

化合物溶液の調製

各化合物は国立医薬品食品衛生研究所にて DMSO を媒体として 10 mM に調製された試料、あるいは DMSO に溶解しない場合は、水を媒体として 10 mM に調製された試料を用いた。

10 mM に調製された化合物をそれぞれの媒体にて 1/10 希釈を行い 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM 及び 10 nM とした。化合物は終濃度が 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM 及び 10 pM となるように培地に添加した(DMSO 終濃度:0.1%)。媒体として水を用いた場合には、他の物質と同じ構成になるように同量の DMSO を同時添加した。

Steady-Glo Luciferase Assay Reagent の調製

Steady-Glo ルシフェラーゼ活性測定試薬 (Steady-Glo Luciferase assay system, Promega) を使用した。Steady-Glo Luciferase Assay Substrate 1 vial に Steady-Glo Luciferase Assay buffer 1 vial 全量を直接加えて溶解した。

ER α を介する転写活性化測定法(レポーター遺伝子アッセイ)アゴニスト検出系

測定の手順

以下の手順に従って測定を行った。

細胞を測定用の 96 well プレートに播種(10^4 cells/100 μ L/well)

↓CO₂ インキュベータ内で培養 3 時間

↓化合物の添加

化合物終濃度: 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM [n=3]

媒体対照区: DMSO [n=6]

陽性対照区: 1 nM E2 [n=6]

↓CO₂ インキュベータ内で培養(20-24 時間)

↓各 well から培地を除去

↓PBS (0.3 mM の MgCl₂ 含む)と Steady-Glo Luciferase Assay Reagent を 1:1 で混和し、各 well に 50 μ L ずつ添加

↓10 分間室温で静置

化学発光測定装置 (TopCount NXT™, PerkinElmer)による発光測定(測定時間: 1 秒/well)

Assay プレート上のサンプル配列 (図 1)

plate format に従い、被験物質、媒体対照区 (DMSO)及び陽性対照区(1 nM E2)を配置した。

データ解析 (図 2)

各濃度区で得られた発光強度(RLU)を陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率(Fold induction)を求めた。同時に被験物質及び陽性対照区の全濃度区で得られた発光強度(RLU)から媒体対照区の平均値を差し引いた後、陽性対照区の平均値(通常、誘導活性がプラトーに達する 1 nM E2 を使用)で除し、相対転写活性化倍率(Relative transcriptional activity)を求めた。また、図 2 で定義される陽性対照区の最大転写活性化倍率(1 nM の E2)の 10%の値を与える濃度(PC10)及び 50%の値を与える濃度(PC50)を 2 濃度区間を結ぶ一次回帰式より求めた。

PC10 が算出されない化合物は hER α アゴニスト活性陰性(-)と判定した。

ER α を介する転写活性化測定法(レポーター遺伝子アッセイ)アンタゴニスト検出系

測定の手順

以下の手順に従って測定を行った。

細胞を測定用の 96 well プレートに播種 (10^4 cells/100 μ L/well)

↓CO₂ インキュベータ内で培養 3 時間

↓化合物の添加

以下の培地中にはスパイク対照 E2 を終濃度 25 pM になるよう予め添加

化合物終濃度: 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM [n=3]

アンタゴニスト陽性対照区: 1 μ M 4-Hydroxytamoxifen [n=3]

細胞毒性対照区: 100 μ M Digitonin [n=3]

スパイク対照区: DMSO (25 pM E2 のみ)[n=3]

以下の培地中にはスパイク対照 E2 を添加し

ない

媒体対照区：DMSO [n=6]

アゴニスト陽性対照区：1 nM E2 [n=6]

↓CO₂インキュベータ内で培養(20-24 時間)

↓各 well から培地を除去

↓PBS (0.3 mM の MgCl₂ 含む)と Steady-Glo

Luciferase Assay Reagent を 1 : 1 で混和し、

各 well に 50 μL ずつ添加

↓10 分間室温で静置

化学発光測定装置 (TopCount NXT™, PerkinElmer)による発光測定(測定時間：1 秒 /well)

Assay プレート上のサンプル配列 (図 3)

plate format に従い、被験物質、アンタゴニスト陽性対照区(1 μM 4-Hydroxytamoxifen)、細胞毒性対照区(100 μM Digitonin)、スパイク対照区(DMSO (25 pM E2 のみ))、媒体対照区(DMSO)及びアゴニスト陽性対照区(1 nM E2)を配置した。

データ解析

被験物質及び各対照区の全濃度区で得られた発光強度(RLU)から媒体対照区の平均値を差し引いた後、スパイク対照区の平均値(25 nM E2)で除し、スパイク対照に対する相対転写活性化倍率(Relative transcriptional activity against Spike control)を求めた後、スパイク対照区の転写活性化倍率(25 nM E2)の 30%を阻害する値を与える濃度(IC30)及び 50%を阻害する値を与える濃度(IC50)を 2.5.3 同様に 2 濃度区間を結ぶ一次回帰式より求めた。

IC30 が算出されない化合物は hERα アンタゴニスト活性陰性(-)と判定した。

細胞毒性試験

IC30 が算出された物質については、細胞毒性による False positive 反応を回避するため、水溶性ホルマザン WST-8 を用いた WST-8 assay により細胞毒性を観察し、細胞生存率が 80%未満になる細胞毒性が認められた濃度区は、hERα アンタゴニスト活性の IC30 及び IC50 の算出から

除外した。

C 研究結果

hERα アゴニスト活性測定

測定を実施した 50 化合物のアゴニスト活性有無をそれぞれ表 1 に示した。

実施した 50 化合物のうち、PC10 が算出されたものは 11 物質であり、さらに PC50 も算出されたものは 3 物質であった。

hERα アンタゴニスト活性測定

測定を実施した 50 化合物のアンタゴニスト活性有無をそれぞれ表 1 に示した。

実施した 50 化合物のうち、IC30 が算出されたものは 7 物質であり、さらに IC50 も算出されたものは 1 物質であった。なお、IC30 が算出された物質について、今回の試験濃度域でいずれも細胞毒性は認められなかった。

D. 考察

今回実施した 50 化合物のうち、hERα アゴニスト活性として PC10 が算出されたものは 11 物質であり、さらに PC50 も算出されたものは 3 物質であった。また、hERα アンタゴニスト活性として IC30 が算出されたものは 7 物質であり、さらに IC50 も算出されたものは 1 物質であった。hERα アゴニスト活性が認められた物質と hERα アンタゴニスト活性が認められた物質で重なりはなく、両者を示す物質は今回の化合物の中には存在しなかった。

E. 結論

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部より供与された 50 化合物について、ヒトエストロゲン受容体 α (hERα)を常時発現するプラスミド及びホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に hERα に対する応答配列が組み込まれたレポータープラスミドが同時に且つ安定的に組み込まれたヒト由来細胞株(HeLa-9903 細胞)を用いて、レポーター遺伝子アッセイにより hERα アゴニスト及びアンタゴニスト活性を測定し、基礎データを収集した。

その結果、hERα アゴニスト活性として PC10

が算出されたものは 11 物質であり、さらに PC50 も算出されたものは 3 物質であり、hER α アンタゴニスト活性として IC30 が算出されたものは 7 物質であり、さらに IC50 も算出されたものは 1 物質であった。hER α アゴニスト活性が認められた物質と hER α アンタゴニスト活性が認められた物質で重なりはなく、両者を示す物質は今回の化合物の中には存在しなかった。

以上、本研究により hER α を介した化学物質

の(坑)エストロゲン活性を培養細胞を用いたハイスループットスクリーニング(HTPS)を利用した超高速分析法を用いたデータの収集の結果、(坑)エストロゲン活性物質の高速スクリーニングにおいてエストロゲン受容体 α サブタイプに対応するアゴニスト作用及びアンタゴニスト作用を評価する手法として有用なものと考えられた。

	化合物 1			化合物 2			化合物 3			化合物 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 μ M	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
B	1 μ M	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
C	100 nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
D	10 nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
E	1 nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
F	100 pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
G	10 pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC : Vehicle control (DMSO), PC : Positive control (1 nM E2)

図1 アゴニスト系マイクロプレート配置例

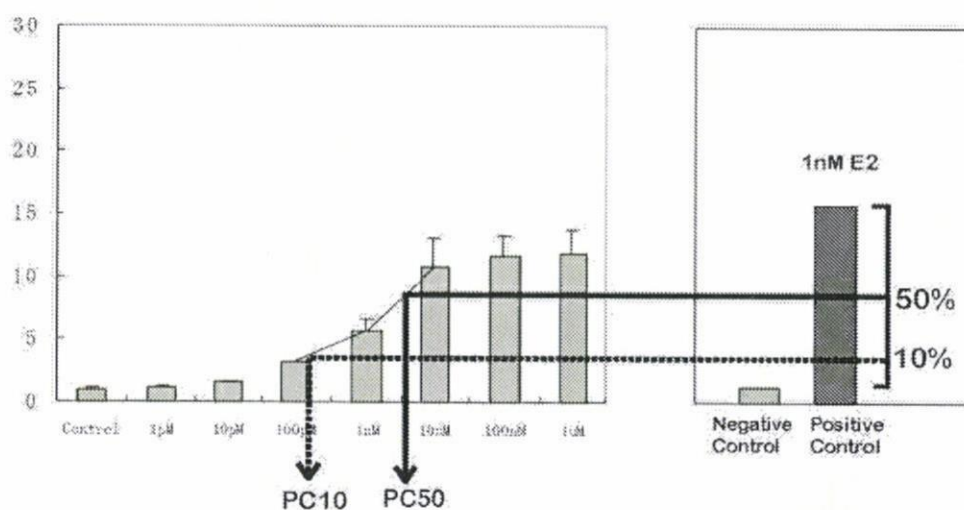


図2 DATA 処理法模式図 (PC10、50 の定義)

	化合物 1			化合物 2			化合物 3			化合物 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 μ M	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
B	1 μ M	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
C	100 nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
D	10 nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
E	1 nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
F	100 pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
G	SC	→	→	→	→	→	AntPC	→	→	Cx	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	AgoPC	→	→	→	→	→

SC : Spike control (DMSO), AntPC : Antagonist positive control (1 μ M OHT),

Cx : Cytotoxicity control, VC : Vehicle control (DMSO), AgoPC : Agonist positive control (1 nM E2)


 : 25 nM E2

図 3 アンタゴニスト系マイクロプレート配置例

表1 hER α アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性有無の結果

Assay ID	CAS No.	Chemical Name	メーカー	製品コード	PC50 (M)	PC10 (M)	IC50(M)	IC30(M)
ED0801	140-57-8	Aramite	ACS	P-132S	-	-	-	-
ED0803	1330-78-5	Tricresyl phosphate	和光	202-02565	-	4.87E-06	-	-
ED0804	1229-55-6	1-(2-Methoxyphenylazo)-2-naphthol	TCI	M0487	-	2.00E-06	-	-
ED0805	122-11-2	4-Amino-N-(2,6-dimethoxy-4-pyrimidinyl)benzenesulf	和光	196-10101	-	-	-	-
ED0806	4306-88-1	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-nonyl-	ACS	PLAS-AX-063N	-	4.36E-06	-	-
ED0807	50-33-9	Phenylbutazone	和光	168-23211	-	-	-	-
ED0808	85-60-9	4,4'-Butyldienebis(6-tert-butyl-m-cresol)	和光	025-12382	-	-	-	4.33E-06
ED0809	57808-65-8	Cloasantel	和光	032-16531	-	-	-	-
ED0810	458-37-7	Curcumin	和光	038-04921	-	2.80E-06	-	-
ED0811	150-86-7	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, (2E,7R,11R)-	和光	161-02561	-	-	-	-
ED0812	50-24-8	Prednisolone	和光	165-11491	-	-	-	3.79E-08
ED0813	119-90-4	Dianisidine	MPB	101536	-	-	-	-
ED0814	2312-35-8	Propargite	和光	024-06943	-	-	-	8.51E-07
ED0815	92-06-8	1,1':3',1''-Terphenyl	和光	207-10082	-	1.64E-06	-	-
ED0816	116-66-5	1h-Indene, 2,3-dihydro-1,1,3,3,5-pentamethyl-4,6-d	LGC	DE-NIT132	-	-	-	2.55E-06
ED0817	3179-89-3	Ethanol, 2,2'+4-(P-nitrophenylazo)-m-tolylimino d	ACS	DYE-019S	-	-	-	-
ED0818	145-39-1	Musk tibetine	LGC	DE-NIT133	-	-	-	-
ED0820	4674-50-4	2(3h)-Naphthalenone, 4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4,4a-d	和光	326-88811	-	-	-	-
ED0821	1910-42-5	Paraquat dichloride	和光	160-08871	-	-	-	-
ED0822	4080-98-2	Dodecanedioic acid, 1,12-dihydrazide	和光	323-20262	-	-	-	-
ED0824	4390-04-9	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonane	和光	321-79412	-	-	-	-
ED0826	1139-30-6	4,12,12-Trimethyl-9-methylene-5-oxatriacyclo[8.2.0.	CHD	ASB-00003251-100	-	-	-	-
ED0828	67564-91-4	Fenpropimorph	和光	066-04981	-	-	-	-
ED0830	58207-19-5	Clindamycin hydrochloride Monohydrate	TCI	C2256	-	-	-	-
ED0831	901-44-0	Ethanol, 2,2'-(1-methylethylidene)bis(4,1-phenyle	和光	321-69142	-	-	-	-
ED0832	75980-60-8	Diphenyl-2,4,6-trimethylbenzoyl phosphine oxide	TCI	D3358	-	3.45E-06	-	-
ED0834	15647-08-2	Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester	和光	322-26072	-	2.00E-06	-	-
ED0835	520-26-3	4H-1-Benzopyran-4-one, 7-[[6-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-2,3-dihydro-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-,	和光	088-07341	-	-	-	-
ED0836	6119-47-7	Quinine, monohydrochloride	ICN	156486	-	-	-	-
ED0840	495-62-5	Cyclohexene, 4-(1,5-dimethyl-4-hexenylidene)-1-	和光	328-28632	-	-	-	-
ED0843	20702-77-6	Neohesperidin dihydrochalcone	MPB	151737	-	-	-	-
ED0844	87-44-5	Beta-Caryophyllene	和光	329-53072	-	-	-	-
ED0847	15233-47-3	N-(1-methylheptyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine	和光	329-26342	-	-	-	-
ED0849	698-76-0	2h-Pyran-2-one, tetrahydro-6-propyl-	和光	325-26001	-	-	-	-
ED0850	475-20-7	Longifolene	MPB	155265	-	-	-	-
ED0853	4980-54-5	Benzoic acid, 4-(1,1-dimethylethyl)-, zinc salt	和光	260-01141	-	-	-	-
ED0854	88-26-6	3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl alcohol	Aldrich	446424	-	-	-	-
ED0855	60-09-3	4-Aminoazobenzene	Aldrich	186368	3.97E-06	1.09E-06	-	-
ED0856	957-51-7	Diphenamid	Wako	041-17021	-	-	-	-
ED0857	89-46-3	Menthyl salicylate	ChromaDex, Inc(Wako)	ASB-00013208-001	-	3.63E-07	-	-
ED0858	127-41-3	alpha-Ionone	Wako	093-00692	-	-	-	-
ED0859	67129-08-2	Metazachlor	Fluka PESTANAL®, analytical standard	36155	-	-	-	5.22E-06
ED0860	345909-26-4	Taurocholic acid sodium salt hydrate	Aldrich	861960	-	-	-	-
ED0864	1836-77-7	Chloritrofen	Wako	032-08983	-	-	-	-
ED0865	90357-06-5	Bicalutamide	Wako (LKT Labs, Inc)	517-40861 (B3209)	-	-	-	-
ED0866	206-44-0	Fluoranthene	TCI	F0016	-	-	-	-
ED0868	501-36-0	Resveratrol	Sigma	R5010	8.34E-07	1.61E-07	-	-
ED0869	84371-65-3	Mifepristone	Sigma	M8046	-	-	2.11E-06	6.67E-07
ED0870	120-46-7	Dibenzylmethane	TCI	D0910	6.62E-06	1.16E-06	-	-
ED0871	4979-32-2	N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide	Wako chemical	323-33452	-	-	-	3.48E-06

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

マウス前立腺のアンドロゲン応答性遺伝子について、2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)、Diethylstilbestrol(DES)の新生児期投与による影響を検索したところ、成体時での発現異常として、PSP94、defensin、PCP4 遺伝子の異常亢進が明らかになった。また、ラットにおける前立腺タンパク質の同定を行い、種間での発現タンパク質の相同性を明らかにした。

A. 研究目的

前立腺におけるアンドロゲン応答性遺伝子を検索同定し、それらについて新生児化学物質暴露の影響を解析し、さらに転写修飾機構を解明する。

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日及び16日目で、TCDDを10、1000 ng/kg b.w.投与、6週齢で屠殺し、前立腺組織を、腹葉(VP)、背側葉(DLP)、前葉(AP)を解剖学的に区別して保存した。また、ラット分泌タンパク質同定のために、F344雄ラットをCharles River Japan購入し、11週齢で屠殺、前立腺の腹葉(VP)、側葉(LP)、背葉(DP)、前葉(AP)を区別して取り出した。各葉に切り込みを入れて内容物を遠心分離に抽出した。

2) mRNA定量: 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のmRNAを定量した。

3) ラット前立腺分泌タンパク質の同定: ラット各葉からの分泌物をpIレンジ3-11で等電点電気泳動し、5-20%グラジエントSDS-PAGEで二次元目泳動を行った。Sypro Ruby染色によりタンパク質を検出し、スポット部のゲルを切り出した。各ゲル片からタンパク質を抽出し、トリプシン消化後、MALDI-TOF質量分析機によりマスペクトルを測定し、peptide mass fingerprinting法を適用してタンパク質を同定した。

(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児期TCDD暴露の作用: 生後6日および16日目にTCDDを投与し、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。生後6日でTCDDを投与した動物では、PSP94、defensin β 、PCP4発現の異常亢進がみられた(既報)が、生後16日目に投与した場合には、これらの変化は観察されなかった。

2) アンドロゲン応答性遺伝子発現を指標にした新生児期DES暴露の作用: DESの0-5 μ g/kg b.w./日を生後1-5日強制投与したC57BLマウスの実験群(太田班員の実験群)について、アンドロゲン応答性遺伝子発現影響を検討した結果、defensin β 、PCP4で発現の上昇が見られた。

3) ラットでの前立腺分泌タンパク質同定とそのアンドロゲン応答性: VPでは、prostatein、cystatin-related protein 1、kallikrein S3、spermine binding proteinが主要なタンパク質であった。LPでは、VPと同様なタンパク質およびcarbonic anhydraseII(CA2)が同定された。DPでは、immunoglobulin binding protein類似タンパク質、transglutaminase4、CA2、epididymispecific protein 1、peroxiredoxin 6が発現していた。APのタンパク質発現はDPとほぼ同様であった。

同定したタンパク質発現のアンドロゲン応答性を、mRNA レベルで検討した。去勢1週間で、CA2 以外の全てのタンパク質の発現は、有意に低下したが、その程度は異なっており、prostaticprotein の mRNA は、検出限界レベルに低下したのに対し、probasin では、対照群の 1/3 程度だった。さらに、去勢動物にテストステロンを投与することで、これらの mRNA の発現が上昇した。

D. 考察

胎生期および新生児期に、低用量エストロゲンや Bisphenol 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、新生児期化学物質曝露の影響を明らかにした。

新生児期 TCDD 投与により、成体(6週齢)の前立腺において、PSP94, defensin, PCP4 遺伝子発現の異常亢進がみられたのに対し、16日令での TCDD 投与では、発現異常が見られなかった。前立腺の腺管分岐発達は生後2週間で完了することが知られているが、今回の結果は、実際にこの時期が特異的に化学物質影響を受けやすい時期であることを明らかにした。さらに、新生児期マウスへの DES 投与群に対する同様の検討でも、defensin β , PCP4 の遺伝子の成体時期発現異常がみられ、共通した遺伝子がターゲットになっていた。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。また、defensin も前立腺癌において、癌抑制遺伝子としての機能が示唆されており、これらの遺伝子の発現異常は、単純な機能障害ということから、長期的には前立腺発癌への影響の可能性も考えられる。

前立腺における発現タンパク質の研究は歴史的にはラットで先行して行われており、prostatein, kallikrein, probasin 等が古くから同定されているが、マウスでは発現しておらず大きな種差があることが指摘されてきた。一方ヒトでは、PSA, PSP94, PAP が主要な分泌タンパク質であり、げっ歯類モデルと相同性が低いとされてきた。そこで、本研究で、ラット前立腺について、その分泌タンパク質発現の全体像を明らかにし、種間の相同性について検討した。その結果、PSP94, immunoglobulin binding protein 類似タンパク質、peroxiredoxin 6 等の、ラット、マウス、ヒトにおいて共通に発現している分泌タンパク質が明らかになった。

E. 結論

新生児期化学物質曝露の前立腺影響の指標として PSP94, defensin, PCP4 発現が有用であることを報告してきたが、今回の TCDD 曝露実験、DES 曝露実験の結果からもこれらの遺伝子発現への影響が示された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 書籍

Kitamura, S., Sugihara, K., Nakamura, K., Kotake, K., Kashiwagi, A., Fujimoto, N. Endocrine Disruption in Toxic Responses In: B. Ballantyne, T. Marrs, T. Syversen (ed.) General and Applied Toxicology III, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, *In press* (2008)

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

Kitamura, S., Sugihara K., Sanoh, S., Fujimoto, N., Ohta, S. Metabolic activation of proestrogens in the environment by cytochrome P450 system, *J.*

Health Sci. 54, 343-355 (2008).

Kitamura, S., Shinohara, S., Iwase, S., Sugihara, K., Uramaru, N., Shigematsu, N., Fujimoto, N., Ohta, S. Affinity for Thyroid Hormone and Estrogen Receptors of Hydroxylated Polybrominated Diphenyl Ethers. *J. Health Sci.* 54, 607-614 (2008).

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)

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)

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).

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).

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).

3. 学会発表

藤本成明、吉田緑、西川秋佳、根本清光、出川雅邦 化学物質による肝肥大の毒性指標としての性ホルモン受容体発現の検討、第 25 回日本毒性病理学会学術集会、浜松 2009 (要旨集 P75)

藤本成明、菅野純、五十嵐勝秀 マウス前立腺に

おけるアンドロゲン応答遺伝子同定とホルモン依存性前立腺増殖への関与 日本癌学会第 67 回学術総会、名古屋 2008 (総会記事 P-4077)

岩瀬恵理、篠原聖治、杉原数美、藤本成明、浦丸直人、北村繁幸、太田茂 ブロム化難燃剤 PBDE および NBR 手袋溶出物質の甲状腺ホルモン攪乱作用 日本薬学会第 128 年会、横浜 2008 (要旨集 27PW-am207)

丹下智子、中村優里、浦丸直人、杉原数美、藤本成明、北村繁幸、太田茂 合成 pyrethroid 剤 permethrin の代謝と内分泌攪乱活性変動 日本薬学会第 128 年会、横浜 2008 (要旨集 27PW-am167)

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)

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.

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)

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)

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)

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.

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)

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)

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) .

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) .

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) .

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
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性的解析

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

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。

マウス胎生 11 日と 14 日の終脳の DNA メチル化状況を比較し、アストロサイト分化能獲得が始まる胎生 14 日で脱メチル化されている DNA 領域のうちアストロサイト特異的遺伝子群のプロモーターに絞り共通 DNA 配列を検索した結果、核内受容体結合配列が高頻度に抽出された。脱メチル化されるべき DNA 領域の目印としての核内受容体の関与が推察される。核内受容体作動性物質に DNA メチル化をかく乱させる作用がある可能性が示唆され、今後さらに解析が必要と考える。

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う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、ブトレッシン、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) を添加したものを扱い、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す、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 を超音波処理にて破碎し、100-400bp の断片とし、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。詳細は本操作をキット化している 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は、Affymetrix 社の TAS(Tiling Analysis software)と IGB(Integrated genome browser)を用いた解析に加え、Genomatix 社の ChipInspector にて解析した。Promoter 配列の *in silico* 解析は、Genomatix Suite(Genomatrix 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、昨年度開始した DNA メチル化状況の網羅的解析を進めるとともに、詳細なデータ解析を進めた。

マウスでは胎生 10 日以降に、神経幹細胞に DNA メチル化を含むエピジェネティックな変化が生じ、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。そこで昨年度は胎生 10 日及び 14 日の胎児終脳のゲノム DNA について、メチル化 DNA 断片の分離精製とマイクロアレイを組み合わせた ChIP on Chip 法により、ゲノム DNA のメチル化状況を網羅的に解析した。その結果、アストロサイト 特異的発現が報告されている遺伝子群 40 遺伝子(JNS 2008:28:p.264-278) 中 24 遺伝子が胎生 14 日で脱メチル化傾向にあることが判明した。そこで、24 遺伝子のプロモーター配列について共通配列の有無を Genomatix suite を用いて検索した結果、核内受容体結合配列が多く抽出された。それらは NR2(Nuclear receptor subfamily 2)および RXR の結合配列であった。この結果は、脱メチル化されるべき DNA 領域の目印として核内受容体が関与している可能性を推察させるものである。すなわち、核内受容体作動性物質に DNA メチル化を変化させる作用がある可能性が示唆され、さらに解析を進める予定である。しかし、このデータは終脳全体の比較をしたものであり、神経幹細胞以外にも神経細胞や血球の混入が予想された。

一方で、神経系では神経幹細胞に転写因子 Sox2 タンパク質が特異的に発現することから、Sox2 陽性細胞を精製することで、培養を経ずに神経幹細胞の濃縮が可能であることが示されている(Cell Stem Cell 2007:1:p.515-528)。そこで本年度は、Sox2 遺伝子プロモーターの下流に GFP をつないだトランスジェニックマウス(Sox2-GFP mouse)を用い、胎生 10 日及び 14 日の終脳から神経幹細胞を GFP 陽性細胞として分離濃縮し、ゲノム DNA のメチル化状況を網羅的に解析した。同時に、アストロサイトのメチル化状況も解析し比較した。その結果、胎生 14 日の神経幹細胞では 10 日に比べメチル化されている DNA 領域が増加し、また、それらの領域はアストロサイトにおいてもメチル化が保たれていることに加え、アストロサイトではさらにメチル化される領域が増えていることが明らかになった。現在、メチル化率が高い DNA 領域に共通する塩基配列の検索など詳細な解析を行っている。

D. 考察

昨年度 ChIP on Chip 法による網羅的 DNA メチル化解析法にはほぼ目処がたった。しかし、本手法には注意すべき点も存在する。それは、網羅的解析を可能とするために多量の DNA を必要とするため、ChIP によって回収された微量の DNA を増幅するステップを必要とする点である。ChIP により回収される DNA 量は数 100pg にとどまり、発現解析で常用するリニア増幅法では十分な増幅を得られないことが多い。実際、増幅法として用いられている 3 種類の方法、1) DNA 断片末端に共通の primer を付加し PCR 増幅する linker-mediated PCR (LM-PCR) 法、2) random primer を用いた PCR により、DNA 断片を増幅する (RP-PCR) 法 (本法をアフィメトリクスが採用している)、3) T7 RNA polymerase を用い、RNA に変換しつつリニア増幅する (TLAD) 法、について検討した結果、増幅量としては LM-PCR 法、RP-PCR 法が優れており、TLAD 法は増幅を 3 回繰り返さなければならないことが判明している。増幅による偏りについて、メチル化領域と非メチル化領域を PCR で解析し評価したところ、増幅を 2 回に止めれば TLAD 法が優れ、RP-PCR 法、LM-PCR 法は PCR サイクルを 30 回までに抑えることで偏りを低く抑えつつ必要な増幅を得られることが分かった。さらに、手法の安定性は RP-PCR 法が最も優れていることが分かった。以上から今後は RP-PCR 法を主として用い、増幅による偏りについてモニターしながら解析を進めることとしている。

本手法は、本研究に於ける神経幹細胞の成熟における DNA メチル化状況の網羅的解析のみならず、化学物質暴露に伴うメチル化変化を調べるのにも有用なツールである。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り、その方向での応用も踏まえ、確実に手法を確立する必要があると考えている。

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。今後、そのデータベースから配列の特徴を詳細に解析し、転写因子やシグナル伝達系の観点から DNA メチル化制御機構を明らかにしたい。それら転写因子やシグナル伝達系に影響する化学物質は、DNA メチル化に影響し、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に強く作用する一群の化学物質として同定できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells. Sanosaka T, Namihira M, Asano H, Kohyama J, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J, Nakashima K. *Neuroscience*. 155:780-788, 2008.

2. 学会発表

SF-1 遺伝子発現のエピジェネティック制御に与える内分泌攪乱物質の影響 板倉寛, 五十嵐勝秀, 松島裕子, 相崎健一, 菅野純, 村松正明, 佐藤憲子, 第二回日本エピジェネティクス研究会年会, 2008年5月, 静岡

シックハウス指針値レベルの経気道暴露による遺伝子発現変化の Percellome 解析 五十嵐勝秀, 小川幸男, 笠井辰也, 長野嘉介, 北嶋聡, 相崎健一, 菅野純, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008年6月, 東京

発生期ドーマイ酸暴露によるマウス脳微細構造異常と情動-認知行動障害

種村 健太郎, 五十嵐勝秀, 相崎 健一, 北嶋聡, 菅野 純, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008年6月, 東京

エストロゲン受容体(α型)ノックダウンマウ

スの神経行動解析 種村 健太郎, 五十嵐 勝秀, 相崎 健一, 北嶋 聡, 菅野 純、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月, 東京

ビスフェノール A 経胎盤曝露によりマウス泌尿生殖洞で発現変動する性分化関連遺伝子群の同定 荒瀬栄樹, 石井健一郎, 五十嵐勝秀, 相崎健一, 小倉友二, 今村哲也, 吉尾裕子, 有馬公伸, 菅野純, 杉村芳樹, 第 13 回日本生殖内分泌学会, 2008 年 11 月, 大阪

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

特になし

委託研究

1) AhR、AR、TR 系レポーター遺伝子測定 - AR を介する作用に関する研究 -

委託先 飯田 満 大塚製薬株式会社 診断事業部 エコスクリーン開発室

研究要旨

我々は、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター遺伝子アッセイ法を開発して、核内受容体に作用する化合物の評価を行っている。本年度は、アンドロゲン受容体(Androgen receptor, AR)に作用する化合物の評価を行った。

その結果、6化合物(prednisolone, piperine, 4-aminoazobenzene, resveratrol, mifpristone(RU486), dibenzoylmethane)に弱いARアゴニスト活性を見出した。この中で、prednisolone、および mifpristone(RU486)は、GRアゴニスト活性をも同時に示した。また、9化合物(aramite, Diphenyl-2,4,6-trimethylbenzoyl phosphine oxide, 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diaminodiphenylmethane, 2,5-Di-*t*-pentylhydroquinone, Chlornitrofen, Bicalutamide, Fluoranthene, Procymidone, Mifepristone(RU486))に弱いARアンタゴニスト活性を見出した。

本測定法は感度および精度に高い性能を保っており、低コストながら信頼性の高い測定法であると考えられた。

A. 研究目的

昨年度までに構築したARレポーター遺伝子アッセイ法を用いて70化合物(付録参照)についてアゴニスト活性、アンタゴニスト活性を測定し、化合物の特性についての知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

ARレポーター遺伝子アッセイ(安定発現細胞株)
AR-EcoScreen™細胞^①を 1×10^5 cell/mLの濃度に調製し、96ウェルプレートに90 μ L/wellで撒いた。このときの培養液はPhenol Red Free D-MEM/F12 (GibcoBRL), 5% Charcoal / Dextran treated FBS (Hyclone)を用いた。翌日(約20時間後)サンプル及び標準物質をプレートフォーマットにしたがって各ウェルに10 μ L 加えCO₂インキュベーターでさらに培養した(約20時間)。翌日、ルシフェリン溶液(Steady-Glo™: Promega)を加えて約10分間振とう混和して細胞を溶解し、ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。発光測定はARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold)を用いた。ARアンタゴニストアッセイでは、ARアゴニストである

5-alpha-dehydrotestosterone(DHT)をあらかじめ細胞培養液に加えておき(終濃度 5×10^{-10} M)、被験物質によるアンタゴニスト活性を評価した。サンプル調製プレートからAR-EcoScreen™細胞に各ウェル10 μ L 加えCO₂インキュベーターでさらに培養した(約20時間)。翌日、ホタルルシフェリンおよびウミシイタケルシフェリン基質溶液(Dual-Glo™: Promega)を測定マニュアルに従って加えて約10分間振とう攪拌して細胞を溶解し、各ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。発光測定はARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold)を用いた。

AR,GRレポーター遺伝子アッセイ(一過性発現系)

CHO-K1細胞(1×10^5 cells / ml)を96ウェルプレートに84 μ L/wellで播種した。培養メディアムは、Phenol Red Free D-MEM/F12(GibcoBRL), 5%Charcoal Dextran treated FCS(Hyclone)を用いた。翌日、プレート1枚あたり、ARレポーター遺伝子アッセイでは、pZeoSV2 AR 124ng、pIND ARE B10-luc 6.2 μ g、GRレポーター遺伝子アッセイにおいては、pcDNA GR 124 ng、pIND ARE B10-luc 6.2 μ gを希釈トランスフェクション試薬

(FuGene6 (ロッシュ) 18.6 μ l を Medium(血清無添加) 620 μ l で希釈したもの)に加えて、96 ウェルプレート各列にマルチチャンネルピペットで 6 μ l 添加し、CO₂ インキュベーターで培養した。培養 6 時間後にサンプル、及び各コントロール物質を各ウェルに 10 μ l 添加して、CO₂ インキュベーターで培養した(約 20 時間)。翌日、ホタルルシフェリン(Steady-Glo™)をマニュアルに従って添加後、10 分間振とう混和して細胞を溶解して、ルシフェラーゼ活性を発光強度として測定した。発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。

(倫理面への配慮)

本実験は、ヒト検体を用いる研究・組み換え DNA 実験には該当しないため、特に配慮は必要ないと考えた。

C. 研究結果

AR アゴニスト活性

これまでの検討から、PC10 が算出できるサンプルは AR アゴニストとして有意な転写活性があると考えられる。よって本年度の検討においても、PC10 が算出できる物質を AR アゴニストとして定義することとした。本年度測定対象とした 70 物質において、PC10、および PC20 を算出することができた AR アゴニスト活性物質について、その結果を表1 及び図 1 に示す。表 1 に示すように prednisolone (ED0812) ($PC_{20} = 1.25 \times 10^{-7}$)、piperine (ED0819) ($PC_{10} = 6.74 \times 10^{-6}$)、4-aminoazobenzene (ED0855) ($PC_{10} = 6.61 \times 10^{-7}$)、resveratrol (ED0868) ($PC_{20} = 6.21 \times 10^{-6}$)、mifepristone (RU486) (ED0869) ($PC_{20} = 2.59 \times 10^{-8}$)、及び dibenzoylmethane (ED0870) ($PC_{20} = 1.27 \times 10^{-6}$) がアゴニストとして検出された。

AR アンタゴニスト活性

AR アッセイのアンタゴニスト活性検出については、これまでの検討により、IC₂₀ が算出できて、なおかつ細胞毒性が 15%未満であれば有意なアンタゴニスト活性が検出されたと判断できる。本年度測定対象とした 70 物質において、有意な AR アンタゴニスト活性物質は 9 物質であった。その結果を表2及び図2に示す。

chlornitrofen(ED0864)、bicalutamide(ED0865)、mifepristone (RU486) (ED0869)は比較的強いアンタゴニスト活性を示した。

AR hyper-induction 活性

AR アンタゴニストアッセイ時に、ルシフェラーゼ転写活性が標準物質である DHT の最大レベルを大きく超える化合物が認められた(図3)。これら化合物単独での転写活性の上昇はわずかであった(測定結果一覧)。

AR、GR アゴニスト活性(一過性発現系)

AR アゴニスト活性を示した6化合物(図1)について、GR に対する作用を検討するために、AR および GR を CHO-K1 細胞に一過的に発現させてアゴニスト活性を測定した(図4)。

AR アゴニスト様活性を示した化合物の中で、prednisolone (ED0812)は、GR に対するアゴニスト活性を示した。また、AR 発現細胞とコントロール細胞で有意な差が見られないことから、prednisolone は GR アゴニストであることが示唆された。また、mifepristone (RU486) (ED0869)は、AR アゴニストとしての作用を示すが、GR アゴニスト作用も同時に示した。

弱い AR アゴニスト活性を示した piperine (ED0819) ($PC_{10} = 6.74 \times 10^{-6}$)、4-aminoazobenzene (ED0855) ($PC_{10} = 6.61 \times 10^{-7}$)、resveratrol (ED0868) ($PC_{20} = 6.21 \times 10^{-6}$)、及び dibenzoylmethane (ED0870) ($PC_{20} = 1.27 \times 10^{-6}$)については、一過性発現系においては、アゴニスト様作用を示さなかった。

D. 考察

(AR アゴニスト化合物)

一過性発現系における AR、GR 特異性の検討は、安定細胞の交差反応性を評価するため、GR の測定時においても AR 安定細胞構築時に用いたプラスミド pIND ARE B10-luc を用いた。

今回の AR アゴニストアッセイにおいて、低濃度でも AR アゴニスト活性が認められた prednisolone (ED0812) ($PC_{20} = 1.25 \times 10^{-7}$)は、GR アゴニストである dexamethasone (DEX) と化学構造が極めて

類似しており、測定結果(図4)からも、本化合物はGRに作用していると考えられる。AR安定発現株(CHO細胞)は、GRを強発現せずともGRアゴニストであるDEXに反応性を示した。これは、CHO細胞に内在しているGRに反応したものであると推測した。

また、AR、GR両方に対してアゴニスト様に作用したMifepristone(RU486)(ED0869)は(図4)、エストロゲン受容体のアンタゴニストとしての作用も知られており、本化合物は、エストロゲン受容体型(サブファミリー3)核内受容体に対して広く作用すると思われる。また、AR安定発現細胞系において弱いARアゴニスト様作用を示したDibenzoylmethaneは、その誘導体が日焼け止めの成分として使用されており、ERに対する作用が報告されている⁽²⁾。また、piperine(ED0819)は黒胡椒の成分であり、近年、痛み受容体Gタンパク質共役レセプターの一つであるTRPV1に対するアゴニストとしての作用が報告されている⁽³⁾。

(ARアンタゴニスト様化合物)

今回の評価で、9物質にARアンタゴニスト活性を検出した。その中で最も強いARアンタゴニスト活性を示した物質はRU486であった(図2)。弱いARアンタゴニスト作用を示した農薬chlornitrofenについては、AR、ERに対する作用が報告されている⁽⁴⁾。また、抗男性ホルモン剤bicalutamideについても、ARアンタゴニストとしての作用が報告されている⁽⁵⁾。殺虫剤procymidoneについても、ARアンタゴニストとしての作用が報告されている⁽⁶⁾。

ARアンタゴニストアッセイ時に、ルシフェラーゼの転写活性が標準物質であるDHTの最大レベルを超える化合物が認められた(図3)。このDHTと共存したときにのみ現れる協同的な活性上昇は、GRと反応する物質に多く見られるが⁽¹⁾、これらの化合物は、GRアゴニスト活性は示さなかった(図4その3)。従って、これらの化合物は、CHO細胞が持つAR、GR以外の内在性レセプターもしくは他の共役因子を介してルシフェラーゼの転写活性を非特異的に上昇させたものと考えられる。

E. 結論

我々が開発したARレポータージーンアッセイは、

内在性リガンドであるDHT等に対して十分感度よく応答した。今年度の検討では、70化合物についてスクリーニングした結果、AR機能を攪乱する可能性のある物質(アゴニスト、アンタゴニスト)の候補を選定することができた。

本アッセイ系において反応を示した化合物については、その受容体特異性を確かめるための2次スクリーニングが必要である。

文献

- (1) Araki, N., Ohno, K., Nakai, M., Takeyoshi, M., Iida, M. (2005) Screening for androgen receptor activities in 253 industrial chemicals by in vitro reporter gene assays using AR-EcoScreen™ cells. *Toxicology in vitro* 19, 831-842.
- (2) Lin, CC., Tsai, YL., Huang, MT., Lu, YP., Ho, CT., Tseng, SF., Teng, SC. (2006) Inhibition of estradiol-induced mammary proliferation by dibenzoylmethane through the E2-ER-ERE-dependent pathway. *Carcinogenesis* 27, 131-136.
- (3) McNamara, F., Randall, A., Gunthorpe, M. (2005) Effect of piperine, the pungency component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *British J. Pharmacol.* 144, 781-790.
- (4) Kojima, H., Iida, M., Katsura, E., Kanetoshi, A., Hori, Y., Kobayashi, K. Effects of a diphenyl ether-type herbicide, chlornitrofen, and its amino derivative on androgen and estrogen receptor activities. (2003) *Environmental Health perspectives* 111, 497-502.
- (5) Bohl, C., Miller, D., Chen, J., Bell, C., Dalton, J. Structural basis for accommodation of nonsteroidal ligands in the androgen receptor. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 37747-37754.
- (6) Vinggaard, AM., Joergense, ECB., Larsen, JC. Rapid and sensitive reporter gene assay for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals. (1999) *Toxicology and applied pharmacology* 155, 150-160.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(雑誌)

1.

① Takeuchi, S., Takahashi, T., Sawada, Y., Iida, M., Matsuda, T., Kojima, H

② Comparative study on the nuclear hormone receptor activity of various phytochemicals and their metabolites by reporter gene assay using Chinese hamster ovary cells.

③ Biol.Pharm.Bull.

④ 32

⑤ 195-202

⑥ 2009

2.

① Satoh, K., Nonaka, R., Ohyama, K.I., Nagai, F., Ogata, A., Iida, M.

② Endocrine disruptive effects of chemicals eluted from nitril-butadiene rubber gloves using reporter gene assay systems.

③ Biol.Pharm.Bull.

④ 31

⑤ 375-379

⑥ 2008

3.

① Takeuchi, S., Iida, M., Yabushita, H., Matsuda, T., Kojima, H

② In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron.

③ Chemosphere

④ 74

⑤ 155-165

⑥ 2008

4.

① Hari, S., Nishikawa, J.I., Horiguchi, K., Iida, M., Nishihara, T.

② Anti-androgenic activity of N-Nitrosodibenzylamine, N-Nitrosodiphenylamine and N-Nitrosodicyclohexamine.

③ J. Health Sci.

④ 52

⑤ 522-531

⑥ 2006

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

なし

表1 ARアゴニストアッセイの結果

Assay ID	chemical name	CAS No.	PC50	PC20	PC10
ED0812	prednisolone	50-24-8	-	1.25×10^{-7}	2.10×10^{-8}
ED0819	piperine	94-62-2	-	-	6.74×10^{-6}
ED0855	4-aminoazobenzene	06-09-3	-	-	6.61×10^{-7}
ED0868	resveratrol	501-36-0	-	6.21×10^{-6}	1.80×10^{-6}
ED0869	Mifepristone (RU486)	84371-65-3	-	2.59×10^{-8}	4.22×10^{-9}
ED0870	dibenzoylmethane	120-46-7	-	1.27×10^{-6}	2.18×10^{-7}

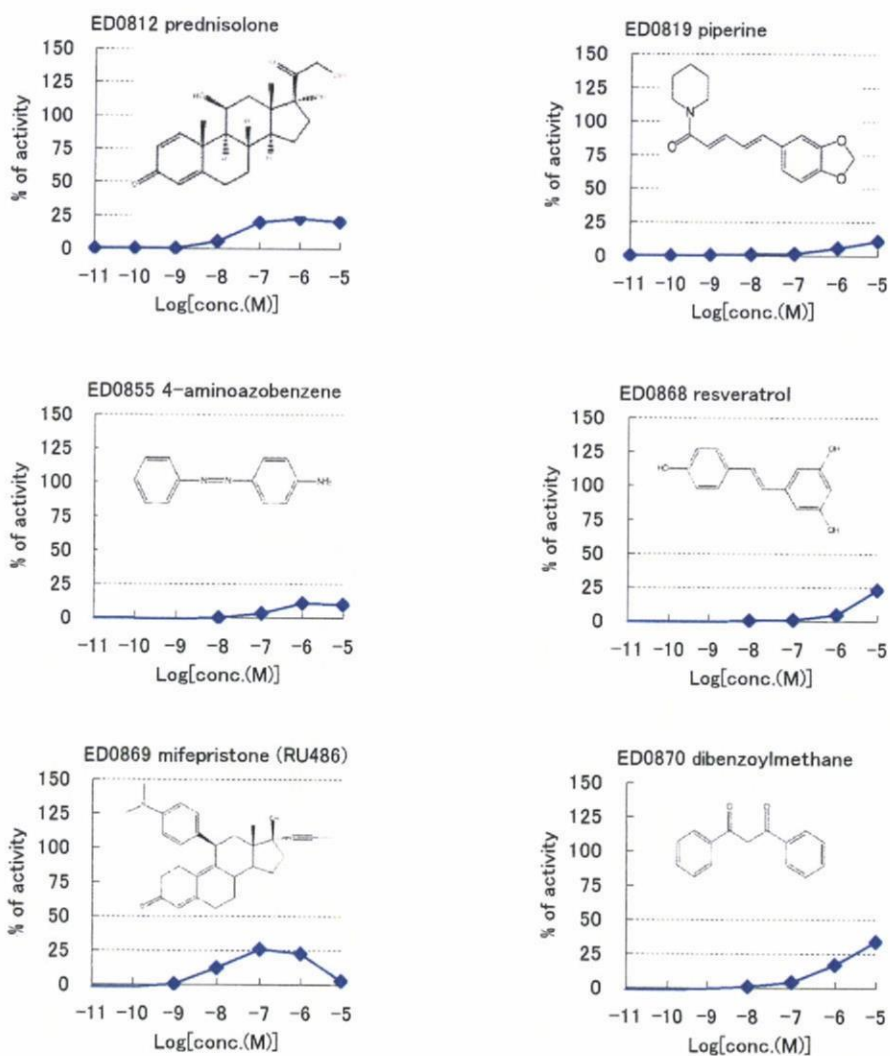
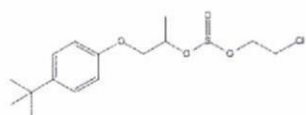
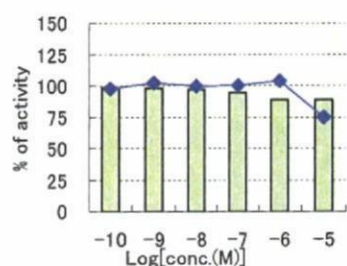


図1 ARアゴニスト活性が認められた6物質と化学構造
(縦軸 1×10^{-8} MにおけるDHTの活性を100、横軸は濃度を示す。)

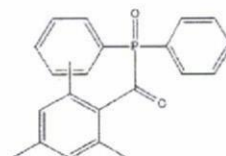
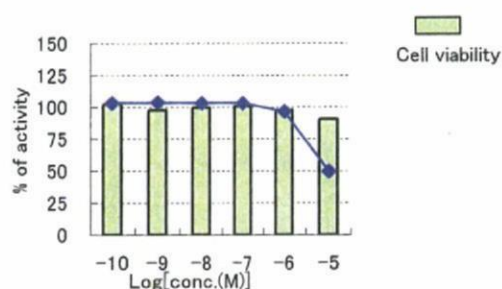
表2 ARアンタゴニストアッセイの結果

Assay ID	chemical name	CAS No.	IC50	IC20
ED0801	Aramite	140-57-8	-	6.66×10^{-8}
ED0832	Diphenyl-2,4,6-trimethylbenzoyl phosphine oxide	75980-60-8	9.77×10^{-6}	-
ED0851	2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diaminodiphenylmethan	42240-73-3	1.49×10^{-6}	-
ED0863	2,5-Di-t-pentylhydroquinone	79-74-3	7.99×10^{-7}	-
ED0864	Chlornitrofen	1836-77-7	3.61×10^{-7}	-
ED0865	Bicalutamide	90357-06-5	4.32×10^{-7}	-
ED0866	Fluoranthene	206-44-0	5.55×10^{-6}	-
ED0867	Procymidone	32809-16-8	3.45×10^{-6}	-
ED0869	Mifepristone(RU486)	84371-65-3	9.61×10^{-8}	-

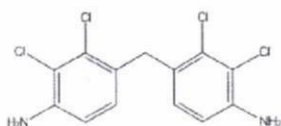
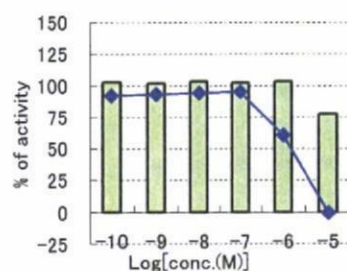
ED0801 aramite



ED0832 Diphenyl-2,4,6-trimethylbenzoyl phosphine oxide



ED0851 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diaminodiphenylmethan



ED0863 2,5-Di-t-pentylhydroquinone

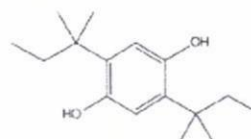
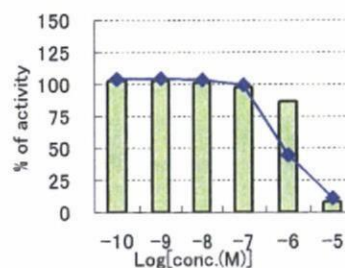


図2 ARアンタゴニスト活性とその化学構造 (その1)

縦軸は相対活性 (5×10^{-10} M における DHT の活性を 100)、横軸は濃度を示す。