

環境化学物質の免疫系に及ぼす影響

稲寺 秀邦
東京大学

「環境化学物質の免疫系に及ぼす影響」という大きなタイトルをつけましたが、本日、以下の3つのお話をさせていただきます。

はじめに環境中に存在する化学物質の中で、エストロゲン様作用を有する化学物質 (xenoestrogen) のケモカイン産生に及ぼす影響、およびその分子機構についてお話しいたします。

続いて、環境化学物質の中で免疫系に顕著な影響を及ぼす化学物質としてダイオキシンを取り上げ、ダイオキシンにより、ある臓器あるいは細胞において、どの程度の遺伝子の発現が変動するかについて Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) という方法を用いて検討しましたので、その成績の概要についてお話しいたします。

そして最後に、これはオンゴーイングの仕事ですが、ある化学物質が免疫系に影響を与えうるのか、ある特定の臓器に影響を与えうるかどうかを、cDNA マイクロアレイを用いて検討する系を確立したいと思っております。これは toxicogenomics (毒性遺伝情報学) に関する仕事ですが、この概要についてお話させていただきます。

ここに示しますように、環境中にはさまざまなエストロゲン様作用を有する化学物質、xenoestrogen が存在することが知られており、このような xenoestrogen に曝露されることは避けられない状況になっております。中には人工的に合成した化学物質もありますが、phytoestrogen や mycoestrogen のように、自然界にナチュラルに存在する化学物質もあります。あるものは体内において濃縮され、それが人体に何らかの影響を及ぼすのではないかと危惧されております。このような化学物質が免疫系に影響を及ぼしているのかどうかについては、現在ははっきりしない状況であると思えます。

一方、エストロゲンが免疫系に影響を及ぼすことは古くから知られております。例えば女性は男性に比べますと、一般には免疫系の応答が強いことが知られておりますし、DES (合成女性ホルモン: diethylstilbestrol) を投与された女性から生まれたお子さんは、自己免疫疾患になりやすいという報告もあります。また、これもよく知られた事実ですが、さまざまな自己免疫疾患は女性の方が圧倒的に発症頻度が高いことが知られており、例えば関節リウマチ、SLE、原発性胆汁性肝硬変、あるいは甲状腺疾患のうち自己免疫が関与するような疾患は、圧倒的に女性の方が発症頻度が高いことが知られています。ですから、性ホルモンが免疫系に影響を及ぼすことは間違いのない事実です。

環境化学物質が免疫系に影響を与えうる可能性を考える場合は、環境化学物質が免疫系にダイレクトに影響する場合と、生殖器系や脳神経系に影響を与えることによって、インダイレクトに免疫系に影響を与える可能性を考えなければいけないと思えます。私どもは初めに、環境中の化学物質であります xenoestrogen が、免疫系にダイレクトに影響を与えうる可能性を考え、*in vitro* の培養系を用いて検討いたしました。標的分子として用いたものがケモカイン (chemokine) という一種のサイトカインです。ケモカインと申しますのは、chemotactic cytokine、chemoattractant cytokine の、chemo と kine を短縮して作った造語であり、免疫反応において重要な役割を演じるサイトカインであることが知られております。

免疫系の細胞には種々のものがありますが、免疫系の細胞はケモカインに対する受容体を発現しており、免疫系の細胞が炎症の局所に集積して活性化されるとき、ケモカインとケモカインの受容体システムが非常に重要な役割を演じていることが、明らかにされております。この中で、私どもは今回、MCP-1 に注目いたしました。MCP-1 と申しますのは Monocyte Chemoattractant Protein-1 を省略して作った言葉です。単球の遊走と活性化に重要な役割を演じていることが知られている MCP-1 に注目して、MCP-1 の産生に及ぼす環境エストロゲンの影響、およびその分子機構について検討してみました。

今回、用いた細胞株は、ヒト乳癌細胞株の MCF-7 細胞です。MCF-7 細胞を IL-1 に刺激しますと、培養上清中に MCP-1 のタンパクが検出されます。そのタンパク量を ELISA によって定量化しました。

また、MCP-1 のメッセージの発現量については MCP-1 の cDNA を用いた、ノーザンブロット (Northern Blot) にて検討いたしました。また、ヒト MCP-1 遺伝子の発現調節領域を組み込んださまざまなレポーター遺伝子を作成し、エストロゲンがいかなる機構で MCP-1 産生に影響を及ぼすのか、その分子機構の検討を行いました。

ヒト乳癌細胞株の MCF-7 細胞を IL-1 α 、TNF などの炎症性サイトカインで刺激しますと、培養上清中には ng/ml のオーダーで MCP-1 の産生が認められます。すなわち IL-1 刺激後、24 時間目から MCP-1 蛋白が培養上清中に検出され、刺激後少なくとも 72 時間目まで、コンスタントに上昇を続けていきます。

それに伴って、メッセージレベルでも、IL-1 の刺激により 8 時間目 から MCP-1 メッセージの誘導が認められ、24 時間目にピークになります。そこでこの系を用いて、初めに天然のエストロゲンである 17 β estradiol(E2)が MCP-1 の産生に影響を及ぼすかどうかについて検討してみました。

IL-1 刺激と同時に、E2 を培養上清中に添加して、72 時間目に MCP-1 のタンパク量を測定しますと、IL-1 刺激によって上昇した MCP-1 のタンパク量は、加える E2 の濃度依存的 (dose-dependent) に抑制されることがわかりました。そして、この産生の抑制はエストロゲン受容体のアンタゴニストである ICI-182,780 を同時添加しますと完全にブロックされることから、エストロゲンはエストロゲン受容体を介して、MCP-1 の産生を抑えていることが明らかとなりました。次に環境エストロゲンであるビスフェノール A (Bisphenol - A) 、ノニルフェノール (Nonylphenol) の影響について検討してみました。

ビスフェノール A、ノニルフェノールを今の系に加えて、MCP-1 の産生に及ぼす影響を検討しますと、先ほど示した E2 と同様に、ビスフェノール A、ノニルフェノールも、MCP-1 の産生を濃度依存的に抑制することが明らかとなりました。ICI-182,780 を同時添加いたしますとこの抑制効果が完全にブロックされることから、ビスフェノール A、ノニルフェノールは、MCP-1 の産生抑制をエストロゲン受容体を介して起こしているものと思われました。

以上の成績を RNA レベルでノーザンブロットで確認してみますと、IL-1 刺激により MCF-7 細胞において MCP-1 のメッセージが認められますが、E2 あるいはビスフェノール A、ノニルフェノールの添加により、濃度依存的に MCP-1 のメッセージが抑制されることが明らかとなりました。そこで、如何なる機序でエストロゲンが MCP-1 の産生を抑えているかについて、その分子機構の検討を行いました。

ヒトの MCP-1 遺伝子の発現調節領域には、いわゆる estrogen-responsive element のコンセンサス配列は認められません。一方、ヒト MCP-1 遺伝子の発現調節領域-2600 近傍には、2 か所の NF- κ B 結合領域のコンセンサス配列が認められます。そこで、この 2 か所の NF- κ B が機能を有するかどうかを確認するために、このエンハンサー領域を、SP-1 サイトを含む近位プロモーター領域と連結したレポーター遺伝子を作成し、初めに IL-1 に対する応答性を検討してみました。このレポーター遺伝子は ENH と名づけていますが、このワイルドタイプの ENH レポーター遺伝子は IL-1 で刺激しますと、約 10 倍程度にレポーター遺伝子の活性は上昇します。一方、A1、A2 という 2 か所の NF- κ B サイトにミュレーションを入れますと、IL-1 に対する応答性は完全にブロックされますので、2 か所の NF- κ B サイト、A1、A2 ともにファンクショナルであることが明らかとなりました。そこで、この野生型の ENH レポーター遺伝子を用いて E2、ビスフェノール A、ノニルフェノールのレポーター遺伝子の活性に及ぼす影響を検討してみました。

IL-1 で刺激すると同時に、E2、ビスフェノール A、ノニルフェノールを添加して、レポーター遺伝子に及ぼす影響を検討しますとパーシャルではありますが、有意にレポーター遺伝子の活性はブロックされることが明らかとなりました。そこでさらにこのことを確認するために、A1、A2 2 か所の NF- κ B サイトをプローブとした Gel Shift Assay (電気泳動度移動アッセイ) を行ってみました。

IL-1 にて刺激しますと NF- κ B の A1 サイトに対する結合が高まりますが、エストロゲンで処理した核タンパクを用いると、濃度依存的に結合が抑制されることが明らかとなりました。ビスフェノ

ール A、ノニルフェノールで処理した核タンパクを用いても同様に NF - κ B の結合が低下することが確認されました。

次に A2 サイトをプローブにした Gel Shift Assay の結果を示します。

先程の A1 サイトと同様にエストロゲン、あるいはビスフェノール A、ノニルフェノールを添加した核タンパクを用いますと、NF - κ B の A2 サイトに対する結合は、濃度依存的に抑制されることが明らかとなりました。

今までの成績をまとめると、環境エストロゲンのビスフェノール A、ノニルフェノールは、免疫系において重要な役割を演じているケモカインの 1 つ、MCP-1 の産生を抑えることが明らかとなりました。その濃度効果はこの系においては、E2 の 1000 分の 1 から 1 万分の 1 の濃度効果でありました。そして、その分子機構を検討した結果、少なくともその一部は、ヒトの MCP-1 遺伝子の発現調節領域に存在する NF - κ B サイトを介したものであることが明らかとなりました。

よく知られているように NF - κ B は、免疫系の応答において重要な役割を演じる転写因子であり、ケモカインのみならずサイトカインやサイトカインの受容体、あるいは接着因子の発現制御にも重要な役割を演じております。今回示した成績は、環境中の化学物質のあるものは、NF - κ B を介して、MCP-1 のみならず他のサイトカイン類や接着因子などの発現にも影響を及ぼす可能性を示唆するものです。

2 番目の話題として、ダイオキシン (TCDD) による遺伝子の発現変動を SAGE 法を用いて網羅的に解析した成績を述べさせていただきます。

TCDD はさまざまな作用を、生体に対して及ぼすことが知られております。TCDD は、本日のシンポジウムのテーマである免疫系に及ぼす影響(胸腺萎縮など)以外にも、種々の薬物代謝酵素の誘導、生殖器系への影響、催奇形性、肝毒性などを起こすことが知られています。私どもは今回、免疫系に及ぼす影響を調べる前にターゲット臓器として肝臓をあげ、肝臓においてどのような遺伝子の発現が変動するかについて検討してみました。

Lipophilic (親油性) の TCDD は、肝臓や脂肪組織に蓄積することが知られていますし、慢性的にラットに TCDD を投与しますと、肝臓に腫瘍が生じるという報告があります。すなわち TCDD の主要な標的臓器は肝臓であります。そして、この毒性は主として AhR と ARNT の系を介して誘導されることが明らかにされています。そこで、この系を介して肝臓においてどの程度の遺伝子の発現が変動するかを検討したわけでありす。すなわち、C57/B6 マウスに TCDD を単回で経口投与して、TCDD に対する応答を SAGE 法という方法にて検討したわけでありす。

ここに SAGE 法の概要を示します。SAGE 法は、Serial Analysis of Gene Expression を短縮して作った言葉です。これは 1995 年に Vogelstein と Kinzler らのグループが「Science」に報告した方法で、ある細胞や臓器において発現している遺伝子の情報を網羅的に解析する方法です。すなわち、メッセンジャー RNA の poly(A) tail から最も近い 3' 側の CATG サイトから、下流側の 10 ベースペアにより、ある遺伝子の発現情報を代表させる方法です。わずか 10 ベースペアであっても塩基は C、A、T、G の 4 種類ありますので、 4^{10} は約 100 万になり、わずか 10 ベースペアの核酸の配列であっても、約 100 万個の種類がある。ヒトの遺伝子がまだいくつかというのは確定していませんが、仮に 3 万 5000 としても、それを十分に凌駕する数があります。この 10 ベースペアのタグの配列を用いて、ある細胞で発現している遺伝子の発現を、網羅的に解析しようとする方法です。具体的な方法として poly(A) tail から最も近い CATG サイトの下流の 10 ベースペアを、タグと名づけ、これをつなげて、2 つつながったものを 'di-tag' と言いますが、それを連結して、1 つの細胞で発現している遺伝子の情報を、効率よく解析していこうという方法です。この方法を用いますと、ある細胞、あるいは臓器に発現している 1 万個の発現遺伝子の情報を、200 回ぐらいのシークエンスで得ることができます。そしてタグの配列から、遺伝子を特定でき、タグの出現頻度を計測することにより、発現頻度の情報を得ることができます。

現在、ある細胞や臓器で発現している遺伝子の情報を得る方法として SAGE 法以外にも、cDNA マイクロアレイ、オリゴアレイなどがあります。cDNA マイクロアレイは現在の測定感度では、発現量

が低いものについては、検出が難しいことを経験しております。すなわち、発現量が低いところで変動する遺伝子に関しては、cDNA マイクロアレイを用いますと、なかなか感度よく発現量の差を見出すことが難しいことを私どもは経験しております。この SAGE という方法を用いますと、発現している遺伝子の情報は、タグの配列によって代表されますので、仮に発現量が低いもの、差の小さなものであっても、SAGE という方法は感度よく検出できるということになり、この方法を用いて解析を加えたわけでありませう。

このスライドは SAGE 法により、マウスの肝臓においてどのような遺伝子が発現しているかを解析しトップ 10 を示したものです。左側に abundance、すなわち何%発現しているのかという数字を示し、遺伝子名を右側に示しております。マウスの肝臓においてはアルブミンやアポタンパク、あるいは Major urinary protein というマウス特異的な血中のタンパクが、肝臓においては高頻度に発現していることが明らかとなりました。

次に TCDD を曝露したマウスの肝臓から同じように SAGE 法により解析し、コントロールと TCDD 曝露群とで、どのくらいの遺伝子の発現が変動するかを検討してみました。統計的に解析しますと、有意水準を 0.05 とするか、0.01 とするかによって変動遺伝子数は変わり、当然きついでところでしめると、応答遺伝子の数が減少するわけです。有意水準 0.05 で切りますと 346 個、有意水準 0.01 で切りますと 56 個の遺伝子が、マウスの肝臓において有意に動いてくるのが明らかとなりました。TCDD 曝露により上昇する遺伝子もありますが、低下する遺伝子もあります。

このスライドは、有意差の高い順に発現が上昇してくる遺伝子を並べたものです。あとでまとめて示しますので、こういう遺伝子が動いてくるのだということを見ていただければいいと思います。こちらの tag の数字は発現量の目安であり、非投与肝臓、TCDD 曝露の肝臓、それぞれに約 5 万 5000 個の tag のシーケンスを検討し、TCDD を曝露しない状況では 240 個程度の出現頻度があり、TCDD を曝露しますと 490 個程度に発現が上昇するというようにみていただければよろしいと思います。

これは発現が低下した遺伝子のリストを示したものです。

主なものだけをここにピックアップしてまとめます。今まで知られていましたように、CYP1A2 などの薬物代謝酵素は、当然のことながら発現の上昇が認められましたが、それ以外にもメタロチオネイン、アルブミン、ヒートショック・プロテインなどの発現が、TCDD の曝露によって誘導されることが明らかとなりました。発現が低下する遺伝子としてはアポリipoprotein (apolipoprotein)、補体系の遺伝子などがあることが明らかとなりました。

機能別にまとめてみますと、薬物代謝酵素以外にも、さまざまな転写因子や血中蛋白 (先程、アルブミンやアポタンパクが変動することを述べましたが) の遺伝子が変動することが明らかとなりました。すなわち、ダイオキシンは、従来、考えられていたように薬物代謝酵素や、ストレス応答遺伝子のみならず、さまざまな遺伝子の発現を変動させることが明らかとなりました。

そこで、私どもはこの SAGE の結果を踏まえて、ある化学物質が肝臓に影響を及ぼしうのかどうかを、遺伝子発現の変化から見ようという cDNA マイクロアレイシステムの確立をめざしました。今回はマウス肝臓における cDNA マイクロアレイの成績を紹介させていただきます。

この cDNA マイクロアレイにスポットしている遺伝子は、総計で 352 個の遺伝子ですから、必ずしも多い遺伝子はスポットしておりませう。先ほどの SAGE 法の結果により、マウスの肝臓において発現が多いことが確認された遺伝子を選択しております。すなわち発現量が低い遺伝子、あるいはもともと発現していない遺伝子はスポットしてはおりませう。すなわち SAGE 法の結果により、スポットする遺伝子を絞り込んだことが大きな特徴であります。それ以外に薬物代謝酵素やサイトカイン、ケモカインなどもスポットしてあります。白血球が遊走してくる炎症モデルにおいては、肝臓においてもサイトカインやケモカイン、及びその受容体の発現が認められることを確認しておりますので、このような炎症性のメディエーターについてもスポットいたしました。それ以外にポジティブ・コントロールとして、GAPDH、 β -アクチン、ネガティブ・コントロールとしては酵母の遺伝子などをスポットしております。

今回、私どもが確立した cDNA マイクロアレイが、本当に使えるかどうかを確認する目的で、初めに、四塩化炭素（肝毒性を起こす物質として古典的な物質）を用いて、マウスの肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響を検討してみました。すなわち、10 ml/kg を腹腔内に投与して、4 時間目、8 時間目、24 時間目に肝臓を取り出して、cDNA マイクロアレイを用いて解析いたしました。

この cDNA マイクロアレイで解析しますと 4 時間目、8 時間目、24 時間目と経過とともに発現が上昇する遺伝子群、4 時間目あるいは 8 時間目で transient に発現が上昇する遺伝子群、経過とともに発現が減少してくる遺伝子群のように、4 つのクラスターに分かれることが明らかとなりました。

以上のことから、この cDNA マイクロアレイが肝毒性を及ぼす物質のスクリーニングに使えるのではないかと考えており、現在、これ以外の化学物質についても同様な検討を続けているところです。

本日のお話をまとめさせていただきます。初めに、私どもは環境エストロゲンの免疫系のメディエーターであるケモカイン産生に及ぼす影響について検討しました。これは *in vitro* の系ですが、ノニルフェノールやビスフェノール A などの環境エストロゲンは、MCP-1 の産生を抑制することが明らかとなりました。そして、その分子機構の 1 つとして、ヒト MCP-1 遺伝子の発現調節領域に存在する NF- κ B を介したものであることが明らかとなりました。

次に免疫毒性を示す物質として、ダイオキシンをとりあげ、ある臓器において、ダイオキシンの投与により発現遺伝子の変動がどの程度みられるかを、SAGE という方法により解析した成績を述べさせていただきました。その結果、従来知られておりますような薬物代謝酵素や、ストレス応答に関する遺伝子のみならず、その他の遺伝子群が幅広い変動を示したことが明らかとなりました。すなわち、TCDD の免疫抑制を考えるうえでも、TCDD が免疫系に直接に作用することはもちろん考えなければいけません。場合によっては血中タンパクやその他の応答遺伝子があり、それらを介して間接的に機能することもありうることを示唆する成績だと考えております。

次に cDNA マイクロアレイを用いて、ある化学物質が肝臓に影響を与えうるかどうかについて、スクリーニングできるようなシステムを確立したいということで、3 番目の結果をご報告させていただきました。将来的には、免疫系に及ぼす影響についても、このようなアレイシステムが使えるのではないかと考えており、現在、検討しているところです。

本研究は東京大学大学院医学系研究科の分子予防医学教室、および国立環境研究所、三和化学、科研工業と、私が所属しております環境安全研究センターの共同研究であります。

質疑応答

ヴァン・ロバレン：大変ありがとうございました。ではディスカッションに移ります。なにか質問は？

ベッカー：ありがとうございます。米国化学工業協会のリチャード・ベッカーです。大変素晴らしい考察でしたが、MCP-1 抑制を調べた試験について質問があります。生体外エストロゲン様物質、ノニルフェノール、ビスフェノール A では反応が見られましたが、それは 1000 分の 1 から 1 万分の 1 ほど低いものだとおっしゃったと思いますが。

稲寺：そのとおりです。

ベッカー：用量反応については通常の用量反応であり、特殊な低用量反応である U 形のカーブではなかったのですね。

稲寺：そうです。今回の *in vitro* 系においては、低用量での効果は観察されませんでした。ですが、*in vivo* 系で低用量効果が起こりうるのかどうかは検討しておりません。

ベッカー：しかしこの系においては観察されないと。

稲寺：この系では観察されません。

ベッカー：わかりました、ありがとうございました。先生が開発されたステージ技術には非常に期待がもてます。近い将来に研究成果が発表されることが楽しみです。

稲寺：ありがとうございます。

坂部：北里研究所の坂部ですが、MCP-1 のことで 1 つだけ、非常に基礎的な質問です。要するに、ケモカイン MCP-1 のエクプレッションを抑制することはわかりますが、当然、この MCF-7 ですと、グロースのシグナルが入ります。セルサイクルとしては、ほとんどが S 期の方に行ってしまうと思いますが、その辺の MCP-1 のエクプレッションはどのように考えますか。

稲寺：セルサイクルとの関連については検討しておりませんので、先生のご質問にはお答えできないのです。今回どうして MCF-7 細胞を選んだかといいますと、もともと MCP-1 を強く発現している細胞は、単球やマクロファージ系や fibroblast 等で IL-1 等で刺激しますと、確かに発現してきますが、エストロゲンに対する抑制効果が、それほど強くないのです。MCF-7 細胞で行った場合、エストロゲンの効果がきれいに出了たということがあります。そこで分子機構を検討するには、MCF-7 細胞がいいだろうということで、この細胞を選んだという経緯があります。

ですから、先生のおっしゃったようなことも考えなければいけないのかもしれませんが、お答えはできません。

坂部：わかりました。

質問：貴重なご発表をありがとうございました。環境監視研究所で BPA や NP の分析をしており、水道水などからも結構、検出しておりますので非常に興味深く拝見しました。

実験で用いられました BPA や NP の濃度は、どのようなものでしょうか。

稲寺：*in vitro* の系で、 10^{-6} mol でエストロゲン受容体に結合して効果を示すことが、ほかの文献等からわかっております。今回については先程、外国人の方の質問がありましたが、一応、低濃度から検討しておりますが、効果が出たのは、 10^{-7} から少し弱く出て、 10^{-6} で有意差が出るような変化が出たということです。

質問：今後のご報告として、こういうプラスチックの添加剤とか原材料以外で、例えば農薬などについても、されていかれる方向がありますか。

稲寺：一応、このスタディは終わりましたが、今、先生がおっしゃったように、ほかの環境エストロゲンの効果を見る系としても、この系は使えると考えております。免疫系に及ぼす影響をスクリーニングする系として、ある化学物質が免疫系に影響を及ぼすのかどうかを見る系として、この assay

系は使えると考えております。可能であれば行っていきたいと思います。

質問：ありがとうございました。

ヴァン・ロバレン：最後に私のほうから質問させていただきます。TCDDによって制御される遺伝子が、予測された以上に多く見ついているようです。

この情報に関して、何かやろうとしていることがありますか。この情報をどのように利用するつもりですか。

稲寺：その質問は答えるのが難しいです。例えば、肝臓毒性や肝臓の発癌に影響を与えるこれらの遺伝子の影響は分っておりません。また、この遺伝子の発現レベルは Ah 受容体によって直接的に制御されているのかどうか、別の系によって間接的

に制御されているのかも分っていません。はじめは正常マウスの肝臓におけるトランスクリプトームを得たいと思っています。そのうえで、TCDD 曝露のマーカーとなるものが欲しいということで、TCDD で制御される遺伝子を得たいと思っています。そういうことで、この検討をやり始めたわけです。

ヴァン・ロバレン：わかりました。

稲寺：あまりいい答えではありませんが。

ヴァン・ロバレン：他に質問はありますか。では、長い間ご静聴いただいた皆さんにお礼申し上げます。講演者の皆さん、素晴らしい講演をありがとうございました。これでこのセッションを終了いたします。ありがとうございました。