

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

エストロゲン受容体(ER)を介した AP-1 の応答系を確立し、エストロゲン様の内分泌かく乱物質の作用を、トランジェンショナルな ERE 応答系と比較解析した。ERE 応答は、ER α を介した系と ER β を介した系の間に差はなかったが、AP-1 応答においては、ER α を介した系でのエストロゲンがアゴニテックに作用し、2つの受容体が反対の作用をすることが示唆された。検討した内分泌かく乱物質は全て、単純な弱いエストロゲン様物質として作用した。

A. 研究目的

子宮や乳管の発達、性周期の調節などのエストロゲンの作用は、核内受容体の一つであるエストロゲン受容体(ER)を介することは周知の通りである。この受容体はリガンドが結合することでコンフォメーション変化し、エストロゲン応答配列(ERE)と呼ばれる DNA の特定の配列を認識して結合できるようになり、その下流の遺伝子の転写を開始する。最近数年間の精力的な研究により、その際リクルートされるコファクターの存在とその役割が次々と明らかになってきた。しかし、エストロゲン受容体を介したホルモン応答の機構には、このトランジェンショナルなエストロゲン応答配列を介したものだけでなく、AP-1(c-fos/c-jun 複合体)結合配列である AP-1 部位や Sp1 の結合する Sp1 部位を介した応答が知られてきた。これらは多くの遺

伝子に遍在するプロモーターであるので、それらを介したエストロゲン応答は、広範な生理作用を惹起しうる。ホルモン依存性の細胞増殖などの生理作用はこの応答系の関与によりもたらされる可能性があり、内分泌かく乱物質の作用を理解する上で重要な応答経路である。

本研究では、エストロゲン依存性 AP-1 応答系をモデル化し、その系におけるエストロゲン及び内分泌かく乱物質の作用様式、作用機序を明らかにする

B. 研究方法

試薬類

17 β エストラジオール、OH-タキシフェン、ゲニスタイン、1,2,3,4,5,6-ヘキサクロシクロヘキシル(HCH)、ジブチル酢酸(DBAA)は、Sigma Chemicals, St. Louis, MO, U.S.A. から、o,p'-DDD

は、Aldrich, Milwaukee, WI, U.S.A. から、ビスフェノール A(BPA)は Wato Chemicals, Osaka から購入し、エタノール溶液としてストックした。

細胞培養

NIH/3T3 細胞および MCF-7 細胞の培養はそれぞれペニシリン/ストレプトマイシン含有の DEM (Sigma Chemicals)+5%CS (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) および MEM 培地+5%FBS にて行った。7 ヶ月前にはそれぞれ DC 処理血清を含むフェナルレット(-)の培地に交換した。

プラスミド

hER α , β は、Dr. S. Kato (Tokyo University, Tokyo)より供与いただき、それぞれ pSG5 発現ベクターへ挿入した。(ERE)₃-SV40-luc は、Dr. M. Kudo (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Tsukuba)より供与いただいた。(AP-1)₆-luc は、Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A., pRL-CMV は、Promega, Madison, WI, U.S.A.より購入した。

トランスジェントトランスフェクション

細胞は、12 穴プレートに 2×10^5 / well で播き、24 時間後に、TransFast transfection reagent (Promega) を用いて全量で 2 μ g の DNA をトランスフェクションした。薬剤処理 24 時間後に細胞を溶解し、Dual luciferase assay substrates (Promega) をそれぞれ加えた。発光測定は、Micro-beta

scintillation counter (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) により行った。

ゲルシフトアッセイ

細胞は、薬剤で 24 時間処理した後溶解して細胞抽出液とした。これを、³²P 末端ラベルした (AP-1)₃ と室温 30 分インキュベーションしたのち、4.5% のアクリルアミドゲルで電気泳動後、オートラジオグラフを得た。

イムノブロットイング

細胞は薬剤処理後に溶解し細胞抽出液としたものを、10%SDS-PAGE で電気泳動後した。これを、Hybond-P (Amersham Pharmacia Biotech) に転写後、ECL キット (Amersham Pharmacia Biotech) により検出した。anti-hcfo5、anti-hcjun は、Santa Cruz, CA, U.S.A. より購入した。

C. 研究結果

1. ER 依存性 AP-1 応答

NIH/3T3 細胞に PG5-hER α および (AP-1)₆-luc または (ERE)₃-luc をトランスフェクションして、そのエストロゲン依存性を見たところ、ER+ の場合のみ、用量依存的に luc レポートが見られた (Fig.1)。さらに、トランスフェクションする ER 量を変えて、AP-1-luc 活性を見てもみると、0.1-1 μ g の間で用量依存性をもって応答が増加した (Fig.2)。

2. AP-1 タンパク質量の変化

エストロゲンを投与した細胞での AP-1 タンパ

質 c-fos および c-jun の発現量の変化を
仏ラ「ロテイン」でみた結果、有意な増加は認
められなかった(Fig. 3)。

3. c-fos/c-jun と AP-1 部位との結合 への影響

エストロゲンを投与した細胞での Ap-1 タンパ
ク質とそれが特異的に結合する応答配列
Ap-1 部位との結合をゲルシフトアッセイによっ
てみた。エストロゲンによって特異的結合の増強
は見られなかった(Fig.4)。

4. ER α および ER β を介した AP-1 応答

NIH/3T3 細胞に PG5-hER α または β と、
(AP-1)₆-luc または(ERE)₃-luc をトランスフェ
クションして、その E2、タキシフェン、ICI に対する
応答を比較した(Fig.5)。ERE 応答につい
ては、ER α と ER β の間に大きな差はなく、
E2 で応答が惹起され、タキシフェン、ICI では
応答が見られなかった。それに対し、AP-
1 応答は、ER α を介するときにはE2、タキシ
フェンで誘導されたが、ER β ではタキシフェンのみ
応答がみられた。

5. MCF-7 細胞での ER 依存性 AP-1 応答

ER α を主に発現しているヒト乳がん細胞
MCF-7 において AP-1 の応答を同様のト
ランスフェクション実験で見た結果、E2 およびタキシ
フェンによる応答が観察された(Fig.6)。

6. 内分泌かく乱物質による ER 依存性 AP-1 の応答

NIH/3T3 の系で、BPA、MC、HCH、
DDD、DBA、ゲニスタインによる AP-1 応答と
ERE 応答を ER α を介する場合と ER β を介
する場合で比較検討した結果、これらの
内分泌かく乱物質は、全て単純な E2 作用
を示した(Fig.7)。

D. 考察

本研究では、E2 受容体を介した細胞応答
のうち AP-1(c-fos/c-jun 複合体)結合配
列である AP-1 部位を介した応答系を再
構成し、内分泌かく乱物質の作用を検討
した。その結果、ERE による応答は、両受
容体の間で基本的に差がなかったが、
AP-1 の応答においては、受容体 α を介し
ては E2 応答があるが、 β を介してはその
作用がないことが明らかになった。

AP-1 は多くの遺伝子に遍在するプロモ
ーターであるので、それらを介した E2 応答は、
細胞依存性の細胞増殖などを含む広範な
生理作用を惹起しうるはずであり、内分
泌かく乱物質の E2 様作用を理解する上
で重要な応答経路である。今回検討した
内分泌かく乱物質は、AP-1 応答について
ER α を介した場合のみ作用がみられ単純
な弱い E2 様物質として作用した。ゲニスタ
インなどのいわゆる植物 E2 は、ER β への親
和性が高いことが報告されてきたが、本
研究では ERE 応答と AP-1 応答のどちら
においても、それを反映するようなゲニスタ
インの ER β 特異的応答は見いだされな
かった。内分泌かく乱物質の E2 作用につい

てはERE応答を中心に研究がすすめられてきたが、今後AP-1応答系についても広範な物質についての検討が必要であろう。

ER依存的なAP-1応答の機構は、ERとAP-1がなんらかの相互作用することで、AP-1結合配列からの転写が活性化すると報告されてきたが、詳細は不明である。この応答は、E2によるc-fos、c-junの発現の増加によるのではないと報告されたが、これは我々の結果と一致した。

Umayaharaらは、E2によりc-fos/c-jun複合体とAP-1配列への結合親和性が増すことが、E2応答のメカニズムであると報告したが、今回のゲルシフトアッセイによる検討では、それは示されなかった。ER β を介したとき、E2での応答がないにもかかわらず、いわゆるAF-1コンシストであるタキフェンで応答がでたことは、受容体のAF-1を介する機構がAP-1応答において機能していることを示唆する。ER α とER β は、その組織分布がかなり大きく異なることから、生理学的な役割が違うことが推測されているがその意義は十分理解されていない。EREを介する応答系では二つの受容体作用の差は見いだされていない。一方で、乳がんや前立腺癌の増殖においてER β は良性のマーカーであると指摘されている。今回我々は、AP-1部位による応答が、ER α では惹起されるがER β を介して誘導されないことを示した。AP-1の増殖関連遺伝子の発現への関与を考えると、このことは癌でのER発現様式とよく一致する。

AP-1を介したE2応答こそがER α とER β の生理的な役割の違いを担うものかもしれない。

E. 結論

ERによるAP1部位を介する転写活性化は、ER α 型と β 型で相反する作用を及ぼすことが示唆された。これは、ER α 型と β 型の生理学的役割を理解する上で極めて重要な結果であり、内分泌かく乱物質のE2作用の一部をなしている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujimoto, N., Maruyama, S., Ito A
Establishment of an estrogen responsive rat pituitary cell sub-line MtT/E-2 *Endocrine J.* 46, 389-396 (1999)

2) Tamura, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Fujimoto, N., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takahashi, M.
Inhibition of thyroid iodine uptake and organification in rats treated with kojic acid. *Toxicol. Sci.* 47, 170-175 (1999)

3) 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, 531-538 (1999)

4) Fujimoto, N., Onodera, H.,

Mitsumori, K., Tamura, T., Maruyama, Ito A Changes in thyroid function during development of thyroid hyperplasia induced by Kojic acid in F344 rats. Carcinogenesis 20, 1567-1571 (1999).

5) Watanabe H, Uesaka T, Kido S, Ishimura Y, Shiraki K, Kuramoto K, Hirata S, Shoji S, Katoh O, Fujimoto N Gastric tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine in Wistar rats with intestinal metaplasia caused by X-irradiation. Jpn J Cancer Res 90, 1207-1211 (1999).

2. 学会発表

1) 藤本成明, 丸山聡, 伊藤明弘: 内分泌かく乱物質によるラット下垂体腫瘍細胞株 MtT/E-2 の増殖. 第 72 回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 1999. (日本内分泌学会雑誌, 75, 123, 1999) .

2) 藤本成明: 下垂体. シンポジウム I 「内分泌臓器の毒性変化と内分泌攪乱化学物質」第 16 回日本毒性病理学会, 岐阜, 2000. (講演要旨集, 7, 2000) .

3) 丸山聡, 藤本成明, 碓井亜, 伊藤明弘: 内分泌かく乱物質によるエストロゲン応答性転写活性化-ERE 応答と AP-1 応答の比較検討. 第 72 回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 1999. (日本内分泌学会雑誌, 75, 198, 1999) .

4) 丸山聡, 藤本成明, 伊藤明弘, 浅野耕助, 碓井亜: ヒト前立腺癌におけるエストロゲン受容体 α . β mRNA の発現. 第 58 回日本癌学会総会, 広島, 1999. (日本癌学会総会記事, 58, 665, 1999) .

5) 丸山聡, 藤本成明, 浅野耕助, 碓井亜, 伊藤明弘: 内分泌攪乱物質による AP-1 を介するエストロゲン応答性転写活性化. 第 7 回日本内分泌学会ステロイドホルモン分科会, 東京, 1999. (日本内分泌学会雑誌, 75, 367, 1999) .

6) 浅野耕助, 藤本成明, 丸山聡, 碓井亜, 伊藤明弘: ラット下垂体のエストロゲン受容体調節における 2 種のプロモーターの関与について. 第 7 回日本内分泌学会ステロイドホルモン分科会, 東京, 1999. (日本内分泌学会雑誌, 75, 367, 1999) .

7) 浅野耕助, 藤本成明, 丸山聡, 碓井亜, 伊藤明弘: ラット下垂体のエストロゲン受容体調節における 2 種のプロモーターの関与について. ホルモントランスミッター研究会, 広島, 2000

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Fig.1

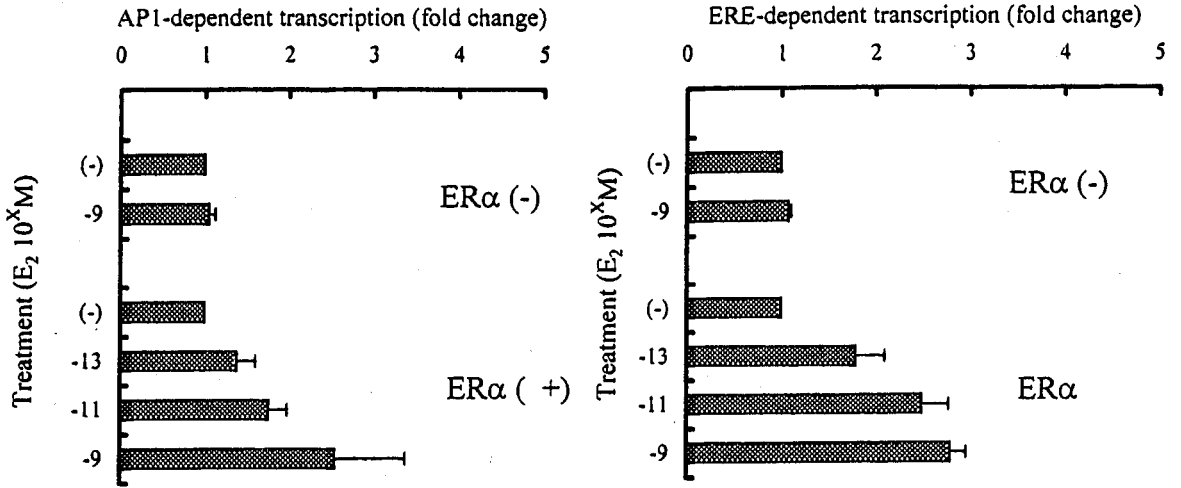


Fig.2

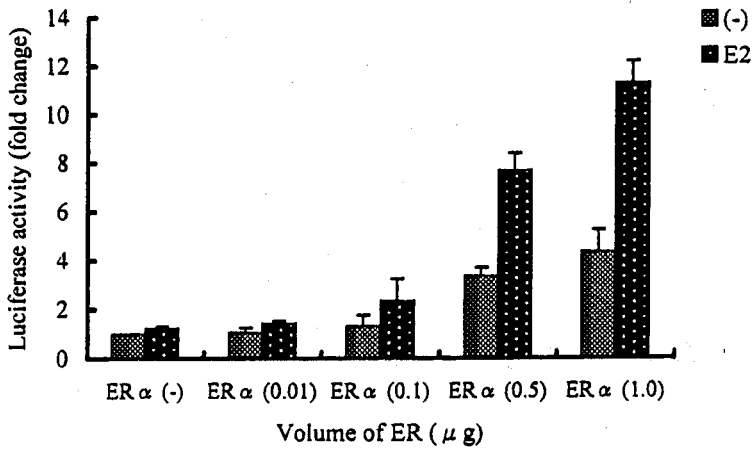


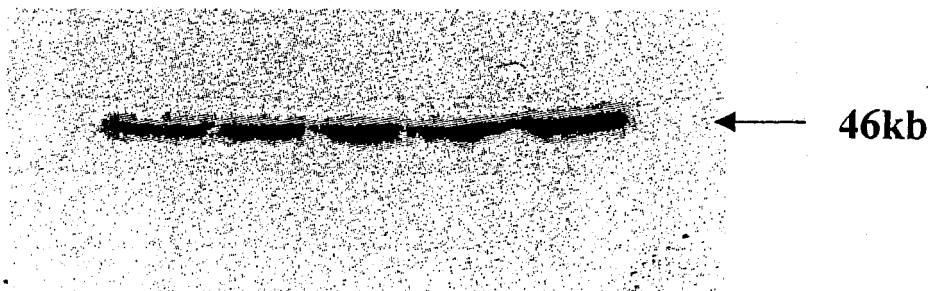
Fig 3

c-fos



(-) E_2 $10^{-8}M$ TPA $10^{-7}M$

c-jun



(-) 10^{-10} 10^{-9} 10^{-8} TPA $10^{-7}M$
 E_2

Fig. 4

Competitor	1/1000	1/100	1/10	
Sp1	(-)			+
ERE				+

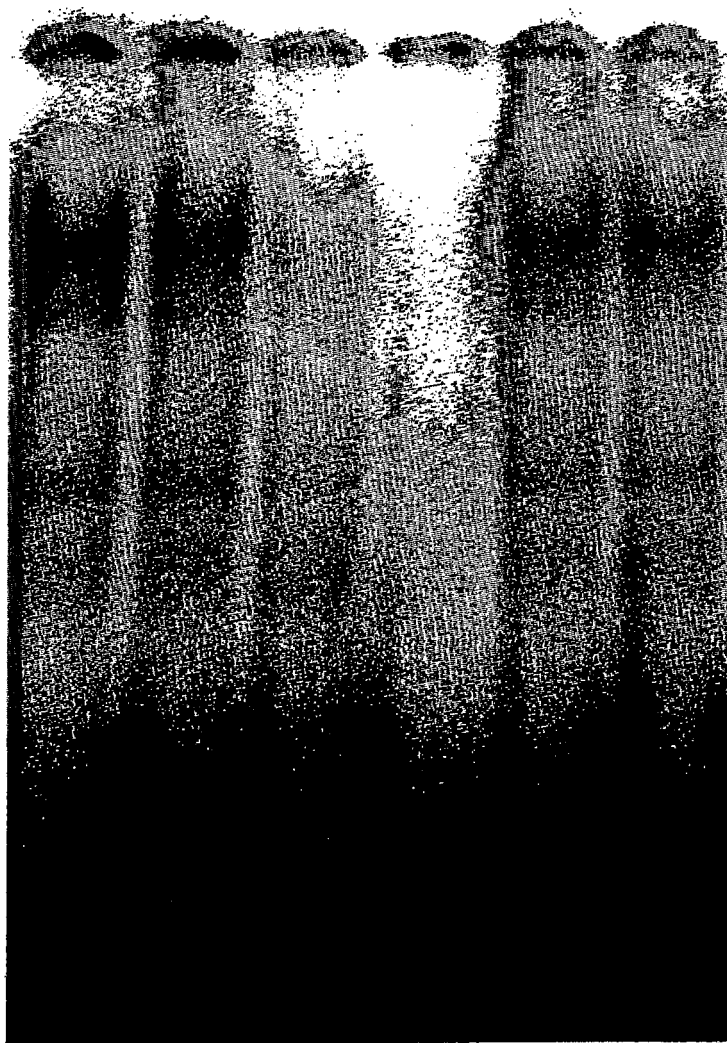


Fig. 5

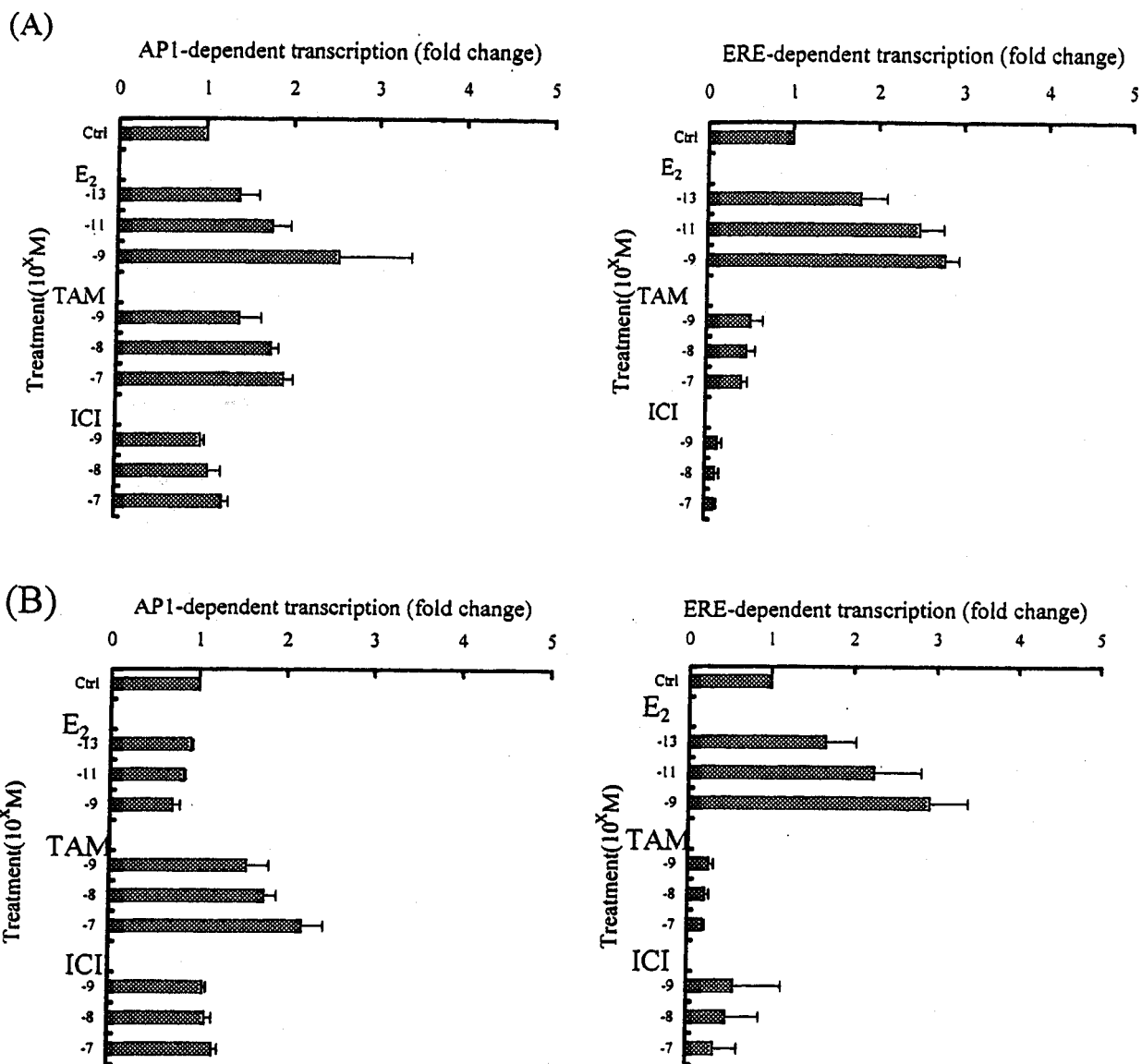


Fig. 6

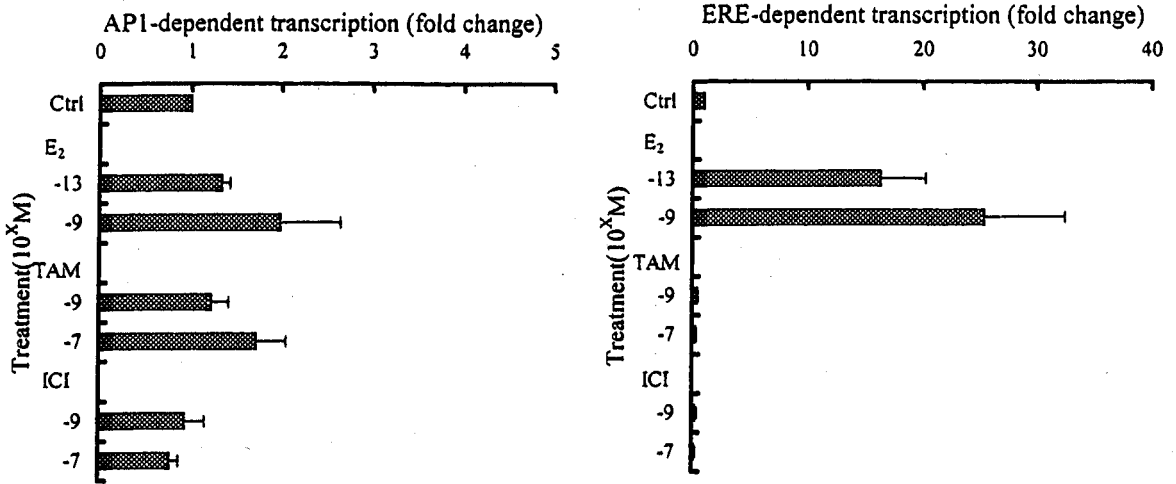
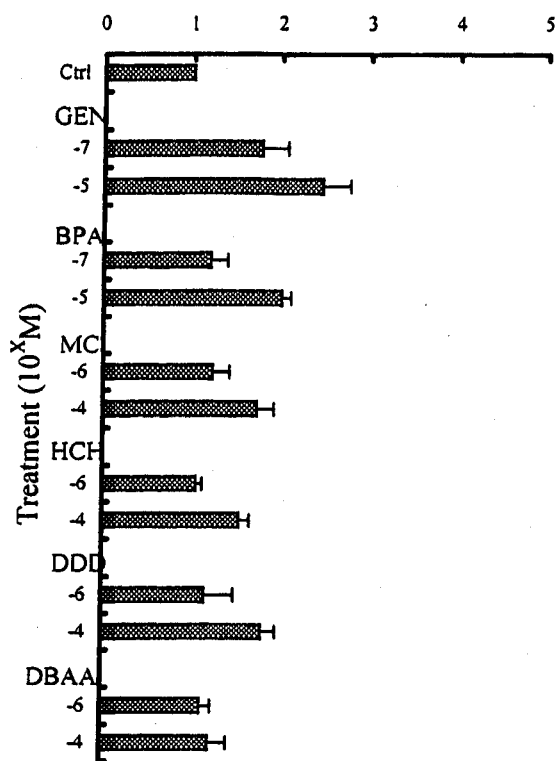
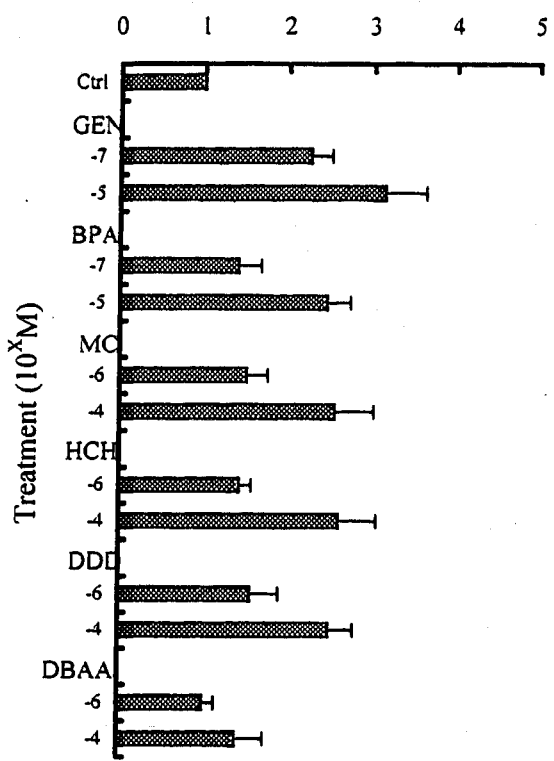


Fig. 7.

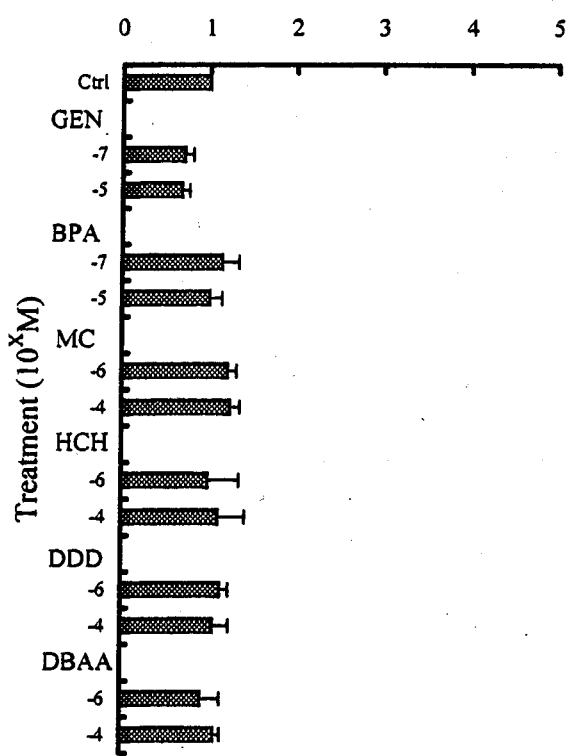
(A) API-dependent transcription (fold change)



ERE-dependent transcription (fold change)



(B) API-dependent transcription (fold change)



ERE-dependent transcription (fold change)

