

## 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinの絨毛細胞における 糖取り込みに関する研究

分担研究者 遠藤 俊明 札幌医科大学 助教授  
共同研究者 斉藤 豪 札幌医科大学 教授  
林 卓宏 札幌医科大学 講師

### 研究要旨

妊娠絨毛細胞モデルとして絨毛癌株を用いてTCDD添加実験を行い、m-RNAおよび蛋白レベルでのglucose transport protein (GLUT)発現につき検討した。TCDD添加により、GLUT蛋白発現には影響を認めなかったものの、一時的ではあるがGLUT1 m-RNA発現は抑制された。これらの結果から、環境ホルモンの胎盤に対する糖輸送能の微妙な変化は、正常な胎児発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

### A. 研究目的

環境ホルモンの一種である

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD)は、その摂取によりベトナム戦争軍人の統計から、2型糖尿病との関連が報告されている。また、血中のTCDDが高濃度の群では、糖尿病を発症しなかった場合でも高インスリン血症を示し、いわゆるTCDDによるインスリン抵抗性の存在が推測されている。

現在我々の生活においてもTCDDは日常的に食物から経口摂取されており、血中脂質TCDD濃度は2.5 pptときには10ppt を超える場合もあるとされている。10-15 pptを超えると、インスリン抵抗性の出現可能性が高まると報告されている。

胎盤は胎児の発育のために、母体から栄養分および酸素を運搬する重要な臓器であるが、特に母体糖分は胎児にとって重要な栄養源である。同時に、胎盤の機能を維持するためには大量の糖分を必要とすることから、胎盤は糖要求性の高い臓器であるといえる。マウスの実験では、TCDDを投与することによりグリコーゲンの生成が増加し胎盤の胎児への糖輸送能が低下、遅れてglucose transport protein(GLUT 3) m-RNAの発現が

変化し、胎盤への糖取り込みも変化することにより胎盤の糖輸送能のかく乱を生じて、最終的に胎児の発育異常や子宮内死亡に至ると報告されている。従ってヒト妊婦の場合でも、日常的にTCDDの暴露を受けた場合に、胎盤の糖輸送能に変化を及ぼし、胎児の発育状況に悪影響を与える可能性が考えられる。

今回我々は、妊娠絨毛細胞モデルとして絨毛癌株を用いてTCDD添加実験を行い、m-RNAおよび蛋白レベルでのGLUT発現につき検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 細胞培養法

絨毛癌細胞株 JAR, JEG-3を10% fetal bovine serum加RPMI1640にて培養。単離浮遊細胞を10cmディッシュに $1.0 \times 10^5$  cells 37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベータ内で2日間培養後、DMSOに溶解したTCDDを濃度10nM添加し培養0, 24, 48時間後の上清ならびに細胞を回収した。なお、コントロールとして同量のDMSOを加えた培養液で同様に添加・培養した。

#### 2. 上清β-hCG測定

培養細胞の分化程度を決定するため、β-hCG RIAキットを用いて得られた上清の濃度を測定

した。

### 3. RT-PCR

培養細胞をISOGENにて処置し、その溶解液から total RNA を採取。これら 5  $\mu$ g RNA から DNase 1 による m-RNA 精製後、random oligodeoxynucleotide primers を用い一本鎖 cDNA を作成し PCR を施行した。PCR 条件は 95°C, 5 min の後、95°C, 60°C, 72°C それぞれ 30 sec を 35 サイクルの後 72°C, 7 min とした。

今回用いたプライマーは

GLUT1: NM006516, left primer (1489-1509)

5'-TCACTGTGCTCCTGGTTCTG-3',

right primer (1721-1741)

5'-CCTGTGCTCCTGAGAGATCC-3',

product size 233bp, GLUT3: NM006931, left primer (1548-1568)

5'-ACCGGCTTCCTCATTACCTT-3', right primer (1706-1726)

5'-AGGCTCGATGCTGTTTCATCT-3',

product size 159bp で housekeeping 遺伝子として  $\beta$  アクチンを用いた。

### 4. Western analysis

超音波破碎を行った細胞溶解から蛋白質を抽出し 1 x SDS サンプルバッファーに溶解した 100  $\mu$ g を電気泳動、膜トランスファーの後 GLUT1, 3 各種抗体を作用させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合二次抗体を作用し、 $\beta$  アクチンを基準にし NIH image にて画像解析した。

## C. 研究結果

### 1. 細胞増殖および $\beta$ hCG 分泌量

JAR 細胞株では、添加 0 時間後の細胞数と比較し、いずれの条件でも添加 24 時間後には約 2.7 倍、48 時間後には約 5 倍の細胞増殖を認めた(図 1)。JEG-3 細胞株でも同様に、添加 0 時間後の細胞数と比較し、いずれの条件でも添加 24 時間後に約 2 倍、添加 48 時間後に約 4 倍の細胞増殖を認めた(図 2)。以上より JAR および JEG-3 細胞株どちらも TCDD 添加による細胞数増加に対する変化は認めなかった。

次に、JAR 細胞株の細胞数  $10^5$  個あたりの  $\beta$  hCG 分泌量を検討したところ TCDD 1nM 添加 24 時間後でコントロールと比較し 1.4 倍、TCDD 10nM 添加では 1.6 倍の分泌量増加を認めた。しかしながら 48 時間後では、いずれの濃度においてもコントロールと同様の分泌量となった(図 3)。JEG-3 細胞株ではいずれの濃度・添加時間でもコントロールと比較し変化はなかった(data not shown)。

### 2. GLUT1 および 3 m-RNA の発現

JAR 細胞株において、TCDD 1nM と 10nM 添加 24 時間後において、両者共に GLUT1 m-RNA 発現抑制を観察したが、添加 48 時間後には両者ともにコントロールの発現と同等に復帰した(図 4)。JEG-3 細胞株では、TCDD 添加による変化は認めなかった(data not shown)。GLUT3 m-RNA 発現は両細胞株共に添加条件・時間に依存せず同様に発現が認められた(data not shown)。

### 3. GLUT1 および 3 蛋白の発現

GLUT1 および GLUT3 蛋白の発現はどちらの細胞株、添加条件においてもほぼ同様発現が認められた(data not shown)。

## D. 考 察

TCDD 添加による細胞増殖能の変化は JAR および JEG-3 両細胞株で認めなかったが、細胞あたりの  $\beta$  hCG 分泌量においては JAR 細胞株の添加 24 時間で増加を認めることから、TCDD は細胞増殖には影響がないものの細胞分化の面では一時的に分化促進に働く傾向のあることが示唆された。

GLUT1 m-RNA 発現に関しては、JAR 細胞株で TCDD 添加 24 時間後に抑制が観察されたことより、TCDD による糖輸送能の抑制作用が考えられた。しかしながら、TCDD 添加 48 時間後には GLUT1 m-RNA の発現はコントロールと同様に復帰していることより、その抑制は一時的であることが考えられた。また、GLUT3 m-RNA 発現において、今回用いた TCDD 濃度・作用時間では変化のないことから、TCDD の GLUT に対する作用はその isoform により違いのあることが考えら

れた。

一方で、GLUT1および3蛋白発現に変化が認められなかったことから、細胞全体としてのGLUT蛋白発現量は変わらないと考えられた。しかしながら、細胞内GLUT蛋白量が同じであっても細胞膜GLUT蛋白局在が多い場合、機能的に糖輸送能が活発であると考えられる。従って、今後はGLUTの細胞膜局在の評価、すなわちGLUT translocationについての検討が必要であると思われた。

## E. 結 論

TCDD添加により、GLUT蛋白発現には影響を認めなかったものの、一時的ではあるがGLUT1 m-RNA発現は抑制された。これらの結果から、環境ホルモンの胎盤に対する糖輸送能の微妙な変化は、正常な胎児発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表  
準備中

## H. 知的所有権の取得状況

なし

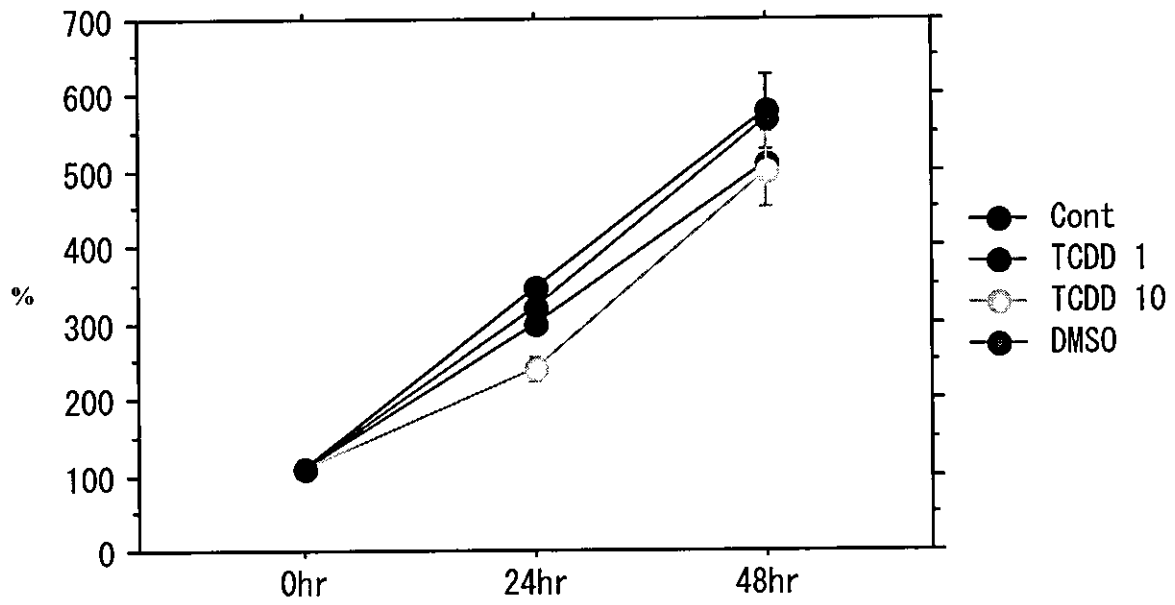


図1 JAR 細胞増殖曲線

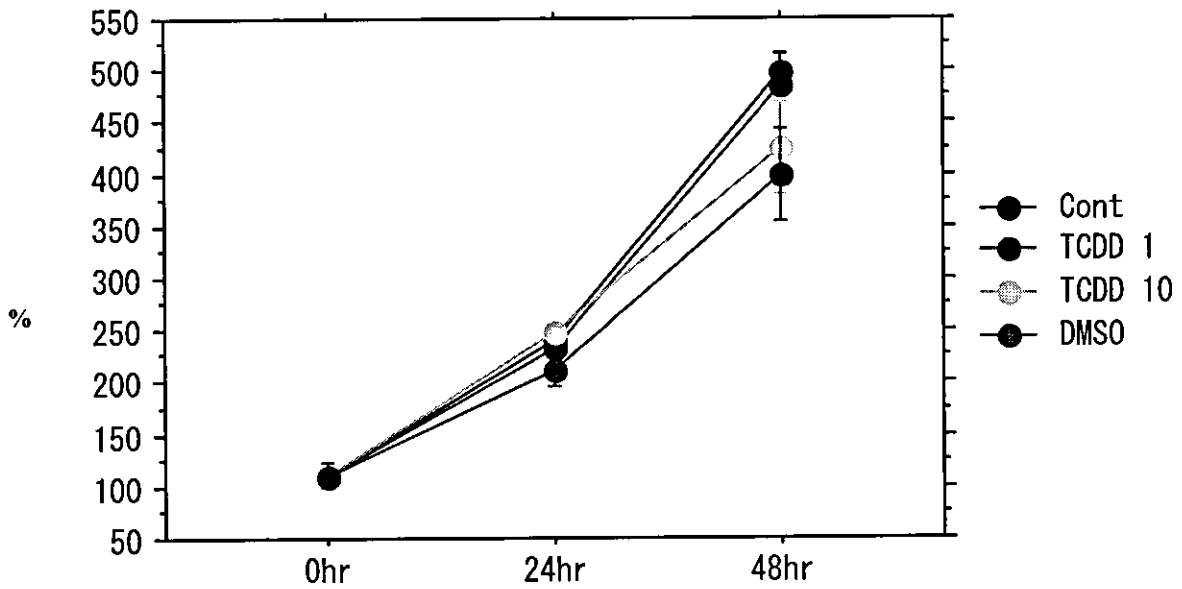


図2 JEG-3 細胞増殖曲線

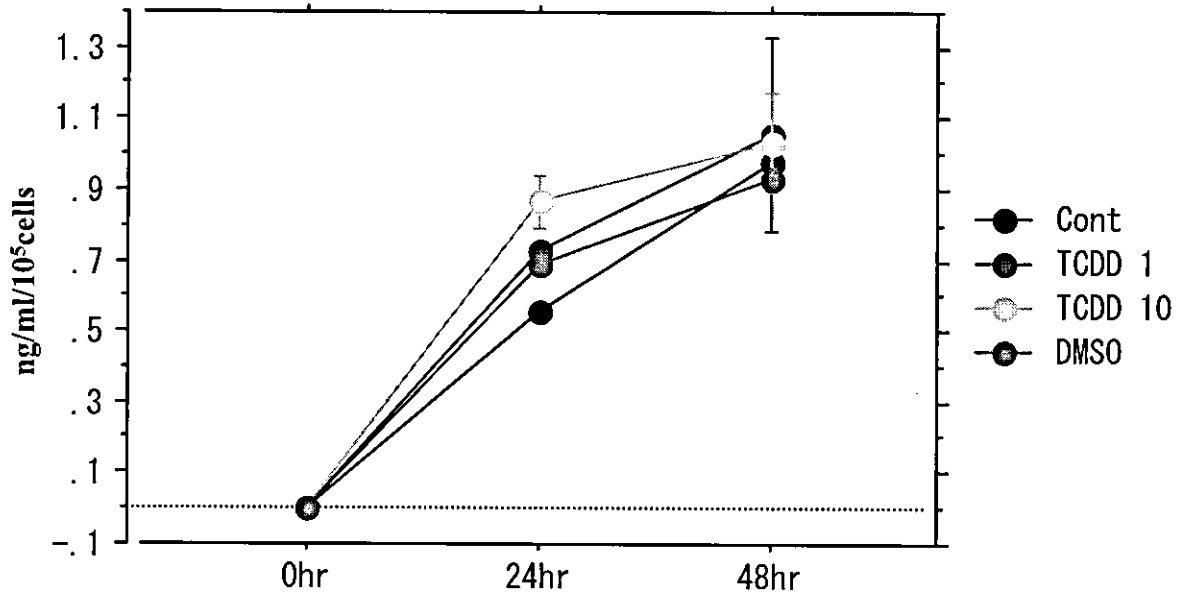


図3 JAR 10<sup>5</sup>細胞あたりのβ-hCG分泌量

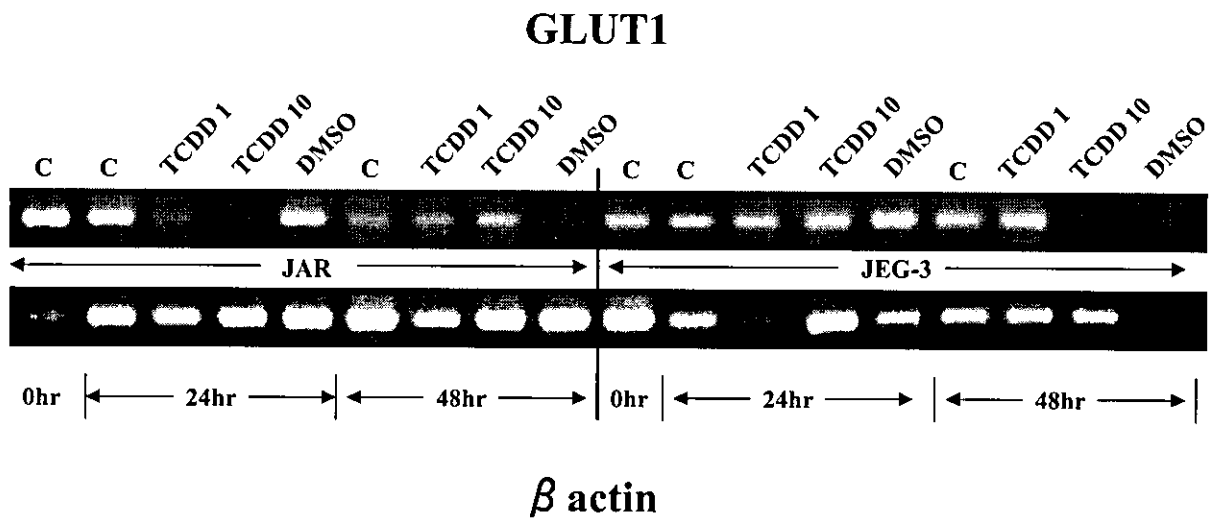


図4 TCDD添加JARおよびJEG-3細胞におけるGLUT1発現の経時的変化

## 婦人科疾患（良性卵巣腫瘍）患者における ダイオキシン類の汚染状況に関する検討

分担研究者 石川 睦男 旭川医科大学産婦人科 教授  
研究協力者 田熊 直之 旭川医科大学附属病院 助教授  
山下 剛 旭川医科大学産婦人科 講師

### 研究要旨

ダイオキシン等の内分泌攪乱物質と子宮内膜症の関連に関して、我々は平成 11-13 年度厚生科学研究（生活安全総合研究事業）において検討してきた。その事業の一つである簡便なダイオキシン類の測定に関して CALUX 法（株式会社日吉）が有用かつ安価であることを報告した。今回我々は CALUX 法を用い、婦人科疾患患者におけるダイオキシン類を実際に測定し、その汚染状況と婦人科疾患の関連について検討する。

### A. 研究目的

各種卵巣腫瘍の発症にダイオキシン類が関与するか否かを実際に生体（皮下脂肪）に蓄積されているダイオキシン類濃度を測定し検討する。

### B. 研究方法

子宮内膜症性嚢胞を含む卵巣腫瘍患者において、当科で核出手術、あるいは摘出手術を施行した患者から文書で同意を得、術中に創部（下腹部）の皮下脂肪約 1 グラムの供与を受け、CALUX 法にてダイオキシン類濃度を測定した。全てのサンプルは匿名化（ナンバー化）され、個人が特定できないようにデータファイルされた。

### C. 研究結果

現在（平成 14 年度末）までに 21 症例を測定しそのダイオキシン類濃度の平均値は 24.92 (pgTEQ/gfat)であった。また、現段階で子宮内膜症患者とその他の良性卵巣腫瘍患者の間で、ダイオキシン類濃度に有意な差は認められなかった。

### D. 考 察

今回測定した良性婦人科疾患におけるダイオキシン類濃度の平均値は CALUX 法及び、HRGCMS 法にて男女無作為に測定した株式会社日吉の資料と比較して、現在のところ特に有意差は認められていない。また各種卵巣腫瘍毎の比較

は症例数を増やした上での今後の課題である。さらに今後は良性卵巣腫瘍のみならず、卵巣癌などの悪性腫瘍患者においても測定値の検討を加える予定である。

### E. 結 論

生体に蓄積されているダイオキシン類汚染状況からみた現在までの検討において、婦人科疾患（良性卵巣腫瘍）にダイオキシン類が関与している可能性は見いだされなかった。

### F. 健康危険情報

特記なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

第 47 回日本不妊学会

岐阜 (10/2-4/02)

シンポジウム

内分泌攪乱物質と生殖生理

アリル炭化水素レセプター系

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## 新たなヒト無精子症の原因遺伝子であるヒト SYCP3 遺伝子同定に関する研究

分担研究者 石川 睦男 旭川医科大学医学部附属病院長

### 研究要旨

近年、女性の社会進出に代表される結婚年齢の高齢化等の社会的な要因に伴い、不妊に悩む夫婦の割合が増加の一途をたどっている。今日までの不妊治療のめざましい進歩により、不妊治療の成果は着実に進歩しているものの、男性不妊症、特に成熟精子を全く有してない、いわゆる無精子症は現在でも不妊治療の大きな壁となっている。男性不妊症は社会の高度化等による現代人のストレス、また化学物質等により精子数が減少する等の報告により、今後ますます増加することが推定されている。ヒト無精子症の原因として以前より、Y染色体上の部分的欠失ことに AZF (azoospermia factor) 領域の欠失が報告されているが、今日までこの AZF 領域においてヒト無精子症の原因遺伝子として明らかとされたのは、わずか3つにすぎない。今回我々はヒト12番染色体上に新たな無精子症原因遺伝子 SYCP3 の同定に成功した。

### 【研究協力者】

宮本 敏伸

(旭川医科大学産婦人科助手)

田熊 直之

(旭川医科大学附属病院助教授)

山下 剛

(旭川医科大学産婦人科講師)

### (倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、全てのサンプルは匿名化(ナンバー化)され、個人が特定できないようにデータファイルされた。

### A. 研究目的

Sycp3 遺伝子のノックアウトマウスは発達上正常である。しかしながら、精子形成過程における減数分裂異常により、無精子症を示すとの報告をもとに、ヒト SYCP3 遺伝子の同定及びヒト無精子症での解析を行う。

### B. 研究方法

マウス Sycp3 cDNA をもとに、ヒト精巣 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、ヒト SYCP3 cDNA を単離し、その後減数分裂異常により、無精子症を呈している不妊症患者 19 名から文章による同意をもとに遺伝子異常の検索を行った。

### C. 研究結果

ヒト SYCP3 遺伝子は減数分裂異常により無精子症を呈している不妊症患者 19 名中 2 名の患者に 1 塩基のみの欠失を認め、これが蛋白レベルでの機能異常を呈していることを明らかにした。

### D. 考察

我々はヒト SYCP3 遺伝子はその点突然変異により、無精子症を呈することを明らかにしたが、特筆すべき点はヒト SYCP3 遺伝子は常染色体であるヒト 12 番染色体に位置している点である。今日まで世界的に報告されてきたヒト無精子症の原因遺伝子 3 つは全て Y 染色体上の AZF 領域に存在する。ヒト SYCP3 遺伝子は AZF 領域以外で証明された最初の無精子症原因遺伝子である。

### E. 結論

我々は新たなヒト無精子症の原因遺伝子

SYCP3 を同定した。また AZF 領域以外にもさらに無精子症原因遺伝子が存在することを示唆した。今後は化学物質と無精子症との関連についても解析を進めて行く予定である。

## F. 健康危険情報

特記なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, Lamb DJ. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. Lancet 362: 1714-1719. 2003

### 2. 学会発表

第 55 回日本産婦人科学会

福岡 (04/12-15/03)

ヒト SYCP3 遺伝子の単離およびその機能解析

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし。



## 精子形成に関与するヒト精巣特異的遺伝子の同定

分担研究者 石川 睦男 旭川医科大学医学部附属病院長

### 研究要旨

最近までの不妊治療のめざましい進歩により、女性不妊因子の治療成果は着実に進歩しているものの、男性不妊症に関しては現在でも不妊治療の大きな壁となっている。男性因子は遺伝的原因の他にも社会の高度化による現代人のストレス、また環境化学物質等が関与しているという報告もあり、今後ますます増加することが推測される。今回我々は精子形成に関与すると予想されるヒト精巣特異的遺伝子の同定を試みた。

### 【研究協力者】

宮本 敏伸（旭川医科大学産婦人科助手）  
田熊 直之（旭川医科大学附属病院助教授）  
佐々木禎仁（旭川医科大学産婦人科医員）

### A. 研究目的

最近、マウスおよびラットにおいて精巣特異的に発現する遺伝子が数多く同定されており、2002年のEMBO reportの報告に、マウスにおいて精巣特異的に発現するとされる80個におよぶTISP遺伝子が発表された。しかしながら現在のところヒトにおいてはまだそれほど多くの精巣特異的遺伝子は同定されていない。今回我々は本研究によってヒト精巣特異的遺伝子の同定を試みた。

### B. 研究方法

マウスの80個のTISP遺伝子の中からGenBankよりヒトと相同性の高い配列を検索した。指摘された相同部位にプライマーを設定し、ヒト組織（15臓器）のcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、精巣特異的なcDNAの同定を試みた。精巣特異的とされた遺伝子に関して3'RACE, 5'RACEを行いfull lengthの解析を行った。またアミノ酸レベルにおいてマウスとの相同性の比較を行なった。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する

倫理指針を遵守し、全てのサンプルは匿名化（ナンバー化）され、個人が特定できないようにデータファイルされた。

### C. 研究結果

80個のマウスTISP遺伝子からヒトと相同性の高い28個のヒトTISP 遺伝子について解析を行った。3個のみ精巣優位に発現し、5個については精巣自体にも発現がみられず、残りは精巣も含め他臓器で発現をみるものが多かった。今回、精巣特異的とされたTISP15, 43, 50の3個についてcDNAを解析し、TISP50についてはfull lengthを同定し、またアミノ酸レベルにおいてマウスとの相同性も83%と高かった。TISP15, 43についてはpartialながら同定した。

### D. 考 察

本研究によりヒトとマウスの間でTISP遺伝子の発現パターンには、かなりの差異があることが示された。報告の中で述べられている遺伝子のうちヒトでは一部のみ精巣特異的であることが示唆された。今回、ヒト精巣特異的とされたTISP15, 43, 50の3遺伝子は、その発現パターンとアミノ酸配列より精子形成への関与が予想された。

### E. 結 論

今後は実際の乏精子症や無精子症の症例におい

て発現パターンの解析を行い、さらに環境化学物質等が精子形成不全に遺伝子レベルで関与するか否かを検討する。

## F. 健康危険情報

特記なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Sasaki Y, Miyamoto T, Sengoku K, Hayashi H, Takuma N, Ishikawa M. The human transcript induced in spermatogenesis 50. ; Reproductive Medicine and Biology 2004; 3: 237-243.

### 2. 学会発表

[ヒト精子特異的遺伝子であるTISP 50, TISP 15, TISP 43についての解析]

9月10日～11日 第52回北日本産科婦人科学会  
(札幌)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし。

## cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価 1

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

### 研究要旨

シトクロム P450 (P450, CYP) は広範な生物種に存在し、生理活性物質の生合成や、医薬品・環境汚染物質などの代謝排泄に関与する、生体のホメオスタシス維持の為に重要な酵素である。P450 には様々な分子種が存在するが、P450 の遺伝多形によって、薬物を中心とした外来異物のクリアランス、毒性発現が異なることが報告されている。そこで、本研究では、異物代謝酵素群及びその調節因子の遺伝的多形を一度に解析するために、新規マイクロアレイの開発を試みた。

また、フタル酸エステルは、胎児期曝露によって尿道下裂など、生殖器の形成異常を引き起こすことが実験動物で報告されている。しかし、フタル酸エステルがどのような経路で精巣毒性を引き起こすのかについては不明な点も多い。そこで、実験動物にフタル酸エステルを投与し、精巣毒性発現のメカニズムについて調べた。ジブチルフタル酸 (DBP) の毒性発現機序を明らかにするため、マイクロアレイ法を用いて、精巣で変動する遺伝子群のスクリーニングを行った。DBP 曝露では、精巣において、CYP4 ファミリーを中心として、約 110 遺伝子の発現が上昇することが明かとなった。一方、ジエチルヘキシルフタル酸 (DEHP) に関しては、PPAR $\alpha$  を介して毒性を発現することが PPAR $\alpha$  ノックアウトマウスなどの報告から分かっている。そこで、DEHP が精巣のホメオスタシス、特に、テストステロン生合成および代謝にどのような影響を与えるのかについて調べた。DEHP 曝露ラットについて、テストステロン生合成に関与する 17 $\beta$ HSD 活性に変動は見られなかったが、テストステロン水酸化を行う P450 や、テストステロン活性型であるデヒドロテストステロンを産生するステロイド 5 $\alpha$  還元酵素の発現及び活性が上昇することが分かった。また、精子形成・維持など精巣のホメオスタシスに不可欠なエストロゲンを産生するアロマターゼに関しては、DEHP 曝露で mRNA レベルが減少することが明かとなった。

### 【研究協力者】

数坂 昭夫

(北海道大学大学院獣医学研究科助教授)

石塚真由美

(北海道大学大学院獣医学研究科助手)

### A. 研究目的

P450 は細菌、植物から哺乳類まで多くの生物種に存在し、ステロイドホルモンやビタミン、エイコサノイドなどの生理活性物質の生合成・代謝を行うと同時に、医薬品や環境汚染物質など、多くの外来異物代謝も担っている一酸素添加酵素である。P450 には様々な分子種が存在し、哺乳類では数百に及ぶ分子種が報告されている。一方で、

P450 に存在する遺伝的多形は、薬物の薬効・毒性を決定することが知られている。例えば、CYP2D6 はヒトにおいて、肝臓における総 P450 発現量の 2-10% を占めているに過ぎないが、ヒト臨床に用いられる薬物の 3 割以上に関与するため、薬物の薬効を決定する重要な酵素である。同時に、CYP2D6 依存の薬物代謝活性は日本人や中国人において白人よりも低く、その低活性の原因が遺伝的多形 (主に CYP2D6\*10) に起因することも報告されている。

また、P450 そのものではなく、その発現調節機構が原因で、P450 発現レベルに差が現れることもある。DA ラットは、ヒト CYP2D サブファミリー-poor metabolizer (PM) モデル動物であるが、近年の我々の研究から、CYP2D1 mRNA だ

けではなく、肝臓において薬物代謝活性の主体となっている CYP2D2 mRNA 発現レベルも顕著に抑制されていることが明かとなった。実際、CYP2D2 低発現によって、DA ラットでは、デブリソキンやブニトロロール、プフラロールなど、多くの薬物代謝に関して低活性であることが分かっている。

このように、P450 及びその制御機構に存在する遺伝多形は、外来異物のクリアランスを決定する重要な要素となっている。P450 は薬物だけではなく、喫煙物質や食物由来の外来異物も代謝するため、CYP1A1 遺伝多形と肺癌、CYP1B1 遺伝多形と大腸癌発生率との関係も報告されている。P450 の中でも、CYP1、CYP2、CYP3、CYP4 ファミリーは様々な外来異物代謝に関与することが知られており、ダイオキシン類や多環芳香族、PCB、農薬などを代謝する。外来異物代謝 P450 分子種の調節因子として、AhR (aryl hydrocarbon receptor) や PXR (pregnane X receptor)、CAR (constitutive androstane receptor)、PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) が知られているが、これらの受容体群は、ダイオキシン類や PCB、フタル酸エステルなどのリガンド受容体にもなっている。しかし、これまで、外来異物の中でも、環境汚染物質の感受性に対して、P450 及びそのレギュレーター遺伝多形がどの様に関与するのかについての報告は少ない。環境汚染物質は、フタル酸エステルのように、胎児期・新生児期のあるクリティカルな期間の短期曝露によって、尿道下裂などの先天異常を引き起こすことが動物実験で示されている。尿道下裂や精巣停留は比較的発生率の多い生殖器先天異常であるが、胎児期におけるテストステロン生合成、テストステロンからデヒドロテストステロン(DHT)への変換活性、アンドロゲン受容体の標的遺伝子転写活性機構になんらかの障害が起こることで発生する。動物実験や細胞実験では、ダイオキシン類やビスフェノール A による P450 テストステロン代謝異常、アンドロゲン受容体活性化阻害が報告されている。

そこで、本研究では、P450 の発現変動や遺伝多形が環境汚染物質を含む様々な外来異物の毒性発現にどの様に関与しているのかを明らかにする。

本年度は、外来異物を代謝する P450 をはじめとする代謝酵素群とその調節因子の遺伝多形を解析するために、マイクロアレイの開発を行う。また、先天異常の尿道下裂や精巣停留の原因となる精巣におけるテストステロン生合成や代謝・毒性発現に、環境汚染物質、特に内分泌攪乱化学物質であるフタル酸エステルがどのような影響を及ぼすのかについて、動物実験から明らかにした。フタル酸エステルとして、一般的に使われるフタル酸ジブチル (DBP) とジエチルヘキシルフタル酸 (DEHP) を用いた。これらのフタル酸エステルは、細胞実験や動物実験から、曝露によって精子細胞の脱落、セルトリ細胞の空胞化、精巣萎縮を特徴とする精巣障害が認められ、妊娠ラットへの曝露では尿道下裂なども報告されている。

DBP を投与したラット肝臓において P450 分子種の一つ CYP4A の発現が増加することから、フタル酸ジブチルもしくはその代謝物は PPAR に結合して生体に作用することが考えられるが同定はされていない。昨年度までの我々の研究で、フタル酸ジブチルが PPAR  $\alpha$  及び  $\beta$  の signal pathway を経由している可能性が考えられた。そこで、PPAR  $\alpha$ 、 $\beta$  に選択性の高いリガンドをラットに投与して、精巣を用いてマイクロアレイによる解析を行い、DBP による精巣毒性発現メカニズムの解明を試みた。

一方で、同じフタル酸エステルである DEHP に関しては、既に PPAR  $\alpha$  に結合して毒性を発現することが知られている。しかし、DEHP がどのようにして精巣毒性を引き起こすのか、そのメカニズムについては不明な点が多い。特に、精巣の重要な機能のひとつであるテストステロン産生・代謝機構に DEHP が及ぼす影響についてはこれまで報告がない。そこで、精巣未発達の実験動物に DEHP を投与し、DEHP がテストステロン代謝・生合成にどのような影響を及ぼすのかを明らかにした。

## B. 研究方法

### 1. 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

薬物代謝酵素に存在する遺伝的多形を簡便に調べる為に、マイクロアレイを用いた方法の開発を試みた。マイクロアレイ法ではサーマルサイクラー以外の特殊な機械を必要とせず、発色によって変異アレルを検出することができ、また、一度に多数の遺伝子について調べることができる。また、PCR 簡略化によって、PCR-RFLP 法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができる可能性がある。

そこで、P450、GST（グルタチオン抱合酵素）などの薬物代謝酵素から、日本人に多形が多い変異アレルを選定し、マイクロアレイの作成を行う。

### 2. フタル酸エステルが精巣に及ぼす影響

#### 2-1) DBP による精巣毒性のメカニズム解明

フタル酸ジブチル (DBP: 500mg/kg)、コントロールとしてコーンオイル、そして、PPAR $\alpha$  のリガンドとして clofibrate (30mg/kg)、PPAR  $\beta$  のリガンドとして 2-bromohexadecanoic acid (2BR16C: 10mg/kg) を 7 週齢オスおよびメスラット (Wistar 系) 4 匹ずつ、計 10 群 (オス、メス 5 群ずつ) に 1 週間、連続経口投与した。1 週間後、精巣において、フタル酸ジブチルおよび PPAR $\beta$  リガンド 2BR16C 投与群の mRNA 発現プロファイルや発現レベルがどのように変動するか、その作用機構を比較検討する為 cDNA マイクロアレイを用いて調べた。

#### 2-2) DEHP テストステロン代謝に及ぼす影響

Wistar ラットオス 3 週齢にフタル酸エステルであるジエチルヘキシルフタル酸 (DEHP) を 0、100mg、1000mg/kg/day で 5 日間経口投与し、精巣におけるテストステロン代謝活性にどのような影響を及ぼすのかを調べた。テストステロン生合成に関与する 17 $\beta$ HSD、活性型テストステロン DHT 生合成に関与するステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素、また、テストステロンを水酸化し、テストス

テロンのクリアランスに関与する CYP3A 及び CYP2C11、テストステロンをエストロゲンに変換する CYP19 (アロマターゼ) などについて発現や代謝活性を HPLC-UV やウェスタンブロットティング法、RT-PCR 法を用いて測定した。血中テストステロン濃度は ELISA 法により解析した。

## C. 研究成果

### 1. 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

P450 は CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調節因子として、GSTM1、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR の 11 遺伝子、の 32 アレルをリストアップした (Table1)。

変異場所の増幅に PCR を用いるため、現在、多数 primer を用いた PCR 法の条件設定を行っている。現在、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2C19、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR に関しては、primer の作成と、PCR・ハイブリ条件の設定が終了している。

### 2. フタル酸エステルが精巣に及ぼす影響

#### 2-1) DBP による精巣毒性経路の同定

DBP 曝露によって、精巣では、ホスホリパーゼや G 蛋白、hormone receptors、VEGFR1 (vascular endothelial growth factor receptor 1) や TGF $\beta$  (transforming growth factor beta) 受容体など growth factor 関連分子あるいは oncogene、proto-oncogene、tumor suppressor、また、カリウムチャネルを始めとする ion channels など、約 110 遺伝子の発現レベルが上昇することが分かった (Table 2)。DBP 投与によって、肝臓で発現が誘導されることが知られているシトクロム P450 分子種の一つ、CYP4A3、CYP4A8 など CYP4A サブファミリー mRNA は、精巣においても発現レベルが 3.0-3.6 倍に増加していた。COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) と PPAR は相互的に転写活性化すること

が報告されているが、今回の結果でも、DBP 投与群では COUP-TFI の発現量が増加していることが明らかとなった。また、今回のマイクロアレイ解析から、DBP 曝露がホスホリパーゼ C isoform である  $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\beta$  のいずれの発現レベルも上昇させることが明らかとなった。また DBP 投与によって、数種のカルシウム結合蛋白の発現量が増加しており、DBP がこの系の活性化に影響する可能性が示唆された。

一方、2BR16C 投与群では約 180 遺伝子の発現レベルが上昇した。DBP と 2BR16C 投与群の両群のラット精巣に発現する mRNA の発現頻度を比較すると、両群において発現量が増加する共通遺伝子は約 20 種であった。

#### 2-2) DEHP が精巣テストステロン代謝に及ぼす影響

DEHP 曝露によって血中テストステロン濃度は減少した (Figure 1)。そこで、精巣においてテストステロン生合成に関与する  $17\beta$ HSD 活性を測定した (Figure 2)。これまで  $17\beta$ HSD 発現が減少するとの報告があったが、今回の結果では、 $17\beta$ HSD 活性に大きな変化は認められなかった。

テストステロン水酸化酵素である CYP3A 及び CYP2C11 はそれぞれ肝臓において  $6\beta$  位水酸化、 $16\alpha$  位水酸化を行う。今回の結果から、テストステロンの精巣における主要な水酸化代謝物は、肝臓と同様に  $6\beta$  位水酸化体および  $16\alpha$  位水酸化体であることが分かった。DEHP 投与によって、精巣の CYP3A2 および CYP2C11 は蛋白レベルで発現が上昇し、それに伴ってテストステロン水酸化活性も増加することが明らかとなった (Figure 3-4)。また、CYP3A2 および CYP2C11 依存の活性であることが分かっているジアゼパム 3 位水酸化、N 脱メチル化活性についても、同様に測定を行った (Figure 5)。ジアゼパム代謝活性は、それぞれ、CYP3A2、CYP2C11 蛋白発現レベル、および、テストステロン代謝活性レベルに一致していた。

$5\alpha$  還元酵素はテストステロンをよりアンドロ

ゲン受容体への結合性が強い DHT に変換する。DHT 感受性は精巣よりも前立腺で顕著とされている。また、肝臓においても  $5\alpha$  還元酵素が発現することが報告されている。今回の結果から、精巣における  $5\alpha$  還元酵素活性は、DEHP 曝露によって上昇することが明らかとなった (Figure 6-B)。しかし、肝臓における  $5\alpha$  還元酵素活性は DEHP によって変動を受けなかった (Figure 6-A)。

CYP19 (アロマトラーゼ) は P450 分子種のひとつで、アンドロゲンをエストロゲンに変換する。CYP19 ノックアウトマウスは性行動に不可欠であり、また、精巣のエストロゲンは精子形成・維持に重要であることが最近の研究で報告されている。今回の結果では、DEHP 曝露は精巣の CYP19 mRNA 発現レベルを減少させることが明らかとなった (Figure 7)。

## D. 考 察

### 1. フタル酸エステルによる精巣毒性発現機序の解明

#### 1-1) DBP 曝露による精巣 mRNA 発現変動のスクリーニング

DBP 投与によって、肝臓で発現が誘導されることが知られている CYP4A サブファミリー mRNA は、精巣においても発現レベルが増加していた。CYP4 ファミリーは PPAR $\alpha$  によって主にその発現が調節されていることが報告されている。フタル酸エステルの一つ DEHP は PPAR $\alpha$  に結合し、受容体を活性化することが報告されているが、DBP も同様に PPAR $\alpha$  を活性化することが考えられた。また、DEHP は PPAR $\alpha$  結合するが、代謝されると MEHP となり、PPAR $\gamma$  を活性化することが既に報告されている。DBP は DEHP 同様、代謝されてモノブチルフタル酸 (MBP) に変換される。今回の実験において、マイクロアレイ解析では、発現レベルの変動する遺伝子群は、DBP 投与群と PPAR $\beta$  リガンド投与群の精巣において一部重なり、一部異なっていた。特に、マイクロアレイ解析から、DBP あるいは PPAR $\beta$  リガンド投与によって、精巣で変動する

共通mRNA が 20 遺伝子同定された。従って、DBP が精巣において PPAR $\alpha$  を活性化するだけでなく、DBP 代謝物が他の PPAR アイソフォームを活性化する可能性も考えられた。

#### 1-2) DEHP 曝露による精巣テストステロン代謝への影響

DEHP 曝露によって、精巣におけるテストステロンの代謝活性が変動することが明らかとなった。

一方で、今回の DEHP 曝露結果によって、精巣でエストロゲン産生酵素である CYP19 mRNA 発現レベルが減少することが分かった。PPAR $\gamma$  リガンド thiazolidinediones の一種 troglitazone はエストロゲン産生酵素・アロマターゼ (CYP19) のプロモーター領域において、PPAR $\gamma$  を介して、アロマターゼの転写活性を阻害することが報告されている。一方、ゼブラフィッシュでは、CYP19 の 5' 領域に PPAR $\alpha$  結合サイトが存在し、実験動物に対する PPAR $\alpha$  リガンド WY-14643 の投与は CYP19 発現レベルを上昇させることが分かっている。DEHP は PPAR $\alpha$  のリガンドであるが、その代謝物 MEHP (モノエチルヘキシルフタル酸) はアロマターゼ発現レベルを転写レベルで抑制することが報告された。従って、PPAR $\alpha$  リガンドが代謝を受け、代謝物が PPAR $\gamma$  など他の PPAR isoform に結合し、その機能を活性化あるいは阻害してステロイド合成あるいはその代謝に影響を及ぼす可能性が考えられる。

### E. 結 論

精巣におけるフタル酸エステル曝露は、DBP、DEHP とともに、PPAR $\alpha$  を活性化させ、同時に、その代謝物が他の毒性発現経路を活性化させることが考えられた。また、DEHP 曝露によって、精巣のステロイド代謝活性が変動することが示された。

### F. 健康危険情報

DBP の精巣における毒性発現には、PPAR $\alpha$  と同時にその代謝物が異なるパスウェイで影響を及

ぼす可能性が考えられた。DEHP 曝露は、肝臓および精巣において、ステロイド代謝酵素に及ぼす影響が異なることが分かった。

### G. 研究発表

#### 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 QK, Naki 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. (in press)

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.

Tilley RE, Kemp GD, Teramitsu I, Hall AJ.  
Isolation of two cytochrome P450 cDNAs,  
CYP1A1 and CYP1A2, from harp seal  
(*Phoca groenlandica*) and grey seal  
(*Halichoerus grypus*). *Comp Biochem  
Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2002  
Jun;132(2):181-91.

## 2. 学会発表

- 1) 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ソール 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) 野生動物と交通  
ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価
- 5) 14<sup>th</sup> International symposium on microsomes and drug oxidations Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Regulates levels of P450 and their metabolic activities in rat testis microsomes
- 6) 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—
  - ②ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価
  - ③ Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively



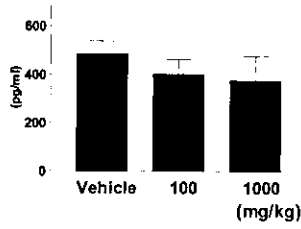
Table 1. 多形アレイ遺伝子リスト

gene	ACC No.	allele	position	DNA	Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee
CYP1A1	X02612	wild	6819	A	
		2C	6819	G	2455A>G(I462V)
CYP1A2	dbSNP ID rs2069514	wild	-3860	G	
		1C	-3860	A	-3858G>A
CYP1B1	U56438	wild	4160	G	
		2	4160	T	355G>T(A119S)
		wild	8131	C	
		3	8131	G	4326C>G(L432V)
CYP2A6	U22027	wild	6867-	ttgt...	
		4	6867-	-	allele deletion
		wild	6416	T	
		7	6416	C	1412T>C(I471T)
CYP2C19	gi22051774(NT_030059)	wild	180546	G	
		3	180546	A	636G>A(stop codon)
		wild	1806252	G	
		2A	1806252	A	681G>A(splicing defect)
CYP2D6	M33189	wild			
		5	deletion		allele deletion
		wild	913	C	
		10	913	T	100C>T
GSTM1	gi22042153(NT_029860)	wild			
		0	deletion		allele deletion
GSTP1	M24485	wild	2627	A	
		1b	2627	G	I105V
NAT2	X14672	wild	1311	G	
		6	1311	A	590G>A(R197Q)
		wild	1578	G	
		7	1578	A	857G>A(G286E)
AhR	dbSNP ID rs2066853	wild		A	
		R554K		G	R554K
PPAR gamma	AB005520	wild	892	C	
		Pro12Ala	892	G	Pro12Ala

Table 2. DBP 曝露によって精巢で発現が増加する遺伝子群

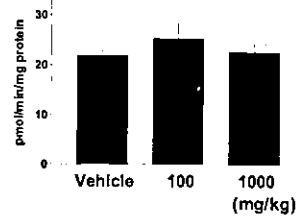
発現増加が同定された遺伝子の機能	同定された遺伝子数
Amino- & Carboxypeptidases	1
Aspartic Proteases	1
Calcium-Binding Proteins	3
Cell Cycle-Regulating Kinases	1
Cell Surface Antigens	3
Complex Lipid Metabolism	3
Energy Metabolism	3
Extracellular Transporters & Carrier Proteins	1
Facilitated Diffusion Proteins	2
Functionally Unclassified Proteins	2
G Protein-Coupled Receptors	3
G Proteins	6
Growth Factor & Chemokine Receptors	6
Growth Factors, Cytokines & Chemokines	3
GTP/GDP Exchangers & GTPase Activity Modulators	1
Hormone Receptors	11
Hormones	4
Interleukins & Interferons	1
Intracellular Kinase Network Members	7
Intracellular Protein Phosphatases	2
Kinase Activators & Inhibitors	1
Ligand-Gated Ion Channels	3
Neurotransmitter Receptors	1
Nuclear Receptors	1
Nucleotide Metabolism	1
Oncogenes & Tumor Suppressors	6
Other Cytoskeleton & Motility Proteins	3
Other Extracellular Communication Proteins	1
Other Intracellular Transducers, Effectors & Modulators	6
Other Membrane Channels & Transporters	2
Other Receptors (by Ligands)	3
Other Trafficking & Targeting Proteins	2
Phospholipases & Phosphoinositol Kinases	3
Protease Inhibitors	1
Proteosomal Proteins	1
Serine Proteases	1
Simple Carbohydrate Metabolism	1
Symporters & Antiporters	2
Voltage-Gated Ion Channels	5

Fig. 1. Serum testosterone level in rat treated with DEHP



Serum testosterone levels were measured using Testosterone EIA Kit. The standard curves ranged from 7.8 to 500 pg/ml.

Fig. 2. Activities of androstenedione 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat testis treated with DEHP



The enzyme activity of testis microsomes from DEHP-treated rats were assayed. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6).

Fig. 3. T 6 $\beta$ -hydroxylation activity and Western blot for CYP3A2 in testis microsomes treated with DEHP

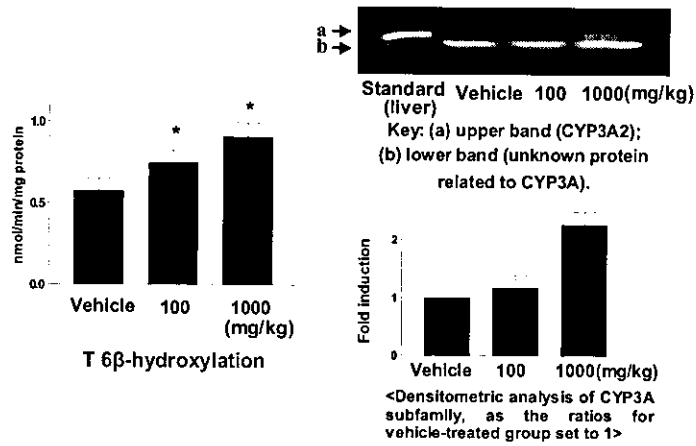


Fig. 4. T16 $\alpha$ -hydroxylation activity and Western blot for CYP2C11 in testis microsomes treated with DEHP

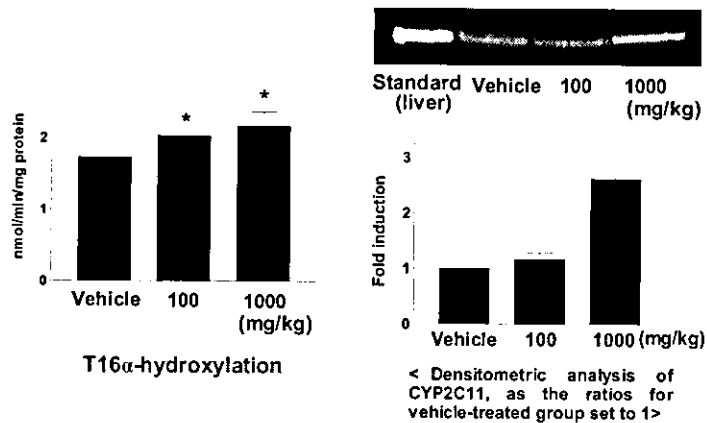


Fig. 5. Diazepam (DZ) metabolism assay in rat testis treated with DEHP

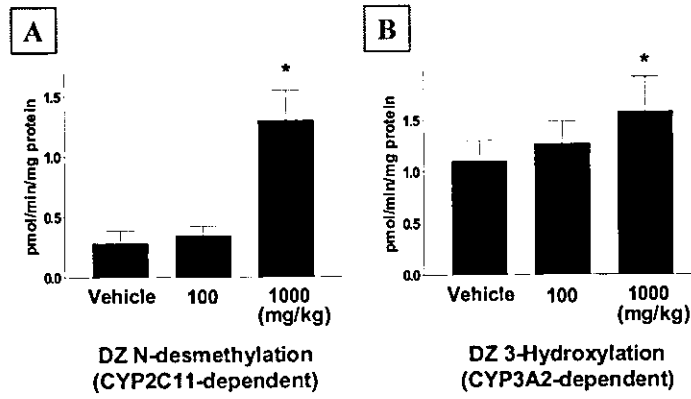


Fig. 6. Activities of testosterone 5 $\alpha$ -reductase in rat liver (A) and testis (B) treated with DEHP

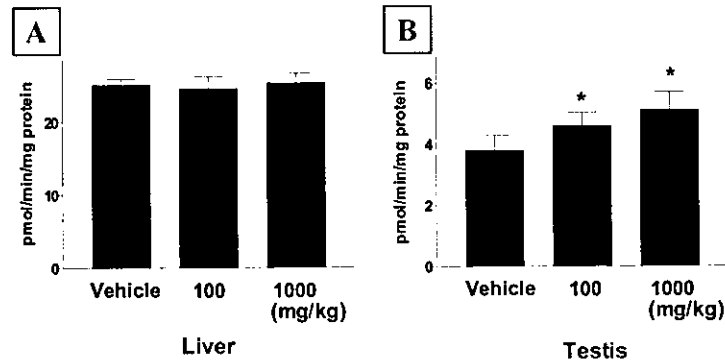
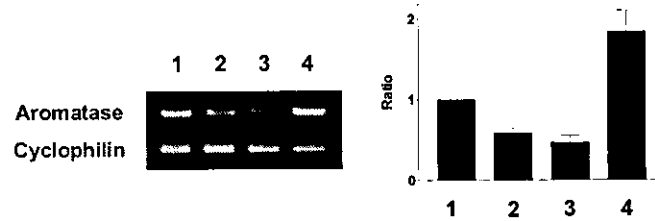


Fig. 7. RT-PCR analysis of Aromatase (CYP19) mRNA expression in rat testis treated with DEHP



Lane 1, vehicle control; Lane 2, DEHP-treated (100 mg/kg); Lane 3, DEHP-treated (1000 mg/kg); Lane 4, positive control (ovary).