

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870475

研究課題名(和文) 極低周波変動磁界曝露による副腎皮質ホルモン分泌刺激作用の網羅的検討

研究課題名(英文) Evaluation of stimulative effect of adrenal steroids secretion by exposure to an extremely-low-frequency magnetic field.

研究代表者

北岡 和義 (Kitaoka, Kazuyoshi)

徳島大学・教養教育院(仮称)設置準備室・講師

研究者番号：50432753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：交流電源の送電線や家庭用電気機器から放出される50Hzないしは60Hzの周波数を持つ磁界である「極低周波変動磁界」が副腎皮質に対し直接ホルモン分泌を誘導する刺激作用を持つかどうかについてマウス培養細胞を用いて検討を行った。その結果、副腎皮質細胞は直接ELF-MFより副腎ステロイドホルモンの分泌を刺激されることが明らかとなり、そのメカニズムは細胞内のホスホジエステラーゼという酵素の活性抑制が関与することが示された。ただし同様に行ったヒト培養細胞を用いた実験ではその効果は軽微であった。

研究成果の概要(英文)：Extremely low-frequency magnetic fields (ELF-MFs) are generated by power lines and household electrical devices. In the current study, we investigated the effect of ELF-MF exposure on the mouse adrenal cortex-derived Y-1 cell line and the human adrenal cortex-derived H295R cell line to clarify whether the ELF-MF stimulates adrenal steroidogenesis directly. ELF-MF exposure was found to significantly stimulate adrenal steroidogenesis in Y-1 cells, but the effect was weak in H295R cells. Our results suggest that ELF-MF exposure stimulates adrenal steroidogenesis via an increase in intracellular cAMP caused by the inhibition of phosphodiesterase activity in Y-1 cells.

研究分野：環境生理学

キーワード：極低周波変動磁界 コルチコステロン アルドステロン 副腎皮質

1. 研究開始当初の背景

極低周波変動磁界 (extremely low frequency magnetic field; ELF-MF) は交流電源の送電線や家庭用電気機器から放出される 50Hz ないしは 60Hz の周波数を持つ磁界である。近年、慢性的な ELF-MF の曝露がヒトや実験動物において不安うつ様行動を引き起こすことが報告されている。

そのメカニズムについては、一般的なストレス反応系である視床下部-下垂体-副腎軸 (HPA 軸) の活性化による副腎皮質ホルモンの上昇がうつ様行動を誘導していると推察されているが、その詳細は明らかではない。請者はこれまでにマウス個体を用いた 200 時間、1.5 mT 強度の ELF-MF 曝露実験において、先行研究と同様なうつ様行動と、マウスの主要な副腎皮質ホルモンであるコルチコステロン血中濃度の有意な上昇を認め、それに対して副腎皮質刺激ホルモンである ACTH はコントロール群との間に差は認められなかった。

これらの結果から、慢性の高強度 ELF-MF 曝露は副腎皮質を直接的に刺激することで副腎皮質ホルモンの分泌を増加させ、それが個体においてうつ様行動、および血圧上昇作用を誘導することが示唆されるが、その刺激閾値や詳細なメカニズム、およびヒトにおいて同様の作用が認められるかどうかについては、現在のところ不明である。

2. 研究の目的

そこで本申請研究は、これまでの研究結果をさらに発展させるために、ELF-MF 曝露による副腎皮質ホルモン刺激作用の磁界強度および曝露時間への依存性、刺激メカニズム、およびヒト細胞での影響の有無について、マウスおよびヒト由来の培養細胞株を用いて詳細に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

培養細胞株はマウス副腎皮質由来 Y-1 細胞、およびヒト副腎皮質由来 H295R 細胞を用いた。それぞれの細胞は 35mm 径の培養用ディッシュにコンフルエントに至るまで 37 °C および 5% CO₂ 下の環境で培養され、その後 ELF-MF 曝露実験に用いた。なお、細胞内カルシウム濃度定量のみ 96 ウェルプレートを用いて培養を行った。ELF-MF 曝露は独自に製作した ELF-MF 曝露装置を用い、疑似曝露はコイルのみ除いた同様の構造の疑似曝露装置を用いて、両条件同時に 37 °C および 5% CO₂ 下の環境曝露を行った。ELF-MF の周波数は 60 Hz、磁界強度は 0.5 mT から 3 mT とし、曝露時間は 1 時間から 48 時間とした。

曝露後の細胞培養液および細胞を採取し、培養液については副腎皮質ホルモン定量に用いた。細胞については破碎処理等を行い、

遺伝子発現、蛋白発現、cAMP、細胞内カルシウム濃度、ホスホジエステラーゼ活性の定量に用いた。

4. 研究成果

まずマウス副腎皮質由来 Y-1 細胞に対し 1 ~ 48 時間の 1.5mT ELF-MF 曝露によるコルチコステロンおよびアルドステロン分泌への影響を検討した。その結果、6 時間以上の ELF-MF 曝露により有意なコルチコステロン、アルドステロンの分泌量増大が認められた (図 1A, B)。同細胞の副腎ステロイド合成に関わる酵素等の遺伝子、蛋白発現量を検討したところ、副腎ステロイド合成の律速段階に関与する CYP11A1 において ELF-MF 曝露による有意な発現上昇が認められた (図 1C, D)。このことから、副腎皮質細胞は直接 ELF-MF より副腎ステロイドの分泌を刺激されることが示された。

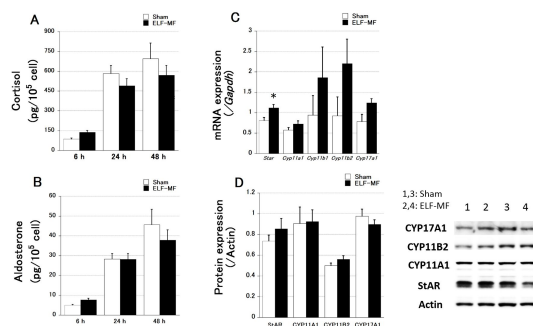


図 1. Y-1 細胞に対する ELF-MF 曝露の効果

一方でヒト副腎皮質細胞株である H295R 細胞では 1.5 mT ELF-MF 曝露による影響は非常に軽微であった (図 2)。

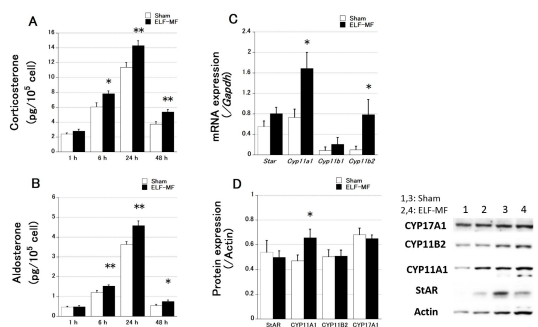


図 2. H295R 細胞に対する ELF-MF 曝露の効果

副腎ステロイドの分泌を調節する代表的な経路として副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) により活性化する PKA 系とアンジオテンシンにより活性化する PKC 系が存在する。そこで、そのうちどちらが ELF-MF による分泌増強に関与するかについて明らかにするために、細胞内 cAMP 濃度と細胞内カルシウム濃度について検討を行った。cAMP 濃度は 1 時間以上の 1.5mT ELF-MF 曝露により有意な増大を示し (図 3A)、さらにその PKA シグナル伝

達の下流に位置する CREB のリン酸化が 24 時間の 1.5mT ELF-MF 曝露により有意に増大した (図 3B)。一方で、細胞内カルシウム濃度を示す Fura-2 の 340nm/380nm 蛍光比では有意な減少を示した (図 3C)。このことから、ELF-MF 曝露による副腎ステロイド分泌増強は細胞内 cAMP 増加に伴う PKA 系の活性化が関与することが示された。

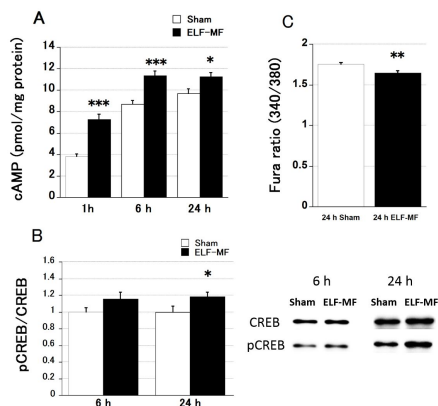


図 3. Y-1 細胞への ELF-MF 曝露による cAMP、CREB リン酸化、細胞内カルシウム濃度への影響

さらに ELF-MF 曝露による cAMP 増加のメカニズムを探るために cAMP 合成に関する G タンパクの サブユニット活性を阻害する NF449 の投与実験、および cAMP を分解するホスホジエステラーゼ (PDE) 活性の評価を行った。NF449 の投与により cAMP 濃度は有意に減少したが、疑似曝露群と ELF-MF 曝露群の間の cAMP 濃度の差は影響を受けなかった (図 4A)。一方で、PDE 活性は 6 時間以上の 1.5mT ELF-MF 曝露によって有意な減少を示した。これらの結果から、ELF-MF 曝露による cAMP の増大は PDE 活性の抑制により誘導されることが示された (図 4B)。

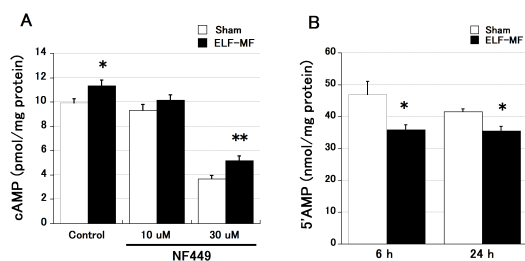


図 4. ELF-MF の効果に対する NF449 によるサブユニット活性阻害の影響および PDE 活性

また、ELF-MF 曝露による副腎ステロイド分泌の磁界強度依存性を検討するために、0.25mT から 3mT の 4 条件で 24 時間の ELF-MF 曝露を行い、コルチコステロン濃度を検討したところ、0.5mT 以上で有意なコルチコステロン濃度の増大が認められた (図 5)。これは国際非電離放射線防護委員会 (ICNIRP) が提案している一般公衆での曝露制限値 (0.2 mT) 以上であるが、職業曝露制限値 (1 mT)

以下の値である。ヒト由来細胞である H295R への曝露実験の結果より、ヒトへの副腎皮質ホルモン分泌への影響はマウスより弱いと考えられるが、今後ヒト個体への ELF-MF 曝露による副腎皮質ホルモン分泌への影響も検討が必要である。

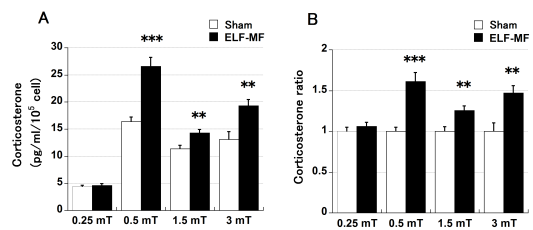


図 5. ELF-MF 曝露による副腎ステロイド分泌の磁界強度依存性

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 1 件)

Kitaoka K, Kawata S, Yoshida T, Kadoriku F, Kitamura M. Exposure to an Extremely-Low-Frequency Magnetic Field Stimulates Adrenal Steroidogenesis via Inhibition of Phosphodiesterase Activity in a Mouse Adrenal Cell Line. PLoS One. 2016 Apr 21;11(4):e0154167. 査読有, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0154167>

〔学会発表〕(計 5 件)

北岡 和義, 川田 知代: 超低周波変動磁界曝露はマウス副腎由来 Y-1 細胞のホスホジエステラーゼ活性を抑制させる, 第 30 回日本生体磁気学会大会, 2015 年 6 月 6 日. 旭川市大雪クリスタルホール(北海道旭川市)

北岡 和義, 川田 知代: マウス副腎由来 Y-1 細胞における超低周波変動磁界曝露による細胞内 cAMP 濃度上昇メカニズムの検討, 第 92 回日本生理学会大会, 2015 年 3 月 22 日. 神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

北岡 和義, 北村 光夫, 吉田 朋広, 角陸 文哉, 川田 知代: 極低周波変動磁界の曝露は cAMP 濃度の上昇を介して副腎皮質由来細胞株のステロイド分泌量を亢進させる, 第 29 回日本生体磁気学会大会, 2014 年 5 月 29 日. 大阪大学吹田キャンパス(大阪府吹田市)

角陸 文哉, 川田 知代, 北村 光夫, 北岡 和義, 極低周波変動磁界の慢性曝露

は H295R 細胞においてアルドステロン分泌を刺激する, 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 17 日. 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市)

川田 知代, 角陸 文哉, 北村 光夫, 北岡 和義, 極低周波変動磁界により誘導される副腎ステロイド分泌増強メカニズムの探索, 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 17 日. 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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

北岡 和義 (KITAOKA KAZUYOSHI)
徳島大学・教養教育院 (仮称) 設置準備室・
講師
研究者番号 : 5 0 4 3 2 7 5 3

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :