

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

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 のステロイドホルモン生合成経路への影響—

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

分担研究者 数坂昭夫 北海道大学・大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 助教授

研究協力者 網田丈二 北海道大学・大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座

研究要旨

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、ビスフェノール A の周生期曝露が、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。

昨年度の研究ではビスフェノール A の周生期曝露によって発現が変動する遺伝子をスクリーニングした。そこで、本年度は、環境化学物質ビスフェノール A への曝露によって周生期のステロイド産生系がどのような影響を受けるのか、視床下部を中心に調べた。ビスフェノール A の曝露によって、テストステロン前駆体であるアンドロステオンジオールの生成量が増加することが分かった。

A. 研究目的

平成 14 年度の研究では、環境化学物質の一つであるビスフェノール A の脳発

達への影響について、曝露によって周生期に発現量が変動する mRNA を cDNA マイクロアレイによって解析した。本年度は、

ビスフェノール A への曝露によって周生期のステロイド産生系がどのような影響を受けるのか、視床下部を中心に調べた。

B. 研究方法

ラットグリア細胞である C6 細胞を実験に供した。培養細胞はテストステロン単曝露、テストステロン+ビスフェノール A 共曝露し、ステロイドホルモン生合成系への影響を調べた。ステロイドホルモンは特に、周生期に分泌の多いデヒドロエピアンドロステロンを基質として、生成される代謝物を HPLC を用いて解析した。

(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. 結果

テストステロン+ビスフェノール A 曝露によって、テストステロン単曝露に比べて、テストステロン前駆体であるア

ンドロステンジオールの生合成経路が活性化されることが明らかとなった。

また、テストステロン単曝露した C6 細胞では、無処置細胞に比べるとアンドロステンジオンの生成量が増加しているが、ビスフェノール A はこの増加を抑制することも明らかとなった。

D. 考察

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。特にアンドロステンジオン、アンドロステンジオールの生合成量の変化から、 3β HSD や 17β HSD 依存の活性に影響を与えることが予測された。

E. 結論

ビスフェノール A 曝露によって周生期のステロイドホルモン合成経路が変化する可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Konomu Saito, Hyung-Sub Kim, Noriaki Sakai, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rat (in press)

2) Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. Arch Toxicol. 2003 Aug;77(8):446-51.

3) 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.

4) Ishizuka M, Yonemoto J, Zaha H, Tohyama C, Sone H. Perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11. J Biochem Mol Toxicol. 2003;17(5):278-85.

5) Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Ishinazaka Tsuyoshi, Sakurai Yasunori. Organochlorine compound accumulation in Steller sea lion *Eumetopias jubatus* migrating along the coast of Hokkaido in northern Japan. Jpn J Toxicol. 2003;6(1):1-10

2. 学会発表

1) 第 135 回日本獣医学会 (平成 15 年春)

① Nakano et al. 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—

② Ibrahim et al. Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

2) 第 30 回 日本トキシコロジー学会

① Nakano et al. 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—

② Sasaki et al. 抗菌剤フラゾリドンと
その代謝物が肝薬物代謝酵素系に与える
影響

3) 環境ホルモン学会 第6回研究発表会

① Joji Tsunada, Mayumi Ishizuka, Akio
Kazusaka and Shoichi Fujita. Transient
neonatal exposure of brain to
testosterone surge initiates
amplification of testosterone
production in astrocytes.

② Naosuke Saji, Mayumi Ishizuka, Akio
Kazusaka, Shoichi Fujita.
Biomonitoring of the Harbor Seawater
Environment in Hokkaido Coast with
Induced Hepatic Cytochrome P450 of
Minnow

4) Annual Meeting of Society of
Environmental Toxicology and
Chemistry in New Zealand

① Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita,
Yoko Goto, Takeomi Isono, Tsuyoshi
Ishinazaka, Vladimir N. Burkanov,
Yasuhiro Sakurai. Organochlorine
pollutions in Steller SeaLions
Eumetopias Jubatus living in the far
eastern waters

② Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka,
Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short
period exposure of di-(2-ethylhexyl)
phthalate regulates testosterone and
arachidonic acid metabolisms in
testis of prepubertal rats

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

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

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

研究協力者 網田丈二 北海道大学・大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座

研究要旨

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。

A. 研究目的

周生期における脳インプリンティングには、アロマターゼ (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。しかし、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。昨年度の我々の研究から、周生期における視床下部のアロマターゼ発現量は、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

本年度は、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。

(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。

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(表 1)。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(表 1)。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。GABA-B 受容体各サブユニットの mRNA 発現レベルの低下は real-time RT-PCR 法によって確認された(図 1)。

一方、鳥類ではテストステロン曝露で発現が増加することが知られているシヌクレインについて、ラットにおいても同様に mRNA 発現レベルが上昇することが明らかとなった。テストステロン曝露によるシヌクレイン発現の増加は低濃度および高濃度の両方で認められた。

D. 考察

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 受容体に加え、GABA-B 受容体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、ラット新生時に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

本研究によって、周生期の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標的因子を同定することができた。特に、これまでに報告のあった GABA-A に加え、GABA-B についても、周生期のインプリンティングによってその発現が抑制されることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Zein Shaban, Samir El-Shazlyb, Mayumi Ishizuka, Kazuhiro Kimura, Akio Kazusaka, and Shoichi Fujita. PPAR

• dependent Modulation of Hepatic CYP1A by Clofibric Acid in Rats (in press)

2) Konomu Saito, Hyung-Sub Kim, Noriaki Sakai, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rat (in press)

3) Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. Arch Toxicol. 2003 Aug;77(8):446-51.

4) Ishizuka M, Yonemoto J, Zaha H, Tohyama C, Sone H. Perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11. J Biochem Mol Toxicol. 2003;17(5):278-85.

2. 学会発表

1) 第135回日本獣医学会 (平成15年春)

① Nakano et al. 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—

② Ibrahim et al. Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

2) 第30回 日本トキシコロジー学会

① Nakano et al. 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—

② Sasaki et al. 抗菌剤フラゾリドンとその代謝物が肝薬物代謝酵素系に与える影響

3) 環境ホルモン学会 第6回研究発表会

① Joji Tsunada, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka and Shoichi Fujita. Transient neonatal exposure of brain to testosterone surge initiates amplification of testosterone production in astrocytes.

② Naosuke Saji, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Biomonitoring of the Harbor Seawater Environment in Hokkaido Coast with Induced Hepatic Cytochrome P450 of Minnow

4) Annual Meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry in New Zealand

① Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Tsuyoshi Ishinazaka, Vladimir N. Burkanov, Yasuhiro Sakurai. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions Eumetopias Jubatus living in the far eastern waters

② Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats

ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats

5) バイオアッセイ研究会・環境毒性学会

① 星野広志、藤田正一、後藤陽子、磯野岳臣、石名坂豪、Vladimir N. Burkanov, 桜井泰憲. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions Eumetopias Jubatus living in the far eastern waters (極東海域に棲息するトドにおける有機塩素系化合物汚染)

③ Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-

Down

- ▣ GABA B receptor 1c,1d,1,2 subunit
- ▣ NMDA receptor
- ▣ Na-Ca exchanger NCX2
- ▣ Kainate receptor 2 subunit
- ▣ Vesicular GABA transporter
- ▣ Dopamine D3 receptor
- ▣ Bcl-x

Up

- ▣ mGluR5
- ▣ Calcineurin A-beta
- ▣ Glutamate-aspartate transporter
- ▣ Monoamine oxidase B
- ▣ L-type calcium channel
- ▣ alpha 2 subunit,beta 2 subunit

表 1. テストステロン曝露によって変化があった主な遺伝子。生後 4 時間後のメスラットにテストステロンを皮下投与し、視床下部における mRNA 発現変動を gene chip を用いて解析した。対照群(コーンオイル投与群)と比較して有意に差があった主な遺伝子を示す。

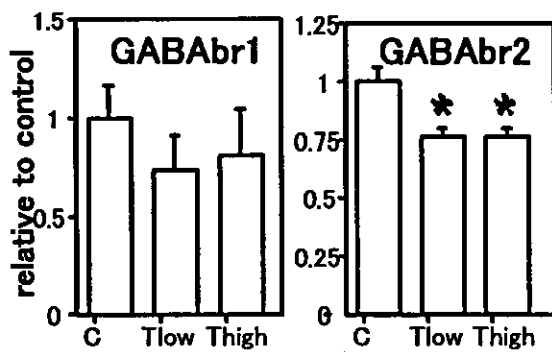


図 1. テストステロン曝露による GABA-B 受容体の視床下部 mRNA 発現レベルの変動。生後 4 時間後のメスラットにテストステロンを皮下投与し、視床下部における GABA-B 受容体サブユニットの mRNA 発現変動を real-time RT-PCR を用いて解析した。T low: テストステロン 100 μ g/匹、T high: テストステロン 1mg/匹。

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 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、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生殖器で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* 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。

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関し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stilbestrol 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を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。

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ズ (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 (図)。

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、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。

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。

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 α 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)

THEIR EFFECT. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

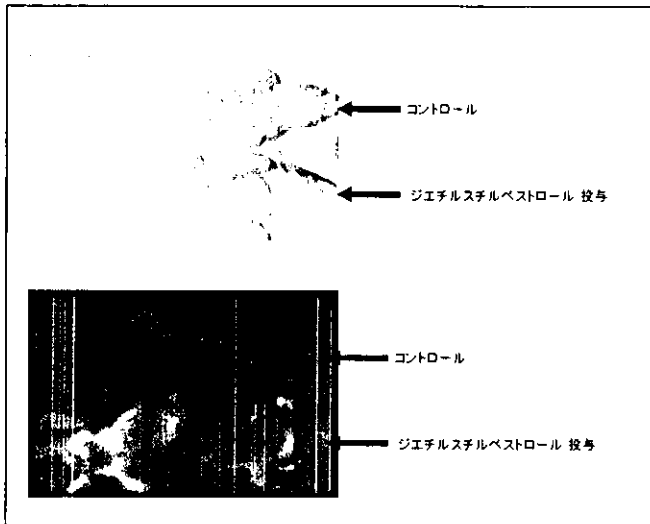
石塚真由美、高菅卓三、谷川力、数坂昭夫、藤田正一、野生ドブネズミに蓄積する環境汚染物質と生体影響の genomics 解析、環境ホルモン学会(2004)

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)

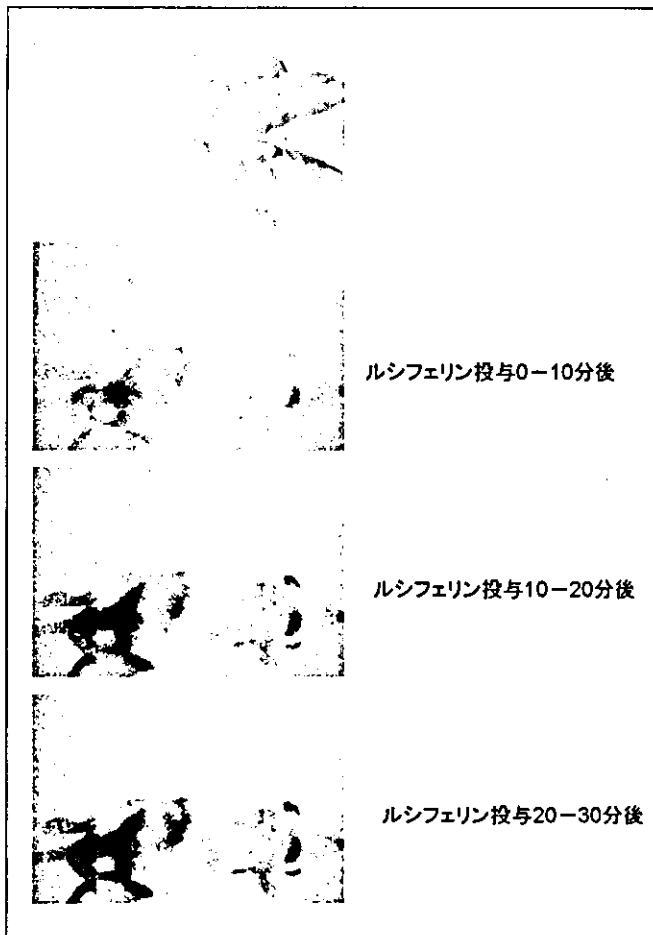
K.M. Muzandu, M. Ishizuka, A. Kazusaka and S. Fujita. POSSIBLE INVOLVEMENT OF PEROXYNITRITE IN ESTROGEN-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND PROTECTIVE ROLE OF CAROTENOIDS. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

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)

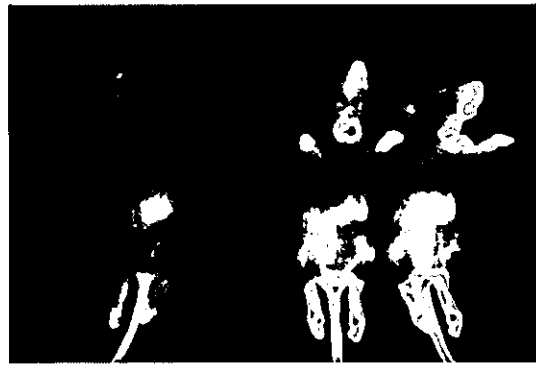
M. Ishizuka, T. Takasuga, T. Tanikwa, S. Fujita. SUPPRESSION OF TESTOSTERONE SYNTHESIS IN TESTES OF WILD NORWAY RATS IN JAPAN: ACCUMULATION OF PERSISTENT ORGANOCHLORINE POLLUTANTS AND POLYBROMINATED DIPHENYL ETHER AND



図上：ジェチルスチ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チルベストールを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。



図下：ジェチルスチ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チルベストールを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、経時的にその発光シグナルについて検出した。ルシフェリン投与30分後まで、ルシフェリンの発光シグナルを検出することができた。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。



コントロール ジエチルステルベ
 ストロール投与群

図上：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。



図上：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。16日齢では、特に、肝臓での強いエストロゲンシグナルが観察された。