

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：37102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01883

研究課題名(和文) 内分泌かく乱作用の評価のための細胞内エストロゲンシグナルクロストーク機構の解明

研究課題名(英文) Study on the crosstalk involving intracellular estrogen signaling for the evaluation of endocrine disruptors

研究代表者

木山 亮一 (KIYAMA, Ryoiti)

九州産業大学・生命科学部・教授

研究者番号：00240739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エストロゲン様化学物質の解析を通して細胞増殖などの細胞機能と脳の性分化などに関わるシグナルクロストーク機構を明らかにすることを目標にし、(1)シグナルクロストーク機構の解析、(2)シグナルクロストーク機構の検証、(3)脳の性分化におけるシグナルカスケードの解析、(4)天然及び合成化合物を用いたシグナルクロストーク機構の検証、の4つの項目について研究を実施した。成果として、内分泌かく乱作用に関わるシグナルクロストークに関するカスケードとシグナル伝達タンパク質に関する情報を得ることができ、さらに天然物の解析を行うことで本研究の成果を創薬や食品などで利用するための基盤が構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、学術的な成果として、細胞レベルで内分泌かく乱作用に関わるエストロゲンシグナルクロストークに関するシグナル伝達カスケードとそれに関わるタンパク質に関する情報を得ることができた。さらに、脳の性分化に関わるクロストークについて解析を行うことで、生体レベルにおける情報も得ることができた。さらに、刺激とする化合物としてエストロゲン様の活性を有する天然物や合成化合物を用いることで、エストロゲンとは異なるシグナル伝達経路やメカニズムについて情報を得た。したがって、創薬や健康食品などの製品化に役立つ基盤を作ることができ、単に学術的な成果だけでなく、社会的にも有用な情報を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to unravel the mechanism of estrogenic signal crosstalk in various cell functions, such as cell proliferation and sexual differentiation in the brain, by examining the effects of the chemicals with estrogenic activity, through the following researches: (1) hypothesizing the mechanism of signal crosstalk, (2) examining the hypothetical signal crosstalk at the cellular level, (3) examining the hypothetical signal crosstalk in the brain, and (4) examining the hypothetical signal crosstalk with natural and synthetic chemicals. The study revealed new signaling proteins and networks, which would be useful for the evaluation of endocrine disruptors and further studies to produce new drugs and health supplements.

研究分野：高等動物の分子生物学

キーワード：内分泌かく乱物質 シグナル伝達 バイオテクノロジー 遺伝子発現 天然化合物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エストロゲンは女性ホルモンとも呼ばれ、性分化、妊娠、性行動などにおいて重要な生理的役割を担っている。近年、工業製品として様々なエストロゲン活性を有する化学物質が合成され、その一部はエストロゲン活性を有したまま環境に残留することで内分泌かく乱作用を示すことが問題になっている。一方で、イソフラボンなどの植物エストロゲンは有効な生理活性物質として健康食品やサプリメントとして利用されている。したがって、エストロゲンの作用を分子レベルで解析することは、内分泌かく乱作用の解明だけでなく、医療や創薬、食品など様々な応用の分野にとっても重要である。

我々はこれまでエストロゲン受容体に関わるシグナル伝達経路に関して研究を進めてきた。エストロゲン受容体は核内受容体として様々な遺伝子(以下、エストロゲン応答遺伝子)の転写を調節しているが、我々は、核内受容体を経由しない、膜経由のエストロゲンのシグナルカスケード(膜受容体経路)について解析を行った(科学研究費補助金・基盤 B,平成 17~19 年度:成果を *Current Pharmacogenomics* 4, 245-260, 2006 にまとめた)。さらに、様々な化学物質(天然試料も含めて)に対する応答を遺伝子の発現レベルにおいてプロファイリングし、エストロゲン応答遺伝子の機能をシグナルカスケードの観点から包括的に解析した(科学研究費補助金・基盤 B,平成 21~23 年度: *Environ. Pollution*, 159, 212-218, 2011 他に発表)。さらに、50 種以上のエストロゲン様化学物質の遺伝子発現プロファイルから新たなエストロゲン様化学物質を見出しサイレントエストロゲンと名付け、シグナルカスケードについて解析した(科学研究費補助金・基盤 B,平成 24~26 年度: *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 2065-2082, 2014、*Environ. Technol. & Innov.* 1-2, 16-28, 2014、及び、*Environ. Int.* 83, 11-40, 2015 に発表した)。

エストロゲン様化学物質は単にエストロゲンに関連する内分泌系に影響を与えるだけでなく、他のホルモンや様々な成長因子(Growth Factor)を介して様々な生理作用にも影響を与えることから、エストロゲンシグナル伝達経路と他のシグナル経路との間にお互いに影響を伝える機構(クロストーク機構)があることが予想されるが、そのメカニズムに関してはまだ十分に解明されていない。本研究では、そのメカニズムの解明を進めたい。

### 2. 研究の目的

我々は、すでにエストロゲンの作用メカニズムとしてゲノミック経路とは異なるシグナルカスケード(ノンゲノミック経路)を明らかにし、さらに、新しいタイプのエストロゲン活性化化合物(サイレントエストロゲン)の同定に成功した。本研究では、その成果をもとに、内分泌かく乱作用を有するエストロゲン様化学物質を対象として、遺伝子発現レベルのプロファイリングや低分子量 G タンパク質を中心にしたシグナル伝達解析を行うことで、細胞増殖や細胞運動などの細胞機能と脳の性分化などに関わるシグナルクロストーク機構を明らかにする。特に、細胞増殖活性を示さないがエストロゲン様の遺伝子発現プロファイルを示す化学物質(サイレントエストロゲン)について選択的エストロゲン受容体モジュレータ(SERM)などのエストロゲン製剤や機能性食品などへの応用の可能性につながる生理作用メカニズムを明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

本研究では、次に示す項目を表示の時系列により進める。

#### (1) 遺伝子発現プロファイル解析によるシグナルクロストーク機構の解析(平成 29~30 年度)

我々は、すでにフェノール系化合物など 50 種類以上の化学物質について遺伝子応答プロファイルの解析を行い、細胞増殖や細胞内輸送などの遺伝子機能との関係について情報を得た(*Cell. Mol. Life Sci.* 71, 2065-2082, 2014)。これらに關与するシグナルカスケードとして、ゲノミック及びノンゲノミック経路、GPR30 経由の膜共役系、Ras、MAPK、AP-1 などを經由する転写活性化経路などを明らかにした。また、食用キノコであるアガリクスの抽出物から、乳がん由来の MCF-7 細胞の増殖は活性化しないがエストロゲンと似た遺伝子発現プロファイルを示すサイレントエストロゲンとしてプレフェルディン A を単離した(*J. Agri. Food Chem.* 61, 128-136, 2013)。プレフェルディン A はゴルジ輸送の阻害剤であり、低分子量 G タンパク質の Arf タンパク質に結合してその機能を阻害する。本項目では、エストロゲンシグナル伝達経路とプレフェルディン A による低分子量 G タンパク質が關与するカスケードとのクロストークを検証する。

#### (2) 細胞機能をもとにしたシグナルクロストーク機構の検証(平成 29~30 年度)

(1) 項で検討したクロストーク機構に関して、すでに我々が明らかにした細胞運動のカスケードとの共通性や相違点を検証し、また、シグナル伝達阻害剤を用いることで、クロストーク機構に關与するタンパク質や細胞機能について明らかにする。細胞機能に關与する低分子量 G タンパク質は大きく分けて、細胞増殖(Ras など)、細胞運動(Rho など)、細胞内輸送(Arf など)、核輸送(Ran など)の機能に分けられる。これらの機能にはエストロゲンが刺激となる場合があることが知られており、文献検索や(1) 項の遺伝子発現プロファイル解析をもとに得られる候補低分子量 G タンパク質に注目して解析することで、カスケードに關与するタンパク質を絞る。

#### (3) 脳の性分化におけるエストロゲン応答細胞運動関連シグナルカスケードの解析(連携研究者との共同研究:平成 29~31 年度)

我々はすでに、ラットの脳のエストロゲン応答に関して、DNA マイクロアレイ法やウエスタン

プロット解析などにより機能解析を行い、細胞運動に関係するエストロゲン応答遺伝子(タンパク質)に関してラット脳(特に脳下垂体視床下部)の性分化との関連について、組織における局在とその日齢変動をもとに解析した(Biochem. Biophys. Res. Comm. 434, 287-292, 2013)。本研究では、(1)項でも解析する Rho や Rac1 などの細胞移動関連低分子量 G タンパク質を中心にシグナルカスケードを解析し、脳の分化におけるエストロゲンシグナルクロストーク機構を明らかにしたい。我々はすでに、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質が関与するシグナル伝達解析の実績(J. Cell Biol. 2008; J. Cell Biol. 2009)を有するので、その技術を利用する。

(4)天然及び合成化合物を用いたシグナルクロストーク機構の検証(連携研究者との共同研究:平成29~31年度)

(1)~(3)で得られたシグナルカスケードに関する情報をさらに複雑な刺激(特に複数の刺激が同時に起る場合)の解析に対して応用が可能かについて合成化合物を用いて検討する。天然試料については、我々はすでに、漢方薬の効能の探索に利用できるような遺伝子発現プロファイルの取得を行ってきた(Trends Food Sci. Tech. 54, 186-196, 2016に一部をまとめた)。また、合成化合物に関しては、50種類以上の単体化合物だけでなく、重油の分解産物の解析も行い、環境評価への応用に関して実績を有する(Environ. Pollution 168, 10-14, 2012)。本研究では、九州産業大学から提供された天然及び合成化合物誘導体についてカスケード情報を得て、(1)及び(2)項で得られた化学物質によるシグナルクロストーク機構と細胞機能との関係を理解する。ここで得た情報は、創薬ターゲットの探索や健康食品開発などへの展開にとって重要になると考えられる。

#### 4. 研究成果

本研究では、エストロゲン様化学物質の解析を通して細胞増殖などの細胞機能と脳の性分化などに関わるシグナルクロストーク機構を明らかにすることを目標にし、(1)シグナルクロストーク機構の解析、(2)シグナルクロストーク機構の検証、(3)脳の性分化におけるシグナルカスケードの解析、(4)天然及び合成化合物を用いたシグナルクロストーク機構の検証、の4つの項目について研究を実施した。以下に詳細をまとめる。

まず、(1)項ではエストロゲン活性を有する化学物質に関してエストロゲンシグナル伝達経路と他のタンパク質が関与するカスケードとのクロストークに関して解析を行った。化学物質の選択は、すでに生理活性を示す天然物の成分から選択し、それぞれ、漢方薬成分(Am. J. Chin. Med., 2017)、緑茶成分(Trends Food Sci. Tech., 2020)、コーヒー成分(Nutrients, 2019)、ショウガ成分(論文投稿中)、大豆発酵物成分(学会発表)や食品成分として広く知られているリグナン(PLoS ONE, 2017)、カプサイシン(Environ. Technol. Innov., 2017)、テルペン類(Eur. J. Pharmacol., 2017)について解析を行い、論文発表及び学会発表として発表した(「5. 主な発表論文等」項参照)。

次に、(2)項では、(1)の結果をもとにそれぞれに有効成分として含まれる化合物を用いて細胞に対して刺激をしてクロストークに関わる受容体やシグナル伝達タンパク質について解析を行った。具体的には、エストロゲンのラピッドシグナル伝達及び多くの受容体シグナル伝達の下流に位置するErk1/2やAktタンパク質と、細胞増殖に関わるサイクリンやCdkタンパク質に注目して、化合物の影響を解析した。また、遺伝子発現レベルの解析には、これまでのDNAチップ法に替えてRNA-Seq法を利用して新たな細胞機能解析を開始した。これにより、今後の研究につながる成果を得ることができた。得られた成果は上に示したように論文発表や学会発表として公表した。

さらに、(3)項では生体レベルにおけるクロストークについて解析を行った。得られた成果は発表準備中である。

最後に、(4)項において、天然物の抽出物や天然物由来の化合物について解析を行うことで、エストロゲンシグナルクロストーク機構の検証を行うとともに、本研究の成果を細胞増殖能のないエストロゲン製剤の開発に利用するための基本的な情報を得ることができた。成果は上記のように論文や学会発表として公表したが、さらに、医薬品や健康食品への利用を考え、論文発表(Sci. Rep., 2018)とともに特許申請とプレス発表も行った(「5. 主な発表論文等」項参照)したが、創薬や食品などで利用するための基盤を作ることができた。

以上の研究の成果として、シグナルクロストークに関わるカスケードとシグナル伝達タンパク質に関する情報を得ることができ、さらに、ハナビラタケ、緑茶、ショウガ、大豆発酵物などの天然物の解析を行うことで、本研究の成果を創薬や食品などで利用するための基盤が構築できた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 9件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kiyama Ryoiti, Furutani Yoshiyuki, Kawaguchi Kayoko, Nakanishi Toshio	4. 巻 8
2. 論文標題 Genome sequence of the cauliflower mushroom <i>Sparassis crispa</i> (Hanabiratake) and its association with beneficial usage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34415-6	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
1. 著者名 Kiyama Ryoiti	4. 巻 815
2. 論文標題 Estrogenic terpenes and terpenoids: Pathways, functions and applications	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 405-415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2017.09.049	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 Kiyama Ryoiti	4. 巻 45
2. 論文標題 Estrogenic Potentials of Traditional Chinese Medicine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The American Journal of Chinese Medicine	6. 最初と最後の頁 1365 ~ 1399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1142/S0192415X17500756	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 Kiyama Ryoiti	4. 巻 6
2. 論文標題 DNA Microarray Based Screening and Characterization of Traditional Chinese Medicine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microarrays	6. 最初と最後の頁 4 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microarrays6010004	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

1. 著者名 Suzuki Jun-ichiro, Roy Badal Chandra, Ogaeri Takunori, Kakinuma Naoto, Kiyama Ryoiti	4. 巻 353
2. 論文標題 Depletion of tumor suppressor Kank1 induces centrosomal amplification via hyperactivation of RhoA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 79 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2017.03.006	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 Zhu Yun, Kiyama Ryoiti	4. 巻 7
2. 論文標題 Capsaicinoids are silent estrogens, a class of estrogenic chemicals without cell-proliferation activity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Environmental Technology & Innovation	6. 最初と最後の頁 182 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eti.2017.02.006	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 Zhu Yun, Kawaguchi Kayoko, Kiyama Ryoiti	4. 巻 12
2. 論文標題 Differential and directional estrogenic signaling pathways induced by enterolignans and their precursors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0171390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0171390	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

1. 著者名 Kiyama Ryoiti	4. 巻 11
2. 論文標題 Estrogenic Activity of Coffee Constituents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1401 ~ 1401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu11061401	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

1. 著者名 Kiyama Ryoiti	4. 巻 95
2. 論文標題 Estrogenic biological activity and underlying molecular mechanisms of green tea constituents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Food Science & Technology	6. 最初と最後の頁 247 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tifs.2019.11.014	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

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 古谷喜幸、川口佳代子、米山誠、田中真弘、中西敏雄、木山亮一
2. 発表標題 ハナビラタケ ( <i>Sparassis crispa</i> ) の全ゲノム解析とエストロゲン様物質の評価
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 付文強、西健太郎、磯部信一郎、木山亮一
2. 発表標題 ショウガ抽出物のエストロゲン活性の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村浩佑、付文強、木山亮一
2. 発表標題 八女茶の有効成分の探索：乳がん細胞を用いたエストロゲン活性の評価
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西健太郎、付文強、松岡洋平、矢住京、水城圭司、青柳貞一郎、磯部信一郎、木山亮一
2. 発表標題 新規蛍光色素Fluolidを用いた蛍光免疫検出法の開発
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川口佳代子、古谷喜幸、米山誠、田中真弘、中西敏雄、木山亮一
2. 発表標題 ハナヒラタケ ( <i>Sparassis crispa</i> ) 有効成分の探索と利用：エストロゲン様活性の解析と評価
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kiyama, R.
2. 発表標題 Estrogenic actions of endocrine disruptors.
3. 学会等名 The 11th International Symposium on Environmental Geochemistry (ISEG 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西健太郎、付文強、磯部信一郎、木山亮一
2. 発表標題 ショウガ抽出物を用いたエストロゲンシグナル伝達経路の探索と遺伝子発現解析によるエストロゲン応答メカニズムの解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村浩佑、西健太郎、木山亮一
2. 発表標題 MCF-7細胞を用いた八女茶のエストロゲン活性評価
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西健太郎、竹本拓矢、伊賀和宏、木山亮一
2. 発表標題 発酵させた豆乳の抽出物を用いたエストロゲン応答メカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丹羽優月、西健太郎、付文強、磯部信一郎、木山亮一
2. 発表標題 ショウガに含まれる化合物のエストロゲン活性評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 木山亮一，新聞陽一（分担）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 17
3. 書名 新版 阻害剤活性化剤ハンドブック	

1. 著者名 木山亮一	4. 発行年 2017年
2. 出版社 九州産業大学工学会	5. 総ページ数 2
3. 書名 遺伝子・ゲノム時代の基礎研究と大学教育	

1. 著者名 木山亮一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 一般財団法人 九州産業技術センター	5. 総ページ数 2
3. 書名 KITEC INFORMATION, 2019年SPRING号(289巻), 6-7: 私の研究室: 九州産業大学生命科学部生命科学科生命科学コース 木山亮一教授	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 エストロゲン様化学物質	発明者 木山亮一 他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-506060	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

1. 九州産業大学: NEWS RELEASE「ハナビラタケの全ゲノム解読に世界で初めて成功 -動脈硬化の新たな治療法開発に道を開く-」(2018年10月30日)
---

## 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
連携研究者	佐久間 康夫  (SAKUMA Yasuo)  (70094307)	東京医療学院大学・保健医療学部・教授・学長    (32823)	
連携研究者	木山 裕子  (WADA-KIYAMA Yuko)  (60234390)	日本医科大学・医学系研究科・准教授    (32666)	
連携研究者	磯部 信一郎  (ISOBE Shin-ichiro)  (80435099)	九州産業大学・生命科学部・教授    (37102)	