

6. Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., Kato, S.: Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α . *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5363-5372, 1999.
7. Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, **283**, 1317-1321, 1999.
8. Yanagi, Y., Suzawa, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Yanagisawa, J., Kato, S.: Positive and negative modulation of vitamin D receptor function by transforming growth factor- β signaling through Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12971-12974, 1999.
9. Kato, S., Sekine, K.: FGF-FGFR signaling in vertebrate organogenesis. *Cell. Mol. Biol.*, **45**, 631-638, 1999.
10. Kitanaka, S., Murayama, A., Sakaki, T., Inoue, K., Seino, Y., Fukumoto, S., Shima, M., Yukizane, S., Takayanagi, M., Niimi, H., Takeyama, K., Kato, S.: No enzyme activity of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene product in pseudovitamin D-deficiency rickets including that with mild clinical manifestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 4111-4117, 1999.
11. Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Koderu, Y., Kawaguchi, Y., Hosoya, T., Kato, S.: Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 α , 25(OH)₂D₃ in intact animals. *Endocrinology*, **140**, 2224-2231, 1999.
12. Suzawa, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kato, S., Ueno, Naoto, Miyazono, K., Matsumoto, T., Fujita, T.: Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells *in vitro*. *Endocrinology*, **140**, 2125-2133, 1999.
13. Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K., Kato, S., Matsumoto, T., Fujita, T.: Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: Studies using VDR knockout mice. *Endocrinology*, **140**, 1005-1008, 1999.
14. Sawada, N., Sakaki, T., Kitanaka, S.,

- Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase coexpression with adrenodoxin and NADPH-adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* *Eur. J. Biochem.*, **265**, 950-956, 1999.
15. Sakaki, T., Sawada, N., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of mouse 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase expressed in *Escherichia coli* *Eur. J. Biochem.*, **259**, 731-738, 1999.
16. Kato, S., Takeyama, K., Kitanaka, S., Maruyama, A., Sekine, K., Yoshizawa, T.: *In vivo* function of VDR in gene expression-VDR knock-out mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **69**, 247-251, 1999.
17. Kato, S.: Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **156**, 7-12, 1999.
18. Sasaki-Iwaoka, H., Maruyama, K., Endoh, H., Komori, T., Kato, S., Kawashima, H.: A *trans*-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 248-255, 1999.
19. Kato, S.: Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **156**, 7-12, 1999.
20. Okuno, M., Sato, T., Kitamoto, T., Imai, S., Kawada, N., Suzuki, Y., Yoshimura, H., Moriwaki, H., Onuki, K., Masushige, S., Muto, Y., Friedman, S. L., Kato, S., Kojima, S.: Increased 9,13-di-*cis*-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF- β mediated fibrogenesis *in vivo*. *J. Hepatol.*, **30**, 1073-1080, 1999.
- 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

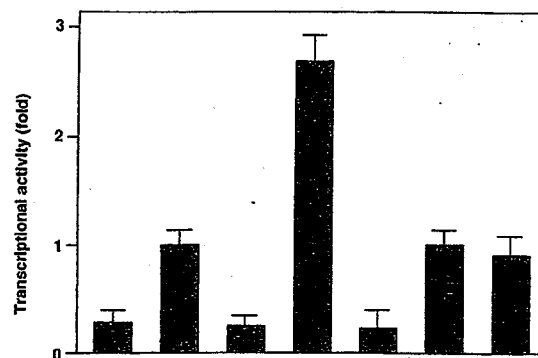


FIG. 2 p68 interacts with the hER α A/B domain but not with the LBD in vivo. p68 interacts with the hER α A/B domain in the mammalian two-hybrid system. A mammalian two-hybrid system with GAL4-p68 fusion protein and VP16-ER fusion proteins (VP16-HE15 and VP16-LBD) was used in COS-1 cells. COS-1 cells were cotransfected with 1 μ g of either GAL4-DBD, GAL4-p68, VP16-HE15, or VP16-LBD in the presence or absence of E2 (10^{-7} M), along with 2 μ g of 17M2G-CAT reporter plasmid. Significant interaction was detected only between p68 and the hER α A/B domain.

MSGYSSDRDR GRDRGFGAPR FGGSRAGPLS GKKFGNPGKE LVKKKWNLDE LPKFEKNFYQ 60

EHPDLARRTA QEVETYYRSK EITVRGHNCP KPVLFNFYEAN FPANVMDVIA RQNFTEPTAI 120

QAQGWPFVALS GLDMVGVAQT GSGKTLSYLL PAIVHINHQP FLERGDGPIC LVLAPTRELA 180

QQVQQVAAEY CRACRLKSTC IYGGAPKGPQ IRDLERGVEI CIATPGRLID FLECGKTNLR 240

RTTYLVIDEA DEA DRMLDMGFEP QIRKIVDQIR PDRQTLMWSA TWPKEVRQLA EDFLKDYIHI 300

NIGALELSAN HNLIQIVDVC HDVEKDEKLI RLMEEIMSEK ENKTIVFVET KRRCDLTRK 360

MRRDGWPAMG IHGDKSQQER DWVLNEFKHG KAPILIATDV ASRGLDVEDV KVVINYDYPN 420

SSEDIYHRIG RTARSTKTGT AYTFFTPNNI KQVSDLISVL REANQAINPK LLQLVEDRGS 480

GRSRGRGGMK DRRDRYSAG KRGGFNTFRD RENYDRGYSS LLKRDFGAKT QNGVYSAANY 540

TNGSFGSNFV SAGIQTSFRT GNPTGTYQNG YDSTQQYGSN VPNMHGMNQ QAYAYPATAA 600

APMIGYPMPT GYSQ 614

FIG. 1 Amino acid sequence of human p68 RNA helicase protein. The five sequences determined by microsequencing are underlined and completely matched to the reported p68 RNA helicase protein (GenBank accession no. X15729 and X52104). The nuclear receptor recognition motif (LXXLL motif [15]) is doubly underlined, and the DEAD box motif is boxed.

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

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、トレードオフ的な 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、AP1 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、このトレードオフ的なエストロゲン応答配列を介したものでなく、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-タモキシフェン、ゲニスタイン、1,2,3,4,5,6-ヘキサクロロシクロヘキサジーン(HCH)、ジブタロ酢酸(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。アッセイ前にはそれぞれ DC 処理血清を含むフェナルレッド(-)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-hc fos、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 タンパク質の変化

エストロゲンを投与した細胞での AP-1 タンパ

ク質 c-fos および c-jun の発現量の変化を
免疫ブロットングでみた結果、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
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、タモキシフェン、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、タモキシフェン、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、タモキシ
フェンで誘導されたが、ER β ではタモキシフェンのみ
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 およびタモ
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 受容体を介した転写応答
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、
転写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 タンパク質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 AP-1 アッセイであるタンパク質で応答がでたことは、受容体の AP-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

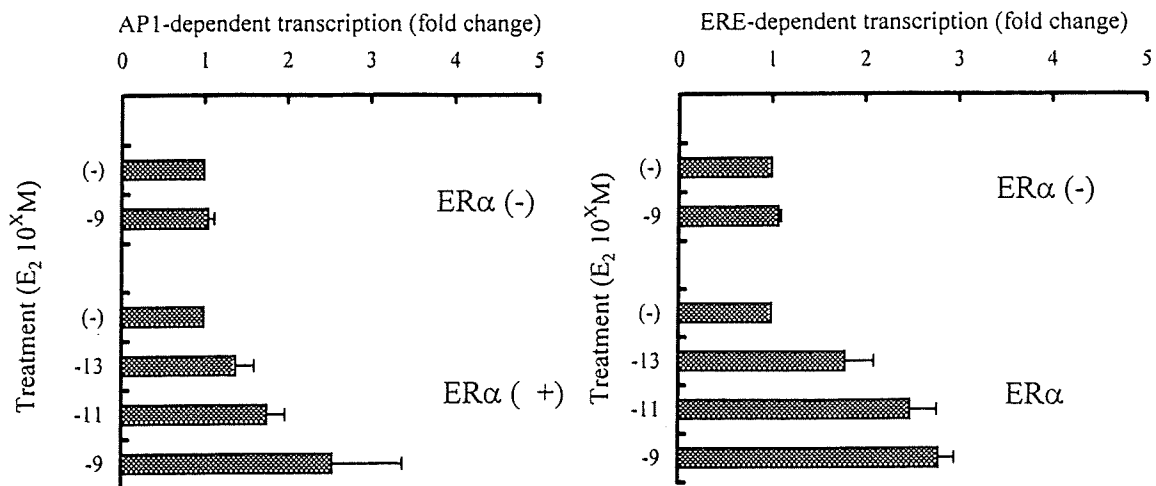


Fig.2

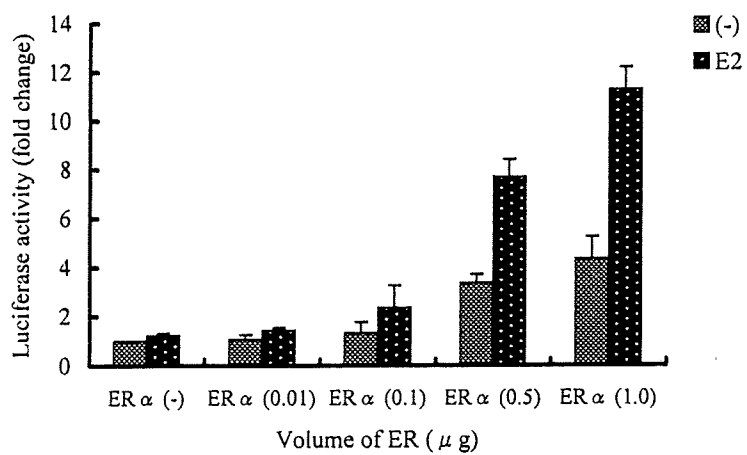


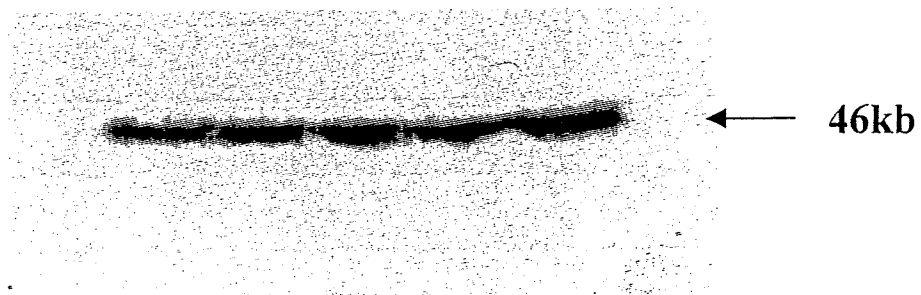
Fig 3

c-fos



(-) E_2 $10^{-8}M$ $TPA10^{-7}M$

c-jun



(-) 10^{-10} 10^{-9} 10^{-8} $TPA10^{-7}M$
 E_2

Fig. 4

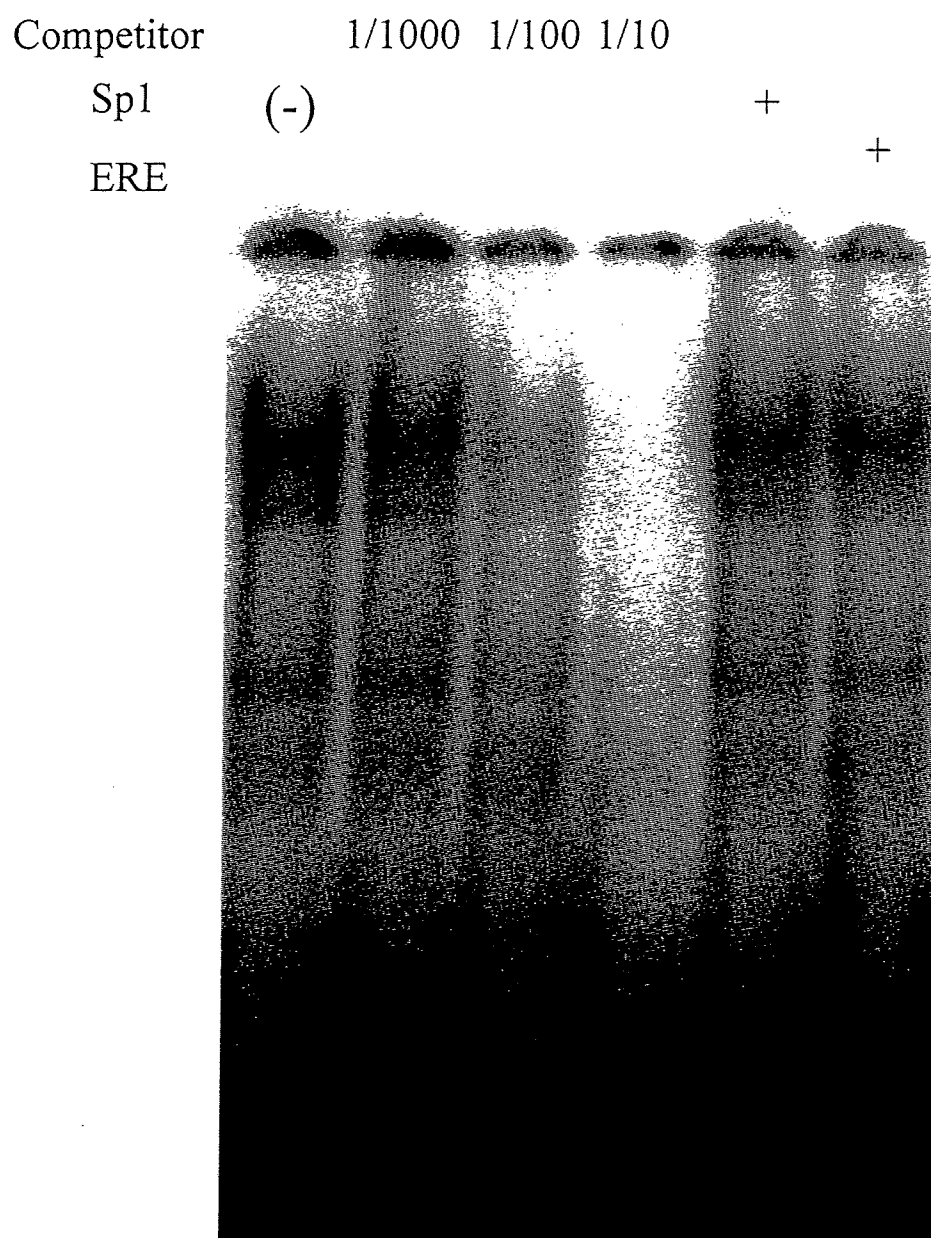


Fig. 5

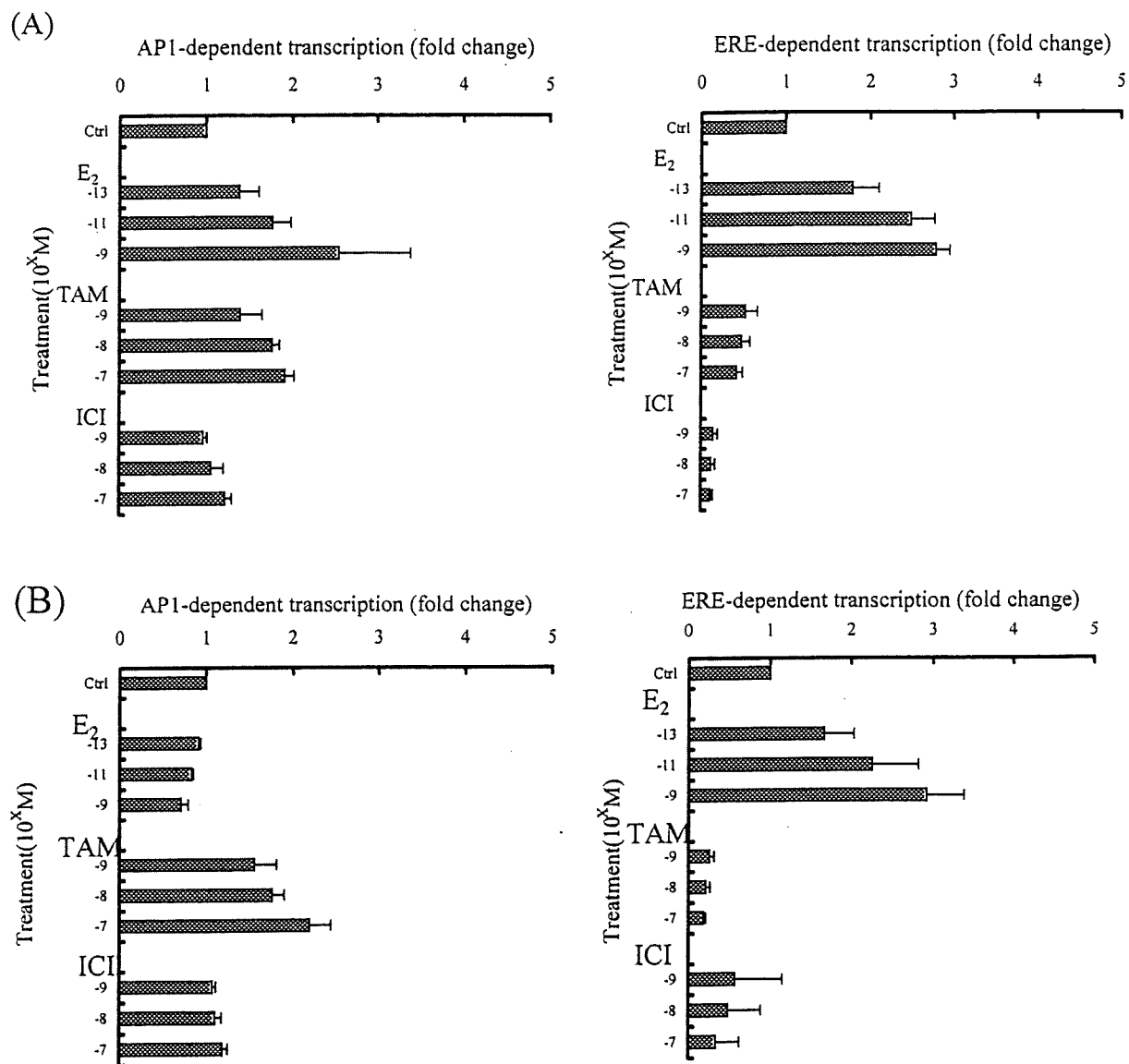


Fig. 6

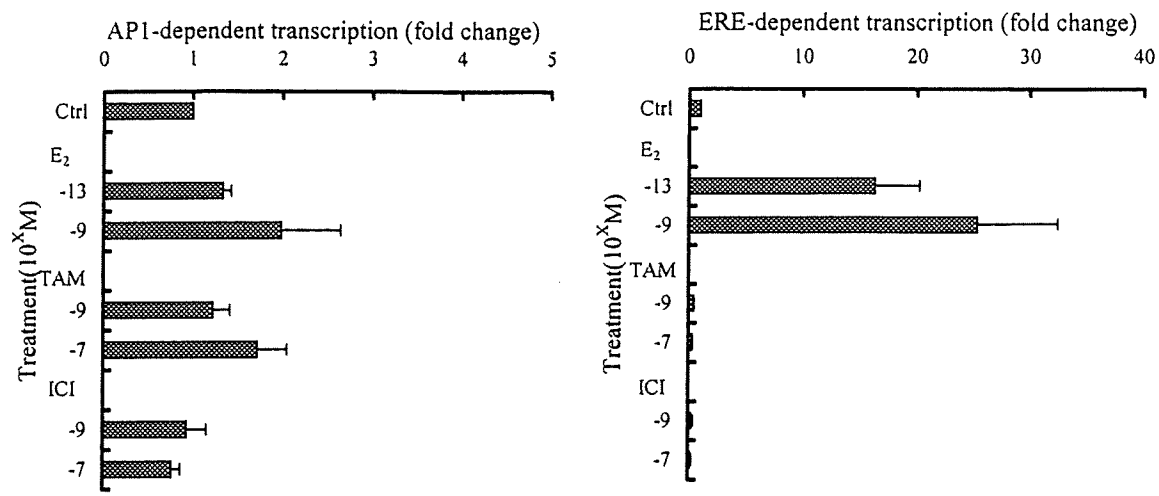
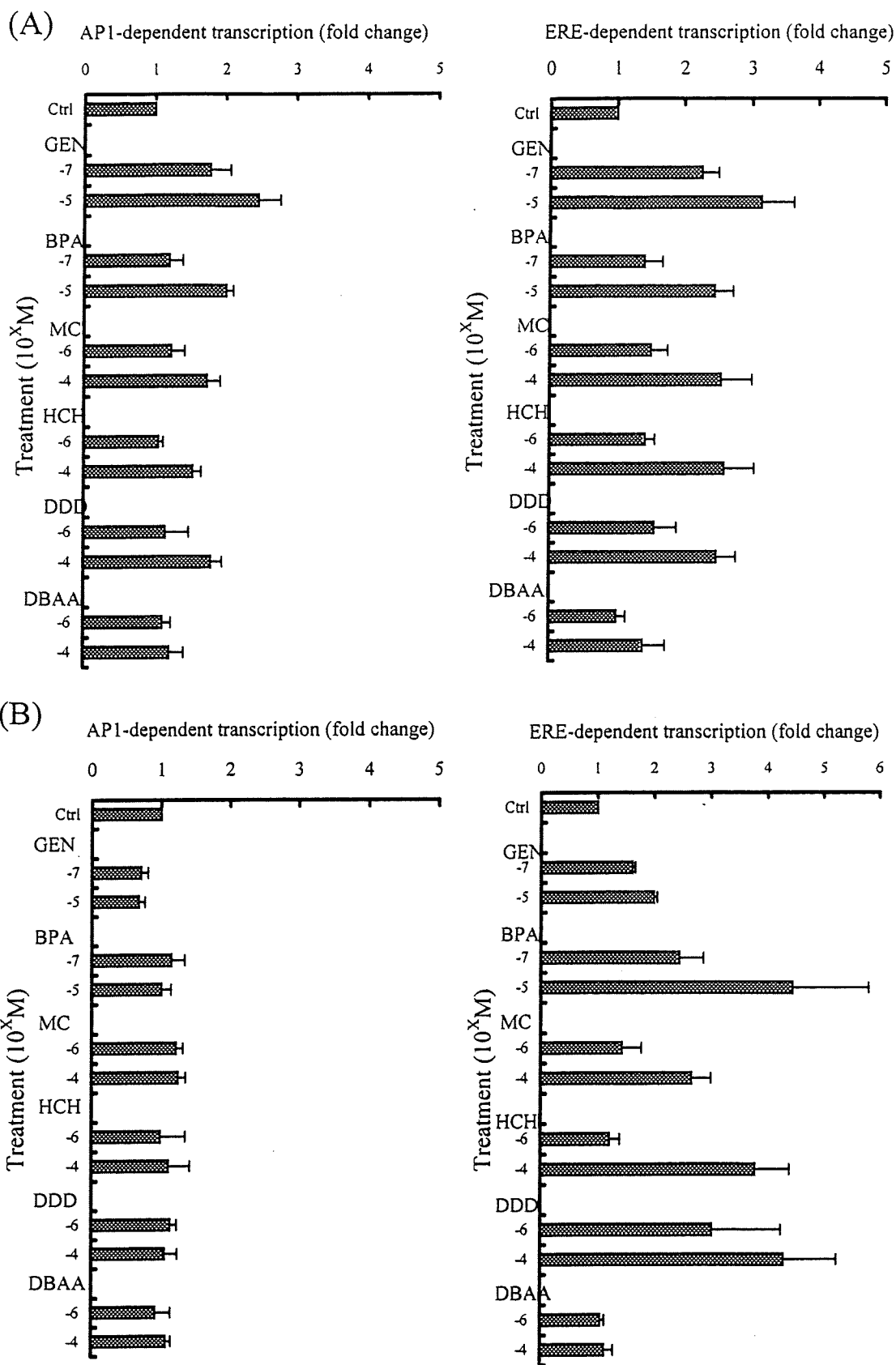


Fig. 7.



厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

研究課題名=ヒト消化管、肝組織におけるエストロゲン代謝の検討

—環境ホルモンに対する生体防御機構の解明—

分担研究者 笹野公伸 東北大学大学院・医学系研究科・医科学専攻病理学

講座・

診断病理学分野 教授

研究要旨

我々は、Estradiol (E2) と Estrone (E1) を相互に変換することにより局所におけるエストロゲン活性の調節に重要な役割を果たしている 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD) に注目し、この酵素がヒト胎児においてどのように発現しているのかに関し種々の検討を行った。肝臓、消化管では 17β -HSD2 を発現し、E2 を E1 へ変換してエストロゲン活性を弱めることによって局所におけるエストロゲン活性を制御し過剰のエストロゲンへの曝露に対するバリアとしての役割を果たしているものと推察された。

A. 研究目的

17β -hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD) は、生物学的活性の高いエストロゲンである estradiol (E2) と低い estrone (E1) とを相互に変換することにより、局所におけるエストロゲン活性のレベルを制御している酵素である。 17β -HSD の type 1 アイソザイム(17β -HSD1)は、C18ステロイドに特異性が高く、主として E1 をエストロゲン活性の高い E2 へ変換している。一方、 17β -HSD の type 2 アイソザイム(17β -HSD2) は、E2 を E1 へ変換してエストロゲ

ン活性を弱めるだけでなく、アンドロゲンに関しても生物学的活性の高い Testosterone から低い Androstenedione に変換する働きを持っている。すなわち 17β -HSD2 は、エストロゲンやアンドロゲンの活性を弱めることによって、これらの性ステロイドの局所における活性を制御している。さらに 17β -HSD2 は、C21ステロイドの 20α -oxidation にも関与しており、 20α -dihydroprogesterone から progesterone に変換してプロゲステロン活性を高める役割も果たしている。

ヒト胎児においては、臍帯血から移行するエストロゲンに加え、嚥下した羊水中に含まれているエストロゲンが消化管から吸収されたり、皮膚から浸透することによってもエストロゲンを取り込んでいることになる。このようにヒトの胎児は、子宮内において大量のエストロゲンに曝露されている。それゆえ、エストロゲンは、妊娠の維持のみならず、胎児の発育に対しても重要な役割を果たしていると考えられる。しかし一方、過剰のエストロゲンへの曝露は、胎児の発育に悪影響を及ぼすともいわれている。例えば、流産の予防のためにエストロゲン製剤である Diethylstilbestrol (DES) を投与された妊婦から生まれた児において数多くの異常を生じていることが報告されている。従って、胎児においてこの大量のエストロゲンがどのように代謝されるのかを知ることは大変重要である。

これまでのところ、マウスやヒト成人の組織で 17β -HSD の発現を検討した報告は出されているが、ヒト胎児組織においてどのように発現しているのかに関しては知られていない。そこで今回ヒト胎児組織における 17β -HSD1 と 17β -HSD2 の発現を検討することにより、妊娠時に増加し続けるエストロゲンがどのように代謝されているのかに関して検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象

胎生 11 週から 21 週までのヒト胎児組織は、合併症のない健常な妊婦に対して施行された elective termination の際に採取した。胎児の年齢は、妊婦の最終月経、胎児の体重及び頭殿長より評価した。胎生 26、30、36 及び 38 週のヒト胎児組織は、東北大学医学部附属病院で行われた autopsy の際に採取した。標本採取は、elective termination の場合は 1 時間以内、autopsy の場合は 2~6 時間以内に行った。これらの標本はいずれも病理組織学的には異常を認めなかった。Enzyme assay 及び RNA 抽出のための標本は採取後素早く凍結させ使用まで -80°C で凍結保存した。免疫組織学的検索のための標本は、10% 中性ホルマリンにて室温で 18 時間固定し、パラフィンに包埋した。

2. ヒト胎児組織における 17β -HSD 活性の検討

ヒト胎児の各組織のホモジネートに、E2 あるいは E1 と補酵素を加えてインキュベートし、E1 あるいは E2 へどの程度変換されるのかを検討することにより、ヒト胎児組織における 17β -HSD 活性の検討を行った。この検討では、胎生 20 週 (男児)、20 週 (女児)、及び 21 週 (女児) の 3 例の胎児より採取した組織を使用した。

まず、これらのヒト胎児組織をリン酸バッファー(100mM KCl、10mM KH₂PO₄、10mM Na₂HPO₄、1mM EDTA、pH7.5)中で、Potter-Elvehjem glass-Teflon homogenizerを用いてホモジナイズした。それを軽く遠心して残渣を沈殿させた後、その上清を、1 μ Mの14Cでラベルされた基質(E2またはE1)と10mMの補酵素(NAD⁺、NADP⁺、NADH、NADPHのうちどれかひとつ)を含んだリン酸バッファー0.5mlに加え、37°Cで30分間インキュベートした。反応は2mlのジエチルエーテルを加えて攪拌することにより停止させた。有機層を分離し、溶媒を蒸発させ、その沈渣をcyclohexane/ethyl acetate (1:1, v/v)へ溶解して薄層クロマトプレートへスポットした後、cyclohexane/ethyl acetate (1:1, v/v)をdeveloping solventとして薄層クロマトグラフィーを施行した。プレートを乾燥させ室温で18時間感光させた後、GS-250 MOLECULAR IMAGER (BIO-RAD Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA)を用い、生成されたE1あるいはE2の検出、定量を行った。ホモジネートの蛋白量は、ウシ血清アルブミンを標準とし、Lowry法にて測定した。ヒト胎児組織間における17 β -HSD活性の差異は、Bonferroni法により検定した。また、補酵素間の17 β -HSD

活性の差異は Student's t-test により検定した。いずれも p 値が 0.01 以下の場合を有意とみなした。

3. 17 β -HSD1 と 17 β -HSD2 の Northern blot analysis

ヒト胎児組織における 17 β -HSD1 と 17 β -HSD2 の mRNA レベルにおける発現を検討するために Northern blot analysis を施行した。この検討では胎生 20 週(女児)より採取した組織を使用した。

まず GTC 溶液 (4M guanidium isothiocyanate, 1% 2-mercaptoethanol) 中でヒト胎児の各組織をホモジナイズした後、塩化セシウム超遠心法にて total RNA を抽出した。抽出した total RNA の濃度は 260nm 吸光度より求めた。10 μ g の total RNA を 1% アガロースゲルにて電気泳動した後、ナイロンメンブレンにトランスファーし、UV クロスリンクを行った。次にメンブレンをハイブリダイゼーションバッファー [50%(v/v)formamide, NaH₂PO₄(250mM,pH7.2), NaCl(250mM), 7%(wt/vol)SDS, denatured salmon sperm (100 μ g/ml)] で 4 時間、42°Cにてプレハイブリダイゼーションを行った後、上述のハイブリダイゼーションバッファーに [α -³²P] でラベルした 17 β -HSD type 1 cDNA あるいは 17 β -HSD

type 2 cDNA プローブを加え、42°C で 18 時間、ハイブリダイゼーションを行った。洗浄を 2×SSC + 0.1%SDS で室温、15 分間、次に 0.1×SSC + 0.1%SDS で室温、20 分間、最後に 0.1×SSC + 0.1%SDS で 55°C、30 分を 3 回行った後、-80 °C にて autoradiography を行った。

4. 17 β -HSD1 と 17 β -HSD2 の RT-PCR

蛍光プライマー (fluorescent dye-labeled primer) を用いて RT-PCR を施行し、画像解析装置を利用することにより、ヒト胎児の各組織における 17 β -HSD1 と 17 β -HSD2 mRNA の半定量を行った。

今回の検討では、胎生 13 週(男児)と胎生 20 週(女児)の 2 例の胎児組織より抽出した total RNA と、17 β -HSD1、17 β -HSD2 及び β -actin の standard RNA を用いて RT-PCR を行った。ヒト胎児組織からの total RNA は上述と同じ塩化セシウム超遠心法にて抽出し、17 β -HSD1、17 β -HSD2 及び β -actin の standard RNA はこれらの cDNA を鋳型とし、T7 RNA polymerase により合成した。total RNA (0.2~2 μ g) と standard RNA (0.02 ~ 2 amol) から SUPERScript reverse transcript (Gibco-BRL, Grand Island, N.Y.) を用いて cDNA を合成し、続いて 23

~28 サイクルの PCR を施行した。PCR 産物は 2% agarose gel に電気泳動した後、Gene Scanner 362 Fluorescent Fragment Analyzer (Perkin-Elmer Co., Foster City, CA) を用いてバンドの検出、定量を行った。

5. 免疫組織化学

(1)1 次抗体

17 β -HSD2 の免疫組織化学には、Dr. Stefan Andersson (Cecil H. and Ida Green Center for Reproductive Biology Sciences, University of Texas Southwestern medical Center, Dallas, Texas)より供与されたマウス抗ヒト 17 β -HSD2 モノクローナル抗体、mAb-C2-12 (subclass IgG1/ κ) を用いた。これは、17 β -HSD2 の C 末端の 375 番から 387 番のアミノ酸残基の合成タンパクに対する抗体である(20)。17 β -HSD1 の免疫組織化学には、Dr. Vihko (Dept. Clinical Chemistry, University of Oulu, Oulu, Finland)より供与されたウサギ抗ヒト 17 β -HSD1 ポリクローナル抗体を用いた。この抗体は、ヒト胎盤より抽出した 17 β -HSD1 に対する抗体である。

(2)免疫組織化学

今回検討した症例は、胎盤に関しては胎生 4 週から 40 週までの計 31 例

(Table 5)、胎児に関しては胎生 11 週から 38 週までの計 10 例 (Table 4) である。免疫組織学は Histofine Kit (Nichirei Co. Ltd, Tokyo, Japan) を用い、Avidin-biotin complex 法にて施行した。

まず、パラフィン包埋された組織を $3.0\mu\text{m}$ に薄切し、シランコートされたスライドガラスにのせた。脱パラフィン後、 $17\beta\text{-HSD2}$ に使用する切片は、抗原賦活化のため、 10 mmol/L のクエン酸バッファー(pH6.0)に浸し、 120°C 、5 分にてオートクレーブ処置を施行した(23)。その後、0.3%過酸化水素含メタノールに 30 分間浸して内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、つづいて非特異的な反応を阻止するため、正常ウサギ血清 ($17\beta\text{-HSD2}$) あるいは正常ヤギ血清 ($17\beta\text{-HSD1}$) と 30 分間反応させた。次に一次抗体を至適濃度に調製し、滴下、 4°C で約 18 時間反応させた。各抗体の希釈倍率は、 $17\beta\text{-HSD1}$ (1:500)、 $17\beta\text{-HSD2}$ (1:5) である。洗浄後、biotin 標識抗マウス IgG 抗体 ($17\beta\text{-HSD2}$)、あるいは biotin 標識ウサギ IgG 抗体 ($17\beta\text{-HSD1}$) を 30 分反応させた後、peroxidase 標識 ストレプトアビジン を 30 分反応させた。最後に、 0.06 mM 3,3' diaminobenzidine (DAB) + 2 mM H_2O_2 in 0.05 M Tris (pH7.6) で発色させた後、ヘマトキシリンにて核染し、透徹封入した。

(倫理面への配慮)

なお、今回の実験プロトコールに関しては、東北大学医学部倫理委員会 の了承を得ている。

C. 研究結果

1. 酵素活性

結果を表 1 にまとめる。肝臓における $17\beta\text{-HSD}$ 活性が他臓器に比較して有意に高く ($p < 0.0001$)、さらに胎盤の方が肝臓に比べ有意に高かった ($p < 0.0001$)。また、消化管、腎臓にも強い $17\beta\text{-HSD}$ 活性を認め、小腸における $17\beta\text{-HSD}$ 活性は脳、心臓、肺、副腎のものより有意に高かった ($p < 0.01$)。脳と副腎における $17\beta\text{-HSD}$ 活性は極めて低く、心と肺においては $17\beta\text{-HSD}$ 活性を全く検出できなかった。補酵素に関する検討では、肝、消化管、腎において、NAD(H) を用いた場合の方が NADP(H) を用いた場合よりも有意に高かった ($p < 0.001$)。

2. Northern blot analysis

1.3 kb の $17\beta\text{-HSD1}$ mRNA の発現は胎盤においてのみ認められた (Figure 1)。一方、 1.5 kb の $17\beta\text{-HSD2}$ mRNA は、胎盤、肝臓、空腸、回腸、及び直腸において強い発現を認めたほか、胃、十二指腸、S 状結腸、

子宮、腎臓及び膀胱においても弱い発現を認めた。

3. RT-PCR

結果を表2に示す。数値は、 β -actin の発現量を基準とし、各組織において発現している 17β -HSD1 と 17β -HSD2 の mRNA 量を相対的に表したものである。 17β -HSD1 は、胎盤で最も強い発現を認め、脳、肺、心臓、腎臓においても弱い発現を認めた。 17β -HSD2 は、胎盤、肝臓、消化管、腎臓において強い発現を認めた。アイソザイム間での比較では、胎盤、脳、心臓、肺、副腎では 17β -HSD1 が優位に発現しており、逆に肝臓、消化管、腎臓では 17β -HSD2 が優位に発現していることが示された。

4. 免疫組織化学

胎児組織における 17β -HSD2 の免疫染色の結果を表3に示す。肝臓と小腸においては、胎生早期から末期まで通して強い発現が認められた。胃、大腸、及び腎臓においては、胎生初期には発現が見られなかったが、胎生中期頃より発現し始め、胎生末期にかけて発現が増強した。胃では、 17β -HSD2 は表層上皮細胞に染色が認められ、胃底腺には染色を認めなかった。小腸及び大腸では、吸収上皮細胞に染色を認め、粘膜下層や筋層には染色を認めなかった。肝臓では、肝細

胞に強い染色を認めた。腎臓では、髄質の尿細管周囲の間質細胞にのみ染色を認め、尿細管や糸球体には染色を認めなかった。胎生 20 週の胎児から採取した皮膚組織において 17β -HSD2 の免疫染色を施行したところ、表皮には染色は認めず、皮脂腺に染色を認めた。 17β -HSD1 に関しては、胎児組織では特異的な染色像は得られなかった。

D. 考察

17β -HSD1 は、NADPH を補酵素として E1 を E2 へと還元し、エストロゲン活性を高める役目をしている。一方 17β -HSD2 は、NAD⁺ を補酵素として E2 を E1 へ、あるいは Testosterone を Androstenedione に酸化し、エストロゲンやアンドロゲンを生物学的活性の低い方へ変換する働きをしている。従って、 17β -HSD1 と 17β -HSD2 の発現のパターンは、組織におけるエストロゲン活性の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

今回のヒト胎児を用いた検討では、肝臓、消化管、腎臓において E2 から E1 へと変換する活性が強く認められ、またこれらの組織では Northern blot analysis において 17β -HSD2 mRNA の発現を強く認めた。このことは、 17β -HSD2 が mRNA 及び蛋白レベルで発現しており、これらの組織中で