

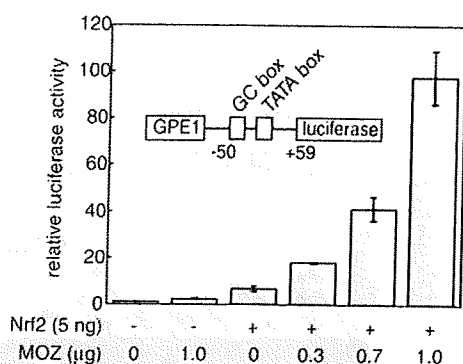


Figure 5 MOZ is a co-activator of Nrf2

Nrf2-mediated transactivation by MOZ was examined in mouse embryonic carcinoma F9 cells. We co-transfected 100 ng of the reporter plasmid (GPE1-luciferase, in the panel) and 5 ng of *Renilla* luciferase plasmid (pRL-tk) with 0, 0.3, 0.7 and 1 μ g MOZ expression plasmid (pCI-MOZ) in the absence (-) or presence (+) of Nrf2 expression plasmid (pA β 2-Nrf2, 5 ng). The luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity. Relative luciferase activity was calculated from the mean values relative to the activity of GPE1-luciferase without Nrf2 and MOZ. Each error bar indicates $\pm$ S.D.



Figure 6 MOZ induces endogenous GSTP expression

H4IIE cells were transfected with 0, 0.4, 0.7 and 1.0 μ g of MOZ expression plasmid (pCI-MOZ, lanes 1–4), and cell lysates were prepared. Endogenous GSTP and GAPDH ('G3PDH') were detected by immunoblotting.

expression plasmid was co-transfected with the reporter plasmid GPE1-luciferase (which includes GPE1 and the GSTP promoter) into F9 cells. MOZ and Nrf2 slightly enhanced the activity of the reporter construct. As expected, MOZ, when in the presence of Nrf2, dose-dependently stimulated GPE1-mediated GSTP promoter activity. MOZ did not stimulate the promoter activity of reporter plasmids including the mutated Nrf2 binding site (results not shown).

Induction of endogenous GSTP expression by MOZ in rat hepatoma cells

As we described above, MOZ stimulated the GSTP promoter activity mediated by Nrf2-MafK. We then assessed the effects of MOZ overexpression on GSTP expression in H4IIE cells. Transiently overexpressed MOZ induced expression of endogenous GSTP but not GAPDH (Figure 6). The induction of GSTP protein was dependent on the exogenous MOZ expression. These results suggest that MOZ functions as a co-activator of the Nrf2-MafK heterodimer and may stimulate GSTP gene expression during hepatocarcinogenesis.

DISCUSSION

HATs contribute to tumour suppression, and loss or dysregulation of these activities may be linked to tumorigenesis [45]. To gain insight into the roles of HATs in liver cancer, we analysed the expression profiles of HATs during hepatocarcinogenesis and evaluated their roles in hepatocarcinogenic-specific gene expression.

We have shown that MOZ expression was up-regulated during hepatocarcinogenesis. MOZ functions as a co-activator of AML1-mediated transcription, and the AML1-MOZ complex might play a role in cell differentiation [28,42]. MOZ frequently is rearranged in leukaemia, and the MOZ fusion protein antagonizes MOZ function in haemopoiesis [26,28]. Even though MOZ rearrangement does not occur during hepatocarcinogenesis, we documented an anomalous increase of MOZ. Because HATs regulate global gene expression [1,46], dysregulation of MOZ may induce unusual gene expression, leading to hepatocarcinogenesis.

Recently, the MOZ-MORF complex including BRPF (bromodomain- and PHD finger-containing) 1/2/3 paralogue and ING5 (inhibitor of growth 5; tumour suppressor) was purified [47]. MORF was not detected in nuclear extracts from livers with hyperplastic nodules (results not shown), so that MOZ, but not MORF, complex may regulate GSTP expression. ING5 is also included in HBO1 [HAT binding to ORC1 (origin recognition complex subunit 1)] complex. Interestingly, ING4, another member of ING family proteins, exists in HBO1 complex, but not MOZ complex. AML1-dependent promoter activity is stimulated by ING5, but not ING4 [47]. This raises a possibility that overexpressed MOZ may affect regulation of AML1-dependent gene expression. ING5 tumour suppressor is included in both HBO1 and MOZ complexes, which are important for DNA synthesis [47]. Overexpressed MOZ might trap ING5 and generate partial complexes, and further, HBO1 complex would be affected with the change of ING5 level. Thus aberrantly expressed MOZ during hepatocarcinogenesis may disturb the tumour suppressor function of ING5 complexes and DNA synthesis, which lead to tumorigenesis.

We also found that the expression of p300 and CBP were decreased during hepatocarcinogenesis. Although AAF blocks the proliferation of hepatocytes, GSTP-expressing cells escape from the growth inhibition and continuously grow in the Solt-Farber model. Trautwein et al. [48] reported that AAF blocks cell-cycle progression after PH by inducing the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. Expression of p21 is regulated mainly by the tumour-suppressor protein p53, and full transcriptional activity of p53 requires the co-activators p300/CBP [49–51]. Down-regulation of p300 and CBP reduces p53 activity and leads to cell-cycle progression of GSTP-expressing cells, suggesting that p300 and CBP may be considered tumour suppressors, and their loss of function may be a link to hepatocarcinogenesis.

GSTP is a Phase II detoxification enzyme involved in the metabolism of carcinogens, and it plays a protective role during chemical hepatocarcinogenesis [52]. The Nrf2-MafK heterodimer is important for the GSTP expression during early hepatocarcinogenesis, but it is difficult to explain the markedly increased expression of GSTP in livers with hyperplastic nodules solely on the basis of the increased quantity of Nrf2 [34]. We found that the expression of MOZ was well correlated with GSTP expression during hepatocarcinogenesis; MOZ also functioned as a co-activator of the Nrf2-MafK heterodimer. We reported that the binding activity of Nrf2-MafK heterodimer to GPE1 is much stronger than that of MafK homodimer. Further Nrf2 alone could not bind to GPE1, and the Nrf2 mRNA level is increased in cells from hyperplastic nodules when compared with those from normal livers [34]. Histones H3 and H4 are acetylated in both GPE1 and in the promoter regions of the GSTP gene in the H4IIE hepatoma cell line but not normal liver [34]. This acetylation coincides with the activation of GSTP expression. MOZ may contribute acetylation of histones in the regulatory region of the GSTP gene. Elevation of both MOZ and Nrf2 expression may be required for the dramatically increased gene expression of GSTP observed during hepatocarcinogenesis *in vivo*. To understand

the molecular mechanism of the GSTP induction mediated by Nrf2–MafK heterodimer and MOZ, we proceeded to identify the regions of MOZ and MafK required for the GSTP expression in exogenously Nrf2-expressed H4IIE cells.

The activation mechanism of GSTP expression is classified into two types: specific induction in livers with hyperplastic nodules by chemical carcinogens, and non-specific induction by non-carcinogenic agents such as antioxidants [29,53]. The former induction may require both Nrf2 and MOZ, but only Nrf2 may be necessary for the latter. Preneoplastic foci and nodules are derived from GSTP-positive single cells [54]. The mechanism of the generation of the GSTP-positive single cell is unclear, and specific induction of GSTP has not been reproduced in cell lines by using chemical carcinogens. The use of transgenic or MOZ knockout animals would probably enable us to demonstrate the mechanism of chemical carcinogen-associated GSTP induction during hepatocarcinogenesis.

This research was supported in part by grants from a Sasakawa Scientific Research Grant from the Japan Science Society, Sankyo Foundation of Life Science, the LRI (Long-range Research Initiative) of the JCIA (Japan Chemical Industry Association), the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology and JSPS (Japan Society for the Promotion of Science). We are grateful to Dr Yoshihiro Nakatani (Harvard Medical School, Boston, MA, U.S.A.) for kindly providing the anti-P/CAF antibody. We also thank the staff of the Radioisotope Research Center, Osaka University (Osaka, Japan). We thank Mitsumasa Kurita and Kiyoto Kageyama for their helpful discussions.

REFERENCES

- 1 Sterner, D. E. and Berger, S. L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 435–459.
- 2 Hebbes, T. R., Thorne, A. W. and Crane-Robinson, C. (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* **7**, 1395–1402.
- 3 Brownell, J. E. and Allis, C. D. (1995) An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 6364–6368.
- 4 Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. and Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319–324.
- 5 Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641–643.
- 6 Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953–959.
- 7 Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L. and Cote, J. (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* **19**, 321–329.
- 8 Xu, W., Edmondson, D. G., Evrard, Y. A., Wakamiya, M., Behringer, R. R. and Roth, S. Y. (2000) Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nat. Genet.* **26**, 229–232.
- 9 Yamauchi, T., Yamauchi, J., Kuwata, T., Tamura, T., Yamashita, T., Bae, N., Westphal, H., Ozato, K. and Nakatani, Y. (2000) Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 11303–11306.
- 10 Borrow, J., Stanton, Jr, V. P., Andresen, J. M., Becher, R., Behm, F. G., Chaganti, R. S., Civin, C. I., Distche, C., Dube, I., Frischauf, A. M. et al. (1996) The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat. Genet.* **14**, 33–41.
- 11 Reifsnyder, C., Lowell, J., Clarke, A. and Pillus, L. (1996) Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nat. Genet.* **14**, 42–49.
- 12 Smith, E. R., Eisen, A., Gu, W., Sattah, M., Pannuti, A., Zhou, J., Cook, R. G., Lucchesi, J. C. and Allis, C. D. (1998) ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 3561–3565.
- 13 Iizuka, M. and Stillman, B. (1999) Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 23027–23034.
- 14 Ikura, T., Ogryzko, V. V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J. and Nakatani, Y. (2000) Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* **102**, 463–473.
- 15 Osada, S., Sutton, A., Muster, N., Brown, C. E., Yates, III, J. R., Sternglanz, R. and Workman, J. L. (2001) The yeast SAS (something about silencing) protein complex contains a MYST-type putative acetyltransferase and functions with chromatin assembly factor ASF1. *Genes Dev.* **15**, 3155–3168.
- 16 Howe, L., Auston, D., Grant, P., John, S., Cook, R. G., Workman, J. L. and Pillus, L. (2001) Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. *Genes Dev.* **15**, 3144–3154.
- 17 Schiltz, R. L. and Nakatani, Y. (2000) The PCAF acetylase complex as a potential tumor suppressor. *Biochim. Biophys. Acta* **1470**, M37–M53.
- 18 Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J. P., Rath, M. and Wagner, E. F. (2003) Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* **112**, 181–192.
- 19 Kalinichenko, V. V., Major, M. L., Wang, X., Petrovic, V., Kuehne, J., Yoder, H. M., Dennewitz, M. B., Shin, B., Datta, A., Raychaudhuri, P. et al. (2004) Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev.* **18**, 830–850.
- 20 Thomson, S., Clayton, A. L. and Mahadevan, L. C. (2001) Independent dynamic regulation of histone phosphorylation and acetylation during immediate-early gene induction. *Mol. Cell* **8**, 1231–1241.
- 21 Barlev, N. A., Liu, L., Chehab, N. H., Mansfield, K., Harris, K. G., Halazonetis, T. D. and Berger, S. L. (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol. Cell* **8**, 1243–1254.
- 22 Carapeti, M., Aguiar, R. C., Goldman, J. M. and Cross, N. C. (1998) A novel fusion between MOZ and the nuclear receptor coactivator TIF2 in acute myeloid leukemia. *Blood* **91**, 3127–3133.
- 23 Liang, J., Prouty, L., Williams, B. J., Dayton, M. A. and Blanchard, K. L. (1998) Acute mixed lineage leukemia with an inv(8)(p11q13) resulting in fusion of the genes for MOZ and TIF2. *Blood* **92**, 2118–2122.
- 24 Chaffanet, M., Gressin, L., Preudhomme, C., Soenen-Cornu, V., Birnbaum, D. and Pebusque, M. J. (2000) MOZ is fused to p300 in an acute monocytic leukemia with t(8;22). *Genes Chromosomes Cancer* **28**, 138–144.
- 25 Kitabayashi, I., Aikawa, Y., Yokoyama, A., Hosoda, F., Nagai, M., Kakazu, N., Abe, T. and Ohki, M. (2001) Fusion of MOZ and p300 histone acetyltransferases in acute monocytic leukemia with a t(8;22)(p11;q13) chromosome translocation. *Leukemia* **15**, 89–94.
- 26 Deguchi, K., Ayton, P. M., Carapeti, M., Kutok, J. L., Snyder, C. S., Williams, I. R., Cross, N. C., Glass, C. K., Cleary, M. L. and Gilliland, D. G. (2003) MOZ–TIF2-induced acute myeloid leukemia requires the MOZ nucleosome binding motif and TIF2-mediated recruitment of CBP. *Cancer Cell* **3**, 259–271.
- 27 Imamura, T., Kakazu, N., Hibi, S., Morimoto, A., Fukushima, Y., Ijuin, I., Hada, S., Kitabayashi, I., Abe, T. and Imashuku, S. (2003) Rearrangement of the MOZ gene in pediatric therapy-related myelodysplastic syndrome with a novel chromosomal translocation t(2;8)(p23;p11). *Genes Chromosomes Cancer* **36**, 413–419.
- 28 Kitabayashi, I., Aikawa, Y., Nguyen, L. A., Yokoyama, A. and Ohki, M. (2001) Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ–CBP fusion protein. *EMBO J.* **20**, 7184–7196.
- 29 Salo, K. (1989) Glutathione transferase as markers of preneoplasia and neoplasia. *Adv. Cancer Res.* **52**, 205–255.
- 30 Sakai, M., Okuda, A. and Muramatsu, M. (1988) Multiple regulatory elements and phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsiveness of the rat placental glutathione transferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 9456–9460.
- 31 Imagawa, M., Osada, S., Okuda, A. and Muramatsu, M. (1991) Silencer binding proteins function on multiple cis-elements in the glutathione transferase P gene. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5–10.
- 32 Morimura, S., Suzuki, T., Hoshi, S., Yuki, A., Nomura, K., Kitagawa, T., Nagatsu, I., Imagawa, M. and Muramatsu, M. (1993) Trans-activation of glutathione transferase P gene during chemical hepatocarcinogenesis of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 2065–2068.
- 33 Suzuki, T., Imagawa, M., Hirabayashi, M., Yuki, A., Hisatake, K., Nomura, K., Kitagawa, T. and Muramatsu, M. (1995) Identification of an enhancer responsible for tumor marker gene expression by means of transgenic rats. *Cancer Res.* **55**, 2651–2655.
- 34 Ikeda, H., Nishi, S. and Sakai, M. (2004) Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis. *Biochem. J.* **380**, 515–521.
- 35 Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I. et al. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313–322.
- 36 Kwak, M. K., Wakabayashi, N. and Kensler, T. W. (2004) Chemoprevention through the Keap1–Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat. Res.* **555**, 133–148.
- 37 Solt, D. and Farber, E. (1976) New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* **263**, 701–703.

- 38 Osada, S., Takano, K., Nishihara, T., Suzuki, T., Muramatsu, M. and Imagawa, M. (1995) CCAAT/enhancer-binding proteins α and β interact with the silencer element in the promoter of glutathione S-transferase P gene during hepatocarcinogenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 31288–31293
- 39 Ohta, K., Osada, S., Nishikawa, J. and Nishihara, T. (2005) Cloning and characterization of a cDNA encoding the histone acetyltransferase MOZ (monocytic leukemia zinc finger protein) in the rat. *J. Health Sci.* **51**, 253–256
- 40 Ikeda, H., Serria, M. S., Kakizaki, I., Hatayama, I., Satoh, K., Tsuchida, S., Muramatsu, M., Nishi, S. and Sakai, M. (2002) Activation of mouse Pi-class glutathione S-transferase gene by Nrf2 (NF-E2-related factor 2) and androgen. *Biochem. J.* **364**, 563–570
- 41 Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745–2752
- 42 Bristow, C. A. and Shore, P. (2003) Transcriptional regulation of the human MIP-1 α promoter by RUNX1 and MOZ. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2735–2744
- 43 Bienz, M. (2006) The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 35–40
- 44 Utley, R. T. and Cote, J. (2003) The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **274**, 203–236
- 45 Timmermann, S., Lehrmann, H., Poleskaya, A. and Harel-Bellan, A. (2001) Histone acetylation and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 728–736
- 46 Krebs, J. E., Fry, C. J., Samuels, M. L. and Peterson, C. L. (2000) Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell* **102**, 587–598
- 47 Doyon, Y., Cayrou, C., Ullah, M., Landry, A. J., Cote, V., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., Yang, X. J. and Cote, J. (2006) ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol. Cell* **21**, 51–64
- 48 Trautwein, C., Will, M., Kubicka, S., Rakemann, T., Flemming, P. and Manns, M. P. (1999) 2-Acetylaminofluorene blocks cell cycle progression after hepatectomy by p21 induction and lack of cyclin E expression. *Oncogene* **18**, 6443–6453
- 49 Gu, W., Shi, X. L. and Roeder, R. G. (1997) Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**, 819–823
- 50 Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595–606
- 51 Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D. and Berger, S. L. (1999) p53 sites acetylated *in vitro* by PCAF and p300 are acetylated *in vivo* in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1202–1209
- 52 Hayes, J. D. and Pulford, D. J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 445–600
- 53 Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I. and Sato, K. (1985) Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 3964–3968
- 54 Satoh, K., Hatayama, I., Tateoka, N., Tamai, K., Shimizu, T., Tateatsu, M., Ito, N. and Sato, K. (1989) Transient induction of single GST-P positive hepatocytes by DEN. *Carcinogenesis* **10**, 2107–2111

Received 3 August 2006/7 September 2006; accepted 3 November 2006

Published as BJ Immediate Publication 3 November 2006, doi:10.1042/BJ20061194

Inhibition of estrogen action by 2-phenylchromone as AhR agonist in MCF-7 cells

Joohee Jung¹, Kunie Ishida, Jun-ichi Nishikawa, Tsutomu Nishihara^{*}

Laboratory of Environmental Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Received 15 March 2007; accepted 6 September 2007

Abstract

Large amounts of phytoestrogen, a group of estrogen derived from plant sources, are taken from the diet by Asians, but a sign of feminization has not been fully recognized. In this study, we found that some flavonoids inhibited an effect on estrogen action without estrogen receptor (ER) binding. Considering the report that dioxin, an aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonist, disrupts the transcriptional activity of ER without binding to the ER, 14 flavonoids were examined for the transcriptional activity of AhR by the yeast reporter assay (AhR). Among them, 2-phenylchromone (flavone, FLA) showed the highest activity. FLA increased the expression of CYP1A1 mRNA, and inhibited the expression of progesterone receptor and pS2 mRNA in MCF-7 cells via non-ER-mediated pathway. Further studies showed that FLA had agonist activity for AhR and enhanced the proteasome-dependent degradation of ER α protein. Thus, FLA inhibited the estrogen action without binding to the ER by acting as a competitive agonist for AhR, which meaning that there can be anti-estrogenic flavonoids such as FLA as well as estrogenic ones such as isoflavones.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: 2-phenylchromone; Aryl hydrocarbon receptor; Estrogen receptor; MCF-7 cell

Introduction

Flavonoids are widely present in plants, and possess diverse physiological activities. Numerous reports have implicated flavonoid phytochemicals as possessing hormone-disrupting activity (Diel et al., 2004; Kuo, 2002; Hsieh et al., 1998). Similar to estrogen's role, several of these phytochemicals have been shown to prevent osteoporosis and cardiovascular disease (Lee et al., 2007; Bingham et al., 1998; Humfrey, 1988; Kutzer and Xu, 1997).

Estrogen plays important roles in the function, growth and differentiation of the mammary gland, uterus, and ovary. It also affects other tissues, including the bone, liver, cardiovascular

system, and brain. Estrogen acts primarily through the estrogen receptor (ER), which is a member of the nuclear hormone receptor superfamily and a ligand-dependent transcription factor (Evans, 1988; Speroff, 2000). The biological activities of many flavonoids may occur via the ER-mediated pathway. It is well known that soybean and its products contain isoflavones, such as genistein, coumestrol, and daidzein, and Asians including Japanese have taken a large amount of such phytoestrogens from food for several hundreds of years. Nishikawa (2003) estimated that Japanese took phytoestrogen at 15 mg/day, corresponding to about ten times the tolerable daily intake of β -estradiol (E2). Nevertheless, feminine qualities in man did not appear (Iwamoto et al., 2006). It may be due to intake of food containing phytoestrogen along with anti-estrogenic substances. The effect of flavonoids on estrogen action by the ER-mediated pathway has been investigated through the authors (Nishihara et al., 2000), but the elucidation of the action of flavonoids is scant. Some chemicals may bind to other receptors, such as aryl hydrocarbon receptor (AhR), constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) (Brosens and Parker, 2003; Mikamo et al., 2003). Among them, we had an interest in

^{*} Corresponding author. Present address: School of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences, 3-6, Minatogima-1, Chuo, Kobe, Hyogo 650-8530, Japan. Tel.: +81 78 304 3000; fax: +81 78 304 2700.

E-mail address: nishihara@huhs.ac.jp (T. Nishihara).

¹ Present address: Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan.

AhR, which is a ligand-activated transcription factor that stimulates gene expression when coupled with AhR nuclear translocator (ARNT) (Carver and Bradfield, 1997; Denison and Whitlock, 1995). TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, a ligand of AhR) induces CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 that hydroxylate E2. Moreover, TCDD and other agonists for AhR disrupt the transcriptional activity of ER by degradation of ER (Buchanan et al., 2000, 2002). Thus, agonists of AhR may mimic the effects of estrogen through the mechanism that is involved in the degradation of ER by a transcriptional active AhR–ARNT complex (Ohtake et al., 2003).

In this study, we investigated the effect of flavonoids on AhR and ER action (Table 1), and found that in MCF-7 cells, 2-phenylchromone (FLA, the structurally most basic compound)

inhibited the expression of ER target genes, suggesting antagonist activity of ER α expressed via AhR in an indirect manner.

Materials and methods

Chemicals

FLA, E2, kaempferol, hesperidin, and α - and β -naphthoflavone (α -NF and β -NF) were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), hesperetin and bromofluoro coumarin were from Extrasynthese (Genay Cedex, France), 2-bromomethyl-7-methoxycoumarin was from BD Gentest (CA, USA), 4-methylumbelliferone was from Sigma-Aldrich Co. (MO, USA), and MG-132 was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Biochanin A, coumestrol, daidzein, genistein, naringenin, phloretin, and quercetin were provided by Dr. H. Utsumi (Kyushu University).

Yeast assay for AhR ligand activity

The yeast transformed with the AhR–ARNT complex and xenobiotic-responsive element (XRE) plasmids was used as described by Miller (Miller, 1999). The AhR ligand activity was determined essentially according to the method of Adachi et al. (2001). The yeast strain YCM3 was grown for 5 h at 30 °C in SD medium lacking tryptophan. Test chemicals were added at given concentrations to 5 μ l of culture and 200 μ l of SD medium containing 2% galactosidase and incubated overnight at 30 °C. After the cell density was determined by reading O.D. at 595 nm, 10 μ l of cell suspension was added to 140 μ l of Z-buffer and β -galactosidase activity was determined by *o*-nitrophenol- β -D-galactopyranoside for 60 min at 37 °C. Absorbance was read at 415 nm.

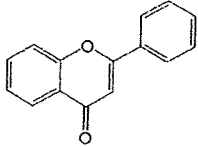
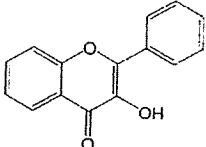
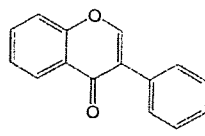
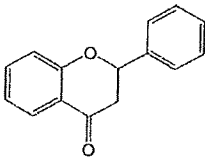
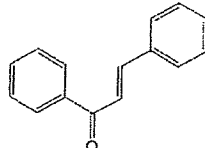
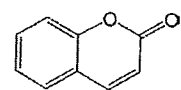
Cells

MCF-7 cells were grown for routine maintenance in Eagle's minimal essential medium (EMEM) with phenol red (Nissui Pharmaceuticals Co., Tokyo, Japan), supplemented with 10 mM non-essential amino acids (Nacalai Tesque Co., Tokyo, Japan) and 10% dextran-charcoal treated fetal bovine serum (FBS). Cells were maintained in a humidified environment at 37 °C with 5% CO₂ in air.

RNA isolation and RT-PCR

MCF-7 (4×10^5 cells/ml) cells were plated in 35-mm dishes and, after 48 h incubation, treated with chemicals for 24 h. After treatment, the cells were washed twice with PBS and RNA was then isolated using Trizol (Invitrogen, CA). cDNA synthesized from 0.8 μ g of total RNA using ReverTra Ace- α ™ (TOYOBO, Osaka, Japan) and PCR for progesterone receptor (PR), pS2, CYP1A1, and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) was performed using Ampli Taq (Roche, Basel, Switzerland). The optimum cycle number that fell within the exponential range of response was used for PR (30 cycles), pS2 (21 cycles), CYP1A1 (30 cycles), or G3PDH (17 cycles).

Table 1
Structures of flavonoids used in this study

Structures	Classifications	Test chemicals
	Flavones	Flavone (FLA)
	Flavonols	Kaempferol Quercetin
	Isoflavones	Biochanin A Daidzein Genistein
	Flavanones	Hesperetin Hesperidin Naringenin
	Chalcones	Phloretin
	Coumarins	Bromofluoro coumarin 2-Bromomethyl-7-methoxycoumarin Coumestrol 4-Methylumbelliferone

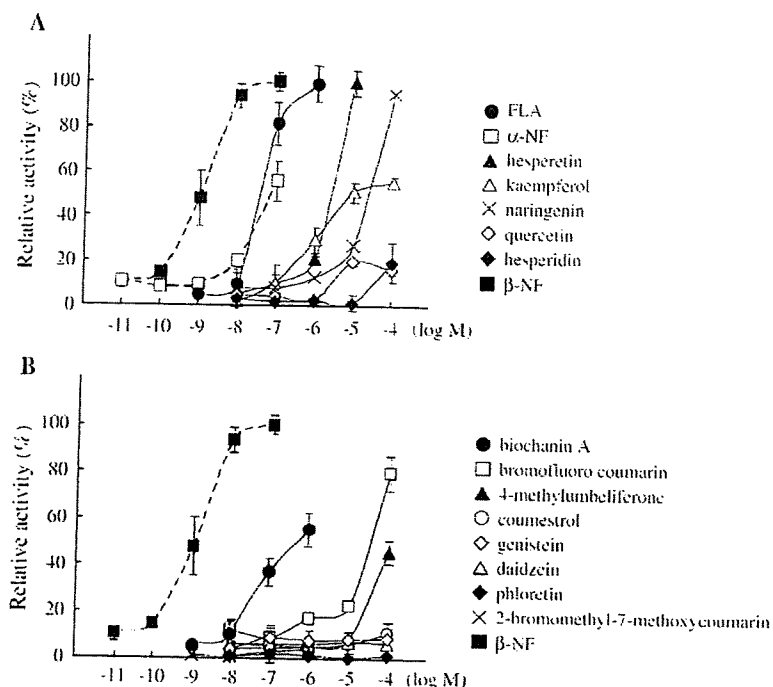


Fig. 1. AhR agonist activity of flavonoids. The test chemicals were applied to the recombinant yeast assay for AhR ligand activity as described in Materials and methods. The test chemicals were divided into two groups; a group included flavones, flavonols, and flavanones (A), and the other group included isoflavones, chalcones, and coumarins (B). Some flavonoids including FLA showed positive activity.

Yeast two-hybrid assay (ER)

We used a yeast two-hybrid assay system with the rat ER (rER) α and the coactivator, TIF2 as described in earlier works (Nishihara et al., 2000; Jung et al., 2004).

Estrogen receptor competitive binding assay

The binding activity of chemicals to human ER (hER) α was determined using a fluorescence polarization assay by FP Screen-for-Competitors Kit (ER α , high sensitivity; PanVera, Madison, WI). Briefly, 1 μ l of each chemical solution was added to 49 μ l of screening buffer in tubes and mixed well by shaking. Then, 50 μ l of ER α -fluorescence estrogen (ES1) complex solution was added to the tube, incubated at room temperature for 1 h, and the fluorescence was determined using BEACON2000 (PanVera, Madison, WI). DMSO (0% inhibition) instead of the chemical solution was used as a negative control and 10 μ l of ES1 (50 nM) instead of ER α ES1 complex as a

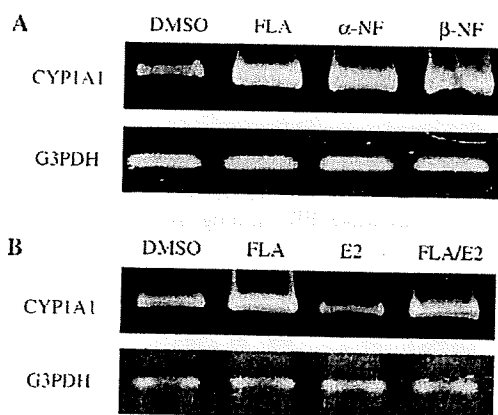


Fig. 2. Effect of FLA on the expression of CYP1A1 mRNA in MCF-7 cells. FLA (10 μ M) was incubated with MCF-7 cells for 24 h in the absence (A) and presence (B) of E2 (10 pM). α - and β -NFs (10 μ M) were used as positive controls, and DMSO as negative control. The expression of CYP1A1 and G3PDH mRNA (as an internal control) was detected by RT-PCR as described in Materials and Methods. FLA induced the expression as well as α -, β -NFs (A), but it was inhibited by E2 (B).

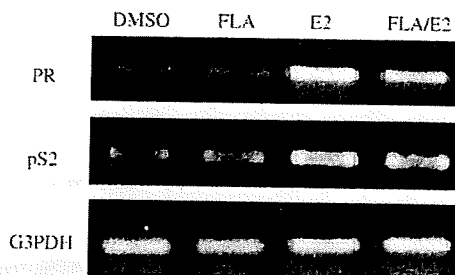


Fig. 3. Effect of FLA on mRNA level of E2-dependent target genes. FLA (10 μ M) was incubated with MCF-7 cells for 24 h in the absence and presence of E2 (10 pM). The expression of PR, pS2 and G3PDH (as an internal control) mRNA was detected by RT-PCR. FLA repressed the expression by E2.

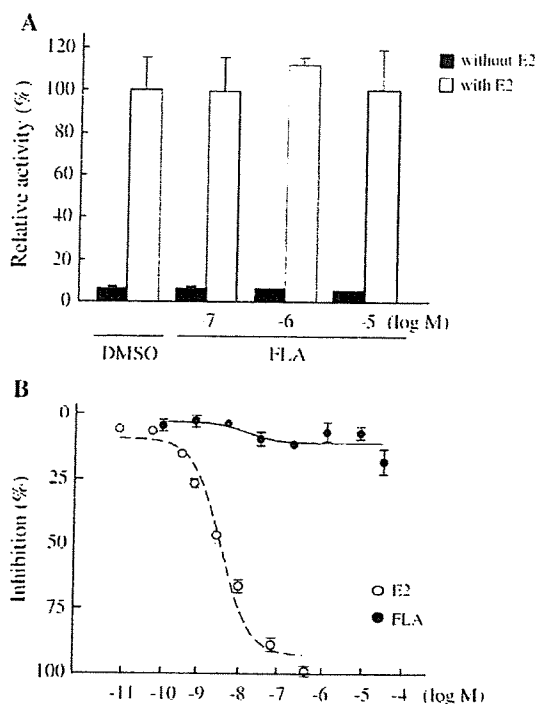


Fig. 4. Estrogen activity of FLA. (A) ER α agonist or antagonist activity of FLA was examined by yeast two-hybrid assay, and the relative activity (%) was calculated as the percentage of E2 (5 nM) activity (100%). (B) Binding affinity of FLA was examined by ER α competitive binding assay as described in Materials and Methods. FLA exhibited no effect on estrogen binding activity to ER α .

positive control (100% inhibition). Curve fitting was performed using GraphPad Prism 2.01 software to obtain IC₅₀.

Protein isolation and Western blots

MCF-7 (4×10^5 cells/ml) cells were plated in 35-mm dishes and, after 48 h, treated with chemicals for the indicated times. After treatment, the cells were washed twice with PBS and then lysed in 70 μ l of lysis buffer containing 8 M urea, 1% NP-40, and 2% 2-mercaptoethanol. After removing the cell debris, the supernatants were used for protein concentration assay. The protein was boiled for 2 min, resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel, and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore immobilon transfer

membrane, MA). After the membrane was blocked using 3% skimmed milk (Yukijirushi, Tokyo, Japan) overnight at 4 °C, it was probed with primary antibodies ER α (1:200 in 1% skimmed milk, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA) and G3PDH monoclonal antibodies (1:1000 in 1% skimmed milk, Chemicon International, MA). Following incubation with peroxidase-conjugated secondary antibody, immunoglobulins were visualized using the ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

Results and discussion

In the yeast reporter gene assay, the effect of flavonoids on AhR was evaluated because it had been reported that TCDD and other AhR agonists inhibited the expression of several E2-induced genes without binding to ER (Buchanan et al., 2002). Among 14 tested flavonoids, 7 compounds (FLA, biochanin A, hesperitin, kaempferol, naringenin, bromofluoro coumarin and 4-methylumbelliferone) dose-dependently increased the AhR activity (Fig. 1A and B). On the contrary, Hamada et al. (2006) reported that some of these flavonoids suppressed TCDD-induced CYP1A1 expression in dioxin-responsive HepG2 cells by permeating Caco-2 cell monolayers. The difference may involve the metabolism of flavonoids by drug-metabolizing enzymes in the Caco-2 cells. Furthermore, we investigated FLA, which was particularly responsible for the high activity of AhR. Although FLA was ten times weaker than β -NF (positive control), it was stronger than the other flavonoids and α -NF (a second positive control). Therefore, FLA was chosen for further study. AhR agonists induce the expression of several genes. For example, mRNA levels of CYP1A1 are induced by TCDD and other AhR ligands (Whitlock et al., 1996). RT-PCR assay indicated that in MCF-7 cells, FLA (fold, 2.6 ± 1.0) induced the expression of CYP1A1 mRNA at similar levels to α - and β -NF (folds, 2.2 ± 0.5 and 2.4 ± 0.5) (Fig. 2A). In contrast, E2 inhibits the expression of genes induced by AhR ligands (Stacey et al., 1999). In this study, the induction of CYP1A1 mRNA by FLA (fold, 2.2 ± 0.1) was inhibited in combination with E2 (fold, 1.5 ± 0.4) (Fig. 2B). The expression of G3PDH mRNA was measured as control, and then it was not changed. Thus, the results suggest that FLA acted as an AhR agonist.

When we tested the anti-estrogenic activity of many chemicals including flavonoids by the yeast two-hybrid assay and the competitive ER binding assay, some flavonoids and

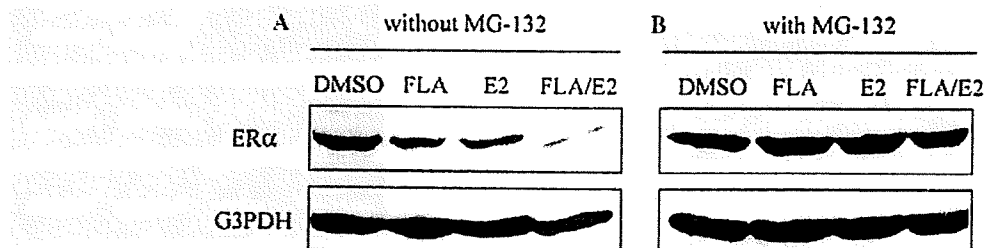


Fig. 5. Effect of FLA on ER α protein level. In the absence (A) or presence (B) of MG-132 (protease inhibitor), FLA (10 μ M) was incubated with/without E2 (10 pM) in MCF-7 cells for 24 h. The cell lysates were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis for ER α and G3PDH (as an internal control). FLA induced the degradation of ER α and it was prevented by MG-132.

their metabolites were determined to be ER antagonists as well as agonists (Nishihara et al., 2000; Ahn et al., 2004a,b; Okamoto et al., 2006). As mentioned earlier in this work, however, these assays are insufficient to explain the anti-estrogenic activity of some flavonoids because these assays can measure only when chemicals directly affect the interaction with ER α . When we screened for the active compound by the reporter gene assay using MCF-7 cells in the presence of E2, some chemicals inhibited the transcriptional activity of ER (details not shown). The expressions of PR and pS2 mRNA were induced by E2 depending on the dose, indicating that these expressions demonstrated estrogen activity (Seo et al., 2003; Petz et al., 2002; Kim et al., 2000). As an AhR agonist, FLA was investigated for estrogen action. E2 (1 pM) induces the mRNA expression of PR (fold, 9.6 ± 1.2) and pS2 (fold, 6.3 ± 0.1) in MCF-7 cells. The E2 induced mRNA expressions of PR (fold, 2.1 ± 0.2) and of pS2 (fold, 1.5 ± 0.1) was minimized by treating with FLA, although FLA alone did not affect these expressions (Fig. 3). The expression of G3PDH mRNA was measured as control. To reconfirm the mode of action of FLA on ER α , the binding activity was examined. As shown in Fig. 4A, FLA had neither the agonistic, nor antagonistic activity on ER in a yeast two-hybrid assay using rER. In the competitive binding assay using hER, FLA did not inhibit binding of ER (Fig. 4B). The results suggested that FLA of the basic structure had anti-estrogenic activity without binding to the ER receptor, though several derivatives of the flavone group have estrogenic activity (Innocenti et al., 2007; Hiremath et al., 2000).

AhR agonists induce rapid proteasome-dependent degradation of ER (Wormke et al., 2003). Furthermore, in breast cancer cells, ligand-bound AhR enhances ubiquitinated forms of ER α and proteasome-dependent degradation of ER α to repress the E2-induced transactivation (Wormke et al., 2000). As shown Figs. 1 and 2, FLA was suggested to be a ligand of AhR. Consequently, the protein level of ER α in the presence of FLA was determined in MCF-7 cells. FLA or E2 significantly decreased ER α protein level and FLA together with E2 enhanced this effect. Since TCDD, a ligand of AhR, activates proteasome-dependent degradation of ER α (Ohtake et al., 2003), the effect of protease inhibitor, a MG-132, was determined on ER α protein level. The results show that MG-132 prevented ER α from degradation by FLA (Fig. 5). Moreover, the results indicate that FLA induced the expression of CYP1A1 mRNA to enhance the degradation of ER α protein, and inhibited the expression of PR and pS2 mRNA through the AhR pathway.

It has been reported that some flavones show estrogenic activity through ER binding so that their intake has a preventive effect against prostate cancer (Raschke et al., 2006) and menopausal syndrome (Miller-Martini et al., 2001), and also has a stimulative effect on endometritis (Cline et al., 2004). Recently the Food Safety Commission of Japan published the upper-limit dose for soy isoflavone supplement to be 30 mg/day. Although Wood et al. (2006) reported that soy isoflavones had anti-estrogenic effects in the postmenopausal breast through ER signaling, we have presented in this work that FLA can be anti-estrogenic via AhR in MCF-7 cells. This means that other AhR agonists in food may potentially affect the action of estrogen.

Acknowledgments

We thank Dr. T. Matsuda (Kyoto University, Japan) for yeast transformed ARNT and AhR and Dr. H. Utsumi (Kyushu University, Japan) for providing chemicals. We appreciate Dr. S. Osada (Nagoya City University, Japan) for their valuable discussion and advice during this study, and also Dr. Y. K. Oh, living in Philadelphia, USA, for kind reviewing the English of this manuscript.

References

- Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C.A., Kato, T., Saeki, K., Matsuda, T., 2001. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *Journal of Biological Chemistry* 276, 31475–31478.
- Ahn, E., Akao, T., Nakamura, N., Komatsu, K., Nishihara, T., Hattori, M., 2004a. Screening of medicinal plant extracts for estrogenic activity in combination with a glycosidase treatment. *Journal of Traditional Medicines* 21, 81–86.
- Ahn, E., Nakamura, M., Akao, T., Nishihara, T., Hattori, M., 2004b. Estrogenic and antiestrogenic activities of the roots of *Moghania philippinensis* and their constituents. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27, 548–553.
- Bingham, S.A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L., Coward, A., 1998. Phytoestrogens; where are we now? *British Journal of Nutrition* 79, 393–406.
- Brosens, J.J., Parker, M.G., 2003. Oestrogen receptor hijacked. *Nature* 423, 487–488.
- Buchanan, D.L., Sato, T., Peterson, R.E., Cooke, P.S., 2000. Antiestrogenic effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mouse uterus: clinical role of the aryl hydrocarbon receptor in stromal tissue. *Toxicological Sciences* 57, 302–311.
- Buchanan, D.L., Ohshiko, S., Tohyama, C., Cooke, P.S., Iguchi, T., 2002. Dioxin inhibition of estrogen-induced mouse uterine epithelial mitogenesis involves change in cyclin and transforming growth factor- β -expression. *Toxicological Sciences* 66, 62–68.
- Carver, L.C., Bradfield, C.A., 1997. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 272, 11452–11456.
- Cline, J.M., Franke, A.A., Register, T.C., Golden, D.L., Adams, M.R., 2004. Effects of dietary isoflavone aglycones on the reproductive tract of male and female mice. *Toxicologic Pathology* 32, 91–99.
- Denison, M.S., Whitlock Jr., J.P., 1995. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *Journal of Biological Chemistry* 270, 18175–18178.
- Diel, P., Schmidt, S., Vollmer, G., Janning, P., Upmeyer, A., Michna, H., Bolt, H.M., Degen, G.H., 2004. Comparative response of three rat strains (DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens. *Archives of Toxicology* 78, 183–193.
- Evans, R.M., 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889–895.
- Hamada, M., Satsu, H., Natsume, Y., Nishiumi, S., Fukuda, I., Ashida, H., Shimizu, M., 2006. TCDD-induced CYP1A1 expression, an index of dioxin toxicity, is suppressed by flavonoids permeating the human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8891–8898.
- Hiremath, S.P., Badami, S., Hunasagatta, S.K., Patil, S.B., 2000. Antifertility and hormonal properties of flavones of *Striga orobanchioides*. *European Journal of Pharmacology* 391, 193–197.
- Hsieh, C.Y., Santell, R.C., Haslam, S.Z., Helferich, W.G., 1998. Estrogen effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Research* 58, 3833–3838.
- Humfry, C.D., 1988. Phytoestrogens and human health effects; weighing up the current evidence. *Natural Toxins* 6, 51–59.
- Innocenti, G., Vegeto, E., Dall'Acqua, S., Ciana, P., Giorgetti, M., Agradi, E., Sozzi, A., Fico, G., Tome, F., 2007. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. *Phytomedicine* 14, 147–152.
- Iwamoto, T., Nozawa, S., Yoshiike, M., Hoshino, T., Baba, K., Matsushita, T., Tanaka, S.N., Naka, M., Skakkebaek, N.E., Jorgensen, N., 2006. Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Human Reproduction* 21, 760–765.

- Jung, J., Ishida, K., Nishihara, T., 2004. Anti-estrogenic activity of fifty chemicals evaluated by in vitro assays. *Life Sciences* 74, 3065–3074.
- Kim, J., Petz, L.N., Ziegler, Y.S., Wood, J.R., Potthoff, S.J., Nardulli, A.M., 2000. Regulation of the estrogen-responsive pS2 gene in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74, 157–168.
- Kuo, S.M., 2002. Flavonoids and gene expression in mammalian cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 505, 191–200.
- Kutzer, M.S., Xu, X., 1997. Dietary phytoestrogens. *Annual Review of Nutrition* 17, 353–381.
- Lee, M.K., Yang, H., Ma, C.J., Kim, Y.C., 2007. Stimulatory activity of lignans from *Machilus thunbergii* on osteoblast differentiation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30, 814–817.
- Mikamo, E., Harada, S., Nishikawa, J., Nishihara, T., 2003. Endocrine disruptors induce cytochrome P450 by affecting transcriptional regulation via pregnane X receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology* 193, 66–72.
- Miller, C.A., 1999. A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast displays additive responses to ligand mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 160, 297–303.
- Miller-Martini, D.M., Chan, R.Y., Ip, N.Y., Sheu, S.J., Wong, Y.H., 2001. A reporter gene assay for the detection of phytoestrogens in traditional Chinese medicine. *Phytotherapy Research* 15, 487–492.
- Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Daikayama, F., Saito, K., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Hori, S., Ustumi, H., 2000. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *Journal of Health Science* 46, 282–298.
- Nishikawa, Y., 2003. Kankyo-Horumon. *Nihon Hyoron-sha*, Japan, p. 178.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2003. Modulation of oestrogen receptor signaling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550.
- Okamoto, Y., Suzuki, A., Ueda, K., Ito, C., Itoigawa, M., Furukawa, H., Nishihara, T., Kojima, N., 2006. Anti-estrogenic activity of prenylated isoflavones from *milletia pachycarpa*: implication of for pahmacophores and unique mechanisms. *Journal of Health Science* 52, 1–6.
- Petz, L.N., Ziegler, Y.S., Loven, M.A., Nardulli, A.M., 2002. Estrogen receptor α and activating protein-1 mediate estrogen receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 143, 4583–4591.
- Raschke, M., Rowland, I.R., Magee, P.J., Pool-Zobel, B.L., 2006. Genistein protects prostate cells against hydrogen peroxide-induced DNA damage and induced expression of genes involved in the defence against oxidative stress. *Carcinogenesis* 27, 2322–2330.
- Seo, H.S., Joume, F., Larsimont, D., Sotiriou, C., Leclercq, G., 2003. Decrease of estrogen receptor expression and associated ERE-dependent transcription in MCF-7 breast cancer cells after oligomycin treatment. *Steroids* 68, 257–269.
- Speroff, L., 2000. A clinical understanding of the estrogen receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 900, 26–39.
- Stacey, M.R., Toscano, D.G., Mattingly, C.J., Toscano Jr., W.A., 1999. Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells. *Journal of Biological Chemistry* 274, 3430–3438.
- Whitlock Jr., J.P., Okino, S.T., Dong, L., Ko, H.P., Clarke-katzenberg, R., Ma, Q., Li, H., 1996. Cytochromes P450 5: induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB Journal* 10, 809–818.
- Wood, C.E., Resigter, T.C., Franke, A.A., Anthony, M.S., Cline, J.M., 2006. Dietary soy isoflavones inhibit estrogen effects in the postmenopausal breast. *Cancer Research* 66, 1241–1249.
- Womke, M., Stoner, M., Saville, B., Safe, S., 2000. Crosstalk between estrogen receptor α and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes. *FEBS Letters* 478, 109–112.
- Womke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., Safe, S., 2003. The aryl hydrocarbon receptor mediated degradation of estrogen receptor α through activation of proteasomes. *Molecular and Cellular Biology* 23, 1843–1855.

PRTR化学物質の各種核内受容体に対する結合性

井 上 大 介*	松 井 久 恵*	清 荒 金 和 成*
楊 敏**	胡 建 英***	池 金 道 淳†
廣 辻 淳 二†	西 川 淳 一††	

Binding Affinity of PRTR Chemicals to Various Human Nuclear Receptors

Daisuke INOUE*, Hisae MATSUI*, Kazunari SEI*,
Min YANG**, Jianying HU***, Jun ARAGANE†,
Junji HIROTSUJI†, Jun-ichi NISHIKAWA†† and Michihiko IKE*

* Division of Sustainable Energy and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

** State Key Lab of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

*** College of Environmental Science, Peking University, Beijing 100871, China

† Advanced Technology R&D Center, Mitsubishi Electric Co., 8-1-1 Tsukaguchi-Honmachi, Amagasaki, Hyogo 661-8661, Japan

†† Department of Environmental Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Abstract

Since the 1990s, population decreases, reproductive anomalies and malformations of highly aquatic animals have been increasingly reported. One possible cause is considered to be endocrine disruptive effects induced by environmental contaminants through a direct interaction with nuclear receptors, not only with steroid hormone receptors but also with other ones. In this study, we examined the binding affinities of 20 chemicals, which are registered in the Japanese Pollutant Release and Transfer Register (PRTR) and have been abundantly discharged into aquatic environments to eight human nuclear receptors and assessed their potential endocrine disruptive effects. Of the 20 PRTR chemicals tested, nonylphenol diethoxylate, telephthalic acid (TPA), and linear dodecyl-benzensulfonate (DBS) bound to at least two receptors at high concentrations. TPA and DBS enhanced the activities of both retinoic acid receptor (RAR) γ and vitamin D receptor (VDR) in a dose-dependent manner. This suggests that TPA and DBS may disturb the vitamin D endocrine functions mediated by a VDR-VDR homodimer or a VDR-RAR heterodimer. Also, our results indicate that endocrine disruptors unsuspected under the current assessment criteria could potentially bind to various nuclear receptors and disrupt endocrine systems mediated by such receptors.

Key words: aquatic environment, endocrine disruptive effect, nuclear receptor, PRTR chemical

1. はじめに

1990年代から、魚類や両生類など、水への依存度の高い野生生物種において、個体数の減少、生殖異常、形態異常の発生が数多く報告されている¹⁻⁶⁾。このような危機的状況をもたらした原因の一つは、環境中に放出された人工化学物質のホルモン様作用に起因する正常な内分泌

バランスの攪乱にあるとされている⁷⁾。内分泌攪乱化学物質 (endocrine disruptors; EDs) の内分泌機能への影響発現には、核内受容体 (nuclear receptor; NR) を介するメカニズムと介さないメカニズムが存在するが、その大部分は NR への直接作用によると考えられている⁸⁾。NR の中には、ヒトを含め、異なる生物種間で高い保存性を示すものもあることから⁹⁾、EDs による内分泌機能攪乱に伴う悪影響

* 大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

** 中国科学院生态环境研究中心 Beijing 100085, China

*** 北京大学環境学院 Beijing 100871, China

† 三菱電機先端技術総合研究所 〒661-8661 兵庫県尼崎市塚口本町 8-1-1

†† 大阪大学大学院薬学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6

がヒトにも生じる可能性があるものと推測される。

従来、EDsに関する研究は、主にエストロゲン受容体 (estrogen receptor ; ER) などの性ホルモン受容体や甲状腺ホルモン受容体 (thyroid hormone receptor ; TR) を中心に進められてきた。しかし近年、ヒトのNRファミリーに48種類の受容体が存在することが断定され¹⁰⁾、EDsの作用点が性ホルモン受容体やTR以外のNRにもある可能性が議論されるようになった^{11,12)}。例えば、プラスチックの可塑剤等に使用されるフタル酸ジエステルの生体内代謝物であるフタル酸モノエステルによる雌生殖毒性等の生態毒性にはペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor ; PPAR)^{13,14)}が、また有機スズ化合物によるイボニシ貝のインボセックス発達の促進にはレチノイドX受容体 (retinoid X receptor ; RXR)¹⁵⁾が関与していることが示唆されている。また、地下水汚染物質の一つ、トリクロロエチレンの生体内代謝物であるトリクロロ酢酸とジクロロ酢酸による肝臓癌とPPAR α の関連性も指摘されている^{16,17)}。これらの新たな科学的事実から、化学物質の内分泌攪乱活性を評価するためには、様々なNRに対する作用を網羅的に検討することが重要であるといえる。すなわち、これまでに性ホルモン受容体やTRについて内分泌攪乱作用がないと判定された化学物質を含め、多くの人工化学物質のNRに対する作用を検討していくことが必要である。本研究では、水環境中に大量に放出されている化学物質のヒトNRに対する結合性を調査し、潜在的な内分泌攪乱作用の可能性を探った。被検物質には、環境汚染物質排出移動登録 (pollutant release and transfer register ; PRTR) 制度の第1種指定化学物質に

含まれ、公共用水域への年排出量が15tを上回る有機化学物質群の中から20種類を選定した。被検物質のNRに対する結合性の評価は、ヒトNRのうちER α 、TR α 、ビタミンA受容体 (retinoic acid receptor ; RAR) γ 、RXR α 、ビタミンD受容体 (vitamin D receptor ; VDR)、PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ を対象として、*in vitro*でNRとコアクチベーターの相互作用を検出できるハイスループットスクリーニング法であるCoA-BAP (coactivator-bacterial alkaline phosphatase) 法¹⁸⁾を用いて実施した。

2. 方 法

2.1 化学物質

標準リガンドとして、ER α には17 β -エストラジオール (E2)、TR α には3,3',5-トリイオド-L-チロニン (T3)、RAR γ には*all-trans*-レチノイン酸 (retinoic acid ; RA)、RXR α には9-*cis* RA、VDRには1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD3 (1,25(OH)₂D3)、PPAR α にはGW7647、PPAR γ にはRosiglitazone、PPAR δ にはGW501516を用いた。

PRTR制度で第1種指定化学物質に指定され、公共用水域への年間排出量15t以上で、水より蒸気圧が低い有機化学物質群の中から20種類の化学物質 (Table 1) を被検物質として選定した。直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (linear dodecyl-benzenesulfonate ; DBS) は、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (linear-alkylbenzenesulfonate ; LAS) の代表として選出した。また、ノニルフェノールジエトキシレート (nonylphenol diethoxylate ; NP2EO) は、ノニルフェノールポリエトキシレート (nonylphenol polyethoxylate ;

Table 1 Binding affinity of 20 PRTR chemicals for various nuclear receptors^a

No.	Compound	ER α	TR α	RAR γ	RXR α	VDR	PPAR α	PPAR γ	PPAR δ
1	Ethylene glycol	-	-	-	-	-	-	-	-
2	N,N-Dimethylformamide	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Nonylphenol diethoxylate (NP2EO)	++	-	-	-	-	-	+	-
4	Thiourea	-	-	-	-	-	-	-	-
5	ϵ -Caprolactam	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Ethylenediaminetetraacetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Terephthalic acid (TPA)	-	-	++	-	++	-	+	-
8	Diethylenetriamine	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Toluene	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1,4-Dioxane	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Methacrylic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
12	2-Aminoethanol	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Acrylic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Linear dodecyl-benzenesulfonate (DBS)	-	+	++	-	++	-	+	-
15	1,3-Dichloro-2-propanol	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Hexamethylenediamine	-	-	-	-	-	-	-	-
17	<i>p</i> -Xylene	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Aniline	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Pyridine	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Phenol	-	-	-	-	-	-	-	-

^a ++, the lowest detectable effective concentrations of tested chemicals were 10³ to 10⁵ times as much as that of the cognate ligand; +, 10⁶ to 10⁸ times; -, not detected.

NPnEOs) の代表として使用した。NP2EOは、親物質であるNPnEOsにも含まれているが、NPnEOsの水環境中での分解の最終産物の一つである。

エチレングリコール、チオ尿素、トルエン、2-アミノエタノール、DBS、1,3-ジクロロ-2-プロパノール、*p*-キシレンは和光純薬工業、N,N-ジメチルホルムアミド、 ϵ -カプロラクタム、テレフタル酸 (telephthalic acid; TPA)、1,4-ジオキサン、アニリン、フェノールはキシダ化学、NP2EO、エチレンジアミン四酢酸、ジエチレントリアミン、メタクリル酸、アクリル酸、ヘキサメチレンジアミンは東京化成工業、ピリジンは林純薬工業から購入した。

標準リガンド及び被検化学物質は、DMSOに溶解後4℃で保存し、使用前にDMSOで段階希釈して用いた。

2.2 CoA-BAP法

本研究では、西川らが開発したCoA-BAP法¹⁸⁾を用いて、供試化学物質のNRへの結合を評価した。CoA-BAP法は、生細胞を使用せずに、リガンドに依存したNRとコアクチベーターの相互作用をマイクロプレート上で検出する *in vitro* 手法である。本手法では、大腸菌を用いて予め高発現させたNRリガンド結合領域 (NR-LBD) とコアクチベーター (CoA) を使用する。NR-LBDを固定したプレートにCoAとリガンドを加えると、リガンドに依存してNRの立体構造が変化し、CoAがNR-LBDに結合する。CoAにはBAPが融合されているため、NRとCoAの相互作用の強さは、BAPのアルカリフォスファターゼ (AP) 活性の強さとして測定できる。このAP活性は用量反応性を示し、検出感度が酵母two-hybrid法よりも高いことが確認されている¹⁸⁾。また本法は、マイクロプレート上で操作するため、一度に多数の化学物質を試験することができる。さらに、NR-LBDとCoAをタンパクとして用いているため、これまで環境汚染化学物質のホルモン様活性の検出に汎用されてきた酵母法で問題視されてきた酵母細胞膜への透過性や酵母細胞に対する毒性による影響を回避することが可能である。

CoA-BAP法は、上述した原理に則って作製されたNuLigandシリーズ (マイクロシステムズ) を用いて行った。0.1 M炭酸緩衝液に溶解させた受容体を96穴マイクロプレートに分注し、4℃で一晩静置することでウェルに固定化させた。緩衝液A (Tris-HCl 20 mM, KCl 100 mM, EDTA 0.25 mM, glycerol 5%, dithiothreitol 0.5 mM, Tween 20 0.05%, pH 7.2) でウェルを3回洗浄後、緩衝液Aに懸濁させた 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ のTIF2-BAP (PPAR δ 以外) 或いはCBP-BAP (PPAR δ) を100 μl 分注し、適宜希釈した標準リガンド或いは被検物質を添加して、4℃で1時間静置した。緩衝液B (Tris-HCl 50 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Nonidet P-40 0.1%, pH 7.2) でウェルを3回洗浄後、発色基質 (*p*-nitrophenylphosphoric acid 10 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8.0) を100 μl 添加して、30℃或いは37℃で反応させ、405 nmの吸光度 (A_{405}) を測定した。実験は全て3連で行い、平均と標準偏差 (standard deviation; SD) を算出した。ある被検物質濃度における A_{405} 値の平均-SDがDMSOの A_{405} 値の平均+SDを上回り、それより高濃度で A_{405} 値がさらに上昇した場合に陽性と判定した。

3. 結 果

CoA-BAP法により、 10^{-9} - 10^{-3} Mの範囲で、20種のPRTR

化学物質の各種NRに対する結合性を調べた。17種類の化合物では、いずれのNRに対しても有意な結合性を示さなかったが、NP2EO、TPA、DBSの3物質はそれぞれ2, 3, 4種類のNRに結合した (Table 1)。NRで見ると、RXR α 、PPAR α 、PPAR δ を除く5種類のNRに対して、少なくとも1種類の被検化学物質が結合した。活性を示した物質の用量反応曲線を受容体種ごとにFig. 1に示す。

NP2EOは、ER α とPPAR γ に対して結合性を示した。ER α では、標準リガンドであるE2に比べて 10^3 倍高濃度である 10^{-6} Mから結合性が確認された (Fig. 1A)。一方、PPAR γ への結合性が認められる濃度は標準リガンドに比べて 10^6 倍高濃度であり、活性は非常に低かった (Fig. 1E)。

TPAは、RAR γ 、VDR及びPPAR γ に対して結合性を示した。RAR γ に対する結合は 10^{-7} Mから認められ、それより高濃度では濃度依存的に活性が上昇した (Fig. 1C)。VDRに対しては、 10^{-8} Mで活性を示し、それより高濃度では、1,25(OH)₂D3と同様の割合で、濃度依存的に活性が上昇した (Fig. 1D)。PPAR γ においては、 10^{-6} M以上の濃度で結合したが、それより高濃度における活性の増大は緩やかであった (Fig. 1E)。

DBSは、TR α 、RAR γ 、VDR、PPAR γ の4種類のNRに結合した。TR α に対する結合性は、 10^{-4} M以上の濃度でのみ認められた (Fig. 1B)。PPAR γ に対しては、 10^{-6} Mで結合性を示した。その活性は 10^{-6} - 10^{-4} Mにおいて僅かずつ高まったが、 10^{-4} M以上では変化しなかった。RAR γ とVDRに対しては、それぞれ 10^{-6} M及び 10^{-7} Mで結合性を示した。また、これらより高濃度では、それぞれの標準リガンドの用量反応曲線に類似した割合で濃度依存的に活性が増大した (Fig. 1C, D)。

4. 考 察

従来、内分泌攪乱活性に基づく環境汚染化学物質のリスク評価は、主にERとTRを対象として進められ、現在EDsとして疑いのある物質に挙げられているアルキルフェノール類やフタル酸エステル類、ビスフェノールA、農薬類などに対して数多くの知見が得られてきた。本研究で調べた20種類のPRTR化学物質の中で、NP2EOがER α に結合することが観察された。NP2EOは、酵母法¹⁹⁾やマスのビテログニン遺伝子発現試験²⁰⁾においてエストロゲン様活性が確認されている。また、本研究で得られたNP2EOのER α に対する最少活性発現濃度は、既往研究¹⁸⁾における4-ノニルフェノールのER α に対する最少活性発現濃度の1/100-1/10であり、これは酵母法における結果¹⁹⁾と同等である。これらより、CoA-BAP法で得られたNRに対する結合性はある程度妥当なものであると考えられた。他方、TR α には、 10^{-4} M以上の高濃度でDBSが結合する可能性のあることが示されたが、DBSを含むLASの甲状腺ホルモン様活性に関する報告はこれまでにない。

これまで、性ホルモン受容体とTR以外のNRは水環境中における化学物質のリスク評価に考慮されてこなかった。そこで本研究では、新たな試みとして、公共用水域に大量に排出されている化学物質を対象として、ER、TR以外のNRへの結合性を調べた。その結果、NP2EOがPPAR γ 、TPAがRAR γ 、VDR及びPPAR γ 、DBSがRAR γ 、VDR及びPPAR γ に結合する可能性のあることが確認された。特に、TPAとDBSのRAR γ 及びVDRに対する結合性は標準リガ

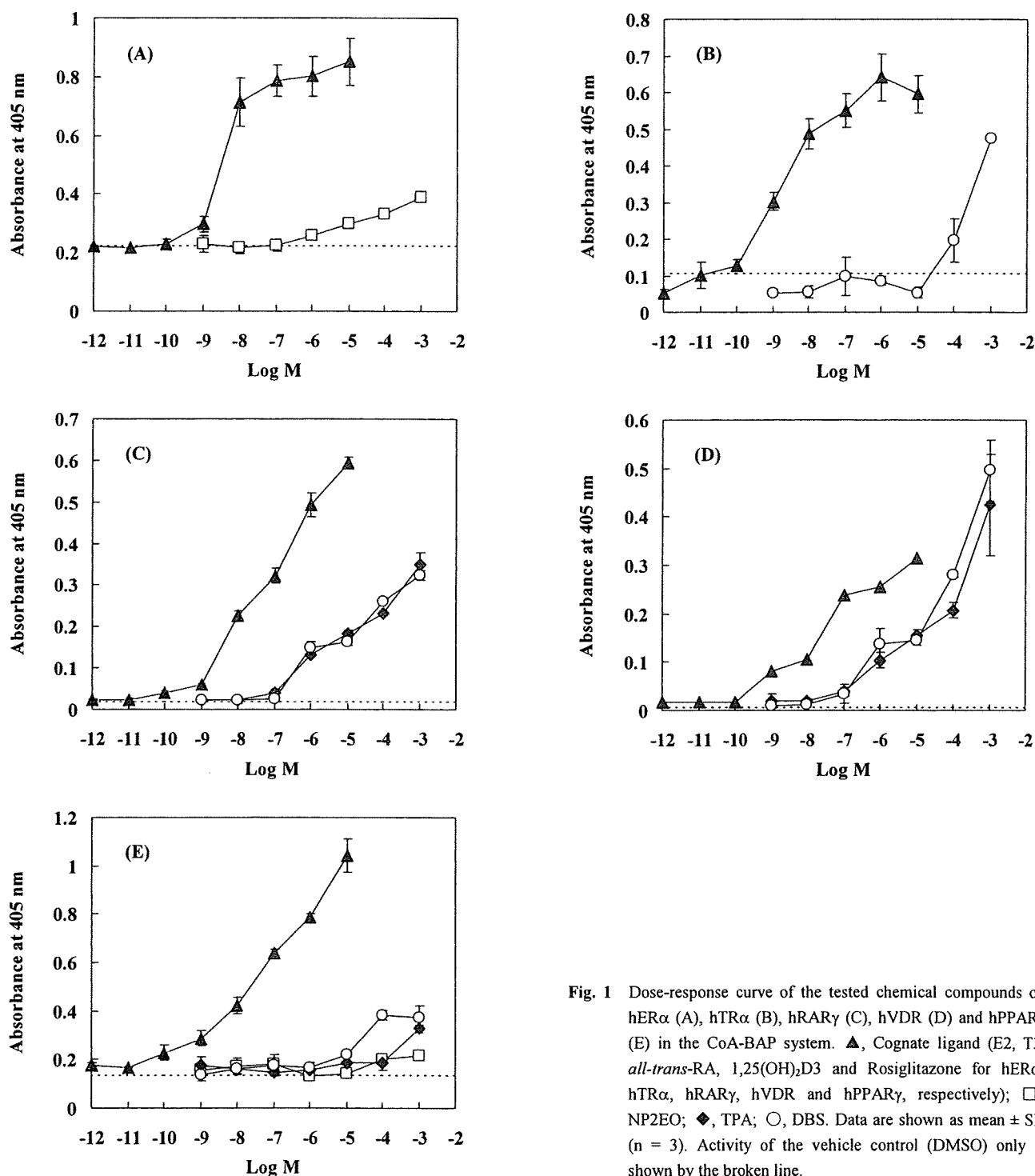


Fig. 1 Dose-response curve of the tested chemical compounds on hER α (A), hTR α (B), hRAR γ (C), hVDR (D) and hPPAR γ (E) in the CoA-BAP system. $\blacktriangle$, Cognate ligand (E2, T3, *all-trans*-RA, 1,25(OH) $_2$ D3 and Rosiglitazone for hER α , hTR α , hRAR γ , hVDR and hPPAR γ , respectively); $\square$, NP2EO; $\blacklozenge$, TPA; $\circ$, DBS. Data are shown as mean $\pm$ SD ($n = 3$). Activity of the vehicle control (DMSO) only is shown by the broken line.

ドに類似した割合で濃度依存的に増大した (Fig. 1C, D)。これらの結果は、現在使用されている多種多様な化学物質の中に、48種類存在するNRのいずれか或いは複数に作用して、内分泌攪乱活性を示すものが数多く存在していることを強く示唆するものである。このため、今後のEDsの評価では、種々のNRを介した内分泌攪乱活性のスクリーニングを実施していくことが重要である。

本研究は被検化学物質のNRに対する結合性をスクリーニングしたものであり、陽性と判定されたケースで必ず

しも生体影響が生じる訳ではない。しかし、本研究の結果はEDsによる内分泌攪乱作用の第一段階であるNRとの結合が生じる可能性を示すものであり、被検化学物質の潜在的な内分泌攪乱作用の可能性をある程度推測し得るものと言える。また、NRには種差があるため、ヒトNRを用いた本研究の結果が全野生生物種に当てはまる訳ではない。しかし、NRの種類によっては、異種間で高い保存性を示すものもあることから⁹⁾、本研究の結果に基づき、ヒト以外の野生生物種を含め、被検物質の生物への悪影

響の可能性をある程度推察できるものと考えられる。そこで、以下では、本研究で得られた結果を基に、幾つかのNRに対する結合性が確認されたNP2EO、TPA及びDBSの潜在的な内分泌攪乱作用に関する推察を試みた。

RARは、脊椎動物の視覚や形態形成、発生、細胞分化、組織の恒常性に重要な役割を果たしている。RARのリガンドであるRAは、脊椎動物の催奇形物質であり、その過剰摂取は多種多様な奇形を発生させる^{21,22)}。1990年代から北米で観察されているカエルの奇形にも、水環境汚染化学物質によるRARシグナル伝達系の攪乱が関係していることが指摘されている^{23,24)}。VDRは、カルシウムの恒常性、骨代謝、及び他の重要な生物作用（細胞分化の誘導、細胞増殖阻害、免疫修飾、他のホルモン系の制御など）において中心的な役割を担っている²⁵⁾。PPAR γ は、主に脂肪とグルコースの代謝に重要な役割を果たしており、種々の臓器において抗発癌作用を発現する²⁶⁾。また、そのアゴニストは、臨床でII型糖尿病の治療薬として使用されている。現在のところ、環境中でVDR或いはPPAR γ を介したものと考えられる悪影響の観察事例はない。

RAR γ ²⁷⁾とPPAR γ ²⁶⁾は、RXRとヘテロ二量体を形成し、各々の標的遺伝子を転写活性化する。しかし、これらの受容体への結合性が認められたNP2EO（PPAR γ ）、TPA（RAR γ 、PPAR γ ）、DBS（RAR γ 、PPAR γ ）は、いずれもRXR α には結合しない（Table 1）。NRが二量体を形成して活性化されるシグナル経路においては、リガンドが二量体を成すNRの片方にしか結合しない場合の影響は、双方に結合する場合に比べて小さい可能性が指摘されている⁹⁾。このことから、NP2EO、TPA、DBSが単独でRARやPPAR γ を介するシグナル伝達系を攪乱する可能性は小さいことが示唆された。しかし、有機スズ化合物のようにRXR α に結合する化学物質が共存する環境下では、RARやPPAR γ のシグナル伝達系への悪影響が生じる可能性もあり得る。ただし、RARとPPAR γ に対する最少活性発現濃度が環境水中濃度に比べて高いことから（NP2EOで10⁴倍以上²⁸⁾、TPAで100倍以上²⁹⁾、DBSで5倍以上³⁰⁾）、現状ではこれらの物質が生物に悪影響を及ぼしている可能性は低いものと考えられる。

他方、VDRは、ホモ二量体、或いはRARかRXRとのヘテロ二量体を形成し、VD応答遺伝子を転写制御する^{31,32)}。VDRへの結合が確認されたTPAとDBSはRXRに結合しないことから、上述したRAR及びPPAR γ のケースと同様に、VDR-RXRヘテロダイマーを介するVDRシグナル伝達機能への悪影響の可能性は低いものと予想される。一方、TPAとDBSは、RAR γ とVDRの両受容体に対する結合性が濃度依存的に増大したことから、それぞれ単独でVDRホモ二量体或いはVDR-RARヘテロ二量体に強く作用する可能性がある。TPAは、混餌投与によって、Fischer-344ラット離乳児に対して、TPAカルシウムを主成分とする膀胱結石を形成し、膀胱移行上皮の肥厚化と高カルシウム尿症を引き起こすことが報告されている³³⁾。また、DBSを含むLASは、経口投与によって哺乳動物胎児に骨化遅延を引き起こすことが明らかにされている³⁴⁾。すなわち、両物質が有する生体毒性は、VDRシグナル伝達系に関わる生体内機能と興味深い一致を示している。以上のことから、TPAとDBSは、急性毒性を示さない濃度において、VDRホモ二量体或いはVDR-RARヘテロ二量体に作用するこ

とでVDRシグナル伝達機能を乱し、生体に悪影響を及ぼす可能性のあることが示唆された。しかし、TPAは、環境水中濃度がRAR γ 及びVDRへの最少活性発現濃度よりもそれぞれ100倍及び10倍以上低く、また、生分解性が良好で残留性が低いことから²⁹⁾、実環境中で活性が発現する可能性は高くないものと推察される。他方、DBSは、環境水中濃度がRAR γ 及びVDRに対する最少活性発現濃度と同程度の場合もあることから³⁰⁾、活性発現の可能性を完全には否定できないが、水環境中での生分解性が高く、数時間～数日間で消失することから³⁰⁾、リスクはさほど高くないものと推定される。以上のように、現状のデータからでは、TPAやDBSが単独で野生動物のVDRシグナル伝達機能に悪影響を及ぼす可能性は低いと考えられるものの、これらが共存した場合には、相乗的な作用が生じることも否定できない。また、環境中への排出実態が明らかでない微量化学物質の中にもNRに結合性を示すものが存在すると推測されることから、多様なNRへの結合を介したリスクについて評価していくことが望まれる。

5. ま と め

本研究では、公共用水域への排出量の多いPRTR第1種指定化学物質20種のNR結合性を調査した。その結果、これまでに内分泌攪乱活性が疑われてこなかったTPAとDBSが複数のNRに結合する可能性のあることが示された。このことは、現在の評価体系で断定されている、或いは疑われているEDs以外の物質が、性ホルモン受容体やTR以外のNRを通じて、内分泌攪乱作用を示す可能性のあることを強く示唆している。今後の内分泌攪乱作用に関するリスク評価では、環境中に排出される可能性のある多様な人工化学物質を対象とし、種々のNRへの結合を介したリスクについて、網羅的、総合的に評価していくことが重要である。

謝 辞

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)提案公募型開発支援研究協力「環境負荷低減・高安全水処理システム技術の研究開発」の一環として実施したものである。ここに謝意を表します。

(原稿受付 2006年10月 2日)

(原稿受理 2006年12月11日)

参 考 文 献

- 1) Bell, B., Spotila, J. R. and Congdon, J. (2006) High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife refuge, *Environ. Poll.*, **142**, 457-465.
- 2) Edwards, T. M., Moore, B. C. and Guillette, L. J. Jr. (2006) Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view, *Int. J. Androl.*, **29**, 109-121.
- 3) Kingsford, M. J., Suthes, I. M. and Gray, C. A. (1996) Exposure to sewage plumes and the incidence of deformities in larval fishes, *Mar. Poll. Bull.*, **33**, 201-212.
- 4) Houlihan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H. and Kuzmin, S. L. (2000) Quantitative evidence for global amphibian population declines, *Nature*, **404**, 752-755.
- 5) Vandenlangenberg, S. M., Canfield, J. T. and Magner, J. A. (2003) A regional survey of malformed frogs in Minnesota (USA) (Minnesota malformed frogs), *Environ. Monit. Assess.*, **82**, 45-61.
- 6) Wake, D.B. (1991) Declining amphibian populations, *Science*, **253**, 860.

- 7) Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., Brandt, I. and Vethaak, A. D. (2000) Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation, *Crit. Rev. Toxicol.*, **30**, 71-133.
- 8) 遠山千春, 大迫誠一郎, 石村隆太 (2000) 内分泌攪乱化学物質の健康リスクアセスメント, 日本臨牀, **58** (12), 2393-2400.
- 9) 西川淳一 (2004) 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生態影響に関する研究, 環境省 平成15年度 内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムの解明等基礎的研究報告書, 83-99.
- 10) Clawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. and Mangelsdorf, D. J. (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the X-files, *Science*, **294**, 1866-1870.
- 11) Janošek, J., Hilscherová, K., Bláha, L. and Holoubek, I. (2006) Environmental xenobiotics and nuclear receptors-Interactions, effects and in vitro assessment, *Toxicol. in Vitro*, **20**, 18-37.
- 12) Tabb, M. M. and Blumberg, B. (2006) New modes of action for endocrine-disrupting chemicals, *Mol. Endocrinol.*, **20**, 475-482.
- 13) Bility, M. T., Thompson, J. T., McKee, R. H., David, R. M., Butala, J. H., Vanden Heuvel, J. P. and Peters, J. M. (2004) Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by phthalate monoesters, *Toxicol. Sci.*, **82**, 170-182.
- 14) Lovekamp-Swan, T. and Davis, B. J. (2003) Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system, *Environ. Health Perspect.*, **111**, 139-145.
- 15) Nishikawa, J., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraishi, F. and Horiguchi, T. (2004) Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods, *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 6271-6276.
- 16) Laughter, A. R., Dunn, C. S., Swanson, C. L., Howroyd, P., Cattley, R. C. and Corton, J. C. (2004) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in response to trichloroethylene and metabolites, trichloroacetate and dichloroacetate in mouse liver, *Toxicology*, **203**, 83-98.
- 17) Zhou, Y.-C. and Waxman, D. J. (1998) Activation of peroxisome proliferator-activated receptors by chlorinated hydrocarbons and endogenous steroids, *Environ. Health Perspect.*, **106** (Suppl. 4), 983-988.
- 18) Kanayama, T., Mamiya, S., Nishihara, T. and Nishikawa, J. (2003) Basis of a high-throughput method for nuclear receptor ligands, *J. Biochem.*, **133**, 791-797.
- 19) Routledge, E. J. and Sumpter, J. P. (1996) Estrogenic activity of surfactants and their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 241-248.
- 20) White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P. and Parker, M. G. (1994) Environmental persistent alkylphenolic compounds are estrogenic, *Endocrinology*, **135**, 175-182.
- 21) Collins, M. D. and Mao, G. E. (1999) Teratology of retinoids, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 399-430.
- 22) Soprano, D. R. and Soprano, K. J. (1995) Retinoids as teratogens, *Annu. Rev. Nutr.*, **15**, 111-132.
- 23) Gardiner, D. M. and Hoppe, D. M. (1999) Environmentally induced limb malformations in mink frogs (*Rana setentrionalis*). *J. Exp. Zool.*, **284**, 207-216.
- 24) Gardiner, D., Ndayibagira, A., Grün, F. and Blumberg, B. (2003) Deformed frogs and environmental retinoids, *Pure Appl. Chem.*, **75**, 2263-2273.
- 25) Dusso, A. S., Brown, A. J. and Slatopolsky, E. (2005) Vitamin D, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **289**, 8-28.
- 26) Michalik, L., Devergne, B. and Wahli, W. (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories, *Nature Rev. Cancer*, **4**, 61-70.
- 27) Chambon, P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors, *FASEB J.*, **10**, 940-954.
- 28) Hoai, P. M., Tsunoi, S., Ike, M., Kuratani, Y., Kudou, K., Viet, P. H., Fujita, M. and Tanaka, M. (2003) Simultaneous determination of degradation products of nonylphenol polyethoxylates and their halogenated derivatives by solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry after trimethylsilylation, *J. Chromatogr. A*, **1020**, 161-171.
- 29) 環境省 (2005) 化学物質ファクトシート2004年度版57. テレフタル酸, 214-216.
- 30) 環境省 (2005) 化学物質ファクトシート2004年度版10. 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩, 39-42.
- 31) Schröder, M., Bendik, I., Becker-André, M. and Carlberg, C. (1993) Interaction between retinoic acid and vitamin D signaling pathway, *J. Biol. Chem.*, **268**, 17830-17836.
- 32) Schröder, M., Müller, K. M., Becker-André, M. and Carlberg, C. (1994) Response element selectively for heterodimerization of vitamin D receptors with retinoic acid and retinoid X receptors, *J. Mol. Endocrinol.*, **12**, 327-339.
- 33) Chin, T. Y., Tyl, R. W., Popp, J. A. and Heck, H. d'A. (1981) Chemical urolithiasis I. Characteristics of bladder stone induction by terephthalic acid and dimethyl terephthalate in weanling Fischer-344 rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **58**, 307-321.
- 34) IPCS. (1996) Environmental Health Criteria, 169.

内分泌攪乱化学物質の 低用量作用と毒性学の あたらしい課題

井上 達 いのうえ とおる

(国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター, 生体異物応答学・分子毒性学)

内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)がヒトや野生生物の生殖に影響を与えるという危惧が新聞などで取り上げられてから10年以上が過ぎた。先頃は哺乳瓶に由来するビスフェノール A や玩具に関するフタル酸エステル類の扱いが取り上げられたが、ひと頃のように大きな話題にはならなかった。けだし内分泌攪乱問題は過去の出来事のように感じている人は少なくないかもしれない。しかしそうした人びとにも、その後この問題がどうなっているのか訝しく感じている向きはこれまた少なくないであろう。それだけに、内分泌攪乱化学物質問題とは、いったい何だったのか、いまそれはどんな意味をもって人々に関わっているのか、そんな点を中心に、これまでになってきたことを整理してみたいと思う。

* *

毒性学では、比較的高用量域における実験的生体反応の用量相関直線を、実験データ以下の低用量域へ外挿して無反応域^{*1}を求め、それら無反応域よりも低い用量での生体影響を“無影響”と推定している。無反応域以下では、障害性はないと考えるわけである。平易な論理であるが、或る事

柄が“ナイ”ということ予測し、保証するということは、科学の方法では大いに稀なことである。必然的にこの論理には、用量相関が線形であるべきことなど様々の前提条件が求められ、これが破れるとその保証が効かなくなる。

しかし線形の用量相関を自明とする安易な認識とも相俟って、危惧された物質の環境中での曝露量は十分に微量と考えられたから、既知の無影響量以下の内分泌攪乱化学物質の曝露が、環境生物やヒトに生体影響を惹き起こす可能性は想定外であった。取り上げられた例もフロリダのアポプカ湖や五大湖での事故のように極端なケースにならざるを得なかった^{*2}。だから低用量の内分泌攪乱化学物質にヒトや野生生物の生存を危うくする様々の危惧があるとして、これらが社会問題化したとき、環境生物やヒトで危惧される事象の事実関係もさることながら、もし事実とすれば“なぜ見落とされたのか”、あるいは、実験動物の観察でなぜ見いだされなかったのか、という疑問がまず取り上げられた。確かに、内分泌ホルモンに類する受容体を通じた低用量の影響が関与する可能

^{*1} 無作用量(NOEL: no observed effect level)とか、無影響量(NOAEL: no observed adverse effect level)と呼ばれる。

^{*2} たとえば、フロリダ州のアポプカ湖では、1980年、dicofol および DDT とその代謝物の汚染によりワニの棲息数が減少した。ミシガン湖周辺のカモメでは、DDT/DDE によるとされる雌化現象が観察された。

性などは、レイチェル・カーソンの『沈黙の春』⁽¹⁾を思い起こした少なからぬ研究者が指摘した。経済協力開発機構(OECD)の試験開発部門が、従前、ホルモン剤の開発などに用いて知られていた“子宮腫大試験”を、環境中の化学物質の調査用にまったく新しく取り上げて調べ直すことになった経緯も、生体のホルモン受容体を介した影響への視点が働いていたし、世界保健機関(WHO)の化学物質安全計画部門がさらなる新たな試験法の開発の重要性を強調した所以でもあった。

こうした中で、高用量域から低用量域への直線外挿の如何を調べてゆくうちに、内分泌ホルモン影響には、それまで認識されていなかった「低用量作用」があることがわかってきた。たとえば、機構の異なるいくつかの複合影響をもたらす物質で生体影響について用量相関を見ると、しばしば非線形反応を呈し、低用量域ではじめて浮かび上がってくる性質が見いだされる。内分泌攪乱化学物質の低用量作用は、追試につぐ追試をうみ、にわかに注目を集めることとなったが、当時、メカニズムなど原理的な説明がつかなかったこととも相俟って、内分泌攪乱現象の真偽の決着はつかなかった^{*3}。

かくして、内分泌攪乱化学物質に関する最初の国際ワークショップ、ウェイブリッジ会議から10年を経た2007年、その10周年のワークショップが、フィンランド科学アカデミーと欧州委員会(EU)の主催によりヘルシンキで開催された。そこでは、相加的で、無作用量(閾値)の認められない反応や、感染・免疫機構ないし神経・行動を中心に、これまで知られていなかった低用量影響がつつぎと紹介された。内分泌攪乱化学物質の生体影響の詳細には、依然として未知の要素が含まれているものの、ようやく、その片鱗が明らかになってきたのを感じた。

^{*3} 内分泌攪乱化学物質の疑いがある作用機序の明らかでなかったものとしては、PCBsやPBBs、あるいは殺虫剤のうち塩素基や臭素基に置き換えたハロゲングループをもつような化学物質については、それらのフェノールの官能基の一部がステロイドホルモン受容体アゴニスト(作用物質)もしくはアンタゴニスト(競合物質)として働く性質があることがわかってきた。

それらを取り入れてこれまでの経過を振り返れば、冒頭で述べた毒性学の論理の前提条件が、どこかで破れていたといわざるを得ない。しかもそれは、想定外の非線形反応にもとづく作用にとどまらず、未知の事柄を含む生物学の認識そのものに関わっていたため、条件の破綻として気付かれなかったものである。近代毒性学の中でいまだ理論化されていない論理の破れ、それは何だったのか。なぜ旧来の毒性学はこれを明らかにできなかったのか。いま低用量問題の本質のありかを解く意義は、ここにある。

「低用量問題」とは^{*4}

内分泌攪乱化学物質の性質として、低用量作用が取り上げられたのは、化学物質のホルモン受容体を介した影響による極微量作動性の有無への疑問が発端であった。それはやがて「反応閾値の有無」への疑問へとつながり、それらの「相乗性・相加性の有無」、あるいは「高用量から低用量への外挿的推定の妥当性」や「反応の線形/非線形用量相関問題」などの諸問題に連関していった。やがて低用量問題として取り上げられた諸点が、相互に密接な関連をもったいわば“ひとつの問題”であることがわかってきた。だから解明の戦略は、その一角を取り崩すことであった。

2002年、ロンドン大学のコーテンカンパ(A. Kortenkamp)らは、内分泌攪乱性を有すると考えられる微量の物質のいくつかを一括して作用させたところ、個別に作用させたときには何らの影

^{*4} 2000年10月、米国環境保護庁(EPA)は、いわゆる内分泌攪乱問題で対象となっているような物質影響が、通常の試験法で従来求められてきた無作用量(NOEL)や無毒性量よりも低い用量域で観察され得るかに焦点をあて、「低用量問題に関するワークショップ」をノースカロライナで開催した。そこでは、ビスフェノールA(BPA)の低用量データ報告の認否について、確認されたとする報告と認められなかったとする報告の双方に信頼性(credibility)を確認する結果となった。さらに低用量作用を示す試験の再現性や、長期試験がジエチルスチルベストロール(DES)にもBPAにも作用を示さなかった事実に言及し、低用量問題の不確実性を結論した。(http://www.epa.gov/scipoly/ospendo/pubs/edmvslowdosepeerfinalrpt.pdf)

響を見せなかった用量の物質が、混合によって女性ホルモン(エストロゲン)にも匹敵する高いホルモン様活性を起し得ることを試験管内反応で明らかにした^{*5(2)(3)}。個々ではわずかな影響に留まったとしても、複合した場合にこのような加算効果があるとすると、その影響はもはや無視できなくなると考えられる。これを相加性複合効果と呼んでいるが、かれらの実験のもうひとつのポイントは、限りなく閾値に近い低用量でこの相加性が認められたということである。続いて、個体レベルの試験系でも、ふたつのグループから顕著な相加効果が報告された⁽⁴⁾⁽⁵⁾。すなわちデンマークにおける2007年のワークショップ^{*6}での発表で、クリスチャンセン(S. Christiansen)らは、抗アンドロゲン作用をもつビクロゾリン、フルタミド、およびプロシミドンなどの農薬の複合投与で、尿道下裂や肛門生殖突起間長の短縮などが、混合体の投与動物群のみに見られたこと⁽⁶⁾を、ライダー(C. V. Rider)らは、そのビクロゾリン、プロシミドンの他、リヌロンなどの農薬と、BBP, DBP, DEHPなどのフタレート類、あわせて7種の混合投与^{*7}で、同様の指標による複合効果が観察された⁽⁷⁾⁽⁸⁾、と報告した。閾値付近での相加性の観察そのものが、従前では想定外な試験である。また、この結果は、フタレート類という類似の生体作用を有する物質の組合せゆえに認められた特異

な現象とする考え方もあろうが、少なくとも類似のホルモン様作用シグナルに関する限り、複合効果を否定できないことが確定した点では、この結果のもつ意味は重く、今後のリスクアセスメント上、大きな検討課題を負うこととなった⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。

種々のホルモンとホルモン類似物質による障害

以上のような認識に立って、身の回りの物質に目を向けてみると、われわれは、内分泌攪乱性が危惧される化学物質もさることながら、多くのホルモン物質、ホルモン類似物質そのものに取り囲まれて暮らしていることに気づく。もとより、生体ホルモンは、本来、低用量で作用し、また、用量、投与方法によっては有害になり得る性質のものである。したがって生体にはそのような影響を避けるためのより緻密な防護システムが備わっており、これが順調に機能していることが、外界から過度な影響を受けないようにする要件と考えられる。胎児の血清中に含まれる高濃度の α -フェトプロテインは、母胎間での女性ホルモンの影響を吸収する役割をもっているし、更年期女性に対するホルモン補充療法が、乳がんへのリスクなど様々の副作用を念頭において、ガイドラインに沿って慎重に行われることもそうした事情にもとづいている⁽¹²⁾。

これに対して、胚細胞期や胎児期・新生児期のように、まだ機能発達が安定する前の時点では、ホルモン様物質が生体ホルモンに置き換わって不可逆的な影響を及ぼすことが無視できない、とするデータが集積してきた⁽¹³⁾。この点は、思春期も同様と考えられる^{*8}。こうした置き換え効果による障害や不全の可能性には、もとより注意が求められていた。ちなみに、ヒトでの発がん性に予防効果が期待され、ほぼ無制限に健康に良いかのごとくに理解されてきたいわゆる植物ホルモン(phytoestrogens)のひとつ、大豆イソフラボン^{*9}

^{*5} これはかつてタフト大学のソト(A. Soto)が試験管内の複合アッセイ系確立の可能性を論じた報告にならって、個体レベルでの影響を見たものである(A. M. Soto et al.: *Environ. Health Perspect.*, **105**(3), 647(1997))。実際のデータは、著者らの文中にあるような相乗性(synergy)は意味せず、相加性(additive)に相当する。

^{*6} 第4回内分泌攪乱物質ワークショップ(2007年5月28～31日)。デンマーク環境省の後援で、コペンハーゲンにて開催された。

^{*7} フタル酸エステル類は、フタル酸とアルコールのエステル体で、ポリ塩化ビニルを主成分としたプラスチックの可塑剤として汎用されている。発生期の動物への曝露で、毒性、とくに生殖発生毒性が認められるため、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)(EDHP)をはじめとするフタル酸エステル類の玩具への使用は禁止されている。フタル酸エステル類の内分泌攪乱性は、女性ホルモン受容体への親和性が弱く確定していないが、何らかの複合的な影響の可能性を疑う研究者もあり、ここに示されるような複合影響の検討が行われてきた。最近、シャープズ(R. M. Sharpe)らは周産期にフタル酸を曝露したラットにおける性分化の変調を報告し、注目されている(文献(8))。

^{*8} EPAは思春期アッセイ試験の採用を重視しており、またこの点は、WHOのグローバルアセスメントでも、巻頭の要旨で取り上げられるべきであったと考えられる。

^{*9} その功罪とも、糖質のはずれた大豆イソフラボン・アグ

の場合も、それまでの想定に反してその取り過ぎには、障害が惹き起こされる可能性が喚起されるようになっている^{*10}。また、牛乳由来の調製乳を与えられた乳幼児と、豆乳由来の調製乳を与えられた乳幼児とでは、尿中のゲニステインやダイゼインなどの植物ホルモン濃度は、後者は前者の500倍高いという報告⁽¹⁴⁾をあげて米国内分泌学会では注意を促している。こうした認識は、内分泌攪乱化学物質への理解の中で深まったもので、ホルモン様作用をもつ化学物質への注視は、もはやリスクアセスメントの必須要件となりつつある。

あらたに見いだされる低用量での生体影響

内分泌攪乱化学物質が、線形の用量反応関係をとらず、U字型や逆U字型の反応曲線をとったり、非常に低用量域で特異的反応を示すことについて、当初、そのこと自体に疑念を投げかける声も少なくなかった⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。それはひとつに、当時その原理的説明がなし得ずいわば現象論に留まったこと、そしてなによりも安全性試験の領域で、非線形反応の想定される例を取り上げなかったからである。しかし様々の核内受容体やDNAの転写因子群の交差反応ネットワークを形成する受容体群や共役して働く補助因子での、至適の用量作動域がしばしば相互にずれていたりすることや、用量の増加とともに受容体反応が飽和に達し不応答状態になるといった現象が明らかにされるにつれて、問題点が整理され、急速に理解が進んでいる⁽¹⁷⁾。こうして理解のギャップの埋められた事柄は少なくないが、他方、まだ未知の領域にとどまるといわざるを得ない事柄も多い。米国の国立環境影響研究所(NIEERL)ではそうした点を重視して、これまでの研究計画のタイムラインを、より長期的展望をもって設定し、今後の検討に入っている⁽¹⁸⁾。

(1) 低用量域で観察される確率論的な生体反応

低用量影響の中には、種々の試験法を適用すると、しばしば意味のあるデータとは認識されず、いわばノイズのような結果として見られることが稀ではない。低用量での変化は頻度も低く、平均値をとるとしばしば測定バラツキの中に隠れてしまうからである。内分泌攪乱現象が、特異な高感受性の遺伝的体質によって特定の個体に起こるものと考えて、たとえばエストロゲン受容体遺伝子多型を探索する研究も進められた。すると確かに先駆的な研究の中には、そうした原因形質が見いだされてきた⁽¹⁹⁾。しかし他方、非遺伝的に、確率論的に惹き起こされる可能性も見いだされている。この面からの研究は充分には進展していないが、ミシガン州立大学のグッドマン(J. Goodman)は、発がんプロモータの研究の中でつぎのような観察をしている。それは、フェノバルビタールによるDNAのメチル化という修飾の形成確率は、平均すれば実験群は対照群と差異が認められなかったが、ネズミ1匹ごとに検出してみると、対照群とは異なって、個体ごとに大きく変動した値が観察されたというものである⁽²⁰⁾。DNAのメチル化は、エピジェネティックな変化と呼ばれるが、ここで認められた低用量におけるメチル化は確率論的に形成され、純系動物でも個体ごとに異なり同じ結果にはならない。このフェノバルビタールによるDNAのメチル化には、発がんのプロモータ作用が知られており、結果として、個体ごとに発がんの臓器分布や頻度が異なってくるという症状のランダムさを惹き起こすことになる。エピジェネティックな変化としては、他に、クロマチン凝縮、ヒストン修飾などがあるが、内分泌攪乱化学物質における低用量反応に対しても、こうしたエピジェネティックな現象として理解する考え方が急速に進展している⁽²¹⁾。これこそ従来の毒性学が想定してこなかった現象で、この領域での今後の進展に注視する必要がある。なお、こうしたエピジェネティックな変化がゲノムに刷り込まれて(=ゲノムインプリンティング)、世代を超えて伝達され、固定されてゆく可能性も現実の間

リコンのエストロゲン類似作用に関連するものと考えられている。

*10 厚生労働省: 大豆及び大豆イソフラボンに関するQ&Aを参照。(http://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/02/h0202-1a.html)

題となっている⁽²²⁾⁽²³⁾。

(2) 高感受性期: 胎生期・新生児期・思春期の問題

機能的に安定する前の胎生期での影響に関して、無視できない不可逆的な事象が指摘されていることは前述した⁽²⁴⁾。胎生期・新生児期・思春期問題には、低用量問題との関連を示すデータが少なからず見いだされており、WHOの報告書「グローバルアセスメント」⁽²⁵⁾でも指摘された通り、胎児や新生児では、ウィンドウ効果^{*11}と呼ばれるわずかな期間での投与が特異的な不可逆反応を惹き起こす現象が知られている⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾。また、野生型の成体では検知されない用量レベルだが、遺伝子改変動物などを用いた過剰反応系の動物を用いると検出される、“新しい概念の影響”の観点から、①閾値問題、②非線形の用量相関、あるいは③相加反応などの問題を見直す試みも進んでいる。内分泌攪乱化学物質として危惧される物質の生体影響研究では、影響メカニズムが未解明である一方、確認や追試が必要となることも少なくない。とくに時を経て遅れて現れる成長後の行動にかかる影響については、解析法そのものに未知の点が少ない。系統的な実験的情報収集が求められる所以である。

WHOの「グローバルアセスメント」では触れられなかったが、性ホルモンのバランスの不安定な“思春期”に関する研究も、胎生期・新生児期と同様に注意が払われるべきと考えられる。胎生期や思春期などの性成熟の臨界期への曝露が与える影響の評価基準は、いまだ定まっていない。疫学的に尿道下裂の発症に関与する遺伝子 *CXorf6* がクローニングされ⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾、実験的には胎生期へのビスフェノールAの投与が思春期の早発傾向とつながるとの報告もなされている⁽³⁰⁾。*CXorf6*のような遺伝子と化学物質との持続的な相互作用など、今後の研究が求められている。

(3) 内分泌器官の拡張や、内分泌機能の概念の拡張

この10年余りの研究により、従来、性ホルモン受容体では想定されていなかった細胞内器官や組織に、内分泌器官の役割が、見いだされてきた。トマス(P. Thomas)らによる膜受容体^{*12}の同定は、そのカテゴリーに含まれる発見であった⁽³¹⁾⁽³²⁾。この発見は、オルファニデス(G. Orphanides)らによって指摘されていた、従来の性ホルモン受容体機能に一般的であった核内受容体で説明の困難だった即時型反応を、遺伝子発現を介さないノンゲノミック(non-genomic)な機構にもとづくホルモン様作用⁽³³⁾で理解するうえで決定的な役割を果たした。やがて、細胞小器官である小胞体の膜にもエストロゲン受容体(ER)の局在が見いだされ⁽³⁴⁾、急峻な反応への対応機構が明らかになっていった。これらの発見は、内分泌攪乱問題には、多くの未知の要因が関与していることをあらためて喚起した。肝臓や、脂肪細胞など、これまで内分泌器官とは考えられてこなかった臓器が、内分泌器官としての役割を果たしていることも明らかになってきた。たとえばノニルフェノールという物質は、通常の方法で見るとごく弱い女性ホルモン様の作用をもっているにとどまるが、肝臓に注目すると、生殖器よりもずっと強い活性を示すことが、岡崎国立基礎生物学研究機構の井口泰泉らによって明らかにされている⁽³⁵⁾。これは、“内分泌器官としての肝臓”という見方につながる結果である。脂肪組織についても同様のことが指摘されている⁽³⁶⁾。イボニシでの内分泌攪乱の知られる有機スズが脂肪組織の増殖を惹き起こすことや、それらの機構に核内受容体が関与していることなどは、これに関連するかもしれない。かくして、同じ受容体結合能を有するリガンド物質が、広範な標的受容体シグナル機構、さらにはまったく異なった表現型(フェノタイプ)の発現に関わる共働

^{*11} 形態形成期である胎生期の狭い胎齢期間に、異物投与期特異的に生体影響が観察されること。

^{*12} 核内受容体と区別する。核内受容体が細胞内で、細胞質や核内にあって、特異的リガンド物質をDNAと特異的に相互作用を促し、転写に寄与するのに対して、細胞膜上に分布し、核酸と直接的相互作用を介さずにホルモン受容体影響を惹起する。