

## 論文内容の要旨

Endocrinological studies on the molecular mechanisms of toxic effects of estrogen on the developing mouse vagina

(マウス膣の発生に対するエストロゲン毒性作用の分子機構に関する内分泌学的研究)

氏名 増井 藤子

エストロゲン様内分泌攪乱化学物質 (EEDC) は、エストロゲン受容体 (ER) に結合してエストロゲン類似作用を示すことにより、野生動物やヒトの内分泌系を攪乱して、生殖障害を引き起こす。マウスでは、周生期にエストロゲンや EEDC に曝されると、生殖器官は分化の道を誤り、奇形や不妊、癌等が誘起される。通常の成体におけるエストロゲン効果は可逆的であって、エストロゲンが消失した後までも効果が持続するということはないが、周生期においては不可逆的な変化がエストロゲンで誘導されるのである。なかでも雌性生殖輸管では、周生期 EEDC 曝露により成体になって輸卵管腫瘍、子宮頸部の角質化、腺疾患、膣上皮の増殖角質化及び腫瘍化などの重篤な異常が生じる。これらの病態はエストロゲン過剰症に類似している一方、卵巣の存否に関わらず同様な異常が認められることから、周生期 EEDC 曝露により、生殖輸管系がエストロゲン非依存下において、エストロゲンによる刺激が常にあるかのように振舞ってしまう結果、上述の病態を発生させると考えられる。

マウスの雌性生殖輸管に対するエストロゲン毒性作用の分子機構については未だ解明されていないが、膣では、周生期に  $17\beta$ -エストラジオール ( $E_2$ ) とビタミン A (VA) を同時投与すると、 $E_2$  のみを投与したときに見られる膣上皮の不可逆的な増殖と角質化が起こらないことや、keratinocyte growth factor (KGF) を周生期に投与すると、 $E_2$  を投与したと

きと同様に膾上皮の不可逆的な増殖角質化が起こること等、断片的だが興味深い現象が報告されている。これらを手がかりに、本研究では、不可逆的な異常を引き起こす EEDC の毒性作用の分子機構について知る目的で、成体マウスの膾にエストロゲン非依存的で不可逆的な増殖を引き起こす周生期エストロゲン作用の分子機構を探った。

#### IA. エストロゲン毒性に対するビタミン A の抑制作用：組織形態と ER 発現を指標とした解析

周生期 EEDC は、膾に直接的に作用して上皮を不可逆的に増殖させる。一方、EEDC は視床下部-脳下垂体系を攪乱して卵巣からの連続的なエストロゲン分泌を促し、間接的にエストロゲン依存的な膾上皮の増殖を生じさせる。膾上皮を異常増殖に導くこれら 2 つの EEDC 作用に対する、VA 同時投与の影響を知る目的で、まず、周生期に E<sub>2</sub> または E<sub>2</sub> と VA 同時投与後の膾上皮の形態を経過観察した。6 日齢及び 18 日齢マウスでは、VA の同時投与の有無に関わらず、両群で肥厚した膾上皮が見られた。卵巣除去から 10 日後の 35 日齢では、E<sub>2</sub> 単独投与群では上皮は増殖していたが、E<sub>2</sub> と VA の同時投与群では上皮の増殖は見られなかった。このことから VA 同時投与は、エストロゲン依存的な膾上皮の増殖（6、18 日齢）を抑制しないが、エストロゲン非依存的な膾上皮の異常増殖（35 日齢）を抑制することがわかった。

次に、エストロゲン投与によって発現量が変動すると予想される ER の発現解析を行った。不可逆的に上皮が増殖している膾、及び投与したエストロゲンに依存して上皮が増殖している膾における ER の発現量は、溶媒のみを投与した群に比べて、ともに減少した。前 2 群間で ER の分布や発現量に差は見られなかった。周生期にエストロゲンに曝露した膾では、不可逆的に ER 発現の変化がみられ、エストロゲン非存在下でもエストロゲン刺激を受けた場合と同様の遺伝子発現を示した。そしてまた、VA 同時投与は、エストロゲン依存的な ER 発現の変化は抑制しないが、エストロゲン非依存的な ER 発現の変化は抑制することがわかった。(Masui et al. 2001)

#### IB. KGF 毒性に対するビタミン A の抑制作用

周生期 E<sub>2</sub> 投与による膾上皮の不可逆的増殖だけでなく、KGF によって引き起こされる膾上皮の不可逆的な増殖を、VA が抑制するかどうかを確かめるため、周生期に KGF と VA を同時投与した時の膾上皮の形態的变化を調べた。その結果、VA は周生期 KGF 投与による膾上皮の不可逆的な増殖と角質化を抑えた。一方、E<sub>2</sub> の場合と異なり、KGF の投与直後には

上皮は増殖しなかった。VA が  $E_2$  及び KGF によって引き起こされる膣上皮の不可逆的増殖の発現とともに抑制したことから、 $E_2$  と KGF は、エストロゲン非依存的な膣上皮の増殖角質化を起こす作用において分子機構を共有することが示唆された。(Masui et al. 2003)

## II. エストロゲン毒性作用を KGF が仲介する可能性についての検討

I 章の結果から  $E_2$  と KGF は不可逆的な膣上皮の増殖を起こす作用において分子機構を共有すると考えられる。そこで、KGF が未分化な膣組織で EEDC 作用を仲介する分子である可能性を検証することにした。まず、KGF が膣に直接作用して不可逆的な膣上皮の増殖角質化を引き起こすか否かを確かめた。視床下部-脳下垂体-卵巣系をはじめ膣以外の機能が乱されることにより間接的に膣上皮の不可逆的増殖が起こる可能性を排除するため、単離した周生期膣に *ex vivo* で薬剤投与する方法を用いた。KGF とヘパリン (KGF の標的細胞内への情報伝達に必要) を与えた膣組織を、卵巣除去した成熟雌マウスの腎被膜下へ移植し、35 日後に移植体の組織観察をしたところ、膣上皮の増殖が見られた。この結果より、KGF は周生期の膣上皮に直接作用して不可逆的増殖を引き起こすことがわかった。KGF 及び KGF 受容体の発現が周生期マウスの膣に見られるという結果も得ていることから、周生期に与えられた KGF は、KGF 受容体を介して KGF シグナルを増強することにより、不可逆的な上皮の増殖を引き起こすと考えられる。一方、 $E_2$  とヘパリンを同時投与したところ、 $E_2$  のみの投与時にはみられる膣上皮の不可逆的増殖が、認められなかった。従って、ヘパリンは KGF-KGF 受容体情報伝達系の関わる段階よりも前の段階で、周生期  $E_2$  の不可逆的作用の発現を抑えたと考えられる。

次に、膣上皮の不可逆的な増殖を引き起こす  $E_2$  作用の発現に KGF シグナル伝達系が必要かどうかを検証するため、前述の *ex vivo* 系を用いて、 $E_2$  作用に対する KGF 中和抗体及び KGF 受容体阻害剤の影響を調べた。その結果、両者とも  $E_2$  の作用を抑制した。従って、EEDC が膣上皮の不可逆的な増殖を引き起こす際には内在性の KGF-KGF 受容体情報伝達系を必要とすることが示唆された。他方、周生期膣の KGF シグナル伝達系を阻害しても、その後のエストロゲン依存的な上皮の増殖能は保たれていた。

上述の結果から EEDC は KGF の作用を増強することで膣上皮の不可逆的変化を引き起こすと考えられた。そこで、EEDC の毒性作用は KGF の発現増加を伴うのではないかと考え、周生期膣での KGF mRNA 発現量に対する  $E_2$  投与の影響を調べたが、KGF mRNA の発現量は増えなかった。以上の結果から EEDC は、周生期の膣に対して、KGF の発現誘導を介さずに KGF-KGF 受容体情報伝達系に関わる分子に作用し、KGF シグナルを増強することにより毒

性を発揮していると考えられる。(Masui et al. in preparation)

### III. 周生期エストロゲン曝露のマーカ―としての膣 TFF1 遺伝子発現

膣に対する EEDC 毒性作用に関わる分子を同定するための手がかりとして、周生期 E<sub>2</sub> 投与により発現量が変化する遺伝子を、DNA マイクロアレイを利用して検索した。周生期に不可逆的毒性を示す濃度又は不可逆的な毒性を示さない低濃度のエストロゲンを4日間投与してから24時間後のマウスの膣組織において、およそ1万種の遺伝子発現量を比較した。その結果両群間で発現量に差の見られた遺伝子の内、十数個の遺伝子について、E<sub>2</sub> 又は溶媒投与群間で mRNA 発現量を比較した。ほとんどの遺伝子は膣の発生段階に関わらず E<sub>2</sub> 依存的で一過的な発現量の増加を示した中で、trefoil factor 1 (TFF1) 遺伝子は、周生期 E<sub>2</sub> 投与により発現量が増えるが、通常の成体では E<sub>2</sub> により発現増加が見られず、周生期 E<sub>2</sub> 投与により上皮が不可逆的に増殖している膣においてエストロゲン非依存的に高発現を示した。さらに、特異的抗体を用いた免疫組織化学により、TFF1 が不可逆的増殖をしている膣上皮に局在していることが確認された。周生期 E<sub>2</sub> 投与によって、成体になっても、膣上皮でエストロゲン非依存的に連続的に活性化される TFF1 は、周生期 EEDC 曝露のマーカ―分子として有効であるばかりでなく、不可逆的変化の上皮から間充織への誘導現象を説明する鍵分子となる可能性がある。(Masui et al. in preparation)

#### 本研究のまとめ

- (I) ビタミン A は、周生期エストロゲンもしくは KGF 曝露による膣上皮の不可逆的な変化を抑制するが、エストロゲン依存的な変化は抑制しないことを明らかにした。
- (II) エストロゲンが周生期膣に内在する KGF-KGF 受容体情報伝達系の働きを増強することを通して、膣上皮の不可逆的な増殖を引き起こすことを明らかにした。
- (III) 周生期エストロゲン曝露の有効な膣上皮分子マーカ―である TFF1 を発見した。

発表論文目録

Fujiko Masui, Manabu Matsuda, Yasuhisa Akazome, Tatsuhiko Imaoka, Takao Mori. Prevention of neonatal estrogen imprinting by vitamin A as indicated by estrogen receptor expression in the mouse vagina. *Cell & Tissue Research* (2001) 306:441-447

Fujiko Masui, Manabu Matsuda, Takao Mori. Vitamin A prevents the irreversible proliferation of vaginal epithelium induced by neonatal injection of keratinocyte growth factor in mice. *Cell & Tissue Research* (2003) 311:251-258

Fujiko Masui, Manabu Matsuda, Takao Mori, Yoshitaka Oka. Involvement of keratinocyte growth factor (KGF)-KGF receptor signaling in developmental estrogenization syndrome of mouse vagina. In preparation.

Fujiko Masui, Manabu Matsuda, Takao Mori, Yoshitaka Oka. Persistent trefoil factor 1 expression imprinted by neonatal estrogenization on mouse vagina. In preparation.