

「内分泌かく乱物質」
平成10年度採択研究代表者

名和田 新

(九州大学医学部 教授)

「核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質」

1. 研究実施の概要

ステロイドホルモンと結合した受容体は、アンドロゲン受容体の場合は細胞質から核内へ移行し(核移行)、エストロゲン受容体の場合は直接に標的遺伝子の転写活性を制御する。この際、転写共役因子と複合体を形成し、この複合体が基本転写因子群と結合することによって標的遺伝子の転写調節が行われる。

我々のチームは、ステロイドホルモン受容体と転写共役因子群より構成される複合体に注目し、内分泌かく乱物質が、この複合体形成さらには基本転写因子群とのコミュニケーションを障害することを明らかにしつつある。レポーター遺伝子を用いたスクリーニング法と、レーザー共焦点顕微鏡を用いた三次元画像解析システムを組み合わせ化学薬品をスクリーニングし、新規の抗アンドロゲン活性を有する化学薬品の同定、さらに内分泌かく乱物質の作用機序別の分類の糸口を得た。また、エストロゲン受容体の、の2種類のサブタイプごとに異なるエストロゲン活性を有する新規の内分泌かく乱物質を同定した。

ステロイドホルモンの特異的な作用は、受容体のみではなく、受容体特異的転写共役因子によっても規定されると考えられる。アンドロゲン、エストロゲン受容体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。最近、ステロイドホルモン受容体の転写活性調節領域であるAF-1領域が、受容体特異的、組織特異的な転写調節に深く関与していることが明らかにされ、我々も、両受容体に対する特異的共役因子のクローニングを遂行中である。また、外因性薬剤の解毒に関与する核内受容体や性分化に必須のステロイド合成酵素系におよぼす化学物質の影響も明らかにしつつあり、さらに内分泌かく乱物質の作用におよぼす栄養学的影響も検討している。化学物質の作用を中和もしくは軽減する機構、栄養素を明らかにすることは、公衆衛生学的見地からも重要である。

2. 研究実施内容

(1) 内分泌かく乱物質スクリーニング系の確立

抗アンドロゲン受容体作用薬剤

抗アンドロゲン剤ヒドロキシフルタミド、ビカルタミドを用い、共焦点顕微鏡と高精細三次元画像解析システム（以下、画像解析システム）を用いた内分泌かく乱物質のスクリーニングシステムを確立した。

ヒドロキシフルタミド、ビカルタミドはアンドロゲン依存性癌である前立腺癌に対する化学療法に用いられる。 アンドロゲン受容体と蛍光蛋白質 Green Fluorescence Protein（GFP）とのキメラ蛋白質をCOS-7細胞で発現させ、核における蛍光の分布パターンを取得すると同時に、Hoechst 33342で細胞核（染色体）を染色し、共焦点顕微鏡で観察した。両者のイメージを画像解析システムを用いて三次元的に再構築した。生理的アゴニストであるジヒドロテストステロン（DHT）を細胞に添加した時には、キメラ蛋白質の蛍光は核移行した後にeuchromatin領域にドット状に分布した。ヒドロキシフルタミド、ビカルタミドを添加した場合は、受容体は核移行はしたが、その後に核内全体に微細な網状パターンをとって分布し、リガンド結合に伴う活性化、非活性化状態にあるアンドロゲン受容体を三次元画像で区別することが可能であった（図1）。核内ドット形成と、アンドロゲン依存性転写活性化能は密接な関連があることが判明した。

そこで、47種類の内分泌かく乱物質の、 10^{-9} MのDHTにより誘導されるアンドロゲン依存性転写活性化能に対する阻害効果を、レポーター遺伝子を用いて測定し、抗アンドロゲン作用を有する内分泌かく乱物質のスクリーニングを施行した。DDE、ニトロフェン、メトリブジン、ビスフェノールA、アラクロール、ピンクロゾリンは、 10^{-6} Mの濃度でおよそ40から60%の阻害効果を有した（図2）。DDE、ピンクロゾリンは従来報告されていたが、その他は今回、新しく抗アンドロゲン活性を有することが判明したものである。これらの薬剤の抗アンドロゲン効果は、ヒト前立腺癌より樹立されたALVA細胞でも観察された。

画像解析システムをこれらの化学物質に応用したところ、DDE、ニトロフェン、ピンクロゾリンの3薬品は、ヒドロキシフルタミド、ビカルタミドと全く同様の核内分布パターンをとることが判明した。すなわち、これらの薬剤単独で処理したアンドロゲン受容体は、核移行した後に核内全体に微細な網状パターンをとって分布した。さらに、 10^{-9} MのDHTにより形成されるアンドロゲン受容体の核内ドット形成を著しく阻害した（図3）。

対照的に、メトリブジン、ビスフェノールA、アラクロールが結合したアン

ドロゲン受容体には核移行は認められず、また 10^{-9} MのDHTにより形成されるアンドロゲン受容体の核内ドット形成にも影響を与えなかった。以上より、我々が確立した画像解析システムは、レポーター遺伝子を用いた転写活性化能測定によるスクリーニングと組み合わせることにより、内分泌かく乱物質のスクリーニングに極めて有効に機能することが確認され、さらに、同じ抗アンドロゲン活性を有する内分泌かく乱物質でも、その作用機序が異なることが判明した。

エストロゲン受容体作用薬剤

内分泌かく乱物質のスクリーニングをおこなうためのin vitro転写系を確立した。この系を用いて、20種類の内分泌かく乱物質の検定を行った結果、エストロゲン受容体、
、
のそれぞれのサブタイプにより異なる作用を発揮する内分泌かく乱物質が同定された(図4)。この事実は、
、
のそれぞれのサブタイプに特異的な転写共役因子に対して内分泌かく乱物質が作用する可能性を示すものであり興味深い。現在、クロマチン鑄型DNAを用いた、さらに生体内に近い転写系の確立を試みるとともに、COS-1細胞にレポーターDNAを安定に組み込むことにより、より生理的状态に近いスクリーニング系を確立しつつある。

(2) 内分泌かく乱物質の作用点となりうる新規転写共役因子のクローニング

アンドロゲン受容体のAF-1結合性新規転写共役因子の探索

アンドロゲン受容体のN端側に存在する転写活性調節領域、すなわちAF-1領域に特異的に結合する転写共役因子の機能障害に起因するアンドロゲン不応症候群患者を解析した。AF-1領域に結合する分子量90kDaの蛋白質の欠損が発症原因である可能性がある。初代培養線維芽細胞よりcDNAライブラリーを作製し、アンドロゲン受容体のAF-1をbaitとした酵母 two-hybrid 系を用いることにより、現在この蛋白質の単離を試みている。これと並行してバキュロウイルスにて発現させたAF-1蛋白質を用いてAF-1結合蛋白質を精製中である。

エストロゲン受容体の新規転写共役因子の探索

エストロゲン受容体の転写調節機構を解明するために、新規転写共役因子の単離を試み、酵母 two-hybrid 系により分子量72kDaのDEAD box proteinを得た。

この蛋白質は、既知の転写活性化因子であるp160蛋白質に結合し、SRAと呼ばれるRNA性の転写共役因子をリクルートすることにより転写促進に寄与するものと考えられた。さらに、エストロゲン受容体に結合する蛋白質因子を蛋白質精製法にて細胞より多数取得すると共に、現在機能解析をすすめている。

(3) 内分泌かく乱物質の作用におよぼす全栄養素の影響

12週令（成熟）フィッシャー 344系オスラットを2群に分け、L群（正常明暗群）およびD群（連続暗黒飼育群）いずれも、タンパク質を含まない飼料で6週間予備飼育した。予備飼育後それぞれの群をさらに2群に分け、低栄養群、および低栄養群の飼料に1%となるようにDBPを添加した群をもうけ（それぞれLおよびL+DBP、DおよびD+DBP）、4週間飼育後屠殺した。体重、雄性器重量（体重100g当たり）、臓器重量（体重100g当たり）および血清性ホルモン濃度、副睾丸尾部精子数（成熟精子はこの部位に存在する）をL群およびD群それぞれについて比較した。

結果：

A) 体重；D+DBP群の体重および睾丸重量がD群より低値であった。また、L+DBP群の肝臓重量および腎臓重量がL群より高値であった。D+DBP群の肝臓重量もD群より高値であった。その他の雄性器、臓器重量には有意差が認められなかった。

B) 血清性ホルモン濃度；テストステロンおよびアンドロステノジオン濃度はDBP投与群が低値傾向であった。エストラジオール濃度はL+DBP群で有意に低値を示した。D群ではL群より低値を示したが、DBP投与によりさらに低下することはなかった。LH濃度はD群で高値を示したがD+DBPでは高値を示さなかった。FSH濃度はD群およびD+DBP群で高値を示し、この群間で有意差は見られなかった。

C) 副睾丸尾部精子数：L+DBP群は明らかに精子数が減少した。D群ではL群より精子数が減少していたが、DBP投与によりさらに減少することはなかった。

以上より、低栄養状態および生体リズムの攪乱によって、雄性器機能に対する内分泌かく乱物質の感受性が高まる可能性が示唆された。

(4) 有機スズ化合物によるアロマターゼ活性阻害作用

内分泌かく乱物質による生態系破壊の代表として取り上げられることの多い、巻貝類のメスがオス化する現象imposexは船舶塗料に用いられてきた有機スズ化合物が原因であることが、疫学および、実際に巻貝類に投与してimposexを誘導できることより実証されている。しかしながら、imposex誘導のメカニズムについては全く不明である。我々の樹立したヒト顆粒膜細胞由来株KGNはエストロゲン産生のkey stepであるアロマターゼを発現しているという特徴を持つ。このKGNにおいてimposexを誘導できる低濃度の有機スズがアンドロステノジオンからエストラジオールの変換を濃度依存性に、また、側鎖依存性に抑制することを見出した。疎水性側鎖をもつスズ化合物は細胞膜を容易に透過できることが推定されるが、側鎖の違いでアロマターゼ抑制効果が異なること（トリブチルスズ>ト

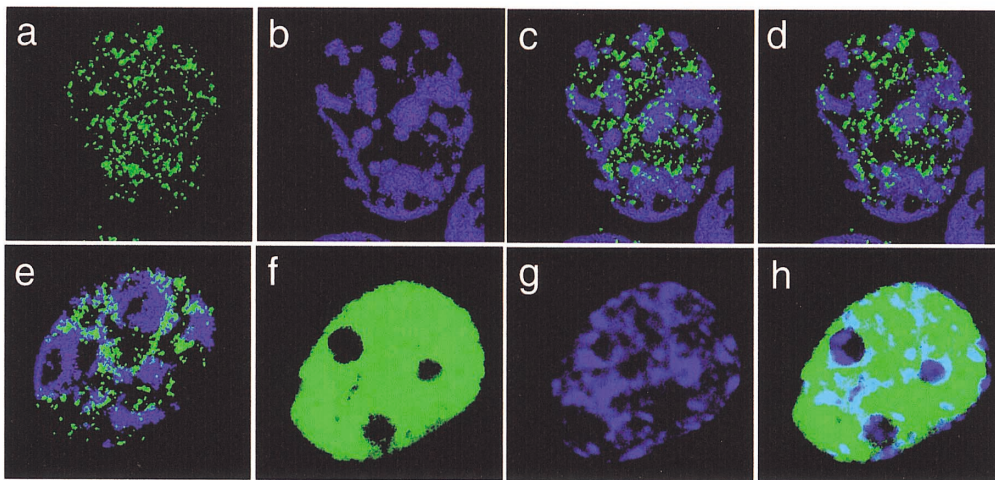
リフェニルスズ)は興味深い。予備実験でこの抑制効果の機序として有機スズ化合物がアロマトラーゼ遺伝子の転写そのものを抑制することを見い出しており、内分泌かく乱物質としての有機スズ化合物の作用点の一つがが解明できるものと期待している。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

無し

図1

AR-GFP/Hoechst33342 を用いた三次元画像解析



a - e 10^{-8} M Dihydrotestosterone
f - h 10^{-6} M Hydroxyflutamide

図2

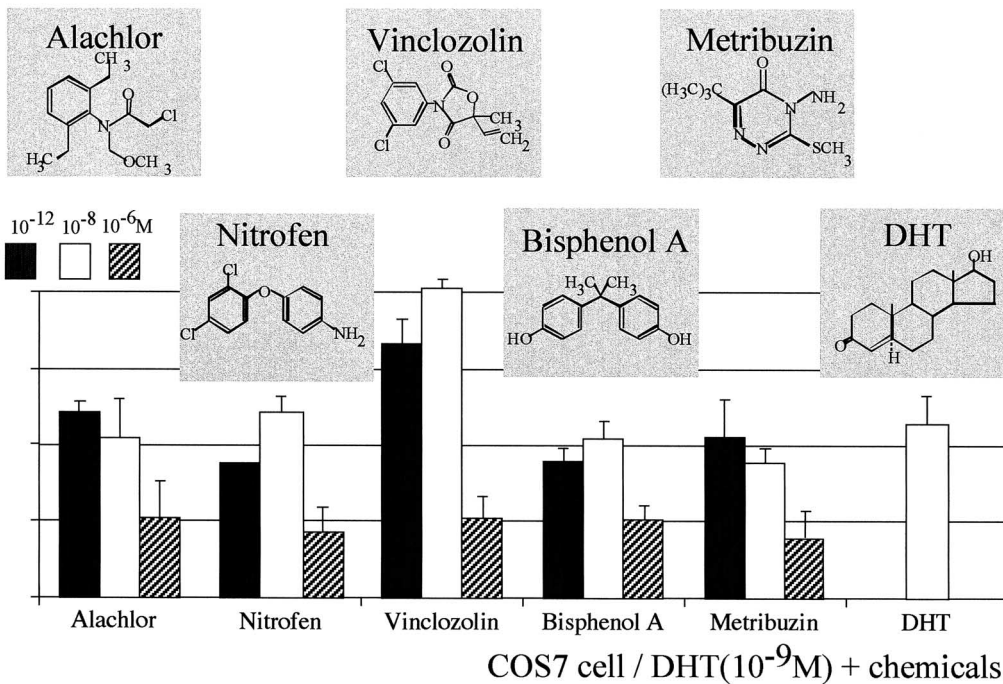
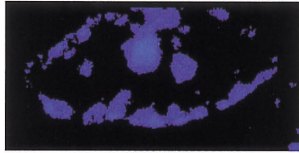


図3

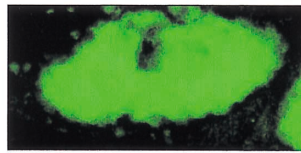
内分泌かく乱物質結合 AR のび漫性核内分布

COS-7 細胞の三次元構成画像断層イメージ

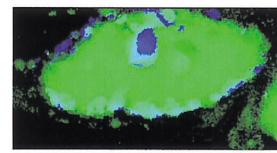
10⁻⁶ M Vinclozolin



Hoechst 33342

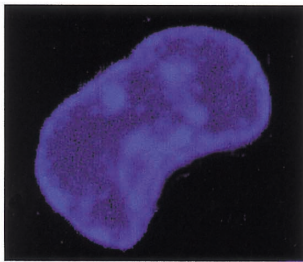


AR/GFP

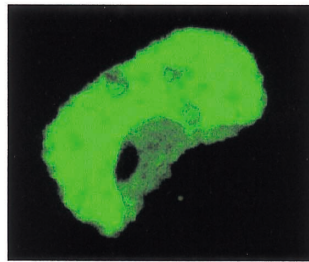


Mix

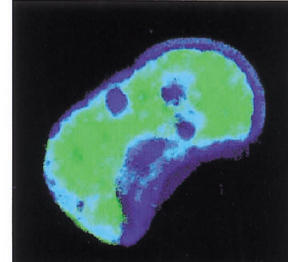
10⁻⁶ M Nitrofen



Hoechst 33342



AR/GFP



Mix

図4

エストロゲン作用を有する内分泌かく乱物質

