

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月10日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580328

研究課題名（和文） 哺乳動物の胎盤を介した植物エストロゲンの作用機序の解明

研究課題名（英文） Effects of placental transfer of phytoestrogen on physiological function in mammals

研究代表者

久米 新一（KUME SHINICHI）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：90355454

研究成果の概要（和文）：植物エストロゲンの一つであるクメステロールを投与すると、妊娠マウスでは小腸のアルカリフォスファターゼ活性が低下し、カルシウム代謝を阻害したが、泌乳マウスでは乳腺における IgA 産生細胞数が増加し、腸管免疫を活性化した。泌乳マウスにクメステロールを投与すると、新生仔マウスのカルシウム代謝では雄だけに強く影響した。これらの成果では、植物エストロゲンの作用機序は主にエストロゲン受容体を介するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Coumestrol administration decreases the ALP activity in intestine of pregnant mice and increases the numbers of IgA-secreting cells in mammary gland of lactating mice. Coumestrol administration to maternal mice during pregnancy and lactation affects renal Ca metabolism in neonatal mice, especially male neonatal mice *via* maternal milk. Phytoestrogens may act as both estrogen agonists and antagonists through estrogen receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：植物エストロゲン、新生仔マウス、胎盤、哺乳動物、腸管免疫、カルシウム代謝、エストロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) アルファルファ、クローバーなどのマメ科牧草は、家畜に不妊などの害をもたらすクメステロール、イソフラボン類などの植物エストロゲンを多量含有している。植物エストロゲンは動物体内でエストロゲン受容体などの核内受容体に結合し、生殖機能などを阻害している。一方で、植物エストロゲンは骨

粗しょう症の改善に効果があるなど、核内受容体を介して動物の生理機能にさまざまな影響を及ぼしている。

(2) 新生児はエストロゲンによる影響を受けやすいが、植物エストロゲンは母体の胎盤を介して新生児の健康状態を改善することが期待されている。しかし、新生児の健康と植

物エストロゲンの関係については今までほとんど明らかにされていない。そこで、新生児に対する植物エストロゲンの有用性を明らかにすることができれば、新生児の健康を改善する効果とともに、マメ科牧草や植物エストロゲンの新たな普及が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、妊娠および泌乳マウスのエストロゲン受容体を介した植物エストロゲンの作用機序、泌乳マウスとその新生仔マウスの小腸におけるカルシウム代謝と腸管免疫に及ぼす植物エストロゲンの影響などを解明し、動物や家畜に対する植物エストロゲンの有用性とリスク、適正給与量、許容量などの基礎データを得ることである。

(2) 本研究では家畜のモデル動物として妊娠マウスおよび泌乳マウスを用いて、植物エストロゲンの一つであるクメステロールを経口投与したが、投与量は厚生労働省推奨（2006年）のイソフラボン許容摂取量（30mg/日）の半分程度（200 μ g/kg/日）に設定した。

3. 研究の方法

(1) クメステロールを妊娠期と泌乳期のマウス（計 85 匹）に経口投与（200 μ g/kg/日）し、妊娠マウスとその新生仔マウスのカルシウム代謝に及ぼす植物エストロゲンの作用機序について調べた。試験ではクメステロールを投与したCM区、溶媒だけを投与した溶媒区と投与しない対照区を設定し、妊娠マウスからは分娩直前に、また泌乳マウスとその仔マウスからは分娩 10 日後に血液、腎臓、小腸などを採取した。

(2) 植物エストロゲンと同様な作用を有するビスフェノールAを妊娠マウス（計 23 匹）に経口投与（2mg または 20mg/kg/日）し、妊娠マウスのカルシウム代謝に及ぼすビスフェノールAの作用機序について調べた。試験ではビスフェノールAを 2mg または 20mg 投与したBA-2およびBA-20区、溶媒だけを投与した溶媒区と投与しない対照区を設定し、妊娠マウスからは分娩直前に血液、腎臓、小腸などを採取した。

(3) カルシウム代謝に関する調査項目は、血液中のカルシウムと無機リン濃度、免疫組織学的解析による小腸および腎臓のビタミンD受容体の局在、酵素組織学的解析による小腸のアルカリフォスファターゼ活性の発現、分子生物学的解析による小腸および腎臓のエストロゲン受容体、ビタミンD受容体などに関連する遺伝子の発現である。

(4) クメステロールを妊娠期と泌乳期のマウス（計 24 匹）に経口投与（200 μ g/kg/日）し、泌乳マウスとその新生仔マウスの腸管免疫に及ぼす植物エストロゲンの作用機序について調べた。試験ではクメステロールを投与したCM区、溶媒だけを投与した溶媒区と投与しない対照区を設定し、泌乳マウスとその仔マウスからは分娩 14 日後に血液、乳腺、小腸などを採取した。調査項目は、血液、胃内容物、小腸および糞の免疫グロブリンA（IgA）濃度、乳腺および小腸におけるIgA産生細胞数、乳腺および小腸におけるIgAに関連する遺伝子の発現である。

4. 研究成果

(1) 妊娠および泌乳マウスへのクメステロール投与により、妊娠マウスでは十二指腸と空腸のアルカリフォスファターゼ（ALP）活性およびALPとエストロゲン誘導遺伝子（c-fosとVEGF）のmRNA発現量が低下したが、泌乳マウスではクメステロール投与による影響はほとんど認められなかった。このことから、エストロゲン活性の高い妊娠マウスでは、植物エストロゲンは小腸のアルカリフォスファターゼ活性の低下を介して、小腸からのカルシウムの吸収を阻害することを明らかにした（図1）。得られた成果は英国のPhytotherapy Researchに掲載されるなど、国際的にも高く評価されている。

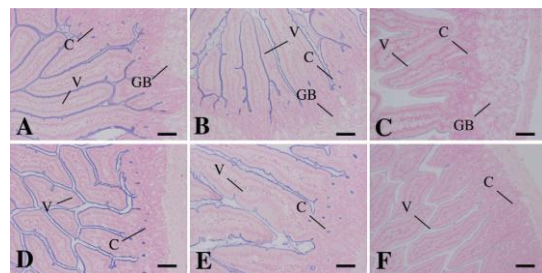


図1、妊娠マウスの十二指腸（上図）と空腸（下図）のアルカリフォスファターゼ活性。AとDは対照区、BとEは溶媒区、CとFはCM区である。CM区では小腸の上皮細胞が青く染色されていないことから、アルカリフォスファターゼ活性の低下していることが認められた。

(2) 泌乳マウスへのクメステロール投与によって雌の新生仔マウスではカルシウム代謝と関連する遺伝子の発現に影響は認められなかったものの、雄の新生仔マウスでは腎臓のカルシウム輸送関連因子（ECaC1とECaC2）とビタミンD受容体のmRNA発現量が増加した。このことは、泌乳マウスの胎盤を介して植物エストロゲンが新生仔マウスに移行するものの、エストロゲン活性の低い雄マウスのカルシウム代謝に強く影響を及ぼすこと

を明らかにしたもので、新生仔マウスの性によって植物エストロゲンの作用機序が異なることを見いだした。得られた成果は日本畜産学会の英文誌 (Animal Science Journal) に受理されるなど、国内外でも高く評価されている。

(3) 20mg のビスフェノールA投与で妊娠マウスの血清カルシウム濃度が低下した (表1) だけでなく、腎臓のカルシウム結合タンパク質 (CaBP-9k) およびビタミン D 合成酵素 (CYP27B1) の mRNA 発現量の低下と、腸の傍細胞輸送を制御するオクルディンおよび JAM-A の mRNA 発現量の低下を見いだした。このことから、大量のビスフェノールA投与は妊娠マウスのカルシウム代謝を強く阻害し、また傍細胞輸送によるカルシウム吸収量の低下がその一因であることを明らかにした。得られた成果は日本畜産学会の英文誌 (Animal Science Journal) に掲載されるなど、国内外でも高く評価されている。

表1, 妊娠マウスの血清中カルシウム (Ca) と無機リン (Pi) 濃度 (mg/dl)

	対照区	溶媒区	BA-2 区	BA-20 区
Ca	9.33 ^a	9.20 ^{ab}	8.88 ^{ab}	8.43 ^b
Pi	7.86	7.38	8.65	6.79

^{a,b} 5%水準で有意差あり

(4) 泌乳マウスへのクメステロール投与によって母体の乳腺における IgA 産生細胞数、IgA と VCAM-1 の mRNA 発現量および血清 IgA 濃度が増加したが、新生仔マウスの血清、胃内容物、小腸および糞中の IgA 濃度は影響されなかった。これらの成果は、クメステロールによる IgA 産生効果を初めて証明したこと、またその作用機序はホーミングリガンドである VCAM-1 の活性化によって生じることを明らかにしたもので、国際的にも高く評価されている。

(5) 本研究の成果から、哺乳動物の胎盤を介した植物エストロゲンの作用機序は、主にエストロゲン受容体 (ER) を介してエストロゲン誘導遺伝子の発現を活性化し、カルシウム代謝や腸管免疫に影響を及ぼすことが考えられた (図2)。また、母体あるいは新生児体内のエストロゲンの状態によって植物エストロゲンの作用機序が異なり、妊娠末期のように体内のエストロゲン濃度が高いと阻害作用を示し、泌乳初期のように体内のエストロゲン濃度が低いと有益作用を示すことが示唆された。したがって、天然素材である植物エストロゲンをその作用機序に基づいて有効利用すると、動物の健康維持や疾病の

予防に効果が高いと考えられる。しかし、植物エストロゲンとビタミンD受容体の関係など、植物エストロゲンの作用機序にはまだ解明されていないことも多いため、今後の一層の研究の進展が望まれる。

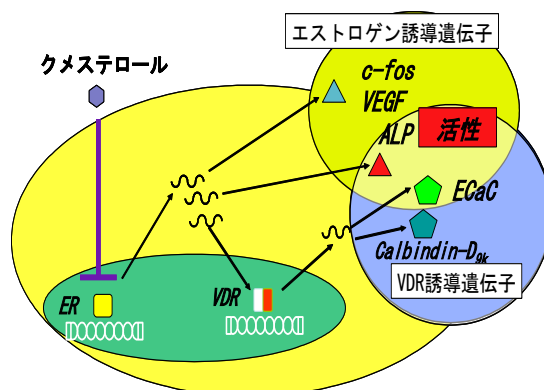


図2, 植物エストロゲン (クメステロール) による核内受容体の発現の作用機序

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4件)

- ① Otsuka H, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. Effects of bisphenol A administration to pregnant mice on serum Ca and intestinal Ca absorption. Animal Science Journal, 査読有、83 巻, 2012, 232-237.
DOI: 10.1111/j.1740-0929.2011.00947.x
- ② Ueda M, Horiguchi Y, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. Effects of coumestrol administration to maternal mice during pregnancy and lactation on renal Ca metabolism in neonatal mice. Animal Science Journal, 査読有、2011(Online published)
DOI: 10.1111/j.1740-0929.2011.00977.x
- ③ Kirihata Y, Horiguchi Y, Ueda M, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. Effects of coumestrol administration to pregnant and lactating mice on intestinal alkaline phosphatase activity. Phytotherapy Research, 査読有、25 巻, 2011, 654-658.
DOI:10.1002/ptr.3317

[学会発表] (計3件)

- ① 王 蒙東・杉本実紀・池田俊太郎・久米新一、泌乳マウスの乳腺における IgA 産生に及ぼすクメステロール投与の影響、

第61回関西畜産学会大会、2011/9/13、
岡山大学

- ② Ueda M, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S.
Effects of coumestrol administration
for maternal mice during pregnancy
on Ca metabolism in neonatal mice.
The 14th Animal Science Congress of
the Asian-Australasian Association
of Animal Production Societies. 2010
/8/22、台湾・高雄
- ③ 上田道久・堀口善裕・池田俊太郎・杉本
実紀・久米新一、新生仔マウスのカルシ
ウム代謝に及ぼすクメステロール投与の
影響、第59回関西畜産学会大会、
2009/8/28、鳥取大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久米 新一 (KUME SHINICHI)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：90355454

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：