

2003/280

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

中枢神経系に影響を与える内分泌かく乱化学物質の

順位付けとヒトでのリスク予測と回避法の研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 船江 良彦

平成16年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
中枢神経系に影響を与える内分泌かく乱化学物質の順位付けと ヒトでのリスク予測と回避法の研究 船江良彦	----- 1
II. 分担研究報告書	
1. 脳神経細胞膜に存在するビスフェノール A 結合蛋白の 生理的意義解明と内分泌かく乱物質の スクリーニング法の確立 船江良彦	----- 11
2. PC12 細胞でのドパミン分泌に対する影響 長田真優子	----- 19
3. 内分泌かく乱化学物質の新規細胞膜 G 蛋白質連関型受容体に 及ぼす影響とその機序・順位付け—内分泌かく乱化学物質の 新しい毒性評価系に関する研究 植田 弘師	----- 23
4. 内分泌かく乱化学物質の中枢神経形成過程に及ぼす影響 今岡 進	----- 29
5. 内分泌かく乱化学物質 Bisphenol A (BPA)の脳神経系形成に 及ぼす影響-Protein Disulfide Isomerase(PDI)の発現変動に着目して 伏木信次	----- 34
6. ビスフェノール A が胎仔の脳発達に与える影響に関する研究 山野恒一	----- 36
7. 胎児・幼児期曝露による中枢神経系腫瘍発生影響 福島昭治	----- 39

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括報告書

中枢神経系に影響を与える内分泌かく乱化学物質の順位付けとヒトでのリスク予測と
回避法の研究

主任研究者 船江良彦 大阪市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨

本研究では、内分泌かく乱化学物質の中枢神経系への影響をそれらの物質のスクリーニング法の開発およびその機序の解明から検討した。

甲状腺ホルモンのリザーバーでビスフェノール結合蛋白質である PDI に対する作用からフェノール基を有する化合物が甲状腺ホルモンをかく乱し中枢神経系に影響を与えることが明らかになった。またドパミンの PC12 細胞からの遊離には膜に存在するエストロゲン様リセプターを介する系の関与が示唆された。現在まで得られた研究結果は下記のとおりである。

- 1) ヒト PDI に対する T_3 結合阻害活性を指標に、内分泌攪乱作用が疑われている化学物質の影響について調べた。ラット PDI との種間による大きな差はみられず、BPA をはじめとするフェノール基含有化合物によって T_3 の結合が阻害された。（船江）
- 2) 我々は、脳内ドパミンの減少により神経発達に悪影響を及ぼす危険性を有する化学物質を見つけ出す簡便な評価法として、PC12 細胞内のドパミン量変化が指標になると考えた。その結果、ビスフェノール A (BPA) と同等なもしくはそれ以上の強いドパミン減少作用を有する化学物質が存在することが明らかになった。（長田）
- 3) 内分泌かく乱化学物質が MAP2 に作用し、微小管重合や海馬神経細胞の突起伸長に対し作用することを明らかにした。さらにこの両作用を抑制するノニルフェノールにはマウス学習機能を低下させる作用を見いだした。（植田）
- 4) ヒトの培養細胞を用いたアッセイ系に BPA を添加すると、低酸素応答阻害がみられ、この活性発現には BPA の 2 つのメチル基が重要であることが明らかになった。アフリカツメガエル卵を用いた実験でも発生異常を示すにはメチル基が重要であった。（今岡）
- 5) Protein disulfide isomerase(PDI)は estradiol、3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3)などのホルモンと、内分泌かく乱化学物質の一つである BPA が競合的に結合するサイトを持つ。BPA が発生期の中枢神経に及ぼす作用を、特に PDI の中枢神経系での発現変動に着目して調べた。胎生 12.5 日から 18.5 日における胎児脳への BPA 暴露は、大脳皮質板での PDI 発現の異常、皮質板の成熟のかく乱をきたし、神経細胞の遊走後の分化、成熟に影響を及ぼす可能性が示唆された（伏木）
- 6) BPA を 1mg/L を含む飲料水で飼育された母マウスから生まれた仔の脳重は対照群に

くらべ 10%低値であり、その神経細胞の密度は高くなっていた。また海馬でのエストロゲン受容体 α と synaptophysin の発現は正常仔にくらべ差異はなかった。また、仔の血中 TSH 値は正常であった（山野）

- 7) 妊娠期間および授乳期間中に BPA、さらに妊娠 18 日目に発がん物質、N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)を母動物に投与した。F₁動物の生後 40 週における脳、脊髄の肉眼的病変に BPA の影響は認められなかった。（福島）

分担研究者

長田真優子

大阪市立大学大学院医学研究科助手

植田弘師

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授

今岡進

関西学院大学理工学部生命科学科教授

伏木信次

京都府立医科大学教授

山野恒一

大阪市立大学大学院医学研究科教授

福島昭治

大阪市立大学大学院医学研究科教授

A. 研究の目的

近年、内分泌かく乱化学物質が、内分泌系・生殖器系に対してのみならず、神経系や免疫系にも様々な影響を与えていることが報告されている。これまでの多くの研究から、内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様作用発現に関しては、「エストロゲン受容体を介した分子生物学的機構」が解明され、「エストロゲン様作用を示す化学物質のスクリーニング法」などの開発も進んでいる。しかし中枢神経系への作用に関しては、「内分泌かく乱化学物質と行動異常や知能低下との関連性」が示唆され、現在問題視されている

にも関わらず、未だ作用機序など不明な点が多い。そこで、本研究では、内分泌かく乱化学物質の中枢神経系への作用を予測するスクリーニング法を開発し、ヒトでのリスク予測とリスク回避法を開発するのが目的である。

B. 研究方法

1. BPA 受容体に対する影響（船江）

ヒト PDI 遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させたヒスチジン融合 PDI を用いて T₃との競合的結合実験をもとに、BPAをはじめとする内分泌攪乱作用を及ぼす可能性のある物質についてスクリーニン

グを行った。ラット肝臓より核抽出液を調製し、甲状腺ホルモンレセプターに対する T_3 との競合的結合実験をもとに、PDI に対して T_3 結合阻害活性の見られた化学物質についてスクリーニングを行った。

2. PC12 細胞でのドパミン分泌に対する影響 (長田)

被検体には、ホルモンかく乱作用を有することがすでに知られている 21 種類の化学物質を用いた。それぞれの化学物質を含む培養液で 30 分間培養した PC12 細胞を PBS で回収し、超音波破碎した。これらを遠心した後、このときの上清に含まれるドパミン量を細胞内ドパミン量として定量した。定量には HPLC を用い、ECD で検出した。このとき、内標準物質としてデオキシエピネフリンを用い、また遠心後の沈渣を用いて蛋白定量することにより補正した。

3. 神経ステロイドに対する影響 (植田)

微小管重合能測定：マウス脳より精製したチューブリンと MAP2 の混合による濁度上昇を計測し、被験物質存在下の効果を解析した。

培養海馬神経細胞突起伸長測定：17 日胚ラット海馬神経細胞の培養 2 日後に被験試薬を添加し、その 2 日後に伸長した突起を蛍光免疫染色により観察し測定した。

マウス学習行動解析：被験試薬脳室内投与 1 日目のマウスをステップスルー型学習試験装置によりトレーニングし、その 24 時間後に学習効果の試験を行った。

4. 甲状腺ホルモンによるオタマジャクシ尾部のアポトーシスに対する影響

(今岡)

ヒト培養細胞 Hep3B の低酸素誘導性遺伝子エリスロポエチン(EPO)をマーカーに

したアッセイ系に BPA およびその誘導体(水酸基をメチル化した BPA-OMe、中央のメチルが 1 個の BPE、中央のメチルのない BPF) を添加して影響を調べた。アフリカツメガエルの受精卵および尾芽胚に BPA およびその誘導体を投与して影響を調べた。さらに、BPA 結合因子についても検討した。

5. BPA 受容体の発現に対する影響 (伏木)

妊娠マウス(ICR)に胎生 12.5 日から 18.5 日まで BPA (3mg/g 混餌) を投与し、胎生 18.5 日で胎仔脳を摘出、PLP 固定液で固定後パラフィン包埋切片を作成し、免疫組織化学的染色を施行した。一次抗体として、抗 PDI 抗体(船江教授より恵与 1:1000)、抗 Nestin 抗体(1:500)、抗 TUJ1 抗体(1:400)、抗 MAP2 抗体(1:1000)、抗 Neurofilament 抗体(1:1000)を用いた。胎生 18.5 日の脳ホモジネートで Western blot を行った。以上を BPA 投与群、非投与群で比較した。

6. 海馬のエストロゲン受容体に対する影響 (山野)

ICR 系マウスを用い、BPA 1mg/L を含む飲料水で飼育した母マウスから生まれた仔を実験群、正常飲料水で飼育された母マウスからの仔を対照群とした。(1) 両群各 12 匹の生後 5、13 日目の脳重と大脳の DNA 量、蛋白量を測定し、細胞密度(DNA 量/蛋白量)を検討した。(2) 両群の生後 0、4、8、10、15 日目の海馬での ER α と synaptophysin の発現を免疫組織化学的に検索した。(3) 両群の生後 5 日目の仔の血中甲状腺刺激ホルモン(TSH)を測定した。

7. 中枢神経系腫瘍発生に対する影響 (福島)

11 週齢の F344 ラットを用い、妊娠を確認

した母動物に妊娠 0 日から出生児の離乳まで Bisphenol A を 0, 0.05, および 200 mg/kg 体重/日の用量で毎日、強制経口投与した。また、ENU を 10 mg/kg 体重の用量で妊娠 18 日目に 1 回、静脈内投与した。F₁ 雄動物を生後 40 週まで無処置で飼育・観察した。生後 13 週で脳のドーパミン測定を、40 週で神経系の腫瘍発生を病理学的に検索した。

C. 研究結果と考察

1. BPA 受容体に対する影響 (船江)

ヒト PDI は、ラット PDI と同等の T₃ 結合親和性を示し、BPA, *p*-オクチルフェノールや、*p*-ノニルフェノール、2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、テトラプロモビスフェノール A、テトラクロロビスフェノール A が、ラット同様に T₃ の結合阻害活性を示した。一方、核内甲状腺ホルモンレセプターに対しては、*p*-オクチルフェノールや、*p*-ノニルフェノール、2,4-ジクロロフェノールは T₃ の結合阻害活性を示さなかった事から、これらの化学物質は甲状腺ホルモンレセプターよりもむしろ PDI に結合する事により、甲状腺ホルモン作用を攪乱する可能性が示唆された。

2. PC12 細胞でのドーパミンに対する影響 (長田)

今回用いた化学物質は、低濃度で生殖器の異常や内分泌、免疫、神経系に影響を与えるなど、ホルモンかく乱作用を有することが報告されている。とりわけ神経系への影響は脳の発達過程を変化させ正常な脳機能を乱すことから、その同定と作用機序の解明が急がれている。そのため、脳神経系に及ぼす影響を評価する確かな方法が必要であると考えられる。我々は、PC12 細胞内ドーパミン量の変化を指標として、21 種類の化学物質について

検討した。結果、BPA と同等もしくはそれ以上の強いドーパミン減少作用を有する化学物質が存在することが明らかになった。さらに、BPA 代謝物である MBP にも減少させる効果があったことから、脳発達の未成熟な胎児期において BPA 代謝物が脳内ドーパミンに影響を及ぼす可能性が考えられる。

3. 神経ステロイドに対する影響 (植田)

MAP2 依存的微小管重合作用に対し、BPA は単独作用は示さずプレグネノロンによる重合促進作用を阻害する重合拮抗阻害を示す化合物に分類された。ノニルフェノールは単独で微小管重合を阻害する重合抑制型の化合物に分類された。

培養海馬神経細胞の樹状突起伸長に対し、BPA は単独で無影響であったが、プレグネノロンによる樹状突起伸長促進作用や突起数増加作用を抑制した。一方、ノニルフェノールは単独で樹状突起の伸長をほぼ完全に抑制し、この効果はプレグネノロンあるいはプロゲステロンにより抑制された。

学習能はノニルフェノール投与で低下が観察された。プレグネノロンあるいはプロゲステロンの同時に投与によりこの抑制された学習効果が改善された。

4. 甲状腺ホルモンによるオタマジャクシ尾部のアポトーシスに対する影響 (今岡)

ヒト培養細胞を用いた低酸素応答のアッセイ系に BPA を添加したところ、顕著な EPO 発現抑制がみられた。BPA の誘導体を合成して検討したところ、BPA-OMe では、同様に誘導阻害がみられたが、BPF では見られず、この活性には BPA のジメチルの構造が必要であることが明らかになった。EPO が誘導されるには、低酸素感受性因子 HIF-1 が安定化される必要が

あり、HSP90 はこの安定化に関与しており、BpA が HSP90 と結合することで HIF-1 を不安定化分解していることが示唆された。一方、アフリカツメガエルの受精卵に、BPA の誘導体を添加したところ、低酸素応答阻害と同じで、BPF は BPA によって引き起こされるような神経盤形成不全などの発生異常を引き起こさなかった。このことは BPA による発生異常が HIF-1 を介して起こっている可能性を示唆している。

5. BPA 受容体の発現に対する影響

(伏木)

大脳皮質形成時期に一致した胎児脳への BPA 曝露は、大脳皮質板での PDI 発現の異常、皮質板の成熟のかく乱をきたし、神経細胞の遊走後の分化、成熟に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、BPA 曝露に伴った発生期終脳壁での遺伝子発現の網羅的解析、組織発生への影響解析を進める予定である。

6. 海馬のエストロゲン受容体に対する影響 (山野)

(1) 生後 5、13 日目の実験群の脳重は対照群の 90%、90% と有意に低値を示した。同日齢の実験群の大脳の細胞密度 (DNA 量/蛋白量) は対照群の 104%、113% と高値を示した。

(2) 対照群の海馬では ER α の発現は生後 4 日目頃から生後 10 日まで錐体細胞で増強していった。synaptophysin の発現も生後 4 日から生後 15 日にかけて増強していった。これらの発現は実験群の海馬でも同じであった。

(3) 対照群、実験群の血中 TSH 値はそれぞれ 2.02~3.53ng/ml、2.94~3.50ng/ml の範囲にあった。

BPA に曝露された仔の脳の細胞密度の高値は神経細胞の成熟の遅れを示唆して

いる。しかし、認知、記憶、学習の中枢である海馬では BPA の受容体である ER α と synaptophysin は正常に発現し、BPA が海馬のシナプス形成に影響を与える積極的な結果は得られなかった。また、BPA が仔の甲状腺ホルモンのかく乱させているような結果は得られなかった。

7. 中枢神経系腫瘍発生に対する影響 (福島)

分娩状況において、分娩時の平均出生児数は対照群と Bisphenol A 投与群との間に有意差を認めず、妊娠期間にも有意差を認めなかった。雄児動物の飼育期間中における体重増加および摂餌量に差を認めなかった。13 週齢での脳ドーパミン量においては差を認めなかった。40 週齢時における脳の絶対および相対重量に有意な差は認められず、また肉眼的所見においても脳、脊髄で種々の変化が認められたものの群間に有意な差を認めなかった。現段階では BPA の神経系腫瘍の発生に及ぼす影響は見られていない。

E. 結論

1. ラット PDI に対するフェノール基含有化合物による T₃ の結合阻害活性は、ヒト PDI においてもみられた。一方、核内 TRs に対しては、T₃ の結合阻害活性を示さないものがあり、これらの化学物質は PDI に結合する事により、T₃ の作用を攪乱する可能性が示唆された。(船江)

2. 我々の評価系により、21 種類の被検体のうち 5 種類の化学物質が、BPA と同様な細胞内ドーパミン量を減少させる作用を有していることが明らかになったよって、BPA 以外のホルモンかく乱作用を有することが報告されている化学物質にもドーパミン調節を乱す可能性が示唆された。(長田)

3. MAP2 が新たな内分泌かく乱化学物質の標的となり、微小管重合能、神経樹状突起伸長作用をかく乱し、その結果中枢神経機能である学習能に変調をきたすことが明らかとなり、この *in vitro* 及び *in vivo* の測定系による化学物質評価系として利用可能であることが示された。(植田)

4. BPA の新しい結合因子 HSP90 を見いだした。この結合には BpA のジメチル構造が必要であり、HSP90 と結合することで HIF-1 を不安定化し、発生過程特に中枢神経形成過程で重要な因子の発現に影響を与えている可能性が示唆された。(今岡)

5. 胎生 12.5 日から 18.5 日における胎児脳への BPA 曝露は、大脳皮質板での PDI 発現の異常、正常の皮質板成熟のかく乱をきたし、神経細胞の遊走後の分化、軸索伸長、投射、シナプス形成などにも影響を及ぼす可能性が示唆された。(伏木)

6. BPA に曝露された仔の脳では神経細胞の成熟の遅れが示唆された。しかし海馬では ER α と synaptophysin も正常に発現し、BPA が海馬のシナプス形成に影響を与える積極的な結果は得られなかった。また、BPA が仔の甲状腺ホルモンのかく乱させているような結果は得られなかった。(山野)

7. ラットを用いて神経系腫瘍の発生に及ぼす BPA の経胎盤および授乳曝露による影響を検討したところ、肉眼的に脳および脊椎腫瘍の発生に影響は見られていない。(福島)

F. 研究発表

1. 論文発表

Kishimoto W, Funae Y. et al.; Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain. *Endocrinology*, 5, 699-705 (2004)

Yoneda T, Funae Y. et al.; Bisphenol A nongenomically stimulates dopamine release via both N-type calcium channels and cyclic AMP pathway in PC12 cells. *J Neurochem*, 87, 1499-1508 (2003)

Suzuki T, Funae Y. et al.; Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience*, 117, 639-44 (2003)

Funae Y, Kishimoto W. et al.; CYP2D in the brain. *Drug Metab Pharmacokin*, 18, 337-349 (2003)

Mizuno D, Funae Y. et al.; Regulation of CYP2D4 gene expression in neural differentiated pheochromocytoma (PC12) cells via a novel transcriptional element. *Biochim Biophys Acta*, 1627, 121-128 (2003)

Osada M, Funae Y. et al.; NADPH-P450 reductase in the plasma membrane modulates the activation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). *J Biol Chem* 277, 23367-23373, (2002)

Imaoka S., Osada M. et al.; Induction of erythropoietin(hypoxia marker) in HEP3B cells by hypoxia depends on NADPH-dependent enzyme. *International Congress Series*, 1233, 273-279 (2002)

- Imaoka S, Osada M, et al.; Role of phenobarbital-inducible cytochrome P450s as a source of active oxygen species in DNA-oxidation. *Cancer Lett*, 203, 117-125 (2004)
- Fujita R. and Ueda H. et al; Protein kinase C-mediated necrosis-apoptosis switch of cortical neurons by conditioned medium factors secreted under the serum-free stress. *Cell Death Differ*, 10, 782-790 (2003)
- Fujita R. and Ueda H. et al.; Protein kinase C-mediated cell death mode switch induced by high glucose. *Cell Death Differ*, 10, 1336-1347. (2003)
- Hamabe W, Ueda H. et al; Neuronal necrosis inhibition by insulin through protein kinase C activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 307, 205-212 (2003)
- Inoue M, Ueda H. et al; In vivo pain-inhibitory role of nociceptin/orphanin FQ in spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther*, 305, 495-501 (2003)
- Inoue M, Ueda H. et al; The algogenic-induced nociceptive flexion test in mice: studies on sensitivity of the test and stress on animals. *Brain Res Bull*, 60, 275-281 (2003)
- Inoue M, Ueda H. et al.; Nocistatin and prepro-nociceptin/orphanin FQ 160-187 cause nociception through activation of Gi/o in capsaicin-sensitive and of Gs in capsaicin-insensitive nociceptors, respectively. *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 141-146 (2003)
- Inoue M, Ueda H. et al.; Locus-specific rescue of GluRepsilon1 NMDA receptors in mutant mice identifies the brain regions important for morphine tolerance and dependence. *J Neurosci*, 23, 6529-6536 (2003)
- Rashid M. H, Ueda H. et al; Increased expression of vanilloid receptor 1 on myelinated primary afferent neurons contributes to the antihyperalgesic effect of capsaicin cream in diabetic neuropathic pain in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 709-717 (2003)
- Uchida H, Ueda H. et al; Neurosteroid-induced hyperalgesia through a histamine release is inhibited by progesterone and p,p'-DDE, an endocrine disrupting chemical. *Neurochem Int* 42, 401-407. (2003)
- Rashid M. H, Ueda H. et al; Loss of peripheral morphine-analgesia contributes to the reduced effectiveness of systemic morphine in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*, in press (2004)
- Ueda M, Ueda H. et al.; The cognition-enhancer nefiracetam inhibits both necrosis and apoptosis in retinal ischemic models in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, in press. (2004)

- Kinoshita A, Imaoka S. et al.; Phenobarbital at low dose exerts hormesis in rat hepatocarcinogenesis by reducing oxidative DNA damage, altering cell proliferation, apoptosis and gene expression. *Carcinogenesis*, 24, 1389-1399 (2003)
- Mizuno D, Imaoka S. et al.; A novel transcriptional element which regulates expression of the CYP2D4 gene by Oct-1 and YY-1 binding. *Biochim Biophys Acta*, 1627, 121-128 (2003)
- Kishimoto W, Imaoka S. et al.; Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain. *Endocrinology* 145, 699-705, (2004)
- Imaoka S, Funae Y. et al.; Role of phenobarbital-inducible cytochrome P450s as a source of active oxygen species in DNA-oxidation. *Cancer Lett*, 203, 117-125, (2004)
- Toba H, Fushiki S. et al.: A Japanese patient with cerebrotendinous xanthomatosis has different mutations within two functional domains of CYP27. *Clin Genet*, 61, 77-78, (2002)
- Fukuyama R, Fushiki S. et al.; A newly established neuronal rho-0 cell line highly susceptible to oxidative stress accumulates iron and other metals. Relevance to the origin of metal ion deposits in brains with neurodegenerative disorders. *J Biol Chem*, 277, 41455-41462 (2002)
- Hattori H, Yamano T. et al.; Magnetic resonance imaging in occipital lobe epilepsy with frequent seizures. *Pediatr Neurol*, 28, 216-218 (2003)
- Ichiba H, Yamano T et al.; Three-year follow up of term and near-term infants treated with inhaled nitric oxide. *Pediatric International*, 45, 290-293 (2003)
- Takaura N, Yamano T. et al.; Attenuation of ganglioside GM1 accumulation in the brain of GM1 gangliosidosis mice by neonatal intravenous gene transfer. *Gene Therapy*, 10, 1487-1493 (2003)
- Tanaka A, Yamano T. et al.; Different attenuated phenotypes of GM2 gangliosidosis variant B in Japanese patients with HEXA mutations at codon 499, and five novel mutations responsible for infantile acute form. *J Hum Genet*, 48, 571-574 (2003)
- Nakajima R, Yamano T. et al.; Effects of leptin to cultured growth plate chondrocytes. *Horm Res*, 60, 91-98 (2003)
- Salim E I, Fukushima S. et al.; Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in p53 heterozygous knockout and wild-type C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, 24, 335-342 (2003)
- 福島昭治：毒性学の現状と将来—発がん物質と内分泌かく乱物質に対するリスク評価の立場から。日本化学会編，発端化学シリーズII 電気化学／光化学／無機固体／環境ケミカルサイエンス，pp. 290-297，丸善株式会社(2003)
- Suzuki T, Fukushima S. et al.; Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances

the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: Enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience*, 117, 639-644 (2003)

Mitsuhashi M, Fukushima S et al.; Lack of inhibition of BBN-induced bladder carcinogenesis in C57BL/6 mice by intravesical instillation of KRN 7000. *J Toxicol Pathol*, 16, 19-23 (2003)

Seike N, Fukushima S. et al.; Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. *Cancer Lett*, 192, 25-36 (2003)

Shen J, Fukushima S et al.; Liver tumorigenicity of trimethylarsine oxide in male Fischer 344 rats-association with oxidative DNA damage and enhanced cell proliferation. *Carcinogenesis*, 24, 1827-1835 (2003)

2. 学会発表

岡田和嗣、船江 良彦等: Effect of bisphenol A on central nervous system. 2001年12月, 筑波日本内分泌攪乱化学物質学会 第4回研究発表会 (日本内分泌攪乱化学物質学会 第4回研究発表会要旨集 73頁)

岡田 和嗣、船江 良彦等: ラット脳に存在する Bisphenol A 受容体の精製. 今岡 進, 廣井 豊子, 林 浩志, 広瀬 克利, 2002年10月, 京都 第75回日本生化学大会 (生化学 第74巻, 第8号, 965頁)

岡田 和嗣、船江 良彦等: Thyroid hormonal-disrupting activity of Bisphenol A. 2002年11月, 広島 第6回内分泌攪乱化学物質学会 第5回研究発表会 (環境ホルモ

ン学会第5回研究発表会要旨集 p.71)

Funae Y. et al.: Effect of endocrine disruptors on the development of brain -Purification and characterization of bisphenol A binding protein in the brain-. 2003年10月, 横浜 第76回日本生化学会大会 (生化学 vol. 75, No. 8, p. 976)

岡田 和嗣、船江 良彦: 甲状腺ホルモン作用を攪乱する環境化学物質 -プロテインジスルフィドイソメラーゼへの結合活性を指標に-. 2003年12月, 仙台 第6回内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会第6回研究発表会要旨集 p.225)

田辺伸聡, 船江良彦等: ラット脳海馬における環境ホルモンビスフェノール-Aの作用の解析. 2003年12月, 仙台 第6回内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会第6回研究発表会要旨集 p.225)

Osada M, Funae Y. et al.: Function of flavonoid as inducer of erythropoietin by hypoxia inducible factor 1 activity 第76回生化学会大会 (横浜 10月)

Mori T, Imaoka S. et al: The role of NADPH-P450 reductase in development of *Xenopus laevis* (第76回日本生化学会大会)

Kubo N, Imaoka S. et al.: Inhibition of EPO induction in hypoxia by polyphenols -Relationship between inhibitor function and its structure- (第76回日本生化学大会)

Fushiki S. et al.: Prenatal and neonatal exposure to bisphenol A affects substantia nigra and hippocampus. Symposium "Effects

of endocrine disruptors on the development of brain”, 第 76 回日本生化学会大会、2003 年 10 月 15 日－18 日、横浜。

Moku M, Fukushima S.et al.: The inhibitory effects of arciin on rat multiorgan carcinogenesis. 94th Annual Meeting, American Association for Cancer Research Apr. 5-9, Toronto, Ontario, Canada, 2003 (AACR proceedings, vol.43, April 5-9 2003, 2454, p.557-558)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：脳神経細胞膜に存在するビスフェノール A 結合蛋白の
生理的意義解明と内分泌かく乱物質のスクリーニング法の確立

分担研究者 船江 良彦 大阪市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨

内分泌攪乱化学物質（EDCs）のエストロゲン様作用に関しては、その作用の発現の分子メカニズムが解明され、その作用を有する化学物質のスクリーニング法も開発されつつある。しかし EDCs の中枢神経系への作用に関しては、その適切な評価法が見いだされていない事や、作用機序を含む多くの点が不明なままである。我々はこれまでに内分泌かく乱作用が疑われているビスフェノール A（BPA）が中枢神経系に影響を及ぼしている事を明らかにしてきた。さらに BPA-Sepharose アフィニティークロマトグラフィーにより、BPA 結合タンパク質としてプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）を単離・精製した。PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られている。甲状腺ホルモンは脳発達に非常に重要な役割を担っており、PDI に BPA が結合する事によって甲状腺ホルモンの作用が攪乱される事が示唆された。平成 14 年度の報告では、発現ラット PDI（rPDI）を用いて競合的結合実験を行い、BPA やノニルフェノール、ペンタクロロフェノールなどが甲状腺ホルモン（T3）の結合を阻害する事が明らかにした。本研究では、新たにヒト PDI 遺伝子（hPDI）をクローニングし、リコンビナントタンパク質として精製した hPDI を用いて、内分泌攪乱作用が疑われている化学物質の影響について調べた。種差による T3 結合阻害活性の大きな差はみられず、hPDI は rPDI 同様に BPA をはじめとするフェノール基含有化合物が T3 の結合を阻害した。さらに、甲状腺ホルモンレセプター（TRs）への結合性を検討したところ、いくつかの化学物質は TRs には結合活性を示さず、PDI に対してのみ結合活性を示す事が明らかになった。このような化学物質は、TRs を介した影響は示さず、PDI を介して甲状腺ホルモン作用に影響を及ぼす事が考えられる。この事から、中枢神経系に影響を及ぼす可能性のある化学物質のスクリーニングには、TRs に対する結合活性を指標にするだけでなく、PDI への結合活性も検討する事で、新たな甲状腺ホルモン作用に対する影響を評価する事ができると考えられる。

A. 研究目的

これまでに EDCs の生殖器系・免疫系への影響に関しては膨大な数の報告があり、その分子メカニズムも明らかになり

つつある。しかし、近年問題視されている学習障害や知能指数の低下、また注意欠陥多動性症候群（ADHD）との関連性が指摘されているにも関わらず、その作

用機序などに関しては不明のままである。我々はこれまでに BPA を胎仔期・授乳期に暴露されたマウスにおいて、脳内のドパミン動態に変動が生じる事を見いだしている。脳におけるドパミンは、運動・感情・情動発現・脳報酬系に関与していると考えられている神経伝達物質である。BPA はドパミンの減少を引き起こす事で中枢神経系に影響を及ぼしている可能性が考えられたことから、ラット脳より BPA 結合タンパク質の単離・精製を試みたところ、BPA-Sepharose アフィニティークロマトグラフィーによって精製されたタンパク質が、甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られている PDI と相同性を示す事が明らかとなった。ヒスチジンタグ融合 PDI を用いて競合的結合阻害実験を行ったところ、ビスフェノール A 以外に p-ニルフェノール、ペンタクロロフェノール、テトラプロモビスフェノール A、テトラクロロビスフェノール A などが T3 の結合を阻害する事が明らかとなった。これらの化学物質は PDI を介して甲状腺ホルモンの働きをかく乱する事により中枢神経系に影響を及ぼす事が考えられたことから、本研究ではヒトにおけるリスク評価を行う目的で、hPDI に対する影響を調べた。またこれらの化学物質の TRs に対する影響についても併せて調べた。以上のスクリーニング法により、甲状腺ホルモン攪乱作用に影響を及ぼす化学物質を選定する目的で行った。

B. 研究方法

I. hPDI のクローニングと His-tag 融合発現

(1) hPDI のクローニング

Human fetal brain cDNA (STRATAGENE) を鋳型にし、二種類のプライマー (sense : 5'-GGG GGA ATT CAT CCG TGT CCG ACA TGC T-3', antisense : 5'-GGG GGT CGA CGG GTC TGG CTT TGC GTA TTA-3') を用いて PCR を行い、hPDI の増幅を行った。

増幅された PCR 産物を EcoR I と Sal I により制限酵素消化し、pBluescript KS-(TOYOBO) に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞 (DH5 α COMPITENT high, TOYOBO) に導入し、形質転換させた。Ampicillin を含む LB 寒天培地で培養し、コロニーを単離した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、Sac I と Kpn I により制限酵素消化した。hPDI 全長を含む DNA 断片を pQE-81L (QIAGEN) に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞に導入し、形質転換させた。Ampicillin を含む LB 寒天培地上で培養し、コロニーを単離した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、全長 hPDI をもつクローンを単離した。

(2) His-tag 融合 hPDI の精製

上記の方法によって得られたクローンを 2 \times YT 培地に植菌し、一晚培養した。10 mL の培養液を 500 mL の培養液に植菌し、OD₆₀₀=6.0 に達するまで振盪培養を行った。培養液に IPTG を 1.0 mg/mL となるように加え、さらに 4 時間、振盪培養を行った。遠心分離により細胞を回収し、PBS に再懸濁した後、遠心分離により洗浄菌体を得た。50 mL の溶菌バッファー (6 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.5 % protease inhibitor cocktail (SIGMA), 1 mg/mL lysozyme, pH 8.0) で懸濁し、氷中に 30 分間おいた。氷中にて 5 分間の超音波

処理を行った後、sucrose monolaurateを0.5%となるように加え、スターラーを用いて4℃にて60分間、穏やかに攪拌した。遠心分離(50000×g, 30min, 4℃)により得られた上澄を可溶化画分とし、Ni-NTA agaroseカラム(1.0 mL, QIAGEN)に供した。5 mLの洗浄液(溶菌バッファー + 0.1% sucrose monolaurate + 0.5% protease inhibitor + 10 mM imidazole)でカラムを洗浄した後、imidazoleによるステップワイズにて溶出した。それぞれの画分をSDS-PAGE分析に供し、必要な画分を集めて50 mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 8.0)に対して透析を行った。得られた最終画分をHis-tag融合PDI精製品とし、使用するまで-80℃にて保存した。

(3) T3結合実験

T3の結合活性は以下のようにして測定した。T3の放射性同位体(^{125}I -T3)とHis-tag融合PDI(0.1 mg/mL protein)とを150 mM NaClを含む50 mM Tris-HCl(pH 7.0)中で3時間、4℃にてインキュベーションした。反応後の反応液に等量の12% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.2M ZnCl_2 を含む50mM Tris-HCl(pH 7.0)を加えて混合した後、遠心分離(14,500 rpm, 5 min, 4℃)を行った。上澄をアスピレーターにより除去した後、沈澱を1.5 mLの洗浄バッファー(6% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.1M ZnCl_2 を含む50mM Tris-HCl, pH 7.0)で2回洗浄した。沈澱に含まれる放射活性を測定し、 ^{125}I -T3の結合量を算出した。また、T3の非特異的結合量を測定するために、上記の反応液に過剰量(30 μM)のT3を加えた系を併せて測定した。

II. hPDIに対するT3の競合的結合阻害

試験T3の結合阻害活性は以下のようにして測定した。試験物質の存在下で、1.0 nM ^{125}I -T3とHis-tag融合PDI(0.1 mg/mL protein)とを150 mM NaClを含む50 mM Tris-HCl(pH 7.0)中で3時間、4℃にてインキュベーションした。反応後の反応液に等量の12% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.2M ZnCl_2 を含む50mM Tris-HCl(pH 7.0)を加えて攪拌した後、遠心分離(14,500 rpm, 5 min, 4℃)を行った。上澄をアスピレーターにより除去した後、沈澱を1.5 mLの洗浄バッファー(6% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.1M ZnCl_2 を含む50mM Tris-HCl, pH 7.0)で2回洗浄した。沈澱に含まれる放射活性を測定し、 ^{125}I -T3の結合量を算出した。また、T3の非特異的結合量を測定するために、過剰量(30 μM)のT3を加えた系を併せて測定した。 ^{125}I -T3の結合率 B/B_0 (%)は次式により求めた。

$$B/B_0(\%) = (TB-NB)/(T_0B-NB) \times 100$$

TB: 試験物質存在下での ^{125}I -T3の結合量

T_0B : 試験物質非存在下での ^{125}I -T3の結合量

NB: 非特異的結合量

III. ラットTRsに対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

(1) ラット核内T3レセプター(NT3R)の調製

TRsはTagami Tら(Endocrinology 126(2), 1990)の方法に従って調製したNT3Rを用いた。SDラット(雄, 5週齢)より肝臓を摘出し、5 mM MgCl_2 を含む0.25 M

sucrose (SM) 中でホモジナイズし、700 x g にて 10 分間の遠心分離を行った。沈殿を 5 mM MgCl₂ を含む 2.5 M sucrose で懸濁した後、sucrose 濃度を 2.2 M に調整した。80,000 x g にて 45 分間の遠心分離を行って得られた沈殿を 0.5 M Triton X-100 を含む SM で 1 回洗浄し、さらに SM で 2 回洗浄した。沈殿を 0.4 M KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT を含む 50 mM

Tris-glycine (pH 8.5) に懸濁し、60 分間攪拌した。117,000 x g にて 30 分間の遠心分離を行い、得られた上澄を NT3R とし、使用するまで -80 度にて保存した。

(2) 競合的結合阻害実験

T3 の結合阻害活性は以下のようにして測定した。試験物質の存在下で、1.0 nM [¹²⁵I]-T3 と NT₃R (0.5 mg/mL protein) とを 5 mM DTT, 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中で 30 分間、0°C にてインキュベーションした。反応後の反応液に 1 / 2.5 量の 10 % AG X8 (Bio-Rad), 5 mM DTT, 150 mM NaCl, を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) を加えて 4°C にて 5 分間攪拌した後、遠心分離 (5,000 rpm, 5 min, 4 °C) を行い、上澄に含まれる放射活性を測定し、[¹²⁵I]-T3 の結合量を算出した。また、T3 の非特異的結合量を測定するために、過剰量 (10 μM) の T3 を加えた系を用意した。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物を用いた実験は、大阪市立大学大学院医学研究科動物実験委員会において審査・承認された実験計画に基づき、動物倫理・動物愛護に配慮した動物実験指針に従い施行した。臓器の摘出の際には苦痛を伴わない断頭法

により行った。

C. 研究結果

I. hPDI のクローニングと His-tag 融合発現

精製された His-tag 融合 hPDI を用いて T3 結合実験を行ったところ、K_d = 3.3 μM の親和性を示した。

II. hPDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

トリブチルスズ, p-オクチルフェノール, p-ノニルフェノール, フタル酸ジブチル, オクタクロロスチレン, フタル酸ジシクロヘキシル, ペンタクロロフェノール, BPA, 2,4-ジクロロフェノール, テトラブロモビスフェノール A, テトラクロロビスフェノール A について競合的結合阻害実験を行った。p-オクチルフェノール, p-ノニルフェノール, ペンタクロロフェノール, BPA, 2,4-ジクロロフェノール, テトラブロモビスフェノール A, テトラクロロビスフェノール A において T3 の結合阻害がみられた。

表 1 His-tag 融合 PDI に対する各種化合物による T₃ の結合阻害 (K_i 値)

Test chemical	K _i (μM)	
	Rat	Human
T3	0.79	3.82
Tributyltin	N.D.	N.D.
p-Octylphenol	2.90	9.10
p-Nonylphenol	5.68	81.20
Dibutyl phthalate	N.D.	N.D.
Octachlorostylene	N.D.	N.D.
Dicyclohexyl phthalate	N.D.	N.D.

Pentachlorophenol	22.10	10.46
BPA	22.05	70.29
2,4-Dichlorophenol	37.36	168.70
Tetrabromobisphenol A	1.16	3.35
Tetrachlorobisphenol A	1.89	3.41

N.D. : 阻害なし

PDI に対して T3 の結合を阻害する化合物はいずれもフェノール基を有するものであった。そこで、構造活性相関を明らかにするべく、BPA 誘導体 (図 1) を用いて、競合的結合実験を行った。

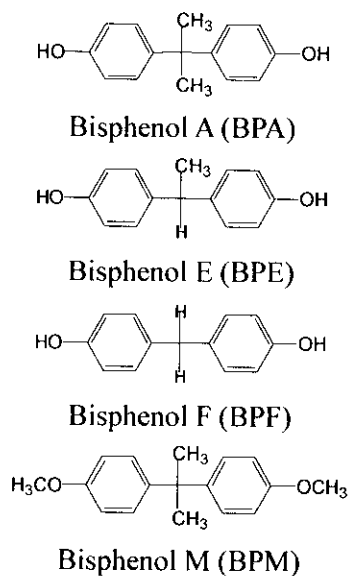
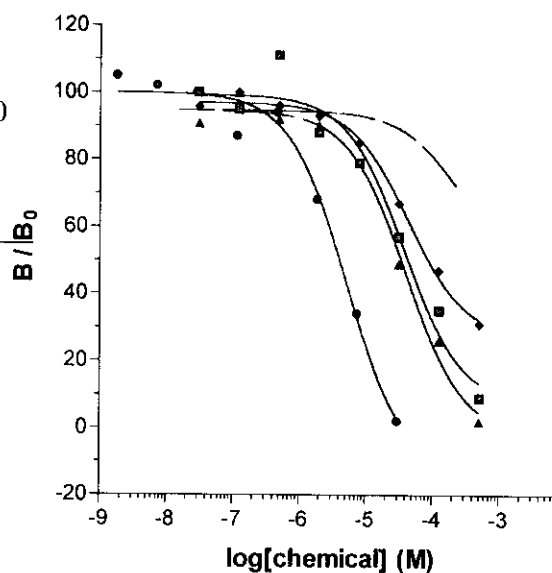


図 1 BPA 誘導体

その結果、BPA のメチル基を置換した誘導体 (BPE, BPF) では阻害活性は BPA と大きな差は見られなかったが、水酸基をメトキシ基に置換した BPM では大きく低下した (図 2)。

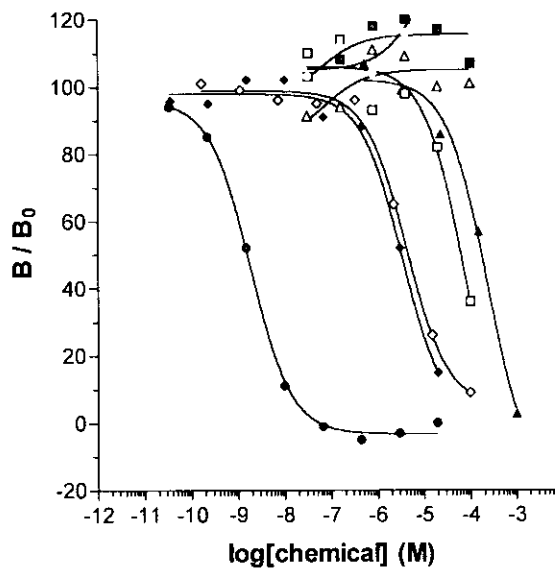


●;T3, ▲;BPA, ■;BPE, ◆;BPF, ◇;BPM

図 2 BPA 誘導体による PDI に対する T3 の競合的結合阻害

Ⅲ. ラット TRs に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

PDI に対する T3 の結合阻害活性が見られた 7 種の化学物質について TRs に対する結合阻害活性を調べた。その結果、ペンタクロロフェノール、BPA、テトラブロモビスフェノール A、テトラクロロビスフェノールに阻害活性が見られた (図 3)。このうち最も強い阻害活性を示したのはテトラブロモビスフェノール A とテトラクロロビスフェノール A で、T3 と比較すると 1/1000 程の作用であった。



●; T3, ○; p-octylphenol, ■; p-nonylphenol,
 □; pentachlorophenol, ▲; BPA,
 △; 2,4-dichlorophenol,
 ◆; tetrabromobisphenol A,
 ◇; tetrachlorobisphenol A

図3. ラット核内 TR に対する各種化合物による T₃ の結合阻害

D. 考察

I. hPDI のクローニングと His-tag 融合発現ラットとヒトでの PDI の相同性は、93.3 % と高い。しかしながら、PDI の T3 結合ドメインは同定されておらず、T3 の結合親和性の差などは不明である。今回 hPDI を用いた検討では、ラットとほぼ同じ親和性 (K_d 値; ラット: 1.8 μM, ヒト: 3.3 μM) を示した。

II. hPDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

今回試験した化学物質のうち、T3 の結合を阻害した化合物の K_i 値は、ラットのそれとほぼ同じであり、またリガンド選択性の差も見られなかった。

さらにフェノール基をもつ化合物のみが T3 結合阻害活性を示した事は、このような特定の化学物質が甲状腺ホルモンの攪乱作用を示す危険性をその構造的性質から予測できるため、リスク評価を行う上でも非常に有用な結果であると考えられる。

III. ラット TRs に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

PDI と TRs に対して T3 の結合を阻害する化学物質は一致しておらず、p-オクチルフェノールや、p-ノニルフェノール、2,4-ジクロロフェノールは、PDI に対してのみ T3 結合阻害活性が見られた。

これまで TRs が化学物質の作用点として考えられており TRs を標的にしたスクリーニングが行われてきたが、PDI を標的にしたスクリーニング法を併せて行っていく必要があると考えられる。

E. 結論

EDCs の中枢神経系への影響は、行動異常・発達障害などとの関連性が示唆されているにもかかわらず作用メカニズムに関しては不明な点が多い。

これまでに我々は、rPDI に対する T3 の結合を BPA が阻害する事を明らかにしてきたが、さらに本研究により、hBPA においても同様に T3 の結合を阻害する事が明らかとなった。

hPDI は、rPDI と同等の T3 結合親和性を示し、また p-オクチルフェノールや、p-ノニルフェノール、2,4-ジクロロフェノール、BPA、ペンタクロロフェノール、テトラブロモビスフェノール A、テトラク

ロロビスフェノール A が、ラット同様に T3 の結合阻害活性を示した。

一方、核内 TRs に対しては、p-オクチルフェノールや、p-ノニルフェノール、2,4-ジクロロフェノールは T3 の結合阻害活性を示さず、これらの化学物質は TRs よりもむしろ PDI に結合する事により、甲状腺ホルモン作用を攪乱する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kishimoto W, Funae Y. et al.; Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain. *Endocrinology*, 5, 699-705 (2004)

Yoneda T, Funae Y. et al.; Bisphenol A nongenomically stimulates dopamine release via both N-type calcium channels and cyclic AMP pathway in PC12 cells. *J Neurochem*, 87, 1499-1508 (2003)

Suzuki T, Funae Y, et al.; Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience*, 117, 639-44 (2003)

Funae Y. et al.; CYP2D in the brain.

Drug Metab Pharmacokin, 18, 337-349 (2003)

Mizuno D, Funae Y et al.; Regulation of CYP2D4 gene expression in neural differentiated pheochromocytoma (PC12) cells via a novel transcriptional element. *Biochim Biophys Acta*, 1627, 121-128 (2003)

2. 学会発表

岡田 和嗣、船江 良彦等： Effect of bisphenol A on central nervous system. 2001年12月、筑波 日本内分泌攪乱化学物質学会 第4回研究発表会（日本内分泌攪乱化学物質学会 第4回研究発表会要旨集 73頁）

岡田 和嗣、船江 良彦等： ラット脳に存在する Bisphenol A 受容体の精製. 2002年10月、京都 第75回日本生化学大会（生化学 第74巻、第8号、965頁）

岡田 和嗣、船江 良彦等： Thyroid hormonal-disrupting activity of Bisphenol A. 2002年11月、広島 第6回内分泌攪乱化学物質学会 第5回研究発表会（環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集 p.71）

Funae Y. et al.: Effect of endocrine disruptors on the development of brain -Purification and characterization of bisphenol A binding protein in the brain-. 2003年10月、横浜 第76回日本生化学会大会（生化学 vol. 75, No. 8, p. 976）

岡田和嗣、船江良彦：甲状腺ホルモン作用を攪乱する環境化学物質 -プロテインジスルフィドイソメラーゼへの結合活性

を指標に-. 2003年12月, 仙台 第6回
内分泌攪
乱化学物質学会 (環境ホルモン学会第6
回研究発表会要旨集 p.225)

田辺伸聡、船江良彦等：ラット脳海馬に
おける環境ホルモンビスフェノール-Aの
作用の解析. 2003年12月, 仙台 第6回
内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモ
ン学会第6回研究発表会要旨集 p.225)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

中枢神経作用性内分泌かく乱化学物質の
スクリーニング法 特願 2002-246351 船
江良彦 平成14年8月27日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究協力者：岡田和嗣

(大阪市立大学大学院医学研究科)