

江馬 眞、原園 景 (2000) ラットの妊娠初期に投与した dibutyltin dichloride の胚致死作用、第 27 回日本トキシコロジー学会

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

Ena, M., Harazono, A. and Kawashima, K. (2000) Early embryonic loss induced by dibutyltin dichloride (DBTCl) in rats. Society of Toxicology, 39th Annual Meeting (The Toxicologist, 54 (1), 291, 2000)

ES 細胞の遺伝子発現に及ぼす TCDD の影響。高木篤也、五十嵐勝英、菅野純、金子豊蔵、井上達、第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京 2002 年 6 月

Effects of TCDD and polychlorinated terphenyls (PCTs) on the development of cleft palate in mouse embryos. Atsuya Takagi, Toyozo Kaneko, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno and Tohru Inoue, The 22st International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Spain, 2002 年 8 月

Effects of TCDD on the gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. TAKAGI, A., MATSUDA, N., KANEKO, T., KANNO, J. and INOUE T., USA, 2002 年 6 月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

ダイオキシンの胎生期暴露のサルウの行動発達に及ぼす影響
分担研究者 安田 峯生 所属機関名 広島国際大学保健医療学部

研究要旨 妊娠 20 日から生後 90 日まで、母体にダイオキシン 30 ng/kg または 300 ng/kg の体内負荷をかけたアカゲザル母体の児について、知能試験（4 段指迷路試験）、社会性行動試験（新奇出合わせ試験）、警戒行動試験（アイコンタクト試験）を行った。知能試験、アイコンタクト試験では各群間に差は認められなかったが、出合わせ試験では高用量群で環境への興味を示している傾向が見られた。

A. 研究目的

PCB やダイオキシンの胎生期暴露がヒトの中樞神経系の発達に悪影響を及ぼしているのではないかと懸念されている。本研究は、胎生期・授乳期にダイオキシン暴露を受けたアカゲザル児の生後の行動発達を調べ、ヒトでの影響評価に資することを目的とする。

B. 研究方法

アカゲザルを交配し、約 60 匹を 3 群に分け、妊娠 20 日に 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン（以下 TCDD）0（溶媒）、30 または 300 ng/kg を皮下投与し、その後 30 日毎に初回投与量の 5% 量を維持量として投与した（30 日毎の 5% 追加は、報告されているアカゲザルでのダイオキシンの半減期に基づき、体内負荷量が平衡状態になったところで 30 または 300 ng/kg となるように設定）。妊娠動物は自然分娩させ、児を哺育させた。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続けた。生後 12～15 ヶ月齢で 4 段指迷路試験、13～15 ヶ月齢で新奇出合わせ試験、23～26 ヶ月齢でアイコンタクト試験を行った。

（倫理面への配慮）

実験動物は愛護的に扱い、また実験者が TCDD からの悪影響を受けないように配慮した。

C. 研究結果

各群 4 匹をランダムに抽出して行った 4 段式指迷路試験では、馴化と練習課題を経た後には、いずれの群も 90% 以上の正反応率を示し、群間には有意差は認められなかった（図 1）。各群オス・メス 2 匹ずつ選んだ児での出合わせ 15 分間の行動を解析したところ、対照群では、ステレオ環境探索行動が、低用量群では他個体に接近・接触する友好的行動が、高用量群では移動する環境探索行動が、比較的多く観察された（図 2）。各群オス・メス 5 匹（高用量群のみオス 3 匹）について行ったアイコンタクト試験では、いずれの群でもメスの

アイコンタクト数が多い傾向が見られたが、TCDD 投与の影響は認められなかった（図 3）。

D. 考察

本実験結果から、アカゲザルでは生後 1 年で既に指迷路試験での知能評価が可能であること、300 ng/kg の母体体内負荷量でも、児の知能発達に悪影響を及ぼさないことが明らかになった。出合わせ試験では、群間の行動パターンに若干の差が認められ、対照群に比べてダイオキシン暴露群では環境への興味を示している傾向が見られたが、これは暴露群でむしろ行動の成熟が進んだのではないかと考えられる。アイコンタクト試験では、明らかな性差が認められたが、TCDD 投与による差は見られず、この指標で評価する限り、オス個体のメス化が起こっているとは考えられない。

E. 結論

TCDD30 または 300 ng/kg の母体体内負荷に妊娠 20 日から生後 90 日まで暴露されたアカゲザル児の認知・行動評価では、新奇出合わせ試験で、各群間の行動パターンに若干の差が見られ、対照群では、ステレオ環境探索行動が、低用量群では他個体に接近・接触する友好的行動が、高用量群では移動する環境探索行動が比較的多く観察されたことから発育個体の社会性に影響がある可能性が示唆されたが、児の知能や警戒心に悪影響を与えないことが示された。

F. 健康危惧情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ogura H, Yasuda M, Nakamura S, Yamashita H,

Mikoshiha K, Ohmori H: Neurotoxic damage of granule cells in the dentate gyrus and the cerebellum and cognitive deficit following neonatal administration of phenytoin in mice. J. Neuropathol. Exp Neurol. 61, 956-967, 2002.

2. 学会発表

- 1) 安田峯生, 隅田寛, 浅岡一雄, 山下敬介, 角崎英志, 井上稔: ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル生殖器発育への影響. 環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集, 355 (抄録), 2002. (環境ホルモン学会第5回研究発表会, 2002年11月25-26日, 広島)
- 2) 飯田景子, 釜中慶朗, 鈴木樹理, 渡辺邦夫, 安田峯生, 久保田俊一郎, 浅岡一雄: ダイオキシン類のサル子宮内膜におよぼす影響の DNA チップによる解析. 環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集, 109 (抄録), 2002. (環境ホルモン学会第5回研究発表会, 2002年11月25-26日, 広島)
- 3) 安田峯生, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 山下敬介: ダイオキシン胎生期・授乳期暴露を受けたアカゲザル児の腎臓異常. 第42回日本先天異常学会学術集会抄録集, 107 (抄録), 2002. (第42

回日本先天異常学会学術集会, 2002年7月10-12日, 浜松)

- 4) Sugihara K, Yamada T, Kitamura S, Ohta S, Yamashita K, Okamura S, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T: Ah-receptor-mediated induction of drug-metabolizing enzymes by indirubin and indigo. Organohalogen Compounds, 59, 453-456 (Short paper), 2002. (22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 11-16, Barcelona, Spain)

H. 知的財産所有権の出願、登録状況なし。

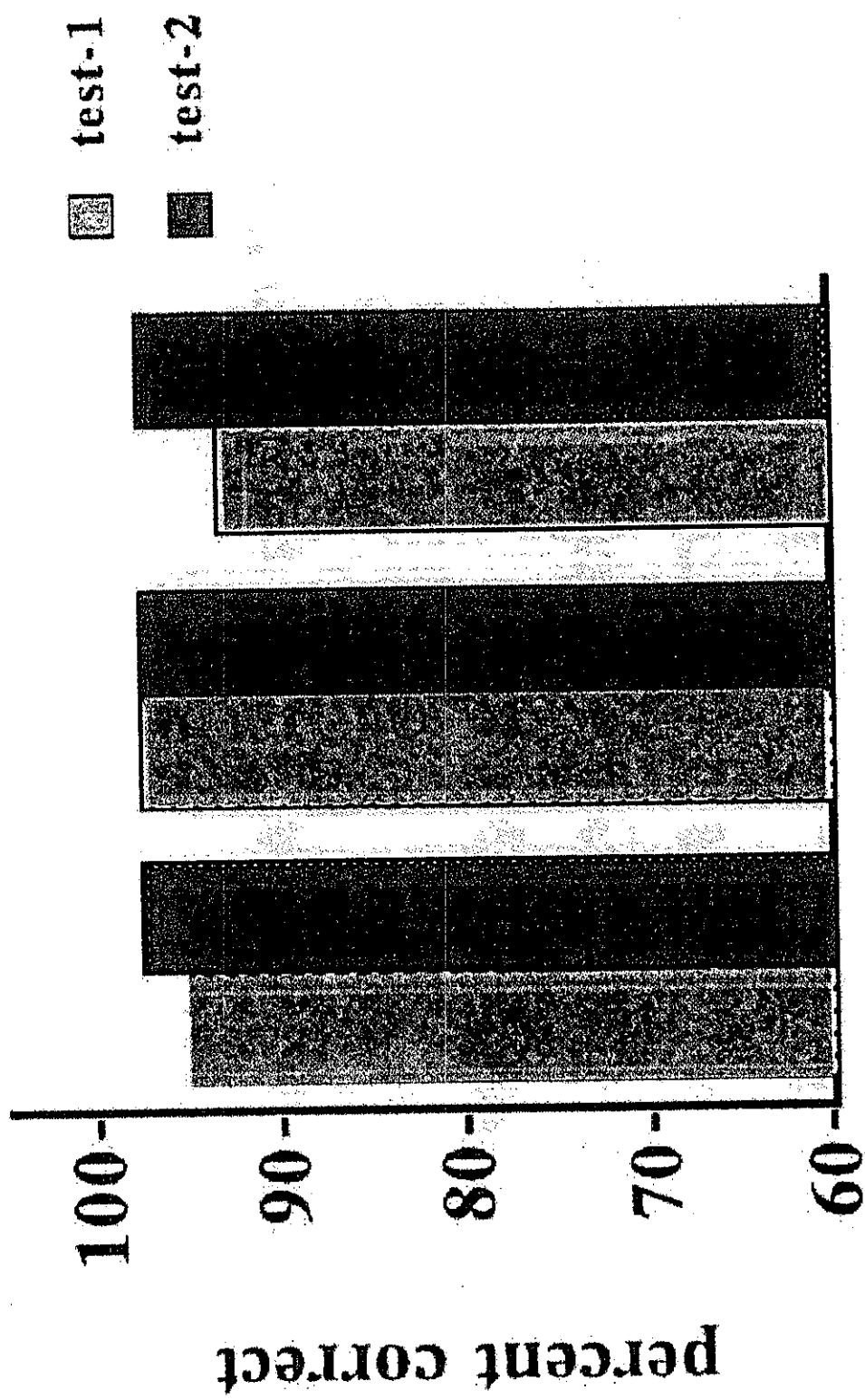


図1. 指迷路ランダムテストにおける正反応率

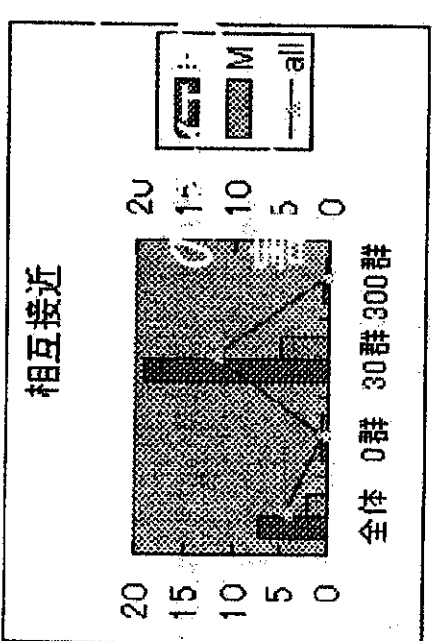
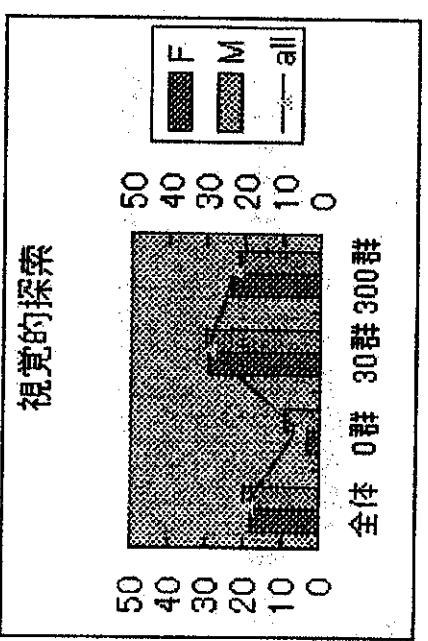
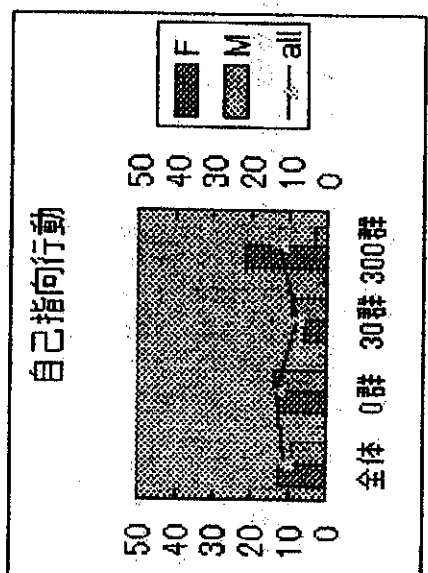
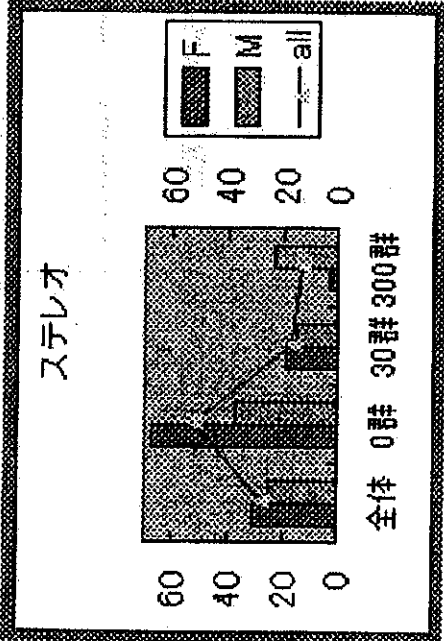
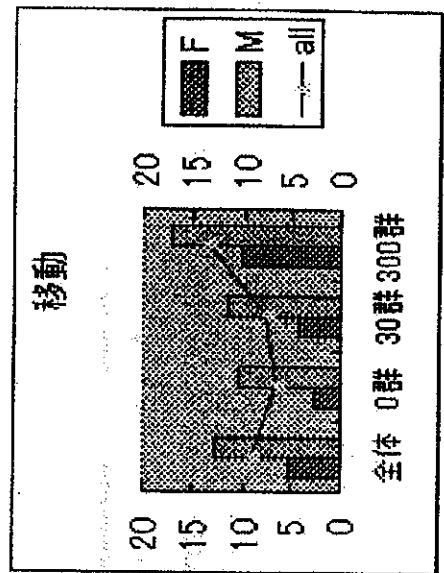
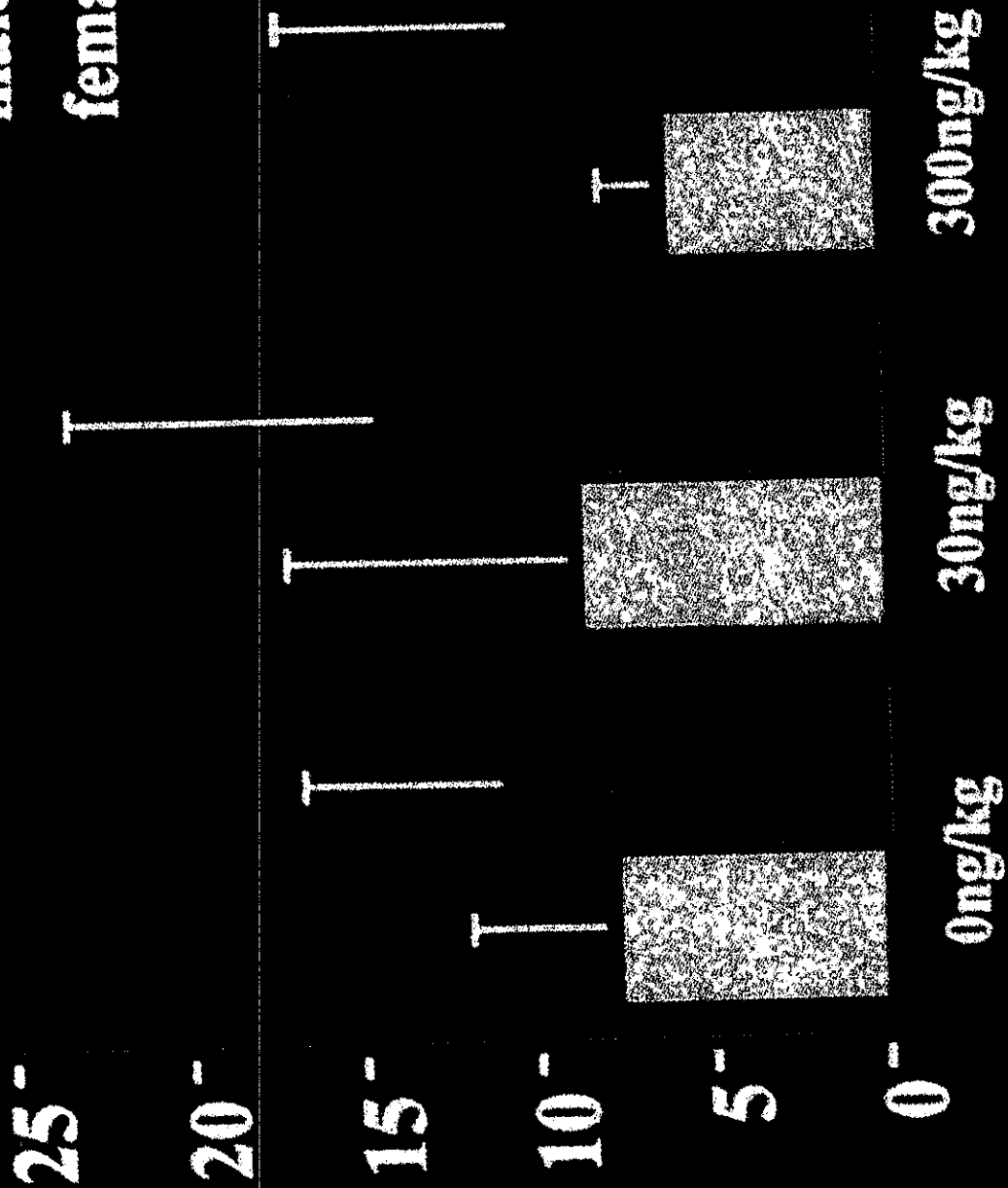


図2. 出会わせ試験での各種行動時
間の割合 (%)

図3. 1分間あたりのアイソントラクト回数

■ male
■ female



厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
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。そこで、胚性幹細胞（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 存在下、ES 培地で培養し、2,3,7,8-TCDD を 10nM の濃度で添加した。添加、4 日後の ES 細胞から 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網羅的に検索した。この結果、CYP1A1 及び CYP1B1 を始め、多くの遺伝子発現の変動が認められ、未分化 ES 細胞がダイオキシンの良く反応す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。これまでにダイオキシン受容体が ES 及び EB において発現することを確認した。したがって、ダイオキシン類の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。本年度は、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 の未分化 ES 細胞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 LIF が存在する ES 培地で培養した。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 ES 細胞より RNA を抽出後、クロンテック社のマイクロアレイを用いて影響を受ける遺伝子を網羅的に検索した。

C. 研究結果

RT-PCR の解析結果から、ES 細胞の 4 日間培養後において、TCDD は薬物代謝酵素の CYP1A1 を用量に依存して増加させた。マイクロアレイの解

析結果、ES 細胞の 4 日間培養後において、TCDD は薬物代謝酵素の CYP1A1 及び CYP1B1 を始め、多くの遺伝子発現を変動させた。CYP 以外では MEK kinase や NEK4 等のリン酸化酵素の増加や ES 細胞の未分化の維持に必要な LIF の増加が認められた。

D. 考察

今回の結果、未分化 ES 細胞において TCDD 添加により、CYP1A1 の増加が RT-PCR 及びマイクロアレイで顕著に認められたことから、この ES 細胞培養系はダイオキシン類の反応を調べる良い系であることが明らかになった。また、LIF が増加したことから、TCDD が分化抑制に働いていることが示唆された。今後は、さらに遺伝子数の多いマイクロアレイ用 chip を用いて網羅的な解析を行う予定である。

E. 結論

ES 細胞を用いることにより CYP1A1 以外の分化誘導に関する他の遺伝子発現のモニターが期待され、胎児毒性のモデルを対象とした TEF 評価の発展が期待された。

F.健康危惧情報

なし。

G.研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

高木篤也、胚幹細胞を用いた検討、井上達監修、
内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法、シュブ
リンガーフェアラーク社、東京、2000年、
pp143-149。

2) 雑誌

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., *Mesp1*
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

1. ES 細胞の遺伝子発現に及ぼす TCDD の影響。高
木篤也、五十嵐勝英、菅野純、金子豊蔵、井上
達、第29回日本トキシコロジー学会学術年会、
東京2002年6月

2. Effects of TCDD and polychlorinated terphenyls
(PCTs) on the development of cleft palate in mouse
embryos. Atsuya Takagi, Toyozo Kaneko,
Katsuhide Igarashi, Jun Kanno and Tohru Inoue,
The 22nd International Symposium on halogenated
Environmental Organic Pollutants and POPs.
Spain, 2002年8月

3. Effects of TCDD on the gene expression in mouse
embryonic stem cells in culture. TAKAGI, A.,
MATSUDA, N., KANEKO, T., KANNO, J. and
INOUE T., USA, 2002年6月

2. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

H.知的所有権の取得状況

厚生労働科学研究補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

ダイオキシン類の健康影響特にその TEF を中心としたリスク評価のための実験的基盤研究

分担研究者 矢守隆夫 （財）癌研究会癌化学療法センター分子薬理部

分担研究課題 細胞アレイを指標とした発がん評価

研究要旨： TCDD、TCDF ほか 11 種のダイオキシン類は、がん細胞パネルにおいて全般的に増殖阻害効果が弱かったが、TCDF のみは顕著な細胞増殖阻害効果を示し際だった特徴を示すことがわかった。その阻害パターンから種々の抗がん剤、阻害剤とは異なるユニークな作用機作を持つことが示唆された。構造上のわずかな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。DNA チップによる解析では、TCDF 感受性の OVCAR-4 細胞では、TCDD では発現されず TCDF により発現が誘導される遺伝子群が見られた。がん細胞パネルは、TCDF 感受性の分子メカニズムを解析するモデルとして有用である。

A. 研究目的

「がん細胞パネル」は、本来抗がん剤探索研究のために開発された Wet and Dry の化合物評価システムであるが、インフォマティクスの守備範囲は抗がん剤評価に限定されるものではなく、毒性影響に対しても対応可能であることがすでに示されている。本研究のねらいは、がん細胞パネルによってダイオキシンのがん細胞増殖への影響を調べ、それを切り口としてダイオキシン類の毒性分子機構の解析を行うことにある。

B. 研究方法：

がん細胞パネル法は、薬剤感受性試験データならびに薬剤感受性データベースをもとに、化合物の作用機作や分子標的をインフォマティクスにより推定する化合物評価系である。この系では肺がん、胃がん、大腸がんなど 39 系のヒトがん細胞株の各々が種々の薬剤にどんな感受性を示すがあらかじめデータベース化されており、被験化合物に対するがん細胞パネルでの感受性データをとれば、インフォマティクスによりその化合物の作用機作推定など有用な情報を引き出すことが可能である。化合物を 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化合物固有の Finger Print が得られる。化合物間で

Finger Print 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、がん細胞パネル 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。また、ダイオキシンに 48 時間曝露されたがん細胞における約 1 万遺伝子の発現変化を DNA チップ（Affimetrix 社）により網羅的に解析した。

C. 研究結果：

TCDD、TCDF ほか 11 種のダイオキシン類は、がん細胞パネルにおいて全般的に増殖阻害効果が弱かったが、TCDF のみは顕著な細胞増殖阻害効果を示し際だった特徴を示すことがわかった。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、がん細胞パネルが、TCDF を抗がん剤、その他の阻害剤と明確にことなる作用機作を持つ化合物として識別できたことを示している。一方、他のダイオキシン類に対してがん細胞パネルの細胞株は全般的に増殖阻害を受ける感受性が低かったが、比較的増殖阻害を受けやすい細胞株も少数見られた（MCF-7, SNB-75, NCI-H226, PC-3 の 4 種）。TCDF 感受性の分子機構を解析するため、TCDF 感受性の OVCAR-4 と TCDF 抵抗性の HT-29 について遺伝子発現プロファイルを DNA チップで調べた。その

結果、HT-29 と OVCAR-4 には AhR, ARNT, HSP90, XAP2(AIP)などダイオキシン経路の遺伝子が発現していた。ダイオキシン処理 48 時間後の遺伝子発現変化を調べた結果、TCDD, TCDF どちらによっても両細胞株で共通に誘導される遺伝子が CYP1A1, CYP1B1 を始め多数見られた。一方、OVCAR-4 (TCDF 感受性)において、TCDD では誘導されず、TCDF によって誘導される遺伝子群(IL-8, GADD 45 ほか) が見られた。

D. 考察:

がん細胞パネルにおいては TCDF のみが顕著な細胞増殖阻害効果を示し、際だった特徴を示すことがわかった。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が判明し、構造活性相関の見地から興味深い。TCDF は、その Finger Print から種々の抗がん剤、阻害剤とは異なるユニークな作用機作を持つことが示唆された。DNA チップによる解析はまだ予試験的ではあるが、少なくとも 2 種類のがん細胞でダイオキシン経路の遺伝子の発現が見られ、かつ TCDD, TCDF で発現誘導のかかることの知られる遺伝子が実際誘導されることからこれらがん細胞株はダイオキシンの影響を見る研究モデルとして有用と思われる。特に、TCDF 感受性 OVCAR-4 細胞において TCDD では誘導されず、TCDF によって誘導される遺伝子群が同定されたことは、興味深い点で、TCDF のシグナル伝達経路と増殖シグナル伝達系とのクロストークがあることを示唆している。この系での解析から TCDF 特異的な分子毒性機構が明らかとなる可能性がある。また、細胞側から見ると、上記 11 種類にまったく無反応なもの、TCDF へのみ反応するもの、および複数のものに強弱はあるものの反応するものがあり、いわゆる WHO の TEF を規定する要因と TEF にまったく従わない化合物特異的な要因が分離できると期待され、次年度以降、これについての検討も加える。

E. 結論:

TCDD, TCDF をはじめとする 11 種のダイオキシン類をがん細胞パネルで評価した結果、TCDF のみが顕著な細胞増殖阻害効果を示すという際だった特徴を示すことがわかった。TCDF により増殖阻害を受ける細胞では、TCDF によって

誘導される遺伝子群がみられた。これらのことから、がん細胞パネルは少なくとも TCDF の毒性機構を解析するモデルとして有用である。

F. 健康危惧情報

G. 研究発表:

1. 論文発表

(英文発表)

1. Yang, L., Mashima, T., Sato, S., Mochizuki, M., Sakamoto, H., Yamori, T., Oh-Hara, T., and Tsuruo, T. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res*, 63: 831-837, 2003.
2. Iwashima, M., Matsumoto, Y., Takenaka, Y., Iguchi, K., and Yamori, T. New Marine Diterpenoids from the Okinawan Soft Coral *Clavularia koellikeri*. *J Nat Prod*, 65: 1441-1446, 2002.
3. Iwashima, M., Terada, I., Iguchi, K., and Yamori, T. New biologically active marine sesquiterpenoid and steroid from the okinawan sponge of the genus *axinyssa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 50: 1286-1289, 2002.
4. Inoue, A., Yoshida, N., Omoto, Y., Oguchi, S., Yamori, T., Kiyama, R., and Hayashi, S. Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J Mol Endocrinol*, 29: 175-192, 2002.
5. Umemura, K., Mizushima, T., Katayama, H., Kiryu, Y., Yamori, T., and Andoh, T. Inhibition of DNA topoisomerases II and/or I by pyrazolo[1,5-a]indole derivatives and their growth inhibitory activities. *Mol Pharmacol*, 62: 873-880, 2002.
6. Sasaki, T., Yamazaki, K., Yamori, T., and Endo, T. Inhibition of proliferation and induction of differentiation of glioma cells with *Datura stramonium* agglutinin. *Br J Cancer*, 87: 918-923, 2002.
7. Owa, T., Yokoi, A., Yamazaki, K., Yoshimatsu, K., Yamori, T., and Nagasu, T. Array-Based Structure and Gene Expression Relationship Study of Antitumor Sulfonamides Including N-[2-[(4-Hydroxyphenyl)amino]-3-pyridinyl]-4-methoxybenzenesulfonamide and N-(3-Chloro-7-

- indolyl)-1,4-benzenedisulfonamide. *J Med Chem*, *45*: 4913-4922, 2002.
8. Hashimoto, S., Xu, Y., Masuda, Y., Aiuchi, T., Nakajo, S., Uehara, Y., Shibuya, M., Yamori, T., and Nakaya, K. β -Hydroxyisovalerylshikonin Is a Novel and Potent Inhibitor of Protein Tyrosine Kinases. *Jpn. J. Cancer Res.*, *93*: 944-951, 2002.
 9. Umezu-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., Aoki, J., and Arai, H. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol*, *158*: 227-233, 2002.
 10. Naasani, I., Yamori, T., and Tsuruo, T. Screening with COMPARE analysis for telomerase inhibitors. *Methods Mol Biol*, *191*: 197-207, 2002.
 11. Uesato, S., Kitagawa, M., Nagaoka, Y., Maeda, T., Kuwajima, H., and Yamori, T. Novel histone deacetylase inhibitors: N-hydroxycarboxamides possessing a terminal bicyclic aryl group. *Bioorg Med Chem Lett*, *12*: 1347-1349, 2002.
 12. Yamada, T., Iwamoto, C., Yamagaki, N., Yamanouchi, T., Minoura, K., Yamori, T., Uehara, Y., Toshiwo, A., Umemura, K., and Numata, A. Leptosins M-N1, cytotoxic metabolites from a *Leptosphaeria* species separated from a marine alga. Structure determination and biological activities. *Tetrahedron*, *58*: 479-487, 2002.
 13. Sawada, M., Moriya, S., Saito, S., Shineha, R., Satomi, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Kannagi, R., and Miyagi, T. Reduced sialidase expression in highly metastatic variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression. *Int J Cancer*, *97*: 180-185, 2002.
 14. Iguchi, K., Sawai, H., Nishimura, H., Fujita, M., and Yamori, T. New Dolabellane-Type Diterpenoids from the Okinawan Soft Coral of the Genus *Clavularia*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, *75*: 131-136, 2002.
 15. 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*, *62*: 1139-1147, 2002.
 16. 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*: 1085-1091, 2001.
 17. 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*: 2513-2518, 2001.
 18. 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*: 896-898, 2001.
 19. 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*: 340-347, 2001.
 20. 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*: 4459-4466, 2001.
 21. 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. Antitumor activity, optimum administration method and pharmacokinetics of 13,14-dihydro-15-deoxy-delta⁷-prostaglandin A1 methyl ester (TEI-9826) integrated in lipid microspheres (Lipo TEI-9826). *Anticancer Drugs*, *12*: 221-234, 2001.
 22. 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.
 23. 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.

24. 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.

25. Mimaki, Y., Kuroda, M., Sashiba, Y., Yamori, T., and Tsuruo, T. Candicanoside A, a Novel Cytotoxic Rearranged Cholestane Glycoside from *Galtoma candicans*. *Helvetica Chimica Acta*, 83: 2698-2704, 2000.

26. Egawa, K., Yamori, T., Nosaka, C., Kumimoto, S., Takeuchi, T., and Nos, K. Deoxybomycin is a selective anti-tumor agent inducing apoptosis and inhibiting topoisomerase I [In Process Citation]. *Biol Pharm Bull*, 23: 1036-1040, 2000.

27. 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 [In Process Citation]. *Genes Chromosomes Cancer*, 29: 9-15, 2000.

28. 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: 357-362, 2000.

29. Hosokawa, N., Inuma, 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.

(邦文発表)

1. 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9報—癌と化学療法, 29 Suppl. II: 225-415, 2002.

2. 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.

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.

2. 学会発表

1. 矢守隆夫 ヒトがん細胞における遺伝子発現と抗がん剤感受性 日本癌学会総会記事 2294, 2002. (第61回総会 東京 2002年10月1日-3日)

ほか

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

1. 特許取得

1) 抗がん剤の適合性予測方法

(1) 発明者: 中村 祐輔、矢守 隆夫、且 慎吾

(2) 出願日: 2003年2月7日

(3) 出願番号: 特願2003_031049

(4) 出願人: 財団法人癌研究会

2) N-ヒドロキシカルボキサミド誘導体

(1) 発明者: 上里新一、長岡康夫、矢守隆夫

(2) 出願日: 2002年8月13日

(3) 出願番号: 特願2002_235912

(4) 出願人: 財団法人大阪産業振興機構

3) 新規生理活性物質

(1) 発明者: 水井 佳治、酒井 孝、矢守 隆夫 他

(2) 出願日: 2001年2月1日

(3) 出願番号: 特願2001_25458

(4) 出願人: メルシャン株式会社、エーザイ株式会社

2. 実用新案登録

なし

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 安全性生物試験研究センター 毒性部

研究要旨

C3B6F1 p53 ヘテロ欠失あるいはワイルド マウスを用いた 2 段階発がん試験での TCDD 低用量発がん作用の検索を行った。TCDD の発がん作用の解析に適した TgAC トランスジェニックマウスの系の立ち上げを行った。また、一部ダイオキシン類を 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、遺伝子発現プロファイリングを行った。

A. 研究目的

TCDD の発がん性のメカニズムは非変異原性、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、ダイオキシンの発がん機構を明らかにすることを目的に、1) 易発がん性遺伝子改変モデルである p53 ヘテロ欠失マウスを用いた低用量域における発がんプロモーター実験（2 段階発がんを含む）、2) プロモーター物質感受性遺伝子改変モデルとして、TCDD の実験に有用な TgAC マウスの試験系開発、3) ダイオキシン類のがん細胞パネルにおける結果に基づき、遺伝子発現のプロファイリングを行った。

B. 研究方法

1) C3B6F1 p53 ヘテロ欠失あるいはワイルド マウスに Diethyl nitrosamine (DEN) を 10mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、投与 7 日後より、2,3,7,8-TCDD を 0.0003、0.001、0.003、0.01、0.03 及び 0.1 µg/kg 体重の用量で週 2 回経口投与した。一群の動物数は 8 匹とした。投与期間は最長で約 3 年とした。

2) プロモーター作用高感受性動物として TgAC マウス（癌遺伝子の v-Ha-ras 導入トランスジェニックマウス）を用いた TCDD の発がん作用の解析に適したマウスを樹立し、TCDD のプロモーター作用を調べる。

3) TCDD、TCDF ほか 11 種のダイオキシン類のがん細胞パネルにおいての結果を受けて、遺伝

子発現のプロファイリングを Affymetrics 社の GeneChip を用いて行う。

C. 研究結果

1) C3B6F1 p53 ヘテロ欠失あるいはワイルド マウスを用いた 2 段階発がん試験では、現時点（14 年度末）で 2 年半が経過した。その間における腫瘍発生状態について集計を行った。P53 ヘテロマウス群で中間用量群における腫瘍発生促進傾向が認められ、現在、その詳細を解析中である。今後、発生した腫瘍病変の詳細解析、TgAC 系を活用したを通じていわゆる U 字型反応の解析を進める。

2) プロモーター作用高感受性動物として TgAC マウスを用いた TCDD の発がん作用の解析のためのマウスの樹立に関しては、動物の SPF 化と TCDD 高感受性系統の C57Bl/6 への back cross を継続している。

3) 遺伝子発現プロファイリングのための絶対遺伝子発現相対化手法を開発し、次いで、TEF との関連における展開として、少数種類の代表的 TCDD と TCDF と内因性の AhR リガンドである indirubin 遺伝子発現プロファイリングを行い、その結果、リガンド依存的なプロファイル（の差）が存在することを明らかにした。

D. 考察

本研究の最終目標は TCDD の発がんプロモーション作用の検討および、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) である。本年度では C3B6F1 p53 ヘテロ欠失あるいはワイルド マウスを用いた 2 段階発がん試験で 2 年半が経過した。病理学的検索を現在実施中であるが、途中死亡の時期に関しては一部用量に相関せず、いわゆる U 字型用量作用関係の傾向も見受けられている。TEF の概念は用量作用関係が直線あるいは少なくとも単調関数であり、複合作用が相乗的でないことを大前提としている。U 字型用量相関が真実である場合、TEF の概念に大きな影響があるため、慎重な解析と検証が必要である。そのためにも必要であるところの、プロモーター作用高感受性動物として Tg.AC マウスを用いた TCDD の発がん作用の解析のためのマウスの樹立に関しては、昨年度、Tg.AC/AhRKO マウス作成に向けての C57BL/6 (TCDD 高感受性マウス) へ Back cross を行い、その過程で Papilloma 発生感受性が C57BL/6 背景でも保たれることを確認したが、動物の SPF 化が重要であることが明らかになり、そのための作製を行っている。

TEF との関連における展開として、細胞アレイの結果に基づき、TCDD、TCDF 及び indirubin の遺伝子発現プロファイリングを行い、その結果、リガンド依存的なプロファイル (の差) が存在することを明らかにした。

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。

E. 結論

In vivo のプロモーター試験については大部分の実験が終了した。*In vitro* 系では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た。これらを開始点として、今後、マウスにおけるフェノタイプとの対比を行う。

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 I, *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

Hirabayashi Y, Matsuda M, Aizawa S, Kodama Y, Kanno J, Inoue T, Serial transplantation of p53-deficient hemopoietic progenitor cells to assess their infinite growth. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 474-479, 2002. Kanno J., kato H., Iwata T., and Inoue T., Phytoestrogen-

low diet for endocrine disruptor studies. J. Agricultural and Food Chemistry, 50 3883-3885, 2002.

Utsuyama M, Kamno J, Seidler H, Inoue T, Hirokawa K.,
Age/sex dependent and non-monotonous dose-response
effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice,
Toxicol. Lett. 135 145-153, 2002.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko
T, Kanno J, Kim DY, Fujii-Kuriyama Y, Inoue T, Aryl
hydrocarbon receptor mediated benzene-induced
hematotoxicity. Toxicol. Sci., 70 150-156, 2002.

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

ダイオキシン類の健康影響とくにその TEF を中心としたリスク評価のための実験的基盤研究

分担研究者 藤井 義明 所属機関名 筑波大学先端学際領域研究センター

研究要旨

ダイオキシンの遺伝子発現は主に AhR を介して起こることが明らかになっている。本年度の研究は CYP1A1 とは異なる遺伝子発現様式を示す CYP1A2 のダイオキシンによる誘導的発現メカニズムについて検討を行った。CYP1A2 は AhR 欠失マウスでは 3 メチルコラントレン (3MC) による誘導現象はみられなくなるが、構成的発現は観察される。CYP1A2 の発現には転写開始点上流にある塩基配列 CATGN₆CTTG に LBP-1a または c が結合し、リガンド結合によって活性化した AhR/Amt ヘテロ 2 量体とその LBP-1 にタンパク質・タンパク質間の相互作用によって結合し、コアクチベータ的に働いて遺伝子発現を活性化することが明らかとなった。またこの作用メカニズムはダイオキシンや 3MC のエストロゲン様作用の発現にも働くことが分かった。エストロジェンの結合していない ER にダイオキシンあるいは 3MC の結合した AhR/Amt が結合して ER の標的遺伝子、例えば c-Fos, VEGF 遺伝子の発現を促進することが明らかになった。

A. 研究目的

CYP1A1 の遺伝子発現様式とは異なる CYP1A2 遺伝子の AhR/Amt による発現メカニズムを明らかにすること及び ER と AhR の相互作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

CYP1A2 の遺伝子上流 6 kb をルシフェラーゼ遺伝子に結合したレポーター遺伝子を 3MC に依存して発現する Hep-G2 細胞を用いて、誘導的発現をコントロールする DNA エレメントを決定する。またこの塩基配列が決定されたならば、この塩基配列に結合するタンパク質を硫酸分画、DEAE、セルロースカラム、決定した DNA 配列を用いたアフィニティークラムによって精製し、エドマン分解法によりペプチドのアミノ酸配列の決定を行った。タンパク質間の相互作用を検討するために GST に目的のタンパク質を融合したタンパク質を作製し、相互作用する相手タンパク質をインキュベートしてそのタンパク質をグルタチオンを結合したビーズにより分離し、ビーズに結合したタンパク質を同定した。同定には各々の抗体を用いて免疫プロット法によって行った。また、タンパク質間の相互作用を検討するためには、一つのタンパク質を抗体で分離し、抗原抗体沈殿物に含まれている相手タンパク質は免疫プロット法によって行っ

た場合もある。DNA との相互作用を検討するためには電気移動度シフト法によって行った。また、DNA に結合している因子の同定は抗体を用いた移動度スーパーシフト法によって行った。

C. 研究結果

AhR 欠失マウスを用いた 3MC による薬物代謝酵素の誘導の研究では、CYP1A1 は構成的発現も誘導的発現も見られなくなるが、CYP1A2 では構成的発現のみは保持されていることが分かり、両者の遺伝子発現のメカニズムは異なっていることが示唆されていた。CYP1A2 遺伝子上流約 6 kb をルシフェラーゼ遺伝子上流に結合し、レポーター遺伝子を作製した。Hep-G2 細胞にそのレポーター遺伝子をトランスフェクトして 3MC の誘導に働く DNA のエレメントを決めた結果、それは CYP1A1 で決めた XRE の構造とは違う CATGN₆CTTG の塩基配列をもっていた。その塩基配列に結合する因子を硫酸分画、DEAE-セルロース、制御配列を結合させた DNA のアフィニティークラムクロマトグラフィーで精製して、エドマン分解法による部分アミノ酸決定を行ったところ、LBP1a または c であることが分かった。また、GST-LBP-1 の融合タンパク質を作製し、AhR あるいは Amt との結合性を検討した結果 LBP1a, c いずれも AhR あるいは Amt と相互作用することが分か

った。また、上記のレポーター遺伝子をトランスフェクトした Hep-G2 細胞は LBP-1a, c 発現ベクターと一緒に投与するとその発現活性は上昇し、AhR あるいは Arnt をトランスフェクトするとさらにその遺伝子発現は、増強されることが分かった。

また、ERE 配列によって駆動されるレポーター遺伝子に AhR を共発現させて、3MC を投与すると ERE レポーター遺伝子の遺伝子発現を上昇させることが分かった。これは ERE にエストロジェンのない状態で結合している ER に 3MC によって活性化された AhR/Arnt が結合することによって起こることが分かった。ER への結合は AhR/Arnt が ER の 2 つある活性化ドメインの中 AF-1 である。3MC によるエストロジェンの標的遺伝子 c-Fos や VEGF の活性化は培養細胞のみではなく、マウスの生体を用いても観察された。しかし、この活性化は AhR 欠失マウスを用いると見られなくなることより、AhR 依存的におこることが分かった。一方、エストロジェンを与えると ER を介した標的遺伝子の活性化は、3MC による活性化より高いが、この高い転写活性は 3MC を加えるとやや減少することが分かった。

D. 考察

AhR/Arnt を介したダイオキシンや 3MC による遺伝子発現の活性化は標的遺伝子のプロモーター領域にある XRE 配列を介した遺伝子発現であることが分かっていたが、ここに示した研究成果は AhR/Arnt による遺伝子発現は XRE によらない遺伝子発現メカニズムで AhR/Arnt は Coactivator 的な役割を演ずることが示された。またダイオキシンや 3MC のエストロジェン様作用のメカニズムも AhR/Arnt と ER による相互作用の結果であることが明らかになった。

E. 結論

ダイオキシンや 3MC のエストロジェン様作用発現のメカニズムが明らかになった。また、AhR/Arnt による遺伝子発現のメカニズムに XRE を介さない新しいメカニズムもあることが示された。これらはいずれも AhR/Arnt が直接 DNA に結合しない Coactivator 的に働くものである。

F. 健康危惧情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 書籍 なし
- 2) 雑誌

Masanobu Morita, Osamu Ohneda, Toshiharu Yamashita, Satoru Takahashi, Osamu Nakajima, Shimako Kawauchi, Masatsugu Erna, Shigeki Shibahara, Tetsuo Udono, Koji Tomita, Makoto Tamai, Kazuhiro Sogawa, Masayuki Yamamoto and Yoshiaki Fujii-Kuriyama, HLF/HIF-2a is a key factor in pathological angiogenesis in proliferative retinopathy in association with erythropoietin, *EMBO.J.* in press.

Byung-II Yoon, Yoko Hirabayashi, Yasushi Kawasaki, Yukio Kodama, Toyozo Kaneko, Jun Kanno, Dae-Yong Kim, Yoshiaki Fujii-Kuriyama and Tooru Inoue. Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Benzene-Induced Hematototoxicity, *Toxicological Sciences* 70, 150-156 (2002)

Masanobu Morita, Akira Kobayashi, Toshiharu Yamashita, Tomomasa Shimanuki, Osamu Nakajima, Satoru Takahashi, Shiro Ikegami, Kaoru Inokuchi, Keisuke Yamashita, Masayuki Yamamoto and Yoshiaki Fujii-Kuriyama. Functional analysis of basic transcription element binding protein(BTEB) by gene targeting technology. *Mol. Cell. Biol.*, in press.

Masahide Tojo, Kazuhito Matsuzaki, Takeshi Minami, Yoshiomi Honda, Hideyo Yasuda, Tsutomu Chiba, Hideyuki Saya, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, and Mitsuyoshi Nakao. The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Transporter is Modulated by the SUMO-1 Conjugating System, *J. Biol. Chem.* 277, 46576-46585 (2002)

Shimada T., Inoue K., Suzuki Y., Kawai T., Azuma E., Nakajima T., Shindo M., Kurose K., Sugie A., Yamagishi Y., Fujii-Kuriyama Y., Hashimoto M. Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, 23, 1199-1207 (2002)

Wang F., Sekine H., Kikuchi Y., Takasaki C., Miura C., Heiwa O, Shuin T., Fujii-Kuriyama Y., Sogawa K. HIF-1 α -prolyl hydroxylase: molecular target of nitric oxide in the hypoxic signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 295, 657-662 (2002)

Oikawa, K., Ohbayashi, T., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Teshima, S., Rokutan, K., Mukai, K. & Kuroda, M. Dioxin stimulates synthesis and secretion of IgE-dependent histamine-releasing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 984-987 (2002)

Mimura, J. & Y. Fujii-Kuriyama. Regulatory roles of AhR. *Env. Sci.* 9, 71-81 (2002)

2. 学会発表

Ah Receptor and inducible expression of Cytochrome P450, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO2002) 2002/7/22-26 (Royton Sapporo Convention Center, 札幌)

Decreased Sensitivity To Xenobiotics In A Humanized Mouse Model, T. Moriguchi, H. Motohasi, Y. Aoki, S. Ohsako, O. Nakajima, Y. Fujii-Kuriyama, C. Toyama and M. Yamamoto. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO2002) 2002/7/22-26 (Royton Sapporo Convention Center, 札幌)

A Novel Mechanism Of Transcriptional Regulation By The Ahreceptor And Arnt, K. Sogawa, K. Numayama-Tsuruta, Y. Kikuchi and Y. Fujii-Kuriyama, 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO2002) 2002/7/22-26 (Royton Sapporo Convention Center, 札幌)

Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction Of CYP1A1, 1A2, And IB1 By Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Mice And Implication Of These P450 Enzymes In Activation Of Procarcinogens, T. Shimada, K. Inoue, E. Azuma, T. Nakajima, Y. Yamagishi, M. Hashimoto and Y. Fujii-Kuriyama, 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO2002) 2002/7/22-26 (Royton Sapporo Convention Center, 札幌)

Nonresponsiveness Of Normal Human Fibroblasts To Dioxin Is Mediated By The Aryl Hydrocarbon Receptor

Repressor, K. Gradin, J. Mimura, L. Poellinger and Y. Fujii-Kuriyama, 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO2002) 2002/7/22-26 (Royton Sapporo Convention Center, 札幌)

Alteration In Metabolism Of Thyroxine And Vitamin A In AHR-null Mice And TTR-null Mice Following 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin Exposure, N. Nishimura, J. Yonemoto, Y. Miyabara, C. Yokoi, Y. Takeuchi, Y. Fujii-Kuriyama, S. Maeda, C. Tohyama, 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO2002) 2002/7/22-26 (Royton Sapporo Convention Center, 札幌)

Alterations In The Reproductive System Of Male Mice By Perinatal TCDD Exposure Are Dependent On AHR GENE, S. Ohsako, N. H-Fukuzawa, R. Ishimura, H. Sone, Y. Fujii-Kuriyama and C. Tohyama, 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO2002) 2002/7/22-26 (Royton Sapporo Convention Center, 札幌)

AhR-Dependent Down-Regulation Of Cytochrome P450 Side Chain Cleavage (P450scc) Enzyme Expression In Adult Mouse Testis By TCDD, N. H-Fukuzawa, M. Sakaue, T. Baba, Y. Fujii-Kuriyama, C. Tohyama and S. Ohsako, 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO2002) 2002/7/22-26 (Royton Sapporo Convention Center, 札幌)

大腸菌で発現させた AhR-Arnt ヘテロ二量体の DNA 結合活性, 菊池康夫¹, 大澤志津江¹, 三村純正^{1,2}, 依馬正次¹, 十川和博¹, 藤井義明^{1,2} (¹東北大・院・生命科学, ²筑波大・TARA セ), 第 75 回日本生化学会大会, 2002/10/17, 京都 (国立京都国際会館)

Role of in expression of biological effects induced by endocrine disruptors, Y. Fujii-Kuriyama, J. Mimura, K. Numayama-Tsuruta, K. Sogawa and T. Baba, International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer (ICH&IHC), 2002/10/21-25, 福岡 (シーホークホテル&リゾート)

Transcriptional Roles of AhR in Expression of Biological Effects Induced by Endocrine Disruptors, Y. Fujii-Kuriyama and J. Mimura, International Symposium on Endocrin Active Substances and Supplementary Workshop (SCOPE/IUPAC), 2002/11/17-21, 横浜 (パシフィコ横浜)

アリルハイドロカーボン受容体 (AhR) の生体作用の分子メカニズム, 藤井義明¹, 沼山恵子², 馬場崇^{2,3}, 三村純正¹, 十川和博², 山本雅之¹, 諸橋憲一郎³ (筑波大・TARA セ, ² 東北大・院生命科学, ³ 基生研) 2002/12/12, 横浜 (パシフィコ横浜)

動物における低酸素応答の分子機構, 十川和博¹, 関根弘樹¹, 王鋒¹, 菊池康夫¹, 高崎親久¹, 藤井義明² (東北大・院生命科学, ² 筑波大・TARA セ) 2002/12/12, 横浜 (パシフィコ横浜)

AhRR による AhR のネガティブフィードバック制御機構, 三村純正¹, 馬場崇², 細谷朋方³, 大島基彦², 中嶋修³, 本橋ほづみ¹, 高橋智⁴, 山本雅之¹, 藤井義明¹ (筑波大・TARA セ, ² 東北大・院生命科学, ³ 山形大・遺伝子, ⁴ 筑波大・基礎医) 2002/12/12, 横浜 (パシフィコ横浜)

ダイオキシン受容体を介した女性ホルモン受容体機能抑制の分子機構の解析, 大竹史明¹, 武山健一^{1,3}, 柳沢純^{1,3}, 松本高広¹, 藤井義明^{2,3}, 加藤茂明^{1,3} (東大分生研, ² 東北大学院, ³ 科技団) 2002/12/11-12, 横浜 (パシフィコ横浜)

T 細胞特異的 Constitutive active arylhydrocarbon receptor トランスジェニックマウスの免疫系の解析, 野原恵子¹, 九十九伸一^{1,2}, 伊藤智彦^{1,2}, 山本雅之^{2,3}, 本橋ほづみ³, 日田安寿美³, 藤井義明^{2,3}, 井上薫^{1,4}, 長井治子^{1,5}, 遠山千春^{1,2} (国立環境研・環境健康, ² 科技団・CREST, ³ 筑波大・TARA セ, ⁴ 学振・科技特, ⁵ 東京理科大・生命研) 2002/12/11-12, 横浜 (パシフィコ横浜)

Amt のパートナーによって異なる DNA 結合様式の解析, 木下耕史¹, 菊池康夫¹, 藤井義明², 鈴木理³, 十川和博¹ (東北大・院生命科学, ² 筑波大・

TARA セ, ³ 産総研・DNA 情報) 2002/12/13-14, 横浜 (パシフィコ横浜)

ヒト型ダイオキシン受容体ノックインマウスの表現型解析, 森口尚^{1,5}, 本橋ほづみ², 細谷朋方³, 中嶋修³, 高橋智^{1,5}, 大迫誠一郎⁴, 青木康展⁴, 遠山千春⁴, 藤井義明², 山本雅之², (筑波大・解剖発生, ² 同・TARA セ, ³ 山形大・遺伝子実験施設, ⁴ 国立環境研, ⁵ 生研機構) 2002/12/13-14, 横浜 (パシフィコ横浜)

マウス未熟児網膜症モデルを用いた血管新生における HLF/Hif-2 α 転写因子の機能解析, 山下年晴^{1,2}, 大根田修¹, 守田匡伸², 鈴木教郎¹, 山本雅之¹, 藤井義明¹ (筑波大・TARA セ, ² 東北大・院理) 2002/12/13-14, 横浜 (パシフィコ横浜)

HIF-1 α プロリン水酸化酵素の一酸化窒素による活性化, 関根弘樹¹, 王鋒¹, 菊池康夫¹, 高崎親久¹, 三浦千沙¹, 奥田平和², 執印太郎², 藤井義明³, 十川和博¹ (東北大・院生命科学, ² 高知医大・泌尿器科学, ³ 筑波大・TARA セ) 2002/12/13-14, 横浜 (パシフィコ横浜)

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究要旨

DNA マイクロアレイ法を用い、マウス肝臓において 3-メチルコランズレン (MC) により発現が変化する遺伝子を調べた。その結果、脂質代謝に関与する peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の標的遺伝子が MC により AHR 依存的に抑制された。レポーターアッセイにより、MC は AHR 依存的に PPAR α による転写活性化を抑制した。この AHR シグナル伝達系による PPAR α シグナル伝達系の抑制は、芳香族炭化水素 (AH) による脂肪肝などの原因である可能性が考えられた。

A. 研究目的

Differential display 法や DNA マイクロアレイ法を用い AHR の新規な標的遺伝子を同定することにより、AHR シグナル伝達機構およびダイオキシン類による毒性発現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 時間後に肝臓を摘出し、mRNA を調製した。DNA マイクロアレイは 8334 クローンが載ったインサイト社の Mouse GEMI を用いた。発現が 2 倍以上変化した遺伝子を抽出した。DNA マイクロアレイの結果はノーザンブロット分析により確認した。レポーターアッセイは、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に PPAR α に応答するレポータープラスミドおよび PPAR α 発現プラスミドを導入し、MC で処置することにより行った。

(倫理面への配慮)

北海道大学動物実験委員会の規定に従って動物実験を行った。

C. 研究結果

DNA マイクロアレイ解析の結果、MC により AHR 依存的に 10 遺伝子が誘導され、44 遺伝子が抑制された。抑制された 44 遺伝子のうち、13 遺伝子は脂質代謝に関与する PPAR α の標的遺伝子群であった (アシル CoA 酸化酵素、カルニチンパルミトイル転移酵素、チトクローム P450 4a10 など)。MC によるこれら遺伝子および DNA アレイに載っていない他の PPAR α 標的遺伝子の抑制はノーザンブロット分析で確認した。PPAR α に応答するレポータープラスミドを HepG2 細胞に導入したところ、PPAR α による転写活性化は MC で抑制された。また、この抑制は AHR アンタゴニストである α -ナフトフラボンで解除された。また、マウス肝臓における PPAR α およびそのヘテロ二量体パートナーであ

る RXR α の mRNA およびタンパク質量を調べたところ、MC 投与で RXR α 発現量が低下した。以上の結果から、AHR は RXR α の減少を介して PPAR α シグナル伝達系を抑制することが示唆された。

D. 考察

PPAR α 欠損マウスにおいて、脂質代謝能の低下による脂肪肝や心機能の低下などが報告されている。このことから、AH による PPAR α /RXR α シグナル伝達系の抑制は、これらの毒性発現に関与することが示唆された。また、RXR α は PPAR α 以外にも様々な核内レセプターとヘテロダイマーを形成しホルモンバランスに関与していることから、AH による RXR α の発現低下は多岐に渡る毒性発現に関与することが示唆された。

E. 結論

AHR の新規な標的遺伝子として、PPAR α の標的遺伝子群を同定した。AHR は PPAR α とヘテロダイマーを形成する RXR α の発現低下を介して PPAR α シグナル伝達系を抑制した。この抑制は、AH による脂肪肝などの毒性発現に関与することが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

該当なし。

2) 雑誌

Kenji Toide, Hiroshi Yamazaki, Rikako Nagashima, Keisuke Itoh, Shunsuke Iwano, Yoshiki Takahashi, Shaw Watanabe, and Tetsuya Kamataki, Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A1, in human freshly isolated white cells: Trimodal distribution of Japanese population according to induction of