

5. 重金属化合物による内分泌攪乱作用の機序に関する研究

研究者 姫野 誠一郎(北里大学薬学部助教授)

研究要旨

重金属化合物が内分泌攪乱作用を示すかどうかを検討するため、ヒト乳癌由来細胞である MCF7 に estrogen response element-luciferase を導入した ME1 細胞、及びヒト前立腺癌由来細胞である LNCaP に androgen response element (ARE)-luciferase を導入した LA16 細胞を樹立した。検討した 26 種類の重金属化合物のうち、tributyltin (TBT), triphenyltin (TPT) が androgen receptor (AR) を介した転写を活性化することにより LA16 細胞を増殖させることを見いだした。また、TBT, TPT は dihydrotestosterone (DHT) による AR の転写活性化をさらに増強した。従って、TBT, TPT は哺乳動物細胞に対してもオス化作用を示す可能性が示唆された。しかし、TBT, TPT の作用は AR と ligand との結合に対する antagonist である flutamide によっては阻害されなかったことから、AR の ligand binding domain とは異なる作用点に TBT, TPT が作用している可能性が示された。一方、LNCaP 以外の前立腺癌由来細胞株である PC3, DU145 に AR 発現 plasmid 及び ARE-luciferase を導入した後、TBT, TPT を作用させた場合には、AR を介した転写の活性化が起こらなかったことから、LNCaP 特異的に存在する何らかの factor が TBT, TPT による AR の転写活性化を促進している可能性が示唆された。

研究協力者

四條裕香子 (北里大学薬学部助手)

星埜 梓 (北里大学薬学部大学院生)

A. 研究目的

現在、多くの化学物質による内分泌攪乱作用が注目されており、わが国においても、環境省による「環境ホルモン戦略計画 SREED'98」の中で、内分泌攪乱作用を持つと疑われる 65 物質がリストされており、うち約 40 物質についてミレニアムプロジェクトにより平成 12 年度より 3 年計画でリスク評価を開始している。65 物質の中に、トリブチルスズ、トリフェニルスズなどの有機スズ化合物が含まれており、イボニシ貝などの巻貝において、メスの生殖器の雄化現象を起こすことが報告されている。しかし、その作用機序はいまだに不明であり、また、哺乳類を含む他の生物でこのようなオス化が起こるのかも十分に検討されていない。

また、上記の 65 物質以外に内分泌攪乱作用が疑われる物質として Cd, Hg, Pb が追記されているが、これらの金属化合物について、内分泌攪乱作用に注目してその量-影響関係や作用機

序について系統的に検討した研究は行われていない。

そこで、本研究はまず、オス化作用、メス化作用を検出する in vitro の系を確立し、金属化合物が内分泌攪乱作用を示すかどうかを検討した。その結果、androgen に応答して増殖する細胞株である LNCaP 細胞を tributyltin (TBT), triphenyltin (TPT) が増殖させることを見いだした。そこで、本年度は、TBT, TPT が LNCaP 細胞を増殖させる機構を解明するため、様々な解析を行った。

B. 研究方法

1. in vitro screening 系の確立

ヒト乳癌由来の MCF7 細胞、及びヒト前立腺癌由来の LNCaP 細胞を、活性炭処理した fetal calf serum を 10% 含む RPMI 1640 培地で培養した。また、androgen response element (ARE) の下流に luciferase を連結した plasmid を LNCaP 細胞に導入して stable transformant (LA16) を樹立した。同様に、MCF7 に estrogen response element-luciferase を導入した stable transformant (ME1) を樹立した。上記の LA16 細胞、及び

ME1 細胞の培地に 26 種類の金属化合物を様々な濃度で添加し、細胞増殖と androgen receptor (AR)、あるいは estrogen receptor (ER) を介した転写活性に及ぼす影響を調べた。細胞増殖は MTT 法により計測した。AR あるいは ER の転写活性は luciferase 遺伝子転写産物の化学発光により計測した。positive control として、ME1 には estradiol、LA16 には dihydrotestosterone (DHT) を作用させた。

2. 有機スズ化合物による AR 依存的転写活性の検討

2-1. Thymidine の取り込み

LA16 細胞の培地に TBT (100 nM), TPT (1 nM), DHT (10 nM) を添加して 52 時間培養後、培地に 3H-thymidine を添加し、さらに 20 時間培養後、細胞を溶解し、細胞への thymidine の取り込みを 3H の放射活性として計測した。

2-2. AR の発現に及ぼす影響

TBT, TPT が AR の発現そのものに影響を与えているかどうかを検討するため、LA16 細胞を TBT (100 nM), TPT (1 nM), DHT (10 nM) で 72 時間処理した後、total RNA を抽出し、Northern blot 分析により AR の mRNA レベルを調べた。

2-3. AR の下流の遺伝子の発現

LA16 細胞を TBT (100 nM), TPT (1 nM), DHT (10 nM) で 72 時間処理した後、total RNA を抽出し、Northern blot 分析により AR によって転写活性化されることが知られている prostate specific antigen (PSA) の mRNA レベルを調べた。

2-4. TBT, TPT と DHT の相互作用

LA16 細胞の培地に DHT (10 nM) と TBT (100 nM), DHT と TPT (1 nM) を同時に添加し、それぞれを単独で添加したときの luciferase の活性化と比較した。

2-5. TBT, TPT の代謝

LA16 細胞の培地に TBT (100 nM), TPT (1

nM) を 72 時間添加後、細胞を回収し、GC/MIP/AED 法により TBT, TPT の各代謝物の濃度を分別定量した。

3. LNCaP 以外の前立腺癌細胞株を用いた検討

LNCaP 細胞の内在性 AR は 1 アミノ酸変異 (877Thr→877Ala) を有する mutant (mut) AR であることが報告されている。一方、ヒト前立腺癌由来の PC3 細胞および DU145 細胞においては内在性 AR の発現が認められないことも分かっている。そこで、PC3 細胞および DU145 細胞に ARE-luciferase と同時に、mut AR 発現 plasmid あるいは wild type (wt) AR 発現 plasmid を導入した後、AR を介した転写活性化に対する TBT の影響を、TBT 単独処理の場合と DHT と併用した場合のそれぞれについて検討した。

C. 研究結果

1. in vitro screening の結果

26 種類の金属化合物を ME1 細胞の培地に添加し、細胞増殖、ER の転写活性に及ぼす影響を検討した結果、いずれの金属化合物も促進的な効果を示さなかった(表1)。一方、LA16 細胞に金属化合物を作用させた場合、Zn, As, Sb, Pb が AR を介した転写を活性化した(表2)。しかし、これらの金属は LA16 細胞の増殖を起こすことはなかった。これに対し、TBT (100 nM), TPT (1 nM) は、AR を介した転写を活性化するとともに、細胞を増殖させた(図1)。その程度は、1 nM の DHT による作用とほぼ同じレベルであった。

2. 有機スズ化合物による AR 依存的転写活性に対する影響

TBT, TPT を LA16 細胞に作用させると、thymidine の取り込みが増加することから、TBT, TPT は確かに LA16 細胞の DNA 合成を促進することにより細胞増殖を起こしていることが確認された。TBT, TPT が AR の発現を亢進させることにより AR 依存的な転写を活性化している可能性もあるので、AR の mRNA レベルに及ぼす TBT, TPT の影響を検討した。その結果、細胞増殖を起こす濃度の TBT, TPT を培地に添加し

ても、AR の mRNA レベルは変化しないことがわかった。また、TBT, TPT 添加によって reporter gene である luciferase の活性化のみならず、PSA の mRNA レベルが上昇していたことから、これらの化合物が AR を介した内在性の遺伝子の転写も活性化していることが確認できた。

dibutyltin (DBT), diphenyltin (DPT) は LA16 細胞の増殖も luciferase の活性化も起こさなかった。一方、TBT, TPT を取り込ませた LA16 細胞の有機スズ化合物の化学形を調べた結果、それぞれ TBT, TPT 以外の代謝物はほとんど検出されなかったことから、AR を介した転写を活性化する作用は、トリアルキル体の有機スズによるものと考えられる。

一方、DHT と TBT, DHT と TPT を同時に培地に添加した場合、それぞれの化合物を単独で添加した場合より、さらに AR 依存的転写活性が増強された。また、AR に ligand が結合するのを阻害する antagonist である flutamide は、DHT による AR 依存的転写活性を阻害したが、TBT, TPT による AR の転写活性には影響を及ぼさなかった(図2)。

3. LNCaP 以外の前立腺癌細胞株に対する影響

LNCaP 細胞の内在性 AR と同じ変異をもつ mut AR を強制発現させた LNCaP 細胞に TBT を添加すると、TBT の濃度依存的に AR を介した転写が活性化された。またそのとき DHT を共存させると、TBT は DHT による転写の活性化をさらに増大させた。しかし、wt AR を発現させた LNCaP 細胞では、DHT 存在下で TBT 処理をした場合にのみ TBT による転写活性化作用が認められた。一方、PC3 や DU145 を用いて同様の検討を行ったが、wt AR あるいは mut AR のいずれの plasmid を発現させた場合にも TBT 単独処理による AR の転写活性化、及び DHT との併用による転写活性化の増強作用は観察されなかった。

D. 考察

本研究で確立した ME1, LA16 の両細胞株は、性ホルモン依存的な細胞の増殖と転写の活性化を同じ細胞で検討することができる。この細胞

株を用いて、オス化、あるいはメス化作用を示す金属化合物を検索した結果、すでにイボニシ貝のオス化を誘発することが報告されている有機スズ化合物である TBT と TPT が前立腺癌由来の LA16 細胞を増殖させ、AR 依存的な転写を活性化することがわかった。この作用は、DBT, DPT では認められず、また、TBT, TPT を取り込ませた細胞に DBT, DPT は検出されなかったことから、トリアルキルスズ化合物に特異的な作用と考えられる。LA16 細胞はトリアルキルスズを脱アルキル化する作用が弱い可能性があるが、逆に言えば、そういう性質を持つ細胞株を用いたために、TBT, TPT の AR に対する作用を検出できた可能性がある。

また、TBT, TPT は、AR の発現そのものには影響を与えないこと、luciferase だけでなく、PSA の mRNA レベルも上昇させることを確認した。従って、TBT, TPT は AR を介した転写を活性化することにより、LA16 細胞の増殖を誘発しているものと考えられる。

ところで、TBT, TPT の作用が flutamide によって阻害されなかったことから、TBT, TPT が AR の ligand binding domain 以外に作用している可能性が示唆された。また、DHT の作用を TBT, TPT が相乗的に増加させたことから、異なる作用点の存在が示唆される。これまで報告されている内分泌攪乱物質は、そのほとんどがホルモン受容体に直接結合することで、作用するものであった。もし、TBT, TPT による AR を介した転写の活性化機構を明らかにすることができれば、内分泌攪乱物質の新しい作用点を見いだすことにもなり、新たな screening 系の開発にもつながる。この点については、今後の検討課題である。

一方、LNCaP の AR には変異が存在することが知られており、その変異のために ligand に対する反応性が変化していることも報告されている。そこで、LNCaP に mut AR と wt AR を ARE-luciferase とともに transient に導入し、TBT の影響を検討したところ、mut AR を導入したときのみ TBT 処理による AR の転写活性化が起こった。一方、wt AR を導入した場合には、DHT の作用を TBT が増強したが、TBT 単独での作用は認められなかった。従って、TBT が AR の転写活

性を増大させる際に、AR のアミノ酸変異が何らかの関与をしているものと考えられる。しかし、DHT の作用を TBT が増強する場合には、AR の変異は関係していないと考えられ、複雑な作用機序が推定された。

また、PC3, DU145 に ARE-luciferase とともに mut AR を導入しても、TBT による AR の転写活性化は観察されなかった。従って、TBT による AR を介した転写の活性化及び細胞増殖の促進は LNCaP 細胞に特異的な現象であり、LNCaP 細胞には TBT が標的とする細胞特異的因子が存在する可能性が示唆された。この因子を同定することができれば、有機スズ化合物の作用点の解明にもつながるものと考えられ、今後検討を行う予定である。

これまで、有機スズによる内分泌攪乱作用は、androgen を estrogen に変換する aromatase に対する阻害作用によるものと推測されてきた。しかし、巻貝の imposex などの現象がそれだけで説明できるかどうかいまだに明らかではない。また、巻貝以外の動物、特に哺乳類に対する有機スズ化合物の内分泌攪乱作用は十分には検討されていない。本研究は、有機スズ化合物が哺乳動物に対してもオス化作用を示す可能性があることを初めて示したものである。その機構として、TBT, TPT が AR を介した転写活性を増大させることを示した。しかし、その機構を解明するには、さらに詳細な検討が必要と思われる。

E. 結論

金属化合物のうち、TBT, TPT が前立腺癌由来の細胞株 LA16 の細胞増殖を促進した。これは LA16 細胞の AR を介した転写を活性化しているためである。しかし、TBT, TPT の作用点は、AR と ligand 結合部位とは異なっている可能性が高い。また、TBT が AR 依存的な転写を活性化する際、LNCaP 特異的な因子が必要であることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Y. Yamabe, A. Hoshino, N. Imura, T. Suzuki and S. Himeno, Enhancement of androgen-

dependent transcription and cell proliferation by tributyltin and triphenyltin in human prostate cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169, 177-184 (2000)

2. 学会発表

・ヒト前立腺癌細胞 LNCaP における金属化合物のアンドロゲン様作用の解析。四條裕香子、星埜 梓、井村伸正、姫野誠一郎。日本薬学会第 120 年会。

・ヒト前立腺癌細胞におけるトリブチルスズの AR 依存的転写活性化作用の解析。星埜 梓、四條裕香子、井村伸正、姫野誠一郎。日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会。

・有機スズ化合物によるアンドロゲンレセプター活性化作用の解析。星埜 梓、四條裕香子、井村伸正、姫野誠一郎。日本薬学会第 121 年会。

Study on Endocrine Disruption by Metal Compounds --- with Special Reference to Androgenic Action of Organotin Compounds

Seiichiro Himeno, (Kitasato University, School of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor)

To investigate endocrine disruption by metal compounds, we have established two cell lines; ME1 that stably expresses estrogen-responsive luciferase reporter gene and proliferates in response to estrogen, and LA16 that stably expresses androgen-responsive luciferase reporter gene and proliferates in response to androgen. ME1 and LA16 cells were derived from human breast cancer cell line, MCF7, and human prostate cancer cell line, LNCaP, respectively. Among 26 metal compounds examined, tributyltin (TBT, 100 nM) and triphenyltin (TPT, 1 nM) enhanced both AR-dependent transcription of luciferase gene and cell growth of LA16 cells to the same extent as those by 1 nM dihydrotestosterone (DHT). TBT or TPT also enhanced the DNA synthesis and expression of endogenous AR target gene such as prostate specific antigen, but not the expression of AR itself. However, an androgen antagonist, flutamide, did not inhibit the TBT- or TPT-induced AR activation. On the other hand, simultaneous treatment of LA16 cells with DHT and TBT or TPT caused highly enhanced effects on AR activation. These results indicate that trialkyltin compounds have an ability to activate AR-mediated transcription in mammalian cells, and suggest that a novel target site other than the ligand-binding site of AR is involved in this activation. Furthermore, we investigated androgenic effects of TBT in other human prostate cancer cell lines, PC3 and DU145. We transfected both androgen-responsive luciferase reporter plasmid and wild type (wt) or mutant (mut) AR expression plasmid in these cell lines and measured luciferase activity after treatment with TBT in the presence or absence of DHT. TBT activated AR-dependent transcription and stimulated DHT-induced transcription in LNCaP cells transfected with mut AR expression plasmid. However, AR-dependent transcription with or without DHT was not activated by TBT, when wt or mut AR expression plasmid was transfected in PC3 or DU145 cells. These results suggest that TBT activated AR-mediated transcription in LNCaP cells via a specific target factor(s) which may not be expressed in PC3 or DU145 cells.

Key words: tributyltin, triphenyltin, androgen receptor, LNCaP

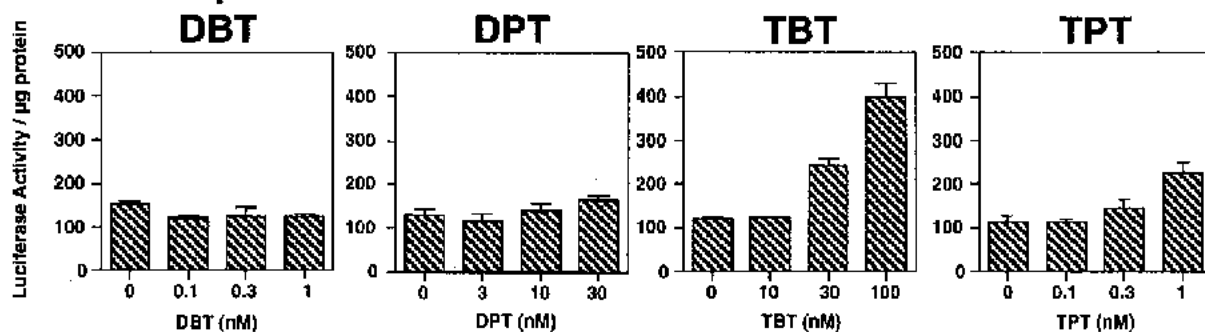
表 1 Effects of metals on ER-mediated transcription in ME1 cells

	Conc.	Luciferase Activity (% of Control)			Conc.	Luciferase Activity (% of Control)	
Control		100	± 31				
E2	1nM	295	± 21				
Li	10μM	137	± 3	100μM	136	± 22	
Al	10μM	96	± 11	100μM	91	± 18	
V	0.3μM	108	± 32	3μM	100	± 32	
Cr (III)	10μM	82	± 18	100μM	73	± 16	
Cr (VI)	0.1μM	119	± 7	1μM	68	± 11	
Mn	1μM	80	± 13	10μM	75	± 21	
Fe	10μM	69	± 12	100μM	79	± 19	
Co	10μM	89	± 14	100μM	65	± 12	
Ni	10μM	71	± 4	100μM	41	± 13	
Cu	1μM	72	± 2	10μM	74	± 17	
Zn	10μM	108	± 7	100μM	134	± 19	
As	1μM	112	± 9	10μM	30	± 9	
Se	0.1μM	108	± 17	1μM	101	± 22	
Mo	3μM	134	± 15	30μM	139	± 30	
Ag	1μM	63	± 17	10μM	59	± 20	
Cd	1μM	54	± 25	10μM	68	± 10	
Sn	1μM	147	± 14	10μM	131	± 29	
Sb	1μM	219	± 18	10μM	146	± 2	
Hg	1μM	72	± 5	10μM	89	± 12	
Tl	1μM	106	± 6	10μM	99	± 32	
Pb	10μM	107	± 4	100μM	106	± 14	
MeHg	1μM	75	± 21	10μM	32	± 6	
DBT	1nM	87	± 9	3nM	31	± 9	
DPT	30nM	53	± 11	100nM	45	± 10	
TBT	30nM	59	± 9	100nM	49	± 13	
TPT	0.3nM	127	± 16	1nM	73	± 24	

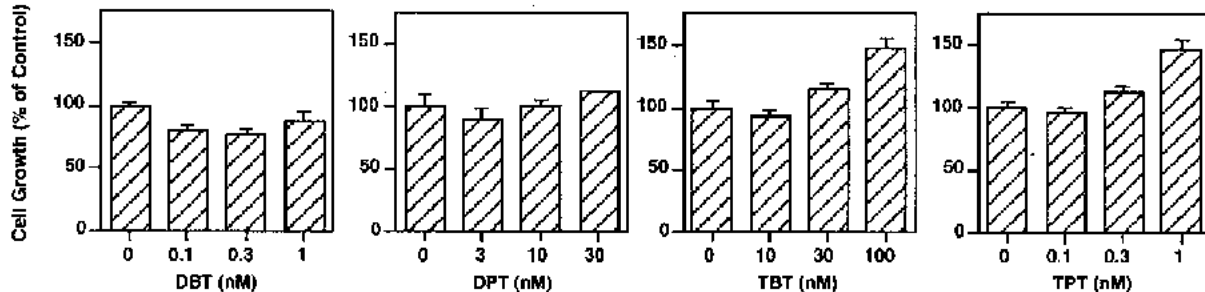
**表 2 Effects of metals on AR-mediated transcription
in LA16 cells**

		Luciferase Activity (% of Control)					Luciferase Activity (% of Control)		
Conc.					Conc.				
Control		100	±	10					
DHT	10nM	460	±	16					
Li	10μM	92	±	11	100μM	83	±	4	
Al	10μM	96	±	5	100μM	85	±	8	
V	0.3μM	102	±	10	3μM	86	±	8	
Cr (III)	10μM	81	±	13	100μM	81	±	12	
Cr (VI)	0.1μM	80	±	22	1μM	63	±	5	
Mn	1μM	92	±	8	10μM	95	±	6	
Fe	10μM	107	±	5	100μM	99	±	20	
Co	1μM	98	±	17	10μM	126	±	12	
Ni	1μM	95	±	5	10μM	105	±	2	
Cu	1μM	111	±	8	10μM	125	±	6	
Zn	10μM	97	±	5	100μM	191	±	42	
As	0.1μM	121	±	11	1μM	229	±	7	
Se	0.1μM	105	±	12	1μM	101	±	14	
Mo	3μM	108	±	10	30μM	106	±	6	
Ag	1μM	92	±	2	10μM	98	±	6	
Cd	1μM	120	±	10	10μM	211	±	73	
Sn	1μM	94	±	15	10μM	148	±	51	
Sb	1μM	177	±	14	10μM	291	±	11	
Hg	1μM	111	±	21	10μM	135	±	13	
Tl	10μM	110	±	15	100μM	66	±	7	
Pb	10μM	158	±	21	100μM	198	±	45	
MeHg	0.1μM	95	±	4	1μM	132	±	18	
DBT	1nM	83	±	3	3nM	83	±	9	
DPT	30nM	127	±	6	100nM	140	±	12	
TBT	30nM	192	±	13	100nM	298	±	36	
TPT	0.3nM	118	±	14	1nM	176	±	18	

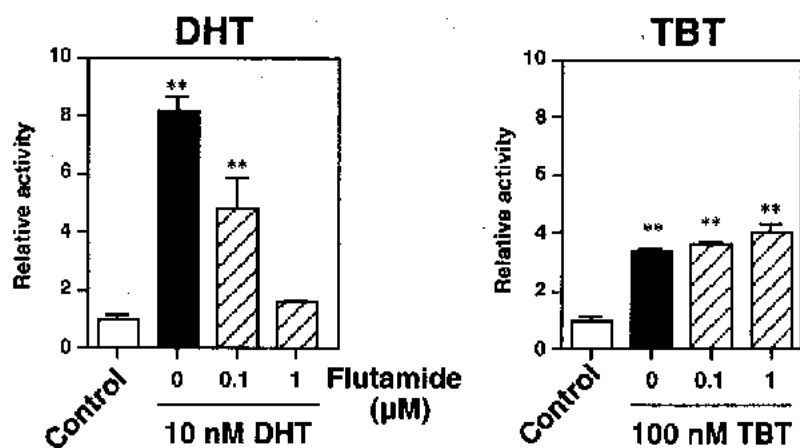
< Transcription >



< Growth >



1 Effects of Alkyltin Compounds on AR-mediated Transcription and Proliferation of LA16 Cells



2 Effects of flutamide on AR-mediated transcription induced by DHT and TBT in LA16 cells

6. ヒト生殖細胞の形成・維持に及ぼす内分泌攪乱化学物質の影響についての研究

研究者 中堀 豊 (徳島大学医学部公衆衛生学教授)

研究要旨 Y染色体研究の立場より、ヒトの性決定・性分化や生殖細胞の形成・維持におよぼす内分泌攪乱化学物質の影響を明らかにしようと試みている。性決定についてはミューラー管抑制因子遺伝子(MIS)プロモータ部位につないだレポーター遺伝子の発現を指標とし、化学物質が性決定・性分化に及ぼす影響を検知しうるシステムの開発をめざして研究を進めた。一方、精子濃度は男性の系統によって異なることを既に明らかにしたが、この現象はそれぞれの男性が持つY染色体の違いに基づく。ヒトにおいてY染色体の個体毎の違いが化学物質への反応性を規定している可能性もあり、生殖細胞の形成・維持に及ぼすY染色体の役割の解明を進めた。

研究協力者氏名

新家利一 (徳島大学医学部公衆衛生学助手), 笹原賢司 (徳島大学医学部公衆衛生学助手), 田村隆教 (徳島大学医学部公衆衛生学講師), 黒木陽子 (徳島大学医学部公衆衛生学 CREST 研究員), 香川征 (徳島大学医学部泌尿器科学教授), 奈路田拓史 (徳島大学医学部泌尿器科学大学院生), 松本孝澄 (福井医科大学法医学教授)

A. 研究目的

近年、内分泌攪乱化学物質のヒトへの影響が懸念されており、性決定・性分化や生殖細胞形成に与える影響は特に重大な関心を呼んでいる。実験動物を使つての研究はあるが、ヒトについての研究はほとんど行われていない。我々は従来より、ヒトY染色体のゲノム解析を行っているが、Y染色体には精巣決定因子や精子形成に必須の遺伝子領域が存在するため、疾患としては性分化異常症、無精子症などを研究してきた。このようなヒトの性分化、精子形成についての知識と実績を生かして、内分泌攪乱化学物質のヒトへの影響を研究する。

B. 研究方法

内分泌攪乱化学物質のヒト生殖細胞に対する影響について我々は、① 生殖腺の形成 (性決定・分化)、② 生殖細胞の分

化・維持・死滅、③ 生殖細胞の腫瘍化、の3つの観点からアプローチを行っている。本研究においては主として①と③について研究を行っているが、以下に我々の研究の下地になっている事実と知識について簡単に述べる

① 生殖線の形成

現在までの分子生物学的知見からは、性決定の機序は生物間で異なっていると考えざるを得ない。その中で、肝腎のヒトに関する知見がほとんど得られていない。1991年にY染色体上の精巣決定遺伝子 SRY (Sex determining region on Y) が発見され、ヒトの性分化に関する研究は大きな進展を期待されたが、残念なことにその後ほとんど進歩がない。SRY 遺伝子は DNA 結合蛋白と推定されるが、その標的となる配列が7塩基の配列であり、ゲノムのどこにでもあるような DNA 配列であること。SRY 遺伝子の構造の中で、ほ乳類で共通して保存されている領域は、HMGbox と呼ばれる DNA 結合部位だけだと考えられること。同様の DNA 結合部位を持つ似たような遺伝子がヒトには20個以上もあり、なぜ SRY が精巣決定因子でなくてはならないかという必然性が不明であることなど、極めて研究しづらい性格の遺伝子であるという問題が根底にある。なにより、ヒトにおける解析を困難にしている最も大きな原因は適切な実