

平成12年度
厚生科学研究費補助金実績報告書
(生活安全総合研究事業)

研究課題名 (課題番号) :

ダイオキシンの毒性発現機構に関する研究

(H11-生活-010)

主任研究者 : 山下敬介

(広島大学助教授 医学部解剖学第一講座)

分担研究者 : 横崎恭之

(国立療養所 広島病院 医師)

平成13年 (2001年) 4月

別添2

厚生科学研究費補助金実績報告書
生活安全総合研究事業

ダイオキシンの毒性発現機構に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山下敬介

平成13年（2001年）4月

平成12年度 厚生科学研究費補助金
報告書
生活安全総合研究事業

目次

I. 総括研究報告書

ダイオキシンの毒性発現機構に関する
研究

山下敬介

II. 分担研究報告

組織再構築における細胞外マトリックス
とその受容体の相互作用

横崎恭之

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

別添 4

厚生科学研究費補助金
(生活安全総合研究事業)

総括研究報告書
ダイオキシンの毒性発現機構に関する研究

主任研究者 山下敬介
(広島大学医学部解剖学第一講座)

研究要旨

A. 研究目的

ダイオキシン類とは、ジベンゾパラジオキシン、ジベンゾフラン、ノンオルソ多塩化ビフェニールの総称である。ダイオキシン類は急性毒性、肝臓酵素誘導作用、生殖毒性、発生毒性（催奇形性）、免疫毒性などさまざまな毒性を有する。近年、ヒトの精子数減少とダイオキシンによる環境汚染との関連性について議論がされて、国民の間に、ダイオキシン類による汚染が将来ヒトの男性生殖機能へ重大な影響を及ぼす可能性があるのではないかとの不安が広がっている。

本研究は、ダイオキシン類の肝臓への影響、精巣毒性に焦点を絞り、これらの毒性発現機序について明らかにしようとするものである。ダイオキシンはダイオキシン受容体（別名：アリール炭化水素受容体、以下AhRと略）を介して毒性を発現すると考えられている。ダイオキシン類の肝臓への影響、精巣毒性に対するAhRの関与の有無について検討することも本研究の目的である。

本年度は3年計画の2年度目にあたるため、マウスを用いて、基礎的実験を

めた。

B. 研究方法

マウスの系統はダイオキシンに対する感受性が最も高いとされる系統のC57BL/6J（日本クレア）を用いた。AhRの関与を見るため、AhR遺伝子欠損マウス(AhR^{-/-})マウス（Mimura et al., 1997）を使用した。ダイオキシンは、ダイオキシン類のうち最も毒性が強いとされる、2,3,7,8四塩化ジベンゾパラジオキシン（2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 以下TCDDと略、Cambridge Isotope Laboratories Japan, CIL Japan 取扱、CIL製造、製品番号ED-901）をコーン油を溶媒として溶解した。溶媒投与（5,000 μ l/kg体重）を対照群とした。

1) 肝臓の変化発現機序：

8週齢の雄マウスを用いて、実験を行った。肝臓への影響をみるため、C57BL/6JマウスにTCDDを40 μ g/kg体重の割合で1回強制経口投与した。投与後1・3・7・14・28日でマウスを頸椎脱臼により屠殺した。AhR遺伝子欠損マウスにも同量のTCDDを投与して7日後に屠殺し、AhRの関与を見た。

2) 精巣毒性発現機序：

C57BL/6Jマウスの雄・雌を終夜交配した。膣栓発見日を妊娠0日（胎齢0日）とし、妊娠14.5日にTCDDを母体体重kg当たり0.625・2.5・10 μ gの割合で強制経口投与した。妊娠14.5日投与では、胎仔に口蓋裂は生じない。この理由で投与日を妊娠14.5日に設定した。出生後、仔をそのままダイオキシン投与母マウス（または、溶媒投与母マウス）に飼育させた。仔は胎生期（妊娠14.5日から出生

まで)にダイオキシンに暴露される他、母乳を通じても暴露される。出生日を0週0日として、4週で離乳した。10週齢に仔を屠殺した。

3) マウスの行動実験の基礎としての小脳発達の小脳内部位差：

ダイオキシンをはじめとする、内分泌攪乱物質は、脳への影響を考慮に入れることが肝要である。この基本的な考えに基づいて、山下らは、10年来マウスを用いて、薬物がマウスの行動に及ぼす影響を評価してきた。今年度は、基本的な実験として、マウス小脳発生の小脳内部位差を検討した。結果は論文として(論文1)発表した。

4) ダイオキシンによるマウス発生毒性発現機序に関する基礎的実験：

妊娠マウス(Jcl:ICR系統)の妊娠12.5日にTCDDを体重1kg当り40 μ gの割合で1回強制経口投与する。妊娠18.5日(満期)に母体を屠殺し、胎仔を取り出し、観察すると、ほぼすべての胎仔に口蓋裂と腎盂拡大(水腎症)が観察される。腎臓の発生を今回は検討し、論文4として発表した。

(倫理面への配慮)実験はヒトを対象としないので、倫理問題は生じない。また、実験動物はマウスを使用した。ヘルシンキ条約に基づき、動物は愛護的に扱い、十分な麻酔下にて屠殺、あるいは頸椎脱臼により屠殺した。

C. 研究結果

1) 肝臓の変化：

C57BL/6Jマウスの肝臓はTCDD投与1週後に腫張が認められた。組織像を見

ると、肝小葉の中心静脈周辺に空胞が多数出現していた。空胞はズダン黒染色に染まることから、その本体は脂肪であることが確認された。AhR遺伝子欠損マウスでは、TCDD投与によっても腫張は認められず、組織像で、脂肪沈着も見られなかった。この結果より、TCDDによる肝臓への脂肪沈着はAhRを介すると言えた。

また、AhR遺伝子欠損マウスはC57BL/6Jマウスに比較して、肝臓の重量(肝臓の体重に対する比重量)が小さいことが認められた。これは、アメリカウイスコンシンのDr. Bradfieldの作出したAhR遺伝子欠損マウスと同様の所見であり、AhR遺伝子欠損による表現型の1つであった(Larvis et al., 2000)。以上の結果は、2001年韓国慶州市で開催される国際ダイオキシン会議で発表する。

2) 精巣毒性発現の有無：

TCDD10 μ g/kg母体体重投与群では、妊娠は継続し出産にいたるが、仔は出生後1-2日のうちに死亡した。死亡の原因については明らかにできなかった。TCDD2.5 μ g/kg母体体重投与群では、仔は出生し、10週まで成熟した。これを最高用量群とした。この精巣・精巣上体を取りだし、組織切片を作製し、投与群と対照群を比較した。精巣にはTCDD投与による明瞭な変化を認めなかった。曲精細管内のセルトリ細胞、精祖細胞から精子にかけての細胞に明瞭な影響は観察できなかった。時に、精祖細胞から精子にかけての細胞に細胞死の像を見たが、実験条件を隠して、ブラインドで観察・比較したところ、どちらとも正確にいい当てることはできなかった。

精巣上体をすりつぶし、精子数を血球計算盤で算出した。これもTCDD投与による精子数の変化を認めなかった。

さらに、精巣上体の精子についてHamilton-Thorneによる精子運動能検査による検討を加えた。しかし、運動能に与えるTCDD投与の影響を捉えることができなかった。

肛門陰門間距離 Anogenital distance (ARD)は測定しなかった。

3) マウスの行動実験の基礎としての小脳発達の小脳内部位差：

Jcl:ICRマウスの雄と雌を1晩同じケージの中にいれて、交配した。翌朝雌マウスに膣栓が確認できたものを、妊娠の可能性ありとして、1匹にして出産まで飼育した。膣栓発見の日の午前0時をもって妊娠の開始とし(妊娠0日0時間)、妊娠19日で出産したマウスの新生仔を実験に供した。この出産日を生後0日として、経時的に小脳の正中矢状断面の光学顕微鏡切片を作製し、小脳の発達を検討した。

小脳において、外果粒細胞層は発生とともに一度厚くなり、マウスにおいては出生後果粒層へ移動することになり、最終的に外果粒層は消失する。私達はマウスの小脳の生後発達を外果粒層細胞の移動を目安に判定した。目的は、小脳にある10個の葉の内部で差があるのかどうか、葉と葉の間、すなわち葉間に差があるのかどうかを調べることにより、小脳発達の部位差を知ることにあつた。10個の葉のうち前側の5葉は前葉、残りの5葉は後葉と呼ばれるが、小脳発生は外果粒層の厚さで見ると、前葉の発生が後葉の発生よりも早く進むことが明らかとなった。1999年に私達が出した論文

(Ohmori et al., 1999)等の、薬物による小脳発生の評価にも本年度の研究はその基礎的データを与えるものである。

4) ダイオキシンによるマウス発生毒性発現機序に関する基礎的実験：

平成12年度には、泌尿器系の発生の総説を著わした。泌尿器系の発生は、中間胚葉からおこり、前腎・中腎・後腎が発生の時間経過を追って順に発生しては、消失し、最終的に後腎が成人の腎臓として機能する。腎臓の形態形成とくにその遺伝子制御機構について総説的に述べた。ダイオキシンによる腎盂・尿管への影響を評価するための基礎的なデータは不足している。今まで、マウスでの腎盂・尿管の発生をきちんと記載した論文はなく、現在準備中である。

D. 考察

1) 肝臓の変化：

肝臓の変化については、予想通り、ダイオキシンによる肝臓の脂肪変性はAhRを介する反応であることが明らかとなった。

2) 精巣毒性発現の有無：

精巣毒性については、アメリカ ウィスコンシン州のDr. Richard Petersonらのグループ(Mably et al., 1992a, 1992b, 1992c; Bjerke and Peterson, 1994; Bjerke et al., 1994a, 1994b; Theobald and Peterson, 1997; Roman and Peterson, 1998; Roman et al., 1998a, 1998b)やドイツ ベルリンのDr. Diether NeubertとDr. Ibrahim Chahoudのグループ(Chahoud et al., 1989; Rune et al., 1991; Chahoud et al., 1992; Faqi et al., 1998)とアメリカ

E P AのDr. Leon Earl Gray Jr.のグループ (Gray et al., 1995; Gray and Kelce 1997; Gray et al., 1997)が一連の実績を納め、世界の標準となっている。しかしながら、これらの仕事の大半はラットを用いて行われており、マウスで結果をだしたのは、このうち、Theobald and Peterson (1997)のみである。雄のF1仔動物のダイオキシンによる影響のエンドポイントとして、彼等は、腹側前立腺の重量減少、凝固腺重量の減少、胸腺重量の減少、腎盂拡大と精巣上体の精子数減少を報告している。

こと、精巣毒性に関しては、一般にダイオキシン類による精巣毒性の感受性を種差の面から見ると、ラットが最も高く、マウスは低いとされる。しかしながら、精巣毒性の発現機序をAhRを手がかりに解明してゆこうとすれば、マウスを使用せざるを得ない。

3) マウスの行動実験の基礎としての小脳発達の小脳内部位差：

これについては、今までたくさんの論文が発表されているが、実は、小脳の葉内の発生・発達については、論文間で、観察する葉（10葉のうち）が、まちまちで、本当の意味での比較がなされた論文がないというのが現実であった。今回の論文はその点を指摘した上で、自分達の観察データを解析したことに意義があると言える。

4) ダイオキシンによるマウス発生毒性発現機序に関する基礎的実験：

E. 結論

肝臓の変化発現機序については、基礎的データをとることができたといえる。

精巣毒性発現機序の項目については、初年度の結果では、うまくエンドポイントを捉えることができなかった。

参考文献

Bjerke DL and Peterson RE (1994) Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male rats: different effects of *in utero* versus lactational exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127: 241-249.

Bjerke DL, Sommer RJ, Moore RW, and Peterson RE (1994a) Effects of *in utero* and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure on responsiveness of the male rat reproductive system to testosterone stimulation in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127: 250-257.

Bjerke DL, Brown TJ, Maclusky NJ, Hochberg RB, and Peterson RE (1994b) Partial demasculinization and feminization of sex behavior in male rats by *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is not associated with alterations in estrogen receptor binding or volumes of sexually differentiated brain nuclei. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127: 258-267.

Chahoud I, Krowke R, Schimmel A, Merker H-J, and Neubert D (1989) Reproductive toxicity and pharmacokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects of high doses on the fertility of male rats. *Arch Toxicol.* 63: 432-439.

Chahoud I, Hartmann J, Rune GM, and Neubert D (1992) Reproductive toxicity and toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 3. Effects of single doses on the testis of male rats. *Arch. Toxicol.* 66: 567-572.

Faqi AS, Dalsenter PR, Merker H-J, and

Chahoud I (1998) Reproductive toxicity and tissue concentration of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 150: 383-392.

Gray LE Jr, Kelce WR, Monosson E, Ostby JS, and Birnbaum LS (1995) Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 108-118.

Gray LE Jr and Kelce WR (1997) A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long Evans hooded rat offspring.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 146: 11-20.

Gray LE Jr, Wolf C, Mann P, Ostby JS (1997) *In utero* exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 146: 237-244.

Mably TA, Moore RW, and Peterson RE (1992a) *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on androgenic status.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 114: 97-107.

Mably TA, Moore RW, Goy RW, and Peterson RE (1992b) *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 114: 108-117.

Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Ritzpatrick A, and Peterson RE (1992c) *In*

utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 3.

Effects on spermatogenesis and reproductive capability.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 114: 118-126.

Larvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy c, Glover E, Bentz M, Southard J, Bradfield CA (2000) Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 10442-10447.

Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, and Fujii-Kuriyama Y (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetra- chlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. Genes to Cells 2: 645-654.

Ohmori H, Ogura H, Yasuda M, Nakamura S, Hatta T, Kawano K, Michikawa T, Yamashita K, and Mikoshiba K (1999) Developmental neurotoxicity of phenytoin on granule cells and Purkinje cells in mouse cerebellum. J. Neurochem. 72 : 1497-1506 (1999).

Roman BL and Peterson RE (1998) *In utero* and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin impairs prostate development. 1. Effects on gene expression.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 150: 240-253.

Roman BL, Pollenz RS, and Peterson RE (1998a) Responsiveness of the adult male rat reproductive tract to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure: Ah receptor and ARNT expression CYP1A1 induction, and Ah receptor down-regulation.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 150: 228-239.

Roman BL, Timms BG, Prins GS, and Peterson RE (1998b) *In utero* and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-

p-dioxin impairs prostate development. 2. Effects on growth and cytodifferentiation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 150: 254-270.

Rune GM, de Souza Ph, Merker H-J, and Neubert D (1991) Morphological and histochemical pattern of response in rat testes after administration of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Histol. Histopath. 6: 459-467.

Theobald HM and Peterson RE (1997) *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: effects on development of the male and female reproductive system of the mouse. Toxicol. Appl. Pharmacol. 145: 124-135.

F. 健康危険情報

今回の実験から直ちにヒトへの影響を外挿することはできない。健康危険情報（国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報）として、厚生省に報告すべき事柄はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1)

著者：Setsuko Yamasaki, Hiromitsu Ohmori, Keisuke Yamashita, and Mineo Yasuda
論文の名称：A morphometric study on postnatal development of the external granular layer of mice cerebella, focusing on local difference.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Hiroshima Journal of Medical Sciences 50 (2): 53-60 (2000).

2)

著者：Keisuke Yamashita, Saori Okamura, Kohji A. Matsui, Yukari

Kanou, and Mineo Yasuda
論文の名称：Microscopic findings of the liver of C57BL/6J and aryl hydrocarbon receptor-null mice after a single administration of TCDD.
発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Dioxin 2001, The 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Organohalogen Compounds 53: 405-407 (2001)

3)

著者：Kazumi Sugihara, Shigeyuki Kitamura, Tuyoshi Yamada, Shigeru Ohta, Keisuke Yamashita, Mineo Yasuda, and Yoshiaki Fujii-Kuriyama
論文の名称：Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine oxidase / xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Biochemical and Biophysical Research Communications 281 (5): 1093-1099 (2001).

4)

著者：山下敬介
論文の名称：連載講座 個体の生と死、泌尿器の発生
発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：生体の科学 51 (4): 328-335 (2000).

5)

著者：Naoki Mori, Mizuyo H. Tsugane, Keisuke Yamashita, Yoshikazu Ikuta, and Mineo Yasuda
論文の名称：Pathogenesis of retinoic acid-induced abnormal pad patterns on mouse volar skin.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Teratology 62 (4): 181-188 (2000).

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

分担研究報告書

組織再構築における細胞外マトリックスとその受容体の相互作用

横 崎 恭 之

国立療養所広島病院

緒言

ダイオキシンの毒性の一つに催奇形性が、挙げられるが、奇形は発生異常の一つの形と考えられる。発生時には時間的連続性をもった組織の再構築が行われるが、この際細胞外マトリックス-マトリックス受容体の相互作用が、大きな役割を果たしていると考えられる。そこで、ダイオキシンの生物毒性機構の解明を目的とし、細胞外マトリックスとその受容体であるインテグリンの相互作用について検討した。1つのマトリックスに対して複数のインテグリンが受容体として機能しているが、多くのインテグリン欠損マウスは致命的で、この重複性は単に予備としての存在ではないようである。複数のインテグリンの使い分けの機序を知ることにより、組織の動的構築機構の解明に道が開かれるものと考えられる。RGD (Arg-Gly-Asp) 配列はインテグリンの認識する配列として良く知られているが、

それ以外の配列を認識するインテグリンも存在する。我々はnon-RGD認識インテグリン $\alpha 9\beta 1$ のテネイシン-C内の認識配列を同定したところ、立体構造上RGDに最も近接した部位に存在した¹⁾。このことから、 $\alpha 9\beta 1$ はリガンド結合をRGDインテグリンと競合する可能性を考え、今回RGDを持つもう一つのリガンド、オステオポンチンにおける認識部位を同定した。

研究目的

I. 我々はインテグリン $\alpha 9\beta 1$ のテネイシン-Cとオステオポンチン内の認識アミノ酸配列を明らかにした (Yokosaki Y, et al, J. Biol. Chem. 273, 1998; Yokosaki Y, et al J. Biol. Chem. 274, 1999)。いずれの認識部位も多くのインテグリンが認識するArg-Gly-Asp (RGD) 配列に隣接しており分子の大きさからは $\alpha 9\beta 1$ とRGDを認識するインテグリンが同時に結合できるとは考えにくい。同じリガンドに重複する受容体インテグリンの切り替え機構を明らかにするため、今回まずこの競合の有無を確認することを目的とした。テネイシン、オステオポンチンともに傷害組織で発現の亢進が認められており、また $\alpha 9\beta 1$ は血管平滑筋に存在する。

インテグリン $\alpha 9\beta 1$ の生物学的特性をさらに明らかにするため、新たなリガンドの存在を検討した。

進行状況

I. 1) 遺伝子工学的に膜貫通ドメインと細胞質ドメインを欠いたヒトインテグリン αv および $\beta 3$ サブユニットcDNAを作成し、両者をそれぞれ発現ベクターに組み込み、CHO細胞に導入した。いくつかのクローンの培養上清を αv サブユニッ

トに対する抗体 L230を用いた免疫沈降でスクリーニングし、分泌型 $\alpha\beta 3$ 産生株を得た。これを、アフィニティーカラムで精製し、リガンドへの結合性を確かめた後、 $\alpha 9$ -transfected SW480 (ヒト大腸癌由来) とテネイシン-Cの細胞接着アッセイの系に加えた。テネイシン-Cは $\alpha\beta 1$ の認識配列とRGD配列両者を持ち合わせる第3フィブロネクチンIII型レピートのリコンビナント断片を作成し用いた。Mock-transfectantはリコンビナントテネイシン-C断片に接着せず、 $\alpha 9$ -transfected SW480細胞はよく接着し、これは抗 $\alpha\beta 1$ 抗体Y9A2により完全に阻害された。この $\alpha\beta 1$ 特異的な細胞接着は可溶性 $\alpha\beta 3$ を加えることにより濃度依存性に抑制された。リガンド内の異なるが近接した部位を認識する2つのインテグリン $\alpha\beta 1$ と $\alpha\beta 3$ がテネイシン-Cに対する結合を競合した。インテグリン $\alpha\beta 1$ はRGDを認識するインテグリンをリガンドから脱着させることにより細胞機能の調節に役割を果たしている可能性が示唆された。

2) 新たにtissue transglutaminase、凝固因子XIIIおよびvon Willebrand factor前駆蛋白、さらに蛇毒ディスインテグリンEC3、EC6がリガンドであることが判明した。Transglutaminaseはマトリックス蛋白を架橋する酵素であり、この活性を持つ凝固因子XIIIはフィブリン塊の形成に役割を果たす。 $\alpha\beta 1$ は血栓形成を介した血管壁リモデリングに関与していると考えられた。また、自然界に存在する蛇毒に標的とされることは生物学的に重要な役割を果たしていることを示すものと考えられた。

研究成果刊行物一覧表 分担研究者：横崎恭之

原著

1)
著者：Koji Arihiro, Mayumi Kaneko, Satoshi Fujii, Koki Inai, and Yasuyuki Yokosaki

論文の名称：Significance of $\alpha\beta 1$ and $\alpha\beta 6$ integrin expression in breast carcinoma.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Breast Cancer 7: 19-26 (2000).

2)

著者：Yasuhiro Ito, Eiji Miyoshi, Tsutomu Takeda, Masato Sakon, Masahiko Tsujimoto, Yasuyuki Yokosaki, and Nariaki Matsuura

論文の名称：ets-1 expression in extrahepatic bile duct carcinoma and cholangiocellular carcinoma.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Oncology 58: 248-252 (2000).

3)

著者：Ito Y, Monden M, Takeda T, Eguchi H, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Sakon M, Nakamura M, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao M, Yokosaki Y, and Matsuura N

論文の名称：The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：British J. Cancer 82: 1211-1217 (2000).

4)

著者： Hiroo Takahashi, Takashi Isobe, Shiro Horibe, Junichi Takagi, Yasuyuki Yokosaki, Dean Sheppard, and Yuji Saito

論文の名称： Tissue transglutaminase, coagulation factor XIII and the pro-polypeptide of von Willebrand factor are all ligands for the integrins $\alpha 9\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称： J. Biol. Chem. 275: 23589-23595 (2000).

5)

著者： Cesary Marcinkiewicz, Yasuyuki Taooka, Yasuyuki Yokosaki, Juan J Calvete, Mariola M.

Marcinkiewicz, Roy R. Lobb, Stefan Niewiarowski, and Dean Sheppard
論文の名称： Inhibitory effects of MLDG-containing heterodimeric disintegrins reveal distinct structural requirements for interaction of the integrin $\alpha 9\beta 1$ with VCAM-1, tenascin-C and osteopontin.

J. Biol. Chem. 275: 31930-31937 (2000).

6)

著者： 重藤えり子、横崎恭之、村上 功
論文の名称： 看護学生と病院職員における二段階ツベルクリン反応検査。

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称： 結核 75: 27-31 (2000).

総説

1)

著者： Yasuyuki Yokosaki, and Dean Sheppard

論文の名称： Mapping of the cryptic

integrin-binding site in osteopontin suggests a new mechanism by which thrombin can regulate inflammation and tissue repair.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称： Trend Cardiovasc. Med. 10: 155-159 (2000).

著書

1)

著者： 横崎恭之

論文の名称： $\beta 4$ サブファミリー.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称： 接着分子ハンドブック、細胞工学別冊 (宮坂昌之 編)、秀潤社 pp. 55-57 (2000).

2)

著者： 横崎恭之

論文の名称： $\beta 5$ サブファミリー.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称： 接着分子ハンドブック、細胞工学別冊 (宮坂昌之 編)、秀潤社 pp. 58-59 (2000).

3)

著者： 横崎恭之、村上 功

論文の名称： $\beta 6$ サブファミリー.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称： 接着分子ハンドブック、細胞工学別冊 (宮坂昌之 編)、秀潤社 pp. 60-61 (2000).

4)

著者： 横崎恭之

論文の名称： インテグリン. 第5章 接着分子、

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称： Vascular Biology ナビゲーター

(丸山征郎、安藤譲二、佐藤靖史 編)

メディカルレビュー社、pp. 194-195 (2000).

厚生科学研究費補助金実績報告書
生活安全総合研究事業

ダイオキシンの毒性発現機構に関する研究

平成12年度 分担研究報告書

組織再構築における細胞外マトリックスと
その受容体の相互作用

分担研究者 横崎恭之
(主任研究者 山下敬介)

平成13年(2001年)4月

分担研究報告書

組織再構築における細胞外マトリックスとその受容体の相互作用

横 崎 恭 之

国立療養所広島病院

緒言

ダイオキシンの毒性の一つに催奇形性が、挙げられるが、奇形は発生異常の一つの形と考えられる。発生時には時間的連続性をもった組織の再構築が行われるが、この際細胞外マトリックス-マトリックス受容体の相互作用が、大きな役割を果たしていると考えられる。そこで、ダイオキシンの生物毒性機構の解明を目的とし、細胞外マトリックスとその受容体であるインテグリンの相互作用について検討した。1つのマトリックスに対して複数のインテグリンが受容体として機能しているが、多くのインテグリン欠損マウスは致死的で、この重複性は単に予備としての存在ではないようである。複数のインテグリンの使い分けの機序を知ることにより、組織の動的構築機構の解明に道が開かれるものと考えられる。RGD

(Arg-Gly-Asp) 配列はインテグリンの認識する配列として良く知られているが、それ以外の配列を認識するインテグリンも存在する。我々は non-RGD 認識インテグリン $\alpha 9 \beta 1$ のテネイシン-C 内の認識配列を同定したところ、立体構造上 RGD に最も近接した部位に存在した¹⁾。このことから、 $\alpha 9 \beta 1$

はリガンド結合を RGD インテグリンと競合する可能性を考え、今回 RGD を持つもう一つのリガンド、オステオポンチンにおける認識部位を同定した。

研究目的

- I. 我々はインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ のテネイシン-C とオステオポンチン内の認識アミノ酸配列を明らかにした (Yokosaki Y, et al, *J. Biol. Chem.* 273, 1998; Yokosaki Y, et al *J. Biol. Chem.* 274, 1999)。いずれの認識部位も多くのインテグリンが認識する Arg-Gly-Asp (RGD) 配列に隣接しており分子の大きさからは $\alpha 9 \beta 1$ と RGD を認識するインテグリンが同時に結合できるとは考えにくい。同じリガンドに重複する受容体インテグリンの切り替え機構を明らかにするため、今回まずこの競合の有無を確認することを目的とした。テネイシン、オステオポンチンともに傷害組織で発現の亢進が認められており、また $\alpha 9 \beta 1$ は血管平滑筋に存在する。

インテグリン $\alpha 9 \beta 1$ の生物学的特性をさらに明らかにするため、新たなリガンドの存在を検討した。

進行状況

- I. 1) 遺伝子工学的に膜貫通ドメインと細胞質ドメインを欠いたヒトインテグリン αv および $\beta 3$ サブユニット cDNA を作成し、両者をそれぞれ発現ベクターに組み込み、CHO 細胞に導入した。いくつかのクローンの培養上清を αv サブユニットに対する抗体 L230 を用いた免疫沈降でスクリーニングし、分泌型

$\alpha v\beta 3$ 産生株を得た。これを、アフィニティーカラムで精製し、リガンドへの結合性を確かめた後、 $\alpha 9$ -transfected SW480（ヒト大腸癌由来）とテネイシン-C の細胞接着アッセイの系に加えた。テネイシン-C は $\alpha 9\beta 1$ の認識配列と RGD 配列両者を持ち合わせる第3フィブロネクチン III 型レピートのリコンビナント断片を作成し用いた。Mock-transfectant はリコンビナントテネイシン-C 断片に接着せず、 $\alpha 9$ -transfected SW480 細胞はよく接着し、これは抗 $\alpha 9\beta 1$ 抗体 Y9A2 により完全に阻害された。この $\alpha 9\beta 1$ 特異的な細胞接着は可溶性 $\alpha v\beta 3$ を加えることにより濃度依存性に抑制された。リガンド内の異なるが近接した部位を認識する2つのインテグリン $\alpha 9\beta 1$ と $\alpha v\beta 3$ がテネイシン-C に対する結合を競合した。インテグリン $\alpha 9\beta 1$ は RGD を認識するインテグリンをリガンドから脱着させることにより細胞機能の調節に役割を果たしている可能性が示唆された。

2) 新たに tissue transglutaminase、凝固因子 XIII および von Willebrand factor 前駆蛋白、さらに蛇毒ディスインテグリン EC3、EC6 がリガンドであることが判明した。Transglutaminase はマトリックス蛋白を架橋する酵素であり、この活性を持つ凝固因子 XIII はフィブリン塊の形成に役割を果たす。 $\alpha 9\beta 1$ は血栓形成を介した血管壁リモデリングに関与していると考えられた。また、自然界に存在する蛇毒に標的とされることは生物学的に重要な役割を果たしていることを示すものと考えられた。

1)

著者：Setsuko Yamasaki, Hiromitsu Ohmori, Keisuke Yamashita, and Mineo Yasuda

論文の名称：A morphometric study on postnatal development of the external granular layer of mice cerebella, focusing on local difference.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：

Hiroshima Journal of Medical Sciences 50 (2): 53-60 (2000).

概要：小脳において、外果粒細胞層は発生とともに一度厚くなり、マウスにおいては出生後果粒層へ移動することになり、最終的に外果粒層は消失する。私達はマウスの小脳の生後発達を外果粒層細胞の移動を目安に判定した。目的は、小脳にある10個の葉の内部で差があるのかどうか、葉と葉の間、すなわち葉間に差があるのかどうかを調べることにより、小脳発達の部位差を知ることにあった。10個の葉のうち前側の5葉は前葉、残りの5葉は後葉と呼ばれるが、小脳発生は外果粒層の厚さで見ると、前葉の発生が後葉の発生よりも早く進むことが明らかとなった。

2) 著者：Keisuke Yamashita, Saori Okamura, Kohji A. Matsui, Yukari Kanou, and Mineo Yasuda

論文の名称：Microscopic findings of the liver of C57BL/6J and aryl hydrocarbon receptor-null mice after a single administration of TCDD.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Dioxin 2001, The 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Organohalogen Compounds (発表予定、印刷中)

概要：ダイオキシン類には肝臓解毒酵素を強力に誘導する作用がある。肝臓における変化を光学顕微鏡的に観察した。ダイオキシン類はアリール炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon receptor, AhR) を介して作用を発揮するとされる。AhR+/+の系統のC57BL/6J成獣マウスに2,3,7,8四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)を単回強制経口投与したのち、1, 3, 7, 14, 28日後に肝臓を取り出し観察した。すると、肝臓には脂肪化が見られた。一方、AhR-/-であるAhR遺伝子欠損マウスに同様の実験を行ったところ、脂肪化は認められなかった。

3)

著者：Kazumi Sugihara, Shigeyuki Kitamura, Tuyoshi Yamada, Shigeru Ohta, Keisuke Yamashita, Mineo Yasuda, and Yoshiaki Fujii-Kuriyama

論文の名称：Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine oxidase / xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Biochemical and Biophysical Research Communications 281 (5): 1093-1099 (2001).

概要：環境汚染物質として悪名高いダイオキシンのうち、最も毒性の強い2,3,7,8四塩化ジベンゾパラジオキシン（TCDDと略）はマウスの肝臓において、ERODとMRODという代謝酵素を誘導する。さらに、キサンチン酸化酵素とキサンチン脱水素酵素の活性を上昇させる。以上の活性の上昇はアリール炭化水素受容体（別名ダイオキシン受容体、AhRと略）遺伝子欠損マウスでは、全く見られなかったことより、AhR依存性の反応であることが判明した。

4)

著者：山下敬介

論文の名称：連載講座 個体の生と死、泌尿器の発生

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：生体の科学 51 (4): 328-335 (2000).

概要：泌尿器系の発生は、中間中胚葉からおこり、前腎・中腎・後腎が発生の時間経過を追って順に発生しては、消失し、最終的に後腎が成人の腎臓として機能する。腎臓の形態形成とくにその遺伝子制御機構について総説的に述べてみた。

5)

著者：Naoki Mori, Mizuyo H. Tsugane, Keisuke Yamashita, Yoshikazu Ikuta, and Mineo Yasuda

論文の名称：Pathogenesis of retinoic acid-induced abnormal pad patterns on mouse volar skin.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Teratology 62 (4): 181-188 (2000)

概要：レチノイン酸はマウスに四肢奇形を誘発する。マウスには掌蹠パッドと呼ばれる手足の掌蹠側に特有の皮膚紋理パターンがあり、骨格奇形を起こす投与量よりも低用量で、掌蹠パッドの異常を生じる。このパッド異常を観察することは、先天異常発見のための鋭敏な指標となりうることが明らかにされた。

6)

著者: Kochhar DM.

論文の名称: Teratogenicity of retinoic acid.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称: Teratology. 2000 Oct;62(4):178-80.

研究成果刊行物一覧表

分担研究者：横崎恭之

原著

1. Koji Arihiro, Mayumi Kaneko, Satoshi Fujii, Koki Inai, and Yasuyuki Yokosaki (2000) Significance of $\alpha 9\beta 1$ and $\alpha v\beta 6$ integrin expression in breast carcinoma. *Breast Cancer* 7: 19-26.
2. Yasuhiro Ito, Eiji Miyoshi, Tsutomu Takeda, Masato Sakon, Masahiko Tsujimoto, Yasuyuki Yokosaki, and Nariaki Matsuura (2000) ets-1 expression in extrahepatic bile duct carcinoma and cholangiocellular carcinoma. *Oncology* 58: 248-252.
4. Ito Y, Monden M, Takeda T, Eguchi H, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Sakon M, Nakamura M, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao M, Yokosaki Y, and Matsuura N (2000) The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *British J Cancer* 82: 1211-1217.
5. Hiroo Takahashi, Takashi Isobe, Shiro Horibe, Junichi Takagi, Yasuyuki Yokosaki, Dean Sheppard, and Yuji Saito (2000) Tissue transglutaminase, coagulation factor XIII and the pro-polypeptide of von Willebrand factor are all ligands for the integrins $\alpha 9\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$. *J Biol Chem* 275: 23589-23595.
6. Cesary Marcinkiewicz, Yasuyuki Taooka, Yasuyuki Yokosaki, Juan J Calvete, Mariola M. Marcinkiewicz, Roy R. Lobb, Stefan Niewiarowski, and Dean Sheppard (2000) Inhibitory effects of MLDG-containing heterodimeric disintegrins reveal distinct structural requirements for interaction of the integrin $\alpha 9\beta 1$ with VCAM-1, tenascin-C and osteopontin. *J Biol Chem* 275: 31930-31937.
7. 重藤えり子、横崎恭之、村上 功 (2000) 看護学生と病院職員における二段階ツベルクリン反応検査。結核 75: 27-31.

総説

1. Yasuyuki Yokosaki, and Dean Sheppard (2000) Mapping of the cryptic integrin-binding site in osteopontin suggests a new mechanism by which thrombin can regulate inflammation and tissue repair. *Trend Cardiovasc Med* 10: 155-159.

著書

1. 横崎恭之 (2000) β 4サブファミリー. 接着分子ハンドブック、細胞工学別冊 (宮坂昌之 編)、秀潤社 pp. 55-57.
2. 横崎恭之 (2000) β 5サブファミリー. 接着分子ハンドブック、細胞工学別冊 (宮坂昌之 編)、秀潤社 pp. 58-59.
3. 横崎恭之、村上 功 (2000) β 6サブファミリー. 接着分子ハンドブック、細胞工学別冊 (宮坂昌之 編)、秀潤社 pp. 60-61.
4. 横崎恭之 (2000) インテグリン. 第 5 章 接着分子、Vascular Biology ナビゲーター (丸山征郎、安藤譲二、佐藤靖史 編) メディカルレビュー社、pp. 194-195.