

コフェロール除去済みのコーンオイルに溶解した BPA (20 µg/kg/day) もしくは DES (0.2 µg/kg/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 および DES 経胎盤投与ともに仔雄マウス泌尿生殖洞の ER α 発現量を上昇させたが、SF1 の発現誘導は BPA に特徴的であった。SF1 発現は基底上皮に局限していたものの、扁平上皮化は認められなかった。また、BPA および DES 投与群では基底上皮の過増殖や腺周囲に ER α 陽性の間質細胞が出現した。

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 γ 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 γ 型 (ERR γ) 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 α 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限局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) を経皮下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 α 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 α 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、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、腺管形成するの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 α を介した作用ではない、もしくは ER α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 γ (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 γ 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 γ 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 γ 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 γ 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 γ 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 γ に BPA が結合しても、既に 100%、フルに活性化した ERR γ 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 γ 発現細胞で起こっていることなのか、もしくは ERR γ 発現細胞が性分化関連遺伝子群を発現していて、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) や膣 (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 γ 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 α 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、マウス胎児期に低用量 BPA の曝露を受けると、泌尿生殖洞間質細胞における性ホルモン受容体発現が変化し、発生初期の腺周囲に筋線維芽細胞が増加することで基底上皮の増殖が刺激される可能性を示した。ヒト前立腺疾患 (肥大症結節や前立腺癌) では筋線維芽細胞が増加していることと併せて考えると、BPA への曝露による前立腺組織構築の変化が、肥大症結節の発生や癌の悪性化に関与していると推察された。近年、BPA が ERR γ 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 ERRγ発現臓器でのみ認められたことから、前立腺のみならず、ERRγ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、ERRγ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*. 2008 Dec;324(2):310-9

Kanai M, Ishii K, Kanda H, Ogura Y, Kise H, Arima K, Sugimura Y. Improvement in predicting tumorigenic phenotype of androgen-insensitive human LNCaP prostatic cancer cell subline in recombination with rat urogenital sinus mesenchyme. *Cancer Science*. 2008 Dec;99(12):2435-43

Watanabe M, Hirokawa Y, Tsuji M, Yanagawa M, Murata T, Suzuki H, Ichikawa T, Kato T, Sugimura Y, Shiraishi T. Lack of involvement of the GNAS1 T393C polymorphism in prostate cancer risk in the Japanese population. *Anticancer Research*. 2008 Nov-Dec;28(6A):3711-6

Kanda H, Ishii K, Ogura Y, Imamura T, Kanai M, Arima K, Sugimura Y. Naftopidil, a selective alpha-1 adrenoreceptor 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 健一朗、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 健一朗、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 健一朗、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: α 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 9 6 回日本泌尿器科学会総会 (横浜) 2008 年 4 月 25-27 日

石井 健一朗、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 6 7 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 6 7 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:

18th 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: 18th 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（平成 19-21 年度）

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

がんの発生と進展には細胞周期の制御の逸脱が深く関わっている。正常細胞は、増殖と分化だけではなく、アポトーシスとのバランスを保ちながら成り立っている。このバランスが崩れると細胞は、癌化への道、死への道へ誘導される。本研究では、正常ヒト乳腺上皮細胞（HMEC）を用いて、エストロゲン受容体 α （ESR1）に結合能を有することが知られているビスフェノールA（BPA）の細胞増殖・細胞老化への影響を調べた。

BPA は、HMEC の増殖を用量依存的に促進した。ヒト乳がん組織において変動が認められる遺伝子群 86 個について定量的な mRNA 遺伝子発現量を調べた。その結果、BPA は、細胞周期の停止やアポトーシスの誘発はおこさず、増殖のみを促進する作用があると考えられた。次いで、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。

これまでに、正常ヒト乳腺上皮細胞（HMEC）において、BPA が 1 週間の初期曝露により細胞増殖作用を示し、その影響が細胞を継代した後も持続することを見出した。そこで、最終年度は、BPA による細胞増殖能がエストロゲン受容体 α （ESR1）、 β （ESR2）及びその関連受容体群 ERRA、ERRB、ERRG の発現レベルと関連しているかどうかをそれらの受容体の発現が異なるヒト乳がん上皮細胞（MCF7 及び MCF10A）及び正常ヒト乳腺上皮細胞（HMEC）を用いて初期の曝露で起こる細胞増殖シグナルイベントの作用機構を検討した。

A. 研究目的

核内受容体に作用する化学物質のうち、エストロゲン受容体 α （ESR1）に結合し、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。そのため、ヒトの乳がん発症や進展の環境因子の一つとして懸念される。そこで、その BPA の発がん促進作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、正常ヒト乳腺上皮細胞（HMEC）における BPA の細胞増殖・細胞

増殖を及ぼすことが示されてきた。そのため、ヒトの乳がん発症や進展の環境因子の一つとして懸念される。そこで、その BPA の発がん促進作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、正常ヒト乳腺上皮細胞（HMEC）における BPA の細胞増殖・細胞

胞老化への影響を調べることにした。

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、用性対象として 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。S 期の細胞数測定は、BrdU の取り込みを指標とし、蛍光抗体法で検出した。全細胞数は、Hoechst 33258 の核染色により測定した。さらに、ERalpha 特異的拮抗剤 1,3-bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinyloxy)phenol]-1H-pyrazole dihydrochloride (MPP), 及び ERbeta 特異的拮抗剤 4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol (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) を蛍光抗体で検出した。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 メチル化状態を調べるには、

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。

C. 研究結果

10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M の BPA を 9 世代目に 7 日間曝露させ、継世代への影響を調べた。BPA は、用量依存的に細胞の増殖を促進する影響が認められた。BrdU の取り込み細胞の分布をみると S 期の細胞が増加し、核の形態観察からアポトーシスを起こしている細胞の割合が BPA 曝露群で減少していた。また HP1 gamma 陽性細胞の割合も用量依存的な増加傾向にあった。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遺伝子 86 個について、定量的リアルタイム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 PCR 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 anti-body 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。

他方、HMEC、MCF10A 及び MCF7 における 10^{-9} 、 10^{-7} M の BPA の 3 日間の短期曝露では、ESR1 mRNA の発現レベルが低い HMEC 及び MCF10A では細胞増殖が認められず、MCF7 において増殖が認められた。BrdU の取り込みによる S 期の細胞数の増加も MCF7 において認められた。興味深いことに 1 週間以上の長期曝露では、HMEC でも増殖が認められ、MPP 及び PHTPP の存在下で、その増殖が抑制された。DNA ダメージに対する影響をガンマ-H2AX 陽性細胞数及び DNA 分画内 8ohdG 量を指標に調べたところ、 10^{-6} M BPA の高濃度においてのみ、DNA 障害性が認められた。

さらに外来からのストレスで応答する遺伝子発現と細胞回転の遺伝子群 (HDAC2, RB1, ATM, MDM2, CDC2, CDKN1A, TP53) の発現を Taqman によるリアルタイム PCR 法で調べた。HMEC 及び MCF7 において、BPA 曝露により、ATM、CDC2 と p53 の遺伝子発現上昇が認められた。さらに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。

つぎに、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されていた。さらに、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 の中レベルメチル化が観察された。

D. 考察

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。

これまでに、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 (Vandenberg ら 2008; Durando ら 2007; Murray TJ ら 2007)、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しつつある (Wu F ら、2008; Moral R ら、2008)。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。一般に、DNA に損傷が起こると、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、我々のこれまでの実験では、初期の BPA 一週間の曝露でその後 2 週間を経て培養した細胞から得られた RNA については、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た。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。さらに、8 継代目の HMEC における BPA の 1 週間曝露は、持続的な細胞の増殖を示し、S 期の細胞及び HP1 γ 陽性細胞の増加が認められている。HP1 γ が存在しないと ATM の二重鎖 DNA 結合修復のための活性化が起こらないとの報告があるため、BPA が DNA ダメージを引き起こした二次的な要因で細胞増殖が引き起こされることが示唆された。そのため、今年度は、短期曝露での影響を調べた。HMEC、MCF10A 及び MCF7 における 10^{-9} 、 10^{-7} M の BPA の 3 日間の短期曝露では、ESR1 mRNA の発現レベルが低い HMEC 及び MCF10A では細胞増殖や S 期細胞数の増加も認められず、MCF7 においてのみ増殖が認められた。この結果は、1 週間以上の長期曝露では、HMEC でも増殖が認められ、MPP 及び PHTPP の存在下で、その増殖が抑制された事と相反していた。BPA の細胞増殖は、ERE の応答を媒介して起こることが、Wu F ら (2008) によって報告されているが、HMEC での一週間以上の曝露も ESR1 及び ESR2 を介しているものと推察できる。

最新の報告で、高濃度の BPA は、DNA 付加体を形成し、DNA ダメージを引き起こすとの報告がある (Izzotti A, 2009; Bennetts LE, 2008; Iso T, 2006)。我々の昨年度までの研究において、BPA の 1 週間

曝露によって HP1 γ が活性化されたことが認められていたため、BPA の細胞増殖が、DNA ダメージを起こしてストレス応答の ATM を活性化することが考えられた。そこで、DNA ダメージに対する影響をガンマ-H2AX 陽性細胞数及び DNA 分画内 80HdG 量を指標に調べた。濃度依存的に 80HdG 量は増加し、 10^{-6} M BPA の高濃度において DNA 障害性が認められた。低濃度の BPA では、HMEC 及び MCF7 において、BPA 曝露により、ATM、CDC2 と p53 の遺伝子発現上昇が認められ、p53 の蛋白発現レベルも、HMEC 及び MCF7 細胞で増加していた。このことは、BPA も UV や熱ショックで応答する ATM/p53 シグナル系を活性化することが示唆された。また、ERRG が ESR1 の発現レベルの低い HMEC 及び MCF10A で BPA 曝露で上昇し、E2 で減少したことは、ESR1 の低い HMEC では、ERRG がより鋭敏に BPA に応答することが示唆された。さらに、ベンゾピレン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ものの、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より活性化されていた。これらの結果は、BPA がベンゾピレンの発ガン感受性を上昇させる可能性があることが示唆された。Dairkee SH (2008) らによって、BPA 曝露したヒト乳がん組織では、BPA に特徴ある遺伝子プロファイリングが示されている。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。したがって、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、エピジェネティックな変化が起こり、さまざまな細胞レベルでの影響を引き起こすものと考えられた。

E. 結論

マウスやラットを用いた実験動物においては、ほとんど Soto らのグループだけであるが、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る。これ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。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。

そこで、BPA の影響を更に詳細に調べた。DNA ダメージに対する影響をガンマ-H2AX 陽性細胞数及び DNA 分画内 8ohdG 量を指標に調べたところ、 10^{-6} M BPA の高濃度においてのみ、DNA 障害性が認められた。さらに外来からのストレスで応答する遺伝子発現と細胞回転の遺伝子群 (HDAC2, RB1, ATM, MDM2, CDC2, CDKN1A, TP53) の発現を Taqman によるリアルタイム PCR 法で調べた。HMEC

及び MCF7 において、BPA 曝露により、ATM、CDC2 と p53 の遺伝子発現上昇が認められた。

BPA による細胞増殖能がエストロゲン受容体 α (ESR1)、 β (ESR2) 及びその関連受容体群 ERRA, ERRB, ERRG の発現レベルと関連しているかどうかをそれらの受容体の発現が異なるヒト乳がん上皮細胞 (MCF7 及び MCF10A) 及び正常ヒト乳腺上皮細胞 (HMEC) を用いて短期の曝露で起こる細胞増殖シグナルイベントの作用機構を検討した。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示すことが示唆された。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書への記載は不要)

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Alama MS, Ohsakob S, Matsuwaki T, Zhua XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sone H, Tohyama C and Kurohmaru M. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction.*, in press, 2009.

2. Yang L, Fukuda T, Akanuma H, Zaha H, Imanishi S, and Sone H. Effects of low dose bisphenol A on the proliferation and sensitivity to benzo[*a*]pyrene of human mammary epithelial cells. (*submitted*).

3. Fukuda T, Zaha H, Matsumoto Y, Imanishi S, Yonemoto J and Sone H. A early exposure to bisphenol A cause a persistent increase of the proliferation rate in human mammary epithelial cells. (*submitted*).

2. 学会発表

1. 曾根秀子 楊淋清 福田智一 BPA は、P53 を介して発がん物質の感受性を上昇する. 日本癌学会 第 68 回学術総会 (2009)

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

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

研究分担者 井口 泰泉 自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター教授

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、膺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 曝露群と対照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。遺伝子発現と DNA のメチル化に相関が見られる遺伝子を見出した。一方で、DNA のメチル化に変化はないがヒストン修飾が変化している遺伝子も見られた。このように新生児期 DES 曝露マウスの膺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膺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。

妊娠ラットへのビクロゾリン（防衛剤）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ている。このように発生途上の未成熟な時期に対する女性ホルモン曝露は、エピジェネティクス作用による晩発性さらには世代をこえた効果が報告されており、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と遺伝子発現との相関について解析を行った。

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、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、摘出した膺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。さらに各群の膣組織からゲノム 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。

(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

出生直後の DES および ER α リガンド投与では、無排卵、子宮筋の乱れ、恒久的な遺伝子発現を伴う卵巣非依存の膣上皮の増殖が誘起されたが、ER β リガンドでは異常は起こらなかった。ER を介した雌性生殖器官の異常の誘起は、主として ER α を介していることが明らかとなった。

マウスのエストロゲン受容体遺伝子を組み込んだレポータージーンアッセイから、今回用いた ER 特異的リガンドは、DES に対して 10 倍量を用いれば DES とほぼ同様のエストロゲン活性を持つことが明らかとなった。

臨界期である出生直後に投与した DES は 0.025-2.5 $\mu\text{g/g}$ bw の全てのマウスにおいて卵巣には黄体が認められず無排卵であり、子宮筋層の乱れが認められた。0.25-2.5 $\mu\text{g/g}$ では前例に卵巣非依存の膣上皮の増殖が認められた。ER α リガンドでは、2.5-25 $\mu\text{g/g}$ で無排卵と子宮筋層の乱れ

が起こり、25 $\mu\text{g/g}$ でのみ卵巣非依存の膣上皮の増殖が認められた。ER β リガンドでは、25 $\mu\text{g/g}$ で無排卵および卵巣非依存の膣上皮の増殖を示す個体も数匹認められたが、統計学的には有意でなかった。したがって、臨界期である出生直後のエストロゲン類似物質投与により誘起される、視床下部下垂体卵巣系の無排卵、子宮筋層の乱れ、卵巣非依存の膣上皮の増殖は、ER α を介して誘起されていることが明らかとなった。

さらに、最高濃度の DES (2.5 $\mu\text{g/g}$ bw)、ER α および ER β リガンド (25 $\mu\text{g/g}$ bw) を出生直後から投与したマウスの膣で、amphiregulin、epiregulin、heparin-binding EGF、Wnt4、Wnt5a、Wnt7a、Wnt11、Notch1、Notch3、p21 の発現を定量 PCR 法により解析したところ、卵巣非依存の増殖を示している DES および ER α リガンド投与の膣では、amphiregulin、epiregulin、heparin-binding EGF、Wnt4、Wnt5a、Notch1、Notch3、p21 の発現が高く、ER β 投与では対照群と同様、膣上皮の増殖は認められず、Wnt7a と Wnt11 の発現が高かった。

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膣上皮細胞の増殖を示した。更に DES 未曝露と曝露マウスの膣において、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されていなかった。一方で同じ領域におけるメチル化は、各群で顕著な差異は認められなかった。これらのことより、Gpr87 遺伝子の発現増加は、ヒストン修飾状態の変化をともなっていることが示唆された。更に、ChIP-on-chip 法により網羅的な DNA のメチル化状態を調べた。一般的に DNA のメチル化は遺伝子発現を負に制御する。DNA メチル化と遺伝子発現が正しく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、膣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。

引き続き、バイサルフェイト法を用いて遺伝子のメチル化状態の解析を行っている。さらに各種ヒストン抗体を用いた ChIP 法を行い、クロマチン状態を併せて解析することが必要である。このように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が重要である。

D. 考察

内分泌をかく乱する可能性のある物質の多くはエストロゲン作用を有すると考えられている。そのため、化学物質のエストロゲン作用は2種類存在する ER α および ER β のどちらを介して作用する可能性があるのかを明らかにする目的で、それぞれの受容体の特異的リガンドとして開発されている物質を、出生直後のマウスに投与して、その後の影響を調べた。その前に、マウスエストロゲン受容体遺伝子を組み込んだレポーター遺伝子アッセイを用いて、特異的リガンドの DES に対するエストロゲン作用の非活性を調べ、各リガンドは DES の 10 倍量必要であることを確認した。

視床下部下垂体卵巣系の無排卵、子宮筋層の乱れ、膣上皮細胞の卵巣非依存の増殖は、臨界期のエストロゲン作用の標的となっている。今回の実験結果からは、エストロゲン作用を持つ物質が悪影響を及ぼすとすれば、少なくとも今回調べた標的臓器に対しては、主として ER α を介して作用を及ぼすことが明らかとなった。

卵巣非依存的に上皮の増殖が継続している膣では、今まで明らかにしている、amphiregulin, epiregulin, heparin-binding EGF に加えて、Wnt4、Wnt5a、Notch1、Notch3、p21 の恒常的発現が明らかとなった。今後は、これらのシグナル系のカスケードを明らかにすることにより、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。

このような恒久的な変化においては、ゲノムがエピジェネティックな変化をしている場合もあり、引き続きエストロゲ

ン曝露とゲノム状態の変化の解析を行う必要がある。

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た出生直後の新生児期マウスへの DES の曝露では、発生の臨界期での DES 曝露により、マウスの膺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 musculoaponeurctic 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。さらにメチル化 DNA 抗体を用いた ChIP-on-chip 解析により、DNA のメチル化状態を網羅的に解析した。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、曝露群の膺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、DNA メチル化とまではいかないが、ヒストン修飾は明らかに影響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。

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、膺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。

E. 結論

エストロゲン作用物質は主として ER α を介して、雌性生殖器官に影響を及ぼすことが明らかとなった。

エストロゲン作用を持つ物質が臨界期のマウスに作用する場合、視床下部下垂体卵巣系の無排卵、子宮筋層の乱れ、膺上皮の不可逆的増殖といった影響は、エストロゲン受容体 α を介して作用する可能性が高いことが明らかとなった。また、不可逆的に上皮が増殖している膺ではいくつもの遺伝子が恒久的に発現していることを明らかにした。

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。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膾上皮細胞の増殖を示した。更に DES 未曝露と曝露マウスの膾において、遺伝子発現プロファイルを探索した。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。その結果 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こ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。このように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が重要である。今後は実際にクロマチン構造の変化が起きた遺伝子について、組織不可逆化に寄与する遺伝子を同定することが重要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ◎1. Kim, H., Hayashi, S., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. and Sato, T. (2009). Effects of diethylstilbestrol on ovarian follicle development in neonatal mice. *Reprod. Toxicol.*, 27, 55-62.
2. Lange, A., Paull, G.C., Coe, T.S., Katsu, Y., Urushitani, H., Iguchi, T. and Tyler, C.R. (2009). Sexual reprogramming and estrogenic sensitization in wild fish exposed to ethinylestradiol. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 1219-1225.
3. Tyler, C.R., Filby, A.L., Bickley, L.K., Cumming, R.I., Gibson, R., Labadie, P., Katsu, Y., Liney, K.E., Shears, J.A., Silva-Castros, V., Urushitani, H., Lange, A., Winter, M.J., Iguchi, T. and Hill, E.M. (2009). Environmental health impacts of equine estrogens derived from hormone replacement therapy. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 3897-3904.
4. Grim, K.C., Wolfe, M., Braunbeck, T., Iguchi, T., Ohta, Y., Tooi, O., Touart, L., Douglas, C., Wolf, D.C. and Tietge, J. (2009). Thyroid histopathology assessments for the amphibian metamorphosis assay to detect thyroid-active substances. *Tox. Pathol.*, 37, 415-424.
- ◎5. Miyagawa, S., Satoh, Y., Haraguchi, R., Suzuki, K., Iguchi, T., Taketo, M.M., Nakagata, N., Matsumoto, T., Takeyama, K., Kato, S. and Yamada, G. (2009). Genetic integrations of the androgen and Wnt/ β -catenin pathways for the masculinization of external genitalia. *Mol. Endocrinol.*, 23, 871-880.
6. Oka, T., Miyahara, M., Yamamoto, J., Mitsui, N., Fujii, T., Tooi, O., Kashiwagi, K., Takase, M., Kashiwagi, A. and Iguchi, T. (2009). Application of metamorphosis assay to a native Japanese amphibian species, *Rana rugosa*, for assessing effects of thyroid system affecting chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 72, 1400-1405.
7. Hikake, T., Hayashi, S., Iguchi, T. and Sato, T. (2009). The role of IGF1 on the differentiation of prolactin secreting cells in the mouse anterior pituitary. *J.*

- Endocrinol., 203, 231-240.
8. Miyagawa, S. Moon, A., Haraguchi, R., Inoue, C., Harada, M., Nakahara, C., Suzuki, K., Matsumaru, D., Kaneko, T., Matsuo, I., Yang, L., Taketo, M.M., Iguchi, T., Evans, S.M. and Yamada, G. (2009). Dosage-dependent hedgehog signals integrated with Wnt/ β -catenin signaling regulate external genitalia formation as an appendicular program. *Development*, 136, 3969-3978.
 - ©9. Kim, H., Nakajima, T., Hayashi, S., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. and Sato, T. (2009). Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries. *Biol. Reprod.*, 81, 1002-1009.
 10. Kirigaya, A., Kim, H., Hayashi, S., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. and Sato, T. (2009). Involvement of estrogen receptor β in the induction of polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Zool. Sci.*, 26, 704-712.
 11. Kohno, S., Katsu, Y., Urushitani, H., Ohta, Y., Iguchi, T. and Guillette, L.J.Jr. (2009) Potential contributions of heat shock proteins to temperature-dependent sex determination in the American alligator. *Sex. Devel.*, (in press).
 12. Moore, B.C., Milnes, M.R., Kohno, S., Katsu, Y., Iguchi, T. and Guillette, L.J. (2009). Influences of sex, incubation temperature, and environmental quality on gonadal estrogen and androgen receptor messenger RNA expression in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Biol. Reprod.*, (in press).
 - ©13. Miyagawa, S., Katsu, Y., Ohta, Y., Sudo, T., Lubahn, D.B. and Iguchi, T. (2009). Estrogen receptor α is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5α -dihydrotestosterone exposure. *Biol. Reprod.* (in press).
 14. Myers, J.P., vom Saal, F.S., Akingbemi, B.T., Arizono, K., Belcher, S., Colborn, T., Chahoud, I., Crain, D.A., Farabollini, F., Guillette, L.J.Jr., Hassold, T., Ho, S.-M., Hunt, P.A., Iguchi, T., Jobling, S., Kanno, J., Laufer, H., Marcus, M., McLachlan, J.A., Nadal, A., Oehlmann, J., Olea, N., Palanza, P., Parmigiani, S., Rubin, B.S., Schoenfelder, G., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Talsness, C.E., Taylor, J.A., Vandenberg, L.N., Vandenberg, J.G., Vogel, S., Watson, C.S., Welshons, W.V. and Zoeller, R.T. (2009). Why public health agencies cannot depend upon good laboratory practices as a criterion for selecting data: The case of bisphenol A. *Environ. Health Perspect.*, 117, 309-315.
 15. Edwards, T.M., Iguchi, T. and Guillette, L.J.Jr. (2009). Genes to ecosystems: viviparous fishes and endocrine disruption. In: *Viviparous Fishes II*. Carmen, M. ed. (in press).
 - ©16. Iguchi, T., Miyagawa, S. and Sudo, T. (2009). Modern genetics of reproductive biology. In: *Environmental Impacts on*

- Reproductive Health and Fertility, Cambridge University Press, Woodruff, T., Guillette, L.J.Jr. (Eds.), (in press).
17. Van Aggelen, G., Ankley, G.T., Baldwin, W.S., Bearden, D.W., Benson, W.H., Chipman, J. K., Collette, T.W., Craft, J.A., Denslow, N.D., Embry, M.R., Falciani, F., George, S.G., Helbing, C.C., Hoekstra, P.F., Iguchi, T., Kagami, Y., Katsiadaki, I., Kille, P., Liu, L., Lord, P.G., McIntyre, T., O'Neill, A., Osachoff, H., Perkins, E.J., Santos, E.M., Skirrow, R.C., Snape, J.R., Tyler, C.R., Versteeg, D., Viant, M.R., Volz, D.C., Williams, T.D. and Yu, L. Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: Hurdles, achievements and future outlook. *Environ. Health Perspect.* 118:1-5; 2010
 18. Halder, M., Léonard, M.A., Iguchi, T., Oris, J.T., Ryder, K., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Embry, M.R., Whale, G., Norberg-King, T. and Lillicrap, A. (2009). Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology. *Integ. Environ. Assess. Manage.* (in press) Doi 10.1002/ieam.48
 19. Katsu, Y., Kubokawa, K., Urushitani, H. and Iguchi, T. (2010). Estrogen-dependent transactivation of amphioxus steroid hormone receptor via both estrogen and androgen response elements. *Endocrinology*, (in press).
 20. Celandier, M.C., Goldstone, J.V., Denslow, N.D., Iguchi, T., Kille, P., Meyerhoff, R.D., Smith, B.A., Hutchinson, T.H. and Wheeler, J.R. (2010). Species extrapolation for the 21st century. *Environ. Toxicol. Chem.*, (in press).
 21. 井口泰泉：ビスフェノール A のリスク評価と研究に関する最近の話題。 *Endocrine Disrupter News Letter* (環境ホルモン学会ニュースレター) 12 (2): 3, 2009.
 22. 井口泰泉：水環境中の女性ホルモンによる生態影響。 *水と水技術*, 76: 32-39, 2009.
- ## 2.学会発表
1. Guillette, L.J., Moore, B.C. Iguchi, T.: Endocrine disrupting contaminants and the developing ovary: altered activin/inhibin and steroid signaling leads to modified folliculogenesis. 5th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters. Ubiquitous endocrine disrupters and possible human health effects, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark, May 20-22, 2009.
 2. Iguchi, T.: Current status of the endocrine disruptor research in Japan and OECD including my own laboratory. International Symposium of Environmental Emerging Compound Measurement Technology and Management, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, May 26, 2009.
 3. Iguchi, T. and Tatarazako, N.: Current research progress in Japan. OECD Validation and Management Group Ecotoxicity, Invertebrate, OECD, Paris,

- France, June 8-9, 2009.
4. Iguchi, T., Kato, Y., Watanabe, H., Oda, S. and Tatarazako, N.: Modulation of sex determination by juvenile hormones and their analogs in *Daphnia magna*. International Conference on Comparative Endocrinology, Symposium 4: Environmental Toxicology and Endocrine Disruption. Organized by Glen Van Der Kraak and Taisen Iguchi, Hong Kong, June 22-26, 2009.
 5. Iguchi, T.: Guidance on identifying endocrine disrupting effects. Organized by ECETOC, Barcelona, Spain, June 29-30, 2009.
 6. Iguchi, T. and Yamazaki, K.: Activities on testing and assessment of ED in Ministry of the Environment, Japan. OECD Workshop on Endocrine Disruption Testing and Assessment, Copenhagen, Sept. 22-24, 2009.
 7. Iguchi, T., Koide-Yoshida, S., Watanabe, H., Igarashi, K., Kanno, J. and Miyagawa, S.: Genomic and epigenetic approaches for analysis of developmental effect of neonatal estrogen on mouse vagina. Horiba Symposium, University of Tokyo, October 26-27, 2009.
 8. Miyagawa, S., Katsu, Y., Ohta, Y., Sudo, T., Lubahn, D.B. and Iguchi, T.: Estrogen receptor α is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5α -dihydrotestosterone exposure. e. hormone, Tulane University, USA, October 20-24, 2009.
 9. Iguchi, T.: Endocrine disruption across multiple animal species - common mechanisms? e. hormone, Tulane University, USA, October 20-24, 2009.
 10. Ohta, Y., Urushitani, H., Takeuchi, T., Iguchi, T., Katsu, Y., Kohno, S., Botteri, N., Moore, B. and Guillette, L.J.: A preliminary study on immunohistochemical detection of estrogen receptor in American alligator oviducts - specificity of antibodies. e. hormone, Tulane University, USA, October 20-24, 2009.
 11. Celander, M.C., Goldstone, J.V., Denslow, N.D., Iguchi, T., Kille, P., Meyerhoff, R.D., Smith, B.A., Hutchinson, T.H. and Wheeler, J.R.: Species extrapolation for the 21st century. 29th SETAC North America, Tampa, Florida, USA, Nov. 16-20, 2009.
 12. 井口泰泉：「雌性ホルモン系における毒性発現の分子メカニズム」日本トキシコロジー学会生涯教育講習会，岩手大学，盛岡，7月5日，2009.
 13. 井口泰泉：「環境中の医薬品や内分泌かく乱物質の最近の研究動向」河川環境管理財団講演会，東京，7月23日，2009.
 14. 井口泰泉：愛知県立豊田西高等学校「生物—環境—化学物質」岡崎，8月3日，2009.
 15. 井口泰泉：横浜雙葉高等学校「特別授業：環境ホルモン」横浜市，横浜雙葉高等学校，9月7日，2009.
 16. 加藤泰彦、小林かおる、渡邊肇、井口泰泉：「エレクトロポレーションを用いたオオミジンコへの遺伝子導入」．第

- 80 回日本動物学会、静岡、 9 月 17-19 日, 2009.
17. 佐藤友美、中島忠章、井口泰泉：「新生仔期のマウス子宮、膈における BMPs の役割」. 第 80 回日本動物学会、静岡、 9 月 17-19 日, 2009.
18. 中島忠章、井口泰泉、佐藤友美：「新生仔期の膈上皮細胞における FGF と HH の役割」. 第 80 回日本動物学会、静岡、 9 月 17-19 日, 2009.
19. 高瀬稔、後藤康之、宮原真紀、三井直子、岡知宏、小林かおる、渡邊肇、井口泰泉：「EE2 暴露のニシツメガエル幼生生殖腺を用いたマイクロアレイ解析」. 第 80 回日本動物学会、静岡、 9 月 17-19 日, 2009.
20. 勝義直、窪川かおる、漆谷博志、井口泰泉：「ナメクジウオの 2 種類のステロイドホルモン受容体遺伝子の単離と機能解析」. 第 80 回日本動物学会、静岡、 9 月 17-19 日, 2009.
21. 鑪迫典久、斎藤和代、中川理緒、江藤千純、井口泰泉：「プロクロラズのみダカを用いた短期繁殖試験による検討」. 日本毒性学会、10 月 4 日, 2009.
22. 渡邊肇、小出静代、五十嵐勝秀、菅野純、井口泰泉：「新生児期エストロゲン曝露によるエピジェネティックな影響」 Epigenetic effect of estrogen exposure on neonatal mouse. 4S14p 化学物質による遺伝子修飾と毒性発現/ Toxic effects of chemical substances and gene modification. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、10 月 21-24 日, 2009.
23. 加藤泰彦、小林かおる、小田重人、鑪迫典久、渡邊肇、井口泰泉：「エレクトロポレーションを用いたオオミジンコにおける GFP 遺伝子の異所的発現」. 第 12 回環境ホルモン学会研究発表会、東京、12 月 7-8 日, 2009
24. 宮川信一、勝義直、井口泰泉：「Estrogen receptor α is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5 α -dihydrotestosterone exposure」. 第 32 回日本分子生物学会、横浜、12 月 9-12 日, 2009.

H. 知的所有権の取得状況
なし