

20031309

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 15 年度 総括・分担研究報告書

平成 16 (2004) 年 3 月

主任研究者 山田 英之

## 平成 15 年度報告書

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

(課題番号 13150201)

## 研究班構成員氏名

主任研究者	九州大学薬学研究院教授	山田 英之
分担研究者	九州大学薬学研究院助手	石田 卓巳
分担研究者	日本大学薬学部教授	手塚 雅勝

## 目 次

### I. 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	1
山田 英之	

### II. 分担研究報告書

1. Heat Shock Protein 誘導剤によるダイオキシン類毒性軽減の可能性	8
山田 英之	
2. 植物成分 curcumin および quercetin によるダイオキシン類毒性の軽減の可能性	16
石田 卓巳	
3. 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	29
手塚 雅勝	

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** ダイオキシン類の毒性と heat shock protein 70 (HSP70) の発現量との間に何らかの関連性があるものと仮定し、HSP70 の誘導剤である geranylgeranylacetone (GGA) を用い、TCDD による口蓋裂および水腎症の発生に対する効果について検討を行った。また、HSP70 発現変動と TCDD 毒性軽減との関連性について更なる情報を得るため、HSP70 誘導剤[carbenoxolone (CBX) および curcumin] および HSP70 発現抑制剤 (quercetin) を用い、TCDD の毒性に対する影響を検討した。その結果、GGA は、TCDD による口蓋裂や水腎症の要因と考えられる腎盂の拡張に対して効果を示さないことが明らかとなった。また、CBX の併用では、TCDD による体重増加抑制および致死性が増強されたが、curcumin および quercetin を併用した場合、TCDD による体重増加抑制が軽減される傾向にあることが明らかとなった。この機構について、HSP70 mRNA の発現変動、Ah-receptor (AhR) 活性化および酸化的ストレスの発生といった観点から検討を行ったが、いずれの指標においてもその機構を説明するには不十分であった。機構を推定することはできなかったが、今回検討したHSP70 発現修飾物質のうち、植物成分の curcumin および quercetin に TCDD 毒性軽減効果が認められ、これを基盤とする今後の展開が期待された。

一方、TCDD の長期曝露により肺の扁平上皮ガンの発生が報告されており、AhR 高発現との関連性が注目されている。そこで、肺ガン由来細胞の増殖におけるダイオキシン類および AhR の活性化の影響を検討した。その結果、AhR および AhR nuclear translocator (Arnt) の共存化においてのみ細胞周期制御に関わる転写因子 E2F 依存的なルシフェラーゼ活性の上昇が観察された。また、E2F の存在は、AhR/Arnt の転写活性を低下させ、さらに、E2F、AhR ならびに Arnt を過剰発現させた細胞の抽出液を用いて免疫沈降を行った結果、E2F と AhR/Arnt の共沈が認められた。この結果から、E2F と AhR/Arnt との複合体形成にともなう転写活性の上昇が、ダイオキシン類による発ガンプロモーター作用の機構の一部であると推測された。

#### 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

石田 卓巳 九州大学薬学研究院  
分子衛生薬学 助手

#### 研究協力者

榛葉 繁紀 日本大学薬学部  
衛生化学研究室 専任講師

### A. 研究目的

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) に代表されるダイオキシン類は、現在、環境中に広く分布する汚染物質の一つであり、その化学的な安定性や生体への高蓄積性から、食物連鎖を通じた生物濃縮および人体への慢性的な曝露が危惧されている。また、それに伴う中毒症状や次世代への影響は社会的な注目を集めており、早急な毒性発現機構の解明が期待されている。

ダイオキシン類の毒性については、これまで様々な研究がなされており、体重増加抑制、肝肥大、胸腺や脾臓の萎縮、免疫機能低下、催奇形性などが報告されている。また、その毒性発現機構には、細胞質に存在する受容体型転写因子である arylhydrocarbon receptor (AhR) が重要な役割を果たしていると考えられている。AhR は、種々の機能性タンパク質の発現を制御する受容体であり、ダイオキシン類は、AhR との相互作用を介してタンパク質の発現量変動を惹起することにより毒性を発現していると考えられている。しかし、AhR によって発現調節を受けるいずれの機能性タンパク質の変動がダイオキシン類の毒性に直結するのかについては未だ解明されておらず、その毒性発現機構には不明な点も多い。

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検討を行ってきた。その中で、ダイオキシン類の一つである 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl を処理したラット肝臓において、heat shock protein 70 (HSP70) が誘導されることを明らかにした。HSP70 は、ストレスにより生じた変性タンパク質の凝集、緩和および修復等に関与するシャペロンタンパク質であると共に、平常時においても細胞内で他のタンパク質と相互作用して正常な細胞機能を維持する機能を有していることが明らかとなっている。我々は、ダイオキシン類の毒性と HSP70 の発現量との間に何らかの関連性があるものと仮定し、HSP70 の誘導剤であり抗胃潰瘍薬として臨床で使用されている geranylgeranylacetone (GGA) を用いて TCDD の毒性に対する影響を検討した。その結果、GGA が TCDD による体重増加抑制および致死性を軽減することを明らかにし、さらに、胎仔における水腎症を軽減する可能性を見出した。また、毒性軽減機構を解明するため、肝臓および小腸における HSP70 mRNA の発現変動を観察したが、明らかな関連性を見出すことが出来なかった。以上のような背景のもと、本研究では、GGA による催奇形性軽減効果についてさらに検証するため、TCDD による口蓋裂および水腎症の発生に対する GGA の効果について詳細な検討を行った。また、HSP70 発現変動と TCDD 毒性軽減との関連性について更なる情報を得るため、HSP70 誘導剤[carbenoxolone (CBX) および curcumin] および HSP70 発現抑制剤 (quercetin) を用い、TCDD の毒性に対する影響を検討した。

一方、ダイオキシン類は生体に対して様々な毒性を惹起することが知られているが、その中の一つに発ガンプロモーター作用が報告されている。この機構に

も AhR の関与が明らかとなっているが、詳細については不明な点も多い。一般に、AhR は、進化の過程においても保存されており、とくに哺乳動物においては肺において最も高い発現を示す。一方、TCDD の長期曝露により肺の扁平上皮ガンの発生が報告されており、AhR 高発現との関連性が注目されている。そこで、本研究では、ダイオキシン類の肺ガンプロモーター作用の機構を明らかにするため、肺由来細胞の増殖におけるダイオキシン類および AhR の活性化の影響を検討した。

## **B. 研究方法**

### **TCDD の催奇形性におよぼす GGA の影響**

妊娠 12 日目の C57BL/6J マウスに GGA を 200 mg/kg 経口投与し、同日に TCDD を 10 µg/kg 単回経口投与した。その後、同量の GGA を連続投与したのち、妊娠 18 日目に胎仔を摘出し、腎臓と口蓋の組織像を観察した。

### **CBX による TCDD 毒性への影響とその機構解析**

5 週令の C57BL/6J 系雄性マウスに CBX を 100 mg/kg 経口投与し、その 30 分後に TCDD 100 µg/kg を単回経口投与した。この日を投与 0 日目として、同量の CBX を 14 日間連続経口投与した。さらに、TCDD による臓器への影響に対する CBX の効果について検討するため、最終投与後各臓器を摘出し、重量を測定した。また、CBX による TCDD 毒性増強機構について検討するため、AhR 依存的に誘導される CYP1A subfamily の指標である ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) 活性を測定した。

### **Curcumin および quercetin による**

### **TCDD 毒性への影響と機構解析**

Curcumin による TCDD 毒性への影響について検討するため、5 週令 C57BL/6J 系雄性マウスに、curcumin を 100 mg/kg/5 ml の用量で経口投与し、その 2 時間後に、TCDD を 200 µg/kg/5 ml もしくは 100 µg/kg/5 ml 単回経口投与した。この日を投与 0 日目として、翌日より同量の curcumin を連続経口投与し体重変化を観察した。次に、quercetin による TCDD 毒性への影響について検討するため、5 週令 C57BL/6J 系雄性マウスに、quercetin を 100 mg/kg/10 ml の用量で経口投与し、その 6 時間後に、TCDD を 100 µg/kg/5 ml もしくは 10 µg/kg/5 ml 単回経口投与した。この日を投与 0 日目として、翌日より同量の quercetin を連続経口投与し体重変化を観察した。さらに、TCDD による臓器への影響に対する quercetin の効果について検討するため、最終投与後に各臓器を摘出し、重量を測定した。さらに、curcumin および quercetin による TCDD 毒性の軽減機構を明らかにするため、毒性軽減時における HSP70 mRNA 発現量、肝 EROD 活性および肝臓における thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 値を測定した。

### **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**

エンハンサー部分に E2F 結合部位を含むルシフェラーゼ遺伝子を E2F, AhR ならびに AhR nuclear translocator (Arnt) の結合ベクターとともに A549 細胞中にトランスフェクションした。また、E2F, AhR ならびに Arnt を過剰発現させ免疫沈降を行い、生成したタンパク質複合体を電気泳動およびイムノブローディングにより解析した。

なお、本研究における実験動物の取り扱いは、九州大学大学院薬学研究院、大学

院薬学府及び薬学部における実験動物に関する指針に従って行った。

### C. 研究結果

#### TCDD の催奇形性におよぼす GGA の影響

TCDD の催奇形性に対する GGA の効果を検討するため、TCDD 暴露母獣より摘出した胎仔の腎臓と口蓋の組織像を観察した。その結果、口蓋裂はコントロール群および GGA 処理群には認められなかったが、TCDD 処理群および GGA 併用群では、観察した胎仔全てに発症が確認された。また、腎盂の拡張については、TCDD 処理群および GGA 併用群の両群において、コントロール群に比べ、発生率および重篤度の両指標とも増加することが明らかとなった。しかし、TCDD 処理群および GGA 併用群の両群に顕著な差は認められなかった。

#### CBX による TCDD 毒性への影響とその機構解析

TCDD の毒性に対する CBX の影響を検討した結果、TCDD 単独投与群および CBX 併用群いずれにおいても体重増加抑制が認められ、さらに、CBX 併用群では、TCDD 単独投与群よりも体重増加の抑制が顕著であることが明らかとなった。また、観察期間である 14 日間の間に、CBX 併用群では 8 匹中 3 匹のマウスが死亡したのに対し、TCDD 単独投与群では 8 匹中 1 匹が死亡したのみであった。次に、TCDD による臓器への影響に対する CBX の効果について検討した結果、CBX 併用群では、TCDD 単独投与群に比べ肝肥大および胸腺・脾臓萎縮が増強されることに加え、有意な腎肥大も惹起されることが明らかとなった。また、AhR 依存的に誘導される CYP1A subfamily の指標である EROD 活性

を測定したが、TCDD 単独投与群および CBX 併用群の両群の活性値に有意な差は認められなかった。

#### Curcumin および quercetin による TCDD 毒性への影響と機構解析

Curcumin による TCDD 毒性への影響について検討するため、C57BL/6J マウスに、curcumin および TCDD を経口投与した。そのうち、同量の curcumin を連続経口投与した結果、TCDD 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与における curcumin 併用群において、TCDD 単独投与群に比べ体重増加抑制の軽減傾向が示された。しかし、臓器重量については、いずれの検討においても curcumin 併用による影響は認められなかった。次に、quercetin による TCDD 毒性への影響について検討するため、C57BL/6J マウスに、quercetin および TCDD を経口投与した結果、TCDD 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与における quercetin 併用群において、TCDD 単独投与群に比べ体重増加抑制の軽減傾向が認められた。また、TCDD (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) による臓器への影響に対する quercetin の効果について検討した結果、quercetin の投与期間が 1 日間および 30 日間の実験において肝肥大が有意に軽減されることが明らかとなった。さらに、quercetin 投与期間が 30 日間の実験では、TCDD による腎肥大の軽減も観察された。この curcumin および quercetin による TCDD 毒性の軽減機構を明らかにするため、毒性軽減時における HSP70 mRNA 発現量を検討した。その結果、curcumin 併用実験の場合、TCDD 単独投与群および curcumin 併用群において、コントロール群に比べ HSP70.1 mRNA 量が低下する傾向にあることが明らかとなった。一方、quercetin 併用実験の場合、HSP70.1 mRNA の発現量に変化は認められなかった。次に、curcumin や quercetin による毒性軽減に



AhR の機能的変化が関与するか否か検討するため、EROD 活性を測定した。その結果、curcumin 併用群において TCDD 単独投与群に比べ EROD 活性が有意に増加することが明らかとなった。また、quercetin 併用群においては、投与期間が 30 日間の場合のみ EROD 活性値は TCDD 単独投与群に比べ有意に増加することが明らかとなった。最後に、TCDD による酸化ストレス発生への quercetin の影響を検討するため、肝臓における TBARS 値を測定した。その結果、quercetin 併用群において、TBARS 値は TCDD 単独投与群に比べわずかに減少する傾向を示したが、顕著な変化は認められなかった。

### **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**

エンハンサー部分に E2F 結合部位を含むルシフェラーゼ遺伝子を E2F, AhR ならびに Arnt の結合ベクターとともに A549 細胞中にトランスフェクションした結果、AhR および Arnt の共存により E2F 依存的なルシフェラーゼ活性の上昇が観察された。また、この上昇は AhR および Arnt 単独では観察されなかった。一方、E2F の存在は、AhR/Arnt の xenobiotic responsive element (XRE) 配列に対する転写活性を低下させた。さらに、E2F, AhR ならびに Arnt を過剰発現させ免疫沈降を行った結果、E2F と AhR/Arnt の共沈が認められる事が明らかとなった。

## **D. 考察**

### **TCDD の催奇形性におよぼす GGA の影響**

本検討結果より、GGA は、TCDD 暴露時に観察される胎仔の催奇形性（口蓋裂および水腎症）に対して影響を示さないことが明らかとなった。一般に、TCDD の

毒性は、毒性の種類によって効果発現に要する最小暴露量が異なることが知られている。従って、本検討で用いた TCDD の投与量は、TCDD による催奇形性発現の最小投与量に対してはるかに過剰な投与量であり、このため、GGA による効果が観察されなかった可能性が考えられる。

### **CBX による TCDD 毒性への影響とその機構解析**

本検討では、HSP70 の誘導剤である CBX の併用により、TCDD の毒性が増強されることが明らかとなった。また、その毒性増強作用は、AhR を介した酵素誘導に影響を与えなかったことから、AhR を介した機構以外の機構に起因している可能性が示唆された。本検討から、CBX による毒性増強機構を明らかにすることはできなかったが、その可能性として、CBX が、TCDD による毒性を相乗的に増強する機構が予想された。

### **Curcumin および quercetin による TCDD 毒性への影響と機構解析**

本検討では、HSP70 の誘導剤である curcumin および HSP70 の発現抑制剤である quercetin を用いて、TCDD 毒性に対する影響を検討した。その結果、両植物性食物成分とも TCDD の毒性の一部を軽減する傾向にあることが明らかとなった。また、これらの毒性軽減機構を明らかにするため、HSP70 の発現変動、AhR 活性化および酸化ストレスに注目し検討を行ったが、いずれの指標においても解明には至らなかった。TCDD は、細胞内において種々の遺伝子の発現変動を起こすと共に、シグナル伝達などに様々な変化をもたらすことが知られている。従って、これらの作用に対する curcumin や quercetin の効果についても今後検討する必要がある。

るのではないかと考えられた。

## **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**

本検討より、AhR および Arnt の共存により E2F 依存的な転写が活性化される事が明らかとなった。一方、E2F の存在は、AhR/Arnt 複合体の XRE 配列に対する転写活性を低下させた。さらに、免疫沈降より、E2F と AhR/Arnt 複合体の相互作用が認められたことから、AhR/Arnt は E2F と複合体を形成したのち、E2F の転写活性を上昇させることが示され、この作用がダイオキシン類による発ガンプロモーター作用の機構の一部であると推測された。

## **E. 結 論**

本研究の結果、GGA は、TCDD による口蓋裂や腎盂拡張に対して効果を示さないことが明らかとなった。また、GGA と同様、HSP70 の誘導剤である CBX では、TCDD による体重増加抑制および致死性が増強され、さらに、HSP70 の誘導剤である curcumin および HSP70 発現抑制剤である quercetin では、TCDD による体重増加抑制が軽減される傾向にあることが明らかとなった。この毒性軽減および毒性増強機構について、HSP70 mRNA の発現変動、AhR 活性化および酸化的ストレスの発生といった観点から検討を行ったが、いずれの指標においてもその機構を説明するには不十分であった。本検討に用いた curcumin や quercetin は、植物性食品や嗜好品に多く含まれる。従って、ダイオキシン類曝露による中毒症状に対する予防という観点から、毎日の食事を通じて摂取することが可能であるこれら栄養素の摂取は、有効な手段の一つと考えられる。本研究では、curcumin および quercetin に

よる TCDD 毒性軽減機構を明らかにすることは出来なかったが、この成果から引き継がれる新たな取り組みが、ダイオキシン類による健康障害に対する治療法および予防法の確立に寄与するものと期待される。

また、A549 細胞において、AhR および Arnt の共存化においてのみ E2F 依存的なルシフェラーゼ活性の上昇が観察された。また、E2F の存在は、AhR/Arnt の XRE 配列に対する転写活性を低下させることが明らかとなった。さらに、E2F、AhR ならびに Arnt を過剰発現させ免疫沈降を行った結果、E2F と AhR/Arnt の共沈が認められた。以上の結果から、E2F は AhR/Arnt と複合体を形成したのち、転写活性を上昇させることが示された。これらの結果より、ダイオキシンの発ガンプロモーター作用の機構の一部を説明できるものと考えられた。

## **F. 健康危機情報**

特に無し。

## **G. 研究発表**

### **1. 論文発表**

1. Ishida, T., Oshimo, T., Nishimura, A., Mutoh, J., Ishii, Y., Koga, N., Yamada, H., Hashiguchi, I., Akamine, A., and Oguri, K., Reduction of the toxic effect of TCDD using an antiulcer drug, geranylgeranylacetone. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.
2. Ishida, T., Taketoh, J., Nakatsune, E., Kan-o, S., Naito, E., Takeda, S., Mutoh, J., Ishii, Y., and Yamada, H., Curcumin anticipates the suppressed body weight gain with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice. *J. Health Sci.*, in press.
3. Shimba, S., Hayashi, M., Ohno, T., and

Tezuka, M., Transcriptional regulation of the AhR gene during adipose differentiation. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1266-1271 (2003)

## 2. 学会発表

1. フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー (仙台, 2003年10月)
2. 第20回日本薬学会九州支部大会 (福岡, 2003年12月)
3. 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (仙台, 2003年12月)
4. 第26回日本分子生物学会年会 (神戸, 2003年12月)

5. 日本薬学会第124年会 (大阪, 2004年3月)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
特に無し。
2. 実用新案登録  
特に無し。
3. その他  
特許出願 ”ダイオキシン類の検出法” (2004-05731)。

分担研究報告書

Heat Shock Protein 誘導剤によるダイオキシン毒性軽減の可能性

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** 細胞内タンパク質 heat shock protein 70 (HSP70) がダイオキシン毒性に対して防御的に働く可能性を検証する目的で、HSP70 誘導剤である geranylgeranylacetone (GGA) を用いて、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) による催奇形性に対する軽減効果について検討した。その結果、GGA は、TCDD 曝露 C57BL/6J マウス母獣より生まれた胎仔に観察される口蓋裂および腎盂の拡張に対して効果をもたないことが明らかとなった。次に、GGA と同様 HSP70 の誘導剤である carbenoxolone (CBX) を用いて、TCDD の毒性に対する効果を検討した。その結果、C57BL/6J マウスにおいて、CBX は TCDD による体重増加抑制および致死性を増強することが明らかとなった。また、CBX の併用は、TCDD による肝肥大や胸腺の萎縮も増強すると共に腎肥大も惹起することが明らかとなった。この CBX による毒性増強機構について検討するため、TCDD および CBX 処理マウス肝臓における ethoxyresorufin-*O*-deethylase 活性を測定したが、差を見出すことは出来なかった。従って、CBX は arylhydrocarbon receptor 活性化に対する影響以外の機構で TCDD 毒性を増強するものと考えられた。前年度までの検討により、GGA は TCDD 毒性の一部を軽減することが示されたが、今回の研究から催奇形性には殆ど無影響であることが明らかとなった。また、HSP70 誘導剤である GGA と CBX が相反する効果を示すことから、HSP70 のダイオキシン毒性に対する防御効果を明確にすることはできなかった。

**A. 目的**

ダイオキシン類は、現在、環境中に広く分布する汚染物質の一つであり、近年、環境ホルモンとして社会的な注目を集めている。ダイオキシン類は、その化学的な安定性や生体への高蓄積性から、食物連鎖を通じた人体への慢性的な曝露が危惧されている。また、それに伴う生体影響、特に多臓器に亘る中毒症状や次世代への影響は社会的な注目を集めており、早急な毒性発現機構の解明および治療法の開発が期待されている。ダイオキシン類の毒

性については、これまで多くの研究がなされており、特に実験動物を用いた研究から、体重増加抑制、肝肥大、胸腺や脾臓の萎縮、免疫機能低下、催奇形性などが報告されている。また、これらの毒性のほとんどは、細胞質に存在する受容体型転写因子である arylhydrocarbon receptor (AhR) 依存的な機構を介すると考えられている。しかし、それのみで説明するには困難な事例も多いことから、ダイオキシン類の毒性発現機構については未だ解明されていない点も多く残されている。

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検討を行ってきた。その一連の研究の中で、ダイオキシン類の一つである 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) を処理したラット肝臓において、heat shock protein 70 (HSP70) が誘導されることを明らかにした。HSP70 は、熱ショックや酸化ストレスなどの様々なストレスによって誘導されることが知られているストレスタンパク質の一つであると共に、ストレスにより生じた変性タンパク質の凝集、緩和および修復等に関与するシャペロンタンパク質の一つである。また、シャペロンタンパク質は、平常時においても細胞内で他のタンパク質と相互作用し、正常な細胞機能を維持するために重要な役割を果していることが明らかになっている。これらのことから、我々は、ダイオキシン類の毒性と HSP70 の発現量との間に何らかの関連性があるものと仮定し、HSP70 の誘導剤であり抗胃潰瘍薬として臨床で使用されている geranylgeranylacetone (GGA) を用いて 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の毒性に対する影響を検討してきた。その結果、GGA が TCDD による体重増加抑制および致死性を軽減することを明らかにし（平成 13 年度研究報告書にて報告済み）、さらに、胎仔における水腎症を軽減する可能性を見出した（平成 14 年度研究報告書にて報告済み）。

本年度は、GGA によるダイオキシンの催奇形性に及ぼす効果をより詳細にする目的で TCDD 処理条件を変えて検討を行った。また、HSP70 発現変動と TCDD 毒性軽減との関連性について更なる情報を得るため、GGA 同様 HSP70 の誘導剤である carbenoxolone (CBX) を用いて、TCDD 毒性に対する影響を検討した。

## B. 研究方法

### TCDD の催奇形性におよぼす GGA の影響

妊娠 12 日目の C57BL/6J マウスに GGA を 200 mg/kg 経口投与し、同日に TCDD を 10 µg/kg の用量で単回経口投与した。その後、同量の GGA を連続投与し、妊娠 18 日目に胎仔を摘出してパラフィン固定したのち口蓋と腎臓の組織像を観察した。

### TCDD による体重増加抑制におよぼす CBX の影響

本検討における投与スケジュールを Fig. 1 に示す。5 週令の C57BL/6J 系雄性マウスに CBX を 100 mg/kg 経口投与し、その 30 分後に TCDD 100 µg/kg を単回経口投与した。本検討における CBX の投与量については、エタノールにより生じる胃粘膜損傷を 84% 保護する投与量や長期間連続投与しても毒性が現れない投与量等の報告を参考に決定した。また、CBX 投与と TCDD 投与の間隔については、ストレスに対する CBX による細胞保護効果が確認されている時間を参考に決定した。なお、コントロールとしては、CBX に対しては滅菌水を、TCDD に対してはコーンオイルを同量経口投与した。この日を投与 0 日目として、その後同量の CBX を 14 日間連続経口投与し、体重を測定した。さらに、TCDD による臓器障害に対する CBX の効果について検討するため、最終投与翌日に臓器を摘出し、その重量を測定した。

### TCDD の AhR 活性化におよぼす CBX の影響

CBX による TCDD 毒性増強に関与する機構について検討するため、AhR 依存的に誘導される CYP1A subfamily の指標である ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) 活

**Table 1 Incidence of cleft palate and hydronephrosis of fetuses from dams following treatment with GGA and TCDD**

Treatment	Cleft palate (%)	Hydronephrosis	
		Hyperplasia (%)	Mean area of renal pelvis (% of the area of kidney $\pm$ S. E.)
Control (28)	0	46	0.9 $\pm$ 0.3
GGA (30)	0	43	1.1 $\pm$ 0.3
TCDD (33)	100	100	16.0 $\pm$ 0.8***
GGA +TCDD (37)	100	100	18.0 $\pm$ 0.7***,†

Number of fetuses examined is shown in parentheses. The areas of renal pelvis were calculated by dividing the area of pelvis by the area of whole kidney. Significantly different from control; \*\*\*,  $p < 0.001$ . Significantly different from TCDD treatment group; †,  $p < 0.05$ .

性を測定した。

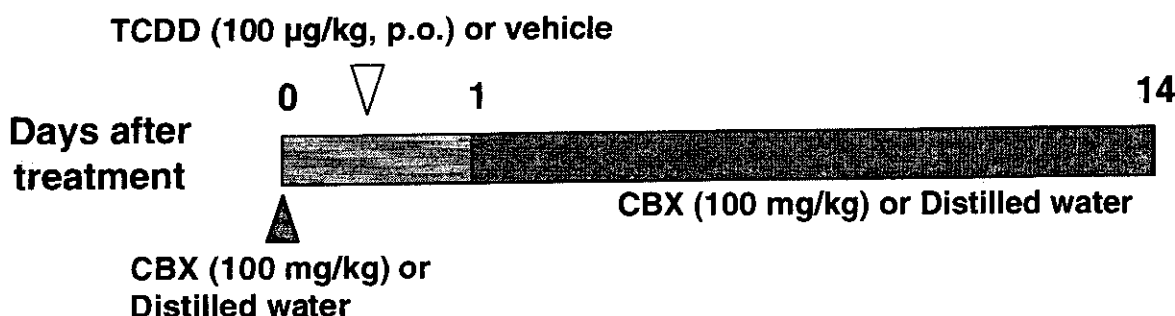
なお、本研究における実験動物の取り扱い、九州大学大学院薬学研究院、大学院薬学府及び薬学部における実験動物に関する指針に従って行った。

### C. 研究結果 TCDD の催奇形性におよぼす GGA の影響

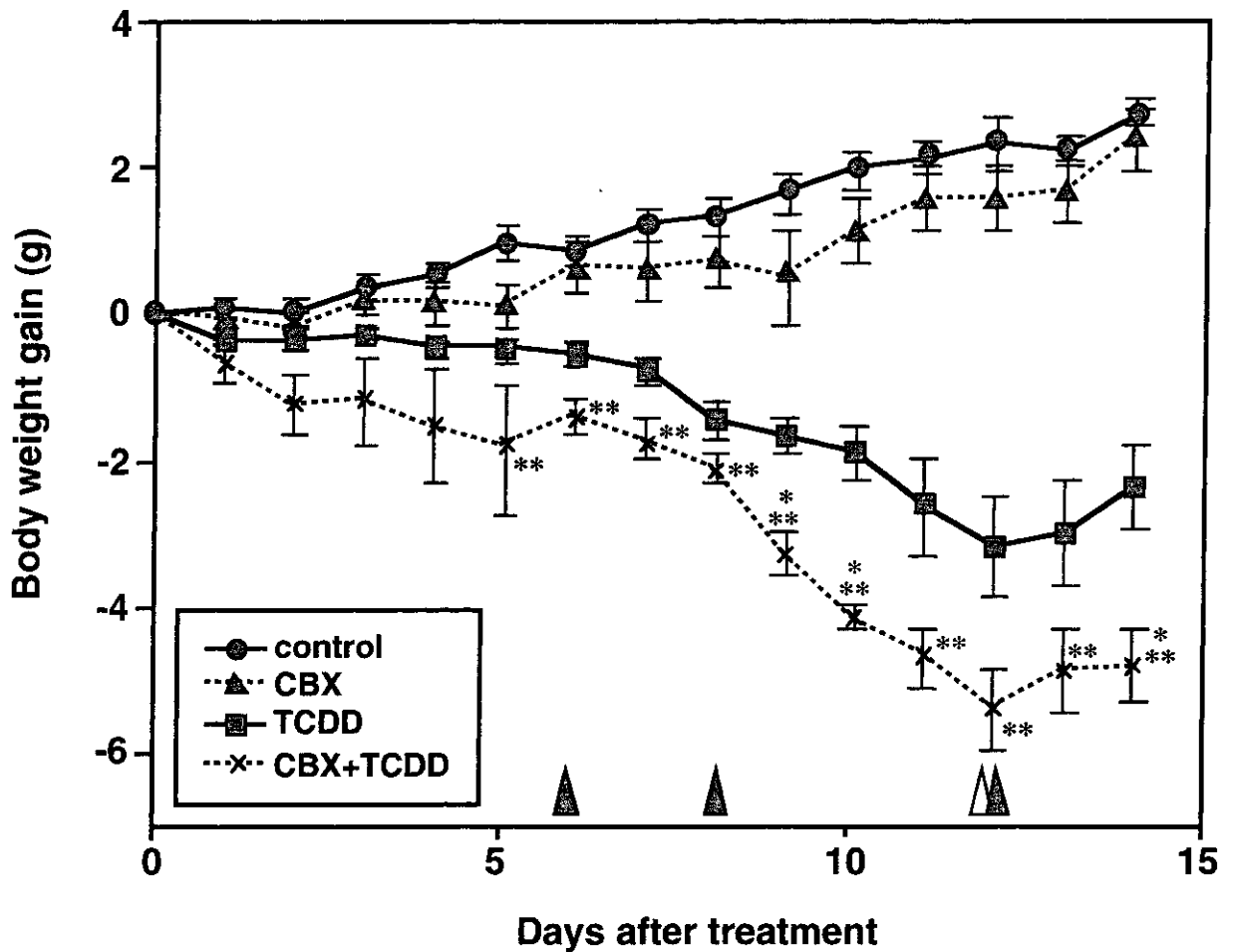
昨年度の検討において、TCDD (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 曝露母獣中の胎仔に観察される水腎症の発生頻度および重篤度に対して、GGA が軽減効果をもつ可能性があることを明

らかにした (平成14年度研究報告書にて報告済み)。そこで、GGA による催奇形性発症軽減効果についてさらに詳細な情報を得るため、TCDD 低濃度曝露時における水腎症発症に対する GGA の効果について検討を行った。

妊娠 12 日目の C57BL/6J マウスに GGA を経口投与し、同日に TCDD を単回経口投与した。その後、同量の GGA を連続投与し、妊娠 18 日目に胎仔を摘出して口蓋と腎臓の組織像を観察した結果、口蓋裂については、コントロール群および GGA 処理群では、発生が認められなかったのに対し、TCDD 処理群および GGA 併用群



**Fig. 1 Administration schedule of CBX and TCDD.**



**Fig. 2** Change in the body weight of C57BL/6J mice after exposure to a single dose of TCDD and/or administration of CBX. The body weight of mice at the start of the experiment was  $20 \pm 0.78$  g. Each plot represents the mean  $\pm$  S. E. of surviving mice ( $n=5-8$ ). Statistical significance was calculated by Scheffe's test. \*, Significantly different from TCDD:  $p < 0.05$ . \*\*, Significantly different from the control:  $p < 0.05$ . The open and closed arrows show the day when mice died in the TCDD treatment group and CBX+TCDD treatment group, respectively.

では、観察した胎仔全てに発症していることが明らかとなった (Table 1)。また、水腎症の原因と考えられる腎盂の拡張については、TCDD 処理群および GGA 併用群の両群において、コントロール群に比べ、腎盂の拡張が起こった腎臓の数 (発生率) および腎臓の断面積に占める腎盂の面積 (重篤度) の両指標ともに増加することが明らかとなった。しかし、両指標とも、

TCDD 処理群と GGA 併用群との間に差は認められなかった。以上の結果から、昨年の結果とは異なり、GGA は TCDD による催奇形性に対して影響をもたないことが明らかとなった。

### TCDD による体重増加抑制におよぼす CBX の影響

マウスに CBX および TCDD を併用した

**Table 2** Change in organ weights of C57BL/6J mice following treatment with TCDD and CBX

Treatment	Liver	Thymus	Spleen	Kidney
	(% of body weight)			
Control (5)	5.54 ± 0.05	0.22 ± 0.01	0.31 ± 0.04	1.35 ± 0.02
CBX (5)	6.72 ± 0.08**	0.22 ± 0.01	0.29 ± 0.01	1.28 ± 0.02
TCDD (7)	7.07 ± 0.19**	0.02 ± 0.00***	0.24 ± 0.01	1.43 ± 0.04
CBX +TCDD (5)	7.72 ± 1.28***	0.02 ± 0.01***	0.17 ± 0.10**	1.94 ± 0.45***

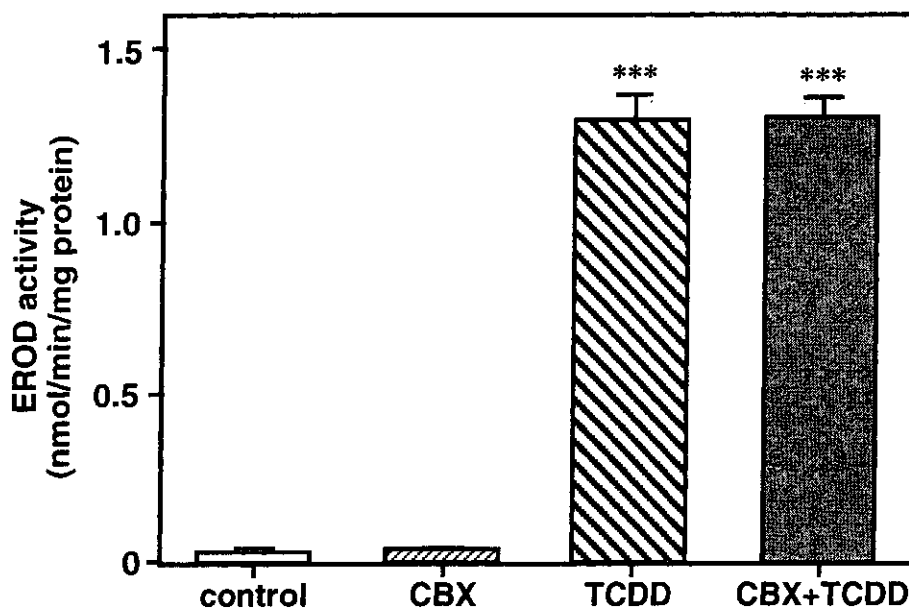
The values represent the mean ± S. E. of surviving mice. The number of the sample is shown in parenthesis. Significantly different from control: \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

結果、投与6日目以降、TCDD単独投与群およびCBX併用群において、コントロール群に比べ体重増加抑制傾向が認められた (Fig. 2)。さらに、CBX併用群では、TCDD単独投与群に比べ投与9日目以降有意な体重増加の抑制が起こることが明らかとなった。また、観察期間である14日間の間に、CBX併用群では8匹中3匹の

マウスが死亡したのに対し、TCDD単独投与群では8匹中1匹が死亡したのみであった。

### TCDDによる臓器重量変化に対するCBXの影響

次に、TCDDによる臓器障害に対するCBXの効果について検討するため、最終



**Fig. 3** EROD activity of liver microsomes from C57BL/6J mice after exposure to TCDD and CBX. The EROD activity of the control was  $0.034 \pm 0.005$  nmol resorufin formed/min/mg protein. Statistical significance was calculated by Scheffe's test. Significantly different from control: \*\*\*,  $p < 0.001$ . The values represent the mean ± S. E. (n=5).



投与翌日に臓器を摘出し、その重量を測定した。その結果、TCDD 単独投与群およびCBX 併用群では、既報の通り肝肥大および胸腺の萎縮が認められた (Table 2)。しかし、この両群を比較した場合、CBX 併用群では TCDD 単独投与群に比べ肝肥大および胸腺・脾臓の萎縮の程度が増強される傾向が認められた。また、CBX 併用群では、有意な腎肥大も惹起されることが明らかとなった。以上の結果から、CBX は、TCDD による体重増加抑制、致死性および臓器障害の程度を増強する傾向にあることが明らかとなった。

### **TCDD の AhR 活性化におよぼす CBX の影響**

CBX による TCDD 毒性増強に関与する機構について検討するため、AhR 依存的に変動することが知られている EROD 活性を測定した。その結果、TCDD を処理した群 (TCDD 単独投与群およびCBX 併用群) では、コントロール群に比べこれまでの報告と同様 EROD 活性の有意な増加が認められた (Fig. 3)。しかし、この両群の活性値に有意な差は認められなかった。以上の結果から、CBX は、TCDD による AhR の活性化以外の機構を介して TCDD の毒性を増強する可能性が示唆された。

### **D. 考 察**

昨年度の検討から、GGA が TCDD による体重増加抑制および致死性、さらに水腎症の原因と考えられる腎盂の拡張に対して軽減効果をもつ可能性が示された。しかし、本年度の検討では、GGA が TCDD による催奇形性に対して効果を持たないことが明らかとなった (Table 1)。TCDD の毒性は、毒性の種類によって効果発現に要する最小曝露量が異なる。例えば、C57BL マウスにおける半数致死量は、114

μg/kg、肝肥大や胸腺の萎縮は 1 μg/kg、さらに、胎仔における口蓋裂や腎盂の拡張は 3 μg/kg であると報告されている。この結果は、単一個体でありながら、それぞれの毒性には異なる閾値が存在することを示唆していると考えられる。従って、GGA は、TCDD による体重増加抑制や致死性を決定する要因に作用することにより、その閾値を上昇させることが示唆される。これに対し、本検討で用いた TCDD の投与量 10 μg/kg は、TCDD による催奇形性発生の最小投与量に対してはるかに過剰な投与量であり、このため GGA による閾値上昇にもかかわらず発症した可能性が考えられる。また、もう一つの可能性として、胎盤における生体異物排除機能による胎仔への GGA の曝露不足が催奇形性を抑止できなかった要因ではないかとも考え得る。しかし、GGA は母獣投与後に、胎仔中もしくは胎盤内への移行も報告されている。このため、胎仔への GGA の曝露不足については、問題ないものと推定された。

本検討では、HSP70 の発現変動と TCDD 毒性との関連性についてさらなる情報を得るため、HSP70 誘導剤である CBX を用いて TCDD の毒性に対する影響を検討した。その結果、CBX を併用することにより、TCDD による体重増加抑制および致死性が増強されることが明らかとなった (Fig. 2)。また、その毒性増強作用は、TCDD による AhR を介した酵素誘導能に影響を与えなかったことから (Fig. 3)、AhR を介した機構以外の機構に起因している可能性が示唆された。CBX による毒性増強機構については、本検討で明らかにすることが出来なかったが、その可能性として、TCDD により誘導される種々の薬物代謝酵素が、CBX の代謝および排泄に影響を与える機構が考えられる。しか

し、CBXの代謝については、CBXの3位もしくは30位がグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受けて尿中に排出されることが明らかとなっている。このため、TCDDによる酵素誘導に伴う体内残留時間の延長は考えにくい。また、CBXとTCDDのお互いが相加的に毒性を増強する機構も予想されるが、CBX 100 mg/kgにおいてこれまで毒性は報告されておらず、また本研究における検討でもCRX単独投与群では体重増加抑制が見られなかったことから、この可能性は少ないものと思われる。従って、CBXによるTCDDの毒性増強の機構については、CBXが、TCDDによる毒性を相乗的に増強する機構が予想される。これまでの報告から、CBXは、11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -OHS) 阻害作用や細胞間のギャップ結合 (gap junction) のコミュニケーション機能を阻害する作用が報告されている。グルココルチコイドやミネラルコルチコイドの生合成のためには、11位の水酸化が必要であるが、11 $\beta$ -OHSはこの活性体を不活性体へと代謝する酵素である。このため、本酵素が阻害された場合、コルチコイド類が活性状態を維持したままになり、その結果、TCDDの毒性に影響を与えた可能性が考えられる。しかし、これまでに、合成グルココルチコイドであるデキサメサゾンがTCDDの体重増加抑制および致死性を軽減するという報告がなされており、しかもその際、デキサメサゾン併用においてEROD活性が上昇することも明らかとなっている。さらに、CBXを投与したラットにおけるグルココルチコイド作用への影響を観察した実験では、CBXは内在性グルココルチコイド活性を示さず、また外的に加えたコルチコステロンの活性を調節しないと言う。これらの観察結果は、CBXによるTCDD毒性増強をコル

チコイド水準の上昇によって説明することを支持しない。しかし、CBXが11 $\beta$ -OHSの阻害を通してミネラルコルチコイドの過剰状態を惹起する可能性も指摘されており、コルチコイドがTCDD毒性修飾因子として働く可能性は否定できない。

もう一つの可能性として、gap junction intercellular communication (GJIC) の阻害が予想される。Gap junctionは隣接する細胞間の連絡路としての役割を果たしており、cAMP、カルシウムイオンおよびATP等の物質輸送の制御を通して細胞間のホメオスタシスの維持に関わっていると考えられている。1つの細胞の細胞膜にはヘミチャネルと呼ばれるギャップ結合の半分が存在し、隣接する細胞のヘミチャネルと結合している。ヘミチャネルは、コネクシン (connexin) と呼ばれる6量体から形成されており、コネクソン (connexon) と呼ばれている。ギャップ結合を構成するconnexinは構造の類似したファミリーを形成しており、哺乳類では15種類が同定されている。この中で、ラット肝臓にはconnexin 32が最も多く、以下connexin 26、connexin 43と続いている。ところで、CBXと同様にTCDDにもGJICの阻害作用があることが報告されている。TCDDを処理したラット肝初代培養細胞において、connexin 32の発現量は顕著に減少するが、connexin 26は変動が見られないと報告されている。また、connexin 43を発現させた細胞を用いた実験では、TCDDによるGJICの阻害が見られないことから、TCDDによるGJICの阻害は、connexin 32のdown-regulationによると考えられている。一方、connexin 43を発現させた細胞においてはGJICの阻害効果が見られることから、CBXの細胞毒性はconnexin 43が標的であると考えられている。CBXはconnexin43の発現量には影響を与えず、ま

た薬物の除去により GJIC 機能の回復が観察されることから、可逆的に connexin 43 に作用し connexon の立体構造を変化させコミュニケーションを阻害すると考えられている。これらのことより、TCDD と CBX を併用した場合、CBX によって connexin 43 がダメージを受け、さらに、それを補うはずの connexin、特に connexin 32 が TCDD により障害を受けてしまうために、GJIC が機能せず毒性増強につながったのではないかと考えられる。

## E. 総括

本検討では、ダイオキシン類による毒性に対する軽減法の開発を目的として GGA および CBX 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 曝露に伴う催奇形性に対して効果を示さないことが明らかとなった。

2) HSP70 誘導剤である CBX は、単独では毒性を示さなかったが、TCDD と併用することでその毒性を増強することが明らかとなった。

3) CBX による毒性増強機構には、AhR 依存的な機構以外の機構が関与している可能性が示唆された。

当初我々は、HSP70 の誘導が TCDD の毒性に対して軽減効果をもつと仮定した。

しかし、HSP70 の発現変動と TCDD 毒性軽減との間に明らかな関連性を見出すことは出来なかった。従って、GGA による TCDD 毒性軽減機構の解明には、HSP70 発現変動以外の機構が関与する可能性も予想され、今後も更なる研究が必要ではないかと考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ishida, T., Oshimo, T., Nishimura, A., Mutoh, J., Ishii, Y., Koga, N., Yamada, H., Hashiguchi, I., Akamine, A., and Oguri, K., Reduction of the toxic effect of TCDD using an antiulcer drug, geranylgeranylacetone. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

### 2. 学会発表

1. フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー (仙台, 2003 年 10 月)

## H. 知的財産権の出願・登録情報 (予定を含む。)

1. 特許取得  
特になし。
2. 実用新案登録  
特になし。
3. その他  
特になし。

分担研究報告書

植物成分 curcumin および quercetin によるダイオキシン類毒性の軽減の可能性

分担研究者 石田 卓巳 九州大学薬学研究院 分子衛生薬学 助手

**研究要旨** Heat shock protein 70 (HSP70) 誘導剤である curcumin および HSP70 生合成阻害剤である quercetin を用いて、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) による毒性に対する効果を検討した。その結果、curcumin および quercetin は、いずれも TCDD 曝露 C57BL/6J マウスに観察される体重増加抑制を軽減する傾向にあることが明らかとなった。また、curcumin は、TCDD による臓器への影響に対して効果を示さなかったが、quercetin は、投与期間 1 日間および 30 日間の検討において、TCDD による肝肥大を有意に軽減することが明らかとなった。この curcumin および quercetin による TCDD 毒性の軽減機構について検討するため、肝臓および小腸における HSP70.1 mRNA の発現量、肝臓における ethoxyresorufin *O*-deethylase 活性 (arylhydrocarbon receptor 活性化機構の指標) および thiobarbituric acid reactive substances 値 (酸化ストレスの指標) を測定した。しかし、いずれの指標においても毒性軽減機構を説明することができなかった。このように、機構を推定することはできなかったが、今回検討した 2 種の化合物が TCDD 毒性軽減をもたらすことから、これを基盤とする今後の展開が期待された。

**A. 研究目的**

ダイオキシン類は、その化学的な安定性から環境への残留性が高く、さらに脂溶性が高いことから、食物連鎖を通じた濃縮効果による生体への影響が懸念されている。また、ダイオキシン類汚染は、依然として深刻な状況にあり、現在でも都市ゴミの焼却や農薬・殺菌剤等の製造および塩素漂白等の過程で非意図的に生成されている。我が国では、ダイオキシン類対策特別措置法の施行により、これらの環境中への排出規制が行われている。しかし、日常生活における曝露は避けられない状況であり、早急な健康障害に対する治療法もしくは予防法の開発が望まれ

ている。

当研究室では、ダイオキシン類の毒性発現機構の解明に向け、細胞内の機能性タンパク質の発現変動に着目し検討を行ってきた。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) を処理した Wistar 系雄性ラットの肝臓において、ストレス応答性の分子シャペロンタンパク質の一つである heat shock protein (HSP) 70 の誘導を明らかにした。HSP は、分子量の違いから幾つかのファミリーに分類されているが、その中でも、分子量約 70 kDa の HSP70 ファミリーは、種を越えて広く存在することが明らかとなっている。また、