

## 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 5 月 15 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 22 年度～平成 23 年度

課題番号：22790132

研究課題名（和文）胎児期エストロゲン曝露による免疫系に対する影響

研究課題名（英文）Effect of overexposure to estrogen in fetal period on immediate allergic reaction

研究代表者

小林 亮（KOBAYASHI RYO）

岐阜薬科大学・薬学部・嘱託職員

研究者番号：50555662

研究成果の概要（和文）：胎児期におけるエストロゲン様化学物質の曝露が、出生後における生殖器官の形成など様々な機能に影響を与える可能性が示唆されているが、免疫系に対する影響もまた懸念されている。しかし、胎児期における過剰なエストロゲンシグナルが、出生後の免疫機能に与える影響については不明な点が多く残されている。本研究では、胎盤を介して胎児に高濃度のエストロゲンを曝露できるモデルマウスを用いて、胎児期エストロゲン曝露による即時型アレルギー反応への影響について検討を行った。その結果、本モデルマウスでは、モデル抗原による免疫を行った場合に、通常のマウスと比較して強い即時型アレルギー反応が認められた。このことから、胎児期における高濃度のエストロゲン曝露は、即時型アレルギー反応の抗原感作過程に何らかの影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Exposure to some endocrine disruptors in fetal period can affect development of reproductive organs and the immune system. However, the effect of overexposure to estrogen in the fetal period remains unclear. In the current study, we generated a transgenic mice model that expressing aromatase driven by placenta-specific promoter (Arom TG mice) and investigated the effect of overexposure to estrogen in the fetal period on immediate allergic reaction. Ovalbumin-induced active cutaneous anaphylaxis in Arom TG mice was enhanced compared with that in wild-type mice.

This finding suggests that overexposure to estrogen in the fetal period may affect antigen presentation.

交付決定額

（金額単位：円）

|          | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|----------|-----------|---------|-----------|
| 平成 22 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 平成 23 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度       |           |         |           |
| 年度       |           |         |           |
| 年度       |           |         |           |
| 総計       | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：胎児期影響, 免疫学, 発生・分化, 環境

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

(1)胎児期におけるエストロゲンの役割及びエストロゲン様化学物質の曝露による影響に関する検討の現状

器官、組織形成が行われる脊椎動物の発生段階においてステロイドホルモンをはじめとする生理活性物質は重要な役割を担っている。そのため、受精卵や胎児は、ホルモンに対する感受性が高く、これらのシグナル伝達が過剰に起こった際には、発達に対して重大な影響をもたらすことが予想される。90年代後半から、従来の毒性学の概念とは異なり、環境に放出され残留した化学物質が非常に低濃度でエストロゲン様作用を示し、毒性を誘発するという内分泌攪乱物質問題が大きく取り上げられるようになってきた。特に野生動物においては、これらの化学物質が示す毒性は発生段階において、深刻な影響を与える可能性がある。これまでもエストロゲン様化学物質に関する検討は精力的に行われてきており、哺乳類における生殖系への影響として、ヒツジ、マウスやラットにおける Diethylstilbestrol (DES)、Bisphenol A 投与による精子数の減少、マウスの DES 投与による前立腺肥大等の報告がされているが、胎児に対するエストロゲン化学物質曝露の影響については、統一した見解が得られていない。

魚類等他の生物種では受精卵が母体と独立して単独で発育するのに対して、哺乳類においては母体-胎盤-胎児複合体を形成する。そのため、これまで哺乳類でエストロゲン様化学物質による影響を検討する場合には、被験物質を胎児に到達させるために、過剰量の被験物質を母体に投与するという検討が行われてきたが、このように過剰量の被験物質を母体に投与した場合には母体にも何らかの影響を及ぼしてしまうことが考えられる。したがって、被験物質を投与することで胎児に何らかの影響が現れたとしても、その影響は被験物質が胎児に直接作用した結果なのか、被験物質の曝露を受けた母体の変化による影響なのかを判別することは困難である。また、エストロゲンシグナルの胎児期における役割についても、前述と同様の理由から、不明な点が多く残されている。このようなことから、哺乳類の胎児期におけるエストロゲンシグナルに対する知見は依然として乏しいのが現状である。

そのため、エストロゲン様化学物質の影響を解析するうえでは、まず胎児期におけるエストロゲンシグナルの役割を明らかにするために、母体に影響を与えることなく、胎児に直接的にエストロゲンを曝露することが

できるシステムを作製する必要がある。このようなシステムを用いて、胎児期におけるエストロゲンシグナルの役割を明らかにすることで、はじめて胎児期におけるエストロゲン曝露の影響を解明することができる。

このような背景のもと作製された胎盤特異的プロモーター制御下にアロマターゼ遺伝子を発現し、胎児に特異的にエストロゲンを曝露できるマウス (Arom TG マウス) を用いて、胎児期エストロゲンシグナルが及ぼす影響について検討することとした。

(2)免疫系におけるエストロゲンの役割及びエストロゲン様化学物質の曝露による影響の検討の現状

免疫系においてもエストロゲンシグナルが及ぼす影響について懸念されている。実際に全身エリテマトーデスや関節性リウマチ等の自己免疫疾患の発症には性差があることが広く知られており、これらの自己免疫疾患は女性の患者数が男性に比べて非常に多く確認されている。また喘息では幼児期に男性の患者が多く、成人になってからは女性の患者が多いというように、アレルギー疾患においても性差があるのではないかと考えられており、エストロゲンはこの免疫疾患の性差を考える上で重要なターゲットとして考えられている。また、エストロゲン様物質の曝露も免疫系に対して影響を与えているのではないかと考えられており、これまでも、エストロゲンおよびエストロゲン様化学物質の免疫系への影響に関して様々な検討が行われている。マウスによる喘息モデルを用いた検討では、雌マウスにおいて雄マウスに比べて気道炎症に対する感受性が高いことが明らかにされており、エストロゲンによる影響があることを示唆している。また、ヒトの肥満細胞株やマウス肥満細胞株を用いた検討では環境中のエストロゲン様物質が肥満細胞の活性化を促進することが報告されている。またエストロゲン様化学物質による影響として、気道炎症とリモデリングが 2-メトキシエストラジオール投与により抑制されることが報告されている。しかしながら、これらの検討は、成体実験動物や細胞を用いた検討であり、胎児期におけるエストロゲンの免疫系における役割に関する検討は、わずかに大豆イソフラボン類であるゲニステインを胎児期、新生児期に投与することで出生後の抗原特異的な IgE 抗体の産生が増加すること等が報告されているにとどまっている。また、この検討に関しても、前述した哺乳類のエストロゲンシグナルによる影響を明らかにする上での問題点については解決でき

ておらず、胎児期エストロゲン様物質曝露による免疫系に対する影響に関しても、知見が乏しいのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では胎児期のエストロゲンの影響を母体に対する影響を排除して、胎児特異的にエストロゲンを曝露できるモデルを用いて、胎児期エストロゲン曝露による免疫系に対する影響を明らかにすることで、これまでほとんど得られていなかった胎児期におけるエストロゲン曝露の免疫系に対する役割、胎児期エストロゲン様物質曝露による免疫系に対する知見を得ることを目指した。

本研究では、前述の問題を解決すべく作製された Arom TG マウスを用いて検討を行ったが、このマウスは胎盤特異的に、かつ母体の影響を排除して胎児にエストロゲンを供給できるモデルであり、胎児期にエストロゲンが過剰発現した場合の免疫系に対する影響を純粋に評価できる。また、免疫系への影響を検討するために、まず即時型アレルギーに対する影響を評価することとした。

即時型アレルギー反応に対する影響を評価した理由として、アレルギー反応に対するエストロゲン曝露の標的分子を明らかにすることで、胎児期にエストロゲン様物質の曝露を受けた場合における影響の予測をすることやこれらの曝露を受けた場合の免疫系に対する影響の評価系を作製できるのではないかと考えた。

以上のように、本研究では、Arom TG マウスを用いて、胎児期エストロゲン曝露による免疫系細胞ポピュレーションの変化、免疫系細胞増殖に対する影響の確認、及び胎児期エストロゲン曝露による即時型アレルギー反応に対する影響の検討を行い、アレルギー反応に対する影響の標的分子を明らかにすることで、胎児期エストロゲン曝露の免疫系に対する役割を解明するための足掛かりとすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)胎児期エストロゲン曝露による免疫系細胞ポピュレーションの確認

まず研究代表者が所属する教室において作製された Arom TG マウスにおける免疫細胞の基本的な性質を確認することを目的として、胸腺、脾臓における T 細胞、B 細胞の細胞サブタイプについて確認を行った。マウスの遺伝子型を判別した後、野生型、Arom TG マウスそれぞれについて、胸腺、脾臓、リンパ節を摘出、単細胞化した後、T 細胞マーカーである CD3 陽性、CD4 陽性、CD8 陽性細胞、B 細胞マーカーである B220 陽性細胞等をあらかじめ蛍光標識されたそれぞれの抗体を用いて標識し、フローサイトメトリ

ーを用いて、各臓器における細胞サブタイプの割合の変化を確認した。

### (2) 胎児期エストロゲン曝露による即時型アレルギー反応に対する影響の確認

アレルギー反応モデルを作製し、胎児期エストロゲン曝露による即時型アレルギー反応に対する影響の確認を行った。

まず、抗原に対する IgE 抗体を投与することにより、受動的に抗体を感作し、アレルギー反応を誘発する passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応をモデル反応として用いる。PCA 反応ではアレルギー反応のうち IgE 抗体感作後に抗原が侵入した際の肥満細胞の活性化等が評価できる。マウスに dinitrophenyl hydrazine(DNP)を抗原する IgE 抗体を皮内注射することにより感作を行い、感作 24 時間後に抗原である DNP をエバンスブルー色素とともに静脈内注射することにより、反応の惹起を行い、この際アレルギー反応部組織内に漏出してくるエバンスブルー色素量を測定することにより、アレルギー反応の確認を行った。

また卵白アルブミン(OVA)を抗原として免疫を行い、アレルギー反応を誘発する Active cutaneous anaphylaxis (ACA) 反応を行った。こちらの反応では抗原曝露から抗原記憶及び抗原特異的な IgE 産生といったアレルギー反応のすべての段階を反映することができる。抗原として OVA をアジュバントとともに 1 週間間隔で 2 回腹腔内投与することにより免疫を行い、OVA 初回投与 2 週間後に抗原である OVA を皮内注射、エバンスブルー色素を静脈内注射することにより、反応の惹起を行い、アレルギー反応部組織内に漏出した色素量を測定することによりアレルギー反応の程度の評価を行った。また経時的に採血を行って、血清中抗原特異的 IgG、IgE 抗体量の変化を確認した。

## 4. 研究成果

### (1)胎児期エストロゲン曝露による免疫系細胞ポピュレーションに対する影響

胸腺及び脾臓において CD3 陽性、CD4 陽性、CD8 陽性細胞、B220 陽性細胞についてフローサイトメトリーによる確認を行ったところ、このマウスでは野生型マウスと比較して胸腺および脾臓のリンパ球ポピュレーションに変化が認められないことが確認された。

### (2) 胎児期エストロゲン曝露による即時型アレルギー反応に対する影響

即時型アレルギーにおいて抗原感作成立後のマスト細胞の反応等を検出する即時型アレルギー反応モデル実験である PCA 反応を行ったところ PCA 反応には、変化は認められなかった。

マスト細胞の活性化だけでなく、抗原感作や抗原に対する抗体の産生等の過程をも含む即時型アレルギー反応モデル実験であるACA 反応について検討を行ったところ野生型マウスと比較して Arom TG マウスではACA 反応の増強が認められ、胎児期エストロゲン曝露により、即時型アレルギー反応が増強されることが確認された。また、この免疫を行ったマウスで、血中抗体量を測定したところ野生型マウスで、TG マウスで抗原特異的 IgE 産生量の増加傾向も認められた。

これらのことから、胎児期の過剰なエストロゲン曝露は、即時型アレルギー反応の抗原感作過程に何らかの影響を与える可能性が示唆された。

#### 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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

渡邊将作、小林 亮、酒井紀行、吉田一郎、中西 剛、永瀬久光、胎児期エストロゲン曝露がアレルギーの感受性に及ぼす影響、フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010 年 9 月 9-10 日、東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 亮 (KOBAYASHI RYO)

岐阜薬科大学・薬学部・嘱託職員

研究者番号：50555662

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：