

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310046

研究課題名(和文) 環境化学物質の複合影響による細胞ストレス保護システムの異常と疾患との関連性の検証

研究課題名(英文) Verification of relationships between dysfunction of the cell stress-protection system by exposures to multiple environmental chemicals and diseases

研究代表者

田淵 圭章 (Tabuchi, Yoshiaki)

富山大学・研究推進機構 研究推進総合支援センター・教授

研究者番号：20322109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：不死化口腔上皮細胞を用いて、小胞体ストレスを伴うフッ化ナトリウムで誘導される細胞死に關与する遺伝子や遺伝子ネットワークを明らかにした。マウスを用いた動物実験において、ネオニコチノイド系殺虫剤クロチアニジンの行動または生殖に対する毒性作用は環境ストレスを負荷したときにより深刻化した。この成績は、複合汚染の中で生きる我々の社会の実情を映し出しているのかもしれない。今回得られた成績は、哺乳動物において環境化学物質の複合影響の分子メカニズムを理解するための基礎データになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using immortalized oral epithelial cells, we have identified genes and gene networks involved in sodium fluoride-elicited cell death accompanying endoplasmic reticulum stress. In a mouse experimental model, the behavioral and reproductive effects of clothianidine, a neonicotinoid pesticide, became serious in combination with environmental stress, which may reflect our actual situation of multiple exposure. These findings obtained here will provide a basis for understanding the molecular mechanisms of combined influences by exposures to multiple environmental chemicals in mammals.

研究分野：細胞生理学

キーワード：内分泌かく乱物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、地球環境中には多種多様な環境化学物質が排泄され、ヒトを含む地球上の生物に多大な影響をおよぼしている。従って、環境化学物質の生体への影響を評価するには、化学物質の単独の作用ではなく、複数の作用(複合影響)を評価する必要がある。

(2) 環境化学物質の生体への影響を考えると、明らかに毒性がある物質と毒性試験で問題とならないような低濃度で生殖器、内分泌、免疫等に影響を与える内分泌かく乱物質とに分けられる。前者は、臓器や組織といった受容体以外の標的に作用し機能異常等を引き起こす。後者は、受容体に作用しシグナル異常を誘導する。外界からの様々なストレスに対して、細胞はストレス保護システムを備えている。構造異常のタンパク質の監視センサーである小胞体 (ER) ストレス、また、細胞内大規模分解とリサイクルシステムであるオートファジーは、互いに密接に連携し、ストレス保護システムの中で非常に重要な役割を担っている。このシステムが正常に機能すると細胞の生存、システムの異常は細胞死を誘導し、生体の恒常性維持に必要不可欠である。

(3) 環境化学物質の複合影響は、ターゲットが同じであれば、相加、相乗と相殺作用になると考えられる。しかしながら、ターゲットが異なる複数の環境化学物質をどのような方法で評価するのが良いのか、結論には至っていない。そこで、今回、研究代表者らは環境化学物質の複合影響評価にこのストレス保護システムが有用であるという仮説を立てた。さらに、非常に興味深いことに、このストレス保護システム異常が糖尿病、肥満、骨疾患等の疾患に関与することが報告されている (Meijer & Codogno: *Crit Rev Clin Lab Sci* 46, 210-, 2009; Hotamisligil: *Cell* 140, 900-, 2010; Fujitani *et al.*: *Am J Physiol Cell Physiol* 299, C1-, 2010; Tohmonda *et al.*: *EMBO Rep* 12, 451-, 2011, 他)。

2. 研究の目的

本研究では、このストレス保護システムに注目し、環境化学物質の複合影響をストレス応答として包括的に捉え、ER ストレスやオートファジーが環境化学物質の複合影響の有用なバイオマーカーとなるか否かを細胞レベルで精査する。さらに、正常動物やストレス保護システムの異常が関与する病体モデルでその複合影響を検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養系 種々の株化された培養細胞を用いた。

(2) 網羅的遺伝子発現解析 トータル RNA

を用いて、アフィメトリクス社のジーンチップシステムにより、発現する遺伝子を検出した。得られたデータは、バイオインフォマティクスに関連するソフトウェアを用いて解析した。

(3) 動物を用いた実験 C57BL/6N マウスを用いた。ダイオキシン (TCDD) はゴマ油に溶解し、妊娠マウスに経口投与した。ネオニコチノイド系農薬クロチアニジン (CTD) は経口補水ゲルに添加してマウスに与えた。慢性予測不能ストレス負荷は、以下のストレスを無作為に4週間負荷した。強制水泳(常温, 5分間/日), 孤立(24時間), 明暗周期の変更(24時間), ケージの振盪(30分/日), 群れの変更(24時間), 床敷きを濡らす(24時間)。新規の細胞モデルを構築する時、温度感受性 SV40 大型 T 抗原遺伝子導入トランスジェニックラットを用いた。

4. 研究成果

(1) 口腔上皮細胞に対するフッ化ナトリウムの作用 フッ化ナトリウム (NaF) やフッ素化合物は虫歯予防、工業材料等、幅広く使用されているが毒性作用もある。最初に、温度感受性 SV40 大型 T 抗原遺伝子導入トランスジェニックラットを用いて、口腔上皮細胞モデルの構築を試みた。その結果、サイトケラチン 4 (Krt4) や Krt13 を発現する不死化非角化重層扁平上皮細胞モデル ROE2 の構築に成功した。このモデルは口腔上皮の生理学、薬理学、毒性学等の研究に有用であると考えられる(雑誌論文番号)。ROE2 細胞モデルにおいて、比較的高濃度の NaF (2-4 mM) は濃度依存的に細胞生存率や細胞のタンパク質含有量を低下させ、ミトコンドリアの膜電

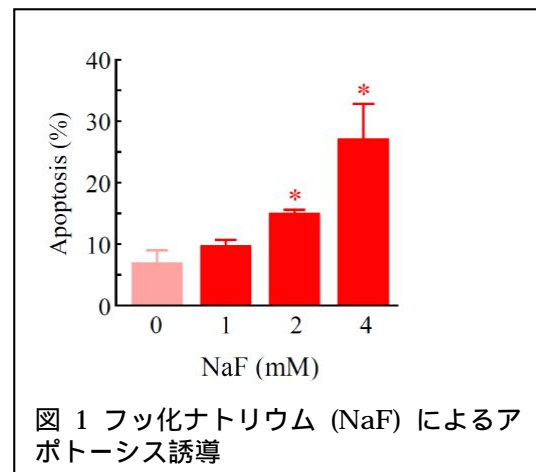


図 1 フッ化ナトリウム (NaF) によるアポトーシス誘導

位の低下を伴うアポトーシスを誘導した(図1)。

網羅的な遺伝子発現解析技術を用いて、このアポトーシス誘導に関連する遺伝子を調べた結果、Hspa5 (heat shock protein 5) や Ddit3 (DNA damage inducible transcript 3) 等の ER ストレスに関連する数多くの遺伝子

の発現が上昇することを見出した。さらに、NaF の細胞死に關与する Hspa5 または Ddit3 を含む遺伝子ネットワークを明らかにした。Hspa5 または Ddit3 をノックダウンした時、NaF による細胞生存率の低下が各々増加または減少したので、Hspa5 は保護的に、反対に Ddit3 は促進的に本化合物による細胞死に關与していると結論できた (雑誌論文番号)。

(2) 培養細胞における環境化学物質の複合影響 我々は、これまでに合成樹脂の原料として使用されているビスフェノール A (BPA) が細胞内の Ca^{2+} 濃度をかく乱し ER ストレスを誘導することを報告している (Tabuchi *et al.*: *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1044-, 2006, 他)。口腔上皮細胞モデルにおいて、NaF と BPA は各々単独で ER ストレスを伴う細胞死を誘導した。ミトコンドリアの脱水素酵素活性を用いた細胞死や Hspa5 と Ddit3 の発現を指標にして、これらの化合物の複合影響を観察したところ、相乗的な作用ではなく、少なくとも相加的な影響であることが示された (投稿準備中)。次に、ER ストレスに關連する転写因子 ATF6 の応答配列を含むルシフェラーゼ遺伝子を細胞に導入し、より高感度な ER ストレス評価系を構築した。既知の典型的な ER ストレス誘導薬であるツニカマイシンやサブシガルギンは、このアッセイ系で鋭敏に応答することを確認した。一方、予想に反して、NaF や BPA のこの系による応答は低レベルであった。他の ER ストレスに關与する遺伝子の応答配列を利用して、今後、環境化学物質の鋭敏な ER ストレス評価系を構築したいと考えている。

(3) 動物モデルに対する環境化学物質の作用 廃棄物の焼却の処理の過程等で発生するダイオキシン類は生物に様々な悪影響を及ぼす。その中でも効果が強いダイオキシン TCDD の妊娠マウスへの投与は、高用量 5000 ng/kg で胎児マウスの歯状回の神経細胞数を有意に減少させた。さらに、低用量 20 ng/kg から海馬の細胞増殖活性を低下させることが判った (雑誌論文番号)。また、200 ng/kg

の TCDD 投与により胎児マウス脳のドーパミン合成に關与するチロシン水酸化酵素の発現量をダイオキシンのアリルカーボン受容体 AhR を介して上昇させることを明らかにした (雑誌論文番号)。

ネオニコチノイド系殺虫剤クロチアニジン (CTD) は近年使用量が増加し、環境への影響が懸念されている (雑誌論文番号)。マウスへの CTD (10-250 mg/kg/day) の投与は、不安様行動を有意に増加させた。また、動物へ慢性予測不能ストレスの負荷により、明らかにマウスの不安様行動が亢進した。このストレス負荷と CTD との併用は、さらに不安様行動を亢進させることが示された (図 2)。精巢の組織化学的な解析から、ストレス負荷マウスにおいて、精巢細胞の減数分裂異常が觀察された。また、本化合物の併用により、精巢上皮の空胞化、抗酸化酵素の減少が認められた。これらの成績は、複合汚染の中で生きる我々の社会の実情を映し出しているのかもしれない (雑誌論文番号)。今回得られた成績は、哺乳動物において環境化学物質の複合影響の分子メカニズムを理解するための基礎データになると考えられる。また、様々な複合影響を動物モデルで評価することが今後の課題である。

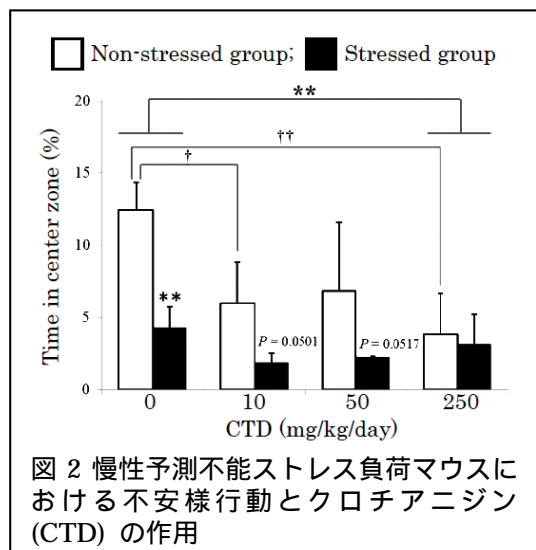
(4) 本課題に關連する研究成果 細胞に熱を負荷すると ER ストレスが誘導されて、細胞死が抑制される。4 種類のヒト繊維芽細胞を用いて、熱によって誘導される ER ストレスに關連する遺伝子を明らかにした (雑誌論文番号)。ポリ塩化ビフェニル PCB は絶縁体など様々な分野で用いられているが非常に毒性が強い。淡水魚の金魚において、PCB (118) が破骨細胞を活性化し骨の吸収を促進することを明らかにした (雑誌論文番号)。海水魚のメジナのウロコにおいて、メチル水銀と無機水銀は、ともに骨芽細胞と破骨細胞に毒性作用があり、メチル水銀の方がその作用が強く、また、短時間の培養で骨芽細胞よりも破骨細胞に影響を与えることが判った (雑誌論文番号)。海洋生物ウニにおいて、水酸化多環芳香族炭化水素がウニ胚の骨片形成を抑制することを明らかにした (雑誌論文番号)。

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 10 件)

Kobayashi Y, Hirano T, Omotehara T, Hashimoto R, Umemura Y, Yuasa H, Masuda N, Kubota N, Minami K, Yanai S, Ishihara-Sugano M, Mantani Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Hoshi N. Immunohistochemical analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) toxicity on the developmental



dentate gyrus and hippocampal fimbria in fetal mice. *J Vet Med Sci.* 2015, Vol. 77, No. 11, pp. 1355-1361. (査読有) doi: 10.1292/jvms.15-0238.

Hirano T, Yanai S, Omotehara T, Hashimoto R, Umemura Y, Kubota N, Minami K, Nagahara D, Matsuo E, Aihara Y, Shinohara R, Furuyashiki T, Mantani Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Hoshi N. The combined effect of clothianidin and environmental stress on the behavioral and reproductive function in male mice. *J Vet Med Sci.* 2015, Vol. 77, No. 10, pp. 1207-1215. (査読有) doi: 10.1292/jvms.15-0188.

Suzuki N, Ogiso S, Yachiguchi K, Kawabe K, Makino F, Toriba A, Kiyomoto M, Sekiguchi T, Tabuchi Y, Kondo T, Kitamura K, Hong CS, Srivastav AK, Oshima Y, Hattori A, Hayakawa K. Monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons influence spicule formation in the early development of sea urchins (*Hemacentrotus pulcherrimus*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2015, Vol. 171, pp. 55-60. (査読有) doi: 10.1016/j.cbpc.2015.02.004.

Tabuchi Y, Yunoki T, Hoshi N, Suzuki N, Kondo T. Genes and gene networks involved in sodium fluoride-elicited cell death accompanying endoplasmic reticulum stress in oral epithelial cells. *Int J Mol Sci.* 2014, Vol. 15, No. 5, pp. 8959-8978. (査読有) doi: 10.3390/ijms15058959.

Hoshi N, Hirano T, Omotehara T, Tokumoto J, Umemura Y, Mantani Y, Tanida T, Warita K, Tabuchi Y, Yokoyama T, Kitagawa H. Insight into the mechanism of reproductive dysfunction caused by neonicotinoid pesticides. *Biol Pharm Bull.* 2014, Vol. 37, No. 9, pp. 1439-1443. (査読有) doi: <http://doi.org/10.1248/bpb.b14-00359>.

Yachiguchi K, Sekiguchi T, Nakano M, Hattori A, Yamamoto M, Kitamura K, Maeda M, Tabuchi Y, Kondo T, Kamauchi H, Nakabayashi H, Srivastav AK, Hayakawa K, Sakamoto T, Suzuki N. Effects of inorganic mercury and methylmercury on osteoclasts and osteoblasts in the scales of the marine teleost as a model system of bone. *Zoolog Sci.* 2014, Vol. 31, No. 5, pp. 330-337. (査読有) doi: 10.2108/zs130265.

Yachiguchi K, Matsumoto N, Haga Y, Suzuki M, Matsumura C, Tsurukawa M, Okuno T, Nakano T, Kawabe K,

Kitamura K, Toriba A, Hayakawa K, Chowdhury VS, Endo M, Chiba A, Sekiguchi T, Nakano M, Tabuchi Y, Kondo T, Wada S, Mishima H, Hattori A, Suzuki N. Polychlorinated biphenyl (118) activates osteoclasts and induces bone resorption in goldfish. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2014, Vol. 21, No. 10, pp. 6365-6372. (査読有) doi: 10.1007/s11356-012-1347-5.

Tanida T, Tasaka K, Akahoshi E, Ishihara-Sugano M, Saito M, Kawata S, Danjo M, Tokumoto J, Mantani Y, Nagahara D, Tabuchi Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Kawata M, Hoshi N. Fetal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin transactivates aryl hydrocarbon receptor-responsive element III in the tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons of the mouse midbrain. *J Appl Toxicol.* 2014, Vol. 34, No. 2, pp. 117-126. (査読有) doi: 10.1002/jat.2839.

Tabuchi Y, Wada S, Ikegame M, Kariya A, Furusawa Y, Hoshi N, Yunoki T, Suzuki N, Takasaki I, Kondo T, Suzuki Y. Development of oral epithelial cell line ROE2 with differentiation potential from transgenic rats harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Exp Anim.* 2014, Vol. 63, No. 1, pp. 31-44. (査読有) doi: <http://doi.org/10.1538/expanim.63.31>.

Tabuchi Y, Furusawa Y, Kariya A, Wada S, Ohtsuka K, Kondo T. Common gene expression patterns responsive to mild temperature hyperthermia in normal human fibroblastic cells. *Int J Hyperthermia.* 2013, Vol. 29, No. 1, pp. 38-50. (査読有) doi: 10.3109/02656736.2012.753163.

[学会発表](計4件)

Tabuchi Y, Furusawa Y, Kariya A, Wada S, Ohtsuka K, Kondo T. Identification of genes responsive to mild hyperthermia in normal human fibroblastic cells. The 11th Int. Congress of Hyperthermic Oncol. & The 29th Jpn. Congress of Thermal Med., 2012, 8, 28-31, Kyoto, Japan.

谷内口孝治, 関口俊男, 羽賀雄紀, 松村千里, 鶴川正寛, 中野武, 北村敬一郎, 鳥羽陽, 早川和一, 近藤隆, 田淵圭章, 和田重人, 遠藤雅人, 服部淳彦, 鈴木信雄. ポリ塩化ビフェニル PCB-118 は魚の骨代謝を攪乱する. 日本動物学会第84回大会, 2013, 9, 26-28, 岡山県・岡山市.

谷内口孝治, 関口俊男, 中野真樹, 服部淳彦, 山元 恵, 田淵圭章, 近藤 隆, 北村敬一郎, 早川和一, 鈴木信雄. メジナのウロコを用いた評価系の開発と水銀の破骨・骨芽細胞に対する作用. 平成26年度日本水産学会秋季大会, 2014, 9, 19-22, 福岡県・福岡市.

平野哲史, 柳井翔吾, 表原拓也, 高田 匡, 米田直起, 梅村ゆりあ, 久保田直人, 南貴一, 広川千英, 山本 杏, 万谷洋平, 横山俊史, 北川 浩, 星 信彦. 環境ストレス下においてネオニコチノイド系農薬クロチアニジンが与える神経行動学的影響. 環境ホルモン学会第18回研究発表会, 2015, 12, 10-11, 栃木県・下野市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: 生命科学先端研究ユニット

<http://www.lsrc.u-toyama.ac.jp/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田淵 圭章 (TABUCHI, Yoshiaki)

富山大学・研究推進機構 研究推進支援センター・教授

研究者番号: 20322109

(2)研究分担者

星 信彦 (HOSHI, Nobuhiko)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号: 10209223

近藤 隆 (KONDO, Takashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号: 40143937

(3)連携研究者

なし