

平成21年 3月30日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580383
 研究課題名（和文） 環境汚染物質の塩素置換体の遺伝子発現解析による生体への影響評価
 研究課題名（英文） Effects of the chlorinated derivatives of environmental pollutant on gene expression
 研究代表者
 久留戸 涼子（KURUTO RYOKO）
 静岡英和学院大学短期大学部・食物学科・准教授
 研究者番号 50205217

研究成果の概要：多環芳香族炭化水素(PAHs)は、ダイオキシン類と同様、様々な燃焼過程で生成され、環境中に排出されている。また、近年 PAHs に塩素が付加した ClPAHs も、環境中から検出され、これらの塩素置換体は、難分解性、蓄積性が増すため、生体への影響も危惧される。そこで、まず上記物質について、乳がん細胞 MCF7 を用いて、E2 制御の PgR 及び pS2、AhR 制御の Cyp1A1、PCR アレイ上の遺伝子の発現レベルを Real-time PCR により解析した。その結果、いくつかの遺伝子で塩素化により発現レベルの変化が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境汚染、塩素処理、エストロジェン、多環芳香族炭化水素、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

これまで、エストロジェンの塩素処理副生成物や塩素化した多環芳香族炭化水素(Cl-PAHs)について、エストロジェン活性、AhR 活性について調べてきた。しかし、その他の生体に対する影響については、まだ調べられていない。塩素化物は、その難分解性、蓄積性が危惧されており、その生体への影響について解明することが急務である。また、同じようなエストロジェン様活性を示す化合物でも、マイクロアレイなどを用いた遺伝子発現解析では、異なった遺伝子発現制御が

報告され、その作用の違いが明らかにされている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、エストロジェンの塩素処理副生成物や Cl-PAHs について、植物由来のエストロジェン活性をもつフラボノイド類の塩素処理副生成物と合わせて、その作用が遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかを調べることにした。

まず、E2 制御の PgR 及び pS2、AhR 制御の Cyp1A1 の各遺伝子の発現について調べ、

特定の遺伝子を増幅するように開発された 96 well plate を用いた real-time PCR である PCR アレイ (Human Breast Cancer and Estrogen Receptor Signaling と Human Cancer Drug Resistance and Metabolism) などを用いて網羅的に解析し、その生体への影響を明らかにすることを目的とする。

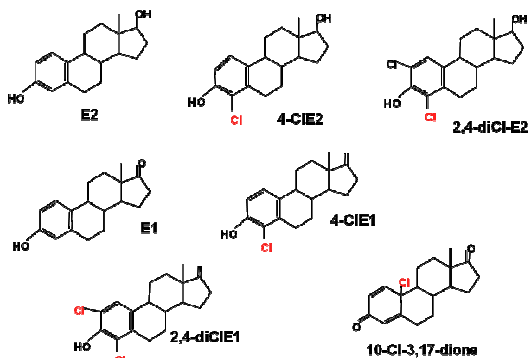
(2) 同時に、生体影響評価として、適切な遺伝子マーカーを見つけ、新規評価システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) エストロゲン類、フラボノイド類の塩素処理副生成物の合成及び精製

これまでに確立した方法に従って、エストラジオール (E2)、エストロン (E1)、Genistein、Daidzein、Naringenin、Apigenin、Crysin を塩素処理し、塩素処理副生成物を単離精製する。

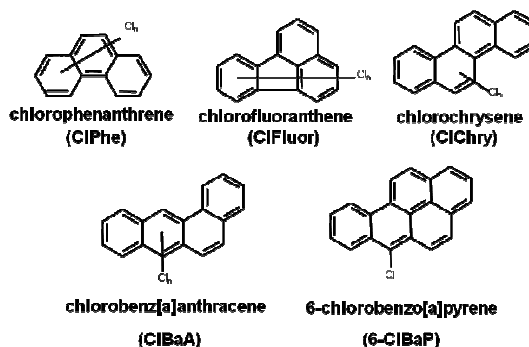
4-ClE2、2-ClE2、4-ClE1、2-ClE1、10-Cl-1,4-estradiene-3,17-dione(10-Cl-3,17-dione)、6,8-diCl-genistein、3',8-diCl daidzein、3',5',8-triCl daidzein、6,8-diCl naringenin、6,8-diCl apigenin、6,8-diCl crysin などが生成される。



(2) 塩素化多環芳香族炭化水素の合成及び精製

既に確立した方法に従い、phenanthrene (Phe)、fluoranthene (Fluor)、pyrene (Py)、benz[a]anthracene (BaA)、benzo[a]pyrene (BaP) を親物質として、塩素置換体を単離精製する。

9-chlorophenanthrene (9-ClPhe)、3,9-dichlorophenanthrene (3,9-Cl₂Phe)、9,10-dichlorophenanthrene (9,10-Cl₂Phe)、3-chlorofluoranthene (3-ClFluor)、1-chloropyrene (1-ClPy)、7-chlorobenz[a]anthracene (7-ClBaA)、6-chlorobenzo[a]pyrene (6-ClBaP) が単離精製される。



(3) PgR、pS2、Cyp1A1 遺伝子発現レベルの解析

MCF7 細胞における上記試料による遺伝子発現レベルの変化を PgR、pS2、Cyp1A1 について調べる。また、炎症疾患と関連しているとされる S100A8 と S100A9 遺伝子の発現についても調べる。

① 乳がん細胞 MCF7 の培養

MCF7 細胞を培養し、検査試料を加える。適宜、濃度や、処理時間を変えて培養する。

② RNA の抽出

RNeasy Mini Kit 及び RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて、RNA 抽出を行う。

③ cDNA への変換

Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) により、RNA を cDNA に変換する。

④ Real-time PCR

PgR、pS2、Cyp1A1、S100A8、S100A9 遺伝子に対する primer を用いて、③ で作製した cDNA を鋳型として、ABI 7500 (Applied Biosystems) を用いて、real-time PCR を行う。

(4) PCR アレイによる遺伝子発現レベルの網羅的解析

(3) と同様に、MCF7 細胞における上記試料による遺伝子発現レベルの変化を、パスウェイ解析を目的とした、特定の遺伝子を増幅するように開発された 96 well plate を用いた real-time PCR、すなわち PCR アレイを行うことにより調べる。

① 乳がん細胞 MCF7 の培養

② RNA の抽出

以上 2 つについては、(3) と同様である。

③ cDNA への変換

RT² First Strand Kit (SA バイオサイエンス社) により、RNA を cDNA に変換する。

④ PCR Array

RT² Profiler PCR Array (SA バイオサイエンス社) を用いて、③ で作製した cDNA を鋳型として、ABI 7500 (Applied Biosystems) を用いて、real-time PCR を行

う。

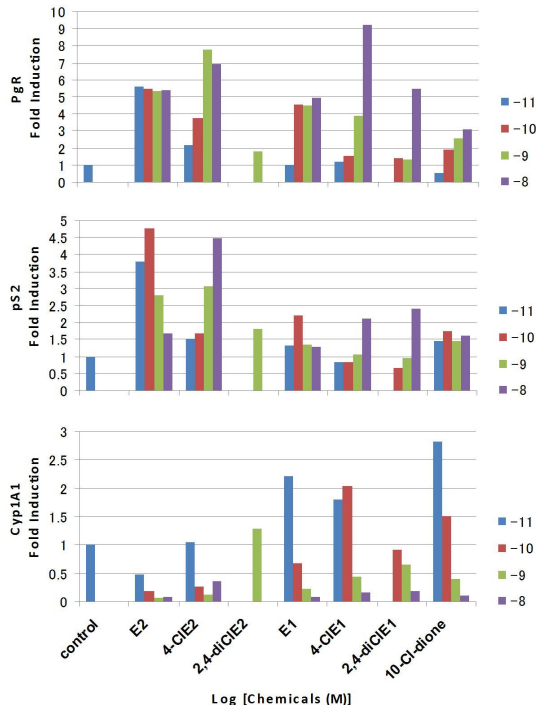
PCR Arrayとして、エストロゲンレセプターのシグナリングに関係した遺伝子 (Human Breast Cancer and Estrogen Receptor Signaling)、薬物代謝に関係したp450ファミリー遺伝子、がん遺伝子、ホルモンレセプター遺伝子 (Human Cancer Drug Resistance and Metabolism) を標的とし、網羅的に解析する。その結果、特異的な発現レベルの変化を示す遺伝子を解析する。

4. 研究成果

(1) PgR, pS2, Cyp1A1, S100A8, S100A9 遺伝子の発現レベル

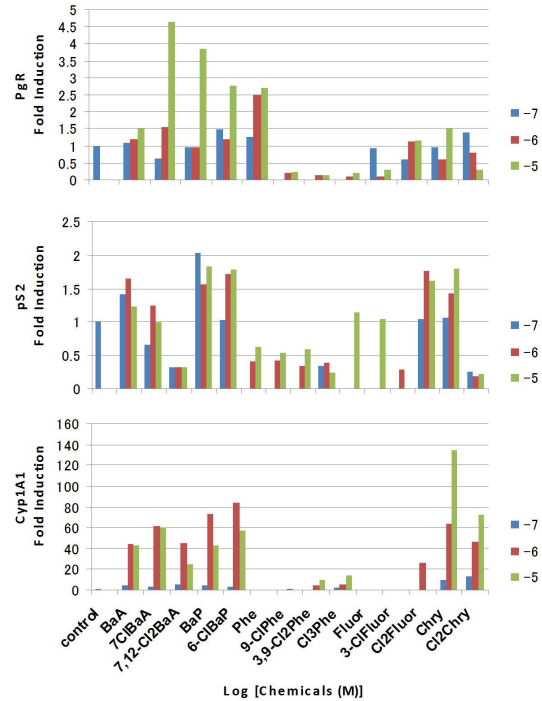
E2, E1 では、PgR 及び pS2 の発現は上昇していたが、Cyp1A1 は低下していた。また、4-ClE2, 4-ClE1 も同様の傾向であった。Benzo[a]pyrene(BaP)、6-ClBaP、benz[a]anthracene(BaA)、7-ClBaA、7,12-Cl2BaA では、PgR 及び pS2 の発現は高濃度で認められた。

一方、Cyp1A1 の発現量は、いずれも高度に上昇していた。Phenanthrene(Phe)では、Cyp1A1 の発現が、塩素付加数に伴って上昇した。Chrysene(Chry) の塩素誘導体において、Cyp1A1 の発現は二塩素置換体でやや減少する傾向にあった。



Expression of PgR, pS2, and Cyp1A1 in MCF7 cells treated with chlorinated estrogens.

Values are the average of duplicate samples for qPCR, normalized to that of GAPDH.



Expression of PgR, pS2, and Cyp1A1 in MCF7 cells treated with ClPAHs.

Values are the average of duplicate samples for qPCR, normalized to that of GAPDH.

S100A8 と A9 遺伝子の発現については、いずれも顕著な変化は認められなかった。

(2) PCR アレイによる網羅的解析

PAHs の中でも、Phenanthrene(Phe)、Chrysene(Chry)、及び環境中ですでに検出されている、両者の塩素置換体である 9-ClPhe、9,10-Cl2Phe、3,9,10-Cl3Phe、6,12-Cl2Chry について、エストロゲン(E2)に対する応答性と比較しながら解析した。

上記 PCR アレイに含まれる約 150 遺伝子のうち、いくつかは発現レベルの変化が認められた。Phe では、塩素付加数に伴って、ATP-binding cassette, sub-family G, member 2 (ABCG2)、CYP1A1、CYP1A2、CYP3A4、Interleukin 6 (IL-6)、N-acetyltransferase 2 (NAT2)で、発現が上昇した。また、Fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1)は、Phe 及びその塩素置換体ともに高いレベルで発現していた。Chry では、塩素付加により、Phe と同様に、CYP1A1、CYP1A2、IL-6 の発現が上昇したが、CYP3A4、NAT2 では、Phe と異なり、Chry、塩素置換体ともに発現量は低かった。ABCG2 は、Chry、6,12-Cl2 Chry とともに高いレベルで発現していた。これらの遺伝子はいずれも、E2 に応答性を示さなかった。

今後これらの遺伝子の発現の変化が生体

にどのような影響を及ぼすのか調べる必要がある。

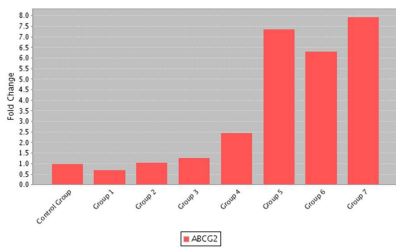
A partial list of genes in PCR arrays

Human Breast Cancer and Estrogen Receptor Signaling PCR Array

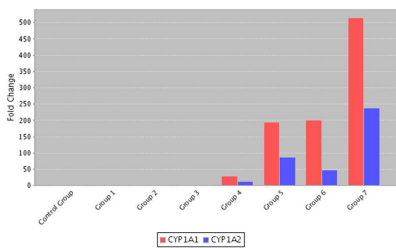
Gene	Description	E2	4-CHE2	BaP	6-CBaP	BaA	7-CBaA
		(1E-10M)	(1E-8M)	(1E-5M)	(1E-5M)	(1E-5M)	(1E-5M)
		Fold Change					
C3	Complement component 3	3.29	3.56	1.14	1.31	0.44	0.62
CCNA1	Cyclin A1	4.58	5.21	0.97	1.50	2.97	2.32
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibi	0.80	0.99	3.57	1.98	0.64	0.72
CYP19A1	Cytochrome P450, family 19, s	1.04	0.53	1.33	0.72	1.04	2.57
FAS	Fas (TNF receptor superfamily,	1.08	0.92	3.72	1.40	0.77	0.66
FOSL1	FOS-like antigen 1	0.87	0.73	15.50	1.19	1.01	1.09
GABRP	Gamma-aminobutyric acid (GA	0.74	0.76	1.02	0.69	0.22	0.40
HSPB1	Heat shock 27kDa protein 1	2.05	2.55	2.32	1.70	1.53	1.48
IL2RA	Interleukin 2 receptor, alpha	1.82	1.92	1.56	1.50	1.63	2.90
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2	0.51	0.43	3.35	1.75	0.70	1.24
PGR	Progesterone receptor	9.75	7.74	3.93	3.31	3.59	3.83
SERPINH5	Serpin peptidase inhibitor, clade	1.46	1.41	3.27	1.33	1.04	1.15
SLC7A5	Solute carrier family 7 (cationic	2.86	2.95	4.45	3.73	3.76	3.63
TFE1	Trefsil factor 1 (breast cancer, c	2.20	2.37	2.06	1.64	1.82	1.60
TGFA	Transforming growth factor, alp	4.68	4.29	3.44	2.64	2.48	2.46
THBS1	Thrombospondin 1	2.86	2.87	1.91	1.60	1.63	1.75
THBS2	Thrombospondin 2	0.14	0.49	0.65	0.28	0.40	1.82
TYE1	Tyrosine kinase with immunogl	0.88	2.09	1.99	1.02	1.27	3.11
TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha	2.15	2.18	1.11	1.51	2.04	1.77
VEGF	Vascular endothelial growth fac	2.14	2.40	0.87	1.27	0.75	0.73

Human Cancer Drug Resistance and Metabolism PCR Array

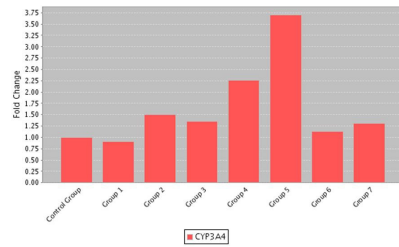
Gene	Description	E2	4-CHE2	BaP	6-CBaP	BaA	7-CBaA
		(1E-10M)	(1E-8M)	(1E-5M)	(1E-5M)	(1E-5M)	(1E-5M)
		Fold Change					
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-fami	0.92	0.96	1.04	1.01	2.50	3.47
ABCC2	ATP-binding cassette, sub-fami	0.72	0.70	1.82	1.15	2.08	1.29
ABCC3	ATP-binding cassette, sub-fami	0.28	0.27	1.31	0.95	0.39	1.26
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-fami	0.88	0.96	3.39	3.12	3.90	4.18
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibi	1.68	1.34	6.88	1.98	1.06	1.41
CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, sul	0.24	0.27	145.21	119.59	94.49	105.24
CYP1A2	Cytochrome P450, family 1, sul	0.32	0.44	20.00	15.80	32.72	56.17
CYP2B6	Cytochrome P450, family 2, sul	2.55	0.95	2.04	1.89	2.50	5.47
CYP2A4	Cytochrome P450, family 3, sul	0.55	0.57	0.54	0.69	1.49	2.07
ERCC3	Excision repair cross-complem	0.68	0.58	0.88	0.90	1.87	1.63
FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basi	0.92	0.96	0.90	1.01	2.50	3.47
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alp	0.95	0.93	1.06	1.00	2.29	2.21
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 rec	1.33	1.39	1.22	1.48	2.61	2.38
MYC	V-myc myelocytomatosis viral	2.14	1.62	1.26	1.63	0.87	0.51
NFKB2	Nuclear factor of kappa light pe	0.66	0.63	0.97	0.84	0.22	0.20
NFKB1B	Nuclear factor of kappa light pe	2.14	0.87	1.52	0.92	0.62	0.89
PPARG	Peroxisome proliferative activat	0.92	0.96	0.90	1.01	2.50	3.47
RARA	Retinoic acid receptor, alpha	2.99	2.67	1.58	1.72	2.95	2.05
RELB	V-rel reticuloendotheliosis viral	1.22	1.25	1.23	1.05	0.21	0.20
SULT1E1	Sulfotransferase family 1E, estr	3.18	1.58	2.37	3.12	2.50	3.47



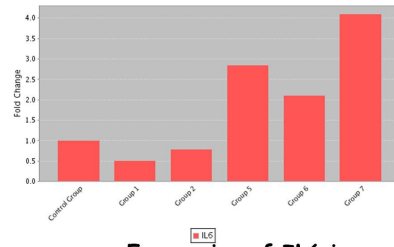
Expression of ABCG2 in MCF7 cells treated with CIPhe and ClChry. Values are the average of duplicate samples for qPCR, normalized to that of GAPDH.



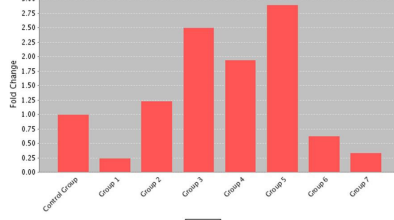
Expression of Cyp1A1 and Cyp1A2 in MCF7 cells treated with CIPhe and ClChry. Values are the average of duplicate samples for qPCR, normalized to that of GAPDH.



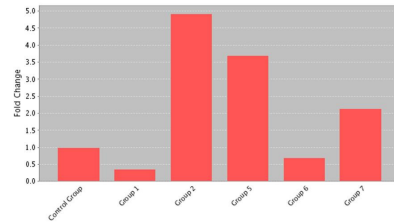
Expression of Cyp3A4 in MCF7 cells treated with CIPhe and ClChry. Values are the average of duplicate samples for qPCR, normalized to that of GAPDH.



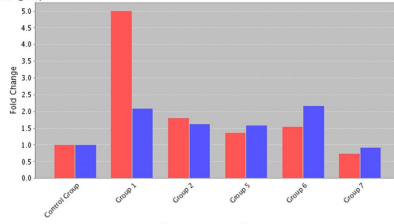
Expression of IL6 in MCF7 cells treated with CIPhe and ClChry. Values are the average of duplicate samples for qPCR, normalized to that of GAPDH.



Expression of NAT2 in MCF7 cells treated with CIPhe and ClChry.



Expression of FGF1 in MCF7 cells treated with CIPhe and ClChry. Values are the average of duplicate samples for qPCR, normalized to that of GAPDH.



Expression of CCNA1 and CCNA2 in MCF7 cells treated with CIPhe and ClChry.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Ohura, T., Morita, M., (他 4 名、3 番目): Differential action of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons on aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling in breast cancer cells. *Environmental Toxicology* in press. 査読有
- ② Sakakibara, H., Ohura, T., (他 5 名、5 番目): Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Gene Expression by Chlorinated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Cross-talk with Estrogen Receptor. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Environmental Research in Asia*, 197-202, 2009. 査読無
- ③ Morita, M., Ohura, T., (他 4 名、3 番目): Chlorinated phenanthrenes induce CYP1A1 through aryl hydrocarbon receptor activation. In: *Persistent Organic Pollutants (POPs) research in Asia*, Ed.M.Morita, Ehime University, 302-307, 2008. 査読無
- ④ Ohura, T., Amagai, T., Makino, M.: Behavior and prediction of photochemical degradation of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons in cyclohexane. *Chemosphere* 70, 2110-2117, 2008 査読有
- ⑤ Kuruto-Niwa, R., Ito, T. (他 4 名、1 番目): Estrogenic activity of the chlorinated derivatives of estrogens and flavonoids using a GFP expression system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 121-128, 2007 査読有
- ⑥ Ohura, T., Morita, M. (他 3 名、1 番目): Aryl hydrocarbon receptor-mediated effects of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1237-1241, 2007. 査読有
- ⑦ Ohura, T.: Environmental behavior, sources, and effects of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Scientific World JOURNAL*, 7, 372-380, 2007. 査読有
- ⑧ Morita, M., Ohura, T., Kuruto-Niwa, R., Sakakibara, H., Amagai, T., Shimoi, K.: Chlorinated phenanthrenes induce CYP1A1 through aryl hydrocarbon receptor activation. *Organohalogen Compd.* 69, 1881-1884, 2007. 査読無
- ⑨ Ohura, T., Kitazawa, A., (他 2 名、1 番目): Relationships between chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and dioxins in urban air and incinerators. *Organohalogen Compd.* 69, 2902-2905, 2007. 査読無
- ⑩ Nakamura, H., Kuruto-Niwa, R., (他 2 名、2 番目): Formation of chlorinated estrone via hypochlorous disinfection of wastewater effluent containing estrone. *Chemosphere* 66, 1441-1448, 2007 査読有
- ⑪ Kuruto-Niwa, R., Tateoka, Y. (他 2 名、1 番目): Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere* 66, 1160-1164, 2007 査読有
- ⑫ Kume, K., Ohura, T. (他 3 名、2 番目): Seasonal and spatial trends of suspended-particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban Shizuoka, Japan. *J. Hazard. Mater.* 144, 513-521, 2007. 査読

[学会発表] (計 12 件)

- ① 久留戸涼子、大浦健、下位香代子: 多環芳香族炭化水素及びその塩素置換体の遺伝子発現解析による生体への影響評価、第 11 回日本内分泌攪乱化学物質学会、2008 年 12 月 14 日、東京
- ② 平林賢、大浦健、森田真紀、久留戸涼子、榊原啓之、雨谷敬史、下位香代子: 塩素化および臭素化多環芳香族炭化水素類による AhR-ER クロストークを介した遺伝子発現について、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア 2008、2008 年 12 月 11 日、静岡
- ③ 平林賢、大浦健、森田真紀、久留戸涼子、榊原啓之、雨谷敬史、下位香代子: ハロゲン化多環芳香族炭化水素による AhR および ER クロストークを介した遺伝子発現、日本環境変異原学会第 37 回大会、2008 年 12 月 4-6 日、沖縄
- ④ Sakakibara, H., Ohura, T., Morita, M., Hirabayashi, S., Kuruto-Niwa, R., Amagai, T., Shimoi, K.: Aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression by chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons. 愛媛 GCOE シンポ、2008 年 11 月、愛媛
- ⑤ 森田真紀、榊原啓之、大浦健、久留戸涼子、内藤博敬、大橋典男、雨谷敬史、下位香代子: 塩素化多環芳香族炭化水素類の AhR 活性の比較、2008 年度日本農芸化学会大会、2008 年 3 月 27-29 日、名古屋
- ⑥ 久留戸涼子、大浦健、寺尾良保: 環境汚染物質の塩素置換体の遺伝子発現解析、第 10 回日本内分泌攪乱化学物質学会、2007 年 12 月、大宮
- ⑦ Takemura, H., Uchiyama, H., Morita, M., Sakakibara, H., Ohura, T., Nagayoshi, H., Matsuda, T., Amagai, T., Kuruto, R., Shimoi, K.: A selective inhibitor of CYP1B1, chrysoeriol. 1st

Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society 2007年11月、北九州

- ⑧ Takemura, H., Uchiyama, H., Morita, M., Sakalibara, H., Ohura, T., Kuruto, R., Amagai, T., Shimoi, K. : Modulation effects of chrysoeriol, a methoxyflavonoid, on CYP1B1 enzyme activity and estrogen metabolism. 3rd International Conference on Polyphenols and Health 2007年11月、京都
- ⑨ Ohura, T., Sawada, K., Amagai, T., Shinomiya, M.: Occurrences and photostabilities of particulate brominated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air. SETAC North America 28th Annual Meeting, Milwaukee, USA, Nov. 11-15, 2007
- ⑩ Yuichi Horii, Y., Ok, G., Ohura, T., Kannan, K.: Occurrence and fate of chlorinated and brominated polycyclic aromatic hydrocarbons in waste incinerators. SETAC North America 28th Annual Meeting, Milwaukee, USA, Nov. 11-15, 2007
- ⑪ Morita, M., Ohura, T., Kuruto-Niwa, R., Sakakibara, H., Amagai, T., and Shimoi, K.: Chlorinated phenanthrens induce Cyp1A1 through aryl hydrocarbon receptor activation. Dioxin 2007 International Symposium. 2007年9月、東京
- ⑫ 大浦 健, 澤田恵一, 雨谷敬史, 四ノ宮美保: 臭素化多環芳香族炭化水素の大気環境動態、第16回環境化学討論会、2007年6月、北九州

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久留戸 涼子 (KURUTO RYOKO)
静岡英和学院大学短期大学部・食物学科・
准教授
研究者番号 50205217

(2) 研究分担者

大浦 健 (OHURA TAKESHI)
静岡県立大学・環境科学研究所・助教
研究者番号 60315851
寺尾 良保 (TERAO YOSHIYASU)
静岡県立大学・環境科学研究所・名誉教授
研究者番号 60046282

(以上2名は、2008年度は連携研究者)

(3) 連携研究者