

機関番号：33919

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890279

研究課題名（和文）マウスES細胞を用いた幹細胞の化学発癌メカニズムの解析

研究課題名（英文）Simulation and analysis of stem cell-carcinogenesis induced by chemical carcinogens using murine embryonic stem cell

研究代表者

岡本 誉士典 (OKAMOTO YOSHINORI)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：50512323

研究成果の概要（和文）：マウス胚性幹（mES）細胞およびマウス胎児性繊維芽細胞（MEF）は共に*Ahr*を発現していた。各細胞の特徴として、*Cyp1a1*は両細胞間で同程度発現しているのに対し、*Cyp1b1*はMEFにおいてmES細胞よりも14倍高く発現していた。両細胞において代表的異物代謝酵素誘導剤3-メチルコラントレン（3-MC）処理により*Cyp1a1*および*Cyp1b1*発現が用量依存的に誘導され、特に*Cyp1a1*はMEFにおいて顕著に誘導された。したがって、未分化状態の細胞では異物代謝が発達しておらず、化学物質に暴露した場合に蓄積しやすいことが示唆される。今後、異物排泄機構も含め、総合的に精査する必要がある。

研究成果の概要（英文）：*Cyp1a1* and *Cyp1b1* were detected in mES cell and MEF. The extent of *Cyp1b1* expression was 14 times higher in MEF as compared with mES cell. 3-Methylcholanthrene (3-MC) treatment was induced *Cyp1a1* and *Cyp1b1* expressions in both cells in a dose-dependent manner. Especially, *Cyp1a1* was induced significantly in MEF. These results suggest that hydrophobic xenobiotics tend to be concentrated in undifferentiated cells such as tissue stem cells, although further study is needed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：環境系薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ES細胞、発がん、性ホルモン、乳がん、遺伝子損傷、幹細胞発がん、酸化ストレス、DNA付加体

1. 研究開始当初の背景

近年、癌化した幹細胞「癌幹細胞」が無秩序な自己複製を繰り返しながら、癌の不均一性・転移・再発に関係していることが指摘さ

れている。例えば、出産経験の有る女性は乳癌罹患率が低いことが統計学的に示されているが、これは妊娠中に乳房組織で起こる大規模な分化・増殖が幹細胞や前駆細胞を消費

することに起因するという説がある (Dontu et al., Stem Cell Rev. 1, 207-214, 2005)。この説が正しいとすると、発癌の標的は幹細胞などの未分化細胞であるという可能性が高い。このように癌幹細胞の生物学的な重要性が認識され始めているにも関わらず、化学物質による幹細胞の発癌メカニズムについては全く明らかにされていない。特に、幹細胞特異的な DNA 損傷はあるのか、幹細胞の防御系 (代謝・排泄・修復) はどの程度発達しているのか、など非常に興味深い課題が山積している。

2. 研究の目的

本課題の目的は、エストロゲンによる発癌過程での幹細胞の重要性を明らかにすることにある。先に述べたように、最近の研究によって発癌の標的が幹細胞であることが示唆されており、幹細胞の癌化メカニズムを理解することは、発癌リスクを低減する方法や新薬の開発に有益な情報が得られる可能性がある。現在では、ES 細胞を入手することは困難ではないが、未分化状態を維持するためには技術を要する。したがって、本課題の達成目標は、乳癌と女性ホルモンとの関連を代表例として、発癌物質による ES 細胞中ゲノム DNA 損傷を定量的に測定する方法論を確立することにある。

3. 研究の方法

ES 細胞を用いたエストロゲンによる発癌メカニズムの解析を進める上で、次の4点について比較検討する。①ES 細胞と MEF との比較：未分化状態が発癌応答に及ぼす影響を明らかにする。②E2 とその構造異性体 (17 α -エストロジオール; 17 α -E2) との作用比較：発癌過程におけるエストロゲン作用の寄与を明らかとする。E2 の構造異性体である 17 α -E2 は弱いエストロゲン作用を示すが、DNA 損傷に関連する部分構造は同一であるため、E2 と同程度の DNA 損傷性を示すと考えられる。③動物個体における細胞系データの検証：細胞レベルのデータが個体レベルでどの程度のインパクトを持つのか検討する。④データ相互の相関性の検証：各データの相関性を抽出し、幹細胞発癌メカニズムを提案する。

4. 研究成果

発がん物質の標的が幹細胞であることを示唆するいくつかの報告がある。本研究では、モデル幹細胞としてマウス胚性幹 (mES) 細胞を用いて化学物質による発がんあるいは分化攪乱作用を評価する実験系を構築することを目的とし、まず、mES細胞の*Cyp1a1*および

*Cyp1b1*発現およびその誘導パターンについて検討した。これらについてマウス胎児性線維芽細胞 (MEF) と比較し、分化/未分化状態における特徴的な酵素発現についても検討した。また、17 β -エストラジオール (E2) の代謝活性化物質 (2-OHE2および4-OHE2) による酸化的遺伝子損傷の誘導について測定した。

mES細胞およびMEFは共に*Ahr*を発現していた。各細胞の特徴として、*Cyp1a1*は両細胞間で同程度発現しているのに対し、*Cyp1b1*はMEFにおいてmES細胞よりも14倍高く発現していた。両細胞において代表的異物代謝酵素誘導剤3-メチルコラントレン (3-MC) 処理により*Cyp1a1*および*Cyp1b1*発現が用量依存的に誘導され、特に*Cyp1a1*はMEFにおいて顕著に誘導された。3-MC処理によって、未分化マーカーである*Sox2*の発現は全く変動しなかったことから、これらの異物代謝酵素の発現誘導は未分化状態に影響しないことが明らかとなった。現在までのところ、2-OHE2および4-OHE2処理によるmES細胞ゲノムDNAの明らかな酸化的遺伝子損傷は確認されていないが、上記の結果から、未分化状態の細胞では異物代謝が発達しておらず、化学物質に暴露した場合に蓄積しやすいことが示唆される。今後、異物排泄機構も含め、総合的に精査する必要がある。

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11件)

- ① Okamoto Y., Toda C., Ueda K., Hashizume K., Kojima N.: Transesterification in the microbial degradation of phthalate esters. J. Health Sci. 57, 293-299 (2011). 査読有
- ② Nishino Y., Ando M., Makino R., Ueda K., Okamoto Y., Kojima N.: Different mechanisms between copper and iron in catecholamines-mediated oxidative DNA damage and disruption of gene expression in vitro. Neurotox. Res. 20, 84-92 (2011). 査読有
- ③ Ando M., Ueda K., Okamoto Y., Kojima N.: Combined effects of manganese, iron, copper, and dopamine on oxidative DNA damage. J. Health Sci. 57, 204-209 (2011). 査読有
- ④ Ando M., Nishida H., Ueda K., Itoh K., Okamoto Y., Kojima N.: Preparation of oligoselenodiglutathiones and their suppressive effects on oxidative DNA

- damage induced by catechol and copper. *J. Health Sci.* 57, 72-77 (2011). 査読有
- ⑤ Nakai T., Ando M., Okamoto Y., Ueda K., Kojima N.: Modulation of oxidative DNA damage and DNA-crosslink formation induced by cis-diammine-tetrachloro-platinum(IV) in the presence of endogenous reductants. *J. Inorg. Biochem.* 105, 1-5 (2011). 査読有
- ⑥ Suzuki N., Liu X., Laxmi Y.R.S., Okamoto K., Kim H.J., Zhang G., Chen J.J., Okamoto Y., Shibutani S.: Anti-breast cancer potential of SS5020, a novel benzopyran antiestrogen. *Int. J. Cancer* 128, 974-982 (2011). 査読有
- ⑦ Okamoto Y., Liu X., Suzuki N., Okamoto K., Kim H.J., Laxmi Y.R.S., Sayama K., Shibutani S.: Equine estrogen-induced mammary tumors in rats. *Toxicol. Lett.* 193, 224-228 (2010). 査読有
- ⑧ Laxmi Y.R.S., Liu X., Suzuki N., Kim S.Y., Okamoto K., Kim H.J., Zhang G., Chen J.J., Okamoto Y., Shibutani S.: Anti-breast cancer potential of SS1020, a novel antiestrogen lacking estrogenic and genotoxic actions. *Int. J. Cancer* 127, 1718-1726 (2010). 査読有
- ⑨ Ando M., Nishida H., Itoh K., Okamoto Y., Ueda K., Kojima N.: Penicillamine selenotrisulfide suppressed DNA strand breaks and oxidative DNA damage in vitro. *J. Res. Inst. Meijo Univ.* 9, 27-33 (2010). 査読有
- ⑩ Nishida H., Ando M., Itoh K., Ueda K., Nishida Y., Okamoto Y., Toda C., Kojima N.: Production of polyselenodipenicillamines, unique selenium compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 58, 957-960 (2010). 査読有
- ⑪ Ando M., Nishida H., Nishino Y., Ohbayashi M., Ueda K., Okamoto Y., Kojima N.: Carbonyl side-chain of catechol compounds is a key structure for the suppression of copper-associated oxidative DNA damage in vitro. *Toxicol. Lett.* 199, 213-217 (2010). 査読有
- [学会発表] (計19件)
- ① 岡本 誉士典, 他7名, セレン架橋チオール化合物の酸化的 DNA 損傷抑制作用と還元型チオール共存による作用変動. 日本薬学会第131年会(2011年3月30日、静岡).
- ② 岡本 誉士典, 他5名, 生体内還元物質共存における Pt(IV)化合物の酸化的 DNA 損傷と配位子の影響. 日本薬学会第131年会(2011年3月30日、静岡).
- ③ 岡本 誉士典, 他5名, Fe(III)-/Cu(II)-カテコール化合物介在性酸化的 DNA 損傷に対する Mn(II)の SOD 様作用・自動酸化促進による増強効果. 日本薬学会第131年会(2011年3月30日、静岡).
- ④ 岡本 誉士典, 他5名, 植物由来化合物によるエストロゲン受容体転写調節における構造的特徴. 日本薬学会第131年会(2011年3月30日、静岡).
- ⑤ 岡本 誉士典, 他5名, マンガンの SOD 様作用・自動酸化促進による鉄-/銅-カテコール誘導酸化的 DNA 損傷の増強. 第81回日本衛生学会学術総会(2011年3月26日、静岡).
- ⑥ 岡本 誉士典, 他1名, マウス胚性幹細胞を用いた神経細胞分化と化学物質による影響評価. 名城大学学術フロンティア推進事業 第3回若手研究者シンポジウム(2011年1月8日、名古屋).
- ⑦ 岡本 誉士典, 他7名, 植物由来化合物によるエストロゲン受容体転写調節と成分総和による作用緩和. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会(2010年11月28日、静岡).
- ⑧ 岡本 誉士典, 他4名, 新しい抗エストロゲン化合物: 遺伝毒性および女性ホルモン作用の無い乳がん治療薬の開発. 日本環境変異原学会第39回大会(2010年11月28日、つくば).
- ⑨ 岡本 誉士典, 他7名, 生体内チオール化合物のセレン架橋生成物が示す遺伝子損傷抑制作用. フォーラム2010 衛生薬学・環境トキシコロジー(2010年9月10日、東京).
- ⑩ 岡本 誉士典, 他6名, エストロゲン受容体転写に対するブラジル産プロポリス各種成分の多彩な正負作用と成分総和による作用緩和. フォーラム2010 衛生薬学・環境トキシコロジー(2010年9月10日、東京).
- ⑪ 岡本 誉士典, 他4名, カテコールアミンによる遺伝子損傷におけるロイコアミノクロム生成の重要性. フォーラム2010 衛生薬学・環境トキシコロジー(2010年9月10日、東京).
- ⑫ 岡本 誉士典, 他7名, ポリセレンोजペニシラミンの生成機構と Cu(II)-カテコール依存的 DNA 損傷抑制効果. 第56回日本薬学会東海支部総会・大会(2010年7月3日、岐阜).
- ⑬ 岡本 誉士典, 他4名, Metal-mediated

oxidative DNA damage induced by endogenous catecholamines and its suppressive effect on gene expression. 第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (2010 年 6 月 26 日、徳島).

- ⑭ 岡本 誉士典, 他 4 名, カテコールアミン酸化中間体および生体内金属による酸化的 DNA 損傷と神経変性における役割. 第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2010 年 6 月 24 日、横浜).
- ⑮ 岡本 誉士典, 他 5 名, 生体内還元物質によって変動する Pt(IV) 化合物の酸化的 DNA 損傷および架橋形成作用. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010 年 6 月 17 日、宜野湾).
- ⑯ 岡本 誉士典, 他 6 名, 食品由来成分によるエストロゲン受容体転写発現への影響. 日本食品化学学会第 16 回総会・学術大会 (2010 年 6 月 10 日、大阪).
- ⑰ Okamoto Y., 他 5 名, Production of polyselenodipenicillamines, unique selenium compounds. 9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (2010 年 6 月 1 日、京都).
- ⑱ Okamoto Y., 他 5 名, Novel antiestrogens, SS1020 and SS5020, for breast cancer therapy and prevention. AACR 101st Annual Meeting (2010 年 4 月 20 日、米国ワシントン D. C.).
- ⑲ Okamoto Y., 他 5 名, DNA oxidation induced by platinum(IV) compound in the presence of endogenous reductants. AACR 101st Annual Meeting (2010 年 4 月 20 日、米国ワシントン D. C.).

[その他]

ホームページ等

http://www-yaku.meijo-u.ac.jp/Research/Laboratory/hygie_chem/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 誉士典 (OKAMOTO YOSHINORI)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号 : 50512323