

研究報告書

平成 11 年度厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究事業)
分担研究報告書

食品中内分泌かく乱物質等の発がん修飾作用に関する実験的研究
(分担課題名: 食品中内分泌かく乱物質等による発がん修飾の分子機構の解明)

分担研究者 藤本 成明 広島大学原爆放射能医学研究所 助教授

研究要旨 ラット下垂体においてがん遺伝子 pttg はエストロゲンにより発現調節され、その応答性の差が、下垂体腫瘍化に関連していることが示唆された。ゲニスタインとニルフェノールについて検討し、下垂体細胞での増殖促進作用が示された。現在この細胞を使った移植腫瘍モデルで *in vivo* での作用を検討中である。また、ラット下垂体腫瘍での α 型エストロゲン受容体の発現は、主に "B" プロモーターにより調節されていることが明らかになった。

A. 研究目的

本研究では、ラット下垂体細胞を主なモデルとして、(1) エストロゲン依存性増殖のメカニズムおよび、(2) エストロゲン受容体発現調節の2点を解析したい。

エストロゲン依存性増殖の分子機構は、乳がん細胞等をモデルに研究されてきたが、未だに十分理解されていない。ここでは、増殖関連遺伝子発現のエストロゲンによる調節機構を明らかにし、内分泌かく乱物質等による修飾作用の可能性を検討する。

エストロゲン受容体は、内分泌かく乱物質等のターゲットである。近年の精力的な研究により、その際リクルートされるコファクターの存在とその役割が次々と明らかになってきた。その一方で、エストロゲン受容体自体の発現調節に関しては未だに現象論的な報告が散見されるのみで、その調節機構についてほとんど知られていない。そこで、ラットにおけるエストロゲン受容体のプロモーター構造を明らかにし、その調節機構および細胞増殖における調節の特異性を明らかにする。

B. 研究方法

試薬類

17 β エストラジオール、OH-タモキシフェンは、Sigma Chemicals, St. Louis, MO, U.S.A. から、ニルフェノール(NP)とビスフェノール A(BPA)は Wakojunyaku (Osaka) から購入、ゲニスタインは本研究班で独自に合成したものをを用いた。 *In vitro* 試験では、各試薬をエタノール溶液としてストックした。

動物

4 週令の雌 F344, Wistar, Brown Norway, Donryu ラットは、Charles River Japan (Atsugi) から購入した。飼育条件は、24 \pm 4 $^{\circ}$ C, 55 \pm 5 $^{\circ}$ C の恒温、恒湿、無窓の清潔な飼育室で 12/12 時間の明暗条件下で行った。水道水を飲料水として用いた。5 週令で 10mg のエストロゲンを含んだコレステロールペレットを皮下に投与した。動物は、一定期間後にエーテル麻酔下で屠殺され、血清および下垂体組織は直ちに凍結保存した。

RT-PCR

下垂体組織の全 RNA の抽出はアイゲン試薬 (Wakojunyaku) により行い、さらにそれを DNase (Promega, Madison, WI, USA) で処理した。一定量の全 RNA は、さらに MMLV-RT (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) によって cDNA にされ、PCR 反応の鋳型とされた。PTTG プライマーは 5'-ATGGCTACTCTGATCTTTGT および 5'-TTAAATATCTGCATCGTAAC であり、600-bp の産物が得られた。PCR には、Ex-Taq DNase polymerase (Takara, Tokyo) を用い、95 $^{\circ}$ C、30 秒、52.9 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C、1 分の 20-30 サイクルで増幅を行った。産物は、1.5% アガロースゲルで泳動した後、エチジウムブロマイドで染色した。各泳動バンド像は、画像解析により半定量された。対照として G3PD を用いた。

細胞培養および増殖アッセイ

MtT/E-2 細胞および MCF-7 細胞の培養はそれぞれペニシリン/ストレプトマイシン含有の DEM/F12 混合培地 (Sigma Chemicals) + 2.5% FBS (Life Technologies) + 7.5% HS (Life Technologies) および

作成上の留意事項について

1. 日本工業規格 A 列 4 番の用紙を使用して下さい。
2. 文字の大きさは、11 ポイントでお願いいたします。

MEM 培地 (Sigma Chemicals) + 5% FBS にて行った。アッセイ前にはそれぞれ DC 処理血清を含むフェノールレッド(-) の培地に交換した。細胞増殖測定は改良型の MTT アッセイである Cell Counting Kit (Wakojunyaku) を用いた。

レポータープラスミド

PTTG レポータープラスミド作成のため、PTTG 構造遺伝子上流域 -720 ~ +16 および -1053 ~ +16 を、それぞれ両端から 22bp の PCR プライマーによりラットゲノム DNA から PCR し、TA-クローニング (Invitrogen, Groninger, The Netherlands) した。これを、ルンフェアーゼレポーター pGL3-basic (Promega) に blunt ligation で導入した (それぞれ、-700f-pGL3、-1000f-pGL3)。また、エストロゲン応答性転写活性化のアッセイに用いた (ERE)₃-SV40-luc は、Dr. M. Kudo (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Tsukuba) より供与いただいた。

トランジェントトランスフェクション

細胞は、12 穴プレートに 2×10^5 / well で播き、24 時間後に、TransFast transfection reagent (Promega) を用いて全量で 2ug の DNA をトランスフェクションした。薬剤処理 24 時間後に細胞を溶解し、Dual luciferase assay substrates (Promega) をそれぞれ加えた。発光測定は、Micro-beta scintillation counter (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) により行った。

C. 研究結果

1. エストロゲンによる PTTG 発現

F344 ラットにエストロゲン (10mg/ペレット) 投与後、8 週、13 週後の下垂体重量はそれぞれ 41、68mg に達した (対照は 13 週で 10mg)。このとき、PTTG 発現をみると、下垂体重量増加に伴って増加していた (Fig. 1)。さらにエストロゲン投与後短時間での変化を Fig. 2 に示すが、48 時間後に有意な PTTG 発現の増加がみられた。

2. PTTG 遺伝子発現調節

-700f-pGL3、-1000f-pGL3 をラット下垂体細胞 MtT/E-2 にトランジェントトランスフェクションした結果、それぞれ 11 倍と 7 倍の転写活性化がみられた。これに、エストロゲン 10^{-11} 、 10^{-9} M を添加すると 1.4 倍の転写活性の増加がみられた (Fig. 3)。

3. genistein、BPA の下垂体 PTTG への作用

genistein、BPA を 1mg/day、1 週間 i.p. 投与後したが、下垂体重量には影響しなかった。一方、対照の 0.1mg/day のエストロゲン投与群では、1.7 倍の重量増加であった。また PTTG 発現については、genistein 群で、エストロゲン同様に PTTG 発現の増加がみられた (Table 1)。

4. エストロゲンによる下垂体腫瘍化の系統差

エストロゲンによるラット下垂体重量増加の程度は、F344、Wistar、Brown Norway の順に低くなり、Donryu ではほとんど観察されなかった (Table 2a)。このときの PTTG 発現を比較した結果が、Table 2b である。

5. genistein およびニルフェノール (NP) による下垂体腫瘍細胞の増殖

エストロゲン応答性増殖をする下垂体細胞株である MtT/E-2 による増殖試験の結果が Fig. 4 である。genistein は 10^{-8} M で有意な増殖促進活性がみられたのに対し、NP は 10^{-5} M で有意な促進をみた。また、(ERE)₃-SV40-luc レポーターによるエストロゲン作用のアッセイ結果を Fig. 5 に示したが、増殖アッセイとよく一致した。

genistein および NP の *in vivo* での MtT/E-2 細胞への作用を試験するため、細胞をラットに移植し、経口で 25、250ppm の薬剤の投与を開始した (現在継続中)。

6. 下垂体でのエストロゲン受容体発現とプロモーター

ラット下垂体では、主に α 型のエストロゲン受容体が発現していた。この受容体遺伝子発現には、子宮と同様にプロモーター B が使われていたことが示された (Fig. 6)。

D. 考察

本研究では、食品中内分泌かく乱物質による細胞増殖の機構を明らかにする目的で、ラット下垂体のエストロゲン応答性増殖を解析する。

ラットの下垂体は、エストロゲンによる連続刺激のみで増殖し容易にプロラクチノーマになることは古くから知られてきた。このようにしてできた下垂体腫瘍の増殖はエストロゲン反応性である。ここでも示したように、その程度はラットの系統によって異なっているが、エストロゲン作用をもつ内分泌かく乱物質の作用を解析するのによいモデルである。下垂体細胞モデルの利点として、下垂体ホルモン産生もまた外部からのホルモン作用の指標となりうることもあげられる。つまり、成長ホルモンは甲状腺ホルモンやグルココルチコイドによって調節されるし、本研究でも示したように、プロラクチン産生はエストロゲン作用のよいマーカーになる。

一般にエストロゲンによって調節される増殖関連遺伝子としては、c-myc、c-fos、サイクリン D などが知られてきた。下垂体細胞においても c-myc やサイクリン D がエストロゲン応答性に調節される。最近、下垂体腫瘍に高発現するがん遺伝子として PTTG が見いだされた。その後これは、sister-chromatid separation inhibitor (securin) と同一であることがわかりその腫瘍化への関与が注目され

いる。ここでは、この PTTG の発現はエストロゲンにより調節されていることが示された。PTTG 遺伝子のプロモーター域には、エストロゲン応答配列は存在しないが、それを使ったレポーター実験では、弱いながらもエストロゲン応答性がみられた。このエストロゲン応答が間接的な遺伝子制御によるのか、プロモーター域上にある Ap-1 や Sp-1 などにエストロゲン受容体が直接働いていわゆるノンライシヨナルなエストロゲン依存性転写活性化機構によるものかは今後の検討課題である。

我々は、エストロゲン応答性の増殖をする下垂体細胞株 MtT/E-2 を樹立してきた。今回、この細胞増殖を指標にすることで、genistein と NP が、*in vitro* で増殖促進作用をもつことを再確認できた。この細胞のラット移植実験により、*in vivo* でホルモン応答性増殖を高感度みることができる。現在、genistein と NP の作用を検討中である。

本研究の第二のテーマとして、エストロゲン受容体の調節機構をあげた。受容体は内分泌かく乱物質の主な作用点であるにも関わらず、それ自体の発現調節に関しては未だによく知られていない。実際増殖に関して、我々は甲状腺ホルモンが下垂体のエストロゲン受容体発現を変化させ、そのエストロゲン応答性増殖を修飾することを示してきた。下垂体細胞、少なくとも成長ホルモン/プロラクチン細胞では、エストロゲン受容体の α 型が主に発現している。今回、エストロゲン受容体遺伝子のプロモーター域の B 領域が、下垂体での受容体調節に関わっていることを明らかにした。今後、その調節と内分泌かく乱物質等による修飾の機構、さらに β 型受容体の発現と増殖との関わりについても検討したい。

E. 結論

- 1) ラット下垂体においては、PTTG mRNA がエストロゲンにより誘導が観察された。5' -PTTG の luc レポーターによる検討では、弱い調節が再現できた。大量の genistein および BPA は下垂体細胞に対しエストロゲン作用を示したが、それによる下垂体重量増加は観察されなかった
- 2) ラットの系統により、エストロゲンによる腫瘍化の程度は異なるが、それは部分的に PTTG 発現量と相関していた。
- 3) 下垂体におけるエストロゲン受容体は主に α 型であり、それは 5' 上流プロモーターの B 領域により調節されていた。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujimoto, N., Maruyama, S., Ito A
Establishment of an estrogen responsive rat pituitary cell sub-line MtT/E-2 *Endocrine J.* 46, 389-396 (1999)
- 2) Tamura, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Fujimoto, N., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takahashi, M. Inhibition of thyroid iodine uptake and organification in rats treated with kojic acid. *Toxicol. Sci.* 47. 170-175 (1999)
- 3) Maruyama, S., Fujimoto, N., Ito A Growth stimulation of a rat pituitary cell line MtT/E-2 by environmental estrogens *in vitro* and *in vivo*, *Endocrine J.* 46, 531-538 (1999)
- 4) Fujimoto, N., Onodera, H., Mitsumori, K., Tamura, T., Maruyama, Ito A Changes in thyroid function during development of thyroid hyperplasia induced by Kojic acid in F344 rats. *Carcinogenesis* 20, 1567-1571 (1999).
- 5) Watanabe H, Uesaka T, Kido S, Ishimura Y, Shiraki K, Kuramoto K, Hirata S, Shoji S, Katoh O, Fujimoto N Gastric tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine in Wistar rats with intestinal metaplasia caused by X-irradiation. *Jpn J Cancer Res* 90, 1207-1211 (1999).

2. 学会発表

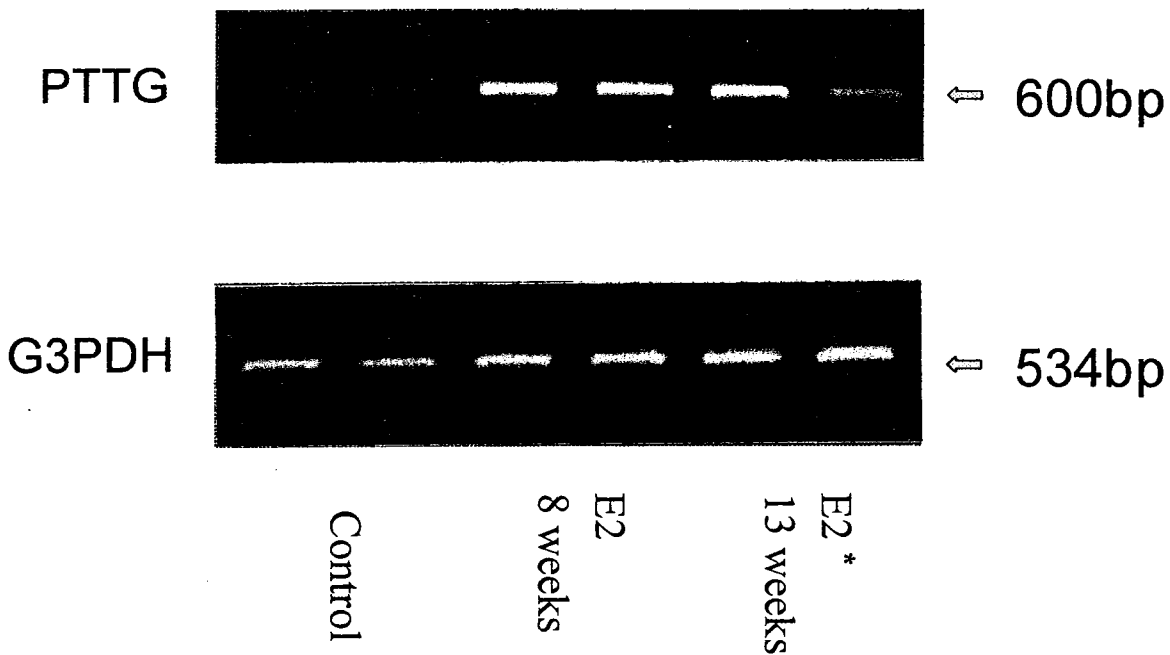
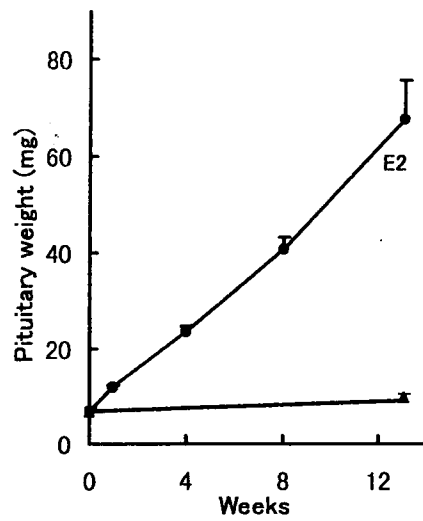
- 1) 藤本成明,丸山聡,伊藤明弘:内分泌かく乱物質によるラット下垂体腫瘍細胞株 MtT/E-2 の増殖.第 72 回日本内分泌学会学術総会,横浜,1999. (日本内分泌学会雑誌,75,123,1999).
- 2) 藤本成明:下垂体.シンポジウム「内分泌臓器の毒性変化と内分泌攪乱化学物質」第 16 回日本毒性病理学会,岐阜,2000.(講演要旨集,7,2000).
- 3) 丸山聡,藤本成明,碓井亜,伊藤明弘:内分泌かく乱物質によるエストロゲン応答性転写活性化-ERE 応答と AP-1 応答の比較検討.第 72 回日本内分泌学会学術総会,横浜,1999.(日本内分泌学会雑誌,75,198,1999).
- 4) 丸山聡,藤本成明,伊藤明弘,浅野耕助,碓井亜:ヒト前立腺癌におけるエストロゲン受容体 α . β mRNA の発現.第 58 回日本癌学会総会,広島,1999.(日本癌学会総会記事,58,665,1999).

5) 丸山聡,藤本成明,浅野耕助,碓井亜,伊藤明弘:内分泌攪乱物質によるAP-1を介するエストロゲン応答性転写活性化.第7回日本内分泌学会ステロイドホルモン分科会,東京,1999.(日本内分泌学会雑誌,75,367,1999).

6) 浅野耕助,藤本成明,丸山聡,碓井亜,伊藤明弘:ラット下垂体のエストロゲン受容体調節における2種のプロモーターの関与について.第7回日本内分泌学会ステロイドホルモン分科会,東京,1999.(日本内分泌学会雑誌,75,367,1999).

7) 浅野耕助,藤本成明,丸山聡,碓井亜,伊藤明弘:ラット下垂体のエストロゲン受容体調節における2種のプロモーターの関与について.ホルモントランスミッター研究会,広島,2000

Fig. 1. Increase in pituitary weight and PTTG mRNA induction by estrogen



* Pellets containing 10mg of E2 were given s.c.

Fig. 2. PTTG mRNA induction by estrogen and serum estrogen levels

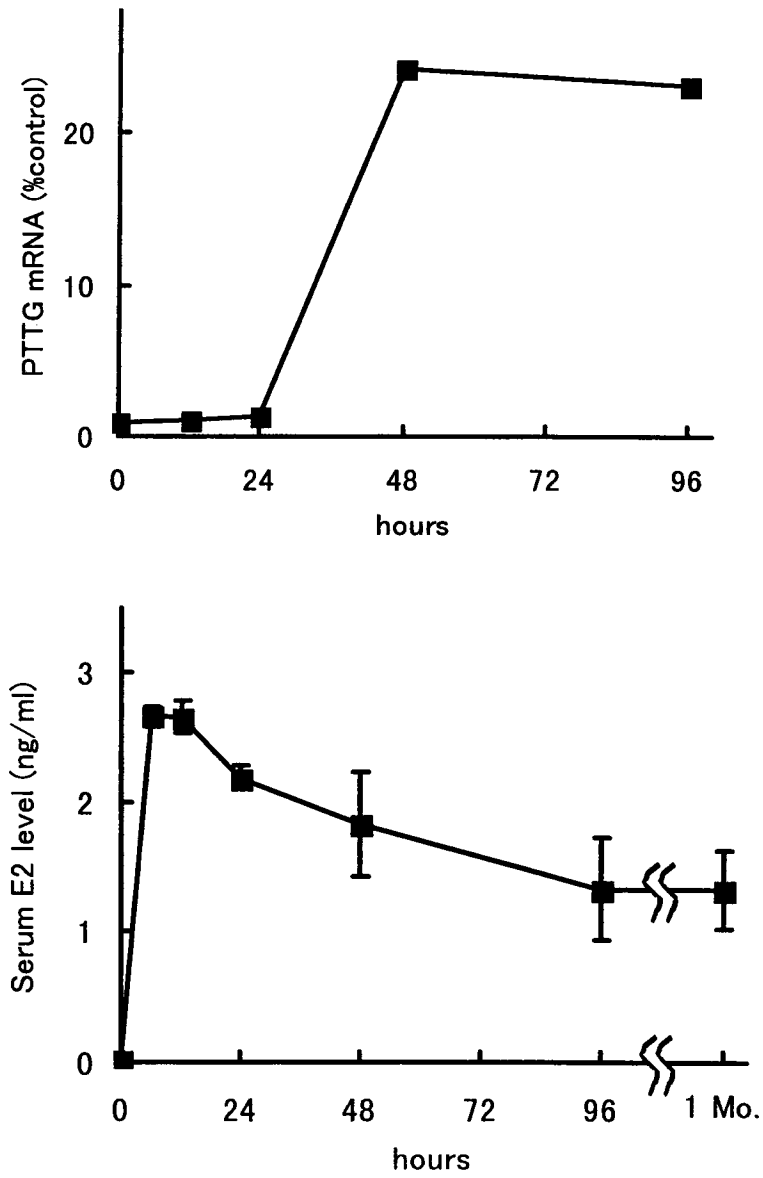


Fig.3. 5'f-PTTG-luc activity and effect of estrogen

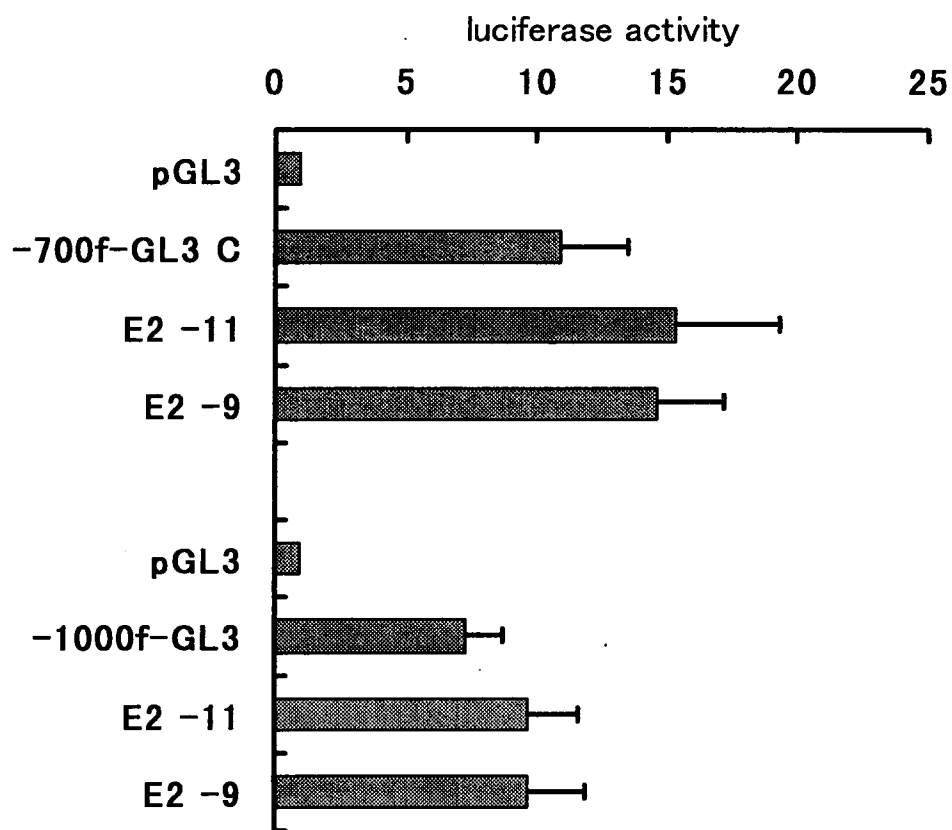


Fig. 4. Effect of nonylphenol (NP) and genistein (GNS) on estrogen responsive growth of MtT/E-2

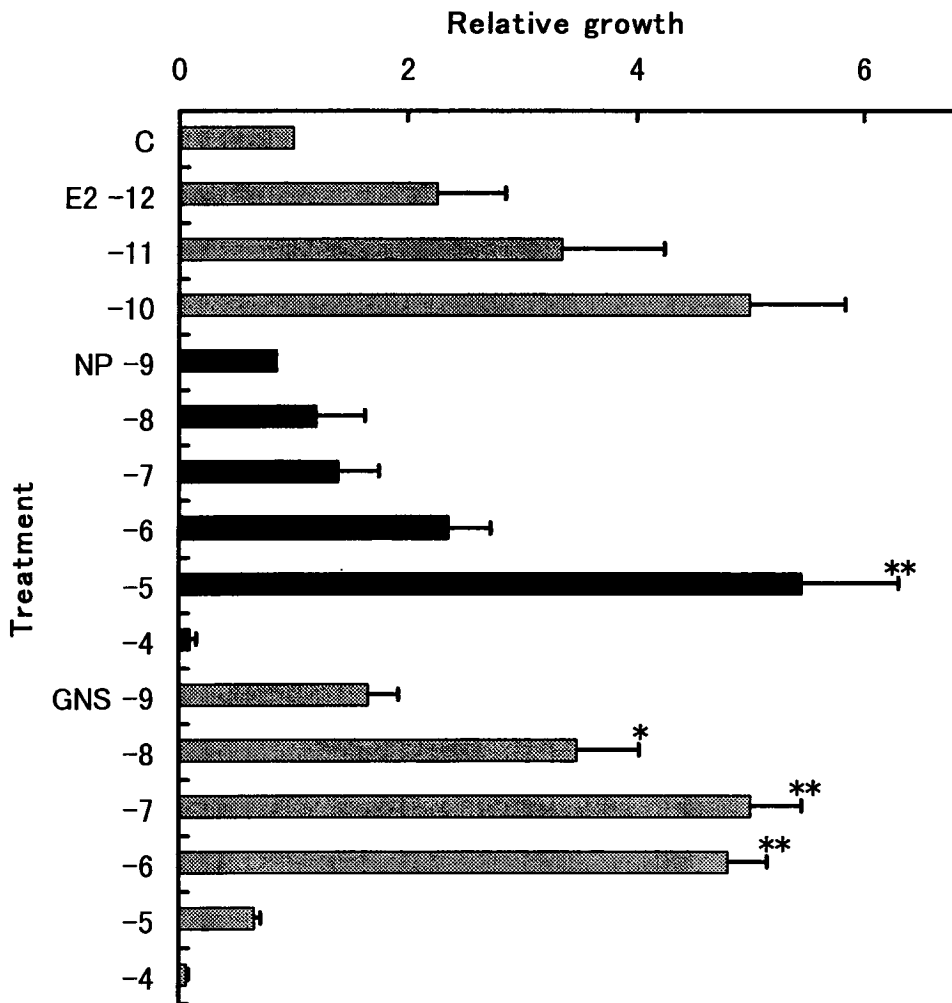


Fig. 5. Effect of nonylphenol (NP) and genistein (GNS) on ERE mediated transcription in MCF-7

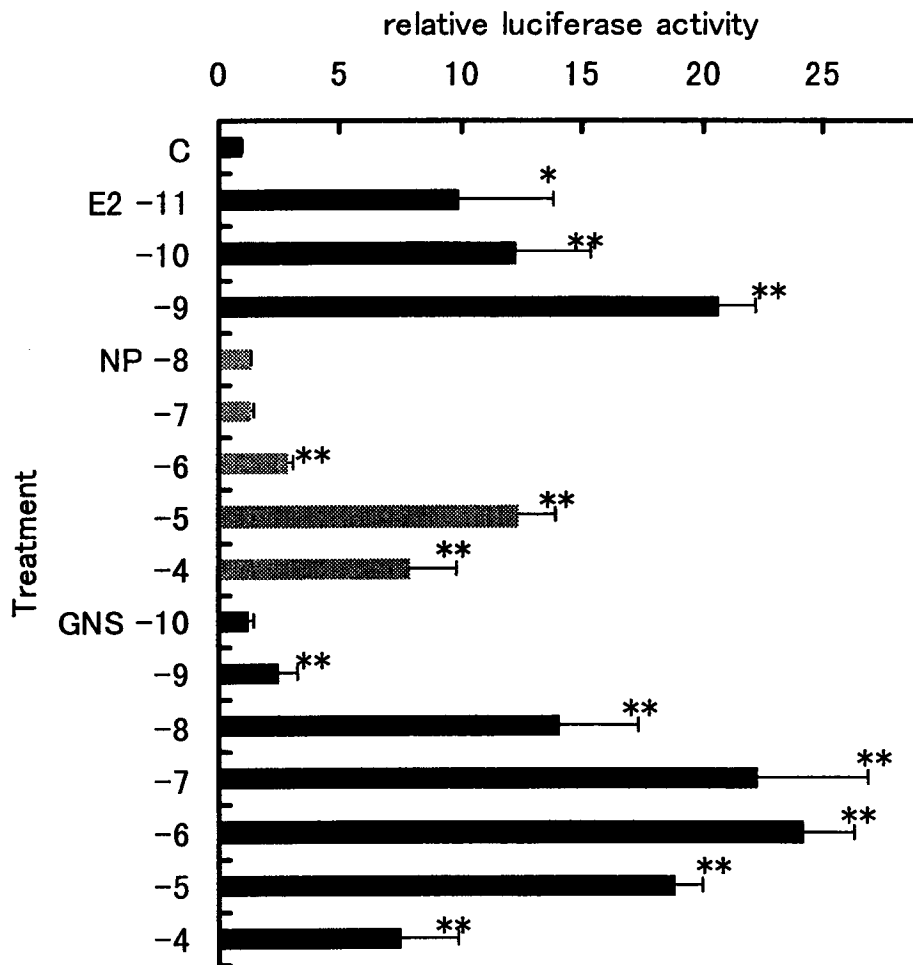


Fig. 6a. The promoter organization of the rat estrogen receptor α gene

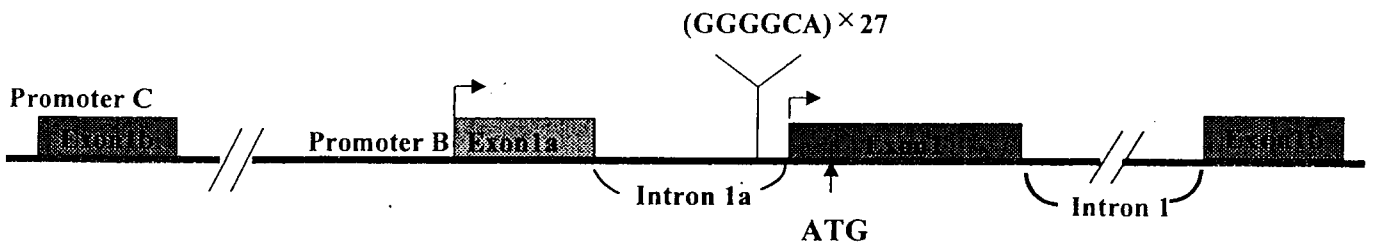


Fig. 6b. RT-PCR detection of promoters B and C in rat liver, uterus and pituitary

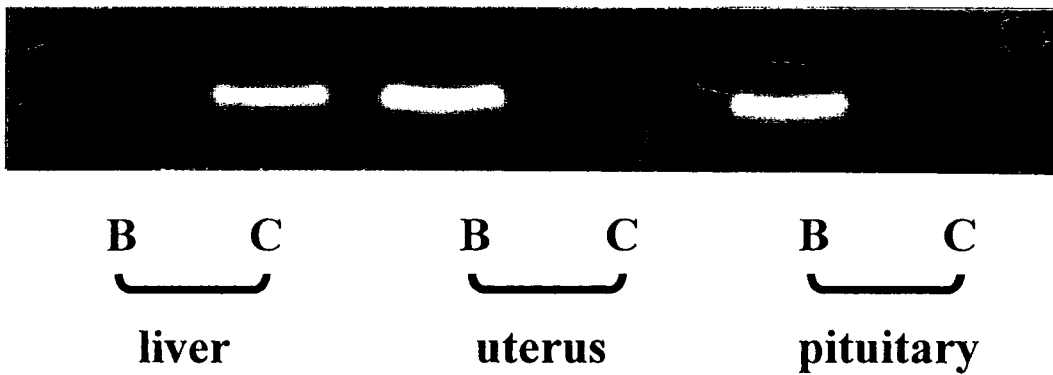


Table 1. Effect of E2, genistein, BPA on PTTG mRNA in the pituitary gland

Treatment	Pit weight (mg)	PTTG mRNA induction	Serum PRL (ng/ml)
C	7.1 ± 0.5	1	5.2 ± 0.8
E2 (0.1mg/day, i.p.)	12.0 ± 0.6	5.0 ± 2.6	64.3 ± 18.2*
Genistein (1mg/day, i.p.)	7.6 ± 0.9	3.5 ± 1.3	7.8 ± 1.0
BPA (1mg/day, i.p.)	6.2 ± 0.2	1.8 ± 0.5	42.1 ± 26.0

Mean ± SE (n=4)

* Pellets containing 10mg of E2 were given s.c. for one week

Table 2a. Increase in pituitary weight by estrogen in different strains of rats

Strain	Control	E2 (4 week) ¹⁾	Increase
F344	7.5 ± 0.1	23.7 ± 1.1**	3.16
Wistar	13.0 ± 2.1	28.7 ± 3.2**	2.21
Brown Norway	4.4 ± 0.2	6.8 ± 0.6**	1.55
Donryu	10.7 ± 1.0	11.2 ± 1.0	1.05

1) A pellet containing 10mg of E2 was given at age of 5 weeks old.

2) Mean±SEM (n=5)

Table 2b. Induction of PTTG mRNA in the pituitary gland by estrogen in different strains of rats

Strain	PTTG mRNA (fold)
F344	5.0 ± 2.6
Wistar	2.5 ± 0.6
Brown Norway	0.6 ± 0.0
Donryu	3.9 ± 0.8

1) Mean±SEM (N=4)