

200941003A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

井 上 達

平成22 (2010) 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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

井 上 達

平成22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

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

【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	17
曽根秀子	

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	21
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	29
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	37
笹野公伸	

【免疫・感染防御系】

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	42
山崎聖美	

【中枢神経・行動系】

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…………… 45

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…………… 49

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…………… 57

粟生修司

【マイクロアレイ基盤整備】

遺伝子発現の網羅的検索とインフォマティクスの確立…………… 61

五十嵐勝秀

【資料】

特別講演

男性性機能障害と環境化学物質…………… 67

緒方 勤 国立成育医療センター研究所 小児思春期発育研究部 部長

参考資料

低用量問題とストカスティックな生体反応…………… 68

井上 達

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 75

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それまで続けられてきた研究を総括し、一昨年平成19年度より新たに発足し、3年目を終了した。

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（広義の障害）、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、その生物影響の本態がホルモン受容体、ひいては広く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年間の研究をはじめた。

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緊要なトピックスに焦点を当てたプロジェクト課題研究を設定するとともに、1) 生殖・核内受容体系、2) 免疫・感染防御系および3) 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と、関連するその他の核内受容体作動系を取り上げた基盤研究の二部構成として研究を継続した。

総括的な本年度における特筆すべき点としては、初年度より研究の推進の留意点としてきたホルモン様化学物質の種々の核内受容体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、脂肪組織、骨組織、マクロファージ等）でのホルモン受容体作動臓器としての新たな機能が医学生物学の多方面で認知され、科学領域における大きなトピックとなりつつあることを挙げるができる。また併せて、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が特筆される。

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にある。

[プロジェクト課題研究]の、[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する際、エストロゲン受容体 α 及び β を介し、ERRG による応答性の上昇、さらには DNA 損傷を伴わない、エピジェネティックなストレス応答遺伝子の刺激によっていることが、明らかになっている。

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べく、クロマチン構造の解析を行い、DES によるクロマチン構造の変化、遺伝子発現の上昇を引き起こした可能性が明らかとなった。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、ダイオキシンレセプターが形成する転写制御複体の同定により、ユビキチン化・蛋白質分解系による女性ホルモン・男性ホルモン作用かく乱作用機構、および脂肪細胞分化のかく乱作用機構が解明された。なお、骨芽（様）細胞（hFOB および MG-63）では、3-methylcholanthrene (3-MC) は、骨芽（様）細胞に対して aromatase および CYP1B1 の発現を増加させ（定量的 PCR および ICC）、また、hFOB の IL-1 β の発現を増加させた（Cytokine antibody array）。[免疫・感染防御系]についてはビスフェノールAの脂肪組織における CD68mRNA 発現量、血中遊離脂肪酸濃度の増加、摂取した BPA の脂肪肝発症への関与が明らかとなった。また、[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、デキサメサゾンで、増殖阻害と、アストロサイトへの分化促進作用が見出された。また海馬スライス中の神経スパイン形成を見ると、BPA は、ラット海馬の神経スパイン密度を減少させていた。なお [マイクロアレイ基盤整備] 課題として、DES 新生児期暴露腔の DNA メチル化変化の網羅的解析、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、DNA 脱メチル化酵素 MBD4 の標的遺伝子の解析、骨芽細胞特異的 ER α KO の骨組織網羅的遺伝子発現解析、等を行った。

研究分担者

粟生修司 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

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
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では、1) 核内受容体作動性の生殖・核内受容体系、2) 免疫・感染防御系および3) 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を企画していた。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、以って安全管理へ向けた基盤整備に貢献しようとするものであった。

[プロジェクト課題研究]の個別課題は、本年度は、[発がんの蓋然性研究]1課題のみで、ビスフェノールA (BPA) のヒト乳腺上皮の正常細胞及び癌細胞に対する細胞増殖・細胞老化への影響を調べた。

[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腫上皮細胞のエストロゲン非依存の細胞増殖に関する遺伝子のクロマチン状態を明らかにするため、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と遺伝子発現との相関について解析を行った。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とし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。また、骨芽細胞における aryl hydrocarbon receptor (AhR) と Steroidogenesis との関連については、AhR のヒト骨芽細胞での発現の確認にひきつづき、骨芽細胞での AhR の機能を明らかにするため、エストロゲン合成酵素 aromatase とサイトカインシグナルに注目した解析を行った。

[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、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位置づけられる 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。[中枢神経・行動系]では、記憶の中枢である海馬の神経細胞における、BPA のシナプス可塑性に対する作用の解明を目指すこと、また、核内受容体作動性化学物質のヒト中枢影響評価に利用できるマウス、ラット、サルを用いた神経行動学的評価法を確立することを目標とした。神経幹細胞の増殖・分化における核内受容体の機能についての低用量域を考慮した影響についても引きつづき検討を行う。[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[発がん蓋然性研究]については、ヒト乳腺上皮の正常細胞 (HMEC) 及び (MCF7 及び MCF10A) を培養し、BPA の 1 - 3 日間曝露による影響を調べた。(陽性対照: 17β estradiol, E2) MCF7 は、DMEM/F12 (1:1) (GIBCO) で培養した。HMEC は、8 継代目の細胞に 0.5%ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した 10^{-9} , 10^{-7} M の BPA と 10^{-9} M の E2

を 3 日間曝露した。S 期の細胞数測定は、BrdU の取り込みを指標とした。全細胞数は、Hoechst 33258 の核染色により測定。さらに、ERalpha 特異的拮抗 (MPP), 及び ERbeta 特異的拮抗剤 (PHTPP) を使用した。DNA 二本鎖切断の指標には、リン酸化ヒストン H2AX (ガンマ-H2AX) を蛍光抗体で検出。さらに ATM-p53 シグナル伝達への影響はそのパスウェイの関連遺伝子の発現を Taqman 法によるリアルタイム PCR 法で調べた。また、DNA メチル化は、CpG アイランドを配列特異的プライマーによる PCR 法 (Super Array) により測定した。

[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 μ g/g bw を投与し、生後 56 日目に卵巣を摘出し、生後 70 日目に剖検し組織を採取した (NeoDES 群)。これに加えて、出生直後から 5 日間、溶媒のみを投与し、生後 56 日目に卵巣を摘出し (Oil 群)、屠殺前に DES を投与した群 (AdultDES 群) を加えた。Affymetrix 社の GeneChip を利用して、摘出した臍の遺伝子発現の比較を行った。NeoDES 群と Oil 対照群および AdultDES 群において発現に差が見られた遺伝子については定量 PCR などにより、詳細に遺伝子発現量を解析した。さらに各群の臍組織からゲノム DNA を抽出し、メチル化 DNA 特異的抗体による免疫沈降を行い、ChIP-on-chip 解析を行った。NeoDES 群と Oil 群、AdultDES 群において遺伝子発現量と、DNA メチル化の相関について検討した。次に、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および細胞周期制御との関連を追及した。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。すなわち、化合物としては BPA、3-MC (以上、和光純薬工業)、溶媒には DMSO (和光純薬工業) を用いた。ヒト正常骨芽細胞には hFOB 1.19 (ATCC, CRL-11372)、骨芽細胞様細胞には MG-63 (東北大学医用細胞資源センター) を使用。BPA 及び 3-MC の骨芽 (様) 細胞への影響については、hFOB 及 MG-63 に対し、BPA (0.01–1 μ M) 及び 3-MC (0.01–1 μ M) を添加し、72 時間後に RNA を抽出、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。ヒト骨組織における AhR の発現は、Anti-AhR (BIOMOL International, L.P.) 抗体を用い、ヒト

骨組織 5 例で検討した。また、コラーゲン染色キット (コラーゲン技術研修会) を用い、コラーゲン染色を行った。なお、Cytokine antibody array では、hFOB に対し、3-MC (0.1 μ M) を添加し、72 時間後に培地を含む細胞破砕液を用いて 88 種のサイトカインの検出を行った。サイトカインの検出には Human Cytokine antibody array (RayBio) を使用した。また、aromatase および CYP1B1 発現解析では、hFOB 及 MG-63 に対し、3-MC (0.01–1 μ M) を添加し、72 時間後に定量的 PCR にて aromatase および CYP1B1 の発現を、immunocytochemistry (ICC) にてそれぞれのタンパク発現を確認した。

[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 μ g、0.05 μ g、0.5 μ g/ml になるように飲料水に加え、10 週、20 週、30 週間投与し肝臓、脂肪組織、血清パラメータについて調べた。

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 μ g、0.05 μ g、0.5 μ 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、20、30 週後に解剖し、肝臓、白色脂肪組織における mRNA 発現量、血中 TG、コレステロール、遊離脂肪酸、イン

シュリン、レプチン、アディポネクチン、MCP-1 濃度について調べた。

[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。

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、プトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの)) に、bFGF (10ng/ml) 及び EGF (10 ng/ml) を添加し、10cm シャーレ (ヌンク社) に 10^6 個/6ml の密度で生細胞を播種する。96 well plate を用いる場合は、 8×10^3 /well の細胞密度とする。化学物質は Tocris 社もしくは Calbiochem 社から購入した。(なお、ネステインや GFAP などの検出に用いたプライマー配列等は、分担報告書を参照)。核内受容体作動性化学物質の神経行動学的研究では、発達期に曝露し、その影響を神経行動学的にラットおよびマウスで比較検討した。すなわち行動評価においては、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。サルではモンキーチェア上に被験ザルを置き、雄ザルまたは雌ザルに対するレバー押し行動を評価した。詳細については、個別分担報告書を参照。[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は、一部誤字の訂正などを行い本報告書の資料欄に総論として再掲した。第3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 Nature, PNAS, 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への掲載論文を含む計 83 報を数えた。欧米における内分泌かく乱研究の活発な進展と対応したこのような当班からの質の高い研究成果の発信に

は、多くの注目が寄せられている。個々の分担研究の結果の概略は、以下の通りである。[プロジェクト課題研究]では、[発がん蓋然性研究]1 課題のみとなった。本課題では、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 期の細胞を増加させることを観察しており、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。併せて、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。本年度は、DNA のメチル化を中心としたエピジェネティックな変化を観察した。

HMEC 及び MCF7 などの細胞系では、BPA 曝露により、ATM、CDC2 と p53 の遺伝子発現上昇が認められた。ウェスタンブロッティングで p53 の蛋白発現レベルを調べると、HMEC 及び MCF7 細胞での増加が認められた。同時に、ERS1, ERS2, ERRA, ERBB, ERRG の遺伝子発現影響を調べると、ERRG が ERS1 の発現レベルの低い HMEC 及び MCF10A で BPA 曝露により上昇し、E2 で減少した。ベンゾピレン (Benzo[a]pyrene) に対する感受性を調べたところ、ベンゾ

ピレンによる細胞増殖には影響を及ぼさなかったが、ベンゾピレン単独に比べ、ベンゾピレン曝露の後に BPA を処理した群では、ATM-p53 のストレス応答系に対して CDC2 を除いてほとんどの遺伝子が活性化していた。BPA を 3 日間曝露した群とベンゾピレンを 24 時間曝露を前処理した群では、ヒトの乳がんの進展にかかわることが知られている BRCA1, CCNA1 及び THBS1 の高メチル化や GSTP1 の中レベルのメチル化が観察された。

[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腔上皮細胞の増殖を示した。そこで DES 未曝露と曝露マウスの腔にて、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) は RT-PCR 法によって遺伝子発現が NeoDES マウスにおいて増加していた。ChIP 法によりクロマチン構造を調べたところ、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認められなかった。以上により、つづいて ChIP-on-chip 法により網羅的な DNA のメチル化状態を調べた。DNA メチル化と遺伝子発現が相関している遺伝子として、serine/arginine-rich protein specific kinase 1 (NM_016795)、muscleblind-like 1 (NM_020007)、plexin domain containing 1 (NM_001163608)、TBC1 domain family, member 8

(NM_018775)などが得られた。その一方で、曝露群で遺伝子発現量の高い epidermal growth factor (EGF)様増殖因子のメチル化は対照群と比べて大差がなかった。一方、TLE(Grg1) (transduction-like enhancer of split 1)のメチル化は高く、遺伝子発現は低下していた。レポーター系を用いて Grg1 を発現させると ER α の活性が抑制されたことから、臍上皮の恒久的な増殖には、ER α の活性化を抑制する機構が低下していることが示唆された。

「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脂肪細胞分化制御機構 3) 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および4) 性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および同定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」、3-MC は、骨芽細胞に対して、aromatase および CYP1B1 の発現を増加させた。また、hFOB の IL-1 β の発現を増加させた。詳細については、Microarray 解析、Cytokine antibody

array 解析、更に aromatase および CYP1B1 発現解析を行った。

[免疫・感染防御系]の研究では、精巣周囲脂肪における mRNA 発現は、マクロファージ表面抗原である CD68 の発現が、BPA 投与により増加していた。血清では、遊離脂肪酸濃度が BPA 投与により増加していた。

[中枢神経・行動系]におけるマウス胎児性神経幹細胞の研究では、C57BL/6 マウス妊娠 14.5 日胎児の終脳分離細胞の培養により、Dexamethasone に、単独でアストロサイト分化マーカー GFAP の mRNA およびタンパク質を誘導する作用があることを見出した。このものに E₂, BPA には分化影響作用は認められず、Tamoxifen に未分化マーカーの Nestin 発現を弱く上昇させる作用が認められた。

「次に成獣ラットの海馬スライスを用いた研究」では、脳の発達期に BPA を曝露し、成獣になったラット海馬における神経スパインを調べた。その結果、スパイン密度は非処理群の 2.42 個/ $1\mu\text{m dendrite}$ から BPA 処理群においては 2.02 個/ $1\mu\text{m dendrite}$ へと大きく減少していた。頭部の直径の太い large-head ($>0.5\mu\text{m}$) というスパインが特に減少した。また、成獣ラット海馬を取り出して BPA を 2 時間作用させて神経スパインを調べたところ、10 nM BPA や 1 nM エストラジオールは 2 時間で、CA1 領域の神経の樹状突起上のスパイン数を 140%程度増加させることを見出した。頭部の直径の細い small-head ($0.2-0.4\mu\text{m}$) と

middle-head (0.4-0.5 μ m) というスパインが特に増加していた。なお 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。以下詳細については、個別報告を参照されたい。

「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、ラットでヒトと類似の非生殖行動の性分化障害、うつ・不安の増大、雄の多動、雄の体重増加と雌の体重減少を引き起こした。マウスではヒトと類似の影響として思春期の一過性の攻撃性の増大と成熟後の攻撃性の低下が雄マウス認められた。この他、ラットの群れ行動に対する影響についても検討を行っており、詳細については、個別の分担報告を参照されたい。

最後に[マイクロアレイ基盤整備]では本年度は、井口班員との DES 新生児期暴露腫の DNA メチル化変化の網羅的解析、加藤班員との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、DNA 脱メチル化酵素 MBD4 の標的遺伝子の解析、骨芽細胞特異的 ER α KO の骨組織網羅的遺伝子発現解析を実施中である。

D. 考察

[プロジェクト課題研究]でおもに考察される点は、[発がんの蓋然性研究]では、BPA は、ベンゾピレンの発がん感受性を上昇させる可能性があることが示唆された。ヒトの乳がんの進展にかかわること

が知られている BRCA1, CCNA1 及び THBS1 の高メチル化や GSTP1 の中レベルメチル化が今回の実験で観察された事により、BPA は DNA のメチル化ステータスも変化させていることが示唆された。BPA の短期曝露と長期曝露での増殖能や遺伝子発現プロファイリングの違いは、曝露後の細胞回転や DNA の代謝回転の結果引き起こされる様々な、エピジェネティックな変化に起因するものと考えられた。

[基盤研究]では、[生殖・核内受容体系]については、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。また発生の臨界期での DES 曝露により、マウスの膣上皮細胞がエストロゲン非依存的に増殖するという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。その結果、DNA のメチル化状態と遺伝子発現量が相関する遺伝子は少ないことが分かった。例えば、曝露群の膣上皮の細胞増殖に寄与する EGF 様増殖因子(曝露群で遺伝子発現が有意に高い)のメチル化は対照群とほぼ同じであった。一方で、Gpr87 遺伝子のように、明らかにヒストン修飾を受けている遺伝子もある。したがって、ヒストン修飾と DNA メチル化の双方からクロマチン状態を明らかにする必要があることが明らかとなった。

メチル化と遺伝子発現が相関する遺伝子として TLE(Grg1) (transduction-like enhancer of split 1) が見いだされた。レポーター系を用いて Grg1 を発現させると ER α の活性が抑制されたことから、臍上皮の恒久的な増殖には、ER α の活性化を抑制する機構が低下していることが示唆された。

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と ChIP-on-chip で得られたデータをもとに、曝露による影響と DNA メチル化状態との関連をより詳細に検討していくことで、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。

次に「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、数多くの転写共役因子及び複合体の結合が明らかとなった。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。また性ホルモン受容体の転写共役因子の細胞周期依存性は、ホルモン依存性癌との関連を考慮すると興味深い。

「骨細胞影響研究」では、骨芽細胞および破骨細胞に AhR が発現することを報告した。また、Microarray 解析からエストロゲン合成酵素 aromatase、エストロゲン

代謝酵素 CYP1B1 が 3-MC の添加によって増加することを確認した。今回の検討結果により、AhR と aromatase の発現、さらには IL-1 β の発現との関係について、(genomic もしくは non-genomic pathway のいずれが関与するか明らかにすることはできないが) AhR に依存してこれらの因子がタンパクレベルで増加することが明らかとなった。種々ステロイドホルモン産生酵素 [steroid sulfatase、17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)、3 β -HSD など] は aromatase 同様にサイトカインによって発現が誘導されることが報告されており [Herrmann M., et al., *Ann N Y Acad Sci.* 2002]、これらのことから AhR はサイトカイン産生誘導を介し、種々の組織における Steroidgenesis に関与していると考えられた。

[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。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。本研究で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 10、20、30 週間 BPA 投与を行った。その結果、BPA 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与群で脂肪肝を発症した。1 個体あたり、BPA を約 7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 摂取し続けたことになる。

昨年度までの本研究では、肝臓における mRNA 発現について調べた。その結果、BPA 投与群の肝臓では、TG 合成にかかわる核内受容体 PPAR γ 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。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、脂肪組織における mRNA 発現および血清パラメータの解析を行った。その結果、脂肪組織ではマクロファージの浸潤を示す CD68 の発現が増加していた。さらに、血中の遊離脂肪酸濃度の増加もみられた。したがって、マクロファージの浸潤により血中に脂肪組織より遊離脂肪酸が放出されて増加し、肝臓で脂肪酸流入を司る CD36 の発現増加し、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。

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。

[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、DEXを始めとする核内受容体作動性物質が神経幹細胞の増殖に加え分化にも影響を与えることが明らかになった。この結果は、核内受容体作動性物質のリスク評価の際には、発達期の神経系に対する影響を十分に考慮する必要があることを示唆している。

DEX は、神経幹細胞の増殖阻害作用に加え、単独でアストロサイト分化を促進し、アストロサイト分化促進因子 LIF 作用を増強する。また、グルココルチコイド受容体阻害剤の Mifepristone によりデキサメタゾン作用は抑制される。従って DEX の作用はグルココルチコイド受容体を介していることが示唆される。現時点で詳細な作用メカニズムは明らかに出来ていないが、アストロサイト分化促進因子 LIF の作用を増強することから、複合的な状況下では、DEX の作用がより低濃度で生じる可能性に注目される。なお、BPA については E₂ 同様、ごく弱く増殖を促進する傾向が認められるに留まった。分化に対する影響は今回の実験条件では認められなかった。

「海馬スライスを用いた研究」では脳の発達期（妊娠期+胎児期+新生仔期+授乳期）へのBPAの曝露に対し、成獣期に解析すると、神経スパイン密度は大きく減少していた。これは、成獣ラット海馬においてBPAを急性的に加えた場合、スパインが増加していたのと全く異なっていた。その理由としては、胎児期の神経細胞がネットワークを形成する際に核の受

容体を介した作用で変異が生じたものと考えられる。これは主にkinase を介してスパインを増やす急性作用とは異なるものと考えられる。

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 で洗い流されてた為であると考えられる。実際、ACSF で洗い流して、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 を添加したとしたら、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られる。

「核内受容体作動性化学物質の神経行動学的研究」では、これまでの研究で、ラットが 1) 行動の中性化、2) 不安・うつへの増強、3) 学習・記憶障害、4) 薬物依存やその他の嗜癖行動、5) 自閉症・コミュニケーション障害などの社会機能異常、6) 母性行動異常、7) 性同一性障害・性志向性異常を含む生殖障害、8) 肥満および摂食障害、などのヒトでも観察される影響とよく似た影響を受けることが明らかになった。核内受容体作動性

化学物質の標的はエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体、PPA 受容体、レチノイド受容体などが示唆されているが、核内受容体から細胞、組織、器官、個体、集団（社会）の各レベルで複数の標的がネットワーク化されて、影響を及ぼしあっている。各レベルで複雑な応答ネットワークをもっているにもかかわらず、共通の発現系を有しているのも事実で、さまざまな物質が異なる標的を介して類似の影響を示しているものと考えられる。

[マイクロアレイ基盤整備]では、次の二点が注目された。すなわち、井口班員との共同研究において、DES 投与により予想以上に DNA メチル化の変化が誘発されていることが示唆された。これはこれまでに別途進めてきた DNA メチル化変化の網羅的解析ではほとんど変化が検出されないことと比べると、驚くべき結果である。今後は、DES により引き起こされる不可逆的变化と関連する DNA メチル化変化を同定することが重要と考えられる。加藤班員との共同研究においては、FXR-PHF2 複合体のリクルート、VDR-MBD4 の機能についての解析が進み、核内受容体を起点に生じるエピジェネティック変化のメカニズム解明にの手がかりが得られてきている。

ChIP on Chip 解析は網羅的遺伝子発現解析を補助する解析ツールとして重要である。特定の転写因子のゲノム DNA への結合やヒストン修飾状況、DNA メチル化状

態の解析に用いることが出来、化学物質の生体影響メカニズム解析に有力な情報をもたらす手法であり、今後も活用されていくことが望まれる。

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]における[発がんの蓋然性研究]では、ビスフェノールA (BPA)の短期曝露は、エストロゲン受容体 α 及び β を介しているものであることがわかった。また、エストロゲン受容体レベルの低い細胞では、ERRGがその応答性をあげていることが示唆された。さらに、低濃度のBPAは、DNA損傷を起こさないが、ストレス応答遺伝子経路を活性化させて細胞増殖や細胞老化さらにはエピジェネティクスに影響をおこすことが示唆された。

[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、さらにメチル化DNA抗体や各種ヒストン抗体を用いたChIP法により、クロマチン構造を解析したところ、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。しかしクロマチン構造と発現量との相関は、それぞれ個別の遺伝子ごとに検討する必要がある。

「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研究では、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、また、ダイオキシンレセプターの会合と蛋白質分解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。

さらに、「骨細胞影響研究」では、骨芽細胞においてAhRはサイトカインシグナルを介しSteroidogenesisに関与することが明らかとなった。すなわち、骨組織に対して内分泌攪乱化学物質は、AhRを介したsteroidogenesisに影響をおよぼすと考えられる。さらに、エストロゲンをはじめとするステロイドホルモンの骨組織への生理作用、骨粗鬆症に代表される病態において、AhR-サイトカインシグナルは重要な役割を担っていると示唆される。

[免疫・感染防御系]では、10、20、30週間BPAをマウスに投与した結果、脂肪組織におけるCD68mRNA発現量、血中遊離脂肪酸濃度が増加し、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 μ 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、CD36 mRNAの発現増加、脂肪組織においては、CD68mRNA発現増加、血中では遊離脂肪酸濃度の増加がみられた。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と考えられる。

[中枢神経・行動系]では、これまでの「神経幹細胞研究」により、核内受容体作動性物質の中にはその増殖及び分化に作用を示すものがあることが示された。特に DEX は増殖阻害作用、アストロサイト分化促進作用を有することが明らかとなった。なお、DEX はアストロサイト分化促進因子 LIF の作用を増強することも明らかになった。

「成獣ラット海馬スライスにおける *ex vivo* 研究」では、脳の発達期にBPAを曝露して成獣になったラットの海馬では神経スパイン密度が減少していた。一方、取り出した海馬スライスでは、急性的にはBPAは 10 nM という低濃度で2時間程度で顕著にスパインを増加させることがわかった。このようにBPA曝露の方法によって神経への影響は大きく異なることがわかった。この結果は、BPAなどの内分泌かく乱物質がいつ作用するか（胎児期と成熟後）によって脳への影響に大きな差が出る可能性が示唆される。

最後に、「核内受容体作動性化学物質の神経行動学的研究」では、同化学物質の発達期への曝露は、耐用 1 日摂取量以下の濃度でも中枢神経系に作用し、ヒトで示唆されている中枢影響と類似の影響を起こすことが主としてラットで明らかになった。また「群れ行動」も影響を受けることが明らかになった。サルを用いた評

価は困難な点が多いが、鼻腔投与法とレバー押し行動を利用することが学習機能や、性志向性、性行動および社会行動を評価できることが明らかになった。

[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

Hirabayashi, Y., and Inoue, T. (2009). Aryl hydrocarbon receptor biology and xenobiotic responses in hematopoietic progenitor cells. *Biochem Pharmacol* 77,

521-535.

Kawasaki, Y., Hirabayashi, Y., Kaneko, T., Kanno, J., Kodama, Y., Matsushima, Y., Ogawa, Y., Saitoh, M., Sekita, K., Uchida, O., Umemura, T., Yoon, B. I., and Inoue, T. (2009). Benzene-induced hematopoietic neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice. *Toxicol Sci* **110**, 293-306.

Yi, J. Y., Hirabayashi, Y., Choi, Y. K., Kodama, Y., Kanno, J., Han, J. H., Inoue, T., and Yoon, B. I. (2009). Benzene activates caspase-4 and -12 at the transcription level, without an association with apoptosis, in mouse bone marrow cells lacking the p53 gene. *Arch Toxicol* **83**, 795-803.

Inoue, T., Hirabayashi, Y. Hematopoietic neoplastic diseases develop in C3H/He and C57BL/6 mice after benzene exposure: Strain differences in bone marrow tissue responses observed using microarrays. *Chem Biol Interact* Doi:10.1016/j.cbi.2009.12.005, 2009

井上 達 (2009). 内分泌攪乱化学物質の低用量作用と毒性学のあたらしい課題. *科学 (Science Journal KAGAKU)* **79**, 1022-1028.

2. 学会発表

Inoue T: Biological Safety Testing in the 21st Century: Overview of the past and prospects for the future. The 10th Annual Commemorative Drug Nonclinical Safety Academic Conference, National Center for Safety Evaluation of Drugs

Foundation (NCSEDF) (2009.12.2)

Inoue T: Benzene Induced Myeloid Leukemia Revisited, Based on Induction of Thioredoxin. 2009 Autumn Symposium, Korean Society of Toxicology/ Korean Society of Environmental Mutagens and Carcinogens/ Korean Society of Environmental Toxicology (2009.11.13)

Inoue T: Gene expression profile of the bone marrow after benzene exposure in C57BL/6 and C3H/He mice: the common gene expression and the stochastic gene expression. FDA-China International Forum and Workshop Microarray-Bioinformatics-Nest-Generation Sequencing in Safety Assessment and Biomarker discovery (2009.9.26)

Inoue T: Hematopoietic neoplastic diseases in C3H/He and C57BL/6 mice after benzene exposure. Differences observed using microarrays. Benzene 2009: Health Effects and Mechanisms of Bone Marrow Toxicity, Implication for t-AML and the Mode of Action Framework. (2009.9.10)

H. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得 :
該当しない
2. 実用新案登録
該当しない
3. その他 (データベース等)
該当しない