

らに、ラットでは胆汁中への  $T_4$  のグルクロン酸抱合体の排泄が行われるが、血中から肝臓への  $T_4$  の移行量に対して、胆汁から  $T_4$  の排泄が追いつかず、 $T_4$  は肝臓に滞ってしまうものと考えられる。今後、さらなる検討が必要である。

## E. 結論

用いた全種の動物において、KC500 投与による血清中  $T_4$  濃度の低下には、 $T_4$  の肝臓への移行が大きく寄与していることが示唆された。すなわち、4 種の動物に PentaCB、HexaCB、KC500 を投与した時、血清中  $T_4$  濃度の低下には、甲状腺への直接作用、 $MeSO_2$  代謝物およびこれまでに考えられてきた肝臓の  $T_4$ -UDP-GT による関与の可能性は低く、別の作用機序が関わる可能性が示唆された。また、KC500 投与後の血清中  $T_4$  濃度の低下には、ラット、モルモットでは、血清中  $T_4$  と TTR との結合阻害が関与している可能性があるが、マウス、ハムスターでは、その可能性はほとんどないことが示唆された。そこで、KC500 投与後、4 種の動物において、 $T_4$  の体内動態を詳しく調べた結果、血清中  $T_4$  濃度の低下には、 $T_4$  の肝臓への移行が大きく寄与していることが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- ◎1. Kelly J. Gauger, Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Hans-Joachim Lehmler, Larry W. Robertson, Ruby Bansal and R. Thomas Zoeller: Polychlorinated biphenyls (PCBs) exert thyroid hormone-like effects in the fetal rat brain but do not bind to thyroid hormone receptors. *Environ. Health Perspect.*, 112, 516-523 (2004)
2. 古賀信幸、金丸知代、黒木広明、原口

浩一、加藤善久、木村良平: 2, 3, 3', 4, 4'-五塩素化ビフェニル (CB105) のハムスターにおける代謝. 福岡医学雑誌, 94, 174-182 (2003)

◎3. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoaki Yamazaki, Yuriko Ito, Shoji Miyajima, Kiyomitsu Nemoto, Nobuyuki Koga, Ryohei Kimura and Masakuni Degawa: Effects of polychlorinated biphenyls, Kanechlor-500, on serum thyroid hormone levels in rats and mice. *Toxicol. Sci.*, 72, 235-241 (2003)

◎4. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Shinichi Ikushiro, Tomoaki Yamazaki, Yuriko Ito, Aki Fujii, Atsushi Shiga, Akinori Shoji, Takashi Iyanagi, Masakuni Degawa and Ryohei Kimura: Species difference among mice, hamsters, rats and guinea pigs in 2, 2', 4', 5, 5'-pentachlorobiphenyl and 2, 2', 3', 4', 5, 6-hexachlorobiphenyl-induced alterations of serum thyroid hormone level. *Organohalogen Compd. (proceedings)*, 64, 332-335 (2003)

◎5. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Shinichi Ikushiro, Yuriko Ito, Tomoaki Yamazaki, Aki Fujii, Takashi Iyanagi, Ryohei Kimura and Masakuni Degawa: Species difference among mice, hamsters, rats and guinea pigs in Kanechlor-500-induced alterations of serum thyroid hormone level. *Organohalogen Compd. (proceedings)*, 64, 316-319 (2003)

6. Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Nobuyuki Koga, Rie Aoshima, Masakuni Degawa and Ryohei Kimura: Identification and tissue distribution of catechol metabolites of polychlorinated biphenyls in rodents dosed with Kanechlor 500. *Organohalogen Compd. (proceedings)*, 64, 345-348 (2003)

7. Nobuyuki Koga, Hiroaki Kuroki, Koichi Haraguchi, Tomoyo Kanamaru, Yoshihisa Kato and Ryohei Kimura: Metabolism of 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl in hamsters. *Organohalogen Compd. (proceedings)*, 64, 427-430 (2003)

◎8. Yoshihisa Kato, Yuriko Ito, Tomoaki Yamazaki, Aki Fujii, Shinichi Ikushiro, Koichi Haraguchi, Takashi Iyanagi, Masakuni Degawa and Ryohei Kimura: Species difference among mice, hamsters, rats, and guinea pigs in Kanechlor-500-induced alteration of serum thyroid hormone level. *J. Toxicol. Sci. (proceedings)*, 28, 321 (2003)

◎9. Yoshihisa Kato, Aki Fujii, Koichi Haraguchi, Shinichi Ikushiro, Tomoaki Yamazaki, Yuriko Ito, Takashi Iyanagi, Masakuni Degawa and Ryohei Kimura: Species difference among mice, hamsters, rats, and guinea pigs in 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl or 2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl-induced alteration of serum thyroid hormone level. *J. Toxicol. Sci. (proceedings)*, 28, 322 (2003)

## 2. 学会発表

◎1. 加藤善久：PCB 類による甲状腺ホルモンかく乱作用とその作用機構：動物種差。第 32 回日本環境変異原学会大会（津）、講演要旨集、p. 54、2003 年 11 月 26 日

2. 濱地勇希、宮島省治、根本清光、加藤善久、原口浩一、木村良平、出川雅邦：PCB 類投与時による Gunn ラットでの肝臓ステロイドホルモン代謝酵素遺伝子の発現変動。第 32 回日本環境変異原学会大会（津）、講演要旨集、p. 133、2003 年 11 月 27 日

◎3. Kelly J. Gauger, Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, H. Lehmler, L.W. Robertson and R. Thomas Zoeller: Paradoxical effects of PCBs on thyroid hormone action. *Neuroscience* 33 rd

Annual Meeting (New Orleans, USA), Abstr., 2003, November 10

◎4. 加藤善久、鈴木 寛、伊藤由里子、出川雅邦、木村良平：Kanechlor-500 のラット血中サイロキシン濃度低下作用とその機序。第 18 回日本薬物動態学会年会（札幌）、講演要旨集、p.196、2003 年 10 月 8 日

◎5. 加藤善久、大西真央、伊藤由里子、出川雅邦、木村良平：Kanechlor-500 の血清中甲状腺ホルモン濃度低下作用とその動物種差。第 18 回日本薬物動態学会年会（札幌）、講演要旨集、p.197、2003 年 10 月 8 日

◎6. 加藤善久、伊藤由里子、山崎友朗、藤井亜紀、生城真一、原口浩一、井柳 堯、出川雅邦、木村良平：Kanechlor-500 (KC500) の血清中甲状腺ホルモン濃度低下作用における動物種差と血中甲状腺ホルモン濃度低下作用機序。第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会（相模原）、講演要旨集、p. 209、2003 年 7 月 19 日

◎7. 加藤善久、藤井亜紀、原口浩一、生城真一、山崎友朗、伊藤由里子、井柳 堯、出川雅邦、木村良平：2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (PentaCB) 及び 2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl (HexaCB) の血中甲状腺ホルモン濃度低下作用における動物種差。第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会（相模原）、講演要旨集、p. 210、2003 年 7 月 19 日

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他（データベース等）  
なし

## II. 分担研究報告書

### II. 基盤研究

雌性生殖器官への作用メカニズムの解明

分担研究者 井口泰泉 岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター

研究要旨

C57BL 系マウスの雌性生殖器官に対するエストロゲン、ノニルフェノールおよびビスフェノール A の影響を、マイクロアレイを用いて遺伝子発現のプロファイルから明らかにすることを目的とし、子宮肥大とそれに係わるエストロゲン応答遺伝子の発現変動の探索、胎児の輸卵管のホルモン受容体の定量、およびエストロゲン非依存的に増殖する腔に発現する遺伝子を探索した。卵巣摘出マウス子宮から低用量および高用量のエストロゲンに反応する遺伝子を探索し、データベース化した。胎児から新生児期の輸卵管のホルモン受容体を定量化した。出生直後のエストロゲン処理により不可逆化した腔からエストロゲン非依存的に発現が起こる遺伝子を同定した。ミューラー管から分化する雌性生殖器官の、エストロゲンおよびエストロゲン作用を有する化学物質に対する反応の異同を明らかにする基礎ができた。

A. 研究目的

マウスの雌性生殖器官に対する低用量および高用量のエストロゲンの影響を、マイクロアレイを用いて遺伝子発現のプロファイルから明らかにすることを目的とした。発達中の雌性生殖器官に対するエストロゲン及びエストロゲン作用を有する化学物質（ノニルフェノール及びビスフェノール A）の影響を、組織学的変化と遺伝子発現の変化を対応させることにより、化学物質の作用メカニズムを明らかにすることが可能と考えられる。

B. 研究方法

成熟 C57BL 系マウスから卵巣を摘出してエストロゲンの存在しないマウスを作成し、エストラジオールを投与し、経時的に発現変動遺伝子を探索し、最

と、マイクロアレイ法によりエストロゲン応答遺伝子の発現変動を探索した。さらに、SD 系ラット胎児の輸卵管でエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体およびアンドロゲン受容体の発現を免疫染色により検索した。出生直後の C57BL 系マウスへのエストロゲン投与によりエストロゲン非依存的に増殖する腔に発現する遺伝子を、デイファレンシャルディスプレイ法により探索した。

〔倫理面への配慮〕

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用あるいは頸椎脱臼法を用い、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。

C. 研究結果

卵巣摘出マウスへ 5 µg/kg エストラ

ジオール投与後、1, 2, 6, 12, 24, 48 時間後に発現変動する遺伝子を調べ、最も変化の多い 6 時間後を選択した。エストロゲン投与後 1-6 時間で発現変動する遺伝子のパターンは 6 タイプに分けられた。初期に発現が増加する遺伝子としては、RNA 合成やタンパク合成に関わる遺伝子があり、発現低下する遺伝子には転写因子群、プロテアーゼ、アポトーシスあるいは細胞周期に関連した遺伝子群であった。これら、エストロゲンにより発現変動する遺伝子は、エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) ノックアウトマウスでは発現変動が認められなかった。マウス子宮で低用量と高用量のエストロゲン、ノニルフェノール、ビスフェノール A 投与 7 日後に起こる子宮肥大を、投与 6 時間後に発現変動する遺伝子群で予想ができること、およびそれらの遺伝子群を明らかにした。ラット胎児の輸卵管では、ER $\alpha$ 、プロゲステロン受容体 (PR) とアンドロゲン受容体 (AR) は発現していたが、ER $\beta$  の発現はきわめて弱かった。輸卵管の ER $\alpha$  は胎生期から生後 3 日にかけて増加した。PR の発現は生後 10 日で最大となった。AR は生後 10 日にかけて弱いながら発現が増加した。出生直後のエストロゲン投与により、エストロゲン非依存的に細胞増殖する腔では、レクチンをはじめとして、いくつかの遺伝子が、エストロゲン非依存的に発現していることを見出した。

#### D. 考察

マイクロアレイ法を用いたマウス子宮での網羅的な遺伝子解析と、エンドポイントとした子宮肥大を重ねると、子宮肥大を引き起こすエストロゲンの用量依存的に、発現変動遺伝子数も増加することが明らかとなった。合成エ

ストロゲンと天然のエストロゲンで発現変動が起こる遺伝子群の相違、エストロゲン類似作用を化学物質で変動する遺伝子のプロファイル等が今後の課題である。予備的な結果として、合成エストロゲンの DES とエストラジオールで発現変動する遺伝子群は必ずしも同じではないこと、化学物質に特異的な遺伝子発現の変動もありそうなことを見出しており、詳細を詰める予定である。またノニルフェノールにより発現が変動する遺伝子について解析したところ、高用量 (50mg/kg) では、エストロゲンと非常に類似した遺伝子群の発現を誘導したのに対し、それ以下の用量では必ずしもエストロゲンによる影響とは一致しなかった。ラット胎児の輸卵管では胎生 15 日から、ステロイドホルモン受容体の発現が確認された。胎児期の合成エストロゲン投与により、輸卵管の形態異常が起こることも報告されており、エストロゲン受容体 $\alpha$  を介した反応と思われる。また、出生直後のエストロゲン処理により不可逆的に細胞増殖を継続する腔では、いくつかの遺伝子がエストロゲン非依存的に発現しており、その中には、多層化上皮の形成に必要な遺伝子に加えて、細胞増殖を継続的に引き起こす細胞増殖因子のポジティブフィードバックループの可能性が示唆された。今後、この点に関して探究する予定である。

#### E. 結論

マイクロアレイ法を用いることにより、マウス子宮におけるエストロゲンで発現変動する遺伝子を検出した。発達時期によりエストロゲンに対して発現変動する遺伝子が異なることを明らかにした。出生直後のエストロゲン投与により誘起した不可逆化で特異的に

発現する遺伝子を 2 種類クローニングし、エストロゲンに応答して臍上皮が多層化するとき連動して発現する遺伝子であることを明らかにした。これらの遺伝子は角質化への分化との関連が高いと考えられる。ラット胎児におけるミューラー管発達過程での、エストロゲン受容体発現およびプロゲステロン受容体発現、エストロゲンに対する反応性には部域差があることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- © 1. Watanabe, H., A. Suzuki, M. Kobayashi, D. Lubahn, H. Handa and T. Iguchi: Analysis of temporal changes in the expression of estrogen regulated genes in the uterus. *J. Mol. Endocr.*, 30: 347-358, 2003.
- © 2. Okada, A., Y. Ohta, S. Inoue, H. Hiroi, M. Muramatsu and T. Iguchi: Expression of estrogen, progesterone and androgen receptors in the oviduct of developing, cycling and pre-implantation rats. *J. Mol. Endocr.*, 30: 301-315, 2003.
- © 3. Katsu, Y., D. Lubahn and T. Iguchi: Expression of novel C-type lectin in the mouse vagina. *Endocrinology*, 144: 2597-2605, 2003.
4. Iguchi, T. and H. Watanabe: Developmental effects of hormonally active agents on animals: from daphnia to humans. *Environ. Sci.*, 10 Suppl.: 43-60, 2003.
5. Watanabe, H. and T. Iguchi: Evaluation of endocrine disruptors based on gene expression using a micorarray. *Environ. Sci.*, 10 Suppl.: 61-67, 2003.
6. Tominaga, N., K. Ura, M. Kawakami, T. Kawaguchi, S. Kohra, Y. Mitui, T. Iguchi and K. Arizono: *Caenorhabditis elegans* responses to specific steroid hormones. *J. Health Sci.* 49: 28-33, 2003.
7. Adachi, T., Y. Matsuno, A. Sugimura, K. Takano, K.-B. Koh, K. Sakurai, T. Shibayama, T. Iguchi, C. Mori and M. Komiyama: ADAM7 (a disintegrin and metalloprotease 7) mRNA is suppressed in mouse epididymis by neonatal exposure to diethylstilbestrol. *Mol. Reprod. Devel.*, 64: 414-421, 2003.
8. Kato, H., T. Ota, T. Furuhashi, Y. Ohta and T. Iguchi: Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reprod. Toxicol.*, 17: 283-288, 2003.
9. Sato, T., Y. Fukazawa, Y. Ohta and T. Iguchi: Multiple mechanisms are involved in apoptotic cell death in the mouse uterus and vagina induced by ovariectomy. *Reprod. Toxicol.*, 17: 289-297, 2003.
10. Urushitani, H., M. Nakai, H. Inanaga, Y. Shimohigashi, A. Shimizu, Y. Katsu and T. Iguchi: Cloning and characterization of estrogen receptor  $\alpha$  in mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Mol. Cell. Endocr.*, 203: 41-50, 2003.
11. Kohno, S., Y. Kamishima and T. Iguchi: Molecular cloning of an

- anuran V2 type [Arg8] vasotocin receptor and mesotocin receptor: functional characterization and tissue expression in the Japanese tree frog (*Hyla japonica*). *Gen. Comp. Endocr.*, 132: 485-498, 2003.
12. Guillette, L.J. Jr. and T. Iguchi: Interspecies variation in the estrogenicity of *p,p'*-DDE. Dioxin Conference in Boston, 2003.
13. Tatarazako, N., S. Oda, H. Watanabe, M. Morita and T. Iguchi: Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere*, 53: 827-833, 2003.
14. Guillette, L.J. Jr. and T. Iguchi: Contaminant -induced endocrine and reproductive alterations in reptiles. *Pure Appl. Chem.*, 75: (in press), 2003.
15. Inui, M., T. Adachi, S. Takenaka, H. Inui, M. Nakazawa, M. Ueda, H. Watanabe, C. Mori, T. Iguchi and K. Miyatake: Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Olyzias latipes*). *Toxicology*, (in press).
- © 16. Watanabe, H., A. Suzuki, M. Kobayashi, D.B. Lubahn, H. Handa and T. Iguchi: Similarities and differences in uterine gene expression patterns caused by treatment with physiological and non-physiological estrogen. *J. Mol. Endocr.*, (in press).
17. Adachi, T., K. -B. Koh, H. Tainaka, Y. Matsuno, Y. Ono, K. Sakurai, H. Fukata, T. Iguchi, M. Komiyama and C. Mori: Toxicogenomic difference between diethylstilbestrol and 17 $\beta$ -estradiol in mouse testicular gene expression by neonatal exposure. *Mol. Reprod. Devel.*, (in press).
- © 18. Miyagawa, S., Y. Katsu, H. Watanabe and T. Iguchi: Estrogen-independent activation of ErbBs signaling and estrogen receptor  $\alpha$  in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Oncogene*, (in press).
19. Miyahara, M., H. Ishibashi, M. Inudo, H. Nishijima, T. Iguchi, L.J. Jr. Guillette and K. Arizono: Estrogenic activity of a diet to estrogen receptors- $\alpha$  and - $\beta$  in an experimental animal. *J. Health Sci.*, (in press).
20. Tominaga, N., S. Kohra, T. Iguchi and K. Arizono: A multi-generation sublethal assay of phenols using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Health Sci.*, (in press).
21. Uchida, D., M. Yamashita, T. Kitano and T. Iguchi: An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*: (in press).
22. Katsu, Y., D.S. Bermudez, E.L. Braun, C. Helbing, S. Miyagawa, M.P. Gunderson, S. Kohno, T.A. Bryan, L.J. Guillette, Jr. and T. Iguchi: Molecular cloning of the estrogen and progesterone receptors of the American alligator. *Gen. Comp. Endocr.*, (in press).
23. Matsuno, Y., T. Adachi, K.B. Koh, H.

- Fukata, A. Sugimura, K. Sakurai, T. Shibayama, T. Iguchi, M. Komiyama and C. Mori: Effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol on testicular gene expression in adult mouse: comprehensive analysis with cDNA subtraction method. *Internat. J. Androl.*, (in press).
24. Adachi, T., Y. Ono, K.B. Koh, K. Takashima, H. Tainaka, Y. Matsuno, S. Nakagawa, E. Todaka, K. Sakurai, H. Fukata, T. Iguchi, M. Komiyama and C. Mori: Long-term alteration of gene expression without morphological change in testis after neonatal exposure to genistein in mice: Toxicogenomic analysis using cDNAmicroarray. *Food Chem. Toxicol.*, (in press).
25. 井口泰泉 (監修): 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発, CMC 出版, pp. 334, 2003.
26. 井口泰泉、鷲見 学、川嶋之雄: ノルフェノール. 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発, CMC 出版, pp. 120-133, 2003.
27. 井口泰泉、宮川信一: サンスクリーン. 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発, CMC 出版, pp. 321-328, 2003.
28. 鈴木敦子、井口泰泉: 野生動物への影響. 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発, CMC 出版, pp. 79-112, 2003.
29. 井口泰泉: 最近 3 年間の研究の動向と評価. 環境ホルモン, 3: 137-154, 2003.
30. 井口泰泉: ダイオキシンの内分泌攪乱作用に新たな知見. 現代化学, No. 390: 8-9, 2003.
31. 井口泰泉: DES と女性性器悪性腫瘍. 産婦人科の実際. 52: (in press) 2003.
2. 学会発表
1. 渡邊 肇、鈴木敦子、小林未佳、井口泰泉: リガンド依存的なエストロゲン受容体標的遺伝子の解析. 第 26 回日本分子生物学会 (神戸) 2003 年 12 月
2. 小林未佳、渡邊 肇、井口泰泉: マウス子宮におけるエストロゲン受容体標的遺伝子群の探索. 第 26 回日本分子生物学会 (神戸) 2003 年 12 月
3. Katsu, Y., R. Matsumoto, C. Tyler, S. Jobling and T. Iguchi: Molecular cloning of sex-determination and sex-differentiation related genes of a teleost fish, Roach. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 6 回研究発表会 (仙台) 2003 年 12 月
4. Sone K., M. Hinago, M. Itamoto, Y. Katsu, H. Watanabe, L. Guillette and T. Iguchi: Molecular cloning of cDNAs encoding two androgen receptors and DMRT1 from mosquito fish. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 6 回研究発表会 (仙台) 2003 年 12 月
5. Miyagawa, S., A. Suzuki, H. Watanabe, Y. Katsu, M. Goto and T. Iguchi: Estrogen-Independent Gene Expression in Mouse Vagina Exposed Neonatally to DES. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 6 回研究発表会 (仙台) 2003 年 12 月
6. Suzuki A., W. Watanabe H. Handa and T. Iguchi: Comparison of estrogen responsible genes in mouse uterus, vagina and mammary gland. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 6 回研究発表会 (仙台) 2003 年 12 月



7. Urushitani H., M. Nakai, H. Inanaga, Y. Shimohigashi, A. Shimizu, Y. Katsu and T. Iguchi: Characterization of estrogen receptor alpha mRNA in mummichog, *Fundulus heteroclitus*. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 6 回研究発表会 (仙台) 2003 年 12 月
8. Sone K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and T. Iguchi: Effects of estrogenic chemicals on developing *Xenopus laevis* -Analysis of gene expression using macroarray- SETAC 24th Annual Meeting (テキサス州、アメリカ合衆国) 2003 年 11 月
9. Ishibashi T., Y. Ohta, H. Kato and T. Iguchi: Age-related Changes of Reproductive Function in Female Rats Given Bisphenol-A Neonatally. e.hormone2003 (ルイジアナ州、アメリカ合衆国) 2003 年 10 月
10. Miyagawa S., Y. Katsu, H. Watanabe and T. Iguchi: Estrogen-Independent Activation of ErbBs Signalling and Estrogen Receptor  $\alpha$  in the Mouse Vagina Exposed Neonatally to Diethylstilbestrol. e.hormone2003 (ルイジアナ州、アメリカ合衆国) 2003 年 10 月
11. Kohno S., Y. Katsu, T. Bryant, D. Bermudez, M. Gunderson, B. Moore and T. Iguchi and Guillette L. J. Jr.: Gene Expression Patterns in Juvenile American Alligator (*Alligator mississippiensis*) Exposed to Environmental Contaminants. e.hormone2003 (ルイジアナ州、アメリカ合衆国) 2003 年 10 月
12. Sone K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and T. Iguchi: Effects of estrogenic chemicals on developing *Xenopus laevis* embryos -Analysis of gene expression using DNA array-. トキシコゲノミックス国際フォーラム (東京) 2003 年 10 月
13. Sone, K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and T. Iguchi: Effects of estrogenic chemicals on developing *Xenopus laevis* embryos -Analysis of gene expression using DNA array- エコトキシコジェノミックス (岡崎) 2003 年 10 月
14. Sone K., M. Hinago, M. Itamoto, Y. Katsu, H. Watanabe and T. Iguchi: Molecular cloning of cDNAs encoding two androgen receptors and DMRT1 from mosquito fish. エコトキシコジェノミックス (岡崎) 2003 年 10 月
15. 勝 義直、井口泰泉: 膾上皮の角質化に関する新規レクチン. 日本動物学会第 74 回大会 (函館) 2003 年 9 月
15. 宮川信一、勝義直、渡邊肇、井口泰泉: マウス膾の不可逆的増殖における成長因子とエストロゲン受容体の作用. 日本動物学会第 74 回大会 (函館) 2003 年 9 月
16. 岡田晃宜、太田康彦、ステイーブン プロディー、井口泰泉: ラット新生児におけるエストロゲンによる輸卵管細胞の増殖・分化の解析. 日本動物学会第 74 回大会 (函館) 2003 年 9 月
17. Katsu, Y., M. Gunderson, L. Guillette, Jr. and T. Iguchi: Molecular cloning of the estrogen receptor, c-Jun and DJ-1 of the American alligator. 第 28 回 日本

比較内分泌学会(富山) 2003年8月

18. Sone, K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and T. Iguchi: Effects of bisphenol-A and nonylphenol on developing *Xenopus Laevis*. 第28回日本比較内分泌学会(富山) 2003年8月
19. Urushitani, H., M. Nakai, H. Inanaga, Y. Shimohigashi, A. Shimizu, Y. Katsu and T. Iguchi: Cloning, expression, and characterization of estrogen receptor alpha mRNA in mummichog, *Fundulus heteroclitus*. 第28回日本比較内分泌学会(富山) 2003年8月

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得      なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他          なし

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

低用量の内分泌かく乱物質とヒト性ステロイド代謝との関連性に関する研究  
：ヒト由来のエストロゲン受容体(ER)陽性細胞を用いたエストロゲン作用の  
新たなる展開について

東北大学大学院医学系研究科病理診断学分野

笹野 公伸 鈴木 貴 中村 保宏

研究要旨

内分泌かく乱物質を含む種々のエストロゲン様物質を様々な濃度でヒト由来のエストロゲン受容体(ER)及び種々のエストロゲン代謝酵素が発現している細胞（培養平滑筋細胞）に添加し、マイクロアレイ法を用いて新たなエストロゲン誘導遺伝子の検出に成功した。更にその遺伝子の発現を siRNA (small interfering RNAs) で阻害し、細胞が由来するヒト組織でその発現を確認し *in vivo* でのエストロゲン作用との関連性を示す事が出来た。今回の結果から、内分泌かく乱物質で誘導される遺伝子群をヒト組織由来の培養細胞を用いたマイクロアレイ法で検出し、その作用を siRNA で阻害して確認し、更にその発現程度をその培養細胞が由来するヒト組織で検討することにより実際の人体での影響の検討に外挿出来る可能性が示された。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質の人体への作用を *in vitro* の結果を外挿して検討する可能性を探究する目的で本研究計画をたてた。すなはちエストロゲン作用の一つの例として動脈硬化抑制に注目し、ヒト平滑筋由来の培養細胞でマイクロアレイ法、および siRNA (small interfering RNAs; 哺乳動物培養細胞において 3'末端に一本鎖 UU を含む 21 塩基の二本鎖 RNA) を用いた RNA interference (二本鎖 RNA にてその RNA と相同配列を持つ遺伝子の発現が抑制される現象)による特定遺伝子の mRNA 発現抑制解析などで同定した新しいエストロゲン応答遺伝子が実際のヒト大動脈組織で動脈硬化抑制というエストロゲン作用とどのよ

うに関係しているのかを検索する目的で研究を施行した。

B. 研究方法

マイクロアレイ法で検出したエストロゲン誘導遺伝子群の中で増殖抑制に関係する遺伝子を同定し、ヒト大動脈におけるその発現動態を多角的に検索した。すなはち 2 種類のヒト平滑筋培養細胞(ER $\alpha$ のみ陽性、および ER $\beta$ のみ陽性)を用いて、エストロゲンを添加後 8 時間と 48 時間後でコントロール群に対し有意に増加している遺伝子群をマイクロアレイを用いて、検索した約 22000 遺伝子の中から同定した。そして最も増殖抑制に関与していると思われる遺伝子を 1 つ選択し、RT 後定量 PCR でも

確認した。更に上記で検出された遺伝子を siRNA 法によりその発現を阻害し、エストロゲンおよびエストロゲン類似物質による増殖抑制に変化が生じるか否かを検討した。最終的にはヒト大動脈剖検標本 22 例でこの遺伝子の発現程度を RT 後定量 PCR 法により検討し、あわせて mRNA in situ hybridization を用いて発現局在も検索しエストロゲン作用との関係を検討した。

〔倫理面への配慮〕

本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得ている (2001-014)。

### C. 研究結果

マイクロアレイによる検討から、エストロゲン添加により細胞増殖抑制に関連して有意に増加している遺伝子 p120E4F が同定され、siRNA でその作用は阻害された。更にヒト大動脈で発現動態を検討したところエストロゲン作用との関連が示された。

#### ①マイクロアレイによる抗動脈硬化に関するエストロゲン応答遺伝子の検出

ER $\alpha$ 細胞にエストロゲンを 8 時間投与する事により、細胞増殖抑制に関与する遺伝子の中では p120E4F がコントロールに比し有意に増加していた。この遺伝子は ER $\beta$ 陽性細胞で発現は認められず、定量 PCR でも同様の結果が得られた。

#### ②検出された遺伝子 p120E4F の細胞増殖抑制への関与

p120E4F の発現を siRNA で阻害すると、エストロゲンによる増殖抑制は阻害されたが、SERM(selective estrogen receptor modulators)では増殖抑制阻害は見られなかった。

#### ③ 検出された遺伝子のヒト大動脈での発現

p120E4F の発現は軽度の動脈硬化を示す閉経前女性ヒト大動脈で強く認められ、動脈硬化症と逆比例する事が認められた。またその局在は ER $\alpha$ を有する新生内膜層

内の平滑筋細胞であった。

### D. 考察

低用量の内分泌かく乱物質の作用を含めて、ヒトの種々の組織、細胞におけるエストロゲン作用動態を検討するにあたっては、エストロゲン及び種々のエストロゲン類似物質をヒト組織由来の培養細胞に添加後、遺伝子発現が増加あるいは低下した遺伝子群、すなはちエストロゲン誘導遺伝子をマイクロアレイ法を用いて広範に検討する事は極めて重要な検索方法である。しかしマイクロアレイ法で検討したエストロゲン誘導遺伝子がエストロゲン作用と関連しているのかどうか？ 更にはその誘導遺伝子が実際のヒトでのエストロゲン作用、代謝動態とどのように関係するのかといった事の解明、すなはち *in vitro* での結果の実際の人体に対しての影響への外挿が欠かせないアプローチとなる。

そこで今回我々は人体に対してのエストロゲン作用の一つの例として動脈の平滑筋細胞に対するエストロゲンの直接作用に注目した。そして ER 及び種々のエストロゲン代謝酵素を発現しているヒト動脈平滑筋由来の培養細胞にエストロゲンを添加して mRNA を抽出し、マイクロアレイ法を用いて誘導遺伝子群を広範に検出した。これらの誘導遺伝子群の中で細胞増殖抑制に関与する遺伝子として p120E4F が新たなるエストロゲン誘導遺伝子として認められ、更にその発現が RT-PCR 法により確認された。次に p120E4F の作用を確認するためにこの遺伝子に対応する siRNA を細胞に導入し、エストロゲン添加により細胞増殖抑制作用が阻害されるのを確認した。このアプローチによりマイクロアレイ法で確認された遺伝子の作用を確実に把握する事が出来た。すなはち平滑筋細胞増殖抑制を生じるエストロゲン応答遺伝子の関与が *in vitro* の実験で証明された。又エストロゲンと

SERMs (selective estrogen receptor modulators)とではこの siRNA 導入による抑制動態も異なり、今後の低用量の内分泌かく乱物質の作用及びその機序を考えるにあたり極めて重要な知見ではないかと考えられた。

次にマイクロアレイ法の結果見つけられた新たなエストロゲン誘導遺伝子 p120E4F が実際のヒトのエストロゲン標的組織、すなわちエストロゲン応答組織でどのような作用をしており、更にはエストロゲン作用とどのように関係しているのかといった事の解析も極めて重要となる。今回の研究で実際のヒト大動脈組織で p120E4F の発現動態を検出したところこの遺伝子の発現細胞は ER $\alpha$  陽性細胞に一致してその発現が認められ、実際のエストロゲン作用と密接な関連性が示唆された。さらにこの遺伝子のヒト大動脈における発現動態は、性別や動脈硬化の程度を含めたエストロゲン作用とも密接に関連を示している事が示された。このように *in vitro* の結果を *in vivo* のヒト組織での所見と対応していくアプローチは今後低容量暴露も含めて内分泌かく乱物質の人体への作用を考えるにあたって極めて重要な知見を供するものと考えられた。

#### E. 結論

今回 *in vitro* の研究の結果検出された新たなエストロゲン誘導遺伝子の実際のヒト組織でのエストロゲン作用との関連性を示す事が出来た。すなわちマイクロアレイ法を用いて新たなエストロゲン誘導遺伝子を同定し、その遺伝子の発現動態をその細胞が由来するヒト組織で検討しエストロゲン作用との関連性を示す事が出来た。今後このようなアプローチで内分泌かく乱物質で誘導される遺伝子群を *in vitro* の実験で検出し、ヒト組織での発現や機能を検討することが極めて重要な検索方法となる事が考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

©I. Nakamura Y, Miki Y, Suzuki T, Nakata T, Darnel AD, Moriya T, Tazawa C, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H.

Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in the atherosclerotic human aorta.

American Journal of Pathology 163:1329-39 2003

2. Konishi A, Tazawa C, Miki Y, Darnel AD, Suzuki T, Ohta Y, Suzuki T, Tabayashi K, Sasano H.

The possible roles of mineralocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 85:439-42 2003

3. Kimura Y, Suzuki T, Kaneko C, Darnel A, Akahira J, Ebina M, Nukiwa T, Sasano H.

Expression of androgen receptor, and 5 $\alpha$ -reductase types 1 and 2 in early gestation fetal lung: A possible correlation with branching morphogenesis.

Clinical Science (London, England) 105:709-13 2003

4. Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Date F, Takeyama J, Darnel AD, Moriya T, Sasano H.

Orexin-A expression in human peripheral tissues.

- Molecular and Cellular Endocrinology  
205:43-50 2003
- ©5. Sato Y, Suzuki T, Hidaka K, Sato H, Ito K, Ito S, Sasano H.  
Immunolocalization of nuclear transcription factors, DAX-1 and COUP-TF II, in the normal human ovary: correlation with adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor-1 immunolocalization during the menstrual cycle.  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88:3415-20 2003
6. Ishiguro H, Kato K, Kishimoto T, Nagai Y, Takahashi T, Sasano H, Ishikura H.  
Expression of steroidogenic enzymes by luteinizing cells in the ovarian-type stroma of a mucin-producing cystic tumour of the pancreas.  
Histopathology 43:97-8 2003
- ©7. Suzuki T, Nakata T, Miki Y, Kaneko C, Moriya T, Ishida T, Akinaga S, Hirakawa H, Kimura M, Sasano H.  
Estrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma.  
Cancer Research 63:2762-70 2003
8. Utsunomiya H, Suzuki T, Ito K, Moriya T, Konno R, Sato S, Yaegashi N, Okamura K, Sasano H.  
The correlation between the response to progestogen treatment and the expression of progesterone receptor B and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human endometrial carcinoma.  
Clinical Endocrinology 58:696-703 2003
9. Kawabata W, Suzuki T, Moriya T, Fujimori K, Naganuma H, Inoue S, Kinouchi Y, Kameyama K, Takami H, Shimosegawa T, Sasano H.  
Estrogen Receptors (alpha and beta) and 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and 2 in Thyroid Disorders: Possible In Situ Estrogen Synthesis and Actions.  
Modern Pathology 16:437-44 2003
10. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H.  
Sex steroid hormone receptors in human thymoma.  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88:2309-17 2003
11. Chai Z, Brereton P, Suzuki T, Sasano H, Obeyesekere V, Escher G, Saffery R, Fuller P, Enriquez C, Krozowski Z.  
17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells.  
Endocrinology 144:2084-91 2003
12. Mune T, Morita H, Suzuki T, Takahashi Y, Isomura Y, Tanahashi T, Daido H, Yamakita N, Deguchi T, Sasano H, White PC, Yasuda K.  
Role of local 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in determining the phenotype of adrenal adenomas.  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88:864-70 2003 (原著)
13. Suzuki S, Koyama K, Darnel A, Ishibashi H, Kobayashi S, Kubo H, Suzuki T, Sasano H, Krozowski ZS.  
Dexamethasone upregulates 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in BEAS-2B cells.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 167:1244-9 2003
14. Tsubochi H, Suzuki S, Kubo H, Ueno T, Yoshimura T, Suzuki T, Sasano H, Kondo T.  
Early Changes in Alveolar Fluid Clearance by Nitric Oxide after

- Endotoxin Instillation in Rats.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 167:205-210 2003
15. Suzuki T, Nakamura Y, Moriya T, Sasano H.  
Effects of steroid hormones on vascular functions.  
Microscopy Research and Technique 60:76-84 2003
16. Suzuki T, Murry BA, Darnel AD, Sasano H.  
Progesterone metabolism in human leukemic monoblast U937 cells.  
Endocrine Journal 49:539-546 2002
17. Ioka RX, Kang MJ, Kamiyama S, Kim DH, Magoori K, Kamataki A, Ito Y, Takei YA, Sasaki M, Suzuki T, Sasano H, Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Yamamoto TT.  
Expression cloning and characterization of a novel GPI-anchored HDL binding protein, GPI-HBP1.  
The Journal of Biological Chemistry 278:7344-9 2002
- ©18. Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C, Hidaka K, Shiotsu Y, Kusaka H, Sasano H.  
Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues.  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 87:5760-5768 2002 (原著)
19. Suzuki T, Moriya T, Ishida T, Kimura M, Ohuchi N, Sasano H.  
In situ Production of Estrogens in Human Breast Carcinoma.  
Breast Cancer 9:296-302 2002
20. Kimura Y, Suzuki T, Kaneko C, Darnel AD, Moriya T, Suzuki S, Handa M, Ebina M, Nukiwa T, Sasano H.  
Retinoid receptors in the developing human lung.  
Clinical Science (London, England) 103:613-621 2002
- ©21. Inoue T, Akahira JI, Suzuki T, Darnel AD, Kaneko C, Takahashi K, Hatori M, Shirane R, Kumabe T, Kurokawa Y, Satomi S, Sasano H.  
Progesterone Production and Actions in the Human Central Nervous System and Neurogenic Tumors.  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 87:5325-5331 2002
22. Gurates B, Sebastian S, Yang S, Zhou J, Tamura M, Fang Z, Suzuki T, Sasano H, Bulun SE.  
WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells.  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 87:4369-4377 2002
23. Akahira J, Suzuki T, Ito K, Kaneko C, Darnel AD, Moriya T, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H  
Differential expression of progesterone receptor isoforms a and B in the normal ovary, and in benign, borderline, and malignant ovarian tumors.  
Japanese Journal of Cancer Research 93:807-815 2002
24. Rainey WE, Carr BR, Sasano H, Suzuki T, Mason JI.  
Dissecting human adrenal androgen production.  
Trends in Endocrinology and Metabolism 13:234-239 2002
25. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Sone M, Noshiro T, Hayashi Y, Sasano H, Shibahara S.  
Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor in the human adrenal glands and tumor tissues of adrenocortical tumors, pheochromocytomas and neuroblastomas.

Peptides 23:1135-1140 2002

26. Honma W, Shimada M, Sasano H, Ozawa S, Miyata M, Nagata K, Ikeda T, Yamazoe Y.

Phenol sulfotransferase, ST1A3, as the main enzyme catalyzing sulfation of troglitazone in human liver. Drug Metabolism and Disposition 30:944-952 2002

27. Ito K, Suzuki T, Akahira J, Moriya T, Kaneko C, Utsunomiya H, Yaegashi N, Okamura K, Sasano H.

Expression of androgen receptor and 5alpha-reductases in the human normal endometrium and its disorders.

International Journal of Gynecological Cancer 10:99:652-657 2002

28. Ogawa Y, Matsumoto K, Maeda T, Tamai R, Suzuki T, Sasano H, Fernley RT.

Characterization of Lacrimal Gland Carbonic Anhydrase VI.

Journal of Histochemistry and Cytochemistry 50:821-8 2002

29. Tamura M, Sebastian S, Yang S, Gurates B, Ferrer K, Sasano H, Okamura K, Bulun SE.

Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin synthesis in endometrial stromal cells by malignant endometrial epithelial cells:

A paracrine effect mediated by prostaglandin E2 and nuclear factor-kappaB.

Journal of Biological Chemistry 277:26208-16 2002

30. Yang S, Fang Z, Suzuki T, Sasano H, Zhou J, Gurates B, Tamura M, Ferrer K, Bulun S.

Regulation of Aromatase P450 Expression in Endometriotic and Endometrial Stromal Cells by CCAAT/Enhancer Binding Proteins

(C/EBPs): Decreased C/EBPbeta in Endometriosis Is Associated with Overexpression of Aromatase.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 87:2336-2345 2002

31. Omura M, Sasano H, Fujiwara T, Yamaguchi K, Nishikawa T.

Unique cases of unilateral hyperaldosteronemia due to multiple adrenocortical micronodules, which can only be detected by selective adrenal venous sampling.

Metabolism 51:350-355 2002

32. Ito A, Yamaguchi K, Onogawa T, Unno M, Suzuki T, Nishio T, Suzuki T, Sasano H, Abe T, Tamai M.

Distribution of Organic Anion-Transporting Polypeptide 2 (oatp2) and oatp3 in the Rat Retina.

Investigative Ophthalmology and Visual Science 43:858-863 2002

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

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  
分担研究者 廣川勝昱 東京医科歯科大学 教授

研究要旨

内分泌かく乱化学物質(EDCs)の胸腺リンパ球と T 細胞の増殖・分化に与える影響を *in vitro* の実験系で検討した。低用量の EDCs 添加とエストロゲン受容体拮抗剤の併用実験の結果、EDCs がエストロゲン受容体を介し、胸腺における未熟胸腺リンパ球の増殖・分化に影響を与えている事が認められた。また、成熟 T 細胞についても、細胞内情報伝達系への影響が認められた。

これらの結果は低用量の EDCs が生体内に取り込まれた場合、T 細胞の増殖・分化過程が抑制され、免疫系の機能に影響を及ぼす可能性のある事が示唆された。

A. 研究目的

免疫系は感染に対する生体防御機構として働くと共に、内部環境のホメオスタシスを維持する上で重要な役割を果たしている。ホメオスタシスの維持においては、免疫系は神経系と内分泌系との緊密な総合作用をしながらその役割を果たしている。免疫系の主要構成細胞であるリンパ球は抗体やサイトカインを作るだけでなく、エンドルフィンなどの神経伝達物質や各種下垂体ホルモンを産生し、それらに対する受容体も持つ。リンパ球はステロイドを作らないが、副腎皮質ホルモンや性ホルモンに対する受容体を持ち、ステロイドの影響を受け易いようになっている。従って、環境にある EDCs が免疫系に影響を及ぼすことは必至である。

本実験では、合成ホルモン(Diethylstilbestrol: DES)、天然エストロゲン(17 $\beta$ -Estradiol)、ビスフェノール(Bisphenol A)、アルキルフェノール類(p-n-Octylphenol) およびフタル酸類

(Benzyl n-butyl phthalate)の Maus 免疫系への影響について、*in vitro* の実験系で検討した。

B. 研究方法

1. 動物：胎生 15 日齢および 6 週齢 C57BL/6 マウスを用いた。
2. 培養細胞株：EL-4 (CD4 陽性 T 細胞株)
3. 内分泌かく乱化学物質：Diethylstilbestro (DES, Sigma: D4628), 17 $\beta$ -Estradiol (E2, Nakarai: 14541-61), Bisphenol A (BPA, Wako: 025-13541), p-n-Octylphenol (OP, Wako: 159-0261), Benzyl n-butyl phthalate, Wako: 023-06371) を DMSO に溶解して用いた。
4. 胸腺微小環境内における未熟胸腺リンパ球の増殖・分化への影響：胎生 15 日齢 C57BL/6 マウス胎仔胸腺を用い、マイクロプレート内で高酸素下胎仔胸腺器官培養(70%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、25%N<sub>2</sub>:HOS-FTOC)を行い、DMSO に溶解した各種内分泌かく乱化学物質(最終濃度：0.1nM)

を添加し、7日後に培養胸腺組織から胸腺細胞を回収して FITC-抗 CD4 抗体と PE-CD8 抗体を用いた 2 重染色および FITC-抗 CD25 抗体、PE-抗 CD44 抗体、PerCP-抗 CD4 抗体、PerCP-抗 CD8 抗体を用いた 3 重染色を施しフローサイトメトリーにて胸腺リンパ球の増殖・分化への影響を検討した。なお、エストロゲン受容体の拮抗剤 (ICI-182.780) 処理群も加えた。

5. 細胞内情報伝達系への影響：磁気ビーズ分離精製法により無刺激調整した脾臓 T 細胞を用い内分泌かく乱化学物質存在下およびエストロゲン受容体の拮抗剤共存下における抗 CD3 抗体による刺激 5、10、20 分後に細胞を回収し TNE buffer にてタンパクを抽出、SDS-PAGE 電気泳動、ウエスタンブロット・免疫染色法にてリン酸化の動向を検討した。(倫理面への配慮)

所属施設である東京医科歯科大学実験動物委員会発行の「東京医科歯科大学における動物実験の手引きに」に従い動物実験を実施した。

## C. 研究結果

1. 未熟胸腺細胞の胸腺内における増殖・分化への影響：

フローサイトメトリー解析では胎生 15 日齢未熟胸腺細胞は CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) のサブセットのみで構成され、前方散乱光 (FSC) 強度の高いサイズの大きい細胞からなる。分化成熟が進むと FSC 強度が低下し、細胞のサイズが小さくなるとともに CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) から CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP)、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (4SP)、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (8SP) のサブセットに分化する。この DN サブセットの中では更に CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (DN1) → CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (DN2) → CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (DN3) → CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> (DN4) と分化過程をたどる。このような生体内での動態が HOS-FTOC

による *in vitro* でも観察することが出来る。

EDCs の存在下では、胸腺細胞の増殖が低下し、細胞数の減少が起こる。また DN1 → DN2 への分化が抑制され、DN1 の割合が増加する。

EDCs に加えて、エストロゲン受容体拮抗剤 (ICI-182.780) を HOS-FTOC 培養液中に添加すると、上記の EDCs の抑制効果がなくなった。即ち、ICI-182.780 のみを添加した対照群と比べて差異は認められなかった。

2. T 細胞の細胞内情報伝達系への影響。

T 細胞を EDCs 処理後に細胞刺激を与えた群とエストロゲン受容体拮抗剤 (ICI-182.780) と EDCs の処理群とを比較すると、T 細胞受容体下流のリン酸化のパターンは異なり PLCγ、ZAP-70、Lck、MAPk-44、MAPk-42 などのタンパクのリン酸化の減少、時間の遅れが認められた。即ち、EDCs が T 細胞内の複数のシグナル伝達物質に影響を与えることが明らかになった。

## D. 考察

胎仔胸腺器官培養システム (HOS-FTOC) を用いることにより、極めて低用量の EDCs が胸腺細胞の増殖分化を抑制することが明らかになった。この EDCs の抑制効果は、培養システムにエストロゲン受容体拮抗剤を添加することにより見られなくなるので、エストロゲン受容体を介したものであることが分かった。

成熟 T 細胞についても、マイトゲンなどの刺激で増殖期にあるものについては、EDCs が細胞内情報伝達系に影響を及ぼすことが分かった。このことから EDCs が T 細胞の分化段階だけでなく、末梢における免疫反応系にも影響を示すことが分かった。今後は EDCs による胸腺リンパ球の増殖・分化に対する抑制効果を妊娠

マウスや胎仔マウスを用いて、in vivoで調べる必要のあることがわかった。

#### E. 結論

今回用いた化学物質は低い用量においても、in vitroにおける胸腺内における胸腺細胞の早期の増殖・分化に影響を与えているのみならず、成熟 T 細胞にも影響を与えていることが示唆された。環境にある EDCs が低用量でも生体内に取り込まれれば、免疫系に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Utsuyama M, Shiraishi J, Takahashi H, Kasai M, Hirokawa K.: Glia maturation factor produced by thymic epithelial cells plays a role in T cell differentiation in the thymic microenvironment. *Int. Immunol.* 15: 557-564 (2003)

Utsuyama M, Hirokawa K.: Radiation-induced-thymic lymphoma occurs in young, but not in old mice. *Exp. Mol. Pathol.* 74: 319-325 (2003)

Shiraishi J, Utsuyama M, Seki S, Akamatsu H, Sunamori M, Kasai M, Hirokawa K.: Essential microenvironment for thymopoiesis is preserved in human adult and aged thymus. *Clin. Dev. Immunol.* 10: 53-59 (2003)

Ikeda T, Kasai M, Suzuki J, Kuroyama H, Seki S, Utsuyama M, Hirokawa K.: Multimerization of the Receptor

Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand (RANKL) Isoforms and Regulation of Osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 278: 47217-47222 (2003)

Fujisaki C, Utsuyama M, Hirokawa K.: An immunosuppressive drug, cyclosporine-A acts like anti-depressant for rats under unpredictable chronic stress. *Med Dent Sci.* 50: 93-100 (2003)

Takahashi K, Hirokawa K, Takahashi H.: Expression of Foxp2, a gene involved in speech and language, in the developing and adult striatum. *J Neurosci Res.* 73: 61-72 (2003)

#### H. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

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

分担研究者 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

研究要旨

内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌かく乱物質のアレルギーや化学物質過敏症との関連も危惧されている。そこで、内分泌かく乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関して研究することを目的として、特にマクロファージ機能への影響について調べた。その結果、マクロファージによる NO 産生は、BPA、アルキルフェノール化合物類とフタル酸エステル化合物類で増加した。貪食作用については、各内分泌かく乱物質とも高濃度で減少する傾向が見られた。以上の結果から、内分泌かく乱物質が免疫機能に影響を与えていることが示唆された。

A. 研究目的

内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌かく乱物質の免疫系への影響も危惧されている。すなわち、内分泌かく乱物質が内分泌系のみならず免疫機能へも何らかの影響を及ぼしている可能性がある。そこで本年度は、内分泌かく乱物質のマクロファージ機能、特に NO 産生と貪食作用に及ぼす影響について調べた。

B. 研究方法

マクロファージ様培養細胞及び内分泌かく乱物質投与 BALB/c マウスから得た腹腔常在性マクロファージを用いた。用いた内分泌かく乱物質は、ノニルフェノール(NP)、ビスフェノール A(BPA)、フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)、フタル酸ジエチル(DEP)、フタル酸ジブチル(DBP)、フタル酸ブチルベンジル(BBP)、フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)である。NO 産生について調べる場合には、マウ

スマクロファージ様細胞 RAW264.7 に内分泌かく乱物質単独あるいは LPS と同時に添加し 16 時間後の培地中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>量を測定した。また、貪食作用については、マクロファージへ分化させたヒト前骨髄性白血病細胞 HL60 に内分泌かく乱物質を加え、蛍光ラテックスビーズを用いフローサイトメーターにて解析を行った。

また、BALB/c マウスに内分泌かく乱物質を 4 週間経口投与し、腹腔常在性マクロファージを得、同様に NO 産生と貪食作用について調べた。

(倫理面への配慮)

マウスの屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。

C. 研究結果

C-1. 培養細胞を用いた研究

(1) NO 産生