

Table 2

Summary of neoplastic lesions in male rats neonatally treated with diethylstilbestrol

Dose	0 µg/kg	0.05 µg/kg	0.5 µg/kg	5 µg/kg
(Number of tumor bearing animal)	[20] 20	[20] 20	[20] 19	[20] 19
(Pituitary gland)	[20]	[19]	[20]	[20]
Carcinoma	1			
Adenoma	10	10	7	13
Hyperplasia	5	4	8	3
Total	16	14	15	16
(Heart)	[20]	[20]	[20]	[20]
Metastasis				1
(Lung & Bronchus)	[20]	[20]	[20]	[20]
Metastasis				2
(Thyroid gland)	[20]	[18]	[20]	[20]
C-cell adenoma	2	2		
C-cell hyperplasia			1	
Follicular cell adenoma	1	1		
Hyperplasia, follicular cell		1	1	
(Parathyroid gland)	[17]	[14]	[16]	[16]
Adenoma			1	2
(Liver)	[20]	[20]	[20]	[20]
Metastasis		1		
Hepatocellular carcinoma	1			1
Hepatocellular adenoma	1		2	1
Focus of cellular alteration	3	2	4	6
(Pancreas)	[19]	[17]	[18]	[19]
Adenoma, islet cell	4	4	1	1
(Jejunum)	[18]	[16]	[18]	[17]
Adenocarcinoma		1		
(Spleen)	[20]	[20]	[20]	[20]
Hemangioendothelioma				1
(Adrenal gland)	[20]	[20]	[20]	[20]
Malignant pheochromocytoma			1	1
Pheochromocytoma	3	2	5	2
Hyperplasia, medullary cell	5	11	3	5
(Prostate: ventral lobe)	[19]	[19]	[20]	[20]
Adenoma				1
(Mammary gland)	[17]	[14]	[14]	[16]
Adenocarcinoma			1	1
Fibroadenoma		2		
(Skin/subcutis)	[20]	[20]	[20]	[20]
Keratoacanthoma	1	1	1	
Histiocytic sarcoma		1		
Hemangiosarcoma			1	
Fibroma, subcutis	1	1	1	
Papilloma, squamous cell	1		1	
Fibrosarcoma	2			
Malignant schwannoma	1			
Epidermal cyst				1
(Hematopoetic system)	[20]	[20]	[20]	[20]
Leukemia, lymphocytic		1	1	
Mononuclear cell leukemia			1	
(Harderian gland)	[18]	[17]	[16]	[16]
Adenoma		1		
(Zymbal gland)	[20]	[20]	[20]	[20]
Squamous cell carcinoma				2

[], number of animal examined.

Table 3

Sexual maturation of animals neonatally treated with diethylstilbestrol

Dose	0 µg/kg	0.005 µg/kg	0.05 µg/kg	0.5 µg/kg	5 µg/kg
Females					
Age at vaginal opening	31.4 ± 1.6 (11)	31.5 ± 1.3 (13)	31.4 ± 1.5 (11)	30.7 ± 1.8 (12)	35.1 ± 1.4 ** (12)
Body weight (g)	15.5 ± 0.8 (11)	15.6 ± 0.7 (13)	16.2 ± 0.9 (11)	16.2 ± 1.1 (12)	17.3 ± 0.9 ** (12)
Males					
Age at preputial separation	31.9 ± 1.1 (10)	33.5 ± 2.7 (12)	31.7 ± 1.2 (12)	31.9 ± 1.9 (8)	32.3 ± 0.9 (8)
Body weight (g)	19.4 ± 1.1 (10)	18.4 ± 0.9 (12)	18.8 ± 1.1 (12)	19.9 ± 1.7 (8)	19.3 ± 1.2 (8)

Data shown as mean ± S.D. (N)

**, Significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

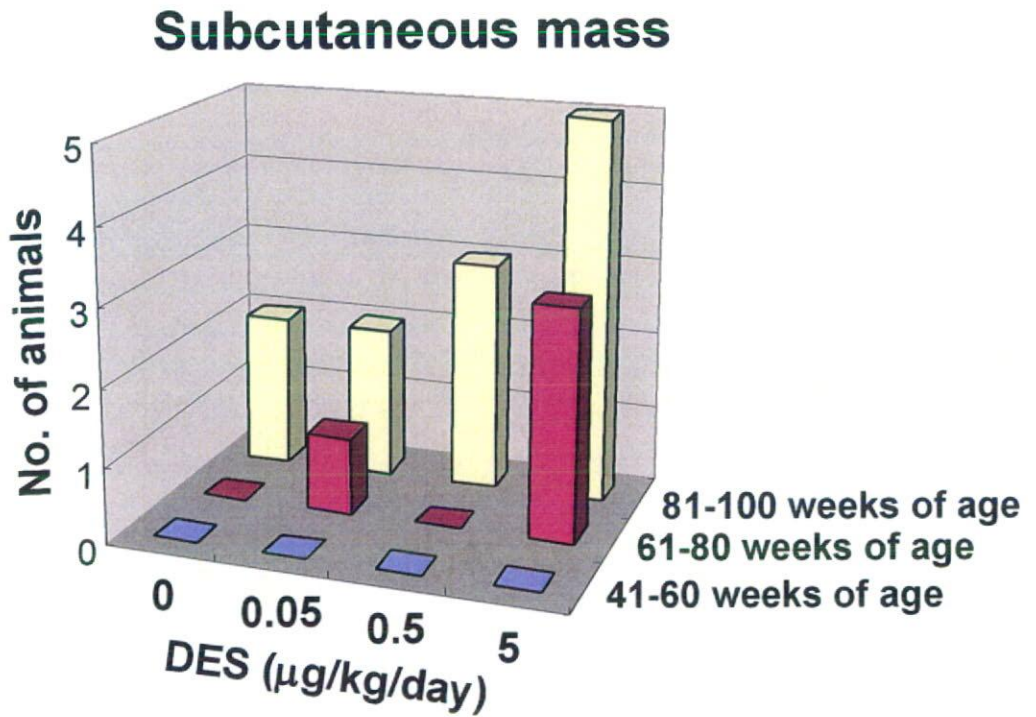
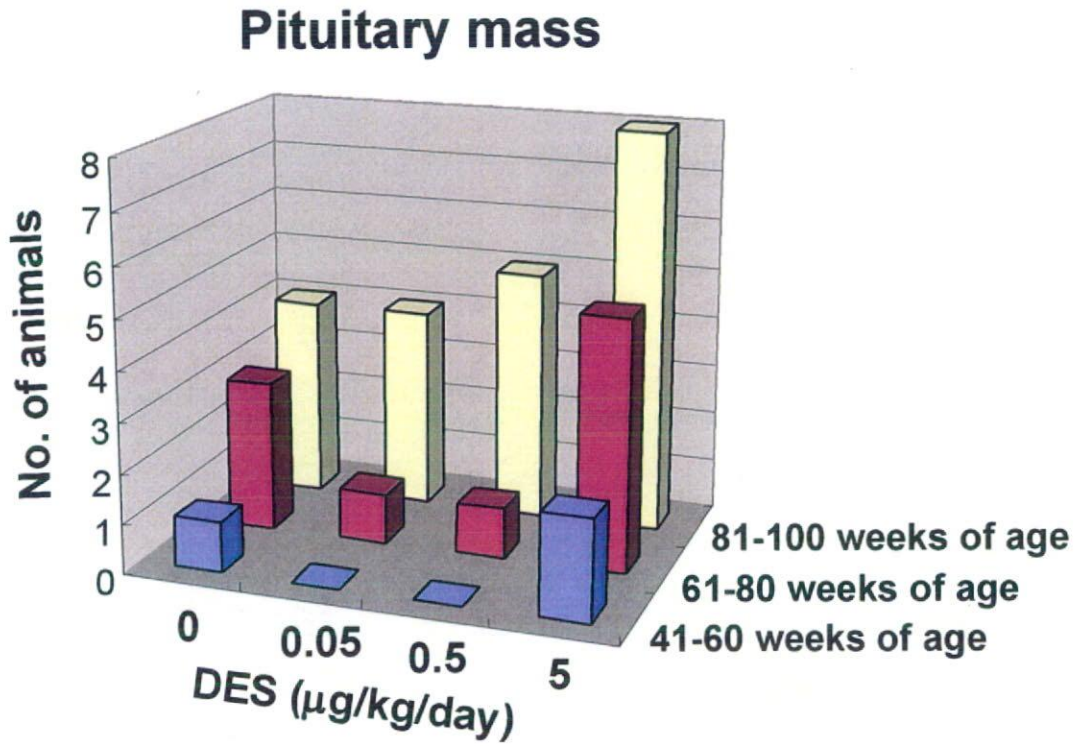


Fig.1 Neoplastic lesions in dead female rats

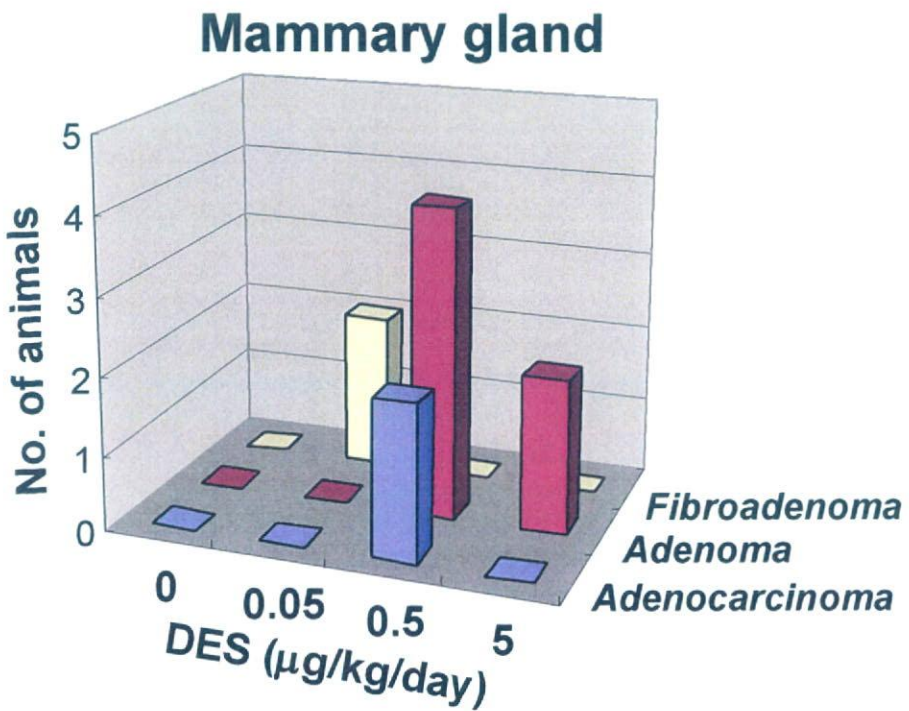
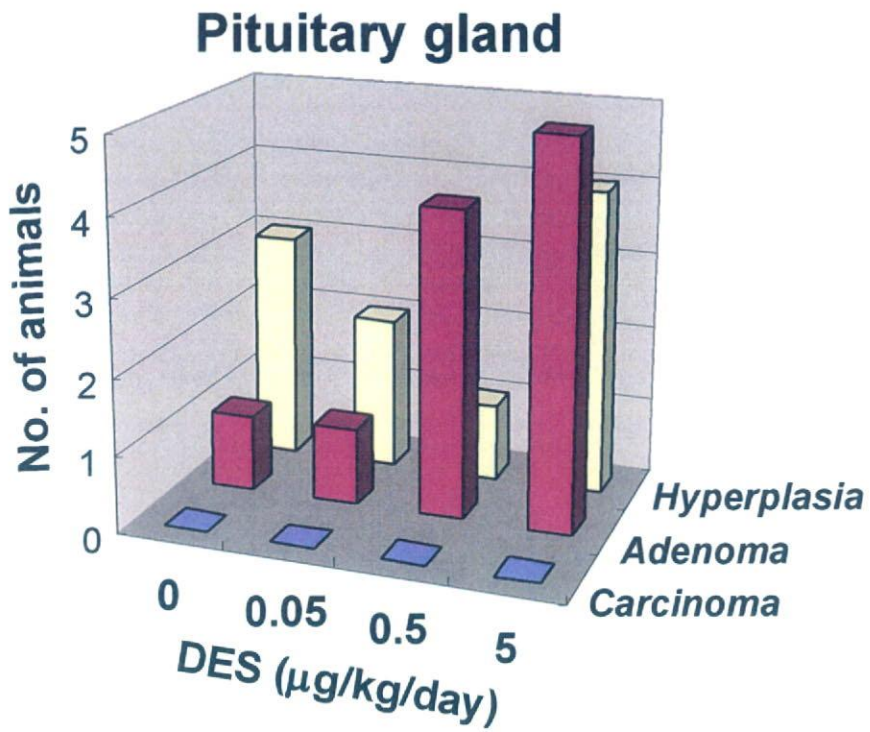


Fig.2 Neoplastic lesions in female rats at 54 weeks of age

9. 化学物質の齧歯類周産期暴露による雌性生殖器等の遅発性障害の研究

研究分担者 松島 裕子

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 主任研究官

研究要旨

前小野班委託研究において、低用量 Bisphenol A (BPA; 0.5、5、50 μ /kg) を SD ラット 妊娠期・授乳期投与し、雌性仔 (F1) の性周期を検査した結果、6 ヶ月齢において対照群には異常は見られなかったが、50 μ g/kg では 3/30 が Persistent estrus を呈し、月齢が進むに従い、全ての BPA 投与群で性周期異常がみられた。

本研究は、委託試験と同様のプロトコールを踏襲し、最初に有意な性周期異常が見られた 6 ヶ月まで継続して視床下部、下垂体、卵巣等の遺伝子発現の解析及び病理組織等を詳細に検査することにより性周期異常が誘導されるメカニズム明らかにする。

現在、分娩後 10 日目であり、投与継続中である。

A. 研究目的

本研究は、低用量 BPA の周産期暴露により性周期異常が誘導されたメカニズムを解明することを目的とする。

B. 研究方法

被験物質及び投与方法;

BPA (関東化学(株)、CAS No. 80-50-7、Lot. No.807W2221) は、オリーブ油((株)フジミ製薬所 LotNo.0040MR) に溶解し、0 (溶媒対照; オリーブ油)、5 及び 50 μ g/kg/day、投与容量 5mL/kg を各群交尾が確認された雌に対し妊娠 6 日一分娩後 20 日(離乳前日)まで 1 日 1 回、毎日強制経口投与した。投与量は最新の体重値を基に算出した。

試験動物;

10 週齢の Crl: CD (SD)IGS ラット (日本チャールス・リバー・株)、雌 42 匹、雄 21 匹を平成 20 年 1 月 21 日に購入した。7 日間の検疫、馴化期間終了後、健常である事が確認されたラットを雄 1 対雌 2 で一晩同居させ、翌朝腔栓及び腔垢中の精子の存在をもって交尾が成立したものとみなし、

その日を妊娠 0 日と定めた。

ラットは、床敷きとしてソフトチップ(三協ラボ株式会社; 加熱乾燥済み)を入れたポリオレフィン樹脂ケージ (CL-0108-2 クリーン 200TPX 日本クレア株式会社、D420×W263×H199) に雌雄とも個別に収容し、温度 25 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 5%、換気回数 12 回/時、明暗サイクル 12 時間明 (7:00-19:00) -12 時間暗 (19:00-7:00) に設定された動物室で飼育した。

飼料は MF (オリエンタル酵母株式会社)、飲料水は給水瓶に上水道水を入れ、いずれも自由摂取させた。

収容匹数収容匹数は、検疫・馴化期間は雌雄共 1 匹/ケージ、交配は雄 1 対 2 雌とし、妊娠期間中は 1 匹/ケージ、分娩後は翌日まで雌 1 匹+全腹/ケージ、哺育 2 日目から離乳まで同腹児数を原則として雌性仔 8 匹となるよう調整した。同腹児数が 8 匹に満たない場合は個体数調整は行わないこととした。離乳以降は 2 匹以下/ケージとする。

母動物の体重は妊娠 0、6、14、17 及び 20 日、分娩後 0、5、7、14 及び 21 日(出生仔の離乳日)

に測定した。妊娠動物の全例を自然分娩させ、出生日(分娩日を分娩 0 日とした)に出産生仔数、出産死亡仔数、出産生仔性記録した。

雌性出生仔(F1)について体重は 0、5、7、14 及び 21 日齢(出生仔の離乳日)、以降週 1 回に加え、膣開口日及び剖検日に測定する。

生存する離乳仔全例について、21 日齢から膣開口を観察する。

生存する雌性出生仔については、離乳翌日 PND21、PND40、3 ヶ月齢及び 6 ヶ月齢に下記検査項目を行う。PND40 以降に剖検する動物は膣スメアにより発情前期の動物とする。

検査項目;

- 1) 出産日、産仔数、死産仔数、出産生仔性比、母・仔の体重
- 2) 体重
視床下部; RNAlater; Gene Chip 及び GnRH 定量 RT-PCR
下垂体; 重量測定; RNAlater あるいは 10%ホルマリン固定; GeneChip 及び免疫染色 (prolactin)
血清; prolactin、LH、FSH、E2 値
卵巣; 重量測定; メタカーン固定; 多卵性卵胞、黄体の有無
乳腺; whole mount preparation
子宮; 重量測定; 10%ホルマリン固定; 病理組織
膣; 10%ホルマリン固定; 病理組織

(倫理面への配慮)

国立医薬品食品衛生研究所・動物実験倫理委員会の制定する「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程」に従い実験を行っている。

C. 研究結果

現在、分娩後 10 日目であり、各群順調に生育

している。

分娩時平均出産数は、溶媒対照群、BPA 5 μ g/kg 及び BPA 50 μ g/kg 各々 15.0 \pm 0.8 (F0 親ラット数 n=4)、15.0 \pm 1.4 (n=7)及び 14.4 \pm 2.1 (n=11)、平均雄仔数(F1)は、6.5 \pm 1.0、7.1 \pm 2.5 及び 7.4 \pm 2.6、平均雌仔数(F1)は 8.5 \pm 1.3、7.6 \pm 2.9 及び 7.1 \pm 1.9、平均雌性仔体重(g)は 6.28 \pm 0.47 (n=34)、6.17 \pm 0.56 (n=53)及び 6.17 \pm 0.75 (n=78)であった。

下垂体抗プロラクチン免疫染色のための条件の至適化を完了した。

D. 考察

周産期にある個体は化学物質に高感受性であり、この時期のエストロゲンあるいはアンドロゲン活性化学物質暴露により、成長後の性周期の異常、早期老化現象、無排卵、加齢に伴う下垂体腫瘍、乳腺腫瘍、子宮頸部腫瘍等の発生が引き起こされることが知られている。

平成 17 年度の委託試験((財)化学物質評価研究機構日田事業所)において、BPA 0、0.5、5 及び 50 μ g/kg/day の用量でラットの妊娠期～授乳期にかけて投与し、得られた雌出生仔(F1)の性周期を 12 ヶ月齢まで継続して検査した。

試験結果では、ヒトでの BPA 許容摂取量 50 μ g/kg 群において、6 ヶ月齢に 3/30 例が persistent estrus を呈し、7 ヶ月齢時には 6/30 例が constant estrus を呈した。以降、8 ヶ月齢では persistent estrus、constant estrus が 10/18 例、9 ヶ月齢では 2/18 例、4/18 例、10 ヶ月齢では persistent estrus が 2/18 例、constant estrus が 9/18 例、11 ヶ月齢では persistent estrus が 6/18 例、constant estrus が 6/18 例、12 ヶ月齢では persistent estrus が 3/18 例、constant estrus が 9/18 例と、性周期異常を呈する動物数が媒体対照群における出現例数を上回っており、統計学的にも、persistent estrus を呈する動物の出現頻度は 7、8、10、12 ヶ月齢時で有意に増加した。これらのことから、BPA の低濃

度の妊娠期・授乳期投与によって pre-middle age における性周期異常が誘導されることが明らかとなった。

上記の性周期異常が誘発された原因が卵巣にあるのか視床下部-下垂体にあるのかについてを検討した論文がある(Forsberg JG, Acta Anat, 1992, 144, 103-106)。それによると、マウスに無排卵を引き起こすと報告されている DES の 5 µg/head を PND1-5 に暴露し、成熟後その卵巣を正常な卵巣摘出動物に移植したところ正常に出産したことから、責任病巣は視床下部-下垂体であるとされている。

一方、周産期エストロゲン暴露により未成熟期から高プロラクチン血症となる(Khurana S, Endocrinology, 2000, 141, 4512-4517)こと、さらに加齢に伴いプロラクチン産生性下垂体腫瘍及び乳がんの発生の増加(Walder BE Cancere Res, 1993, 53, 1546-1549、huseby RA, Am j obstet Gynecol.,1982, 144, 939-949)が報告されている。高プロラクチン血症は、視床下部の GnRH の分泌を抑制し、その結果、下垂体の LH, FSH 分泌を抑制し、血清 LH, FSH の減少により卵巣からのエストロゲンの分泌が減少し、排卵の減少及び萎縮による性周期の異常を誘発することが知られている。(ヒトにおいては、排卵抑制や乳汁分泌などの症状が現れ、乳汁漏出・無月経症候群として知られており、男性より女性(80%)に高頻度に発症する。)

他方、視床下部ドーパミンは、下垂体プロラクチンの分泌に抑制的に作用するが、鈴木班員により BPA を暴露された胎児脳においてドーパミン神経発達がかく乱されることが報告されている。

これらのことから、BPA の経胎盤・経母乳暴露により、高プロラクチン血症が誘導され、性周期異常が引き起こされることが推測される。

委託試験において、最初に統計学的に有意な性周期異常の見られたのは生後 6 ヶ月齢である。媒体対照群では異常周期を示す動物はみられな

かったが、5 µg/kg 群で総異常周期動物数(7/22、31.8%)の発生頻度が増加したことを受け、本研究は、委託試験と同様のプロトコールを踏襲し、最初に有意な性周期異常が見られた 6 ヶ月まで継続して視床下部、下垂体、卵巣等の遺伝子発現の解析及び病理組織等を詳細に検査することにより性周期異常が誘導されるメカニズム明らかにする。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表(発表雑誌名、巻号、ページ、発行年)

松島 裕子、菅野 純、基礎飼料 CRF-1 と Phytoestrogen low diet のマウス妊娠期・授乳期摂取による雌雄仔への影響の比較検討、環境ホルモン学会第 10 回研究発表、2007 年 12 月 9-11 日、大宮

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、飼料中植物性エストロジェンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の percellome 手法を用いた解析、第 32 回日本トキシコロジー学会、2005(H17) 6 月 29 日-7/1

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、飼料中の植物エストロジェンがトランスクリプトームに及ぼす影響、東京環境ホルモン学会第 8 回研究発表会トキシコゲノミクスからのアプローチ、2005 年 9 月 27-29 日、

菅野 純、五十嵐勝秀、松島裕子、相崎健一、中津則之、環境ホルモン評価法の進歩と情報の蓄積、

環境ホルモン学会、第 15 回公演会、平成 17 年 6 月 2 日(2005)

菅野純、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、五十嵐勝秀、雌性マウスにおける視床下部下垂体性腺系の性周期遺伝子発現の *Percellome* 解析、環境ホルモン学会第 8 回研究発表会 2005 年 9 月 27-29 日、東京

松島裕子、菅野 純、マウス周産期の低用量 DES 暴露が遅発に雌性生殖器に及ぼす影響の検討、第 32 回日本トキシコロジー学会、2005(H17) 6 月 29 日-7/1

小川幸男、関田清司、北嶋 聡、松島裕子、山本雅也、斉藤 実、児玉幸夫、井上 達、菅野 純、ガルシニア抽出物の安全性に関する研究-ヒドロキシクエン酸のマウス精巣毒性の検討、第 32 回日本トキシコロジー学会、2005(H17) 6 月 29 日-7/1

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

【有害性発現分子メカニズムの解析研究】

10. ES 細胞分化増殖試験系を用いた胎児毒性評価手法の開発研究、及び AhR を介する晩発影響の解析研究

研究分担者 高木篤也 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 室長

研究要旨

ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析にもよく用いられている。それゆえ、内分泌かく乱化学物質の解析の難しい発生初期への影響を調べる試験系として有用である。平成 19 年度は ES 細胞及び ES 細胞から形成される胚様体(EB)の形成開始後 7 日間の遺伝子発現に対する溶媒の DMSO あるいは Bisphenol-A の影響を、定量的な比較を正確に行うことが可能な Percellome 法によるマイクロアレイ解析を用いて検索し、それぞれ影響を受ける遺伝子群を同定した。

A.研究目的

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞で、遺伝子欠失マウス作製に用いられている。一方、ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析によく用いられている。また、数百個の ES 細胞を天井培養することにより形成される胚様体(Embryoid body(EB))は、胎児の三胚葉形成過程を模倣することが知られることから、特に、化学物質の影響を解析することが難しい発生初期への影響を調べるモデル試験系として有用であると思われる。そこで、この『ES/EB 系』を用いて TCDD を含む胎児発生毒性物質の有害性発現メカニズムの解明を行う。

B.研究方法

今年度はまず、化合物の添加溶媒として dimethyl sulfoxide (DMSO)の ES/EB 系に対する遺伝子発現影響について基礎的検討を行なった。実験は、DMSO を 0.1%の濃度で培地に添加し、ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で、最初の 2 日

間は天井培養法で、次の 5 日間は浮遊培養法で、計 7 日間培養した。培養開始 1 日目から 7 日目まで毎日 EB を採取してプールし、サンプルとし、アフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。また、その解析には定量的比較を正確に行うために、我々の開発した Percellome 手法(細胞1 個当たりの mRNA 絶対量を得る遺伝子発現解析手法)を適用した。また、既知情報に基づく pathway 解析を IPA5.5(Ingenuity Systems 社)を用いて実施した。次いで、内分泌かく乱化学物質として知られている Bisphenol-A (BPA) (1nM)を DMSO (final 0.1%) に溶解して、培地に添加し、ES/EB 系への影響を同様のプロトコールにて検索した。

(倫理面への配慮)

該当無し。

C.研究結果

DMSO の ES/EB 系の遺伝子発現に及ぼす影響をマイクロアレイにて検索したところ、外胚葉、

中胚葉、臓側内胚葉マーカーに明らかな影響は観られなかったが、心筋分化マーカーの発現が 0.5 日程度早期に見られることが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子と同様の発現パターンを示す遺伝子をリストアップして、pathway 解析を実施したところ、TGF-beta の系が抽出され、DMSO が TGF-beta 系を活性化していることが示唆された。また、培養 7 日目にケモカイン関連遺伝子の変動が観られ、DMSO が ES 細胞培養系で白血球系の分化にも影響する可能性が示唆された。

BPA の ES/EB 系の遺伝子発現に及ぼす影響を同様にマイクロアレイにて検索したところ、中胚葉、臓側内胚葉マーカーに明らかな影響は観られなかったが、培養 7 日目にアストロサイトのマーカーの GFAP 及び神経幹細胞のマーカーである Nestin が軽度増加した。また、心筋分化マーカーの Mlx2.5 の発現が 7 日目で対照群と比較して有意に高かった。また、核内受容体の発現について検索したところ、androgen receptor (AR)が培養 1-2 日目で、有意に高かった。培養期間を通して見ると、培養1 日目と 7 日目に多くの遺伝子発現の増加が見られた。1 日目に増加した遺伝子を対象に、pathway 解析を実施したところ、AR-NCOR の系が抽出された。また、テストステロンの代謝酵素 Cyp3a11 やステロイドホルモン合成にかかわる Steroidogenic acute regulatory 蛋白 (StAR)の増加が認められた。

D. 考察

DMSO の ES/EB 系に対する影響解析の結果、心筋分化が軽度に促進されていた。DMSO は TCDD の口蓋裂誘導を抑制するとともに、ある種の細胞で分化誘導作用が報告されている (EC 細胞での心筋分化誘導、HL-60 細胞での好中球

分化誘導等)。また、最近では ES 細胞のメチル化に影響することも報告されている。EC 細胞において DMSO の心筋分化促進作用は示されているが、ES 細胞でも同様な作用を有し、パスウェイ解析の結果から、TGF-β系に作用していることが示唆された。尚、本実験条件下ではメチル化に関与する遺伝子発現の影響は見られなかった。

BPA の ES/EB 系に対する遺伝子発現影響解析の結果、分化マーカー GFAP の増加が 7 日目で見られた。in vitro の系で BPA による GFAP の増加が報告されていることから、マウス ES/EB 系でも GFAP が増加していることが示唆されるが、さらに後期での発現も確認する必要があると思われる。培養 1 日後の解析から、androgen receptor (AR)の発現増加やテストステロン合成、分解系酵素の増加が見られ、BPA が初期胚において androgen 受容体やテストステロンレベルに影響を及ぼすことが示唆された。今後、さらに得られたデータの解析を継続するとともに TCDD 等の影響についても検討していく予定である。

E. 結論

ES 細胞及び EB の分化に対する DMSO ならびに BPA の影響を定量的マイクロアレイ解析手法を用いて明らかにし、それぞれ、標的遺伝子に関する新知見を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

書籍

なし

論文発表

Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube, Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Tetsuji Nishimura, Nobutaka Fukumori, Akio Ogata, Norio Ohashi, Satoshi Kitajima and Jun Kanno, J. Toxicol. Sci., 33, 105-116, 2008.

トキシコゲノミクスの新展開 Percellome Project による 2,3,7,8-TCDD—2,3,7,8-TCDF 比較、菅野純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋聡、中津則之、児玉幸夫、高木篤也、細胞工学、26、1391-1396、2007

Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み、菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、細胞工学、26、71-77、2007

学会発表

Quantitative microarray analysis by “Percellome” method on murine embryonic stem cells and embryoid bodies, TAKAGI A, KITAJIMA S, NAKATSU N, IGARASHI K, AISAKI K, EMA M AND KANNO J, 47th Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2008 年 3 月

マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子の Percellome 手法を用いた定量的マイクロアレイ解析、高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純第 30 回日本分子生物学科会年会、2007 年 12 月、横浜

マウス ES 細胞分化系における分化マーカー遺伝

子発現パターンの解析(その2)、高木篤也、北嶋聡、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007 年 6 月、東京

Quantitative microarray analysis with “Percellome” method in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated murine fetal palate, TAKAGI A, NAKATSU N, IGARASHI K, AISAKI K, EMA M AND KANNO J 46th Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2007 年 3 月

Percellome 手法を用いたマウス ES 細胞分化系における分化マーカー遺伝子の発現パターンの解析、高木篤也、北嶋聡、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、2006 年 7 月、名古屋

Percellome 手法を用いたマウス胎児における TCDD 誘導口蓋裂の分子発生機序の解析、高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、江馬眞、菅野純、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、2006 年 7 月、名古屋

Global gene expression profiling in mouse embryonic stem cells and embryoid bodies. A. TAKAGI, S. KITAJIMA, N. NAKATSU, K. IGARASHI, K. AISAKI AND J. KANNO, 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006 年 6 月、京都

Effects of TCDD on mouse embryonic stem cells in culture. A. Takagi and J. KANNO. 45th Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2006 年 3 月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

11. 新生児化学物質暴露の前立腺影響の解析研究

研究分担者 藤本 成明 広島大学 原爆放射線医科学研究所 准教授

研究要旨

新生時期前立腺でアンドロゲン応答性に発現する PSP94、EAPA2、IgGBPLP、defensin β 、PCP4 は、前立腺発達において重要な役割を果たしている。これらの遺伝子上流域の転写プロモーター機能を解析したところ、アンドロゲン応答性にエストロゲン受容体が関与していることが示された。前立腺での化学物質暴露による遺伝子発現異常におけるエストロゲン受容体系の役割が明らかになった。

A. 研究目的

前立腺形態形成(新生児期)において重要な役割を果たすアンドロゲン応答性遺伝子について、転写活性化のメカニズムを明らかにし、それに対する化学物質の修飾作用を解明する。

B. 研究方法

1) 動物: 生後 5 日目の C57BL 雄マウスを Charles River Japan より購入した。生後 6 日目で、テストステロンプロピオネイト (TP) 4 mg/kg bw、17 β estradiol(E2) 0.1、1 μ g/kg bw を i.p.投与した。前立腺組織については、腹葉(VP)、背側葉(DLP)、前葉(AP)を解剖学的に区別して保存した。

2) 器官培養: 生後 6 日目のマウスの前立腺を切り出し、MC フィルター上に置いて培養した。培地として、DME/F12/albumin/insulin/transferrin を用いた。

3) mRNA 定量: 前立腺の各組織および培養片から 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 の mRNA を定量した。

4) *in vitro* プロモーター解析

新生仔期のアンドロゲン応答遺伝子である PSP94, probasin, SPI-KT3, EAPA2, defensin b1 についてその遺伝子上流域を含む luc レポーターを作製した。これらを、CHO、DT3 細胞株にトランジェントに導入して、ジヒドロテストステロン(DHT)及び E2 を添加し、アンドロゲン応答性とその修飾作用を解析した。またこのプロモーター領域の DNA と細胞内因子の相互作用をゲルシフトアッセイにより検討した。

(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おこなった。

C. 研究結果

1) アンドロゲン応答性遺伝子発現を指標にした新生時期エストロゲン暴露の作用: 生後6日目に TP または TP+E2 を投与。48 時間後および6 週齢における前立腺への影響を、アンドロゲン応答性遺伝子発現を指標に検討した。T 投与 48 時間後には、PSP94、EAPA2、defensin β 、PCP4、SBP、SPI-KT3 等の遺伝子の mRNA が有意に増加するが、E2 投与群ではこれらの発現の抑制がみられ

た。しかし、6 週齢時では、E2 投与群において PSP94、EAPA2、SBP、SPI-KT3 発現増加がみられた。

2) アンドロゲン応答遺伝子 PSP94 の 5' f 上流域のプロモーター活性

2a) mPSP94 プロモーター領域の同定: mPSP94 の転写開始点上流域を含む luc レポーターを作製し、アンドロゲン受容体(AR)とともに細胞株へ導入したところ、この領域がアンドロゲン応答性転写活性化を示した。さらに部分領域のレポーターを作製することで転写活性を検討したところ、アンドロゲンに対する応答性は転写開始点から -87 までの領域に局限していた。この領域には ARE 様の構造が存在する。部分欠失レポーターによる解析の結果、実際にこの ARE 領域がアンドロゲン転写活性化に寄与していることが示された。しかし、興味深いことに ARE 欠失レポーターにおいても 30-40%程度のアンドロゲン応答性が残っており、この領域以外の部分もアンドロゲン応答性に関与している。

ARE 配列は、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド 応答配列と相同であることが知られる。そこで、PSP94 上流域のデキサメサゾンへの応答性を検討した。CHO 細胞においては、コンセンサスの ARE レポーターはデキサメサゾン応答性であるが、PSP94 プロモーター-358 では全く応答性を欠いていた。一方で、-87 のレポーターでは、弱いながらデキサメサゾン応答性がみられたことから、-87 より上流のプロモーター構造がリガンド特異性を高める機能を果たしていることが示唆された。

2b) エストロゲン受容体(ER)のアンドロゲン応答性転写への影響: ER α ・ β をコトランスフェクションした細胞モデルにより検

討した結果、PSP94 プロモーター活性は、ER α の存在下で 2-3 倍になった。一方で、ER β による転写活性化促進は弱いことが示された。

3) アンドロゲン応答遺伝子 EPAP2 の 5' f 上流域のプロモーター活性: mEAPA2 の転写開始点上流域を含む luc レポーターを作製し、AR とともに細胞株へ導入した。上流 1.9kbp を含むレポーターで弱いアンドロゲン応答性が示され、0.9kb 以下でアンドロゲン応答性は消失した。しかしこのプロモーター領域は、ER α 存在下では顕著なアンドロゲン応答性を示すようになった。-290/-342 の領域がこの AR/ER によるアンドロゲン応答性に関与していると考えられた。

D. 考察

胎生期および新生時期に、低用量エストロゲンやビスフェノール A に暴露されることで、前立腺に不可逆的な異常増殖が誘導されることが知られている。新生児期の前立腺形成は、腺管分岐発達の過程であり、アンドロゲンに依存性に進行することが知られている。これまで我々は、マウス前立腺を材料に、この時期のアンドロゲン応答遺伝子の検索同定をおこなった。同定された応答遺伝子は、SPR, defensin b2, Srd5 α 2、PCP4、また、前立腺分泌タンパク質の SPI-KT3、SBP、PSP94、EAPA2、IgGBPLP であった。これらの遺伝子は、前立腺発達における腺管形態形成に関与するものや前立腺分泌機能タンパクそのものである。本研究では、これらのアンドロゲン標的遺伝子について、その機能を明らかにするとともに、発現修飾のメカニズムを探ることにより、化学物質影響の分子メカニズムを解き明かす。

新生仔期 E2 投与 (TP との同時投与) により、成体 (6 週齢) の前立腺において、PSP94、EAPA2、SBP、SPI-KT3 の mRNA の発現が亢進していた。すなわち、低用量 E2 の新生仔期暴露により、前立腺の分泌機能の一部が不可逆的に影響されることが示された。

前立腺分泌タンパク質である PSP94 は、アポトーシスの促進作用などにより癌抑制遺伝子として機能することが知られる。その遺伝子上流域に転写活性があることは既に報告があったが、アンドロゲン応答性のメカニズムについては不明であった。-1kb までの領域は、ラットとマウスでよく保存されており、-0.6kb までの領域ではヒト PSP94 遺伝子とも相同性が認められた。直上流 -85 に ARE 配列が認められたことから、この部分がアンドロゲン応答性に関わると予想された。実際、この領域を含む -87 のレポーターだけで十分なアンドロゲン応答性が再現された。しかし、ARE を欠失させても有意なアンドロゲン応答性が残ることから、未知のメカニズムによりこの遺伝子近傍部位もアンドロゲン応答性転写に関与していると考えられた。

興味深いことに、ER α が存在することで、PSP94 遺伝子プロモーターの転写活性およびアンドロゲン応答性の増強が見られた。一方、リガンドである E2 が存在すると、この増強は見られないか逆に発現の抑制が観察された。このことは、*in vivo* における結果と一致する。すなわち、E2 投与により一時的にはアンドロゲン応答遺伝子の発現は抑制されるが、成体においては発現の亢進がみられた。前立腺に対する化学物質影響は ER の発現変化が関与していることが示唆された。また、EAPA2 プロモーターにおいても、アンドロゲン応答性が明確に ER の存在に依存していた。

E. 結論

新生時期前立腺でアンドロゲン応答性に発現する遺伝子のうち、PSP94 と EAPA2 の転写プロモーターについて解析した。いずれの遺伝子上流域も転写プロモーター活性を持ち、アンドロゲン応答性に ER が強く関与していることが明らかになった。アンドロゲン標的組織での化学物質影響を検索するうえでの ER の発現の重要性が明らかになった。

F. 健康危惧情報

なし。

G. 研究発表

1. 書籍

- 1) Kitamura, S., Sugihara, K., Fujimoto, N., Endocrine Disruption by organophosphate and Carbamate pesticides In: R. C. Gupta (ed.) ***Toxicology of organophosphate and carbamate compounds***, Elsevier Academic Press, London, pp481-494 (2006).

2. 論文発表

- 1) Suzuki, T., Fujimoto, N., Kitamura, S., Ohta, S. Effects of environmental antiandrogenic chemicals on expression of androgen-responsive genes in rat prostate lobes. ***J. Health Sci.*** 53, 401-405 (2007)
- 2) Fujimoto, N., Nakajima, O., Suzuki, T., Kitamura, S., Ohta, S. *In vivo* function of the 5' flanking region of mouse estrogen receptor beta gene. ***J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*** 105, 57-62 (2007)
- 3) Suzuki, T., Fujimoto, N., Kitamura, S., Ohta, S. Quantitative determination of lobe

- specificity of mRNA expression of androgen-dependent genes in the rat prostate gland. *Endocr. J.* 54, 123-132 (2007).
- 4) Fujimoto, N., Akimoto, Y., Suzuki, T., Kitamura, S., Ohta, S. Identification of prostatic-secreted proteins in mice by mass spectrometric analysis and evaluation of lobe-specific and androgen-dependent mRNA expression. *J. Endo.* 190, 793-803 (2006).
 - 5) Kuwahara, S., Ikei, A., Taguchi, Y., Tabuchi, Y., Fujimoto, N., Obinata, M., Uesugi, S., Kurihara, Y. PSPC1, NONO, and SFPQ are expressed in mouse Sertoli cells and may function as coregulators of androgen receptor-mediated transcription. *Biol Reprod.* 75, 352-359 (2006).
 - 6) Kohno Y., Kitamura S., Sanoh S., Sugihara K., Fujimoto N., Ohta S. Metabolism of the alpha,beta-unsaturated ketones, chalcone and trans-4-phenyl-3-buten-2-one, by rat liver microsomes and estrogenic activity of the metabolites. *Drug Metab Dispos.* 33, 1115-23 (2005).
 - 7) 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.* 94, 15-21 (2005)
 - 8) 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).
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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)
3. 学会発表
- 1) 藤本成明、丹下智子、岩瀬恵理、太田茂 マウス前立腺分泌タンパク質のアンドロゲン応答性転写制御 第15回日本ステロイドホルモン学会 仙台 2007 (要旨集 7-1)
 - 2) Fujimoto, N., Suzuki, T., Ohta, S. Prostatic secreted proteins in mice and rats: Identification, hormone dependent expression and implication for pathological utility Gordon Research Conferences, New London NH, U.S.A. 2007.
 - 3) 篠原 聖治、丹下智子、北村繁幸、杉原

- 数美、藤本成明、太田茂、難燃剤ポリブ
ロム化ジフェニルエーテルのエストロゲ
ンおよび甲状腺ホルモン攪乱作用 日本
薬学会第 127 年会 富山 2007 (要旨集
30T-am01)
- 4) 丹下智子、中村優里、杉原数美、藤本成
明、太田茂、北村繁幸 cis および trans-
permethrin の代謝とそれによる内分泌攪
乱活性変動 日本薬学会第 127 年会富山
2007 (要旨集 30T-am02)
 - 5) 藤本成明、秋元志美、鈴木文男 プロテ
オーム解析による新規マウス前立腺分泌
タンパク質同定とそのアンドロゲン依存
性前立腺増殖への関与 第 65 回日本癌
学会学術総会 横浜 2006 (総会記事 O-
179)
 - 6) 藤本成明 マウス前立腺分泌タンパク質
の同定とそのアンドロゲン応答性転写、
前立腺生物学シンポジウム 2006、鳥羽
2006.
 - 7) 藤本成明、鈴木智晴 シンポジウム X:
マススペクトロメトリー(MS)解析によ
るマウス前立腺分泌タンパク質の同定、
第 79 回日本内分泌学会学術総会、神戸
2006 (日本内分泌学会雑誌 82 S10-1)
 - 8) Fujimoto, N. *In vivo* functional analysis of
the estrogen receptor β gene promoter (招待
講演) 13th Asia-Oceania Congress of
Endocrinology (Abstract book S2-1) Tehran,
Iran (2006)
 - 9) 北村 繁幸、杉原数美、北村繁幸、藤本
成明、太田茂 ブロム化難燃剤の甲状
腺ホルモン攪乱作用の構造的要因 第9
回日本環境ホルモン学会研究発表会、東
京 2006 (要旨集 PB-15) .
 - 10) 丹下智子、中村優里、杉原数美、藤本成
明、太田茂、北村繁幸 pyrethroids およ
び carbamate 系殺虫剤の代謝とそれに伴
う内分泌攪乱活性変動 第9 回日本環境
ホルモン学会研究発表会、東京 2006 (要
旨集 PB-16) .
 - 11) 柳田真希、杉原数美、山崎岳、藤本成明、
北村繁幸、太田茂 環境化学物質曝露に
よるラット 新生仔脳および生殖器官にお
けるエストロゲンレセプターの発現への
影響 第9 回日本環境ホルモン学会研究
発表会、東京 2006 (要旨集 PD-35) .
 - 12) 丹下智子、北村繁幸、鈴木智晴、杉原数
美、藤本成明、太田茂 カルバメート系
農薬の代謝と内分泌攪乱活性 日本薬学
会 仙台 2006
 - 13) 篠原聖治、北村繁幸、鈴木智晴、杉原数
美、藤本成明、太田茂 環境化学物質の
AhR 結合活性とその置換基による影響
日本薬学会 仙台 2006
 - 14) 藤本成明、浅野耕助、碓井亜 マウス・
エストロゲン受容体 β 遺伝子上流域の *in*
vivo プロモーター機能解析 第 13 回日
本ステロイドホルモン学会、名古屋 2005
(日本内分泌学会雑誌 81)
 - 15) 鈴木智晴、藤本成明、本田浩章、太田茂、
北村繁幸 マウス前立腺各葉における分
泌タンパク質同定とそのアンドロゲン応
答性転写第 13 回日本ステロイドホルモ
ン学会、名古屋 2005 (日本内分泌学会雜
誌 81)
 - 16) Fujimoto, N., Suzuki, T., Akimoto, Y.,
Kitamura, S. Identification of mouse
prostatic proteins and their hormonal
regulation, Gordon Research Conferences,
South Hadley, U.S.A. 2005.
 - 17) 荒木瑞、杉原数美、北村繁幸、藤本成

明、太田茂 病院排水中医薬品の探索
及び環境影響 衛生薬学・環境トキシ
コロジーフォーラム 2005 徳島 2005 (抄
録集 P12)

18) 杉原数、美荒木瑞、北村繁幸、藤本成
明、太田茂 病院排出下水による環境汚
染の調査 日本薬学会第 125 回年会 抄
録集 30-0913 東京 2005 (抄録集
30-0913)

19) 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

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

12. 神経系形成・発達メカニズムに基づいた高感受性集団に対する化学物質脳神経系影響の分子毒学的解析

研究分担者 五十嵐勝秀

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 主任研究官

研究要旨

本研究では、神経系形成・発達メカニズムについて、神経幹細胞の成熟における DNA メチル化制御機構を網羅的な観点から解析する。それにより、神経系恒常性維持機構が未発達な小児など高感受性集団への化学物質影響解析の突破口となる知見を得る。

A. 研究目的

神経系が正常に発達するためには、神経幹細胞の分化が適切に制御される必要がある。神経幹細胞は、発達初期には神経細胞にしか分化できないが、中期以降はグリア細胞にも分化できるようになる特徴を持つことが知られており、この「発達プログラムに応じた神経幹細胞の分化能力変化」、すなわち「成熟」に DNA メチル化が関わっていることが報告されている。DNA メチル化は主に発達期に確立され、その後は細胞の性質を維持する、いわば「細胞記憶」を支える仕組みの一つとして働くと考えられている (Nature 2006:435:p.794-795)。よって、DNA メチル化パターンの確立過程に影響を与える化学物質は、細胞の性質を恒久的に変え、その影響が記憶され長く残る極めて深刻な作用を有すると考えられる。DNA メチル化に影響を与える物質として、DNA メチル基転移酵素を直接阻害し DNA を脱メチル化させる Azacytidine が有名である。また、メカニズムは不明であり再現性の確認が必要と考えられるが、交配前から離乳までの投与により、Bisphenol A や Genistein が DNA メチル化を変化させるという報告がなされている (PNAS. 2007 :104:p.13056-13061.)。しかし、その数はごく少なく、未だ見出されていない化学物質が多数存在する可能性は否定できない。数が少ないのは、神経系発達における DNA メチル化機構の全容が

よく分かっていないためであると考えられ、全容が解明されれば、化学物質が影響を与える仕組みが浮かび上がり、その化学物質の性質を演繹的に予測することが可能になる。研究手法の進展により、今やゲノム DNA のメチル化状況を網羅的に調べる手法が開発され利用可能になっている。本研究ではこの手法を最大限に活用し、神経幹細胞の成熟における DNA メチル化制御機構解明に焦点を絞った解析を行う。

B. 研究方法

<マウス胎児神経幹細胞培養(NS cell 培養)>
C57BL/6 マウス妊娠 11.5 日もしくは 14.5 日の胎児より終脳を分離し、トリプシンもしくは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、プトレッシン、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)及び EGF (10 ng/ml) を添加したものをを用い、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。翌日 bFGF を半量添加、翌々日培地交換のサイクルを繰り返し、未分化状態での細胞増殖を促す。

<メチル化DNA の分離精製>

培養細胞、組織から抽出精製したゲノム DNA 5ug を超音波処理にて破碎し、100-400bp の断片と

する。メチル化 DNA 結合蛋白質 MBD2 を用いたメチル化 DNA の分離精製を行う。詳細は、Methylcollector (Active motif 社)のプロトコールに従った。

<Promoter array による解析>

Mouse Promoter 1.0R Array (Affymetrix 社)にてデータを取得した。Affymetrix 社のプロトコールに従い、DNA を増幅し、uracil-DNA-glycosylase を用い短鎖化し、3'末端をビオチンラベルしたターゲット液をハイブリさせ、ストレプトアビジン-phycoerythrin にて染色し、蛍光シグナルデータを得た。

<データ解析>

Promoter array から得られたデータを Genomatix 社の Chipinspector にて解析した。

Promoter 配列の *in silico* 解析は、Genomatix Suite (Genomatix 社)にて行った。Pathway 解析は Ingenuity pathway analysis (Ingenuity Systems Inc.)にて行った。

C. 研究結果

本研究ではマウス胎児神経幹細胞を主な材料として用い、3年間の研究期間において、1) 神経幹細胞成熟前後の各段階(胎生 11 日から 14 日まで)の DNA メチル化状況の網羅的解析と、2) それらの変化を制御する分子メカニズムの解明、を行う。

今年度は、DNA メチル化に関するデータベース構築を開始した。マウスでは、胎生 10 日以降に神経幹細胞にゲノム DNA のメチル化を含むエピジェネティックな変化が生じ、それに伴い、ニューロンにしか分化しない性質からグリア細胞にも分化しうる性質を獲得することが知られている。そこで、胎生 10 日及び 14 日の終胎から取得したゲノム DNA のメチル化状況を、メチル化 DNA の分離精製法とマイクロアレイを組み合わせた

ChIP on Chip 法により網羅的に解析した。その結果、すでに知られている GFAP, S100b などのアストロサイト細胞特異的遺伝子のプロモーター領域のメチル化が胎生 10 日の方が高いという陽性コントロールデータが得られたのに加え、メチル化状況が異なる他の多数の領域が明らかになった。それらの遺伝子群のリストを IPA (Ingenuity Pathway Analysis) にかけて結果、"Gene expression", "Cell cycle", "Embryonic development", "Nervous system development" 等の機能カテゴリーに属する遺伝子が含まれていることが分かった。現在、これらの DNA メチル化率が高い DNA 領域に共通する塩基配列の検索を行っている。

D. 考察

今年度 ChIP on Chip 法による網羅的 DNA メチル化解析法にほぼ目処がついた。本手法は、本研究に於ける神経幹細胞の成熟における DNA メチル化に関するデータベース構築のみならず、化学物質暴露に伴うメチル化変化領域を調べるのに有用なツールとなりうる。すなわち、胎児や子どもなどの高感受性集団に対する化学物質暴露の遅発影響の背景となりうる DNA メチル化制御を網羅的に調べることが可能である。

今後、DNA メチル化状況に差があった領域の塩基配列の解析を進め、DNA メチル化を制御するシグナル伝達機構の解明を進める予定である。

E. 結論

今年度の研究により、神経系形成・発達メカニズムに関し、神経幹細胞の成熟における DNA メチル化制御に関するデータベースが得られつつある。そのデータベースを元にして、DNA メチル化制御機構に影響しうる化学物質を新たに見出すことが出来る可能性がある。それにより、神経系恒常性維持機構が未発達な小児など高感受性集団への化学物質影響解析の突破口が得られると期