

研究課題名=内分泌かく乱化学物質の人の健康への影響のメカニズム等に関する調査研究

主任研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部部長

研究要旨

内分泌かく乱化学物質問題を包括的に把握するために、本研究は、高次生命系としての神経・内分泌・免疫それぞれのネットワークに対する諸影響を横軸に置き、発生・生殖と時間との両軸から検討した。また、以上の各要素相互の連携を司るシグナル伝達系を解析する必要性から、①核内レセプターとその共役転写因子、②エストロゲン受容体とセカンドメッセンジャーの相互作用、③ステロイド代謝活性機構をも併せて検討した。これらの研究過程で集積される科学情報および研究結果の統合（データベース化）と成果の出版をすすめている。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属における職名

垣塚 彰 大阪バイオサイエンス研究所 部長
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 室長
広川勝昱 東京医科歯科大学医学部 教授
井口泰泉 横浜市立大学理学部 教授
鈴木勝士 日本獣医畜産大学 教授
西原 力 大阪大学大学院・薬学系研究科 教授
藤本成明 広島大学原爆放射能医学研究所 助教授
笹野公伸 東北大学大学院・医学系研究科 教授

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の標的には、いわゆる内分泌臓器（下垂体、甲状腺、副腎、卵巣、精巣など）およびそれらホルモンの支配下にある諸臓器（乳腺、子宮、前立腺など）があげられ、問題の中心を占めている。あわせて、高次系生命維持機構としての神経・内分泌・免疫ネットワーク機構は、ホルモンを含む共通のシグナル分子種を用いて相互に情報交換を行って、生体のホメオスタシスの維持に役割を果している。このため、内分泌かく乱化学物質がいわゆる内分泌臓器のみならず、神経系や免疫系を標的として、ホメオスタシスに影響を及ぼす可能性、ひいては、全身の諸臓器を標的とし得る可能性を考慮しなければなら

ない。また、内分泌かく乱化学物質をめぐる window 問題（胎生期、発達期における高感受期）など、成熟した個体での作用と大きく異なる可能性が指摘されており、この問題に関しては極めて基礎的な発生生殖機構研究が重要であることが示唆されている。加えて、内分泌かく乱化学物質の作用は、核内レセプターを介しており、転写の共役因子等する多種多様なシグナル伝達共役分子との相互作用によって大きく修飾されることが知られている。

本研究では、内分泌かく乱化学物質に関する研究を他の試験研究分野で行われている分析や研究とは異なり、高次生命系の発生・維持機構とそれに関わる組織特異的機能制御における核内レセプター分子の発現と機能修飾の分子メカニズムを多角的かつ系統的に解明することを目的している。そのため、1) 神経、2) 免疫、3) 発生・生殖、4) 核内レセプター、5) ステロイド代謝活性機構各分野について 8 つの研究テーマと内分泌かく乱化学物質に関する文献収集・評価課題を実施した。

高次生命系を標的として捉えた場合の内分泌かく乱化学物質のヒトの健康への影響のメカニズムの解明は、内分泌かく乱化学物質問題に対応する知的基盤構築に貢献するものと期待される。

B. 研究方法

研究方法は以下の通りである。

1) 高次系ネットワーク：神経 ポリグルタミン神経毒性のリスクファクターとしての内分泌かく乱物質の解析（垣塚）

ポリグルタミンの発現に伴って、同調的に発現するテトラサイクリン等の薬剤によるコントロールシステムを導入した神経細胞株の樹立を試みた。そして、ポリグルタミンの発現によって引き起こされる神経細胞の形態・細胞死の生化学的な解析を行った。

神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響（菅野）

胎生10日目の雌マウスの胚の頭部を採取し、トリプシン処理後に壁接着性の弱い成分を繰り返し選択継代し、初代神経幹細胞培養系の樹立を試みた。また、エストロジェンレセプターaの各エクソンを個別に認識するPCRプライマーを設計し、PCRの条件検討を行った。先手、ヒトエストロジェンレセプターaに対するPCRプライマーを作成し、ヒト乳癌細胞MCF-7細胞から抽出したtRNAを用いて、RT-PCRの条件検討を行った。次に、これをもとに、マウスエストロジェンレセプターaに対するPCRプライマーを作成し、マウスの子宮のtRNAを材料として、マウスエストロジェンレセプターaを検出するRT-PCRの条件検討を行い、ポリグルタミン発現系をモデル化する可能性についての検討をすすめた。

2) 高次系ネットワーク：免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (広川)

Diethylstilbsterol (DES) 用いて、低用量 (3 mg/kg) と高用量 (15 mg/kg) を雄マウスの腹腔内に投与し、胸腺、脾臓の重量およびT細胞、B細胞の数の変化を検討した。

3) 高次系ネットワーク：生殖

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (井口)

妊娠 10 日目から 9 日間、2 μ g のジエチルスチルベストロール(DES)および 3 mg のビスフェノール-A (BA) を母親マウスにそれぞれ投与し、妊娠 19 日目の胎仔生殖器官を組織学的に検討することにより、出生直後の DES 処理による、膈上皮での不可逆的増殖について解析した。また、細胞増殖制御異常と細胞死(アポトーシス)の異常についても観察した

初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用に関する研究 (鈴木)

硫酸エストロン 0.01ng/ μ l/g を鶏受精卵に、気室内と卵黄内経路で投与し、48 時間孵卵して鶏胚の発生状況につき対照と比較検討して、試験法としての確立を試みた。

4) 核内レセプター

内分泌かく乱物質のホルモンレセプターを介する作用発現機構に関する研

究 (西原)

酵母Two-hybrid法を用い、コアクチベーターのうちCBP、P300、SRC1、RIP140、TIF1、TIF2についてER alphaとのエストロゲン依存的な相互作用を調べ、次に、エストロゲン様活性を持つことが知られている既知の化学物質について検討した。ER betaについても同様のシステムを構築し、一部の化学物質についてはER alphaとER betaの差異について検討した。

ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討 (藤本)

ヒト乳癌細胞、ヒト前立腺癌細胞等に、レポーター遺伝子、受容体コ・ファクター発現遺伝子のトランスフェクションを行い細胞株を確立した。そして、ER alpha 発現ベクターとレポーター遺伝子を共導入した培養細胞で、ERE 部位と AP-1 部位を介するエストロゲン応答を比較検討した。

5) ステロイド代謝活性機構

ヒト組織における性ステロイド代謝酵素と受容体の検索に関する研究 (笹野)

17 β -HSD2がヒト臍帯静脈におけるE2の濃度が母体血中との解離に関係していると考え、種々の妊娠週数の胎盤を用いて17 β -HSD 1 及び2の発現を検討した。

6) 内分泌かく乱化学物質に関する文

献収集評価に関する研究（総括班）

研究成果のデータベース化と、社会への還元を本班会議で得られた成果をモノグラフとして出版する事により具体化する。平成10～12年度は、各班員からの結果の集積とコンピュータによるデータベース化を行い、最終報告を待って、科学研究モノグラフの刊行を行なう。

C. 研究結果

1) 神経

ポリグルタミン神経毒性のリスクファクターとしての内分泌かく乱物質の解析（垣塚）

培養神経細胞 PC12 を用い、ポリグルタミンをコードする CAG リピートをテトラサイクリンで発現誘導可能な培養細胞株を樹立する事に成功した。ポリグルタミンは、発現誘導後核内凝集体形成し、それに一致して SEK1 というキナーゼが活性化されることが見出された。今後、内分泌かく乱化合物の神経毒性の作用点として、このキナーゼカスケードの重要性が考えられた。

神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響（菅野）

得られた細胞は神経幹細胞集団いわゆるニューロン・ボールと呼ばれるもので、プラスチックシャーレで培養7日目には、ニューロン様に分化したものや、グリア細胞様に分化した細胞がみられた。また、ヒトエストロジェンレセプタ

ー a とマウスエストロジェンレセプター a の各エクソンを検出する RT-PCR 法を確立した。この系を用いて、マウス子宮には、エストロジェンレセプターのスプライシングバリエーションが存在することを明らかにした。

2) 免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究（広川）

若齢の雄と雌マウスを用い、低用量と高用量を5日間連続投与し、最終投与の2日後に屠殺し検索に用いた。この場合には胸腺の明瞭な萎縮とその逆に脾臓の肥大を認め、どちらもその程度は雌の方に顕著であった。脾臓で見るとT細胞、B細胞共に減少し、抗SRBC抗体産生能の低下が認められた。しかし、NK細胞には明瞭な数の変化はなく、活性で見ると雄では寧ろ亢進する傾向が見られた。

3) 発生・生殖

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究（井口）

ビスフェノール-A (BA) を母親マウスにそれぞれ投与し、妊娠19日目の胎仔生殖器官を組織学的に解析したところ、雌マウスでは子宮、膣の上皮の丈の高さがDES、BA投与群ともに有意に増加し、細胞分裂率はBA投与群のみ有意に増加していた。雄マウスではDES投与により潜伏精巣が発生し、精巣も小さく単位面

積当たりの精細管の数も有意に減少していることを見いだした。また、細胞増殖制御異常と細胞死（アポトーシス）の異常について観察したところ、出産直後のDES処理マウスの膣では、卵巣の有無に関わらずDNAの断片化が同程度に認められ、卵巣摘出による上皮細胞死は見られなかった。

初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用に関する研究（鈴木）

硫酸エストロンを卵黄内に投与することにより約20%の胚で胚盤葉下層の消失、胚の管様構造への変形、重複胚奇形、神経管形成の異常が生じた。気室内投与でも胚発生の遅延（体節数低下）などの軽度の影響があることを見いだした。

4) 核内レセプター

内分泌かく乱物質のホルモンレセプターを介する作用発現機構に関する研究（西原）

ER α の β -estradiol 依存的な相互作用はTIF2が一番強く、次にSRC1、RIP140、TIF1の順であり、CBP、P300はほとんど相互作用しなかった。また、 β -estradiolの濃度を変化させてその応答を調べたところ、TIF2、SRC1、RIP140、TIF1について 10^{-9} Mから β -galactosidase活性の上昇が認められ、 10^{-7} Mで飽和し、それ以上濃度を上げても活性は変わらなかった。

既知のエストロゲン様化合物によるアッセイ系の検証：酵母細胞内でのエストロゲンレセプターとコアクチベーターの相互作用の実験では、ER α の β -estradiol 依存的な相互作用はTIF2が一番強く、次にSRC1、RIP140、TIF1の順であり、CBP、P300はほとんど相互作用しなかった。また、 β -estradiolの濃度を変化させてその応答を調べたところ、TIF2、SRC1、RIP140、TIF1について 10^{-9} Mから β -galactosidase活性の上昇が認められ、 10^{-7} Mで飽和し、それ以上濃度を上げても活性は変わらなかった。

既知のエストロゲン様化合物によるアッセイ系の検証実験では、diethylstilbestrolとestroneは β -estradiolと同等の活性を示し、ついでestriol、genistein、p-nonylphenol、DHT、bisphenol Aの順でエストロゲン様活性を示した。また、他のステロイドのtestosteroneや β -sitosterolには 10^{-3} Mまで全く応答性を示さなかった。

これらの結果は、他の方法で調べたエストロゲン様活性の強さとよく相関していた。また、コアクチベーター間での化学物質による応答性に大差は認められなかった。

ER α とER β の差異の検討では、ER α とER β のリガンド結合領域GAL4DBDに繋ぎ、コアクチベーターのTIF2との相互作用を調べる系を作製した。ER α とER β のいずれを用いた時にも、 β -estradiolへの

応答性は 10^{-9} Mからみられ、ER α とER β で本来のリガンドである β -estradiolへの結合親和性は同程度であると考えられた。それに対し、植物エストロゲンであるgenisteinで処理した時には、ER α への応答性は 10^{-7} Mからしかみられなかったのに比べ、ER β では 10^{-9} Mから応答性が見られた。同様のことが防腐剤として知られているパラベン類においても観察された。これらのことから、ER α とER β で化学物質の構造によって結合特性が違うことが推察された。

ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討 (藤本)

エストロゲン(E2)に応答性の増殖をするラット下垂体腫瘍株 MtT/E-2 が樹立した。この株のエストロゲン応答性の増殖について解析したところ、(1)下垂体腫瘍遺伝子 PTTG の mRNA 発現は、ラットの正常下垂体では検出されず、MtT/E-2 細胞においてのみ発現していた。(2) E2 投与後、c-myc、cyclin D の上昇がみられたが、そのとき PTTG 発現の増加は観察されず、E2 の反応性との関わりは低いと考えられた。この細胞は下垂体組織と同様に α 型のエストロゲン受容体(ER)を発現していた。(3) 上記により得られて細胞株は E2 様の内分泌かく乱物質に対してもよい増殖活性を示し、それ自体よいアッセイ系になると考えられた。

エストロゲン受容体を持ち生理的な

応答をしている細胞モデルとして、ヒト乳ガン細胞 MCF-7、上記 MtT/E-2 および前立腺細胞 PC-3 をとり、ERE-luc および AP-1-luc レポーターをトランスフェクトしてその ERE および AP-1 を介した応答の解析を試みた。さらに、ER α 発現ベクターを co-トランスフェクトした NIH/3T3 での解析を行った。(1) エストロゲン受容体の発現は、PC-3 で β 型が主で他は α 型がドミナントであった。(2) MtT/E-2、MCF-7 では、ERE を介した転写活性化は確認できたが、いずれの株でも

AP-1 を介した応答は観察できなかった。

(3) NIH/3T3+ER の系では、E2 により ERE 応答および AP-1 応答が見られた。ER の AP-1 アゴニストであるタモキシフェンやナフォキシジンでは、AP-1 応答のみが観察された。E2 作用を持つ内分泌かく乱物質について検討した結果、ERE、AP-1 応答に有意な差はなかった。

5) ステロイド代謝活性機構

ヒト組織における性ステロイド代謝酵素と受容体の検索に関する研究 (笹野)

17 β -HSD1は妊娠期間を通して全ての胎盤組織のhCG陽性のsyncytiotrophoblastsにおいてのみ認められた。これに対して17 β -HSD2は妊娠11週までの胎盤組織においてはまったく発現していなかった。妊娠12週から17 β -HSD2は絨毛の中のCD34、UEA-I陽性の血管内皮細胞で発現が認め

られはじめ、妊娠の経過と共にこの17β-HSD2陽性の血管内皮細胞の面積は増大する傾向にあった。又絨毛の中の一部の間質細胞 (interstitial or stromal cells) ではこの17β-HSD2の発現が認められた。一方臍帯の臍帯静脈では内皮細胞で17β-HSD2の発現が認められたが、臍帯動脈では発現は見られなかった。一方CD34は妊娠4週の絨毛かた認められはじめた。17β-HSD1及び2の2重染色では17β-HSD1がsyncytiotrophoblastsに17β-HSD2が絨毛内の血管内皮細胞に認められ、絨毛内で異なる細胞でこれらのエストロゲン代謝酵素が発現しているのが確認された。

3) 文献収集・評価

内分泌かく乱化学物質に関する文献収集評価に関する研究 (総括班)

本班研究によりもたらされた研究成果の集積を開始した。また、国際的データベースである、GEDRI (THE GLOBAL ENDOCRINE DISRUPTOR RESEARCH INVENTORY) への対応を含めたデータベース化を開始した。これと並行して、文献集積を開始した。

D. 考察

内分泌かく乱化学物質の人の健康への影響のメカニズムを解明するため

1) 神経、2) 免疫、3) 発生・生殖、4) 核内レセプター、5) ステロイド代謝活性機構各分野について 8 つの研究

テーマについて検討し新たな知見をいくつか得た。

今後、さらに基礎的研究として、詳しく検討し、また、内分泌かく乱化学物質に関する文献収集・評価を実施することで、最終的には総合領域すなわち高次生命系の発生・維持機構とそれに関わる組織特異的機能制御における核内レセプター分子の発現と機能修飾の分子メカニズムを系統的な解明を目指したい。

E. 結論

本研究班では、内分泌かく乱化学物質問題を包括的に時間軸を考慮に入れつつ、高次生命系としての神経・内分泌・免疫ネットワークに対する影響を解析する立場から、神経、免疫、および発生・生殖について検討した。また、そのネットワークのシグナル伝達系に対する影響を解析する立場から、核内レセプターとその共役転写因子およびエストロジェン受容体とセカンドメッセンジャーとの相互作用、ステロイド代謝活性機構を検討した。加えて、これらの研究過程で集積される科学情報および研究結果の統合 (データベース化) と出版の準備に着手した。

本研究班では、内分泌かく乱化学物質のヒトの健康への影響のメカニズムを個体発生から成体での内分泌機能への影響に至るまでの広い範囲を視野に入れ、生命科学の立場から探求している。こうした視点に立った本年度の当班に

おける研究の成果は、内分泌かく乱化学物質問題に関する 9 省庁連絡会のカバーする研究企画の中でも他にみられない特異な位置を占めており、この問題での近い将来における国際的な Scientific Assessment の際にも高い貢献をなすものと期待される。また、その学際的性格は本研究の有効性を更に際立たせるものと結論される。

1. 論文発表

Kawasaki Y, Umemura T, Saito M, Momma J, Matsushima Y, Sekiguchi H, Matsumoto M, Sakemi K, Isama K, Inoue T, Kurokawa Y, Tsuda M: Toxicity study of a rubber antioxidant, 2-mercaptobenzimidazole, by repeated oral administration to rats. *Toxicol Sci*, 1998, Feb;23(1):53-68

Hirabayashi Y, Matsumura T, Matsuda M, Kuramoto K, Motoyoshi K, Yoshida K, Sasaki H, Inoue T: Cell kinetics of hemopoietic colony-forming units in spleen (CFU-S) in young and old mice. *Mech Ageing Dev*, 1998, Apr 1;101(3):221-231

Sai K, Kai S, Umemura T, Tanimura A, Hasegawa R, Inoue T, Kurokawa Y: Protective effects of green tea on hepatotoxicity, oxidative DNA damage and cell proliferation in the rat

liver induced by repeated oral administration of 2-nitropropane, *Food Chem Toxicol*, 1998, Dec;36(12):1043-1051

Sai K, Upham BL, Kang KS, Hasegawa R, Inoue T, Trosko JE: Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro. *Cancer Lett*, 1998, Aug 14;130(1-2):9-17

Mitsumori K, Imazawa T, Onodera H, Takahashi M, Kitajima S, Inoue T, Kurokawa Y: Ultrastructural changes in motor endplates of the lumbrical muscles of rats induced by a microsomal Ca²⁺ ATPase inhibitor, 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone. *Arch Toxicol*, 1998, 72(2):115-118

Trosko JE, and Inoue T: Oxidative stress, signal transduction, and intercellular communication in radiation carcinogenesis, *Stem Cells*, 1997, 15 (suppl2), 59-67.

Sasaki H, Matsuda M, Lu Y, Ikuta K, Matuyama S, Hirabayashi Y, Mitsui H, Matsumura T, Muramatsu M,

Tsukada T, Aizawa S, and Inoue T. :
A fraction unresponsive to growth
inhibition by TGF- β among the
high-proliferative potential
progenitor cells in bone marrow of
p53-deficient mice. *Leukemia*, 1997,
11, 239-244.

Nishimura Y, Hirabayashi Y,
Matuszaki Y, Musette P, Ishii A,
Nakauchi H, Inoue T., and Yonehara
S.: In vivo analysis of Fas
antigen-mediated apoptosis:
Effects of agonistic anti-mouse
Fas monoclonal antibody on thymus,
spleen, and liver. *Int Immunol* ,
1997, 19, 307-316.

Yoshida K, Inoue T., Nojima K,
Hirabayashi Y, and Sado T. : Calorie
restriction reduces the incidence of
myeloid leukemia induced by a single
whole-body radiation in C3H/He mice.
Proc Natl Acad Sci USA , 1997, 94,
2615-2619.

Inoue T., Cronkite EP, Hirabayashi Y,
Bullis JE, Mitsui H, Umemura T. :
Lifetime treatment of mice with
azidothymidine (AZT) produces
myelodysplasia. *Leukemia*, 1997, 11
(Suppl 3), 123-127.

Inoue T., Hirabayashi Y, Matsuda M,
Furuta Y, Aizawa S, Sasaki H. :
Model of MDS-like myelodysplasia
that transforms into single
lineage-hemopoietic malignancies
upon transplantation-implication
for pediatric myelodysplastic
syndrome-. *Intnt'l J Ped
Hematl/Oncol.*, 1997, 4:221-230.

Hanzawa C, Kobayashi K,
Hirabayashi Y, Inoue T., Aizawa S,
Adachi K: Hair follicle dermal
papilla cell lines from p53-
knockout mice. *J Dermatol Sci*, 1997,
15, 59-63.

Hirabayashi Y, Matsuda M, Matumura
T, Mitsui H, Sasaki H, Tukada T,
Aizawa S, Yoshida K and Inoue T.: The
p53-deficient hemopoietic stem
cells: their resistance to
radiation- apoptosis, but lasted
transiently. *Leukemia*, 1997, 11
Suppl 3, 489-492.

2. 学会発表

Atsushi Ono, Masaya Yamamoto,
AtsuyTakagi, Jun Kanno, and Tohru
Inoue. Molecular mechanism of
endocrine disrupting chemicals

(EDCs) (Celebrating the 10th
Anniversary of the AACR Special
Conferences in Cancer Research) H11