



Title	内分泌搅乱物質の核内受容体ファミリーを介した作用 発現機構の解析
Author(s)	金山, 知彦
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44794
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	かな 金 山 知 彦
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 18647 号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	内分泌搅乱物質の核内受容体ファミリーを介した作用発現機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 西原 力 (副査) 教授 田中 慶一 教授 那須 正夫 教授 土井 健史

論文内容の要旨

内分泌搅乱物質問題は、“Our Stolen Future”などで報告された外因性化学物質によって生じる生態の生殖への不可逆的な悪影響を危惧する点に起因する。この問題を解決するためには、環境中に排出される可能性のある化学物質すべてに対して検討を行う必要がある。しかしながら、現状ではそのすべてにおいて緻密な毒性評価を行うことは不可能であり、効率的なスクリーニング手法を用いた多段階的なリスク評価が必須である。こうした中、内分泌搅乱物質のその標的と考えられる核内受容体群への影響評価が、近年行われてきている。当初、発生・生殖に関わる受容体としてエストロゲンやアンドロゲンといった性ホルモン受容体について評価が行われてきたが、現在ではヒトで48種類存在するヒト核内受容体すべてについての検討が必要とされている。

本研究では、これらのヒト核内受容体に対する影響を検討するため、他種類の核内受容体のリガンドを効率的にスクリーニングできる試験系、CoA-BAP systemを開発した。次に、確立した14種類の核内受容体リガンド試験系を内分泌搅乱作用の疑われている物質40種類に適応し、その影響を検討した。そして、この過程で陽性物質として得られた有機スズ化合物について、マウス前駆脂肪細胞株3T3-L1 cellを用い、核内受容体活性化能についてさらに詳細な検討を行った。

本研究にて核内受容体リガンドの新規スクリーニング手法として開発したCoA-BAP systemは、核内受容体によるリガンド依存的転写制御機構の最初のステップである、核内受容体リガンド結合領域(NR LBD)とTIF2などのp160ファミリーを含む転写共役活性化因子の核内受容体相互作用領域(NID)とのリガンド依存的な相互作用を利用していいる。CoA-BAP systemは検出系としてアルカリフォスファターゼを用い、bacterial alkaline phosphatase(BAP)を融合させたヒトTIF2 NIDの組み換え蛋白質を検出剤として用いる点が特徴的である。さらにNR LBDをマイクロプレート上へ固定化することで、ハイスループットスクリーニングへの適応を行った。その結果、一度に数百から数千サンプルというような多検体のスクリーニングを行うことが可能な、迅速・簡便でかつ、低コストに再現性の良いデータを得られる試験系を開発することができた。

CoA-BAP systemの検出感度について既知リガンドを用いて検討したところ、多くの受容体においてナノモルレベルでの低濃度領域から検出を行うことができた。低親和性のリガンドしか知られていない、胆汁酸受容体であるFXRのような場合でもマイクロモルレベルでの検出を行うことができた。こうした既知リガンドにおける検出感度は既存の *in vitro* 手法と比較しても遜色ないものであり、内分泌搅乱物質のような外来性化学物質の評価についても適応で

きると考えられた。そこで、環境省によりリストアップされた内分泌搅乱作用の疑いのある物質のうち 40 種類について、CoA-BAP system を適応した。その結果、ノニルフェノールやオクチルフェノール、マンネブ、マンゼブ、フタル酸ベンジルブチル、リンデンは複数の核内受容体に対する作用が認められた。これらは一つ一つの受容体に対する親和性は弱いながらも、*in vivo* において相加的な効果の現れる可能性も考えられるため、今後の検討が必要である。一方で、有機スズ化合物であるトリプチルスズ (TBT) は RXRs、トリフェニルスズ (TPT) は RXRs と PPAR γ に対して既知リガンドと同程度の親和性を示すことが明らかとなった。これら有機スズ化合物について、特定の受容体が標的となる報告はこれまでに無いため、CoA-BAP system 以外の系として培養細胞を用いたレポーター遺伝子試験を用いて、核内受容体活性化能について検討した。GAL4 レポータープラスミドをレポーターとして用いて、有機スズ化合物の転写活性化への寄与を検討した結果、有機スズ化合物は TPT、TBT どちらにおいても RXR α 、PPAR γ 依存的な転写活性化能を有していることが示された。TBT における結果が両 *in vitro* の試験系にて異なるものとなつたが、これは CoA-BAP system に用いている転写共役活性化因子が TIF2 一種類であるのに対して、培養細胞内には複数存在していることが原因として考えられた。この点は転写共役活性化因子の種類を変更することで CoA-BAP system でも対応できると考えられる。

次に有機スズ化合物による RXR、PPAR γ の活性化を生理的機能の側面から検討するため、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 cell を用いてその影響を観察した。3T3-L1 cell は PPAR γ /RXR ヘテロダイマーの活性化によって成熟脂肪細胞へと分化することが分かっており、有機スズ化合物添加による脂肪細胞分化への影響を脂肪滴の蓄積、分化マーカーの検出によって検討した。その結果、TPT、TBT はともに 10 nM-30 nM 程度の低濃度領域から 3T3-L1 cell の成熟脂肪細胞への分化を誘導・促進することが明らかとなった。さらに PPAR γ を活性化させた 3T3-L1 cell を用いて、PPAR によって転写制御を受けることが知られている遺伝子群についてその mRNA 発現量を検討した。その結果、ACS、LPL、LXR α については TPT、TBT の 100 nM 添加において、10 nM 添加では増加した mRNA 発現量の減少が認められた。この mRNA の減少は PPAR γ mRNA 発現量の減少と相関しており、直接的な PPAR γ の作用であると考えられた。TPT、TBT 100 nM 添加における ACS の挙動は PPAR γ リガンド過剰量添加における報告と類似しており、Rosiglitazone 100 nM 添加時と比較して同濃度の TPT、TBT 添加時に PPAR γ の活性化がより強く起こっている可能性が考えられた。一方で CD36、RevErbA α 、aP2 について TPT、TBT 添加においても濃度依存的に mRNA の増加が認められた。これらの遺伝子発現については PPAR γ 以外の転写因子による転写制御も受けていることが考えられた。

今後は、本研究で開発した CoA-BAP system の活用により、核内受容体のリガンドスクリーニングが容易なものとなり、その受容体の転写調節機構解明の一助となるに加えて、内分泌搅乱物質問題解決への強力なツールとしての展開が期待される。

論文審査の結果の要旨

内分泌搅乱物質に関する最大の課題はその作用発現機構の解明である。金山君は、核内レセプターを介する機構に着目し、14 種類のヒト核内レセプターに対するリガンド活性を検出できる CoA-BAP システムを開発し、感度・精度ともに既存の検出法とほぼ同等で、より簡便に安価に迅速に検出できることを示した。本システムを用いて、内分泌搅乱作用が疑われる化学物質 40 種類についてアゴニスト活性を網羅的に検索した結果、ノニルフェノール、フタル酸ベンジルブチル、リンデンなどが複数のレセプターと反応することを見出した。これは生体内でこれらの物質は同時に複数のレセプターを介して作用を発現する可能性を示すものである。さらに、有機スズ化合物のトリフェニルスズとトリプチルスズが RXRs と PPAR γ に高い親和性を示すことを明らかにした。これに基づき有機スズ化合物の作用について前駆脂肪細胞株を用いて分子生物学的に検討し、分化の誘導・促進効果を示すことや PPAR γ の活性化作用は陽性対照物質と同程度であることを明らかにした。

以上のように、金山君は内分泌搅乱物質の簡便な検出手法を開発するとともに、その作用発現機構の一端を解明したものであり、その成果は社会的にも学術的にも高く評価され、博士（薬学）学位論文として充分価値あるものと認められる。