

平成21年 4月 1日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890144
 研究課題名（和文）
 内分泌攪乱物質曝露による生殖障害発現機序とエピジェネティクス
 研究課題名（英文）
 Effects of endocrine disruptor on reproductive function and epigenetic regulation
 研究代表者
 割田 克彦（WARITA KATSUHIKO）
 香川大学・医学部・助教
 研究者番号：40452669

研究成果の概要：

本研究では、器官形成期におけるエストロゲン様化学物質の曝露が、如何にして不可逆的な生殖障害を引き起こすのか、そのメカニズムの一端を解明することを試みた。本研究により、視床下部-下垂体-性腺軸一連の機能障害メカニズムにおいては、より中枢側の責任が大きいこと、また、精巣ライディッヒ細胞における側鎖切断酵素 P450_{scc} 遺伝子は、ヒストン脱アセチル化を引き起こすことにより遺伝子発現が低下し、アンドロゲン産生能の低下に至ることが推察された。興味深いことに、天然エストロゲンでは P450_{scc} 遺伝子のヒストン脱アセチル化が引き起こされず、エストロゲン様内分泌攪乱物質と天然エストロゲンでは、ヒストン修飾のレベルで作用機序が異なることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：生殖内分泌学，分子細胞遺伝学，毒性学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学，胎児・新生児医学

キーワード：内分泌攪乱物質，下垂体，ライディッヒ細胞，ステロイドホルモン産生系，ヒストンアセチル化，エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

個体や細胞の死を引き起こすような従来の化学物質の影響とは異なり、細胞に発現している受容体を介して、ホルモンの如く作用する化学物質の潜在的危険性が指摘され、『内分泌攪乱物質』という概念が提唱された。この受容体原性毒性は、ある濃度の物質曝露では影響がなくても、それよりもさらに低い用量でホルモン作用を発揮するなど、内分泌攪乱物質特有の作用機序を持ち、必ずしも単純な濃度依存的効果を示すとは限らない。

生物系への内分泌攪乱物質の作用機序解

明は、分子生物学的知見をもとに新しい時代に入ったといえる。しかしながら、器官形成・発達時期である胎仔期・新生仔期での内分泌攪乱物質曝露が、長期にわたって不可逆的にフィードバック機構の破綻を招来するメカニズムの解明については具体的基礎研究が少ない。

2. 研究の目的

(1) 胎仔期および新生仔期におけるエストロゲン様物質曝露の濃度依存的影響につい

て、組織学的、内分泌学的に解析し、基礎データの構築を行った。エストロゲン活性をもつ化学物質の陽性対照として、合成エストロゲン Diethylstilbestrol (DES) を用い、性成熟後のフィードバック機構に及ぼす影響について、中枢（下垂体）および末梢（精巣）の両側面から評価を行った。

(2) 胎仔期・新生仔期は化学物質等への感受性が非常に高く、一般に無毒性量あるいは最小毒性量とされる曝露量であっても、正常な個体発生に影響を及ぼす可能性が指摘されている。内分泌攪乱物質の低濃度複合曝露は最も現実的な問題であるものの、その影響については不明な点が多い。本研究では作用点の異なる3種の内分泌攪乱物質、ビスフェノール A (BPA)、フタル酸ジエステル (DEHP)、ダイオキシン (TCDD) の単独曝露、複合曝露を行い、中脳ドーパミン作動性 (DA) 神経への影響について比較検討を行った。

(3) エストロゲン受容体には α 、 β の2種類のサブタイプが存在し、エストロゲン様内分泌攪乱物質の種類により親和性が異なることが報告されている。すなわち、エストロゲン様内分泌攪乱物質は、内因性のエストロゲンと作用メカニズムを異にすることが想定され、内分泌攪乱物質特有の影響を解析することは喫緊の研究課題であると考えられる。

近年、温度感受性 Simian virus 40 (tsSV40) 大型 T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが作製され、これまでの癌化した株化細胞よりもより本来の性質を保った培養細胞株が樹立されるようになった。これにより、従来よりもさらに生体反応に近い *in vitro* の解析結果を得ることが可能となった。本実験ではこのトランスジェニックマウスから得られたライディッヒ細胞株 TTE1 を用いてマイクロアレイ解析を実施し、Gene Ontology (GO) による分類と機能的解析により生物学的解釈を行い、内因性エストロゲンと内分泌攪乱物質と間の影響の差異を解析することを試みた。

(4) 内分泌攪乱化学物質に曝露されることでステロイドホルモン合成が阻害された場合、生物における発生や生殖において深刻な影響が表れることが想定され、内分泌攪乱化学物質がステロイドホルモン産生系に与える影響は過小評価できるものではない。これまでに行った *in vivo* の実験データより、雄マウスの妊孕能はテストステロン濃度、とくにステロイドホルモン産生の律速因子である StAR 遺伝子発現と密接に関わっていることが推察され、内分泌攪乱化学物質が StAR 遺伝子に与える影響の重要性が示唆された。

また、コレステロールのミトコンドリア内膜への移行に引き続き、P450scc によって行われる側鎖切断は、以後のステロイド合成を行う第一段階であり、ステロイドホルモン合成系に P450scc が及ぼす影響は非常に大きい。本実験ではライディッヒ細胞株 TTE1 を用い、エストロゲン様内分泌攪乱物質がライディッヒ細胞の StAR および P450scc 遺伝子発現に及ぼす影響を解析し、また、これらの遺伝子領域におけるヒストンアセチル化の変化についてクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により検討することを試みた。

3. 研究の方法

(1) ICR 系マウスを用い、膣栓確認後、母マウスに DES 10 $\mu\text{g}/\text{day}$ を妊娠 7, 10, 13, 16 日目に反復投与し、出生後 3~7 日にかけて雄新生仔に DES 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{day}$ を反復投与した。各群ともに性成熟に達した 8 週齢にて採材し、各群の雄マウスにおける影響を組織学的、内分泌学的に評価した。

(2) BPA, DEHP, TCDD およびこれらの混合を妊娠マウスおよび新生仔マウスに経口投与し、2, 4, 6 週齢の中脳 DA 神経核 (A9, A10, A8) におけるチロシン水酸化酵素 (TH) および Fos の発現を定量免疫組織学的に解析した。各投与物質の濃度は無毒性量・最小毒性量以下とした。

(3) ライディッヒ細胞株 TTE1 を 33°C で培養後、Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した 5 μM DES を培養液に添加した (DMSO の最終濃度は 0.1%)。合成エストロゲン DES の比較対象として、DES と同等の力価を有する天然エストロゲン Estradiol 17 β (E2) を用い、同様に 5 μM の添加実験を行った。なお、DES および E2 の溶媒である DMSO を培養液に 0.1% 添加したものをコントロールとした。各物質の培養後 24 時間で total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。取得した遺伝子発現プロファイルをもとに Gene Ontology (GO) による分類と機能的解析を行い、DES と E2 がライディッヒ細胞に及ぼす影響の生物学的解釈を行った。

(4) 予備実験から TTE1 への DES の曝露量を 5 f- 5 μM に設定し、24 時間の培養を行った。培養後、各サンプルから total RNA を抽出し、2 step RT-PCR 法により、StAR および P450scc 遺伝子の発現変化を検索した。また、DES が StAR をはじめとする cAMP 反応性遺伝子の発現誘導に影響を及ぼすか否かを検討するため、DES とともに 24 時間培養した TTE1 に 0.5 mM 8-Br-cAMP を添加し、3 時間後の細胞反応を検討した。さらに StAR およ

び P450scc 遺伝子におけるアセチル化ヒストンの解析として、ChIP assay を行った。

4. 研究成果

(1) DES の胎仔期・新生仔期曝露により、性成熟時の FSH, LH およびテストステロン分泌が曝露量に相関して低下し、特に下垂体におけるゴナドトロピン分泌の制御系は、生殖器に組織学的変化が引き起こされる曝露量よりもより低濃度で影響を受けることが示された。精巣ではステロイドホルモン産生の律速因子 Steroidogenic acute regulatory (StAR) 遺伝子の発現低下が示され、テストステロン産生低下が裏付けられた。また、テストステロン産生が低下しているのも関わらず、下垂体からのゴナドトロピン分泌が低下していることから、フィードバック機構の破綻には、視床下部-下垂体系における機能低下が大きく関与していることが示唆された。

(2) 中脳 DA 神経核 (A9, A10, A8) の TH 発現ニューロン数および TH 染色強度は、BPA, DEHP, TCDD の単独投与により有意な減少が観察され、各物質・各週齢に特有の減少パターンが認められた。また、DEHP 投与群の A8 における Fos 発現ニューロン数は有意に増加した。しかしながら、複合投与群ではいずれの神経核・週齢でも有意な差は検出されなかった。単独投与による作用が複合曝露によって打ち消されたことから、環境中微量化学物質による影響の複雑さ、ならびに複合汚染に対する新たな側面が示された。

(3) DES および E2 を曝露したライディッヒ細胞株 TTE1 から得られた遺伝子発現プロファイルを利用し、GO 解析を行った結果、DES と E2 で真逆の変動を示した GO カテゴリーとして以下のものが挙げられた。

GO ID	GO term
<i>DES: upregulate, E2: downregulate</i>	
GO:0008152	metabolism
GO:0044237	cellular metabolism
GO:0044238	primary metabolism
GO:0030032	lamellipodium biogenesis
GO:0043170	macromolecule metabolism
GO:0030031	cell projection biogenesis
<i>DES: downregulate, E2: upregulate</i>	
GO:0015732	prostaglandin transport

また DES および E2 を曝露した TTE1 から得られた遺伝子発現プロファイルを利用して、GenMAPP パスウェイで分類される各遺伝子セット全体の発現変動について検討を加えた (このような検定は、大きな発現変動を示す比較的少数の遺伝子よりもパスウェイ上において複数遺伝子の中程度の変化が生物学

的に重要な場合に有効であると思われる)。DES 曝露でのみ変動したパスウェイの中で特筆すべきものとして、Cholesterol Biosynthesis の低下が挙げられた (図 1)。

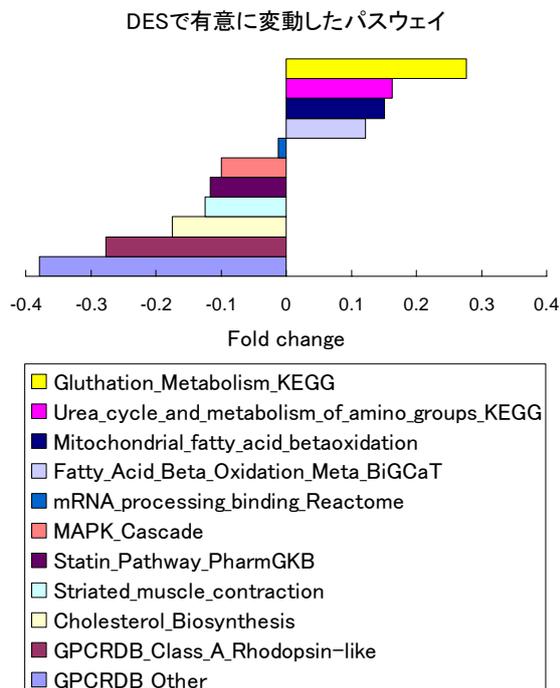


図 1

次に E2 曝露では変化せず DES 曝露でのみ有意な低下がみられた GO term のうち、特筆すべきものを以下にまとめた。

GO ID	GO term	P value
GO:0008632	Apoptotic program	0.00208
GO:0007200	G-protein signaling, coupled to IP3 second messenger (phospholipase C activating)	0.00338
GO:0008610	lipid biosynthesis	0.00675
GO:0006695	cholesterol biosynthesis	0.00746
GO:0030814	regulation of cAMP metabolism	0.00766
GO:0051482	Elevation of cytosolic calcium ion concentration during G-protein signaling, coupled to IP3 second messenger (phospholipase C activating)	0.0089
GO:0031583	G-protein signaling, phospholipase D activating pathway	0.0089
GO:0016126	sterol biosynthesis	0.0117
GO:0046058	cAMP metabolism	0.0347
GO:0044255	cellular lipid metabolism	0.0381
GO:0030818	negative regulation of cAMP biosynthesis	0.0437
GO:0030815	negative regulation of cAMP metabolism	0.0437
GO:0006281	DNA repair	0.0472

GO 分類『Apoptotic program』に該当する遺伝子群は、DES 曝露により有意 (P =

0.00208) に発現減少することが示された。また、『DNA repair』に属する遺伝子群の発現は、DES 曝露で有意 ($P=0.0472$) に低下していることが示され、これらの事象を鑑みると、細胞ストレスに対して DES 曝露細胞ではアポトーシスが起り難く、かつ DNA 修復機構も惹起され難い、すなわちライディッヒ細胞の癌化に繋がる合成エストロゲン特有の影響と推察された。

(4)

StAR 遺伝子は 5 μM の DES 曝露で有意に発現が増加し、*in vivo* における遺伝子発現とは相反する動態が認められた。この発現増加は GO 解析より得られた『negative regulation of cAMP biosynthesis』の有意な低下によって裏付けられるものと推察された。StAR 遺伝子は LH 刺激により発現が誘導される cAMP 反応性遺伝子であり、細胞内シグナル伝達への DES 曝露の影響を検討するために 8-Br-cAMP の添加実験を行ったところ、DES の曝露量に関わらず Control と同様の発現誘導が認められ、DES がライディッヒ細胞の StAR 遺伝子発現低下に直接的に与える影響はみられないものと考えられた。一方、P450scc 遺伝子は DES の曝露量に相関して発現減少が認められ、*in vivo* においてテストステロン産生低下を引き起こした原因の 1 つであると推察された。すなわち、P450scc 遺伝子は DES によって直接的に、StAR 遺伝子は LH の低下を介して間接的に発現低下が引き起こされ、テストステロン産生能低下を引き起こすことが明らかとなった。

StAR 遺伝子がクロマチン修飾のレベルで DES の影響を受けるか否かを検討するため、プロモーター領域について ChIP assay を行ったところ、Control との間に有意な差はみられなかった。一方、P450scc 遺伝子は、DES の曝露によりヒストン脱アセチル化が引き起こされることが明らかとなり、P450scc mRNA の発現低下が裏付けられた。興味深いことに、天然エストロゲンの E2 曝露では、P450scc 遺伝子の脱アセチル化が引き起こされないことが示された (図 2)。すなわち、エストロゲン様の内分泌攪乱化学物質は、エストロゲン受容体に結合して作用するものの、その作用機序はクロマチン修飾のレベルで内因性エストロゲンと異なることが明らかとなった。

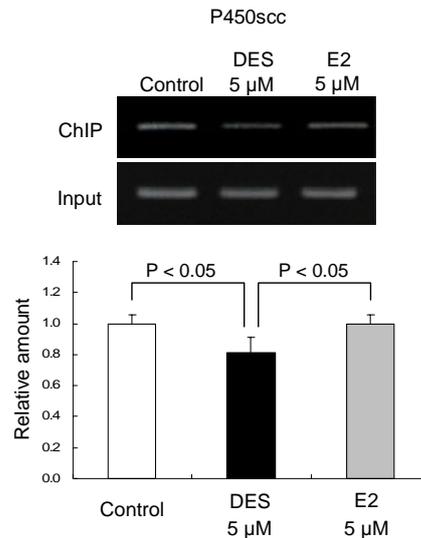


図 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① Tanida T, Warita K, Ishihara K, Fukui S, Mitsuhashi T, Sugawara T, Tabuchi Y, Nanmori T, Qi W-M, Inamoto T, Yokoyama T, Kitagawa H, Hoshi N. Fetal and neonatal exposure to three typical environmental chemicals with different mechanisms of action: Mixed exposure to phenol, phthalate, and dioxin cancels the effects of sole exposure on mouse midbrain dopaminergic nuclei. *Toxicol. Lett.* 2009. 査読有
- ② Warita K, Okamoto K, Mutoh K, Hasegawa Y, Yue ZP, Yokoyama T, Matsumoto Y, Miki T, Takeuchi Y, Kitagawa H, Sugawara T, Hoshi N. Activin A and equine chorionic gonadotropin recover reproductive dysfunction induced by neonatal exposure to an estrogenic endocrine disruptor in adult male mice. *Biol. Reprod.* 78: 59-67. 2008. 査読有
- ③ Miki T, Kuma H, Yokoyama T, Sumitani K, Matsumoto Y, Kusaka T, Warita K, Wang ZY, Hosomi N, Imagawa T, S Bedi K, Itoh S, Nakamura Y, Takeuchi Y. Early postnatal ethanol exposure induces fluctuation in the expression of BDNF mRNA in the developing rat hippocampus. *Acta. Neurobiol. Exp.* 68: 484-93. 2008. 査読有
- ④ Miki T, Yokoyama T, Sumitani K, Kusaka T, Warita K, Matsumoto Y, Wang ZY, Wilce PA, Bedi KS, Itoh S, Takeuchi Y. Ethanol neurotoxicity and dentate gyrus development. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. 48: 110-7. 2008. 査読有

- ⑤ Ishihara K, Warita K, Tanida T, Sugawara T, Kitagawa H, Hoshi N. Does paternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affect the sex ratio of offspring? *J. Vet. Med. Sci.* 69: 347-52. 2007. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 三觜友子, 割田克彦, 菅原照夫, 田渕圭章, 松本由樹, 三木崇範, 石原可奈, 谷田任司, 蝦名康彦, 櫻木範明, 横山俊史, 竹内義喜, 北川浩, 星信彦. 雄性化破綻メカニズムとエピジェネティクス. 第 146 回日本獣医学会学術集会. 2008.9.24-26. 宮崎.
- ② Warita K, Mitsuhashi T, Sugawara T, Yokoyama T, Matsumoto Y, Kitagawa H, Miki T, Takeuchi T, Hoshi N. Male reproductive disorder induced by neonatal exposure to estrogenic agents results from dysfunction of hypothalamic-pituitary axis than from dysfunction of lower reproductive organs. 21th European Congress of Perinatal Medicine. 2008.9.10-13. Istanbul, Turkey.
- ③ Mitsuhashi T, Warita K, Sugawara T, Tabuchi Y, Takasaki I, Kondo T, Hayashi F, Matsumoto Y, Miki T, Takeuchi Y, Ebina Y, Sakuragi N, Yokoyama T, Nanmori T, Kitagawa H, Hoshi N. Epigenetic abnormality of SRY gene in the XY female with pericentric inversion of the Y chromosome. 21th European Congress of Perinatal Medicine. 2008.9.10-13. Istanbul, Turkey.
- ④ 石原可奈, 割田克彦, 谷田任司, 三觜友子, 青木香保里, 横山えりか, 田阪健, 横山俊史, 北川浩, 大迫誠一郎, 遠山千春, 星信彦. 雄親への TCDD 曝露による次世代性比変動時期の特定. 日本アンドロロジー学会第 27 回学術大会. 2008.7.4-5. 京都.
- ⑤ 割田克彦, 三觜友子, 菅原照夫, 田渕圭章, 松本由樹, 三木崇範, 石原可奈, 谷田任司, 横山俊史, 竹内義喜, 北川浩, 星信彦. エストロゲン様化学物質曝露によるステロイドホルモン産生系遺伝子の発現変化とヒストンアセチル化解析. 第 48 回日本先天異常学会学術集会. 2008.6.28-30. 東京.
- ⑥ 三觜友子, 割田克彦, 菅原照夫, 田渕圭章, 高崎一郎, 松本由樹, 三木崇範, 石原可奈, 谷田任司, 蝦名康彦, 櫻木範明, 横山俊史, 竹内義喜, 北川浩, 星信彦.

Y染色体腕間逆位を有するXY女性におけるSRY遺伝子のエピジェネティック異常. 第48回日本先天異常学会学術集会. 2008.6.28-30. 東京.

- ⑦ 割田克彦, 三觜友子, 菅原照夫, 田渕圭章, 松本由樹, 三木崇範, 横山俊史, 竹内義喜, 北川浩, 星信彦. ライディッヒ細胞株 TTE1 におけるエストロゲン様化学物質曝露の影響: ステロイドホルモン産生系遺伝子発現とヒストン修飾の変化. 第2回日本エピジェネティクス研究会学術年会. 2008.5.5-9. 三島.
- ⑧ 割田克彦, 菅原照夫, 田渕圭章, 三觜友子, 松本由樹, 三木崇範, 石原可奈, 谷田任司, 横山俊史, 竹内義喜, 北川浩, 星信彦. 外因性エストロゲン様化学物質が Leydig 細胞株 TTE1 の StAR および P450scc 遺伝子発現に与える影響とアセチル化ヒストンの変化. 第145回日本獣医学会学術年会. 2008.3.28-30. 相模原.
- ⑨ 谷田任司, 割田克彦, 石原可奈, 福井志穂, 三觜友子, 斎旺梅, 稲元哲朗, 横山俊史, 北川浩, 星信彦. 中脳ドーパミン作動性神経核の発達に及ぼす環境中微量化学物質の影響: 複合曝露は単独曝露作用を打ち消す. 第145回日本獣医学会学術年会. 2008.3.28-30. 相模原.
- ⑩ 谷田任司, 割田克彦, 石原可奈, 福井志穂, 三觜友子, 斎旺梅, 稲元哲朗, 横山俊史, 北川浩, 星信彦. マウス中脳ドーパミン作動性神経核の発達に及ぼす環境中微量化学物質の複合曝露的作用. 第10回環境ホルモン学会学術年会. 2007.12.10-11. 大宮.
- ⑪ 割田克彦, 菅原照夫, 田渕圭章, 三觜友子, 松本由樹, 三木崇範, 石原可奈, 谷田任司, 横山俊史, 竹内義喜, 北川浩, 星信彦. 外因性エストロゲン様化学物質が Leydig 細胞株 TTE1 のステロイドホルモン産生系遺伝子発現に与える影響とヒストンアセチル化解析. 第10回環境ホルモン学会学術年会. 2007.12.10-11. 大宮.

〔図書〕(計 1 件)

- ① Hoshi N, Handa Y, Nishi S, Yamada H, Kishida T, Sagawa T, Warita K, Sakuragi N, Fujimoto S. Molecular cytogenetic aspects of sex differentiation anomalies in the field of obstetrics and gynecology. Perspectives in Human Genetics. 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

割田 克彦 (WARITA KATSUHIKO)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：40452669

(2) 研究協力者

星 信彦 (HOSHI NOBUHIKO)

神戸大学・農学部・教授

研究者番号：10209223

竹内 義喜 (TAKEUCHI YOSHIKI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20116619

三木 崇範 (MIKI TAKANORI)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：30274294

田渕 圭章 (TABUCHI YOSHIKI)

富山大学・生命科学先端研究センター・准教授

研究者番号：20322109

菅原 照夫 (SUGAWARA TERUO)

小樽商科大学・保健管理センター・教授

研究者番号：40250451

松本 由樹 (MATSUMOTO YOSHIKI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：90335844

谷田 任司 (TANIDA TAKASHI)

神戸大学大学院・農学研究科・大学院生

三觜 友子 (MITSUHASHI TOMOKO)

神戸大学大学院・農学研究科・大学院生