

平成 13 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

ダイオキシンの発がん性と TEF

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長

研究要旨

ダイオキシン類を WHO-TEF を基準に（矢守班員選択リストを利用）少数、代表化学物質として選択し、後述の各種遺伝子改変モデル実験に遺伝子発現プロファイリング手法を新たに取り入れて、AhR 依存性・非依存性影響を含むリガンド依存性生体影響メカニズム解析に基づいた TEF 評価を目指す。

概説：TCDD の発がん性のメカニズムを考察すると、その非変異原性、難代謝性、および AhR 依存性から、プロモーター作用が中心であり、すなわち epigenetic carcinogen であると考えられる。そこで、発がんプロモーター実験（2 段階発がんを含む）として、易発がん性遺伝子改変モデルから、p53KO モデルを、また、プロモーター物質感受性遺伝子改変モデルとして、Tg.AC モデルを用いて検討を加えてきた。進捗状況としては、C3B6F1 p53(+/-) を用いた TCDD 低用量発がん促進実験 (0.0003 - 0.1microg/kg) が進行中であり、興味深い結果が得られつつある。TEF との関連における展開として、少数種類の代表的 PCDD、PCDF、および Coplanar PCB の投与実験および関連遺伝子発現プロファイリングを開始した。その結果、一部の物質についてリガンド依存的なプロファイル（の差）が存在することが確認され

た。

Tg.AC mouse を用いた発がんプロモーター作用検出は、Promoter only で皮膚 papilloma が誘発され、TCDD 単独でも誘発されることが知られている系である。最終目標は TCDD の発がん促進作用の検討および、TEF との関連性（力価・シグナル伝達経路の多様性の有無--AhR 以外への入力の有無）であり、Tg.AC/AhRKO マウス作成に向けての C57BL/6 へ Back cross の途中である。その過程で Papilloma 発生活感受性が B6 背景でも保たれることを確認し、また、皮膚塗布実験古典的皮膚発がん 2 段階実験 (DMBA(x1) + TPA(x2/week)) を用いると B6 が背景に有れば、melanocytic tumor も Tg.AC に非依存的に発生することが示された。現在、もどし交配中に生じる「non-responder」対策を講じている。

今後、これらの in vivo 系と、AhRKO マ

ウスの組み合わせを用いた、AhR 依存性・非依存性影響を含むリガンド依存性生体影響メカニズム解析を進め、これに基づいた TEF 評価を進める。

このような観点から、AhR (+/+) および AhR (-/-) マウスに対する、各種 PCDD、PCDF、および、Coplanar PCB の影響を遺伝子発現プロファイル解析を開始点として、マウスにおけるフェノタイプとの対比、およびヒトガン細胞パネルにおける遺伝子発現プロファイルおよび細胞増殖促進・抑制効果との対比を開始し、データの蓄積を行っている。

F. 研究発表 学会発表

論文発表

Jun Kanno, Lesley Onyon, Joseph Haseman, Penelope Fenner-Crisp, John Ashby, and William Owens, The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses: Phase 1, Environmental Health Perspectives, 109, 785-794, 2001

B.-I. Yoon, Y. Hirabayashi, T. Kaneko, Y. Kodama, J. Kanno, J. Yodoi, D.Y. Kim, T. Inoue, Transgene Expression of Thioredoxin (TRX/ADF) Protects Against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD)-Induced Hematotoxicity Arch. Environ. Contam. Toxicol, 41, 232-236, 2001

Byung-II Yoon, Yoko Hirabayashi, Yukio

Ogawa, Jun Kanno, Tohru Inoue Hemopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice, Chemosphere, 43, 819-822, 2001

菅野 純, ホルモン様化学物質と内分泌攪乱治療学, 34, 468-472, 2001

Kimie Sai, Jun Kanno, Ryuichi Hasegawa, James E Trosko and Tohru Inoue, Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol, Carcinogenesis, 21, 1671-1676, 2001

菅野 純, 内分泌攪乱化学物質の生物影響ファルマシア (日本薬学会) 35, 219-223, 1999

Mutsunori Fujiwara, Isao Okayasu, Masae Oritsu, Junko Komatsu, Michiyasu Yoshitsugu, Yoshihasa Katoh, Takafumi Bandoh, Hiroshi Toyoshima, Yoshio Kasae, Kunio Sugihara, Jun Kanno, Yuzo Hayashi, Significant Increase in prostaglandin E-Main Urinary Metabolite by Laxative Administration: Comparison with Ulcerative Colitis, Digestion, 61, 201-206, 2000

G. 知的所有権の取得状況

なし。

分担研究報告書

細胞アレイを指標とした発がん評価

矢守 隆夫 （財）癌研究会 癌化学療法センター 分子薬理部

研究要旨

抗ガン剤スクリーニングのためのガン細胞パネルは、そのインフォマティクスが毒性影響に対しても十分対応可能である可能性がすでに示されている。本研究のねらいは、そのインフォマティクスをダイオキシン毒性、特にその細胞増殖に関連する影響を切り口として活用し、もって毒性分子機構の解析に当てることにある。今年度は、TCDD、TCDFをはじめとする 11 種のダイオキシン類をガン細胞パネルで評価した結果、これらはおしなべて増殖阻害効果が弱いあるいはほとんどなかったが、唯一 TCDF のみが有意な細胞増殖阻害を示し、その阻害パターンは種々の抗がん剤、阻害剤とは異なる特有の様相を呈した。わずかな構造上の違いが大きな増殖阻害能の違いを生じること、ならびに TCDF に対し高感受性と抵抗性のがん細胞のあることが明らかとなった。構造活性相関、ならびに TCDF に対する感受性の違いを説明する分子メカニズムの解明は、ダイオキシン類の毒性機構を理解する上で重要と考えられる。

A. 研究目的

抗ガン剤スクリーニングのためのガン細胞パネルは、新規抗ガン剤候補物質の選択のために開発されたものではあるが、そのインフォマティクスの守備範囲はそれに限定されるものではなく、毒性影響に対しても十分対応可能である可能性がすでに示されている。本研究は、そのユニークな性能をダイオキシン毒性、特にその細胞増殖に関連する影響を切り口として活用し、もって毒性分子機構の解析に当てるものである。

B. 研究方法

ヒトがん細胞パネル法は、薬剤感受性データベースをもとに、薬物の作用機作や分子標的を情報科学的に推定するバイオインフォマティクス手法を用いた化合物評価系である。我々は、肺がん、胃がん、大腸がんなど 39 系のヒトがん細胞の薬剤感受性をデータベース化し、情報処理により作用機作など有用な情報を引き出すことが可能である。薬剤を 39 系のヒトがん細胞と 48 時間接触後、各細胞に

対する 50%がん細胞増殖阻害濃度 を求め、それをパネル全体で見るとその薬剤固有の Finger Print が得られる。薬物間で FP の相関性を検定するプログラム COMPARE により作用機作を推定できる。本研究では、TCDD、TCDF をはじめとする 11 種のダイオキシン類の評価を行った。

(倫理面への配慮)

— 倫理面への配慮 本研究は、基本的に樹立された細胞株を用いた実験および計算機を用いた実験であるため、倫理面の問題は発生しないが十分配慮しながら研究を進めた。

C. 研究結果

これらはおしなべて増殖阻害効果が弱いかあるいはほとんどなかったが、唯一 TCDF のみが有意な細胞増殖阻害を示した。わずかな構造上の違いが大きな増殖阻害能の違いを生じること、ならびに TCDF に対し高感受性と抵抗性のがん細胞のあることが明らかとなった。TCDF の Finger Print は COMPARE 解析の結果、種々の抗がん剤、阻害剤とは異なって TCDF 固有のパターンであることが判明した。これは、ガン細胞パネルが、TCDF を抗がん剤、その他の阻害剤と明確にことなる化合物として識別できたことを示している。

D. 考察

今回評価したダイオキシン類は予想に反して直接のがん細胞増殖阻害効果は弱いことがわかった。唯一 TCDF のみが有意な細胞増殖阻害を示したのは構造活性的におもしろい知見である。わずかな構造上の違いが大きな増殖阻害能の違いを生

じることが判明した。また、TCDF に対し高感受性と抵抗性のがん細胞のあることが明らかとなった。これらの違いを説明しうる分子メカニズムの解明はダイオキシン類の毒性機構を理解する上で重要と考えられる。

E. 結論

TCDD、TCDF をはじめとする 11 種のダイオキシン類をガン細胞パネルで評価した結果、これらはおしなべて増殖阻害効果が弱いことが判明した。唯一 TCDF のみが有意の細胞増殖阻害を示し、その阻害パターン (Finger Print) は固有の様相を呈した。構造活性相関、ならびに TCDF に対する感受性の違いを説明しうる分子メカニズムの解明は、ダイオキシン類の毒性機構を理解する上で重要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Chen, Z., Naito, M., Hori, S., Mashima, T., Yamori, T., and Tsuruo, T. A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 264: 847-54, 1999.
2. Iwasa, K., Nishiyama, Y., Ichimura, M., Moriyasu, M., Kim, H.-S., Wataya, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., and Lee, D.-U. Structure-activity relationships of quaternary protoberberine alkaloids having an antimalarial activity, *Eur J Med Chem.*

- 34: 1077-1083, 1999.
3. Hirai, K. I., Koyama, J., Pan, J., Simamura, E., Shimada, H., Yamori, T., Sato, S., Tagahara, K., and Tsuruo, T. Furanonaphthoquinone analogs possessing preferential antitumor activity compared to normal cells, *Cancer Detect Prev.* 23: 539-50, 1999.
 4. Naasani, I., Seimiya, H., Yamori, T., and Tsuruo, T. FJ5002: a potent telomerase inhibitor identified by exploiting the disease-oriented screening program with COMPARE analysis, *Cancer Res.* 59: 4004-11, 1999.
 5. Yamori, T., Matsunaga, A., Sato, S., Yamazaki, K., Komi, A., Ishizu, K., Mita, I., Edatsugi, H., Matsuba, Y., Takezawa, K., Nakanishi, O., Kohno, H., Nakajima, Y., Komatsu, H., Andoh, T., and Tsuruo, T. Potent antitumor activity of MS-247, a novel DNA minor groove binder, evaluated by an in vitro and in vivo human cancer cell line panel, *Cancer Res.* 59: 4042-9, 1999.
 6. Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-i, S., Wada, H., Fujimoto, J., and Kohno, M. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors, *Oncogene.* 18: 813-22, 1999.
 7. Kuroda, M., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yamori, T., and Tsuruo, T. GaltoniosideA, a novel cytotoxic cholestane glycoside from *Galtonia candicans*, *Tetrahedron Letters.* 41: 251-255, 2000.
 8. Hosokawa, N., Iinuma, H., Takeuchi, T., Sato, S., Yamori, T., Tsuchiya, S. K., and Hori, M. Anticancer and Some Biological Activities of Thiazinotrienomycin B, *J Antibiot.* 53: 306-308, 2000.
 9. Akiyama, N., Hijikata, M., Kobayashi, A., Yamori, T., Tsuruo, T., and Natori, S. Anti-tumor effect of N-beta-alanyl-5-S-glutathionyl dihydroxyphenylalanine (5-S-GAD), a novel anti-bacterial substance from an insect, *Anticancer Res.* 20: 357-62, 2000.
 10. Oyama, T., Miyoshi, Y., Koyama, K., Nakagawa, H., Yamori, T., Ito, T., Matsuda, H., Arakawa, H., and Nakamura, Y. Isolation of a novel gene on 8p21.3-22 whose expression is reduced significantly in human colorectal cancers with liver metastasis, *Genes Chromosomes Cancer.* 29: 9-15, 2000.
 11. Egawa, K., Yamori, T., Nosaka, C., Kunimoto, S., Takeuchi, T., and Nos, K. Deoxynybomycin is a selective anti-tumor agent inducing apoptosis and inhibiting topoisomerase I, *Biol Pharm Bull.* 23: 1036-40, 2000.
 12. Su, W., Ito, T., Oyama, T., Kitagawa, T., Yamori, T., Fujiwara, H., and Matsuda, H. The Direct Effect of IL-12 on Tumor Cells: IL-12 Acts Directly on Tumor Cells to Activate

- NF-kappaB and Enhance IFN-gamma-Mediated STAT1 Phosphorylation, *Biochem Biophys Res Commun.* 280: 503-512, 2001.
13. Dan, S. and Yamori, T. Repression of Cyclin B1 Expression after Treatment with Adriamycin, but Not Cisplatin in Human Lung Cancer A549 Cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 280: 861-867, 2001.
14. Miyata, F., Yoshida, S., Yamori, T., and Katoh, K. An efficient and expeditious synthesis of a novel 5H-naphth [1',2':5,6][1,4]oxazino[2,3-b]quinoxalin-5-one and its unique inhibitory activity against a panel of human cancer cell lines, *Heterocycles.* 54: 619-622, 2001.
15. Fukushima, S., Takeuchi, Y., Kishimoto, S., Yamashita, S., Uetsuki, K., Shirakawa, S., Suzuki, M., Furuta, K., Noyori, R., Sasaki, H., Kikuchi, Y., Kita, T., Yamori, T., Sawada, J., Kojima, M., Hazato, A., Kurozumi, S., and Fukushima, M. Vihydro-15-deoxy-delta7-prostaglandin A1 methyl ester (TEI-9826) integrated in lipid microspheres (Lipo TEI-9826), *Anticancer Drugs.* 12: 221-234, 2001.
16. Mimaki, Y., Kuroda, M., Sashiba, Y., Yamori, T., and Tsuruo, T. Candicanoside A, a Novel Cytotoxic Rearranged Cholestane Glycoside from *Galtonia candicans*, *Helvetica Chimica Acta.* 83: 2698-2704, 2000.
17. Omoto, Y., Kobayashi, Y., Nishida, K., Tsuchiya, E., Eguchi, H., Nakagawa, K., Ishikawa, Y., Yamori, T., Iwase, H., Fujii, Y., Warner, M., Gustafsson, J., and Hayashi, S. Expression, Function, and Clinical Implications of the Estrogen Receptor beta in Human Lung Cancers, *Biochem Biophys Res Commun.* 285: 340-7, 2001.
18. Komatsu, Y., Tomizaki, K. Y., Tsukamoto, M., Kato, T., Nishino, N., Sato, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Furumai, R., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Hayashi, H. Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity, *Cancer Res.* 61: 4459-66, 2001.
19. Iwasa, K., Moriyasu, M., Yamori, T., Tsuruo, T., Lee, D. U., and Wiegrebe, W. In vitro cytotoxicity of the protoberberine-type alkaloids, *J Nat Prod.* 64: 896-8, 2001.
20. Sakamoto, H., Mashima, T., Sato, S., Hashimoto, Y., Yamori, T., and Tsuruo, T. Selective activation of apoptosis program by *s-p*-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase i-overexpressing human lung cancer cells, *Clin Cancer Res.* 7: 2513-8, 2001.
21. Saji, H., Koike, M., Yamori, T., Saji, S., Seiki, M., Matsushima, K., and Toi, M. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma, *Cancer.*

92: 1085-91, 2001.

22. Dan, S., Tsunoda, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Zembutsu, H. Katagiri, T., Yamazaki, K., Nakamura, Y., and Yamori, T. An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines., Cancer Research. in press:, 2002.

1. 矢守隆夫, 竹田和由 増殖因子、サイトカインによる癌細胞増殖促進, 癌と化学療法. 26: 1209-1213, 1999.

2. 矢守隆夫 抗癌剤開発・基礎—ヒト培養がん細胞パネルによるスクリーニングを中心に, 臨床腫瘍学 (有吉寛, 西條長宏, 佐々木康綱, 福岡正博, 渡辺亨編, 癌と化学療法社), p. 494-502, 1999.

3. 矢守隆夫, 安藤俊夫, 上原至雅, 小野眞弓, 河野通明, 済木育夫, 内藤幹彦, 早川洋一, 鶴尾隆, 杉本芳一, 清宮啓之, 馬島哲夫 制がん剤の分子標的スクリーニング成績—わが国における制がん剤候補物質のスクリーニング成績・第8報—, 癌と化学療法. 27: 1-192, 2000.

4. 矢守隆夫 分子標的薬剤のバイオインフォーマティクス, 現代医療. 32: 2453-2460, 2000.

ほか

・出願日 (登録日): 平成 13 年 2 月 1 日

・出願人: エーザイ株式会社 (代表者: 内藤晴夫)、メルシャン株式会社 (鈴木忠雄)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 発明の名称: 新規生理活性物質

・発明者: 水井佳治、酒井孝、矢守隆夫

分担研究報告書

胚幹細胞（ES 細胞）に対するダイオキシンの影響

高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

発生初期の胎児は小さく、かつ、培養も出来ないため、一般に解析が難しい。一方 ES 細胞から形成される胚様体は胎児の卵筒胚に近似している。そこで、この ES 細胞培養系を用いて TCDD の初期発生過程への影響を検索した。ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で浮遊培養し、2, 3, 7, 8-TCDD は 10nM の濃度で添加した。添加、4 日後の浮遊培養により形成された胚様体あるいは4日から5日までの24時間培養の胚様体より RNA を抽出後、マイクロアレイを用いて影響を受ける遺伝子を検索した。この結果、TCDD が上皮・間充織の相互作用を阻害していることが示唆された。

A. 研究目的

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞である。また、ES 細胞から形成される胚様体（Embryoid body : EB と略す）は胎児の卵筒胚（egg cylinder, 5～7日胚）に似ており、主に発生学の分野で発生初期胎児に発現する遺伝子の解析等に利用されている。さらに、ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析にもよく用いられている。それゆえ、内分泌攪乱化学物質を含む種々の化学物質の解析の難しい発生初期への影響を調べる試験系として ES 細胞が有用であると思われる。本研究でとりあげる、TCDD は胎児に対して種々の毒性を示すことが報告されている。また、TCDD の受容

体は胚盤胞にも発現していることが知られており、胚盤胞以後の分化過程に影響を及ぼす可能性が予想されるが、未だ明らかではない。そこで、上記の ES 細胞培養系を用いて TCDD の初期発生過程への影響を調べるため、TCDD の EB における遺伝子発現への影響を検索した。

B. 研究方法

ES 細胞をゼラチンコート Dish 上で培養後、LIF を除いた ES 培地で、浮遊培養した。2, 3, 7, 8-TCDD は DMSO に溶解して、最終濃度 10nM で添加した。対照群には DMSO を 0.1% の最終濃度で添加した。添加、4 日後の浮遊培養により形成された胚様体あるいは4日から5日までの24時間培養の胚様体より RNA を抽出後、c-DNA マイクロアレイを用いて影響を受ける遺伝子を

同定した。

(倫理面への配慮)

ダイオキシン類の取り扱いに関しては EPA Method 8280 に準拠して実施した。

C. 研究結果

EB の4日間培養後において、内胚葉、中胚葉、外胚葉のマーカー遺伝子の発現には TCDD による影響は認められなかった。また、TCDD により誘導されることが知られている *Cyp1a1* の増加は認められなかった。一方、上皮のマーカーであるケラチン類の遺伝子発現の減少並びに上皮・間充織間の相互作用に關与する遺伝子発現の減少が認められた。24 時間培養ではこの上皮・間充織間の相互作用に關与する遺伝子発現の減少が認められなかった。

D. 考察

以上の結果、TCDD は発生初期において、少なくとも内胚葉、中胚葉、外胚葉の形成に対して、影響を及ぼさない事が示唆された。一方、TCDD は上皮の分化を阻害すると共に、上皮・間充織の相互作用を阻害していることが示唆された。また、24 時間培養では上皮・間充織の相互作用に關与する遺伝子の減少が見られなかったことから、これらは TCDD による反応において、より後期で見られる event であると思われた。

E. 結論

TCDD は ES 細胞培養系において、上皮の分化を阻害すると共に、上皮・間充織の相互作用を阻害することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Haraguchi S., Kitajima S., Takagi A., Takeda H., Inoue T. and Saga Y., *Mechanisms of Development*, 108 59-69, 2001.

Takahashi. Y., Koizumi Ken-ichi, Takagi A., Kitajima S., Inoue T., Koseki H. and Saga Y. *Mesp2* initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway, *Nature genetics*, 25, 390-396, 2000.

Kitajima S., Takagi A., Inoue T., and Saga Y., *Mespl* and *Mesp2* are essential for the development of cardiac mesoderm, *Development*, 127, 3215-3226, 2000.

Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyasaki, J and Inoue, T. *MesP1* is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126:3437-3447, 1999.

2. 学会発表

- ES 細胞の分化に及ぼす TCDD の影響。
高木篤也、五十嵐勝英、菅野純、井上達、第28回日本トキシコロジー学会学術年会、東京2001年6月
- Synergistic function of *Mesp2* and *Paraxis* on the vertebral development.
Atsuya TAKAGI, Satoshi KITAJIMA, Yu TAKAHASHI, Tohru INOUE, Alan Rawls and Yumiko SAGA. 国際発生生物学会、京都2001年7月

3. Synergistic function of Mesp2 and Paraxis on the vertebral development. Atsuya TAKAGI, Satoshi KITAJIMA, Yu TAKAHASHI, Tohru INOUE , Alan Rawls² and Yumiko SAGA. Somite meetings in Nara, 奈良 2001年7月
4. Effects of TCDD on the gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. Atsuya Takagi, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno and Tohru Inoue, The 21st International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Korea, 2001年9月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

分担研究報告書

Ahr/Arnt の作用メカニズムの分子基盤と標的遺伝子の検索

藤井義明 東北大学大学院 理学研究科

研究要旨

AhR の機能を抑制する因子 AhRR (AhR repressor) の遺伝子発現機構を詳細に検討した。AhRR はマウスの染色体では 13C2、ラットでは 1p11.2、ヒトでは 5p15.3 に局在する。この遺伝子は TATA-less 遺伝子で複数の転写開始点から転写される。遺伝子上流 1.5kb までに 3 個の GC box、3 個の XRE、1 個の NF- κ B 結合配列が存在し、これらの制御配列には各々 Sp1 または Sp3 は AhR/Arnt、NF- κ B が結合し、協調的に働いて遺伝子の発現を活性化することを明らかにした。すなわち 3 メチルコラントレンや TPA を培養細胞に与えると相乗的に AhRR 遺伝子の発現は増強される。また 3 つ存在する GC box 配列には Sp1 または Sp3 が結合して転写を活性化することも分かった。SAhR は AhR-KO マウスの解析から生殖にも関与していることが明らかになった。さらに CYP1A2 の遺伝子発現に関して発見された AhR/Arnt の Coactivator 作用のメカニズムについて詳しい検討を行った。

A. 研究目的

AhR の転写制御作用の調節に抑制的に働く AhRR の遺伝子発現機構を明らかにする。また AhR の CYP1A2 遺伝子発現に関して Coactivator としての作用機構をさらに詳しく検討すると共に AhR-KO マウスの雌不妊の原因を探求する。

B. 研究方法

AhRR 遺伝子の 3137b 上流までを luciferase 遺伝子に結合させレポーター

遺伝子を作製し、HeLa 細胞にリン酸カルシウム法によって導入し、3MC あるいは TPA を培養液に与えて、luciferase 活性を測定することによって転写活性を測定した。さらに適当な制限酵素によって上流を切断して欠失変異体を作り、その転写活性を測定した。また、制御配列を思われる配列を推定したときには、その配列に点変異を導入することによって制御配列の活性を確認した。制御配列への因子の結合は GMSA (Gel mobility shift assay) によって行い、特定の因子の同定には抗

体を用いたスーパーシフト法によって確認した。AhRR 遺伝子のクロモソームマッピングは FISH 法によって行った。CYP1A2 の XREII への結合因子のクローニングは、XREII の塩基配列を持ったアフィニティークラムによって精製し、ゲル電気泳動後に各々のバンドからタンパク質を溶出し、エドマン分解によって部分アミノ酸配列を決定し、そのアミノ酸配列に基づいて行った。AhR の生殖機能への関わりは我々の研究室で作った AhR-KO マウスを用いて行った。

C. 研究結果

AhRR 遺伝子の染色体上での局在を FISH 法で決定した。その結果、マウスでは 13C2、ラットでは 1p11.2、ヒトでは 5p15.3 の位置にマップされることが分かった。これらの染色体上の位置は各々種間で相同性のあることが知られている領域である。マウスの AhRR 遺伝子 3.2kb 上流までを luciferase 遺伝子に結合し、レポーター遺伝子とし、欠失変異と点変異を導入して発現制御に関係している 3 個の GC box、3 個の XRE、1 個の NF- κ B 部位を決定した。また、これらの制御配列には、各々、Sp1 又は Sp3、AhR/Arnt、NF- κ B が結合し各々協調的に AhRR の発現を活性化することが示された。また CYP1A2 の転写活性化に働く XREII には因子 X が結合するが、その一時構造を cDNA クローニングによって決めることができた。さらに AhR/Arnt はその因子 X に結合して CYP1A2 遺伝子の発現を活性化することが示された。現在バッククロスを繰り返すことにより、その詳しい解析を進めている。AhR-KO マウスの遺

伝的背景 (Genetic background) を C57BL/6j に揃えると雌は不妊になる。この不妊の原因は黄体の形成不全であることが分かった。この不妊のメカニズムの解析をさらに進めている。

D. 考察

AhR は転写因子として異物に対する生物応答の他に多くの生物現象に関わっていることが分かって来た。現在ここに述べた他にも免疫細胞の分化などへの関与が分かりつつある。AhR の本来の機能をさらに進めることによって AhR についての包括的理解が得られる可能性がある。

E. 結論

- 1) AhR 作用の抑制因子 AhRR の遺伝子発現に必要な制御配列とそれに結合して働く因子を明らかにした。
- 2) CYP1A2 の遺伝子発現機構の研究から AhR/Arnt が Coactivator として働くメカニズムをさらに詳しく検討した。
- 3) AhR が生殖機能に働くことを見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Kawauchi, S., Ema, M., Yamamoto, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Defective development of secretory neurons in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes to Cells*. **6**, 361-374 (2001)

- Sugihara, K., Kitamura, S., Yamada, T., Ohta, S., Yamashita, K., Yasuda, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 1093-1099 (2001)
- Watanabe, T., Imoto, I., Kosugi, Y., Fukuda, Y., Mimura, J., Fujii, Y., Isaka, K., Takayama, M., Sato, A. & Inazawa, J. Human arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR) gene: genomic structure and analysis of polymorphism in endometriosis. *J. Hum. Genet.* **46**, 342-346 (2001)
- Baba, T., Mimura, J., Gradin K., Kuroiwa, A., Watanabe, T., Matsuda, Y., Inazawa, J., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J. Biol. Chem.* **276**, 33101-33110 (2001)
- Oikawa, K., Ohbayashi, T., Mimura, J., Iwata, R., Kameta, A., Iwaya, K., Fujii-Kuriyama, Y., Kuroda, M. & Mukai, K. Dioxin suppresses the checkpoint protein, MAD2, by an AhR-independent pathway. *Cancer rese.* **61**, 5707-5709 (2001)
- Kawane, T., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. & Horiuchi, N. Parathyroid Hormone (PTH) Suppresses Rat PTH/PTH-related Protein Receptor Gene Promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 313-322 (2001)
- Ogi, T., Mimura, J., Hikida, M., Fujimoto, H., Fujii-Kuriyama, Y. & Ohmori, H. Expression of human and mouse genes encoding polκ: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription. *Genes to Cells* **6**, 943-753 (2001)
2. 学会発表
- Functions of AhR and its mechanisms of action, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, K. Numayama-Tsuruta, J. Mimura, T. Baba and K. Sogawa, 2001/2/6, Symposium on Current Topic in Dioxin Research (長井記念会館、東京)
- アрилハイドロカーボン (ダイオキシン) 受容体の生物作用と作用メカニズム 藤井義明 2001/2/17 日本医科大学医学会 第103回例会「環境ホルモンの現状をめぐって」 (日本医科大学第二臨床講堂)
- 1CYP1A2遺伝子発現においてAhR/Arntヘテロダイマーをコファクターとして要求する転写因子の同定 沼山恵子、十川和博、菊池康夫、藤井義明 (東北大・院・生命科学・分子生命科学) 2001/5/10-12 日本分子生物学会第1回春季シンポジウム (つなぎ温泉ホテル紫苑、盛岡市)
- AhR/Arnt転写因子の作用メカニズムとP450の発現制御 藤井義明 2001/5/26-27 日本

生化学会 シトクロムP450シンポジウム『何処へ行く21世紀のシトクロム』（金沢大学医学部十全講堂、金沢市）

Transcriptional function of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, 2001/ 6/22-23, (Institute of Toxicology University of Mainz) 1st International Symposium on Organ and cell type specificity of tumorigenesis, tumor development and tumor prevention (Germany, Mainz)

Regulatory mechanisms of transcription activity of Ah receptor, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, 2001/9/11-15, International Conference on Cytochrome P450 - Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology XIIth International Conference on Cytochrome P450 - Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology (La Grande Motte, France)

ダイオキシンの生体毒性発現におけるアールハイドロカーボ受容体（ダイオキシン受容体）の役割 藤井義明 2001/9/19 科学技術振興事業団（JST）戦略的基礎研究推進事業（CREST）内分泌かく乱物質 第1回領域シンポジウム（全電通ホール、東京）

Gene Expression in Pathogenic States 藤井義明 2001/10/3-5 日本人類遺伝学会 第46回大会及び東アジア人類遺伝学会第1回大会（大宮ソニックシティ、埼玉市）

発癌性芳香族炭化水素ジベンゾ[a,1]ピレン誘発皮膚がん過程におけるAhレセプターの役割 中鶴陽子¹、戸塚由加里²、若林敬二²、藤井義明³、石川隆俊⁴（¹東大・大学院・医・分子病理、²国立がんセ・研・がん予防、³東北大・理・化学、⁴大学評価・学位授与機構）2001/9/26-27 日本癌学会（パシフィコ横浜、横浜）

Ah receptor as a potential determinant of individual difference in the drug-metabolizing capacity, Y. Fujii-Kuriyama, K. Numayama-Tsuruta, J. Mimura, and K. Sogawa 2001/10/23-25, 国際変異原学会 第30回日本環境変異原学会及び第8回国際環境変異原学会（静岡市）

SNP inhibits hypoxia mediated apoptosis through repressing expression of HIL1a in an O2-dependent way, Feng Wang, Kazuhiro Sogawa, Yoshiaki Fujii-Kuriyama (Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University) 2001/10/24-28, 日本生化学会 第74回日本生化学会大会（国立京都国際会館、京都宝ヶ池プリンスホテル、京都市）

Ahレセプターがコアクティベーターとして機能するCYP1A2遺伝子転写制御機構の解析 沼山恵子¹、十川和博¹、菊池康夫¹、半田宏²、藤井義明¹（¹東北大院・生命科学・分子生命科学、²東工大・フロンティア）2001/9/26-27 日本癌学会（パシフィコ横浜、横浜）

単球系制帽への分化に伴って誘導されるヒトAhRの転写機能 渡辺潤子¹、角純子¹、生田統悟¹、本間良夫¹、十川和博²、藤井義明²、川尻要² (¹埼玉がんセ・研、²東北大・院理・化学) 2001/9/26-27 日本癌学会 (パシフィコ横浜、横浜)

ハイポキシアで活性化するHLFのDNA結合様式の解析 木下耕史¹、笹倉由貴江¹、十川和博¹、鈴木理²、藤井義明¹ (¹東北大院・生命科学・分子生命科学、²産総研・DNA情報) 2001/10/24-28 第74回日本生化学会大会 (国立京都国際会館、京都宝ヶ池プリンスホテル、京都市)

大腸菌を用いたAhR-Arntヘテロ二量体の発現 菊池康夫、大澤志津江、三村純正、依馬正次、十川和博、藤井義明 (東北大院・生命科学、分子生命科学) 2001/10/24-28 第74回日本生化学会大会 (国立京都国際会館、京都宝ヶ池プリンスホテル、京都市)

成体での血管新生におけるHLFの役割 守田匡伸¹、高橋智²、中島修²、大根田絹子²、山下年晴¹、依馬正次¹、柴原茂樹³、鶴殿徹男³、富田浩史³、玉井信³、十川和博¹、山本雅之²、藤井義明¹ (¹東北大院・理、²筑波大・TARAセ、³東北大院・医) 2001/10/24-28 第74回日本生化学会大会 (国立京都国際会館、京都宝ヶ池プリンスホテル、京都市)

ダイオキシン類によるXDH/XOの誘導機構 山田剛士¹、杉原数見¹、北村繁幸¹、太田茂¹、山下敬介²、加納由香利²、岡村さおり²、安田峯生²、藤井義明³ (¹広島大・医・総薬、²広島大・医・解剖、³東北大院・理)

2001/10/24-28 第74回日本生化学会大会 (国立京都国際会館、京都宝ヶ池プリンスホテル、京都市)

生物の環境適応と転写因子 藤井義明 (東北大・院・理・化学) 2001/10/23-25 第30回日本環境変異原学会及び第8回国際環境変異原学会 (静岡市)

哺乳類DNAポリメラーゼ κ による多環性芳香族化合物 (PAH) 付加型DNA損傷の回避メカニズム 萩朋男¹、三村純正²、疋田正喜³、藤本弘一⁴、藤井義明²、大森治夫¹ (¹京都大・ウイルス研、²東北大・院理・化、³岡山大・工・生物機能、⁴三菱化学・生命研) 2001/12/9-12 第24回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、横浜)

腫瘍血管新生におけるHLF(Hif-1 α like factor)の役割 山下年晴¹、大根田修²、大根田絹子²、守田匡伸¹、山本雅之²、藤井義明¹ (¹東北大・院・理、²筑波大・TARAセ) 2001/12/9-12 第24回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、横浜)

低酸素応答に関与する転写因子HLFのC末端側転写活性化ドメインのリン酸化 Katarina Gradin、十川和博、高崎親久、藤井義明 (東北大・院・生命科学・分子生命) 2001/12/9-12 第24回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、横浜)

AhRとNrf2の2重欠失マウスにおける異物代謝系酵素群の誘導的発現 野田秀平¹、本橋ほづみ¹、伊東研¹、日田安寿美¹、藤井義明²、山本雅之¹ (¹筑波大・TARAセ、²東北大・院・

生命科学) 2001/12/9-12 第24回日本分子
生物学会年会 (パシフィコ横浜、横浜)

ダイオキシンによる女性ホルモン攪乱作用
の分子メカニズムの解析 大竹史明¹、武山
健一^{1, 3}、柳沢純^{1, 3}、佐藤隆史^{1, 3}、藤井義
明^{2, 3}、加藤茂明^{1, 3} (¹東大・分生研、²東北
大・院、³科技団・CREST) 2001/12/9-12 第
24回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横
浜、横浜)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. 実用新案登録

なし

分担研究報告書

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の機能に関する研究

鎌滝哲也 北海道大学大学院薬学研究

研究要旨

マウスに 3-メチルコランスレン(MC)を投与し, differential display 法で発現が変化している mRNA を調べた結果, 肝臓において発現が変化する遺伝子が 63 クローン得られた. 特に MC により低分子プレキニノーゲン遺伝子の発現が抑制されていた. この抑制は aryl hydrocarbon receptor (AhR) 依存的であり, 血漿中のブラジキニンの濃度も同様に推移した. これはダイオキシンなどの多環芳香族炭化水素 (PAH) の毒性にみられる高血圧の原因のひとつであると考えられる.

A. 研究目的

ダイオキシン類や MC などの PAH は生殖毒性, 発がん促進, 成長遅延, 体重減少および高血圧などの様々な毒性を示す. これらの毒性の発現には, AhR が関与すると考えられている. そこで本研究では, AhR を介したシグナル伝達機構を解明し, これらの毒性の分子機構を明らかにすることを目的とした.

B. 研究方法

7 週齢の雄性野生型マウスおよび AhR 欠損マウスに MC を投与した. 投与量は 80 mg/kg とし, 2 日間腹腔内単回投与した. 最終投与より 24 時間後に屠殺し, 肝を摘出した. 肝より全 RNA を調製した. AhR によりその mRNA の発現が制御されている遺伝子の発現におよぼすこれらの化学物質の影響

を differential display 法を用いて解析した. 結果をノーザンブロット分析により検証した. MC の投与により発現が大きく変化した遺伝子については, MC による毒性の発現との関連を検討した.

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

野生型マウスに MC を投与し, differential display 法で発現が変化している mRNA を調べた結果, 肝臓において発現が変化する遺伝子が 63 クローン得られた. 見いだした 63 クローンの中で特に低分子プレキニノーゲン遺伝子の発現が MC により抑制されていた (図 1). MC の投与により発現が誘導される CYP1A2 の mRNA

量は上昇した（陽性対照）。低分子プレキニノーゲンの抑制は、AhR 欠損マウスでは認められず AhR 依存的であった。低分子プレキニノーゲンはブラジキニンの前駆体である。ブラジキニンは血管の弛緩により血圧を低下する作用を有する。そこで MC の投与により血漿中のブラジキニンの濃度が低下するか否かを検討した(図 2)。MC の投与により血漿中のブラジキニンの濃度が低下することを見いだした。ブラジキニン濃度の低下も AhR 依存的であった。

D. 考察

低分子プレキニノーゲンは、血圧調節において重要な役割を担っている。低分子プレキニノーゲンを欠損するラットにおいては高血圧や心機能障害を発症しやすいことが報告されている。したがって、MC による低分子プレキニノーゲン遺伝子の発現の減少は、体内に放出されるブラジキニン量を減少し、高血圧症や心機能障害を発症しやすくなる可能性が考えられる。MC の投与による低分子プレキニノーゲン遺伝子の発現量の低下は、PAH の毒性にみられる高血圧の原因のひとつであると考えられる。

E. 結論

MC によりプレキニノーゲン遺伝子の発現が抑制されていた。この抑制は AhR 依存的であり、血漿中のブラジキニンの濃度も同様に推移した。これは PAH の毒性にみられる高血圧の原因のひとつであると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Nukaya, Y. Takahashi, F.J. Gonzalez and T. Kamataki: Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of expression of the low-molecular-weight prekininogen gene in mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287:301-304, 2001.

2. 学会発表

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: ダイオキシン受容体の新規標的遺伝子の探索, 日本薬物動態学会(福岡), 2000. 10. 11

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: ダイオキシン受容体の新規標的遺伝子の探索, 日本分子生物学会(神戸), 2000. 12. 14

標的遺伝子の探索と機能解析, 日本薬学会(札幌), 2001. 3. 29

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による成長ホルモン応答シグナル伝達の阻害とその分子機構, 日本トキシコロジー学会(東京), 2001. 6. 12

M. Nukaya, Y. Takahashi, F.J. Gonzalez, T. Kamataki: Aryl hydrocarbon receptor (AhR) target genes involved in the toxicity caused by aromatic hydrocarbons, 9th International

congress of Toxicology (Australia, Brisbane), 2001. 7.11

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による STAT シグナル伝達の阻害とその分子機構, 2001. 9. 28

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

分担研究報告書

ダイオキシン類の幼若ラットに対する誘起排卵抑制モデルにおける Toxic Equivalency Factors (TEF) の検証

松木 容彦（財）食品薬品安全センター秦野研究所、
研究協力者 代田 真理子（財）食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者 金子豊蔵 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

雌性生殖に対する影響評価における TEF の妥当性を検証するために、幼若雌ラットに TCDD を単回経口投与後、翌日にウマ絨毛性性腺刺激ホルモンを投与して排卵検査を行い、既報を追試した。その間、経日的に剖検して器官重量を測定し、併せて TCDD 濃度測定及び遺伝子発現定量のための組織を採取した。これに先立ち、実験条件の検討および TCDD の ELSIA 法および mRNA の定量システムを立ち上げた。

A. 研究目的

ダイオキシン類の生体影響評価において用いられている Toxic Equivalency Factors (TEF) が、雌性生殖に対する影響評価にも適用しようという科学的実証は充分に行われていない。本研究は、ダイオキシン類の雌性生殖に及ぼす影響評価においても TEF が適用され得るかどうかを、Gao ら（1999）が、ダイオキシン類の前投与によって抑制すると報告している、幼若ラットに対する誘起排卵モデルを用いて検証しようとするものである。

今年度は研究初年度として、使用する各種実験系の確立を目的として研究を行った。すなわち、

1) ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG)

投与による幼若ラットに対する誘起排卵モデルを構築し、

2) それを用いて Gao ら（1999）が報告するように、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の前投与によって eCG 投与による誘起排卵が抑制を受けるかどうか追試した。また、

3) 影響評価のエンドポイントとして加える、ダイオキシン類関連遺伝子および卵胞発育関連遺伝子の発現量について定量方法を確立し、

4) ダイオキシン類投与により認められた影響と体内動態との相関性を得るために、TEF の大きいダイオキシン類の enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を確立して生体試料の前処理方