

平成22年6月4日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790120
 研究課題名 (和文) 男性ホルモン依存性転写活性化に対する多環芳香族炭化水素の抑制作用のメカニズム
 研究課題名 (英文) Mechanisms for the inhibitory effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on androgen-dependent transcriptional activation
 研究代表者
 眞田 法子 (Sanada Noriko)
 同志社女子大学・薬学部・助教
 研究者番号：60411089

研究成果の概要 (和文) : 5 α -dihydrotestosterone (DHT) によって活性化された遺伝子の転写に対する 3-methylcholanthrene (3MC) の抑制作用の機構解明を目的とし、本研究を行った。その結果、3MC による抑制作用の発現には、男性ホルモン受容体 (AR) とアリル炭化水素受容体 (AhR) の複合体形成や男性ホルモン応答遺伝子の転写調節領域上に存在する AhR 結合配列への AhR の結合が重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : The aim of this study is to investigate the mechanism for the inhibitory effect of 3-methylcholanthrene (3MC) on 5 α -dihydrotestosterone (DHT)-dependent transcriptional activation in human prostate cancer LNCaP cells. The results in this study suggest that complex formation between AhR and androgen receptor (AR), and binding of AhR to the AhR-binding site in the transcriptional regulatory region of androgen-regulated gene, a prostate specific antigen gene, play important roles in the inhibitory effect of 3MC on DHT-dependent transcriptional activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境衛生学、内分泌攪乱物質

1. 研究開始当初の背景

男性ホルモンは雄性生殖機能の発達・維持や身体の成長を担う重要な性ホルモンであり、転写制御因子である男性ホルモン受容体 (AR) に結合し、その作用を発現する。一方で、環境中に存在する化学物質でヒトや動物

の内分泌機能に障害を与える内分泌攪乱物質が大きな社会問題となっている。特にダイオキシンや自動車の排気粉じん中に多く含まれる多環芳香族炭化水素 (PAH) などのアリル炭化水素受容体 (AhR) アゴニストによる内分泌攪乱作用が注目される中、これまで

男性ホルモンの作用に及ぼす研究はほとんどなかった。ARやAhRのいずれも、通常は細胞質に存在しているが、アゴニストが結合すると核内へ移行し、標的遺伝子の転写調節領域上にあるそれぞれに特異的なDNA配列に結合し、遺伝子の転写を制御する。研究代表者らの研究室では、世界に先駆けARシグナルとAhRシグナルのクロストークに関する研究を行い、PAHが男性ホルモン依存性転写活性化を阻害すること、その作用発現にはAhRが不可欠であること、PAHはARに結合しないことを明らかにしてきた。その機構の一つとして、PAHにより活性化したAhRがARと複合体を形成し、ユビキチンリガーゼE3として働き、ARの分解を促進させることが提唱されているが、実際に複合体形成により標的遺伝子の転写調節領域へのARの結合量が減少するか、AhRとARがそれぞれの部位で複合体を形成するか等、未だ不明な点も多い。また、男性ホルモン応答遺伝子の転写調節領域にはAhR結合配列(XRE)が複数存在することなど、他の機構がPAHによる抑制作用発現に関与していることも十分に考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、本研究では、男性ホルモン依存性転写活性化に対するPAHの抑制作用機構をさらに詳細に多方面から明らかにすることを目的とし、男性ホルモン応答性のヒト腫瘍由来培養細胞を用いて以下の研究を計画した。

(1) ARとAhRの複合体形成による影響とその結合部位の解明

活性化されたAhRとARの複合体形成により男性ホルモン応答遺伝子の転写調節領域へのARの結合が阻害されるか否か、される場合はARとAhRのそれぞれの複合体形成部位を特定する。

(2) AhR結合配列(XRE)の関与

代表的な男性ホルモン応答遺伝子である前立腺特異抗原(PSA)の転写調節領域には、AR結合配列(ARE)以外にもXREが複数存在する。PAHにより活性化されたAhRのXREへの結合が男性ホルモン依存性の転写活性化に影響を及ぼすか否かを明らかにする。

(3) AhR以外のタンパク質の関与

ARと複合体を形成し、ARを不活性化するタンパク質が幾つか知られている。これらタンパク質とARの複合体形成がPAHにより影響を受けるか否か明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞の培養

本研究では、ヒト前立腺がん由来LNCaP

細胞を用いた。基本培地(DMEM-10% fetal bovine serum (FBS))を用いて37°C、5% CO₂条件下において培養し、4日毎に継代を行った。アッセイを行う際は、アッセイ培地(フェノールレッド不含DMEM-5% charcoal dextran-treated FBS)を使用した。

(2) 化合物の処置

本研究では、男性ホルモンとして5 α -dihydrotestosterone (DHT)を、PAHとして3-methylcholanthrene (3MC)を使用した。3MCとDHTはいずれもdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解した。24時間前に基本培地からアッセイ用培地に置換し培養した細胞を、DMSO、DHT (10 nM)、3MC (1 μ M)をそれぞれ単独または組み合わせで処置した。すべての細胞の処置においてDMSOの濃度は0.1% (v/v)とした。全細胞溶解液と核抽出液はCellLytic M、CellLytic NuCLEAR kit (Sigma)を用いてそれぞれ調製した。

(3) ウェスタンブロット

全細胞溶解液または核抽出液をサンプルとしSDS-PAGE、PVDF膜への転写を行った後、5%スキムミルク含有TBSTバッファーを用いてブロッキングを行い、1次抗体(ウサギ抗ヒトAR抗体; Millipore)、2次抗体(peroxidase 標識抗ウサギIgG抗体; GE Healthcare)と反応を行った。その後、Chemi-Lumi One (ナカライテスク)と反応させ抗体陽性バンドを検出した。

(4) 共免疫沈降

核抽出液にヤギ抗ヒトAhR抗体(Santa Cruz)とプロテインGセファロースビーズProtein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare)を加え免疫沈降を行った後、免疫沈降物中のARをウェスタンブロット法により検出した。

(5) ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ

① プラスミドの構築

ホタルルシフェラーゼ発現プラスミドpGL3-basic (Promega)のホタルルシフェラーゼ遺伝子の5'上流にヒトPSA遺伝子の転写調節領域(-5824から+12)を挿入したpGLPSAp5.8はDr. Mizukami(金沢大学医学部)から入手した。pGLPSA Δ X6-8(-5321から+12)、pGLPSA Δ X1-5(-5824から+12のうち-3193から-541を欠損)はpGLPSAp5.8を制限酵素処理することにより作製した。

X2、4、5の変異体はPCRにより変異XREを含むDNAフラグメントを作製し、このDNAフラグメントとpGLPSAp5.8について制限酵素処理を行い、それぞれのXREに変異を持つpGLPSAp5.8(pGLPSAXm2、pGLPSAXm4、pGLPSAXm5)を作製した。

② レポーターアッセイ

LNCaP細胞にホタルルシフェラーゼ発現

プラスミド及びウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド phRG-TK (Promega) を Lipofectamine (Promega) を用いて導入し、ピッカジーンデュアルシーパンジー発光キット (東洋インキ) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

(6) siRNA によるノックダウン

本研究では、PIAS α または c-Fos に対する siRNA、non-silencing siRNA (Qiagen) を使用した。Non-silencing siRNA は、既知の哺乳類の遺伝子に対し相同性を示さないようデザインされている。RNAiFect (Qiagen) によって siRNA をトランスフェクションした後、細胞を化合物で処置し、real-time PCR を行った。

(7) real-time PCR

LNCaP 細胞から RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した後、ExScript RT reagent kit (Takara) を用いて逆転写し cDNA を調製した。得られた cDNA を鋳型に、各遺伝子について SYBR premix ExTaq (Takara) を用いて PCR を行った。

4. 研究成果

(1) AR と AhR の複合体形成による影響とその結合部位の解明

男性ホルモン依存性転写活性化に対する PAH の抑制機構の一つとして、PAH により活性化した AhR が AR と複合体を形成し、AR の分解を促進させることが提唱されている。そこで、AR 発現に対する 3MC の影響を検討するため、LNCaP 細胞を DHT 単独、または DHT と 3MC の組み合わせで 24 時間処置した後、全細胞溶解液を調製し、抗 AR 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、DHT で処置した細胞における AR の発現量は 3MC によって変化しなかった。また DHT によって誘導された AR の核内への移行が 3MC によって阻害されれば、男性ホルモン依存性転写活性化の抑制につながることから、DHT による AR の核移行に対する 3MC の影響を検討した。LNCaP 細胞を DHT 単独、または DHT と 3MC の組み合わせで 1 時間処置した後、核抽出液を調製し、抗 AR 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、DHT による AR の核移行に 3MC による影響は見られなかった。以上の結果から、男性ホルモン依存性転写活性化に対する 3MC の抑制作用は、AR の発現量や核移行量の減少によらないことが示唆された。

次に、3MC によって AhR と AR が複合体を形成するか否かを検討するため、細胞を DHT、3MC 単独、または DHT と 3MC の組み合わせで 1 時間処置した後、核抽出液を調製し、抗 AhR 抗体を用いた共免疫沈降法を行った。その結果、3MC を単独、または 3MC

と DHT の組み合わせで処置した細胞では、核において抗 AhR 抗体との共免疫沈降中に AR が検出され、DHT と 3MC の組み合わせで処置した細胞では 3MC を単独処置した細胞に比べ、より多くの AR が検出された。また、DHT を単独処置した細胞では、抗 AhR 抗体との共免疫沈降物中に AR は検出されなかった。以上の結果から、DHT と 3MC を組み合わせで処置した細胞では AhR と AR が複合体を形成していることが明らかになり、男性ホルモン依存性転写活性化に対する 3MC の抑制作用に AR と AhR の複合体形成が関与していることが示唆された。

(2) AhR 結合配列 (XRE) の関与

代表的な男性ホルモン応答遺伝子は PSA 遺伝子である。PSA の転写調節領域 (5.8 kb) には ARE の他にも XRE (5'-GCGTG-3' または 5'-CACGC-3') が図のように 8 箇所存在する。



これら XRE を転写開始点側より X1~X8 とし、X1~X8 を一箇所または複数箇所欠損した転写調節領域を含むホタルルシフェラーゼ発現プラスミドを用いたルシフェラーゼ・レポーターアッセイを行い、これら XRE が男性ホルモン依存性転写活性化に対する 3MC の抑制作用に関与しているか否かを検討した。

まず、3MC による抑制作用にこれら X1~X5 と X6~X8 のいずれかが関与しているかを検討するため、PSA 遺伝子の転写調節領域を含むプラスミド pGLPSAp5.8 (X1~X8 を含む)、pGLPSA Δ X1-5 (X6~X8)、pGLPSA Δ X6-8 (X1~X5) を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、いずれのプラスミドを導入した細胞でも DHT によってルシフェラーゼ活性は上昇したが、この上昇は pGLPSAp5.8 または pGLPSA Δ X6-8 を導入した細胞では 3MC によって減弱されたのに対し、pGLPSA Δ X1-5 を導入した細胞では 3MC によって減弱されなかった。また、pGLPSAp5.8 または pGLPSA Δ X6-8 を導入した細胞では、AhR アンタゴニストである α -naphthoflavon 存在下において、DHT によるルシフェラーゼ活性の上昇に対する 3MC の抑制作用は減弱することから、3MC は AhR を活性化しルシフェラーゼ活性の上昇を抑制していると考えられる。これらの結果から、DHT による PSA 遺伝子の転写活性化に対する 3MC の抑制作用に、X1~X5 を含む領域が関与していることが示唆された。

次に、3MC による抑制作用に X1~X5 のうちいずれの XRE が関与しているかを検討するため、それぞれの XRE に対し変異を導入

した PSA 遺伝子の転写調節領域を含むプラスミド pGLPSAXm2、Xm4、Xm5 (pGLPSAXm1 と pGLPSAXm3 は作製できなかった) を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、いずれのプラスミドを導入した細胞でも DHT によってルシフェラーゼ活性は上昇したが、この上昇は pGLPSAXm4 または pGLPSAXm5 を導入した細胞では 3MC によって減弱されたのに対し、pGLPSAXm2 を導入した細胞では減弱されなかった。以上の結果から、DHT による PSA 遺伝子の転写活性化に対する 3MC の抑制作用には、PSA 遺伝子の転写調節領域上に存在する XRE2 が関与しており、3MC によって活性化された AhR が XRE2 に結合することにより DHT によって活性化された転写を抑制することが示唆された。

(3) AhR 以外のタンパク質の関与

AR と複合体を形成し不活性化するタンパク質として PIASx α や c-Fos が知られている。これらタンパク質と AR の複合体形成が PAH によって増加すれば男性ホルモン依存性転写活性化の抑制につながる。そこで 3MC による抑制作用に PIASx α や c-Fos が関与しているか否か検討した。

non-silencing、PIASx α 、または c-Fos siRNA をそれぞれ導入した細胞を、DHT 単独または DHT と 3MC の組み合わせで 24 時間処置した後 total RNA を抽出し、PSA、SCAP、および FKBP51 などの男性ホルモン応答遺伝子の mRNA 発現について real-time PCR を行った。その結果、non-silencing siRNA を導入した細胞では、DHT によって各遺伝子の mRNA 発現は上昇したが、その上昇は 3MC によって減弱した。PIASx α または c-Fos siRNA をノックダウンした細胞においても、同様に DHT によって上昇した mRNA 発現は、3MC によって non-silencing RNA の場合と同程度減弱した。以上の結果から、DHT による転写活性化に対する 3MC の抑制作用に、PIASx α や c-Fos は関与しないことが示唆された。

PAH やダイオキシン類は大気・水・土壌・食品にと身の回りの環境中に最も普遍的に存在する汚染物質であり、ヒトはこれら化合物に日常的に暴露されている。一方、男性ホルモンは、性・生殖器の分化・発達、精子の産生、体の成長などを担う極めて重要なホルモンである。近年、野生動物において性分化異常が数多く報告され、ヒトでも最近の数十年の間にヒトの精子産生能の低下や精子の質の低下が指摘されている。代表的な AhR アゴニストである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin をラットやマウスに暴露すると、前立腺などの雄性生殖器の重量が減少し、精子産生能が低下することが報告されていることから、PAH やダイオ

キシン類などの環境中の化学物質が男性ホルモンの作用に及ぼす影響が懸念されるが、従来の内分泌攪乱物質に関する研究のほとんどは女性ホルモン (卵胞ホルモン、エストロゲン) に関連するものであり、男性ホルモンの作用を攪乱する化学物質およびその作用機構に関する研究例や知見は、その重要性にも関わらず未だ極めて少ない。

研究代表者は男性ホルモン依存性転写活性化に対する PAH の抑制作用の機構を解明することを目的とし、本研究を行った。その結果、PAH による抑制作用の発現は、AR の発現レベルの減少に基づく可能性は低く、AR と AhR の複合体形成や男性ホルモン応答遺伝子の転写調節領域上に存在する XRE への AhR の結合が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後は、AhR と AR の複合体形成により男性ホルモン応答遺伝子の転写調節領域への AR の結合が阻害されるか否か、AR と AhR がそれぞれどの部位で複合体を形成するか、AR と AhR をそれぞれ機能的な領域に分割しクローニングした種類のプラスミド (作製済み) を用いて特定する必要がある。また、男性ホルモン応答遺伝子の転写調節領域上に存在する XRE に対する研究では、PSA 遺伝子の転写調節領域上にある XRE1 と XRE3 について未だ検討がなされていないため、今後その関与について検討する必要がある。また、AR と複合体を形成し不活性化するタンパク質は、PIASx α と c-Fos 以外にも、DJBP や c-Jun などがある。これらタンパク質についても検討する必要がある。

本研究で得られた成果は、PAH やダイオキシン類の毒性発現を理解する上で極めて重要な知見となり、ヒトや野生動物で観察される内分泌系の異常と化学物質の関連の解明に大きく寄与すると思われる。また、PAH やダイオキシン類以外にも、PCB 類などの AhR を活性化する環境汚染物質が男性ホルモンに及ぼす影響とその機構を理解する上で有益な知見になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- ① Noriko Sanada, Yuka Gotoh, Rumiko Shimazawa, Carolyn Klinge, Ryoichi Kizu, Repression of activated aryl hydrocarbon receptor-induced transcriptional activation by 5 α -dihydrotestosterone in human prostate cancer LNCaP and human breast cancer T47D cells, Journal of pharmacological sciences, 380, 2009, 380-387, 査読有

〔学会発表〕(計6件)

- ① 後藤由佳, 神経系前駆細胞の生存に対する3-メチルコランスレンの影響, 日本薬学会第130年会, 2010年3月30日, 岡山コンベンションセンター(岡山市)
- ② 海馬由来培養神経系前駆細胞の増殖に対する3-メチルコランスレンの効果, 第83回日本薬理学会年会, 2010年3月18日, 大阪国際会議場(大阪市)
- ③ 後藤由佳, 海馬神経系前駆細胞の増殖に対する3-メチルコランスレンの影響, フォーラム2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2009年11月5日, 沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)
- ④ 後藤由佳, アリル炭化水素受容体アゴニストによる男性ホルモン依存性遺伝子の転写活性化, 日本薬学会第129年会, 2009年3月26日, 国立京都国際会館(京都市)
- ⑤ 後藤由佳, Transcriptional activation of androgen-regulated genes by aryl hydrocarbon receptor agonist in androgen-responsive cell lines, SOT2009, 2009年3月16日, Baltimore convention center (Baltimore, USA)
- ⑥ 眞田法子, アンドロゲンによるアリル炭化水素受容体シグナルの抑制作用に関する研究, フォーラム2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2008年10月18日, 熊本市民会館(熊本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞田 法子 (Sanada Noriko)
同志社女子大学・薬学部・助教
研究者番号: 60411089