲンの脳神経系への作用に関しては不明な点が多いが、本研究によって、エストロゲン標的因子の活性化を経時的に、さらに、臓器・細胞レベルで検出することができる。Adult 動物においても、エストロゲン作用を個体レベルで検出することができるため、老化動物では、アルツハイマーや骨粗しょう症などの研究や医薬品の開発に応用することができる。

また、近年、脳におけるステロイドホルモンはニューロステロイドとして記憶や性行動に関してその機能が注目されている。脳では生殖器同様、ステロイド産生に関して高活性を有していることが報告されている。周生期の脳では、生殖器や副腎から生合成されたテストステロンやデヒドロエピアンドロステロンを代謝し、活用していると考えられる。そこで、本研究では周生期の脳におけるステロイドホルモンの生合成経路について、テストステロンシャワーによるインプリンティングがどのように働いているのかを明らかにした。また、周生期の環境化学物質が周生期のニューロステロイド産生経路に与える影響についても調べた。

一方で、周生期のテストステロン→エストロゲンのシグナルがその後どのような経路を経てインプリンティングを引き起こすのかは不明な点が多い。そこで、本年度は、このインプリンティングによって引き起こされる発現遺伝子の変化を gene chip を用いてスクリーニングした。

## 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。初代培養細胞や cell line による in vitro アッセイから、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. テストステロンによる neonatal インプリンティング時のステロイド代謝変動

近年、脳神経内においてステロイドホルモンの生合成が行われ、ニューロステロイドとして機能していることが報告された。本研究では、周生期のステロイドホルモンの代謝経路が通常の adult とどのように変わっているのかを明らかにする為、ステロイドホルモン代謝酵素の活性や mRNA 発現レベルについて測定を行った。また、神経細胞の中でステロイドホルモンの生合成能が高いグリア細胞について、周生期を想定したテストステロン曝露による影響に関して明らかにした。C6 cell line や視床下部由来の初代培養細胞におけるステロイドホルモンの代謝経路や活性の変化を明らかにした。

### 3. neonatal インプリントイング時の視床下部における環境化学物質の影響

周生期に環境ホルモンの一つビスフェノール A を曝露し、ステロイドホルモン生合成系にどのような影響を与えるのかを明らかにした。

### 4. 脳神経系におけるエストロゲン標的遺伝子のスクリーニング

周生期においてエストロゲンの標的遺伝子は不明であり、インプリントイングによってどのようなシグナルが引き起こされるのかは明らかにされていない。そこで、周生期のテストステロンシャワー→エストロゲンによるインプリントイングが起こらないメスに関して、同時期にテストステロン

を投与し、gene chip によって変動する mRNA のスクリーニングを行った。

### (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

エストロゲンは CYP 分子種の一つ、アロマターゼ (CYP19) によって生合成される。オスでは、精巣から分泌されたテストステロンが脳のアロマターゼでエストロゲンに変換され、脳がエストロゲンによってインプリントイングされ、性成熟後に性行動がオス化する。メスでは、この時期に体幹でエストロゲンがトラップされるため、エストロゲンは脳へは運ばれないことも分かっており、脳内アロマターゼは「エストロゲンの産生→インプリントイング→成熟後の正常な性行動・性ホルモン分泌」を決定付ける重要な酵素である。我々は、昨年度までの研究において、この時期のインプリントイングへの影響を *in vivo* でスクリーニングする系を確立するため、1) トラ

ンスジェニック動物の作成、2) 脳神経系におけるエストロゲン標的遺伝子のスクリーニングの影響、を計画し、以下の結果を得た。

### 1. トランスジェニック動物の作成

我々は、トランスジェニックマウス作成のために、ERE-レポーター遺伝子カセットの条件設定及び調製を行った。昨年度の研究により、エストロゲンに特異的に感受性の高い ERE 単純繰り返し配列の連結クローンをカセットに組み込んだ。昨年度は、ERE-lacZ レポーターカセットを用いて、トランスジェニックマウスの作成・ブリーディングを行った。しかし、途中、lacZ レポーターでは脳神経細胞において非常にバックグラウンドが高く、エストロゲンシグナルの特異的な検出が難しいことが判明したため、同じ ERE 単純繰り返し配列の連結クローンにルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだカセットを作成した。現在、ラットに導入し、トランスジェニックを作成している。

### 2. テストステロンによる neonatal インプリント時のステロイド代謝変動

前年度は周生期脳において、アロマトラーゼやステロイド 5 $\alpha$  還元酵素がどのような変動を示すのかを明らかにした。本年度は、平成 14 年度に引き続き、3 $\beta$ HSD、17 $\beta$ HSD などテストステロン代謝に関わる酵素群がどのような影響を受けるのかを、real-time PCR やホルモン産生パターン

測定によって明らかにした。In vivo のテストステロン投与によって、新生仔ラットの視床下部では、17 $\beta$ HSD、アロマトラーゼ mRNA には変動が見られなかったが、ステロイド 5 $\alpha$  還元酵素の発現は有意に減少した。また、3 $\beta$ HSD の発現レベルは上昇することが明らかとなった。一方、ステロイド代謝活性の高いグリア細胞由来 C6 細胞や、新生仔期の視床下部の初代培養細胞では、テストステロンの曝露によって、アロマトラーゼ、ステロイド 5 $\alpha$  還元酵素 mRNA はともに発現レベルが上昇した。

### 3 neonatal インプリント時の視床下部における環境化学物質の影響

ビスフェノール A はエストロゲン受容体に弱い結合を持つことが知られているが、新生仔期の曝露によって、性成熟後の行動が変化することが報告されている。そこで、新生仔期のテストステロンによる視床下部のインプリントにビスフェノール A がどのような影響を与えるのかを、ステロイドホルモンの産生 pathway を中心に明らかにした。環境化学物質ビスフェノール A を周生期に曝露したラット視床下部において、デヒドロエピアンドロステロンからのアンドロステジオールの合成を促進させ、結果的にテストステロンの産生を促進させることが明らかとなった。

### 4. 脳神経系におけるエストロゲン標的遺伝子のスクリーニング



本年度は、マイクロアレイ解析法を用いて、周生期にテストステロンに曝露したメスラットの脳において、発現レベルが変動する遺伝子群のスクリーニングを行った。テストステロンシャワーによるインプリンティングのモデルとして、本来ならばインプリンティングの起こらない生後4時間以内の新生メスラットにテストステロン 0mg、0.1mg、1mg を皮下投与し、72 時間後の視床下部を採取した。視床下部より抽出した mRNA は、アフィメトリックス社の gene chip (RN-U34、約 1300 遺伝子) を用いてスクリーニングした。また、得られた結果について、リアルタイム RT-PCR 法でその変動を確認した。

テストステロン投与によって、Bcl-x, GABA B receptor 1, 1c, 1d, 2, gb2 subunit, NMDA receptor, Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger NCX2, Dopamine D3 receptor, Kainate receptor 2 subunit, Vesicular GABA transporte などの受容体群の発現レベルが減少した。また、mGluR5, Calcineurin A-beta, Glutamate-aspartate transporter, Monoamine oxidase B, L-type calcium channel alpha 2 subunit, beta 2 subunit などについてはその発現が上昇することがわかった。本研究によって、初めて、テストステロンシャワーによる neonatal インプリンティング時の視床下部の標的遺伝子の変動プロファイルが明らかとなった。特に、GABA などによる神経伝達調節が

neonatal インプリンティングによって変動することが示された。

#### D. 考察

テストステロンによる neonatal インプリンティング時のステロイド代謝変動

周生期の *in vivo* の視床下部ではテストステロン曝露によって 5 $\alpha$ 還元酵素の発現が抑制されたが、*in vitro* ではその mRNA 発現量に変化は認められなかった。また、C6 細胞ではテストステロン曝露によって 5 $\alpha$ 還元酵素の発現は増加し、*in vitro* や、モデル細胞において、*in vivo* の再現性が認められないことがわかった。3 $\beta$ HSD については、テストステロン曝露によって *in vivo*、*in vitro* のいずれの実験系でも mRNA レベルの増加が認められ、プレグネノロンや胎児期に大量に生合成され放出されるデヒドロエピアンドロステロンからアンドロゲンを合成する 3 $\beta$ HSD がテストステロンによる発現制御を受けている可能性が考えられた。

グリア細胞である C6 細胞では、ステロイド代謝酵素である 3 $\beta$ HSD、17 $\beta$ HSD のいずれの酵素も発現していたが、デヒドロエピアンドロステロンを基質とした場合、代謝物としてアンドロステンジオールが多く検出されたことから、3 $\beta$ HSD よりも 17 $\beta$ HSD 依存の活性がより高いことが示唆された。視床下部由来の初代培養細胞でも、同様に、胎児期・新生時期に血中濃度が高

くなるデヒドロエピアンドロステロンはアンドロステンジオールに変化しやすいことが明らかとなった。

neonatal インプリントイング時の視床下部における環境化学物質の影響

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トイングを阻害し、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。ビスフェノール A の周生期曝露によって脳の性分化にどのような影響を与えるのか明らかにされていない。エストロゲンはラットの性的二型核の形成に影響を与えるが、ビスフェノール A 曝露では影響が見られないとの報告もある。しかし、性成熟後にビスフェノール A 曝露ラットでは行動に影響が認められることも報告されている。今回の結果では、ビスフェノール A は周生期のホルモン生合成経路に影響を及ぼしていることが示唆された。

脳神経系におけるエストロゲン標的遺伝子のスクリーニング

周生期のテストステロン→エストロゲンによって変動する遺伝子群をスクリーニングした。これまでの GABA-A に加え、GABA-B も周生期のインプリントイングによって発現が変動することが明らかとなった。GABA-A 受容体は周生期に Ca の細胞内流入

を起こし、CREB リン酸化や c-fos 発現増加などによって BDNF mRNA 増加を引き起こし、細胞の生存や樹状突起形成を促進することが報告されている。テストステロンから変換されたエストラジオールはこの GABA-A 作用を増強することが知られている。今回、GABA の研究で明らかとなった GABA-B は、ラット新生時では発達していないが、プレシナプスでは抑制的に機能していることが報告されている。

また、シヌクレイン  $\alpha$  は、鳥類では、テストステロンによって発現が増加し、シナプスの保護に働くことが報告されている。今回の研究において、ラットでもテストステロンによってその発現が制御されていることが示唆された。

## E. 結論

本研究によって、周生期のテストステロンシャワーによる neonatal インプリントイング時の標的因子を同定することができた。特に、これまでに報告のあった GABA-A に加え、GABA-B についても、周生期のインプリントイングによってその発現が抑制されることが分かった。また、周生期におけるテストステロン曝露によって、ステロイドホルモンの生合成酵素の発現や活性が変動することが分かった。一方で、ビスフェノール A などの環境化学物質は、周生期におけるこれら neurosteroid の合成経路についても影響を与えることが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Zein Shaban, Samir El-Shazlyb, Mayumi Ishizuka, Kazuhiro Kimura, Akio Kazusaka, and Shoichi Fujita. PPAR · dependent Modulation of Hepatic CYP1A

by Clofibrilic Acid in Rats (in press)

2) Konomu Saito, Hyung-Sub Kim, Noriaki Sakai, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rat (in press)

3) Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. Arch Toxicol 2003 Aug,77(8) 446-51.

4) 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.

5) Ishizuka M, Yonemoto J, Zaha H, Tohyama C, Sone H. Perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters

sex-dependent expression of hepatic CYP2C11. J Biochem Mol Toxicol. 2003,17(5) 278-85.

6) Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Ishinazaka Tsuyoshi, Sakurai Yasunori. Organochlorine compound accumulation in Steller sea lion Eumetopias jubatus migrating along the coast of Hokkaido in northern Japan. Jpn J Toxicol. 2003,6(1) 1-10

### 2. 学会発表

1) 第135回日本獣医学会 (平成15年春)

① Nakano et al. マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—

② Saji et al. ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価

③ Ibrahim et al. Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

2) 第30回 日本トキシコロジー学会

① Nakano et al. マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—

② Sasaki et al. 抗菌剤フラソリドンとその代謝物が肝薬物代謝酵素系に与える影響

3) 環境ホルモン学会 第6回研究発表会

① Joji Tsunada, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka and Shoichi Fujita. Transient neonatal exposure of brain to testosterone surge

initiates amplification of  
testosterone production in  
astrocytes

② Naosuke Saji, Mayumi Ishizuka,  
Akio Kazusaka, Shoichi Fujita.  
Biomonitoring of the Harbor  
Seawater Environment in Hokkaido  
Coast with Induced Hepatic  
Cytochrome P450 of Minnow

4) Annual Meeting of Society of  
Environmental Toxicology and Chemistry  
in New Zealand

① Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita,  
Yoko Goto, Takeomi Isono, Tsuyoshi  
Ishinazaka, Vladimir N. Burkanov,  
Yasuhiro Sakurai. Organochlorine  
pollutions in Steller SeaLions  
Eumetopias Jubatus living in the  
far eastern waters

② Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka,  
Akio Kazusaka, Shoichi Fujita.  
Short period exposure of di-(2-  
ethylhexyl) phthalate regulates  
testosterone and arachidonic acid

metabolisms in testis of  
prepubertal rats

5) バイオアッセイ研究会・環境毒性学会

① 佐治尚介、石塚真由美、数坂昭夫、  
藤田正一 ウグイを用いた小樽、石狩、  
美国港周辺の環境汚染の評価

② 星野広志、藤田正一、後藤陽子、磯  
野岳臣、石名坂豪、Vladimir N.  
Burkanov, 桜井泰憲. Organochlorine  
pollutions in Steller SeaLions  
Eumetopias Jubatus living in the  
far eastern waters (極東海域に棲息  
するトドにおける有機塩素系化合物汚  
染)

③ Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka,  
Akio Kazusaka, Shoichi Fujita.  
Short period exposure of di-(2-  
ethylhexyl) phthalate regulates  
testosterone and arachidonic acid  
metabolisms in testis of  
prepubertal rats

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

テストステロンによる neonatal インプリンティング時のステロイド代謝酵素の変動  
—in vivo におけるステロイド代謝経路の変動—

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

研究協力者 網田丈二 北海道大学・大学院獣医学研究科  
環境獣医科学講座

#### 研究要旨

胎生仔期や新生期仔は、神経細胞が分化し、神経ネットワークを形成する重要な時期である。特に、哺乳類では周生期脳のスレ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、この時期の内分秘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。

前年度は周生期脳において、アロマトラーゼやステロイド  $5\alpha$  還元酵素がどのような変動を示すのかを明らかにした。本年度は、平成 14 年度に引き続き、CYP19（アロマトラーゼ）やステロイド  $5\alpha$  還元酵素以外にも、 $3\beta$ HSD、 $17\beta$ HSD などテストステロン代謝に関わる酵素群がどのような影響を受けるのかを、real-time RT-PCR によって、mRNA レベルで明らかにした。

In vivo 実験において、メスへの周生期のテストステロン投与によって、72 時間後の新生仔ラットの視床下部では、 $17\beta$ HSD、アロマトラーゼ mRNA には変動が見られなかったが、ス

テロイド 5 $\alpha$  還元酵素の発現は、コントロール群に比べて有意に減少した。また、3 $\beta$ HSD の mRNA 発現レベルは、テストステロン曝露によって上昇することが明らかとなった。

#### 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イングを阻害し、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。

周生期における脳インプリンテイングには、アロマターゼ (CYP19) 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。また、テストステロンの生合成には 3 $\beta$ HSD、17 $\beta$ HSD、CYP17 などさまざまな酵素群が関わっている(図 1)。最近では、ステロイド合成酵素は生殖器や副腎以外に、脳にも高頻度で発現し、ニューロステロイドの生合成に寄与していることが報告されている。しかし、周生期におけるニューロステロイドの生合成系が Adult とどのように違うのかについては、明らかにされていない。そこで、本研究では、周生期における精巣からのテストステロン分泌が脳のニューロステロイド産生にどのような影響を与えるのかについて明らかにする為、以下の実験を行った。

#### B. 研究方法

in vivo におけるテストステロン曝露の影響

生後 4 時間以内のラットにテストステロンを皮下投与し、72 時間後に視床下部を採取した。ステロイドホルモン生合成酵素 (3 $\beta$ HSD、17 $\beta$ HSD、CYP17、CYP19、ステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素など) について mRNA 発現レベルを real time RT-PCR で測定した。

(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

in vivo におけるテストステロン曝露の影響

テストステロン曝露によって、 $3\beta$ HSD の mRNA 量は増加した。一方で、テストステロンを活性型デヒドロテストステロンに変換する  $5\alpha$ 還元酵素 (type2) の発現レベルはテストステロン曝露で顕著に減少することが明らかとなった(図2)。

#### D. 考察

周生期の *in vivo* の視床下部ではテストステロン曝露によって  $5\alpha$ 還元酵素の発現が抑制された。従って、*in vivo* ではテストステロンの濃度上昇に伴ってアンドロゲン産生の負の方向に制御が移行する可能性が考えられた。

#### E. 結論

周生期のテストステロン曝露によって脳視床下部におけるニューロステロイド合成系に関与する酵素の発現はテストステロン産生について正の方向に制御されていることが明らかとなった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. Arch Toxicol. 2003 Aug,77(8) 446-51.

2) 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.

3) Ishizuka M, Yonemoto J, Zaha H, Tohyama C, Sone H. Perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11. J Biochem Mol Toxicol. 2003,17(5) 278-85.

##### 2 学会発表

##### 1) 第135回日本獣医学会 (平成15年春)

① Nakano et al. マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—

② Saji et al. ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価

③ Ibrahim et al. Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

##### 2) 第30回 日本トキシコロジー学会

① Nakano et al. マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—

② Sasaki et al. 抗菌剤フラゾリドンとその代謝物が肝薬物代謝酵素系に与える影響

3) 環境ホルモン学会 第6回研究発表会

① Joji Tsunada, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka and Shoichi Fujita. Transient neonatal exposure of brain to testosterone surge initiates amplification of testosterone production in astrocytes.

② Naosuke Saji, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Biomonitoring of the Harbor Seawater Environment in Hokkaido Coast with Induced Hepatic Cytochrome P450 of Minnow

4) Annual Meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry in New Zealand

① Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Tsuyoshi Ishinazaka, Vladimir N. Burkanov, Yasuhiro Sakurai. Organochlorine pollutions in Steller Sea Lions Eumetopias Jubatus living in the far eastern waters

② Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats

5) バイオアッセイ研究会・環境毒性学会

① Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-

ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats.



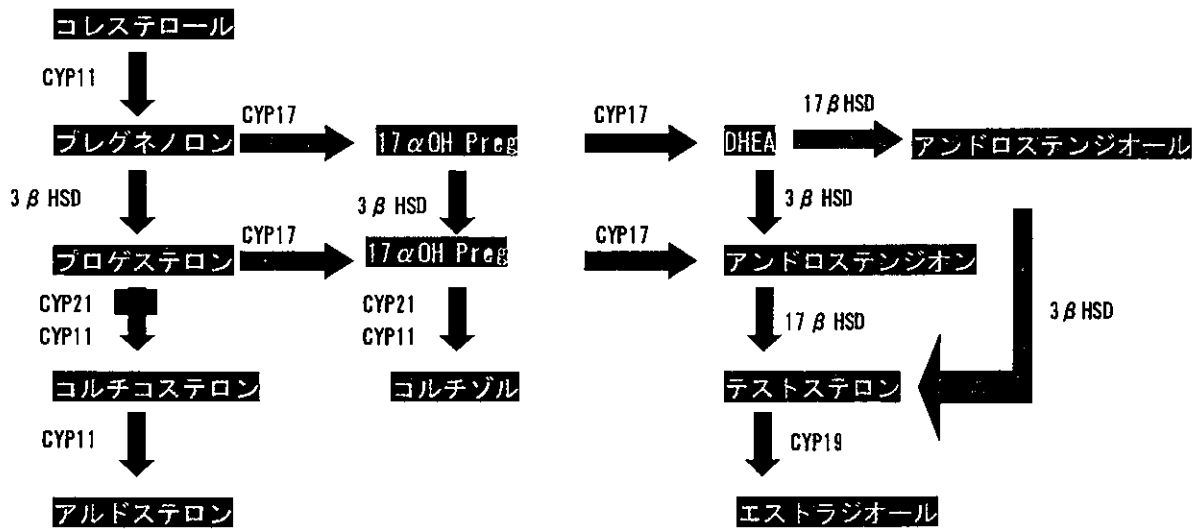


図1 ステロイドホルモン合成経路。Preg プログネノロン。  
DHEA デヒトロエピアンドロステロン

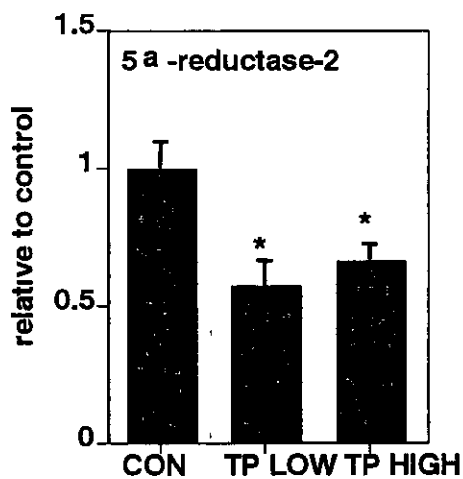


図2 視床下部における5α還元酵素のmRNA発現レベルの変動。生後4時間後のメスラットにテストステロンを皮下投与し視床下部における5α還元酵素の発現変動をreal-time RT-PCR法を用いて測定した。TP LOW テストステロン100μg/匹、TP HIGH テストステロン1mg/匹皮下投与。CON 対照群としてコーンオイルを投与した

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

テストステロンによる neonatal インプリント時のステロイド代謝変動  
—グリア細胞におけるステロイド代謝経路の変動—

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 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

研究協力者 網田丈二 北海道大学・大学院獣医学研究科  
環境獣医科学講座

研究要旨

グリア細胞はニューロンに比べてステロイド代謝活性が顕著に高いことが報告されている。そこで、グリア細胞のニューロステロイド産生経路が、周生期のステロイドホルモンインプリントによってどのように変化するのかについて調べた。グリア細胞由来 C6 細胞や、新生仔期の視床下部の初代培養細胞では、テストステロンの曝露によって、アロマトーゼ、ステロイド  $5\alpha$  還元酵素 mRNA はともに発現レベルが上昇した。

テストステロンの前駆体であり、胎児期や新生時期に産生能が上昇し、血中濃度が高くなるデヒドロエピアンドロステロンを基質としたところ、C6 細胞や視床下部由来の初代培養細胞では、 $17\beta$ HSD によって生合成されるアンドロステンジオールが主要な代謝物として検出された。その生成速度は曝露 36 時間後まで時間依存的であった。

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。

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→エストラジオールの変換が不可欠である。また、テストステロンの生合成には  $3\beta$ HSD、 $17\beta$ HSD、CYP17 などさまざまな酵素群が関わっている。最近では、ステロイド合成酵素は生殖器や副腎以外に、脳にも高頻度で発現し、ニューロステロイドの生合成に寄与していることが報告されている。

神経系におけるステロイドホルモンの産生は特にグリア細胞で活発であることが報告されている。そこで、本研究では、視床下部由来の初代培養細胞やグリア細胞の株化細胞である C6 細胞を用いて、グリア細胞におけるステロイドホルモンの産生系と、それらにテストステロンの周生期曝露がどのような影響を与えるのかを明らかにする為に、以下の実験を行った。

## B. 研究方法

### 1. 初代培養細胞におけるテストステロン曝露のステロイド生合成系への影響

新生仔ラット視床下部を採取し、初代培養を行った。培養細胞にテストステロンを曝露し、ステロイドホルモン代謝経路が

どのように変動するのかについて、real time RT-PCR 法で発現する代謝酵素 mRNA を測定すると共に、代謝物の測定を行った。

### 2. グリア細胞 (C6) におけるテストステロン曝露のステロイド生合成系への影響

最近の報告でステロイドホルモンの代謝活性はニューロンではなく、グリア細胞で高いことが分かっている。そこで、ラットグリア細胞 cell line である C6 細胞を用いて、テストステロンの曝露によって、ステロイドホルモン代謝経路がどのように変動するのかについて、real time RT-PCR 法で発現する代謝酵素 mRNA を測定すると共に、代謝物の測定を HPLC を用いて行った。

### (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. 初代培養細胞におけるテストステロン曝露のステロイド生合成系への影響

視床下部由来の初代培養細胞では、テストステロン曝露によって、高濃度 ( $100\mu$

M)では  $3\beta$ HSD や CYP19mRNA の増加が認められた。

一方、テストステロン前駆体であり、胎児期・新生時期に生合成能が高くなり、血中濃度が上昇するデヒドロエピアンドロステロンを視床下部由来の初代培養細胞に曝露し、その代謝物濃度を測定したところ、曝露 12 時間後では、アンドロステンジオールの濃度はアンドロステンジオン濃度に比べて顕著に高い値を示した(図 1)。

## 2. グリア細胞 (C6) におけるテストステロン曝露のステロイド生合成系への影響

C6 細胞では、ステロイド代謝酵素である CYP19、 $3\beta$ HSD、 $17\beta$ HSD、 $5\alpha$ 還元酵素に関して mRNA レベルで検出することができた。C6 細胞をテストステロンに曝露したところ、高濃度(100 $\mu$ M)では  $3\beta$ HSD や CYP19、 $5\alpha$ 還元酵素 mRNA の発現が増加した。特に  $5\alpha$ 還元酵素はテストステロンの濃度依存的に発現が増加した。

テストステロン前駆体のデヒドロエピアンドロステロンを C6 細胞に曝露し、経時的に代謝物の濃度変化を調測定したところ、アンドロステンジオン、アンドロステンジオール、テストステロンに関して 36 時間まで、時間依存的にその濃度が増加することが分かった。特にアンドロステンジオールの産生は著しく(図 2)、グリア細胞である C6 細胞では、デヒドロエピアンドロステロンは、よりアンドロステンジオールに代謝されやすいことが明らかとなった。一方、テストステロンや、テストステロンの

活性型であるジヒドロテストステロンの前処置によって、C6 細胞ではアンドロステンジオールの生合成に変化は見られなかったが、アンドロステンジオンの生成は増加することが明らかとなった。

## D. 考察

周生期の *in vivo* の視床下部ではテストステロン曝露によって  $5\alpha$ 還元酵素の発現が抑制されたが、*in vitro* ではその mRNA 発現量に変化は認められなかった。また、C6 細胞ではテストステロン曝露によって  $5\alpha$ 還元酵素の発現は増加し、*in vitro* や、モデル細胞において、*in vivo* の再現性が認められないことがわかった。 $3\beta$ HSD については、テストステロン曝露によって *in vivo*、*in vitro* のいずれの実験系でも mRNA レベルの増加が認められ、プレグネノロンや胎児期に大量に生合成され放出されるデヒドロエピアンドロステロンからアンドロゲンを合成する  $3\beta$ HSD がテストステロンによる発現制御を受けている可能性が考えられた。

グリア細胞である C6 細胞では、ステロイド代謝酵素である  $3\beta$ HSD、 $17\beta$ HSD のいずれの酵素も発現していたが、デヒドロエピアンドロステロンを基質とした場合、代謝物としてアンドロステンジオールが多く検出されたことから、 $3\beta$ HSD よりも  $17\beta$ HSD 依存の活性がより高いことが示唆された。視床下部由来の初代培養細胞でも、同様に、胎児期・新生時期に血中濃度が高く