

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08402

研究課題名(和文) 環境化学物質の毒性指標：エストロゲン受容体ER 誘導とそのスプライスバリエント

研究課題名(英文) Estrogen receptor beta induction and its splice variants as toxicity indicators of environmental chemicals

研究代表者

竹田 修三 (Takeda, Shuso)

広島国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：00460379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン受容体(ER) は4種類のスプライスバリエントからなり、ER 抑制性と非抑制性が存在する。大麻主成分テトラヒドロカンナビノール(THC)がER の発現増加を介してER を抑制することから、THCを含む環境化学物質がER の選択的スプライシング異常の誘発を介してER を抑制する可能性を考え、その証明を目指した。本研究では、特にビスフェノールAの代替品として汎用されるビスフェノールAF (BPAF)に焦点を当て、解析を進めた。その結果、BPAFは曝露濃度に応じてER 1の転写活性化及びER 2発現誘導の両側面からER を抑制的に調節する抗エストロゲンとして機能することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は衛生薬学を志向している。これは「健康体を病気にしないサイエンス」である。氾濫する化学物質の中でも、慢性的に長期間曝露されることで、悪影響がはじめて現れる例があり、代表例として内分泌かく乱物質がある。本研究では、独自に見出した知見を応用し、環境化学物質による女性ホルモン作用かく乱の分子機構をER (エストロゲン受容体)の発現変動に注目して解明することを目指した。得られた知見は、毒性学の観点からモリスク評価系の構築に貢献することが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Estrogens including estradiol utilize estrogen receptors (ERs) / to evoke a number of physiological effects as ligands. Many endocrine-disrupting chemicals (EDCs) have been known to exhibit estrogenic/anti-estrogenic activities, which are, at least in part, mediated by the two ERs. EDCs have been shown to modulate estrogen signaling in two manners: i) a direct/indirect interaction with ERs and ii) the up-/down-regulation of ERs. Bisphenol AF (BPAF) is recognized as one of the replacements for bisphenol A (BPA). Although considerable experimental evidence suggests that BPA is an EDC, the toxicological profile of BPAF has not fully investigated. In this study, we demonstrated that i) BPAF functioned as a stimulator of ER 1 (in addition to ER ), ii) the stimulation of ER 1 by BPAF was abrogated by PHTPP (an ER selective antagonist), and iii) the expression of ER 1 and ER 2 was not modulated by BPAF at nanomolar concentrations.

研究分野：環境毒性学

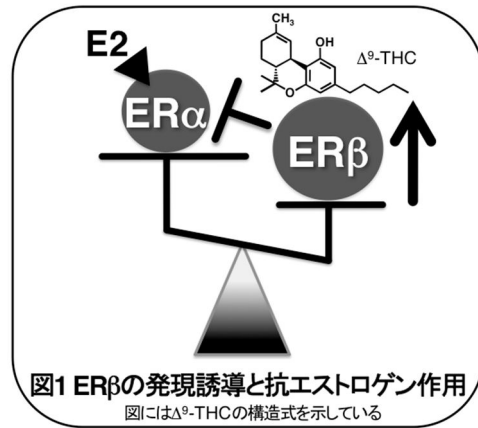
キーワード：エストロゲン受容体 スプライスバリエント 抗エストロゲン作用 毒性指標

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エストロゲン受容体(ER)にはER $\alpha$ とER $\beta$ が存在し、女性ホルモンである17 $\beta$ -エストラジオール(E2)等のリガンド刺激を受けると、エストロゲン応答配列(ERE)に結合することで種々の生理作用を示す。近年、ER $\beta$ の分子構造の全容が明らかになりつつあり、ER $\beta$ には少なくとも4種類のスプライスバリエント(ER $\beta$ 1=wild type, ER $\beta$ 2(ERbcx), ER $\beta$ 4及びER $\beta$ 5)が存在することが示されている(PNAS, 103: 13162, 2006)。機構は不明であるが、ER $\beta$ 1とER $\beta$ 2はER $\alpha$ の活性を抑制することが可能であるが、ER $\beta$ 4とER $\beta$ 5は抑制しない。

1970年代から大麻主成分であるテトラヒドロカンナビノール(THC)による「抗エストロゲン」作用を含めたE2作用に対する修飾現象が報告されていた(Toxicol. Appl. Pharmacol., 34: 513, 1975; Science, 195: 875, 1977ほか)。しかし、THCはER $\alpha$ にリガンドとして作用しないことから、研究は頓挫していた(J. Pharmacol. Exp. Ther., 224: 404, 1983ほか)。我々は、THCはER $\alpha$ に直接作用せず、ER $\beta$ の発現増加を介してER $\alpha$ の活性化を抑制することを明らかにした(Chem. Res. Toxicol., 26: 1073, 2013)



(図1)。ER $\alpha$ 陽性細胞におけるER $\beta$ の発現は極めて低く、これにTHCが加わるとER $\beta$ の顕著な発現誘導が引き起こされ、E2/ER $\alpha$ 活性が抑制された。THCはカンナビノイド受容体に依存しない機構でER $\beta$ の発現誘導を来すことから(Fundam. Toxicol. Sci., 3: 55, 2016)、ER $\beta$ の発現誘導を来す環境化学物質は抗エストロゲン作用を示すことが強く示唆される。

### 2. 研究の目的

これまでにエストロゲンシグナルを指標とした内分泌かく乱研究における*in vitro*評価系として、MCF-7細胞などのER $\alpha$ 陽性細胞を用いたEREレポータージーンアッセイ、酵母two-hybrid法、および表面プラズモン共鳴法などが駆使され、成果が示されている。しかし、環境化学物質の中にはTHCと同様にER $\beta$ の発現を誘導・活性化することでE2/ER $\alpha$ 活性を抑制する抗エストロゲン作用を示すものが存在することが予想される。さらに、ER $\beta$ には4種類のスプライスバリエント(ER $\alpha$ 抑制性のER $\beta$ 1/ER $\beta$ 2、ER $\alpha$ 非抑制性のER $\beta$ 4/ER $\beta$ 5)が存在することから、THCを含めたER $\beta$ の発現を誘導・活性化する化合物はER $\beta$ の選択的スプライシングに「異常」を誘発することでER $\alpha$ の機能を抑制する可能性がある。そこで、本研究ではER $\beta$ の発現を誘導する環境化学物質が、ER $\alpha$ の機能に与える影響を解明し、ER $\beta$ を環境化学物質による毒性指標(抗エストロゲン作用)として確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、生化学的、分子生物学的、および細胞生物学的手法を駆使し、上述の「研究の目的」を達成すべく検討を行った。

### 4. 研究成果

ビスフェノールA(BPA)の代替品として汎用されているビスフェノールAF(BPAF)に焦点を当てた。本研究に先立ち、ER $\alpha$ 陽性乳がんMCF-7細胞において、BPAFがE2誘導性のERを介した転写活性を抑制し、この抑制にER $\beta$ の発現誘導が関与することを見出していた。さらに、BPAFはER $\alpha$ の発現レベルに影響することなくER $\beta$ の発現を誘導した。つまり、BPAFはTHCと同様にER $\beta$ の発現を誘導・活

性化することで E2/ER $\alpha$ 活性を抑制する抗エストロゲン作用を示す環境化学物質である。

本研究では、さらに ER $\alpha$ 陰性乳がん MDA-MB-231 細胞を用いて、詳細に BPAF の ER $\beta$ に対する影響の解析を進めた。高濃度( $\mu$ M オーダー)の BPAF は ERE を介した転写を活性化し、ER $\beta$ の発現を誘導し、特に ER $\beta$ 2 の発現増加を来した。このことから、BPAF は ER $\beta$ の発現誘導を介して転写を亢進したと考えられる。一方、nM オーダーの低濃度領域においては、BPAF は ER $\beta$ 1 及び ER $\beta$ 2 の発現を誘導しなかった。しかし、BPAF は ER $\beta$ 1 の転写活性を促進した。この BPAF 誘導性の転写活性は ER $\beta$ 1 の選択的アンタゴニスト(PHTPP)により抑制されたことから、BPAF がアゴニストとして ER $\beta$ 1 の転写活性を促進することを明らかにした。ER $\beta$ 1 とは異なり、ER $\beta$ 2 はリガンドによって活性化を受けないスプライズバリエーションであり、ER $\alpha$ と相互作用することにより ER $\alpha$ の機能が低下する。従って、BPAF はその曝露濃度に応じて ER $\beta$ 1 の転写活性化作用及び ER $\beta$ 2 発現誘導の両側面から ER $\alpha$ の機能を抑制する、抗エストロゲンとして機能することが明らかになった。

BPAF による ER $\beta$ 1 及び ER $\beta$ 2 の発現誘導において BPAF が ER $\beta$ の選択的スプライシングに対して与える影響に関しては今後の検討課題であるが、THC と同様に ER $\beta$ の発現を誘導・活性化することで E2/ER $\alpha$ 活性を抑制する抗エストロゲン作用を示す化合物として BPAF のその ER $\alpha$ の機能を抑制する機構の一端を明らかにすることに成功した。E2 が女性生殖器の発育や性周期の維持に關与する生理作用を考慮すると、THC や BPAF のような化合物は女性の性周期の破綻を来す可能性も考えられる。

本研究は、これまでに蓄積した知見と統合することで、環境化学物質に対する毒性軽減戦略を考えるために資する基礎研究でもあり、本研究で得られた成果は今後極めて意義深いものになると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Hirao-Suzuki Masayo, Takeda Shuso, Kodama Yasushi, Takiguchi Masufumi, Toda Akihisa, Ohara Masahiro	4. 巻 319
2. 論文標題 Metalloestrogenic effects of cadmium are absent in long-term estrogen-deprived MCF-7 cells: evidence for the involvement of constitutively activated estrogen receptor and very low expression of G protein-coupled estrogen receptor 1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 22 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2019.10.018	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 Hirao-Suzuki Masayo, Takeda Shuso, Koga Takayuki, Takiguchi Masufumi, Toda Akihisa	4. 巻 45
2. 論文標題 Cannabidiolic acid dampens the expression of cyclooxygenase-2 in MDA-MB-231 breast cancer cells: Possible implication of the peroxisome proliferator-activated receptor / abrogation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 227 ~ 236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.45.227	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 -
1. 著者名 Okazaki Hiroyuki, Hirao-Suzuki Masayo, Takeda Shuso, Takemoto Yukimi, Mizunoe Ramu, Haraguchi Koichi, Watanabe Kazuhito, Takiguchi Masufumi, Aramaki Hironori	4. 巻 43
2. 論文標題 Bisphenol AF as an activator of human estrogen receptor 1 (ER 1) in breast cancer cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 321 ~ 327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.43.321	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 -
1. 著者名 Hirao-Suzuki Masayo, Takeda Shuso, Kobayashi Takanobu, Kino Katsuhito, Miyazawa Hiroshi, Waalkes Michael P., Takiguchi Masufumi	4. 巻 43
2. 論文標題 Cadmium down-regulates apolipoprotein E (ApoE) expression during malignant transformation of rat liver cells: direct evidence for DNA hypermethylation in the promoter region of ApoE	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 537 ~ 543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.43.537	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 -

1. 著者名 Hirao-Suzuki Masayo, Takeda Shuso, Okuda Katsuhiko, Takiguchi Masufumi, Yoshihara Shin'ichi	4. 巻 95
2. 論文標題 Repeated Exposure to 4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene (MBP), an Active Metabolite of Bisphenol A, Aggressively Stimulates Breast Cancer Cell Growth in an Estrogen Receptor (ER)-Dependent Manner	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 260 ~ 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/mol.118.114124	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 -

1. 著者名 Hirao-Suzuki Masayo, Takeda Shuso, Iwata Takayuki, Fujita Satoshi, Tomiyama Taishi, Takiguchi Masufumi, Shindo Mitsuru	4. 巻 1
2. 論文標題 Anti-proliferative effects of (-)-isostemonamine on highly aggressive human breast cancer MDA-MB-231 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 32 ~ 34
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirao-Suzuki Masayo, Takeda Shuso, Watanabe Kazuhito, Takiguchi Masufumi, Aramaki Hironori	4. 巻 662
2. 論文標題 9-Tetrahydrocannabinol upregulates fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) via PPAR $\alpha$ induction: A possible evidence for the cancellation of PPAR $\alpha$ -mediated inhibition of PPAR $\gamma$ in MDA-MB-231 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 219 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2018.12.011	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 Okazaki Hiroyuki, Takeda Shuso, Kakizoe Kazuhiro, Taniguchi Aya, Tokuyasu Miki, Himeno Taichi, Ishii Hiroyuki, Kohro-Ikeda Eriko, Haraguchi Koichi, Watanabe Kazuhito, Aramaki Hironori	4. 巻 40
2. 論文標題 Bisphenol AF as an Inducer of Estrogen Receptor (ER $\alpha$ ): Evidence for Anti-estrogenic Effects at Higher Concentrations in Human Breast Cancer Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1909 ~ 1916
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00427	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 -

1. 著者名 Okazaki Hiroyuki, Takeda Shuso, Matsuo Saki, Matsumoto Masaya, Furuta Erika, Kohro-Ikeda Eriko, Aramaki Hironori	4. 巻 42
2. 論文標題 Inhibitory modulation of human estrogen receptor and activities by dicyclohexyl phthalate in human breast cancer cell lines	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 417 ~ 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.42.417	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 -

1. 著者名 Takeda Shuso, Kakizoe Kazuhiro, Aramaki Hironori	4. 巻 4
2. 論文標題 Phytocannabinoids, 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol, as human calpain-1 (CAPN1) activators	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 101 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.4.101	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平尾雅代、竹田修三、瀧口益史
2. 発表標題 閉経後乳がん細胞モデルにおけるER の恒常的活性化とGPER1の発現低下を介したカドミウムのエストロゲン作用の消失
3. 学会等名 第59回日本薬学会 中四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平尾雅代、竹田修三、瀧口益史
2. 発表標題 閉経後乳がん細胞モデルにおけるカドミウムのエストロゲン作用の消失 : ER のリガンド非依存的活性化とGPER1の発現低下の関与
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平尾雅代、竹田修三、渡辺和人、瀧口益史、荒牧弘範
2. 発表標題 9-Tetrahydrocannabinolによるfatty acid 2-hydroxylase (FA2H)の発現調節機構
3. 学会等名 フォーラム2019：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平尾雅代、竹田修三、奥田勝博、瀧口益史、吉原新一
2. 発表標題 ビスフェノール A の活性代謝物(MBP)によるER の活性化を介したER陽性乳がん細胞の増殖促進
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平尾雅代、竹田修三、奥田勝博、瀧口益史、吉原新一
2. 発表標題 ビスフェノール A の活性代謝物(MBP)の曝露影響：ER の活性化を介した乳がん細胞の増殖促進
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田修三、藤井由希子、原口浩一、渡辺和人、荒牧弘範
2. 発表標題 環境化学物質による女性ホルモン機能の修飾メカニズム
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takeda Shuso、Ikeda Eriko、Okazaki Hiroyuki、Aramaki Hironori	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 7
3. 書名 Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Diagnosis, Treatment, and Pharmacology ( 9-Tetrahydrocannabinol effects in human breast cancer)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島国際大学薬学部環境毒物代謝学研究室ホームページ <a href="http://www.hirokoku-u.ac.jp/pharm/xme_toxicology/">http://www.hirokoku-u.ac.jp/pharm/xme_toxicology/</a>
--

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	平尾 雅代  (Hirao-Suzuki Masayo)  (30780746)	広島国際大学・薬学部・助教    (35413)	