

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明：
チトクローム P450 発現を指標として

分担研究課題：内分泌かく乱物質によるチトクローム P450 の変動
の分子生物学的解析

分担研究者 根本 清光 静岡県立大学 薬学部助手
(主任研究者 出川 雅邦との共同研究として行った)

研究要旨：肝障害、生殖障害、造血障害をもたらすことが知られている鉛イオン（硝酸鉛）を雄性 SD ラットに投与し、肝及び精巣におけるステロイドホルモン代謝（合成や分解）に関わるチトクローム P450（P450）酵素（CYP51、CYP11、CYP1A1/1A2 および CYP3A1/3A2 など）の変動を RT-PCR を用いて検討した。その結果、硝酸鉛投与により、肝では、臓器重量の増加とともにこれまで発現変動がほとんど起こらないとされていた CYP51 やコレステロール合成の律速酵素のひとつ HMG-CoA レダクターゼ遺伝子の発現増加が起こること、また逆に CYP1A や CYP3A 分子種の発現は低下することが明らかとなった。また、精巣においては、CYP51 の発現増加は見られるものの、HMG-CoA レダクターゼの発現はほとんど変化しないこと、また、CYP11 の発現は低下することが明らかになった。また、この CYP11 の発現低下が、既に報告されている硝酸鉛投与時のアンドロゲンの産生の主因となることが示唆された。その他、P450 各分子種の発現制御機構の解明に、最近樹立したラット肝培養細胞株が有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

これまでに 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)、DDT や polychlorinated biphenyls (PCB) など、数多くの 外因性内分泌かく乱物質が報告され、ヒトへの影響が懸念されている。これら化合物には、ホルモン様物質として直接的にホルモンレセプターに作用するものや、それ自身にはホルモン様作用はないが、生体内でホルモンの合成や代謝、排泄に影響を与え、二次的にホルモンバランスを変化させるものなどが考えられている。また、これらの内分泌かく乱機構は各々独立したものは限らない。たとえば、DDT や PCB あるいはその代謝物は、直接的ホルモン様作用

をもつものとされているが、これら化合物を含め、多くの内分泌かく乱物質には、それら自身のみならずホルモンの代謝に関わる酵素の発現を変動させる作用があり、直接的ホルモン様作用物質もまた、少なからず生体内でのホルモンの合成や代謝、排泄に影響を及ぼしているものと推察される。一方また、内分泌かく乱物質に対する感受性には動物種差、性差あることや、チトクローム P450 (P450) には数多くの分子種が存在し、各分子種の発現・誘導には、動物種差、性差および臓器差が見られることが知られている。これらの知見は、種々 P450 分子種の発現量の差が、内分泌かく乱作用発現の動物種差・性差・臓器差

などを生む要因になることを示唆している。

そこで、本研究では、造血障害、中枢神経障害、肝障害、生殖障害などを引き起こすことが報告されている鉛を試料として、雄性ラットに投与した場合の、精巣や肝臓におけるステロイドホルモン合成・分解に関わる数種の酵素遺伝子の発現変動を検討した。また、各 P450 分子種の発現・誘導における動物種差、性差など明らかにするにはそれらの発現制御機構の解析の必須であり、その解析には培養細胞を用いることが有利である。しかし、現在まで CYP1A1 を除く他の P450 分子種を発現する培養細胞株は樹立されていない。そこで、まず、ラット肝初代培養細胞より樹立した培養肝細胞株を用いて各種 P450 分子種の発現・誘導能を RT-PCR 法を用いて検討した。

B. 研究方法

1) 硝酸鉛投与時のラット肝および精巣における P450 分子種の発現変動

アンドロゲン合成阻害や肝増殖作用を有する鉛イオン（硝酸鉛：100 $\mu\text{mol/kg}$, *iv*）を、4 週令雄性 SD ラットに投与し、肝や精巣の臓器重量およびこれら臓器におけるステロイドホルモン合成酵素（CYP51 や CYP11：それぞれ P450 分子種のひとつ）及び薬物やステロイドホルモンの代謝酵素（CYP1A1/2, 3A1/3A2 など）の発現への影響を RT-PCR 法を用いて検討した。

2) 種々 P450 分子種の発現機構の解明

P450 分子種の発現機構の解析には培養細胞を用いることが有利であるが、現在まで CYP1A1 以外の P450 分子種を発現する培養細胞株は樹立されていない。そこで、まず、ラット肝初代培養細胞より樹立した培養肝細胞株を用いて各種 P450 分子種の発現・誘導能を RT-PCR 法を用いて検討した。また、硝酸鉛処理時の CYP51 分子種の発現変動も併せて検討した。

（倫理面への配慮）

P450 の発現制御機構に関する研究は、P450 を充分発現する培養細胞株が樹立されておらず、動物実験に依存しているのが現状である。本研究で、少なくともある種のラット P450 分子種については、既に樹立した肝培養細胞株で研究が可能となった。今後、ヒトを含め他の動物の P450 発現研究についても、順次研究材料となりうる細胞株の樹立・検索を進め、実験動物に依存する研究を少なくしたいと考えている。

C. 研究結果

1) 肝および精巣重量の変化

硝酸鉛を投与した後、経時的（3、6、12、24、48 時間後）に屠殺し、肝臓、精巣の各湿重量を測定した結果（図 1）、肝臓では投与 24 時間後から重量の増加が見られ、少なくとも、48 時間後まで継続した。一方、精巣重量は、投与 48 時間後まで有意な変化は見られなかった。

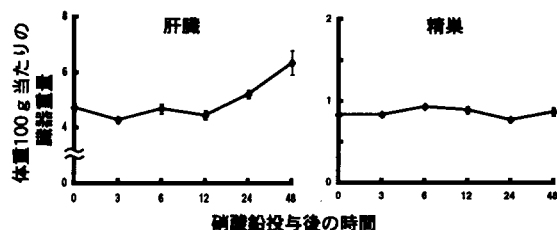


図1. 硝酸鉛投与後の肝臓と精巣の重量変化
各実験群 3 匹の平均値および標準誤差を示している。

2) 肝臓及び精巣におけるステロイドホルモン合成・分解系酵素遺伝子の発現変動

肝臓のコレステロール合成の律速酵素のひとつである HMG-CoA レダクターゼ遺伝子の発現は、硝酸鉛投与 3 時間後から上昇が見られ、投与 48 時間後まで継続した（図 2）。CYP51 遺伝子の発現は投与 12 時間後に増加が認められ、以後減少し、48 時間後にコントロールレベルに回復した。なお、肝ではコレステロー

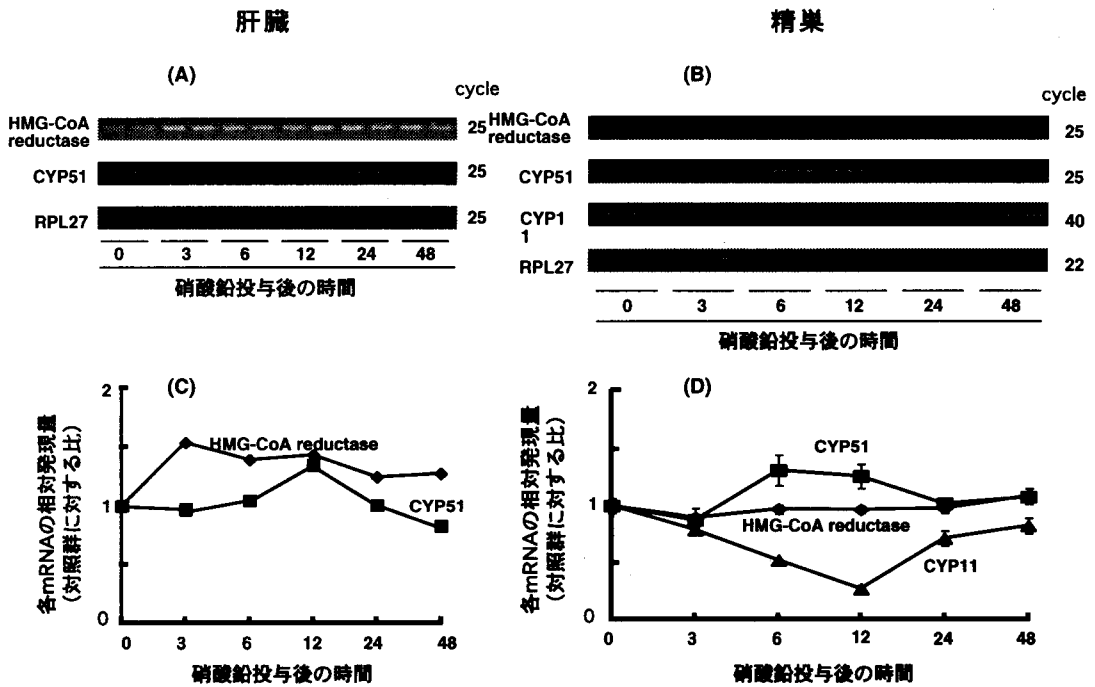


図2. 硝酸鉛投与後のラット肝臓および精巣におけるステロイドホルモン合成系酵素の発現変動

(A) & (B) : RT-PCR後の各生成物の電気泳動パターンを示している。

(C) & (D) : RPL27 mRNAの発現量を基準として各mRNA量を算出し、対応する対照群と比較した。

ルからのステロイドホルモン合成の最初の過程に働く P450_{scc} (CYP11) は発現しないことが確認された。また、精巣でも硝酸鉛投与 6-12 時間後に CYP51 遺伝子の発現上昇が見られたが、肝臓の場合とは異なり HMG-CoA レダクターゼの発現には大きな変化は見られなかった。また、精巣では常在的に発現している CYP11 の発現は、硝酸鉛投与 6 時間後から低下することが明らかになった (図 2)。

ステロイドホルモンの代謝に関わる酵素のうち CYP3A1 遺伝子の発現は、肝臓では、硝酸鉛投与により低下が認められたが、精巣では、逆に遺伝子の一過性 (投与 6 時間後) の上昇が見られた (図 3)。なお、CYP3A2 分子種の発現は、肝臓、精巣ともに、減少傾向が見られるに過ぎなかった。

3) 種々 P450 分子種の発現機構の解明

雄性 SD ラットの初代培養肝細胞より樹立

した培養肝細胞株を用いて、数種の P450 分子種の発現状況を検索した結果、平常培養時には、CYP1A1、CYP2B1 および CYP51 の各分子種の発現が、また、タンパク質合成阻害剤のサイクロヘキシミド添加時には平常時に見られた CYP 分子種に加え、*in vivo* 肝細胞で発現している CYP1A2、CYP3A1/3A2 および CYP2B2 の発現も起こった。また、硝酸鉛を添加し、培養すると *in vivo* 肝の場合と同様に CYP51 遺伝子の発現増加が観察された。

D. 考察

本研究により得られた結果を、表 1 にまとめた。

精巣においては、硝酸鉛投与によりコレステロール合成系酵素のうち CYP51 の発現が上昇すること、また逆に、テストステロン合成の最初のステップを触媒するコレステロールの側鎖切断酵素 (P450_{scc} : CYP11) の発

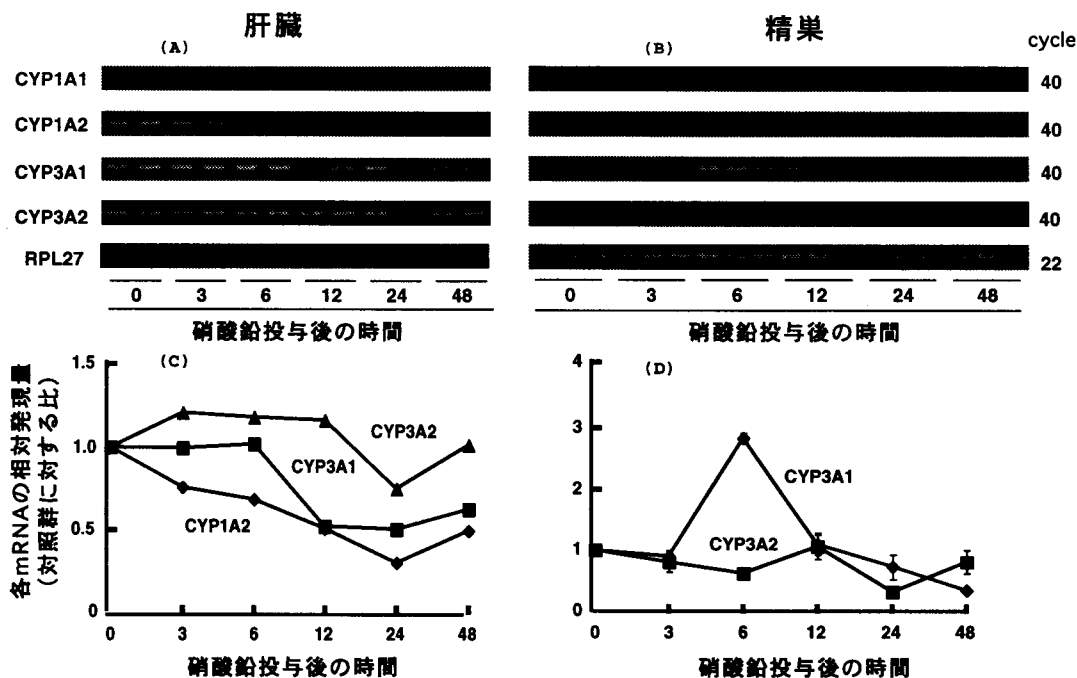


図3. 硝酸鉛投与後の異物・ステロイドホルモン代謝酵素の発現変動

(A) & (B) : RT-PCR後の各生成物の電気泳動パターンを示している。

(C) & (D) : RPL27 mRNAの発現量を基準として各mRNA量を算出し、対応する対照群と比較した。

現が低下することが明らかとなった。また、テストステロンの分解代謝に関わる、CYP3A1 酵素遺伝子の発現が一過性ではあるが上昇することが明らかになった。本研究結果と、鉛投与によりラット精巣中のテストステロン量が低下するというこれまでの報告を考え合わせると、ステロイドホルモンの合成・分解経路全体として、CYP11 の減少がアンドロゲン合成の減少をきたす要因になっていると考えられる。

肝臓においては、硝酸鉛投与により、肝重量の増加とともにコレステロール生合成系酵素 (HMG-CoA reductase や CYP51) の発現の上昇が見られた。また、これまで CYP51 遺伝子は、多種の生物において、また、あらゆる臓器に恒常的に発現するものとされ、その発現量はほとんど変動しないとされてきた。しかし、本研究により硝酸鉛投与により肝や精巣でその発現量が変動 (増加) することが示

され、細胞増殖や分化 (障害) と関連で新たな興味もたれる。

表1. 硝酸鉛投与によるラット肝臓および精巣でのステロイドホルモン合成・分解系酵素遺伝子の発現変動

測定した酵素遺伝子		精巣	肝臓
コレステロール合成系酵素	HMG-CoA reductase	→	↗
	CYP51	↗	↗
ステロイドホルモン合成系酵素	P450 _{sc} (CYP11)	↓	N.D.*
ステロイドホルモン分解系酵素	CYP1A1	N.D.	N.D.
	CYP1A2	N.D.	↓
	CYP3A1	↑	↘
	CYP3A2	↘	↘

*Not detected

一方また、高濃度ではあるが、硝酸鉛投与時、肝臓、精巣における種々の P450 分子種 (CYP1A や CYP3A など) が低下するため、

ステロイドホルモン及び異物に対する代謝機能の低下、さらには生体内における内分泌ホルモンのバランスのかく乱が推測される。したがって、今後、より低濃度での慢性曝露時の影響を精査することが必要と考えている。

以上得られた知見は、ステロイドホルモンの合成や分解に関与する P450 酵素の発現変動が、内分泌かく乱を惹起する要因になる可能性を強く示唆しており、現在、種々の動物を用いて、P450 酵素の発現変動と内分泌かく乱との関連性をさらに追究中である。また、本研究では、肝臓、精巣における鉛の影響を検討したが、鉛の蓄積しやすい腎臓や糖質コルチコイド、鉱質コルチコイドなどのステロイドホルモン合成に関わる副腎などの臓器における影響も検討する必要がある。現在これらのことを考慮し、検討を進めている。

また、各種 P450 分子種を発現する培養細胞株を検索する一環として、すでに樹立していたラット肝培養細胞株を用いて種々 P450 分子種の発現・誘導能を調べた結果、少なくとも数種の P450 分子種 (CYP1A, 2B, 3A および CYP51) については、*in vivo* 肝細胞と類似の発現・誘導が観察された。したがって、現在本培養細胞株を用いて、上記 P450 分子種の発現制御機構の解明を進めている。

E. 結論

硝酸鉛をラットに投与し、肝および精巣におけるステロイドホルモンの合成・分解に関わる数種の P450 酵素への影響を分子生物学的手法を用いて比較検討し、臓器差 (肝及び精巣) を示す酵素があること、また、硝酸鉛曝露により精巣でのアンドロゲン量の減少が CYP11 の減少に起因している可能性を見出した。また同時に、これまでほとんどの臓器で発現し、かつ発現変動が少ないと考えられていたコレステロール合成に関わる CYP51 酵素の遺伝子が、硝酸鉛投与時、変動 (上昇) することなどの新知見を得た。以上の結果を踏まえ、今後さらに、発現変動が見られた P450

分子種を指標として、内分泌かく乱物質に対する感受性の種差・性差・臓器差の解析を継続する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryouhei Kimura. Induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congenere in rats. *Organohalogen Compounds*, **42**, 337-340 (1999).

2. 学会発表

1. 吉本直樹, 並木雅幸, 宮田信吾, 根本清光, 橋本嘉幸, 出川雅邦: ラット培養肝細胞株における種々のチトクローム P450 分子種の発現. 第 6 回肝細胞研究会 (東京), 抄録集, 3, p.104, 1999 年 6 月 5 日.
2. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryouhei Kimura. Induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congenere in rats. 19th International Symposium on Halogenated Enviromental Organic Pollutants and POPs (Venice, Italy), 1999, Sep. 13.
3. 渥美 宏, 梅原 薫, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた生薬中のグルココルチコイド様成分の検索. 日本生薬学会第 46 回大会 (大阪), 要旨集, p.168, 1999 年 9 月 18 日.
4. 根本清光, 安本 勤, 宮田信吾, 村井詩, 出川雅邦: 硝酸鉛投与ラット肝での神経栄養因子およびその受容体の発現変動. 平成 11 年度日本薬学会東海支部会例会 (名古屋), 要旨集, p. 25, 1999 年 12 月 4 日.
5. 梅原 薫, 渥美 宏, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: 植物起源のグ

ルコルチコイド様物質の検索 (2). 日本薬学会第 120 年会 (岐阜), 要旨集 2, p.57, 2000 年 3 月 29 日.

6. 吉本直樹, 今野芳浩, 根本清光, 出川雅邦: ラット肝細胞培養株を用いた CYP 分子種の発現機構の解明. 日本薬学会第 120 年会 (岐阜), 要旨集 3, p.58, 2000 年 3 月 30 日.
7. 安本 勤, 宮田信吾, 根本清光, 根本文子, 村井 詩, 出川雅邦: 硝酸鉛によるラット肝増殖誘発時の神経栄養因子及びその受容体遺伝子の発現変動. 日本薬学

会第 120 年会 (岐阜), 要旨集 3, p.75, 2000 年 3 月 30 日.

G. 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
なし