

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860102

研究課題名(和文) 環境化学物質がもたらす胸腺加齢化促進作用および免疫機能加齢化促進の影響

研究課題名(英文) Investigation of thymic aging effect of environmental compounds via PPAR signal pathway

研究代表者

廣森 洋平 (HIROMORI, Youhei)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：60515956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺を萎縮させる作用が報告されている環境化学物質であるdi-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) およびperfluorooctanoic acid (PFOA)に着目し、その胸腺萎縮作用に胸腺の脂肪化が関与しているか検討を行った。その結果、DEHPおよびPFOA投与により脂肪重量が上昇し、PFOA投与により胸腺の重量が減少した。DEHPおよびPFOA投与により胸腺の $\alpha$ 2、PPAR $\gamma$  mRNA発現量の上昇が認められた。また、これらの結果から、DEHPおよびPFOAがPPAR $\gamma$ を介して胸腺機能の加齢化を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of environmental chemicals on thymic aging via PPAR  $\gamma$ . di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) administration in the C57BL/6 mice increased adipose and liver weight but had not changed thymus weight. perfluorooctanoic acid (PFOA) administration in the C57BL/6 mice decreased body, thymus and spleen weight, increased liver and adipose weight. Furthermore, DEHP and PFOA enhanced the mRNA levels of PPAR  $\gamma$  and  $\alpha$ 2 in the adipose and thymus. These results suggest that DEHP and PFOA promotes thymic aging via PPAR  $\gamma$ .

研究分野：分子毒性学

キーワード：胸腺 DEHP PFOA PPAR $\gamma$

### 1. 研究開始当初の背景

加齢により様々な生理機能の低下が認められるが、加齢の影響を大きく受ける臓器として胸腺が知られている。胸腺は全身免疫系の獲得免疫に重要なリンパ球の1つであるT細胞を産生する臓器で、加齢とともに萎縮することが知られている。胸腺は思春期を過ぎると萎縮が始まり、脂肪組織に置き換わっていく。60~70歳になると、胸腺のほとんどは脂肪組織となっており、加齢に伴って胸腺から新たに産生されるT細胞の数が減少することが明らかとなっている。加齢による免疫機能の低下により、感染症の罹患率が增大することが知られており、実際にアメリカではインフルエンザの罹患率及び死亡率は65歳以上の高齢者において非常に高くなっている。さらに、感染症防止に予防接種が有効であるが、高齢者に予防接種を行っても、免疫機能が低下しているために十分な効果が得られないことが問題となっている。一方で、環境化学物質の曝露が免疫機能に影響を及ぼす可能性が懸念されている。特に現代病ともいえるアレルギー疾患に関しては、環境化学物質との因果関係について、環境化学物質による免疫機能修飾を中心に数多くの検討がなされている。さらにアレルギー疾患と同様に、環境化学物質が免疫機能の加齢化を促進する可能性も考えられるが、胸腺の加齢化に着目した検討はほとんど行われていない。今後高齢化社会を迎える我が国においては、トリインフルエンザを初めとする新興感染症のみならず、結核などの既存の感染症に対しても、感染を蔓延させないために高齢者の免疫機能の老化防止が必要不可欠となってくるが、そのためには免疫機能の老化メカニズムと増悪因子の解明を行う必要がある。

### 2. 研究の目的

我々は有機スズ化合物の毒性作用機構を解明する過程で、有機スズ化合物が胸腺の脂肪化を促進することを見出した。本研究では化学物質による胸腺の脂肪化促進作用と、免疫機能の加齢化促進因子としての可能性について検討することを目的として、胸腺を萎縮させる作用が報告されている環境化学物質である di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) および perfluorooctanoic acid (PFOA) に着目し、その胸腺萎縮作用に胸腺の脂肪化が関与しているか検討を行った。

### 3. 研究の方法

16週齢のC57BL6/J雌マウスに、セサミオイルに溶解したDEHP(50, 500 mg/kg/day)またはPFOA(2, 20 mg/kg/day)を14日間連続で経口投与を行った。体重を測定後に解剖し、胸腺、脾臓、肝臓、脂肪、腎臓を摘出後、その重量を測定した。また、胸腺、脂肪における脂肪化に関連する遺伝子(PPAR $\gamma$ 、aP2)のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCR法により評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) DEHP投与が臓器重量に及ぼす影響

C57BL6/J雌マウスに、セサミオイルに溶解したDEHP(50, 500 mg/kg/day)を14日間連続で経口投与を行った。投与後、体重を測定した結果、どちらの投与群においても体重に変化は認められなかった(図1)。

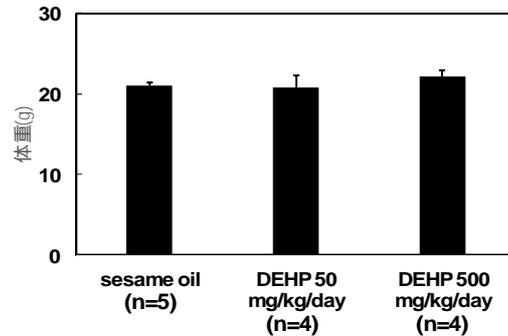
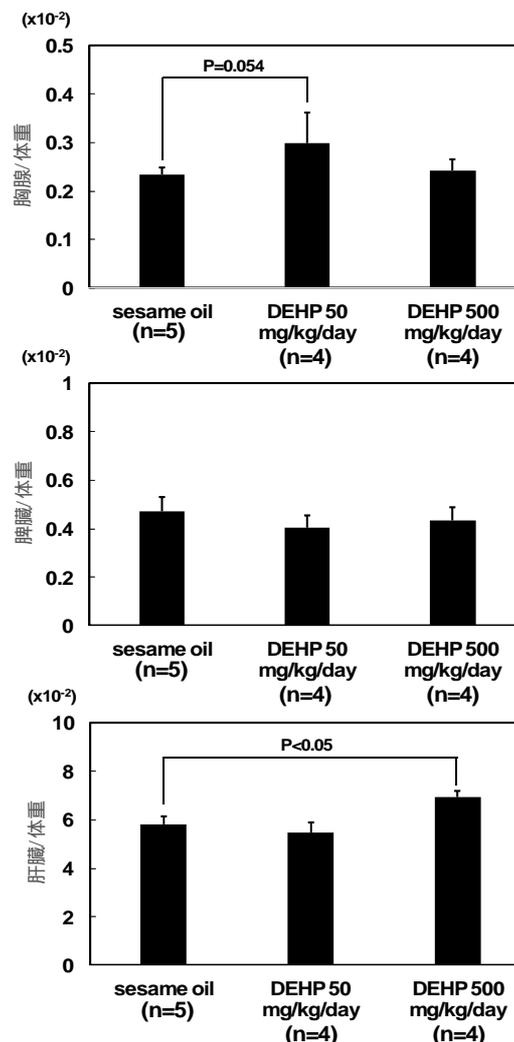


図1. マウス体重に対するDEHPの影響

その後解剖し、胸腺、脾臓、肝臓、脂肪、腎臓の重量を測定した。その結果、DEHP 50 mg/kg/day投与群において、脂肪重量の有意な増加が認められ、胸腺においても重量の増加傾向が認められた。また、DEHP 500 mg/kg/day投与群においては、肝臓、脂肪重量の有意な増加が認められた(図2)。



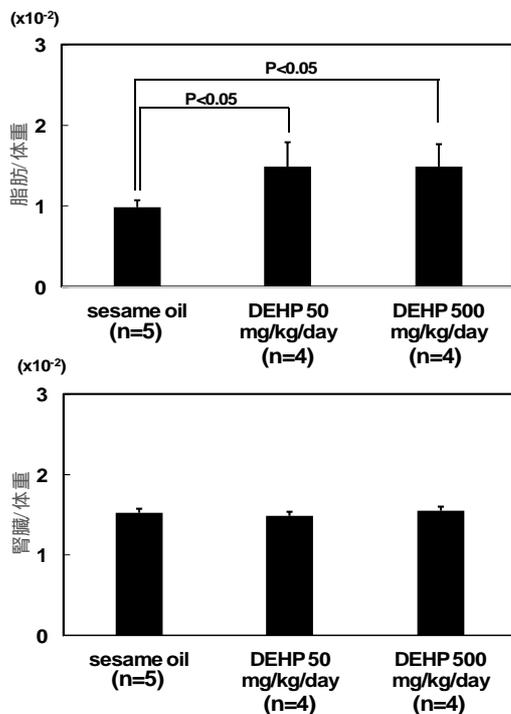


図 2. マウス臓器重量に対する DEHP の影響

(2) PFOA 投与が臓器重量に及ぼす影響

DEHP と同様に PFOA に C57BL6/J 雌マウスに、セサミオイルに溶解した PFOA(2, 20 mg/kg/day)を 14 日間連続で経口投与を行った。投与後、体重を測定した結果、PFOA 20 mg/kg/day 投与群において有意な体重減少が認められた(図 3)。

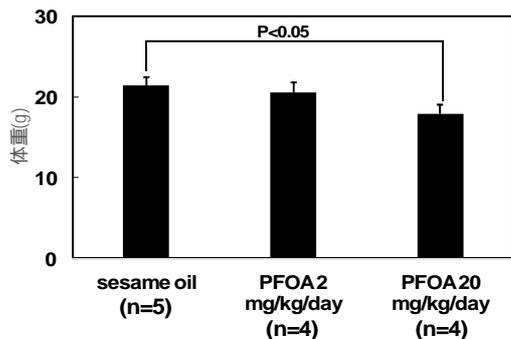


図 3. マウス体重に対する PFOA の影響

DEHP による検討と同様に、胸腺、脾臓、肝臓、脂肪、腎臓の重量を測定した。その結果、PFOA 2 mg/kg/day 投与群において肝臓重量の有意な増加、PFOA 20 mg/kg/day 投与群において、胸腺、脾臓重量の有意な減少、肝臓重量の有意な増加が認められた(図 4)。

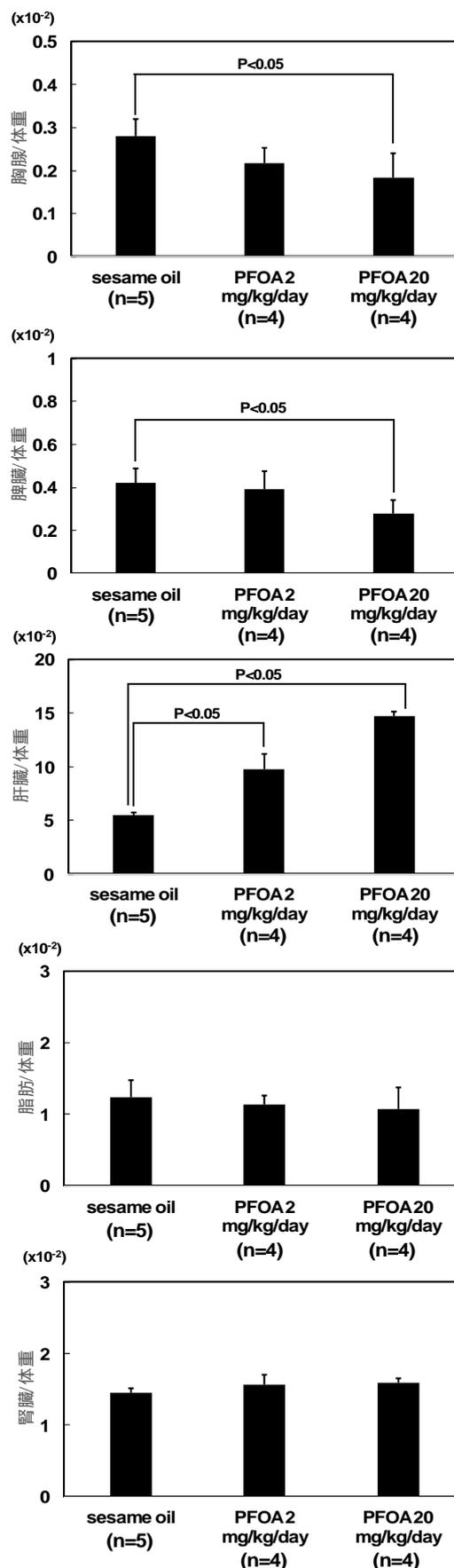


図 4. マウス臓器重量に対する PFOA の影響

(3) DEHP が胸腺および脂肪の aP2, PPAR $\gamma$  mRNA 発現量に及ぼす影響

DEHP 投与後、摘出した胸腺および脂肪から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR によりそれぞれの aP2, PPAR $\gamma$  mRNA 発現量を測定した。その結果、DEHP 50 mg/kg/day 投与群においては、胸腺 aP2, PPAR $\gamma$  および脂肪 aP2, PPAR $\gamma$  mRNA 発現の有意な上昇が認められた。一方で、DEHP 500 mg/kg/day 投与群においては、脂肪 aP2 mRNA の有意な発現上昇作用が認められたが、胸腺 PPAR $\gamma$  mRNA 発現に変化は認められず、胸腺 aP2 および脂肪 PPAR $\gamma$  mRNA に関しては、増加傾向は認められたものの、有意な変化ではなかった (図 5)。

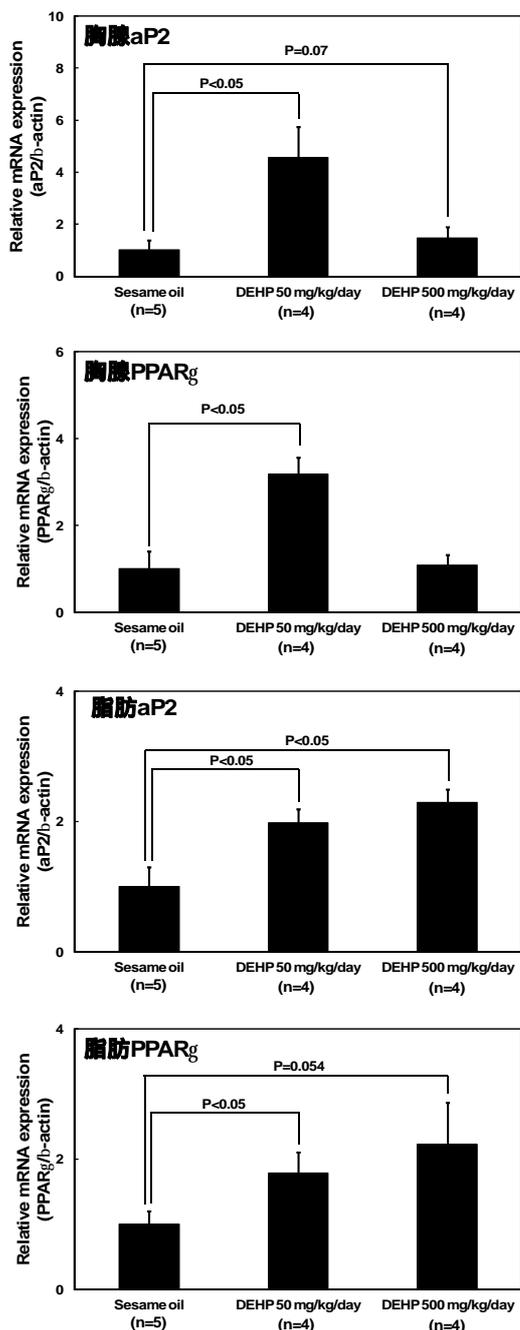


図 5. 胸腺および脂肪 aP2, PPAR $\gamma$  mRNA 発現量に対する DEHP の影響

(4) PFOA が胸腺および脂肪の aP2, PPAR $\gamma$  mRNA 発現量に及ぼす影響

DEHP と同様に、PFOA 投与後の胸腺および脂肪についても aP2, PPAR $\gamma$  mRNA 発現量を測定した。その結果、PFOA 2 mg/kg/day 投与群において、脂肪 aP2 mRNA 発現量の有意な上昇が認められた。また、PFOA 20 mg/kg/day 投与群において、胸腺 aP2, PPAR $\gamma$  mRNA 発現量の有意な上昇が認められた (図 6)。

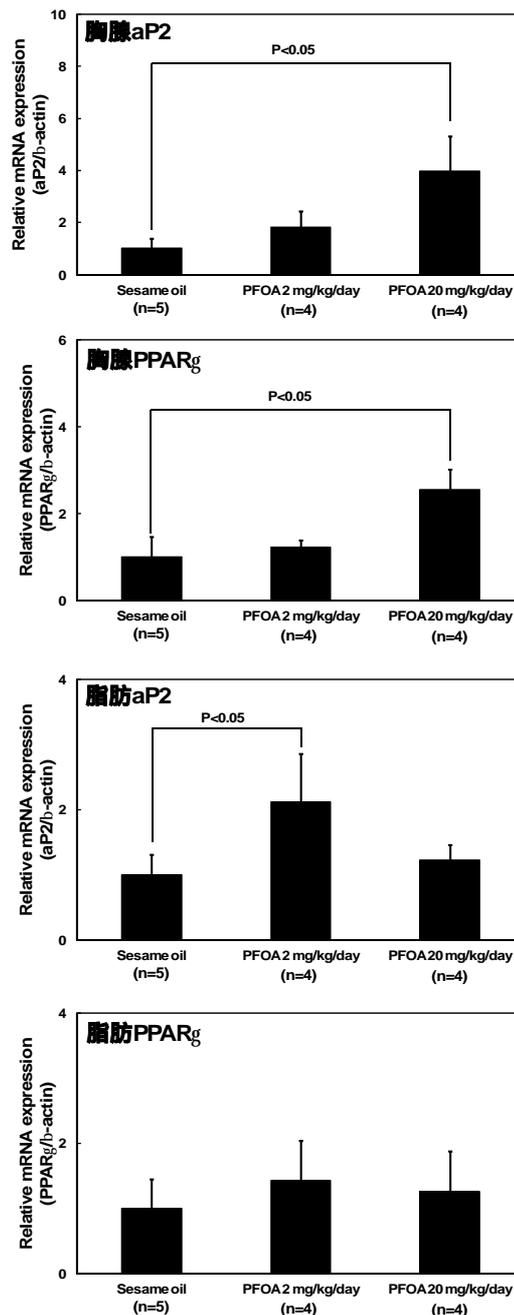


図 6. 胸腺および脂肪 aP2, PPAR $\gamma$  mRNA 発現量に対する PFOA の影響

(5) まとめ

本研究では、DEHP および PFOA を用いて検討を行った。DEHP は mono-ethylhexyl phthalate (MEHP)へと代謝される。MEHP は

PPAR $\gamma$ アゴニスト活性を有しており、これがPPAR $\gamma$ を介して肥満を促進することを示す研究報告がある。本検討においても過去の報告と同様に脂肪重量の増加が認められた。また、脂肪において脂肪細胞の分化マーカーである aP2 mRNA 発現量の上昇が認められ、脂肪の PPAR $\gamma$  mRNA 発現も上昇していた。胸腺においても PPAR $\gamma$  を介した作用が認められることが予想されるが、予想に反して、胸腺重量に有意な変化は認められなかった。しかし、50 mg/kg/day 投与群においては、胸腺 aP2、PPAR $\gamma$  mRNA 発現量の上昇が認められた。したがって、DEHP によって胸腺の加齢化が促進されていると考えられる。一方で、500 mg/kg/day 投与群では胸腺 aP2、PPAR $\gamma$  mRNA 発現量に有意な変化は認められなかったが、50 mg/kg/day 投与群とは異なり、肝臓重量の有意な増加が認められた。したがって、DEHP 500 mg/kg/day 投与群においては、肝機能にも影響が及んでいる可能性が予想される。この結果から、DEHP 投与量によって、胸腺に対する影響が濃度依存的でない原因として、肝機能の変化が関与している可能性が考えられる。

PFOA には胸腺委縮作用があることが明らかになっているが、この作用に PPAR $\gamma$  が関与しているかは不明である。本検討では、PFOA 20 mg/kg/day 投与群において、体重の有意な減少、肝臓重量の有意な上昇、脾臓重量の有意な減少が認められており、非特異的な毒性が表れていることが予想される。しかし、PFOA 20 mg/kg/day 投与群においては胸腺重量の有意な減少が認められた。さらに、胸腺 aP2、PPAR $\gamma$  mRNA 発現量の有意な上昇が認められた。この結果から、PFOA が PPAR $\gamma$  を介して胸腺の加齢化を促進している可能性が考えられる。

以上の結果から、DEHP および PFOA が PPAR $\gamma$  を介して胸腺機能の加齢化を促進す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 3 件)

- 1) Harada S, Hiomori Y, Nakamura S, Kawahara K, Fukakusa S, Maruno T, Noda M, Uchiyama S, Fukui K, Nishikawa J, Nagase H, Kobayashi Y, Yoshida T, Ohkubo T, Nakanishi T., Structural basis for PPAR transactivation by endocrine-disrupting organotin compounds. *Sci. Rep.*, 5, 8520, 2015. doi:10.1038/srep08520
- 2) Hiomori Y, Yui H, Nishikawa JI, Nagase H, Nakanishi T., Organotin compounds cause structure-dependent induction of progesterone in human choriocarcinoma Jar cells. *J. Steroid*

*Biochem. Mol. Biol.*, in press. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.10.010

- 3) Gutierrez-Mazariegos J, Nadendla EK, Lima D, Pierzchalski K, Jones JW, Kane M, Nishikawa J, Hiomori Y, Nakanishi T, Santos MM, Castro LF, Bourguet W, Schubert M, Laudet V., A mollusk retinoic acid receptor (RAR) ortholog sheds light on the evolution of ligand binding. *Endocrinology*, 155, 4275-4286, 2014. doi: 10.1210/en.2014-1181

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 廣森洋平、酒井紀行、小林亮、上代大地、中西剛、永瀬久光：トリフェニルスズの全身免疫系に対する加齢化促進作用の検討 (ポスター) 2014 年 9 月 11~12 日 (徳島)
- 2) 桑山隼、廣森洋平、西川淳一、中西剛、永瀬久光：酵母 two-hybrid 法を用いたヒトおよびマウス PXR アゴニスト活性評価系の構築 (口頭) 第 41 回 日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月 2~4 日 (神戸)
- 3) 廣森洋平、中西剛、永瀬久光：核内受容体を介した有機スズ化合物の毒性 (口頭) 第 41 回 日本毒性学会学術年会 (招待講演) 2014 年 2014 年 7 月 2~4 日 (神戸)
- 4) 廣森洋平、中西剛、永瀬久光：核内受容体を介した有機スズ化合物の毒性 (口頭) メタルバイオサイエンス研究会 2013 (招待講演) 2013 年 9 月 26~27 日 (静岡)

〔その他〕

ホームページ等

金城学院大学学術研究データベース

[http://tdb.kinjo-u.ac.jp/search/index.php/search/teacher\\_info?id=185&s\\_tl\\_subject=71&rd=depart\\_list](http://tdb.kinjo-u.ac.jp/search/index.php/search/teacher_info?id=185&s_tl_subject=71&rd=depart_list)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣森 洋平 (HIROMORI, Youhei)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：60515956