

Fig. 6 Survival rate of females

9. 化学物質の齧歯類周産期暴露による雌性生殖器等の遅発性障害の研究

研究分担者 松島 裕子 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究要旨

先行研究班で実施された委託研究において、低用量 Bisphenol A (BPA 0.5、5、50 µg/kg) を母 SD ラットの妊娠期～授乳期に投与し、得た雌性児 (F1) の性周期が 6 ヶ月齢において、溶媒対照群には異常は見られないところ、5 µg/kg 群において異常性周期を呈する動物数が有意に増加すること、更に月齢が進むに従い溶媒対照群にも異常が出現し始めるが全ての BPA 投与群の性周期異常がそれを上回ることが示された。

本研究は、上記試験と同様のプロトコール (BPA 0、5、50 µg/kg) を踏襲した実験を行い、6 ヶ月齢までの経時的な視床下部、下垂体、卵巢等の遺伝子発現の解析及び病理組織等を詳細に検査することにより、性周期異常が誘導されるメカニズムを明らかにする事を目的とする。

6 ヶ月齢時の性周期検査では、性周期異常を示す動物が対照群 5/23 例 (21.7%)、5 µg/kg 群 12/19 例 (63.2%)、50 µg/kg 群 8/17 例 (47.1%) であり BPA 投与群で発生頻度が増加した。6 ヶ月齢時に持続発情前期及び持続発情期を呈した動物の卵巢の絶対及び相対重量は溶媒対照群に比し有意に低値であり、病理組織学的検査では卵胞 (濾胞) 囊胞の形成と黄体形成不全がみられ、下垂体の GnRH 受容体 mRNA の発現が有意に低値であった。

A. 研究目的

本研究は、低用量 BPA の齧歯類への周産期暴露により性周期異常が誘導されるメカニズムを解明することを目的とする。

の検疫、馴化期間終了後、健常である事が確認されたラットを雄 1 対雌 2 で一晩同居させ、翌朝膣栓及び膣垢中の精子の存在をもって交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠 0 日と定めた。

B. 研究方法

1) 被験物質及び投与方法

BPA (関東化学(株)、CAS No. 80-50-7、Lot. No.807W2221) は、オリーブ油 ((株)フヂミ製薬所 LotNo.0040MR) に溶解し、0 (溶媒対照; リーブ油)、5 及び 50 µg/kg/day、投与容量 5mL/kg を各群、交尾が確認された雌に対し妊娠 6 日～分娩後 (PND) 20 日 (離乳前日) まで 1 日 1 回、毎日強制経口投与した。投与量は最新の体重値を基に算出した。

ラットは、床敷きとしてソフトチップ (三協ラボ株式会社; 加熱乾燥済み) を入れたポリオレフィン樹脂ケージ (CL-0108-2 クリーン 200TPX 日本クレア株式会社、D420×W263×H199) に雌雄とも個別に収容し、温度 25±1°C、湿度 50±5%、換気回数 12 回/時、明暗サイクル 12 時間明 (7:00-19:00) -12 時間暗 (19:00-7:00) に設定された動物室で飼育した。

飼料は MF (オリエンタル酵母株式会社)、飲料水は給水瓶に上水道水を入れ、いずれも自由摂取させた。

2) 試験動物及び飼育環境

10 週齢の Crl: CD (SD) IGS ラット (日本チャールス・リバー・株)、雌 42 匹、雄 21 匹を 7 日間

収容匹数は、検疫・馴化期間は雌雄共 1 匹/ケージ、交配は雄 1 対 2 雌とし、妊娠期間中は 1 匹/ケージ、分娩後は翌日まで母動物 1 匹+

全腹/ケージ、哺育 2 日目から離乳まで同腹児数を原則として雌性児 8 匹となるよう調整した。同腹児数が 8 匹に満たない場合は個体数調整は行わないこととした。離乳以降は 2 匹以下/ケージとした。

3) 母動物

母動物の体重は妊娠 0、6、14、17 及び 20 日、分娩後 0、5、7、14 及び 21 日(出生児の離乳日)に測定した。妊娠動物の全例を自然分娩させ、出生日(分娩日を分娩 0 日とした)に出産児数、出産死亡児数、出産生児性を記録した。

4) 児動物

離乳児全例について、21 日齢から膣開口を観察した。

雌性児については、離乳翌日 PND21、PND40、3 ヶ月齢及び 6 ヶ月齢時に解剖し、下記の項目の検査・検体採取を行った。PND40 以降は膣スメアにより発情前期にあることを確認した上で剖検に供した。

検査・検体採取項目;

- ①血清: prolactin、LH、FSH、E2 値測定用
- ②視床下部: RNAlater 保存(定量 RT-PCR 用)
- ③下垂体: 重量測定、全解剖例の半数は RNAlater 保存、残りの半数は 10%ホルマリン固定(定量 RT-PCR 及び prolactin 免疫組織化学染色用)
- ④卵巢: 重量測定、メタカーン固定(病理組織用)
- ⑤乳腺: whole mount preparation
- ⑥子宮: 重量測定、10%ホルマリン固定(病理組織用)
- ⑦膣: 解剖例の半数は 10%ホルマリン固定、残りの半数は RNAlater 保存(病理組織用及び RT-PCR 用)

5) スメアによる性周期判定:

全ての出生児について 3 ヶ月齢から 6 ヶ月齢まで性周期の観察を行った。14 日間連続膣スメア採取後、2 週間休止した。膣スメアは午前 10:00 から 12:00 の間に採取し、ギムザ染色後、性周期を、発情前期、発情期、発情後期、休止期の 4 区分に分類した。Normal、persistent diestrus (休止期が 5~9 日継続)、constant diestrus (休止期が 10 日以上継続)、persistent estrus (発情期及び発情前期が 3-7 日継続)、constant estrus (発情期及び発情前期が 8 日以上継続)に分類した。2 週間の観察期間の中で休止期の継続と発情期の継続が認められた場合には、発情期の継続を分類として採用した。また、いずれの分類区分にもあてはまらないが、不規則な性周期を示した個体については irregular estrus とした。

6) 下垂体の GnRH 受容体 mRNA の発現 全 RNA の抽出と cDNA の合成

下垂体を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社)に浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作まで -80℃にて保存した。RNAlater を除いた後、RNeasy kit (キアゲン社)添付の RLT buffer を用いて組織破碎液を調製し、DNA 定量用蛍光試薬である Picogreen を用いて、破碎液中の DNA 量を測定した。DNA 量に応じて (Spike factor=0.003µL/ng DNA)、Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の mix)を添加し、TRIzol を用いて粗抽出した液を RNeasy kit を用いて全 RNA 精製した。得た全 RNA の 0.5µg を電気泳動し品質を確認した。

全 RNA 1 µg をオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を作製した。

定量 RT-PCR

96 well プレート、サンプル量 25µL とし、

SYBR Green 試薬 (ABS) を用い、初期変性後 (95°C, 10sec)、ニーリング温度 60°C 1sec で PCR を行った。定量は ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) を用いて行った。

Dissociation Stage により融解曲線分析を行い、primer dimer の無いことを確認した。

(倫理面への配慮)

国立医薬品食品衛生研究所・動物実験倫理委員会の制定する「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程」に従い実験を行っている。

C. 研究結果

母動物;

妊娠期間中、溶媒対照群及び BPA 投与群とも母動物の一般状態、体重に異常は見られなかった。

出生児;

分娩時の平均出産数は、溶媒対照群、BPA 5 µg/kg 及び BPA 50 µg/kg 群、各々 14.8 ± 1.0 (母動物数 n=9)、13.4 ± 4.0 (n=11) 及び 14.1 ± 2.10 (n=11)、平均雄児数 (F1) は、各々 6.9 ± 1.1、6.9 ± 3.7 及び 7.4 ± 2.5、平均雌児数 (F1) は、各々 7.9 ± 1.2、6.3 ± 3.3 及び 6.5 ± 2.6 であり、溶媒対照群と BPA 投与群との間に有意な差はみられなかった。

膣開口検査;

溶媒対照群、BPA 5 及び 50 µg/kg 群の平均膣開口齢は各々 33.1 ± 1.2 (n=53)、34.1 ± 2.1** (n=47)、33.3 ± 1.9 (n=48) であり、5 µg/kg 群において溶媒対照群との間に有意 (**; p<0.01) な遅延がみられた。平均膣開口日の体重 (g) は各々 121.3 ± 11.9、127.2 ± 15.2*、125.5 ± 13.1 であり、5 µg/kg 群において有意 (*; p<0.05) に高値であった。

性周期検査;

3 ヶ月齢時の性周期検査では、溶媒対照群、BPA 5 µg/kg 群及び 50 µg/kg 群で各々 0/23、1/19、1/17 例が性周期異常を示した。

4 ヶ月齢時の性周期検査では、溶媒対照群、BPA 5 µg/kg 群及び 50 µg/kg 群で各々 3/23、4/19、5/17 例が性周期異常を示した。

5 ヶ月齢時の性周期検査では、溶媒対照群、BPA 5 µg/kg 群及び 50 µg/kg 群で各々 2/23、6/19、1/17 例が性周期異常を示した。

6 ヶ月齢時の性周期検査では、溶媒対照群、BPA 5 µg/kg 群及び 50 µg/kg 群で各々 5/23、12/19、8/17 例が性周期異常を示した。

統計学的には、BPA 5 µg/kg 群の 6 ヶ月齢時の総異常性周期動物数が有意な増加を示した。

6 ヶ月齢時の臓器重量;

全ての臓器において絶対及び相対重量とも溶媒対照群と BPA 投与群との間に差はみられなかった。一方、卵巣の相対及び絶対重量は、正常な性周期を示す動物に比し、持続発情あるいは持続発情前期を示す動物では有意に低値であった。

6 ヶ月齢時の卵巣の病理組織学的検査;

持続発情期及び持続発情前期を呈した動物に卵胞嚢胞の形成と及び黄体の形成不全がみられた。

乳腺の whole mount preparation 検査;

6 ヶ月齢時では、対照群に比し BPA 投与群において持続休止期を呈した動物の terminal end buds の拡張傾向が認められた。

血清生化学検査;

E2 値は、正常な性周期を示す動物では、溶

媒対照群と BPA 投与群では差は見られなかった。一方、溶媒対照群及び同群の正常性周期を示す動物に比し BPA 5 µg/kg では、持続休止期を呈する動物、BPA 50 µg/kg 群では持続発情期及び持続休止期を示す動物で有意に低値であった。

血清 FSH 値は、正常な性周期を示す動物では、溶媒対照群と BPA 投与群では差は見られなかった。一方、BPA 5 µg/kg 群では溶媒対照群で正常性周期を示す動物に比し持続発情期を示す動物で有意に高値であった。BPA 50 µg/kg 群では同群で正常性周期を示す動物に比し、持続発情期及び irregular cycle を示す動物が有意に高値であった。

血清 LH 値は、溶媒対照群で正常な性周期を示した動物に比し、同群の irregular cycle を示す動物で有意に低値であった。BPA 5 µg/kg 群では溶媒対照群で正常性周期を示す動物に比し、持続発情期及び持続休止期を示す動物が有意に低値であり、更に持続休止期の動物は、同群で正常性周期を示す動物と比しても有意に低値であった。BPA 50 µg/kg 群では溶媒対照群で正常性周期を示す動物に比し、正常性周期、持続発情期及び irregular cycle を示す動物で有意に低値であった。

血清プロラクチン値は、溶媒対照群で正常な性周期を示した動物に比し、同群で irregular cycle を示す動物で有意に低値であった。BPA 5 µg/kg 群では、溶媒対照群で正常な性周期を示した動物に比し、正常性周期及び持続休止期を呈する動物において有意に低値であり、更に持続休止期を呈する動物では同群の正常性周期を示す群と比しても有意に低値であった。BPA 50 µg/kg 群では溶媒対照群で正常な性周期を示した動物に比し、正常性周期、持続休止期及び irregular cycle を示す動物が有意に低値であり、更に持続休止期を示す動物は同群の正常性周期を示す動物と比しても有意に

低値であった。

下垂体の GnRH 受容体 mRNA の発現;

正常な性周期を示す動物に比し持続発情期及び持続発情前期を示す動物において有意に低値であった。

D-E. 考察及び結論

先の委託試験において、BPA を 5 乃至 50 µg/kg/day の用量で母ラットの妊娠期～授乳期に投与し得られた雌出生児 (F1) の性周期異常が溶媒対照群に比し有意に増加したことから、BPA の低濃度の妊娠期～授乳期投与が premiddle age における性周期異常を誘導することが示された。

本研究においても、6ヶ月齢時の性周期検査において、性周期異常を示す動物が溶媒対照群では 5/23 例 (21.7%)、5 µg/kg 群では 12/19 例 (63.2%)、50 µg/kg 群では 8/17 例 (47.1%) であり、統計学的に 5 µg/kg 群において有意な発生頻度の増加を示し、再現性のある変化であることが示された。

血清 LH 値は、溶媒対照群で正常な性周期を示した動物に比し、BPA 投与群では性周期異常を示した動物において有意に低値であった。今回、持続発情期及び持続発情前期を呈する動物では GnRH 受容体 mRNA の発現が有意に低値であったことから視床下部からの GnRH が下垂体の LH 分泌細胞へ十分に届いていない可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表 (発表雑誌名、巻号、ページ、発

行年)

松島 裕子、菅野 純、基礎飼料 CRF-1 と Phytoestrogen low diet のマウス妊娠期・授乳期摂取による雌雄児への影響の比較検討、環境ホルモン学会第 10 回研究発表、2007 年 12 月 9-11 日、大宮

松倉 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、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、エピジェネティクス研究会、2008 5 月、三島

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

【有害性発現分子メカニズムの解明研究】

10. ES 細胞分化増殖試験系を用いた胎児毒性評価手法の開発研究、及び AhR を介する晩発影響の解析研究

研究分担者 高木篤也

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 室長

研究要旨

Bisphenol A (BPA)の初期発生分化過程に及ぼす影響を明らかにするため、ES 細胞分化増殖試験系に 1nM の濃度で BPA を添加し、定量的なマイクロアレイ手法である Percellome 手法を用いて解析した。その結果、アンドロジェン受容体、コレステロール、エストロジェン、アンドロジェン合成に関与する遺伝子の発現が BPA 添加 1~2 日後に一過性に増加し、long non-coding RNA の Malat-1 が BPA 添加 1~7 日にかけて持続的に増加することが明らかになった。また、TCDD 及び DMSO 投与 C57BL/6 マウス肝のマイクロアレイ解析を実施し、変動する遺伝子群を同定した。

A. 研究目的

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞で、遺伝子欠失マウス作製に用いられている。一方、ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析によく用いられている。また、数百個の ES 細胞を天井培養することにより形成される胚様体 (Embryoid body (EB)) は、胎児の三胚葉形成過程を模倣することが知られることから、特に、化学物質の影響を解析することが難しい発生初期への影響を調べるモデル試験系として有用であると思われる。そこで、この『ES/EB 系』を用いて胎児発生毒性物質の有害性発現メカニズムの解明を行う。また、AhR を介する晩発影響解析に資するため、マウス肝の遺伝子発現に及ぼす TCDD の影響ならびに DMSO の影響について検討した。

B. 研究方法

胎児発生毒性物質として BPA を対象に

実験を実施した。BPA (1nM) を DMSO (final 0.1%) に溶解して、培地に添加し、ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で、最初の 2 日間は天井培養法で、次の 5 日間は浮遊培養法で、計 7 日間培養した。培養開始 1 日目から 7 日目まで毎日 EB を採取してプールし、サンプルとし、アフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。また、その解析には定量的比較を正確に行うために、我々の開発した Percellome 手法 (細胞 1 個当たりの mRNA 絶対量を得る遺伝子発現解析手法) を適用した。

AhR を介した晩発影響解析に資するため、マウス肝の遺伝子発現解析実験を実施した。すなわち、雄 C57BL/6 マウス (10 週齢) に 2,3,7,8-TCDD を 1.0 μ g/kg の用量にて経口投与した。さらに、TCDD 誘発口蓋裂を DMSO が阻害することを以前、見いだしていたので、DMSO の影響についても調べるため、DMSO を TCDD 投与 24 時間

後に 5ml/kg の用量にて単回経口投与した。DMSO 投与、2、4、8 及び 24 時間後に肝を採取、上記と同様に Percellome 手法によるマイクロアレイ解析を実施した。なお、動物への投与実験は(株)イナリサーチにて委託して実施された。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、当該施設の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用など苦痛の少ない方法を用いる。

C. 研究結果

BPA の ES/EB 系の遺伝子発現マイクロアレイ解析データの詳細な解析を実施した。すなわち、細胞当たりのコピー数や増減比による足切りを行わず、有意 ($p < 0.05$) に変動した全遺伝子の発現パターンを解析した。その結果、中胚葉、外胚葉、臓側内胚葉については影響は認められなかった。核内受容体の発現について検索したところ、androgen receptor (AR) が培養 1~2 日目で、有意に高かった(図 1)。また、コレステロール、アンドロジェン、エストロジェン合成に関与する蛋白をコードする遺伝子発現増加が BPA 添加 1~2 日目に認められた(図 2)。また、long non-coding RNA である malat-1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) の持続的発現増加が認められた(図 3)。さらに、Malat-1 遺伝子の胎児での発現部位を明らかにするため、6.5 から 9.75 日のマウス胚を用いた whole mount in situ hybridization を行ったところ、6.5 日胎児の栄養外胚葉

(trophoectoderm)を除いて明らかな局在は見られなかった(data not shown)。

TCDD 投与マウス肝の遺伝子発現解析実験では TCDD 投与後、cyp1a1、Ugdh (UDP-glucose dehydrogenase)、Notch1、Nqo1 (NADPH dehydrogenase, quinone1)等の遺伝子発現が顕著に増加した。また、DMSO は Mbd1 (methyl-CpG binding domain protein 1 と Socs2 (suppressor of cytokine signaling2)を一過性に増加させた。

D. 考察

BPA の ES/EB 系に対する遺伝子発現影響解析の結果、培養 1 日後から、androgen receptor (AR) の発現増加が認められた。なお、マウス胎児前立腺間葉系細胞に対して BPA はエストロジェンと同様にアンドロジェン受容体の発現増加を起すことが報告されている (Environ Health Perspect, 115, 902, 2007)。

コレステロール合成関連として、ミトコンドリア内膜へのコレステロール輸送に関わる Star 遺伝子、コレステロール合成の間のステロールの $\delta 24$ 二重結合の還元を触媒する Dhcr24 が増加し、アンドロジェン、エストロジェン合成に関与する Hsd17b7 酵素の増加が見られた。また、estron sulfate をエストロジェンの上流にある estron に変換する酵素の Sts も増加した。これらのことから、BPA 添加初期に、エストロジェン、アンドロジェン合成が増加していることが示唆された。また、long non-coding RNA である Malat-1 が増加した。Malat-1 の機能は不明であるが、RNA のスプライシングに関与していることが示唆されており (BMC genomics 8, 39, 2007)、初期胚において BPA により RNA

のサプライシングが影響されることが示唆された。分化関連遺伝子の解析から、本実験条件下では内胚葉、中胚葉、外胚葉等への明らかな影響は認められなかった。

TCDD 投与により *cypla1* や *Ugdh* 等の既知のダイオキシンで誘導される遺伝子発現が確認された。DMSO はメチル化に関与する MBD1 やサイトカインシグナルを抑制する *Socs2* の発現を増加させた。今後、これらの増加が TCDD による遺伝子発現に影響するか、マイクロアレイデータ解析をさらに進めていく予定である。

E. 結論

ES 細胞及び EB の分化に対する BPA の影響を定量的マイクロアレイ手法を用いて解析した結果、アンドロジェン受容体、コレステロール、エストロジェン、アンドロジェン合成に関与する遺伝子の発現が BPA 添加 1~2 日後に一過性に増加し、long non-coding RNA の *Malat-1* が BPA 添加 1~7 日にかけて持続的に増加することが明らかにした。TCDD 及び DMSO 投与 C57BL/6 マウス肝のマイクロアレイ解析を実施し、変動する遺伝子群を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

書籍

なし

雑誌

Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of

multi-wall carbon nanotube, Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Tetsuji Nishimura, Nobutaka Fukumori, Akio Ogata, Norio Ohashi, Satoshi Kitajima and Jun Kanno, *J. Toxicol. Sci.*, 33, 105-116, 2008.

トキシコゲノミクスの新展開 Percellome Project による 2,3,7,8-TCDD-

2,3,7,8-TCDF 比較、菅野純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋聡、中津則之、児玉幸夫、高木篤也、細胞工学、26、1391-1396、2007

Percellome Project による毒性トランスクリプトミクス of 新しい試み、菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、細胞工学、26、71-77、2007

2. 学会発表

Percellome 手法によるマウス ES 細胞分化過程における遺伝子発現の経時データベースの構築と活用、高木篤也、北嶋聡、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第 32 回日本分子生物学科会年会、2009 年 12 月、横浜

Quantitative microarray analysis by "Percellome" method on murine embryonic stem cells and embryoid bodies, Takagi A, Kitajima S, Nakatsu N, Igarashi K, Aisaki K, Ema M and Kanno J, 47th Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2008 年 3 月

マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子の Percellome 手法を用いた定量的マイクロアレイ解析、高木篤也、中津則之、五十嵐

勝秀、相崎健一、菅野純、第30回日本分子生物学会年会、2007年12月、横浜

マウスES細胞分化系における分化マーカー遺伝子発現パターンの解析(その2)、高木篤也、北嶋聡、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第34回日本トキシコロジー学会学術年会、2007年6月、東京

Quantitative microarray analysis with “Percellome” method in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated murine fetal palate, Takagi A, Nakatsu N, Igarashi K, Aisaki K, Ema M and Kanno J
46th Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2007年3月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

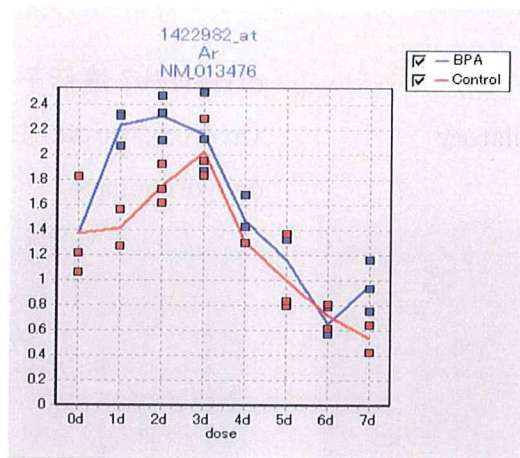
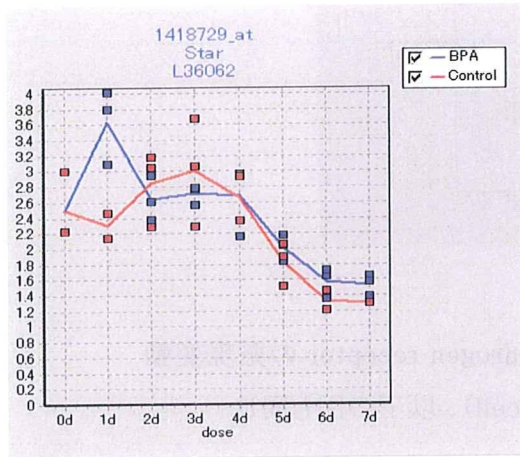
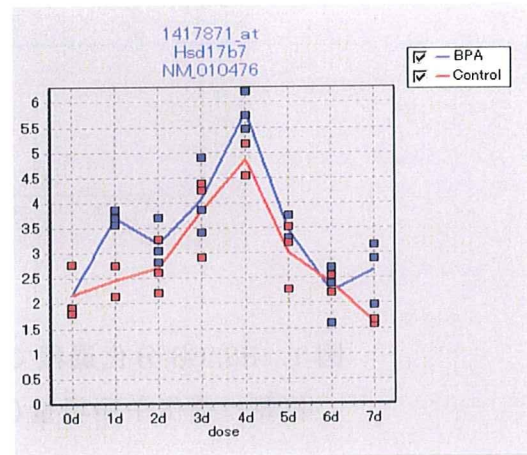


図 1. ES/EB 分化過程での Androgen receptor の発現変動
縦軸は遺伝子発現量 (copy/cell)、以下の図も同じ。

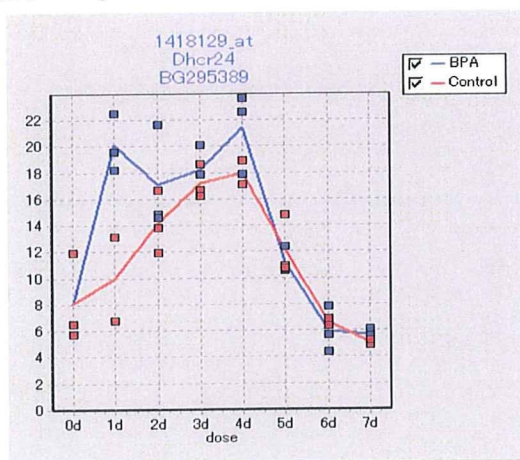
a) Star 遺伝子
(Steroidogenic acute regulatory protein)



c) Hsd17b7 遺伝子
(hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase)



b) Dhcr24 遺伝子
(24-dehydrocholesterol reductase)



d) Sts 遺伝子
(Steroid sulfatase)

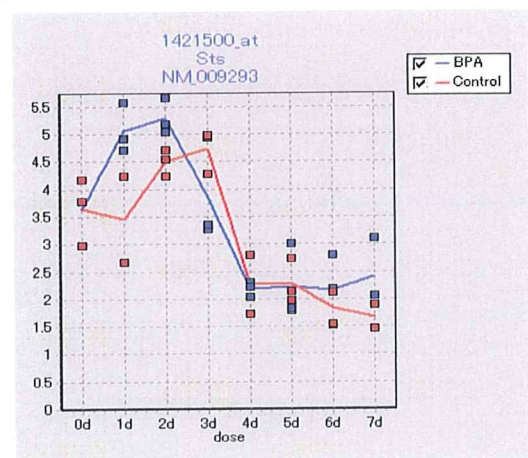


図 2. ES/EB 分化過程でのコレステロール、エストロゲン、アンドロゲン合成に関与する遺伝子の発現変動
(a:Star、b:Dhcr24、c:Hsd17b7、d:Sts)

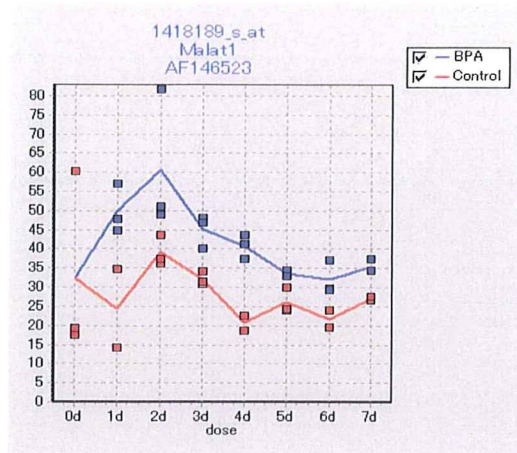


図 3. ES/EB 分化過程での Malat-1 遺伝子の発現変動

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 放射線再生医学研究部門 准教授

研究要旨

前立腺タンパク質遺伝子の PSP94 は、新生児期前立腺のアンドロゲン応答遺伝子で、化学物質暴露に高感受性を示す。そのアンドロゲン応答性プロモーター機能について解析した結果、エストロゲン受容体 α の発現が転写活性に関係しており、新生児期化学物質の標的となって感受性を高めていることが示唆された。

A. 研究目的

新生児期の前立腺形態形成において役割を果たすアンドロゲン応答性遺伝子について、転写メカニズムを明らかにし、それに対する化学物質の修飾作用を解明する。

B. 研究方法

1) 動物

生後 5 日目および 8 週齢の C57BL 雄マウスを Charles River Japan より購入した。生後 6 日目で、テストステロンプロピオネイト (TP) 4 mg/kg bw (body weight) および 17β -estradiol (E2) 0.5 及び 10 μ g/kg bw を i.p. 投与した。8 週齢マウスは去勢し、1 週間後に TP 4 mg/kg bw および E2 を 10 μ g/kg bw で i.p. 投与した。投与後 24 時間で屠殺し、前立腺組織については、実体顕微鏡下で、腹葉 (VP)、背側葉 (DLP)、前葉 (AP) を解剖学的に区別して保存した。

2) mRNA 定量

RNAlater 中に保存した前立腺の各葉の組織をホモジナイズし、RNA 抽出ミニキットにより全 RNA を精製した後、MMLV-RT による逆転写で、cDNA 化した。Sybr Green 法による real time PCR 法により、mRNA 発現を定量した。内部標準として β actin の mRNA を定量した。

3) レポータープラスミド

PSP94, EAPA2 の遺伝子上流域を、高正確性 Taq を用いて PCR クローニングし、それを luc 遺伝子 (pGL3-B) 上流に挿入した。作成した luc レポータープラスミドに対し、site-directed mutagenesis 法を適用して、目的遺伝子領域に点変異、欠失変異をもつレポーターを作成した。ヒト型エストロゲン受容体 α 、 β およびアンドロ

ゲン受容体の発現プラスミド (pSG5-hER α 、pSG5-hER β 、pSG5-hAR) については既報である。

4) 細胞培養

CHO、NIH3T3 細胞株は、dextran-charcoal treated FBS 5% を含むフェノールレッド不含の DMEM で培養した。プラスミド DNA は、リポフェクチン法によりトランジェントに導入した。ジヒドロテストステロン (DHT) 及び 17β -エストラジオール (E2) を添加 24 時間後に細胞を溶解し luc 活性を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては、苦痛の少ない方法に留意する等、広島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) 前立腺アンドロゲン応答遺伝子のエストロゲン感受性 (表 1)

生後 6 日目および 9 週齢動物に TP 投与 24 時間で、応答遺伝子である SBP, SPI-KT3, PSP94, EAPA2 の優位な発現上昇が観察された。このとき同時に E2 を投与すると、生後 6 日目動物ではアンドロゲン応答遺伝子がいずれも発現抑制を受けが、9 週齢では、発現レベルに低下がなかった。

2) PSP94 遺伝子のプロモーター同定

2a) mPSP94 遺伝子上流域のプロモーター活性 (図 1, 2)

mPSP94 の転写開始点上流域を含む luc レポーターを作製し、AR 発現ベクターとともに細胞株へ導入したところ、この領域にアンドロゲン応

答性転写活性があることが示された。そこで、転写開始点上流-76, -87, -95, -118, -358, -1202pb 領域について転写活性を検討したところ、アンドロゲンに対する応答性は転写開始点から-87より短い配列では消失した。-1202領域のアンドロゲン応答性転写活性は相対的に低かった。

また118bpレポーターでみると、アンドロゲンへの応答性は、DHT 10-9Mで最大値となった。またこの転写活性は、抗アンドロゲン剤であるOH-flutamideにより競合的に阻害された。

2b) アンドロゲン応答配列(ARE)類似構造による転写 (図3)

転写開始点から-84にある半保存ARE配列のアンドロゲン応答作用を検索するため、この部位の欠失および塩基置換したレポーターを作成した。 $\Delta(-79/-95)$ 、 $\Delta(-79/-84)$ でアンドロゲン応答が消失した。さらに、-84のTGTをGAGへ置換した変異レポーターにおいても応答の消失がみられた。一方で、それより転写開始点側の-31/-44の欠失では、転写活性に影響はなかった。

2c) ゲルシフトアッセイ

上流DNA領域 +21~-45/, -48~-118, -280~-358(転写開始点+1)のligoDNAに対する細胞抽出物の結合をみたところ、-48~-118のDNA断片にのみ特異的な結合が観察された。

3) ERの共発現の作用

3a) PSP94遺伝子アンドロゲン応答性転写へのERの作用(図4)

PSP94プロモーターレポーター系に、ER α 、ER β の発現プラスミドをコトランスフェクションした。ERの導入は、PSP94pro-118によるアンドロゲン応答性転写活性には影響を与えなかったが、PSP94pro-1202によるアンドロゲン応答性の転写活性を上昇させた。この転写活性化はER α でのみ観察された。

3b) エストロゲン投与の影響

ER α +ARのアンドロゲン応答に対して、E2を投与すると、用量相関性をもって、PSP94転写活性を低下させた。この作用は、ER α 依存的にみられた。

D. 考察

胎生期および新生時期に、低用量エストロゲンやビスフェノール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。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同定を行った。さらにそれらを指標とすることで、新生児期化学物質暴露により前立腺機能に異常が生じていないかどうかについて、新生児期マウスへのTCDD投与実験および低用量DES投与実験で検討してきた。昨年度報告したとおり、新生児期のDES投与の影響として、成体時の前立腺腹葉において、前立腺タンパク質であるPSP94、defensin β およびPCP4遺伝子が、用量相関性をもって発現上昇していた。また以前の試験で新生児期TCDD投与の影響として、成体時期に上記の3つの遺伝子発現が異常亢進することも示してきた。すなわち比較的低用量のDESおよびTCDDの新生児期暴露により、前立腺の分泌機能の一部が不可逆的に影響されることが示された。

本研究では、これらのアンドロゲン応答性の遺伝子発現がエストロゲンにより影響を受ける感受性の違いを、新生児期と成体期で比較した。視床下部下垂体系によるフィードバックをキャンセルするため、E2投与はTP投与と同時に、TP投与とTP+E2投与群を比較した。その結果、アンドロゲン応答遺伝子発現は、新生児期ではエストロゲンにより強く抑制されたのに対し、成体においては抑制されなかった。用いたE2レベルは0.5ug/kg bwと生理的レベルであるが、新生児期の前立腺が成体にくらべエストロゲンに高感受性であることが示された。

前立腺タンパク質であるPSP94は、 β セミンミクロプロテインとも呼ばれる94アミノ酸残基からなる非グリコシル化タンパク質である。一般に分泌タンパクとされているが、我々は、げっ歯類の前立腺分泌液中にはあまり含まれていないことを示してきた。PSP94はアポトーシスの促進による癌抑制遺伝子としての作用も報告されている。この遺伝子のプロモーター活性については、ヒトPSP94の遺伝子上流域-2.1kbが前立腺特異的発現を決定している領域であることが示されている。PSP94遺伝子は、アンドロゲン応答性のタンパク質であり、我々は、ラット・マウスのPSP94について、前立腺葉特異的に転写調節されていることを報告してきた。アンドロゲン応答性の分子メカニズムについては不明であったが、本研究初年度において、その上流にアンドロゲン応答転写活性があることを報告した。この遺伝子上流域は、ラットとマウスでよく保存されており、また-600bp域ではヒトPSP94遺伝子とも相同性が高い。転写開始点から-84番に半保

存のアンドロゲン応答配列 (half ARE) が認められたことから、この部分がアンドロゲン応答性に関わると予想された。この領域を含むレポーターだけで強いアンドロゲン応答性を示し、この ARE を欠失および変異させたレポーターではアンドロゲン応答性が消失した。このことから、この half ARE がアンドロゲン応答性の主要な機構であると考えられた。一方、-1.2kb までの領域のプロモーター活性をみると、アンドロゲン応答性が低下するが、興味深いことに、ER が共存しているとその応答性が回復した。つまり、プロモータ全体としては、ARE 活性の抑制と ER を介したその解除の機構があることが示された。さらに、そのときエストロゲンを投与すると、転写活性が抑制された。このことは、*in vivo* 新生児期において、E2 投与によりアンドロゲン応答遺伝子の発現が抑制されることと一致する。

成体前立腺では、ER β が主要な受容体サブタイプであるが、新生児期においては ER α が優位に発現している。本研究で、ER α の存在により PSP94 遺伝子のアンドロゲン応答性が促進されること、さらに、このメカニズムにより前立腺におけるアンドロゲン応答が、エストロゲン依存的に調節されていることが示された。このことから、新生児期における化学物質影響は ER α を介するアンドロゲン応答系への作用であることが示唆された。

E. 結論

新生児期前立腺でアンドロゲン応答性に発現する PSP94 遺伝子について転写プロモータ機構を明らかにし、新生児期の化学物質影響に ER α の発現が関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G1. 書籍

- 1) 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 pp.539-582 (2009)

G2. 論文発表

- 1) Fujimoto N., Suzuki T., Ohta S., Kitamura S.: Identification of rat prostatic secreted proteins using mass spectrometric analysis and androgen-dependent mRNA expression. *J. Androl.* 30, 669-78 (2009).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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).

G3. 学会発表

- 1) 藤本成明、吉田緑、西川秋佳、小澤正吾、蒲生俊恵、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および応答性遺伝子発現の検討、第26回日本毒性病理学会学術集会、金沢 2010 (要旨集 O-6).
- 2) 佐能正剛、岩瀬恵理、松原加奈、杉原数美、浦丸直人、藤本成明、北村繁幸、太田茂 環境中における甲状腺ホルモン攪乱物質のスクリーニング 130年会、岡山 2010 (要旨集 30P-pm308Q)
- 3) 佐能正剛、岩瀬恵理、杉原数美、加藤善

- 久, 浦丸直人, 藤本成明, 北村繁幸, 太田茂 環境化学物質の甲状腺ホルモン受容体結合活性とその代謝変動 環境ホルモン学会第12回研究発表会 東京 2009 (要旨集 PC-4).
- 4) 藤本成明, 鈴木智晴, 太田茂 MS 解析による前立腺タンパク質の同定とそのアンドロゲン応答性 第32回日本分子生物学会年会 横浜 2009 (要旨集 P0100).
 - 5) Fujimoto N., Suzuki, T., Ohta, S. Prostatic secreted proteins in mice and rats: Identification using mass spectrometric analysis and the hormone dependent expression. European Congress of Endocrinology. Istanbul, Turkey, 2009 (Abstract 648).
 - 6) 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)
 - 7) 岩瀬恵理, 小島弘幸, 杉原数美, 浦丸直人, 藤本成明, 黒木広明, 北村繁幸, 太田茂 臭素化難燃剤 PBDE の甲状腺ホルモン受容体結合活性の代謝による変動 日本薬学会第129年会 京都 2009 (要旨集 26P-am254)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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)
 - 12) 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.

H.知的財産所有権の出願、登録状況

無し

**表1. Effect of E2 on testosterone regulated genes expression
in mouse prostate at PND 6 and week 9**

PND6				
Treatment	SBP	SPI-KT3	PSP94	EAPA2
control	5.7±1.0	0.27±0.02	2.18±0.36	0.13±0.02
TP	35.0±1.3*	3.38±0.26*	9.94±0.81*	1.70±0.48*
TP+E2L	25.7±0.1	1.45±0.17	2.84±0.81	1.09±0.04
TP+E2H	7.1±0.5	0.66±0.11	1.41±0.01	1.72±0.64

WEEK 9				
Treatment	SBP	SPI-KT3	PSP94	EAPA2
control	8.5±5.5	10±0.6	3.9±1.7	44.9±6.3
TP	33.8±4.1*	275±111	21.8±4.7*	123±25.3*
TP+E2H	34.9±2.6	286±63	58.0±6.3	146±17.8

Mean±SEM (n=4). Values are mRNA levels divided by beta actin mRNA levels.

Male C57BL mice were treated with testosterone propionate (TP, 4mg/kg body weight) and/or estradiol (E2L, 0.5 ug/kg bw and E2H, 10 ug/kg bw) at PND6 and week 9.

図1. mPSP94 5' 配列によるのアンドロゲン応答活性

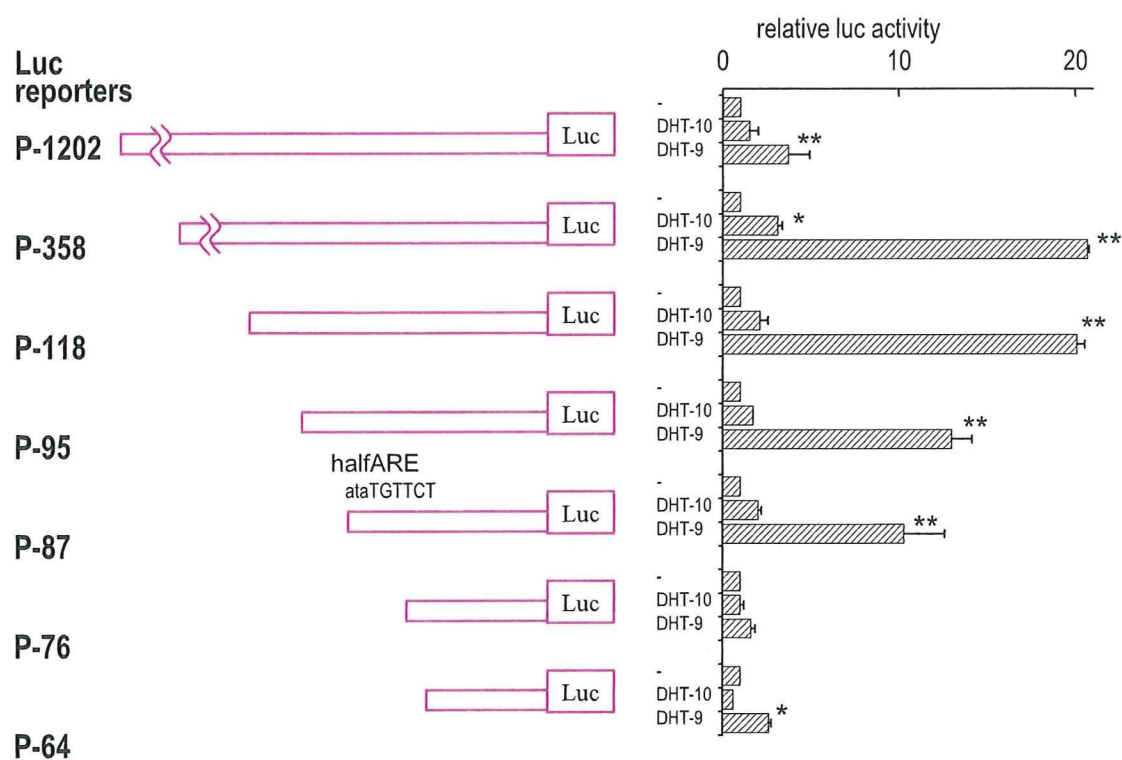


図2. mPSP94-118-lucのアンドロゲン応答性

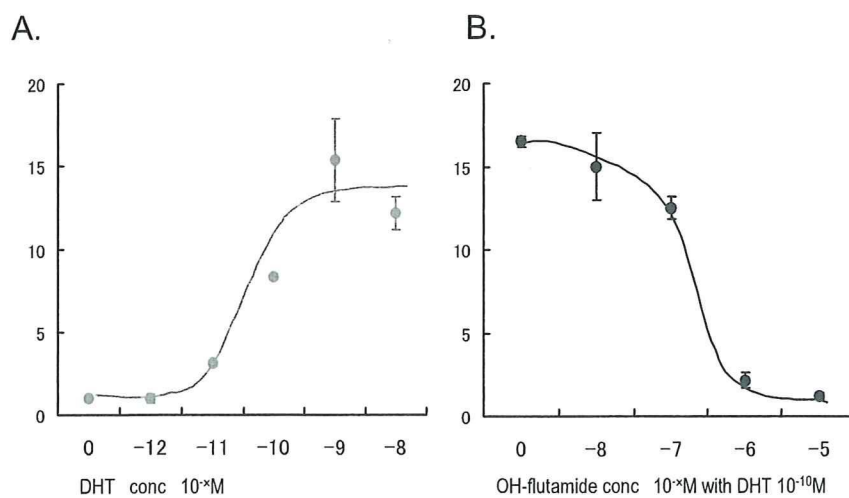


図3. mPSP94 5' f欠失および点変異配列によるアンドロゲン応答活性の変化

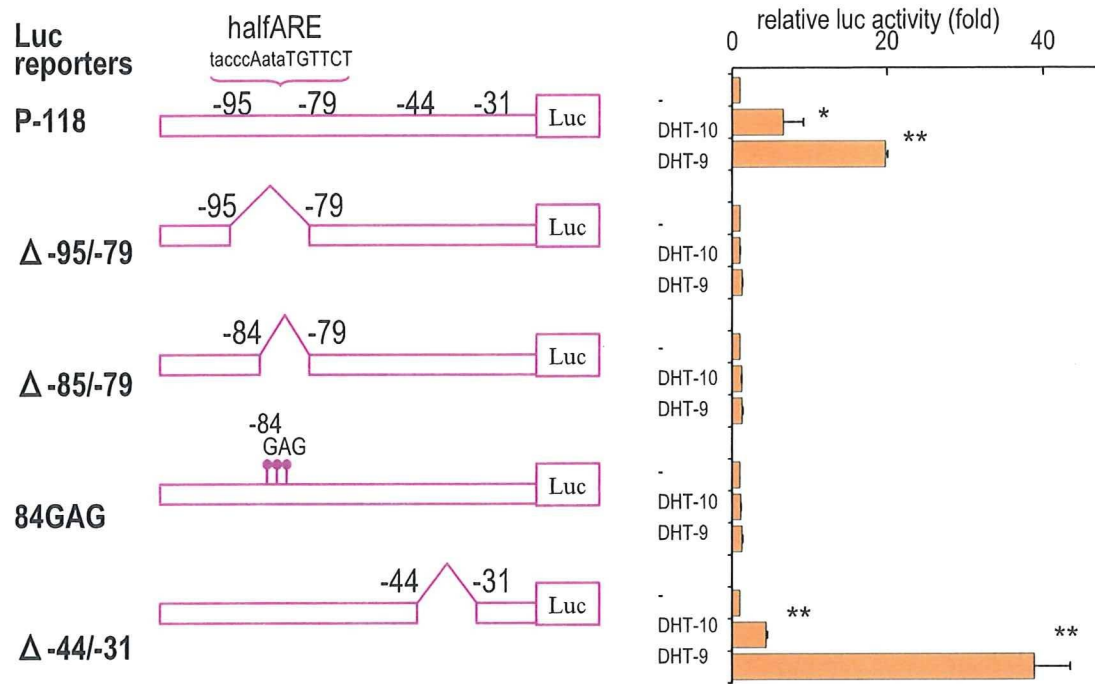


図4. mPSP94 5' fアンドロゲン応答へのERの作用

