

「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

抗アンドロゲン作用、エストロゲン作用を有する内分泌かく乱物質の作用機構を、分子生物学的および発生工学的手法を用いて解析し、さらにステロイドホルモン受容体の核内におけるコンパートメント形成を、共焦点顕微鏡を用いて可視化してきた。

活性化されたアンドロゲン受容体 (AR) が形成する核内クラスターは、AR のみに特異的ではなく、エストロゲン受容体 (ER)、グルココルチコイド受容体 (GR) などの他のステロイドホルモン受容体、TIF-II などの p160 ファミリー、さらには CBP/p300、と空間的に共有されることを明らかにした。さらに、pre-mRNA splicing factor のひとつである U5 snRNP に対する結合タンパク質 p102 を新たなリガンド非依存性の AR-AF-1 転写共役因子 (コアクチベーター) として同定し、ANT-1 (androgen receptor N-terminal domain transactivator-1) と命名した。その核内局在と作用発現における意義について検討した。アロマターゼ活性を亢進させる化学物質ベノミルを新たに同定し、その作用機構を検討した。ベノミルによるアロマターゼ活性上昇には、従来より主要調節機構として知られる A-kinase 系を介さぬことを明らかにした。抗アンドロゲン剤が germ cell の遊走能におよぼす事を明らかにし、その作用機構を検討している。

エストロゲン作用を有する化学物質の作用機構に関して、多くは ER α 、ER β に共に作用するが、Trifluralin と BBP は ER α の AF-1 活性を特異的に増強することを明らかにした。Trifluralin と BBP は ER α と AF-1 の転写活性化因子である p72/p68 との結合を誘導するものの、AF-2 転写活性化因子である TIF2, p300, TRRAP の結合は誘導しない。同時に乳癌細胞増殖への影響も検討し、環境中の化学物質は乳癌の進展に働く可能性を明らかにした。さらに、PCAF および PCAF-BGCN5 遺伝子欠損マウスを作出し、内分泌かく乱物質が確実に生殖腺発達を障害するモデル動物系の確立を試みており、E2 に対する感受性について、in vivo、in vitro の系で検討中である。

2. 研究実施内容

2-1 抗アンドロゲン作用を有する内分泌かく乱物質の作用機構

(1) 共焦点顕微鏡を用いた抗アンドロゲン様化学物質の作用機構の検討

我々は平成 12 年度までに、高精細三次元再構築を行った共焦点顕微鏡画像を用いることによ

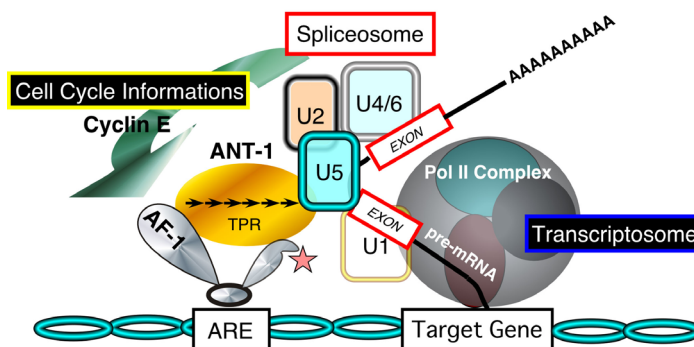
り、活性化されたアンドロゲン受容体(AR)が単一核あたりおよそ250から400個のクラスターを形成して euchromatin 領域に分布するのと対照的に、抗アンドロゲン作用を有する化学物質が結合したARは、核移行はするものの、核内全体にびまん性に分布することを見いだしてきた。この方法を、抗アンドロゲン作用を有する化学物質のスクリーニングに応用し、新たな抗アンドロゲン化学物質としてニトロフェンを同定した。平成13年度ではさらに、この核内クラスターは、ARのみに特異的ではなく、エストロゲン受容体(ER)グルココルチコイド受容体(GR)などの他のステロイドホルモン受容体、TIF-IIなどのp160ファミリー、さらにはCBP/p300、と空間的に共有されることを明らかにした。また、恒常的転写活性化能を有するAR-AF-1の三次元的核内分布はAR全長、AR-2とは異なる核内での網目状分布をなし、AF-1とAF-2の完全な協調作用が発揮されたときのみリガンド依存性にクラスター状分布をすることが明らかとなった。

(2) 核内コンパートメント形成を阻害する内分泌攪乱物質

AR-AF-1結合タンパク質のクローニングを平成11年度から試みた結果、splicing factorのひとつであるU5 snRNPに対する結合タンパク質p102を新たなリガンド非依存性のAR-AF-1転写共役因子(コアクチベーター)として同定し、ANT-1 (androgen receptor N-terminal domain transactivator-1)と命名した。三次元再構築画像では、ANT-1の核内分布は、単一核あたり20から40個の粗大なクラスターを形成し、splicing factor compartment (SFC)と同一の分布であった。以上をふまえて、我々は「核内コンパートメント間のコミュニケーション」という概念を提唱した。すなわち、核内移行したステロイドホルモン受容体、転写共役因子は前述のステロイドホルモン受容体コンパートメント(クラスター)にいったん局在し、SFCに局在するsplicing factorと、基本転写因子群がSFC周辺部に形成する複合体

(co-transcriptional splicing complex, transcripto-spliceosome)と相互作用する、との考え方である(図1)。ANT-1はそのコンパートメント間の相互作用を媒介するタンパク質と考えられた。

Receptor-Transcription-Splicing Coupling



(3) アロマトラーゼ活性に及ぼす内分泌かく乱物質の影響

ヒト卵巣顆粒膜細胞癌より樹立した KGN 細胞は、豊富なアロマトラーゼ活性を有しており、この細胞を用いることでアロマトラーゼ活性を亢進させる化学物質を過去において同定した。この化学物質ベノミルのアロマトラーゼ活性上昇には、従来より主要調節機構として知られる A-kinase 系を介さぬことが明らかになった。さらに、ベノミルは、土壤中ですばやく分解されて、カルベンダジムへと変換されるが、このカルベンダジムもベノミルと同等のアロマトラーゼ活性上昇作用を有することが明らかとなった。カルベンダジムは土壤中への残留がカナダ政府により指摘されており、今後、ベノミルによるアロマトラーゼ活性化機構の詳細についてさらに検討する予定である。

(4) 発生工学を用いた生殖細胞の発生、分化に及ぼす内分泌かく乱物質の影響

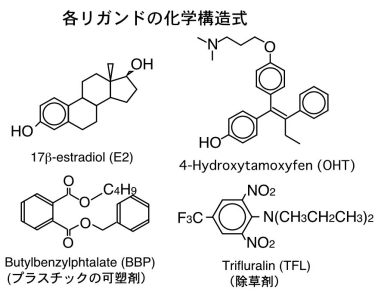
マウス発生初期において、未分化胚細胞から生殖系列に決定がなされた始原生殖細胞は胎生 8.5 日には尿膜基部に分布し、その後分裂増殖をくり返しつつ腸管膜に沿って移動、11.5 日には将来性腺が発生する生殖隆起に達し、以降は性腺と一体となり分化、成熟を遂げ、配偶子として、世代間の遺伝情報を繋いでゆく。この過程のどこで障害が生じても配偶子形成がうまく行かず、不妊が生じうる。種の保存という生命の根幹に関わる重要な現象であるにも関わらず、その分子機構は殆ど明らかではない。我々はこれまでに抗アンドロゲン作用を示す内分泌かく乱物質であるビンクロゾリンが、始原生殖細胞の増殖、生殖隆起への移動を阻害すること、さらにアンドロゲン受容体を介する作用であることをマウス個体レベルで明らかにしてきた。妊娠初期の内分泌かく乱物質への暴露が生殖細胞の発生に影響を与えることは社会的にみても重要な問題提起であり、本研究は生殖細胞の分化、誘導機構の解明、さらには不妊生殖医療にも大きく貢献するものである。

2-2 エストロゲン受容体を介する内分泌かく乱物質の作用機構

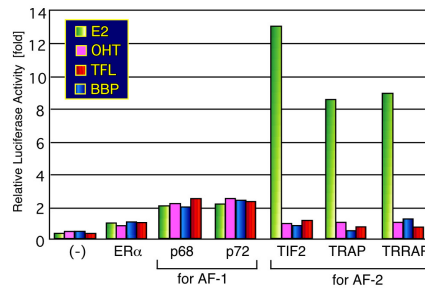
多くの内分泌攪乱物質は、エストロゲン様、もしくは抗エストロゲン様作用を持つことが報告されている。エストロゲンはまた、乳癌などのホルモン依存性癌の増悪因子としても知られている。我々のグループは平成13年度は以下の2点について研究を進めた。

(1) ER の転写活性に影響を及ぼす内分泌攪乱物質のスクリーニング

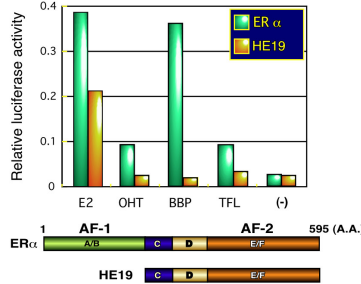
平成12年度は60種類の内分泌攪乱物質について ER α 、 β の転写活性に及ぼす影響を培養細胞系を用いて検討した結果、多くの内分泌攪乱物質が ER α 、 β の転写活性に影響を与えることが明らかとなった。それらの中で、今年度は Trifluralin と BBP について解析を行った。興味深いことに Trifluralin と BBP は ER α の AF-1 活性を増強することが明らかとなった。Trifluralin と BBP は ER α と AF-1 の転写活性化因子である p72/p68 との結合を誘導するものの、AF-2 転写活性化因子である TIF2, p300, TRRAP の結合は誘導しない(図 2)。乳癌治療剤である Tamoxifen は ER α の AF-1 活性を誘導することが知られているが、同時に転写抑制因子である N-CoR/SMRT もリクルートする。Trifluralin は Tamoxifen と同じく ER α に N-CoR/SMRT をリクルートするものの、BBP はリクルートせず、Trifluralin, Tamoxifen に比較し、4倍近い AF-1 活性を誘導することが示された。また、これらの薬剤の乳癌細胞の増殖への影響を検討したところ、BBP のみがエストロゲンと同様乳がん細胞を増殖させることが判明した。



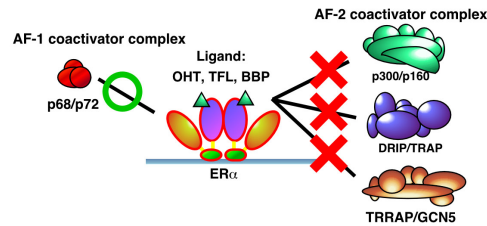
ERαへのコアクチベーターのリクルートの確認



ERα特異的なリガンドBBP, TFLはAF-1活性を示す



BBP, TFLによりERαにリクルートされるコアクチベーター



近年、ERによる転写制御には、ERとエストロゲン依存的に結合する転写活性化因子と呼ばれる蛋白質複合体が必須であることが明らかになりつつある。われわれはER α にエストロゲン依存的に結合する新たな転写活性化因子複合体を精製した。この複合体はTRRAPと呼ばれる巨大蛋白質を介してER α に結合し、その転写活性を促進する。TRRAPのアンチセンスRNAを乳がん細胞株に発現させ、TRRAPの産生量を低下させたところ、エストロゲン依存的な乳がん細胞の増殖が顕著に抑制された。上述した結果とあわせて、内分泌攪乱物質が癌の増悪に関与することを強く示唆するものである。

(2) PCAF (p300/CBP-associated factor)およびPCAF-BGCN5遺伝子欠損マウスの解析

全てのステロイドホルモン受容体の転写共役因子であるPCAF (p300/CBP-associated factor)およびPCAF-BGCN5遺伝子欠損マウスを作出し、内分泌かく乱物質が確実に生殖腺発達を障害するモデル動物系の確立を試みた。その結果、PCAFおよびPCAF-B/GCN5遺伝子欠損マウスは、内分泌かく乱物質の遺伝子発現を介したゲノミックな作用が一部欠損していると考えられ、内分泌かく乱物質の作用を解析する格好のモデル動物になる可能性が示唆された。よって本年度は内分泌かく乱物質のエストロゲン(E2)様作用を想定し、PCAFおよびPCAF-B/GCN5遺伝子欠損マウスを用いてE2の作用をin vivo, in vitroで解析した。

PCAFおよびPCAF-B/GCN5遺伝子欠損マウスのE2に対する感受性について、生殖器官の発達に着目して解析した。雌マウスに卵巣摘出手術(OVX)および疑似手術(Sham)を施し、E2を皮下に投与して子宮重量変化を観察した。その結果、野生型マウスにおいては、子宮重量はE2投与によってOVXの約10.4倍、Shamの約2.5倍に増加した。一方、PCAF遺伝子単独欠損マウスは、E2投与によってOVXの約8.0倍、Shamの約2.0倍、PCAF、PCAF-B多重遺伝子単独欠損マウスは、E2投与によってOVXの約7.0倍、Shamの約1.8倍増加した。OVX + E2群を各遺伝子型で比較すると、野生型マウスに比べPCAF遺伝子単独欠損マウス、PCAF、PCAF-B多重遺伝

子欠損マウスのいずれの子宮重量も有意に低下していた。また、Sham の子宮重量も野生型、PCAF 遺伝子単独、PCAF, PCAF-B 多重遺伝子欠損の順に低下する傾向にあった。また幼弱雄マウスに E2 を投与し、睪丸重量変化をみた。その結果、野生型マウスにおいてのみ睪丸重量が低下していた。

各遺伝子型のマウスから胎生繊維芽細胞を分離・培養し、2種類の E2 受容体発現ベクター (ER α 、ER β) を用いた転写実験を行った。その結果、PCAF 遺伝子単独欠損マウス、PCAF, PCAF-B 多重遺伝子欠損マウス由来の細胞で、ER α の E2 非依存的な転写活性化が見られた。方、ER β の転写活性化はいずれの場合も野生型と同様で正常であった (図 3)。以上の結果より、PCAF 遺伝子単独欠損マウスおよび PCAF, PCAF-B 多重遺伝子欠損マウスにおいては E2 の正常な機能が障害されており、その機構の一部は ER α の E2 依存的転写活性化機能の障害によるものと考えられた。

3. 研究実施体制

名和田グループ

- ① 名和田 新(九州大学医学部第三内科・教授)
- ② 発生工学を用いた胚細胞におよぼす化学物質の作用機構の検討、
アンドロゲン受容体 AF-1 機能におよぼす化学物質の作用、
アロマターゼ活性におよぼす、化学物質の作用

柳澤グループ

- ① 柳澤 純(東京大学分子細胞生物学研究所・助手)
- ② エストロゲン受容体を介した内分泌かく乱物質の作用機構

江指グループ

- ① 山内 淳(国立健康栄養研究所・研究員)
- ② 内分泌かく乱物質に栄養素が与える影響を再現性をもって観察できる
実験系の確率

柴田グループ

- ① 柴田健雄(帝国臓器製薬(株)研究所・研究本部長)
- ② 内分泌かく乱物質の in vivo アッセイ試験
アンドロゲン受容体リガンド結合部位高次構造とリガンド分子構造の関連

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Tomura,A., Goto,K., Morinaga,H., Nomura,M., Okabe,T., Yanase,T., Takayanagi,R., Nawata,H.

The subnuclear three-dimensional image analysis of androgen receptor fused to green fluorescence protein.

J.Biol.Chem. 276:28395-28401, 2001

- Mu, Y-M., Yanase, T., Nishi, Y., Tanaka, A., Saito, M., Jin, C-H., Mukasa, C., Okabe, T., Nomura, M., Goto, K., Nawata, H.
Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, Induce apoptosis in human granulosa cells.
Endocrinology 142:3590-3597, 2001
- Mu, Y-M., Yanase, T., Nishi, Y., Takayanagi, R., Goto, K., Nawata, H.
Combined treatment with specific ligands for PPAR γ :RXR nuclear receptor system markedly inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cancer cells.
Mol.Cell.Endocrinol. 181:239-248, 2001
- Saitoh, M., Yanase, T., Morinaga, H., Tanabe, M., Mu, Y-M., Nishi, Y., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Takayanagi, R., Nawata, H.
Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 289:198-204, 2001
- Ogata, R., Omura, M.
Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats.
Journal of Toxicology and Environmental Health 63:127-144, 2001
- Omura, M., Ogata, R., Kubo, K., Shimasaki, Y., Aou, S., Oshima, Y., Tanaka, A., Hirata, M., Makita, Y., Inoue, N.
Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats.
Toxicological Sciences 64:224-232, 2001
- Yanase, T., Mu, Y-M., Nishi, Y., Goto, K., Nomura, M., Okabe, T., Takayanagi, R.
Regulation of aromatase by nuclear receptors
The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 79:187-192, 2001
- The Tamoxifen-responsive Estrogen Receptor Mutant D351Y Shows Reduced Tamoxifen-dependent Interaction with Corepressor Complexes
Yasuji Yamamoto, Osamu Wada, Miyuki Suzawa, Yoshiko Yogiashi, Tetsu Yano, Shigeaki Kato, Junn Yanagisawa
J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 46, 42684-42691, 2001
- 鈴木 静、市野 功、蘆田健二、野村政壽、岡部泰二郎、後藤公宣、柳瀬敏彦、名和田 新
フェノフィブラートが著効した血清トリグリセライド異常高値の IIb 型高脂血症の 1 例
新薬と臨床 50(7)73-75, 2001

(2) 特許出願

なし

※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