

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

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

研究分担者 杉村 芳樹 三重大学大学院医学系研究科・腎泌尿器外科学・教授

研究要旨

低用量ビスフェノール A (BPA)曝露による成獣マウス前立腺基底上皮の異常増殖機構解明に向けて、前立腺の発生母体である泌尿生殖洞に着目し、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、特に性分化関連遺伝子群の発現変動を解析した。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を見出した。BPA 曝露による性分化関連遺伝子群の発現上昇は ERR $\gamma$ 発現臓器でのみ認められたことから、前立腺のみならず、ERR $\gamma$ 発現臓器において不可逆的影響を示す可能性が示唆された。

A. 研究目的

低用量ビスフェノール A (BPA)曝露による成獣マウス前立腺基底上皮の異常増殖機構解明に向けて、前立腺の発生母体である泌尿生殖洞における特徴的な遺伝子変化を探索した。すなわち、腺管の発生から増殖、細胞分化に至るまで性ステロイドホルモンの支配下にある前立腺では、上皮や間質細胞に存在する性ステロイドホルモン受容体を介した上皮-間質の相互作用により制御されている。我々は、低用量 BPA 曝露による成獣マウス前立腺基底上皮の異常増殖が、投与直後に起こる体内ホルモンバランスの不均衡と、それに関わる遺伝子レベルでの

変化に起因していると考え、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、特に性分化関連遺伝子群の発現変動に着目した。

B. 研究方法

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し、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。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、やむを得ず実験動物を使用したが、その使用数は最小限にとどめ、当大学の実験動物取り扱い倫理規定に準拠し、十分な配慮を行った。

### C. 研究結果

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を見出した。すなわち、

BPA もしくは DES 曝露により、雄 UGS 後側葉の基底上皮細胞数と上皮における Ki-67 index は有意に増加した。しかし、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た。

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た。これらの発現変化は、雌雄 UGS 間質のほか、脳、心臓、腎臓、卵巣において認められたが、精巣では認められなかった。また、性分化関連遺伝子群が発現していない雌雄 UGS 上皮では、BPA 曝露による発現誘導も認められなかった。

エストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型 (ERR $\gamma$ )の発現は、雌雄 UGS 間質、脳、心臓、腎臓、卵巣に発現していたが、雌雄 UGS 上皮および精巣での発現は認められなかった。性ホルモン受容体については、BPA もしくは DES 曝露直後に、雄 UGS では AR が発現上昇し、雌 UGS では ER $\alpha$ が発現上昇した。

### D. 考察

BPA は、妊娠中の曝露による胎児および次世代への毒性発現が懸念される。我々は、低用量 BPA 経胎盤投与が合成エストロゲン剤 DES と同様に、仔雄マウス成獣時前立腺の基底上皮に局限して扁平上皮化を誘導することを報告した (Ogura et al., 2007)。しかし、BPA (0.2, 2, 20, 200 mg)を経皮的に成獣マウス前立腺へ 4 週間投与した検討では濃度依存的な扁平上皮化が認められたものの、200 mg 投与群においても DES (2 mg)投与群で観察された著明な扁平上皮

化生 (Squamous metaplasia) は認められなかった。これは、ER $\alpha$  に対する BPA の結合力は DES に比べて 1,000~10,000 倍低いために、この BPA の濃度では DES 2 mg 相当の活性には及ばなかったためと考えられる。BPA 曝露による内分泌攪乱は ER $\alpha$  を介すると考えられるものの、その詳細は膜系の関与も含め不明である。そこで、本年度は 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詳細に解析し、BPA が有するエストロゲン様作用とは別の、化学物質としての生理作用に着目した。

我々は BPA 曝露群に特徴的な遺伝子変化として、性分化に関わる DAX-1、Ad4BP/SF-1、Cyp 群の発現上昇を見出した。性分化関連遺伝子 mRNA は BPA 曝露直後には発現変化しないものの、出生直後、すなわち前立腺が発生し、腺管形成すると同時に発現上昇する。さらに、この現象で驚く事は、雄 UGS だけでなく雌 UGS でも観察されたことである。よって、雌雄 UGS における性ステロイドホルモンのバランスや性ステロイドホルモン受容体の優位性とは関係ないと考えられた。また、性分化関連遺伝子群の発現変動は合成エストロゲン剤 DES 曝露では認められないことと合わせて考えても、雌雄 UGS に発現している ER $\alpha$  を介した作用ではない、もしくは ER $\alpha$  発現細胞で起こる遺伝子変化ではない、と考えられた。

BPA 曝露による性分化関連遺伝子群の発現変動が ER $\alpha$  発現細胞とは関係ないことを確かめるために、小脳、心臓、腎臓、精巣、

卵巣における ER $\alpha$  と性分化関連遺伝子 mRNA の発現変化を検討した。その結果、検討に用いた全ての臓器が ER $\alpha$  を発現していたものの、精巣では性分化関連遺伝子群の発現変動が認められなかった。このことから、ER $\alpha$  発現細胞の存在と、BPA 曝露による性分化関連遺伝子群の発現変動が起こる臓器とは関係ないことが示唆された。

そこで、松島らが 2007 年に報告した、BPA が特異的に結合する ERR $\gamma$  (Matsushima et al., J Biochem., 142: 517-524, 2007) について検討した。その結果、BPA 曝露による性分化関連遺伝子群の発現変動が観察された小脳、心臓、腎臓、卵巣には ERR $\gamma$  mRNA が発現しているものの、発現変動が認められなかった精巣では ERR $\gamma$  mRNA が検出されなかった。また、雌雄 UGS から初代培養した間充織細胞 (UGM) における ERR $\gamma$  の発現陽性率は、BPA 曝露群で有意に高かった。以上より、BPA 曝露による性分化関連遺伝子群の発現変動は、臓器における ERR $\gamma$  発現細胞の存在に依存している可能性が示唆された。しかし、ERR $\gamma$  は最初からほぼ 100%、フルに活性化されている「自発活性化型核内受容体」であり、内在性リガンドが無い、真の意味でのオーファン受容体の可能性が指摘されている。つまり、活性化コンフォメーションにある ERR $\gamma$  に BPA が結合しても、既に 100%、フルに活性化した ERR $\gamma$  が生体内でどのような影響を示すのかは分からない。我々の系で考えれば、BPA 曝露による性分化関連遺伝子群の発現変動が ERR $\gamma$  発現細胞で起こっていることなのか、もしくは ERR $\gamma$

発現細胞が性分化関連遺伝子群を発現している、BPA 曝露により、臓器におけるそれらの数が増加した結果なのかどうかを検証する必要がある。その1つの候補として骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の存在が考えられる。矢澤らは、MSC が *in vivo* ならびに *in vitro* でステロイドホルモン産生細胞へ分化する能力を有していることを報告し、そのとき Ad4BP/SF-1 発現が必須であることを示している (Yazawa *et al.*, *Endocrinology*, 147: 4104-4111, 2006)。雌雄 UGS から前立腺 (雄) や陰 (雌) が発生するような、組織リモデリングが起こっている部位には MSC が動員されることは既知の事実であることから、ERR $\gamma$ 発現細胞が性分化関連遺伝子群を発現しているか否か、そして、BPA 曝露により MSC の動員が増加するか否かを早急に検討していきたいと考えている。

当初から、我々は BPA が DES と同様に、前立腺に発現している ER $\alpha$ を介して発揮すると考えられるエストロゲン様作用について調べてきた。これまでの多くの研究も BPA と DES を対比させ、BPA はエストロゲン様活性を有する内分泌攪乱物質であると報告してきた。BPA 曝露群のマウス前立腺で観察される扁平上皮化もそれを支持するものであったが、網羅的遺伝子発現変動解析の結果は、胎生期に BPA 曝露したマウス泌尿生殖洞では DES 曝露群には認められない特徴的な遺伝子変化、特に性分化関連遺伝子群の発現変動が起こっていることを示した。この知見で興味深い点は、BPA 曝露群に特

徴的な遺伝子変化は雌雄ともに認められていることである。すなわち、雌雄の泌尿生殖洞に発現している性ステロイドホルモン受容体の優位性とは関係ないカスケードで、BPA に特徴的な遺伝子変化を誘発していると考えられる。現在、詳細な分子レベルでの解析を遂行中であり、今後はエストロゲン様作用とは別の、化学物質としての BPA による作用にも注目していきたい。

## E. 結論

我々は、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。近年、BPA が ERR $\gamma$ と強く結合することが報告され、我々の結果でも、BPA 曝露による性分化関連遺伝子群の発現上昇は ERR $\gamma$ 発現臓器でのみ認められたことから、前立腺のみならず、ERR $\gamma$ 発現臓器において不可逆的影響を示す可能性が推察された。我々が見出した 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。

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ishii K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Sugimura Y. Role of stromal tenascin-C in

mouse prostatic development and epithelial cell differentiation. *Developmental Biology*. (in press)

Kanai M, Ishii K, Kanda H, Ogura Y, Kise H, Arima K, Sugimura Y. Improvement to predict tumorigenic phenotype of androgen-insensitive human LNCaP prostatic cancer cell subline in recombination with rat urogenital sinus mesenchyme. *Cancer Science*. (in press)

Watanabe M, Hirokawa Y, Tsuji M, Yanagawa M, Murata T, Suzuki H, Ichikawa T, Katoh T, Sugimura Y, Shiraishi T. Lack of involvement of the GNAS1 T393C polymorphism in prostate cancer risk in the Japanese population. *Anticancer Research*. (in press)

Kanda H, Ishii K, Ogura Y, Imamura T, Kanai M, Arima K, Sugimura Y. 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)

## 2. 学会発表

◎ 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：ビスフェノール A 経胎盤投与によりマウス泌尿生殖洞で発現変動した遺伝子群の探索：第 17 回泌尿器科分子・細胞研究会（東京）2008 年 2 月 15-16 日

石井 健一郎、今村 哲也、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、有馬 公伸、杉村 芳樹：ヒト前立腺癌細胞株のアンドロゲン感受性と間質由来増殖因子への応答性：第 17 回泌尿器科分子・細胞研究会（東京）2008 年 2 月 15-16

日

◎ 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：ビスフェノール A 経胎盤投与によるマウス泌尿生殖洞での SF1 発現誘導：第 96 回日本泌尿器科学会総会（横浜）2008 年 4 月 25-27 日

石井 健一郎、今村 哲也、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、有馬 公伸、杉村 芳樹：再燃前立腺癌の増殖に関わる間質由来増殖因子の探索：第 96 回日本泌尿器科学会総会（横浜）2008 年 4 月 25-27 日

今村 哲也、石井 健一郎、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、杉村 芳樹： $\alpha 1$  遮断剤の前立腺組織に及ぼす影響：間質の線維化に関する組織学的検討：第 96 回日本泌尿器科学会総会（横浜）2008 年 4 月 25-27 日

石井 健一郎、金井 優博、井口 和弘、小倉 友二、有馬 公伸、平野 和行、杉村 芳樹：アンドロゲン非依存的間質由来シグナルに制御されるアンドロゲン不応性前立腺癌細胞の増殖に関する研究：第 67 回日本癌学会学術総会（横浜）2008 年 10 月 28-30 日

広川 佳史、渡邊 昌俊、鈴木 啓悦、市川 智彦、杉村 芳樹、加藤 貴彦、白石 泰三：前立腺癌における *GNAS1* 遺伝子多型の解析：第 67 回日本癌学会学術総会（横浜）2008

年 10 月 28-30 日

◎ 荒瀬 栄樹、石井 健一朗、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：ビスフェノール A 経胎盤投与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：第 13 回日本生殖内分泌学会学術集会（大阪）2008 年 11 月 29 日

Kenichiro Ishii, Tetsuya Imamura, Kazuhiro Iguchi, Shigeki Arase, Yuko Yoshio, Kiminobu Arima, Kazuyuki Hirano, Yoshiki Sugimura: A new therapeutic strategy for targeting tumor stroma in hormone-refractory prostate cancer growth under androgen ablation therapy: 18<sup>th</sup> Annual Fall Meeting of the Society for Basic Urologic Research (SBUR) in Phoenix, AZ, 2008 年 11 月 13-16 日

Kenichiro Ishii, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Yoshiki Sugimura: Role of stromal tenascin-C in mouse prostatic development and epithelial cell differentiation: 18<sup>th</sup> Annual Fall Meeting of the Society for Basic Urologic Research (SBUR) in Phoenix, AZ, 2008 年 11 月 13-16 日

#### 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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

研究分担報告書

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

研究分担者 国立環境研究所 曾根秀子

研究要旨

本年度は、定量的に乳がん関連遺伝子群及びBPA特徴遺伝子群について、mRNA遺伝子発現レベルを解析し、BPAの正常ヒト乳腺上皮細胞（HMEC）細胞増殖能がどのようなシグナル伝達へ結びつくのかを理解するのに役立てた。その結果、BPAによる曝露では、 $10^{-9}$  Mから $10^{-7}$  Mの範囲において、COX2及びEGFRを上昇させ、一方、cyclinA2、p53、p16、Ki-67及びTopoIIを低下させることを明らかにした。この結果は、BPAは、HMECの細胞増殖を誘導し、アポトーシス系を抑制することが示唆された。

A. 研究目的

核内受容体に作用する化学物質のうち、エストロゲン作用を有することが知られているビスフェノールA (BPA)は、マウス及びラットにおいて周産期曝露で乳腺の発達に影響を及ぼすことが示されてきた。さらに、ヒトの乳がん組織から得た乳腺細胞にBPAを曝露させると、BPAで発現誘導される遺伝子のプロファイルが悪性度の高い癌組織のそれと類似するとの報告もあり、乳がんの発症や進展に関与しているのではないかと懸念が高まっている。また、癌細胞は、エンドレスに増殖を繰り返すし、増殖を停止する老化細胞とは表裏の関係である。そこで、BPAがどのように乳がんの進展に関与しているかを明らかにするために、正常ヒト乳腺上皮細胞（HMEC）におけるBPAの細胞増殖・細胞老化への影響を調べた。

B. 研究方法

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。

### C. 研究結果

昨年度までに、BPAの曝露は、用量依存的に細胞の増殖し、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た。次に、13世代目細胞をマトリゲルコートした培養皿で培養して増殖能の再現性を調べたところ、溶媒対照に比べ、細胞集塊(コロニー)あたりの細胞数、コロニーの大きさが、BPA曝露群で有意に増大した。

### D. 考察

これまで、マウスやラットを用いた実験動物においては、BPAの周産期曝露によって乳腺管の肥厚、過形成や腫瘍の増加が認められていたが、さらに、遺伝子発現プロファイルやメチル化な

どBPAの曝露と乳がんの発症・進展を関与するデータが蓄積つつある(Wu Fら、2008 ;Moral Rら、2008 ;Durando ら 2007 ;Murray TJら2007)。乳がんへの影響に関するBPAの分子メカニズムを明らかにし、ヒトへの影響予測を可能にするために、本研究では、HMECを用いた実験システムでBPAの影響を評価した。すなわち、初期曝露による晩発影響を解析するモデル細胞系を構築した。そのため、8世代を経たところで曝露し、11世代目の細胞における遺伝子発現プロファイルを調べた。どの濃度においても2倍以上あがったCOX2遺伝子のシグナル伝達経路図を調べてみると、プロスタグランジン代謝酵素であると同時に、DNAダメージのストレスによる血管新生の鍵遺伝子である。周辺のBrca1-ESR1を介したIGFR1, VEGFシグナル伝達系では、VEGF-Aに変動が認められ、G1-S期の変動の鍵分子CyclinD1も濃度によっては、活性化していることが認められた。DNAに損傷が起これば、p53が誘導され、それが転写制御因子として働き、p21の発現を介して細胞周期の停止とアポトーシスの誘発という二面的な役割を果たすことが知られているが、今回の実験では、p53はE2では増加しているがBPAではどの濃度でも抑制していた。p21、p16も同様な傾向となっている。したがって、BPAは、細胞周期の停止やアポトーシスの誘発はごく弱いものであると考えられた。ヒト乳がん組織にBPAを暴露して特異的に発現する遺伝子のうち、乳がん関連遺伝子と考えられている3個の癌遺伝子については、IGFBP2、PTEN、TOP2Aは、顕著な影響が認められなかった。

## E. 結論

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。一方、細胞周期の停止やアポトーシスに関連した遺伝子への影響は最小であった。3次元で培養によるコロニーの増大が再現性よく認められた。これらの結果から BPA は、分化やアポトーシスよりも細胞増殖系への影響を及ぼすことが示唆された。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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

正常ヒト乳腺上皮細胞におけるビスフェノールAの分化、増殖及び老化に及ぼす影響  
(日本トキシコロジー学会第35回研究発表会・2008)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

## Ⅱ. 分担研究報告書

### Ⅱ. 基盤研究

#### 研究要旨

臨界期における内分泌かく乱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（DES）を投与し、膣上皮細胞のエストロゲン非依存の増殖を誘導した。この現象は、曝露影響が不可逆的に持続することから、エピジェネティクスな観点から遺伝子発現制御機構について明らかにするのに適切な系である。DES 未曝露と曝露マウスを用いて DNA マイクロアレイにより遺伝子発現レベルの解析を行った。この結果をもとに、発現に変化があった遺伝子のゲノム領域についてヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法により解析した。その結果、特有の遺伝子について、新生児期曝露マウスにおいてクロマチン状態が変化していることが明らかになった。

#### A. 研究目的

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膣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。

妊娠ラットへのピンクロゾリン（防黴剤）およびメトキシクロル曝露により、生まれた雄の精子形成率が低下するとともにメチル化状態が変化した遺伝子が見いだされ、4世代にわたってこの現象が継続したとの報告から、世代を超えた遺伝子のメチル化状態の変化、エピジェネティックな変化が大きな話題となり、化学物質による内分泌かく乱のメカニズムの有力な候補とも考えられている。すなわち、内分泌かく乱化学物質の新生児期曝露が生体に影響を及ぼすメカニズムの一端を明らかにするために、DES を臨界期

に曝露することにより標的器官の遺伝子のクロマチン状態が変化し得るのかを調べた。

#### B. 研究方法

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、膣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。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験においては、自然科学研究機構動物実験委員会の「自然科学研究機構における動物実験に関する指針」に準拠した。(使用する動物の屠殺にあたっては、頸椎脱臼法を用いた。)

### C. 研究結果

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膈上皮細胞の増殖を示した。更に DES 未曝露と曝露マウスの膈において、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。G protein-coupled receptor 87 (Gpr87) のヒストン修飾状態を調べた。

まず、RT-PCR 法により Grp87 の遺伝子発現が DES 曝露マウスにおいて増加していることを確認した。

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、免疫沈降物を特異的なプライマーを用いて PCR により検出した。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 番目のリジンがトリメチル化されており、9 番目のリジンのトリメチル化はされていなかった。

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

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は重要である。

現在、DES 曝露の影響により変動する遺伝子発現と DNA メチル化との関連性を明らかにするために、ChIP on chip 法での解析を行っている。

### D. 考察

内分泌かく乱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、出生直後の新生児期マウスに DES を曝露した。DES 曝露により膈上皮細胞がエストロゲン非依存的に増殖を誘導するという、この現象をモデルとして、遺伝子制御機構でのエピジェネティックな変化を探索するために、DES 未曝露・曝露マウスで DNA マイクロアレイを行い、遺伝子発現の変動を解析した。

その一部として、癌に関与する遺伝子で、gene regulated by estrogen in breast cancer protein (MN\_007670)、FBJ osteosarcoma oncogene (MN\_010234)、v-mof muscloponeurtic fibrosarcome oncogene family (NM\_010755)、受容体関連では G protein-coupled receptor 105 (NM\_133200)、G protein-coupled receptor 87 (NM\_032399)、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a (NM\_013749)、interleukin 1 receptor-like 2 (NM\_133193) が DES 曝露マウスにおいて遺伝子発現が増加した。

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、不可逆的増殖するメカニズムに迫ることができると思われる。

#### E. 結論

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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Watanabe, H., K. Kobayashi, Y. Kato, S. Oda, R. Abe, N. Tatarazako and T. Iguchi: Transcriptome profiling in crustaceans as a tool for ecotoxicogenomics. Cell Biol. Toxicol., 24: 641-647, 2008.
2. Katsu, Y., S. Kohno, S. Hyodo, S. Ijiri, A. Hara, L.J. Guillette Jr. and T. Iguchi: Molecular cloning, characterization and evolutionary analysis of estrogen receptors from

phylogenetically ancient fish. Endocrinology, 149: 6300-6310, 2008.

3. Kohno, S., Y. Katsu, T. Iguchi and L.J. Guillette Jr.: Novel approaches for the study of vertebrate steroid hormone receptors. Integ. Comp. Biol. (in press).
4. Iguchi, T. and Y. Katsu: Commonality and difference in mechanisms of endocrine disruption in various animal species. BioScience, (in press).
5. Naido, V., Y. Katsu, and T. Iguchi: The influence of non-toxic concentrations of DDT and DDE on the old world vulture estrogen receptor  $\alpha$ . Gen. Comp. Endocrinol., 159: 188-195, 2008.
- ◎6. Nakamura, T., Y. Katsu, H. Watanabe and T. Iguchi: Estrogen receptor subtypes selectively mediate female mouse reproductive abnormalities induced by neonatal exposure to estrogenic chemicals. Toxicology, 253: 117-124, 2008.
7. Katsu, Y., R. Ichikawa, T. Ikeuchi, S. Kohno, L.J. Guillette Jr. and T. Iguchi: Molecular cloning and characterization of estrogen, androgen and progesterone nuclear receptors from a freshwater turtle (*Pseudemys nelsoni*). Endocrinology, 149: 161-173, 2008.
8. Kato, Y., K. Kobayashi, S. Oda, J.K. Colbourne, N. Tatarazako, H.

- Watanabe and T. Iguchi: Molecular cloning and sexually dimorphic expression of DM-domain genes in *Daphnia magna*. *Genomics*, 91: 94-101, 2008.
9. Kobayashi, T., Y. Takita, A. Suzuki, Y. Katsu, T. Iguchi, and Y. Ohta: Vacuolar degeneration of skeletal muscle in transgenic mice overexpressing ORP150. *J. Vet. Med. Sci.*, 70: 115-118, 2008.
  10. Tyler, C.R., A.L. Filby, T. Iguchi, V. Kramer, J. Larsson, G. van Aggelen, K. van Leeuwen, M. Viant and D. Tillet: Chapter 3 - Application of Genomics to Tiered Testing. In: Ankley, G. and G. Daston (Eds.): *Molecular Biology and Risk Assessment: Evaluation of the Potential Roles of Genomics in Regulatory Ecotoxicology*. 2008.
  11. Nishida, H., S. Miyagawa, D. Matsumaru, Y. Wada, Y. Satoh, Y. Ogino, T. Iguchi, S. Fukuda, T. Taga, T. and G. Yamada: Gene expression analyses on the embryonic external genitalia: identification of regulatory genes possibly involved in masculinization processes. *Congen. Anorm.*, 48: 63-67, 2008.
  12. Milnes, M.R., T.A. Bryan, Y. Katsu, S. Kohno, B.C. Moore, T. Iguchi and L.J.Jr. Guillette: Increased post hatching mortality and loss of sexually dimorphic gene expression in alligators (*Alligator mississippiensis*) from a contaminated environment. *Biol. Reprod.*, 78: 932-938, 2008.
  13. Connon R, H.L. Hooper, R.M. Sibly, F.L. Lim, L.H. Heckmann, D.J. Moore, H. Watanabe, A. Soetaert, K. Cook, S.J. Maund, T.H. Hutchinson, J. Moggs, W. De Coen, T. Iguchi, A. Callaghan: Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. *Environ. Sci. Technol.*, 42: 2181-2188, 2008.
  14. Oka, T., O. Tooi, N. Mitsui, M. Miyahara, Y. Ohnishi, M. Takase, A. Kashiwagi, T. Shinkai, N. Santo and T. Iguchi: Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*. *Aquat. Toxicol.*, 87: 215-226, 2008.
  15. Iguchi, T., H. Watanabe, Y. Ohta and B. Blumberg: Developmental effects: estrogen induced vaginal changes and organotin induced adipogenesis. *Int. J. Androl.*, 31: 263-268, 2008.
  - © 16. Milnes, M.R., A. Garcia, E. Grossman, F. Grün, J. Shiotsugu, M.M. Tabb, Y. Kawashima, Y. Katsu, H. Watanabe, T. Iguchi and B. Blumberg: Activation of steroid and xenobiotic receptor (SXR, NR112) and its orthologs in laboratory, toxicological, and genome model species. *Environ. Health Perspect.*, 116: 880-885, 2008.
  17. Kohno, S., D. Bermudez, Y. Katsu, T. Iguchi and L.J. Guillette Jr.: Gene expression patterns in juvenile

- American alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed to environmental contaminants. *Aquat. Toxicol.*, 88: 95-101, 2008.
18. Crain, D.A., S.J. Janssen, T.M. Edwards, J. Heindel, S.-M. Ho, P. Hunt, T. Iguchi, A. Juul, J.A. McLachlan, J. Schwartz, N. Skakkebaek, A.M. Soto, S. Swan, C. Walker, T. Woodruff, T. Woodruff, L.C. Giudice and L.J. Guillette, Jr.: Female reproductive disruption: The roles of endocrine disrupting compounds and developmental timing. *Fertil. Steril.*, 90: 911-940, 2008.
19. Lange, A., Y. Katsu, R. Ichikawa, G.C. Paull, L.L. Chidgey, T.S. Coe, T. Iguchi and C.R. Tyler: Altered sexual development in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to environmental concentrations of the pharmaceutical  $17\alpha$ -ethinylestradiol and associated expression dynamics of aromatases and estrogen receptors. *Tox. Sci.*, 106: 113-123, 2008.
20. Iguchi, T., H. Watanabe and Y. Katsu: Toxicogenomics and ecotoxicogenomics: Studying chemical effects and basic biology in vertebrates and invertebrates. In: *Toxicogenomics: A Powerful Tool for Toxicology Assessment*. John Wiley & Sons, 143-158, 2008.
21. Edwards, T.M., T. Iguchi and L.J. Guillette, Jr: Genes to ecosystems: viviparous fishes and endocrine disruption. In: *Viviparous Fishes II*. Carmen, M. ed. (in press).
22. Kim, H., S. Hayashi, P. Chambon, H. Watanabe, T. Iguchi and T. Sato: Effects of diethylstilbestrol on ovarian follicle development in neonatal mice. *Reprod. Toxicol.*, (in press).
23. Myers, J.P., F.S. vom Saal, B.T. Akingbemi, K. Arizono, S. Belcher, T. Colborn, I. Chahoud, D.A., Crain, D.A., F. Farabollini, L.J.Jr. Guillette, T. Hassold, S.-M. Ho, P.A. Hunt, T. Iguchi, T., S. Jobling, J. Kanno, H. Laufer, M. Marcus, J.A. McLachlan, A. Nadal, J. Oehlmann, N. Olea, P. Palanza, S. Parmigiani, B.S. Rubin, G. Schoenfelder, C. Sonnenschein, A.M. Soto, C.E. Talsness, J.A. Taylor, L.N. Vandenberg, J.G. Vandenberg, S. Vogel, C.S. Watson, W.V. Welshons, and R.T. Zoeller: Why public health agencies cannot depend upon 'good

- laboratory practices' as a criterion for selecting data: The case of bisphenol A. *Environ. Health Perspect.*, (in press).
24. 井口泰泉、中村武志：内分泌かく乱物質が及ぼす発生、成長への影響. *ビオフィリア*, 4: 13-17, 2008.
  25. 勝義直、井口泰泉：レポータージーンアッセイを利用した魚類エストロゲン受容体の種特異性. *環境ホルモン学会ニュースレター*, 2008.
  26. 井口泰泉：2.13 乳腺・生殖器（女性） 「からだと水の事典」佐々木成、石橋賢一（編集），朝倉書店, 205-213, 2008.
- 2.学会発表
1. Iguchi, T.: The novel field of ecotoxicogenomics in the study of endocrine disruption in non-mammalian models. The Endocrine Society 90th Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, June 2008.
  2. Iguchi, T.: Sex determination mechanisms of fish food, *Daphnia magna*. Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions, Honolulu, Hawaii, USA, May 2008.
  3. Iguchi, T.: Current situation of endocrine disruptor issue in Japan. Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors, Waterville, Valley Resort, NH, USA, June 2008.
  4. Kato Y., Kobayashi K., Colbourne J. K., Watanabe H., Iguchi T.: Cloning and characterization of DM domain genes from the water flea, *Daphnia magna*. Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors, Waterville Valley Resort, NH, USA, June 2008.
  5. Iguchi, T.: New concepts in environmental endocrine signaling. e. hormone 2008, Tulane University, New Orleans, LA, USA, April 2008.
  6. Iguchi, T.: Activities in OECD and Japan. NERC International Workshop on Fish Toxicogenomics: Moving into Monitoring and Regulation. Vancouver, Canada, April 2008.
  7. Iguchi, T. and Tooi, O.: Achievements of UK Japan collaboration. DEFRA meeting: Endocrine Disruption in Aquatic Environments: Lessons for Taking the Science Forward in Support of Chemical Management, UK, May 2008.
  8. 井口泰泉：内分泌かく乱物質の作用メカニズム. 第9回比較3学会合同シンポジウム. 東京医科歯科大学, 2008年8月26日.
  9. Lange, A., Katsu, Y., Iguchi, T. and Tyler C.R.: Development and application of molecular tools for establishing mechanistic information on chemical effect pathways. The 10th Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals,

- Bovey Castle, Devon, 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> October 2008.
10. Katsu, Y., Lange, A., Tyler, C.R. and Iguchi: Comparative responsiveness and sensitivity of fish estrogen receptors to steroid estrogens and estrogen mimics. The 10th Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Bovey Castle, Devon, 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> October 2008.
  11. Ohta, Y., Katsu, Y., Iguchi, T., Kohno, S., Moore, B. and Guillette, L.J.Jr: Estrogen receptor expression in American alligator oviduct. The 10th Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Bovey Castle, Devon, 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> October 2008.
  12. Tatarazako, N., Hirai, N. and Iguchi, T.: Embryo toxicity in Japanese medaka and zebrafish exposed to endocrine disruptors, pesticides, and PPCPs. The 10th Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Bovey Castle, Devon, 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> October 2008.
  13. Lange, A., Paull, G.C., Katsu, Y., Urushitani, H., Ichikawa, R., Coe, T.S., Iguchi, T. and Tyler, C.R.: Sexual re-programming and oestrogenic sensitization in wild fish exposed to ethinylestradiol. The 10th Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Bovey Castle, Devon, 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> October 2008.
  14. Kikuchi, N., Watanabe, H. and Iguchi, T.: Analysis of ligand-independent activation of the estrogen receptor in mouse vagina. 7<sup>th</sup> OIB Symposium, Frontiers of Biological Imaging, Synergy of the Advanced Techniques. Okazaki, Nov. 12-13, 2008.
  15. Yoshida-Koide, S., Watanabe, H. and Iguchi, T.: Epigenetic effect of estrogen exposure in prenatal mice. 7<sup>th</sup> OIB Symposium, Frontiers of Biological Imaging, Synergy of the Advanced Techniques. Okazaki, Nov. 12-13, 2008.
  16. Kato, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H. and Iguchi, T.: Molecular analysis of *csd* gene from the water flea, *Daphnia magna*. 7<sup>th</sup> OIB Symposium, Frontiers of Biological Imaging, Synergy of the Advanced Techniques. Okazaki, Nov. 12-13, 2008.
  17. Katsu, Y., Lange, A., Tyler, C.R. and Iguchi, T.: Comparative responsiveness and sensitivity of fish estrogen receptor to steroid estrogens and other environmental estrogens. 7<sup>th</sup> OIB Symposium, Frontiers of Biological Imaging, Synergy of the Advanced Techniques. Okazaki, Nov. 12-13, 2008.

H. 知的所有権の取得状況

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

研究分担者 加藤茂明 東京大学分子細胞生物学研究所教授

#### 研究要旨

内分泌かく乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つには、性ステロイドホルモン作用のかく乱が考えられている。本研究では、核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにする。ダイオキシンレセプターが蛋白質分解系を誘導することで、女性ホルモン・男性ホルモン作用をかく乱することが明らかになった。さらにダイオキシンレセプターの脂肪細胞分化制御を担う転写抑制制御機構を解明した。また女性ホルモン受容体の新規の転写制御機構を同定し、性ステロイドホルモン作用かく乱の作用点として解析を進めている。

#### A. 研究目的

低容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。すなわち、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。これまで継続してきた性ホルモンレセプター共役因子群の同定に加え、ダイオキシンレセプターを介した女性ホルモン・男性ホルモンレセプターへの影響について検討した。

#### B. 研究方法

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を検討した。すなわち、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する。また、複合

体としての機能を *in vitro* 系で評価する。また、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。さらに新たな材料として脂肪細胞を用いる。

#### C. 研究結果

性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子を同定した。また、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発見した。さらに脂肪細胞分化制御におけるダイオキシンレセプター複合体を同定した。すなわち、

##### 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

女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子複合体として、アセチル化ヒストン結合性タンパク質 BRD を同定した。この複合体は、女性ホルモンレセプターN

末端側の転写促進領域に特異的に結合し、転写機能を活性化することが分かった。

さらに本年度は、女性ホルモン受容体の転写活性化機構を詳細に解析した結果、女性ホルモン受容体の転写活性化能には細胞周期依存性があることを見出した。すなわち、女性ホルモン受容体の転写活性は DNA 複製期 (S 期) で強く、分裂期 (M 期) で抑制されることを見出した。

## 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

ダイオキシンレセプターとエストロゲンレセプターとの関連を検討した結果、活性化されたダイオキシンレセプターが女性ホルモンレセプターと会合することを見出した。エストロゲンが結合した状態では、ダイオキシンレセプターはその機能を抑制することが明らかとなった。また、ダイオキシンレセプターの分解に関する新規複合体の同定に成功した。この複合体はダイオキシンレセプターへのリガンド結合に依存的に、エストロゲンレセプターをユビキチン化することを見出した。ユビキチン化複合体の形成はリガンド依存的であった。従ってダイオキシンレセプターは、相互作用蛋白の分解促進という全く新規の分子機能を有することが示唆された。さらに、タンパク質分解促進を活性化するダイオキシンレセプターリガンドを見出したことから、ダイオキシン類の作用の一部が分解経路によって発揮される可能性が考えられる。

## 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

ダイオキシン類の脂肪細胞分化に対する阻害作用が知られている。一方脂肪細胞分化は核内レセプターの一種である PPAR $\gamma$  によって誘導される。そこで、脂肪細胞分化制御におけるダイオキシン類の毒性作用機構の解明を目指し、ST2 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。方法としては、再構築ダイオキシン受容体蛋白質をプロンプタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。その結果、新規の転写共役抑制因子として SARA を同定した。SARA はダイオキシンレセプターの機能を仲介する新規の共役因子と考え解析を進めている。

## 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

性ホルモンレセプターと転写共役因子との相互作用を *in vitro* 細胞系で解析を行なってきたが、これらの結果は、必ずしも個体での現象を反映しない。そこで、ショウジョウバエにヒト AR, ER を組織特異的に発現する系の構築に成功した。下流のリポーター遺伝子は GFP を用いたので、AR/ER のリガンド依存的な転写機能は GFP の発現に振り替えられるため、結果として蛍光として観察できる。エサに性ホルモンを加えると、GFP による蛍光が観察された。また、このレセプターを介した転写促進能は、AR を強制発現させたいずれの組織においても観察されている。AR の転写活性を指標としたスクリーニングにより、ヒストン脱ユビキチン化酵素を同定した。これにより、AR を介した転写活性化機構の一端解明に成功した。