

ビスフェノール A 膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究

研究者 船江 良彦（大阪市立大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨

化学物質による内分泌攪乱作用は、生殖器系だけでなく中枢神経系へも影響を及ぼしている事が憂慮されており、この影響は甲状腺ホルモン作用を攪乱する事により引き起こされる事が報告されている。脳機能の正常な発達に必須な甲状腺ホルモンの作用が化学物質によって攪乱される機序を解明する事は、行動異常や学習障害との関連性を明らかにする上で重要な課題である。我々はこれまでに、ビスフェノール A (BPA) の標的タンパク質としてプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) を単離・精製し、PDI に対するトリヨードサイロニン (T_3) の結合が BPA をはじめとするフェノール基含有化合物によって阻害される事を明らかにしてきた。これらの化学物質は PDI を介して甲状腺ホルモン作用に影響を及ぼしている事が考えられた。

本年度は、PDI に対する結合性と甲状腺ホルモン作用への影響との関係を、ラット下垂体由来 GH3 細胞を用いて比較・検討した。GH3 細胞は甲状腺ホルモン応答性の細胞増殖及び成長ホルモン (GH) 産生が誘導される事から、これらの化学物質による甲状腺ホルモン依存的な反応への影響を評価する上でよいモデルになりうると考えた。その結果、BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ノニルフェノールが GH3 細胞の細胞増殖促進性を、また 4-オクチルフェノールは促進・阻害の両活性を示す事が明らかになった。一方、GH 産生への影響について検討したところ、BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ノニルフェノール, ペンタクロロフェノールが GH 産生阻害性を示した。

これらの事から、PDI に対して T_3 の結合阻害活性を示す化学物質は、 T_3 依存的な生体反応に影響をもたらしている事が明らかになった。従って、PDI に対する T_3 の結合阻害活性を指標にスクリーニングする事により、様々な甲状腺ホルモン作用への影響を網羅でき得ると考えられた。

研究協力者

今岡 進（関西学院大学理工学部 教授）
長田真優子（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）
吉田 徳之（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）
岡田 和嗣（大阪市立大学大学院医学研究科 大学院生）

A. 研究目的

平成 14 年度の研究において、我々は BPA の中枢神経系への作用メカニズムを明らかにするべく、標的タンパク質の単離・精製を行った。その結果、ラット脳シナプトゾーム画分に存在する BPA 結合タンパク質が PDI である事を同定した。PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としての機能を有する。甲状腺ホルモンは脳の正常な発達において非常に重要な役割を果たしており、甲状腺ホルモン機能の障害は、重篤な悪影響をもたらす。BPA は PDI の T_3 結合部位に作用し、甲状腺ホルモン作用に影響を与えているのではないかと考え、競合的結合阻害試験を行ったところ、BPA は T_3 の結合を阻害する事が明らかになった。さらに、平成 12-13 年度に環境省においてリストアップされた「優先してリスク評価に取り組む物質」の 20 種類について同様の試験を行った結果、4-オクチルフェノール, *p*-ノニルフェノール, ペンタクロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノールが T_3 の結合阻害活性を有する事が明らかになった。こ

これらの化学物質は、PDI に対して T_3 結合を阻害することで、甲状腺ホルモン作用に影響を与えている事が示唆された。そこで本年度の研究では、これらの化学物質の甲状腺ホルモン作用への影響を調べるために、ラット下垂体由来 GH3 細胞を用いた検討を行った。ラット下垂体由来 GH3 細胞は、甲状腺ホルモン応答性の細胞増殖、および GH 産生・放出を行う事が知られている。これらの生体応答への影響を指標に「優先してリスク評価に取り組む物質」が及ぼす作用について評価し、甲状腺ホルモン作用を攪乱しうる化学物質の選定を行う目的で検討を行った。

B. 研究方法

. GH3 細胞の増殖に及ぼす影響

(1) 細胞培養

GH3 細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。

細胞は 15 % ウマ血清, 2.5 % ウシ胎仔血清, 50 units / mL ペニシリン, 50 units / mL ストレプトマイシンを含む Ham ' s F-10 培地で、5 % CO_2 , 湿度 95 %, 37 °C にて培養した。

(2) 甲状腺ホルモン欠乏血清の作製

AG 1-X8 樹脂 (Bio-Rad) を蒸留水で 3 回洗浄した後、血清に 50mg 樹脂 / mL 血清となるように加え、ローテータを用いて 5 時間、室温にて穏やかに混合した。1,000 x g にて 10 分間の遠心分離を行った後、上澄に新しい AG 1-X8 樹脂を 50mg 樹脂 / mL 血清となるように加え、ローテータを用いて 18 時間、室温にて穏やかに混合した。1,000 x g にて 10 分間の遠心分離を行って得られた上澄をさらに 30,000 x g にて 20 分間遠心分離して微粒子を除去したものを甲状腺ホルモン欠乏血清とし、使用するまで -80 °C にて保存した。 T_3 の含量を DELFIA Triiodothyronine Reagents (Perkin Elmar) を用いた EIA 法により測定したところ、処理後の T_3 含量は検出限界濃度以下 (< 0.2 ng / mL) であった。

(3) GH3 細胞増殖試験 (Wst-1 法)

GH3 細胞を 1×10^4 cells / well となるように 24 ウェルマルチプレートに播種した。培養には通常の培養液 (T_n 培地) および甲状腺ホルモンを除去した血清を用いて作製した培地 (T_d 培地) を用いた。24 時間後、各ウェルに被検物質を添加し、7 日間培養した。培養液を除去し、各ウェルに 0.25 mM Wst-1, 0.01 mM 1-methoxy PMS, 1mM HEPES (pH 7.4) を含む T_d 培地を 200 μ L ずつ添加し、5 % CO_2 , 湿度 95 %, 37 °C にて 4 時間インキュベーションした。培地を回収し、690 nm を対照にして 450 nm の吸収を測定して細胞増殖度を算出した。

. GH3 細胞の GH 産生に及ぼす影響

GH3 細胞を 1×10^4 cells / well となるように 24 ウェルマルチプレートに播種した。培養には T_n 培地および T_d 培地を用いた。24 時間後、各ウェルに被検物質を添加し、48 時間培養した。培養液を回収して、3000 x g にて 5 分間の遠心分離を行った後、上澄に含まれる GH 含量を Rat growth hormone EIA (Amersham Bioscience) を用いて定量した。

C. 実験結果

. GH3 細胞の増殖に及ぼす影響

(1) GH3 細胞の増殖に及ぼす T_3 の影響

GH3 細胞を 1×10^4 cells / well となるように 24 ウェルマルチプレートに播種し、24 時間後に被検物質を添加したのち、細胞数を Wst-1 法にて定期的に定量した。その結果、 T_n 培地では 6 日後に最大値を示した (図 1A)。また T_d 培地に T_3 を添加した系では T_3 の濃度依存的な細胞増殖の誘導が見られた (図

1B)

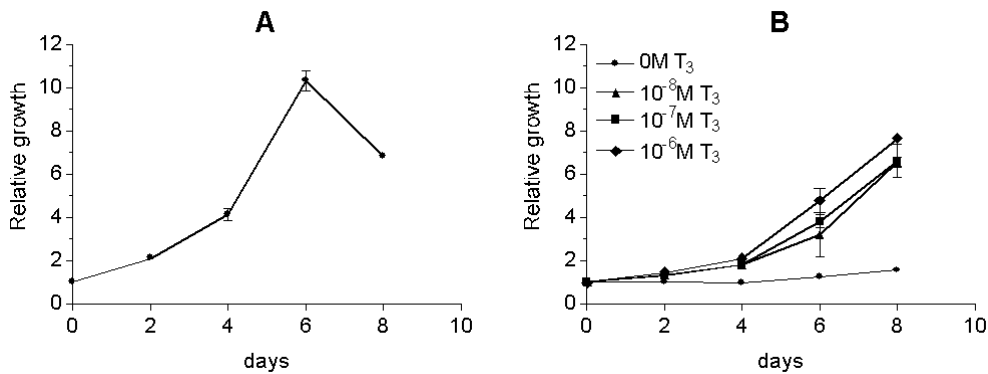


図1 GH3 細胞増殖に及ぼす T₃ の影響 (経時的変化)

(2) GH3 細胞の増殖に及ぼす BPA の影響

T_d 培地に BPA を添加した系では 10⁻⁵ M 以上の濃度において細胞増殖の誘導が見られた (図 2A)。T_n 培地に BPA を添加した系では BPA による影響は見られず (図 2B)、したがって細胞増殖の阻害作用は認められなかった。

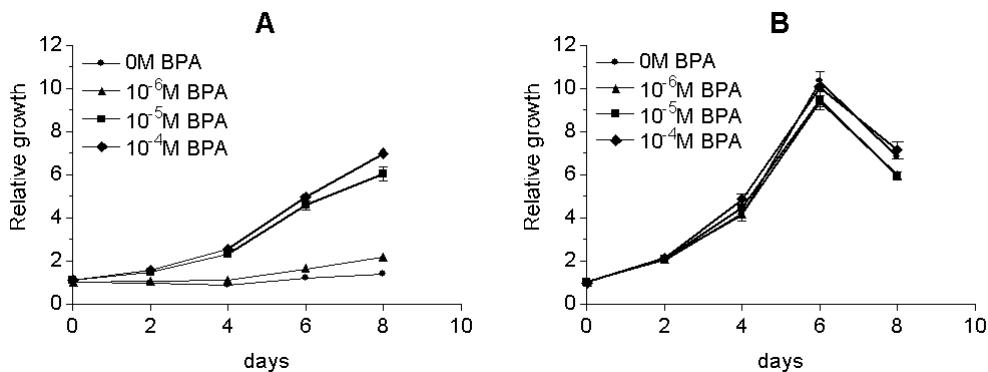


図2 GH3 細胞増殖に及ぼす BPA の影響 (経時的変化)

(3) GH3 細胞増殖に及ぼす内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の影響

内分泌攪乱性が疑われる化学物質について、GH3 細胞の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。まず、細胞増殖の抑制作用について検討するため、T_n 培地に各種化学物質を添加し、7 日後に細胞数を定量した。なお、細胞増殖度は試験物質を加えない系での 7 日後の測定値を 1 とし、相対値で示した。その結果、4-オクチルフェノールにおいてのみ抑制作用が見られた (図 3)。一方、トリブチルスズとトリフェニルスズにおいては 24 時間後に全細胞の死滅が観察されたため、これらは細胞毒性によるものと判断した。

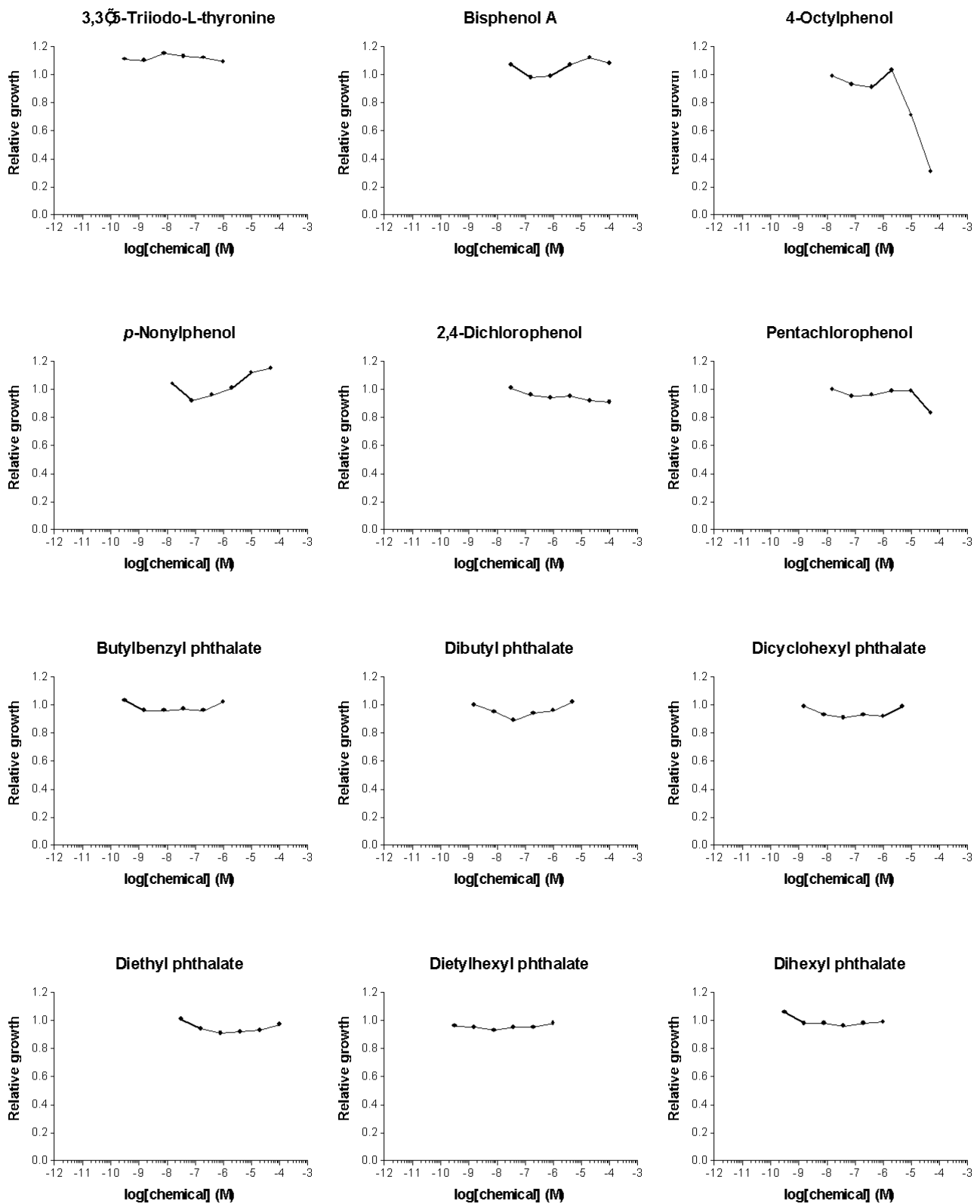


図3 化学物質のGH3細胞増殖抑制作用(その1)

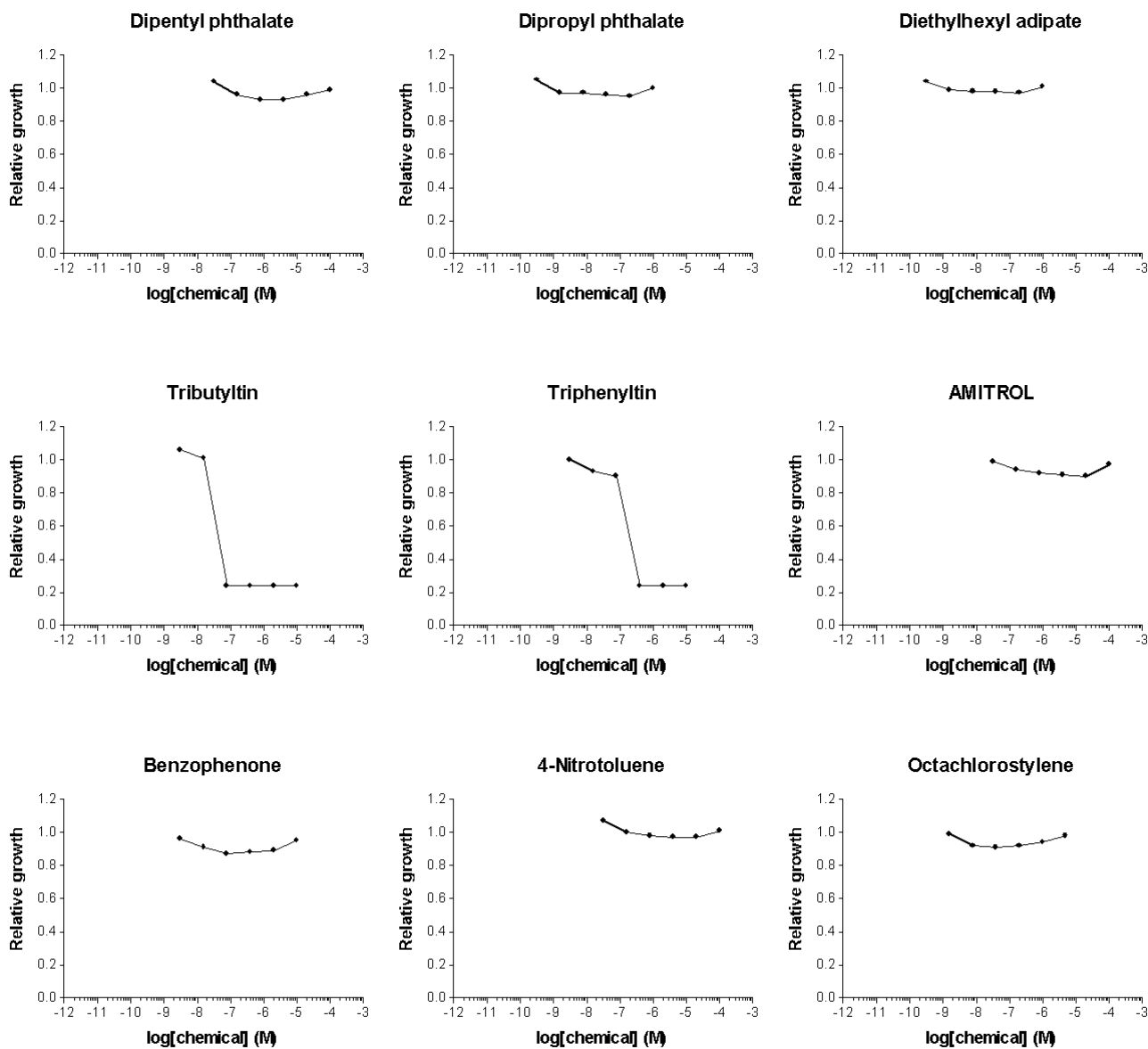


図3 化学物質のGH3細胞増殖抑制作用（その2）

次に、化学物質による細胞増殖の促進作用を検討するため、 T_0 培地に被検物質を添加し、7日後に細胞数を定量した。なお、細胞増殖度は被検物質を加えない系での7日後の測定値を1とし、相対値で示した。その結果、*p*-ノニルフェノール、BPAに明らかな増殖促進作用が見られた（図4）。また、4-オクチルフェノールにおいても弱いながらも促進作用が見られた。

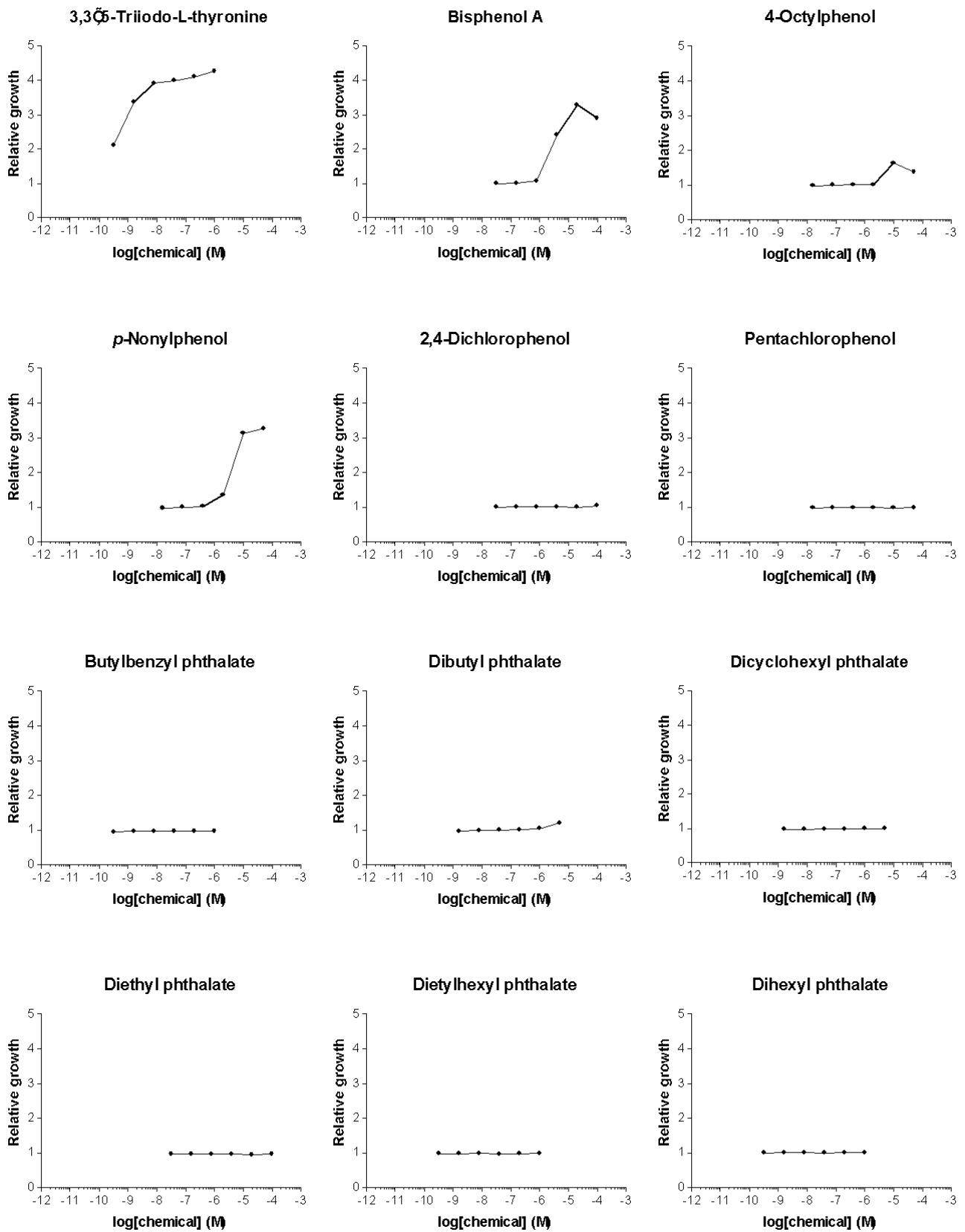


図4 化学物質のGH3細胞増殖促進作用(その1)

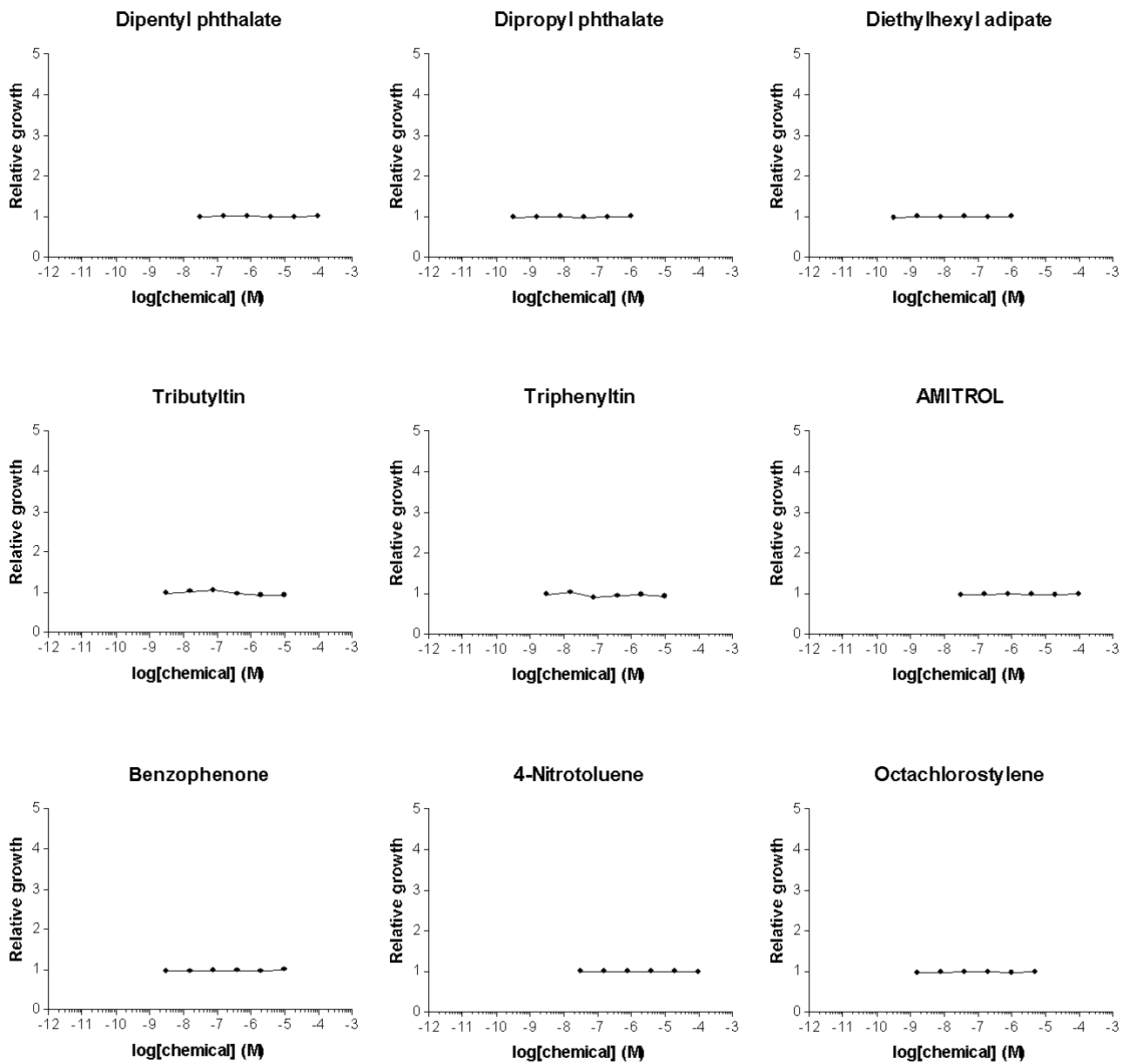


図4 化学物質のGH3細胞増殖促進作用(その2)

(4) GH3 細胞増殖に及ぼす 17 β -エストラジオールの影響

17 β -エストラジオール (E_2) の GH3 細胞の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。T₀培地に E_2 を添加し、7 日後に細胞増殖度を測定した。その結果、 E_2 の濃度依存的な細胞増殖の促進が見られた (図 5)。

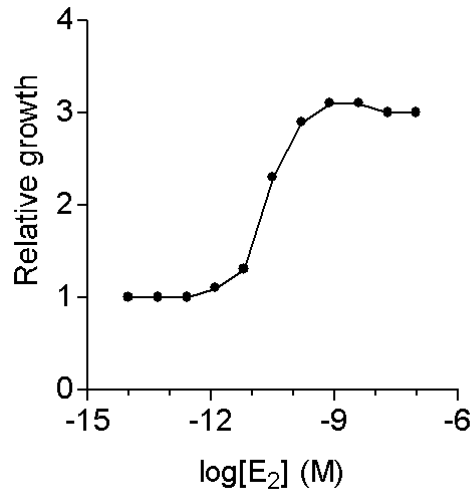


図 5 E_2 の GH3 細胞増殖促進作用

(5) GH3 細胞増殖誘導に及ぼす ICI 182,780 の影響

これまでの結果から、T₃ と E_2 がともに増殖促進作用を示したことから、 E_2 のアンタゴニストである ICI 182,780 による阻害性について検討を行った。

10 nM T₃, 10 nM E_2 , 10 μ M BPA を含む T₀培地に ICI 182,780 添加し、7 日後に細胞数を定量した。なお、細胞増殖度は ICI 182,780 を加えない系での 7 日後の測定値を 1 とし、相対値で示した。その結果、T₃, E_2 , BPA の全ての増殖促進作用が ICI 182,780 により濃度依存的に抑制された (図 6)。

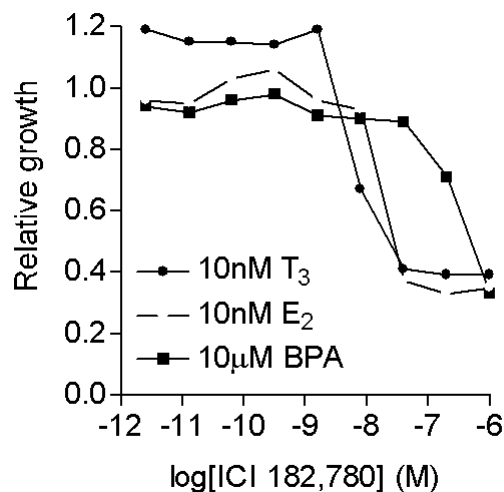


図 6 ICI 182,780 の GH3 細胞増殖抑制作用

GH3 細胞の成長ホルモン産生に及ぼす影響

T₀培地に被検物質を添加し、2日後のGH産生量を測定した。T₃は濃度依存的にGH産生を誘導し、10⁻⁸ M付近で最大となった(図7)。一方、E₂ではGH産生の誘導性はみられなかった事から、GH3細胞のGH産生誘導はE₂依存的ではない事が分かった。また、BPAについてもGH産生の誘導性は見られなかった。

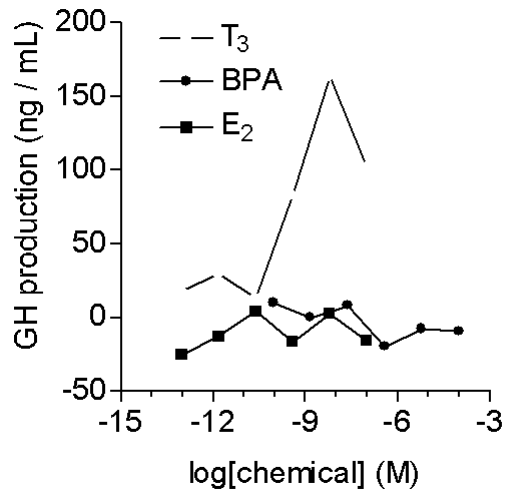


図7 GH3 細胞のGH産生に及ぼす影響

次に、4-オクチルフェノール、*p*-ノニルフェノール、ペンタクロロフェノール、2,4-ジクロロフェノールを対照に GH 産生の誘導性について検討したが、いずれの化学物質も GH 産生誘導への影響はみられなかった (図 8)。

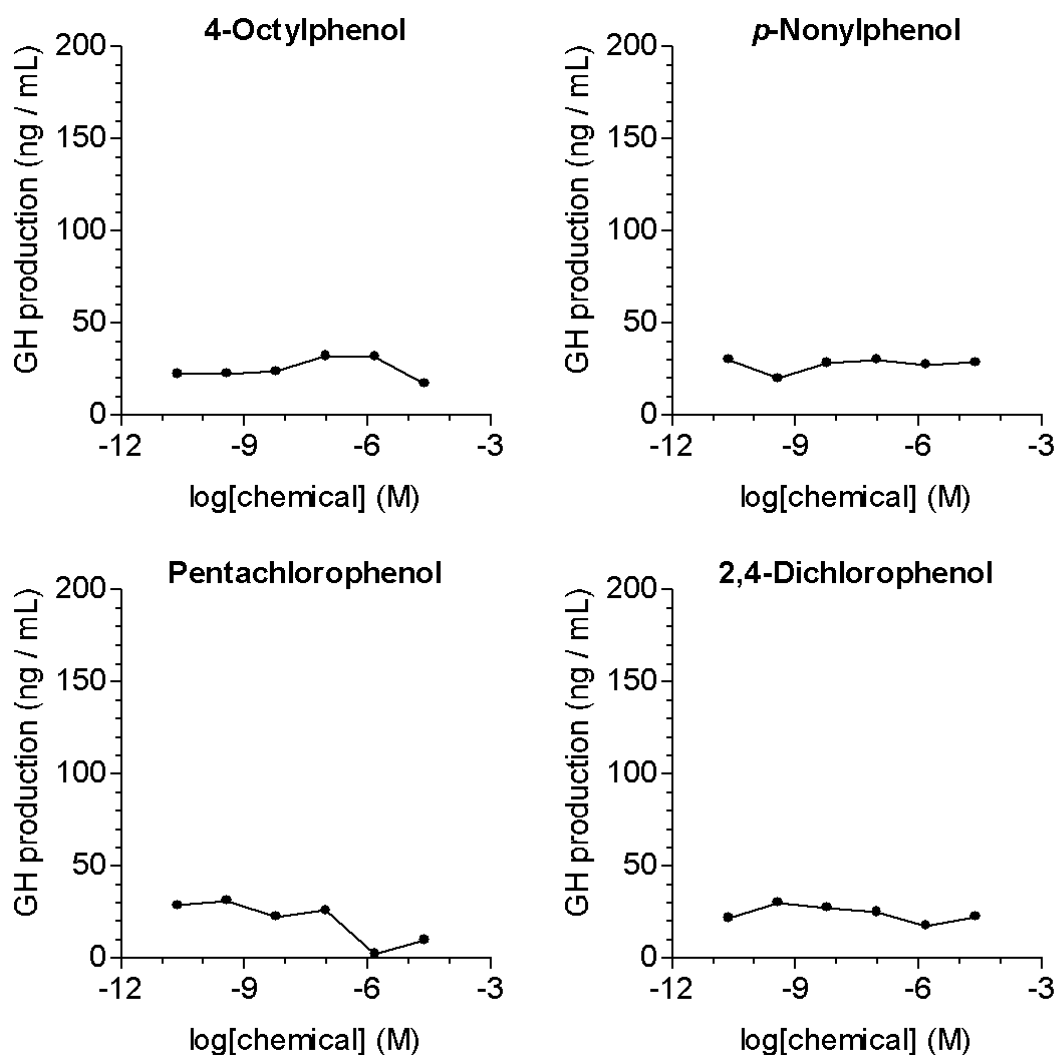


図 8 化学物質の GH 産生促進作用

次に、GH 産生の阻害性について調べるため T_d 培地に 10^{-8} M T_3 を添加した系に被検物質を加え、GH の定量を行った (図 8)。

T_3

10^{-10} - 10^{-8} M の範囲で GH 産生の誘導が見られたが、 10^{-7} M になると抑制が見られた。

4-Octylphenol

低濃度領域 (10^{-11} - 10^{-9} M) と高濃度領域 ($> 10^{-4}$ M) において GH 産生の抑制が見られた。

p-Nonylphenol

低濃度領域 ($< 10^{-11}$ M) と高濃度領域 ($> 10^{-4}$ M) において GH 産生の抑制が見られた。

Pentachlorophenol

低濃度領域 ($< 10^{-10}$ M) と高濃度領域 ($> 10^{-5}$ M) において GH 産生の弱い抑制傾向が見られた。

BPA

低濃度領域 (10^{-11} - 10^{-10} M) と高濃度領域 ($> 10^{-4}$ M) において GH 産生の抑制が見られた。

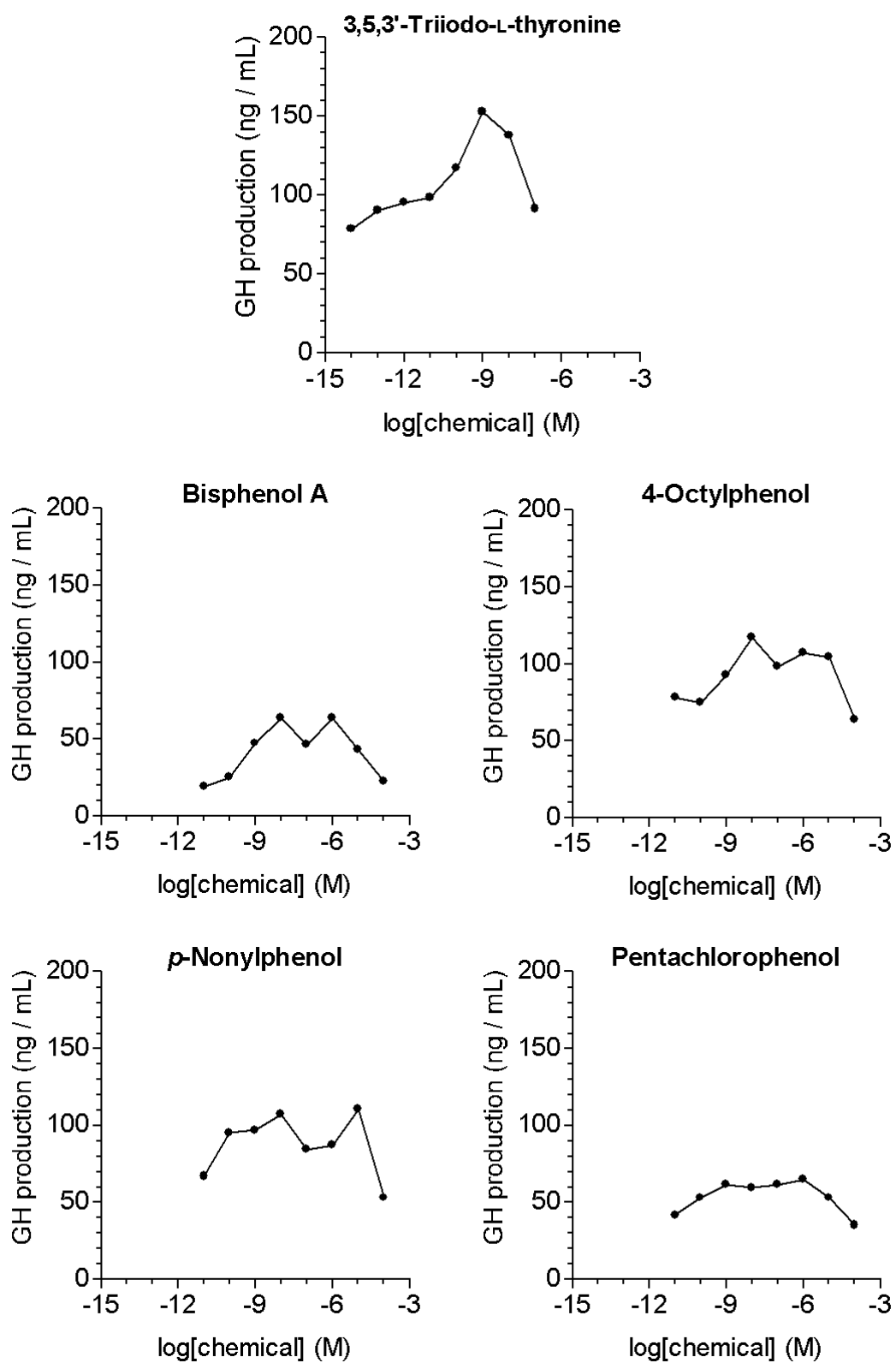


図9 化学物質のGH産生抑制作用

D. 考察

・GH3 細胞の増殖に及ぼす影響

平成 14 年度の研究成果において、BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノール, ペンタクロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノールが PDI に対する T_3 の結合阻害活性を有する事が明らかになったことから、これらの化学物質は T_3 依存的な作用に影響を及ぼしている事が示唆された。そこで本年度は、GH3 細胞の T_3 依存的な細胞増殖、及び GH 産生に及ぼす影響について検討した。

今回試験した化学物質のうち、4-オクチルフェノールのみが GH3 細胞の細胞増殖を阻害した。一方、誘導性を示したのは、BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノールであった。4-オクチルフェノールは促進・阻害の両作用が見られたが、これは T_3 のアゴニスト・アンタゴニストの両活性を併せ持つためであると考えられる。これらの化学物質は GH3 細胞において T_3 の作用に影響を及ぼす事が明らかになった。しかし、GH3 細胞の細胞増殖は E_2 においても誘導された事から、GH3 細胞の細胞増殖には T_3 だけでなく E_2 も作用している事が明らかになった。従って、これらの化学物質が甲状腺ホルモン作用、あるいはエストロゲン作用のいずれを模倣 / 阻害するのかが明らかにする事ができなかった。さらに E_2 のアンタゴニストである ICI 182,780 による阻害性について検討したところ、ICI 182,780 は E_2 の作用だけでなく T_3 の作用をも阻害する事が明らかになった。従って、ICI 182,780 は E_2 のアンタゴニスト活性だけでなく、 T_3 のアンタゴニストとしての活性も有する、すなわち ICI 182,780 のアンタゴニスト活性は E_2 と T_3 とで重複している事が考えられる。これらの関係は今後、化学物質のホルモン作用への影響を検討する上でも明らかにするべきである。

また、PDI に対して T_3 の結合阻害活性が見られたが、細胞増殖には影響しない化学物質として、ペンタクロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノールが挙げられた、これらの化学物質は他の T_3 作用に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

・GH3 細胞の成長ホルモン産生に及ぼす影響

BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノール, ペンタクロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノールについて GH3 細胞の T_3 依存的な GH 産生に及ぼす影響について検討した。今回試験した化学物質の中ではいずれの化学物質も GH 産生の促進作用は認められなかったが、BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノール, ペンタクロロフェノールに阻害作用が認められた。さらにその用量反応は典型的なシグモイド曲線ではなく、二相性の反応を示した。 T_3 においても高濃度 (10^{-7} M) では抑制作用が見られた事から、GH3 細胞の GH 産生への作用には濃度の臨界域があると考えられる。

E. 結論

BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノール, ペンタクロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノールは PDI に対する T_3 の結合を阻害する。

4-オクチルフェノール, BPA, *p*-ニルフェノールは GH3 細胞の細胞増殖促進性を示した。4-オクチルフェノールは促進・阻害の両活性を示した。

BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノール, ペンタクロロフェノールは GH3 細胞の GH 産生阻害性を示した。

これらの化学物質は PDI を介してホルモン攪乱作用を示す事が示唆された。

Effect of environmental chemicals on thyroid hormone action in GH3 cell

**Yoshihiko Funae, Professor
Osaka City University Medical School,**

Key Word : bisphenol A, protein disulfide isomerase, thyroid hormone, GH3 cell

Abstract :

Environmental chemicals have been known to affect not only reproduct systems but also central nervous systems, which is caused by disruption of thyroid hormone action. In order to clarify their relevance to behavior disorder or learning disorder, it is important to elucidate the mechanism of disrupting activity of environmental chemicals toward thyroid hormone action, essential for normal development of brain function. Previously, we isolated and purified the novel bisphenol A (BPA) binding protein, protein disulfide isomerase (PDI), and characterized that the triiodothyronine (T₃) binding was inhibited by phenolic compounds including BPA. These chemicals may interfere the function of thyroid hormone via PDI.

In this study, to compare their binding activity toward PDI with their effect on thyroid hormone action, we investigated the thyroid hormone disrupting activity using GH3 cells, a rat pituitary cell line which grow and produce growth hormone (GH) depending on physiological concentrations of thyroid hormone. The cell growth is induced by the treatment of BPA, 4-octylphenol, and *p*-nonylphenol. 4-Octylphenol have both facilitating and inhibition activity. The GH production was inhibited by BPA, 4-octylphenol, *p*-nonylphenol, and pentachlorophenol.

It was clarified that the chemicals which have displacing activity of T₃ toward PDI is affect T₃ dependent thyroid hormonal action.

