

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25740024

研究課題名(和文) 乳がん細胞におけるビスフェノールAのエストロゲン様活性増強の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism of bisphenol A's reinforced estrogen-like activity in the breast cancer cell

研究代表者

劉 暁輝 (LIU, Xiaohui)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60596849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ビスフェノールA(BPA)は乳がん細胞増殖作用を示す。我々は、エストロゲン受容体(ER)とエストロゲン関連受容体(ERR)が共存すると、BPA活性が相乗的に増強されることを発見した。本研究では、この増強作用の分子機構解明に取り組んだ。まず、乳がん細胞に存在するERとERRを調べ、BPA暴露による発現量変化を解析した。その結果、ER、ERRとERRの活性増強への関与が判明した。また、コアクチベーターも特定のものが関与していることが判明した。さらに、BPAが結合するのはERで、ERRは協働作用に働くこと、DNA結合エレメントには必須な構造要因があることなどが判明した。

研究成果の概要(英文)：Bisphenol A (BPA) increases tumor cell proliferation in breast cancer. We discovered that BPA's estrogen-like activity reinforced is due to the cooperative stimulative interaction between the estrogen receptors (ERs) and the estrogen-related receptors (ERRs). The aim of this study is to elucidate the molecular mechanism of this interaction in the breast cancer cell. We first analyzed the gene expression of ERs and ERRs with and without BPA administration, and it was found that ER and either ERR or ERR cooperate for stimulative activity reinforcement together with a certain participation of some coactivators. In addition, we found that BPA binds to ER, to which ERRs work cooperatively. It was also clarified that, for cooperative function between ER and ERRs, DNA requires a specific structure of ERE element for binding of ER. It was also revealed that ER and ERRs function as a homodimer for activity enhancement, although their direct interaction has not been observed.

研究分野：環境解析学

キーワード：ビスフェノールA エストロゲン様作用 核内受容体 生理活性 乳がん細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向

生活環境中の有害化学物質であるビスフェノールA (BPA) は、プラスチックやエポキシ樹脂の原料として 1950 年代から広く使用されてきた化合物であり、近年、乳がん患者数増加の原因の一つである。乳がん細胞の増殖は、がん細胞中のエストロゲン受容体 (ER) にエストロゲンが結合し、転写活性化されることで起こる。しかし、BPA と ER の結合性はエストロゲンの 1,000 - 10,000 分の 1 と比べて弱く、したがって、かなり強い BPA のエストロゲン様活性の分子機構の解明が待たれている。

こうしたなか、申請者らは、『BPA が核内受容体の 1 種 ERR γ に天然ホルモン並みに非常に強く結合する』こと、『CV-1 細胞において、ER α と ER α 、あるいは ERR γ を共存させると、BPA の作用は大きく活性増強される』ことを発見した。これら全く予想外の発見により、BPA の真正な生理作用を解析、理解する端緒を世界で始めて切り開いた。BPA が乳がん細胞の増殖作用を示す分子機構の解明、特に協働作用の機作の解明においては緊要の研究課題となった。

(2) 着想に至った経緯とその内容

2008 年 9 月、アメリカ国家毒性プログラム・NTP は、「化学物質・BPA は、胎児、乳幼児において、特に脳神経系、生殖系で悪影響が懸念される」とする最終報告書を発表した。こうしたなか、「BPA の特異的な受容体は ERR γ である」、「ER と ERR が共存すると BPA の作用が増強される」という我々の研究グループの結果は、BPA の真正な生理作用を解析する上できわめて有力な端緒となると思われた。ところで、乳がん細胞には、ER の 2 種 (ER α 、ER β)、ERR の 3 種 (ERR α 、ERR β 、ERR γ) がすべて存在するが、これら受容体が共存する生理学的影響は全く研究されていない。こうした研究背景により、BPA が乳がん細胞の増殖作用を示す分子機構の解明が可能となる、という着想に思い至った。

近年、DVD や携帯電話などの製造に不可欠な高性能プラスチックとしてさまざまな BPA の構造類似体が続々と開発され、これら「新世代ビスフェノール」の悪影響が心配されている。こうしたなか、我々は複数の新世代ビスフェノールが ER や ERR に強く結合することを発見し、その中でもビスフェノール AF は ER に強く結合し、ER α を活性化するアゴニスト、ER β の活性化を抑制するアンタゴニストとして作用することを世界に先駆けて発見した。こうした新世代ビスフェノールに関して、特に ER と ERR の相互作用を介した悪影響の解析が強く求められている。

2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」で述べた通り、BPA による乳がん細胞の増殖が観察され、環境有害化学物質の新たな問題となっている。しかしながら、BPA の ER との結合は非常に弱く、「なぜビスフェノールA が強く作用するのか？」は現在まで未解明である。一方、BPA はエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) と非常に強く結合するものの、ERR γ を基盤以上には活性化することはないため、乳がん細胞増殖の機構を説明しない。本研究の最大の目的は、乳がん細胞において ER と ERR が協働作用し、BPA が増殖作用を示すメカニズムがあるのか？ を調べ、あればそれを分子レベルで解析し、解明することである。

3. 研究の方法

(1) プラスミドの作製

変異受容体発現プラスミドおよびホタルルシフェラーゼレポータープラスミドは、特異的プライマーを用いて PCR により増幅して得た。それぞれにエストロゲン受容体応答配列 (ERE) を配するプラスミドを設計・合成し、アニーリング法により得た。得られた産物を適切な制限酵素で消化の後、発現ベクター-pcDNA3.1、あるいはレポーターベクター-pGL3 に導入した。配列は DNA シーケンサを用いて確認した。

(2) 細胞培養

常法に従い、乳がん細胞 MCF-7、及び T47D 細胞を Eagle's MEM 培地 (10%血清、0.1 mM NEAA、1 mM Sodium Pyruvate を含む) で培養した。MDA-MB-361 細胞を L15 培地 (2 mM glutamine、15%血清を含む) で培養した。アフリカミッドザル腎臓由来 CV-1 細胞を Eagle's MEM 培地 (10%血清を含む) で培養した。培養に用いた血清は、内在性の低分子化合物を取り除くためにデキストラン被膜活性炭処理した。

(3) 化学物質暴露およびトータル RNA の抽出

MCF-7 細胞、あるいは T47D 細胞に任意の濃度の 17 β -estradiol (E2)、あるいは BPA を暴露した。24 時間、あるいは 48 時間暴露した後、細胞を回収し、トータル RNA を抽出した。次いで、逆転写により cDNA を得た。

(4) リアルタイム PCR mRNA アッセイ

乳がん細胞における内在性核内受容体 5 種、転写共役因子 5 種の mRNA の発現量について、それぞれに特異的なプライマーを用いて標準 DNA プラスミドを作製した。(2) で調製した乳がん細胞の cDNA に対して、化合物暴露の有無により内在性遺伝子の発現量を定

量・比較した。定量測定における平準化には、GAPDH (glycerol-3- phosphate dehydrogenases) mRNA を標準に用いた。リアルタイム PCR は、96 穴プレートを使用する方法で実施した。

(5) レポーター遺伝子アッセイ

MCF-7 細胞、あるいは CV-1 細胞に、核内受容体 ERs、あるいは ERRs のプラスミドを単独、あるいはそれぞれを組み合わせて細胞に共発現させた。その際、受容体の活性を検出するために、ERE のルシフェラーゼのレポータープラスミドを用いた。細胞への発現プラスミドの導入には、lipofectamine とプラスミドを用いた。24 時間後、E2、あるいは BPA 任意の濃度を暴露した。さらに、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定・評価した。

(6) 受容体タンパク質間の相互作用の解析

ER と ERR 受容体タンパク質間の相互作用を観察するために、蛍光核が近接すると発光する検出法のキットを用いて実施した。まず、ER α と ERR α のモノマー遺伝子、あるいは強制ダイマー遺伝子についてプラスミドを作製し、CV-1 細胞に導入した。48 時間後、タンパク質間相互作用を蛍光シグナルとして蛍光顕微鏡で観察・検出した。

4. 研究成果

(1) BPA 暴露による内在性遺伝子の発現量への影響

BPA 暴露による乳がん細胞の増殖作用を調べるため、まず、MCF-7、T47D、MDA-MB-361 細胞の 3 種乳がん細胞において、内在性核内受容体の発現量を調べた。すなわち、ER 2 種、ERR 3 種の遺伝子発現量を解析した。いずれの細胞においても、ER α の発現量は多く、これに対して ERR α と ERR γ の発現量は一定量を確保されるものの、わずかであった。しかし、ER β と ERR β は非常に低発現であることが分かった。

転写共役因子ステロイド受容体コアクチベーター SRC1、SRC2、SRC3、及びペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 共役因子 pGC1 α 、pGC1 β の合計 5 種の共役制御因子について調べた。SRC3、及び SRC1 は多く発現し、SRC2 は中程度、pGC1 α と pGC1 β は低発現であることが判明した。

MCF-7 で BPA の活性増強を調べたところ、SRC1 以外の全てのコアクチベーター遺伝子、及び全ての核内受容体遺伝子の発現量が減少することが明らかとなった。これは E2 投与でも同様に起こった。

(2) 遺伝子の導入による BPA の活性増強解析

MCF-7 細胞に ER と ERR 受容体の各発現プラスミドを単独あるいは組み合わせて導入

し、BPA 暴露による活性変化を調べた。その結果、ER α 、ERR α 、あるいは、ERR γ の発現は BPA 活性を増強した。これは内在性核内受容体との協働作用による増強と思われた。一方、ER β 、ERR β 発現は活性を抑制し、これらの核内受容体に何らかの協働的な抑制作用が存在することを示唆した。この事例の詳細な解析はこれまでになく、今後の課題である。

(3) BPA が活性増強のために結合する受容体の同定

ER α /ERR α 、あるいは ER α /ERR γ 発現系において、BPA が結合する受容体を同定することにした。BPA が結合できない ER α および ERR γ 変異受容体を作製し、これらを CV-1 細胞に発現し、レポーター遺伝子アッセイにより解析した。その結果、BPA のエストロゲン様活性は BPA が ER α に結合して発揮されることが明らかとなった。そして、ERR α 、及び ERR γ には BPA は結合する必要はないことが判明した。ERR α 、ERR γ は ER α に協働的に作用し、BPA の結合依存的に ER α の活性を増強することが明らかとなった。

(4) DNA エlement 構造による BPA 活性増強への影響

DNA 上に構築した ERE エlement は、3 回リピートである。今回、DNA に活性増強に必要な構造要因を解明するため、この繰り返し (リピート) 数の影響を調べた。1~5 回リピートの ERE を持つレポーター遺伝子アッセイの結果、4 回リピートで最大になった。リピート間の塩基数は、2 重らせん構造におけるピッチのおくりを規定する。10~11 bp は 1 ピッチの間隙をつくることになる。今回、3 回リピートでリピート間スペースについて 11、22、33 bp のスペースで検討したところ、22 bp で最大になった。このように、DNA の Element 構造には ER-ERR の協働作用発現に必要な構造要因があることが判明した。

(5) 受容体の相互作用による BPA 活性増強への影響

これまでの解析から、BPA によって活性増強が起こる機作仮説として、『ER、ERR ともにホモダイマー構造を形成し、受容体ホモダイマーどうしがテトラマーとして他の転写因子と巨大複合体を形成する』モデルが考えられた。そこで、両受容体ホモダイマー間の相互作用についてタンパク質断片コンプリメーション法で調べたところ、この方法に関する限り直接的な相互作用はないことが判明した。

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 11 件)

1. Liu, X., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: A novel method to identify and quantify the coactivator proteins that couple with human nuclear receptor: The use of interacting interface α -helix peptide for quantitative inhibition. *Peptide Science* 2014, 査読有, 2015, 349-350.
2. Matsuyama, Y., Nishimura, H., Liu, X., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: Structural and molecular evolutionary analysis of the ligand-binding domain of forty-eight human nuclear receptors. *Peptide Science* 2014, 査読有, 2015, 347-348.
3. Umeno, S., Matsuo, A., Matsuyama, Y., Nakamura, M., Koga, K., Liu, X., Matsushima, A., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y.: Bisphenol A-induced substantial peak decay of *Drosophila* circadian neuropeptide hugin mRNA expression. *Peptide Science* 2014, 査読有, 2015, 41-42.
4. Liu, X., Matsushima, A., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y.: A Characteristic Back Support Structure in the Bisphenol A-Binding Pocket in the Human Nuclear Receptor ERR γ . *PLoS ONE*, 査読有, 9(6): 2015, e101252.
DIO: 10.1371/journal.pone.0101252
5. Liu, X., Nishimura, H., Fujiyama, A., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: Constitutive α -helix-peptides required for functional dimerization of estrogen-related receptor γ (ERR γ). *Peptide Science* 2013, 査読有, 2014, 429-430.
6. Matsuyama, Y., Liu, X., Nishimura, H., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: Three-dimensional docking modeling to human nuclear receptors for exploration of bisphenol-A targeting receptors. *Peptide Science* 2013, 査読有, 2014, 459-460.
7. Matsuo, A., Umeno, S., Matsuyama, Y., Nakamura, M., Takeda, Y., Sumiyoshi, M., Liu, X., Matsushima, A., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y.: Bisphenol A-induced epigenetic mutations in circadian

pacemaker neuropeptide mRNAs of hyperactive *Drosophila* fruit flies. *Peptide Science* 2013, 査読有, 2014, 457-458.

8. Umeno, S., Matsuo, A., Matsuyama, Y., Nakamura, M., Takeda, Y., Sumiyoshi, M., Liu, X., Matsushima, A., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y.: Influence analysis of the circadian evening pacemaker neuropeptide *hugy* gene in the bisphenol A-exposed fruit fly *Drosophila* Brain. *Peptide Science* 2013, 査読有, 2014, 455-456.
9. Sugiyama, M., Matsuo, A., Saito, T., Uchimura, E., Liu, X., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: Expression and mutation analyses of brain neuropeptide genes of endocrine-disrupting bisphenol A-exposed hypoactive mouse. *Peptide Science* 2013, 査読有, 2014, 453-454.

[学会発表](計 96 件)

1. 劉 曉輝、松島 綾美、下東 康幸: ヒト核内受容体の非リガンド性阻害ペプチド創薬をめざして. 第 20 回ペプチドフォーラム「生命分子・ペプチド機能に学ぶ医薬品」, 平成 27 年 (2015 年) 3 月 12-14 日、長浜バイオ大学 命江館 (長浜市).
2. 劉 曉輝、池田 伸、松島綾美、下東康幸: ER α と ERR α の強制ホモダイマーと強制ヘテロダイマーから解った核内受容体の転写活性化分子機構. リスクサイエンス研究フォーラム 2015、平成 27 年 (2015 年) 3 月 9 日、福岡大学セミナーハウス (福岡市).
3. 劉 曉輝、池田 伸、松島綾美、下東康幸: ビスフェノール A 活性を相乗的に増強させる自発構成活性型核内受容体の新機能. リスクサイエンス研究フォーラム 2015、平成 27 年 (2015 年) 3 月 9 日、福岡大学セミナーハウス (福岡市).
4. 劉 曉輝、松島綾美、下東康幸: ヒト核内受容体活性化を阻害するペプチドの分子設計と活性化の分子メカニズム解析. リスクサイエンス研究フォーラム 2015、平成 27 年 (2015 年) 3 月 9 日、福岡大学セミナーハウス (福岡市).
5. 木村僚子、劉 曉輝、西村裕一、松島綾美、下東康幸: ビスフェノール A の核内受容体 ERR に対する薬理的シャペロン効果. リスクサイエンス研究フォー

- ラム 2015、平成 27 年(2015 年)3 月 9 日、福岡大学セミナーハウス(福岡市)。
6. 佐藤俊介、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸:自発活性化型核内受容体によるエストロゲン受容体協働作用: SF1 が介添えするビスフェノール A による活性増強. リスクサイエンス研究フォーラム 2015、平成 27 年(2015 年)3 月 9 日、福岡大学セミナーハウス(福岡市)。
 7. 松島綾美、劉 曉輝、池田 伸、下東康幸:カスパーゼ 7 のエストロゲン受容体遺伝子応答配列を用いた自発活性化型核内受容体のレポーター遺伝子試験. リスクサイエンス研究フォーラム 2015、平成 27 年(2015 年)3 月 9 日、福岡大学セミナーハウス(福岡市)。
 8. 劉 曉輝、池田 伸、松島綾美、下東美樹、下東康幸:核内受容体 ER および ERR の協働作用を介したビスフェノール A の低用量効果の分子メカニズム. 環境ホルモン学会 第 17 回研究発表会、平成 26 年(2014 年)12 月 9-10 日、東京大学山上会館(東京都)。
 9. 劉 曉輝、池田 伸、松島綾美、下東美樹、下東康幸:強制ダイマー化により解る核内受容体の転写活性化の分子メカニズム: ER α と ERR α のホモおよびヘテロダイマー化. 環境ホルモン学会 第 17 回研究発表会、平成 26 年(2014 年)12 月 9-10 日、東京大学山上会館(東京都)。
 10. 劉 曉輝、藤山明菜、崎戸沙耶、松山祐昂、松島綾美、下東康幸:核内受容体 ERR γ におけるホモダイマー化の必須構造要因. 環境ホルモン学会 第 17 回研究発表会、平成 26 年(2014 年)12 月 9-10 日、東京大学山上会館(東京都)。
 11. 佐藤俊介、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸:自発活性化型核内受容体 SF1 のエストロゲン受容体 ER への協働作用によるビスフェノール A の活性増強. 環境ホルモン学会 第 17 回研究発表会、平成 26 年(2014 年)12 月 9-10 日、東京大学山上会館(東京都)。
 12. Xiaohui Liu, Ayami Matsushima, and Yasuyuki Shimohigashi: A novel method to identify and quantify the coactivator proteins that couple with human nuclear receptor: The use of interacting interface α -helix peptide for quantitative inhibition. The 51st Japanese Peptide Symposium, October 22 - 24, 2014, Otsuka Memorial University Auditorium (Tokushima University, Tokushima).
 13. 劉 曉輝、松島綾美、下東美樹、下東康幸:ビスフェノール A のエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) 強結合における特徴的後方支援構造要因. 第 87 回日本生化学会大会、平成 26 年(2014 年)10 月 15 日(水)~18 日(土) 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都市)。
 14. 劉 曉輝、池田 伸、松島綾美、下東美樹、下東康幸:自発活性化型核内受容体 ERRs の協働作用:ビスフェノール A の ER α を介したエストロゲン様活性の相乗的増強. 第 87 回日本生化学会大会、平成 26 年(2014 年)10 月 15 日(水)~18 日(土) 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都市)。
 15. 劉 曉輝:ビスフェノールを分子ツールにした核内受容体のリガンド応答分子メカニズムの解明. 平成 26 年度日本生化学会九州支部例会、平成 26 年(2014 年)5 月 17~18 日、九州大学コラボステーション□(福岡市)。
 16. 劉 曉輝、池田 伸、松島綾美、下東康幸:ER α との協働作用に必要な核内受容体には高い構成活性化が必須である. 平成 26 年度日本生化学会九州支部例会、平成 26 年(2014 年)5 月 17~18 日、九州大学コラボステーション□(福岡市)。
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://lsfb.scc.kyushu-u.ac.jp>
<http://RSRC.scc.kyushu-u.ac.jp>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
劉 曉輝 (LIU, Xiaohui)
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号: 60596849
 - (2) 研究分担者
該当なし
 - (3) 連携研究者
該当なし