

HSP70 は、細胞の防御機構にも関与しており、高発現させた細胞では熱ショック等の外的ストレスにより惹起されるアポトーシスが抑制されるという報告もなされている。これらの事実から、我々は、HSP70 の誘導とダイオキシン類の毒性との間に何らかの関連性があるのではないかと仮定した。さらに、この仮説を検証するため、HSP70 の誘導剤である 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た。その結果、C57BL/6J 系雄性マウスにおいて、GGA が TCDD 毒性の一部である体重増加抑制および致死性を軽減する傾向にあることを明らかにした (平成 13 年度研究報告書にて報告済み)。本研究では、HSP70 の発現変動とダイオキシン類の毒性との関連性についてさらに検証するため、HSP70 誘導剤である植物性分 curcumin および HSP70 生合成阻害剤であり植物フラボノイドの一つである quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) を用いて、TCDD の毒性に対する影響を検討した。

B. 研究方法

TCDD による体重増加抑制および臓器毒性に対する影響

5 週令 C57BL/6J 系雄性マウスに、curcumin を 100 mg/kg/5 ml 経口投与し、その 2 時間後に、TCDD を 200 µg/kg/5 ml (Experiment 1) もしくは 100 µg/kg/5 ml (Experiment 2) 単回経口投与した。curcumin の投与量については、予備検討として C57BL/6J マウスの体重変化に対する curcumin の影響を用量依存的に検討し (成績未掲載)、その結果、体重変化に影響を与えなかった用量を採用した。また、TCDD の投与量については、GGA 併用実験を参考に、高用量および低用量の 2 群を設定した。さら

に、コントロール群として、curcumin に対しては同量のアラビアゴムを、TCDD に対しては同量の corn oil を投与した。この日を投与 0 日目として、翌日より同量の curcumin を 10 日間 (Experiment 1) もしくは 28 日間 (Experiment 2) 連続経口投与し体重変化を観察した。また、TCDD の臓器への影響に対する curcumin の効果を検討するため、最終投与翌日に摘出した臓器の湿重量を測定した。

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 経口投与し、その 6 時間後に、TCDD を 100 µg/kg/5 ml (Experiment 3) あるいは 10 µg/kg/5 ml (Experiment 4) 単回経口投与した。この際、quercetin の投与量については、マウスにおける quercetin の LD₅₀ およびマウスにおいて HSP70 生合成阻害が観察された投与量を基に決定した。また、TCDD の投与量については、高用量および低用量における作用を検討するため、毒性発現の指標の一つである体重増加抑制が観察される投与量およびその 1/10 用量を設定した。また、コントロールについては、quercetin に対しては同量の滅菌水を、TCDD に対しては同量の corn oil を投与した。この日を投与 0 日目として、翌日より同量の quercetin を、Experiment 3 では 1、5 および 30 日間、Experiment 4 では 30 日間連続経口投与し、体重変化を測定した。さらに、TCDD の臓器への影響に対する quercetin の効果について検討するため、最終投与翌日に摘出した臓器重量を測定した。

HSP70 発現との関連性

curcumin および quercetin による TCDD 毒性の軽減と HSP70 発現変動との関連性を明らかにするため、毒性軽減時におけ

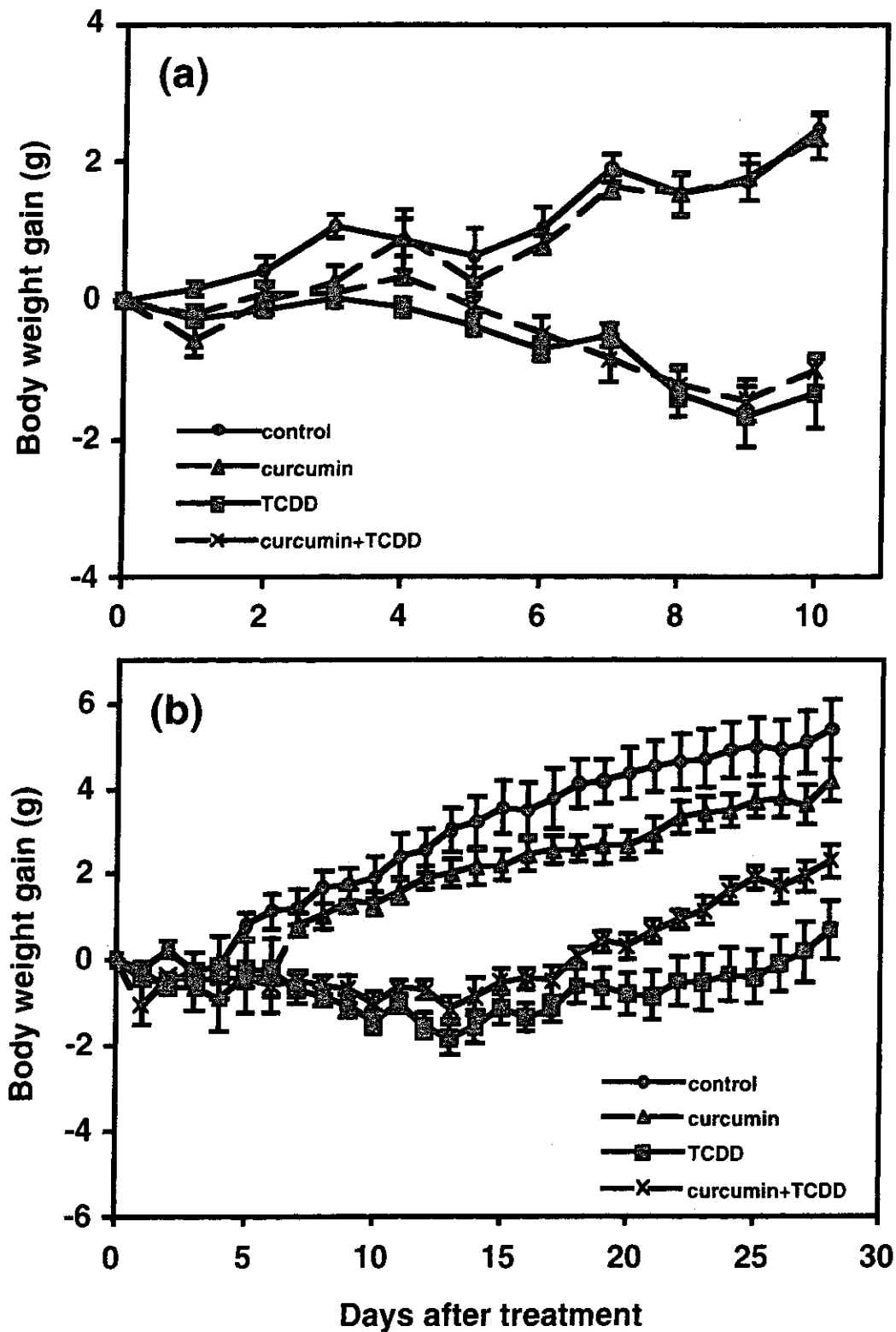


Fig. 1 Change in the body weight gain of C57BL/6J mice after treatment with TCDD and/or curcumin. Each value represents the mean \pm S. E. of surviving mice. Significantly different from TCDD: *, $p < 0.05$. (a) Experiment 1, (b) Experiment 2.

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

Treatment	Liver	Thymus	Spleen
	(% of body weight)		
Experiment 1			
Control (5)	5.73 ± 0.13	N. D.	N. D.
Curcumin (5)	5.94 ± 0.09**	N. D.	N. D.
TCDD (5)	7.09 ± 0.21***	N. D.	N. D.
Curcumin +TCDD (5)	7.19 ± 0.06***	N. D.	N. D.
Experiment 2			
Control (5)	5.40 ± 0.11	0.16 ± 0.02	0.28 ± 0.01
Curcumin (4)	5.45 ± 0.12	0.16 ± 0.01	0.27 ± 0.01
TCDD (7)	8.14 ± 0.24***	0.04 ± 0.01***	0.32 ± 0.04
Curcumin +TCDD (5)	7.28 ± 0.28**	0.06 ± 0.00***	0.28 ± 0.02

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

N. D.: no data.

る HSP70 mRNA 発現量を半定量的 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法にて検討した。先の検討 (Experiment 2 および Experiment 3) にて処理されたマウスの肝臓もしくは小腸より total RNA を調製し、さらに逆転写反応を行って cDNA を作製した。これを鋳型としてストレス誘導性の HSP70 isoform である HSP70.1 に特異的な primer (Table 3) を用いて PCR を行ない、mRNA の発現量を検討した。なお、内標準としてハウスキーピング遺伝子である β -actin の mRNA 量を定量し、これに対する HSP70.1 mRNA の相対量を算出した。

Ah-receptor 活性化との関連性

curcumin や quercetin による毒性軽減と AhR の機能的変化との関連性について検

討するため、AhR 依存的な誘導機構で制御される CYP1A1 の活性の指標である ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 活性を測定した。

本検討を行うにあたり、9,000 x g 上清による EROD 活性測定の至適条件の検討を行った結果 (成績未掲載)、コントロール群、curcumin 処理群および quercetin 処理群では、タンパク質濃度 100 μ g、反応時間 3 分間であるのに対し、TCDD 単独処理群および併用群では、タンパク質濃度 20 μ g、反応時間 2 分間が適切であると考えられた。そこで、先の検討 (Experiment 2 および Experiment 3) にて処理されたマウスの肝臓より 9,000 x g 上清を調製した後、上記の条件のもと EROD 活性を測定した。

酸化ストレスとの関連性

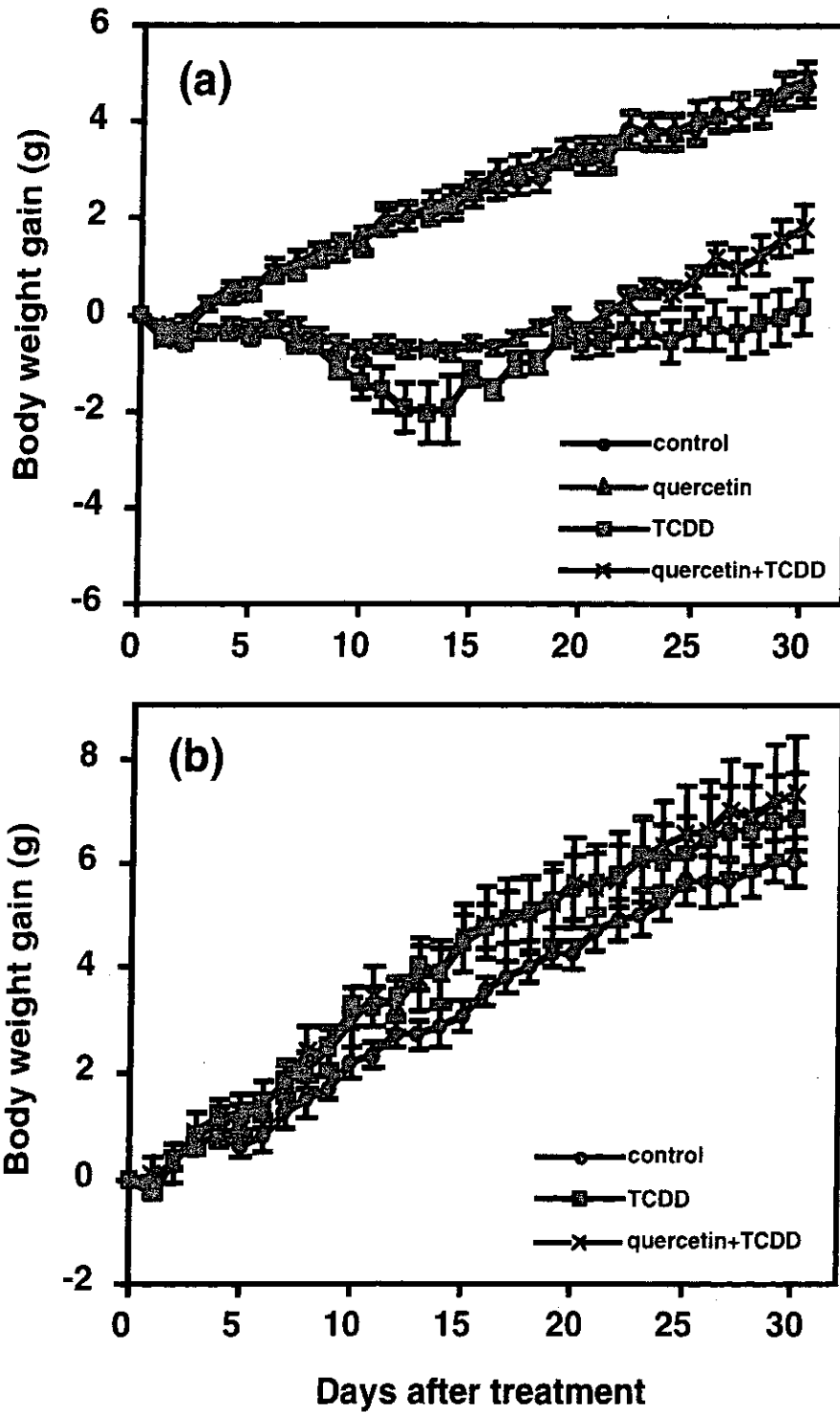


Fig. 2 Change in bodyweight gain of C57BL/6J mice after treatment with TCDD and/or quercetin. Each value represents the mean \pm S. E. of surviving mice. Significantly different from TCDD: *, $p < 0.05$. (a) Experiment 3, (b) Experiment 4.

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

Treatment	Liver	Thymus	Spleen	Kidney
	(% of body weight)			
Experiment 3				
1 day				
Control (4)	5.91 ± 0.11	0.26 ± 0.00	0.29 ± 0.02	1.30 ± 0.03
Quercetin (4)	6.01 ± 0.14	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.01	1.31 ± 0.01
TCDD (4)	6.37 ± 0.06**	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.02	1.33 ± 0.02
Quercetin +TCDD (4)	6.02 ± 0.07†	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.35 ± 0.02
5 days				
Control (4)	5.80 ± 0.11	0.22 ± 0.02	0.27 ± 0.01	1.35 ± 0.03
Quercetin (4)	5.97 ± 0.18	0.24 ± 0.01	0.28 ± 0.01	1.36 ± 0.03
TCDD (4)	7.48 ± 0.06***	0.09 ± 0.01***	0.26 ± 0.02	1.41 ± 0.04
Quercetin +TCDD (4)	7.85 ± 0.19***	0.10 ± 0.01***	0.28 ± 0.01	1.39 ± 0.03
30 days				
Control (10)	5.20 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.24 ± 0.01	1.29 ± 0.02
Quercetin (10)	5.05 ± 0.05	0.17 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.25 ± 0.02
TCDD (9)	7.89 ± 0.34***	0.07 ± 0.01***	0.26 ± 0.01	1.38 ± 0.01*
Quercetin +TCDD (10)	6.87 ± 0.27***†	0.07 ± 0.01***	0.26 ± 0.01	1.32 ± 0.01
Experiment 4				
Control (5)	5.09 ± 0.06	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.31 ± 0.01
TCDD (5)	6.03 ± 0.09***	0.12 ± 0.00***	0.26 ± 0.00	1.31 ± 0.03
Quercetin +TCDD (5)	6.15 ± 0.09***	0.12 ± 0.01***	0.26 ± 0.01	1.25 ± 0.03

The values represent the mean ± S. E. of surviving mice. The number of the sample is shown in parenthesis. Significantly different from control: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Significantly different from TCDD: †, $p < 0.05$.

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、肝臓における脂質過酸化の指標である thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 値を測定した。先の検討 (Experiment 2 および Experiment 3) にて処理されたマウスの肝臓よりホモジネートを調製した後、TBARS

値を測定し、肝臓における酸化ストレスの程度を評価した。

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による体重増加抑制および臓器毒性に対する影響

TCDDの毒性に対する curcumin の影響を検討するため、TCDDの一般的な毒性指標の一つである体重増加抑制現象に注目し検討を行った。Fig. 1に、投与0日目の体重を基準とした体重の経日変化を示す。Experiment 1では、TCDD単独投与群および curcumin 併用群において、コントロール群および curcumin 単独処理群に比べ体重増加の抑制が観察された (Fig. 1(a))。しかし、TCDD単独投与群と curcumin 併用群との間に差は認められなかった。一方、Experiment 2においても、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体重増加抑制が認められたが (Fig. 1(b))、curcumin 併用群では、投与20日目以降、TCDD単独投与群に比べ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。また、TCDDの臓器への影響に対する curcumin の効果を検討するため、最終投与翌日に摘出した臓器の湿重量を測定した結果 (Table 1)、両検討において既報と同様 TCDD単独処理により有意な肝肥大および胸腺の萎縮が認められたが、curcumin 併用による有意な軽

減効果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を行った。Fig. 2には、投与0日目の体重を基準とした体重の経日変化を示している。Experiment 3の場合 (Fig. 2(a))、投与3日目以降、TCDD単独投与群および quercetin 併用群において、コントロール群および quercetin 単独処理群に比べ有意な体重増加の抑制が観察された。しかし、投与20日目以降、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。これに対し、Experiment 4 (Fig. 2(b)) では、いずれの処理群においても対照群と同様な体重増加が観察され、quercetin の併用による体重変化への影響は認められなかった。次に、TCDDの臓器への影響に対する quercetin の効果について検討するため、最終投与翌日に摘出した臓器重量を測定した (Table 2)。その結果、両検討 (Experiment 3/4) において、TCDD単独投与群では有意な肝臓の肥大が認められた。これに対し、quercetin 併用群では、Experiment 3における投与期間が1日間および30日間の実験において肝肥大が軽減することが明らかとなった。一方、胸腺の萎縮については、いずれの検討においても、quercetin 併用による効果は認められなかった。さらに、

Table 3 Primers and product size

Gene		Primer sequence	Product size (bp)
HSP70.1	sense	5'- TAA TGT TGG GAG CAC TGT -3'	325
	antisense	5'- AGG GTG GCA GTG TAG ACA TGT A -3'	
β -actin	sense	5'- CAC CAT GTA CCC AGG CAT TGC -3'	194
	antisense	5'- AGG GGC CGG ACT CAT CGT ACT -3'	

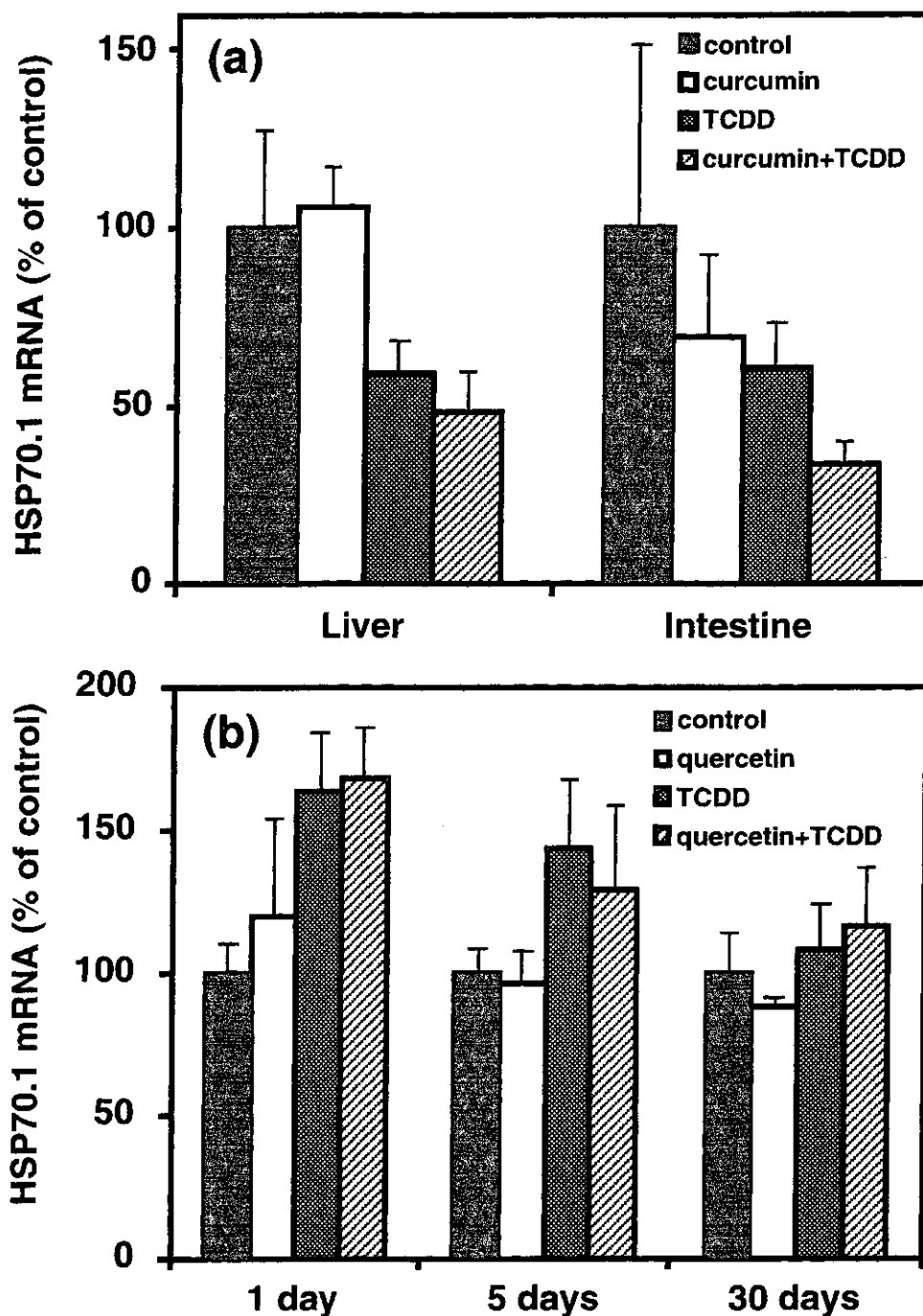


Fig. 3 Effect of curcumin (a) or quercetin (b) on the expression of HSP70.1 mRNA. Relative abundance of HSP70.1 mRNA estimated by semi-quantitative RT-PCR. (a) Hepatic and intestinal HSP70.1 mRNA level treated with TCDD and/or curcumin. Each bar represents the mean \pm S. E. of 4-6 mice. (b) Hepatic HSP70.1 mRNA level treated with TCDD and/or quercetin. Each bar represents the mean \pm S. E. of 4 mice.

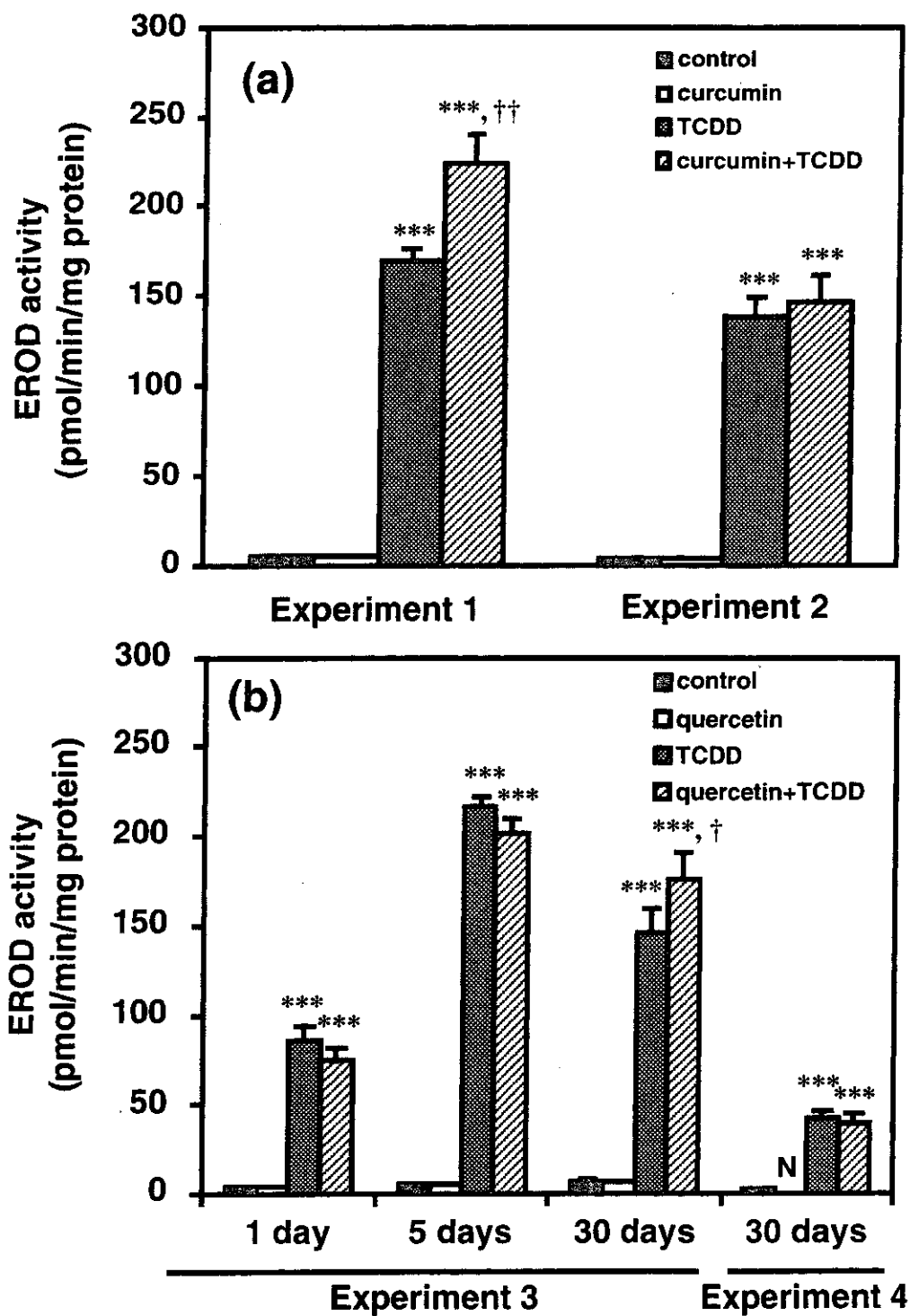


Fig. 4 Effect of curcumin (a) or quercetin (b) on hepatic ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity of C57BL/6J mice treated with TCDD. Each value represents the mean \pm S. E. Significantly different from control: ***, $p < 0.001$. Significantly different from TCDD: †, $p < 0.05$; ††, $p < 0.01$. N: not determined.

Experiment 3 における投与期間 30 日間の実験において、TCDD 単独処理群で腎臓重量の有意な増加が認められたが、この増加は quercetin の併用により軽減されることが明らかとなった。

HSP70 発現との関連性

本研究を行うにあたり、我々は、HSP70 誘導がダイオキシン類の毒性を軽減する可能性があるかと仮定した。その作業仮説のもと HSP70 誘導剤である curcumin および HSP70 生合成阻害剤である quercetin を用いて検討を行ったが、両検討とも TCDD による体重増加抑制を軽減する傾向を示すことが明らかとなった。そこで、curcumin および quercetin による TCDD 毒性の軽減と HSP70 発現変動との関連性を明らかにする

ため、毒性軽減時における HSP70 mRNA 発現量を半定量的 RT-PCR 法にて検討した。その結果、curcumin 併用実験の場合 (Experiment 2)、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肝臓および小腸における HSP70.1 mRNA 量が低下する傾向にあることが明らかとなった (Fig. 3(a))。しかし、両群の HSP70.1 mRNA 発現量に差は認められなかった。一方、quercetin 併用実験の場合 (Experiment 3)、投与期間 1 日間および 5 日間における実験では、TCDD 単独処理群および quercetin 併用群において、コントロール群に比べ HSP70.1 mRNA の発現量は増加傾向を示した (Fig. 3(b))。しかし、投与期間 30 日間の実験では、HSP70.1 の発現量はいずれの投与群においても同程

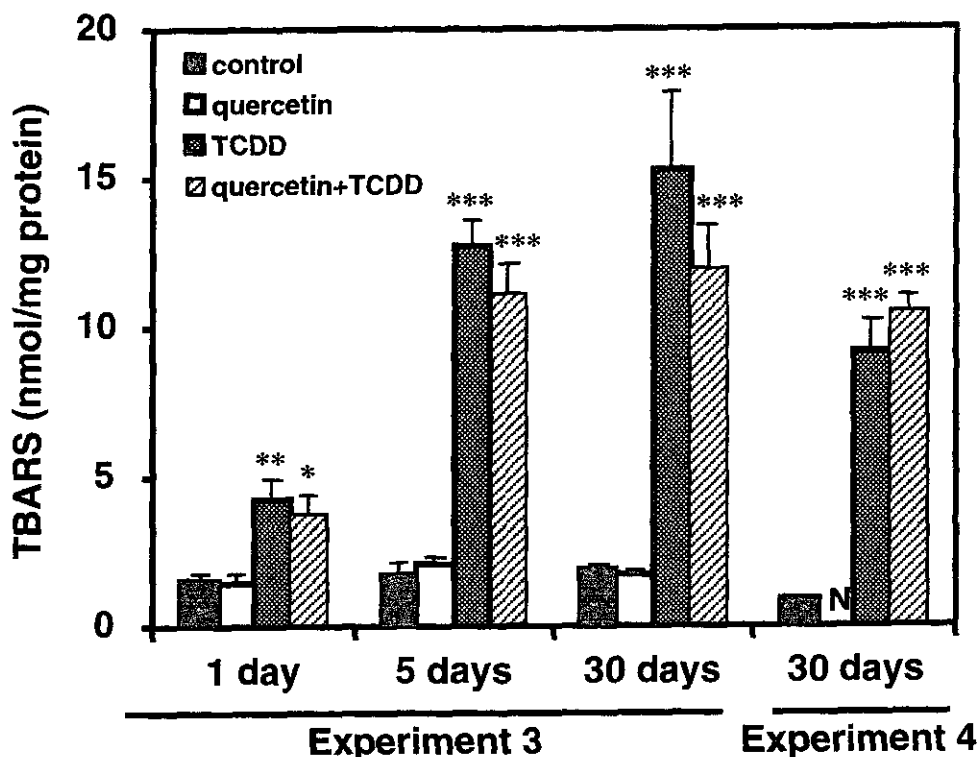


Fig. 5 Effect of quercetin on lipid peroxidation in liver of C57BL/6J mice treated with TCDD. Each value represents the mean \pm S. E. Significantly different from control: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$. N: not determined.

度であった (Fig. 3(b))。以上の結果から、curcumin および quercetin によるダイオキシン類の毒性軽減において、HSP70 の発現変動は関与しない可能性が示唆された。

Ah-receptor 活性化との関連性

curcumin や quercetin は、AhR に対して親和性を有し、agonist もしくは antagonist 作用を示すことが報告されている。そこで、curcumin や quercetin による毒性軽減と AhR の機能的変化との関連性について検討するため、AhR 依存的な誘導機構で制御される CYP1A1 の活性の指標である EROD 活性を測定した。その結果、Experiment 1 では、TCDD 単独処理群および curcumin 併用群において、コントロール群に比べ有意な活性の上昇が認められ (Fig. 4(a))、さらに、curcumin 併用群では 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。これに対し、Experiment 2 では、TCDD 単独処理群および curcumin 併用群において、Experiment 1 と同様コントロール群に比べ有意な活性の上昇が認められたが (Fig. 4(a))、両群間に差は認められなかった。一方、quercetin 併用実験の場合、Experiment 3 では、いずれの投与スケジュールにおいても、TCDD 投与群および quercetin 併用群において、コントロール群に比べ有意な活性の増加が認められた (Fig. 4(b))。さらに、投与期間 30 日間では、quercetin 併用群における 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。これに対し、Experiment 4 では、quercetin 併用による変化は認められなかった (Fig. 4(b))。以上の結果より、curcumin および quercetin による TCDD 毒性軽減には、AhR 活性化阻害以外の機構が関与する可能性が示唆された。

酸化ストレスとの関連性

TCDD を処理した動物の体内では、肝脂質過酸化の亢進や DNA 障害および superoxide anion の発生等の酸化ストレスの発生を示唆する報告がなされている。一方、quercetin は、脂質過酸化の阻害、superoxide anion の捕捉および lipid peroxy radical の減少等の抗酸化作用を有することが知られている。そこで、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、肝臓における脂質過酸化の指標である TBARS 値を測定した。その結果、Experiment 3 での全ての投与スケジュールにおいて、quercetin 併用群における TBARS 値は、TCDD 単独投与群に比べてわずかに減少する傾向にあるものの、顕著な効果を示さないことが明らかとなった (Fig. 5)。これに対し、Experiment 4 では、quercetin 併用による TBARS 値の変化は認められなかった。以上の結果から、quercetin による TCDD 毒性軽減において、その抗酸化作用の寄与は少ないものと考えられた。

D. 考察

本研究では、HSP70 の発現変動とダイオキシン類の毒性との関連性について検証するため、HSP70 の誘導剤である curcumin および HSP70 生合成阻害剤である quercetin を用いて、C57BL/6J 系雄性マウスにおける TCDD 毒性への影響を検討した。その結果、curcumin および quercetin は、TCDD の毒性の一部である体重増加抑制を軽減する傾向にあり (Fig. 1 and 2)、さらに quercetin は、TCDD による肝肥大を軽減する傾向にあることが明らかとなった (Table 1 and 2)。また、TCDD の毒性軽減に関与する機構を明らかにするため、HSP70 の発現変動、AhR の活性化および酸化ストレス発生に着目し検討

を行ったが、いずれの指標においても curcumin および quercetin による毒性軽減効果を説明することはできなかった (Fig. 3, 4 and 5)。

HSP70 family については、現在、マウスにおいて少なくとも7種類の遺伝子が発見されており、それぞれが分子シャペロンとしての機能を有することが明らかとなっている。本研究ではストレス誘導性である HSP70.1 mRNA の発現変動と TCDD 毒性との関連性について検討を行った。しかし、いずれの検討においても TCDD 処理群における HSP70.1 mRNA の有意な増加は確認できなかった (Fig. 3)。また、HSP70 は摂餌量の減少に対応して誘導されることが報告されているが、今回行った全ての検討における TCDD 処理群の摂餌量はコントロール群と同程度であったため (データ未掲載)、その影響は少ないと考えられた。本検討では、TCDD により HSP70.1 mRNA が誘導されなかった原因を明らかにすることはできなかった。しかし、かつて当研究室で明らかにしたダイオキシン類による HSP70 の誘導は、PCB126 処理による Wistar 系雄性ラット肝臓におけるものであったことから、ダイオキシン類によるストレスの発生の程度およびストレスに対する応答の動物種差が要因の一つではないかと考えられる。

本研究では、更に TCDD による AhR の活性化や酸化ストレスの亢進に注目し検討を行ったが、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。TCDD は生体に曝露された場合、肝臓や脂肪組織に蓄積され易いため、その毒性は、持続的に起こる作用の蓄積によって生じた結果であると予想される。一方、quercetin を経口投与した場合、約 20% が消化管から吸収され、未吸収体の 30% 以上が分解されて CO₂ に変換され、残

りの 30% 以上が未変化体のまま糞中に排泄されると報告されている。また、吸収された quercetin は、quercetin そのものあるいはメチル化代謝物に変換されたのち、グルクロン酸抱合体あるいは硫酸抱合体となり胆汁中や尿中に排泄されることから、quercetin による作用は一過性のものであることが予想される。従って、curcumin と quercetin の両化合物が弱い毒性軽減効果を示すのみであるのは、生体内半減期が短い点や活性体の障害部位への集積が少ないこと等が原因である可能性も否定できない。

TCDD は、種々の遺伝子の発現変動を起こす以外にも、様々な変化を細胞にもたらすことが知られているが、その一つとして、tyrosine kinase 活性および protein kinase C 活性の上昇が報告されている。また、epidermal growth factor receptor のリン酸化も TCDD により惹起されることが明らかとなっている。これらのタンパク質は、細胞内のシグナル伝達に関わる酵素群の一種であり、細胞の増殖や分化、さらに細胞死を司るシグナル伝達経路で重要な働きを担う因子である。さらに、これらは、適宜その活性を正負に制御されることで、生体の恒常性を保っていると考えられている。このため、TCDD がこれらの因子に作用することにより、安定に保たれたシグナル伝達のネットワークを崩し、その結果が毒性として現れるのではないかと考えられる。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のではないかと考えられる。

E. 総括

以下に、本研究で得られた知見を要約して示す。

1. Curcumin の併用は、TCDD 100 µg/kg を処理した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。これに対し、TCDD 200 µg/kg では、curcumin による軽減効果は認められなかった。また、いずれの投与実験においても、TCDD による臓器毒性に対する curcumin の影響は観察されなかった。

2. Quercetin の併用は、TCDD 100 µg/kg を処理したマウスに観察される体重増加抑制を軽減する傾向を示し、さらに、肝肥大を有意に軽減することが明らかとなった。これに対し、TCDD 10 µg/kg では、quercetin による同様の効果は観察されなかった。

3. 肝臓もしくは小腸における HSP70.1 mRNA 量を定量した結果、HSP70 の発現変動と curcumin および quercetin による TCDD 毒性軽減との間に関連性を見出すことはできなかった。

4. 肝臓における AhR 活性化の指標である EROD 活性を測定した結果、curcumin および quercetin による TCDD 毒性軽減との間に関連性を見出すことはできなかった。また、TBARS 値の結果からも、quercetin 併用による毒性軽減機構を明らかにすることはできなかった。

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ため、我々の食生活に深い関わりを持っている。そのため、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。curcumin および quercetin による TCDD 毒性軽減機構については不明な点も多いが、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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

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 11 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

ダイオキシン類およびダイオキシン受容体による肺がん由来細胞増殖促進作用

分担研究者 手塚 雅勝 日本大学薬学部 衛生化学教室 教授
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

研究要旨 昨年度、我々はダイオキシン類の曝露あるいはダイオキシンレセプター(AhR)の活性化が細胞周期制御に関連した転写因子であるE2Fを活性化し、その結果、様々な細胞周期関連遺伝子の発現が誘導されることを明らかにした。そこで本年度はAhRとE2Fとの複合体の形成に関して検討を行った。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

i) リポーター遺伝子アッセイ

50~70% confluent の状態のA549細胞または293細胞に、リポーター遺伝子、発現

ベクターおよび内部標準ベクターであるpRLベクター (Promega) をリポソーム法により導入した。導入48時間後、PBSで細胞を洗い、Passive Lysis Buffer (Promega) で細胞を溶解した。次いで検体中のルシフェラーゼ活性を、Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (Promega) を用いて測定した。

ii) 免疫沈降法

50~70% confluent の状態のA549細胞または293細胞をディッシュより剥離した後、KRP bufferに懸濁した。ボルテックスにより細胞を破壊した後遠心し、得られた上清に抗体を添加した。一定時間反応後、protein G sepharoseを添加しさらに反応を続けた。タンパク質複合体をその後、SDS添加により反応をとめ、電気泳動ならびにウエスタンブロッティング法により目的タンパク質の存在を確認した。

C. 研究結果

エンハンサー部位に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の発現ベクターとともにA549細胞中にトランスフェクションした。その

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 (図1)。また、この上昇は、AhR あるいは Arnt 単独では見られなかった。その一方で E2F の存在は AhR/Arnt の XRE 配列に対する転写活性を低下させた (図2)。E2F、AhR ならびに Arnt を過剰発現させ免疫沈降を行ったところ、E2F と AhR/Arnt の共沈が確認された (図3)。

D. 考察

AhR を過剰発現したヒト肺ガン細胞において、増殖速度の増加および細胞周期における S 期への移行速度の増加が明らか

となっている (平成14年度研究報告書にて報告済み)。本検討結果から、AhR/Arnt は E2F と複合体を形成し、E2F の転写活性を上昇させることが示され、この相互作用がダイオキシン類による発がんプロモーター作用のメカニズムの一部であると推察された。

E. 総括

A549 細胞を用いて AhR および Arnt 共存下における E2F 依存的なルシフェラーゼ活性を観察した結果、AhR および Arnt のタンパク質複合体が E2F 依存的な転写

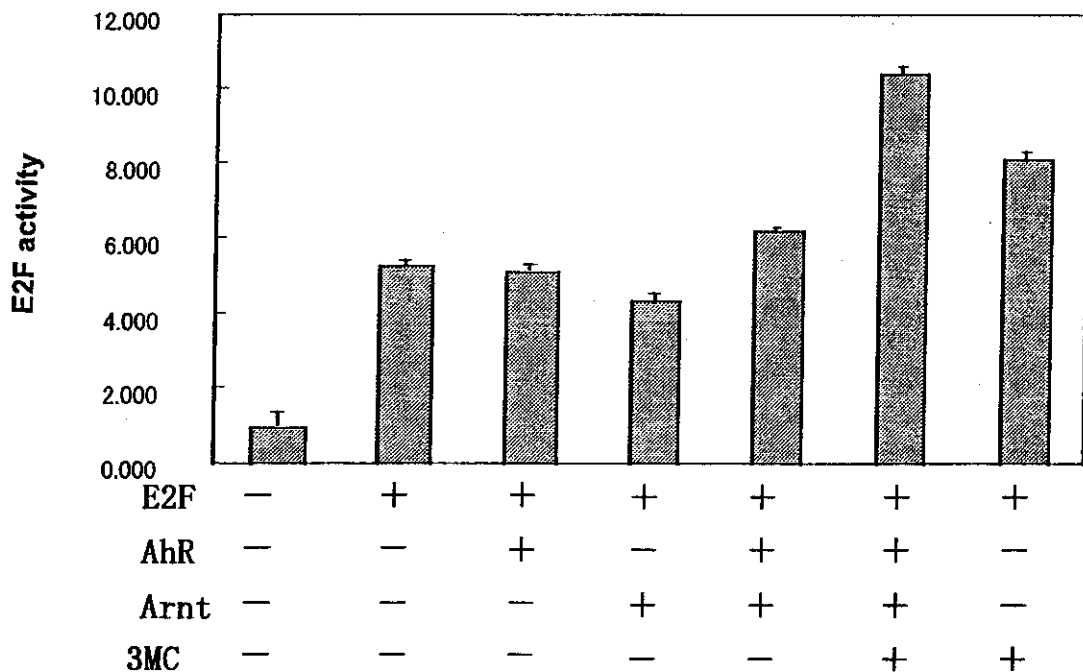


図1 AhR/ArntによるE2F活性の促進

エンハンサー部位に 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 の発現ベクターととともに A549 細胞中にトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

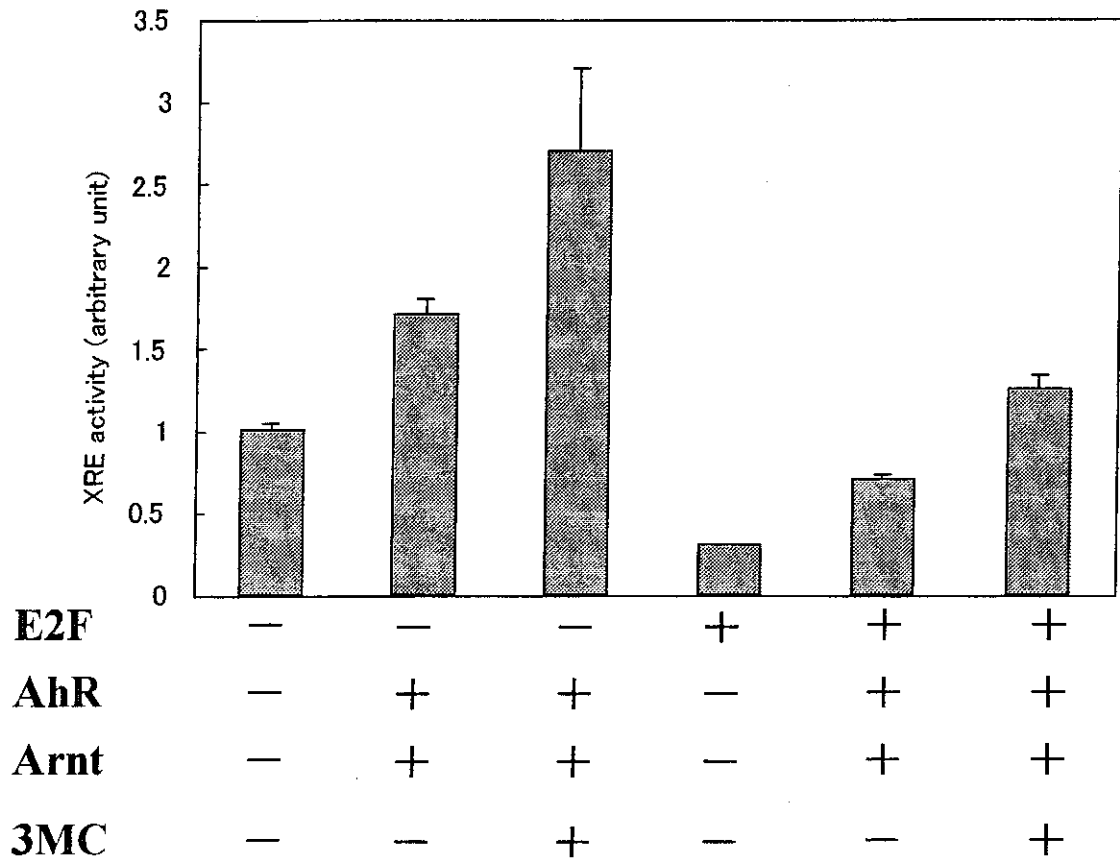


図2 E2FによるAhR/Arnt活性の抑制

エンハンサー部位にAhR/Arnt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の発現ベクターとともにA549細胞中にトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

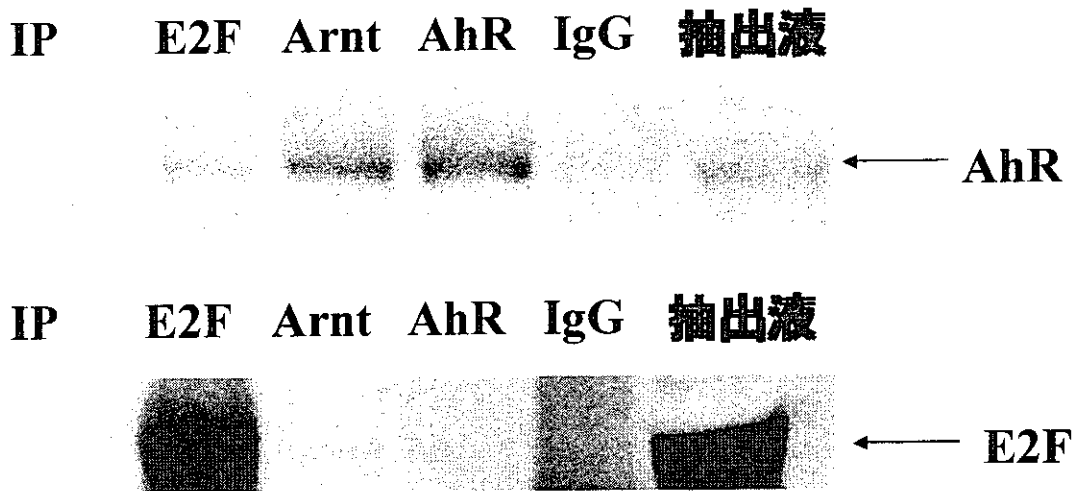


図3 免疫沈降法によるAhR/Arnt/E2Fの複合体の解析

E2F, AhRならびにArntの発現ベクターを293細胞中にトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後に細胞抽出液を調製し、免疫沈降を行った。各タンパク質の存在は、SDS/電気泳動ならびにウエスタンブロットティングにより検出した。

活性を上昇させることが明らかとなった。一方、E2Fは、AhR/Arntの転写活性を低下させることも明らかとなった。さらに、免疫沈降の結果から、AhR/Arntタンパク質複合体とE2Fとの相互作用も示唆された。この相互作用がダイオキシン類によるプロモーター作用の一端を担っていると予想される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (仙台, 2003年12月)
3. 第26回日本分子生物学会年会 (神戸, 2003年12月)
4. 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
特許出願 ”ダイオキシン類の検出法” (2004-05731)。

20031309

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
P. 32の「G. 研究発表 1. 論文発表」をご参照ください。