

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19790109
研究課題名（和文） エストロゲン様化学物質によるエピジェネティクスへの影響に関する研究
研究課題名（英文） The effects of estrogenic chemicals on epigenetics.

研究代表者
佐藤 浩二（SATO KOJI）
新潟薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：10445893

研究成果の概要：環境中の化学物質や、食品中の成分、薬剤の中にはエストロゲンなどのヒトが持つホルモンと構造が似たものがあり、それらを摂取することによって正常なホルモンの働きに悪影響が起ることが懸念されている。本研究では、培養細胞にエストロゲン様の化学物質を加えてその影響を調べたところ、DNAメチル化を担う遺伝子の発現が変化したことから、エピジェネティクスという遺伝子発現の調節機構に影響が起ることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：遺伝子、ゲノム、環境、衛生、発現制御、エピジェネティクス、DNAメチル化、エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめ、様々な生物のゲノムプロジェクトにより、ゲノム DNA 上の遺伝子配列が解読されたが、それらの遺伝子の発現を時間的、空間的に制御するメカニズムであるエピジェネティクスの研究が重要性を増している。DNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな制御システムが、細胞・組織特異的な遺伝子の発現、機能的分化など、様々な生命現象に関与していることが分かって来ている。また、それらエピジェネティクスのシステムの破綻により、癌をはじめとして、

インプリンティング関連疾患や精神神経障害など様々な疾病が起ることが明らかとなって来ている。

しかし、そのようなエピジェネティクスの異常を起こす環境因子についての知見は限定的であり、その作用メカニズムについても不明なものが多く、今後解明していくことが望まれる重要な課題である。現在知られている例として、加齢、ウイルス感染、喫煙、メチル基供与体欠乏食や一部の薬剤などがあり、DNAメチル基転移酵素阻害剤やヒストン脱アセチル酵素阻害剤は癌の治療への応用が行

われている。

我々は、合成女性ホルモンのジエチルスチルベストロール(DES)が生殖器に与える影響について、エピジェネティクスの観点からの研究を行ってきた。妊婦が妊娠中に流産防止薬としてDESを服用することによって、生まれた子供に生殖器系の癌や奇形が発生したことが知られており、またマウスを使用した実験モデルにおいても、胎児・新生児期でのDESへの曝露によって、生殖器系の癌や精子数の減少や運動能低下、特定遺伝子の恒常的な発現増加または減少などが起こることが報告されてきた。

そこで、我々はこれらの影響にエピジェネティクスの異常が関与していることを考え、マウス新生児にDESを投与し、雄の精巣上体および雌の子宮でのDNAメチル基転移酵素のmRNA発現解析およびゲノムDNAメチル化の網羅的解析を行った。その結果、精巣上体においてDNAメチル基転移酵素のmRNA発現増加とDNAメチル化の異常を、子宮においてDNAメチル基転移酵素のmRNA発現減少とDNAメチル化の異常を見出した。また、両者において、DNAメチル基転移酵素の発現量は転写因子のSp1またはSp3のmRNA発現量との相関が見られた。

本研究では、これらの研究成果を背景として、培養細胞とエストロゲン作用を持つ数種の化学物質を用いて、DNAメチル基転移酵素の発現や、作用経路の分子的なメカニズム等について明らかにして行こうと計画した。

2. 研究の目的

本研究では、数種の子宮癌由来の培養細胞等を用いて、以下の点について明らかにすることを目的とした。

(1)ジエチルスチルベストロール(DES)への曝露により、DNAメチル基転移酵素Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3bのmRNAレベル、タンパクレベルでの発現がどのように変化するかを調べる。また、その曝露濃度依存性について明らかにする。

(2)ゲノム全体でのDNAメチル化レベルへの影響を明らかにする。先行研究においてはRestriction Landmark Genomic Scanning法という網羅的手法によってDNAメチル化の解析を行ったが、一度に解析できる部位が多くなかったことや、多くのサンプルを解析することが技術的に困難だったことから、定量的な解析には至らなかった。本研究では、まず

ゲノム全体のDNAメチル化への影響を定量的に解析する。

(3)転写因子Sp1、Sp3のmRNAレベル、タンパクレベルへの影響を明らかにする。

Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3bの発現は、転写因子のSp1、Sp3によって制御されるという報告があるが、我々の先行研究においても、DnmtsのmRNA発現とSp1、Sp3のmRNA発現の間には相関関係が見られた。本研究では、Sp1、Sp3のmRNAレベルに加えてタンパクレベルでの発現や曝露濃度依存性についても明らかにする。

(4)内在性エストロゲンの17βエストラジオール(E2)による影響との比較を行う。

E2は*in vitro*でエストロゲンレセプターへの親和性がDESとほぼ等しいにもかかわらず、我々の過去の研究において、新生児期マウスに投与した場合その影響はDESとは異なり作用も弱かった。DESにはエストロゲンレセプターを介さない作用メカニズムが存在することが予想されている。その候補として、Estrogen Related Receptor (ERR)が存在する。ERRはE2をリガンドとしないが、DESをリガンドとする。E2とDESによる影響の差が見られた場合、ERRが関与しているかどうかについて明らかにする。

(5)エストロゲン作用を持つ他の物質による影響と比較する

内分泌攪乱作用をもつ化学物質のビスフェノールA、植物エストロゲンのゲニステイン、ワインに含まれるポリフェノールのレスベラトロールなどを用いてその影響を調べる。環境汚染物質や、食物に含まれる成分が人体へ及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

先行研究ではマウスを用いて*in vivo*の実験で精巣上体及び子宮の解析を行ったが、本研究では、より直接的な影響を調べることができ、遺伝子機能の操作も比較的容易な*in vitro*の実験系の構築を行うことを目標とする。精巣上体の細胞株は入手が困難であり、マウスを用いたモデルで子宮への影響の方が大きかったことから、本研究では数種類の子宮体癌・子宮頸癌細胞株を用いることとした。また、当初の計画にはなかったが、乳癌細胞もエストロゲンに感受性が高いことから同時に実験に用いた。

細胞の培地中にジエチルスチルベストロール(DES)、17βエストラジオール(E2)、を添加し、以下の項目について検討し、比較を行

った。

細胞は子宮癌細胞の HEC-1-A、Ishikawa、乳癌細胞の MCF-7 を用いた。

(1)細胞増殖率、毒性の検討及び溶媒の影響を調べた。

細胞を通常の培地で培養後、チャコール処理 FBS を添加したフェノールレッドフリー DMEM で 24 時間培養し、DES または E2 を含む培地に交換して 3 時間～72 時間培養した。DES または E2 の濃度は 10 pM～20 μM とした。DES、E2 はジメチルスルホキシドに溶解した。細胞の増殖率は WST-1 試薬を用いて解析した。

(2)DNA メチル基転移酵素 Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b の発現を mRNA 及びタンパクレベルで測定した。

mRNA 量は SYBR green I を用いたリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。タンパク質の発現量はウェスタンブロッティング法を用いて解析した。

(3)転写因子 Sp1、Sp3 の発現を解析した。

以前の我々の *in vivo* での研究において Dnmts の mRNA 発現と、転写因子 Sp1、Sp3 の mRNA 発現に相関が見られたことから、培養細胞系においても Sp1、Sp3 の mRNA の発現を調べた。解析はリアルタイム RT-PCR 法を用いた。

(4)エストロゲンレセプター阻害剤および MEK 阻害剤の影響を調べた。

DES、E2 は共にエストロゲンレセプターに結合して作用することから、エストロゲンレセプター阻害剤の ICI182,780 を加えてその影響を調べた。また、Dnmts の発現は ERK/MAP キナーゼ経路によって制御されている可能性があることから、MEK 阻害剤の PD98059 を加えてその影響を調べた。

ICI182,780 および PD98059 は DES または E2 を加える 1 時間前から添加した。

(5)エストロゲン関連レセプター (ERR) の発現解析を行った。

DES と E2 は共にエストロゲンレセプターに結合するが、前者は ERR にも結合するのに対し、後者は結合しないため、実験に用いた細胞における ERR (ERR α 、ERR β および ERR γ) の発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。

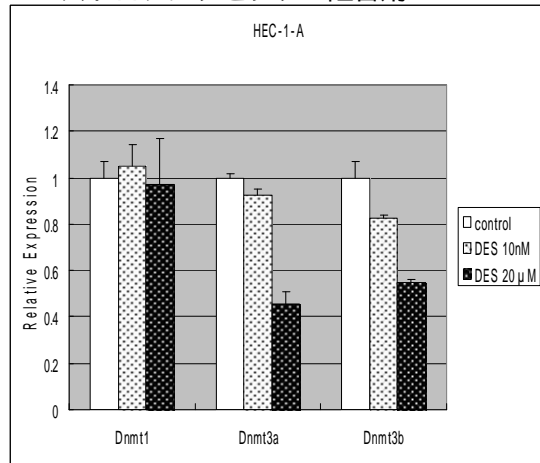
4. 研究成果

本研究では 2 種類の子宮癌細胞 HEC-1-A および Ishikawa と乳癌細胞 MCF-7 を用いて、培地へのエストロゲン様化学物質の添加が DNA メチル基転移酵素 Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b の発現に与える影響について検討した。エストロゲン作用を持つ物質として、天然エストロゲンの 17 エストラジオール (E2) および合成エストロゲンのジエチルstilbestロール (DES) を使用した。

Ishikawa 細胞では mRNA レベルで DNA メチル基転移酵素の発現に変化が見られなかったため、以後の解析には使用しなかった。HEC-1-A 細胞では高濃度 (10～20 μM) の DES に曝露されたときに Dnmt3a、Dnmt3b の mRNA の発現低下が見られた (図 1) しか、高濃度の DES を添加したときには細胞増殖率の低下と細胞死が観察された。

一方、乳癌細胞 MCF-7 では幅広い濃度 (10 pM～10 μM) の DES への曝露で Dnmt1、Dnmt3b の mRNA 発現が上昇していた (図 2)。乳癌細胞では E2 への曝露でも同様な遺伝子発現変化が観察されたが (図 2)、子宮癌細胞では E2 への曝露では遺伝子発現変化は観察されなかった。

エストロゲンレセプター阻害剤



ICI182,780 を培地中に加えたところ、これらの遺伝子発現変化が部分的、または完全に阻害された。

図 1 HEC-1-A 細胞における DNA メチル基転移酵素 mRNA の発現量

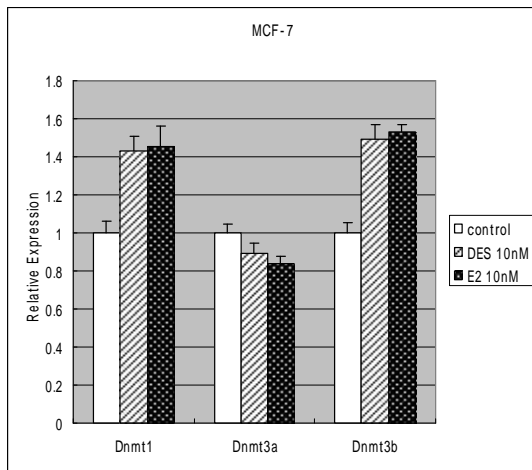


図2 MCF-7細胞におけるDNAメチル基転移酵素mRNAの発現量

また、子宮癌細胞 HEC-1-A と乳癌細胞 MCF-7 の培地中に DES または E2 を添加し、DNAメチル基転移酵素 Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b のタンパク質の発現量をウェスタンブロッティング法で解析した。

子宮癌細胞では 10 ~ 20 μM の高濃度の E2、DES で Dnmt3a、Dnmt3b のタンパク質が減少していたが、乳癌細胞では 10 pM ~ 10 μM の濃度で Dnmt1、Dnmt3b のタンパク質は逆に増加していた。

mRNA とタンパク質の発現変化には相関があったが、細胞の種類によって逆の結果となった。

使用した細胞のエストロゲンレセプター (ER) 及びエストロゲン関連レセプター (ERR) の発現を調べたところ、HEC-1-A 細胞では ER α の発現量は小さかったが、MCF-7 細胞では大きかった。一方、ERR の発現については両者に大きな違いはなかった。当初 HEC-1-A 細胞で見られた DES と E2 への反応性の違いは ERR の発現量の差に由来すると予想していたが、原因は他にあると考えられた。

DNAメチル基転移酵素 (Dnmts) の発現制御機構については未だに明らかにされていないものの、転写因子 Sp1、Sp3 が関与しているとの報告があり、我々の過去の研究においても Dnmts の発現量と Sp1、Sp3 の発現量の間に関連が見られた。しかし、本研究においては、HEC-1-A 細胞、MCF-7 細胞における Dnmts の発現変化と Sp1、Sp3 の発現変化の間に相関は見られなかった。

Sp1、Sp3 の他に、Dnmts の発現制御に ERK/MAP キナーゼ経路が関与することが報告されている。本研究でも、MEK (MAP キナーゼキナーゼ) 阻害剤の PD98059 を添加することによって、DNAメチル基転移酵素の発現が低下する

ことが認められた。エストロゲン様物質が ERK/MAP キナーゼ経路を活性化するのかが今後の検討が必要と思われた。

本研究から、エストロゲン様物質を培地に添加することにより、DNAメチル基転移酵素の発現が変化することが分かったが、その細胞による詳細なメカニズム、関与するレセプター等の分子などは明らかとなるまでには至らなかった。また、本研究で観察された DNAメチル基転移酵素の発現変化が、実際にどの程度の影響 (DNAメチル化の変化やそれによる細胞機能の変化等) を及ぼすのかについても今後の検討課題として残った。

近年、*in vivo* のレベルで、内分泌攪乱物質や低栄養などが DNA のメチル化などのエピジェネティクスに及ぼす影響が報告されてきているが、その細胞レベル、分子レベルでのメカニズムは未だに明らかにはなっていないと言いが難い。それを明らかにするための実験モデルの一つとして、本研究が発展し、貢献していくことを期待したい。

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 3 件)

Sato K, Fukata H, Kogo Y, Ohgane J, Shiota K, Mori C, Neonatal exposure to diethylstilbestrol alters expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA in the mouse uterus. *Endocrine Journal*, 56, 131-139, 2009, 査読有

Kuriyama M, Udagawa A, Yoshimoto S, Ichinose M, Sato K, Yamazaki K, Shiota K, Mori C, DNA methylation changes during cleft palate formation induced by retinoic acid in mice. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 45, 545-551, 2008, 査読有

Omori N, Fukata H, Sato K, Yamazaki K, Aida-Yasuoka K, Takigami H, Kuriyama M, Ichinose M, Mori C, Polychlorinated biphenyls (PCBs) alter the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Human & Experimental Toxicology*, 26, 811-816, 2007, 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

川城由紀子、深田秀樹、佐藤浩二、油谷浩幸、滝上英孝、森千里、ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)が酸化ストレスに関連する遺伝子発現に及ぼす影響、環境ホルモン学会第 11 回研究発表会、2008 年 12 月 13~14 日(東京)

川城由紀子、深田秀樹、森可奈、佐藤浩二、滝上英孝、油谷浩幸、森千里、臭素系難燃剤高濃度曝露がヒト臍帯静脈内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響、環境ホルモン学会第 10 回研究発表会、2007 年 12 月 10~11 日(埼玉)

Kawashiro Y, Fukata H, Sato K, Takigami H, Aburatani H, Mori C, Effects of the flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, on human umbilical vein endothelial cells using DNA microarray analysis. 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants DIOXIN 2007, 2-7 September, 2007 (Tokyo)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 浩二 (SATO KOJI)
新潟薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：10445893