

Fig.2 ER α and β mRNA levels in the prostate gland in castrated rats (Cast) treated with testosterone (T) (A: for one week, B: Time dependent changes)

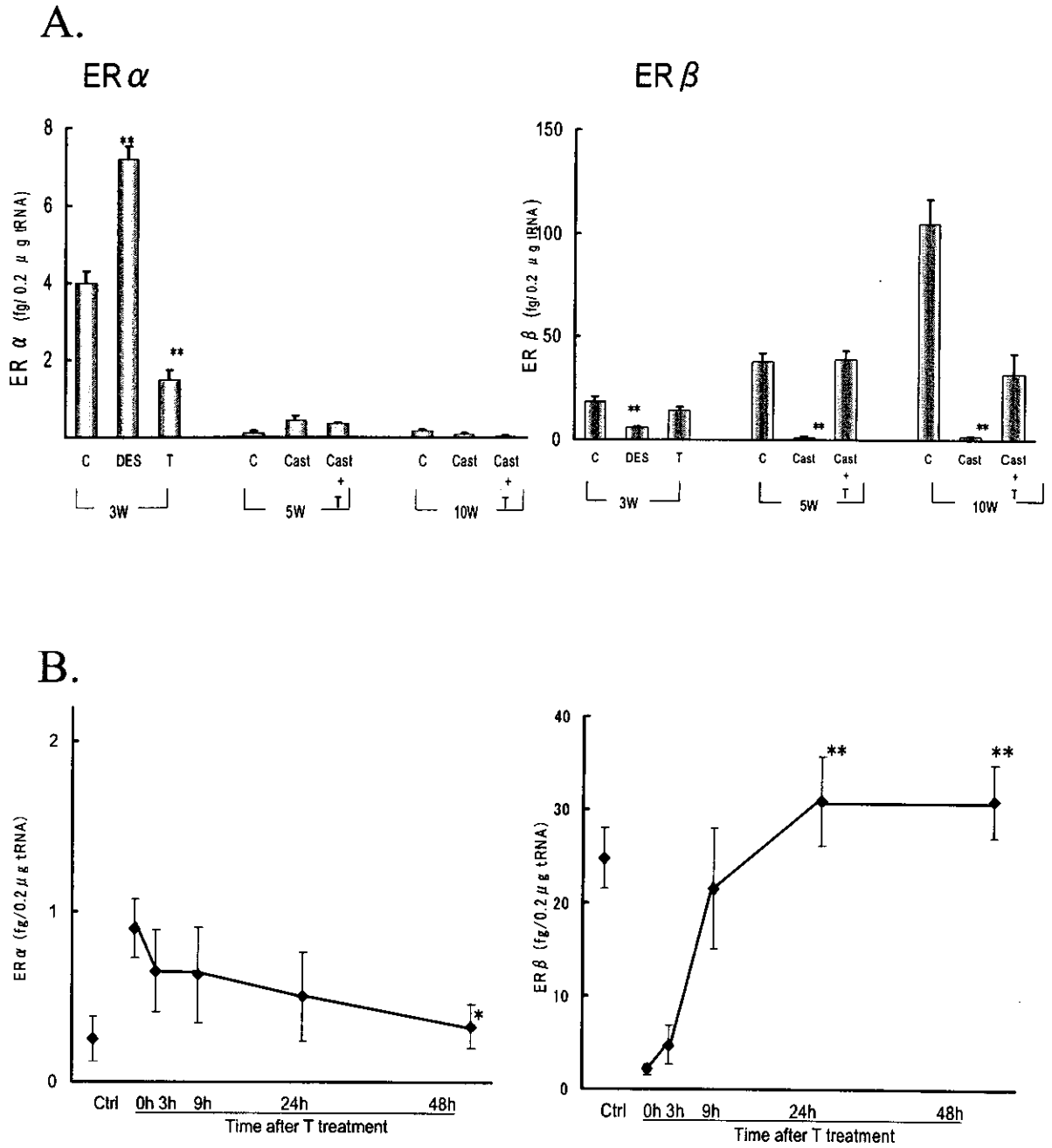


Fig.3 ER α and β mRNA levels in the prostate gland in castrated rats treated with testosterone (10mg, T) and estradiol (2.5mg, E) or tamoxifen (10mg, TAM) for a week

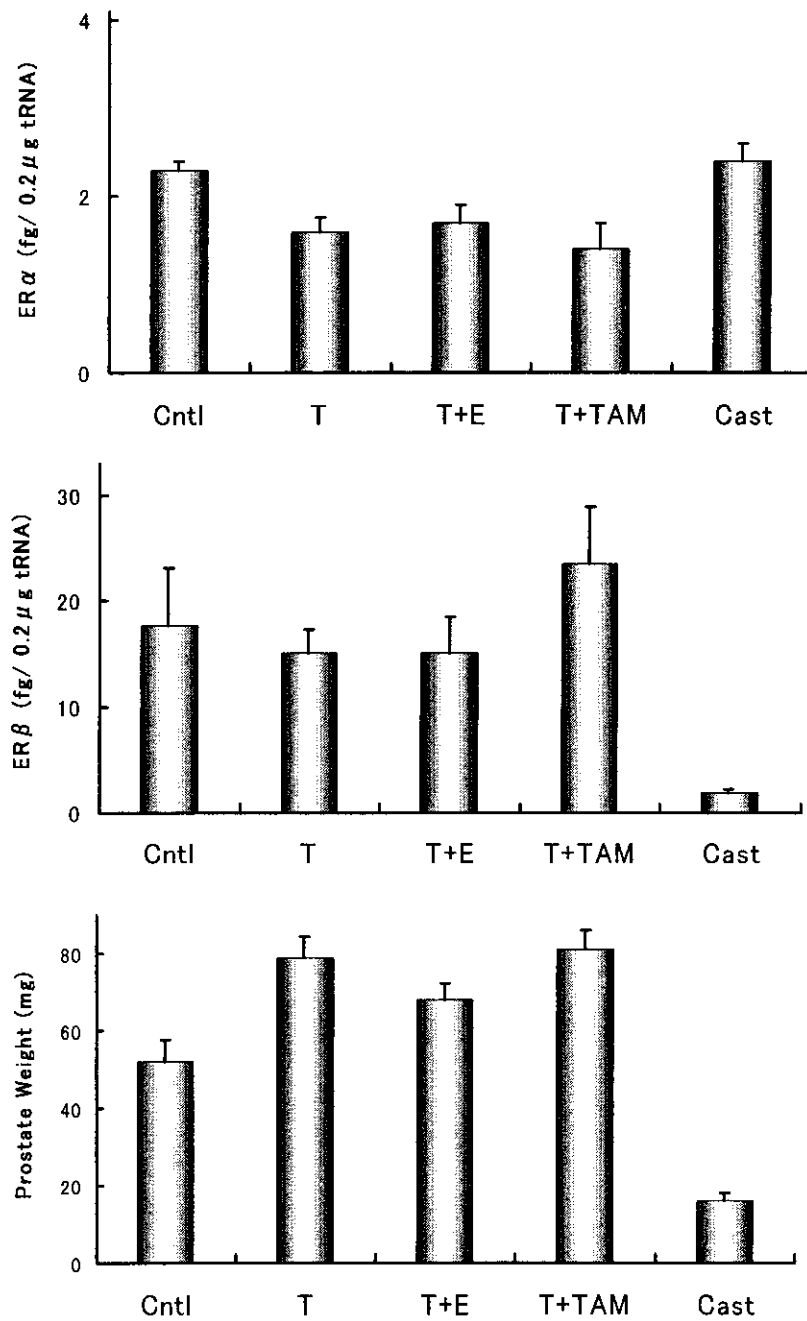


Fig.4 ER α and β mRNA levels in the prostate gland in castrated rats treated with testosterone (50mg, T) and estradiol (2.5mg, E) for two and four weeks

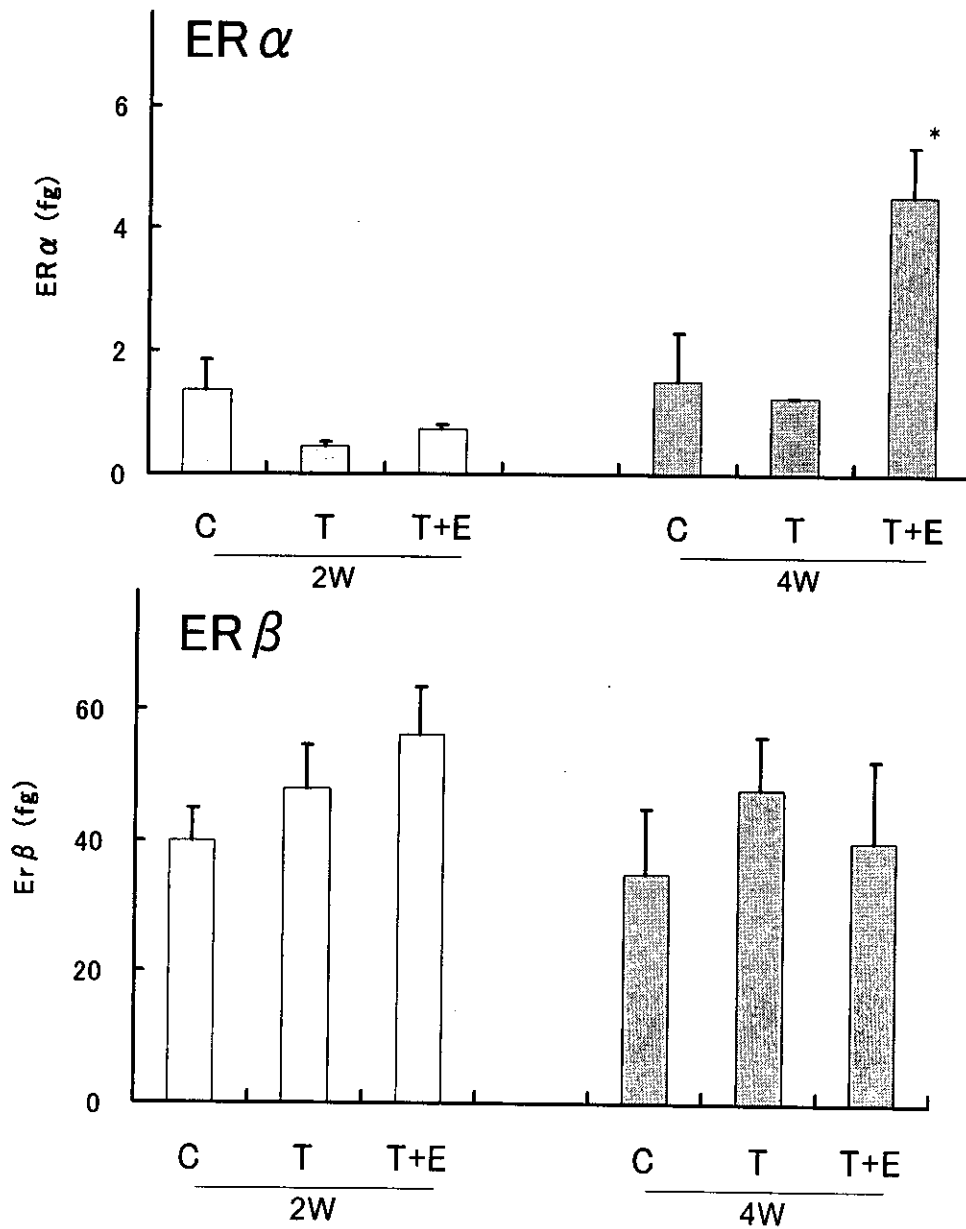
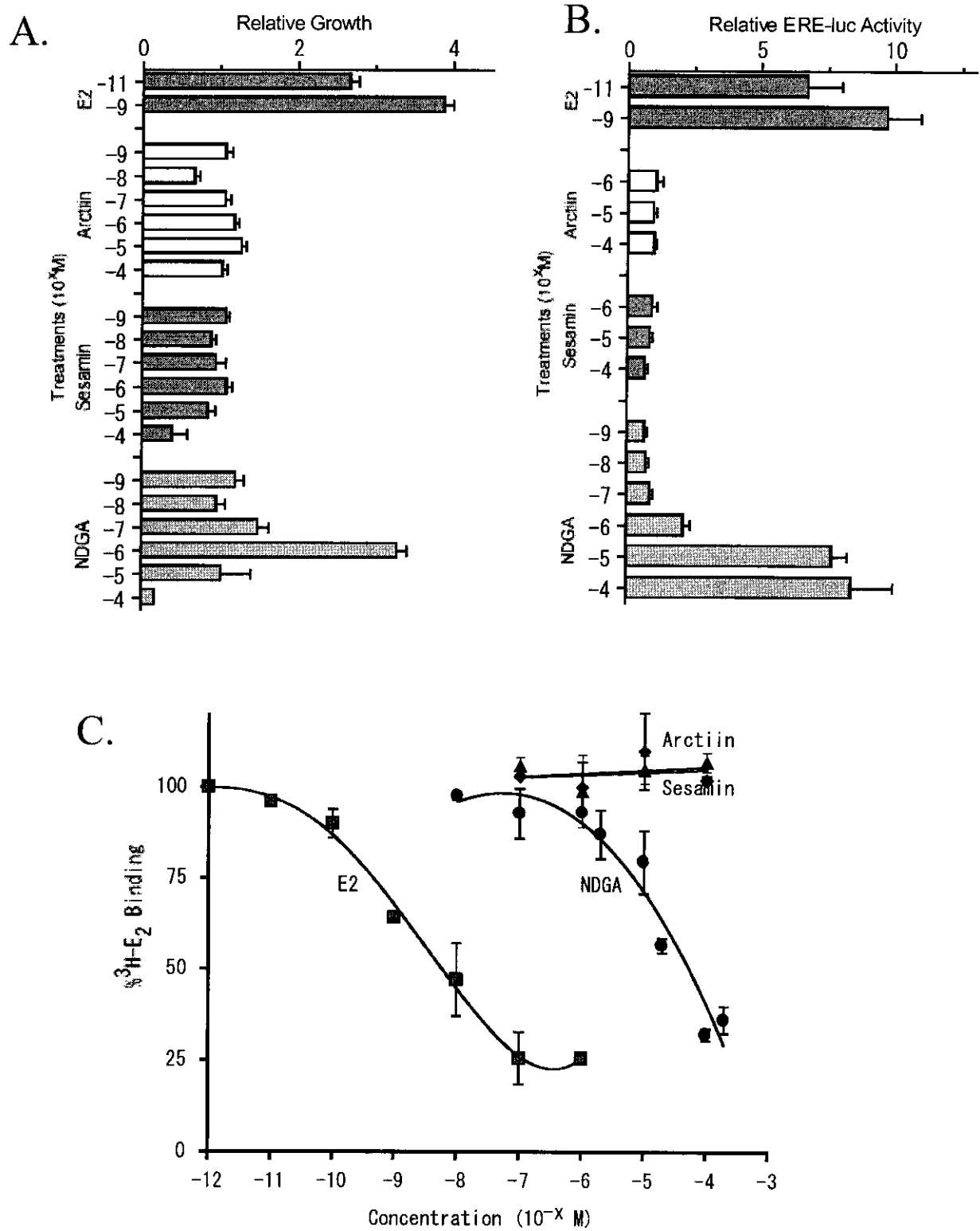


Fig. 5. Estrogenic activity of Arctiin, Sesamin and NDGA (A: estrogen responsive growth, B: ERE-luc activity, C: Binding to estrogen receptor)



厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

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* の実験系において、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。G2/M 期停止、アポトーシス誘導や DNA 修復に関与することが報告されている *gadd45* 遺伝子がゲニステイン処理により誘導されることを見出し、その誘導は *gadd45* のプロモーター領域を介するものであることが判明した。

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。一昨年度の研究において、ゲニステイン処理は、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。そこで今年度はゲニステイン処理による G2/M 期停止に関与する遺伝子の発現に対する影響を検討し、さらにその影響の機構を検討した。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る。

B. 研究方法

ヒト前立腺癌由来で p53 遺伝子に変異していることが報告されている細胞株 DU145 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細胞増殖への影響〕 DU145 細胞では 3×10^4 個の細胞を播種

し、その 24 時間後に終濃度 10、20、50 μM 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、あるいは薬物無添加の培地に交換した。そしてその後 24 時間毎に 72 時間後までの細胞数を計測した。〔ゲニステイン処理による細胞周期への影響〕 3×10^5 個の細胞を播種し、その 24 時間後に DU145 細胞では終濃度 50 μM のゲニステインを加えた培地あるいは薬物無添加の培地に交換した。そしてゲニステイン処理 24 時間後に、その細胞に対してエタノール固定を実施した。エタノール固定された細胞は RNase 処理した後 propidium iodide で染色し、FACSCalibur (Becton Dickinson) 及び ModFit を用いて細胞周期の解析を行った。

〔ゲニステイン処理による *gadd45* 遺伝子発現誘導への影響〕 用量依存性試験については DU145 細胞を 5×10^5 個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 10、50 μM 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、あるいは薬物無添加の培地に交換した。そして薬剤添加 24 時間後に細胞を回収した。時間依存性試験については DU145 細胞を 5×10^5 個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 50 μM 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 3、6、12、24、48 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。サンプルとして得られた total RNA 20 μ g を 1% Agarose gel で電気泳動を行い、Gene Screen Plus メンブレン (NEB) に転写を行った。Probe はヒト *gadd45* cDNA を BcaBEST Labelling Kit (Takara) によりランダム標識を行い調整した。Perfect Hyb (Toyobo) を用い、メーカーのプロトコールに従ってプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの条件は 68 $^{\circ}$ C で 20 時間とした。メンブレンを洗浄後、Imaging Plate 或いは X 線フィルムに感光させた。[ゲニステイン処理による *gadd45* 遺伝子プロモーター活性化への影響] DU145 細胞では 1 \times 10⁵ 個の細胞を播種し、その 24 時間後に DEAE-Dextran 法を用いて Transfection を行った。用いた Reporter plasmid は、ヒト *gadd45* 遺伝子プロモーター領域にルシフェラーゼを reporter 遺伝子として組み込んだものである。Transfection 24 時間後に、終濃度 10、50 μ 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、あるいは薬物無添加の培地に交換した。そしてその後 24 時間毎に Picca gene Lysis buffer 100 μ l を用いて細胞を溶解し、ルシフェラーゼ測定及び蛋白量測定に用いた。ルシフェラーゼ測定はルシフェラーゼアッセイキットを用いそのプロトコールに従って実施した。

C. 研究結果

前回、前々回の研究報告でも、我々が採用した *in vitro* の実験系において、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、骨肉腫由来の MG63 細胞においては G2/M 期において、乳癌由来の 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。今回、前立腺癌細胞である DU145 を用いてゲニステインの影響を検討し、G2/M 期の細胞周期の制御に関していることが知られている *gadd45* 遺伝子の発現に注目した。

[ゲニステイン処理による細胞増殖への影響] DU145 細胞では 20 μ M のゲニステイン濃度で中程度の増殖抑制が認められ、50、100 μ M のゲニステイン濃度で著明な増殖抑制が認められた。[ゲニステイン処理による細胞周期への影響] 上記実験においてゲニステイン処理により細胞増殖の顕著な抑制が認められたことから、ゲニステインの細胞増殖抑制作用が、細胞周期のどの位置において働いているかを検討した。DU145 細胞では、50 μ M ゲニステイン処理後 24 時間で 顕著な G2/M 期における細胞周期の停止が認められた。

[ゲニステイン処理による *gadd45* 遺伝子発現誘導への影響] G2/M 期停止、DNA 修復、アポトーシス誘導に関与する遺伝子である *gadd45* 遺伝子の発現が、ゲニステインによる G2/M 期における細胞周期の停止に関与していると推測し、Northern blotting によりその mRNA 発現を検討した。その結果、細胞周期抑制が認められた濃度である 50 μ M で発現の誘導が認められ、その誘導の開始はゲニステイン 6 時間後より始まり、時間依存的に増強した。[ゲニステイン処理による *gadd45* 遺伝子プロモーターの活性化] ゲニステインによる *gadd45* 遺伝子の誘導が、そのプロモーター領域の活性化か否かを検討するために、*gadd45* 遺伝子プロモーターを用いたプロモーター解析を実施した。その結果、*gadd45* 遺伝子プロモーターはゲニステイン処理により活性化されることが明らかとなった。

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* の実験系において、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た。その細胞増殖の停止は、過去の我々の報告と同様に DU145 細胞においても 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

らかの影響を与えたと考えられた。最近、大腸菌を用いた変異原性試験系において、ゲニステイン添加により DNA 修復能が向上するとの報告があり、我々は G2/M 期停止と DNA 修復に関与する遺伝子である *gadd45* 遺伝子に注目した。その結果、ゲニステイン処理により *gadd45* 遺伝子の mRNA 発現増強と *gadd45* 遺伝子プロモーターの活性化が見出された。*gadd45* 遺伝子プロモーターの活性が認められたことから、今後、ゲニステイン処理による *gadd45* 遺伝子プロモーター領域内に存在する応答配列を決定することで、ゲニステインによる遺伝子発現調節機構を更に詳細に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。この G2/M 期における細胞周期の停止は、ゲニステインによる *gadd45* 遺伝子の発現誘導によるものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

Matsuzaki, Y., Miyazawa, K., Yokota, T., Hitomi, T., Yamagishi, H., Sakai, T.,
Molecular cloning and characterization of the human p19^{INK4d} gene promoter, FEBS Lett., 517: 272-276, 2002.

Maeda, A., Yoshida, T., Kusuzaki, K., Sakai, T.,
The characterization of the human Siah-1 promoter, FEBS Lett., 517: 223-226, 2002.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Son, H-Y., <u>Nishikawa, A.</u> , Ikeda, T., Imazawa, T., Kimura, S., <u>Hirose, M.</u>	Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine-deficient diet.	Jpn. J. Cancer Res.	92	103-108	2001
Ikeda, T., <u>Nishikawa, A.</u> , Son, H-Y., Nakamura, H., Miyachi, M., Imazawa, T., Kimura, S., <u>Hirose, M.</u>	Synergistic effects of high-dose soybean intake with iodine deficiency, but not sulfadimethoxine or phenobarbital, on rat thyroid proliferation.	Jpn. J. Cancer Res.	92	390-395	2001
<u>Hirose, M.</u> , <u>Nishikawa, A.</u> , Shibutani, M., <u>Mitsumori, K.</u>	Environmental agents, endocrine disrupting chemicals and rat thyroid carcinogenesis.	J. Toxicol. Pathol.	14	71-77	2001
Okazaki, K., Okazaki, S., Nishimura, S., Nakamura, H., Kitamura, Y., Hatayama, K., Nakamura, A., Tsuda, T., Katsumata, T., <u>Nishikawa, A.</u> , <u>Hirose, M.</u>	A repeated 28 days oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals.	Arch. Toxicol.	75	513-521	2001
Okazaki, K., Imazawa, T., Nakamura, H., Furukawa, F., <u>Nishikawa, A.</u> , <u>Hirose, M.</u>	A repeated 28 days oral dose toxicity study of 17 α -methyltestosterone in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening the endocrine-disrupting chemicals.	Arch. Toxicol.	75	635-642	2002
Kimoto, N., <u>Hirose, M.</u> , Futakuchi, M., Iwata, T., Kasai, M., Shirai, T.	Site-dependent modulating effects of conjugated fatty acids from safflower oil in a rat two-stage carcinogenesis model in female Sprague-Dawley rats.	Cancer Lett.	168	15-21	2001

Ueda, M., <u>Mitsumori, K.</u> , Onodera, H., Takagi, H., Yasuhara, K., Takizawa, T., <u>Hirose, M.</u>	Lack of modifying effects of bisphenol A and roasted soybean (Kinako) on <i>N</i> -ethyl- <i>N</i> nitrosourea-induced uterine carcinogenesis in heterozygous <i>p53</i> deficient CBA mice.	J. Toxicol. Pathol.	14	129-134	2001
Takagi, H., <u>Mitsumori, K.</u> , Onodera, H., Nasu, M., Tamura, T., Yasuhara, K., Takegawa, K., <u>Hirose, M.</u>	Modifying effects of endocrine disrupting chemicals on <i>N</i> -bis(2-hydroxypropyl)nitrosoamine and sulfadimethoxine-induced thyroid carcinogenesis in rats.	J. Toxicol. Pathol.	14	121-128	2001
<u>Tsuda, H.</u> , Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Naito, A., Ota, T., Sekiya, T. and Terada, M.	High susceptibility of transgenic rats carrying the human <i>c-Ha-ras</i> proto-oncogene to chemically-induced mammary carcinogenesis.	Mutat. Res.	477	173-182	2001
Toriyama-Baba, H., Iigo, M., Asamoto, M., Iwahori, Y., Park, C. B., Han, B. S., Takasuka, N., Kakizoe, T., Ishikawa, C., Yazawa, K., Araki, E., <u>Tsuda, H.</u>	Organotropic chemopreventive effects of <i>n</i> -3 unsaturated fatty acids in a rat multi-organ carcinogenesis model.	Jpn. J. Cancer Res.	92	1175-1183	2001
Asamoto, M., Ota, T., Toriyama-Baba, H., Hokaiwado, N., Naito, A. and <u>Tsuda, H.</u>	Mammary carcinomas induced in human <i>c-Ha-ras</i> proto-oncogene transgenic rats are estrogen-independent, but responsive to α -limonene treatment.	Jpn. J. Cancer Res.	93	32-35	2002
Takasuka, N., Naito, A., Fukamachi, K., Murakoshi, M., Nishino, H. and <u>Tsuda, H.</u>	Modifying effects of carotenoids in a rat multi-organ carcinogenesis model. -inhibition in the liver but promotion of lung tumor development.	Proc. Japan Acad.	78	33-38	2002

Han, B. S., Fukamachi, K., Takasuka, N., Ohnishi, T., Maeda, M., Yamasaki, T. and <u>Tsuda, H.</u>	Inhibitory effects of 17 β - estradiol and 4- <i>n</i> - octylphenol on 7,12- dimethylbenz[<i>a</i>]anthracene- induced mammary tumor development in human <i>c-Ha-ras</i> proto-oncogene transgenic rats.	Carcinogenesis			in press
Watanabe, T., Kashida, Y., Yasuhara, K., Koujitani, T., <u>Hirose, M.</u> and <u>Mitsumori, K.</u>	Rapid induction of uterine endometrial proliferative lesions in transgenic mice carrying human prototype <i>c-Ha-ras</i> gene (rasH2 mice) given a single intraperitoneal injection of N-ethyl- <i>N</i> -nitrosourea.	Cancer Lett.			in press
Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., <u>Imaida, K.</u> , Ito, N., Shirai, T.	Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1- methyl-6-phenylimidazo [4,5- <i>b</i>]pyridine (PhIP)- associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2- dimethylhydrazine.	Cancer Lett.	171	17-25	2001
<u>Imaida, K.</u> , Sano, M., Tamano, S., Asamoto, M., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T.	Organ dependent enhancement of rat 3,2'-dimethyl-4- aminobiphenyl (DMAB) carcinogenesis by 2-amino- 1-methyl- 6-phenylimidazo [4,5- <i>b</i>] pyridine (PhIP): positive effects on the intestine but not the prostate.	Carcinogenesis	22	1295-1299	2001
Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.M., Takahashi, S., Ikeda, Y., <u>Imaida, K.</u> , Shirai, T.	Prostate carcinomas developing in transgenic rats with SV40 T antigen expression under probasin promoter control are strictly androgen dependent.	Cancer Res.	61	4693-4700	2001

<u>Imaida, K.</u> , Tamano, S., Kato, K., Ikeda, Y., Asamoto, M., Takahashi, S., Nir, Z., Murakoshi, M., Nishino, H., Shirai, T.	Lack of chemopreventive effects of lycopene and curcumin on experimental rat prostate carcinogenesis.	Carcinogenesis	22	467-472	2001
Hokaiwado, N., Asamoto, M., Cho, Y.M., <u>Imaida, K.</u> , Shirai, T.	Frequent c-Ha-ras gene mutations in rat mammary carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine.	Cancer Lett.	163	187-190	2001
Vinh, P.Q., Sugie, S., <u>Tanaka, T.</u> , Hara, A., Yamada, Y., Katayama, M., Deguchi, T., Mori, H.	Chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin on <i>N</i> -butyl- <i>N</i> -(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice.	Jpn. J. Cancer Res.	93	42-49	2002
Yanaiida, Y., Kohno, H., Yoshida, K., Hirose, Y., Yamada, Y., Mori, H., <u>Tanaka, T.</u>	Dietary silymarin suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats.	Carcinogenesis	23	787-794	2002
<u>Tanaka, T.</u> , Kohno, H., Tanino, M., Yanaiida, Y.	Inhibitory effects of estrogenic compounds, 4-nonylphenol and genistein, on 7,12-dimethylbenz(<i>a</i>)anthracene-induced ovarian carcinogenesis in rats.	Ecotoxicol. Environ. Safety			in press
Kohno, H., Tsukio, Y., Yanaiida, Y., Tanino, M., <u>Tanaka, T.</u>	Lack of modifying effects of 4-n-octylphenol on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in rats.	Ecotoxicol. Environ. Safety			in press

Masuda, C., <u>Wanibuchi, H.</u> , Otori, K., Wei, M., Yamamoto, S., Hiroi, T., Imaoka, S., Funae, Y. and Fukushima, S.	Presence of a no-observed effect level for enhancing effects of development of the α -isomer of benzene hexachloride (α -BHC) on diethylnitrosamine- initiated hepatic foci in rats.	Cancer Lett.	163	179-185	2001
Iwai, S., Wei, M., Morimura, K., <u>Wanibuchi, H.</u> , Tanaka, R., Matsunaga, S., Yoshitaka, A., Seki, S. and Fukushima, S.	Possible prevention by abieslactone of development of diethylnitrosamine- initiated GST-P positive foci in the rat liver.	Teratogen. Carcinogen. Mutagen.	21	223-229	2001
Morimura, K., Hori, T., Kaneko, M., Nishikawa, T., <u>Nishikawa, A.</u> , <u>Wanibuchi, H.</u> , Takada, N., Osugi, H. and Fukushima, S.	Promotion of chemically induced rat esophageal tumorigenesis with post-initiation ethanol modification.	Teratogen. Carcinogen. Mutagen.	21	295-301	2001
Kinoshita, A., <u>Wanibuchi, H.</u> , Imaoka, S., Ogawa, M., Masuda, C., Morimura, K., Funae, Y. and Fukushima, S.	Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell-cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of p21 ^{WAF1/Cip1} , cyclin D1 and Ogg1.	Carcinogenesis	23	341-349	2002
Maruyama, S., <u>Fujimoto, N.</u> , Asano, K., Ito A.	Suppression by estrogen receptor beta of AP-1 mediated transactivation through estrogen receptor alpha.	J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.	78	177-184	2001
Yin, H., <u>Fujimoto, N.</u> , Maruyama, S., Asano, K.	Strain difference in regulation of pituitary tumor transforming gene (<i>PTTG</i>) in estrogen induced pituitary tumorigenesis in rats.	Jpn. J. Cancer Res.	92	1034-1040	2001

Tamura, T., <u>Mitsumori, K.</u> , Onodera, H., <u>Fujimoto, N.</u> , Yasuhara, K., Takegawa, K., Takagi, H., <u>Hirose, M.</u>	Dose-threshold for thyroid tumor-promoting effects of orally administered kojic acid in rats after initiation with <i>N</i> -bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine.	J. Toxicol. Sci.	26	85-94	2001
Maeda, A., Yoshida, T., Kusuzaki, K., <u>Sakai, T.</u>	The characterization of the human Siah-1 promoter.	FEBS Lett.	517	223-226	2002
Matsuzaki, Y., Miyazawa, K., Yokota, T., Hitomi, T., Yamagishi, H., <u>Sakai, T.</u>	Molecular cloning and characterization of the human <i>p19^{INK4d}</i> gene promoter.	FEBS Lett.	517	272-276	2002