

植物エストロジェンと環境ホルモン

- 植物エストロジェンから環境ホルモン問題を切る。 -

香山不二雄

自治医科大学保健科学講座

この研究の概要

生物は人工の内分泌かく乱化学物質に触れる以前から自然界に存在するホルモン様物質（植物エストロジェン）を摂取してきた。そして進化の過程で植物エストロジェンの暴露に対して適応し、植物エストロジェンが生理的に重要な役割を果たすようになった可能性がある。内分泌かく乱化学物質の健康リスク評価をする場合、食事より吸収される植物エストロジェンの存在は、レセプターへの親和性が弱くとも存在する量を考慮すると、無視する事はできない。本研究では内分泌かく乱化学物質の問題を植物エストロジェンと人工の内分泌かく乱化学物質との比較から解明して行こうとしている。

植物エストロジェンは豆科植物、穀類、ブドウ、ナツメヤシなどに多く含まれている。東洋人は、味噌や豆腐など大豆食品からのイソフラボン摂取量が多く、内分泌かく乱化学物質の影響を評価をするときに、植物エストロジェンは大きな修飾因子となる可能性がある。そのため植物エストロジェンと人工の内分泌かく乱化学物質との間に作用メカニズムの差があるのか、また、共存すれば、作用を増強したり緩和したりすることがあるのか、両群の物質の相互作用の研究を進める必要がある。

方法としては、種々の植物エストロジェンおよび人工化学物質の作用メカニズムの差異を、主に分子生物学的手法を用いて遺伝子レベル、細胞レベル、臓器レベル、個体レベルで検討する。さらに、全国数地域での農家住民の女性で、両群物質の生体内存在量を調査測定し、骨密度に影響のエンドポイントとして調査検討を行っている。これらの結果を総合的に検討、内分泌かく乱化学物質問題の現状を評価することにより、今後の対策の指針を作成するために必要な知見が得られることが予想される。

作用メカニズムの差はあるのか？

植物エストロジェンと人工の内分泌かく乱化学物質との生体での作用メカニズムの差異を明らかにするために、まず生体内の天然エストロジェン(エスト

ラジオール;E2)の作用機序について分子生物学的手法を用いて検討を行ってきた。

E2 の作用発現は標的細胞の核内に存在する特異的レセプター(ER α 、ER β)を介した転写制御と、転写産物(mRNA)の安定化・不安定化制御などの転写後制御の2段階で調節されると考えられている。転写段階については詳細な分子メカニズムが既に明らかにされている。一方、転写後段階の mRNA 安定化・不安定化制御に関しては未解明な部分が多い。近年、RNA 結合タンパクである AUF1 と HuR が mRNA 分解制御において重要な役割を担うことが明らかとなってきた。そこで我々はこれらの因子に注目し、子宮及び卵巣組織においてこれらの因子の発現量および E2 による発現調節について解析した。E2 投与後、子宮組織において AUF1mRNA 蓄積量が増加し、ER 阻害剤(ICI82,780)により抑制された。この変化は卵巣組織では起こらなかった。一方、HuR mRNA は子宮および卵巣組織で発現が確認されたが、E2 による発現量の変化は見られなかった。植物エストロジェンの一つであるクメステロール (Cou) によっても AUF1mRNA 蓄積量の変化は E2 同様に起こった。しかし、その変化は長時間続かず一過性であることが明らかとなった。一方、人工内分泌かく乱化学物質の一つであるビスフェノールAでは AUF1mRNA 蓄積量の変化は見られなかった。これらの結果は植物エストロジェンと人工内分泌かく乱化学物質では転写後段階の制御の違いにより遺伝子の発現が異なる可能性を示唆するものと考えられた。

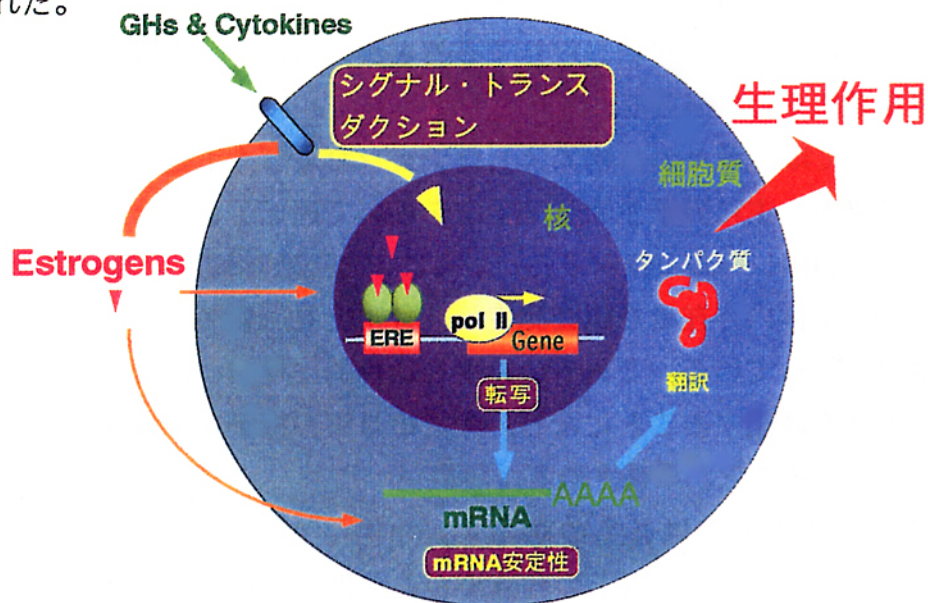
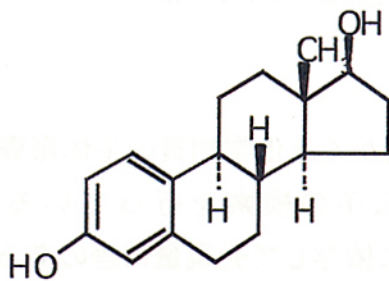


図1 mRNAの安定化にかかわるメカニズム

次にヒト胎児腎臓由来細胞(293T)に ERE-tk-Luc および ER α あるいは ER β 発現ベクターを一過的に発現させ、E2、Cou、ゲネステイン(Gen)の ER を介した転写活性化能を測定した。その結果、Cou および Gen は ER β 依存的な転写活性化能は E2 同様であったが、ER α 依存的な転写に関しては Cou は E2 の 10 倍、Gen は E2 の 100 倍濃度で E2 同等の転写活性化能を示すことが明らかとなった。すなわちより Cou は 10 倍、Gen は 100 倍濃い濃度が存在しないと E2 と同様な遺伝子発現を起こすことができないことが明らかとなった。

さらに、女性ホルモン作用あるいは抗炎症作用が知られている植物より精製された化学物質を、上述の ERE-tk-Luc および ER α ER β 発現ベクターを一過的に発現させた 293T 培養細胞に添加して、エストロゲン活性を検討した。フェンネル（セリ科植物）から抽出されたテルペン類であるフェルチニンにエストロゲン活性が確認され、ER α に対してはアゴニストとして促進的働きを、ER β に対してはアンタゴニストとして拮抗阻害的作用することが明らかとなった。さらにその分子メカニズムは、フェルチニンが ER に結合することにより、コンフォメーション（立体構造）が変化し、ER と転写共役因子である TRAP220 の結合が進行しなくなることが示唆された。



エストロジェンの構造式

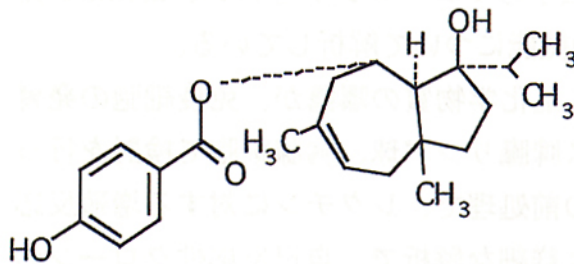


図2 フェルチニンの分子構造



図3 フェンネル

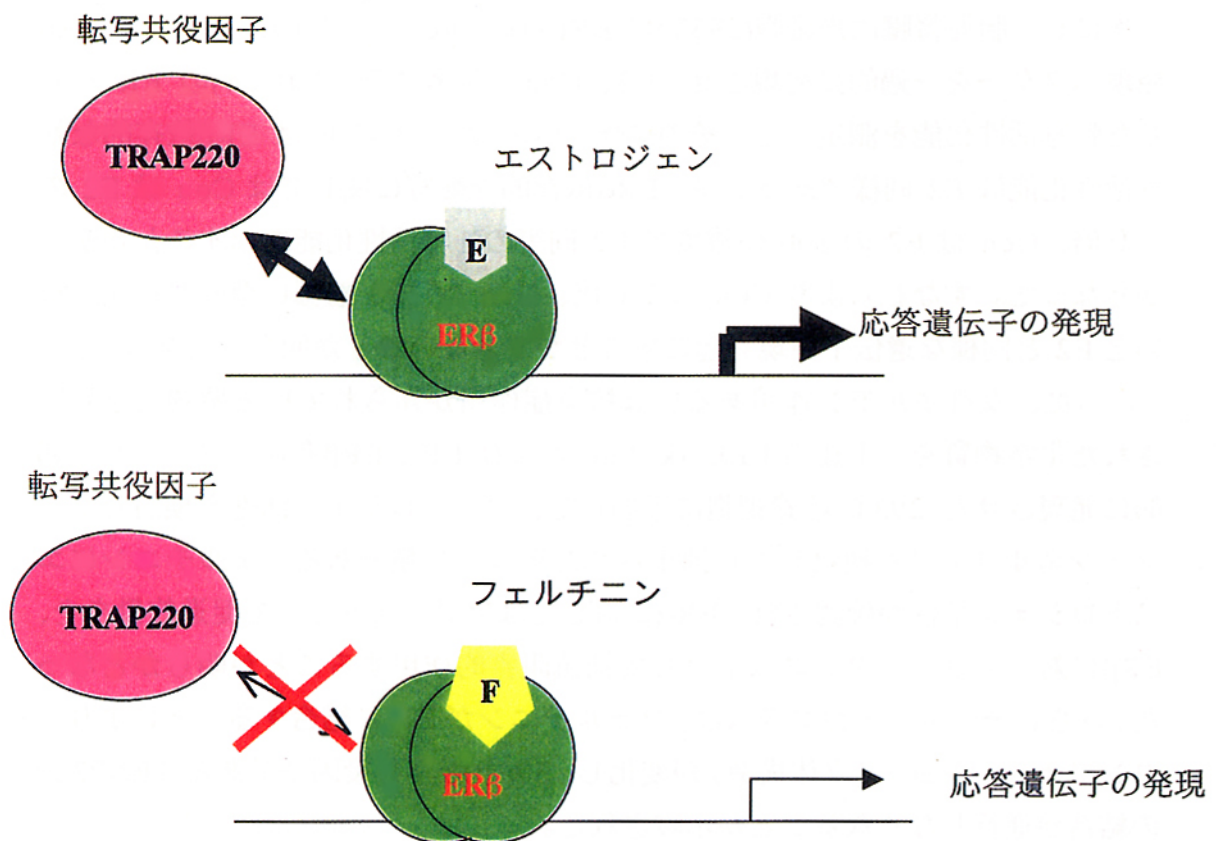


図4 フェネルの結合と転写共役因子との結合阻害

さらに、植物エストロゲンや人工内分泌かく乱化学物質の生体影響のバイオマーカーとして既知または未知の遺伝子の検索を行っている。PCR differential display 法を用い、E2の有無に依存して発現量に差のある遺伝子をラット子宮組織から検索した。その結果、E2 依存的に誘導される遺伝子と、抑制される遺伝子が取得された。現在、植物エストロゲンおよび人工内分泌かく乱化学物質によって取得された遺伝子のクローニングを行い、mRNA 発現量に差がある遺伝子について、生理的機能について解析している。

植物エストロゲンや人工内分泌かく乱化学物質の曝露が、免疫細胞の発育に影響を与えるかどうかについてマウス脾臓リンパ球、胸腺細胞で検討を行った。低濃度の人工の内分泌かく乱物質の前処理で、レクチンに対する増殖反応性を亢進した。サイトカインなどのより詳細な解析で、自己反応性クローンの生存率が上昇すると考えられた。この結果は自己免疫やアレルギー疾患との関

連性を示唆する結果であった。

骨芽細胞系の細胞株 MC3T3-E1 cell は、炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 (IL-1) 刺激で、IL-6 の産生を増強する。その培養系に、E2、Gen、ダイゼイン (Dai)、Cou を添加することにより、IL-6 産生の増加が抑制される。この *in vitro* の系でも植物エストロジェンは、エストロジェンより弱い、同様に破骨細胞を活性化する炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかとなった。

個体レベルでの差

また、エストロジェン様物質は赤血球増殖因子であるエリスロポエチン(EPO) 産生に抑制的に働くことが明らかとなった。運動選手が高地トレーニングをすると EPO 産生が誘導され造血が亢進するように、ラットを低気圧に曝露することにより EP 産生誘導することができる。E2 およびジエチルstilbestロール同時投与により、EPO 産生の増強を抑制することが明らかとなった。生理的には妊婦の生理的貧血の発生メカニズムを説明できると考えられる。Gen では EPO 産生増強を抑制することができなかった。

集団レベルの調査

内分泌かく乱物質と骨粗鬆症の疫学調査

食物中の植物エストロジェンの検索法および、生体試料(血液、尿、脂肪組織)からの抽出法と定量法 (高速液体クロマトグラフィー+クーロメトリー法) を開発してきた。100 μ l の血清中のイコール、Gen、Dai およびそれらの前駆体のグリコシドであるゲネスチン、ダイジンを簡便に定量できるようになった。また、電子捕捉型検出器付きガスクロマトグラフィー法による、血清中の有機塩素系農薬 (p,p'-DDE、HCB、 β -BHC、 γ -BHC、Trans-Nonachlor) の測定や、バイオアッセイ系の CALUX 法を用いて全血中のダイオキシン類濃度の測定を行っている。

これまで、全国3カ所、農家女性 40-69 歳、約500 名を対象に、骨粗鬆症との関連について調査中である。曝露評価としては、全血中ダイオキシン類濃度を測定し、調査日から1ヶ月前までの食生活の記憶に基づいて、自記式の食事調査を行い、大豆食品など種々の食品の摂取量から、摂取したと考えられるイソフラボン類、大豆蛋白量を算定し、さらにビタミン類やカルシウム等の

栄養素についても検討を加えている。また、運動習慣、一日の労働強度も骨密度に関係が大きいので、生活活動調査も詳細に行い、骨代謝にかかわる要因に関して解析を進め得ている。影響評価としては、骨粗鬆症 (骨密度 DEXA, 骨代謝マーカー) について評価し、遺伝的素因については ER, ビタミン D レセプター, IL-1 レセプターの遺伝子多型性について調査中である。

以上のように遺伝子レベルから、臓器、個体、集団レベルまでの範囲と種々の方法論を用いながら、植物エストロジェンと人工の内分泌かく乱物質との作用、影響の違いについて、また相互作用について検討を重ね、今後の内分泌かく乱物質対策に視するために研究が進行中である。