

出生直後のDiethylstilbestrol投与による多卵性卵胞誘導とエストロジェンレセプター β

佐藤 友美^{1), 2)}, 金 翰那¹⁾, 桐ヶ谷明子²⁾, 井口 泰泉³⁾, 林 しん治^{1), 2)}

1) 横浜市立大学大学院・国際総合科学研究科

2) 横浜市立大学大学院・総合理学研究科

3) 自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター

はじめに

エストロジェンは、エストロジェンレセプター(ER)を介してその作用を示す。マウスのERには α タイプと β タイプの2種類が存在しており、子宮、膣などではER α が、卵巣や前立腺ではER β が多く発現している。ER α とER β のノックアウトマウスを用いた研究結果から、生体内でエストロジェン作用を主に仲介しているのはER α であることが分かっている。しかし、ER β の生理的機能については未だに不明な点が多い。

1996年、KuiperらによってER β cDNAがラット前立腺から同定された[1]。単離されたラットER β は485個のアミノ酸を含み、分子量54,200と推定された。それまでに単離されていたER(ER α)とは、cDNAレベルで65%の相同性があり、タンパクレベルでの相同性はドメインごとに16.5(ABドメイン), 95.5(Cドメイン), 28.9(Dドメイン), 53.5%(EFドメイン)となっている。また、エストロジェン、合成エストロジェン、その他のステロイドホルモンとの親和性は、Kd値の高い順に17 β -estradiol > diethylstilbestrol (DES) > estriol > estrone > 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol >> testosterone = progesterone = corticosterone = 5 α androstane-3 α , 17 β -diolとなっている。CHO細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイでは、10 nM 17 β -estradiolにより約3倍の転写活性が認められた。その後ER β は、ヒト[2]、マウス[3]と次々と単離され、現在ではほ乳類に限らず鳥類、は虫類、両生類、魚類、軟骨魚類まで数十種類の動物種で単離、同定されている[4](図)。

一方、出生直後のマウスに合成エストロジェンであるdiethylstilbestrol (DES)を投与すると、視床下部-下垂体系の恒久的な変化により無排卵になるとともに、1つ

の卵胞内に複数の卵細胞をもつ多卵性卵胞の多発、卵巣間質の肥大、hemorrhagic cystの形成、子宮の萎縮や筋層の乱れ、卵巣に依存しない膣上皮の恒常的な増殖などの組織学的な異常が引き起こされる[5-9]。多卵性卵胞は、女性ホルモンが卵巣に直接作用することにより形成され、さらに、多卵性卵胞由来の卵細胞の受精率は低いことが知られている[10-12]。また、胎仔期のethinylestradiol投与や[13]、内分泌かく乱化学物質の1つと疑われているbisphenol-A投与によっても誘導される[14]。DESはエストロジェンと同様に、ERに結合することによってエストロジェン様作用を示す。DESによる膣上皮の増殖には、ER α が関与していることが分かっているが[15]、多卵性卵胞の誘導にER α とER β どちらが関与しているかは不明であった。

ER β とER α との比較、ノックアウトマウスの特徴

ER α mRNAは子宮、精巣、脳下垂体、卵巣、腎臓、副精巣、副腎に、ER β mRNAは前立腺、卵巣、肺、膀胱、脳、子宮、精巣に発現している[16]。¹²⁵I-17 β -estradiolを用いて解離定数を調べると、ER α はKd = 0.1 nM、ER β はKd = 0.4 nMを示した。生理的作用をもつエストロジェンとの結合親和性は、ER α とER β とでは似通っていたが、植物性エストロジェンはER β と強く結合することが明らかとなった。たとえば、17 β -estradiolとの結合親和性をそれぞれ100とすると、coumestrolはER α が94に対してER β は185、genisteinはER α が5に対してER β が36であった。さらに、bisphenol-AもER α が0.05に対してER β が0.33となっていた。このように、ER α とER β とは構造、局在、リガンドとの結合親和性において共通点が多くみられる一方で、ER β 独特の特徴もあり、何かしらの特異的な生理的機能を担っていることが予想されている。

ER α とER β の生体内での役割を調べるために、それぞれのノックアウトマウス、およびER α とER β のダブルノックアウトマウスが作製され、さまざまな結果が報

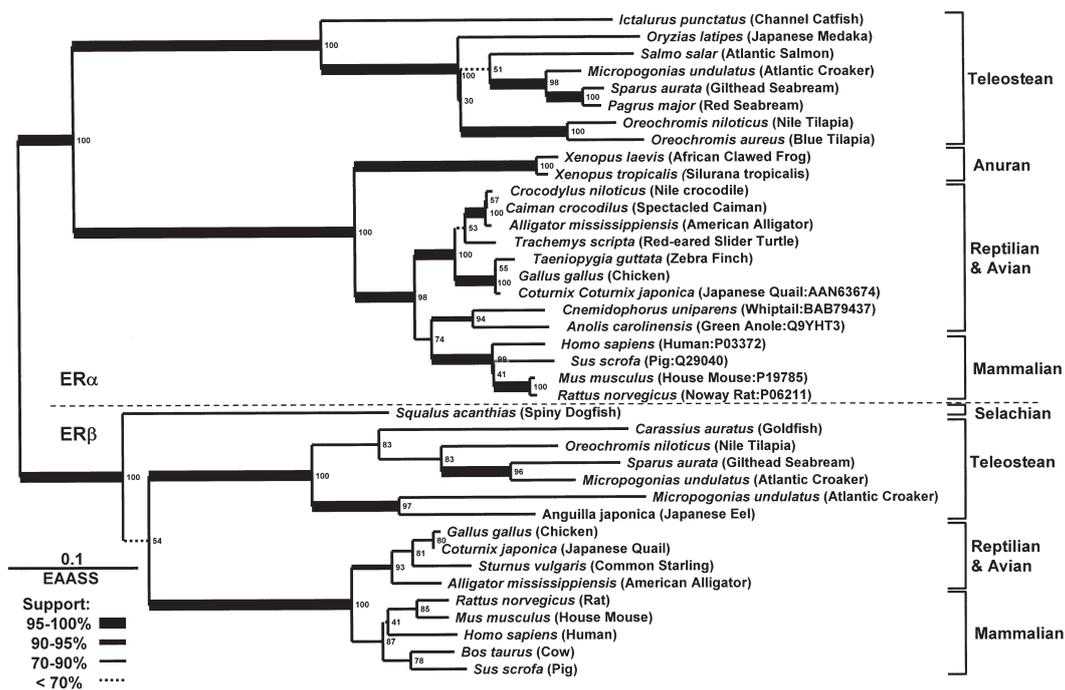
連絡先：佐藤友美、横浜市立大学大学院国際総合科学研究科理学専攻

〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸22-2

TEL: 045-787-2394

FAX: 045-787-2413

E-mail: tomomi@yokohama-cu.ac.jp



図

告されている [17].

ERαノックアウトマウスは1993年に作製され [18], 大きな特徴として, 成獣になるまで普通に成長すること, 雌雄ともに不妊であることが挙げられる. メスの子宮は重度の形成不全を示し, 卵巣には嚢胞があり黄体は認められない. エストロジェンを3日間投与しても子宮, 膈に変化はなく, したがって, 生体内の生殖器官および生殖に対するエストロジェン作用はERαを介していることが明らかとなった. その後, ERαノックアウトマウス卵巣ではFSHレセプターおよびLHレセプターのmRNA量が野生型に比べて増加していること [19], 視床下部-下垂体-生殖腺系のネガティブフィードバック機構が働かないことから, 脳下垂体でのLH発現および血中LH量が増加し, その結果, 卵巣において嚢胞の発生, ステロイド合成酵素の高発現が引き起こされていることが明らかとなった [20]. 実際, 抗GnRH剤の長期投与により, 高LH状態が抑制されて嚢胞が消失する. さらに, 生殖腺刺激ホルモンの投与により排卵が誘発されるという報告もある [21].

一方, ERβノックアウトマウスは1998年に作製された [22]. ERβノックアウトマウスは, ERαノックアウトマウスの場合と同様, 成獣になるまで普通に成長し, さらに雌雄ともに繁殖能力をもっている. しかし産仔数

が少なく, 生まれた仔は野生型よりも小さかった. PMSGに続いてhCGを投与して排卵を誘発させたところ, 排卵数が野生型よりも有意に少なかったことから, 排卵機能にERβが関与していることが示された. のちに, ERβノックアウトマウス卵巣ではPMSGの投与による顆粒膜細胞の分化が起こらず, エストロジェン合成も抑制されており, 続くhCGの刺激に反応できないためであることが示されている [23]. また, 器官培養したERβノックアウトマウスの卵巣では, 初期の胞状卵胞から成熟卵胞への発達が抑制されており, エストロジェンの産生も低下していたことから [24], ERβが卵胞の成熟に必要なことが示されている.

ERαとERβのダブルノックアウトマウスは1999年, 2000年に独立に作製された [25, 26]. ダブルノックアウトマウスは, ERαノックアウトマウスの特徴に加え, 卵巣の卵胞顆粒膜細胞が精巣でみられるセルトリ細胞に転分化することが報告されている.

これら3種類のノックアウトマウスの特徴から, 子宮や膈といったエストロジェン標的器官でのエストロジェン作用はERαを介していること, 一方, ERβは卵巣機能に関わっていることが徐々に明らかとなってきた.

卵巣におけるERβの局在と役割

ERβ mRNAの卵巣内での局在をみてみると、一次卵胞から成熟卵胞にいたるまでのすべての顆粒膜細胞で強く発現しており、間質細胞および卵細胞ではほとんどシグナルが認められない[1]。経時的な発現を調べると、卵巣では胎齢14.5日からERα mRNAが、胎齢16.5日からERβ mRNAが発現している[27]。また、ERβタンパクの発現は、一次、二次および成熟卵胞の顆粒膜細胞で認められ、間質細胞、莢膜細胞、黄体細胞、卵細胞では認められない[28, 29]。免疫組織化学的手法を用いると、出生直後の新生仔マウスの卵巣ではERβ免疫陽性細胞は認められず、5日齢、10日齢の一次、二次卵胞の顆粒膜細胞のみで弱く発現している[29]。一方、生殖腺刺激ホルモンのPMSGとhCG投与により強制排卵させた卵では、RT-PCRを用いた解析によりERβのmRNAが検出されている[30]。

前述したように、ERβは卵巣での卵胞の成熟に必要であることがいくつかの報告から示されている。さらに、成熟したERβノックアウトマウスにおける卵巣内の卵胞の発達段階ごとの解析では、原始卵胞の数が増加していることが報告されている[24]。また、成熟したアロマターゼノックアウトマウスでは、原始卵胞および一次卵胞の数が減少しており、成熟後にエストロゲンを補っても改善されないこと[31]、20日齢のマウスに抗GnRH剤とERβ特異的アゴニストである8-vinylestra-1,3,5(10)-triene-3,17β-diolを同時に投与すると、3a/bタイプの卵胞(一次卵胞)、初期卵胞状卵胞、成熟卵胞の数が増加するという報告から[32]、初期の卵胞形成に対するエストロゲンの効果にもERβが関与していると考えられている[33]。

出生直後の合成エストロゲン処理による多卵性卵胞誘導とERβ

われわれは、新生仔期のマウスにDESを投与し、卵巣への影響と多卵性卵胞の誘導メカニズムを解明することを目的としていくつかの実験を行った。まずDESの卵胞形成への影響を調べるため、組織学的な解析と、卵胞形成に関わるタンパクの発現変化を調べた。

出生日を0日齢とし、0～4日齢までの5日間、1日1回ゴマ油、もしくは3μg DESをC57BL/6Jマウスの新生仔に投与した。DESを投与されたマウス卵巣の形態的变化と多卵性卵胞の発生頻度を調べた結果、出生直後にDESを投与されたC57BL/6Jマウスでは、同じ日齢の

対照群に比べて卵巣の発達が遅れていた。卵巣の組織切片を詳細に観察したところ、卵胞の発達の遅れのみならず、卵細胞を取り囲む顆粒膜細胞の配列や卵巣内での卵胞の配列が乱れていた。一方、卵巣内における間質部分の占める割合が増加し、間質内の間隙も多く存在した。すなわち、出生直後のDES投与は、卵巣全体に対する形態的な異常を引き起こした。10日齢を除くすべての日齢で、出生直後にDESを投与すると多卵性卵胞の発生頻度が対照群に比べて有意に増加した(表1)。また多卵性卵胞の数を経時的に見ると、20日齢でピークを示し、その後、加齢に伴い徐々に減少した。このとき総卵胞数は、30、50日齢のDES群において有意に増加していた。このことからDESは、0～20日齢までの卵胞形成時に大きな影響を与えていることが明らかになった。さらに、5、10日齢のマウスの卵巣では、ERβとmullerian inhibiting substance(MIS)のタンパクは共に顆粒膜細胞に発現しており、DESを投与しても局在、発現量に変化はみられなかった。また多卵性卵胞においても、ERβタンパクは対照群と同様に顆粒膜細胞に発現していた。

次に、卵巣の形態的な異常や多卵性卵胞形成に関与するERを同定するために、ERαノックアウトマウスおよびERβノックアウトマウスを用いて組織学的解析を行った。DESを投与されたERαノックアウトマウスでは、野生型と同様に高頻度で多卵性卵胞がみられたが、ERβノックアウトマウスでは、野生型と比べて多卵性卵胞の出現が有意に減少した。したがって、DESはERαではなく、ERβを介して多卵性卵胞を誘導していることが明らかとなった。この結果は、植物性エストロジェンの1つであるgenisteinを新生仔マウスに投与すると誘導される多卵性卵胞も、ERβを介しているという報告とも一致する[34]。

DESによる多卵性卵胞誘導のメカニズムを解析するために、卵胞形成に関するいくつかの因子のmRNA量

表1 Incidence of PFs in an ovary of C57BL/6J mice treated with oil or 3μg DES neonatally.

Treatments	Age (day)	Incidence of PF (%)
Oil	10	1.70 ± 1.043
	20	0.94 ± 0.187
	30	0.28 ± 0.171
DES	10	3.30 ± 0.745
	20	15.66 ± 2.017*
	30	9.62 ± 1.234*

Data were expressed as the mean ± standard error.

*: p < 0.05 compared with age-matched oil control mice.

をリアルタイムPCR法により経時的に定量したところ、bone morphogenetic protein-15 (BMP-15)の発現量が、対照群に比べてDES投与群において増加する傾向にあった(表2)。BMP-15のノックアウトマウスでは、女性ホルモンを投与していないにも関わらず多卵性卵胞が観察されていることから[35]、BMP-15の増加と多卵性卵胞の発生に何らかの関連が考えられる。そこで、DESがER β を介してBMP-15のmRNA量を変化させているかどうかER β ノックアウトマウスを用いて調べたところ、BMP-15の発現量は野生型、ER β ノックアウトマウスともにDES投与により有意に増加していた(表3)。このことから、DES投与によるBMP-15の発現量の増加にER β が関与していない可能性が示された。BMP-15は卵細胞が産生する成長因子であり、DES投与による総卵胞数の増加とBMP-15の発現量の増加には関連があるのかもしれない。しかし他の遺伝子群の中には、DESを投与していないにもかかわらず、野生型と比較してER β ノックアウトマウスで発現量が増加していたものもあり、ER β アゴニストなどを用いたさらなる解析が必要であると考えている。

表2 Relative expression of BMP-15 mRNA in oil- or DES- treated C57BL/6J mice neonatally by real-time quantitative PCR.

Treatments	Age (day)	Relative mRNA expression (fold)
Oil	20	1.00 \pm 0.832
DES	20	1.65 \pm 0.692

Data were expressed as the mean \pm standard error. Measurements are normalized to the cyclophilin mRNA and shown relative to the mRNA expression levels of 20-day-old oil control mice.

表3 Relative expression of BMP-15 mRNA in oil- or DES- treated wild-type (WT) or ER β knockout (KO) mice neonatally by real-time quantitative PCR.

Genotypes	Treatments	Age (day)	Relative mRNA expression (fold)
WT	Oil	20	1.00 \pm 0.124
	DES	20	1.73 \pm 0.190*
KO	Oil	20	1.00 \pm 0.068
	DES	20	1.78 \pm 0.199*

Data were expressed as the mean \pm standard error. Measurements are normalized to the cyclophilin mRNA and shown relative to the mRNA expression levels of 20-day-old oil control mice. *: p < 0.05 compared with age-matched oil control mice.

おわりに

ノックアウトマウスの解析や、ER β 特異的アゴニストの投与により、卵巣機能にER β が重要な役割を果たしていることが徐々に明らかにされつつある。一方、われわれの結果から、出生直後の女性ホルモン処理によって引き起こされる多卵性卵胞の誘導は、ER β を介していることが明らかとなった。今後は、ER β 以降のシグナル伝達経路の解析や、出生後の卵細胞のアポトーシスの解析などを通して、多卵性卵胞の発生メカニズムの解明を進めていきたい。

文 献

1. Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-A (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 5925-5930.
2. Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392, 49-53.
3. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor β . *Mol Endocrinol* 11, 353-365.
4. Katsu Y, Myburgh J, Kohno S, Swan GE, Guillet LJ, Iguchi T (2006) Molecular cloning of estrogen receptor α of the Nile crocodile. *Comp Biochem Physiol* 143, 340-346.
5. Iguchi T (1992) Cellular effects of early exposure to sex hormones and antihormones. *Int Rev Cytol* 139, 1-57.
6. Iguchi T, Sato T (2000) Endocrine disruption and developmental abnormalities of female reproduction. *Am Zool* 40, 402-411.
7. Iguchi T (1985) Occurrence of polyovular follicles in ovaries of mice treated neonatally with diethylstilbestrol. *Proc Japan Acad Series B* 61, 288-291.
8. Iguchi T, Takasugi N, Bern HA, Mills KT (1986) Frequent occurrence of polyovular follicles in ovaries of mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Teratology* 34, 29-35.
9. Iguchi T, Ohta Y, Fukazawa Y, Takasugi N (1987) Strain differences in the induction of polyovular follicles by neonatal treatment with diethylstilbestrol in mice. *Med Sci Res* 15, 1407-1407.
10. Iguchi T, Todoroki R, Takasugi N, Petrow V (1988) The effects of an aromatase inhibitor and a 5 alpha-reductase inhibitor upon the occurrence of polyovular follicles, persistent anovulation, and permanent vaginal stratification in mice treated neonatally with testosterone. *Biol Reprod* 39, 689-697.
11. Iguchi T, Fukazawa Y, Uesugi Y, Takasugi N (1990) Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro. *Biol Reprod*, 43, 478-484.
12. Iguchi T, Kamiya K, Uesugi Y, Sayama K, Takasugi N (1991) In vitro fertilization of oocytes from polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol. *In Vivo* 5, 359-363.

13. Kirigaya A, Hayashi S, Iguchi T, Sato T (2006) Developmental effects of ethinylestradiol on reproductive organs of female mice. *In Vivo* 20, 867-874.
14. Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, Sato T, Ohta Y, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T (2002) Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod Toxicol* 16, 107-116.
15. Couse JF, Dixon D, Yates M, Moore AB, Ma L, Maas R, Korach KS (2001) Estrogen receptor-alpha knockout mice exhibit resistance to the developmental effects of neonatal diethylstilbestrol exposure on the female reproductive tract. *Dev Biol* 238, 224-238.
16. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson J-Å (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138, 863-870.
17. Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocrine Rev* 20, 358-417.
18. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O (1993) Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11162-11166.
19. Schomberg DW, Couse JF, Mukherjee A, Lubahn DB, Sar M, Mayo KE, Korach KS (1999) Targeted distribution of the estrogen receptor- α gene in female mice: Characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. *Endocrinology* 140, 2733-2744.
20. Couse JF, Yates MM, Walker VR, Korach KS (2003) Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ER α but not ER β . *Mol Endocrinol* 17, 1039-1053.
21. Couse JF, Bunch DO, Lindzey J, Schomberg DW, Korach KS (1999) Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor- α knockout mouse. *Endocrinology* 140, 5855-5865.
22. Kregel JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson J-Å, Smithies O (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15677-15682.
23. Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, Korach KS (2005) Estrogen receptor- β is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology* 146, 3247-3262.
24. Emmen JMA, Couse JF, Elmore SA, Yates MM, Kissling GE, Korach KS (2005) *In vitro* growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER) α and ER β null mice indicate a role for ER β in follicular maturation. *Endocrinology* 146, 2817-2826.
25. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS (1999) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors α and β . *Science* 286, 2328-2331.
26. Dupont S, Krust A, Gransmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M (2000) Effects of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127, 4277-4291.
27. Lemmen JG, Broekhof JLM, Kuiper GGJM, Gustafsson J-Å, van der Saag PT, van der Burg B (1999) Expression of estrogen receptor alpha and beta during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 81, 163-167.
28. Fitzpatrick SL, Funkhouser JM, Sindoni DM, Stevis PE, Deecher DC, Bapat AR, Merchenthaler I, Frail DE (1999) Expression of estrogen receptor-beta protein in rodent ovary. *Endocrinology* 140, 2581-2591.
29. Sar M, Welsch F (1999) Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology* 140, 963-971.
30. Hiroi H, Momoeda M, Inoue S, Tsuchiya F, Matsumi H, Tsutsumi O, Muramatsu M, Taketani Y (1999) Stage-specific expression of estrogen receptor subtypes and estrogen responsive finger protein in preimplantational mouse embryos. *Endocrine J* 46, 153-158.
31. Britt KL, Saunders PK, McPherson SJ, Misso ML, Simpson ER, Findlay JK (2004) Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod*, 71, 1712-1723.
32. Hegele-Hartung C, Siebel P, Peters O, Kosemund D, Muller G, Hillisch A, Walter A, Kraetzschmar J, Fritzscheier KH (2004) Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 5129-5134.
33. Woodruff TK, Mayo KE (2005) To beta or not to beta: estrogen receptors and ovarian function. *Endocrinology* 146, 3244-3246.
34. Jefferson WN, Couse JF, Padilla-Banks E, Korach KS, Newbold RR (2002) Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) α expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: Evidence for ER β -mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod* 67, 1285-1296.
35. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunber BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM (2001) Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 15, 854-866.