

結果、BPA, DES, エストラジオールは LTD を強化した。一方 ノニルフェノール(NP), オクチルフェノール(OP)は LTD を弱体化した。3) ER $\alpha$ の免疫電子顕微鏡観察を行った。その結果、ER $\alpha$ が海馬 CA1-CA3 や DG 領域におけるグルタミン酸作動神経のポストシナプス及びプレシナプスにも存在することを発見した。もちろん神経の細胞質や核の方が ER $\alpha$ は多く存在した。また BPA に特異的な受容体である ERR $\gamma$ の抗体を用いて組織染色を行い、ERR $\gamma$ と ER $\alpha$ は両者とも海馬グルタミン酸作動神経に局在することを確認した。ER $\alpha$ と異なり、ERR $\gamma$ は脳の中でも海馬に特に多く、視床下部には少なかった。

#### D. 考察

今年の結果を踏まえて、今後は、シナプスでの働き(スパイン増減や LTD など)を更に厳密に解析する方向に進む。内分泌かく乱物質がリン酸化酵素を駆動して働いているか? 内分泌かく乱物質の受容体と ER $\alpha$ はヘテロ結合を作るか? などの解析。

#### E. 結論

以上の結果から、内分泌かく乱化学物質は1時間程度で、成獣ラットの海馬神経細胞のシナプス伝達に顕著なモジュレーション作用を示すことがわかった。BPA, DESはスパイン増加や長期抑圧においてエストラジオールの作用と非常に良く似た作用を示した。NPとOPは長期抑圧ではエストラジオールの作用と反対の効果を示した。また、シナプスには内分泌かく乱化学物質や女性ホルモンの作用を媒介する、エストロゲン受容体 ER $\alpha$ が存在していた。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

**Ishii H., Tsurugizawa T., Ogiue-Ikeda M., Asashima M., Mukai H., Murakami G., Hojo Y., Kimoto T., Kawato S.** Local Production of Sex Hormones and Their Modulation of Hippocampal Synaptic Plasticity. **The Neuroscientist**, 13, 323-334 (2007)

**Mukai H., Tsurugizawa T., Murakami G., Kominami S., Ishii H., Ogiue-Ikeda M., Takata N., Tanabe N., Furukawa A., Hojo Y., Oishi Y., Morrison J H, Janssen JG M, Rose J A, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T and Kawato S** Rapid Modulation of Long-term Depression and Spinogenesis via Synaptic Estrogen Receptors in Hippocampal Principal Neurons. **J. Neurochem.** 100, 950-967 (2007)

**Mukai H., Tsurugizawa T., Ogiue-Ikeda M., Murakami G., Hojo Y., Ishii H., Kimoto T., Kawato S.** Local neurosteroid production in the hippocampus: influence for synaptic plasticity of memory. **Neuroendocrinology** 84, 255-263 (2006)

**Murakami G, Tsurugizawa T, Hatanaka Y, Komatsuzaki Y, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Kominami S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S** Comparison between basal and apical dendritic spines in estrogen-induced rapid spinogenesis of CA1 principal neurons in the adult hippocampus. **Biochem Biophys Res Commun** 351, 553-558 (2006).

**Mukai H, Takata N, Ishii H, Tanabe N, Hojo Y, Furukawa A, Kimoto T, and Kawato S** Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity: **Synaptocrinology. Neuroscience** 138, 757-764 (2006)

## 2. 学会発表

### 海外招待講演

1. Kawato S, et al., 27th Int Epilepsy Congress, Singapore, July 2007
2. Kawato S.et al., 4th Int Meeting of Steroids and Nervous System, Torino, Italy, February 2007

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

### 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

核内受容体作動性化学物質の中樞影響に関する研究

分担研究者 栗生修司 九州工業大学大学院生命体工学研究科

研究要旨

核内受容体作動性化学物質の中樞影響を行動およびニューロンレベルで解明し、評価法を確立することを目的とした。核内受容体作動性化学物質を発達期に曝露し、その影響を各種行動評価試験で調べ、さらに電気生理学的、神経化学的に検討した。環境中に存在する核内受容体作動性化学物質は性依存的に探索行動やストレス対処行動、体重のセットポイントに影響を及ぼし、情動行動については性非依存的に影響を及ぼした。大脳辺縁系への影響が認められた。

A. 研究目的

核内受容体作動性化学物質の中樞影響を行動およびニューロンレベルで解明し、評価法を確立することを目的とした。すなわち、ビスフェノールA (BPA)、ジエチルヘキシルフタル酸の胎生期あるいは新生児期曝露の行動の性分化および情動行動に及ぼす影響を比較検討した。またフロン代替物質として溶剤などに使われている1-ブromoプロパン(1-BP)の中樞影響も調べた。

B. 研究方法

核内受容体作動性化学物質の発達期曝露の中樞影響を各種行動評価試験で調べ、さらに電気生理学的、神経化学的に検討した。すなわち行動評価においては、活動性や探索行動の評価にオープンフィールド試験、不安情動の評価に高架十字迷路試験、回避学習の評価に受動的回避学習試験、うつ反応の評価に強制水泳試験、攻撃行動や警戒反応の評価に侵入者試験

を用いた。電気生理学的評価は *in vivo* 細胞外記録法、*in vitro* スライス標本による長期増強や興奮性試験、神経化学的にはカルモジュリンキナーゼ IIなどを測定した。曝露手段としては、50ppbのBPAを飲料水に混ぜて母ラットあるいは母マウスに投与した。1-BPは母ラットを曝露チェンバーに1日6時間置き、20日間400ppmあるいは700ppmの濃度で曝露した。

実験はすべて「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」に基づいて行った。

C. 研究結果

環境中に存在する核内受容体作動性化学物質は性依存的に探索行動やストレス対処行動、体重のセットポイントに影響を及ぼし、情動行動については性非依存的に影響を及ぼした。大脳辺縁系への影響が認められた。すなわちラットにおい

て、50ppb の BPA やフタル酸の胎生期曝露は探索行動や回避学習の性分化を障害した。1週間 50ppb の BPA を CD-1 マウスに曝露すると、雌雄ともにオープンフィールドにおける活動性が上昇した。性行動および侵入者試験における攻撃性や警戒反応については明確な変化は認められなかった。また BPA は濃度依存的、性依存的にラットの体重のセットポイントを修飾した。

1-BP (400ppm, 700ppm) を妊娠中の 20 日間繰り返し曝露したのち、生まれた仔が成熟後に行動の性分化および海馬電気生理学的特性を調べた。オープンフィールド試験における探索行動や強制水泳試験における不動時間（うつ反応の指標）の性差が消失した。受動的回避学習ならびに高架十字迷路試験では有意の変化は認められなかった。さらに 1-BP 曝露群の海馬切片標本で長期増強には変化が認められなかったが刺激応答性が減弱した。

#### D. 考察

低濃度の BPA やフタル酸は主として雄に作用し、行動の雌化を引き起こす。最近、性分化に核内受容体であるエストロゲン受容体だけでなく、アンドロゲン受容体も関与していることが明らかになっており、低濃度の核内受容体作動性化学物質の中枢影響はアンドロゲン受容体を介する抗アンドロゲン作用と思われる。またうつ反応などの情動行動に及ぼす影響は性非依存的に引き起こされる。核内受容体作動性化学物質の中枢影響については性依存的な影響と非依存的な影響が認められるが、発達期の曝露時期によりその発現の仕方が異なる。また動物種で

も異なっている。膜受容体の関与も示唆されており、評価法の確立が重要な課題である。

フロン代替化合物の 1-プロモプロパン (1-BP) は生殖系への影響も報告されており、成熟脳への影響が報告されている。今回の研究で、400ppm および 700ppm の胎生期曝露で行動の性分化を障害し、さらに海馬の興奮性が抑制されるが、長期増強には影響しないことが明らかになった。海馬のカルモジュリンキナーゼ II にも影響が認められ、モノアミン系だけでなく大脳辺縁系も高感受性部位であることが示唆され、その細胞機構の解明が今後の課題である。

#### E. 結論

核内受容体作動性化学物質の発達期曝露は耐用 1 日摂取量以下の濃度でも中枢神経系に作用し、性依存的あるいは性非依存的に非生殖行動に影響を及ぼす。モノアミン系とともに大脳辺縁系が主要な標的的部位である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. ©Tsuruoka T, Monda M, Fujimoto T, Fueta Y, Ishidao T, Hori H, Aou S. Positive and negative effects of environmental chemicals on brain functions in rodents. *Studies in Computational Intelligence*. in press

2. Masuda A, Aou S. Extinction and acquisition of avoidance response by social interaction in rat. *Studies in Computational Intelligence*. in press
  3. Inoue T, Lukats B, Fujimoto T, Moritake K, Karadi Z, Aou S. Category recognition in the monkey orbitofrontal cortex. *Studies in Computational Intelligence*. in press
  4. Ota K, Kitazono T, Ooboshi H, Kamouchi M, Katafuchi T, Aou S, et al. (2007) Role of substantia innominata in cerebral blood flow autoregulation. *Brain Res.* 1135, 146-53
  5. Aou S, Tateno K, Matsuura H, Mizuno M, Fujimoto T, Hangodi O, Horio K, Yamakawa Y (2007) Brain-inspired adaptive models based on motivational and emotional processes. *International Congress Series* in press
  6. 栗生修司、松浦弘典、成清公弥、立野勝巳 (2007) 摂食調節と睡眠. *心身医学* 47, 765-770
2. 学会発表
1. Sakaguchi S, Mizuno M, Aou S (2007) Loud white noise attenuate depressive response without affecting glucocorticoid levels in rats. The 30th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Sep 10-12, Yokohama.
  2. Narikiyo K, Aou S (2007) Fat binge eating alters dopamine response in rat nucleus accumbens. The 30th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Sep 10-12, Yokohama.
  3. Oomura Y, Aou S, Fukunaga K, Moriguchi S, Sasaki K (2007) Facilitation of brain plasticity during food intake. The 30th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Sep 10-12, Yokohama.
  4. Masuda A, Aou S (2007) Social transmission in avoidance learning is dependent on learning experience in rats. The 30th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Sep 10-12, Yokohama.
  5. 栗生修司 (2007) 心身医学の未来に向けて：基礎心身医学からの展望. 第 48 回日本心身医学会総会. 2007 年 5 月 24 日-25 日、福岡
  6. Oomura Y, Aou S, Fukunaga K, Hori N, Sasaki K, Shiraishi T (2007) Leptin facilitates plastic learning and memory functions in rats brain. *Neuroscience 2007*. Nov 3-7, San Diego.
  7. Mizuno M, Doi A, Yasaka T, Furue H, Aou S, Yoshimura M (2007) Cortical membrane potential fluctuations may be modified by thalamocortical inputs in rat barrel cortex in vivo *Neuroscience 2007*. Nov 3-7, San Diego.
  8. Lukacs B, Inoue T, Mizuno M, Papp S, Takaza G, Szalay C, Egyed R, Lnard L, Aou S (2007) Organization of

- feeding-related neuronal mechanisms in the orbitofrontal cortex Neuroscience 2007. Nov 3-7, San Diego.
9. Masuda A, Aou S (2007) Social transmission of avoidance learning in learned and unlearned rats Neuroscience 2007. Nov 3-7, San Diego.
  10. Narikiyo K, Aou S (2007) Effects of intermittent access to fat on eating behavior and nucleus accumbens dopamine in rats. Neuroscience 2007. Nov 3-7, San Diego.
  11. Sakaguchi S, Mizxuno M, Aou S (2007) Loud white noise attenuates depressive response of rats in forced swimming test Neuroscience 2007. Nov 3-7, San Diego.
  12. Masuda A, Aou S (2007) Acquisition and extinction of avoidance response by social interaction in rats. The 4<sup>th</sup> International Conference on Brain-Inspired Information Technology. Nov 14-16, Kitakyushu.
  13. Tsuruoka T, Monda M, Fujimoto T, Fueta Y, Ishidao T, Hori H, Aou S. Positive and negative effects of environmental chemicals on brain functions in rodents. The 4<sup>th</sup> International Conference on Brain-Inspired Information Technology. Nov 14-16, Kitakyushu.
  14. Inoue T, Lukats B, Fujimoto T, Moritake K, Karadi Z, Aou S. Category recognition in the monkey orbitofrontal cortex. The 4<sup>th</sup> International Conference on Brain-Inspired Information Technology. Nov 14-16, Kitakyushu.
  15. ◎藤本哲也、久保和彦、栗生修司 (2007) ビスフェノール A 胎生期曝露が捕食者のニオイ回避反応および扁桃体内側核の選択的興奮性応答様式に及ぼす影響. 第 10 回環境ホルモン学会、12 月 10, 11 日、大宮
  16. ◎門田誠、鶴岡朋子、Decatanzaro D、栗生修司 (2007) ビスフェノール A 乳児期曝露がマウスの行動に及ぼす影響. 第 10 回環境ホルモン学会、12 月 10, 11 日、大宮
- H. 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 (データベース等)  
なし

研究課題名=[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

分担研究者 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

研究要旨

本研究は、当研究班での相互的関連研究分野に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、核内受容体作動性化学物質に関連する遺伝子の網羅的発現解析を行い、各班員の研究の基盤を支えることを目的とする。実際には、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結果を班員にフィードバックする。

今年度実施中の共同研究は、加藤班員との破骨細胞特異的 ER $\alpha$  ノックアウトマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析及び Androgen receptor 変異体 (T877A) ノックインマウスを用いた前立腺癌増悪に関わる遺伝子の網羅的検索である。

A. 研究目的

本研究は、当研究班での相互的関連研究分野に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、核内受容体作動性化学物質に関連する遺伝子の網羅的発現解析を行い、各班員の研究の基盤を支えることを目的とする。

核内受容体はリガンド依存的転写因子として特定の遺伝子（群）を発現させ、胎生期には形態形成プログラムをも制御する。この遺伝子発現カスケードは、臓器ごとにその発生・発達段階により多種多様であると考えられる。例えば、核内受容体活性化物質の *in vivo* 試験として従来から行われている子宮肥大試験や Hershberger 試験における比較的単純な endpoint でさえ、幾重かの反応カスケードの結果であると考えられる。このカ

スケードの解析は容易ではないが、進歩の著しい DNA マイクロアレイ技術を導入することにより包括的かつ迅速な検討を行う方法が得られることが示されている。そこで本研究では、DNA マイクロアレイ技術を当班で活用可能とし、各班員が実施中の研究を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。

B. 研究方法

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。

各班員からの検体の RNA の分離精製

生体組織を採取後すみやかに RNAlater

(Ambion 社)に浸漬し、RNase を不活化する。その際、臓器の場合は厚さが 5mm 以下となるように細切する。その後、RNA 抽出操作までは $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存する。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製し、破砕液の 10 $\mu\text{L}$  を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定する。DNA 含量に応じ、Spike cocktail (Bacillus 由来の RNA 5 種類を濃度を変えてあらかじめ混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出する。一部を電気泳動し RNA の純度および分解の有無を検討した。以上のステップのうち、生体組織分離と RNA later への浸漬までを共同研究先の班員が実施し、その後のステップを当方で実施した。

#### Genechip 解析

全 RNA 5  $\mu\text{g}$  を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、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 とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは  $45^{\circ}\text{C}$ 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、専用スキャナーで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

本年度は、加藤茂明班員と、

1) 破骨細胞特異的 ER $\alpha$  ノックアウトマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析追加解析、2) Androgen receptor 変異体 (T877A) ノックインマウスを用いた前立腺癌増悪に関わる遺伝子の網羅的検索を実施した。1) については加藤班員より論文としてまとめられ、2) については共同で解析中である。

#### 破骨細胞特異的 ER $\alpha$ ノックアウトマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析追加解析 (加藤班員)

この共同研究は、エストロゲンによる骨代謝制御機構に関する研究として実施した。閉経後骨粗鬆症の原因はエストロゲン欠乏に起因する事は明らかであるとされているが、その作用機序は不明である。骨代謝に直接関わる骨芽細胞 (骨形成細胞)、破骨細胞 (骨吸収細胞) に対する作用が有力視されているが、全身性エストロゲン受容体 (ER) ノックアウトマウスは内分泌系の異常により、骨量減少すら起きない事が分かっている。このような背景のもと、加藤班員が破骨細胞特異的な ER ノックアウトマウスを作製したところ、明確な骨量減少が観察され、骨に対するエストロゲン作用が強く抑制されている事から、破骨細胞が骨組織に置けるエストロゲンの主要な標的細胞であると加藤班員は結論づけている。

そこで、破骨細胞でのエストロゲン標的遺伝子を特定するために、加藤班員と協同研究を実施した。12 週齢のコントロール群・破骨細胞特異的



ERKO マウス群、それぞれの群に対する卵巣摘出モデル群、更にそれぞれの卵巣摘出モデルにエストロゲンを投与した群の合計6群を作製し、遺伝子発現の変動をエストロゲン投与後4時間で検討した。その結果、エストロゲン投与でアポトーシス関連遺伝子群、破骨細胞分化遺伝子群が発現上昇するのに対し、破骨細胞特異的 ER $\alpha$  ノックアウトマウスでは抑制されていた。この結果は、エストロゲンの破骨細胞に対する作用はアポトーシスの誘導であるという加藤班員のモデルに合致するものであった。これを受け、論文投稿に必要な数のデータを追加取得し、マイクロアレイデータ (EXP file data, CEL file data, CHP file data) を米国 NCBI の GEO (Gene Expression Omnibus) database に登録した (Accession number: GSE7798)。

#### Androgen receptor (AR) 変異体 (T877A) ノックインマウスを用いた前立腺癌増悪に関わる遺伝子の網羅的検索 (加藤班員)

ホルモン抵抗性前立腺癌の14%に見出されるARの点変異 T877A は、前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞を用いた解析で、DHT のみならずフルタミドや、エストラジオールなどもアゴニストとすることが証明されている。そこでこの機能亢進 AR が、前立腺癌の悪化や転移にどのように影響するかを、AR 点変異体 (T877A) を cre-loxP システムを用いて導入した conditional マウスを作出し検討した。このマウスはコントロールに比べ前立腺の腺管形成が亢進したものの、癌を発症することはなかった。ホルモン応答性については、ペレット投与により検討した結果、DHT 以外にエストラジオールをアゴニストに、フルタミドも部分的アゴニ

ストとすることが分かった。次にこの AR 変異体 (T877A) ノックインマウスに前立腺癌を生じる TRAMP マウス (前立腺特異的な probasin を promoter として、simian virus 40 large tumor antigen を発現する) を交配したところ、コントロールに比べ前立腺癌の発症と進行を促進することが明らかになった。

以上の加藤班員の研究結果に基づいた共同研究として、AR 変異体 (T877A) による前立腺癌増悪に関わる遺伝子の検索を開始した。具体的には、TRAMP マウスと TRAMPxART877AKI マウスの2系統に対し、非発癌と発癌の2段階で DHT を投与し前立腺を採取し、Percellome 手法を適用したマイクロアレイ解析を実施した。多数の遺伝子発現に変化が生じている結果が得られているが、その意義を現在共同で解析中である。

#### D. 考察

加藤班員との共同研究において、まず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。すなわち、破骨細胞特異的 ER $\alpha$  ノックアウトマウスを用いることで初めて見出された ER $\alpha$  を介した破骨細胞抑制現象を説明する機構として、エストロゲンが破骨細胞にアポトーシスを誘導するという加藤班員のモデルを支持する遺伝子発現パターンが得られ、加藤班員の研究に貢献し得た。この成果は今後核内受容体作動性物質の骨代謝への影響を解析する際に貴重な情報となる。Androgen receptor (AR) 変異体 (T877A) ノックインマウスを用いた前立腺癌増悪に関わる遺伝子の網羅的検索においては、特定のシグナル伝達系における変化の観点からデータ

の検討を進めている。発癌前後での発現の違いが大きい、ART788AKI でそれが更に大きくなっている。すなわち、ART788A 依存的に発現変化する遺伝子が多数見出されており、それを元に重要なシグナル系を抽出できるものと考えている。

## E. 結論

本研究は、網羅的遺伝子発現解析を用いることで、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て実施している。

網羅的遺伝子発現解析技術は、数万の遺伝子の発現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核内受容体作動性化学物質の作用を、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力な手法となる。

## F. 研究発表

### 論文発表

© Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. *Cell*, 130:811-823, 2007

© Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like cells: a possible androgenic bone protective effects induced by exemestane. Miki Y, Suzuki T, Hatori

M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Nakamura Y, Uzuki M, Sawai T, Sasano H. *Bone*, 40:876-887, 2007

The negative regulation of Mesp2 by mouse Ripply2 is required to establish the rostro-caudal patterning within a somite. Morimoto M, Sasaki N, Oginuma M, Kiso M, Igarashi K, Aizaki K, Kanno J, Saga Y. *Development*, 134:1561-1569, 2007

Hypothalamus region-specific global gene expression profiling in early stages of central endocrine disruption in rat neonates injected with estradiol benzoate or flutamide. Shibutani M, Lee KY, Igarashi K, Woo GH, Inoue K, Nishimura T, Hirose M. *Dev Neurobiol*, 67:253-269, 2007

### 2. 学会発表

© Pulmonary Toxicogenomics as a part of multi-organ Percellome Project. Igarashi K. Toxicogenomics Gordon Conference (New Hampshire, USA) June 2007

© エストロゲン受容体 $\alpha$ 型の非翻訳領域遺伝子改変マウスの妊娠維持不良解析 五十嵐勝秀, 北嶋聡, 種村健太郎, 菅野純, 第100回日本繁殖生物学会大会 P-87, October 2007

© ヒト骨芽細胞における内分泌攪乱物質の影響 三木 康宏, 長崎 修治, 赤平 純一, 五十嵐 勝秀, 菅野 純, 鈴木 貴, 笹野 公伸 第34回日本トキシコロジー学会学術年会

© 化学物質によるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした Percellome 解析 五十嵐 勝秀, 種村 健太郎, 中津 則之, 相崎 健一, 北嶋 聡, 菅野 純 第34回日本トキシコロジー学会学術年会

アセフェート暴露によるマウス神経行動毒性の発現機構の Percellome 解析 種村 健太郎, 五十嵐 勝秀, 中津 則之, 相崎 健一, 北嶋 聡, 児玉 幸夫, 菅野 純 第34回日本トキシコロジー学会学術年会

モデル催奇形性物質を用いた発生トキシコゲノ  
ミクス (Percellome 手法) 解析 北嶋 聡, 相崎  
健一, 五十嵐 勝秀, 中津 則之, 菅野 純 第 34  
回日本トキシコロジー学会学術年会

3. 知的所有権の取得状況

A. 特許取得

なし

B. 実用新案登録

なし

C. その他

なし

資 料

[講演抄録：特別講演]

化学物質の胎盤機能修飾を考慮した発生毒性に関する研究

中西 剛（大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野）

化学物質の発生毒性評価は、胎児に対する直接的な影響を中心に行われているが、我々は胎盤機能に着目した検討を行ってきた。胎盤は、母体胎児間に妊娠期のみに存在する組織であり、妊娠の維持や胎児の発育に必要な不可欠な種々のホルモンを供給する第二の視床下部-下垂体-性腺複合体としての機能を有している。例えば、ヒトにおいては妊娠期のエストロゲン産生（アンドロゲン代謝）は胎盤で行われるが、エストロゲンをアンドロゲンに変換する酵素であるアロマターゼが胎盤において欠損した女児を妊娠した事例においては、母子ともにエストロゲン濃度が低下しアンドロゲン濃度が上昇する結果、仮性半陰陽（内生殖器は女性様であるが、外生殖器は男性様の症状）が起こる。このことは、性ステロイドホルモンがヒト胎児の生殖器官形成に多大な影響を与えることを示すと共に、胎盤のアロマターゼによる性ステロイドホルモンバランスの制御が重要であることを示している。またヒトの胎盤では、ステロイドホルモン以外にも妊娠の維持に必要なゴナドトロピン（hCG）等の産生が行われていることから、化学物質がこのような胎盤内分泌機能を修飾した場合には、少なからず胎児に影響が及ぶ可能性がある。このような背景のもと我々はこれまでに、1）ヒト絨毛細胞株を用いた化学物質のヒト胎盤内分泌機能への影響に関する検討、および2）胎盤内分泌機能変動による胎児への影響の検討、を行ってきた。本講演では、これらの研究成果について紹介する。

<有機スズ化合物の核内受容体を介したヒト胎盤内分泌機能修飾>

まず我々は、ヒト絨毛細胞株を用いて、アロマターゼを含む胎盤の内分泌機能に対する様々な環境化学物質の影響について検討を行った。化学物質が毒性を示さない濃度域で検討を行ったところ、トリブチルスズ（TBT）とトリフェニルスズ（TPT）が、hCG 産生、アロマターゼ活性ともに濃度依存的に上昇させた<sup>1)</sup>。またこれらの有機スズ化合物は、ヒト胎盤において不活性型エストロゲン（エストロン）を活性型（エストラジオール；E2）に変換する酵素（17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type I：17 $\beta$ -HSD I）をも活性化し、E2 産生を促進することも確認された<sup>1,2)</sup>。さらにこれらの機能の亢進は、それぞれの mRNA の発現上昇を伴っていた。

船底塗料などに使用されてきた TBT などの有機スズ化合物は、イボニシなどの巻貝類の雌に対して雄の性徴発達を示す（ペニスを発生させる）インボセックスと呼ばれる生物攪乱作用を誘導することから、雄性化を誘導する典型的な化学物質であるとされてきた。また、これらの有機スズ化合物は性ステロイドホルモン受容体には結合しないことから、エストロゲン合成酵素であるアロマターゼの酵素活性を阻害し、体内のアンドロゲン濃度を上昇させる

ことで、雄性化を誘導するという『アロマターゼ阻害説』が圧倒的に支持されてきた。しかし無脊椎動物においては、性ステロイドホルモンの受容体は存在しないという報告がある上、貝類のアロマターゼは同定されていないことから、これを証明する核心的なデータは存在していなかった。また我々のデータにおいては、有機スズ化合物は少なくともヒト胎盤に対してはエストロゲン産生を亢進することから、すべての生物種に対し雄性化作用を示すわけではないことが明らかとなった。このことは、有機スズ化合物がアロマターゼ以外の分子を標的として毒性を誘発する可能性を示唆している。

そこで次に我々は、有機スズ化合物の作用点がヒト胎盤の hCG、アロマターゼおよび 17 $\beta$ -HSD I の mRNA の上昇に共通の経路にあると考え、さらに検討を進めた。その結果、TBT および TPT は retinoid X receptor (RXR) のアゴニストとして作用することが明らかとなった。これらの有機スズ化合物の RXR に対する親和性は、精製蛋白質を用いた検討では RXR の内因性リガンドである 9-*cis* レチノイン酸 (9cRA) と比較して 1/5-1/10 程度であったが、細胞を用いたレポーターアッセイでは転写活性化能はほぼ同等であった<sup>3)</sup>。しかし 9cRA とは異なり、これらの有機スズ化合物は、もう一つのレチノイン酸受容体である retinoic acid receptor (RAR) には親和性も転写活性化能も示さなかった。また有機スズ化合物のヒト胎盤の内分泌機能に対する作用は、RXR を介したものであることも明らかとなった<sup>2,3)</sup>。さらに我々は、TBT と TPT がチアゾリジン系糖尿病薬をアゴニストとする peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  のアゴニストとしての作用を有することも見いだした<sup>4)</sup>。有機スズ化合物の PPAR $\gamma$  に対する親和性および転写活性能は、ともに既知のアゴニストである rosiglitazone と同等以上であった。すなわちこれらの有機スズ化合物は、PPAR $\gamma$  と RXR の強力な 2 重アゴニストとして作用することが明らかとなったのである。既知の PPAR $\gamma$  や RXR アゴニストとは構造が全く異なる TBT や TPT が、これほどまでに強力なアゴニスト活性を示すのは驚きである。その一方で、最近、貝類にも 9cRA 反応性の RXR が存在し、9cRA を投与すると有機スズ化合物と同様にインポセックスを誘導することが報告され、有機スズ化合物による貝類のインポセックスにも RXR が関与していることが明らかとなった<sup>5,6)</sup>。即ちヒトと貝類に対して全く逆の作用を示すと考えられていた有機スズ化合物の作用は、実はどちらの生物種においても RXR が関与していたのである。このことは有機スズ化合物が、生物種によって誘発する表現型は異なるものの、RXR や PPAR $\gamma$  を介することで様々な毒性を引き起こす可能性を示唆している。

#### <胎盤アロマターゼ過剰発現による胎児への影響>

有機スズ化合物の発生毒性試験については、これまでも精力的に行われてきているが、上述のごとくヒト胎盤の E2 産生を促進するにも関わらず、このような結果から想定される発生毒性は報告されていない。これは胎盤内分泌機能の種差に起因するものと考えられる。すなわちヒトにおいて胎盤は、妊娠期間中の主要なエストロゲン産生臓器であるが、実験動物として汎用されている齧歯類の胎盤には、アロマターゼが存在しないことから、齧歯類の胎盤ではエストロゲン産生は行われず、逆に主要なアンドロゲン産生臓器となっている。したがって、齧歯類を用いて有機スズ化合物の発生毒性を検討しても、当然のことながらヒ

ト絨毛細胞株で確認されたような影響は認められない。そこで我々は、有機スズ化合物のように胎盤内分泌機能の種差の部分に作用する化学物質の影響を評価するために、胎盤特異的にヒトアロマターゼを発現するトランスジェニックマウスを作成したり、レンチウイルスベクターを用いて胎盤特異的にヒトアロマターゼ遺伝子を発現させることで、その胎児への影響の検討を試みている。まだ十分な結果が得られていない状態であるが、本講演ではその成果の一部を紹介する予定である。

- 1) Nakanishi T, et al: J Clin Endocrinol Metab (2002) 87: 2830-2837
- 2) Nakanishi T, et al: Biochem Pharmacol (2006) 71: 1349-1357
- 3) Nakanishi T, et al: Mol Endocrinol (2005) 19: 2502-2516
- 4) Kanayama T, et al: Mol Pharmacol (2005) 67: 766-774
- 5) Nishikawa J, et al: Environ Sci Technol (2004) 38: 6271-6276
- 6) Filipe C Castro L, et al: Aquat Toxicol (2007) 85: 57-66

[講演抄録：話題提供]

アリールハイドロカーボン受容体の生物作用：自然発症腫瘍の抑制と寿命の延長

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 平林容子

アリールハイドロカーボン受容体 (AhR) は、本来の生理的機能の不明な異物認識受容体タンパクであり、ARNT とヘテロ二量体を構成して転写因子として機能する。この AhR を欠失 (KO) したマウスでは、野生型に比べて自然発症腫瘍が早期に観察されたことから、AhR のがん抑制遺伝子としての機能が推測された。しかし、野生型マウスにしても AhR-KO マウスにしても、全てのマウスが腫瘍死するわけではないことから、おそらく AhR は広くゲノムの安定性に関与し、結果としてマウスの寿命延伸に寄与することが想定される。

AhR-KO マウスでは、骨髄細胞のみならず、造血前駆細胞レベルでも、 $H_2O_2$  処理後の DCFH-DA を指標とした細胞内活性酸素種 (ROS) 量の、野生型に比べて有意な増加が認められた。造血前駆細胞は骨髄内で低酸素環境下にあつて静止期を維持し、弱い酸化ストレス刺激によって制御されていることがわかってきた。また、AhR はより未分化な造血幹細胞に比較的強く発現し、未分化な造血幹細胞の細胞周期を緩徐化し、より大きな休止期分画の維持に寄与することを明らかにしている。以上により、AhR が機能することは、低酸素分圧環境下で、がん抑制遺伝子としての役割と共に、ゲノムの安定化に寄与しており、結果として今回 AhR-KO マウスに比した野生型マウスの長寿性が観察されたものと考えられる。



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	号	ページ	年
Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Otto T, Trosko JE, <u>Inoue T.</u>	Protective Role of Connexin 32 in Steady-State Hematopoiesis, Regeneration State and Leukemogenesis	Exp Biol Med	232	700-712	2007
Hirabayashi Y, <u>Inoue T.</u>	Implication of hemopoietic progenitor cell kinetics and experimental leukemogenesis: Relevance to Gompertzian mortality as possible hematotoxicological endpoint	Exp Hematol	35	125-133	2007
Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, <u>Inoue T.</u>	Membrane Channel Connexin 32 Maintains Lin(-)/c-kit (+) Hemopoietic Progenitor Cell Compartment: Analysis of the Cell Cycle	J Membr Biol	217	105-113	2007
Vermeire T, Munns WrJr, <u>Sekizawa J</u> , Suter G, Kraak GV.	An Assessment of Integrated Risk Assessment	Hum Ecol Risk Assess	13	339-354	2007
<u>Sekizawa J</u> , Ohtawa H, Yamamoto H, Okada Y, Nakano T, Hirai H, Yamamoto S, Yasuno K..	Evaluation of Human Health Risks From Exposures to Four Air Pollutants in the Indoor and the Outdoor Environments in Tokushima, and Communication of the Outcomes to the Local People	J Risk Res	10	841-851	2007
関澤 純	内分泌かく乱化学物質による低用量影響の蓋然性	日本リスク研究学会誌	17	79-84	2007
Nakamura Y, Yamamoto H, <u>Sekizawa J</u> , Kondo T, Hirai N, Tatarazako N.	The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish	Chemosphere	70	865-873	2008
<u>Sekizawa J</u> , Kojima Y, Mihara K, Yamamoto H, Ohta N, Harada A, Takeda E, Miyairi S, Nakamura Y, Imamura Y, Ikeuchi T, Yamada N.	URINE CONCENTRATIONS OF INDIRUBIN IN RATS AND HUMANS AND ITS POSSIBLE INTERACTION WITH OTHER ARYL HYDROCARBON RECEPTOR LIGANDS	Organohalogen Compounds	69	369-372	2007
田村 生弥, 太田 美菜子, 関澤 純, 山本 裕史.	下水道未普及地域における河川生物膜による直鎖アルキルベンゼンスルホン酸浄化作用の評価	Environmental Engineering Research	44	127-134	2007
Yamamoto H, Nakamura Y, Nakamura Y, Kitani C, Imari T, <u>Sekizawa J</u> , Takao Y, Yamashita N, Hirai N, Oda S, Tatarazako N.	Initial Ecological Risk Assessment of Eight Selected Human Pharmaceuticals in Japan	Environmental Sciences	14	177-193	2007
山本 裕史, 中村 友紀, 木谷 智世, 中村 雄大, 関澤 純, 鎌迫典久	非ステロイド系医薬品類の生態リスク評価	Environ Sanit Eng Res	21	71-78	2007
Ogura Y, Ishii K, Kanda H, Kanai M, Arima K, Wang YZ, <u>Sugimura Y.</u>	Bisphenol A induces permanent squamous change in mouse prostatic epithelium.	Differentiation	75	745-756	2007
Uchida K, Kanai M, Yonemura S, Ishii K, Hirokawa Y, <u>Sugimura Y.</u>	Proprotein convertases modulate budding and branching morphogenesis of rat ventral prostate	Int. J. Dev. Biol.	51	229-234	2007
Kanda H, Ishii K, Ogura Y, Imamura T, Kanai M, Arima K, <u>Sugimura Y.</u>	Naftopidil, a selective $\alpha$ -1 adrenoceptor antagonist, inhibits growth of human prostate cancer cells by G1 cell cycle arrest	Int. J. Cancer.	122	444-451	2008
Tanaka J, Yonemoto J, Zaha H, Kiyama R, <u>Sone H.</u>	Estrogen-responsive genes newly found to be modified by TCDD exposure in human cell lines and mouse systems	Mol Cell Endocrinol.	272	38-49	2007
Suzuki A, Urushitani H, Watanabe H, Sato T, <u>Iguchi T</u> , Kobayashi T, Ohata Y.	Comparison of Estrogen Responsive Genes in the Mouse uterus, Vagina and Mammary Gland.	J. Vet. Med. Sci.	69	725-731	2007

Suzuki A, Urushitani H, Sato T, Kobayashi T, Watanabe H, Ohta Y, <u>Iguchi T.</u>	Gene Expression Change in the Mullerian Duct of the Mouse Fetus Exposed to Diethylstilbestrol in Utero	Exp Biol Med	232	503-514	2007
<u>Iguchi T.</u> , Katsu Y, Horiguchi T, Watanabe H, Blumberg B, Ohata Y.	Endocrine Disrupting Organotin Compounds are Potent inducers of ImPOSEX in Gastropods and Adipogenesis in Vertebrates	Mol Cell Toxicol	3	1-10	2007
Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriskin M, Farabollini F, Guillette LJ Jr, Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, <u>Iguchi T.</u> , Jobling S, <u>Kanno J.</u> , Keri RA, Knudsen KE, Laufer H, Leblanc GA, Marcus M, McLachlan JA, Myers JP, Nadal A, Newbold RR, Olea N, Prins GS, Richter CA, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness CE, Vandenberg JG, Walser-Kuntz DR, Watson CS, Welshons WV, Wetherill Y, Zoeller RT.	Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Intergration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure	Reprod Toxicol	24	131-138	2007
Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Yamaguchi Y, Kitada K, Honma S, Moriya T, Hirakawa H, Evance DB, Hayashi S, Ohuchi N, <u>Sasano H.</u>	Aromatase Localization in Human Breast Cancer Tissues: Possible Interactions between Intratumoral Stromal and Parenchymal Cells	Cancer Res	67	3945-3954	2007
Miki Y, Suzuki T, Hatori M, <u>Igarashi K.</u> , Aisaki K, <u>Kanno J.</u> , Nakamura Y, Uzuki M, Sawai T, <u>Sasano H.</u>	Effect of aromatase inhibitors on hman osteoblast and osteoblast-like cells: A possible androgenic bone protective effects induced by exemestane	Bone	40	876-887	2007
Miki Y, Suzuki T, <u>Sasano H.</u>	Aromatase inhibitor and bone	Biomed Pharmacother	61	540-542	2007
Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, <u>Kato S.</u>	Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase	Nature	446	562-566	2007
Takeda I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, <u>Kato S.</u>	A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical wnt signalling supresses PPAR- $\gamma$ transactivation	Nat Cell Biol	9	1273-1285	2007
Miyamoto J, Matsumoto T, Shiina H, Inoue K, Takada I, Ito S, Itoh J, Minematsu T, Sato T, Yanase T, <u>nawata H.</u> , <u>Osamura RY.</u> , <u>Kato S.</u>	The Pituitary Function of Androgen Receptor Constitutes a Glucocorticoid Production Circuit.	Mol Cell Biol	27	4807-4814	2007
Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, <u>Igarashi K.</u> , Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, <u>Kanno J.</u> , Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, <u>Kato S.</u>	Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor $\alpha$ and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts.	Cell	130	811-823	2007
<u>Yamazaki T.</u> , Nakamori A, Sasaki E, Wada S, Ezaki O.	Fish Oil Prevents Sucrose-Induced Fatty Liver But Exacerbates High-Safflower Oil -Induced Fatty Liver in	Hepatology	46	1779-1790	2007
Iizuka A, <u>Ikarashi Y.</u> , Yoshida M, Heike Y, Takeda K, Quinn G, Wakasugi H, Kitagawa M, Takaue Y.	Interleukin (IL)-4 promotes T helper type2-biased natural killer T (NKT) cell expansion, which is regulated by NKT cell-derived interferon- $\gamma$ and IL-4	Immunology	123	100-107	2007
Yoshida M, Matsui Y, <u>Ikarashi Y.</u> , Usui T, Osada H, Wakasugi H.	Antiproliferating Activity of Mitotic Inhibitor Pironetin against Vindesine- and Paclitaxel-resistant Human Small Cell Lung Cancer H69 Cells	Anticancer Res	27	729-736	2007

Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Weston CS, Zoeller RT, Belcher SM.	In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action	Reprod Toxicol	24	178-198	2007
Ishii H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, Asashima M, Mukai H, Murakami G, Hojo Y, Kimoto T, Kawato S.	Local Production of Sex Hormones and Their Modulation of Hippocampal Synaptic Plasticity.	The Neuroscientist	13	323-334	2007
Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison J H, Janssen JG M, Rose J A, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S.	Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons.	J. Neurochem.	100	950-957	2007
Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Tsurugizawa T, Takata N, Kimoto T, Kawato S.	Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disrupters in hippocampal neurons	Brain Res Rev.			Epub