

平成30年6月28日現在

機関番号：80106

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08791

研究課題名(和文)食品中に含まれる化学物質の複合曝露による核内受容体を介した免疫系に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of chemical mixtures contained in foods on immune response via nuclear receptors.

研究代表者

小島 弘幸 (Kojima, Hiroyuki)

北海道立衛生研究所・生活科学部・部長

研究者番号：10414286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食品中に含まれ日常的に曝露される化学物質について、核内受容体に対する作用を明らかにし、免疫系細胞への影響を遺伝子発現のレベルで調べた。すなわち、ビスフェノールA(BPA)やそのアナログ、フタル酸エステル類、有機リン系難燃剤、ポリ塩化ビフェニル類(PCBs)、有機フッ素化合物など核内受容体活性をレポーターアッセイ法により明らかにした。また、ヒトマクロファージ様細胞株THP-1に対して核内受容体活性を有する化学物質を単独あるいは複合曝露し、マイクロアレイ解析により核内受容体を介する新たな遺伝子発現変化を見出した。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of chemicals contained in foods on transcriptional activity via human nuclear receptors, and the effects of these compounds on global gene expression in immune cells. As a result, we revealed that bisphenol A and its analogs, phthalates, organophosphate flame retardants, PCBs and perfluoroalkyl acids have agonistic and/or antagonistic activity against nuclear receptors in in vitro reporter gene assays. In addition, these compounds were found to act as inducers and depressors of gene expression in human macrophage-like THP-1 cells using microarray analysis. Taken together, these results suggest that such chemical mixtures might affect the gene expression of THP-1 cells via nuclear receptors.

研究分野：環境保健、衛生化学、毒性学

キーワード：化学物質 免疫毒性 核内受容体 複合曝露影響

1. 研究開始当初の背景

食品中には農薬、可塑剤(フタル酸エステル類やビスフェノール類など)、難燃剤(臭素系や有機リン系など)、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニル類(PCBs)、有機フッ素化合物など様々な化学物質が微量ではあるが残留しており、我々はこれらに日常的に曝露されている。近年、これらの化学物質の一部は、エストロゲン受容体(ER)やアンドロゲン受容体(AR)などのホルモン受容体に作用する内分泌攪乱化学物質であることが報告されている。ERやARは化学物質誘導性転写因子であり、ヒトで48種類存在する核内受容体スーパーファミリーに属する。このような化学物質と結合する種々の核内受容体は、内分泌系のみならず、種々の臓器組織に分布しており、免疫系細胞にも存在することが明らかにされている。例えば、自己免疫疾患やアレルギーなどの免疫異常症への関与が注目されているヘルパーT細胞群(Th17)に存在する核内受容体・レチノイド関連オファン受容体(ROR)やアリルハイドロカーボン受容体(AhR)は、この細胞分化を制御する重要な転写因子である。また、マクロファージ系細胞におけるLiver X受容体(LXR)や制御系T細胞でのレチノイン酸受容体(RAR)など、生体防御系での核内受容体の役割が重要とされている。しかしながら、どのような化学物質が免疫系に存在する核内受容体に作用し、どのような影響を及ぼすかは未解明である。さらに化学物質の複合曝露による核内受容体を介した免疫系への影響については、それら化学物質の組み合わせが膨大であることから、ほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

in vitro レポーターアッセイ法を用いて食品中に存在する化学物質について、免疫系細胞で発現している核内受容体(ER, AR, GR, PXR, PPAR, RAR, ROR, LXR, AhR)への作用の有無を調べ、ヒトマクロファージ様THP-1細胞に曝露し遺伝子発現の影響を調べる。さらに、様々な化学物質の組み合わせから、核内受容体への相加あるいは相乗作用を確認し、THP-1細胞におけるサイトカイン産生への影響を調べる。以上の試みは、化学物質の複合曝露影響を解明する糸口になると考える。

3. 研究の方法

(1) 試験物質: ビスフェノールA(BPA、ER α / β アゴニスト及びPXRアゴニスト)、フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP、ER α アゴニスト及びPXRアゴニスト)、ペルフロロオクタナ酸(PFOA、PPAR α アゴニスト)、3,3',4,4',5-PeCB(PCB126、AhRアゴニスト)、T0901317(LXRアゴニスト及びRORインバーサアゴニスト)などの化学物質の標準品を使用した。

(2) *In vitro* 核内受容体レポーターアッセイ法: CHO-K1細胞にホルモン受容体発現プラスミドを、COS-7細胞にLXR, PPAR α / γ あるいはPXR発現プラスミドを対応するレポータープラスミドとともにそれぞれ導入し、試験物質を24時間反応させた後、細胞内に産生されたルシフェラーゼ活性についてルミノメーターを用いて測定した¹⁾。

(3) *In vitro* AhRレポーターアッセイ法: 我々が以前開発した高感度なDR-EcoScreen細胞株²⁾を使用した。96穴プレートに細胞を播種し、試験物質を24時間反応させた後、Steady-Glo試薬によりAhR依存的に細胞内に産生されたルシフェラーゼ活性についてルミノメーターを用いて測定した。

(4) マイクロアレイ解析: THP-1細胞にPMAを添加し、マクロファージ様細胞に分化させた。この細胞に化学物質を添加し、37で24時間培養した。Trizol試薬を用いて細胞からTotal RNAを抽出し、さらにmRNAを精製した。約4万個の遺伝子を搭載したアジレント社製マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。いくつかの変動遺伝子について、RT-PCR法を用いてmRNA発現解析を行った。

(5) *in silico* 分子結合シミュレーション: 化学物質(3D構造)と核内受容体(結晶構造)の分子結合解析ソフトAutoDockを用いて、それぞれの結合エネルギー量を算出した。

4. 研究成果

(1) 食品中に含まれる化学物質の核内受容体に対する影響評価: レポーターアッセイの結果、化学物質の構造に依存した核内受容体への作用が確認された。フタル酸エステル類とその代謝物はER α , AR, PXR, PPAR α / γ アゴニスト活性とER β , ARアンタゴニスト活性を示した。ビスフェノールAとそのアナログはER α / β , PXRアゴニスト活性とAR, GRアンタゴニスト活性を示したことに加え、その臭素化や塩素化物はPPAR α / γ アゴニスト活性を示した。有機リン系難燃剤においてもER α / β , PXRアゴニスト活性とAR, GRアンタゴニスト活性を認められたが、これらの代謝物は何れの受容体活性を示さなかった³⁾。PCBsはER, AR, GR, PXR活性を示し、ある種のPCBsはAhR活性を示した⁴⁾。有機フッ素化合物は核内受容体の中でもPPAR α を特異的に活性化した。以上の試験物質において、RAR, ROR, LXR活性は認められなかった。

(2) 核内受容体に対する化学物質の複合曝露影響と*in silico*解析: DEHP, BPA, PCB126の混合試験溶液を作製し、レポーターアッセイを用いて複合曝露影響を調べた。単独曝露に比べ、複合曝露で各核内受容体への作用が向上した。また、DEHPとその代謝物MEHPの複合曝露はMEHPのPPAR α アゴニスト作用に対してDEHPの抑制作用を認めた。このDEHPによるPPAR α アンタゴニスト作用は*in silico*実験によっても支持された。

(3) THP-1 細胞の遺伝子発現に及ぼす核内受容体リガンドの影響：THP-1 細胞による遺伝子発現において、T0901317 曝露は IL-1beta, LXR, fatty acid synthetase, CYP2D6, ROR などを増強し、PGE 合成酵素、GPR32, GPR78, UGT3A1 などを抑制した。一方 BPA 曝露は G 蛋白受容体 141, グランザイム 3, CYP3A43, RXR などを増強し、G 蛋白受容体 32, IL-36, GABA 受容体などを抑制した。また、MEHP 及び PCB126 曝露により、それぞれ PPAR 及び AhR シグナルに依存した遺伝子発現変化が認められた。さらに、IL-1 などのサイトカイン産生（蛋白質）については、遺伝子発現と同様に T0901317 曝露で増加したことを認めた。これらの化学物質を混合して THP-1 細胞へ複合的に曝露した場合の遺伝子発現は、単独曝露に比べ、変動遺伝子数の増加や核内受容体シグナルの増強などの変化を確認した（詳細は解析中）。

文献

- 1) Kojima *et al.*, *Toxicology*, 314, 76-83 (2013)
- 2) Takeuchi *et al.*, *Chemosphere*, 74, 155-165 (2008)
- 3) Kojima *et al.*, *Toxicol Lett*, 245, 31-39 (2016)
- 4) Takeuchi *et al.*, *Environ Pollut*, 227, 306-313, (2017)

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 9 件)

1. Kojima H, Takeuchi S, Iida M, Nakayama SF, Shiozaki T: A sensitive, rapid and simple DR-EcoScreen bioassay for the determination of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in environmental and food samples. *Environ Sci Pollut Res*, 25, 7101-7120, 2018, DOI: 10.1007/s11356-015-4662-9 (査読有)
2. Takeuchi S, Tanaka-Kagawa T, Saito I, Kojima H, Jin K, Satoh M, Kobayashi S, Jinno H: Differential determination of plasticizers and organophosphorus flame retardants in residential indoor air in Japan. *Environ Sci Pollut Res*, 25, 7113-7120, 2018, DOI: 10.1007/s11356-015-4858-z(査読有)
3. Takahashi M, Muromoto R, Kojima H, Takeuchi S, Kitai Y, Kashiwakura J, Matsuda T: Biochanin A enhances ROR γ activity through STAT3-mediated recruitment of NCOA1. *Biochem Biophys Res Commun*, 489, 503-508, 2017, doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.181 (査読有)
4. Takeuchi S, Anezaki K, Kojima H: Effects of unintentional PCBs in pigments and chemical products on transcriptional activity via aryl hydrocarbon and nuclear hormone receptors. *Environ Pollut*, 227, 306-313, 2017, doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.059 (査読有)

5. Zwart N, Andringa D, de Leeuw WJ, Kojima H, Iida M, Houtman C, de Boer J, Kool J, Lamoree M, Hamers T: Improved androgen specificity of AR-EcoScreen by CRISPR based glucocorticoid receptor knockout. *Toxicology in Vitro*, 45, 1-9, 2017, doi.org/10.1016/j.tiv.2017.08.004 (査読有、国際共著)
6. Abe T, Takahashi M, Kano M, Amaike Y, Ishii C, Maeda K, Kudo Y, Morishita T, Hosaka T, Sasaki T, Kodama S, Matsuzawa A, Kojima H, Yoshinari K: Activation of nuclear receptor CAR by an environmental pollutant perfluorooctanoic acid. *Arch Toxicol*, 91, 2365-2374, 2017, DOI: 10.1007/s00204-016-1888-3 (査読有)
7. 増田茜、増田雅美、川野拓歩、橘内陽子、中山晴香、中島宏之、小島弘幸、北村繁幸、浦丸直人、保坂卓臣、佐々木崇光、吉成浩一：肝細胞肥大の毒性学的特徴の解明に向けた農薬のラット反復投与毒性試験結果のデータベース構築, *薬学雑誌*, 137(5), 611-622, 2017 (査読有)
8. Fujino C, Tamura Y, Tange S, Nakajima H, Sanoh S, Watanabe Y, Uramaru N, Kojima H, Yoshinari K, Ohta S, Kitamura S: Metabolism of methiocarb and carbaryl by rat and human livers and plasma, and effect on their PXR, CAR and PPAR activities. *J Toxicol Sci*, 41, 677-691, 2016, DOI: 10.2131/jts.41.677 (査読有)
9. Kojima H, Takeuchi S, Van den Eede N, Covaci A: Effects of primary metabolites of organophosphate flame retardants on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicol Lett*, 245, 31-39, 2016, DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.01.004(査読有、国際共著)

〔学会発表〕(計 30 件)

1. Kojima H, Okuda K, Uramaru N, Kitamura S, Takeuchi S, Muromoto R, Sugihara K, Kishi R, Araki A: In vitro and in silico studies on PPAR α/γ and PXR activation by di-(2-ethylhexyl) phthalate and its metabolites. Conference of International Society for Environmental Epidemiology and International Society of Exposure Science-Asia Chapter (ISEE-ISES AC 2018), 2018.6.21-24, Taipei
2. 佐藤志穂、渡部容子、立花研、浦丸直人、小島弘幸、吉成浩一、樋口敏幸、北村繁幸：フタル酸エステルとその代謝物が核内受容体 PXR および PPAR α の転写活性に及ぼす影響、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 26 日、金沢市
3. Kojima H, Takeuchi S, Sanoh S, Kitamura S, Uramaru N, Sugihara K, Yoshinari K: Characterization of the endocrine disruption potential of bisphenol A structural analogues

- via human nuclear receptors. The 14th International Symposium on Persistent Toxic Substances (ISPTS 2017), 2017.9.25, Nagoya
4. Takeuchi S, Kojima H : Effects of photopolymerization initiators on in vitro transcriptional activities via nuclear receptors. The 14th International Symposium on Persistent Toxic Substances (ISPTS 2017), 2017.9.25, Nagoya
 5. 小島弘幸, 武内伸治, 室本竜太, 岸玲子, 荒木敦子 : ヒトマクロファージ様 THP-1 細胞の遺伝子発現に及ぼす DEHP と MEHP の曝露影響、第 24 回日本免疫毒性学会学術年会、2017 年 9 月 4 日、十和田市
 6. 室本竜太, 高橋美妃, 小島弘幸, 武内伸治, 松田正 : Biochanin A による核内受容体 ROR γ 活性化機構の解析、フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー、2017 年 9 月 1 日、仙台市
 7. 柳川ひらり, 渡部容子, 小島弘幸, 吉成浩一, 北村繁幸 : リン系難燃剤のラット核内受容体 PXR, CAR および PPAR α に対するアゴニスト活性、日本薬学会 第 137 年会、2017 年 3 月 25-27 日、仙台市
 8. 藤野智恵里, 渡部容子, 浦丸直人, 佐能生剛, 小島弘幸, 吉成浩一, 北村繁幸 : カルバメート系農薬のラットおよびヒトでの in vitro 代謝とその核内受容体活性への影響、日本薬学会 第 137 年会、2017 年 3 月 25-27 日、仙台市
 9. 服部祥子, 渡部容子, 立花研, 小島弘幸, 吉成浩一, 北村繁幸 : ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の PXR, CAR および PPAR α 活性とシトクロム P450 活性への影響、日本薬学会 第 137 年会、2017 年 3 月 25-27 日、仙台市
 10. 武内伸治, 佐藤正幸, 小島弘幸 : LC/TOF-MS 及び薬物受容体アッセイを用いた危険ドラッグ成分のスクリーニング、日本薬学会 第 137 年会、2017 年 3 月 25-27 日、仙台市
 11. Kojima H, Takeuchi S, Shiraishi F, Kuroki H, Kitamura S : Characterization of thyroid hormone receptor and retinoid X receptor activities in 100 hydroxylated polychlorinated biphenyls using CHO-K1 cell-based transactivation assays. The 9th International PCB Workshop, 2016.10.10-12, Kobe
 12. Takeuchi S, Anezaki K, Kojima H : Effects of unintentional PCBs in pigments and chemical products on transcriptional activity via 10 nuclear receptors and aryl hydrocarbon receptor. The 9th International PCB Workshop, 2016.10.10-12, Kobe
 13. 小島弘幸, 武内伸治 : 危険ドラッグの迅速検知に向けたバイオアッセイ系について、第 68 回北海道公衆衛生学会、2016 年 10 月 1 日、札幌市
 14. 小島弘幸 : 環境化学物質による核内受容体を介した免疫毒性作用 (奨励賞受賞講演)、第 23 回日本免疫毒性学会、2016 年 9 月 6-7 日、北九州市
 15. 小島弘幸 : 環境化学物質と核内受容体 - Cell-based Assay 法を用いた毒性評価と環境測定 - (招待講演) 第 30 回薬物作用談話会、2016 年 7 月 31 日、札幌市
 16. 高橋美玲, 阿部大樹, 小島弘幸, 保坂卓臣, 佐々木崇光, 吉成浩一 : 環境汚染物質 perfluorocarboxylic acids (PFCAs) によるマウス及びヒト CAR 活性化作用、第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 6 月 29-7 月 1 日、名古屋市
 17. Kojima H, Uramaru N, Kitamura S, Takeuchi S, Kishi R, Araki A : Comparative study on the in vitro nuclear receptor activities of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its five metabolites. Conference of International Society for Environmental Epidemiology and International Society of Exposure Science-Asia Chapter (ISEE-ISES AC 2016), 2016.6.26-29, Sapporo
 18. Takeuchi S, Tanaka-Kagawa T, Sato M, Kobayashi S, Kojima H, Saito I, Uemura H, Jinno H : Comparison of the forms of plasticizers and organophosphorus flame retardants present in residential indoor air in different seasons. Conference of International Society for Environmental Epidemiology and International Society of Exposure Science-Asia Chapter (ISEE-ISES AC 2016), 2016.6.26-29, Sapporo
 19. Takahashi M, Abe T, Kojima H, Sasaki T, Hosaka T, Yoshinari K : Environmental pollutant PFCAs are phenobarbital-like indirect human and mouse CAR activators. 11th International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) Meeting, Busan, 2016
 20. 津越幸枝, 谷川悠華, 渡部容子, 浦丸直人, 小島弘幸, 北村繁幸 : パラベン、サリチル酸エステル及びフタル酸エステルの核内受容体活性の構造活性相関、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26-29 日、横浜市
 21. 武内伸治, 佐藤正幸, 小林智, 小島弘幸 : 生活用品等に含まれる精油成分の性ホルモン受容体を介した作用、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26-29 日、横浜市
 22. Kojima H : Endocrine-disrupting potential of environmental chemicals via nuclear receptors. Seminar in National Health Research Institutes (Taiwan), 2015.11.17., Zhunan
 23. 武内伸治, 香川(田中)聡子, 斎藤育江, 小島弘幸, 佐藤正幸, 小林智, 神野秀人 : 居住住宅における室内環境中の可塑剤及び有機リン系難燃剤の測定、フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015

- 年 9 月 17-18 日、神戸市
24. 谷川悠華、小山賢一、渡部容子、浦丸直人、小島弘幸、藤本成明、北村繁幸：サリチル酸及びサリチル酸エステル類の核内受容体 ER, AR, PXR 及び CAR に対する作用、フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015 年 9 月 17-18 日、神戸市
 25. 清水良、渡部容子、浦丸直人、小島弘幸、武内伸治、黒木広明、太田茂、北村繁幸、杉原数美：核内受容体の転写活性化を介した新規甲状腺ホルモンかく乱機構の解析、フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015 年 9 月 17-18 日、神戸市
 26. 渡部容子、井上智賀、谷川悠華、浦丸直人、杉原数美、小島弘幸、北村繁幸：リン系難燃剤のラット肝カルボキシルエステラーゼ活性に対する阻害効果、フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015 年 9 月 17-18 日、神戸市
 27. 小島弘幸、室本竜太、高橋美妃、平尾徹、松田正：STAT3 活性化を介した IL-17A 遺伝子発現に及ぼすバイオカニン A の影響、第 22 回日本免疫毒性学会、2015 年 9 月 11-12 日、京都市
 28. 吉成浩一、小島弘幸：化学物質による複雑な肝毒性を予測および評価するためのインビトロ・インシリコ統合型システムの開発、2015 年 LRI 研究報告会、2015 年 8 月 28 日、東京都
 29. 武内伸治、姉崎克典、小島弘幸：色素や化成品に含まれる PCB の核内受容体及びダイオキシン受容体を介した作用、第 24 回環境化学討論会、2015 年 6 月 24-26 日、札幌市
 30. 渡部容子、小島弘幸、武内伸治、藤本成明、北村繁幸：パーソナルケア製品に含まれる化学物質による ER α / β 及び PXR を介した内分泌攪乱活性、第 24 回環境化学討論会、2015 年 6 月 24-26 日、札幌市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 弘幸 (KOJIMA, Hiroyuki)
北海道立衛生研究所生活科学部・部長
研究者番号：10414286

(2) 研究分担者

室本 竜太 (MUROMOTO, Ryuta)
北海道大学大学院薬学研究院・講師
研究者番号：30455597

鈴木 智宏 (SUZUKI, Tomohiro)
北海道立衛生研究所食品科学部・主査
研究者番号：10414327

浦丸 直人 (URAMARU, Naoto)
日本薬科大学薬学部・講師
研究者番号：90424069

(3) 連携研究者

武内 伸治 (TAKEUCHI, Shinji)
北海道立衛生研究所生活科学部・主査
研究者番号：20414287

(4) 研究協力者

菅野陽平 (SUGANO, Youhei)
奥田勝博 (OKUDA, Katsuhiko)