

内分泌かく乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究

研究者 那須 民江 (名古屋大学大学院医学系研究科 教授)

研究要旨

マウスライディッヒ腫瘍細胞を用いて、種々の化学物質のテストステロン合成に与える影響の機序の解明を行った。

- 1) 低濃度領域でプロゲステロンやテストステロンの合成を抑制した化学物質はなかった
- 2) 高濃度の化学物質曝露においては、すべての化学物質によりプロゲステロン濃度は上昇した。テストステロン濃度も上昇傾向を示したが、用いた最高濃度においては元のレベルに戻る場合が多かった
- 3) ビスフェノール A を除いて、曝露濃度の上昇に伴い、プロゲステロンに対するテストステロンの濃度が低下した。即ち、高濃度領域ではプロゲステロンに至る過程よりもプロゲステロンからテストステロンに至る過程の合成抑制が強いことが予想された
- 4) ビスフェノール A は 0.033mM の曝露濃度でプロゲステロンに対するテストステロンの合成を誘導していた
- 5) MEHP によるテストステロン合成には CYP11A、CYP17 および 3 β HSD の遺伝子発現が、ビスフェノール A 曝露によるテストステロン合成の誘導には StAR と 17 β HSD の遺伝子発現が関与していることが推測された
- 6) コレステロールの *de novo* 合成に関わる遺伝子は化学物質投与の影響を受けやすいが、テストステロン濃度には大きな影響を与えないことが推測された

研究協力者

市原 学 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)
上島 通浩 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)
山ノ下 理 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)
宮田麻衣子 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

A. 研究の目的

外因性内分泌かく乱化学物質の代表的毒作用のひとつに性ホルモンレベルへの影響がある。この機構を解明するために、多くの場合、テストステロン合成過程に焦点があてられ、この過程に与える影響が検討されている (Fig.1 参照)。しかしテストステロンの基質であるコレステロールの合成、輸送に関しては殆ど検討されていない。この一つの原因は、各ステップの酵素活性測定系が確立していないことにある。申請者らは、最近、定量リアルタイム PCR 法を用いることにより、テストステロン合成に関わる種々の遺伝子発現が定量できる方法を開発した。この方法を用いて、昨年度は種々の内分泌かく乱化学物質のマウス精巣におけるテストステロン合成に関わる遺伝子発現への影響を検討した。しかし、*in vivo* の実験においては、ライディッヒ細胞を分画する必要があるため、一群に多くの動物が必要であるため、投与量の検討が困難である。特にマウスを用いた場合、ライディッヒ細胞を分画するためには 3~4 匹の精巣をプールする必要があり、投与量の設定が限定され

てくる。そこで、本年度はマウスの培養細胞を用いた研究を計画した。

B . 研究方法

1) 細胞の培養と回収

1)-1 細胞の培養

細胞は MLTC-1 マウスライディッチ腫瘍細胞 (ATCC:CRL-2065)を用いた。75cm² 培養フラスコで細胞を培養し、コンフルエントを 5ml の PBS(phosphate buffered saline pH7.4) で洗い、2×トリプシン 10 μl を加えて 37 °C 10 分インキュベートした。その後、20%FBS、50 μg/ml アンピシリンを含んだ RPMI1640 培養液を 5ml の加え、50ml 遠心チューブに移し、1000g で 5 分間 (22 °C) 遠心した。上清を捨て、フェノールレッド抜きの 0.45%グルコース、10mM HEPES、10%FBS を含んだ RPMI1640 培養液を加えた後、25cm² フラスコに 2ml ずつ分注した。各フラスコに 3ml の 0.45%グルコース、10mM HEPES、10%FBS を含んだ RPMI1640 培地をそれぞれ加えて 37 °C で 24 時間インキュベートした。

1)-2 化学物質処理

フタル酸モノエチルキシル (MEHP)、フタル酸ジ 2-エチルヘキシル(DEHP)、ビスフェノール A、2,4 - ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) および塩化トリメチルスズの最終濃度が 0M、10⁻⁶M、10⁻⁵M、3.3×10⁻⁵M、10⁻⁴M、3.3×10⁻⁴M、10⁻³M となるようにフラスコに添加した。MEHP、DEHP、ビスフェノール A、および塩化トリメチルスズは 0.5%エタノールに、2,4-D は水に溶解させたものを使用した。これらの化学物質添加後、細胞を 37 °C で 2 日間インキュベートした。

1)-3 細胞および細胞外液の回収

LDHを測定するために2mlの培養液を2mlチューブに入れて回収し、- 80 °C に保存した。残りの細胞および培地に 120 μl のトリパンブルー溶液を加え、方眼マイクロメーター (1.25cm × 1.25cm)格子を備えた顕微鏡において細胞数を数えた。その後培地を廃棄し、フェノールレッドと血清抜きの 2ml の 0.45%グルコース、10mM HEPES を含んだ RPMI1640 培地で 2 回洗浄し、同じ組成の培地を 5ml 加えた。50 μl 、100nM の hCG を加え、37 °C で 2 時間インキュベートした。インキュベーション終了後培地を各 2ml ずつ 2 本回収し、テストステロンとプロゲステロン測定のため、- 80 °C で保存した。残りの培地を捨てて、2ml の 2×トリプシンを加え、37 °C 10 分インキュベートした。これを 2ml チューブに移し、1500g で 5 分間 (22 °C) 遠心した。上清を捨てて、- 80 °C で保存した。

2) テストステロン・プロゲステロンの測定

培養液中に放出されたテストステロンとプロゲステロンは EIA Kit(Cayman 社、USA) を用いて測定した。

3) RNA 抽出・cDNA 合成

回収した細胞に 70%エタノールを 400μl 入れてよく攪拌した。2ml collection tube に乗せた RNeasy mini spin column に混合液を注ぎ、12000rpm で 15 秒間 遠心した。廃液を捨て、collection tube を元に戻し、Buffer RW1(Wash buffer) 350ml を column に注ぎ、

12000rpm で15分間遠心した。Collection tube を新しいものと交換し、DnaseI 溶液と Buffer RDD を1:7の割合で混ぜた溶液 80 μ l を column のメンブランに注ぎ、20~25°C で15分間放置した。Buffer RW1 350 μ l を column に注いだ後、12000rpm で15分間遠心した。Collection tube を新しいものに交換し、Buffer RPE(Wash buffer) 500 μ l を column に注いだ。12000rpm で15分間遠心し、廃液を捨て、collection tube を元に戻して、Buffer RPE 500 μ l を column に注いだ。その後15000rpm で2分間遠心した。Collection tube を新しいものと交換し、再び15000rpm で1分間遠心した。1.5ml collection tube に交換し、RNase-free water 50 μ l を column のメンブランに注ぎ、30秒間放置した。15000rpm で1分間遠心し、RNA 抽出液を得た。

RNA の検定を電気泳動により行った。10 \times FA gel buffer(MOPS が200mM、sodium acetate が50mM、EDTA が10mM となり、pH が7.0 となるように10NのNaOHで調整)を作った。その後1.2% FA gel(0.24g アガロース、2ml 10 \times FA gel buffer、18ml RNase-free water)を100ml 三角フラスコに入れ、電子レンジで溶解し、37% formaldehyde を0.36ml 加え、エチジウムブロマイドを0.2 μ l 加えた。ゆっくり混ぜてプレートに流した後、4に30分ほど放置してゲルを固めた。5 \times RNA loading buffer(80 μ l saturated bromophenol blue solution、0.8 μ l 0.5M EDTA pH8.0、7.2 μ l 37% formaldehyde、100% glycerol、30.84 μ l formamide、40 μ l 10 \times FA gel buffer)を作り、RNA 抽出液1に対し、5 \times RNA loading buffer が4になるように加えて、RNA サンプルを調整した。その後65 5分間放置し、氷冷水につけた。次にマーカー(5 \times RNA loading buffer と saturated bromophenol blue solution の割合が1:4になるようにする)を作成した。さらに1 \times FA gel running buffer(40ml 10 \times FA gel buffer、8ml 37% formaldehyde、352ml RNase free water)を作り、Mupid(ミニゲル泳動槽)に流し、固めておいた1.2% FA gel を入れ、分子マーカーを端に3.25 μ l 乗せ、RNA サンプルを乗せて50V、1時間泳動した。

cDNA の合成は Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit を使い、Oligo(dT)₁₂₋₁₈ プライマーで合成した。

4) 定量リアルタイム PCR

プライマー、プローブの作成は下記 GI ナンバーの塩基配列を参考に、その配列を基にして PE Biosystems 社製 Primer Express version 1.0 で作成した。マウスの GAPDH は PE Biosystems 社製を使用した。PPAR-alpha と GAPDH は PE Biosystems 社製 TaqMan Universal PCR Master Mix を使用し、TaqMan probe で測定した。プライマー濃度は100nM、プローブ濃度は200nM で PCR を行った。その他の mRNA は SYBR Green 法で測定した。

PPAR-alpha の TaqMan probe は全て蛍光物質として FAM, 消光剤として TAMURA を付けた。GAPDH の TaqMan probe は全て蛍光物質として VIC, 消光剤として TAMURA を付けた。

Quantitative real time-PCR は PE Biosystems 社製 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System で行った。各測定物質はそれぞれのアンプリコンを Rromega 社製 pGEM-T Easy vector 又は Invitrogen life technology 社製 pCR2.1 vector に組み込み、解析した数値は GAPDH に対する比として表した。

使用したプライマーあるいはプローブは以下の通りである。

- HMG-CoA synthase (HS): forward primer: 5'-TGTGGCACCCGGATGTCTTT-3',
reverse primer: 5'-GACCAGATACCACGTTCCCTCAA-3';

- HMG-CoA reductase (HR): forward primer: 5'-TGTGGTTTGTGAAGCCGTCAT-3',
reverse primer: 5'-CGTCAACCATAGCTTCCGTAGTT-3';
- steroidogenic acute regulatory protein (StAR):
forward primer: 5'-AAGGAAAGCCAGCAGGAGAAC-3',
reverse primer: 5'-TCCATGCGGTCCACAAGTT-3';
- peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR):
forward primer: 5'-AGTTCGTGGCACTGCATAAGC-3',
reverse primer: 5'-GCTGCCATTCTCTCCTCCTA-3';
- cytochrome P450_{scc} (CYP11A): forward primer: 5'-CCATCAGATGCAGAGTTTCC
AA-3',
reverse primer: 5'-TGAGAAGAGTATCGACGCATCCT-3';
- 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ 5 β -4-isomerase (3 β -HSD):
forward primer: 5'-GGAGGCCTGTGTTCAAGCAA-3',
reverse primer: 5'-GGCCCTGCAACATCAACTG-3';
- cytochrome P450₁₇ (17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ lyase CYP17):
forward primer: 5'-CCATCCCGAAGGACACACAT-3',
reverse primer: 5'-CTGGCTGGTCCCATTCAATT-3';
- 17 β -HSD: forward primer: 5'-CAACGATTCCCTCCTGACACGAT-3',
reverse primer: 5'-GCTGATGTTGCGTTTGAGGTAA-3';
- PPAR α : GI 7106384, forward primer: 5'-TTTCCCTGTTTGTGGCTGCTA-3',
reverse primer: 5'-CCCTCCTGCAACTTCTCAATG-3'
Taq Man probe, 5'-AATTTGCTGTGGAGATCGGCCTGG-3'
- GAPDH: PE Biosystems 社製 TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents を使用
Taq Man probe, 5'-CCCGTTCTCAGCCTTGACAGTGCC-3'

SYBR Green 反応は、25 μ l 中に最終濃度 1 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 400 nM プライマー, および 1 ng cDNA をテンプレートとして加え、95 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベーションをして Amplitaq Gold polymerase の活性化を行った。引き続き 95 $^{\circ}$ C で 15 sec、40 cycles denaturation を、60 $^{\circ}$ C で 1 分間 annealing と extension を行った。

5) 統計学的検定

実験結果の有意差の検定には分散分析後 Dunnett の多重比較を使用した。

C . 研究結果

1) MEHP

Fig.2 に MEHP 添加後の細胞数の変化を示す。MEHP 0.18mM までは細胞数の変化は認められないが、0.33mM からは明らかに減少した。

Fig.3 にテストステロンとプロゲステロン濃度の変化、Fig. 4 にプロゲステロンに対するテストステロンの生成割合を示す。プロゲステロン濃度は MEHP 0.33mM から増加し、0.6mM で最大となり、1mM で 0.33mM と同レベルに戻った。一方、テストステロン濃度は MEHP 0.18mM

から上昇し、0.33mMで最大となった後、0mMと変わらないレベルまで減少した。MEHP添加後のプロゲステロン生成に対するテストステロンの割合をみると、0.33mM以上の濃度で明らかに減少していた。Fig. 5はMEHPのテストステロン合成関連遺伝子発現への影響を示す。統計的に有意差があったのはStARの1mMで、有意にmRNAの発現が上昇していた。PBRと17βHSDのmRNAの発現も1mMにおいて上昇傾向を示した。その他のテストステロン合成関連遺伝子はテストステロン濃度と類似した挙動を示した。即ち、0.18mMで最大となり、その後減少傾向を示した。特にCYP17と3βHSD-mRNAの発現の低下は著しく、1mMにおいては、それぞれ0mMの1%と6%にまで減少していた。1mMにおけるCYP11Aの低下もCYP17と3βHSD-mRNAの発現の低下に次いで著しく、0mMの17%まで低下していた。HR,HS,PPARαの挙動はお互いに類似していて、0.18mMの曝露により上昇傾向を示したが、1mMのMEHP曝露後は0mMと同レベルの遺伝子発現を示す傾向であり、この点がCYP17、3βHSDおよびCYP11Aの挙動と一致していなかった。これらの結果から、テストステロン濃度の上昇や低下の挙動と類似しているのはHR,HS,PPARα、CYP11A、CYP17、3βHSDであるといえる。特に高濃度領域におけるCYP17と3βHSDの著しい低下は、プロゲステロンに対してテストステロン生成の著しい低下に関連しているかもしれない。

Supplemental Figure

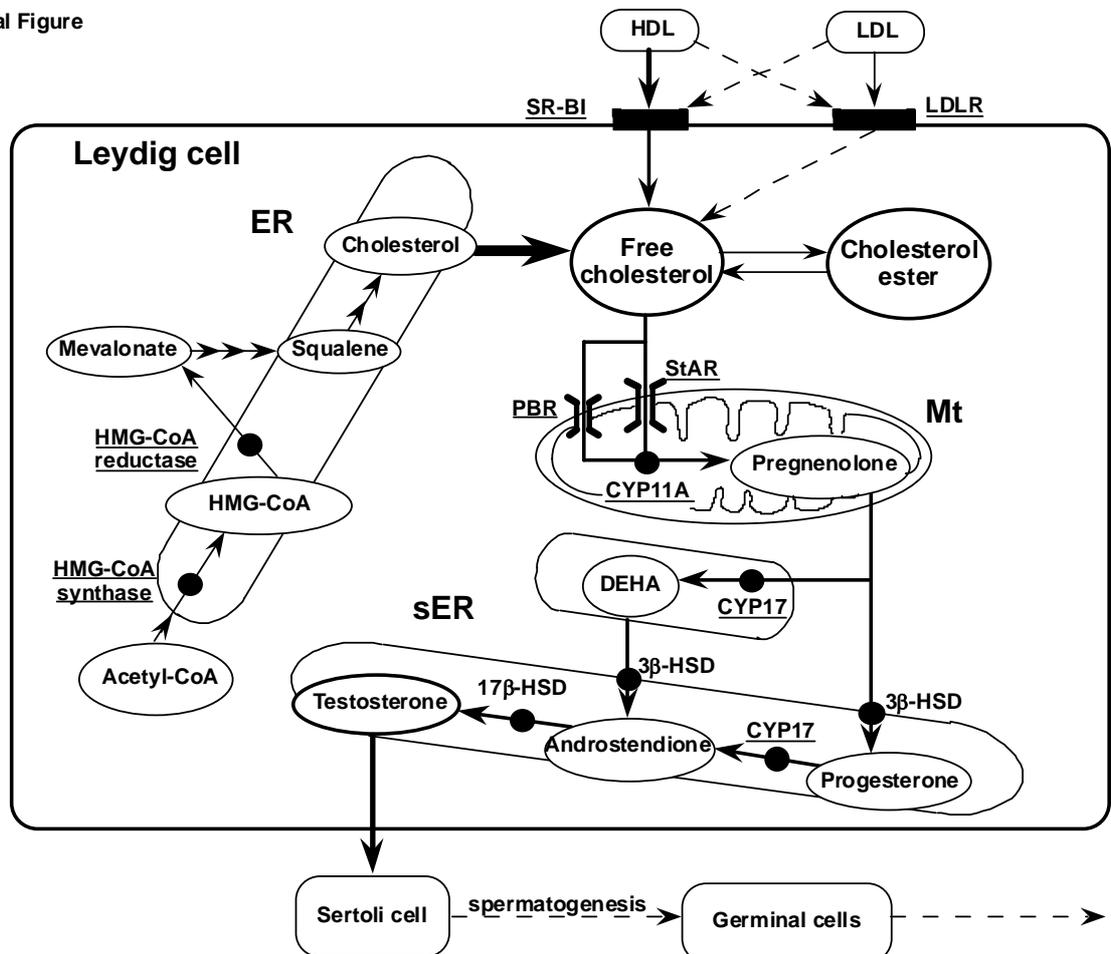


Fig.1 ライディッヒ細胞におけるテストステロン合成

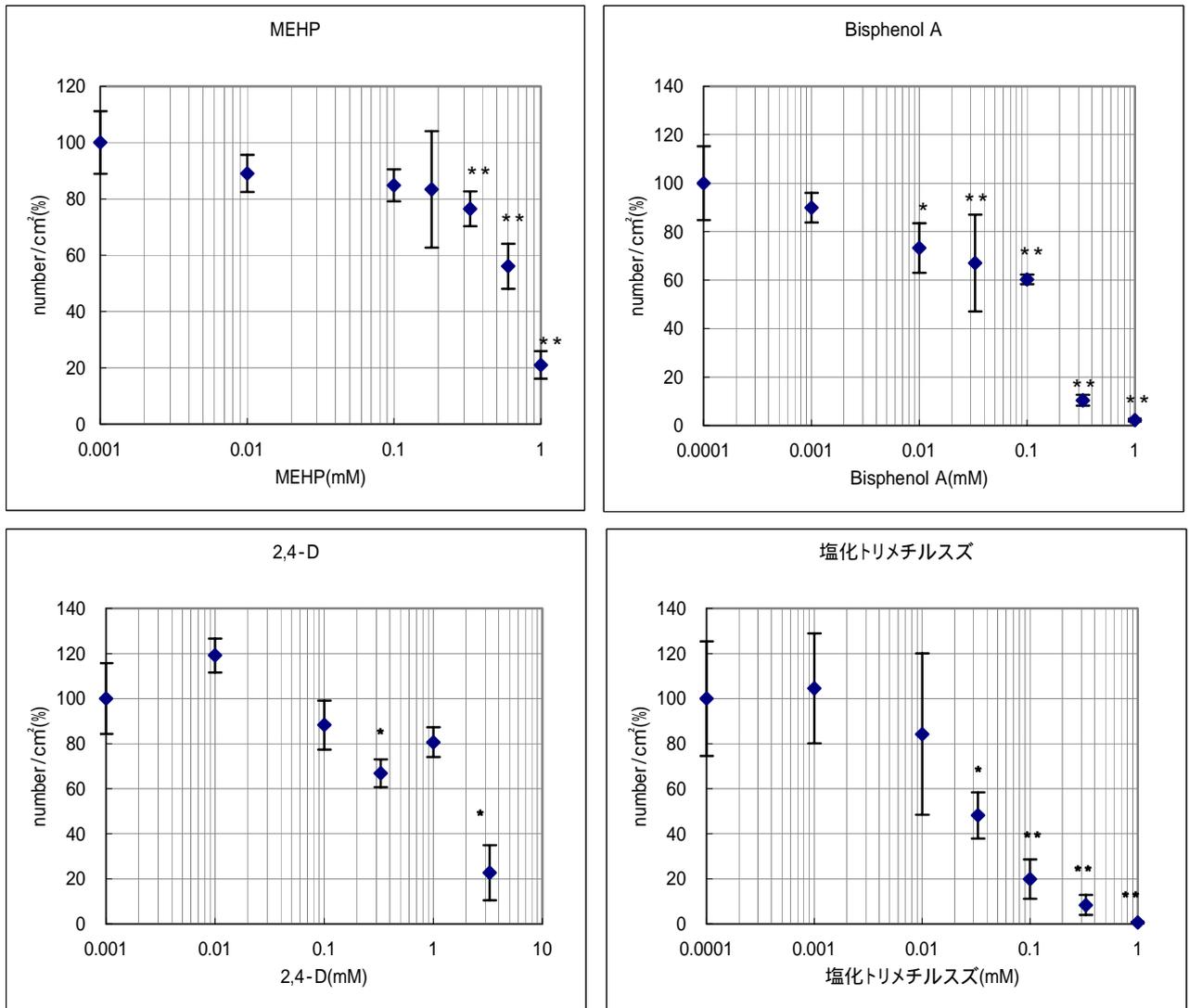


Fig.2 MEHP、ビスフェノール A、2,4-D および塩化トリメチルスズ添加後の細胞数の変化。0mMを100%とした。各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

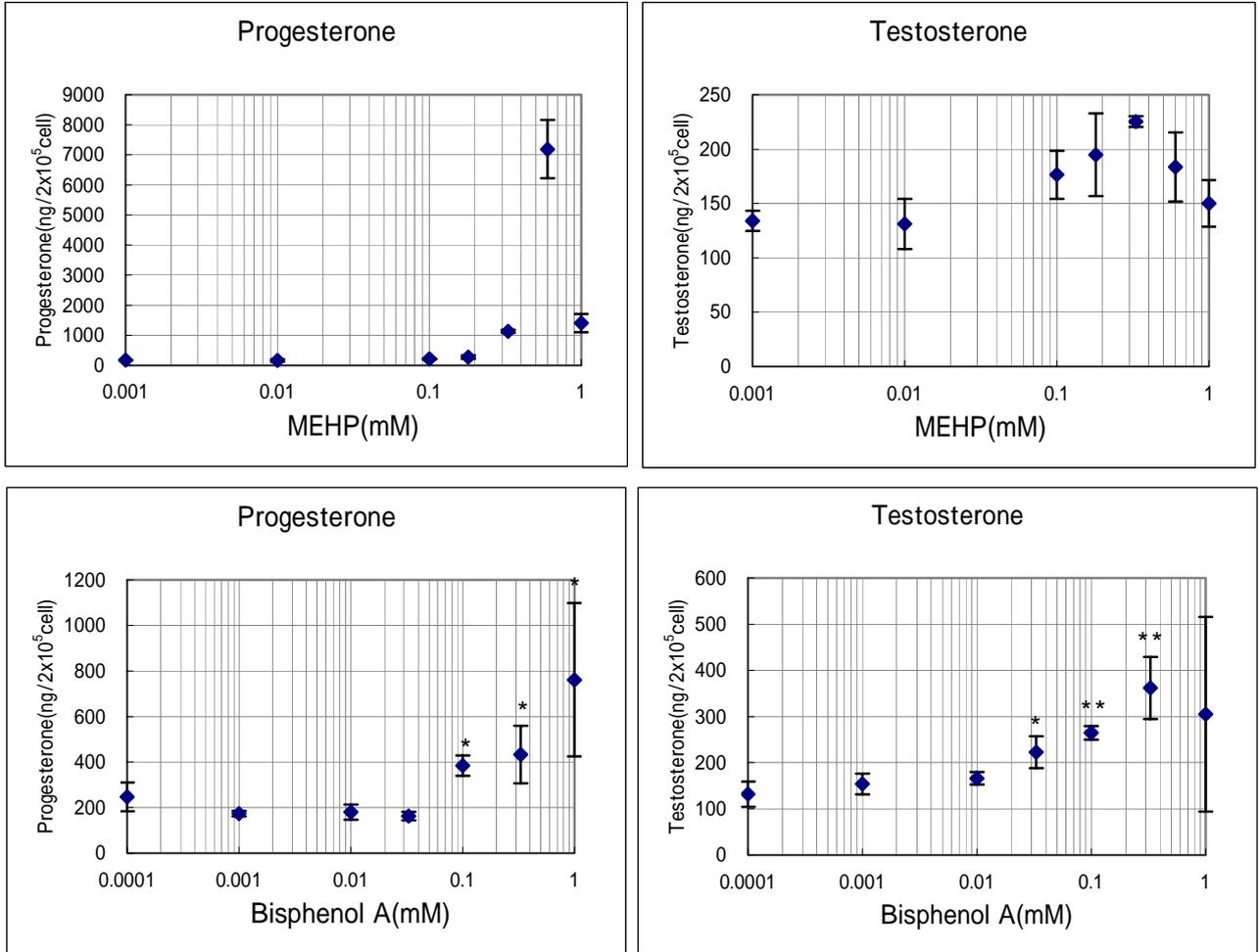


Fig.3a MEHP とビスフェノールA 添加後の培養液中のテストステロンとプロゲステロン濃度。

各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す

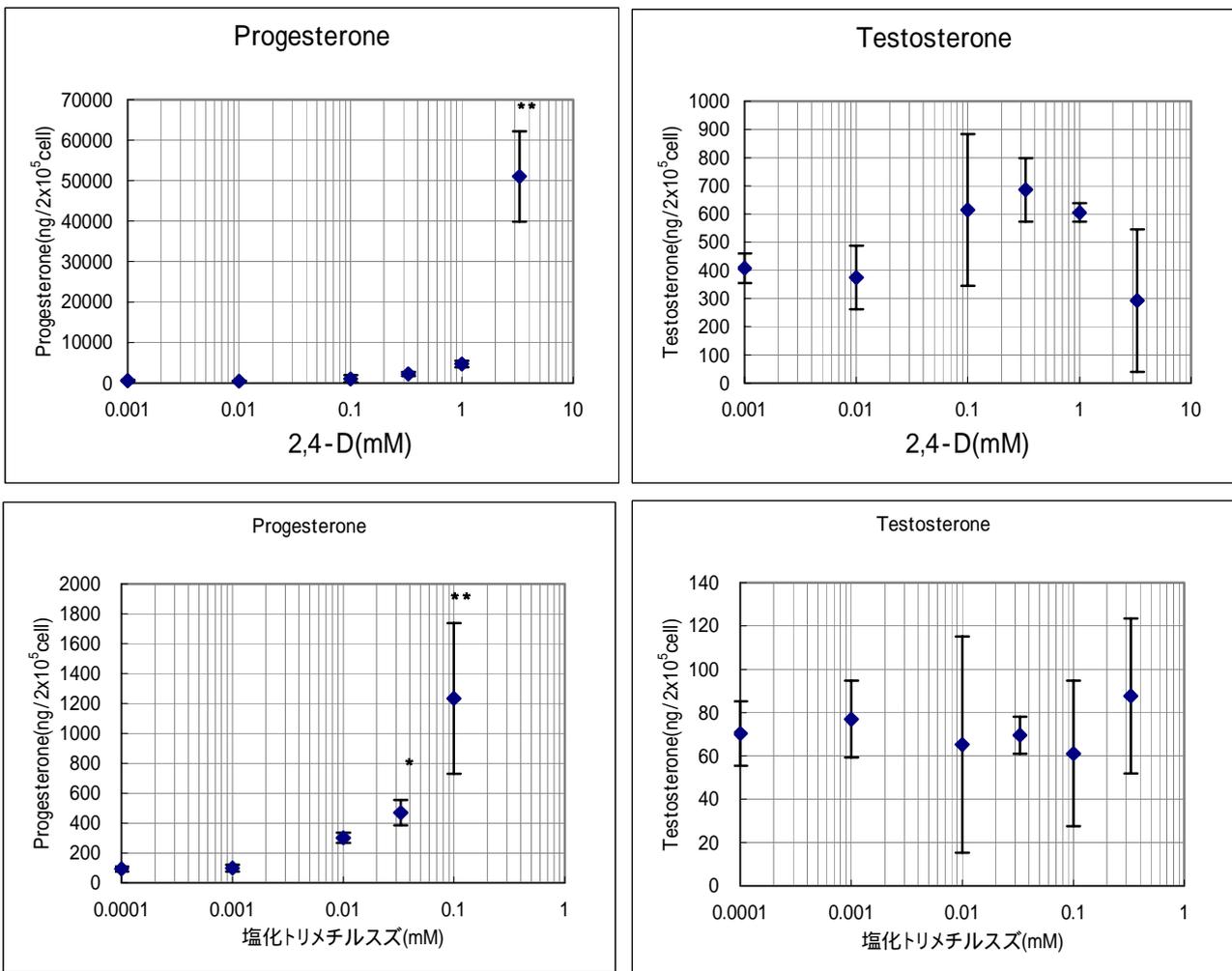


Fig.3b 2,4-D と塩化トリメチルスズ添加後の培養液中のテストステロンとプロゲステロン濃度。各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

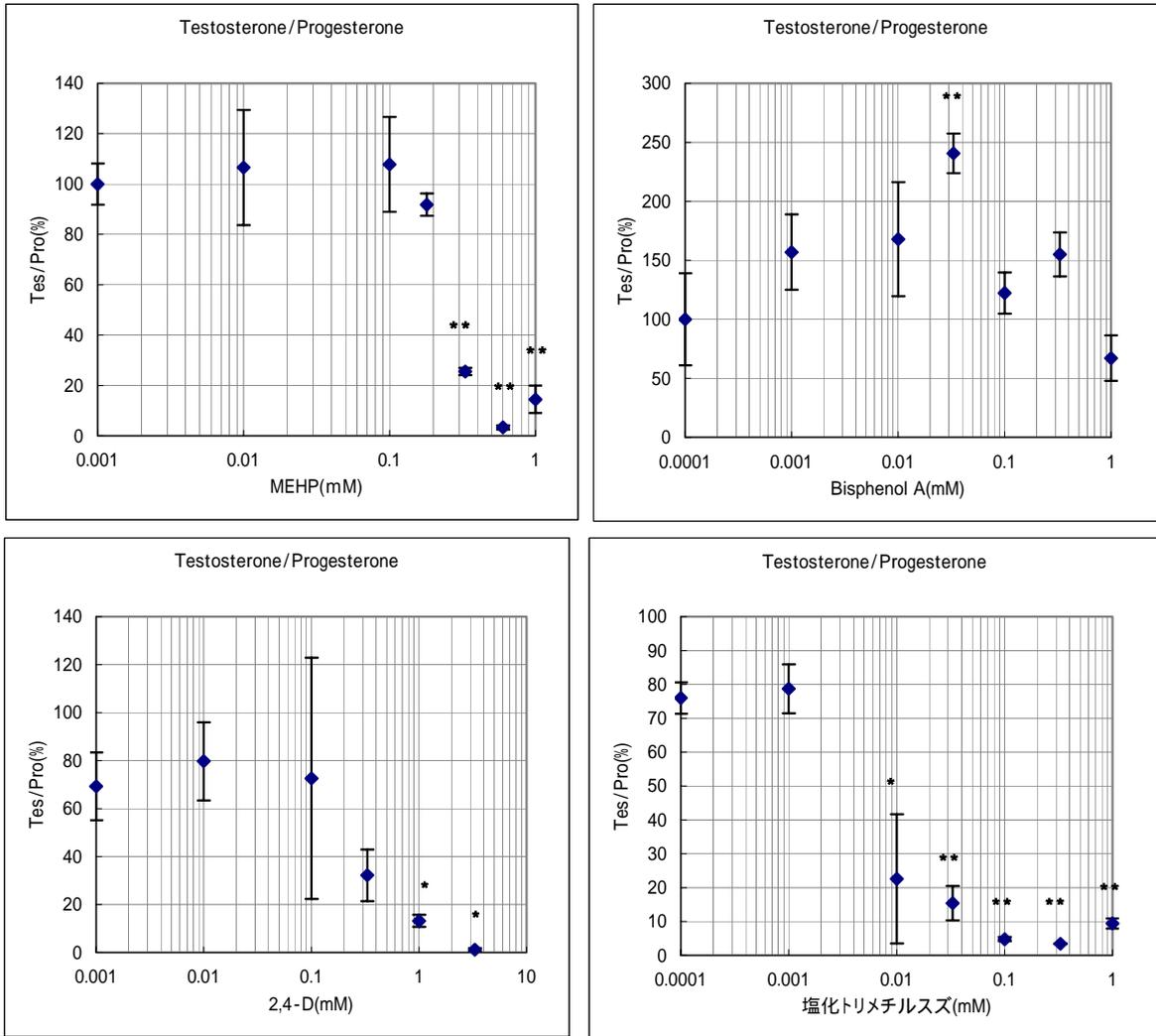


Fig.4 MEHP , ビスフェノール A、 2,4-D および塩化トリメチルスズ添加後のプロゲステロンに対するテストステロンの生成割合。各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

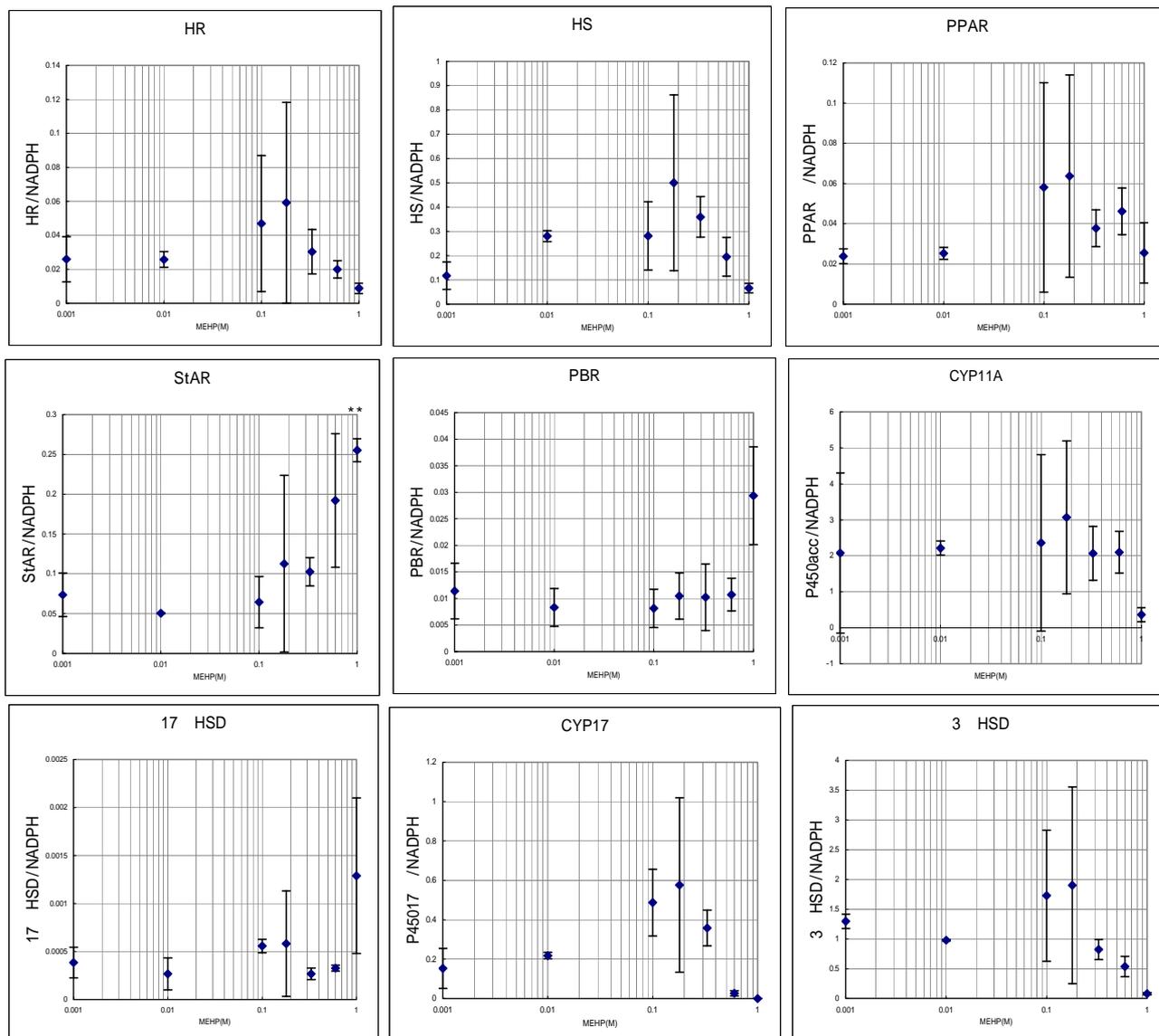


Fig.5 MEHP 添加後のテストステロン合成関連遺伝子発現の変化
各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

2) DEHP

DEHP に関しては 0.5%エタノールに対して 0.033mM が最大溶解濃度であったので、この濃度以下で実験を行った。0.01mM 添加後プロゲステロンとテストステロン濃度は上昇傾向を示したが、有意差はなかった (Fig.6)。

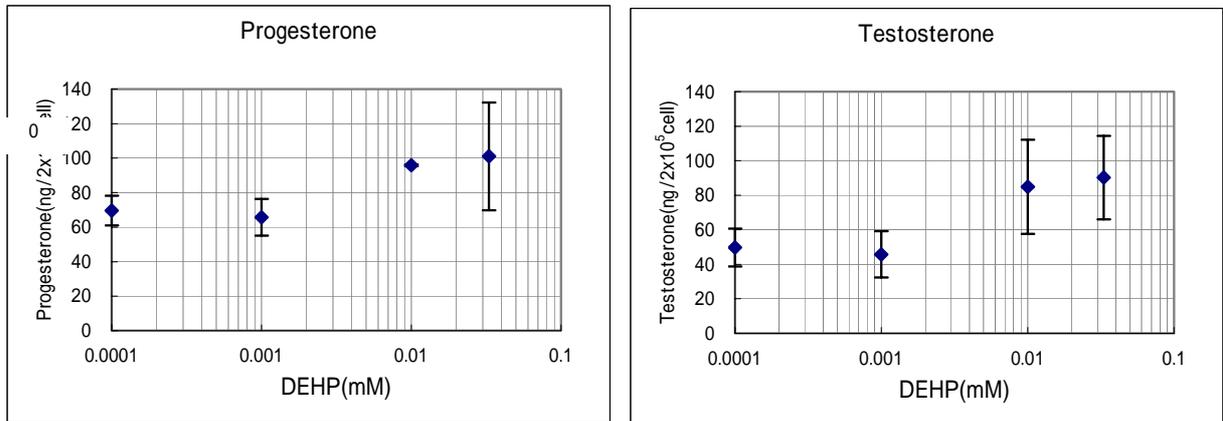


Fig.6 DEHP のプロゲステロンおよびテストステロン合成への影響
各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

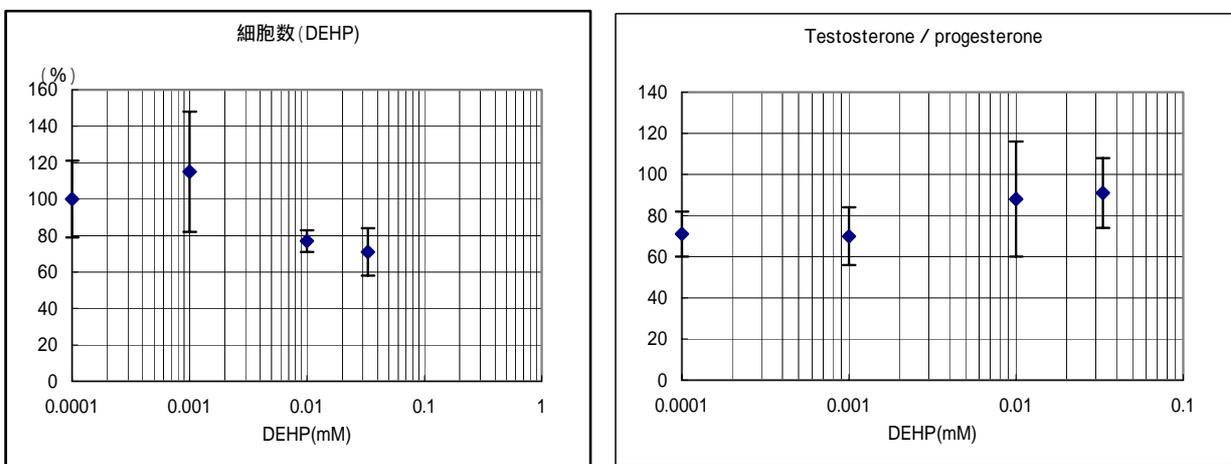


Fig.7 DEHP の細胞数、テストステロン/プロゲステロンに与える影響
各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

3) ビスフェノール A

ビスフェノール A 添加後の細胞数は 0.01mM 添加後から減少し、0.33mM においては 0mM の約 10%にまで減少していた (Fig.2)。細胞数の減少が MEHP 添加した場合より低濃度で生じることが明らかである。

ビスフェノール A 添加後の培養液中のテストステロンとプロゲステロン濃度を Fig. 3 に示す。プロゲステロンは 0.1mM において、テストステロン濃度は 0.033mM 以上の濃度において上昇した。

プロゲステロンに対するテストステロンの生成割合は、0.033mM において明らかに上昇し、MEHP と異なった挙動を示した (Fig.4)。特に、0.033mM において、プロゲステロンの合成量に対してテストステロン合成量が 100%を超えており、このような現象は MEHP や DEHP 投与では観察されなかった点が注目される。これはプロゲステロン合成の増大よりテストステロン合成の増大が優先していたためであろう。

Fig.6 にビスフェノール A 添加後のテストステロン合成に関わる遺伝子発現の変化を示す。0.33mM 以上の濃度においては細胞数が少ないため、測定を省略した。HR, HS, PPAR α および CYP11A の mRNA 量はビスフェノール A 濃度の上昇に伴い減少し、また、プロゲステロンやテストステロン濃度の挙動と全く異なっていたことから、これらの遺伝子の関与は少ないと判断された。PBR, 3 β HSD、CYP17 の mRNA は殆ど変化しなかった。一方、17 β HSD と StAR の mRNA の発現はビスフェノール A が 0.1mM において明らかに上昇していた。これらの遺伝子発現の上昇はプロゲステロンやテストステロン濃度の上昇が確認された濃度とほぼ一致しており、ビスフェノール A を曝露した場合のステロイド合成に重要な作用をもたらすと考えられる。

4) 2,4-D

細胞数は 0.5mM 以上の 2,4-D 濃度において減少し、MEHP を添加した場合と類似していた (Fig.2)。プロゲステロンは一番高い濃度(5mM)でのみ上昇したが、テストステロン濃度に変化は認められなかった(Fig.3b)。プロゲステロンに対するテストステロンの生成割合をみると、1mM 以上の濃度において明らかに減少していた (Fig.4)。減少のパターンは MEHP に類似していたが、MEHP より高濃度において減少が観察された。

5) 塩化トリメチルスズ

塩化トリメチルスズを添加した場合、細胞数は 0.033mM から減少し、ビスフェノール A と同様に細胞毒性が強い物質であった (Fig.2)。0.1mM ではビスフェノール A を添加した場合細胞数は 60%残っていたのに対し、塩化トリメチルスズの場合は 20%残っていたのみであった。

プロゲステロン濃度は 0.033mM から上昇したが、テストステロン濃度に変化はみられなかった (Fig.3b)。しかし、プロゲステロンに対するテストステロンの精製割合をみると (Fig.4) 0.01M から著しく減少した。減少のパターンは MEHP や 2,4-D 添加後に類似していたが、これらの化学物質より低濃度から減少した。ビスフェノール A 添加後のパターンとは全く異なっていた。

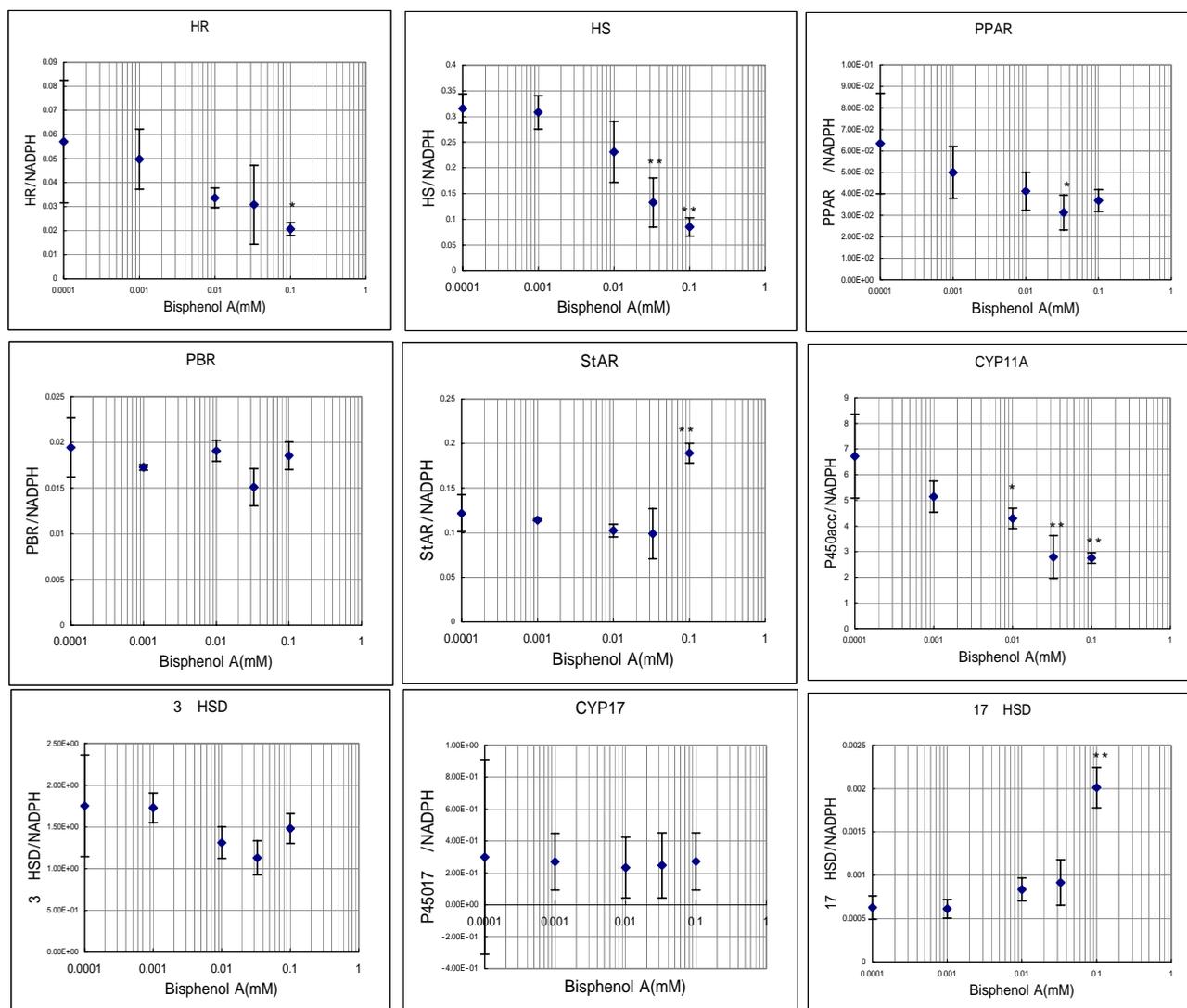


Fig.8 ビスフェノールA添加後のテストステロン合成関連遺伝子発現の変化
各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

D . 考察

テストステロンはほとんどがライディッチ細胞で産生され、その後すみやかに、血清中に放出される。一方で精巣内の精細管にパラクラインされて、セルトリ細胞の機能維持や生殖細胞の成熟と分化に本質的な役割を果たす。従って、テストステロン合成への影響を明らかにすることは、精巣障害の機構を明らかにする上でも重要である。

今回観察されたのは、以下の通りである。

- 1) 細胞毒性は、塩化トリメチルスズ > ビスフェノールA > MEHP > 2,4-D であった
- 2) 低濃度領域でプロゲステロンやテストステロンの合成を抑制した化学物質はなかった
- 3) 高濃度の化学物質曝露においては、すべての化学物質によりプロゲステロン濃度は上昇した。テストステロン濃度も上昇傾向を示したが、用いた最高濃度においては元のレベルに戻る場合が多かった
- 4) ビスフェノール A を除いて、曝露濃度が上昇に伴い、プロゲステロンに対するテストステロンの濃度が減少した。即ち、高濃度領域ではプロゲステロンに至る過程よりもプロゲステロンからテストステロンに至る過程の合成抑制が強いことが予想された
- 5) ビスフェノールAは 0.033mM の曝露濃度でプロゲステロンに対するテストステロンの合成を誘導していた
- 6) MEHP によるテストステロン合成の低下には CYP11A、CYP17 および 3 β HSD の遺伝子発現が、ビスフェノールA 曝露によるテストステロン合成の誘導には StAR と 17 β HSD の遺伝子発現が関与していることが推測された
- 7) コレステロールの *de novo* 合成に関わる遺伝子は化学物質投与の影響を受けやすいが、テストステロン濃度には大きな影響を与えないことが推測された

私達は昨年度に DEHP の投与実験を行った。その結果、DEHP 投与はライディッチ細胞の CYP17 の発現を低下させることを報告した。この結果は今回の培養細胞を用いた結果とよく一致する。CYP17 の発現の低下は PPAR α のリガンドである MEHP により抑制され、リガンドではないビスフェノール A 曝露による影響は受けていないので、PPAR α に関連した作用かもしれない。実際、別の実験で、PPAR α ノックアウトマウスの CYP17 の発現が野生型マウスより有意に低いことを確認している。他の化学物質によっても CYP17 活性あるいは mRNA 発現の低下と血清テストステロン値の低下が観察されることが報告されている。例えば、肝臓毒として知られているノジュラリン（アオコ毒の 1 種）はラットの精巣と血清のテストステロンを低下させ、CYP17 の活性も低下させることが報告されている（Park et al., *Molecular Carcinogenesis* 2002）。CYP17 は DEHP の様な化学物質の影響を受けやすいのかもしれない。

DEHP の血清テストステロン濃度への影響に関する報告は多く、殆どがその濃度を低下させるというものである。Akingbemi らはラットに DEHP を投与し、テストステロン合成への影響を検討した（*Biol Reproduction* 2001）。胎仔期に投与した場合 21 日と 35 日齢ラットにおいて有意に血清テストステロンレベルが低下したが、90 日齢ではコントロール群と差が認められなかった。21 日齢のラットに DEHP を 2 週間曝露すると、血清中のテストステロンレベルは変化しないが、ライディッチ細胞のテストステロン合成能は低下した。この場合、CYP11A, 3 β HSD, CYP17, 17 β HSD の活性が濃度依存的に低下していた。今回の実験において、17 β HSD を除くこれらの酵素の mRNA の発現は低下傾向を示していたので、活性の

低下は DEHP 曝露による遺伝子発現の低下によるかもしれない。

CYP17 は 2 種の酵素活性を有す。即ち、17 α -hydroxylase と C₁₇₋₂₀ lyase である。両方の活性が抑制されるのか、あるいは片方なのか、今回は活性を測定していないので不明である。今後の検討課題である。

ビスフェノール A 曝露によっては、テストステロンは変わらないとする報告 (Kawai et al., Environ Health Perspect 2003; Takahashi and Oishi Food Chem Toxicol 2003) と増加するという報告 (Williams et al., Human Repro Update 2001) がある。Williams らは生後 2 日のラットに 12 日間ビスフェノール A を与え、18 日目に血清テストステロン濃度を測定した。その結果テストステロン濃度が 2 倍上昇していることを確認した。このテストステロン上昇には StAR あるいは 17 β HSD の遺伝子発現が関与しているかもしれない。一方、Kawai らは胎仔期のマウスに母獣を経由で、Takahashi と Oishi は成熟ラットあるいはマウスにビスフェノール A を与えたが、血清のテストステロンには影響を与えないことを報告している。投与時期によって得られる結果が異なるのか、あるいは動物種の差異によるのか、さらに検討が必要であろう。このようにして、ビスフェノール A と MEHP ではテストステロン合成系に与える影響は異なる様である。

E . 結論

内分泌かく乱作用が疑われている化学物質のテストステロン合成に関わる遺伝子発現への影響をマウスライディヒ腫瘍細胞を用いて検討した。テストステロン合成の低下には CYP11A, CYP17, 3 β HSD が、誘導には StAR, 17 β H S D の遺伝子発現が関与しているかもしれない。内因性のコレステロール合成も影響を受けるが、テストステロンのレベルには大きな影響を与えないと思われる。

Effects of probable endocrine disruptors on cholesterol and/or testosterone synthesis in mouse Leydig tumor cells

Nakajima T, Ichihara G, Kamijima M, Yamanoshita O and Miyata M.

Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University
Graduate School of Medicine

We investigated the effects of monoethylhexyl phthalate (MEHP), di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), bisphenol A, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and trimethyltin chloride on testosterone synthesis in mouse Leydig tumor cells. None of these endocrine disrupting chemicals decreased the levels of progesterone and testosterone at lower concentrations. In contrast, all increased progesterone level at higher concentrations. These chemicals also increased testosterone levels at higher concentrations, but testosterone returned to the control level at the highest concentration. All chemicals except bisphenol A decreased the rates of testosterone to progesterone production dose-dependently; bisphenol A increased the rate at the middle concentration. These results suggest that the chemicals other than bisphenol A suppress the process of progesterone to testosterone production more than that to progesterone production, whereas bisphenol A increases the process of the former. Quantitative real time PCR analyses showed that expression of CYP11A (cytochrome P450_{sc}), CYP17 (cytochrome P450_{17 α} : 17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ lyase) and 3 β HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ 5 β -4-isomerase) genes may be involved in testosterone suppression by MEHP, whereas expression of StAR (steroidogenic acute regulatory protein) and 17 β HSD (17 β -hydroxysteroid dehydrogenase) genes is involved in the induction by bisphenol A. Genes involved in cholesterol *de novo* synthesis such as HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase were influenced by exposure to the endocrine disruptors, which might not play an important role in the synthesis of testosterone in Leydig cells.