

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名

核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者 名和田 新 九州大学 大学院医学研究院 教授

主たる研究参加者 柳澤 純 筑波大学 応用生物学系 教授

〃 江指 隆年 (独) 国立健康・栄養研究所 客員研究員

〃 柴田 健雄 帝国臓器製薬(株) 研究所 研究本部長

(～平成15年3月)

3. 研究内容及び成果：

本研究を開始する時点において、生物界における多くの性分化異常が報告されており、その原因はある種の化学物質が各々の受容体を介して、エストロゲン、アンドロゲンを中心とする内在性ステロイドホルモンの作用を攪乱する事によるものと想定されていた。一方臨床の場から、受容体の異常による性分化異常症に加え、受容体は正常であるにも係らず、転写因子／共役因子の異常によって「完全型睾丸性女性化症」等の性分化異常症が発症する事が明らかになって来た。

これらの背景から、本研究では、以下の作業仮説に基づき、内分泌かく乱物質の作用機構を明らかにすると共に、内分泌かく乱物質をその作用機構の観点から再分類する事を目標とした。

①内分泌かく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、機能障害を生じた複合体はホルモン応答領域への結合異常をきたし、多面的な機能障害をもたらす。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、ステロイド合成酵素、アクチビンシグナル伝達系等への多面的な障害を惹起する。③これらの障害は栄養等の環境因子の影響を受ける可能性がある。

本研究の成果概要は以下の通りである。

(1) 核内受容体・転写共役因子複合体と内分泌かく乱物質（名和田グループ）

共焦点顕微鏡と高精細三次元画像解析システムによる、ステロイドホルモン受容体の細胞内三次元分布解析法を開発し、非活性化状態とリガンド結合により活性化した状態とでは核内での分布に特徴的な差異が生ずる事を明らかにした。本解析法をアンドロゲン受容体（AR）に適用して、新たな抗アンドロゲン物質として nitrofen を同定し、内分泌かく乱物質のスクリーニング系として有効である事を示した。

複合体の分布解析の結果、転写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 euchromatin 内の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・回収される事が示唆された。また、ARコンパートメントはスプライシング因子コンパートメントとは異なる核内分布を示し、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。

抗アンドロゲン物質の作用機序の本質は、機能的核内受容体コンパートメント形成阻害にあると推察されるが、コンパートメント間のコミュニケーションに作用する物質の有無は今後の課題である。

ヒト卵巣顆粒膜細胞培養株KGN細胞を用いて、約60種の化合物のエストロゲン合成酵素P450アロマターゼに対する影響を解析した。有機スズ化合物は、アロマターゼ活性を抑制することでエストロゲン産生を抑制し、相対的アンドロゲン優位に至らせ、インポーズックスに見られるような雌の雄性化を引起す事が示唆された。イミダゾール系農薬Benomy1はアロマターゼ活性を増強したが、代謝物のカルベンダジムが転写レベルで作用している事を明らかにした。

抗アンドロゲン物質は、ARを介して始原生殖細胞の増殖、移動を阻害する事を明らかにした。この事は、内分泌かく乱物質の胎児期曝露が、生殖腺の分化のみならず、生殖細胞自身の発生・分化・移動にも影響を与えている可能性を示唆するものとして、社会的、公衆衛生学的にも重要な知見である。

胎仔期、授乳期にビスフェノールA (BPA) に曝露されたラットの脳では、青斑核、扁桃体内側核で性差が逆転、消失し、高い感受性を示す事が明らかになった。耐用1日摂取量(0.1ppm)以下の濃度でも、探索行動の性差が消失する等の影響が現れる事が明らかになった。

(2) エストロゲン受容体 (ER) を介した内分泌かく乱物質の作用機構 (柳澤グループ)

内分泌かく乱作用が疑われている60種の化合物について、ER α 、ER β を介する転写活性・抑制を検討し、両者に共通に作用する物質と、各々に特異的に作用する物質がある事を明らかにした。

Butyl benzyl phthalate (BBP) はER α に結合するが、タモキシフェン (TAM) とは異なり、乳癌の増殖を促進する。TAMは転写活性化因子及び転写抑制因子の双方との結合を誘導するが、BBPは転写活性化因子との結合のみを促進する事を明らかにした。この事は、乳癌の抑制には転写抑制因子とER α の結合が必要であるという仮説を強く支持するものである。

内分泌かく乱物質の作用の多様性は、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事が示唆された。この事は、同じ様にER α に結合する物質であっても、どのような因子と結合するかを検討する事に依り、その作用の予測及び分類を可能とする事を意味し、重要な知見である。

ダイオキシンは、ダイオキシンが結合した受容体 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して転写活性を促進する事で内分泌かく乱作用を示す事を明らかにした。

(3) 内分泌かく乱物質が性腺発達障害に及ぼす栄養状態、生活環境、遺伝的背景の影響 (江指グループ)

Di-butyl phthalate (DBP) を用いた解析から、低栄養状態及び生体リズムの攪乱に依って、内分泌かく乱物質への雄性生殖機能の感受性が高まる可能性が示唆された。この

事は、ヒトにおいて、内分泌かく乱物質の曝露量のみならず栄養状態、生活環境・生活リズムの差に依っても影響の発現様式が異なる可能性を示唆しており、社会的に極めて重要な問題を提起するものである。

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）欠損マウスでは、エストロゲン依存的転写活性化機構の破綻により転写活性化が異常に増大しているが、子宮、睾丸のエストロゲン感受性は低下している事が確認された。フィードバック機構が働いた結果と思われるが、メカニズムの解明は今後の課題である。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

核内受容体・転写共役因子複合体の攪乱を介したEDの作用を、三次元共焦点顕微鏡を用いて視覚的に検出する方法を開発した。ARにリクルートされる転写共役因子を明らかにし、抗アンドロゲン作用のメカニズムを解明して、核内受容体コンパートメント仮説を提唱した。さらに、ERについても、転写共役因子がEDの作用発現に重要な役割を果たしている事を明らかにした。個々のEDの作用が転写共役因子複合体の様々なモジュレーションにより引起される事を示したことは、内分泌かく乱作用の本質を理解し、EDを評価する上で新しい視点を導入するインパクトの高い重要な成果として高く評価される。

アロマトラーゼ高発現細胞株KGN細胞を樹立し、アロマトラーゼ活性に対するEDのスクリーニングを行うと同時に、有機スズ化合物がアロマトラーゼ活性を阻害することを示し、イボニシに対するインポセックス誘導の作用機構を明らかにした。個別の化学物質の内分泌かく乱作用の分子機構を明らかにする事が出来た数少ない事例として特筆されよう。

研究成果は論文(海外32報)、学会(国内74件、国際学会26件)発表されている。論文数は必ずしも多いとは言えないが、本研究目標との関連性を厳格に判断して選択・記載した結果であり、高レベルの国際誌への掲載が多い。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

「EDが核内受容体・転写共役因子複合体の本来の機能に影響を及ぼし、多面的な機能障害を引起す」と言う仮説は、相当程度の確度を持って証明されたものと思われる。「EDをその作用機構の観点から再分類する」と言う目標は端緒に付いたばかりであり、今後の進展に期待したいが、当初の目標を略達成出来たものとして高く評価される。研究開始当時、誰もARが核内でこのような局在を示すとは考えていなかった。その後、核内蛋白の空間的配置が大きな問題として取り上げられるようになって来たが、そのような機運の先駆的役割を果たした。さらに、AR欠損マウスの研究から、脂肪細胞分化との関連で、EDが中年期以降にも影響を及ぼす可能性に付いても考察しており、次々に新しい視点を導入する成果は賞賛に値する。

核内受容体・転写共役因子複合体に関する研究成果は、EDの作用機構の理解はもとより、遺伝子発現調節機構の理解にも大きく貢献するものとなろう。さらに、臨床的にも「共役因子病」という新しい疾患概念を確立したのみならず、androgen

hypersensitivity syndrome という新しい病気を発見するに至っている。

技術的にも、本研究で確立された手法や細胞は、直ちにEDスクリーニング系として利用可能であるばかりでなく、基礎研究や応用研究にも大きく貢献するであろう。既に、性ホルモンと老化との関連に関する研究、創薬への展開等、新たな構想で研究を開始しており、その成果を期待したい。

4-3. その他の特記事項（受賞歴など）

研究期間中に、柳澤氏が筑波大学応用生物化学教授に就任した。

チーム主催の公開シンポジウムを3回開催した。

※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