

#### D. 考察

性ホルモンレセプターには、数多くの転写共役因子及び複合体が結合することが分かった。今後遺伝子ノックアウト等により、確認する必要があると思われた。また、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ことから、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た。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、その作用には組織特異的転写制御の存在が示唆された。

#### E. 結論

性ホルモンレセプターの転写制御能を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。

#### F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は特に無い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Imai, Y., Nakamura, T., Matsumoto, T., Takaoka, K. and Kato, S. Molecular Mechanisms Underlying the Effects of Sex Steroids on Bone and Mineral Metabolism. **J.**

**Bone. Miner. Metab.** 2008 (in press).

Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A. and Kato, S. Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. **Mol. Cell. Endocrinol.** 2008 (in press).

Kouzu-Fujita, M., Mezaki, Y., Mtsumoto, T., Yamaoka, I., Sawatsubashi, S., Yano, T., Taketani, Y., Kitagawa, H. and Kato, S. Co-activation of ER $\beta$  by a gonadotropin-induced cofactor. **Mol. Cell. Biol.** 2008 (in press).

Tanabe, M., Kouzmenko, A., Ito, S., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Fujiyama, S., Yamagata, K., Zhao, Y., Kimura, S., Ueda, T., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K. and Kato, H. Activation of facultatively silenced *Drosophila* loci associates with increased acetylation of histone H2AvD. **Genes to Cells** 2008 (in press).

©Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. **Biochem. Pharmacol.** 2008 (in press).

Zhao, Y., Lang, G., Ito, S., Bonnet, J., Metzger, E., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Le Guezennec, X., Stunnenberg, H. G., Krasnov, A., Georgieva, S. G., Schüle, R., Takeyama, K., Kato, S., Tora, L. and Devys, D. A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. **Mol. Cell** 29, 92-101, 2008.

© Okada, M., Takezawa, S., Mezaki, Y., Yamaoka, I., Takada, I., Kitagawa, H. and Kato, S. Switching of chromatin-remodelling complexes for oestrogen receptor-alpha. **EMBO Rep.** 9, 563-568, 2008

Yokoyama, A., Takezawa, S., Schüle, R., Kitagawa, H. and Kato, S. Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase LSD1. **Mol. Cell. Biol.** 28, 3995-4003, 2008.

Kimura, S., Sawatsubashi, S., Ito, S.,

- Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Ueda, T., Fujiyama, S., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K., Yaegashi, N. and Kato, S. *Drosophila* arginine methyltransferase 1 (DART1) is an ecdysone receptor co-repressor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 371, 889-893, 2008.
- ©Ohtake, F., Baba, A., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 370, 541-546, 2008.
- Kouzmenko, A. P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T. and Kato, S. Ligand-dependent interaction between estrogen receptor  $\alpha$  and adenomatous polyposis coli. **Genes to Cells** 13 723-730, 2008.
- Akimoto, C., Kitagawa, H., Matsumoto, T. and Kato, S. Spermatogenesis-specific association of SMCY and MSH5. **Genes to Cells** 13, 623-633, 2008.
- Kouzmenko, A. P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T. and Kato, S. Truncation mutations abolish chromatin-associated activities of adenomatous polyposis coli. **Oncogene** 27, 4888-4899, 2008.
- Matsumoto, T., Shiina, H., Kawano, H., Sato, T. and Kato, S. Androgen receptor functions in male and female physiology. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 109, 236-241, 2008.
- Murata, T., Suzuki, E., Ito, S., Sawatsubashi, S., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Fujiyama, S., Kimura, S., Ueda, T., Matsukawa, H., Kouzmenko, AP., Furutani, T., Takeyama, K. and Kato, S. RNA-binding protein hoip accelerates polyQ-induced neurodegeneration in *Drosophila*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 72, 2255-2261, 2008.
- Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Guber H.J., Okamoto, K., Nishikawa, K., Latz, E., Golenbock, D.T., Aoki, K., Ohya, K., Imai, Y., Morishita, Y., Miyazono, K., Kato, S. Saftig, P. and Takayanagi, H. Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. **Science** 319, 624-627, 2008.
- Sasagawa, S., Shimizu, Y., Kami, H., Takeuchi, T., Mita, S., Imada, K., Kato, S. and Mizuguchi, K. Dienogest is a selective progesterone receptor agonist in transactivation analysis with potent oral endometrial activity due to its efficient pharmacokinetic profile. **Steroids** 73, 222-231, 2008.
- Honzawa, S., Yamamoto, Y., Yamashita, A., Sugiura, T., Kurihara, M., Arai, M. A., Kato, S. and Kittaka, A. The 2 $\alpha$ -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D3 analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu). **Bioorg. Med. Chem.** 16, 3002-3024, 2008.
- Yanase, T., Fan, W., Kyoya, K., Min, L., Takayanagi, R., Kato, S. and Nawata, H. Androgens and metabolic syndrome: Lessons from androgen receptor knock out (ARKO) mice. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 109, 254-257, 2008.
- Iriyama, A., Fujiki, R., Inoue, Y., Takahashi, H., Tamaki, Y., Takezawa, S., Takeyama, K., Jang, W. D., Kato, S. and Yanagi Y. A2E, a pigment of the lipofuscin of retinal pigment epithelial cells, is an endogenous ligand for retinoic acid receptor. **J. Biol. Chem.** 283, 11947-11953, 2008.
- Fujita, H., Sugimoto, K., Inatomi, S., Maeda, T., Osanai, M., Uchiyama, Y., Yamamoto, Y., Wada, T., Kojima, T., Yokozaki, H., Yamashita, T., Kato, S., Sawada, N. and Chiba, H. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca<sup>2+</sup> absorption between enterocytes. **Mol. Biol. Cell.** 19, 1912-1921, 2008.
- Takaki, H., Ichiyama, K., Koga, K., Chinen, T., Takaesu, G., Sugiyama, Y., Kato, S., Yoshimura, A. and Kobayashi, T. STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter,



which is reverted by retinoic acid receptor. **J. Biol. Chem.** 283, 14955-14962, 2008.

## 2. 学会発表

### 【国内】

#### 2008年度日本農芸化学会大会

新規クロマチン構造調節因子を介した転写抑制機構の解析

伊藤紗弥、沢津橋俊、山形 薫、鈴木絵里子、趙 越、田辺真彦、木村周平、上田崇、藤山沙理、村田拓哉、松川紘之、武山健一、加藤茂明

酸化還元刺激によるグルココルチコイドレセプター転写制御メカニズムの解析

山岡育子、北川浩史、目崎善弘、清水崇史、加藤茂明

分子遺伝学とプロテオミクスのアプローチによる新規 BTB/POZ タンパク質群の網羅的機能解析

藤山沙理、沢津橋俊、伊藤紗弥、木村周平、村田拓哉、鈴木絵里子、田辺真彦、趙越、上田 崇、松川紘之、山形 薫、武山健一、加藤茂明

ビタミンKは Msx2 遺伝子を転写調節することにより骨芽細胞分化を促進する

五十嵐庸、過足芳子、三原正朋、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明

分子遺伝学的手法による新規転写共役因子の網羅的探索法の構築と機能解析

武山健一、伊藤紗弥、沢津橋俊、鈴木絵里子、趙 越、山形 薫、田辺真彦、木村周平、上田 崇、藤山沙理、村田拓也、松川紘之、Alexander Kouzmenko、加藤茂明

オーファン核内受容体 TLX の、転写共役因子複合体の同定による転写抑制機構の解明  
横山 敦、竹澤慎一郎、北川浩史、加藤茂明

ショウジョウバエ分子遺伝学とプロテオミクス解析による新規転写共役抑制因子 Z4 の解析

村田拓哉、沢津橋俊、伊藤紗弥、鈴木絵里子、山形 薫、趙 越、田辺真彦、藤山沙理、木村周平、上田 崇、松川紘之、武山健一、加藤茂明

#### 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会

新規クロマチン構造調節因子 BAHD1 を介した転写抑制機構の解明

伊藤紗弥、沢津橋俊、鈴木絵里子、趙 越、山形 薫、田辺真彦、木村周平、上田 崇、藤山沙理、村田拓哉、松川紘之、林 珍仙、武山健一、加藤茂明

Y染色体遺伝子 Dby の miRNA 産生制御における機能解析

井上和樹、松本高広、山形 薫、秋本千央、米澤正祥、加藤茂明

Multinuclear expression of ER  $\alpha$  in mature osteoclasts

Min-Young Youn, Ichiro Takada, Shino Kondoh, Yuuki Imai, Shigeaki Kato

絶食シグナルによるヒストン脱メチル化酵素 PHF2 活性制御機構の解明

奥野陽亮、馬場敦史、大竹史明、加藤茂明

オーファン核内受容体 TLX の転写抑制を介した神経幹細胞未分化維持機構の解明

横山 敦、竹澤慎一郎、北川浩史、加藤茂明

◎ER $\alpha$  はM期特異的にE3 ligase複合体を形成する

岡田麻衣子、大竹史明、加藤茂明

骨芽細胞におけるエストロゲンの作用の解明—骨芽細胞特異的エストロゲン受容体欠損マウスを用いて

金藤紫乃、今井祐記、高田伊知郎、中村貴、松本高広、加藤茂明

◎女性ホルモン・エストロゲンによるmiRNA産生抑制機構の解析

山形 薫、鈴木絵里子、沢津橋俊、伊藤紗弥、藤山沙理、田辺真彦、上田 崇、村田拓哉、趙 越、松川紘之、林 珍仙、汐崎裕美、武山健一、加藤茂明

シヨウジョウバエZn-fingerタンパクZ4の新規クロマチン凝集化機能の解析

村田拓哉、沢津橋俊、伊藤紗弥、鈴木絵里子、山形 薫、趙 越、田辺真彦、藤山沙理、木村周平、上田 崇、松川紘之、林 珍仙、武山健一、加藤茂明

新規ヒストンシャペロン *Drosophila* DEK はクロマチン構造変換を介してエクダイソンレセプターの転写反応を正に制御する転写共役因子である

沢津橋俊、武山健一、伊藤紗弥、鈴木絵里子、田辺真彦、趙 越、山形 薫、木村周平、村田拓哉、藤山沙理、上田 崇、松川紘之、

林 珍仙、多羽田哲也、伊藤 敬、加藤茂明

シンポジウム「組織幹細胞とニッシェ」  
骨組織分化における PPAR $\gamma$  機能制御因子群の解析

高田伊知郎、須澤美幸、加藤茂明

シンポジウム「タンパク質分解を介した新たな生理機能」

◎リガンド依存性転写因子はユビキチンリガーゼ複合体として機能する

大竹史明、岡田麻衣子、西川亜美、藤井義明、加藤茂明

第 81 回日本内分泌学会学術総会

グルココルチコイドレセプター (GR) による未知炎症制御メカニズムの解析

北川浩史、山岡育子、目崎善弘、清水崇史、加藤茂明

第 26 回日本骨代謝学会

芽細胞を介したエストロゲンの直接作用—骨芽細胞特異的エストロゲン受容体欠損マウスの作出

金藤紫乃、今井祐記、高田伊知郎、中村貴、松本高広、加藤茂明

成熟多核破骨細胞におけるエストロゲン受容体 ER $\alpha$  の発現解析

延 珉榮、高田伊知郎、金藤紫乃、今井祐記、加藤茂明

第 16 回日本ステロイドホルモン学会学術集会

グルココルチコイドレセプター (GR) による未知炎症制御メカニズムの解析

北川浩史、山岡育子、岡田麻衣子、藤山沙理、加藤茂明

【国際】

2008 Keystone Symposia Conference (RNAi, MicroRNA, and Non-Coding RNA) (Whistler, Canada)

DEAD-box RNA helicase is required for Drosha-mediated processing of a subset of microRNAs.

Inoue, K., Matsumoto, T., Yamagata, K., Akimoto, C., Yonezawa, M., Kato, S.

Identification of novel insulator function to regulate chromatin formation through Dcr-2/Ago2 pathway.

Suzuki, E., Sawatsubashi, S., Ito, S., Zyo, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Ueda, T., Murata, T., Fujiyama, S., Matsukawa, H., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Tomari, Y., Siomi, H., Kato, S.

2008 Keystone Symposia Conference (Nuclear Receptors: Orphan Brothers) (Whistler, Canada)

A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR-gamma function.

Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Kato, S.

Novel corepressor, SNASH induces neurogenesis through the transcriptional repressing for notch signaling.

Takeyama, K., Ito, S., Sawatsubashi, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Ueda, T., Murata, T., Matsukawa, H., Fujiyama, S.,

Hirabayashi, Y., Gotoh, Y., Kato, S.

Aberrant expression of a novel androgen corepressor in testicular tumors.

Ueda, T., Ito, S., Sawatsubashi, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Yamagata, K., Zhao, Y., Tanabe, M., Kimura, S., Murata, T., Matsukawa, H., Fujiyama, S., Miki, T., Takeyama, K., Kato, S.

2008 Keystone Symposia Conference (Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena) (Snowmass, USA)

© Switching of chromatin-remodeling complexes for estrogen receptor  $\alpha$ .

Okada, M., Takezawa, S., Mezaki, Y., Yamaoka, I., Takada, I., Kitagawa, H., Kato, S.

Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase, LSD1.

Yokoyama, A., Takezawa, S., Schüle, R., Kitagawa, H., Kato, S.

Analysis of a novel co-repressor, Z4 with *Drosophila* molecular genetics and proteomics.

Murata, T., Sawatsubashi, S., Ito, S., Zhao, Y., Yamagata, K., Suzuki, E., Tanabe, M., Fujiyama, S., Kimura, S., Ueda, T., Matsukawa, H., Takeyama, K., Kato, S.

*Drosophila* arginine methyltransferase 1 (DART1) modulates ecdysone receptor-mediated transcription in *Drosophila* metamorphosis.

Kimura, S., Ito, S., Sawatsubashi, S.,



Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Ueda, T., Fujiyama, S., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K., Kato, S.

Integrated Signaling Network of Metabolic Dysfunction (Seoul, Korea)

©The function of nuclear receptors in bone cells.

Kato, S.

International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest under Stress (Okinawa, Japan)

Nuclear O-glycosylation regulates histone methyltransferase activity of RAIGIN during retinoic acid-induced differentiation.

Kato, S.

11th Frontiers in Nuclear Receptor Action Conference (Savannah, USA)

Sex steroid hormones mediate osteoprotective effects by controlling osteoclast life cycle.

Kato, S.

NYAS on Integrative Physiology (New York, USA)

Nuclear receptor function in skeletal tissues.

Kato, S.

Workshop on the Establishment, Maintenance, and Turnover of Fat Depots (Bethesda, USA)

A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR-gamma function.

Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Kato, S.

The Endocrine Society's 90th Annual Meeting (San Francisco, USA)

Control of gene expression by the VDR.

Kato, S.

Annal Scientific Meeting of Endocrine Society of Australia (ESA) & Society for Reproductive Biology (SRB) (Melbourne, Australia)

Function of nuclear sex hormone receptors in target tissues.

Kato, S.

Australian & New Zealand Bone & Mineral Society (ENZBMS) (East Melbourne, Australia)

Estrogen mediate osteoprotective effects by controlling osteoclast life cycle.

Kato, S., Imai, Y., Nakamura, T.

A non-canonical Wnt signal induces osteoblastogenesis through attenuated PPARgamma-mediated adipogenesis.

Kato, S., Takada, I.

Erasmus MC Lectures on Endocrinology (Rotterdam, Holland)

The molecular mechanism of osteo-protective actions of sex hormones.

Kato, S.

ASBMR 30<sup>th</sup> Annual Meeting (Montreal, Canada)

Biochemical characterization of ERα co-regulators in multinucleated mature osteoclasts.

Takada, I., Young, M.-Y., Imai, Y., Kato, S.

Multinuclear expression of ER $\alpha$  in mature osteoclasts.

Young, M.-Y., Takada, I., Kondou, S., Imai, Y., Kato, S.

Dioxin Toxicity: Mechanisms, Models, & Potential Health Risks, Michigan State University (East Lansing, USA)

©Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase.

Kato, S.

13<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE) 2008 (Rio de Janeiro, Brazil)

Androgen receptor function in gene regulation.  
Takeyama, K., Zhao, Y., Kato, S.

H. 知的所有権の取得状況

なし

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

研究分担者：笹野 公伸 東北大学大学院 医学系研究科 医科学専攻  
病理病態学講座 病理診断学分野 教授

#### 研究要旨

本研究では bisphenol A (BPA) の aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介した骨芽細胞に対する影響を検討することを目的とした。検討には、ヒト骨芽細胞株及び骨芽細胞様細胞に対し、BPA 及び 3-methylcholanthrene (3-MC) の影響を確認した。また、ヒト骨組織における AhR の発現を確認した。結果、3-MC は hFOB 及び MG-63 に対して CYP1A1 の発現を増加させ（定量的 PCR）、hFOB のマイクロアレイ解析ではエストロゲン合成/代謝酵素に関する遺伝子の変動を認めた。また、AhR はヒト骨組織においてはコラーゲン陽性細胞に発現を認めた。本検討によって、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。

#### A. 研究目的

本研究では bisphenol A (BPA) の aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介した骨芽細胞に対する影響を検討することを目的とした。

すなわち、近年、ラット骨芽細胞において AhR の発現が報告された。我々は、この骨芽細胞における AhR と内分泌攪乱化学物質 BPA の関係に注目し、ヒト骨芽細胞株及び骨芽細胞様細胞を用いた検討を行った。さらにヒト骨組織を用いた AhR の発現とその局在を検討した。

#### B. 研究方法

ヒト骨芽細胞株及び骨芽細胞様細胞に対し、BPA 及び 3-methylcholanthrene (3-MC) の影響を

確認した。さらにヒト骨組織における AhR の局在を確認した。

すなわち、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 $\mu$ M) 及び 3-MC (0.01~1 $\mu$ 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。

(倫理面への配慮)

ヒト骨組織を用いた検討は、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認を得て、実施した。

## C. 研究結果

3-MC は hFOB 及び MG-63 に対して CYP1A1 の発現を増加させ (定量的 PCR)、hFOB のマイクロアレイ解析ではエストロゲン合成/代謝酵素に関する遺伝子の変動を認めた。また、AhR はヒト骨組織においてはコラーゲン陽性細胞に発現を認めた。

すなわち、

### 1) BPA 及び 3-MC の骨芽 (様) 細胞への影響

#### 1) -1 CYP1A1 発現に対する影響

hFOB では 3-MC の添加による CYP1A1 の増加は、高濃度 (1 $\mu$ M) の添加で 1.43 倍程度の増加に過ぎなかった {Control:  $1.7 \pm 0.24$ , 1000nM 3-MC:  $2.4 \pm 0.68$  [% of RPL13A, (mean  $\pm$  SD)  $\times$

$10^{-4}$ , n=3]}。一方、MG-63 では 3-MC の濃度依存性に CYP1A1 の発現を増加し、高濃度の添加では 8.4 倍の増加が認められた {Control:  $2.5 \pm 0.04$ , 10nM 3-MC:  $11.6 \pm 0.07$ , 100nM 3-MC:  $14.8 \pm 0.48$ , 1000nM 3-MC:  $20.6 \pm 0.34$  [n=3, (mean  $\pm$  SD)  $\times 10^{-4}$ ]}。

#### 1) -2 マイクロアレイ解析

hFOB において、3-MC 添加で 2 倍以上増加した遺伝子の中で、今後、以下の 5 遺伝子について骨芽細胞に対する発現意義を検討していく予定である: cytochrome P450 1B1 (CYP1B1)、microsomal epoxide hydrolase (EPHX1)、cytochrome c oxidase 7A2 (COX7A2)、sulfotransferase 1A1 (SULT1A1)、aromatase (CYP19)。今回の hFOB のマイクロアレイの解析では、3-MC の添加による CYP1A1 の誘導は確認できなかった

### 2) ヒト骨組織における AhR の発現

検討した全ての症例で、AhR の発現を認めた。この AhR 局在についてはコラーゲン陽性細胞に一致し、骨芽細胞であると考えられた。

## D. 考 察

骨芽細胞に対する内分泌攪乱化学物質の影響について、我々は BPA の SXR を介した作用を報告した (笹野, 平成 19 年度井上班会議, 2007)。一方、Xenobiotics の代謝に関しては AhR が関与する経路が古くから注目されており、実際、骨組織においてもラット骨芽細胞様細胞 (ROB、UMR-106)、Preosteoblastic 細胞 (MC3T3-E1) での AhR の発現が報告されている (Mandal, 2005, *J Comp Physiol*; Wejheden et al., 2006, *Biochem Biophys Res Commun*)。UMR-106 では、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 添加によ

って、AhR の応答遺伝子である CYP1A1 の発現が増加することが確認されている (Wejheden et al., 2006, *Biochem Biophys Res Commun*)。本研究でのヒト骨組織を用いた検討においては、コラーゲン陽性骨芽細胞に強く AhR の発現が認められた。近年 Ryan ら (2007, *J Bone Miner Res*) は、AhR はラットの骨芽細胞において、アルカリファオスファターゼを発現する比較的未熟な段階から発現し、オステオカスシンを発現する段階では発現しないことを報告した。以上のことから、AhR 作動化学物質が骨芽細胞の成熟段階に作用することにより、正常な骨組織の形成に影響を及ぼすことが示唆される。本研究ではさらに BPA が骨芽細胞に対して AhR を介した攪乱作用を有することを確認した。SXR については骨芽細胞における標的遺伝子が既に明らかにされている。AhR においても骨芽細胞特異的標的遺伝子の存在が示唆され、本研究でのマイクロアレイ解析はその一端を明らかにするものである。本研究でのマイクロアレイ解析では、エストロゲン代謝関連酵素 (CYP1B1, CYP19, SULT1A1) の発現に注目するが、今後さらなるこれら遺伝子群と AhR の genomic な関係を解明しなければならない。

以上、BPA を含めた内分泌攪乱化学物質の骨芽細胞に対する影響における AhR の役割を、今後さらに明確にしていくことが課題である。

## E. 結論

本検討によって、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。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nagasaki S, Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Kitada K, Ishida T, Handa H, Ohuchi N, **Sasano H**; 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12 in human breast carcinoma: a prognostic factor via potential regulation of fatty acids synthesis; *Cancer Research*. in press
- 2) Sato R, Suzuki T, Katayose Y, Miura K, Shiiba K, Tateno H, Miki Y, Akahira J, Kamogawa Y, Nagasaki S, Yamamoto K, Ii T, Egawa S, Dean B. Evans, Unno M, **Sasano H**; Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in colon carcinoma: regulators of intratumoral estrogen concentrations and potent prognostic factor; *Cancer Res*. in press
- 3) © Nakamura Y, Suzuki T, Arai Y, **Sasano H**; Nuclear Receptor DAX1 in Human Prostate Cancer: A Novel Independent Biological Modulator; *Endocr J*. 2008 [Epub ahead of print]
- 4) © Nakamura Y, Vargas Morris C, **Sasano H**, Rainey WE; DAX-1A (NR0B1A) Expression Levels are Extremely Low Compared to DAX-1 (NR0B1) in Human Steroidogenic Tissues; *Horm Metab Res*. 2008 [Epub ahead of print]
- 5) Suzuki T, Miki Y, Ohuchi N, **Sasano H**; Intratumoral estrogen production in breast

- carcinoma: significance of aromatase; Breast Cancer. 2008;15(4):270-7.
- 6) Niikawa H, Suzuki T, Miki Y, Suzuki S, Nagasaki S, Akahira J, Honma S, Evans DB, Hayashi S, Kondo T, **Sasano H**; Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma; Clin Cancer Res. 2008;14(14):4417-26.
- 7) Matsumoto M, Yamaguchi Y, Seino Y, Hatakeyama A, Takei H, Niikura H, Ito K, Suzuki T, **Sasano H**, Yaegashi N, Hayashi S; Estrogen signaling ability in human endometrial cancer through the cancer-stromal interaction; Endocr Relat Cancer. 2008;15(2):451-63.
- 8) Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Moriya T, Ohuchi N, **Sasano H**; Aromatase in human breast carcinoma as a key regulator of intratumoral sex steroid concentrations; Endocr J. 2008;55(3):455-63.
- 9) Shibuya R, Suzuki T, Miki Y, Yoshida K, Moriya T, Ono K, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, Evans DB, **Sasano H**; Intratumoral concentration of sex steroids and expression of sex steroid-producing enzymes in ductal carcinoma in situ of human breast; Endocr Relat Cancer. 2008;15(1):113-24.
- 10) © Nakamura Y, Aoki S, Xing Y, **Sasano H**, Rainey WE. Metastin stimulates aldosterone synthesis in human adrenal cells. Reprod Sci. 2007;14(8):836-45.
- 11) © **Sasano H**, Suzuki T, Miki Y, Moriya T; Intracrinology of estrogens and androgens in breast carcinoma; J Steroid Biochem Mol Biol. 2008;108(3-5):181-5
- 12) ©三木康宏、**笹野公伸**; 内分泌攪乱物質と骨; 医学のあゆみ No.224 Vol. 11 TOPICS, pp. 873-874, 医歯薬出版株式会社, 2008
- ## 2. 学会発表
- 1) © 骨芽細胞に対するエストロゲン受容体作動薬の直接作用の比較; 三木康宏、端 秀子、長崎修治、赤平純一、鈴木 貴、**笹野公伸** (第 29 回東北骨代謝研究会 2008 年 仙台市)
- 2) © 食道扁平上皮癌における SXR、MDR1、MRP2 の免疫組織化学的検討; 武山大輔、藤島史喜、三木康宏、赤平純一、鈴木 貴、宮崎修吉、**笹野公伸** (第 97 回日本病理学会総会 2008 年 金沢市)
- 3) © ヒト骨組織における Steroid and Xenobiotic Receptor の発現とその作用; 三木康宏、長崎修治、端 秀子、赤平純一、鈴木 貴、**笹野公伸** (第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 2008 年 東京都)
- 4) © ヒト骨肉腫における性ステロイドホルモンの作用; 土肥 修、羽鳥正仁、鈴木 貴、小野克彦、保坂正美、赤平純一、三木康宏、長崎修治、井樋栄二、**笹野公伸** (第 41 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 2008 年 浜松市)



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

研究分担者 山崎聖美 国立健康・栄養研究所基礎栄養プログラム 上級研究員

### 研究要旨

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について調べる。C57BL/6 マウスに総エネルギー比 30%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 $\mu$ g、0.05 $\mu$ g、0.5 $\mu$ 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、脂肪組織について調べた。BPA 投与群では、脂肪組織重量については差がみられなかったが、肝臓 TG 量が増加しており、肝臓では、TG 合成にかかわる核内受容体 PPAR $\gamma$ の標的遺伝子であり、肝臓への脂肪酸流入を行う CD36 の発現が増加していた。BPA 摂取により非アルコール性脂肪性肝炎にいたる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

核内受容体に作用する化学物質がマクロファージなどの免疫担当細胞に及ぼす影響について調べる。すなわち、核内受容体に作用するある種の化学物質はマクロファージ機能に影響し、脂肪組織機能を悪化させ肥満へ導き、肝臓に脂肪を蓄積させ非アルコール性脂肪性肝炎（nonalcoholic steatohepatitis：NASH）を発症させる。肥満や脂肪肝は糖尿病、生活習慣病発症へつながる。そこで、特に意図せず摂取し、核内受容体に作用する化学物質として考えられる BPA のマクロファージ機能、肥満、脂肪肝発症に与える影響について検討した。

### B. 研究方法

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 $\mu$ g、0.05 $\mu$ g、0.5 $\mu$ 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 $\mu$ g、0.05 $\mu$ g、0.5 $\mu$ 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 週間および 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。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、国立健康・栄養研究所倫理委員会の承認を得て実施した。

### C. 研究結果

脂肪組織重量については差がみられなかったが、肝臓 TG 量が増加しており、肝臓では、TG 合成にかかわる核内受容体 PPAR $\gamma$  の標的遺伝子で肝臓への脂肪酸流入を行う CD36 の発現が増加していた。

すなわち、体重、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、脾臓重量は 10 週投与、20 週投与ともにコントロール群と BPA 投与群に差はみられなかったが、胸腺重量のみ 10 週投与で BPA0.5 $\mu$ g/ml 投与群のみ有意に減少していた。肝臓 TG 量は、10 週投与では BPA 投与群で増加傾向にあったもののコントロール群と差はみられなかったが 20 週投与では、BPA0.05 $\mu$ g/ml 投与群でコントロール群に比べ有意に増加していた。

肝臓における mRNA の発現について調べた結果、10 週投与、20 週投与のいずれにおいても脂肪酸合成を制御する転写因子 SREBP-1c の発現が BPA0.005 $\mu$ g/ml 投与群では有意に減少、BPA0.05 $\mu$ g/ml 投与群では減少傾向にあった。また、SREBP-1c に発現

制御を受ける遺伝子 FAS、ACC1、Elovl6、GPAT などの発現も BPA0.05 $\mu$ g/ml、0.005 $\mu$ g/ml 投与群で減少していた。脂肪合成にかかわる核内受容体 PPAR $\gamma$  の標的遺伝子であり脂肪酸の流入を行う CD36 の発現は、10 週投与では BPA0.005 $\mu$ g/ml 投与群で、20 週投与では BPA0.05 $\mu$ g/ml、0.005 $\mu$ g/ml 投与群で増加していた。脂肪酸酸化に関わる遺伝子の発現には変化はみられなかった。

### D. 考察

脂肪肝はメタボリックシンドロームの初発症状である。特に、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) はメタボリックシンドロームの肝における表現型といわれ、肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣を背景に発症する。NAFLD の約 1 割は NASH へ、そしてさらに肝硬変、肝癌へと進展する。さらに、日本人中年男性において、NASH は II 型糖尿病の危険因子であるとの報告もある。昨年度は日本人の食事摂取基準にあわせ、総エネルギーに対し脂質エネルギー比率が 30% であるエサをマウスに食べさせ 30 週間 BPA 投与を行った。その結果、BPA 0.05 $\mu$ g/ml 投与群で脂肪肝を発症した。そこで、今年度は脂肪肝発症の過程を明らかにする目的で、同様の条件で 10 週間、および 20 週間の投与実験を行った。その結果、20 週投与後から BPA 0.05 $\mu$ g/ml 投与群で脂肪肝を発症することが明らかになった。1 個体あたり、BPA を約 7 $\mu$ g/kg/day 摂取し続

けたことになる。

肝臓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。CD36 の発現増加により、血中遊離脂肪酸が肝臓に取り込まれ、肝臓に脂肪が蓄積したものと考えられる。一般に、SREBP-1c は活性化された場合に脂肪酸合成がさかんになり脂肪肝になる。しかし、本研究では肝臓脂肪量が増加したにもかかわらず SREBP-1c の活性が低下していた。メカニズムは不明だが、絶食した場合に同様の現象がみとめられる。すなわち、絶食すると脂肪組織から遊離脂肪酸が肝臓へと流れ込み、脂肪肝になるが、この場合、SREBP-1c の活性は低下する。脂肪酸流入により肝臓に多量の脂肪が蓄積するために、脂肪酸合成を抑制するようなシステムが存在している可能性がある。

以上、本研究から、BPA のような化学物質を意図せず摂取し、脂肪肝あるいは肥満、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。

## E. 結論

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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Fish oil fed prior to ethanol administration prevents acute ethanol-induced fatty liver in mice.

Wada S, Yamazaki T\*, Kawano Y, Miura S, Ezaki O. J Hepatol., 49(3):441-450, 2008 (\*Corresponding author)

## 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）

研究分担報告書

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

研究分担者 五十嵐 美德 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

研究要旨

bisphenol A (BPA)のNKT細胞のTヘルパー(Th) 1/Th2 産生バランス異常の誘導のメカニズムを解明する。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 *in vitro*で解析した。BPAによる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。

A. 研究目的

bisphenol A (BPA)のNKT細胞のTヘルパー(Th) 1/Th2産生バランス異常の誘導のメカニズムを解明する。

BPAはNKT細胞のサイトカイン産生バランスを攪乱し、Th2優位にする。BPAによるサイトカイン産生異常がNKT細胞に対する直接的な影響なのか抗原提示細胞を介した間接的な影響かについて検討した。

B. 研究方法

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 *in vitro*で解析した。

BALB/cマウス(オス5~6週齢)の脾細胞を $\alpha$ -galactosylceramide( $\alpha$ -GalCer)およびBPA( $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$ 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。

(倫理面への配慮)

国立がんセンター動物実験倫理委員会規定に基づき、動物実験を行なった。

C. 研究結果

BPAによる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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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。また、LPS刺激によりAPCはIL-10およびIL-12産生するが、BPAの影響は認められなかった。

D. 考察

核内受容体作動性化学物質が免疫系のTh1/Th2バランスに影響を及ぼし、Th2優位な反

応を引き起こし、アレルギーの発症と関連することが報告されている。これまでわれわれは免疫応答を制御するNKT細胞に着目し、BPAによってNKT細胞のサイトカイン産生がTh2優位になることを*in vivo*及び*in vitro*で明らかにしてきた。BPAが直接的にNKT細胞に影響を及ぼすのか、あるいはAPCなどを介して間接的にNKT細胞のTh1/Th2バランスに影響を及ぼすのかについて検討した。*in vitro*では、BPAはAPCのIL-10及びIL-12産生に影響を及ぼさないことから、NKT細胞自身が直接的にBPAによってTh2優位に産生する細胞に偏向することが示唆された。BPAが*in vitro*では何らかの機序でNKT細胞の増殖を促進することから、NKT細胞が増殖あるいは成熟の過程でBPAによって選択的にTh2に偏向したNKT細胞を増殖させる可能と考えられる。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書への記載は不要)

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kawamura T, Takeda K, Kaneda H, Matsumoto H, Hayakawa Y, Raulet DH, Ikarashi Y, Kronenberg M, Yagita H, Kinoshita K, Abo T, Okumura K and Smyth MJ. NKG2A inhibits iNKT cell activation in hepatic injury. *J Immunol.* (in press).
2. ©Imataki O, Heike Y, Makiyama H, Iizuka A, Ikarashi Y, Ishida T, Wakasugi H and Takaue y. Insufficient ex vivo expansion of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> natural killer T cells in malignant lymphoma patients related to the suppressed expression of CD1d molecules on CD14<sup>+</sup> cells. *Cytotherapy.* 2008, 10: 497-506.
3. Chen S, Ndhlovu LC, Takahashi T, Takeda K, Ikarashi Y, Kikuchi T, Murata K, Pandolfi PP, Riccardi C, Ono M, Sugamura K, Ishi N. Co-inhibitory roles for glucocorticoid-induced TNF receptor in CD1d-dependent natural killer T cell. *Eur J Immunol.* 2008; 38: 2229-2240.

##### 2. 学会発表

1. 急性graft-versus-host 病(GvHD)マウスモデルにおけるドナー細胞の*in vivo* 蛍光イメージング解析 第70回日本血液学会総会(京都) 2008年10月11日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし



## 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

研究分担者 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

### 研究要旨：

内分泌かく乱化学物質の作用を、脳海馬の神経系を対象に解析した。ある種の内分泌かく乱化学物質は、海馬スライス中の神経 3 次元可視化解析で、神経スパインを増加させることを見出した。海馬スライスの電気生理解析では、これらの物質がシナプス伝達の長期抑圧を強化したり、弱体化したりする急性効果を見出した。エストロゲンの効果と比較して検討したが、これら内分泌かく乱化学物質は、海馬神経に発現しているエストロゲン受容体を介して作用している可能性が高い。

### A. 研究目的

17 $\beta$ -エストラジオール（女性ホルモン）は神経細胞の可塑性に効果がある。内分泌かく乱物質は血流に乗って1時間程度で脳に到達し、作用する。本研究において我々は、記憶の中枢である海馬の神経細胞に対する、内分泌かく乱化学物質の、シナプス可塑性に対する作用を解明することを目指す。作用の情報伝達経路の解明を目指して、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や、内分泌かく乱化学物質特有の受容体も探索することも目的とする。海馬内の内分泌かく乱物質の存在を質量分析で定量する。

### B. 研究方法

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する。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探る。

### （倫理面への配慮）

全ての動物実験は東京大学の定める基準に従って行い、適切に管理された飼育環境の実現や実験に際しての麻酔等によって、動物に無用な苦痛を与えないよう配慮した。

### C. 研究結果

1) 成獣ラット海馬で、10 nM ビスフェノール A (BPA), 1 nM DES, 10 nM エストラジオールは2時間以内で、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。頭の直径の細かい small-head (0.2-0.4  $\mu$ m) と middle-head (0.4-0.5  $\mu$ m) というスパインが特に増加した。MAP kinase を阻害、あるいは NMDA 受容体をブロックするとこの BPA の作用は無くなった。2) 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。3) 環境ホルモンであるBPAのhigh affinity受容体としてEstrogen-related receptor protein  $\gamma$  (ERR $\gamma$ )の海馬での発現を調べた。その結果、海馬のCA1、CA3、DGの神経細胞にERR $\gamma$ が発現していることを見出した。ERR $\gamma$ はWesternブロットでシナプス膜画分(PSD)にも発現していることも確認した。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

海馬内に64 nMのBPAが存在するのに、10 nMのBPAを外部から加えてスパインが増えるというのは、一見すると矛盾に見える。しかし、これは、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考えられる。実際、ACSFで洗い流して、スパイン新生や電気生理学の実験条件を再現した状態の海馬スライスに含まれるBPAを質量分析で定量したところ、濃度が0.5 nM以下に減少していた。もし、洗い流さずに、取り出したばかりの海馬スライスに10 nMのBPAを添加したとすれば、上記の効果は観察されなかったと考えられる。東京大学医学部堤研究室のELISAを用いた先行研究で、血中のBPA濃度は24.9 ng/mL (110 nM)であることから、今回測定された海馬のBPA濃度は、血流を通じて脳内に運ばれ、海馬に蓄積されたと考えてつじつまが合う。

#### E. 結論

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ス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。海馬シナプスにもBPAの受容体ERR $\gamma$ が存在していた。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ogiue M., Tanabe N., Mukai H., Hojo Y, Murakami G, Takata N, Tsurugizawa T, Shimohigashi Y., Honma S, Komatsuzaki Y, Kimoto T and Kawato S. Rapid Modulation of Long-term Depression and Spinogenesis by Endocrine Disrupters in Adult Hippocampal Neurons. *Brain Res Rev.*, 57, 363-375 (2008)

Hojo Y., Murakami G., Mukai H., Higo S., Hatanaka S., Ogiue-Ikeda M., Ishii H., Kimoto T. and Kawato S. Estrogen synthesis in the brain – Role in synaptic plasticity and memory. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 290, 21-43 (2008)

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)

## 2. 学会発表

### 国際会議

1. Kawato, S., Mukai, H., Ogiue-Ikeda, M., Murakami, G., Hojo, Y., Tsurugizawa, T.

“Rapid modulation of spines and LTD by estradiol in adult rat hippocampus: neuro-synaptocrinology” The 37th annual meeting of the Society for Neuroscience, in San Diego, November, 2007

2. Kawato S., Mukai H., Hojo Y., Murakami G., Higo S., Hatanaka Y., Kimoto T.

“Rapid modulation of synaptic plasticity by hippocampus-derived estrogens: Synaptocrinology” US/JAPAN Neurosteroid symposium 2008, Gifu, September, 2008

3. Hojo Y., Higo S., Mukai H., Murakami G., Kominami S., Yamazaki T., Harada N., Honma S., Kimoto T. and Kawato S.

“Neurosteroid synthesis and synaptocrinology in the hippocampal synapses.” US/JAPAN Neurosteroid symposium 2008, Gifu, September, 2008

4. Higo S., Mukai H., Ogiue-Ikeda M., Murakami G. and Kawato S. “Synaptic localization of estrogen receptor and its rapid action on synaptic plasticity of rat hippocampus” US/JAPAN Neurosteroid symposium 2008, Gifu, September, 2008

### 国内学会

1. 伊藤光 畑中悠佑 荻上(池田)真理 川戸佳「環境ホルモンの脳海馬記憶学習への作用」第10回日本内分泌攪乱化学物質学会、2007年12月

2. 大石悠貴、北條泰嗣、川戸佳 「海馬 CA1 の長期増強に対する神経ステロイド作用の解析」第45回日本生物物理学会年会 2007年12月

3. 佐藤怜以、畑中悠佑、釣木澤朋和、川戸佳「女性ホルモンによる海馬神経スパインの形態変化」第45回日本生物物理学会年会 パシフィコ横浜 2007年12月

4. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳 「海馬樹状突起スパインに及ぼす男性ホルモンの急性的効果」第45回日本生物物理学会年会 パシフィコ横浜 2007年12月

5. 向井秀夫、村上元、北條泰嗣、小南思郎、木本哲也、川戸佳「ラット海馬にお

けるエストロゲン受容体分布局在の解析」第45回日本生物物理学会年会 2007年12月

6. 大石悠貴、川戸佳 「海馬 CA1 におけるニューロステロイドのシナプス伝達修飾の解析」

第31回神経科学大会、2008年7月

7. 畑中悠佑、木本哲也、川戸佳

「海馬樹状突起スパイン形態に及ぼす男性ホルモンの急性効果」第31回神経科学大会、2008年7月

8. 木本哲也、肥後心平、石井寛高、村上元、川戸佳「ラット海馬におけるニューロステロイドの受容体と合成酵素の発現解析」第31回神経科学大会 2008年7月

9. 村上元、佐藤怜以、釣木澤朋和、畑中悠佑、小松崎良将、北條泰嗣、向井秀夫、木本哲也、川戸佳「海馬におけるエストロゲンのスパイン制御作用」第31回神経科学大会、2008年7月

10. 北條泰嗣、肥後心平、向井秀夫、村上元、小南思郎、原田信広、本間誠次郎、木本哲也、川戸佳「海馬神経細胞シナプスにおけるニューロステロイドの合成と局所分泌」第31回神経科学大会、2008年7月

## 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