

- by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 95, 1-6 (2004)
- Yamamoto J., Ihara K., Nakayama H., Hikino S., Satoh K., Kubo N., Iida T., Fujii Y., Hara T. Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: Organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sci.* 9, 1039-1049 (2004)
- Yoshiaki Fujii-Kuriyama and Junsei Mimura. Transcriptional roles of AhR in expression of biological effects induced by endocrine disruptors. *Pure Appl. Chem.*, 75, 1819-1826 (2003)
- Kikuchi Y, Ohsawa S, Mimura J, Ema M, Takasaki C, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y., Heterodimers of bHLH-PAS Protein Fragments Derived from AhR, AhRR, and Arnt Prepared by Co-Expression in *Escherichia coli*: Characterization of Their DNA Binding Activity and Preparation of a DNA Complex. *J. Biochem.*, 134, 83-90 (2003)
- Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S., Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423, 545-550 (2003)
- Takashi Moriguchi, Hozumi Motohashi, Tomonori Hosoya, Osamu Nakajima, Satoru Takahashi, Seiichiroh Ohsako, Yasunobu Aoki, Noriko Nishimura, Chiharu Tohyama, Yoshiaki Fujii-Kuriyama and Masayuki Yamamoto, Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse, *Proc. Natl Acad. Sci. U SA.*, 100, 5652-5657 (2003)
- Shuhei Noda, Nobuhiko Harada, Azumi Hida, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Hozumi Motohashi and Masayuki Yamamoto. Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303, 105-111 (2003)
- Masanobu Morita, Osamu Ohneda, Toshiharu Yamashita, Satoru Takahashi, Norio Suzuki, Osamu Nakajima, Shimako Kawauchi, Masatsugu Ema, Shigeki Shibahara, Tetsuo Udono, Koji Tomita, Makoto Tamai, Kazuhiro Sogawa, Masayuki Yamamoto and Yoshiaki Fujii-Kuriyama. HLF/HIF2a is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO J.*, 22, 1134-1146 (2003)
- Junsei Mimura, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD, *Bioch. Biophys. Acta*, 1619, 263-268 (2003)
- Byung-II Yoon, Yoko Hirabayashi,

Yasushi Kawasaki, Yukio Kodama, Toyozo Kaneko, Jun Kanno, Dae-Yong Kim, Yoshiaki Fujii-Kuriyama and Tohru Inoue. Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Benzene-Induced Hematotoxicity, *Toxicol. Sci.* 70, 150-156 (2002)

Masahide Tojo., Kazuhito Matsuzaki., Takeshi Minami., Yoshiomi Honda., Hideyo Yasuda., Tsutomu Chiba., Hideyuki Saya., Yoshiaki Fujii-Kuriyama, and Mitsuyoshi Nakao. The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Transporter is Modulated by the SUMO-1 Conjugating System, *J. Biol. Chem.* 277, 46576-46585 (2002)

Shimada T., Inoue K., Suzuki Y., Kawai T., Azuma E., Nakajima T., Shindo M., Kurose K., Sugie A., Yamagishi Y., Fujii-Kuriyama Y., Hashimoto M. Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, 23, 1199-1207 (2002)

Wang F., Sekine H., Kikuchi Y., Takasaki C., Miura C., Heiwa O, Shuin T., Fujii-Kuriyama Y., Sogawa K. HIF-1 α -prolyl hydroxylase: molecular target of nitric oxide in the hypoxic signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res. Commun.* 295, 657-662 (2002)

Gradin K., Takasaki C., Fujii-Kuriyama Y., Sogawa K. The Transcriptional Activation Function of the HIF-like Factor Requires Phosphorylation at a Conserved Threonine. *J Biol Chem.* 277, 23508-23514 (2002)

Oikawa, K., Ohbayashi, T., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Teshima, S., Rokutan, K., Mukai, K. & Kuroda, M. Dioxin stimulates synthesis and secretion of IgE-dependent histamine-releasing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 984-987 (2002)

Mimura, J. & Y. Fujii-Kuriyama. Regulatory roles of AhR. *Env. Sci.* 9, 71-81 (2002)

2. 学会発表 (国内)

藤井義明, 持田製薬総合研究所セミナー, 「AhR を介した生体における外来異物応答のメカニズム」, 持田製薬株式会社・創薬第三研究所 (御殿場) 2004年4月26日 (月)

藤井義明, 第241回CBI学会研究講演会, 「AhR 研究の最近の進歩」, 日本化学会化学会館 7F ホール (お茶の水), 2004年4月27日 (火)

藤井義明, 第81回日本生理学会, 「生体の環境適応と遺伝子発現制御」, 内分泌攪乱物質の生物作用発現と雌マウス生殖における AhR の役割, 北海道札幌コンベ

ンションセンター (札幌) 2004 年 6 月 3 日 (木)

藤井義明, 第 77 回日本生化学会大会マスターズレクチャー講演, “Molecular mechanisms of mammalian responses to environmental pollutants”, パシフィコ横浜 (横浜) 2004 年 10 月 13 日 (水)

三村純正, 大島基彦, 山本雅之, 藤井義明, AhRR の SUMO 化とその意義, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004 年 12 月 8 日 (水)

岩田典子, 大根田修, 山下年晴, 藤井義明, 山本雅之, HIF-2 α 遺伝子ノックダウンマウスにみられる貧血に対する解析, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004 年 12 月 8 日 (水)

山下年晴, 大根田修, 長野真澄, 岩田典子, 藤井義明, 山本雅之, IPAS/HIF-3 α は低酸素刺激によるエリスロポエチン産生に関与している, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004 年 12 月 8 日 (水)

大竹史明, 馬場敦史, 三木ひろみ, 高田伊知郎, 藤井義明, 加藤茂明, ダイオキシン受容体とエストロゲン受容体のクロストークを制御するユビキチンリガーゼ複合体の精製, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004 年 12 月 9 日 (木)

藤井義明, 第 7 回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム, “多環性芳香族化合物の内分泌攪乱作用における AhR の役割, Roles of AhR in endocrine disruptive effects by polycyclic

aromatic hydrocarbons”, 名古屋国際会議場 (名古屋), 2004 年 12 月 15 日 (水) ~ 17 日 (金)

藤井義明, 日本薬学会関東支部第 29 回学術講演会「化学物質の毒性メカニズムとリスク評価」“生体の外来異物応答における AhR の役割”, (独) 国立環境研究所 大山記念ホール (つくば市), 2005 年 1 月 18 日 (火)

(国外)

Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Workshop in Saarbrücken “3000 and more Cytochromes P450: where to go now?”, Germany (July, 1 - 3, 2004)

Yoshiaki Fujii-Kuriyama, 15th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO2004), Mainz, Germany (July, 4-9, 2004)

Yoshiaki Fujii-Kuriyama, The Nobel-conference on Oxygen Biology “Functional role of Hif-2a in tumor angiogenesis” Karolinska Institutet in Stockholm, Sweden. (November 11-13, 2004)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

7. ヒト型モデル試験系による内分泌かく乱化学物質の影響解析

鎌滝 哲也

北海道大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨

これまでに我々は多環芳香族炭化水素 (PAHs) が retinoid X receptor (RXR) α を aryl hydrocarbon receptor (AHR) を介して抑制することを見出した。RXR α は様々な核内受容体とヘテロ二量体を形成し、ホルモンバランスに調節している。そこでコレステロールのホメオスタシスに深く関与する核内受容体、liver X receptor (LXR) シグナルに対する PAHs の影響を検討したところ、LXR α シグナル伝達経路に対して PAHs が AHR を介して抑制することを見出した。

A. 研究目的

PAHs による AHR を介した RXR α の抑制が、生体内でのコレステロール代謝のマスターレギュレーターである LXR α シグナル伝達経路を抑制するか否かをヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いて検討し、PAHs による RXR α の抑制機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

PAHs が LXR α 標的遺伝子 (ABCA1, SREBP1c) mRNA 発現に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。TK プロモータに LXR 応答配列を連結させたレポータープラスミドを HepG2 細胞に導入し、3-methylcholanthrene (MC) の LXR α 転写活性に及ぼす影響を検討した。RXR α タンパク質の発現量は HepG2 細胞から調製した核抽出液を用い、ウエスタンブロット法により定量した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

PAHs の一つである 3-methylcholanthrene (MC) で処置した場合、ABCA1 及び SREBP1c mRNA 発現量は MC の濃度依存的に抑制された。LXR α を介して誘導された転写活性は MC によって抑制された。MC による LXR α を介した転写活性の抑制は siAHR 導入により回復した。MC による RXR α タンパク質の

発現量の抑制はプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチン共処置によって解除された。このことから、LXR α シグナル伝達経路は PAHs によって AHR を介した RXR α タンパク質のプロテアソームによる分解が促進されることで抑制される可能性が示唆された。

D. 考察

LXR α 欠損マウスにおいて、コレステロール代謝のバランスが著しく低下し、肝臓へのコレステロールの蓄積および血漿コレステロール濃度の上昇が報告されている。また PAHs はタバコ煙中に多く含まれ、動脈硬化を誘発することが知られている。以上のことから、PAHs は LXR α /RXR α シグナル伝達系を抑制することでコレステロールのホメオスタシスを阻害し、その結果、動脈硬化誘発などの毒性が誘発される可能性が示唆された。

E. 結論

PAHs が LXR α のリガンドによって誘導される LXR α 標的遺伝子の mRNA 発現を濃度依存的に抑制した。LXR α を介して誘導された転写活性は PAHs によって AHR 依存的に抑制された。LXR α のヘテロ二量体のパートナーである RXR α のタンパク質の分解はプロテアソームを介して PAHs によって促進される可能性が示唆された。以上を示す PAHs による LXR α シグナルの抑制は、タバコによる動脈硬

化誘発機序の一つであることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

該当なし。

2) 雑誌

Manabu Nukaya, Yoshiki Takahashi, Frank J. Gonzalez and Tetsuya Kamataki: Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of GH receptor and janus kinase 2 expression in mice, FEBS Letter, 558(1-3):96-100, 2004

Kenji Toide, Hiroshi Yamazaki and Tetsuya Kamataki: Response to the Letter to the Editor(Reply): Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A1, in human freshly isolated white cells: trimodal distribution of Japanese population according to induction of CYP1B1 mRNA by environmental dioxins, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. ,12 : 1118, 2003

Kenji Toide, Hiroshi Yamazaki, Rikako Nagashima, Keisuke Itoh, Shunsuke Iwano, Yoshiki Takahashi, Shaw Watanabe and Tetsuya Kamataki: Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A1, in human freshly isolated white cells: trimodal distribution of Japanese population according to induction of CYP1B1 mRNA by environmental dioxins, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 12:219-222, 2003

2. 学会発表

岩野俊介, 糠谷学, 斎藤鉄也, 浅沼文恵, 鎌滝哲也: Disruption of Liver X Receptor Signal Pathways by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons via Aryl Hydrocarbon Receptor, 日本分子生物学会, 第 27 回年会 (神戸), 436, 2004.

岩野俊介, 糠谷学, 斎藤鉄也, 浅沼文恵, 鎌滝哲也: PAH による AhR を介した LXR

シグナル伝達の抑制, 日本薬物動態学会, 第 19 回年会 (金沢), 39, 2004.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による PPAR α シグナル伝達の抑制とその分子機構, 日本分子生物学会, 第 25 回年会 (横浜), 944, 2002.

柴原憲仁, 糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による血液凝固第 V 因子遺伝子の発現抑制とその影響, 日本分子生物学会, 第 25 回年会 (横浜), 944, 2002.

Manabu Nukaya, Yoshiki Takahashi, Frank J. Gonzalez and Tetsuya Kamataki, Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of PPAR α signal caused by polycyclic aromatic hydrocarbons, North American International Society for the Study of Xenobiotics, 11th Meeting (Orlando), 35, 2002.

柴原憲仁, 糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による血液凝固カスケードの阻害について, 日本薬物動態学会, 第 17 回年会 (東京), 223, 2002.

Manabu Nukaya, Yoshiki Takahashi, Frank J. Gonzalez and Tetsuya Kamataki, Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of growth hormone signal caused by polycyclic aromatic hydrocarbons, Microsomes and Drug Oxidation, 14th International Symposium (Sapporo), 169, 2002.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による PPAR α 標的遺伝子の抑制とその分子機構, 日本トキシコロジー学会, 第 29 回年会 (名古屋), 226, 2002.

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録
該当なし。

3. その他
該当なし。

8. 齧歯類前立腺を用いた内分泌かく乱化学物質の新生仔暴露の作用

藤本 成明

広島大学 助教授

研究要旨

マウス前立腺に対する EDC 暴露の作用を検討する第一段階として、前立腺における発現タンパク質をプロテオーム解析により同定し、これまで未解明であったマウスの前立腺タンパク質を同定した。一方、新生仔期前立腺における cDNA マイクロアレイ解析により、この時期におけるアンドロゲン応答性遺伝子を明らかにした。mRNA 定量発現解析の結果、新規同定タンパク質／遺伝子の一部はアンドロゲン応答性であるばかりでなく、エストロゲンおよび 3 メチルコラントレンにより発現修飾を受けることが示された。

A. 研究目的

新生仔期 (PND0-15) マウス前立腺に対する化学物質の障害作用は、前立腺ダクトの分岐発達へ関わるものである。これはアンドロゲンにより惹起される過程であるので、まずこの時期の前立腺においてアンドロゲンに应答する遺伝子群を網羅的に検索同定する。さらに、それらの遺伝子発現に対するダイオキシン類およびエストロゲン作用物質应答性を検討することにより、障害作用のターゲット遺伝子を同定する。

本年度は、1) マウス前立腺から分泌されている未解明タンパク質群の同定と、2) 新生仔期前立腺での、アンドロゲン標的遺伝子の検索をおこなう。

B. 研究方法

1) 動物： 生後 5 日目、及び 10 週齢の C57BL 雄マウスを Charles River Japan より購入した。前立腺分泌タンパクの解析には、11 週齢の正常 C57BL マウスを用いた。新生仔マウスは、直ちに去勢し、PND6 で dihydrotestosterone (DHT) 20 μ g/pup (10mg/kg) を s.c. 投与した。また成熟動物へのホルモン投与試験では、10 週齢動物を去勢して一週間おいて用いた。投与は、DHT 5mg/kg, 17 β estradiol (E2) 50 μ g/kg, 3-methylcholanthrene (3MC) 10 mg/kg とした。前立腺組織については、腹葉 (V)、背側葉 (DL)、凝固体 (CG) を解剖学的に区別して保存した。精囊 (SV) も保

存した。

2) 二次元電気泳動と MALDI-TOF/MAS 解析によるタンパク質同定： 前立腺 V、DL 組織をプロテアーゼ阻害剤含有の PBS 中で切断して内容物を溶出した。これを pI レンジ 4-7 及び 3-10 で等電点電気泳動した後、12.5%の SDS-PAGE で二次元目泳動を行った。銀染色の各スポットからタンパク質を抽出した後、トリプシン消化を行い MALDI-TOF 質量分析機によりマススペクトルを測定した。これに peptide mass fingerprinting 法を適用してタンパク質を同定した。

3) mRNA 定量： 既知の前立腺タンパク質および新規に同定されたタンパク質についてその mRNA レベルの定量した。前立腺の各組織から RNA 抽出キットにより全 RNA を精製し cDNA 化後、Sybr green による real time PCR 法により mRNA の発現レベルを測定した。内部標準として β actin を定量した。

4) cDNA マイクロアレイ解析： 各組織より全 RNA を抽出した後、これを鋳型に、cDNA 化、cRNA 化し、Affymetrix 社 GeneChip mouse シリーズによる変動遺伝子を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては、苦痛の少ない方

法を用いるなど、本大学の動物取り扱い倫理規定に沿って行った。

C. 研究結果

1) マウス前立腺における既知前立腺タンパク質の mRNA 発現 (Fig.1) : 既知分泌タンパク質の probasin (Pb), prostatic secreted protein 94 a.a. (PSP94), Seminal vesicle secreted protein 2 (SVS2), prostatein (homolog), kallikrein (PSA homolog), Cystatin related protein 1 (CRP-1, predicted cDNA) について mRNA を定量した。高いレベルの Pb および PSP94 の発現が lobe 特異性をもって見られた。SVS2 は、前立腺では発現がなく、SV に限局的に強く発現していた。増殖因子群 EGF, IGF-1, FGF2, KGF, TGF α/β については、部位によらず一様に発現していた。アンドロゲン受容体 (AR) mRNA の発現も SV を含む全ての部位で観察された。また、エストロゲン受容体 (ER) α も同程度の量発現していた一方で、ER β は V, DL に限局されていた。

2) マウス前立腺分泌タンパク質の同定 : マウス前立腺分泌物を 2 次元電気泳動で展開して、多く発現しているタンパク質を同定した (Fig.2)。その結果、polyimmunoglobulin receptor (PIGR), protein disulfide isomerase, urinary bladder cDNA (UB), α -actin, zinc- α -2-glycoprotein (Z2G), peroxiredoxin 6 (Perox6), major urinary protein (MUP), dnaK-type molecular chaperone grp78 (GRP78), rosin が同定された。

3) 新規に同定されたタンパク質 mRNA の発現と調節 : mRNA の定量解析の結果、Z2G, Perox6, GRP78, UB が高発現していた (Fig.3)。また UB、PIGR は V 側に発現が限局していた。さらに去勢マウスでは、UB, GRP78, Z2G, Perox6 の発現が低下することが示された。

4) 新生仔期前立腺での発現遺伝子 : 生後 1W 動物では、前立腺のいずれの部位でも、Pb, PSP94, SVS2 の発現は非常に低かった。ER β mRNA は発現していな

った。PIGR, UB も低値であった。しかし、この時期 AR mRNA および ER α mRNA レベルは 10 週齢動物と同程度発現していた。同様に Z2G 及び Perox6 も高発現していた。また MUP の発現は、成体に比し 1W での発現のほうが 100 倍以上高かった。

5) 新生仔期前立腺での発現遺伝子 2 : cDNA マイクロアレイ解析により同定された遺伝子 : 生後 1W の前立腺の腹葉と背側葉において有意な RNA 発現量があって、テストステロンに応答の見られた遺伝子として、small proline-rich proteins (SPRP), lipin2, cathepsin E, defensin β 等が同定された (Table 1)。

6) 3MC 及び E2 の遺伝子発現への作用 : 去勢 10W 動物において、アンドロゲン応答性遺伝子発現に対する、E2 及び 3MC の作用を検討した。DHT 単独投与群に比べ、DHT +E2 群では IGF-1 及び ER α が 2.5 倍発現上昇していた。一方で、DHT +3MC 群においては mUB, grp78 の発現がそれぞれ 1/2, 1/4 に低下した。

D. 考察

本研究では、新生仔期マウス前立腺のアンドロゲン応答遺伝子を検索し、内分泌かく乱物質の障害標的遺伝子を同定する。一般に前立腺においてアンドロゲンにより調節されている代表的なタンパク質は、前立腺分泌タンパク質群であり、ヒトとラットで Prostatein, CRP-1, PSP94, PSA, Pb 等が報告されてきた。しかし、マウスの分泌タンパク質については、未解明であったので、プロテオーム解析により分泌タンパク質を同定することで、アンドロゲン標的遺伝子の一群を明らかにできると考えた。10 週齢マウス前立腺分泌物の 2 次元電気泳動の主要なスポットを同定することで、Z2G, Perox6, UP, GRP78 等の存在が明らかになった。さらにこれらの遺伝子発現は、去勢により著明に低下しており、アンドロゲン応答性の遺伝子であることが示唆された。興味深いことにラット前立腺で高発現している PSP94, CRP 等のタンパク質は泳動ゲル上で主要なスポットとして同定されず、発現は低

いと考えられた。この結果は、mRNA の定量によっても支持された。また、分泌タンパク質の発現は、前立腺の部位により異なっていることが知られるが、その分布もマウス、ラット間でかなり差があることが明らかになった。

生後 1W 時の前立腺における遺伝子発現プロファイルを明らかにするために、増殖遺伝子群、AR、ER、新規同定タンパク質の mRNA レベルを定量した。AR 及び ER α mRNA は、成体と同様の高いレベルであることから、この時期既にアンドロゲン、エストロゲンターゲットとして十分な受容体が発現していると考えられた。新生仔期においては Pb、PSP94 等の発現はほとんどみられなかった。この時期、上皮細胞から分泌されるタンパク質群の発現が低いのはむしろ当然と考えられるが、一方で、今回見いだされた Z2G、Perox6 及び MUP mRNA レベルが高かったことは興味深い。これら物質の産生部位、機能は今後の検討課題である。

これまで明らかになったアンドロゲン応答性遺伝子について、3MC 及び E2 による発現修飾作用を検討した。DHT 単独に対し、E2 の同時投与では、ER α 遺伝子の上昇が観察されたが、同様のことはラット前立腺でも見いだされており、ER α の増殖への関与を示唆する。一方で、3MC の同時投与で、アンドロゲン応答性の mUB 及び GRP78 発現が抑制されており、今後詳細な検討が必要である。

E. 結論

新生仔期マウス前立腺において、Z2G、Perox6、MUP、GRP78、UB が、アンドロゲン応答性の転写調節を受けていることが明らかになった。これらのいくつかは、新生仔期でも高発現しており、3MC により発現抑制され、前立腺の発生分化への関与が示唆された。

G. 研究発表

G1. 論文発表

1) Fujimoto, N., Asano, K., Usui, T., Honda, H., Kitamura, S. Cloning and characterization of the 5'-

flanking region of the rat estrogen receptor β gene *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* In press (2005)

- 2) Kitamura, S., Kato, T., Iida, M., Jinno, N., Suzuki, T., Ohta, S., Fujimoto, N., Hanada, H., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole. *Life Sci.* 76, 1589-1601 (2005).
- 3) Kitamura, S., Jinno, N., Suzuki, T., Sugihara, K., Ohta, S., Kuroki, H., Fujimoto, N. Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology*, 208, 377-387 (2005)
- 4) Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., Ohta, S. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 203, 9-17 (2005)
- 5) Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., Ohta, S. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol. Sci.*, 84, 1-12 (2005)
- 6) Fujimoto, N., Suzuki, T., Honda, H., Kitamura, S. Estrogen enhancement of androgen responsive gene expression in hormone induced hyperplasia in the ventral prostate of F344 Rats. *Cancer Sci.* 95, 711-715 (2004).
- 7) 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.* 91, 121-129 (2004).
- 8) Fujimoto, N., Jinno, N., Kitamura, S. Activation of ERE responses by thyroid hormone with increase in estrogen receptor levels in a rat pituitary cell line, GH3. *J. Endo.* 181, 77-83 (2004).
 - 9) Yoshihara, S., Mizutare, T., Makishima, M., Suzuki, N., Fujimoto, N., Igarashi, K., Ohta, S. Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicol. Sci.* 78, 50-59 (2004).
 - 10) Fujimoto, N., Honda, H., Kitamura, S. Effects of environmental estrogenic chemicals on API mediated transcription with estrogen receptors alpha and beta, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 53-59 (2003).
 - 11) Fujimoto, N., Kohta, R., Kitamura, S., Honda, H. Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA), *Life Sci.* 74, 1417-1425 (2003).
 - 12) Fujimoto, N., Honda, H. Effects of environmental estrogenic compounds on growth of a transplanted estrogen responsive pituitary tumor cell line in rats. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1711-1717 (2003).
 - 13) Kitamura, S., Suzuki, T., Fujimoto, N., Ohta, S. Antiandrogenic activity of the organophosphorus pesticide fenthion and related compounds, and the effect of metabolism. *Env. Health Persp.* 111, 503-508. (2003)
 - 14) Asano, K., Maruyama, S., Usui, T., Fujimoto, N. Regulation of estrogen receptor α and β expression by testosterone in the rat prostate gland. *Endocrine J.* 50, 281-287 (2003)
 - 15) Kitamura, S., Ohmegi, M., Sanoh, K., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Ohta, S. Estrogenic Activity of Styrene Oligomers after Metabolic Activation by Rat Liver Microsomes. *Env. Health Persp.* 111: 329-334 (2003)
 - 16) Fujimoto, T., Kitamura, S., Sanoh, S., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Ohta, S. Estrogenic activity of an environmental pollutant, 2-nitrofluorene, after metabolic activation by rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 303, 419-426 (2003).
 - 17) Yin, H., Bhattacharjee, D., Fujimoto, N., Nakatani, T., Ito, A. : Tumorigenesis in infant C3H/HeN mice exposed to tritiated water (HTO), *J. Radiat. Res.*, 43, 345-351 (2003).
 - 18) Kitamura S., Jinno N. Ohta, S., Kuroki H. Fujimoto N. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 554-559 (2002).
- G2. 学会発表
- 1) Araki, M., Sugihara, K., Kitamura, S., Fujimoto, N., Ohta, S. Endocrine-disrupting activity in hospital sewage International Symposium of the Environmental Risk of Endocrine Disrupter, Kyoto, 2005
 - 2) 浅野耕助、藤本成明、碓井亜 ラットエストロゲン受容体 β 遺伝子プロモーターの同定 第12回日本ステロイドホルモン学会、大阪、2004 (日本内分泌学会雑誌 80, 402)

- 3) 鈴木智晴、藤本成明、本田浩章、太田茂、北村繁幸 ラット前立腺各葉における特異的遺伝子発現とそのアンドロゲン応答性 第12回日本ステロイドホルモン学会、大阪、2004 (日本内分泌学会雑誌 80, 415)
- 4) 藤本成明、本田浩章、五十嵐勝秀、菅野純、井上達 エストロゲンによるラット前立腺過形成とアンドロゲン応答遺伝子発現 第63回日本癌学会総会、福岡、2004 (日本癌学会総会記事 318)
- 5) 藤本成明、鈴木智晴、本田浩章、北村繁幸 ラット前立腺におけるアンドロゲン応答遺伝子発現に対するエストロゲンの相乗作用 第77回日本内分泌学会学術総会、京都、2004 (日本内分泌学会雑誌 80, 140)
- 6) 浅野耕助、藤本成明、碓井亜 ラットのエストロゲン受容体β遺伝子プロモーターの同定 第77回日本内分泌学会学術総会、京都、2004 (日本内分泌学会雑誌 80, 202)
- 7) Fujimoto, N., Honda, H. and Kitamura, S. Cloning and characterization of the 5'flanking region of rat estrogen receptor beta gene. 16th International Symposium Of The Journal Of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, Seefeld, Austria, 2004.
- 8) 藤本成明、本田浩章、五十嵐勝秀、菅野純、井上達 エストロゲン応答ラット下垂体細胞 GH3 における低濃度ビスフェノール A (BPA) 応答遺伝子の cDNA マイクロアレイによる検索 第76回日本内分泌学会学術総会、横浜、2003 (日本内分泌学会雑誌 79, 10404)
- 9) 鈴木智晴、北村繁幸、太田公規、遠藤泰之、藤本成明、太田茂 カルボラン骨格を含む創製アンドロゲンアンタゴニストの構造活性相関 日本薬学会 第123回年会、長崎、2003 (要旨集 P2I-402)
- 10) 吉原新一、水垂亨、藤本成明、五十嵐一雄、太田茂 Bisphenol A のエストロゲン活性代謝物の構造決定 日本薬学会 第123回年会、長崎、2003 (要旨集 P2I-399)
- 11) 藤本成明、本田浩章、五十嵐勝秀、菅野純、井上達 ラット下垂体細胞エストロゲン応答遺伝子の cDNA マイクロアレイによる解析、内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム、湘南、2003.
- 12) 藤本成明、本田浩章、五十嵐勝秀、菅野純、井上達 cDNA マイクロアレイによるエストロゲン依存性下垂体腫化関連遺伝子の検索 第62回日本癌学会総会、名古屋、2003 (日本癌学会総会記事 2644PP)
- 13) 幸田龍紀、北村繁幸、鈴木智晴、佐能正剛、杉原数美、太田茂、藤本成明 スチルベン誘導体の内分泌攪乱活性発現における構造要因およびその代謝的活性化 環境ホルモン学会 第6回研究発表会、仙台 2003
- 14) 北村繁幸、鈴木智晴、幸田龍紀、佐能正剛、杉原数美、吉原新一、太田茂、藤本成明 エストロゲン活性を示すビスフェノール類の構造と活性の相関性およびその前駆物質の活性化 環境ホルモン学会第6回研究発表会、仙台 2003
- 15) 鈴木智晴、北村繁幸、太田茂、藤本成明 抗アンドロゲン物質の代謝による活性変動 環境ホルモン学会第6回研究発表会、仙台 2003
- 16) 北村繁幸、鈴木智晴、藤本隆志、神野敬将、幸田龍紀、杉原数美、黒木広明、藤本成明、太田茂 内分泌攪乱化学物質の代謝とその活性変動 環境ホルモン学会第5回研究発表会 広島 2002 (要旨集 B-2-1)
- 17) 加藤輝久、大野研、荒木直比呂、北村繁之、太田茂、黒木広明、藤本成明 甲状腺ホルモン受容体応答性レポータージーンアッセイ法による内分泌攪乱化学物質のスクリーニ

- ング 環境ホルモン学会第 5 回研究
発表会 広島 2002 (要旨集 PB33)
- 18) 幸田龍紀, 北村繁幸, 杉原数美, 佐
能正剛, 藤本成明, 大和田智彦,
太田 茂 フタル酸エステル類の代
謝とエストロゲン活性 環境ホルモ
ン学会第 5 回研究発表会 広島 2002
(要旨集 PB42)
- 19) 藤本成明, 本田浩章 AP1 および
PTTG プロモーターを介したエストロ
ゲン応答と内分泌攪乱物質の作用
フォーラム 2002: 衛生薬学環境トキシ
シコロジー, 広島 (抄録集 P212)
- 20) 神野敬將, 北村繁幸, 太田茂, 黒木
広明, 藤本成明 甲状腺ホルモン機
能攪乱物質のスクリーニング フォ
ーラム 2002: 衛生薬学環境トキシコ
ロジー, 広島 (抄録集 P214)
- 21) 鈴木智晴, 北村繁幸, 太田 茂, 藤
本成明 環境中からの抗アンドロゲ
ン物質のスクリーニングとその代謝
的活性変動 フォーラム 2002: 衛生
薬学環境トキシコロジー, 広島
(抄録集 P215)
- 22) 藤本成明, 本田浩章 ラット前立腺
癌化とエストロゲン受容体発現 第
61 回日本癌学会総会, 横浜, 2002 (日
本癌学会総会記事, 69, 2002)
- 23) Fujimoto, N., Maruyama, S.
Regulation of estrogen receptors
alpha and beta in the rat prostate
- the involvement in prostate
carcinogenesis 18th UICC
International Cancer Congress,
Oslo, 2002 (Int. J. Cancer, suppl.
13, 145, 2002)
- 24) 北村繁幸, 佐能正剛, 神野敬將, 鈴
木智晴, 杉原数美, 藤本成明, 太田
茂 DDT およびその関連化合物の構
造と内分泌攪乱作用 日本薬学会
第122回年会, 千葉, 2002 (PII-281)
- H. 知的財産所有権の出願、登録状況
1. 特許取得
該当なし。
 2. 実用新案登録
該当なし。
 3. その他
該当なし。

Fig.1. mRNA levels of prostatic proteins in different lobes of prostate in mice (10W old)

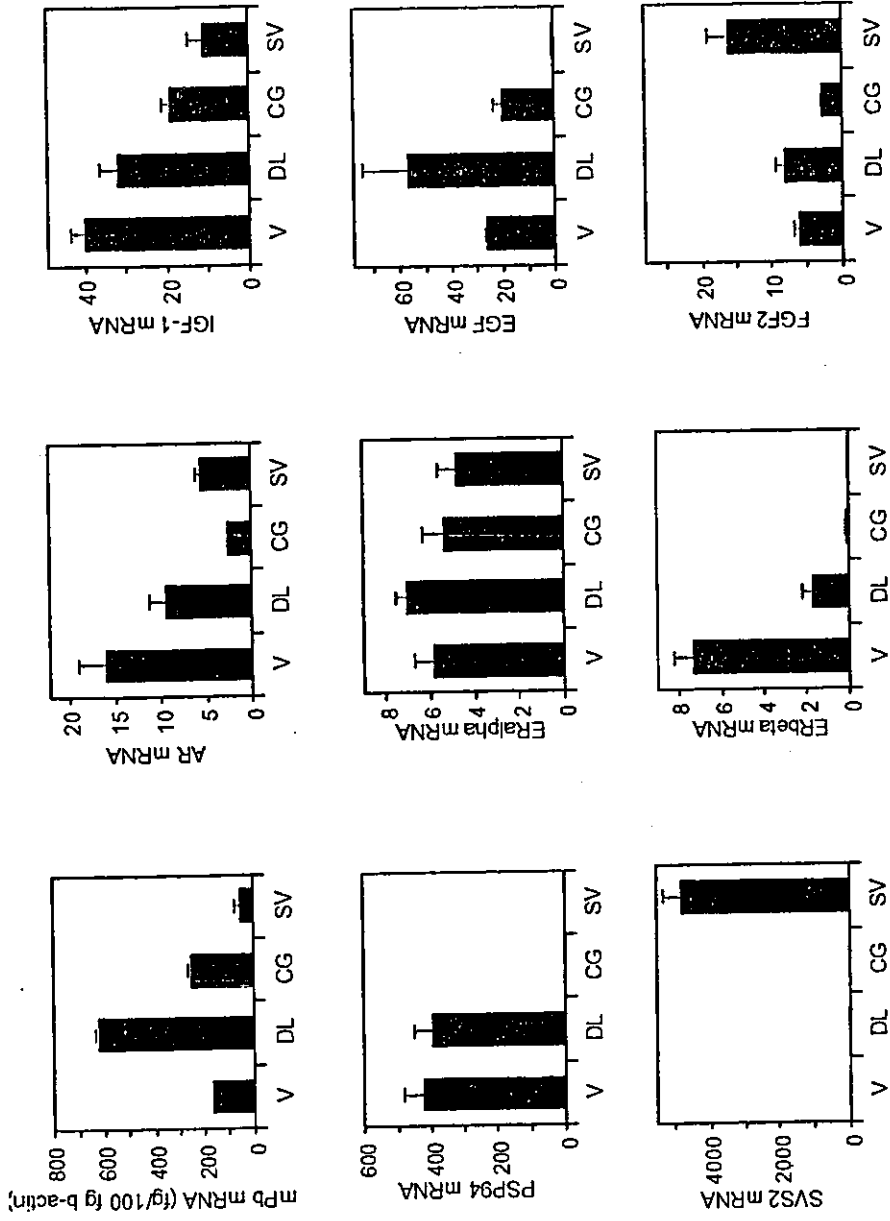


Fig.2. Newly identified prostatic secreted proteins in the ventral and dorsolateral prostate in mice

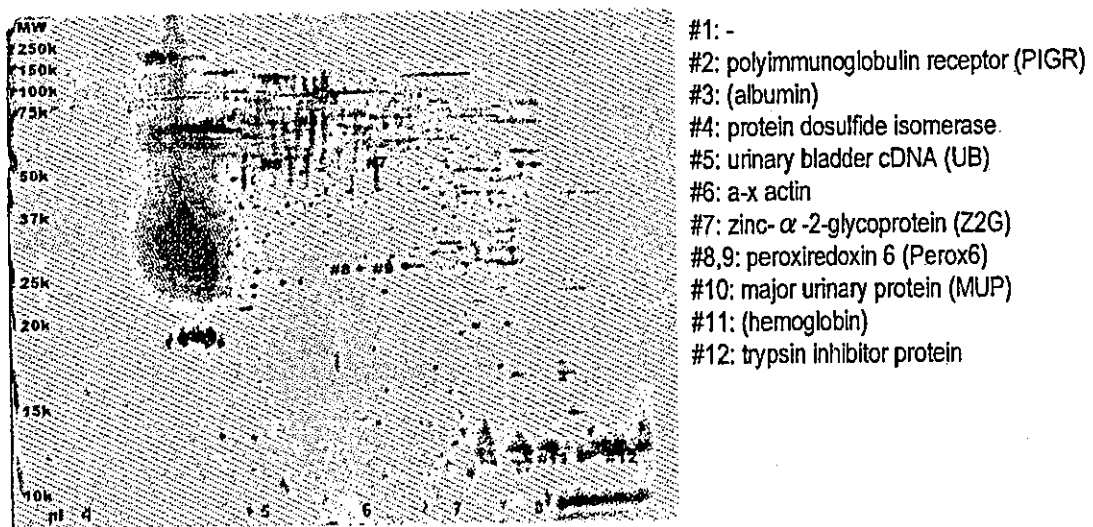


Fig.3. mRNA levels of newly identified prostatic proteins in different lobes of prostate in mice (10W old)

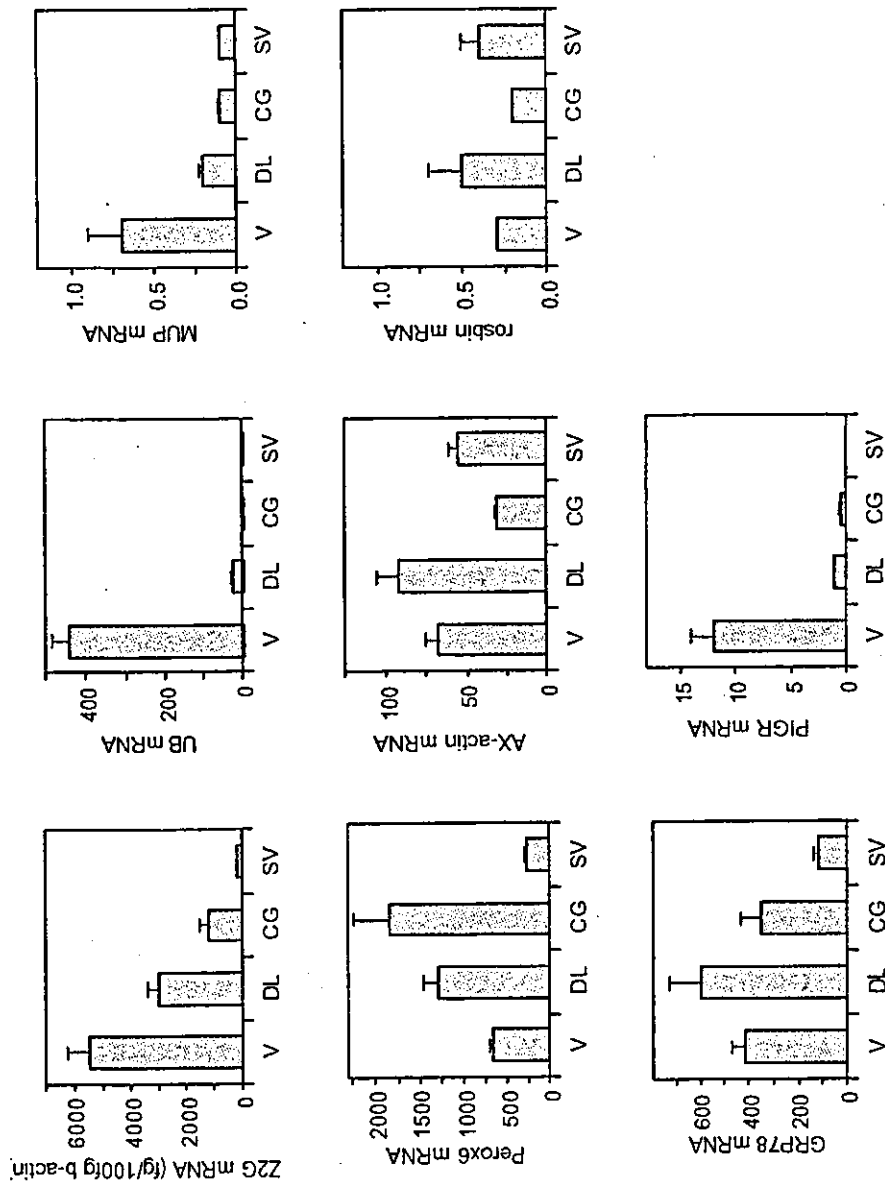


Table 1. Androgen-inducible prostatic proteins

Genes	VP	DLP	CG	SV
Urinary bladder protein	8.6*	27.5	-	-
GRP78	4.2	7.4	5.6	1.5
Zn- α -2glycoprotein	3.0	4.7	2.4	-
Peroxiredoxin6	0.7	2.5	4.5	0.7
PSP94	85.0	511.0	-	-
Probasin	12.7	4.7	3.2	-
SVS2	-	-	-	2.9
IGF-1	1.5	2.0	0.7	1.1
EGF-1	1.0	6.2	1.4	-

* Fold changes of mRNA levels in intact control over castrated animals

Fig.4. mRNA levels of newly identified prostatic proteins in different lobes of prostate in newborn mice (1W old)

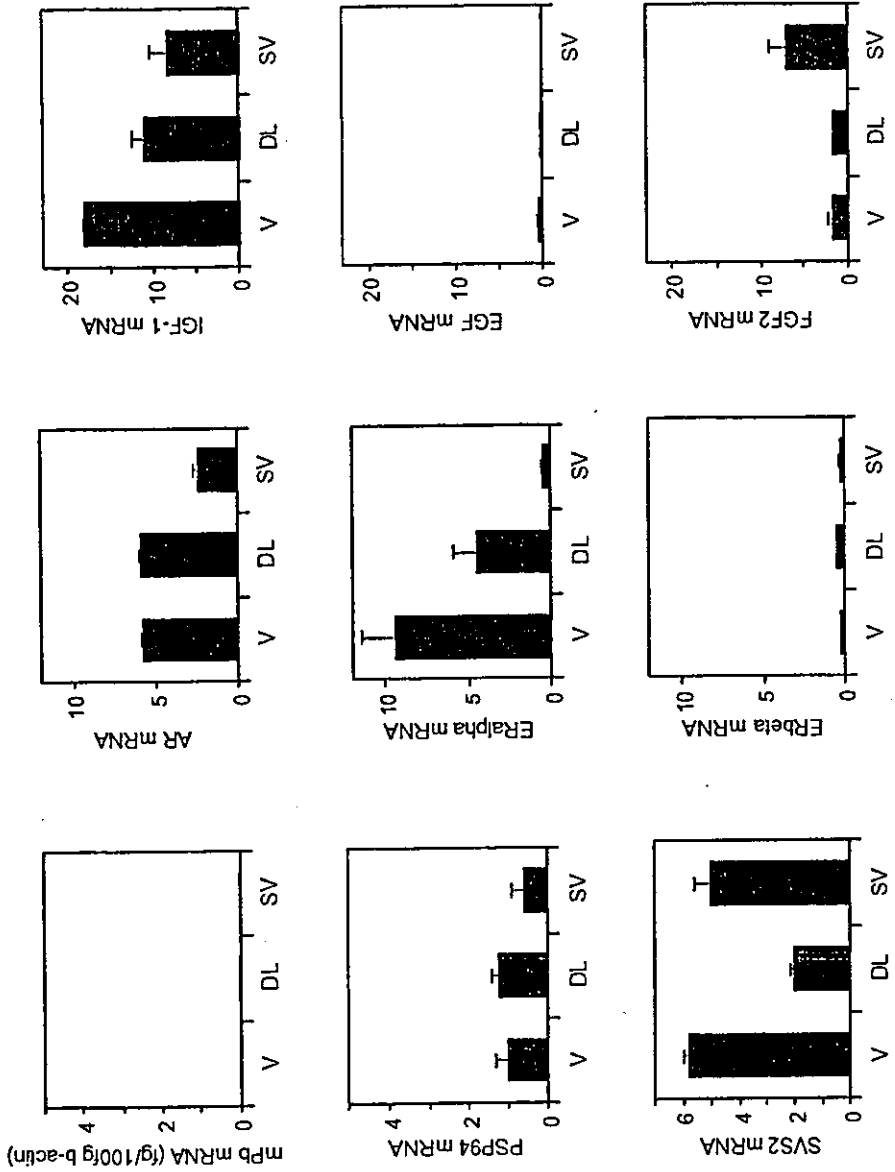
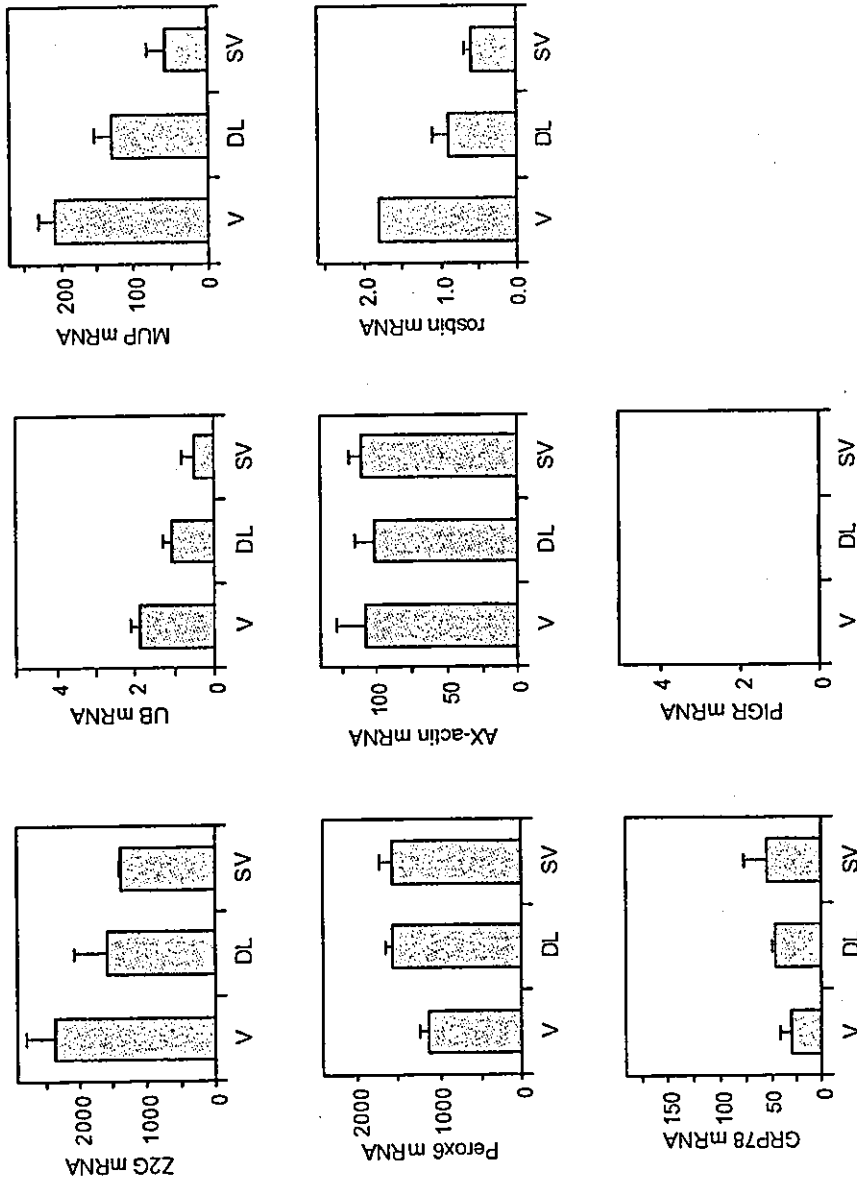


Fig.5. mRNA levels of newly identified prostatic proteins in different lobes of prostate in newborn mice (1W old)



9. 甲状腺ホルモンかく乱物質の作用機構の解明：ラットからヒトへ

加藤 善久 静岡県立大学 薬学部講師

研究要旨

本研究では、いくつかの動物種を用いて、polychlorinated biphenyl (PCB) 投与による血中サイロキシン(T_4)濃度の低下における動物種差やその発現の機序を明らかにし、ヒトの PCB による血中甲状腺ホルモン濃度の低下機構を追究する。Kanechlor-500(KC500)投与後、4種の動物において、 $[^{125}\text{I}]T_4$ の体内動態を詳しく調べた結果、血清中 T_4 濃度の低下には、 T_4 の肝臓への移行が重要であることが示唆された。 T_4 の肝臓への移行には、特定の輸送担体が関与している可能性が考えられるが、肝臓への T_4 の移行メカニズムについてはさらに検討する必要がある。これまでの研究から、KC500 投与によるラットの血清中 T_4 濃度の低下には、少なくとも一部、 T_4 -UDP-glucuronosyltransferase(T_4 -UDP-GT)が関与すると考えられている。その T_4 の代謝を担う UGT 分子種は、主に UGT1A7 である可能性が考えられる。また、ヒト UGT 分子種の中で、 T_4 -UDP-GT 活性の高い分子種は、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A8 であることが示された。

A. 研究目的

Polychlorinated biphenyl (PCB) は、多くの野生生物の組織のみならず、ヒトの血液、母乳、肝臓、脂肪組織などにも見出され、生体に対する影響が懸念されている。ラットでは、すでに、PCB 投与により血中サイロキシン(T_4)濃度が低下することが報告され、ヒトにおいても PCB 曝露により甲状腺ホルモンの攪乱が引き起こされている可能性が指摘されている。しかし、ヒトのみならず、ラットなどの動物において PCB による血中甲状腺ホルモン濃度の低下機構は、いまだ解明されていない。本研究では、いくつかの動物種を用いて、PCB 投与による血中 T_4 濃度低下における動物種差やその発現の機序を明らかにし、ヒトの PCB による血中甲状腺ホルモン濃度の低下機構を追究する。

B. 研究方法

ddY 系マウス、Syrian 系ハムスター、Wistar 系ラット、Hartley 系モルモットに、Kanechlor-500(KC500) (100 mg/kg) を投与し、血清中 total T_4 、free T_4 濃度および肝臓中甲状腺ホルモントランスポーター遺伝子の発現量を測定した。また、KC500 投与後 4 日に $[^{125}\text{I}]T_4$ を静脈内投与し、 $[^{125}\text{I}]T_4$ の血清クリアランス、 $[^{125}\text{I}]T_4$ の血清-組織間分配係数(K_p 値)および $[^{125}\text{I}]T_4$ の組織分布量を測定した。さらに、ラット、マウスに KC500 投与後 4 日に肝実質細胞懸濁液を調製し、肝実質細胞への $[^{125}\text{I}]T_4$ の取り込み量を測定した。また、COS 細胞発現系ラットおよび昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種の T_4 -UDP-GT 活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、*in vivo* での甲状腺ホルモン¹の体内動態の動物種差を再現しうる培養系細胞あるいはそれに代わる実験系がないため、やむを得ず実験動物を使用したが、その使用数は最小限にとどめ、実験動物に対して苦痛を与えない十分な配慮をした。また、実験者および飼育者は PCB による汚染を受けないように十分に保護対策を施し、また、PCB 暴露動物、廃液等は保管し、暴露・漏洩を防止する対策についても万全を期して実施している。

C. 研究結果

KC500 投与により、マウス、ハムスター、ラットあるいはモルモットにおいて、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の血清クリアランス及び分布容積は有意に増加した。分布容積の増加の度合いには、種差が見られ、KC500 (100 mg/kg) を投与した時、ラットで 4.2 倍、ハムスターで 3.7 倍、モルモットで 1.8 倍、マウスで 1.4 倍であった。

次に、各対照 (KC500 未処理) 動物に $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ を投与し、その組織分布を測定した。その結果、分布量は肝臓で特に高値を示した。また、KC500 投与により、いずれの動物においても、特に肝臓の分布量が顕著に増加し、 K_p 値及び肝臓単位重量当たりの $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の分布量も有意に増加した。また、マウス、ラット、モルモットにおいて、肝臓重量が増加した。

そこで、KC500 を投与し、各トランスポーターの遺伝子発現への影響を RT-PCR 法を用いて測定した。ラットでは、KC500 投与により、肝臓の有機アニオン輸送ポリペプチド (Oatp2)、L 型アミノ酸トラン

スポーター (LAT1) 及び多剤耐性タンパク質 (Mrp3) の mRNA の発現量が有意に増加したが、 Na^+ /タウロコール酸共輸送ペプチド (Ntcp)、L 型アミノ酸トランスポーター (LAT2)、モノカルボン酸トランスポーター (MCT8)、Mrp2 の mRNA の発現量は変化しなかった。マウスでは、KC500 投与により、肝臓の LAT1 及び Mrp3 の mRNA の発現量が有意に増加したが、Oatp2、MCT8、Mrp2 の mRNA の発現量は変化しなかった。さらに、ラット、マウスに KC500 を投与し、肝臓の LAT1 タンパクを、抗マウス LAT1 抗体を用いてウエスタンブロット法により測定した。両動物の肝臓では、KC500 投与の有無に関わらず、LAT1 タンパクは検出されなかった。

次に、ラット、マウスに KC500 を投与後、肝実質細胞懸濁液を調製し、肝実質細胞への $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の取り込み量を測定した。しかし、KC500 投与により、ラット、マウスの肝実質細胞への $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の取り込み量は変化しなかった。

ラット及びヒトの T_4 -UDP-glucuronosyl-transferase (T_4 -UDP-GT) 活性を担う UGT 分子種を明らかにするために、COS 細胞発現系ラット及び昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種の T_4 -UDP-GT 活性を測定した。ラット UGT 分子種では、UGT1A2、UGT1A5 及び UGT1A7 の T_4 -UDP-GT 活性は、UGT1A1、UGT1A3 および UGT1A6 の活性よりも著しく高かった。一方、ヒト UGT 分子種では、UGT1A1、UGT1A3 及び UGT1A8 の T_4 -UDP-GT 活性は、UGT1A4、UGT1A6、UGT1A9 および UGT2B7 の活性よりも著しく高かった。

D. 考察

KC500 投与により、いずれの動物においても、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の血清クリアランス及び