

Fig.5 Types of estrous cycle in rats following neonatal exposure to DES

Table 1 Reproductive performance of rats following neonatal exposure to DES

DES ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	Males					Females				
	0	0.05	0.5	5	5	0	0.05	0.5	5	5
At 12 weeks of age										
Copulation index (%) (No. copulated/no. mated)	100.0 (20/20)	95.0 (19/20)	100.0 (20/20)	90.0 (18/20)	90.0 (18/20)	100.0 (20/20)	95.0 (19/20)	100.0 (20/20)	90.0 (18/20)	90.0 (18/20)
Fertility index (%) (No. pregnant/no. copulated)	100.0 (20/20)	84.2 (16/19)	95.0 (19/20)	100.0 (18/18)	100.0 (18/18)	90.0 (18/20)	81.3 (13/16)	80.0 (16/20)	0.0 ** (0/18)	0.0 ** (0/18)
At 23 weeks of age										
Copulation index (%) (No. copulated/no. mated)	100.0 (20/20)	95.0 (17/20)	100.0 (20/20)	90.0 (18/20)	90.0 (18/20)	100.0 (20/20)	60.0 ** (12/20)	90.0 (18/20)	90.0 (18/20)	90.0 (18/20)
Fertility index (%) (No. pregnant/no. copulated)	89.5 (17/19)	100.0 (17/17)	100.0 (20/20)	83.3 (15/18)	83.3 (15/18)	80.0 (16/20)	58.3 (7/12)	33.3 ** (6/18)	33.3 ** (6/18)	33.3 ** (6/18)
At 34 weeks of age										
Copulation index (%) (No. copulated/no. mated)	100.0 (20/20)	90.0 (18/20)	100.0 (20/20)	95.0 (19/20)	95.0 (19/20)	55.0 (11/20)	25.0 (5/20)	20.0 * (4/20)	20.0 * (4/20)	20.0 * (4/20)
Fertility index (%) (No. pregnant/no. copulated)	95.0 (19/20)	72.2 (13/18)	90.0 (18/20)	84.2 (16/19)	84.2 (16/19)	54.5 (6/11)	60.0 (3/5)	25.0 (1/4)	25.0 (1/4)	25.0 (1/4)
At 56 weeks of age										
Copulation index (%) (No. copulated/no. mated)	90.0 (18/20)	60.0 (12/20)	60.0 (12/20)	79.8 (15/20)	79.8 (15/20)					
Fertility index (%) (No. pregnant/no. copulated)	72.2 (13/18)	66.7 (8/12)	83.3 (10/12)	66.7 (10/15)	66.7 (10/15)					
At 68 weeks of age										
Copulation index (%) (No. copulated/no. mated)	57.9 (11/19)	47.4 (9/19)	55.6 (10/18)	55.6 (10/18)	55.6 (10/18)					
Fertility index (%) (No. pregnant/no. copulated)	72.7 (8/11)	66.7 (6/9)	80.0 (8/10)	50.0 (5/10)	50.0 (5/10)					

*P<0.05, **P<0.01 as compared with 0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ group

Table 2 Development of F1 pups from rats following neonatal exposure to DES

DES ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0	0.05	0.5	5
At the 1st parturition				
Number of dams	18	13	16	0
Gestation length in days	22.1 \pm 0.3	22.2 \pm 0.7	22.1 \pm 0.5	
Number of newborns	13.9 \pm 3.4	12.9 \pm 3.9	14.1 \pm 3.6	
Pup weight (g)	6.9 \pm 0.3	6.8 \pm 0.6	6.7 \pm 0.7	
Female	6.5 \pm 0.3	6.4 \pm 0.6	6.3 \pm 0.7	
Viability index on PND 4	99.7 \pm 1.5	98.5 \pm 3.0	99.0 \pm 3.0	
At the 2nd parturition				
Number of dams	16	7	8	0
Gestation length in days	22.3 \pm 0.5	22.9 \pm 0.4 *	22.5 \pm 0.5	
Number of newborns	12.8 \pm 3.9	12.7 \pm 3.7	7.6 \pm 5.8 *	
Pup weight (g)	7.2 \pm 0.8	6.9 \pm 0.7	7.4 \pm 0.9	
Female	6.7 \pm 0.7	6.8 \pm 0.7	6.6 \pm 0.6	
Viability index on PND 4	93.3 \pm 25.1	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	
At the 3rd parturition				
Number of dams	6	3	1	0
Gestation length in days	22.4 \pm 0.5	22.7 \pm 0.6	22.0	
Number of newborns	12.0 \pm 4.3	11.0 \pm 6.6	14.0	
Pup weight (g)	7.1 \pm 0.5	7.2 \pm 1.2	6.8	
Female	6.6 \pm 0.5	6.8 \pm 1.4	6.7	
Viability index on PND 4	96.5 \pm 5.9	100.0 \pm 0.0	100.0	

*P<0.05 as compared with 0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ group

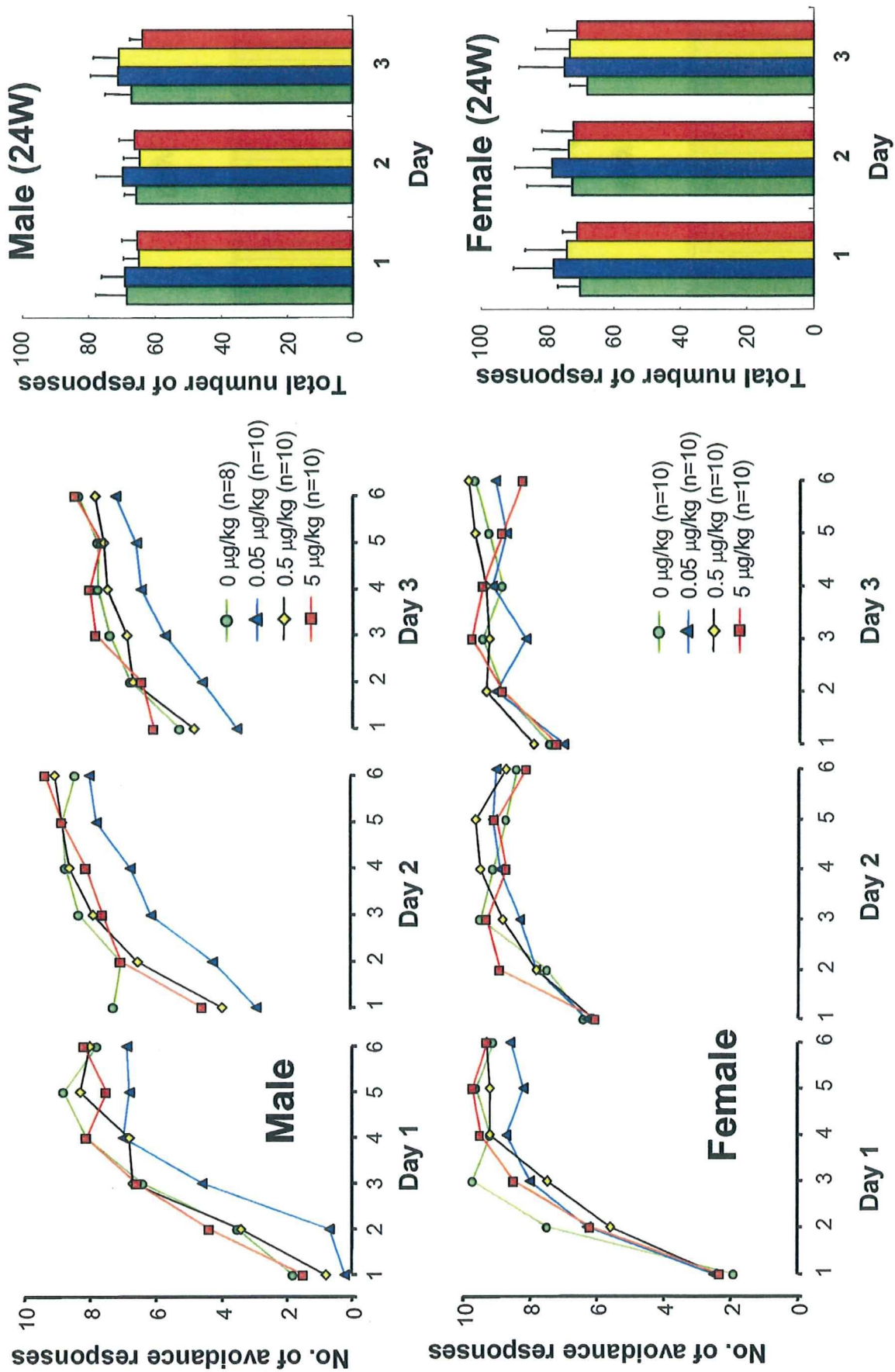


Fig.6 Shuttle-box avoidance responses in 24-week old rats following Neonatal exposure to DES

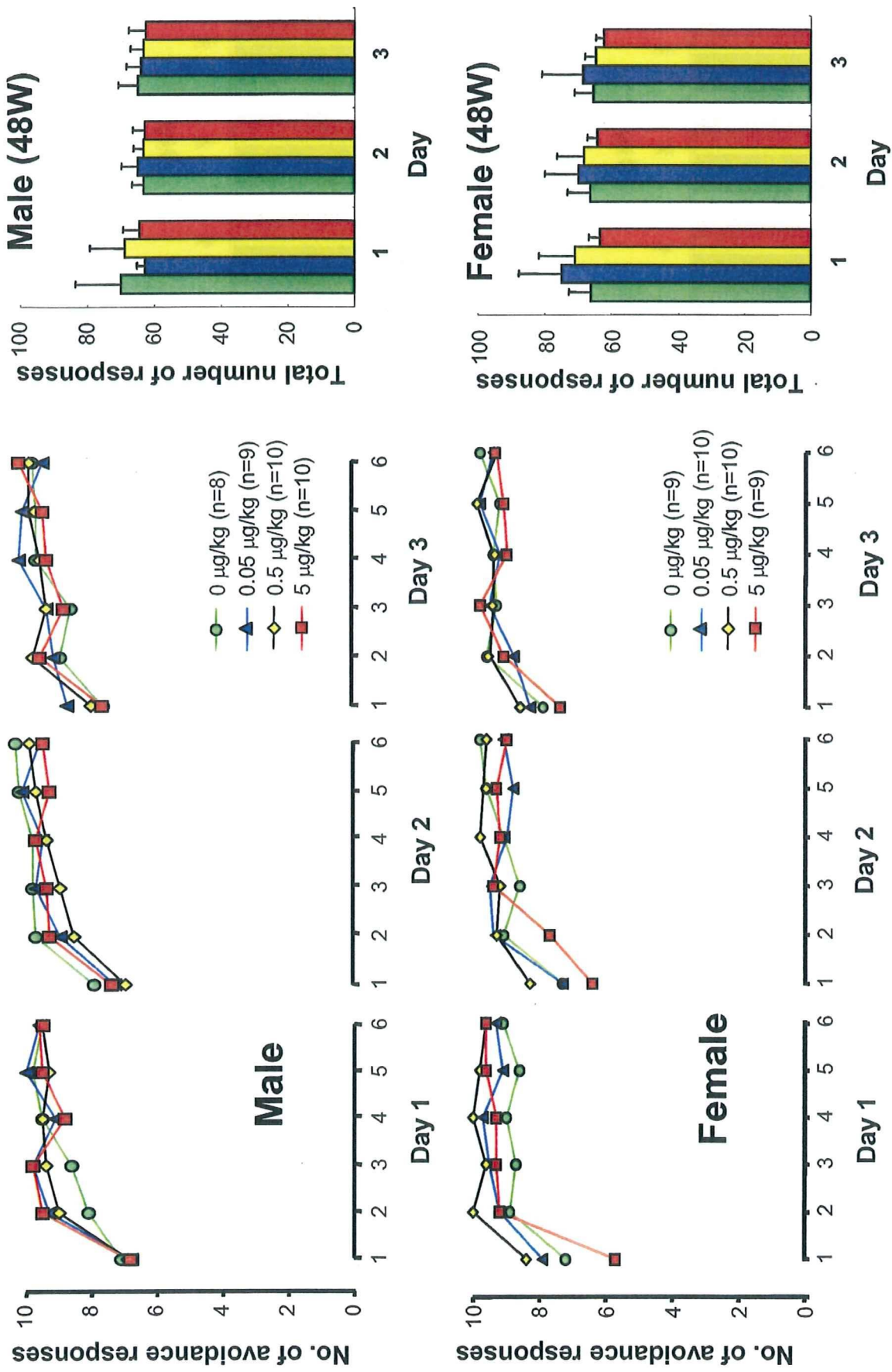
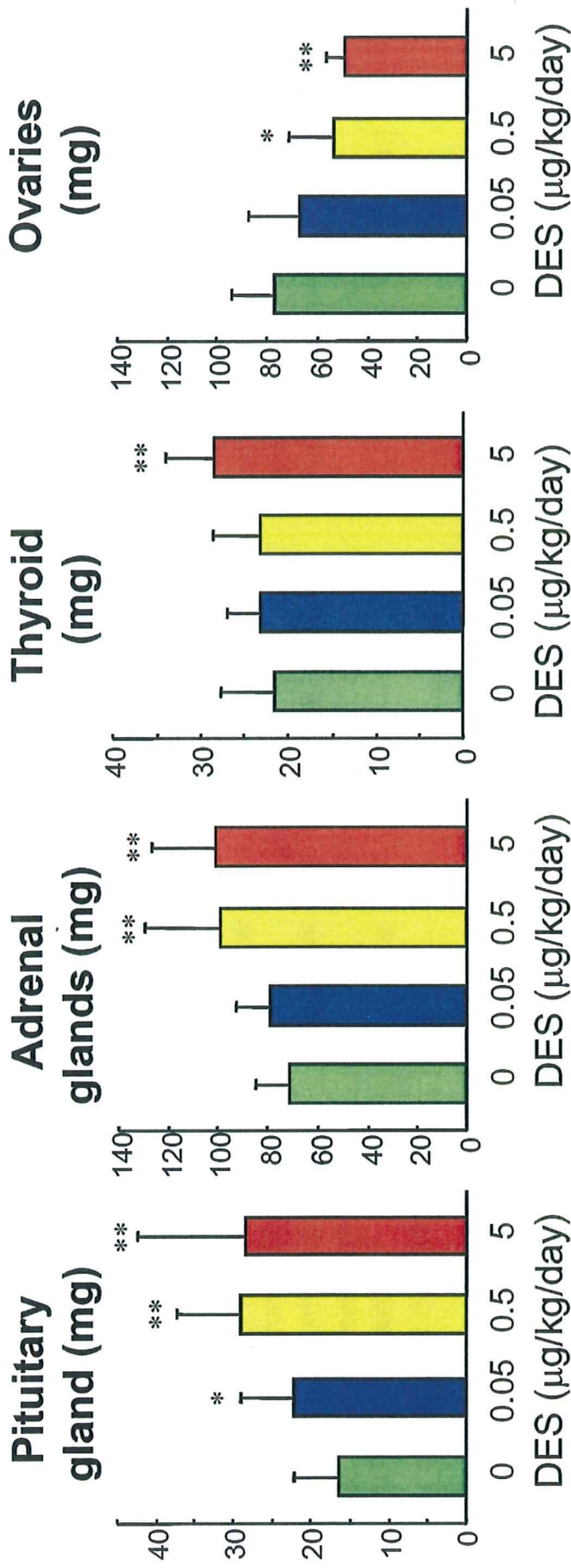


Fig. 7 Shuttle-box avoidance responses in 48-week old rats following neonatal exposure to DES

Table 3 Sperm counts and organ weights of male rats following neonatal exposure to DES

DES ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)		0	0.05	0.5	5
At 26 weeks of age					
Number of males		10		10	8
No. of sperm per caudal epididymis weight (million/g)		1344 \pm 508	1078 \pm 396	944 \pm 184	1216 \pm 278
Sperm head counts per testis weight (million/g)		106 \pm 14	103 \pm 27	95 \pm 23	83 \pm 13
Organ weights					
Testes (g)		3.72 \pm 0.29	3.70 \pm 0.27	3.71 \pm 0.38	3.59 \pm 0.25
Epididymides (g)		1.36 \pm 0.09	1.37 \pm 0.06	1.38 \pm 0.07	1.37 \pm 0.06
Seminal vesicles (g)		2.08 \pm 0.22	1.90 \pm 0.27	2.01 \pm 0.23	2.09 \pm 0.18
Ventral prostate (mg)		603 \pm 158	639 \pm 154	582 \pm 181	658 \pm 137
At 52 weeks of age					
Number of males		8	9	10	10
No. of sperm per caudal epididymis weight (million/g)		1122 \pm 370	1116 \pm 346	970 \pm 381	1065 \pm 311
Sperm head counts per testis weight (million/g)		73 \pm 19	78 \pm 15	70 \pm 10	70 \pm 8
Organ weights					
Testes (g)		3.72 \pm 0.20	3.84 \pm 0.19	3.80 \pm 0.27	3.72 \pm 0.37
Epididymides (g)		1.41 \pm 0.13	1.37 \pm 0.14	1.38 \pm 0.13	1.39 \pm 0.14
Seminal vesicles (g)		2.26 \pm 0.28	1.85 \pm 0.29	2.29 \pm 0.52	2.00 \pm 0.21
Ventral prostate (mg)		600 \pm 96	598 \pm 154	647 \pm 189	654 \pm 154



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared with 0 µg/kg/day group
Bar, S.D.

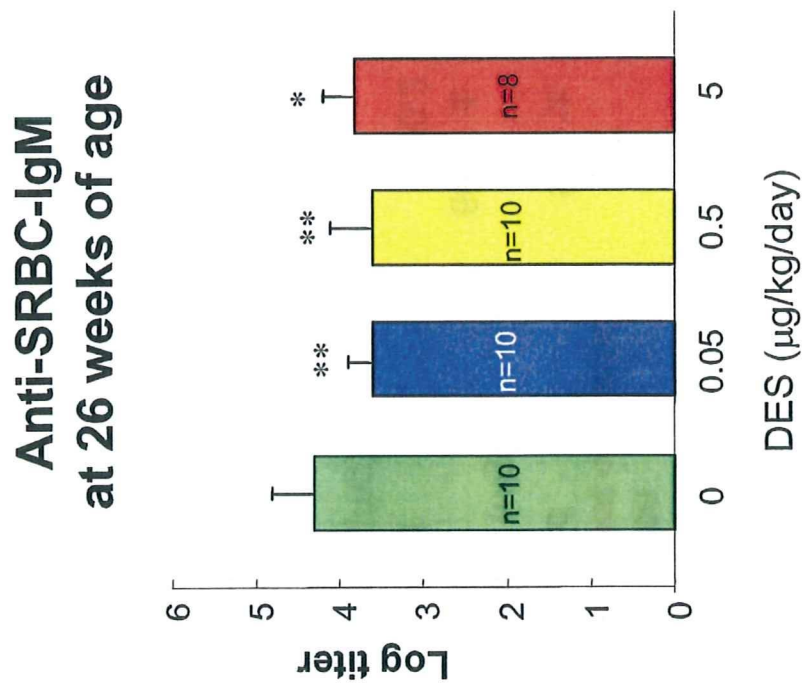
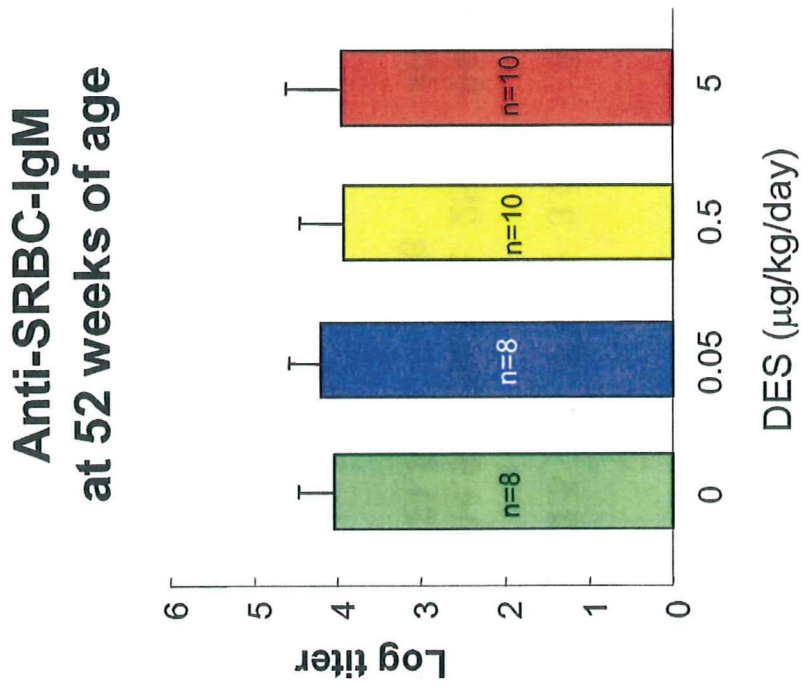
Number of females examined
 0 µg/kg/day group: 16 animals
 0.05 µg/kg/day group: 20 animals
 0.5 µg/kg/day group: 19 animals
 5 µg/kg/day group: 19 animals

Fig. 8 Organ weights of 54-week old females following neonatal exposure to DES

Table 4 Induced ovulation to 54-week old females following neonatal exposure to DES

DES ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0	0.05	0.5	5
Number of females examined	8	10	10	10
Induced ovulation				
Ovulated / not ovulated	7 / 1	6 / 4	9 / 1	8 / 2
Oocytes shed	5.7 \pm 3.1	6.5 \pm 2.5	5.0 \pm 3.0	3.8 \pm 2.5
Ovarian weight (mg)				
Ovulated	66.8 \pm 18.0	59.0 \pm 14.9	66.9 \pm 25.2	84.6 \pm 27.8
Not ovulated	90.2	124.8 \pm 21.5	36.6	46.5 \pm 4.9
Uterine weight (mg)				
Ovulated	677.2 \pm 186.7	841.3 \pm 280.1	742.3 \pm 195.4	505.2 \pm 118.7
Not ovulated	504.6	542.1 \pm 98.9	989.8	424.5 \pm 50.8

Females were sacrificed at 16-17 hours after injection of 10 IU hCG and their oviducts examined for oocytes.



*P<0.05, **P<0.01 as compared with 0 µg/kg/day group
Bar, S.D.

Fig. 9 Antibody response to SRBC in male rats following neonatal exposure to DES

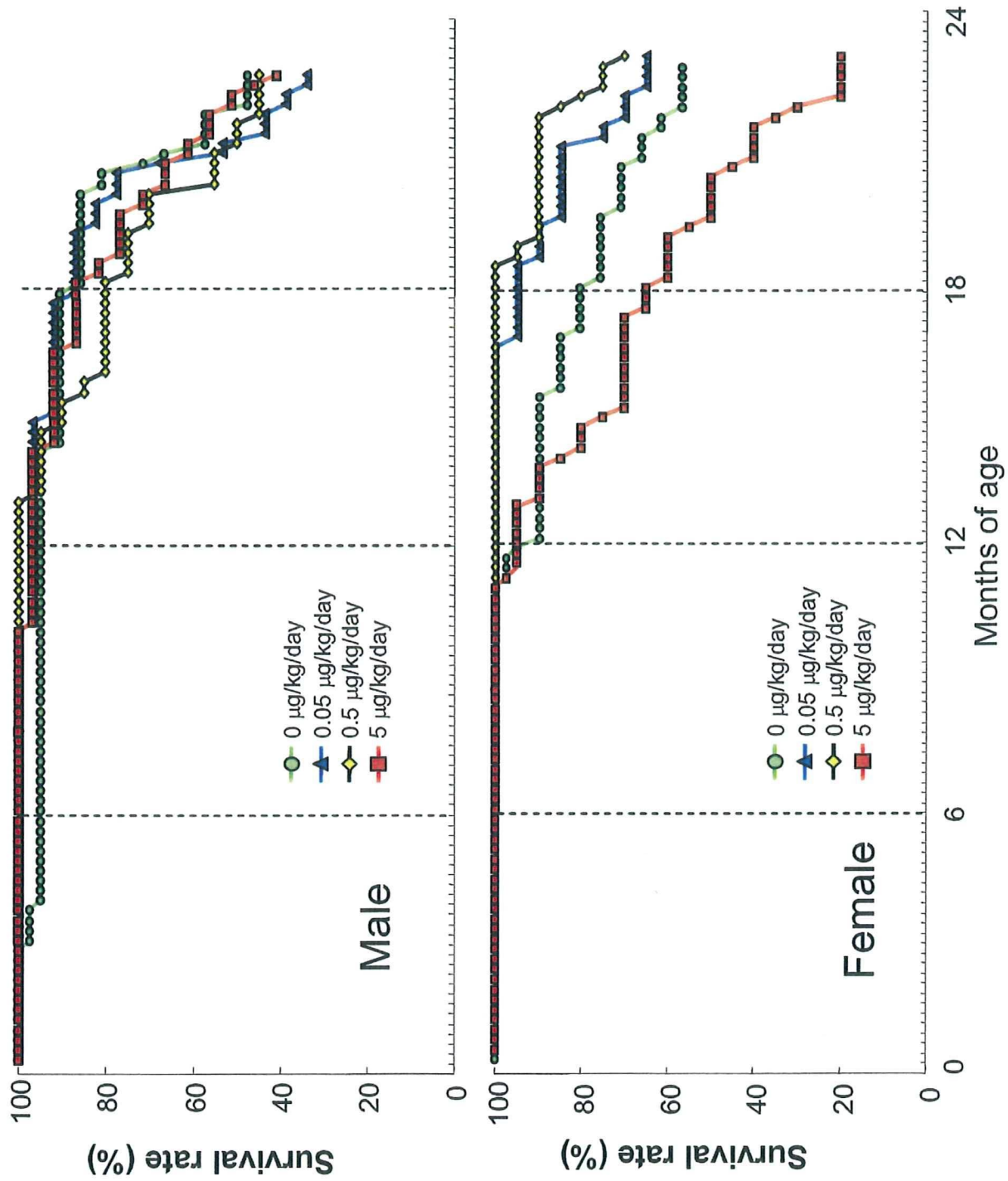


Fig. 10 Survival curve in rats following neonatal exposure to DES

〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉

10. 確定試験に関わる発がん性検討：

乳腺上皮系の分化形質を指標とした内分泌かく乱化学物質の発がん影響の検討

分担研究者 長村 義之

東海大学 医学部 基盤診療学系 病理診断学 教授

研究要旨

内分泌かく乱化学物質(EDCs)の乳腺に対する影響を確認するため、ラット及び乳がん由来株化細胞を用いて検索した。今年度は EDCs による乳がん由来細胞の ER α を介した作用を明らかにするため、RNAi により ER 発現を抑制した細胞の増殖能について観察した。その結果、ER 発現抑制下において MCF-7 の EDCs による細胞増殖能が明らかに減弱した。この事象に対する解析を進め、EDCs の乳腺上皮に対する影響を明らかにしていく。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質の乳腺発がんに及ぼす影響を検討するため、代表的な内分泌かく乱化学物質(EDCs)である Bisphenol A (BPA) および Diethylstilbestrol (DES) の作用を乳腺上皮の分化及び腫瘍化を指標とし検索を進めてきた。今年度はヒト乳腺腫瘍由来の株化細胞を用いて、以下の試験を実施した。

- 1) 乳がん由来株化細胞の化合物に対する反応性及び ER α 発現の比較
EDCs のヒト乳腺腫瘍由来の株化細胞を用いて評価するにあたり、ER(+)である MCF-7 及び BT474 を用いて化合物の作用および用量反応性を確認した。E2, DES および BPA の添加培養における細胞増殖を比較するとともに、Quantitative RT-PCR および免疫組織化学染色により ER α 発現についても検索した。この結果から、RNAi による ER α 発現抑制系の試験における細胞の選択、化合物添加の至適条件を見出した。
- 2) MCF-7 の RNAi による ER α 発現抑制
EDCs の乳腺腫瘍由来の株化細胞への作用が ER を介した機序であることを確認するため、RNAi により ER α 発現抑制を施した細胞における化合物の

影響を評価した。

B. 研究方法

- 1) 乳がん由来株化細胞の ER α 発現
ヒト乳がん由来株化細胞である MCF-7 : ER(+)HER2(-) および BT474 : ER(+)HER2(+) 細胞を DMEM (25U/ml penicillin, 25 mgU/ml streptomycin, 10% FBS) にて継代培養を行った後、両細胞共 Soto らの E-SCREEN Test に則り、12 穴の培養皿を用いて、2 万個の細胞をダルベッコ改変イーグル培養液 5% ウシ胎児血清存在下で 24 時間培養後、活性炭処理した血清 5% を含むフェノールレッドフリーの培養液に変え、これに E2, DES および BPA の 10^{-10} ~ 10^{-6} M を添加し 6 日間培養、7 日目に Cell counting Kit-8 を用いて細胞数を算出した。さらに、両細胞の ER α 発現を免疫組織化学(IHC) および Real time RT-PCR により検索した。
- 2) MCF-7 の RNAi による ER α 発現抑制
a) MCF-7 の shRNA による ER α 発現抑制、培養条件及び被験物質の添加
ヒト乳がん由来株化細胞である MCF-7 : ER(+) に対する RNAi 誘導による ER α 発現抑制は shRNA 法 (Short hairpin RNA は、18~29 塩基の dsRNA

領域と 3~9 塩基の loop 領域を含む、ヘアピン状に折り畳まれた一本鎖 RNA で、生体内に発現させると Dicer によって切断され、siRNA が切り出されるため、標的 RNA の切断・分解が誘導される) により実施した (Fig. 1)。MCF-7 は、DMEM (25U/ml penicillin, 25 gU/ml streptomycin, 10% FBS) にて、継代培養を行った後、リポフェクション法 (FuGENE HD, Roche) により piGENE PUR U6 ER α (iGENE 社) または Empty ベクターをトランスフェクションすることにより ER α の発現を抑制した。トランスフェクションの 24 時間後にピューロマイシンを用いてベクターが導入されなかった細胞を除去した。ピューロマイシン処置後の生存細胞は、フェノールレッドフリーの DMEM (25U/ml penicillin, 25 gU/ml streptomycin) に 5% 活性炭-0.5% dextran T70 で処理し、10% FBS を添加した培地を使用して 24Well プレートに 5 \times 10⁴/well の条件で播種した。Vehicle (0.1%DMSO) および被験物質 (E2, DES, BPA) は、以下に示す濃度で培地中に添加し、5%CO₂ インキュベーターにて、4 日間の培養を行った。その後、プレートから培養液を取り除き、Cell counting Kit-8 (Dojindo) を用いて 2 時間 37°C でインキュベーション後、450nm で吸光度を測定し、培地中の細胞数を算出した。

E2: 10⁻¹⁰~10⁻⁶ M

DES: 10⁻¹⁰~10⁻⁶ M

BPA: 10⁻⁷~10⁻⁵ M

b) Quantitative RT-PCR による ER α 発現抑制の確認

被験物質添加後に回収した細胞から SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて Total RNA を抽出し、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて 2g の Total RNA を逆転写した。100ng cDNA, SYBR GREEN Master Mix (Roche) 10 l, プライマー (ER α) 0.2 l で

Opticon 2 (Bio Rad) を用いて行った。また、ER_mRNA 発現レベルは相対定量で行い、 β -actin により補正した。

c) 免疫組織化学染色による ER α 発現抑制の確認

添加試験に使用した細胞の ER α 発現抑制を確認するため、一部の細胞はチャンバースライドに播種し、1 日培養した後 20% ホルマリン固定により作製した標本を 1 次抗体 (mouse anti-human ER α DAKO) を室温、1 時間反応させ、その後 DAKO Envision+ Kit を用いて染色した。

C. 研究結果

1) 乳がん由来株化細胞の ER α 発現 (EDCs による MCF-7 および BT474 細胞の影響)

MCF-7, BT474 細胞に各種条件で EDCs (E2, DES, BPA) を添加し、4 日間培養の後に細胞数を測定したところ、MCF-7 に おける E2 添加では 10⁻⁸M, DES 添加では 10⁻¹⁰M および 10⁻⁶M, BPA 添加では 10⁻⁸M および 10⁻⁶M において、Vehicle と比較し細胞数の有意な増加が認められた。一方、BT474 ではいずれの EDCs 投与群においても Vehicle と比較し有意な増殖は認められなかった (Fig. 2-4)。

また、MCF-7 および BT474 の ER α の発現量を Quantitative RT-PCR, 免疫組織化学染色を用い解析したところ、ER α の mRNA 発現量は MCF-7 が有意に高値を示し (Fig. 5), 免疫染色性でも MCF-7 において明らかに強い染色性を示した (Photo. 1)。

2) shRNA 導入による ER α 発現抑制された MCF-7 細胞の EDCs の影響

BPA を含む化合物の細胞増殖応答と ER α の関与を検討するため、shRNA による RNAi 誘導により ER α 発現抑制した MCF-7 またはコントロールとして、Empty ベクターをトランスフェクションした MCF-7 細胞を用いて E2, DES 及び BPA を種々の濃度で 4 日間培養し、細胞増殖について確認した。

その結果、MCF-7 に Empty ベクターをトランスフェクションした E2 添加群では Vehicle と比べ、 10^{-10} M、 10^{-8} M および 10^{-6} M のいずれの濃度においても、有意な増加が認められ、特に 10^{-8} M において明らかな高値を示した (Fig. 6)。DES 添加群では 10^{-10} M、 10^{-8} M および 10^{-6} M のいずれの濃度においても増加傾向が見られ、特に 10^{-8} M において、顕著な増加を示した (Fig. 7)。BPA 添加群についても 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M で有意な増殖が認められ、特に 10^{-6} M において、顕著な増殖が認められた (Fig. 8)。一方、shRNA により ER α 発現抑制した MCF-7 細胞では、いずれの化合物についても、すべての濃度で EDCs による細胞数の増加は認められなかった (Fig. 6-8)。また、ER α 発現抑制を確認するため Quantitative RT-PCR および免疫組織化学染色では、Empty ベクターをトランスフェクションした細胞に対し、明らかな ER α 発現抑制が確認された (Photo. 2)。

D. 考察

1) 乳がん由来株化細胞の ER α 発現 (EDCs による MCF-7 および BT474 細胞の影響)

ER 発現を示す乳がん由来の株化細胞である MCF-7、BT474 の両細胞を用いて化合物の反応性について精査したところ、MCF-7 においては、E2、DES および BPA のいずれの化合物添加においても、細胞数の増加ないし増加傾向が認められたが、BT474 では明らかな増加傾向が認められないという相反する結果が得られた。また、両細胞間の ER α の発現は、mRNA 発現および免疫組織化学の結果から、MCF-7 で明らかに強いことが示された。このことから化合物に対する反応性の差は ER α 発現の差に依存することが示唆された。

この結果を受け、RNAi を用いた ER α 発現抑制による影響の確認試験には、

ER α 発現の関与がより高い MCF-7 を用いることとした。

2) shRNA 導入による ER α 発現抑制された MCF-7 細胞の EDCs の影響

ER α 発現を抑制させた MCF-7 においては、E2、DES および BPA のいずれの化合物添加においても、Empty ベクターをトランスフェクションした細胞に対し、細胞数の増加は認められなかった。これは、今回の検索に用いた被験物質である E2、DES および BPA のいずれもが、ER α を介し、作用が発現することを示唆する変化であると考えられた。今後は細胞増殖能に関連した因子の発現変動や、その他の増殖因子の変動についても検索していき、本事象を明らかにしていく。

E. 結論

ヒト乳癌由来の株化細胞を用いて E2、DES 及び BPA について評価した。その結果、MCF-7 では BPA を含めて細胞増殖作用を示唆する結果が得られた。

さらに、ER α 発現抑制系により化合物の細胞増殖能を評価したところ、ER α 発現抑制により化合物による各細胞増殖活性は明らかに減弱した。この結果から、MCF-7 の ER α を介する作用が明確に示された。この事象をより明らかにするため、細胞増殖以外にも関連因子に着目した観察が必要であると考えられた。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Y Sekido, S Umemura, S Takekoshi, Y Suzuki, Y Tokuda, T Tajima, RY Osamura: Heterogeneous gene alterations in primary breast cancer contribute to discordance between primary and asynchronous metastatic/recurrent sites: HER2 gene

amplification and p53 mutation,
International Journal of Oncology 22,
1225-1232, 2003

2) S Umemura, H Itoh, M Ohta, Y
Suzuki, M Kubota, Y Tokuda, T Tajima,
RY Osamura: Immunohisto-
chemical Evaluation of Hormone Receptor for
Routine Practice of Breast Cancer:
Highly Sensitive Procedurs
Significantly Contribute to the
Correlation with Biochemical Assays,
AIMM 11(1), 62-72, 2003

2. 学会発表

1) 日本トキシコロジー学会学術年会,
第 32 回研究発表会, 2005 年 6 月 29
日-7 月 1 日(タワーホール船堀)

Diethylstilbestrol の周産期曝露がラッ
ト乳腺上皮の分化および腫瘍発生に及
ぼす影響 (P169)

美谷島 克宏, 竹腰 進, 柿本 恒知,
長村 義之 他

2) 環境ホルモン学会, 第 8 回研究発
表会, 2005 年 9 月 27-29 日(江戸東京
博物館)

Diethylstilbesterol および Bisphenol A
の周産期曝露がラット DMBA 誘発乳
腺発がんに及ぼす影響 (P210)

美谷島 克宏, 柿本 恒知, 竹腰 進,
長村 義之

H. 知的所有権の出願・取得状況

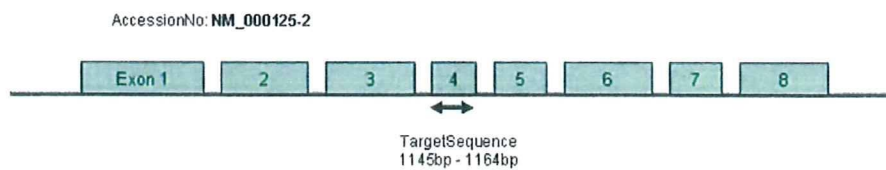
1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

Fig. 1 ER α RNAi 発現コンストラクト



ER α RNAi発現コンストラクト

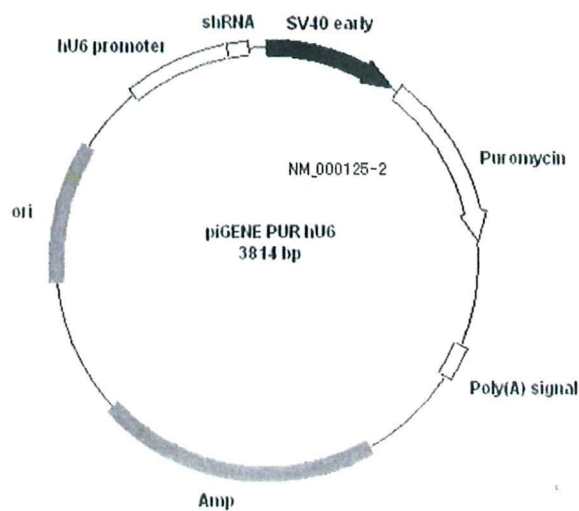


Fig.2 MCF-7 および BT474 における E2 暴露

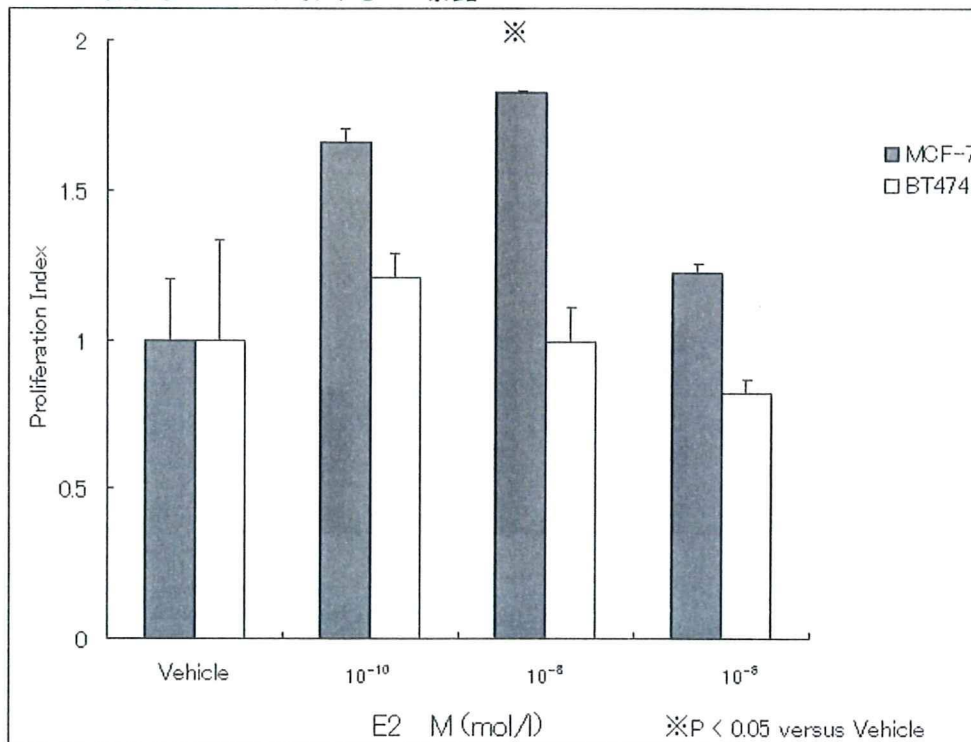


Fig.3 MCF-7 および BT474 における DES 暴露

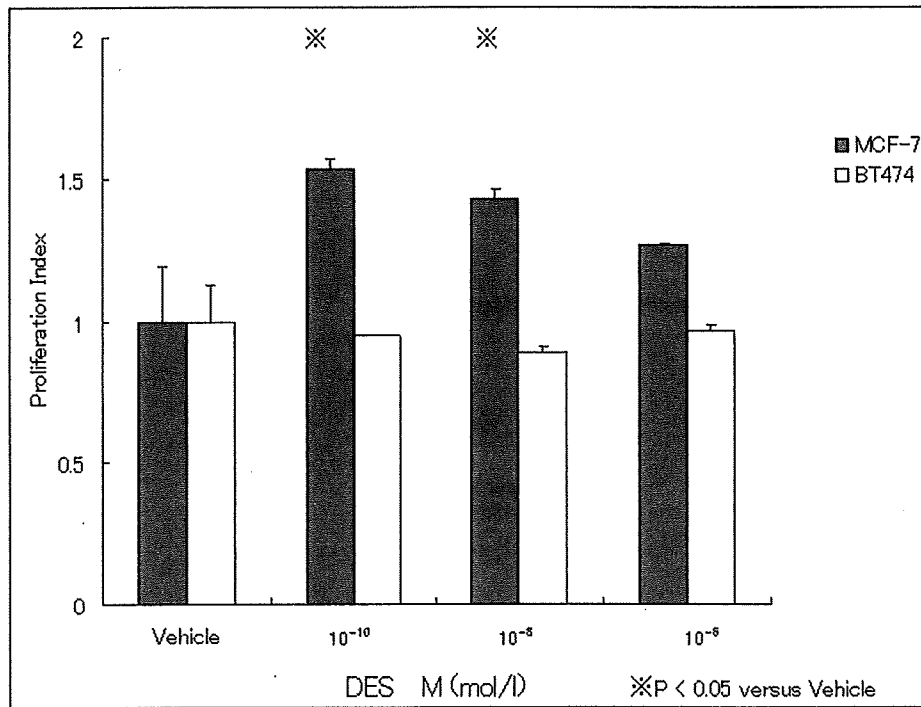


Fig. 4 MCF-7 および BT474 における BPA 暴露

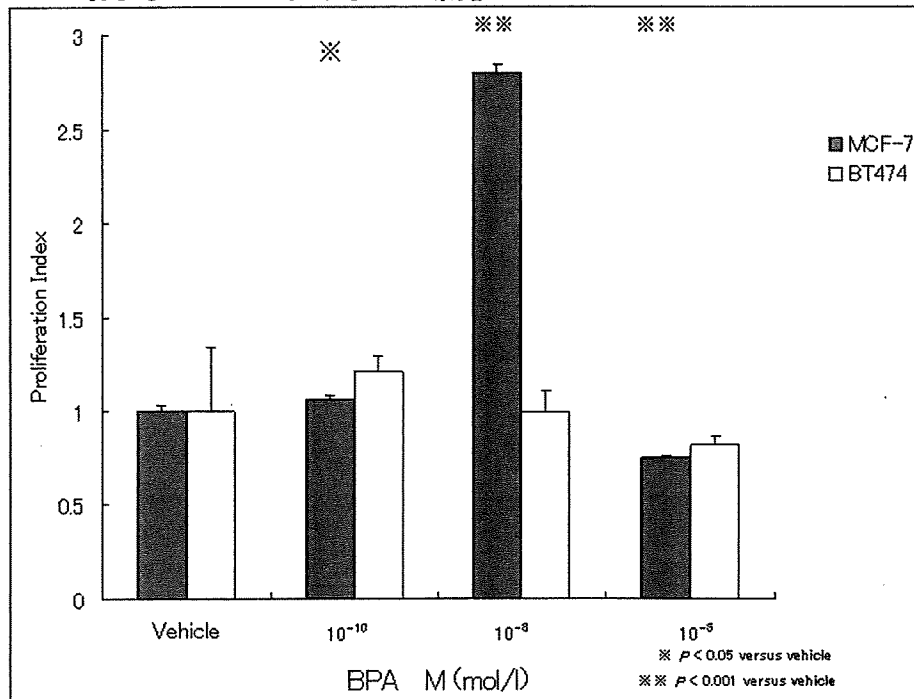
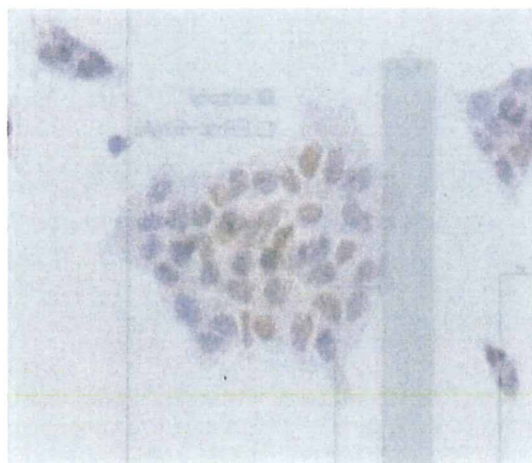


Photo.1 免疫組織染色による ER α 発現量の確認
BT474



MCF-7

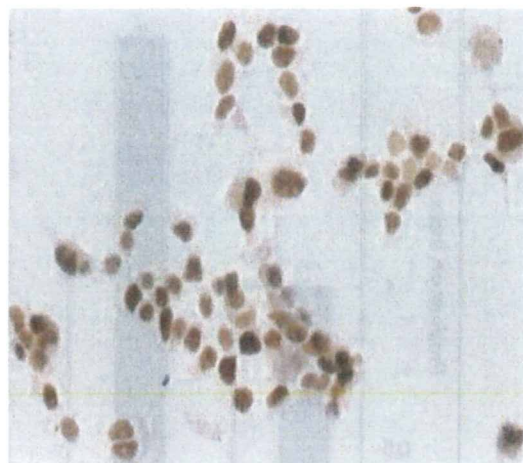


Fig.5 ER α RNAi を行った MCF-7 細胞における Quantitative RT-PCR

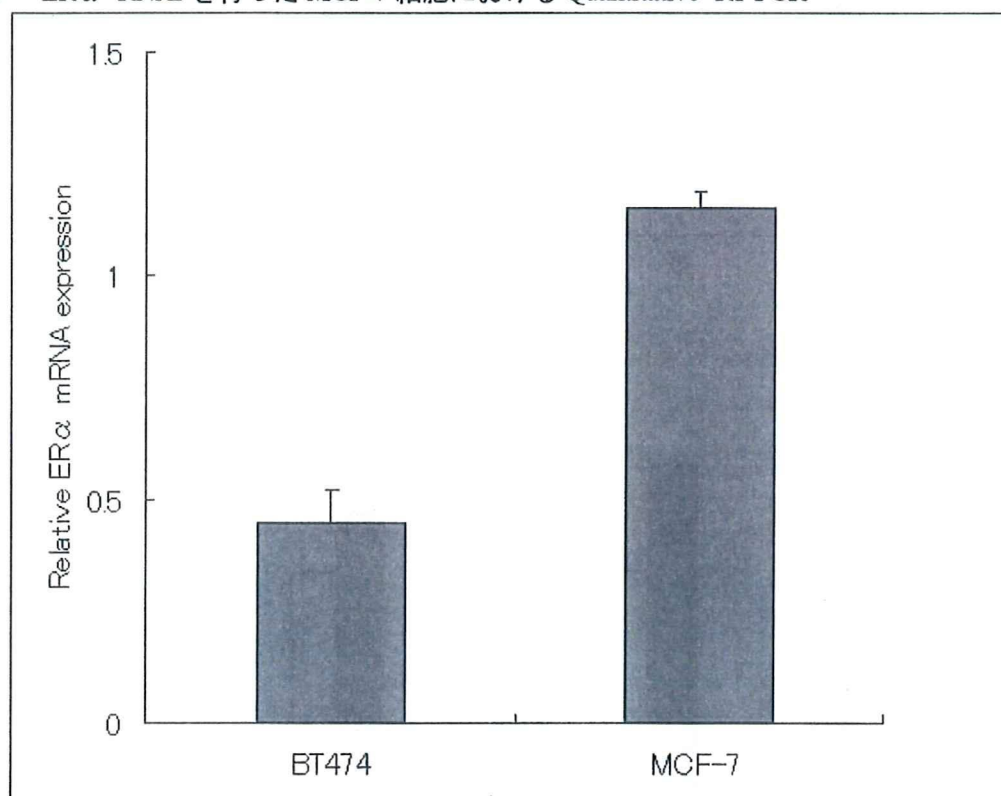


Fig.6 ER α 発現抑制 MCF-7 細胞における E2 暴露

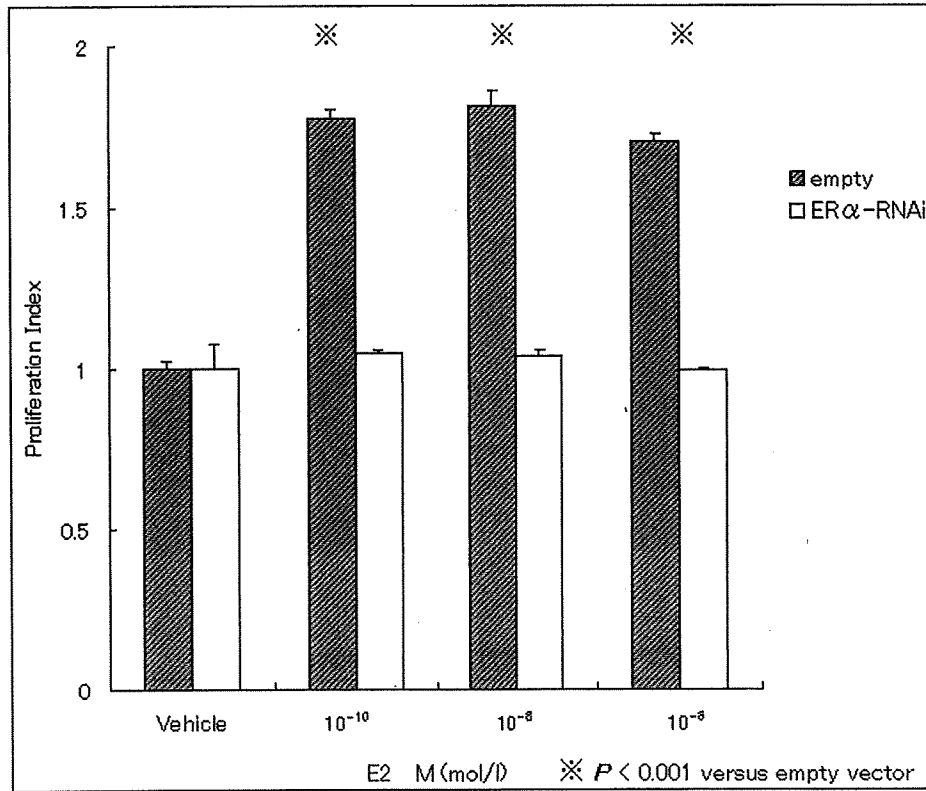


Fig.7 ER α 発現抑制 MCF-7 細胞における DES 暴露

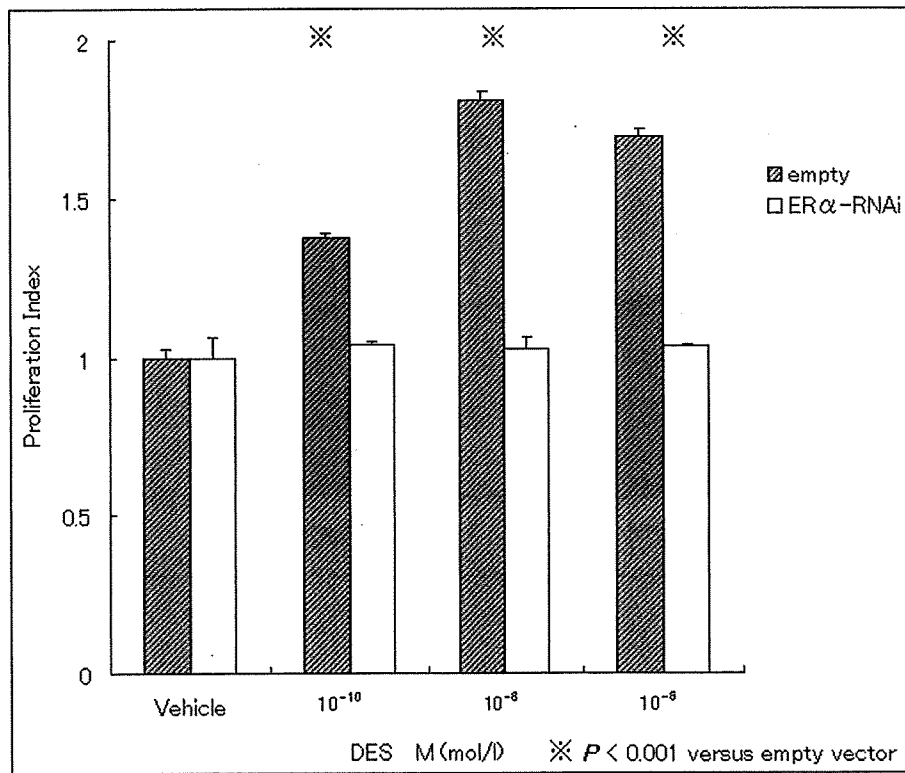


Fig.8 ER α 発現抑制 MCF-7 細胞における BPA 暴露

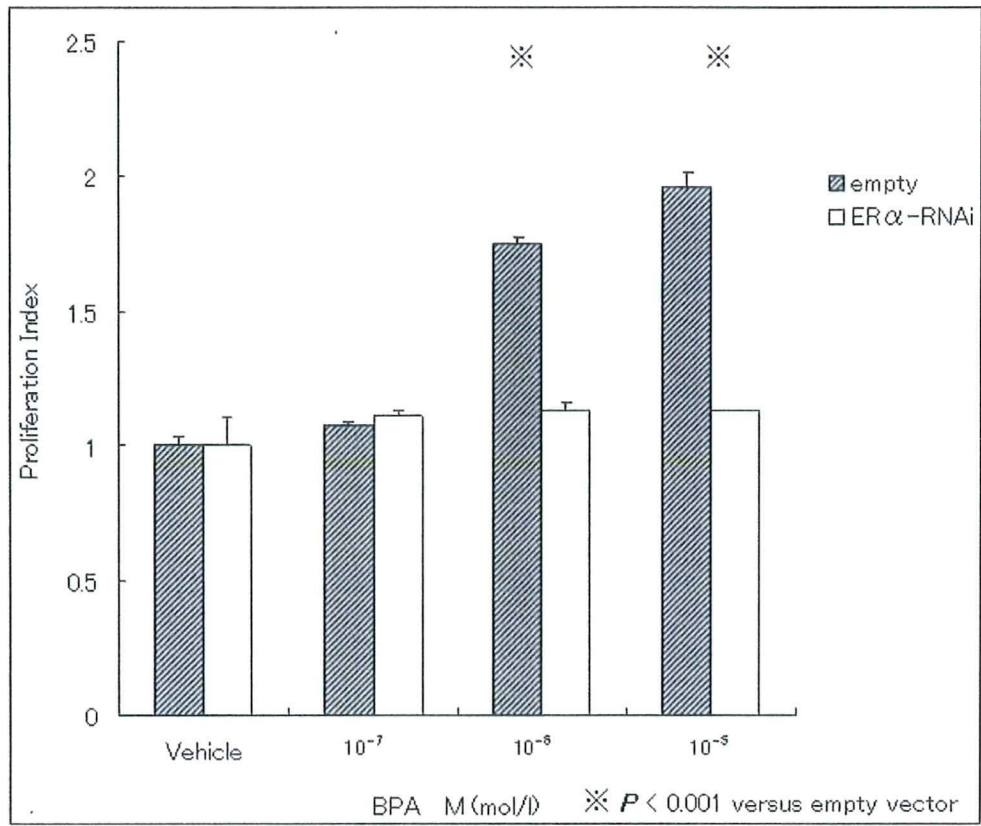
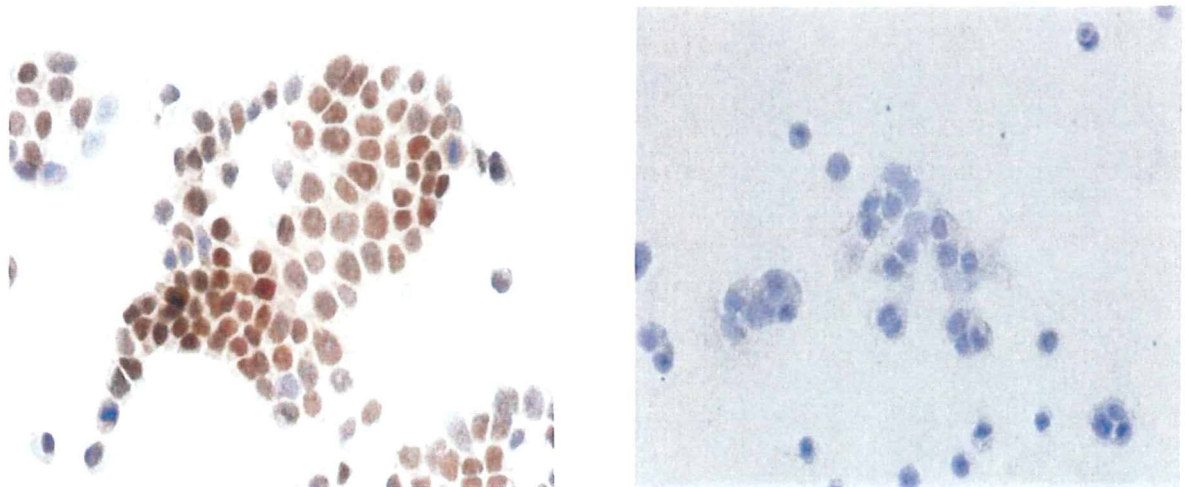


Photo.2 ER α RNAi を行った MCF-7 細胞における ER α の免疫組織化学染色

MCF-7 Control

MCF-7 ER α -RNAi



11. 確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究

分担研究者 西川 淳一 大阪大学大学院 薬学研究科 助教授

研究要旨

これまでの研究から、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質の中には多種類の核内受容体へ結合する物質が存在する事が分かってきた。本年度は、引き続き、核内受容体の一種で外来異物の受容体である SXR について検討した。その結果、SXR は免疫系のキーレギュレーターである NFκB と相互に抑制的な関係にある事が分かった。SXR と NFκB のクロストークは、内分泌かく乱物質の免疫系への影響を考える際に重要である。

A. 研究目的

SXR (Steroid and Xenobiotic Receptor) は、外来異物の受容体として 1998 年に Bruce Blumberg 等によってクローニングされた核内受容体である。SXR は、外来異物依存的に薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現を誘導するが、CYP3A4 は臨床的に用いられている薬物の 50% 以上の代謝に関わる事が知られている非常に重要な酵素である。さらに、SXR は、Rifampicin、Taxol、Phenytoin、SR12813、Clotrimazole、Mifepristone、Phenobarbital、St John's wort、Ritonavir 等の多様な構造の外来異物をリガンドとし、化学物質の代謝に中心的な役割を果たしている。私は、これまで様々な化学物質の多種類の核内受容体への影響を調べてきたが SXR については検討しておらず、本年度は内分泌かく乱作用が疑われている化学物質の SXR への影響について検討した。

B. 研究方法

細胞培養

肝腫瘍細胞 HepG2 は American Type Culture Collection より購入し、10% FBS を添加した EMEM 中、37°C、5% CO₂ の条件で培養した。遺伝子導入 24 時間前に、細胞を 96 穴細胞培養プレートに移した。

レポーター遺伝子試験

SXR 発現ベクターとしてヒト由来 SXR を CMV プロモーター下流につないだ pCDG1-hSXR を、NFκB サブユニット p65 発現ベクターとして p65 遺伝子を CMV プロモーター下流につないだ pCMX-p65 を用いた。レポーター遺伝子としては、SXR 認識配列 (XRE; Xenobiotic Response Element) をルシフェラーゼ遺伝子上流につないだ pXRE-luc と NFκB 認識配列を同様につないだ pNFκB-luc を用いた。発現ベクターとレポーター遺伝子を、HepG2 細胞にリン酸カルシウム法で遺伝子導入し、化学物質添加後のルシフェラーゼ活性の値を測定した。また、