

平成 12 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 下垂体腫瘍モデルにおいて、ノニルフェノール(NP)、ゲニスタイン(GNS) およびアトラジン(Atz)の作用を検討した。NP、GNS はエストロゲン応答性細胞増殖活性を示したが、*in vivo*での作用を、移植腫瘍形成を指標にみると 250ppmGNS のみが促進作用を示した。Atz は *in vivo*、*in vitro*とも作用を示さなかった。また、下垂体腫瘍増殖に関わる癌遺伝子の PTTG およびエストロゲン受容体 のプロモーターについて解析した。今回検討した物質はいずれもこれらの遺伝子発現に影響を与えなかった。

目的

本研究では、エストロゲン応答性増殖細胞であるラット下垂体腫瘍細胞を主なモデルとして、エストロゲン依存性増殖のメカニズムおよびエストロゲン受容体発現調節の解析を通じ、食品中内分泌かく乱物質等の発がん修飾作用を明らかにする。

1) 食品中に潜在的に含まれる可能性のある内分泌かく乱物質、ノニルフェノール(NP)、ゲニスタイン(GNS)、アトラジン(Atz) の発がん修飾作用を、ラット下垂体および移植下垂体細胞をモデルにして検討した。

2) 昨年度の本研究により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。その転写活性の機構を明らかにするため、プロモーター領域の解析をおこなった。

3) 我々はラット下垂体腫瘍において、ER 量が調節されることで、エストロゲン応答性増殖性が調節(修飾)されることを示してきた。一方エストロゲン受容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よく解明されていない。従って、内分泌かく乱物質等による腫瘍増殖修飾の理解においても、エストロゲン受容体調節の機構を明らかにすることは重要であり、ここで解析をおこなった。

材料と方法

試薬類

17 β -エストロゲン、17 β -OH-テストステロンは、Sigma Chemicals, St. Louis, MO, U.S.A. から、ノニルフェノール(NP)は和光純薬(大阪)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用いた。*In vitro* 試験では、各試薬をイソプロパノール溶液としてストックした。

動物

4 週令の雌 F344 ラットを、Charles River Japan (Atsugi)から購入し卵巣摘出をした。飼育条件は、24 \pm 4 $^{\circ}$ C、55 \pm 5% の恒温、恒温、無窓の清潔な飼育室で 12/12 時間の明暗条件下で行った。NIH 変形飼料および水道水を自由摂取とした。5 週令時に下垂体細胞 MtT/E-2 を 3 \times 10⁵/部位で移植した。GNS および NP は 25、250ppm で、また ATZ は 5、50、500ppm で上記飼料に混餌し自由摂取させた。コントロールとして 1.0mg 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。移植腫瘍が生着し径が 20mm 程度になった時点で、動物 w6 屠殺し、血清および下垂体組織を直ちに凍結保存した。

細胞培養および増殖アッセイ

MtT/E-2 細胞、MCF-7 細胞、NIH3T3 細胞の培養はそれぞれ 16 \times 125mm² トレイに含有の DEM/F12 混合培地 (Sigma Chemicals) + 2.5% FBS (Life Technologies) + 7.5% HS (Life Technologies)、DEM 培地 (Sigma Chemicals) + 5% FBS および DEM (Sigma Chemicals) + 5% CS (Life Technologies)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 (和光純薬)を用いた。Competitive RT-PCR

による PTTG 定量下垂体組織の全 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 である (600bp 産物)。PCR に先立ちサブプライマーと同時に、competier DNA(上記プライマー配列を両端にもつ 421bp の DNA)の 0.3-10fg を定量的に加え PCR した。増幅は、Ex-Taq DNase polymerase (Takara, Tokyo) を用い、95℃、30 秒、52.9℃、20 秒、72℃、1 分の 20-30 サイクルで行った。産物は、1.5%アガロースゲルで泳動した後、EzView Blue で染色し、画像解析して、competitoer と目的産物の光学濃度の比率が 1:1 になる点を求めることで定量した。

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 内の 5 つの領域について PCR によりサブプライマー DNA から増幅し、TA-クローニング (Invitrogen, Groninger, The Netherlands) した。これを、レポータープラスミド pGL3-basic (Promega) に blunt ligation で導入した。また、エストロゲン応答性転写活性化のサイトには、(ERE)₃-SV40-luc を用いた。

また、サブプライマー ER の 5' 上流域の B プライマー(-2100 ~ -3155)の解析もこの領域内のサブプライマーを PCR クローニングして上記と同様にレポーターを作成した。

トランスフェクション

細胞を、24 穴プレートに $4-8 \times 10^4$ / well で播き、24 時間後に、TransFast transfection reagent (Promega) を用いて全量で 0.8ug 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。

結果

1. 下垂体細胞増殖サイトおよび ERE 転写活性化サイトによる *in vitro* エストロゲン活性

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. 1 である。GNS は 10^{-8} M で有意な増殖促進活性がみられた(ただし 10^{-5} M 以上では増殖抑制)のに対し、NP は 10^{-5} M で有意な促進をみた。また、Atz は 10^{-4} M まで活性はなかった。さらに、(ERE)₃-SV40-luc レポーターによるエストロゲン依存性転写活性化のサイト結果は、Fig.2 に示したとおりで、増殖サイトとよく一致した。

2. 移植下垂体腫瘍細胞腫瘍形成試験

MtT/E-2 腫瘍形成促進作用を試験結果を Fig 3 および 4 に示す。250ppm までの NP および 500ppm までの Atz は移植下垂体細胞腫瘍形成に影響しなかったが、GNS の 250ppm 群で有意な生着期間の短縮が見られた。いずれの薬剤も子宮重量に有意な影響は与えなかった。

3. 原発性下垂体腫瘍化、PTTG 発現および PRL 産生への作用

エストロゲン群においては下垂体重量が増加し、過形成となったが、NP、GNS および Atz のいずれも下垂体の重量に影響を与えなかった(Fig. 5)。また、下垂体の PTTG mRNA 発現にも影響は見られなかった。血中プロラクチンレベルは、エストロゲン群で有意に上昇していたが、他のいずれの群でも有意な増加は観察されなかった。

4. PTTG 遺伝子の発現プライマーの解析

PTTG 遺伝子上流域のプライマー活性を検討した結果、-542/+43 で最大の基本転写活性があることが示された(Fig.6)。また、エストロゲン受容体の存在下でエストロゲン依存的なこのプライマーの転写活性化作用が示された(Fig.7)。さらに、その応答は受容体の α 型に特異性があった。

5. 下垂体でのエストロゲン受容体発現とプライマー

サブプライマーエストロゲン受容体 遺伝子上流域-3155/-2100 およびその部分配列をもつレポーターは、下垂体細胞および乳がん細胞において基本転写活性化能を示すことが示された(Fig.8)。また、その転写活性に対する NP、GNS、Atz の作用を検討したが有意な影響は観察されなかった(Fig 9)。

考察

本研究では、食品中内分泌かく乱物質による発がん修飾作用を検討する目的で、

NP, GNS および Atz の作用をラット下垂体腫瘍形成を指標に検討した。さらに下垂体腫瘍増殖に関わる 2 つの遺伝子 PTTG およびエストロゲン受容体の発現調節作用を解析した。

ラット下垂体は、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ンになることは古くから知られてきた。エストロゲンに対する反応性の程度は系統依存的であることは昨年度本研究で示した通りであるが、F344 ラットの系は、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りモデルである。本研究では、我々が樹立したエストロゲン応答性下垂体細胞株 MtT/E-2 の細胞増殖およびそのラット移植実験により、内分泌かく乱物質の腫瘍プロモーション過程に与える作用をみた。その結果、*in vitro* におけるエストロゲン作用は、GNS NP の順に強く、Atz は活性を示さなかった。この作用は、経口投与での移植細胞の腫瘍化促進において同様であった。Atz は、*in vivo* においては下垂体系に対し腫瘍化やプロラクチン分泌の促進作用があると報告されてきたが、本研究の最大 500ppm までの経口投与では、そのような作用は全く見られなかった。

ラット下垂体腫瘍に高発現するがん遺伝子として近年 PTTG が見いだされた。我々は、この遺伝子がエストロゲンにより調節されており、それがホルモン依存性の腫瘍化に関与すること示してきたが、そのプロモーター域にエストロゲン応答配列 (ERE) は存在しない。そこでその発現調節機構を明らかにする目的で、PTTG 上流のプロモーター解析を行った。レポーター実験の結果、エストロゲン受容体存在下での、エストロゲンによる転写活性化がエッセイ化できること示すことができた。しかし、エストロゲン応答性に特異的に関与する因子は特定できなかった。興味深いことに、エストロゲン受容体存在化では、E2 による転写活性化は見られなかったが、*in vivo* では転写が誘導された。同じ系に ERE-luc レポーターを導入した場合には、エストロゲン受容体との転写活性化能に差はなかった。つまり PTTG の応答はエストロゲン受容体との生理機能の違いを示している。

我々は、下垂体腫瘍増殖に関して、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。エストロゲン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。下垂体細胞、少

なくとも成長ホルモン分泌細胞では、エストロゲン受容体の β 型が主に発現している。昨年度の研究で、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。そこで、今回プロモーター B 領域をクローニングしてそのプロモーター作用を解析した。B 領域全体にわたるレポーターおよびその部分配列をもつレポーターの転写活性化を比較してみても、特異的な転写活性化領域は存在せず、転写活性化の強さはプロモーターの長さに依存しているのみであった。これは、 β 型のエストロゲン受容体でのプロモーター活性で報告されていることと同様であった。また、今回検討した下垂体細胞および乳がん細胞の系で見ると、このプロモーターに、*in vivo* で見られるような甲状腺ホルモン等への応答性は見られなかった。また、NP、GNS、Atz も作用を示さなかった。

結論

1. *in vitro* アッセイにおいて、GNS は比較的強い NP は弱いエストロゲン活性を示し、Atz はエストロゲン作用を示さなかった。NP および Atz の経口投与は、原発性下垂体腫瘍化を引き起こさないのみならず、腫瘍化のプロモーション作用も示さなかった。しかし、高濃度の GNS 経口投与は *in vivo* において下垂体腫瘍化形成に関わりうることを示唆された。

2. 下垂体腫瘍化に伴い癌遺伝子 PTTG の発現が上昇すること、および PTTG の発現はエストロゲン応答性であることが示してきた。その応答はエストロゲン受容体依存的であり、かつ受容体の β 型での転写活性様式が異なっていることが示された。

3. エストロゲン受容体遺伝子上流域 “B” をクローニングし転写活性化能があることを示した。しかし、このプロモーターを介した受容体発現の調節は示されなかった。

研究発表

1. 論文発表

1) Sugihara, K., Kitamura, S., Sanoh, S., Ohta, S., Fujimoto, N., Maruyama, S.,

- Ito, A. Metabolic activation of the proestrogens trans-stilbene and trans-stilbene oxide by rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 167, 46-54 (2000)
- 2) Maruyama, S., Fujimoto, N., Asano, K., Ito A., Usui, T. Expression of estrogen receptor α and β mRNAs in prostate cancers treated with leuprorelin acetate. *Euro Urol*, 38, 635-639 (2000)
- 3) Fujimoto, N., Effects of endocrine disruptors on the pituitary gland. *J. Toxicol. Pathol.* in press (2001)
- 4) 藤本成明：下垂体細胞を用いた試験系：今井他（編）内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法、シュプリンガーフェアラーク東京（2000）
2. 学会発表
- 2) 藤本成明，丸山聡，浅野耕助，伊藤明弘：ラット下垂体における pttg のエストロゲンによる調節. 第 73 回日本内分泌学会学術総会，京都，2000 (日本内分泌学会雑誌，76，119，2000). 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 種のプロモータの関与について. 第 73 回日本内分泌学会学術総会，京都，2000(日本内分泌学会雑誌，76，237，2000).
- 3) 丸山聡，藤本成明，浅野耕助，碓井亜，伊藤明弘：ヒト前立腺癌におけるエストロゲン受容体 mRNA の発現. 第 88 回日本泌尿器科学会総会，札幌，2000.
- 4) 藤本成明，丸山聡，伊藤明弘：エストロゲンによるラット下垂体腫瘍化と pttg 発現. 第 59 回日本癌学会総会，横浜，2000 (日本癌学会総会記事，59，3315，2000).
- 5) 丸山聡，藤本成明，伊藤明弘，浅野耕助，碓井亜：前立腺のホルモン依存性増殖とエストロゲンレセプター発現. 第 59 回日本癌学会総会，横浜，2000. (日本癌学会総会記 59，3330，2000).
- 6) Fujimoto, N., Maruyama, S., Ito, A. Opposite roles of ER and ER on estrogen receptor - AP-1 mediated transactivation. *Keystone Symposia, Co. USA*, 2000
- 7) Fujimoto N., Yin H., Maruyama S., Asano K., Ito A. Strain difference in estrogen regulation of pttg (pituitary tumor transforming gene) in the rat pituitary gland International congress of endocrinology, Sydney, Australia, 2000.
- 8) Maruyama S., Fujimoto N., Asano K., Ito A., Usui T. Regulation of estrogen receptor and in rat prostate. Sydney, Australia, 2000.
- 9) 藤本成明，殷宏，丸山聡，伊藤明弘，浅野耕助：ラット下垂体における PTTG (Pituitary Tumor Transforming Gene) のエストロゲン (E2) による調節. 第 23 回日本分子生物学会，神戸，2000
- F. 藤本成明，丸山聡，浅野耕助，伊藤明弘，殷宏：ゲニスタインおよびニルフェノールによるエストロゲン応答性ラット下垂体腫瘍増殖作用. 第 17 回日本毒性病理学会，淡路島，2001