

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580408

研究課題名（和文） ハロゲン化多環芳香族炭化水素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 halogenated derivatives of polycyclic aromatic
hydrocarbons on gene expression

研究代表者

久留戸 涼子 (KURUTO RYOKO)

常葉学園大学・教育学部・准教授

研究者番号：50205217

研究成果の概要（和文）：多環芳香族炭化水素（PAHs）は、様々な燃焼過程で生成され、環境中に排出されているが、近年、塩素や臭素が付加したハロゲン化 PAHs も検出されている。これらの生体影響を評価するため、遺伝子発現レベルの変化を2種の乳がん細胞（MCF7、MDA-MB-231）を用いて調べた。PCR アレイでの網羅的解析では、ハロゲン化物では、親物質とは発現レベルの変化が異なる遺伝子もあった。また、実験に用いた2種の乳がん細胞で、発現レベルに差も見られた。

研究成果の概要（英文）：Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental contaminants that are formed by the incomplete combustion of organic compounds. Recently, chlorinated and brominated PAHs were detected in the environmental samples. Then their effects on gene expression were investigated by real-time PCR analysis in human breast carcinoma MCF7 and MDA-MB-231 cells. PCR arrays revealed that the expression levels of several genes in halogenated PAHs were different from that in parent compounds. In addition, the different results were obtained between both cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

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、ハロゲン化、多環芳香族炭化水素、遺伝子発現、PCR アレイ

1. 研究開始当初の背景

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環境汚染化学物質である。その分布、蓄積性、生体影響等に関する研究は、広く行われている。PAHs は体内

に吸収後、細胞内でアрилヒドロカーボン受容体(AhR)と結合してシトクロームP450(CYP)1A1 や 1B1 等の薬物代謝酵素を誘導し、発がん性、変異原性だけでなく、内分泌攪乱作用もあることが報告されている。近年、PAHs に塩素や臭素が付加した塩素

化、臭素化 PAHs (ClPAHs, BrPAHs)も、環境中から検出されている (Nilsson, et al.,1993, Ishaq, et al.,2003)。当グループの大浦らも、標準試料となる 12 種類の ClPAHs を合成し、多成分高感度分析法を確立し、実際に環境分析に適応したところ、大気微粒子中に ClPAHs が存在することを見出している。ClPAHs は、構造的にダイオキシン類と PAHs との共通類縁化合物と考えられ、生体への影響が大きいものと考えられる。合成した ClPAHs を用いて、AhR リガンド活性とエストロゲン活性を調べたところ、アッセイしたいずれの化合物についても AhR 活性が認められたが、塩素付加により、三環系では活性が増し、四環系以上では減少する傾向があった。エストロゲン活性については、酵母によるアッセイでは、いずれも認められなかったが、乳がん細胞 MCF7 を用いたアッセイ系では、高濃度で活性が認められるものもあった。CYP1A1 の遺伝子発現については、三環系の phenanthrene (Phe) で、塩素付加数が増すに従って、発現レベルが上昇した。

また、BrPAHs についても、当グループの大浦らが、初めて大気環境中から検出し、標準試料となる 11 種類の BrPAHs を合成に成功し、AhR 活性についても解析中である。

2. 研究の目的

ハロゲン化 PAHs は、親物質よりも、難分解性、蓄積性が増すとされ、生体への影響も危惧される。しかしながら、その生体に対する影響については、ほとんど解明されていない。そこで、生体影響を評価するための基礎的なデータを得るために、遺伝子発現レベルの変化を網羅的に調べることにした。

まず、乳がん細胞 MCF7 を用いて、検査試料で処理し、RNA を抽出し、PCR アレイにより、real-time PCR を行い、遺伝子発現レベルを網羅的に解析する。これにより、遺伝子発現レベルが、親物質とハロゲン置換体とで異なる遺伝子を見つけ出し、生体影響評価として適切な遺伝子マーカーを見つける。さらに、これらを標的遺伝子として、primer を作成し、詳細に検査試料における発現レベルの変化を調べる。

また、乳がん細胞でも MCF7 細胞とは異なり、エストロゲンレセプター(ER)を発現していない MDA-MB-231 細胞について、同様の実験を行い、その差異についても解析する。

これらの結果をもとに、新規評価システムとしての利用の確立を目指し、新規化学物質の危険度の評価を可能にすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ハロゲン化 PAHs の合成及び精製

既に確立した方法に従い、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、臭素置換体を単離精製する。

塩素置換体としては、9-chlorophenanthrene(9-ClPhe)、3,9-Cl₂-Phe、9,10-Cl₂Phe、3,9,10-Cl₃Phe、3-ClFluor、1-ClPy、7-ClBaA、6-ClBaP が、臭素置換体としては、9-bromophenanthrene(9-BrPhe)、7-BrBaA、4,7-Br₂BaA、5,7-Br₂BaA、7,11- Br₂BaA、7,12-Br₂BaA、1-BrPy、6-BrBaP が単離精製される (Fig. 1)。

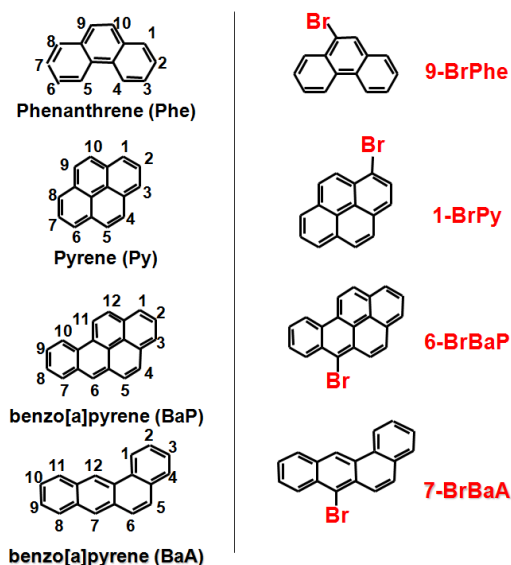


Fig. 1 Chemical structures of BrPAHs.

(2) PCRアレイによる遺伝子発現レベルの網羅的解析

乳がん細胞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、PCRアレイを用いて調べる。

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。

②RNAの抽出：RNeasy Mini Kit及びRNase-Free DNase Set (Qiagen)を用いて、RNA抽出を行う。

③cDNA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。

④PCR 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、購入するリアルタイムPCRシステム(ストラタジーン社)を用いて、real-time PCRを行う。PCR Arrayとして、ER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。

(3) 標的遺伝子発現レベルの解析

(2)で変化の見られた遺伝子について、以下の手順に従い、試料濃度や処理時間を変え詳細な解析を行う。

① primerの設計

②乳がん細胞MCF7の培養：(2)の①と同じ。

③RNAの抽出、cDNAへの変換：上述のようにRNA抽出を行い、RNAをcDNAに変換する。

④Real-time PCR：設計したprimerを用いて、SYBR Green PCR Core Reagentsを使用して、③で作成したcDNAを鋳型として、real-time PCRを行う。

(4) MDA-MB-231細胞における遺伝子発現レベルの解析

これまで用いていたMCF7細胞は、ERを発現している細胞であるが、同じ乳がん細胞でもERを発現していないとされるMDA-MB-231細胞について、同様の実験を行い、遺伝発現レベルの解析を行う。また、その差異についても解析する。

4. 研究成果

(1) ハロゲン化 PAHs の合成及び精製

ハロゲン化PAHsの合成及び精製は、一部を除いて、問題なく行うことができた。Br体の二置換体は、収量が悪かった。

(2) PCRアレイによる遺伝子発現レベルの網羅的解析

(1)で合成した試料の中で、PCRアレイによる遺伝子発現レベルの網羅的解析は、これまでのCl体に加えて、Br体に注目し、まず最初にBaPのBr付加体である6-BrBaPについて行った(Table 1)。今回は、Human Cancer Drug Resistance and Metabolismのパスウェイ解析を目的としたPCRアレイを用いた。

アレイ上の約90遺伝子のうち、BaPと6-ClBaPとの結果と比較して、Br体でCl体と同様に発現が増加、あるいは減少した遺伝子は2種ずつであった。一方、Cl体よりも発現が増加した遺伝子が9種あった。従って、これらの遺伝子については、Br体の方が遺伝子発現に影響を与えるという可能性も考えられた。また、これらの遺

伝子発現がどのように相互に関わっているのかも考察していく必要があると考えられた。また、他の物質についても解析中である。

Table 1 A partial list of genes in PCR arrays.

Human Cancer Drug Resistance and Metabolism PCR Array							
Gene	Description	BaP	6-ClBaP	Cl/BaP	BaP	6-BrBaP	Br/BaP
		(1E-5M)	(1E-5M)		(1E-5M)	(1E-5M)	
		Fold Change		Fold Change			
ABCC6	ATP-binding cassette, sub-fa	0.24	0.23	0.93	0.30	0.60	2.00
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-fa	3.39	3.12	0.92	3.78	2.58	0.68
BAX	BCL2-associated X protein	1.89	1.13	0.59	2.30	0.89	0.39
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhib	6.88	1.98	0.29	6.32	1.23	0.19
CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, s	145.21	119.59	0.82	1595.73	592.22	0.37
CYP1A2	Cytochrome P450, family 1, s	20.00	15.80	0.79	44.63	79.34	1.78
CYP2B6	Cytochrome P450, family 2, s	2.04	1.89	0.93	0.74	0.43	0.58
CYP2C9	Cytochrome P450, family 2, s	0.37	1.02	2.75	0.93	0.99	1.06
CYP2E1	Cytochrome P450, family 2, s	0.19	0.38	2.01	0.27	0.68	2.50
ERBB4	V-erb-a erythroblastic leuken	0.03	0.11	3.97	0.03	0.42	16.80
MYC	V-myc myelocytomatosis vira	1.26	1.63	1.29	2.16	1.31	0.61
PPARG	Peroxisome proliferative activ	0.90	1.01	1.13	0.68	1.30	1.92
RARB	Retinoid acid receptor, beta	0.13	0.56	4.20	0.84	1.01	1.21
SULT1E1	Sulfotransferase family 1E, es	2.37	3.12	1.32	0.91	0.95	1.05

reported in 2008.

(3) 標的遺伝子発現レベルの解析

既に報告した実験で、9-ClPhe、chrysene (Chry)、6-ClChryにおいて、炎症マーカーであるInterleukin 6 (IL-6)の発現レベルが上昇していたので、今回もIL-6に注目した。また、AhR標的遺伝子であるCYP1A1とエストロゲン応答遺伝子であるpS2についても解析を行った。今回は、Phe、Py、BaP、BaA及びその臭素置換体である9-BrPhe、1-BrPy、6-BrBaP、7-BrBaAの8検体を検査試料とした。濃度はいずれも $10^{-5}M$ とした。

IL-6では、対照として行ったエストロゲン(E_2)では変化が認められないのに対し、8検体いずれについても、増加が認められた(Fig. 2A)。特に、BaP、6-BrBaP、BaA、7-BrBaAについては高レベルであった。CYP1A1については、上記の4検体について、遺伝子発現が高まり、Br体ではやや低くなる傾向が見られた(Fig. 2B)。さらに、pS2では、Phe、9-BrPhe、Py、1-BrPyでやや上昇する傾向が認められた(Fig. 2C)。

今後は、(2)の結果で発現レベルに変化があった遺伝子について、同様にreal-time PCRを行う予定である。

(4) MDA-MB-231細胞における遺伝子発現レベルの解析

E_2 に非応答性の乳がん細胞MDA-MB-231について、ハロゲン化PAHsのうち、特にBaPのハロゲン化物であるClBaPとBrBaPについて、 E_2 やビスフェノールA(BPA)と比較しながら、MCF7細胞

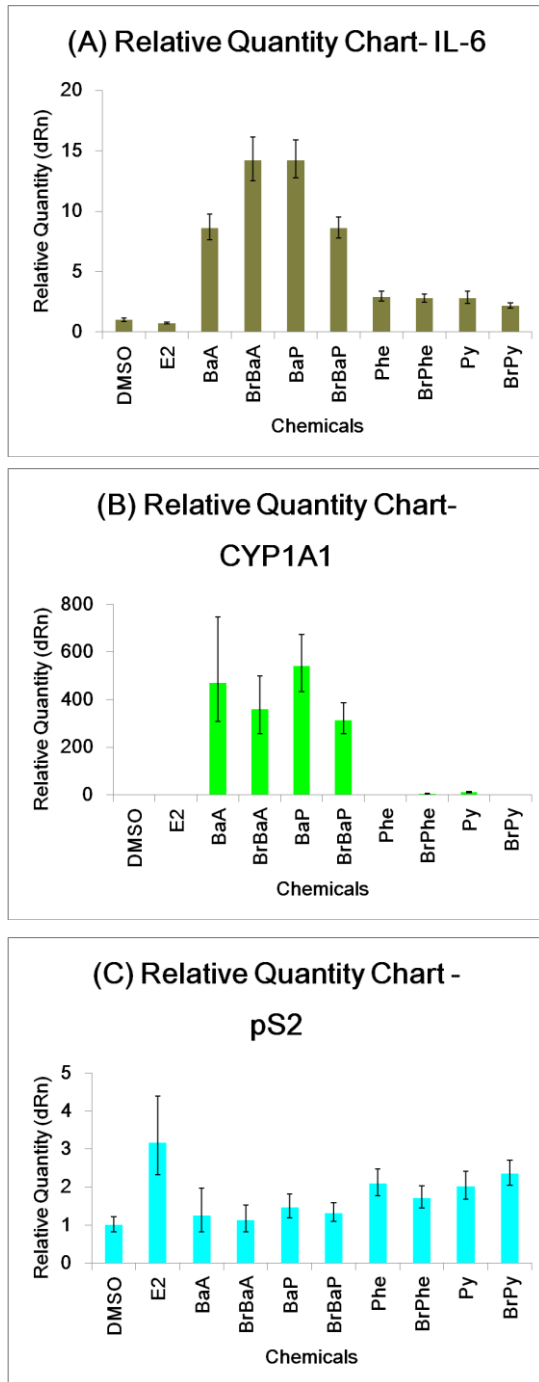


Fig. 2 Induction of (A) IL-6, (B) CYP1A1, and (C) pS2 in MCF7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

と対比させて調べた。

まず、遺伝子発現解析の前に、細胞増殖について調べた。この際、cell counting kit (Dojin)を用いて、吸光度測定により算出した。MCF7細胞では、E₂と同様にBaPやハロゲン化BaPでも増殖能が高まり、エストロゲン様作用があると考えられたが

(Fig. 3A)、MDA-MB-231細胞では、E₂やBPAと同様、増殖促進作用が認められなかった(Fig. 3B)。これは、MDA-MB-231細胞では、ERを発現していないためと考えられた。

このことから、両細胞を用いた系で、増殖能を比較することで、エストロゲン様物質かどうか、エストロゲン様作用とは無関係に増殖能を増大、あるいは減少させる物質かどうかを容易に判定することができることが分かった。

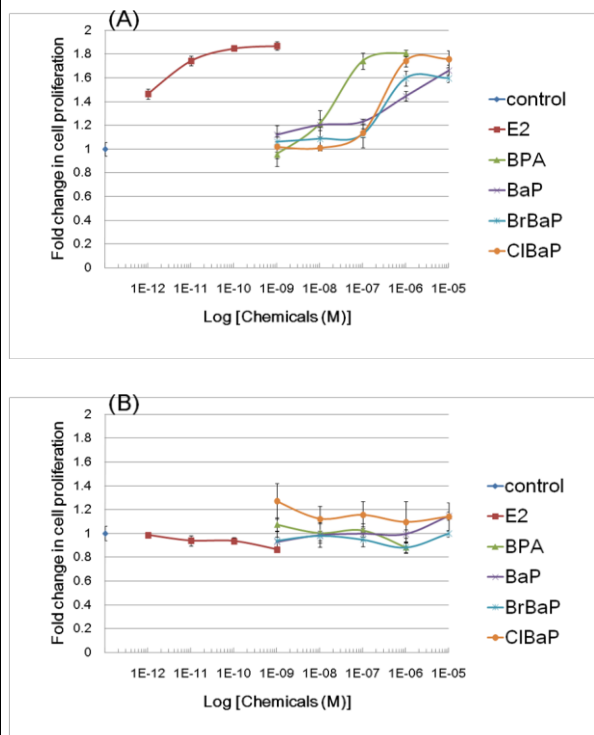


Fig. 3 Effects of BaP, BrBaP, and ClBaP on cell growth of (A) MCF7 and (B) MDA-MB-231 cells. The values are relative to the OD 450-630 obtained with control.

遺伝子発現については、(3)と同じ3種の遺伝子について解析を行った。pS2の発現レベルは、MCF7細胞では、E₂やBPAと同様にBaPやClBaPでも増加したが、BrBaPでは高くならなかった(Fig. 4A)。この結果は、細胞増殖能の結果とは相関していなかった(Fig. 3A)。MDA-MB-231細胞ではいずれの物質でもほとんど変化が認められなかった(Fig. 5A)。CYP1A1では、両細胞とも、BrBaPよりもBaPやClBaPで、発現量が高まった(Fig. 4B, 5B)。しかし、そのレベルは、MCF7細胞の方が約10倍高かった。IL-6については、MCF7細胞では、BaPとハロゲン化BaPで増加していたが、MDA-MB-231細胞では、それに加えて

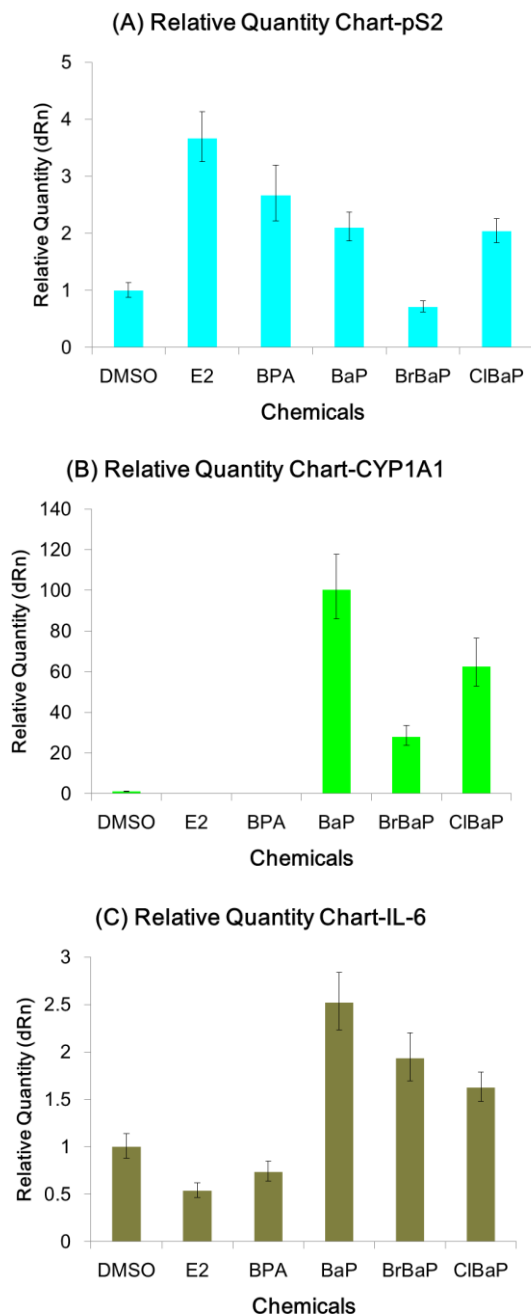


Fig. 4 Induction of (A) pS2, (B) CYP1A1, and (C) IL-6 in MCF7 cells.

BPAでもやや高くなる傾向が見られた (Fig. 4C, 5C)。BrBaPでは、CYP1A1とpS2の発現量の誘導レベルが、BaPやClBaPに比べて低く、Br化によって細胞に対する作用が明らかに変化したことがわかった。

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 17件)

① Evaluation of chlorinated benz[a]anthracene

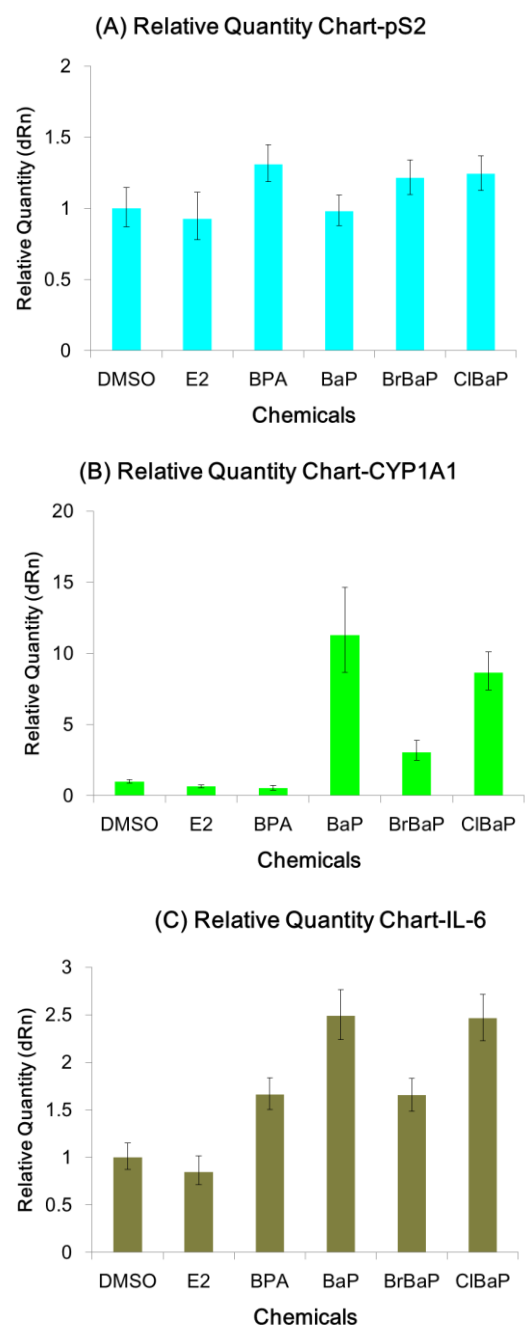


Fig. 5 Induction of (A) pS2, (B) CYP1A1, and (C) IL-6 in MDA-MB-231 cell.

on hepatic toxicity in rats and mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. T. Kido (他 10名、3番目): *Environ. Toxicol.*, 査読有 in press(2011)

DOI: 10.1002/tox.20693

② Environmental analysis of chlorinated and brominated polycyclic aromatic hydrocarbons by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry. T. Ieda (他 4名、4番目): *J. Chromatogr. A*,

- 査読有 1218, 3224-3232 (2011)
DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.013
- ③ Differential action of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons on aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling in breast cancer cells. T. Ohura, M. Morita, R. Kuruto-Niwa (他 3 名、3 番目): Environ. Toxicol., 査読有 25, 180-187 (2010)
DOI: 10.1002/tox.20488
- ④ Effects of the chlorinated derivatives of environmental pollutant on gene expression. R. Kuruto, T. Ohura, Y. Terao: Tokoha Gakuen University Research Review (Faculty of Education) 査読無 30, 377-391 (2010)
- ⑤ Inhibitory effects of chrysoeriol on DNA adduct formation with benzo[a]pyrene in MCF-7 breast cancer cells. H. Takemura (他 7 名、7 番目): Toxicology, 査読有 274, 42-48 (2010)
DOI: 10.1016/j.tox.2010.05.009
- ⑥ Aryl hydrocarbon receptor activities of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in recombinant yeast cells. T. Ohura, R. Kurihara, S. Hashimoto: Toxicol. Environ. Chem., 査読有 92, 737-742 (2010)
- ⑦ Aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression by chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and cross-talk with estrogen receptors. H. Sakakibara, T. Ohura, (他 5 名、5 番目): Interdiscip. Stud. Environ. Chem., 査読有 2, 197-202 (2009)
- ⑧ Discovery of novel halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban particulate matters: Occurrence, photostability, and AhR activity. T. Ohura (他 3 名、1 番目): Environ. Sci. Technol., 査読有 43, 2269-2275 (2009)
- ⑨ Relative potencies of individual chlorinated and brominated polycyclic aromatic hydrocarbons for induction of aryl hydrocarbon receptor-mediated responses. Y. Horii (他 5 名、5 番目): Environ. Sci. Technol., 査読有 43, 2159-2165 (2009)
- [学会発表] (計 2 3 件)
- ① 久留戸涼子: 多環芳香族炭化水素及びそのハロゲン置換体の乳がん細胞に及ぼす影響、第 14 回日本内分泌攪乱化学物質学会、2011 年 12 月、東京
- ② T. Ohura: Diurnal variation of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air, Japan. The 23rd International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds. Sep. 4-8, 2011, Münster, Germany.
- ③ 大浦健: 都市大気における塩素化多環芳香族炭化水素類の日内変動、第 20 回環境

- 化学討論会、2011 年 7 月、熊本
- ④ 三輪良: 塩素化多環芳香族類の光分解挙動と遺伝毒性に関する研究、第 20 回環境化学討論会、2011 年 7 月、熊本
- ⑤ 久留戸涼子: 多環芳香族炭化水素及びその臭素置換体の遺伝子発現に及ぼす影響、第 13 回日本内分泌攪乱化学物質学会、2010 年 12 月 17 日、東京
- ⑥ T. Kido: Effects of 7-chlorinated benz[a]anthracene on hepatic CYP1 family expression in rats, and mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Dec. 15-18, 2010, Pattaya, Thailand.
- ⑦ 貴戸武利: 7-クロロベンゾ[a]アントラセンのラット肝における CYP1A2 誘導と変異原性、変異機構研究会第 23 回夏の学校、2010 年、名古屋
- ⑧ 堀井勇一: 焼却排ガス中塩素化・臭素化多環芳香族炭化水素の分布、第 19 回環境化学討論会、2010 年 6 月 21 日、春日井
- ⑨ 久留戸涼子: 多環芳香族炭化水素及びその臭素置換体の AhR、ER 標的遺伝子の発現への影響、第 12 回日本内分泌攪乱化学物質学会、2009 年 12 月、東京
- ⑩ 家田曜世: GCxGC-高分解能 TOF-MS による環境試料中塩素化・臭素化 PAHs の分析、日本分析化学会 第 58 年会、2009 年 9 月 24 日、札幌
- ⑪ 大浦健: 塩素化多環芳香族炭化水素の土壌汚染と発生源に関する研究、第 18 回環境化学討論会、2009 年 6 月 9 日、つくば

[図書] (計 3 件)

- ① T. Ohura, NOVA Science Publishers, Polycyclic Aromatic Hydrocarbonson: Pollution, Health Effects and Chemistry (Pierre A. Haines & Milton D. Hendrickson, Eds.) 2009, 107-112.
- ② T. Ohura, NOVA Science Publishers, Environment and Regional Air Pollution (D. Gallo & R. Mancini, Eds.) 2009, 379-388.
- ③ T. Ohura, NOVA Science Publishers, Airborne Particulates (M. Cheng & W. Liu, Eds.) 2009, 157-170.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久留戸 涼子 (KURUTO RYOKO)
常葉学園大学・食物学科・准教授
研究者番号: 50205217

(2) 研究分担者

大浦 健 (OHURA TAKESHI)
名城大学・農学部・准教授
研究者番号: 60315851