

九州大学大学院医学研究院
病態制御内科・教授

名和田 新

「核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質」

研究期間：平成11年1月1日～平成15年12月31日

1. 研究実施の概要

我々は、これまでに科学技術振興事業団より資金援助を受け、生殖腺におよぼす内分泌かく乱物質の作用機序を、以下の点において分子レベルで明らかにしてきた。①内分泌かく乱物質は核内受容体・転写共役因子複合体に作用し、その機能を多面的に障害するとともに複合体の核内における三次元的分布の変化をもたらす、②ある種の内分泌かく乱物質は、ステロイドホルモン受容体への作用のみでなく、ステロイド生合成酵素およびアクチビンシグナル系などへの多面的な障害を惹起する、③in vivo では生後の環境要因の影響をうける可能性がある。

アンドロゲン受容体 (AR)、エストロゲン受容体 (ER) が、細胞核内で転写共役因子とともに構築する巨大複合体を可視化する鋭敏な方法を開発するとともに、およそ60種類の化学物質を入手し、AR、ERがもたらす転写活性化能を指標としてスクリーニングを施行した。その結果、従来指摘されてきたごとく、ARに結合する化学物質はその数は少数であり、抗アンドロゲン作用を持つもののみであったが、新たな抗アンドロゲン化学物質 nitrofen を同定できた。対照的に、多くの化学物質が ER α 、 β の転写活性に影響を与えることが明らかになった。ステロイドホルモンの特異的な作用は、ステロイドホルモン受容体のみではなく、特異的転写共役因子によっても規定される。AR、ER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N端側に存在する転写活性調節領域であるAF-1領域が、受容体特異的、組織特異的な転写活性化調節に深く関与していることが明らかにされつつある。このような観点から、両受容体に対する特異的共役因子のクローニングを施行し、AR-AF-1 結合性転写共役因子 (ANT-1)、ER-AF-1 結合性転写共役因子 p68/p72、ER-AF-2 結合性転写共役因子複合体である TFTC 複合体を新たに同定した。化学物質の性腺に与える作用を分子レベルで解明するためには、基礎的な共役因子同定作業は不可欠であり、今後も継続する必要がある。さらに、生殖腺が形成される以前の胎仔マウスの全身に AR が発現しており、ES 細胞においても同様に AR の発現が観察された。抗アンドロゲン化学物質の妊娠マウスへの投与は、生殖腺原器へ遊走する primordial germ cell 数を減少させた。未分化胚細胞から始原生殖細胞への分化に AR が関与していることが考えられ、内分泌かく乱物質が始原生殖細胞の増殖、移動にとどまらず、その分化自身にも影響を及ぼす可能性を示すものであるが、何がリガンドとなっているのか、リガンド依存性の転写活性化能を必要とするのかは今後の課題である。

抗アンドロゲン作用を有する化学物質の作用機序を分子レベルで明らかとする

ために、蛍光蛋白質で標識した AR の、核内における空間的分布・クロマチン構造との関係を、三次元的に再構成した共焦点レーザー顕微鏡画像により可視化した。本法は、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極めて有用であるとともに、核内コンパートメントと核内受容体という新たな研究領域を開拓した。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ることが明らかとなり、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が示唆された。このコミュニケーションを選択的に阻害する化学物質の有無は今後の課題である。さらに、ER に関しては、ER はリガンドが結合していない状態で既に核内においてクラスターを形成しているため、共焦点顕微鏡による詳細な観察が未施行の課題として残っている。三次元的に、リガンド結合、非結合状態で核内クラスター分布が異なるのか否か興味ある点である。ER、SXR/PXR のような核内受容体は ANT-1 と相互作用しないが、核内受容体の種類によって核内コンパートメント間のコミュニケーションが多様性を有していることを示している。現在、スプライシング因子コンパートメントには、スプライシング因子リン酸化酵素、N-COR などの転写共役因子も含まれることが明らかになっており、転写/翻訳複合体形成が核内情報の最終的なアウトプットにしめる重要性が今後ますます明らかになっていくものと思われる。さらに、核内受容体の核内における分解過程が転写活性化能のなかで、特に quality control に重要であることも明らかにされた。

多くの化学物質が ER α 、ER β の転写活性化能に影響を与えることがスクリーニングの結果明らかとなったが、転写活性を抑制するもの、促進するもの、AF-1 活性、AF-2 活性それぞれに対し選択的に働くものなど、化学物質により個々の性質が大きく異なる。可塑剤 butyl benzyl phthalate (BBP) が ER α 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、tamoxifen の結合した ER α が転写抑制因子と結合し、標的遺伝子群の転写を抑制するが、耐性を獲得した癌では ER α に変異が生じ、この転写抑制因子との結合が阻害されていた。tamoxifen、BBP はともに、ER α の AF-1 活性を誘導するが、BBP は tamoxifen とは逆に乳癌増殖を促進した。tamoxifen 存在下において ER α 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 α と AF-1 転写活性化因子の結合のみを促進した。同じように ER-AF-1 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ることが示され、環境中に存在するある種の化学物質が発癌作用を有することが明らかとなり、今後この方面の研究で社会に警鐘を与える必要がある。

このように、転写共役因子が環境中の化学物質の作用発現に占める役割はきわめて大きいですが、我々がここ数年間行ってきた実験系では、いわゆる「内分泌かく乱物質作用のU字現象」を説明する鍵は見出されていない。我々のシステムは転写を標的にしているため、AR、ERのいわゆる genomic action を対象としている。

「U字現象」の説明にはごく最近注目されだした AR、ER の non-genomic action が関与する可能性もあり今後の検討課題である。AR、ER を介さないステロイド生合成酵素およびアクチビンシグナル系などがこの「U字現象」に関与する可能性もある。我々は、ヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN 細胞を樹立し、60種類の化学物質をスクリーニングし、imposex の原因物質である有機スズ化合物が、転写段階でアロマターゼ活性を抑制することを示した。さらに、アロマターゼ活性を亢進させる化学物質として、新しくベノミルを同定し、cAMP-PKA および PKC 系以外のシグナル伝達経路の関与を明らかにした。ベノミルは土壤中で速やかに分解されるが、分解産物であるカルベンダジムも、同様にアロマターゼ活性を上昇させることを明らかにし、カナダにおけるベノミルの内分泌かく乱物質としての認定を立証した。

2. 研究構想

【研究背景】

本研究を提案した時点において、生物界における多くの性分化異常が報告され、その原因として、内分泌攪乱物質はエストロゲン、アンドロゲンを中心とするステロイドホルモン作用機構全体を攪乱する事実が明らかにされつつあった。この一方で、ステロイドホルモン受容体を含む広義の核内受容体型転写調節因子/共役因子複合体のカスケード、およびアクチビンシグナル伝達系による泌尿生殖洞の幹細胞からの副腎・生殖腺の発生分化機構の詳細が解明されつつあった。一方で、我々はヒトにおけるこれら核内受容体、転写因子の異常による性分化異常症が発症することを明らかにした。先天性アンドロゲン不応症は、AR 遺伝子の先天性異常で発症することを明らかにしてきたが、我々は、正常 AR 遺伝子を有しながら重症のアンドロゲン不応症（完全型睾丸性女性化症）となった症例で、AR の AF-1 領域に特異的に作用する転写共役因子の障害が存在することを明らかにした。また、アクチビンのセリン/スレオニンキナーゼ型細胞膜レセプターであるタイプ IIA レセプター 欠損マウスでは、オスでは精巣のサイズが半分以下となることも明らかにした。これらの事実は、ある種の内分泌攪乱物質は、広義の核内受容体型転写調節因子のリガンドとなるか、あるいは転写共役因子の機能障害、もしくはアクチビンシグナル伝達系の異常を惹起し、抗アンドロゲン作用またはエストロゲン作用を惹起することを強く示唆した。加えて、出生後の二次的な環境要因をも考慮する必要があるものと考えられた。

【仮説】

内分泌攪乱物質がステロイドホルモン受容体を含む核内受容体型転写調節因子/共役因子複合体、アクチビンシグナル伝達系を介した転写調節機構全般に及ぼす影響に詳細な検討を加えるものである。我々の仮説を図 1 に模式的に示す。

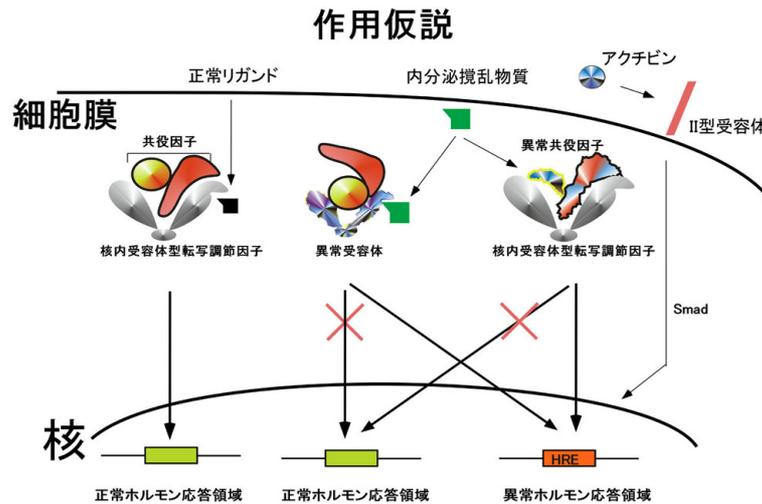


図 1 作用仮説

(1) 内分泌攪乱物質は核内受容体型転写調節因子/共役因子複合体に作用し、機能障害を生じた受容体/転写共役因子複合体は本来のホルモン応答領域 (HRE) への結合能の低下、あるいは正常なら結合しない他の遺伝子の異なった HRE への異常結合により多面的な機能障害を惹起し、同時に核内における受容体/共役因子複合体の三次元的分布の異常をもたらす、(2) ある種の内分泌攪乱物質はアクチビンシグナル伝達系の機能障害を惹起する、(3) この異常転写調節機構は、第二次性徴に伴う個体の性腺、副腎由来の性ステロイドホルモン環境の変動、ならびに高脂肪食摂取などの出生後の二次的な環境要因により修飾される、以上 3 点を明らかにし、内分泌攪乱物質を作用機構の観点より再分類することを目標とした。

【研究の進め方】

仮説を証明するために多面的なアプローチを行うこととした。

1) 細胞

我々の研究施設では卵巣顆粒膜細胞由来の細胞株 KGN 細胞を樹立している。この細胞は豊富なアロマターゼ活性を有しており、正常細胞に近いといえる。このほか、前立腺癌細胞株、乳癌細胞株などをおもに使用する。

2) 受容体/共役因子複合体の核内分布の可視化

共焦点顕微鏡と高精細 3 次元画像構築システムを組み合わせることにより、既知の内分泌攪乱物質をスクリーニングする。この方法は共焦点顕微鏡を用いて多くの断層面を撮影し、3D 構築用コンピューター処理により三次元画面に再現するものである。核内受容体による転写制御は複数の共役因子との結合を介して発現されるが、この共役因子群は核内に均一に分布するのではなく、核内マトリック

スに点状に局在し、この点状の分布に一致して活性の核内受容体が分布し、この分布が生理的に活性の転写を行う複合体の形成を反映すると考えられている。AR、SXR、と GFP（緑色蛍光）とのキメラ、共役因子蛋白と YFP（黄色蛍光）とのキメラを作成し、同一の細胞で共発現させ、生細胞で転写活性化能のある転写複合体を可視化することを試みた。この系に内分泌攪乱物質を添加することにより、正常の複合体形成を阻害するか否かをスクリーニングすることができる。

3) レポーターアッセイ

前述の核内受容体型転写調節因子の発現ベクターを各レポーター遺伝子とともに細胞にトランスフェクト、もしくは microinjection し、異常転写活性化能を測定する。以上の機能解析、画像解析法を用いることにより、内分泌攪乱物質を可能なかぎり広くスクリーニングする。正常転写活性化能を阻害する、もしくは異常転写活性化作用を誘導する内分泌攪乱物質を同定し、以下の実験にて確認する。

4) 抗受容体抗体を用いた転写共役因子の免疫共沈

5) キメラ受容体を用いた機能解析

6) rescue 実験

同定された受容体もしくは転写共役因子の異常が過剰量の正常受容体、もしくは正常転写共役因子により代償されうるかどうかを検討する。

7) 前述した KGN 細胞を用いることにより、アロマターゼ活性におよぼす内分泌かく乱物質の作用を検討する。

8) 動物実験

アクチビン II レセプター欠損マウス、及び、その細胞内シグナル伝達物質である Smad 欠損マウスを用い、野性型マウスとノックアウトマウス各々について、その 1 次培養細胞系と whole body における内分泌攪乱物質のアクチビン-smad 伝達系と性ホルモン分泌調節に及ぼす効果、内分泌臓器に対する影響を検討することにより、内分泌攪乱物質のアクチビンシグナル伝達系に及ぼす影響とその作用点を明らかにする。また、新規の AR、ER の作用を模索するため、生殖腺の発生・分化以前の始原生殖細胞におよぼす化学物質の作用を明らかとするとともに、性腺の発達を抑制した群、高脂肪餌を投与した群を作製し、第二次性徴、高脂肪食の及ぼす作用を検討する。

9) 新規共役因子の同定

本研究プロジェクトの遂行に不可欠である転写共役因子のクローニング、機能解析を積極的に行う。

【チーム内での分担】

九州大学・名和田グループは、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、共焦点顕微鏡を用いた AR 依存性転写活性化機構の可視化、アロマターゼ活性、始原生殖細胞の遊走・分裂に及ぼす化学物質の影響を検討した。さらに、学内共同研究者を募集し、停留睾丸、性行動・性差におよぼす化学物質の影響、ダイオキシンにより惹起される遺伝子発現の変化を検討することとした。同時に、AR に作用する転写共役因子のクローニングを進めた。

筑波大学・柳澤グループは、ER に作用する内分泌かく乱物質のスクリーニングを独立して行い、その作用機構の解明、さらに新規の ER 作動性転写共役因子のクローニング、ER の核内における分解過程の解明を精力的に進めた。

国立栄養研・山内グループは、栄養素がもたらす内分泌かく乱物質への感受性の変化、ならびに鋭敏な内分泌かく乱物質スクリーニング系の立ち上げを試みた。

【その後の新展開から生まれた目標】

これまでの研究で、核内受容体の最終的な機能発現は、転写共役因子複合体群、もしくは受容体の分解に関与する「ユビキチン・リガーゼ」複合体など、数種類の複合体により規定されること、さらに受容体の核内移行および転写共役因子をリクルートしながら核内に局在する機能的コンパートメント間のコミュニケーションなど、単にリガンド結合の有無では予想されない多くの段階で規定されることを明らかになった。集積された知見を基にし、性ステロイドホルモンないし化学物質の個体に対する作用を予測する技術を創出し、最終的には哺乳類において最大の遺伝子スーパーファミリーを形成する核内受容体を自由に制御することにより、ホルモン依存性癌をはじめとして広く生活習慣病に対する新しい治療戦略が創出されることが期待される。さらに、共通した作用を有する化学物質より機能発現に必要な基本骨格を抽出する技術をうみだすことにより、男女両性の更年期以降の、肥満を初めとした性ステロイドホルモン欠乏による生活習慣病や、ホルモン依存性癌の治療戦略が創出される。

さらに、性腺原基が形成される以前のごく早期の胎児において性ステロイドホルモン受容体が全身性に発現しており、かつ primordial germ cell の遊走に必須であることが明らかになった。この事実は AR、ER の機能に、生殖腺分化以外の未知の機能があることを示唆しており、精子数減少をはじめとする男性不妊の原因が明らかになることが期待される。また、我々が独自に開発した前立腺癌の遠隔転移モデルを用いて、癌の「遠隔転移抑制」を標的とした斬新な抗癌剤が開発されうる。また、ER にリクルートされる抑制性共役因子を標的とした乳癌治療薬

を設計するとともに、環境中に存在する「乳癌増殖刺激性化学物質」を明らかにし、社会に警告を与えることも期待される。

このように、多くの化学物質を取り扱い、その作用機構を解明することは、単に公衆衛生に寄与するのみでなく、疾病の治療に多大な貢献があると思われる。

3. 研究成果

3. 1 “核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質（名和田グループ）”

(1) 研究内容及び成果

a) 抗アンドロゲン受容体作用薬剤と AR の核内三次元分布

アンドロゲン受容体に拮抗作用を有するヒドロキシフルタミド、ビカルタミドをモデル化学物質として用い、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、その強力な抗アンドロゲン活性のために、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ている。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ところ（図 2）、アンドロゲン受容体の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。対照的に、アンタゴニストである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。

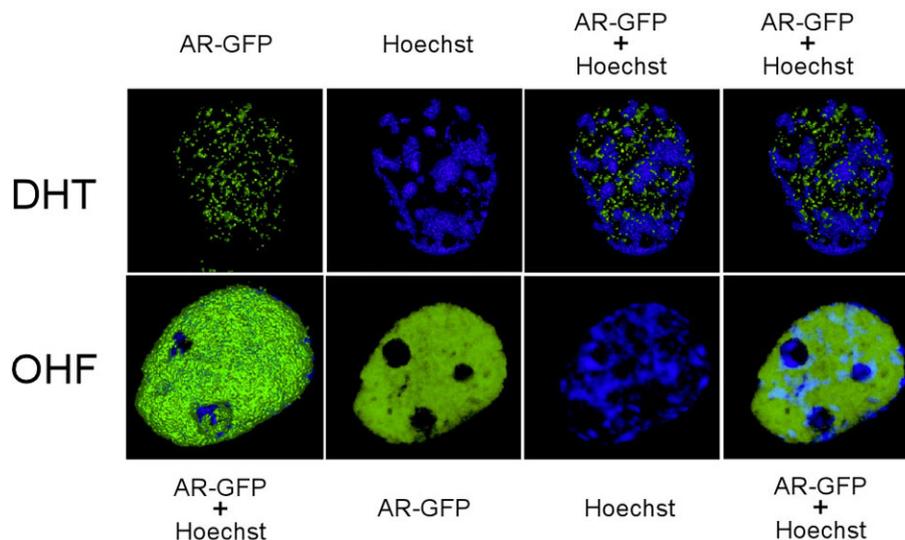


図 2 AR の核内三次元分布

入手可能な 60 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受容体依存性転写活性化機構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ところ、DDE、ニトロフェン、ビンクロゾリンは、 10^{-6}M の濃度でおよそ 40 から 60%の阻害効果を有した。DDE、ビンクロゾリンは従来報告されていたが、ニトロフェンは今回、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、COS-7 細胞ばかりでなく、ヒト前立腺癌より樹立され、正常アンドロゲン受容体依存性の転写活性化機構を有する ALVA 細胞でも観察され、用量依存性であった。

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、ビンクロゾリンの 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（図 3）。

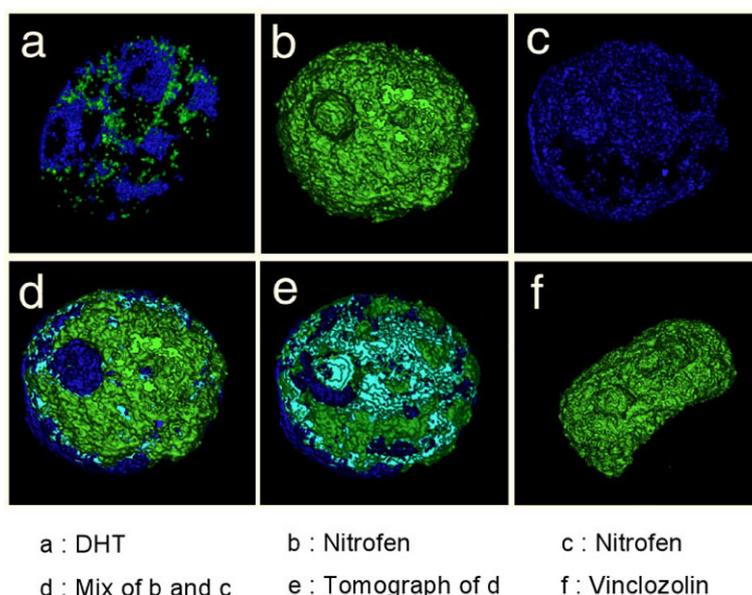


図 3 内分泌かく乱物質に対する AR の分布

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た。

b) 核内受容体コンパートメントの形成

GR がリガンド存在下では細胞質より核内へ移行し、核内では点状にクラスターを形成して分布することが報告されて以来、同様の核内でのクラスター形成が ER α 、AR についても報告され、核内のクラスター形成とステロイドホルモン受容体による転写活性化は連関していることが明らかになってきた。我々はクラスター形成のメカニズムや生理的意義明らかにすることにより、アンドロゲン作用、抗アンドロゲン作用を示す内分泌かく乱物質の分子標的ならびに作用機序の詳細を明らかにすることを目的に研究を開始した。

AR の核内局在に対する転写共役因子 SRC-1、TIF-2 および CBP の影響

Cyan Fluorescent Protein(CFP)を C 端に融合した AR 発現ベクター(AR-CFP)を COS7 細胞にトランスフェクションすると、リガンド非存在下では AR-CFP は細胞質に分布した(図 4A)。しかし DHT を添加すると、以前報告されたように核内へ移行した。さらにその核内の分布は均一ではなく、クラスターを形成して分布した(図 4B)。AR の転写共役因子である SRC-1 と TIF2 の各々の N 端に Yellow Fluorescent Protein(YFP)を融合した YFP-SRC-1、YFP-TIF2 を COS7 細胞に発現させると、これらは核内にびまん性に分布した(図 4C, I)。さらに AR を共発現させ、DHT を添加すると YFP-SRC-1、YFP-TIF2 は核内で分布が変化し、クラスターを形成した(図 4F, J)。しかしこれらの転写共役因子は DHT 添加のみ、AR 共発現のみではクラスターを形成しなかった(図 4D, E)。このクラスターは DHT 存在下の AR の分布と一致した(図 4G, H, K, L)。即ち、YFP-SRC-1、YFP-TIF2 は転写活性化能を獲得した AR にリクルートされ、核内で再分布されることが示された。

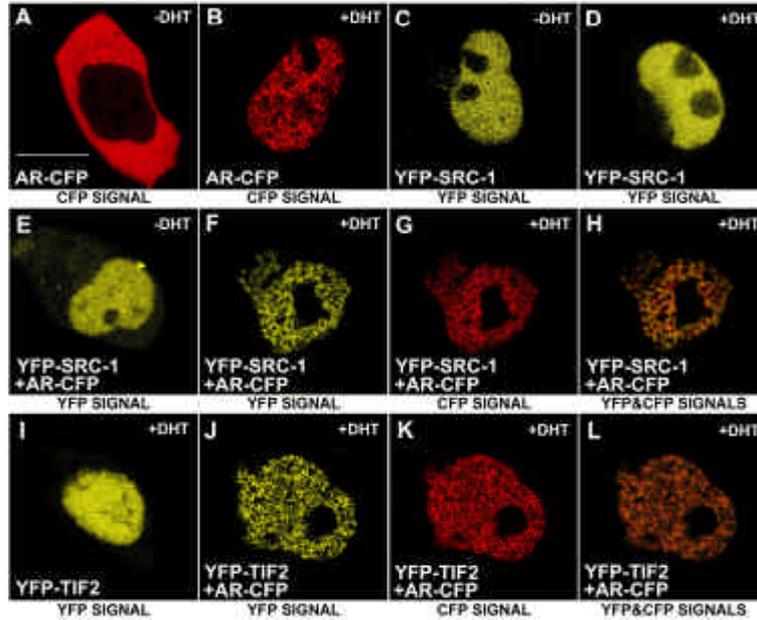


図4 ARの核内局在に対する転写共役因子の影響

核内受容体全般のインテグレーターであるCBPのN端にYFPを融合したYFP-CBPをCOS7細胞に発現させると、YFP-CBPは核内に分布したが、YFP-SRC-1、YFP-TIF2と異なり、一部クラスターを形成して分布した(図5A)。AR-CFPを共発現させると、DHT非存在下ではAR-CFPは細胞質に分布したが(図5A)、DHTを添加すると、AR-CFPはYFP-CBPのクラスターに一致する形で核内に移行した(図5B)。次に内因性CBPについて核内の分布を観察した(図5C)。ARを共発現させDHTを添加すると、ARはクラスターを形成して核内に分布したが、この状態で内因性CBPは、3種類の抗体を用いても免疫染色できなかつた(図5D)。DHTの代わりに抗アンドロゲン剤のフルタミドを添加すると、報告されているようにARは核内にクラスターを形成せずにびまん性に分布した(図5E)。即ち、転写活性化能を有していないARは核内でクラスターを形成しない。このフルタミドを添加した場合は内因性CBPは免疫染色が可能であった(図5F)。このことは、ARをトランスフェクションしてDHTを添加した場合、転写活性化能を獲得したARが、核内にクラスターを形成して分布したCBPに結合することにより、CBPの抗体認識部位がマスクされたことを示唆している。即ち、活性化されたARは直ちに核内にクラスター状に分布したCBPにリクルートされることが強く示唆された。このように、SRC-1やTIF2と異なり、CBPは核内でのクラスター形成に本質的な役割を担っていることが示唆された。

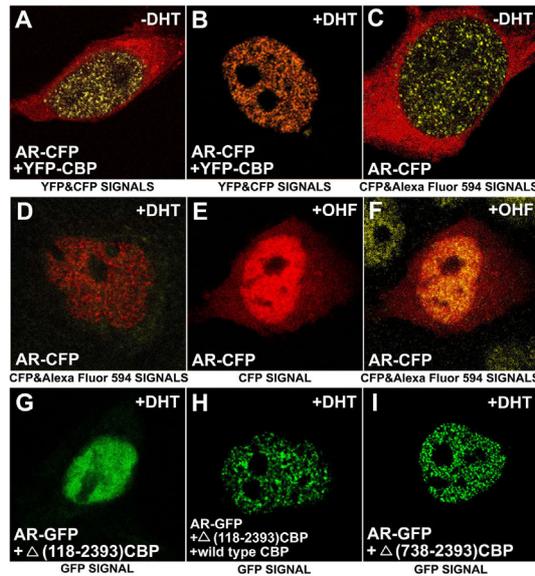


図5 ARの核内局在に対する転写共役因子の影響

このことをさらに確認するため、変異CBPのARクラスター形成に及ぼす効果を観察した。ARの転写活性化能に対してドミナントネガティブ効果を発揮する変異CBPを作成するため、CBPの一連のドメイン別欠損変異体を作成し、ARの転写活性化能に対する効果を検討した。いくつかの変異CBPのうち、N端とC端のみを残し、118番目から2393番目までのアミノ酸を欠失させた $\Delta(118-2393)$ CBP断片の強制発現は、AR転写活性に対して抑制効果を示した。

この $\Delta(118-2393)$ CBPを共発現させると、AR-GFPのクラスター形成は抑制されたが(図5G)、野生型CBPの共発現でAR-GFPはクラスターを形成し(図5H)、AR転写活性も回復した。ドミナントネガティブ効果を持たない $\Delta(738-2393)$ CBPを共発現させてもAR-GFPのクラスター形成に影響を与えなかった(図5I)。以上の結果は、内在性のCBPがARのクラスター形成に必須であることを示している。CBPのドミナントネガティブ効果を詳細に調べるため $\Delta(118-2393)$ CBP強制発現下で $\Delta(118-2393)$ CBP及び内因性CBPの分布を調べた。 $\Delta(118-2393)$ CBPは核内にびまん性に分布したが、内因性CBPは図5C同様に核内にクラスターを形成して分布した。AR-CFP、DHT存在下でもCBP分布は同様であった。従ってCBPのN端100アミノ酸に核内受容体結合領域があるため、 $\Delta(118-2393)$ CBPはおそらくARのCBP結合部位を占めることによってドミナントネガティブ効果を発揮すると考えられた。

ARのN端及びC端断片の核内3次元分布

AR全長ばかりでなくAR欠失変異体断片においても、核内でのクラスター形成

と転写活性化能は良く相関したが、クラスター形成の有無は転写活性化のレベルの差を反映するものではなかった。即ち、野生型 AR 単独あるいは、単独では殆ど転写活性化能を示さない C 端断片 (AR-AF-2) と AR の N 端断片 (AR-AF-1) の両者をトランスフェクションした場合の転写活性化能は、AR-AF-1 単独の転写活性化能よりも高値であったが、二次元画像解析での核内のクラスター形成は両者間に差を認めなかった。

そこで、これらの核内分布の詳細を明らかにするため、三次元画像解析法を開発し、AR 断片と AR 全長の核内分布を比較した。AR 全長-GFP は DHT 存在下にてヘキスト 33342 で淡染される euchromatin と考えられる領域に (図 6 E) 孤立した点状に分布していた。一方、AF-2-CFP は DHT の有無にかかわらず、核内全域に heterochromatin 領域と重複してびまん性に分布したのに対して、AF-1-YFP は DHT の有無にかかわらず、弧在性のクラスターは形成せず、主に euchromatin 領域に網状パターンの分布であった。ところが AF-2-CFP を共発現させると DHT 存在下で AF-1-YFP は弧在性のクラスターを形成し、AR 全長-GFP と全く同一の分布を示した。また、 Δ (DBD) AR-AF-1 を共発現させた場合でも DHT 依存性に AR-AF-2-CFP は同様に分布した。これらは CV-1 や LNCaP 細胞でも同様の結果であった

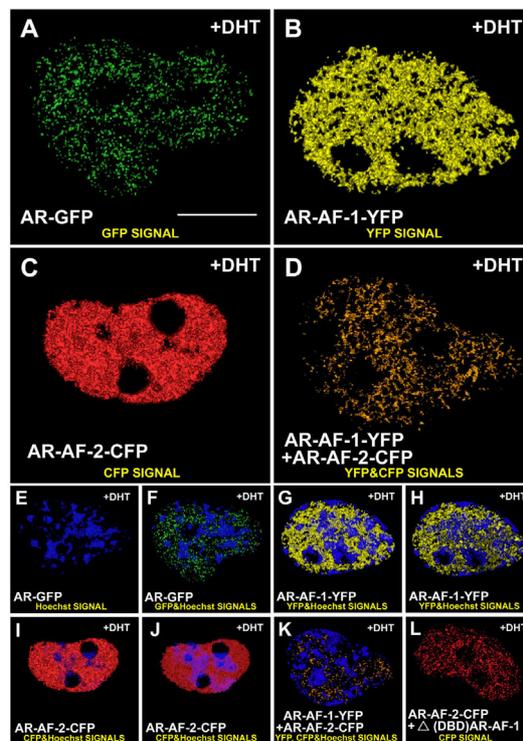


図 6 AF-1, AF-2 断片の核内局在

AR、GR及びER α の核内クラスター分布の数量的解析

我々の開発したAR-GFPの核内分布の三次元画像解析法は、画像再構築課程において、非特異的検出やレンズ収差によって生じるバックグラウンドを取り除いて得られた画像であるため、核内のクラスターの数の定量が可能であり、その数は1つの核当たり約300個と計算された(図7A)。また、これらのクラスターは核の約10%の体積を占めると計算された。同様の方法でYFPをC末に融合したGR(GR-YFP)、GFPをC末に融合したER α (ER α -GFP)に適用したが、GR-YFP、ER α -GFP共に、リガンド存在下で核内にクラスターを形成して分布し(図7B,C)、その数はAR-GFPの場合と同様に約300個(308 \pm 23、n=8)であった。そこでAR-CFPとGR-YFPを各々のリガンド存在下で共発現させると、これらは全く同一のクラスターに分布した(図7D)。さらに、AR-CFPとER α -GFPを各々のリガンド存在下で共発現させても、同様の結果を得た(図7E)。また、その数はAR-GFPあるいはGR-YFP単独で発現させた場合とほぼ同一であった。さらに、AR-GFPの核内クラスターの数はYFP-SRC YFP-TIF2、YFP-CBPを共発現させても影響されなかった。また、YFP-SRC-1、YFP-TIF2、YFP-CBPはすべてのAR-GFPのクラスターに集簇した(図7F,G,H)。

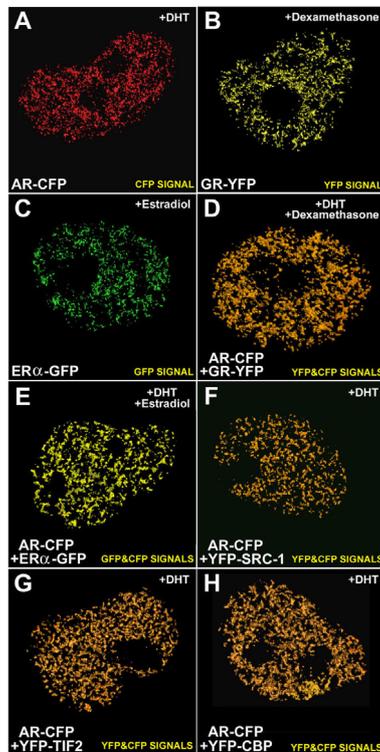


図7 AR、GR及びER α の核内クラスター分布の数量的解析

AF-1 と AF-2 の機能に関して AR は、ステロイドホルモン受容体のなかで特異な存在であり、大部分の転写活性化機能が AF-1 に存在することが報告されている。AR の AF-2 にもリガンド依存性転写活性化能は当然存在するが、哺乳類の細胞ではその活性が極端に低いことが報告されている。また、AR の LBD は、リガンド非存在下において、DBD と ヒンジ領域にまたがる 557-653aa または 617-633aa または 627-658aa に存在するといわれている核移行シグナルをマスクすることにより、AR を細胞質へ留まらせるといわれている。それと同時に AR の LBD は、リガンド非存在下では AF-1 の恒常的転写活性化能を抑制していると考えられている。また、AR の AF-1 は TIF2 や SRC-1 と直接結合することが報告されている。

今回の我々の研究は、今まで報告されてきたこれらの事項を細胞レベルで完全に可視化することに成功した。即ち、今回我々の作成した AR-AF-1、AR-AF-2 断片は露出された核移行シグナルを含んでおり、単独で核移行したが、AR-AF-1-YFP に加えて AR-AF-2 を共発現させると、AR-AF-1-YFP のクラスター形成が抑制され、さらに、細胞質に分布した。AR-AF-1 の強い恒常的転写活性化能を反映して、AR-AF-1-YFP は単独でクラスターを形成したが、AR-AF-2-CFP 単独ではリガンド存在下でも、明らかなクラスター形成は示さなかった。また、YFP-SRC-1 は AF-1-CFP と核内でクラスターを形成して集積した。しかし、ER α ではリガンド存在下に SRC-1 をリクルートしてクラスターを形成するためには helix12 と AF-2 領域のみで十分であると Stenoien らは報告している。これらのことより、クラスター形成の詳細な分子メカニズムはステロイドホルモン受容体間で多少異なるが、転写共役因子をリクルートすることが転写活性化能を得るために必要かつ共通のステップであることが示唆される。

さらに、単独ではリガンド依存性転写活性化能がほとんど無い AR-AF-2 と強い転写活性化能を持つ AR-AF-1 が相互作用することが相乗的作用を生み出し、AR の完全な転写活性化能を発揮するために必要であることが示された。この現象の説明として AF-2 (LBD) の活性化能は低い、AF-1 が共存すると、両者の機能的結合が起こり、転写共役因子をリクルートできる完全な立体構造を形成することが可能となり、転写共役因子を含めた各因子が相乗的に作用し、AR の完全な転写活性化能が発揮できると考えられる。このような推測は、これまで報告のあるレポーター活性や GST pull down assay、あるいは two-hybrid assay など結果からの総合的考察と一致する。

以上のことより AR/共役因子複合体は、AR の AF-1 断片と、AR 全長あるいは AF-1 と AF-2 が共存する場合とでは、構造的に異なることが強く推察されるが、これまでの二次元画像解析では、その差を検出することは不可能であった。我々は新た

な三次元画像解析法を開発し、これを応用することによって、初めて AR 断片/共役因子複合体と AR 全長/共役因子複合体の構造に差があるという直接的証拠を画像として捕らえることに成功した。また三次元画像解析から、AR/共役因子複合体は転写が活発に行われている euchromatin に分布することも明らかになった。また、三次元画像解析法は蛍光蛋白でラベルしたステロイドホルモン受容体の正確な核内分布と定量的解析を可能とした。その結果、リガンド存在下で AR、GR、ER α は全く同一の核内クラスター、即ち核内コンパートメントに集積されること、過剰発現させた時のいわば、最大の核内コンパートメントの数が COS7 細胞で約 300 個であること、SRC-1、TIF2、CBP などの転写共役因子もこの同一のコンパートメントに集積されること、さらにこれらの転写共役因子を過剰発現させても核内コンパートメントの数は変化しないことも明らかになった。これらの観察より転写的活性化能を獲得したステロイドホルモン受容体はその種類に関係なく、転写共役因子と複合体を形成して核内の euchromatin 内のある特定のコンパートメントに集積し、そこから転写される標的遺伝子へ動員、さらに回収されることが考えられる。この仮説を支持するものとして GFP-GR は、標的遺伝子との結合、遊離を素早く繰り返していること、一度形成された GR, ER α のクラスターは核を DNAase で処理しても変化しないことが報告された。また、CFP-ER α , YFP-SRC-1 複合体は核マトリックスとの結合、遊離が秒単位で起こっていることが FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) を用いて証明されている。

結論として今回の AR のクラスター形成の研究で、ステロイドホルモン受容体におけるクラスター形成の生理的意義が明らかとなった。つまり AR のクラスター形成には少なくとも CBP が必須である。また、ステロイドホルモン受容体共通のコンパートメントにおけるクラスター形成は、AF-1 と AF-2 が相互作用して十分な転写活性を発揮できる完全な受容体立体構造を形成していることを意味するものである。

今回の研究に用いた三次元画像解析法は AR の機能解析に有効な新しい手法である。この方法は ER などの他の核内受容体の転写活性化機構解析にも有用であると同時に、内分泌かく乱物質添加による AR の立体構造や局在の変化を正確に同定することを可能にする。また今回の研究により、ステロイドホルモン受容体が核内受容体コンパートメントに局在するということが、ステロイドホルモン受容体が転写共役因子をリクルートできる完全な立体構造をとっていることを意味するものであることが明らかになった。したがって、核内受容体コンパートメントを標的にした内分泌かく乱物質の研究は本質をついたものであり、将来の研究の発展が期待される。

c) AR-AF1 結合転写共役因子のクローニング

平成 10 および 11 年度で、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患者を解析し、AF-1 領域に結合する分子量約 90kDa の蛋白質の欠損が発症原因である可能性を提唱した (N. Engl. J. Med. 390-(12))。この新規転写共役因子は、抗アンドロゲン活性を有する内分泌かく乱物質の標的分子たりうる。初代培養ヒト線維芽細胞より 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 系を用いこのタンパク質の単離を試みた。

その結果、分子量 106 kDa の分子を、アンドロゲン受容体 AF-1 領域結合タンパク質として同定した。このタンパク質はその分子内に TPR (Tetratricopeptide Repeat) モチーフを 19 回反復し、その中央部分に leucine zipper 構造を持つというユニークな構造を有していた (図 8)。ANT-1 (AR N-terminal domain transactivating protein-1) と名付けたこのタンパク質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したが、ER α の AF-1 活性は増加しなかった。対照的に ANT-1 はリガンド依存性の AF-2 活性には影響を及ぼさなかった。ANT-1 の配列は、酵母では prp6p と呼ばれる、スプライシングに参与するタンパク質 U5 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) への結合タンパク質の、ヒトにおける配列と全く同一の物であり、スプライソゾーム構成タンパク質であることが判明した。GST-pull down 法、および immunoprecipitation にて、AR-AF1 と ANT-1 の結合を確認した。

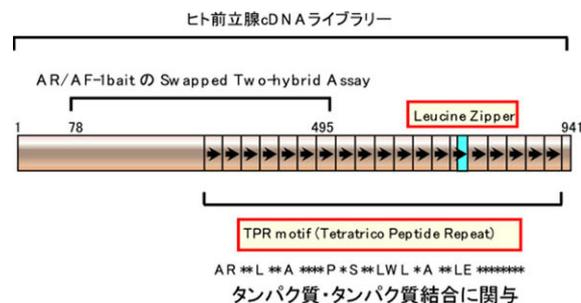


図 8 ANT-1 の構造

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

て局在した。AR はびまん性分布をする ANT-1 とは同一の核内空間に分布したが、対照的に SFC speckle とは異なる核内空間に局在し、SFC speckle は AR が存在する speckle により取り囲まれているように分布していた（図 9）。

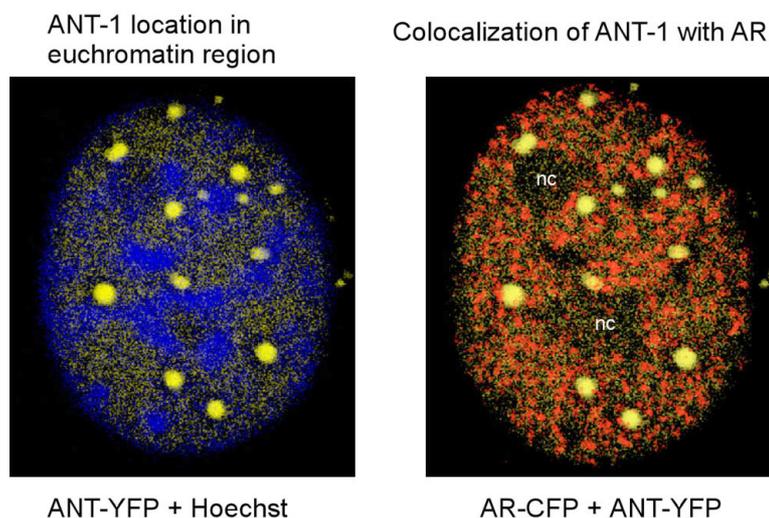


図 9 ANT1 の核内局在

近年、アクティブな実際の遺伝子転写は SFC speckle 周辺部において、pre-mRNA 修飾と同時に行われていることが示唆されている。ANT-1、AR という異なる核内 speckle に分布するタンパク質同士の相互作用は、ANT-1 を介して AR が、転写-スプライシングが同時進行する巨大複合体へのリクルートされる事を示唆する。ANT-1 と AR との結合は、抗アンドロゲン作用を有する化学物質により阻害されず、また共焦点顕微鏡で観察される AR、ANT-1 の核内局在にも影響を与えなかった。このことは、現時点で同定されている抗アンドロゲン作用を有する化学物質の主な作用点は、AF-2 阻害によるものであることを示唆する。

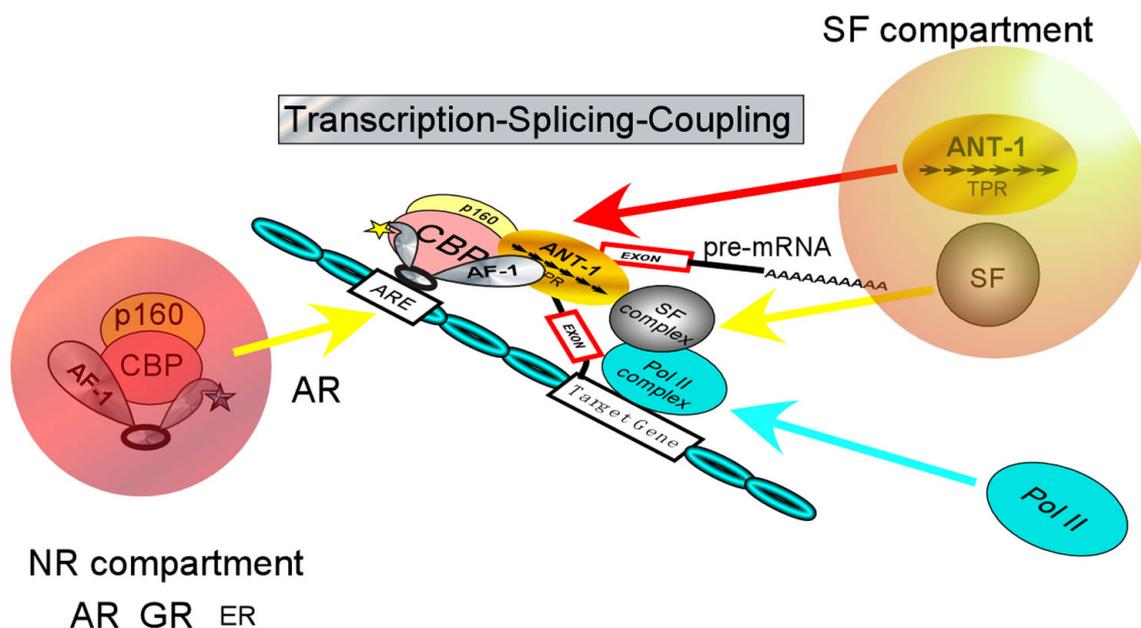


図10 ANT1の作用機構

d) 有機スズ化合物のアロマトラーゼ活性におよぼす影響

二十世紀後半に地球環境の汚染という大きな問題を生じ、その大きな部分を内分泌攪乱物質が占めていると言える。二十一世紀となり将来を見据えた解決策が切望されている。レイチェル・カールソンの著書である「奪われし未来」に示されたように内分泌攪乱物質のいくつかは野生動物の生殖腺に影響を与え、動物種によっては絶滅の危機に瀕している。我々ヒトの健康への影響は不明な点が多いが、性腺機能低下や不妊が生じる可能性が示唆されている。内分泌攪乱物質は蓄積性が高く、食物連鎖の頂点にあるヒトにおいてその影響を無視することはできず、その作用機構、生体への影響の解明が急務である。

スズは船底や漁網の汚染防除剤として広く使用されていたが、1990年外国渡航船を除き、その使用が禁止された。日本の海岸に生息するイボニシの雌にペニスが見られ、すなわち雄性化（インポセックス）や個体数の減少がこの有機スズ化合物によることが報告された。この雄性化のメカニズムとしてエストロゲン合成が低下し、相対的にアンドロゲンが優位となっていることが予想される。エストロゲンはアンドロゲンを基質とし、水酸化酵素であるP450アロマトラーゼにより生合成される。そこで我々が樹立しているP450アロマトラーゼ活性を有するヒト卵巣顆粒膜細胞KGN細胞を用いて、エストロゲン合成のkey enzymeであるP450アロマトラーゼにおよぼす有機スズ化合物の影響を解析した。(Saito et. al. BBRC 289:198-204, 2001)

KGN細胞の培養上清に有機スズ化合物の一つトリブチルスズを 10^{-8} Mの濃度

で添加し、24 時間培養後に細胞中の P450 アロマターゼ mRNA を RT-PCR 法を用いて半定量を行なったところ、図 1 1 A に示すようにトリブチルスズの添加により、mRNA 量が 3 分の 1 に減少した。次に P450 アロマターゼ遺伝子転写活性におよぼす影響を調べた。図 1 1 B に示すように、P450 アロマターゼ遺伝子 5' 領域をルシフェラーゼ遺伝子につないで構築したレポータープラスミドを KGN 細胞に一過性に導入し、トリブチルスズの添加の有無で 24 時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。トリブチルスズ、トリフェニルスズの添加により活性はともに約 70% 抑制された。すなわち有機スズは P450 アロマターゼ遺伝子の転写を抑制することが明らかとなった。ステロイド合成系 P450 遺伝子の発現に不可欠な転写因子である Ad4BP を供導入すると P450 アロマターゼ遺伝子の転写活性は約 6 倍に増加するが、有機スズはこの Ad4BP 依存的な転写活性の増加もほぼ基礎値にまで著明に抑制した。

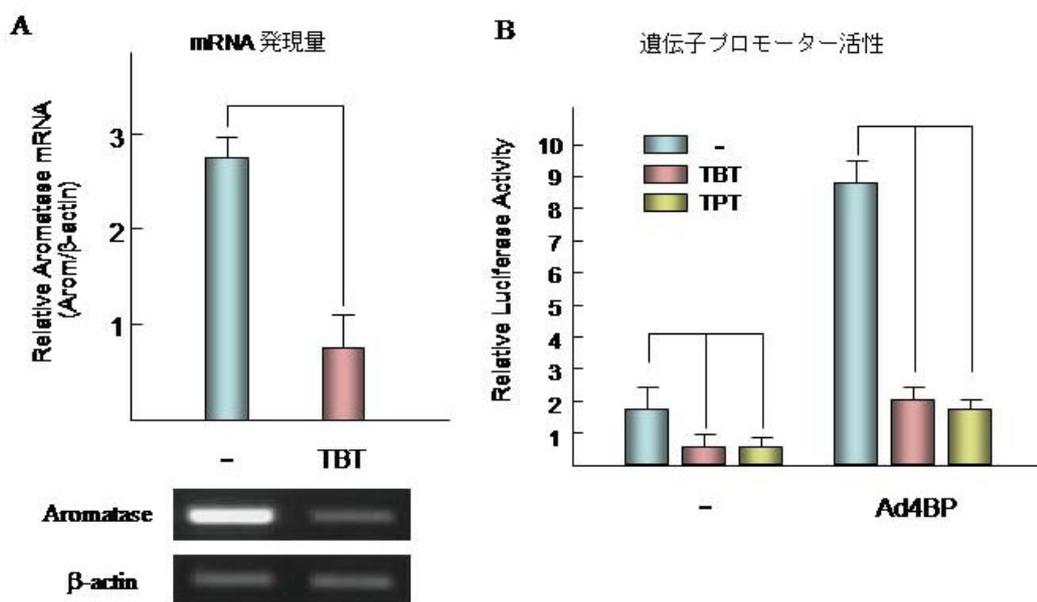


図 1 1 P450 アロマターゼ転写活性に対するスズ化合物の影響

次に KGN 細胞におけるアロマターゼ活性ならびにエストラジオール (E2) 産生を測定した。図 1 1 に示すように、有機スズであるトリブチルスズ、トリフェニルスズはともにアロマターゼ活性の基礎値を 3 分の 1 まで抑制し、さらに

dbcAMPにより増加したアロマトラーゼ活性もほぼ完全に抑制した。また、アンドロステンジオンを基質としたE2産生量も図12に示すように50%以下まで抑制した。

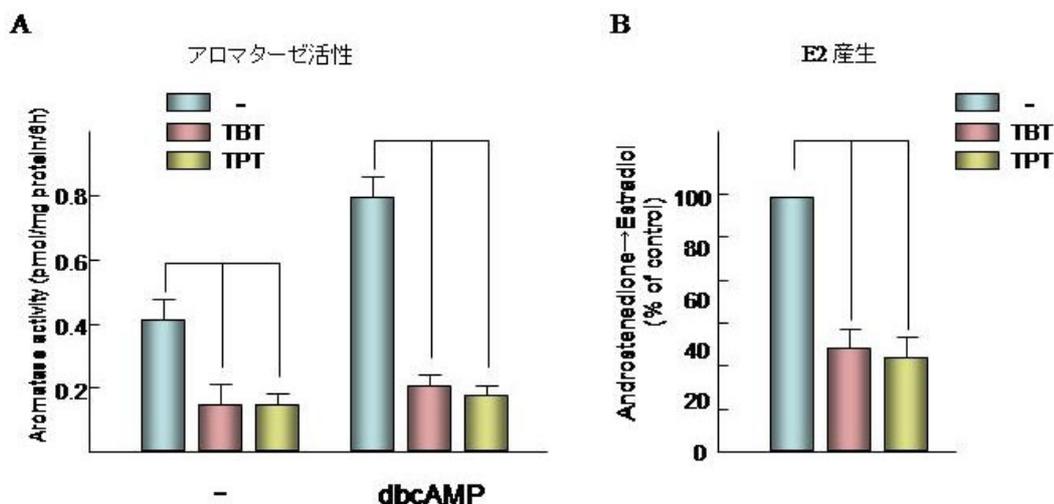


図12 アロマトラーゼ活性に対するスズ化合物の影響

以上の研究結果より、有機スズがアロマトラーゼ活性を抑制することでエストロゲン産生が低下し、相対的にアンドロゲン優位に至ったためにインポセックスにみられるような雌の雄性化が発生したのではないかと考えられる。極低濃度の有機スズによりアロマトラーゼ活性が抑制されたことから、内分泌攪乱物質の作用機序として、性ホルモン受容体への直接作用以外にも、性ホルモン合成酵素活性を変化させることで個体レベルでの性ホルモンバランスを乱す可能性を示唆している。

e) 化学物質ベノミルのアロマトラーゼ活性増強作用の機構

ステロイド合成経路における重要な酵素は、サイトクローム P450 アロマトラーゼ (P450arom) であり、これは *CYP19* 遺伝子の生成物で、アンドロゲンからエストロゲンへの転換をつかさどる律速酵素である。この酵素は卵巣、精巣、胎

盤、脳、肝臓、脂肪組織、乳腺と多くの組織で発現している。P450arom の発現パターンは *CYP19* 遺伝子の選択的スプライシング機構の結果、組織特異的プロモーターにより、調節されている。

我々は最近、ヒト卵巣顆粒膜細胞癌患者より KGN 細胞と名付けたステロイド産生細胞を樹立した。この細胞株は比較的高いアロマターゼ活性をはじめ正常のヒト顆粒膜細胞に近い性状を有する。よってこの細胞株はアロマターゼ活性に対する内分泌攪乱物質の *in vitro* における効果を検討するには最適のシステムである。このシステムを用いて、我々は 55 種類の内分泌攪乱物質候補をスクリーニングし唯一、ベンズイミダゾール系の農薬として使用されているベノミルのみがアロマターゼ活性を誘導した。ベノミルは微小管の重合を阻害する薬剤としても知られ、また直ちにカルベンダジム に転換される。この研究では、ベノミルのアロマターゼ活性の誘導機序について研究を行った。

KGN 細胞を用いたアロマターゼ活性に対する内分泌攪乱物質のスクリーニング

我々は、KGN 細胞を用いてアロマターゼに対する内分泌攪乱化学物質（55 種類）の影響を検討した（図 13）。その中でベノミルがアロマターゼ活性を増強した。ベノミルにより 10 μ M の濃度でコントロールに対して 3 倍程度の活性上昇が見られ、ベンゾ(a)ピレン、ヘプタクロルもわずかではあるが、活性の増強が観察された。我々は、影響が最も著しかったベノミルの活性増強のメカニズムに関する研究を行った。

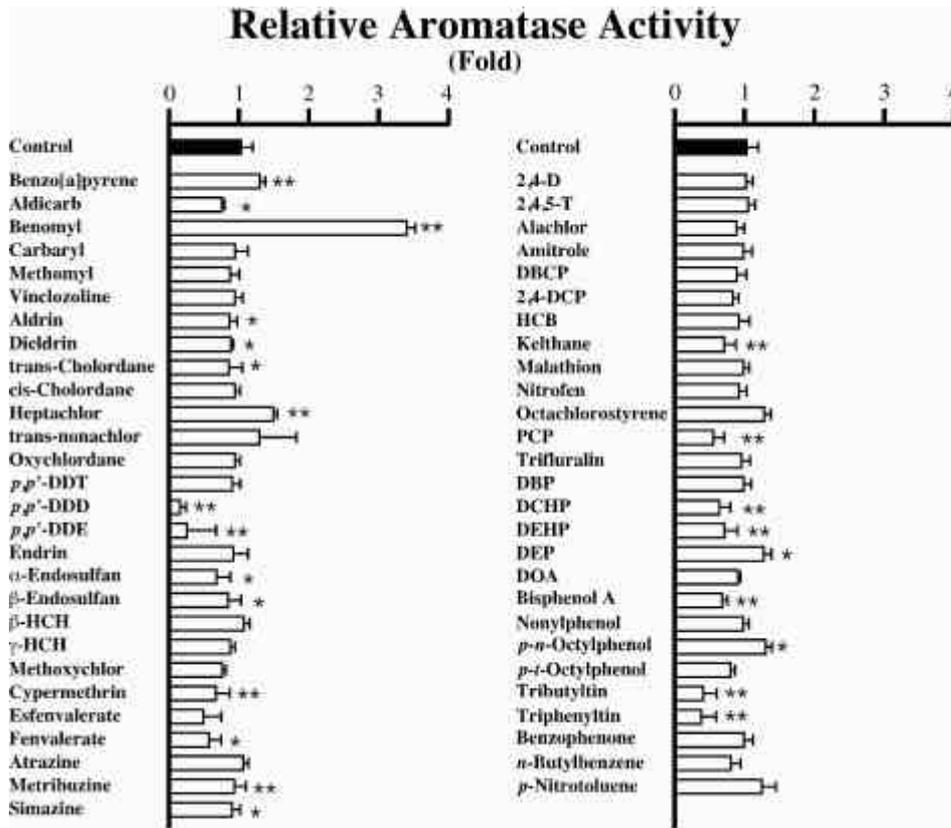


図 1 3 アロマトラーゼ活性に対する内分泌かく乱物質のスクリーニング

CYP19の転写活性に対するベノミルの影響

ベノミルが転写活性へ影響を及ぼしているか検討するために、我々は、RT-PCR によって mRNA の発現レベルを解析した。各々の薬剤で刺激した後、total RNA を抽出し P450arom および β-アクチン mRNA の両方を増幅した。cAMP-PKA パスウェイを活性化すると知られている forskolin および hMG は P450arom mRNA の発現を増加させ、同様に、ベノミルは P450arom mRNA レベルを増加させた (図 1 4 A)。

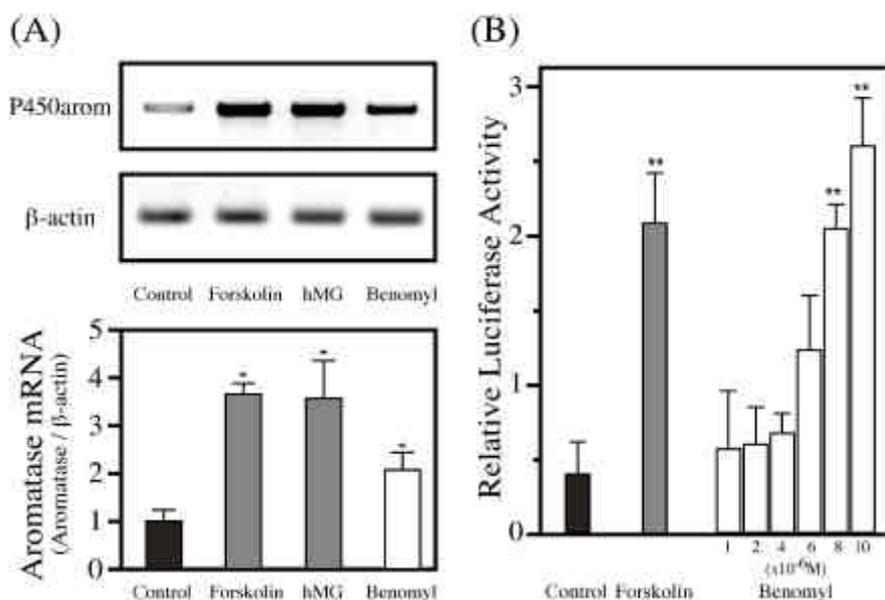


図 1 4 *CYP19* 転写活性に対するベノミルの影響

さらに我々は、*CYP19* プロモーターに対する影響を解析した。P450arom プロモーターII が含まれているルシフェラーゼレポータープラスミドを KGN 細胞に導入し、その後、各薬剤で刺激した。ベノミルはルシフェラーゼ活性を増強させ、転写を増強させることにより、アロマトラーゼ活性を上昇させていることが分かった (図 1 4 B)。

cAMP 生産および CRE 依存的転写に対するベノミルの影響

卵巣顆粒膜細胞における P450arom の発現は、主に cAMP-PKA 系が制御していることが知られている。我々は、アロマトラーゼ活性に対するベノミルがこの経路に関わっているか検討した。各薬剤で刺激した後、培地中の cAMP 濃度を測定した所、forskolin および hMG は cAMP レベルを増加させたが、ベノミルはコントロールと同様増加させなかった (図 1 5 A)。さらに我々は、CRE 配列を含んでいるルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して、CRE 依存的転写に対するベノミルの影響を解析した。これも cAMP 産生の結果と同様ベノミルの影響は認められなかった (図 1 5 B)。これらの結果から、ベノミルによるアロマトラーゼ活性の増強は、cAMP-PKA 経路に依存しないことが示唆された。

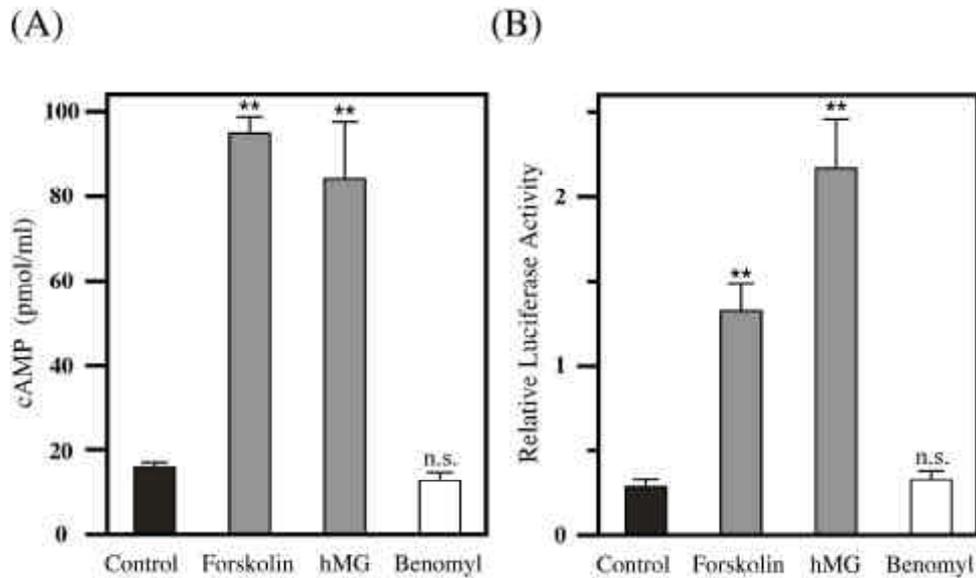


図 15 cAMP 生産および CRE 依存的転写に対するベノミルの影響

プロゲステロン産生、及び P450_{scc}, StAR mRNA に対するベノミルの影響

KGN 細胞では、アロマターゼよりも P450_{scc}, StAR が主に発現しており、それらに対するベノミルの影響も検討した。各薬剤で刺激した後、培地中のプロゲステロン産生量を測定したが、ベノミルの影響は認められなかった。さらに、RT-PCR による mRNA の発現量も検討したが、それらの発現量の増加は認められなかった。これらの結果より、ベノミルはアロマターゼに特異的に作用していると思われる。

ベノミルの代謝物であるカルベンダジムのアロマターゼに対する影響

ベノミルは、土壌中や水中で速やかにカルベンダジムに代謝されることが知られており、我々はその代謝物の影響を検討した。カルベンダジムもまたアロマターゼの転写活性を増強させ、ウェスタンブロッティングによるアロマターゼ遺伝子産物の検討においても増加させることが分かった。これらの結果より、ベノミルは、カルベンダジムに代謝して作用していることが示唆された。

アロマターゼ活性に対するタキソールの影響

微小管はチューブリンというタンパク質の集合体から成る細胞骨格の一つであり、細胞小器官の輸送等に関連しており、チューブリンと微小管の間で動的平衡が存在する。ベノミルは微小管の重合を阻害することが知られている。一

方、タキソールは重合を促進させ微小管を安定させることが知られている。我々は、この2つの薬剤をアロマターゼに対する影響において比較した。ベノミル又はタキソールは細胞の形態を明らかに変化させ、さらに、抗チューブリンで蛍光免疫染色を行ったところ、核周囲に強いシグナルが観察された。加えて、レポーターアッセイによるプロモーターへの影響を検討したところタキソールもまたベノミルと同様、活性の増強が認められた。これらの結果より、チューブリンと微小管の動的平衡の破壊がアロマターゼ活性の増強に関与していることが示唆された。

この研究では、55種類の内分泌かく乱物質をアロマターゼに対して KGN 細胞を用いたスクリーニングを行い、ベノミルが活性を増強させることが分かった。その活性の増強は mRNA の上昇によるものであり、レポーターアッセイにおいてもその作用が確認された。これらより、ベノミルはアロマターゼの転写活性を上昇させることによりアロマターゼ活性を増強させると思われる。特に、ベノミルそのものではなく、カルベンダジムが影響を与えていることが重要であると思われる。イミダゾールである fadrozole と vordozole 等は驚くべきことに、アロマターゼ活性を抑制する作用を有している。したがって、ベノミルが転写レベルでアロマターゼ活性を増強させるという点でユニークなタイプのイミダゾールであると考えられる。

FSH は、cAMP レベルを増加させることによって *CYP19* の発現を増加させる生理的な作用を有している。このメカニズムは CREB/ATF ファミリーの CRE への結合によるものである。しかしながら、ベノミルは cAMP 産生、CRE 依存的な転写の活性を増強させなかったため cAMP-PKA パスウェイへの関与は否定された。FSH 受容体によって活性化されるとの報告がある、Protein Kinase B (PKB/Akt)、Serum and Glucocorticoid induced Kinase (Sgk)、ERK および p38 のキナーゼは阻害剤投与実験にてそれらによる阻害効果を確認したが、ベノミルによるアロマターゼ活性の増加は阻害されなかったため、これらのキナーゼに関連した作用ではないと思われる。

細胞の細胞骨格は、微小管、微小繊維および中間フィラメントから成り、それらコンポーネントの分布の変化が別のものに影響を及ぼす場合がある。その一つとして、ステロイド合成は微小管に関連しているかもしれない。卵巣顆粒膜細胞のステロイド合成における微小管の役割は以前に報告されている。例えばコルヒチン、ノコダゾール、微小管を脱重合するこれら薬剤はプロゲステロン産生を上昇させる。一方、タキソールは FSH で上昇したプロゲステロン産生

を抑制する。我々の研究で、ベノミルとタキソールは、アロマターゼ活性において同様の影響が確認された。興味深いことに、キャメロンらは JEG-3 絨毛膜癌腫細胞でエストロゲン産生およびアロマターゼ両方を増加させることを報告している。これらの結果は、微小管の動的平衡の破壊がアロマターゼ活性の増加に関する重要な要素であることを強く示唆する。

さらに注目すべきことに、ステロイド合成におけるベノミルの影響は、ミクロソーム酵素である P450arom で特異的に観察されたが、ミトコンドリアの蛋白質 StAR、P450scc への影響は観察されなかった。ミクロソームとミトコンドリアの細胞内の分布等を再編制する場合、ベノミルはクロス・ブリッジする微小管および細胞小器官に影響を及ぼすかもしれない。これらの違いは、単に MIA の種類あるいは細胞の種類や条件に依存するかもしれない。MIA は、分子のメカニズムに関してほとんど知られていないが、MAP キナーゼの 1 つである JNK パスウェイへの部分的な関与が報告されている。MIA およびベノミル依存的なアロマターゼ活性の誘導はさらなる検討が必要である。

我々のこの結果は、ベノミル、カルベンダジムまたは、タキソールの野生生物およびヒトへの長期または過度の暴露が、エストロゲン依存的な腫瘍促進、性分化の異常等の病理学に関連するかもしれないことを示唆している。胚や思春期等の重要な成熟期間中に、ベノミル依存的なアロマターゼの誘導は、異常な女性化に繋がるかもしれない。ヒトの女性では、乳房、間質組織中のアロマターゼの高発現による局地的なエストロゲンの産生が、乳癌のリスク増加に関係していた。興味深いことに、タキソールは、正常と悪性腫瘍の胸部組織に由来した繊維芽細胞中で TNF α 依存的なアロマターゼ活性の増加を阻害することが報告されている。これは、乳癌の治療への効果が期待された。しかしながら、その研究ではそのような効力が別の MIA によって確認されなかった。MIA の影響は、組織特異的であり、内分泌かく乱物質の評価は慎重に行うべきである。

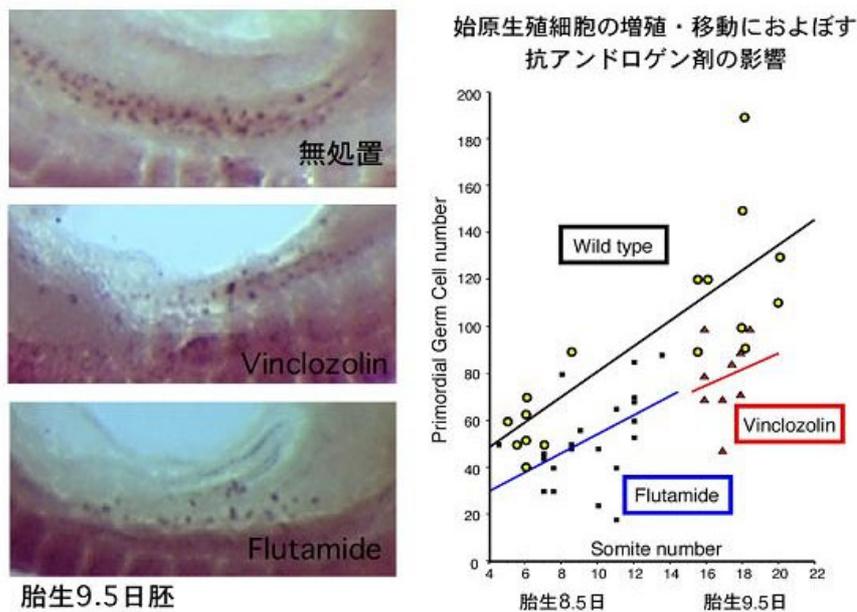
ベノミルはげっ歯類および犬においてオスの生殖に有害なものとして、知られている。ベノミルあるいはその代謝物質カルベンダジムは菌類中の微小管構成を阻害するので、細胞分裂の阻害または、精子形成における微小管依存のプロセスによる精巣の機能障害が生じることが多くの研究者によって示唆された。しかしながら、これがヒトの男性の場合にはあてはまるかどうかは明らかではない。さらに、卵巣および精巣において使用される *CYP19* のプロモーターが同一であるために、ベノミルが精巣のアロマターゼ活性へ影響することにより男性の女性化に関連する可能性を検討することは興味深い。

最後に、我々が樹立したヒト顆粒膜細胞株は、アロマターゼアッセイによる

内分泌かく乱物質の同定において非常に有用であることが証明された。このシステムを使用して、私たちは初めてそのベノミルおよびその代謝物質が cAMP の活性化とは無関係にアロマターゼ活性を増強することを実証した。ベノミルまたはカルベンダジムの影響は、主として転写のレベルで作用することが分かり、微小管の不均衡な重合、脱重合と密接に関係のあるように思われる。

f) 始原生殖細胞の発生、分化、増殖に及ぼす内分泌かく乱物質の影響

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な細胞である。個体発生初期の未分化胚細胞である胚体外胚葉の一部の細胞が始原生殖細胞への分化を運命決定される。マウスでは胎生 8.5 日には尿膜基部に分布し、この始原生殖細胞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成熟した精子、卵子といった生殖細胞へ分化する。生殖隆起から始まる性腺の分化に、アンドロゲン、エストロゲンをはじめとする性ステロイドが必須であり、したがってこれら性ステロイドの作用に変化を与える内分泌かく乱物質が性腺の分化に影響を与えることが予想される。一方、生殖隆起に達するまでみられる始原生殖細胞に特徴的な発生、増殖、移動の機構はほとんど明らかではなく、性ステロイドの影響も全く解析されていない。始原生殖細胞はアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色により陽性となり、実体顕微鏡下に可視化される特徴をもつ。我々はこのことを応用し、始原生殖細胞の分化成熟過程におよぼす内分泌かく乱物質の影響を調べた。細胞レベルで抗アンドロゲン作用を示すことを明らかにした内分泌かく乱物質の候補物質に関し、実際に個体レベルで如何なる影響がみられるか解析を行なうことが最終的に不可欠である。



始原生殖細胞数におよぼす抗アンドロゲン剤の影響

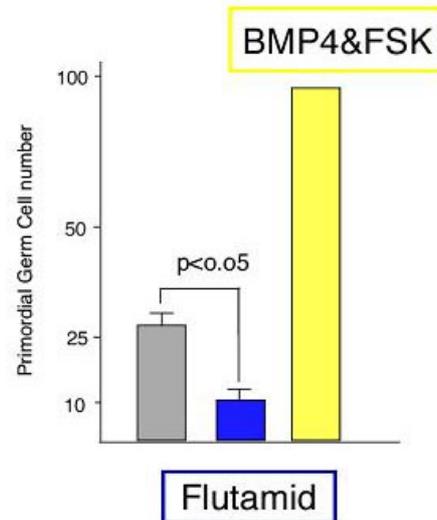
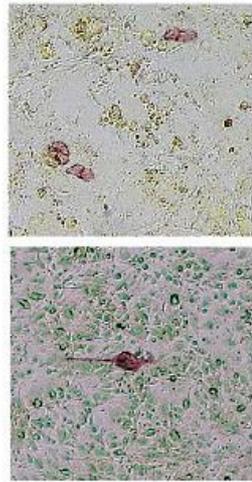
左にALP染色肉眼像を示す。点状に濃く染色される細胞が始原生殖細胞である。無処置に比べ、ビンクロゾリン、フルタミド投与群で陽性細胞数の減少を認める。体節の数により発生段階を揃えた結果を右に示す。

図 1 6 始原生殖細胞に及ぼす抗アンドロゲン剤の影響

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およびコントロールとして抗アンドロゲン剤であるフタミドを受精卵の着床後より性腺の分化が開始される前、すなわち妊娠 4.5 日から 8.5 日までの間妊娠マウスに経口投与した (5mg/kg 体重)。胎生 8.5 日から 9.5 日の仔胎を回収し、ALP 染色を行ない、始原生殖細胞数を測定した。図 1 6 に示すように、ビンクロゾリンならびにフルタミド投与群で有意な始原生殖細胞数の低下を認め、抗アンドロゲン剤が始原生殖細胞の増殖、移動を阻害することを明らかにした。

次に我々は始原生殖細胞を *in vitro* で培養し、抗アンドロゲン剤の効果を調べた。胎生 9.5 日胚から始原生殖細胞を含む腸間膜を分離し、トリプシン処理の後に STO 細胞をフィーダー細胞とした培養を行なった。上清に抗アンドロゲン剤であるフルタミドを 10^{-9} M 添加した群、および始原生殖細胞の増殖を促進することが示唆されている BMP, forskolin を添加した群、無添加群に分け、48 時間の培養を行なった後に ALP 染色を行ない、始原生殖細胞数を測定した。図 1 7 に示すように、フルタミド添加により始原生殖細胞数は無添加コントロールに比べ優位に減少していることが示された。図 1 6 で示した個体レベルでの抗アンドロゲン剤の効果は始原生殖細胞への直接作用であることが示唆された。

始原生殖細胞のSTO細胞上での培養

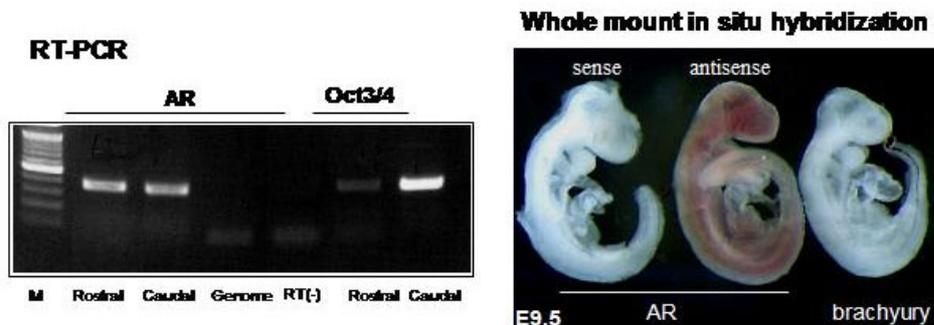


始原生殖細胞の増殖におよぼす抗アンドロゲン剤の影響

始原生殖細胞を9.5日胚より回収しSTO細胞をフィーダー細胞とし48時間培養し、ALP染色により始原生殖細胞を可視化した肉眼増を左に示す。培養上清に各種薬剤を添加した際の細胞数を右に示す。

図 1 7 始原生殖細胞の増殖におよぼす抗アンドロゲン剤の影響

これまでに得られた抗アンドロゲン剤による胎生初期における始原生殖細胞数の減少はアンドロゲン受容体 (AR) を介する作用であろうか? これまでに生殖腺発生以前の AR 発現を示した報告はない。そこで我々は AR 発現を RT-PCR、Whole mount In Situ Hybridization 法を用いて調べた。驚くべきことに 9.5 日胚において、AR はほぼ全身に発現していることが明らかとなった (図 1 8)。胎生初期における始原生殖細胞数におよぼす抗アンドロゲン剤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。このことはアンドロゲン受容体欠損マウス胎生 9.5 日胚においても始原生殖細胞数の有意な低下を認めたことから支持される (未発表データ)。始原生殖細胞自身に AR 発現があるかは今後の興味ある課題である。



9.5日胚でのアンドロゲン受容体発現

(左) RT-PCR, 9.5日胚を頭側、尾側に2分割し、各々よりT. RNAを調整、RT-PCRによりAR mRNAを増幅した。ARIは両側で発現していた。Oct3/4は始原生殖細胞特異的発現をしており、尾側に優位に発現している。
 (右) Whole mount in situ hybridization. AR anti-sense probeにより、9.5日胚ほぼ全身にその発現が確認された。Brachyuryは背景に発現している。

図18 9.5日胚でのアンドロゲン受容体発現

以上の結果はアンドロゲン受容体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。

g) 内分泌攪乱化学物質の行動および脳の性分化に及ぼす影響

胎児期および授乳期におけるビスフェノールA(BPA)曝露の影響をラットを用いて調べ、ジェチルスチルベストロール(DES)およびレスベラトロール(RVT)と比較し、さらに青斑核内の高感受性部位を検索した。BPAは探索行動の性差を消失させたが、DESは探索行動だけでなく、雌の生殖機能も抑制した。RVTは生殖行動への影響を強く示した。どの化学物質も視床下部の性的二型核は変化させなかったが、青斑核は、BPAおよびDES群では雄の方が大きく、性差が逆転した。RVT群では逆転せず、性差が消失した(図19)。中でも、青斑核中間前部への影響が著明であったが、BPA、DES群ではさらに雄の尾側部が増大し、雌の吻側部が減少した。また、エストロゲン受容体(ER)に及ぼすBPA

の影響を扁桃体および視床下部で調べた。生後21日目におけるERβの発現を免疫組織学的に前脳部で調べると、視床下部ではBPA曝露の影響はなく、扁桃体内側核ではBPA曝露で雌雄ともに著明に増加し、性差が消失した。この研究により、脳、特に青斑核と扁桃体内側核はBPAに高い感受性を示すことが明らかとなった。

これまでBPAの脳への影響については、げっ歯類の行動に影響を及ぼすとか、妊娠中の脳内ERα発現量を変えるなどの海外の報告があるが、未だよく分かっていない。今回我々は、微量のBPAが脳、中でも青斑核と扁桃体内側核に影響を及ぼすことを見出した。今後さらに詳細な検討を行うことで、これらの部位は内分泌攪乱化学物質の生体に与える影響を評価する上での新たなEndpointとなりえ、その意義はとて大きいと考えられる。

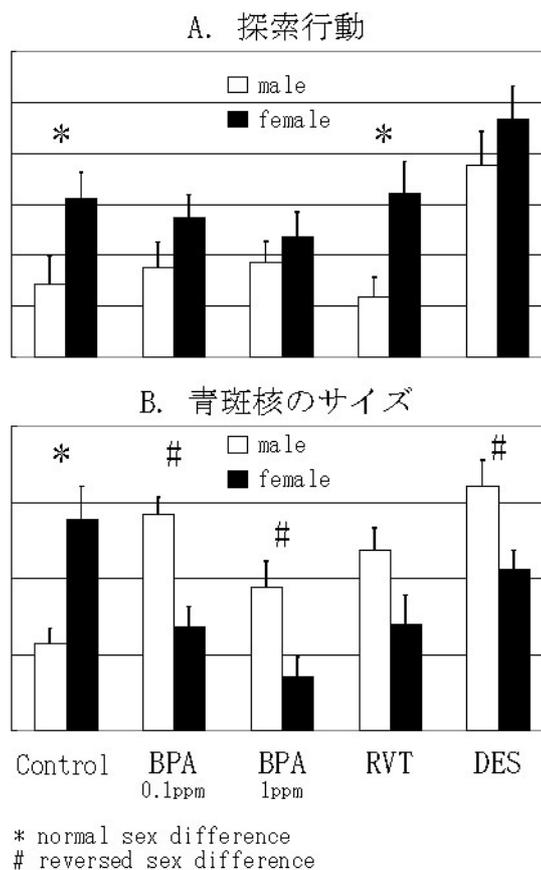


図 19 胎児期および授乳期におけるビスフェノールA (BPA) 曝露の影響

h) 内分泌攪乱物質ビスフェノールAの胎生期曝露は耐容1日摂取量以下の極微でも行動の性分化を障害する

耐容1日摂取量以下のビスフェノールA (BPA, 0.1ppm) を飲水中に混ぜ妊娠ラットの出産前1週間だけ曝露し、成長後に各種行動試験を実施した。オープンフィールド試験で探索行動を、受動的回避学習試験で回避学習能を調べ、従来行った周産期6週間曝露の結果と比較した。さらに強制水泳試験でうつ傾向とストレス対処行動を評価した。その結果、探索行動の性差は、従来の周産期間曝露と同様に消失した。受動回避学習試験では、5ppmBPAの周産期6週間曝露で性差が消失したが、今回の0.1ppmBPA出産前1週間曝露では影響がなかった。強制水泳試験では、struggling時間(ストレス対処行動の指標)の性差(雌>雄)が、出産前1週間曝露で消失した。うつ反応の指標であるimmobility時間は、対照群でも性差はなかったが、胎生期曝露により雌雄とも対照群に比べ有意に延長した。以上の結果、BPAの出産前1週間の胎生期曝露は、周産期6週間曝露と同様に、耐容1日摂取量以

下の極微量でも探索行動の性分化を消失させること、さらに強制水泳試験におけるうつ反応やストレス対処行動も影響を受けることが明らかになった。

オープンフィールド試験および強制水泳試験は、内分泌攪乱物質の鋭敏な評価法としての有用性が示され、性ホルモン依存的に脳の性分化に影響を与える可能性のある多くの人工化学物質のリスクアセスメントに適用できると考えられる。また、出生前1週間は探索行動やうつ情動を制御する中枢が正常に発達するための臨界期と考えられ、性差出現の濃度依存性のみならず、曝露時期の重要性に関する新たな知見を得たことは非常に意義深いと考えられる。

i) ビスフェノール A に曝露されたマウスの行動異常 (名和田グループ)

—脳内エストロゲンレセプター発現やセロトニン機能との関連—

内分泌攪乱物質の生殖器への影響についての報告は多いが、行動や情動への影響についての研究は不十分である。我々は、妊娠中の ICR 系マウスに ビスフェノール A を体重あたり 2ng/g 経口投与し、生まれた雄仔マウス (Bis-A mice) の生後 4・8・12 週目に行動テストを施行。さらに、生後 4 週目のマウス脳を用いて、エストロゲンレセプター (ER) α ・ β の発現を背側縫線核 (DRN)・扁桃体・内側視索前野においてコントロール群と比較、セロトニン・セロトニントランスポーターについては DRN での染色強度をコントロールと比較した。

(成果) 行動テストと血清テストステロン値

- ① 攻撃性テスト : Bis-A mice の接触時間 (侵入者への興味) は生後 8 週 (性成熟開始期) に高値であった^{1,2)}。
- ② 高架式十字迷路 (不安度) : コントロールと有意差なし。
- ③ 血清テストステロン値 : コントロールと有意差なし^{1,2)}。

免疫組織化学 (生後 4 週目) :

- ① Bis-A mice は DRN において ER α ・ β 発現が亢進。DRN 以外では有意差なし。
- ② DRN におけるセロトニン・セロトニントランスポーター陽性細胞数は有意差なし。

胎生期のエストロゲン様物質の曝露は、性成熟開始期に一過性に接触時間 (侵入者への興味) を亢進させ、セロトニン細胞が豊富に分布している DRN においてエストロゲンレセプター α ・ β 発現の亢進を引き起こす。今回の検討では、生後 4 週目には DRN におけるセロトニン陽性細胞量はコントロールと差が認められなかったが、生後 8 週目以降に性ホルモンの分泌が活発になると、過剰に発現した ER がセロトニン系を介して攻撃性テストにおける接触時間の亢進に関与している可能性が考えられた。

昨今、日本でも青少年による凶悪犯罪や「すぐ切れる子供」の増加、学級崩壊の問題などがクローズアップされている。現時点でこれらの現象と内分泌攪乱物質を結び付け

るのは早計であるが、本研究の継続によりさらなる成果が得られれば、内分泌攪乱物質もこのような社会現象に何らかの影響を与えている可能性について国内外に強く警告を与えることができる。内分泌攪乱物質によるマウスの行動異常の研究は2001年ごろより散見されるが、まだ詳細なメカニズムの解明には至っていない。本研究の進展は内分泌攪乱物質の研究の新たな一面となることが期待される。

j) ヒト単核球におけるダイオキシン受容体関連遺伝子群の定量と有用性の検討

ダイオキシンは大部分が AhR を介して細胞内に取り込まれることがわかっており、AhR をはじめとするダイオキシン受容体関連遺伝子群 (ARNT, CYP1A1, AhRR) の細胞内発現を定量することが、生体内の毒性の評価につながる可能性があると考え、ABI PRISM7700 Sequence detector を用いたリアルタイム PCR 法による定量系を確立し、臓器や単核球における定量を行い検討した。

(対象と方法)

1. 臓器別・生殖系腫瘍細胞株の遺伝子発現量の定量評価

ヒト成人および胎児の各組織の cDNA パネル (それぞれ 16 臓器、12 臓器) を使い定量解析を行った。

2. ヒト臍帯血、母体血、乳児血、成人血単核球中のダイオキシン受容体関連遺伝子群の定量

3. 3-methylcholanthrene (3MC) によるダイオキシン受容体関連遺伝子誘導の観察

臓器別の比較において成人精巣で AhRR の高発現が認められたことから、精巣腫瘍細胞株でのダイオキシンによる発現変化を検討した。3MC (1 μ M) を添加、48 時間培養し、3MC 非存在下で培養した細胞の発現量と比較検討した。また臍帯血、母体血、乳児血、成人血単核球において、いくつかのダイオキシン受容体関連遺伝子群の発現量に差異が認められたことから、臍帯血、乳児血、成人血の単核球における 3MC による発現誘導も同様に観察した。

4. 臍帯血と成人血のダイオキシン濃度

母体血とペアの臍帯血のダイオキシン濃度を GC/MS 法により測定し、両者を比較した。

(結果)

1. AhR は肺、胎盤、脾臓、ARNT は成人の卵巣、肺、脾臓、精巣、膵臓と胎児の肺、腎臓で比較的高発現であったが、どの臓器にも発現がみられた。CYP1A1 は成人の肺で極めて高発現であったほか、膵臓、肝臓、心臓、前立腺、小腸と胎児の肺でも高発現であった。AhRR は成人の精巣で極めて高発現であり、肺、脾臓、膵臓でも比較的高発現が認められた。CYP1A1 と AhRR は全般に胎児臓器での発現が非常に低かった。

2. AhR は、臍帯血と母体血に比べ乳児血、成人血で有意に高値であった。一方、CYP1A1

は、母体血が臍帯血、乳児血に比べ有意に低値であり、AhRR は、臍帯血が母体血、乳児血、成人血に比べ有意に高値であった。

3. 細胞株を用いた実験では、 $1\mu\text{M}$ 48 時間の処理で CYP1A1 で約 10 倍、AhRR で約 3 倍の発現誘導が観察された。臍帯血、乳児血、成人血の単核球における 3MC の発現誘導実験では、成人血由来の単核球では CYP1A1、AhRR 遺伝子は有意な誘導がみられたが乳児血単核球は CYP1A1 でのみ、また臍帯血単核球ではいずれも有意な誘導がみられなかった。

4. 4 ペアいずれも臍帯血でダイオキシン濃度が有意に低値であった。

ヒト臍帯血、母体血、乳児血、成人血の単核球におけるそれぞれの遺伝子発現を比較検討し、3MC による発現誘導を観察した。その結果、単核球の種類によりその特徴的な違いが明らかになったと同時に成人血の単核球においては CYP1A1、AhRR 遺伝子発現量はダイオキシン暴露の指標として有用である可能性が示唆された。将来、これらの遺伝子の発現量とのダイオキシン濃度と直接比較することで環境から受ける内分泌攪乱物質の暴露を評価するためのこのシステムの有効性を証明できるかもしれない。

(2) 研究成果の今後期待される効果

名和田グループは、当初より、核内受容体依存性の転写活性化機構を、単にレポーターアッセイで確認するのみでなく、それを高精細な画像処理システムを用いることにより可視化することを大きなテーマとしてきた。この研究の遂行により、AR、ER、そしてグルココルチコイド受容体が、核内受容体コンパートメントと我々が名付けた共通のコンパートメントに集積することが明らかとなり、また、そのコンパートメント形成の一つの大きな key molecule が CBP/p300 であることも判明した。加えて、従来より提唱されていた transcription-splicing coupling 機構も可視化することが可能であった。柳澤グループの知見とあわせて、核内受容体のリガンド依存性転写活性化機構には、現在主たる研究分野であるリガンド結合、共役因子のリクルートの他に、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ことが明らかとなったわけで、今後の新しい研究分野を開拓したものと考えている。これらの新しいステップを阻害もしくは助長させる薬剤の開発が将来的には可能になると考えられ、創薬の標的が拡大したことになる。

さらに、生殖腺発生以前の胎児の全身に AR が発現していることは、AR がリガンド非依存性に胎生初期に重要な機能を発揮している可能性を示しており、極めて興味深い現象であると考えられる。ごく最近、ER などの細胞質、細胞膜直下における機能が明らかとなりつつあるが、核内以外の場で AR が有する作用が将来的に明らかになることが期待される。また、アロマターゼ遺伝子の転写活性化が、細胞内微小管の重合のダイナミックなバランスで惹起される可能性も示され、今後の研究課題である。

3. 2 “エストロゲンレセプターを介した内分泌かく乱物質の作用メカニズム” (柳澤グループ)

(1) 研究内容及び成果

主要女性ホルモンであるエストロゲンはエストロゲンレセプター (ER α 、 β) を介してその作用を発揮する。ER α は核内レセプター遺伝子ファミリーに属するリガンド誘導性転写因子であり、エストロゲンを受容し、女性生殖器の維持・発達、骨量の維持や乳癌・子宮癌の増悪に関与することが知られている。内分泌攪乱物質の多くは、エストロゲンの生体内での作用を攪乱することから、ER α の転写活性に対して何らかの影響を及ぼすことが考えられた。

そこで、本研究者を中心とするグループは、1) 多くの内分泌攪乱物質について、ER α の転写活性に及ぼす影響を検討するとともに、2) 核内レセプターの転写制御機構の分子基盤の解明を目標に研究を行ってきた。

1) 内分泌攪乱物質が ER α の転写活性に及ぼす影響

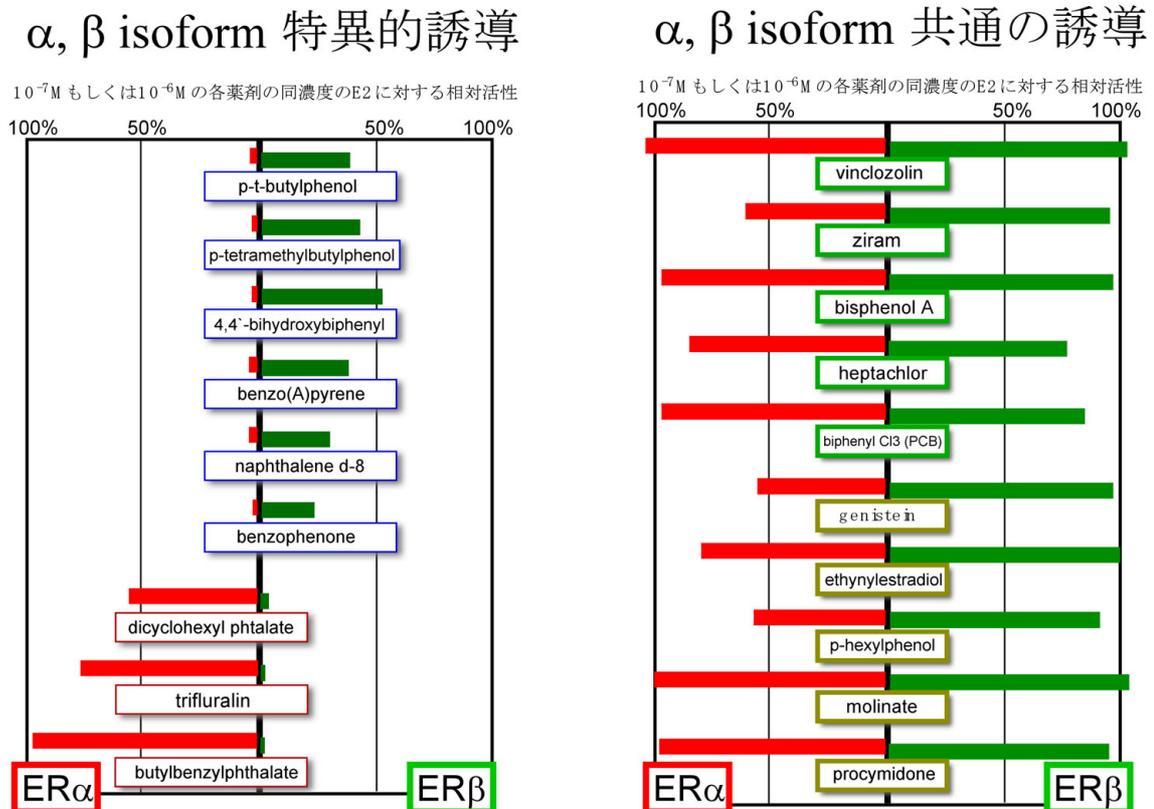


図 20 ER に対する内分泌かく乱物質のスクリーニング

内分泌攪乱物質の多くは主要女性ホルモンであるエストロゲンの作用を攪乱することが知られている。そこで、60種類の内分泌攪乱物質について、ER α の転写活性に及ぼす影響を検討した。その結果、多くの内分泌攪乱物質がER α の転写活性を抑制または促進することが明らかとなった（図20）（Environmental Science 2002）

さらにわれわれは、内分泌攪乱物質をスクリーニングする過程で、内分泌攪乱物質の1つであるBBP (butylbenzyl phthalate)がER α に結合し、TAMと同様にAF-1活性のみを促進することを見出した。興味深いことに、BBPは乳癌の増殖に対してはTAMと異なり促進的に作用することが明らかとなった。BBP結合ER α の転写共役因子との結合を検討した結果、TAMはER α とAF-1転写活性化因子および転写抑制因子双方との結合を誘導するのに対し、BBPはAF-1転写活性化因子との結合のみを促進することが明らかとなった（図21）。この結果は、乳癌の抑制には転写抑制因子とER α との結合誘導が必要であるという仮説を強く支持している。実際、N-CoR/SMRTのdominant negative体を乳癌細胞株であるMCF-7に強制発現させるとTAMで増殖が促進される。これら結果はTAMによるER α とN-CoR/SMRTの結合がTAMの抗がん活性に重要であることを示唆するものである。

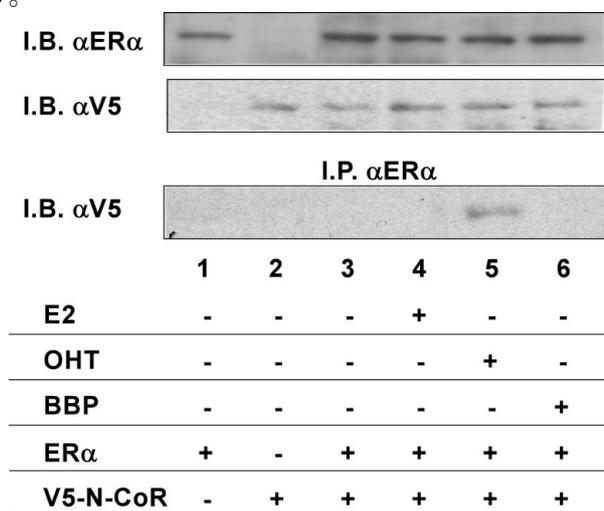


図21 ER α と転写共役因子の結合に与えるBBPの影響

核内レセプターによる転写の制御には、レセプターとリガンド依存的に解離または結合する「転写共役因子」と呼ばれる蛋白質群が必要である。転写共役因子はレセプターと結合して、その転写活性を促進する「転写活性化因子」と転写活性を抑制する「転写抑制因子」の2種類が存在する。内分泌攪乱物質の多

くは、ER α 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 α 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 α と相互作用する転写共役因子群の探索と解析が必須であると考えられた。

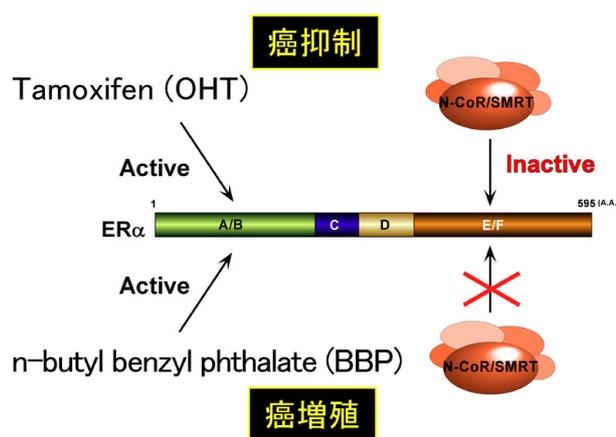


図 2 2 BBP による転写共役因子の結合阻害

2) 核内レセプターの転写制御機構

内分泌攪乱物質の作用を理解するためには ER α の転写制御機構を解明が必須である。本研究者らは転写制御機構を解析する目的で転写共役因子群の検索を行い、多くの因子を単離し性状解析を行った。

核内レセプターによる転写制御には、レセプターとリガンド依存的に解離もしくは結合する一群の蛋白質複合体が必須である。これらの蛋白質複合体は、核内レセプターと結合し、ヒストン修飾によるクロマチン構造変換や RNA ポリメラーゼを含む基本転写装置との架橋を介して転写活性を制御するものと考えられており、転写を抑制する転写抑制因子 (co-repressor) 複合体と転写を活性化する転写活性化因子 (co-activator) 複合体に大別される。転写活性化因子の多くはヒストンアセチル化活性を持ち、また転写抑制因子はヒストン脱アセチル化酵素と複合体を形成している。ヒストンのアセチル化と転写の活性化には深い相関関係があることが以前より知られており、ヒストンの N 末側のアセチル化により、DNA との結合が緩くなり、ヌクレオソーム構造が壊されるものと

考えられている。DNA 結合性転写因子が DNA 上の特定の配列と結合し、ヒストンアセチル化酵素群をリクルートすることにより、コアプロモーター付近のヌクレオソームヒストンをアセチル化し TFIID を結合可能な状態にすること、さらには、コード領域のアセチル化により RNA ポリメラーゼ II の進行停止を阻止することによって転写が活性化するものと考えられる。一方、ヒストン脱アセチル化酵素群はこれとは逆にヒストンアセチル化酵素群のプロモーター付近への結合を阻み、周辺のヒストンを脱アセチル化し、ヌクレオソーム構造を安定化することによって転写を抑制すると考えられている。

核内レセプターの転写抑制因子としては、N-CoR, SMRT が知られている。N-CoR は、酵母 two-hybrid 法によりリガンド非存在下に TR と結合する因子として、また、SMRT は、RXR と相互作用する因子としてクローニングされた。これらの因子は、リガンド非存在下で核内レセプターに結合し、その転写活性を抑制する。N-CoR, SMRT には Sin3 (Mad-Max のコリプレッサー、yeast の転写抑制因子 Sin3P ホモログ) や ヒストンデアセチラーゼ活性を持つ HDAC が結合しており、ヒストンのアセチル化を防ぐことにより転写を抑制しているものと考えられている。N-CoR, SMRT は ID-1, 2 と呼ばれる二つの領域内に LLXXLL からなる配列を持ち、この領域で核内レセプターの helix3, 5 を認識して結合する。核内レセプターにリガンドが結合すると、helix12 がシフトして helix3, 4, 5 と交差するために、転写抑制因子結合領域が消失するとともに転写活性化因子結合領域が現れるものと考えられる。

AF-2 の転写活性化因子の研究は精力的に行われており、現在までに、二つの蛋白質複合体 p300/p160 と DRIP/TRAP が AF-2 の転写活性化因子として機能することが報告されている。P300/p160 複合体は、p300/CBP と呼ばれる相同性の高い二つの巨大分子と分子量 160kDa の 3 種類の転写活性化因子、SRC-1(N-CoA1), TIF2(GRIP1, NcoA2), p/CIP(RAC3, ACTR, AIB1) を含んでいる。これらは、LXXLL モチーフを介して、リガンドの結合した核内レセプターの helix3, 4, 5 と helix12 で形成される溝構造を認識して結合する。これらの蛋白質はヒストンアセチルトランスフェラーゼであり、ヒストンの N 末端に存在する tail 部分をアセチル化することにより DNA とヒストンからなるクロマチン構造を弛緩させ、転写を促進するものと考えられている。特に p/CIP は乳がんにおいて高発現していることが知られており、興味深い。

一方、DRIP/TRAP 複合体は VDR にリガンド依存的に結合する複合体として Freedman のグループから、また、TR に結合する複合体として Rader のグループからそれぞれ独立に報告された。DRIP/TRAP は十数個の蛋白質から構成され

る巨大な複合体であり、ヒストンアセチル化活性を持たないにも関わらず *in vitro* 転写系において VDR の転写活性を増強する。この複合体は、基本転写因子群と共通の構成因子をもつことから、核内レセプターと基本転写因子群との橋渡しをおこなっているものと考えられている。DRIP/TRAP 複合体はその構成因子の一つである DRIP205 (TRAP220) 分子中の二つの LXXLL モチーフを介してリガンドの結合した核内レセプターに結合する。これらの結果から DRIP/TRAP 複合体は p300/p160 複合体がクロマチン構造を弛緩させた後に結合し、基本転写因子群との仲立ちをするいわゆる two-step model が提唱されている。

われわれは、カラム精製により ER α AF-1 および AF-2 の新規転写活性化因子を精製・同定した。

2) -A リガンド非結合型 ER α と結合する因子

リガンドの結合していないには、シャペロン蛋白質である Hsc70 が結合し、DNA と ER α との結合を阻害することによって、その転写活性を抑制していることが明らかになった。ER α にリガンドが結合すると Hsc70 が解離し、DNA への結合が可能になることを示した。

さらに、代表的内分泌攪乱物質であるダイオキシン存在下においては、ダイオキシンのレセプターである AhR/Arnt がリガンドの結合していない ER α に結合し、転写活性化因子をリクルートすることによって、ER α の転写活性を促進することも明らかにした。これらの結果は AhR/Arnt による内分泌攪乱の分子メカニズムを説明するものである。

2) -B エストロゲン結合型 ER α と結合する因子群

エストロゲン存在下において、AF-1 活性を担う AB 領域に、DEAD-box 蛋白質ファミリーに属する p68 と p72 及びヒストンアセチル化因子 p300/CBP が複合体を形成して結合することを明らかにした。この複合体は AB 領域のリン酸化に依存して結合し、AF-1 活性を促進する。p300 は AF-2 の転写活性化因子としても機能し、AF-1 と AF-2 を橋渡しすることによって、両者の転写活性を協調的に促進する。

一方、AF-2 活性を担う DEF 領域には p300 複合体以外に DRIP/TRAP 複合体、TRRAP, GCN5 を含む TFIIIC 複合体の二つの巨大蛋白質複合体が結合することを示した (図 2 3)。TRRAP は c-Myc の結合蛋白質として最初に見出された蛋白質であり、その癌化能に関与することが報告されている。一方、GCN5 はヒストンアセチル化活性を保持しており、転写に関与することが知られている。われわ

これは、TRRAP と GCN5 が同じ複合体に含まれていることを見出し、この複合体の精製および同定を行った。その結果、この複合体は TRRAP, GCN5 以外に TAF など転写に関与すると思われる因子を含み、TRRAP の LXXLL モチーフを介してリガンド依存的に ER α に結合することが明らかとなった。そこで、次にこの複合体が ER α に与える影響を *in vitro* 転写系を用いて検討したところ、この複合体は ER α の転写活性を 4 倍程度促進することが示された。

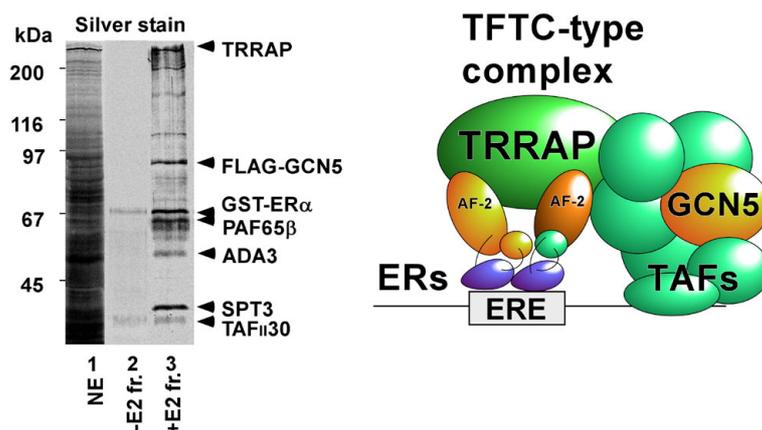


図 2 3 ER における巨大蛋白質複合体の形成

クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) により TRRAP/GCN5 が DRIP/TRAP 複合体とほぼ同じタイミングでエストロゲンの標的遺伝子プロモーター上にリクルートされることから、p300/p160 がヒストンをアセチル化し、クロマチン構造を弛緩させた後に TRRAP/GCN5 または DRIP/TRAP 複合体が結合してくるものと考えられる。さらに TRRAP のアンチセンス RNA を乳がん由来の細胞株である MCF-7 に発現させたところ、エストロゲン依存的な細胞増殖促進が抑制された。これらの結果は TRRAP/GCN5 を含む複合体が ER α のコアクチベーターとして機能することを強く示唆している。

2) -C SERM 結合型 ER α と結合する因子群

Tamoxifen に代表される Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) は ER α の部分的アゴニストとして作用する。SERM は乳癌においては ER α のアンタゴニストとして作用することから、乳癌の第一選択薬として用いられているが、長期投与により癌が耐性を獲得するという問題点がある。本研究者らは、SERM の結合した ER α が転写抑制因子と結合し、標的遺伝子群の転写を抑制すること、耐性を獲得した癌では ER α に変異が生じ、転写抑制因子との結合が阻害されていることを示した。転写抑制因子と ER α の結合を人工的に阻害した乳癌は SERM

依存的な増殖を示すことから、転写抑制因子と ER α との結合が SERM の癌抑制にとって必須であるものと考えられる。

代表的な SERM であるタモキシフェン(TAM)は乳癌に対しアンタゴニストとして、逆に骨に対してアゴニストとして作用することから副作用の少ない医薬品として多く使用されている。しかしながら、長期間の投与によって癌が耐性を獲得すること、子宮体癌に対してアゴニストとして作用することが問題となっている。TAM は ER α に結合し、AF-2 活性のみを選択的に抑制することが知られていたが、近年、TAM の結合が ER α と転写抑制因子である N-CoR/SMRT の相互作用を誘導することが明らかとなった。われわれは、N-CoR, SMRT が ID-1, 2 領域内に存在する LLXXLL からなる配列によって、核内レセプターの helix3, 5 を認識して結合することを見出した。TAM と同様に SERM に分類されているラロキシフェンでも ER α と N-CoR/SMRT の結合が誘導されることから、両者の結合が SERM の抗癌活性に極めて重要である可能性が考えられた。

TAM はホルモン依存性癌の第一選択薬であり、多くの患者に投与されるが、数年間に及ぶ連続投与により癌が耐性を獲得し、逆に TAM 依存的増殖を示すようになる。このような TAM 依存的増殖を示す乳がん由来の ER α には 351 番目のアミノ酸の変異(D351Y)が多く認められる。この変異は、N-CoR/SMRT の結合領域に位置することから、ER α (D351Y)と N-CoR/SMRT との結合能を検討した。その結果、TAM 存在下において N-CoR/SMRT と ER α (D351Y)との結合は、野生型 ER α との結合と比較し、顕著に低下していることが明らかとなった。TAM の結合した ER α は AF-2 活性を示さず、AF-1 活性のみを発揮することが知られているが、N-CoR/SMRT の結合しない ER α (D351Y)は TAM 存在下で野生型に比べ 4 倍近い AF-1 活性を示す。これらの結果から、TAM によて誘導される N-CoR/SMRT の ER α への結合によって、AF-1 活性が阻害され、乳癌の増殖が抑制されるものと考えられる。一方、N-CoR/SMRT の結合しない ER α では、TAM によって誘導される AF-1 活性が高いため、乳癌の増殖が促進されるのであろう。骨・子宮体癌など TAM がアゴニストとして作用する組織では、AF-1 の転写活性化因子量が転写抑制因子量を上回っている可能性が考えられる。

2) -D ER α の分解を制御する因子群

最近、多くの核内レセプターがリガンド依存的にユビキチン化され、プロテアソームによって分解を受けることが報告されている。プロテアソームによる分解を阻害すると核内レセプターの転写活性が促進または抑制されることから、ユビキチン・プロテアソーム系は核内レセプターの転写活性を制御しているも

のと推測されるが、その分子基盤は不明である。強力な内分泌攪乱物質であるダイオキシンは ER α の分解を促進することが知られており、分解機構の解明は内分泌攪乱物質の作用機構を理解する上で急務である。

本研究者は ER α のユビキチン化に関与する蛋白質の単離を試み、新規の E3 型ユビキチン・リガーゼを見出した。この E3 はリガンド依存的に ER α に結合し、ER α をユビキチン化することによって、その分解を促進する。現在、E3 の解析と同時に遺伝子欠損マウスの作製をおこなっており、ER α の分解系制御機構について分子レベルで明らかにすることを目指す。同時にわれわれは、リガンド未結合型の ER α に結合し、分解を促進する、上記とは異なった E3 型ユビキチン・リガーゼも見出した。この E3 はシャペロン蛋白質複合体とともに ER α に結合し、ER α の品質管理を行っているものと考えられ、今後解析を進める予定である。

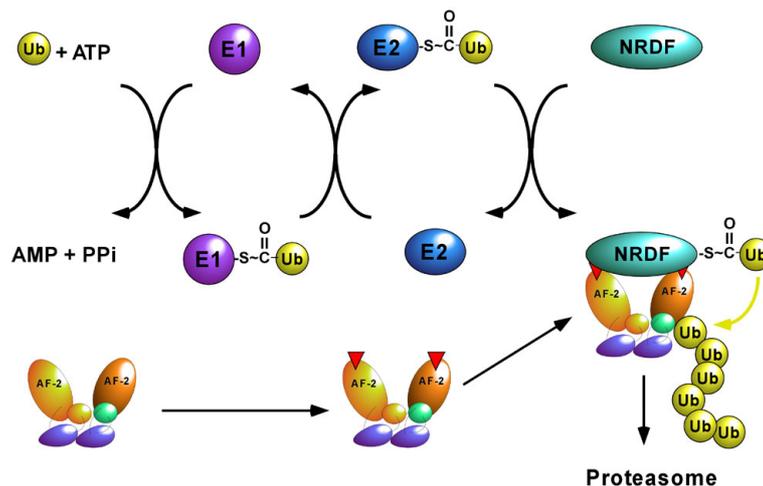


図 2 4 ユビキチン化による ER α の分解

まとめと考察

- 1) 内分泌攪乱物質の多くは ER α に結合し、転写活性に影響を与えるが、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。これらは物質の結合によって誘導される ER α の構造変化、特に H12 の角度が異なることに起因するものと考えられる
- 2) ER α の転写活性制御には、ER α とリガンド依存的に解離もしくは結合する様々な蛋白質が関与しており、ER α の機能は、これらの因子によって規定される。AF-2 に結合するすべての因子は H3、H5 と H12 によって形成される領域を

認識して結合する。その際、H12の角度によって結合する因子が規定されるものと考えられる。

以上の結果から、内分泌攪乱物質が示すさまざまな作用は、それらの物質の結合によって誘導されるER α の構造変化の違いと、その結果生じる転写共役因子のリクルートの違いに起因するものと考えられた。実際に、ER α の転写活性を促進する物質間でも、あるものは乳癌の増殖を促し、他の物質は乳癌の増殖を抑制するが、この差はリクルートされる転写共役因子が異なるために生じることが明らかとなっている。したがって、同じようにER α に結合する物質でも、どのような因子と結合するかを*in vitro*で検討することにより、生体内での影響を予測することが可能となる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究者の研究結果から、内分泌攪乱物質によるさまざまな作用は、物質の結合によって引き起こされるER α の構造変化の差と、それに伴う相互作用因子の違いに起因するものと考えられる。

ER α 結合型内分泌攪乱物質の分類と作用予測

本研究者はER α と相互作用する因子としてp68/p72、p300 (AF-1 転写活性化因子)、p300、DRIP/TRAP、TFTC 複合体 (AF-2 転写活性化因子)、Hsc70、N-CoR/SMRT (転写抑制因子)、Nurf-1 (分解促進因子)を見出し、これらの因子の結合によってER α の機能が規定されることを明らかにした。これらの結果は、内分泌攪乱物質がどのような相互作用因子をER α にリクルートするかを検討することにより、当該物質の個体に対する作用を予測できることを示唆している。そこで、今後、内分泌攪乱物質存在下でのER α と相互作用因子との結合を検討し、内分泌攪乱物質の作用の予測を行うと同時にそれらの分類を試みる。

相互作用因子による分類と作用予測は、内分泌攪乱物質だけでなく薬物のスクリーニングに対しても応用が可能である。コンパウンドの一次スクリーニングをER α に対する結合を指標に行い、二次スクリーニングとしてさまざまな相互作用因子との結合を検討することにより、コンパウンドの作用予測とそれに伴った分類が可能となる。また、内分泌攪乱物質の多くはER α に結合し、さまざまな相互因子をリクルートすることから、これらの物質が新たな薬物開発のマザー・コンパウンドとなる可能性も考えられ、今後検討を行う予定である。

3. 3 “内分泌かく乱物質が性腺発達障害におよぼす栄養状態、生育環境、および遺伝的背景の影響（山内 淳／江指隆年グループ）”

(1) 研究内容及び結果

A: 内分泌かく乱物質が性腺発達障害におよぼす栄養状態の影響

ポリ塩化ビニルは、硬度の調整が容易であることから、食器、ビニールシートなどに使用されている。これらのプラスチックは、エチレンモノマーと二塩化エチレンを原料として重縮合をくり返すことにより形成される。ポリ塩化ビニルは元来硬いものであるが、可塑剤としてフタル酸エステルを加えて軟化することができる。このフタル酸エステルが内分泌かく乱物質として疑われている。その中で、DBP (Dibutylphthalate) は睾丸に作用し、睾丸萎縮、精子数の減少をもたらすことが報告されている。そこで、DBP の雄性器機能におよぼす影響が、栄養状態によって異なるか否か実験動物を用いて調べた。

12 週令 (成熟) SD 系オスラットを 4 群に分けた。コントロール群 (Cont.) は、国際標準精製飼料 AIN93M (M は成熟ラット用を示す) で 4 週間飼育した。低栄養群 (Low) とは、AIN93M 飼料のうち、食物繊維、脂質を除く栄養素 (タンパク質、ビタミンおよびミネラル) を規定量の 1/5 となるように調整した飼料で 4 週間飼育した。飼料脂質量を減少させなかった理由は、脂溶性内分泌攪乱物質の体内移動が円滑に進むように配慮したためである。食物繊維を減少させなかった理由は、下痢を防ぎ、糞の形状を維持させるためである。内分泌攪乱物質として、DBP を 1mg/100gBW/day となるように、飼育開始から 2 週間連続して皮下に注射した群をそれぞれもうけ (Cont. + DBP および Low + DBP)、投与終了から 2 週間同様の飼料で飼育後、屠殺した。雄性器発達 (重量/体重 100g) および血清性ホルモン濃度を各群間で比較したが、各群間に有意差は認められなかった。

そこで、4 週令 (幼若) SD 系オスラットを 4 群に分けた。コントロール群 (Cont.) は、AIN93G (G は幼若ラット用を示す) で 8 週間飼育した。低栄養群 (Low) とは、AIN93G 飼料のうち、食物繊維、脂質を除く栄養素 (タンパク質、ビタミンおよびミネラル) を規定量の 1/5 となるように調整した飼料で 2 週間飼育した。内分泌攪乱物質として、DBP を 1mg/100gBW/day となるように、飼育開始から 2 週間連続して背部皮下に注射した群をそれぞれもうけ (Cont. + DBP および Low + DBP)、投与終了から 6 週間同様の飼料で飼育後、屠殺した。雄性器発達 (重量/体重 100g) および血清性ホルモン濃度を各群間で比較したが、ここでも各群間に有意差は認められなかった。

B. 内分泌かく乱物質が性腺発達障害におよぼす生育環境の影響

DBP の雄性器機能におよぼす影響が、栄養状態と生体リズムの攪乱によって異なるか否か実験動物を用いて調べた。12 週令（成熟）フィッシャー344 系オスラットをまず 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（AIN93M から、リン、カルシウム、食物繊維、脂質を除く栄養素を規定量の 1/5 となるように調整した飼料）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。リンおよびカルシウム量を減少させなかった理由は、リンおよびカルシウムによる亜鉛その他の微量元素の吸収阻害を期待したからである。なお、飼料は、DBP を含む飼料に対して pair feeding とし、摂取量をもとに DBP 摂取量を計算したところ、51mg/100gBW/day となった。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。

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（図 2 5）。

Table 3

Body weight and organ weight

Lighting (L) or Darkness (D) ± DBP	L	L + DBP	D	D + DBP
Body weight (g)	196.8 ± 5.6	191.6 ± 5.2	193.7 ± 5.1	184.8 ± 3.5*
Testes (g/100g BW)	1.19 ± 0.07	1.11 ± 0.11	1.06 ± 0.04	0.80 ± 0.12*
Epididymides (g/100g BW)	0.31 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.03
Seminal vesicle (mg/100g BW)	132.1 ± 38.3	134.2 ± 25.5	80.7 ± 6.7	101.6 ± 30.0
Prostate (mg/100g BW)	73.5 ± 5.9	56.9 ± 7.2	39.7 ± 10.5	42.1 ± 14.6
Liver (g/100g BW)	2.57 ± 0.15	3.39 ± 0.17*	2.36 ± 0.04	3.38 ± 0.14*
Kidney (g/100g BW)	0.60 ± 0.03	0.68 ± 0.03*	0.59 ± 0.03	0.69 ± 0.04
Spleen (g/100g BW)	0.19 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01

* L + DBP group is significantly different from L without DBP (P < 0.05)

** D + DBP group is significantly different from D without DBP (P < 0.05)

図 2 5 雄性器、臓器重量における DBP の影響

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。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攪乱物質の感受性が高まる可能性が示唆された。このことは、ヒトにおいて、内分泌攪乱物質の暴露量のみならず栄養状態、生活環境・生活リズムの差によっても影響の発現様式が異なることが示唆された。

C. 内分泌かく乱物質が性腺発達障害におよぼす遺伝的背景の影響（エストロゲン受容体転写共役因子 PCAF および PCAF-B 遺伝子欠損マウスを用いた内分泌かく乱物質の作用機序の解析）

内分泌かく乱物質の作用点の一つは、核内ステロイドホルモン受容体であると考えられている。核内ステロイドホルモン受容体は共役転写因子と複合体を形成し、下流の遺伝子発現を制御することで個々のステロイドホルモンの情報伝達を仲介していると考えられている。そこで、全てのステロイドホルモン受容体の共役転写因子である PCAF (p300/CBP-associated factor) および PCAF-B/GCN5 遺伝子欠損マウスを作出し、内分泌かく乱物質が生殖腺発達を障害する作用機序の解析を目的とした。

1) PCAF 遺伝子欠損マウスの作出と解析

PCAF 遺伝子ターゲティングベクターの構築及び相同組み換え ES 細胞のスクリーニング

ヒト PCAF cDNA の塩基配列の相同性を利用して、マウス PCAF cDNA を得た。マウス PCAF cDNA をプローブに用い、ゲノミックライブラリーよりマウス PCAF 遺伝子を得た。第一エクソンを含む DNA 断片をクローニングし、詳細な遺伝子地図を作成した。第一エクソンを含む約 1 kb の領域をネオマイシン耐性遺伝子と置換したターゲティングベクターを作成した。これをマウス ES 細胞に導入し、G-418 耐性コロニーを 69 個得た。特異的プローブを用いたサザン解析によって、6 個の相同組み換え ES 細胞を得た。

PCAF 遺伝子欠損マウスの作出

2種類の相同組み換え ES 細胞をマウス桑実胚にマイクロインジェクションしてキメラマウスを得た。このマウスと野生型マウスを交配させ、PCAF ヘテロ接合体 (PCAF^{+/-}) を得た。次に PCAF^{+/-} を交配させ、PCAF ホモ接合体 (PCAF^{-/-}) を得た。PCAF 遺伝子が欠損していることを確認するために、PCAF 特異的抗体を用いてウエスタン解析を行い、PCAF^{-/-} は PCAF の発現が完全に消失していることを確認した。

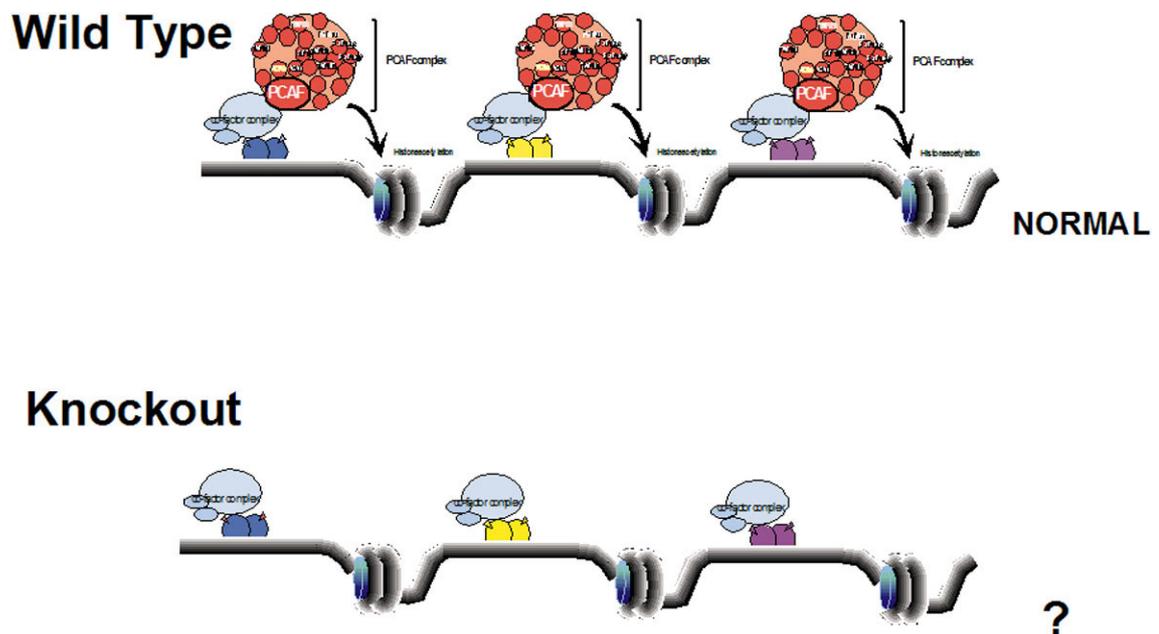


図 2 6 PCAF 遺伝子欠損マウスの作出

PCAF 遺伝子欠損マウスの解析

PCAF 遺伝子欠損マウスは、正常に発生、発育した。病理学的解析においても野生型との差は見られなかった。雌雄ともに生殖可能であった。PCAF^{-/-} マウスにおいて、PCAF-B/GCN5 遺伝子発現の亢進が認められた。

以上のことから、PCAF 遺伝子欠損によっては個体の発生、分化に影響しないことが明らかになった。これは PCAF-B/GCN5 がその機能の一部を補償することによるものと考えられる。

PCAF-B/GCN5 遺伝子欠損マウスの作出と解析

PCAF-B/GCN5 遺伝子ターゲティングベクターの構築及び相同組み換え ES 細胞のスクリーニング

ヒト PCAF-B/GCN5 cDNA の塩基配列の相同性を利用して、マウス PCAF-B/GCN5 cDNA を得た。マウス PCAF-B/GCN5 cDNA をプローブに用い、ゲノミックライブラリーよりマウス PCAF-B/GCN5 遺伝子を得た。全遺伝子を含む約 12kb の DNA 断片をクローニングし、詳細な遺伝子地図を作成した。ヒストンアセチル化酵素活性を有する領域をネオマイシン耐性遺伝子と置換したターゲティングベクターを作成した。これをマウス ES 細胞に導入し、G-418 耐性コロニーを 31 個得た。特異的プローブを用いたサザン解析によって、4 個の相同組み換え ES 細胞を得た。

PCAF-B/GCN5 遺伝子欠損マウスの作出

2 種類の相同組み換え ES 細胞をマウス桑実胚にマイクロインジェクションしてキメラマウスを得た。このマウスと野生型マウスを交配させ、PCAF-B/GCN5 ヘテロ接合体 (PCAF-B/GCN5^{+/-}) を得た。次に PCAF-B/GCN5^{+/-} を交配させ、ホモ接合体 (PCAF-B/GCN5^{-/-}) を得た。PCAF-B/GCN5 遺伝子が欠損していることを確認するために、特異的抗体を用いてウエスタン解析を行ったところ、ホモ接合体においては PCAF-B/GCN5 の発現が完全に消失していることを確認した。

PCAF-B/GCN5 遺伝子欠損マウスの解析

PCAF-B/GCN5^{+/-} マウスは野生型マウスとの明らかな違いは認められなかった。一方、PCAF-B/GCN5^{-/-} は胎生致死であった。胎生 9 日齢で心拍が認められること、embryonic turning が終了していることから、胎生 9.5 日齢で発生を停止したものと判断した。

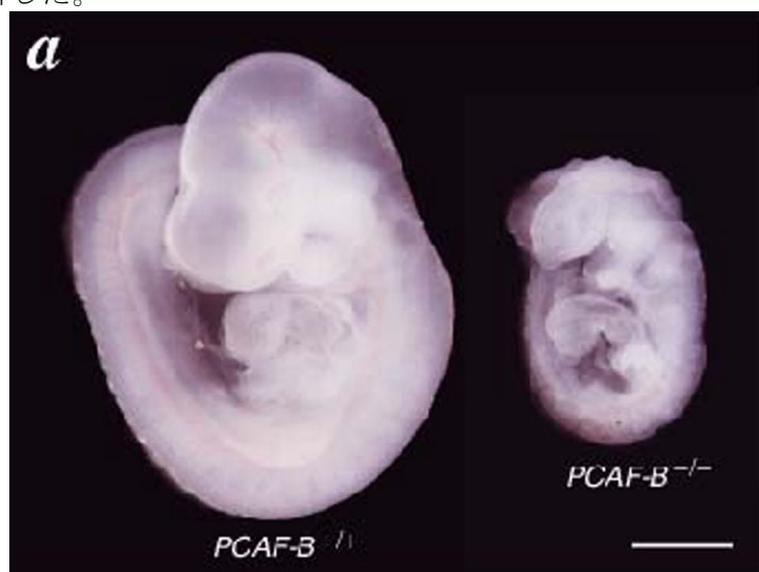


図 2 7 胎生 9.5 日齢の PCAF-B/GCN5 遺伝子欠損マウス

In situ hybridization によって、胚発生段階における PCAF-B/GCN5 遺伝子発現を調べたところ、PCAF-B/GCN5 は胎生 10.5 日齢ですでに発現していたが、PCAF の発現は 12.5 日齢ではじめて確認された。このことから、PCAF-B/GCN5 欠損マウスにおいては、PCAF は PCAF-B/GCN5 を相補できずに致死である可能性が示唆された。

PCAF および PCAF-B/GCN5 多重遺伝子欠損マウスを用いた内分泌かく乱物質作用機序解析の試み

PCAF-B/GCN5 遺伝子欠損によって胎生致死であることから、野生型 (WT), PCAF^{-/-}PCAF-B/GCN5^{+/+}, PCAF^{-/-}PCAF-B/GCN5^{+/-} の 3 種類の遺伝子型を持ったマウスを用いて、雄の生殖器官発育阻害を指標に内分泌かく乱物質の作用を評価するモデルになりうるか試みた。

(in vivo における解析) : 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。

E2 依存的に転写活性が上昇することが知られている c-fos 遺伝子の発現をノザン法で調べた。その結果、野生型、PCAF 遺伝子欠損いずれにおいても、E2 によって c-fos 遺伝子の活性化がみられた。さらに E2 投与による骨塩量 (BMC) および骨密度 (BMD) を調べたところ、野生型と変化なく、OVX によって減少、E2 投与によって回復した。このことは、欠損マウスにおいて、E2 の感受性が子宮において特異的に低下していることが考えられた。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。

(in vitro における解析) : 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。一方、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。

結論

全てのステロイドホルモン受容体の共役転写因子である 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) を作出した。PCAF 遺伝子欠損雌マウスに卵巣摘出を施し、エストロゲン (E2) 投与による子宮重量変化を解析したところ、E2 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、E2 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 E2 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。

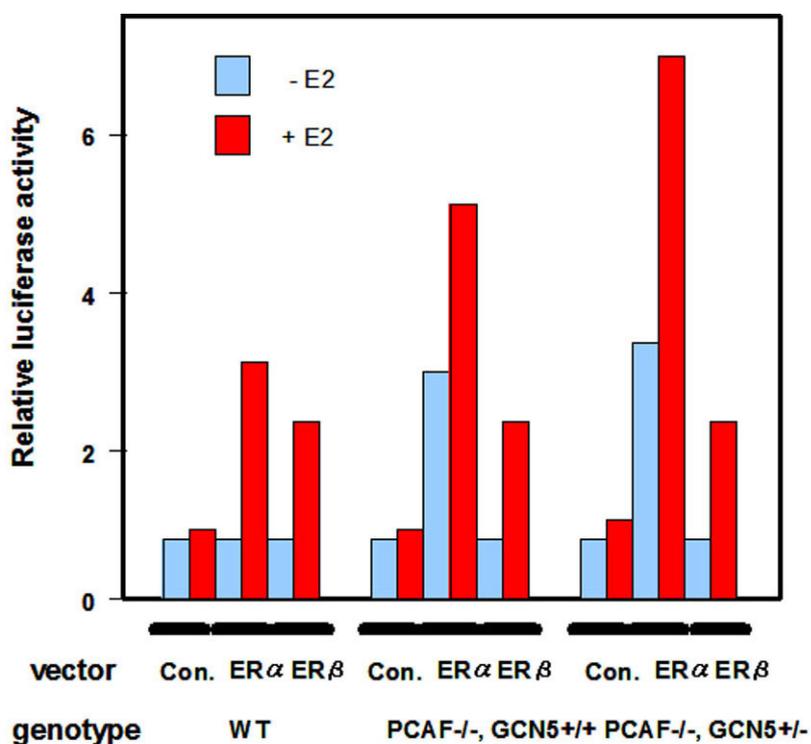


図 28 胎生繊維芽細胞を用いた ER レポーターアッセイ

このような E2 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、 α 、 β E2 受容体 (ER α 、ER β) 発現ベクターおよび E2 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 α においてのみ E2 非存在時にも転写が活性化されており、さらに E2 依

存的な転写が著しく増大した（図28）。

このことは内因性の PCAF 遺伝子欠損によって E2 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 α 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 α 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 α における厳格な E2 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 E2 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。

（1）研究成果の今後期待される効果

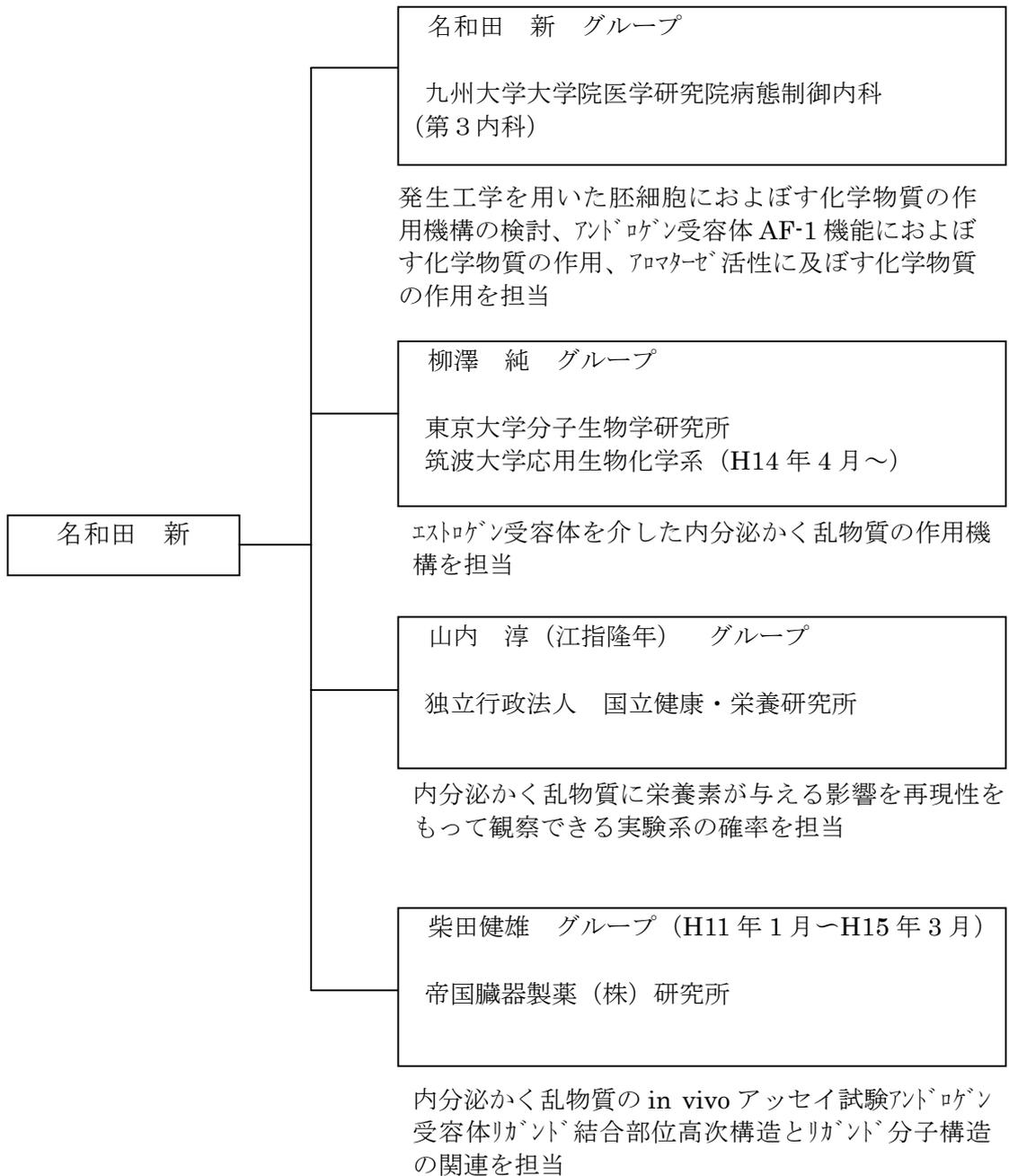
光不足の影響はまず生殖系列に現れる。我々は食事中の栄養素を十分に摂取することによってこの影響を軽減、消失させることをラットを用いたモデル実験によって明らかにしてきた。このモデル系を用いた内分泌かく乱物質の生殖線に対する影響を評価したところ、低栄養状態および生体リズムの攪乱によって、雄性器機能に対する内分泌攪乱物質の感受性が高まる可能性が示唆された。これらの結果は、社会的に極めて重要な問題を提示している。社会活動の多様化や労働条件の変化によって光不足の生活をしている国民は多い。厚生労働省の調査によると全企業の10%以上の労働者が交代勤務制についている。この数には従業員30人以下の企業は含まれず、日常生活でしばしば経験する、一時的に光不足をひき起こしている人は含まれないので、実際に光不足となっている数は膨大な数になろう。また、国民栄養調査によると、1人1日あたりの栄養素摂取量はおおむね所要量を満たしているものの食生活の変化、外食産業の進出、無理なダイエットなどによる栄養の片寄りが指摘されている。このような要因が重なると、環境中に含まれる内分泌かく乱物質の影響を受けやすくなる可能性があることを本研究は示唆している。

PCAF および PCAF-B/GCN5 遺伝子欠損マウスを用いた解析により、E2 の生理作用が、これら ER の転写共役因子と密接に関与することを示した。これら遺伝子欠損により、特に子宮、睾丸に特異的に E2 感受性が低下する結果は興味深い。一方、初代培養細胞を用いた結果では、ER α に対する E2 の感受性が逆に高くなった。このことは、転写共役因子は単に転写活性を促進するのみならず、転写

調節全体のバランスを調節している可能性が示唆された。乳がんや前立腺がんを発症するヒトの染色体 3 p 2 4 の遺伝子座が欠損あるいは変異していることが報告されている。この領域には PCAF 遺伝子が存在する。現時点ではあくまで仮説であるが、正常な E2 の機能に PCAF が重要な役割を持つ可能性を示唆するものと考えられる。このことは、内分泌かく乱物質の作用には、直接結合する ER などのホルモン受容体のみならず、その転写共役因子群の相互作用も視野にいたれた研究が必須であることを示していると考えられる。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2)メンバー表

①名和田 グループ (テーマ別)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
名和田 新	九州大学大学院医学研究院	教授	総括	平成 11 年 1 月～ 平成 15 年 12 月
柳瀬敏彦	〃	助教授	レポーターアッセイによる内分泌かく乱物質のスクリーニング・PPAR γ への影響	平成 11 年 1 月～ 平成 15 年 12 月
後藤公宣	〃	助手	アンドロゲン受容体共役因子のクローニングと機能解析	平成 11 年 1 月～ 平成 15 年 12 月
岡部泰二郎	〃	助手	免疫系におよぼす作用	平成 12 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
野村政壽	〃	助手	発生工学研究・胚細胞移動のメカニズム	平成 11 年 6 月～ 平成 15 年 12 月
水木一仁	〃	医員	発生工学研究	平成 15 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
向笠千寿	〃	研究生	発生工学研究	平成 12 年 5 月～ 平成 15 年 12 月
田中公貴	〃	大学院生	アクチビン情報伝達系の解析	平成 11 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
後藤 穰	〃	大学院生	アクチビン情報伝達系の解析	平成 13 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
権藤重喜	〃	大学院生	アクチビン情報伝達系の解析	平成 13 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
渡辺哲博	〃	大学院生	発生工学研究	平成 14 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
范 呉強	〃	大学院生	PPAR γ への影響	平成 14 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
范 妹麗	〃	大学院生	アンドロゲン受容体共役因子のクローニングと機能解析	平成 15 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
高柳涼一	〃	教授	アンドロゲン受容体共役因子のクローニングと機能解析	平成 11 年 1 月～ 平成 15 年 12 月

大中佳三	〃	助手	有機スズの作用	平成 12 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
河手久弥	〃	助手	アンドロゲン受容体共役 因子のクローニングと機能解 析	平成 13 年 5 月～ 平成 15 年 12 月
谷口 博	〃	大学院生	PPAR γ への影響	平成 13 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
生山祥一郎	九州大学生体 防御医学研究 所	助教授	下垂体細胞の分化に及ぼ す内分泌かく乱物質の影 響	平成 11 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
井上尚英	九州大学大学 院医学研究院	教授	生殖腺に及ぼす内分泌か く乱物質の影響	平成 11 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
水田祥代	〃	教授	停留睾丸に及ぼす内分泌 かく乱物質の影響	平成 11 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
原 寿郎	〃	教授	臍帯血リンパ球の機能へ の影響	平成 11 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
久保千春	〃	教授	ストレスに及ぼす内分泌かく 乱物質の影響	平成 11 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
粟生修司	〃	教授	脳の性分化に対する作用	平成 13 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
足立雅広	〃	医員	複合体 3 次元構造の 検討	平成 11 年 1 月～ 平成 12 年 3 月
蘆田健二	〃	医員	抗体の調製、バキュロウイ ルス発現系	平成 11 年 1 月～ 平成 13 年 3 月
市野 功	〃	医員	生活習慣病との関連	平成 12 年 12 月～ 平成 13 年 3 月
鈴木 静	〃	研究生	抗体の調製、バキュロウイ ルス発現系	平成 11 年 1 月～ 平成 15 年 6 月
斎藤雅之	〃	医員	発生工学研究	平成 11 年 1 月～ 平成 15 年 2 月
田辺真紀人	〃	大学院生	発生工学研究	平成 12 年 4 月～ 平成 14 年 5 月
母 義明	〃	大学院生	共役因子のクローニ ング	平成 11 年 1 月～ 平成 13 年 2 月

趙 越	〃	大学院生	共役因子のクローニング	平成 11 年 1 月～平成 15 年 3 月 (H14 年 7 月～H15 年 2 月 CREST 研究補助員)
下田聖子	〃	研究生	生活習慣病との関連	平成 12 年 5 月～平成 15 年 3 月
戸村有宏	〃	受託研究員	抗体の調製、バキュロウイルス発現系	平成 12 年 5 月～平成 12 年 3 月
森永秀孝	九州大学大学院医学研究院病態制御内科	CREST 研究員	ペパミルの作用点の解析	平成 11 年 5 月～平成 15 年 12 月
田中智子	〃	CREST 研究員	免疫系に与える影響	平成 12 年 9 月～平成 15 年 12 月
三小田玲子	〃	研究補助員	経理的業務及び庶務的業務	平成 11 年 1 月～平成 15 年 12 月
北村節子	〃	研究補助員	動物舎管理・器具洗浄	平成 13 年 11 月～平成 14 年 4 月
亀山あゆみ	〃	研究補助員	シーケンシング	平成 14 年 7 月～平成 15 年 3 月
山本有美	〃	研究補助員	シーケンシング・動物舎管理	平成 15 年 5 月～平成 15 年 10 月

②柳澤 グループ (テーマ別)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
柳澤 純	筑波大学応用生物化学	教授	転写共役因子精製と解析	平成 11 年 1 月～平成 15 年 12 月
川辺洋一	〃	助手	ER α の分解機構の解析	平成 15 年 4 月～平成 15 年 12 月
村山明子	〃	博士研究員(COE 博士研究員)	内分泌かく乱物質のスクリーニング	平成 15 年 4 月～平成 15 年 12 月

小林陽子	〃	博士研究員（日本学術振興会特別研究員）	免疫系におよぼす作用	平成15年4月～ 平成15年12月
加藤茂明	東京大学分子生物学研究所	教授	研究統括	平成11年1月～ 平成13年3月
金井由美子	〃	技官	内分泌かく乱物質スクリーニング系	平成11年1月～ 平成13年3月
須澤美幸	〃	技官	核内レセプターによる転写メカニズムの解明	平成11年1月～ 平成13年3月
舩広善和	〃	大学院生	In vitro 転写系立ち上げ	平成11年1月～ 平成13年3月
渡辺理子	〃	大学院生	新規共役因子単離	平成11年1月～ 平成12年12月
小川智子	〃	大学院生	新規共役因子単離	平成12年4月～ 平成13年3月
目崎善弘	〃	大学院生	新規共役因子単離	平成13年4月～ 平成14年3月
藤田哲男	筑波大学応用生物化学	CREST研究員	核内レセプターによる転写メカニズムの解明	平成13年4月～ 平成15年2月

③山内 グループ（テーマ別）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
江指隆年	独立行政法人国立栄養研究所	客員研究員（聖徳大学・教授）	総括	平成11年1月～ 平成15年12月
山内 淳	〃	主任研究員	研究総括・研究計画・結果解析	平成11年1月～ 平成15年12月
井上絵里奈	〃	CREST研究員	特殊飼料設計・調製・動物管理	平成13年4月～ 平成15年12月

花井美保	〃	研究協力員（聖徳大学・助手）	結果解析（統計処理）	平成 11 年 1 月～ 平成 15 年 12 月 （H11 年 4 月～H13 年 3 月 CREST 研究員）
梅垣敬三	〃	室長	低栄養幼若動物生殖器発達・性ホルモン測定	平成 11 年 1 月～ 平成 13 年 3 月
中嶋洋子	〃	客員研究員（聖徳大学・教授）	妊娠動物・F1 生殖器官発達評価	平成 11 年 1 月～ 平成 13 年 3 月
萩原清和	〃	室長	低栄養成熟動物精子連続評価・性ホルモン測定	平成 11 年 1 月～ 平成 12 年 3 月

①柴田 グループ（テーマ別）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
柴田健雄	帝国臓器製薬(株)研究所	研究本部長	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	平成 11 年 1 月～ 平成 14 年 3 月

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成11年 3月9日	名和田チーム第1回 合同打ち合わせ	九州大学医 学部 第三内科	7名	①基本戦略の打ち合わせ②事 務説明 ③各グループ毎の従 来の研究成果発表
平成12年 2月8日	第1回内分泌かく乱 物質公開シンポジウ ム	九州大学医 学部 カンファレンスルーム	約45名	名和田チーム研究成果発表
平成13年 2月6日	第2回内分泌かく乱 物質公開シンポジウ ム	九州大学医 学部 コラボ・ステーション 視聴覚ホール	約80名	名和田チーム研究成果発表
平成14年 3月19日	第3回内分泌かく乱 物質公開シンポジウ ム	九州大学医 学部 コラボ・ステーション 視聴覚ホール	約50名	名和田チーム研究成果発表

(2) 招聘した研究者等

なし

6. 主な研究成果物、発表等

(1)論文発表 (国内 0件、海外32件)

Yanagisawa J., Yanagi Y., Masuhiro Y., Suzawa M., Watanabe M., Kashiwagi K., Toriyabe T., Kawabata ., Miyazono K., Kato S.
Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-actibators.

Science 283:1317-1321, 1999

Takemiya K., Masuhiro Y., Fuse H., Endoh H., Murayama A., Kitanaka S., Suzawa M., Yanagisawa J., Kato S.

Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog.

Mol. Cell. Biol. 19:1049-1055, 1999

Endoh H., Murayama K., Masuhiro Y., Kobayashi Y., Goto M., Tai H., Yanagisawa J., Metzger D., Hashimoto S., Kato S.

Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α .

Mol. Cell. Biol. 19:5363-5372, 1999

Adachi, M., Takayanagi, R., Tomura, A., Imasaki, K., Kato, S., Goto, K., Yanase, T., Ikuyama, S., Nawata, H.

Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease.

N Engl J Med 343:856-862, 2000

Shono, T., Kai, H., Suita, S., Nawata, H.

Time-specific effects of mono-n-butyl phthalate on the transabdominal descent of the testis in rat fetuses.

BJU Internaional 86:121-125, 2000

Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kogayashi, Y., Takeyama, K., Endoh, H., Yanagisawa, J.

Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways.

Genes to Cells 5:593-601, 2000

Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S.

p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor α and β by interacting directly with the N-terminal A/B domains.

J. Biol. Chem. 275: 15645-15651, 2000

Yamauchi, J. *, Yamauchi T. *, Kuwata T. *, Tamura, T., Yamashita, T., Bae, N., Westphal, H., Ozato, K., Nakatani, Y. *Equally contribution.

Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 97(21):11303-11306, 2000

Nishi Y., Yanase T., Mu Y-M., Oba K., Ichino I., Saitoh M., Goto K., Takayanagi R., Kashimura T., Haji M., Nawata H.

Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa cell tumor-like cell line, KGN as a useful model to study various aspects of physiological regulation of human granulosa cells.

Endocrinology 142:437-445, 2001

Watanabe M., Yanagisawa J., Kitagawa H., Takeyama K., Arao Y., Suzawa M., Kobayashi Y., Ogawa S., Yano T., Yoshikawa H., Masuhiro Y., Kato S.

A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor α coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA.

EMBO J. 20, 1341-1352, 2001

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. Commun. 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

Yamamoto Y., Wada O., Suzawa M., Yogiashi Y., Yano T., Kato S., Yanagisawa J.
The Tamoxifen-responsive Estrogen Receptor Mutant D351Y Shows Reduced
Tamoxifen-dependent Interaction with Corepressor Complexes
J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 46, 42684-42691, 2001

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 TFIIIC-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

Mukasa C., Numura M., Tanaka T., Tanaka K., Nishi Y., Okabe T., Goto K., Yanase T., Nawata H.

Activin signaling through type IB activin receptor stimulates aromatase activity in the ovarian granulosa cell-like human granulosa (KGN) cells.

Endocrinology 144(4):1603-1611, 2003

Kitagawa H., Fujiki R., Yoshimura K., Mezaki Y., Uematsu Y., Matsui D., Ogawa S., Unno K., Okubo M., Tokita A., Nakagawa T., Ito T., Ishimi Y., Nagasawa H., Matsumoto T., Yanagisawa J., Kato S.

The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome.

Cell 113(7):905-917, 2003

Fujita T., Kobayashi Y., Wada O., Tateishi Y., Kitada L., Yamamoto Y., Takeshima H., Murayama A., Yano T., Baba T., Kato S., Kawabe YI., Yanagisawa J.

Full activation of estrogen receptor alpha (ER alpha) activation function-1 (AF-1) induces proliferation of breast cancer cells.

J. Biol. Chem. 278(29):26704-26714, 2003

Ohtake F., Takemiya K., Matsumoto T., Kitagawa H., Yamamoto Y., Nohara K., Tohyama C., Krust A., Mimura J., Chambon P., Yanagisawa J., Fujiki-Kuriyama Y., Kato S. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor.

Nature 423(6939):545-550, 2003

Suzawa M., Takada I., Yanagisawa J., Ohtake F., Ogawa S., Yamauchi T., Kadowaki T., Takeuchi Y., Shibuya H., Gotoh Y., Matsumoto K., Kato S.

Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade.

Nature Cell Biol. 5(3):224-230, 2003

(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演 (国内 5 2 件、海外 6 件)

② ポスター発表 (国内 2 2 件、海外 2 0 件)

③ プレス発表 なし

- Tomura A. (九州大学医学部第三内科) et al.
The Three Dimensional Image Analysis of the Intranuclear Cluster Formation of Transcriptionally Active Androgen Receptor Fused to Green Fluorescence Protein.
11th International Congress of Endocrinology (Sydney : 2000. 10. 29-11. 2)
- Zhao Y. (九州大学医学部第三内科) et al
Molecular interaction of cytoskeleton proteins with the AF-1 of human androgen receptor.
11th International Congress of Endocrinology (Sydney : 2000. 10. 29-11. 2)
- Mu Y-M. (九州大学医学部第三内科) et al.
Nuclear receptor system constituted by PPAR γ :RXR heterodimer inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cancer cells.
11th International Congress of Endocrinology
(Sydney : 2000. 10. 29-11. 2)
- Yanase T. (九州大学医学部第三内科) et al.
Insulin sensitizer, troglitazone, directly inhibits aromatase activity in human ovarian granulosa cells.
11th International Congress of Endocrinology (Sydney : 2000. 10. 29-11. 2)
- Nishi Y. (九州大学医学部第三内科) et al.
Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa cell tumor-like cell line, KGN, as a useful model to study various aspects of physiological regulation of human granulosa cells.
11th International Congress of Endocrinology (Sydney : 2000. 10. 29-11. 2)
- Saito M. (九州大学医学部第三内科) et al.
The activation function(AF-1) domein responsible for train scriptionally active intranuclear distribution of androgen receptor.
11th International Congress of Endocrinology (Sydney : 2000. 10. 29-11. 2)
- Nawata H. (九州大学医学部第三内科)
Transcription factors and cofactors with endocrine disrupters.
International Symposium on Environmental Endocrine Disrupters 2000.
(Yokohama : 2000. 12. 16-18)
- Okabe, T. (九州大学医学部第三内科) et al.
The suppression of NF-kB is one possible mechanism by which glucocorticoid induces apoptosis in a human T-cell line.
The Endocrine Society' s 83rd Annual Meeting (Denver: 2001. 6. 20-23)
- Saitou M. (九州大学医学部第三内科) et al.
Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in cultured human granulosa-like tumor cell line, KGN.
The Endocrine Society' s 83rd Annual Meeting (Denver: 2001. 6. 20-23)
- Zhao Y. (九州大学医学部第三内科) et al.
Identification of endocrine disrupting chemicals which activate CYP3A gene expressions via SXR, a steroid xenobiotics receptor.

- The Endocrine Society' s 83rd Annual Meeting (Denver: 2001.6.20-23)
- Morinaga H. (CREST、九州大学医学部第三内科) et al.
Effect of antiandrogens in the intranuclear distribution and on the transactivation function of androgen receptor.
The Endocrine Society' s 83rd Annual Meeting (Denver: 2001.6.20-23)
- Nawata H. (九州大学医学部第三内科)
Coactivator disease of androgen-insensitivity syndrome and mechanism of action of antiandrogenic endocrine disruptor.
The 4th International Conference on Reproductive Endocrinology
(Beijing:2001.11.27)
- Yue Zhao (九州大学医学部第三内科) et al.
Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between two distinct subnuclear compartments.
26th International Congress of Internal Medicine (Kyoto:2002.5.25)
- Saitoh M. (九州大学医学部第三内科) et al.
The presence of both the amino-and carboxyl-terminal domains in the AR 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.
The 84th Annual Meeting of The Endocrine Society (San Francisco:2002.6.19-22)
- Mukasa C. (九州大学医学部第三内科) et al.
Activin signaling by activin type IB receptor stimulates aromatase activity in the ovarian granulosa cell line.
The 84th Annual Meeting of The Endocrine Society (San Francisco:2002.6.19-22)
- Tanaka K. (九州大学医学部第三内科) et al.
Activin signaling by Smad2 represses androgen receptor-mediated transcription in prostate cancer cells.
The 84th Annual Meeting of The Endocrine Society (San Francisco:2002.6.19-22)
- Goto Y. (九州大学医学部第三内科) et al.
The role of activin receptor/Smad2 signaling in Pancreas.
The 84th Annual Meeting of The Endocrine Society (San Francisco:2002.6.19-22)
- Morinaga H. (九州大学医学部第三内科) et al.
Benomyl, a pesticide, can cause activation of aromatase activity in cultured human ovarian granulosa-like tumor cell line, KGN.
The 84th Annual Meeting of The Endocrine Society (San Francisco:2002.6.19-22)
- Goto K. (九州大学医学部第三内科) et al.
Symposium: Steroid Receptors: Structure and Function II
Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between two distinct sets of subnuclear compartments.
International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer
(Fukuoka : 2002.10.21-25)

Saitoh M. (九州大学医学部第三内科) et al.
Subnuclear distribution of steroid receptors and coactivators.
International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer
(Fukuoka : 2002. 10. 21-25)

Morinaga H. (九州大学医学部第三内科) et al.
Benomyl, a pesticide, can cause activation of aromatase activity in cultured human
ovarian granulosa-like tumor cell line, KGN.
International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer
(Fukuoka:2002. 10. 21-25)

Zhao Y. (九州大学医学部第三内科) et al.
Identification of the p102 U5 snRNP binding protein as a coactivator for androgen
receptor.
International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer
(Fukuoka:2002. 10. 21-25)

Tanaka K. (九州大学医学部第三内科) et al
Activin signaling by Smad2 represses androgen receptor-mediated transcription
in prostate cancer cells.
International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer
(Fukuoka:2002. 10. 21-25)

Kawate H. (九州大学医学部老年医学) et al
Tob family proteins modulating androgen receptor-dependent transcriptional
activation.
International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer
(Fukuoka : 2002. 10. 21-25)

Yanagisawa J. (筑波大学応用化学系) et al
Regulation of estrogen receptor mediated transactivation.
International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer
(Fukuoka : 2002. 10. 21-25)

Mukasa C. (九州大学医学部第三内科) et al
Activin signaling by activin type IB receptor stimulates aromatase activity in
the ovarian granulosa cell line.
International Aromatase Conference (Kyoto:2002. 10. 26-30)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
内分泌攪乱物質の生殖腺発生分化への作用メカニズム
第 39 回日本臨床化学会 (京都 : 1999. 9. 30-10. 1)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
内分泌攪乱物質作用の解析ー内分泌学の立場よりみた今後の課題
第 25 回環境トキシコロジーシンポジウム・第 3 回衛生薬学フォーラム合同大会
(名古屋 : 1999. 10. 21-22)

後藤公宣 (九州大学医学部第三内科) 他
転写共役因子障害とアンドロゲン抵抗症

第 22 回日本分子生物学会年会
(福岡：1999. 12. 8)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科) 他
ステロイドの作用機構と功罪
第 99 回日本皮膚科学会総会ランチョンセミナー (仙台：2000. 5. 28)

戸村有宏 (九州大学医学部第三内科) 他
活性化アンドロゲン受容体の euchromatin 領域におけるクラスター形成
第 73 回日本内分泌学会学術総会 (京都：2000. 6. 16)

高柳涼一 (九州大学医学部老年医学) 他
アンドロゲン受容体 (AR) の転写活性化機構：共役因子病と活性化 AR の核内三次元分布
第 73 回日本内分泌学会学術総会 (京都：2000. 6. 16)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
転写共役因子と疾病
日本癌学会公開シンポジウム (大宮：2000. 6. 23)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
内分泌攪乱化学物質の研究の展望
第 1 回近畿内分泌代謝フォーラム (京都：2000. 9. 23)

後藤公宣 (九州大学医学部第三内科)
環境ホルモンと「自然のメス化」
2000 年日本 BPW 連合会西日本ブロック研究会 (福岡：2000. 9. 30)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
転写因子・共役因子の研究の展望
第 3 回 Endocrine Bay Seminar (横浜：2000. 10. 7)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
内分泌かく乱物質の転写因子・共役因子を介した作用機序
第 73 回日本生化学大会 (横浜：2000. 10. 14)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
神経ステロイドの生合成と生理作用
第 43 回日本神経化学会 (金沢：2000. 10. 18)

野村政壽 (九州大学医学部第三内科)
発生工学を用いたアクチビンレセプター・Smad シグナル伝達系の機能解析
日本生殖内分泌学会 (大阪：2000. 12. 1)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
転写因子・共役因子と内分泌攪乱化学物質
第 3 回日本分子生物学会 (神戸：2000. 12. 15)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
転写因子・共役因子と内分泌攪乱化学物質
第 3 回内分泌攪乱化学物質に関するシンポジウム (横浜：2000. 12. 18)

大村 実 (九州大学医学部衛生学) 他
Tributyltin is a possible aromatase inhibitor in male rats.
日本内分泌攪乱化学物質学会第3回研究発表会 (横浜: 2000. 12. 18)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
21世紀の内科学の展望
鳥取大学医学部講演 (米子: 2001. 4. 21)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
21世紀の内分泌代謝学の展望
高知医大2内科同門会総会記念講演 (高知: 2001. 5. 20)

河合啓介 (九州大学医学部心療内科) 他
胎生期の内分泌攪乱化学物質の暴露がマウスの攻撃性に及ぼす影響
第42回日本心身医学総会 (鹿児島: 2001. 5. 23)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
21世紀の内分泌代謝学のめざすもの
宮崎内分泌同好会特別講演会 (宮崎: 2001. 6. 6)

名和田 新 (九州大学医学部第三内科)
アンドロゲンと性分化
第7回環境ホルモン学会講演会 (東京: 2001. 6. 11)

野村政壽 (九州大学医学部第三内科) 他
生殖細胞の発生成熟におけるアクチビン受容体の機能
第74回日本内分泌学会学術総会 (横浜: 2001年6. 29-7. 1)

足立雅広 (九州大学医学部第三内科) 他
アンドロゲン不応症の新しい疾患概念- コアクチベーター病-
第74回日本内分泌学会学術総会 (横浜: 2001年6. 29-7. 1)

斎藤雅之 (九州大学医学部第三内科) 他
活性化アンドロゲン受容体の核内ドット状分布の機構
第74回日本内分泌学会学術総会 (横浜: 2001年6. 29-7. 1)

向笠千寿 (九州大学医学部第三内科) 他
卵巣顆粒膜細胞におけるアクチビン受容体シグナルの機能解析
第74回日本内分泌学会学術総会 (横浜: 2001年6. 29-7. 1)

趙 越 (九州大学医学部第三内科) 他
The Regulation of CYP3A and CYP7A Gene Expression by a Nuclear Receptor, SXR, Bound
to Endocrine Disrupting Chemicals.
第74回日本内分泌学会学術総会 (横浜: 2001年6. 29-7. 1)

森永秀孝 (CREST、九州大学医学部第三内科) 他
アンドロゲン受容体依存性転写活性を抑制する内分泌攪乱物質
第74回日本内分泌学会学術総会 (横浜: 2001年6. 29-7. 1)

田中公貴 (九州大学医学部第三内科) 他

前立腺癌由来培養細胞 ALVA におけるアクチビンシグナル伝達機構の解析
第 74 回日本内分泌学会学術総会（横浜：2001 年 6. 29-7. 1）

河合啓介（九州大学医学部心療内科）他
胎生期の内分泌攪乱化学物質の暴露がマウスの攻撃性に及ぼす影響
第 74 回日本内分泌学会学術総会（横浜：2001 年 6. 29-7. 1）

名和田 新（九州大学医学部第三内科）
核内レセプターと病態
住友化学工業講演会（東京：2001. 7. 16）

名和田 新（九州大学医学部第三内科）
性ステロイドの最近のトピックス
第 10 回産婦人科分子内分泌懇談会（大阪：2001. 10. 20）

名和田 新（九州大学医学部第三内科）
内分泌攪乱物質の核内受容体・共役因子複合体及び性分化に対する作用
フォーラム 2001：衛生薬学・環境トキシコロジー（金沢：2001. 10. 31）

岡部泰二郎（九州大学医学部第三内科） 他
グルココルチコイドによる T 細胞アポトーシス誘導とグルココルチコイド受容体による
NF- κ B 抑制との関連性について
第 24 回日本分子生物学会年会（横浜：2001. 12. 9）

名和田 新（九州大学医学部第三内科）
特別講演「社会にニーズに応えた 21 世紀の内分泌・糖尿病の研究と臨床」
第 19 回日本臨床内科医会総会（名古屋：2002. 3. 30）

名和田 新（九州大学医学部第三内科）
教育講演「転写因子・共役因子の臨床の展望」
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）

名和田 新（九州大学医学部第三内科）
学会賞受賞講演「ステロイドホルモンとそのレセプターの基礎的臨床的研究」
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）

柳瀬敏彦（九州大学医学部第三内科）他
シンポジウム：核内受容体の新展開
アンドロゲン受容体 (AR) 並びに同拮抗剤の作用機構
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）

後藤公宣（九州大学医学部第三内科）他
新規 AR AF-1 結合性転写共役因子 ANT-1 の核内分布
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）

岡部泰二郎（九州大学医学部第三内科）他
グルココルチコイドによる T 細胞アポトーシス誘導における MAP キナーゼの役割について(1)
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）

- 野村政壽（九州大学医学部第三内科） 他
妊娠初期の抗アンドロゲン剤暴露による始原生殖細胞の発生分化への影響
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）
- 斎藤雅之（九州大学医学部第三内科） 他
AF-1 及び AF-2 領域は完全なアンドロゲン受容体(AR)転写活性に必須であり、活性化 AR
は他の活性化ステロイドレセプター(SR)と同一の核内 compartment に集積する
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）
- 向笠千寿（九州大学医学部第三内科） 他
卵巣顆粒膜細胞におけるアクチビンシグナル伝達とその役割
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）
- 田中公貴（九州大学医学部第三内科） 他
前立腺癌細胞におけるアンドロゲンシグナルとアクチビンシグナルの相互作用
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）
- 田中智子（九州大学医学部第三内科） 他
グルココルチコイドによる T 細胞アポトーシス誘導における MAP キナーゼの役割について(2)
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）
- 森永秀孝（九州大学医学部第三内科） 他
CYP19（アロマターゼ）活性に影響を及ぼす内分泌攪乱物質の検討
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）
- 趙 越（九州大学医学部第三内科） 他
新規 AR AF-1 結合性転写共役因子 ANT-1 の解析
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）
- 柳澤 純（筑波大学応用化学系） 他
骨と核内レセプター
第 75 回日本内分泌学会総会（大阪：2002. 6. 28-30）
- 柳澤 純（筑波大学応用化学系） 他
新たな核内ステロイドホルモンレセプター転写共役因子複合体の機能
第 3 回ホルモンと癌研究会（仙台：2002. 8. 2-3）
- 後藤公宣（九州大学医学部第三内科） 他
シンポジウム:脂溶性メディエーターと受容体研究 アンドロゲン受容体と核内コンパートメント
第 75 回日本生化学会（京都：2002. 10. 14-17）
- 野村政壽（九州大学医学部第三内科） 他
シンポジウム:内分泌攪乱作用研究の進展 化学物質の抗アンドロゲン作用の発現機構
第 75 回日本生化学会（京都：2002. 10. 14-17）
- 名和田 新（九州大学医学部第三内科）
ステロイドの作用機序
第 52 回日本アレルギー学会総会（横浜：2002. 11. 29）

野村政壽（九州大学医学部第三内科） 他
ワークショップ:環境化学物質に対する生物応答の分子基盤 化学物質による性ステロイドホルモン系の攪乱作用の分子機構
第 25 回日本分子生物学会年会（横浜：2002. 12. 11-14）

田中智子（九州大学医学部第三内科） 他
グルココルチコイドによる T 細胞アポトーシス誘導における MAP キナーゼの役割について
第 25 回日本分子生物学会年会（横浜：2002. 12. 11-14）

名和田 新（九州大学医学部第三内科）
会頭講演 21 世紀の内分泌代謝学の展望：予防から先端医療まで
第 100 回日本内科学会総会（福岡：2003. 4. 1-3）

森永秀孝（九州大学医学部第三内科） 他
内分泌かく乱物質 Benomy1 の ICYP19 (アロマターゼ) に対する作用機序の解析
第 76 回日本内分泌学会学術総会（横浜：2003. 5. 9-11）

田中智子（九州大学医学部第三内科） 他
グルココルチコイドによる T 細胞アポトーシスにおけるカスパーゼ依存性についての解析
第 76 回日本内分泌学会学術総会（横浜：2003. 5. 9-11）

斎藤雅之（九州大学医学部第三内科） 他
ステロイド受容体 (AR, GR) の転写活性化能に及ぼす NcoR、AP-1 の作用
第 76 回日本内分泌学会学術総会（横浜：2003. 5. 9-11）

田中公貴（九州大学医学部第三内科） 他
前立腺癌細胞の in vivo 増殖におけるアクチビン受容体シグナルの役割
第 76 回日本内分泌学会学術総会（横浜：2003. 5. 9-11）

范 呉強（九州大学医学部第三内科） 他
共焦点顕微鏡並びに FRAP を用いた Ad4BP と DAX-1 の核内相互作用の解析
第 76 回日本内分泌学会学術総会（横浜：2003. 5. 9-11）

河手久弥（九州大学医学部老年医学） 他
DNA 結合ドメイン (DBD) の変異により AR に核内移行障害と mobility の低下を認めたアンドロゲン不応症 (AIS)
第 76 回日本内分泌学会学術総会（横浜：2003. 5. 9-11）

名和田 新（九州大学医学部第三内科）
ステロイドホルモンとステロイドホルモン受容体と内分泌攪乱物質
内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム（湘南：2003. 6. 13-14）

渡辺哲博（九州大学医学部第三内科） 他
アンドロゲン受容体依存性転写活性を抑制する内分泌攪乱物質の作用機構
第 4 回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003. 10. 21-22）

森永秀孝（CREST、九州大学医学部第三内科） 他
内分泌かく乱物質 Benomy1 の CYP19 (アロマターゼ) に対する作用機序の解析
第 4 回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003. 10. 21-22）

田中公貴（九州大学医学部第三内科） 他
前立腺癌細胞におけるアンドロゲン受容体とアクチビンシグナルのクロストーク
第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003.10.21-22）

野村政壽（九州大学医学部第三内科） 他
妊娠初期の抗アンドロゲン剤暴露による始原生殖細胞の発生分化への影響
第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003.10.21-22）

范 妹麗（九州大学医学部第三内科） 他
アンドロゲン受容体 AF-1 領域結合タンパク質 ANT-1 の同定と機能解析
第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003.10.21-22）

小林陽子、藤田哲男、柳澤 純（筑波大学応用生物化学系） 他
エストロゲンレセプター α (ER α) AF-1 の乳癌細胞に対する影響
第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003.10.21-22）

立石幸代、柳澤 純（筑波大学応用生物化学系） 他
エストロゲンレセプター α (ER α) の分解経路の解析
第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003.10.21-22）

山内 淳（独立行政法人 国立健康・栄養研究所） 他
内分泌かく乱物質(ED)が性腺発達障害におよぼす栄養状態、生育環境、および遺伝的背景の影響
第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003.10.21-22）

山本順子、原 寿郎（九州大学医学部小児科） 他
ヒト単核球におけるダイオキシン受容体関連遺伝子群の定量と有用性の検討
第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003.10.21-22）

生野 猛、水田祥代（九州大学医学部小児外科） 他
ビンクロゾリンの脊髄神経核の発達と精巣下降に及ぼす影響に関する基礎的研究
第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003.10.21-22）

河合啓介、久保千春（九州大学医学部心身医学） 他
ビスフェノール A が脳内エストロゲンレセプター $\alpha \cdot \beta$ の発現に与える影響
第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003.10.21-22）

久保和彦、栗生修司（九州大学医学部耳鼻咽喉科・九州工業大学大学院生命体工学研究科） 他
内分泌攪乱化学物質の行動および脳の性分化に及ぼす影響
第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003.10.21-22）

藤本哲也、栗生修司（工業大学大学院生命体工学研究科） 他
内分泌攪乱物質ビスフェノール A の胎生期曝露は耐容 1 日摂取量以下の極微量でも行動の性分化を障害する。
第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム（東京：2003.10.21-22）

7. 結び

本チームは、内分泌かく乱物質のステロイドホルモン受容体を介した、いわゆる genomic action を中心に、その作用機構を分子レベルおよび画像を用いる手法で明らかにしてきた。プロジェクトの取りかかりとして、既知の有名な内分泌かく乱物質にとらわれることなく、できるだけ多くの化学物質を入手し、スクリーニングすることを試みた。最初に感じた点は、化学物質の入手の困難さであり、煩雑な書類申請を必要としたものが少なからずあったことである。また、知的財産として、特許申請もいくつか進めたが、手続きに苦労したこともあった。

当初の計画では、帝国臓器製薬とともに、抗アンドロゲン作用を有する化学物質に共通の骨格をコンピュータを用いて検討する予定であったが、ソフトウェアの問題もあり、十分な検討ができないままに終わってしまったのは遺憾である。この共通の分子骨格の予想は、内分泌かく乱化学物質を、創薬のモデルとして利用することを可能とするものであり、今後のプロジェクトとして検討予定である。

本プロジェクトの予算は、使用法に弾力性があり、予算執行が柔軟に行えた点が特筆すべきものであった。研究技術員を雇用することが可能であり、修士課程卒業者を対象として公募を行ったが、極めて優秀な研究技術員を雇用することができ、研究室の活性化には極めて有用であった。筆頭著者としての論文もできており、博士号申請予定である。

CREST は、チーム型の研究であり、各グループ間の交流、情報交換は必須である。このため、年に一度、各グループに来福していただき、グループの1年間の研究の進捗状況を発表していただいた。第2年次以降は、医歯薬キャンパスのみでなく九州大学全学に案内し、公開ワークショップの形態をとったが、多くの研究室より参加していただいた。活発な意見交換が行え、内分泌かく乱物質に対する関心の深さが実感できた。今後も、このネットワークを通じて、何らかの意見交換の場を設けていきたいと考えている。

今後は、これらの化学物質、核内受容体・共役因子の集約された情報を元に、さらに多くの内分泌かく乱物質を同定し、リスクアセスメントを確立し、内分泌かく乱作用のU字現象の解明に取り組みたい。さらに、ホルモン依存癌（前立腺癌、乳癌）、生活習慣病（肥満、糖尿病、骨粗鬆症）と創薬の開発を目指してゆく予定である。



九州大学大学院医学研究院病態制御内科（第3内科）
九州大学大学院医学研究院老年医学
名和田 新 グループ



筑波大学応用生物化学系
柳澤 純 グループ



独立行政法人 国立健康・栄養研究所
山内 淳（江指隆年） グループ

※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