

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580485

研究課題名(和文) ヒト培養細胞を用いた環境汚染物質の新規リスク評価系の開発

研究課題名(英文) The evaluation of environmental contaminants using human breast carcinoma cells

研究代表者

久留戸 涼子 (KURUTO, Ryoko)

常葉大学・教育学部・准教授

研究者番号：50205217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん細胞MDA-MB-231について、乳がん細胞MCF-7と同様に、PCR Arrayを用いた遺伝子発現の網羅的解析を行った。また、環境汚染物質として、多環芳香族炭化水素に注目し、benzo[a]pyrene (BaP)とそのハロゲン化物について、両細胞での応答の差異も解析した。

さらに、環境汚染物質が生体内に取り込まれた際に、その作用は生体内に存在する様々な物質との複合作用として表れるものと考えた。そこで、BaP及びそのハロゲン化物について、女性ホルモンであるエストロジェン(E2)との共存下での作用を調べた。その結果、それらはE2のMCF-7細胞への作用に影響を与えることがわかった。

研究成果の概要(英文)：A variety of contaminants are present in the environment. Their effects were investigated using human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 cells. The water samples from Tomoe River in Shizuoka city and Manyo pond in Tokoha University showed estrogenic and cytotoxic activity. Then we focused benzo[a]pyrene (BaP), one of polycyclic aromatic hydrocarbons, and its halogenated derivatives, ClBaP and BrBaP. They indicated estrogenic activity. The profile of gene expression of BaP was different from that of the natural estrogenic substances such as estrogen (E2) and genistein (Gen). Their combined effects were examined using MCF-7 cells. Exposure to 10⁻⁶ M BaP led to inhibit the proliferative effects of E2. Although 10⁻⁵ M BaP itself strongly enhanced cell proliferation, its effect was reduced by the addition of E2. Exposure to ClBaP or BrBaP enhanced the proliferative effects of E2. Gen inhibited the induction of CYP1A1 and IL-6 gene expression by BaP and BrBaP.

研究分野：細胞生物学

キーワード：環境汚染物質 多環芳香族炭化水素 ハロゲン化 エストロジェン ゲニステイン 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

環境中には、様々な化学物質が存在し、その中には生物にとって有害な汚染物質も多くある。しかし、実際に生態系にどのような影響を与えるのかは評価しにくい。

これまで筆者らは、環境中に検出されるエストロゲン類や多環芳香族炭化水素 (PAHs) 及びそのハロゲン置換体について、それらの合成試料を使い、ヒト乳がん細胞の培養系に加えることで、細胞への影響評価を行ってきた。ヒト乳がん細胞としては、エストロゲン受容体 (ER) を発現している MCF-7 細胞と、ER を発現していない MDA-MB-231 細胞の 2 系統を用いた。前者は、細胞増殖がエストロゲン応答性であり、エストロゲン様物質を検出するために用いる細胞の 1 つである。後者は、エストロゲン応答性がない細胞である。従って、両細胞が示す増殖能の増大あるいは減少を比較することで、作用物質がエストロゲン様物質か否かを判定することができると考えた。

また、MCF-7 細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、発現レベルに変化のあった遺伝子を選択した。その中で、炎症反応に関わるサイトカインである Interleukin-6 (IL-6) の発現レベルが、多くの PAHs で上昇していたため、これに注目した。また、PAHs の多くで発現が上昇する AhR 標的遺伝子の CYP1A1、エストロゲン応答遺伝子である pS2 についても同時に解析を行った。その結果、PAHs の 1 つである benzo[a]pyrene (BaP) やそのハロゲン化物である ClBaP と BrBaP では、エストロゲン様作用を示すこと、IL-6 や CYP1A1 の発現が両細胞で増大することが分かった。

2. 研究の目的

これまで、乳がん細胞 MCF7 において、PCR Array により、遺伝子発現の網羅的解析を行ってきた。今回は、まず、ER を発現していないとされる乳がん細胞 MDA-MB-231 について同様の解析を行うことにした。

さらに、河川水などの環境中の水系、すなわち環境水から採集した水を、2 系統のヒト乳がん細胞に曝露し、細胞増殖や遺伝子発現の解析を行うことで、環境汚染評価を行うことを試みた。

また、環境汚染物質が生体内に取り込まれた際に、その作用は生体内に存在する様々な物質との複合作用として表れるものと考えた。BaP は、乳がん細胞の増殖において、エストロゲン様作用を示したが、エストロゲン (E₂)、また植物エストロゲンであるゲニステイン (Gen)、ダイゼイン (Dai) とは、遺伝子発現レベルにおいては、必ずしも同じではないという結果も得られている。そこで、これらが共存した場合に、どのような複合効果が表れるのか、BaP の塩素置換体や臭素置換体も含めて、検証することにした。

3. 研究の方法

(1) ハロゲン化 BaP の合成及び精製

既に確立した方法に従い、BaP を親物質として、塩素置換体 6-ClBaP が、臭素置換体 6-BrBaP が単離精製された (Fig. 1)



Fig. 1 Structures of BaP, ClBaP, and BrBaP

(2) 環境水の採集

静岡県内の河川である巴川 (静岡市) や逆川 (掛川市)、常葉大学構内の萬葉植物園の池、雨水、水道水から環境水をそれぞれ採集した。各採集水を濾過滅菌し、減圧乾固した後、培養液に再懸濁して用いた。

(3) 細胞培養

MCF-7 細胞 (H. Hagenmaier, University of Tuebingen, Germany より分与)、または、MDA-MB-231 細胞 (静岡県立大学大学院生活健康科学研究科下位香代子教授より分与) を、10% 牛血清 (ICN Biomedicals) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (日水製薬) で、5% CO₂、37 °C で培養した。

(4) 遺伝子発現レベルの網羅的解析

MDA-MB-231 細胞を DMEM に懸濁し、10 cm シャーレに、7.4 × 10⁵ 個/dish となるように播種した。

24 時間後に、培地を活性炭処理した 10% 牛血清 (Hyclone) を含む phenol red-free DMEM (Gibco) に交換した。

さらに 24 時間後に、検査試料を加えた。Control には、試料の溶媒である DMSO を加えた。

RNA の抽出：試料添加 24 時間後に、RNeasy Mini Kit 及び RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて、RNA 抽出を行った。

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 に変換した。

PCR Array：RT² Profiler PCR Array (SA バイオサイエンス社) を用いて、で作製した cDNA を鋳型として、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 を行った。PCR Array として、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、網羅的に解析した。

(5) 細胞増殖試験

phenol red-free DMEM に、細胞を懸濁し、96 穴プレートに、5 × 10³ 個/well となるように播種した。

4 時間後、検査試料を一定の濃度で加え、さらに 3 日間培養した。陽性コントロールとして、 10^{-12} ~ 10^{-9} M E_2 を行った。

3 日後、細胞増殖試験用試薬である cell counting kit-8 (Dojin) を各ウェルに加えミキシングし、2 時間呈色反応を行った。

マイクロプレートリーダー EL808 (BioTek) を用い、450 nm (参照波長 630 nm) の吸光度を測定した。

(6) 標的遺伝子発現レベルの解析

(4) の ~ と同様に細胞を培養し、検査試料を加えた。

(4) の と同様に RNA の抽出を行った。

cDNA への変換 : Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) により、RNA を cDNA に変換した。

Real-time PCR : QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) を使用して、で作成した cDNA を鋳型として、real-time PCR を行った。標的遺伝子は、pS2、CYP1A1、IL-6 とした。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現レベルの網羅的解析

既に乳がん細胞 MCF7 において、PCR Array により、遺伝子発現の網羅的解析を行ってきたが、ER を発現していないとされる乳がん細胞 MDA-MB-231 についても同様の解析を行った。その結果、両細胞において、様々な遺伝子の発現レベルが異なっていたが、特に ER の発現量が MCF7 細胞において MDA-MB-231 細胞の数千倍高く、また V-erb、Retinoid X receptor、AR など多くの遺伝子において MDA-MB-231 細胞での発現量が低かった。

さらに、BaP と BrBaP の曝露では、ABCG2 や CYP1A1 のように、MCF7 細胞と同じく発現が上昇した遺伝子もあったが、発現量に変化のない遺伝子も多く存在した。一方、MCF7 では変化のなかった Retinoic acid receptor で、発現量が高くなり、細胞によって応答性に違いが認められた。また、Br 体では MCF7 と同様に CYP1A1 の発現量が低かったが、低発現の ER は BaP 曝露により発現量が高まった。

(2) 環境水の汚染評価

河川などから採集した環境水を、細胞に曝露し、細胞増殖や遺伝子発現の解析を行った。

巴川上流水 (TU) は、MCF-7 細胞の増殖能を濃度依存的に高め、MDA-MB-231 細胞の増殖能には影響を与えなかったため、エストロゲン様物質が含まれていると考えられた (Fig. 2)。巴川下流水 (TD) では、両細胞とも濃度依存的に増殖能が低下したことから、細胞毒性があると考えられた。

遺伝子発現については、IL-6 の遺伝子発現レベルを上昇させた環境水もあり、細胞に何

らかの炎症作用を引き起こすような物質が存在している可能性が示された (Fig. 3)。

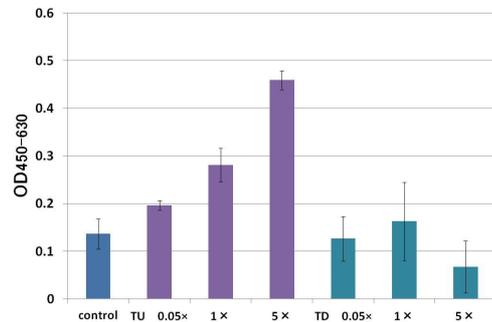


Fig. 2 Effects of the water samples on the growth of MCF-7 cells.

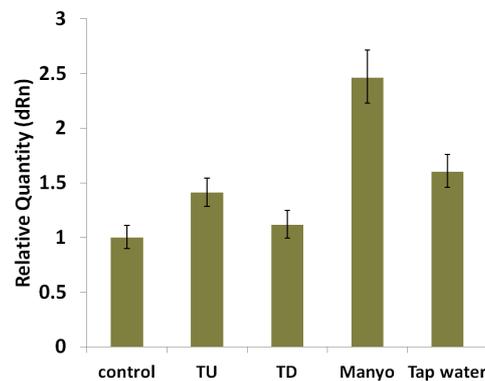


Fig. 3 Induction of IL-6 in MCF-7 cells.

(3) BaP 及びそのハロゲン化物のエストロゲン作用に及ぼす影響

ヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いて、 E_2 、Gen、Dai、BaP、ClBaP、BrBaP を組み合わせて曝露し、細胞増殖試験と遺伝子発現解析を行った。

細胞増殖試験

まず、 E_2 と、Gen や Dai とを共存させた。 10^{-12} M E_2 と Gen の共曝露では、単独 Gen の作用が表れ、 10^{-11} M E_2 では、低濃度の Gen で E_2 の効果が表れた。 10^{-10} 、 10^{-9} M の E_2 では、低濃度の Gen で E_2 の効果が表れたが、Gen が高濃度になると、むしろ E_2 の作用を抑制した。Dai も同様であった。 E_2 と BaP を共に曝露させると、 10^{-7} M の BaP では、 E_2 単独と同程度であったが、 10^{-6} M の BaP では、 10^{-10} 、 10^{-9} M の E_2 の増殖作用を抑制した (Fig. 4)。 10^{-5} M の BaP でも、もともと細胞増殖作用が強く認められるが、 10^{-10} 、 10^{-9} M といった高濃度の E_2 存在下では、細胞増殖能は E_2 単独の効果と同等までに低下した。

同様に、Gen と BaP を共に曝露させると、 10^{-8} 、 10^{-7} M の BaP では、Gen の作用が維持されたが、 10^{-6} M の BaP 下では、Gen の増殖作用を顕著に抑制した。 10^{-5} M の BaP でも、 10^{-5} M の高濃度の Gen に対して、その効果を抑制することが認められた (Fig. 5)。Dai では、 10^{-8} 、 10^{-7} M の BaP では、 10^{-5} M の高濃度の Dai に対して、その効果

を抑制する傾向が認められた。 10^{-6} 、 10^{-5} M のBaPでは、BaPの作用が維持された。

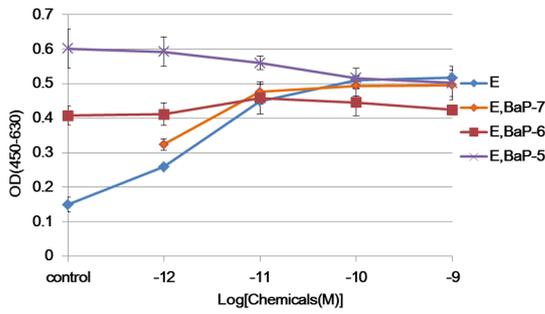


Fig. 4 Effects of E_2 and BaP on cell growth of MCF-7 cells.

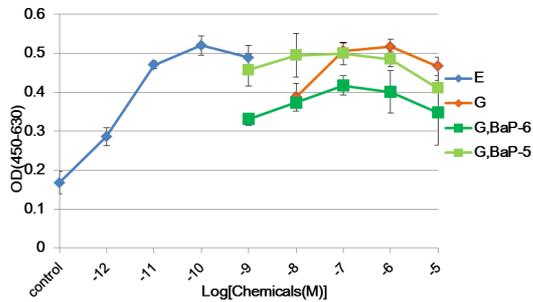


Fig. 5 Effects of Gen and BaP on cell growth of MCF-7 cells.

次に、ClBaPとBrBaPで同様の実験を行った。ClBaPでは、 E_2 と共に曝露させると、 E_2 単独の細胞増殖作用よりも、濃度依存的に増殖能が上昇した (Fig. 6)。BrBaPも、ClBaPと比較すると弱いながら、同様の傾向が認められた。ClBaP、BrBaPは弱いエストロゲン作用を示すことがわかっているので、その効果が E_2 に加わったものと考えられた。

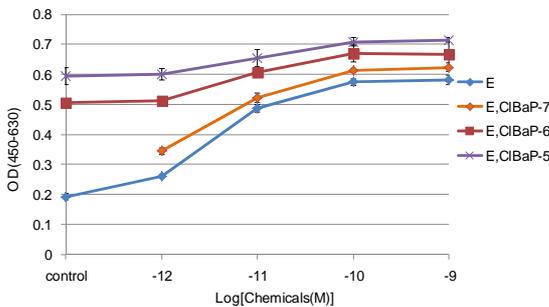


Fig. 6 Effects of E_2 and ClBaP on cell growth of MCF-7 cells.

標的遺伝子発現レベルの解析

上記の結果を踏まえて、いくつかの組み合わせでMCF-7細胞に曝露し、遺伝子発現レベルの変化を調べた。

pS2は、 E_2 により、その発現レベルが高まることが知られている。 10^{-10} M E_2 と 10^{-6} または 10^{-5} M Genの組み合わせでは、単独で

発現量が高いGenでの結果と同等になった。 E_2 とDaiの組み合わせでは、単独のものより、低い傾向が見られた。 10^{-5} Mや 10^{-6} MのBaPと、 E_2 、Gen、またはDaiの共曝露では、後者単独に比べ、pS2発現のレベルを低下させる傾向があった。ClBaPとBrBaPは、BaPに比べpS2の発現量が低いが、 E_2 との共曝露では、 E_2 の作用をやや抑える傾向にあった。

CYP1A1は、PAHsで発現量が高まることが知られている。 10^{-5} M BaPに 10^{-5} M Genを共存させると、BaPによるCYP1A1発現誘導をやや抑制したが、 E_2 やDaiではその傾向は認められなかった。 10^{-6} M BaPでは、Genにより濃度依存的に抑制された。BrBaPでは、 E_2 やGenによりCYP1A1の発現が抑制された (Fig. 7)。

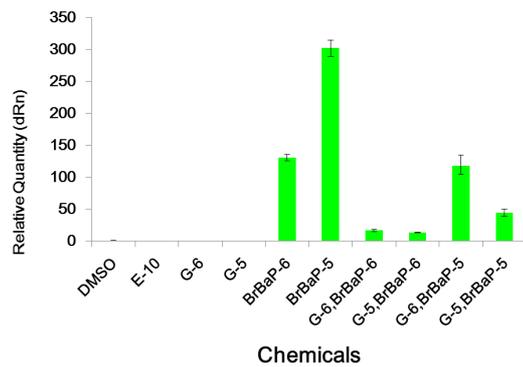


Fig. 7 Induction of CYP1A1 in MCF-7 cells.

炎症マーカーであるIL-6は、 E_2 、Gen、Daiでは発現は上昇しないが、BaPでは高まることが確認されている。Genは、BaPによる発現誘導を濃度依存的に抑制したが (Fig. 8)、 E_2 やDaiでは抑制傾向は認められなかった。ClBaPとBrBaPでは、 E_2 との共存下でやや上昇傾向も認められたが、BrBaPでは、Genにより濃度依存的にIL-6の発現が抑制された。

以上のことから、BaP、ClBaP、BrBaPを比較すると、エストロゲン作用に対する効果が異なることが考えられた。

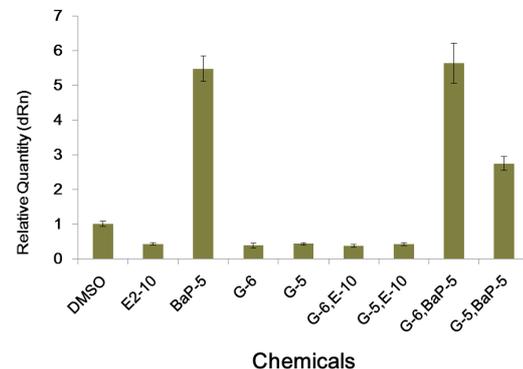


Fig. 8 Induction of IL-6 in MCF-7 cells.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Kuruto, R., Abe, T., Yoshida, K., Ohura, T. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and their halogenated derivatives on estrogenic action. Tokoha University Research Review (Faculty of Education), 査読無 35, 2015, 269-290.

Sakakibara, H., Ohura, T., Kamiya, Y., Yamanaka, N., Shimada, N., Shimoi, K., Guruge, K.S. Sex-dependent difference in the hepatic and pulmonary toxicological effects in mice administrated 7-chlorinated benz[a]anthracene. Fund. Toxicol. Sci., 査読有 1, 2014, 101-108.

Kakimotoa, K., Nagayoshi, H., Konishi, Y., Kajimura, K., Ohura, T., Hayakawa, K., Toriba, A. Atmospheric chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons in East Asia. Chemosphere, 査読有 111, 2014, 40-46.

DOI:10.1016/j.chemosphere.2014.03.072

Ohura, T., Sakakibara, H., Watanabe, I., Shim, W.J., Manage, P.M., Guruge, K.S. Spatial and vertical distributions of sedimentary halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in moderately polluted areas of Asia. Environmental Pollution, 査読有 196, 2015, 331-340.

DOI: 10.1016/j.envpol.2014.10.02

Kuruto, R., Yamamoto, S., Akimoto, K., Ohura, T., Shimoi, K. The evaluation of contamination in environmental waters using human breast carcinoma cells. Tokoha University Research Review (Faculty of Education), 査読無 34, 2014, 293-308.

Ohura, T., Kojima, M., Horii, Y., Kamiya, Y. Diurnal variability of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air, Japan. Atmos. Environ., 査読有 81, 2013, 84-91.

DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.08.044

Ma, J., Chen, Z., Wu, M., Feng, J., Horii, Y., Ohura, T., Kannan, K. Airborne PM2.5/PM10-associated chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and their parent compounds in a suburban area in Shanghai, China. Environ Sci Technol., 査読有 47, 2013, 7615-7623.

DOI:10.1021/es400338h

Sakakibara, H., Ohura, T., Kido, T., Yamanaka, N., Tanimura, N., Shimoi,

K., Guruge, K. S. Organ-specific distribution of 7-chlorinated benz[a]anthracene and regulation of selected cytochrome P450 genes in rats. J. Toxicol. Sci., 査読有 38, 2013, 137-143.

DOI:10.2131/jts.38.137

Kido, T., Sakakibara, H., Ohura, T., Guruge, K. S., Kojima, M., Hasegawa, J., Iwamura, T., Yamanaka, N., Sakaguchi, M., Amagai, T., Shimoi, K. Evaluation of chlorinated benz[a]anthracene on hepatic toxicity in rats and mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. Environ. Toxicol., 査読有 28, 2013, 21-30.

DOI:10.1002/tox.20693

Ma, J., Zheng, J. S., Chen, Z. Y., Wu, M. H., Horii, Y., Ohura, T., Kannan, K. Chlorinated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban Surface Dust and Soil of Shanghai, China. Adv. Mat. Res., 査読有 610-613, 2013, 2989-2994.

DOI:10.4028/www.scientific.net/AMR.610-613.2989

Kuruto, R., Yamamoto, S., Ohura, T. Effects of halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons on gene expression. Tokoha Gakuen University Research Review (Faculty of Education), 査読無 33, 2013, 279-294.

Wang, J., Chen, S., Tian, M., Zheng, X., Gonzales, L., Ohura, T., Mai, B., Simonich, S.L. Inhalation cancer risk associated with exposure to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in an electronic waste and urban area in South China. Environ. Sci. Technol., 査読有 46, 2012, 9745-9752.

DOI: 10.1021/es302272a

神谷優太、今中努志、池盛文数、西脇さゆみ、安藤正典、大浦健 未規制リスク因子の環境動態解析ならびに生体影響評価—塩素化多環芳香族類の大気汚染実態調査とダイオキシン受容体活性化能—。名城大学総合研究所紀要, 査読有 17, 2012, 19 - 22.

〔学会発表〕(計 22 件)

久留戸涼子、吉田滉太、大浦健 ハロゲン化多環芳香族炭化水素のエストロジェン作用に及ぼす影響 第 17 回日本内分泌攪乱化学物質学会 2014 年 12 月 9 日 東京

Kakimotoa, K., Nagayoshi, H., Takagi, S., Konishi, Y., Kajimura, K., Ohura, T., Hayakawa, K., Toriba, A., Chlorinated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air Particulates in

North-East Asia. International Conference of Asian Environmental Chemistry (ICAEC2014), 2014年11月24~26日, Bangkok, Thailand
神谷優太、亀田貴之、大浦健、東野達 塩素化多環芳香族炭化水素類の大気内挙動解析 第55回大気環境学会年会 2014年9月17~19日 松山
大浦健 大気ハロゲン化PAHs研究の最前線 ~分析法から発生源解析まで~ 第23回環境化学討論会 2014年5月14日 京都
堀井勇一、神谷優太、大浦健 東京湾集水域におけるハロゲン化多環芳香族炭化水素類の環境残留特性 第23回環境化学討論会 2014年5月14~16日 京都
鈴木里奈、大浦健 生体試料中の塩素化多環芳香族類分析における前処理法の検討 第23回環境化学討論会 2014年5月14~16日 京都
久留戸涼子、阿部智江、大浦健 多環芳香族炭化水素のエストロゲン作用に及ぼす影響、第16回日本内分泌攪乱化学物質学会、2013年12月13日 東京
Suzuki, R., Ohura, T. The Analytical Development of Chlorinated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Used by Ion Trap GC/MS, and Bioaccumulation of Wild Organisms. 2013 International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds (ISPAC 2013) conference, Sep. 8-12, 2013, Corvallis, OR, USA
Kamiya, Y., Ohura, T. Size Distribution and Source Apportionment of Chlorinated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in an Urban Air, Japan. 2013 International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds (ISPAC 2013) conference, Sep. 8-12, 2013, Corvallis, OR, USA
Kakimoto, K., Nagayoshi, H., Takagi, S., Konishi, Y., Kajimura, K., Ohura, T., Toriba, A., Hayakawa, K. Atmospheric chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons in East Asia. 33rd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants and POPs -DIOXIN 2013, Aug. 25-30, 2013, Korea
Horii, Y., Minomo, K., Ohtsuka, N., Nojiri, K., Ohura, T., Miyake, Y. Evaluation of toxic equivalents for halogenated polyaromatic hydrocarbons in waste incinerators, Japan. 33rd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants and POPs -DIOXIN 2013, Aug. 25-30, 2013, Korea
大浦健、神谷優太、須原 健、池盛文数、中島大介 塩素化多環芳香族炭化水素類

談全国大気調査 第22回環境化学討論、2013年8月1日 府中 東京
神谷優太、池盛文数、飯島明宏、奥田知明、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環境動態ならびに発生源解析 第22回環境化学討論 2013年7月31日 府中、東京
Kamiya, Y., Ikemori, F., Ohura, T. Environmental factors affecting the concentrations of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particulate matters. SETAC Europe 23rd Annual Meeting, May. 12-16, 2013, Glasgow, UK
Ohura, T., Sakakibara, H., Kido, T., Yamanaka, N., Tanimura, N., Shimoi, K., Guruge, K.S. Organ-specific distribution of 7-chlorinated benz[a]anthracene and regulation of selected cytochrome P450 genes in rats. SETAC Europe 23rd Annual Meeting, May. 12-16, 2013, Glasgow, UK
久留戸涼子、山本彩季、秋元慧、大浦健、下位香代子 ヒト乳がん細胞を用いた環境水の汚染評価、第15回日本内分泌攪乱化学物質学会、2012年12月18~19日 東京
三輪良、大浦健 塩素化芳香族類の光反応挙動 日本分析化学会第61年会、2012年9月19~21日 金沢
神谷優太、池盛文数、大浦健 名古屋市中大気中におけるハロゲン化芳香族類濃度の年間変動。日本分析化学会第61年会、2012年9月19~21日 金沢

〔図書〕(計 1 件)

Ohura, T., Kamiya, Y., Ikemori, F., Imanaka, T., Ando, M. Analysis of halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in the air. *In* Air Quality-New Perspective (G. Lopez, B. Valdez, & M. Schorr, Eds.), InTech. 2012, 313-326

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.tokoha-u.ac.jp/teachers/pedagogy/elementary/kuruto/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久留戸 涼子 (KURUTO, Ryoko)
常葉大学・教育学部・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