

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月25日現在

機関番号：80106

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21590675

研究課題名（和文） 環境化学物質における核内受容体 ROR 活性の探索と Th17 細胞分化に及ぼす影響

研究課題名（英文） Effects of environmental chemicals on differentiation of helper-T 17 cells via retinoic acid receptor-related orphan receptors

研究代表者

小島 弘幸 (KOJIMA HIROYUKI)

北海道立衛生研究所・理化学部・主査（有害化学物質）

研究者番号：10414286

研究成果の概要（和文）：レチノイド関連オーファン受容体（ROR）は、自然免疫や自己免疫疾患に関わるヘルパーT（Th）17細胞の分化増殖を制御する重要な調節因子である。この研究で、様々な環境化学物質のROR活性を調べた結果、アゾール系殺菌剤によるROR抑制活性及び植物由来化学物質によるROR増強活性を見出した。さらに、これらの化学物質はTh17細胞におけるIL-17遺伝子発現をそれぞれ抑制及び増強することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The retinoic acid receptor-related orphan receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  (ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ ), are key regulators of helper T (Th) 17 cell differentiation, which is involved in the innate immune system and autoimmune disorders. In this study, we found that several azole-type fungicides and phytochemicals have ROR $\alpha/\gamma$  inverse agonistic activity and ROR $\alpha/\gamma$  agonistic activity, respectively. In addition, we found that these ROR $\alpha/\gamma$  inverse agonists and ROR $\alpha/\gamma$  agonists respectively show the inhibitory and enhanced effect on the gene expression of interleukin (IL)-17, which mediates the function of Th17 cells. These results suggest that some of environmental chemicals might regulate IL-17 production via ROR $\alpha/\gamma$ .

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境保健、環境化学物質、核内受容体、ROR、Th17

## 1. 研究開始当初の背景

近年、環境要因が疑われる疾患（特にアレルギーなどの免疫異常症）が増えており、普遍的に存在する環境化学物質もその要因の

一つと考えられている。さらに最近、免疫研究の分野でCD4+ヘルパーT細胞の中でもTh1やTh2に属さないTh17と呼ばれるインターロイキン(IL)-17を特異的に産生する細

胞の一群が目目され、この細胞の分化増殖が Th1/Th2 バランスの変化により生じる免疫異常症の増悪に影響を及ぼすことが報告された。また、この Th17 の細胞分化を制御するマスター遺伝子として、レチノイド関連オーファン核内受容体 ROR が報告されたことから、環境化学物質による ROR を介する作用を明らかにすることは、環境化学物質と免疫異常を伴う各種疾患との因果関係を解明する一助になると考えられる。

## 2. 研究の目的

*in vitro* アッセイ法を用いて環境化学物質の ROR $\alpha/\gamma$  活性を調べ、マウス T リンパ腫 EL4 細胞での IL-17 遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 試験物質：環境化学物質（約 300 種類）を試験した。

(2) ROR $\alpha/\gamma$  レポーターアッセイ：ROR $\alpha$  あるいは ROR $\gamma$  発現プラスミド、RORE-luc レポータープラスミド、コントロールプラスミドを導入したチャイニーズハムスター卵巣由来 (CHO) 細胞を用い、化学物質を添加し 24 時間培養後に細胞内ルシフェラーゼの酵素活性を測定した。

(3) 遺伝子発現の測定：刺激剤 (PMA/ionomycin あるいは抗 CD3/CD28 抗体) 処理した EL4 細胞の IL-17、ROR $\alpha$  及び ROR $\gamma$  遺伝子発現に対する化学物質の影響を RT-PCR 法にて測定した。さらに、ROR $\alpha/\gamma$ -targeting shRNA 発現ベクターを導入した ROR $\alpha/\gamma$ -double knockdown EL4 細胞を用いた場合の影響も解析した。

(4) IL-17 蛋白の測定：刺激剤処理した EL4 細胞の IL-17 産生に対する化学物質の影響をフローサイトメトリー法により測定した。

## 4. 研究成果

(1) ROR レポーター遺伝子アッセイ法の確立：CHO 細胞を用いて ROR $\alpha$  及び ROR $\gamma$  活性測定のためのレポーター遺伝子アッセイ法を確立した。ROR インバースアゴニストとして報告されている T0901317 を陽性物質として反応させたところ濃度依存的なルシフェラーゼ活性の抑制が認められた。このことから、環境化学物質の ROR 活性をスクリーニングするための測定系を確立することに成功した。

(2) 環境化学物質における ROR 活性のスクリーニング：上記のレポーター遺伝子アッセイ系において、アゾール系殺菌剤、有機塩素系殺虫剤、有機スズ化合物、フタル酸エステル類及び有機リン系難燃剤のいくつかは ROR $\alpha/\gamma$  インバースアゴニスト活性を見出した。また、イソフラボン類の中には ROR $\alpha/\gamma$

アゴニスト活性を見出した。

(3) EL4 細胞での IL-17 遺伝子発現に及ぼすアゾール系殺菌剤の影響：ROR  $\alpha/\gamma$  インバースアゴニスト活性を示した 5 種類のアゾール系殺菌剤 (Imibenconazole, Triflumizole, Hexaconazole, Tetraconazole, Imazalil) について EL4 細胞での IL-17 mRNA 誘導への影響を調べた。その結果、これらの殺菌剤は IL-17 遺伝子発現を濃度依存的に抑制することを明らかにした (Kojima et al. 2012)。

(4) EL4 細胞での IL-17 遺伝子発現に及ぼすイソフラボン類の影響：ROR  $\alpha/\gamma$  アゴニスト活性を示した 2 種類のイソフラボン類 (Biochanin A, Formononetin) について EL4 細胞での IL-17 mRNA 誘導への影響を調べた。その結果、これらのイソフラボン類のうち、Biochanin A が IL-17 遺伝子発現及び IL-17 蛋白産生を濃度依存的に増強することを明らかにした。

(5) ROR $\alpha/\gamma$ -knockdown EL4 細胞を用いた解析：ROR $\alpha/\gamma$ -knockdown EL4 細胞では、Imibenconazole や Biochanin A による IL-17 遺伝子発現の影響はわずかであった。以上の結果から、環境化学物質のいくつかは ROR 依存的な IL-17 遺伝子発現を正あるいは負に制御して Th17 細胞分化の機能に影響を与えることが示唆された。

さらに、我々が確立した CHO 細胞を用いた ROR レポーター遺伝子アッセイ法は、Th17 細胞分化の指標となる IL-17 遺伝子発現に影響を与える化学物質の探索に有用であることが示唆された。

## 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 12 件)

① Kojima H, Muromoto R, Takahashi M, Takeuchi S, Takeda Y, Jetten AM, and Matsuda T. Inhibitory effects of azole-type fungicides on interleukin-17 gene expression via retinoic acid receptor-related orphan receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 259, 338-345 (2012) 査読有り, 10.1016/j.taap.2012.01.011

② Takeuchi S, Shiraishi F, Kitamura S, Kuroki H, Jin K and Kojima H. Characterization of steroid hormone receptor activities in 100 hydroxylated polychlorinated biphenyls, including congeners identified in humans. *Toxicology*, 280, 112-121 (2011) 査読有り, 10.1016/j.tox.2011.08.001

③ Ishizaki M, Akimoto T, Muromoto R, Yokoyama M, Ohshiro Y, Sekine Y, Maeda H, Shimoda K, Oritani K and Matsuda T. Involvement of tyrosine kinase-2 in both the

IL-12/Th1 and IL-23/Th17 axes in vivo. *J. Immunol.*, 187, 181-189 (2011) 査読有り,  
10.4049/jimmunol.1003244

④ Kojima H, Takeuchi S, Tsutsumi T, Yamaguchi K, Anezaki K, Kubo K, Iida M, Takahashi T, Kobayashi S, Jin K and Nagai T. Determination of dioxin concentrations in fish and seafood samples using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells. *Chemosphere*, 83, 753-759 (2011) 査読有り,  
10.1016/j.chemosphere.2011.02.062

⑤ Kojima H, Sata F, Takeuchi S, Sueyoshi T and Nagai T. Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using reporter gene assays. *Toxicology*, 280, 77-87 (2011) 査読有り  
10.1016/j.tox.2010.11.008

⑥ Kojima H, Takeuchi S and Nagai T. [Minireview] Endocrine-disrupting potential of pesticides via nuclear receptors and aryl hydrocarbon receptor. *J. Health Sci.*, 56(4), 374-386 (2010) 査読有り,  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhs/56/4/56\\_4\\_374/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhs/56/4/56_4_374/_pdf)

⑦ 小島弘幸, 武内伸治, 高橋美妃, 室本竜太 : 農薬による核内受容体ROR $\alpha/\gamma$ を介したIL-17 遺伝子発現に及ぼす影響, *ImmunoTox Letter* (日本免疫毒性学会), 15(2), 4-6 (2010) 査読有り,  
<http://www.immunotox.org/immunotoxletter/pdf/30vol15no2-2010J.pdf>

⑧ 小島弘幸 : 生体異物センサー ; PXRとCARを介した内分泌攪乱作用, *Endocrine Disrupter NEWS LETTER* (環境ホルモン学会), 13(1), 4 (2010) 査読無し,  
<http://www.jsedr.jp/newsletter/news1.htm#13-1>

⑨ Muromoto R, Kuroda M, Togi S, Sekine Y, Nanbo A, Shimoda K, Oritani K and Matsuda T. Functional involvement of Daxx in gp130-mediated cell growth and survival in BaF3 cells. *Eur. J. Immunol.*, 40, 3570-3580 (2010) 査読有り, 10.1002/eji.201040688

⑩ Anezaki K, Yamaguchi K, Takeuchi S, Iida M, Jin K. and Kojima H. Application of a bioassay using DR-EcoScreen cells to the determination of dioxins in ambient air : A comparative study with HRGC-HRMS analysis. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 7478-7483 (2009) 査読有り,  
10.1021/es901003b

⑪ Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Sugihara K, Yoshida T. and Kitamura S. Nuclear hormone receptor activity of brominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated metabolites in transactivation assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ. Health Perspect.*, 117, 1210-1218 (2009) 査読有り,  
10.1289/ehp.0900753

⑫ Muromoto R, Taira N, Ikeda O, Shiga K, Kamitani S, Togi S, Kawakami S, Sekine Y, Nanbo A, Oritani K. and Matsuda T. The exon-junction complex proteins, Y14 and MAGOH regulate STAT3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 382, 63-68 (2009) 査読有り, 10.1016/j.bbrc.2009.02.127

[学会発表] (計 20 件)

① 小島弘幸, 室本竜太, 高橋美妃, 武内伸治, 松田正 「環境化学物質における核内受容体ROR $\alpha/\gamma$ 活性の探索とIL-17 遺伝子発現への影響」日本薬学会第 132 年会総会、2012 年 3 月 31 日、札幌市 (北海道大学)

② 高橋美妃, 室本竜太, 小島弘幸, 武内伸治, 松田正 「炎症性サイトカインIL-17 産生に及ぼすBiochanin Aの影響に関する研究」日本薬学会第 132 年会総会、2012 年 3 月 29 日、札幌市 (北海道大学)

③ 武内伸治, 小林智, 小島弘幸 「室内空気中から検出された光重合開始剤及びその類似化合物の核内受容体を介した作用」日本薬学会第 132 年会総会、2012 年 3 月 31 日、札幌市 (北海道大学)

④ Kojima H, Muromoto R, Takahashi M, Takeuchi S, Takeda Y, Jetten AM, and Matsuda T. Inhibitory effects of azole-type fungicides on interleukin-17 gene expression via retinoic acid receptor-related orphan receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . The 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT), 2012 March, San Francisco, USA

⑤ Takeuchi S, Shiraishi F, Kitamura S, Kuroki H, Jin K and Kojima H. Characterization of steroid hormone receptor activities in 100 hydroxylated polychlorinated biphenyls, including congeners identified in humans. The 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT), 2012 March, San Francisco, USA

⑥ 小島弘幸, 室本竜太, 高橋美妃, 武内伸治, 松田正 「ROR $\alpha/\gamma$ 依存的なIL-17 産生に及ぼすBiochanin Aの影響」環境ホルモン学会第 14 回研究発表会、2011 年 12 月 1 日、東京都

(東京大学山上会館)

⑦武内伸治、小林智、小島弘幸 「室内空気中化学物質における核内受容体活性のプロファイル」フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー (日本薬学会主催)、2011 年 10 月 28 日、金沢市 (金沢エクセルホテル東急)

⑧小島弘幸、室本竜太、高橋美妃、武内伸治、松田正 「ROR $\gamma$ t 依存的な IL-17 遺伝子発現誘導に対するイソフラボン類の影響」第 18 回日本免疫毒性学会、2011 年 9 月 8 日、千葉市 (千葉大学けやき会館)

⑨武内伸治、兼俊明夫、小林智、北村繁幸、小島弘幸 「トリクロサン及びその塩素化誘導体の 13 種類の核内受容体への作用」日本薬学会第 131 年会総会、2011 年 3 月 30 日、静岡市 (ツインメッセ静岡)

⑩小島弘幸 「遺伝子導入細胞を用いた環境・食品試料中のダイオキシン類簡易測定法の開発」道央バイオ研究交流会・平成 22 年度研究発表会、2011 年 2 月 25 日、恵庭市 (恵庭リサーチビジネスパーク・センタービル)

⑪小島弘幸、武内伸治、高橋美妃、室本竜太 「農薬による核内受容体 ROR $\alpha$ / $\gamma$  インパースアゴニスト活性と免疫系への影響」環境ホルモン学会第 13 回研究発表会、2010 年 12 月 16 日、東京都 (東京大学山上会館)

⑫小島弘幸、佐能正剛、武内伸治、杉原数美、北村繁幸 「ビスフェノール A 関連物質の核内受容体 PXR/CAR を介した転写活性に及ぼす影響」フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー (日本薬学会主催)、2010 年 9 月 10 日、東京都 (星薬科大学)

⑬小島弘幸、武内伸治、高橋美妃、室本竜太 「農薬 200 物質におけるレチノイド関連オープン受容体 (ROR) 活性の探索と IL-17 産生に及ぼす影響」第 17 回日本免疫毒性学会学術大会、2010 年 9 月 9 日、つくば市 (国立環境研究所・大山記念ホール)

⑭ Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Sugihara K, Yoshida T and Kitamura S. Nuclear hormone receptor activity of brominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated metabolites based on transactivation assays. 5th International Symposium on Brominated Flame Retardants, 2010 April, Kyoto University, Japan

⑮小島弘幸、武内伸治、杉原数美、浦丸直人、北村繁幸 「臭素化難燃剤 PBDE 水酸化体の

核内受容体アゴニスト及びアンタゴニスト活性」日本薬学会第 130 年会総会、2010 年 3 月 30 日、岡山市 (桃太郎アリーナ)

⑯室本竜太、関根勇一、織谷健司、下田和哉、松田正 「A new biological function of Jun activation domain-binding protein 1 (JAB1) / CSN5 in the regulation of type I interferon signaling」第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 2 日、大阪市 (大阪国際会議場)

⑰小島弘幸、武内伸治、佐田文宏 「ピレスロイド系殺虫剤によるヒト及びマウス PXR/CAR を介した転写活性の比較」フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー (日本薬学会主催)、2009 年 11 月 6 日、宜野湾市 (沖縄コンベンションセンター)

⑱小島弘幸 「高感度レポーターアッセイ法を用いた環境化学物質の核内受容体活性の検出およびダイオキシン類生物検定法への適用」生物化学的測定研究会第 14 回学術シンポジウム、2009 年 10 月 30 日、つくば市 (つくばインフォメーションセンター)

⑲ Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Sugihara K, Yoshida T and Kitamura S. Nuclear hormone receptor activity of brominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated metabolites in transactivation assays using Chinese hamster ovary cells. HORIBA International Conference/CDBIM Symposium: 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, 2009 October, Tokyo University, Japan

⑳小島弘幸、武内伸治、浦丸直人、杉原数美、北村繁幸 「臭素化難燃剤 PBDE 及びそれら代謝物によるホルモン受容体を介した内分泌攪乱作用」日本薬学会北海道支部第 132 例会、2009 年 5 月 30 日、札幌市 (札幌コンベンションセンター)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小島 弘幸 (KOJIMA HIROYUKI)  
北海道立衛生研究所理化学部・主査  
研究者番号：10414286

### (2) 研究分担者

武内 伸治 (TAKEUCHI SHINJI)  
北海道立衛生研究所理化学部・研究職員  
研究者番号：20414287  
室本 竜太 (MUROMOTO RYUTA)  
北海道大学大学院薬学研究院・助教  
研究者番号：30455597