

## 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 6月 4日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790131

研究課題名（和文） PPAR $\gamma$ を介した有機スズ化合物の毒性発現機構に関する研究研究課題名（英文） Potential toxicity induced by organotin compounds via PPAR $\gamma$  signaling pathway

研究代表者

廣森 洋平 (HIROMORI YOUHEI)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：60515956

研究成果の概要（和文）：トリフェニルスズ(TPT)曝露により胸腺の脂肪化・萎縮が促進されることで、末梢においてリンパ球ポピュレーションが変化し、免疫機能の加齢化が促進される可能性が示唆された。また、PPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウスでは野生型マウスと比べて、胸腺重量の減少、脂肪化に関与する遺伝子群の mRNA 発現が減弱していたことから、TPT 曝露による胸腺重量の減少には胸腺の脂肪化が関与し、その作用は PPAR $\gamma$  活性化作用を介して起こることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：TPT administration in the wild-type mice decreased the thymus weight, increased adipose weight and enhanced the mRNA levels of PPAR $\gamma$ , aP2 and CD36 in the thymus. Furthermore, TPT promoted the thymic adipogenesis. On the other hand, the effect of TPT administration in PPAR $\gamma$  hetero-knockout mice tended to be lower than the wild-type mice. Flow cytometric analysis demonstrated a significant decrease in the thymus and spleen cell number and a slight decrease in the rate of naïve T cell from the thymus. These results suggest that TPT promotes thymic atrophy, adipogenesis and aging via PPAR $\gamma$ .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：トリフェニルスズ、胸腺、PPAR $\gamma$ 、脂肪化

## 1. 研究開始当初の背景

有機スズ化合物は、スズ原子に炭化水素鎖が結合した構造を持つ化合物で、樹脂合成時の安定剤や農薬、船底に水生生物が付着するのを防止するために防汚剤として船底塗料に使用されてきた。しかし、船底塗料として

広く用いられてきたトリブチルスズ(TBT)やトリフェニルスズ(TPT)は、ごく低濃度で貝類の雌にペニスが発生させるという明確な内分泌攪乱作用（インボセックス）を引き起こすことが明らかとなり、その海洋汚染が問題となっている。また、ヒトにおいても、有

機スズ化合物に汚染された魚を食することで、曝露を受ける可能性があるため、ヒトに対しても何らかの影響を及ぼす可能性が懸念されている。

齧歯類などを用いた動物実験により、有機スズ化合物が哺乳動物に与える毒性に関する研究は数多く行われており、神経毒性や免疫毒性、発生毒性など様々な毒性を示すことが明らかとなっている。しかし、そのほとんどが現象論のみの報告であり、作用メカニズムについては不明な点が多く残されている。

一方で、我々は、TBT や TPT が、転写調節因子であり、ビタミンAの代謝物である9-cisレチノイン酸をリガンドとする核内受容体 retinoid X receptor (RXR) と II 型糖尿病治療薬であるチアゾリジン系薬物をリガンドとする核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  の強力な2重アゴニストとなることを明らかにした。しかしながら、哺乳動物における有機スズ化合物の毒性と核内受容体との関連については、TBT を経胎盤ばく露した仔マウスにおいて、PPAR $\gamma$ /RXRヘテロ二量体を介した脂肪細胞の過形成が起こった事例が唯一報告されているのみである。

## 2. 研究の目的

PPAR $\gamma$  は免疫系においてマクロファージをはじめとする炎症細胞に発現し、細胞増殖やサイトカインの分泌調節を介して炎症反応の進展や免疫機構に関与していることが明らかとなっている。有機スズ化合物の毒性発現には PPAR $\gamma$  の機能を介したものが潜在的に数多く存在すると考えられるが、核内受容体アゴニストとして作用することが明らかとなったのがごく最近ということもあり、*in vivo* での有機スズ化合物の毒性に、PPAR $\gamma$  が積極的に関わっているという科学的な証拠はわずかしか存在しないのが現状である。以上のような研究背景から、応募者は、有機スズ化合物の免疫毒性発現における PPAR $\gamma$ /RXR の関与について検討を行った。

## 3. 研究の方法

16 週齢の C57BL6/J 雌マウスに、セサミオイルに溶解した TPT (10  $\mu$ mol/kg/day) を 14 日間連続で経口投与を行った。投与後に解剖し、胸腺、脾臓、肝臓、脂肪を摘出後、その重量を測定した。また、胸腺、脾臓、肝臓、脂肪における脂肪化に関連する遺伝子 (PPAR $\gamma$ 、aP2、CD36) の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により評価した。PPAR $\gamma$  ヘテロ欠損マウスを用いて同様の検討を行うことで TPT 曝露の影響が PPAR $\gamma$  活性化作用を介して起こるものであるかを検討した。さらに TPT 投与後のマウス胸腺について組織学的な検討を行った。また胸腺、脾臓を摘出後、単

細胞化して細胞数を計数しフローサイトメトリー法でリンパ球サブセットの解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) TPT 投与が臓器重量に及ぼす影響

C57BL6/J 雌マウスに、セサミオイルに溶解した TPT (10  $\mu$ mol/kg/day) を 14 日間連続で経口投与を行い、その後解剖し、胸腺脂肪の重量を測定した。その結果、TPT 投与によって胸腺重量の有意な減少、脂肪重量の有意な増加が認められた。(図 1)。

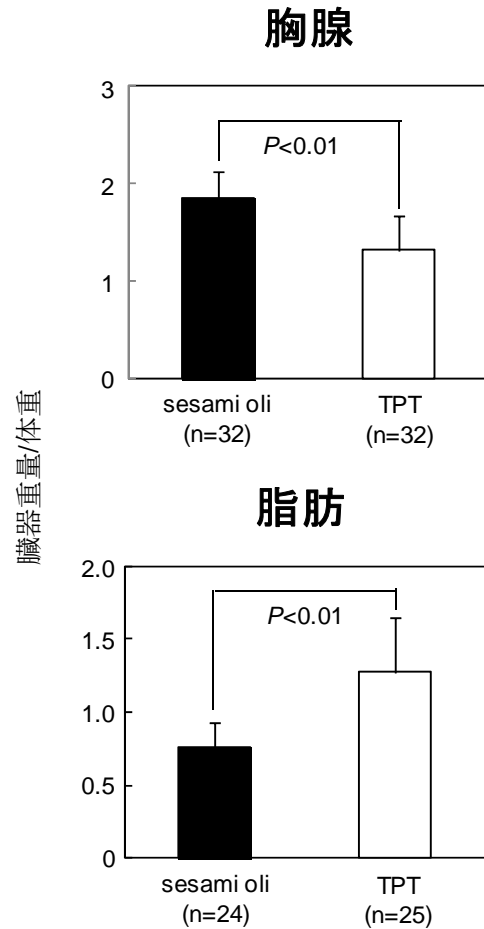


図 1. TPT 投与による臓器重量の変化

重量変化が認められた胸腺、脂肪について PPAR $\gamma$ ヘテロ欠損 (KO) マウスを用いて同様の検討を行うことで、TPT の作用が PPAR $\gamma$  の活性化を介したものであるかを検討した。検討に先立ち、KO マウス胸腺における PPAR $\gamma$  mRNA 発現量の測定を行った。その結果、KO マウス胸腺では野生型 (WT) マウスと比較して、PPAR $\gamma$  mRNA 発現量が 65%減少していることが確認された(図 2)。

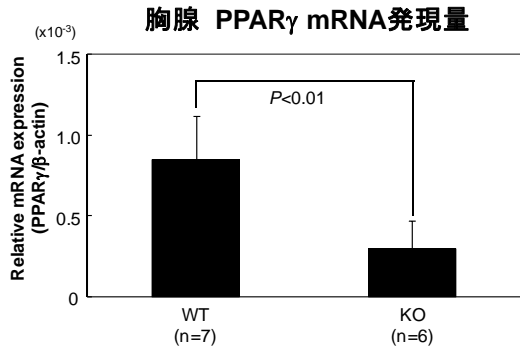


図2. 野生型(WT)マウスおよびPPAR $\gamma$ ヘテロ欠損(KO)マウスの胸腺におけるPPAR $\gamma$  mRNA発現量の比較

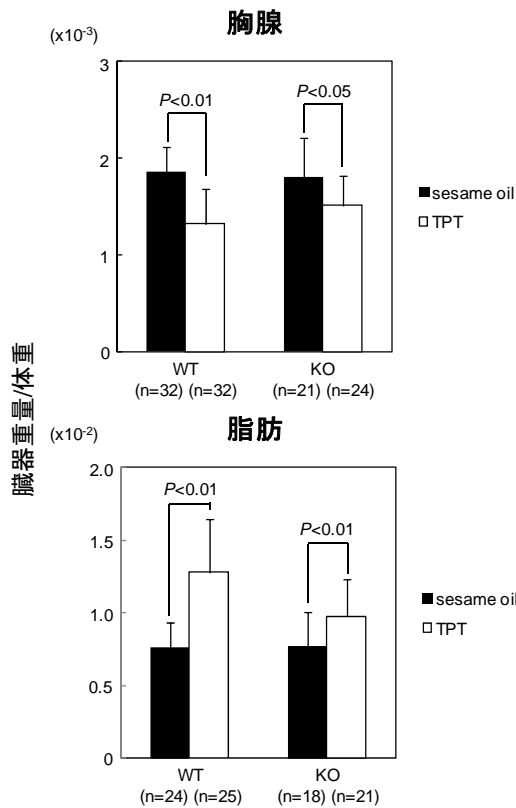


図3. WTマウスとKOマウスのTPT投与による臓器重量変化の比較

続いて、WTマウスと同様にKOマウスにTPTを投与し、臓器重量を測定した。その結果、胸腺重量の有意な減少、脂肪重量の有意な増加が認められた。しかし、WTマウスでは対照群と比較して29%の胸腺重量の減少、67%の脂肪重量の増加が確認されたのに対して、KOマウスでは胸腺重量は16%の減少、脂肪重量は26%の増加にとどまっており、重量変化の度合いが小さくなっていることが確認された(図3)。したがって、TPT投与によるこれらの臓器重量の変化はPPAR $\gamma$ の活性化を介した作用によって起こっている可能性

が示唆された。

(2) TPT投与が胸腺の脂肪化に及ぼす影響  
TPTの投与により胸腺の萎縮が促進されることが確認されたが、加齢による胸腺の萎縮は胸腺の脂肪化を伴って起こることが知られている。また、第二項において脂肪重量の増加を確認したことから、TPTは胸腺の脂肪化を促進することで萎縮作用を示している可能性が考えられる。そこで、TPT投与が胸腺の脂肪化に及ぼす影響について検討を行った。

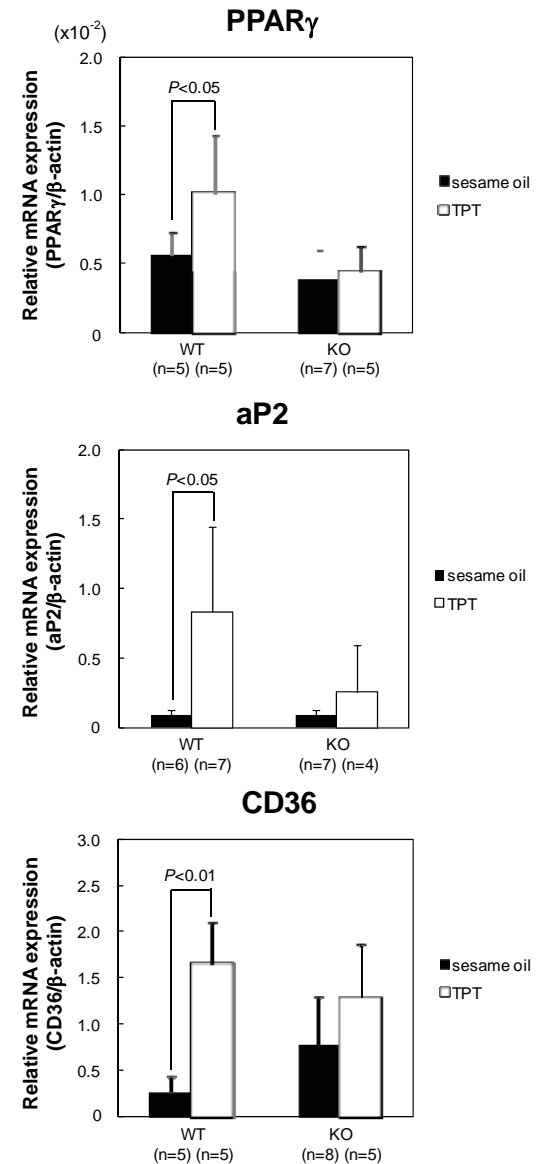


図4. 胸腺における脂肪化関連遺伝子mRNA発現量

まず、TPT投与後の胸腺について脂肪化に関連する因子であるPPAR $\gamma$ 、aP2、CD36のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCR法によって測定した。KOマウスを用いて同様の検討を行うことで、TPTの作用がPPAR $\gamma$ の活性化を介したものであるかを合わせて検討した。

検討の結果、TPT 投与マウスの胸腺において脂肪化に関わる因子の mRNA 発現量が有意に上昇していることが確認された。また、KO マウスにおいては、WT マウスと比較して mRNA 発現量の上昇が小さくなっていることから、TPT による胸腺の脂肪化促進作用には PPAR $\gamma$  の活性化が関与していることが示唆された(図 4)。

TPT 投与によって胸腺の脂肪化に関連する遺伝子の mRNA 発現量が上昇することが確認されたため、TPT 投与後の胸腺について組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色及び Oil red O 染色を行うことで、組織学的にも脂肪化が促進されているかの確認を行った。検討の結果、TPT 投与マウスの胸腺において顕著な脂肪滴の蓄積が確認された。よって、TPT 投与によって胸腺は mRNA レベルのみでなく、組織学的にも脂肪化が促進されていることが確認された(図 5)。

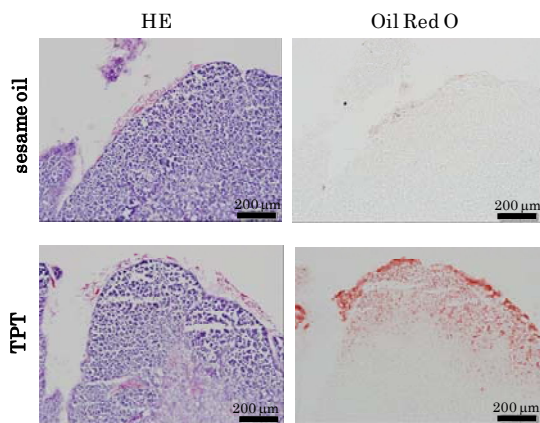


図 5. 胸腺組織切片のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色及び Oil red O 染色

### (3) TPT 曝露による胸腺の脂肪化・萎縮に伴う全身免疫系への影響

加齢により免疫機能は全体的に低下することが知られているが、その主な原因であると考えられているのが胸腺の脂肪化である。脂肪化した胸腺は、T 細胞の分化成熟の場である微小環境が崩れているため、末梢へと供給される T 細胞が減少する。したがって高齢者では一般的に若年者と比べてリンパ球、特にナイーブ T 細胞が少なく、感染に対する防御機能が低下していると言われている。

TPT の曝露によって胸腺の脂肪化・萎縮が引き起こされることが確認されたが、加齢化によって誘発されるような全身免疫系の機能低下が TPT 投与によっても起こるか否かを胸腺及び代表的二次リンパ組織である脾臓のリンパ球数の測定、リンパ球サブセット解析を行うことで確認した。

胸腺細胞数の測定およびフローサイトメトリーによるリンパ球サブセットの解析を

行うことで、TPT 投与による胸腺リンパ球への影響について検討を行ったところ、胸腺におけるリンパ球数は、TPT 曝露による胸腺の脂肪化・萎縮に伴って有意に減少していることが確認された(図 6)。一方で、TPT 曝露により胸腺リンパ球中の CD4、CD8 陽性細胞の割合に変化は認められなかった(図 7)。TPT 投与により胸腺リンパ球は質的な変化を伴わずに数が減少することが確認された。これらの結果から、TPT 投与により胸腺リンパ球は質的な変化を伴わずに数が減少することが確認された。

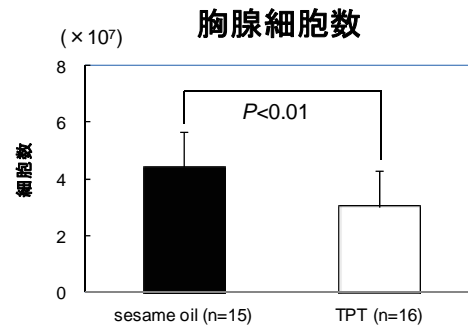


図 6. TPT 投与による胸腺細胞数への影響

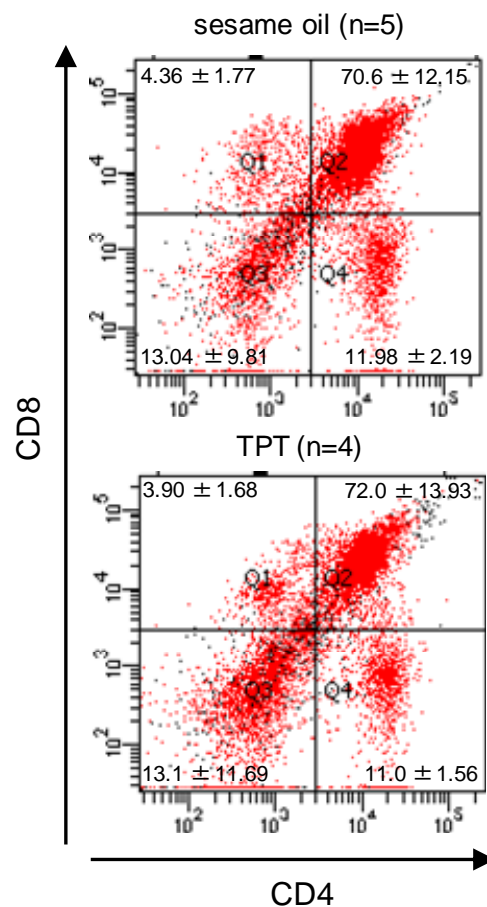


図 7. TPT 投与による胸腺リンパ球サブセットバランスへの影響

#### (4) まとめ

TPT 投与により、胸腺重量の有意な減少が認められ、脂肪化に関連する因子である PPAR $\gamma$ 、aP2、CD36 の mRNA 発現量が増加した。さらに、Oil red O 染色の結果から、TPT 投与によって胸腺の脂肪化が促進されていることが確認された。一方で、KO マウスにおいては、WT マウスに比べて、胸腺重量の減少、脂肪化に関与する遺伝子群の mRNA 発現が減弱していた。このことから、TPT 投与による胸腺重量の減少には胸腺の脂肪化が関与し、その作用は PPAR $\gamma$  活性化作用を介して起こると考えられる。

また、TPT 投与による胸腺の脂肪化に伴い、胸腺細胞数の減少が認められたことから、TPT 投与により免疫機能の加齢化が促進される可能性が示唆された。

#### 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)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 酒井紀行、小林亮、上代大地、廣森洋平、中西剛、永瀬久光：トリフェニルスズの全身免疫系に対する加齢化促進作用の検討 (口頭)、メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011、平成 23 年 12 月 8 日 (名古屋)
- ② 酒井紀行、小林亮、上代大地、廣森洋平、中西剛、永瀬久光：トリフェニルスズの全身免疫系に対する加齢化促進作用の検討 (口頭)、フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー、平成 23 年 10 月 27 日 (金沢)
- ③ Youhei Hiromori, Jun-ichi Nishikawa, Hisamitsu Nagase, Tsuyoshi Nakanishi. : Structure-activity studies on the RXR agonist activity of organotins. The 5th International Conference on Metals and Genetics, Kobe, (Sep. 4. 2011).
- ④ 廣森洋平、原田秀作、中村昇太、吉田卓也、西川淳一、中西剛、永瀬久光：X線結晶構造解析による有機スズ化合物とヒト PPAR $\gamma$  の結合様式の解明 (ポスター)、第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会、平成 23 年 7 月 12 日 (横浜)
- ⑤ 廣森洋平、原田秀作、中村昇太、吉田卓也、西川淳一、中西剛、永瀬久光：X線結晶構造解析による有機スズ化合物とヒト PPAR $\gamma$  の結合様式の解明 (口頭)、第 2 回メタロミクス研究フォーラム、平成 22 年 11 月 2 日 (京都)
- ⑥ 廣森洋平、原田秀作、中村昇太、吉田卓也、西川淳一、中西剛、永瀬久光：X線結晶構造解析による有機スズ化合物とヒト PPAR $\gamma$  の結合様式の解明 (口頭)、第 9 回

次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム 2010、平成 22 年 10 月 2 日 (京都)

- ⑦ 廣森洋平、原田秀作、中村昇太、吉田卓也、西川淳一、中西剛、永瀬久光：X線結晶構造解析による有機スズ化合物とヒト PPAR $\gamma$  の結合様式の解明 (口頭)、フォーラム 2010・衛生環境トキシコロジー、平成 22 年 9 月 9 日 (東京)
- ⑧ 廣森洋平、原田秀作、中村昇太、吉田卓也、中西剛、永瀬久光：有機スズ化合物の PPAR $\gamma$  転写活性化における必須アミノ酸部位の検討 (口頭)、第 56 回日本薬学会東海支部 総会・大会、平成 22 年 7 月 3 日 (岐阜)
- ⑨ 廣森洋平、佐藤祥暁、山口雄士、澤田和子、井上大介、清和成、池道彦、中西剛、永瀬久光：水生生物を対象としたレチノイド様化学物質による生体影響評価のための *in vivo* アッセイ系の構築 (ポスター)、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会、平成 22 年 6 月 12 日 (那覇)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

廣森 洋平 (HIROMORI YOUHEI)  
金城学院大学・薬学部・助教  
研究者番号：60515956