

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（平成 19-21 年度）

核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御への影響に関する研究

研究分担者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所教授

研究要旨

内分泌かく乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つには、性ステロイドホルモン作用のかく乱が考えられている。本研究では、核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにする。具体的には、男性、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相互作用する複合体を解析した。ダイオキシンレセプターが形成する転写制御複合体の同定により、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を解明した。また性ホルモン受容体の細胞周期における新規の転写制御機構を同定し、性ステロイドホルモン作用かく乱機構の一端解明への発展を目指している。

A. 研究目的

低容量内分泌かく乱化学物質の性生殖へ影響を及ぼす作用点を分子レベルで解明する。すなわち、性生殖作用を担う性ステロイドホルモン作用へのかく乱効果を、ホルモンレセプターの転写制御機能について調べる。これまで継続してきた性ホルモンレセプター共役因子群の同定に加え、ダイオキシンレセプターを介した女性ホルモン・男性ホルモンレセプターへの影響について検討した。

B. 研究方法

男性ホルモン、女性ホルモンレセプターおよびダイオキシンレセプターに結合する転写共役因子複合体の同定及びダイオキシンレセプターとのクロストークを検討した。すなわち、これらレセプター群に結合する転写共役因子複合体を、生化学的に精製及びその構成因子群を同定する。また、複合体としての機能を *in vitro* 系で評価する。また、ダイオキシンレセプターとの機能的相互作用を転写レベルで検討する。さらに新たな材料として脂肪細胞および細胞周期制御との関連を追及した。

C. 研究結果

1) 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及び同定

女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子複合体として、アセチル化ヒストン結合性タンパク質 BRD を同定した。この複合体は、女性ホルモンレセプターN 末端側の転写促進領域に特異的に結合し、転写機能を活性化することが分かった。

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

2) ダイオキシンレセプターを介したエストロゲン作用かく乱の分子メカニズム

ダイオキシンレセプターとエストロゲンレセプターとの関連を検討した結果、活性化されたダイオキシンレセプターが女性ホルモンレセプターと会合することを見出した。エストロゲンが結合した状態では、ダイオキシンレセプターはその機能を抑制することが明らかとなった。また、ダイオキシンレセプターの分解に関する新規複

合体の同定に成功した。この複合体はダイオキシンレセプターへのリガンド結合に依存的に、エストロゲンレセプターをユビキチン化することを見出した。ユビキチン化複合体の形成はリガンド依存的であった。従ってダイオキシンレセプターは、相互作用蛋白の分解促進という全く新規の分子機能を有することが示唆された。さらに、タンパク質分解促進を活性化するダイオキシンレセプターリガンドを見出したことから、ダイオキシン類の作用の一部が分解経路によって発揮される可能性が考えられる。

### 3) ダイオキシンレセプターを介した脂肪細胞分化制御機構

ダイオキシン類の脂肪細胞分化に対する阻害作用が知られている。一方脂肪細胞分化は核内レセプターの一つである PPAR $\gamma$  によって誘導される。そこで、脂肪細胞分化制御におけるダイオキシン類の毒性作用機構の解明を目指し、ST2 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。方法としては、再構築ダイオキシン受容体蛋白質をプローブタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。その結果、新規の転写共役抑制因子として SARA を同定した。SARA はダイオキシンレセプターの機能を仲介する新規の共役因子であり、脂肪細胞分化の制御能を有する転写共役因子であった。

### 4) ショウジョウバエを用いた男性、および女性ホルモンレセプター転写共役因子の機能解析

性ホルモンレセプターと転写共役因子との相互作用を *in vitro* 細胞系で解析を行ってきたが、これらの結果は、必ずしも個体での現象を反映しない。そこで、ショウジョウバエにヒト AR, ER を組織特異的に発現する系の構築に成功した。下流のリポーター遺伝子は GFP を用いたので、AR/ER のリガンド依存的な転写機能は GFP の発現に振り替えられるため、結果として蛍光

として観察できる。エサに性ホルモンを加えると、GFP による蛍光が観察された。また、このレセプターを介した転写促進能は、AR を強制発現させたいずれの組織においても観察されている。AR の転写活性を指標としたスクリーニングにより、ヒストン脱ユビキチン化酵素を同定した。これにより、AR を介した転写活性化機構の一端解明に成功した。

### 5) 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及び同定

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

さらに最終年度は、女性ホルモン受容体の転写活性化機構を詳細に解析した結果、女性ホルモン受容体の転写活性化能には細胞周期依存性があることを見出した。すなわち、女性ホルモン受容体の転写活性は DNA 複製期 (S 期) で強く、分裂期 (M 期) で抑制されることを見出した。さらにこの分子機構として転写共役因子複合体の細胞周期依存的な相互作用機構を解明した。細胞周期依存的な性ホルモン受容体相互作用因子同定に成功した。

## 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。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。

## E. 結論

性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子を同定した。また、ダイオキシンレセプターが女性ホルモンレセプターの蛋白分解を促進することを見出した。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を同定した。研究テーマとして次の4項目について取り組んだすなわち、

1) ダイオキシンレセプターを介したエストロゲン作用かく乱の分子メカニズム

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

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及び同定

以上、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。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。

## 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

Kim, M., Kondo, T., Takada, I., Youn, M., Yamamoto, Y., Takahashi, S., Matsumoto, T., Fujiyama, S., Shirode, Y., Yamaoka, I., Kitagawa H., Takeyama, K., Shibuya, H., Ohtake, F. and Kato, S. DNA

demethylation in hormone-induced transcriptional derepression. **Nature** 461, 1007-1012, 2009.

Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R. G., Kitagawa, H. and Kato, S. GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. **Nature** 459, 455-459, 2009.

©Yamagata, K., Fujiyama, S., Ito, S., Ueda, T., Murata, T., Naitou, M., Takeyama, K., Minami, Y., O'Malley, B. W. and Kato, S. Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. **Mol. Cell** 36, 340-347, 2009.

Zhao, Y., Takeyama, K., Sawatsubashi, S., Ito, S., Suzuki, E., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Fujiyama, S., Ueda, T., Murata, T., Matsukawa, H., Shirode, Y., Kouzmenko, A. P., Li, F., Tabata, T. and Kato, S. Corepressive action of CBP on androgen receptor transactivation in pericentric heterochromatin in a Drosophila experimental model system. **Mol. Cell Biol.** 29, 1017-1034, 2009.

©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.** 29, 83-92, 2009.

©Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A. and Kato, S. Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. **Mol. Cell. Endocrinol.** 310, 3-10, 2009.

Yoshimura, K., Kitagawa, H., Fujiki, R., Tanabe, M., Takezawa, S., Takada, I., Yamaoka, I., Yonezawa, M., Kondo, T., Furutani, Y., Yagi, H., Yoshinaga, S., Masuda, T., Fukuda, T., Yamamoto, Y., Ebihara, K., Li, D. Y., Matsuoka, R., Takeuchi, J. K., Matsumoto, T. and Kato, S. Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit,

Williams syndrome transcription factor (WSTF). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106, 9280-9285, 2009.

Suzuki, E., Zhao, Y., Ito, S., Sawatsubashi, S., Murata, T., Furutani, T., Shirode, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Ueda, T., Fujiyama, S., Lim, J., Matsukawa, H., Kouzmenko, A. P., Aigaki, T., Tabata, T., Takeyama, K. and Kato, S. Aberrant E2F activation by polyglutamine expansion of androgen receptor in SBMA neurotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106, 3818-3822, 2009.

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.** 27, 127-130, 2009.

Fujiyama-Nakamura, S., Ito, S., Sawatsubashi, S., Yamauchi, Y., Suzuki, E., Tanabe, M., Kimura, S., Murata, T., Isobe, T., Takeyama, K. and Kato, S. BTB protein, dKLHL18/CG3571, serves as an adaptor subunit for a dCul3 ubiquitin ligase complex. **Genes to Cells** 14, 965-973, 2009.

©Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. **Biochem. Pharmacol.** 77, 474-484, 2009.

Takada, I., Kouzmenko, A. P. and Kato, S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. **Nat. Rev. Rheumatol.** 5, 442-447, 2009.

Takada, I., Kouzmenko, A. P. and Kato, S. Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. **Expert Opin. Ther. Targets.** 13, 593-603, 2009.

Oya, H., Yokoyama, A., Yamaoka, I., Fujiki, R., Yonezawa, M., Youn, M.-Y., Takada, I., Kato, S. and Kitagawa, H. Phosphorylation of WSTF by MAPK induces a switching between two distinct chromatin remodeling

complexes. **J. Biol. Chem.** 2009, in press.

Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S. and Miyazono, K. Modulation of microRNA processing by p53. **Nature** 460, 529-533, 2009.

©Kawajiri, K., Kobayashi, Y., Ohtake, F., Ikuta, T., Matsushima, Y., Mimura, J., Pettersson, S., Pollenz, R. S., Sakaki, T., Hirokawa, T., Akiyama, T., Kurosumi, M., Poellinger, L., Kato, S. and Fujii-Kuriyama, Y. Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106, 13481-13486, 2009.

Zhang, Z., Hener, P., Frossard, N., Kato, S., Metzger, D., Li, M. and Chambon, P. Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106, 1536-1541, 2009.

Miyagawa, S., Satoh, Y., Haraguchi, R., Suzuki, K., Iguchi, T., Taketo, M. M., Nakagata, N., Matsumoto, T., Takeyama, K., Kato, S. and Yamada, G. Genetic interactions of the androgen and Wnt/{beta}-catenin pathways for the masculinization of external genitalia. **Mol. Endocrinol.** 23, 871-880, 2009.

Ikeda, Y., Aihara, K., Yoshida, S., Sato, T., Yagi, S., Iwase, T., Sumitomo, Y., Ise, T., Ishikawa, K., Azuma, H., Akaike, M., Kato, S. and Matsumoto, T. Androgen-androgen receptor system protects against angiotensin II-induced vascular remodeling. **Endocrinology** 150, 2857-2864, 2009.

Suzuki, K., Yamaguchi, Y., Villacorte, M., Mihara, K., Akiyama, M., Shimizu, H., Taketo, M. M., Nakagata, N., Tsukiyama, T., Yamaguchi, T. P., Birchmeier, W., Kato, S. and Yamada, G. Embryonic hair follicle fate change by augmented beta-catenin through Shh and Bmp signaling. **Development** 136, 367-372, 2009.

Iwasawa, M., Miyazaki, T., Nagase, Y., Akiyama, T., Kadono, Y., Nakamura, M., Oshima, Y., Yasui, T., Matsumoto, T., Nakamura, T., Kato, S., Hennighausen, L., Nakamura, K. and Tanaka, S. The antiapoptotic protein Bcl-xL negatively regulates the bone-resorbing activity of osteoclasts in mice. **J. Clin. Invest.** 19, 3149-3159, 2009.

Honzawa, S., Takahashi, N., Yamashita, A., Sugiura, T., Kurihara, M., Arai, M. A., Kato, S. and Kittaka, A. Synthesis of a 1alpha-C-methyl analogue of 25-hydroxyvitamin D3: interaction with a mutant vitamin D receptor Arg274Leu. **Tetrahedron** 65, 7135-7145, 2009.

Ishizawa, M., Iwasaki, K. I., Kato, S. and Makishima, M. Hypergravity modulates vitamin D receptor target gene mRNA expression in mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 297, E728-734, 2009.

Shiizaki, K., Hatamura, I., Imazeki, I., Moriguchi, Y., Sakaguchi, T., Saji, F., Nakazawa, E., Kato, S., Akizawa, T. and Kusano, E. Improvement of impaired calcium and skeletal homeostasis in vitamin D receptor knockout mice by a high dose of calcitriol and maxacalcitol. **Bone** 45, 964-971, 2009.

## 2. 学会発表

### 【国内】

2009 年度日本農芸化学会大会  
(2009/3/27-29、福岡)

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析

伊藤紗弥、沢津橋俊、山形 薫、鈴木絵里子、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、米沢正祥、加藤茂明

ビタミンDレセプターのユビキチンリガーゼ活性の生理機能解明

奥村知子、西川亜美、大竹史明、加藤茂明

ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 による神経分化制御メカニズムの解析

横山 敦、藤山沙理、北川浩史、加藤茂明

骨芽細胞におけるエストロゲンの作用の解明

金藤紫乃、今井祐記、高田伊知郎、中村貴、松本高広、加藤茂明

BTB タンパク質 dKLHL18/CG3571 は E3 ユビキチンリガーゼ Cul-3 複合体のアダプターとして機能する

中村沙理、伊藤紗弥、沢津橋俊、鈴木絵里子、田辺真彦、村田拓哉、武山健一、加藤茂明

新規クロマチンバウンダリー調節因子の探索とその解析

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

新たな VDR 転写調節機構の解明

山本陽子、福田 亨、目々澤愛、新道真代、高木健一郎、加藤茂明

ユビキチンリガーゼ活性を有する核内受容体の機能解析

西川亜美、奥村知子、岡田麻衣子、大竹史明、加藤茂明

活性型クロマチン構造調節に関わる新規転写共役因子の探索の試み

林 珍仙、沢津橋俊、伊藤紗弥、山形薫、鈴木絵里子、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

第 82 回日本内分泌学会学術総会  
(2009/4/23-25、前橋)

核内受容体転写修飾因子として機能する  
クロマチン構造変換複合体の新規細胞内  
シグナル依存性機能制御メカニズムの解  
明

北川浩史、大矢博之、山岡育子、藤木亮  
次、吉村公宏、横山 敦、神津 円、高  
田伊知郎、加藤茂明

ダイオキシン受容体はリガンド依存性ユ  
ビキチンリガーゼである

大竹史明、藤井義明、加藤茂明

アンドロゲン受容体新規転写共役抑制因  
子を介したアンドロゲン依存性癌の分子  
機構の解析

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

ビタミンD3 1 $\alpha$ 水酸化酵素遺伝子上で、  
活性型ビタミンD依存的な転写抑制解除  
に関する脱メチル化酵素MBD4欠損マウ  
スは、ビタミンD代謝機構の破綻を呈す  
る

近藤剛史、金 美善、高田伊知郎、松本  
高広、武山健一、加藤茂明

細胞周期依存的な E $\alpha$ R 転写制御機構の解  
析

岡田麻衣子、竹澤慎一郎、目崎喜弘、高  
田伊知郎、北川浩史、加藤茂明

ミネラルコルチコイド受容体 (MR) によ  
る未知臓器傷害メカニズムの解析

横田健一、大竹史明、北川浩史、加藤茂  
明

第 27 回日本骨代謝学会学術集会  
(2009/7/23-25、大阪)

MBD4 はビタミン D 生合成調節因子である  
- DNA demethylation for  
hormone-induced transcriptional

derepression -

近藤剛史、金 美善、高田伊知郎、松本  
高広、加藤茂明

ヒストンメチル化酵素、Jmjd5 は破骨細  
胞形成抑制因子である

- A histone demethylase, Jmjd5, is an  
osteoclastogenic regulator -

延 珉榮、高田伊知郎、今井祐記、加藤  
茂明

第82回日本生化学会大会(2009/10/21-24、  
神戸)

炎症制御に関するグルココルチコイド  
レセプター (GR) の分解制御メカニズムの  
解析

北川浩史、山岡育子、岡田麻衣子、藤山  
沙理、加藤茂明

Nuclear O-glycosylation of a histone  
methyltransferase facilitates  
retinoic-acid-induced differentiation  
Ryoji Fujiki, Chikanishi Toshihiro,  
Waka Hashiba, Robert G Roeder,  
Hirochika Kitagawa, Shigeaki Kato

ダイオキシン受容体はリガンド依存性ユ  
ビキチンリガーゼである

大竹史明、藤井義明、加藤茂明

O-結合型 N-アセチルグルコサミン転移酵  
素 (OGT) の核内新規相互作用因子の探索  
近西俊洋、藤木亮次、橋場和華、加藤茂  
明

AhR の LPS 刺激に対する抗炎症的作用機  
構の解明

関根弘樹、三村純正、大島基彦、渡辺要  
平、五十嵐勝秀、菅野 純、生田統悟、  
川尻 要、加藤茂明、藤井義明

ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 による神経  
分化制御メカニズムの解析

横山 敦、藤山沙理、北川浩史、加藤茂  
明

第17回日本ステロイドホルモン学会学術集会 (2009/11/4、福岡)

グルココルチコイドレセプター (GR) による炎症制御メカニズムの解析

北川浩史、加藤茂明

核内糖修飾を介する血球分化促進機構

藤木亮次、北川浩史、加藤茂明

第 32 回日本分子生物学会年会 (2009/12/9-12、横浜)

核輸送制御とクロマチン構造調節の相互作用を担う新規因子の探索

村田拓哉、伊藤紗弥、沢津橋俊、鈴木絵里子、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

MBD4はビタミンD生合成調節因子である

- DNA demethylation for hormone-induced transcriptional derepression -

近藤剛史、金 美善、高田伊知郎、松本高広、加藤茂明

Y 染色体遺伝子 Uty の性差形成における機能解析

井上和樹、松本高広、肥塚真実子、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

ビタミン D レセプターのユビキチンリガーゼ活性の生理機能解明

朝妻知子、西川亜美、岡田麻衣子、大竹史明、加藤茂明

A h R のユビキチンリガーゼ活性の細胞周期依存的調節機構の解析

橋山幸世、大竹史明、岡田麻衣子、加藤茂明

A signal-dependent histone demethylase

complex in regulation of gluconeogenic genes

Fumiaki Ohtake, Atsushi Baba, Yosuke Okuno, Shigeaki Kato

BAHD1, a novel chromatin reorganization factor regulates histone gene expression through heterochromatin formation

Saya Ito, Shun Sawatsubashi, Eriko Suzuki, Masahiko Tanabe, Shuhei Kimura, Takashi Ueda, Sally Fujiyama, Takuya Murata, Hiroyuki Matsukawa, Jinseon Lim, Ken-ichi Takeyama, Shigeaki Kato

A histone demethylase, Jmjd5, is an osteoclastogenic regulator

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

**【国際】**

International Joint Symposium on "Cell Fate Regulation Research: Molecular Basis and Therapeutic Potentials" (2009/4/9-10, Kumamoto, Japan)

Regulated histone methylase/demethylase complexes supporting nuclear receptors  
Kato, S.

The New York Academy of Sciences (NYAS), 3rd Conference on Skeletal Biology and Medicine (2009/4/29-5/2, New York, USA)

Transcriptional regulation of steroid action  
Kato, S.

The 66th Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology Annual Meeting (2009/5/12-13, Seoul, Korea)

Nuclear O-glycosylation regulates histone methyltransferase activity of MLL5 during retinoic acid-induced differentiation  
Kato, S.

36th European Symposium on Calcified Tissues (2009/5/23-27, Vienna, Austria)

Non-canonical Wnt signaling and the osteoblast-adipocyte lineage decision  
Kato, S.

16th International Conference on

Cytochrome P450 (2009/6/21-25, Okinawa, Japan)

Nuclear vitamin D receptor-regulated expression of the human CYP27B1 gene mediated the DNA methylation/demethylation

Kato, S.

The 24th Naito Conference "Nuclear Dynamics and RNA [III]" (2009/6/23-26, Sapporo, Japan)

The Role of histone modifying enzymes in gene regulation

Kato, S.

21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2009/8/2-7, Shanghai, China)

Epigenetic regulators for nuclear receptors

Kato, S.

GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis

Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, G. R., Kitagawa, H., Kato, S.

Spetses Summer school in Athenes (2009/8/23-28, Athenes, Greece)

Regulated histone methyltransferase/Demethyltransferase supporting nuclear receptor function

Kato, S.

Dana-Farber Cancer Institute (Affiliated to Harvard Medical School) Seminar (2009/9/8, Boston, USA)

Regulated histone methyltransferases supporting nuclear

Kato, S.

Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES) / European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE) 8th Joint Meeting Global Care in Pediatric Endocrinology (2009/9/9-11, New York, USA)

Biology and physiology of steroid hormone receptor"

Kato, S.

ASBMR 31<sup>th</sup> Annual Meeting (2009/9/11-15, Denver, USA)

A histone demethylase, Jmjd5, is an osteoclastogenic regulator

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

EMBO Conference, Nuclear Receptor: from molecular mechanisms to molecular medicine (2009/9/25-29, Dubrovnik, Croatia)

Regulated histone methyltransferase/demethylase supporting nuclear receptor function

Kato, S.

14th Workshop on Vitamin D (2009/10/4-8, Brugge, Belgium)

Epigenetic modifications supporting VDR-mediated gene regulations

Kato, S.

Phosphorylation of WSTF by MAPK induces a switching between two distinct chromatin remodeling complexes

Oya, H., Takeyama, K., Yokoyama, A., Fujiki, R., Youn, M.-Y., Takada, I., Kato, S., Kitagawa, H.

A tissue-specific function by unliganded VDR

Yamamoto, Y., Memezawa, A., Takagi, K., Ochiai, E., ShindoM., Kato, S.

DNA Demethylation factor, MBD4 is a key molecule in the vitamin D metabolism

Kondo, T., Kim, M.-S., Matsumoto, T., Yamamoto, Y., Takeyama, K., Kato, S.

H. 知的所有権の取得状況

なし



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書(平成 19-21 年度)

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

分担研究者：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 1) bisphenol A (BPA) の Steroid Xenobiotic Receptor (SXR) を介した骨芽細胞に対する影響、2) bisphenol A (BPA) の aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介した骨芽細胞に対する影響、3) 骨芽細胞における aryl hydrocarbon receptor (AhR) と Steroidogenesis との関連について明らかにすること、などを目的として研究を行った。それぞれ、ヒト骨芽細胞株 hFOB に SXR を安定発現させた株による、BPA の影響（増殖、遺伝子発現及びコラーゲンの蓄積）の確認、ヒト骨芽細胞株及び骨芽細胞様細胞に対する BPA 及び 3-methylcholanthrene (3-MC) の影響の確認、骨芽（様）細胞（hFOB および MG-63）を用いた 3-methylcholanthrene (3-MC) の影響の確認、などを指標として検討し、結果として 1) では、SXR を安定発現した hFOB では BPA の細胞増殖作用が強く認められたこと、また、BPA の添加によって SXR 応答遺伝子群の発現が誘導され、細胞内のコラーゲンが蓄積する傾向が認められたこと、2) では 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、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、3) では 3-MC は骨芽（様）細胞に対して aromatase および CYP1B1 の発現を増加させた（定量的 PCR および ICC）、また、hFOB の IL-1 $\beta$  の発現を増加させる（Cytokine antibody array）ことを見出した。以上により、本検討によって、hFOB に対する BPA 添加による細胞増殖とコラーゲン蓄積の SXR の関与、骨芽細胞における機能的な AhR の発現、および骨芽細胞における AhR のサイトカインシグナルを介した Steroidogenesis への関与が明らかになった。

A. 研究目的

本研究では 1) bisphenol A (BPA) の Steroid Xenobiotic Receptor (SXR) を介した骨芽細胞に対する影響を検討すること、2) 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、および 3) 骨芽細胞における aryl hydrocarbon receptor (AhR) と Steroidogenesis との関連につい

て明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

それぞれの目的に対して、1)では、ヒト骨芽細胞株 hFOB に SXR を安定発現させ、BPA の影響（増殖、遺伝子発現及びコラーゲンの蓄積）を確認した。さらに BPA による hFOB の微細構造の変化を電子顕微鏡にて観察した。

次いで 2)で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。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。

3)では、ヒト骨芽細胞株及び骨芽細胞様細胞に対し、AhR agonist である 3-methylcholanthrene (3-MC) の影響を検討した。すなわち、以下の方法で実験を行った。

### (1) 化合物

3-methylcholanthrene (3-MC、和光純薬工業)、2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid-(2-methyl-4-*o*-tolyl-azophenyl)-amide (AhR antagonist, Calbiochem)。溶媒はいずれに対してもジメチルスルホキシド (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（骨肉種由来株）MG-63（東北大学医用細胞資源センターより分譲）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）。維持培養には通常の牛胎仔血清 (FBS) を、実験にはチャコール処理を行った FBS をそれぞれ使用した。

### (3) 3-MC の骨芽（様）細胞への影響

#### (3)-1 Microarray

前年度実施した hFOB の Microarray のデータのうち、3-MC (0.1 $\mu$ M) を添加 (72 時間後) によって変動した遺伝子群について、再解析を行った。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。

#### (3)-2 Cytokine antibody array

hFOB に対し、3-MC (0.1 $\mu$ M) を添加し、72 時間後に培地を含む細胞破碎液を用いて 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。

### (3)-3 aromatase および CYP1B1 発現解析

hFOB 及 MG-63 に対し、3-MC (0.01–1 $\mu$ 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。

なお、倫理面については、2) についてののみ該当し、以下の通りである。

(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

1) については、SXR を安定発現した hFOB では BPA の細胞増殖作用が強く認められた。また、BPA の添加によって SXR 応答遺伝子群の発現が誘導され、細胞内のコラーゲンが蓄積する傾向が認められた。

次いで 2) については、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。

また 3) では、3-MC は骨芽 (様) 細胞に対して aromatase および CYP1B1 の発現を増加させた (定量的 PCR および ICC)、また、hFOB の IL-1 $\beta$  の発現を増加させた (Cytokine antibody array)。すなわち、以下の結果が得られた。

#### (1) Microarray 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に、以下のサイトカインに関わる遺伝子が含まれた : interleukin 1 family, member 8 (IL1F8)、interleukin 1 family, member 7 (IL1F7)、oncostatin M receptor (OSMR)。さらにコラーゲン

に関わる遺伝子 (COL18A1、COL23A1) の発現増加が認められた。また、エストロゲン合成酵素 aromatase およびエストロゲン代謝酵素 CYP1B1 の発現増加が認められた (2008 年に報告済み)。

## (2) Cytokine antibody array 解析

hFOB に対し、3-MC の添加によって IL-1 $\beta$  の発現が増加し、この増加は AhR antagonist の併用によって阻害された。その他の oncostatin M、IL-6 および IL-8 を含めたサイトカインの発現に変動はなかった。

## (3) aromatase および CYP1B1 発現解析

定量的 PCR での検討では、hFOB に対して 3-MC (0.1, 1 $\mu$ M) の添加によって aromatase 及び CYP1B1 の発現が増加し、この増加は AhR antagonist の併用によって阻害された。また、MG-63 においても同様の結果が得られた。ICC での検討では、hFOB に対して溶媒対照および低 (0.01  $\mu$ M) - 中 (0.1  $\mu$ M) 濃度の 3-MC 添加では aromatase および CYP1B1 の明らかな発現は認められなかった。一方、高濃度 (1 $\mu$ M) 3-MC 添加では aromatase および CYP1B1 のタンパク発現が ICC にて認められた。

## D. 考 察

骨基質はコラーゲンと非コラーゲン性タンパク質で構成され、骨基質の約 90% がコラーゲンで、残りの 10% がオステオカルシン、オステオネクチン、オステオポンチンなどの非コラーゲン性タンパク質である。コラーゲンは骨の石灰化の基質として重要な役割をしている。Tabb ら (2003, *J Biol Chem*) は骨芽細胞様細胞 (MG-63) を用い、SXR を介したビタミン K<sub>2</sub> の作用を報告しており、さらに Ichikawa ら (2006, *J Biol Chem*)

はビタミン K<sub>2</sub> が SXR の activator である RIF と同様に SXR を介してコラーゲン蓄積に重要な遺伝子 (TSKU) を増加させることを報告した。以上のことから、SXR を介した骨芽細胞の活性化が骨組織の維持に重要な働きを担っていると考えられる。BPA が SXR に結合し得ることは既に報告 (Takeshita et al., 2001, *Eur J Endocrinol*) されており、本研究で確認した BPA による細胞増殖刺激は、ビタミン K と同様に SXR を介するものと示唆される。今回の検討では、BPA が hFOB に対して TSKU などの遺伝子発現を誘導することを確認したが、コラーゲンの蓄積及び超微形態においては RIF ほどの効果を認めることができなかった。このことは BPA の SXR に対する結合性が RIF よりも低いことが原因として考えられる。以上の結果、BPA が骨芽細胞の SXR を介した機能を攪乱する可能性が示唆された。

Xenobiotics の代謝に関しては、SXR を介した代謝・排泄機構の他、核内受容体 aryl hydrocarbon receptor (AhR) が関与する経路も古くから注目されている。AhR はラット骨芽細胞様細胞 (ROB、UMR-106)、Preosteoblastic 細胞 (MC3T3-E1) で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*)。一方、近年、BPA が核内受容体 estrogen-related receptor (ERR $\gamma$ ) と強く結合することが報告された (Takayanagi et al., 2006, *Toxicol Lett*) が、ERR $\gamma$  の骨芽細胞を含めた骨組織での発現は現

時点での報告はない。以上のことから、内分泌攪乱化学物質の骨芽細胞に対する影響についてこれら核内受容体を中心に、ヒト骨組織での発現状況を含めて更なる解析を行っていくことが今後の課題である。

骨芽細胞に対する内分泌攪乱化学物質の影響については、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。

骨組織に対する内分泌攪乱化学物質の影響については、我々は AhR の関与について検討し、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 [以上、笹野, 平成 20 年度井上班会議, 2008]。本検討では骨芽細胞での AhR の機能に注目した。

ヒト滑膜細胞を用いた検討では、AhR リガンド (3-MC、benzo[ $\alpha$ ]pyrene および 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) の添加によって IL-1 $\beta$ 、IL-6 および IL-8 の発現が増加することが報告されている [Tamaki A., et al., *Biol Pharm Bull*, 2004; Kobayashi S., et al., *Rheumatology*, 2008]。IL-1 $\beta$ 、IL-6 および IL-8 はいずれも aromatase の発現誘導能を有しており、これらのサイトカインを介したエストロゲン合成の促進が考えられる。また、ヒト肺線維芽細胞において、Cigarette smoke extract が AhR を介して cyclooxygenase-2 (COX-2) および prostaglandin E2 (PGE2) の発現を誘導することが報告された [Martey CA., et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005]。AhR を介した COX-2 の誘導経路は xenobiotic response element 依存的 [Degner SC., et al., *Nutr Cancer*,

2007] な genomic pathway と、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加に依存する [Sciullo EM., et al., *Arch Biochem Biophys.* 2008] non-genomic pathway が報告されている。これら PGE2 および COX-2 も同様に、aromatase 発現を誘導することが報告されており、以上のことから骨芽細胞において AhR は、サイトカインを介してエストロゲンの局所合成に重要な役割を担っていると示唆される。

今回の検討結果からは AhR と aromatase の発現、さらには IL-1 $\beta$  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 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)、3 $\beta$ -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 NY 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 Steroidogenesis に関与していると考えられる。

## E. 結 論

1)に関する検討によって、hFOB に対する BPA 添加による細胞増殖とコラーゲン蓄積に SXR が関与することが明らかとなった。

すなわち、今後、深刻化することが懸念される内分泌攪乱化学物質のヒト健康に対する影響について、我々は内分泌攪乱化学物質の標的としての骨粗組織への影響を、骨芽細胞を中心に検討してきた。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。

また 2)では、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。

最終年度における 3)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、エストロゲンは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。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) © Miki Y, Suzuki T, Nagasaki S, Hata S, Akahira J, **Sasano H**. Comparative effects of raloxifene, tamoxifen and estradiol on human osteoblasts in vitro: estrogen receptor dependent or independent pathways of raloxifene. *J Steroid Biochem Mol Biol*;113:281-289. 2009
- 2) © 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 acid synthesis. *Cancer Res*: 69:1392-1399, 2009
- 3) © Nagasaki S, Suzuki T, Miki Y, Akahira JI, Shibata H, Ishida T, Ohuchi N, **Sasano H**. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human breast carcinoma: Possible regulator of lymphangiogenesis via vascular endothelial growth factor-C expression. *Cancer Sci*. 100:639-645. 2009
- 4) Tamaki K, Moriya T, Sato Y, Ishida T, Maruo Y, Yoshinaga K, Ohuchi N, **Sasano H**. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis. *Cancer Sci*. 100:88-94. 2009
- 5) **Sasano H**, Nagasaki S, Miki Y, Suzuki T. New developments in intracrinology of human breast cancer: estrogen sulfatase and sulfotransferase. *Ann N Y Acad Sci*; 1155:76-79.2009
- 6) Nakamura Y, Hornsby PJ, Casson P, Morimoto R, Satoh F, Xing Y, Kennedy MR, **Sasano H**, Rainey WE. Type 5 17{beta}-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) contributes to testosterone production in adrenal reticularis. *J Clin Endocrinol Metab*; 94:2192-2198.
- 7) Nakamura Y, Suzuki T, Sugawara A, Arai Y, **Sasano H**. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate carcinoma. *Pathol Int*;59:288-293.2009
- 8) Nakamura Y, Suzuki T, Arai Y, **Sasano H**. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11 (Pan1b) expression in human prostate cancer. *Neoplasma*; 56:317-320.2009
- 9) Nakamura Y, Xing Y, **Sasano H**, Rainey WE. The mediator complex subunit 1 enhances transcription of genes needed for adrenal androgen production. *Endocrinology*, 150: 4145-4153, 2009
- 10) © Nagasaki S, Miki Y, Akahira J, Suzuki T, **Sasano H**. Transcriptional regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12 by SREBP-1. *Mol Cell Endocrinol*, 307: 163-168, 2009
- 11) Loo WT, Chow LW, Suzuki T, Ono K, Ishida T, Hirakawa H, Ohuchi N, **Sasano H**. Expression of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human breast carcinoma cells and tissues. *Anticancer Res* 29: 2525-2530, 2009
- 12) © Takeyama D, Miki Y, Fujishima F, Suzuki T, Akahira JI, Hata S, Miyata G, Satomi S, **Sasano H**. Steroid and xenobiotic receptor in human esophageal squamous cell carcinoma: A potent prognostic factor. *Cancer Sci*. 2009 in press.

## 2. 学会発表

- 1) ©ヒト骨芽細胞における内分泌攪乱物質の影響：Steroid and xenobiotic receptor を介した bisphenol A の作用；三木康宏, 端 秀子, 笹野公伸, 第 30 回東北骨代謝研究会, 仙台市, 2009 年
- 2) © Sex steroid receptors expression and hormone-induced cell proliferation in human osteosarcoma ; O. DOHI, M. HATORI, T. SUZUKI, K. ONO, M. HOSAKA, J. AKAHIRA, Y. MIKI, S. NAGASAKI, E. ITOI, **H.**

**SASANO.** *55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*, Las Vegas, 2009)

- 3) ◎ヒト骨組織における aryl hydrocarbon receptor の発現; 三木康宏, 端 秀子, 長崎修治, 鈴木 貴, 笹野公伸, 第36回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡市, 2009年)
- 4) 卵巣癌における steroid and xenobiotic receptor の発現と臨床病理学的因子との関連についての検討; 楽 暁ジ, 赤平純一, 三木康宏, 宇都宮裕貴, 伊藤 潔, 笹野公伸, 八重樫伸生, 第82回日本内分泌学会学術総会, 前橋市, 2008年
- 5) 10%ホルマリン固定パラフィン包埋標本から抽出した Total RNA および microRNA の質的検討; 三浦伊久美, 三木康宏, 赤平純一, 鈴木 貴, 笹野公伸, 第98回日本病理学会総会, 京都市, 2009年
- 6) 卵巣癌における steroid and xenobiotic receptor の発現と臨床病理学的因子との関連についての検討; 楽 暁妮, 赤平純一, 三木康宏, 宇都宮裕貴, 伊藤 潔, 笹野公伸, 八重樫伸生, 第98回日本病理学会総会, 京都市, 2009年



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（平成 19-21 年度）

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、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。BPA 投与群では、脂肪組織重量、肝臓 TG 量が増加しており、肝臓においては、TG 合成にかかわる核内受容体 PPAR $\gamma$  やその標的遺伝子 CD36、マクロファージの浸潤や炎症マーカーである TNF $\alpha$ 、CD68 などの mRNA の発現が増加していた。

また、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。BPA 摂取により脂肪組織へのマクロファージの浸潤が起り、脂肪組織より脂肪酸が血中に放出され、肝臓に取り込まれて非アルコール性脂肪肝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ことにした。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、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 $\mu$ 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 を用いることにより各組織における mRNA 発現量を調べるとともに、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。

(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。

次に、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。

すなわち、精巣周囲脂肪重量はコントロール群に比べ変化がみられなかったが、mRNA について調べたところ、アディポ

ネクチン、MCP-1 の発現量に変化は見られなかったが、マクロファージの脂肪組織への浸潤を示す CD68 の mRNA の発現が BPA0.05 $\mu$ g/ml 投与群で 10 週後より増加していた。BPA0.005 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml 投与群では 30 週後に増加していた。

血清パラメータについて調べた結果、インシュリン、アディポネクチン、レプチン、MCP-1、TG、コレステロール濃度にはコントロールと比べ BPA 投与群に変化は見られなかったが、遊離脂肪酸のうどは BPA 投与群でコントロールに比べ増加していた。

#### 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。本研究ではまず、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。次いで、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認められる。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。そこでひきつづいて、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 $\gamma$ 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。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

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た。

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。

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。

血清パラメータについて調べた結果、インシュリン、アディポネクチン、レプ

チン、MCP-1、TG、コレステロール濃度にはコントロールと比べ BPA 投与群に変化は見られなかったが、遊離脂肪酸のうどは BPA 投与群でコントロールに比べ増加していた。

マウスに 10、20、30 週間 BPA を投与した結果、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 $\mu$ 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、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。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

なし