

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：35409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12261

研究課題名(和文) 環境化学物質の新たな毒性指標：脂肪酸2位水酸化酵素FA2H誘導とその意義

研究課題名(英文) Fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) as an exacerbation factor for the development of breast cancer

研究代表者

竹田 修三 (Takeda, Shuso)

福山大学・薬学部・教授

研究者番号：00460379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン受容体ER 陰性乳がんの悪性化には、脂肪酸の量的変化ではなく、その質的变化が関与していると考えられる。この質的变化を引き起こす要因として、環境化学物質によるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR α) を介した脂肪酸2位水酸化酵素 (FA2H) の発現誘導を想定し、この仮説の証明を目指した。本研究では、PPAR α の活性化作用を有し、ER 陰性乳がんリスクに正の相関が示唆されているペルフルオロオクタン酸 (PFOA) に焦点を当て、解析を進めた。その結果、PFOAはPPAR α の活性化に呼応したFA2Hの発現誘導を介してER 陰性乳がん細胞の悪性化を来たすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、「健康体を病気にしないサイエンス」である衛生薬学を志向している。我々は日常的に環境化学物質に曝露されており、がんの発症リスク要因や悪性化の要因となることがある。本研究では、独自に見出だした知見を応用し、未解明である環境化学物質によるER 陰性乳がんの悪性化機構をFA2Hの発現と機能に注目して解明することを目指した。得られた知見は、毒性学の観点からも新たな毒性指標の確立に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We recently demonstrated that fatty acid 2-hydroxylase (FA2H), which is regulated by PPAR α , stimulates the migration of ER α -negative breast cancer MDA-MB-231 cells. Exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) correlates with estrogen receptor (ER) α -negative breast cancer risk, and it can activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR α). However, there is no evidence for the relationship between PFOA exposure and PPAR α -FA2H axis-driven cell migration. In this study, we demonstrated that in MDA-MB-231 cells, i) PFOA upregulates FA2H expression coupled with stimulation of PPAR α -mediated transcription, ii) PFOA stimulates cell migration dependent on FA2H expression, and iii) PFOA relieves PPAR α / ER α -mediated suppression of PPAR α activity as a mechanism for upregulating FA2H.

研究分野：環境毒性学

キーワード：脂肪酸2位水酸化酵素 FA2H 環境化学物質 毒性指標 乳がん Fatty acid 2-hydroxylase PPAR

1. 研究開始当初の背景

我が国では、乳がんは早期発見や治療法の向上により、他のがんと比べると診断後の生存率は高いが、年間 10 万人近くが罹患しており、近年、その罹患患者数は増加する傾向にある。乳がんの発症要因として、先天性の要因と後天性の要因の 2 つに大きく分けられるが、遺伝子の異常などを伴う先天性の要因が急激に増加するとは考え難い。したがって、近年の乳がん罹患患者数の増加には、後天性要因の生活習慣の変化(環境要因)に起因していると考えられる。乳がんは女性ホルモンと密接に関連しており、女性ホルモンと構造が類似した環境化学物質はエストロゲン受容体 α (ER α)などを刺激することで、乳がん細胞の増殖を来す。そのため、我々も含めた多くの研究者が、乳がんの悪性化因子として ER α の刺激作用を有する環境化学物質の影響を解析してきた。しかし、盲点であったのが、「ER α 陰性乳がん」の存在である。特に、治療標的である ER α 、プロゲステロン受容体 (PR) およびヒト上皮増殖因子受容体 2 (HER2) がすべて陰性のトリプルネガティブ乳がん (TNBC) は全乳がんの約 20% を占める。この TNBC は浸潤・転移しやすく、抗がん薬治療にも抵抗性を示し、予後が悪い難治性乳がんである。TNBC を含む ER α 陰性乳がんは、ER α 非依存的な機構で増殖するが、これまでにこのような乳がん注目し、環境化学物質が与える毒性影響を網羅的かつ詳細に解析した例は少ない。

日本人女性 5 万人を対象とした多目的コホート研究により、欧米型の食事(高脂肪食)が乳がんリスクを上昇させ、ER α 陽性乳がんだけでなく、ER α 陰性乳がんにおいても、欧米型食事が乳がん悪性化のリスクをもたらすことが示されている (Br. J. Nutr., 115: 1769, 2016)。一方、環境化学物質をはじめとした食事以外の外来異物の影響は不明である。

これまでに、我々は、大麻主成の Δ^9 -テトラヒドロカンナビノールがペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α (PPAR α)を介して脂肪酸 2 位水酸化酵素 (fatty acid 2-hydroxylase; FA2H) を誘導することを見出しており、この FA2H が ER α 陰性乳がん細胞における遊走の正の調節因子として機能することを報告している (J. Toxicol. Sci., 38: 305, 2013; Toxicology, 326: 18, 2014; Arch. Biochem. Biophys., 662: 219, 2019; Biochem. Biophys. Res. Commun., 531: 215, 2020)。したがって、PPAR α の活性化あるいは発現誘導を示す化学物質は、PPAR α を介して FA2H の発現を誘導し、ER α 陰性乳がん細胞の遊走を促進することで乳がんの悪性化を来す可能性が考えられる。

2. 研究の目的

これまでの疫学データから、中性脂肪値が高い肥満が ER α 陰性乳がんの発症リスクを高めるが (WCRF/AICR 報告書 2007) ER α 陰性乳がんの発症リスクと脂肪酸摂取量の間に正の相関はないことが判明している (J. Natl. Cancer Inst., 106: dju068, 2014)。さらに、FA2H は ER α 陰性乳がんの予後不良因子として示されている (Breast Cancer Res. Treat., 171: 199, 2018)。これらのことから、生活習慣を是正しても引き起こされる ER α 陰性乳がんの悪性化には、脂肪酸の量的変化ではなく、その「質的变化 = 2 位水酸化脂肪酸代謝物の生成」が関与しているとの仮説を立てた。この脂肪酸の質的变化を引き起こす要因として、日々曝露されている環境化学物質による PPAR α を介した FA2H の発現誘導を想定し、この仮説の証明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

上述の研究目的を達成すべく、PPAR α の活性化あるいは発現誘導を示す環境化学物質が ER α 陰性ヒト乳がん細胞の遊走に対して与える影響について、生化学的、分子生物学的、および細胞学的手法を駆使し、検討を行った。

4. 研究成果

有機フッ素化合物であるペルフルオロオクタン酸 (PFOA) は PPAR α の活性化作用を有し、その曝露と ER 陰性乳がんの発症リスクに正の相関があることが報告されている (Int. J. Cancer, 146: 917, 2020)。そこで、本研究では PFOA に焦点を当てた。

ER 陰性乳がん MDA-MB-231 細胞において、PFOA は PPAR α を介した転写を活性化し、この転写活性化は PPAR α の阻害剤である GW6471 の共処理により抑制された。さらに、PPAR α の転写活性化に呼応した FA2H の有意な発現増加が見られた。PFOA は細胞増殖には影響を与えなかったが、MDA-MB-231 細胞の遊走を促進した。FA2H の siRNA を用いて PFOA 誘導性の FA2H の発現を抑制すると、細胞遊走が PFOA 非曝露細胞と同レベルまで抑制された。したがって、PFOA は FA2H の発現誘導を介して MDA-MB-231 細胞の遊走を促進することが示唆された。

しかしながら、MDA-MB-231 細胞には PPAR α に加えて、PPAR α の転写活性を負に制御する PPAR β/δ も発現している。本研究に先立ち、MDA-MB-231 細胞における PPAR α による FA2H の発現制御機構を解析したところ、PPAR α のリガンドであるパルミチン酸処理では FA2H の発現は誘導されなかった。一方、PPAR α を高発現させた MDA-MB-231 細胞を PPAR β/δ のアンタゴニストである GSK0660 で処理することにより FA2H の発現が増加した。また、PPAR β/δ の siRNA 処理によっても、FA2H の発現が増加した。これらのことから、通常培養条件下では、MDA-MB-

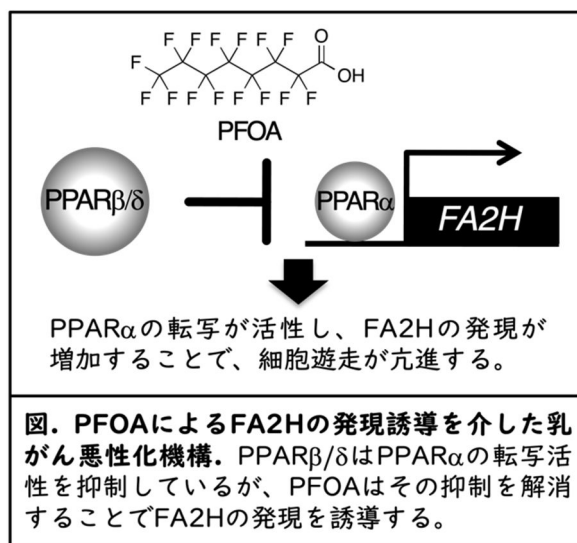
231細胞において、PPAR α の機能は共存するPPAR β/δ により負に調節されていると考えられる。

そこで、PPAR β/δ によるPPAR α の抑制下において、PFOAがどのようにFA2Hの発現を誘導するか検討した。実験系として、PPAR α とPPAR β/δ を過剰発現させたMDA-MB-231細胞を用いて、PFOAがPPAR α を介した転写活性とFA2Hの発現レベルに与える影響を解析した。PPAR α の転写活性はPPAR β/δ の共発現により、PPAR α の単独発現下に比べて低下したが、PFOAはPPAR β/δ によるPPAR α の抑制下でもPPAR α の転写を活性化した。さらに、FA2Hの発現も同様に、PPAR α とPPAR β/δ の共過剰発現により低下したが、PFOAはPPAR β/δ によるPPAR α の抑制下でも、FA2Hの発現を誘導した。以上より、ER α 陰性乳がんMDA-MB-231細胞において、PFOAは1)

PPAR α の転写活性化に付合してFA2Hの発現を誘導する、2)FA2H依存的に細胞遊走を促進する、3)PPAR β/δ によるPPAR α の抑制を解消することが明らかとなった(図)。

ER α 陰性乳がん細胞において、PFOAがPPAR β/δ によるPPAR α の転写活性の抑制を解消する機構に関しては今後の検討課題であるが、環境化学物質によるPPAR α 制御性FA2Hを介したER α 陰性乳がんの悪性化機構の一端を明らかにすることに成功した。FA2Hが2位水酸化脂肪酸代謝物の生成に関与することを考慮すると、PFOAのようにFA2Hの発現を誘導する環境化学物質は脂肪酸の質的变化を引き起こし、ER α 陰性乳がんの悪性化を来たす可能性が考えられる。

本研究は、これまでに蓄積した知見と考え合わせることで、我々が独自に見出したPPAR α 制御性のFA2Hが環境化学物質の新たな毒性指標となりうる可能性を示すとともに、難治性のER α 陰性乳がんの悪性化機構の解明に資する基礎研究でもあり、本研究で得られた成果は今後極めて意義深いものになることが期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Hirao-Suzuki Masayo, Kanameda Koki, Takiguchi Masufumi, Sugihara Narumi, Takeda Shuso	4. 巻 45
2. 論文標題 2-Methoxyestradiol as an Antiproliferative Agent for Long-Term Estrogen-Deprived Breast Cancer Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 7336 ~ 7351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb45090464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirao-Suzuki Masayo, Takiguchi Masufumi, Yoshihara Shin'ichi, Takeda Shuso	4. 巻 378
2. 論文標題 Repeated exposure to 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene (MBP) accelerates ligand-independent activation of estrogen receptors in long-term estradiol-deprived MCF-7 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 31 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2023.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koga Takayuki, Inoue Kie, Hirayama Fuka, Hiromura Makoto, Fujii Kiyonaga, Ishii Yuji, Hirao-Suzuki Masayo, Takeda Shuso, Toda Akihisa, Soeda Fumio	4. 巻 46
2. 論文標題 Dimethylglycine, a Methionine Metabolite, Participates in the Suppressive Effect of Methionine on 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene-Induced Dermatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 946 ~ 954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Shuso, Hirao-Suzuki Masayo, Aramaki Hironori, Watanabe Kazuhito	4. 巻 41
2. 論文標題 9-Tetrahydrocannabinol stimulation of estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cell migration: Interfering interaction with the estrogenic milieu	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 287 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11419-022-00655-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Genki, Hirao-Suzuki Masayo, Koga Takayuki, Kobayashi Takananobu, Kamishikiryo Jun, Tanaka Michitaka, Fujii Kiyonaga, Takiguchi Masufumi, Sugihara Narumi, Toda Akihisa, Takeda Shuso	4. 巻 47
2. 論文標題 Perfluorooctanoic acid (PFOA) as a stimulator of estrogen receptor-negative breast cancer MDA-MB-231 cell aggressiveness: Evidence for involvement of fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) in the stimulated cell migration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 159 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.47.159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Shuso, Hirao-Suzuki Masayo, Shindo Mitsuru, Aramaki Hironori	4. 巻 44
2. 論文標題 (-)-Xanthatin as a Killer of Human Breast Cancer MCF-7 Mammosphere Cells: A Comparative Study with Salinomycin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 3849 ~ 3858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb44090264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirao-Suzuki Masayo, Takayuki Koga, Takiguchi Masufumi, Peters Jeffrey M., Takeda Shuso	4. 巻 731
2. 論文標題 Cannabidiolic acid activates the expression of the PPAR / target genes in MDA-MB-231 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109428 ~ 109428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2022.109428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirao-Suzuki Masayo, Takeda Shuso, Shindo Mitsuru	4. 巻 4
2. 論文標題 Exposure to (-)-Xanthatin during the Haploid Formation of Mouse Spermatocyte GC-2spd(ts) Cells, an in vitro Male Germ Cell Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 202 ~ 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.4.6_202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Shuso	4. 巻 44
2. 論文標題 Foreword-Recent Advances in the Understanding of Nuclear Receptors- and Drug-Metabolizing Enzymes-Mediated Inter-Individual Differences	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1593 ~ 1593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-ctf4411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirao-Suzuki Masayo, Nagase Keita, Suemori Tatsuya, Tsutsumi Kana, Shigemori Egao, Tanaka Michitaka, Takiguchi Masufumi, Sugihara Narumi, Yoshihara Shin'ichi, Takeda Shuso	4. 巻 44
2. 論文標題 4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene (MBP) Targets Estrogen Receptor , to Evoke the Resistance of Human Breast Cancer MCF-7 Cells to G-1, an Agonist for G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1524 ~ 1529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00417	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirao-Suzuki Masayo, Takeda Shuso, Sakai Genki, Waalkes Michael P., Sugihara Narumi, Takiguchi Masufumi	4. 巻 447
2. 論文標題 Cadmium-stimulated invasion of rat liver cells during malignant transformation: Evidence of the involvement of oxidative stress/TET1-sensitive machinery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 152631 ~ 152631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tox.2020.152631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Shuso, Hirao-Suzuki Masayo, Yamagishi Yukimasa, Sugihara Takahiro, Kaneko Masataka, Sakai Genki, Nakamura Tetsuya, Hieda Yuhzo, Takiguchi Masufumi, Okada Masahiro, Sugihara Narumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of the ethanol extract of Neopyropia yezoensis, cultivated in the Seto Inland Sea (Setonaikai), on the viability of 10 human cancer cells including endocrine therapy-resistant breast cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 75 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.8.75	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平尾雅代、要田恒希、古賀貴之、杉原成美、瀧口益史、竹田修三
2. 発表標題 脂肪酸2位水酸化酵素FA2Hによる乳がん細胞遊走促進におけるエクソソームの関与
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会（横浜）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平尾雅代、要田恒希、古賀貴之、杉原成美、瀧口益史、竹田修三
2. 発表標題 ペルフルオロオクタン酸による脂肪酸2位水酸化酵素FA2Hを介した乳がん細胞遊走の促進
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会（横浜）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平尾雅代、要田恒希、古賀貴之、瀧口益史、杉原成美、大原正裕、竹田修三
2. 発表標題 エストロゲン受容体 陽性乳がん細胞における脂肪酸2位水酸化酵素FA2Hの機能的発現に与えるエストロゲンの影響
3. 学会等名 フォーラム2023：衛生薬学・環境トキシコロジー（広島）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平尾雅代、境絃樹、古賀貴之、田中満崇、杉原成美、瀧口益史、竹田修三
2. 発表標題 脂肪酸2位水酸化酵素FA2Hの発現に与えるエストロゲンの影響解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会(札幌)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 境絃樹、平尾雅代、古賀貴之、護山海都、要田恒希、瀧口益史、杉原成美、竹田修三
2. 発表標題 亜鉛トランスポーターの発現に与える影響解析：FA2Hの過剰発現とエストロゲン多寡条件下による検討
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(広島)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 境絃樹、平尾雅代、古賀貴之、瀧口益史、杉原成美、竹田修三
2. 発表標題 環境化学物質による乳がん悪性化：脂肪酸2位水酸化酵素FA2Hを指標とした解析
3. 学会等名 フォーラム2021：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 境絃樹、平尾雅代、瀧口益史、杉原成美、竹田修三
2. 発表標題 脂肪酸2位水酸化酵素FA2Hを標的とした乳がん悪性化機構の解析
3. 学会等名 第60回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平尾雅代、境絃樹、古賀貴之、田中満崇、杉原成美、瀧口益史、竹田修三
2. 発表標題 脂肪酸2位水酸化酵素FA2HのPPAR を介した発現調節機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福山大学薬学部衛生薬学研究室HP
<https://www.fukuyama-u.ac.jp/course/pharm/pharmacy/labo-list/eiseiyakugaku/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	平尾 雅代 (Hirao-Suzuki Masayo) (30780746)	広島国際大学・薬学部・助教 (35413)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------