

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510065

研究課題名 (和文) 新生児期の甲状腺系機能刷り込み現象の解明による発達期化学物質影響のリスク推定

研究課題名 (英文) Effects of neonatal exposure to thyroid hormone disrupting chemicals in rats

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

研究成果の概要 (和文)：

肝臓における甲状腺ホルモン応答性遺伝子を cDNA マイクロアレイで解析した結果、新規応答遺伝子として、RLT3-2, RLT3-13, RLT3B-24, RLT3B-49 等を同定した。新生児期の甲状腺ホルモン投与動物において、これらの遺伝子の成体期発現が可逆的に変化しており、リスク推定に応用できる可能性が示された。また、化学物質の甲状腺ホルモン作用同定のためのレポーターアッセイ系の改良にも取り組み、既存の系より 2 桁高感度なアッセイ系の開発に成功した。

研究成果の概要 (英文)：

The expression of rat liver genes was determined by a cDNA microarray method to identify the thyroid hormone responsive genes. The identified genes include RLT3-2, RLT3-13, RLT3B-24 and RLT3B-49. In rats, neonatal exposure to thyroid hormones irreversibly altered the expression profile of these genes in adulthood, which suggested these genes could be useful markers for the neonatal effects of thyroid hormone disrupting chemicals. In addition, we established an improved thyroid hormone reporter gene assay to determine environmental chemicals exhibiting weak thyroid hormone activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：内分泌かく乱

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：甲状腺ホルモン、内分泌かく乱物質、子供の環境リスク

1. 研究開始当初の背景

過去 10 年ほどの間に、環境中にある内分泌かく乱物質の存在と潜在的リスクが明らかにされてきた。内分泌かく乱作用をもつ物質が次々に同定され作用メカニズムが明らかになるにつれて、生体影響 (健康リスク) 研究の重要な課題は、形態形成期への影響であることが認識されるようになった。外乱への感受性は胎児期～思春期の各ステージで

大きく変化すると考えられるが、これまでの毒性学では系統的に解析されておらず、近年いわゆる「子供の環境リスク問題」として再認識されるようになった。特に甲状腺ホルモン系のかく乱作用は、成長ばかりでなく中枢神経系の発達障害に直接関与することから、重大なリスクであり、正確な理解が求められている。

これまで我々は、環境中の物質とその代謝

物のエストロゲン作用、抗アンドロゲン作用さらに甲状腺ホルモン作用を次々と明らかにしてきた。特に、難燃剤として多用されてきたテトラプロモビスフェノール A (TBBPA) の甲状腺ホルモン作用を世界に先駆けて明らかにした他、PCB 類にも同様の作用があることを報告してきた。これらの仕事は、レポータージーンアッセイ、受容体結合アッセイ、さらにはカエルの変態アッセイによって達成されたが、個体レベルのリスク評価のためには、甲状腺ホルモンのホメオスタシスを維持している視床下部・下垂体・甲状腺系 (+ 肝臓) 自体への影響、特にその機能発達への影響について、定量的な評価が必要である。

新生児期の甲状腺ホルモンの欠如または過剰は、終生にわたり甲状腺系のホルモンレベルや応答性を変える「刷り込み」作用を示すことが知られている。そこで、この新生児期の甲状腺系機能構築に対する障害発症メカニズムを、ホルモン応答性の変化という点から明らかにする。我々はこれまで、前立腺をモデルにした研究で、アンドロゲン応答遺伝子を検索同定し、低用量エストロゲンの作用を、初めて遺伝子発現レベル明らかにした。本研究でも、この手法を応用する。また肝臓を甲状腺系の一部であると考えて分析をするものとし、肝臓でのホルモン応答遺伝子の同定、また、実際の化学物質については、肝臓での代謝活性化を考慮した解析をおこなうこととする。

2. 研究の目的

発達期の甲状腺ホルモンかく乱作用は、個体の成長および中枢神経系構築に直接関与する重大なリスクである。特に甲状腺系自身の機能発達がかく乱されて、甲状腺ホルモンのホメオスタシスが障害されるのは深刻な影響である。本研究では、新生児期での甲状腺ホルモンの一時的暴露により、終生にわたり甲状腺ホルモンレベルが変わってしまう「刷り込み」モデル (ラット) を解析する。すなわち、視床下部・下垂体・甲状腺 (+ 肝臓) 系発達への影響を、系を構成する組織のホルモン応答遺伝子の発現レベルの変化として捕らえ定量的に解析する。

3. 研究の方法

1) 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。

ホルモン応答性遺伝子検索実験には、8週令 F344 雄ラットを Charles River Japan より購入して用いた。抗甲状腺剤の PTU (プロ

ピルチオウラシル) を飲水中 0.05% で 1 週間投与後、トリヨードサイロニン (T3) を $1\mu\text{g/g}$ 体重で i. p. 投与した。24 時間後に動物を屠殺し、肝、甲状腺、下垂体の各組織を RNALater で保存した。

新生仔期投与実験では、生後 1 日の F344 雄ラットを購入して用いた。生後 1, 3, 5 日目に、T3 およびサイロキシニン (T4) を、それぞれ $0.04\mu\text{g/g}$ 体重/回、 $4\mu\text{g/g}$ 体重/回で投与した。また化学物質として Amiodarone (Ami) $0.4\mu\text{g/g}$ 体重/回を投与した。動物は 8 週令で屠殺して、肝、甲状腺、下垂体の各組織を RNALater で保存した。

2) cDNA マイクロアレイ解析による T3 応答遺伝子の検索

ラット初代培養細胞 (SD ラット由来) を、Lonza より購入して用いた。培地に T3 を最終濃度 1nM で添加した細胞と、対照群の細胞から、Isogen 試薬により、全 RNA を抽出した後、これを鋳型に、cDNA 化、cRNA 化し、Affymetrix 社 GeneChip rat シリーズにより網羅的発現解析を行った。

3) mRNA 定量解析

組織から抽出した全 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 β actin の mRNA を定量した。

4) レポータージーンアッセイ

新規の甲状腺ホルモン応答配列をもつシフェラーゼレポーターとして、DR4 型の TRE をタンデムに 2 回つないだ配列をもつプラスミド pGL4-TRE2 を構築して用いた。ラット TR α , β の発現プラスミドは、PCR クローニングにより構築した (pSG5-rTR α / rTR β)。

ラット下垂体由来細胞 MtT/E-2 は、DEM/F12 に、デキストランチャコール処理した FBS および HS をそれぞれ 2%, 8% を添加した培地で培養した。トランスフェクション実験では、細胞を 4×10^4 /well で 48 孔プレートに播き、pGL4-TRE2, pSG5-rTR α または β 及び内部標準用の phRLCMV を、HilyMax 試薬によりトランジェントに導入した。T3, T4 及び被験物質を添加して、24 時間後に細胞を回収した。Dual-luc 試薬により、ホタルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

1) ラット肝臓における新規甲状腺ホルモン応答遺伝子の同定

マイクロアレイ解析の結果、ラット肝初代培養細胞の T3 投与に応答性の遺伝子として、対照群に対し 3 倍以上の発現上昇のあった

遺伝子 38 個がリストされた (表 1)。これらの遺伝子から、*in vivo* でも応答性を示す遺伝子を抽出するため、T3 投与 F344 ラットの肝臓組織を用いて、さらにスクリーニングを行った結果、RLT3-2, RLT3-13, RLT3B-24, RLT3B-49 の応答性が確認された (表 2)。既知の応答遺伝子 Spot14, ME, BCL3, Cyp7A1, DIO1 についても反応性が確認できた。

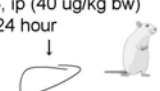
表 1. ラット初代肝細胞cDNAマイクロアレイ解析結果

Probe Set ID	Gene Symbol	rLiv-13/ rLiv-C ratio	Probe Set ID	Gene Symbol	rLiv-13/ rLiv-C ratio
1 1378964	Lrrc23	18.50	21 1385121	Lsm7_predicted	4.08
2 1370239	Hmra2 /// LOC	15.16	22 1386127	RCB1307222_pre	3.97
3 1368047	Sult1d1	13.69	23 1387826	Ptkk /// RCB15	3.94
4 1370787	Bcl2l1	12.24	24 1372264	Ptk1	3.65
5 1372416	Plg1	12.15	25 1368608	Fgf16	3.54
6 1385575	Typl	11.55	26 1383586	Nape_predicted	3.52
7 1370973	Scn7a	11.15	27 1378708	Krtap14_predicted	3.45
8 1387787	Tig2_predicted	10.92	28 1368089	Ptkc	3.31
9 1370517	Npx1	8.09	29 1365885	Acp1_predicted	3.30
10 1368731	Orx2	7.85	30 1381678	Pax1	3.28
11 1382887	Acd1	7.81	31 1383291	C7 /// Tubb2a	3.21
12 1368230	Gabr2	5.98	32 1387874	RCB1565523_pre	3.16
13 1387834	Bcan	5.35	33 1388231	Sgpl	3.14
14 1382889	Plg1	5.30	34 1386274	Scl7a2_predicted	3.13
15 1387712	Eso1 /// LOC8	5.15	35 1384523	RCB1308734	3.09
16 1368208	Or1	4.88	36 1382885	Uros	3.05
17 1385274	Pdhb19	4.53	37 1372935	Tmem119	3.00
18 1384445	LOC289442	4.51	38 1385114	RCB1564088_pre	3.00
19 1388245	Nig1	4.34	39 1370943	Sult1c2a	2.99
20 1381766	H3st5_predicted	4.29	40 1385071	RCB1563855_pre	2.96

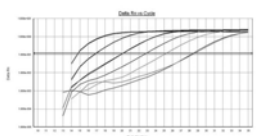
表 2.

Gene	fold induction
RLT3-2	x6
RLT3-13	x1.8
RLT3B01	x1.5
RLT3B24	x14
RLT3B49	x4
Spot14	x4
ME	x10
BCL3	x4
Cyp7A1	x9
DIO1	x15

F344♂ラット 8W
PTU投与1週間
T3, ip (40 ug/kg bw)
24 hour



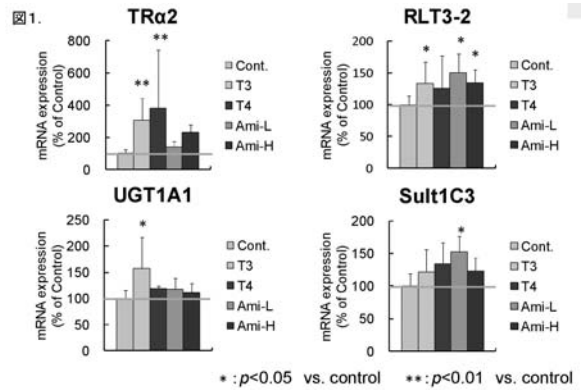
Liver組織での、Q-RT-PCR
による遺伝子発現定量



2) 甲状腺ホルモン新生仔期暴露の影響

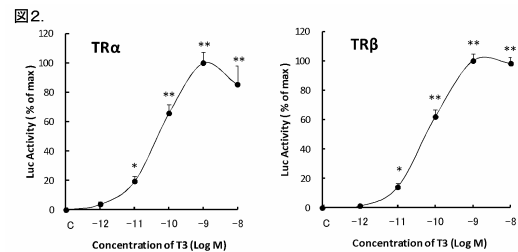
新生仔期に甲状腺ホルモンを投与したラットの 8 週令時での影響を検索した。血中 T3 値には影響はなく、一方で T4 値は、新生仔期 T4 投与群で有意に低下した。既に報告されている通り、新生仔期 hyperthyroidism により、血中 T4 値が不可逆的に低下することが確認された。本研究では、甲状腺ホルモン受容体、T3/T4 代謝酵素遺伝子、T3/T4 応答性遺伝子発現のプロファイルが、どの様な影響を受けるかが課題であった。結果、TRa2 遺伝子の上昇がもっとも強い影響として観察された他、甲状腺応答遺伝子の RLT3-2 の増加、代謝酵素遺伝子の UGT1A1 および Sult1C3 の有意な上昇が観察された (図 1)。興味深いことに、下垂体組織、甲状腺組織における発現においても、TRa2 が最も影響を受けた遺

伝子であった。



3) 高感度甲状腺ホルモンレポーターアッセイ系の構築

環境中の甲状腺ホルモン作用物質のアッセイにおいて、これまで、ホルモン依存性を示す下垂体細胞の増殖や成長ホルモン産生を指標にする方法が使われてきたが、特異性が低いという問題があった。一方で、TRE ルシフェラーゼレポーター遺伝子などによるアッセイが開発されて来たが、感度において劣っていた。今回、新規の TRE レポーターと下垂体細胞 MtT/E-2 を組み合わせることで、増殖アッセイと同程度の高い感度をもつレポーターアッセイ系の開発に成功した (図 2)。この系により、家畜動物医薬品である、bithionol, closantel, rafoxanide、また、抗不整脈薬の amiodarone が、弱い甲状腺ホルモン様活性を持つことが示された。



Luciferase activity of a TRE reporter in MtT/E-2 incubated in serum free medium. Cells were transiently transfected with pGL4-TRE2 and pSG5-rTRa1 or PSG5-rTRb and incubated in serum free medium with various concentrations of T3. Higher T3 responsive luciferase induction was evident at concentrations 10⁻¹¹ and 10⁻¹⁰M. Bar indicates mean ± SEM, n=8. * p<0.05 and ** p<0.01 vs. control.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1) 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. 208, 30–35, 2012 (査読あり).

2) 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. 127, 301-306, 2011 (査読あり).

3) Fujimoto, N., Suzuki, T., Ohta, S., Kitamura, S. Identification of rat prostatic secreted proteins using mass spectrometric analysis and androgen-dependent mRNA expression. J. Androl. 30, 669-678, 2009 (査読あり).

4) Kitamura, S., Shinohara, S., Iwase, S., Sugihara, K., Uramaru, N., Shigematsu, N., Fujimoto, N., Ohta, S. Affinity for Thyroid Hormone and Estrogen Receptors of Hydroxylated Polybrominated Diphenyl Ethers. J. Health Science 54, 607-614, 2008 (査読あり).

5) Kitamura, S., Sugihara K., Sanoh, S., Fujimoto, N., Ohta, S. Metabolic activation of proestrogens in the environment by cytochrome P450 system. J. Health Science 54, 343-355, 2008 (査読あり).

[学会発表] (計 15 件)

1) 松原加奈, 佐能正剛, 藤本成明, 浦丸直人, 杉原数美, 北村繁幸, 太田茂 環境化学物質の甲状腺ホルモン攪乱作用 *in vitro* 評価, 日本薬学会第 131 年会, 静岡 2011. 3 (要旨集 30P-0858)

2) 藤本成明, 高木篤也, 菅野純 低用量 TCDD 新生児期暴露のマウス前立腺分泌機能への影響, 環境ホルモン学会第 13 回研究発表会, 東京 2010. 12. 17 (要旨集 3D3)

3) 松原加奈, 藤本成明, 佐能正剛, 杉原数美, 北村繁幸, 太田茂 環境化学物質甲状腺ホルモン作用の高感度レポーター遺伝子アッセイ, 環境ホルモン学会第 13 回研究発表会, 東京 2010. 12. 16 (要旨集 PB19)

4) 藤本成明, 北村繁幸 マウス PSP94 のアンドロゲン応答性転写機構 - エストロゲン受容体の関与, 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸 2010. 12. 9 (要旨集 1P-0356)

5) Fujimoto N., Kitamura S., Ohta, S. Requirement of estrogen receptor α for androgen dependent transcription of a mouse prostatic protein gene, PSP94, 14th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Edinburgh,

U.K. 2010. 9. 23 (Abstract #8)

6) 松原加奈, 佐能正剛, 岩瀬恵理, 藤本成明, 浦丸直人, 杉原数美, 加藤善久, 北村繁幸, 太田茂 環境化学物質による甲状腺ホルモン応答の高感度評価, フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー, 東京 2010. 9. 10 (要旨集 P-058)

7) 佐能正剛, 松原加奈, 岩瀬恵理, 今岡進, 岡田和嗣, 浦丸直人, 藤本成明, 杉原数美, 北村繁幸, 太田茂 環境化学物質の protein disulfide isomerase (PDI) への結合による内分泌系に対する影響, フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー, 東京 2010. 9. 9 (要旨集 06-2)

8) 佐能正剛, 岩瀬恵理, 松原加奈, 杉原数美, 浦丸直人, 藤本成明, 北村繁幸, 太田茂 環境中における甲状腺ホルモン攪乱物質のスクリーニング, 130 年会, 岡山 2010. 3. 30 (要旨集 30P-pm308Q).

9) 藤本成明, 吉田緑, 西川秋佳, 小澤正吾, 蒲生俊恵, 根本清光, 出川雅邦 化学物質による肝肥大の毒性指標としての性ホルモン受容体および応答性遺伝子発現の検討, 第 26 回日本毒性病理学会学術集会, 金沢 2010. 2. 3 (要旨集 0-6).

10) 藤本成明, 鈴木智晴, 太田茂 MS 解析による前立腺タンパク質の同定とそのアンドロゲン応答性, 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜 2009. 12. 9 (要旨集 P0100).

11) 佐能正剛, 岩瀬恵理, 杉原数美, 加藤善久, 浦丸直人, 藤本成明, 北村繁幸, 太田茂 環境化学物質の甲状腺ホルモン受容体結合活性とその代謝変動, 環境ホルモン学会第 12 回研究発表会, 東京 2009. 12. 7 (要旨集 PC-4)

12) Fujimoto N., Suzuki, T., Ohta, S. Prostatic secreted proteins in mice and rats: Identification using mass spectrometric analysis and the hormone dependent expression. European Congress of Endocrinology. Istanbul, Turkey, 2009. 4. 28 (Abstract 648)

13) 岩瀬恵理, 小島弘幸, 杉原数美, 浦丸直人, 藤本成明, 黒木広明, 北村繁幸, 太田茂 臭素化難燃剤 PBDE の甲状腺ホルモン受容体結合活性の代謝による変動 日本薬学会第 129 年会、京都 2009. 3. 27 (26P-am254)

14) 藤本成明, 吉田緑, 西川秋佳, 根本清光, 出川雅邦 化学物質による肝肥大の毒性指標としての性ホルモン受容体発現の検討, 第 25 回日本毒性病理学会学術集会、浜

松 2009. 1. 28 (要旨集 P75)

15) 藤本成明, 菅野純, 五十嵐勝秀 マウス前立腺におけるアンドロゲン応答遺伝子同定とホルモン存性前立腺増殖への関与
日本癌学会第 67 回学術総会、名古屋
2008. 10. 28 (総会記事 P-4077)

[図書] (計 2 件)

1) Kitamura, S., Sugihara, K., Fujimoto, N., Yamazaki, T.: Organophosphates as endocrine disruptors In: T. Satoh, R.C. Gupta (ed.) Anticholinesterase Pesticides, John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken, NJ, pp. 203-223, 2010

2) Kitamura, S., Sugihara, K., Nakamura, K., Kotake, K., Kashiwagi, A., Fujimoto, N.: Endocrine Disruption in Toxic Responses In: B. Ballantyne, T. Marrs, T. Syversen (ed.) General and Applied Toxicology III, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 539-582, 2009

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：4 0 2 4 3 6 1 2

(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：4 0 1 3 6 0 5 7

杉原 数美 (SUGIHARA KAZUMI)
広島大学・医歯薬総合研究科・准教授
研究者番号：2 0 2 7 1 0 6 7
(H21-22 年度：連携研究者)