

### 3 環境中の内分泌障害性物質が生体防御系に与える影響に関する研究

担 当 機 関 厚生労働省 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 鈴木和博

重点強化次項 リスク

研究期間 平成11年度～15年度

研究予算総額 109,521千円

#### 研究の背景と目的

免疫系は内分泌系と同様の中胚葉性外胚葉を発生起源とし、両者間では多くのサイトカイン類、受容体群を共有して、生理的なネットワークを形成している。したがって、内分泌攪乱物質は免疫系にも影響をもつと予想される。白血球と総称される免疫細胞は好中球、リンパ球、マクロファージ、好塩基球、好酸球など多種類の細胞群からなるが、それらはいずれも骨髄の血液幹細胞に由来する。機能的に未成熟な細胞が、特定の機能を獲得して特化した細胞になっていくプロセスを「分化」というが、この過程に内分泌攪乱物質を共存させると免疫細胞の機能にどのような影響が出るか検討するのが、「生殖器官の発生・分化に影響をもつ」内分泌攪乱物質の効果を検討するのに合理的と考えられる。ここで重要なのは、内分泌攪乱物質は極めて低濃度での試験となるから実験科学的に再現性のある系を構築すること、そしてなるべくヒトの細胞で研究することであろう。したがって、まずヒト由来の免疫系未分化培養細胞をin vitroの培養系で分化させる系に、内分泌攪乱物質を共存させ影響を見る実験系を組むことにした。そして、遺伝子発現の変化を解析して、環境保全に資する成果を得ることを目的とした。

#### 研究の成果

##### (1) 内分泌攪乱物質の免疫細胞に対する影響の培養試験系の確立

HL-60細胞にジメチルスルホキシド及び顆粒球コロニー刺激因子を加えて6日間培養し、好中球様に分化誘導した。この分化誘導開始時から内分泌攪乱物質を種々の濃度で共存させた。分化後の細胞につき洗浄後、活性酸素能測定および生細胞数測定を行い、細胞あたりの活性酸素産生能を定量する試験系を確立した。

##### (2) 内分泌攪乱物質が白血球の活性酸素産生能獲得に及ぼす影響

白血球の活性酸素産生能を有意に亢進するものが予想外に多く（エストラジオール、ビスフェノールA、アトラジン、トリブチルスズ、ゲニステイン、パラチオン、トリフェニルスズ）、有意の効果を示さないもの（フタル酸ジエチルヘキシル、スチレンダイマー、スチレントリマー、ノニルフェノール）、阻害作用を示すもの（ピンクロゾリン、DDE (p,p'-dichlorodiphenildichloroethylene)）に分類できた。ビスフェノールAとトリフェニルスズのデータを図1に示す。

##### (3) コフィリンの細胞内分布変化に対する影響

アクチン制御蛋白コフィリンの動態に対する内分泌攪乱物質の影響については、紙数が限られているので本ダイジェスト版では省略する。各年度の報告書を参照されたい。

##### (4) 食細胞受容体（CD18）の発現量に対する影響

本研究で使用している刺激剤オプソニン化ゼイモザンは、Mac 1と呼ばれる補体受容体（CR3, CD11b/CD18）に結合してシグナルを細胞内に送り、活性酸素産生をはじめ多くの機能を惹起する。そこで、この受容体レベルの変動をフローサイトメトリー分析で定量的に解析した。その結果、図2に示すように、ビスフェノールAとトリフェニルスズはCD18の発現を濃度依存的に増加させ、かつ、その増加の程度と効果のあった濃度は、上記の活性酸素産生に対する影響とよく相関した。すなわち、刺激物質OZの受容体が増加していたことが、活性酸素の産生能が上昇した原因の一つであった可能性が考えられた。

(5) 白血球機能蛋白の発現に対する内分泌攪乱物質の影響

白血球の多彩な機能は、分子レベルでは様々な蛋白の機能発現の結果として現出する。p47phoxおよびp22phoxはスーパーオキシド生成酵素の細胞質サブユニットであり、コフィリンはアクチンの制御を担う主要な蛋白である。さらに、hckは白血球特有のチロシンキナーゼである。そこで、これら四者につき、その発現変動をウェスタンブロットで解析した。その結果、図3に示すように、トリフェニルスズが最も顕著な発現促進効果を示したほか、ビスフェノールAもp22phoxの発現を有意に促進した。しかしゲニステイン始め、図には示さなかった他の内分泌攪乱物質（パラチオン、DDT、アトラジン、ピンクロゾリン）は有意の変化をもたらさなかった。

(6) 転写因子PU.1の活性レポーターベクターの設計・構築とその発現細胞株の樹立

近年、EtsファミリーのPU.1が、白血球の分化に特異的に発現し機能する転写因子であることが明らかにされてきた。内分泌攪乱化学物質の免疫影響を究明するには、PU.1の活性変化をモニターすることが重要となる。そこで、本研究では、PU.1レポーターベクターの新規構築とその安定発現細胞株の樹立に取り組んだ。ここでは経過の詳細は省略するが、安定細胞クローンA-4-7を樹立することが出来た。この細胞株は、今後の化学物質の影響を検討するのに好適な細胞である。なお、このクローン化細胞は凍結保存可能で、解凍後も十分な活性を示す安定細胞株であること、および遺伝子導入していない親株HL-60細胞と比べて、内分泌攪乱物質の影響をほぼ同様に示すことも確認した。

(7) 分化誘導過程におけるPU.1活性の経時変化と内分泌攪乱物質の影響

転写因子PU.1は、好中球の機能を担う重要な蛋白（CD18、phox蛋白など）の発現を制御している。そこで、前項で樹立した細胞株（A-4-7）を用いて、好中球へ分化する場合のPU.1活性の経時変化を検討した。その結果、図4に示すように分化誘導後徐々に上昇し、3日目をピークとしたのち、徐々に低下するパターンが得られた。その分化誘導時に種々の内分泌攪乱物質を共存させると、ビスフェノールAおよびDDTでPU.1活性の顕著な上昇が認められた。また、パラチオンやゲニステインではコントロールとほとんど変わらず、トリフェニルスズでは活性の低下が観察された。上述したビスフェノールAの活性酸素産生能亢進は、このPU.1活性の上昇と関連がある可能性がある。また、トリフェニルスズでは逆にPU.1活性の低下が見られ、これはこのあとで述べるいくつかの遺伝子の発現が変動していることと深く関連している可能性が大きいと思われる。また、「内分泌攪乱物質」と一括しても化合物により白血球分化に及ぼす影響の内実は様々であることが、分子レベルで示されたことになる。

(8) ビスフェノールAの作用とエストロゲン受容体の関係

ビスフェノールAの効果は、多くの場合エストロゲン受容体を介したものと考えられてきたが、その結合活性はエストロゲンと比べて10,000倍以上も低い上、白血球ではエストロゲン受容体発現量も少ない。そこで、本研究で捉えたビスフェノールAの効果はエストロゲン受容体を介したものの否か、競合阻害剤タモキシフェンを用いて検討した。その結果、タモキシフェンは、ビスフェノールAの作用を競合阻害しなかった。したがって、ビスフェノールAの作用はエストロゲン受容体を介したものと異なることが示唆された。

(9) DNAアレイを用いた遺伝子発現変動の解析

最近、多くの既知の遺伝子DNAをスライドガラスや人工膜上に高密度に並べて配置し、試料中のDNAをハイブリダイズさせることにより遺伝子発現の変動を網羅的に解析する手法が開発された。いわゆる、「DNAチップ」とか、「DNAアレイ」を使う手法である。本研究でも、誘導4日目の細胞についてDNAアレイで試験した。その結果、表1に示すように、ビスフェノールA、ゲニステインともに顕著な変動は示さなかったが、チロシンフォスファターゼLC-PTPが共通して減少し、これは次のトリフェニルスズでも観察されたことから、活性酸素産生を亢進させる内分泌攪乱物質に共通のメカニズムかもしれない。また、トリフェニルスズでは多くの遺伝子発現に変動が見られ、特にG-CSF受容体やケモカイン（MCP-1, 2, 3）の上昇、NOTCH1やLC-PTPの低下などは好中球への分化を亢進する効果を分子レベルで裏付けるものであろう。ただ、このアレイ上にはまだ全ての機能蛋白遺伝子が配列されているわけではないので、とくにphox系蛋白などは、次項のリアルタイムPCRで解析した。

(10) リアルタイムPCRによる遺伝子発現変動の定量的解析

活性酸素産生に直接関与する蛋白群（CD18、p47phox、p67phox）、PU.1の標的遺伝子G-CSFR（顆粒球コロニー刺激因子受容体）およびDNAアレイで内分泌攪乱物質に共通して変動の見られたLC-PTP（白血球チロシンフォスファターゼ）についてリアルタイムPCRにより解析した。その結果、図5に示すように、トリフェニルスズによるCD18、p47phox、p67phox発現の促進、LC-PTP発現の低下が顕著であった。ビスフェノールAおよびDDTはいずれの蛋白発現についても有意に上昇させた。

本研究において複数の内分泌攪乱物質につき分化後の白血球の機能を変化させていることを初めて検出し、そのメカニズムを追究してきたが、ここで白血球の機能蛋白の発現量に変動していることが分子レベルで裏付けられたことになった。

#### (11) 白血球分化時におけるサイトカイン産生

好中球は、従来はTNF- $\alpha$ やIL-8などの炎症性サイトカインが作用する細胞群の一つとされてきたが、近年では単球系細胞ばかりでなく、好中球自体もこれらのサイトカインの産生細胞としての役割が認められている。そこで、好中球への分化過程に共存させた内分泌攪乱化学物質が、サイトカイン産生にどのような影響をもつか検討した。その結果、表2に示すように、この分化培養系ではIL-8が構成的に産生されており、それはTBTの濃度依存的に顕著に促進された。nMオーダーで明瞭な効果を示しており、TPTでも類似の効果が得られたことから、有機スズ化合物が好中球分化を促進していることを裏付ける結果と言える。

#### 【まとめ及び考察】

内分泌攪乱物質が白血球分化過程にどのような影響を及ぼすかについて、以下の方法により解析した。(1)オプソニン化ゼイモザン(OZ)刺激による活性酸素産生能、(2)OZの受容体CD18のフローサイトメトリによる解析、(3)ウェスタンブロッティングによる白血球機能蛋白の発現変動、(4)分化調節転写因子PU.1の活性変動、(5)エストロゲン受容体の競合阻害薬を用いたビスフェノールAの標的分子の検討、(6)DNAアレイを使用しての遺伝子発現変動の検索、(7)リアルタイムPCRによる特定遺伝子発現変動の精査、(8)プロテインアレイ法による白血球分化途上の各種サイトカイン濃度の定量。以上の結果を総合するとビスフェノールAの活性酸素産生能亢進は、PU.1活性の上昇を介した白血球機能蛋白CD18、p47phox、p67phoxの発現亢進によるものであることが示された。また、トリフェニルスズでは逆にPU.1活性の低下が見られながらも、機能蛋白CD18、p47phoxなどの発現は上昇していた。それらは、PU.1以外の調節機構を介したものと考えられる。また、IL-8の産生促進がnMオーダーの有機スズ化合物で明瞭に見られており、好中球分化を促進していることを裏付けた。本研究は、全国紙の取材を受けて紹介され(読売新聞、2000年10月30日夕刊、毎日新聞2001年2月6日夕刊)分析用にデザインしたPCRプライマーは、新規開発配列として、国際データベースへの登録を依頼されて、登録した(RTPPrimerDB、ID761-765)。

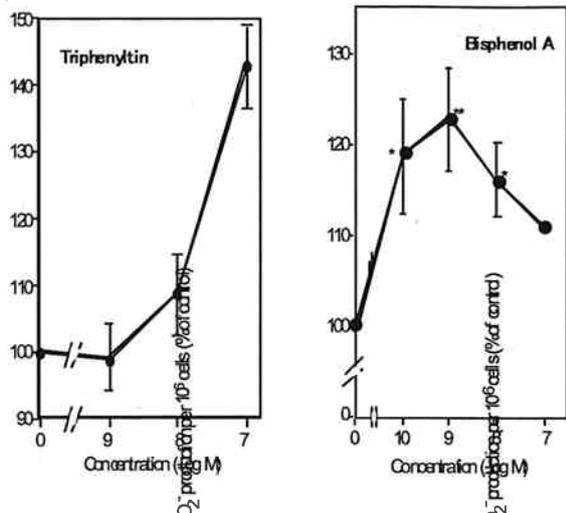


図1 HL-60細胞の活性酸素産生増進に対するビスフェノールAおよびトリフェニルスズの効果

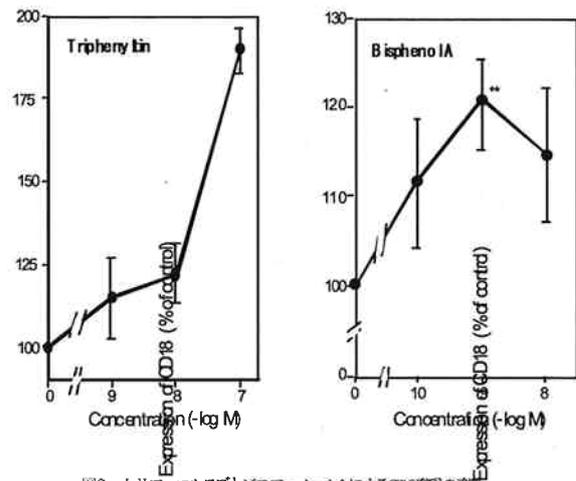


図2 トリフェニルスズとビスフェノールAによるCD18発現の効果

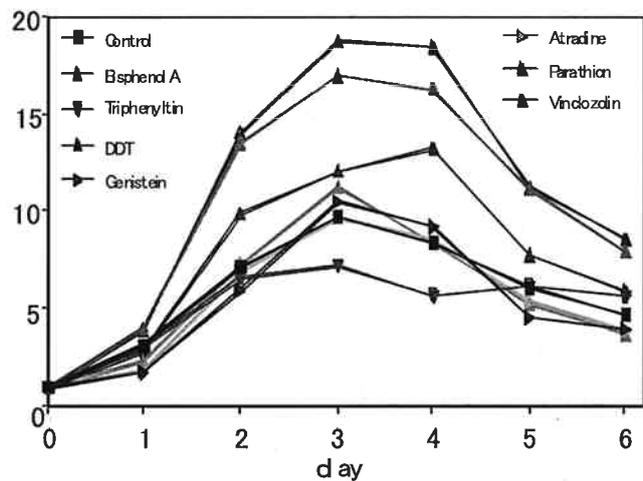
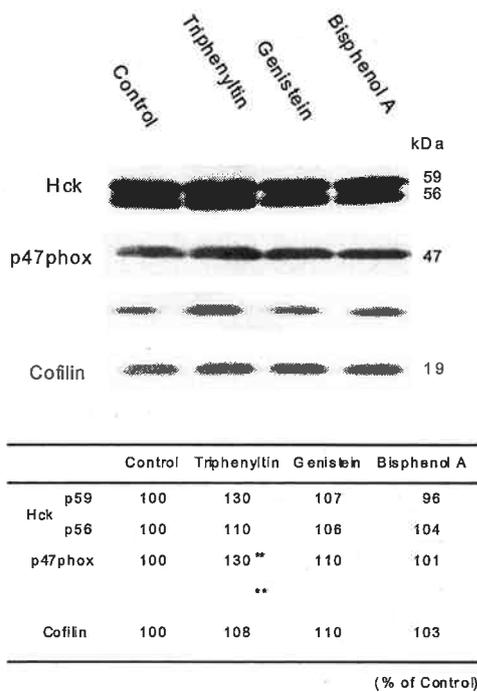


図4 HL-60細胞分化時のPU.1活性に対する内分泌系物質の影響

表1 DNAアレイによる遺伝子発現変動の解析

1) ビスフェノールA									
#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	Ratio		Gene	
		Control	ED			Up	Down		
1	C5d	25	10	Down	-15			CMRF35 antigen precursor	
2	D3k	91	46	Down	-45		2	protein tyrosine phosphatase LC-PTP (HEPTP, PTPN7)	
3	D5k	30	7	Down	-23			tyrosine protein kinase itk/tsk, T-cell specific kinase	
2) ゲニステイン									
#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	Ratio		Gene	
		Control	ED			Up	Down		
1	C5d	25	11	Down	-14			CMRF35 antigen precursor	
2	D5k	30	8	Down	-22			tyrosine protein kinase itk/tsk, T-cell specific kinase	
3) トリフェニルスズ									
#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	Ratio		Gene	
		Control	ED			Up	Down		
1	A1l	81	29	0.36	-52		2.8	probable G-protein-coupled receptor 5 (GPR5)	
2	A1m	146	75	0.51	-71		1.9	probable G-protein-coupled receptor 13 (GPR13, CMK BRL1)	
3	A3m	46	81	1.76	35	1.8		granulocyte colony stimulating factor precursor (G-CSF-R)	
4	A5j	27	13	Down	-14			erythroblastosis virus oncogene homolog (ETS-1, p54)	
5	A7g	154	77	0.5	-77		2	60S ribosomal protein L22 (RPL22), EAP, HBP15	
6	B1c	39	21	0.54	-18		1.9	cell surface glycoprotein A15, TALLA-1, MXS1	
7	B1f	253	147	0.58	-106		1.7	neurogenic locus notch protein homolog 1 (NOTCH1), TAN1	
8	B1h	24	9	Down	-15			natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1)	
9	B2i	64	28	0.44	-36		2.3	eosinophil lysophospholipase, Charcot-Leyden crystal protein	
10	B3n	29	14	Down	-15			interleukin-1 beta precursor (IL-1, IL1B), catabolin	
11	B5g	72	125	1.74	53	1.7		monocyte chemotactic protein precursor (MCP-1), MCAF, JE	
12	B5j	66	25	0.38	-41		2.6	lymphotactin precursor (LTN), cytokine scm-1x, lymphotaxin	
13	B5l	29	73	2.52	44	2.5		CC chemokine eotaxin precursor, eosinophil chemotactic protein	
14	B5m	107	46	0.43	-61		2.3	CX3C chemokine precursor	
15	B5n	23	79	3.43	56	3.4		monocyte chemotactic protein 2 precursor (MCP2), HC14, SCYA8	
16	B6a	26	44	1.69	18	1.7		monocyte chemotactic protein 3 precursor (MCP3), NC26, SCYA7	
17	B6f	19	6	Down	-13			platelet-derived growth factor B subunit precursor (PDGFB)	
18	C1c	19	36	1.89	17	1.9		complement decay-accelerating factor precursor (DAF), CD55	
19	C1d	117	206	1.76	89	1.8		monocyte differentiation CD14 antigen precursor, LPS-R	
20	C1i	53	6	Down	-47			intercellular adhesion molecule 2 precursor (ICAM2), CD102	
21	C2e	60	111	1.85	51	1.9		CD44 antigen hematopoietic form precursor (CD44H), PGP-1	
22	C2i	24	49	2.04	25	2		lymphocyte function-associated antigen 3 precursor (LFA3)	
23	C5d	25	10	Down	-15			CMRF35 antigen precursor	
24	D1f	55	32	0.58	-23		1.7	paired box protein PAX-5, B-cell specific transcription factor	
25	D1j	39	22	0.58	-17		1.8	NF-ATc	
26	D3k	91	40	0.44	-51		2.3	protein tyrosine phosphatase (LC-PTP), HEPTP, PTPN7	
27	D5k	30	10	Down	-20			tyrosine-protein kinase itk/tsk, T-cell specific kinase	
28	D6f	16	28	1.75	12	1.8		induced myeloid leukemia cell differentiation protein MCL-1	
29	D6h	22	46	2.09	24	2.1		BCL-2-related protein A1 (BCL2A1), BFL1 protein, GRS protein	
30	D7b	78	32	0.41	-46		2.4	nonsecretory RNase precursor, eosinophil-derived neurotoxin	
31	G13	304	119	0.39	-185		2.6	brain-specific tubulin $\alpha$ 1 subunit (TUBA1)	

図10 内分泌攪乱物質の遺伝子発現に対する影響のリアルタイムPCRによる解析

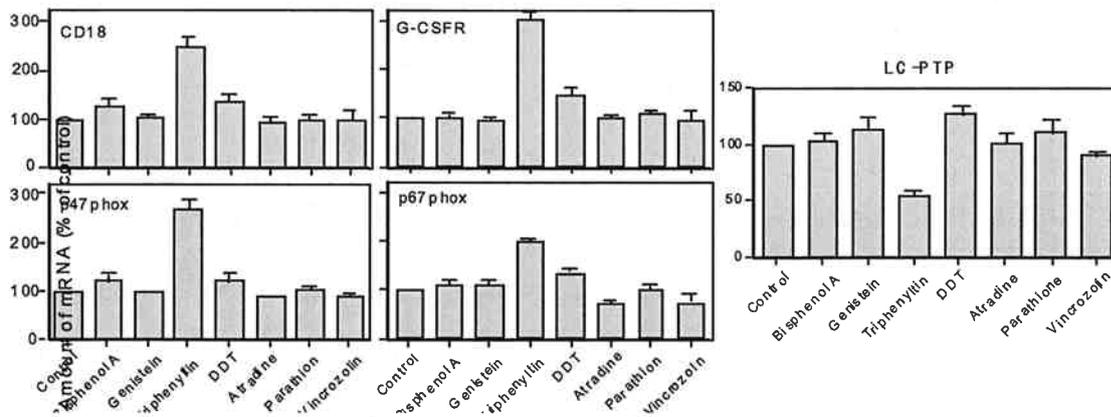


表2 好中球分化過程におけるサイトカイン産生に対するトリフェニルスズ (TB T) の効果

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	GM-CSF	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$
0	0.80	1.06	N.D.	26.23	1.74	1.83	1.09	0.56
TB T 1 nM	1.07	1.79	N.D.	60.15	2.79	2.85	0.44	2.49
10 nM	1.33	2.71	N.D.	65.30	2.74	3.79	0.44	2.78
100 nM	0.65	1.64	N.D.	78.01	2.34	2.85	0.55	1.90
1 $\mu$ M	1.07	2.10	N.D.	85.21	1.89	2.96	0.55	3.08
10 $\mu$ M	1.20	2.22	N.D.	166.73	N.D.	3.43	0.66	2.05
100 $\mu$ M	0.93	2.34	N.D.	9.73	N.D.	2.73	N.D.	2.78

(単位: pg/ml)

研究発表

発表題名	掲載方法/学会等	発表年月	発表者
(主な紙上発表)			
・ Triphenyltin enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 Cells	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> <b>306</b> , 26-31	2003. 7	渡辺、安達、平山、笠原、鈴木
・ Bisphenol A significantly enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 cells	<i>Int. Immunopharmacol.</i> <b>3</b> , 1601-1608 <i>J. Biol. Chem.</i> <b>277</b> , 45566-45571	2003. 10	渡辺、安達、楠井、平山、笠原、鈴木
・ Antisense Oligonucleotide to Cofilin Enhances Respiratory Burst and Phagocytosis in Opsonized Zymosan-stimulated Mouse Macrophage J774.1 Cells	<i>J. Biol. Chem.</i> <b>277</b> , 544-549	2002. 12	安達、武内、鈴木
・ LIM-kinase 1 Modulates Opsonized Zymosan-triggered Activation of Macrophage-like U937 Cells. Possible Involvement of Phosphorylation of Cofilin and Reorganization of Actin Cytoskeleton		2002. 1	松井、松上、安達、楠井、平山、渡辺、大橋、水野、山口、笠原、鈴木
(主な口頭発表)			
Effects of endocrine disruptors on gene expression during differentiation of leukocytes	The 33rd Annual Meeting of Japan Immunology Society 日理生化学会	2003. 12	渡辺、安達、平山、笠原、鈴木
白血球の遺伝子発現に対する内分泌攪乱と化学物質の影響		2002. 10	渡辺、安達、平山、笠原、鈴木
白血球細胞の分化に対する内分泌攪乱と化学物質の影響	フォーラム2001: 衛生化学・環境トキソロジー	2001. 10	渡辺、安達、楠井、笠原、鈴木
白血球細胞の分化に対する内分泌攪乱と化学物質の影響	第30回日理免疫学会総会・学術集会	2000. 11	渡辺、安達、楠井、笠原、鈴木