

Title	17 β -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	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/44795
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

17 β -Estradiol の作用に影響を及ぼす化学物質に関する研究

鄭 周姫

17 β -Estradiol の作用に影響を及ぼす化学物質に関する研究

鄭 周姫

目 次

緒論	1
本論	3
第1章 17 β -Estradiol の作用を抑制する物質	3
第1節 E ₂ 作用抑制物質のスクリーニング	3
第2節 E ₂ 作用抑制物質の ER 結合性	9
第3節 ER の転写活性に対する影響	11
第4節 考察および小括	13
第2章 17 β -Estradiol の作用を促進する物質	16
第1節 E ₂ 作用促進物質のスクリーニング	16
第2節 E ₂ 依存的な遺伝子の発現変動	19
第3節 ER 結合性に対する影響	22
第4節 考察および小括	23
第3章 1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene による E ₂ 作用の促進メカニズム	25
第1節 CDNB 代謝物のエストロゲン様作用	25
第2節 CDNB の MAPK 経路に対する活性化作用	28
第3節 考察および小括	32
総括	35
結論	37
謝辞	38
参考文献	39

結 論

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内分泌機能に障害を与える物質も存在している。これらの物質は内分泌攪乱物質（endocrine disruptor; ED）と呼ばれ、生体の恒常性、生殖、発生あるいは行動に関与する種々の生体内ホルモンの合成、貯蔵、分泌、体内輸送、結合、そしてそのホルモン作用そのもの、あるいはクリアランスなどの諸過程を阻害する性質を持つ外来性の物質¹と定義され、新たな環境汚染物質として注目されている。EDの問題を解決するためには、数万種類以上の一般化学物質の中からEDの可能性のある物質を検索することが必要である。

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。その中でも、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すとともに、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もっている。そのため、エストロゲンの作用に影響を及ぼすEDが最重要視されている。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）と結合して作用する。ERはリガンド依存的に標的遺伝子の発現を調節する転写因子の一つである^{2,3}。エストロゲンと結合したERはエストロゲン応答配列（estrogen response element; ERE）に結合して、コアクチベーターや基本転写因子群（general transcription factors, GTFs）を介して情報を転写装置に伝えることにより、遺伝子の転写反応を調節している（Fig. 1）。

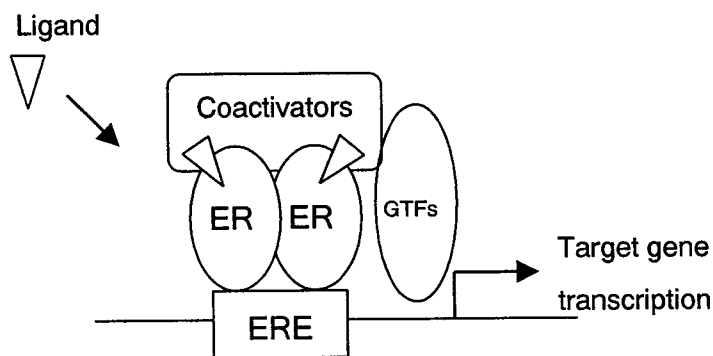


Fig. 1 Mechanism of ER-mediated transcription.

The ligand such as estrogen binds to estrogen receptor (ER) and subsequently the ligand-ER complex recruits coactivators at an estrogen response element (ERE). The complex, via general transcription factors (GTFs) regulates the expression of target genes.

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。すなわち、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・抑制するといえる (Fig. 2)。

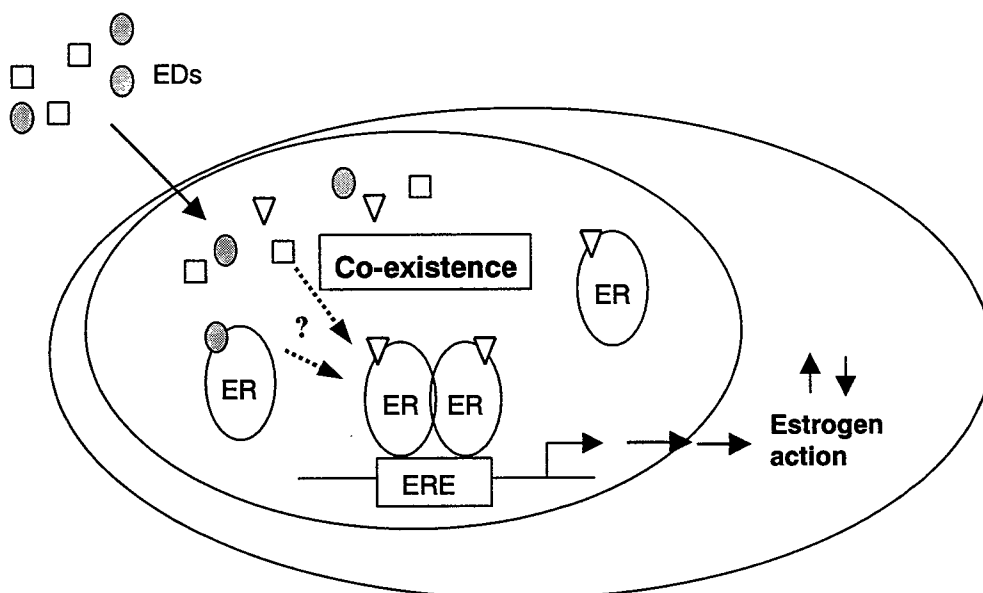


Fig. 2 Model for EDs activation on estrogen action.

EDs (□, ●) co-exist with estrogen (▽) in the cells, when EDs are uptaken. EDs may inhibit or stimulate the original estrogen action.

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、 17β -estradiol (E_2) 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例が多く、 E_2 との混合物として実施されたものはほとんどない。

本研究においては、 E_2 を共存させた状態で化学物質のエストロゲン作用に及ぼす影響を検討した。まず、Yeast Two-hybrid 試験⁴により ED と疑われている物質を中心に E_2 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 (第 1 章)。一方、 E_2 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 (第 2 章)、その活性が顕著であった 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) を用いて E_2 の作用を促進するメカニズムについて検討した (第 3 章)。

本 論

第 1 章 17 β -Estradiol の作用を抑制する物質

ED として疑われている物質および関連物質の 50 種類について、E₂ の作用を抑制する物質をスクリーニングした。

第 1 節 E₂ 作用抑制物質のスクリーニング

リガンドと結合した ER は、コアクチベーターを介して基本転写装置に働きかけることにより標的遺伝子の転写を活性化することが知られている⁵。Yeast Two-hybrid 試験は、酵母の転写因子である GAL4 遺伝子を利用し 2 つのタンパク質の相互作用を検出できる系である。スクリーニングに用いた系は、ER のリガンド結合ドメイン (LBD) と GAL4 の DNA 結合ドメイン (DBD)、コアクチベーターである TIF2 と GAL4 の転写活性化ドメイン (AD) をそれぞれ融合タンパク質として酵母内で共発現させ、これらのタンパク質がリガンド依存的に反応することをレポーター遺伝子である β -galactosidase 活性で測定する方法である (Fig. 3)。

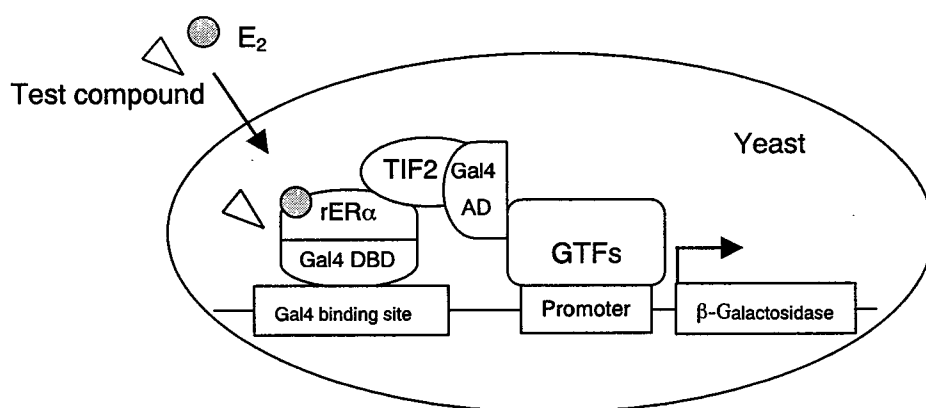


Fig. 3 Outline of Yeast Two-hybrid assay.

Yeast Two-hybrid assay was used to estimate the estrogenic activity of the chemicals, based on the ligand-dependent interaction between ER and TIF2. The activity was expressed as β -galactosidase units. In this study, the test compound was treated in the presence of E₂, and then the inhibitory effect of the test compound was calculated as the percentage against E₂ alone.

Yeast Two-hybrid 試験により、リガンドである E₂ が ER と TIF2 との相互作用を濃度依存的に活性化することを確認し、共存させた E₂ の活性を試験化合物が抑制できるかについて調べた。

I. 実験方法

1. 試薬

E₂ (>97%), menadione (K3) および α -tocopherol (vitamin E) は和光純薬工業(株)製、hexachlorophene (HCP) は東京化成工業(株)製、vitamin K1 は関東化学(株)製、vitamin K2 は Sigma Chemical Co. 製を使用した。4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) は早川和一教授(金沢大学)、all-*trans* および 13-*cis* retinoic acids は伊藤允好教授(神戸薬学大学)から供与いただいた。表 1 に示した他の化学物質は入手でき得る高純度品で dimethylsulfoxide (DMSO) 溶液を試験液として、内海英雄教授(九州大学)から提供されたものを用いた。

2. Yeast Two-hybrid 試験

2.1 宿主細胞

酵母は、Y190 株 (CLONTECH) を使用した。

2.2 発現プラスミド

(1) ベイト

酵母内で GAL4DBD 融合タンパク質として発現できる pGBT9 (CLONTECH) に rat ER α を組み込んだプラスミドを使用した。

(2) プレイ

酵母内で GAL4AD 融合タンパク質として発現できる pGAD424 (CLONTECH) に human TIF2 を組み込んだプラスミドを使用した。

2.3 形質転換方法

MATCHMAKER™ Two-Hybrid System (CLONTECH)のプロトコールに準じた。

YPD 培地 20 ml に Y190 を植菌し 30°C で一晩前培養した。培養液を YPD 培地 300 ml に加え 30°C で 3 時間本培養後、2200 rpm × 5 分 (TS-7 roter ; TOMY) で集菌し、Lisorb 1.5 ml に懸濁した (コンピデントセル)。Carrier DNA 10 μ l、pGBT9-rER α 100 ng、pGAD424-TIF2 100 ng、コンピデントセル 100 μ l、PED/LiAc 溶液 600 μ l をボルテックスにより混和後、30°C で 30 分間インキュベートした。反応液に DMSO 70 μ l を加え、42°C で 15 分間静置した。14000 × 5 秒 (TMP-11 roter ; TOMY) で集菌後、TE 500 μ l に懸濁し、そのうち 100 μ l を SD プレート (Leu、Trp 欠損 SD 培地 + 2% Agar) にまき 30°C で

3日間培養した。

2.4 相互作用の検出方法

酵母前培養液 50 μ l を SD 培地 (Leu, Trp 欠損) 200 μ l に加えた後、E₂ (5 nM) と試験化合物を加え、30℃で 4 時間培養した。MATCHMAKER™ Two-Hybrid System (CLONTECH) のプロトコールおよび Nishikawa ら⁴の方法に準じて、基質として *o*-Nitrophenylgalactoside (ONPG)を反応させ、 β -galactosidase アッセイにより検出した。

β -Galactosidase の活性は、595 および 415 nm における吸光度から算出した。試験化合物の活性は、共存させた E₂ (5 nM) の単独活性を 100%として、相対活性であらわした。

2.5 酵母に対する毒性の評価

試験化合物の酵母に対する毒性は、酵母培養液の O.D. 595 nm 値により評価し、溶媒投与群と比べて低下率が 10%以下の場合、毒性がないとした。

II. 結果

Table 1 に示した 50 種類の化合物について、Yeast Two-hybrid 試験を用いて E₂ 活性の抑制物質をスクリーニングした。

Table 1 List of test chemicals

<i>Benzenes & Heterocyclics (20)</i>	<i>Phenols (11)</i>	<i>Pesticides (13)</i>
1, 2-Epoxyethylbenzene	2, 4, 5-Trichlorophenol	1, 2-Dibromo-3-chloropropane
1-Chloro-2-nitrobenzene	2, 4-Dimethylphenol	2, 4, 5-Trichlorophenoxyacetic
2, 4-Diaminotoluene	2, 4-Dinitrophenol	2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid
2, 4-Dinitroaniline	2, 5-Dichlorophenol	Aldicarb
2, 5-Dichloroaniline	2-Methylphenol	Carbaryl
2-Methylpyridine	Hexachlorophene	Kelthane
2-Phenylene diamine	Hydroquinone	Methoxychlor
4-Chloroaniline	<i>m</i> -Nitrophenol	Molinate
4-Toluenesulfonamide	Pentachlorophenol	Nitrofen
Benzylalcohol	<i>p</i> -Nitrophenol	γ -Hexachlorocyclohexane
Diphenylmethane	Resorcinol	Thiobencarb
<i>n</i> , <i>n</i> -Dimethylaniline		Trifluralin
<i>n</i> -Ethylaniline		Ziram
<i>n</i> -Phenyl-1-naphthylamine	<i>Vitamins (6)</i>	
<i>n</i> -Phenyl-2-naphthylamine	all- <i>trans</i> retinoic acid	
<i>o</i> -Toluidine	13- <i>cis</i> retinoic acid	
Phenylhydrazine	Menadione (vitamin K3)	
Styrene monomer	Vitamin E	
Terephthalic acid	Vitamin K1	
Toluene	Vitamin K2	

1. 共存する E₂ の濃度

Yeast Two-hybrid 試験により生体のリガンドである E₂ の標準曲線を求めた (Fig. 4)。
E₂ 10⁻⁷M で活性が最大となったので、その活性を 100% として相対活性であらわした。
相対活性が 50% となる E₂ 濃度 (EC₅₀) は 5 nM であった (Fig. 4)。そこで、E₂ 作用の抑制物質をスクリーニングするため、Yeast Two-hybrid 試験で共存する E₂ の濃度を 5 nM にした。

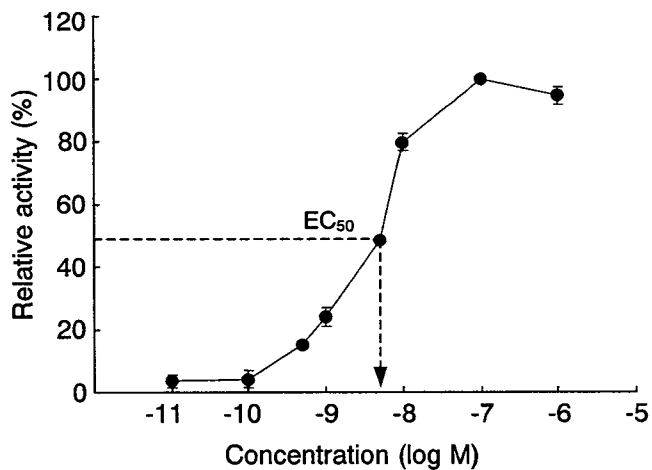
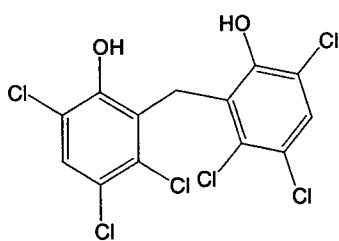


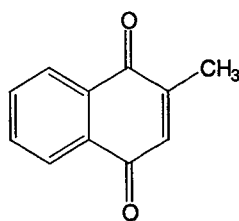
Fig. 4 Dose response curve of E₂ in Yeast Two-hybrid assay.

β -Galactosidase activity of E₂ (10⁻⁷M) was regarded as 100 % in the Yeast Two-hybrid assay. EC₅₀ (50% Effective Concentration) of E₂ was 5 nM. Values represent the mean \pm SD (n = 3).

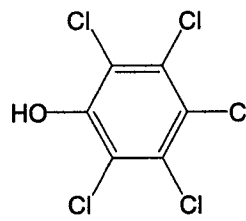
2. E₂ 作用の抑制物質



Hexachlorophene
(HCP)



Menadione
(K3)



Pentachlorophenol
(PCP)

Fig. 5 Structure of chemicals inhibiting E₂ activity.

環境省がリストアップしている ED 作用が疑われる物質および関連物質 50 種類について、E₂ 作用抑制物質を Yeast Two-hybrid 試験によりスクリーニングした。試験化合物と 5 nM E₂ を共存させて、無添加系に対する相対活性 (%) から化学物質の抑制作用を評価した。相対活性が 90% 以下になる化合物を陽性物質と判定した結果、Fig. 5 に示した hexachlorophene (HCP)、menadione (K3) および pentachlorophenol (PCP) の 3 物質はすべて濃度依存的に抑制活性を示した (Fig. 6)。抑制作用が 50% である濃度 (IC₅₀) を求め、その作用を比較すると、HCP が 1 μM、PCP が 1.6 μM、K3 が 70.8 μM であった。特に、HCP および PCP はポジティブコントロールとした 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) より強いアンタゴニスト活性を示した。なお、いずれの化合物も、調べた濃度領域では毒性が見られなかった (データ省略)。

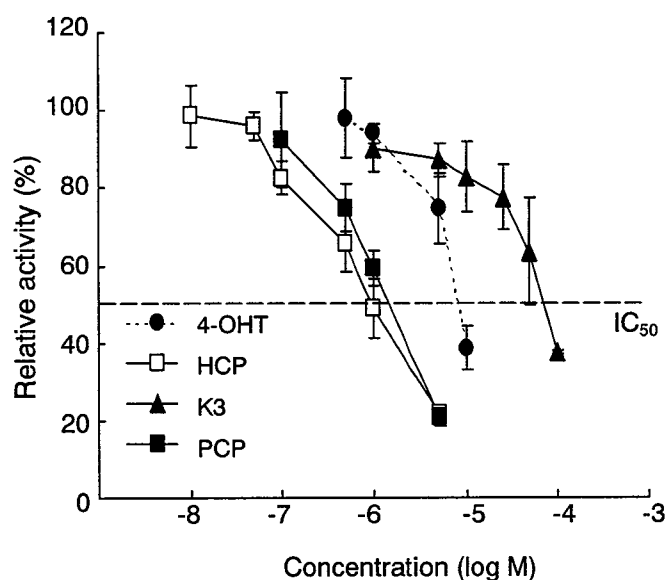


Fig. 6 Inhibitory effect of chemicals on E₂ activity in the Yeast Two-hybrid assay.

Relative activity of chemicals, 4-OHT, HCP, K3 and PCP, in the presence of 5 nM E₂ was calculated as the percentage against E₂ 5 nM alone (100%). Values represent the mean ± SD (n = 3).

第2節 E₂作用抑制物質のER結合性

前節のスクリーニングで得られた E₂ 作用抑制物質について、その作用メカニズムを検討するために、競合 ER 結合試験を行った。競合 ER 結合試験は蛍光偏光法を利用した FP Screen-for-competitors Kit を用い、テスト化合物が ER と結合した蛍光標識の E₂ とどのくらい置換できるかについて調べる方法である (Fig. 7)。

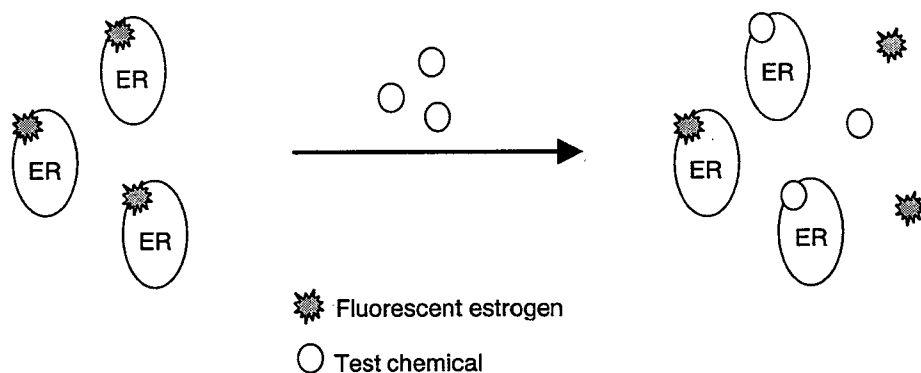


Fig. 7 Outline of fluorescence polarization competition binding assay.

I. 実験方法

1. 競合 ER 結合試験

FP-Screen-for-Competitors High Sensitivity Kit (Pan Vera) のプロトコールに従い、蛍光偏光度の測定には Full-Range BEACON 2000 (Pan Vera) を用いた。なお、データの解析および 50% 結合阻害濃度 (IC₅₀) の算出には Graph Pad PRISM (Graphpad. Inc.) を用いた。

種々の濃度に希釈した試験化合物 1 μl を含む screening buffer 50 μl に ERα-ES1 complex (15 nM human recombinant ERα および 10 nM fluormone ES1 を含む) 50 μl を加え、1 時間室温に静置したのち、蛍光偏光度を測定した。なお、陰性対照として DMSO を用い、陽性対照としては screening buffer に fluormone Estrogen 50 μl を加えて行った。

II. 結果

第1節のスクリーニングから得られた HCP、PCP および K3 について、競合 ER 結合試験を行い、 IC_{50} を求めた。 E_2 の IC_{50} が 3.5×10^{-9} M、4-OHT の IC_{50} が 4×10^{-9} M であり、ほぼ同じ程度の結合性を示したのに対し、K3、HCP および PCP の IC_{50} は 8.4×10^{-6} 、 7.2×10^{-6} 、 9.64×10^{-5} M であった。 E_2 と比べて、1,000 から 10,000 倍弱い結合性であったが、いずれも ER と結合した (Fig. 8)。

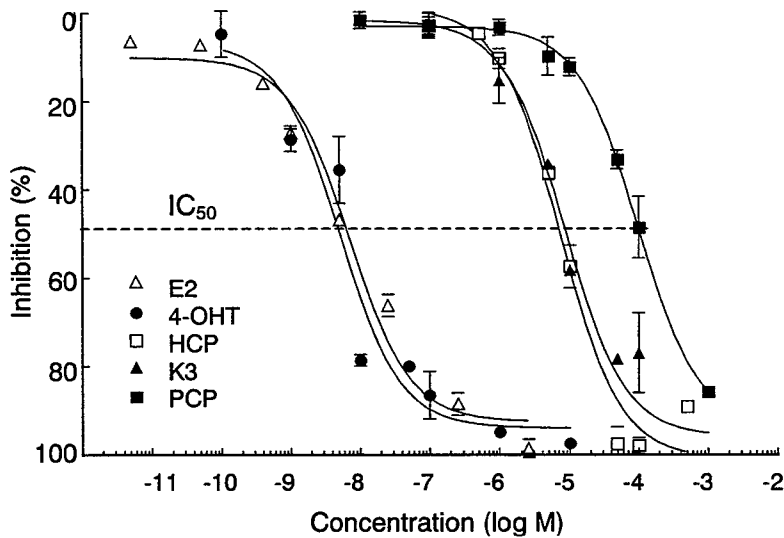


Fig. 8 Effect of chemicals on the competitive binding to ER.

The test chemicals (HCP, K3, and PCP) and the controls (E_2 and 4-OHT) were competed against the fluorescence E_2 for human $ER\alpha$, and the inhibition percentage was calculated. Values represent the mean \pm SD (n=3)

第3節 ERの転写活性に対する影響

E₂の作用を抑制した物質について、E₂と共存下にERを介した転写活性に対する影響を調べた。ヒト乳がん細胞であるMCF-7細胞を用いてレポーター遺伝子試験を行った。

I. 実験方法

1. レポーター遺伝子試験

1.1 細胞培養

乳がん細胞株MCF-7細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS, ICN Biochemical)および10 mM Non-essential amino acid (ナカライ)含有Minimum Essential Medium (MEM, Nissui)で37°C、5%CO₂存在下で培養した。

1.2 プラスミド

(1) レポータープラスミド

ルシフェラーゼ遺伝子の発現プラスミドであるpGV-Bに4×ERE-TATA (E1b)をSmaI-KpnIサイトで組み込んだものを用いた。

(2) 内部標準プラスミド

β-Galactosidaseを発現するプラスミド(SV-40β-gal)を用いた。

1.3 トランスフェクション

MCF-7細胞を3.5 cm ディッシュに1.5×10⁵個播種した。細胞は、活性炭-デキストラン処理で脂溶性ホルモンを除去した血清を加えたMEM培地(フェノールレット不含)で培養した。24時間後、FuGENE™トランスフェクション試薬(Roche)のプロトコールに準じ、レポータープラスミド400 ng、内部標準としてSV40-β-galactosidase発現プラスミド100 ngを導入し24時間後に試験化合物を添加した。

1.4 Luciferase 活性の測定

試験化合物の添加24時間後に細胞溶解液80 μlを加え、15分間室温で振とうした。その後、溶液を15,000 gで5分間遠心分離し、上清を細胞抽出液とした。ルシフェラーゼ活性は、ピッカジーン発光キット(東洋インキ製造)の発光基質液100 μlに対し、細胞抽出液2 μlを加えて、ルミノメーター(Lumat LB9501, Berthold)により10秒間の発光量を測定した。Luciferase活性の測定値は、β-galactosidaseの活性値により補正した。

II. 結果

試験に用いた乳がん細胞由来の MCF-7 細胞には、ER が存在している。そこで、ERE-TATA (E1b)をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーター遺伝子を導入し、レポーター遺伝子試験を行った。試験化合物を 1 nM E₂とともに添加して 24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定し、転写活性の指標とした。共存させた 1 nM E₂の転写活性化能を 100%として試験化合物による活性を相対活性であらわした。PCP および K3 は濃度依存的に E₂の転写活性を抑制した。しかし、HCP は毒性の現れなかった濃度範囲 (10⁵ M 以下) では抑制作用が見られなかった (Fig. 9)。PCP は K3 より低い濃度でアンタゴニスト活性を示し、その作用は 4-OHT より 10 倍高濃度であった。

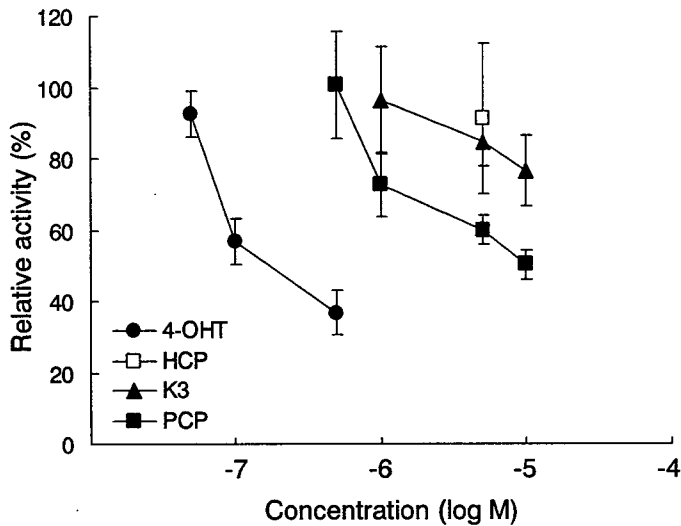


Fig. 9 Inhibition of E₂ activity by chemicals in MCF-7 cell reporter gene assay.

Relative activity of chemicals (HCP, K3 and PCP) and the control (4-OHT) in the presence of 1 nM E₂, was calculated as the percentage against E₂ alone (100%). Values represent the mean \pm SD (n = 3).

第4節 考察および小括

I. 考察

EDに関する関心は Colborn ら⁶の“*Our stolen future*”の出版とともに高くなった。EDの問題を解決する緊急課題の一つは、数万種類以上の化学物質からEDの作用を持つ化学物質を検索することである。その中でも、女性ホルモンである E_2 およびERに注目し、研究した報告が多い^{7,9}。しかし、*in vitro*で E_2 と共存下に化学物質をスクリーニングした例はあまりない。

本章においては、 E_2 依存的に結合するERとTIF2の相互作用を利用したYeast Two-hybrid試験を用いて E_2 の作用を抑制する物質をスクリーニングしたところ、HCP、K3およびPCPが陽性物質として得られ、いずれもERとの結合性を示した(Fig. 8)。また、ヒト乳がん細胞であるMCF-7細胞を用いたレポーター遺伝子試験でもK3およびPCPは E_2 による転写活性を抑制した。したがって、これらの物質は E_2 と競合し、ERに結合して E_2 の作用を抑制することが考えられる(Fig. 10)。

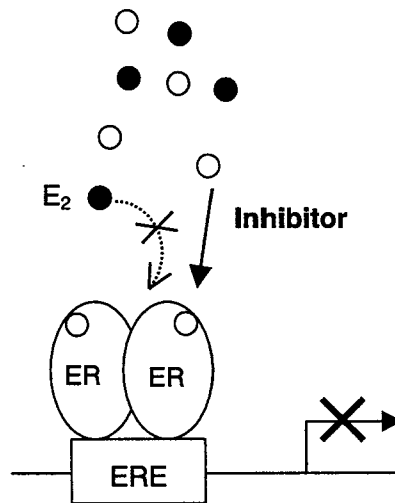


Fig. 10 Model for inhibition of E_2 activity.

しかし、HCPはYeast Two-hybrid試験および競合ER結合試験で強いアンタゴニスト活性を示したが、レポーター遺伝子試験ではその作用が見られなかった。MCF-7細胞にはER以外の転写因子が多く存在することから^{10,11}、他の因子によりHCPの E_2 抑制作用が見られなくなることが可能性として考えられる。同様に、*all-trans* retinoic acidおよび13-*cis* retinoic acidはYeast Two-hybrid試験のスクリーニングにおいて陰性だったが、

細胞では ER と結合せずにアンタゴニスト活性を示す報告がある¹²⁻¹⁴。Retinoic acid は retinoic acid receptor (RAR) と結合し、retinoic acid/RAR が ER と ERE の結合を障害することが報告されている¹⁵。このような ER との結合以外の経路によって作用することも考えられる。

また、HCP とともに農薬として知られている PCP については、ED 作用が報告されているが、そのメカニズムに関しては不明点が多く残されている¹⁶⁻¹⁸。本研究では PCP がアンタゴニストとして E₂ 依存的の転写活性を抑制した (Fig. 6, 9) のに対し、MCF-7 細胞の増殖にアゴニスト作用を示す報告もある⁸。この差は混合物として共存させた E₂ の濃度と PCP の濃度条件により、その差があると考えられる。また、PCP の細胞増殖作用は ER 非依存的に作用することも考えられる。

もう一つの E₂ 作用抑制物質である K3 は合成 vitamin K として知られている。K3 は apoptosis や necrosis を誘導し^{19,20}、protein-tyrosine phosphatases の抑制により細胞増殖を抑制することが報告されている²¹⁻²³。しかし、核内受容体に関する報告はなく、本研究で ER に対する E₂ の抑制物質としてスクリーニングされたのがはじめてである。また、類物質として vitamin K1 および K2 も調べたが、アンタゴニスト活性は示さず (データ省略)、構造の関連性は見られなかった。

K3 および 4-OHT の IC₅₀ は Yeast Two-hybrid 試験において 70.8 μM および 7.9 μM であり、PCP の IC₅₀ 1.6 μM より弱いアンタゴニスト活性を示したが、競合 ER 結合試験では IC₅₀ が 8.4 μM と 4 nM で 96.4 μM PCP の IC₅₀ より低い濃度でアンタゴニスト活性を示した (Fig. 6, 8)。これは主に酵母の膜透過性と使ったコアクチベーターによる差と考えられる。本章においては、スクリーニングから得られた物質が実験方法によってその感度が異なるが、いずれも同様に共存させた E₂ と競合して ER と結合することでアンタゴニスト活性を示すことが明らかになった。

II. 小括

1. 50 種類の化学物質について、Yeast Two-hybrid 試験を行った結果、HCP、PCP および K3 が E_2 の活性を抑制した。
2. スクリーニングで得られた陽性物質は、競合 ER 結合試験でいずれも ER に結合した。
3. MCF-7 細胞を用いたレポーター遺伝子試験を行った結果、ER を介した E_2 の転写活性化能を PCP および K3 が濃度依存的に抑制した。

以上の結果から、HCP、K3 および PCP は E_2 と競合し、ER に結合して E_2 の作用を抑制することが考えられた。

第2章 17 β -Estradiol の作用を促進する物質

エストロゲン様作用を示さない化学物質について、前章と同様に Yeast Two-hybrid 試験を用いたスクリーニングを行ったが、E₂ の作用を促進する化学物質は見つからなかった。Yeast Two-hybrid 試験は ER と TIF2 との相互作用を簡単にスクリーニングする系であり、他の因子との作用は無視されているので、促進する物質のスクリーニングには適当ではないと判断した。それで、レポーター遺伝子試験を用いてスクリーニングを行い、E₂ の作用を促進する化学物質を検索し、それらの影響を調べた。

第1節 E₂ 作用促進物質のスクリーニング

第1章、第3節と同様の方法を用いて、E₂ の作用を促進する化学物質をスクリーニングした。

I. 実験方法

1. 試薬

CDNB はナカライテスク (株) 製、2-chloro-3, 5-dinitrobenzotrifluoride は東京化成工業 (株) 製、4-methylumbelliferone は Sigma Chemical Co. 製、hesperitin は Extrasynthese (France) 製、7-benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin は Gentest, BD Biosciences 製を使用した。表2に示した他の化学物質は第1章、第1節に準して使用した。

2. レポーター遺伝子試験

第1章、第3節に準して行った。

II. 結果

Table 2 に示した 10 種類の化合物について、MCF-7 細胞を用いたレポーター遺伝子試験を行い、E₂ 活性の促進物質をスクリーニングした。

Table 2 List of test chemicals

1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene
2, 4, 6-Tribromophenol
2-Chloro-3, 5-dinitrobenzotrifluoride
4-Methylumbellferone
7-Benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin
13- <i>cis</i> -retinoic acid
Captan
Hespertin
Vitamin K1
Vitamin K2

その結果、E₂による転写活性を促進した物質の構造を Fig. 11 に示した。その物質は 7-benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin (BFC)、1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) および 2-chloro-3, 5-dinitrobenzotrifluoride (CNBT) の 3 物質だった。

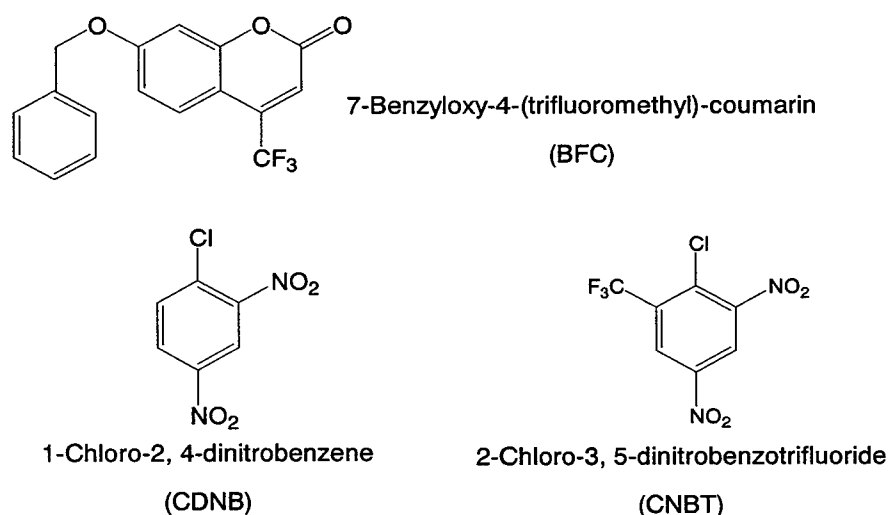


Fig. 11 Structure of chemicals stimulating E₂ activity.

共存させた 1 nM E₂ の luciferase 活性を 1 として、それぞれを比較したところ、10 μM BFC が 1.5 倍、5 μM CDNB が 4 倍および 1 μM CNBT が 2 倍増強した (Fig. 12)。

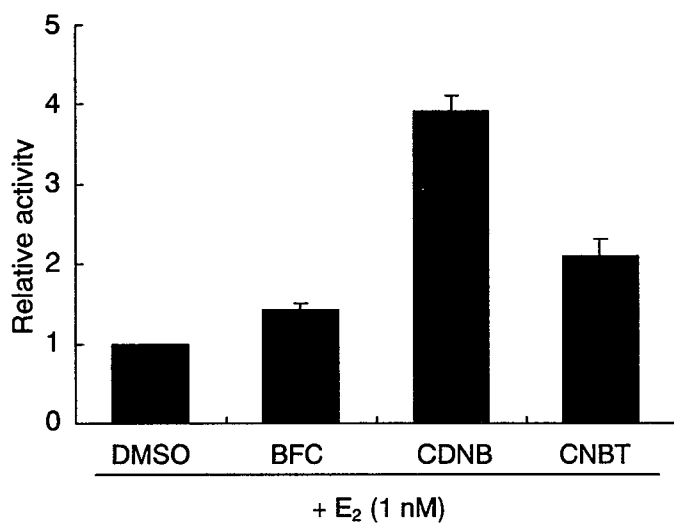


Fig. 12 Enhancement of E₂-induced transcriptional activity by chemicals.

Estrogenic activity was determined by reporter gene assay using MCF-7 cells on 10 μ M BFC, 5 μ M CDNB, or 1 μ M CNBT with 1 nM E₂. Relative activity was expressed the luciferase activity of E₂ as 1. Values represent the mean \pm SD (n = 3).

第2節 E₂ 依存的な遺伝子の発現変動

第1節で E₂ による転写活性を強く促進した CDNB を用いてさらに詳細にその作用を検討した。まず、E₂ により発現が変動する遺伝子について E₂ と CDNB の共存による発現の変動を調べた。

I. 実験方法

1. 細胞培養

第1章、第3節に準じて、行った。

2. RNA の調製

MCF-7 細胞を 3.5 cm ディッシュに 1.5×10^5 個播種した。細胞は、活性炭-デキストラン処理で脂溶性ホルモンを除去した血清を加えた MEM 培地 (フェノールレット不含) で培養した。48 時間後、試験化合物を添加し、24 時間後に TRIzol (Invitrogen) 0.5 ml を用いて、プロトコールに準じて total RNA を調製し、解析に用いた。

3. RT-PCR 法

RT 反応は、total RNA 0.8 μ g をテンプレートとして、ReverTra Ace- α TM (TOYOBO) のプロトコールに従い、Oligo dT(20) プライマーを用いて 42°C で 20 分間伸長反応を行った。PCR は、得られた cDNA をテンプレートとし、Ampli Taq (Roche) のプロトコールに従って行った。プライマーは、それぞれ human estrogen-response finger protein (hEfp) (forward, 5'-GCATCCACCAGAGCACCATAGACCTC-3'; reverse, 5'-TGCCTACTTGGGG GAGCAGATGG-3'), pS2 (forward, 5'-ATCCCTGACTCGGGGTCGCCITTTG-3'; reverse, 5'-AATATCGATCTCTTTTAATTTTTAGGCC-3')、human progesterone receptor (hPR) (forward, 5'-AGCCAAGCCCTAAGCCAGAGATTCACCT-3'; reverse, 5'-GAAAGAGAA GGGGTTTCACCATCCCT-3') および hER α (forward, 5'-GCTCCGCAAATGCTACGA AGTGGGA-3'; reverse, 5'-CAGTTGATCATGTGAACCAGCTCCCTG-3') を使用した。PCR は、それぞれサイクル数を検討し、直線的に増加するところで反応させた。Hefp の場合は 32 cycles (94°C で 30 秒、62°C で 30 秒、72°C で 40 秒)、pS2 は 21 cycles (94°C で 30 秒、59°C で 30 秒、72°C で 30 秒) および PR は 28 cycles (94°C で 30 秒、62°C で 30 秒、72°C で 40 秒) 反応させたのち、PCR 産物を 1% アガロースゲルで電気泳動した。泳動したゲルは、ethidium bromide で染色後、FAS-II (TOYOBO) で照射して画像を取

り込んだ。

4. ノザンロット解析

4.1 プローブの調製

プローブは hER α (+723~+1079)の領域を使用した。hER α に関する cDNA は、RT-PCR により増幅させた。得られた cDNA 断片は、BcaBESTTM Labeling Kit (TaKaRa) のプロトコルに従い、[α -³²P] dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) で標識した。

4.2 ノザンロット

Molecular Cloning に準じて行った。細胞から回収した RNA をホルムアミド含有 1% 変性アガロースゲルにて電気泳動後、ナイロンメンブレン (HybondN+, Amersham Pharmacia Biotech) に転写した。ハイブリダイゼーション液 (1% BSA と 0.25 M SDS を 0.5 M リン酸ナトリウム[pH7.2]に溶解した液) にメンブレンを 65°C で 3 時間以上処理し、プレハイブリダイゼーションした。新たなハイブリダイゼーション液に交換し、作製したプローブを加え、65°C で一晩反応させた。目的遺伝子の発現量はオートラジオグラフィーにより検出した。

II. 結果

E_2 依存的に発現が変動する遺伝子である、*efp*、PR および pS2 について *mRNA* の発現を RT-PCR で調べた。 E_2 によりいずれの遺伝子も発現が増加した (Fig. 13)。また、10 μ M CDNB は 1 nM E_2 と共存させた場合、 E_2 単独より *efp mRNA* の発現は増加した。PR *mRNA* の発現は有意な差はなかったが、増加する傾向が見られた。pS2 についてはあまり変化がなかった (Fig. 13)。

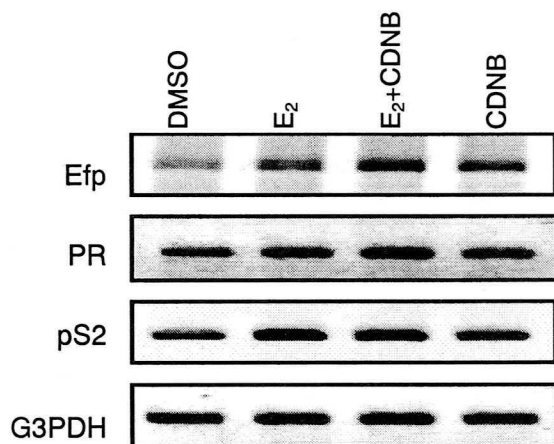


Fig. 13 Stimulation of E_2 -dependent target gene transcription by CDNB.

ER *mRNA* に関しては、報告²⁴⁻²⁶されているように E_2 により低下することが確認され、 E_2 と共存させた CDNB によりさらに低下した。CDNB 単独においても、ER *mRNA* 発現の低下が見られた (Fig. 14)。

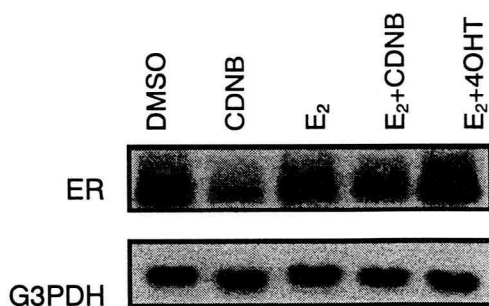


Fig. 14 Effect of CDNB on ER *mRNA*.

第3節 ER 結合性に対する影響

CDNB による E_2 の活性促進が ER と直接に関係があるかについて、競合 ER 結合試験を用いて調べた。

I. 実験方法

第1章、第2節に準じて行った。

II. 結果

CDNB は E_2 と共存させると E_2 の作用を促進するが、ER との結合性を調べた結果、CDNB は ER と結合しなかった (Fig. 15)。

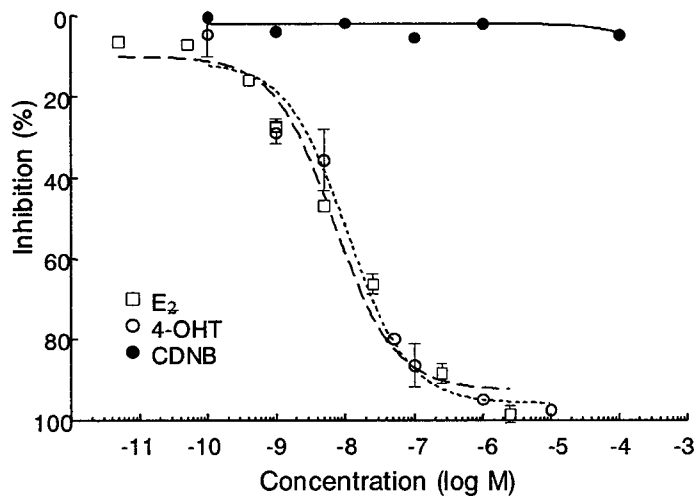


Fig. 15 Competitive binding of CDNB to ER.

第4節 考察および小括

I. 考察

MCF-7 細胞を用いたレポーター遺伝子試験により、 E_2 による転写活性を促進する 3 種類の化合物 (BFC、CDNB、CNBT) を得た。いずれの化合物でもその活性は濃度依存的であった (データ省略)。しかし、単独の化学物質を添加した際の転写はあまり活性化しなかった。CDNB は産業で合成化学工業品の原料や染料の原料として使われ、研究用においては GST 活性の測定試薬として使われている。CNBT は CDNB に $-CF_3$ がある類似物質で、CDNB と同様に GST 活性の測定試薬で使用されている。また、BFC は研究用で CYP3A の誘導剤に使われている。3 種類の陽性物質のうち CDNB はもっとも強く E_2 作用を促進し、CDNB は共存させた E_2 の濃度 ($10^{-13}M$ から $10^{-9}M$ まで) 依存的にも E_2 の活性を促進した (データ省略)。これは、本来の ER に CDNB が作用し、 E_2 の反応性を高くしたと考えられた。そのため、CDNB が ER に結合するかについて競合 ER 結合試験を行ったが、直接的な ER との作用はなかった。

E_2 による転写活性を促進する CDNB は E_2 依存的な遺伝子の発現も促進することが見られた。Efp は正常な乳腺において、細胞周期にかかわる $14-3-3\sigma$ と結合し、ユビキチン-プロテインリガーゼとして機能する²⁷。また、乳がん細胞の増殖にかかわる因子であり、完全な ERE 配列を持つ 1 次 E_2 依存的遺伝子である^{28,29}。PR と pS2 は不完全な ERE の配列を持っているが、 E_2 依存的に発現が誘導される遺伝子である³⁰。しかし、 E_2 と共存させた CDNB による遺伝子発現は遺伝子によって異なることが示された (Fig. 13)。PR および pS2 は E_2 依存的に発現が変動する遺伝子であるが、細胞の培養条件により、その調節が異なる³¹。さらに、pS2 は ERE 以外に activator protein (AP)-1 結合サイトが存在し、ER と AP-1 とのクロストークによる発現調節の影響があると考えられる³²。

E_2 により ER mRNA の発現は低下することが知られている³³。そこで、 E_2 と共存させた CDNB による ER mRNA 発現の変動についてノザンプロットで調べた。それぞれの化合物を 24 時間処理した場合、1 nM E_2 により ER は低下し、1 μM 4-OHT によりその低下作用が抑制された。しかし、CDNB を加えると ER の低下作用は促進することが示された。 E_2 による ER の発現低下は転写および転写後調節で行われ、タンパク質の合成に非依存的である³⁴。CDNB は ER との結合性が見られなかったため、その作用メカニズムは ER 非依存的な経路を介して作用すると考えた。

そこで、第3章では CDNB による E_2 作用の促進メカニズムについて、さらに検討を行った。

II. 小括

1. E₂による転写活性能を促進する物質として BFC、CDNB および CNBT がレポーター遺伝子試験で得られた。
2. CDMB は E₂ 依存的に誘導される *efp* および PR *mRNA* の発現を促進し、E₂により低下する ER *mRNA* の発現をさらに低下した。
3. CDMB は ER と直接に結合せずに、E₂の作用を促進した。

第3章 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene による E₂作用の促進メカニズム

E₂作用の促進活性が強かった CDNB について、その作用メカニズムを調べた。

第2章、第3節の結果から、CDNBはERと直接に結合しないことがわかったので、CDNBがE₂の作用を促進するために介した経路を調べた。まず、EDの中には、*trans-stilbene* や *methoxychlor* のように代謝されて初めてエストロゲン様作用を示す物質が存在する³⁵⁻³⁹。そこで、CDNBの代謝物がエストロゲン様物質としてE₂作用を促進するかについて検討した。次に、ER非依存的にE₂作用を促進する経路として *mitogen-activated protein kinase* (MAPKinase) 経路が知られているので⁴⁰、CDNBがMAPKinase経路を活性化するかについて検討した。

第1節 CDNB代謝物のエストロゲン様作用

化学物質は細胞の中で代謝される。第2章でCDNBがERと結合せずにE₂の作用促進活性を示した。E₂作用の促進がCDNBの代謝物による作用かどうかについて検討するため、ラット肝 S-9 mixture により代謝させ、代謝反応後の溶液について、Yeast Two-hybrid 試験およびレポーター遺伝子試験を用いてエストロゲン様作用を調べた。

I. 実験方法

1. 特に、記載した以外の試薬および方法は、第1章、第1節に準じた。
2. S-9 mixture による代謝反応

ラット肝 S-9 mixture (オリエンタル酵母) は、プロトコールに準じて 400 μl の反応系を調製した。各試験化合物は、DMSO に溶解して、終濃度 1% DMSO 溶液となるように添加した。代謝反応は、37°C の水浴中で 1 時間行った。

3. Yeast Two-hybrid 試験

代謝した反応溶液 125 μl と 2×SD 溶液に懸濁した酵母を 125 μl を加え、第1章、第1節に準じて測定した。2×SD 溶液は、Yeast Two-hybrid 試験による反応系において最終濃度が SD 溶液と等しくなるように調整して用いた。

4. レポーター遺伝子試験

第1章、第3節に準じて、行った。

II. 結果

EDの中には、代謝されてERに影響をおよぼす物質が存在する^{41,42}。ERと直接結合しない化学物質が細胞中で代謝されることにより、E₂の作用を促進する可能性をYeast Two-hybrid試験およびレポーター遺伝子試験を用いて検討した。

1. Yeast Two-hybrid試験を用いたCDNB代謝物のエストロゲン様作用の検討

代謝前のCDNB単独ではエストロゲン様作用を示さないことが認められた。CDNBはラットS-9 mix（オリエンタル酵母）により37℃で1時間代謝反応を行った⁴³。1000倍高濃度のCDNBを用いて代謝させたのち、代謝反応後の溶液についてERに対するアゴニスト活性を調べた。代謝させたCDNBはDMSO溶媒の反応溶液と比べ、有意な差が見られず、エストロゲン様作用が認められなかった（Fig. 16）。また、5 nM E₂と代謝させたCDNBを共存させてもE₂の活性を促進することは認められなかった（データ省略）。

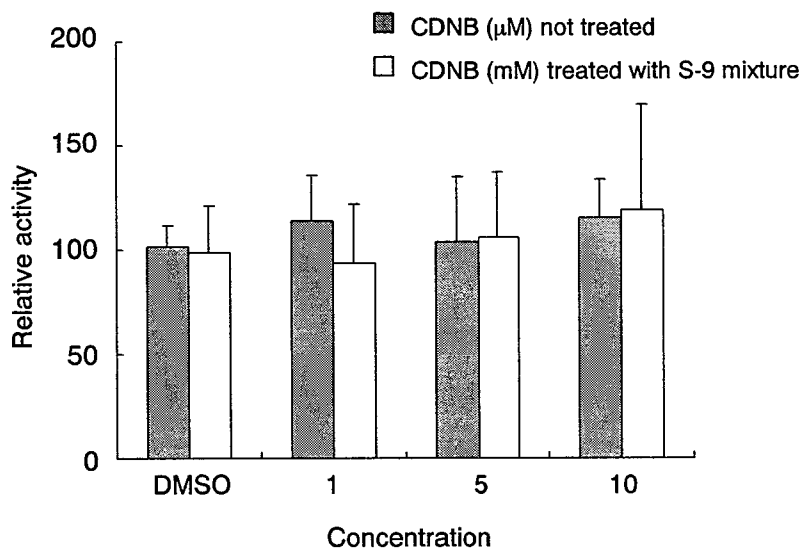


Fig. 16 Effect of CDNB metabolite on estrogenic activity of E₂.

After CDNB was treated with S-9 mixture at 37℃ for 1 h, the estrogenic activity was determined by Yeast Two-hybrid assay and the relative activity against DMSO was expressed. Values represent the mean ± SD (n = 3).

2. レポーター遺伝子試験を用いた CDNB 代謝物のエストロゲン様作用の検討

E_2 作用の促進を示した MCF-7 細胞において、CDNB と CDNB の代謝物による影響を比較した。Fig. 16 の場合と同様に、10 mM CDNB を S-9 mixture により 37°C で 1 時間代謝させて、代謝反応液を細胞に添加した。S-9 mixture を処理しない CDNB は 5 μ M を添加した。第 2 章、第 1 節の結果と同様に、代謝前 CDNB は E_2 と共存で E_2 による転写活性を促進したが、代謝させた CDNB と共存すると促進作用が見られなかった (Fig. 17)。また、代謝させた CDNB 単独でもエストロゲン様作用は示さなかった。

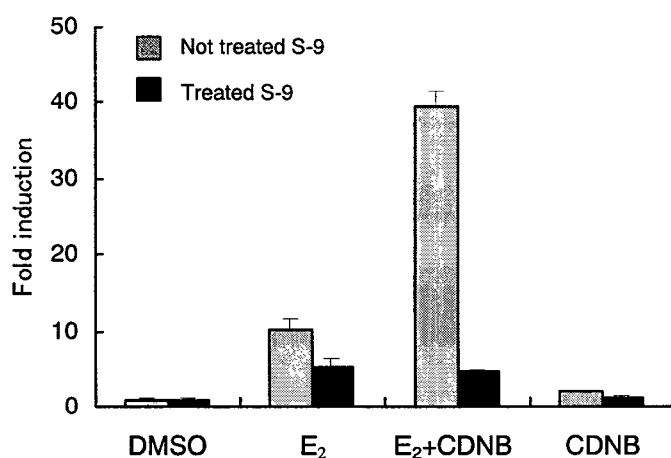


Fig. 17 Enhancement of estrogenic activity by CDNB metabolite.

After CDNB was treated with S-9 mixture at 37°C for 1 h, the estrogenic activity was determined by Reporter gene assay. Values represent the mean \pm SD (n = 3).

以上の結果において、CDNB の代謝物はエストロゲン様作用を示さないことから、 E_2 作用の促進は CDNB 本体が示すことが考えられた。

第2節 CDNBのMAPK経路に対する活性化作用

ERはMAPKによりリン酸化され、転写が活性化することが知られており^{44,45}、乳がん細胞では過剰に活性化されたMAPKによりERの発現が減少することも報告されている⁴⁶。そこで、MCF-7細胞を用いて、CDNBによるERの転写活性の促進およびERの発現低下がMAPKを介しているかについて調べた。

I. 実験方法

1. 細胞培養

第1章、第3節に準じて行った。

2. タンパク質の回収

MCF-7細胞は、活性炭-デキストラン処理で脂溶性ホルモンを除去した血清を加えたMEM培地（フェノールレット不含）で48時間以上培養した。その後、細胞を3.5 cmディッシュに 1.5×10^5 個播種した。48時間後、試験化合物を添加し、それぞれの時間処理した。PBS溶液で洗ったのち、Solution A（Urea 8M、1% NP-40、2% 2-Mercaptoethanolを含む）70 μ lを用いて回収した。

3. タンパク質の定量

Bradford法を利用したプロテインアッセイCBB溶液（ナカライ）のプロトコールに準じて行った。20倍希釈したタンパク質溶液にCBB溶液（コマジープリリアンドブルーG-250、エタノール、リン酸を含む）1 mlを加え、15分放置した後、吸光度595 nmを測定した。標準物質（牛血清アルブミン、BSA）を用いて検量線を作成し、サンプルの濃度を定量した。

4. Western blotting

サンプルは濃度を合わせたタンパク質とsolubilization bufferを15:9の比率で混ぜ、2分間沸騰して作製した。サンプルはSDS-PAGEで分離して、PVDF（Millipore immobilon transfer membrane）に転写した。それぞれのブロッキング溶液で1時間以上処理した。ERの検出には3%スキムミルク液を、ERKおよびリン酸化ERKの検出には2.5%BSA溶液を使用した。PBST（0.1% Tween20を含むPBS）で洗ったのち、1次抗体反応を4℃

で一晩行った。さらに、PBST で洗い、2 次抗体反応を室温で 2 時間以上行った。ECL 溶液 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて、プロトコールに従い反応させたのち、発色させた。

5. 抗体

ERK およびリン酸化 ERK 抗体は 1.25% BSA 溶液に希釈して用いた。1 次抗体の phospho-p44/p42 MAPkinase anti-rabbit IgG (Cell signaling technology) と ERK-1 anti-mouse IgG (BD Biosciences) は 1 : 1000 の比率で希釈した。2 次抗体の rabbit IgG (Amersham Pharmacia Biotech) は 1 : 5000、mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech) は 1 : 2000 の比率で行った。ER anti-rabbit IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) は 1.5% スキムミルク溶液に 1:200 の比率で希釈した。また、2 次抗体の rabbit IgG は 1 : 2000 の比率で行った。

II. 結果

MAPK 経路の中で、乳がん細胞に関連がある ERK 経路に着目して CDNB が ERK を活性化するかについて検討した。ERK はリン酸化され、活性型になるので、リン酸化 ERK1/2 に対する抗体を用いて ERK が活性化したかについて調べた。また、第 2 章、第 2 節の結果との関連から、ER のタンパク質量も調べた。

1. CDNB による ERK の活性化

レポーター遺伝子試験を行った条件と同様に CDNB で 24 時間処理し、ERK1 抗体を用いて ERK の発現量を調べた結果、CDNB による変化がなかった (Fig. 18; lower panel)。一方、E₂ と共存させると、ERK1/2 のリン酸化体の増加が見られ、CDNB が ERK を活性化することが示された (Fig. 18; upper panel)。

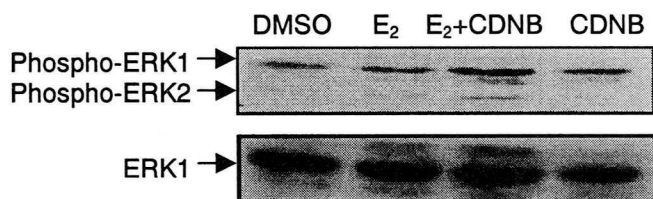


Fig. 18 Effect of CDNB on phosphorylation of ERK.

After MCF-7 cells were treated with DMSO, E₂ (1 nM), CDNB (10 μM), or E₂+CDNB for 24 h. Phospho-ERK was detected by Western blotting. E₂+CDNB activated the phosphorylation of ERK more than E₂ or CDNB alone.

次に、ERK 経路は 1 時間以内に早く反応する経路として報告されていることが多いので、CDNB の処理時間による変動を調べた。その結果、E₂ 共存、非共存にかかわらず ERK1 の発現量は変化なかった (Fig. 19; right)。一方、リン酸化された ERK1/2 は CDNB 単独でも、E₂ 単独でも、また両者共存でも量的な差はあるが、2 時間のところに最大となり、8 時間までリン酸化 ERK が検出された。なお、24 時間処理では見にくかった CDNB 単独でも弱い、1 時間からリン酸化した ERK が見られた。

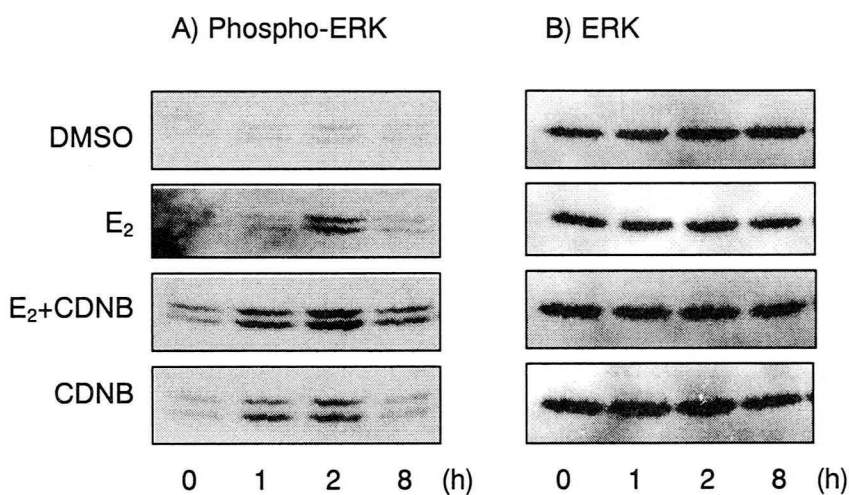


Fig. 19 Kinetics of ERK phosphorylation.

MCF-7 cells were grown in phenol red free MEM supplemented with 10% dextran-charcoal stripped FBS for 4 days. Cells were exposed for various periods of time to DMSO, E₂, E₂+CDNB or CDNB. Phospho-ERK (A) and ERK (B) were detected by western blot.

2. ER タンパク質に対する CDNB の影響

E₂により ER タンパク質量が減少することが報告されている⁴⁷⁻⁴⁹。化学物質で 12 時間処理したところ、CDNB 単独あるいは E₂ 単独より両物質を共存させた方が ER タンパク質量は低下した。

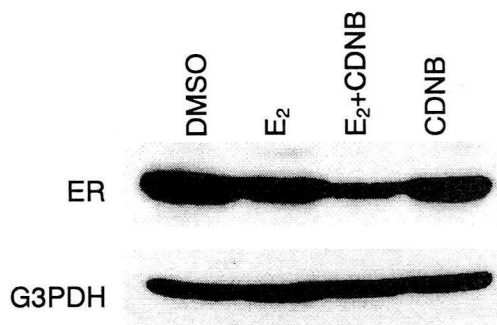


Fig. 20 Decrease of ER protein by CDNB.

MCF-7 cells were grown in phenol red free MEM supplemented with 10% dextran-charcoal stripped FBS for 4 days. Cells were exposed for 12 h to DMSO, E₂, E₂+CDNB or CDNB. ER protein was detected by western blot and G3PDH was shown as a control of constant protein loading.

第3節 考察および小括

I. 考察

第2章の結果から、CDNBは直接的なERに結合せず、 E_2 の作用を促進することが明らかになったので、本章では、CDNBによる E_2 作用の促進メカニズムについて調べた。そこで、CDNBが何を介して E_2 作用の促進するかを調べるために、2つの仮説を立てた。まず、CDNBの代謝により、 E_2 作用が促進されるかどうかについて調べた。細胞の中では化学物質は酵素により代謝される。しかし、競合ER結合試験は無細胞系で代謝物による影響は検出できない方法である。第2章、第3節の結果でもCDNBがERと直接に作用しなかったが、CDNBの代謝物がERと直接結合して、作用する可能性は考えられる。しかし、S-9 mixtureを用いて代謝させたCDNBの代謝物はエストロゲン様作用を示さなかった。また、 E_2 との共存でも E_2 による転写活性には変化がなかった。さらに、代謝物と考えられる2,4-dinitrophenolにもエストロゲン様作用はなかった(データ省略)。これらの結果から、CDNBの本体が間接的な経路を介して作用することが考えられたので、CDNBによるMAPK経路の活性化を調べた。

MAPK経路はERK経路、JNK/SAPK経路およびp38 MAPKの3つの経路に大きく分けられる。MAPK経路を介してERがリン酸化され、活性化することは報告されている⁴⁰。特に、ERKの経路が乳がん細胞では主要な経路であることから、ERKの活性化にCDNBが関与するかについて調べた。本研究の条件においては E_2 の共存、非共存にかかわらずCDNBによるERKの活性化が1時間目から2時間目をピークに8時間目まで維持された。すなわち、CDNBはERと結合せずに、MAPK経路を介して活性化したERKにより間接的にERを活性化し、 E_2 の作用を促進することが示唆された(Fig. 21)。

樹状細胞においてCDNBがMAPK経路を活性化し、免疫反応に関与することが最近報告された⁵⁰。本章の結果は、乳がん細胞においてCDNBがMAPK経路のERKを活性化して E_2 の作用に影響を及ぼすことを示すものである。

活性化されたERKはERの活性化だけではなく分解にもかかわることがら、ERのタンパク質分解に対するCDNBの影響を調べた。CDNBはERタンパク質の発現量を若干低下させ、 E_2 と共存させるとCDNBはERの発現量をさらに低下させた。この結果は、CDNBが活性化させたERKによりERの分解作用が促進されたと考えられる。さらに、CDNB単独ではERKの活性化も弱く、ERの転写活性もあまり示さなかったが、 E_2 との共存でCDNBは E_2 による転写活性をより強く促進した。

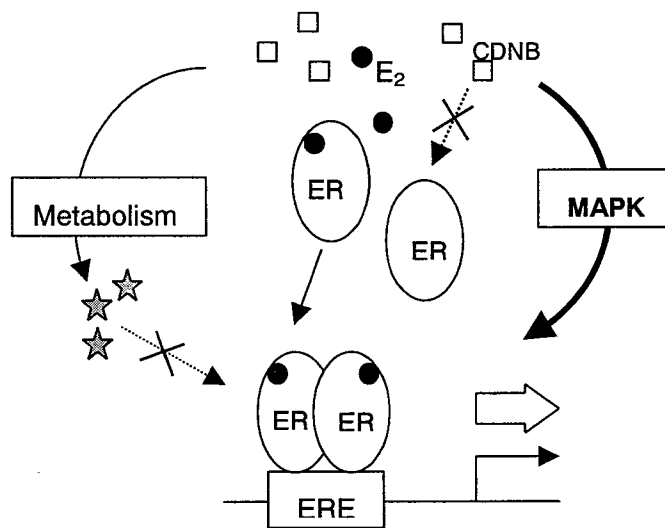


Fig. 21 Model for stimulation of E₂ activity by CDNB

以上の結果から、Fig. 21 に示したような CDNB による E₂ の作用に対する促進作用のメカニズムが推定される。

II. 小括

1. CDNB 代謝物のエストロゲン様作用は Yeast Two-hybrid 試験およびレポーター遺伝子試験、いずれの方法でも認められなかった。
2. E₂ と共存させると CDNB は MAPK 経路の一つである ERK を強く活性化した。
3. CDNB は ER タンパク質の分解を促進した。

以上の結果から、CDNB は MAPK 経路を介して ER の転写活性と ER タンパク質の分解を促進することが示唆された。

総 括

ホルモンは極微量でその作用を果たしているため、その合成、分泌、代謝などの一連の作用は非常に厳密に調節されており、その濃度バランスを維持している。しかし、EDは、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。また、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生殖系に重要な役割を果たしていることから、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巢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適當である。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、エストロゲンはERと結合することにより作用を果たすので、ER

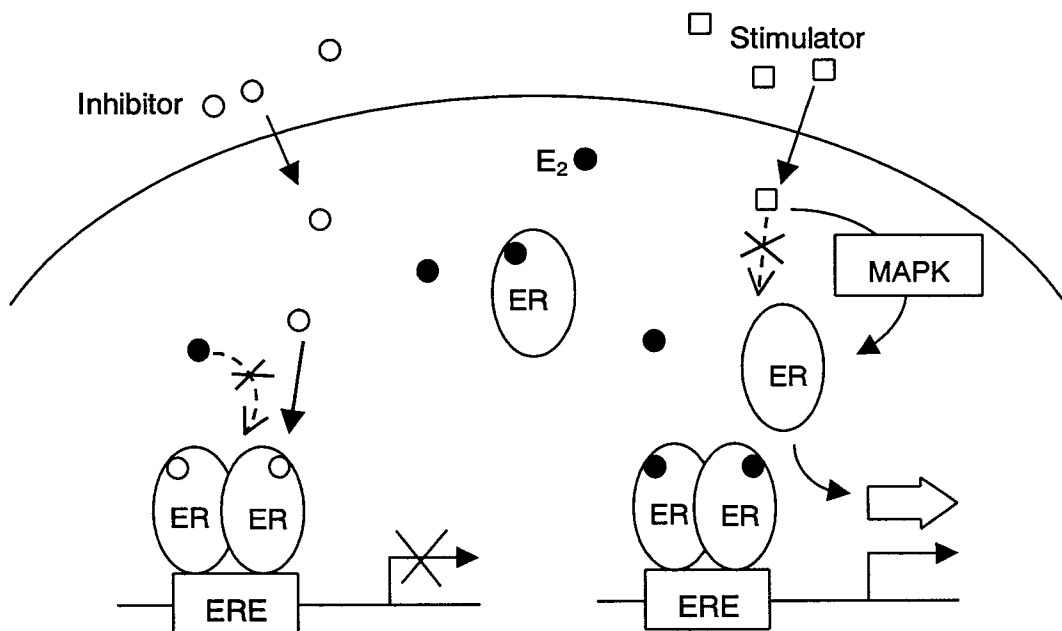


Fig. 22 Model for disruption of E₂ activity by chemicals

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。しかし、多くの研究が化学物質の単独に対するエストロゲン様作用を検索したものである。体内には E₂ と ER が存在しており、環境中に存在している ED に暴露されると混合物として作用する。しかしながら、その条件が *in vitro* 試験では無視され、検討されている場合がほとんどである。

そこで、本研究では化学物質を微量の E₂ と共存させて、*in vitro* 試験を行い、化学物質の E₂ 作用に及ぼす影響を調べた。

まず、第 1 章では、HCP、K3 および PCP のような化学物質が E₂ の代わりに ER に結合して E₂ の作用を抑制することを明らかにした。次に、第 2 章ではレポーター遺伝子試験により BFC、CDNB および CNBT は E₂ による転写活性化能の促進を示した。また、第 3 章では、E₂ の作用を強く促進した CDBN は ER と直接に結合せず、MAPK 経路を介して E₂ の作用を促進することを示した。CDBN による ERK の活性化、すなわち ERK のリン酸化が認められた。CDBN は単独では ER の転写活性の促進をあまり示さないが、E₂ と共存すると転写活性を大きく促進した。さらに、転写活性の促進とともに、ER mRNA はフィードバックで発現を下げ、ER タンパク質の分解を促進したと考えられた。

本研究から、環境中には ER または MAPKinase を介して E₂ の活性を抑制または促進する化学物質が存在することを明らかにした (Fig. 22)。

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。

結 論

1. EDとして疑われている物質を含めて50種類の物質について、 E_2 の作用を抑制する物質をスクリーニングした結果、hexachlorophene, menadione および pentachlorophenol の3種類の物質が検索された。これらの物質は、ERに対して E_2 と競合して E_2 の作用を抑制した。
2. E_2 による転写活性能を促進する物質として 7-benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene および 2-chloro-3,5-dinitrobenzotriflouride がレポーター遺伝子試験により検索された。
3. E_2 の作用を強く促進した 1-chloro-2,4-dinitrobenzene は E_2 と共存下で E_2 単独より、ER mRNA およびタンパク質の発現量を減少させ、その作用メカニズムは、ERに対する直接的な作用ではなく、間接的な MAPK 経路によることが示唆された。

以上の結果から、環境化学物質の中には、化学物質単独による影響だけではなく、 E_2 共存下に ER に直接または間接的に作用し、 E_2 本来の作用に影響を及ぼす物質が存在することが明らかになった。今後、化学物質の ED 作用を検討する際には、エストロゲン以外の性ホルモンに関しても、受容体に対する間接的な経路も含めて、本来のホルモン共存下にその影響を研究し、混合物としてのリスクも評価する必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心なご指導ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授、西原 力先生に心から篤く御礼申し上げます。

本研究に際し、熱心なご指導ご鞭撻を頂きました大阪大学大学院薬学研究科助教授、西川淳一先生に深く感謝いたします。

研究途上有益なご助言を頂きました大阪大学大学院薬学研究科助手、長田茂宏先生をはじめ微生物動態学分野のみなさまに感謝いたします。

実験に熱心にご協力頂きました石田一恵学士、原田真吾学士および播さや香学士に深く感謝いたします。

常日頃から激励、応援をいただきました、鄭 淇化先生、鄭 春植先生に深く感謝いたします。

最後に、ここまで研究できるように、ご援助をいただきました、両親、家族に心から感謝いたします。

参考文献

1. Kavlock R.J., Daston G.P., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Gray L.E., Kaattari S., Lucier G., Luster M., Mac M.J., Maczka C., Miller R., Moore J., Rolland R., Scott G., Sheehan D.M., Sinks T., and Tilson H.A. (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop, *Environmental Health of Perspectives* **104**, 715-740.
2. Speroff L. (2000) A clinical understanding of the estrogen receptor, *Annals of New York academy of sciences* **900**, 26-39.
3. Kregge J.H., Hodgins J. B., Couse J. F., Enmark E., Warner M., Mahler J. F., Sar M., Korach K. S., Gustafsson J. A., and Smithies O. (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β , *Proceeding of the national academy of sciences of USA* **95**, 15677-15682.
4. Nishikawa J., Saito K., Goto J., Dakeyama F., Matsuo M., and Nishihara T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator, *Toxicology and applied pharmacology* **154**, 76-83.
5. Horwitz K.B., Jackson T.A., Bain D.L., Richer J.K., Takimoto G.S., and Tung L. (1996) Nuclear receptor coactivators and corepressors, *Molecular endocrinology* **10**, 1167-1177.
6. Colborn T., Myers J. P., and Dumanoski D. (1996) Our stolen future. *Dutton*, New York, USA.
7. Nishihara T., Nishikawa J., Kanayama T., Dakeyama F., Saito K., Imagawa M., Takatori S., Kitagawa Y., Hori S., and Ustumi H. (2000) Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay, *Journal of health science* **46(4)**, 282-298.
8. Suzuki T., Ide K., and Ishida M. (2001) Response of MCF-7 human breast cancer cells to some binary mixtures of oestrogenic compounds in vitro, *Journal of pharmacy and pharmacology* **53**, 1549-1554.
9. Yamasaki K., Takeyoshi M., Yakaba Y., Sawaki M., Imatanaka N., and Takatsuki M. (2002) Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals, *Toxicology* **170**, 21-30.
10. Frasor J., Danes J. M., Komm B., Chang K. C. N., Lyttle R. C., and Katzenellenbogen B. S. (2003) Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype, *Endocrinology* **144(10)**, 4562-4574.
11. Kinyamu H. K., and Archer T. K. (2003) Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in Mdm2 protein expression, *Molecular and cellular biology* **23(16)**, 5867-5881.
12. Eck-Enriquez K., Kiefer T. L., Springgs L. L., and Hill S. M. (2000) Pathways through which a

- regimen of melatonin and retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells, *Breast cancer research and treatment* **61**,229-239.
13. Nesaretnam K., Lim E. J., Reimann K., and Lai L. C. (2000) Effect of a carotene concentrate on the growth of human breast cancer cells and pS2 gene expression, *Toxicology* **151**, 117-126.
 14. Takeyoshi M., Yamasaki K., Sawaki M., Nakai M., Noda S., and Takatsuki M. (2002) The efficacy of endocrine disruptor screening tests in detecting anti-estrogenic effects downstream of receptor-ligand interactions, *Toxicology letters* **126**, 91-98.
 15. Demirpence E., Balaguer P., Trousse F., Nicolas J. C., Pons M., and Gagne D. (1994) Antiestrogenic effects of all-trans-retinoic and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in breast cancer cells occur at the estrogen response element level but through different molecular mechanism, *Cancer research* **54**, 1458-1464.
 16. Beard A. P., Bartlewski P. M., Chandolia R. K., Honaramooz A., and Rawlings N. C. (1999) Reproductive and endocrine function in rams exposed to the orfanochlorine pesticides lindane and pentachlorophenol from conception, *Journal of reproduction fertility* **115**(2), 303-314.
 17. Danzo B. J., Shappell H. W., Danerjee A., and Hachey D. L. (2002) Effects of nonylphenol, 1, 1-dichloro-2, 2-bis(p-chlorophenyl) ethylene (p, p'-DDE), and pentachlorophenol on the adult female guinea pig reproductive tract, *Reproductive toxicology* **16**(1), 29-43.
 18. Dat Q. T., Diane M. K., Beth L. L., Charles F. I., John A. M., and Steven F. A. (1996) Inhibition of progesterone receptor activity in yeast by synthetic chemicals, *Biochemical and biophysical research communications* **229**, 518-523.
 19. Sakagami H., Satoh K., Hakeda Y. and Kumegawa M. (2002) Apoptosis-inducing activity of vitamin C and vitamin K, *Cellular and molecular biology* **46**(1), 129-143.
 20. Sata N., Kleoneowski-Stumpe H., Han B., Haussinger D., and Niederau C. (1997) Menadione induces both necrosis and apoptosis in rat pancreatic acinar AR4-2J cells, *Free radical biology & medicine* **23**(6), 844-850.
 21. Kar S. Adachi T. and Carr B. I. (2002) EGFR-independent activation of ERK1/2 mediates growth inhibition by a PTPase antagonizing K-vitamin analog, *Journal of cellular physiology* **190**, 356-364.
 22. Ni R., Nishikawa Y., Carr B. I. (1998) Cell growth inhibition by a novel vitamin K is associated with induction of protein tyrosine phosphorylation, *The journal of biological chemistry* **273**, 9906-9911.
 23. Wang Z., Southwich E. C., Wang M., Kar S., Rosi K. S., Wilcox C. S., Lazo J. S., and Carr B. I. (2001) Involvement of cdc25A phosphatase in Hep3B hepatoma cell growth inhibition induced by novel K vitamin analogs, *Cancer research* **61**, 7211-7216.
 24. Read L.D., Greene G.L., and Katzenellenbogen B.S. (1989) Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in human breast cancer cell lines by sex steroid

- hormones, their antagonists, and growth factors, *Molecular endocrinology* **3**, 295-304.
25. Reid G., Denger S., Kos M., and Gannon F. (2002) Human estrogen receptor- α : regulation by synthesis, modification and degradation, *Cellular and molecular life sciences* **59**, 821-831.
 26. Kaisd A., Strobl J. S., Huff K., Greene G. L., and Lippman M. E. (1984) A novel nuclear form of estradiol receptor in MCF-7 human breast cancer cells, *Science* **225**, 1162-1165.
 27. Horie K., Urano T., Ikeda K., and Inoue S. (2003) Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth, *Journal of steroid biochemistry & molecular biology* **85**, 101-104.
 28. Inoue S., Orimo A., Hosoi T., Kondo S., Toyoshima H., Kondo T., Ikegami A., Ouchi Y., Orimo H., and Muramatsu M. (1993) Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein, *Proceeding of the national academy of sciences of USA* **90**, 11117-11121.
 29. Ikeda K., Orimo A., Higashi Y., Muramatsu M., Inoue S. (2000) Efp as a primary estrogen-responsive gene in human breast cancer, *FEBS letters* **472**, 9-13.
 30. Klinge C. M. (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements, *Nucleic acids research* **29(14)**, 2905-2919.
 31. Cho H. S., NG P. A., Katzenellenbogen B. S. (1991) Differential regulation of gene expression by estrogen in estrogen growth-independent and-dependent MCF-7 human breast cancer cell sublines, *Molecular endocrinology* **5(9)**, 1323-1330.
 32. Barkhem T., Haldosen L.-A., Gustafsson J.-A., and Nilsson S. (2002) pS2 gene expression in HepG2 cells: Complex regulation through crosstalk between the estrogen receptor α , an estrogen-responsive element, and the activator protein 1 response element, *Molecular pharmacology* **61(6)**, 1273-1283.
 33. Ree A. H., Lnadmark B. F., Eskild W., Levy F. O., Lahooti H., Jahnsen T., Aakvaag A., and Hansson V. (1989) Autologous down-regulation of messenger ribonucleic acid and protein levels for estrogen receptors in MCF-7 cells: an inverse correlation to progesterone receptor levels, *Endocrinology* **124(5)**, 2577-2583.
 34. Martin M. B., Saceda M., Garcia-Morales P., and Gottardis M. M. (1994) Regulation of estrogen receptor expression, *Breast cancer research and treatment* **31**, 183-189.
 35. Cummings A. M. (1997) Methoxychlor as a model for environmental estrogens, *Critical reviews in toxicology* **27**, 367-379.
 36. Cupp A. S., and Skinner M. K. (2001) Actions of the endocrine disruptor methoxychlor and its estrogenic metabolite on in vitro embryonic rat seminiferous cord formation and perinatal testis growth, *Reproductive toxicology* **15**, 317-326.
 37. Kupfer D., and Bulger W. H. (1987) Metabolic activation of pesticides with proestrogenic activity, *Federation proceedings* **46(5)**, 1864-1869.
 38. Sanoh S., Kitamura S., Sugihara K., and Ohta S. (2002) Cytochrome P450 1A1/2 mediated

- metabolism of trans-stilbene in rats and humans, *Biological & pharmaceutical bulletin* **25**(3), 397-400.
39. Sugihara K., Kitamura S., Sanoh S., Ohta S., Fujimoto N., Maruyama S., and Ito A. (2000) Metabolic activation of the proestrogens trans-stilbene and trans-stilbene oxide by rat liver microsomes, *Toxicology and applied pharmacology* **167**(1), 46-54.
40. Santen R. J., Song R. X., McPherson R., Kumar R., Adam L., Jeng M.-H., and Yue W. (2002) The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer, *Journal of steroid biochemistry & molecular biology* **80**, 239-256.
41. Kramer VJ, Helferich WG, Bergman A, Klasson-Wehler E, and Giesy JP. (1997) Hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites are anti-estrogenic in a stably transfected human breast adenocarcinoma (MCF7) cell line, *Toxicology and applied pharmacology* **144**, 363-76.
42. Sumida K, Ooe N, Nagahori H, Saito K, Isobe N, Kaneko H, and Nakatsuka I. (2001) An in vitro reporter gene assay method incorporating metabolic activation with human and rat S9 or liver microsomes, *Biochemical and biophysical research communications* **280**, 85-91.
43. Yoshihara S., Makishima M., Suzuki N., and Ohta S. (2001) Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction, *Toxicological sciences* **62**, 221-227.
44. Kato S., Endoh H., Masuhiro Y., Kitamoto T., Uchiyama S., Sasaki H., Masushige S., Gotoh Y., Nishida E., Kawashima H., Metzger D., and Chambon P. (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase, *Science* **270**, 1491-1495.
45. Lannigan D.A. (2003) Estrogen receptor phosphorylation, *Steroid* **68**, 1-9.
46. OH A.S., Lorant L.A., Holloway J.N., Miller D.L., Kern F.G., and El-Ashry D. (2001) Hyperactivation of MAPK induces loss of ER α expression in breast cancer cells, *Molecular endocrinology* **15**, 1344-1359.
47. Zafar N., David M.L., Andrew P.D., Carolyn L.S., and Gert W.O.-M. (1999) Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor, *Proceeding of the national academy of sciences of USA* **96**, 1858-1862.
48. Ashini L., Wijayaratne, and Donald P.M. (2001) The human estrogen receptor α is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators, *The journal of biological chemistry* **276**, 35684-35692.
49. Abdelhamid E.K., and Guy L. (1999) Implication of proteasome in estrogen receptor degradation, *FEBS letters* **448**, 160-166.
50. Aiba S., Manome H., Nakagawa S., Mollah Z., Mizuashi M., Ohtani T., Yoshino Y., and Tagami H. (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene, *Journal of investigative dermatology* **120**, 390-399.

