

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

内分泌かく乱化学物質の生体影響メカニズム
(低用量効果・複合効果を含む)に関する総合研究

(H16—化学—002)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

井 上 達

平成17 (2005) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の生体影響メカニズム (低用量効果・複合効果を含む)に関する総合研究	1
井上 達	

II. 分担研究報告書

I. プロジェクト課題研究

【低用量評価・文献調査研究】

ビスフェノールAの低用量影響評価の検討と評価情報データベース作成	21
関澤 純	

内分泌かく乱化学物質のモデル化合物としてのビスフェノールAに関する 低用量影響論文調査研究	42
井藤悦朗	

天然のAhRリガンドの存在量と作用メカニズムに関する調査研究	45
松井三郎	

【低用量シグナル実験研究】

低用量 estrogenic chemicals による前立腺重量、発育などに対する 影響に関する研究	48
杉村芳樹	

低用量暴露による遺伝子発現、たんぱく発現データの解析による ホメオスタシスに関する研究	51
福島昭治	

II. 基盤研究

【生殖・ステロイド代謝】

- 雌性生殖器官への作用メカニズムの解明・・・・・・・・・・・・・・・・ 57
井口泰泉
- ヒト骨芽細胞に対する内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究・・・・・・・・ 63
笹野公伸

【免疫】

- 低用量内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究・・・・・・・・ 74
廣川勝昱
- 内分泌かく乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究・・・・ 77
山崎聖美

【神経・行動】

- 神経系初期発生における核内受容体の機能及び内分泌かく乱化学物質の
低用量影響に関する解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 79
菅野 純
- 内分泌かく乱物質の神経行動学的評価とその脳内機序の解明・・・・・・・・ 86
粟生修司

【核内レセプター】

- 核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御への影響に関する
研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 91
加藤茂明
- 核内レセプターを介した内分泌かく乱物質の生体影響・・・・・・・・ 98
Ishwar S. Parhar

【マイクロアレイ基盤技術整備】

- マイクロアレイ基盤整備 遺伝子発現の網羅的検索とインフォマティ
クスの確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 100
五十嵐勝秀

【若手協力研究】

内分泌かく乱化学物質暴露によるモノアミン系発達に対する影響に
関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 105
根岸隆之

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 111

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の生体影響メカニズム（低用量効果・複合効果を含む）
に関する総合研究（H16-化学-002）

主任研究者 井上 達

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・センター長

研究要旨

医薬品はもとより、農薬、工業用化学物質などの中に、内分泌かく乱作用を示すホルモン様化学物質（HAC）と、その延長線上で、内分泌障害を引き起す内分泌かく乱物質（EDC）があり得るとの危惧のもとに、厚生科学研究がスタートして、2 期 6 年を終了し、本研究は第 3 期初年度として遂行し、終了を見たものである。

本研究は、過去 6 年間の研究推進成果の上に立って、申請時のスキームに沿って、生体影響のメカニズムの低用量効果・複合効果等に関わるトピックスに焦点を当てたプロジェクト課題研究と、過去 2 期の当該研究で一層明らかになってきた中枢神経系、免疫系及び内分泌系に係る生体統御システムとしての高次生命系を取り上げた基盤研究との、二部構成として研究を進めて来た。

その中で、I. プロジェクト課題研究においては、専門家 14 名によるビスフェノール A(BPA)を中心とした、低用量問題に関連した文献のピアレビューを行なうとともに、ホルモン様作用食品の検討や前立腺への生理的影響に特化した実験研究、また、内分泌かく乱化学物質によるエピジェネティック発がん頻度の用量直線性、非線形性の検討など、広範な疑問点に的確な研究がスタートし、成果への展望を示した。

また、II. 基盤研究においては、内分泌かく乱物質の投与による常時発情不可逆性変化の分子シグナル機構が明らかになり、またエストロゲン受容体の AF-1 と AF-2 の臓器による転写活性の違いに基づいたホルモン様物質の臓器による機能発現の違いなど、現在この領域で世界的な注目点となっている基盤的な知見が明らかになり、内分泌かく乱機構研究の本邦からの知見の発信の中心を構成する結果となっている【生殖・ステロイド代謝部門】。旧来の文献的知見にない低用量レベルでの免疫担当細胞の反応【免疫部門】、同じく神経・行動面での反応【神経・行動部門】、さらに各種核内受容体シグナルの相互作用などの領域でも【核内レセプター部門】、ネイチャーなどの論文発表に達したものと、編集者との交渉中のものとの違いはあれ、初年度にして大きな前進を遂げた点は、研究結果の概要として特筆されることである。

マイクロアレイ基盤整備【マイクロアレイ基盤整備部門】についても、年次を追

って各班員の研究支援を進めてきており、それらの中には、極めてインパクトの高い論文がすでに発表されつつある。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属における職名 (50音順)

粟生 修司	九州工業大学大学院・生命体工学研究科 教授
五十嵐勝秀	国立医薬品食品衛生研究所毒性部 主任研究官
井口 泰泉	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所生命環境研究領域 教授
井藤 悦朗	宇部興産(株)環境安全部 主席研究員
加藤 茂明	東京大学分子細胞生物学研究所分子生物部門 教授
菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部 部長
笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理学講座 教授
杉村 芳樹	三重大学医学部泌尿器科学 教授
関澤 純	徳島大学総合科学部 教授
廣川 勝昱	東京医科歯科大学医学部感染免疫病理学講座 教授
福島 昭治	大阪市立大学大学院医学研究科 教授
松井 三郎	京都大学大学院地球環境学堂環境毒性学 教授
山崎 聖美	国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部 主任研究員
Ishwar S. Parhar	日本医科大学・医学部 生理学第一教室 講師

A. 研究目的

本研究の目的は、新段階に達した高次生命系への内分泌かく乱化学物質のかく乱作用の背景にある分子機構を、核内受容体へのシグナルネットワークを中軸として統一的に研究を進め、内分泌系、神経系、免疫系への影響メカニズムの解明を図る。現実課題となっている低用量効果・複合効果については、引き続きプロジェクト研究として、ホメオステシスの背景に潜伏する比較的低レベルでの生体影響をも視野に入れた研究を図ること

とする。

B. 方法

I. プロジェクト課題研究

I-1. 情報関連研究

関澤と井藤は、過去5年間のビスフェノールA (BPA) による低用量影響に関係すると考えられる文献をMEDLINEで検索し原報を入手した。野生生物への影響や分析法に関する文献約40数報を省き、計

168報を得た。これらにつきBPAの低用量影響の証拠の確からしさと、影響の内容、およびデータの信頼性について評価し検討する上で、調査項目は、著者名、論文原題名、出典、対象生物、影響標的臓器、影響レベル(細胞・組織・個体)、暴露方法、暴露時期(胎生期など)、暴露濃度と用量段階、試験記録信頼性保証、および、論文の概要などの構成とした。標的器官別に影響のあり方をまとめた。結果を総合して低用量作用の蓋然性について考察を加えた。14名の専門家の協力を得て、レビューとデータベースの作成に着手した。

I-2. 食物等異物受容体結合物の調査

松井は、天然のアリールヒドロカーボン受容体(AhR)リガンドの存在量とその生理活性(特に細胞周期への影響)の作用メカニズムについて文献調査を行い、実験的な検討も行った。

I-3. 成長初期の前立腺におけるエストロゲン影響

杉村は、マウス前立腺上皮由来細胞株mPrを用いた*in vitro*細胞増殖試験、およびマウス前立腺の腺管分枝構造を解析する無血清器官培養法を行なった。

I-4. 低用量発がん

福島は、6週齢の雄性F344ラット、156匹を用いた。イニシエーターとしてDEN(100mg/kg体重)を週1回、3週にわたって腹腔内に投与した後、プロモーションの段階に α -BHCを0、0.01、0.05、0.1、1、

50、500ppmの用量で32週間、混餌投与した。実験開始35週にてラットを屠殺し、肝臓について病理組織学および分子生物学的に検索し、プロモーション効果におけるホルミシス機構について考察した。

II. 基盤研究

II-1. 生殖・ステロイド代謝部門

井口は、それぞれの生育過程にあるマウスにエストロゲンを曝露し、雌性生殖器官における応答を解析した。

笹野は、本研究ではヒト骨芽細胞由来株のhFOB 1.19を対象とした、細胞増殖(WST-8 assay)及びアポトーシス(Hoechst、TUNEL assay)を指標とした研究を行った。これによりEstradiol、5 α -dehydro-xytestosteroneのこの細胞に対する影響を確認する事により性ステロイドに対する応答性を検討し、またgenistein、bisphenol A、diethylstilbestrolの影響も検索した。

II-2. 免疫・感染防御系

廣川は、胸腺微小環境について検討したが、胸腺萎縮に関わる遺伝子や諸因子について解析中である。妊娠マウスにBPAを含む飲料水を自由摂取させ、その胎仔及び新生仔の免疫系への影響を胸腺を中心に調べた。

山崎は、免疫担当細胞への影響を明らかにすることを目的とした。リンパ球への影響についてはJurkat細胞を用い、マクロファージへの影響についてはHL60細胞を用いて解析を行った。

II-3. 神経系・行動系

菅野は、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、その影響を検討した。網羅的遺伝子発現解析法によりDESの影響を調べ、核内受容体群の発現に関する情報を得た。

粟生は、脳と行動の性分化に及ぼす低用量効果の解析のため、耐容 1 日摂取量 ($50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) 以下の BPA (0.1ppm) を飲水中に混ぜ、妊娠ラットの出産前 1 週間のみ曝露し、仔ラットの成長後 (6 週齢以降) に各種行動試験および電気生理学的実験を行った。

II-4. 核内レセプター系

加藤は、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。

Parharは、各種核内受容体の同定を行った。ティラピア肝臓由来 mRNA より PXR および RXR 遺伝子を同定した。免疫組織学的に同定した単一 GnRH ニューロンをマイクロマニピュレーターにより採取後、RNA を抽出し、3 種類の GnRH ニューロンにおける PXR および RXR 遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析した。

II-5. マイクロアレイ基盤研究

五十嵐と井上は各班員との協議の下、共同研究を行い、組織もしくは細胞の検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析を行い、その解析結果を班員にフィードバックすることで研究を支援した。

C. 結果

I. プロジェクト課題研究

I-1. 情報関連研究：リスク評価情報に関する研究、とくにビスフェノール A の低用量影響についての文献調査 (関澤・井藤)

ビスフェノール A の低用量影響として、どのような生物学的な現象が見られており、その証拠としての研究報告の信頼性と、データの生物学的な意義を文献的に検証した。内分泌かく乱化学物質について 2000 年に NTP が低用量影響評価ワークショップを開催、翌年欧州でより小規模なワークショップが持たれたが、この問題について最終的な決着は見られていない。今回の試みは BPA をひとつの材料としてひとつの結論を得ることを目指し、以下の項目を実施した。

- (1) 低用量作用に関する文献の選別
- (2) 生殖系への影響
- (3) 免疫系への影響
 - a. 生体レベルでの影響データ
 - b. 免疫系細胞レベル
- (4) 神経行動への影響
 - a. 生体レベルでの影響データ
 - b. 細胞レベルでの影響
- (5) 吸収・代謝・分布・排泄について
- (6) 標的器官別の低用量影響検出結果の整理

(結果の詳細は、分担報告書参照。)

データベースは完成次第、ウェブサイト上に公開の方針である。

I-2. 食物等異物受容体結合物の調査： アリールハイドロカーボン受容体 (AhR) に対してリガンドとなり得る、 食品を含む種々の物質の調査研究（松 井）

AhR が細胞周期に影響を与えるメカニ
ズムとして CDK 阻害タンパクの誘導、RB
との結合、NF κ B との相互作用などが
明らかになりつつある。緑茶、ウーロ
ン茶、コーヒー、リンゴジュース、ト
マトジュース中には複数の AhR リガン
ドが存在していた。また、インディル
ビンの LC/MS/MS を用いた定量方法を開
発した。定量限界は 10pg/ml 程度であ
った。

(1) 文献調査

天然の AhR リガンドの存在量に関す
る定量的な研究論文は見当たらなかつ
た。AhR が細胞周期に影響を与えるメ
カニズムについては、CDK 阻害タンパ
ク質の p16, p21, p27 などの誘導、RB
タンパク質との結合による阻害が意外
にも、NF κ B との相互作用による細胞
周期の調節機構が明らかになりつつあ
る。

(2) 食品中新規 AhR リガンド

身近な飲料である緑茶、ウーロン茶、
コーヒー、リンゴジュース、トマトジ
ュース中に AhR リガンドが存在するか
どうか調査した。これらのブルーレー
ヨン抽出物中にはいずれも AhR リガン
ド活性が認められた。HPLC で分画し、
バイオアッセイを行った結果、緑茶、
コーヒー、リンゴジュースには少なく
とも 2 種類以上の AhR リガンドが存在
することが明らかとなった。現在この

リガンドの単離精製をすすめている。

(3) インディルビン定量法開発

天然の AhR リガンドであるインディ
ルビンを定量するため、インディルビ
ンの ^{13}C 標識体を内部標準として、
LC/MS/MS で定量する系を開発した。定
量限界は 10pg/ml 程度であった。

I-3. 成長初期の前立腺におけるエスト ロゲン影響（杉村）

エストロゲン (10^{-11} – 10^{-9}M)、TGF α
(0.1 – 10ng/ml) は、mPr の細胞増殖率を
濃度および時間依存的に上昇させた。器
官培養法では、エストロゲンによる扁平
上皮化生の誘導に伴う TGF α の過剰発現
を確認した。また、TGF α 単独でもエス
トロゲンと同様の扁平上皮化生を誘導
した。これを用いて、前立腺のエスト
ロゲンによるゲノム刻印機構及び催奇
形性に関する研究に着手した。

I-4. 低用量発がん：発がん二段階法を 用いた低用量発がんの検討（福島）

α -BHC の高用量は肝発がんプロモー
ション作用を、逆に低用量は抑制傾向
を示した。すなわち、 α -BHC の高用量
投与 (50 及び 500 ppm) では肝腫瘍の発
生頻度が有意に増加した。また逆に、
低用量投与 (0.1 ppm) は肝細胞腺腫の発
生頻度の減少を示した。

腫瘍周囲の正常肝において、低用量
投与 (0.01 – 0.1 ppm) では c-jun の mRNA
発現低下と TGF- β の mRNA 発現上昇を
認めた。一方、TGF- α の mRNA 発現は、
DEN 単独投与群と変化を示さなかった。

II. 基盤研究

II-1. 生殖・ステロイド代謝部門：(井口、笹野)

II-1.1. 雌性生殖器官への作用メカニズムの解明 (井口)

マウスの成育過程におけるエストロゲンの影響を明確にするために、様々な生育段階にあるマウスにエストロゲン (DES を障害性陽性対象物質とする) を投与し、雌性生殖器官におけるエストロゲン応答遺伝子について解析を行った。その結果、新生仔期から成長が進むにつれその応答遺伝子の数が増加することが明らかになった。

さらに、こうした成育過程によるエストロゲン応答性の差は、マウス腔においても確認され、マウスの成育が進むにつれてエストロゲン応答性の遺伝子が増加することが明らかになった。これは、新生仔期のエストロゲン曝露による雌性生殖器官への不可逆的な影響を解明する上でも重要な知見である。

以上、不可逆的シグナル伝達機構の成立メカニズムについて知見を得た。

II-1.2. 低用量の内分泌かく乱物質とヒト性ステロイド代謝との関連性に関する研究：ヒト由来のエストロゲン受容体 (ER) 陽性細胞を用いたエストロゲン作用の新たな展開について (笹野)

hFOB は estrogen receptor β 、androgen receptor を発現しており、estradiol 及び 5α -dehydroxy testosterone の添加によって、細胞増殖の刺激を受けた。さらに、これらのステロイド添加は血清枯渇によるアポ

トーシスを抑制した。また bisphenol A も同様に細胞増殖を刺激したが、diethylstilbestrol はアポトーシスを惹き起した。

II-2. 免疫・感染防御系：(廣川、山崎)

II-2.1. 低用量内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (廣川)

BPA を含む飲料水の摂取により、子宮内死亡胎仔の増加と胸腺萎縮が特に低用量の BPA 摂取群において認められた。

(1) 妊娠 7 日目より 15 日目までの母親への経口投与による 15 日齢胎仔マウスへの影響

- ・子宮内胎仔死亡が Bisphenol-A-Low 群では Cont 群に比較し高頻度で認められた。
- ・胸腺内細胞数が Bisphenol-A-Low 群では Cont 群に比較し低値を示した。
- ・未熟胸腺細胞亜集団 DN1 ($CD4^+CD8^+CD44^+CD25^-$) の割合が Bisphenol A-Low 群でやや高値を示した。

(2) 妊娠 7 日目より出産までの母親への経口投与による新生仔マウスへの影響

- ・胸腺内細胞数が Bisphenol A-Low、-High 群ともに Cont 群に比較し低値を示した。
- ・未熟胸腺細胞亜集団 DN ($CD4^+CD8^+$) の割合が Bisphenol A-Low、-High 群ともに高値を示した。

(3) BPA の免疫系への影響の長期的に追跡

- ・胎齢 7 日から離乳までの 5 週間、BPA

を母体経路で摂取したマウスを飼育中。BPA は、胎仔期は胎盤を通して、また、生後離乳までの間は乳に含まれたものを摂取することになる。

II-2.2. 内分泌かく乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究 (山崎)

Jurkat 細胞への NP、BPA、DBP への遺伝子レベルでの影響については解析途中である。HL60 細胞の遊走能は、高濃度(0.1mM)の NP、BPA、DBP で低下した。前者については、 10^{-8} モルオーダーまでの低用量作用が観察されている。

II-3. 神経系・行動系：(菅野、粟生)

II-3.1. 神経系初期発生における核内受容体の機能及び内分泌かく乱化学物質の低用量影響に関する解析 (菅野)

胎生期後期胎児脳神経幹細胞における核内受容体群の発現を、当方が開発した Percellome 手法を適用した DNA マイクロアレイによって検討し、オーファンレセプターの RVR, TR4 に加え、COUP-TF1, GR, PPARb, TRa など多種類の核内受容体群が発現していることを確認した。

(1) 神経幹細胞における核内受容体群の発現

前年度までに、マウス胎児脳から培養した神経幹細胞において、mRNA レベルで ER alpha, beta が共に発現していることを、alpha 及び beta に特異的な primer を用いた PCR により確認している。今年度は、Percellome 手法を適用した DNA マイクロアレイにて検討した

結果、48 種類の核内受容体の発現に関する情報が得られた。特に、オーファンレセプターの RVR, TR4 に加え、COUP-TF1, GR, PPARb, TRa などの高発現が認められた。それらの受容体の発現は、ER の alpha, beta よりも発現が相対的に高いことがわかった。

(2) DES *in utero* 暴露影響検討-網羅的遺伝子発現解析 -

これまでの検討により、*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)に影響を与える結果を得ている。この神経幹細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、IGFBP-2, IGFBP-10, c-FOS, VEGF などのエストロゲン応答遺伝子群の持続的変調が惹起される事が示唆される結果を得た。そのメカニズムは現時点では不明であるが、*in utero* での一時的な DES 暴露が、その後の DES を取り除いた *ex vivo* 条件下における神経幹細胞内の遺伝子発現を持続的に変化させ(インプリンティング様の変化)、自己複製能ひいては分化能に影響することから、実際の胎児での神経系の分化発達に対して影響する可能性が考えられた。現在、DES の *in utero* 暴露後に培養に移した神経幹細胞は多分化能を失いアストロサイトへの分化に片寄る傾向があることを示す結果を得たことに基づいて、アストロサイトが分化し始める胎生 16 日の終脳における遺伝子発現変化を網羅的に調査し、そのデータを解析中である。

II-3.2. 内分泌かく乱物質の神経行動

学的評価とその脳内機序の解明（粟生）

BPAの胎生期曝露により、従来の周産期曝露と同様に探索行動の性差が消失した。ストレス対処行動である“もがき行動”の性差も消失し、不安・うつ反応は雌雄ともに増強した。また、扁桃体内側核領域ニューロンの嗅覚応答の性差もBPA曝露により消失した。

II-4. 核内レセプター系：（加藤、Parhar）

II-4.1. 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（加藤）

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。

(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。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。また、ダイオキシンレセプターの分解に関する新規複合体の同定に成功した。現在、この新規複合体のエストロゲンレセプターへの機能を解析している。

(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。

(4) ショウジョウバエを用いた男性、および女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 発現ショウジョウバエのライン化も行った。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。また、ER α の Ser¹¹⁸ のリン酸化が Cdk7 によってなされており、そのリン酸化によって ER の転写活性が増強されていることをショウジョウバエの個体レベルで証明した。

II-4.2. 核内レセプターを介した内分泌かく乱化学物質の生体影響 (Parhar)

PCR 法によりティラピアより PXR および RXR 遺伝子の部分配列を同定した。免疫組織学手に同定されたティラピア脳内の 3 種類の GnRH 産生ニューロン由来の RNA を用いた RT-PCR により、GnRH1 と GnRH3 ニューロンにおいて PXR の発現が確認された。一方、RXR の発現は

いずれの GnRH タイプにおいても認められなかった。

II-5. マイクロアレイ基盤研究：マイクロアレイ基盤整備 遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立 (五十嵐・井上)

本年度は笹野班員とヒト骨芽細胞における内分泌攪乱化学物質の影響—マイクロアレイによる遺伝子発現の解析—を実施した。得られた結果は笹野班員と共同で解析中である。微量組織サンプルの網羅的遺伝子発現解析については、T7 RNA polymerase による RNA 増幅を 2 回行う方法を検討し、安定してデータが得られる環境を整備することに成功した。

D. 考 察

I. プロジェクト課題研究

I-1. 情報関連研究：リスク評価情報に関する研究、とくにビスフェノール A の低用量影響についての文献調査：(関澤・井藤)

内分泌かく乱化学物質について NTP が低用量影響評価ワークショップを開催、翌年欧州でより小規模なワークショップが持たれたが、低用量影響問題について最終的な決着は見られていない。今回の試みはビスフェノール A をひとつの材料としてひとつの結論を導こうとする重要な位置づけにあり、科学的な裏づけを持ち説得力のあるも

のでなければならない。最近、BPA は弱いエストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用のほかに弱いエストロゲン様作用では説明できない作用があり、胎生期、授乳期暴露による免疫系や神経系への影響があるとの報告が急増している。本研究では特にその点に着目してレビューを行った。これらの中には低用量での影響を示唆するデータも見られ、さらに慎重な検討が必要と考えられた。ER または AR 経由の直接エストロゲンやアンドロゲンが関与する生殖系への BPA によるヒトへの影響の生物学的な蓋然性は低いと考えられるが、エストロゲン非存在下の ER とアリルヒドロカーボンレセプター(AhR)とのクロストークによるエストロゲン作用の発現、さらには ER 経由直接といえない BPA による免疫・神経行動影響など高次生命系の関与を示唆するいくつかの注目すべき知見が集積されつつあり、また無影響量レベルのエストロゲン物質の複合曝露による作用の検出など、それら作用の生物学的な意義とともに、低用量による影響として有意であるか否かと含めて詳細な検討が必要となっている。

I-2. 食物等異物受容体結合物の調査：アリールヒドロカーボン受容体(AhR)に対してリガンドとなり得る、食品を含む種々の物質の調査研究。(松井)

食品中の AhR リガンドの存在量に関する定量的な検討はほとんど行われていなかった。また、それらの代謝・解

毒作用に関する文献もインディルビンと FICZ に関するもの以外は見当たらなかった。今後、これらの研究を行う必要がある。そのとき今回開発したインディルビンの定量方法が役立つと考えられる。LC/MS/MS による定量限界は 10pg/ml 程度と極めて感度がよく、血清中の濃度を十分測定しうる感度であった。

I-3. 成長初期の前立腺におけるエストロジェン影響：(杉村)

アンドロゲン依存性副生殖腺である前立腺の発生・分化にはアンドロゲンが必要不可欠であるが、単純に、アンドロゲン受容体との結合により発現するアンドロゲン依存性因子だけが前立腺の成長に関わっているのではなく、上皮と間質細胞の間で交わされるシグナル伝達(上皮-間質の相互作用)が重要であることは広く知られている。今回、マウス前立腺上皮由来細胞株 mPr がジヒドロテストステロンの刺激にตอบสนองしなかったのは、上皮細胞の増殖にはアンドロゲン受容体を介した刺激よりも間質細胞からのパラクライン的なシグナル伝達が重要であることを意味している。逆に、エストロゲンが上皮細胞の増殖率を上昇させた理由として、エストロゲン受容体との結合を介して発現するオートクライン的な増殖促進因子が関与していると考えられた。その1つが TGF α である。

TGF α は Epidermal Growth Factor (EGF) や Keratinocyte Growth Factor (KGF) と同様に前立腺上皮細胞の増殖を

刺激することが知られている。無血清器官培養実験において明らかとなった、エストロゲンによる TGF α の過剰発現および扁平上皮化生の誘導が基底細胞に限られている点が非常に興味深い。これはマウス前立腺におけるエストロゲン受容体の発現分布に依存していると考えられ、早急の詳細な検討が必要である。また、Estrogenic な化学物質でもマウス前立腺の基底細胞における TGF α の発現誘導が起こると考えられ、同様の検討を経て、作用メカニズムを明らかとする予定である。

I-4. 低用量発がん：発がん二段階法を用いた低用量発がんの検討（福島）

α -BHC の長期高用量投与では肝腫瘍の発生頻度が有意に増加し、低用量では腺腫の発生減少が認められた。従って昨年度報告した肝 GST-P 陽性細胞巢の発生に関するデータと合わせて考えると、 α -BHC のラット肝への作用にはホルミシス現象があり、確実に発がんの閾値が存在すると考えられる。

また、低用量投与では c-jun の mRNA 発現低下と TGF- β の mRNA 発現上昇を認めたのに対し、TGF- α の mRNA 発現は、DEN 単独投与群と変化を示さなかった。これらが α -BHC のラット肝発がんに関係すると示唆された。

II. 基盤研究

II-1. 生殖・ステロイド代謝部門：（井口、笹野）

II-1.1. 雌性生殖器官への作用メカニ

ズムの解明（井口）

マウスの新生仔期によるエストロゲン影響は既に多くの報告があるが、不可逆的な影響を受けるのは、出生後一定の期間に限定される。こうした感受性の高い期間は臨界期とよばれそれぞれの影響によりその期間は異なる。例えば、膈上皮のエストロゲン非依存的な増殖は、出生後 5 日以内にエストロゲン曝露があると誘発される。従来は、この曝露と最終的な発現系（エンドポイント）との関連、エンドポイントの解析が主であったが、本研究によりエストロゲン曝露により引き起こされる初期の変化について明らかにすることができた。

エストロゲン受容体は胎仔期から発現していることが知られているが、実際にエストロゲンを産生する思春期以前から受容体が機能しているのかについては、いまだ明確になっていない。本研究の結果、エストロゲン曝露により強制的にエストロゲン受容体を機能させた場合、雌性生殖器官における反応は成育段階で異なっていることが示された。こうした変化は比較的急速におきており、臨界期が終了する生後 5 日では、エストロゲンにより誘導される遺伝子数は出生直後のものに比べて増加しているだけでなく、遺伝子の種類も異なっていた。したがって新生仔期においてのみ反応するエストロゲン応答遺伝子について、発現パターンや機能解析を進めていくことにより、最終的に引き起こされる不可逆的な影響の発現メカニズムを解明できると思わ

れる。

II-1.2. 低用量の内分泌かく乱物質とヒト性ステロイド代謝との関連性に関する研究：ヒト由来のエストロゲン受容体 (ER) 陽性細胞を用いたエストロゲン作用の新たな展開について (笹野)

ヒトにおいては閉経後女性に骨粗鬆症が多い等、骨組織に対するステロイドホルモン特に性ステロイドホルモンの影響が高齢化社会の拾来とあわせて重要視されてきている。閉経期女性に認められるようにエストロゲン欠乏は種々の骨吸収性サイトカインの発現を亢進し、破骨細胞の分化を促す。一方、エストロゲン及びアンドロゲンは骨芽細胞に直接作用し、その細胞増加を促すことが最近明らかにされてきている。このように骨組織はステロイドホルモンの影響を強く受けることから、内分泌かく乱化学物質の影響をかなり強く受けることは予想されてきたが生殖器、中枢神経系などと比べるとその検索は必ずしもあまり行われてはきていなかった。内分泌かく乱化学物質の骨組織への影響は水棲生物にみられる骨格奇形という形で現れ、近年これらの動物で Bone Mineral density (骨密度) を評価した報告もされている (Lind PM. et al., 2004, *Environ Health Perspect*)。ヒトにおいては 1970 年代に diethylstilbestrol に暴露された子供の骨格成長が、暴露を受けない子供と比して促進しているということが知られていた (Wettenhall HN. et al., 1975, *J Pediatr*)。しかし、これらが骨細胞、

骨芽細胞といった細胞単位で直接的に影響するか否かについてはまったくわかっていない。さらに上記の影響は感受性の高い胎児に特有の現象とも考えられ、成人骨組織への影響には直接あてはまらないと想定されてきたが、具体的な科学的検証はまったく行われてこなかった。

近年になって内分泌かく乱化学物質の影響として、骨芽細胞における作用がようやく注目されるようになり、Suzuki N. & Hattori A. (2003, *Life Sci*) は goldfish の骨芽細胞における bisphenol A (BPA) の影響を検討し、ALP が BPA によって減少することを明らかにした。さらに Kanno S ら (2004, *Toxicology*) はマウス間葉系細胞 MC3T3-E1 を用いて BPA、nonylphenol (NP)、bisphthalate (DEHP) の影響を確認し、NP は濃度依存性 (10^{-9} - 10^{-4} M) に、BPA と DEHP は高濃度 (10^{-4} M) でその細胞増殖を抑制することを報告した。このようにようやく内分泌かく乱物質の性ステロイド標的組織である骨に対しての影響の検索は細胞単位で科学的に行われるようになり、特に近年内分泌かく乱物質が骨芽細胞の分化過程に影響を及ぼしているのではないのかという事が考えられてきている。

一方、ヒト成人においては植物エストロゲンが閉経後女性の骨粗鬆症予防につながると考えられており (Morabito N. et al., 2002, *J Bone Miner Res*; Setchell KD and Lydeking-Olsen E., 2003, *Am J Clin Nutr*; Branca F., 2003, *Proc Nutr Soc*)、その臨床応用が高齢

化社会の到来と共に大きな注目を集めてきている。すなはちこれらの植物エストロゲンの検索結果はなんらかの形で内分泌かく乱化学物質が胎児のみならず成人骨組織へも作用することを示唆しているものである。

そこで本研究では、骨芽細胞である hFOB を用いて、この株化細胞における種々の性ステロイドホルモン環境を明らかにし、ステロイド反応性の骨芽細胞、つまり成人の生体細胞を反映したモデルであることを評価した。すなはちステロイドホルモンのヒト骨に対しての影響は主には骨芽細胞の細胞数の保持、あるいは減少といった形で示されてくる為、この性ステロイドの対して感受性のある hFOB 1.19 (ATCC, CRL-11372, transfected with T large antigen) を用いて内分泌かく乱物質の細胞増殖、細胞死に対しての影響を検討する事は極めて重要な *in vitro* の実験系であると考えられる。すなわち、このモデルを使用し、3 種類の内分泌かく乱化学物質の影響を検討したところ、その作用に質的つまり、生理的ステロイドの作用を示したり、細胞傷害を示したりといった差異が認められた。この内分泌かく乱物質による骨芽細胞の細胞増殖、細胞死に対しての影響の違いが何に起因しているのかを追求するためには、今後更なる詳細な検討が必要となる。そこで現在マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を施行中である。

このように骨形成はエストロゲン標的器官として、中高年女性の骨粗鬆症

と関連する重要な意味を持っている。

II-2. 免疫・感染防御系: (廣川、山崎)

II-2.2. 低用量内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (廣川)

Bisphenol A を摂取した妊娠マウスでは、胎仔が早期の段階で子宮内死亡をすることが示唆された。この場合、興味あることは EDCs が高濃度より低濃度に含まれた飲料水を摂取したときに、子宮内胎仔死亡が有意に増加することである。

生存した胎仔では胎盤を介した EDCs が胸腺に作用し、胎仔および新生仔の胸腺内胸腺リンパ球の増殖・分化を抑制することが分かった。

これらの結果から *in vivo* 実験系においても低用量の BPA が胎仔の未熟胸腺細胞の増殖分化に抑制的に作用することがわかった。

これからの問題点はこのようにして、胎仔期から新生仔期に BPA に暴露された個体において、長期的に見た場合にどのような BPA の影響が見られるかを検討することである。

II-2.2. 内分泌かく乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究 (山崎)

内分泌かく乱物質の免疫系への影響について、特にリンパ球への影響について調べてきたが、その影響はカルシウムイオン濃度の上昇や細胞内蛋白質のチロシンリン酸化といったシグナル伝達系を介して瞬時に伝わることを見

い出した。一方、IL-2 などのサイトカイン産生に変化があることも見出し、リンパ球内では遺伝子レベルで変化が起きている可能性も示唆された。しかし、エストロゲンレセプターアンタゴニストを用いてもリンパ球への内分泌かく乱物質の影響に変化が無かったことから、内分泌かく乱物質のリンパ球への影響は、生殖系への影響のようなエストロゲンレセプターなどを介したものではないことが考えられた。本研究により、リンパ球への影響が遺伝子レベルで解明されることが期待される。

II-3. 神経系・行動系：(菅野、粟生)

II-3.1. 神経系初期発生における核内受容体の機能及び内分泌かく乱化学物質の低用量影響に関する解析 (菅野)

今年度は胎児神経幹細胞における核内受容体発現について、後期胎児神経幹細胞では多種類の核内受容体 mRNA が発現していることを明らかにした。特に、オーファンレセプターの RVR, TR4 に加え、COUP-TF1, GR, PPARb, TRa などの発現が高かった。一方で、ER は alpha、beta とともにこれらの受容体より発現が相対的に低いことが判明した。核内受容体の神経幹細胞における機能に関する情報は少ないが、GR に関連する可能性を示す情報として、胎児期に母胎がストレスを受けると、グルココルチコイドを介して胎児神経幹細胞の数が減り、その数の減少は生涯持続するとの報告がある。今回、GR の発現が

高いことが確認されたことは、神経幹細胞において GR シグナル系は作動しており、神経幹細胞は母胎ストレスを始めとする環境要因による影響を受けやすい細胞であることが示唆された。また、甲状腺ホルモンには神経幹細胞からのオリゴデンドロサイト分化誘導作用があることが報告されているが、TRa の発現が高いことは甲状腺ホルモン様物質が神経幹細胞に影響を与えやすいことを支持するものとする。内分泌かく乱化学物質の標的として重要度の高いエストロゲンレセプターに関する研究として実施している DES の作用については、終脳を用いた網羅的遺伝子発現解析を追加実施し、神経幹細胞のそれとの対比により下流遺伝子群抽出を目指しているところである。

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。これまでに得られている、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。この緩和機構の情報も合わせて抽出すべく解析を進める。

II-3.2. 内分泌かく乱物質の神経行動学的評価とその脳内機序の解明 (粟生)

以上の結果、BPAの出産前1週間の胎生期曝露は、周産期曝露と同様に、耐容1日摂取量以下の極微量でも探索行動の性分化を消失させること、さらに強

制水泳試験におけるうつ反応やストレス対処行動、不安反応も影響を受けることが明らかになった。オープンフィールド試験および強制水泳試験は内分泌攪乱物質の鋭敏な評価系として有用と思われる。また、BPAの胎生期曝露が行動だけでなく、情動反応に重要な役割を果たしている扁桃体の機能的性分化をも障害したことが示唆される。BPAが胎生後期に影響を及ぼす情動その他の行動異常の少なくとも一部に扁桃体領域が関与している可能性がある。

II-4. 核内レセプター系：(加藤、Parhar)

II-4.1. 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(加藤)

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。

II-4.2. 核内レセプターを介した内分泌かく乱化学物質の生体影響(Parhar)

本研究の結果から、GnRH1 と GnRH3 ニューロンによる精巣の発達や生殖行動の調節は、PXR の影響を受ける可能性が示唆された。単一細胞レベルでの解

析を行う本手法のアプローチは、GnRH ニューロンにおける様々な遺伝子発現プロファイリングを可能にした。大部分の脊椎動物は脳内に複数種の GnRH ニューロンが存在しているが、本手法は脊椎動物における各 GnRH タイプの分子生理学的基盤を理解するうえで非常に有効であると考えられる。

II-5. マイクロアレイ基盤研究：マイクロアレイ基盤整備 遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立(五十嵐・井上)

今年度実施した技術導入検討により、微量サンプルの網羅的遺伝子発現解析も十分に実施可能となり、今後班員研究サポートを行っていく上で障害となる可能性のあったサンプル量の問題が解決されたと考える。今年度実施した笹野班員との共同研究では、骨芽細胞に対する内分泌かく乱化学物質影響に焦点を絞っているが、ほぼ全ての遺伝子の発現値を俯瞰して解析の進められる網羅的遺伝子発現の威力が発揮された。同様の研究に於いて、早期に研究の方向が定まり、研究の効率化が図られることが期待される。

E. 結論

I. プロジェクト課題研究

I-1. 情報関連研究：リスク評価情報に関する研究、とくにビスフェノール A