

氏名(本籍)	高橋 誠治 (岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 604 号
学位授与日付	平成 17 年 3 月 2 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Effects of dioxin and nutrition on cellular proliferation and dioxin- and estrogen-linked genes in ovarian cancer cell lines
審査委員	(主査) 教授 玉 舎 輝 彦 (副査) 教授 森 秀 樹 教授 小 澤 修

論文内容の要旨

緒言

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)を代表とする環境汚染物質はすべての生物に対してその健康を脅かすものと考えられてきた。実験的にはTCDDを投与されたアカゲザルで子宮内膜症が増加し、また血中TCDDの濃度の高い女性に子宮内膜症の頻度が高いことが一部で報告されている。これらの報告はTCDDが子宮内膜症の発生に影響を与えていることを示しており、TCDDの女性ホルモンの調節や発癌性における役割が注目されている。Aryl hydrocarbon receptor (AhR)はTCDDに対する受容体とされており、AhR nuclear translocator (ARNT)と二量体を形成し、TCDDの作用を発揮すると考えられている。Cytochrome P450 (CYP)は多くの化学物質(発癌や毒性のある内因性および外因性の物質や薬品など)の代謝を担う酵素であり、TCDDの代謝にも関与している。また、Estrogen receptor(ER)とAhRのシグナル伝達系にはクロストークの存在が知られており、性ホルモンとTCDDの関連は複雑であり、また、相互の関わりも大きい。この論文では、TCDDの婦人科癌細胞株の増殖に対する影響と、性ホルモンに関連する因子、またそのシグナル伝達系および代謝因子を含めた因子との関連を、低栄養状態(培養液に加える血清の制限、同時に細胞株の環境における性ホルモンや増殖因子の供給源の減少を意味する)における反応を中心に検討した。

研究方法

対象となる細胞株は二種類で、卵巣原発腺癌株のSK-OV-3はATCCより購入し、McCoy's5a培地(fetal bovine serum 10%)の培養液で維持した。Caov-3は同じくATCCより購入し、Dulbecco's modified Eagle's培地(fetal bovine serum 10%)で維持した。MTT アッセイ: 細胞増殖の定量化にはMTT assayを利用した。5000細胞/mlの浮遊細胞を100 μ l/wellずつ96wellの培養皿に植付け、TCDDを段階的濃度で各wellに加え、72時間培養した。細胞は培養液で二度洗浄し、MTT溶液を加え、37°C 5%CO₂下で、3時間培養した。培養後、マイクロプレートリーダーを使用し570nmの吸光度を測定した。RT-PCRによる各遺伝子mRNAの定量: 0.5, 1.0および10%のFBS濃度におけるAhR mRNA, ER α mRNA, ER β mRNA, CYP1A1 mRNA, ARNT mRNAの発現を、RT-PCRによって測定した。72時間の細胞培養後、total RNAを抽出し、RT-PCRをおこなった。PCRは、90°C, 45秒の変性、55°C, 45秒のアニーリング、72°C, 90秒の伸張反応を35サイクル施行した。PCR産物を2%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UVにてバンドを検出した。PCR産物のシーケンスは、市販品のプロトコールによるkitを用いて、ディデオキシ法によって確認した。統計処理は、Student's t testにて解析し、 $p < 0.05$ をもって有意差があると判定した。

結果

1) 低FBS濃度における細胞増殖についてのTCDDの影響; Caov-3で、0.5 %FBS(低濃度)において、TCDD 20-

200pMの濃度で、細胞増殖が促進された。SK-OV-3では影響は認められなかった。

2) AhR mRNAの発現について；Caov-3で、低濃度FBSにおいてAhR mRNAの発現が増加した。SK-OV-3ではFBS濃度によるAhR mRNA発現の変化は認められなかった。

3) ER α mRNAの発現について；Caov-3で、低濃度FBSにおいてER α mRNAの発現が増加した。SK-OV-3ではER α mRNAの発現が減少した。

4) ER β mRNAの発現について；Caov-3およびSK-OV-3では、FBSの濃度変化に対してER β mRNAの発現に変化は認められなかった。

5) CYP1A1 mRNAの発現について；Caov-3ではFBS濃度によるCYP1A1 mRNA発現の変化は認められなかった。SK-OV-3で、低濃度FBSにおいてCYP1A1 mRNAが減少した。

6) ARNT mRNAの発現について；Caov-3ではFBS濃度によるARNT mRNA発現の変化は認められなかった。SK-OV-3で、低濃度FBSにおいてARNT mRNAが減少した。

考察

婦人科腫瘍のエストロゲン依存性は、それらの治療にとって大きな影響力を持つ。本研究は、栄養とエストロゲンの供給原であるFBSの種々の濃度における影響に注目し、二種類の卵巣癌細胞株の増殖におけるTCDDの効果について示した。細胞が通常濃度FBS（10%）下で培養された場合、TCDDは両者に影響をおよぼさないが、低濃度FBS下では、Caov-3において、20-200 pMのTCDD濃度幅で増殖が促進された。低濃度FBS下で増加したAhR、ER α によりTCDDに対する反応性亢進があり、結果として細胞増殖をもたらしたと考えられる。本研究において、細胞増殖におけるTCDDの反応性は細胞固有の特異性と栄養状態に依存することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 高橋誠治は、ダイオキシン(TCDD)の毒性に関する研究の過程で、婦人科癌細胞培養株においてその栄養環境を悪化させた場合、各種の受容体を含めたシグナル伝達機構などの変化をきたし、ダイオキシンが増殖促進作用を持つことを明らかにした。本研究の成果は、ダイオキシンを含めた内分泌攪乱化学物質の毒性やホルモン作用の研究の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Effects of dioxin and nutrition on cellular proliferation and dioxin- and estrogen-linked genes in ovarian cancer cell lines

European Journal of Gynaecological Oncology (in press)