

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：80106

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590773

研究課題名(和文)環境化学物質によるダイオキシン受容体を介したTh17細胞分化に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effects of environmental chemicals on Th17 cells differentiation via aryl hydrocarbon receptor

研究代表者

小島 弘幸(KOJIMA, HIROYUKI)

北海道立衛生研究所・食品科学部・主幹

研究者番号：10414286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヘルパーT細胞(Th17)分化を制御するマスター遺伝子として、レチノイド関連オーファン受容体(ROR)やダイオキシン受容体(AhR)が報告されている。DR-EcoScreen細胞を用いた試験の結果、農薬やイソフラボン類にAhRアゴニスト活性を見出した。これらの物質は、EL4細胞でのIL-17A遺伝子発現や蛋白産生を濃度依存的に増強したが、AhR-knockdown EL4細胞ではその効果を示さなかった。RORを介した作用を考え合わせると、ある種の環境化学物質は、Th17細胞においてAhRやRORを介してIL-17産生を正に制御できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) are key regulators of helper T (Th)17 cell differentiation. However, it remains unclear whether environmental chemicals, including dioxins, affect Th17 cell functions. In this study, we examined the AhR activity of 200 environmental chemicals using DR-EcoScreen assay, and found that several pesticides and isoflavones enhanced AhR-mediated transcriptional activity. These compounds increased the expression of IL-17A mRNA without effecting ROR mRNA levels in mouse T lymphoma EL4 cells. On the other hand, these chemicals did not affect the IL-17A gene expression in ROR- or AhR-knockdown EL4 cells. Taken together, these results suggest that several AhR agonists might enhance IL-17 production via ROR and AhR. This study also provides the evidence that environmental chemicals can act as modulators of IL-17 gene expression in immune cells.

研究分野：衛生学、環境毒性学、免疫学

キーワード：環境化学物質 AhR IL17 Th17 ROR 自己免疫疾患 ダイオキシン レポーターアッセイ

1. 研究開始当初の背景

内分泌系・免疫系・神経系は、ホルモンやサイトカインを介して密接に連携していることが知られている。近年、インターロイキン(IL)-17 を特異的に産生するヘルパーT細胞群(Th17)による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おり、この細胞分化を制御するマスター遺伝子として、レチノイド関連オーファン受容体(ROR)の他に、ダイオキシン受容体(AhR)が報告されている。環境化学物質の中にはAhRに結合して生体へ悪影響を及ぼす物質が数多く報告されており、これらの物質によるIL-17Aを介した免疫異常症への関与が懸念される。しかしながら、環境化学物質によるAhRを介したIL-17A発現機構については不明な点が多く、RORによる制御機構を含めた詳細な議論が必要とされている。

2. 研究の目的

in vitro レポーターアッセイ法を用いて環境化学物質のAhR活性の有無を調べ、マウスリンパ腫EL4細胞でのIL-17A遺伝子発現やIL-17A蛋白産生に及ぼす影響を明らかにする。さらに、その作用機構において、RORやシグナル伝達転写活性化因子(STAT3)との関係についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 試験物質：農薬、難燃剤、可塑剤、植物由来化学物質などの環境化学物質の標準品を使用した。

(2) AhRレポーターアッセイ：我々が以前開発した高感度なDR-EcoScreen細胞株を使用した。96穴プレートに細胞を播種し、翌日に試験物質を添加し培養後、さらに翌日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。

(3) IL-17A遺伝子発現の測定：刺激剤(PMA/ionomycinあるいは抗CD3/CD28抗体)処理したEL4細胞のIL-17A遺伝子発現に対する試験物質の影響をRT-PCR法にて測定した。

(4) ノックダウン細胞株の作製：AhRあるいはシグナル伝達転写活性化因子(STAT3)-targeting shRNA発現ベクターをそれぞれEL4細胞に導入したAhR-knockdown EL4細胞及びSTAT3-knockdown EL4細胞を作製した。

(5) IL-17A蛋白の測定：刺激剤処理したEL4細胞における化学物質のIL-17A産生応答をフローサイトメトリーにより測定した。

(6) STAT3活性化の測定：リン酸化STAT3(Y705)に対する抗体を用いたWesternblot(WB)法により解析した。

(7) ROR γ ・SRC-1複合体形成の解析：ROR γ 活性化に必須である転写コアクチベーターSRC-1との複合体形成に及ぼす影響をWB法により解析した。

4. 研究成果

(1) 環境化学物質におけるAhR活性のスクリーニング: DR-EcoScreen assayにより約300物質の中から尿素系除草剤(リニユロン、デュウロン、プロパニル)やイソフラボン類(バイオカニンA、フォルモノネチン、ゲニステイン、ダイゼイン)にAhRアゴニスト活性を見出した。

(2) EL4細胞でのIL-17A遺伝子発現に及ぼす農薬やイソフラボン類の影響: EL4細胞への添加実験により、リニユロンやバイオカニンAが濃度依存的(0.1~10 μ M)にIL-17A mRNA発現を増強することを明らかにした。

(3) EL4細胞でのIL-17A蛋白産生に及ぼす影響: IL-17A遺伝子発現に加え、バイオカニンAはEL4細胞でのIL-17A蛋白産生を増強することを認めた。

(4) AhRノックダウン細胞を用いた解析: AhR-knockdown EL4細胞では、バイオカニンA添加によるIL-17A遺伝子発現の増強作用はほとんど認められなかった。

(5) STAT3チロシンリン酸化に及ぼす影響: EL4細胞において、バイオカニンA暴露によりSTAT3蛋白の増減に影響を認めなかったが、リン酸化STAT3の増加を認めた。さらに、BAはSTAT3リン酸化の増強とともにRorc遺伝子発現を増強した。

(6) STAT3ノックダウン細胞を用いた解析: STAT3-knockdown EL4細胞では、バイオカニンA添加によるIL-17A遺伝子発現の増強作用はほとんど認められなかった。

(7) ROR γ とSRC-1との結合に及ぼす影響: ROR γ とコアクチベーターSRC-1との相互作用はバイオカニンA存在下で増強した。この作用はROR γ のAF2欠損型では認められなかった。

本研究では、AhR活性を有するイソフラボン類のIL-17A産生に対する影響及びその作用機構を明らかにした。イソフラボン類の一つ、バイオカニンAはAhRやSTAT3依存的なIL-17A遺伝子発現を正に制御してTh17細胞分化の機能に影響を与えることが示唆された。また、STAT3の転写活性化機能に重要な705番目のチロシンリン酸化の増強が認められた。さらに、我々の先行研究で認めたバイオカニンAのROR活性増強作用について、さらに作用機構を詳細に検討した結果、バイオカニンAはROR γ とSRC-1の結合を増強することが明らかとなり、特にROR γ のAF2領域が重要な役割を果たしていることが示唆された。以上の結果から、バイオカニンAは、ROR活性を亢進してIL-17A産生を増強するが、その作用にはAhRやSTAT3の双方を介した活性化も重要であることが示された。

最後に、本研究で新たに樹立されたAhR及びSTAT3恒常的ノックダウンEL4細胞は、今後、他の化学物質によるIL-17A産生作用の機序解明に有用であると考えられた。

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)

[雑誌論文](計 13 件)

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*, in press (2015) 査読有り, 10.1007/s11356-015-4662-9

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*, in press (2015) 査読有り, 10.1007/s11356-015-4858-z

Kojima H, Takeda Y, Muromoto R, Takahashi M, Hirao T, Takeuchi S, Jetten AM, Matsuda T. : Isoflavones enhance interleukin-17 gene expression via retinoic acid receptor-related orphan receptors α and γ . *Toxicology*, 329, 32-39, (2015) 査読有り, 10.1016/j.tox.2015.01.007

Watanabe Y, Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Sanoh S, Sugihara K, Kitamura S, Ohta S. : Metabolism of UV-filter benzophenone-3 by rat and human liver microsomes and its effect on endocrine-disrupting activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 282, 119-128 (2015) 査読有り, 10.1016/j.taap.2014.12.002

吉田緑、梅村隆志、小島弘幸、井上薫、高橋美和、北村繁幸、浦丸直人、安部賀央里、頭金正博、小澤正吾、吉成浩一：化学物質のリスク評価における肝肥大の取扱いの基本的考え方, *食品衛生学雑誌*, 56, 42-48 (2015) 査読有り, https://www.jstage.jst.go.jp/article/shokueishi/56/2/56_42/_pdf

Kato M, Muromoto R, Togi S, Iwakami M, Kitai Y, Kon S, Oritani K, Matsuda T. : PML suppresses IL-6-induced STAT3 activation by interfering with STAT3 and HDAC3 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 461, 366-371 (2015) 査読有り, 10.1016/j.bbrc.2015.04.040

Takeuchi S, Kojima H, Saito I, Jin K, Kobayashi S, Tanaka-Kagawa T, Jinno H. : Detection of 34 plasticizers and 25 flame retardants in indoor air from houses in Sapporo, Japan. *Sci. Total Environ.*, 491-492, 28-33 (2014) 査読有り, 10.1016/j.scitotenv.2014.04.011

Zhou Z, Zhao B, Kojima H, Takeuchi S, Takagi Y, Tateishi N, Iida M, Shiozaki T, Xu P, Qi L, Ren Y, Li N, Zheng S, Zhao H, Fan S, Zhang T, Liu A, Huang Y. : Simple and rapid determination of PCDD/Fs in flue gases from various waste incinerators in China using DR-EcoScreen cells. *Chemosphere*, 102, 24-30 (2014) 査読有り, 10.1016/j.chemosphere.2013.12.006

Ishizaki M, Muromoto R, Akimoto T, Sekine Y, Kon S, Diwan M, Maeda H, Togi S, Shimoda K, Oritani K, Matsuda T. : Tyk2 is a therapeutic target for psoriasis-like skin inflammation. *Int. Immunol.*, 26, 257-267 (2014) 査読有り, 10.1093/intimm/dxt062

小島弘幸、室本竜太、高橋美妃、武内伸治、松田正：イソフラボン類の IL-17 産生増強作用, *ImmunoTox Letter (日本免疫毒性学会誌)*, 18(2), 12-14 (2013) 査読有り, <http://www.immunotox.org/>

Kojima H, Takeuchi S, Itoh T, Iida M, Kobayashi S, Yoshida T. : In vitro endocrine disruption potential of organophosphate flame retardants via human nuclear receptors. *Toxicology*, 314, 76-83 (2013) 査読有り, 10.1016/j.tox.2013.09.004

Watanabe Y, Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Ohta S, Kitamura S. : Comparative study on transcriptional activity of 17 parabens mediated by estrogen receptor α and β , and androgen receptor. *Food Chem. Toxicol.*, 57, 227-234 (2013) 査読有り, 10.1016/j.fct.2013.03.036

Muromoto R, Nakajima M, Hirashima K, Hirao T, Kon S, Shimoda K, Oritani K, Matsuda T. : Jun activation domain-binding protein 1 (JAB1) is required for the optimal response to interferons. *J. Biol. Chem.*, 288, 30969-30979 (2013) 査読有り, 10.1074/jbc.M113.485847

[学会発表](計 20 件)

渡部容子、小島弘幸、浦丸直人、杉原数美、吉成浩一、太田茂、北村繁幸「香粧品香料のヒトおよびラット PXR, CAR, PPAR α , AhR に対するアゴニスト活性」日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸市(神戸学院大学他)

Kojima H, Takeda Y, Muromoto R, Takahashi M, Hirao T, Takeuchi S, Jetten AM, Matsuda T. : Isoflavones enhance interleukin-17 gene expression via retinoic acid receptor-related orphan receptors α and γ . The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT), 2015 March 24, San Diego (USA)

Kojima H, Sanoh S, Takeuchi S, Sugihara K, Yoshinari K, Kitamura S. : Characterization of human and mouse PXR- and CAR-mediated transcriptional activation by bisphenol A and its related compounds. The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT), 2015 March 25, San Diego (USA)

Kojima H. : In vitro endocrine-disrupting effects of pesticides via nuclear receptors. 17th Joint Symposium of Hokkaido University and Seoul National University, 2014 November 28, Sapporo (Japan)

Kojima H, Takeuchi S, Iida M, Shiozaki T. : Application of a bioassay using DR-EcoScreen cells to the determination of dioxins in environmental and food samples: comparative studies using HRGC-HRMS analysis. International Conference of Asian Environmental Chemistry (ICAEC2014), 2014 November 24, Bangkok (Thailand)

Kojima H, Takeuchi S, Sata F, Nakajima H, Noomote C, Fujino C, Uramaru N, Kitamura S, Shigeyuki K, Yoshinari K. : Comparative study on human and mouse nuclear receptor activities of hepatomegaly-inducing perfluorooctanoic acid and its related compounds. International Conference of Asian Environmental Chemistry (ICAEC2014), 2014 November 25, Bangkok (Thailand)

Takeuchi S, Jin K, Sato M, Kobayashi S, Kojima H, Saito I, Uemura H, Tanaka-Kagawa T, Jinno H. : Differential determination of plasticizers and organophosphorus flame retardants in residential indoor air. International Conference of Asian Environmental Chemistry (ICAEC2014), 2014 November 25, Bangkok (Thailand)

Watanabe Y, Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Sugihara K, Sanoh S, Ohta S, Kitamura S. : Effects of metabolism of UV-absorbers by rat liver microsomes on their nuclear receptor activation. 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2014), 2014 September 5, Madrid (Spain)

Ono A, Takeyoshi M, Maeda Y, Suzuki N, Kojima H, Takeuchi S, Hong JH, Lee HS, Vinggaard AM, Odum J, Laws S, Kojima H. : An inter-laboratory validation study of an androgen receptor stably transfected transcriptional activation (AR STTA) assay for a new OECD test guideline. 9th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2014 August 26, Prague (Czech)

小島弘幸、北村繁幸、浦丸直人、吉成浩一「化学物質の核内受容体活性化作用と肝肥大作用；In vitro 試験を用いた解析」第41回日本毒性学会学術年会シンポジウム、2014年7月4日、神戸コンベンションセンター（神戸市）

Kojima H, Takeuchi S, Takahashi K, Sata F. : Effects of perfluoroalkylcarboxylic acids and phthalate metabolite on transcriptional activity via PPARA and PPARA-V227A variant. The 8th World Conference on Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD), 2013 November 19, Singapore

小島弘幸、室本竜太、高橋美紀、武内伸治、松田 正「イソフラボン類による STAT3 と ROR γ を介した IL-17 産生増強作用」第20回日本免疫毒性学会、2013年9月12日、東海大学代々木キャンパス（東京都）

Kojima H, Muromoto R, Takahashi M, Takeuchi S, Matsuda T. : Effects of environmental chemicals on interleukin-17 production via aryl hydrocarbon receptor. 33th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2013), 2013 August 27, Daegu (Korea)

Takeuchi S, Kojima H, Saito I, Jin K, Kobayashi S, Kagawa-Tanaka S, Jinno H. : Determination of 34 plasticizers and 25 flame retardants in indoor air of houses in Sapporo, Japan. 33th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2013), 2013 August 27, Daegu (Korea)

Zhou Z, Zhao B, Kojima H, Takeuchi S, Takagi Y, Tateishi N, Iida M, Shiozaki T, Xu P, Qi L, Ren Y, Li N, Zheng S, Zhao H, Fan S, Zhang T, Liu A, Huang Y. : Simple and rapid determination of PCDD/Fs in flue gases from various waste incinerators in China using DR-EcoScreen cells. 33th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2013), 2013 August 27, Daegu (Korea)

小島弘幸、高橋美紀、武田行正、室本竜太、武内伸治、Jetten AM、松田 正「核内受容体 ROR α/γ 依存的 IL-17 産生に及ぼすイソフラボン類の影響」日本薬学会第133年会、2013年3月29日、パシフィコ横浜（横浜市）

小島弘幸、室本竜太、高橋美紀、武内伸治、松田 正「ダイオキシン受容体を介した IL-17 遺伝子発現に及ぼす環境化学物質の影響」環境ホルモン学会第15回研究発表会、2012年12月18日、東京大学山上会館（東京都）

高橋美妃、室本竜太、小島弘幸、松田 正
「 A plant-derived isoflavone, biochanin A enhances IL-17 production in T cells 」第 41 回日本免疫学会総会、2012 年 12 月 6 日、神戸国際会議場（神戸市）

Zhou Z, Kojima H, Zhao B, Takagi Y, Tateishi N, Iida M, Takeuchi S, Xu P, Liu A, Huang Y : Determination of PCDD/Fs in the flue gas from various waste incinerators in China using a rapid and sensitive cell-based assay. SETAC Asia Pacific 2012, 2012 September 26, Kumamoto (Japan)

小島弘幸、室本竜太、高橋美妃、武内伸治、松田 正「マウス EL4 細胞の IL-17 及び IL-22 遺伝子発現に及ぼす AhR アゴニストの影響」第 19 回日本免疫毒性学会、2012 年 9 月 15 日、東京慈恵会医科大学（東京都）

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食品科学部・主幹
研究者番号：10414286

(2)研究分担者

武内 伸治 (TAKEUCHI SHINJI)
北海道立衛生研究所理化学部・主査
研究者番号：20414287
室本 竜太 (MUROMOTO RYUTA)
北海道大学大学院薬学研究院・助教
研究者番号：30455597

(3)連携研究者

松田 正 (MATSUDA TADASHI)
北海道大学大学院薬学研究院・教授
研究者番号：20212219