

200839012A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での  
核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムの  
解明及びその評価手法にかかる総合研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

井 上 達

平成21（2009）年3月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での  
核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムの  
解明及びその評価手法にかかる総合研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

井 上 達

平成21（2009）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

形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での核内受容体作動性 化学物質等の有害性発現メカニズムの解明及びその評価手法 にかかると総合研究	1
井上 達	

### II. 分担研究報告書

#### I. プロジェクト課題研究

##### 【低用量作用に関する文献調査】

高次生命系における核内受容体作動性化学物質の低用量影響に関する検討(2)	17
関澤 純	

##### 【前立腺影響研究】

低用量核内受容体作動性化学物質による前立腺重量や発育などに対する 影響に関する研究	35
杉村芳樹	

##### 【発がんの蓋然性研究】

核内受容体作動性化学物質の発がん・加齢などに及ぼす影響の 分子メカニズムに関する研究	41
曾根秀子	

#### II. 基盤研究

##### 【生殖・核内受容体系】

核内受容体作動性化学物質の雌性生殖器官への作用メカニズムの解明	45
井口泰泉	

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	53
加藤茂明	
ヒト骨芽細胞に対する核内受容体作動性化学物質の影響に関する研究	62
笹野公伸	
<b>【免疫・感染防御系】</b>	
核内受容体作動性化学物質の免疫担当細胞やマクロファージ、 脂肪細胞への影響に関する研究	66
山崎聖美	
低用量核内受容体作動性化学物質の免疫応答制御に及ぼす影響に関する研究	69
五十嵐美德	
<b>【中枢神経・行動系】</b>	
核内受容体作動性化学物質の海馬記憶過程に及ぼす影響	72
川戸 佳	
神経系初期発生における核内受容体の機能及び核内受容体作動性 化学物質の低用量影響に関する解析	75
菅野 純	
核内受容体作動性化学物質の中枢影響に関する研究	83
粟生修司	
<b>【マイクロアレイ基盤整備】</b>	
遺伝子発現の網羅的検索とインフォマティクスの確立	87
五十嵐勝秀	
<b>【資料】</b>	
特別講演	
化学物質リスクと生殖医療	93
堤 治 医療法人財団順和会 山王病院-院長	
話題提供	
ミジンコの性決定機構の解明	94
加藤 泰彦 自然科学研究機構 岡崎統合バイオセンター	

参考資料

内分泌かく乱化学物質における低用量問題について……………95

井上 達

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………113

# 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

形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムの解明及びその評価手法にかかる総合研究

研究代表者 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

本研究は、1996年12月ロンドン郊外のWeybridgeで内分泌かく乱化学物質問題に関する最初の国際ワークショップが開催されて以来10年が経過した時点で、この問題のこれまでの蓄積と当研究課題に先行してこれまで続けられてきた研究を総括し、昨平成19年度より新たに発足し、2年目を終了しつつある。

当初の研究課題として当研究班は、性ステロイドホルモンの投与が、生殖機能のかく乱、更には生殖器系腫瘍の誘発につながる旨の既知の知見に立脚し、この問題の生物学的蓋然性をも基礎として、その生物影響の本質がホルモン受容体、ひいては核内受容体を介した化学物質の高次生命系機能に及ぶものとの仮説的認識に立って3年間の研究に着手したものである。

研究体制の骨格としては引き続き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、生殖・核内受容体系、免疫・感染防御系および中枢神経・行動系に係る生体統御システムとしての高次生命系、ならびにその他の核内受容体作動系を取り上げた基盤研究との、二部構成として研究を継続し、総括的な本年度における特筆すべき点としては、初年度に研究の推進の留意点としたホルモン様化学物質の種々の核内受容体群間での作用の相互修飾や生殖器系や本研究で取り上げてきた高次生命系以外の諸臓器（肝、脂肪、骨組織、マクロファージ、胎盤等）でのホルモン受容体作動臓器としての新たな役割が医学生物学の多方面で認知され大きなトピックとなりつつあること、併せて胎児期・新生児期や思春期などの形態形成期での不可逆的高感受性の問題に社会的関心も深化しつつあることなどである。

本研究のテーマは、いわゆる内分泌かく乱化学物質に限定せず、核内受容体作動性化学物質の生体影響研究として、核内受容体フィードバック系の認められる高次生命系全般を対象とし、そこにおける蓋然性としての有害性発現メカニズムの解明を研究

目的とし、ここから導き出される標的分子と応答遺伝子の相互関係によって総合的な評価手法の開発を行うことを目標とすることとしている。

[プロジェクト課題研究]では、引き続き[低用量作用に関する文献調査]の一環としてビスフェノール A (BPA)に関する文献を中心に検索を続けた。結果、新たに 17 報が選別された。またこの NTP の環境健康リスク専門家 (CERHR) の BPA レビュー結果についても取り上げた。[前立腺影響研究]については BPA 特異的発現遺伝子 SF1 の基底上皮限局性発現を見出した他、[発がんの蓋然性研究]については、BPA がヒト乳腺上皮細胞の増殖を用量依存的に促進したこと、ならびにこれに伴う変動遺伝子群 86 個を定量的に同定した。

また、[基盤研究]においては、[生殖・核内受容体系]では、臨界期における核内受容体作動性化学物質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として、出生直後のマウスに合成エストロゲン、ならびにエストロゲン受容体 (ER)  $\alpha$  および  $\beta$  の特異的リガンドを投与し、関与する受容体サブタイプを検討した。核内レセプターの転写制御機能の分子レベルでの解析については男性、女性ホルモンレセプターおよびダイオキシンレセプターに相互作用する複合体を解析した。また BPA の Steroid Xenobiotic Receptor (SXR) を介した骨芽細胞に対する影響について細胞増殖作用の如何についての検討が行われた。[免疫・感染防御系]については核内受容体に作用する化学物質がマクロファージなどの免疫担当細胞ならびに脂肪組織細胞に及ぼす影響、T ヘルパーリンパ球前駆細胞の分化に及ぼす影響の 2 点について研究した。[中枢神経・行動系]では、マウス胎児神経幹細胞初期培養系における増殖、分化への影響を検討した。海馬スライス中の神経スパイン形成への影響ならびに中枢影響の行動およびニューロン変化に基く評価法の確立に向けての研究を行った。なお [マイクロアレイ基盤整備] 課題として破骨細胞特異的 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と Androgen 受容体変異体 (T877A) ノックインマウスにおける前立腺癌増悪に関わる遺伝子のそれぞれ網羅的検索解析を行った。

#### 研究分担者

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  
五十嵐美徳 国立がんセンター研究所  
がん宿主免疫研究室 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  
川戸 佳 東京大学大学院総合文化研



究科広域科学専攻 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  
一毒性部 部長  
笹野公伸 東北大学大学院医学系研究科医  
科学専攻病理学講座 教授  
杉村芳樹 三重大学医学部泌尿器科学  
教授  
関澤 純 徳島大学総合科学部 教授  
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  
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、核内受容体作動性の生殖・核内受容体系、免疫・感染防御系および中枢神経・行動系などの高次生命系における発現遺伝子シグナルのかく乱を指標として形態形成期や思春期にある高感受性集団に想定される影響について各々の系における影響メカニズムを統一的に理解し、もって評価法の確立にむけて研究を推進することにある。対象器官としては核内受容体の分布に応じて肝、心、血管組織、脂肪織をはじめマクロファージ系へも対象を拡張し、実験動物におけるこれまで観察された表現型を内分泌かく乱症候群として位置づけ、化学物質の惹起しうる有害性評価を念頭におきつつ、安全管理へ向けの方策の確立を目指した。

[プロジェクト課題研究]の個別課題と

しては[低用量作用に関する文献調査]では核内受容体作動性化学物質 BPA の低用量影響を中心に 2007 年 12 月 1 日以降 2008 年 11 月 23 日までに公表された BPA の影響報告を生殖・発生毒性を中心に評価した。また[前立腺影響研究]では、成獣マウスでの低用量 BPA 暴露による前立腺基底上皮の異常増殖機構の解明に向けて遺伝子発現を中心に研究を行い、[発がんの蓋然性研究]では BPA の発がん促進作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、BPA の老化への修飾を念頭におき正常ヒト乳腺上皮細胞 (HMEC) における影響を調べた。

[基盤研究]では、[生殖・核内受容体系]については、臨界期での合成エストロゲン (DES) 曝露により誘起されたマウス乳腺上皮細胞のエストロゲン非依存の細胞増殖に関与する遺伝子のクロマチン状態を明らかにするため、新生児期での DES の曝露による標的器官の遺伝子発現を探索することとし、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課題では、性生殖作用を担う性ステロイドホルモン作用へのかく乱効果を、ホルモンレセプターの転写制御機能について調べることにした。ヒト骨芽細胞影響への研究では、このものにおける BPA の aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介した影響を中心に検討することとした。[免疫・感染防御系]では、核内受容体に作用する化学物質がマクロファージなどの免疫担当細胞に及ぼ

す影響を明らかにするため、BPA のマクロファージへの機能的影響の肥満や脂肪肝の発症に与える影響、ならびに、BPA の NKT 細胞の T ヘルパー (Th) 1/Th2 の産生バランス異常の誘導機構の解明のため、BPA の Th2 優位の状態の誘導機構を明らかにすることを目的として研究を行った。[中枢神経・行動系]では、 $17\beta$ -エストラジオール神経細胞生育における可塑性に焦点をあて、エストロゲン受容体 ER  $\alpha$ , ER  $\beta$  の下流の蛋白質リン酸化酵素経路を検索するとともに、BPA の妊娠期、周産期、授乳期曝露の各種行動に及ぼす影響の検討を、またそれらの神経行動学的評価法に向けての検討を目的とした。[マイクロアレイ基盤整備]では、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した。

## B. 方法

各々の研究方法は、個別分担報告書に述べられているが、概略は以下の通りである。

[プロジェクト課題研究]の[低用量作用に関する文献調査]については、2007年12月1日以降2008年11月23日までに公表されたビスフェノールAの影響報告を、2007年12月1日以降検索したヒット文献の原報を収集し内容を検討した。影響の標的は生殖・発生毒性の再評価とし検討した。結果を整理して、総説論文

にまとめた。[前立腺影響研究]については BPA 経胎盤投与群に特徴的な仔雄マウス泌尿生殖洞の形態組織学的変化と遺伝子発現変化を解析した。すなわち、妊娠13~16日目の間、雌C57BL/6マウスに対して、トコフェロール除去済みのコーンオイルに溶解した BPA (20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) もしくは DES (0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) を強制胃内投与し、出生前後 (E17~P1 および P5) の泌尿生殖洞 (UGS)、小脳、心臓、腎臓、精巣 (雄)、卵巣 (雌) を回収した。形態組織学的解析には、前立腺が発生する前後 (E17 と P1) の雄 UGS を用いた。網羅的遺伝子発現変動解析については (五十嵐勝秀班員に依頼)、Percellome 手法を適用した Affymetrix 社の Genechip システムによる解析を実施した (雄 UGS)。さらに、RT-PCR、リアルタイム PCR を用いて、BPA 曝露群で特徴的に発現変動した遺伝子を経時的、定量的に解析することで、BPA に特徴的な作用メカニズムを推考した。[発がん蓋然性研究]については、HMEC の培養には、HMEC (6 世代目) を Lonza 社の乳腺上皮細胞用増殖培地を用いて培養した。8 世代 - 9 世代間に 0.5%ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  M の BPA と、陽性対象として  $10^{-9}$  M の E2 を 7 日間曝露した。溶媒に用いた DMSO のみを曝露したものをコントロールとした。その後、細胞は BPA を含まない培地で培養し、11 世代目と 14 世代目に RNA を抽出した。ヒト乳がん組織において選択的に発現している遺伝子について、定

量的リアルタイムPCRにより発現量を測定した。さらに、この13世代目細胞をマトリゲルコートした培養皿で3次元培養して増殖能を調べた。また細胞老化の指標のひとつであるHP1 gammaを免疫細胞組織染色法により染色し、核が陽性となる細胞中の陽性凝集体の数を測定した。

[生殖・核内受容体系]では、出生直後から5日間、C57/BL6系雌マウスにDES 2.5  $\mu\text{g/g bw}$ を投与した。生後56日目に卵巣を摘出、生後70日目にAffymetrix社のGeneChipを利用して、遺伝子発現の比較を行った。曝露群と対照群において発現に差が見られた遺伝子について、腫からクロマチン画分を抽出、DNAを断片化した後、ヒストン修飾の特異抗体(アセチル化ヒストンH3、メチル化ヒストンH3抗体等)を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)法を行った。その免疫沈降産物を遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRにより、ヒストン修飾の有無を検出し、遺伝子発現との関連性を明らかにした。また、男性ホルモン、女性ホルモンレセプターおよびダイオキシンレセプターに結合する転写共役因子複合体の同定及びダイオキシンレセプターとのクロストークの検討では、これらレセプター群に結合する転写共役因子複合体を、生化学的に精製及びその構成因子群を同定した。また、複合体としての機能を*in vitro*系で評価した。さらに、ダイオキシンレセプターとの機能的相互作用を転写レベルで検討するとともに、新たな材料として脂肪

細胞を用いた。ヒト骨芽細胞株及び骨芽細胞様細胞に対するBPA及び3-MCの影響については、以下の方法で実験を行った。

1) 化合物: Bisphenol A、3-methylcholanthrene(以上、和光純薬工業)。溶媒はDMSO(和光純薬工業)を用いた。2) ヒト正常骨芽細胞・骨芽細胞様細胞: ヒト正常骨芽細胞 hFOB 1.19(ATCC, CRL-11372)及び骨芽細胞様細胞 MG-63(東北大学医用細胞資源センター)を使用した。(以降、ヒト正常骨芽細胞及び骨芽細胞様細胞を骨芽(様)細胞と略す) 3) BPA及び3-MCの骨芽(様)細胞への影響: hFOB及MG-63に対し、BPA(0.01~1  $\mu\text{M}$ )及び3-MC(0.01~1  $\mu\text{M}$ )を添加し、72時間後に定法に従ってRNAを抽出し、CYP1A1の定量的PCR(LightCycler, Roche)を行った。同様にBPA 100nM及び3-MC 100nMをそれぞれhFOBに添加し、マイクロアレイ解析に使用した。マイクロアレイは human 1A(Agilent Technologies)を、解析には GeneSpring(Agilent Technologies)をそれぞれ使用した。4) ヒト骨組織におけるAhRの発現: Anti-AhR(BIOMOL International, L.P.)抗体を用い、ヒト骨組織5例での検討を行った。また、コラーゲン・ステイン・キット(コラーゲン技術研修会)を用いたコラーゲン染色を行った。

[免疫・感染防御系]では、マクロファージ、脂肪組織の検索ではC57BL/6マウスに総エネルギー比30%(30en%)の脂肪を含むエサを与え、さらにビスフェノー

ル A(BPA) を  $0.005 \mu\text{g}$ 、 $0.05 \mu\text{g}$ 、 $0.5 \mu\text{g/ml}$  になるように飲料水に加え、10 週間および 20 週間投与し、肝臓、脂肪組織を中心に調べた。すなわち、C57BL/6 マウス (♂ 7 週齢) に脂肪 30en% のエサを与え、さらに、コントロールにはエタノール 0.01% の飲料水を、ビスフェノール A(BPA) 投与群には、BPA  $0.005 \mu\text{g}$ 、 $0.05 \mu\text{g}$ 、 $0.5 \mu\text{g/ml}$  になるように飲料水に加え (エタノール最終濃度 0.01%) 投与した (各群  $n=4$ )。投与開始から 10 週および 20 週後に解剖し、肝臓、白色脂肪 (精巣周囲脂肪、後腹壁脂肪、腸間膜脂肪、皮下脂肪)、褐色脂肪、筋肉、腎臓、脾臓、胸腺重量、肝臓などのトリグリセライド (TG) 量について調べた。さらに、Real-Time PCR を用いて各組織における mRNA 発現量について調べた。また、BPA の NKT 細胞の Th1/Th2 サイトカイン産生バランス異常が抗原提示細胞 (APC) によるのかの如何については、次の要領で *in vitro* で解析した。すなわち、BALB/c マウス (雄 5~6 週齢) の脾細胞を  $\gamma$ -galactosylceramide ( $\gamma$ -GalCer) および BPA ( $10^{-6}$ ~ $10^{-4}\text{M}$ ) を加えて培養した。また、抗原提示細胞 (APC) を刺激する目的で LPS を加えて BPA と培養した。培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-12 のサイトカインの産生について ELISA 法にて解析した。

[中枢神経・行動系] では、ラット海馬のスライスによる神経スパインの密度の増減解析では、1) ラット海馬のスライスを用いて、単一神経に蛍光色素をマイ

クロインジェクションして可視化し、神経スパインの密度の増減に対する内分泌かく乱物質の急性作用を画像解析した。

2) 質量分析 LC-MS/MS を用いてラット海馬内の BPA 濃度を定量する。海馬から抽出した BPA は、検出感度を高めるためにピコリノイル誘導体化を行った。

3) 海馬スライスでエストロゲン受容体や内分泌かく乱物質の受容体の分布を観察した。

マウス胎児神経幹細胞の研究では、C57BL/6 マウス妊娠 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 ( $10\text{ng/ml}$ ) 及び EGF ( $10 \text{ng/ml}$ ) を添加し、10cm シャーレ (ヌンク社) に  $10^6$  個/6ml の密度で生細胞を播種した。また、免疫染色では、細胞を 4% パラフォルムアルデヒドで 15 分間固定後、ウサギ抗 GFAP 抗体 (DAKO 社) にて蛍光免疫染色を行った。同時に細胞核をヘキスト色素にて染色した。また、行動評価では、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。さらに 4 匹のラットをオープンフィールドに置き、群れ行動を評価し

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。[マイクロアレイ基盤整備]では各班員との協議の下、共同研究を行い、組織もしくは細胞の検体の供与を受け、DNAマイクロアレイ解析データ解析結果を班員にフィードバックした。

(倫理面への配慮)

実験すべて、個々の研究機関の動物実験に関する指針に準拠して行われた。

### C. 結果

本研究の共通課題として位置づけられる低用量における核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムについて本報告書の資料欄に総論として添付した。第2年度における本研究班からの英文国際誌による研究成果の発信はEmbo JournalやJBCあるいはEnvironmental Health Perspectiveなどのいわゆる高い引用指数を有する学術誌を含む計90報であった。この他ミシガン州立大学における核内受容体関連物質研究のシンポジウムへの招聘をはじめ当研究班からの国際的学術講演会等での参画には注目すべき結果がみられた。

個別の研究成果としては分担研究報告書に詳細が紹介されているがその概略は、[プロジェクト課題研究]では、[低用量作用に関するBPAの文献調査]に関しては156報の報告を得た。そのうち特に低用量影響調査の顕著な20報を選別し分担報告中に掲載した。これによれば試験の条件、

観察内容、統計解析にそれぞれ問題が指摘される場合もあるが、①少なくとも20報(うち19報では最小影響量は $200\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 以下、10報では $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 以下)が従来観察されていたよりもはるかに低用量で何らかの影響を示していること、②とりわけそれらが周産期曝露による神経行動毒性影響または性分化の異常ないしは生殖器における形態学的な影響であった。[前立腺影響研究]ではBPA曝露群の間質では、Ki-67 indexと筋線維芽細胞のマーカーであるテネイシンCの占拠率が有意に増加していることを見出した。BPA曝露群に特徴的な遺伝子変化としてDAX-1、Ad4BP/SF-1、CYP群の発現上昇を認め、さらにERR $\gamma$ 発現細胞が存在する臓器との関連が見出された。なおこの研究ではアレイおよび定量PCRによる遺伝子発現解析により、BPA曝露群に特徴的な遺伝子変化として、雄UGSでは性分化に関わるDAX-1、Ad4BP/SF-1、CYP群の発現上昇を認めている。[発がん蓋然性研究]については、昨年度までに、BPAの曝露が、用量依存的に細胞を増殖させ、特に、S期の細胞が増加することを認めている。今年度は、さらに、HP1 gamma陽性細胞の割合や陽性凝集体の数を調べたところ、有意な増加が認められた。同時に、11世代目のHMECについて、ヒト乳がん組織において選択的に発現している86個の遺伝子について、定量的リアルタイムPCRにより発現量を測定したところ、BPAのいずれの濃度においても曝露によ

り増加した遺伝子は、2倍以上の Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2, COX-2/COX2)、1.2倍の Epidermal growth factor receptor (EGFR) の2遺伝子のみであった。一方、発現が低下した遺伝子は、Cyclin-dependent kinase A2 (Cyclin A2)、Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (Ki-67)、Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)、Tumor suppressor protein p53 (p53) 及び、Topoisomerase II alpha (TopoII) であった。その他、細胞周期関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子の発現量にも変動が認められている。なお13世代目細胞をマトリゲルコートした培養皿でその増殖能の再現性を調べたところ、BPA曝露群では細胞集塊あたりの細胞数(コロニーの大きさ)が対象に比べ有意に増大していた。

[基盤研究]では[生殖・核内受容体系]に関しては、臨界期である出生直後にDESを曝露した時のみ、エストロゲン非依存的に膺上皮細胞の増殖が認められた。更にDES未曝露と曝露マウスの膺において、遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイにより取得した。更にG protein-coupled receptor 87 (Gpr87)のヒストン修飾状態を調べた。RT-PCR法によりGpr87の遺伝子発現がDES曝露マウスにおいて増加していたので、次に、ヒストンH3の修飾を検出できる特異抗体を用いてChIP法を行い、免疫沈降物より特異的なプライマーを用いてPCRでこれ

を検出した。ChIP法にはアセチル化ヒストンH3(K9)抗体:AcH3、ヒストンH3トリメチル(K4)抗体:H3K4me3、そしてヒストンH3トリメチルK9抗体:H3K9me3を用いた。DES曝露マウスで発現が増加したGpr87は抗-AcH3抗体と抗-H3K4me3抗体で検出でき、抗-H3K9me3抗体では検出されなかった。すなわち、Gpr87遺伝子は9番目のリジンがアセチル化、4番目のリジンのトリメチル化が認められ、9番目のリジンのトリメチル化は認められなかった。これらのことより、Gpr87遺伝子の発現増加は、ヒストン修飾状態の変化をともなっていることが示唆された。エピジェネティクスの基盤はクロマチン構造に基づいた遺伝子発現制御であり、DNAメチル化やヒストン修飾の状態を解析することの重要性が明らかになった。性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子の研究では、このものを同定するとともに、ダイオキシンレセプターが女性ホルモンレセプターの蛋白分解を促進することを見出している。さらに脂肪細分化制御におけるダイオキシンレセプター複合体も同定された。すなわち、この研究では 1) ホルモン活性を規定するレセプター転写共役因子の検索及び同定 2) ダイオキシンレセプターを介したエストロゲン作用かく乱の分子メカニズム 3) ダイオキシンレセプターを介した脂肪細胞分化制御機構 4) ショウジョウバエを用いた男性、および女性ホルモンレセプター転写共役因子の機能解析など

からなっており詳細については個別分担報告を参照されたい。骨細胞影響研究では、SXR を安定発現した hFOB 及び MG-63 では BPA の細胞増殖作用が強く認められた。これを用いて BPA 及び 3-MC の骨芽細胞への影響をみたところ CYP1A1 は 3-MC の添加により MG-63 では選択的に発現が増強していた。hFOB における結果と比較してマイクロアレイの解析を行っている。

[免疫・感染防御系]の研究では BPA 投与群では脂肪組織重量については、最終的には差が認められなかったが肝 TG 量が増加しており、TG 合成にかかわる核内受容体 PPAR $\gamma$  の標的遺伝子で肝への肝臓への脂肪酸流入を行う CD36 の発現が増加していた。(以上は PPAR $\gamma$  が preosteoblast の増殖を抑制し脂肪細胞の増殖に振り向けるとする加藤などの最近の研究結果に合致する結果に他ならない。) つぎに BPA の T 細胞分化に与える影響に関する研究では BPA ( $10^{-8}$ ~ $10^{-5}$ M) は *in vitro* で Th2 優位なサイトカイン産生を誘導したが、この Th2 優位な NKT 細胞のサイトカイン産生は、APC に非依存性であった。BPA は *in vivo* 及び *in vitro* で  $\beta$ -GalCer 刺激による NKT 細胞のサイトカイン産生を IL-4(Th2) 優位にする。BPA ( $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$ M) は  $\beta$ -GalCer 存在下では Th1 反応を抑制する IL-10 あるいは Th1 反応を促進する IL-12 の産生に影響を及ぼさなかった。

[中枢神経・行動系]では、C57BL/6 マウス妊娠 14.5 日の胎児終脳より分離した神経上皮細胞はニューロスフェア形成後、

17-beta-estradiol ( $E_2$ )、Bisphenol A(BPA)、Genistein(GEN)、或いは Daidzein (DAI) の曝露下で増殖促進作用を認め、他方グルココルチコイド受容体アンタゴニストの Mifepristone の存在下で増殖阻害を示した。この外 Dexamethasone (DEX) の GFAP 発現促進効果についても示唆的效果を観察した。次に成獣ラットの海馬スライスを用いた研究では、10 nM ビスフェノール A(BPA)、1 nM DES、10 nM エストラジオールが 2 時間以内に、CA1 領域の神経の樹状突起上のスパイン (シナプス後部) 数を増加させることを画像解析で確認した。スパインの形態に応じた分類により頭部の直径の細かいスパインで増加傾向が認められた。これらスパインをピコリノイル誘導体化することによって質量分析の感度を大幅に改善することに成功し、海馬の BPA 濃度を定量した結果、14.6 ng/mL (64 nM) の値を得た。BPA の high affinity 受容体として Estrogen-related receptor protein  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) の海馬での発現を見出し、この ERR $\gamma$  が脳で海馬に特に多く、視床下部に少ないことを見出した。行動研究では環境中に存在する核内受容体作動性化学物質はオープンフィールド行動や情動行動、体重に対して、ラットでは性依存的・時間非依存的に影響を及ぼすが、マウスでは性非依存的・時間依存的に影響を及ぼすことが明らかになった。またこの影響がモノアミン系を介する作用機序を有することが示唆された。

最後に[マイクロアレイ基盤整備]では加藤茂明班員と、肝臓における絶食シグナル

依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関する ChIP on Chip 解析を実施している。工夫の詳細については分担研究書を参照されたい。

#### D. 考察

[プロジェクト課題研究]でおもに考察される点は、[低用量作用に関する文献調査]では(1) ビスフェノールAの低用量曝露による影響の可能性について多くの試験がなされ、各国国際機関での健康リスクの蓋然性についての検討が進んでおり、これらに対して、調和のとれた対策を目指して生物学的メカニズムに沿った検討が行われることが必要と考えられる。

[前立腺影響研究]では、EER $\gamma$ の関与の有無をはじめ詳細な分子レベルでの解析を行う必要がある。[発がんの蓋然性研究]では、HMECを用いた実験システムにおけるBPAの影響を観察したが、BPAの細胞周期の停止やアポトーシスの誘発は比較的弱く、乳がん関連遺伝子と考えられている標的についても、顕著な影響は認められなかった。

[基盤研究]では、[生殖・核内受容体系]については、新生児期マウスへのDESの曝露実験では、今回はGpr87遺伝子に着目してヒストン修飾状態をChIP法により解析したところ、遺伝子発現を活性化するヒストン修飾が確認できた。今後は、DNAマイクロアレイにより得られた遺伝子発現プロファイルのデータをもとに、曝露による影響とDNAメチル化状態との

関連をChIP on chip法で解析することで、不可逆的に増殖するメカニズムに迫ることができると思われる。性ホルモンレセプターの転写制御能研究では、性ホルモンレセプターに、数多くの転写共役因子及び複合体が結合することが明らかになりつつあり、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事実から、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る。またダイオキシンレセプターの脂肪細胞における転写制御機構の解析から、その作用に組織特異的転写制御の存在が示唆される。骨影響研究では、BPAのSXRを介した作用を初めて報告した本研究では、ラットの前骨芽細胞様細胞(ROB、UMR-106)を標的とし、その応答遺伝子であるCYP1A1の発現、BPAによるAhRの発現、その結果としておこるAhRによる骨芽細胞特異的变化などがからみあった状況にある。

[免疫・感染防御系]では、内分泌かく乱影響のひとつの可能性としてのエンドポイントをメタボリックシンドロームにおいて検討したところ、肝における遺伝子発現変化の特徴は、脂肪酸合成を制御する転写因子SREBP-1c及びその標的遺伝子群の発現減少と脂肪合成を制御する転写因子PPAR $\gamma$ の標的遺伝子であり脂肪酸流入をつかさどるCD36の発現増加であることが明らかになった。今回の結果では、肝の脂肪量の増加にもかかわらず、SREBP-1cの活性が低下しており、メカニ



ズムが不明の点があるが、この点を明らかにすることが必要である。また、核内受容体作動性化学物質が免疫系のTh1/Th2バランスに関する研究では、BPAによってNKT細胞のサイトカイン産生がTh2優位になることによりNKT細胞への影響、あるいは抗原提示細胞APCなどを介して間接的にNKT細胞のTh1/Th2バランスの影響を検討したが、種々の可能性が浮上し、今後の検討に委ねられた。

[中枢神経・行動系]では、神経肝細胞の増殖と分化に標的をおいたBPAの研究では、検討した最低濃度32PM以上で増殖促進作用が認められ1  $\mu$ Mでも増殖阻害が認められなかった。この点について、E2でも同様であり、BPAとE2の活性は受容体結合でみる限り、同等の濃度で作用したものと推定され、これについて確認を進めることが必要である。なお、GENおよびDAIの影響を観察したが、ここで認められた高濃度での増殖抑制は、これらの披験物質のチロシンキナーゼ阻害によるものと想定された。成獣ラットの海馬スライスを用いた研究については海馬内に64 nMのBPAが存在する事実と、10 nMの外部からのBPAの付加によるスパインの増加に乖離があるかに認められる。これについては、調製した海馬スライスが2時間以上、BPAを含まないACSFで洗い流されているためであると推察した。いくつかのこの立場からの検討は整合性がよいものと判断される。行動については、結果で述べたとおり、マウスにおけるBPAの行動影響に性差

が認められなかった。近年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核影響がアンドロゲン受容体を介する抗アンドロゲン作用である可能性を考慮に入れて今後の検討を進める。

[マイクロアレイ基盤整備]では、加藤班員との共同研究において、PHF2 複合体が絶食条件依存的に代謝関連遺伝子群のプロモーター領域にリクルートされることがゲノムワイドに確認された。また、基盤技術改良として、TLAD 法がChIP 後のDNA の増幅方法として使用可能であることを確認出来た。今後のChIP on Chip 解析ではTLAD 法を用いることでノイズの少ないデータが得られ、解析精度が増すことと考えられる。

## E. 結 論

概略ならびに結果と考察の項でもふれたが以下に個々の研究の結論を簡潔に述べる。すなわち、[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]では、2007年11月23日以降2008年11月23日までの文献調査により得られた156件の影響報告を生殖・発生毒性を中心に評価した。また[前立腺影響研究]では、BPA 曝露に特徴的な遺伝子変化として性分化関連遺伝子群の発現上昇を見出した。見出された BPA 曝露に特徴的な遺伝子変化は、ERR  $\gamma$  の転写活性を介したものか否

かは不明であり、今後、分子レベルでの詳細な解析が必要と考えられた。[発がんの蓋然性研究]では、ビスフェノール A (BPA) の正常ヒト乳腺上皮細胞 (HMEC) における、細胞増殖・細胞老化への影響を調べた。HMEC の増殖や mRNA 遺伝子発現レベルでの影響を調べると、BPA の曝露により、増殖に関連した遺伝子の有意な誘発が認められた。今後、この増殖促進作用を確認するために、SCID マウスへの移植および、妊娠マウス曝露による仔の乳腺末梢管の肥厚とどのような関連があるか検討する予定である。

[基盤研究]では、[生殖・核内受容体系]については、エストロゲン作用物質である DES の臨界期のマウスへの影響を、未曝露マウスと比較し、発現が増加する遺伝子を DNA マイクロアレイにより探索した。その中の G protein-coupled receptor 87 遺伝子はヒストン H3 のアセチル化とメチル化修飾を受けていた。DES 曝露による影響がクロマチン構造を変化させ遺伝子発現の増加を引き起した可能性が高いことが明らかとなった。今後は DNA メチル化状態との関連性を加えた詳細な解析が必要である。また、性ホルモンレセプターの転写制御能研究では、レセプター相互作用因子の観点から検討した。すなわち、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た。また、ダイオキシンレセプターの会合による新たな性ホルモンかく乱作用の分子機構を明らかにした。これら機構は

内分泌かく乱物質の標的分子候補である可能性が考えられた。骨影響研究では、骨芽細胞においても機能的な AhR が発現することが明らかとなった。すなわち、今後、内分泌攪乱化学物質の主な標的組織 (生殖器系、神経系、免疫系など) への影響と骨組織への影響について、それらの作用機序を比較・検討していくことも重要であると考えられる。

[免疫・感染防御系]では、10 週及び 20 週間 BPA 投与により、肝臓 TG 量が増加した。摂取した BPA が脂肪肝発症に関与していることが示された。すなわち、BPA 投与群、特に BPA 0.05  $\mu$ g/ml 投与群では、肝臓 TG 量が増加しており、肝臓においては、核内受容体 PPAR  $\gamma$  の標的遺伝子 CD36 mRNA の発現が増加していた。BPA のような化学物質を意図せず摂取し、脂肪肝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あるのではないかと考えられる。また核内受容体作動性化学物質が免疫系の Th1/Th2 バランスに関する研究では、BPA は NKT 細胞に直接的に影響を及ぼし、Th2 優位な免疫応答を誘導し、Th1/Th2 サイトカインバランスを攪乱したと考えられる。BPA は Th1/Th2 バランス制御に重要な役割を果たす NKT 細胞を Th2 優位なサイトカイン産生に偏らせるが、この反応は APC に対する影響ではなく、むしろ NKT 細胞に直接的に影響していることが示唆された。

[中枢神経・行動系]では、これまでの研究により、神経幹細胞に対し核内受容

体作動性物質が様々な作用を示すことを示した。BPA については、それが低濃度でも増殖促進作用を示すことがわかり、今後、分化に対する影響の有無を早急に明らかにし、脳に対する作用、特に神経系初期発生における低用量影響を考察する。BPA は ERR $\gamma$  (Estrogen receptor related receptor gamma) に結合することが報告されているがこの増殖作用との関係は現段階では不明である。成獣ラット海馬スライスにおける *ex vivo* 研究では BPA は 10nM という低濃度で1時間程度で、成獣ラットの海馬神経細胞のシナプ스에 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。BPA の海馬内濃度は、64 nM と高かった。スパインへの作用は一旦スライスから BPA を抜いてその後 10nM BPA を添加した回復作用を測定したものである。なお海馬シナプスにも BPA の受容体 ERR $\gamma$  が存在していた。さらに行動研究では、核内受容体作動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。ラットおよびマウスで明確な種差があり、ラットでは性依存的・時間非依存的に作用し、マウスでは性非依存的・時間依存的に作用することが明らかになった。評価対象に応じて動物種を選択することでより効率の良い評価ができることが期待される。

[マイクロアレイ基盤整備]では、網羅的ゲノム解析手法を用いることで、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おり、今年度も有用な結果を得ることが出来た。すなわち、網羅的ゲノム解析手法は、発現解析として数万の遺伝子の発現を迅速に検討することに加え、クロマチン免疫沈降と組み合わせることで転写因子やヒストン修飾、DNA メチル化などのクロマチン制御メカニズムを網羅的に解析することを可能とす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. 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, Tsuboi I, Kitada K, Igarashi K, Kodama Y, Kanno J, Yoshida K, Dainiak N, Inoue T. Comparison of murine gene expression profiles between spontaneous and radiation-induced myelogenous

- leukemias: Stochastic and probabilistic expression variances in the former vs. radiation-specific expression commonalities in the latter. *Exp Hematol.* 2009. (in press)
- Hirabayashi Y, Inoue T. Aryl hydrocarbon receptor biology, xenobiotic responses in hematopoietic progenitor cells. *Biochem Pharmacol* doi. 2008 Sep 30; 10: 1016. (Epub ahead of print)
- Tsuboi I, Hirabayashi Y, Harada T, Koshinaga M, Kawamata T, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Role of hematopoietic microenvironment in prolonged impairment of B cell regeneration in age-related stromal-cell-impaired SAMP1 mouse: effects of a single dose of 5-fluorouracil. *J Appl Toxicol.* 2008; 28: 797-805.
- Tsuboi I, Hirabayashi Y, Harada T, Hiramoto M, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Predominant regeneration of B-cell lineage, instead of myeloid lineage, of the bone marrow after 1 Gy whole-body irradiation in mice: role of differential cytokine expression between B-cell stimulation by IL10, Flt3 ligand and IL7 and myeloid suppression by GM-CSF and SCF. *Radiat Res.* 2008; 170: 15-22.
- Suzuki H, Inoue T, Matsushita T, Kobayashi K, Horii I, Hirabayashi Y, Inoue T. In vitro gene expression analysis of nephrotoxic drugs in rat primary renal cortical tubular cells. *J Appl Toxicol.* 2008; 28: 237-24.
- Suzuki H, Inoue T, Matsushita T, Kobayashi K, Horii I, Hirabayashi Y, Inoue T. In vitro gene expression analysis of hepatotoxic drugs in rat primary hepatocytes. *J Appl Toxicol.* 2008; 28: 227-36.
- Hirabayashi Y, Inoue T. Principles of data-mining in toxicogenomics. In: Sahu SC, ed. *Toxicogenomics: A Powerful Tool for Toxicity Assessment.* Hoboken, NJ John Wiley & Sons, Ltd. 2008; 57-84.
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, Inoue T. Benzene-induced hematopoietic 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.* 2008 Aug; 73(1 Suppl): S290-4.

## 2. 学会発表

井上 達、壺井 功、北田邦夫、五十嵐勝秀、児玉幸夫、菅野 純、吉田和子、平林容子. マウス放射線誘発骨