

- Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1049-1055, 1999.
32. 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.
33. 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 coactivators. *Science*, 283, 1317-1321, 1999.
34. 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.
35. Kato, S., Sekine, K.: FGF-FGFR signaling in vertebrate organogenesis. *Cell. Mol. Biol.*, 45, 631-638, 1999.
36. 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.
37. Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Kadera, 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.
38. 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.
39. 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.

40. 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.

41. 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.

42. 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.

43. 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.

研究報告書

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

ステロイド受容体発現調節機構およびその内分泌かく乱物質低用量影響に関する研究

分担研究者 藤本 成明 広島大学原爆放射能医学研究所

研究要旨 内分泌かく乱物質の低用量影響の作用点としてエストロゲン受容体(ER)を捉え、その発現調節について解析した。1) ラット前立腺においてはERの α 型と β 型の発現が発生過程を通じて動的に変化しており、それぞれテストステロンにより負と正に調節されていることが示された。2) ER β の発現機構を探るためcDNAの上流を探索し未知領域の構造を決定した。

A. 研究目的

エストロゲン受容体(ER)は核内受容体遺伝子スーパーファミリーに属し、それを介した遺伝子調節機構は、急速に解明されてきた。しかし、その一方で、ER自体の発現に関してはその調節機構について未だ十分に知られていない。つまり、多くの内分泌攪乱物質の標的分子であるERの発現調節に関して著しく知見が不足しているといえる。胎生期の生殖腺や脳の性分化といった過程では、ERの発現調節は非常に精密に行われていることが現象としては明らかになってきたが機構は不明である。一方で、この時期は低用量の内分泌攪乱物質が作用しうる時期として危惧されており、内分泌攪乱物質の作用を特定するにおいて、受容体発現調節メカニズムの解明の重要性は明らかであるが、報告は少なく進展が遅れている。エストロゲン(E)は名の通り、雌成熟に関わるものとして理解されてきたが、近年雄性生殖線の発達においても、受容体を介した直接作用の重要性が明らかになった。特に、ER β が最初に発見された前立腺では、ERの発現調節がみられることが結合アッセイ等で示されてきた。

そこで我々は低用量内分泌攪乱物質のターゲットとしてERを捉え、ラット前立腺をモデルにその発現様式を解析する。今回は、1) ラット前立腺ER α ・ β のテストステロンによる発現様式の解明、2) ラットER β cDNAの5'RACE法による上流構造探索について報告する。

B. 研究方法

B-1. ラット前立腺でのER mRNA発現調節
B-1-1. Hormones

17 β -estradiol and diethylstilbestrol (DES) were purchased from Sigma Chemicals, St. Louis, MO, U.S.A.; and testosterone (T) was from Wako Junyaku KK, Osaka, Japan. They were dissolved in ethanol to give stock solutions.

B-1-2. Animal experiment

Male F344 rats were purchased from Charles River Co., Kanagawa, Japan. They were maintained with free access to basal diet and tap water. All experiments were conducted under the guidelines of the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" of Hiroshima University. Animals were sacrificed under anesthesia and the ventral and dorsolateral prostate tissues were dissected and separately frozen. Blood samples were collected from the abdominal artery and separated sera were stored at -20°C until assayed
Experiment 1. One, 2, 4 and 9 week-old rats were maintained for a week and sacrificed to examine the prostate gland.

Experiment 2. Four and 9 week-old animals were castrated and treated with 5 mg of T in a silicone tube for a week. For 2 week-old rats, 0.5 mg of DES in a silicone tube was given instead of castration. They were treated with 0.5 mg of T in silicone tube for a week.

Experiment 3. Four week-old male rats were castrated. One week later, 10 mg of T was

藤本-1-

作成上の留意事項について

1. 日本工業規格 A 列 4 番の用紙を使用して下さい。
2. 文字の大きさは、11ポイントをお願いいたします。 120

administered i.p. They were sacrificed at hours 0, 3, 9, 24 and 48 after an injection.

B-1-3. Cell culture

Two androgen independent rat prostate carcinoma cell lines, AT3 and PLS10, were maintained in DMEM (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo., USA) containing penicillin and streptomycin with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco/In vitrogen, CA, U.S.A.). For hormone treatments, the medium was changed to phenol red free DME (Sigma Chemicals) containing the same antibiotics along with dextran-charcoal treated FBS for a week.

B-1-4. PCR primers

RER-a1u and RER-a1d with the sequences 5'-AATTCTGACA ATCGACGCCA G (473-493) and 5'-GTGCTTCAAC ATTCTCCCTC CTC (794-816) were employed for rER α detection (344bp), and RER-b1u and RER-b1d with the sequences 5'-TTCTTGGCAG CACCAGTAAC C (38-58) and 5'-TCCCTCTTTG CGTTTGGACT A (279-299) were employed for rER β detection (262bp). For construction of an ER α competitor, RER-a2u, RER-a2d, RER-a12u (RER-a1u linking to RER-a2u) and RER-a12d (RER-a1d linking to RER-a2d) with the sequences 5'-GAGACTCTCC AGCAGCAGCG AG (515-536), 5'-AAAGCCTTGC AGCCTTCAACA GG (605-626), 5'-AATTCTGACA ATCGACGCCA GGAGACTCTC CAGCAGCAGC GAG and 5'-GTGCTTCAAC ATTCTCCCTC CTCAAAGCCT TGCAGCCTTC ACAGG were used. For the ER β competitor, RER-b2d and RER-b12d with the sequences 5'-GAGGTTCTGC ATAGAGGAGC G (152-172) and 5'-TCCCTCTTTG CGTTTGGACT AGAGGTTCTG CATAGAGGAG CG were applied.

B-1-5. Construction of competitive cDNA

A rER α plasmid was mixed with 20 pmol each of primers RER-a2u and RER-a2d in a total volume of 50 μ l containing 1.25 U of Ex-Taq Dnase polymerase (Takara Shuzo Co., Otsu, Japan), 0.2 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 2 mM MgCl₂ and 50 mM KCl, and a 112-bp DNA fragment was isolated with a GFX Gel Band Purification Kit (Amersham pharmacia biotech, Uppsala, Sweden). Using this fragment as a template, a further PCR amplification with primers RER-a12u and RER-a12d and gel purification were performed to obtain a 126-bp

competitor DNA for ER α . The same procedures with RER-b1u and RER-b2d followed by amplification of RER-b1u and RER-b12d was performed to obtain the ER β competitor (156 bp). The sequences of the resulting DNA fragment were confirmed with a capillary sequencer, ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

B-1-6. Reverse transcription (RT) and Competitive PCR

Briefly, total RNAs from cells were prepared by a modified acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method and treated with RQ1 DNase (Promega). 1 μ g of total RNA was reverse-transcribed with 100 U of MMLV-RT (Life Technologies) and 1.25 pmol of oligo-dT primers.

Sample cDNA (equivalent of 0.2 μ g of total RNA) and competitor DNA at various concentrations (0-20 fg) were co-amplified by PCR with Ex-Taq using the RER-a1u and RER-a1d primer set. The amplification condition was as described above in the final volume of 20 μ l. Each PCR product was electrophoretically separated on a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide at 0.2 μ g/ml. The image was digitized with a video capturing device, PrintGraph (Atto Co., Tokyo, Japan) and intensities of the blots were quantified using a software, Scion Image (Scion Corp., Frederick, MD, U.S.A.). The log ratio of the blot intensities of sample cDNA over the competitor in each lane was plotted against amounts of the competitor. Quantity of rER mRNAs was determined where the ratio was equal to 1.

B-1-7. ER assay by the competitive binding method

The cytosol fraction of prostate tissues were prepared in TEDMG buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM disodium EDTA, 1mM dithiothritol (DTT), 10 mM sodium molybdate and 10% (v/v) glycerol, pH 7.4) and incubated in 0.05-50 nM of [¹⁷ β -2,4,6,7-³H] - estradiol (NEN Life Science Products, Boston, MA, U.S.A.), with or without a 100-fold molar excess of unlabelled estradiol (10 nM), at 30°C for 40 min. The bound [³H] -estradiol was separated by the hydroxyl apatite method. Binding data were analyzed by Scatchard plotting.

B-1-8. Serum T levels

Serum T was measured by a RIA kit for rat serum 17 β -estradiol, purchased from Immunotech Inc. (Marseille Cedex, France).

B-1-9. Statistical analysis

Statistical comparisons were made using the Student's t-test.

B-2. 5'-RACE(5'-Rapid Amplification of cDNA Ends)法による cDNA 5'端の検索

10週齢の F344 ラットから摘出した前立腺, 卵巣, 子宮および前立腺癌培養細胞 AT3, DT3, PLS10 よりグアニジン酸チオシアネート-フェノール-クロホルム変法にて全 RNA を抽出した後、Oligotex™-dT30 [Super] (Takara)を用いて poly(A)⁺mRNA を精製し、これを鋳型に 5'-Full RACE kit (Takara)を用いて 5'-RACE 反応を行った。すなわち 5'端をリン酸化した rERβ の gene specific primers (GSP-ERβ, Table 2)を用いて、AMV reverse transcriptase により 30°C、10 min、50°C、60 min、80°C、2 min インキュベートして得られた 1本鎖 cDNA を、T4 DNA ligase により環状構造とした。さらに、これを鋳型に 2組のアダプタープライマーを用いて nested-PCR 反応し、未知の 5'端を増幅した。得られた cDNA クローンの塩基配列を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems, CO, USA)により決定した。

C. 研究結果

C-1. ラット前立腺での ER mRNA 発現調節

C-1-1. Age dependent changes in ERα and ERβ mRNA levels in rat prostate

ERα mRNA was the major type of ER expressed in the 2 week-old rat prostate. The expression decreased afterward and the ERβ mRNA expression became apparent in 5 and 10 week-old rats (Fig.1).

C-1-2. Effects of castration and T administration on ER mRNA levels in the rat prostate gland at different ages

At ages 5 and 10 weeks old, the ERβ mRNA levels were decreased by castration and recovered by T administration (Fig.2). However, the regulation of ER mRNA by T was not found in the dorsolateral part of the prostate gland at 5 weeks (Fig.3). The control ERα mRNA level was low and not regulated by castration or T. ERα mRNA in the prostate of 3 week-old rats, which was relatively high, seemed to be induced by T. ERβ at this age decreased by DES treatment albeit the levels were low.

C-1-3. Time dependent changes in ER mRNA levels in the prostate gland after a T injection in 6 week old rats.

Changes in ERα and β mRNA levels in the ventral prostate in castrated rats after a 10 mg

of the ventral prostate in castrated rats after a 10 mg of T injection was summarized in Fig. 4. ERβ mRNA in the prostate gland began to increase 3 hours after the injection and reached the maximum at 24 hours. The level of ERα mRNA was significantly decreased in 48 hours. The weight of the ventral prostate was unchanged for 48 hours. The serum T level marked a peak at 3 hours after the injection.

C-1-4. Numbers of specific estradiol binding sites in the prostate cytosol in normal and castrated rats.

Table 1 showed the ER levels in the prostate gland by the competitive binding assay. No specific estradiol binding sites were detected in the prostate cytosol in castrated animals, while significant amounts of binding sites were apparent in the control.

C-1-5. ER mRNA levels in rat prostate cell lines.

The amounts of ERβ mRNA were higher than those of ERα in both AT3 and PLS10 cell lines. The levels were, however, not changed by T administration in either cell lines (Fig.5).

C-2. 5'-RACE

5'-RACE 法により正常前立腺組織由来の mRNA から得られたクローン F322 の塩基配列を Table 2 に示す。構造遺伝子領域から上流-416 塩基までは、既に報告されている cDNA の配列と一致した。さらに上流-524 塩基までの 108bp が、今回新たに同定された配列である。卵巣, 子宮からも F322 より短いクローンが得られたが、いずれもこの配列内に一致をみるものであった。

D. 考察

D-1. ラット前立腺での ER mRNA 発現調節

Several investigations have indicated that ERβ in the rat prostate is developmentally regulated probably by androgen. The present results clearly demonstrated that androgen regulated the expression of ERα mRNA as well as ERβ in the rat prostate gland. More importantly, we showed that the significant amount of ERα mRNA was expressed in the prostate gland in neonatal rats when ERβ expression was still low. That is, ERα would be a target receptor for estrogen and many other endocrine disrupting chemicals in the prostate gland at early stage of life.

It has been reported that ERβ is localized in prostatic epithelial cells as opposed to stromal localization for ERα. At birth, low levels of ERβ message were observed in the epithelial and

mesenchymal cells. ER β levels decreases afterward as differentiation of mesenchymal cells. The increase in ER β begins around day 15 by elevations in testosterone. The maximal expression of ER β is observed at day 90 when adult testosterone levels are at their peak.

It is interesting to note that down-regulation of ER by androgen has been demonstrated clearly in humans and monkeys, but in rats there are evidences of an opposite effect since castration decreases ER expression in the prostate according to the early competitive binding studies. This might be explained by the opposite regulation of ER α and ER β expression by androgen since ER β mRNA is abundant in the rat prostate but at only a low level in the prostate gland in man.

D-2. 5'RACE 法

ER α については構造遺伝子上流にプロモーター領域が、複数存在し、このうちの一つのプロモーターから転写が開始されることが知られている。どのプロモーターが選択されるかは、臓器特異的に決定しており、活性化したプロモーター領域の 3'端にあるエクソンが、スプライスされて、転写されることにより、プロモーターの種類に特異的な mRNA が合成されることが知られる。 β についても同様のプロモーター解析が待たれていたが、近年相次いで、ヒトとマウスにおける ER β の 5'端の解析が報告され、特にヒトでは ER α と同様に異なる 5'側エクソンを有する mRNA が 2種類同定され、組織特異的に発現していることが認められ、ER β にも ER α と同様の多重プロモーターを用いた発現機構が存在する可能性が示唆された。しかし、今回我々は 5'RACE 法により、未知領域を含む cDNA を同定したが、基本的に単一分子種であり、これは単一プロモーターの可能性を示唆するものであった。

E. 結論

本研究では、ER を介する内分泌かく乱化学物質の低用量影響をみる目的で、ER の発現調節とその機構を解析する。それは、1) 低用量内分泌かく乱化学物質の作用において、代表的なターゲットである ER の発現がいつどの様に調節されているか理解しておく必要があること、および、2) 内分泌かく乱化学物質により ER 発現自体が影響を受けることが指摘されているので、その

低用量での作用を把握する必要があるからである。そこで研究の第一段階として、ラット前立腺 *in vivo* での調節様式を定量的に検討した。その結果、ER の mRNA 発現は、成長過程を通じて α 型から β 型へ動的に発現移行していることが明らかになった。さらに、 β 型発現は T 依存して調節されており、逆に α 型の発現は T により抑制的に調節されていることが明らかになった。それらの調節は比較的短時間でみられ、直接的な ER 転写調節が関与していることが示唆された。エストロゲン受容体発現調節は、一般に構造遺伝子上流にある複数のプロモーターによっているであろうことが示されてきた。ラットの ER β についても複数プロモーターとそれに依存的な複数エクソンを仮定して、cDNA の上流構造を 5'RACE 法で検索したが、結果的に単一種類の分子種のみが発現していることを見いだした。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) Fujimoto, N. Effects of endocrine disruptors on the pituitary gland. *J. Toxicol. Pathol.* 14, 65-69 (2001)
- 2) Maruyama, S., Fujimoto, N., Asano, K., Ito A. Suppression by estrogen receptor beta of AP-1 mediated transactivation through estrogen receptor alpha. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 78, 177-184 (2001)
- 3) Yin, H., Fujimoto, N., Maruyama, S., Asano, K. Strain Difference in Regulation of Pituitary Tumor Transforming Gene (PTTG) in Estrogen Induced Pituitary Tumorigenesis in Rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 1034-1040 (2001)
- 4) Tamura, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Fujimoto, N., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takagi, H., Hirose, M. Dose-threshold for thyroid tumor-promoting effects of orally administered kojic acid in rats after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine. *J Toxicol Sci.* 26(2), 85-94 (2001)
- 5) Nitta, Y., Endo, S., Fujimoto, N., Kamiya, K., Hoshi, M. Age-dependent exposure to radioactive iodine (¹³¹I) in the thyroid and total body of newborn, pubertal and adults Fischer 344 rats. *J. Radiat. Res.* 42, 143-155 (2001)

F-2. 学会発表

- 1) 藤本成明, 丸山聡 ゲニステインおよびノニルフェノールによるエストロゲン応答性ラット下垂体腫瘍増殖作用 第17回日本毒性病理学会、淡路, 2001(講演要旨集20)
- 2) Fujimoto, N., Yin, H., Maruyama, S., Asano, K., Ito, A. Estrogen dependent tumorigenesis and the regulation of PTTG in the rat pituitary gland. 5th Joint conference of AACR and JCA, Maui, HI, U.S.A., 2001 (Proceedings A-93)
- 3) 浅野耕助, 藤本成明, 丸山聡, 碓井亜 ラットエストロゲン受容体βの発現機構の解析 第74回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 2001 (日本内分泌学会雑誌, 77, 100, 2001).

2001 (日本内分泌学会雑誌, 77, 100, 2001).

- 4) 丸山聡, 藤本成明, 浅野耕助, 碓井亜 ラット前立腺におけるエストロゲンレセプターα、βの発現 第74回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 2001 (日本内分泌学会雑誌, 77, 164, 2001).
- 5) 藤本成明, 丸山聡 ノニルフェノールおよびアトラジン経口投与によるエストロゲン応答性ラット下垂体腫瘍増殖作用 第60回日本癌学会総会, 横浜, 2001 (日本癌学会総会記事, 68, 2001)
- 6) 佐能正剛, 杉原数美, 北村繁幸, 藤本成明, 太田茂 スチルベン誘導体のエストロゲン作用と代謝活性化及び構造活性相関 フォーラム 2001: 衛生薬学環境トキシコロジー, 石川(抄録集 04-1)
- 7) 佐能正剛, 杉原数美, 北村繁幸, 吉原新一, 藤本成明, 渡邊敦光, 太田茂 スチルベンのエストロゲン作用における構造活性相関ならびにその生殖器への影響 環境ホルモン学会第4回研究発表会 筑波 2001 (要旨集 PB-21)
- 8) 鈴木智晴, 北村繁幸, 太田茂, 藤本成明 環境中からの抗アンドロゲン物質のスクリーニング 環境ホルモン学会第4回研究発表会 筑波 2001 (要旨集 PB-17)

Fig.1

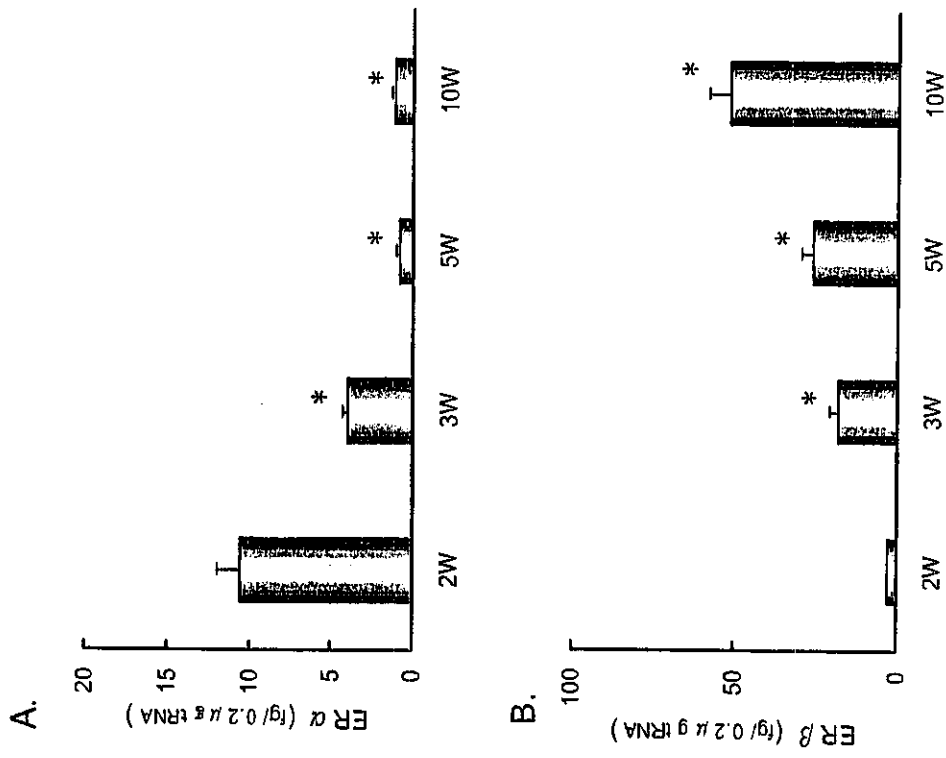


Fig. 1. Expression of ER α and ER β mRNAs in the normal prostate gland in 2, 3, 5 and 10 week-old rats. Bars indicate Mean \pm SEM (n=6, each point)

Fig.2

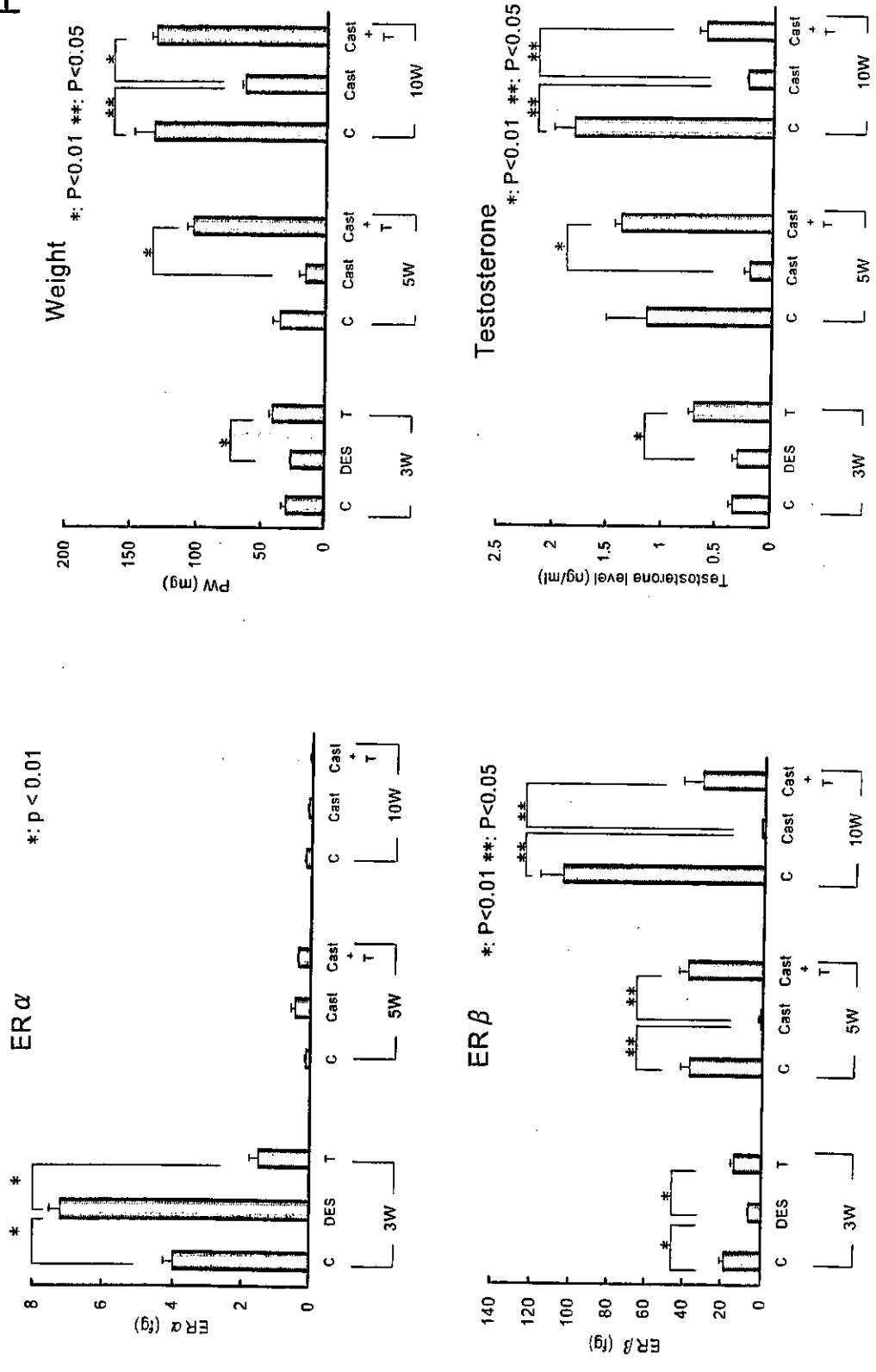


Fig. 2. Effects of castration and testosterone (T) on ER mRNA levels and weights in the ventral prostate and serum T levels in rats at 3,5 and 10 weeks old. Bars indicate Mean \pm SEM (n=6, each point).

Fig.3

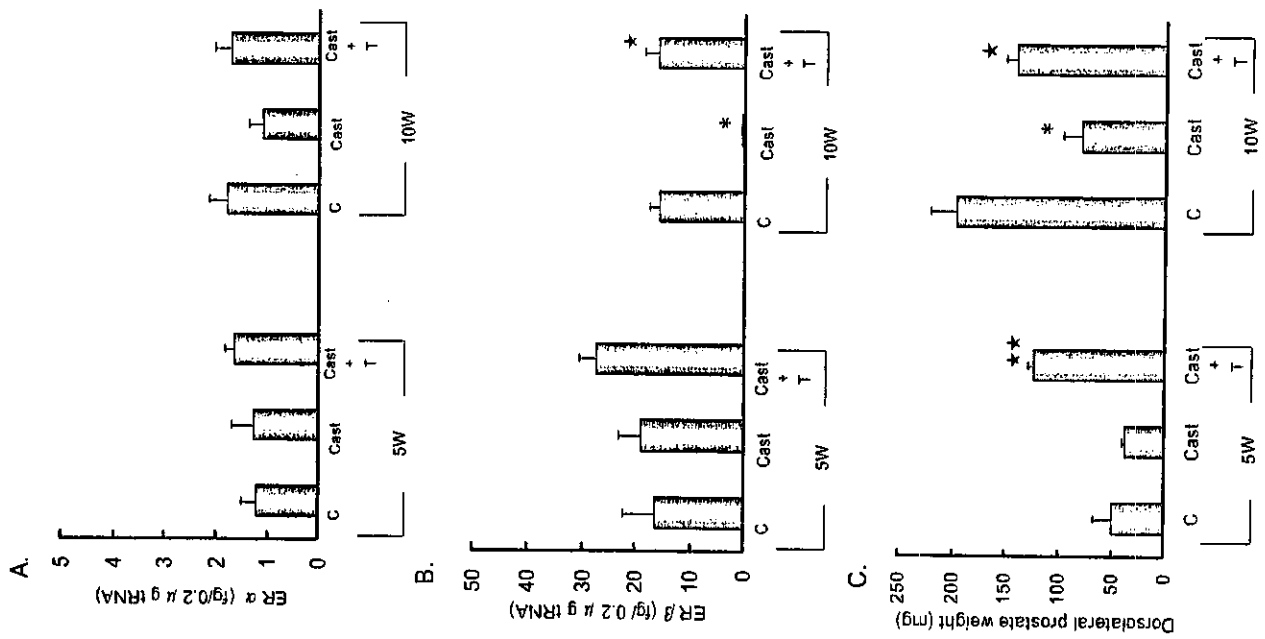


Fig. 3. Effects of castration and testosterone (T) on ER mRNA levels and weights in the dorsolateral prostate in rats at 5 and 10 weeks old. Bars indicate Mean \pm SEM (n=6, each point).

Fig. 4

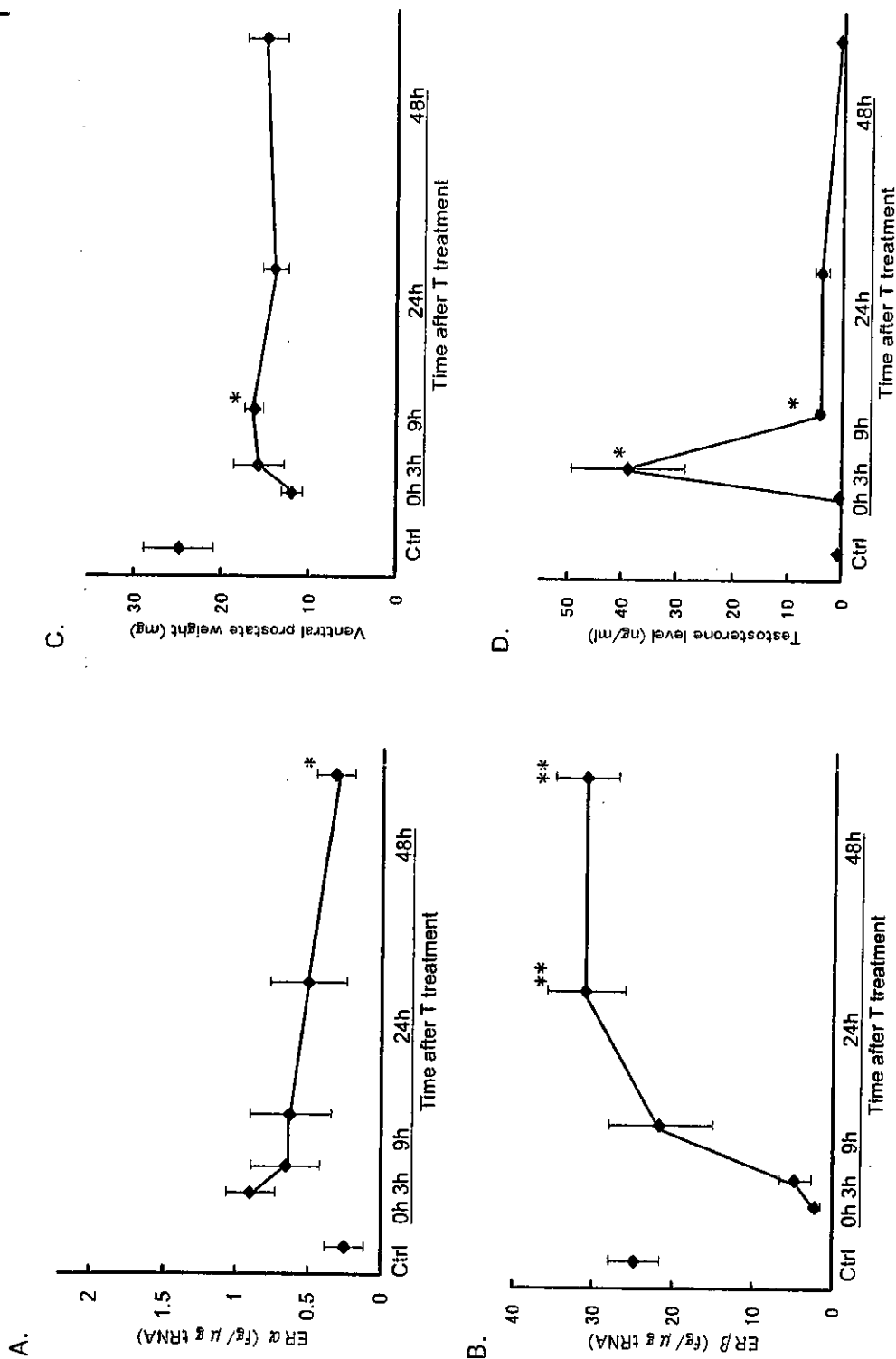


Fig. 4. Time dependent changes in ER mRNA levels and weights in the ventral prostate and serum testosterone (T) levels in 5 week-old castrated rats after a T injection. Mean \pm SEM (n=6, each point).

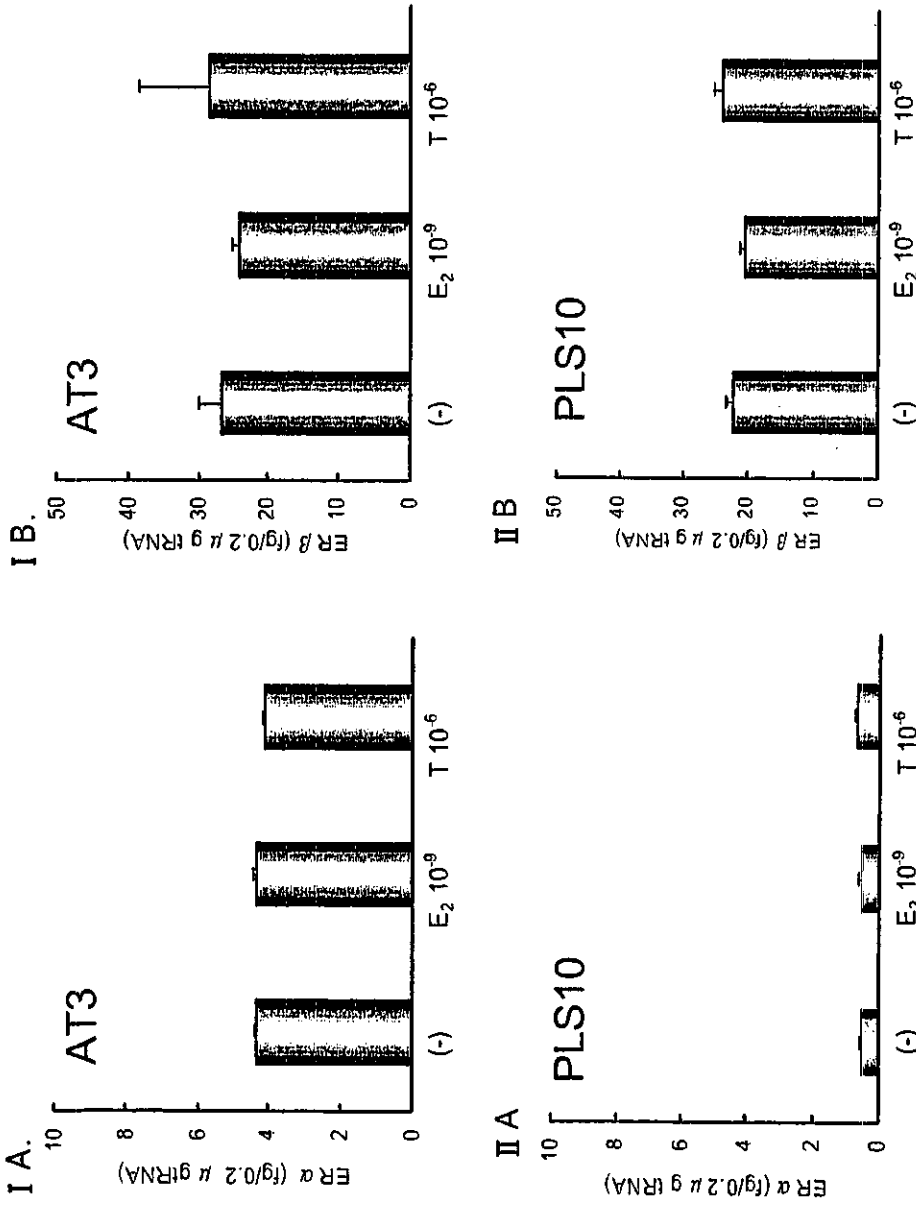


Fig. 5. ER mRNA levels in rat prostate cell lines, AT3 and PLS10 treated with 17β -estradiol (E_2) at 10^{-9} M or testosterone (T) at 10^{-6} M ($n=3$).

Table 1. Cytosolic ER levels in the prostate gland by the competitive binding assay

Prostate	Treatment	Specific binding (fmol/mg protein)
Ventral	Control	15.9, 8.6
	Castration	0, 0
Dorsolateral	Control	24.6, 13.7
	Castration	0, 0

* Each measurement was made with the combine tissues from two animals of 9 week-old.

```

-524 gtgggtaaatcttttgcagcttctcc
-500 agctgtggcctttttgaaacgcactctcaggtccctgccttcagcgagg
-450 ctctagaatcagccacctcttgaactcttgggt gggagctggccogg
-400 gggagcggctggtgctgccactggccatccctagggaccaccaggtctgcaat
-350 aaagcctggcagccactgcatggctgagcgacaaccagtggtgggagtc
-300 cggctctgtggctgaggaaagcactgctgctgcaatttagaagaatgcaaaat
-250 agagaatgTTTTACCTGCAGTCAITACAICTGAGTCCCAITGAGTCTCTGA
-200 GAACATAATGTCCATCTGTACCTCTTCACAAAGGAGTTTTCTCAGCTGC
-150 GACCCTCTGAAGACAIGGAGAUCAAAAATCACCCTCGAGC CTTAGTTC
-100 CTTGCTTCCIAAP2-ASTAA CTGTAGCCAGTCCATCTACCCCTGGAGCACGGGCC
-50 CATCTACATCCCTTCTCTATCTGTAGACAACCGGCATGAGTAITCAGCT
+1 ATGACATTTACAGTCTGTGTGATGAAP2-ASCTACAGTGTTCOCGGCAGCAC
+51 CAGTAACTGGACGGTGGCCCTGTCCGACTGAGCACAAGCCCAAAITGTGC
+101 TATGGCCAACTTCTGGGCACTGTCTCTTTAGCCACCCATTGCCAATCA
+151 TCGCTCTCTATGCAGAACCTCAAAGAGTCTTGGTGTGAAGCAAAGATC
+201 ACTAGACACACCTTACTGTAAAAP2-ASCAGAGACACTGAAGAGGAAGCTTA
+251 GTGGAGCAGTTGTGCCAGCCCTGTTACTAGTCCAACCGCAAAGAGGGAT
+301 GCTCACTTCTGCCCGTCTGAGCGAAP2-ASITAGCAITCTGGGTATCAITACGG
+351 CGTTTGGTCAITGTGAAGATGAP2-ASAAGGCCCTTTTTTAAAGAAAGCAITTC AAG
+401 GACATAP2-ASATGATTAATCTGTCCAGCCA CGAATCAGTGTACCAITAGACAAG
+451 AACCGCGTAAAGCTGCCAGGCCTGCGS-P-RetA CGACTTCGCAAGTGT_TATGAAGT
+501 AGGAATGGTCAAGTGTGGATCCAGGAGAGAACGGTGTGGGTACCCGTATAG

```

Table 2. 5'RACE法で得られたクローンF322の5'側の塩基配列
転写開始点から上流524塩基対の配列が得られた。-417までは既に報告されたcDNA構
造と同一であった。下線は今回の解析で用いたプライマー部位を示す。

三木康宏、金子智香、鈴木貴、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 病理診断学分野

研究要旨

近年標的組織並びに全身のエストロゲン作用、動態を制御している事が示されてきている steroid sulfatase (STS)及び estrogen sulfotransferase (EST)の成人及び胎児の全身分布を RT-PCR 及び免疫組織化学を用いて検討した。EST はヒト全身で広範な発現が認められており、エストロゲンの不活化を通してエストロゲン代謝ならびに作用を制御している可能性が考えられた。一方 STS の発現はほとんど認められず、ヒトにおいてはエストロゲン代謝、作用にあたってはほとんど関与していない事が示唆された。

A. 研究目的

エストロゲンは代表的な女性ホルモンであり、その多くは卵巣と胎盤で合成されると考えられてきた。エストロゲンは胎児の性分化へも影響を及ぼし、思春期の発来、成熟期で重要な役割を果たしている。さらにエストロゲンは数多くの生殖器外の組織(脂質代謝や糖代謝、骨、心血管系、中枢神経系)でも重要な作用を示している事が明らかになってきた。エストロゲン受容体である ER には2つのサブタイプ ER α と ER β が知られており、これら ER は男女の生殖器のみならず中枢神経系、循環器系、骨、肺、肝及び腸管など多くのヒト組織で発現している事が近年明らかになり、エストロゲンの全身組織での作用を支持する結果となっている。

天然のエストロゲンにはエストロン(E1)、エストラジオール(E2)及びエストリオール(E3)があり、このうちもっとも作用が強いのは E2 である事が知られている。生体内では E2 \rightleftharpoons E1 \rightarrow E3 と代謝されるが、生体内でもっとも多く存在するのは E1 が

硫酸抱合され、不活性化したエストロンサルフェート(E1S)であり、E1 と E2 を併せた量よりも 10 倍以上認められている。そしてこの体内に大量に存在する E1S は肝臓や標的組織において脱抱合化され E1 となり種々のエストロゲン活性を示す。このエストロゲン活性、作用で非常に重要な役割を果たしている E1S の E1 への脱抱合は steroid sulfatase(STS)が担っている事が知られている。又この逆の過程である E1 の E1S への硫酸抱合、すなわち不活化は estrogen sulfotransferase (EST)により反応が触媒される。この STS と EST のバランスがエストロゲン作用を規範する重要な因子であることが考えられてきている。例えば代表的なエストロゲン標的組織であるヒト乳癌組織では STS 活性が高く、この酵素により血中から癌細胞に至った E1S が E1 となり、エストロゲンが供給され癌細胞の発育を促す。この事から乳癌組織においては STS の阻害剤が開発されるなど、多くの研究がなされてきているが正常組織における動態は不明のままである。

一方 EST は、男女の生殖組織、肝臓、腎臓及び副腎などに酵素活性が見いだされているが、実験動物が中心の研究報告となっている。

このように、これらの酵素のヒト全身組織における遺伝子発現、成人及び胎児における発現様式の違いについてはほとんど知られていない。そこで今回我々は、免疫組織化学及び定量的 RT-PCR によって、成人及び胎児組織での STS 及び EST の発現と組織内局在について比較検討を行い、エストロゲン代謝、作用との関係を検討した。

B. 研究方法

対象

本研究に用いた成人組織は、死後 3 時間以内に施行された剖検例より採取した(男性 3 例: 24、84 及び 87 歳、女性 2 例: 15 及び 38 歳)。また胎児組織については elective termination により得られた胎児(17-21 週齢の男女)より採取した。なお、採取した組織ではいずれも病理組織学的な異常は認められなかった。

定量的 PCR (Real-Time PCR)

得られた組織の一部は、ただちに 5mm 角に細切し、液体窒素にて凍結した。凍結組織は TRIzol reagent (GIBCO BRL / Life Technologies, Gaithersburg, ND) を用いてホモジナイズし、phenol-chloroform 法にて total RNA を抽出して Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, ND) を用いて cDNA を作成した。STS 及び EST の Primer を用いて PCR を行った。PCR 反応は、Light Cycler System (Roch Diagnostics GmbH, Mannheim,

Germany) を使用し、二本鎖 DNA に特異的に結合する蛍光色素 (SYBER Green 1, Roch Diagnostics) を取り込ませ、PCR 産物量に応じた蛍光強度を計測し、産物量の定量を行った。PCR 反応終了後は、2%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにて UV 下で発色し、PCR バンドを確認した。陽性対照として STS は胎盤組織を、EST は肝癌細胞 (HuH7) を用いた。なお、同一サンプルの glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を同様に定量して、STS 及び EST の mRNA の発現量を GAPDH mRNA の発現量に対しての比率として算出した。それらの値について、それぞれの陽性対照での発現を 100%とした時の割合を求めて評価した。

免疫組織化学

得られた組織は定法に従ってパラフィンに包埋し、3 μ m に薄切した。STS は Envision (DAKO Co. Ltd., Carpinteria, CA, USA) を EST は Histofine SAB-PO (R) kit (Nichirei Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用い、biotin-streptavidin 法により染色を施行した。免疫組織化学に用いた抗体は anti STS mouse monoclonal antibody (KM1049、協和発酵工業株式会社、東京) 及び anti estrogen sulfotransferase polyclonal antibody (SULT1E、BML、群馬) を使用した。これらの 1 次抗体の希釈倍率は STS: 1:3,000、EST: 1:750 である。EST の免疫染色では抗原賦活処理としてマイクロウェーブによる熱処理 (500W、15 分) を加えた。反応後の抗原抗体複合体は 3,3'-diaminobenzidine (DAB) にて発色し、ヘマトキシリンにて核染して鏡検した。陽性対象として、STS は胎盤組織を EST では肝組

織を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたっては、東北大学医学部倫理委員会の承認を得た。

(承認番号:1999-54、2000-98)

C. 研究結果

定量 PCR 及び免疫組織化学の結果を表1にまとめた。

定量 PCR (Real-Time PCR)

GAPDH で補正した全身組織の STS mRNA の発現は、陽性対象として用いた胎盤組織での発現と比較し、成人の肝臓、精巣、甲状腺、肺及び大動脈で 1-5%、胎児各組織で 1-4% と成人及び胎児組織ともほとんどの組織で発現は認められなかった。一方、EST mRNA の発現は、陽性対象として用いた肝癌細胞での発現と比較し、成人各組織で 10-104%、胎児各組織で 20-210% と成人及び胎児組織ともほとんどの組織で発現が認められた。そのなかでも成人では副腎(104%)、大動脈(68%)、小腸(50%)、肝臓(40%)、腎臓(33%)及び肺(30%)での発現が高く、胎児でも同様の傾向が認められた。なお、成人の脾臓と膵臓での発現は認められなかった。発現が認められた例はいずれもアガロースゲル電気泳動にて PCR バンドが確認出来た(図 1、STS: 296bp、EST: 117bp)。また、GAPDH はすべてのサンプルで発現が認められた(図 1、307bp)。

免疫組織化学

STS における免疫組織化学では、胎盤合体細胞の細胞質に陽性像が認められた(図 2)ほか、成人及び胎児組織ともに各組織共陰性であ

った。EST では陽性対象に用いた肝臓(肝細胞)の他に、成人では副腎皮質(束状層から網状層にかけて)、消化管(胃、小腸及び大腸)上皮細胞、腎尿細管(近位で著明)、精巣ライディッヒ細胞、大動脈中膜に明らかな陽性像が認められ(図 2)、その他の各組織でも陽性所見が得られた。胎児でも成人の結果と同傾向であったが、腎臓では尿管ではなく間質に陽性像が認められた。

D. 考察

今回の検討結果から、ヒト正常組織において STS mRNA はほとんど発現していないことが判明した。成人の肝臓、精巣、甲状腺、肺及び大動脈、胎児各組織で若干の発現が認められたが、成人のこれらの組織ではアロマトーゼの発現が確認されており、テストステロンやアンドロステンジオンから E1 や E2 が生成される経路に加えて、量的には多くはないものの STS による E1 供給路が存在する事が考えられた。また、胎児組織でも同様の傾向が認められている。これらの組織における免疫組織化学では、mRNA の発現が認められた組織を含めて陽性対象以外に陽性像はみられなかったが、このことは STS の発現量が極めて少なく免疫組織化学の限界以下であった事を示唆している。

EST については STS とは逆に成人及び胎児ともにほとんどの組織において EST mRNA の発現が認められた。この事は、過剰のエストロゲンを EST によって不活する事により全身及び局所でのエストロゲン作用、動態を制御している可能性があるものと考えられる。特に EST の発現が高かった副腎では免疫組織化学において束状

層から網状層に発現が認められている。ESTにはE1SのE1化以外の別の作用がある。すなはちモルモットのEST(gpEST)は、E2と結合活性を有し、さらにプレグネロンとのかなり高い親和性を持っており、E2のgpESTとの結合と競合するもののgpESTによってプレグネロンは硫酸抱合されず、E2の硫酸抱合を制御しない。このプレグネロンへのgpESTの結合は、ESTのpregnenolon-binding carrier proteinとして説明されている。副腎皮質においてはE2よりプレグネロンの量が圧倒的に多いことから、ESTは副腎皮質においてはプレグネロンの代謝に一定の役割を担っているとも考えられる。

肝臓、腎臓及び腸管においてESTはいずれも過剰のエストロゲンを親水性の高い硫酸抱合体に代謝して体外に排泄する排泄臓器としての作用に関与していると考えられる。さらに腎臓ではE1Sに関与する有機アニオン輸送(OAT)システムが発達しており、腎臓近位尿細管の基底側膜及び管腔側膜にOATファミリーがそれぞれ存在することが知られている。この事はすなはちE1Sを血中から尿細管細胞へ取り込む作用と、尿細管細胞から尿細管腔へ排出する作用を腎臓は有している事を示唆している。すなはち尿細管細胞においては、E1をESTによってE1Sへと不活化し、速やかに排出する機構が備わっているものと考えられる。今回の検討ではヒト胎児の腎臓において尿細管細胞ではなく周囲間質においてタンパクの発現を確認したが、これはE2をE1へ変換する 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 (17β HSD2)の発現と一致している。すなはち胎児の尿細管は未発達なため、尿細管中のE1やE2が間質へリークす

ることが予想され、 17β HSD2とESTによって過剰なエストロゲンの不活化を腎臓の間質では行っているものと考えられる。 17β HSD2の発現はESTの発現が顕著であった消化管の上皮においても同様に観察されており、これらの組織ではE2→E1→E1Sの経路を経てエストロゲン作用の不活性化ならびに排泄に関係していると考えられる。

精巣、大動脈及び肺ではアロマターゼの発現も確認されており、精巣と大動脈については組織内の局在する細胞も一致している。このことはこれらの組織ではアロマターゼによる活性化エストロゲンの産生に対してESTが産生される活性型のエストロゲン量を調節する働きを担っているとも考えられる。実際にテストステロンの生合成は過剰なエストロゲンによって妨げられることも知られており、精巣におけるESTは過剰なエストロゲンの作用から精巣機能をいわば保護している事も考えられる。

E. 結論

以上のことから生体におけるエストロゲン代謝、作用を調整していると考えられているEST、STSであるが、STSは成人、胎児をとわずほとんどのヒト組織で発現しておらず、生体内では主にESTによるE1の不活化によりエストロゲンの作用、代謝、排泄などの制御が行われていることが示唆された。

近年、内分泌かく乱物質の一つであるPolychlorinated biphenyls (PCBs)のハイドロキシ化されたPCB-OHsに強力なEST阻害作用があることが報告されている。このことはESTによってエストロゲンの作用が調節されているほとんど

の組織に対して PCBs が影響を及ぼすことが示唆される。しかし、エストロゲンの調節には様々な酵素が関与しているため、これらの酵素の組織分布や内分泌かく乱物質の影響については今後の検討が必要ではないかと考えられる。

図1 定量的PCR(Real-Time PCR)によるSTS及びEST mRNA の発現

定量的 PCR(Real-Time PCR)によって得られた PCR 産物の 2%アガロースゲル電気泳動の結果を示す。図には検索した成人及び胎児組織の結果の代表例(成人の肝臓、大動脈、肺、脾臓、副腎、腸管(小腸)及び胎児の肝臓、腎臓、肺、腸管(小腸))を示す。STS(296bp)はポジティブコントロール(P.C.)に用いた胎盤で明らかな発現が認められ、他の組織ではほとんど発現は認められなかった。EST(117bp)は脾臓では発現が認められなかったものの、P.C.に用いた肝癌細胞(HuH7)と同等の発現が他の各組織に認められた。なお、検索に用いたサンプルではいずれも GAPDH(307bp)の発現が認められた。

N.C.: ネガティブコントロール(サンプルの代わりに水を用いた。) Marker: 100bp DNA ladder marker

図2 STS 及び EST の免疫組織化学

STS 及び EST の免疫組織化学の結果を示す。STS は胎盤の合胞体細胞のみに陽性であった(A)。EST は肝細胞(B)、副腎皮質網状層(C)、精巣ライディッヒ細胞(D、▲)などに局在を認めた。なお、本標本はヘマトキシリンによる核染色を施した。

表1 定量的PCRと免疫組織化学の結果のまとめ

定量的 PCR(Real-Time PCR)によって得られた STS 及び EST の値は、同サンプルでの GAPDH で補正し、各ポジティブコントロール(P.C.)での発現を 100 %とした時の割合(%)を算出した(mRNA)。結果はそれぞれ -から+++までの5段階で評価した。免疫組織化学の結果(Immuno.)は、STS は P.C.に用いた胎盤(合胞体細胞層)以外に陽性像は得られなかったため、表には示していない。EST は-もしくは+で評価し、組織内の局在が明瞭であったものに関してはその部位のみを記載した。なお、表には示していないが、胎盤の EST は合胞体細胞層に陽性像が得られた。

mRNA: -; 0 %, ±; - 29 %, +; - 59 %,

++; - 99 %

+++; 100 % ≤

Immuno.: -; 陰性、

+; 陽性、局在が明瞭な組織はその部位のみを記載

-^{*)}: 未検索

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Brereton P, Suzuki T, **Sasano H**, Li K, Duarte C, Obeyesekere V V, Haeseleer F, Palczewski K, Smith I I, Komesaroff P, Krozowski Z. Pan1b (17betaHSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Molecular and cellular Endocrinology* 171:111-117 2001
2. Takamura T, Nagai Y, Taniguchi M, Yamashita H, Nakamura S, Ikeda T, Kobayashi K, Suzuki T, **Sasano H**. Adrenocorticotropin-independent unilateral adrenocortical hyperplasia with Cushing's syndrome: Immunohistochemical studies of steroidogenic enzymes, ultrastructural examination and a review of the literature. *Pathology International* 51:118-122 2001
3. Nagura H, Ohtani H, **Sasano H**, Matsumoto T. The immuno-inflammatory mechanism for tissue injury in inflammatory bowel disease and Helicobacter pylori-infected chronic active gastritis. Roles of the mucosal immune system. *Digestion* 63:12-21 2001
4. Honma W, Kamiyama Y, Yoshinari K, **Sasano H**, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y. Enzymatic characterization and interspecies difference of phenol sulfotransferases, ST1A forms. *Drug metabolism and disposition* 29:274-281 2001
5. Suzuki T, **Sasano H**, Kaneko C, Ogawa S, Darnel AD, Krozowski ZS. Immunohistochemical distribution of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human eye. *Molecular and cellular Endocrinology* 173:121-125 2001
6. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Sone M, Satoh F, Kitamuro T, Noshiro T, Hayashi Y, **Sasano H**, Shibahara S. Expression of melanin-concentrating hormone receptor messenger ribonucleic acid in tumor tissues of pheochromocytoma, ganglioneuroblastoma, and neuroblastoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:369-374 2001
7. Muramatsu Y, Sugino N, Suzuki T, Totsune K, Takahashi K, Tashiro A, Hongo M, Oki Y, **Sasano H**. Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in normal cycling human ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:1362-1369 2001
8. Suzuki T, Moriya T, Sugawara A, Ariga N, Takabayashi H, **Sasano H**. Retinoid receptors in human breast carcinoma: possible modulators of in situ estrogen metabolism. *Breast Cancer Research and Treatment* 65:31-40 2001
9. Suzuki S, Tsubochi H, Suzuki T, Darnel AD, Krozowski ZS, **Sasano H**, Kondo T. Modulation of transalveolar fluid absorption by endogenous aldosterone in adult rats. *Experimental Lung Research* 27:143-155 2001
10. Ariga N, Suzuki T, Moriya T, Kimura M, Inoue T, Chuchi N, **Sasano H**. Progesterone receptor a and b isoforms in the human breast and its disorders. *Japanese Journal of Cancer Research* 92:302-308 2001
11. Meng L, Zhou J, **Sasano H**, Suzuki T, Zeitoun KM, Bulun SE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating CCAAT/enhancer binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma: mechanism of desmoplastic reaction. *Cancer Research* 61:2250-2255 2001
12. Shimizu C, Kubo M, Takano K, Takano A, Kijima H, Saji H, Katsuyama I, **Sasano H**, Koike T. Interleukin-6 (IL-6) producing pheochromocytoma: direct IL-6 suppression by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 54:405-410 2001