

内分泌かく乱物質と男児外生殖器疾患との因果関係に関する研究

国立環境研究所環境リスク研究センター
曾根 秀子

はじめに

内分泌かく乱物質は、「内分泌系の機能を変化させることにより、健全な生物個体やその子孫、あるいは集団（またはその一部）の健康に有害な影響を及ぼす外因性化学物質または混合物」と、世界保健機構・国際化学物質安全計画で定義されている。その多くは、さまざまな核内受容体に作用して転写活性を示す。ビスフェノール A (BPA) は、最初にエストロゲン受容体 α (ESR1) アゴニストであると同定された内分泌かく乱物質の1つである。BPA は、妊娠母親の血清、臍帯血、胎児血清、羊水および胎盤においては、1~4 ng/mL (4~16 nM 相当) の範囲で検出されており [1, 2], BPA がヒト細胞において直接ステロイド産生を阻害することが示され、男児生殖器に対する健康影響が心配されている [3]。また、停留精巣や尿道下裂などの男児外生殖器疾患が増加しているという疫学的データが蓄積されたことから、遺伝因子だけではなく、環境因子もその疾患の発症や進展に関与しているかもしれないと考えられるようになった。そこで、筆者らのグループは尿道下裂、停留精巣およびマイクロペニスなどの男児外生殖器疾患と BPA 曝露との因果関係を調べるために、BPA が関与する核内受容体とその転写活性化遺伝子に着目し、その遺伝子多型頻度と停留精巣や尿道下裂患者の発生頻度とのリスク解析および患者由来細胞における BPA の応答性に関する研究を実施した。本稿では、他の研究者の知見とともにわれわれの研究成果について概説する。

Bisphenol A (BPA) の雄性生殖における内分泌かく乱作用

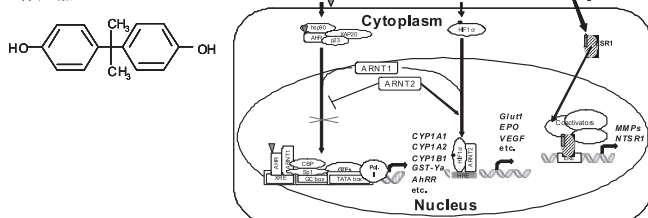
実験動物における BPA の雄性外生殖器に対する影響は、相反した結果が混在している。VomSaal FS グループでの前立腺重量の増加や精子数の減少の報告 [4], 最近では Chitra らがラット精巣上体中の精子数の減少 [5] を、小林らがラット精巣上体重量の低下を報告している [6]。一方、多くの他のグループが同様な実験を行ったが、影響は確認できていない。BPA よりも ESR1 に対するアゴニスト活性が100倍以上強い diethylstilbe-

strol (DES) では、新生児期で DES に曝された成体雄のマウスは、包皮の鞘分離を含むペニスの奇形、ペニスの寸法の縮小と脂肪細胞と海綿体ペニスの平滑筋細胞と海綿静脈洞の損失の蓄積を誘発する。DES で誘発されるこれらの発達奇形の全ては ESR アンタゴニスト、アドロゲン受容体 (AR) 作用薬 DHT またはテストステロン (T) の共処置によって軽減されるため、ESR と AR 経路がペニスの異常発育の一部を媒介していることを示唆するものである [7]。また、新生児期のエストロゲン曝露による T サージの抑制は、ESR1 アンタゴニストでほぼ回復するので、ESR1 を介すると考えられる。したがって、臨界期に生じる低アンドロゲン状態が、ペニスの間質細胞を脂肪生成の増加に再プログラムしてペニス奇形につながると考えられている。

フランスの N'Tumba-Byn らは、6.5~10.5 妊娠週 (GW) のヒト精巣、または、それに相当する性交後 (dpc) 14.5 日のラットおよび dpc12.5 のマウスの胎児精巣の器官培養システムにおける BPA の影響を調べた。ヒトの培養精巣において BPA の 10 nM 濃度はテストステロン分泌を減少させたが、用いた DES のどの濃度でも影響を示さなかった。ラットおよびマウスでは BPA および DES とも 10 μ M レベルでテストステロン分泌の減少を示した。これらの発見は、種特異的な感受性の違いや BPA と DES の作用が同一でないことを示唆している。さらにマウスにおける BPA 10 μ M のテストステロン分泌減少作用は、ER α ノックアウトマウスにも同様に観察されたことから BPA のテストステロン分泌減少作用は、ESR1 を介さない別のシグナリング経路が関与していることが示唆されている [8]。

それでは、BPA の標的分子は何なのであろうか？ 最近のヒト細胞における受容体研究から、BPA は、さらに ESR1 アゴニスト作用を示すより低濃度で ESR1 および ESR2 (EP β) のアンタゴニスト作用を示し [9], エストロゲン受容体型のサブファミリーの1つである Estrogen-related receptor (ERRG) の強いアゴニスト (結合親和性 IC₅₀ 9.9 nM) であることを証明している [10]。このように、BPA は、1 分子で3種類の異なる作用点をもつ化学物質である可能性がある。ERRG は、正常の

A) Bisphenol A (BPA)の化学構造と作用点



B) 多因子・高次元解析multifactor dimensionality reduction (MDR)法による疾患と遺伝子多型の相関解析

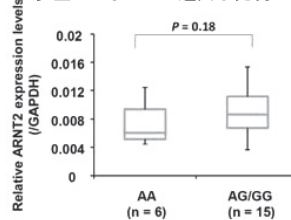
Disease	SNPの組み合わせ	TBA	CVC	P-value
CO (n = 95)	rs5000770 (ARNT2)	0.5318	7/10	0.377
	rs4919686 (CYP17A1); rs5000770 (ARNT2)	0.5999	8/10	0.055
	rs4919686 (CYP17A1); rs5000770 (ARNT2)	0.6281	10/10	0.011
HS (n = 98)	rs2069521 (CYP1A2)	0.6958	10/10	0.001
	rs2069521 (CYP1A2); rs2278705 (ARNT2)	0.6998	9/10	0.001
	rs2069521 (CYP1A2); rs2278705, rs5000770 (ARNT2)	0.6576	10/10	0.001

Control = 236, P values are from the sign test. TBA, testing balanced accuracy. CVC, cross validation consistency. これらの結果は、疾患の発症は一つの遺伝子変異の原因と考えにくいことを示唆している。

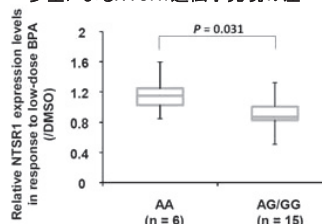
図1 ビスフェノール A (BPA) と男児外生殖器疾患との関連性解析のまとめ

停留精巣 (CO) や尿道下裂 (HS) などの男児外生殖器疾患の発症や病態の進展と BPA の因果関係を調べるために、患者の包皮皮膚 (FF) 由来細胞を用いて、BPA の細胞応答性と BPA 応答遺伝子の多型解析を行った。文献 [13, 14] より抜粋, 改変。

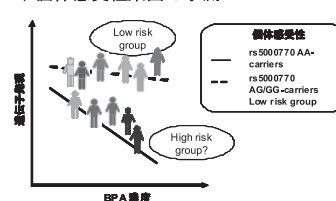
C) ARNT2遺伝子のrs5000770SNPの多型によるARNT2遺伝子発現の差



D) ARNT2遺伝子のrs5000770SNPの多型によるNTSR1遺伝子発現の差



E) 個体感受性集団の予測



生殖系組織においては、胎盤の trophoblast 栄養膜細胞に強く発現しており、trophoblast の分化の過程でエストロゲンからテストステロンに変換する酵素アロマターゼの遺伝子発現を酸素依存的に調節していることが報告されている [11]。また、皮膚組織や前立腺組織においても ERRG タンパク質が高発現している部位とそうでない部位がある。ESR1 (-) の乳癌上皮や前立腺癌組織に高発現している報告もある。尿道下裂や停留精巣の子の胎盤の trophoblast では、エストロゲン含有量が高いとの報告があり、先述した動物実験の結果と合わせて考察すると、これら ERRG を発現している組織においては、BPA は何らかの影響を及ぼしている可能性がある。また、高濃度10 μM 以上ではあるが、BPA は AhR や PXR と作用して下流の遺伝子発現を転写調節している。

患者由来細胞における BPA の細胞応答性と遺伝子多型解析

われわれは、停留精巣 (CO) や尿道下裂 (HS) などの男児外生殖器疾患の発症や病態の進展と BPA の因果関係を調べるために、患者の包皮皮膚 (FF) 由来細胞を用いて、BPA の細胞応答性と BPA 応答遺伝子の多型解析を行った (図1)。10 nM BPA および0.1nM E2 曝露による変動した遺伝子発現プロファイルのなかから、有意な発現上昇を示した Neurotensin receptor 1 (NTSR1) および有意に減少したmatrix metalloproteinase 11 (MMP11) 遺伝子の発現を両患者間で調べた [12]。NTSR1 は HS 患者で高く、MMP11については、HS グループで有意に低かった。NTSR1 は、G-タンパク質共役受容体の1つで成長ホルモン促進タンパク質とヘテロ2量体を形成して消化管や下垂体分泌を調節している。MMP11は、亜鉛依存的なペプチド内部加水分解酵素であるファミ

リーの1つである。この酵素ファミリーは、細胞外マトリックスを分解する働きをもっており、癌の転移だけでなく発生過程や生殖機能において重要な働きを示すことが知られている。未だ男児外生殖器の病因と NTSR1 や MMP11 との関連性は報告されていないが、尿道下裂の病因には、尿道形成過程における上皮細胞の封着形成が鍵ステップの1つであると考えられている。したがって、MMP11 発現の抑制制御が、発達中の尿道および外生殖器の細胞接着能の低下に結びつき、尿道下裂を引き起こす、あるいはその病態の進展を促進するものと考えられた。次にわれわれは、包皮皮膚由来ゲノム DNA を用いて BPA 関連の核内受容体遺伝子 (AHR, AHRR, PXR) それらのヘテロ 2 量体のパートナー遺伝子 (ARNT, ARNT2, RRXRA, RXXB, RXXG) およびそれらの転写下流遺伝子 (CYP1A2, CYP1B1, CYP2B6, CYP3A4) の多型解析を行った [13]。これらのうち、ARNT2 の rs2278705, rs5000770 や CYP1A2 の rs2069521 が最も疾患リスクに関与していることが示唆された。特に、ARNT2 の rs5000770 は、多型により ARNT2 の発現が異なっていた。先述の NTSR1 の発現も ARNT2 rs5000770 の遺伝子多型によって異なっており、BPA の応答性に影響するものと考えられた [14]。そこで、今度は、ARNT2 の遺伝子発現が ESR1 依存性かどうかを ESR1 の発現が高い MCF7 細胞を用いて調べた。ESR1 の発現がほとんどない細胞株 LNCaP では ARNT2 の遺伝子発現は全くみられなかった。ESR1 の特異的阻害剤で処理した場合も ARNT2 の発現は抑制され、ARNT2 の遺伝子発現は ESR1 に依存していることが考えられた。そこで、siRNA 法によって ARNT2 mRNA を特異的に阻害した場合、ARNT2 のヘテロダイマーである HIF1 α のシグナル伝達に変化を及ぼすかどうか調べた [15]。その結果、最も変化の大きかった遺伝子が、MMP1 (matrix metalloproteinase 1), SAG (S-antigen; retina and pineal gland/arrestin), VHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase) であり、これらは、MMP11 と同様の細胞外マトリックスの接着や、ホルモン刺激、細胞増殖シグナルに関与する遺伝子であることが分かった。今後、FF 細胞におけるこれら遺伝子の役割や機能解明に関する研究が進展できれば、化学物質応答に関する指標の有用なバイオマーカーになりうるものと考えられた。

おわりに

BPA の研究が進むに連れて、ヒトと動物の応答性が異なること、濃度によって作用点異なることなどがより明確となってきた。BPA は ESR1 だけでなく ERRG, PXR, AHR と複数の核内受容体のリガンドとなりうるため、内分泌生殖疾患の病態の各ステージに影響を及ぼす可能性がある。われわれの健康に BPA の曝露がどのように、どれだけ関与しているのか、また、BPA だけでなく、同じフェノール骨格をもつ環境フェノール類を総合的に測定すると体内負荷量はもっと上昇するはずである。臨床検体由来の組織や細胞における環境化学物質の曝露量と応答性の関係がより明確になれば、日常生活環境の改善や予防・治療薬の開発にもつながる。多くの研究者によるさらなる研究の進展を期待する。

引用文献

1. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJ, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A (2010) *Environ Health Perspect* 118, 1055-1070.
2. Fénichel P, Déchaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, Pacini P, Wagner-Mahler K, Pugeat M, Brucker-Davis F (2012) Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum Reprod* 27, 983-990.
3. Zhang X, Chang H, Wiseman S, He Y, Higley E, Jones P, Wong CK, Al-Khedhairi A, Giesy JP, Hecker M (2011) Bisphenol A disrupts steroidogenesis in human H295R cells. *Toxicol Sci* 121, 320-327.
4. Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS (2005) Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 7014-7019.
5. Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP (2003) Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 185, 119-127.
6. Kobayashi K, Kubota H, Ohtani K, Hojo R, Miyagawa M (2012) Lack of effects for dietary exposure of bisphenol A during in utero and lactational periods on reproductive development in rat offspring. *J Toxicol Sci* 37, 565-573.
7. Goyal HO, Braden TD, Williams CS, Williams JW (2009) Estrogen-induced developmental disorders of the rat penis involve both estrogen receptor (ESR) -and androgen receptor (AR) -mediated pathways. *Biol Reprod* 81, 507-516.
8. Li Y, Burns KA, Arao Y, Luh CJ, Korach KS (2012) Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals

- bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor α and β in vitro. *Environ Health Perspect* 120, 1029-1035.
9. Okada H, Tokunaga T, Liu X, Takayanagi S, Matsushima A, Shimohigashi Y (2008) Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect* 116, 32-38.
 10. N'Tumba-Byn T, Moison D, Lacroix M, Lecureuil C, Lesage L, Prud'homme SM, Pozzi-Gaudin S, Frydman R, Benachi A, Livera G, Rouiller-Fabre V, Habert R (2012) Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PLoS One* 7, e51579.
 11. Kumar P, Mendelson CR (2011) Estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) mediates oxygen-dependent induction of aromatase (CYP19) gene expression during human trophoblast differentiation. *Mol Endocrinol* 25, 1513-1526.
 12. Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T, Sone H (2012) Identification of novel low-dose bisphenol a targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS One* 7, e36711.
 13. Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H (2012) Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet* 57, 434-441.
 14. Qin XY, Sone H, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Hisada A, Zaha H, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T (2012) Individual variation of the genetic response to bisphenol a in human foreskin fibroblast cells derived from cryptorchidism and hypospadias patients. *PLoS One* 7, e52756.
 15. Qin XY, Wei F, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, Sone H (2011) siRNA-mediated knockdown of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 affects hypoxia-inducible factor-1 regulatory signaling and metabolism in human breast cancer cells. *FEBS Lett* 585, 3310-3315.