

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

食品中の内分泌攪乱物質等の主要臓器に対する発がん修飾作用の研究

分担研究者 鰐淵 英機 大阪市立大学医学部講師

研究要旨：ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、ノニルフェノールおよびゲニステインの発がん修飾作用を検討した。その結果、ノニルフェノールおよびゲニステインはラット肺腫瘍の発生頻度を対照群に比較し有意に増加させた。また、細胞増殖能のマーカーである BrdU Index はこれらにおいて増加するとともに、酸化了的 DNA 傷害のマーカーである 8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG) の形成の増加が、ノニルフェノールおよびゲニステイン投与肺組織において認められた。さらに、大腸においては、非腫瘍部の BrdU Index がノニルフェノールおよびゲニステイン投与において増加する傾向が見られた。一方、肝における前がん病変のマーカーである glutathione-S-transferase placental type (GST-P) foci の形成は、ノニルフェノールおよびゲニステイン投与により有意に抑制された。

A. 研究目的

食品中の内分泌攪乱物質の主要な臓器における発がん修飾作用をラット多臓器中期発がん性試験法を用いて検討する。発がんリスクに対する評価は一臓器に対するのみでは不十分で、主要な臓器に対して同時に評価する必要がある。ラット多臓器中期発がん性試験法を用いると多種類の発がん物質によるイニシエーションの後、被検物質を投与することにより主要臓器に対する発癌修飾作用を検討でき、発がんリスク評価として有用である。ノニルフェノールは内分泌攪乱化学物質であるとの疑いがもたれている。また、ゲニステインは大豆などに多く含まれ、植物由来の内分泌攪乱化学物質である。そこで、ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、これらを経口投与し、主要臓器における発がん修飾作用を

検討した。

B. 研究方法

6 週齢の F344Du/Crj 系雄ラット 124 匹を 8 群に分け、Fig. 1 に示すデザインで動物実験を施行した。すなわち、第 1～第 5 群（各群 20 匹ずつ）に実験開始日に diethylnitrosamine 100mg/kg b.w. を腹腔内投与、N-methylnitrosourea を第 2、第 5、第 8、第 11 日に 20mg/kg b.w. の用量で腹腔内投与、dimethylhydrazine を第 14、第 17、第 20、第 23 日に 40mg/kg b.w. を腹腔内投与、それらと平行して第 1～第 2 週に N-butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine を 0.05% の濃度で飲料水投与、第 3～第 4 週に 2,2-hydroxy-di-n-propylnitrosamine(DHPN) を 0.1% の濃度で飲料水投与しイニシエーション処置 (DMBDD) とした。実験開始後 5 週目から内分泌攪乱物

質のノニルフェノールを第1群と第2群にそれぞれ29週間250ppm、25ppmで混餌投与、同様に第3群と第4群にはゲニステインをそれぞれ29週間250ppm、25ppmで混餌投与した。第5群には同様のイニシエーション処置後、通常の粉末飼料を与えた。また併置対照群として第6～第7群（各群8匹ずつ）にはイニシエーション処置を行わず、5週目からそれぞれ、ノニルフェノールを250ppm、ゲニステインを250ppmで混餌投与した。第8群（8匹）は無処置群とした。実験開始後33週間後に全生存例をエーテル麻酔下で脱血致死させ、主要臓器を摘出し病理組織学的に検索した。

C. 研究結果

第2群の一例が発癌物質の腹腔内投与中に動脈の穿刺により死亡した。同群の1例で実験開始後17週目から血便が出現、さらにもう1例で22週目から歩行困難と羸瘦が出現したため、それぞれ実験開始後25週、22週で切迫屠殺した。その結果それぞれ直腸と頭蓋底に腫瘍を認めた。第5群の1例が30週目に頬部の腫瘍で死亡した。第3群の1例が32週で死亡、血性胸水約20mlと左腎に腫瘍を認めた。第6群の1例が9週目に死亡したが原因は不明であった。

全生存例において体重推移はイニシエーション群間、非イニシエーション群間において有意差は認められなかった（Fig.2）。食餌摂取量、飲水量では非イニシエーション群がイニシエーション群に比べて増加する傾向が見られた。臓器重量では肝、腎、精巣でイニシエーション群間で有意差は認められなかった（Table 1）。アンドロゲンの影響を受けると言われて

いる肛門挙筋球海綿体の重量において第1群、第2群が第5群に比べて有意に減少していた。また、前立腺の重量も第1群と第4群で対照群の第5群に比較し有意に減少していた（Table 2）。しかし、非イニシエーション群において、ノニルフェノールを250ppm、ゲニステインを250ppmで混餌投与した群ではこれらの重量に、対照群との間に有意な差は認められなかった。腫瘍の発生に関しては、イニシエーション群において肺の腫瘍発生がノニルフェノール、ゲニステイン投与群で対照群に比較し有意に増加した（Table 3）。肺腫瘍のラット1匹あたりの発生個数はTable 4の通りで、ゲニステイン250ppm群で肺腺腫が有意に増加していた。それ以外の臓器では、腫瘍を認めたが、発生頻度に対照群と有意な差は認められなかった（Table 5）。肺組織の非腫瘍部における細胞増殖能の指標であるBrdU labeling indexがノニルフェノール、ゲニステイン投与群で対照群に比較し、有意に増加していた（Fig. 3）。また、大腸においてもノニルフェノール、ゲニステイン投与群で腫瘍発生が有意差はないものの対照群に比較し増加傾向が見られ（Table 5）、また、BrdU labeling indexは対照群に比較し、有意に増加していた（Fig. 4）。一方、肝の前がん病変の指標であるglutathione-S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢はノニルフェノール、ゲニステイン投与した群で対照群に比し、有意にその数および面積が減少していた（Fig. 5）。また、肺発がん促進作用の機序解明のために、DHPNでイニシエーション後ノニルフェノールとゲニステインを4週間投与した肺組織の酸化ストレスの指標である8-hydroxy-

deoxyguanosine (8-OHdG)を検索したところ、これらの群で対照群に比し、8-OHdGの形成が上昇していた。

D. 考察

体重に関して、ゲニステイン、ノニルフェノール群ともに影響を及ぼさなかった。一方、イニシエート群においてノニルフェノールおよびゲニステイン投与した群で肛門挙筋球海綿体および前立腺の重量が影響を受け、有意に減少したが、これには用量相関は見られず、非イニシエート群でのノニルフェノールおよびゲニステイン投与した群でこれらの重量が影響を受けていないことより、ゲニステイン、ノニルフェノールの直接的な内分泌攪乱作用ではないと判断された。今回、ゲニステイン、ノニルフェノールがイニシエート群において肺腫瘍の発生頻度を増加させ、ラット肺発がんを促進したと判断された。また、有意差はないものの大腸腫瘍の発生頻度も増加させ、大腸発がんも促進させることが疑われた。これらには、細胞増殖の亢進が見られ、促進の機序の一因と考えられた。さらに、肺における8-OHdG形成の増加から酸化ストレスの関与が疑われた。内分泌攪乱化学物質のヒト発がんに及ぼす影響を明かにすることは極めて重要で、本研究においてノニルフェノールおよびゲニステインの作用を明かにすることにより、内分泌攪乱物質のヒトへのリスクアセスメントに対する科学的な情報の一端を与えることができよう。

E. 結論

ラット多臓器中期発がん性試験法をもちいて、ノニルフェノール、ゲニステインの発がん修飾作用を検討し

た結果、これらはラットの肺および大腸発がんを促進することが明らかになった。

F. 研究発表

(論文発表)

1. Sukata, T., Ozaki, K., Uwagawa, S., Seki, T., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Okuno, Y., Fukushima, S.: Organ-specific, carcinogen-induced increases in cell proliferation in *p53*-deficient Mice., *Cancer Res.*, 60, 74-79, 2000.
2. Yamamoto, S., Tada, M., Lee, C.C.R., Masuda, C., Wanibuchi, H., Yoshimura, R., Wada, S., Yamamoto, K., Kishimoto, T., Fukushima, S.: *p53* status in multiple human urothelial cancers: assessment for clonality by the yeast *p53* functional assay in combination with *p53* immunohistochemistry., *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 181-189, 2000.
3. Taniyama, T., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Yano, Y., Otani, S., Nishizawa, Y., Morii, H., Fukushima, S.: Chemopreventive effect of 24*R*,25-dihydroxyvitamin D₃ in *N,N*-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis., *Carcinogenesis*, 21, 173-178, 2000.
4. Salim, E.I., Wanibuchi, H., Morimura, K., Kim, S., Yano, Y., Yamamoto, S., Fukushima, S.: Inhibitory effects of 1,3-diaminopropane, an ornithine decarboxylase inhibitor, on rat two-stage urinary bladder carcinogenesis initiated by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine., *Carcinogenesis*, 21, 195-203, 2000.
5. Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Prevention of urinary bladder cancer: The interface between experimental and

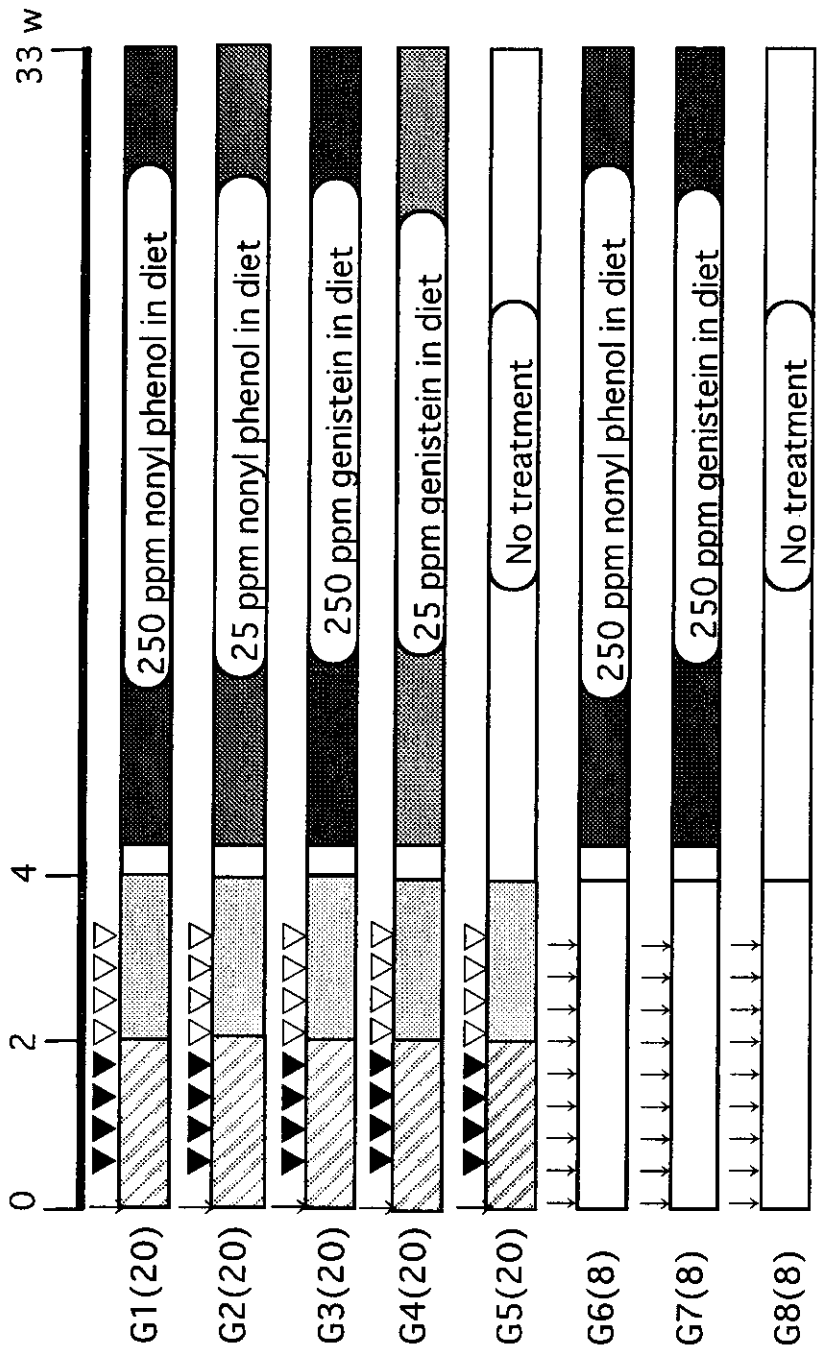
- human studies. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 1, 15-33, 2000.
6. Li, W., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Wei, M., Yamamoto, S., Nishino, H. and Fukushima, S.: Inhibition by ginseng of 1,2-dimethylhydrazine induction of aberrant crypt foci in the rat colon. *Nutrition and Cancer*, 36, 66-73, 2000.
 7. Takaba, K., Saeki, K., Suzuki, K., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Significant overexpression of metallothionein and cyclin D1 and apoptosis in the early process of rat urinary bladder carcinogenesis induced by treatment with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine or sodium L-ascorbate. *Carcinogenesis*, 21, 691-700, 2000.
 8. Romanenko, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Kinoshita, A., Kaneko, M., Vozianov, A. and Fukushima, S.: Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the chernobyl accident. *Int. J. Cancer*, 86, 790-798, 2000.
 9. Vijayaraghavan, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Hakoi, K., Nakae, D., Konishi, Y. and Fukushima, S. : Lack of promoting potential of dimethylarsinic acid in the kidney of male NCI-Black reiter rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 13, 87-91, 2000.
 10. Morikawa, T., Wanibuchi, H., Morimura, K., Ogawa, M. and Fukushima, S. : Promotion of skin carcinogenesis by dimethylarsinic acid in *keratin (K6) / ODC* transgenic mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 579-581, 2000.
 11. Masuda, C., Wanibuchi, H., Sekine, K., Yano, Y., Otani, S., Kishimoto, T., Tsuda, H. and Fukushima, S. : Chemopreventive effects of bovine lactoferrin on *N*-Butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced rat bladder carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 582-588, 2000.
 12. Kitano, M., Wanibuchi, H., Kikuzaki, H., Nakatani, N., Imaoka, S., Funae, Y., Hayashi, S. and Fukushima, S. : Chemopreventive effects of Coumapherine from pepper on the initiation stage of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 674-680, 2000.
 13. Vijayaraghavan, M., Wanibuchi, H., Takada, N., Yano, Y., Otani, S., Yamamoto, S. and Fukushima, S. : Inhibitory effects of S-methylcysteine and cysteine on the promoting potential of sodium phenobarbital on rat liver carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 780-785, 2000.
 14. Kitano, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Sukata, T., Shizusawa, M. and Fukushima, S. : Morphological changes in silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) related to proliferative activity in glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive foci of rat liver. *J. Toxicol. Pathol.*, 13, p.261-264, 2000.
 15. Murai, T., Mori, S., Hosono, M., Iwakura, Y., Oohara, T., Makino, S., Takeda, R., Koide, A., Mori, Y., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Differences among three sister strains of NON/Shi mice in sensitivity to urinary tract carcinogenesis by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *J. Toxicol. Pathol.*, 13, p.225-229, 2000.
 16. Wei, M., Wanibucchi, H., Yamamoto, S., Iwai, S., Morimura, K., Nomura, T., Takayama, R. and Fukushima, S. :

Chemopreventive effects of S-methylcysteine on rat hepatocarcinogenesis induced by concurrent administration of sodium nitrite and morpholine. *Cancer Lett.*, 161, p.97-103, 2000.

Annual meeting of American Association for Cancer Research. March 24-28, 2001, New Orleans, LA, USA.

(学会発表)

1. 清家則孝、鰐淵英機、西川隆之、小川元女、加国雅和、星学、土井賢一郎、須方督夫、福島昭治：内分泌攪乱化学物質の発癌修飾作用：ラット多臓器発癌モデルによる検討 第7回日本がん予防研究会、7月14-15日、兵庫県淡路、2000.
2. 清家則孝、鰐淵英機、西川隆之、小川元女、加国雅和、須方督夫、福島昭治：内分泌攪乱化学物質の発癌修飾作用：ラット多臓器発癌モデルによる検討 第59回日本癌学会総会、10月4-6日、横浜、2000.
3. 清家則孝、鰐淵英機、三橋誠、小川元女、市原敏夫、福島昭治：内分泌攪乱化学物質の発癌修飾作用：ラット多臓器発癌モデルによる検討 第17回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、兵庫県淡路、2001.
4. Seike, N., Wanibuchi, H., Nishikawa, T., Ogawa, M., Kaneko, M., Fukushima, S.: Modifying effects of endocrine disrupting chemicals on multiorgan carcinogenesis in F344 rats. 92nd



Animals ; male F344 rats, 6 weeks old

↓ : DEN ; diethylnitrosamine 100 mg/kg i.p. once in the beginning

▼ : MNU ; N-methylnitrosourea 20 mg/kg i.p. in days: 2, 5, 8 and 11 (4 times)

▽ : DMH ; dimethylhydrazine 40mg/kg s.c. in days: 14, 17, 20 and 23 (4 times)

▨ : BBN ; N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine 0.05% in drinking water weeks 1 and 2

▩ : DHPN ; 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine 0.1% in drinking water weeks 3 and 4

↓ : Saline

Fig. 1 実験デザイン

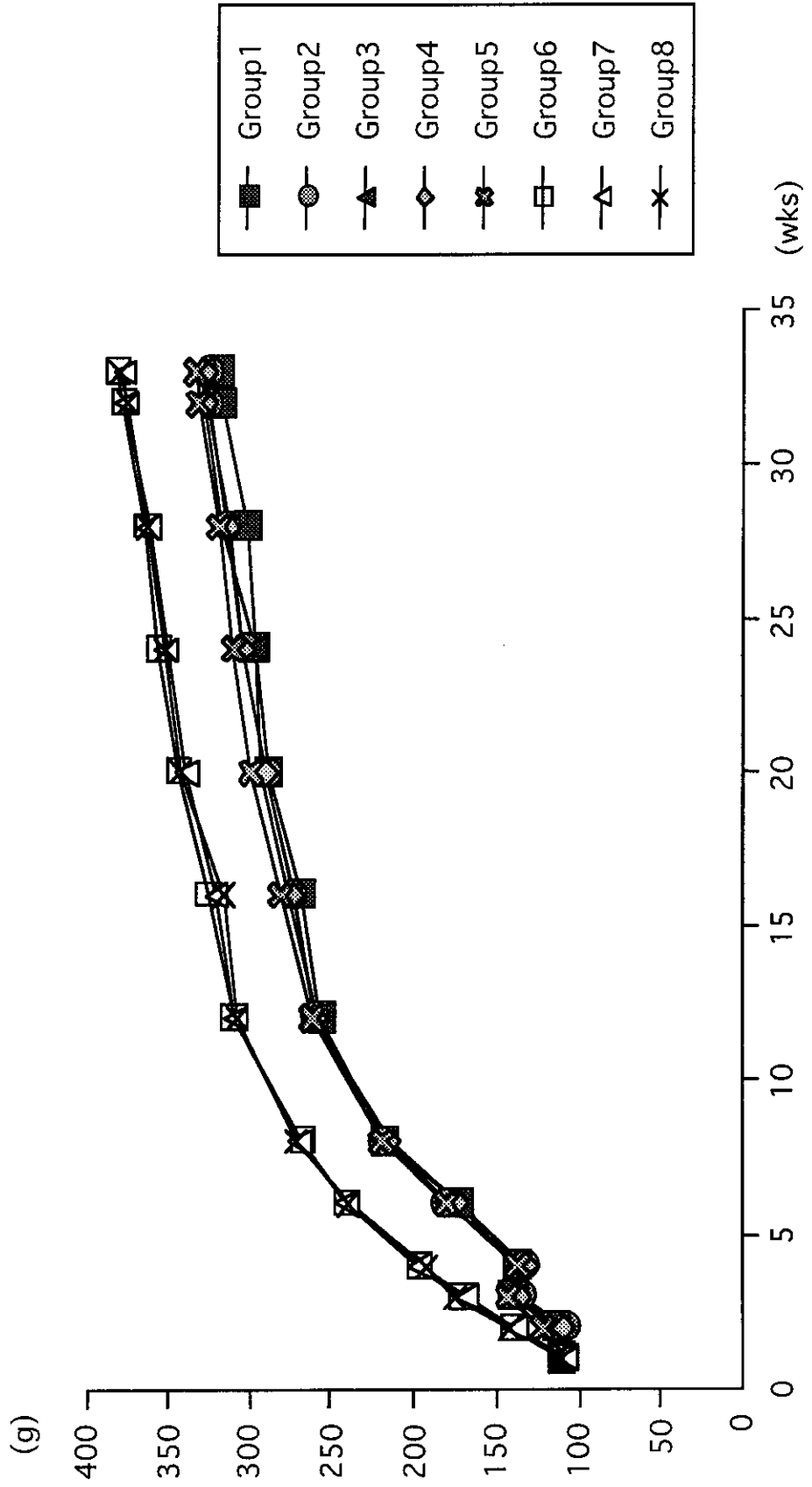


Fig. 2 Growth curves

* : Significantly different from group 5 at $p < 0.05$

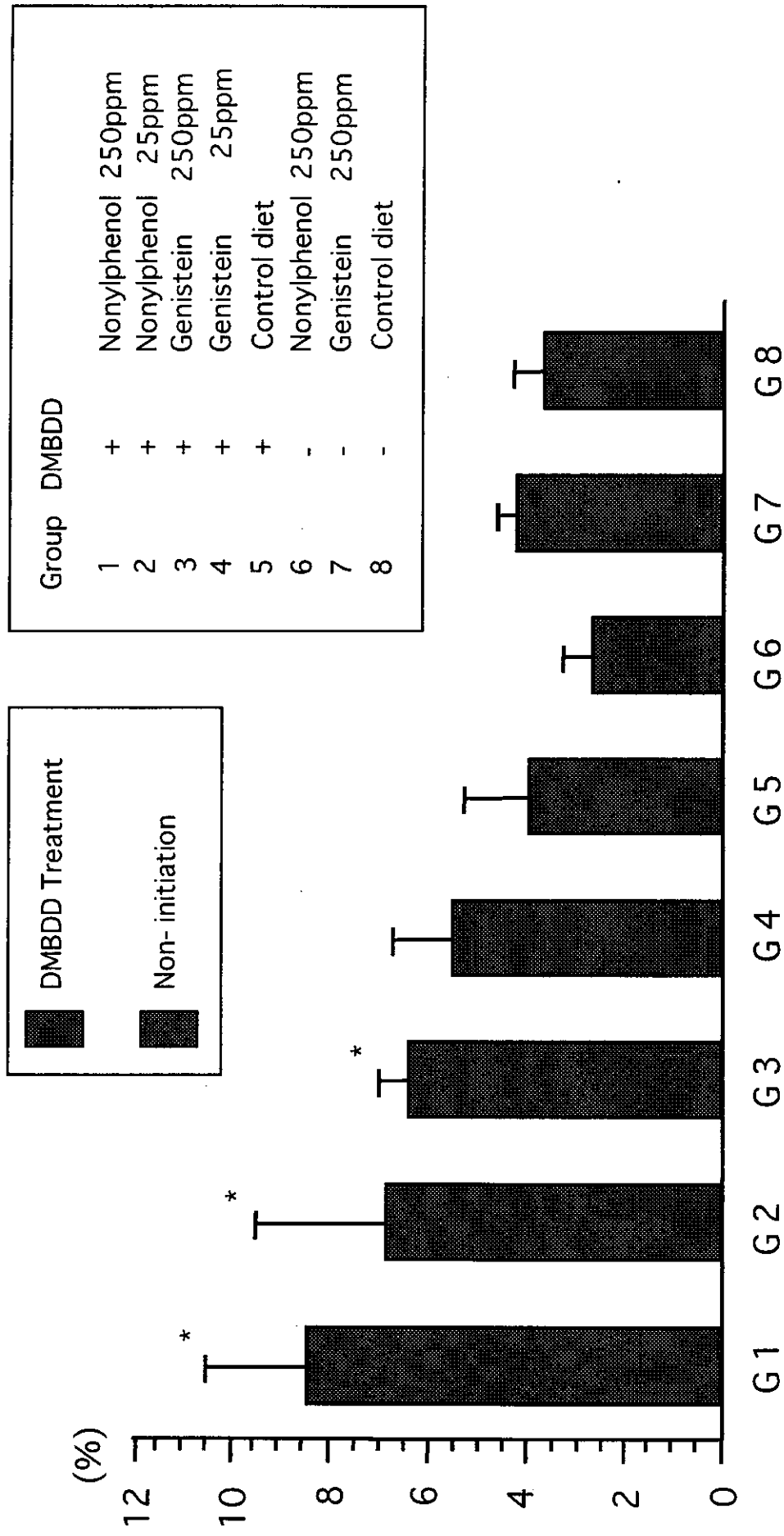


Fig. 3 BrdU Labeling Indices of Non-tumorous Lung Tissue

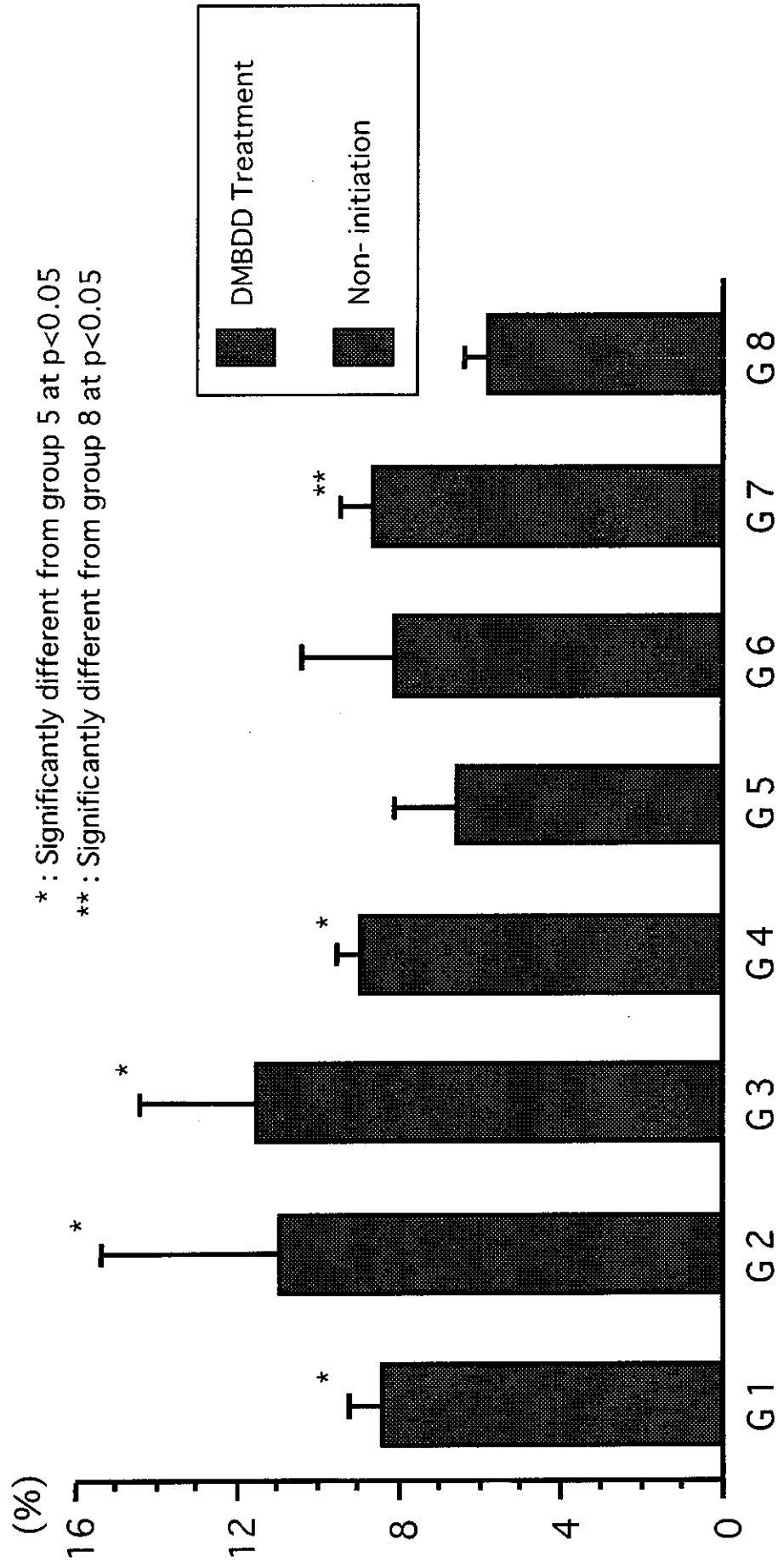


Fig. 4 BrdU Labeling Indices of Non-tumorous Colon Epithelium

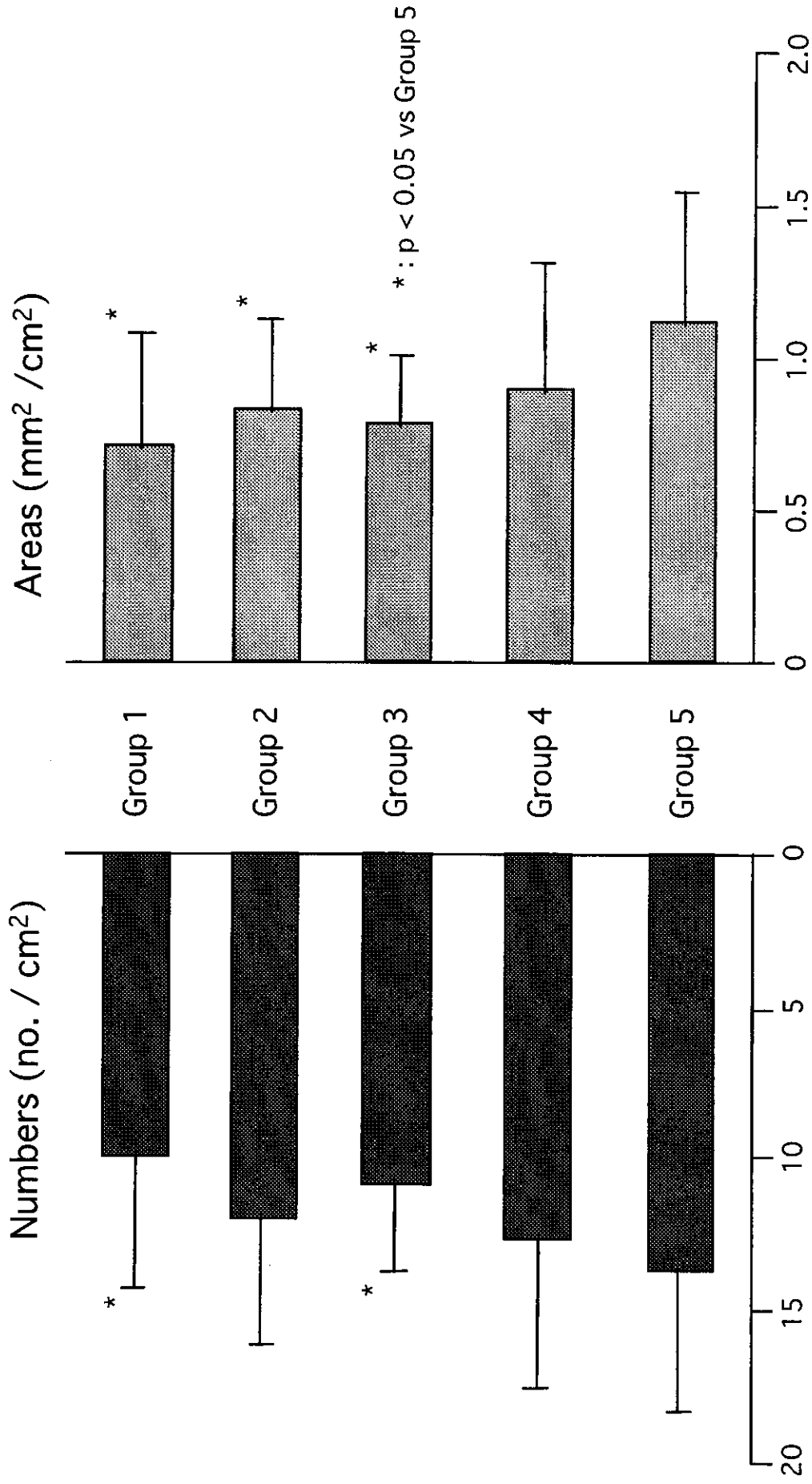


Fig. 5 GST-P-positive Foci in the Liver

Table 1 Final Body Weight and Relative Organ Weight

Group No.	Treatment		Effective No. of Animal	Final Body Weight (g)	Relative Organ Weight (%)	
	DMBDD	Food			Liver	Kidney
1	+	Nonylphenol 250ppm	20	320	2.82	0.63
2	+	Nonylphenol 25ppm	17	326	2.75	0.63
3	+	Genistein 250ppm	19	330	2.66	0.63
4	+	Genistein 25ppm	20	330	2.77	0.63
5	+	Control diet	19	334	2.75	0.62
6	-	Nonylphenol 250ppm	7	382	2.81	0.54
7	-	Genistein 250ppm	8	377	2.50	0.53
8	-	Control diet	8	380	2.44	0.53

Group No.	Treatment		Testis	Muscles Levator Ani	Adrenal Gland
	DMBDD	Food			
1	+	Nonylphenol 250ppm	0.75	0.23 *	0.011
2	+	Nonylphenol 25ppm	0.81	0.22 *	0.011
3	+	Genistein 250ppm	0.81	0.24	0.010
4	+	Genistein 25ppm	0.84	0.24	0.010
5	+	Control diet	0.74	0.25	0.010
6	-	Nonylphenol 250ppm	0.85	0.24	0.010
7	-	Genistein 250ppm	0.84	0.25	0.009
8	-	Control diet	0.86	0.24	0.009

Values are mean

* : significantly different from group 5 at p<0.05 ** : significantly different from group5 and 8

*** : significantly different from group 8

Table 2 Relative Organ Weight

Group	Treatment		Effective No. of Animal	Relative Organ Weight of Prostate (%)		
	DMBDD	Food		Ventral	Dorsolateral	Total
1	+	Nonylphenol 250ppm	16	0.11	0.12 [*]	0.23 [*]
2	+	Nonylphenol 25ppm	13	0.11	0.13	0.24
3	+	Genistein 250ppm	13	0.11	0.13	0.24
4	+	Genistein 25ppm	16	0.10 [*]	0.13	0.24 [*]
5	+	Control diet	17	0.11	0.14	0.26
6	-	Nonylphenol 250ppm	6	0.11	0.14	0.25
7	-	Genistein 250ppm	6	0.11	0.14	0.25
8	-	Control diet	6	0.12	0.14	0.25

Values are mean * : significantly different from group 5 at p<0.05

Table 3 Incidences of Neoplastic Lesions in Lung

	Nonylphenol 250 ppm	Nonylphenol 25 ppm	Genistein 250 ppm	Genistein 25 ppm	Control diet
	1 (n=20)	2 (n=17)	3 (n=19)	4 (n=20)	5 (n=19)
Hyperplasia	20 (100)	17 (100)	19 (100)	20 (100)	19 (100)
Adenoma	11 (55.0)	12 (70.6)	13 (68.4)	12 (60.0)	8 (42.1)
Adenocarcinoma	9 (45.0)	6 (35.3)	8 (42.1)	7 (35.0)	3 (15.8)
Squamous cell carcinoma	1 (5.0)	0	0	0	0
Adeno-squamous cell carcinoma	0	0	0	1 (5.0)	0
Adenoma + Carcinoma	15 (75.0)*	14 (82.4)*	16 (84.2)*	15 (75.0)*	8 (42.1)

Parenteses show percent incidence

*: Significantly different from group 5 at $p < 0.05$

Table 4 Multiplicities of Neoplastic Lesions in Lung

	Nonylphenol 250 ppm	Nonylphenol 25 ppm	Genistein 250 ppm	Genistein 25 ppm	Control diet
	1 (n=20)	2 (n=17)	3 (n=19)	4 (n=20)	5 (n=19)
Hyperplasia	12.1 ± 3.6	11.8 ± 3.8	10.0 ± 3.0	13.7 ± 2.6*	11.6 ± 3.2
Adenoma	1.1 ± 1.3	0.8 ± 0.6	1.3 ± 1.1*	0.9 ± 0.9	0.6 ± 0.9
Adenocarcinoma	0.5 ± 0.6	0.5 ± 0.9	0.5 ± 0.6	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.5
Adenoma + Carcinoma	1.6 ± 1.5	1.3 ± 1.1	1.8 ± 1.2	1.2 ± 1.0	0.8 ± 1.3

Parentheses show percent incidence

*: Significantly different from group 5 at p<0.05

Table 5 Incidences of Neoplastic Lesions in Various Organs

	Nonylphenol 250 ppm	Nonylphenol 25 ppm	Genistein 250 ppm	Genistein 25 ppm	Control diet
Thyroid gland	1 (n=20)	2 (n=17)	3 (n=19)	4 (n=20)	5 (n=19)
Hyperplasia	1 (5.0)	0	1 (5.3)	0	0
Adenoma	0	0	0	2 (10.0)	1 (5.3)
Carcinoma	4 (20.0)	4 (17.6)	0	1 (5.0)	5 (26.3)
Urinary bladder					
PN hyperplasia	4 (20.0)	2 (11.8)	2 (10.5)	3 (15.0)	3 (15.8)
Papilloma	1 (5.0)	3 (17.6)	3 (15.8)	4 (20.0)	3 (15.8)
TCC	2 (10.0)	4 (23.5)	0	4 (20.0)	1 (5.3)
Liver					
HCC	0	1 (5.9)	0	1 (5.0)	0
Kidney					
Adenoma	0	0	0	0	1 (5.3)
Nephroblastoma	8 (40.0)	11 (64.7)	7 (36.8)	7 (35.0)	10 (52.6)
RCC	0	1 (5.9)	2 (10.5)	0	2 (10.5)
Colon					
Adenoma	1 (5.0)	0	1 (5.3)	1 (5.0)	0
Adenocarcinoma	4 (20.0)	4 (23.5)	2 (10.5)	3 (15.0)	2 (10.5)

Parentheses show percent incidence

*: Significantly different from group 5 at p<0.05

研究報告書

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 α 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として検討した。
- 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 エストラジオール、OH-タモキシフェンは、Sigma

Chemicals, St. Louis, MO, U.S.A.から、ノルフェノール(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、各試薬をエタ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 $^{\circ}$ 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。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)、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。

藤本-1-

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。

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に先立ちサンプルと同時に、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°C、30秒、52.9°C、20秒、72°C、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、エチジウムブロマイトで染色し、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ッド

PTTGレポータープラスミッド作成のため、PTTG構造遺伝子上流域-720~-+16内の5つの領域についてPCRによりラットゲノムDNAから増幅し、TAクローニング(Invitrogen, Groninger, The Netherlands)した。これを、ルシフェラーゼレポーター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アッセイには、(ERE)₃-SV40-lucを用いた。

また、ラットERの5'上流域のBプロモーター(-2100~-3155)の解析もこの領域内のフラグメントを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。

トランジェントトランスフェクション

細胞を、24穴プレートに4-8x10⁴ / 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.下垂体細胞増殖アッセイおよびERE転写活性化アッセイによる*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10⁻⁸Mで有意な増殖促進活性がみられた(ただし10⁻⁵M以上では増殖抑制)のに対し、NPは10⁻⁵Mで有意な促進をみだ。また、Atzは10⁻⁴M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アッセイ結果は、Fig.2に示したとお

りで、増殖アッセイとよく一致した。

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PTTGmRNA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遺伝子の発現プロモーターの解析

PTTG遺伝子上流域のプロモータ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ロモータ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β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ロモーター

ラットエストロゲン受容体α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。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いモデルである。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モデル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モチーフ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 β 存在化では、E2による転写活性化は見られなかったが、タモキシフェン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 α と β 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 α と β 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/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。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依存しているのみであった。これは、ヒトのエストロゲン受容体 α 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 α 、 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の上流域“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方法、シュプリンガーフェアラーク東京 (2000)

2. 学会発表

- 1) 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).

- 2) 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 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 α , β 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 の発現. 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 α and ER β 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 α and β 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
- 10) 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ノ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

Fig.1 Effects of NP, GNS, Atz on MtT/E-2 cell growth

