

20020960

平成14年度厚生科学研究費補助金
(食品・化学物質安全総合研究事業)

ダイオキシン類標的組織における障害性発現機構の解析

(課題番号 13150201)

平成14年度研究報告書

平成15年3月

主任研究者 山田 英之

総括研究報告書

ダイオキシン類標的組織における障害性発現機構の解析

主任研究者 山田英之 九州大学薬学研究院 分子衛生薬学 教授

研究要旨 これまでに当研究室で行った研究から、ダイオキシン類処理ラットにおける heat shock protein (HSP) 70 の誘導が明らかとなっている。また、この誘導とダイオキシン類に対する臓器の感受性との間に関連性が見いだされたことから、この HSP70 の誘導は、ダイオキシン類に対する細胞の防御的応答ではないかと予想された。もしこの推定が真実であるならば、予め HSP70 を誘導させることにより、ダイオキシン類の毒性を軽減することができるのではないかと期待された。そこで、HSP70 の誘導剤である geranylgeranylacetone (GGA) を用い、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の毒性軽減について検討した結果、GGA は、TCDD の毒性の一部を軽減することが明らかとなった。本研究では更にこれを発展させ、TCDD による毒性に対する GGA の効果について、次世代への影響も含めて検討を行った。その結果、GGA は、TCDD による体重増加と致死性の軽減に加えて、TCDD 暴露胎仔における水腎症の原因と考えられている腎盂の拡張についても、その発症頻度および重篤度を軽減することが明らかとなった。これに対し、TCDD による肝肥大や胸腺の萎縮、aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介した酵素誘導、さらに暴露胎仔に見られる口蓋裂については、GGA による軽減効果は認められなかった。さらに、GGA による毒性軽減機構を明らかにするため、各臓器における HSP70 の発現量を検討した。その結果、肝臓および小腸において、TCDD 単独投与に比べ GGA の併用で HSP70 の発現増加傾向が認められた。この変動傾向がどの程度 GGA の毒性軽減機構に関与しているか明らかにすることはできなかったが、HSP70 が何らかの関与を示している可能性が示された。以上の結果は、ダイオキシン類による急性毒性のみならず、催奇形性や生殖毒性など次世代に及ぼす影響に対する解決策の発端になると考えられる。

一方、ダイオキシン類は、発がんプロモーター作用を有していることも知られている。この機構には、AhR が関与すると考えられているが、未解明な点も多い。そこで、AhR を過剰発現させた肺がん由来細胞を用いて、細胞増殖との関連性について検討した。その結果、AhR 過剰発現にともない、細胞増殖速度の増加および S 期への早期移行が明らかとなった。また、AhR の活性化が、細胞周期制御に関する転写因子である E2F 依存的な転写活性を増加させることを見だし、細胞増殖促進作用をよく支持する現象を明らかにした。

A. 目的

ダイオキシン類は、現在、地球規模で注目されている環境汚染物質であり、ヒトを含む生体への影響が懸念されているのは周知の事実である。これまでに実験動物を用いた研究から、ダイオキシン類は体重増加抑制、催奇形性、生殖毒性、肝臓障害および免疫機能低下など多岐に亘る毒性を発揮することが知られている。しかし、そのヒトへの有害性の根拠と程度は意外にもよく理解されていない。ダイオキシン類の毒性発現機構については、これまでに詳細な研究がなされており、その大部分は、細胞の可溶性画分に存在する Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の関与が示されている。AhR は受容体型転写制御因子の一つであり、種々の機能性タンパク質の発現を制御しており、ダイオキシン類の毒性は AhR との相互作用を介してタンパク質発現の変動を惹起することによると考えられている。しかし、どのタンパク質の発現変動が毒性に直接関連するかは未だよく理解されていない。従って、ダイオキシン類の毒性発現機構は未解明な点が多く、このような状況から有効な健康障害防止法の構築にも至っていない。このように、ダイオキシン類の毒性発現機構については、その解明に向け今後も多くの研究が必要であり、基礎的な研究成果を基盤として、理論的なダイオキシン類の有害性の定量的把握と効果的な対応の構築が必要であると考えられる。

我々の研究室では、これまでに、ダイオキシン類の毒性発現機構の解明と有効な健康障害防止法の開発に向け、機能性タンパク質の発現量の変化に注目し検討を行ってきた。その結果、ストレス応答性タンパク質である heat shock protein (HSP) 70 が、ダイオキシン類によって誘導され、さらに、ダイオキシン類に対して感受性の

高い組織では HSP70 の増加が少ないかもしくは生じないことを明らかにしている。HSP70 等のストレス応答性タンパク質は、生体にとって防御タンパク質の1つと考えられており、事実、種々のストレスによって誘発されるアポトーシスに対して防御効果を持つこと等が報告されている。そこで我々は、ダイオキシン類の毒性と HSP70 の発現に注目し、HSP70 誘導剤である geranylgeranylacetone (GGA) を用いて検討を行った。その結果、GGA が、ダイオキシン類の中で最強の毒性をもつと考えられている 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) による体重増加抑制や致死性を軽減することを明らかにした。本研究ではこのような知見を更に発展させ、TCDD の毒性に対する GGA の軽減効果について、次世代への影響も含め検討を行なった。また、その毒性軽減機構について明らかにするため、HSP70 の発現状況についても検討を行なった。

ダイオキシン類の毒性の中に、発がんプロモーター作用が知られており、その機構にも AhR の関与が明らかとなっている。AhR はほ乳動物の肺に高い発現を示すが、これと関連して、TCDD の長期投与は肺の扁平上皮がん発生を引き起こすことが報告されている。そこで本研究では、ダイオキシン類の肺がんプロモーター作用の機構について、AhR を過剰発現させた肺由来細胞を用いて検討した。

B. 結果・考察

GGA による TCDD 毒性の軽減とその機構解明

C57BL/6J 雄性マウスに GGA (200 mg/kg、経口投与) を投与したのち、TCDD を 100 µg/kg の用量で経口投与した。TCDD 投与後、上記と同量の GGA を 30 日間経口投与し、毒性の指標として体重変化を観察

した。その結果、GGA は、TCDD による体重増加抑制および致死性を軽減することが明らかとなった。また、GGA 投与 30 日目における検討から、GGA は TCDD による肝肥大や胸腺の萎縮および AhR 依存的な酵素誘導については影響を与えないことも明らかとなった。次に、TCDD の催奇形性に対して GGA が軽減効果を有するか否かを検討するため、妊娠 C57BL/6J マウスに GGA (200 mg/kg、経口投与) を投与し、次いで TCDD を 20 μ g/kg の用量で経口投与した。そののち、妊娠 17 日目まで同量の GGA を経口投与し、妊娠 18 日目に胎子を摘出し口蓋と腎臓の組織像を調べた。その結果、GGA は口蓋裂に対しては軽減効果を示さなかったが、水腎症の原因と考えられる腎盂の拡張については、その発症頻度および重篤度に対して軽減効果を示すことが明らかとなった。GGA の TCDD による毒性軽減の機構について検討するため、GGA および TCDD を処理したマウスの各臓器における HSP70 の発現量を検討した。その結果、GGA を併用時には TCDD 単独処理と比べて肝 HSP70 のタンパク質および mRNA の発現量が増加する傾向が観察された。その他の臓器については、小腸において、HSP70 のタンパクレベルでの増加が確認されたのみであった。

ダイオキシン類およびダイオキシン受容体による細胞増殖促進作用

AhR 過剰発現細胞を構築するため、AhR cDNA を発現ベクターにセンス方向で挿入し、リポソーム法にてヒト肺がん A549 細胞にトランスフェクションした。細胞のクローニングについてはネオマイシン耐性を指標に行い、10% 牛胎児血清

培地中にて培養を行った。形質転換細胞を用いた検討の結果、AhR の発現量に比例して細胞増殖速度が増加することが明らかとなった。また、細胞を M 期同調し、その後の S 期への移行を検討したところ、AhR 過剰発現株は、コントロール細胞よりも S 期へ移行し易いことも確認された。次に、DNA アレイ法を行ない発現に差異のある遺伝子の解析を行った。その結果、AhR の活性化が、細胞周期制御に関連した転写因子である E2F の標的遺伝子群の発現を増加させることが明らかとなった。この E2F 依存的転写活性についてさらに検討するため、リポータージーンアッセイを行った結果、AhR の活性化が E2F 依存的転写活性を増加させることが示された。

C. 結 論

本研究の結果、GGA はダイオキシン類による体重増加抑制や致死性、さらに暴露した胎子に見られる水腎症の原因と考えられる腎盂の拡張を軽減することが明らかとなった。また、その毒性軽減機構については、GGA 併用時の肝臓および小腸において TCDD 単独投与時に比べ HSP70 の発現量に増加傾向が認められたことから、HSP70 が関与している可能性が示唆された。このことから、当初の予想通り、TCDD 毒性が HSP70 によりある程度消去されることが支持された。

また、AhR 過剰発現細胞は、コントロール細胞に比べ細胞増殖速度が増加し、さらに、細胞周期制御に関連する転写因子である E2F を活性化することが示された。以上の結果から、ダイオキシン類による発がんプロモーター作用には、AhR が、E2F とのクロストークを介して細胞増殖に関与する機構が示唆された。

Heat Shock Protein 誘導剤による ダイオキシン類毒性の軽減について

主任研究者 山田英之 九州大学薬学研究院 分子衛生薬学 教授
研究協力者 石田卓巳 九州大学大学院薬学研究院 助手

研究要旨 当研究室では、ダイオキシン類による毒性とHSP70との発現量の関連性に注目し、HSP70誘導剤である geranylgeranylacetone (GGA) を用いて、ダイオキシン類による毒性の軽減の可能性について検討を行った。その結果、マウスを用いた検討から、GGAは2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) による体重増加抑制や致死性、さらに催奇形性の症状の1つである水腎症の原因と考えられる腎盂拡張の発症頻度および重篤度を軽減することが明らかとなった。これに対し、GGAはTCDDによる肝肥大や胸腺の萎縮、酵素誘導、および口蓋裂については軽減効果を示さなかった。このGGAによる毒性軽減の機構について検討するため、TCDDおよびGGA処理マウスの各臓器におけるHSP70の発現量を検討した。その結果、肝臓において、わずかではあるがTCDD処理時よりもGGA併用によりHSP70の発現量が増加することが明らかとなった。このHSP70の増加が、GGAによる毒性軽減にどの程度寄与するか明らかにすることはできなかったが、本検討結果は、ダイオキシン類による急性毒性のみならず、催奇形性や生殖毒性などの問題に対する解決の発端となると考えられる。

A. 目的

ダイオキシン類は、現在、地球規模で注目されている環境汚染物質である。これまでに、ダイオキシン類によるヒトを含めた生体への被害は多数報告されている。実験動物を用いた研究から、体重増加抑制、催奇形性、生殖毒性、肝臓障害、免疫機能低下などが報告されている(1)。また、その毒性発現機構についても研究がなされており、一部はAryl hydrocarbon receptor (AhR) との関与が示されている。AhRは受容体型転写制御因子の一つであり、種々の機能性タンパク質の発現を制御していることが知られている。ダイオキシン類の毒性発現についてもAhRによ

り制御されるタンパク質との関連性が注目されているが、毒性に直接関連するものは未だ解明されておらず、有効な健康障害防止法の開発に至っていない。

当研究室では、これまでに、ダイオキシン類の毒性発現機構の解明に向け、機能性タンパク質の発現量の変化に注目してきた。その結果、ダイオキシン類の一つである3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (IUPAC No. PCB126) 処理ラット肝臓において、分子シャペロンの一つであるHeat shock protein 70 (HSP70) が誘導されることを明らかにしている(2)。一般に分子シャペロンは、新生タンパク質の折畳み(folding)や会合(assembly)、さらに、細胞内輸送

(membrane translocation) や品質管理 (quality control) 等の細胞維持機能を持つだけでなく、ストレスにより生じた変性タンパク質の凝集の緩和、修復等の防御的役割を果たすことが知られている (3, 4) (Fig. 1)。さらに最近では、種々の刺激により誘発されるアポトーシスにおいて、HSP70 が抑制効果を持つことも報告されている (5)。

これらの事実から、我々はダイオキシン類の毒性発現と HSP70 の発現量との関連性に注目し、HSP70 の誘導剤であり臨床の場で抗胃潰瘍薬として使用されている geranylgeranylacetone (GGA) を用いて、ダイオキシン類による毒性の軽減の可能

性を検討した。その結果、GGA が TCDD によって引き起こされる体重増加抑制および致死性を軽減する傾向にあることを明らかにした (平成 13 年度研究報告書にて報告済み)。

以上のような背景のもと、本年度は、GGA によるダイオキシン毒性の軽減効果についてさらに検証するため、TCDD による一般毒性および次世代におよぼす毒性に対する影響を検討した。さらにその毒性軽減と HSP70 の関連性を追求するために、各臓器における HSP70 の発現量をタンパク質および mRNA レベルで検討を行った。

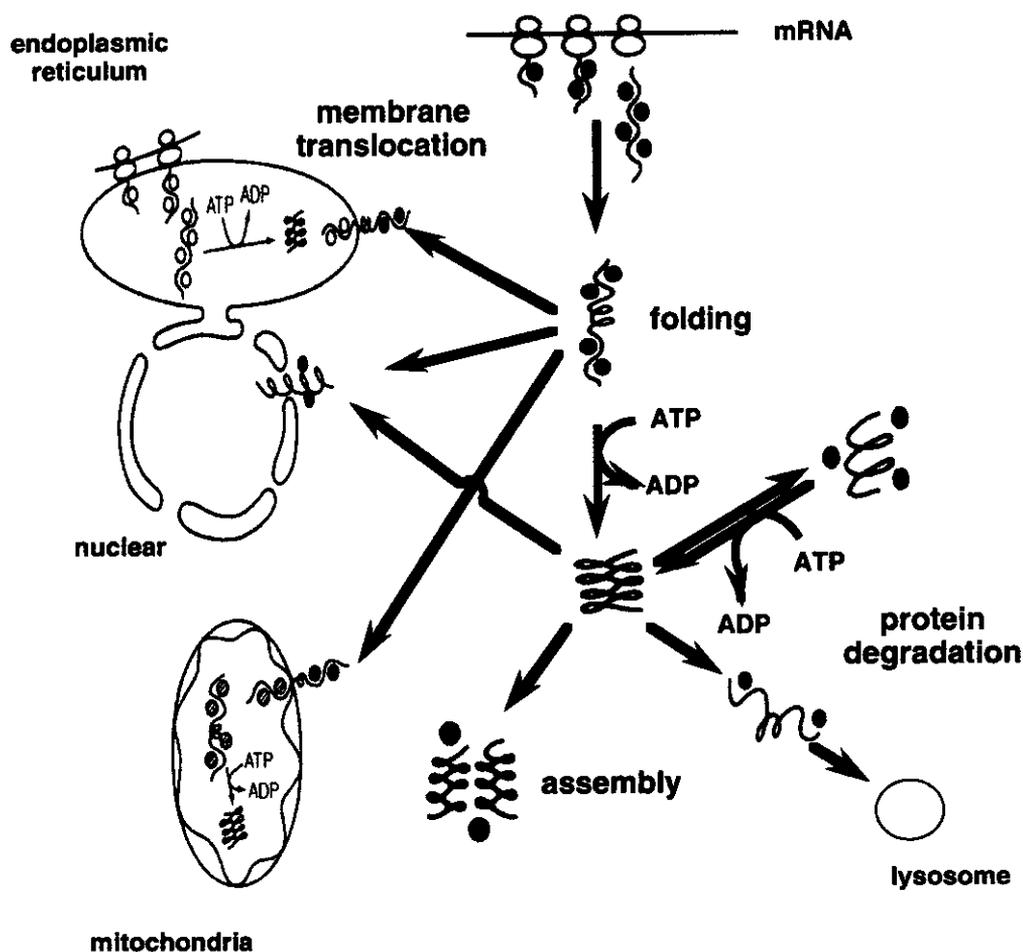


Fig. 1. Proposed role of molecular chaperone

● : HSP70, ○ : GRP78, ◐ : mtHSP70

(中井 彰・永田和宏 蛋白質 核酸 酵素 39, 793-807 (1994) より改変)

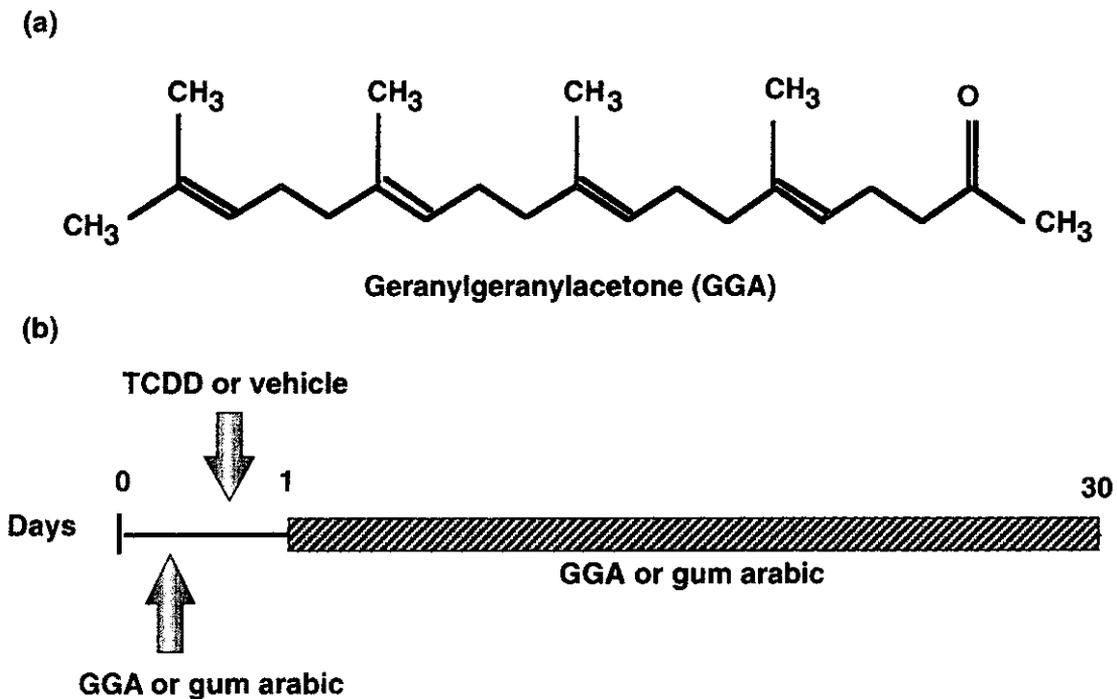


Fig. 2. Structure of geranylgeranylacetone (GGA, (a)) and schedule of TCDD and GGA treatment (b).

B. 方法・結果

TCDDによる体重増加抑制におよぼす影響

本検討における TCDD と GGA の投与スケジュールを Fig. 2 に示す。5 週令雄性 C57BL/6J マウスを 1 群 10 匹とし、GGA を 200 mg/kg 経口投与した。その 4 時間後、TCDD 100 μ g/kg を単回経口投与した。なお、コントロールとして GGA に対してはアラビアゴムを、TCDD に対してはコーンオイルを用いた。この日を投与 0 日とし、投与翌日より同量の GGA を 30 日間連続経口投与し、体重ならびに摂餌量を測定した。Fig. 3 には投与初日を基準とした各群における体重変化を示している。その結果 TCDD 単独投与群および GGA 併用群いずれにおいてもコントロール群に対して体重増加抑制が認められたが、投与 17 日目以降、GGA 併用群において、TCDD 単独投与群に比べ有意な体重増加抑制の軽減が認められた。また、TCDD 単独投与群

では、期間中に 10 匹中 1 匹のマウスが死亡したのに対して、他群では死亡したマウスは見られなかった。

TCDDによる臓器重量変化に対する影響

TCDDの毒性の一つに肝肥大や胸腺萎縮など臓器への影響が知られている。そこで、体重増加抑制や致死性に対して効果を示した GGA が、TCDD による組織障害性に対して軽減効果を示すか否かについて検討した。その結果、投与 30 日目において、TCDD を投与した群では既報の通り肝臓の肥大や胸腺の萎縮が確認され、GGA 併用群においても同等の現象が認められた (Table 1)。これより、GGA は、TCDD の臓器に対する影響には効果を示さないことが明らかとなった。

また、GGA が TCDD による酵素誘導能に影響を与えるか否かを検討するため、AhR 依存的に誘導される CYP1A subfam-

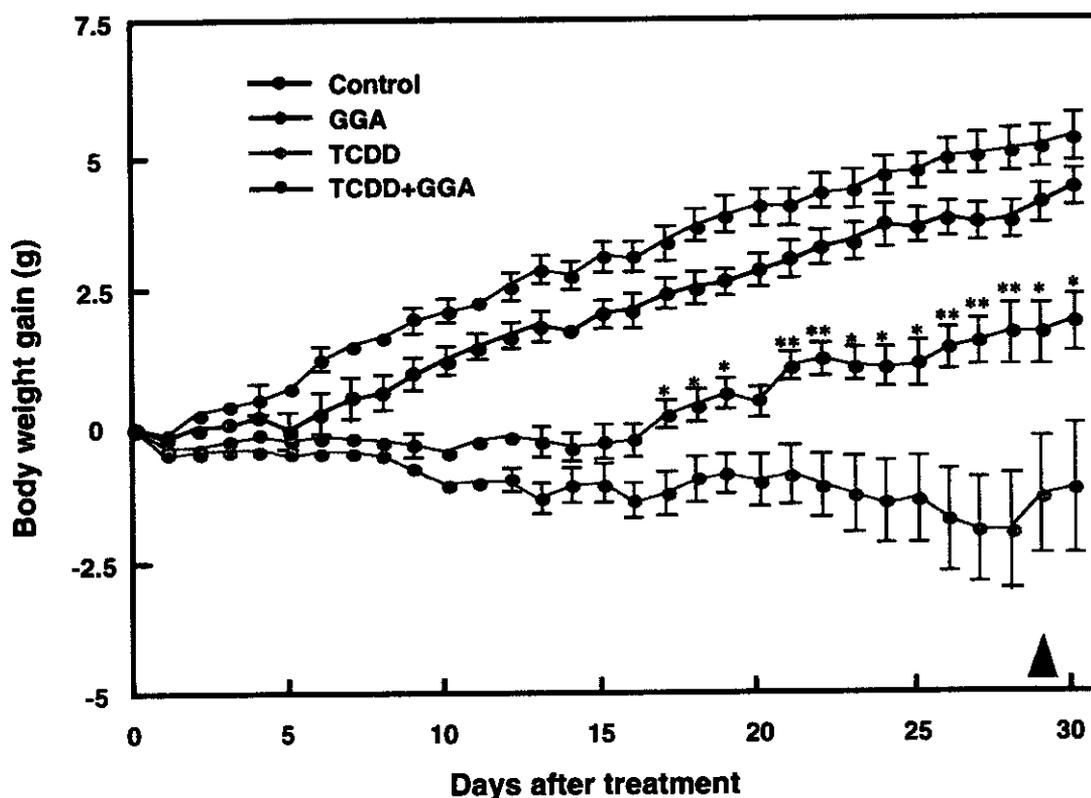


Fig. 3. Changes in the body weight of C57BL/6J mice after exposure to single dose of TCDD and/or administration of GGA. On day 0, mice in the GGA treatment group were given GGA orally at a dose of 200 mg/kg body weight. Then 4 hours after administration of GGA, TCDD in corn oil was given once at a dose of 100 μ g/kg. The values represent the mean \pm SE. of surviving mice (n=9-10). Significantly different from TCDD: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. The green arrow shows the day when mice died in TCDD treatment group.

Table 1. Change in organ weights of C57BL/6J mice following treatment with TCDD and GGA.

organ	Liver	Thymus	Spleen	Kidney
	(% of body weight)			
Control (10)	5.00 \pm 0.05	0.19 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01	1.21 \pm 0.01
GGA (10)	4.93 \pm 0.08	0.18 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	1.18 \pm 0.02
TCDD (6 or 9)	7.73 \pm 0.30 ^{***}	0.05 \pm 0.01 ^{***}	0.24 \pm 0.02	1.31 \pm 0.01
TCDD+GGA (10)	7.55 \pm 0.18 ^{***}	0.06 \pm 0.01 ^{***}	0.30 \pm 0.03	1.38 \pm 0.05 ^{**}

The values represent the mean \pm SE. Though the number of samples is shown in parenthesis, the value of the thymus of TCDD treated mice was calculated with 6 samples because three thymuses were less than 0.001 gram. Significantly different from control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

ily の指標である ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) 活性を測定した。その結果、TCDD 単独投与群およびGGA 併用群において、コントロール群に比べ、顕著な EROD 活性の上昇が認められたが、両群の間に有意な差は認められなかった (Fig. 4)。以上の結果より、GGA は TCDD による AhR を介した酵素誘導に対して影響を示すことなく毒性軽減効果を示す可能性が示唆された。

TCDD による催奇形性におよぼす影響

実験動物を用いた研究から、TCDD は生殖毒性、催奇形性をもつことが知られている。これらは、母体への明らかな毒性が現れないような低濃度でも発症することが報告されていることから、TCDD による最も感受性の高い毒性であると考えられている (6)。マウスにおいて、器官形成期

に TCDD に曝露された場合、腎臓や口蓋特異的に形態的变化を示すことが知られている (7, 8)。そこで、GGA の毒性軽減効果についてさらなる情報を得るため、TCDD の催奇形性におよぼす影響を検討した。

妊娠 12 日目の C57BL/6J マウスに GGA 200 mg/kg を経口投与し、同日 TCDD 20 μ g/kg を単回経口投与した。その後 GGA を連続投与し、妊娠 18 日目に胎子を摘出し、パラフィン固定したのち、腎臓と口蓋の組織像を観察した (Fig. 5)。TCDD の投与量については、Couture らの文献 (9) をもとに、水腎症と口蓋裂がほぼ 100% 発症する投与量を選択した。また、GGA の投与量は体重増加抑制軽減実験と同じ投与量を用いた。

Fig. 6 には胎仔腎臓の結果を示している。既報の通り、control 群、GGA 単独投与群

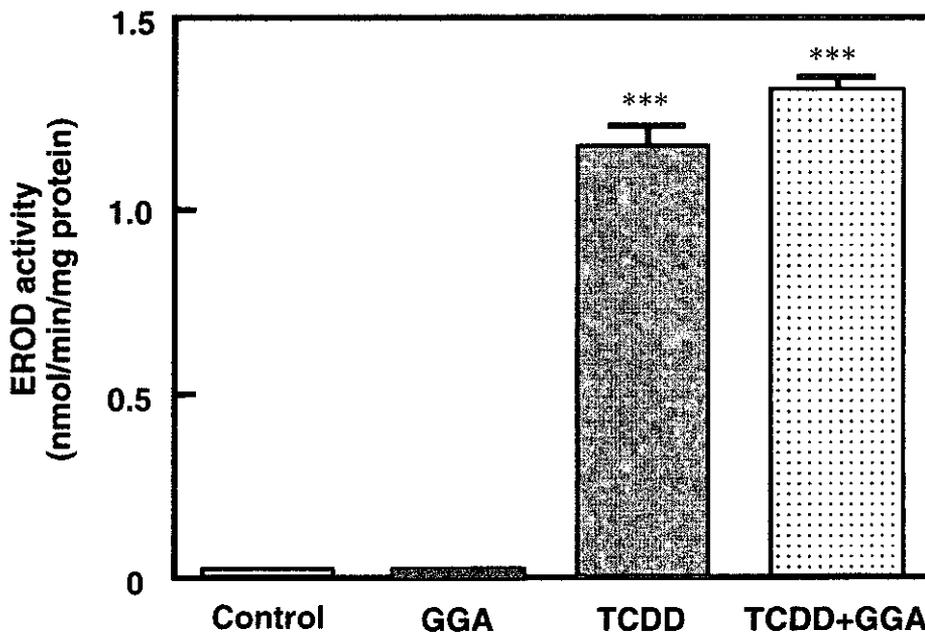


Fig. 4. Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity of liver microsomes of C57BL/6J mice after exposure to TCDD and GGA. The EROD activity of the control was 0.016 ± 0.002 nmol resorufin formed/min/mg protein. Significantly different from control: ***, $p < 0.001$. The values represent the mean \pm SE. (n=5).

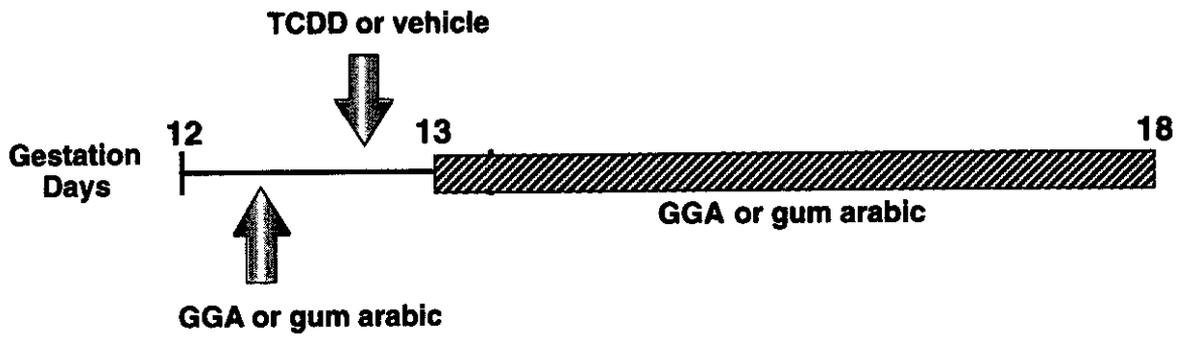


Fig. 5. Schedule of TCDD and GGA treatment in pregnant mice.

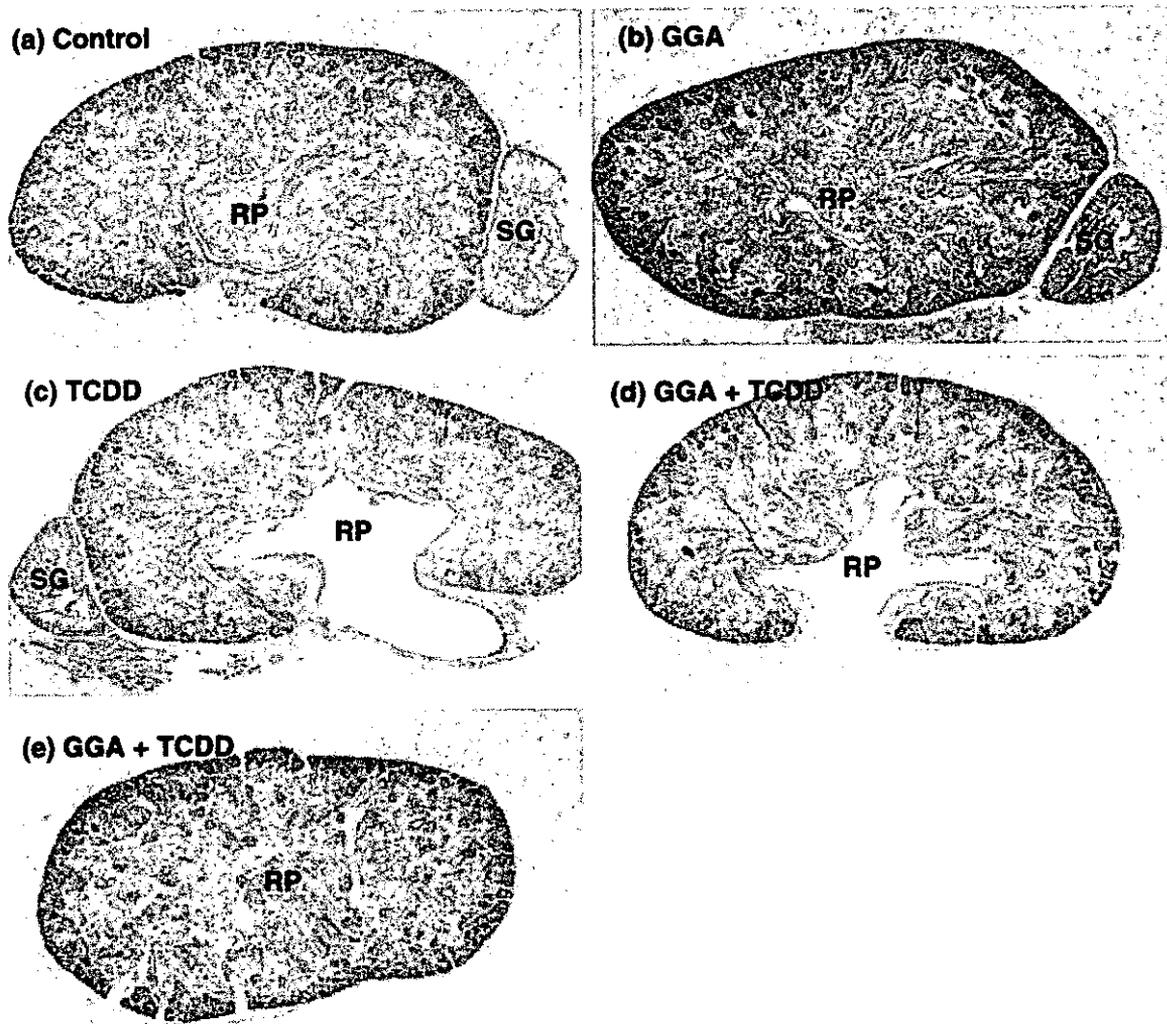


Fig. 6. Morphometric study of hydronephrosis on fetuses from dams treated with TCDD and GGA. (a) Control, (b) GGA, (c) TCDD and (d), (e) GGA+TCDD. RP: renal pelvis, SG: suprarenal gland.

では腎臓に異常は認められなかったが (Fig. 6(a), (b))、TCDD 単独投与群では、水腎症の原因と考えられる腎盂の拡張が認められた (Fig. 6(c))。これに対し、GGA 併用群では、Fig. 6(d) にも見られるように、腎盂の拡張が認められたが、その程度は、TCDD 単独投与群に比べ軽減されていた。また、GGA 併用群の中には、Fig. 6(e) に見られるように、拡張が認められないものも存在した。さらに、発生の頻度についても軽減効果が見られており、TCDD 単独投与群では、調べた腎臓中、全てに腎盂の拡張が認められたのに対し、GGA 併用群では、約 70% 程度であった (Table 2)。もう1つの催奇形性の症状である口蓋裂については、GGA の併用による軽減効果は認められなかった (データ未掲載)。以上の結果より、GGA は TCDD による水腎症に対して軽減効果を持つことが明らかとなった。

HSP70 発現誘導との関連性

本研究を行うに当たり、我々は、ダイオ

キシンの毒性と HSP70 の誘導に注目した。すなわち、HSP70 の誘導に伴い細胞内の防御機構が増強されることでダイオキシンの毒性を軽減することができるのではないかという作業仮説を立てている。そこで、GGA による毒性軽減機構について検討するため、投与 30 日後の肝臓、小腸、腎臓、精巣、脾臓における HSP70 の発現量を検討した。先の実験で 30 日間 GGA を投与したマウスから各臓器を取り出し、サイトソルを調製したのち、SDS-PAGE で分離し HSP70 抗体で免疫染色を行った。その結果、TCDD 単独投与群および GGA 併用群の肝臓において、若干ではあるが control 群に比べ、HSP70 発現量が高い傾向を示した (Fig. 7)。また、小腸においては、GGA 単独投与群のみで HSP70 の誘導傾向が認められた (Fig. 8)。一方、腎臓、精巣、脾臓では、すべての群において顕著な発現量の変化は認められなかった (データ未掲載)。

ストレス応答性の HSP70 には HSP70.1、

Table 2. Incidence of hydronephrosis of fetuses from dams exposed TCDD and/or GGA.

Sample	cleft palate	hydronephrosis
	incidence (%)	
Control	0	0
GGA	0	0
TCDD	100	100
GGA+TCDD	100	72

The number of hydronephrosis/the number of investigated kidney in TCDD or GGA+TCDD group is as follow: from TCDD group, 37/37; from GGA+TCDD group, 28/39.

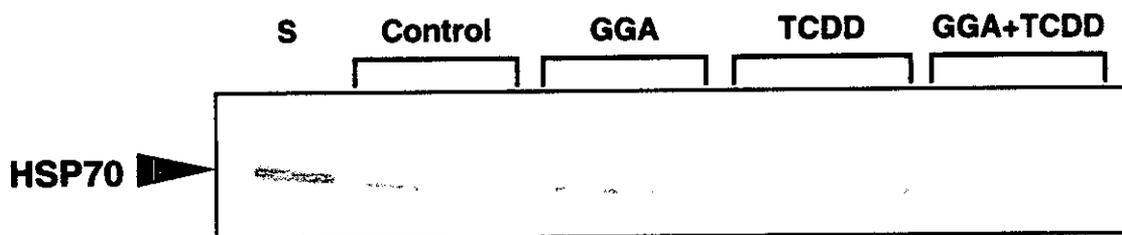


Fig. 7. Immunoblot analysis of HSP70 in liver cytosol of mice treated with TCDD and GGA. Liver cytosol (3 μ g protein) from control, GGA, TCDD and GGA+TCDD treated mice were subjected to SDS-PAGE (7.5% polyacrylamide gel) and blotted with anti-HSP70 antibody. S: HSP70 standard

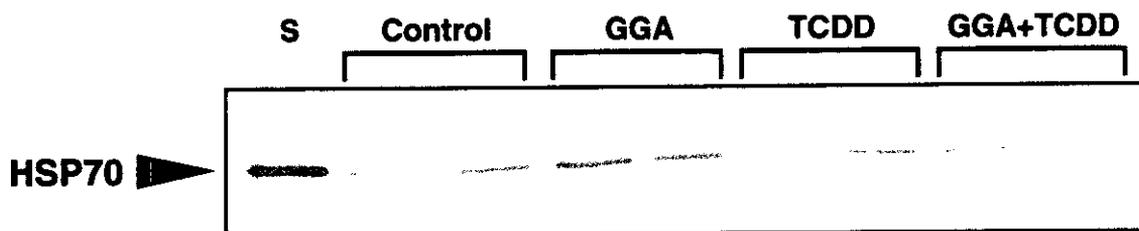


Fig. 8. Immunoblot analysis of HSP70 in intestine cytosol of mice treated with TCDD and GGA. Intestine cytosol (5 μ g protein) from control, GGA, TCDD and GGA+TCDD treated mice were subjected to SDS-PAGE (7.5% polyacrylamide gel) and blotted with anti-HSP70 antibody. S: HSP70 standard

HSP70.2 およびHSP70.3 の少なくとも3 種類の isoform が存在すると言われている (10)。以前の当研究室における結果より、ダイオキシン類に対して主に誘導されるものは、HSP70.1であることが示されている (黒木ら、データ未発表)。そこで、HSP70.1 に特異的な配列にプライマーを設計し、タンパク質レベルで差の認められた肝臓と小腸における HSP70.1 mRNA の定量を試みた。

先の実験で得られた臓器から total RNA を調製したのち cDNA を調製し、これを鋳型として HSP70.1 に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。なお、内部標準物質として β -actin を使い、これに対する相対強度で定量を行った。その結果、TCDD 単独投与群の肝臓において HSP70.1 mRNA の誘導が見られ、GGA 併用群では、その

誘導レベルがさらに高まる傾向を示した (Fig. 9)。一方、小腸においては、各群とも変化は認められなかった (Fig. 10)。

C. 考 察

本検討から、GGA は TCDD の体重増加抑制および致死作用を軽減させることが明らかとなった (Fig. 3)。また胎仔の水腎症に対しても軽減効果が認められた (Fig. 6)。

TCDD の毒性の中でも、致死性に関しては、摂餌量の減少に伴う体重増加抑制が原因ではないかと考えられている。しかし、今回の検討から GGA による体重増加抑制の軽減が見られた場合においても、摂餌量に顕著な差が見られなかった。この TCDD による毒性と摂餌量の減少との関連性については、これまでにも摂餌量を制限した pair-fed を設けることで、様々

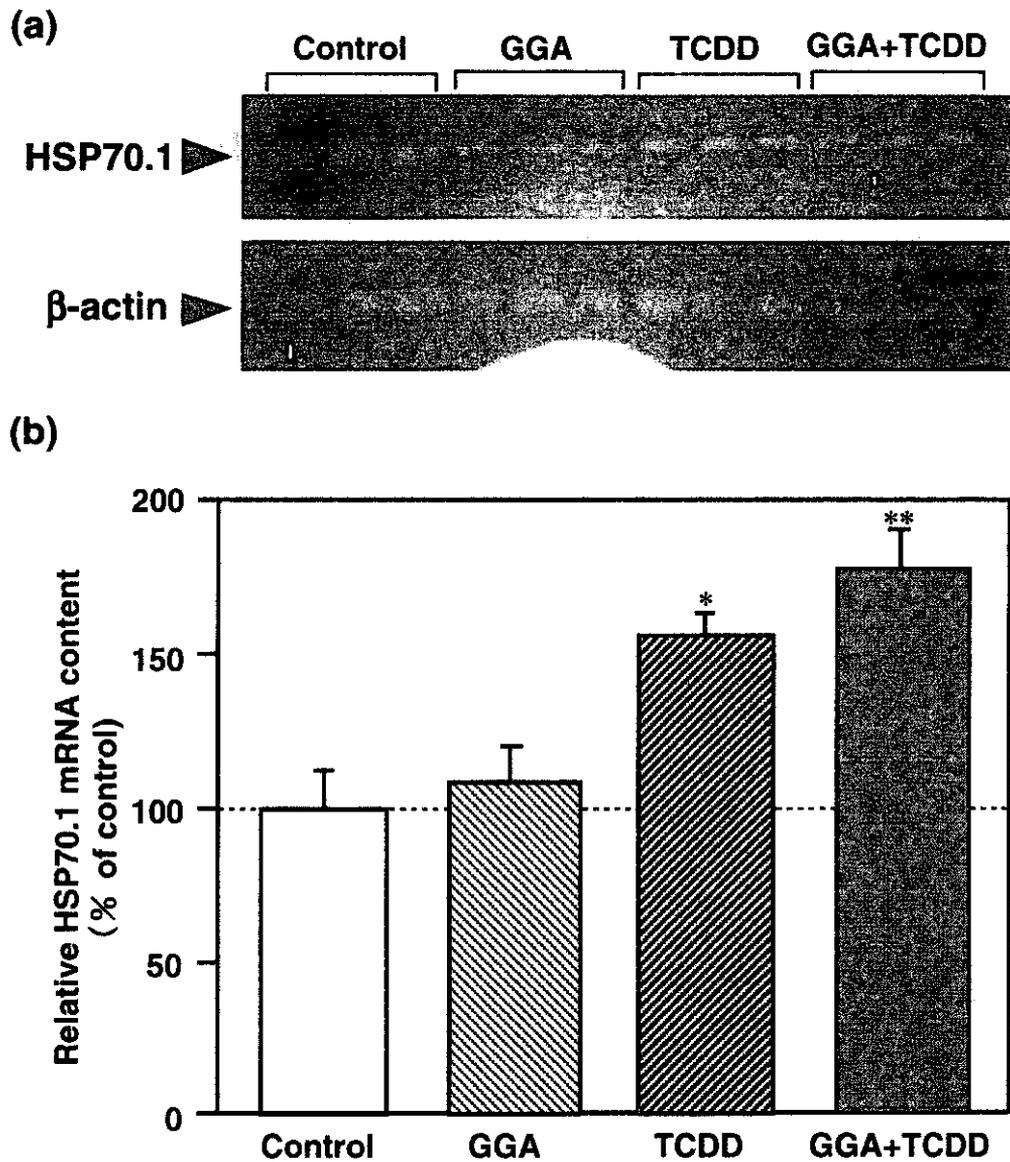


Fig. 9. Analysis of liver hsp70.1 mRNA expression by quantitative RT-PCR.

Total RNA were isolated from the liver of mice treated with GGA and TCDD and analyzed for the expression of hsp70.1 mRNA using RT-PCR. PCR products separated on 2% agarose gel followed by ethidium bromide staining. β -actin was used as a standard for loaded mRNA. (a) Expression of HSP70.1 mRNA analyzed by RT-PCR. (b) Relative abundance of HSP70.1 mRNA estimated by quantitative RT-PCR.

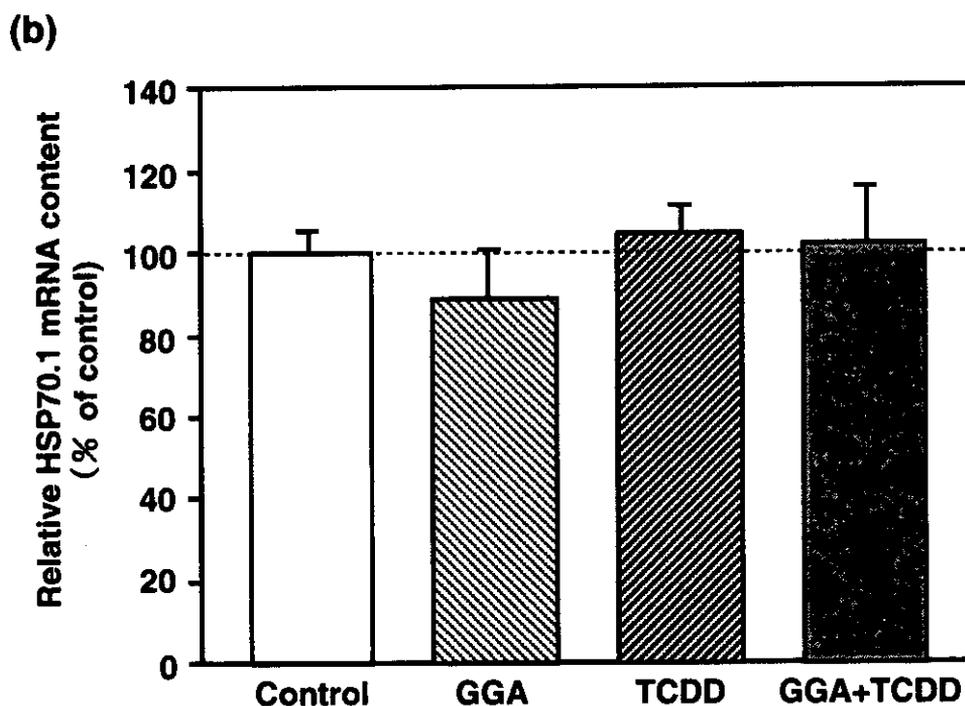
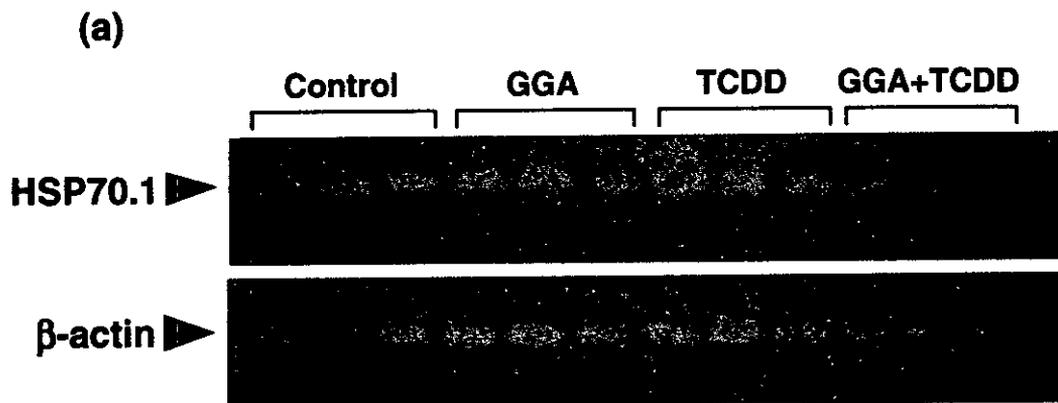


Fig. 10. Analysis of intestine hsp70.1 mRNA expression by quantitative RT-PCR. Total RNA were isolated from the intestine of mice treated with GGA and TCDD and analyzed for the expression of hsp70.1 mRNA using RT-PCR. PCR products separated on 2% agarose gel followed by ethidium bromide staining. β -actin was used as a standard for loaded mRNA. (a) Expression of HSP70.1 mRNA analyzed by RT-PCR. (b) Relative abundance of HSP70.1 mRNA estimated by quantitative RT-PCR.

な検討がなされている。それらの報告では、ダイオキシン類の処理時に見られる糖代謝や脂質代謝に関与する酵素の発現量等の変動が、Pair-fedコントロール群においては見られていない(11, 12)。従って、TCDD処理による摂餌量減少と通常の摂餌量減少との間には、機構上大きな違いがあると考えられる。このような理由から、GGAによるTCDDの毒性軽減効果に摂餌量の回復は含まれておらず、その他の機構が大きく関与している可能性が示唆された。

体重増加抑制と同様に、催奇形性に関してもその発現機構については未解明な点が多い。しかし、一つの可能性として、成長因子であるEGF (epidermal growth factor) とTGF (transforming growth factor)- α の関与が報告されている(13)。すなわち、EGFノックアウトマウスにおいてTCDDによる口蓋裂の発生率が低下するのに対し、TGF- α は影響を示さないとする。一方、水腎症の発症に関しては、EGFおよびTGFノックアウトマウスにおいて頻度と重篤度に上昇が認められている。これらの結果より、口蓋裂と水腎症の発症機構もしくはその閾値には、大きな違いがあると予想される。このことから、GGAは口蓋裂ではなく水腎症を引き起こすような機構もしくは閾値を決定する因子に対して作用しているのではないかと考えられる。

GGAによる毒性軽減機構は未解明な点が多い。しかし、本研究の作業仮説が、HSP70の誘導に伴うダイオキシン類の毒性軽減にあることから、HSP70の発現量の変化を検討した。その結果、TCDD投与30日後の肝臓において、TCDD単独投与群およびGGA併用群のHSP70のタンパク質およびmRNAの発現レベルが、コントロール群に比べ上昇することが明らかと

なった (Fig. 7 and 9)。さらにTCDD単独投与群とGGA併用群を比較した場合、GGA併用群においてわずかではあるがHSP70の発現増加傾向が示された。このわずかなHSP70の発現増加が、生体防御にどの程度寄与しているかについて明らかにすることはできなかった。しかし、この点に関して、一般に防御タンパク質の発現量に比例して生体の防御能が上昇することが予想されるが、必ずしもそうではないとする報告もなされている。例えば、HSP70を高発現させた細胞において、コレステロールのミトコンドリアへの輸送に関わるタンパク質であるsteroidogenic acute regulatory (StAR) タンパク質の発現レベルを著しく低下させることが報告されている(14)。このStARの欠損マウスは致死性を示すことから(15)、生体にとってHSP70過剰状態は必ずしも防御的に働くわけではないと考えられる。またラット局所虚血モデルを用いた検討では、虚血時、HSP70 mRNAの発現は広い領域に見られるが、虚血後、細胞障害の生じる部分では持続してその発現が見られるのに対し、回復する領域ではHSP70 mRNAのシグナルは減弱していく(16)。本研究での30日目におけるHSP70の僅かな増加が、持続的なものによるのか、それとも一過性の過剰発現に対するフィードバックの結果であるのか、明らかにすることができなかったが、今後この点も併せて明らかにしていく必要があるのではないかと考えられる。

GGAはラットの初代培養肝細胞においてエタノールとH₂O₂によるアポトーシスを抑制し(17)、また、ラット肝臓移植の際の虚血障害に対して、その後の生存率を大幅に上昇させることが報告されている(18)。これらの防御効果はいずれもHSP70の誘導が関与していると考えられ

ている。また以前に、マウスに anti-TNF- α を投与することで TCDD による体重増加抑制や致死性を軽減することが報告された (19)。さらに最近になって、予め熱処理を加えたマウスでは、ストレスに対する TNF- α の発現量が低下し、それに伴う致死率の減少が報告されている (20)。HSP70 誘導時の転写因子である heat shock factor (HSF)-1 欠損マウスではストレスに対して TNF- α の産生が増大し、死亡率が増大したという報告もあることから (21)、GGA による HSP70 の誘導とそれに伴う生体のストレスに対する防御能の増強は、十分に予想される。また、Lindquist らのショウジョウバエを用いた実験では、HSP70 と同様シャペロンタンパク質の一つである HSP90 がショウジョウバエの形態を決定する閾値を構成する要素の一つであることを明らかにしている (22)。これより、同じシャペロンタンパク質である HSP70 が、マウス胎仔の形態を維持するための要因の一つである可能性も十分に考えられる。一方、GGA は HSP70 以外にも thioredoxin や PGE₂ を増加させることが報告されている (23)。TCDD の毒性は以前より酸化ストレスの関与が示唆されているが (24)、酸化ストレスに対して生体が持つ防御因子の一つに thioredoxin が挙げられている。また、thioredoxin の 5'-非翻訳領域には HSE が存在することが示されており (25)、HSF-2 は thioredoxin の発現誘導に関与していると報告されている (26)。さらに thioredoxin は HSP70 と同様の抗アポトーシス因子であり、シャペロン様作用を示すことも示唆されている (27)。以上より GGA による毒性軽減機構に関しては、HSP70 だけでなく、thioredoxin など種々の細胞内における防御因子が関与している可能性も予想される。これらの点も含めて、GGA とダイオキシ

ン類による毒性軽減との関連性については、今後さらなる検討が必要であると考える。

D. 総括

本研究では、ダイオキシン類の毒性軽減方法の開発を目的とし、HSP70 の誘導剤である GGA を用いて検討を行った。以下に本研究で得られた知見を示す。

1) GGA は TCDD によって引き起こされる体重増加抑制や致死性といった毒性に対して軽減効果を示すことが明らかとなった。さらにその毒性軽減効果は、GGA による摂餌量の回復以外の機構によることが示唆された。一方、TCDD による肝肥大や胸腺の萎縮、さらに、TCDD の毒性発現機構の一端を担うと考えられている AhR 依存的な機能性タンパクの発現に対しては、GGA による変動抑制効果は認められなかった。

2) GGA を併用することにより、TCDD 暴露胎仔に見られる水腎症の原因と考えられる腎盂拡張の発症頻度および重篤度が軽減されることが明らかとなった。これに対し、口蓋裂に関しては、GGA の毒性軽減効果は認められなかった。

3) GGA により毒性軽減効果が認められたマウスの肝臓において、HSP70.1 mRNA の上昇傾向が認められた。これより、GGA による毒性軽減効果の要因の一つに HSP70 の誘導が関与している可能性が考えられた。

本研究結果は、現在臨床で用いられている薬が、実際にダイオキシンの毒性を軽減した初めての報告である。今回得られた見解は、ダイオキシン類による急性

毒性のみならず、将来的に直面すると予想される催奇形性や生殖毒性などの問題に対する解決策の発端となり得ると考えられる。今後さらなる詳細な研究が、今回得られた所見を明らかなものにすると考えている。

E. 研究発表

1. フォーラム 2002: 衛生薬学・環境トキシコロジー (広島, 2002年10月)

F. 参考文献

1. Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (1997) *J. Biochem.*, **122**, 1075-1079.
2. 福田垂弥子, 石井祐次, 田崎健二, 松末公彦, 石田卓巳, 小栗一太 (1999) *福岡医誌*, **90**, 259-271.
3. Hartl, F. U. (1996) *Nature*, **381**, 571-579.
4. Pirkkala, L., Nykanen, P. and Sistonen, L. (2001) *FASEB J.*, **15**, 1118-1131.
5. Samali, A. and Orrenius, S. (1998) *Cell Stress Chaperones*, **3**, 228-236.
6. Birnbaum, L. S., Weber, H., Harris, M. W., Lamb, J. C. and McKinney, J. D. (1985) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **77**, 292-302.
7. Moore, J. A., Gupta, B. N., Zinkl, J. G. and Vos, J. G. (1973) *Environ. Health Perspect.*, **5**, 81-85.
8. Neubert, D., Zens, P., Rothenwallner, A. and Merker, H. J. (1973) *Environ. Health Perspect.*, **5**, 67-79.
9. Couture, L. A., Harris, M. W. and Birnbaum, L. S. (1990) *Fundam. Appl. Toxicol.*, **15**, 142-150.
10. Huang, L., Mivechi, N. F. and Moskophidis, D. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 8575-8591.
11. Ishii, Y., Kato, H., Hatsumura, M., Ishida, T., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1997) *Toxicology*, **116**, 193-199.
12. Matsusue, K., Ishii, Y., Ariyoshi, N. and Oguri, K. (1999) *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 1158-1165.
13. Bryant, P. L., Schmid, J. E., Fenton, S. E., Buckalew, A. R. and Abbott, B. D. (2001) *Toxicol. Sci.*, **62**, 103-114.
14. Liu, Z. and Stocco, D. M. (1997) *Endocrinology*, **138**, 2722-2728.
15. Caron, K. M., Soo, S. C., Wetsel, W. C., Stocco, D. M., Clark, B. J. and Parker, K. L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11540-11545.
16. Welsh, F. A., Moyer, D. J. and Harris, V. A. (1992) *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **12**, 204-212.
17. Ikeyama, S., Kusumoto, K., Miyake, H., Rokutan, K. and Tashiro, S. (2001) *J. Hepatol.*, **35**, 53-61.
18. Fudaba, Y., Tashiro, H., Ohdan, H., Miyata, Y., Shibata, S., Shintaku, S., Nishihara, M., Ito, H., Fukuda, Y., Asahara, T. and Dohi, K. (2000) *Transplant. Proc.*, **32**, 1615-1616.
19. Taylor, M. J., Lucier, G. W., Mahler, J. F., Thompson, M., Lockhart, A. C. and Clark, G. C. (1992) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **117**, 126-132.
20. Singh, I. S. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 9841-9848.
21. Xiao, X. Z., Zuo, X. X., Daris, A. A., McMillian, D. R., Curry, B. B., Richardson, J. A. and Benjamin, I. J. (1999) *EMBO J.*, **18**, 5943-5952.
22. Rutherford, S. L. and Lindquist, S. (1998) *Nature*, **396**, 336-342.
23. Dekigai, H., Nakamura, H., Bai, J., Tanito, M., Masutani, H., Hirota, K., Matsui, H., Murakami, M. and Yodoi, J. (2001) *Free Radical Res.*, **35**, 23-30.
24. Stohs, S. J., Shara, M. A., Alsharif, N. Z.,

- Wahba, Z. Z. and Al, B. Z. (1990) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **106**, 126-135.
25. Taniguchi, Y., Taniguchi, U. Y., Mori, K. and Yodoi, J. (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2746-2752.
26. Leppa, S., Pirkkala, L., Chow, S. C., Eriksson, J. E. and Sistonen, L. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 30400-30404.
27. Mitsui, A., Hirakawa, T. and Yodoi, J. (1992) *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **186**, 1220-1226.

ダイオキシン類およびダイオキシン受容体による 肺がん由来細胞増殖促進作用

分担研究者 手塚雅勝 日本大学薬学部 衛生化学研究室 教授

研究要旨 本年度においてはダイオキシン類の発がんプロモーター作用に関するメカニズムを検討する目的で、ダイオキシンレセプター(AhR)過剰発現細胞を作成し、その細胞増殖に対する影響をDNAアレイ法を用いて解析した。その結果、ダイオキシン類の曝露あるいはAhRの活性化が細胞周期制御に関連した転写因子であるE2Fを活性化し、その結果、様々な細胞周期関連遺伝子の発現が誘導されることを明らかにした。

A. 目的

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)をはじめとするダイオキシン類は生体に対し様々な毒性を示し、発がんプロモーター作用もそのひとつである。これらの毒性の発現にはダイオキシン類に対する特異的受容体であるarylhydrocarbon receptor (AhR)が関与している。AhRはその構造内にbHLH/PAS構造を有する転写因子であり、進化の過程においても保存されている。またほ乳動物において、AhRは検討された各臓器において発現が確認され中でも肺において最も高い発現を示す。一方、TCDDの長期投与により肺の扁平上皮がんの発生が報告されている。以上をふまえ本年度においてはダイオキシン類の肺がんプロモーター作用のメカニズムを明らかにする目的で肺由来細胞の増殖におけるダイオキシン類ならびにAhRの活性化の影響を検討した。

B. 方法

i) AhR 過剰発現細胞の構築

AhR cDNA を pRC/CMV ベクター

(Invitrogen)にセンスの方向で挿入しリポソーム法を用いてヒト肺がんA549細胞にトランスフェクションした。細胞のクロニングはネオマイシン耐性を指標に行った。A549細胞ならびにAhR 過剰発現細胞は10%牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地中にて培養を行った。

ii) DNA アレイ法

AhR 過剰発現細胞ならびにベクター導入細胞よりpoly A RNAを抽出した。このRNAを鋳型として、[α -³²P]-dCTP存在下で逆転写反応を行った。得られたcDNAを用いてAtlas Human Cell Cycle Arrayとハイブリダイゼーションを行った。発現に差異が認められた遺伝子に関してはRT-PCR法により発現量の再確認を行った。

iii) リポーター遺伝子アッセイ

50-70% confluentの状態のA549細胞に、リポーター遺伝子、発現ベクターおよび内部標準ベクターであるpRLベクター(Promega)をリポソーム法により導入した。導入48時間後、PBSで細胞を洗い、Passive Lysis Buffer (Promega)で細胞を溶解した。次いで検体中のルシフェラーゼ活性を、