

「内分泌かく乱物質」

平成10年度採択研究代表者

名和田 新

(九州大学医学部第三内科 教授)

## 「核内受容体・転写共役因子複合体と内分泌かく乱物質」

### 1. 研究実施の概要

我々のチームは一貫して、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するとともに、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、および他の機能的核内コンパートメント間とのコミュニケーションが核内受容体の機能発現に必須であることを示してきた。

当該年度は、アンドロゲン受容体 (AR) AF-1領域に結合する新規の転写共役因子ANT-1 (AR N-terminal domain transactivating protein-1)の機能ドメインマッピング、AR情報伝達系とアクチビン情報伝達系とのクロストーク、PPAR $\gamma$ 依存性転写活性化能に影響を与える内分泌かく乱物質の同定、始原生殖細胞におよぼす化学物質の影響、およびアロマターゼ活性を上昇させる化学物質ベノミルの作用機構の解明を名和田グループが進め、柳澤グループはエストロゲン受容体 (ER) 依存性転写活性化機構におよぼす化学物質の影響を、山内グループはPCAF (p300/CBP-associated factor)およびPCAF-B/GCN5遺伝子欠損マウス (以下PCAF遺伝子欠損マウス) を用いたER依存性転写活性化機構破綻のメカニズムを探索している。

### 2. 研究実施内容

(1) AR依存性転写活性化機構におよぼす内分泌かく乱物質の作用機構

(1) : 1 AR-AF 1結合性転写共役因子ANT-1の解析

アンドロゲン受容体において、その転写活性化能の大部分は AF-1と呼ばれる転写活性化領域の作用によりもたらされる。スプライシングに関与するタンパク質U5 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP)と同一タンパク質であるANT-1は、リガンド非依存性、かつ恒常的なAF-1活性を、AR、グルココルチコイド受容体において増強するが、対照的にリガンド依存性のAF-2活性には影響を及ぼさない。ANT-1は、核内においてはびまん性かつ網状の分布を背景とした20から40個の大きなスプライシング因子コンパートメント (SFC) の specklesを構成して局在することから、核内受容体の機能発現には、異なる核内コンパートメント間のコミュニケーションが重要である可能性を示した。本た

んぱく質の切断断片を用いて機能ドメインのマッピングを行った結果、ANT-1の分子内には少なくとも3箇所のドメインが存在し、AR依存性転写活性化機構に必須のドメインと、SFC形成に必須のドメインは、互いに独立していることが判明した。

AF-1とAF-2の分子内機能協調作用により、活性化されたARが構成するARコンパートメントへは、p300/CBP依存性にSRC-1、TIF-IIなどの転写共役因子がリクルートされた。抗アンドロゲン剤の作用機序の本質は、AF-1とAF-2の分子内機能的協調作用の阻害による、機能的核内受容体コンパートメント形成阻害と考えられた。このARコンパートメントは、ANT-1により形成されるスプライシング因子コンパートメントとは異なる核内空間に分布し、核内の異なるコンパートメント間のコミュニケーションの重要性も明らかにした。

### (1) : 2 AR情報伝達系とアクチビン情報伝達系とのクロストーク

従来よりアクチビンシグナルが前立腺癌細胞の増殖を抑制することも報告されている。これらの知見を元に、前立腺癌細胞でのアクチビンシグナルとアンドロゲンシグナルのクロストークを、アクチビン受容体を恒常的に発現する前立腺癌細胞株を用いて検討した結果、AR依存性情報伝達系とアクチビン情報伝達系の、Smad2を介したクロストークが存在することが明らかとなった。この安定発現株は、*in vitro*ではテストステロン、flutamide 添加による増殖速度の変化は示さなかったが、ヌードマウスに移植すると、原発巣の増殖は対照野生型より緩やかであるが、リンパ節を含めて全身に広範な転移巣を形成した(図1)。

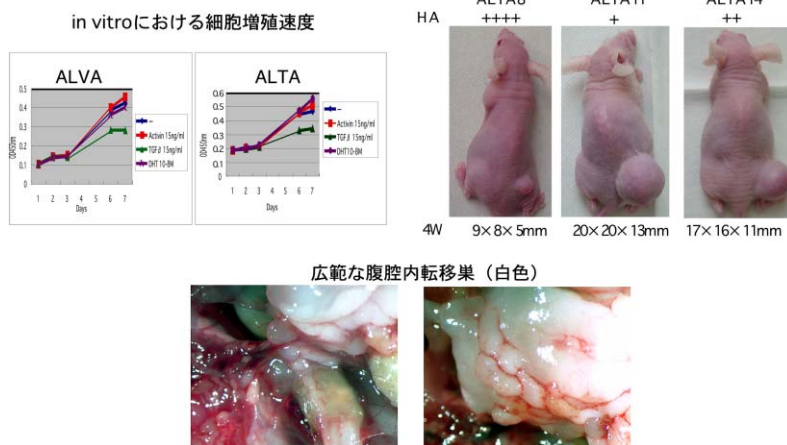
リンパ節を中心とした遠隔転移の分子機構、及びこれに及ぼす化学物質の作用を検討する上で格好のモデルシステムといえ、近年急増している前立腺癌に対する治療薬開発への応用を考えている。

(2) ER依存性転写活性化機構におよぼす内分泌かく乱物質の作用機構

### (2) : 1 ER $\alpha$ に作用する内分泌かく乱物質の作用機構

これまでに60種類の内分泌攪乱物質をスクリーニングし、多くの化学物質がER $\alpha$ 、 $\beta$ の転写活性に影響を与えること明らかにしてきた。内分泌攪乱物質の多くは、ER $\alpha$ に直接結合してその転写活性に影響を与えているものと考えられるが、物質によって転写活性を抑制するもの、促進するもの、AF-1活性に対し選択的に働くもの、AF-2活性に対してのみ影響を与えるものなど、その性質が大きく異なることが明らかになってきた。これらの結果はER $\alpha$ に結合する内分泌攪乱物質の種類によって、リクルートされる転写共役因子が異なることを示唆しており、これらの物質の作用を理解するためにはER $\alpha$ と相互作用する転写

### in vitroとin vivoの表現形質の差

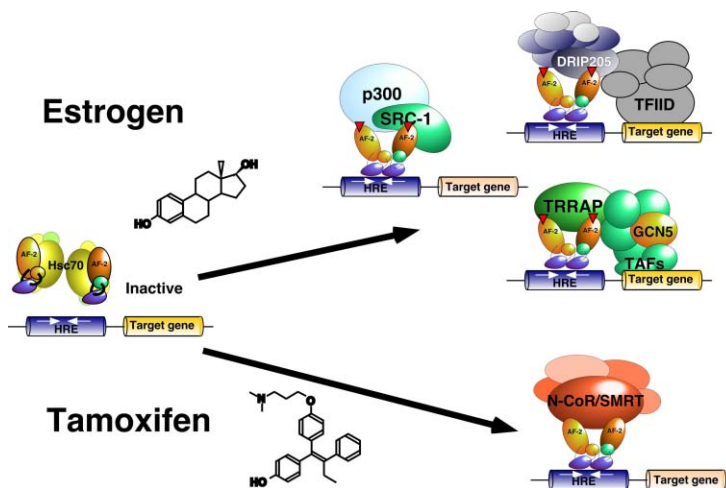


共役因子群の探索と解析が必須であると考えられた。

平成14年度は、それらの中でプラスチックの可塑剤として用いられるbutyl benzyl phthalate (BBP) について詳細な解析を行った。BBPはER $\alpha$ のAF-1領域への転写活性化因子の結合を促すことによってAF-1活性のみを特異的に促進することが示された。乳癌抑制剤であるtamoxifenはBBPと同じくER $\alpha$ のAF-1活性を誘導することが知られている。そこで、BBPの乳癌増殖抑制能を検討したところ、BBPはtamoxifenとは逆に乳癌増殖を促進することが判明した。この原因を探るため、BBPまたはtamoxifenによる種々の転写共役因子のER $\alpha$ へのリクルートを検討した。その結果、tamoxifen存在下においてER $\alpha$ はAF-1転写活性化因子と転写抑制因子の双方と結合するが、BBPはER $\alpha$ とAF-1転写活性化因子の結合のみを促進することが明らかとなった。これらの結果はER $\alpha$ の転写活性を誘導する物質でも結合する転写共役因子によって生理作用が異なっていることを示しており、転写共役因子の重要性を示唆するものである

(図2)。

ダイオキシンは、ダイオキシンレセプター(AhR/Arnt)に結合し、生体に対してエストロゲン様・アンチエストロゲン様作用を示すことが報告されているが、その分子基盤は不明であった。本研究では、AhR/ArntがER $\alpha$ にダイオキシン依存的に結合し、ER $\alpha$ の転



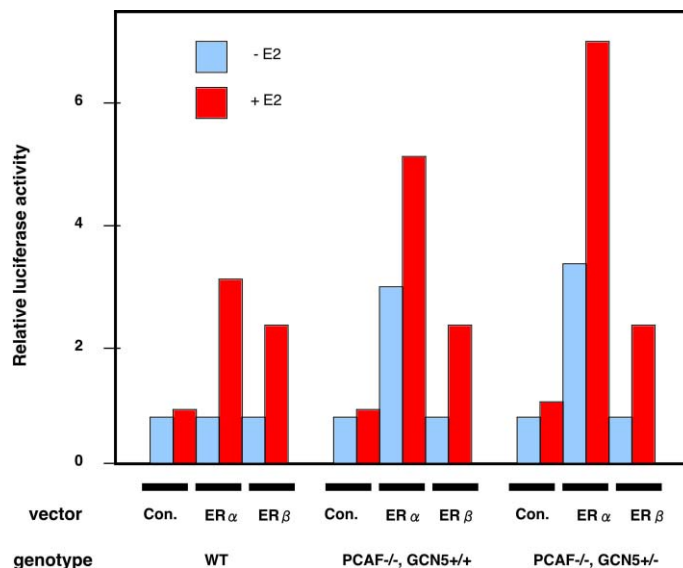
写活性を促進することを見出した。また、エストロゲンが乳癌を増悪させることから、内分泌攪乱物質の乳癌増殖に対する作用を検討し、BBPが乳癌の増殖を著しく促進することを突き止めた。この結果は、エストロゲン様作用を持つ内分泌かく乱物質とホルモン依存性癌との関連をはじめて示したものであり、内分泌かく乱物質の危険性をあらためて示すものである。さらに、ER $\alpha$ による乳癌の増悪機構を分子レベルで明らかにする目的で、細胞核の核抽出液より、ER $\alpha$ に結合する蛋白質複合体TFTCを精製・同定した。TFTCの活性を阻害するとエストロゲン依存的な乳癌の増殖が抑制されることから、TFTCはエストロゲン依存的な乳癌の増悪に関与する蛋白質複合体であることが明らかとなった。

## (2) : 2 PCAF遺伝子欠損マウスを用いたin vivoでの検討

PCAF遺伝子欠損雌マウスに卵巣摘出を施し、エストロゲン投与による子宮重量変化を解析したところ、エストロゲン投与による子宮重量の増加が野生型に比べて有意に抑制されていた。一方、エストロゲンは雄の睾丸の発育を抑制することが知られているが、PCAF遺伝子欠損マウスにおいてはエストロゲン投与による睾丸発育の抑制が有意に起こらなくなっていた。

このようなエストロゲン感受性低下のメカニズムを解析するために、これらのマウスか

ら胎生繊維芽細胞を分離・培養し、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 発現ベクターおよびエストロゲン応答配列をもつルシフェラーゼレポーターベクターを細胞内に導入し、転写実験を行った。その結果、PCAF遺伝子欠損マウス由来の胎生繊維芽細胞はER $\alpha$ においてのみエストロゲン非存在時にも転写が活性化されており、さらにエストロゲン依存的な転写が著しく増大した（図3）。このことは内因性のPCAF遺伝子欠損によってエストロゲンのゲノミックな作用がかく乱されていることを示唆する結果であると考えられた。ER $\alpha$ の変異体であるHE15（A、BおよびC領域を含む）とHE19（C、D、EおよびF領域を含む）を用いて調べたところ、いずれの細胞を用いた場合においても転写活性化に明確な差はなかった。このことは、PCAFおよびPCAF-Bによる転写制御にはER $\alpha$ 分子全体の構造が必須であることが示唆された。

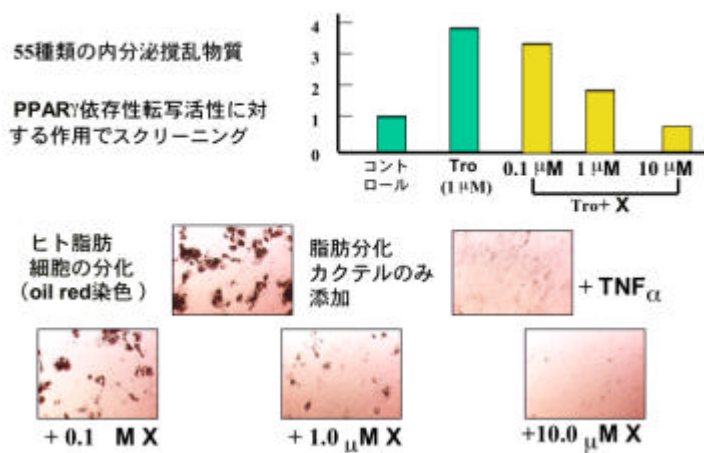


以上のことからPCAF遺伝子単独欠損マウスおよびPCAF、PCAF-B多重遺伝子欠損マウスにおいては、ER $\alpha$ における厳格なエストロゲン依存的転写活性化機能の破綻による転写活性化の異常な増大が起こり、メカニズムは不明だがフィードバック機構によって結果的には個体におけるエストロゲン感受性低下が引き起こされるのではないかと考えている。

### (3) PPAR $\gamma$ 依存性転写活性化能に影響を与える化学物質の同定

脂肪細胞分化に必須の核内受容体であるPPAR $\gamma$ に、煙草中に含まれる発癌物質であるbenzo(a)pyrene (BAP)が結合し、その転写活性化能を抑制するというユニークな現象を見いだした。さらにスクリーニングを継続した結果、ある化学物質が、BAPよりさらに強力にPPAR $\gamma$ 依存性転写活性化能を抑制することを見出した。Troglitazone 1  $\mu$ M存在下で引き起こされる脂肪細胞への分化を、等濃度の本化学物質は約50%抑制し、10  $\mu$ Mではほぼ完全に抑制した（図4）。

### PPAR $\gamma$ 結合性内分泌かく乱物質のスクリーニング



#### (4) アロマトラーゼ活性を上昇させる内分泌かく乱物質benomylの作用機構の検討

これまでに、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benomylを過去において同定した。さらに、ベノミルは、土壌中で速やかに分解されて、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を明らかとしている。ベノミルのアロマトラーゼ活性上昇には、従来よりアロマトラーゼ遺伝子発現の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しているが、このほか、C-kinase、MAP-kinase系も関与しないことが判明し、本化学物質の作用機構は極めてユニークである。本年度の実験で、細胞骨格を構成するマイクロフィラメントがアロマトラーゼ活性の調節に関与しているらしい予備データが得られたが、次年度へ持越しである。なお、カルベンダジムは土壌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。

#### (5) 生殖細胞の分化におよぼす化学物質の影響

世代を超えその遺伝情報を伝達する生殖細胞は、生命の継承を担う極めて重要細胞である。我々はこれまでにこの生殖隆起へと移動、増殖する始原生殖細胞への性ホルモンの関与を明らかにしてきた。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を妊娠4.5日から8.5日までの間経口投与した群で、胎生8.5日から9.5日にその仔胎で始原生殖細胞数の有意な低下を認め、内分泌かく乱物質が始原生殖細胞の増殖、移動を阻害した。次に我々は未分化胚細胞から始原生殖細胞へと運命決定がなされる過程に及ぼすビンクロゾリンの影響を解析する目的で、胎生5.5日胚から胚体外胚葉細胞を得、培養下で始原生殖細胞への分化を観察した。ビンクロゾリンを培養条件に含む群では他の群と比べ始原生殖細胞数の低下を認めた。アンドロゲン受容体の発現をRT-PCR、Whole-mount In Situ Hybridization 法を用いて調べたところ、未分化胚細胞の時期よりすでに発現がみられ、ビンクロゾリンのこれらの作用はアンドロゲン受容体を介して作用していることが示唆された。事実AR欠損マウス胎生9.5日胚でもおで始原生殖細胞数の有意な低下を認めた。

以上の結果はARの新たな機能を示唆する重要な発見であるとともに、内分泌かく乱物質が始原生殖細胞の分化、増殖、移動に影響を及ぼす可能性を示している。妊娠期の内分泌かく乱物質への暴露が生殖腺の分化のみならず、その初期の暴露により生殖細胞自身の発生に影響を与えることを示唆しており、学問的さらには社会的、公衆衛生学的にみても重要な知見である。

### 3. 研究実施体制

名和田 新グループ

① 名和田 新：(九州大学医学部第三内科・教授)

② 研究項目：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、AR AF-1機能におよぼす化学物質の作用、アロマトラーゼ活性におよぼす化学物質の作用、アクチ

ビンシグナル伝達系におよぼす化学物質の作用

柳澤 純グループ

- ① 柳澤 純：（筑波大学応用生物化学系・教授）
- ② 研究項目：ERを介した内分泌かく乱物質の作用機構

山内 淳グループ

- ① 山内 淳：（国立健康栄養研究所・主任研究員）
- ② 研究項目：PCAF遺伝子欠損マウスを用いたER依存性転写活性化機構の解明

柴田健雄グループ

- 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アッセイ試験と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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

##### （1）論文（原著論文）発表

- Nawata H, Goto K, Morinaga H, Yanase T, Yanagisawa J, Kato S, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R.  
Molecular mechanisms underlying the action of environmental endocrine-disrupting chemicals  
**Environmental Science** 9, 1 :057-070, 2002
- Saitoh, M., Takayanagi, R., Goto, K., Fukamizu, A., Tomura, A., Yanase, T., Nawata, H.  
The presence of both the amino- and carboxyl-terminal domain in androgen receptor is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors : A three-dimensional imaging study.  
**Molecular Endocrinology** 16(4):694-706, 2002
- Zhao, Y., Goto, K., Saitoh, M., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Takayanagi, R., Nawata, H.  
Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between subnuclear splicing factor compartment and nuclear receptor compartment  
**J. Biol. Chem.** 277:30031-30039, 2002
- Nawata, H., Yanase, T., Goto, K., Okabe, T., Ashida K.  
Mechanism of action of anti-aging DHEA-S and the replacement of DHEA-S  
**Mechanisms of Ageing and Development** 123:1101-1106, 2002
- Mukai, T., Kusaka, M., Kawabe, K., Goto, K., Nawata, H., Fujieda, K., Morohashi, K.  
Sexually dimorphic expression of Dax-1 in the adrenal cortex.  
**Genes to Cells** 7:717-729, 2002

- Nawata, H.  
Androgen Insensitivity by Co-activator Abnormality  
The Forth Lilly International Symposium Abnormality of Sexual  
Differentiation from Bench to Clinic 8-9, 2002
- Hardy, S., Brand, M., Mittler, G., Yanagisawa, J., Kato, S., Meisterernst, M.,  
Tora, L.  
TATA-binding Protein-free TAF-containing Complex (TFTC) and p300 Are Both  
Required for Efficient Transcriptional Activation.  
**J. Biol. Chem.** 277(36):32875-32882, 2002
- Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi,  
M., Oishi, H., Yamamoto, Y., McMahon, S. B., Cole, M. D., Tora L., Takahashi,  
N., Nagasawa, H., Kato, S.: Nuclear Receptor Function Requires a TFTC-Type  
Histone Acetyl Transferase Complex.  
**Molecular Cell.** 9(3):553-62, 2002
- Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Fuse, H., Ogawa, S., Yogiashi, Y., Okuno, A.,  
Nagasawa, H., Nakajima, T., Matsumoto, T., Kato, S.:  
Ligand selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation  
function (AF-1) by a CBP-containing HAT complex.  
**Mol. Cell. Biol.** 22(11):3698-706, 2002

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：1件）

※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/public/public01_261226_j.html)

<http://www.u-tokyo.ac.jp/content/400007786.pdf>

[http://www.jst.go.jp/osirase/20160325\\_oshirase-2.html](http://www.jst.go.jp/osirase/20160325_oshirase-2.html)