

(独)科学技術振興機構
戦略的創造研究推進事業
于一△型研究(CREST)
追跡評価用資料

研究領域「内分泌かく乱物質」
(1998-2005)

研究総括 鈴木 継美

2012年5月31日

目次

第1章 調査概要	1
1. 追跡調査	1
(1) 調査の目的	1
(2) 調査の方法	1
2. アウトプット概要 (領域全体)	1
2.1 論文数から見た研究成果	1
2.2 大型研究助成金からみた研究の発展状況	2
2.3 特許からみた研究成果	2
3. アウトカム概要(領域全体)	7
3.1 受賞	7
3.2 学会・研究会等への貢献	7
第2章 研究領域及び各研究課題の成果・進展の概要	8
1. 研究領域概要	8
1.1 研究領域発足時の背景	8
1.2 戦略目標	8
1.3 領域概要	9
1.4 研究総括	9
1.5 領域アドバイザー	9
1.6 研究課題および研究代表者	10
2. 各研究課題の主な成果と継続状況	11
2.1 平成10年採択研究課題	11
(1) 内分泌かく乱化学物質の細胞内標的分子の同定と新しいバイオモニタリング	11
(2) 植物由来および人工の内分泌かく乱物質の相互作用	12
(3) ヒトを含む哺乳類の生殖機能への内分泌かく乱物質の影響	12
(4) リスク評価のためのダイオキシンによる内分泌かく乱作用の解明	13
(5) 核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質	13
(6) 内分泌かく乱物質の生体毒発現の分子メカニズムとモニター系の開発	14
(7) 性分化機構の解明	15
2.2 平成11年度採択研究課題	16
(1) 内分泌かく乱物質による精子形成異常に関与する癌遺伝子産物 DJ-1 と AMY-1	16
(2) 内分泌かく乱物質の動物への発生内分泌学的影響	16
(3) 内分泌かく乱物質のヒト生殖機能への影響	17
(4) 内分泌かく乱物質が減数分裂, 相同組換えに与える影響	18
(5) 内分泌かく乱物質の脳神経系機能発達への影響と毒性メカニズム	18
2.3 平成12年度採択研究課題	19
(1) 高感度質量分析計の開発と内分泌かく乱物質の分析	19

(2) ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン	20
(3) 大気中に存在する新しいタイプの内分泌攪乱物質	20
(4) 魚類生殖内分泌系に及ぼす内分泌かく乱物質の影響の分子メカニズム	21
(5) 生殖系での低濃度内分泌攪乱物質関連遺伝子データベースの構築	21
第3章 詳細調査	23
1. 研究課題 「核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質」	23
1.1 研究期間中における状況	23
1.2 研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況	25
1.3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果	27
1.4 研究成果から生み出された社会的、経済的な効果・効用および波及効果	28
2. 研究課題 「内分泌かく乱物質の動物への発生内分泌学的影響」	31
2.1 研究期間中における状況	31
2.2 研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況	34
2.3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果	34
2.4 研究成果から生み出された社会的、経済的な効果・効用および波及効果	35
3. 研究課題 「脳ニューロステロイド作用をかく乱する環境ホルモン」	38
3.1 研究期間中における状況	38
3.2 研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況	41
3.3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果	42
3.4 研究成果から生み出された社会的、経済的な効果・効用および波及効果	44
第3章のまとめ	46

第1章 調査概要

1. 追跡調査

(1) 調査の目的

戦略的創造研究推進事業において、研究終了後一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、JST 事業及び事業運営の改善等に資するために追跡調査を行う。

(2) 調査の方法

研究者代表者全員に対して、論文、研究助成金、特許、受賞などに関するデータベース調査を実施し、その結果を2. アウトプット概要として、2.1 論文数から見た研究成果、2.2 大型研究助成金から見た研究の発展状況、2.3 特許から見た研究成果としてまとめた。また、3.アウトカム概要として、3.1 受賞、3.2 学会・研究会等への貢献をまとめた。さらに、第2章第2節の各研究課題の①プロジェクト期間中の主な成果と②主な継続状況として、各研究代表者について、終了報告書や事後評価に上記データを加えて、概略を記載した。

2. アウトプット概要 (領域全体)

2.1 論文数から見た研究成果

論文発表件数の推移は研究者の研究活動を示す一つの指標であると考えられるため、CESRT 開始時からの論文数と終了後の論文数を比較した。

表 2-1 は論文データベース Scopus(エルゼビア社)の著者名検索を用いて、研究者名を特定し、その論文リストから、プロジェクト開始時から調査時点までならびにプロジェクト終了時から調査時点までの原著論文数を求めたものである。%はプロジェクト終了時からの論文数がプロジェクト開始時からの論文数の割合を示したもので、プロジェクト終了後の研究代表者の研究発展状況を知る指標とした。

表 2-1 プロジェクト期間からとプロジェクト終了後の論文数一覧

番号	研究課題	研究 代表者名	①PJ 開始時から の論文数	②PJ 終了後の論 文数	% ②/①	
H10-1	内分泌かく乱化学物質の細胞内標的分子の同定と新しいバイオモニタリング	梅澤喜夫 ²	1998～	146	2004～ 62	42.5%
H10-2	植物由来および人工の内分泌かく乱物質の相互作用	香山不二雄 ¹	1998～	61	2004～ 45	73.8%
H10-3	ヒトを含む哺乳類の生殖機能への内分泌かく乱物質の影響	堤 治 ¹	1998～	112	2004～ 34	30.4%

H10-4	リスク評価のためのダイオキシンによる内分泌かく乱作用の解明	遠山千春 ²	1998～	136	2004～	62	45.6%
H10-5	核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質	名和田 新 ²	1998～	291	2004～	135	46.4%
H10-6	内分泌かく乱物質の生体毒発現の分子メカニズムとモニター系の開発	藤井義明 ³	1998～	83	2004～	53	63.8%
H10-7	性分化機構の解明	諸橋憲一郎 ²	1998～	60	2004～	38	63.3%
H11-1	内分泌かく乱物質による精子形成異常に関与する癌遺伝子産物DJ-1とAMY-1	有賀寛芳 ¹	1999～	114	2005～	54	47.4%
H11-2	内分泌かく乱物質の動物への発生内分泌学的影響	井口泰泉 ¹	1999～	170	2005～	99	58.2%
H11-3	内分泌かく乱物質のヒト生殖機能への影響	岩本晃明 ¹	1999～	71	2005～	35	49.3%
H11-4	内分泌かく乱物質が減数分裂、相同組換えに与える影響	黒田雅彦 ¹	1999～	53	2005～	31	58.5%
H11-5	内分泌かく乱物質の脳神経系機能発達への影響と毒性メカニズム	黒田洋一郎 ¹	1999～	48	2005～	10	20.8%
H12-1	高感度質量分析計の開発と内分泌かく乱物質の分析	交久瀬五雄 ¹	2000～	12	2006～	1	8.3%
H12-2	脳ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン	川戸 佳 ²	2000～	44	2006～	20	45.5%
H12-3	大気中に存在する新しいタイプの内分泌攪乱物質	武田 健 ³	2000～	77	2006～	39	50.6%
H12-4	魚類生殖内分泌系に及ぼす内分泌かく乱物質の影響の分子メカニズム	長濱嘉孝 ²	2000～	145	2006～	44	30.3%
H12-5	生殖系での低濃度内分泌攪乱物質関連遺伝子データベースの構築	宮本 薫 ¹	2000～	66	2006～	18	27.3%

調査は 1: 2010 年 10 月実施、2: 2011 年 6 月実施、3: 2011 年 10 月実施

2.2 大型研究助成金からみた研究の発展状況

研究の展開を大枠で把握するために、表 2-2 に大型研究費の取得状況を纏めて示した。研究代表者のほとんどはプロジェクト期間中あるいは終了後、文部科学省の科研費、厚生労働省の厚生労働科学研究費補助金、JST の発展研究(SORST)、大学発ベンチャー創出推進事業、バイオインフォマティクス推進事業等の研究補助金を得て、研究をさらに展開していることが窺える。

2.3 特許からみた研究成果

特許出願ならびに登録件数は基礎研究から産業への貢献を分析する一つの指標であると考えられるため、本研究領域から出願し登録された特許を表 2-3 にまとめた。

梅澤 喜夫はプロジェクト期間中から調査時点までに出願した特許は最大数の 20 件におよび、その半数の 10 報が特許番号を有し、登録されている。名和田 新は出願件数 3 件のうち 1 件が登録されている。井口泰泉、岩本晃明および宮本 薫はそれぞれ出願件数 2 件、4 件、4 件のうち 1 件が登録されている。また、黒田洋一郎および交久瀬五雄は出願 1 件であるが、いずれも登録されている。その他の研究者も 1-3 件の出願をしているが、現時点での登録は認められていない。

表 2-2 研究補助金の取得状況

研究 代表 者	N o	事業名	機関名	テーマ	期間
梅澤喜夫	1	大学発ベンチャー創出推進事業 平成16年度採択 開発代表者：梅澤 喜夫 起業家：木村 廣道	JST	独自の非侵襲可視化技術を用いた生体内シグナルの動態解析試薬等の開発	2004～2007年 (会社設立2006年)
	2	科研費 基盤研究(S)(代表者)	文部科学省	細胞内及び膜界面の分子を可視化する新手法の創案と展開	2003～2007年度 (104,910千円)
香山不二雄	1	厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究 食品の安心・安全確保推進研究(主任研究者)	厚生労働省	カドミウムを含む食品の安全性に関する研究	2004～2006年度
	2	厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究分野 食品の安心・安全確保推進研究(主任研究者)	厚生労働省	カドミウムを含む食品の安全性に関する研究	2005～2007年度
遠山千春	1	厚生労働科学研究費補助金 健康安全総合研究経費 食品医薬品等リスク分析研究(化学物質リスク研究事業)(主任研究者)	厚生労働省	コプラナーPCBの非ダイオキシン毒性の識別によるダイオキシン耐容摂取量の設定のあり方に関する研究(総括研究報告書)	2002～2004年度
名和田新	1	厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究分野 化学物質リスク研究(主任研究者)	厚生労働省	アロマターゼ高発現KGN細胞および三次元共焦点顕微鏡による内分泌代謝攪乱物質のスクリーニングシステムの開発	2002～2004年度
	2	21世紀COEプログラム平成15年度採択拠点事業<医学系>(事業推進担当者)(リーダー)	(独)日本学術振興会	大規模コホートに基づく生活習慣病研究教育 -久山型研究を応用した日本人特有の発症因子の解明と先端医療の開発-	2003～2007年度 (927,500千円)
藤井義明	1	戦略的創造研究推進事業 発展研究(研究代表者)	JST/SORST	ダイオキシン受容体の生体における本来的機能の解明	2003～2008年度
	2	戦略的創造研究推進事業 ERATO 型研究(研究員)	JST/ERATO	加藤核内複合体プロジェクト	2004～2009年度
諸橋憲一郎	1	新学術領域研究(研究領域提案型)(研究代表者)	文部科学省	「性差構築の分子基盤」の領域運営と支援活動	2010～2011年度 (15,210千円)
	2	新学術領域研究(研究領域提案型)(研究代表者)	文部科学省	性特異的エンハンサーを介した性差構築	2010～2011年度 (81,900千円)
	3	特定領域研究(研究代表者)	文部科学省	性分化を制御する遺伝子カスケード解明	2004～2008年度 (264,000千円)

有賀寛芳	1	厚生労働科学研究費補助金 先端的厚生科学研究分野 こころの健康科学研究(主任研究者)	厚生労働省	パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子 DJ-1 の機能と創薬応用	2003～2006 年度
井口泰泉	1	厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究分野 化学物質リスク研究(分担研究者)	厚生労働省	形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムの解明及びその評価手法にかかる総合研究	2007～2009 年度
	2	厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究 化学物質リスク研究(分担研究者)	厚生労働省	内分泌かく乱化学物質の生体影響メカニズム(低用量効果・複合効果を含む)に関する総合研究	2004～2006 年度
岩本晃明	1	厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究分野 食品の安心・安全確保推進研究(分担研究者)	厚生労働省	熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究	2003～2005 年度
黒田雅彦	1	厚生労働科学研究費補助金 疾病・障害対策研究分野 第3次対がん総合戦略研究(分担研究者)	厚生労働省	システム生物学的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索	2007～2009 年度
	2	厚生労働科学研究費補助金 厚生科学基盤研究分野 政策創薬総合研究(分担研究者)	厚生労働省	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	2004～2006 年度
川戸佳	1	厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究分野 化学物質リスク研究(分担研究者)	厚生労働省	形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムの解明及びその評価手法にかかる総合研究	2007～2009 年度
	2	バイオインフォマティクス推進事業	JST	脳スライス中で可視化した神経シナプスの自動解析	2005～2008 年
	3	感情障害の発症脆弱性素因に関する神経発達・神経新生的側面からの検討並びにその修復機序に関する分子生物学的研究(分担研究者)	厚生労働省	感情障害の発症脆弱性素因に関する神経発達・神経新生的側面からの検討並びにその修復機序に関する分子生物学的研究	2002～2004 年度
武田健	1	厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究分野 化学物質リスク研究(代表研究者)	厚生労働省	ナノマテリアルの健康影響の評価手法に関する総合研究	2008～2010 年度
長濱嘉孝	1	特定領域研究(代表研究者)	文部科学省	魚類における性決定と生殖腺の性分化の分子メカニズム	2004～2008 年度 (74,800 千円)

表 2-3 登録特許リスト

研究 代表者	出願 番号	公開番 号	特許番号	発明者/ 考案者	出願人 /権利者	発明の名称	国際出願番号
梅澤 喜夫	特 願 2000- 133017	特 開 2001 -318092	特許 004121688 号 (2008.05.09)	梅澤 喜夫, 手島玲子, 澤田 純一, 明谷早映子	JST	アレルギー原因物質の特定 方法	-
	特 願 2000- 202730	特 開 2002- 017359	特許 003643520 号 (2005.02.04)	梅澤 喜夫, 佐藤 守俊, 小澤 岳昌	JST	cGMP 可視化プローブ及び それを利用した cGMP の 検出・定量方法	WO0203069 (A1) 2002.01.10 (US7329494 (B2) 2008.02.12 US6924119 (B2) 2005.08.02 EP1235073 (B1) 2008.12.31 CA2384170 (C) 2006.02.14)
	特 願 2002 -272043	特 開 2004- 108943	特許 004287633 号 (2009.04.03)	梅澤 喜夫, 小澤 岳昌	JST	オルガネラ局在タンパク質 の解析方法と解析材料	WO2004027057(A1)2004.04. 01 (EP1541679 (B1) 2009.12.23)
	特 願 2002 -514409		特許 003772193 号 (2006.02.24)	梅澤 喜夫, 小澤 岳昌	JST	蛋白質-蛋白質相互作用解 析用プローブ及びそれを利用 した蛋白質-蛋白質相互 作用の解析方法	WO0208766 (A1) 2002.01.31 (JP3772193 (B2) 2006.05.10 US7166447 (B2) 2007.01.23 EP1229330 (B1) 2007.02.21)
	特 願 2002- 572395		特許 003956214 号 (2007.05.18)	梅澤 喜夫, 青木 寛	JST	核酸塩基対相補性の電気化 学的検出方法	WO02073183 (A1) 2002.09.19 (JP3956214 (B2) 2007.08.08 US7169614 (B2) 2007.01.30 CA2441180 (C) 2008.08.12)
	特 願 2002- 575624		特許 003888974 号 (2006.12.08)	梅澤 喜夫, 佐藤 守俊, 小澤 岳昌	JST	蛋白質リン酸化・脱リン酸 化可視化プローブとそれを 用いた蛋白質リン酸化・脱 リン酸化の検出および定量 方法	WO02077623 (A1) 2002.10.03 (JP3888974 (B2) 2007.03.07US7425430 (B2) 2008.09.16CA2410460 (C) 2010.06.29)
	特 願 2003- 120253	特 開 2004- 325253	特許 003878922 号 (2006.11.10)	梅澤 喜夫, 佐藤 守俊	JST	脂質セカンドメッセンジャ ー検出・定量用プローブと それを用いた脂質セカンド メッセンジャーの検出およ び定量方法	WO2004095024(A1) 2004.11.04 (US7507555 (B2) 2009.03.24 CA2523466 (C) 2009.12.22)
	特 願 2005- 518070		特許 004485475 号 (2010.04.02)	梅澤 喜夫, 佐藤 守俊	JST	核内レセプターのアゴニス ト・アンタゴニスト検出用 プローブとそれを用いた核 内レセプターに対するアゴ ニストおよびアンタゴニス トのスクリーニング方法	WO2005078119(A1) 2005.08.25 (JP4485475 (B2) 2010.06.23)
	特 願 2006- 510829		特許 004628355 号 (2010.11.19)	梅澤 喜夫, 小澤岳昌	JST	蛋白質核内移行検出用プロ ーブとそれを用いた蛋白質 核内移行の検出・定量方法	WO2005085439(A1) 2005.09.15 (JP4628355 (B2) 2011.02.09 CA2559299 (C) 2010.08.17)
	特 願 2008- 548903		特許 004491516 号 (2010.04.16)	梅澤喜夫, 小澤岳昌, 菅野 憲	東京大学,自 然科学研究 機構	活性化プロテアーゼインジ ケーター	WO2008140060(A1) 2008.11.20 (JP4491516 (B2) 2010.06.30)
名和田 新	特 願 2000 -613468		特許 004509395 号 (2010.05.14)	中牟田 誠, 名和田 新, 上畑 雅義	田辺三菱製 薬株式会社	肝臓疾患の予防治療薬	WO0064478 (A1) 2000.11.02 (JP4509395 (B2) 2010.07.21 US6794398 (B1) 2004.09.21 EP1177796 (B1) 2011.04.27 CN100438910 (C) 2008.12.03 CA2369560 (C) 2011.02.01)

井口泰泉	特願 H11-333246	特開 2001-149928	特許 004304281号 (2009.05.15)	木村太門, 清原正勝, 庄野信浩, 中山千秋, 窪田吉信, 藤嶋昭, 井口泰泉, 中島哲人, 丹羽智佐	TOTO株式会社, (財)神奈川科学技術アカデミー, JST	女性ホルモン類 除去システム	-
岩本晃明	特願 2002-314256	特開 2004-002279	特許 004327436号 (2009.06.19)	藤至, 吉池美紀, 吉田薫, 岩本晃明, 向井敏二, 児島浩一郎, 山崎肇史, 高野昇一	聖マリアンナ医大, 神奈川県	セミノジェリンの精子運動抑制因子(SPMI)部分を認識するモノクローナル抗体、及び、これを用いる検出方法	-
	特願 H11-092060	特開 2000-283982	特許 004233169号 (2008.12.19)	岩本晃明, 吉池美紀, 佐藤至	聖マリアンナ医大, 神奈川県	精液の検出方法	-
黒田洋一郎	特願 H08-126419	特開 H09-286727	特許 003808130号 (2006.05.26)	角田隆巳, 野沢歩, 瀧原孝宣, 坂根巖, 黒田洋一郎	株式会社伊藤園	グルタミン酸拮抗剤及び神経細胞死予防剤	-
交久瀬五雄	特願 2002-157152	特開 2003-346701	特許 004009900号 (2007.09.14)	石原盛男, 豊田岐聡, 交久瀬五雄	(財)新産業創造研究機構	イオンビーム用像縮小レンズ系及び質量分析装置	-
宮本薫	特願 2002-366512	特開 2004-196700	特許 004140951号 (2008.06.20)	宮本薫, 山田一哉	JST	転写制御因子 ZHX3	WO2004055051(A1) 2004.07.01 (EP1574519 (B1) 2010.01.27 CA2499354 (C) 2010.01.26)

3. アウトカム概要(領域全体)

3.1 受賞

本プロジェクト終了後に数名の研究代表者は研究成果が評価され、表 3-1 に示した賞を受賞している。これらより、本研究領域からの化学会、内分泌学会や医学会などへの貢献が窺える。

表 3-1 受賞リスト

研究者名	受賞名	年度
梅澤 喜夫	日本化学会賞	2006 年度(平成 18 年度)
遠山千春	日本衛生学会 学会賞	2010 年(平成 22 年)
遠山 千春	日本リスク研究学会 学会賞	2008 年(平成 20 年)
名和田 新	日本骨代謝学会 特別賞	2005 年(平成 17 年)
名和田 新	第 1 回日本内分泌学会 学会賞	
藤井 義明	高松宮妃癌研究基金学術賞 「クローム P450 の化学発癌における役割とその発現抑制」	2006 年 2 月 (平成 17 年度)
諸橋 憲一郎	Asia & Oceania Medal, イギリス内分泌学会	2007 年(平成 19 年)
武田 健	日本薬学会学術貢献賞第 4B 部門 「ナノマテリアルの次世代健康科学～衛生薬学の新たな研究領域の開拓」	2011 年(平成 23 年)
井口 泰泉	日本動物学会賞	2011 年 9 月予定

3.2 学会・研究会等への貢献

環境ホルモン学会(正式名：日本内分泌攪乱化学物質学会)は、内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の研究に関する情報交換や成果の発表の場として、本研究領域の発足と同時期の 1998 年 6 月に発足した学会で、表 3-2 に示した研究者は本学会の創設や運営に貢献している。

表 3-2 学会に貢献した研究者

研究者名	学会・研究会名	創設・貢献	備考
香山不二雄	日本内分泌攪乱化学物質学会	創設に貢献	元理事
堤 治	日本内分泌攪乱化学物質学会	創設・運営に貢献	現副会長
遠山千春	日本内分泌攪乱化学物質学会	創設・運営に貢献	現副会長
井口泰泉	日本内分泌攪乱化学物質学会	創設・運営に貢献	現副会長
黒田 洋一郎	日本内分泌攪乱化学物質学会	運営に貢献	現理事

第 2 章 研究領域及び各研究課題の成果・進展の概要

1. 研究領域概要

1.1 研究領域発足時の背景

本領域は、所謂「内分泌かく乱物質問題」が大きな社会的関心となっていた平成10年度(1998年度)に補正予算で急遽発足したという経緯があり、他のCREST研究領域とは若干性格を異にしているところがある。それは、CREST 本来の役割である基礎研究の推進に加え、可能な限り早期に問題解決への手掛かりを提供することを求められているなど、「社会的貢献」をより強く期待されていた。¹⁾

また、戦略目標を達成するために、他の研究領域の様に特定の学問分野で深く掘り下げた先端的な基礎研究を推進するだけでなく、野生生物への影響からヒトへの影響、生殖機能への影響から高次精神活動への影響といった、極めて幅広い学問分野をカバーしつつ、先端的な研究を推進するとともに、その結果を総合的に判断しなければならないと云う困難な課題が併在していた。

そこで、内分泌かく乱物質問題の本質的理解と解決をめざした研究、具体的には、「ヒトや野生生物を対象とした内分泌系への作用メカニズムの解明」、これを発端とする「生殖、神経／行動、発達、免疫等への影響のメカニズムの解明」、「ヒト及び生態系に対する個別さらには複数の内分泌かく乱物質に関する量と影響、量と反応の関係の評価」、「それらをもとにした対策技術に関する研究」が社会的にも期待され始めた時期にあたる。また、社会不安への対策として行政が規制を実施する場合の科学的根拠を提供するレギュラトリーサイエンスとしての側面や、OECD 等に代表される国際的ネットワークへの貢献にも留意して研究は推進された。

1.2 戦略目標

「環境にやさしい社会の実現」

地球上の人口は現在約58億人であり、1970年を境に増加は減速しつつあるものの、依然として年率1.5%で増加しており、2025年には83億人、2050年には98億人に達すると予想されている。今後人類が、真に豊かで快適な生活を実現し、維持していくためには、地球規模での無制限な開発や化石燃料の過剰使用等による環境の破壊を来すことなく、必要な食料及びエ

エネルギーを確保するとともに、種々の人間活動やその結果生じる廃棄物等の生態系への影響を極力低減していくことが重要である。近年顕在化してきた内分泌かく乱物質の問題については、科学的に不明な点が数多く残されており、早急に知見を集積し、必要な対策を立てていくことが重要である。

このためには、地球規模の諸現象の解明とその予測を行うとともに、これらを基礎として人間の諸活動の環境への影響を正確に把握することや、環境保全関連技術の確立、内分泌かく乱物質の生体への影響の把握が不可欠であり、それらを踏まえて環境にやさしい社会を構築していくことが必要である。

したがって、戦略目標を、地球変動のメカニズムの解明とその予測、環境への影響の把握、環境保全関連技術の確立、内分泌かく乱物質の生体への影響メカニズムの解明等により人間の諸活動の環境への負荷の低減を目指す「環境にやさしい社会の実現」とする。

1.3 領域概要

内分泌かく乱物質問題の本質的な理解と解決をめざした研究を対象とするものです。

具体的には、ヒトや野生動物を対象とした内分泌系への作用メカニズムの解明、これを発端とする生殖、神経／行動、発達、免疫等への影響のメカニズムの解明、ヒトおよび生態系に対する個別さらには複数の内分泌かく乱物質に関する量と影響、量と反応の関係の評価、それらをもとにした対策技術に関する研究等を対象とする。

1.4 研究総括

鈴木継美 (東京大学名誉教授 故人 2010年逝去)

1.5 領域アドバイザー

表 1-5 領域アドバイザーリスト

領域 アドバイザー	所属	役職	任期
井上 達	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター	センター長	平成15年8月 ～平成18年3月
井村 伸正	財)日本薬剤師研修センター	理事長	平成10年11月 ～平成18年3月
加藤 順子	株)三菱化学安全科学研究所 リスク評価研究センター	副センター長	平成15年8月 ～平成18年3月
紫芝 良昌	国家公務員共済組合連合会 三宿病院	前院長	平成10年11月 ～平成18年3月
松下 秀鶴	静岡県顧問	試験研究高度化推進担当	平成10年11月 ～平成18年3月
安野 正之	滋賀県立大学	前教授	平成10年11月 ～平成18年3月
寺尾 允男	国立医薬品食品衛生研究所	所長	平成10年11月 ～平成15年3月
宮本 純之	財)化学物質評価研究機構	技術顧問	平成10年11月 ～平成15年3月

1.6 研究課題および研究代表者

研究課題(研究者)の公募は平成10年度から3年間、3期にわたり、総計17件の研究課題を採択した。表1-2に各期の研究課題、研究代表者、採択当時の所属機関と役職ならびに現在の所属と役職を示した。

表 1-6 研究課題と研究者の所属

番号	研究課題	研究者名	所属(PJ時)	現所属
H10(1)	内分泌かく乱化学物質の細胞内標的分子の同定と新しいバイオモニタリング	梅澤 喜夫	東京大学大学院 理学系研究科 教授	武蔵野大学薬学研究所 客員教授
H10(2)	植物由来および人工の内分泌かく乱物質の相互作用	香山 不二雄	自治医科大学 保健科学講座 教授	自治医科大学保薬理学講座 教授
H10(3)	ヒトを含む哺乳類の生殖機能への内分泌かく乱物質の影響	堤 治	東京大学大学院 医学系研究科 教授	山王病院 院長
H10(4)	リスク評価のためのダイオキシンによる内分泌かく乱作用の解明	遠山 千春	(独)国立環境研究所 環境健康研究領域 領域長	東京大学大学院医学系研究科 教授
H10(5)	核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質	名和田 新	九州大学大学院 医学研究院 教授	福岡県立大学 学長
H10(6)	内分泌かく乱物質の生体毒発現の分子メカニズムとモニター系の開発	藤井 義明	筑波大学先端学際領域 研究センター 客員教授	東京医科歯科大学大学院 客員教授
H10(7)	性分化機構の解明	諸橋 憲一郎	岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 教授	九州大学大学院医学研究院 教授
H11(1)	内分泌かく乱物質による精子形成異常に関与する癌遺伝子産物 DJ-1 と AMY-1	有賀 寛芳	北海道大学大学院 薬学研究科 教授	北海道大学大学院薬学研究科 教授
H11(2)	内分泌かく乱物質の動物への発生内分泌学的影響	井口 泰泉	岡崎国立共同研究機構 統合バイオサイエンスセンター 教授	自然科学研究機構・基礎生物研究所 岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授
H11(3)	内分泌かく乱物質のヒト生殖機能への影響	岩本 晃明	聖マリアンナ医科大学 泌尿器科 教授	国際医療福祉大学 教授
H11(4)	内分泌かく乱物質が減数分裂、相同組換えに与える影響	黒田 雅彦	東京医科大学病理学講座 講師	東京医科大学医学部病理診断部 主任教授
H11(5)	内分泌かく乱物質の脳神経系機能発達への影響と毒性メカニズム	黒田 洋一郎	(財)東京都神経科学総合研究所 客員研究員	不明
H12(1)	高感度質量分析計の開発と内分泌かく乱物質の分析	交久瀬 五雄	大阪大学 名誉教授	大阪大学 名誉教授
H12(2)	脳ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン	川戸 佳	東京大学大学院 総合文化研究科 教授	東京大学大学院総合文化研究科 教授
H12(3)	大気中に存在する新しいタイプの内分泌攪乱物質	武田 健	東京理科大学薬学部 教授	東京理科大学薬学部 教授
H12(4)	魚類生殖内分泌系に及ぼす内分泌かく乱物質の影響の分子メカニズム	長濱 嘉孝	自然科学研究機構 基礎生物学研究所 教授	自然科学研究機構基礎生物学研究所 研究員
H12(5)	生殖系での低濃度内分泌攪乱物質関連遺伝子データベースの構築	宮本 薫	福井大学医学部 教授	福井大学医学部 教授

2. 各研究課題の主な成果と継続状況

2.1 平成 10 年採択研究課題

(1) 内分泌かく乱化学物質の細胞内標的分子の同定と新しいバイオモニタリング

梅澤 喜夫 (東京大学大学院理学系研究科 教授)

①プロジェクト期間中の主な成果

多数の細胞内情報伝達過程を可視化する独創的なプローブ／解析法を創案・開発し、女性ホルモン受容体に対するアゴニスト／アンタゴニスト的作用の識別、蛋白質の相互作用／細胞内オルガネラ局在性／核内移行／リン酸化、セカンドメッセンジャーの動態等を、生きた細胞中で時間的・空間的に解析する事を可能にした。当時は蛋白質間相互作用可視化プローブ、蛋白質リン酸化プローブ、セカンドメッセンジャープローブ(cGMP, PIP3, DAG, IP3, NO など)、オルガネラ局在蛋白質同定プローブなど、融合蛋白質から成る 10 数種を作成した。開発した可視化プローブ類は、細胞シグナルの基礎研究用試薬、病態の診断、薬物のスクリーニング等にも役立つものである(Nature Cell Biol., AOP (2003), Nature Biotech., 21, 287 (2003), JBC, 247, 30945 (2003), Nature Biotech., 20, 287 (2002), PNAS, 99, 15608 (2002)。

これらの方法によって初めて明らかにされた細胞内情報伝達過程や、EGF 受容体と女性ホルモン受容体の相互作用等の新しい知見も含め、極めてインパクトの大きい研究成果であった。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

これらの研究成果は、細胞内情報伝達において鍵となる生体情報分子を可視化計測する技術として、単に「内分泌かく乱物質」領域の研究に止まらず、基礎生物学、分子生物学、医学等の広範の学問分野に、新しい視点や解析手法を提供するものとして、その発展に大きく貢献している。

2004年度にはJSTの大学発ベンチャー創出推進事業に採択され、「独自の非侵襲可視化技術を用いた生体内シグナルの動態解析試薬等の開発」へと研究開発を展開している。2006年7月には(i)研究用プローブ試薬の販売事業、(ii) 研究用プローブ試薬の受託開発事業、(iii)プローブ試薬の構築、アッセイ系構築に係るコンサルティング事業を実施するベンチャー企業、株式会社 ProbeXを設立している。検出法や定量法の技術やプローブなどに関して、精力的に出願した特許20件のうち、登録数が10件に及んでいる点で、事業化には有利と思われる。

一方、梅澤は大学教授として、教育の責任を強く意識して、若手研究者の育成のために、「機器分析実験(2002年、東京化学同人)」、「基礎分析化学実験(2004年、東京化学同人)」、「先端の分析法—理工学からナノ・バイオまで(エヌ・ティー・エ,2004年)」等、多くの教科書を出版している。

これらの成果が評価され、2005年には、日本分光学会賞を受賞している。また、2006年度には「イオン・分子の可視化と検出のための新手法」で、日本化学会賞を受賞している。

(2) 植物由来および人工の内分泌かく乱物質の相互作用

香山 不二雄 (自治医科大学保健科学講座 教授)

①プロジェクト期間中の主な成果

植物エストロゲンには多様な種類があり、転写レベルおよび転写後レベルでもそれぞれ多様な作用機序を示すことが明らかにした。化学形が異なると作用や代謝に大きな違いがあるので、イソフラボン配糖体とアグリコン体とでは作用が異なる事等、興味深い結果を得た。植物エストロゲンも多量に摂取すれば悪影響があり、適量の摂取が健康の維持増進に効果があることが明らかとなった。また、ダイオキシン類や有機塩素系農薬のヒトの体内存在量は前者に比べ1000倍以下の濃度であるが、農村地域主婦人体中ダイオキシン濃度と有機塩素系農薬汚染に相関が見られなかった。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

香山は、本研究領域の発足と同時期の1998年6月には、環境ホルモン学会(正式名：日本内分泌攪乱化学物質学会)を創設し、環境ホルモンとその影響についての学問・技術の進歩発展及び環境の改善に寄与している。2004～2007年度まで、厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究 食品の安心・安全確保推進研究において、「カドミウムを含む食品の安全性に関する研究」を実施している。

また、厚生労働省 薬事・食品衛生審議会 食品規格部会委員、内閣府 食品安全委員会 汚染物質専門調査会委員、環境省 内分泌攪乱物質問題検討委員会の委員等を務め、幅広く専門家としての活躍を続けている。

2002年には第9回日本免疫毒性学会 会長賞を受賞し、研究成果が認められている。

(3) ヒトを含む哺乳類の生殖機能への内分泌かく乱物質の影響

堤 治 (東京大学大学院医学系研究科 教授)

①プロジェクト期間中の主な成果

内分泌かく乱物質の汚染実態を明らかにするため、ヒト試料(血液、卵胞液、精液、胎児血、羊水、胆汁等)においてビスフェノール A (BPA)やダイオキシンに加えてノニルフェノール等を検出し、その濃度を定量的に評価した。その結果、様々な内分泌かく乱物質が複合的に生殖器官を汚染し、母体から胎児への汚染動態を明らかにした。内分泌かく乱物質の作用検出系としてマウス胚培養系を考案し様々な内分泌かく乱物質の作用濃度を明らかにし、低用量作用や次世代影響の存在を示した。内分泌かく乱物質と各種生殖パラメーター、子宮内膜症を含む疾患との量-反応関係や遺伝子、分子レベルの解析をおこなった。

産婦人科医としての立場から、母体血、母乳、羊水、臍帯血等の試料を用いて、胎児汚染の実態を明らかにし、母体・胎児汚染、汚染経路、胎児肝機能の重要性等々が示した。臨床試料を用いて母体や胎児の汚染状況を明らかにし、大きな社会的インパクトを与えた。

②主な継続状況(PJ 終了後)

初期胚を用いた化学物質評価系や子宮内膜症モデル等は、内分泌かく乱物質関連研究ばかりでなく、生物学、薬学、医学等々、様々な研究分野にも応用展開が可能であり、発展が期待されていたが、プロジェクト終了後、研究は継続していない。現在は病院長として、生殖医療に関わるとともに、日本内分泌攪乱化学物質学会の副会長として活躍している。

(4) リスク評価のためのダイオキシンによる内分泌かく乱作用の解明

遠山 千春 ((独)国立環境研究所環境健康研究領域 領域長)

①プロジェクト期間中の主な成果

低用量の2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-p-ジオキシンやコプラナーポリ塩素化ビフェニルを、感受性が高い受精卵から新生児までのラット・マウスに投与し、生殖、脳機能、免疫機能に着目をして個体・臓器・細胞・遺伝子レベルへの影響を探り、用量・反応関係を調べた。その結果、低用量曝露による様々なエンドポイントの変化、感受性が高い臨界時期の存在、アリアル炭化水素受容体に依存的毒性と非依存的毒性、動物種や系統間の感受性の差異についての新たな知見が得られた。

「内分泌かく乱物質問題」に対する啓蒙的論文も多く、ダイオキシンの「母乳問題」、「アトピー発症問題」等に対してもタイムリーな情報発信を行っており、レギュラトリー・サイエンスの観点から高く評価された。そのなかでも、雄性生殖器への影響のデータが、2001年のWHO/FAOでの耐容摂取量(TDI)設定の根拠データとして採用された。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

TDI 根拠文献として採用された論文で問題提起している、PCB類の非ダイオキシン受容体依存的毒性に対する新たなリスク評価手法の開発の必要性も含め、進展に期待された。2002～2004年度には、厚生労働科学研究費補助金 健康安全総合研究経費 食品医薬品等リスク分析研究(化学物質リスク研究事業)で、「コプラナーPCBの非ダイオキシン毒性の識別によるダイオキシン耐容摂取量の設定のあり方に関する研究」を展開している。また、2003年からは内閣府食品安全委員会・汚染物質調査専門部会委員、容器包装調査専門部会委員、2008年からはWHOの「Temporary Advisor for the risk assessment of environmental chemicals」を務め、世界的に活躍している。なお、2008年には日本リスク研究学会 学会賞を、2010年には日本衛生学会 学会賞を受賞している。

(5) 核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質

名和田 新 (九州大学大学院医学研究院 教授)

①プロジェクト期間中の主な成果

核内受容体・転写共役因子複合体系の攪乱を介した内分泌かく乱物質(ED)の作用を、三次元共焦点顕微鏡を用いて視覚的に検出する方法を開発し、抗アンドロゲン剤の作用機構を可視化するとともに、抗アンドロゲン剤の germ cell に与える影響、アロマターゼ活性を抑制する有

機スズ化合物、活性を亢進させるベノミルの作用機序を明らかにした。エストロゲン受容体 α を特異的に誘導する環境化学物質ブチルベンジルフタレート(BBP)が、AF-1 転写活性を誘導することにより乳癌細胞の増殖を促進することを明らかにした。

男性ホルモン受容体にリクルートされる転写共役因子を明らかにし、さらに、女性ホルモン受容体についても、転写共役因子がED の作用発現に重要な役割を果たしている事を明らかにした。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

核内受容体・転写共役因子複合体に関する研究成果は、ED の作用機構の理解はもとより、遺伝子発現調節機構の理解にも大きく貢献するもので、技術的にも、本研究で確立された手法や細胞は、直ちにED スクリーニング系として利用可能であるばかりでなく、基礎研究や応用研究にも大きく貢献すると期待された。2002～2004年度には厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究分野 化学物質リスク研究において、「アロマターゼ高発現KGN細胞および三次元共焦点顕微鏡による内分泌代謝攪乱物質のスクリーニングシステムの開発」を、2003～2007年度には、21世紀COEプログラム平成15年度採択拠点事業のリーダーとして、「大規模コホートに基づく生活習慣病研究教育-久山型研究を応用した日本人特有の発症因子の解明と先端医療の開発-」で、疫学的観点からも研究を発展させている。なお、2005年には日本骨代謝学会 特別賞を受賞している。

(6) 内分泌かく乱物質の生体毒発現の分子メカニズムとモニター系の開発

藤井 義明 (筑波大学先端学際領域研究センター 客員教授)

①プロジェクト期間中の主な成果

ダイオキシン受容体(AhR)がダイオキシン(TCDD)などの外来異物によって活性化され、Arnt とヘテロ 2 量体を形成して標的遺伝子を活性化するメカニズムを明らかにした。また、AhR の欠失マウスを作製して TCDD などの示す催奇形性や発癌性に AhR が関わっていることを示した。さらに、AhR 欠失雌マウスは不妊となり、AhR が生殖リサイクルに関与していることを示した。リガンドの結合によって活性化された AhR が Arnt とヘテロ 2 量体を形成して、E2 の結合していない ER α 及び ER β に結合して E2 標的遺伝子の発現を活性化するメカニズムを明らかにした。

AhRと結合したダイオキシンがエストロゲンと結合していない女性ホルモン受容体(ER)と結合して転写活性を促進する事、ヒトAhR 導入マウスはダイオキシン感受性が低下する等、AhR 欠損マウスはベンツピレンの代謝活性化が起らず発癌が生じない事、AhR がアロマターゼの発現を調節している事、AhR リプレッサーによるAhR 機能の調節機構等、ダイオキシンの作用機構を明確に説明し、AhR の本来の機能に迫り、さらにダイオキシンのヒトに対するリスク評価にも示唆を与える極めてインパクトの高い世界的をリードする成果を挙げている。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

ダイオキシン等に対する感受性の動物種間差異を検定する系も開発しており、ヒトや野生生

物に対する耐容量の設定等にも応用可能であることが期待された。2003～2008年度にはSORSTの研究代表者として、「ダイオキシン受容体の生体における本来的機能の解明」において、AhRの生殖における役割、免疫、皮膚における役割を解明し、AhRが魚類から哺乳類まで保存されている進化的意義を明らかにすると同時に外来異物に対する生体応答の理解をさらに深化させた。また、2004～2009年度には、ERATO「加藤核内複合体プロジェクト」に研究員として参画し、AhRと性ホルモン受容体群との機能的クロストークの分子機構の解明の過程で、AhRがユビキチンE3リガーゼ複合体の主要構成因子であることを証明し、研究を展開している。

これらの成果が、高く評価され、2006年には高松宮妃癌研究基金学術賞を受賞している。

(7) 性分化機構の解明

諸橋 憲一郎（岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 教授）

①プロジェクト期間中の主な成果

有性生殖を行なう生物種は生殖細胞を通じ、次世代に遺伝情報を受け継ぐシステムを構築してきた。この生殖のプロセスこそが地球上の多様な種の繁栄を可能にした基本原理であり、従ってその基盤となる性の分化は重要な生命活動と位置付けられる。生殖腺の性分化機構に関する研究を行ない、自らが発見した生殖腺発生に不可欠な因子Ad4BP/SF-1を中心に据え、生殖腺分化を制御する新たな因子を多数同定するとともに、これらの遺伝子によって構成される遺伝子カスケードの一部を明らかにした。

また、性分化は性ホルモンのみではなく、多数の蛋白質(受容体、転写調節因子等)の複雑な相互作用によるものである事を明らかにした。さらに、性分化異常症の原因遺伝子を明らかにしたほか、ダイオキシンの女性ホルモン様作用発現機構の解明、ダイオキシン受容体のリン酸化による制御の発見等、内分泌かく乱物質(ED)の作用機構解明の基礎となる重要な知見を得た。

② 主な継続状況(PJ終了後)

性分化異常を伴うヒト遺伝性疾患XLAGにおけるARX遺伝子の役割に関する研究成果は、滑脳症の診断等に応用可能であり、2004年と2006年に特許が公開されているが、現時点で特許は成立していない。

遺伝子破壊、導入、自然発症マウス等を多数収集し、遺伝的背景をC57BL/6及びFVBに統一して維持しており、交配実験の結果から、遺伝子の相互作用、カスケード解析手法としての有効性が示唆され、2004～2008年度には科研費 特定領域研究「性分化を制御する遺伝子カスケード解明」において、さらに研究を展開した。2010～2011年度には科研費 新学術領域研究「性差構築の分子基盤」の領域代表として活躍しながら、研究を発展させている。

さらに、2006年からEndocrinology、Sexual DevelopmentやMolecular Endocrinologyの編集委員を務め、学会に貢献している。また、2009年には「NHKスペシャル：シリーズ 女と男 最新科学が読み解く性」の番組作成に協力し、社会へ情報を発信している。

なお、2007年には Asia & Oceania Medal, イギリス内分泌学会を受賞している。

2.2 平成 11 年度採択研究課題

(1) 内分泌かく乱物質による精子形成異常に関与する癌遺伝子産物 DJ-1 と AMY-1

有賀 寛芳 (北海道大学大学院薬学研究科 教授)

① プロジェクト期間中の主な成果

DJ-1 は転写調節, 抗酸化ストレス, プロテアーゼの 3 つの機能を有し、の機能破綻がパーキンソン病, 男性不妊原因となる。アンドロゲンアンタゴニストにより DJ-1 はアンドロゲン受容体との核での共局在を失いアンドロゲン受容体活性を低下させる。また、ビスフェノール A, TCDD が誘導する活性酸素に対し, DJ-1 は自己酸化されることで除去を行うが, 過剰に酸化された DJ-1 は機能消失しパーキンソン病発症原因となることを示した。パーキンソン病の原因遺伝子 DJ-1 は、抗酸化ストレス、ミトコンドリア complex 1 の活性化、凝集蛋白質の分解等の複数の段階で発症に関与している可能性がある事等を明らかにした。このことは、癌遺伝子関連研究の観点からはインパクトの高い成果であり、内分泌かく乱物質関連研究成果とは独立して、高く評価された。

② 主な継続状況 (PJ 終了後)

DJ-1 とパーキンソン病等の疾病との関連性が解明されるにつれ、創薬ターゲットとしての重要性が認識され始め、既に極めて激しい研究開発競争が始まっているため、逸早く産業応用にまで繋がることを期待された。また、開発した特殊抗体には、基礎・臨床医学分野での様々な応用場面が想定されるため、その後の展開を期待された。2003~2006年度には、厚生労働科学研究費補助金 先端的厚生科学研究分野 ころの健康科学研究 「パーキンソン病PARK7の原因遺伝子DJ-1の機能と創薬応用」において、応用研究へと展開している。

(2) 内分泌かく乱物質の動物への発生内分泌学的影響

井口 泰泉 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授)

① プロジェクト期間中の主な成果

周生期のエストロゲン曝露による雌雄のマウス組織不可逆的増殖機構の分子生物学的な背景を解明するとともに、ビスフェノール A の胎盤透過性, 低用量影響, 遅延性無排卵現象を見出した。また、マウス組織のエストロゲン応答遺伝子を選択してマイクロアレイを作成した。アメリカワニ, ローチなど野生動物の化学物質の臨界期を明らかにし, ホルモン受容体, ホルモン産生関連酵素遺伝子のクローニングおよびマイクロアレイ化を行った。

「内分泌かく乱物質問題」に真正面から取り組み、胎児(胎仔)移行性、ホルモン感受性の臨界期、ホルモン感受性の臓器特異性、等々の重要課題に対し、広範な野生生物への影響に関する貴重な新知見を数多く得た。この成果は生態系への毒性影響を遺伝子発現の観点から解析する新し

い研究分野である、エコトキシコジェノミクス(Ecotoxicogenomics)の確立に大きく貢献した。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究 化学物質リスク研究において、2004～2006年度「内分泌かく乱化学物質の生体影響メカニズム(低用量効果・複合効果を含む)に関する総合研究」、2007～2009年度には、「形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムの解明及びその評価手法にかかる総合研究」を実施している。プロジェクト期間中にTOTO株式会社等と共同出願した特許「女性ホルモン類除去システム」は2009年に登録されている。

本研究の成果及び新規開発した各種評価系は、経済協力開発機構(OECD)や日米欧の環境行政にも数多く採り入れられている。また、研究代表者、共同研究者らは、OECD や世界保健機構化学物質安全性プログラム(WHO/IPCS)等の国際調整機関及び日米欧環境行政当局の専門的助言者として貢献している。Ecotoxicology and Environmental Safety、Molecular and Cellular Endocrinology や Biology of Reproduction の編集委員 としても活躍している。

現在は日本内分泌攪乱物質学会 副会長を務めている。

(3) 内分泌かく乱物質のヒト生殖機能への影響

岩本 晃明 (聖マリアンナ医科大学泌尿器科 教授)

① プロジェクト期間中の主な成果

ヒト試料(血液、精漿、精巣組織等)を用いて、男性生殖機能の評価マーカーとなる新たな物資や現象を探索した。その結果、1) 障害を受けた精巣の精細管基底膜や精細胞およびステロイド代謝にヒトに特徴的な変化が生じること、2) EDC 曝露によって cofilin-2 と testican-3 の遺伝子発現が変動すること、3) DJ-1 が造精機能マーカーとして期待できること、4) RecQ ヘリカーゼがゲノム維持機構に関与していること、5) Y 染色体のハプロタイプの違いが精子形成能に影響することを見いだした。また、6) 精子運動能の解析を重視し、新しい精子自動解析装置を開発した。

「環境汚染物質が本当に男性生殖機能に悪影響を及ぼしているのか？」という重大な問い掛けに対する解答を得る上で極めて重要な研究課題で、世界的にも殆ど実施されておらず、人類生態学的にも意義深い研究であるが、インパクトの高い成果或いは何らかの明確な回答が得られなかった。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

男性生殖機能評価系の確立は、化学物質の影響評価ばかりでなく、医薬品開発等にも応用可能であり、極めて重要と思われた。プロジェクト期間中に特許「精液の検出方法」および「セミノジェリンの精子運動抑制因子(SPMI)部分を認識するモノクローナル抗体、及び、これを用いる検出方法」はそれぞれ、2008年と2009年に登録されている。

2003～2005年度には厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究分野 食品の安心・安全確保推進研究の分担研究者として、「熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究」を展開している。

(4) 内分泌かく乱物質が減数分裂, 相同組換えに与える影響

黒田 雅彦 (東京医科大学病理学講座 講師)

①プロジェクト期間中の主な成果

ダイオキシンによって応答し減数分裂に関与する新規遺伝子として, DIF-2(Dioxin Inducible factor-2), DIF-3(Dioxin Inducible factor-3)を単離し, ダイオキシンによって発現が低下する遺伝子として Mad2 を同定した。ダイオキシン受容体を介さないダイオキシンの作用機構として、細胞周期に関与する Mad2 を介する新規な情報伝達系の存在を示唆し、ダイオキシンの毒性発現を考える上で極めて重要な成果である。DIF-2 遺伝子は, *Drosophila* の染色体の構造維持に関与する *wapl* 遺伝子のヒトホモログであり、その後の解析から、ヒト子宮頸癌の原因癌遺伝子であることが判明した。また、環境化学物質によって誘導される減数分裂期の染色体構造異常は、修復機構の破綻が原因である可能性が示され、染色体テリトリーへの影響をその研究手法の確立をも含めて明らかにした事、等々の新規で重要な成果を挙げた。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

新たに単離した遺伝子(DIF-1, 2, 3)は子宮内膜症、子宮頸癌、気管支喘息、アトピー性皮膚炎等の診断・治療の分子標的としても興味深く、ユニークで基礎生物学的にも、臨床応用的にも重要な成果であった。

プロジェクト終了後、2004～2006年度には厚生労働科学研究費補助金 厚生科学基盤研究分野 政策創薬総合研究「ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立」、2007～2009年度には厚生労働科学研究費補助金 疾病・障害対策研究分野 第3次対がん総合戦略研究「システム生物学的的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索」へと研究の方向を変えている。現場では、正確で迅速な病理組織診断(生検組織診断、手術で摘出された臓器・組織の診断、手術中の迅速診断)、細胞診断、および病理解剖実践することにより、質の高い医療に貢献している。

(5)内分泌かく乱物質の脳神経系機能発達への影響と毒性メカニズム

黒田 洋一郎 ((財)東京都神経科学総合研究所 客員研究員)

①プロジェクト期間中の主な成果

学習障害(LD)、注意欠陥・多動性障害(ADHD)および高機能自閉症児が全学童の6%に達している。子どもの脳機能発達への化学物質の影響を調べるため、DNA マイクロアレイ、シナプス形成系、サル"指迷路"学習など、遺伝子から、細胞ならびに行動レベルの多くの新しい毒性実験系を開発した。低濃度のPCB類は脳発達に必須の甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現や神経回路(シナプス)形成を阻害し、高次機能の獲得に必須の神経活動依存性の遺伝子発現は DDT

など殺虫剤や除草剤グルホシネートでかく乱された。母ザル血中 PCB 濃度に比例した子ザルの学習成績の悪化など種々の化学物質汚染による知能・行動異常が定量的に示され、ヒトでの複合暴露濃度から脳発達障害の一因と考えられた。このような各種化学物質の脳神経系発達への影響を遺伝子・細胞・個体レベルで研究する手法は、神経毒性学のみならず基礎神経科学の観点からも、極めて重要かつ大きな成果である。また、神経細胞・甲状腺ホルモン・化学物質を繋げる事によって、神経毒性学に新しい道を拓いた。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

従来は心理学的研究の対象であったサルの行動を、毒性学的指標として確立しつつ、ヒト脳高次機能への影響を正確に推定するための重要な基盤となると期待されたが、その後の展開は見られない。

最近、特定非営利活動法人 ダイオキシン・環境ホルモン対策国民会議において、「環境化学物質と子どもの脳の発達障害 ネオニコチノイド・有機リン農薬の危険性」(2010年8月発行)等のニュースレター執筆活動や「環境化学物質と子どもの脳の発達障害—ネオニコチノイド・有機リン農薬の危険性—」NPO 法人 ダイオキシン・環境ホルモン対策国民会議総会記念講演会(2010年7月)24日等の啓蒙活動に務めている。

2.3 平成 12 年度採択研究課題

(1) 高感度質量分析計の開発と内分泌かく乱物質の分析

久瀬 五雄 (大阪大学 名誉教授)

① プロジェクト期間中の主な成果

ダイオキシンの公定測定法は、分解能1万以上の磁場型質量分析計を用いて測定する事になっており、本課題の主たる目標は従来の磁場型質量分析計の高感度化であったが、分解能2万、従来品の10倍以上の感度を有する高感度質量分析計を開発した。位置検出器を装備した質量分析計の開発では、内分泌かく乱物質の前処理を簡素化したため、煩雑な前処理の軽減、試料の少量化が可能となり、環境汚染物質の測定等に大きく貢献できると期待された。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

新規開発したターボレンズ系、ズームレンズ系等の技術は、他の質量分析計(飛行時間型/TOFMS 等々)にも応用可能であり、その感度向上が期待された。高感度化により、質量分析計の宇宙工学、半導体工学への応用等々、新たな展開が期待されていたが、現時点での展開はみられない。

(2) ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン

川戸 佳 (東京大学大学院総合文化研究科 教授)

① プロジェクト期間中の主な成果

脳海馬内でチトクロム P450 系は女性・男性ホルモンを合成していることと、合成酵素系のシナプス局在と生合成経路と合わせて示した。女性ホルモンは海馬の記憶学習を司る神経シナプスの伝達効率(長期抑圧)や構築(スパイン数)を急性的に変動させており、これら神経可塑性に対し、女性ホルモン類似内分泌攪乱物質(ビスフェノールなど)は、急性的に大きな攪乱を与えることを発見した。この分子過程は神経シナプスに女性ホルモン受容体 ER α が存在し、女性ホルモンが記憶・学習に密接に関与しており、その作用は膜受容体を介した急性的作用である事を示した。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

ステロイドホルモンの情報伝達が、「核内受容体と遺伝子発現」という伝統的な枠組みから脱却して一大発展を遂げる事を期待された。また、脳が合成する性ホルモンが神経栄養因子としても作用している事が示唆されており、神経栄養因子分野の研究に革新をもたらすと共に、脳神経分野の臨床に科学的基礎を提供するものとして、その後の進展が期待された。

2005~2008年にはJSTのバイオインフォマティクス推進事業において、「脳スライス中で可視化した神経シナプスの自動解析」を展開している。

(3) 大気中に存在する新しいタイプの内分泌攪乱物質

武田 健 (東京理科大学薬学部 教授)

① プロジェクト期間中の主な成果

大気中の化学物質には多くのヒトが日常的に晒されるため、大気汚染物質中に内分泌かく乱物質が存在する事を明らかにし、その成分を特定する研究は社会的に重要度が高いため、本課題は、ディーゼル排ガス(DE)/ディーゼル排ガス微粒子成分(DEP)の内分泌かく乱物質の単離・同定を試みた。その結果、DEP 中からエストロゲン及びアンドロゲン作用かく乱物質、またダイオキシン受容体刺激作用、性ステロイドホルモン受容体発現抑制作用を有する物質を同定した。マウス妊娠期 DE 曝露により、胎仔の性分化に関わる遺伝子の発現が抑制されること、出生した仔の血中テストステロン値、一日精子産生量に変動するなど様々な内分泌かく乱現象が認められた。また、精液性状の悪化、行動異常や脳内モノアミン代謝の変動が観察された。このような、生殖機能への影響、脳神経系への影響、行動薬理学的研究、等々多面的な研究が同時に行われた例は他になく、パイオニアスタディーとして意義のある研究であった。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

プロジェクト期間中の成果は定性的・半定量的結果に止まっていたが、より有効・有益なディーゼル排ガス対策等に対する科学的基盤・基礎を提供するものであり、その後、成果が裏付

けを得て適切に発展する事が期待された。

2008～2010年度には厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究分野 化学物質リスク研究において、「ナノマテリアルの健康影響の評価手法に関する総合研究」へと展開し、より実践的な側面で研究を進展させている。

(4) 魚類生殖内分泌系に及ぼす内分泌かく乱物質の影響の分子メカニズム

長濱 嘉孝 (自然科学研究機構基礎生物学研究所 教授)

① プロジェクト期間中の主な成果

魚類の性分化に関して、分子・細胞学的アプローチを用いて、脊椎動物で二番目となるメダカの性決定遺伝子(DMY)を発見するとともに、精巣分化(DMRT1)と卵巣分化(芳香化酵素, エストロゲン)を制御する重要因子を同定した。これらの分子マーカーを駆使することにより、性ホルモンや内分泌かく乱物質が魚類の性転換を起こす際の作用部位が性決定過程(性決定遺伝子)ではなく、生殖腺の性分化過程(生殖腺体細胞での遺伝子発現)であることを見出した。また、DES が魚類卵の成熟を誘起する作用があること、またその作用メカニズムは魚類の卵成熟誘起ホルモン(17 α ,20 β -DP)と同様であることを明らかにした。さらに、内分泌かく乱物質の作用メカニズムを解析するためのトランスジェニックメダカを数系統作出するとともに、マイクロアレイ系(性分化期の雌雄生殖腺)を作製した。

本課題は魚類の性分化に関して、性分化制御因子や内分泌かく乱物質の作用点が生殖腺の体細胞であることを世界に先駆けて明らかにしたもので、性分化の仕組みや性決定遺伝子が驚くべき多様性を有している事、成体魚でも性の可塑性を保持しており性転換誘起が可能である事、ホルモンや外因性化学物質が成体の性行動にも影響を及ぼす事、等々の新知見従来の常識/定説を覆すものであり、極めてインパクトの高い成果であった。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

内分泌かく乱物質のターゲットとして生殖腺体細胞が特定された事、新規ステロイド膜受容体を介したノンジェノミック/急性的作用を示す可能性がある事、魚類の性の可塑性が示された事、等々により、野生生物/生態系での、ひいては人類への影響をも考慮した、「内分泌かく乱物質問題」の本質的理解が深化され、2004～2008年度には科研費 特定領域研究「魚類における性決定と生殖腺の性分化の分子メカニズム」で研究を進展させている。

また、基礎生物学研究所の公開シンポジウム「生き物を科学」で、「動物のオスとメスが決まる仕組み」(2007年10月)を子供から大人まで市民に向けて、講演するなど社会貢献をしている。

(5) 生殖系での低濃度内分泌攪乱物質関連遺伝子データベースの構築

宮本 薫 (福井大学医学部 教授)

① プロジェクト期間中の主な成果

環境中に存在し得る程度の低用量の内分泌かく乱物質が生殖内分泌系に与える影響は解明されていなかったため、本課題ではヒトを含めた哺乳類動物の卵巣-子宮系細胞での遺伝子発現

の変化をサブトラクションクローニングの手法を用いて、的確にとらえ、低用量内分泌かく乱物質によって誘導、もしくは抑制される遺伝子データベースを構築・公開した。

(<http://www1.fukui-med.ac.jp/SEIKA2/ED-Genes.html>).

低濃度のダイオキシンやジエチルスチルベストロールの曝露により、雌性生殖器で発現が変動する遺伝子群を解析し、ダイオキシンの胎盤でのインターフェロン関連遺伝子群の発現誘導、ジエチルスチルベストロールの黄体形成ホルモン(LH)分泌抑制作用等を明らかにした。

② 主な継続状況(PJ 終了後)

このような研究成果は、DBとして公開されることにより、多数の研究者の共通基盤知識として利用され、研究の促進に大きく貢献するもので、共同研究等を通して、ダイオキシンやジエチルスチルベストロール以外の化合物の研究成果も加わり、一大DBとして進化・発展し、世界中からの利用が拡大する事が期待されたが、現時点では実現されていない。

第3章 詳細調査

今回の詳細調査においては、内分泌かく乱物質(いわゆる環境ホルモン)の体内侵入先として代表的存在であるステロイドホルモン受容体、とくにエストロゲン受容体(ER)、アンドロゲン受容体(AR)に焦点をあて、それら受容体を介した内分泌かく乱物質の作用機構を中心とした基礎研究が、環境、医療といった応用分野にどのように展開されているか、また、別の基礎研究分野にどのようなつながりを持っているかを俯瞰する。したがって、詳細調査を実施するにあたって、研究成果にかぎらず、本領域の応用分野への発展状況を勘案してできるだけ幅広くカバーするようこころがけ、次の3研究課題を抽出した。

- 1) 核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質(研究代表者 名和田 新)
- 2) 内分泌かく乱物質の動物への発生内分泌学的影響(研究代表者 井口泰泉)
- 3) 脳を制御する神経ステロイドの作用をかく乱する環境ホルモン(研究代表者 川戸 佳)

なお、CREST期間中には他にも優れた研究成果を挙げた事例が数多くあったが、領域全体の特徴を概観するための調査という目的から、ステロイドホルモン受容体をキーワードとして、この3つの抽出事例にしぼって調査を進めた。以下にその内容を記載した。

1. 研究課題 「核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質」

研究代表者：名和田 新 (福岡県立大学 学長, CREST 時 九州大学大学院 教授)

1.1 研究期間中における状況

(1) CREST 開始の頃の状況(背景)

CRESTに本研究を提案した頃、生物界における多くの性分化異常が報告され、その原因として、内分泌かく乱物質はエストロゲン、アンドロゲンを中心とするステロイドホルモン作用機構全体をかく乱する事実が明らかにされつつあった。一方で、ステロイドホルモン受容体を含む広義の核内受容体型転写調節因子/共役因子複合体のカスケード、およびアクチビンシグナル伝達系による泌尿生殖洞の幹細胞からの副腎・生殖腺の発生分化機構の詳細が解明されつつあった。名和田らは、先天性アンドロゲン不応症は、AR 遺伝子の先天的異常で発症することを明らかにしてきたが、彼らは、正常AR 遺伝子を有しながら重症のアンドロゲン不応症(完全型睾丸性女性化症)となった症例で、AR のAF-1領域に特異的に作用する転写共役因子の障害が存在することを見いだした。この事実は、ある種の内分泌かく乱物質は、広義の核内受容体型転写調節因子のリガンドとなるか、あるいは転写共役因子の機能障害、もしくはアクチビンシグナル伝達系の異常を発現し、抗アンドロゲン作用またはエストロゲン作用を惹起することが考えられた。

名和田らは、つぎのような仮説をたて、それを検証するためにCREST研究を開始した¹⁾。

内分泌かく乱物質は核内受容体型転写調節因子/共役因子複合体に作用し、機能障害を生じた受容体/転写共役因子複合体は、本来のホルモン応答領域(HRE)への結合能の低下、あるいは正常なら結合しない他の遺伝子の異なったHRE への異常結合により多面的な機能障害を惹起し、同時に核内における受容体/共役因子複合体の三次元的分布の異常をもたらす。またある種の内分泌かく乱物質はアクチビンシグナル伝達系の機能障害を惹起する(図1)。

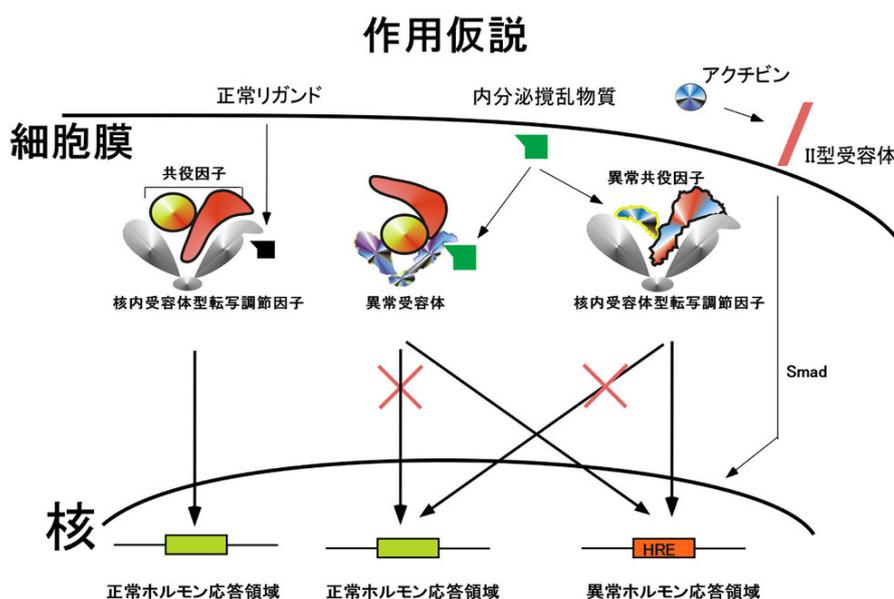


図1 核内受容体/転写共役因子複合体における内分泌かく乱物質の作用仮説¹⁾

(2) 主な狙いと研究成果

名和田らは、ARおよびERが、細胞核内で転写共役因子とともに構築する巨大複合体を可視化する鋭敏な方法を開発するとともに、およそ60種類の化学物質を入手し、AR、ER がもたらす転写活性化能を指標としてスクリーニングを行った。その結果、AR に結合する化学物質は少数であったが、新たな抗アンドロゲン化学物質nitrofen を同定した。対照的に、多くの化学物質がER α 、 β の転写活性に影響を与えることが明らかになった。ステロイドホルモンの特異的な作用は、ステロイドホルモン受容体のみではなく、特異的転写共役因子によっても規定される。AR、ER に対する特異的転写共役因子を同定することは、内分泌かく乱物質の作用機序を解明するうえで必須である。その頃、ステロイドホルモン受容体のN端側に存在する転写活性調節領域であるAF-1 領域が、受容体特異的、組織特異的な転写活性化調節に深く関与していることが明らかにされつつあった。このような観点から、両受容体に対する特異的共役因子のクローニングを行い、AR-AF-1 結合性転写共役因子(ANT-1)、ER-AF-1 結合性転写共役因子p68/p72、ER-AF-2 結合性転写共役因子複合体であるTFTC 複合体を新たに同定した。

また、抗アンドロゲン作用を有する化学物質の作用機序を分子レベルで明らかにするために、蛍光蛋白質で標識した AR の、核内における空間的分布・クロマチン構造との関係を、三次元的に再構成した共焦点レーザー顕微鏡画像により可視化した。

本法は、抗アンドロゲン作用を有する化学物質のスクリーニングに極めて有用であるととも

に、核内コンパートメントと核内受容体という新たな研究領域を開拓した。AF-1 とAF-2 の分子内機能協調作用により、活性化されたAR が構成するARコンパートメントへは、p300/CBP 依存性にSRC-1、TIF-II などの転写共役因子がリクルートされることが明らかとなり、抗アンドロゲン剤の作用機序の本質は、AF-1 とAF-2 の分子内機能的協調作用の阻害による、機能的核内受容体コンパートメント形成阻害と考えられた。

多くの化学物質がER α 、ER β の転写活性化能に影響を与えることがスクリーニングの結果明らかとなったが、転写活性を抑制するもの、促進するもの、AF-1 活性、AF-2 活性それぞれに対し選択的に働くものなど、化学物質により個々の性質が大きく異なる。

tamoxifen、可塑剤butyl benzyl phthalate (BBP)はともに、ER α のAF-1 活性を誘導するが、BBP はtamoxifen とは逆に乳癌増殖を促進した。tamoxifen 存在下においてER α はAF-1 転写活性化因子と転写抑制因子の双方と結合するが、BBP はER α とAF-1 転写活性化因子の結合のみを促進した。

このように、転写共役因子が環境中の化学物質の作用発現に占める役割はきわめて大きい、名和田らがCRESTにおける数年間行ってきた実験系では、いわゆる「内分泌かく乱物質作用のU 字現象」を説明する鍵は見出されていない。名和田らの提唱するシステムは転写を標的にしているため、AR、ER のいわゆるgenomic action を対象としている。「U 字現象」の説明には最近注目されたAR、ER のnon-genomic actionが関与する可能性もあり、検討課題として残った。AR、ER を介さないステロイド生合成酵素およびアクチビンシグナル系などがこの「U 字現象」に関与する可能性もある。

さらに彼らは、アロマターゼ活性を高発現するヒト卵巣顆粒膜細胞株KGN 細胞を樹立して、上述の60 種類の化学物質をスクリーニングし、imposexの原因物質である有機スズ化合物が、転写段階でアロマターゼ活性を抑制することを示した。

以上のように本研究では、内分泌かく乱物質のステロイドホルモン受容体を介した、いわゆるgenomic actionを中心に、その作用機構を分子レベルおよび画像を用いる手法で明らかにしてきた。研究チームの姿勢として、既知の有名な内分泌かく乱物質にとらわれることなく、できるだけ多くの化学物質を入手し、スクリーニングすることを試みた。

また、名和田らのCRESTにおける当初の計画では、帝国臓器製薬とともに、抗アンドロゲン作用を有する化学物質に共通の骨格をコンピュータを用いて検索する予定であったが、ソフトウェアの問題もあり、十分な検討ができないままに終わっている。しかし、この共通の分子骨格の予想は、内分泌かく乱化学物質を、創薬のモデルとして利用することを可能とするものである。この考えは、やがてCREST終了後に、1.4で詳述するように生活習慣病の分野において、前立腺刺激作用を認めず脂質代謝改善作用を有するselective androgen receptor modulator(SARM)の同定と創薬開発の動きへとつながって行った。

1.2 研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況

名和田らは、2002 年度から始まった文科省 21 世紀 COE プログラムに参画するとともに、次いで科研費・基盤 S を獲得し、CREST で得られた研究成果をもとに、疾患の成因と治療をより指向したテーマで、以下のような分野に取り組んできた。

(1) ステロイドホルモンレセプターと転写因子・共役因子の研究

ステロイド不応性は临床上、重要な問題であるが、名和田らは本邦で最初のグルココルチコイド抵抗症の症例を見出し、グルココルチコイドレセプター(GR)のリガンド親和性と DNA 結合性の低下を証明した。また、先天性のアンドロゲン不応により睾丸性女性化症を呈する多数症例群において、原因遺伝子のアンドロゲン受容体(AR)における種々の変異を証明し、病態との関係を明らかにした。さらに AR 遺伝子および AR 結合能に全く異常を認めない一例において、その病因が AR の AF1 領域に結合する特異的な共役因子の異常によることを証明し、世界で初めてステロイド不応症の中に「共役因子病」という疾患概念を確立した。

(2) ステロイドホルモンの生活習慣病治療への応用

副腎より分泌される DHEA-S の血中濃度は思春期に著増し、思春期以後加齢と共に直線的に著減することから、老化指標あるいは老化制御ホルモンとして注目されている。DHEA の生理作用については不明なところが多かったが、動物実験、*in vitro* の実験で免疫賦活作用、抗糖尿病作用、抗骨粗鬆症作用、抗動脈硬化作用、抗肥満作用、抗腫瘍作用、中枢神経作用を明らかにした。間接作用の例として、骨芽細胞で DHEA がエストロンに変換され骨量維持を行う *intracrine* 機構の可能性を示した。DHEA の直接作用解明の糸口として、最近、DHEA により特異的に発現が誘導される新規の *protein tyrosine phosphatase* のクローニングに成功し、DDSP と命名した。この DDSP は、Map kinase の p38 を特異的に不活化する p38 phosphatase であることを明らかにし注目されている²⁾。

(3) 糖尿病血管障害の成因研究

名和田らは、細胞内情報伝達酵素プロテインキナーゼ C(PKC)活性化異常が、糖尿病性血管障害の重要な成因であることを明らかにしてきた。また PKC 活性化によって血管壁細胞 NAD(P)H オキシダーゼが活性化され、酸化ストレス亢進を惹起させることを見いだしたが、このことは新規の抗酸化療法の開発への道を拓くものである。さらに、酸化ストレス亢進が血管合併症を引き起こす機序について、糖尿病モデルラットにおける、ミトコンドリア DNA 障害の重要性を証明した。

(4) 副腎細胞の再生

近年、iPS 細胞樹立の成功で再生医療が注目されているが、名和田らは、マウスの骨髄間葉系幹細胞や脂肪組織間葉系幹細胞に Ad4BP/SF-1 遺伝子を導入し、世界で初めて ACTH 受容体を保持したコルチゾール産生細胞(副腎細胞)の作製に成功した^{3,4)}。近い将来、コルチゾール補充療法については、コルチゾール産生細胞の移植治療が可能になることが期待される。

(5) 内分泌かく乱物質の研究

ホルモン作用を持つ内分泌かく乱物質の環境への広範な汚染により、野生動物やヒトの生殖系への影響が懸念されている。名和田らは、CRESTの内分泌かく乱物質研究領域の研究代表者として、核内受容体の新規の高精細核内三次元分布解析システムを開発し、核内におけるARの特異的な局在が転写発現に極めて重要である事を初めて解明した。更にこの方法や独自に樹立したアロマトラーゼ高発現KGN細胞を用いて、新しい内分泌かく乱物質スクリーニング法を開発

し、高く評価されている。KGN細胞はすでにCREST期間中に樹立されていたが、この細胞を用いたスクリーニングの過程で除草剤Atrazineが、steroidogenic factor 1(SF-1)のリガンドとなり、アロマターゼの転写活性を促進することを発見し注目された⁵⁾。これは、環境面では、野生ガエルのメス化による個体数の激減などの原因になっている。

1.3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果

(1) 科学・技術の進歩に貢献する成果

— アンドロゲンとその標的因子による中枢性肥満と動脈硬化の制御の分子メカニズム

性ステロイドは肥満やメタボリック・シンドローム、糖尿病の性差を説明する重要な背景因子であるが、研究成績は比較的少なく、特に内因性テストステロン(T)の関与についてはエストロゲンに比し不明な点が多い。近年、疫学研究から内因性Tは抗肥満、抗糖尿病、抗動脈硬化の方向に作用する可能性が示唆されているが、機序も含めて明確な結論は得られていない。アンドロゲン受容体ノックアウトマウス(ARKO)⁶⁾のオスでは晩発性の肥満をきたすが、その機序にはエネルギー消費の低下と脂肪分解系の低下が関与している。一方、インスリン感受性は比較的正常であったが、その原因として血中adiponectin濃度の高値の関与が考えられた⁷⁾。

インスリン感受性に関して、内因性Tのadiponectinの分泌低下作用は不利に作用するが、脂肪蓄積抑制作用は有利に作用すると言え、実際の生体では、両者のバランスによって感受性が規定されているものと考えられる。

名和田らはまた、ARが食欲やエネルギー代謝を制御する視床下部諸核に密に存在したことから、中枢神経系におけるT-AR系と食欲調節経路のレプチン経路との関連を検討した。T-AR系はレプチン作用を増強する方向で作用している成績が得られ、これはT-AR系の抗肥満作用機序の一端である可能性が示唆された。

臨床的には男子性腺機能低下症患者における体脂肪量の増加や、T補充によるその改善が報告されており、名和田らの臨床成績もそれを支持した。これらの結果はARKOマウスの結果とよく一致する。中高年の「中年太り」にT-AR系の加齢変動(低下)が関与する可能性がある。

さらに、名和田らは、生活習慣病創薬の観点から、前立腺刺激作用を認めず脂質代謝改善作用を有するselective androgen receptor modulator(SARM)の候補化学物質を同定し、ラットへの投与実験で血中中性脂肪の低下作用を見出している。これらの研究は、CREST期間中に萌芽があったにせよ、本格的な展開はCREST終了後のことであり、SARM関連の創薬研究は、医学分野における発展研究の好事例と思われるので、少し詳しく次項で述べることにする。

(2) 人材育成からみた参加研究者の活動状況

CREST期間中は、4グループ体制で研究を進めたが、その中で、グループリーダーの柳澤純氏は、東京大学分子細胞生物学研究所・助手から筑波大学教授に転身した。また、同じくグループリーダーであった帝国臓器製薬・研究所の柴田健雄氏は引退したが、帝国臓器製薬(現あすか製薬)とは、特許の共同出願などで協力関係が続いている。

1.4 研究成果から生み出された社会的、経済的な効果・効用および波及効果

(1) 医療・福祉に繋がる芽

ー 生活習慣病領域におけるアンドロゲンの意義と SARM(S42)の創薬開発

内臓脂肪型肥満を発症基盤とするメタボリックシンドローム(MS)、糖尿病、動脈硬化といった生活習慣病領域における、アンドロゲン-AR系の観点からの研究成績は世界的にも少ない。

名和田らは、東京大学加藤茂明教授らにより開発されたARKOマウスが、エネルギー消費の低下により晩発性肥満を起こすことを見出した。この成果を踏まえ、アンドロゲンとしてのtestosterone (T) とdehydroepiandrosterone (DHEA) のMSや動脈硬化における意義を明らかにしようとした。研究の目的としては次の4つを設定し研究を進めた。

- ① エネルギーバランスの中枢性調節機構におけるアンドロゲンの意義
- ② Tの抗動脈硬化作用機構
- ③ 前立腺には増殖作用を示さず、抗肥満作用を有するSARM (selective androgen receptor modulator)の開発
- ④ 抗老化ホルモンDHEAにより誘導されるP38 特異的phosphatase, DHEA-enhanced dual specificity protein phosphatase (DDSP)の抗肥満作用機序の解明

以下、4つの研究目的ごとに、成果を詳述する。

① 肥満におけるアンドロゲン-AR系の中枢性作用機序：

脂肪由来ホルモンのレプチンは摂食抑制と交感神経活性の亢進作用による体重減少効果を有する。オスARKOマウスでは、血中レプチン濃度は増加しているが、摂食量は正常で、レプチン抵抗性が存在する。

このレプチン抵抗性は肥満前の同マウスへの脳室内レプチン投与実験でも確認され、AR欠乏に伴うintrinsicな現象と考えられた。レプチンはレプチン受容体に結合し、下流のSTAT3のY705をリン酸化する。リン酸化STAT3は核内へ移行し、転写活性を発揮することにより生物作用を発現するが、このときARはレプチン誘導性のSTAT3の転写活性化能を増強した。この事実は、レプチン脳室内投与下の野性型マウスでは、視床下部弓状核STAT3の顕著な核内発現を認めるのに対し、オスARKOマウスではSTAT3の核内発現が明らかに低下していることから確認された。以上の結果より、アンドロゲンの抗肥満作用機序の一端として、レプチン作用の増強による交感神経活性化作用も関与しているものと考えられる。

② アンドロゲンと動脈硬化：

ARKOとApoEKOマウスの交配オスマウスの動脈硬化面積は、血中脂質レベルとは無関係にApoEKOマウス群に較べ有意に強い動脈硬化度を示した。内因性Tの抗動脈硬化作用は、高コレステロール食飼下のNew Zealand white rabbitの動脈硬化を精巣摘出が増悪し、DHT投与により著明に抑制した成績からも支持された。

③ selective androgen receptor modulator(SARM)の開発：

オスARKOマウスは肥満をきたし、白色脂肪組織の熱産生蛋白質UCP-1の発現は劇的に低下する。3T3L1細胞におけるUCP-1の発現増強をきたし、かつ前立腺癌細胞株LNCap細胞におけるPSAの発現上昇をきたさないような候補化合物(前立腺刺激作用を認めず脂質代謝改

善作用を有する)のスクリーニングを行ない、S42(仮称)というひとつの化学物質の同定に成功した⁸⁾。現在、ラットの系でS42の投与により血中中性脂肪値が劇的に低下することを観察している。この成果は、2009年に国際特許出願されている¹⁰⁾。

④ DHEA の抗肥満作用 :

DDSP-TGマウスの解析において、常食下での表現型には異常は認められなかった。高脂肪食下でのオスDDSP-TGの体重増加が、野生型と比較して有意に抑制され、内臓脂肪の減少を認めた。野生型と比較して、体重あたりの酸素消費量は、DDSP-TGの方が高く維持されていたことから、基礎代謝の亢進による体重増加抑制と考えられた。DDSPはDHEAの抗肥満作用機序の一端を説明する可能性がある。

(2) 得られた成果の世界・日本におけるインパクトと今後の展望

アンドロゲンの抗メタボリック作用は、現在、世界的にも注目されているが、機序はほとんど解明されていない。名和田らの成果は、「T-AR系によるレプチンシグナルの増強」という新知見を提供することができた。また、現在、世界的に上述したSARMの開発研究が進められているが、いまだ実用化されたものはない。今回の抗メタボリック作用を有するSARM 候補物質の同定は、創薬の観点からもインパクトが大きい。さらに、Tと動脈硬化の関係については、世界的にも一定の見解が得られていないが、彼らの研究から内因性Tの抗動脈硬化作用機序が明らかになった。

集積された知見を基にし、性ステロイドホルモンないし化学物質の個体に対する作用を予測する技術を創出し、最終的には哺乳類において最大の遺伝子スーパーファミリーを形成する核内受容体を自由に制御することにより、ホルモン依存性癌をはじめとして広く生活習慣病に対する新しい治療戦略が創出されることが期待される。さらに、共通した作用を有する化学物質から機能発現に必要な基本骨格を抽出する技術を生み出すことにより、男女両性の更年期以降の、肥満をはじめとした性ステロイドホルモン欠乏による生活習慣病や、ホルモン依存性癌に対する創薬の道を開くことにもなる。

さらに、性腺原基が形成される以前のごく早期の胎児において、性ステロイドホルモン受容体が全身性に発現しており、かつprimordial germ cell の遊走に必須であることが明らかになっている。この事実はAR、ER の機能に、生殖腺分化以外の未知の機能があることを示唆しており、精子数減少をはじめとする男性不妊の原因が明らかになることが期待される。

[参考文献]

1. 名和田 新 : CREST 研究終了報告書
2. Ashida K *et al.*: Dehydroepiandrosterone negatively regulates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by a novel PTPN7 locus-derived transcript. *Biochim Biophys Acta* 1728(1-2): 84-94, 2005
3. Tanaka T *et al.* : *J.Mol.Endocrinol.*2007: 39,343-350
4. Gondo S *et al.* : *Endocrinology* 2008: 149,4717-4725
5. Fan, W *et al.* : *Biochem.Biophys.Res.Comm.*2007: 355,1012-1018
6. Yanase T *et al.*: *Androgens and Metabolic Syndrome : Lessons from Androgen Receptor Knock Out (ARKO) Mice* *JSTeroid Biochem Molec Biol* 2008 in press

7. Fan W *et al.*: IGF1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor. *J Biol Chem* 282: 7329-38, 2007
8. Min, L *et al.* : *Endocrinology* 2009 : 150, 5606-5616
9. Fan W *et al.*: Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity due to decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with big adiponectin secretion. *Diabetes* 54: 1000-1008, 2005
10. PCT/JP2009/ 58659

2. 研究課題 「内分泌かく乱物質の動物への発生内分泌学的影響」

研究代表者：井口 泰泉 自然科学研究機構・基礎生物学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授(CREST 当時の所属：岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター)

2.1 研究期間中における状況

(1) 本研究開始の頃の状況(背景)

— 環境問題とホルモン様物質

環境問題には、フロンガスによるオゾン層の破壊、地球の温暖化、砂漠化、絶滅危惧種の増加などに加えて、化学物質の問題がある。ダイオキシン類や PCB 類などのように残留性が高く、健康に悪影響を与える恐れのある物質が社会問題となって久しい。残留性の高い化学物質だけでなく、今までは安全と考えられて環境中に放出されていた農薬、界面活性剤、プラスチックの原材料などの物質の中に、生体のホルモン受容体、特に女性ホルモン受容体に結合することにより、あたかも女性ホルモンと同じ様な働きをする化学物質、男性ホルモンや甲状腺ホルモンの受容体に結合してホルモン作用を阻止する物質など(環境ホルモン、内分泌かく乱物質)が明らかになった¹⁻³⁾。特に、男性の生殖健康が低下しているとの懸念がある⁴⁾。ヒトでは精子数がこの 50 年間で半減し⁵⁾、アメリカでは先天奇形の尿道下裂がこの 20 年間で倍になり⁶⁾、精巣癌が増加して 30 代がピークであるとの報告もあり⁷⁾、胎児期での内分泌かく乱物質が原因になっているとの仮説が提出されている。

(2) 主な狙いと研究成果

1) 研究の狙い

井口らは、ステロイドホルモンや内分泌かく乱物質の、動物に対する発生影響のメカニズムを解明することを目的に、受容体—遺伝子発現—何らかの影響、という軸からの研究を展開し、最終的には影響に関連する遺伝子を明らかにすることを目指した。

CREST がスタートしたとき、井口は研究代表者として、環境ホルモンのエストロゲン作用を柱にして次のような具体的目標を設定した。

(a) 内分泌かく乱物質の多くはエストロゲン作用を示すことから、発生中の脊椎動物、及び成体での生殖系、神経系、及び行動をもとに、哺乳類、鳥類、両生類、魚類にエストロゲンがどのような不可逆的な影響を及ぼすかを作用機構を含めて明確にし、エストロゲンに敏感な発生中の期間(臨界期)を動物種毎に解析する。

(b) これを基にして、内分泌かく乱物質の環境濃度での発生影響をも明らかにする。

(c) 全ての遺伝子が解析され、ヒトの遺伝子との相同性も多く、エストロゲンに反応するマウスやセンチュウ(*C.elegans*)を、発生影響を調べる系として用いるとともに、マウスではマイクロアレイ法などを用いて、ホルモン応答遺伝子を整理する。

一方で、環境ホルモンの影響評価という点で、哺乳類での胎盤透過性と、海産巻貝、ミジンコを用いて生態系への影響も検討した。

(d) マウスやサルを用いて、内分泌かく乱物質の胎児影響を調べる科学的な根拠として胎盤透過性を解析する。

(e) 内分泌かく乱物質の生態系に対する影響を、内分泌かく乱物質の影響が明確な海産巻貝を用いて作用機構を明らかにすると共に、環境影響評価に用いられるミジンコへの発生影響、世代交代に対する影響、及び作用機構を明らかにする。

以上のように、本研究領域における井口のねらいは、生殖内分泌学、比較内分泌学、発生内分泌学、神経発生学的知見を総合して、脊椎動物の発生・生殖・行動・神経を対象に、また、無脊椎動物の発生・生殖・行動を対象にして、主にホルモン及び内分泌かく乱物質の不可逆化機構を、遺伝子レベルで解明することにあつた。

2) 研究成果

(a) ホルモン応答遺伝子の解析

この研究課題中、もっとも大きなグループであり、2つのサブグループに分かれて遺伝子発現解析に注力した。

ホルモンおよび内分泌かく乱物質がマウスの雌性生殖器官におよぼす影響について、遺伝子発現レベルからDNA マイクロアレイを用いた網羅的な解析を行った。臨界期とよばれる新生仔期におけるエストロゲン暴露による影響も同様な手法で解析を行うことにより、遺伝子レベルで内分泌かく乱物質の作用について明らかにした。

また、センチュウでのホルモン応答遺伝子の探索を行い、哺乳類の遺伝子解析に寄与する目的もあって環境指標生物としての可能性を探った。

① 特異的遺伝子の解析とエストロゲン応答遺伝子DDV10の同定

マウスの膣は卵巣から分泌されるエストロゲンにより上皮細胞の増殖が制御されている。しかし、エストロゲンによる遺伝子の発現とそれに伴う細胞増殖の制御機構は分かっていない。さらに、出生直後(新生仔期)のマウスにエストラジオール (E2)や合成女性ホルモンのジエチルスチルベストロール(DES)を投与した場合、成熟後卵巣を除去しエストロゲン量を減少させても膣上皮の委縮は起らず、エストロゲン非依存の不可逆的増殖を示す⁸⁾。このような膣上皮の不可逆的増殖の分子機構を明らかにすべく、ディファレンシャルディスプレイ法(DD 法)を用いて、膣に発現するエストロゲン応答遺伝子DDV10を同定し、塩基配列の解析から新規の膜蛋白質C-type lectin の仲間であることを明らかにした⁹⁾。また、DESを出生後マウスに投与し、精巣および精巣上体で発現が変化する遺伝子の解析も行った。新生児マウス雌性生殖器官に対する影響は、高用量のビスフェノールA (BPA)投与でも検討した。

② マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析

ステロイドホルモン受容体は、核内受容体の一員であり直接遺伝子の転写に関与することから、ステロイドホルモンまたは内分泌かく乱化学物質による遺伝子発現への影響を、マウスを用いて転写レベルで解析した。それぞれのホルモンや化学物質が引き起こす遺伝子発現パターンの変化についてDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した¹⁰⁾。

また、ラット胎児生殖輸管におけるプロゲステロン受容体の発現解析、及び胎盤形成への影響について、周生期の雄性ホルモン処理により連続発情となったラットでは、上皮および間質細胞のホルモン依存性受容体発現が変化し着床能に影響することが示唆された。

さらに、センチュウのエストロゲン応答遺伝子群の検索および蛋白質のリン酸化の解析を行

い、簡便かつ再現性の高い評価方法(致死影響試験、成長・成熟影響試験)を確立した。

(b) 神経系及び行動への作用解析

鳥類の発生・行動、魚類の発生・嗅覚・行動および哺乳動物の神経系への作用を解析した。

ニワトリへの発生影響を一例に挙げると、中枢への化学物質の作用メカニズムを調べるために、ニワトリ卵・初生雛を用いて神経行動学的解析を行った。全実験群で記憶保持率の低下傾向がみられたことから、記憶保持率低下にはエストロゲン受容体を介したエストロゲン系のかく乱作用、甲状腺ホルモン系のかく乱作用、BPA 独自のレセプターを介した作用など複数の経路を介した阻害作用が考えられた。BPA は、ニワトリの孵化率の低下や形態形成の異常を誘発するだけでなく、脳内シナプス形成を阻害して記憶力の低下をもたらすことが示唆された。

(c) 両生類の発生・生殖への作用メカニズムの解析

アフリカツメガエルへの発生影響を一例に挙げると、BPA 及びノニルフェノール(NP)などエストロゲン様化学物質の胚発生に及ぼす影響を遺伝子レベルで明らかにした。さらに、ツチガエルの性転換機構を明らかにし、性分化に関連する遺伝子の探索を目的にして、アフリカツメガエルとの比較解析を行った。

(d) 水棲無脊椎動物の生殖への作用メカニズムの解析

ミジンコ、海産巻貝でのステロイドホルモンの有無の解析、および内分泌かく乱物質の不可逆的作用を解析した。

その一環として、通常メスしか生まないオオミジンコ *Daphnia magna* が、幼若ホルモン作用によりオスを産むことを見出すとともに¹¹⁾、マイクロアレイを世界に先駆けて作成し、内分泌かく乱作用を明らかにできると思われる試験系を構築した¹²⁾。幼若ホルモンによる性比の変動は、経済協力開発機構(OECD)の化学物質の内分泌かく乱作用評価のための試験系として採用され、現在も使われている。

(e) まとめ

本研究領域は、化学物質の環境への影響を、メカニズムの解明を主に検討することで、環境の後追いではなく事前に予想できることをめざした。

井口チームのターゲットは、どの時期に作用すると何が起こるか、のメカニズム解明が主であり、野生生物の女性ホルモン受容体のレポーターアッセイを OECD に提案した。

研究対象としての生物種は非常に多岐にわたっているが、分化の過程のどこに作用点があるか、臨界期を捕まえることにフォーカスすると、いろいろな動物で見たかったので、このように種類が多くなったようである。多様な生物を対象にしたメリットの一例としては、オオミジンコの幼若ホルモン類似物質によるオス産生の研究が、性決定遺伝子の発見につながったことに顕れている¹³⁾。

2.2 研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況

— ホルモンと内分泌かく乱物質¹⁴⁾

エストロゲンは標的細胞に作用する場合は核内のエストロゲン受容体蛋白質に結合し、2量体になって DNA 上の遺伝子のエストロゲン反応エレメントに結合して遺伝子発現を誘導する。エストロゲンによって発現誘導される遺伝子としては、ラクトフェリン、プロゲステロン受容体などがある。特に、魚類、両生類、爬虫類、鳥類では卵黄蛋白質の前駆体ビテロゲニンの発現が誘導される。ホルモン(リガンド)とホルモン受容体は1対1対応の鍵と鍵穴と言われてきたが、エストロゲン受容体に関しては千種類以上もの合い鍵(化学物質)があり、弱いながらエストロゲン活性を示すことがわかっている。さらに、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類ではエストロゲン受容体に α, β の2種類、魚類では $\alpha, \beta 1, \beta 2$ の3種類があり¹⁵⁾、膜受容体も見出されている。内分泌かく乱物質にはエストロゲン様作用だけではなく、エストロゲン拮抗作用、アンドロゲン作用、アンドロゲン拮抗作用、甲状腺ホルモン拮抗作用なども研究対象になっている¹⁶⁾。さらに、核受容体スーパーファミリーのひとつとして、新たなオーファン受容体 SXR が見出されている。SXR は肝臓、小腸、大腸に発現しており、SXR を活性化する CYP3 遺伝子が標的となっている。マウスとヒトでは SXR を発現させる物質が異なることから、代謝の違いが、内分泌かく乱物質のマウスとヒトへの作用の違いとなっていると考えられる。BPA と植物性エストロゲンはヒトとウサギで SXR を発現させ代謝が起こるが、齧歯類では発現誘導が低いこと、PCB は逆に、齧歯類では SXR の発現誘導があるが、ヒトとウサギでは低いことなど、作用の違いを代謝の違いから説明できた¹⁷⁾。井口らは、SXR の発現を基に内分泌かく乱物質を整理することで、ヒトと実験動物への作用の違いを明確にできると考えている。

また、井口らは CREST 期間中から継続して魚類におけるエストロゲン受容体の進化を、遺伝子解析によって追跡している¹⁸⁾。さらに、カダヤシに対する合成アンドロゲン(トレンボロン)の影響を検討し、トレンボロン暴露によって尻鰭が突起状に形態変化してオスのようになること、卵巣に精子ができることを見だし、2005年に形態変化の推移を発表した¹⁹⁾。

2.3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果

(1) 科学・技術の進歩に貢献する成果

内分泌かく乱物質とされている多くの化学物質のほとんどはエストロゲンの受容体に結合してエストロゲン様の作用を示す。井口らはエストロゲンの作用を新生仔期および胎仔期(周生期)のマウスを用いて研究してきた。周生期にエストロゲンを投与された雌マウスではひとつの卵胞に多数の卵が囲まれる多卵性卵胞が高率に発現する。多卵性卵胞からの卵は受精しにくく、視床下部・下垂体系の異常により無排卵にもなる^{20, 21)}。

また、卵巣を摘出し、体内のエストロゲンを無くした雌マウスにエストロゲンおよび内分泌かく乱物質を投与し、子宮重量の増加を指標として検討した結果、BPA、NP、メトキシクロールはエストロゲンの10,000倍以上の投与で子宮重量が増加したことから、エストロゲン活性は弱いながらも確実に存在することを明らかにした。この研究も OECD のエストロゲン作用物質の試験法である子宮重量増加試験につながっている。さらに、ラクトフェリン遺伝子の発現を指標にしても、エストロゲン作用を確認している。エストロゲンによって発現が誘導される遺

伝子及び発現が減少する遺伝子も、DD 法および DNA マイクロアレイ法を用いて見出している。近い将来、エストロゲン応答遺伝子の整理ができると期待される。

(2) 人材育成からみた参加研究者の活動状況

井口教授のもとで博士研究員であった浦和寛氏は北海道大学大学院水産科学研究院の助教に、足立哲也氏は京都府立医科大学の助教に就任している。准教授の渡邊肇氏は大阪大学工学部の教授、助教の勝義直氏は北海道大学理学院の准教授に昇進している。

2.4 研究成果から生み出された社会的、経済的な効果・効用および波及効果

(1) 生態系への影響調査とエコトキシコジェノミクスの確立²²⁻²⁷⁾

CREST 期間中に井口の手掛けた実験動物は多岐にわたっているが、分化の過程でどこに作用点があるか、臨界期を捕まえることにフォーカスすると、いろいろな動物で見たかったので、このように研究対象の種類が多くなったとのことである(研究代表者談)。

多くの動物種からの結果がそろえば、内分泌かく乱物質の生物影響について断片的に言われてきたことが総合的に理解できるようになる可能性があり、科学的にも社会的にもインパクトは大きい。

このように多様な動物種を手掛けることで高まった、生態系への影響に対する関心は、OECD での試験法開発への参画にも見られ、CREST 終了後の研究対象にも継承されている。井口は、現在も(2011 年 3 月時点)、OECD の化学物質の内分泌かく乱作用の試験法開発に貢献している。この過程で、生態系への毒性影響を遺伝子発現の観点から解析する新しい研究分野である、エコトキシコジェノミクスの確立にも貢献し、OECD の分子スクリーニンググループにデータを供与している。

また、トリブチルスズはマウスやアフリカツメガエルの核内受容体の RXR や PPAR α を活性化し、脂肪細胞分化に関連する遺伝子の発現を高めるため、脂肪細胞が増加して肥満につながることを明らかにした²⁸⁾。この研究は“Obesogen”という用語を生みだし、米国での化学物質による肥満の研究の開始や、胎児期影響が大人での病気の原因になる(Fetal Basis for Adult Disease)という研究の後押しに大きく貢献している。

これらの研究が評価され、2011 年 9 月に平成 23 年度日本動物学会賞が授与される。

(2) 日英共同研究による国際貢献

1999 年 3 月に開催された主要国首脳会議(G8)の環境大臣会合の際、日英間で、内分泌かく乱化学物質に関して先進的な研究業績を持つ日英両国が共同で研究を実施していくということが合意され、同年 12 月に、(i) 技術的情報の交換、(ii) 研究上の知見の共有による共同研究の発展、(iii) 合同シンポジウム等学術討議の開催、(iv) 両国専門家の交流 を主とする日英共同研究実施の取り決めが締結された。この取り決めを受けて、環境庁(現環境省)では、1999 年度から「化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究」事業を開始した(日英共同研究第 1 期 1999-2003 年)。

CREST で井口らの研究課題が終了する 2004 年度には、日英両国の協議において共同研究実

施の延長が決定され、第2期(2004-2009年)がスタートした(日本側総括研究責任者は井口泰泉教授)。

さらに、2010年からの5年間(日英共同研究第3期)については、研究成果を内分泌かく乱化学物質の野生生物(生態系)に対する影響(リスク)の評価及び管理につなげていくことを念頭に、対象生物などを限定しない内分泌かく乱化学物質問題を横断するテーマを設定した。

内分泌かく乱作用に限らず、化学物質の野生生物(生態系)への影響については、OECDにおける試験法開発をはじめとして、国際的に調査法や評価法(試験法)の開発などの取り組みがなされている。日英共同研究についても、単に研究レベルでの取り組みに留まらず、得られた成果を日本国内の環境行政はもとより、OECDへの提案などを通して国際貢献につなげていくことが期待されている。CRESTから引き継いだテーマの中では、イギリスのコイ科の魚であるローチを受精直後から2年間、イギリスの河川で検出される実際の環境濃度の経口避妊薬エチニルエストラジオールを継続的に曝露することにより、精巣卵や性転換も起こり、生殖の低下につながることを明らかにした。また、下水処理水中での飼育により、魚の胆汁からのノニルフェノールの検出に加えて、ホルモン補充療法で使用されたエクイレニンなど馬のエストロゲンを検出し、環境中に出ている物質が魚類の体内から検出されることを証明した²⁹⁻³¹⁾。さらに、各種動物からエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体および甲状腺ホルモンの受容体を単離し、化学物質のホルモン作用を簡便に調べる試験系を構築しており、環境省の試験にも組み込まれている。さらには、イギリスのみならずオーストラリアからの要請により、この試験系を国際的にも供与するとともに、WHO/UNEPが改定している化学物質の内分泌かく乱作用のドキュメントの作成にも貢献した。なお、発表論文や総説をホームページで公表している³²⁾。

(3) 今後の展望

内分泌かく乱物質は成体に対してはおそらく可逆的に作用し、原因物質を除去あるいは少なくすることにより問題の解決がはかれると思われる。しかしながら、胎仔期から新生仔期では不可逆的な作用を及ぼす可能性がある。また、水系に棲息するカエルや魚に関しては、卵の発生ステージによってはホルモン様化学物質に対して敏感な時期があり、発生異常、性分化の異常が引き起こされる可能性もある。生殖に異常をきたせば種の絶滅にもつながる恐れがあるので、胚および胎仔に対する内分泌かく乱物質の影響の研究および検出系の確立が急務であると同時に、胎仔期から新生仔期に内分泌かく乱物質に曝露された個体の免疫系、行動を含めた長期的な研究も必要であろう。

【参考文献】

1. Colborn T and Clement C (eds): Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection, Princeton Sci Pub, pp. 403, 1992.
2. Estrogens in the Environment: Environ Health Perspect 103 Suppl 7: 1-178, 1995.
3. Soto A, Sonnenschein C and Colborn T (eds): Special Issue: Endocrine Disruption and Reproductive Effects in Wildlife and Humans. Comments Toxicol. 5: 315-506, 1996.

4. Glwercman A. *et al.*: Int J Androl 15: 373-375, 1992.
5. Carlsen E, *et al.*: Br Med J 306: 609-613, 1992.
6. Ekborn A *et al.*: APMIS 106: 225-231, 1998.
7. Dolk H: Lancet 351: 770, 1998.
8. Miyagawa S. *et al.*: Oncogene 23: 340-349, 2004.
9. Katsu Y. *et al.*: Endocrinology 144: 2597-2605, 2003.
10. Watanabe, H. *et al.*: J Mol Endocr 33: 243-252, 2004.
11. Oda S. *et al.*: Chemosphere 61: 1168-1174, 2005.
12. Watanabe H. *et al.*: Environmental Tox. Chem. 26: 669-676, 2007.
13. Kato Y *et al.*: PLoS Genet: 7, e1001345, 2011.
14. Iguchi T and Sato T: Am Zool: 40, 402-411, 2000.
15. Katsu, Y. *et al.*: Endocrinology 151: 639-648, 2010.
16. Iguchi T and Katsu Y: BioScience, 58: 1061-1067, 2008.
17. Milnes MR *et al.*: Environ Health Perspect 116: 880-885, 2008.
18. Katsu Y *et al.*: Endocrinology 151: 639-648, 2010.
19. Sone, K. *et al.*: Gen Comp Endocrinol 143: 151-160, 2005.
20. Iguchi T: Int Rev Cytol 139:1-57, 1992.
21. Iguchi T, Miyagawa S and Sudo T: Environmental Impacts on Reproductive Health and Fertility. (eds. Woodruff T et al., Cambridge Univ. Press, 2010).
22. <http://bem.m.chiba-u.ac.jp/education/kouza/001220/iguchi.html>
23. Genomic Approaches for Cross-Species Extrapolation in Toxicology. Taylor and Francis, CRC Press, pp. 1-31, 2007.
24. Genomics in Regulatory Ecotoxicology: Applications and Challenges. SETAC Press. pp.33-62, 2007.
25. Toxicogenomics: A Powerful Tool for Toxicology Assessment. Ed. Sahu, S.C., John Wiley & Sons, 143-158, 2008.
26. Handbook of Systems Toxicology. Eds. Casciano, D.A. and Sahu, S.C., John Wiley & Sons, Ltd. pp.67-72, 2011.
27. 井口泰泉 : 化学と生物 43:61-66, 2005.
28. Grün F *et al.*: Mol Endocrinol 20: 2141-2155, 2006.
29. Lange A *et al.*: Environ Sci Technol 43: 1219-1225, 2009.
30. Tyler CR *et al.*: Environ Sci Technol 43: 3897-3904, 2009.
31. Lange A *et al.*: Environ Sci Technol 45: 1673-1679, 2011.
32. <http://www.nibb.ac.jp/bioenv1/index-j.html>

3. 研究課題「脳ニューロステロイド作用をかく乱する環境ホルモン」

研究代表者：川戸 佳 （所属） 東京大学大学院総合文化研究科 教授

3.1 研究期間中における状況

(1) 本研究開始の頃の状況(背景)¹⁾

川戸らは、記憶学習の中枢である大脳の海馬を研究の中心に据えて、神経伝達に対する女性ホルモンの作用と、環境ホルモンのかく乱作用を研究対象にした。その点で、生殖への影響を解析している他の多くの内分泌かく乱研究チームと目的・対象を異にしていた。

従来の神経内分泌学の常識では、ステロイドホルモンは性腺や副腎皮質で合成されて、血流に乗って標的である脳(特に性中枢である視床下部など)に到達して作用する、というふうに理解されてきた。これに対して、彼らはこれまでの研究結果から、(A) 記憶を司る海馬では、独自にチトクロム P450 系が脳ニューロステロイドとして女性・男性ホルモンを合成している可能性がある、(B) 女性ホルモンは神経伝達や神経シナプス回路の配線を1時間ほどで急性的に変動させる可能性がある、ことを示す複数のデータをつかんでいたもので、これを厳密に証明しようと考えた。そして(C) 環境ホルモンはこのような女性ホルモン作用にかく乱を与える、と考えた。この当時世界的に、グループの数は少ないが、ステロイドホルモンの急性的で non-genomic な作用の研究と、膜上のステロイド受容体探索の機運が盛り上がり国際会議も発足していたが、彼らの試みは、これを更に難しい高次脳機能と結びつけるという、野心的な構想であった。性腺から脳に到達するステロイドの生殖作用や、核のエストロゲン受容体を介した genomic な作用の研究の蓄積に比べれば、信頼でき利用できる報告の数は極めて少なく、成功確率の低い研究と思われたようである。

(2) 主な狙いと研究成果

CREST期間中の研究内容については、終了後も発展研究が進んでおり、以下、脳内のエストロゲン合成、その受容体、脳でのエストロゲン作用の3点に分けて概説した。

1) 脳でのエストロゲン合成

CRESTにおいて川戸らは、放射性ステロイド基質をラットの海馬スライスに添加して代謝解析を行った。この結果、世界で初めて、コレステロール→プレグネノロン→デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)→アンドロステジオール→テストステロン→エストラジオールに到る、海馬における女性ホルモン合成経路を発見した^{2,3,4)}。更に、テストステロン→ジヒドロテストステロン→3 α ,5 α -アンドロスタンジオールという男性ホルモンの代謝経路も存在した⁵⁾。性ホルモン合成活性は、雌雄の海馬に顕著な差はなく、海馬のような高次脳機能を司る器官では、性差は少ないことを窺わせた。

また、免疫抗体染色の結果、性ホルモン合成に関わるチトクロムP450などの酵素蛋白質は、CA1-CA3領域の錐体神経細胞とDG領域の顆粒神経細胞に局在していた^{2,6)}。これは、性ステロイドが記憶を貯蔵する神経シナプスで局所的に合成されることを示す重要な成果である。

2) 脳のエストロゲン受容体

脳の神経細胞は性ホルモンを自前で合成しているので、ここに、エストロゲン受容体が存在することは論理的に予想できた。川戸らは、数十分以内で起こる早い記憶学習に影響を及ぼす女性ホルモンの作用部位は、神経膜か神経シナプスに存在するであろうエストロゲン受容体だと予測した。海馬の神経はエストロジオールの作用を大きく受けるが、ラット海馬の神経細胞にエストロゲン受容体が存在するという明確な証明は、当時まだ世界的にもなく、数少ないインターニューロンにかろうじてエストロゲン受容体ER α の抗体反応が認められるという報告が多かった。川戸らは、記憶機能において中心的役割を果たす、数の多いグルタミン酸神経細胞での存在を解析するため研究を始め、それまで世界中で使用されてきた著名なER α の抗体(例えば MC-20抗血清)は、不純抗体を多く含む抗血清として使用されており、海馬・大脳皮質・小脳などER α が極めて少ない部位で染色すると、ER α とうまく反応せず、未同定の蛋白質に結合してしまうという事実を見いだした。従ってそれまでに発表されてきた多くの論文は、海馬スライスの組織染色、免疫電子顕微鏡観察、単離した培養神経細胞などで、ER α の分布に関し深刻な間違いを含んでいる。この難問題は、本CREST研究領域の小南グループがER α の新しい高純度精製抗体RC-19 を作製することで解決できた。

RC-19 抗体を用いると、ER α が海馬神経シナプス膜分画や核内に存在することが示され、電子顕微鏡による免疫金抗体染色の解析を行って、錐体神経細胞と顆粒神経細胞のシナプス前部・後部と核にER α が確かに局在していることを発見した。

3) 脳でのエストロゲン作用(電気生理とスパイン解析)

神経シナプスでのER α 受容体の存在が確定したので、神経シナプス伝達・記憶学習の環境ホルモンによるかく乱は、このシナプス局在ER α に、環境ホルモンのビスフェノールA (BPA) やジエチルスチルベストロール(DES) などが作用する結果起こると想定して、電気生理やスパイン解析を行った。ところで、環境ホルモンは体に入った後、脳に移行する。ラットやサルに注入したBPA は、30分から1時間程度で脳血液関門を越えて脳内に移行することが、本CREST研究領域の井口らの研究で確認されている。

電気生理解析は、女性ホルモンや環境ホルモンの記憶学習に対する急性効果(30分~1時間の効果)を測定する方法としては、最も高感度である。ラット海馬スライスを用いて、CA1, CA3, DGの3領域で同時にNMDA 刺激による長期抑圧LTD を多電極電気生理で測定したところ、エストロジオール, DES, BPA などは、低濃度でLTD を促進した^{7,8)}。このLTD 促進効果はER α のアゴニストPPTでも同様に得られたが、ER β のアゴニストDPNでは抑制されたので、おそらくER α を介した効果であろう。このように、環境ホルモンがナノモルの低濃度でシナプス伝達をかく乱する効果がはっきりと観測された。

環境ホルモンの影響を感度よく調べる、もうひとつの方法として、神経スパイン(シナプス後部)の密度と形態を解析する方法がある。電気生理では、シナプスを形成する活性型の神経スパインしか測定できないが、この形態解析法では、シナプスを形成しない神経スパインも含んだ全てのスパインが解析できる。海馬スライス中の単一神経に蛍光色素をマイクロインジェクションし、個々のスパインを可視化する。その結果海馬スライスにエストロジオールを2時間作用させるだけで、CA1 領域で全スパイン密度が増加し、特にthin スパインが選択的に増加することを発見した^{9,10,11,12,13,14)}。エストロジオール, DES, BPAは低濃度で非常によく

似たスパイン増加効果を示した¹⁵⁾。更なる解析結果から、ER α アゴニストのPPT がエストラジオールと同じようなスパイン増加効果を示すことから、これらの作用はER α を介して行われていることを確認した。

一方、ラット新生仔の小脳神経細胞の発達解析を行い、エストラジオール、OP 及びBPA は共に、プルキンエ神経細胞突起の発達を促進させ、また、スパインの数も増加させることが明らかになった。これ等の神経成長促進は、タモキシフェンを加えておくと阻害されたので、エストロゲン受容体を介した作用であると考えられる¹⁶⁾。

4) まとめ

研究成果を具体的に挙げると、次のようになる。

- i) 海馬の脳ニューロステロイド合成活性と、環境ホルモンによるかく乱の解析
- ii) 海馬ニューロステロイド合成酵素系の神経局在の同定
- iii) エストロゲン受容体の神経シナプス局在の同定
- iv) 電気生理による海馬長期抑圧に対する影響で環境ホルモンの急性効果を解析
- v) スパイン密度・形態変化による海馬神経細胞での急性効果の解析

以上得られた結果を、わかりやすく説明した図を以下に示す(図2)。「記憶するぞ」と努力すると、大量のCa²⁺ がスパイン(シナプス後部)に流入して、Steroidogenic acute regulatory protein(StAR)を駆動して脳ニューロステロイドの合成が始まる。「誤った記憶を修正したい」と努力すると、少量のCa²⁺ がスパインに流入する。これも脳ニューロステロイドの合成を促進する。合成されたエストラジオールなどは、シナプス膜にある受容体に作用して、長期抑制を促進したり、スパインの新生を引き起こす。同じ神経で合成されて作用するので、「神経シナプス分泌機構」ともいうべきものである。このエストロゲン作用を、環境ホルモンである BPA, DES, NP (多分OPも)などがさまざまにかく乱する¹⁵⁾。

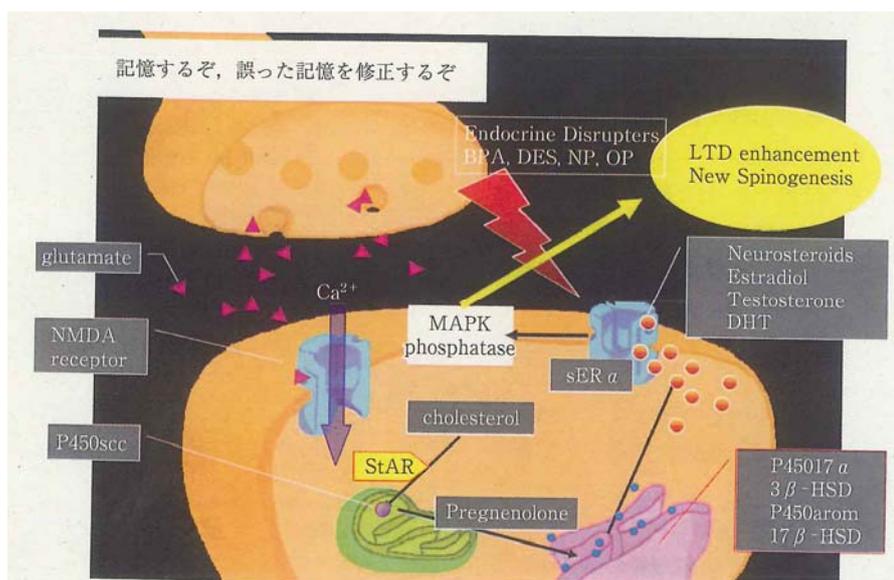


図2 海馬での女性ホルモンの合成と海馬神経伝達制御の機構¹⁾

3.2 研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況

川戸は、CREST 研究が終了した 2005 年度以降も引き続き、脳での精神現象を担う高次情報変換を、生物物理学と分子細胞生物学の立場から解明する研究を行っており、神経情報伝達に伴う電気信号、Ca²⁺信号、ニューロステロイド信号など、情報の受信・変換・発信メカニズムを解析している。謂わば、電気生理イメージング・顕微光 CT などの計測法を縦軸、生物物理学・分子細胞生物学を横軸として研究を進めていると言えよう。川戸によれば、脳は論理的と言うよりも感情的なコンピュータであり、脳海馬の記憶学習は、神経伝達物質のニューロステロイドが制御する感情・精神に強く依存している。

前述のように、ステロイドホルモンは脳内では合成されず、精巣や卵巣、副腎皮質で合成されたものが血流に乗って脳に運ばれ、それが作用しているということが神経内分泌学における過去の定説であったが、川戸らの CREST 研究の成果はこれを覆した点で画期的であった^{3,4,12,13,14}。

脳ニューロステロイドは、海馬の神経細胞に局在するチトクローム P450 の存在下に合成され、シナプスで局所的に作用し神経伝達物質として働いている。すなわち、同じホルモンが部位によって役割を全く異にしていることが特徴的である。

CREST では、エストロゲンの合成経路が脳内にあること、海馬神経シナプスにその受容体 ER α が局在していることを見出し、エストロゲン作用と環境ホルモンによるかく乱作用について明らかにしたり。この研究は、CREST 終了後も継承され、1) エストラジオールなど女性ホルモンの海馬神経シナプスへの作用、とくに記憶学習のモジュレーション^{13, 14, 16, 17, 18, 19}、また、2) テストステロンなど男性ホルモンの海馬神経シナプスへの作用、とくに記憶機能への影響^{20, 21}、について研究が続けられた。

(1) 女性ホルモンの海馬神経シナプスへの作用

更年期のアルツハイマー病など認知症の治療法として、ホルモン補充療法でエストラジオール(E2)を投与すると海馬の記憶能力を活性化できることが臨床的に知られており、海馬での E2 の作用はよく研究されている。

雄ラット海馬スライスに E2 を作用させると、スパイン密度が増加する。この作用を媒介する情報伝達については、ER α と MAPK, PKA, PKC などの蛋白キナーゼ群が働いていることが明らかになった。女性ホルモン補充療法で E2 を投与すると、海馬におけるスパイン密度が増加して記憶能力の活性化につながると説明される。

(2) 男性ホルモンの海馬神経シナプスへの作用^{20, 21}

テストステロン(T)やジヒドロテストステロン(DHT)など男性ホルモンの記憶作用の研究は少なく、高次脳機能での作用はよくわかっていない。川戸らは神経に蛍光色素を注入することで、個々のスパインの密度や形態を共焦点顕微鏡の 3D 画像で可視化し、男性ホルモンの作用を検討した。DHT を雄ラット海馬スライスに作用させると、グルタミン酸神経のスパイン密度が増加し、これはアンドロゲン受容体 AR を介して駆動することを明らかにした。さらに、AR の下流の作用経路には、MAPK, PKA, PKC などの蛋白キナーゼ群が働いていること

も明らかにした。スパインは記憶を蓄える素子なので、DHT や T が記憶力を短時間で高めると考えられる。

また、男性の更年期や加齢により、脳内の T や DHT の低下でスパイン数が減少して記憶機能が低下し、認知症とくにアルツハイマー病が発症するものと考えられる。男性患者に対してはテストステロン補充療法が考えられるが、現在のところ、女性ホルモン補充療法ほど一般化していない。

ほかに川戸らは、現在、以下のようなことをめざしている²²⁾。

- 1) 海馬でのニューロステロイド合成酵素と受容体からなるネットワークの遺伝子解析。
- 2) 遺伝子工学・蛋白質工学などによって受容体や蛋白質を発現した人工脳細胞を用いての上記研究。
- 3) 脳型コンピュータのアルゴリズムを見つけるべく、神経シナプス 3 次元配線の自動解析法の開発。

記憶学習中枢の海馬で合成される脳ニューロステロイドは全く新しいモジュレータであり、シナプス受容体に働き、記憶・学習機能を変動させモジュレートする。川戸らは現在、多電極電気生理とデジタル蛍光顕微システムを用いて、単一神経・シナプスや神経ネットワークの交信機構を解析している。

高次脳機能においては、女性・男性ホルモンは性ホルモンではなく(雄の脳も女性ホルモンを合成する)、ニューロステロイドの代表格であり、神経モジュレータ・神経成長因子として働き、精神現象を規定していることが明らかになった。

これらは抑うつ症やアルツハイマー病の治療効果があり、また、ストレスステロイドは精神抑うつ症の要因である。更に、アクチビン(性ホルモンだが、脳でも作られる)や環境ホルモンとくに合成女性ホルモンが、急性的に海馬の記憶学習を変動させることを見出し、その分子機構を解析している。このように、現在の発展状況は CREST の研究成果をさらに深化させた結果であり、川戸らは、かねてより神経内分泌学を革新しようと、「神経シナプス分泌学」を提唱してきた。

3.3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果

(1) 科学・技術の進歩に貢献する成果

CREST 終了後に継続的に別のファンドを受けた代表的な発展事例として、計測分野での次の 2 つが挙げられる。海馬における脳ニューロステロイドの合成経路発見(CREST)以降、川戸らの研究は、定量性を上げた計測・解析手法を駆使した神経シナプスの作用機構解明や記憶学習のモジュレーションのほうに指向している。

- 1) 「脳スライス中で可視化した神経シナプスの自動解析」(科学技術振興機構・バイオインフォマティクス推進事業)^{7,13,14,15,23,24)}

大脳スライス中の単一神経細胞の樹状突起に存在する個々のスパイン(シナプス後部)を、蛍光色素を注入して可視化すると、ホルモンや薬物の作用を受けて、1時間程度で急性的に数や形態が変動する様子が高感度で観察できる。このスパインの増加・減少や変形を数学的演算を用いて自動的に解析できるソフトウェアを世界で初めて開発することを目指した。川戸らは、前述のようにCRESTを中心とした研究で、スパインが、i) ストレスホルモンで変化する²³⁾、ii) 脳内で合成される女性ホルモン(神経成長因子)やアクチビン(性ホルモン)で新生する²⁵⁾、iii) 環境ホルモンでも新生する¹⁵⁾、iv) これらのスパイン変化はMAPキナーゼ系を介した経路で駆動されている、などの新しい現象を見いだした。しかし、これらの研究に用いる顕微神経可視化解析手法は、熟練研究者の目で1個1個確認する手作業であり、単一神経細胞に関しても完了するまでに数日はかかる。この難点を、自動・高速解析法の開発によって解決しようとした。神経樹状突起の分岐、スパイン位置、及び複雑なスパイン形態を特定し、3次元の共焦点顕微画像から自動的に高速解析できる、新規なアルゴリズムを持つ画期的なソフトウェアを開発した²⁴⁾。これにより、コルチコステロイド増加によるストレス起因のうつ病・パニック的記憶障害、性ホルモン低下による更年期型うつ病、またアルツハイマー病の女性ホルモン補充療法による改善法など、現代社会で緊急の課題に対し、創薬のための新規解析法を提供することができよう。

2)「環境ホルモン記憶学習かく乱のテララーメード多電極計測」(文科省・科学技術振興調整費・産学官連携プロジェクト)^{7,13,14,15,26,27)}

環境ホルモンや脳女性ホルモンの記憶学習効果研究に大きな実績のある川戸(代表者)と、多電極神経計測MED64を開発し脳神経の記憶学習を計測しているアルファメッドサイエンス社とが連携して、環境ホルモン(擬似女性ホルモン)による記憶学習のかく乱につき、異なる脳部位や動物種に対応したテララーメード多電極計測法を開発するプロジェクトである。

海馬や大脳皮質が主な標的である環境ホルモンの記憶学習かく乱は、脳女性ホルモンの神経作用(長期増強・長期抑制のモジュレーション)をかく乱することによって起こる。

川戸らは、環境ホルモン(擬似女性ホルモン)が哺乳類の海馬で記憶学習に急性的にはっきりしたかく乱を与えることを発見し、その分子メカニズムの解析に業績を挙げている。本共同研究では、脳スライスの神経配列に個別に対応した多電極配列をフォトリソグラフィ技術で作成することにより、動物種や脳の部位に個別に対応し、微弱な環境ホルモンの影響を記憶学習(長期増強)計測で検出する世界標準法を確立しようとしている。それを用いて、ビスフェノールA・DES・ダイオキシンを始めとして70種以上に及ぶ環境ホルモンの脳記憶学習へのかく乱をスクリーニングしている^{7,13,14,15)}。

(2) 人材育成からみた参加研究者の活動状況

CREST 当時はポスドクだった高橋泰城は、北海道大学文学研究科の准教授に就任した。現在は行動経済学的手法と神経生物学的手法を組み合わせた神経経済学を展開している。

また、CREST 当時は助教授として、また小南グループの一員としてER α の高純度精製抗体RC-19を作製し、海馬のステロイド合成酵素の遺伝子発現の変動を解析した山崎岳は、現在、広島大学総合科学研究科教授として、環境化学物質の神経作用の分子生物学的解析で活躍している。

CREST 当時、広島大学総合科学研究科教授で、小脳でのステロイドホルモンの合成を見出すなど先駆的な業績をあげた筒井和義は、現在、早稲田大学教育・総合科学学術院の教授に就任し、この分野の指導的立場にある。

さらに、CREST 当時ポスドクとして、海馬でのシナプス膜に女性ホルモン受容体が発現していることを発見・同定した向井秀夫は、現在、日本大学文理学部物理生命システム科学科の助教、同じくポスドクだった北條泰嗣は、現在、東京大学大学院総合文化研究科の特任研究員、博士課程大学院生だった石井寛高は、現在、日本医科大学第一生理学講座の助教に就任している。

3.4 研究成果から生み出された社会的、経済的な効果・効用および波及効果

(1) 医療・福祉に繋がる芽

以上の発展状況から、従来の神経内分泌学の枠に入らない、神経シナプス分泌学という新しい方法論が起ち上がったと言える。この方法論によって、「(A) 記憶を司る海馬は独自にチトクロムP450 系が女性・男性ホルモンを合成し、(B) エストラジオールは、神経シナプス膜上に局在するエストロゲン受容体ER α などに作用し、神経伝達や神経シナプス回路の配線を1 時間ほどで急性的に変動させる。(C) 環境ホルモンはこのような女性ホルモン作用に、1 時間ほどでかく乱を与える。」という現象が、無理なく説明できる。

今後、脳神経が合成する男性ホルモンの作用も、神経シナプス分泌学的に解明されようとしている。また、エストロゲン受容体の下流のシグナル伝達系に関する研究も活発に展開されていくであろう。実際、エストラジオールや環境ホルモンの引き起こすリン酸化カスケードを含む急性効果は、内分泌細胞や血管内皮細胞においても起こることなどが、本CREST研究領域の梅澤研究代表者²⁸⁾や海外の研究グループによって報告されており、今後このような分子メカニズムの深い解析が進んでゆくはずである。

川戸によれば、脳が合成する性ホルモンは、新しい神経成長因子のスーパーファミリーであり、現在BDNF (brain-derived neurotrophic factor) しか考えていない脳の神経栄養因子分野の研究を革新するだろうと見られている。また、神経シナプスに存在するステロイド受容体はER α に限られてはおらず、今後多くの、シナプスに存在するステロイド受容体が発見されて、ステロイド・シグナル伝達の研究が、「核内受容体と転写作用」という伝統的な研究から脱して、大きく発展すると期待される。

社会的に見ると川戸らの研究は、疑わしい環境化学物質が、脳の機能をかく乱するかどうかの判定を行う方法論を提供できたほかに、「女性ホルモン摂取によるアルツハイマー型認知症の治療(ホルモン補充療法)で、どうして海馬の記憶活性が改善するのか」、「うつ病の患者の女性ホルモン補充療法によってうつ状態が改善するのはなぜか」などの疑問に、神経科学的分子メカニズムで答えることができる可能性が出てきたと考えられる。

【参考文献】

1. CREST研究領域「内分泌かく乱物質」 研究課題「脳ニューロステロイド作用を

かく乱する環境ホルモン」研究終了報告書

2. Kimoto,T. *et al.* : Endocrinology 2001: 142,3578-3589
3. Kawato,S. *et al.* : Methods Enzymol.2002: 357,241-249
4. Hojo,Y. *et al.* : PNAS 2004: 101,865-870
5. Kawato,S. *et al.* : Adv.Biophys.2003: 37,1-48
6. Murakami,G. *et al.* : Drug Metab.Rev. 2006: 38,353-369
7. Mukai,H. *et al.* : J. Neurochem. 2007: 100, 950-967
8. Kawato,S. *et al.* : Environ Sci.2004: 11,1-14
9. Mukai,H. *et al.* : Neuroscience 2006: 138,757-764
10. Mukai,H. *et al.* : Neuroendocrinology 2006: 84, 255-263
11. Murakami,G. *et al.* : Biochem.Biophys.Res.Commun.2006: 351,553-558
12. 川戸 佳ら:生体の科学 2007: 58,65-71
13. Ishii H.*et al.* The Neuroscientist (2007) 13, 323-334
14. Hojo Y. *et al.*, Mol Cell Endocrinol. (2008) 290, 31-43
15. Ogiue-Ikeda M. *et al.*, Brain Res. Rev.(2008) 57, 363-375
16. Shikimi *et al.* (2004) Neurosci. Lett. 364, 114-118
17. Hojo Y. *et al.*,Endocrinology (2009) 150, 5106-5112
18. Munetsuna E., Endocrinology. (2009) 150, 4260-4269
19. Kimoto *et al.*, Endocrinology (2010) 151, 5795-5806
20. Hatanaka Y. *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. (2009) 381, 728-732
21. 川戸 佳 : 総合臨床 2010: 59,1546-1550
22. <http://glia.c.u-tokyo.ac.jp/research-j.html>
23. Higo S. *et al.* . PLoS One (2011) Web online
24. Mukai H. *et al.* Cerebral Cortex (2011) Web online
25. 川戸 佳 共立出版 (2007) 「生命システムをどう理解するか(浅島誠 編)」第9章
26. Ooishi Y., *et al.* Cerebral Cortex (2011) Web online
27. <http://glia.c.u-tokyo.ac.jp/proj-j.html>
28. CREST研究領域「内分泌かく乱物質」 研究課題「内分泌かく乱化学物質の細胞内標的分子の同定と新しいバイオモニタリング」研究終了報告書

第3章のまとめ

この領域の特性から考えて、基礎研究面での科学・技術的成果と、レギュラトリー・サイエンス(規制の科学：行政が規制を実施する場合の科学的根拠を提供)及び社会的貢献の両面から研究成果を判断すべきと考えるが、「内分泌かく乱物質問題」の科学的本質が完全に理解され、それに従って適切な対応策を策定できる状況にはまだ至っていない。しかし、その基盤となる科学・技術的側面ではこの研究領域を推進したことによって大きな進展があったと云えよう。内分泌かく乱物質の受容体(女性ホルモン・男性ホルモン・ダイオキシン・甲状腺ホルモン受容体等々)を介した毒性発現機構の一端が解明され、性分化の基本的メカニズム、魚類における性の可塑性が明らかにされつつあることから、「次世代への影響の懸念」に対してある程度の方策を指し示すことにはなった。また、「内分泌かく乱物質問題」を正確に把握・理解することを困難にしている根本的原因はその解析・分析手法が欠如していることにあるが、男性・女性生殖器官への影響を *in vitro* で解析できる手法の開発、分子・細胞・個体レベルでの脳神経系関連研究手法の開発、高感度質量分析計とそれを利用した極微量プロテオーム解析手法の開発、等々、本領域で手掛けられた手法は、内分泌かく乱物質関連の研究を推進する大きな原動力となっているばかりでなく、今後の科学技術を発展させるための基盤技術と位置づけられる。

一方、規制科学や社会貢献という点で見ると、多くの研究代表者は、国内ばかりでなくOECD等々の国際機関においても、専門委員、アドバイザーとして活躍しており国際貢献を果たしている。⁵⁾

さらに、社会的要求に応えた成果として、各種化学物質のヒトでの汚染状況の把握、社会的認知度の高い諸問題(母乳、子宮内膜症、精子数など)への対応やダイオキシン耐用摂取量算定のための基礎データ提供などがあり、これらは適宜情報発信され啓蒙活動として貢献している。反面、いわゆる低用量問題やディーゼル排ガス・微粒子などの問題は将来の検討課題として残されている。

ところで、本領域のように学際的・学問分野横断的課題を扱う環境関連研究分野においては、特定の学問分野での先端的基礎研究を目的とするCREST 本来の趣旨から若干逸脱する部分があると鈴木研究総括(故人)は指摘しておられ、同一基準での事業運営・評価にはなじまない部分があるため、他の何らかの枠組みを用意することも考えるべきと述べている。

研究期間終了後、社会的関心にひと頃のような熱狂はないが、「内分泌かく乱物質問題」に係る諸事象の本態が理解・解決されたという訳ではなく、CRESTによって研究進展のための科学的基盤が整えられたに過ぎず、今後さらなる研究の蓄積が必要と思われる。皮肉な事に、社会的関心の低下と共に、関係研究者の間では、特定時期の特定汚染物質の影響が遅延的に生活の質に大きく影響する可能性が強く認識されるようになって来ている。社会的な一時的熱狂や無関心に影響されることなく、地道に継続的な研究を行うことが求められる。

※本プロジェクトのメンバーであった柳澤 純氏については、同氏が所属する研究室において論文の不正行為があったことが東京大学において認定されています。

認定された不正行為には、本プロジェクトの研究成果とされた論文の一部が含まれています。詳細は、下記をご参照下さい。

http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_261226_j.html.

<http://www.u-tokyo.ac.jp/content/400007786.pdf>.

http://www.jst.go.jp/osirase/20160325_oshirase-2.html