

Ema, M. and Harazono, A. (2001)
Toxic effects of butyltin
trichloride during early
pregnancy in rats. *Toxicol. Lett.*,
125, 99-106.

Harazono, A. and Ema, M. (2001)
Effects of 4-tert-octylphenol on
initiation and maintenance of
pregnancy following oral
administration during early
pregnancy in rats. *Toxicol. Lett.*,
119, 79-84.

Ema, M. and Miyawaki, E. (2001)
Effects on progesterone on
suppression of uterine
decidualization and implantation
failure induced by triphenyltin
chloride in rats. *Cong. Anom.*, 42,
106-111.

前川京子、小出達夫、齋藤博幸、原
園 景、江馬 眞、谷本 剛、岡田
敏史 (2001)、エルカトニン製剤
の含有評価、医薬品研究、32, 465-
471.

小泉睦子、江馬 眞、広瀬明彦、黒
川雄二、長谷川隆一 (2001) フタル
酸エステルの生殖・発生無毒性量、
精巣毒性の週齢差、種差および DEHP
の 1 日耐用摂取量、日本食品化学会
雑誌 8, 1-8.

Ema, M. and Miyawaki, E. (2000)
Adverse effects of dibutyltin
dichloride on initiation and
maintenance of rat pregnancy.
Reprod. Toxicol. 14, 451-456.

Ema, M., Miyawaki, E. and
Kawashima, K. (2000). Effects of
dibutylphthalate on reproductive
function in pregnant and
pseudopregnant rats. *Reprod.*
Toxicol. 14, 13-19.

Ema, M., Miyawaki, E. and

学会発表

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

Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Yoko
Hirabayashi, Toyozo Kaneko, Makoto
Ema and Jun Kanno, The 23rd

International Symposium on
halogenated Environmental
Organic Pollutants and POPs.

USA, 2003 年 8 月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ダイオキシンの胎生期・授乳期曝露のサル児の生後発育に及ぼす影響

安田 峯生 広島国際大学保健医療学部 教授

研究要旨

妊娠 20 日から生後 90 日まで、母体に 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) 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、生後発育を観察したところ、300 ng/kg で 10 例中 5 例に乳歯や永久歯胚の欠如が認められた。妊娠 80 日における母体血漿中 TCDD 濃度を分析したところ、歯異常児の母体では歯正常児母体に比べて TCDD 濃度が高かった。

A. 研究目的

PCB やダイオキシンの胎生期曝露がヒトの歯の形成、発育に悪影響を及ぼしているとの疫学調査報告がある。本研究は、胎生期・授乳期にダイオキシン曝露を受けたアカゲザル児の歯の形成と発育を調べ、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。妊娠動物は自然分娩させ、児 (F1a) を哺育させた。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続けた。F1a の離乳後、期間において母体を再度交配し、同様に TCDD を負荷して、第 2 産児 (F1b) を得た。F1a については生後約 1000 日、F1b については生後約 200 日に軽麻酔下で児の歯を肉眼および X 線により観察した。なお、300 ng/kg では新しい母体を数匹追加し、これらより生まれた F1a は生後約 200 日に観察した。また、妊娠 80 日の時点で採血し、 -80°C で保存してあった母体血漿の TCDD 濃度をガスクロマトグラフィー質量分析計で測定した。

(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

観察できた生存児は、F1a では対照群 13 例、30 ng/kg 群 12 例、300 ng/kg 群 8 例、300 ng/kg 追加群 2 例、F1b では対照群 11 例、30 ng/kg 群 10 例、300 ng/kg 群 10 例である。対照群および 30 ng/kg 群では乳歯および永久歯胚に異常は認められなかった。これに対して、300 ng/kg 群では 4 例、300 ng/kg 追加群では 1 例に歯あるいは歯胚の欠如が見出された。欠如していたのは上顎乳中・側切歯、上顎永久側切歯胚、下顎永久中切歯胚などで、犬歯や臼歯には欠如はみられなかった。F1b では乳歯の観察のみ可能であったが、全群で明らかな異常は認められなかった。母体の血漿中 TCDD 濃度は、対照群では検出限界以下、30 ng/kg 4 例の平均値 \pm 標準偏差は 0.20 ± 0.01 pg/g (湿重量) であった。300 ng/kg では測定値が $1.1 \sim 8.7$ pg/g とばらついてはいたが、児に歯異常が認められなかった 6 母体の平均値 \pm 標準偏差が 1.98 ± 0.88 pg/kg であったのに対し、児に歯の異常があった 5 母体の平均値は 5.42 ± 2.48 pg/kg で、異常のない母体よりも有意に高かった。

D. 考察

げっ歯類でダイオキシン類の胎生期・授乳期曝露により歯の形成異常が誘発され、歯はダイオキシン類の発生障害作用に感受性の高い器官と考えられている。ヒトでも油症患者やセベソ事故被曝者の追跡調査で、ダイオキシン類に体内で曝露さ

れた児には歯の欠損や石灰化不全が多発することが報告されている。本実験結果から、TCDD300 ng/kgの母体負荷が児の歯形成を障害することが明らかになった。本実験の TCDD 曝露期間は歯原基形成前から永久歯胚形成期に及び、乳歯、永久歯ともに欠如が誘発されたことは、発生段階の点から TCDD の影響によるものと考えてよい。また、300 ng/kg 群でも、胎児歯形成期の母体血中 TCDD 濃度が高かった例で 歯異常が多発している結果からも、観察された異常が TCDD によるものであることが伺える。本研究では経費の点から用量段階を 30 ng/kg と 300 ng/kg に絞らざるを得なかったが、これらの量はげっ歯類における TCDD の最小毒性体内負荷量 (LOAEL) 86 ng/kg の約 1/3 と約 3 倍に相当する。300 ng/kg 負荷で高率に歯の形成障害が誘発されたが 30 ng/kg では障害作用が認められなかった本実験結果は、アカゲザルにおける TCDD の LOAEL がげっ歯類におけるそれとほぼ同じ桁にあることを示唆している。

E. 結論

TCDD の胎生期・授乳期曝露は児の歯の形成を障害する。その LOAEL はげっ歯類における発生毒性のそれとほぼ同じ桁にあると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 安田峯生, 隅田寛, 佐藤利夫, 井上尚彦: マウス胎児における外脳誘発による口蓋裂の予防. 河合幹, 夏目長門 編, 口唇口蓋裂における基礎研究と予防の現状, ネオ・メディク, 名古屋, 2004, pp 231-236.
- 2) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 431-434, 2003.
- 3) Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Yasuda M: Renal fibrosis induced by *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 453-456,

2003.

2. 学会発表

- 1) 安田峯生, 隅田寛, 松葉美鈴, 杉原数美, 岡村さおり, 山下敬介, 関澤潤: インディルビンによるダイオキシン毒性の修飾. 環境ホルモン学会第 6 回研究発表会要旨集, 323 (抄録), 2003. (環境ホルモン学会第 6 回研究発表会, 2003 年 12 月 2-3 日, 仙台)
- 2) 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, 関澤潤: Indirubin の生体内代謝と AhR 結合活性の変動. 環境ホルモン学会第 6 回研究発表会要旨集, 228 (抄録), 2003. (環境ホルモン学会第 6 回研究発表会, 2003 年 12 月 2-3 日, 仙台)
- 3) 隅田寛, 上塚翼, 安田峯生, 山下敬介, 角崎英志, 井上稔: 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) の胎児・授乳期曝露を受けたアカゲザル肝細胞の形態解析. 環境ホルモン学会第 6 回研究発表会要旨集, 325 (抄録), 2003. (環境ホルモン学会第 6 回研究発表会, 2003 年 12 月 2-3 日, 仙台)
- 4) 安田峯生, 松葉美鈴, 隅田寛: C57BL マウスの口蓋ヒダ. 日本解剖学会第 58 回中国・四国地方会要旨集, 17 (抄録), 2003. (日本解剖学会第 58 回中国・四国地方会, 2003 年 11 月 8-9 日, 松山)
- 5) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 431-434 (Short paper), 2003. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 6) Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Yasuda M: Renal fibrosis induced by *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 453-456 (Short paper), 2003. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)

- 7) Sugihara K, Kitamura S, Okayama T, Kohno Y, Ohta S, Yamashita K, Okamura S, Yasuda M, Saeki K, Matsui S, Matsuda T: Metabolism of indirubin and endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand candidates, and competitive effect with respect to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Organohalogen Compounds*, 65, 134-137 (Short paper), 2003. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 8) 安田以久, 安田峯生, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル歯形成への影響. 第43回日本先天異常学会学術集会要旨集, 118 (抄録), 2003. (第43回日本先天異常学会学術集会, 2003年7月2-4日, 大阪)
- 9) 安田峯生, 安田以久, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル口蓋ヒダ形成への影響. 第43回日本先天異常学会学術集会要旨集, 119 (抄録), 2003. (第43回日本先天異常学会学術集会, 2003年7月2-4日, 大阪)
- 10) 安田峯生, 安田以久, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 山下敬介: アカゲザルの口蓋ヒダ. *Acta Anat Nippon*, 78, Suppl, 220 (抄録), 2003. (第108回日本先解剖学会総会・学術集会, 2003年4月1-3日, 福岡)

H. 財産所有権の出願、登録状況
なし

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、培養も困難なため、一般に解析が難しい。そこで、胚性幹細胞（ES）細胞を用いて TCDD の初期発生過程への影響を調べる系としての有用性を検討した。その結果、ES 細胞において TCDD 添加は ES 細胞のコロニーの分化、未分化状態の維持には影響しないことが明らかとなった。一方、ES 細胞の細胞数には分化、未分化にかかわらず、TCDD により減少が見られたことから、TCDD が ES 細胞の増殖抑制あるいは細胞死を亢進させている可能性が示唆された。また、胚様体（EB）においては TCDD 添加により、細胞数増加が認められ、ES 細胞とは異なった反応性が示すことが示唆された。また、ES 細胞及び EB において Cyp1a1 の増加が認められたことから、ES 細胞が遺伝子レベルで TCDD に反応していることが示された。以上の結果、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。

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。そこで、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 細胞の有用性を検討するため、本年度は、ES 細胞培養系を用いて、主に TCDD の ES 細胞の形態に及ぼす影響を検索した。

B. 研究方法

ES 細胞（E14-2a）をゼラチンコート Dish 上で LIF 存在あるいは非存在 ES 培地で培養した。2, 3, 7, 8-TCDD は DMSO に溶解して、最終濃度 0, 1, 10 あるいは 100nM で添加した。対照群には DMSO を 0.1% の最終濃度で添加し、それぞれ、コロニーの分化状態並びに細胞数を計測した。また、ES 細胞を LIF 非存在 ES 培地で浮遊培養し、4 日後に形成された胚様体（EB）の細胞数を計測した。また、RNA を抽出し、RT-PCR 法により CYP1A1 の誘導を検索し

た。

C. 研究結果

ES 細胞をゼラチンコート Dish 上で LIF が存在下で培養すると対照群では 3 日後で殆ど未分化コロニーであり、TCDD の添加は 1, 10, 100nM 群ともこの未分化コロニー形成率に影響を与えなかった。また、LIF 非存在 ES 培地で ES 細胞を 3 日間、培養すると対照群では殆ど全てのコロニーで分化した。TCDD の添加は 1, 10, 100nM 群ともこの分化コロニー率に影響を与えなかった。また、培養 4 日後に ES 細胞の細胞数を計測した結果、LIF 添加、非添加群とも、TCDD の用量相関的に有意な減少または減少傾向が認められた。また、RT-PCR の結果、LIF 存在下で TCDD 添加 2 日間培養後、TCDD の 1nM から CYP1A1 の増加を確認した。

ES 細胞を LIF が非存在 ES 培地で浮遊培養し、4 日後に形成された胚様体（EB）の細胞数を計測した結果、100nM 群で有意な増加、1, 10nM 群で増加傾向が認められた。また、RT-PCR 法により CYP1A1 の誘導が 1nM 群より確認された。

D. 考察

今回の結果、ES 細胞において TCDD 添加は ES 細胞のコロニーの分化、未分化状態の維持には影響

しないことが明かとなった。一方、ES細胞の細胞数には分化、未分化にかかわらず、TCDDにより減少が見られたことから、TCDDがES細胞の増殖抑制あるいは細胞死を亢進させている可能性が示唆された。また、EBにおいては細胞数増加が認められ、ES細胞とは異なった反応性が示された。ES細胞及びEBにおいてCyp1a1の増加が認められたことから、ES細胞が遺伝子レベルでTCDDに反応していることが示された。以上の結果、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。

E. 結論

TCDDはES細胞培養系において、細胞数を減少させ、EBにおいては増加させた。また、双方で、薬物代謝酵素のCyp1a1の発現を強く誘導した。ES細胞培養系が、ダイオキシンの影響を調べる良い系であることが明かとなった。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

高木篤也、ヒト全MHC遺伝子導入マウス、ヒト型モデル動物、pp79-82、井上達、野田哲生、野本明男編集、シュプリンガーフェアラーク社、2002。

Haraguchi S., Kitajima S., Takagi A., Takeda H., Inoue T. and Saga Y., Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: differential usage of enhancers during development. *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.

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

学会発表

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

Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Yoko Hirabayashi, Toyozo Kaneko, Makoto Ena and Jun Kanno, The 23rd International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. USA, 2003年8月

H. 知的所有権の取得状況

2. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

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 Tg. AC 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く、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 0.1µg/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、生涯観察を行う。

2) プロモーター作用高感受性動物として Tg. AC 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 段階発がん試験の生涯観察を終了し、病理検査を進めている。p53 ヘテロマウス群および野生型動物での中間用量群における腫瘍発生促進傾向が認められたが、全体としては有意差は明瞭ではなかった。

2) 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、動物の SPF 化と TCDD 高感受性系統の C57BL/6 への back cross を継続した。その過程で胃の前胃に発生する乳頭腫が TCDD 経口投与実験の標的として適当であることが示唆され、非単調用量相関性を検討する比較的短期実験として Tg. AC マウスに上記 1) で使用した用量の投与を開始した。

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

本年度は、班研究の最終年度として 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）に関する基礎的データを取りまとめた。C3B6F1 p53 ヘテロ欠失あるいはワイルド マウスを用いた 2 段階発がん試験を終了し、病理学的検索を現在実施中である。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、昨年度来 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、さらに、前胃の乳頭腫が経口投与実験には観測項目として皮膚乳頭腫の代替として使用可能であることが示唆された。前胃の乳頭腫を標的とした Tg.AC マウス経口投与による逆 U 字型用量相関の有無の検証を比較的短期の実験系として実施中である。さらに、副次的所見として戻し交配により B6 背景が濃くなるに連れて、胸腺腫（胸腺リンパ腫）の発生が高率となり、歯芽腫および前胃乳頭腫と近い発生率・発生時期を示すことが判明した。

3) 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（別添参照）。

E. 結論

In vivo のプロモーター試験については実験

が終了し、低用量における非単調用量相関の存在が示唆され、追加確認実験を実施中である。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、用いる細胞株のバラエティーの増加を含めデータの蓄積を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

○Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies. Environ Health Perspect. 2003 Sep;111(12):1550-8.

○Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. Environ Health Perspect. 2003 Sep;111(12):1530-49.

Yoon BL, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. Environ Health Perspect. 2003 Aug;111(11):1411-20.

○Matsunaga N, Kanno J, Yoshimura I A statistical method for judging synergism: Application to an endocrine

disruptor animal experiment- Synergism in endocrine disruptor studies, *Environmetrics* 2003, Volume 14, Issue 2, : 213-222

○ Kanno J, Reverse toxicology as a future predictive toxicology, T. Inoue, W.D. Pennie Eds, *Toxicogenomics*, pp.213-218, Springer-Verlag Tokyo, 2002

○ Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Kanno J, Kim DY, Fujii-Kuriyama Y, Inoue T. Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity. *Toxicol Sci.* 2002 Nov;70(1):150-6.

Utsuyama M, Kanno J, Inoue T, Hirokawa K. Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice. *Toxicol Lett.* 2002 Sep 5;135(1-2):145-53.

2. 学会発表

菅野 純「分子標的」と「全遺伝子トキシコゲノミクス」、がん分子標的治療研究会

菅野 純、「トキシコゲノミクスの現状」、第 30 回トキシコロジー学会学術年会ワークショッププロテオミクスとトキシコゲノミクスの現状と問題点」

菅野 純、「トキシコゲノミクスの新展開」、第 26 回日本学術会議トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム

Jun Kanno, *Toxicogenomics -A phenotype*

independent approach-, Annual Meeting of Korean Society of Toxicology, Oct 30, 2003, Seoul, Korea

菅野純、「IGS ラットを用いたトキシコゲノミクス」、CD(SD)IGS 研究会/研究集会

Jun Kanno “Focusing on Toxicogenomics Research” The 3rd International Congress of Asian Society of Toxicology : ASIATOX III February 1-6, 2004, Bangkok / Chiang Mai, Thailand

H. 知的財産権の出願・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

平成 15 年度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

細胞アレイを指標とした発がん評価

矢守隆夫（財）癌研究会癌化学療法センター分子薬理部

研究要旨

TCDD、TCDF など 11 種のダイオキシン類に関して、39 系のがん由来培養細胞株からなるがん細胞パネルにおいて、増殖阻害効果の検討を行った。ダイオキシン類は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。さらに、新たな 31 系のがん由来培養細胞株において TCDD、TCDF の増殖阻害効果を検討した結果、TCDF にみられた顕著な細胞増殖阻害効果は普遍的なものであることが分かった。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

「がん細胞パネル法」は、本来抗がん剤探索研究のために開発された Wet and Dry の化学物質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、化学物質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学物質評価系である。すなわち、数 10 系（現状で約 70 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かがあらかじめデータベース化

されており、被験化学物質に対するがん細胞パネルでの感受性データを測定することで、インフォマティクスによりその化学物質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。化学物質をがん細胞と 48 時間接触後、各細胞に対する 50%増殖阻害濃度を求め、これを統計処理して偏差値を求めグラフ化することによって、その化学物質固有の Finger Print が得られる。化学物質間で 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、TCDD および TCDF の 42 種がん細胞パネルにおける増殖阻害効果の比較および Finger Print の解析を行った。42 種がん細胞パネルは、乳がん 10 系、胃がん 21 系および肝がん 11 系よりなる。

C. 研究結果：

前年度までに、TCDD、TCDF ほか 11 種のダイオキシン類の 39 種がん細胞パネルにおける

増殖阻害効果を検討したところ、一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有し、際だった特徴を示すことが判明している。そこで、今年度は新たなパネルとして42種がん細胞パネルを用いてもTCDFの増殖阻害効果が見られるのかどうか、TCDDを対照に検討した。その結果、TCDFは、新たな42種がん細胞パネルにおいても多くの細胞株で顕著な細胞増殖阻害を示し、TCDDはほとんど効果を示さなかった。TCDFのFinger Printは、42種がん細胞パネルにおけるCOMPARE解析では、少なくとも既知の抗癌剤約70種類とは異なる固有のパターンであることが判明した。

D. 考察：

TCDFは、39種がん細胞パネルで見られた現象と同じく、42種がん細胞パネルにおいても顕著な細胞増殖阻害効果を示し、対照的にTCDDはほとんど効果を示さなかった。両者のがん細胞に対する増殖阻害効果の違いは、かなり普遍的であると考えられる。わずかな構造上の違いから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解析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が、その作用機作の解明は今後の課題である。さらに、TEFによる比較では、TCDFはTCDDの1/10の力価とされるが、本研究結果は、がん細胞増殖阻害効果で見ると両者の力は逆転することを示すもので、この違いが固体レベルでも何らかの生物学的影響の差を生ずるのかも新たな問題といえよう。

E. 結論：

TCDDとTCDFをはじめとする42種がん細胞パネルで評価した結果、TCDFは顕著な細胞増殖阻害効果を示したが、TCDDはほとんど効

果を示さなかった。これは、TEFによる評価と矛盾する現象であり、これを説明するには、本研究で見られたTCDDとTCDFの違いを生み出す分子メカニズムの解明が今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表：

1. 論文発表

(英文発表)

1. 論文発表 (2003-2004)

1. Bai, J., Kitabatake, M., Toyozumi, K., Fu, L., Zhang, S., Dai, J., Sakai, J., Hirose, K., Yamori, T., Tomida, A., Tsuruo, T., and Ando, M. Production of Biologically Active Taxoids by a Callus Culture of *Taxus cuspidata*, *J Nat Prod.* 67: 58-63, 2004.
2. Hama, K., Aoki, J., Fukaya, M., Kishi, Y., Sakai, T., Suzuki, R., Ohta, H., Yamori, T., Watanabe, M., Chun, J., and Arai, H. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1, *J Biol Chem*, 2004.
3. Rengifo-Cam, W., Konishi, A., Morishita, N., Matsuoka, H., Yamori, T., Nada, S., and Okada, M. Csk defines the ability of integrin-mediated cell adhesion and migration in human colon cancer cells: implication for a potential role in cancer metastasis, *Oncogene.* 23: 289-97, 2004.
4. Mashino, T., Nishikawa, D., Takahashi, K., Usui, N., Yamori, T., Seki, M., Endo, T., and Mochizuki, M. Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives, *Bioorg Med Chem Lett.* 13: 4395-7, 2003.

5. Sugiyama, Y., Dan, S., Yoshida, Y., Akiyama, F., Sugiyama, K., Hirai, Y., Matsuura, M., Miyata, S., Ushijima, M., Hasumi, K., and Yamori, T. A large-scale gene expression comparison of microdissected, small-sized endometrial cancers with or without hyperplasia matched to same-patient normal tissue, *Clin Cancer Res.* 9: 5589-600, 2003.
 6. Dan, S., Shirakawa, M., Mukai, Y., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Kawaguchi, T., Matsuura, M., Nakamura, Y., and Yamori, T. Identification of candidate predictive markers of anticancer drug sensitivity using a panel of human cancer cell lines, *Cancer Sci.* 94: 1074-82, 2003.
 7. Tanabe, M., Izumi, H., Ise, T., Higuchi, S., Yamori, T., Yasumoto, K., and Kohno, K. Activating transcription factor 4 increases the cisplatin resistance of human cancer cell lines, *Cancer Res.* 63: 8592-5, 2003.
 8. Bando, T., Iida, H., Tao, Z. F., Narita, A., Fukuda, N., Yamori, T., and Sugiyama, H. Sequence specificity, reactivity, and antitumor activity of DNA-alkylating pyrrole-imidazole diamides, *Chem Biol.* 10: 751-8, 2003.
 9. Shiwa, M., Nishimura, Y., Wakatabe, R., Fukawa, A., Arikuni, H., Ota, H., Kato, Y., and Yamori, T. Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform, *Biochem Biophys Res Commun.* 309: 18-25, 2003.
 10. Matsuda, M., Yamori, T., Naitoh, M., and Okutani, K. Structural revision of sulfated polysaccharide B-1 isolated from a marine *Pseudomonas* species and its cytotoxic activity against human cancer cell lines, *Mar Biotechnol (NY).* 5: 13-9, 2003.
 11. Umemura, K., Yanase, K., Suzuki, M., Okutani, K., Yamori, T., and Andoh, T. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide, *Biochem Pharmacol.* 66: 481-7, 2003.
 12. Suzuki, M., Watanabe, K., Fujiwara, S., Kurasawa, T., Wakabayashi, T., Tsuzuki, M., Iguchi, K., and Yamori, T. Isolation of Peridin-Related Norcarotenoids with Cell Growth-Inhibitory Activity from the Cultured Dinoflagellate of *Symbiodinium* sp., a Symbiont of the Okinawan Soft Coral *Clavularia viridis*, and Analysis of Fatty Acids of the Dinoflagellate, *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 51: 724-7, 2003.
 13. Yamori, T. Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics, *Cancer Chemother Pharmacol.* 52 Suppl 1: 74-9, 2003.
 14. 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: 831-7, 2003.
- (邦文総説・著書)
1. 矢守隆夫 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤, *Surgery Frontier.* 10: 56-57, 2003.
 2. 矢守隆夫 Cancer Cell Informatics による制癌剤のスクリーニング, *Surgery Frontier.* 10: 304-312, 2003.
 3. 矢守隆夫 ケモカインとがん転移, *日本臨床.* 61: 116-122, 2003.

4. 且慎吾、矢守隆夫 遺伝子発現情報を用いた抗がん剤感受性予測, 血液・腫瘍科. 47: 575-581, 2003.
5. 且慎吾、矢守隆夫 がん化学療法感受性と遺伝子発現, 分子細胞治療. 2: 378-384, 2003.
6. 矢守隆夫 がん細胞パネルインフォーマティクス - 分子標的治療薬探索と感受性診断への応用, Drug Delivery System. 18: 385-393, 2003.
7. 矢守隆夫 がん細胞パネル - 抗がん剤探索およびポストゲノム研究における活用, 3 edition, p. 196-202. 東京: 癌と化学療法社, 2003.
8. 矢守隆夫 抗がん剤スクリーニングの変遷, 化学療法の領域. 19, S-1: 16-21, 2003.

2. 学会発表

1. 中津則之、吉田陽子、菅野純、矢守隆夫ら ヒト癌細胞パネルによる化合物の分子薬理・分子毒性の評価および抗癌剤感受性関連遺伝子の同定 日本癌学会総会記事 3234-0P, 2003. (第 62 回総会 名古屋 2003 年 9 月 25 日-27 日)

ほか

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

1. 特許出願状況

1) 血清アポリポタンパク質 A-II 量変化の検出方法

- (1) 発明者：矢守隆夫、西村由美子、志和美重子、若田部るみ、有國尚
- (2) 出願日：2003 年 5 月 7 日
- (3) 出願番号：特願 2003-129028
- (4) 出願人：財団法人癌研究会、サイファージェン・バイオシステムズ株式会社

2) 腫瘍細胞の抗癌剤に対する感受性を判定する方法

- (1) 発明者：矢守隆夫、吉田陽子
- (2) 出願日：2003 年 4 月 25 日
- (3) 出願番号：特願 2003-122338
- (4) 出願人：財団法人癌研究会

3) 大腸癌細胞の測定方法

- (1) 発明者：矢守隆夫、西村由美子、志和美重子、府川愛、有國尚
- (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、サイファージェン・バイオシステムズ株式会社

2. 実用新案登録

なし

AhR/Arnt の作用メカニズムの分子的基盤と標的遺伝子の検索

藤井 義明 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。ダイオキシンあるいはその他の外来異物による毒性発現の感受性の動物種差や系統差は、主として外来異物と AhR の解離定数の違いによることが考えられている。実際にこれまで得られているダイオキシンに対する各種動物の LD₅₀ と薬物代謝酵素 CYP1A1 誘導の ED₅₀ 及び AhR の解離定数を較べてみるとハムスターの場合を除いて、よい比例関係にあることが分った。さらにこれを確認するためにヒト化 AhR マウスを作製して検討した。ヒトの AhR は低感受性 DBA/2 マウスの AhR と同程度のダイオキシンに対する解離定数をもっている。ヒト AhR を高感受性マウス C57BL/6 の AhR 遺伝子座に置換してヒト化 AhR マウスを作製した。このマウスは、ダイオキシンに対する薬物代謝酵素の誘導、水腎症、口蓋裂の発症の感受性に関し、DBA/2 と同程度か、それより低感受性になっていることが明らかになった。

A. 研究目的

ダイオキシンなどの外来異物の毒作用に対する動物の感受性の種差あるいは、系統差が AhR の異物に対する解離定数とどのような関係にあるかをこれまで得られている各種動物のダイオキシンに対する LD₅₀、薬物代謝酵素 CYP1A1 誘導の ED₅₀ 及び AhR の解離定数の関係を調べ、さらにヒト AhR を C57BL/6 の AhR 遺伝子座に置き換えたマウスを作製して毒性発現や酵素誘導に関する感受性の変化を検討した。

B. 研究方法

先の我々の 3MC 高感受性マウス C57BL/6 と低感受性マウス DBA/2 マウスの AhR の研究からダイオキシンや 3MC に対するマウスの系統による感受性の違いは、AhR の各々の化合物に対する解離定数の違いによって説明できる事を示した。これを、さらに、動物種間のダイオキシンに対する感受性の種差にまで延長して考えることができるかを Hahn の総説に得られているパラメーター (Reviews in Toxicology 2: 395-443, 1998) によって調べてみ

る。ヒトの AhR のダイオキシンに対する解離定数は、 $1.58 \times 10^{-9} \text{M}$ で不感受性マウス (DBA/2) と $1.66 \times 10^{-9} \text{M}$ と殆ど等しい。ヒトの AhR の cDNA を高感受性マウスの AhR 遺伝子座に相同組み換え法によって置き換え高感受性マウス (C57BL/6) の薬物代謝酵素の誘導、水腎症、口蓋裂の発症の 3MC やダイオキシンに対する感受性を検討した。

C. 研究結果

各種動物の AhR の解離定数及び LD₅₀ と ED₅₀ の関係を Hahn の総説と我々によって得られた値を加えて調べた。その結果をモルモット、ラット (Sprague-Dawley)、モンキー、マウス (C57BL/6) と (DBA/2)、ハムスターの AhR のダイオキシンに対する解離定数と各動物種の LD₅₀ 及び薬物代謝酵素 CYP1A1 誘導に対する ED₅₀ はハムスターの場合を除いて、よい平行関係にあることが分った。ヒト化 AhR マウス (C57BL/6) は、その cDNA をマウス (C57BL/6) AhR の第 1 エクソンに相同組み換えによって導入することによって作製した。そして、AhR の発現を調べると肺、肝、腎、小腸、胸腺などで

マウスの AhR と同程度に発現していることが分かった。免疫組織学的方法によって肺における AhR の発現を検討した結果もタンパク質としての AhR の発現が確認された。このマウスを用いて 3MC による CYP1A1 と CYP1A2 の誘導的発現を肝組織において見ると 3MC 80 mg/kg の投与で(C57BL/6)マウスにおける発現が最も顕著で、ヒト化 AhR (C57BL/6) マウスの発現は不感受性(DBA/2)マウスの発現と同程度に弱かった。TCDD 100 µg/kg を投与すると(C57BL/6)マウスにおける CYP1A1 と CYP1A2 は顕著に誘導され、低感受(DBA/2)マウスでは、中程度に誘導されるが、ヒト化 AhR (C57BL/6) マウスでは、誘導の程度が(DBA/2)マウスよりも明らかに劣ることが分かった。また、妊娠マウスの 12.5 日目に TCDD 40 µg/kg を経口的に与え 18.5 日の胎児に水腎症と口蓋裂の発症を観察すると(C57BL/6)マウスでは、殆どすべての胎児マウスに口蓋裂と水腎症の発症が観察されたが、(DBA/2)マウスでは、水腎症は 80% に観察され、口蓋裂は、軽度で胎児マウスの 30% にその発症が認められた。一方、ヒト化 AhR (C57BL/6) マウスでは、水腎症の発症は 80% 程度で(DBA/2)マウスと同程度であったが、口蓋裂は殆ど観察されないことが、明らかになった。

D. 考察

ヒト AhR はダイオキシンの毒性発現に対して(DBA/2)マウスの AhR と同程度か、それより低い感受性を動物に与えるものと推論される。また、各種動物の AhR の解離定数及び LD₅₀ と ED₅₀ は、ハムスターの場合を除いて、よい平行関係にあることから、動物のダイオキシンに対する感受性は AhR によって決められることが示された。ハムスターの場合には、異物の取込み、分布に何か特有のものがあることが示唆される。AhR を横軸としたダイオキシンの用量作用関係よりヒトの場合のダイオキシンに対する LD₅₀ は、600 µg/kg、薬物代謝酵素の誘導の ED₅₀ は 5 µg/kg と算出され、モンキーの LD₅₀ 70 µg/kg、ED₅₀ 0.26 µg/kg より遥かに高い値であることが分かった。

E. 結論

動物種のダイオキシンに対する毒性感受性は、ハムスターの例外はあるが、AhR の解離定数によって予測することができる。この点では、モンキー

の値からヒトの感受性を考えることは間違いである。ヒト型 AhR を導入した高感受性(C57BL/6)マウスは、ダイオキシンに対して低感受性(DBA/2)マウスと同程度あるいは、それ以下になることが分かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

大村恒雄, 石村巽, 藤井義明, 編集, P450 の分子生物学, 講談社サイエンティフィク(2003. 10. 10)

2) 雑誌

Tsutomu Shimada and Yoshiaki Fujii-Kuriyama. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 95, 1-6 (2004)

Yamamoto J., Ihara K., Nakayama H., Hikino S., Satoh K., Kubo N., Iida T., Fujii Y., Hara T. Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: Organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sci.* 9, 1039-1049 (2004)

Kawane T, Mimura J, Yanagawa T, Fujii-Kuriyama Y, Horiuchi N. Parathyroid hormone (PTH) down-regulates PTH/PTH-related protein receptor gene expression in UMR-106 osteoblast-like cells via a 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent, protein kinase A-independent pathway. *J. Endocrinol.* 178, 247-256 (2003)

Kikuchi Y, Ohsawa S, Mimura J, Ema M, Takasaki C, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y., Heterodimers of bHLH-PAS Protein Fragments Derived from AhR, AhRR, and Arnt Prepared by Co-Expression in *Escherichia coli*: Characterization of Their DNA Binding Activity and Preparation of a DNA

Complex. *J. Biochem.*, 134, 83-90 (2003)

Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S., Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423, 545-550 (2003)

Takashi Moriguchi, Hozumi Motohashi, Tomonori Hosoya, Osamu Nakajima, Satoru Takahashi, Seiichiroh Ohsako, Yasunobu Aoki, Noriko Nishimura, Chiharu Tohyama, Yoshiaki Fujii-Kuriyama and Masayuki Yamamoto, Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.*, 100, 5652-5657 (2003)

Daisuke Mori, Naoko Okuro, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Kazuhiro Sogawa, Gene structure and promoter analysis of the rat BTEB2 gene. *Gene* 304, 163-170 (2003)

Shuhei Noda, Nobuhiko Harada, Azumi Hida, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Hozumi Motohashi and Masayuki Yamamoto. Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303, 105-111 (2003)

三村純正, 藤井義明, 薬物受容体シグナル系, 受容体がわかる (わかる実験医学シリーズ), 羊土社, 82-90 (2003. 11. 1)

三村純正, 藤井義明, 薬物異物と転写制御, 蛋白質核酸酵素, 共立出版, 48, 2261-2266 (2003)

三村純正, 藤井義明, ダイオキシンの毒性はどのように発現するのか, 現代化学, 東京化学同人, 394, 62-66 (2004)

2. 学会発表

馬場崇, 三村純正, 山本雅之, 諸橋憲一郎, 藤井義明, AhR の卵巣における機能と内分泌攪乱作用の

分子メカニズム, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003 年 12 月 11 日 (木)

大竹史明, 馬場敦史, 高田伊知郎, 藤井義明, 加藤茂明, ダイオキシン受容体を介したエストロゲン受容体制御機構の解析と相互作用複合体精製の試み, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003 年 12 月 10 日 (水) ~13 日 (土)

Daisuke Mori, Kazuhiro Sogawa, Satoru Takahashi, Masayuki Yamamoto, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Functional analysis of BTEB2, a zinc finger transcription factor, in mouse early development, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003 年 12 月 10 日 (水) ~13 日 (土)

伊藤智彦, 九十九伸一, 山本雅之, 本橋ほづみ, 鈴木教郎, 藤井義明, 三村純正, Tien-Min Lin, Richard E. Peterson, 遠山千春, 野原恵子, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003 年 12 月 10 日 (水) ~13 日 (土)

藤井義明, 内分泌かく乱物質の生体毒性発現メカニズムとモニター系の開発, 2003/10/20-22 科学技術振興機構 (JST) 戦略的基礎研究推進事業 (CREST) 内分泌かく乱物質, 第 4 回領域シンポジウム (平成 10 年度採択課題終了シンポジウム)

Yoshiaki Fujii-Kuriyama. 13th International Conference on CTOCHROMES P450, June 29- July 3, 2003, PRAGUE, CZECH REPUBLIC, Molecular mechanisms of transactivation by Ah receptor for target gene expression.

藤井義明, 「第 26 回日本医学会総会学術講演会」シンポジウム平成 15 年 4 月 5 日・6 日, 福岡市/福岡国際会議場・福岡サンパレス・シーホークホテル&リゾート, 「内分泌攪乱物質の生体作用発現における Ah リセプターの役割」

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

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の機能に関する研究

鎌鏡 哲也

北海道大学大学院薬学研究科

研究要旨

我々はこれまで、DNA マイクロアレイを用い、脂肪酸代謝に関与する peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の標的遺伝子が 3-メチルコランスレン (MC) により AhR 依存的に抑制されることを見出した。本年度は、この抑制がマウス生体に与える影響およびこの抑制の分子機構について検討した。その結果、マウスに MC を投与すると肝臓において AhR 依存的に脂肪滴が蓄積することが明らかとなった。また、MC は AhR を介して PPAR α のヘテロ二量体パートナーである retinoid X receptor α (RXR α) のタンパク質分解を促進することにより、PPAR α シグナル伝達を抑制することを明らかにした。

A. 研究目的

MC による PPAR α シグナル伝達の抑制がマウス生体に与える影響を検討することおよび MC による AhR を介した PPAR α シグナル伝達抑制の分子機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

7 週齢の野生型および AhR 欠損マウスに MC (80 mg/kg bw) を腹腔内単回投与した。1 週間後に肝臓を摘出し、組織標本を作製し、H. E. 染色および中性脂肪酸を染色する oil red O 染色を行った。また、MC 投与後、経時的に肝臓を摘出し、RXR α の mRNA およびタンパク質量をリアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロット分析により調べた。MC による PPAR α シグナル伝達抑制の分子機構の解析には、AhR および PPAR α /RXR α シグナル伝達経路の両経路が働くヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いた。RXR α タンパク質は 26S プロテアソーム経路を介して分解されることが知られているため、26S プロテアソーム阻害剤である MG132 および lactacystin が RXR α タンパク質レベルに及ぼす影響をウェスタンブロット分析により調べた。また、PPAR α /RXR α ヘテロダイマーを介した転写活性に与える影響は PPAR 応答配列を連結したルシフェラーゼレポータープラスミドを用いて調べた。

C. 研究結果

野生型マウスに MC を投与したところ、中心静脈周辺部に脂肪滴の蓄積 (中心性小脂肪滴症) が認められた。一方、AhR 欠損マウスでは脂肪滴の蓄積は認められなかった。MC による PPAR α シグナル伝達抑制の分子機構を検討するために、PPAR α シグナル伝達の構成因子である PPAR α および RXR α の発現量を調べた。その結果、MC により RXR α の発現量が mRNA およびタンパク質の両レベルで減少した。また、MC による RXR α の抑制の経時変化を調べたところ、mRNA は MC 投与後約 24 時間で減少したのに対し、タンパク質は MC 投与後約 2 時間で急速に減少することが明らかとなった。さらに、HepG2 細胞に MC (5 μ M) と 26S プロテアソーム阻害剤を共処置したところ、MC による RXR α タンパク質量の減少は認められず、また、PPAR α /RXR α を介した転写活性の抑制も認められなかった。

D. 考察

RXR α はリン酸化修飾を受けることにより、その核外排出およびタンパク質分解が促進されることが知られている。このことから、AhR が直接的あるいは間接的に RXR α をリン酸化することにより、そのタンパク質分解を促進する可能性が考えられた。

E. 結論

MC による PPAR α 標的遺伝子の抑制は脂肪酸代謝能の低下、ひいては脂肪酸の蓄積を引き起こすこと

を明らかにした。また、AhR シグナル伝達系は RXR α タンパク質の分解を促進することにより、PPAR α シグナル伝達系を抑制することを明らかにした。

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

Manabu Nukaya, Yoshiki Takahashi, Frank J. Gonzalez and Tetsuya Kamataki, Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Suppression of GH Receptor and Janus Kinase 2 Expression in Mice. *FEBS Letter*, 2004, 558, 96-100.

Kenji Toide, Hiroshi Yamazaki and Tetsuya Kamataki, Response to the Letter to the Editor(Reply) , Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A1, in human freshly isolated white cells: trimodal distribution of Japanese population according to induction of CYP1B1 mRNA by environmental dioxins. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* , 2003, 12, 1118.

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 CYP1B1 mRNA by environmental dioxins. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* , 2003, 12, 219-222.

Manabu Nukaya, Yoshiki Takahashi, Frank J. Gonzalez and Tetsuya Kamataki, Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of expression of the low-molecular-weight prekininogen gene in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 2001, 287, 301-304.

2. 学会発表

糠谷学, 高橋芳樹, 斎藤鉄也, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による脂質代謝異常の分子レベルにおける発現機構の解明. 日本薬物動態学会, 第18回年会(札幌), 173, 2003.

柴原憲仁, 都出健治, 山崎浩史, 永島理香子, 伊藤圭介, 岩野俊介, 高橋芳樹, 斎藤鉄也, 渡辺昌, 鎌滝哲也: CYP1B1 mRNA 量を指標としたヒトにおけるダイオキシン類曝露の定量的評価法の確立. 日本薬物動態学会, 第18回年会(札幌), 174, 2003.

糠谷学, 高橋芳樹, 斎藤鉄也, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による脂質代謝異常の発現機構の分子レベルでの解明. 日本トキシコロジー学会, 第30回年会(相模原), 245, 2003.

柴原憲仁, 斎藤鉄也, 鎌滝哲也: ヒト CYP1B1 の細胞特異的な発現制御機構. 日本トキシコロジー学会, 第30回年会(相模原), 226, 2003.

斎藤鉄也, 日景盛, 本郷敏雄, 坂口邦彦, 鎌滝哲也: ビスフェノール A と多環芳香族炭化水素によるヒト CYP1A1 遺伝子の発現誘導. 日本トキシコロジー学会, 第30回年会(相模原), 227, 2003.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による AHR を介した PPAR α シグナル伝達の阻害. 日本薬学会, 第123回年会(長崎), 4-47, 2003.

柴原憲仁, 糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による血液凝固第 V 因子遺伝子の発現抑制. 日本薬学会, 第123回年会(長崎), 4-46, 2003.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による PPAR α シグナル伝達の抑制とその分子機構. 日本分子生物学会, 第25回年会(横浜), 944, 2002.

柴原憲仁, 糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による血液凝固第 V 因

子遺伝子の発現抑制とその影響, 日本分子生物学会, 第25回年会(横浜), 944, 2002.

Manabu Nukaya, Yoshiki Takahashi, Frank J. Gonzalez and Tetsuya Kamataki, Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of PPAR α signal caused by polycyclic aromatic hydrocarbons. North American International Society for the Study of Xenobiotics, 11th Meeting (Orlando), 35, 2002.

柴原憲仁, 糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による血液凝固カスケードの阻害について. 日本薬物動態学会, 第17回年会(東京), 223, 2002.

Manabu Nukaya, Yoshiki Takahashi, Frank J. Gonzalez and Tetsuya Kamataki, Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of growth hormone signal caused by polycyclic aromatic hydrocarbons. Microsomes and Drug Oxidation, 14th International Symposium (Sapporo), 169, 2002.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による PPAR α 標的遺伝子の抑制とその分子機構. 日本トキシコロジー学会, 第29回年会(名古屋), 226, 2002.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による脂質代謝阻害の分子機構の解明. 日本分子生物学会, 第24回年会(横浜), 78, 2001.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による脂質代謝酵素の発現抑制とその分子機構, 日本薬物動態学会, 第16回年会(神戸), 189, 2001.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による JAK-STAT シグナル伝達の阻害とその分子機構. 日本癌学会, 第60回年会(横浜), 163, 2001.

Manabu Nukaya, Yoshiki Takahashi, Frank J. Gonzalez and Tetsuya Kamataki, Aryl hydrocarbon receptor (AHR) target genes involved in the toxicity caused by polycyclic aromatic hydrocarbons. International Congress of Toxicology, 9th Meeting (Brisbane), 22, 2001.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

ダイオキシン類の短期間雌雄ラットへの暴露が生殖器に及ぼす影響

鈴木 勝士 日本獣医畜産大学教授

研究要旨

TCDD および HxCDD の相対力価を求めるために、精巣摘出したウィスターイマミチラット近交系の雄に、プロピオン酸テストステロン (TP) の 0、0.5、1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とダイオキシンの存在、不在下で優性福生殖腺増加抑制反応を調べ、生物学的作用の大きさを比較した。TCDD については 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与した。HxCDD については既存の TEF に鑑み 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 回経口投与する予定であったが、TCDD の抗アンドロゲン作用が 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で必ずしも明瞭に認められなかったため、HxCDD の実験については、断念した。TCDD の HB 試験における副生殖器への影響については、有意差はみられないものの生殖器によって微妙に異なるように見え、臓器ごとに作用が一定しないように見えた。昨年実施した E2 の子宮重量増加作用に及ぼす影響では 2 種のダイオキシンで修飾作用が異なっており、かつ肝臓重量に対する影響も微妙にことなっていた。これらのことは、この 2 種のダイオキシンが子宮重量増加に関して必ずしも同一の機序で作用しているわけではないことを示唆している。雄性副生殖器について今回明確な成績を得られなかったが、雌に対する影響から考えると従来定説となっていた致死作用をもとにした TEF の決定法には問題があると言えよう。

A. 研究目的

WHO TEF で最も高値と比較的低値の TCDD と HxCDD について、ハーシュバーガー (HB) アッセイを用いて、相対力価を確認する。

B. 研究方法

精巣摘出ラットにプロピオン酸テストステロン (TP)、2,3,4,7,8-TCDD または 1,2,3,7,8-HxCDD を併用投与した際の各 TCDD の抗アンドロゲン作用の影響を雄性福生殖器重量増加抑制の程度によって検討する。胸腺に対するダイオキシン類の影響についても確認する。

実施場所：(財)動物繁殖研究所

2,3,7,8-TCDD に関しては以下の時期に実施。

- | | |
|-----------|-----------------|
| 1) 動物入荷 | 2004 年 2 月 24 日 |
| 2) 精巣摘出手術 | 2004 年 2 月 25 日 |
| 3) 投与開始 | 2002 年 3 月 3 日 |
| 4) 解剖検査 | 2002 年 3 月 17 日 |

2,3,7,8-TCDD 試験の化合物：

被験 2 物質-1

- ①名称：2, 3, 7, 8-TCDD (和光純薬)
- ②ロット番号：B1040436
- ③保存条件：密封して冷暗所。

被験物質-2

- ①名称：testosterone propionate (和光純薬)
- ②保存条件：室温・暗所

なお、2004 年 1 月 24 日入荷の動物で試験を実施したが TP の用量を間違えたため、上記日程で再実験を行った。上記日程の試験は、当初下記の 1,2,3,4,7,8-HxCDD の実験として計画されていたものである。1,2,3,4,7,8-HxCDD に関しては TCDD の実験において、後述するように胸腺への影響は有意であることが認められたものの、抗アンドロゲン作用は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量でも顕著ではなかったため、HxCDD については 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度の用量ではその影