

学 位 論 文 題 名

Effects of Tributyltin and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic Acid on Apoptosis and Differentiation in PC12 Cells

(PC12細胞のアポトーシスおよび分化に対するトリブチルスズ
および 2, 4, 5 - トリクロロフェノキシ酢酸の影響)

学位論文内容の要旨

化学物質の中にはホルモン様作用をする物があり、近年、外因性内分泌攪乱化学物質と呼ばれ注目されている。これらの物質の低濃度暴露により生殖関連のホルモンの類似した作用を示すという研究に主眼がおかれているが、それ以外の生体影響を調べた研究は未だ数多く存在はしていない。船底塗料として使われているトリブチルスズ (TBT) 及び、除草剤の一つである2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸 (2,4,5-T) も、外因性内分泌攪乱化学物質として認識されている。一方、TBT等は、高濃度暴露によって細胞にアポトーシスを引き起こすことが知られている。細胞のアポトーシスとは本来、生物が発生・分化および形態形成をしていく過程において不必要な細胞の除去や、化学物質、放射線および紫外線等によりDNA等が損傷した細胞の除去の為に必須の現象であると考えられている。

そこで本研究では外因性内分泌攪乱化学物質が低濃度暴露で生体に生殖関連以外の影響を与えているかを調べることを目的として、アポトーシスと分化に着目して研究を行った。低濃度のTBTおよび、2,4,5-Tが培養細胞 (PC12) にアポトーシスを引き起こさせるか否か、およびアポトーシスが必ずおこる条件下でアポトーシスを促進するか否かについて検討した。神経成長因子の添加による細胞の分化誘導がTBTおよび2,4,5-Tにより阻害されるかについても検討した。

培養細胞を培地 (DMEM) に仔牛胎児血清 (FBS) を加え培養した。この培地にTBTまたは2,4,5-Tを低濃度暴露し、細胞がアポトーシスを起こすのか否かをDNAの損傷および断片化を指標にして調べた。また、FBSを除いた培地で細胞を培養すると確実にアポトーシスを引き起こすことが知られているが、この条件にTBT及び2,4,5-Tを低濃度暴露すると、引き起こされるはずのアポトーシスがどのように変化するかについて同様の指標を用いて検討した。得られた結果がFBSのみに依存したものかどうかを確認するために、アポトーシスを引き起こす物質である6-ヒドロキシドーパミン (6OHDA) を用いて同様の実験を繰り返し行なった。これらの実験で得られた結果が実際に細胞死につながるか否かを確認するために幾つかの条件において細胞の生残率の算出を行ない、さらにその機構を推定する目的でアポトーシスを起こすときに増減するアポトーシス制御因子の定量および転写制御因子の定量を行なった。アポトーシスに伴うDNAの損傷度は細胞を培養後、メタノールで固定し、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法を用いて行なった。細胞の生残率については培養

した後トリパンブルーによる染色後、生細胞と死細胞を見分け算出した。PC12細胞は神経成長因子を暴露すると神経細胞に分化するが、TBTおよび2,4,5-Tを低濃度暴露することによりその分化が阻害されるかどうか観察した。

得られた結果は以下のとおりである。FBS添加培地にTBTまたは2,4,5-Tを 10^{-12} から 10^{-4} g/Lの濃度で3日間細胞に暴露すると、DNAの損傷度は、対照群とほとんど変わらず、これらの物質の高濃度暴露とは異なり細胞にアポトーシスを起こさせないことが解った。つまり、TBTおよび2,4,5-Tは低濃度暴露ではアポトーシスを誘起しないことが考えられた。しかし、FBS不添加培地を用いてTBTまたは2,4,5-Tを同様に3日間細胞に暴露させると、TBTおよび2,4,5-Tを暴露させていない細胞ではアポトーシスが引き起こされているのにも関わらず、全ての暴露濃度群において著しくDNA損傷度が低下し、正常な状態で培養した細胞と変わらなかつた。すなわちFBS不添加による細胞のアポトーシスがTBTまたは2,4,5-Tの低濃度暴露によって抑えられたことを示していた。この結果は、それぞれの条件における細胞の生残率ともよく一致している。すなわちFBS不添加の対照群に比べFBS添加とTBTまたは2,4,5-Tを加えた群では、生残率が有意に高くなっていた。またこれら4つの群に関し核DNAの電気泳動を行うとFBS不添加群のみにアポトーシスが起きたことを示すDNAのラダー状の切断が観察された。しかし他の3群ではほとんど観察されなかつた。この結果からもTBTおよび2,4,5-Tがアポトーシスを抑制していることが確かめられた。

次にTBTまたは2,4,5-Tの添加によるアポトーシスの抑制の機構を推定するため、アポトーシスに関与する因子であるBAD、BAXおよびp53、アポトーシスを抑える働きがあると考えられている因子であるBCL-2の諸量を定量したところ、FBS不添加の対照群に比べ2,4,5-Tの添加群では4因子の量にどれも差が認められなかつたが、TBT添加群ではBAX量が有意に低下していた。この結果からTBT添加群のアポトーシスの抑制はBAX量の低下によるものと思われたが、2,4,5-Tの添加群におけるアポトーシスの抑制はこれら4因子を介さないものであると考えられた。

このTBTおよび2,4,5-Tのアポトーシスの抑制効果は、6OHDAによる細胞のアポトーシスに対してもFBS不添加の場合ほど劇的ではないが、同様に認められた。しかしながら、アポトーシス関連因子の動態はFBS不添加の場合と異なり、TBTまたは2,4,5-Tを暴露された細胞は対照群である6OHDAのみ添加された細胞に比較して全ての因子の量が低下していた。このことから6OHDAによるアポトーシスの抑制は6OHDAとTBTまたは2,4,5-Tの添加によるタンパク質の合成阻害により引き起こされたと推測された。このようにアポトーシスに至る経路が異なる物質に対してもTBTおよび2,4,5-Tによるアポトーシス抑制効果が認められた。

10日間TBTまたは2,4,5-Tを低濃度で暴露したPC12細胞においてDNA修復系の調節因子であるTFIIHがいくつかの暴露条件で上昇していた。このことからTBTまたは2,4,5-TがDNA修復を促進している可能性が考えられるが、このようなアポトーシス抑制機構に関してはまだ不明の点が数多く残されている。

このようにTBTおよび2,4,5-Tはアポトーシスを抑制することから細胞の発生、分化に対して影響があることが予測された。そこでPC12細胞が神経成長因子の存在下で交感神経に分化される特性を用いて、TBTおよび2,4,5-Tの分化に対する影響を検討した。その結果、神経成長因子の存在下におけるTBTまたは2,4,5-Tの低濃度暴露により、PC12細胞の分化を抑えることが観察された。

以上、本研究において外因性内分泌攪乱化学物質であるTBT及び2,4,5-Tが低濃度暴露により細胞のア

ポトーシスを抑制する効果があり、細胞の分化を阻害することが初めて示された。このことから、これらの化学物質の低濃度暴露により生体の発生および分化過程における障害がおこされる可能性が考えられた。本研究の成果は今後全ての化学物質において低濃度における生体影響を精査する必要性があることを示した点で、今後の毒性学の発展に多大な貢献をなすものであると期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	岩熊敏夫
副査	教授	東正剛
副査	助教授	新岡正
副査	助教授	齋藤健 (医学部)

学位論文題名

Effects of Tributyltin and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic Acid on Apoptosis and Differentiation in PC12 Cells

(PC12細胞のアポトーシスおよび分化に対するトリブチルスズ
および2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸の影響)

化学物質の中にはホルモン様作用をする物があり、近年、外因性内分泌攪乱化学物質と呼ばれ注目されている。これらの物質の低濃度暴露により生殖関連のホルモンの類似した作用を示すという研究に主眼がおかれているが、それ以外の生体影響を調べた研究は未だ数多く存在はしていない。船底塗料として使われているトリブチルスズ (TBT) および除草剤 2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸 (2,4,5-T) も、外因性内分泌攪乱化学物質として認識されている。一方、TBT 等は、高濃度暴露によって細胞にアポトーシスを引き起こすことが知られている。細胞のアポトーシスとは本来、生物が発生・分化および形態形成をしていく過程において不必要な細胞の除去や、DNA 等が損傷した細胞の除去の為に必須の現象であると考えられている。本研究は外因性内分泌攪乱化学物質が低濃度暴露で生体に生殖関連以外の影響を与えているか否かを調べることを目的とした。TBT および、2,4,5-T が培養細胞 (PC12) にアポトーシスを引き起こさせるか否か、およびアポトーシスが必ずおこる条件下でアポトーシスを促進するか否かについて検討した。また TBT および2,4,5-T が細胞の分化誘導を阻害するかについても検討した。

まず仔牛胎児血清 (FBS) 添加培地に TBT または 2,4,5-T を 10^{-12} から 10^{-4} g/L の濃度で 3 日間細胞に暴露すると、高濃度暴露とは異なり細胞にアポトーシスを起こさせないことが解った。FBS を除いた培地で細胞を培養すると確実にアポトーシスを引き起こすことが知られているが、FBS 不添加培地を用いて TBT または 2,4,5-T を同様に 3 日間細胞に暴露させると、TBT および 2,4,5-T を暴露させていない細胞ではア

ポトーシスが引き起こされているのにも関わらず、全ての暴露濃度群において著しく DNA 損傷度が低下し、正常な状態で培養した細胞と変わらなかった。すなわち FBS 不添加による細胞のアポトーシスが TBT または 2, 4, 5-T の低濃度暴露によって抑えられていた。この結果は、それぞれの条件における細胞の生残率ともよく一致した。また核 DNA の電気泳動を行うと FBS 不添加群のみにアポトーシスが起きたことを示す DNA のラダー状の切断が観察されたが他の群ではほとんど観察されなかった。

次に TBT または 2, 4, 5-T の添加によるアポトーシスの抑制の機構を推定するため、アポトーシスに関与する因子の BAD、BAX、p53 および BCL-2 の諸量を定量した。FBS 不添加の対照群に比べ 2, 4, 5-T の添加群では 4 因子の量にどれも差が認められなかったが、TBT 添加群では BAX 量が有意に低下していた。この結果から TBT 添加群のアポトーシスの抑制は BAX 量の低下によるものと思われたが、2, 4, 5-T の添加群におけるアポトーシスの抑制はこれら 4 因子を介さないものであると考えられた。

得られた結果が FBS のみに依存したものかどうかを確認するために、アポトーシスを引き起こす物質である 6-ヒドロキシドーパミン (6OHDA) を用いて同様の実験を行なった。TBT および 2, 4, 5-T のアポトーシスの抑制効果は、6OHDA による細胞のアポトーシスに対しても同様に認められた。しかしアポトーシス関連因子の動態は FBS 不添加の場合と異なり、TBT または 2, 4, 5-T を暴露された細胞は対照群である 6OHDA のみ添加された細胞に比較して全ての因子の量が低下していた。このことから 6OHDA によるアポトーシスの抑制は 6OHDA と TBT または 2, 4, 5-T によるタンパク質の合成阻害により引き起こされたと推測された。

TBT を低濃度で暴露した PC12 細胞において核内に TBT の蓄積が見られ DNA 修復系の転写制御因子である TFIIH がいくつかの暴露条件で上昇していたことから、TBT または 2, 4, 5-T が DNA 修復を促進してアポトーシスを抑制している可能性が考えられた。

TBT および 2, 4, 5-T はアポトーシスを抑制することから細胞の発生、分化に影響することが予測される。そこで PC12 細胞が神経成長因子の存在下で交感神経に分化される特性を用いて、TBT および 2, 4, 5-T の分化に対する影響を検討した。その結果、神経成長因子の存在下における TBT または 2, 4, 5-T の低濃度暴露により、PC12 細胞の分化を抑えることが観察された。

本研究は外因性内分泌攪乱化学物質である TBT 及び 2, 4, 5-T が、ごく低濃度の暴露で細胞のアポトーシスを抑制し細胞の分化を阻害することを初めて示したものである。化学物質の低濃度における生体影響の考え方と常識を根底から改めさせるという点で、今後の毒性学の発展に多大な貢献をなすものと期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また大学院における研究や取得単位なども併せ、申請者が研究者として誠実かつ熱心であり、博士（環境科学）の学位を受けるのに

十分な資格を有するものと判断した。