

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2021

課題番号：18KK0320

研究課題名（和文）新世代ビスフェノールによる新規な肥満誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on the metabolic effects of endocrine-disrupting chemicals on nuclear receptors

研究代表者

松島 綾美（Matsushima, Ayami）

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：60404050

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,400,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：プラスチック原料のビスフェノールAは、ごく微量の暴露での悪影響が懸念される有害環境化学物質でもある。こうした化学物質の標的は、細胞核内に存在し、遺伝子の転写を制御する核内受容体であると考えられている。これまでに我々は、ビスフェノールAは核内受容体の一つであるエストロゲン受容体のみならず、エストロゲン関連受容体 型とも結合することを見出した。本研究では、ビスフェノールA悪影響の分子機構の解明を目指し、エストロゲン受容体とビスフェノールAの構造活性相関解析研究や、代謝に注目し膵臓におけるエストロゲン関連受容体 型の生理作用を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代社会においては、さまざまな化学物質が環境中に放出されている。これらの環境化学物質の安全性の評価は、社会・国民の健康生活にきわめて重要である。現在、有害環境化学物質ビスフェノールAが示す、ごく微量の暴露で悪影響をおよぼす低用量効果は、未解明の課題となっている。本研究では、この解明の端緒として、ビスフェノールAが結合する複数の核内受容体が存在することに注目し、有意義な研究成果を得た。

研究成果の概要（英文）：Bisphenol A is a raw material of polycarbonate and epoxy resins. This chemical is also known as a harmful environmental chemical, which shows adverse effects even at low doses. The target molecules of environmental chemicals are thought to be nuclear receptors that control gene transcriptions. We have found that bisphenol A bound not only to estrogen receptors but also estrogen-related receptor gamma. In this study, we performed the structure-activity relationship study between bisphenol A and estrogen receptors. We also analyzed the function of estrogen-related receptor gamma in the pancreas, aiming to reveal its effects on metabolism.

研究分野：生物化学, リスクサイエンス

キーワード：エネルギー代謝 活性発現の分子機構 人体有害物質 生物活性分子 内分泌かく乱物質 微量化学物質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

プラスチック原料であるビスフェノールA (BPA)は、いわゆる環境ホルモンとして知られる有害環境化学物質である。これらには、主にマウスやラットなどを用いた動物実験により、低用量での胎児・乳幼児の脳神経系へ悪影響が懸念されている。そのために、アメリカ国家毒性プログラム (NTP) は、2008年に、低用量BPAが示す受容体を介したシグナル毒性として、胎児や乳幼児等の神経や行動に悪影響を及ぼす懸念を報告し、詳しい検討を要請した。国内外において、生体内におけるBPA代謝産物の影響として、このBPAのシグナル毒性が生じる可能性や、BPAが結合するERの組織特異的な発現や機能がないかなどを調べる研究が実施されている。しかし、解決に至らなかった。こうした歴史的な背景を経て、現在では、The Consortium Linking Academic and Regulatory Insights on BPA Toxicity (CLARITY-BPA) programとして、アメリカ国立環境衛生科学研究所 (NIEHS)、NTP、アメリカ食品医薬品局 (FDA) の主導により、包括的なBPAの影響解析が実施されているところである。

このようなBPAに対する安全性を危惧する世界的な潮流により、近年ではBPAの代替として、高機能プラスチックの原料として開発されていたビスフェノールの類縁体、すなわち、新世代ビスフェノールが用いられるようになってきた。しかし、これらについては、核内受容体応答の特性や、受容体を介したシグナル毒性など解析は、あまり進んでいない。いくつかの新世代ビスフェノールのみについては、エストロゲン受容体に対する結合性や活性の試験が行われており、なかにはBPAよりも強い結合活性を示すビスフェノールAFなども報告されている。

2. 研究の目的

我々は、BPAに結合する核内受容体を探索した。その結果、BPAや新世代ビスフェノールが、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) に非常に強く結合することを見出した。そこで、これらが実験動物の脳神経系に与える影響を解析する過程で、世代ビスフェノールを胎仔期暴露して生まれた仔マウスは、比較対照群よりも太る現象に気がついた。これは、BPAが示すエストロゲン様の活性によるものと考えられる。そこで、この解明のために、ホルモン受容体と代謝異常研究の第一人者であるEvans教授と共に、ノックアウトマウスを用いた国際共同研究を行う。本国際共同研究は、生殖系や脳神経系の悪影響が注目される有害環境化学物質研究において、代謝異常に関する世界的な新展開を導くことを目的とする。

3. 研究の方法

まず、共同研究者のEvans教授の元を訪問し、Evans教授が作製したERR γ をタモキシフェンの投与により時期特異的に自在にノックアウトできる、コンディショナルノックアウトマウス (ERR γ f1/f1) を用いて、タモキシフェンの投与によるERR γ のノックアウトの効率を詳細に解析した。タモキシフェンを200 mg/kg体重となるようにコーンオイルに溶かして5日連続で経口投与し、最終投与日より3日後に、各組織を解剖して摘出し、液体窒素で凍結した。血液、肝臓、膵臓、腎臓、心臓、脳などを摘出した。比較対象のために、タモキシフェンを含有しないでコーンオイルのみを投与したマウスの実験も行った。これらより、Trizol (Thermo Fisher Scientific社) およびRNeasy Plus Micro Kit (Qiagen社) を用いてRNAを抽出した。得られたRNAを用いて、SYBR Greenを用いた定量PCRにより、各組織におけるERR γ の発現量を評価した。

また、膵臓について、組織構造の詳細を観察した。RNA抽出と同様に、タモキシフェンを200 mg/kg体重となるように5日連続で経口投与し、最終投与日より3日後に、解剖して膵臓を摘出し、ホルムアルデヒドで一晩固定した。その後、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色およびトリクロム染色により細胞や組織構造の詳細を観察した。

国内においては、新世代ビスフェノールを胎仔期に投与して出生した仔マウスについて、餌の摂取量や活動量などの行動観察実験を行った。活動量の評価には、赤外線センサー付きの飼育ケージを用いて離乳後の仔マウスの活動量を測定した。

4. 研究成果

消化管では様々な消化酵素が分泌され、食物が消化される。膵臓は、糖代謝に必要なインスリン、グルカゴン、ソマスタチンなどを分泌しており、糖尿病とも関わりが深い。まず初めに、ERR γ ノックアウトマウスにおける各臓器でのERR γ のノックアウト効率を調べた。特に、これまでにERR γ ノックアウトマウスでは、膵臓の大きさが有意に減少し、膵炎様の発症しているという観察結果が得られており、膵臓でのERR γ の発現効率に注目した。しかし、一方で、膵臓はRNAase活性が非常に高い組織であり、ERR γ の発現定量には、高品質なRNAの抽出が必要である。そこで、RNAの安定化のためにRNA later (Thermo Fisher Scientific社)を解剖直後に膵臓に注入するなどの工夫をしてRNAを抽出した。また、今回の実験では、脳は全脳を用いて発現を評価した。また、ERR γ は脂肪分を分解してエネルギー産生を行う褐色脂肪細胞(BAT)や筋肉(soleus, ヒラメ筋)で発現量が高いため、これらの組織についてもERR γ のmRNA発現を定量した。その結果、ERR γ ノックアウトマウスでは、対照群と比べて、確かにERR γ の発現が減少していることが確認された。特に、BATや膵臓では完全にERR γ の発現が抑制されていた。これは、ERR γ ノックアウトマウスでは、膵臓の大きさが有意に減少する現象にも推定された(図1)。

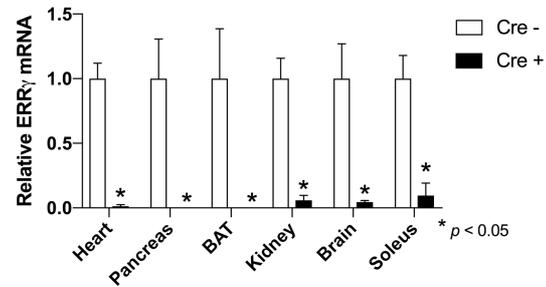


図1 対照群(Cre-)に対するERR γ ノックアウトマウス(Cre+)のERR γ 発現量比

また、ERR γ のノックアウトマウスについて、膵臓に対するヘマトキシリン・エオシン(HE)染色およびトリクロム染色を実施した(図2)。染色の結果、対照群と比較してコラーゲン繊維の増大などが観察され、雌雄共に、膵炎様の症状を発現することが確認された。また、ERR γ のノックアウトマウスでは、対照群と比べ、有意に膵臓の大きさが減少する。ERR γ ノックアウトマウスに由来する膵臓オルガノイドを用いた実験についても、その大きさがERR γ のノックアウトに従い減少することが確認された。

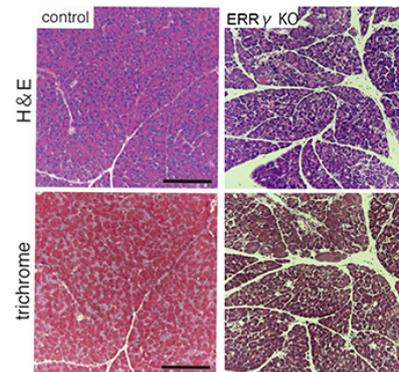


図2 ERR γ ノックアウトマウスのHE染色およびトリクロム染色結果

さらに、妊娠マウスに新世代ビスフェノールを食餌することにより、胎仔期に新世代ビスフェノールに暴露して出生した仔マウスについて、餌の摂取量については対照群と比べ有意な差は見られなかった。さらに、赤外線センサー付きの飼育ケージを用いて長期間にわたり活動量を評価した(図3)が、対照群と比べ有意な差は見られなかった。また、スリーチャンバー試験において、社会性に対する影響を調べたが、対照群と比べ有意な差は見られなかった。一方で、高架式十字路試験においては、新世代ビスフェノール暴露群においては、対照群と比べ不安様行動の増加が観察されるという、大変興味深い結果が得られた。また、脳神経系に発現する遺伝子の発現変動も見られ、脳神経系に対して新世代ビスフェノールの胎仔期暴露が影響することが示された。

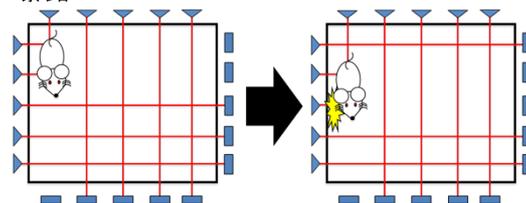


図3 赤外線センサー付き飼育ケージによるマウス活動量試験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tagawa, K., Suyama, K., Kesamaru, H., Masuya, T., Nose, T., Matsushima, A	4. 巻 -
2. 論文標題 Design and synthesis of a universal coactivator peptide binding to the estrogen receptor and Nurrl	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptide Science 2020	6. 最初と最後の頁 123-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Liu Xiaohui, Sakai Hiroki, Nishigori Mitsuhiro, Suyama Keitaro, Nawaji Tasuku, Ikeda Shin, Nishigouchi Makoto, Okada Hiroyuki, Matsushima Ayami, Nose Takeru, Shimohigashi Miki, Shimohigashi Yasuyuki	4. 巻 377
2. 論文標題 Receptor-binding affinities of bisphenol A and its next-generation analogs for human nuclear receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114610 ~ 114610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2019.114610	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 Iwamoto Masaki, Masuya Takahiro, Hosose Mari, Tagawa Koki, Ishibashi Tomoka, Suyama Keitaro, Nose Takeru, Yoshihara Eiji, Downes Michael, Evans Ronald M., Matsushima Ayami	4. 巻 297
2. 論文標題 Bisphenol A derivatives act as novel coactivator-binding inhibitors for estrogen receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101173 ~ 101173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101173	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩本雅輝、巢山慶太郎、野瀬健、松島綾美
2. 発表標題 ビスフェノール構造に基づくエストロゲン受容体の新規アンタゴニストの系統的合成
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松島綾美
2. 発表標題 有害環境化学物質から新発見されたエストロゲン受容体の活性化剤と阻害剤
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩本雅輝、巢山慶太郎、野瀬健、松島綾美
2. 発表標題 三環系ビスフェノールを母体としたエストロゲン受容体アンタゴニストの設計合成
3. 学会等名 令和2年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 多田悠亮
2. 発表標題 マウスを用いた新世代ビスフェノールの影響解析
3. 学会等名 第18回泉屋コロキウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉曉輝、酒井大樹、錦織充広、巢山慶太郎、縄司奨、池田伸、西垣内誠、岡田浩幸、松島綾美、野瀬健、下東美樹、下東康幸
2. 発表標題 新世代ビスフェノールのヒト核内受容体に対する結合活性
3. 学会等名 第 92 回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本雅輝、巢山慶太郎、野瀬 健、松島綾美
2. 発表標題 有害環境化学物質ビスフェノールC構造に基づく新規なエストロゲン受容体阻害剤
3. 学会等名 令和3年度日本生化学会 九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本雅輝、枘屋宇洋、細瀬摩利、石橋知佳、松島綾美
2. 発表標題 新世代ビスフェノールはER のコアクチベータ結合阻害剤として働く
3. 学会等名 環境ホルモン学会 第19回研究発表会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学理学研究院化学部門構造機能生化学研究室ホームページ
<http://lsfb.scc.kyushu-u.ac.jp>

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	エヴァンス ロナルド	ソーク研究所・Gene Expression Laboratory・Professor	
	(Evans Ronald)		

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			
米国	ソーク研究所			