

ヒト子宮頸部組織における細胞質分画エストロゲン結合能と それに影響する因子について

岡山大学医学部産科婦人科学教室 (指導: 関場 香教授)

小 林 俊 三

(平成3年11月18日受稿)

Key words : uterine cervix, estrogen receptor inhibition

緒 言

卵胞が成熟するにつれ、卵胞より女性ホルモンが分泌されるが、その内最も重要とされるのは estradiol-17 β である。その作用は主として子宮内膜を増殖させる事により内膜を胚の着床に快適な状態にすることとしてよく知られているが、同じく重要な働きとして子宮頸部の粘液腺を刺激し、排卵直前には透明な頸管粘液を大量に分泌させ、精子が受精部位である卵管膨大部に到達する経路の一部である子宮頸部を通過し易くする働きを持つ。これは estradiol-17 β が頸部組織に結合し、その作用を司っていると考えられている。しかし、排卵後は黄体ホルモンである progesterone が分泌される為、estradiol-17 β が血中に高値で存在するにも関わらず頸管粘液の分泌が抑制される¹⁾。また排卵誘発剤である抗エストロゲン剤を投与した場合にも頸管粘液の分泌不全が生じる事に臨床的にしばしば遭遇する。同様に男性ホルモンは女性ホルモンと反対の作用を持つとされ、男性ホルモン過剰である場合、女性ホルモンの働きは抑制されると考えられている。さらに子宮内膜症の治療剤である danazol は中枢・末梢のいずれかに作用するのか不明であるが、estradiol-17 β レセプターへの直接作用も認められている²⁻⁴⁾。しかしながらこれらのホルモンが子宮頸部のエストロゲン結合あるいはその作用に対しどの程度あるいはどのような形式で影響を及ぼしているか、未だ不明である。この点を解明する為には子宮頸部の estradiol-17 β 結合能に対する影響を直接検討す

る必要があるが、その測定法として血清中の結合蛋白である Sex Hormone Binding Globulin (SHBG)⁵⁾ などの影響を排除する方法として testosterone や 5 α -dihydrotestosterone などを加えなければならなかった⁶⁾。この点を解消する為、組織中の estradiol-17 β 結合蛋白 (レセプター) が比較的熱に弱く⁷⁾、血清中の SHBG が globulin 分画に属するため熱に強い点を考慮し、子宮頸部組織のエストロゲン結合蛋白の結合能に及ぼす種々のステロイドホルモンあるいはステロイドホルモン作用に影響を及ぼすホルモンについてその estradiol-17 β 結合能に及ぼす影響を検討した。

実験材料および実験方法

1. Steroid および試薬

[³H] estradiol-17 β (SA : 106.0 Ci/mmol) は New England Nuclear Co., Boston, MA より購入し使用した。estradiol-17 β , mestranol, hexestrol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, tamoxifen, dehydroepiandrosterone, testosterone, androstenedione, progesterone, 17-hydroxyprogesterone および Norit A (charcoal) は Sigma Chemical Co., St. Louis, MO より購入し使用した。Dextran-T70は Pharmacia Co., Piscataway, Sweden より購入し使用した。また抗エストロゲン剤である clomiphene は塩野義製薬、cyclofenyl は帝国臓器製薬から入手し使用した。その他の試薬は和光製薬の特級を使用した。

2. 子宮頸部組織

子宮頸部は月経周期を有する子宮筋腫の患者より手術療法により摘出された子宮から患者の同意を得て採取した。摘出子宮は即時に0℃の生理食塩水に浸し、子宮頸部を切り離した。次いで生理食塩水にて数回洗浄、血液・頸管粘液を除去した後、約2mm³程度まで細切し、それに同等量 (wt/vol) の Tris Glycerol Buffer (10% glycerol, 1.5mM EDTA, 1.0mM Tris HCl; pH 7.6) を加え、液体窒素にて凍結して粉碎し、実験まで-80℃にて凍結保存した。

3. cytosol (125,000xg 上清) の調製

凍結した組織を0℃にて融解し、組織の5倍量 (wt/vol) の Tris Glycerol Buffer を加え、glass-glass homogenizer を使用し10秒間ホモジナイズ後30秒間冷却する操作を3回繰り返した。以上の操作により得たホモジネートを0℃, 800xg 10分間遠沈し、この上清をさらに125,000xg 1時間遠沈し、得られた上清を cytosol とした。次いで内因性のステロイドを除去するため、最終濃度が12.5mg/ml cytosol となるように charcoal を加え、15分間インキュベートした後10,000xg 15分遠沈し、得られた上清を estradiol-17β の結合能測定に使用した。なおこれらの操作はすべて0℃で行った⁶⁾。

4. インキュベーションおよび bound/free 分離

全ての測定は duplicate にて行った。40℃で60分間加熱した charcoal 処理後の cytosol、非加熱の charcoal 処理後の cytosol を0.5mlづつ、それぞれ10nM [³H] estradiol-17β と30℃で2時間インキュベートした。インキュベーション終了後、1.0% charcoal, 0.1% Dextran T70 水溶液 (DCC) 0.5ml を加えて、0℃で15分間さらにインキュベートした。反応液を1,500xg で15分間遠沈して DCC を除去した後、その上清の放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloca LSC-703) を用いて測定した。scintillation fluid は Aquasol-2 (New England Nuclear Co.) を用いた。counting efficiency は約45%であった。

加熱処理 cytosol における結合能を非特異結合とし、非加熱処理 cytosol における結合能か

ら差し引いた値を特異結合能 (receptor 濃度) として計算した。

5. タンパク濃度測定

Lowry *et al* 法に準じ、bovine serum albumin を standard として用いてタンパク濃度を測定した⁹⁾。

実験結果

1. 加熱温度と加熱時間

receptor を不活化し、非特異結合能を測定するため、ここでは加熱処理 cytosol を用いたが、そのための加熱条件として、40℃・45℃・60℃ および30~120分で温度および時間の影響を検討した。40℃では加熱開始後60分ではほぼ一定値となり以後安定していた。45℃では同様に60分一定値となるものの、その後やや不安定な値を示した。60℃では加熱した cytosol の方が逆に高い値を示し、非特異結合が増加する傾向が認められた。従って cytosol の加熱方法としては40℃・60分が適当と思われた (図1)。

2. DCC 濃度

DCC の最終濃度を0.06%, 0.13%, 0.25%, 0.5%, 1.0% および2.0% とし、bound/free 分離を行うと、charcoal 濃度が最終0.5%の場合に最も良好な結合を示しており、一般に用いられている同濃度⁶⁾で bound/free 分離を行うのが良いと考えられた (図2)。

3. [³H] estradiol-17β の至適濃度の設定および解離定数

[³H] estradiol-17β 濃度を0.315nM より20nM として特異結合を測定すると、10nM にて最大に達し、非特異結合も10nM まで直線に回帰していた。これを Scatchard plot にて解析するとほぼ直線回帰を示しており、Sex Hormone Binding Globulin などの結合と考えられる low affinity の部分は出現しなかった。解離定数を算定すると Kd=0.93~2.0×10⁻⁹M であった (図3)。

4. 阻害物質の影響

阻害物質を1.0μM 加え最大結合の阻害程度について検討すると、阻害率は合成エストロゲン剤である mestranol は80%, hexestrol は78%, ethynylestradiol は77%, diethylstilbestrol は

67%といずれも強い阻害効果を示した。一方抗エストロゲン剤で排卵誘発剤として用いられる clomiphene は66%, cyclofenil は58%, エス

トロゲンレセプターに対する特異阻害剤として乳癌に用いられている tamoxifen⁹⁻¹⁰⁾は44%と中等度~強度の阻害効果を示した(図4)。女性ホルモンとは反対の作用を持つと考えられている男性ホルモンでは dehydroepiandrosterone は57%, testosterone は44% そして androstenedione は19%と中等度の阻害を示した。また黄体ホルモンである progesterone は20%, 17-

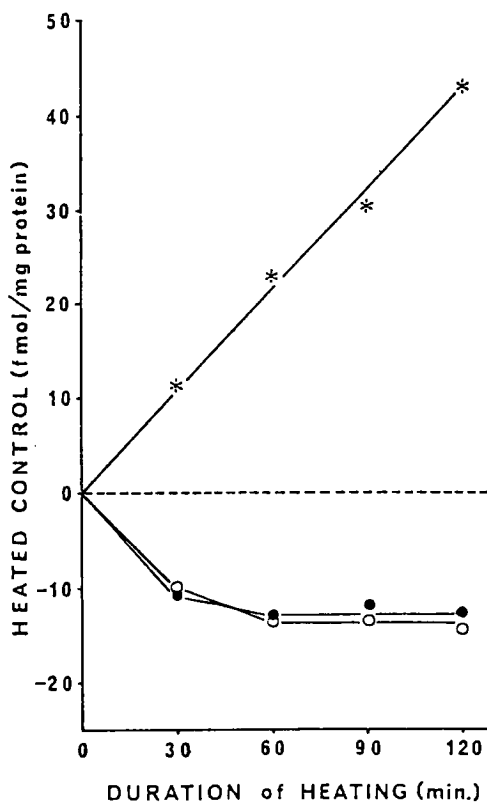


図1 加熱処理法による estradiol-17β特異結合能の影響
○ : 40℃, ● : 45℃, * : 60℃

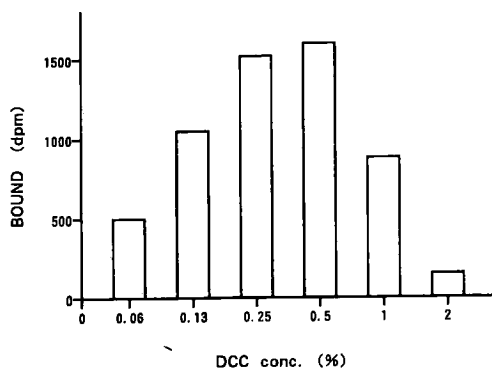


図2 charcoal 濃度と estradiol-17β特異結合

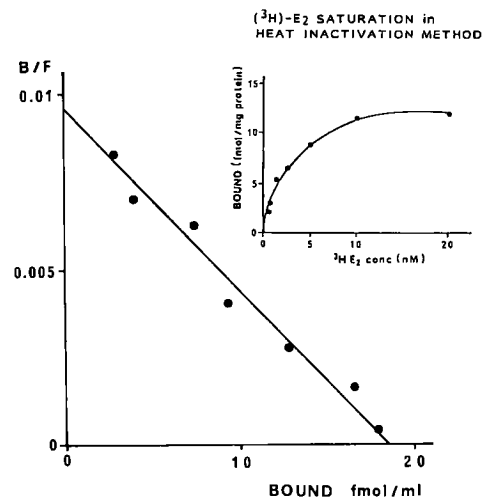


図3 estradiol-17β特異結合の Schatchard Analysis ($K_d=2.0 \times 10^{-9}M$)

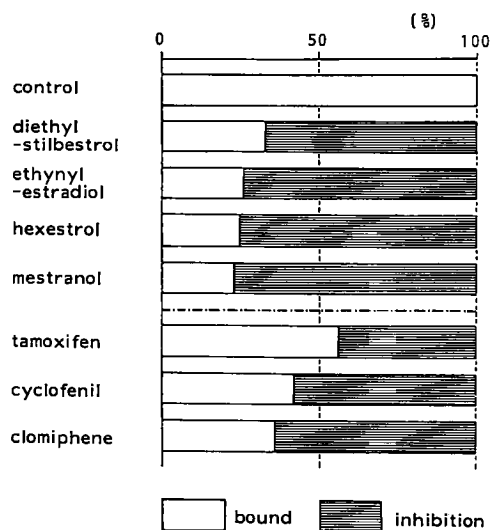


図4 estradiol-17β特異結合への影響(合成エストロゲン・抗エストロゲン)

hydroxyprogesteroneは15%と阻害効果は比較的軽度であった。また子宮内膜症の治療に用いられるが、作用点の不明なC₁₈ステロイドであるdanazolは44%と男性ホルモンと同等の阻害効果を示した(図5)。

次いで阻害形式について Scatchard plot にて解析した。各種阻害物質を1.0μM加えた状態でみせかけの解離定数(Kp)を測定した。阻害物質を加えなかった場合の解離定数Kd=0.93×10⁻⁹Mであったのに対し、合成エストロゲンである ethynylestradiol では Kp=0.65×10⁻⁹M, diethylstilbestrol では Kp=1.1×10⁻⁹M(図6), 抗エストロゲン剤では clomiphene では Kp=1.3×10⁻⁹M, cyclofenyl では Kp=1.1×10⁻⁹M, tamoxifen では Kp=1.4×10⁻⁹M(図7), また testosterone では Kp=0.69×10⁻⁹M, progesterone では Kp=0.98×10⁻⁹M そして danazol では Kp=0.65×10⁻⁹M(図8)といずれも阻害物質を加えない場合の解離定数と大差なく、非拮抗阻害形式を示した。

考 察

エストロゲンはレセプターを介しその作用を発現し、視床下部¹¹⁾, 子宮内膜¹²⁻¹⁴⁾, 子宮筋層^{6),14,15)}さらに子宮頸部¹⁶⁻²⁰⁾にも存在する事が知られ、さらに子宮頸癌での変動についても検討されている²¹⁻²⁴⁾。しかし、月経周期の変動に伴い子宮頸部より分泌される頸管粘液がエストロゲンにより増加し、黄体ホルモンである progesterone の作用により抑制されるとされているが、その作用が組織中のエストロゲンの結合に影響をおよぼしている為か、それとも全く別の作用によるものか依然不明のままである。また抗エストロゲン剤で視床下部あるいは脳下垂体に作用し排卵誘発作用を持つとされ、臨床上排卵誘発剤として用いられている薬剤として clomiphene および cyclofenyl があるが、臨床上 clomiphene を連続して使用した場合には、血中の estradiol-17βの値は高値を示すにも関わらず頸管粘液の分泌が十分におこらず、逆に cyclofenyl を用いると頸管粘液の分泌は抑制されない事をしばしば経験する。これらの事から、子宮頸部の組織内のエストロゲン結合蛋白に対する様々なステ

ロイドあるいは類似物質による阻害効果を知る事は、薬剤ではその使用方法を調整する為に、また natural steroids ではその影響を知る為に非常に重要である。従来これを測定する方法としてアンドロゲンを加えたり⁹⁾, estradiol-17β以外に何も加えずに DCC 法にて測定したりされ

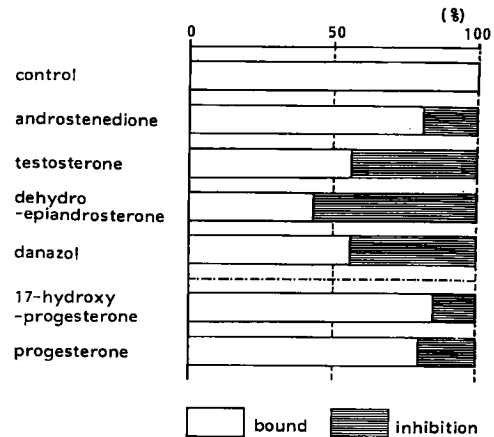


図5 estradiol-17β特異結合への影響(男性ホルモン・黄体ホルモン・他)

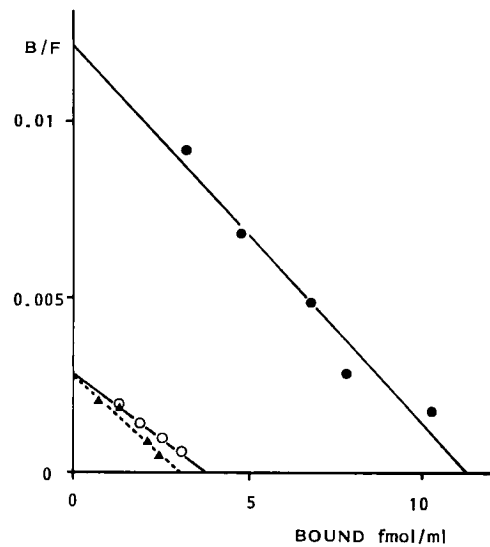


図6 estradiol-17β特異結合への影響(Scatchard Analysis)
● : control
○ : with diethylstilbestrol
▲ : with ethynylestradiol

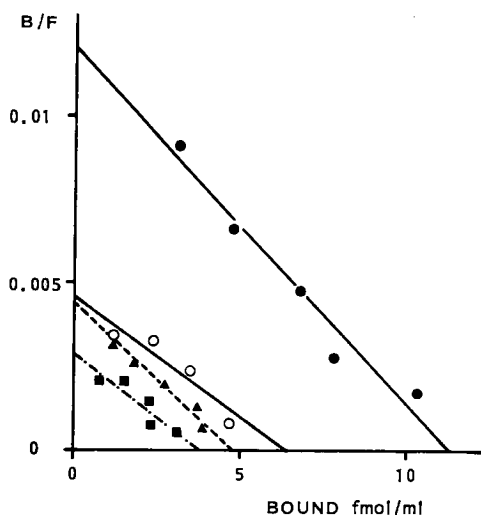


図7 estradiol-17 β 特異結合への影響 (Scatchard Analysis)

- : control
- : with clomiphene
- : with tamoxifen
- ▲ : with cyclofenyl

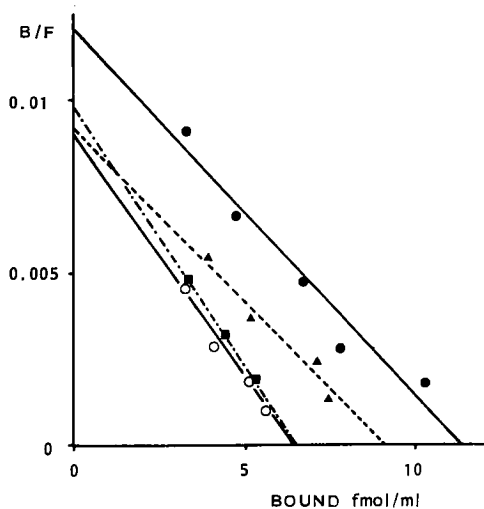


図8 estradiol-17 β 特異結合への影響 (Scatchard Analysis)

- : control
- ▲ : with progesterone
- : with testosterone
- : with danazol

ていた。しかし、それらの方法を用いると、アンドロゲンの影響を除外出来なかつたり、あるいは Sex Hormone Binding Globulin と estradiol-17 β との結合を除外出来なかつたりする欠点があった。そこで今回はレセプターが熱に弱い点に着目し、熱に弱いと考えられるエストロゲンの結合蛋白の不活化が40 $^{\circ}$ C・60分で完全となる事を示した。この条件下で加熱処理した cytosol の [3 H] estradiol-17 β の結合能をコントロールとして、特異結合が測定できることを示した。これにより得られた値は Sanborn ら¹⁸⁾の報告と合致しており、測定として使用可能であると考えられた。しかし60 $^{\circ}$ Cとなると非特異性の蛋白による estradiol-17 β との結合が逆に増加してしまう事を示した。これに関する詳細は不明であり、今後検討を要する問題である。

エストロゲンの結合蛋白に対する阻害効果を検討すると、エストロゲン製剤はいずれも強い阻害効果を示し、次いで抗エストロゲン剤、次にアンドロゲン、そして黄体ホルモンの順であったが、いずれも非拮抗阻害を示した。この事はエストロゲン製剤が0.04~0.08mg/日程度で効果をあらわすのに対し、抗エストロゲン製剤が50~600mg/日程度の大量を用いないと効果を示さない事と合致しており、さらに抗エストロゲン間にその程度の差が大きくなかつた事は、抗エストロゲン効果を得る為には大量の抗エストロゲン剤が必要であることが示された。また、両者とも非拮抗阻害を示した事は、一度このエストロゲン結合蛋白に結合するとなかなか離れず、その蛋白合成の誘導あるいは阻害効果を示すことが示されていて興味深い。アンドロゲンはエストロゲンや抗エストロゲン程のエストロゲン結合蛋白に対する阻害効果は示さなかつたものの、中程度の阻害効果を示したが、これは Sex Hormone Binding Globulin への結合は除外出来ているものと思われ、アンドロゲンが直接エストロゲン結合蛋白のエストロゲンとの結合に影響を及ぼしている事が示されており、最も強いアンドロゲンとされる testosterone は estradiol-17 β より大量に血中に存在する事²⁵⁾から考慮しても興味深い。

黄体ホルモンである progesterone はそれが

増加する事により頸管粘液の分泌を阻害すると考えられている。このホルモンのエストロゲン結合蛋白に対する阻害効果は軽度であるが、その分泌は排卵後に急増し、estradiol-17 β の100倍程度²⁶⁾に達する。この事を考慮に入れると、progesteroneのエストロゲン結合蛋白に対する阻害は直接作用も十分に考えられた。

子宮頸部組織のエストロゲン結合蛋白の結合能に及ぼす種々のステロイドホルモンあるいはステロイドホルモン作用に影響を及ぼすホルモンについてその estradiol-17 β 結合能に及ぼす影響を検討した結果、estradiol-17 β との結合に対し、その結合阻止作用はエストロゲン製剤>抗エストロゲン製剤>アンドロゲン=danazol>黄体ホルモン(ゲスターゲン)の順であり、その阻害形式はいずれも非拮抗阻害を示したが、これは広橋ら²⁷⁾の報告におけるScatchard解析の結果と合致していた。エストロゲン製剤が一日量

0.04~0.08mg程度でその効果を示すのに対し抗エストロゲン剤は50~600mg必要である事、次いでアンドロゲンあるいはゲスターゲンについては血中のそれらホルモンの値(testosterone: 0.4~0.7ng/ml, progesterone [黄体期]: 10~20ng/ml)より考慮すると、頸管粘液分泌などの子宮頸部の周期性の変化はアンドロゲンやゲスターゲンの結合蛋白を介する作用のみでなく、エストロゲン結合蛋白に直接作用する可能性を示唆したものと考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました関場香教授、御校閲を賜りました産賀敏彦教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接御指導いただきました吉田信隆講師に深謝します。

なお本論文の要旨は第56回日本内分泌学会(東京)ならびに第57回日本内分泌学会(東京)で発表した。

文 献

- 1) Novak ER, Jones GS and Jones Jr. HW: Infertility and Abortion. Novak's Textbook of Gynecology (1970) 549—572.
- 2) Barbieri RL, Lee H and Ryan KJ: Danazol Binding to Rat Androgen, Glucocorticoid, Progesterone and Estrogen Receptors: Correlation with Biologic Activity. Fertil Steril (1979) 31, 182—186.
- 3) Tamaya T, Murakami T, Yamada T, Wada K, Fujimoto J and Okada H: Serum Hormone and Steroid Hormone Receptor Levels during Luteal-phase and Long-term treatment with Danazol. Fertil Steril (1983) 40, 585—589.
- 4) Tamaya T, Wada K, Fujimoto J, Yamada T and Okada H: Danazol Binding to Steroid Receptors in Human Uterine Endometrium. Fertil Steril (1984) 41, 732—735.
- 5) 吉良正道 簡易 TeBG 測定法と% TeBG Testosterone, Estradiol 結合率測定法について. 日内分泌会誌 (1980) 56, 1461—1474
- 6) Giannopoulos G, Goldberg P, Shea TB and Tulchinsky D: Unoccupied and Occupied Estrogen Receptors in Myometrial Cytosol and Nuclei from Nonpregnant and Pregnant Women. J Clin Endocrinol & Metab (1980) 51, 702—710.
- 7) Joab I, Redeuilh G, Secco C, Radanyi. C, Baulieu EE and Richard-Foy H: Thermal Inactivation and Molecular Forms of the Estrogen Receptor: Effects of Molybdate. Biochem Biophys Res Commun Acta (1981) 103, 505—510.
- 8) Lowry O: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J Biol Chem (1951) 265—275.
- 9) Murphy LC and Sutherland RL: A High-affinity Binding Site for the Antioestrogens, Tamoxifen and CI628, in Immature Rat Uterine Cytosol which is Distinct from the Oestrogen Receptor. J Endocrinol (1981) 91, 155—161.
- 10) Fishman JH: Estradiol and Tamoxifen Interaction at Receptor Sites at 37°C: Endocrinology (1983)

- 113, 1164—1166.
- 11) Garai J, Vertes M and Kovacs S : In vitro Effects of Cytosolic Inhibitor and Opiates on the Binding of [³H] Oestradiol to Nuclear type II Binding Sites of Rat Uterus and Hypothalamus. *J Steroid Biochem* (1989) **32**, 433—438.
 - 12) Krishnan AR, Hingorani V and Laumas KR : Binding of ³H-oestradiol with Receptors in the Human Endometrium and Myometrium. *Acta Endocrinol* (1973) **74**, 756—768.
 - 13) Tseng L and Gurdip E : Effects of Progestins on Estradiol Receptor Levels in Human Endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* (1975) **41**, 402—404.
 - 14) Geier A, Beery R, Levran D, Menczer J and Lunenfeld B : Unoccupied Nuclear Receptors for Estrogen in Human Endometrial Tissue. *J Clin Endocrinol Metab* (1980) **50**, 541—545.
 - 15) Schmidt-Gollwitzer M, Eiletz J, Genz T and Pollow K : Determination of Estradiol, Estorone and Progesterone in Serum and Myometrium : Correlation with the Content of Sex Steroid Receptors and 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity throughout the Menstrual Cycle. *J Clin Endocrinol Metab* (1979) **49**, 370—376.
 - 16) Sanborn BM, Held B and Kuo HS : Specific Estrogen Binding Proteins in Human Cervix. *J Steroid Biochem* (1975) **6**, 1107—1112
 - 17) Sanborn BM, Held B and Kuo HS : Hormonal Action in Human Cervix-II Specific Progestogen Binding Proteins in Human Cervix. *J Steroid Biochem* (1976) **7**, 665—672.
 - 18) Sanborn BM, Kuo HS and Held B : Estrogen and Progestogen Binding Site Concentrations in Human Endometrium and Cervix throughout the Menstrual Cycle and in Tissue from Women Taking Oral Contraceptives. *J Steroid Biochem* (1978) **9**, 951—955.
 - 19) Cano A, Monmeneu R, Serra V, Marzo C and Rivera J : Expression of Estrogen Receptors, Progesterone Receptors and an Estrogen Receptor-associated Protein in the Human Cervix during the menstrual Cycle and Menopause. *Fertil Steril* (1990) **54**, 1058—1064.
 - 20) Chilton BS and Geis LS : Steroid Receptors in the Developing and the Adult Rabbit Endocervix and in Endocervical Epithelial cells isolated by Flow Cytometry. *J Steroid Biochem Molec Biol* (1990) **37**, 649—659.
 - 21) Darne J, Soutter WP, Ginsberg R and Sharp F : Nuclear and "Cytoplasmic" Estrogen and Progesterone Receptors in Squamous Cell Carcinoma of the Cervix. *Gynecol Oncol* (1990) **38**, 216—219.
 - 22) Scambia G, Benedetti Panici P, Baiocchi G, Battaglia F, Ferrandina G, Greggi S and Mancuso S : Steroid Hormone Receptors in Carcinoma of the Cervix : Lack of Response to an Antiestrogen. *Gynecol Oncol* (1990) **37**, 323—326.
 - 23) Gao YL, Twiggs LB, Leung BS, Yu WCY, Potish RA, Okagaki T, Adcock LL and Prem KA : Cytoplasmic Estrogen and Progesterone Receptors in Primary Cervical Carcinoma : Clinical and Histopathologic Correlates. *Am J Obstet Gynecol* (1983) **146**, 299—306.
 - 24) Ratajczak T, Twaddle E and Haehnel R : Sex Hormone-Bindng Globulin and Estrogen Receptor in Endometrial and Cervical Cancer. *Gynecol Oncol* (1980) **10**, 262—266.
 - 25) 吉田信隆, 吉良正道, 鎌田常子, 清水健治, 小林俊三, 林 泰堂, 秋本晁久, 関場 香 : 妊娠, 分娩時の testosterone-estradiol binding globulin と sex steroid について. *日産婦誌* (1982) **34**, 1833—1838.
 - 26) 片山隆章 : 自然排卵周期における子宮内膜超音波像の変化と血中 estradiol, progesterone との関係. *日産婦誌* (1990) **42**, 1530—1536.
 - 27) 広橋 武, 星野明生, 花岡仁一, 佐藤芳昭, 竹内正七 : Danazol 投与によるヒト子宮内膜エストロゲンおよびプロゲステロンレセプターの動態. *エンドメトリオーシス研究会講演要旨* (1982) 8—11.

**Estrogen binding capacity in cytosol fraction of human
uterine cervix: effect of estrogen and anti-estrogens**

Shunzo KOBAYASHI

Department of Obstetrics and Gynecology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. K. Sekiba)

The estrogen binding activity in the human uterine cervix was measured, and the effect of natural and synthesized steroids on the activities was determined. To assay the estrogen binding activity, the sample was incubated with 10 nM [³H] estradiol-17 β at 30°C for 2 hours. Then dextran-coated charcoal (DCC) was added to a final concentration of 0.5% to separate bound/free (B/F) estradiol. Estrogen binding activity was determined by subtracting the activity found in the heated sample from the corresponding activity in the untreated sample. For this purpose it was found appropriate to heat the sample at 40°C for 60 minutes. The dissociation constant obtained from the Scatchard plot analysis was : $K_d=2.0\times 10^{-9}M$. A variety of steroids at the same molar concentration (1.0 μM) were added to the sample to determine their effects on the estrogen binding activity. For binding with [³H] estradiol-17 β , the synthetic estrogens were strongly inhibitory, the anti-estrogen agents were strongly to moderately inhibitory, the androgens were moderately inhibitory, and the gestagens were moderately inhibitory. Danazol, which has been used for the treatment of endometriosis, was found to be as effective as androgens. All of those inhibitory effects occurred in a non-competitive manner.