

20031293

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

内因性リガンドの存在を前提とするダイオキシンの
リスクの再評価に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

平成 16 (2004) 年 3 月

主任研究者 関澤 純

目 次

I. 総括研究報告	
内因性リガンドの存在を前提とするダイオキシンリスクの再評価に関する研究 …1	
関澤 純	
II. 分担研究報告 (順不同)	
インディルビンの体内動態検討を目的とした高感度測定法の開発 ……………7	
宮入 伸一	
実験動物におけるインディルビンの臓器分布の解析 ……………9	
江馬 眞、宮入 伸一、関澤 純	
インディルビンの生理活性の解析 ……………13	
松田 知成	
インディルビンの免疫細胞機能獲得への影響解析 ……………15	
鈴木 和博	
AhR 内因性リガンド候補 indirubin の生体内代謝と活性活動 ……………19	
北村 繁幸	
インディルビン誘導体の抗変異原活性およびヒト肝ミクロゾーム による代謝経路の解析 ……………23	
佐伯 憲一	
マウス胎児繊維芽細胞における遺伝子発現プロファイルの ……………27	
インディルビンと TCDD の比較	
菅野 純	
エストロゲン受容体の転写調節機構への影響の解析に関する研究 ……………31	
加藤 茂明	
子宮筋腫における特異的遺伝子の検索とダイオキシン関連遺伝子の 変動 ……………35	
有菌 幸司	
インディルビンによるダイオキシン発生毒性の修飾 ……………37	
安田 峯生	
ヒト試料のダイオキシンおよびインディルビンの分析および 関連遺伝子発現解析 ……………41	
秋葉 澄伯	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……………45	

I 総括研究報告

内因性リガンドの存在を前提とするダイオキシンの
リスクの再評価に関する研究

主任研究者 関澤 純

研究課題名 内因性リガンドの存在を前提とするダイオキシンリスクの再評価に関する研究（課題番号 H-14-食品・化学-024）

主任研究者 徳島大学総合科学部 関澤 純

研究要旨

アрилハイドロカーボン受容体(AhR)の内因性リガンドであるインディルビンの高感度で特異的な分析法を確立し、その生理的な機能を体内での動態の解明を行った。CYP 誘導や体内での分解、およびダイオキシンとの相互作用について遺伝子発現、細胞、動物のレベルでそれぞれ基礎的なデータを得た。インディルビンとダイオキシンによる遺伝子発現誘導の相違や、細胞の増殖・分化の制御などの生理的な役割について検討した。これらの研究結果に基づき、ダイオキシンによる有害影響の発現の機作および人と動物の間の有害影響発現の違いについて検討した。AhR 内因性リガンドの有力な候補と推定されるインディルビンに焦点をあて研究を進めた結果、現状のダイオキシンリスク評価について、さらなる解明を進めその上にたち見直しが図られるべきであると考えた。

- (1) インディルビンと AhR の生理的な役割の解明を通してダイオキシンの有害影響が AhR の生理的な役割のかく乱による可能性を示唆した。
- (2) インディルビンが生体内でダイオキシンによる有害影響を阻止する可能性を示唆した。
- (3) 研究成果を基にダイオキシンリスクの再評価に向けた新知見を整理して提示した。

研究課題代表者

徳島大学総合科学部	関澤 純
分担研究者（順不同）	
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部長	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総合評価室室長	江馬 眞
国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部室長	鈴木和博
京都大学工学研究科環境デザイン工学講座専攻助教授	松田知成
広島国際大学保健医療学部教授	安田峯生
日本大学薬学部薬化学研究室教授	宮入伸一
広島大学医学部総合薬学科助教授	北村繁幸
東京大学分子細胞生物学研究所教授	加藤茂明
熊本県立大学環境共生学部食品安全性学講座教授	有菌幸司
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科教授	秋葉澄伯
名古屋市立大学薬学研究科医薬品代謝解析学講師	佐伯憲一

A. 研究目的

ダイオキシンの毒性はアリルヒドロカーボン受容体 (AhR) 経由で発現することはほぼ確立しているが、生体内における AhR の生理的な役割についてはまだ十分解明されていない。本研究班の松田らが AhR の内在性リガンドとして見出したインディルピンはダイオキシンに比べて、はるかに低濃度で AhR 経由の特定遺伝子の発現活性を示す。生体内の AhR リガンドであるインディルピンの存在を前提にダイオキシンによるリスク評価を再検討するため、以下の研究を行う。

- (1) インディルピンの生体内での動態と可能な生理的な役割について解明する。
- (2) AhR 経由反応ほかにおけるインディルピンとダイオキシンの関係について検討し、ダイオキシンによる有害影響発現の機構について検討する。
- (3) インディルピンがダイオキシンによる AhR 経由の有害作用を抑制している可能性について検討するとともに、インディルピンの存在を前提に人と動物の間でのダイオキシンの有害影響の種差の解明を含め、ダイオキシンのリスク再評価に重要な新知見を提供する。

B. 研究方法

- (1) インディルピンの合成、免疫抗体の作成は定法により行った。
- (2) ヒト未分化白血病細胞はすでに樹立された細胞、ヒト肝マイクロゾームは市販のものを用い、マウス胎児繊維芽細胞は当該研究機関の倫理規定に沿った方法でマウスから作成した。
- (3) 試験に用いた動物はそれぞれの研究施設における動物愛護規定に沿って取り扱った。インディルピンの臓器別分布を検討するために、ラットの飼育と解剖を GLP 適合の動物供給業者に委託した場合には動物の取り扱いなどについて詳細に指示し遵守させた。

(4) インディルピンの人の組織や尿中における存在量を知るために、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科においてインフォームドコンセントを経て子宮筋腫による子宮全摘手術を受けた患者さんから子宮筋腫組織と正常組織および尿の試料を入手した。

C. 研究結果

(1) 研究材料であるインディルピンとその誘導体を高純度で必要量を合成した。質量分析および免疫抗体反応によるインディルピンとその誘導体について特異性の高い高感度な分析法を確立した。すなわちインディルピン骨格を有する新規ハプテンを合成し特異抗体を作成、酵素イムノアッセイ系を構築する一方、安定同位体標識インディルピンを合成し GC-MS における測定条件を検討した。尿、血液以外の生体組織からの効率的な抽出・精製法の検討を進めている。

(2) BriHan:WIST ラットの尿、血清及び主要器官 (血清、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、及び精巣上体) を採取し、インディルピンの臓器分布の解析を行っている。雄動物の24時間蓄積尿のインディルピン濃度は 11.9 ± 9.9 pM/mg creatinine (n=51) であった。他方、インフォームドコンセントを得て予備的に供試した男女の大学生の尿中濃度は 1.08 ± 0.67 pM/mg creatinine (n=8) であった。現在は、雌ラットおよびインフォームドコンセントを経て入手した子宮筋腫患者の尿および組織 (正常部分と筋腫部分) についても分析中である。

(3) インディルピンをマウスに経口または腹腔内投与すると用量に依存して薬物代謝酵素活性が誘導されたが、投与を停止すると誘導は3日でほとんど消失し代謝・分解の早いことが示唆された。本誘導が AhR を介していることを AhR 欠損マウスを用いて確認した。インディルピンがヒト肝がん細胞 HepG2 において、きわめて低濃度で CYP1A1 や CYP1A2 を誘導し、さらに CYP1A1 によってそれ自身、代

謝・分解されフィードバック制御の対象となっていることを明らかにした。インディルビンの生理作用のひとつとしてダイオキシン (TCDD) と同様の AhR を介した肝薬物代謝酵素誘導活性を認めたが、高い AhR 親和性に比してその誘導活性は低かった。これはインディルビンが生体内で代謝され易いためと予測され、ラット肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 実験で複数の代謝物の生成と二次・三次代謝の進行が認められた。代謝生成物は AhR 結合活性を示さなかった。発現系 CYP 各分子種を用いインディルビンの代謝活性を調べたところ、1A1, 1A2 での活性が高く 3A1, 2E1 でわずかな活性が認められ、分子種特異性が高かった。ラットおよびマウス *in vivo* でインディルビンの生体内動態を調べたところ、経口、腹腔内、皮下投与ではいずれも血中よりインディルビンを検出することができなかった。臓器残存量を調べたところ、肝で投与後約 2 時間でほとんど消失していることがわかった。投与後急速な消失が認められた。

(4) 野生型マウス由来の胚繊維芽細胞を用いて低用量 (50nM) での *in vitro* 曝露実験を行ったところ、TCDD, TCDF と共通する発現誘導遺伝子に加え、多数のインディルビン特異的な発現誘導遺伝子を得、インディルビンは AhR を介した生理活性を有し、生理的リガンドとして TCDD, TCDF とは異なる活性機序を有していることが示唆された。

(5) ヒト未分化白血病細胞培養細胞 ML-1 を使い DNA マイクロアレイ解析を行い、CYP1A1 などの薬物代謝酵素以外にも IL-1 β 、IL-2、TNF- α 、TGF- β 2 などのサイトカインや、細胞周期やアポトーシス関連因子の p27、PAI-2、Bax、estrogen receptor、PKC family、c-Fos、c-Jun などさまざまな因子が遺伝子レベルで誘導されることが確認された。インディルビンと TCDD は単独では高濃度でも増殖、分化に影響を及ぼさなかったが、インディルビンを低濃度 (1-10nM) で TNF- α (10 ng/ml) と併用曝露すると、細胞

増殖を抑えアポトーシスや分化を誘導した。細胞増殖抑制は G1 アレストであり、CDK の阻害因子である p21 の mRNA およびタンパク質の発現もまたインディルビンと TNF- α により相乗的に発現した。AhR のシグナルと TNF- α によるシグナルが協調的に働くメカニズムが存在し細胞内の p21 レベルを上昇させることにより、G1 アレストを引き起こすことが示唆された。p21 および IL-1 β のプロモーター領域の塩基配列を調べたところ、TNF- α からのシグナルを受け取る NF κ B サイトと AhR からのシグナルを受け取る XRE が隣接した部位に見つかった。このことより、AhR のシグナルと TNF- α によるシグナルが協調的に働くメカニズムが存在し、細胞内の p21 レベルを上昇させることにより G1 アレストを引き起こすことが示唆された。AhR は TNF- α による NF κ B シグナルと何らかの方法で相互作用し、p21 および IL-1 β 遺伝子の発現を相乗的に誘導して細胞増殖を抑制すると推察される。

(6) 免疫機能に対するインディルビンの影響を定量的に再現性良く検討する系として、ヒト未成熟白血球株 HL-60 をジメチルスルホキシドおよび顆粒球コロニー刺激因子を用いて好中球様に分化させる試験系において、分化後の細胞のスーパーオキシド産生能を指標に検討したところ 1 μ M のインディルビンを共存させた細胞は、未処理のコントロール細胞と比べて高い活性を示した。白血球の分化に特異的な転写因子 PU.1 の活性を測るレポーターベクターを構築し未分化白血球に導入した安定発現細胞株を樹立、白血球に分化させたところ、インディルビンが存在する場合 PU.1 活性は顕著に促進された。PU.1 により発現調節されている白血球受容体 (Mac-1、CD11b/CD18) の発現上昇が確認された。Protein Array による解析から、インディルビン処理により、ある種の炎症性サイトカインの産生が顕著に促進される結果も蓄積されつつあり、インディルビンは転写因子 PU.1 の活性上昇を介して受容体の発現を促進し、イン

ディルビンの活性酸素産生能獲得促進活性を分子レベルで裏付けるものと考えられる。

(6) AhR とエストロゲン受容体とがダイオキシン依存的に相互作用し、エストロゲン非存在下にエストロゲン受容体を活性化することを見出した。他方 AhR がエストロゲン受容体のプロテアソーム依存的分解を促進することを新たに見出した。この分解促進作用によって、リガンド活性化エストロゲン受容体に対する機能抑制が起こり、従って AhR によるエストロゲン受容体制御は転写活性化作用・分解促進作用のバランスによって決定されると考えられる。

(7) インディルビンの作用メカニズム検討のため、インディルビンのハロゲン誘導体を合成し、極性・分子サイズ増大効果並びに π 電子系への電子吸引効果と AhR との親和性を調べた。インディルビンの誘導体をベンズピレンと併用投与した時に、ベンズピレンの小核誘発性を阻害し AhR の部分アゴニストとして CYP1A1 誘導阻害による抗変異原活性が示唆された。

(8) 妊娠マウスにインディルビン 100 mg/kg を強制経口投与した後、ダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) を 5、10、20 μ g/kg 強制経口投与し、胎児の口蓋裂及び水腎症を調べたが、調べた条件下ではインディルビンの顕著な修飾作用は認められていない。

D. 考察

試験結果からインディルビンの生理的な役割、およびダイオキシンとの関係について考察しダイオキシンによる有害リスクの再評価に結びつくと思われる事項を整理する。

(1) インディルビンは生体内 AhR リガンド候補物質として、AhR 経路で薬物代謝酵素以外にも IL-1 β 、IL-2、TNF- α 、TGF- β 2 などのサイトカインや、細胞周期やアポトーシス関連因子の p27、PAI-2、Bax、estrogen receptor、PKC family、c-Fos、c-Jun などさまざまな因子を遺伝子レベルで誘導発現しうることを示され、

発現プロファイルはダイオキシンと部分的に共通するものの独自の部分が見られインディルビンの生理作用を解明する糸口となり得ると考えられた。

(2) インディルビンを低濃度で TNF- α と併用曝露すると細胞増殖を抑えアポトーシスや分化を誘導し、細胞増殖・分化の制御に重要な役割を果たしていることが伺われた。

(3) ヒト未成熟白血球株を用いた実験から、インディルビンは炎症性サイトカインの産生や転写因子 PU.1 の活性上昇を介して白血球受容体の発現を促進し、活性酸素産生能獲得を促進し免疫機能にも影響を及ぼす可能性が示唆された。(4) 妊娠マウスへのダイオキシンとの強制経口投与による併用投与試験では、胎児の口蓋裂及び水腎症の修飾作用は認められず、この理由としてインディルビンはきわめて水溶性が低いことから吸収が困難なこと、また極めて代謝、分解が早いことによる生体内での標的臓器への分布に関しても投与方法に問題があったためではないかと推定される。

(5) インディルビンが AhR との親和性が良いと同時に生体内で代謝・分解が早いことは、その生理的な役割を考慮すると重要と考えられる。他方ダイオキシンはインディルビンに比べやや高濃度で AhR 経路のいくつかの遺伝子発現を活性化するがその代謝・分解が極めて悪いためいくつかの機能を恒常的に発現させる可能性があり、生体のホメオスタシスを攪乱させる可能性が大である。

(6) 酵母にヒトおよびマウスの AhR/Arnt 応答レポーターアッセイ系を用いた系では、 β -ナフトフラボン、2,3,7,8-TCDD、ベンズピレン、3-メチルコラントレンは AhR/Arnt 応答を活性化したが、この活性化は転写に重要な Arnt も Q-rich 領域を欠失させると激減したという報告がある。同時にこれら物質による活性化はヒトとマウスの間で差が見られなかったのに対し、インディルビンではヒトの方がマウスに比べて 35-140 倍活性化が高く、ヒトとマウ

スの間でのインディルビンによる AhR 経路応答に種差が存在することを示唆している。

(7) AhR とエストロゲン受容体とがダイオキシン依存的に相互作用しエストロゲン非存在下にエストロゲン受容体を活性化する一方、AhR がエストロゲン受容体のプロテアソーム依存的分解を促進、リガンド活性化エストロゲン受容体の機能を抑制、AhR がエストロゲン受容体の転写活性化作用を制御するという事実は、エストロゲン応答機能を含む生体内の遺伝子発現活性の各種転写因子間のクロストークによる制御を示唆している。

(8) 予備的ではあるがラットとヒトの間で尿中インディルビン濃度に差がある可能性を示すデータを得ていることから、インディルビンがダイオキシンと相互作用してダイオキシンによる有害影響の発現に人と動物の間の種差を説明する一助になりうる可能性がある。今後、雌雄ラットの尿およびインフォームドコンセントを経て入手した子宮筋腫患者の尿および組織についても分析を進め、より詳細な情報を得てダイオキシンによる有害影響の性差の発現を含めて検討を進める。

E. 結論

AhR 内因性リガンドの有力な候補と推定されるインディルビンに焦点をあて研究を進めた結果、現状のダイオキシンリスク評価について、以下の事項のさらなる解明を進めその上にたち見直しが図られるべきであると考え。 (1) インディルビンの生体内での動態と可能な生理的な役割の一部を解明した。すなわちインディルビンがダイオキシンに比べてはるかに低濃度で AhR 経路で遺伝子発現を活性化し、かつダイオキシン投与の場合に見られない多くの種類の遺伝子を誘導することを見出した。しかしおそらくインディルビンの易分解性（ことに自ら誘導した CYP1A1/2 により分解される）のためこの活性発現は一時的なものであり、この事実は生理的に重要なことと考えられた。またインディルビンは AhR 経路

でサイトカイン産生や転写因子の誘導を通じて免疫機能を亢進させたり、細胞周期やアポトーシス関連遺伝子を誘導し G1 期アレストを誘起するなどにより外界からのストレス応答や細胞増殖の調節に関与している可能性が示された。インディルビンなどのリガンドが結合することで AhR はエストロゲン非存在下にエストロゲン受容体経路の遺伝子発現を活性化したり核内に移動後にエストロゲン受容体と結合してエストロゲン受容体の分解を促進するなど、受容体同士が転写因子としても作用しクロストークによる複雑な調節機構を担っていることの一部を明らかにした。

(2) インディルビンがダイオキシンによる有害作用を修飾する可能性について検討する動物を用いた併用試験では有意な効果は見られなかったが、この理由としては外部から投与されたインディルビンの極めて迅速な分解と難溶解性が実際的な効果を検出することを妨げた可能性があげられる。前記の結果を合わせて考えると、ダイオキシンは生体内でインディルビンの AhR 親和性を上回る高濃度で存在したときにはじめてその高い残留性によってインディルビンによる微妙な生理的な制御を攪乱し種々の有害影響を示すと推定される。すなわちインディルビンがダイオキシンによる AhR 経路の有害作用を抑制している可能性が指摘できる。

(3) 予備的ではあるがラットとヒトの間で尿中インディルビン濃度に差がある可能性を示すデータを得ていることから、今後生体組織中のインディルビンと AhR の発現の種、性、発生時期、臓器別の詳細な分析と、生理機能の関連について解明し、ダイオキシンによる有害影響リスクの発現と修飾の可能性についてより確実な証拠を示す必要があると考える。

F. 研究発表

1. 論文・図書発表

1) 関澤 純(2003) リスク評価の考え方と実

際、アプローチ環境ホルモナーその基礎と水環境における最前線、日本水環境学会関西支部編、技報堂出版、2003年

- 2) 関澤 純 (2003) リスクアセスメント・リスクコミュニケーションの国際動向、*Environmental Mutagen Res.*, 25: 199-202

2. 学会発表

- 1) Sekizawa J Miyairi S & Ema M: Possible Modification of Dioxin Risk in the Presence of Endogenous Ligands for Arylhydrocarbon Receptor (2003.8, Boston)
- 2) Sekizawa, J (2003) A comparison between Integrated Risk Assessment and classical Health /Environmental Risk Assessment: emerging beneficial properties , Tenth International Congress of Toxicology. (2003.7 Tampere)
- 3) 安田峯生, 隅田寛, 松葉美鈴, 杉原数美, 岡村さおり, 山下敬介, 関澤 純: インディルビンによるダイオキシン毒性の修飾、日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会 (2003.12, 仙台)
- 4) 杉原数美, 北村繁幸, 岡山幸誠, 原田亜紀子, 太田茂, 山下敬介, 岡村さおり, 安田峯生, 佐伯憲一, 松井三郎, 松田知成, 関澤 純: Indirubinの生体内代謝とAhR結合活性の変動、日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会 (2003.12, 仙台)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし

II 分担研究報告

インディルビンの体内動態検討を目的とした高感度測定法の開発

分担研究者 宮入 伸一 日本大学薬学部

研究要旨

インディルビンの生体作用を解析するうえで、その生体内挙動や分布に関する知見は重要である。そこで、昨年度開発したインディルビンを測定対象とする酵素免疫アッセイ法を用いて、生体試料中および食品（飲料）中のインディルビン量の測定に関する基礎的検討を行った。

A. 研究目的

ダイオキシン受容体に高い親和性を示すインディルビンの生体機能・動態に興味をもたれている。そこで、特異抗体を用いた酵素免疫アッセイ法を用いて、生体試料中インディルビン測定のための基礎的検討を企てた。さらに食餌による生体内インディルビン量の変動も考えられることから食品（飲料）中のインディルビン量の精査を企てた。

B. 研究方法

昨年度開発したインディルビンの酵素免疫アッセイ系の特異性の検討および生体試料測定のための基礎的検討を行うとともに飲料中に含まれるインディルビンの検索を行った。

C. 研究成果

まず、前年に引き続き近縁化合物を用いて交差反応性を検討したところ、本抗体は5位メトキシル誘導体よりも6位にメトキシル基を有する誘導体に高い親和性を示すことが明らかになった。また、異性体であるインディゴにも約1%程度の交

差反応性を認めた。

次に、測定値の精度の向上を目的として検量線の直線化を試み、インディルビン濃度をlogで、また結合率をlogit変換してプロットするとき、検量線は極めて良好な直線となり各試料中のインディルビン量を簡便に算出できることが明らかになった。そこで、ヒト尿試料を用いてインディルビンの添加・回収試験を行ったところ、本アッセイ系による測定値は満足できる回収率を示した。また、本抗体をアガロースゲルに反応させて作成した固定化抗体カラムを用いたアフィニティー抽出を組合せてみたが、測定値に差異は認められなかったことから、他の尿成分による妨害の少ない優れたアッセイ系であることが明らかになった。

次いで、本アッセイ系を用いて、ヒトおよびラットの尿中インディルビン量を測定したところ、ヒトでは 1.33 ± 0.86 (n=23)、ラットでは 20.12 ± 17.37 pmol/mg クレアチニン (n=80)であり、ラットはヒトに比べて約20倍の高値を示した。また、種々の飲料中のインディルビン量を測定したところ、緑茶（自家煎）やほうじ茶、ウーロン茶

が高値を示し、ジュース類の中ではグレープジュースやプルーンジュースが比較的高値を示した。

D. 考察

本アッセイに用いた抗体は、5位のみならず6位に置換基を有する誘導体に対しても高い親和性を示すことから、本抗体から作成した固定化抗体カラムは試料中インディルビンおよびその5位および6位に置換基を有する類縁体の一斉抽出に有用であると考えられる。また、前処理法を組合せた検討より、本アッセイ系は尿試料中インディルビンの直接測定が可能な優れたシステムであることが示された。

E. 結論

これまでの検討により、簡便で特異性に優れるインディルビンの酵素イムノアッセイ系が確立でき、ヒトおよびラット尿中のインディルビンの測定が可能となった。さらに本アッセイ系により緑茶等の飲料中にインディルビン様物質が存在することが明らかになった。今後、これらインディルビン様物質の構造を明らかにすることは食品を用いたダイオキシンリスク低減に新たな知見を与えることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Possible modification of dioxin risk in the presence of endogeneous ligands for arylhydrocarbon receptor

Jun Sekizawa, Shinichi Miyairi and Makoto Ema

(Dioxin 2003, 2003.08., Boston)

酵母を用いたダイオキシン活性測定法の
高感度化

藤野裕介, 三浦伸彦, 塗師基博, 宮入伸一,
久下周佐, 永沼章

(日本内分泌かく乱化学物質学会第6回
研究発表会 平成15年12月2日 仙台)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案

なし

3. その他 (データベース等)

なし

厚生労働科学研究補助金(化学物質リスク研究事業)

分担研究報告書

実験動物におけるインディルビンの臓器分布の解析

分担研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所総合評価研究室

協力研究者 宮入伸一 日本大学薬学部

協力研究者 関澤 純 徳島大学総合科学部

研究要旨

BrIHan:WIST@Jcl (GALAS)ラットの尿、血清及び主要器官を雌動物の性周期別に採取し、インディルビンの臓器分布の解析を行うための実験計画を行った。23 時間の蓄積尿を 7 日分採取し、さらに、血清、肝臓、腎臓、脾臓、卵巣及び子宮を採取した。

A. 研究目的

ラットにおける血液、尿中および主要器官のインディルビン分布の解析を行う。

雌 BrIHan:WIST@Jcl (GALAS) ラット(9 週令) 130 匹を購入した。免疫期間中特記すべき異常は認められなかった健全な 120 匹を選抜し、試験に供した。

B. 研究方法

雌 BrIHan:WIST@Jcl (GALAS) ラットを日本クレアから購入した。動物は温度 21-25°C、湿度 40-70%照明 12 時間(7-19 時)に設定した動物室にて、固形飼料(CE-2、日本クレア)及び水道水を自由に与えて飼育した。7 日間の検疫後、8 日間の膈垢像観察で 4 日サイクルで規則正しい性周期を示す動物から 30 匹づつを選抜した。採尿開始日から 4 日間の性周期(発情前期、発情期、発情後期、発情休止期)で 1 日づつ、動物を採尿ケージに收容し、23 時間蓄積尿(10 時~翌朝 9 時)を採取した。採尿動物を含む 128 匹について後大静脈から採血した。血清、肝臓、腎臓、脾臓、卵巣及び子宮を採取した。採取した尿、血清及び各器官は各ラット毎に個別に保存した。試料の調製は株式会社 イナ リサーチに委託した。分析定量は、新たに調製した抗体を用いた高感度酵素イムノアッセイ法を適用して実施する。

11 週令の動物を採尿開始日から 7 日間採尿ケージに收容し、23 時間蓄積尿(10 時から翌朝 9 時)を継続採尿した。採尿中ラットの一般状態を 1 日 1 回観察したが、一般状態に異常は認められず、採尿時にトラブルもなく、全サンプルを採取できた。

採尿から保存まで、採尿容器は保冷剤にて冷却した。採取した尿は個別別に 1 日分毎に容器に入れ-20°C 以下にて保存した。採尿中においても給餌及び給水の制限は行わなかった。

性周期観察開始時の雌ラットの体重は 174-215 g であった。

無処置の注射針及びポリプロピレン製注射筒を用いて後大静脈から採血した。採血後 30 分以上室温にて静置した後、遠心分離により血清を分離した。得られた血清は個別別に容器に入れ、-20°C 以下にて保存した。

採血終了後、後大動脈及び腹大動脈を切断してラットを放血致死させた。肝臓、脾臓、左右の腎臓、卵巣及び子宮を摘出した。摘出した臓器を生

C. 研究結果と考察

理食塩水で洗浄後、個体別に容器に入れ液体窒素で凍結した(設定温度:-80°C)。液体窒素での凍結までの間はドライアイスにて冷却した。

採尿開始以後実験終了に至るまでのいずれの動物の一般状態にも異常は認められなかった。

採取した血清、尿、臓器からのインディルビンの分離精製と分析が進行中である。

D. 結論

ラット臓器におけるインディルビンの分布について調査を企図した。11週令の雌ラット性周期毎に30匹を用い23時間蓄積尿を7日間継続採尿、その後血清および臓器(肝臓、腎臓、脾臓、卵巣および子宮)の採取を行った。

採取した血清、尿、臓器からのインディルビンの分離精製と分析を行った。

E. 研究発表

1. 論文発表

○Ema M, Harazono A, Fujii S, Kawashima K. (in press) Evaluation of developmental toxicity of β -thujaplicin (hinokitiol) following oral administration

during organogenesis. Food Chem. Toxicol.

○Ema M, Harazono A, Hirose A, Kamata E. (2003) Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats. Toxicol. Lett., 143, 233-238.

Koizumi M, Noda A, Ito Y, Furukawa M, Fujii S, Kamata E, Ema M, Hasegawa R. (2003). Higher susceptibility of newborn than young rats to 3-methylphenol. J. Toxicol. Sci., 28, 59-70.

○Harazono A, Ema M. (2003). Suppression of decidual cell response induced by dibutyltin in pseudopregnant rats as a cause of early embryonic loss. Reprod. Toxicol., 17,

393-399.

○Ema M, Miyawaki E, Hirose A, Kamata E. (2003). Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. Reprod. Toxicol., 17, 407-412 (2003).

広瀬明彦、江馬 眞、鎌田栄一、小泉睦子、長谷川隆一(2003)ビスフェノールAの内分泌かく乱作用のヒトへの影響評価、日本食品化学会誌、10, 1-12.

Takagi A, Hirose A, Hirabayashi Y, Kaneko T, Ema M, Kannno J. (2003). Assessment of the cleft palate induction by seven PCDD/F congeners in the mouse fetus.

Organohalogen Compounds, 64, 336-341.

○Sekizawa J, Miyairi S, Ema M. (2003).

Possible modification of dioxin risk in the presence of endogenous ligands for arylhydrocarbon receptor. Organohalogen Compounds, 65, 325-328.

2. 学会発表

Ema M, Miyawaki E. (2003) Decreased anogenital distance (AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBEP) during pregnancy. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting.

Koizumi M, Nishida N, Enami T, Sunaga M, Horikawa H, Kamata E, Ema M, Hasegawa R. (2003) Comparative toxicity study of 3-aminophenol in newborn and young rats. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting.

Hasegawa R, Koizumi M, Noda A, Ito Y, Furukawa

M, Fujii S, Kamata E, Ema M. (2003) Higher

susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol than young. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting.

江馬 眞 (2003) 可塑剤フタル酸エステルの子鼠次世代の発生に及ぼす影響、第5回生殖・発生毒性東京セミナー

江馬 眞、宮脇英美子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2003) モノブチルフタレートによる子鼠雄胎児における肛門生殖突起間距離の短縮及び精巣下降不全、第43回日本先天異常学会

江馬 眞、原園 景、広瀬明彦、鎌田栄一 (2003) ジブチルスズによる子鼠における着床阻害に対するプロゲステロンの効果、第30回日本トキシコロジー学会

原園 景、江馬 (2003) 子鼠妊娠初期に投与した塩化トリブチルスズの着床阻害作用、第30回日本トキシコロジー学会

Takagi A., Hirose A, Hirabayashi Y, Kaneko T, Ema M, Kannno J. (2003). Assessment

of the cleft palate induction by seven PCDD/F congeners in the mouse fetus.

23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2003).

Sekizawa J, Miyairi S, Ema M. (2003).

Possible modification of dioxin risk in the presence of endogenous ligands for arylhydrocarbon receptor. 23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2003).

F. 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. その他(データベース等)

なし

厚生労働科学研究補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

インディルビンの生理活性の解析

分担研究者：京都大学地球環境学 松田知成

研究要旨

AhR リガンドによって CYP1A1 などの薬物代謝酵素以外にも IL-1 β 、IL-2、TNF $\cdot\alpha$ 、TGF $\cdot\beta$ 2 などのサイトカインや、細胞周期・アポトーシス関連因子の p27、PAI-2、Bax、その他 estrogen receptor、PKC family、c-Fos、c-Jun などさまざまな因子が遺伝子レベルで誘導されることが確認されている。今回我々は、未分化白血病細胞株 ML-1 にインディルビンや TCDD などの AhR リガンドと TNF $\cdot\alpha$ を同時曝露すると相乗的に細胞増殖を抑制し、その細胞増殖抑制は G1 アレストであることを発見した。CDK の阻害因子である p21 の mRNA およびタンパク質の発現もまたインディルビンと TNF $\cdot\alpha$ により相乗的に発現した。このことより、AhR のシグナルと TNF $\cdot\alpha$ によるシグナルが協調的に働くメカニズムが存在し、細胞内の p21 レベルを上昇させることにより G1 アレストを引き起こすことが示唆された。

A. 研究目的

昨年度までの研究により、未分化白血病細胞株 ML-1 に、TCDD またはインディルビンなど AhR リガンドと TNF $\cdot\alpha$ を同時曝露すると、相乗的に細胞増殖を抑制することを見出した。今年度はこの詳細なメカニズムを解明することを研究目的とした。

B. 研究方法

ML-1 細胞に TNF $\cdot\alpha$ 10ng/ml、インディルビン、又は TCDD を 1~10nM、そしてそれらの複合曝露を行い、細胞増殖阻害、細胞周期、アポトーシスの誘導、曝露後 8 時間における各種遺伝子の発現、24 時間後におけるタンパク質の発現について調べた。

C. 研究結果

TNF $\cdot\alpha$ 10ng/ml の単独曝露ではわずかに細胞抑制がかかったが、インディルビン、又は TCDD の 1~10nM による単独曝露は、細胞増殖にまったく影響を与えなかった。両者の同時曝露では、インディルビンおよび TCDD が 1nM の時でも完全に細胞増殖を抑制した。細胞周期の解析を行ったところ、この抑制は G1 アレストによって引き起こされていることがわかった。また、アポトーシスがおきているかどうか調べたところ、ほとんどアポトーシスはおきていないことが明らかとなった。細胞周期に関連する遺伝子についてその発現を網羅的に調査した結果、p21 遺伝子と IL-1 β 遺伝子の発現が TNF $\cdot\alpha$ と AhR リガンドで相乗的に増加していることがわかった。p21 についてはタンパク質レベルでも相乗的な発現の増加が観察され

た。

D. 考察

本研究により、AhR のシグナルと TNF $\cdot\alpha$ によるシグナルが協調的に働くメカニズムが存在し、細胞内の p21 レベルを上昇させることにより G1 アレストを引き起こすことが示唆された。このメカニズムを明らかにするため、p21 および IL-1 β のプロモーター領域の塩基配列を調べたところ、TNF $\cdot\alpha$ からのシグナルを受け取る NF κ B サイトと AhR からのシグナルを受け取る XRE が両方とも存在し、しかもそれらが隣接した部位に見つかった。もしかしたら、AhR は ML-1 細胞中において、NF κ B と複合体を作りこれらの遺伝子の転写活性を行っているのかも知れない。この仮説を調査するため、現在 p21 および IL-1 β のプロモーター配列を組み込んだレポーター遺伝子の系を構築している。この中の XRE と NF κ B サイトに変異を導入したときどのような影響がでるか調査する予定である。

E. 結論

AhR は TNF $\cdot\alpha$ による NF κ B シグナルと何らかの方法で相互作用し、p21 および IL-1 β 遺伝子の発現を相乗的に誘導して細胞増殖を抑制する。

F. 学会発表

1. J. Adachi, Y. Mori, S. Matsui, T. Matsuda: TCDD and Indirubin-regulated genes in HepG2 cells and human umbilical vein endothelial cells. (Dioxin2003 Boston)
2. Y. Mori, J. Adachi, S. Matsui, T. Matsuda:

The effect of combined exposure of 2,3,7,8-TCDD and $\text{TNF } \alpha$ on proliferation and differentiation of human myeloblastic leukemia ML-1 cells. (Dioxin2003 Boston)

インディルビンの免疫細胞機能獲得への影響解析

分担研究者 鈴木和博 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部

研究要旨

昨年度の結果からインディルビンが白血球の活性酸素産生能獲得を促進することが示唆されたので、今年度は白血球の分化に特異的な転写因子 PU.1 の活性を測るべくレポーターベクターを構築し、それを未分化白血球に導入した安定発現細胞株を樹立した。その細胞株を白血球に分化させたところ、インディルビンが存在する場合、PU.1 活性は顕著に促進された。さらに、PU.1 により発現調節されている白血球受容体 (Mac-1, CD11b/CD18) をフローサイトメトリーで解析した結果、発現上昇が確認された。以上の結果より、インディルビンは転写因子 PU.1 の活性上昇を介して受容体の発現を促進し、活性酸素産生能を亢進している可能性が示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシン等の受容体 Ah-receptor の内因性リガンドは長いこと不明であったが、最近インディルビンが同定された。Ah-receptor へのリガンド結合（活性化）は免疫系に影響をもつ可能性が指摘されてきたが、インディルビンの影響は不明である。本研究は、白血球の機能的成熟過程を *in vitro* で観察する細胞培養実験系を用いて、インディルビンの影響を感度良く免疫生化学的・定量的に解析することを目的とする。

B. 研究方法

転写因子 PU.1 の結合配列 5'-TCCTCTGAAAGAGGAACTTGGTG-3' を三回繰り返した DNA を合成して、pGL3 ベクターのルシフェラーゼの上流に挿入し、レポーターベクターを構築した。それをネオマイシン耐性 pcDNA(+)ベクターとともにヒト未成熟白血球細胞株 HL-60 に電気穿孔法で導入し、限界希釈法で安定発現株を樹立した。その細胞株を DMSO および G-CSF 存在下に 6 日間培養して白血球に分化させ、インディルビン存在下および非存在下の場合のルシフェラーゼ活性の変動を

比較した。受容体 Mac1(CD11b/CD18)の発現は、CD18 の特異抗体を用いた間接蛍光抗体法により染色した細胞をフローサイトメトリーにより解析した。

C. 研究結果

【要約】

白血球分化特異的転写因子 PU.1 のレポーターベクターを構築し、その導入細胞を樹立した。インディルビンは、分化過程における PU.1 の活性を亢進するとともに、細胞膜の受容体 Mac-1 の発現も促進した。

1) PU.1 レポーターベクターの構築及びその発現細胞の樹立

手法は前項に記した。クローニングした細胞株のうち、分化誘導前と分化後 3 日目の PU.1 活性の比がもっとも大きい株 (A-4-7) をアッセイに使用した。なお、この株は親株同様の分化による活性酸素産生能獲得活性があること、およびレポーターベクター活性は細胞の凍結融解にも安定であることを確認した。

2) PU.1 活性に対するインディルビンの影響

前項で樹立した細胞株を用いて、活性酸素産

生促進効果のあった 1 μ M インディルビン(昨年度報告)の影響を検討した。その結果、インディルビンは分化誘導 3 日目の PU.1 活性を約 2 倍促進した。

3) 受容体 Mac-1 に対するインディルビンの影響

本研究で用いている刺激剤オプソニン化ザイモザンの受容体は Mac-1 あるいは CR3 と呼ばれる β 2 インテグリンファミリーの細胞膜蛋白で、白血球抗原系統分類上の CD11b/CD18 に相当する。この受容体の細胞膜上における発現量をフローサイトメトリーで解析した結果、1 μ M のインディルビンにより、有意に促進されていた。

D. 考察

今年度樹立した pU.1 レポーターベクター導入細胞株は今後の化学物質の免疫影響研究一般に幅広く役に立つ細胞である。また、インディルビンは、PU.1 活性の促進、および OZ 受容体 Mac-1 の発現亢進効果を示した。さらに、現在進行中の実験では、カルシウム応答も亢進している予備的なデータが得られている。これらの結果は、昨年度報告したインディルビンの活性酸素産生能獲得促進活性を分子レベルで裏付けるものと考えられる。さらに Protein Array による解析から、インディルビン処理により、ある種の炎症性サイトカインの産生が顕著に促進される結果も蓄積されつつある。

E. 結論

インディルビンは、白血球の活性酸素産生能獲得促進効果を示したが(昨年度報告)、その分子メカニズムの一部として、転写因子 PU.1 の活性を亢進し、細胞膜の受容体 Mac-1 の発現を促進していることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kusui, K., Sasaki, H., Adachi, R., Matsui, S., Yamamoto, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T. and Suzuki, K.: Ribosomal protein S18 identified as a cofilin-binding protein by using phage display

library. *Mol. Cell. Biochem.* in revise (2003)

- 2) Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Suzuki, K., Yamamoto, Y., and Hayakawa, T.: Role of Optimal Phosphorylation of L-plastin in Superoxide-generating Oxidase Activation of Human Neutrophils. *J. Biochem.* in press (2003)

- 3) Tajima, K., Matsumoto, N., Ohmori, K., Wada, H., Ito, M., Suzuki, K., and Yamamoto, K.: Augmentation of NK cell-mediated cytotoxicity to tumor cells by inhibitory NK cell receptor blockers. *Int. Immunol* in press (2003)

- 4) Wada, H., Matsumoto, N., Maenaka, K., Suzuki, K., and Yamamoto, K.: The inhibitory NK Cell Receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct wets of HLA-E residues. *Eur. J. Immunol.* in press (2003)

- 5) Watanabe, H., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A., Kasahara, T., and Suzuki, K.: Bisphenol A significantly enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 cells. *Int. Immunopharmacol.* 3, 1601-1608 (2003)

- 6)安達玲子、鈴木和博:食細胞の機能発現と LIM キナーゼ-コフィリンによるアクチン細胞骨格制御(総説) *生化学* 75, 1238-1243 (2003)

- 7)Watanabe, H., Adachi, R., Hirayama, A., Kasahara, T., and Suzuki, K.:Triphenyltin enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 26-31 (2003)

2. 学会発表

- 1) Watanabe, H., Adachi, R., Hirayama, A., Kasahara, T., Suzuki, K.; Effects of endocrine disruptors on gene expression during differentiation of leukocytes. The 33rd Annual Meeting of Japan Immunology Society Dec.

(2003)

- 2) Hirayama, A., Adachi, R., Mizuno, K., Kasahara, T., Suzuki, K.: Cofilin/LIM-kinase modulates chemotaxis of phagocytes. The 76th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Oct. (2003)
- 3) 安達玲子、武内恒成、鈴木和博：マクロファージの反応性に対するコフィリンアンチセンスの効果 第4回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2003年6月

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

H. 謝辞

本研究は、共立薬科大学学生化学教室の笠原忠教授、平山明子さん、渡辺裕佳さんの協力を得て行ったものである。