

機関番号：33902

研究種目：基盤研究C

研究期間：2008～2010

課題番号：20592352

研究課題名（和文）

環境ホルモンが口唇口蓋裂発生に与える影響に関する研究

研究課題名（英文）

Study on effects of endocrine disrupter on cleft lip and/or palate.

研究代表者

新美 照幸 (NIIMI TERUYUKI)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：60291762

研究成果の概要（和文）：

ビスフェノール A (BPA)は、血管新生阻害作用の指標である u-PA の産生阻害作用に対して影響を示さなかったことから、奇胎の大きな原因である胎児期の血管新生には影響しないと推察された。また、葉酸摂取が口唇口蓋裂の発症を予防することから、環境ホルモンが葉酸代謝に及ぼす影響を、葉酸代謝関連遺伝子の発現で検討した。

BPA は、レチノイン酸受容体 (RAR) による骨代謝関連遺伝子の転写を部分的に修飾し、口唇口蓋裂の発症を抑制している可能性が示唆された。また、口唇口蓋裂の発症予防を目指して、RAR 及びエストロゲン受容体に対する天然アゴニストの探索を行い、いくつかの RAR アゴニストを単離同定した。

研究成果の概要（英文）：

As an environmental factor, the inhibition of the production of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) as a marker of vascular development was studied using bisphenol A (BPA). The u-PA production was not inhibited by BPA. On the other hand, the metabolism of folate affects the cause of cleft lip and/or palate. To clarify this point, several gene expressions related with folate metabolism were determined.

It is suggested that BPA is likely to partly modulate the transcription of the genes involved in bone metabolism through retinoic acid receptor, resulting in the suppression of the development of a cleft lip and/or palate. Further, through the comprehensive screening of natural retinoic acid receptor or estrogen receptor agonists to prevent the development of a cleft lip and/or palate, we isolated a few RAR agonists from crude drugs used in Kampo medicines.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ビスフェノールA、口唇裂、先天異常、予防、胸腺

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂の発症には、遺伝的要因の他、母体の年齢、薬剤摂取、疾病などの環境的要因も影響するとされており、特に内分泌攪乱物質（環境ホルモン）は、動物の胎児や産仔に対する奇形等の大きな要因と考えられている。また、胎児期における母体の葉酸摂取は、口唇口蓋裂の発症の予防の重要な因子であることが知られている。一方、性ステロイドホルモン受容体は幅広い生理作用を発揮するが、その分子基盤は必ずしも明らかではない。特に、エストロゲンは、各種標的臓器にて様々なシグナル伝達とクロストークする例が知られている。このようなクロストークを介し、複雑なエストロゲンの生理作用が発揮されると信じられている。さて、ビスフェノール A (BPA) はエストロゲンレセプターと結合することが知られており、そして、かなりの低濃度で内分泌攪乱因子として働くことも知られている。しかし、BPA のエストロゲン受容体 (ER) への結合はエストロゲンに比べると極めて弱く (<1000)、最近では、ヒト 48 種の核内受容体の中で estrogen-related receptor (ERR) に高い親和性で結合することが見出されている。また、BPA はエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体の発現に影響を及ぼし、甲状腺ホルモンの作用は阻害するなど、他のホルモンの作用に影響を及ぼしており、その作用は複雑であることが予想されるが詳細な機序の解明は進んでいない。

これまでに、口唇口蓋裂自然発症モデルマウスにおいて、エストラジオールおよび BPA が口唇口蓋裂の発生を抑制し、その作用は U 字型の用量作用曲線を示すこと、BPA をマウスに経口投与することにより生殖器におけるレチノイン酸レセプター (RAR)、レチノ

イド X レセプター (RXR) の mRNA が 2 相性に発現誘導されること、疫学調査によりレチノイドの摂取量と口唇口蓋裂の発生率が負の相関を示すことが示されている。また、一方、レチノイン酸は骨の発生において重要な働きをしていることは良く知られており、核内受容体 RAR α 、RAR γ を欠損したマウスでは、胎生期骨形成異常がみられること、胎生期の骨格形成において必須の遺伝子である Runx2 (runt-related gene 2) はレチノイン酸により発現が誘導されること、レチノイドは骨リモデリングに関与する骨芽細胞、破骨細胞の機能を調節しているが、過量のレチノイドは骨量の著しい低下を引き起こすことが知られている。

2. 研究の目的

(1) 代表的な環境ホルモンのひとつである BPA が、奇胎の大きな要因である胎児期の血管新生阻害作用に与える影響を検討し、奇胎と血管新生阻害作用との関連を明らかにする。また、葉酸摂取が奇胎の予防に大きく関与することから、培養細胞を BPA で処理後、葉酸代謝関連の遺伝子発現に及ぼす影響を検討する。

(2) BPA による口唇口蓋裂の発症抑制機序を探るとともに、口唇口蓋裂発症の予防を目指した新規予防薬の探索をすることを目的とし、骨の発生、代謝において重要な役割を果たしているエストロゲン及びレチノイドに注目し、BPA とレチノイドとの骨芽細胞に対する作用の解析および天然由来 RAR、ER アゴニストの探索を行う。

(3) エストロゲン活性を有する生薬に口唇口蓋裂の発症抑制効果があるか否かを検討

する。

3. 研究の方法

(1) 血管新生阻害作用は、urokinase-type plasminogen activator (u-PA)の産生阻害作用を指標とした。ヒト繊維肉腫 HT-1080 細胞を 96 穴マイクロプレートに播種し (2,000 cells/well, 200 μ l)、種々の濃度に調製した BPA を添加して 24 時間培養後、無血清培地に入れ替えてさらに 24 時間培養した。培養上清に産生され u-PA は、20 μ g/ml の濃度で添加した plasminogen の酵素活性を、合成基質の D-Val-Leu-Lys-pNA を用いて 405 nm で測定した。また同時に BPA の HT-1080 細胞毒性を MTT 法で検討した。対照群として in vitro で u-PA 産生阻害作用を有する 2,4-diamino-6-(pyridine-4-yl)-1,3,5-triazine (4pyDAT)を用いた。

BPA の葉酸代謝に及ぼす影響は、HT-1080 細胞を種々の濃度の BPA 処理後、葉酸代謝に関わる種々の遺伝子発現をリアルタイム PCR で検討した。35 mm ディッシュに HT-1080 細胞を播種後 (2 X 10⁵ cells/dish, 2 ml) BPA を添加した。24 時間培養後、ISOGEN を用いて RNA を抽出した。抽出した 90 ng の RNA を oligo dT と Reva TraAce を用いて逆転写反応後、SYBR Premix Ex Taq を用いてリアルタイム PCR を行った。目的の遺伝子発現量は、ヒト housekeeping 遺伝子の ribosomal protein large P1 (PRLP1)と glucuronidase beta (GUSB)の発現量で補正した。葉酸代謝に関わる遺伝子として、表 1 に示した遺伝子を用いた。

表 1 リアルタイムPCRに用いた葉酸代謝関連遺伝子

| | |
|---------|--|
| DHFR | Homo sapiens dihydrofolate reductase (DHFR), mRNA |
| FPGS_v1 | Homo sapiens folypolyglutamate synthase (FPGS), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA |
| FPGS_v2 | Homo sapiens folypolyglutamate synthase (FPGS), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2, mRNA |
| GART_v1 | Homo sapiens phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase (GART), transcript variant 1, mRNA |
| GART_v2 | Homo sapiens phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase (GART), transcript variant 2, mRNA |
| RRM1 | Homo sapiens ribonucleotide reductase M1 (RRM1), mRNA |
| RRM2 | Homo sapiens ribonucleotide reductase M2 polypeptide (RRM2), mRNA |
| RRM2B | Homo sapiens ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible) (RRM2B), mRNA |
| SLC19A | Homo sapiens solute carrier family 19 (folate transporter), member 1 (SLC19A1), mRNA |
| SLC46A1 | Homo sapiens solute carrier family 46 (folate transporter), member 1 (SLC46A1), mRNA |
| TYMS | Homo sapiens thymidylate synthetase (TYMS), mRNA |
| GGH | Homo sapiens gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folypolyglutamate hydrolase) (GGH), mRNA |
| EZF1 | Homo sapiens EZF transcription factor 1 (EZF1), mRNA |
| EZF4 | Homo sapiens EZF transcription factor 4, p107/p130-binding (EZF4), mRNA |

(2) マウス骨芽様細胞株 MC3T3-E1 ((財)ヒューマンサイエンス振興財団より購入) は α -MEM 培地を基本培地として、ヒト腎臓由来細胞株 HEK293 (理化学研究所より購入) は DMEM 培地を基本培地として、ヒト子宮頸癌細胞 HeLa ((財)ヒューマンサイエンス振興財団より購入) は MEM 培地を基本培地として、10%牛胎児血清及びペニシリン/ストレプトマイシンを含有する培養液中で、37°C、5%炭酸ガスインキュベーター内で培養した。RAR α アゴニストの探索は、HEK293 細胞を pCMX-hRAR α 発現ベクター、tk- β REII-Luc レポータープラスミド、 β -gal 発現プラスミドをリン酸カリシウム法で形質転換させたルシフェラーゼレポーターアッセイ法を用いて行った。ER α と ER β アゴニストの探索は、HeLa 細胞を pER α あるいは pER β 発現プラスミド、pERE レポータープラスミド、 β -gal 発現プラスミドをリン酸カリシウム法で形質転換させたルシフェラーゼレポーターアッセイ法を用いて行った。RAR アゴニストの探索には厚生労働省承認漢方方剤である 210 処方に繁用される生薬 84 種のメタノールエキスを、また、ER アゴニストの探索には 120 種の熱水抽出エキスを使用した。

(3) エストロゲン活性を有する乾燥カンゾウ 12g を 1 時間煮出し、抽出液を 400ml に

調整し、未経産の A/J 系マウスに妊娠 1 週前より口蓋形成期が終了する妊娠 12 日まで飲料水の代わりに自由摂取させた後に、妊娠 18 日に帝王切開にて胎仔を取り出し、実体顕微鏡下に胎仔を観察した。

4. 研究成果

(1) 図 1 に BPA の u-PA 産生阻害を示す。BPA は、 $IC_{50} = 200 \mu M$ で u-PA 産生阻害作用を示したが、この結果は、用いた HT-1080 細胞に対する直接細胞毒性を反映した値であり、活性は認められなかった。

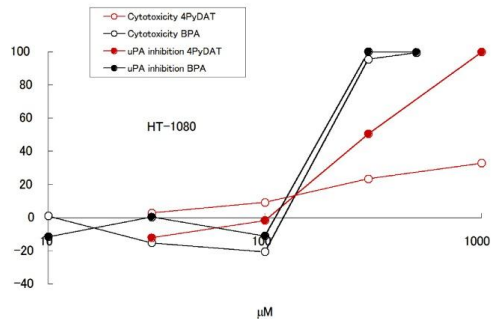


図 1 BPAのu-PA産生阻害

図 2 に BPA 処理後の HT-1080 細胞の葉酸代謝関連遺伝子の発現量の補正值を示した。10 μM の BPA 処理により、葉酸代謝の律速酵素である dihydrofolate reductase (DHFR) の発現が 12 倍上昇した。また、100 μM の BPA 処理により葉酸トランスポータの SLC46A1 の発現量が約 6 倍上昇していることがわかった。

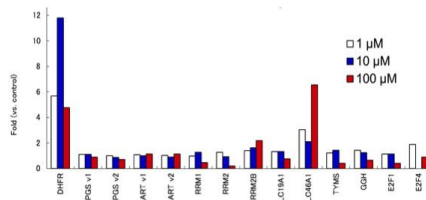


図 2 BPA処理後のHT-1080細胞の葉酸代謝関連遺伝子の発現量

(2) 新規予防薬の探索

① BPA の機序解析

エストロゲンおよび BPA が口唇口蓋裂の発生を抑制する機序を明らかにするために、BPA が骨形成・吸収に関与する核内受容体レチノイン酸受容体 (RAR) を介した遺伝子発現に及ぼす効果を骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を用いて検討した。その結果、MC3T3-E1 細胞には RAR α が発現していることが明らかになり、その mRNA、蛋白質発現は広範な濃度の BPA により大きく影響を受けないことがわかった。しかし、RAR を介した遺伝子発現に及ぼす BPA の効果を、RAR アゴニストである *all-trans* レチノイン酸 による RAR 標的遺伝子オステオポンチンの mRNA 発現に及ぼす影響を調べることにより検討したところ、 $10^{-9} \sim 10^{-8} M$ の BPA はその mRNA レベルを上昇させ、BPA がレチノイドによる遺伝子発現に何らかの影響を及ぼしている可能性が示された。また、その作用は逆 U 字型の用量依存性を示し、この結果は、生体内において BPA がある濃度下において RAR の反応性を高め、骨形成を促進することにより口唇口蓋裂の発症を抑制している可能性が推察された。一方、胎生期の骨格形成において必須の遺伝子である Runx2 (*runt-related gene 2*) はレチノイン酸により RAR を介して発現誘導されることが知られており、BPA がレチノイン酸による Runx2 の発現誘導に及ぼす効果を調べたところ、BPA はレチノイン酸による Runx2 の遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。この結果は BPA が ER 受容体を介して RAR の遺伝子発現に影響を及ぼしていない可能性を示した。以上の結果をまとめると、BPA は RAR による骨代謝関連遺伝子の転写を部分的に修飾している可能性が考えられた。

②RAR リガンドの探索

骨形成において重要な役割を果たしている RAR に着目し、口唇口蓋裂の発症を予防する副作用が少ない薬物の開発を目指して、天然生薬より RAR α に対するアゴニスト探索を行った。84 種類の生薬メタノール抽出エキスを調製し、ルシフェラーゼレポーターアッセイ系でスクリーニングを行ったところ、ドクカツ、ジコッピ、ソウハクヒ、サンシシに強い活性を見出した。そして、植物化学の手法を用いて活性成分の単離を試みたところ、ドクカツより pimaradienoic acid (PDA) を RAR アゴニストとして単離同定した(図3)。PDA のアゴニスト活性は既知の RAR アゴニストである *all-trans* レチノイン酸 (ATRA) より 10^3 程弱いものであったが、PDA の RAR アゴニストとしての活性を細胞レベルで検討したところ、ATRA と同様に前骨髄性白血病細胞株 HL-60 の分化を誘導し、その作用は RAR アンタゴニストである LE540 で阻害されたことより、PDA が細胞レベルで RAR アゴニストとして機能することが明らかになった。PDA は ATRA とは大きく構造が異なっているにも関わらず RAR アゴニスト活性を示したことは非常に興味深く、PDA 関連化合物と RAR アゴニスト活性の構造活性相関を若干検討した。その結果、PDA の立体構造異性体である pimaric acid は PDA と同等の活性を示し、abietic acid は PDA より強い活性を示すことを見出した。また、マウステラトカルシノーマ細胞 F9 における RAR 標的遺伝子 mHoxa1 と mCyp26a1 の mRNA 発現に及ぼす効果を検討したところ、ATRA は両 mRNA 発現を強く誘導したが、PDA 及び abietic acid は誘導しなかった。これらの結果は、PDA は ATRA と異なった様式で RAR を活性化し、その結果、ATRA と異なる遺伝子

の転写活性化を誘導することが考えられた。

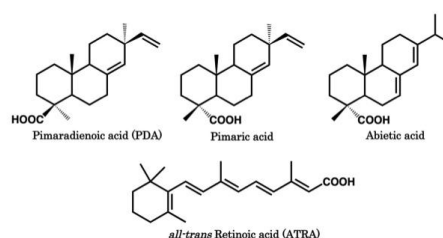


図3 単離されたRARアゴニストの構造

③ER アゴニストの探索

骨形成において重要な役割を果たしている ER に着目し、口唇口蓋裂の発症を予防する BPA に代わる副作用が少ない薬物の開発を目指して、天然生薬より ER α と ER β に対するアゴニスト探索を行った。これまでに、ER α は生殖器に多く発現しており、その機能の調節に重要な役割を果たしていることがわかっている。一方、ER β は骨、免疫系で重要な役割を果たしていると考えられている。これまでに、ER β に対する天然アゴニストの探索研究は殆ど行われたおらず、今回は漢方処方に繁用される生薬 120 種を用いて、網羅的に ER β アゴニストの探索を行った。その結果、0.1 nM 17 β -エストラジオールに対する比活性で評価すると、同等以上の活性を示した生薬として、ER α に関しては、カッコン・カンゾウ・ダイオウ・クジン・ソウヨウ・ホコツシ・ゴシュユの 7 種類、ER β に関しては、カッコン・ダイオウ・カンゾウ・オウゴン・クジン・ホコツシ・キジツ・インチンコウ・オウギ・キクカ・ケイヒ・ケイガイの 12 種類であった。これまでの報告により ER のアゴニスト活性が報告されているマメ科やミカン科の生薬以外にも、フラボノイドを多く含有すると考えられる、キク科やシソ科の生薬で強い活性が見られた。その中でも、キク科

のインチンコウやキクカは ER α に対するよりも ER β に対してより強い活性を示していたことから、これらの生薬には ER β 選択的なアゴニストが存在している可能性が考えられた。

(3) エストロゲン活性を有するカンゾウを、口唇口蓋裂自然発生モデル A/J 系マウスに投与した結果、現在のところ死亡吸収数の増加や胎仔の体重の著明な低下を伴うことなく、口唇口蓋裂発生の抑制傾向を認めたが、必要な実験数に達していないため、現在も継続中である。

5. 主な発表論文等

継続中の実験終了後、投稿予定。

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 1 件)

名称：レチノイン酸受容体アゴニスト剤

発明者：井上 誠 他 3 名

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2010-229890

出願年月日：2010 年 10 月 12 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新美 照幸 (NIIMI TERUYUKI)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：60291762

(2) 研究分担者

夏目 長門 (NATSUME NAGATO)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：90183532

南 克浩 (MINAMI KATSUHIRO)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70346162

井上 誠 (INOUE MAKOTO)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：50191888

佐々木 琢磨 (SASAKI TAKUMA)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：90109976

田中 基裕 (TANAKA MOTOHIRO)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：60197481

田邊 宏樹 (TANABE HIROKI)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：10415601