

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

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エストロジェ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。加えて、近年、進歩の著しいcDNA マイクロアレイ技術の内分泌かく乱化学物質研究への導入を試みた。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 東京医科歯科大学大学院・医学系研究科 教授
松島綱治 東京大学大学院・医学系研究科 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
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
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

本研究の目的は、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探索し、以って毒性評価にかかわる知的

基盤を整備するために、同物質に関連する核内受容体・細胞間シグナル分子ネットワークを解明することにある。

内分泌かく乱化学物質の生物影響とし

て最も危惧されているのが、その生殖への影響である。しかし、その生殖に関わる受容体、シグナル伝達物質、制御メカニズムは、いずれも複雑な系を形成しており、全てが解明されているわけではない。緊急性を帯びる内分泌かく乱化学物質のリスク評価においては、現状で速やかに測定可能な標的臓器におけるホルモン受容体への結合、転写活性、増殖活性等の試験からのデータが利用される。しかし、内分泌かく乱化学物質が受容体、シグナル伝達系を介して生体に影響するという特徴を考慮すると、多種多様なシグナル伝達分子種と当該化学物質の相互作用に注目したメカニズム解析によって得られるデータが無ければ、生殖への影響の精密な評価は困難である。本研究におけるシグナル伝達分子種を共有する免疫系、神経系、内分泌系、及び生殖発生系での核受容体、細胞内シグナル伝達ネットワークに関する研究からなる分子生物学に基礎をおいた総合的なアプローチは以上の基盤を形成するものとなる。加えて、近年、進歩の著しい cDNA マイクロアレイは、大量の発現遺伝子の解析を迅速に進める手だてを現実のものとし、総合的な遺伝子発現カスケードを解析するツールとなることが期待される。そこで、本年度より内分泌かく乱化学物質 (EDCs) に応答する遺伝子を機能別に整理し、いわば EDC-トキシコゲノミクスデータベースを構築する課題を設定することとした。

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)

神経系に発現する新規の核内受容体のコファクターを同定し、核内受容体と新規コファクターの相互作用における内分泌攪乱物質の作用を解析した。

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)

1. 初代神経幹細胞培養系を用いた内分泌かく乱化学物質の影響の検討

マウス初代神経幹細胞培養系を確立するため、準備段階として、脳の実験の分野において技術的に進んでいるラットを用いた培養法の検討を行った。Wistar 系妊娠 (13, 15, 17 日目) ラットの胎児の脳新皮質の初代培養を行い、分化マーカーによる免疫染色及び RT-PCR 法によるエストロゲンレセプター α および β の発現を検討した。

2. RT-PCR 法を用いたエストロゲンレセプター検出系の確立

マウスエストロゲンレセプターのスプラッシングバリエーションの構成を検討するため、エクソン全長の PCR 法として、マウスのエストロゲンレセプター α について、エクソン 1 末端とエクソン 8 最上流部のプライマーを用いた PCR を行

い、その泳動産物を膜にトランスファーし、エクソン 2 からエクソン 7 を含むプローブを用いて、サザンプロテイングを行った。

また、将来の個々エクソン解析のためのツールとして、欠損が予想されるエクソン 2 から 7 について、個別に del 2、del 3、del 4、del 5、del 6、del 7 の PCR プライマーセットを作製し、シーケンシングと組み合わせ、スプライシングバリエーションの存在を検討した。

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)

C57BL/6 マウス (♂/♀) 3 ヶ月齢、18 ヶ月齢に Diethylstilbesterol (DES) を 1. 急性投与実験；高用量(15mg/ Kg)、低用量(3mg/ Kg)を腹腔内投与で 1 回 x 5 日、2. 慢性投与実験；比較的低用量を二用量(0.44 μg/ Kg、4 μg/ Kg)添加粉末飼料として 3 ヶ月間給餌、で投与した。これらについて、A) 体重と臓器重量 (胸腺、脾臓、肝、腎、精巣、卵巣、副腎)、B) フローサイトメトリー 胸腺 (CD4/ CD8)、脾臓 (Thy-1/ B220, CD4/ CD8, ナイフ/ メリ、NK/ CD3)、C) リンパ球の増殖能 T 細胞増殖能 (anti-CD3MoAb, Con A)、B 細胞増殖能 (LPS)、D) 抗 S R B C 抗体産生能 (PFC 法)、E) NK 細胞活性 を検討した。

内分泌かく乱化学物質による抗原提示細胞分化、機能への影響の解析 (松島)

C57/B6 マウスの骨髄から密度勾配法で単核球を分け、セルソーターにより Lin 陰性 c-kit 陽性骨髄前駆細胞を分離、GM-CSF、stem cell factor (SCF) 及び TNF-α 存在下で 14 日まで培養し、CD11b、CD11c、Ia などの細胞表面マーカーの発現を解析した。また、ヒト末梢血単核細胞から密度勾配法により単核球のみを分離し、MACS (Miltenyi Biotec, Beergisch, Germany) を用いて CD14 陽性細胞をプラスチックプレートへ撒き、付着能を以って単球とみなし、樹状細胞分化への前駆細胞とした。GM-CSF、IL-4、及び TNF-α 刺激により分化した樹状細胞の mRNA を抽出し、SAGE 法を用いて同細胞に発現する遺伝子群を探索した。

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)

マウスの胎児期あるいは出生直後に ジエチルスチルベストール (DES)、ビスフェノール A(BPA)を投与し、卵巣を摘出し、臍を組織学的に検討した。また、妊娠 17 日目のマウスの皮下に BPA を投与し、30 分、1、2、3、6、12、24 時間後に、母胎の血中、肝臓、脳、胎盤、および、胎仔の血中、肝臓、脳、子宮、精巣中の BPA を測定した。

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)

500pg または 5ng/embryo の E1 を鶏受精卵に投与し、48 時間孵卵して鶏胚の発生状況につき対照と比較、胚盤葉下層の消失、胚の管様構造への変形、重複胚奇形、神経管形成の異常などの有無および胚発生の遅延 (体節数低下) を指標とした形態学的な検討を行った。また、孵卵直前 (ステージ 10)、孵卵後 24 および 48 時間の無処置胚から総 mRNA を抽出し、RT-PCR 法により ERmRNA の発現を検討した。

4) 核内レセプター

性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明 (加藤)

レセプター種 [ER、アンドロゲンレセプター (AR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR)、ビタミンDレセプター (VDR)] 固有の共役因子の検索・同定を、酵母 two-hybrid 法を用いた cDNA スクリーニング、及び生化学的手法を用いて行った。

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)

NIH/3T3 細胞に PG5-hER α または β と、(AP-1)₆-luc または (ERE)₃-luc をコトランスフェクションして、その E2、タモキシフェン、ICI に対する応答を比較した。また、この系で、BPA、MC、HCH、DDD、DBA、ゲニスタインによる AP-1 応答と ERE 応答を ER α を介する場合と

ER β を介する場合で比較検討した。

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)

ヒト胎児組織の各臓器を用いておける 17 β -HSD1 と 17 β -HSD2 の 17 β -HSD1 及び 2 の酵素活性や発現を検討した。

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 (菅野)

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。

7) 内分泌かく乱研究整備

神経に対する内分泌かく乱化学物質研究-cDNA マイクロアレイによる発現遺伝子解析 (井上、他)

cDNA マイクロアレイ技術導入と運用のための予備的な検討を行った。また、高次生命系解析の中心となる神経に焦点を当て、外来性ホルモン様作用物質 DES の影響について、内因性ホルモン様作用物質 estradiol の作用と比較しつつ基本的に window 効果に照準を定めた実験系へのこのシステムの活用を試みた。

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)

神経機能におよぼす内分泌ホルモンが作用する場合に関与すると考えられる核内受容体の新規コアクティベーターを同定した。このコアクティベーターは、これまでに褐色脂肪に特異的な PPAR γ のコアクティベーターとして同定された PGC1 と最もホモロジーが高いため PGC2 と銘々した。PGC2 は、卵巣・子宮・精巣さらには神経にも発現が確認でき、エストロゲン受容体(ER)とリガンド依存性の結合を示した。また、高濃度のゲニスタインによって ER と PGC2 の相互作用が誘導されたが、ビスフェノール、ノニルフェノールにそのような活性は認められなかった。

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)

1. 初代神経幹細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響の検討

胎生 13, 15, 17 日目のそれぞれの大脳新皮質の初代培養を行い、神経幹細胞のマーカーである nestin とニューロンのマーカーである MAP-2、グリア細胞のマーカーである GFAP の抗体を用い免疫染色を行った。各ステージにおける陽性細胞のポピュレーションは、培養初日では、MAP-2 陽性細胞は胎生 13 日では 26%、15 日では 31%、17 日では 48% と増加が見られ、この時期のニューロンへの分化が盛んに起きていることが観察さ

れた。また、RT-PCR 法によると胎生 15 日及び 17 日目の大脳皮質初代培養細胞にはエストロゲンレセプター α および β の発現が検出された。現在この実験系での、内分泌かく乱化学物質添加の影響を検討している。

2. RT-PCR 法を用いたエストロゲンレセプター検出系の確立

生後 40 日齢の雌マウス大脳、海馬、視床下部、小脳について、エクソン 1 からエクソン 8 のプライマーで RT-PCR 反応を行い、得られた産物に対するエクソン 2 からエクソン 7 のプローブによるサザンブロット法で解析した結果、ワイルドタイプの全長バンド以外に、スプライシングバリエーションと思われる複数のバンドを検出した。さらに、胎生期に DES を暴露した胎児脳を用いて、このアレイ系が薬物に対しての評価系となるかを検討しつつある。

個別のエクソン欠損スプライシングバリエーション PCR プライマーにより得られた産物は、予想されるマウスエストロゲンレセプター α (del 2, del 3, del 4, del 5) 及びマウスエストロゲンレセプター β (del 3, del 4, del 5, del 6, del 7) であることをシーケンシングにより確認した。この系を用いて、C57BL/6 雌マウスの生後 40 日齢の大脳、海馬、視床下部、小脳及び胎生 17 日の雌胎児の大脳、中脳、小脳におけるエストロゲンレセプターのスプライシングバリエーションの発現を検討したところ、各部位において、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結果を得た。

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)

腹腔内に5日間投与する急性実験では胸腺萎縮、脾臓T細胞の減少とその増殖能の低下という免疫系の抑制が認められ、その影響は雄より雌の方がやや顕著であった。腹腔内投与量より $10^2 \sim 10^3$ のオーダー少ない量を餌に混じて3ヶ月間与えた慢性実験でも、胸腺の萎縮は明瞭に認められたが、免疫機能の低下については検出できなかったが、老齢ではむしろ軽度ながら機能亢進が認められた。

ごく少量のDESを長期間与える慢性投与実験でも、胸腺を中心とした免疫系に影響を及ぼすことが分かった。しかし、その影響を老齢マウスで見ると、必ずしも抑制効果ばかりではなく、免疫系の一部の細胞集団や機能は逆に亢進することが分かった。

内分泌かく乱化学物質による抗原提示細胞分化、機能への影響の解析 (松島)

マウス骨髄前駆細胞は、樹状細胞へ分化過程で、分化誘導刺激後6日目に $CD11b^{-/dull}CD11c^{+}$ 及び $CD11b^{+/high}CD11c^{+}$ の異なる表現系を示す未熟樹状細胞群へ分かれ、14日目には成熟樹状細胞へと分化した。このとき分化に伴いCCR7の発現が増強した。TGF- β 添加では、造血前駆

細胞から先程の $CD11b^{-/dull}CD11c^{+}$ 及び $CD11b^{+/high}CD11c^{+}$ の未熟樹状細胞への分化が抑制され、培養後10日目にマクロファージ様の細胞に分化した。また、ヒト末梢血単球の樹状細胞への分化時における遺伝子発現の変化をSerial Analysis of Gene Expression(SAGE)法により系統的に解析したところ、樹状細胞への分化によりgelsolin、TARC、lysosomal acid lipase等のmRNAの転写促進され、MRP-14、MRP-8、Ficolin-1等のmRNA転写抑制されることを見いだした。

尚、当研究については、内分泌かく乱化学物質との相互作用についての研究としての展望が見られないので、上段の成果を持って、研究は終了することとした。

1. 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)

胎仔期での投与ではDES投与のみでエストロゲン非依存の膣上皮の多層化が誘起されたが、出生直後の投与では大量のDES、BPAともにエストロゲン非依存の膣上皮の増殖と、多卵性卵胞が誘起された。さらに、妊娠期に投与したBPAは30分で胎児の血中、脳、肝臓、子宮、精巣に移行した。

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)

投与法を改善し、卵殻切開後、直視下で孵卵時(ステージ10)の鶏胚に投与し

より正確に投与部位を特定できる方法に変えた。異常発生が再現されたので、硫酸エストロンの多段階投与により用量反応相関を確認した。孵卵 0、1、2 日の胚から ERmRNA の検出に成功し、発生に伴う発現増加が確認された。ホールマウント標本作製の準備が完了した。

2. 核内レセプター

性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明 (加藤)

ERのN末端側の転写促進領域 (AF-1) に結合する p68 を細胞核抽出液より精製・クローニングした。p68 は cDNA クローニングの結果、RNA ヘリケースの 1 種であることが判明し、AR、MR、VDR への効果についても調べたところ全く効果がなく、ER α 特異的であることが判明した。

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)

ERE 部位と AP-1 部位によるエストロゲン応答を、ER α と ER β の間で比較検討したところ、ERE を介する応答は、両受容体の間で差がないのに対し、AP-1 を介するエストロゲン応答は α 型のみでみられた。内分泌かく乱物質において ERE または AP-1 の応答性を見ると、全て弱いエストロゲン型として作用していた。

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)

脳、心臓、肺、副腎においては 17 β -HSD1、肝臓、消化管、腎臓においては 17 β -HSD2 が優位に発現していた。また、胃の表層上皮細胞と、小腸及び大腸の吸収上皮細胞に 17 β -HSD2 発現を認めた。

2. 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結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) への登録を開始した。これと並行して、科学研究モノグラフの刊行の準備を開始した。

7) 内分泌かく乱研究整備

神経に対する内分泌かく乱化学物質研究 -cDNA マイクロアレイによる発現遺伝子解析 (井上、他)

マウス脳に関連する遺伝子をピンコンタクト法でプロットしたチップをアッセイに使えるよう準備を進めた。また、mRNA として、ハイブリダイゼーションに必要な量を見積もり、最低 10 マイクログラム (mRNA) という概算をえて、システムの運用のメドを得た。妊娠時に DES 投与された各成長段階マウスの脳について、mRNA の分離、蓄積を行い、

現在、mRNA の cDNA の逆転写反応を終了し、チップの選択とハイブリダイゼーションの条件検討を行っている。

D. 考察

シグナル伝達分子種を共有する神経系、内分泌系、免疫系、およびその複雑な制御系に支配された生殖・発生過程、そして核内レセプターを介したシグナル伝達そのものに関する研究からなる多角的なアプローチにより、高次生命系の立場から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のための知見が集積されつつある。また、こららの研究を支援するために、早急に取り組むべき課題として近年、進歩の著しい cDNA マイクロアレイを内分泌かく乱化学物質研究への導入を試みた。内分泌かく乱化学物質は複雑な反応系を介していることが予想されるが、cDNA マイクロアレイシステムによる解析で反応メカニズム解明のための有力な情報を得られることが期待できる。

このように、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。

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ゲ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、近年、進歩の著しい cDNA マイクロアレイを内分泌かく乱化学物質研究への導入を試みた。また、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データベース登録及び出版準備を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshida K, Inoue T, Hirabayashi Y, et al.: Calorie restriction and spontaneous hepatic tumors in C3H/He mice, *J Nutrition, Health and Aging*, 1999, 3:121-126

2) Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki Ji, Inoue T: MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126(15):3437-47, 1999.

3) Kurata H, Liu CB, Valkova J, Koch AE, Yssel H, Hirabayashi Y, Inoue T, Yokota T, Arai Ki.: Recombinant adenovirus vectors for cytokine gene therapy in mice. *Allergy Clin Immunol*, 103: 471-84, 1999.

2. 学会発表

1) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Conformational changes on ER α induced by endocrine disrupting chemicals (EDCs). *Keystone symposia*, 2000

2) K.Sai, B.L. Upham, K. -S. Kang, R. Hasagawa, J.E.Trosko, T.Inoue, Pentachlorophenol inhibits gap junctional intercellular

communication in rat liver epithelial cells. 1999 International Gap junction Conference Gwatt, Switzerland (August 28 ~ September 2, 1999)H/He

3)佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上 達 : Pentachlorophenol の肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連 : 第 58 回日本癌学会総会、広島(平成 11 年 9 月 29 日~10 月 1 日)

4)平林容子、高木篤也、児玉幸夫、菅野純、黒川雄二、井上達 : Mn-SOD 遺伝子導入マウス骨髄細胞での紫外線抵抗性 : 第 58 回日本癌学会総会、広島(平成 11 年 9 月 29 日~10 月 1 日)

5) K.Sai, J.E.Trosko, T.Inoue: Pentachlorophenol-induced down-regulation of gap junctional intercellular communication was ameliorated by (-)-epigallocatechin gallate in rat liver epithelial cells. *Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell Communication*, Ann Arbor, Michigan (Oct.17-20,1999)

6) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Mechanism based high throughput screening method for

endocrine disrupting chemicals
(EDCs) using bio-sensor. 2nd
European Workshop 99
International Molecular Toxicology
1999

2回研究発表会 1999

7) 松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井
上 達, 卵巣摘出ラットにおけるエスト
ロゲン枯渇期間と子宮肥大反応の關係に
ついて, 日本内分泌攪乱化学物質学会第

G. 知的所有權の取得狀況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし