

Title	17 $\beta$ -Estradiol の作用に影響を及ぼす化学物質に関する研究
Author(s)	鄭, 周姫
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/44795">http://hdl.handle.net/11094/44795</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	鄭 周 姫
博士の専攻分野の名称	博士 (薬学)
学位記番号	第 18650 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	17 $\beta$ -Estradiol の作用に影響を及ぼす化学物質に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 西原 力 (副査) 教授 田中 慶一 教授 那須 正夫 教授 宮本 和久

#### 論文内容の要旨

内分泌系は、組織から分泌されるホルモンで厳密に調節されている。しかし、環境から検出される化学物質の中には生体内に取り込まれてホルモンのバランスを崩し、内分泌機能に障害を与える物質、すなわち、内分泌攪乱物質 (endocrine disruptor; ED) が存在している。また、ED は、その構造が代謝・分解しにくく、蓄積されるものもあり、その影響が生殖・発生にかかわることから、1 世代の影響のみならず、多世代にわたって悪影響を及ぼす可能性が指摘されている。特に、女性ホルモンであるエストロゲンは乳腺、子宮、卵巣などの生殖系器官の成熟および機能の維持に重要な役割を果たしている。また、骨、肝、心血管および中枢神経系などの生殖系以外の組織に対しても重要な作用を果たしている。そのことから、エストロゲンの作用に影響を及ぼす物質は重要視されており、環境中に存在している数万以上の化学物質からその作用に影響を与える物質を検索する必要がある。

ED のスクリーニング試験として、実験動物を用いた卵巣摘出ラットの子宮重量試験がある。しかし、比較的長期間かかり、熟練したテクニックを要する試験法であり、数多い化学物質を 1 次的にスクリーニングするには不适当である。そこで、短期間で迅速に多量の化学物質をスクリーニングするために、*in vitro* 試験が開発され、精力的に数多く行われている。

特に、内在性のリガンドであるエストロゲンはエストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) と結合して作用を果たすので、ER を用いた *in vitro* 試験系が使われている。例えば、ER 結合試験、レポーター遺伝子試験、Yeast Two-hybrid 試験などである。

体内には恒常的に微量のエストロゲンが存在していることから、ED に暴露されると ED は少なくとも生体本来のエストロゲンと共存することになる。ED は単独ではなくエストロゲン共存下にエストロゲン作用を促進・抑制することが予想される。したがって、ED の作用メカニズムを検討する場合やリスクを評価する場合は生体本来のエストロゲン、すなわち、17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) 共存を考慮に入れて実施すべきである。しかし、*in vitro* では化学物質単独の作用を調べている系が多く、E<sub>2</sub> との混合物として実施された例はほとんどない。

そこで、本研究では化学物質を微量の E<sub>2</sub> と共存させて、*in vitro* 試験を行い、化学物質の E<sub>2</sub> 作用に及ぼす影響を調べた。

まず、Yeast Two-hybrid 試験により ED と疑われている物質を中心に E<sub>2</sub> の作用を抑制する物質を検索し、選択された物質について競合 ER 結合試験や乳がん細胞によるレポーター遺伝子試験により、その作用メカニズムを調べた。

50 種類の化学物質を用いて Yeast Two-hybrid 試験を行った結果、hexachlorophene、menadione および pentachlorophenol がアンタゴニスト活性を示した。また、これらの化学物質は E<sub>2</sub> の代わりに ER に結合して E<sub>2</sub> の作用を抑制することが明らかになった。

一方、E<sub>2</sub> の作用を促進する物質をレポーター遺伝子試験により検索した結果、7-benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin (BFC)、1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) および 2-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride (CNBT) が E<sub>2</sub> による転写活性化能を促進した。その中でも、促進作用が顕著であった CDNB を用いて E<sub>2</sub> の作用を促進するメカニズムについてさらに検討した。CDNB と CDNB 代謝物はどちらも ER と直接に結合せず、単独ではエストロゲン様作用を示さなかった。

また、CDNB は ERK の活性化、すなわち ERK のリン酸化に作用することが認められた。さらに、CDNB は E<sub>2</sub> による転写活性の促進とともに、ER mRNA の発現および ER タンパク質の量を低下させた。その結果は MAPKinase の活性化により、ER の転写が活性化して、フィードバックで ER mRNA の発現を下げ、ER タンパク質の分解を促進したと考えられた。このことから、CDNB は MAPK 経路を介して E<sub>2</sub> の作用を促進することが示された。

本研究から、環境中には化学物質単独でエストロゲン様作用を示さなくても、E<sub>2</sub> と共存下で ER または MAPKinase を介して E<sub>2</sub> の活性を抑制または促進する物質が存在することを明らかにした。

本研究ではエストロゲンについて影響を及ぼす物質を検討したが、他のホルモンに関しても同様に、環境中には単独では作用を示さなくても、本来のホルモンの作用を促進あるいは抑制する物質が存在することが考えられる。また、ホルモン受容体に対する直接的な経路以外の経路で作用をあらわす物質もあることが示唆された。したがって、今後、化学物質の ED 作用を *in vitro* で検討する際には、単独だけではなく、本来のホルモン共存下で検討することが重要である。

#### 論文審査の結果の要旨

鄭君は、内分泌攪乱 (ED) 作用が疑われる物質を含む 50 種類の物質について 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) 共存下にエストロゲン活性を測定した。その結果、hexachlorophene、menadione および pentachlorophenol の 3 種類の物質が E<sub>2</sub> と競合して ER に結合することにより E<sub>2</sub> の作用を抑制すること、また 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)、7-benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin、および 2-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride が E<sub>2</sub> の作用を促進することを明らかにした。さらに促進物質の CDNB は ER に対する直接的な作用ではなく、間接的な MAPK 経路による作用であることを示唆した。以上の結果は、環境化学物質の中には、単独による影響だけではなく、E<sub>2</sub> 共存下に ER に直接または間接的に作用し、E<sub>2</sub> 本来の作用に影響を及ぼす物質が存在することを明らかにしたものであり、混合物としてのリスクも評価する必要があることを示すものである。

以上の成果は、一般化学物質の中には E<sub>2</sub> 作用の抑制あるいは促進物質が存在することを示すとともにその作用機構の一端を明らかにしたものであり、学術的にも社会的にも高く評価され、博士 (薬学) 学位論文として充分価値あるものと認められる。