

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510074

研究課題名(和文) 内分泌攪乱物質の次世代免疫・神経系への作用機序の解明と発育・健康リスク評価の検討

研究課題名(英文) The role of prenatal exposure to endocrine disruptors on immune and neural systems.

研究代表者

高本 雅哉 (TAKAMOTO, Masaya)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：90226928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：内分泌攪乱作用を持つ物質が免疫系のみならず神経系にも影響を与え、近年問題となっている神経発達障害やアレルギー・自己免疫疾患などの免疫疾患の増加に関与している可能性が高い。植物エストロゲンの影響を防ぐため大豆除去飼料を用いて数世代繁殖させたマウスをもちいて検討したところ、マウス飼料中の大豆由来物質はビスフェノールAと同様Th1細胞分化を抑制させることが明らかとなった。内分泌攪乱物質によりややアレルギーが起きやすい状態が誘導されているが、現在のところそれだけではアレルギー疾患増多の説明がつかない。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify Th cell differentiation and M1 and M2 markers of macrophages, mice given soy bean-free (SF) or normal (N) chows for several generations were immunized with KLH. BPA was given orally 1 day before immunization. Mice were again immunized 14 days after first immunization, and splenocytes were taken 7 days after challenge. Peritoneal macrophages were collected from non-immunized mice. Component(s) of soy beans inhibit Th1 differentiation. BPA influences additively on the inhibitory effects of the soy bean component(s). In addition, M1 and M2 markers and cytokine profiles of macrophages from SF and N were not completely parallel with the data of Th differentiation, although they indicate that component(s) of soy beans might induce M2 differentiation. Further study is necessary to clarify this mechanism.

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：環境学・放射線化学物質影響科学

キーワード：phytoestrogen Th1/Th2 macrophages

1. 研究開始当初の背景

内分泌攪乱化学物質(ED)はヒトのみならず野生動物の内分泌系に作用し、生殖毒性などを発揮する。特にPCB(ポリ塩化ビフェニル)やダイオキシンなどの残留性有機汚染物質(POPs)は今後何世紀にもわたって問題となると考えられており、環境への放出を防ぐ対策がとられているが、生殖毒性の比較的弱いEDについては1日許容摂取量の設定にとどまっているのが現状である。最近、発生初期の低用量ビスフェノールA(BPA)暴露が、生殖毒性のみならず、生後の神経発達や免疫機能に影響を及ぼすことが我々や他の研究者など(Fujimotoら, Brain Res 2006;1068;49-55)により報告された。また、免疫系は内分泌系や神経系と様々な情報伝達分子を共有し、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。免疫系の様々な白血球細胞が産生するサイトカインが脳神経系の細胞や内分泌系臓器に作用し、神経伝達・ホルモン産生を変化させるのみならず、神経伝達物質であるアミン類やニューロペプチド、種々のホルモンも免疫系に様々な影響を与えることが明らかとなった。副腎皮質ステロイドホルモンがリンパ球に作用し免疫抑制作用を発揮することは周知の事実であるが、エストロゲンをはじめとする種々の性ホルモンも免疫系に作用し、ヒトをはじめとして疾病成立に関与する。SLEや関節リウマチなどの自己免疫疾患はその発病率に大きな性差が見られるが、エストロゲンによる作用が原因と考えられている。

これらの点を総合的に考えると、内分泌攪乱作用を持つ物質が免疫系のみならず神経系にも影響を与え、近年問題となっている神経発達障害やアレルギー・自己免疫疾患などの免疫疾患の増加に関与している可能性が高い。我々は、代表的なEDの1つであるBPAがTh2分化を増強させることを明らかにし、それが出世前暴露の場合は成長した後に暴露した場合に比しはるかに低用量で作用を示すことを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では内分泌攪乱物質が免疫系に与える影響について、特に次世代の免疫系に及ぼす影響について実験動物モデルをもちいて明らかにするとともに、現在問題になっている神経発達障害やアレルギー・自己免疫疾

患などの免疫疾患発症に関与しているかどうかについて検討することを第一義的な目的とした。

3. 研究の方法

(1)大豆除去飼料(Soy-free SF)によるマウスの繁殖

母マウス由来の植物エストロゲンの影響をできるだけ少なくするため、繁殖前に大豆除去飼料(船橋農場)のみを3週間与えたマウスより2回目以降の出産で生まれたマウスを次の繁殖に用いた。その後は大豆除去飼料のみで継代維持を行なった。飲水はガラスの給水瓶から蒸留水を与え、TPX製のケージとステンレス網のふた、紙チップをもちいて飼育した。比較対照として、通常の飼料(N)を用いて繁殖をおこなったマウスを使用した。

(2)マウスの免疫

マウスの免疫は1匹あたり50 µgのKLHを生理食塩水に溶解し、腹腔に投与した。BPA投与群は免疫前に経口的にBPAを投与した。14日後に再度同量のKLHで免疫し、その7日後に脾臓を採取した。

(3)免疫応答の変化の検討 CD4⁺T細胞分化に関する検討

CD4⁺T細胞はその産生するサイトカインによりいくつかのサブセットに分けられる。それらは、3種のエフェクターT細胞Th1, Th2, Th17とそれを制御するTreg細胞であり、お互いの分化を抑制しあっている。アレルギー疾患などではその分化が極端に進み強い炎症を引き起こす。正常な場合、強い免疫応答は起きないので、これらサブセット比率の偏りは免疫恒常性の破綻の証拠となる。出生前BPA暴露によりサブセット比率の偏りなどが起こっていないかどうか、表面マーカーや、細胞内サイトカイン染色などの方法を用いて検討する。具体的にはマウスより、脾臓・リンパ節・末梢血を採取し赤血球を溶血により除去する。

(4)免疫応答の変化の検討 マクロファージ分化に関する検討

M2マクロファージ分化について検討を行うため、腹腔や脾臓からマクロファージを採取し、表面マーカーやサイトカイン産生を検討した。

4. 研究成果

(1)大豆中の植物エストロゲンとビスフェノール A の T 細胞分化に及ぼす影響

普通飼料(N)および大豆除去飼料(SF)を用いて数世代繁殖させたC57BL/6雄マウスをKLHで免疫した。BPA投与群は免疫前に経口的にBPAを投与した。14日後に再度免疫しその7日後に脾臓を採取した。脾臓中にTh1/Th2/Th17/Tregが誘導されたかどうかを、サイトカイン産生などを指標に検討した。SF群はN群と比較してTh1の割合およびIFN- γ 産生が亢進していた。両群とも免疫前にBPAを投与することによりTh1およびIFN- γ 産生の亢進は低下した。以上の結果よりマウス飼料中の大豆由来物質はTh1細胞分化を抑制させること、および同様の作用を持つ内分泌かく乱化学物質であるBPAと相加的な効果を持つことが明らかとなった。

(2)大豆中の植物エストロゲンとビスフェノール A のマクロファージ分化に及ぼす影響

マクロファージ表面のM1・M2マクロファージ特異的な受容体の発現をフローサイトメーターで解析した。SFはNと比較してCD204, CD206の発現が低下する傾向にあったが、それぞれの群中には個体差がありSFとNの間の有意差は認められなかった。TLR4の発現にはほとんど変化がなく、M2分化が抑制されやすいSTAT6KOマウスと似たパターンを示した。LPS刺激によるサイトカイン、ケモカインの産生を比較したがSF群とN群で特に有意な差は認められなかった。

(3)マクロファージ細胞移入による大豆中の植物エストロゲンのT細胞分化に及ぼす影響

マクロファージの変化が原因となって、大豆中の植物エストロゲンのT細胞分化に影響が及ぼされているのかどうか検討するためSFおよびN群のマウスから腹腔マクロファージおよび脾臓接着性細胞を分離しN群およびSF群のマウスに移入した。それぞれのマウスをKLHで免疫し、14日後に再度免疫しその7日後に脾臓を採取した。脾臓中にTh1/Th2/Th17/Tregが誘導されたかどうかを、サイトカイン産生などを指標に検討した。SF群はN群と比較してTh1の割合およびIFN- γ 産生が亢進していたが、腹腔マクロファージおよび脾細胞のSF \rightarrow N移入群、N \rightarrow SF移入群において、細胞移入していない群との差は見いだせなかった。これらの結果より、マウス飼料中の大豆由来物質によるTh1分化抑制活性はマクロ

ファージや樹状細胞などの抗原提示細胞を介しているのではないことが示唆された。

(4)考察

以上の研究結果より、エストロゲン作用を持つビスフェノールAや大豆中の植物エストロゲンは、T細胞分化に影響を及ぼしTh1細胞分化を抑制させることが明らかとなった。その原因について種々の方法で検討したが、今までのところ明らかとすることはできていない。マクロファージなどを介するのではなく、発生の初期のリンパ系の細胞の分化に影響があると考えられるが、現在までのところ明確な証拠は得られていない。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Takamoto M: Effect of phytoestrogens on helper T cell and macrophage differentiation. 15th International Congress of Immunology, 24/8/2013, Milan, Italy

2. Takamoto M: Effect of phytoestrogens on macrophage differentiation. The joint meeting of 78th meeting of Japanese Society for Interferon and Cytokine Research and 21st International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 21/5/2013, Tokyo, Japan

3. 高本雅哉: 植物エストロゲンのマクロファージ分化に及ぼす影響第15回日本内分泌攪乱化学物質学会大会 東京 2012年12月18日

4. 高本雅哉: ヘルパーT細胞分化と環境ホルモン・植物エストロゲン. 第77回日本インターフェロンサイトカイン学会 神戸 2012年6月21日

5. 高本雅哉: 植物エストロゲンのヘルパーT細胞分化に及ぼす影響. 第14回日本内分泌攪乱化学物質学会大会 東京 2011年12月2日

6. 高本雅哉: 飼料中の植物エストロゲンのヘルパーT細胞分化に及ぼす影響. 第40回日本免疫学会総会・学術集会 千葉 2011年11月27日

〔図書〕(計 1 件)

1. 高本雅哉: ビオチン化抗原をもちいたサンドイッチELISA法による寄生虫抗原特異的IgE測定法『寄生虫学研究: 材料と方法』(宇賀昭二・丸山治彦編)三恵社 pp49-50, 2012

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高本 雅哉 (TAKAMOTO, Masaya)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：90226928