

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

エストロゲンによる周生期脳インプリンティングを中心とした、
個体レベルでの核内受容体シグナル検出系の確立に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

北海道大学大学院獣医学研究科 石塚真由美

目次

I. 総括研究報告

エストロゲンによる周生期脳インプリンティングを中心とした、個体レベルでの核内受容体
シグナル検出系の確立

石塚 真由美 -----3

II. 分担研究報告

エストロゲンによる周生期脳インプリンティングを中心とした、個体レベルでの核内受容体
シグナル検出系の確立

石塚 真由美 -----12

蛍光による *in vivo* イメージング方法

石塚 真由美、藤田 正一 -----24

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----31

厚生労働科学研究費補助金 (萌芽的先端医療技術推進研究事業)
総括研究報告書

エストロゲンによる周生期脳インプリンティングを中心とした、
個体レベルでの核内受容体シグナル検出系の確立

主任研究者 石塚真由美 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授
(環境獣医科学講座)

研究要旨

生体は農医薬品、環境汚染物質の多くに対して、特に周生期に高い感受性を持っており、この時期の外来化学物質への曝露は不可逆的な毒性影響が懸念されている。中でも内分泌攪乱化学物質としてエストロゲン作用を持つ化学物質への曝露は、周生期ステロイドホルモンによる脳インプリンティングを阻害し、正常な性分化を攪乱することが報告されている。周生期において脳インプリンティングには、アロマターゼによるテストステロン→エストラジオールの変換が不可欠である。しかし、この時期に生成された脳エストロゲンの標的因子は不明な点が多い。また、多くの医薬品・環境化学物質に関して、神経培養細胞を用いた曝露実験では、神経細胞に対する毒性影響は検出することができるが、周生期における脳インプリンティングへの影響や、シトクロム P450 (CYP) などの薬物代謝酵素による生体内代謝、ホルモン受容体の発現や活性化機構の臓器別の違いを考慮した、*in vivo* での環境化学物質の毒性を検出することはできない。

そこで、本研究では、エストロゲン結合サイト下流にレポーター遺伝子を結合し、ゲノムに導入することで、エストロゲンによる転写活性化を個体レベルで検出することができるトランスジェニック動物を作成し、エストロゲンの周生期における生理的機能解明と共に、*in vivo* で医薬品・環境化学物質の毒性影響を検出する系を確立することを目的とした。また、本研究によって、エストロゲンのみならず、アンドロゲンや甲状腺ホルモンなど、核内受容体による幅広いホルモンホメオスタシス維持機構への、医薬品や環境化学物質の影響を検出する系の基礎を確立することができる。

今回、400 個のラット卵にエストロゲン結合サイト-ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、14 line の founder を得た。得られたトランスジェニックラットを用いて、ジエチルスチル

ベストロールなど合成エストロゲンを投与し、そのシグナルの誘導について調べ、phenotyping を行ったところ、エストロゲンによって転写活性が個体レベルで検出できる 1 line を得た。

また、シグナルの検出のために、ルシフェリン以外に、より詳細な解析を可能とする蛍光を用いた in vivo イメージングについて検討した。キシレノール・オレンジや、ロンダミン 123、アリザリンコンプレクソン、Alexa など、様々な波長を持つ蛍光色素をラット新生仔あるいはマウスに取り込ませ、個体 in vivo におけるイメージングを試みた。通常のイメージャーでは深部の撮影は難しかったが、励起光源の強化と長波長域の蛍光色素を用いることで深部のイメージングが可能であることが明らかとなった。

分担研究者 藤田正一 北海道大学・大学院獣医学研究科 教授 (環境獣医科学講座・毒性学教室)

A. 研究目的

生体は農医薬品、環境汚染物質の多く医薬品・環境化学物質の内分泌攪乱作用スクリーニングは、最も簡便な方法としては培養細胞を用いたレポーターアッセイなどが挙げられる。しかし、培養細胞において、核内受容体結合配列下流にレポーター遺伝子を連結させたプラスミドを transient に導入する従来のレポーターアッセイ法では、臓器・細胞によって異なる医薬品・環境化学物質の毒性影響を、細胞レベルでのエンドポイントでしか検出することができない。医薬品や環境化学物質は生体内でシトクロム P450 (CYP) などの代謝酵素によって代謝を受けるため、その毒性発現は、従来の

レポーターアッセイでは網羅しきれないことが考えられる。実際、薬物代謝酵素によって代謝を受けたビスフェノール A など環境化学物質が、エストロゲン受容体との結合性を増強することが報告されている。また、核内受容体であるホルモン受容体に関しては、既に、由来する臓器・細胞によって、転写に関与する共役因子などその活性化機構が異なることが報告されている。従って、医薬品・環境化学物質毒性評価に関しては、クリアランスや代謝的活性化機構、さらに臓器・細胞別の受容体活性化機構をも含めた、個体レベルでの毒性スクリーニング手法の確立が不可欠である。そこで、本研究では、医薬品および環境化学物質に関して、これらの要素を含めた個体レベルでのレポーターアッセイを行う系を確立することを目的とする。

本研究では、エストロゲン攪乱作用のスクリーニングを行うことを目的の一つとしているが、当然、確立された手法を用いて、アンドロゲンや甲状腺ホルモンなど、

周生期に不可欠な内分泌ホメオスタシス系への影響評価に応用することができる。また、個体を用いた評価手法のため、レポーター遺伝子の検索によって、周生期のみならず、成熟後や老化過程での影響についてもスクリーニングを行うことが可能である。周生期におけるエストロゲンの脳神経系への作用に関しては不明な点が多いが、本研究によって、エストロゲン標的因子の活性化を経時的に、さらに、臓器・細胞レベルで検出することができる。Adult 動物においても、エストロゲン作用を個体レベルで検出することができるため、老化動物では、アルツハイマーや骨粗しょう症などの研究や医薬品の開発に応用することができる。

また、NIH では生命医療のイメージングとバイオエンジニアリングを目的として、NIBIB (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering) を設立した。蛍光・偏光を用いた光イメージングも当然その研究対象となっており、光マンモグラフィなど、癌診断領域などでの応用が期待されている。最近になって、本研究以外にも、ルシフェラーゼを組み込んだ *in vivo* 光イメージングが報告されている。今回、レポーターとしてルシフェラーゼを選択したが、ルシフェラーゼによる *in vivo* 解析でも、いくつかの問題点があることが明らかとなってきた。一方、蛍光による *in vivo* 解析に関しては、光イメージングによる個体の 3 次元解析の可能性が示唆されている。そこで、蛍光の *in vivo* のシグナル検出のための条件についても検討した。

B. 研究方法

エストロゲンによる脳インプリンティングに対する医薬品や環境化学物質の毒性は未知数であり、スクリーニングが行われている例は少ない。これは、個体レベルでのアッセイ系が確立していないことが主な原因として挙げられる。また、エストロゲンの周生期脳神経系における標的因子も不明である。本研究では、これらの点について解決するため、トランスジェニック動物の作成を試みた。また周生期の環境化学物質への曝露が脳神経の発達にどのような影響を与えるのかを調べるため、妊娠動物を環境化学物質に曝露させ、行動に及ぼす影響や遺伝子発現レベルの変動について明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

1. レポーター遺伝子の作成

レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターを作成し、トランスジェニック動物の作成に最適な ERE (estrogen response element) 配列の連結数や、ERE の種類などを検討する。初代培養細胞や cell line による *in vitro* アッセイから、*in vivo* でレポーターアッセイを行う際にどの配列が最も適しているのかについて検討を行う。得られたレポーターカセットについて、適当な部位で切断し、ラ

ットに導入してトランスジェニックラットを作製した。

得られたラットについて、実際に合成エストロゲンなどを投与し、そのシグナルの変化について調べた。

2. 蛍光色素による in vivo イメージングの検討

蛍光色素として、キシレノール・オレンジ（励起波長 570 nm、蛍光波長 610 nm）、Alexa750（励起波長 650 nm、蛍光波長 780 nm）、ロンダミン 123（励起波長 500 nm、蛍光波長 540 nm）、アリザリンコンプレクソン（励起波長 530–560 nm、蛍光波長 580 nm）を用いた。

キシレノール・オレンジ、アリザリンコンプレクソンはラットに生後 1 日齢より 3 日間皮下投与した。投与 1 週間後に撮影に用いた。

ロンダミン 123 および Alexa750 はマウスおよびラット新生仔に腹腔内投与および脳室内投与を行った。Alexa750 は 6000MN のアミノ基をもつポリエチレングリコールと結合させ、尾静脈投与も行った。

（倫理面への配慮）

ヒトの組織及び動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の

処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。

C. 研究結果

エストロゲンは CYP 分子種の一つ、アロマターゼ (CYP19) によって生合成される。オスでは、精巣から分泌されたテストステロンが脳のアロマターゼでエストロゲンに変換され、脳がエストロゲンによってインプリンティングされ、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、脳内アロマターゼは「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。我々は、昨年度までの研究において、この時期のインプリンティングへの影響を in vivo でスクリーニングする系を確立するため、1) トランスジェニック動物の作成、2) 脳神経系におけるエストロゲン標的遺伝子のスクリーニングの影響、を計画し、以下の結果を得た。

1. トランスジェニック動物の作成

我々は、トランスジェニックマウス作成のために、ERE-レポーター遺伝子カセットの条件設定及び調製を行った。昨年度の研究により、エストロゲンに特異的に感受性

の高い ERE 単純繰り返し配列の連結クローンをカセットに組み込んだ。これまでの研究で ERE-lacZ レポーターカセットを用いて、トランスジェニックマウスの作成・ブリーディングを行った。しかし、途中、lacZ レポーターでは脳神経細胞において非常にバックグラウンドが高く、エストロゲンシグナルの特異的な検出が難しいことが判明したため、同じ ERE 単純繰り返し配列の連結クローンにルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだカセットを作成した。400 個の卵を導入し、14 匹の founder ラットを得た。

2. Phenotyping

得られた 14 line のラットについて、F1 を作製した。得られた約 300 匹の F1 ラットについて、genotyping を行い、8 週齢の Tg (+) ラットについて、ジエチルスチルベストロール投与後のエストロゲンシグナルの変化について、in vivo および in vitro の両方から検討した。

In vivo イメージングのために、ルミノイメージャーである BERTHOLD TECHNOLOGIES (ドイツ) の NightOWL LB981、および、FUJI film(日本)の LAS3000 を用いた。ルシフェリンは Beetle Luciferin, Potassium Salt(プロメガ)を用いた。ジエチルスチルベストロールは 1000 μ g/kg で経口投与し、24 時間後にルシフェリンを 75mg/kg で腹腔投与した。ルシフェリン投与後、経時的に 1 時間発光シグナルを検出した。両機種について、adult ラットでも、

剃毛処理を行わずに発光を検出することができたが、NightOWL LB981 の方が、ルシフェリンの検出について感度が高かった。

In vitro では、ジエチルスチルベストロール投与 24 時間後にラットをと殺し、肝臓、肺、脳、生殖器を採取し、ホモジネートを作製した。各ホモジネートにルシフェリンを曝露し、その直後にルミノメーターで発光シグナルを測定した。

14 line の F1 ラットの中で、11 line は ERE 転写シグナルが認められず、3 line について、ジエチルスチルベストロールによるエストロゲンシグナルの誘導性を検出し、1 line について当該研究の目的に使用できることが分かった。

3. エストロゲンシグナルの in vivo 検出

ジエチルスチルベストロールによってエストロゲンシグナルが検出された line について、生後 5 週齢および 16 日齢の F2 ラットを作製した。F2 ラットにジエチルスチルベストロールを 1000 μ g/kg で腹腔投与し、投与 24 時間後にルシフェリンを 150mg/kg 濃度で腹腔投与した。ルシフェリン投与後、FUJI film 社の LAS3000 を用いて、その発光シグナルについて検出した。

8 週齢の Tg (+) ラットでは、オス、メスともに、ジエチルスチルベストロール投与無しでエストロゲンシグナルがわずかにバックグラウンドとして検出された。しかし、5 週齢のメスでは、性成熟ラットと異なり、ジエチルスチルベストロール投与

無しでのエストロゲンシグナルは殆ど検出されなかった。ジエチルスチルベストロール投与後の5週齢のオスラットでは、生殖器および肝臓にエストロゲンシグナルを検出することができた。いずれも剃毛は行わなかった。

16日齢ラットでは、非常に強いエストロゲンシグナルを検出することができた。ルシフェリンは600nm程度の波長を持つ。この領域の波長では、その発光シグナルが血液などに一部吸収される。従って、透過距離の長いadultラットよりも16日齢ラットの方がシグナルの透過性が強いためと考えられた。

4. 蛍光色素を用いた個体 *in vivo* イメージング

蛍光イメージングでは、発光では不可能であった3次元解析の可能性が考えられ、*in vivo* 光イメージングでは蛍光を用いる方が将来的に発展しうると考えている。しかし、長波長領域のライト光源およびCCDカメラ、フィルターについては、700nm程度の解析を限界とする機種が多い。アロカ社のオデッセイのように700-800nm近赤外領域のみ対象とした機種はあるが、メンブレン解析を対象とし、レーザースキャン方式となっていることから、*in vivo*での解析は行うことができない。一方、これまでの研究の過程で、FUJIフィルム社の好意により、光源やフィルターについて、これまでに無い長波長域の解析が可能となり、*in*

vivo イメージングの条件についてバンドフィルターやLED光源波長などさまざまな検討を行うことができた。

キシレノール・オレンジ、アリザリンコンプレクソンは蛍光の波長が、600 nmでルシフェリン発光波長と似ており、かろうじて血管などを通過する。骨組織に取り込まれるため、手足や尾部分の透過撮影は可能であった。しかし、生後10日齢では、深部におけるシグナルが弱く、撮影が不可能であった。

ロンダミン 123 について、腹腔内投与を行ったところ、シグナルが弱く、深部撮影は不可能であった。この波長域では *in vivo* イメージングは難しいことが分かった。

一方、最も長波長である Alexa750 は近赤外の波長を持ち、血液などを透過する。本研究では脳室内および腹腔内両方とも深部の透過撮影が可能であった。Alexa750 をアミノ基を持つポリエチレングリコールに結合させ、尾静脈注射を行い、静脈撮影を試みたところ、一部血管撮影が可能であった。

D. 考察

1. エストロゲンシグナルの *in vivo* 可視化

発光では、2次元的な解析が行われるため、形態の異なる成熟、未成熟ラット間でのエストロゲンシグナルの比較は難しかった。また、ルシフェリンによるエストロゲンシグナル検出は、ルシフェリン投与後

15-30 分間でピークを迎えることが分かった。In vivo イメージャーとして開発された BERTHOLD TECHNOLOGIES (ドイツ) の NightOWL LB981 の方が発光シグナルの検出に関しては感度が高かったが、ゲル・メンブレン解析装置である FUJI film 社の LAS3000 でも検出は可能であった。

エストロゲンシグナルは性成熟後ではバックグラウンドが比較的高く、メスでは体全体が発光した。生後 16 日齢の F2 ラットでは、肝臓、生殖器部位のエストロゲンシグナルが特に高いシグナルとしてカウントされた。一方、脳についても ex vivo ではなく、in vivo のまま測定が可能であることが分かった。

2. 蛍光色素を用いた個体 in vivo イメージング

in vivo 光イメージングは、米国に比べて 2-3 年遅れているといわれている。実際、Xenogen 社の IVIS や GE HealthCare 社など in vivo に特化したイメージャーの国内販売は米国普及の 2-3 年後の販売となっている。

現在、HaloTag (Promeg 社) や Qdot (カンタム社) のように、in vivo イメージングのための蛍光タンパクや、蛍光色素が開発されている。しかし、HaloTag は in cell のために開発されたリガンド結合型蛍光タンパクであり、半導体量子ドット Qdot はルシフェリン同様事前の投与が必要である。In vivo トラッカー用に発現タンパクとして開発された Evrogen 社の Kindling-

Red は Kinding によって 600nm の蛍光を発する。しかし、Kinding 波長が最長でも 550nm であるため、in vivo 体表のみのトラッカーとしかなりえないことが考えられる。Green Fluorescent Protein (GFP) のような既存の蛍光プローブが in vivo で深部測定を不可能にしている理由のひとつは、蛍光のみが長波長域を持っており、励起が 600nm 以下のものが多いためである。また、光源ライトの強度も in vivo を想定した機種が殆ど無いため、深部測定を難しくしている。本研究では、励起光源の強化と長波長 (近赤外領域) の蛍光色素を使用することで、蛍光での in vivo 撮影が可能であることが明らかとなった。

E 結論

エストロゲンシグナルを living animal で検出できるトランスジェニックラットを作成した。合成エストロゲンの投与で、そのシグナルの変動を検出することができた。

また、光 in vivo イメージングのための条件について検討した。本研究では、励起光源の強化と長波長 (近赤外領域) の蛍光色素を使用することで、蛍光での in vivo 撮影が可能であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Muzandu, K., Shaban, Z., Ishizuka, M., Kazusaka, A., SHOICHI, Fujita, S. Possible involvement of peroxyne nitrite in estrogen-induced oxidative stress. *Free Radical Research*. (In press)

Shaban, Z., Soliman, M., El-shazly, S., El-bohi, K., Abdelazeez, A., Kehelo, K., Kim, H., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. AhR and PPAR α Antagonistic effects on CYP2B and CYP3A and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica*. (In press)

Nikaidou, S., Ishizuka, M., Maeda, Y., Hara, T., Kazusaka, A., Fujita, S. Effect of components of green tea extracts, caffeine and catechins on hepatic drug metabolizing enzyme activities and mutagenic transformation of carcinogens. *J Vet Med Sci*. (In press)

Shaban, Z., El-Shazly, S., Abdelhady, S., Fattouh, I., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kimura, K., Kazusaka, A., Fujita, S. Down regulation of hepatic PPAR α function by AhR ligand. *J Vet Med Sci*. 66(11):1377-86 (2004)

Sakamoto, K.Q., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. Iodine intake as a possible cause of discontinuous decline in sperm counts: a re-evaluation of historical and geographic variation in semen quality. *Jpn J Vet Res*. 52(2):85-94. (2004).

Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy. *J Vet Med Sci*. 66(9):1119-24 (2004).

Saito K, Sakai N, Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in sprague-dawley, brown norway, dark agouti, and wistar strain rats. *Drug Metab Dispos*. 32(9):959-65 (2004).

Shaban Z, El-Shazly S, Ishizuka M, Kimura K, Kazusaka A, Fujita S. Related PPAR α -dependent modulation of hepatic CYP1A by clofibric acid in rats. *Arch Toxicol*. 78(9):496-507 (2004).

Saito K, Kim HS, Sakai N, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Polymorphism in

diazepam metabolism in Wistar rats. J Pharm Sci. 93(5):1271-8 (2004)

2. 学会発表

Shaban, Z, El-Shazly, S, 石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一、NEGATIVE CROSS-TALK BETWEEN PPAR-ALPHA AND AHR、日本薬学会 (2005)

Zein Shaban, Samir El-Shazly, Mayumi Ishizuka, Kazuhiro Kimura, Akio Kazusaka, and Shoichi Fujita, PPAR · · dependent Modulation of Hepatic CYP1A by Clofibric Acid in Rats. Microsomes and Drug Oxidations (2004)

Shaban, Z, El-Shazly, S, 石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一、Ah 受容体リガンドによる PPAR α 機能の抑制、環境ホルモン学会 (2004)

石塚真由美、高菅卓三、谷川力、数坂昭夫、藤田正一、野生ドブネズミに蓄積する環境汚染物質と生体影響の genomics 解析、環境ホルモン学会 (2004)

藤田正一、石塚真由美、高菅卓三、谷川力、千葉一成、佐治尚介、坂本健太郎、数坂昭夫、日本の野生生物における内分泌攪乱と環境汚染、環境ホルモン学会 (2004)

K.M. Muzandu, M. Ishizuka, A. Kazusaka and S. Fujita. POSSIBLE INVOLVEMENT OF PEROXYNITRITE IN ESTROGEN-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND PROTECTIVE ROLE OF CAROTENOIDS. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

H-S. Kim, M. Ishizuka, A. Kazusaka and S. Fujita. DI-(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE SUPPRESSES TAMOXIFEN-INDUCED APOPTOSIS IN PITUITARY GH3 CELLS. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

M. Ishizuka, T. Takasuga, T. Tanikwa, S. Fujita. SUPPRESSION OF TESTOSTERONE SYNTHESIS IN TESTES OF WILD NORWAY RATS IN JAPAN: ACCUMULATION OF PERSISTENT ORGANOCHLORINE POLLUTANTS AND POLYBROMINATED DIPHENYL ETHER AND THEIR EFFECT. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

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

エストロゲンによる周生期脳インプリンティングを中心とした、
個体レベルでの核内受容体シグナル検出系の確立

主任研究者 石塚真由美

北海道大学大学院獣医学研究科 助教授
(環境獣医科学講座)

研究要旨

医薬品・環境化学物質の内分泌攪乱作用スクリーニングは、最も簡便な方法としては培養細胞を用いたレポーターアッセイなどが挙げられる。しかし、培養細胞において、核内受容体結合配列下流にレポーター遺伝子を連結させたプラスミドを transient に導入する従来のレポーターアッセイ法では、臓器・細胞によって異なる医薬品・環境化学物質の毒性影響を、細胞レベルでのエンドポイントでしか検出することができない。医薬品や環境化学物質は生体内でシトクロム P450 (CYP) などの代謝酵素によって代謝を受けるため、その毒性発現は、従来のレポーターアッセイでは網羅しきれないことが考えられる。実際、薬物代謝酵素 CYP によって代謝を受けたビスフェノール A など環境化学物質が、エストロゲン受容体との結合性を増強することが報告されている。また、核内受容体であるホルモン受容体に関しては、既に、由来する臓器・細胞によって、転写に関与する共役因子などその活性化機構が異なることが報告されている。従って、医薬品・環境化学物質毒性評価に関しては、クリアランスや代謝的活性化機構、さらに臓器・細胞別の受容体活性化機構をも含めた、個体レベルでの毒性スクリーニング手法の確立が不可欠である。そこで、本研究では、医薬品および環境化学物質に関して、これらの要素を含めた個体レベルでのレポーターアッセイを行う系を確立することを目的とした。

本研究では、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターを作成し、トランスジェニック動物の作成に最適な ERE (estrogen response element) 配列の連結数や、ERE の種類などを検討した。初代培養細胞や cell line による in vitro アッセイから、in vivo でレポーターアッセイを行う際にどの配列が最も適しているのかについて検

討を行った。得られたレポーターカセットについて、適当な部位で切断し、ラットに導入してトランスジェニックラットを作製した。

作製したトランスジェニックラットについて、新生仔、性成熟前、性成熟後のF1およびF2ラットを作製し、エストロゲンシグナルのバックグラウンドや、合成エストロゲン投与後のシグナルの変化、シグナル検出の部位や経時的変化について、生きたままの個体 *in vivo* でイメージング解析を行った。性成熟後のラットでは肝臓および生殖器で強いエストロゲンシグナルが観察された。また、新生仔では、ジエチルスチルベストロール投与後に、肝臓でエストロゲンシグナルを検出することができた。

また、*in vitro* では、ジエチルスチルベストロール投与 24 時間後にラットをと殺し、肝臓、肺、脳、生殖器を採取し、ホモジネートを作製した。各ホモジネートにルシフィリンを添加し、その直後にルミノメーターで発光シグナルを測定した。*In vitro* でも *in vivo* の結果を反映し、肝臓や生殖器で高いエストロゲンシグナルが測定された。

分担研究者 藤田正一 北海道大学・大学院獣医学研究科 教授 (環境獣医科学講座・毒性学教室)

A. 研究目的

生体は農医薬品、環境汚染物質の多く医薬品・環境化学物質の内分泌攪乱作用スクリーニングは、最も簡便な方法としては培養細胞を用いたレポーターアッセイなどが挙げられる。しかし、培養細胞において、核内受容体結合配列下流にレポーター遺伝子を連結させたプラスミドを *transient* に導入する従来のレポーターアッセイ法では、臓器・細胞によって異なる医薬品・環境化

学物質の毒性影響を、細胞レベルでのエンドポイントでしか検出することができない。医薬品や環境化学物質は生体内でシトクロム P450 (CYP) などの代謝酵素によって代謝を受けるため、その毒性発現は、従来のレポーターアッセイでは網羅しきれないことが考えられる。実際、薬物代謝酵素によって代謝を受けたビスフェノール A など環境化学物質が、エストロゲン受容体との結合性を増強することが報告されている。また、核内受容体であるホルモン受容体に関しては、既に、由来する臓器・細胞によって、転写に関与する共役因子などその活性化機構が異なることが報告されている。従って、医薬品・環境化学物質毒性評価に関しては、クリアランスや代謝的活性化機構、さらに臓器・細胞別の受容体活性化機構を

も含めた、個体レベルでの毒性スクリーニング手法の確立が不可欠である。そこで、本研究では、医薬品および環境化学物質に関して、これらの要素を含めた個体レベルでのレポーターアッセイを行う系を確立することを目的とする。

本研究では、エストロゲン攪乱作用のスクリーニングを行うことを目的の一つとしているが、当然、確立された手法を用いて、アンドロゲンや甲状腺ホルモンなど、周生期に不可欠な内分泌ホメオスタシス系への影響評価に応用することができる。また、個体を用いた評価手法のため、レポーター遺伝子の検索によって、周生期のみならず、成熟後や老化過程での影響についてもスクリーニングを行うことが可能である。周生期におけるエストロゲンの脳神経系への作用に関しては不明な点が多いが、本研究によって、エストロゲン標的因子の活性化を経時的に、さらに、臓器・細胞レベルで検出することができる。Adult 動物においても、エストロゲン作用を個体レベルで検出することができるため、老化動物では、アルツハイマーや骨粗しょう症などの研究や医薬品の開発に応用することができる可能性が考えられる。

B. 研究方法

エストロゲンによる脳インプリンティングに対する医薬品や環境化学物質の毒性は未知数であり、スクリーニングが行われている例は少ない。これは、個体レベルで

のアッセイ系が確立していないことが主な原因として挙げられる。また、エストロゲンの周生期脳神経系における標的因子も不明である。本研究では、これらの点について解決するため、トランスジェニック動物の作成を試みた。また周生期の環境化学物質への曝露が脳神経の発達にどのような影響を与えるのかを調べるため、妊娠動物を環境化学物質に曝露させ、行動に及ぼす影響や遺伝子発現レベルの変動について明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

1. レポーター遺伝子の作成

レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターを作成し、トランスジェニック動物の作成に最適な ERE (estrogen response element) 配列の連結数や、ERE の種類などを検討する。初代培養細胞や cell line による in vitro アッセイから、in vivo でレポーターアッセイを行う際にどの配列が最も適しているのかについて検討を行う。得られたレポーターカセットについて、適当な部位で切断し、ラットに導入してトランスジェニックラットを作製した。

得られたラットについて、新生仔、性成熟前、性成熟後の F1 および F2 ラットを作製し、エストロゲンシグナルのバックグラウンドや、合成エストロゲン投与後のシグナルの変化、シグナル検出の部位や経時

的变化について、生きたままの個体 *in vivo* でイメージング解析を行った。

また、*in vitro* では、ジエチルスチルベストロール投与 24 時間後にラットをと殺し、肝臓、肺、脳、生殖器を採取し、ホモジネートを作製した。各ホモジネートにルシフィリンを曝露し、その直後にルミノメーターで発光シグナルを測定した。

(倫理面への配慮)

ヒトの組織及び動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。

C. 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。我々は、この時期のインプリンティングへの影響を *in vivo* でスクリーニングする系を確立するため、1) トランスジェニック動物の作成、2) 脳神経系におけるエストロゲン標的遺伝子のスクリーニングの影響、を計画し、以下の結果を得た。

1. トランスジェニック動物の作成

我々は、トランスジェニックマウス作成のために、ERE-レポーター遺伝子カセットの条件設定及び調製を行った。昨年度の研究により、エストロゲンに特異的に感受性の高い ERE 単純繰り返し配列の連結クローンをカセットに組み込んだ。これまでの研究で ERE-lacZ レポーターカセットを用いて、トランスジェニックマウスの作成・ブリーディングを行った。しかし、途中、lacZ レポーターでは脳神経細胞において非常にバックグラウンドが高く、エストロゲンシグナルの特異的な検出が難しいことが判明したため、同じ ERE 単純繰り返し配列の連結クローンにルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだカセットを作成した。作製したレポーターカセットを 400 個の卵に導入し、14 匹の founder ラットを得た。

2. Phenotyping

得られた 14 line のラットについて、F1 を作製した。得られた約 300 匹の F1 ラットについて、PCR による genotyping を行い、8 週齢の Tg (+) ラットについて、ジエチルスチルベストロール投与後のエストロゲンシグナルの変化について、生きた個体を丸ごと用いた in vivo ルシフェラーゼ活性測定、および臓器採取による in vitro ルシフェラーゼ活性測定の両方から検討した。

In vivo イメージングのために、ルミノイメージャーであるベルトールドテクノロジー (BERTHOLD TECHNOLOGIES、ドイツ) の Night OWL LB981、および、FUJI film(日本)の LAS3000 を用いた。ルシフェリンは Beetle Luciferin, Potassium Salt(プロメガ)を用いた。ジエチルスチルベストロールは 1000 μ g/kg で経口投与し、24 時間後にルシフェリンを 75mg/kg で腹腔投与した。ルシフェリン投与後、経時的に 1 時間発光シグナルを検出した。両機種について、adult ラットでも、剃毛処理を行わずに発光を検出することができたが、NightOWL LB981 の方が、ルシフェリンの検出について感度が高かった。

14 line の F1 ラットの中で、11 line は ERE 転写シグナルが認められず、3 line について、ジエチルスチルベストロールによるエストロゲンシグナルの誘導性を検出し、1 line について当該研究の目的に使用できることが分かった。

3. エストロゲンシグナルの in vivo 検出

ジエチルスチルベストロールによってエストロゲンシグナルが検出された line について、生後 5 週齢および 16 日齢の F2 ラットを作製した。F2 ラットにジエチルスチルベストロールを 1000 μ g/kg で腹腔投与し、投与 24 時間後にルシフェリンを 150mg/kg 濃度で腹腔投与した。ルシフェリン投与後、FUJI film 社の LAS3000 を用いて、その発光シグナルについて検出した。

8 週齢のトランスジェニック (+) ラットでは、オス、メスともに、ジエチルスチルベストロール投与無しでエストロゲンシグナルがわずかにバックグラウンドとして検出された。しかし、5 週齢のメスでは、性成熟ラットと異なり、ジエチルスチルベストロール投与無しでのエストロゲンシグナルは殆ど検出されなかった。ジエチルスチルベストロール投与後の 5 週齢のオスラットでは、生殖器および肝臓にエストロゲンシグナルを検出することができた (図)。いずれも剃毛は行わなかった。

16 日齢ラットでは、非常に強いエストロゲンシグナルを検出することができた (図)。ルシフェリンは 600nm 程度の波長を持つ。この領域の波長では、その発光シグナルが血液などに一部吸収される。従って、透過距離の長い adult ラットよりも 16 日齢ラットの方がシグナルの透過性が強いとと考えられた。

ジエチルスチルベストロール投与 24 時間後にラットをと殺し、肝臓、肺、脳、生殖器を採取し、ホモジネートを作製した。

各ホモジネートにルシフィリンを添加し、その直後にルミノメーターで発光シグナルを測定したところ、*in vivo* によるエストロゲンシグナルを反映する結果となった。特にジエチルスチルベストロール投与後、生殖器および肝臓においてルシフェリンの強い発光が検出された。

D. 考察

発光では、2 次元的な解析が行われるため、形態の異なる成熟、未成熟ラット間でのエストロゲンシグナルの比較は難しかった。また、ルシフェリンによるエストロゲンシグナル検出は、ルシフェリン投与後 15–30 分間でピークを迎えることが分かった。*In vivo* イメージャーとして開発された BERTHOLD TECHNOLOGIES (ドイツ) の NightOWL LB981 の方が発光シグナルの検出に関しては感度が高かったが、FUJIFILM 社の LAS3000 でも検出は可能であった。

エストロゲンシグナルは性生成熟後ではバックグラウンドが比較的高く、メスでは体全体が発光した。生後 16 日齢の F2 ラットでは、肝臓、生殖器部位のエストロゲンシグナルが特に高い発光シグナルとしてカウントされた。一方、脳についても *ex vivo* ではなく、*in vivo* のまま測定が可能であることが分かった。

E. 結論

レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターを作成し、トランスジェニック動物の作成に最適な ERE (estrogen response element) 配列の連結数や、ERE の種類などを検討する。初代培養細胞や cell line による *in vitro* アッセイから、*in vivo* でレポーターアッセイを行う際にどの配列が最も適しているのかについて検討を行った。得られたレポーターカセットについて、適当な部位で切断し、ラットに導入してトランスジェニックラットを作製した。

得られたラットについて、新生仔、性成熟前、性成熟後の F1 および F2 ラットを作製し、エストロゲンシグナルのバックグラウンドや、合成エストロゲン投与後のシグナルの変化、シグナル検出の部位や経時的変化について、生きたままの個体 *in vivo* でイメージング解析を行った。

また、*in vitro* では、ジエチルスチルベストロール投与 24 時間後にラットをと殺し、肝臓、肺、脳、生殖器を採取し、ホモジネートを作製した。各ホモジネートにルシフィリンを曝露し、その直後にルミノメーターで発光シグナルを測定した。*In vitro* シグナルのパターンは *in vivo* の実験結果を反映するものであった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Muzandu, K., Shaban, Z., Ishizuka, M., Kazusaka, A., SHOICHI, Fujita, S. Possible involvement of peroxynitrite in estrogen-induced oxidative stress. Free Radical Research. (In press)

Shaban, Z., Soliman, M., El-shazly, S., El-bohi, K., Abdelazeez, A., Kehelo, K., Kim, H., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. AhR and PPAR α Antagonistic effects on CYP2B and CYP3A and additive inhibitory effects on CYP2C11. Xenobiotica. (In press)

Shaban, Z., El-Shazly, S., Abdelhady, S., Fattouh, I., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kimura, K., Kazusaka, A., Fujita, S. Down regulation of hepatic PPAR α function by AhR ligand. J Vet Med Sci. 66(11):1377-86 (2004)

Sakamoto, K.Q., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. Iodine intake as a possible cause of discontinuous decline in sperm counts: a re-evaluation of historical and geographic variation in semen quality. Jpn J Vet Res. 52(2):85-94. (2004).

Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy. J Vet Med Sci. 66(9):1119-24 (2004).

Saito K, Sakai N, Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in sprague-dawley, brown norway, dark agouti, and wistar strain rats. Drug Metab Dispos. 32(9):959-65 (2004).

Shaban Z, El-Shazly S, Ishizuka M, Kimura K, Kazusaka A, Fujita S. Related PPAR α -dependent modulation of hepatic CYP1A by clofibric acid in rats. Arch Toxicol. 78(9):496-507 (2004).

2. 学会発表

Shaban, Z, El-Shazly, S、石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一、NEGATIVE CROSS-TALK BETWEEN PPAR-ALPHA AND AHR、日本薬学会(2005)

Zein Shaban Samir El-Shazly, Mayumi Ishizuka, Kazuhiro Kimura, Akio

Kazusaka, and Shoichi Fujita, PPAR •
• • dependent Modulation of Hepatic
CYP1A by Clofibric Acid in Rats.
Microsomes and Drug Oxidations (2004)

Shaban, Z、El-Shazly, S、石塚真由美、
数坂昭夫、藤田正一、Ah 受容体リガンド
による PPAR α 機能の抑制、環境ホルモン
学会(2004)

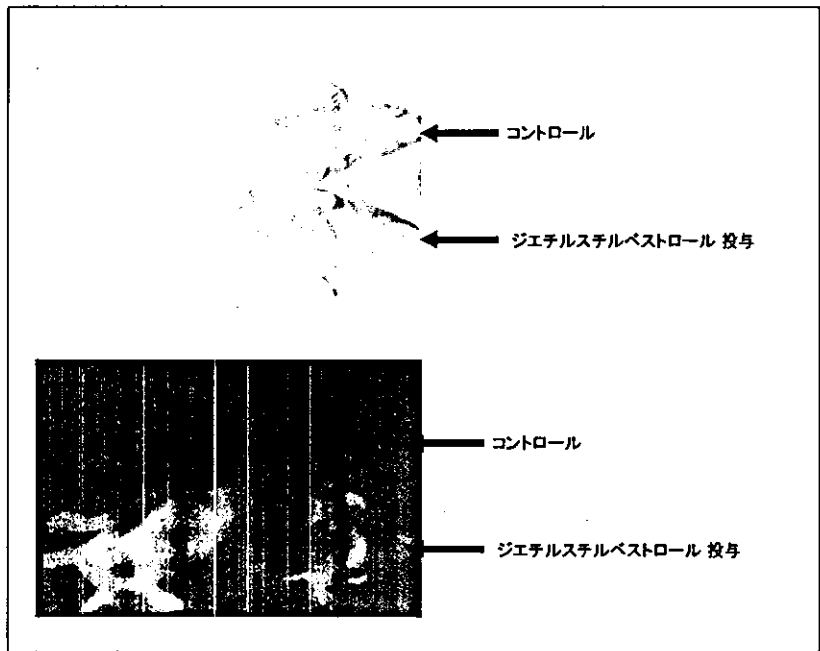
石塚真由美、高菅卓三、谷川力、数坂昭夫、
藤田正一、野生ドブネズミに蓄積する環境
汚染物質と生体影響の genomics 解析、環
境ホルモン学会(2004)

藤田正一、石塚真由美、高菅卓三、谷川力、
千葉一成、佐治尚介、坂本健太郎、数坂昭
夫、日本の野生生物における内分泌攪乱と
環境汚染、環境ホルモン学会(2004)

K. M. Muzandu, M. Ishizuka, A. Kazusaka
and S. Fujita. POSSIBLE INVOLVEMENT OF
PEROXYNITRITE IN ESTROGEN-INDUCED
OXIDATIVE STRESS AND PROTECTIVE ROLE
OF CAROTENOIDS. 10th International
Congress of Toxicology (2004, Finland)

H-S. Kim, M. Ishizuka, A. Kazusaka and
S. Fujita. DI-(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE
SUPPRESSES TAMOXIFEN-INDUCED APOPTOSIS
IN PITUITARY GH3 CELLS. 10th
International Congress of Toxicology
(2004, Finland)

M. Ishizuka, T. Takasuga, T. Tanikwa,
S. Fujita. SUPPRESSION OF TESTOSTERONE
SYNTHESES IN TESTES OF WILD NORWAY
RATS IN JAPAN: ACCUMULATION OF
PERSISTENT ORGANOCHLORINE POLLUTANTS
AND POLYBROMINATED DIPHENYL ETHER AND
THEIR EFFECT. 10th International
Congress of Toxicology (2004, Finland)



ジェチルステルベストールによってエストロゲンシグナルが検出された line について、生後 5 週齢の F2 ラットを作製した。F2 ラットにジェチルステルベストールを $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ で腹腔投与し、投与 24 時間後にルシフェリンを $150\text{mg}/\text{kg}$ 濃度で腹腔投与した。ルシフェリン投与後、FUJI film 社の LAS3000 を用いて、その発光シグナルについて検出した。