

「内分泌かく乱物質」

平成10年度採択研究代表者

香山 不二雄

(自治医科大学保健科学講座 主任教授)

「植物由来及び人工内分泌かく乱物質の相互作用」

1. 研究実施の概要

植物由来のエストロゲン様物質には様々なものが存在する。それらはエストロゲンとの構造相関性あるいはエストロゲンレセプター(ER)への結合性またはin vitroでのER依存的転写活性化能等によってエストロゲン活性のある物質として認識されている。しかしながら、それらの物質の生理機能発現の過程では、種々の差異が有ることが観察されている。我々は、その反応性の多様性に関して、植物由来および人工の内分泌攪乱物質の作用に関して、レセプター親和性、転写活性レベル、転写後制御、および生理機能の発現レベルと異なったレベルで検討を加えてきた。

テルペノイドの一種、フェルチニン、ツチガネジンがER- α アゴニスト、ER- β パーシャル・アゴニストであることが明らかとなった。その機序としては、転写共役因子TRAP20が、これらのリガンドがER- β に結合したときに結合阻害が起こっており、その立体構造の変化がこのような特異的な反応性の原因になっていることが推察された。またin vitroでは非常に強いアゴニスト活性を示すゲニスチンは動物体内ではエストロゲン活性をほとんど示さないことを見いだした。

また動物体内でのエストロゲン作用は転写制御ばかりでなく、転写後のmRNA安定化制御も重要であり、植物エストロゲンの種類によってその活性が異なることを明らかにした。また、今後、エストロゲンによるmRNA安定化制御の分子機構を解明することにより、細胞内の未知なエストロゲンシグナル伝達経路を明らかにできる可能性が予想される。

エストロゲンやクメステロール投与によって誘導される遺伝子および抑制される遺伝子を、PCRディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて見出し、それぞれの発現量の変化から種々の作用機序が徐々に明らかとなってきた。また、エストロゲンおよびDESによりエリスロポイエチン産生誘導が抑制されることが明らかとなった。また、免疫系細胞では、植物由来および人工の内分泌かく乱物質が、自己応答性クローンの生存率を上昇させることが明らかとなってきた。

これらの機能的な解析の知見を人の健康リスク評価につなげるために、人工の内分泌かく乱物質の農薬類と大豆イソフラボン量の血中濃度を、農家女性集団で検討し、内分泌かく乱作用の相互的作用があるのかどうか、それぞれの血中濃度と骨密度などの健康指標と

の間に関連が有るのかどうかを調べるために疫学調査を行っている。

2. 研究実施内容

研究目的 植物由来および人工のエストロゲン様物質の子宮に対する作用機序を分子レベルで明らかにすること、エストロゲンによるエリスロポイエチン産生抑制のメカニズムに関すること、農家女性の疫学調査を通じて、血中イソフラボンおよび残留有機塩素系農薬およびダイオキシン類の存在量を職業曝露等の検討を行い、内分泌攪乱物質の人へのリスク評価に資することを目的とする。

研究方法と結論

1. エストロゲン依存的なmRNA分解制御機構におけるAUF1の役割

方法；ラット子宮組織ではmRNA分解を制御するRNA結合タンパクのひとつであるAUF1はエストロゲンによってmRNA安定化制御を受け、そのmRNA蓄積量が増加することを明らかにした。さらに、タンパクレベルでもAUF1は増加することが明らかになったので、ラット子宮組織におけるAUF1の標的mRNAのスクリーニングを行い、2つの候補遺伝子を取得した。シークエンスの結果、取得された遺伝子はABIN2およびpip92/ier2のラットホモログであることが明らかになった。これらの遺伝子cDNAを取得し3'-UTRの配列を検討したところポリ(A)付加シグナル近傍にmRNA分解制御配列に特徴的なAUUUA配列を持つという共通性が見出された。次に、これらの遺伝子のラット子宮組織での発現を検討した。ABIN2mRNA発現量はエストロゲン処理6時間後から減少し、pip92/ier2mRNAはエストロゲン処理3時間後に一過的にその蓄積量が増加するが、その後急速に減少した。転写阻害剤であるアクチノマイシンDにより転写を阻害すると、これらのmRNAはエストロゲン存在下でも安定であることが分かった。

結論 エストロゲンによってde novo合成される因子によってmRNAの不安定化が促進されていることを示しており、エストロゲンによって発現量が増加するAUF1の関与を示唆するものと考えられた。現在AUF1のABIN2および pip92/ier2mRNAへの結合能を検討している。本研究はラット子宮組織における遺伝子発現制御には転写制御とは異なる制御カスケードが存在することを示すものであり、今後、生殖組織に対する各種の環境ホルモンの作用点を考える上で重要な知見になると考えられる。

2. エストロゲンによるエリスロポイエチン産生抑制

方法 エストロゲン (E_2) と、 E_2 作用を持つ他の人工・天然化学物質（ディエチルstilbestrol (DES)、ビスフェノールA、ジェニスタイン) の4種類について、腎臓で産生される造血ホルモンであるエリスロポエチン (EPO) 産生に対する抑制作用を、ラットを用いたin vivoの実験系で調べた。

結果；脱血による貧血惹起刺激でのEPO産生に対しても E_2 とDESは抑制作用を持つが、その作用は低気圧やコバルトによるものに比較してやや弱いことが新たに明らかになった。また、実際に E_2 とDESを2ヵ月間投与すると、EPOの上昇を伴わない軽度の貧血が惹起されることも観察できた。さらに、2ヵ月間の鉄欠乏食による実際の鉄欠乏性貧血においても、

E₂がそれによって亢進したEPOの産生を抑制することも判明した。

結論；妊娠中に観察される「生理的貧血」には、体内でのE₂の大量産生によるEPO産生の抑制が大きな役割を演じていることが考えられた。

3. 内分泌攪乱物質の生体存在量に関する疫学調査

方法； 全国5カ所、1408名の農家女性から採取した血液サンプルを用いて、植物エストロゲンおよび有機塩素系農薬、ダイオキシン類の血中濃度に関して、測定を行い、統計解析を行い、論文作成を行っている。AhRへの結合および転写活性をルシフェラーゼ活性で測定するCALUX assay法を用いて測定の同意の得られた1160名の血中ダイオキシン濃度(PCDD+PCDF分画)を測定した。

結論；有機塩素系農薬は、年齢と共に上昇する傾向があり、南の地域で高く北に行くほど低くなる傾向があった。しかし、ダイオキシン濃度が高かった地域は北の地域であり、有機塩素系農薬の不純物としての職業曝露および環境曝露からの血中ダイオキシン濃度の上昇はないことが明らかとなった。

それぞれのチームで活発な研究が進んでおり、遺伝子レベルから集団レベルまでの研究領域があるが、総合して植物エストロゲンと人工の化学物質との内分泌攪乱作用における相互の関係を理解し、人のリスクアセスメントにつなげていくことが出来ると考えられる。

2. 研究実施体制

香山グループ

①研究分担グループ長名 香山不二雄（自治医科大学、主任教授）

②研究項目

1. 荒尾行知 助手 mRNAの安定化制御機構
2. 野本 聡 講師 エストロゲン抑制遺伝子の解明
3. 堀口兵剛 助教授 エリスロポイエチン産生制御に関する研究
4. 香山不二雄 教授 農家女性の血中農薬濃度、イソフラボン濃度解析

山田グループ

①研究分担グループ長名 山田耕路（九州大学大学院、教授）

②究項目

1. 山田 耕路 ヒト乳癌MCF-7細胞の増殖に及ぼすイソフラボンの作用
植物エストロゲンの分析法の確立
2. 立花 宏文 ヒト乳癌MCF-7細胞の増殖に及ぼすイソフラボンの作用

山下グループ

①研究究分担グループ長名 山下優毅（産業医科大学免疫学、教授）

②研究項目

1. 山下 優毅 内分泌攪乱物質のマウス脾臓細胞に対する影響
2. 吉田 安弘 内分泌攪乱物質のマウス脾臓細胞に対する影響

平野グループ

①研究分担グループ長名 平野 靖史郎 (国立環境研究所)

②研究項目

1. 平野 靖史郎 植物エストロジェンの骨芽細胞に対する影響
2. 菅野さな枝 植物エストロジェンの骨芽細胞に対する影響

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文 (原著論文) 発表

- Arao Y, Kikuchi A, Ikeda K, Nomoto S, Horiguchi H, and Kayama F.
A+U-rich-element RNA-binding factor 1/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D gene expression is regulated by oestrogen in the rat uterus.
Biochem. J, 361; 25-132, 2002
- Nomoto S, Arao Y, Horiguchi H, Ikeda K, Kayama F.
Oestrogen causes G2/M arrest and apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231.
Oncol Rep 2002 Jul-Aug;9(4):773-6
- Ikeda K, Arao Y, Otsuka H, Nomoto S, Horiguchi H, Kato S, Kayama F.
Terpenoids found in the umbelliferae family act as agonists/antagonists for ER(alpha) and ERbeta: differential transcription activity between ferutinine-liganded ER(alpha) and ERbeta.
Biochem Biophys Res Commun 2002 Feb 22;291(2):354-60
- Mori C, Hamamatsu A, Fukata H, Koh KB, Nakamura N, Takeichi S, Kusakabe T, Saito T, Morita M, Tanihara S, Kayama F, Shiyomi M, Yoshimura J, Sagisaka K.
Temporal changes in testis weight during the past 50 years in Japan.
Anat Sci Int 2002 Jun;77(2):109-16
- Kayama F, Horiguchi H. and Hamamatsu A
Potential health effects of alkylphenols in Japan.
JMAJ 46 (3); 108-114 2003
- Fujio Kayama, Arao Y, Hyogo Horiguchi, and Satoshi Nomoto
Naturally Occurring and Synthetic Xenoestrogens.
Environmental Science, 9, 1(2002) 051-055
- S. Kanno, S. Hirano, and F. Kayama (2002) Effects of 17b-estradiol, phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. Biomed. Res. Trace Elem. 13:328-329.
- Yamashita, U., Sugiura, T., Yoshida, Y. and Kuroda, E. : Effect of endocrine disrupters on murine thymocytes in vitro. Journal of UOEH, 25:161-170, 2003.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数 : 0件 (研究期間累積件数 : 0件)