

2003/295

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク 研究事業

ダイオキシン類の
生体毒性発現機構の解析

平成15年度
総括・分担研究報告書

平成16年（2004）3月

主任研究者 山下 敬介

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働省 化学物質リスク 研究事業）

ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析 （H14—食品・化学—026）

平成15年度 研究報告書

目次

I. 主任研究報告書

ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析

主任研究者 山下敬介 （広島大学大学院医歯薬学総合研究科・助教授）

————— 1

II. 分担研究報告書

1. ダイオキシンの免疫毒性発現機構の解析

分担研究者 菅野雅元 （広島大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

————— 4

2. 細胞外基質認識受容体、インテグリンの研究

分担研究者 横崎恭之 （広島大学大学院医歯薬学総合研究科・講師）

————— 10

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

————— 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷

————— 17

厚生科学研究費補助金（厚生労働省 化学物質リスク 研究事業）
ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析（H14—食品・化学—026）
研究報告書（平成15年度）

主任研究者 山下敬介（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・助教授）

要旨

ダイオキシンは、アリール炭化水素受容体（Aryl hydrocarbon receptor, AhR）を介してその毒性を発現することが明らかにされてきた。AhR-ARNT系によって、その下流領域で発現してくる遺伝子産物にアリール炭化水素受容体抑制因子（Aryl hydrocarbon receptor repressor, AhRR）がある。この遺伝子欠損マウスが作製された。AhR-ARNT系によって、AhRRが誘導されてくることは、一種のフィードバックループが形成されることを意味する。AhRR遺伝子発現をなくすることは、このフィードバックループが破綻して、AhR-ARNT系がオンになった状態が続くことが予想された。今回は、ダイオキシンによる、マウス胎児の発生毒性を具体的なエンドポイントとして、実験を行った。AhRR^{-/-}マウス胎児では、ダイオキシンによる発生毒性（口蓋裂・腎盂拡大）が増強することが予想された。結果は、予想に反して、「不変」であった。この予想と反する結果をもたらした原因については、現在のところ、解析できていない。

A. 研究目的

ダイオキシンは生体内でアリール炭化水素受容体（別名ダイオキシン受容体、Aryl hydrocarbon receptor, 以下 AhR と略）を介して、毒性を発揮すると言われる。その毒性は、肝臓の解毒酵素の誘導、発ガンのプロモータ作用、免疫毒性、生殖毒性、発生毒性（催奇形性）、内分泌攪乱作用と多岐にわたる。AhR の作用を調べる目的で、遺伝子欠損マウスが作製された（Mimura et al., 1997）。

ダイオキシンのマウスに対する発生毒性機序発現に対する、AhR の関与の有無を検討した。

ダイオキシンのうち、最も毒性が強いといわれる 2,3,7,8 四塩化ジベンゾパラジオキシン（2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD と略）を妊娠 12.5 日（膈栓発見日を妊娠 0 日とする）のマウスに 40 μg/kg 体重の割合で 1 回強制経口投与するという実験系を組んだ。

親マウスがオス・メスともに、C57BL/6J の場合（AhR の遺伝子型はオス・メスとも AhR^{+/+}）、すべての胎児の遺伝子型は AhR^{+/+} となる。この条件で、妊娠マウスに TCDD を投与すると、すべての胎児に口蓋裂と腎盂拡大が誘発された。

一方、親マウスがオス・メスともに、AhR^{-/-}（AhR 遺伝子欠損ホモ）の場合、すべての胎児の遺伝子型は、AhR^{-/-}になる。この場合には、胎児には口蓋裂も腎盂拡大も見られなかった

（Mimura et al., 1997）。このことは、ダイオキシンのマウスに対する発生毒性は、AhR 経路を介することを意味する。

親マウスのオスが AhR^{-/-}、メスが AhR^{+/+} の場合、胎児の遺伝子型はすべて、AhR^{+/+} とヘテロ型になる。この交配を行い、上記の通り、TCDD を投与すると、胎児の口蓋裂・腎盂拡大の感受性は、胎児の遺伝子型が AhR^{+/+} と AhR^{-/-} の中間的な値を示した。遺伝子産物が中間的である、haploinsufficiency を示したことになる。

ついで、ダイオキシンによるマウス胎児の口蓋裂誘発機序を検討してみた。口蓋は左右の二次口蓋突起が最初は口腔に向かって垂直位をとっている。ついで、妊娠 14.0 から 14.5 日にかけて、口蓋突起は 90 度転位・挙上し、水平位をとる。左右の突起は正中線上で接触し、やがて両者が癒合することによって、口蓋は閉鎖し、口腔と鼻腔が隔てられることになる。ダイオキシンは垂直位にある口蓋突起の粘膜上皮と間葉細胞に働き、両者の細胞増殖をおさえることによって、口蓋突起の伸長を抑制する。このため、口蓋突起が水平位に転位しても、左右の突起の接触はおこらない。これによって、口蓋裂が誘発されることになる（Takagi et al., 2000）。

さらに、どういう遺伝子メッセージのカスケードが、口蓋突起の増殖を抑制し、口蓋裂を誘発するにいたるのかを明らかにするための実験

を行った。方法は、上記、実験系を用いて、TCDDを同じ用量で、妊娠 12.5 日の C57BL/6J マウスに投与し、投与 6, 12, 24 時間後の胎児の口蓋部分の遺伝子メッセージの発現を、ディフアレンシャル・ディスプレイ法、ディフアレンシャル・スクリーニング法、cDNA マイクロアレイ法で見た。メッセージの検討には、投与 12 時間後が適当であることが判明したが、結局、うまくカスケードを描くには至らなかった。

AhR と類似した構造をもつタンパク (bHLH ドメインと PAS ドメインをもつ) をスクリーニングしている最中に、培養細胞系で、AhR の作用を抑制する働きをもつ、AhR 抑制因子 (AhR repressor, AhRR) がクローニングされた (Mimura et al., 1999; Baba et al., 2001; Mimura and Fujii-Kuriyama, 2002)。今回、この AhRR 遺伝子の欠損マウスが作製された (論文未発表、三村氏による参考日本語総説を添付しています)。

ダイオキシンをはじめとする芳香族炭化水素は細胞内に入ると、細胞質に存在する AhR と結合する。AhR は、核移行シグナルがオンになって、核に移行すると、AhR 核移行分子 (AhR nuclear translocator, Arnt と略) と結合し、AhR-Arnt ヘテロ二重体を形成する。AhR-Arnt は、DNA のダイオキシン反応配列 (Xenobiotic responsive element, XRE と略) に結合し、種々の遺伝子発現を調節する。AhRR も発現が上昇する。AhRR は、さらに Arnt とヘテロ二重体を形成する。AhR-Arnt, AhRR-Arnt の両者が XRE を取り合うことによって、AhR の作用を拮抗的に阻害する。こうして、AhR の作用が AhRR によって抑制される結果、負のフィードバック・ループが形成される。

さて、AhRR 遺伝子を欠損したホモマウスにおいては、この負のフィードバック・ループの一翼が欠損することになり、リガンドを結合した AhR-Arnt 系の転写が促進され続けることが、予想された。ダイオキシンの口蓋裂誘発の実験系において、AhRR 欠損マウスでは、ダイオキシンの影響は強くなるのだろうか。結果は、「増強しない」であった。

B. 研究方法

1) マウス

マウスは細谷らが作製した AhRR 遺伝子欠損マウスを用いた。メス AhRR^{-/-} マウスをオス C57BL/6J にバッククロスし、AhRR^{+/-} ヘテ

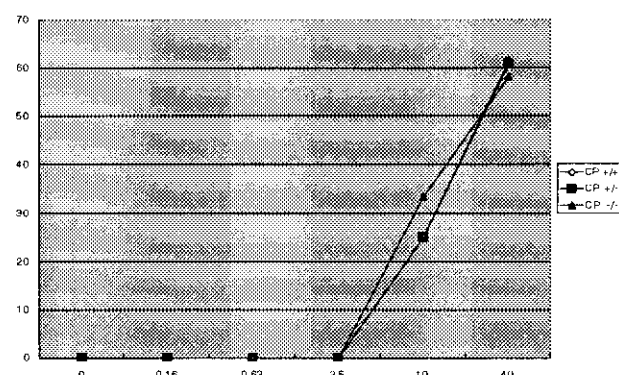
ロマウスを得た。この AhRR^{+/-} ヘテロマウスの雌雄を交配し、妊娠マウスを得た。胎児の遺伝子型はメンデルの法則に従って、AhRR^{-/-}, ^{+/-}, ^{+/+} (野生型) が得られた。

1. TCDD 投与

妊娠 12.5 日の AhRR^{+/-} マウスに、TCDD を公比 4 で、0 (溶媒), 0.156, 0.625, 2.5, 10, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の割合で 1 回投与した。各用量群に供した妊娠マウスは 7 母体とした。妊娠 18.5 日に母体を屠殺し、胎児の口蓋裂の有無、腎盂拡大の有無を観察した。胎児の尾から DNA を抽出して、AhRR の遺伝子型を判定した。各用量での胎児の遺伝子型別の口蓋裂、腎盂拡大の頻度を計算した。

C. 研究結果

TCDD 10, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の野生型胎児 (AhRR^{+/+}) において、口蓋裂が観察された。AhRR^{+/-}, ^{-/-} の胎児においては、口蓋裂の誘



発率が AhRR^{+/+} のそれと殆ど同じであった。AhRR 遺伝子型の違いと口蓋裂誘発との関係を示す結果を図に示す。横軸は TCDD の用量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) を、縦軸は口蓋裂の誘発率 (% per fetus) を表す。腎盂拡大については、予想とは逆に AhRR^{-/-} 群が野生型群よりも誘発率が若干低いという結果が得られた。

D. 考察

胎児の口蓋裂、腎盂拡大をエンドポイントにした場合、AhRR 遺伝子欠損マウスのダイオキシンへの感受性上昇は見られなかった。最初に想定した結果が得られなかったことについて、考察する必要がある。

野生型マウスにおいて、リガンド存在下で AhRR の発現は臓器によって異なる。さらに詳細に AhRR の発現を調べて、実験にのぞむ必要がある。

(参考文献)

- Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, Inazawa J, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (2001) Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem* 276: 33101-33110.
- Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes to Cells* 2: 645-654.
- Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13: 20-25.
- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619: 263-268.
- Takagi TN, Matsui KA, Yamashita K, Ohmori H, Yasuda M (2000) Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 20: 73-86.
- 三村純正 (2004) 生体内における AhR シグナル伝達系の役割. *生化学* 76 (4): 359-362.

E. 結論

AhRR 遺伝子を欠損したノックアウトマウスが作製された。この遺伝子ノックアウトホモマウス (AhRR-/-) においては、ダイオキシン等のリガンドを結合した AhR-Arnt 系の転写が促進され続けることが、予想された。換言すれば、ダイオキシンの作用が増強することが予想された。

しかしながら、ダイオキシンの口蓋裂誘発の実験系において、AhRR 欠損マウスでは、ダイオキシンの影響は変化を受けなかった。

ダイオキシンの作用が AhRR-/- マウスで増強しなかった原因については、未だに明らかにできていない。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(論文発表)

- 1) Morita M, Kobayashi A, Yamashita T, Shimanuki T, Nakajima O, Takahashi S, Ikegami S, Inokuchi K, Yamashita K,

Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y.

Functional analysis of basic transcription element binding protein by gene targeting technology.

Mol. Cell Biol. 23: 2489-2500 (2003).

Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Okayama T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T.

Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 318: 571-578 (2004).

(学会発表など)

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生科学研究費補助金(厚生労働省 化学物質リスク 研究事業)
ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析 (H14—食品・化学—026)
分担研究報告書(平成15年度)

分担研究者 菅野雅元 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科・教授)

研究要旨

本研究では、「ダイオキシン類の免疫系・血球系への作用を解析する」という目的でスタートした。今まで、ダイオキシン類の免疫系に及ぼす作用の分子免疫学的解析は殆ど行われていない。今回ダイオキシンを1回経口投与しただけで、(1)免疫系にとって非常に重要な胸腺が劇的に萎縮し、細胞数が激減し、効果が1か月以上持続することがわかった。(2)造血系幹細胞の性状が変化することが分かった。このような複数の異常により免疫不全症になることが分かった。以上より、「どのような細機構が関与しているのか?」、「Ahレセプターとダイオキシン投与による胸腺萎縮作用との関連は?」、などの問いに答えることを全体計画とし、将来的には、「この免疫不全症に対処する方法は何か?」の問いに対する答えの基盤を提供することを目的とした。

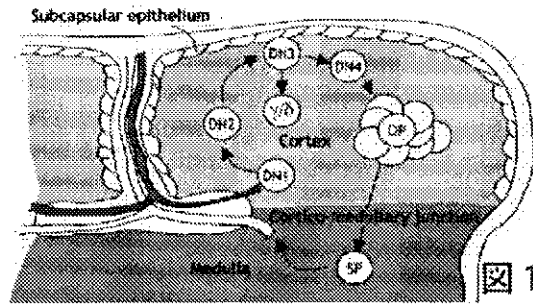
A. 研究目的

ダイオキシン類の免疫系に及ぼす作用の分子免疫学的解析は殆ど行われていない。今回ダイオキシンを1回経口投与しただけで、免疫系にとって非常に重要な胸腺が劇的に萎縮し、細胞数が激減し、効果が1か月以上持続することがわかった。さらに血球系にとって最も重要な骨髄中の造血幹細胞の性状も変化することが分かった。これらの異常により免疫不全症になることが分かった。以上より、「どのような機構が関与しているのか?」、「Ahレセプターとダイオキシン投与によるこれらの異常との関連は?」、などの問いに答えることを全体計画とし、将来的には、「この免疫不全症

に対処する方法は何か?」の問いに対する答えの基盤を提供することを目的とした。

ヒトの胸腺は10歳ごろまでは増加しなければならぬ臓器であり、ダイオキシン類の影響により胸腺の萎縮が起きれば、結果として小児のアレルギーやアトピーの増加を招く可能性が非常に高いと思われる。そのような観点から、小児で増加しているアレルギーやアトピーの原因の一つとしてダイオキシン類をターゲットとして考え、その対応法を探るための基礎実験の必要性は非常に高く、社会的なニーズも高いと考えられる。大人でもアレルギー性の疾患は年々増加しており、ダイオキシン類との関係は無視できない。さらに、最近の再生医療芽注目を集める中、造血幹細胞を用

いた各種の再生医療の試み等も盛んになってきているが、この幹細胞がダイオキシン投与でどのような影響があるのかについてはほとんど報告が無い。本研究を遂行することで、小児のアレルギーやアトピーに対処する新しい方法論や幹細胞生物学に対する新しいアプローチ、再生医療への応用、などが生まれる基礎研究になることを目指した。



細胞死のルートが設定されていると考えられている。

B. 研究方法

ダイオキシン経口投与 (1回) マウスを用い、胸腺のT細胞の分化過程の解析、および骨髄中の造血幹細胞の機能解析を行った。

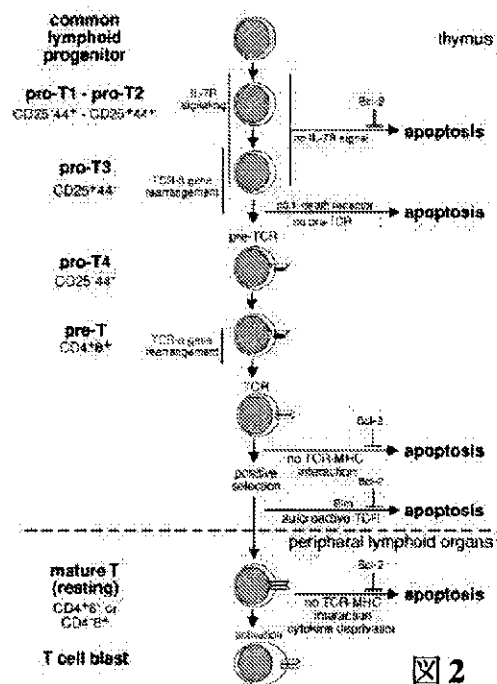
(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、広島大学動物実験指針に基づき実験計画書の審査がなされ、許可されたものであり、倫理面の審査も問題がないとされた。

C. 研究結果

実験1 (胸腺萎縮)；

胸腺という器官はTリンパ球の発生・分化に重要な器官で有るだけではなく、免疫系全体にとっても、「自己・非自己の識別」をリンパ球が学習する教育機関として非常に重要である。ここで正しく「自己同一性」を教育されなければ、外部からの感染症に対応出来なくなり、さらに間違った教育から自己を攻撃してしまう、などのために「感染症」「自己免疫疾患」「免疫不全」「アレルギー・アトピー」との関係を考えるうえで、中心的な器官である。その胸腺の中で、リンパ球は、図1の様に胸腺の中を移動しながら分化・成熟し、末梢・全身へと運ばれてゆく。さらに詳しくその分化段階を見ると図2の様な段階が判明しており、ほぼ各段階ごとに



研究の経過：

ヒトの体内に普通にダイオキシンが入ってくるのと同じ経路 (経口投与) でマウスに投与したときに、「マウス個体 (特に免疫系) に何が起きているのか？」という事を正確に記述・解析することにフォーカスを絞った。免疫学的には、最近リンパ球の発生・分化に核内受容体ファミリーが重要な役割を果たしていることが少しずつ明らかになってきているが、AhRが胸腺内T細胞分化にどのような役割を果たしているの

か、という点に研究的を絞った（生体内のリガンドは不明？）。とにかく、ダイオキシンによる免疫不全（胸腺萎縮を含む）に関して、あまりにも間違っただ情報が報告されている。実際、ダイオキシンによる胸腺萎縮、免疫不全の作用点は、「アポトーシス・細胞周期停止」としてin vitroの実験をしている論文・報告があるが、それは間違いである事がはっきり分かった。

TCDDをただ1回、経口投与するだけで、3日後から胸腺の萎縮が始まり、回復するのに1ヶ月以上かかることがわかった（図3）。最も症

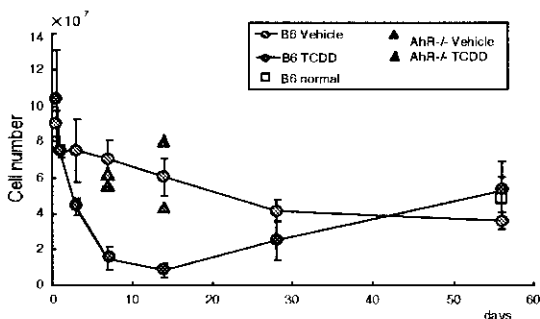


図3 胸腺細胞数の推移

状が顕著である3日—2週間の時期について、注目すると、この時期の胸腺は正常の1/10の大きさになり、遺伝子再構成を起こす分化段階（図2のpro-T3とpro-T4の間；）が最も影響が強い事などがわかった。このことから、DN3(ProT3)細胞で、pre-TCRシグナルが入り細胞増殖が起きるステージから後のT細胞分化段階においてTCDD投与による異常（細胞数の減少）が起こることが判明した。その分子機構としては、DN3細胞の増殖(またはサバイバル障害)と細胞死のバランスの破綻が起きていることが考えられた。

2) この時期のダイオキシンの作用点は細胞周期ではなく、細胞死調節機構であることが判明した。ダイオキシンによる胸腺細胞死は、DNA分断非依存性、Bcl-2非依存性（Bcl-2 Tg マウ

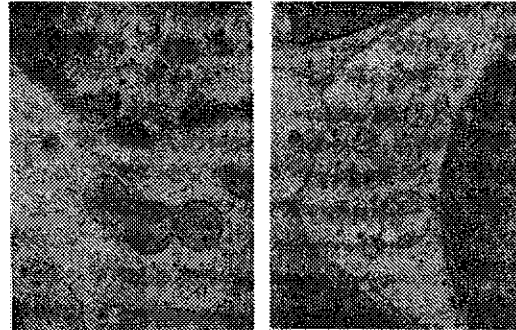


図4 TCDD 投与による胸腺T細胞

スでレスキュー出来ない)、Caspase非依存性、であるが、ミトコンドリア膜電位依存性、の細胞死であることが分かり、「アポトーシス」とは異なるタイプの細胞死である事が分かった（データは示しません）。形態学的にも、電子顕微鏡観察を行ったところ、ミトコンドリアの膨化や、小胞体(ER)が空胞化している像が多く見られ、死細胞の割合も多かった（図4）。特にこのステップの細胞死はp53依存性の細胞死であることが判明してきており、AhR依存性の細胞死の経路とp53依存性細胞死が交差している可能性が考えられた。

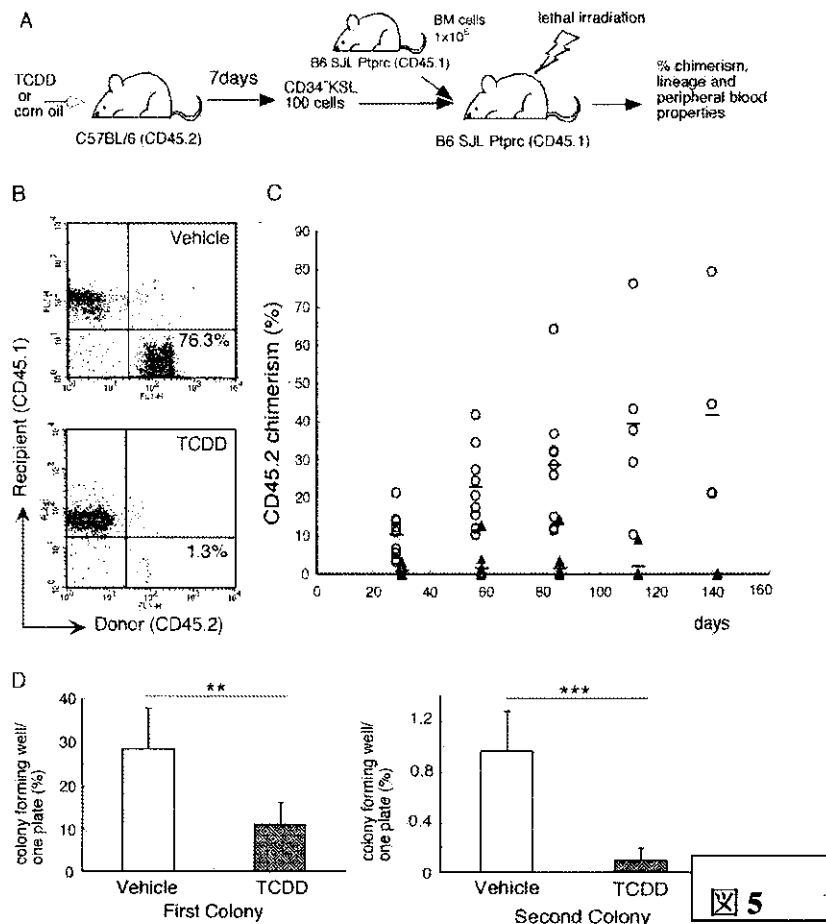
3) Ahリセプター遺伝子欠損マウスにおいて同様の実験を行うと、胸腺萎縮が90%以上回復することから、ミトコンドリアの膜電位を介したCaspase非依存性の細胞死機構がAhR依存性である事が判明した。この経路・機構にAhR/Arntの標的遺伝子群が関与していると考えられた。この事は逆にいうと、この時期（図1、図3の

DN3からDN4への移行期) にリンパ球が滞在しているsubcapsular領域にAhRのリガンドが存在している可能性も示唆している。

実験2 (造血幹細胞):

免疫系・血球系細胞の基になる「造血幹細胞」に対するTCDDの影響は何であろうか？ ほとんど報告がなされていないのが現状である。そこで、ダイオキシン投与による造血幹細胞の機能を骨髓移植の実験系を用いて解析を始めた。その結果、表面マーカーは造血幹細胞であるが、まったく再構築能を失っていることが判明した(図5A参照)。図5Aの様に、ダイオキシン経口投与1週間後のマウス骨髓より、CD34⁺、c-Kit

幹細胞分画をFACS Vantage/ cell sorterで単離し、その細胞100個を、致死量の放射線を照射し、血球系を破壊しておいたレシピエント・マウスに骨髓移植を行った。その後140日まで、観察し長期再構築能を検討した。図5Cのグラフで分かるように、コントロール群(白丸)は正常に血球系が再構築されたが、ダイオキシン投与群(黒三角)の幹細胞分画はその能力をほとんど失っていた。この結果は単にダイオキシン類が幹細胞の自己複製能をも標的にしているという毒性学的な観点だけでなく、AhRとその自然リガンド系が幹細胞の自己複製制御機構に関与していると考えることが出来る。



⁺, Sca-1⁺, Lineage marker-negativeの造血

D. 考察

実験1 (胸腺萎縮)

今回の研究から、AhR/Amt 系 (または TCDD の作用) は、T細胞の Diversity 形成に重要な preTCR からのシグナルを受け取った後の細胞増殖 (beta-selection) を制御していることがわかった。少なくともそのシグナル伝達分子の遺伝子発現が AhR/Amt により制御されていることがわかった。結果的に免疫系の Diversity が正常よりかなり小さくなることから、自己免疫疾患・アレルギー との関係について無視できないことわかった。その人工的制御技術の開発、または TCDD の作用を阻害する手段の開発につながる分子標的を示すことが出来た。その意味では社会的な波及効果は大きいと思う。

実験2 (造血幹細胞) :

この研究結果は、AhR/Amt を介して、造血幹細胞の自己複製能を制御できる可能性が存在する事を意味している。このことは将来的には患者自身の造血幹細胞を用いた再生医療を考える上で、その人工的制御技術の開発という観点からは非常にインパクトが大きいと思われる。さらに TCDD が造血幹細胞の機能にも致命的な障害を与えているという、全く初めての研究結果なので、その意味でも社会的影響は大きいと思われる。

E. 結論

ダイオキシン(TCDD)が免疫系・血球系にどのように作用しているのかと言う質問に、一部答えることが出来た。特に胸腺萎縮に関しては新しい作用点を発見できたし、造血幹細胞については機能障害を証明できた。このような変化が小児に多発しているアトピーやアレルギーの原因となることが十分に考えられた。作用点が分かることにより対策も可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Kajiume T, Ninomiya Y, Ishihara H, Kanno R, and Kanno M

The *Polycomb* group gene *mel-18* modulates the self-renewal activity and cell-cycle status of hematopoietic stem cells. **Exp. Hematol.** 2004 In press

・ Yuge L, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Kataoka K. Cell differentiation and p38(MAPK) cascade are inhibited in human osteoblast cultured in a three-dimensional ctiostat. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.** 2003 Jan;39(1):89-97.

・ Yuge L, Okubo A, Miyashita T, Kumagai T, Nikawa T, Takeda S, Kanno M, Urabe Y, Sugiyama M, Kataoka K. Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts. **Biochem Biophys Res Commun.** 2003 ;311(1):32-8.

・ Fujisaki S, Ninomiya Y, Ishihara H, Miyazaki M, Kanno R, Asahara T, and Kanno M. Dimerization of the Polycomb-group protein Mel-18 is regulated by PKC-phosphorylation. **BBRC** 300:135-140, 2003.

・ Sakai R, Kajiume T, Inoue H, Kanno R, Miyazaki M, Ninomiya Y, and Kanno M. TCDD treatment eliminates the long-term reconstitution activity of hematopoietic stem cells. **Toxicol. Sci.** 72, 84-91, 2003

2. 学会発表 など

(国外：シンポジウム・学会発表、など)

M.Kanno Chromatin silencing and tumorigenesis by Polycomb group genes. Dana-Farber Cancer Institute, 17th, March, 2003 Boston, USA

(国内：シンポジウム・特別講演)

・ 菅野雅元 ポリコーム遺伝子群による生体制御 (細胞のがん化) 第 2 回転写研究会 0 2 筑波国際会議場 2003 年 1 月 23 日—25 日

・ 菅野雅元 ポリコーム遺伝子群と細胞メモリー機構 京大ウイルス研究所コロキウム 「クロマチン構造変換と生命機能」2003 年 2 月 17 日—18 日 京大会館

・菅野雅元、田上英明、梶梅輝之、安田季道、井倉毅、菅野理恵子、二宮裕一、中谷喜洋 ポリコーン蛋白質複合体の精製と複合体間の平衡関係によるガン化制御機構 シンポジウム S3K 染色体代謝—新しい視点からの制御の分子機構 第26回日本分子生物学会 2003年12月10日—13日 神戸ポートアイランド

(一般演題)

・菅野雅元、田上英明、梶梅輝之、安田季道、井倉毅、菅野理恵子、二宮裕一、中谷喜洋 ポリコーン蛋白質複合体の精製と複合対間平衡関係によるガン化制御機構 第62回日本癌学会 名古屋国際会議場 2003年9月25日—27日

・新田剛、M.Nasree、菅野雅元、高浜洋介 胸腺T細胞分化における IAN4 の役割 第33回日本免疫学会 福岡国際会議場 2003年12月8日—10日

・梶梅輝之、菅野理恵子、二宮裕一、菅野雅元 ポロキーム遺伝子群 mel-18 による造血幹細胞の制御機構 第33回日本免疫学会 福岡国際会議場 2003年12月8日—10日

・宮崎正輝、加藤裕子、河本宏、糸井マナミ、雨貝孝、石原浩人、菅野理恵子、菅野雅元 胸腺内T細胞初期分化(ETPs)におけるポリコーン遺伝子 mel-18 の役割 その2 第33回日本免疫学会 福岡国際会議場 2003年12月8日—10日

・加藤裕子、宮崎正輝、河本宏、糸井マナミ、雨貝孝、石原浩人、菅野理恵子、菅野雅元 胸腺内T細胞初期分化(ETPs)におけるポリコーン遺伝子 mel-18 の役割 その1 第33回日本免疫学会 福岡国際会議場 2003年12月8日—10日

・二宮裕一、安田季道、梶梅輝之、菅野雅元 活性化マクロファージに対するオキシステロールの抗炎症作用および標的遺伝子発現抑制機構の解析 第33回日本免疫学会 福岡国際会議場 2003年12月8日—10日

・菅野雅元、井上洋子、菅野理恵子、Warner Held、二宮裕一 NK 細胞受容体 LY49A の発現維持におけるポリコーン遺伝子群の関与 第33回日

本免疫学会 福岡国際会議場 2003年12月8日—10日

・井上洋子、片山恵子、柚木久雄、岸本真哉、玉造滋、友栗徹士、田中純子、梶梅輝之、菅野理恵子、吉澤浩司、菅野雅元 ヒトC型肝炎ウイルス(HCV)の感染初期過程の免疫学的解析 第33回日本免疫学会 福岡国際会議場 2003年12月8日—10日

・二宮裕一、安田季道、菅野理恵子、菅野雅元 マウス LXR beta の新規アイソフォームの解析 第26回日本分子生物学会 2003年12月10日—13日 神戸ポートアイランド

・宮崎正輝、加藤裕子、菅野理恵子、河本宏、菅野雅元 胸腺T細胞初期分化におけるポリコーン遺伝子 mel-18 の役割 第26回日本分子生物学会 2003年12月10日—13日 神戸ポートアイランド

知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究協力者

井上洋子 (広島大学 医学部・教務員)

菅野理恵子 (広島大学 医学部・研究員)

厚生科学研究費補助金（厚生労働省 化学物質リスク 研究事業）

ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析 （H14—食品・化学—026）

分担研究報告書（平成15年度）

分担研究者 横崎恭之 （広島大学大学院医歯薬学総合研究科・講師）

要旨

酸性糖蛋白オステオポンチンは、組織リモデリングや炎症の制御などの多彩な局面で作用を示す細胞外マトリックスで、骨形成、線維化、冠動脈狭窄や腫瘍の転移に関する報告が多くみられる。横崎はオステオポンチンが7種類のインテグリンを受容体とすることから、オステオポンチンとインテグリンの相互作用に関して検討した。まず、 $\alpha 9 \beta 1$ の他のリガンドであるトランスグルタミナーゼにより重合を受ける事に注目し、重合化オステオポンチンの作用を検討した。さらに、インテグリン $\alpha 9 \beta 1$ は生体では上皮も含め広く発現しているが、細胞株では限られたものみに発現がみられているため、発現調節機構に関して検討した。また、インテグリン $\alpha v \beta 6$ はTGF β を活性化することが判明したが、オステオポンチンのこの機構への関与を検討した。これらより、オステオポンチンの多彩な作用は、リガンド側の翻訳後修飾とそれに関連した受容体の種類の変化によって制御される可能性が示された。

A. 研究目的

酸性糖蛋白オステオポンチンは、組織リモデリングや炎症の制御などの多彩な局面で作用を示す細胞外マトリックスで、骨形成、線維化、冠動脈狭窄や腫瘍の転移に関する報告が多くみられる。作用の多様性は、このマトリックスはサイトカインのクライテリアを満たしており、IL-28と提唱されたことから伺える。オステオポンチンの機能発現にはその受容体と結合することが必要であるが、少なくとも7種類のインテグリン、 $\alpha 4 \beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha 8 \beta 1$ 、 $\alpha 9 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ がこの分子の受容体として作用する事が知られている。多機能性は、少なくとも一部、これらの性質の違いに負っているものと考えられる。これらのうち多くはオステオポンチン内の Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を認識し結合する。 $\alpha 9 \beta 1$

はオステオポンチンがトロンピンに切断されて始めて結合するが、横崎はその配列を SVVYGLR と同定し、その配列の C-末端がトロンピン切断部位で、N-末側に隣接して RGD 配列が存在する (..TYDGRGDSVVYGLRSKSKKF...) ことを示した (1)。このことより 1) SVVYGLR 配列はトロンピン切断によりはじめてインテグリンに認識され、2) ここにインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ が結合した場合 RGD に結合するインテグリンは競合的に結合を解除する可能性を示した。従って、トロンピン存在下で $\alpha 9 \beta 1$ を介して受容体の切り替えが生じる可能性が考えられ (2)、オステオポンチンとインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ の相互作用の生物学的意義に興味もたれる。本年度、この点に関する興味深い2編の報告がなされた。一つはこの相互作用を阻害する事により、マウスのリウマチモデルで、関節

滑膜細胞の増殖、骨のびらん、炎症性細胞の浸潤などが抑制されることが示された(3)。

他の一編では、血管内皮細胞を3次元ゲルでこのSVVYGLRペプチドとともに培養すると著明な管腔形成を示す事が報告されている(4)。横崎はオステオポンチンがインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ の他のリガンドであるトランスグルタミナーゼにより重合を受ける事に注目し、重合化オステオポンチンの作用を検討した。さらに、インテグリン $\alpha 9 \beta 1$ は生体では上皮も含め広く発現しているが、細胞株では限られたものみに発現がみられているため、発現調節機構に関して検討している。また、インテグリン $\alpha v \beta 6$ はTGF β を活性化することが判明したが(5)、オステオポンチンのこの機構への関与を検討した(6)。

(関連論文)

1) Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, Saitoh Y, Yamakido M, Taooka Y, Sheppard D.

The integrin $\alpha 9 \beta 1$ binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino terminal fragment of osteopontin. *J. Biol. Chem.* 274: 36328-36334 (1999).

2) Yokosaki Y, and Sheppard D.

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

3) Yamamoto N, Sakai F, Kon S, Morimoto J, Kimura C, Yamazaki H, Okazaki I, Seki N, Fujii T, Uede T.

Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 112: 181-188 (2003).

4) Hamada Y, Nokihara K, Okazaki M, Fujitani W, Matsumoto T, Matsuo M, Umakoshi Y, Takahashi J, Matsuura N.

Angiogenic activity of osteopontin-derived peptide SVVYGLR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 153-157 (2003).

5) Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D.

The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96: 319-328 (1999).

6) Yokosaki Y, Tanaka K, Yamashita K, Murakami I, Eboshida A, Sheppard D. Interaction of integrin $\alpha v \beta 6$ with osteopontin, The international meeting of American Thracic Society, Orland, Florida, U.S.A. (2004).

B. 研究方法

インテグリンとオステオポンチンの相互作用は、目的のインテグリンを遺伝子導入により発現させた細胞を用い、オステオポンチン

でコートしたプレートへの接着性を観察した。オステオポンチンはリコンビナント GST 融合蛋白として大腸菌に産生させ、蛋白融解酵素で GST 部分を切り離して使用した。

C. 研究結果

オステオポンチンはトランスグルルミン一鎖より重合されたが、インテグリンとの結合性は保たれていた。またオステオポンチンはインテグリン $\alpha v \beta 6$ を受容体とすることを明らかとした。

D. 考察および結論

オステオポンチンの機能の多様性は翻訳後修飾とそれによる受容体の変化に、活性が影響され、また TGF β などの他の生物活性物質を巻き込んで発揮されているものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(総説)

1) 横崎恭之

気道上皮インテグリンのノックアウトマウスは肺気腫に至る

分子呼吸器病学 8: 10-17 (2004).

(著書)

2) 横崎恭之

1-7 細胞接着蛋白質

図説 血栓・止血・血管学、中外医学社、

(2004 年印刷中)

2. 学会発表など

学会

(国内学会)

1) 2003 年 7 月 17 日-18 日 札幌

第 5 回オステオポンチン研究会、

生体防御機能異常ワークショップ

第 6 回肝臓生物研究会

合同年会

横崎恭之、烏帽子田彰

オステオポンチンとインテグリンの相互作用

(基調講演)

2) 2003 年 7 月 24 日-25 日 京都

遺伝子診療学会

村上功、横崎恭之、烏帽子田彰

肺癌における分子生物学的異常の治療前診断の試み

3) 2003 年 10 月 21 日-24 日 長崎

日本人類遺伝学会

横崎恭之、村上功、佐々木朋宏、田中久美、

粟屋智一、東川史子、烏帽子田彰

肺癌・胃癌重複患者で同定されたインテグリン $\alpha 9$ サブユニット細胞質ドメインの一塩基置換は機能変化をもたらす

4) 2003 年 11 月 8 日 広島

日本老年医学会地方会

横崎恭之、烏帽子田彰

心・血管リモデリング因子オステオポンチンの翻訳後修飾

5) 2003年12月10日-13日 神戸
第26回日本分子生物学会
横崎恭之、田中久美、山下敬介、烏帽子田彰
オステオポンチンの翻訳後修飾による受容体
の変化

6) 2004年12月19日-20日 東京
第3回分子予防環境医学研究会
横崎恭之、烏帽子田彰
生体反応修飾因子オステオポンチンの機能的
多様性とインテグリン

7) 2004年3月31日-4月2日
第44回日本呼吸器学会学術講演会
村上功、横崎恭之、重藤えり子
進行非小細胞肺癌患者における遺伝子多型お
よびp53 遺伝子変異の予後的検討

(国際学会)

8) 2003年9月16日-18日 Heviz,
Hungary
Second Japanese-Hungarian Transglut-
aminase Conference
Yokosaki Y, Eboshida A
Post-translational modification of osteo-
pontin and transglutaminatioin.

2004年5月22日-27日 Orlando, Florida,
U.S.A.
International Meeting of American
Thoracic Society
Yokosaki Y, Tanaka K, Yamashita K,

Murakami I, Eboshida A, Sheppard D
Interaction of integrin avb6 with
osteopontin.

9) 2004年5月22日-27日 Orlando,
Florida, U.S.A.
International Meeting of American
Thoracic Society

Inoue Y, Yamamoto S, Hebisawa A,
Yamadori I, Akira M, Arai T, Mochizuki Y,
Sato T, Fujita Y, Nagata N, Akagawa S,
Saito Y, Maruyama M, Saito T, Eda R, Abe
M, Kitada S, Fukushima K, Yokosaki Y,
Kobashi Y, Hayashi S, Nagai S, Kitaichi M,
Nishimura K, Sakatani M, Travis WD
Prognostic evaluation of radio-pathol-
ogical findings in fibrotic idiopathic
interstitial pneumonitis.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

特許
抗オステオポンチン抗体およびその用途 (出
願)

日本 特願 2002-579907

米国 第10/473,174

ヨーロッパ 第02713293.5号

韓国 第10-2003-7012488

メキシコ 第PA/A/2003/009052号

ブラジル 第4820/03号

チェコ 第PV2003-2697号

オーストラリア 第 2002244968 号

ニュージーランド 第 528483 号

インド 第 01216/ KOLNP/ 2003 号

アルゼンチン 第 P02 01 01 262 号

台湾 第 91106862 号

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

ア) 主任研究者：山下敬介

1) Morita M, Kobayashi A, Yamashita T, Shimanuki T, Nakajima O, Takahashi S, Ikegami S, Inokuchi K, Yamashita K, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y.

Functional analysis of basic transcription element binding protein by gene targeting technology. *Molecular and Cellular Biology* 23: 2489-2500 (2003). (原著論文) ————— 18—29

2) Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Okayama T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T.

Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo.

Biochemical and Biophysical Research Communication 318: 571-578 (2004). (原著論文) — 30—37

参考) 三村純正

生体内における AhR シグナル伝達系の役割

生化学 76: 359-362 (2004). (原著論文) ————— 38—41

イ) 分担研究者：菅野雅元

3) Sakai R, Kajiume T, Inoue H, Kanno R, Miyazaki M, Ninomiya Y, and Kanno M. TCDD treatment eliminates the long-term reconstitution activity of hematopoietic stem cells.

Toxicological Sciences 72, 84-91, 2003. (原著論文) ————— 42—49

ウ) 分担研究者：横崎恭之

4) 横崎恭之

気道上皮インテグリンのノックアウトマウスは肺気腫に至る

分子呼吸器病学 8: 10-17 (2004). (総説) ————— 50—58

5) 2003年7月17日-18日 札幌

第5回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ第6回肝臓生物研究会 合同年会
横崎恭之、烏帽子田彰

オステオポンチンとインテグリンの相互作用(基調講演)(学会発表、国内学会) ————— 59

6) 2003年7月24日-25日 京都

遺伝子診療学会

村上功、横崎恭之、烏帽子田彰

肺癌における分子生物学的異常の治療前診断の試み(学会発表、国内学会) ————— 60

7) 2003年10月21日-24日 長崎

日本人類遺伝学会

横崎恭之、村上功、佐々木朋宏、田中久美、粟屋智一、東川史子、烏帽子田彰

肺癌・胃癌重複患者で同定されたインテグリン $\alpha 9$ サブユニット細胞質ドメインの一塩基置換は機能変化をもたらす(学会発表、国内学会) ————— 61

- 8) 2003年11月8日 広島
日本老年医学会地方会
横崎恭之、烏帽子田彰
心・血管リモデリング因子オステオポンチンの翻訳後修飾 (学会発表、国内学会) —————62
- 9) 2003年12月10日-13日 神戸
第26回日本分子生物学会
横崎恭之、田中久美、山下敬介、烏帽子田彰
オステオポンチンの翻訳後修飾による受容体の変化 (学会発表、国内学会) —————63
- 10) 2004年12月19日-20日 東京
第3回分子予防環境医学研究会
横崎恭之、烏帽子田彰
生体反応修飾因子オステオポンチンの機能的多様性とインテグリン (学会発表、国内学会) —————64
- 11) 2004年3月31日-4月2日
第44回日本呼吸器学会学術講演会
村上功、横崎恭之、重藤えり子
進行非小細胞肺癌患者における遺伝子多型およびp53遺伝子変異の予後的検討 (学会発表、国内学会) —65
- 12) 2003年9月16日-18日 Heviz, Hungary
Second Japanese-Hungarian Transglut-aminase Conference
Yokosaki Y, Eboshida A
Post-translational modification of osteo-pontin and transglutaminatioin. (学会発表、国際学会) —66
- 13) 2004年5月22日-27日 Orlando, Florida, U.S.A.
International Meeting of American Thoracic Society
Yokosaki Y, Tanaka K, Yamashita K, Murakami I, Eboshida A, Sheppard D
Interaction of integrin avb6 with osteopontin. (学会発表、国際学会) —————67
- 14) 2004年5月22日-27日 Orlando, Florida, U.S.A.
International Meeting of American Thoracic Society
Inoue Y, Yamamoto S, Hebisawa A, Yamadori I, Akira M, Arai T, Mochizuki Y, Sato T, Fujita Y, Nagata N, Akagawa S, Saito Y, Maruyama M, Saito T, Eda R, Abe M, Kitada S, Fukushima K, Yokosaki Y, Kobashi Y, Hayashi S, Nagai S, Kitaichi M, Nishimura K, Sakatani M, Travis WD
Prognostic evaluation of radio-pathol-ogical findings in fibrotic idiopathic interstitial pneumonitis.
(学会発表、国際学会) —————68

20031295

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。