

論文の内容の要旨

論文題目 エストロゲンの分子作用機構とその応用に関する研究

氏名 齋藤智之

緒言

女性ホルモンのひとつであるエストロゲンは、胎生期では脳の性分化に、思春期では女性生殖器の発達や骨端の閉鎖に、成人期では性周期維持や妊娠維持に必須である。更に、骨代謝や精子形成など男性にも極めて重要な性ホルモンであることが、近年明らかになっている。一方、閉経後のエストロゲン欠乏を原因とした、皮膚や女性生殖機能の退縮、動脈硬化症、骨粗鬆症やアルツハイマー型痴呆症などの各種病態にも深く関与することが知られている。このようにエストロゲンは女性の表現型を決めるのに重要な役割を演じているだけでなく、生涯を通じて、性を越えた広範囲な臓器に対して重要な生理作用を及ぼしている。

生体内のエストロゲンはエストラジオール、エストロン、エストリオールであり、これらは主に卵巣の顆粒膜細胞、胎盤より合成・分泌されている。エストロゲンは標的細胞の核内に存在するエストロゲン受容体(ER) α あるいは β と結合した後に、転写因子としてゲノム DNA 上のエストロゲン応答配列(標的エンハンサー配列)に結合して応答遺伝子の発現を調節する。エストロゲンに応答する遺伝子には Efp、プロラクチン、プロゲステロン受容体、pS2、c-fos などの 1 次的応答遺伝子に加え、更にその下流の 2 次的、3 次的応答遺伝子があり、これら既知あるいは未知の数多くの遺伝子産物の機能介してエストロゲン作用を発現すると予想される。しかしながら、特に応答遺伝子産物の機能やその発現機構など、多彩なエストロゲンの作用機序については、依然として不明な点が多いのが現状である。更に、エストロゲンは乳癌、子宮体癌、子宮筋腫、子宮内膜症などのエストロゲン依存性

疾患の発症や増殖を促進する原因因子としても作用するが、その作用機序の多くも依然として不明である。従って、エストロゲンの作用機序を分子レベルで解明することは、エストロゲンの多彩な生理作用の発現機構を説明するだけでなく、エストロゲン依存性疾患の発生・進展機構の解明や、疾患に対する新たな治療方法の開発においても非常に重要である。

そこで、本研究ではエストロゲンの分子作用機構の一端を解明する目的に、機能未知のエストロゲン応答遺伝子、**estrogen-responsive finger protein (Efp)**の機能発現について解析した。更にエストロゲンの各種分子作用機序に基づいた抑制薬開発の可能性について研究した。

I. エストロゲンの作用機序の解析 —エストロゲン応答遺伝子、Efp の機能解析—

乳腺上皮や乳癌あるいは子宮内膜に対するエストロゲンの増殖作用を担う応答遺伝子はごく僅かの例しか見出されていない。エストロゲンの多彩な作用発現と結びつく応答遺伝子を検索するため、ゲノム結合部位クローニング法を用いたスクリーニングから、RING-finger, B-box coiled coil ドメインをもつ Efp が見出された。この Efp は子宮内膜や乳癌においてエストロゲン依存性に発現しており、エストロゲンの細胞増殖との関連性が示唆されている。そこで、Efp の機能を明らかにすることは、「一種のエストロゲン応答遺伝子の作用によって、エストロゲン作用の少なくとも一部を解明できる」と仮定し、Efp の機能発現について検討を加えた。

はじめに、ヒトエストロゲン依存性乳癌細胞、MCF-7 の細胞増殖に対する Efp の発現抑制の影響について検討した。その結果、エストラジオール(E₂)により促進された MCF-7 細胞の増殖は、Efp antisense の添加により用量依存的に抑制された。また、雌ヌードマウスに移植した MCF-7 乳癌細胞のエストロゲンに依存した腫瘍増殖は、Efp antisense の投与により Efp の発現を抑制することで抑制された。一方、Efp sense は細胞増殖や腫瘍増殖には影響しなかった。

次に MCF-7 の細胞増殖に対する Efp の過剰発現の影響について検討した。その結果、Efp を過剰発現する MCF-7 細胞は増殖が著明に亢進した。またこの細胞を卵巣摘出ヌードマウスに移植すると、エストロゲン非存在下でも腫瘍を形成した。

以上の結果より、エストロゲン応答遺伝子産物である Efp は細胞の増殖を促進する方向に作用していることが明らかとなった。また、エストロゲンによる細胞増殖の促進機序の一部には、Efp を介する新たな経路が存在すること、更に Efp が乳癌における癌原因子のひとつとして機能する可能性が示唆された。

II. エストロゲンの分子作用機構に基づいた、エストロゲン作用抑制薬開発への応用

子宮内膜や乳癌においてエストロゲン依存性に発現している Efp は、エストロゲンの細胞増殖作用の少なくとも一部を担うことが明らかになった。このことから、エストロゲン作用抑制薬の標的分子の1つは、Efp であると考えられた。そこで、Efp を含めた各種エストロゲン作用発現機構を担う鍵分子を標的としたエストロゲン作用抑制薬の開発を試みた。

II-1. エストロゲン受容体を標的としたエストロゲン作用抑制薬開発の検討

子宮内膜症や乳癌などのエストロゲン依存性疾患に対する最も有効な治療法は、卵巣摘出などによってエストロゲンを枯渇させ、エストロゲン作用を完全に欠如することである。しかしながら、この方法は同時に閉経後と同じ状態を惹起することになり、骨量減少など女性の生活の質から好ましい選択ではない。そこで、ER を標的とした「エストロゲンと ER との結合阻害」による、組織選択的なエストロゲン作用抑制を發揮させることが可能であるかについて、新たに開発された TZE-5323 を用いて検討した。

はじめに、TZE-5323 の ER α 、ER β との結合親和性について *in vitro* で合成した ER 蛋白と E₂ との結合阻害作用により、また、ER α 、ER β を介する転写活性について ERE-CAT のレポーターアッセイにより検討した。その結果、TZE-5323 は ER α あるいは ER β と E₂ の結合を用量依存性に抑制し、E₂ により促進された ER α 、ER β を介した転写活性を用量依存性に抑制することが明らかとなった。更に E₂ により促進される ER 陽性 MCF-7 乳癌細胞の増殖及び Efp の発現について検討した結果、TZE-5323 は E₂ により促進される細胞増殖及び Efp の発現を抑制した。このように、TZE-5323 は ER と E₂ の結合を阻害するため、少なくとも Efp の発現を抑制することにより、エストロゲン作用を抑制することが明らかとなった。

次に、TZE-5323 がエストロゲン標的組織に対して抗エストロゲン作用を示すかを明らかにするため、子宮についてはエストロゲンで増加する重量と内膜上皮の高さを、乳腺についてはエストロゲンで増加する DMBA 誘発乳腺腫瘍の発症率を、骨についてはエストロゲンで維持される大腿骨と腰椎の骨密度を指標にして検討した。その結果、TZE-5323 は子宮重量や子宮内膜上皮細胞の高さ及び DMBA 誘発乳腺腫瘍の発症を用量依存性に抑制したが、大腿骨や腰椎の骨密度には全く影響を与えなかった。このように、TZE-5323 は子宮や乳腺に対しては抗エストロゲン作用を示したものの、骨に対しては抗エストロゲン作用を示さないという、組織選択的な性質のあることが明らかとなった。

最後に、TZE-5323 のエストロゲン作用抑制薬としての可能性について、子宮内膜組織を腎皮膜下に移植する実験的子宮内膜症ラットモデルを用いて検討した。その結果、TZE-5323 は用量依存性に病巣の移植内膜を縮小させ、病態モデルにおいてもエストロゲン作用を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、TZE-5323 のような ER を標的とした「エストロゲンと ER との結合阻害」に基づく、組織選択的なエストロゲン作用抑制を応用することにより、子宮内膜症などのエストロゲン依存性疾患に対する治療薬となる可能性が考えられた。

II-2. エストロゲン変換酵素、ステロイドスルファターゼを標的としたエストロゲン作用抑制薬開発の検討

閉経後乳癌はエストロゲン産生が低下した閉経後において発症・進展する乳癌であり、その多くはエストロゲン依存性に増殖する。閉経後乳癌の増殖に必要なエストロゲンは、自らの組織内においてエストロンスルフェート (E₁S) から供給されていることが明らかにされてきた。ステロイドスルファターゼ (STS) は不活性型エストロゲンである E₁S を活性型エストロゲンであるエストロン (E₁) に変換する酵素であり、腫瘍内ではその活性が著しく

高まっていることが指摘されている。そこで、STS を標的とした「エストロゲンの産生阻害」により、エストロゲン作用抑制を發揮させることが可能であるかについて、新たに開発された TZS-8478 を用いて検討した。

はじめに、TZS-8478 の STS 阻害作用について検討した。その結果、TZS-8478 はヒト乳癌 MCF-7 細胞に添加した E_1S から E_1 への産生を用量依存的に抑制した。また、 E_1S により促進される MCF-7 細胞増殖及び Efp の発現は TZS-8478 により抑制された。更に、TZS-8478 はラットの肝臓や子宮の STS 活性を抑制し、 E_1S により増加する卵巣摘出ラットの子宮重量を抑制した。このように、TZS-8478 は STS の阻害に基づく E_1S から E_1 の産生を抑制することにより、*in vitro* のみならず *in vivo* においてもエストロゲン作用を抑制することが明らかとなった。

次に、TZS-8478 のエストロゲン作用抑制薬としての可能性について、ニトロソメチルウレア誘発の閉経後乳癌モデルラットにおける、乳腺腫瘍の増殖抑制作用と作用発現機序を検討した。 E_1S により促進される乳腺腫瘍の増殖を TZS-8478 は卵巣摘出と同程度に抑制し、また血漿中 E_1 及び E_2 濃度を著明に低下させた。このように、TZS-8478 はラットにおいて E_1S から E_1 の産生を抑制することにより、乳腺腫瘍の増殖を抑制する作用機序が確認された。以上の結果から、STS を標的とした「エストロゲンの産生阻害」に基づくエストロゲン作用抑制を応用することにより、エストロゲン依存性閉経後乳癌の治療薬となる可能性が示唆された。

総括

エストロゲンの分子作用機構の一端を解明する目的で Efp の機能発現について解析した。Efp は細胞の増殖を促進する方向に作用する機能のあることを明らかにし、エストロゲンによる細胞増殖促進の作用機構の少なくとも一部は Efp を介していることを明確にすることができた。更にエストロゲンの各種分子作用機序に基づいた応用的研究から、ER 及び STS を標的としたエストロゲン作用抑制により、エストロゲンの増殖作用に対する抑制薬開発の可能性を示すことができた。

本研究では、Efp の機能解析からエストロゲンによる細胞増殖促進の作用機構の一部を解明することができた。一方、エストロゲンによる増殖促進機序での Efp の生理的重要性など、不明な点も多く残された。今後、更に Efp の機能発現機構や疾患における発現などの詳細な解析を通じ、エストロゲン作用抑制薬や病態予防などの応用に貢献できると期待される。また同時に、Efp のみならず機能未知のエストロゲン応答遺伝子の解析が、エストロゲンの分子作用機構の解明に必須であると考えられた。