

多環芳香族炭化水素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

久留戸 涼子、阿部 智江、吉田 滉太、大浦 健

The Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and
Their Halogenated Derivatives on Estrogenic Action

Ryoko KURUTO, Tomoe ABE, Kota YOSHIDA, Takeshi OHURA

2014年11月21日受理

Abstract: A variety of contaminants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their halogenated derivatives are present in the environment. Their effects on cell proliferation and gene expression have been investigated using human breast carcinoma cells. We focused benzo[*a*]pyrene (BaP), one of PAHs, and its halogenated derivatives, ClBaP and BrBaP. They indicated estrogenic activity. However, the profile of gene expression of BaP was different from that of the natural estrogenic substances such as estrogen (E_2), genistein (Gen), and daidzein (Dai). In this study, the combined effects of E_2 , Gen, Dai, BaP, ClBaP, and BrBaP on cell proliferation and gene expression of pS2, CYP1A1, and IL-6 were examined using human breast carcinoma MCF-7 cells, which have estrogen receptor. Exposure to 10^{-6} M BaP led to inhibit the proliferative effects of E_2 . Although 10^{-5} M BaP itself strongly enhanced cell proliferation, its effect was reduced by the addition of E_2 . Also, BaP reduced the proliferative effects of Gen. Exposure to ClBaP or BrBaP enhanced the proliferative effects of E_2 . The levels of pS2 expression induced by E_2 , Gen, and Dai were reduced by BaP. ClBaP and BrBaP were induced pS2 gene expression in lower level. However, the induction of pS2 gene expression by E_2 was reduced by them. On the other hand, 10^{-5} M Gen inhibited the induction of CYP1A1 and IL-6 gene expression by BaP and BrBaP. CYP1A1 induction by BrBaP was reduced by

high concentration of E_2 . Therefore, the effects of BaP, ClBaP, and BrBaP on estrogenic action were different among them.

1. 研究の背景

環境中には、人間の営みにより、様々な化学物質が排出され、環境汚染が問題となっている。これまで、環境中で検出されるエストロジェン類や多環芳香族炭化水素 (PAHs)、及びその二次副生成物であるハロゲン置換体について、それらの合成試料などを用いて、エストロジェン様作用があるかどうかを調べてきた (1-5)。ハロゲンが付加された化合物は、付加されたハロゲンが多いほど不燃性、脂溶性があり、その難分解性、蓄積性が増すとされる。従って、少量であっても食物連鎖による生物濃縮などによって、生体への影響も懸念されている。

ヒト乳がん細胞 MCF-7 は、エストロジェン受容体 (ER) を発現しており、女性ホルモンであるエストロジェンの存在下で、細胞増殖能が増すことが知られている (6)。従って、エストロジェンと同様に MCF-7 細胞の増殖能を高める効果のある物質は、エストロジェン様作用があると判断することができる。PAHs の中でも、乳がん細胞の増殖能を高め、エストロジェン様作用を示すものが存在した (4)。また、その塩素置換体や臭素置換体の中にも、親物質と同様にエストロジェン様作用を示すものもあった (5, 7-9)。これらは、生体内に取り込まれた際には、単独の作用としてよりも、ホルモンなどの内因性物質などとの共存下での複合的な効果として表れることが考えられる。

PAHs の 1 つである benzo[*a*]pyrene (BaP) は、乳がん細胞の増殖において、エストロジェンと同様の効果を示した (4, 5)。しかし、エストロジェン、また植物エストロジェンであるゲニステイン (Gen)、ダイゼイン (Dai) といったイソフラボンとは、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。

2. 研究の目的

本研究では、BaP や、そのハロゲン化物である、塩素置換体 ClBaP や臭素置換体 BrBaP に注目し、エストロジェン 17β -estradiol (E_2) や Gen、Dai などの天然物質との共存下で、エストロジェン作用にどのような影響を及ぼすか調べることにした (Fig. 1)。これまでと同様に、まず ER を発現しているヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いて、細胞増殖試験や、遺伝子発現解析を行うことにした。遺伝子発現解析では、エストロジェン応答遺伝子である pS2、アリルヒドロカーボン受容体 (AhR) 標的遺伝子である CYP1A1、炎症マーカーである Interleukin-6 (IL-6) に注目した。

3. 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、塩素置換体としては、6-Cl-BaP が、臭素置換体としては、6-BrBaP が単離精製された (4, 10, 11) (Fig.1)。

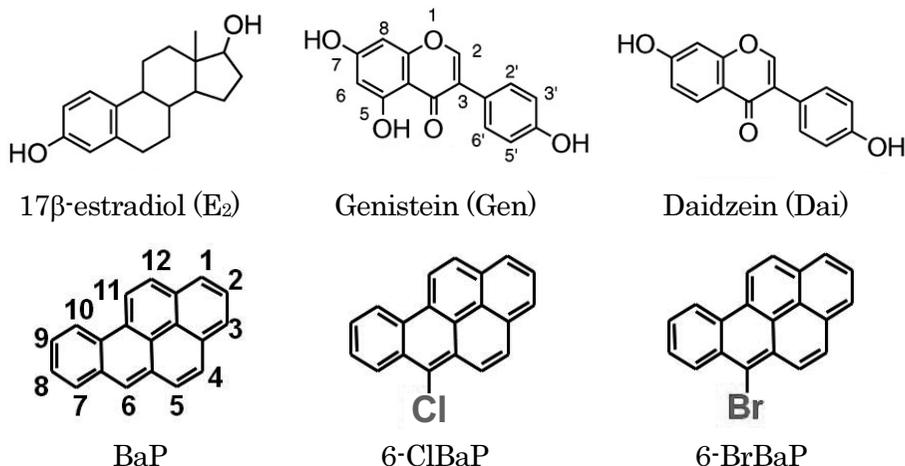


Fig. 1 Chemical structures used in this study.

(2) 細胞培養

MCF-7 細胞 (H. Hagenmaier, University of Tuebingen, Germany 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 下で培養した。

(3) 細胞増殖試験

- ① 活性炭処理をした 10% 牛血清 (Hyclone) を含む phenol red-free DMEM (Gibco) に細胞を懸濁し、96 穴プレートに、 5×10^3 個 /well となるように播種した。
- ② 4 時間後に、検査試料を一定の濃度で加え、さらに 3 日間培養した。Control には、E₂ の溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO) を加えた。また、陽性コントロールとして、 $10^{-12} \sim 10^{-9}$ M E₂ を毎行行った。
- ③ 3 日後、細胞増殖試験用試薬である cell counting kit-8 (Dojin) (12, 13) 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。
- ④ マイクロプレートリーダー EL808 (BioTek) を用い、450nm (参照波長 630nm) の吸光度を測定した。

(4) 遺伝子発現レベルの解析

- ① (3)の①と同様に細胞を DMEM に懸濁し、10 cm シャーレに、 7.4×10^5 個 / dish となるように播種した。
- ② 24 時間後に、培地を phenol red-free DMEM に交換した。
- ③ さらに 24 時間後に、(3)の②の検査試料を加えた。Control には、試料の溶媒である DMSO を加えた。
- ④ 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。
- ⑤ cDNA への変換：Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) により、RNA を cDNA に変換した。
- ⑥ Real-time PCR：QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) を使用して、④で作成した cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR システム Mx3000P(ストラタジーン社)を用いて、real-time PCR を行った。標的遺伝子は、pS2、CYP1A1、IL-6 とした (5)。内部標準遺伝子として GAPDH を用いた。

4. 結果

(1) 細胞増殖試験

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、細胞増殖試験を行った。この細胞は、ER を発現しているため、 E_2 に対して、濃度依存的に増殖能が高まることが知られており、本実験でも $10^{-12} \sim 10^{-9}$ M E_2 で、濃度依存的に細胞増殖能が高まることが確認して行った。いずれの結果も、3 回行ったうちの代表的な結果 1 つを示した。

① エストロジェンと植物エストロジェン

まず E_2 と、植物エストロジェンである Gen や Dai とを共存させたときに、エストロジェン作用がどのように変化するかを調べた。 E_2 の濃度が 10^{-12} 、 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} M の一定にした時に、Gen または Dai の濃度を $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M に変化させて曝露した。いずれも単独では、濃度依存的に細胞増殖能が高まった。

10^{-12} M E_2 と Gen の共曝露では、単独 Gen の作用が表れた (Fig. 2A)。 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 (Fig. 2B)。 E_2 と Dai の共曝露でも、Dai はもともと Gen よりもエストロジェン作用が弱いとされるが、Gen と同様の傾向が認められた (Fig. 3A, B)。

② エストロジェン、植物エストロジェンと BaP

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. 6)。 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

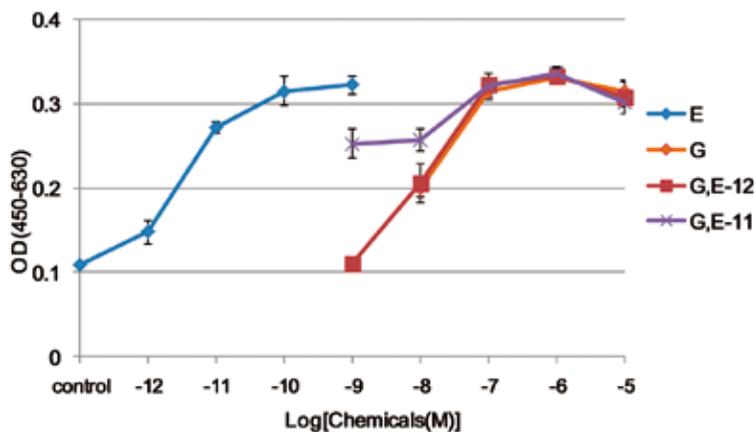
た高濃度の E_2 存在下では、細胞増殖能は E_2 単独の効果と同等までに低下した。

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 (Fig. 4A, B)。 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。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 (Fig. 5A)。 10^{-6} 、 10^{-5} M の BaP では、BaP の作用が維持された (Fig. 5B)。

③ エストロジェンと BaP のハロゲン化物

次に、BaP の塩素置換体 ClBaP と臭素置換体 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. 7)。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 (Fig. 8)。ClBaP、BrBaP は弱いエストロジェン様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。

(A)



(B)

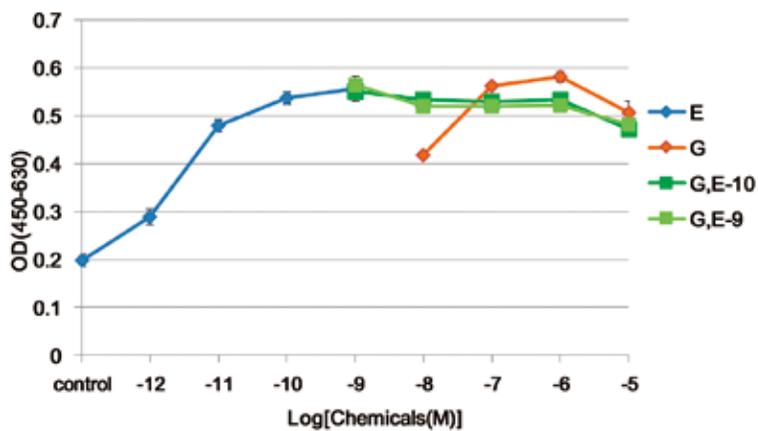
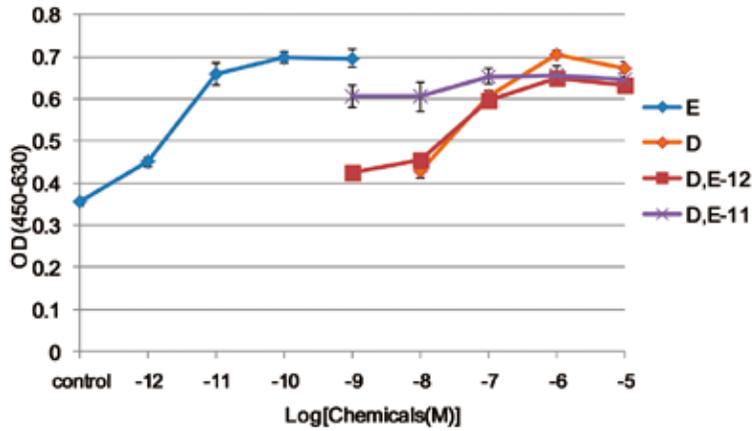


Fig. 2 Effects of E_2 and Gen on cell growth of MCF-7 cells.
 G:Gen, E-12: 10^{-12} M E_2 , E-11: 10^{-11} M E_2 , E-10: 10^{-10} M E_2 , E-9: 10^{-9} M E_2 .

(A)



(B)

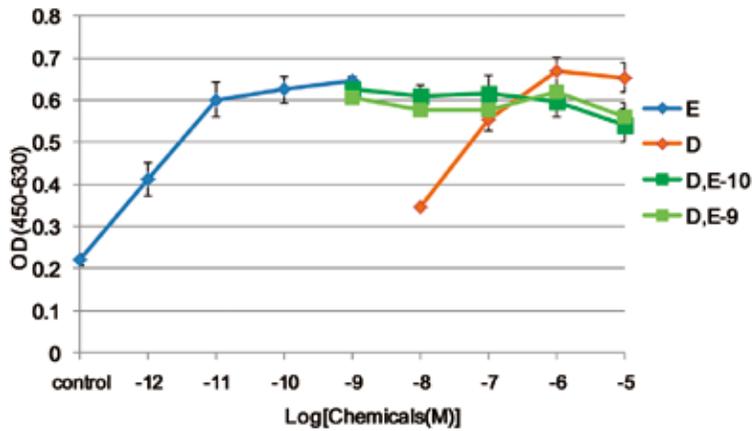
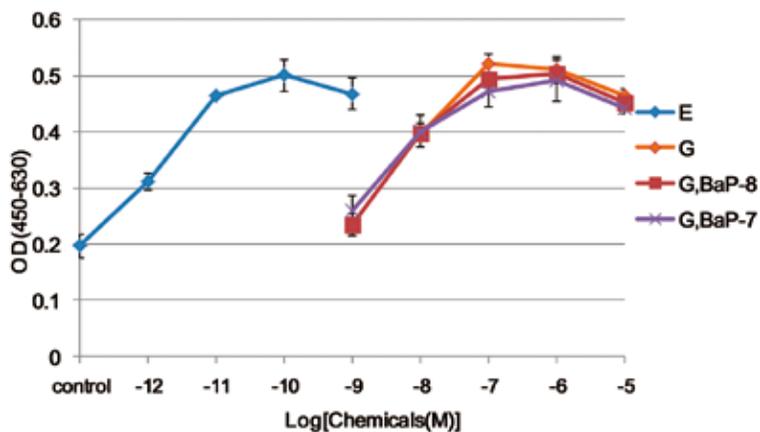


Fig. 3 Effects of E_2 and Dai on cell growth of MCF-7 cells.
 D:Dai, $E-12:10^{-12}$ M E_2 , $E-11:10^{-11}$ M E_2 , $E-10:10^{-10}$ M E_2 , $E-9:10^{-9}$ M E_2 .

(A)



(B)

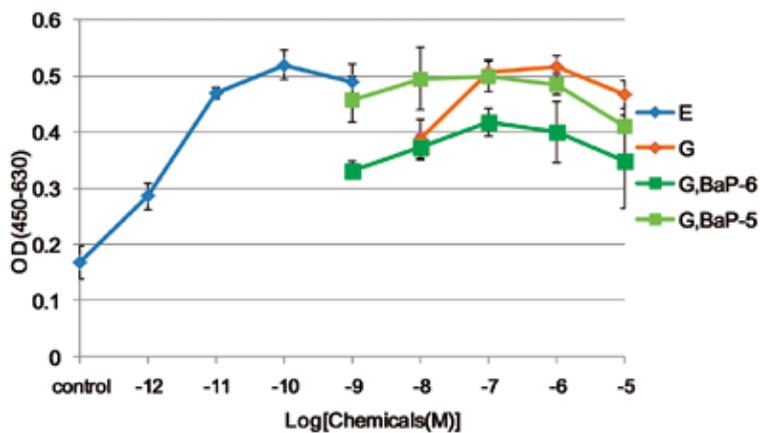
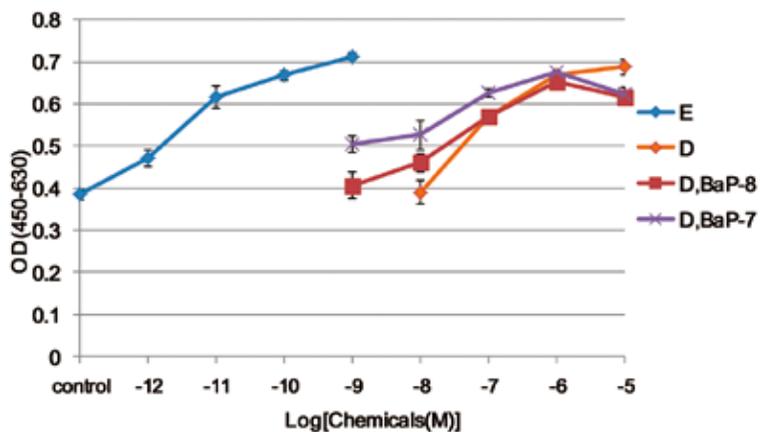


Fig. 4 Effects of Gen and BaP on cell growth of MCF-7 cells.
 E: E₂, G: Gen, BaP-8: 10⁻⁸ M BaP, BaP-7: 10⁻⁷ M BaP, BaP-6: 10⁻⁶ M BaP, BaP-5: 10⁻⁵ M BaP.

(A)



(B)

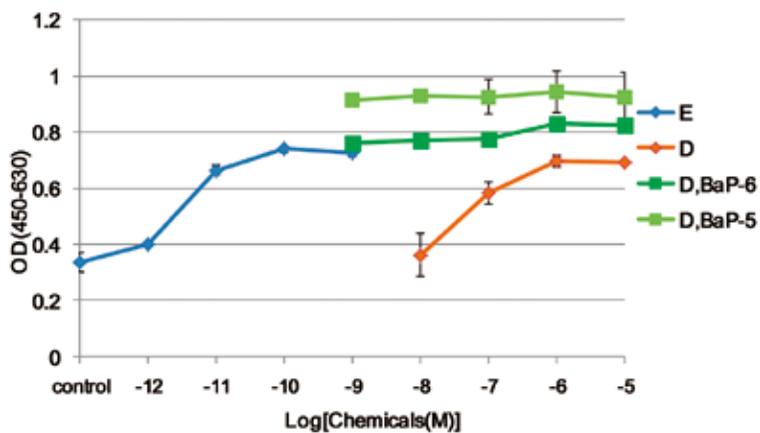


Fig. 5 Effects of Dai and BaP on cell growth of MCF-7 cells.
 E: E₂, D: Dai, BaP-8: 10⁻⁸ M BaP, BaP-7: 10⁻⁷ M BaP, BaP-6: 10⁻⁶ M BaP, BaP-5: 10⁻⁵ M BaP.

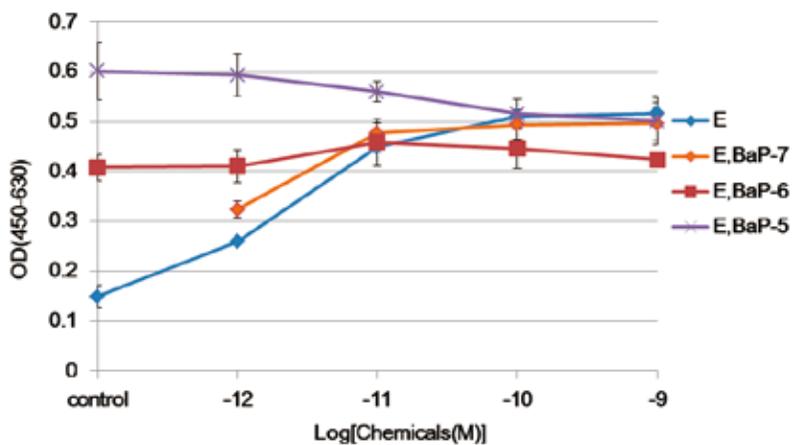


Fig. 6 Effects of E₂ and BaP on cell growth of MCF-7 cells.
E:E₂, BaP-7:10⁻⁷ M BaP, BaP-6:10⁻⁶ M BaP, BaP-5:10⁻⁵ M BaP.

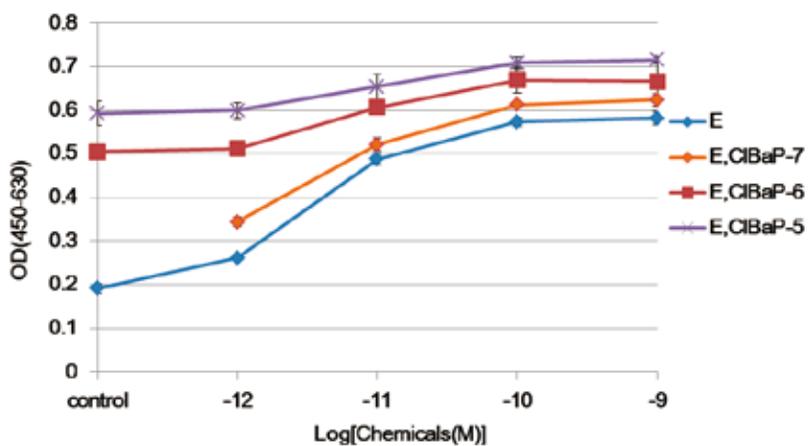


Fig. 7 Effects of E₂ and ClBaP on cell growth of MCF-7 cells.
E:E₂, ClBaP-7:10⁻⁷ M ClBaP, ClBaP-6:10⁻⁶ M ClBaP, ClBaP-5:10⁻⁵ M ClBaP.

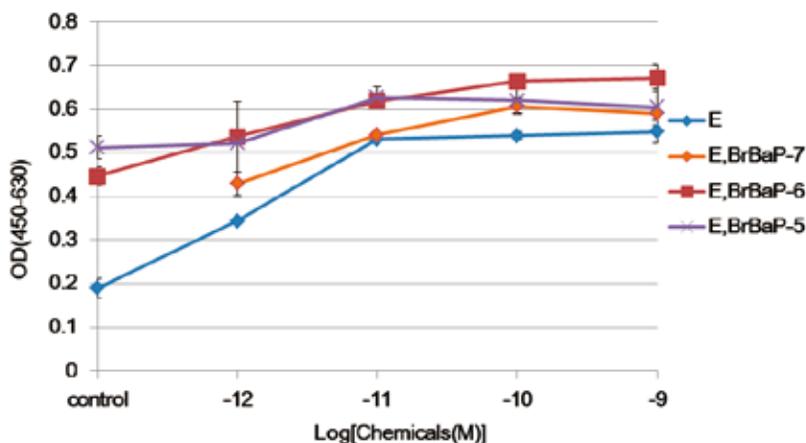


Fig. 8 Effects of E_2 and BrBaP on cell growth of MCF-7 cells.

E: E_2 , BrBaP-7: 10^{-7} M BrBaP, BrBaP-6: 10^{-6} M BrBaP, BrBaP-5: 10^{-5} M BrBaP.

(2) 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。標的遺伝子は、pS2、CYP1A1、IL-6 の 3 つとした。Control の溶媒である DMSO 曝露での値を 1 として、内部標準遺伝子として用いた GAPDH で補正し、発現量を相対的に表した。以下に遺伝子ごとの結果を示した。

① pS2

pS2 は、エストロゲン応答遺伝子で、エストロゲンにより、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} M 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 (Fig. 9A)。 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 (Fig. 9B)。 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 (Fig. 9A - C)。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、エストロゲン作用をやや抑える傾向にあった (Fig. 9D)。BrBaP と Gen では、濃度によって pS2 の発現への影響が異なっていた (Fig. 9E)。

② CYP1A1

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

(Fig. 10A)、E₂ や Dai ではその傾向は認められなかった (Fig. 10A, B)。10⁻⁶ M BaP では、Gen により濃度依存的に抑制された (Fig. 10C)。BrBaP では、E₂ や Gen により CYP1A1 の発現が抑制された (Fig. 10D, E)。

③ IL-6

炎症マーカーである IL-6 は、E₂、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 (5)。Gen は、BaP による発現誘導を濃度依存的に抑制したが (Fig. 11A, C)、E₂ や Dai では抑制傾向は認められなかった (Fig. 11B)。ClBaP と BrBaP では、E₂ との共存下でやや上昇傾向も認められたが (Fig. 11D)、BrBaP では、Gen により濃度依存的に IL-6 の発現が抑制された (Fig. 11E)。

5. 考察

生体内での化学物質の作用は、共存する物質同士の複合的な作用として表れることが考えられる。本研究では、PAHs、及びその二次副生成物で新奇の環境汚染物質として注目されるハロゲン置換体と、女性ホルモンであるエストロジェンとの共存下で、エストロジェン作用にどのような影響があるかを調べた。今回は、PAHs の中でも、BaP に注目した。

乳がん細胞 MCF-7 の細胞増殖試験においては、E₂、Gen、Dai、BaP、ClBaP、BrBaP のいずれも、単独では、程度は異なるが、濃度依存的に細胞増殖能を高めることがわかっている (1, 5)。細胞増殖試験の結果より、E₂ が低濃度では、組み合わせた物質の方のエストロジェン様作用が認められた。また、E₂ が高濃度では、Gen、Dai、BaP では、むしろ抑制的な効果を示した。ClBaP、BrBaP では、全体的にエストロジェン様作用を高めた。従って、生体内でもエストロジェン作用に影響を与えることが考えられた。BaP と Gen では、高濃度の Gen の作用を抑制したが、BaP と Dai では、高濃度の BaP ではその作用に Dai の作用が隠れたかたちとなった。

pS2 は、エストロジェンによりその発現レベルが高まる。BaP 自体は、pS2 の発現を上昇させるが、E₂、Gen、または Dai の共存下では、高濃度の BaP が pS2 の発現を抑制する傾向があった。このことは、細胞増殖試験の結果と似た傾向であった。CYP1A1 や IL-6 の発現上昇は、PAHs に認められる現象であり、BaP、ClBaP、BrBaP でも高まることを報告したが、今回 Gen によりその発現誘導が抑制されることがわかった。

従って、BaP、ClBaP、BrBaP を比較すると、エストロジェン作用に対する複合効果が異なる傾向にあった。また、イソフラボンである Gen では、その作用を抑制する作用があることも考えられた。AhR を介した活性化能は、ClBaP よりも BrBaP が高いという報告もある (14)。複合効果は、これらのリガンド

としての AhR や ER に対する結合能に関係していることが考えられ、さらに調べていく必要がある。

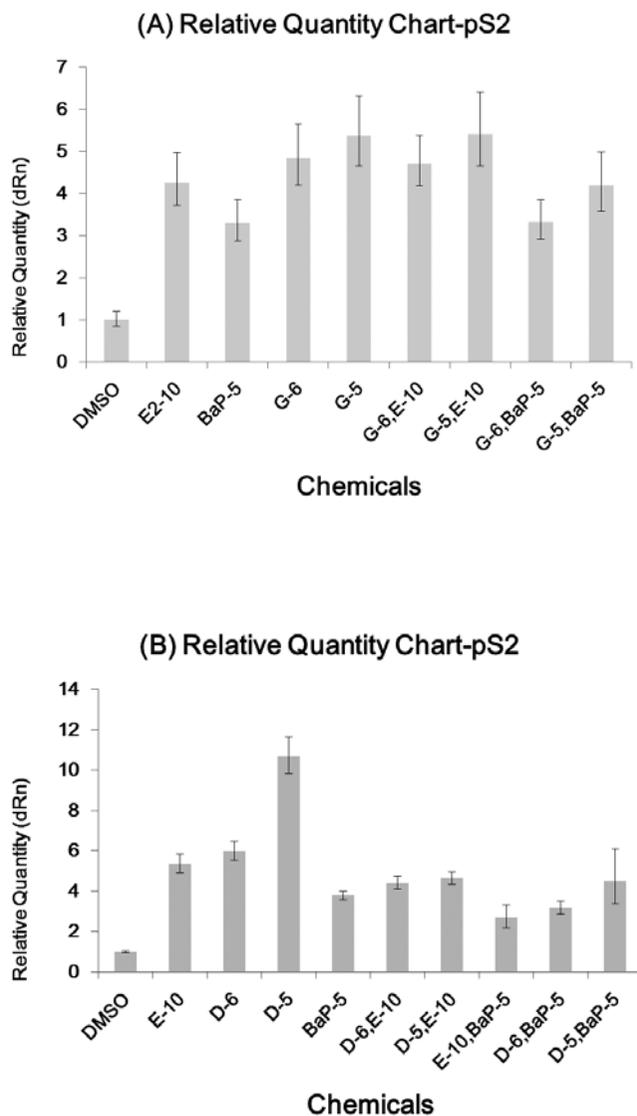


Fig. 9A, B Induction of pS2 in MCF-7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

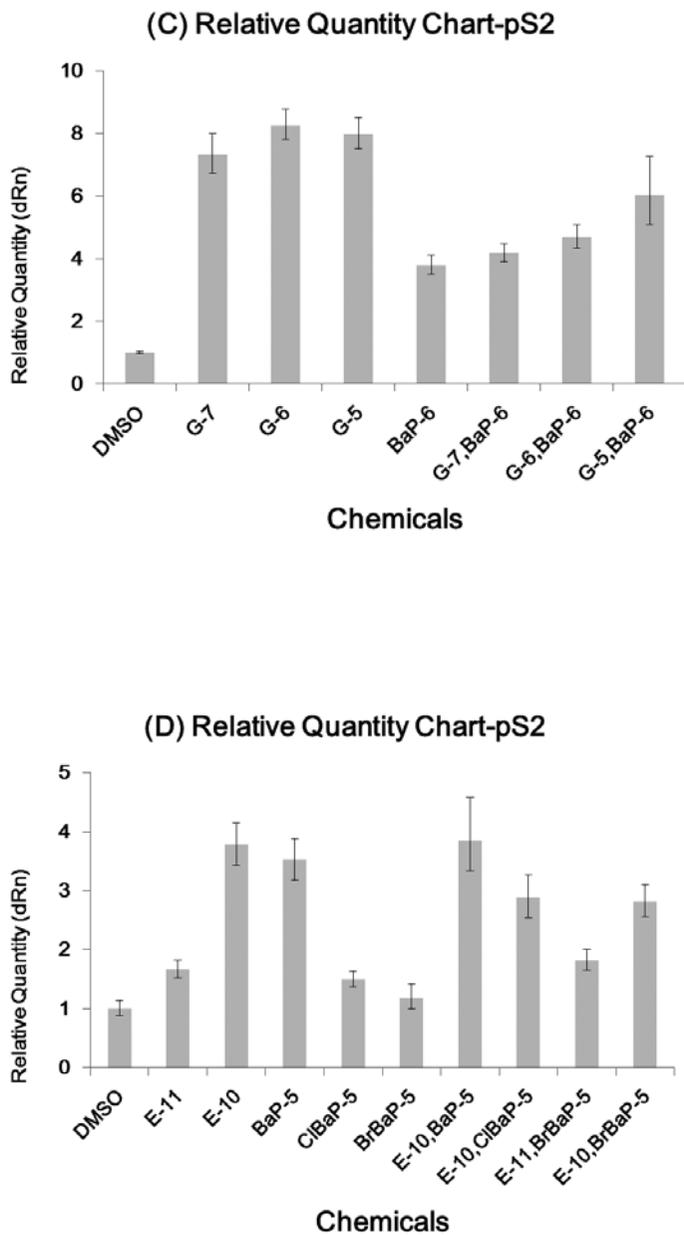


Fig. 9C, D Induction of pS2 in MCF-7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

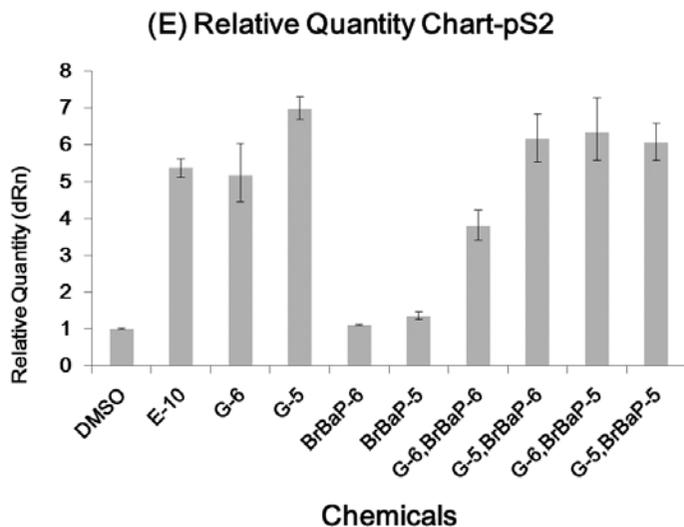


Fig. 9E Induction of pS2 in MCF-7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

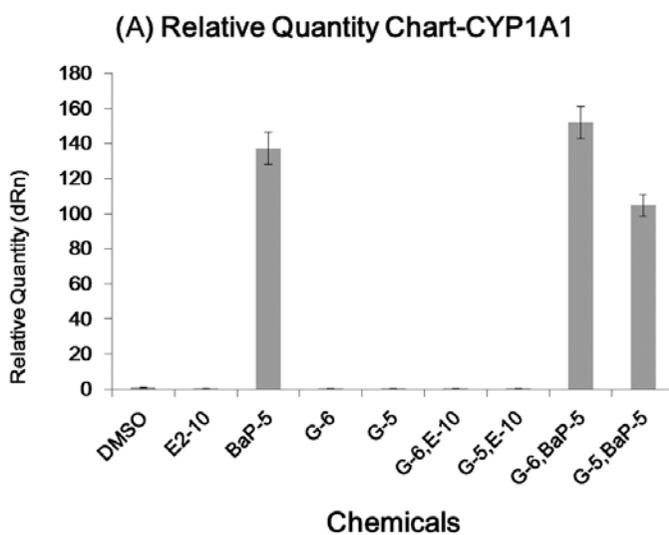


Fig. 10A Induction of CYP1A1 in MCF-7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

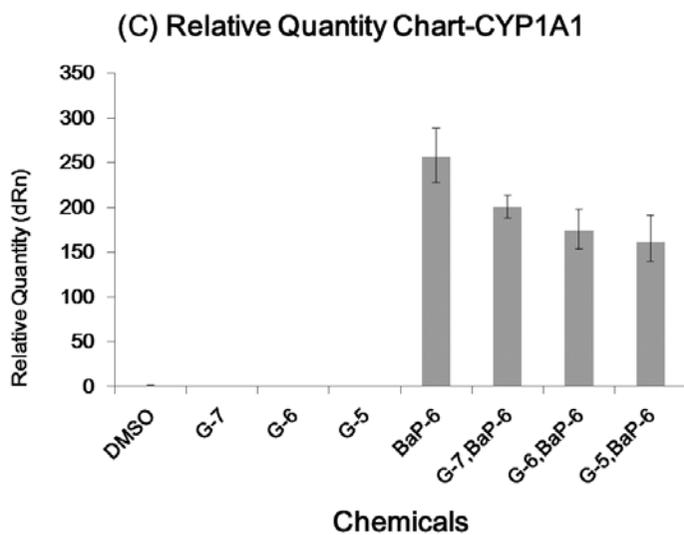
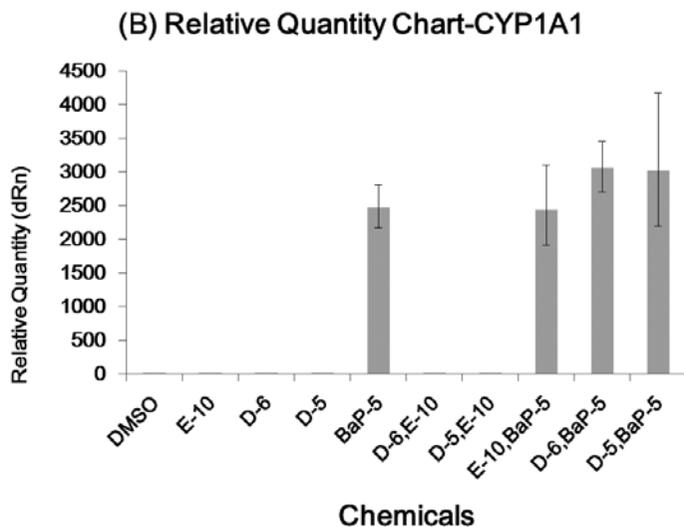


Fig. 10B, C Induction of CYP1A1 in MCF-7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

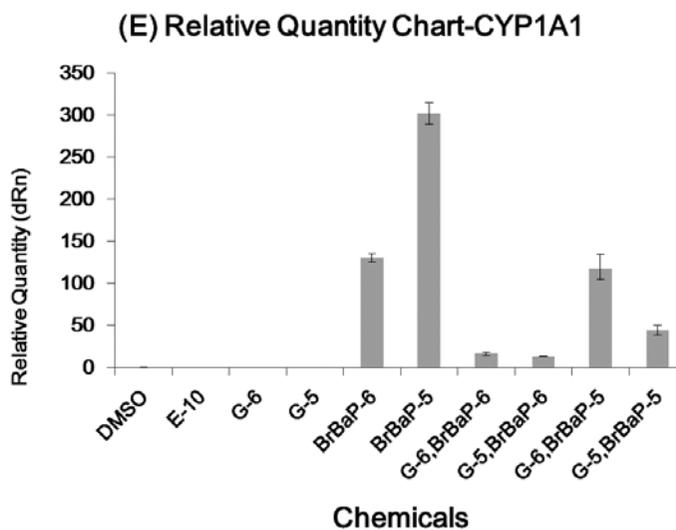
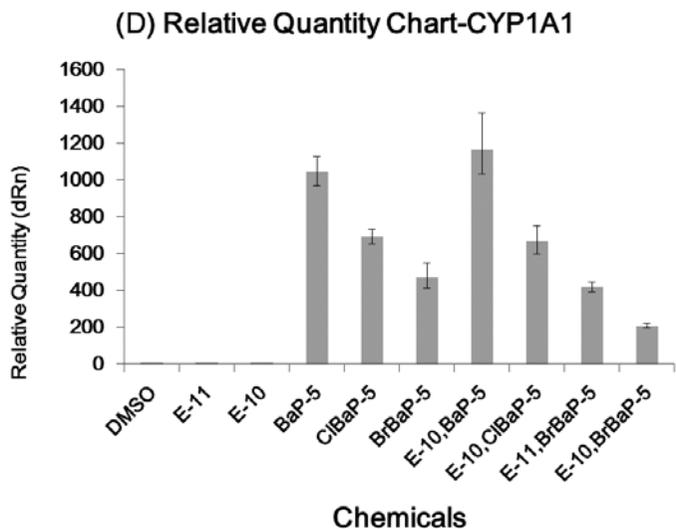


Fig. 10D, E Induction of CYP1A1 in MCF-7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

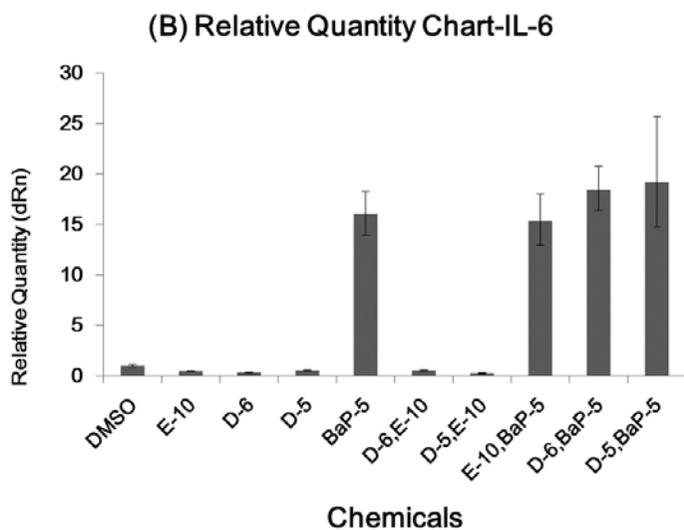
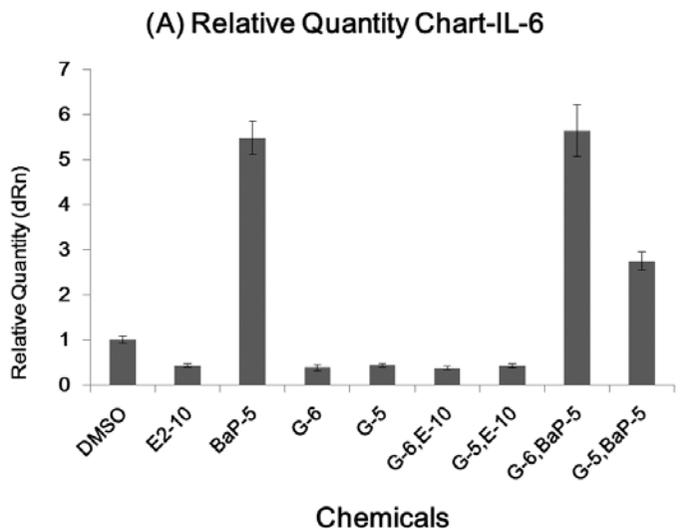


Fig. 11A, B Induction of IL-6 in MCF-7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

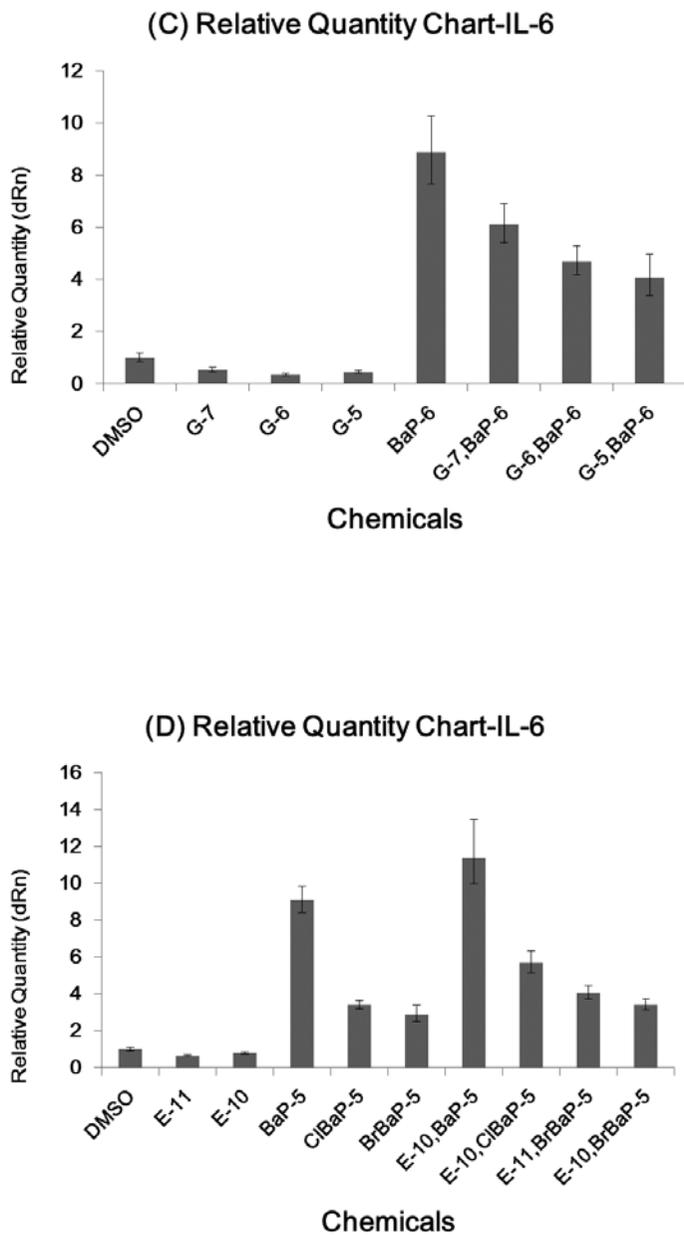


Fig. 11C, D Induction of IL-6 in MCF-7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

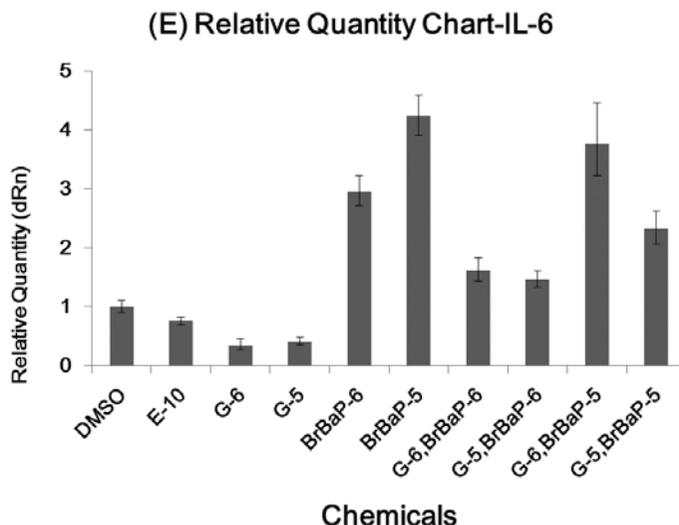


Fig. 11E Induction of IL-6 in MCF-7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

謝辞

本研究は平成 24-26 年度科学研究費補助金（基盤研究 C: 課題番号 24580485）の助成を受けたものである。

参考文献

1. Kuruto-Niwa, R., Ito, T., Goto, H., Nakamura, H., Nozawa, R., Terao, Y. : Estrogenic activity of the chlorinated derivatives of estrogens and flavonoids using a GFP expression system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 23, 121-128, 2007.
2. Nakamura, H., Shiozawa, T., Terao, Y., Shiraishi, F., Fukazawa, H. : By-products produced by the reaction of estrogens with hypochlorous acid and their estrogen activities. *J. Health Science*, 52, 124-131, 2006.
3. Nakamura, H., Kuruto-Niwa, R., Uchida, M., Terao, Y. : Formation of chlorinated estrone via hypochlorous disinfection of wastewater effluent containing estrone. *Chemosphere*, 66, 1441-1448, 2007.

4. Kuruto, R., Ohura, T., Terao, Y. : Effects of the chlorinated derivatives of environmental pollutant on gene expression. *Tokoha Gakuen University Research Review (Faculty of Education)*, 30, 377-391, 2010.
5. Kuruto, R., Yamamoto, S., Ohura, T. : Effects of halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons on gene expression. *Tokoha Gakuen University Research Review (Faculty of Education)*, 33, 279-294, 2013.
6. Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O. : The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.*, 103, 113-122, 1995.
7. Ohura, T., Morita, M., Makino, M., Amagai, T., Shimoi, K. : Aryl hydrocarbon receptor-mediated effects of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 1237-1241, 2007.
8. Sakakibara, H., Ohura, T., Morita, M., Hirabayashi, S., Kuruto-Niwa, R., Amagai, T., Shimoi, K. : Aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression by chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and cross-talk with estrogen receptors. *Interdiscip. Stud. Environ. Chem.*, 2, 197-202, 2009.
9. Ohura, T., Morita, M., Kuruto-Niwa, R., Amagai, T., Sakakibara, H., Shimoi, K. : Differential action of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons on aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling in breast cancer cells. *Environ. Toxicol.*, 25, 180-187, 2010.
10. Kitazawa, A., Amagai, T., Ohura, T. : Temporal trends and relationships of particulate chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and their parent compounds in urban air. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 4592-4598, 2006.
11. Horii, Y., Ok, G., Ohura, T., Kannan, K. : Occurrence and profiles of chlorinated and brominated polycyclic aromatic hydrocarbons in waste incinerators. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 1904 – 1909, 2008.
12. Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. : A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, 44, 1299-1305 , 1997.
13. Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M. : A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.*, 36, 47, 1999.

14. Horii, Y., Khim, J.S., Higley, E.B., Giesy, J.P., Ohura, T., Kannan, K.
: Relative potencies of individual chlorinated and brominated polycyclic aromatic hydrocarbons for induction of aryl hydrocarbon receptor-mediated responses. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 2159-2165, 2009.