

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。また、テストステロンの曝露によってアンドロステンジオン濃度が増加することから、周生期のテストステロン濃度上昇が、ステロイドホルモンの生合成経路を変化させることが考えられた。

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

2) 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

3) 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 Hiki River, Kanagawa Prefecture, Japan. Chemosphere. 2003 May,51(6) 491-500.

4) 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

5) 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 誘導に伴うウロボ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) 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

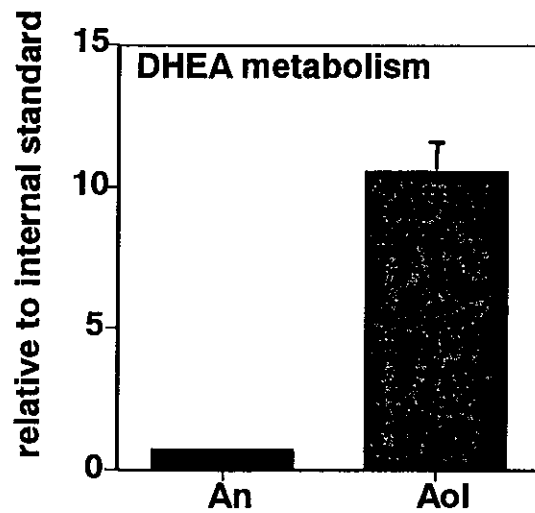


図1 視床下部由来初代培養細胞におけるデヒドロエピアンドロステロンの代謝。視床下部由来培養細胞にデヒドロエピアンドロステロンを曝露し、12時間後の代謝物の濃度をHPLCで測定した。An アンドロステンジオン、Ao1 アンドロステンジオール。

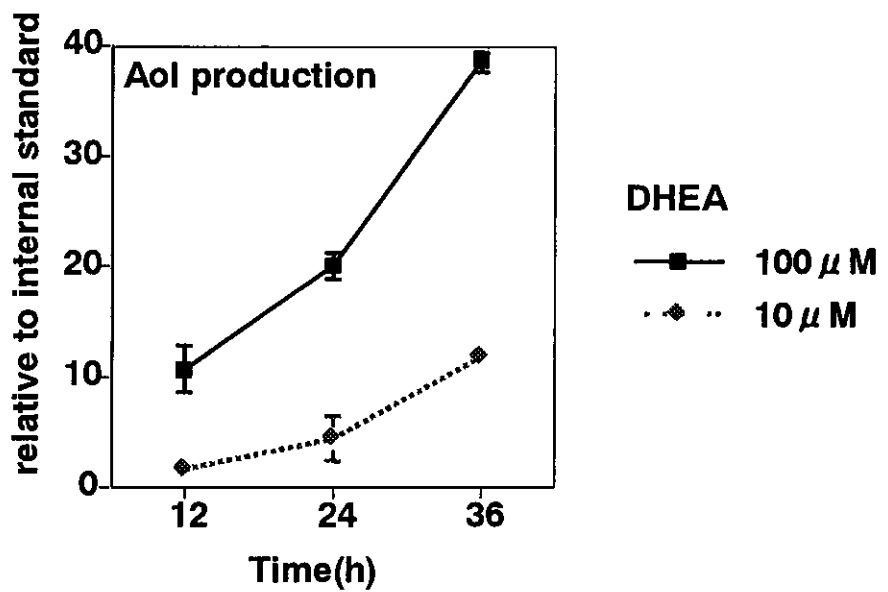


図2 C6細胞にデヒドロエピアンドロステロンを曝露した時のアンドロステンジオールの産生。C6細胞にデヒドロエピアンドロステロンを曝露し、12時間、24時間、36時間後の代謝物の濃度をHPLCで測定した。DHEA デヒドロエピアンドロステロン。Ao1 ア

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

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—

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

哺乳類周生期では、脳神経のエストロゲン・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が報告されている。ビスフェノール A はエストロゲン受容体への結合性が極めて弱いとされてきた。しかし、ビスフェノール A の周生期曝露が、化学物質への感受性の高い発達期の脳神経系に影響は不明である。

昨年度の研究ではビスフェノール A の周生期曝露によって発現が変動する遺伝子をスクリーニングした。そこで、本年度は、環境化学物質ビスフェノール A への曝露によって周生期のステロイド産生系がどのような影響を受けるのか、視床下部を中心に調べた。ビスフェノール A の曝露によって、テストステロン前駆体であるアンドロステオンジオールの生成量が増加することが分かった。

A. 研究目的

平成 14 年度の研究では、環境化学物質の一つであるビスフェノール A の脳発

達への影響について、曝露によって周生期に発現量が増加する mRNA を cDNA マイクロアレイによって解析した。本年度は、

ビスフェノール A への曝露によって周生期のステロイド産生系がどのような影響を受けるのか、視床下部を中心に調べた。

B. 研究方法

ラットグリア細胞である C6 細胞を実験に供した。培養細胞はテストステロン単曝露、テストステロン+ビスフェノール A 共曝露し、ステロイドホルモン生合成系への影響を調べた。ステロイドホルモンは特に、周生期に分泌の多いデヒドロエピアンドロステロンを基質として、生成される代謝物を HPLC を用いて解析した。

(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

テストステロン+ビスフェノール A 曝露によって、テストステロン単曝露に比べて、テストステロン前駆体であるア

ンドロステンジオールの生合成経路が活性化されることが明らかとなった。

また、テストステロン単曝露した C6 細胞では、無処置細胞に比べるとアンドロステンジオンの生成量が増加しているが、ビスフェノール A はこの増加を抑制することも明らかとなった。

D. 考察

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。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。特にアンドロステンジオン、アンドロステンジオールの生合成量の変化から、 3β HSD や 17β HSD 依存の活性に影響を与えることが予測された。

E. 結論

ヒスフェノール A 曝露によって周生期のステロイドホルモン生合成経路が変化する可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Ishinazaka Tsuyoshi, Sakura 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 Fujit. 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

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

視床下部におけるエストロゲン標的遺伝子のスクリーニング

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

研究協力者 綱田丈二 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・新生仔期では、精巣からテストステロンが一時的に分泌され、脳に到達し、CYP19(アロマターゼ)によってエストラジオールに変換され、脳の性分化を引き起こすさまざまな変化が mRNA、蛋白合成レベルで起こることが報告されている。しかし、このインプリンティング時におけるテストステロン→エストロゲンの標的遺伝子は不明な点が多い。そこで、本研究では、周生期の視床下部において、テストステロンシャワーによって引き起こされる mRNA プロファイルの変動のスクリーニングを行った。

新生メスラットにテストステロンを投与し、アフィメとリックス社の gene chip を用いて、視床下部に発現する mRNA の変動プロファイルを調べた。特に、GABA-B やシヌクレインについて、テストステロン曝露によって発現が抑制あるいは上昇することが明らかとなった。

A. 研究目的

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。しかし、インプリンティング

時におけるテストステロン→エストロゲンの標的遺伝子は明らかにされていない。昨年度の我々の研究から、周生期における視床下部のアロマターゼ発現量は、これまでの報告と異なり、大きな雌雄差は認められ

ないことが明らかとなった。従って、メスにおいても、テストステロン曝露によって、オスと同じく視床下部でのアンドロゲンのエストロゲンへの変換や、それによって標的遺伝子の発現の変動が引き起こされる可能性が考えられる。そこで本研究では、このことを利用し、周生期の視床下部において、テストステロンシャワーによって引き起こされる mRNA プロファイルの変動のスクリーニングを行った。

B. 研究方法

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。

(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、アロマトラーゼ (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トラ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ティングされ、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、脳内アロマトラーゼは「エストロゲンの産生→インプリンティング→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。

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⁺-Ca²⁺ 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(表 1)。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(表 1)。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。GABA-B 受容体各サブユニットの mRNA 発現レベルの低下は real-time RT-PCR 法によって確認された(図 1)。

一方、鳥類ではテストステロン曝露で発現が増加することが知られているシヌクレインについて、ラットにおいても同様に mRNA 発現レベルが上昇することが明らかとなった。テストステロン曝露によるシヌクレイン発現の増加は低濃度および高濃度の両方で認められた。

D. 考察

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 受容体に加え、GABA-B 受容体も周生期のインプリンティ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ロジオールはこの 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 α 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 インプリンティ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ティングによってその発現が抑制されることが分かった。

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 \cdot -dependent Modulation of Hepatic CYP1A by Clofibric 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) 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 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

■ Down

- GABA B receptor 1c,1d,1,2 subunit
- NMDA receptor
- Na-Ca exchanger NCX2
- Kainate receptor 2 subunit
- Vesicular GABA transporter
- Dopamine D3 receptor
- Bcl-x

■ Up

- mGluR5
- Calcineurin A-beta
- Glutamate-aspartate transporter
- Monoamine oxidase B
- L-type calcium channel
- alpha 2 subunit,beta 2 subunit

表1 テストステロン曝露によって変化があった主な遺伝子。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 mRNA 発現変動を gene chip を用いて解析した。対照群(コーンオイル投与群)と比較して有意に差があった主な遺伝子を示す。

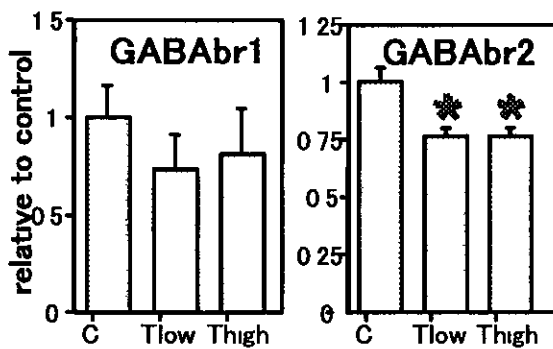


図1 テストステロン曝露による GABA-B 受容体の視床下部 mRNA 発現レベルの変動。生後4時間後のメスラットにテストステロンを皮下投与し、視床下部における GABA-B 受容体サブユニットの mRNA 発現変動を real-time RT-PCR を用いて解析した。T low テストステロン 100 μ g/匹、T high テストステロン 1mg/匹。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Zein Shaban, Samir El-Shazlyb, Mayumi Ishizuka, Kazuhiro Kimura, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita.	PPAR alpha dependent Modulation of Hepatic CYP1A by Clofibric Acid in Rats	Archives of Toxicology			in press
Saito K, Kim HS, Sakai N, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S.	Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rat	J Pharmaceutical Sciences			in press

Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S.	Short period exposure to d1-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats.	Arch Toxicol.	77(8)	446-451	2003
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 (<i>Cyprinus carpio</i>) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan.	Chemosphere	51(6)	491-500	2003
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.	17(5)	278-285	2003
Hoshino H, Fujita S, Goto Y, Isono T, Ishinazaka T, Yasunori S.	Organochlorine compound accumulation in Steller sea lion <i>Eumetopias jubatus</i> migrating along the coast of Hokkaido in northern Japan	Jpn J Toxicol.	6(1)	1-10	2003