

①内分泌かく乱物質単独の場合

内分泌かく乱物質単独で処理した場合のコントロールの NO_2^- 濃度は $1.26 \pm 0.88 \mu\text{M}$ であった。

アルキルフェノール類の場合、NP は $10^{-3} \sim 10^{-4}\text{M}$ と $10^{-10} \sim 10^{-11}\text{M}$ の濃度でコントロールに比べて有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。OP は 10^{-3}M と 10^{-11}M の濃度でコントロールに比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。

フタル酸エステル類では、BBP と DEP は 10^{-3}M と 10^{-11}M の濃度で、DEHP では 10^{-3}M 、DBP は 10^{-11}M の濃度でコントロールに比べて有意に NO 産生を上昇させた ($p < 0.05$)。

BPA、2,4'-DDE、4,4'-DDE は、 10^{-3}M と 10^{-11}M の濃度で NO 産生が有意に上昇した (BPA は $p < 0.01$ 、2,4'-DDE、4,4'-DDE は $p < 0.05$)。

②内分泌かく乱物質と LPS 同時処理の場合

LPS と内分泌かく乱物質を同時に処理した場合、コントロールの NO_2^- 濃度は、 $6.17 \pm 1.67 \mu\text{M}$ であった。

アルキルフェノール類を LPS と同時に処理した場合、NP は、 $10^{-4} \sim 10^{-5}\text{M}$ の濃度でコントロールに比べて有意に低い値を示した ($p < 0.01$)。OP は $10^{-3} \sim 10^{-5}\text{M}$ の濃度でコントロールに比べて有意に低い値を示した ($p < 0.01$)。

フタル酸エステル類を LPS と同時に処理した場合、BBP では $10^{-3} \sim 10^{-4}\text{M}$ と $10^{-6} \sim 10^{-8}\text{M}$ で有意に NO 産生が減少した ($p < 0.01$)。DEHP では $10^{-4} \sim 10^{-5}\text{M}$ 、DBP は $10^{-3} \sim 10^{-4}\text{M}$ で、DCHP は $10^{-3} \sim 10^{-4}\text{M}$ の濃度でコントロールに比べて有意に NO 産生を減少させた ($p < 0.01$)。また、DEP は 10^{-5}M と 10^{-11}M の濃度で、また DBP は 10^{-11}M で有意に NO 産生を上昇させた ($p < 0.01$)。

BPA は $10^{-3} \sim 10^{-4}\text{M}$ の濃度で NO 産生が有

意に減少した ($p < 0.01$)。2,4'-DDE、4,4'-DDE はともに 10^{-3}M 、 10^{-8}M の濃度で有意に減少した ($p < 0.01$)。4,4'-DDE では、 10^{-4}M 、 $10^{-10} \sim 10^{-11}\text{M}$ 以外の濃度で、すべてコントロールに比べて有意に NO 産生が減少した ($p < 0.05$)。

(2) 食食作用

OP では 10^{-9}M 付近で食食能が高い傾向が見られた。NP、OP とともに 10^{-4}M の濃度で有意に食食作用が減少した。それよりもうすい濃度では、コントロールとの有意差はなかったが、 $10^{-9} \sim 10^{-12}\text{M}$ で増加する傾向が見られた。

BBP はどの濃度でも食食作用を抑制する傾向が見られ、 10^{-5}M の濃度では有意に食食能が減少した ($p < 0.05$)。DBP は有意差はなかったが、 10^{-4}M 、 10^{-9}M の濃度付近で抑制する傾向が見られた。また DCHP は 10^{-4}M で食食能が減少した ($p < 0.05$)。

BPA では 10^{-7}M 付近と 10^{-11}M 付近で食食能増加の傾向が見られた。

4,4'-DDE では 10^{-7}M で有意に食食能が減少した ($p < 0.05$)。2,4'-DDE では変化が見られなかった。

C-2. マウスの腹腔常在性マクロファージを用いた研究

(1) NO 産生

LPS を加えずに 16 時間インキュベートした後の NO 産生量は、コントロールでは、 $0.77 \pm 0.15 \mu\text{M}$ であった。NP、DCHP、BPA (DCHP、BPA : 0.5、5、50、500mg/kg 体重/day、NP : 0.5、5、50mg/kg 体重/day) 投与群のいずれもコントロールとの有意差は認められなかったが、NP 投与群から得られたマクロファージはどの濃度でも NO 産生を上昇させる傾向にあったが、BPA、DCHP 投与群から得られたマクロファージでは抑制する傾向が見られた。

LPS を加えて 16 時間インキュベートした場合の NO 産生量は、コントロール

では、 $1.43 \pm 0.32 \mu\text{M}$ であった。NP、DCHP、BPA 投与群のいずれもコントロールと比較して有意差はなかったが、DCHP 投与群については、NO 産生を抑制する傾向にあった。また、BPA 投与群は、0.5 及び 500 mg/kg 体重/day の場合には NO 産生が上昇し、5 mg/kg 体重/day では減少する傾向が見られた。

(2) 食食作用

食食能については、NP、BPA 投与群のいずれもコントロールに比べて有意な差は見られなかった。DCHP 投与群については、0.5 mg/kg 体重/day で、有意に食食作用を低下させた。

D. 考察

マクロファージは自然免疫を担う細胞の1つであり、多数の表面レセプターによって異物を認識し、迅速に食食、排除を行うとともに、炎症性サイトカインを産生する。この機構は、免疫系の中でも最も原始的なものであり、高等生物のみならず生物が広く持っているシステムである。

LPS や IFN- γ で活性化されたマクロファージには一酸化窒素合成酵素 (NOS) が発現し、L-アルギニンのグアニジド基に酸素を添加して、NO と L-シトリルリンを生成する。NO は細菌や腫瘍細胞に対して高レベルの毒性がある。NO は毒性と関係しないシグナル伝達の機能も持っており、その毒性機能は、ほとんどが過酸化亜硝酸塩の形成につながる酸素還元系の産物との相互作用の後に起こる。この機能は、食作用や炎症の部位で起こる。感染防御機構において、自然免疫は感染早期の防御機構のみならず、適応免疫の Th1/Th2 細胞への分化を決定する大きな要因となる。

本研究では、内分泌かく乱物質のマクロファージの活性化に対する影響を調べ

ることを目的とし、マクロファージの活性化の指標として、NO 産生量と食食作用を選んだ。

in vitro では、アルキルフェノール化合物類、フタル酸化合物類、BPA、2,4'-DDE、4,4'-DDE とともに低濃度で NO 産生を上昇させ、LPS で刺激したときは逆に $10^{-3} \sim 10^{-4}\text{M}$ で NO 産生を減少させた。これらの化合物は、 $10^{-3} \sim 10^{-4}\text{M}$ と $10^{-10} \sim 10^{-11}\text{M}$ の濃度で特に細胞に作用すると思われる。食食作用については、NO 産生で見られた $10^{-3} \sim 10^{-4}\text{M}$ と $10^{-10} \sim 10^{-11}\text{M}$ の濃度での高い反応性は見られなかったが、 $10^{-3} \sim 10^{-4}\text{M}$ では食作用が減少し、 $10^{-10} \sim 10^{-11}\text{M}$ では上昇する傾向が見られた。 $10^{-3} \sim 10^{-4}\text{M}$ という濃度は、化合物によっては細胞毒性を示す濃度であるため、NO 産生の上昇と食作用の減少は、細胞毒性によるものかもしれない。今回の実験では、NO 産生については 16 時間処理で、食作用については 3 時間処理である。食食作用についても、長時間の処理を行った場合の実験をする必要があると思われる。

in vivo での結果は、*in vitro* とは異なり、コントロールと有意差はみられなかったが、個体間のばらつきが大きかったことが差のみられなかった一因と考えられる。

本研究では、食食作用という指標では化学物質の影響ははっきりと確認できなかったが、NO 産生については影響があることが分かった。NO 産生量の低下は、直接的に抗病原微生物作用の低下に結びつき、感染防御の低下につながる点で重要な知見であると思われる。また、NO 産生の増加、食食能の増加は、常にマクロファージが活性化され続けることによって異物が進入した際に本来の機能が働かなくなる可能性も示している。マクロファージ活性化の別の指標、たとえば

TNF- α の産生量などでこれらの化合物の影響をさらに調べる必要があると思われる。

内分泌かく乱物質が免疫系に影響を及ぼしている例として、海棲哺乳類が大量に死亡した事件があげられる。死亡したイルカの多くは、体内に種々の化学物質が蓄積されており、皮膚及び器官にウイルスやバクテリアの著しい日和見感染があったことが報告されている。これは化学物質が免疫機能を低下させウイルス感染に抵抗できなかったためと考えられる。また、PCBに汚染したバルト海の魚を餌として与えたアザラシに先天性及び後天性の免疫応答抑制が見られたという報告がある。汚染された海域に住むアザラシにおける免疫抑制は、細菌性及びウイルス性感染症の発症率増加の理由であると考えられている。本研究から得られた結果がこういった現象を一部裏付けているのではないかと思われる。

マクロファージはホルモン受容体を介していない経路で影響を受けていると思われる。今回の研究から、内分泌攪乱作用を疑われている化学物質が、内分泌系だけでなく免疫機能に影響を及ぼしていることが示唆された。免疫機能がどのような経路で化学物質の影響を受けるのか、その詳細なメカニズムの解明に関する研究もこれから行う必要がある。フタル酸エステル類はPPARを活性化する。マクロファージにおけるPPAR活性化とマクロファージ機能との関係についてはまだ明らかになっていないが、このような経路により影響を及ぼしている可能性もある。

今回の研究において、アルキルフェノール類、フタル酸エステル類、BPAでは、NO産生において低用量での反応が見られた。フタル酸エステル化合物はプラスチック類の可塑剤として使用されており、

BPAは樹脂の原料として使用されている。ヒトは食器や食品の包装材などを通してこれらの化合物を低用量で日常的に摂取している可能性があり、さらなる研究が必要であると思われる。

E. 結論

本研究では、内分泌かく乱物質がマクロファージの機能に影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち、*in vitro*の実験では、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、フタル酸エステル化合物類で増加した。食食作用については、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。*In vivo*の実験では、個体差が大きく有意差はみられなかったが、DHP投与群において腹腔常在性マクロファージのNO産生及び食食作用の低下がみられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukamachi K, Han BS, Kim CK, Takasuka N, Matsuoka Y, Matsuda E, Yamazaki T, Tsuda H. Possible enhancing effects of atrazine and nonylphenol on 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced mammary tumor development in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats. *Cancer Science*, 2004(in press).

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

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

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

分担研究者 垣塚 彰 京都大学大学院生命科学研究科

研究要旨

外来の有害な化学物質に生体が曝露されると様々なチトクローム P450 (CYP) 酵素群が特定の核内受容体を介して誘導され、有害物質は代謝され、時に活性化を受ける。我々は、フェノバルビタールから内在性に誘導される活性物質とそれに応答する核内受容体の検討を行った。ラットにフェノバルビタールを腹腔内投与し、肝臓から脂溶性低分子を含む分画を抽出した。得られた分画によって mouse pregnane X receptor (mPXR) が顕著な活性化を受けた。この mPXR を活性する物質を精製・同定したところ、di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) であることが判明した。当初、フェノバルビタールによって誘導される内在性の mPXR 活性化因子を同定することが出来たと考えていたが、実際に同定された DEHP は実験の過程でプラスチック製品から混入したものと推察される。DEHP は、ヒト PXR (hPXR) に比べ mPXR をより強く活性化し、この活性化は血清によりほとんど消失した。以上のことは、広くプラスチック製品等に使われる DEHP には、生体内で hPXR の潜在的な活性化能があることを示唆している。

A. 研究目的

外来の有害な化学物質に生体が曝露されると様々なチトクローム P450 (CYP) 酵素群が特定の核内受容体を介して誘導され、有害物質が代謝される。我々は、フェノバルビタールを用いて内在性に誘導される活性物質の検討とそれに応答する核内受容体の検討を行った。

外来の有害な化学物質は代謝されることで必ずしも無毒化されるとは限らない。代謝産物がさらに別の受容体を活性化し、別の生体応答を引き起こす可能性がある。つまりひとたび生体が有害な外来物質に曝露されると、外来物質に対する 1 次応答による異所性の擬ホルモン作用や、代謝産物による 2, 3 次応答といった多段階の反応を引き起こし、生体によりいっ

その悪影響を与える可能性がある。このような多段階の生体応答機構（種差による違いを含む）を明らかにする目的で、ヒトと齧歯類で異なる反応を示すフェノバルビタールを用いて 2, 3 次的に誘導される物質の同定とそれに応答する核内受容体について検討した。

一方、パーキンソン病の発症に関与することが示唆されている核内受容体 Nurr1 に対する内在性のリガンドの同定も試みた。

B. 研究方法

ラットにペルオキシソーム増殖誘導剤であるフェノバルビタールを腹腔内投与し、肝臓から脂溶性低分子を抽出した。得られた脂溶性低分子を含む分画によって活性

化される核内受容体とその活性化因子を同定した。

フェノバルビタールのようなペルオキシソーム増殖誘導剤は、齧歯類ではペルオキシソームの増殖をもたらすがヒトではそのような現象は見られない。このようにヒトと齧歯類で異なる作用を示す薬物であるフェノバルビタールを投与した肝臓より脂溶性低分子分画を抽出した。得られた脂溶性低分子分画の核内受容体に対する感受性の違いを培養細胞を用いて検討した。その結果、mouse pregnane X receptor (mPXR)がこの脂溶性低分子分画に良く応答すること、その反応はhuman pregnane X receptor (mPXR)よりも顕著であることが判明した。続いて、mPXRの転写活性化能を指標に、この抽出液をHPLC (High pressure liquid chromatography)を用いて分離・精製し、mPXRの転写を活性化する物質をNMRにて同定した。

一方、血清中にNurr1の転写を活性化する分画が存在する可能性を見出したので、Nurr1の転写活性化能を指標に、この分画をHPLC (High pressure liquid chromatography)を用いて分離・精製した。

(倫理面への配慮)

使用した動物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当大学の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行った。

C. 研究結果

1) mPXR 活性化物質の同定

フェノバルビタールを投与した肝臓から抽出した脂溶性低分子分画に含まれるmPXRの活性化能を持つ物質をHPLCを用いて分離・同定したところ、その物質はdi-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)であることが判明した。

すなわち、ラットにフェノバルビタールを3日間連続で腹腔内投与し、4日目

に肝臓を摘出した。Folch法によって肝臓から脂溶性低分子を抽出した。この抽出液によって活性化される核内受容体を検討した。この分画はRetinoic acid receptor (RAR)及びperoxisome proliferators-activated receptor alpha (PPAR α), PPAR γ を活性化したが、それは肝臓に内在性に多く含まれるレチノイドや脂肪酸の影響と考えられた。他の受容体として、特にmPXRが良く応答しているのが観察された。フェノバルビタールは主にconstitutive androstane receptor (CAR)を介してP450(CYP2B)を誘導する。しかしながら、フェノバルビタールはCYP3Aも誘導する。CYP3Aは主にPXRを介して誘導されるが、フェノバルビタールがPXRのリガンドとして働くかどうかは明らかではない。フェノバルビタールによって直接CAR、PXRが活性化される可能性も考えられるが、フェノバルビタールの代謝産物が2, 3次応答といった多段階の反応を引き起こしPXRを活性化している可能性も否定できない。我々は、フェノバルビタールによって2, 3次的に誘導されている物質がPXRを活性化している可能性を考え、肝臓抽出液からmPXRを活性化する物質の同定を試みた。

まず肝臓抽出液を順層系のCNカラムを用いてHPLCで分画し、それぞれの分画を培養細胞に添加しmPXRを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、分画8, 9に強い活性が観察された(図1)。この分画をさらに精製するために逆層系のC18カラムを用いて分画後、同様に培養細胞を用いてレポーターアッセイを行った。分画12-15に活性物質が含まれていると考えられたため(図2)、これらの分画のうち分画12を用いてさらにC18カラムで分画後、培養細胞を用いてレポーターアッセイを行った結果、分画13, 14

に mPXR の転写活性化能が観察されたので、この分画に関して NMR 解析を行った。その結果、この分画に含まれる物質は、di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) であることが判明した。この物質はフタル酸エステル類の 1 つであり、内分泌攪乱物質の一つとして考えられている。

そこで、DEHP の応答性に種間で差が見られるかどうかをマウスとヒトの PXR を用いて検討した。また、DEHP は代謝されて mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) が生じるため同時に MEHP についても検討した。

その結果、DEHP はヒトよりもマウス PXR に対して活性化能が高く、その代謝産物である MEHP はヒト、マウス PXR を共に活性化しないことが判明した。しかしながら、MEHP は PPAR α , PPAR γ に作用し、特に PPAR α に対して強い活性を示すことが明らかとなった。

2) Nurr1 活性化物質の同定

上記と同様な方法を用いて、血清から Nurr1 の転写を活性化すると思われる物質をほぼ HPLC の単一ピークまで精製した。

D. 考察

当初フェノバルビタールによって誘導される内在性の mPXR 活性化因子を同定することが出来たと考えていたが、実際に同定された DEHP は天然物では無く、実験操作上プラスチック製品を用いたときに誤って溶出混入した物質であると推察される。この DEHP はフタル酸エステル類の 1 つであり、塩化ビニル樹脂の可塑剤として、子供用玩具、医療器具、建築材料、自動車用内装材など、幅広く利用されており、日常生活においては、常にある程度の濃度の DEHP に曝露される可能性がある。たとえば、医療用に使用

されている軟質塩ビニル器具としては、点滴用バッグ、点滴用チューブ、透析用チューブ、輸血用バッグ、輸血用チューブ、心臓バイパス機器用チューブ、鼻腔栄養チューブ、呼吸用チューブ等があり、これらに含まれる DEHP に関して、人への毒性影響に関しては激しい議論が行われている。

今回の結果から、DEHP にヒト PXR 受容体を活性する潜在能力があることが判明したが、その活性化能は、マウス PXR 受容体に対するものよりかなり弱く、齧歯類を用いた動物実験において示された精巢毒性等は、ヒトでは起こりにくいものと推測される。

一方、DEHP は血液中のリパーゼなどにより加水分解されて MEHP となると、PPAR α を強く活性化することから、本来の作用とは異なった状況で PPAR α の標的遺伝子の活性化を促進する。その結果として内分泌の攪乱作用も無視できないかもしれない。

昨年度作成した PGC-1 α および ERRL1/PGC-1 β を発現させるトランスジェニックマウスの寿命等について、現在、個体数を増やして解析中である。また、神経変性疾患マウス等との掛け合わせ実験および低容量の内分泌攪乱物質による影響の解析は、現在進行中である。

E. 結論

マウス PXR を活性化する低分子化合物として、塩化ビニールの可塑剤として広くもちいられている DEHP を同定した。しかしながら、この活性はヒトの PXR に対しては弱く、血清の存在下では、さらに減弱した。

以上の結果は、ひろくプラスチック製品等に使われる DEHP には、生体内で hPXR の潜在的な活性化能があることを示唆している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

Maeda, H., Hori, S., Ohizumi, H., Segawa, T., Kakehi, Y., Ogawa, O., & Kakizuka, A. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of Arsenic Trioxide and L-Buthionine-Sulfoximine. Cell Death Differ. In press, 2004.

Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, H., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M., Nakayama, K. I. Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. EMBO J. in press, 2004

Sato, A., Imaizumi, M., Hoshi, Y., Rikiishi, T., Fujii, K., Kizaki, M., Kagechika, H., Kakizuka, A., Hayashi, Y., Iinuma K. Alteration in the cellular response to retinoic acid of a human acute promyelocytic leukemia cell line, UF-1, carrying a patient-derived mutant PML-RARAa chimeric gene. Leukemia Res. In press, 2004

Kimura, Y., & Kakizuka, A. Polyglutamine diseases and molecular chaperones. IUBMB Life 55:337-345, 2003.

Kobayashi, T., & Kakizuka, A. Molecular

analyses of Machado-Joseph disease. Cytogenet. Genome Res. 100: 261-275, 2003.

©Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., & Kakizuka, A. PGC-1 β /ERRL1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 12378-12383, 2003

Mizuno, Y., Hori, S., Kakizuka, A. & Okamoto, K. Vacuole-creating protein in neuro-degenerative diseases. Neurosci. Lett. 343:77-80. 2003.

2. 学会発表

©Kakizuka, A. Identification of PGC-1 β /ERRL1 as an ERR "protein ligand", whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity in mice. "The Role of Nuclear receptors in Cardiovascular disease", Hotel Del Coronado, San Diego, CA. Oct. 10, 2003

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

PCT/JP03/10163 「抗肥満・抗糖尿病薬剤スクリーニング法」平成15年8月8日出願

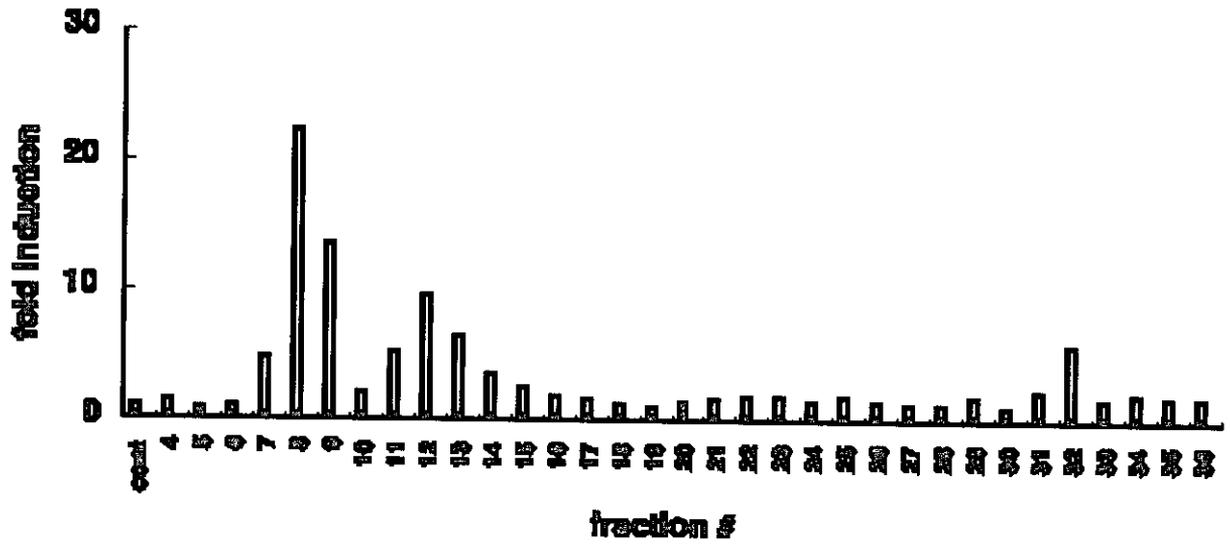


図1 CN カラムをもちいた肝臓抽出液の分画とその分画に含まれる mPXR の活性化能

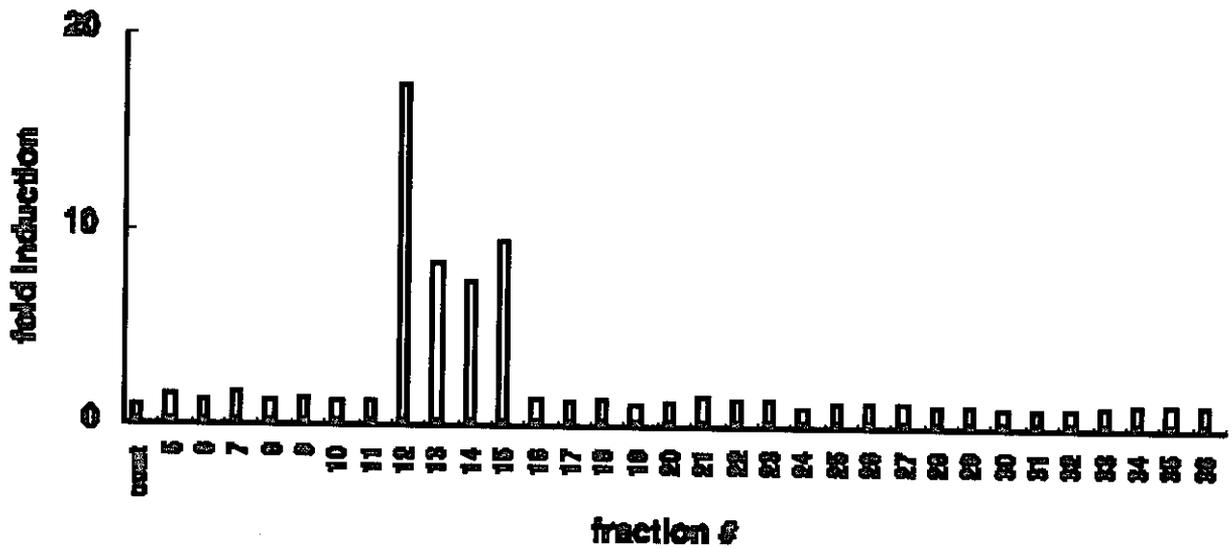


図2 C18 カラムをもちいた CN カラム分画#8, 9 の再分画とその分画に含まれる mPXR の活性化能

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

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

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・部長

研究要旨

本研究は、エストロゲンレセプターの神経系初期発生における機能を解析し、以て低用量内分泌かく乱候補化学物質の影響を、分子レベルで解明することを目的とする。

昨年度までの検討で、エストロゲンレセプターがマウス胎児神経幹細胞に発現していることを明らかにし、さらに胎生期中期に一時的に DES 暴露を受けた後期胎児脳神経幹細胞が *ex vivo* 培養環境下で自己複製不良となること、そのメカニズムとして EGF receptor 発現の低下を含む多種の増殖分化関連遺伝子の持続的変調が関係している事を示唆する結果を得た。今年度は、胎生期中期 DES 暴露を受けた後期胎児脳神経幹細胞の分化能について検討し、DES 暴露により神経細胞への分化能が低下することを示唆する結果を得た。

本研究により、エストロゲンレセプターを介したシグナル伝達の中枢神経系発生機能制御への関わりについて新たな展望が開け、低用量内分泌かく乱候補化学物質の中枢神経系への作用点を明確にすることが可能となると期待される。

キーワード：

エストロゲン受容体、胎生初期暴露、神経管細胞、自己複製、分化誘導、不可逆的变化（遅発影響）

A. 研究目的

本研究は、エストロゲンレセプターの神経系初期発生における機能を解析し、低用量内分泌かく乱候補化学物質の影響を、分子レベルで解明することを目的とする。

すなわち、ほ乳類の脳は雌型がデフォルトであり、雄型脳は、自身の精巣が発達するに伴って分泌されるテストステロンが、脳内でアロマターゼによってエストロゲンに変換され、その作用によって形成されると考えられている。マウス

ではテストステロンの分泌が起こるのは、胎生 16 日頃からとされ、主にこの時期を含む胎生後期から新生児期を対象に、エストロゲンシグナルの脳神経系発達に対する影響の検討が行われてきた。一方で、エストロゲンレセプター(ER)の発現は胎生初期から脳内で確認されており、胎生初期の脳発達において ER が機能している可能性が指摘される。胎生初期の脳は未熟な神経幹細胞が多く含まれる時期であることから、胎児神経幹細胞に ER が発現し、機能している可能性が考えられ

るが、その研究は進んでいない。

そこで本研究により、エストロゲンレセプターを介したシグナル伝達機構が神経幹細胞機能にどのように関わっているか、伝達機構のかく乱によりどのような影響が生じるかを明らかにすることで、エストロゲンレセプター系が中枢神経系発生のいかなる機能制御に寄与しているかを解析する新たな展望が開くものと期待される。それにより、低用量内分泌かく乱候補化学物質の中枢神経系への作用点を分子レベルで詳細に説明づけることが可能となる。

B. 研究方法

DES を妊娠マウスに投与し、胎児脳から神経幹細胞を培養して影響を検討する。網羅的遺伝子発現解析も併用する。

すなわち、

マウス胎児神経幹細胞培養（ニューロスフェア培養）

マウス C57BL/6 妊娠 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し、ピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培養培地（N2/DMEM/F12（シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、ブトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの））には bFGF（10ng/ml）および EGF（25 ng/ml）を添加したものをを用い、10cm シャーレ（ヌンク社）に 10^6 個/6ml の密度で生細胞を播種する。7 日間培養し、単細胞から形成される細胞増殖塊（ニューロスフェア）の数と直径の測定、RNA 抽出および遺伝子発現検討を実施した。

マウス胎児神経上皮細胞培養（接着培養）

マウス C57BL/6 妊娠 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し、ピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培地

（N2/DMEM/F12（シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、ブトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの））に bFGF（10ng/ml）を添加したものをを用い、あらかじめポリ-L-オルニチンおよびフィブロネクチンでコーティングした 10cm シャーレ（ヌンク社）に 1 胎児分の細胞/6ml の密度で細胞を播種。4 日間培養後、ピペッティングにて細胞をはがし、生細胞数をカウント後、 2×10^5 /200 μ l の細胞密度で 8well チャンバースライドに継代後、免疫染色に供した。

マウス胎児神経幹細胞（ニューロスフェア培養）分化試験

培養により得られたニューロスフェアをランダムに数百個選び、分化誘導物質として、牛胎児血清(FBS)を 1%加えた培養培地（N2/DMEM/F12 前出）にマイクロピペットを用いて移した。培養容器は Nunc 社のカルチャー スライド（8well/slide）を用い、ポリ-L-オルニチンおよびフィブロネクチンでコーティングし、ニューロスフェア細胞が容器に接着し分化しやすい条件とした。培養期間は 1 週間とし、培養終了後、4%ホルマリン/PBS(-)にて 15 分間固定した後、各細胞系に対するマーカーを用いて免疫染色し、1 々のニューロスフェアからニューロン（マーカー：MAP2）、アストロサイト（マーカー：GFAP）、オリゴデンドロサイト（マーカー：O4）のどの細胞系が生じたかを測定した。各群 20 々のニューロスフェアを数え、ニューロンを N、アストロサイトを A、オリゴデンドロサイトを O と略し、3 系統に分化したニューロスフェアは NA0、というように表記し、割合を算出した。

免疫染色

チャンバースライドから培地を除き、4%ホルマリン/PBS(-)にて15分間固定し、一次抗体（マウス抗 nestin, マウス抗 MAP2, ラット抗 GFAP、マウス抗 O4）、二次抗体（FITC ラベル抗マウス IgG、Texas Red ラベル抗ラット IgG, AMCA ラベル抗マウス IgM）を用い、蛍光免疫染色した。

DES *in utero* 暴露

DES はコーンオイルに溶解し、妊娠11.5日目から14.5日目まで2 µg/kg 連日皮下投与した。

Genechip 解析

形成されたニューロスフェアを回収し、ISOGEN（日本ジーン社）を用い、全 RNA を抽出した。得た全 RNA をキアゲン社の RNeasy キットを用いて精製した。アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 5 µg を T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ（アフィメトリクス社キット）を用い、ピオチン化 CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はキアゲン社の RNeasy キットにて精製後、300-500bp になるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip にはマウス MGU74Av2 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 16 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、スキャンしてデータを得た。結果はシリコンジェネティクス社の Genespring を用いて解析した。

C. 研究結果

DES 胎児期投与により神経幹細胞の自己複製能のみならず、分化能も影響を受け

る可能性を示唆する結果が得られた。DNA マイクロアレイ解析により選択した数十種類の遺伝子の発現変化を定量的 RT-PCR により検証することに成功した。

すなわち、

神経幹細胞におけるエストロジェンレセプターの発現

昨年度までに、マウス胎児脳から取り出し培養した神経幹細胞において、ER が発現していることを、タンパク質レベルで検討し、発現を確認した。今年度は、mRNA レベルでの発現について確定的なデータを得るために、ER alpha, beta を確実に検出し分けることができる primer を設計し検討した。Primer を設定する領域としては、mRNA の 5' 側が比較的相同性が低いことを利用し、5' 側を選択した。設計した primer の特異性は、PCR により増幅された断片の DNA 配列を確認することで行い、確かに alpha, beta 特異的な primer が設計できたことを確認した。培養したニューロスフェアから全 RNA を回収し、RT-PCR を実施した結果、alpha, beta ともに逆転写反応を行った場合のみ特異的な PCR 増幅を得た。すなわち、今回得られた PCR 増幅が RNA サンプル中に混入したゲノム DNA に由来するものではなく、RNA に由来するものであることが示された。以上をもって、ER は alpha, beta ともに神経幹細胞に発現していると結論した。

DES *in utero* 暴露影響検討-分化能への影響-

昨年度までの検討により、*in utero* での DES 暴露が、胎児終脳中の神経幹細胞のその後の増殖（自己複製能）に影響を与えていることを示唆する結果を得た。そこで、今年度は、*in utero* での DES 暴露が神経幹細胞の分化能に影響を及ぼす可能性を検討した。妊娠11.5日目から

14.5日目まで母体にDES 0.02, 0.2, 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与し、胎生15日目に胎児終脳を分離し、bFGF, EGF存在下浮遊培養して得たニューロスフェアを1%FBSおよび接着培養条件に置き分化を促進する条件において検討した。1週間の分化培養の後、20ヶのニューロスフェア由来のコロニーを選び、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのマーカーとしてそれぞれMAP2, GFAP, O4を選び、3重免疫染色を行い、個々のニューロスフェアの分化能を測定した。その結果、VehicleおよびDES0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与由来のニューロスフェアは90%が3系統の神経系細胞に分化し、多分化能を維持していたが、DES0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与では分化能に影響が生じ、ニューロンへの分化能を失い、グリア系細胞にのみ分化可能な細胞の割合が増えていた。

網羅的遺伝子発現解析の検証

昨年までに行った、Genechipを用いた網羅的遺伝子発現解析結果を検証するために、発現変動を示した複数の遺伝子について定量的RT-PCRを行い検討した。検討の対象とした遺伝子は、GAPDH, b-actin, Dlx-2 (distal-less gene 2), PDGFR, EST (GluR-B like), Hox-1.2, Ob-r, Igfbp10, cycB1, Egfr, I110038L14Rik, Gklf, c/ebp delta, junB, N10, Gdnfif, mGIF, vascular endothelial growth factor, hsp68, Id1, NL, IGFBP-2, pip92, Krox-24, c-fos の25種である。このうち、GAPDH, b-actin は網羅的遺伝子発現解析の結果、DESによる変動を示さなかったコントロール遺伝子として選んだ。実際の測定においては、用いるRNAの量を厳密に揃えるために、広い定量域を持つRNA定量試薬であるRibogreenを用いて正確にRNA量を測定した。RNA量に応じ、Bacillus

PHE mRNAをspike RNAとして添加し、PHEの量を他の遺伝子と同時に定量して標準遺伝子として用い、データの補正を行った。その結果、適切なprimer設計が困難であるか、発現量が低すぎて定量的な測定ができなかったHox1.2, Ob-r以外については、GeneChip解析から得られたのと同様の発現変化を示すことが明らかとなった。

D. 考察

今年度は、網羅的遺伝子発現解析により得られた発現変動遺伝子の定量的RT-PCRによる検証と、DES暴露による神経幹細胞の分化能に及ぼす影響について焦点を絞って検討した。その結果、21種類の遺伝子が実際にGeneChip解析結果と同様の変化を示すことがわかり、GeneChip解析結果がほぼ検証される結果が得られた。それら遺伝子の発現変動の特徴は、細胞分化に関わる遺伝子の発現 (PDGF receptor) が上昇し、cell cycle, cell signal, EGF receptor等、自己複製に関わると考えられる遺伝子の発現が減少していることである。また、c-fos, VEGF, Egr1等、子宮を始めとする他の臓器においてestrogenによって発現が誘導されることが知られている遺伝子の発現が低下していること、estrogenと作用の一部を共有することが判明しているinsulin系シグナルに関わるIGFBP-2遺伝子の発現が低下していることは、*in utero* DES暴露により、本来estrogenによって誘導されるべき遺伝子群が誘導されない状態に固定されている可能性が示唆され、胎児期のエストロゲンシグナルのかく乱による影響を検討する上で今後重要な知見である。

今回得られた、DES暴露を受けた胎児脳由来ニューロスフェアの分化能に影響が生じていることを示唆する結果は、

GeneChip 解析および定量的 RT-PCR 解析から判明した発現変動遺伝子群の機能から予想される影響と矛盾しない。すなわち、マウス胎生 11 日から 14 日という、神経幹細胞が盛んに自己複製を行う時期の DES 暴露は、神経幹細胞の自己複製能を低下させるのみならず、その分化能にも影響する可能性があることが、これらの結果から結論される。DES のエストロゲン受容体への結合活性がエストラジオールと遜色ないことを踏まえると、この影響はエストロゲン受容体を介していることが強く示唆される。BPA などの他の内分泌かく乱物質でも同様の影響が生じるかを含め、胎生期脳におけるエストロゲンシグナルのかく乱が神経幹細胞に及ぼす影響についてさらに踏み込んだ解析が必要である。

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

E. 結論

胎児期の内分泌かく乱化学物質への暴露により、神経幹細胞の自己複製能、分化能に影響が生じる可能性がある。

すなわち、

神経幹細胞にエストロゲン受容体が発現していることは、これまでの本研究で確認されたことである。よって、脳発生初期の内分泌かく乱候補化学物質への暴露が、エストロゲン受容体シグナルのかく乱につながり、神経幹細胞機能に

影響、すなわち神経幹細胞の増殖能及び分化能の両方のかく乱が生じると考えられる。低用量内分泌かく乱候補化学物質の神経系への作用点およびその影響の範囲の明確化を図るために、胎生期脳におけるエストロゲンシグナルの重要性についてさらに踏み込んで解析する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

©Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W.

The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies. *Environ Health Perspect.* 2003 111(12):1550-1558.

©Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W.

The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 2003 111(12):1530-1549.

Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y.

Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect.* 2003 111(11):1411-1420.

© Matsunaga N., Kanno J. and Yoshimura I.

A statistical method for judging synergism: Application to an endocrine disruptor animal experiment- Synergism in endocrine disruptor studies, Environmetrics 2003, Volume 14, Issue 2, : 213-222

2. 学会発表

菅野 純、「トキシコゲノミクスの現状」、第30回トキシコロジー学会学術年会ワークショップ「プロテオミクスとトキシコゲノミクスの現状と問題点」

菅野 純、「トキシコゲノミクスの新展開」、第26回日本学術会議トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム

H. 知的所有権の取得状況

A. 特許取得

なし

B. 実用新案登録

なし

C. 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

核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御の影響に関する研究

分担研究者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所

研究要旨

内分泌かく乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つには、性ステロイドホルモン作用のかく乱が考えられている。本研究では、核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにする。具体的には、男性、女性レセプターの転写共役因子を同定するとともに、ダイオキシンレセプターの相互作用を解析した。その結果、この2者のレセプターが直接相互作用することで、女性ホルモン作用がかく乱することが明らかになった。

A. 研究目的

低用量内分泌かく乱化学物質の性生殖へ影響を及ぼす作用点を分子レベルで解明する。すなわち、性生殖作用を担う性ステロイドホルモン作用へのかく乱効果を、ホルモンレセプターの転写制御機能について調べる。これまで継続してきた性ホルモンレセプター共役因子群の同定に加え、特に本年度はダイオキシンレセプターと女性ホルモンレセプターとの会合について検討した。

B. 研究方法

男性ホルモン、女性ホルモンレセプターの転写機能を担う転写共役因子の同定及びダイオキシンレセプターとのクロストークを検討した。すなわち、性ホルモンレセプター群に結合する転写共役因子複合体を、生化学的に精製及びその構成因子群を同定する。また、複合体としての機能を *in vitro* 系で評価する。また、ダイオキシンレセプターとの機能的相互作用を転写レベルで検討する。

C. 研究結果

男性ホルモン及び女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子のいくつかを同定した。また、ダイオキシンレセプターと女性ホルモンレセプターが核内で会合することを見出した。すなわち、

1) ホルモン活性を規定するレセプター転写共役因子の検索及び同定

男性ホルモンに結合する新しい転写共役因子として p54, PSF, PSP1 等を生化学的に同定した。これら因子は、直接男性ホルモンレセプターN末端側の転写促進領域に会合することで、転写促進能を亢進することが分かった。また p54, は女性ホルモンレセプターN末端側の転写促進領域に会合すると、逆に転写機能を抑制することが分かった。このように p54 は、性ホルモンレセプター群のグローバルな調節因子である可能性が示唆された。

2) ダイオキシンレセプターを介したエストロゲン作用かく乱の分子メカニ

ズム

ダイオキシシンレセプターとエストロゲンレセプターとの関連を検討することで、活性化されたダイオキシシンレセプターが核内に移行し、結果として、女性ホルモンレセプターと会合することを見出した。興味深いことに、エストロゲンが結合していないエストロゲンレセプターは、ダイオキシシンレセプター結合により、その転写促進機能が惹起された。一方、エストロゲンが結合した状態では、ダイオキシシンレセプターはその機能を抑制することが明らかとなった。

3) 新たな染色体構造調節因子複合体の同定

転写共役因子は、単独で作用することなく、複合体として機能することから HeLa 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。方法としては、ヒト ER α のリガンド結合領域 (AF-2) をエストロゲン存在下で、プローブタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。その結果、既知の 3 つの転写共役因子複合体に加え、第 4 の転写共役因子複合体が存在することを見出した。またこの複合体はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有することも確かめ、またいくつかの構成成分も同定した。更に、この複合体群の中にはヒストンメチル化酵素活性を持つものも見出された。そこで、この酵素活性を指標にこの複合体の精製を行っている。同様の方法を用い、ヒトビタミン D レセプター (VDR) に相互作用する核内複合体を単離同定したところ、13 の因子から構成される新規染色体構造調節因子複合体の同定に成功した。この複合体は VDR のみならず、他の核内レセプターにも作用するようであり、現在、その詳細を検討しているところである。

4) ショウジョウバエを用いた男性ホルモンレセプター転写共役因子の機能解析

性ホルモンレセプターと転写共役因子との相互作用を *in vitro* 細胞系で解析を行ってきたが、これらの結果は、必ずしも個体での現象を反映しない。そこで、ショウジョウバエにヒト AR を組織特異的に発現する系の構築に成功したが、今年度は ER 発現ハエラインも樹立した。下流のリポーター遺伝子は GFP を用いたので、AR/ER のリガンド依存的な転写機能は GFP の発現に振り替えられるため、結果として蛍光として観察できる。エサに性ホルモンを加えると、GFP による蛍光が観察された。また、このレセプターを介した転写促進能は、AR を強制発現させたいずれの組織においても観察されている。次に、各種染色体特定領域を欠損したショウジョウバエ変異体群を、これらトランスジェニックハエと交配させることで、分子遺伝学的に ER 若しくは AR に必須な因子を検索している。

D. 考察

性ホルモンレセプターには、数多くの転写共役因子及び複合体が結合することが分かった。しかしながら、これら因子複合体の中でいずれが最も重要であるかは判断できなかった。今後遺伝子ノックアウト等により、確認する必要があると思われた。また、ダイオキシシンレセプターと性ホルモンレセプターが会合することから、性ホルモンかく乱作用の一つは、この分子機構を介するものと考えられた。

E. 結論

性ホルモンレセプターの転写制御能をレセプター相互作用因子の観点から検討した。すなわち、男性及び女性ホルモン

レセプターに結合する新たな転写共役因子を同定し、内分泌かく乱物質の標的分子候補である可能性が考えられた。また、ダイオキシンレセプターとの会合による新たな性ホルモンかく乱作用の分子機構を明らかにした。

F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は無い。

G. 研究発表

1. 発表論文 (原著)

© Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Modulation of estrogen receptor signalin by an association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423, 545-550, 2003.

© Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Mezaki, Y., Uematsu, Y., Matsui, D., Ogawa, S., Unno, K., Okubo, M., Tokita, A., Nakagawa, T., Ito, T., Ishimi, Y., Nagasawa, H., Matsumoto, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoter and is impaired in Williams syndrome. *Cell*, 113, 905-917, 2003.

©Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Kato, S.: Inhibition of adipogenesis by cytokines with

suppression PPAR γ function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol.*, 5, 224-230, 2003.

© Ishitani, K., Yoshida, T., Kitagawa, H., Ohta H., Nozawa, S., Kato, S.: p54^{orb} acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 660-665, 2003.

Kawano, H., Sato, T., Yamada, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Fukuda, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Aihara, K., Yamamoto, Y., Nakamichi, Y., Metzger, D., Chambon, P., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Kato, S.: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 9416-9421, 2003.

Nakamichi, Y., Shukunami, C., Yamada, T., Aihara, K., Kawano, H., Sato, T., Nishizaki, Y., Yamamoto, Y., Shindo, M., Yoshimura, K., Kawaguchi, H., Hiraki, Y., Kato, S.: Chondromodulin-I (ChM-I) is a bone remodeling factor. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 636-644, 2003.

Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H., Kato, S.: Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (ARKO) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300, 167-171, 2003.

Taketani, Y., Nomoto, M., Yamamoto, H., Isshiki M., Morita, K., Arai, H., Miyamoto, K., Kato, S., Takeda E.: Increase in IP3 and intracellular Ca²⁺ induced by phosphate depletion in LLC-PK1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 287-291, 2003.

Fujishima, T., Kittaka, A., Yamaoka, K., Takeyama, K., Kato, S., Takayama, H.: Synthesis of 2, 2-dimethyl-1, 25-dihydroxyvitamin D₃: A-ring structural motif that modulates interactions of vitamin D receptor with transcriptional coactivators. *Org. Biomol. Chem.*, 1, 1863-1869, 2003.

Masuyama, R., Nakaya, Y., Katsumata, S., Kajita, Y., Uehara, M., Tanaka, S., Sakai, A., Kato, S., Nakamura, T., Suzuki, K.: Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *J. Bone Miner. Res.*, 18, 1217-1226, 2003.

©Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P., Kato, S.: Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003 (in

press).

Endo, I., Inoue, D., Mitsui, T., Umaki, Y., Akaike, M., Yoshizawa, T., Kato, S., Matsumoto, T.: Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology*, 2003 (in press).

WuQiang, F., Yanase, T., Yin, W., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H.: Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol. Endocrinol.*, 2003 (in press).

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

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

分担研究者 藤本 成明 広島大学原爆放射線医科学研究所

研究要旨

齧歯類の前立腺をモデルに、そのエストロゲン受容体（ER） β 型の発現とその調節機構を解析した。前立腺では、部位によらず ER α と ER β がアンドロゲンにより調節されていた。またエストロゲンは修飾的に ER α の発現を増強した。マウス ER β 遺伝子上流域をクローニングしてレポーターを作成し解析した結果、マウスとラットで共通の構造をもつこの領域が ER β の機能的なプロモータであることが示された。

A. 研究目的

齧歯類の前立腺をモデルに、そのエストロゲン受容体（ER） β 型の発現とその調節機構を解析する。すなわち、

内分泌かく乱物質の低用量作用の背景因子として ER の発現の変化があげられる。そこで、齧歯類の前立腺でどのように ER が発現調節されているかを明らかにし、さらその調節メカニズムを知るために ER 遺伝子プロモーター構造と機能を解明する。

B. 研究方法

ラット前立腺において ER 等の遺伝子発現を定量解析した。また、マウス ER β 遺伝子上流域をクローニングしてレポーターを作成し機能解析した。すなわち、マウス ER β 遺伝子上流域のクローニングは、既報の遺伝子 5'端をプローブとしてマウス DNA ライブラリをスクリーニングすることにより行った。その全域および断片を pGL3-luc レポーターへ挿入したものをを用い、前立腺培養細胞で発現を解析した。また、LacZ レポーターを作成し、これをマウス胚へ導入した。in vivo での発現様式の解析のため、real-time RT-PCR 法により組織中の ERmRNA 等の定量をおこなった。

動物は、F344 系雄ラットおよび BDF1

雄マウスを購入して用いた。

（倫理面への配慮）

動物実験においては、苦痛の少ない方法を用いるなど、本大学の動物取り扱い倫理規定に沿っておこなった。

C. 研究結果

前立腺では、部位によらず ER α と ER β がアンドロゲンにより発現調節されていた。マウスの ER β 遺伝子上流域をクローニングし解析した結果、基本転写活性およびアンドロゲン応答性活性があることが示された。すなわち、

C-1. ラット前立腺の各部位での ER 発現

正常ラットの前立腺各葉での ER α 、ER β 、AR、またアンドロゲン依存性の遺伝子である probasin、Kallikrein S3 の発現を Table 1 にまとめた。いずれの葉でも、ER β の mRNA 発現が高いが、ER α との比率では腹葉（VP）がもっとも高かった。10 週齢と 52 週齢とを比較してみると、52 週齢では、ER β 発現の α に対する比率が低下しており、側葉（LP）においては、ER α の mRNA レベルが β と同程度にまで増加していた。

C-2. ラット前立腺の ER 発現の調節

去勢により前立腺の腹葉、背葉のいずれでも ER α の上昇、ER β の低下がみられた

(Table 2)。また、probasin、Kallikrein S3 発現は明確に部位特異的であった。精囊においては、去勢により ER α の発現が大きく上昇していた。アンドロゲン存在下においてエストロゲンが作用すると前立腺肥大が促進されるが、この時 ER α の上昇が観察された (Table 3)。さらに、アンドロゲン依存性の遺伝子である probasin、Kallikrein S3 の発現が相乗的に上昇していた (Table 4)。

C-3. マウス ER β 遺伝子上流域の構造

λファージライブラリより exon 1 とその上流を含む2つのクローンを得、転写開始点上流-2135bp までの領域をサブクローニングして構造決定した (Fig. 1)。配列解析の結果、この領域は転写因子結合モチーフを多く含み、特に完全な SRY、CdxA、AML-1a 結合部位が複数個存在していた。

C-4. *In vitro* プロモーター活性

クローニングした ER β 遺伝子上流域の全長および一部配列をルシフェラーゼ (luc) レポータープラスミドに挿入し細胞導入実験をおこなったところ、それらが遺伝子転写活性を持つことが示された (Fig. 2)。さらに、アンドロゲン受容体発現遺伝子を同時に導入した系では、テストステロンによる ER β の発現誘導が観察された (Fig. 3)。

D. 考察

エストロゲン作用を持つ内分泌かく乱化学物質の低用量作用メカニズムには、その受容体の発現変化が関与していると考えられる。従って、ER の発現変化とその調節機構を明らかにすることは、低用量作用を理解する基礎である。これまでの研究で、ラットおよびマウスの前立腺での ER 発現の *in vivo* での調節様式明らかにしてきた。すなわち、ER の mRNA 発現は、成長過程を通じて α 型から β 型へ動的に発現移行していること、および、 β 型発現はアンドロゲン依存的に調節されており、逆に α 型の発現は抑制的に調節

されていることがマウス、ラット共通の現象として明らかになった。

今回、前立腺部位による発現とその調節様式の違いを検討した。その結果、ER α 、 β のアンドロゲン依存性発現調節そのものは部位によって差がなかった。しかし、mRNA の発現量およびその ER α ・ β 比率は部位により異なっており、これが組織における上皮細胞と間質細胞の構成比等による結果か、細胞での遺伝子発現調節の差によるのかは今後検討課題である。また、成熟期の 10 週齢の前立腺と 52 週齢の比較においては、後者で ER β の発現低下と ER α の発現上昇が観察された。これは、おそらく老化に伴い漸減するアンドロゲンレベルによる結果と考えられた。ER α の上昇と発癌リスクが相関することが、マウスモデルおよびヒト臨床例から報告されているが、ラットにおいては、老化とともに明確な ER α の上昇が観察されたことはこれに符合する。

前立腺細胞増殖において、エストロゲンはアンドロゲンと同時に投与したときには相乗的に前立腺肥大を誘導しさらに前立腺癌化にも関係することが示されてきた。このとき、アンドロゲン応答性の遺伝子である probasin および kallikrein S3 の発現も増強されることが示された。probasin は、lipocalin superfamily に属する分泌タンパク質の一つであるが核内にも取り込まれる。また遺伝子上流に明確な AR 結合部位が同定されている。kallikrein S3 はアンドロゲン依存性に分泌される serine protease であり、おそらくヒトの PSA のホモログである。

昨年度の研究で、ラット ER β の遺伝子上流域を約 0.7 kbp クローニングしそこにプロモーター活性があることを示した。またこの領域は既知のマウス ER β 上流域と非常に相同性が高かった。上流域の活性をより詳しく解明するため、マウスゲノムのさらに広範な領域について解析した。exon 1 上流約 2.1 kbp までのレポーターで解析