

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

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

井 上 達

平成19（2007）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	

【資料】

特別講演 内分泌かく乱物質の発がん・加齢などに及ぼす影響の 分子メカニズムに関する研究……………	13
曽根 秀子 国立環境研究所 環境リスク研究センター 主任研究員	

II. 分担研究報告書

I. プロジェクト課題研究

【ビスフェノールA関連文献調査】

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……………	15
関澤 純	

【食物等異物受容体結合物の調査】

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……………	24
松井三郎	

【低用量エストロゲン様物質の前立腺影響研究】

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……………	26
杉村芳樹	

【発がんの蓋然性研究】

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	32
福島昭治	
内分泌かく乱物質の発がん・加齢などに及ぼす影響の 分子メカニズムに関する研究	38
曾根秀子	
II. 基盤研究	
【生殖・ステロイド代謝系研究】	
雌性生殖器官への作用メカニズムの解明	41
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	48
笹野公伸	
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	54
加藤茂明	
【免疫・感染防御系】	
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	60
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	63
山崎聖美	
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	66
五十嵐美德	
【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	69
菅野 純	
内分泌攪乱物質の神経行動学的評価とその脳内機序の解明	75
栗生修司	

【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…………… 79

五十嵐勝秀

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 85

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

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、当班における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イブリッジにてこの問題に関する世界最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労働科学研究第3期3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では、低用量作用に関する文献調査の一環としてひきつづき専門家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)に関する文献のうち胎・胎児期の暴露による神経行動系に関する報文のピアレビューを行なった。また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対するテロメラーズの関与や、発がんホルミシスの存否について、低用量域における研究を継続し、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、エストロゲンや内分泌かく乱物質の投与が不可逆性変化を及ぼし得る臨界期では、成獣で応答する遺伝子群とは異なった遺伝子グループが変動しており、臨界的特異的応答反応と理解された。また生殖器以外の臓器におけるエストロゲンの影響として骨芽細胞に対する影響研究

が行われたが、これにより SXR を介した化学物質作用への理解が進展するとともに、内分泌かく乱の枠組みが拡張された。また、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もすすんだ。【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を介した脂肪織への化学物質の影響を検討した。さらに【神経・行動系部門】胎児期のエストロゲン様化学物質への曝露研究をすすめ、神経幹細胞の自己複製能、分化能への影響を明らかにした他、行動面で BPA が、耐用 1 日摂取量以下の用量でも、探索行動の性分化障害を増強することを見出した。【マイクロアレイ基盤整備部門】については、今年度は、杉村、加藤、両分担研究者に対し支援を行い、インパクトの高い情報発信に貢献している。

以上、本課題では、内分泌かく乱化学物質に危惧されていた低用量効果や複合効果を含めた高次生命系に対する影響について基本的にそれらのメカニズム面からの蓋然性を明らかにした。従ってヒト影響についても危惧がないわけではないが、さしあたり直接の暴露対象とはなっていないものと考えられ、重要性は医療器具等への個別の対応に留まるものと思われる。

分担研究者	杉村芳樹	三重大学医学部泌尿器科学教授
栗生修司	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
五十嵐美德	国立がんセンター研究所	化学療法部 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	医学専攻病理学講座 教授
	関澤 純	徳島大学総合科学部 教授
	曾根秀子	国立環境研究所環境リスク研究センター 主任研究員
	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	日本バイオアッセイ研究センター 所長
	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

A. 研究目的

本総合研究で設定した統括的目的は、内分泌かく乱化学物質の高次生命系へのかく

乱作用の背景にある分子機構を、核内受容体のシグナルネットワークを中軸とした基盤研究をすすめ、生殖・ステロイド代謝系、免疫・感染防御系、神経・行動系への影響メカニズムを統一的に理解することにある。また現実課題となっている低用量効果・複合効果についても、プロジェクト研究として、ホメオスタシスの背景に潜伏する比較的低用量レベルでの生体影響を視野に入れ、個別に時宜に応じた疑問に答える研究を図ることとしてきた。

プロジェクト研究の個別の課題としては、**ビスフェノール A 関連文献調査** (関澤) の第 3 年度計画については、周産期曝露による神経系への影響を中心に低用量影響問題に関して文献的な評価を行うこととした。**食物等異物受容体結合物の調査** (松井) については食品中の新規 AhR リガンドの構造決定と、CYP1A1 を組み込んだ酵母 AhR リガンドアッセイ系の開発。**低用量エストロゲン様化学物質の前立腺影響研究** (杉村) については、低用量エストロゲン様化学物質の曝露によるマウス前立腺の異常増殖機構解明に向けて、独自の発生物学的手法に分子生物学的手法を組み合わせた解析を目標とした。**発がんの蓋然性研究**については細胞回転の制御の鍵となる分子のひとつであるテロメラーゼのがん発生に伴う発現応答に着目し、内分泌かく乱化学物質の曝露による細胞周期やテロメラーゼ活性及びその制御分子 (human telomerase reverse transcriptase (hTERT)) の発現に及ぼす影響を解析する課題 (曾根)、および、発がん性をもつ α -BHC の低用量曝露による低用量域における発がんホルミシス現象

をマウスを用いて検証することを目的として (福島) それぞれ研究を行った。

次に基盤研究としては、**生殖・ステロイド代謝系**の研究では、井口は、内分泌かく乱化学物質の胎児曝露が生体に影響を及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的に、笹野は、bisphenol A (BPA) のステロイド・生体異物受容体を介した骨芽細胞に対する影響を解析することを目的として研究をすすめた。尚、加藤は、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ことを目的とした。**免疫・感染防御系**については、本年度は、山崎による内分泌かく乱物質のマクロファージを介した脂肪組織への影響と、廣川による妊娠マウスへのビスフェノール A 含有飲料水投与の後、離乳後も飲料水を介して生後 6 ヶ月まで曝露したマウスでの影響観察を計画した。尚、今期より参加した五十嵐^美は、低用量の bisphenol A (BPA) の、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞を介した免疫制御機構に及ぼす影響を見ることを目的とした。**神経・行動系**では、菅野が、発生過程での中枢神経系における各種受容体の発現を見ること、粟生が、ビスフェノール A 投与後の行動観察のための適切な指標を選定することを目的とした。尚、**マイクロアレイ基盤整備**を担当する五十嵐^勝は、各班員が実施中の研究に対して、網羅的遺伝子発現解析の側面からサポートする体制を整えることを目的として技術支援を実施した。

B. 方法

各々の研究の方法の概略は、それぞれ以下

の通りである。

ビスフェノールA関連文献調査 ビスフェノールAの公表文献をMEDLINE（2005年9月24日から2006年11月9日まで）で検索して得られた95編の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55報を選別した。文献の原報を入手し、内容により分別。テーマに沿いビスフェノール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（関澤）。

食物等異物受容体結合物の調査 染色工場廃水及び各種コーヒーから有機物を抽出し、AhRリガンドを単離精製し、構造決定した（松井）。

低用量エストロゲン様物質の前立腺影響研究では、ビスフェノールA（BPA）によるマウス前立腺の形態組織学的変化を評価し、さらにBPA経胎盤投与により変化する泌尿生殖洞の遺伝子発現を解析した（杉村）。

次に**発がんの蓋然性研究**のうち、テロメラーゼ活性測定研究では、ヒト胎盤絨毛がん細胞（BeWo）、ヒト乳がん細胞（MCF-7）及びヒト子宮内膜癌細胞（RL95-2）を定法に従い内分泌かく乱化学物質（TCDD及びビスフェノールA）もしくは 17β -エストラジオール（E2）を培地に添加し、24時間後に細胞懸濁液よりRNAを抽出してテロメラーゼ活性及びhTERTとERの発現測定に用いた（曾根）。また、発がんホルミシス研究では、TGF- α 遺伝子導入マウスにdiethyl-nitrosamine（DEN）でイニシエーションをかけた後、種々の用量の α -BHCを投与した後、肝を病理組織学的に検索した（福島）。

生殖・ステロイド代謝系研究では、井口は、妊娠マウスに合成エストロゲンを投与し、出産直前の胎児から組織を摘出、発現の変動した遺伝子を解析した。笹野は、ヒト骨芽細胞株hFOBに対するBPAの影響を細胞増殖及び細胞周期解析にて観察した。さらにこの細胞でのSXRを介したBPAの作用を調べた。尚、加藤は、男性ホルモン、及び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観察した。

免疫・感染防御系では、廣川は、胎仔期から6ヶ月以上低用量BPAに暴露されたマウスの胸腺・脾臓の重量および機能について免疫学的に検索した。また山崎は、C57BL/6マウスにビスフェノールA（BPA）を $0.05\mu\text{g}$ 、 $0.5\mu\text{g}$ 、 $5\mu\text{g/ml}$ になるように飲料水に加え、12週間投与し、その後脂肪組織の重量・遺伝子発現等を調べた。また五十嵐^美は、BPAのNKT細胞の増殖及びTh1/Th2サイトカイン産生バランスに対する影響を解析した。

神経・行動系では、菅野は、C57BL/6マウス妊娠11.5日から14.5日各日の胎児より終脳を分離し、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）からRNAを抽出し、遺伝子発現検討を実施した（培養条件については個別報告を参照）。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を用いて調べた。

マイクロアレイ基盤整備（五十嵐^勝・井上）に関する方法については個別報告を参照。

C. 結果

[ビスフェノール A 関連文献調査] 神経系の器官形成期でホルモン感受性の高い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。NTP 長期毒性試験での LOEL 5mg/kg 体重よりも低い曝露濃度でこのような体重減少の影響が観察されている。エストロゲン様作用以外のエンドポイントに焦点をあてた毒性学的な試験と考察が必要と指摘されている(関澤)。

[食物等異物受容体結合物の調査] 染色工場廃水から3種類の AhR リガンド、単離同定した。またコーヒー中に複数のリガンドを発見したが、構造決定には至っていない。YCM3-CYP1A1 は期待通り働き、CYP1A1 によるリガンドの分解と不活化の評価が可能となった(松井)。

[低用量エストロゲン様化学物質の前立腺影響研究] BPA 経皮下投与により成獣マウス前立腺に角化性病変が認められ、これは BPA 経胎盤投与による仔雄マウスの成獣時前立腺においても観察された。BPA 経胎盤投与により変化する泌尿生殖洞の遺伝子は角化に関与する遺伝子群のほか、性分化に関与する SF1 および、その関連遺伝子群であった。これらの変化は、用量レベルは異なるが、雌の BPA による膺上皮角化性変化と対応的である(杉村)。

[発がんの蓋然性研究] テロメロース発現ではヒト乳がん細胞 MCF-7 とヒト子宮内膜癌細胞 RL95-2 のステロイドホルモン受容体の mRNA 発現レベルを RT-PCR で調べた。ビスフェノール A を用いて、MCF7 における hTERT 及びテロメラーゼ活性に対する影響では、 10^{-6} ~ 10^{-8} M の範囲で有意な増加が認められた(曾根)。発がん

ホルミシス研究では、肝腫瘍の発生は、 α -BHC, 0 ppm に比較し、500 ppm のみで有意に増加し、1 ppm 以下では差はみられなかった(福島)。

[生殖・ステロイド代謝系] 胎児期の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した結果、胎児期で応答する遺伝子は成体におけるエストロゲン応答遺伝子と大きく異なり、胎児期特異的応答遺伝子の存在が明らかになった。さらに、エストロゲン応答遺伝子について、クロマチン免疫沈降法により、エストロゲン受容体が直接的に発現を制御している遺伝子を同定した。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も明らかになった(井口)。

ビスフェノール A (BPA) の骨芽細胞への影響研究については、BPA は培養細胞 hFOB の増殖を促した。また、hFOB において BPA は SX 応答遺伝子の発現の変化を促し、これを介して、CYP3A4 promoter の活性を促した。実施した骨組織の結果でも SXR タンパクの発現を認めた(笹野)。

また、性生殖へ影響を及ぼす性ホルモン作用点の探索については、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群を同定した。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(加藤)。

[免疫・感染防御系] 胸腺系への影響に関する今回の実験デザインでは、用いた BPA は胎仔免疫系の発達を抑制する用量であったが、6ヶ月齢に達したマウスの胸腺・脾臓の重量、リンパ球の構成、リンパ球

の増殖能と各種のサイトカイン産生能には、BPAの影響は認められなかった(廣川)。ビスフェノール A のマクロファージを介した脂肪織への影響については、コントロール群に比べて BPA 投与群に大きな変化はみられなかったが、白色脂肪組織重量及び褐色脂肪組織重量が増加する傾向にあった。また、精巣周囲脂肪組織では、脂肪細胞の増大、機能の悪化、マクロファージの浸潤を示す遺伝子の発現が増加していた。また、TNF α の亢進や、マクロファージ遊走能の亢進を見た(山崎)。さらにナチュラル・キラーT細胞に対する影響については、NKT細胞は *in vitro* で BPA 10^{-7} ~ 10^{-5} M の濃度で、濃度依存的に Th2 優位なサイトカイン産生パターンを示した。さらに BPA 濃度依存的に Th2 優位なサイトカイン産生が見られた(五十嵐^美)。

[神経・行動系] 発現が高い核内受容体群は、終脳とニューロスフェアではレパトりの多くが一致した。終脳では発現が低いにもかかわらずニューロスフェアで高いものとして、ESRR α 、GR、NGFI-B α 、などが同定され、これらを終脳全体で見ると、発現は低い神経幹細胞に於いて高発現を示す核内受容体であることが推量された(菅野)。

行動影響研究については、BPAは主として雄に作用し、探索行動の性分化を障害し、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週間ととくに感受性が高いことがわかった。(粟生)。

[マイクロアレイ基盤整備] 発生中期妊娠10日目から、発生後期妊娠16日目まで経時的に胎児終脳を採取し、網羅的遺伝

子発現解析を行った。ニューロン分化とグリア分化との、異なった分化時期のニューロスフェアも比較した。核内受容体48種類について解析した結果、終脳に於いて、TR α の発現が経時的に上昇すること、COUP-TF1(Nr2f1)他持続的に高値を示すもの、COUP-TF2(Nr2f2)他経時的に減少するものなどが同定された。

D. 考 察

[ビスフェノール A 関連文献調査] NTP の長期毒性試験での体重減少による LOEL 5mg/k \cdot 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の必要性が考えられた(関澤)。

[食物等異物受容体結合物の調査] 市販の染料物質に強力な AhR リガンド活性がみとめられた。もっとも強力な DY64 の底質中半減期は 240 日以上であると報告されており、環境中に長期間残留する可能性がある。DY64 と 3'-HB[b]QP はいずれもキノフタロン骨格を持っており、新しいタイプの AhR リガンドであると考えられる(松井)。

[低用量エストロゲン様化学物質の前立腺影響研究] 低用量エストロゲン様化学物質(BPA や DES)に対する感受性は、マウス前立腺の分葉 lobe に特異的であった(AP>DLP>VP)。そこで、各 lobe におけるエストロゲン受容体 α の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により検討したところ、BPA や DES に対する感受性とエストロゲン受容体 α の発現量に強い相関が認められた。BPA 投与により変化する泌尿生殖洞

内の遺伝子変化は、BPA に特徴的な発現変化が多く認められる。BPA の作用は、合成エストロゲン剤 DES が有するエストロゲン作用の一部と共通しているものの、より特徴的な作用を有する可能性が示唆された。今後、BPA に特徴的な作用を検討する必要がある（杉村）。

【発がんの蓋然性研究】「テロメラーゼ研究」については、TCDD のテロメラーゼに対する増強作用には、ER 依存及び ER 非依存経路のあることが明らかとなった。しかし、細胞の倍加時間とテロメラーゼ活性の強さは相関しなかったことから、細胞回転の速度には、テロメラーゼの活性化以外の因子が関わっており、それらと ER シグナル伝達の間接的な関係を明らかにすることが、内分泌かく乱化学物質の癌化への関与のメカニズムを解明するうえで、重要であると考えられた(曾根)。「発がんホルミシス研究」では、肝における α -BHC 投与における腫瘍(肝腺腫と肝細胞がん)の発生は 0.05-1 ppm の低用量群では対照群との差がなく、500 ppm 群でのみ有意な増加を見た。この事実は、 α -BHC のマウス肝発がん性には閾値が存在することを示唆している。しかし、ラット肝発がんにおいて認められた発がんホルミシス現象は、マウスではみられなかった。このことは、DEN によるイニシエーションが適切な用量域になかったこと、低用量域における α -BHC の用量、ラットとマウスの発がん感受性の差、および実験に用いた動物数、等が関与しているものと考えられた(福島)。

【生殖・ステロイド代謝系】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。今回の胎生期のエストロゲン影響研究により、胎児期のエストロゲン曝露によって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体とは異なっていることが明らかとなり、胎生期特異応答と考えられた(井口)。また、骨代謝系への影響研究は、内分泌かく乱研究の枠組みを大きく拡張した。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り 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た。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。本研究では BPA による骨芽細胞の増殖機序として、SXR に注目した。骨芽細胞における SXR を介した細胞増殖経路が骨組織の維持に重要な働きを担っていると考えられた。内分泌かく乱化学物質を含めた化学物質の骨組織への影響をさらに検討し、明らかにすることが必要と考えられる(笹野)。性ホルモンレセプター研究では、数多くの転写共役因子及び複合体がこのものに結合することが分かった。これら因子複合体の中でいずれが最も重要であるかは未だ判断できない。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(加藤)。

[免疫・感染防御系] 胸腺・Tリンパ球への影響研究では、胎仔期に低用量のBPAが暴露されると、Notch-1リガンド、Gliamaturation factor β 、Thymic stromal-derived lymphopoietin receptorなどの遺伝子発現は低下し、一方、エストロゲン受容体をはじめ、ACTH-R、TSH-R及びTRH-Rなどの発現は増強した。このようなマウスの出生後、同じように、低用量のBPA飲料水を摂取した母マウスに保育させ、離乳後も、6ヶ月齢までBPAを含む飲料水を摂取させたF1の免疫系を検索した結果では、検索したいずれの免疫系の指標や機能も対照群と比べて、差がなかった。これは、胎仔期に認められた変化が修復可能な可能性を示唆している(廣川)。他方マクロファージを介した脂肪織への影響研究では、脂肪組織に浸潤したマクロファージは脂肪組織へ大きな影響を与えていることが明らかになった。マクロファージや脂肪細胞からは、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)が分泌される。単球のマクロファージへの分化、MCP-1等のケモカインやTNF α 等のサイトカインの分泌促進へと反応性ループの形成が示唆される。本研究により、BPAはマクロファージを介した脂肪組織に影響を与えている可能性のあることが示唆された。結果として、BPAのような内分泌かく乱物質は、マクロファージを介して肥満に関与し、ひいては生活習慣病につながるような状態に陥りやすくしている可能性が考えられた(山崎)。またT細胞亜分画バランスの研究で

は、内分泌かく乱化学物質が免疫系のTh1/Th2バランスに影響を及ぼし、Th2優位な反応を引き起こすことが知られている。Th1およびTh2両者のサイトカインを産生し免疫応答を制御するNKT細胞に対しても、内分泌かく乱化学物質が影響を及ぼし、NKT細胞の関与する自己免疫やアレルギー疾患に影響を及ぼすと考えられる。NKT細胞の抗原特異的な反応は、BPA 10^{-7} ~ 10^{-5} Mの濃度で、増殖およびサイトカイン産生に影響を及ぼすと考えられた(五十嵐^美)。

[神経・行動系] 神経幹細胞の増殖、分化は、塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型(bHLH)転写因子による制御を受けていることが知られている。bHLH型転写因子の中で、神経幹細胞の未分化型増殖を担うHES1は、エストロゲンによる発現低下が知られている。これは、神経幹細胞に於いて核内受容体間の多岐に渡るクロストークが存在することを示唆し、1つの核内受容体系のかく乱により、他の核内受容体系にも影響が及ぶ可能性を示唆している(菅野)。

行動面から見ると、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、不応時間を増強させる。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、不応時間の増強は出産後の追加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が関わっていると考えられる。今回の不応行動の結果が新生児期の強く発現したことは、BPAが特に新生児期のセロトニン系の

発達に影響を与えた可能性がある(粟生)。
[マイクロアレイ基盤整備] 杉村班員との共同研究で、BPAによる前立腺の角化と、SF-1 発現上昇を介した抗ミュー管ホルモンシグナル系の活性化が見出された。ケラチン化はこれまでの研究を裏付けるものである。他方、SF-1 発現上昇は本研究によって初めて見出された現象である。加藤班員と行った共同研究で、エストロゲンの骨代謝制御機構を解明する一助となる成果が得られた(五十嵐^勝)

E. 結 論

[ビスフェノール A 関連文献調査] PubMed 医学文献データベースより文献 55 件を収集し評価した。視索前野脳室周囲核(AVPV)における tyrosine hydroxylase (TH) 陽性ニューロン数の減少、脳内の somatostatin receptor subtype 3 (ss3) mRNA 量の変化、前脳辺縁における dopamine 受容体の up regulation などの報告が注目された。化学物質の安全性評価からは、さらに高次生体統御システムの解明に資する研究が求められる(関澤)。
[食物等異物受容体結合物の調査] 新規の AhR リガンドを単離同定し、キノフタロン系化合物が新しいタイプの AhR リガンドであることを示した。また、新しく作成した YCM3-CYP1A1 は新規リガンドの毒性を簡便に予測する秀れた系である(松井)。

[低用量エストロゲン様化学物質の前立腺影響研究] 低用量BPAに暴露したマウス前立腺では、DESの作用と一部共通した形態組織学的変化(squamous change)やlobe 特異性 (AP>DLP>VP)を示した。しか

し、高用量 BPA の投与で DES と同じ形態組織学的変化を示すことはなく、さらに遺伝子発現変化の結果からも、BPA に、より特徴的な作用が存在する可能性が示唆された(杉村)。これらの変化は、雄生殖器に対する BPA の作用と対比的に理解される。

[発がんの蓋然性研究] 各種生殖器系のヒト癌細胞を用いて、内分泌かく乱化学物質の曝露による細胞周期やテロメラーゼ活性及びその制御分子 hTERT の発現に及ぼす影響を解析した。E2 は癌細胞において、ER の発現量に依存してテロメラーゼ活性及びその制御分子 hTERT の発現を増加させることがわかった。TCDD のテロメラーゼに対する増強作用には、ER 依存及びER非依存経路の存在が明らかとなった(曾根)。また α -BHC の発がんホルミシスの可能性については、マウス肝発がん性に閾値が存在することが強く示唆された。しかし、ラット肝発がん認められた発がんホルミシス現象は認められなかった(福島)。

[生殖・ステロイド代謝系] 胎生期のエストロゲン影響研究では、マウス雌性生殖器官のエストロゲン応答遺伝子は胎児期と成体で大きく異なっていた。すなわち、エストロゲンが不可逆的な影響を及ぼしうる臨界期では、成獣で応答する遺伝子群とは異なる遺伝子の変動しており、エストロゲンによる不可逆的な影響の誘発に関与している可能が示唆された。またトリブチルスズによる影響も、不可逆的な作用という点で、エストロゲンと類似のメカニズムが作用している可能性も

あり今後の詳細な解析が必要である(井口)。その他の組織でも核内受容体発現による変化が認められ、BPAの骨芽細胞に対する増殖作用は、エストロゲン受容体ではなく、SXRを介した経路であることが示唆された(笹野)。さらに性ホルモンレセプターの転写制御能の検討では、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候補分子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が明らかになった(加藤)。

[免疫・感染防御系] 胎仔期に影響するBPAを、さらに6ヶ月間投与しても、マウスの免疫系には有意な影響は見られなかった(廣川)。他方、BPAは、マクロファージを介して脂肪組織のサイトカイン産生などに影響を与えている可能性があることが明らかになった(山崎)。さらに、 $BPA_{10^{-7}} \sim 10^{-5}M$ の濃度においてNKT細胞の抗原特異的な反応をTh2優位にすることを明らかとなった。すなわちBPAが免疫応答の制御、特に、Th1/Th2バランス制御に重要な役割をするNKT細胞をTh2優位な反応に偏らせ、Th2反応が関与するアレルギー疾患などの発症に関連する可能性が示唆された(五十嵐^美)。

[神経・行動系] 胎児期のエストロゲン様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、胎児神経幹細胞における核内受容体TRaの高発現は甲状腺ホルモン作用によるオリゴデンドロサイトの分化と関連することが示唆

された(菅野)。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については、BPAが耐用1日摂取量以下の用量でも、探索行動の性分化を障害し、うつ反応を増強すること、前者は胎生期が臨界期であり、後者のうつ反応の増強の臨界期は、新生児期と考えられた。1-BPも新たな内分泌攪乱物質の可能性が高い(粟生)。

[マイクロアレイ基盤整備] 各班員の研究方向決定に影響を与える情報を短期間のうちに得ることを狙いとした。網羅的遺伝子発現解析技術は、数万のマーカーを迅速に検討できる有効な技術である。本研究で示されてきたように、この技術は、既知の情報から推測することが困難な新たな情報を提供してくれる可能性を秘めた解析手法であり、明確な表現型を伴って影響が現れることが少ない内分泌かく乱化学物質の作用を、その作用メカニズムに立ち入って解析する際に今後も有効活用していくことが望ましい(五十嵐^勝)。

F. 健康危惧情報

直接該当する事柄は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

原著

Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, Inoue T: Benzene-induced hemato-poietic toxicity transmitted by AhR in wild-type mouse and nullified by repopulation with AhR-deficient bone

marrow cells: time after benzene treatment and recovery. *Chemosphere*, in press.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE Inoue T.; Protective role of connexin 32 in steady-state hematopoiesis, regeneration state and leukemogenesis. *Exp Biol Med* (Maywood), in press.

Yoshida K, Hirabayashi Y, Watanabe F, Sado T, Inoue T. (2006). Caloric restriction prevents radiation-induced myeloid leukemia in C3H/HeMs mice and inversely increases incidence of tumor-free death: implications in changes in number of hemopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* **34**, 274-83.

Yoon BI, Kaneko T, Hirabayashi Y, Imazawa T, Nishikawa A, Kodama Y, Kanno J, Yodoi J, Han JH, Hirose M, Inoue T. Electron microscopical evidence of the protective function of thioredoxin (Trx/ADF) transgene against 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo- p-dioxin (TCDD)-induced cellular toxicity in the liver and brain. *J Toxicol Pathol*. 2005, 18:41-46.

2. 学会発表

Inoue T: Effect of endocrine disruptors on health: possible underlying mechanistic background of low-dose and synergistic actions. Weybridge+10 Workshop

“Impacts of Endocrine Disrupters (2006. 11.10) [Helsinki, Finland, Meeting abstract, 7: 2006]

Inoue T, Yoon BI, Igarashi K, Kanno J, Yodoi J, Hirabayashi Y Global Gene-Expression Profilings of Steady-State Mice Carrying A Graded Dosage of Trx-Gene Elucidate Major Principal Gene-Component for the ROS-removal and for Trx-Dependent Anti-Oxidative Stress. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2006.6.23) [Kyoto, Meeting abstract pp 797]

Inoue T: Summary and Future Directions “Regulation of hematopoiesis”. Pathophysiology & Molecular Biology of Hematopoiesis, Malignancy & Radiation Response “International Symposium in Memory of Eugene P. Cronkite, M.D.” (2006.5.12) [Brookhaven National Laboratory, NY, No abstract]

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

資 料

講演抄録

内分泌かく乱物質の発がん・加齢などに及ぼす影響の分子メカニズムに関する研究

曾根秀子 独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター 主任研究員

内分泌かく乱化学物質の主作用は、アリールヒドロカーボン受容体 (AhR) やエストロゲン受容体 (ER) などの核内受容体に作用してそれら応答遺伝子の発現を変動させることにあるという理解が深まってきた。AhR や ER などの核内受容体は、細胞の分化と増殖に関与することがわかってきており、がんの発生と進展には細胞周期の制御の逸脱が深く関わっている。内分泌かく乱化学物質がヒトの癌の発生や進展に関与していると考えれば、細胞周期と癌化メカニズムの接点に何らかの役割をしているに違いない。

そこで細胞回転の制御、細胞の加齢の鍵分子のひとつであるテロメラーゼの発現応答に着目し、3つの異なるアプローチ、1) ヒト細胞培養実験、2) ER α 抗体を用いた免疫沈降法によるエストロゲン制御のエピジェネティック関連遺伝子の探索、3) パイオインフォマティクスを行っている。今回の講演では、1) ヒト細胞培養実験を中心にこれまでの研究成果を紹介する。

各種のヒト生殖器系組織由来の癌細胞を用いて、内分泌かく乱化学物質の曝露による細胞周期やテロメラーゼ活性及びその制御分子 human telomerase reverse transcriptase (hTERT) の発現に及ぼす影響を解析した。

ヒト胎盤絨毛がん細胞 BeWo、ヒト乳がん細胞 MCF-7 及びヒト子宮内膜癌細胞 RL95-2 を定法に従いフェノールレッドフリーの培地と活性炭処理した 10%牛胎仔血清 (FBS) で培養した。溶媒 0.1%DMSO、内分泌かく乱化学物質 (TCDD 及びビスフェノール A) もしくは 17 β -エストラジオール (E2) を培地に添加し、24 時間後に細胞破濁液もしくは RNA を抽出してテロメラーゼ活性及び hTERT と ER の発現測定に用いた。テロメラーゼ活性は Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) 法によって測定した。

ヒト乳がん細胞 MCF-7 とヒト子宮内膜癌細胞 RL95-2 のステロイドホルモン受容体の mRNA 発現レベルを RT-PCR で調べたところ、MCF-7 を 1 とすると ER α および PR は、RL95-2 においてはそれぞれ 0.3 および 0.2 であった。ER β 及び AR は RL95-2 において検出できなかった。また、MCF-7 の倍加時間を 1 とすると BeWo 細胞は、1 RL95-2 は、1.4 であった。テロメラーゼ活性は、E2 1nM で曝露したときの MCF-7 における活性を 100 とすると、BeWo 細胞は 100、RL95-2 は 23 であった。1nM TCDD での曝露では、BeWo 細胞は 120、RL95-2 は 2.0 であった。ビスフェノール A を用いて、MCF7 における hTERT 及びテロメラーゼ活性に対する影響を調べたところ、 10^{-6} ~ 10^{-8} M の範囲で有意な増加が認められた。また、細胞周期への影響を 1nM の E2 で調べたところ、BeWo 細胞では、G0/G1 期が 15%、S 期が 65%G2/M 期が 20%であったが、RL95-2 は G0/G1

期が 55%、S 期が 29%、G2/M 期が 16%であった。1nM TCDD での曝露では、この細胞周期の存在比が変化し、BeWo 細胞では、G0/G1 期が 24%、S 期が 68%、G2/M 期が 8%、RL95-2 は G0/G1 期が 60%、S 期が 20%、G2/M 期が 17%であった。S 期のマーカー遺伝子の c-myc も同様に相対的に RL95-2 では E2 1nM 及び TCDD 1nM の曝露による発現誘導は、BeWo 細胞よりも低かった。

生殖細胞や初期胚では強いテロメラーゼ活性が認められるのに対して、成体の体細胞のように分化が終了した正常体細胞ではテロメラーゼ活性は検出できない。しかし、細胞が癌化するとテロメラーゼは再活性化する。テロメラーゼは無限回に増殖し老化プログラムから逸脱している細胞にのみ特異的に活性があるものと考えられている。このことに着目して、内分泌かく乱化学物質の曝露による細胞周期やテロメラーゼ活性及びその制御分子 hTERT の発現に及ぼす影響を解析した。上記に示した結果から、E2 は、ER の発現量に依存してテロメラーゼ活性及びその制御分子 hTERT の発現を増加させることがわかった。この E2 のテロメラーゼに対する増強作用は、ER の発現量に依存し、ER のないラット線維芽細胞 TGR1 ではテロメラーゼ活性はみとめられなかった。TCDD も同様に ER の発現量に依存してテロメラーゼ活性及びその制御分子 hTERT の発現を増加させるが、ER の発現していない細胞でもテロメラーゼ活性を示し、ER 非依存性のメカニズムが存在することがわかった。また、E2 によるテロメラーゼ活性の増加した細胞では、hTERT や c-Myc の発現量や S 期の存在比も増加しており、E2 は、ER を介して hTERT の発現量が増加し、テロメラーゼを活性化させて細胞増殖へ導くものと推察された。ビスフェノール A も弱いながら hTERT の発現量を増加させ、テロメラーゼの活性化を導くものと推察された。しかしながら、今回の実験では細胞の倍加時間とテロメラーゼ活性の強さは相関しなかった。細胞回転の速度には、テロメラーゼの活性化以外の因子が強く関わっており、それらと ER シグナル伝達の間関係を明らかにすることが、内分泌かく乱化学物質の癌化への関与のメカニズムを明らかにする一助になると考えられる。今後、ER は無いがテロメラーゼ活性が高い細胞において、E2 やビスフェノール A が同様な作用を示すかどうか検討する必要がある、ホルモン制御のエピジェネティクスによる癌化の可能性についても考察したい。

Ⅱ. 分担研究報告書

I. プロジェクト課題研究