

Fig.2 Effects of NP, GNS, Atz on ERE mediated transactivation in MCF-7 cells

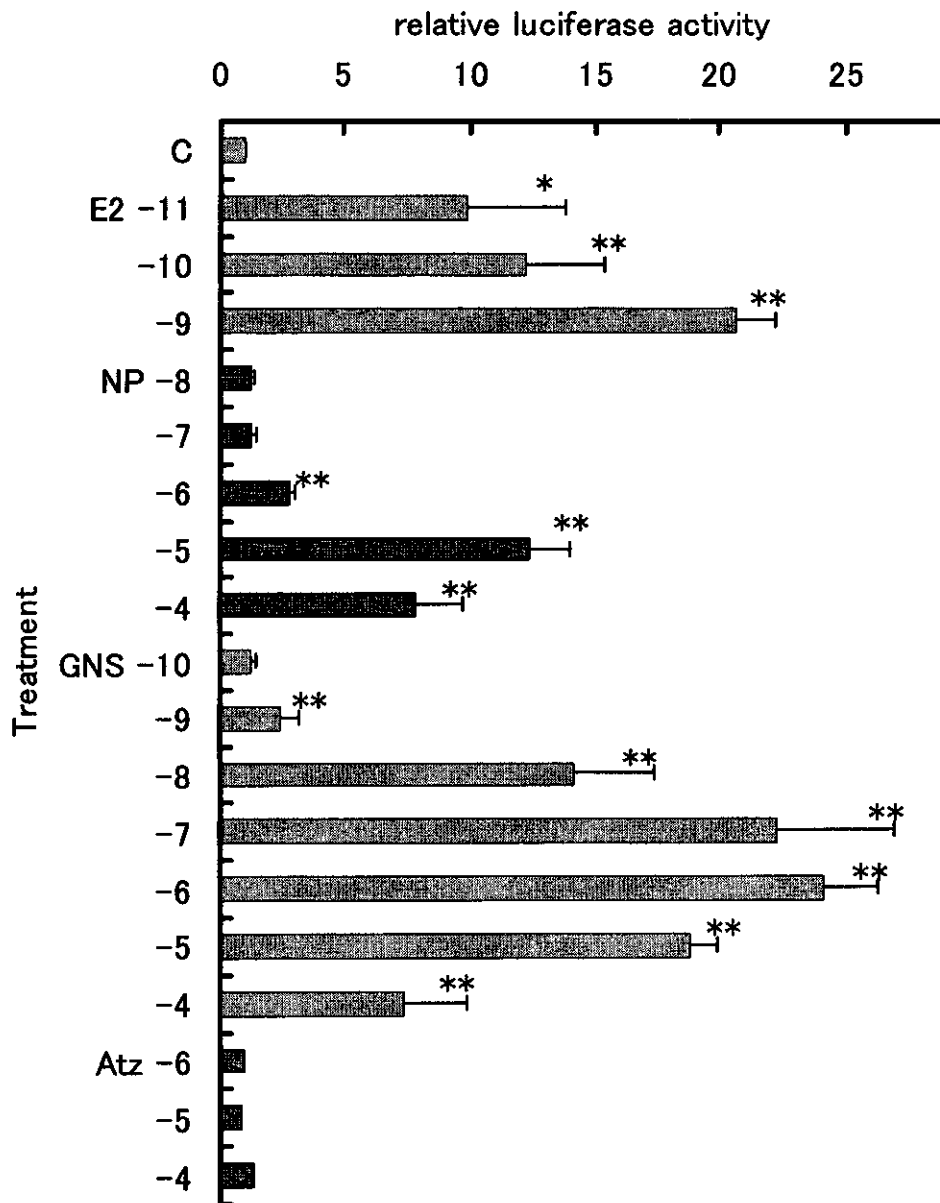


Fig.3 Effects of NP and GNS on MtT/E-2 tumor formation in ovariectomized F344 rats

	Body weight (g)		Ut.W. (mg)
	Initial	Final	
C	73 ± 3.5	43 ± 2.2	43 ± 2.2
E2	70 ± 0.7	321 ± 47.4**	321 ± 47.4**
GNS25	75 ± 1.0	48 ± 6.5	48 ± 6.5
GNS250	78 ± 1.0	39 ± 8.2	39 ± 8.2
NP25	73 ± 1.7	44 ± 2.5	44 ± 2.5
NP250	75 ± 1.5	50 ± 4.8	50 ± 4.8

Mean ± SEM (n=6)

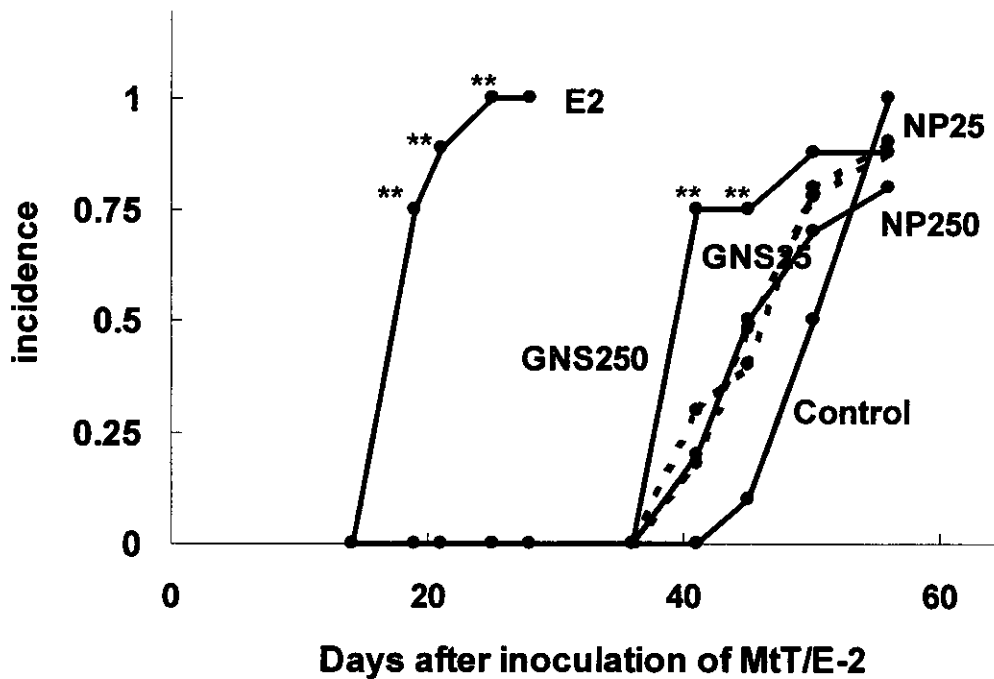


Fig.4 Effects of Atz on MtT/E-2 tumor formation in ovariectomized F344 rats

	Body weight (g)		Ut.W. (mg)
	Initial	Final	
C	100 ± 3.8	134 ± 3.5	80 ± 4.2
E2	103 ± 1.3	111 ± 3.2**	387 ± 29.8**
Atz5	101 ± 2.1	135 ± 4.3	89 ± 5.4
Atz500	99 ± 1.7	134 ± 2.6	84 ± 6.5
Atz500	101 ± 1.0	126 ± 1.4	70 ± 3.9

Mean ± SEM (n=6)

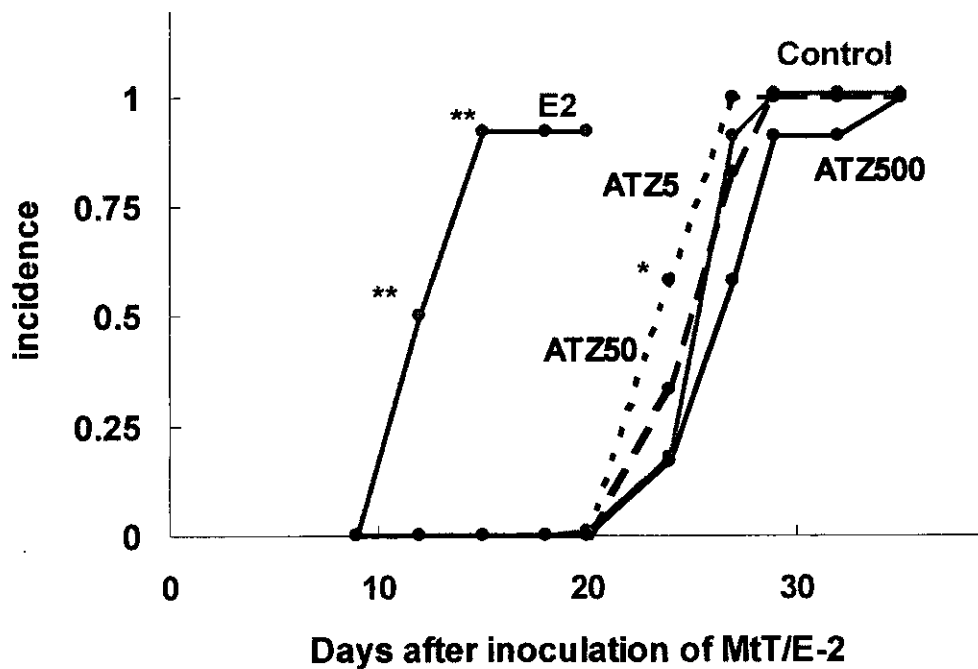


Fig.5 Pituitary weights, PTTG mRNA and serum PRL levels in ovariectomized F344 rats treated with NP, GNS and Atz.

	Pit.W. (mg)	PTTG (fg/ μ g RNA)	Serum PRL (ng/ml)
C	8.6 \pm 0.61	0.78 \pm 0.10	11.9 \pm 3.33
E2	10.4 \pm 0.58	0.42 \pm 0.16	41.7 \pm 8.37**
GNS25	8.0 \pm 0.21	0.65 \pm 0.08	11.0 \pm 0.82
GNS250	9.1 \pm 0.54	0.65 \pm 0.24	10.0 \pm 0.89
NP25	9.2 \pm 0.40	0.69 \pm 0.29	9.8 \pm 0.65
NP250	8.8 \pm 0.38	0.76 \pm 0.45	9.2 \pm 0.93

Mean \pm SEM (n=6)

	Pit.W. (mg \pm SEM)	Serum PRL (ng/ml)
C	6.8 \pm 0.2	7.4 \pm 0.93
E2	11.5 \pm 0.3**	50.9 \pm 7.54**
Atz5	6.9 \pm 0.2	9.2 \pm 0.87
Atz500	7.1 \pm 0.2	8.5 \pm 0.84
Atz500	7.1 \pm 0.2	6.6 \pm 0.78

Mean \pm SEM (n=6)

Fig. 6 Basic transcription activities at rPTTG-5' f in MtT/E2

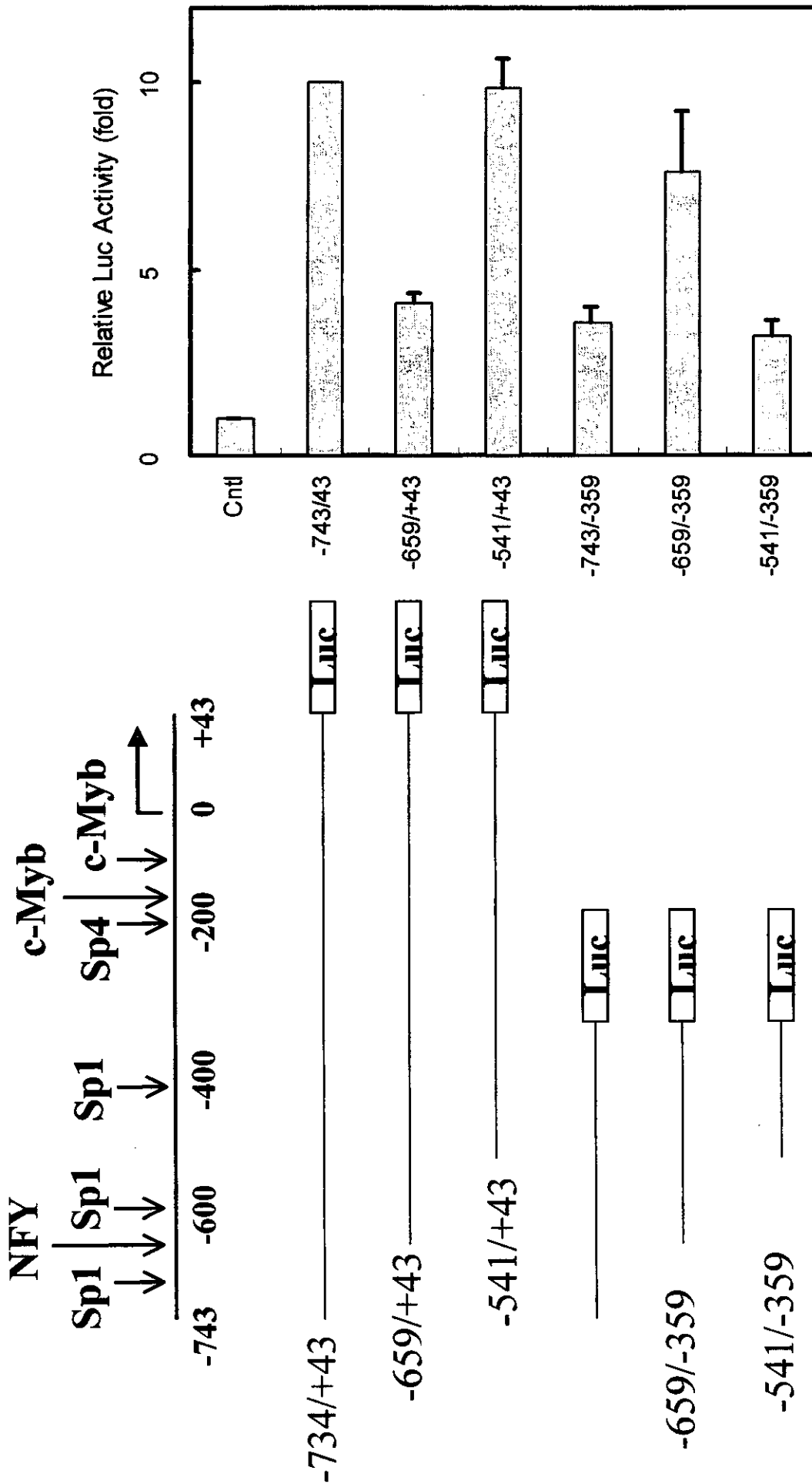


Fig.7 Differential E2 responses at rPTTG-5'f through ER α and β

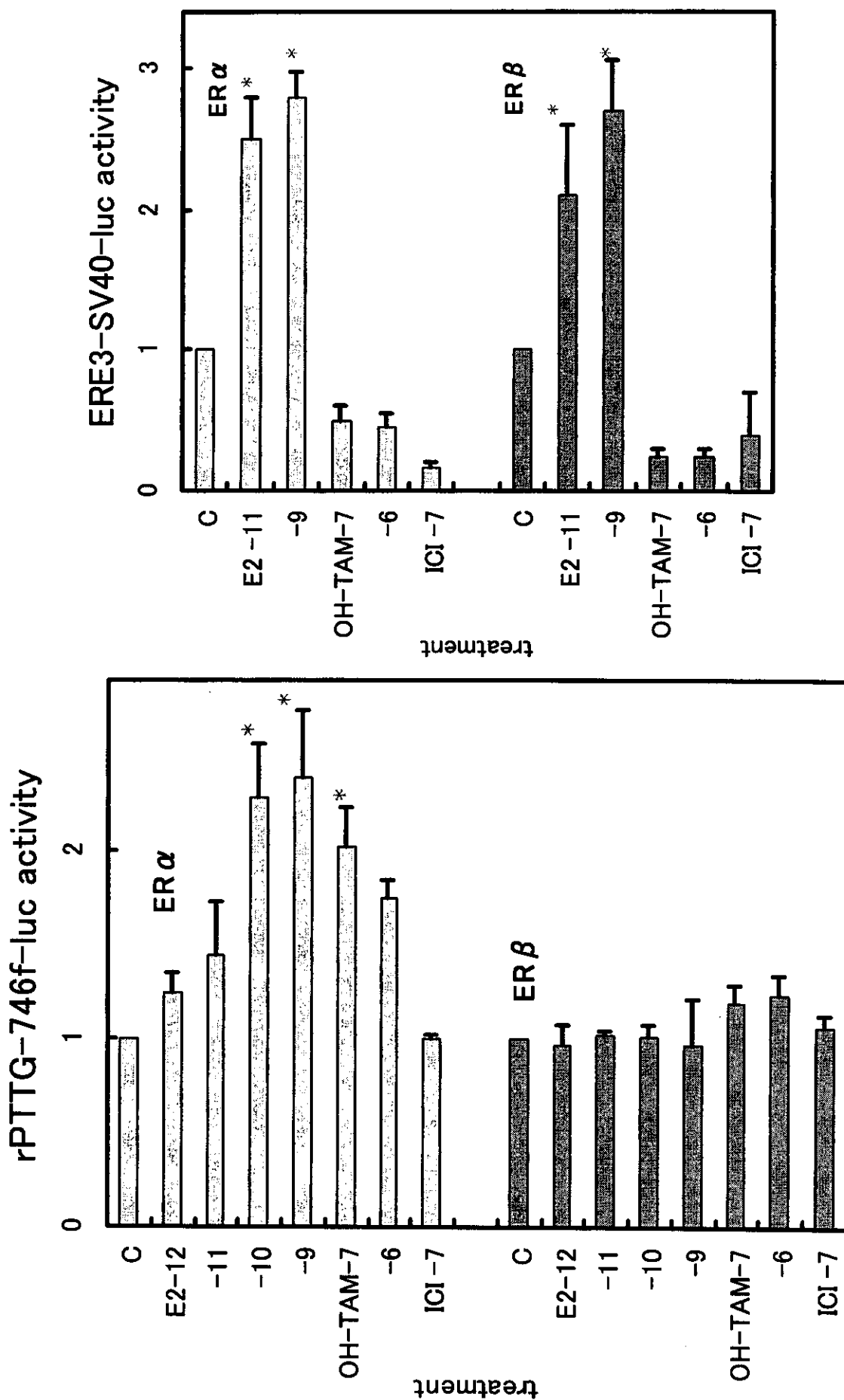


Fig.8 rER-promoter-B reporters and their basic transcriptional activities

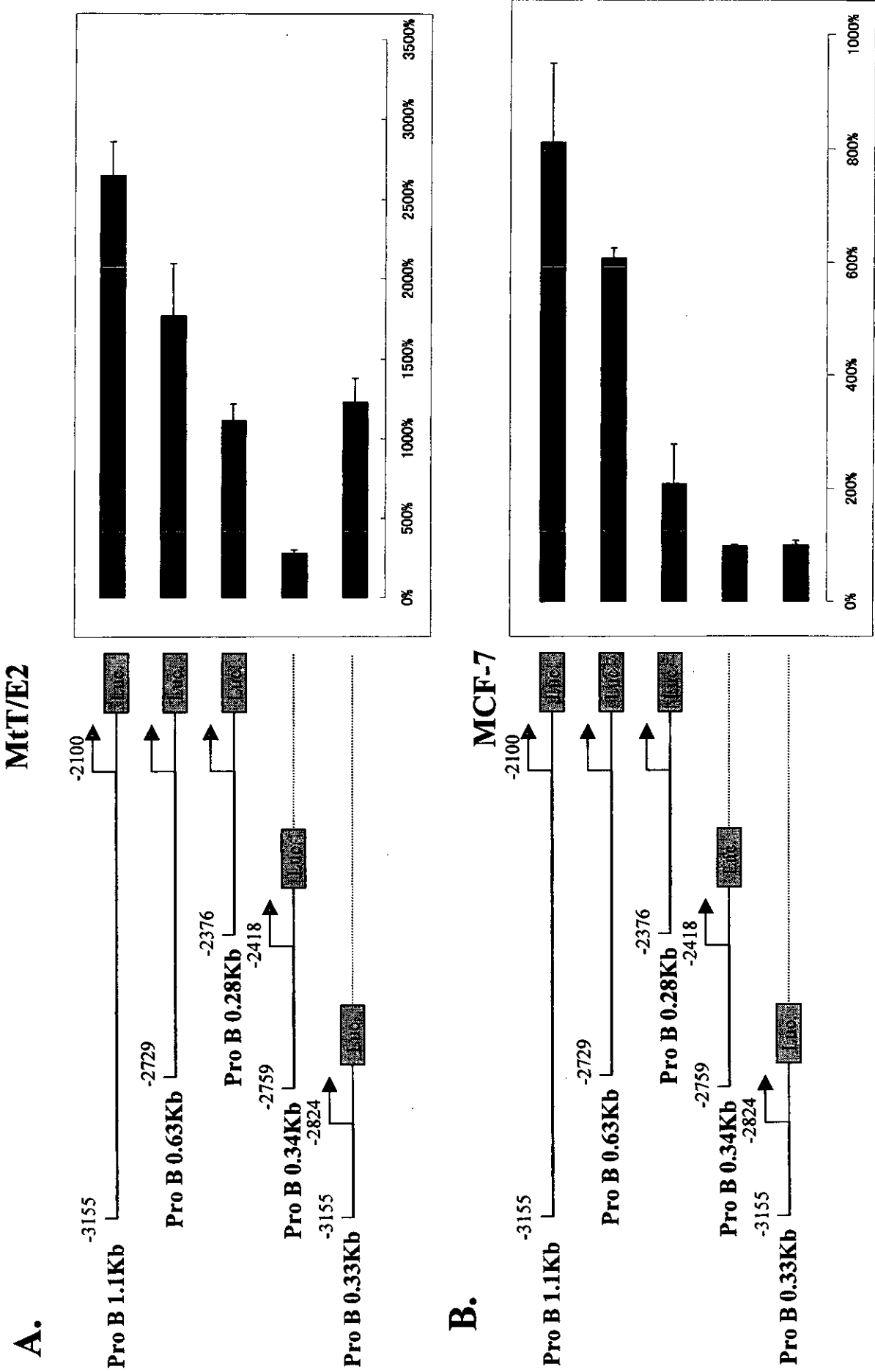
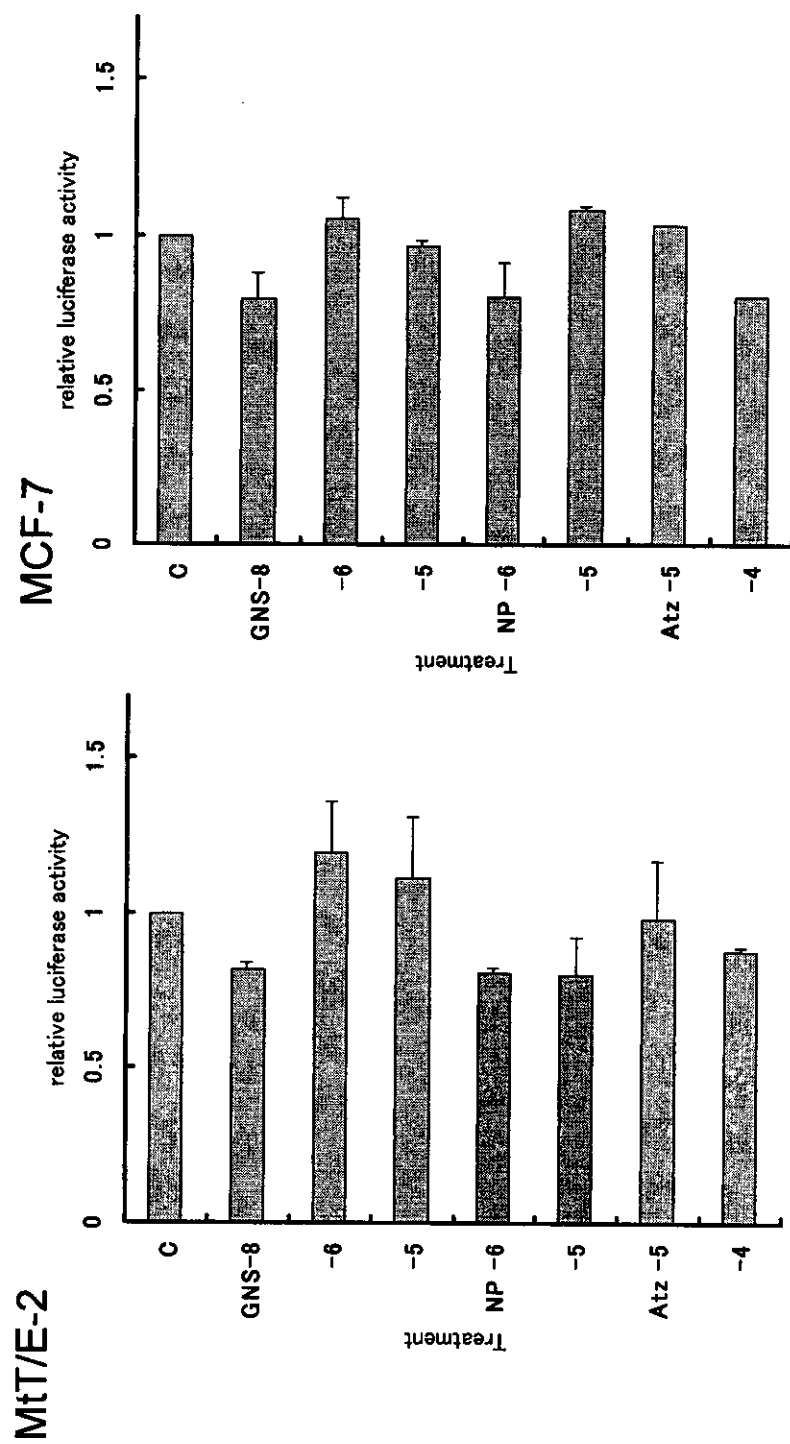


Fig.9 Effects of NP, GNS and Atz on the transactivation at rER-ProB



食品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
分担研究報告書

食品中内分泌かく乱物質による細胞増殖制御機構解明に関する研究

分担研究者 酒井敏行 京都府立医科大学 公衆衛生学教室 教授

研究要旨 豆類等から日常的に摂取されているフラボノイドであるゲニステインが内分泌かく乱物質であることに着目し、それらによる発癌修飾を細胞増殖制御機構の観点から明らかにしようと考えた。我々が採用した *in vitro* の実験系に於いて、ゲニステイン投与は、癌細胞の増殖を G2/M 期で停止させることが明らかとなった。更に cDNA アレイ法による解析において、ゲニステイン投与により FADD 遺伝子、Pim-2 遺伝子の発現が誘導されていることが明らかとなった。また除草剤として広く用いられているアトラジンの細胞増殖への影響を検討したが、高濃度においても増殖に影響を与えることはなかった。

A. 研究目的

豆類等から日常的に摂取されているフラボノイドであるゲニステインが内分泌かく乱物質であることに着目し、それらによる発癌修飾を細胞増殖制御機構の観点から明らかにしようと考えた。フラボノイドに関しては、日常的に摂取しているにもかかわらず、その発癌性については、促進的に働くのか抑制的に働くのかすら不明な点が多い。昨年度の研究において、癌細胞の増殖に対して G2/M 期において抑制することが認められた。そこで今回は、ゲニステインの G2/M 期における作用や遺伝子発現への作用を検討を行い、これらの結果より、内分泌かく乱物質による発癌修飾を理解する一助にしたいと考えた。

また我々の用いている癌細胞の増殖測定系によって、除草剤として広く利用されて

いるアトラジンの細胞増殖への影響も検討した。

B. 研究方法

ヒト骨肉腫由来の細胞株 MG63 及びヒト乳癌由来の細胞株 MCF-7 を用いてゲニステイン処理にともなう変化を検討した。

[ゲニステイン処理による *cdc2* 活性への影響] MG63 細胞では 3×10^5 個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 $50 \mu\text{M}$ のゲニステインあるいはゲニステインの溶媒として用いた DMSO 0.1% を加えた培地に交換した。そして薬剤添加 12 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間に細胞を回収した。MCF-7 細胞では 5×10^5 個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 $100 \mu\text{M}$ のゲニステインあるいはゲニステインの溶媒として用いた DMSO 0.1% を加えた培地に交換し

た。そして薬剤添加12時間後、24時間後、48時間後、72時間に細胞を回収した。

Medium を除去し、PBS で洗浄した細胞を TNN buffer を加え溶解させ、細胞抽出液として、遠心処理によってその上清を回収した。この上清を、まず Protein A - Sepharose と反応させることで、非特異的に Protein A - Sepharose に結合する画分を除去した。次に、cdc2 抗体と4°Cにおいて一夜反応させ、更に Protein A - Sepharose と反応させた後、十分洗浄することで、ゲニステイン処理細胞及びコントロール細胞から免疫沈降サンプルとして cdc2 自身及びその形成複合体を回収した。cdc2 活性は、この免疫沈降サンプルとヒストン H1 と γ -³²P ATP を反応させた後の、ヒストン H1 に取り込まれた γ -³²P ATP の量を cdc2 活性として考え、電機泳動後のヒストン H1 バンドの比放射活性の測定を実施した。

[cDNA アレイ法によるゲニステイン処理による発現変化を受ける遺伝子群の解析] MG63 細胞では 3×10^6 個の細胞を播種し、その24時間後に終濃度 $50 \mu\text{M}$ のゲニステインあるいはゲニステインの溶媒として用いた DMSO 0.1% を加えた培地に交換した。そして薬剤添加24時間後に細胞を回収した。MCF-7 細胞では 5×10^6 個の細胞を播種し、その24時間後に終濃度 $100 \mu\text{M}$ のゲニステインあるいはゲニステインの溶媒として用いた DMSO 0.1% を加えた培地に交換した。そして薬剤添加24時間後に細胞を回収した。回収された細胞からの Total RNA の調整は、Sepazol RNA (ナカライテスク) を用い、メーカーのプロトコールに従って total RNA を調整した。Total RNA からの mRNA の調整は、MESSAGE MAKER 試薬

セット (ライフテック) を用い、メーカーのプロトコールに従って mRNA を調整し、この mRNA をサンプルとして cDNA アレイ法を実施した。cDNA アレイ法は、Gene NavigatorTM cDNA Array System (東洋紡) を採用し、cDNA アレイとしては、ヒト癌関連遺伝子177種が解析可能な human cancer selected (東洋紡) を採用し、メーカーのプロトコールに従って cDNA アレイ法を実施した。

[アトラジン処理による細胞増殖への影響] MCF-7 細胞 2×10^4 個の細胞を播種し、その24時間後に終濃度 100nM 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ のアトラジンあるいは DMSO 0.1% を加えた培地、あるいは薬物無添加の培地に交換した。そして薬物添加後24時間毎に96時間後までの細胞数を計測した。

C. 研究結果

前回の研究報告では、我々が採用した in vitro の実験系に於いて、ゲニステイン投与によって癌細胞の増殖に対して抑制的に働くことが判明し、その細胞増殖の停止は、MG63 細胞においては G2/M 期において、MCF-7 細胞においては G1 期及び G2/M 期で認められたことから、ゲニステインの作用は G2/M 期の制御機構に何らかの影響を与えると考えられた。G2/M 期の細胞周期の制御においては、cdc2 と cyclin B1 が重要な働きをすることが知られているので、cdc2 と cyclin B1 蛋白量へのゲニステインの作用を検討したところ、cdc2 蛋白量は影響を受けなかったが、cyclin B1 蛋白量は増加することが判明した。しかしながらゲニステイン処理による cyclin B1 蛋白量の増加は、MG63 細胞では持続的なものであったのに対し、MCF-7 細胞では一時的な増加と

消失という異なる動向を示した。ゲニステイン処理した MG63 細胞及び MCF-7 細胞において同様に G2/M 期での細胞周期の停止が認められながらも、cyclin B1 蛋白量においては経時的变化に違いが認められたことは、ゲニステインによる G2/M 期停止においては cyclin B1 蛋白量よりもむしろ cdc2 キナーゼ活性の変化にゲニステインが何らかの影響を与えている可能性を示唆するものであった。そこで、今回我々は MG63 細胞及び MCF-7 細胞におけるゲニステイン処理時の cdc2 キナーゼ活性への影響の検討を実施した。

[ゲニステイン処理による cdc2 活性への影響] MCF-7 細胞では 100 μ M のゲニステイン処理で、12 時間後、48 時間後、72 時間後でコントロールに比べて cdc2 活性は約 20~30%低下を示した。全般的にゲニステイン処理によって cdc2 活性は低下傾向を示した。しかし逆に、MG63 細胞では 50 μ M のゲニステイン処理で、12 時間後ではコントロールに比べて cdc2 活性は約 50%まで低下したものの、24 時間、48 時間、72 時間後では、コントロールより約 50%増加していた。これらの cdc2 活性における相反する結果は、ゲニステイン処理によって観測された MCF-7 細胞、MG63 細胞での G2/M 期停止作用が、cdc2 活性に依存していないことを示唆するものとも考えられた。そこで我々はゲニステインの標的因子（標的遺伝子）を求めるために cDNA アレイ法を実施した

[cDNA アレイ法によるゲニステイン処理による発現変化を受ける遺伝子群の解析] MCF-7 細胞における 100 μ M のゲニステイン処理細胞とコントロール細胞の mRNA 発現解析の結果、ゲニステイン処理によって

mRNA の発現が上昇していると認められた遺伝子としては、p21、Pim-2 があり、逆に mRNA の発現が低下していると認められた遺伝子としては、Bcl-x、PCNA、c-fos が観察された。次に MG63 細胞における 100 μ M のゲニステイン処理細胞とコントロール細胞の mRNA 発現解析の結果、ゲニステイン処理によって mRNA の発現が上昇していると認められた遺伝子としては、c-jun、p16、FADD、Pim-2、p53 があり、逆に mRNA の発現が低下していると認められた遺伝子はなかった。

[アトラジン処理による細胞増殖への影響] MCF-7 細胞において、100nM、1 μ M、10 μ M、100 μ M のアトラジンは細胞増殖への影響を示さなかった。アトラジン濃度 1mM の場合も検討を行ったが、medium 中でアトラジンが析出してしまい測定を継続することが不可能であった。

D. 考察

豆類に多く含まれ日常的に摂取されているフラボノイドの一種であるゲニステインは、我々が採用した *in vitro* の実験系に於いて、その投与によって癌細胞の増殖に対して抑制的に働くことが判明し、その細胞増殖の停止は、MG63 細胞においては G2/M 期において、MCF-7 細胞においては G1 期及び G2/M 期で認められたことから、ゲニステインの作用は G2/M 期の制御機構に何らかの影響を与えると考えられた。哺乳類細胞の G2/M 期の細胞周期の制御においては、cdc2 活性が重要な働きをすることが知られているので、ゲニステイン処理による cdc2 活性への影響を検討したところ、MCF-7 細胞は cdc2 活性の低下傾向が認められたが、より明瞭な G2/M 期停止が観察

された MG63 細胞では、cdc2 活性の低下は認められず、むしろ上昇を示した。そこで我々はゲニステインによる G2/M 期停止作用には cdc2 以外の標的因子が存在すると考え、その検索のために cDNA アレイ法を実施した。その結果、幾つかの細胞周期関連遺伝子やアポトーシス関連遺伝子、細胞内シグナル伝達系関連遺伝子の発現に変動が認められた。我々はこれら発現変動を示した遺伝子群の中でも、MG63 細胞、MCF-7 細胞両方でゲニステイン処理により発現の上昇が認められた遺伝子である FADD や Pim-2 遺伝子の発現制御に関して、来年度は検討を実施する予定である。また更に多数の遺伝子群の発現に対するゲニステインの影響も検討予定している。更に、細胞増殖への影響は認められなかったアトラジンにも、この cDNA アレイ法を適用し、遺伝子発現への影響を検討する予定である。

E. 結論

豆類等から日常的に摂取されているフラボノイドであるゲニステインが内分泌かく乱物質であることに着目し、それらによる発癌修飾を細胞増殖制御機構の観点から明らかにしようと考えた。我々が採用した *in vitro* の実験系に於いて、ゲニステイン投与は、癌細胞の増殖を G2/M 期で停止させることが明らかとなった。更に cDNA アレイ法による解析において、ゲニステイン投与により FADD 遺伝子、Pim-2 遺伝子の発現が誘導されていることが明らかとなった。また除草剤として広く用いられているアトラジンの細胞増殖への影響を検討したが、高濃度においても細胞増殖に影響を与えることはなかった。