

研究課題名 アロマターゼ高発現KGN細胞および三次元共焦点顕微鏡による内分泌代謝攪乱物質のスクリーニングシステムの開発に関する研究(H14-食品・化学-009)

主任研究者 九州大学大学院医学研究院・病態制御内科
名和田 新

1. 研究目的

以下の(1) - (5)のスクリーニング法を用いて化学物質の効率的スクリーニングシステムを確立する。

すなわち、(1) 独自に樹立した高いアロマターゼ(エストロゲン合成)活性を有するヒト卵巣顆粒膜細胞株KGNを用いて、アロマターゼ活性に影響を与える物質をスクリーニング、(2) アンドロゲン受容体(AR)の標的遺伝子への転写活性を指標としたスクリーニング、(3) (2)と関連して、ARの標的遺伝子の転写活性には共焦点顕微鏡画像上、核内でのARのクラスター形成が必須であることから、この系を用いたARの転写活性の阻物質のスクリーニング、(4) アンドロゲン作用抑制作用を指標とした*in vivo*スクリーニング、(5) 始原生殖細胞の遊走能障害を指標としたスクリーニングである。

その他、エストロゲン受容体(ER α)の転写活性に影響を与える物質のスクリーニングとその作用機構の研究も行う。

2. 研究の進捗状況及び得られている成果

(1) KGN細胞を用いたアロマターゼ活性

環境省が掲げる69化学物質のうち、55種類の物質について測定した。

有機スズ化合物(tributyltin, triphenyltin)、ニトロフェン、ビンクロゾリン、pp'-DDE、pp'-DDD、pentachlorophenol(PCP)及びbisphenol Aはアロマターゼ活性を抑制する。

ベノミル及びベノミルの分解産物であるカルベンダジムは、同様にアロマターゼ活性を上昇させる。その作用機序は、微小管の重合阻害によることを明らかにした(文献1)。

KGN細胞を用いてELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)によるアロマターゼ活性の測定系を立ち上げた(大塚製薬との共同研究、平成14年度まで行っていた³H-water法に比べ、感度、簡便性の点で優れ、大量スクリーニングにおける有用性が期待できる)。この系を用いて国内でもっとも頻用されている産業関連化学物質上位100種類のスクリーニングを行った。その結果、thiophenol, bumetizole, hexabromocyclododecan はアロマターゼ活性を抑制した。

(2) AR 標的遺伝子転写活性

リガンドである 5 α -dihydrotestosterone (DHT) 依存性の AR の転写活性は、MMTV(mouse mammary tumor virus)-luciferase 遺伝子をレポーター遺伝子としてルシフェラーゼアッセイにより測定可能である。この活性を指標に 55 種類の化学物質のスクリーニングを行った。

その結果、ニトロフェン、ビンクロゾリン、pp'-DDE は AR 転写活性を抑制し、抗アンドロゲン作用を有する化学物質と考えられた (文献 2)。

一方、ヒト前立腺癌で認められる T877A 変異を有する AR(T877A) の転写活性に対する 55 種類の化学物質の影響をこのアッセイ系を用いて検討したところ、唯一、ビンクロゾリンが、AR(T877A) の転写活性を刺激した。

(3) AR の核内ドット分布

我々は DHT 依存性の AR 転写活性化は、共焦点顕微鏡画像における GFP(green fluorescence protein)-AR の核内でのドット形成を引き起こし、抗アンドロゲン剤のフルタミドはこのドット形成を消失させることから、AR の転写活性化と核内でのドット形成は、機能的連関があることを見出している。(2) の系で抗アンドロゲン活性を示したニトロフェン、ビンクロゾリン、pp'-DDE について、AR の核内ドット分布の有無を指標としたアッセイを行ったところ、いずれの化学物質も AR の DHT 依存性の核内クラスター形成を阻害し、この系においても抗アンドロゲン作用物質であることが確認された (文献 2)。

さらに(2) の系で AR(T877A) に対して刺激活性を示したビンクロゾリンについて同様の検討を行ったところ、AR(T877A) は核内でドット形成を示し、この変異に対するビンクロゾリンのアゴニスト作用が確認された。

(4) アクチビン受容体細胞株転移能

アクチビン受容体を恒常的に発現させたヒト前立腺癌細胞株 ALVA 細胞をヌードマウスに移植すると全身リンパ説転移を引き起こすこと、しかも睾丸除去によりその遠隔転移が抑制されることを見出し、抗アンドロゲン作用物質の *in vivo* スクリーニングに有用なシステムである可能性を見出した。

(5) 始原生殖細胞の遊走能

生殖腺が形成される以前の胎仔マウスの全身に AR が発現していること、抗アンドロゲン剤投与は、生殖腺原器へ遊走する始原生殖細胞の数と遊走を減少させることから、化学物質は AR を介して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が示された。本システムを用いて、抗アンドロゲン作用を有するビンクロゾリンが始原生殖細胞とその移動を減少させることを明らかにした。

その他、55種類の化学物質について、ER α の転写活性に及ぼす影響を検討した結果、特に Butyl benzyl phthalate (BBP) が ER α に結合し、AF-1 活性を促進することによって転写活性を増加させることを明らかにした (文献 3)。BBP が乳癌の増悪に影響を及ぼす可能性を示唆する。また、エストロゲン依存的に ER α に結合する新規転写共役因子複合体 TFTC を精製し、この複合体が乳癌の増悪に関与することを示した。また、ダイオキシンの受容体である AhR/Arnt がリガンド未結合型 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を証明した (文献 4)。

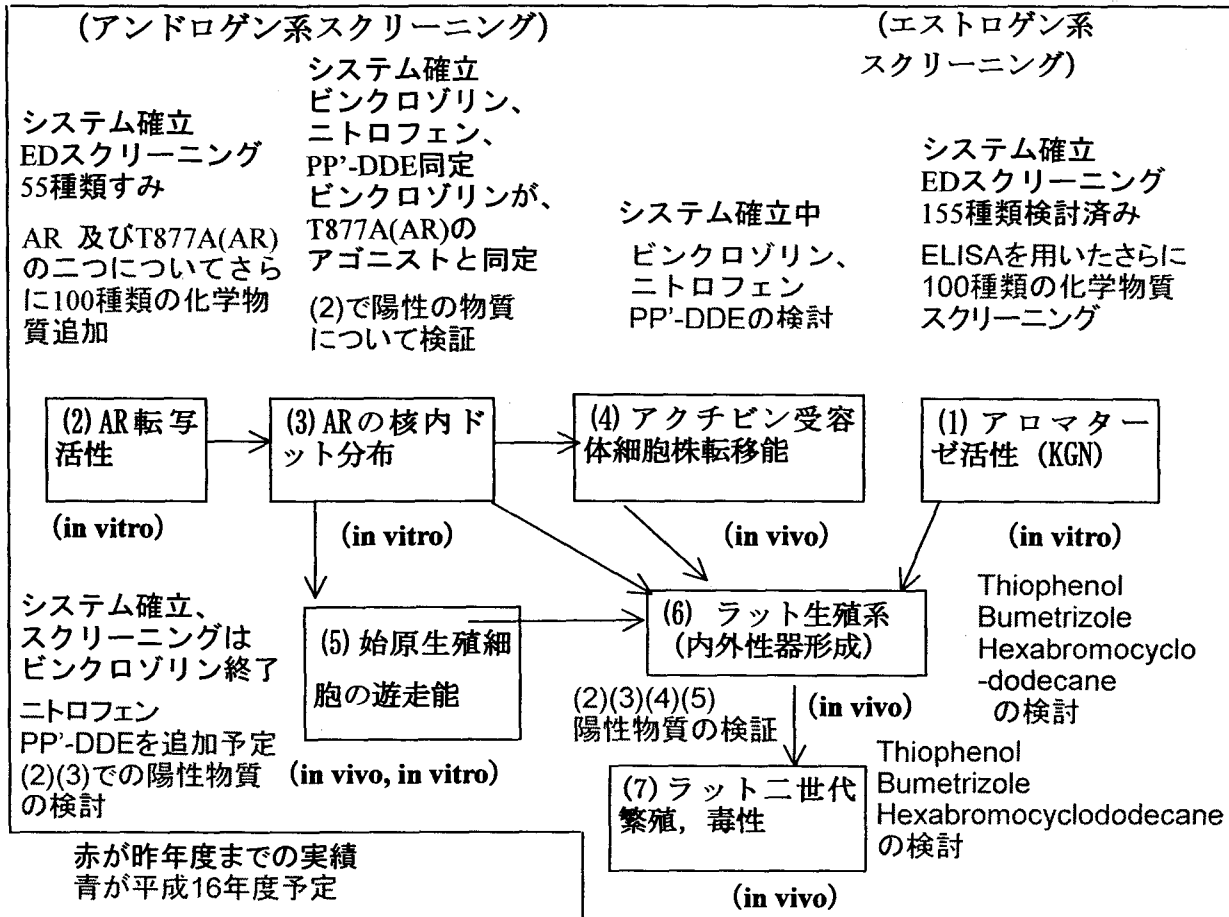
3. 今後の予定

- (1) ELISA 法を用いたアロマトーゼ活性を指標としてさらに産業関連化学物質上位 101 位から 200 位までのスクリーニングを行う。
- (2) AR 野生型と AR(T877A)の転写活性を指標にさらに 100 種類の化学物質のスクリーニングを行う。
- (3) (2) での陽性物質に関して、さらに検証を行う。
- (4) の系を用いて抗アンドロゲン作用を示すニトロフェン、ビクロゾリン、pp'-DDE の検討を行い、*in vivo* スクリーニングシステムとしての有用性を検討する。
- (5) の始原生殖細胞の遊走能を指標としてニトロフェン、PP'-DDE の抗アンドロゲン作用の検証を行う。

平成 15 年度までの陽性物質について、すでに生殖系や 2 世代試験への影響が報告されているものは除き、4. の(6)(7)の系での検討を行う。

その他、新たにユビキチン・プロテアソーム系と ER α の転写活性との関連に関して基礎的検討を行い、化学物質の作用点としてのユビキチンリガーの可能性を検討する。

4. 研究概要に関するポンチ絵



5. 引用文献

- Morinaga H, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H: A Benzimidazole Fungicide, Benomyl and Its Metabolite Carbendazim Induce Aromatase Activity in Human Ovarian Granulose-Like Tumor Cell Line (KGN) Endocrinology 145:1860-1869, 2004
- 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 Sciences 9: 57-70, 2002
- Fujita T, Kobayashi Y, Wada O, Tateishi Y, Kitada L, Yamamoto Y, Takashima H, Murayama A, Yano T, Baba T, Kato S, Kawabe Y, Yanagisawa J.: Full activation of estrogen receptor alpha activation function-1 induces proliferation of breast cancer cells. J Biol Chem 278: 26740-14, 2003
- Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S.: Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. Nature 29:545-50, 2003