

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

井 上 達

平成18（2006）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】

胚・胎児期の曝露による神経行動関連を中心としたビスフェノールAの 低用量影響の検討……………	23
関澤 純	

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……………	35
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……………	38
杉村芳樹	

低用量曝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……………	43
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	51
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	58
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	65
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	69
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	72
菅野 純	
内分泌攪乱物質の中核影響に関する研究	79
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	83
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	91
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	93
五十嵐勝秀	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	99

【資料】

特別講演

脳ニューロステロイド作用をかく乱する環境ホルモン…………… 373

川戸佳 東京大学大学院・総合文化研究科・広域科学専攻

特別協力研究

低用量内分泌かく乱化学物質の免疫応答制御に及ぼす影響に関する研究…………… 376

五十嵐美德

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こ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12年が経過した。併せて、後述のとおり今年には英国のウェブリッジにて世界初の世界保健機構と経済開発協力機構の合同会議が欧州委員会の呼びかけで行われて10年になる。これらの研究の蓄積を背景に本研究は厚生科学研究第3期2年度の終了にあたり、各分担研究者によって遂行された研究成果を総括するものである。具体的には、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。

I. プロジェクト課題研究においては、ひきつづき専門家14名（分担研究者報告参照）の協力によりビスフェノールA(BPA)を中心とした低用量問題に関連した文献のうち胎・胎児期の暴露による神経行動に関する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、前立腺の実験的研究、さらに、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に関する用量反応関係の直線性、非線形性の検討などについて研究を継続し、所期の成果を見た。

また、II. 基盤研究においては、【生殖・ステロイド代謝部門】では昨年度明らかになった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の研究を拡張し、異なった生育過程にあるマウスへのエストロゲン暴露後の雄性生殖器官の系統的な探索をすすめるとともに、生殖器以外の臓器におけるエストロゲンの影響、化学物質の影響研究が進展した。【免疫・感染防御系部門】では、胎仔及び新生仔への低用量ビスフェノールA投与後のマイクロアレイ解析、及び、マクロファージの遊走能を標的とした化学物質の影響を検討した。さらに【神経・行動系部門】

については、培養神経幹細胞の初期培養と化学物質の暴露のシステムを確立し、ラットを用いた母体への内分泌かく乱物質の仔の行動への影響を種々の評価系に拡張した。また【核内レセプター部門】では、性ホルモン受容体の転写機能を担う転写共役因子の同定とそれらのアリアル炭化水素受容体とのクロストークの研究や、性腺刺激ホルモン分泌促進ホルモン受容体の同定がすすんだ。【マイクロアレイ基盤整備部門】についても、年次を追って、分担研究者への支援がすすみ、逐次、インパクトの高い情報発信が行われている。

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
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ことにあつた。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してきた。

B. 方法

BI. プロジェクト課題研究

BI-1. 情報関連研究

関澤は、ビスフェノールAの公表文献調査を、胚・胎児期の暴露の神経系発達に焦点をあてて検討をすすめた。MEDLINE (2004年3月31日から2005年9月23日まで) で検索し得られた489文献から野生生物への影響や分析法に関する文献などを除外し135報を得、要約を作成した。これらの文献の原報を入手し、内容により分別した。テーマに沿ってビスフェノールA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検討した。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。

BI-2. 食物等異物受容体結合物の調査

松井は、【食品中新規 AhR リガンド】食品中の AhR リガンドに関する文献調査を行うとともに、お茶とコーヒー中に含まれる AHR リガンドの単離精製を行った。

また【AhR リガンドと TNF- α による細胞増殖抑制作用】の研究については昨年度の AhR リガンドと TNF- α の相乗的細胞増殖抑制、これへの p21 の誘導関与の発見にひきつづき、p21 以外の増殖関連遺伝子と、NF κ B 関連遺伝子の発現を RT-PCR による検索を行った。レポーター遺伝子アッセイによるプロモーターの相乗効果に効いている部位の探索も行った。

BI-3. 成長初期の前立腺におけるエストロ

ジェン影響

杉村は、前立腺の腺管分枝構造に対する BPA の作用は、当科で樹立した無血清器官培養法により解析した。また、泌尿生殖洞におけるエストロゲン受容体 α (ER \cdot) の発現・分布は免疫組織化学染色法および RT-PCR 法により評価した。

BI-4. 低用量発がん

福島は、21日齢、雄性F344ラット140匹を7群に分け α -BHCを0、0.01、0.05、0.1、1、50、500ppmの用量で混餌投与した。実験開始16週にてラットを屠殺し、肝臓について肝前がん病変の指標であるGST-P陽性細胞巢、酸化的DNA障害の指標である8-OHdGの形成レベル、および解毒代謝酵素であるCYP2B1の発現量を検索した。また、各投与群での肝組織における遺伝子プロファイリングをオリゴマイクロアレイ法を用いて検索した。

BI1. 基盤研究

BI1-1. 生殖・ステロイド代謝部門

井口は、異なった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、生殖器官以外の性ホルモン標的研究の一環として、ヒト骨芽細胞hFOBを対象とし、細胞増殖についてEstradiol (E2)、bisphenol A (BPA)、genistein (GEN)、diethylstilbestrol (DES) の影響を検索した。さらにマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。

BI1-2. 免疫・感染防御系

廣川は、胎盤を経た低用量BPAの胎仔の

成長に与える影響、及び胸腺ストローマの遺伝子発現への影響をDNA アレイ法で検討した。

山崎は、マクロファージの遊走能に対するビスフェノール A やノニルフェノールの影響を検討した。マクロファージ遊走能は、マウスマクロファージ様培養細胞 RAW264.7 を用い、96 穴ケモタキシスチャンバーを使用して測定した。

TNF α は ELISA により測定した。

用いた内分泌かく乱物質は、ノニルフェノール(NP)、ビスフェノール A (BPA)、フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)、フタル酸ジエチル(DEP)、フタル酸ジブチル(DBP)、フタル酸ブチルベンジル(BBP)、フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)である。

B11-3. 神経系・行動系

菅野は、核内受容体のリガンドと成り得る化学物質を妊娠マウスに投与し、胎児脳から神経幹細胞を培養に移し、それに対する影響を検討した。併行して、培養下に直接化学物質を処理した際の影響についても検討を行った。

粟生は、発達期の諸段階で内分泌かく乱物質を母ラットに投与し、仔ラットの成長後の行動特性を種々の行動評価法で調べた。

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 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。行動試験に関する方法を種々拡張した。

B11-4. 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、ティラピアより 3 種類の GnRH 受容体および GPR54 遺伝子を同定した。レーザーキャプチャー顕微鏡を用いて採取した単一 GnRH ニューロンおよび下垂体細胞における GnRH 受容体および GPR54 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により解析した。

B11-5. 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データ解析結果を班員にフィードバックすることで研究をサポートする計画とした。

C. 結果

CI. プロジェクト課題研究

CI-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）

近年周産期の一過性曝露による神経系への影響の報告が多いが、周産期は神経系の器官形成期で最もホルモン感受性が高い時期で行動レベルで性差の消失と組織学的に青斑核や Bed nucleus の性差の消失の報告がある。しかし SDN-POA (性的二型核) 神経核の大きさが影響を受けたという報告はない。NTP

長期毒性試験での体重減少の LOEL 5mg/kg bw よりも低い曝露濃度で前記影響が観察されていることから、典型的なエストロゲン様作用以外に焦点をあてた毒性学的な試験と考察が必要とされている。

CI-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)
【食品中新規 AhR リガンド】 食品中の AhR リガンドに関する文献調査では、様々な食品中に AhR リガンドが存在するという報告はすでにあるが、未だにその構造は決定されていない。モロヘイヤとパセリに強い AhR アンタゴニストが存在するという報告があるがいずれも構造は決まっていない。我々も、お茶とコーヒーの抽出物中に、酵母アッセイで AhR リガンド活性を示すフラクションを単離精製しているが、まだ構造は決まっていない。

【AhR リガンドと TNF- α による細胞増殖抑制作用】 ヒト白血病細胞株 ML-1 にインディルビンや TCDD などの AhR リガンドと、TNF- α を同時曝露すると増殖が相乗的に抑制された。細胞増殖関連遺伝子、p15, p16, p18, p19, p21, p57, CyclinD1, D2, D3, E1, E2, CDK2, 4, 6 について調べた結果、この処理により変動があったのは p21 と CDK6 のみであった。p21 は相乗的に誘導され、CDK は相乗的にダウンレギュレートされた。また、

IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , TNF- β , TNFR2 などのサイトカイン、4 種類の NF κ B 遺伝子、AhR,

Arnt, CYP1A1 についてそれぞれ調べた結果、IL-1 β , TNF- α , COX2 遺伝子などで、AhR リガンドと TNF- α による相乗的な発現誘導がみられた。

次に、p 21 の相乗的誘導のメカニズムであるが、p 21 のプロモーターを組み込んだレポータープラスミドを作成した。残念ながら ML-1 にトランスフェクトすることができず、代わりに MCF-7 細胞を用いて実験を行った。この系では、ML-1 で見られたような劇的な相乗作用は再現できなかったが、わずかながら相乗作用が確認された。解析の結果、下流の 400bp に AhR と TNF α により制御される領域があることが明らかとなった。現在、可能性の高い部位にポイントミューテーションを導入してさらに詳細な解析を行っている。

CI-3. 成長初期の前立腺におけるエストロゲン影響 (杉村)

無血清器官培養法において、高用量の BPA は E2 と同様の扁平上皮化生 (SQM) を誘導し、そのとき Transforming Growth Factor alpha (TGF \cdot) の過剰発現を認めた。泌尿生殖洞における ER \cdot の発現は間充織細胞に限局しており、さらに領域による発現・分布の差を認めた。

CI-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)

肝前がん病変の指標である GST-P 陽性

細胞巢の発生は 0.01~50 ppm では対照群と差がなく、500 ppm で有意な増加を示した。また、酸化 DNA 障害の指標である 8-OHdG の形成レベルと代謝酵素である CYP2B1 の発現量についても同様な傾向を示した。

マイクロアレイ法を用いて各投与群の肝組織における遺伝子プロファイリングを解析した結果、500 ppm 投与群において特異的に異常発現している遺伝子を 135 個同定した。

CII. 基盤研究

CII-1. 生殖・ステロイド代謝部門：(井口、笹野)

CII-1.1. 雌性生殖器官への作用メカニズムの解明 (井口)

様々な生育段階にあるマウスにエストロゲンを投与し、雌性生殖器官における応答遺伝子について解析を行った。その結果、新生仔期 (0 日、5 日) と成熟期 (70 日) で応答遺伝子が大きく異なることが明らかになった。

新生仔にエストロゲンを曝露し、子宮における遺伝子発現変化を解析したところ、解析した 1 万 2 千の遺伝子のうちおよそ 30 遺伝子が発現上昇していた。これに対し、出生 70 日後のマウスにおいては 600 以上の遺伝子がエストロゲンにより発現が誘導されていた。また新生仔期に発現が誘導される遺伝子の多くは出生 70 日後のマウスにおいて誘導される遺伝子とは異なっており、新生仔期に特有のエストロゲン応答をすることが示唆された。これらと同様の遺伝子発

現変化は、マウスの膺でも観察され、新生仔期には少数の遺伝子がエストロゲンに応答するのに対して、成熟期でははるかに多数の遺伝子がエストロゲンに応答した。こうした新生仔期特有のエストロゲン応答性が急速に変化していくことから、これらの遺伝子が臨界期において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。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。

さらに、エストロゲン応答遺伝子について、詳細な解析を行い、クロマチン免疫沈降法により、エストロゲンが受容体を介して直接的に発現を制御している遺伝子を同定した。アドレノメジュリン遺伝子はその 1 つであり、エストロゲン投与後 1-2 時間後にすみやかに遺伝子発現制御領域に結合し、その遺伝子発現を誘導することが明らかになった。また、アドレノメジュリンの受容体の機能を変換する遺伝子である RAMP3 もエストロゲン受容体により直接エストロゲン受容体の制御を受けることが明らかになり、これらが強制的にマウス子宮の間質において重要な機能を果たしていることが示唆された。

また、胎児期の TBT 投与により、出生直後のマウスの肝臓で、脂肪合成が誘導されることが明らかになった。一連の解析から、TBT は RXR・および PPAR・のリガンドとして機能することが明らかになった。さらに、遺伝子発現プロファイルの解析から、脂肪合成に関連した一連の遺伝子発現が上昇していることが明

らかになった。

CII-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)

BPA は hFOB の増殖を促したが、逆に DES は細胞死を起こし、GEN は hFOB に影響を与えなかった。遺伝子発現では BPA と E2 が比較的類似した発現プロファイルを示した。

CII-2. 免疫・感染防御系:(廣川、山崎)

CII-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)

低用量の BPA が、子宮内死亡胎仔を増加させた。また、胎仔胸腺のストローマの遺伝子発現を大きく変動させた。

CII-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)

NP では 10^{-3}M ~ 10^{-4}M の濃度で遊走能が減少した。それよりもうすい濃度では、 10^{-11}M ~ 10^{-13}M で増加する傾向が見られた。TNF α は 10^{-4}M ~ 10^{-5}M 、 10^{-10}M で増加した。

BBP は 10^{-10}M 、 10^{-12} ~ 10^{-13}M の濃度では有意に遊走能が増加した。TNF α は 10^{-3}M ~ 10^{-4}M 、 10^{-8}M 、 10^{-12}M で増加した。DBP は 10^{-3} ~ 10^{-7}M 、 10^{-10} ~ 10^{-11}M 、 10^{-13} ~ 10^{-14}M で増加した。TNF α は 10^{-3} ~ 10^{-12}M で増加した。DCHP は 10^{-7}M 、 10^{-11}M で遊

走能が増加した。TNF α は 10^{-3} ~ 10^{-13}M で増加した。DEHP は、 10^{-8}M 、 10^{-11} ~ 10^{-12}M の濃度では遊走能が増加した。TNF α は 10^{-3} ~ 10^{-12}M で増加した。DEP は、 10^{-12} ~ 10^{-13}M で増加した。TNF α は 10^{-8}M 、 10^{-11} ~ 10^{-13}M で増加した。

BPA では 10^{-5} ~ 10^{-7}M 、 10^{-10} ~ 10^{-13}M の濃度では有意に遊走能が増加した。TNF α は 10^{-3}M ~ 10^{-4}M 、 10^{-8}M ~ 10^{-9}M 、 10^{-12}M で増加した。

CII-3. 神経系・行動系:(菅野、粟生)

CII-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)

マウス胎生期後期胎児脳神経幹細胞に甲状腺ホルモンを作用させるとオリゴデンドロサイトへの分化が促進されることが明らかとなった。網羅的遺伝子発現解析により、甲状腺ホルモンが Notch により制御を受ける Hes1, Hes5 の発現を上昇させることが判明した。

CII-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 は主として雄に作用し、探索行動の性分化を障害し、雄のうつ反応を増強した。前者は出産前1週間、後者は出産後1週間がとくに感受性が高い。1-BP は主として雌に影響を及ぼし探索行動やうつ反応の性分化を障害した。

CII-4. 核内レセプター系:(加藤、Parhar)

CII-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

男性ホルモンレセプター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。

また、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複合体として、RNA のスプライシングに関与する複合体の構成因子である SF3a p120 を含む新規転写共役因子複合体を同定した。この複合体は、女性ホルモンレセプター N 末端側の転写促進領域に Ser¹¹⁸ のリン酸化を認識して特異的に結合し、転写機能を活性化することが分かった。また、この複合体は、女性ホルモンレセプター依存的な RNA のスプライシングにも関与し、それには女性ホルモンレセプターの Ser¹¹⁸ のリン酸化が必須であることも明らかとなった。

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。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。この新規複合体はダイオキシンレセプターをユビキチン化することにより分解していることが明らかとなった。また、この複合体はのエストロゲンレセプターをもユビキチン化する活性を有していることも明らかとなった。その過程で、エストロゲンレセプターがこの新規複合体によりモノユビキチン化を受けるという全く新しい現象を発見した。現在、エストロゲンレセプターのユビキチン化部位の同定とモノユビキチン化の意義の解析を進めている。

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・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 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。

G11-4.2. 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 3 種類すべての GnRH 受容体遺伝子の発現が GnRH ニューロンにおいて確認された。また 8 種類の下垂体細胞すべてにおいて、複数種の GnRH 受容体遺伝子が同一の細胞内に発現していた。一方、GPR54 は未成熟に比べて成熟個体の GnRH ニューロン中に有意に高頻度で発現が認められた。

G11-5. 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、杉村芳樹班員とのマウス前立腺における BPA の作用の網羅的遺伝子発現変動解析を実施中であるのに加え、菅野純班員とのマウス胎児培養神経幹細胞の網羅的遺伝子発現解析を実施した。結果は各班員と共同で解析予定である。

D. 考 察

DI. プロジェクト課題研究

DI-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)

個体レベルでの低用量効果に関する影響を検出した報告はほぼ全て神経系に関する報告である。神経系 (特にその発達) はビスフェノール A に対する感受

性が高いということを否定できなくなってきた。これらの報告が低用量に分類される暴露を行っている以上、NTP 長期毒性試験での体重減少の LOEL 5mg/kg bw よりも低い曝露濃度で影響が観察されていることから、典型的なエストロゲン様作用以外に焦点をあてた毒性学的な試験と考察が必要とされている。ADI の 50 ・ g/kg/day は見直す必要があるのかもしれない。

DI-2. 食物等異物受容体結合物の調査：アリアル hidrocarbon 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 リガンドと TNF α によって p21 が誘導され、CDK6 がダウンレギュレートされることは、細胞増殖のメカニズムを良く説明している。また、IL-1 β や TNF α などのサイトカインも AhR によって相乗的に発現することがわかり、ダイオキシンの免疫毒性との関連性が示唆された。

DI-3. 成長初期の前立腺におけるエストロゲン影響：（杉村）

前立腺の生物学的特性として、1) アンドロゲン依存性、2) 上皮-間質細胞の相互作用、3) 腺内での解剖学的・機能的な異質性が挙げられ、これらの特性と前立腺の異常増殖機構との関連が示唆されている。

臓器の発生・分化・増殖は、上皮-間質の相互作用により起こり、特に前立腺は間質成分が多いことから重要な意味を持つ。ヒト前立腺は解剖学的に 4 つの

異なる領域に分けることができ、前立腺癌を発生する遺伝子改変マウスにおいてもヒト前立腺と同様に、癌が発生しやすい領域が存在するため、その発生生物学的な差異を作り出すメカニズムを解明することは、前立腺の異常増殖性疾患を考える上で非常に重要となる。

今回の問題点は、無血清器官培養法において高用量の BPA (>100 nM) は E2 (1 nM), TGF \cdot (20 ng/mL) と同様の SQM を誘導したものの、低用量での形態学的変化は認められなかったこと、また昨年度から引き続き、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 TGF \cdot に焦点を絞っているものの、BPA による TGF \cdot の発現誘導メカニズムが解明できておらず、早急な検討が必要となっていることである。

DI-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）

肝臓における α -BHC 単独投与による前がん病変の発生、酸化的 DNA 障害および代謝酵素のレベルが 50 ppm までは対照群と差がなく、500 ppm で有意な増加を示した。このことは α -BHC のラット肝発がんの作用には発がんの閾値が存在することを示唆している。また、本実験で α -BHC のホルミシス現象が見られなかったのはイニシエーションを受けずの 0 ppm α -BHC 対照群での GST-P 陽性細胞巢の発生が非常な低値を示したためと考えられる。

さらに、500 ppm 投与群において特異的に異常発現している 135 個の遺伝子が

α -BHC のラット肝発がんに関係すると考えられる。

DII. 基盤研究

DII-1. 生殖・ステロイド代謝部門: (井口、笹野)

DII-1.1. 雌性生殖器官への作用メカニズムの解明 (井口)

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のは思春期以降である。思春期以前のエストロゲン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。しかし本研究の結果、新生仔期に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。すなわち、新生仔期の雌性生殖器官はその時点でエストロゲンに適切に応答する準備ができていなかったとも考えられる。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さらに遺伝子の種類も異なっていた。したがって臨界期 (出生 5 日以内) においてのみエストロゲンに応答する遺伝子を明らかにすることは、臨界期について分子レベルで明らかにする上でも重要であると考えられ、これにより、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。

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、膺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。こうした臨界期のメカニズムについては不明であったが、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。

一方で、クロマチン免疫沈降法をマウスの組織に適用することにより、子宮内でエストロゲン受容体の直接のターゲットとなっている遺伝子を同定できた。この解析系をさらに発展させ、新生仔のマウスにも適用することにより、臨界期におけるエストロゲンの直接のターゲット遺伝子を同定できる可能性がある。

また、妊娠時期の・・・曝露により新生仔に誘導される脂肪合成は、RXR・および PPAR・などの核内受容体を強制的に活性化させることにより、その下流にある脂肪合成経路を不適切な時期に活性化していると考えられる。不適切な時期における核内受容体の活性化による遺伝子発現の攪乱は、エストロゲン様化学物質についても同様であり、今後、エストロゲンのみならず、・・・などの影響も並行して解析をすすめることにより、臨界期における問題とその作用メカニズムについて明らかにできると思われる。

DII-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）

近年、内分泌かく乱化学物質の骨組織への影響は魚類や爬虫類で注目されつつある。(Suzuki and Hattori, 2003, *Life Sci*; Lind et al., 2004, *Environ Health Perspect*) さらに、Tsukamoto ら (2004, *Biochem Pharmacol*) はトリブチルスズ化合物の添加によってマウス胎児の骨形成が妨げられることを示している。このことはヒトを含めたほ乳類の骨組織に内分泌かく乱化学物質が影響を及ぼす可能性を示唆している。

今回の研究においては、BPA は比較的低濃度 (100nM) から骨芽細胞に増殖刺激が認められた。BPA のエストロゲン受容体に対する親和性は低く、estrogenic な作用を引き起こすには高い濃度で (IC50: 約 10^{-5} - 10^{-6} M) の暴露が必要である (Nagel et al., 1997, *Environ Health Perspect*; Kuiper et al. 1997, *Endocrinology*; Blair et al., 2000, *Toxicol Sci*; Sheeler et al., 2000, *Environ Health Perspect*)。従って、今回の BPA の影響は受容体を介さない可能性が示唆され、実際、ER \cdot の agonist の性質も持つ (Kuiper et al. 1997, *Endocrinology*) GEN では hFOB に対する作用がまったく認められなかったことも、受容体非依存的な作用を示唆する所見である。BPA の影響と ER の関係についてはさらなる検討を実施中である。

今回、Ras oncogen family, Rab とその関連遺伝子の発現が BPA の添加によって増加した。Ras 遺伝子は cell cycle control に関与することで良く

知られておるが、RAB については、vesicle transport に関係することが報告されている以外、正常、病態組織での意義は不明である (Review in Oxford & Theodorescu, 2003, *Cancer Lett*; Wennerberg et al., 2005, *J Cell Sci*) ため、骨芽細胞数の増加との関係は今後の検討課題として考えられる。また、BPA は骨芽細胞の増殖に関連することが知られている collagen type13 (Ylönen et al., 2005, *J Bone Miner Res*) の発現を増加させ、増殖刺激を促していると示唆された。

一方、DES 添加ではアポトーシスを示したが、これも受容体非依存的な作用であった。この時、非ステロイド抗炎症剤 (NSAIDs) の Diclofenac と同様に GDF15/NAG-1 を介した経路が関係すると示唆された。GDF15/NAG-1, Growth Differentiation Factor 15/Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-activated Gene-1 は、NSAIDs によって誘導され、種々細胞にアポトーシスを起こすことが報告されている (Kim et al., 2002, *Gastroenterology*; Wilson et al., 2003, *Int J Cancer*; Jung et al., 2004, *Carcinogenesis*)。

内分泌かく乱化学物質のヒト骨組織での健康被害の報告例は無いが、過去には DES に暴露した子供に骨格成長の促進がみられ (Wattenhall et al., 1975, *J Pediatrics*)、同様にエストロゲン・クリーム (Estradiol K; 製品に関する詳細は不明) を使用していた妊婦の男児に女性化乳房がみられ、同時に骨格成長が促進したとも報告されている (Felner

and White, 2000, *Pediatrics*)。すなわちヒト骨格系への影響は、種々のホルモンが関与しており、これらの結果が必ずしも骨細胞への直接影響を示す訳では無い。今回の研究では、エストロゲン様化合物が直接骨芽細胞に影響を与えることを示した。また、同じエストロゲン様化合物に分類されているものでも、骨芽細胞に対しては全く異なる作用を介した影響を与えることが確認できた。

D11-2. 免疫・感染防御系：(廣川、山崎)

D11-2.2. 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)

今回は BPA の胸腺ストローマへの影響を見るために、胎仔胸腺よりストローマを分離し、BPA の影響を見た。

DNA アレイ法で、BPA に暴露されたストローマをコントロールと比べることにより、実に多くの遺伝子の変動のあることが分かった。

胎仔期に低用量の BPA の暴露されると、これらの各種ホルモン受容体の発現も大きく変動した。興味あることは、エストロゲン・R、ACTH-R、TSH-R 及び TRH-R などの発現が増強したことである。これらの遺伝子発現の変動がどのような意味を持つかについては今後の解析が必要である。

D11-2.2. 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)

マクロファージは自然免疫を担う細胞の1つであり、多数の表面レセプターに

よって異物を認識し、迅速に食食、排除を行うとともに、炎症性サイトカインを産生する。この機構は、免疫系の中でも最も原始的なものであり、高等生物のみならず生物が広く持っているシステムである。感染防御機構において、自然免疫は感染早期の防御機構のみならず、適応免疫の Th1/Th2 細胞への分化を決定する大きな要因となる。

本研究では、内分泌かく乱物質のマクロファージの活性化に対する影響を調べることを目的とし、マクロファージの遊走能について調べた。その結果、高濃度の内分泌かく乱物質はマクロファージの遊走能を低下させた。低濃度では、物質によって遊走能を逆に増加させる傾向を示すものもあった。

遊走能の低下は感染防御の低下につながると考えられる。逆に遊走能の増加は、常にマクロファージが活性化され続けることによって異物が進入した際に本来の機能が働かなくなる可能性も示している。

マクロファージはホルモン受容体を介していない経路で影響を受けていると思われる。今回の研究から、内分泌攪乱作用を疑われている化学物質が、内分泌系だけでなく免疫機能に影響を及ぼしていることが示唆された。免疫機能がどのような経路で化学物質の影響を受けるのか、その詳細なメカニズムの解明に関する研究もこれから行う必要がある。

D11-3. 神経系・行動系：(菅野、粟生)

D11-3.1. 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)

昨年度までに、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。この中で 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シグナル伝達による影響を与えることを示唆するもので、実際に甲状腺ホルモンのオリゴデンドロサイト分化促進作用を確認した。網羅的遺伝子発現解析により、甲状腺ホルモンが Notch シグナル系を活性化することが示唆されたがその生理的意義の検証が必要である。甲状腺ホルモンと他の核内受容体系とのクロストークについてはエストロゲン受容体に注目した解析を主としたが、エストロゲン受容体以外にも多数の核内受容体の発現が上昇することが示唆されている。これらの結果は、神経幹細胞における核内受容体間のクロストークは想像通りに多岐に渡り複雑であることを示唆し、1つの核内受容体体系のかく乱により、他の核内受容体体系にも影響が及ぶことを念頭に置いた研究の重要性を確認するものである。

D11-3. 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)

1-ブロモプロパン(以下 1-BP)は産業界では洗浄溶剤として多く使われているフロン代替化合物であり、1-BP の生殖器ならびに成熟脳への影響が報告されている。BPA は、出産前後いずれの曝

露でも探索行動の性差を障害させ、不動時間を増強させる。しかし、探索行動の性差は出産前曝露による影響により強く影響され、不動時間の増強は出産後曝露においてより顕著に確認された。探索行動の発現には海馬、青斑核が関与していることが示唆されており、胎生期間におけるこれらの発達に BPA が深く関わっていると考えられる。一方、不動時間で評価されるうつ反応の発現は、特に新生児期のセロトニン系の発達の阻害に基づいていることが種々のモデル動物の実験で示されており、今回の不動行動の結果が新生児期に強く発現したことは、BPA が特に新生児期にセロトニン系の発達に影響を与えた可能性がある。

D11-4. 核内レセプター系：(加藤、Parhar)

D11-4. 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。

D11-4. 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)

下垂体細胞における複数種の GnRH 受容体の発現は、正常な性的発達が機能的に heterogeneous な仕組みによって制御されることを示唆するものと考えられた。GPR54 が GnRH ニューロンの細胞移動を抑制したことから、GPR54 は GnRH の細胞成長および分泌抑制の制因子として機能する可能性が示唆された。また、これらはステロイドホルモンによる制御も受けることが知られていることから、今後、ステロイドホルモンと G タンパク質共役型受容体の関係を解析する。

D11-5. 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）

昨年度技術導入に成功した微量サンプルの網羅的遺伝子発現解析を基本に、LCM による極めて微量のサンプルからの網羅的遺伝子発現解析実施について検討を加え、見通しが立った。その結果は杉村班員の今後の研究展開に示唆を与えるものと期待される。菅野班員と行った共同研究からは、胎児発生が進むにつれ神経幹細胞がグリア細胞への分化能力を獲得する現象を反映する遺伝子発現変動が認められた。今後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

E I. プロジェクト課題研究

EI-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）

個体レベルでの低用量効果に関する影響を検出した報告はほぼ全て神経系に関する報告である。神経系（特にその発達）はビスフェノール A に対する感受性が高いということを否定できなくなっている。これらの報告が低用量に分類される暴露を行っている以上、NTP 長期毒性試験での体重減少の LOEL 5mg/kg bw よりも低い曝露濃度で影響が観察されていることから、典型的なエストロゲン様作用以外に焦点をあてた毒性学的な試験と考察が必要とされている。ADI の 50 ・ g/kg/day は見直す必要があるのかもしれない。

EI-2. 食物等異物受容体結合物の調査：アリア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）

食品中の AhR リガンドについてはその存在は知られているものの、その化学構造に関する知見はまだほとんど得られていない。我々も 2, 3 の物質について解析を進めているが、構造決定にはもう少し時間が必要である。

AhR は p21 を介して細胞周期の調節をすることが明らかになった。この調節には、p21 のプロモーター領域の下流 400bp のいずれかの部位が係っていることが明らかとなった。

EI-3. 成長初期の前立腺におけるエストロゲン影響：（杉村）