

図 12 エストロゲン活性の用量反応曲線

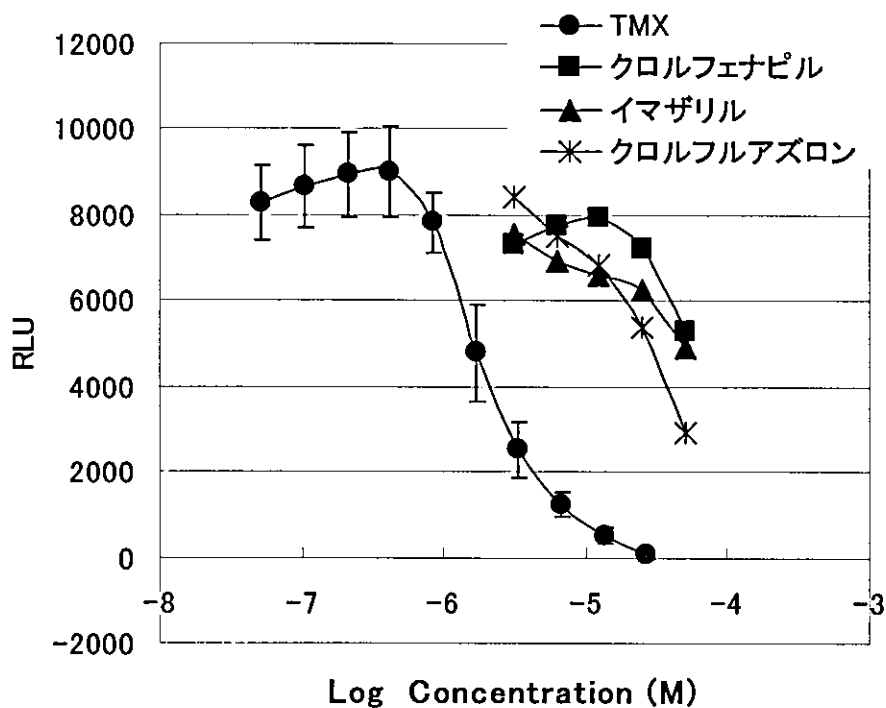


図 13 抗エストロゲン活性の用量反応曲線

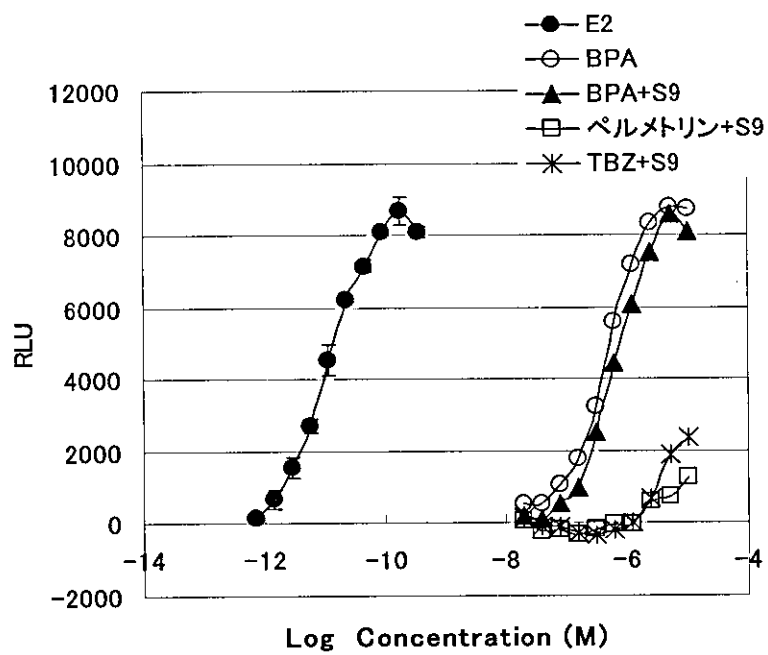


図 14 S9 代謝後のエストロゲン活性反応曲線

表1 レモン、オレンジおよびグレープフルーツ中の OPP, TBZ 検出数

		OPP	TBZ	OPP+TBZ	N. D.
オレンジ	(n=8)	4/8	1/8	1/8	2/8
レモン	(n=8)	2/8	2/8	1/8	3/8
グレープフルーツ	(n=4)	0/4	2/4	0/4	2/4

N. D.: not detected

表2 レモン、オレンジおよびグレープフルーツ中の OPP, TBZ 濃度

		OPP	TBZ
オレンジ	(n=8)	0.02~0.9mg/kg	0.02~1.1mg/kg
レモン	(n=8)	0.05~1.5mg/kg	0.01~2.4mg/kg
グレープフルーツ	(n=4)	N. D.	0.05~0.1mg/kg

N. D.: not detected

表3 OPP および TBZ の基準値

	OPP	TBZ
FAO/WHO 食品規格案 暫定最大残留量	10mg/kg	10mg/kg
日本の残留基準量	10mg/kg	10mg/kg
FAO/WHO 1日摂取許容量	0.02mg/kg	0.3mg/kg

表 4 17β エストラジオールと各種農薬の検出限界濃度の比較

農薬	検出限界濃度(M)
17β エストラジオール	$1 \times 10^{-12}$
プロチオホス	$1 \times 10^{-6}$
ピリプロキシフェン	$1 \times 10^{-6}$
プロチオホス+ピリプロキシフェン	$1 \times 10^{-7}$
ダイアジノン	$1 \times 10^{-5}$
トリクロホスメチル	$1 \times 10^{-6}$
ダイアジノン+トリクロホスメチル	$1 \times 10^{-7}$
オルトフェニルフェノール(OPP)	$1 \times 10^{-5}$
チアベンダゾール(TBZ)	$1 \times 10^{-5}$
チアベンダゾール+オルトフェニルフェノール (TBZ+OPP)	$1 \times 10^{-7}$

表5 測定農薬の分類と分子量

No	農薬名		分類	分子量
1	OPP	o-phenylphenol	殺菌剤	170.2
2	TBZ	thiabendazole	ベンゾイミダゾール系殺菌剤	201.3
3	アセフェート	acephate	有機リン系殺虫剤	183.2
4	イマザリル	imazalil	イミダゾール系殺菌剤	297.2
5	エトフェンプロックス	ethofenprox	ピレスロイド系殺虫剤	376.5
6	キャプタン	captan	有機塩素系殺菌剤	300.6
7	クロルピリホス	chlorpyrifos	有機リン系殺虫剤	350.6
8	クロルフェナビル	chlorfenapyr	殺虫剤	407.6
9	クロルフルアズロン	chlorfluazuron	ベンゾイルウレア系殺虫剤	540.7
10	ジクロフルアニド	dichlofuanid	有機塩素系殺菌剤	333.2
11	ジコホール	dicofol	有機塩素系殺虫剤	370.5
12	ジフェニール	diphenyl	ビフェニル系殺菌剤	154.2
13	シフルトリン	cyfluthrin	ピレスロイド系殺虫剤	434.3
14	シペルメトリン	cypermethrin	ピレスロイド系殺虫剤	416.3
15	ダイアジノン	diazinon	有機リン系殺虫剤	304.4
16	テブフェンピラド	tebufenpyrad	ピラゾール系殺虫剤	333.9
17	トリフルミゾール	triflumizole	イミダゾール系殺菌剤	345.8
18	トルクロホスメチル	tolclofos-methyl	有機リン系殺菌剤	301.1
19	ハルフェンプロックス	halfenprox	ベンジルエーテル系殺虫剤	477.4
20	ビテルタノール	bitertanol	トリアゾール系殺菌剤	337.4
21	ピリプロキシフェン	pyriproxyfen	昆虫成長抑制剤	321.4
22	フェンバレレート	fenvalerate	ピレスロイド系殺虫剤	419.9
23	フェンプロパトリン	fenpropathrin	ピレスロイド系殺虫剤	349.4
24	フルシトリネート	flucythrinate	ピレスロイド系殺虫剤	451.5
25	フルバリネート	fluvalinate	ピレスロイド系殺虫剤	502.9
26	フルフェノクスロン	flufenoxuron	ベンゾイルウレア系殺虫剤	488.8
27	プロシミドン	procymidone	ジカルボキシイミド系殺菌剤	284.2
28	プロチオホス	prothiofos	有機リン系殺虫剤	345.2
29	ペルメトリン	permethrin	ピレスロイド系殺虫剤	391.3
30	マラチオン	malathion	有機リン系殺虫剤	330.4
31	メタミドホス	methamidophos	有機リン系殺虫剤	141.1
32	ルフエヌロン	lufenuron	殺虫剤	511.2

表 6 残留農薬基準値と検出濃度

	分子量	残留基準 ( $\mu\text{g/g}$ )		検出値	
		最大	最小	$\mu\text{g/g}$	$\times 10^{-4}\text{M}$
シベルメトリン	416.3	20	0.05	1	0.24
ベルメトリン	391.3	50	0.05	0.5	0.13
ダイアジノン	304.4	0.1	0.1	0.05	0.02
トルクロホスメチル	301.1	3	0.1	0.1	0.03
ピリプロキシフェン	321.4	1	0.5	0.01	0.003
プロチオホス	345.2	5	0.01	0.02	0.01
TBZ	201.3	10	3	3.5	1.74
OPP	170.2	10	10	0.2	0.12
基準設定農薬最大		1440	20		
基準設定農薬最小		0.02	0.005		

内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化及び内分泌かく乱作用の比較

食品関連化学物質の細胞内シグナル伝達

分担研究者：松岡洋一郎

関西医科大学病理学第二講座 助教授

研究要旨

ヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット 1 個体に発生した乳腺腫瘍より乳癌細胞株 7 株 (C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17) を樹立した。Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によるエストロゲン受容体 (ER) 遺伝子発現の解析では、ER 陰性 (C17)、ER $\alpha$ のみ陽性 (C1)、ER $\beta$ のみ陽性 (C2、C11)、ER $\alpha$ , $\beta$ 陽性 (C3、C6、C15) の各細胞株であることが判明した。C3 (ER $\alpha$ ,  $\beta$ 陽性)、C11 (ER $\beta$ 陽性)、C17 (ER 陰性) 細胞の増殖はいずれもエストロゲン (17 $\beta$ -estradiol) 非依存的であった。ゲニステインおよびダイゼイン (0-50  $\mu$ M) 添加 24 時間後での DNA 合成活性への影響を C3、C11、C17、MCF7 を用いて測定すると、ゲニステイン 10 $\mu$ M 以上で C3、C11 に DNA 合成の阻害を、MCF7 (ER $\alpha$ ,  $\beta$ 陽性、エストロゲン依存性) には促進を認め、C17 では無効であった。一方、ダイゼインは 50 $\mu$ M まで全細胞の DNA 合成活性へ影響を与えなかった。ER $\beta$ 陽性 C11 株を用いゲニステイン添加後の遺伝子発現変動を DNA アレイにより解析した。10 $\mu$ M ゲニステイン添加 72 時間後に 2 倍以上の発現変動を認めた遺伝子は、発現上昇 410 個、低下 327 個の 737 遺伝子で、全体の 3.6% (737/20,500) であった。発現上昇群には eaf2 (2.6 倍)、IL-15 (2.5 倍)、tumor necrosis factor receptor superfamily 12 (2.2 倍)、caspase recruitment domain protein 9 (2.1 倍)、発現低下群には transcription factor 2a1 (1/4.4 倍)、connexin 26 (1/3.4 倍)、apoptosis inhibitor 2 (1/2.5 倍)、cyclinG (1/2.2 倍) が含まれていた。ER $\alpha$ 結合試験とエストロゲン感受性細胞株 MCF-7 の内在性遺伝子 c-myc、pS2 の発現量変化を指標としてカビエストロゲン Zearalenone の代謝産物ゼラノール ( $\alpha$ -Zearalanol) のエストロゲン様作用を測定した。ゼラノールには ER $\alpha$ 結合親和性、遺伝子発現誘導能とも 17 $\beta$ -estradiol とほぼ同程度の活性が認められた。

A. 研究目的

本邦女性の乳癌死亡率は近年急激に上昇しており、食生活の欧米化との関連が指摘されている。他方、アジア諸国における大豆の高摂取量と乳癌低発症率の相関が注目され、大豆に含まれるエストロゲン様物質であるイソフラボンによる乳癌の予防効果が期待されている。これら疫学

的研究の結果は、食品中に含まれる天然ならびに合成エストロゲン様物質が乳癌発生の促進あるいは抑制に関与する可能性を示唆している。また、食品中のエストロゲン様物質には内分泌かく乱作用も懸念されている。したがって、例えば乳癌予防の目的で大豆イソフラボンを大量摂取した場合、副作用としての内分泌か

く乱作用やエストロゲン受容体を介する乳癌増殖作用が懸念される。本研究の目的は、食品中のエストロゲン様物質の作用を測定するための培養細胞系を樹立し、その作用機構を解析することである。殊に、乳腺発癌の実験動物モデルとしてはラットが汎用されていることから、動物実験データとの互換性に鑑みラット乳癌細胞株による実験系樹立を目指す。さらに、エストロゲン感受性ヒト乳癌細胞の内在性遺伝子の発現を指標とするエストロゲン作用の測定系確立も目指す。

## B. 研究方法

### B-1. ラット乳癌細胞株の樹立

ラット乳癌細胞株は 7,12-dimethylbenz[a]anthracene 投与によりヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット 1 個体に発生した腫瘍より Hallows らの方法に従い樹立した。方法を略記すると、細切した 1.5g 腫瘍組織を 0.2% コラゲナーゼ、0.1% ヒアルロニダーゼ、5% 牛胎児血清含有 199 メディウム中で 37°C、2 時間処理した。分離細胞塊を 500 $\mu$ m、70 $\mu$ m メッシュフィルターにて濾過後、40 $\mu$ m フィルターにて残った細胞を再浮遊し、培養皿に 2 時間接着させた。非接着上皮細胞を採取、培養し、2 回の限界希釈により単コロニー由来の細胞株 7 株 (C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17) を樹立した。

### B-2. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

全 RNA からの 1st. strand cDNA 合成は ReverTra Ace  $\alpha$  (東洋紡、大阪) を用いて行った。増幅は KOD plus (東洋紡、大阪) により、デネイチャー 95°C、15 秒、アニーリング 60°C、30

秒、伸長 68°C、1 分、サイクル数 30 回の条件にて施行した。用いたプライマーは次の通りである。

#### ER $\alpha$

forward: 5'-atgaccatgacccttcacaccaag-3'

reverse: 5'-ggcgtcgattgtcagaattggacc-3'

#### ER $\beta$

forward: 5'-aggaatggtaaggtggatccagg-3'

reverse: 5'-tgctggagttaactcacggaacc-3'

#### GAPDH

forward: 5'-ttcaacggcacagtcagg-3'

reverse: 5'-catggactgtggtcatgag-3'

### B-3. DNA 合成活性の測定

DNA 合成活性は 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) labeling kit (ペーリンガー・マンハイム、ドイツ) を用いて測定した。対数増殖期にある細胞 0.5-1 $\times 10^4$  個を 96 穴マイクロタイタープレート各ウェルに播種し、10% 血清存在下 24 時間培養後、含 3% チャコール処理血清培養液にてさらに 24 時間前培養する。0-1000pM 17  $\beta$ -estradiol (E2) および 0-50 $\mu$ M のゲニステイン、ダイゼイン存在下で 24 時間培養後、10 $\mu$ M BrdU で 2 時間ラベルする。引き続き、70% エタノール/0.5M 塩酸で -20°C、30 分固定、ヌクレアーゼ処理 (37°C、30 分)、peroxidase 標識抗 BrdU 抗体で 37°C、30 分インキュベートした後、peroxidase 基質を加え 405nm での吸光度を測定した。

### B-4. DNA マイクロアレイ

遺伝子発現の網羅的解析は、ER  $\alpha$  発現陰性 C11 細胞を 10 $\mu$ M ゲニステイン非存在および存在下 ( $\phi$  6 cm ディッシュ各 3 枚) で 72 時間培養後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN、CA)



にて精製した全 RNA を鋳型として cRNA を合成し、アジレント社製ラットオリゴヌクレオチドアレイ (約 20,500 遺伝子搭載) を用いて行った。

#### B-5. Estrogen 受容体 $\alpha$ 結合試験

試料 (ゼラノール) の Estrogen 受容体 (ER)  $\alpha$  に対する結合親和性は Ligand Screening System (東洋紡、ERA-101) を用いて測定した。まず、既知濃度の ER  $\alpha$  20 $\mu$ l、未標識 17 $\beta$ -estradiol (リガンド) 30 $\mu$ l と 3-100nM ゼラノール 30 $\mu$ l の混合液を 4 $^{\circ}$ C、1 時間反応させる。次いで、混合液 50 $\mu$ l とペルオキシダーゼ標識 17 $\beta$ -estradiol 50 $\mu$ l を抗 17 $\beta$ -estradiol 抗体固相化ウェル内で 4 $^{\circ}$ C、1 時間反応させ、混合液中に含まれる遊離 17 $\beta$ -estradiol 量を酵素免疫競合法により測定する。陽性対照として 15-300nM Diethylstilbestrol (DES) を用いた。下記の式により結合阻害度を算出後、阻害曲線を作成し、阻害曲線より IC<sub>50</sub> を求めた。

$$\text{結合阻害度} = (\text{吸光度 BL} - \text{吸光度 S}) / (\text{吸光度 BL} - \text{吸光度 A})$$

吸光度 BL : DES 0nM の吸光度平均値

吸光度 S : 各試料の吸光度平均値

吸光度 A : DES 300nM の吸光度平均値

#### B-6. 内在性遺伝子発現を用いたエストロゲン作用の測定

エストロゲン感受性細胞株 MCF-7 の内在性遺伝子 c-myc、pS2 の発現量変化を指標として用いた。pS2 遺伝子はエストロゲン応答配列非依存的に、c-myc 遺伝子は非依存的に発現調節を受ける遺伝子である。MCF-7 細胞を血清非存在下で 3 日間培養した後 10<sup>-13</sup>-10<sup>-7</sup> M の 17 $\beta$ -estradiol (E2) および ゼラノールを

添加し、2 時間後に mRNA を回収してそれぞれの遺伝子の発現量を RT-PCR 法にて解析した。遺伝子発現の変化は被験物質非存在下での対象遺伝子の mRNA/ $\beta$ -actin mRNA 比に対する相対値として表した。用いたプライマーは次の通りである。

c-myc

forward: 5'-gggctctgctcgcctcctctacgttc-3'

reverse: 5'-

gactccgtcgaggagagcagagaat-3'

pS2

forward: 5'-atggccaccatggagaacaa-3'

reverse: 5'-ctaaaattcacactcctcttctgga-3'

$\beta$ -actin

forward: 5'-cagggcgtgatggtggg-3'

reverse: 5'-ggtcattctctcgcggttgg-3'

### C. 研究の実施結果

#### C-1. ラット乳癌細胞株の ER 発現と p53 遺伝子変異

ヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット 1 個体に発生した乳腺腫瘍 (腺癌) より乳癌細胞株 7 株 (C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17) を樹立した。RT-PCR 法による ER 遺伝子発現の解析では、ER 陰性 (C17)、ER  $\alpha$  のみ陽性 (C1)、ER  $\beta$  のみ陽性 (C2、C11)、ER  $\alpha$ ,  $\beta$  陽性 (C3、C6、C15) の各細胞株が得られた (図 1)。一方、細胞増殖ならびにアポトーシス関連分子群と ER 発現との間には明らかな相関は認められなかった。

DNA 傷害等細胞内傷害によるアポトーシス誘導に中心的役割を担う p53 の遺伝子変異について解析した。全株について RT-PCR で全長 p53 遺伝子が増幅され、大きな欠失等は存在しなかった。また、PCR 産物の塩基配列を解析した結果 C11 のコード

ン 246 に 1 塩基変異が検出された。この変異は、ゲノム DNA の塩基配列解析により確認された。さらに、導入ヒト H-ras 遺伝子には全株で変異が認められたのに対して、ラット H-ras 遺伝子には変異が見られなかったことは興味深い (表 1)。

#### C-2. C3、C11、C17 株の増殖のエストロゲン依存性

C3 (ER $\alpha$ ,  $\beta$  陽性)、C11 (ER $\beta$  陽性)、C17 (ER 陰性) 細胞のエストロゲン依存性を 0-1000pM E2 添加による DNA 合成活性の変動により検討した。1000pM E2 添加時の DNA 合成活性はそれぞれ非添加対照群の C3 91.1 $\pm$ 2.0%、C11 96.1 $\pm$ 3.3%、C17 92.0 $\pm$ 20.6% でいずれもエストロゲン非依存性であった。エストロゲン依存性 MCF-7 細胞では 1000pM E2 添加により約 1.4 倍の DNA 合成の上昇を認めた (図 2)。

#### C-3. ゲニステイン、ダイゼインの DNA 合成活性への影響

ゲニステインおよびダイゼイン (0-50 $\mu$ M) 添加 24 時間後での C3、C11、C17、MCF-7 細胞の DNA 合成活性への影響を測定した。5 $\mu$ M ゲニステインまで C3、C11、C17 細胞では明らかな影響は認めなかったが、10 $\mu$ M 添加時より C3、C11 細胞で DNA 合成抑制が認められ、50 $\mu$ M 添加により非添加対照群の C3 34.7 $\pm$ 8.0%、C11 59.0 $\pm$ 17.9% であった。一方、C17 細胞では 120.8 $\pm$ 9.6% であった。MCF-7 細胞では 25 $\mu$ M 添加時より有意な DNA 合成亢進を認め、50 $\mu$ M 添加により約 1.8 倍の DNA 合成上昇を認めた。ダイゼインは 50 $\mu$ M までいずれの細胞の DNA 合成活性へも明らかな影響

を認めなかった (図 3)。

#### C-4. DNA マイクロアレイ解析

ER $\beta$  陽性 C11 細胞を用いゲニステイン添加後の遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイにより解析した。10 $\mu$ M ゲニステイン添加 72 時間後に 2 倍以上の発現変動を認めた遺伝子は、発現上昇 410 個、低下 327 個の 737 遺伝子で、全体の 3.6% (737/20,500) であった。発現上昇群には eaf2 (2.6 倍)、IL-15 (2.5 倍)、tumor necrosis factor receptor superfamily 12 (2.2 倍)、caspase recruitment domain protein 9 (2.1 倍)、発現低下群には transcription factor 2a1 (1/4.4 倍)、connexin 26 (1/3.4 倍)、apoptosis inhibitor 2 (1/2.5 倍)、cyclinG (1/2.2 倍) が含まれていた (図 4)。

#### C-5. ゼラノールの ER $\alpha$ 結合親和性

DES は 15nM、30nM、45nM でそれぞれ 36.3 $\pm$ 10.1%、87.2 $\pm$ 1.3%、95.6 $\pm$ 0.9% の E2 に対する ER $\alpha$  結合阻害活性が認められた (図 5)。阻害曲線より IC<sub>50</sub> は 20nM と測定された。ゼラノールは 15nM、30nM、45nM、100nM でそれぞれ 10.7 $\pm$ 5.0%、59.3 $\pm$ 4.2%、80.0 $\pm$ 6.8%、98.0 $\pm$ 1.0% の結合阻害活性が認められ、IC<sub>50</sub> は 26nM であった (図 5)。この結果からゼラノールの ER $\alpha$  に対する相対結合親和性 (DES の IC<sub>50</sub>/ゼラノールの IC<sub>50</sub>) は 0.77 と計算された。

#### C-6. ゼラノールの遺伝子発現への影響

pS2 遺伝子発現に対しては E2、ゼラノールとも 10<sup>-12</sup>M でそれぞれ 1.24 倍、1.48 倍の最大誘導活性を示した (図 6)。一方 c-myc 遺伝子発現に対しては、E2 は 10<sup>-13</sup> - 10<sup>-10</sup> M の範囲で

濃度依存的に c-myc 遺伝子発現を上昇させ、 $10^{10}$  M でほぼ最大値 (1.49 倍) に達した。ゼラノールも  $10^{13}$ - $10^9$  M の範囲で濃度依存的に遺伝子発現を上昇させ、 $10^9$  M で最大 1.80 倍上昇させた。ところが、 $10^8$  M で 1.31 倍、 $10^7$  M では 1.09 倍とより高濃度域では濃度依存的に c-myc 遺伝子の発現上昇が減弱した (図 6)。

#### D. 考察

大豆イソフラボンによる乳癌抑制がエストロゲン受容体を介する作用であるのか否か未解決のままである。大豆イソフラボンの腫瘍抑制効果は乳癌のみならず、エストロゲン非依存性癌である大腸癌、皮膚癌でも報告されている。研究分担者も、エストロゲン非依存性乳癌を好発するヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子導入ラットを用いた動物実験で大豆イソフラボンの発癌抑制効果を確認している (Toxicol. Pathol.,2003)。また、大豆イソフラボンは弱いエストロゲン受容体結合能を有するものの、タモキシフェン等の抗エストロゲン剤が持つエストロゲン受容体阻害作用はほとんど認められない。以上の結果から、大豆イソフラボンの乳癌抑制効果としてエストロゲン受容体を介さない作用機作も考慮に入れるべきと考える。

大豆イソフラボン、殊に主要構成成分であるゲニステインの乳癌に対する抑制効果は試験管内実験、動物実験の両者により実証されている。しかし、腫瘍抑制効果の作用機作としては、細胞増殖、血管新生、転移の抑制や細胞死誘導、抗酸化作用など種々の可能性が報告されており結論を見るに至っていない。エストロゲンは乳腺上皮や多くの乳癌細胞に

対して増殖促進作用を示し、植物エストロゲンであるイソフラボン類も増殖シグナルを活性化できる。したがって、エストロゲン受容体陽性の乳癌細胞を用いたこれまでの報告では、大豆イソフラボンのエストロゲン受容体依存的・非依存的作用が混在したまま観察されていたものと思われる。本研究の一環として樹立したラット乳癌細胞株を駆使することで大豆イソフラボンのエストロゲン受容体非依存的作用を選択的に観察することが可能で、その乳癌抑制機構の本態解明に迫る知見が得られよう。また得られる結果は、内分泌かく乱作用を有さない乳癌予防物質や薬剤の発見、創製へ向けた基盤となるものと期待される。

試験管内結合阻害実験により DES、ゼラノールの  $IC_{50}$  はそれぞれ 20nM、26nM と測定された。この結果からゼラノールは DES と同程度 (相対結合親和性=0.77) の  $ER\alpha$  結合親和性を有することが明らかとなった。また、ゼラノールのエストロゲン活性は遺伝子発現を指標とした場合でも  $17\beta$ -estradiol とほぼ同等との結果であった。ゼラノールは欧州ではすでに使用禁止となっているが、米国では牛の成長促進剤として依然使用されている。ゼラノールのエストロゲン作用はすでに知られており、動物実験の結果から  $17\beta$ -estradiol や DES と同様の臓器標的性を持つことが報告されている。例えば、乳腺組織の増殖促進 (Sheffield and Welsch, Cancer Let.,28;77,1985)、睾丸での病変形成 (Perez-Martinez ら, J. Comp. Pathol.,114;407,1996)、肝臓腫瘍の形成 (Coe ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,89;1085,1992) 等である。ゼラノールの使用が認められている米国

での使用基準上限値は筋肉中  $2\mu\text{g/kg}$ 、肝臓中  $10\mu\text{g/kg}$  で (Leffers ら, Hum. Repro.,16;1037,2001)、これらの値はそれぞれ  $6.2\text{nM}$ 、 $31\text{nM}$  に相当する。したがって、牛肉等の経口摂取により体内へ移行するゼラノールは極めて微量と考えられる。しかしながら、これまでヒト血中のゼラノール濃度を正確に測定した報告はなく、微量測定系の確立が待たれる。

#### E. 結論

- 1) ヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット1個体に発生した乳腺腫瘍より乳癌細胞株7株 (C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17) を樹立した。ER 遺伝子発現の解析では、ER 陰性1株、ER $\alpha$ のみ陽性1株、ER $\beta$ のみ陽性2株、ER $\alpha$ 、 $\beta$ 陽性3株であった。
- 2) C3 (ER $\alpha$ 、 $\beta$ 陽性)、C11 (ER $\beta$ 陽性)、C17 (ER 陰性) 細胞の増殖はいずれもエストロゲン非依存的であった。
- 3) ゲニステイン  $10\mu\text{M}$  以上でC3、C11にDNA合成の阻害を、MCF7 (ER $\alpha$ 、 $\beta$ 陽性、エストロゲン依存性) には促進を認め、C17では無効であった。一方、ダイゼインは  $50\mu\text{M}$  まで全細胞のDNA合成活性へ影響を与えなかった。
- 4) C11細胞を用い  $10\mu\text{M}$  ゲニステイン添加後の遺伝子発現変動をDNAマイクロアレイにより解析すると、添加72時間後に2倍以上の発現変動を認めた遺伝子は、発現上昇410個、低下327個の737遺伝子で、全体の3.6% (737/20,500) であった。
- 5) ゼラノール ( $\text{IC}_{50}=26\text{nM}$ ) はDES ( $\text{IC}_{50}=20\text{nM}$ ) と同程度のER $\alpha$ 結合親和性 (相対結合親和性=0.77) を有

する。

6) MCF-7の内在性遺伝子pS2、c-mycへの最大発現誘導を示すゼラノール濃度はそれぞれ $10^{12}\text{M}$ 、 $10^9\text{M}$ であった。これらはE2と同等の値であり、ゼラノールがE2と少なくとも同程度の遺伝子発現誘導活性を有することを示唆している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hamaguchi, T., Matsuoka, Y., Bechberger, J., Ohnishi, T., Fujita, K., Naus, C.C., Kusunoki, M., Tsubura, A. and Tsuda, H. Establishment of an apoptosis-sensitive rat mammary carcinoma cell line with a mutation in the DNA-binding region of p53. *Cancer Let.*, in press.
- 2) Hamaguchi, T., Matsuoka, Y., Kawaguchi, H., Fukamachi, K., Takasuka, N., Ueda, S., Shimizu, K., Ohki, M., Kusunoki, M., Sakakura, T., Yoshida H., and Tsuda, H. Terminal endbuds and acini as the respective major targets for chemical and sporadic carcinogenesis in the mammary glands of human c-Ha-ras protooncogene transgenic rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 83: 43-56, 2004.
- 3) Fukamachi, K., Han, B.S., Kim, C.K., Takasuka, N., Matsuoka, Y., Matsuda, E., Yamasaki, T., Tsuda, H. Possible enhancing effects of atrazine and nonylphenol on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumor development in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. *Cancer Sci.*, 95:404-410, 2004.
- 4) 濱口哲也、松岡洋一郎、川口博明、高須賀信夫、深町勝巳、吉田

浩己、津田洋幸 (2004) ヒト正常型c-Ha-ras遺伝子トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性の機序解析—化学発がんとは自然発がんの比較— 乳癌基礎研究13:21-27

- 5) Matsuoka, Y., Fukamachi, K., Hamaguchi, T., Toriyama-Baba, H., Kawaguchi, H., Kusunoki, M., Yoshida H., and Tsuda, H. Rapid emergence of mammary preneoplastic and malignant lesions in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats: possible application for screening of chemopreventive agents. *Toxicol. Pathol.*, 31: 632-637, 2003.
- 6) Barkalow, K.L., Italiano, Jr. J.E., Chou, D.E., Matsuoka, Y., Bennett, V., and Hartwig, J.H. a-adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation. *J. Cell Biol.*, 161: 557-570, 2003.
- 7) 濱口哲也、松岡洋一郎、川口博明、高須賀信夫、深町勝巳、吉田浩己、津田洋幸 (2003) ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性の機序解析-第2報- 乳癌基礎研究 12:45-49

## 2. 学会発表

- 1) 松岡洋一郎、濱口哲也、川口博明、吉田浩己、津田洋幸 (2004) ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット乳がんの発生母地について —化学発がんとは自然発がんの比較— 第12回日本乳癌学会、北九州
- 2) 松岡洋一郎、濱口哲也、津田洋幸 (2004) 経産ヒト正常型 c-Ha-ras

遺伝子トランスジェニックラットの乳腺発がん抵抗性について 第63回日本癌学会、福岡

- 3) Matsuoka, Y., Hamaguchi, T., Kawaguchi, H., Yoshida, H., Tsuda, H. (2003) Terminal endbuds and acini as the respective major targets for chemical and sporadic carcinogenesis in the mammary glands of human c-Ha-ras protooncogene transgenic rats. Mini-Symposium, 24th. Congress of the International Association for Breast Cancer Research, Sacramento, CA.
- 4) Matsuoka, Y., Asamoto, M., Hamaguchi, T., Takasuka, N., and Tsuda, H. (2003) The human c-Ha-ras protooncogene transgenic rat model. 7th. Thai National Cancer Conference Satellite Symposium, Bangkok, Thailand.
- 5) 濱口哲也、松岡洋一郎、川口博明、高須賀信夫、深町勝巳、吉田浩己、津田洋幸 (2003) ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット乳がんの発生母地について —化学発がんとは自然発がんの比較— 第62回日本癌学会、名古屋
- 6) 松岡洋一郎、濱口哲也、川口博明、吉田浩己、津田洋幸 (2003) ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性の機序解析-最終報 Ras 情報伝達系活性化により乳腺上皮に何が起こるか 第13回乳癌基礎研究会、鳥取
- 7) 松岡洋一郎、濱口哲也、川口博明、高須賀信夫、吉田浩己、津田洋幸 (2003) ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットを用い

た乳腺前がん病変の研究 第56回  
日本細胞生物学会、大津

8) 松岡洋一郎、川口博明、濱口哲也、  
高須賀信夫、吉田 緑、深町勝巳、  
吉田浩己、津田洋幸 (2003) ヒト  
正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジ  
ェニックラット乳腺の生物学的特  
性と発がん高感受性の関連 第92  
回日本病理学会、福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

图1

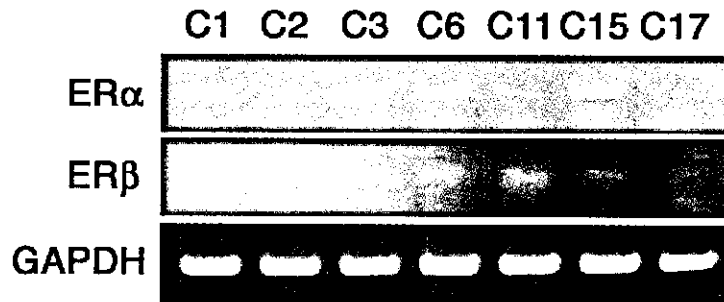


图2

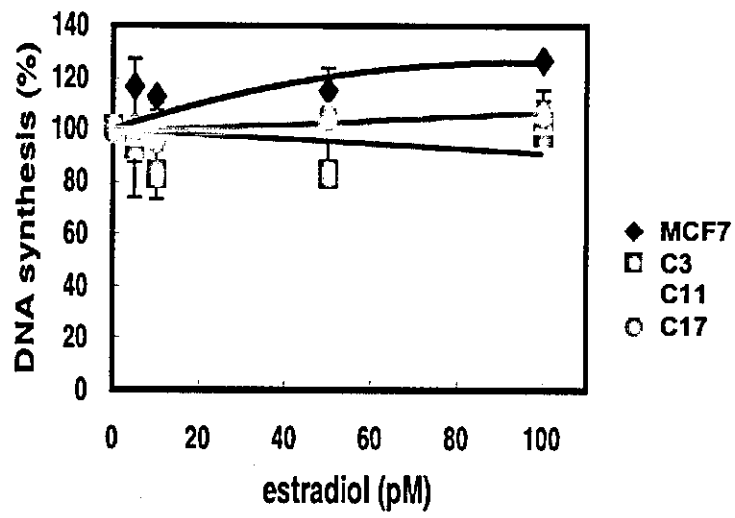


Figure 3

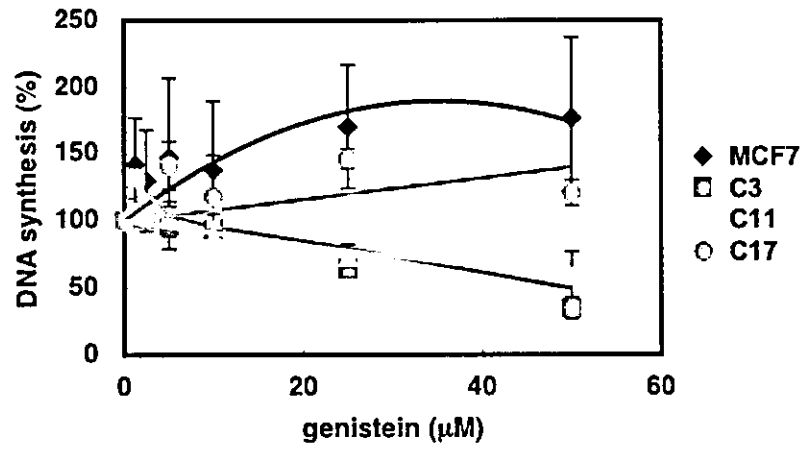


Figure 4

### RT-PCR Analysis

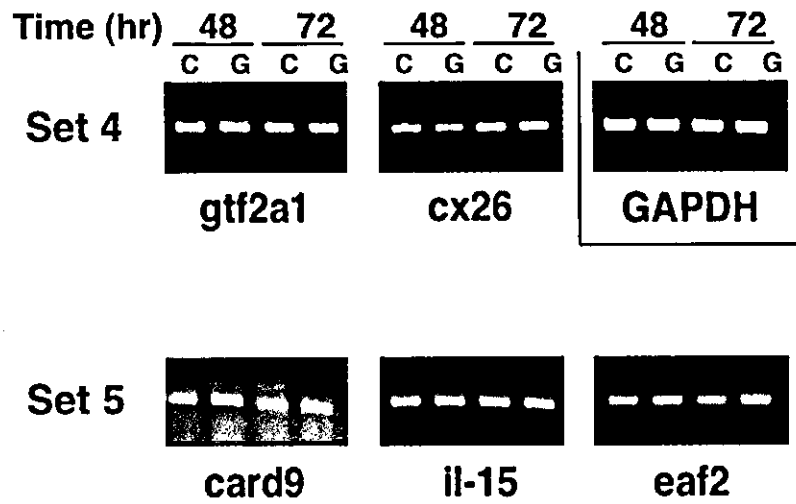




Figure 5

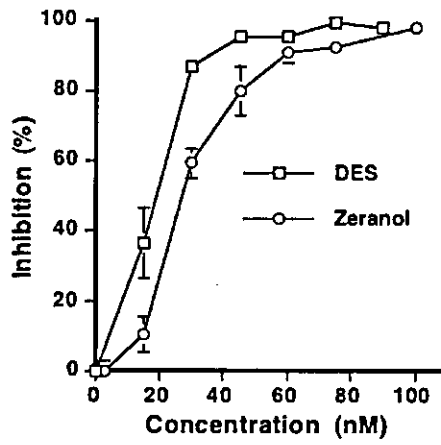


Figure 6

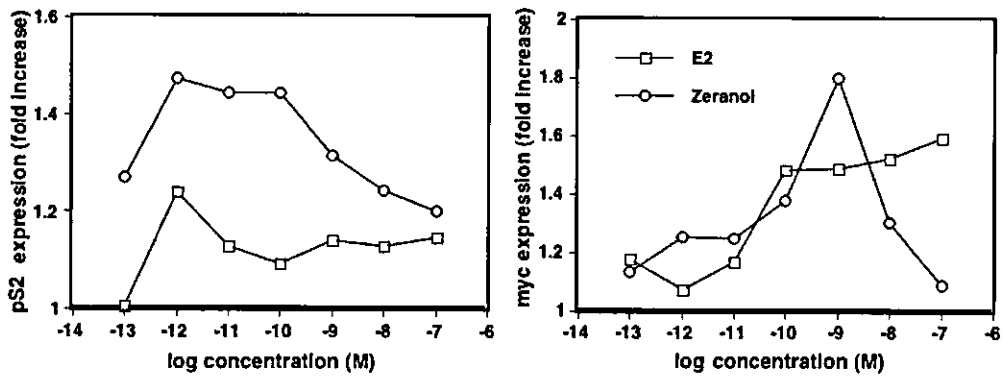


表1

Cell line	Sequence of gene				
	<i>p53</i>	Rat <i>Ha-ras</i> <sup>a</sup>		Human <i>Ha-ras</i> <sup>b</sup>	
		exon 1	exon 2	codon 12	codon 61
C1	W <sup>c</sup>	W	W	GA/TC	W
C2	W	W	W	GA/TC	CGG
C3	W	W	W	GAC	W
C6	W	NA <sup>e</sup>	NA <sup>e</sup>	GA/TC	W
C11	GGC(codon 246 <sup>d</sup> )	W	W	GAC	CAT
C15	W	W	W	GA/TC	CAT
C17	W	W	W	GAC	W

<sup>a</sup>The entire region flanking exons 1 and 2 including codons 12 and 61, respectively, were sequenced.

<sup>b</sup>The wild-type sequences are as follows: codon 12 is GGC and codon 61 is CAG.

<sup>c</sup>W denotes the wild-type sequence.

<sup>d</sup>The wild-type sequence of codon 246 is CGC.

<sup>e</sup>The rat *Ha-ras* was not sequenced because of unsuccessful PCR amplification.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takatori S, Kitagawa Y, Oda H, Miwa G, Nishikawa J, Nishihara T, Nakazawa H, Hori S.	Estrogenicity of Metabolites of Benzophenone Derivatives Examined by a Yeast Two-Hybrid Assay.	J Health Sci	49	91-98	2003
Nikaido Y, Yoshizawa K, Pei R-J, Yuri T, Danbara N, Hatano T, Tsubura A.	Prepubertal zearalenone exposure suppresses <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced mammary tumorigenesis but causes severe endocrine disruption in female Sprague-Dawley rats.	Nutr Cancer	47	164-170	2003
Pei R-J, Sato M, Yuri T, Danbara N, Nikaido Y, Tsubura A.	Effect of prenatal and prepubertal genistein exposure on <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats.	In Vivo	17	349-358	2003
Sato M, Pei R-J, Yuri T, Danbara N, Nakane Y, Tsubura A.	Prepubertal resveratrol exposure accelerates <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced mammary carcinoma in female Sprague-Dawley rats.	Cancer Lett	202	137-145	2003
Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A.	Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring.	Reprod Toxicol	18	803-811	2004
Yuri T, Nikaido Y, Shimano N, Uehara N, Shikata N, Tsubura A.	Effects of prepubertal zeranol exposure on estrogen target organs and <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats.	In Vivo	18	755-762	2004

Hamaguchi T, Matsuoka Y, Bechberger J, Ohnishi T, Fujita K, Naus CC, Kusunoki M, Tsubura A, Tsuda H.	Establishment of an apoptosis- sensitive rat mammary carcinoma cell line with a mutation in the DNA-binding region of p53.	Cancer Lett			in press
Tsubura A, Uehara N, Kiyozuka Y, Shikata N.	Dietary factors modifying breast cancer risk and relation to time of intake.	J Mammary Gland Biol Neoplasia			in press
Nikaido Y, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A.	Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of the estrogen target organs in female CD-1 mice.	In Vivo			in press
斐 仁正, 四方伸明, 坂 貴司, 段原直行, 辻田 (久徳) 美樹, 螺良愛郎.	周生期Genistein暴露による 化学発癌剤誘発ラット乳癌の 抑制ならびにその作用機序.	乳癌基礎研	13	41-46	2004