

ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討に関する研究

分担研究者 藤本 成明 広島大学原爆放射能医学研究所 助教授

研究要旨

内分泌かく乱物質のうちでも、エストロゲン様物質は人への影響が早くから危惧されてきた。そこで、他の細胞内伝達物質及び転写因子との相互作用を明らかにするため、ER alpha 発現ベクターとレポーター遺伝子をコトランスフェクトした培養細胞で、ERE 部位と AP-1 部位を介するエストロゲン応答を比較した。今回検討した内分泌かく乱物質においては、それらによる ERE または AP-1 選択的な活性化はないと考えられた。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質は自然界にあるホルモンの細胞内での応答や結合様式を変えたり、ホルモンの合成や代謝に影響を与えたりすることで、内分泌系の機能を変化させる外来性の物質である。それらの多くは弱いエストロゲンまたは抗エストロゲンとして作用するため、ヒトおよび野生生物における生殖、発生等への影響が危惧されて多くの議論を呼んできた。

エストロゲン受容体を介したエストロゲン応答の機構には、よく知られるエストロゲン受容体が DNA の ERE に結合する事で転写を活性化する機構の他に、DNA の AP-1 部位を介して転写を活性化する系が知られる。このエストロゲン応答系の生理的意義やその作用メカニズムの詳細については十分理解されているとはい

えず、内分泌かく乱物質の作用を理解する上でも詳細な解析が必要である。エストロゲン反応性のある細胞株モデルとして MCF-7 や前立腺細胞株、また新たに樹立した下垂体細胞株を材料に、そのエストロゲンによる AP-1 応答を生理的なパックランドで解析したい。さらに、AP-1 応答の再構成細胞モデル系を使って、その作用様式について詳細な解析をすすめ、内分泌かく乱物質の作用とその修飾について明らかにしたい。

このため、内分泌かく乱物質のエストロゲン作用、その相互作用および細胞内因子による修飾作用を、エストロゲン受容体を経て ERE および AP-1 を介した応答系において解析する。

B. 研究方法

1. エストロゲン反応性増殖細胞株における ERE および AP-1 を介した応答系の解析と内分泌かく乱物質の作用

1-A. エストロゲン反応性の増殖をする細胞株としてヒト乳癌細胞 MCF-7 がよく知られる。それとは全く別のモデル系としてエストロゲン応答性の増殖をするラット下垂体腫瘍株を樹立しそのホルモン応答について解析した。

1-B. 生理的にエストロゲン受容体を発現している細胞モデルとして上記の下垂体細胞、ヒト乳癌細胞 MCF-7 およびヒト前立腺細胞 PC-3、LNCaP を材料とし、本来持っているエストロゲン受容体を介して起こるエストロゲンによる ERE 応答および AP-1 応答をするレポーター系を確立した。これらの系を利用して代表的な内分泌かく乱物質の作用を解析した。

2. 再構成モデル系での ERE および AP-1 を介した応答への内分泌かく乱物質の作用

上記1ではもともとエストロゲン応答している細胞系に対してレポーターを導入することで、生理的な条件下で、2つのエストロゲン応答の様式である ERE と AP-1 の応答を解析した。AP-1 応答に関してより詳細な検討をするため、エストロゲン受容体(-)のモデル細胞を材料に、エストロゲン受容体発現ベクター、fos/jun 発現ベクター等の導入により、受容体の型や発現量、また、他の転写因子(特に受容体コファクター)との相互の様式を解析し、内分泌かく乱物質の作

用点およびその相互作用の可能性を検討した。

C. 研究結果

1. エストロゲン(E2)に応答性の増殖をするラット下垂体腫瘍株 MtT/E-2 のエストロゲン応答性の増殖について解析したところ、(1)下垂体腫瘍遺伝子 PTTG の mRNA 発現は、ラットの正常下垂体では検出されず、MtT/E-2 細胞においてのみ発現していた。(2)E2 投与後、c-myc、cyclin D の上昇がみられたが、そのとき PTTG 発現の増加は観察されず、E2 の反応性との関わりは低いと考えられた。この細胞は下垂体組織と同様に a 型のエストロゲン受容体(ER)を発現もしていた。(3)この細胞株は E2 様の内分泌かく乱物質に対してもよい増殖活性を示し、それ自体よいアッセイ系になると考えられた。

2. エストロゲン受容体を持ち生理的な応答をしている細胞モデルとして、ヒト乳ガン細胞 MCF-7、上記 MtT/E-2 および前立腺細胞 PC-3 をとり、ERE-luc および AP-1-luc レポーターをトランスフェクトしてその ERE および AP-1 を介した応答の解析を試みた。さらに、ER alpha 発現ベクターをコトランスフェクトした NIH/3T3 での解析を行った。(1)エストロゲン受容体の発現は、PC-3 で beta 型が主で他は a 型がドミナントであった。(2)MtT/E-2、MCF-7 では、ERE を介した転写活性化は確認できたが、いずれの

株でも AP-1 を介した応答は観察できなかった。(3) NIH/3T3+ER の系では、E2 により ERE 応答および AP-1 応答が見られた。ER の AF-1 アゴニストであるタモキシフェンやナフォキシジンでは、AP-1 応答のみが観察された。E2 作用を持つ内分泌かく乱物質について検討した結果、ERE、AP-1 応答に有意な差はなかった。

D. 考察

エストロゲン応答において、ERE を介する系での内分泌かく乱物質の作用や転写コファクターとの相互作用については詳細に検討されている。しかし、他の転写開始ターゲットを介したレスポンスについて、内分泌かく乱物質作用の検討は報告がなく、我々の研究の独創的な点である。

今後は、

1. AP-1 応答系で、ER beta 型での検討。
2. AP-1 の系と他の細胞内伝達物質の相互作用の検討
3. AP-1 の系での、受容体コファクターの相互作用と内分泌かく乱物質の作用の検討する。

E. 結論

ER alpha 発現ベクターとレポーター遺伝子をコトランスフェクトした培養細胞で、ERE 部位と AP-1 部位を介するエストロゲン応答を比較した。今回検討した内分泌かく乱物質においては、それらによ

る ERE または AP-1 選択的な活性化はないと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Maruyama, S., Fujimoto, N., Ito A. Growth stimulation of a rat pituitary cell line MtT/E-2 by environmental estrogens in vitro and in vivo, *Endocrine J.* 46, In press (1999).
2. Fujimoto, N., Maruyama, S., Ito A. Establishment of an estrogen responsive rat pituitary cell sub-line MtT/E-2. *Endocrine J.* 46, In press (1999).
3. Fujimoto N., Watanabe H., Nakatani T., Roy G., Ito A. Induction of thyroid tumours in (C57BL/6N x C3H/N)F1 mice by oral administration of kojic acid. *Food Chem. Toxicol.* 36, 697-703 (1998).
4. Yamamoto, O., Seyama, T. Ito, A., Fujimoto, N. Oral administration of tritiated water (HTO) in mouse. III: Low dose-rate irradiation and threshold dose-rate for radiation risk. *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 535-541 (1998).
5. Watanabe H., Fujimoto, N., Masaoka,

Y., Kurosumi, M., Oguri, T., Takahashi,
T., Kido, S, Hirata S., Kuramoto, K.,
Shoji S., Katoh O. Effects of
azoxymethane on

X-ray induced intestinal metaplasia in
Donryu rats. Oncol. Rep. 5, 837-40
(1998)