

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510076

研究課題名(和文)ヨード状態を軸とした新生児期化学物質暴露による甲状腺ホルモン系かく乱の定量解析

研究課題名(英文)Quantitative analysis of neonatal exposure to thyroid hormone disrupting chemicals

研究代表者

藤本 成明 (FUJIMOTO, Nariaki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：40243612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：環境中の化学物質には甲状腺ホルモンかく乱作用を有する化合物があり、その発達期における影響が危惧されている。本研究では、そのような化学物質である臭素化難燃剤の一部が、ある組織や臓器ではホルモン作用物質と働く一方で、別の標的組織や別の種では、抗ホルモン作用をする可能性が示された。またラットモデルにおいて、新生仔期での甲状腺ホルモンかく乱の影響が成体期の遺伝子発現にまで及ぶことを明らかにし、発達時期影響の指標となることがわかった。

研究成果の概要(英文)：There have been many concerns regarding the possible adverse effects of thyroid hormone-disrupting chemicals such as PBDEs. Our results suggested that thyroid hormone-disrupting actions (agonism or antagonism) of PBDEs differ among target tissues or species. Our in vivo studies demonstrated that neonatal exposure to T3 altered the expression of some hepatic genes, including TRa2 and Ugt1A1 in the adult stage, suggesting that neonatal exposure to thyroid hormone-disrupting chemicals may affect the gene expression profile of the thyroid axis in adulthood.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：環境学 放射線・化学物質影響科学

キーワード：内分泌かく乱物質 下垂体甲状腺系 肝臓 甲状腺ホルモン 臭素化難燃剤

### 1. 研究開始当初の背景

家電製品や家具を不燃化するために多量の難燃剤-主として臭素化難燃剤-が使用されている。臭素化難燃剤は、分解され難いため環境中に蓄積され、ヒトおよび野生生物はそれらに定常的に曝露されている。近年臭素化難燃剤が甲状腺ホルモン系へのかく乱作用を持つことが明らかになり、さらにヒトにおいて日常レベルの臭素化難燃剤曝露が甲状腺ホルモン系へ影響を与えていることが報告された。甲状腺ホルモンは個体の成長および中枢神経系構築に必須であることから、発達期におけるかく乱の影響が危惧されている。臭素化難燃剤の甲状腺ホルモン作用の詳細を明らかにし、特に新生時期の曝露による影響を把握する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、*in vitro*アッセイを改良して、化学物質の甲状腺ホルモン作用を高感度に同定し、さらに、新生時期の甲状腺ホルモンかく乱の影響を評価する *in vivo* 評価系を構築することを目的とした。

臭素化難燃剤の中のうち、体内蓄積性が懸念されるポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) 類の甲状腺ホルモン活性については、これまでの *in vitro* のアッセイにおいても報告により結果が異なり、その生物活性について一定の結論がでていない。そこで、本研究では、高感度の甲状腺ホルモン応答性レポーター遺伝子アッセイ系を構築し、PBDE 類の甲状腺ホルモン活性の詳細を明らかにすることを考えた。また、*in vivo* においては、下垂体-甲状腺フィードバック系において重要な役割を果たす肝でのホルモン代謝や受容体動態を中心とした解析により、新生時期での化学物質曝露影響を検索する新たな評価系を構築することを考えた。

### 3. 研究の方法

#### 1) PBDE の合成

PBDE とその水酸化体・メトキシ体は、Marsh 他の方法により合成した。ガスクロマトグラフ-MS により 98%以上の純度であることを確認した。

#### 2) TRE レポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポーター-pGL4-TRE2 は、pGL4ヘダイレクトリピート型TREx2を挿入して作成した。甲状腺ホルモン受容体発現ベクターはPCRクローニングしたラット TR $\alpha$  を pSG5 へ挿入した。ラットの下垂体細胞 MtT/E-2 および CHO 細胞に、これらのプラスミドをリポフェクション法により導入し、被験物質投与後 24 時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

#### 3) TR 受容体リガンド結合領域蛋白の作成

サブクローニングしたリガンド結合配列を pGEX-6P へ挿入して、大腸菌 BL-21-codon plus で増殖させた後、破碎し、グルタチオンセファレーズで組換え蛋白を精製した。

#### 4) 定量的 RT-PCR

細胞または動物組織からグアニジンチオンアネート変法により抽出した全 RNA を鋳型に cDNA 化後、Sybr Green による real time PCR 法により mRNA の発現レベルを測定した。内部標準として actin 発現を用いた。

#### 5) 動物実験

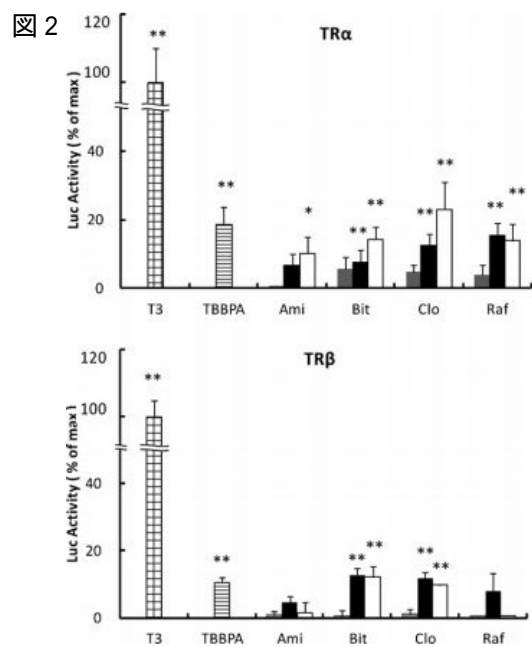
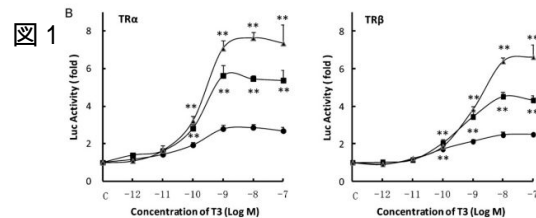
動物実験は、広島大学動物実験委員会の承認を得て、広島大学動物取り扱い倫理規定に沿っておこなった。

妊娠後期の F344 ラットを購入し、雄ラット生後 1,3,5 日目に、T3 を 0, 0.4, 4, 10, 40, 100 ng/g 体重/回で投与した。動物は 8 週令で屠殺して、肝、甲状腺、下垂体の各組織を液体窒素中で凍結して保存した。

### 4. 研究成果

#### 1) 高感度 TRE アッセイ系構築

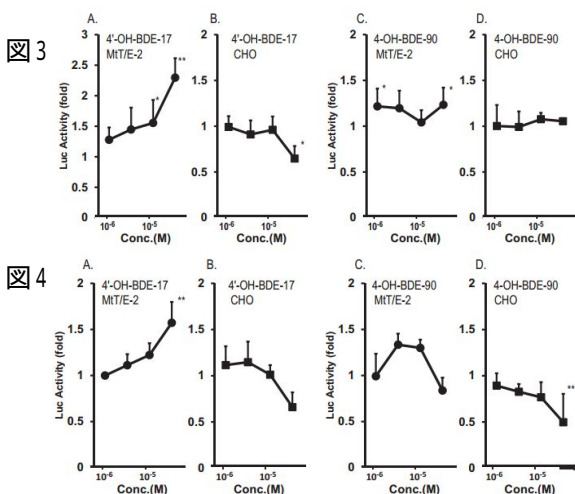
改良 TRE レポーター遺伝子アッセイ系を構成して、 $10^{-11}$ M の T3 活性を検出可能となった。これまで一般に使われてきたアッセイ系より 2 桁高感度である (図 1)。このアッセイによりクロサンテル等の抗寄生虫剤がもつ微弱な T3 活性を検出できることが示され (図 2)、環境化学物質のアセスメントに重要な高感度のアッセイ系が確立できた。



#### 2) PBDE のアゴニズム・アンタゴニズム解析

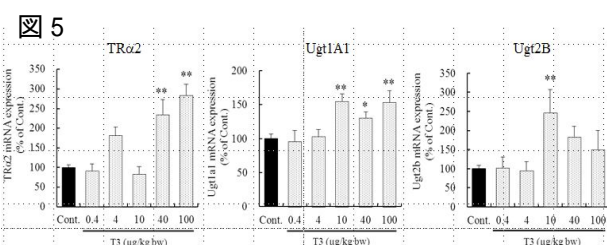
PBDE の甲状腺ホルモン活性については、多くのレポーターアッセイ系でアンタゴニスト活性が示される一方で、甲状腺ホルモン標

的である下垂体細胞の増殖や成長ホルモン産生指標でみるとアゴニスト活性が見られる等、結果が一定していなかった。水酸化物も含む一連の PBDE 類において、その甲状腺ホルモン作用を、下垂体細胞 MtT/E-2 によるレポーター遺伝子アッセイと、CHO 細胞を用いたアッセイで比較検討した結果、細胞によりアゴニスト・アンタゴニスト活性が変更されることが示された。すなわち、MtT/E-2 系においては、高い甲状腺ホルモン受容体結合活性をもつ 4-OH-BDE-90 等は、全く作用しない一方で、CHO 系ではアンタゴニスト活性が示された。さらに、4-OH-BDE17 等は、MtT/E-2 でアゴニスト、CHO ではアンタゴニストとして作用した (図 3 アゴニストアッセイ、図 4 アンタゴニストアッセイ)。このことは、MtT/E-2 の甲状腺ホルモン応答性遺伝子 PDXK の発現でも再現された。したがって、PBDE の甲状腺ホルモン「かく乱」性は、標的細胞(組織)によりアゴニスト~アンタゴニスト活性が変更される可能性が示唆された。



### 3) 新生仔期甲状腺ホルモン曝露の成体時期への影響の解析

雄の F344 ラットに生後 1~5 日で T3 投与した結果、8 週齢の下垂体甲状腺系(下垂体、甲状腺、肝臓の組織) 遺伝子発現に変化がおこることが明らかになった(図 5)。特に、甲状腺ホルモン受容体 2 の発現の上昇が顕著であり、明確な指標遺伝子発現になると考えられた。また、甲状腺ホルモン代謝酵素である、UGT1A1、UGT2B の発現の上昇もみられた。弱い甲状腺ホルモン作用をもつ化学物質(医薬品)のアミオダロン投与においても同様の変化が観察され、化学物質影響の指標としての有用性が示された。



[雑誌論文](計 6 件)

- 1) Tange, S., Fujimoto, N., Uramaru, N., Sugihara, K., Ohta, S., Kitamura, S., *In vitro* metabolism of cis- and trans-permethrin by rat liver microsomes, and its effect on estrogenic and anti-androgenic activities, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 査読有, 37, 2014, 996-1005, doi: 10.1016/j.etap.2014.03.009
- 2) Nakamura, N., Matsubara, K., Sanoh, S., Ohta, S., Uramaru, N., Kitamura, S., Yamaguchi, M., Sugihara, K., Fujimoto, N., Cell type-dependent agonist/antagonist activities of polybrominated diphenyl ethers, *Toxicol. Lett.* 査読有, 223, 2013, 192-197, doi: 10.1016/j.toxlet.2013.09.007.
- 3) Fujimoto, N., Takagi, A., Kanno, J., Neonatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the mRNA expression of prostatic proteins in C57BL mice, *J. Toxicol. Sci.* 査読有, 38, 2013, 279-283, <http://www.jtoxsci.org/j-home>
- 4) Fujimoto, N., Inoue, K., Yoshida, M., Nishikawa, A., Ozawa, S., Gamou, T., Nemoto, K., Degawa, M., Estrogen and androgen receptor status in hepatocellular hypertrophy induced by phenobarbital, clofibrate, and piperonyl butoxide in F344 rats, *J. Toxicol. Sci.* 査読有, 37, 2012, 281-286, <http://www.jtoxsci.org/j-home>
- 5) Matsubara, K., Sanoh, S., Ohta, S., Kitamura, S., Sugihara, K., Fujimoto, N., An improved thyroid hormone reporter assay to determine the thyroid hormone-like activity of amiodarone, bithionol, closantel and rafoxanide, *Toxicol. Lett.* 査読有, 208, 2012, 30-35, doi: 10.1016/j.toxlet.2011.10.004.
- 6) Fujimoto, N., Kitamura, S., Kanno, J., Androgen dependent transcription of a mouse prostatic protein gene, PSP94: involvement of estrogen receptors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 査読有, 127, 2011, 301-306, doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.08.001.

[学会発表](計 16 件)

- 1) 中村直樹, 佐能正剛, 松原加奈, 杉原敦美, 浦丸直人, 北村繁幸, 藤本成明, 太田茂, *In vitro* および *in vivo* における環境化学物質の甲状腺ホルモンかく乱影響評価, 日本薬学会第 134 年会, 2014.03.30, 熊本
- 2) 藤本成明, 菅野純, テストステロンとエ

- ストラジオール投与により誘導されるマウス前立腺肥大, 毒性病理学会, 2014.1.3, 徳島
- 3) 藤本成明, 松原加奈, 佐能正剛, 太田茂, 浦丸直人, 北村繁幸, 宮川信一, 井口泰泉, 新生仔ラットの甲状腺ホルモン応答遺伝子発現への臭素化難燃剤の影響, 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 2013.12.12, 東京
- 4) Fujimoto, N., Matsubara, K., Sanoh, S., Ohta, S., Kitamura, S., Profiling of thyroid hormone related gene expression to access the neonatal effects of endocrine disruptors 1st international symposium on profiling, 2013.09.03, リスボン (ポルトガル)
- 5) 藤本成明, 中村直樹, 松原加奈, 佐能正剛, 太田茂, 杉原数美, 北村繁幸, 臭素化難燃剤の甲状腺ホルモン活性 - 細胞依存的アゴニスト・アンタゴニスト作用 第 86 回日本内分泌学会学術総会, 2013.04.25, 仙台
- 6) 藤本成明, 松原加奈, 佐能正剛, 太田茂, 山口雅史, 杉原数美, 浦丸直人, 北村繁幸, 臭素化難燃剤の甲状腺ホルモン活性 - 細胞依存的アゴニスト・アンタゴニスト作用, 環境ホルモン学会第 15 回研究発表会, 2012.12.18, 東京
- 7) 佐能正剛, 柏木啓子, 花田秀樹, 松原加奈, 川畑公平, 中村直樹, 鈴木賢一, 山本卓, 新海 正, 藤本成明, 杉原数美, 北村繁幸, 柏木昭彦, 太田茂, 甲状腺ホルモン様化学物質アミオダロン曝露によるカエルの変態に対する影響, 環境ホルモン学会第 15 回研究発表会, 2012.12.18, 東京
- 8) 藤本成明, 松原加奈, 佐能正剛, 太田茂, 北村繁幸, ラット肝での新規甲状腺ホルモン応答遺伝子 pdxk の同定とプロモーター解析, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012.12.12, 福岡
- 9) 松原加奈, 中村直樹, 佐能正剛, 杉原数美, 浦丸直人, 北村繁幸, 宮川信一, 井口泰泉, 藤本成明, 太田茂, 環境化学物質による甲状腺ホルモン攪乱作用の *in vitro* および *in vivo* 評価 衛生薬学・環境トキシコロジーフォーラム, 2012.10.25, 名古屋
- 10) Fujimoto, N., Matsubara, K., Sanoh, S., Ohta, S., Kitamura, S., Sugihara, K., Effects of neonatal exposure to thyroid hormones on gene expression profile of the pituitary-thyroid-liver in rats, 2012.05.08, フェレンツェ (イタリア)
- 11) 松原加奈, 佐能正剛, 藤本成明, 杉原数美, 北村繁幸, 太田茂, 環境化学物質の転写活性化を介した甲状腺ホルモン攪乱作用, 日本薬学会第 132 年会, 2012.03.31, 札幌
- 12) 藤本成明, 松原加奈, 佐能正剛, 太田茂, 北村繁幸, ラット肝における甲状腺ホルモン応答遺伝子の同定, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.15, 横浜
- 13) 藤本成明, 松原加奈, 佐能正剛, 太田茂, 杉原数美, 北村繁幸, 新生仔ラットへの甲状腺ホルモン作用物質曝露の影響, 環境ホルモン学会第 14 回研究発表会, 2011.12.02, 東京
- 14) 佐能正剛, 柏木啓子, 花田秀樹, 松原加奈, 川畑公平, 新海正, 山本卓, 鈴木賢一, 藤本成明, 杉原数美, 北村繁幸, 柏木昭彦, 太田茂, 甲状腺ホルモン様物質のアフリカツメガエルの自然変態に対する影響評価, 環境ホルモン学会第 14 回研究発表会, 2011.12.01, 東京
- 15) 藤本成明, マウス PSP94 遺伝子のアンドロゲン依存性転写活性化のエストロゲン受容体による修飾, 第 19 回日本ステロイドホルモン学会, 2011.11.26, 福岡
- 16) 松原加奈, 佐能正剛, 藤本成明, 杉原数美, 北村繁幸, 太田茂, 新生仔期ラットへの甲状腺ホルモン様物質曝露による影響評価, フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010.10.28, 金沢

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤本成明 (FUJIMOTO NARIAKI)  
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授  
 研究者番号: 40243612

### (2) 研究分担者

北村 繁幸 (KITAMURA SHIGEYUKI)  
 日本薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号: 40136057

佐能 正剛 (SANOH SEIGO)  
 広島大学・医歯薬保健学研究所・助教  
 研究者番号: 00552267