

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 14 - 16 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

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. 分担研究報告書

視床下部および精巣のエストロゲン及びテストステロン産生酵素の性差と
環境化学物質の影響の検討（平成 14 年度）

石塚 真由美 藤田 正一 数坂昭夫 -----25

周生期の脳神経細胞における環境化学物質の影響（平成 14 年度）

ービスフェノール A 周生期曝露による行動への影響ー

石塚 真由美 藤田 正一 -----33

周生期の脳神経細胞における環境化学物質の影響（平成 14 年度）

ービスフェノール A 曝露後の小脳マイクロアレイ解析ー

石塚 真由美 数坂 昭夫 -----39

テストステロンによる neonatal インプリンティング時のステロイド代謝酵素の変動（平成
15 年度）

ーin vivo におけるステロイド代謝経路の変動ー

石塚 真由美 藤田 正一 網田 丈二 -----49

テストステロンによる neonatal インプリント時のステロイド代謝変動 (平成 15 年度)

—グリア細胞におけるステロイド代謝経路の変動—

石塚 真由美 数坂 昭夫 網田 丈二 -----54

neonatal インプリント時の視床下部における環境化学物質の影響 (平成 15 年度)

—ビスフェノール A のステロイドホルモン生合成経路への影響—

石塚 真由美 数坂 昭夫 網田 丈二 -----60

視床下部におけるエストロゲン標的遺伝子のスクリーニング (平成 15 年度)

石塚 真由美 網田 丈二 -----64

エストロゲンによる周生期脳インプリントを中心とした、個体レベルでの核内受容体シグナル検出系の確立 (平成 14-16 年度)

石塚 真由美 -----70

蛍光による in vivo イメージング方法 (平成 16 年度)

石塚 真由美、藤田 正一 -----81

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----88

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）
総合研究報告書

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、1) 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、2) 周生期のステロイドホルモンやその標的因子、環境化学物質の影響について明らかにすること、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 foudner 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stil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、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。

環境化学物質の周生期曝露が脳神経の発達にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするため、ラットを胎生仔期・新生仔期に低濃度の内分泌攪乱化学物質ビスフェノール A に曝露し、脳の発達や行動に対する影響を調べた。妊娠 1 日目から離乳期まで、母ラットに、連続でビスフェノール A を飲水投与(約 1.5mg/kg/day)し、得られたオス及びメスの仔ラットについて、生後 13 日齢から、自発運動量測定器 SCANET を用いて定期的に自発運動量などを測定した。胎仔期・新生仔期のビスフェノール A 低濃度曝露によって、新生仔期のオスラットでは自発運動量が増加することが分かった。

一方、周生期のエストロゲン・アンドロゲン曝露が神経細胞アポトーシスの調節を行っていることも報告されている。そこで、cDNA マイクロアレイ法を用いて、同じく、ビスフェノール A などエストロゲン作用を持つ環境汚染物質によってその発現が変動する脳神経系の遺伝子群を解析した。ビスフェノール A 曝露によって、G 蛋白質 α 及び β サブユニットの発現量が増加していた。 α は G_i (inhibiting) に比べ、 G_s (stimulating) 蛋白の発現量が顕著に増加していた。また、神経伝達物質受容体の中で、ドパミン D2、D4 受容体、ニコチン性やムスカリン性アセチルコリン受容体の発現量も増加することが示された。ビスフェノール A 曝露のオスラット小脳では、ホスホリパーゼ C の発現量は変わっていなかったが、カルモジュリン発現量は顕著に減少していた。また、bcl-2、bax、caspase3 などのアポトーシス関連遺伝子もその発現レベルが変動しており、周生期の環境化学物質への曝露が脳神経細胞の増殖に影響を与える可能性が明らかとなった。

さらに、周生期の脳内ステロイドについて、CYP19（アロマターゼ）やステロイド 5 α 還元酵素以外にも、3 β HSD、17 β HSD などテストステロン代謝に関わる酵素群がどのような影響を受けるのかを、real-time RT-PCR によって、mRNA レベルで明らかにした。In vivo 実験において、メスへの周生期のテストステロン投与によって、72 時間後の新生仔ラットの視床下部では、17 β HSD、アロマターゼ mRNA には変動が見られなかったが、ステロイド 5 α 還元酵素の発現は、コントロール群に比べて有意に減少した。また、3 β HSD の mRNA 発現レベルは、テストステロン曝露によって上昇することが明らかとなった。

これらの代謝酵素に関して、グリア細胞はニューロンに比べてステロイド代謝活性が顕著に高いことが報告されている。そこで、グリア細胞のニューロステロイド産生経路が、周生期のステロイドホルモンインプリンティングによってどのように変化するのかについて調べた。グリア細胞由来 C6 細胞や、新生仔期の視床下部の初代培養細胞では、テストステロンの曝露によって、アロマターゼ、ステロイド 5 α 還元酵素 mRNA はともに発現レベルが上昇した。テストステロンの前駆体であり、胎児期や新生時期に産生能が上昇し、血中濃度が高くなるデヒドロエピアンドロステロンを基質としたところ、C6 細胞や視床下部由来の初代培養細胞では、17 β HSD によって生合成されるアンドロステジオールが主要な代謝物として検出された。その生成速度は曝露 36 時間後まで時間依存的であった。

胎生仔・新生仔期では、精巣からテストステロンが一時的に分泌され、脳に到達し、CYP19(アロマターゼ)によってエストラジオールに変換され、脳の性分化を引き起こすさまざまな変化が mRNA、蛋白合成レベルで起こることが報告されている。しかし、このインプリンティング時におけるテストステロン→エストロゲンの標的遺伝子は不明な点が多い。そこで、本研究では、周生期の視床下部において、テストステロンシャワーによって引き起こされる mRNA プロファイルの変動のスクリーニングを行った。新生メスラットにテストステロンを投与し、アフィメとリックス社の gene chip を用いて、視床下部に発現する mRNA の変動プロファイルを調べた。特に、GABA-B やシヌクレインについて、テストステロン曝露によって発現が抑制あるいは上昇することが明らかとなった。

本研究によって、周生期の脳ステロイド代謝および、エストロゲンの標的遺伝子、そしてそれらに対する環境化学物質の影響を明らかにすることができた。また、in vivo でレポーターアッセイを行うことのできるトランスジェニックラットを作成することができた。

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 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。

周生期における脳インプリンティングには、アロマトラーゼ (CYP19) によるテストステロン→エストラジオールの変換が不可欠である。哺乳類周生期では、脳神経のエストロゲン・アンドロゲン曝露が神経細胞アポトーシスの調節を行っていることが報告されている。ビスフェノール A はエストロゲン受容体への結合性が極めて弱いとされてきた。しかし、化学物質への感受性の高い発達期の脳神経系に影響は不明である。そこで、ビスフェノール A の脳発達への影響についてその原因を明らかにする為に、ビスフェノール A を妊娠ラットに連続投与し、小脳重量やニューロフィラメントの発現量に差の見られた生後 7 日目において、新生仔の小脳を採取し、発現量が変動する mRNA を cDNA マイクロアレイによって解析した。

一方、テストステロンの生合成には 3β HSD、 17β HSD、CYP17 などさまざまな酵

素群が関わっている。最近では、ステロイド合成酵素は生殖器や副腎以外に、脳にも高頻度で発現し、ニューロステロイドの生合成に寄与していることが報告されている。神経系におけるステロイドホルモンの産生は特にグリア細胞で活発であることが報告されている。そこで、本研究では、視床下部由来の初代培養細胞やグリア細胞の株化細胞である C6 細胞を用いて、グリア細胞におけるステロイドホルモンの産生系と、それらにテストステロンの周生期曝露がどのような影響を与えるのかを明らかにする為に実験を行った。

また、テストステロンインプリンティング時におけるテストステロン→エストロゲンの標的遺伝子は明らかにされていない。これまでの我々の研究から、周生期における視床下部のアロマトラーゼ発現量は、これまでの報告と異なり、大きな雌雄差は認められないことが明らかとなった。従って、メスにおいても、テストステロン曝露によって、オスと同じく視床下部でのアンドロゲンのエストロゲンへの変換や、それによって標的遺伝子の発現の変動が引き起こされる可能性が考えられる。そこで本研究では、このことを利用し、周生期の視床下部において、テストステロンシャワーによって引き起こされる mRNA プロファイルの変動のスクリーニングを行った。

B. 研究方法

トランスジェニックラットの作成

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。

レポーター遺伝子およびトランスジェニックラットの作成

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。

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。

テストステロンによる neonatal インプリンティング時のステロイド代謝変動

近年、脳神経内においてステロイドホルモンの生合成が行われ、ニューロステロイドとして機能していることが報告された。本研究では、周生期のステロイドホルモンの代謝経路が通常の adult とどのように変わっているのかを明らかにする為、ステロイドホルモン代謝酵素の活性や mRNA 発現レ

ベルについて測定を行った。また、神経細胞の中でステロイドホルモンの生合成能が高いグリア細胞について、周生期を想定したテストステロン曝露による影響に関して明らかにした。C6 cell line や視床下部由来の初代培養細胞におけるステロイドホルモンの代謝経路や活性の変化を明らかにした。

neonatal インプリンティング時の視床下部における環境化学物質の影響

周生期に環境ホルモンの一つビスフェノール A を曝露し、ステロイドホルモン生合成系にどのような影響を与えるのかを明らかにした。

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

周生期においてエストロゲンの標的遺伝子は不明であり、インプリンティングによってどのようなシグナルが引き起こされるのかは明らかにされていない。そこで、周生期のテストステロンシャワー→エストロゲンによるインプリンティングが起こらないメスに関して、同時期にテストステロンを投与し、gene chip によって変動する mRNA のスクリーニングを行った。

(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

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 個の卵に導入し、14 匹の founder ラットを得た。

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。

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。

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 であるルシフェリ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。

視床下部性的二型核および精巣に発現する性ステロイド産生酵素の性差と環境化学物質の影響

①SDN-POA における性ホルモン産生酵素の発現量の性差

周生期のアロマターゼ発現量はオスで高い傾向を示したが、顕著な性差は認められなかったまた、同時期のステロイド 5 α 還元酵素発現量はメスで高い傾向を示した。しかし、有意な性差は認められなかった。

② 精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素群への環境化学物質の影響

ジエチルヘキシルフタル酸暴露によって血中テストステロン濃度は減少した。精巣における 5 α 還元酵素活性は、ジエチルヘキシルフタル酸曝露によって上昇することが明らかとなった。また、ジエチルヘキシルフタル酸曝露は精巣のアロマターゼ mRNA 発現レベルを減少させることが明らかとなった。

周生期における環境化学物質曝露が脳神経に与える影響の解明

①ビスフェノール A 周生期曝露による行動への影響

飲水投与ビスフェノール A 曝露によって、仔ラットのオス、メスともに体重や産仔数に変化は見られなかった。しかし、ビスフェノール A 曝露群では、オス・メスともに eyelid-opening の早期化が観察された。また、生後 7 日目の視床下部重量について、ビスフェノール A 曝露群とコントロール群との間に差は見られなかったが、小脳重量はオスで有意に減少していた。

SCANET を用いた運動量の測定から、胎仔期・新生仔期のビスフェノール A 低濃度曝露によって、新生仔期のオスラットでは自発運動量が増加することが分かった。しかし、メスでは自発運動量に変化がなかったため、ビスフェノール A 曝露によって、この時期の運動量の性差が消失することが明らかとなった。また、性成熟期の 49 日齢では、オスラットの自発運動量及び探索行動が減少することが明らかとなった。この減少は、その後、aging にともなって消失することも明らかとなった。メスでは、ビスフェノール A による自発運動量及び探索行動の変化は観察されなかった。

②ビスフェノール A 周生期曝露脳のマイクロアレイ解析

ビスフェノール A を曝露した生後 7 日目の新生オスラットの小脳において、発現

量が減少する遺伝子は、約 50 種、発現レベルが上昇する遺伝子は約 120 種が同定された。

今回の解析では、ビスフェノール A 曝露によって、小脳に発現する G 蛋白質 α 及び β サブユニットの発現量が増加していた。 α は G_i (inhibiting) に比べ、 G_s (stimulating) 蛋白の発現量が顕著に増加していた。また、神経伝達物質受容体の中で、ドパミン D2、D4 受容体、ニコチン性やムスカリン性アセチルコリン受容体の発現量も増加することが示された。

ビスフェノール A 曝露のオスラット小脳では、カルモジュリン発現量は顕著に減少していた。カルモジュリン結合性の ras ファミリー・Kir (kinase-inducible ras-like) の発現量は変わらず、PKC (protein kinase C) や同じく ras ファミリーである Rin (ras-like protein in neurons) の発現量は増加していた。また、NMDA (N-methyl-D-aspartate receptor) 受容体 2A、2B、AMPA (3H-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate) 受容体、GluR2 (glutamate receptor 2) 発現量に変動は見られなかった。

一方、ビスフェノール A の曝露によって、mGluR (metabotropic glutamate receptor) のうち、mGluR 2、mGluR 5、mGluR 6、mGluR 7 の発現量は増加していたが、小脳に分布の多い GluR1 の発現量に変化は見られなかった。

③小脳初代培養に対するビスフェノール A 曝露の影響

初代小脳培養細胞（グリア細胞）では、ビスフェノール A の曝露によって細胞増殖が抑制されることが示された。グリア細胞の中でアストロサイトのマーカー蛋白である GFAP 発現レベルは、蛋白量あたりでは変動は見られなかった。

視床下部初代培養細胞におけるテストステロン曝露のステロイド生合成系への影響

視床下部由来の初代培養細胞では、テストステロン曝露によって、高濃度 (100 μ M) では 3β HSD や CYP19mRNA の増加が認められた。しかし、 5α 還元酵素は mRNA 発現レベルが減少することが明らかとなった。

一方、テストステロン前駆体であり、胎児期・新生時期に生合成能が高くなり、血中濃度が上昇するデヒドロエピアンドロステロンを視床下部由来の初代培養細胞に曝露し、その代謝物濃度を測定したところ、曝露 12 時間後では、アンドロステンジオールの濃度はアンドロステンジオン濃度に比べて顕著に高い値を示した。

グリア細胞 (C6) におけるテストステロン曝露のステロイド生合成系への影響

C6 細胞では、ステロイド代謝酵素である CYP19、 3β HSD、 17β HSD、 5α 還元酵素に関して mRNA レベルで検出することができた。C6 細胞をテストステロンに曝露したと

ころ、高濃度 (100 μ M) では 3β HSD や CYP19、 5α 還元酵素 mRNA の発現が増加した。特に 5α 還元酵素はテストステロンの濃度依存的に発現が増加した。

テストステロン前駆体のデヒドロエピアンドロステロンを C6 細胞に曝露し、経時的に代謝物の濃度変化を調測定したところ、アンドロステンジオン、アンドロステンジオール、テストステロンに関して 36 時間まで、時間依存的にその濃度が増加することが分かった。特にアンドロステンジオールの産生は著し、グリア細胞である C6 細胞では、デヒドロエピアンドロステロンは、よりアンドロステンジオールに代謝されやすいことが明らかとなった。一方、テストステロンや、テストステロンの活性型であるジヒドロテストステロンの前処置によって、C6 細胞ではアンドロステンジオールの生合成に変化は見られなかったが、アンドロステンジオンの生成は増加することが明らかとなった。

neonatal インプリンティング時の視床下部における環境化学物質の影響

ビスフェノール A はエストロゲン受容体に弱い結合を持つことが知られているが、新生仔期の曝露によって、性成熟後の行動が変化することが報告されている。そこで、新生仔期のテストステロンによる視床下部のインプリンティングにビスフェノール A がどのような影響を与えるのかを、ステロイドホルモンの産生 pathway を中心に明ら

かにした。環境化学物質ビスフェノール A を周生期に曝露したラット視床下部において、デヒドロエピアンドロステロンからのアンドロステンジオールの合成を促進させ、結果的にテストステロンの産生を促進させることが明らかとなった。

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

マイクロアレイ解析法を用いて、周生期にテストステロンに曝露したメスラットの脳において、発現レベルが変動する遺伝子群のスクリーニングを行った。テストステロンシャワーによるインプリンティングのモデルとして、本来ならばインプリンティングの起こらない生後 4 時間以内の新生メスラットにテストステロン 0mg、0.1mg、1mg を皮下投与し、72 時間後の視床下部を採取した。視床下部より抽出した mRNA は、アフィメトリックス社の gene chip (RN-U34、約 1300 遺伝子) を用いてスクリーニングした。また、得られた結果について、リアルタイム RT-PCR 法でその変動を確認した。

テストステロン投与によって、Bcl-x, GABA B receptor 1, 1c, 1d, 2, gb2 subunit, NMDA receptor, Na⁺-Ca²⁺ exchanger NCX2, Dopamine D3 receptor, Kainate receptor 2 subunit, Vesicular GABA transporte などの受容体群の発現レベルが減少した。また、mGluR5, Calcineurin A-beta, Glutamate-aspartate

transporter, Monoamine oxidase B, L-type calcium channel alpha 2 subunit, beta 2 subunit などについてはその発現が上昇することがわかった。本研究によって、初めて、テストステロンシャワーによる neonatal インプリンティング時の視床下部の標的遺伝子の変動プロファイルが明らかとなった。特に、GABA などによる神経伝達調節が neonatal インプリンティングによって変動することが示された。

D. 考察

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、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生成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。

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Kindlingによって600nmの蛍光を発する。しかし、Kindling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かなりえないことが考えられる。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。

視床下部性的二型核および精巣に発現する性ステロイド産生酵素の性差

①SDN-POAにおける性ホルモン産生酵素の発現量の性差

今回の結果から、これまでの報告とは異なり、胎生期ラットの視床下部におけるアロマターゼやステロイド5 α 還元酵素の発現レベルには有意な性差は認められなかった。アロマターゼ/ステロイド5 α 還元酵素のmRNA発現レベル比は、オスで高い傾向を示したが、同様に有意な性差は認められなかった。従って、脳インプリンティングには、酵素群の発現レベルや活性ではなく、周生期のテストステロン量の性差が重要である可能性が考えられた。

② 精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素群への環境化学物質の影響

ジエチルヘキシルフタル酸曝露結果によって、精巣でエストロゲン産生酵素であるアロマターゼmRNA発現レベルが減少することが分かった。これまでの報告と今回の報告を合わせ、精巣におけるテストステロン合成・異化代謝酵素群は、フタル酸エステル(ジエチルヘキシルフタル酸:DEHP及びジブチルフタル酸DBP)によって影響を受けることが考えられた。

ビスフェノール A 曝露による脳神経の発達
や行動への影響

①ビスフェノール A 曝露による行動への影 響

エストロゲン曝露によって、eyelid-opening の早期化が報告されている。また、eyelid-opening には明らかに性差が存在し、メスはオスよりも早期である。したがって、今回ビスフェノール A 曝露で同様の結果が得られたのは、エストロゲン作用によるものと考えられた。

また、生後 13 日齢のオスでは、ビスフェノール A 投与群はコントロール群に比べて、有意な自発運動量の増加が見られた。また、オス及びメス自発運動量には性差が存在するが、オスでは、精製熟時の 49 日齢において、ビスフェノール A 投与群はコントロール群に比べて、有意に自発運動量および探索行動量が増加した。オスで観察されたいずれの変化も、メスでは顕著ではなかった。従って、胎生仔期・新生仔期のビスフェノール A への曝露が、特に雄において、新生仔期のホルモンによる脳インプリンティングを変化させる可能性が考えられた。

②ビスフェノール A 曝露による小脳発現遺 伝子への影響

ビスフェノール A の曝露によって、アセチルコリンやドパミンなどの神経伝達に影響がある可能性が考えられた。実際、in vitro 実験では、ビスフェノール A 曝露によって、アセチルコリンによるチャンネル活

性化・細胞膜脱分極が阻害されることが報告されている。

一方、ビスフェノール A 曝露によって、生後 7 日目の小脳では、アポトーシスを誘発する bax などの遺伝子発現が増加していた。これまで、グリア細胞において、bax 活性化はアポトーシスを引き起こすことが報告されている。また、カルモジュリンの発現も顕著に減少していた。ラットグリア由来細胞や PC12 細胞において、カルモジュリン機能の抑制が、アポトーシスを誘発することも報告されている。従って、ビスフェノール A 曝露で周生期の神経細胞の正常な分化・発育に影響がある可能性が考えられた。

周生期脳インプリンティングに関する酵素群 の性差と環境化学物質の影響

アロマターゼ発現レベルが高いことが報告されている胎生 20 日齢のラットでは、アロマターゼおよびステロイド 5 α 還元酵素の mRNA 発現レベルに顕著な性差は見られなかった。一方、環境化学物質への曝露が、周生期脳インプリンティングに重要な精巣のテストステロンの生合成・代謝酵素の発現や放出に影響を与えることが示唆された。

ビスフェノール A の周生期曝露による脳神 経への影響

ビスフェノール A の胎仔期及び新生仔期曝露は、新生仔期及び性成熟期のラットの自発運動量及び探索行動に影響を与える

ことが分かった。これらの行動の変化には性差が見られることから、周生期のホルモンによる脳インプリンティング機構に、ビスフェノール A が影響を及ぼしている可能性が考えられた。また、ビスフェノール A 曝露群は生後 7 日齢において、小脳重量の減少が観察された。体重への重量比について、視床下部には影響は見られなかった。そこで、生後 7 日齢のラット小脳を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、カルモジュリンや *bax* 遺伝子の発現量が減少していることが明らかとなった。また、小脳初代培養細胞にビスフェノール A を曝露したところ、細胞増殖が抑えられることが明らかとなった。従って、この時期の環境化学物質への曝露は、正常な脳神経の発達に影響を与える可能性が明らかとなった。

テストステロンによる neonatal インプリンティング時のステロイド代謝変動

周生期の *in vivo* の視床下部ではテストステロン曝露によって 5α 還元酵素の発現が抑制されたが、*in vitro* ではその mRNA 発現量に変化は認められなかった。また、C6 細胞ではテストステロン曝露によって 5α 還元酵素の発現は増加し、*in vitro* や、モデル細胞において、*in vivo* の再現性が認められないことがわかった。 3β HSD については、テストステロン曝露によって *in vivo*、*in vitro* のいずれの実験系でも mRNA レベルの増加が認められ、プレグネノロンや胎児期に大量に生合成され放出されるデ

ヒドロエピアンドロステロンからアンドロゲン合成する 3β HSD がテストステロンによる発現制御を受けている可能性が考えられた。

グリア細胞である C6 細胞では、ステロイド代謝酵素である 3β HSD、 17β HSD のいずれの酵素も発現していたが、デヒドロエピアンドロステロンを基質とした場合、代謝物としてアンドロステンジオールが多く検出されたことから、 3β HSD よりも 17β HSD 依存の活性がより高いことが示唆された。視床下部由来の初代培養細胞でも、同様に、胎児期・新生時期に血中濃度が高くなるデヒドロエピアンドロステロンはアンドロステンジオールに変化しやすいことが明らかとなった。

neonatal インプリンティング時の視床下部における環境化学物質の影響

哺乳類では周生期脳のステロイドホルモンへの曝露が性成熟後の性行動を決定していることが明らかとなっている。従って、この時期の内分泌攪乱化学物質への曝露は、ステロイドホルモンによる脳インプリンティングを阻害し、正常な性分化や性成熟後の性行動を攪乱することが懸念される。ビスフェノール A の周生期曝露によって脳の性分化にどのような影響を与えるのか明らかにされていない。エストロゲンはラットの性的二型核の形成に影響を与えるが、ビスフェノール A 曝露では影響が見られないとの報告もある。しかし、性成熟後にビス

フェノール A 曝露ラットでは行動に影響が認められることも報告されている。今回の結果では、ビスフェノール A は周生期のホルモン生合成経路に影響を及ぼしていることが示唆された。

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

周生期のテストステロン→エストロゲンによって変動する遺伝子群をスクリーニングした。これまでの GABA-A に加え、GABA-B も周生期のインプリンティングによって発現が変動することが明らかとなった。GABA-A 受容体は周生期に Ca の細胞内流入を起こし、CREB リン酸化や c-fos 発現増加などによって BDNF mRNA 増加を引き起こし、細胞の生存や樹状突起形成を促進することが報告されている。テストステロンから変換されたエストラジオールはこの GABA-A 作用を増強することが知られている。今回、GABA の研究で明らかとなった GABA-B は、ラット新生時では発達していないが、プレシナプスでは抑制的に機能していることが報告されている。

また、シヌクレイン α は、鳥類では、テストステロンによって発現が増加し、シナプスの保護に働くことが報告されている。今回の研究において、ラットでもテストステロンによってその発現が制御されていることが示唆された。

E 結論

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。

周生期の環境化学物質曝露がステロイドホルモンの代謝や標的因子にどのような影響を与えるのかスクリーニングした。また、この時期の脳におけるエストロゲンのターゲット遺伝子についてマイクロアレイを用いて解析し、新たに遺伝子を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

平成 14 年度

1. 論文発表

Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats. Arch Toxicol. (in press)

Sakamoto KQ, Nakai K, Aoto T, Yokoyama A, Ushikoshi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Cytochrome P450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. *Chemosphere*. 2003 May;51(6):491-500.

Sakamoto KQ, Kunisue T, Watanabe M, Masuda Y, Iwata H, Tanabe S, Akahori F, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Accumulation patterns of polychlorinated biphenyl congeners and organochlorine pesticides in Steller's sea eagles and white-tailed sea eagles, threatened species, in Hokkaido, Japan. *Environ Toxicol Chem*. 2002 Apr;21(4):842-7.

Chiba I, Sakakibara A, Iwata TH, Ishizuka M, Tanabe S, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S. Hepatic microsomal cytochrome p450s and chlorinated hydrocarbons in largha and ribbon seals from Hokkaido, Japan: differential response of seal species to Ah receptor agonist exposure. *Environ Toxicol Chem*. 2002 Apr;21(4):794-806.

2. 学会発表

第133回日本獣医学会 (平成14年春)

① 妊馬ホルモン・Equileninによる異物代謝酵素の誘導

② マウス海馬におけるビスフェノール A 投与の影響

2) 北海道薬物作用談話会

雌性ホルモンが Ah レセプター介在性・非介在性 CYP1A サブファミリー発現機構に及ぼす影響

3) 環境ホルモン学会 第5回研究発表会

Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats

4) 14th International symposium on microsomes and drug oxidations

Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Regulates levels of P450 and their metabolic activities in rat testis microsomes

5) 第135回日本獣医学会

① マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—