

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

分担研究者 廣川勝昱 東京医科歯科大学 教授

研究要旨

妊娠マウス（7日目）に Bisphenol-A (BPA) を含む飲料水を自由摂取させ、胎仔の未熟胸腺リンパ球の増殖・分化に与える影響を検討した。胎生15日の胎仔における BPA の影響は、子宮内死亡例の増加、胸腺細胞数の減少、未熟胸腺細胞 (DN1) の増加として、特に低用量の場合に認められた。又、新生仔でも胸腺細胞数の減少、未熟胸腺細胞 (DN) の増加が認められた。これらの結果は BPA が母親の胎盤を介し、胎仔の生体内に取り込まれた場合、胸腺内での T 細胞の分化過程が抑制され、免疫系に影響を及ぼす可能性のある事が示唆された。

A. 研究目的

妊娠マウスに Bisphenol-A (BPA) を投与し、*in vivo* でその胎仔免疫系への影響を明らかにする。

免疫系は感染に対する生体防御機構として働くと共に、内部環境のホメオスタシスを維持する上で重要な役割を果たしている。ホメオスタシスの維持においては、免疫系は神経・内分泌系との緊密に連携をしながらその役割を果たしている。免疫系の主要構成細胞であるリンパ球は抗体やサイトカインを作るだけでなく、エンドルフィンなどの神経伝達物質や各種下垂体ホルモンを産生し、それらに対する受容体も持つ。リンパ球はステロイドを作らないが、副腎皮質ホルモンや性ホルモンに対する受容体を持ち、ステロイドの影響を受けて機能している。従って、環境にある内分泌かく乱化学物

質 (EDCs) が生体内に取り込まれれば、免疫系に影響を及ぼすことは必至である。

これまでの *in vivo* 及び *in vitro* の実験において、EDCs が未熟胸腺リンパ球の増殖・分化過程を抑制することを明らかにしてきた。本実験では、EDCs の未熟胸腺への影響を *in vivo* において見るために、母体に BPA を投与し、その胎仔免疫系への影響を、胸腺を中心に検討した。

B. 研究方法

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。

1. 動物：妊娠確認7日目の C57BL/6 雌マウスを購入し実験に用いた。
2. 内分泌かく乱化学物質：BPA (Wako: 025-13541) を用いた。

3. BPA の経口投与：BPA をエチルアルコールに溶解後、最終濃度 1%エチルアルコール水溶液として給水瓶よりの自由摂取させた。BPA 濃度 $0\mu\text{g/ml}$ 、 $2.5\mu\text{g/ml}$ 、 $10\mu\text{g/ml}$ の 3 群を Cont、Low、High 群とした。

C. 研究結果

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。

実験 A：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

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

実験 B：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

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

実験 C (現在進行中)：BPA の免疫系への影響を長期的に追跡するため、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。

D. 考察

BPA 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。

E. 結論

マウスでは母体に摂取された BPA が胎盤を通して、胎仔に作用し、子宮内胎仔死亡や胸腺萎縮をもたらすことが分かった。

①妊娠マウスに高濃度ではなく、低濃度の BPA を飲ませた場合に、子宮内胎児死亡が増加する。

②子宮内死亡を起こさず生存した胎仔、および新生仔についてその胸腺を調べると、萎縮性変化があり、胸腺リンパ球の増殖・分化が抑制されていることが

分かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 廣川勝昱、宇津山正典。低用量内分泌かく乱物質の免疫系に及ぼす影響について(分担)
高次生命系と内分泌攪乱化学物質—生体影響の分子機構— (井口、井上編)
シュプリンガー出版 印刷中
2. Hirokawa K, Utsuyama M and Makinodan T. Immunity and Aging. In Principle and Practice of Geriatric Medicine (Pathy MSJ ed). In press
3. Kitagawa M, Utsuyama M, Hirokawa K et al. Cancer and Aging. Cancer Immunol. Immunother. In press.
4. Tsunemi A, Utsuyama M, Hirokawa K. et al. Age-related decline of brain monoamines in mice is reversed to young level by japanease herbal medicine. Neuroch. Res. in press
5. Hirokawa K and Utsuyama M. Search for factors determining early decline of thymic function. Geriatr. Gerontol. Int. 2004;4:S251-253.
6. Seidler H, Utsuyama M, Hirokawa K et al. Expression level of Wnt signaling components possibly influences the biological behavior of colorectal cancer in different age groups. Exp. Mol. Pathol. 76:224-244, 2004
7. Endo T, Abe S, Hirokawa K. et al. Expression of IAP family proteins in colon cancers from patients with different age groups. Cancer Immunol. Immunoth. 53:770-776, 2004
8. Nakai D, Shimizu T, Hirokawa K, et al. coq7/clk-1 regulates mitochondrial respiration and the generation of reactive oxygen species via coenzyme Q. Aging Cell. 3:273-81. 2004
9. Okada Y, Ito Y, Hirokawa K. et al. Lewy bodies in the sinoatrial ganglion: clinicopathological studies. Pathol. Int. 54:682-687, 2004
10. Suzuki J, Ikeda T, Hirokawa K. et al. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms. BBRC. 314:1021-7, 2004

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 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

研究要旨

内分泌かく乱物質の免疫系への影響について、特にリンパ球とマクロファージへの影響について調べた。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。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、高濃度のノニルフェノール(NP)、ビスフェノール A(BPA)、フタル酸ジブチル(DBP)で低下した。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質の免疫系への影響について、特にリンパ球とマクロファージへの影響について調べた。すなわち、内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌かく乱物質の免疫系への影響も危惧されている。したがって、内分泌かく乱物質が内分泌系のみならず免疫機能へも何らかの影響を及ぼしている可能性がある。そこで、今年度はリンパ球への遺伝子レベルでの影響及びマクロファージの遊走能への影響について調べた。

B. 研究方法

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。

1. リンパ球への影響

Jurkat 細胞を FCS フリー及びフェノールレッドフリー培地で培養し、種々の濃度のノニルフェノール(NP)、ビスフェノール A(BPA)、フタル酸ジブチル(DBP)を添加し、一晚培養後、細胞から RNA を調製し、Affymetrix 社 Human Genome U133 Plus2.0 Array にて解析を行った。

2. マクロファージへの影響

HL60 細胞を FCS フリー及びフェノールレッドフリー培地で培養し、あらかじめ種々の濃度の NP、BPA、DBP をウェルに加えておいたケモタキシスチャンバーに加え、2時間後に遊走能の解析を行った。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

HL60細胞の遊走能は、高濃度(0.1mM)のNP、BPA、DBPで低下した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukamachi K, Han BS, Kim CK, Takasuka N, Matsuoka Y, Matsuda E, Yamazaki T, Tsuda H. Possible enhancing effects of atrazine and nonylphenol on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumor development in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. Cancer Science, 2004 95(5):404-410.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得:

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他(データベース等)

該当しない

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所毒性部 部長

研究要旨

本研究は、低用量内分泌かく乱化学物質の神経系初期発生に対する影響を、神経幹細胞における核内受容体の機能に着目して明らかにすることを目的とする。

これまでに、エストロゲンレセプターがマウス胎児神経幹細胞に発現しており、胎生期中期に一時的に DES 暴露を受けた後期胎児脳神経幹細胞が *ex vivo* 培養環境下で自己複製不良となること、そのメカニズムとして 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動が関係している事が示唆される結果を得ている。今年度は、胎生期後期胎児脳神経幹細胞における核内受容群の発現を、DNA マイクロアレイを用いて検討し、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。

本研究により、核内受容体群を介したシグナル伝達の中枢神経系発生機能制御への関わりについて新たな展望が開け、低用量内分泌かく乱候補化学物質の中枢神経系への作用点を明確にすることが可能となると期待される。

キーワード：

核内受容体、エストロゲン受容体、胎生初期暴露、神経幹細胞、自己複製、分化誘導、不可逆的变化（遅発影響）

A. 研究目的

低用量内分泌かく乱化学物質の神経系初期発生に対する影響を、神経幹細胞における核内受容体の機能に着目して明らかにすることが本研究の目的である。

すなわち、核内受容体群は神経系発達において

重要な機能を果たしていると考えられている。例えば、脳の性分化においてエストロゲンシグナルの重要性が示されている。エストロゲンレセプター(ER)は胎生初期から脳内で発現していることが確認されていることから、胎生初期の脳発達においてERが機能してい

る可能性が示唆される。胎生初期の脳は未熟な神経幹細胞が多く含まれる時期であり、胎児神経幹細胞に ER が発現し、機能している可能性が考えられるが、その研究は緒についたばかりである。

本研究では、ER を最重要標的としつつ、中枢神経系発生において発現している各種核内受容体群を同定し、それらが神経系初期発生のいかなる機能制御に相補的に寄与しているかを解析し、低用量内分泌かく乱候補化学物質の中枢神経系への作用点をシグナルクロストークを念頭に分子レベルで包括的且つ詳細に説明づけることを可能とすることを目的とする。

B. 研究方法

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影響を検討する。網羅的遺伝子発現解析を用い、DES の影響を調べ、核内受容体群の発現に関する情報を得る。

すなわち、

マウス胎児神経幹細胞培養（ニューロスフェア培養）

マウス C57BL/6 妊娠 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し、ピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培養培地 (N2/DMEM/F12 (シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、ブトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの)) には bFGF (10ng/ml) および EGF (25 ng/ml) を添加したものを用い、10cm シャーレ (ヌンク社) に 10^6 個/6ml の密度で生細胞を播種する。7日間培養し、単細胞から形成される細胞増殖塊 (ニューロスフェア)

の数と直径の測定、RNA 抽出および遺伝子発現検討を実施した。

マウス胎児神経上皮細胞培養（接着培養）

マウス C57BL/6 妊娠 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し、ピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培地 (N2/DMEM/F12 (シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、ブトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの)) に bFGF (10ng/ml) を添加したものを用い、あらかじめポリ-L-オルニチンおよびフィブロネクチンでコーティングした 10cm シャーレ (ヌンク社) に 1 胎児分の細胞/6ml の密度で細胞を播種。4 日間培養後、ピペッティングにて細胞をはがし、生細胞数をカウント後、 2×10^5 /200 μ l の細胞密度で 8well チャンバースライドに継代後、免疫染色に供した。

DES *in utero* 暴露

DES はコーンオイルに溶解し、妊娠 11.5 日目から 14.5 日目まで 2 μ g/kg 連日皮下投与した。

GeneChip 解析

マウス組織の場合は取得後すみやかに組織重量の 5 倍以上の容量の RNA later に浸し、RNase を不活化した後、RLT buffer にて破砕液とする。細胞は RLT buffer に直接回収し、破砕液とする。RLT 破砕液の 10 μ L を取り、DNA 定量用蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定し、DNA 含量に応じて Bacillus 由来の 5 種類の RNA を混合した Spike RNA cocktail を RLT 破砕液に添加する。RLT 破砕液は TRIZOL で抽出し、水層を得、キアゲン社

の RNeasy キットを用いて RNA を精製する。アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 5 µg を T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とする。次に T7 RNA ポリメラーゼ (アフィメトリクス社キット) を用い、デオキシ CTP, UTP を共存させつつ cRNA を合成する。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp になるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip にはマウス MGU74Av2 もしくは Mouse Genome 430 2.0 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45℃にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、スキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアにて絶対的数値に変換し、同ソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

C. 研究結果

胎生期後期胎児脳神経幹細胞における核内受容群の発現を、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。

以下にその詳細を述べる。

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。ER は alpha, beta ともにそれらの受容体より発現が相対的に低いことが示された。

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。

D. 考察

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考えられる。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描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。

E. 結論

マウスでは、胎児期のエストロゲン様内分泌かく乱化学物質への暴露により、神経幹細胞の自己複製能、分化能に影響が生じることが示唆された。また、胎児神経幹細胞では GR や TRa などの核内受容体が発現していることが明らかとなり、次年度以降これらの受容体シグナル系のクロストークに着目した解析を加えていく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, Kanno J, Inoue T, Saga Y. Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev.* 2004 Dec;121(12):1443-53.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Inoue T. Mechanism of

- benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses. *Toxicol Pathol.* 2004 Jul-Aug;32 Suppl 2:12-6.
- Fujimoto N, Igarashi K, Kanno J, Honda H, Inoue T. Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 Jul;91(3):121-9.
- Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T. Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004 Jun;229(6):494-502.
- Nagao T, Wada K, Kuwagata M, Nakagomi M, Watanabe C, Yoshimura S, Saito Y, Usami K, Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod Toxicol.* 2004 Jan-Feb;18(1):109-20.
- Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willecke K, Inoue T. Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells. *Toxicology.* 2004 Jan 15;195(1):19-29.
- 菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、中津則之、トキシコゲノミクス、ゲノム研究実験ハンドブック、p329-337 実験医学別冊 2004
- 菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、中津則之 ゲノム毒性学形質非依存型トキシコゲノミクスの導入、細胞工学 Vol.23 No.6 2004685-693、株式会社秀潤社
- 菅野 純 : 医薬品開発におけるわが国のトキシコゲノミクスの取り組み、月刊薬事、2004年5月, Vol.46, No.6 株式会社じほう
- 菅野 純 : 化学物質の毒性 化学と教育 52巻5号『化学物質とリスク評価』2004年 302-305 (社)日本化学会

2. 学会発表

- Jun Kanno, Screening/Testing Scheme for Endocrine Disrupting Chemicals, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia
- Jun Kanno, Endocrine Disrupting Chemicals Researches, Current Topics, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia

- 菅野 純 「前向き」Toxicogenomics、
第 88 次日本法医学会総会、2004 年 6
月 2~4 日、旭川
- 高橋 雄、北嶋 聡、菅野 純、相賀裕
美子、「Notch リガンド D113 は Mesp2
の欠損による体節形成と前後パターン
形成の異常を回復する」、日本発生生
物学会第 37 回大会、2004 年 6 月 4~6
日、名古屋
- 平林容子、壺井 功、菅野 純、井上 達、
「造血器における細胞間ギャップ結合
の病理-コネクシン欠失による造血障
害と実験白血病高甘感受性について
-」、第 93 回日本病理学会総会、2004
年 6 月 9~11 日、札幌
- J Kanno, K Aisaki, A Ono, N Nakatsu,
Y Kodama, K Igarashi, PHENOTYPE-
INDEPENDENT TOXICOGENOMICS USING
“PERCELLOME” AND “MILLE-FEUILLE”
DATA SYSTEM, 第 31 回日本トキシコ
ロジー学会学術年会 (特別講演)、2004
年 7 月 6~8 日、大阪
- 中津則之、相_ 健一、五十嵐勝秀、小野
敦、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純、「日
内変動遺伝子群プロファイルの解析」
第 31 回日本トキシコロジー学会学術
年会 (口演)、2004 年 7 月 6~8 日、
大阪
- J Kanno, K Aisaki, A Ono, K Igarashi,
TOXICOGENOMICS USING “PERCELLOME”
AND “MILLE-FEUILLE” DATA SYSTEM,
10th International Congress of
Toxicology, 11-15 July, 2004;
Tampere, Finland
- 鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小
原有弘、本間正充、林 真、高木篤
也、菅野 純、「GeneChip による遺
伝子発現解析を用いてアリストロキ
ア酸による遺伝子傷害の臓器特異性
を予測可能か Use of the gene
expression analysis by the
GeneChip for a prediction of the
target organs in Aristolochic
acid-induced genotoxicity in
mice.」第 63 回日本癌学会学術総会、
2004 年 9 月 29 日~10 月 1 日、福岡
- 菅野 純、藤井寿一、菅野 仁、相_
健一、「解糖系障害で誘導される赤
芽球アポトーシスと p53 の関連、p53
involvement in glycolysis
disorder-induced apoptosis of
erythroid cell」第 63 回日本癌学
会学術総会、2004 年 9 月 29 日~10
月 1 日、福岡
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki,
Katsuhide Igarashi, Noriyuki
Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio
Kodama “Percellome” Analysis of
Hormonally Active Compounds.
Toxicogenomics International
Forum 2004, 12-13 October, 2004
- 五十嵐勝秀、高橋芳樹、菅野 純、内分泌
かく乱化学物質の胎児神経幹細胞に対
する作用、第 27 回日本分子生物学会年
会、2004 年 12 月 8 日~12 月 11 日、
神戸
- 中津則之、相崎健一、小野 敦、五十嵐勝
秀、児玉幸夫、菅野 純、マウス肝臓
におけるダイオキシン類による遺伝子
発現変動解析、第 27 回日本分子生物学
学会年会、2004 年 12 月 8 日~12 月 11
日、神戸

椎名博子、佐藤隆史、五十嵐勝秀、松本高広、宮本純子、高田伊知郎、中村貴、盛真友、菅野純、吉川裕之、加藤茂明、アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子である、第27回日本分子生物学会年会、2004年12月8日～12月11日、神戸

高橋芳樹、五十嵐勝秀、菅野純、マウス胎児神経幹細胞の維持におけるDNAメチル化の役割、第27回日本分子生物学会年会、2004年12月8日～12月11日、神戸

渡辺裕介、小久保博樹、宮川一富田幸子、五十嵐勝秀、菅野純、相賀裕美子、マウス心臓におけるNotch1シグナリングの機能解析、2004年12月8日～12月11日、神戸

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Percellome" method application to the analysis of hormonally active compounds and its possible contribution to the ecotoxicogenomics. 環境ホルモン学会第7回研究発表会、2004年12月15日、名古屋

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 粟生修司 九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報専攻 教授

研究要旨

耐容1日摂取量以下の量の Bisphenol A (BPA) を胎生期の出生前1週間に限定して曝露し、仔ラットの成長後にオープンフィールド試験(探索行動)、高架十字迷路試験(不安反応)、受動的回避学習試験(回避学習)、強制水泳試験(うつ反応)を施行し、行動の性分化に及ぼす影響を調べた。その結果、探索行動の性分化を障害し、さらに不安・うつ反応を増強することが判明した。また、扁桃体内側核領域のニューロンの嗅覚応答様式の性差にも影響を及ぼし、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ことが示唆された。

A. 研究目的

低用量の BPA を妊娠後期のラットに投与し、仔ラットの成長後の行動に与える影響を調べた。すなわち、従来明らかになっていた周産期曝露での探索行動への影響(Kubo et al., 2003)を胎生期曝露でも調べ、行動の性分化の胎生期間における重要性を評価すると同時に様々な行動試験を通して鋭敏な評価法の確立を目指した。さらに機能レベルでの中枢影響を評価するため、電気生理学的手法を用い、扁桃体内側核領域のニューロン応答に与える影響を調べた。

B. 研究方法

耐容1日摂取量(50 μ g/kg/day)以下のBPA(0.1ppm)を飲水中に混ぜ妊娠ラットの出産前1週間だけ曝露し、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。すなわち、オープンフィールド試験で探索行動を、受動的回避学習試験で回避学習能を調べ、従来の周産期曝露の結果と比較した。さらに強制水泳試験でうつ傾向とストレス対処行動を評価し、高架十字迷路試験で不安レベルに及ぼす影響を調べた。また、扁桃体内側核領域のニューロンの嗅覚応答を細胞外記録法により調べた。

(倫理面への配慮)

所属施設である九州工業大学大学院生命体工学研究科における動物実験に関する指針の規制に基づいて行った。

C. 研究結果

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。すなわち、探索行動の指標となるオープンフィールド試験における立ち上がり行動の回数は、従来の周産期曝露と同様、対照群で性差(オス<メス)があったが、曝露群では消失した。一方、受動的回避学習試験では、従来 5ppm BPA の周産期曝露で性差が消失したが (Kubo et al., 2001)、今回の出産前曝露では影響がなかった。強制水泳試験では、対照群の struggling 時間 (ストレス対処行動の指標) はメスの方が有意に長かったが、今回の出産前 1 週間曝露でその性差が消失した。うつ反応の指標である immobility 時間は、対照群でも性差は認められなかったが、胎生期曝露により対照群に比べ有意に延長した。高架十字迷路試験では、対照群に比べ、曝露群でオープンアーム滞在時間が短縮し、不安傾向が認められた。扁桃体内側核領域のニューロンは、種々のニオイ物質に対して興奮性応答および抑制性応答を示した。対照群では興奮性応答がメスよりもオスで有意に多く、性差が認められたが、曝露群ではこの性差が消失した。また、各群のオスメスの応答を合計すると BPA 曝露で興奮性応答が有意に増加した。

D. 考察

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かく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。

E. 結論

ラットでは、BPA は探索行動、不安・うつに影響を及ぼし、扁桃体内側核領域の機能にも影響を与える。すなわち、BPA の出産前 1 週間の胎生期曝露は、従来の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。また、強制水泳試験におけるうつ反応やストレス対処行動、高架十字迷路試験における不安反応も影響を受ける。さらに扁桃体内側核領域のニューロンの嗅覚応答様式の性差にも影響を及ぼすことが示唆される。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. © Omura M, Shimasaki Y, Oshima Y, Nakayama K, Kubo K, Aou S, Ogata R, Hirata M, Inoue N. (2004) Distribution of Tributyltin,

- Dibutyltin and Monobutyltin in the Liver, Brain, Fat and Neonate of Rats - Evaluation in Two-Generation Toxicity Study of Tributyltin Chloride. *Environ Sci.* 11,2, 123-132
2. ©Aou S, Inoue T, Fujimoto T, Mizuno M, Oomura Y, Kubo K, Arai O (2004) Chemical impacts on higher brain functions. *Brain-Inspired IT I*, p101-104
 3. Takeda S, Kunugita N, Fueta Y, Fukunaga K, Aou S (2004) Anxiety induced by a chronic exposure to formaldehyde in mice. *Neuroscience2004 Press Book Part II*, 699-701
 4. Mizuno M, Doi A, Yasaka T, Furue H, Aou S, Yoshimura M (2004) In vivo patch-clamp analysis of synaptic responses in rat primary somatosensory barrel cortex(SI). *Brain-Inspired IT I*, p73-76
 5. Aou S, Uchida N, Matsunaga Y, Kubo K, Li XL, Hatanaka A (2004) Green odor reduces pain sensation and fatigue-like responses without affecting sensori-motor function. *Chemical sense*, in press
 6. Kim J, Ishibashi M, Nakajima K, Aou S, Hatanaka A, Oomura Y (2004) Effects of green odor on expression of Fos-immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the thalamus in forced swimming rats. *Chemical sense*, ページ in press
 7. ©Aou S, Hanazawa A, Nakagawa H (2004) Behavioral and electrophysiological study on neural mechanisms underlying sensory recognition, emotional integration and behavioral expression: neurobiological basis of brain-inspired technology. 印刷中
 8. 粟生修司、内田典子、久保千春 (2004) 免疫. *脳機能と栄養*、横越英彦編、幸書房、249-257
 9. 粟生修司、藤本哲也 (2004) 性欲. *脳機能と栄養*、横越英彦編、幸書房、257-265
 10. ©粟生修司 (2004) ビスフェノールA と行動発達障害. *BRAIN MEDICAL*. 株式会社メディカルレビュー社、印刷中
 11. ©粟生修司 (2004) ビスフェノールAの青斑核に対する影響. *高次生命系と内分泌攪乱物質*、井口泰泉・井上達編、シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社、印刷中
2. 学会発表
 1. Aou S, Oomura Y, Hori N, LiX.-L, Li.-J (2004) Energy signals regulates learning and memory function. The 4th Korea-Japan joint symposium on brain science and cardiac- smooth muscle physiology、韓国
 2. ©Aou S, Inoue T, Fujimoto T, Mizuno M, Oomura Y, Kubo K, Arai O. (2004) Chemical impacts on higher brain functions. *生命体国際シンポジウム*
 3. Mizuno M, Doi A, Yasaka T, Furue H, Aou S, Yoshimura M. (2004) In vivo patch-clamp analysis of synaptic

- responses in rat primary somatosensory barrel cortex (SI). 生命体国際シンポジウム
4. Aou S, Uchida N, Matsunaga Y, Kubo K, Li X-L, Hatanaka A. (2004) Green odors reduces fatigue-like responses without affecting normal locomotor activity. ISOT/JASTS 2004,
 5. Sasaki K, Aou S, Hatanaka A, Oomura Y. (2004) Green leaf fragrance restores the increased 5-HT metabolisms and the decreased short-term food Intake during and / or after immobilization stress in rats. ISOT/JASTS 2004
 6. ©T Fujimoto, K Kubo, S Ueno, S Aou (2004) Exposure to bisphenol A during a later fetal period affect the exploratory behavior and emotions in rats, 34th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego
 7. T Inoue, S Takara, M Mizuno, T Hasegawa; S Aou (2004) Categorical visual discrimination of food and sex in rhesus monkey, 34th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego
 8. K Sasaki, S Aou, A Hatanaka, Y Oomura (2004) Effects of trans - 2 - hexenal on brain 5 - HT and da metabolisms in rats with electrical foot shock, 34th Annual Meeting Society for Neuroscience. San Diego
 9. K Kubo, O Arai, S Aou (2004) Perinatal exposure of endocrine disrupters impair the sex differences in open - field behavior and the locus coeruleus size in rats, 34th Annual Meeting Society for Neuroscience, 34th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego
 10. S Takeda, N Kunugita, Y Fueta, K Fukunaga, S Aou (2004) Anxiety induced by a chronic exposure to formaldehyde in mice, 34th Annual Meeting Society for Neuroscience,
 11. 高良沙幸、井上貴雄、水野雅晴、粟生修司 (2004) サルの視覚的弁別機能に及ぼす内外界ストレスの影響. 生理第 55 回西日本学会.
 12. 藤本哲也、久保和彦、粟生修司 (2004) 内分泌攪乱物質ビスフェノール A の胎生期曝露はニオイに対する行動および神経応答に影響を与える. 生理第 55 回西日本学会.
 13. 竹田勝一、樺田尚樹、笹田由紀子、粟生修司 (2004) ホルムアルデヒドの慢性曝露はマウスの不安を引き起こす. 生理第 55 回西日本学会.
 14. 甲斐義宏、藤本哲也、粟生修司 (2004) ラット学習機能に及ぼす植物の香りの影響. 生理第 55 回西日本学会
 15. 佐々木和男、粟生修司、畑中顕和、大村裕 (2004) ストレス下ラット脳内アミン代謝及び摂食量変化に対する「みどりの香り」の作用. 第 43 回日本エム・イー学会大会.
 16. 粟生修司 (2004) 「内分泌攪乱化学物質の学習行動および情動行動に及ぼす影響」第 10 回「性と生殖」公開シンポジウムー生殖機能と環境ー
 17. ©藤本哲也、久保和彦、粟生修司 (2004) ビスフェノール A の胎生期曝露

はラットのニオイに対する警戒行動および扁桃体神経応答に影響を与える。
第7回環境ホルモン学会研究発表会。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他（データベースなど）

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 加藤茂明 東京大学分子細胞生物学研究所 教授

研究要旨

内分泌かく乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つには、性ステロイドホルモン作用のかく乱が考えられている。本研究では、核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにする。具体的には、男性、女性ホルモンレセプターの転写共役因子を同定するとともに、ダイオキシンレセプターの相互作用を解析した。その結果、この2者のレセプターが直接相互作用することで、女性ホルモン作用がかく乱することが明らかになった。

A. 研究目的

低用量内分泌かく乱化学物質の性生殖へ影響を及ぼす作用点を分子レベルで解明する。すなわち、性生殖作用を担う性ステロイドホルモン作用へのかく乱効果を、ホルモンレセプターの転写制御機能について調べる。これまで継続してきた性ホルモンレセプター共役因子群の同定に加え、特に本年度はダイオキシンレセプターを介した女性ホルモンレセプターへの影響について検討した。

B. 研究方法

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。すなわち、性ホルモンレセプター群に結合する転写共役因子複合体を、生化学的に精製及びその構成

因子群を同定する。また、複合体としての機能を *in vitro* 系で評価する。また、ダイオキシンレセプターとの機能的相互作用を転写レベルで検討する。

C. 研究結果

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。すなわち、

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。興味深いことに、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で下で、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* 細胞系で解析を行なってきたが、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 発現ハエラインも樹立した。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。

D. 考察

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る。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。

E. 結論

性ホルモンレセプターの転写制御能をレセプター相互作用因子の観点から検討した。すなわち、男性及び女性ホルモンレセプターに結合する新たな転写共役因子を同定し、それらが内分泌かく乱物質の標的分子候補である可能性が考えられた。また、ダイオキシンレセプターとの会合による新たな性ホルモンかく乱作用の分子機構を明らかにした。

F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は特に無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

©Murayama A, Kim M, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S.: Trans-repression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J.*, 23, 1598-1608, 2004.

©Sato T, Matsumoto T, Kawano H,

Watanabe T, Uematsu Y, Sekine K, Fukuda T, Aihara K, Krust A, Yamada T, Nakamichi Y, Yamamoto Y, Nakamura T, Yoshimura K, Yoshizawa T, Metzger, D, Chambon P, Kato S.: Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 1673-1678, 2004.

©Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S.: Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J. Biol. Chem.*, 279, 40255-40258, 2004.

Maki A, Sawatsubashi S, Ito S, Shiode Y, Suzuki E, Zhao Y, Yamagata K, Kouzmenko A, Takeyama K, Kato S.: Juvenile hormones antagonize ecdysone actions through co-repressor recruitment to EcR/USP heterodimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 262-267, 2004.

Sawatsubashi S, Maki A, Ito S, Shiode Y, Suzuki E, Zhao Y, Yamagata K, Kouzmenko A, Takeyama K, Kato S.: Ecdysone receptor-dependent gene regulation mediates histone poly (ADP-ribosyl)ation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 268-272, 2004.

©Takeyama K, Ito S, Sawatsubashi S, Shiode Y, Yamamoto A, Suzuki E,