

estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res.*, 1999;59:4870-4875.

(35) Niwa T. et al. Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones. *Xenobiotica* 1999;28:539-547.

F. 研究発表

論文発表

Kurahashi N, Sata F, Kasai S, Shibata T, Moriya K, Yamada H, Kakizaki H, Minakami H, Nonomura K, Kishi R. Maternal genetic polymorphisms in *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* and the risk of hypospadias. *Mol Hum Reprod.* 2005;11;93-98.

倉橋典絵、笠井世津子、西條泰明、佐田文宏、岸玲子. 内分泌かく乱物質曝露に関する疫学研究の実際と課題—特に尿道下裂と停留精巣について— *日本衛生学雑誌*. 2005;60;15-22.

分担研究報告書

ダイオキシン曝露ラット胎仔精巣におけるステロイド生合成調節に関わる因子の変動：脳下垂体ホルモンへの影響を起点とした新メカニズム

分担研究者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 教授
研究協力者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 助教授
石田 卓巳 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 助手

研究要旨 本研究では、ダイオキシン類による後世代影響について、その機構を明らかにするため検討を行った。ダイオキシン類の毒性は、多岐に亘ることが知られているが、中でも妊娠中に 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) に曝露された母獣より生まれる胎仔において、性成熟の遅延や性行動不全、さらに精子数の減少等の異常が現れることが明らかとなっている。この機構を明らかにするため、TCDD 曝露胎仔の精巣および副腎におけるステロイドホルモン生合成因子およびステロイドホルモンレセプターの遺伝子発現について半定量的 reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて検討し、これまでに TCDD 曝露胎仔雄の精巣において、steroidogenic acute regulatory protein (StAR)、CYP11A1 および CYP17 の各 mRNA 量が有意に減少することを明らかにして来た。本研究では、この StAR の発現低下機構について詳細に検討を行った。Organ culture した胎仔精巣へ TCDD を作用させた場合、StAR レベルへの影響は観察されなかった。一方、TCDD 曝露胎仔の血液中の黄体形成ホルモン(luteinizing hormone : LH)レベルは有意に低下していた。TCDD 曝露胎仔に、ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG)を in utero 投与した時、胎仔精巣の StAR レベルは、コントロールレベルと同等にまで回復した。TCDD は、胎仔精巣 LH 受容体レベルへは影響を及ぼさなかった。これらのことから、胎仔精巣の StAR 発現の抑制は、TCDD の精巣への直接作用ではなく、脳下垂体における LH の合成阻害が一つの要因であることが示唆された。本研究結果より、TCDD による StAR の発現変動が、後世代影響の発現機構である可能性が示唆された。

A. 研究目的

油症の原因物質と考えられている polychlorodibenzofuran 類 (PCDFs) や coplanar polychlorinated biphenyl 類 (coplanar PCBs) などのダイオキシン類は、

内分泌異常、免疫毒性、催奇形性、発ガンプロモーション、胸腺や脾臓の萎縮など、生体に対して多岐にわたる障害を引き起こすことが知られている。また、その毒性の発現については、arylhydrocarbon

receptor (AhR) の関与が示唆されているが、根源的な機構は未だ不明であり、その危険度も正確には把握されていない。ダイオキシン類による毒性の一つに生殖毒性や後代的影響が報告されている。胎仔期にダイオキシン類の曝露を受けた場合、性成熟の遅延や性行動不全、雄の精子数減少等の異常が起こることが報告されているが、これには性ホルモンの変動が関与していると考えられている。一方、ダイオキシン類は、cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)をはじめとする種々の機能性タンパク質の発現に影響を与えることが知られており¹⁾、これらの変動とダイオキシン類の毒性との関係について興味を持たれるところである。特に、P450のある分子種は、ステロイドホルモンの生合成に関与することが知られていることから、胎仔期のダイオキシン曝露によりステロイドホルモン作用に関連する因子が変動している可能性が予想された。昨年度より、胎仔期の母獣経由の TCDD 曝露が、性ホルモンをはじめとするステロイドホルモンの生合成に関わる因子およびエストロゲンレセプターへ及ぼす影響を明らかにしてきた。本年度は、ステロイドホルモン生合成の場となるミトコンドリアへのコレステロールの輸送に関与し、ステロイドの生合成の鍵を握る StAR に着目した。TCDD 曝露による胎仔精巣の StAR 発現低下のメカニズムを検討することを通じて、TCDD による後代影響発現機構を明らかにすることを目的とした。

B. 方法・結果

性ホルモンである androgen や estrogen は、生体内においてコレステロールより生合成されており、この出発原料となるコレステロールのミトコンドリアへの輸送が重要な鍵を握っている。(Fig. 1) 我々は、このステップに関与する StAR mRNA レベルが TCDD 曝露した胎仔精巣で低いことを見出ししている。そこで、胎仔期の TCDD 曝露による StAR mRNA レベルの低下が、どのようなメカニズムで引き起こされるか検討を行った。StAR および関連因子の mRNA レベルは、半定量的 RT-PCR 法を用いて検討を行った。

1) ラット胎仔精巣培養系を用いた TCDD 曝露による StAR の発現変動

ダイオキシンによる遺伝子発現変動は主に AhR を介する経路によるものであり、常識的にはダイオキシンが細胞内に取り込まれ、標的臓器中に存在している必要がある。しかし、ダイオキシンによる胸腺の萎縮については、ダイオキシンの胸腺中の分布量は著しく低いことが知られている。このことから、ダイオキシンが標的臓器に存在しなくても、他臓器での影響を通して傷害を引き起す場合もあり得ることが考えられる。

ステロイドホルモン生合成は視床下部-下垂体により支配をうけ、性腺刺激ホルモンにより支配を受ける。StAR の発現はこれら性腺刺激ホルモンの刺激によって cyclic AMP (cAMP) レベルが上昇し、それに伴って protein kinase A (PKA) が活性化され、その下流の種々の転写因子が活性化されて引き起される。これまでの報告にお

いても cAMP およびそのアナログである 8-Br-cAMP 処理において StAR の発現が上昇することが明らかにされている。そこで次に本研究では、TCDD の StAR 抑制効果が胎仔精巣への直接作用か否かを検証する目的で、精巣培養系を用いて、StAR の発現変動を観察した。すなわち、妊娠 20 日目の Wistar ラットから胎仔精巣を摘出し、TCDD 100 nM 含有の無血清 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地で 24 時間培養し、StAR mRNA 発現量を検討した。

StAR についての検討に先立ち、TCDD 処理によって変動することが知られている CYP11A1 の発現変動を調べた。その結果、TCDD 処理によって顕著な誘導が見られ、精巣培養系においても TCDD 依存的な遺伝子の発現変動を観察できることを確認した (Fig. 2A)。StAR の発現に関し、cAMP アナログである 8-Br-cAMP は StAR の発現を有意に上昇させ、この結果より StAR 発現制御に関わるシグナルトランスダクション系も培養精巣系中で機能することが示された (Fig. 2B)。一方、大変興味あることに、これまで示してきた *in vivo* での結果とは一致せず、TCDD 処理による StAR の発現抑制は観察されなかった (Fig. 2B)。8-Br-cAMP と共に TCDD を同時処理した場合、TCDD による抑制効果は見られなかった (Fig. 2B)。また 8-Br-cAMP の代わりに、cAMP レベルを上昇させることが知られている forskolin およびウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (equine chorionic gonadotropin : eCG) を用いた場合においても、StAR の誘導やこれに対す

る TCDD の無影響性の結果が得られた (Fig. 2C)。

TCDD 直接曝露によって胎仔精巣 StAR の発現変動には影響を与えないことから、TCDD はラット胎仔精巣のステロイド合成系に直接影響を与えない可能性が示唆された。従って、TCDD による胎仔精巣 StAR の発現低下は、StAR 発現刺激物質の供給不足、即ち PKA 経路よりも上流の部分に起因している可能性が考えられた。

2) TCDD 曝露胎仔における黄体形成ホルモンレベルの変動

TCDD 曝露ラット胎仔精巣に見られる StAR mRNA の発現低下は TCDD の精巣に対する直接作用でない可能性が示唆された。そこで、StAR 発現制御の上位因子である性腺刺激ホルモンの一つである黄体形成ホルモン(LH) レベルに着目し検討を行った。すなわち、雄性ラット胎仔より血漿を調製し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法によって LH を測定した結果、TCDD 曝露群では有意な LH レベルの低下が認められ、StAR の発現低下は StAR 発現の上位因子に起因しているという可能性を支持する結果が得られた (Fig. 3)。

LH が精巣における PKA 経路を活性化するには LH receptor (LHR) の発現が必要である。LHR の発現レベルが低下すれば、LH による刺激が伝達せず、StAR 発現低下に繋がる可能性が考えられることから、次に精巣 LHR mRNA について検討を行った。その結果、TCDD 曝露による有意な発現変動は認められず (Fig.4)、精巣 StAR

発現低下が LHR の低下に起因する機構は支持されなかった。

LHは脳下垂体前葉より合成される糖タンパクであり、 α 、 β のサブユニットから構成されている。血漿 LH レベルに低下が認められたことから、LHを構成しているサブユニットの発現が低下している可能性が考えられた。そこで、雄性胎仔脳から LH α 、 β サブユニットについて mRNA 発現量を比較したところ、 α サブユニットは TCDD 曝露群において有意な発現低下が観察され、脳内の LH 合成が抑制されていることが示唆された (Fig. 5)。

4) TCDD 曝露胎仔への絨毛性性腺刺激ホルモン直接投与における精巣 StAR 発現変動

TCDD 曝露を受けたラット胎仔における精巣 StAR 発現低下は上記 1)および 2)の実験結果から、下垂体前葉ホルモン LH レベルの低下が原因である可能性が示唆された。そこで次に、胎仔の LH レベルを上昇させることによる StAR 発現低下の回復の可能性を考え、TCDD 曝露を受けた胎仔にウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) を直接投与し、StAR の発現変動にどのような影響を与えるかについて検討を行った。

妊娠 15 日目に TCDD 曝露を受けたラット胎仔に、妊娠 17 日目に母体の麻酔下に胎仔を一時的に取り出し、半分 (片腹) の胎仔の腹腔へ eCG 5.0 I.U.を直接投与した。残りの半分 (反対側の片腹) の胎仔には対照として vehicle (PBS) を直接投与し

た。妊娠 20 日目に胎仔精巣を摘出し、これまでと同様に StAR mRNA の発現変動を比較した。その結果、対照群では StAR の発現は低いままであるが、eCG 投与群については対照群に対し有意な StAR 発現上昇が認められ、TCDD 曝露による精巣 StAR 発現低下は eCG 直接投与によって回復されることが確認された (Fig. 6)。

C. 考察

胎仔期にダイオキシンによる曝露を受けた場合、生殖器官の成長遅延や生殖行動への抑制効果が見られることが知られている。ダイオキシンの毒性は機能性タンパクの発現変動によるという作業仮説から、本研究では精巣のステロイド作用関連因子の発現変動を中心に検討したが、複数の因子の発現変動が観察され、生殖毒性との関連性が強く示唆された。また、そのメカニズムは TCDD が精巣に直接作用して効果を発現するのではなく、制御の上位因子である LH レベルの低下によってステロイド合成因子等の発現を低下させ、ステロイド作用の低下に繋がる可能性が強く示唆された。本研究では胎仔脳内 LH α サブユニットの mRNA レベルが低下していたことから、LH 合成に障害が起こっている可能性が示唆された。LH は脳に貯蔵され、分泌されるホルモンであるので、TCDD 曝露によって脳内 LH の貯蔵および分泌へ影響を与える因子が発現変動している可能性も考えられる

(Fig.7)。従って、今後は TCDD 曝露胎仔脳における LH 合成のみならず、これの貯蔵や分泌に関与する遺伝子発現変動に着

目して展開される必要がある。

これまで、ダイオキシン毒性の多くは細胞内の AhR が中心的な役割を演じるとされ、多くの研究者はこれを認知していると思われる。しかし、遺伝子転写因子である AhR によって制御を受け、かつ毒性発現に関与するタンパク質については殆ど理解されていないのが実情である。本研究では、TCDD の生殖毒性の起点として脳下垂体ホルモンを提案することができ、これは機構解明に向けた契機となる可能性がある。本研究では、AhR と脳下垂体ホルモン変動との接点を明らかにするには至らなかったが、本研究での成果の信ぴょう性や生殖毒性における AhR の役割を理解するためには、この点の検討も必要と考えられる。

D. 参考文献

1) K. Sogawa and Y. Fujii-Kuriyama, *J. Biochem.*, **122**, 1075-1079 (1997).

E. 研究発表

- 1) フォーラム 2004 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (東京、2004 年 10 月)
- 2) 第 21 回日本薬学会九州支部大会 (長崎, 2004 年 12 月)

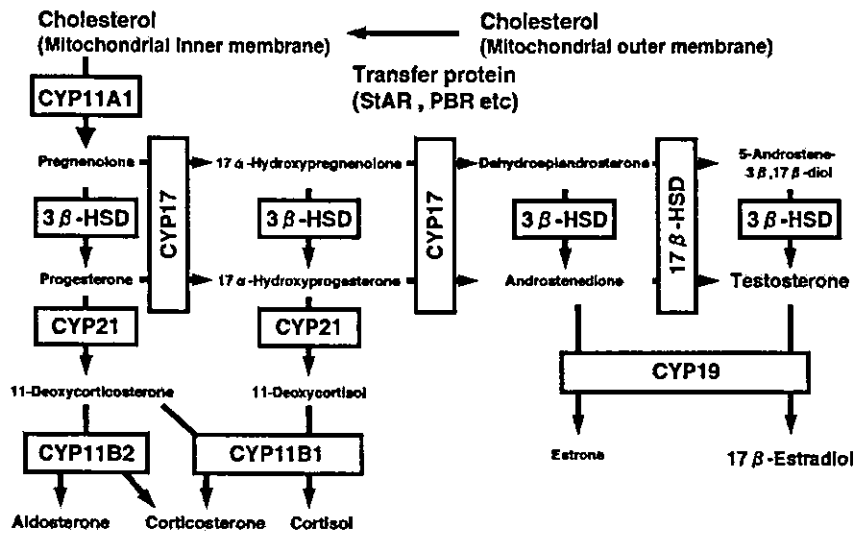


Fig. 1. The pathways of steroidogenesis.

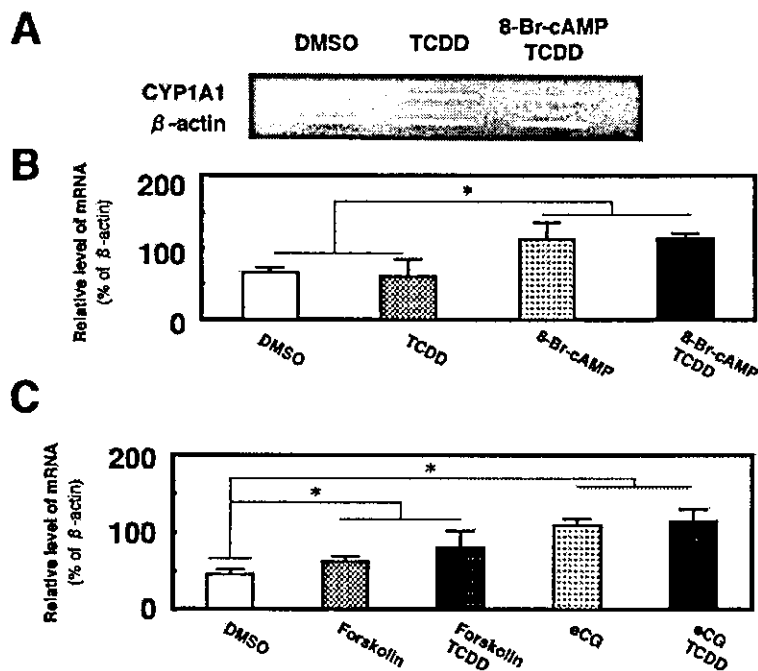


Fig. 2. Effect of TCDD and 8-Br-cAMP on the expression of CYP1A1 and StAR mRNAs in cultured rat fetal testis.

(A) Induction of the CYP1A1 mRNA expression in cultured fetal testis. (B, C) Comparison of the StAR mRNA expression level. The level of the StAR mRNAs in cultured rat fetal testis was normalized to β-actin. Each bar represents the means ± S.D. (n = 3).

*: Significantly different from DMSO and TCDD ($p < 0.05$, post hoc test).

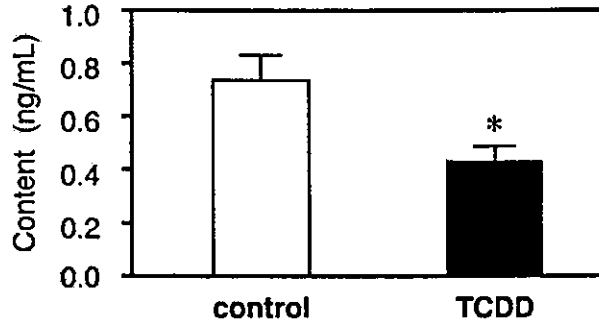


Fig. 3. Change in plasma LH in male rat fetuses following exposure of the dams to TCDD (1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at GD15). Each bar represents the means \pm S.D. of male rat fetuses which were removed from 3 different dams. Significant difference in mRNA levels between control and TCDD exposure was calculated using Student's *t* test (*: $p < 0.05$).

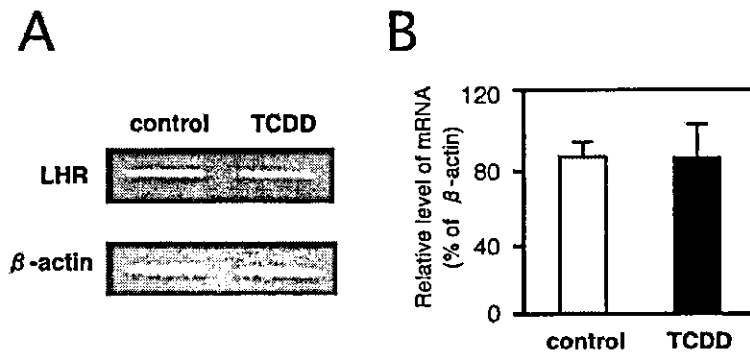


Fig. 4. Change in mRNA of testicular LH receptor (LHR) in rat fetuses following exposure of the dams to TCDD (1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at GD15). (A) Comparison of the mRNA profiles between control and TCDD exposure. (B) Relative levels of the mRNAs in testis of rat fetus normalized to β -actin. The values expressed are the means \pm S.D. of 6 fetuses each 2 of which were removed from 3 different dams.

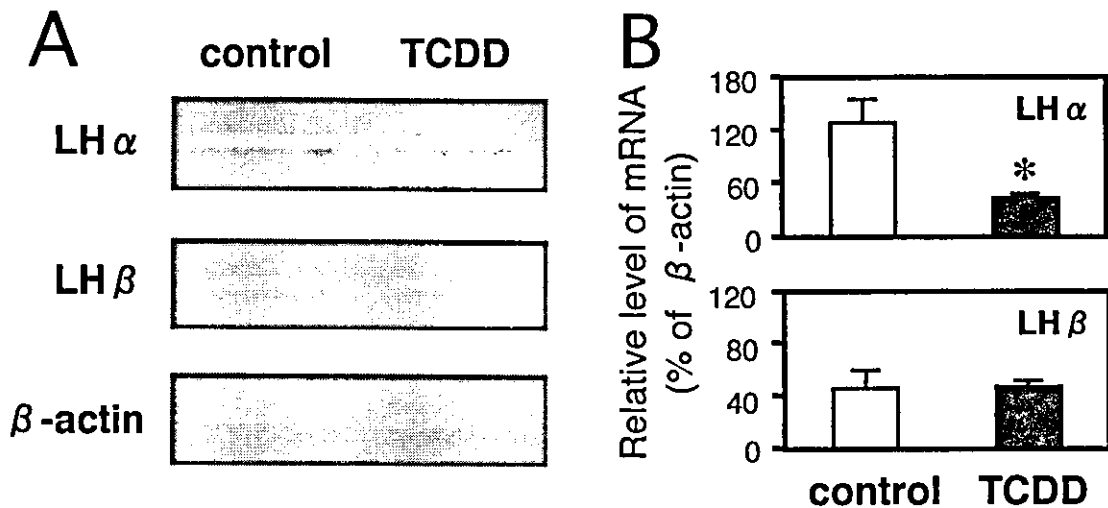


Fig. 5. Change in the expression of mRNAs coding leuteinizing hormone (LH) α and β subunit in rat fetal brain following exposure of the dams to TCDD (1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at GD15).

(A) Comparison of the mRNA profiles between control and TCDD exposure. (B) Relative levels of the mRNAs in brain of rat fetus normalized to β -actin. The values expressed are the means \pm S.D. of 3 fetuses each of which was removed from 3 different dams. Significant difference in mRNA levels between control and TCDD exposure was calculated using Student's t test (*: $p < 0.05$).

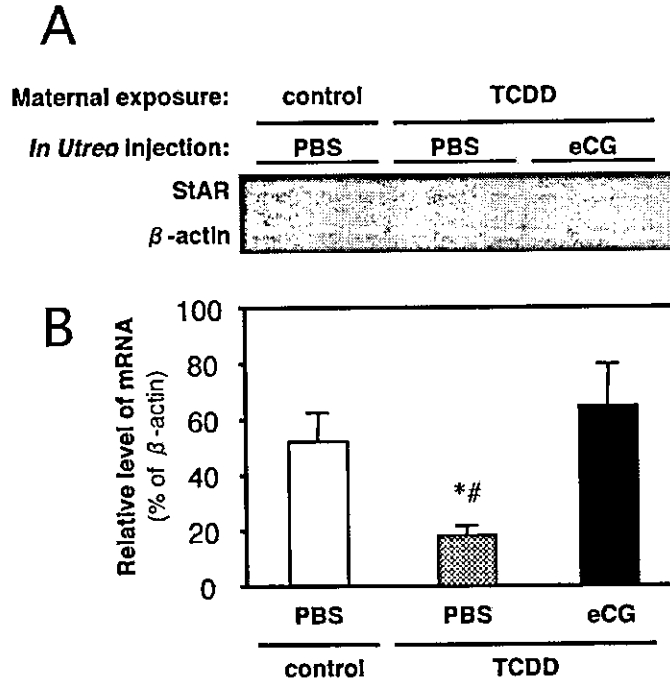


Fig. 6. Recovery of TCDD-induced reduction of testicular StAR mRNA in rat fetuses by direct injection of eCG. TCDD (1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was orally administered to pregnant rats at GD15. eCG (5 I.U.) was directly injected (i.p.) to fetuses at GD17, and the fetal testes were removed at GD20. (A) Comparison of the mRNA profiles between PBS (control) and eCG direct injection. (B) Relative levels of the mRNAs in testis of rat fetus normalized to β -actin. Each bar represents the means \pm S.D. (n = 3). *: Significantly different from control and TCDD ($p < 0.05$, post hoc test). #: Significantly different from PBS and eCG ($p < 0.05$, post hoc test).

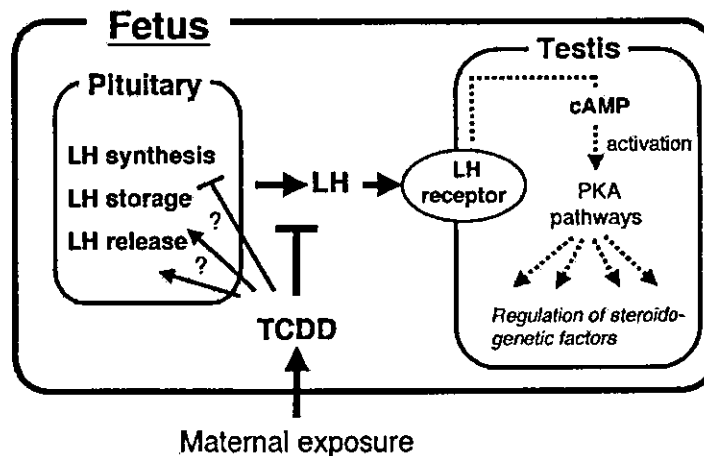


Fig. 7. Summary of the effect of maternal exposure of TCDD on steroidogenesis and steroid action in fetus.

分担研究報告書

ダイオキシン毒性軽減に関する基礎的検討：Heat shock protein 70 が arylhydrocarbon receptor を介した転写活性化に及ぼす影響

分担研究者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 教授
研究協力者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 助教授
石田 卓巳 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 助手

研究要旨 当研究室では、これまでに heat shock protein 70 (HSP70)の誘導剤である geranylgeranylacetone (GGA) が C57BL/6J 雄性マウスにおいて体重増加抑制などのダイオキシン類の毒性の一部を軽減する可能性を明らかにしている。本研究では、HSP70 と arylhydrocarbon receptor (AhR)のタンパク質間相互作用により、ダイオキシン類などのリガンド存在下に起こる AhR 活性化を HSP70 が抑制するという作業仮説を立て、HSP70 を介したダイオキシン類の毒性軽減について基礎的な検討を行った。まず、AhR の結合配列であり、ダイオキシンへの応答配列として知られる xenobiotic responsive element (XRE)を有するルシフェラーゼレポータープラスミドを構築し、AhR 高発現細胞であるヒト乳癌由来 T47D 細胞を用いて、AhR を介した転写活性化評価系を確立した。また、HSP70 の特異的誘導剤である N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN) により、T47D 細胞に HSP70 を過剰発現させる条件を確立した。次いで、HSP70 過剰発現が AhR を介した転写活性化に及ぼす影響についてレポーター遺伝子アッセイ法を用い検討を行った。3-Methylcholanthrene (3MC)による AhR を介した転写活性化は、HSP70 誘導条件下に有意に抑制された。2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)および 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (IUPAC No. PCB126)処理による転写活性化に関しても同様の抑制効果が観察された。一方、2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (IUPAC No. PCB52)は、AhR を介した転写活性化能は示さず、これに対する HSP70 誘導の効果も観察されなかった。これらの結果より ALLN により誘導された HSP70 によって AhR を介した転写活性化が抑制される可能性が強く示唆された。本研究の結果から、HSP70 レベルを適切に増加させることを通じてダイオキシン毒性が軽減できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

油症の原因物質と考えられている polychlorodibenzofuran 類 (PCDFs) や coplanar polychlorinated biphenyl 類 (coplanar PCBs) などのダイオキシン類は

体重増加抑制、生殖毒性、発癌性などの多岐に亘る毒性を発現し、その高蓄積性と難分解性から、健康傷害性の継続が問題視されており、毒性発現機構の解明および毒性軽減法の開発が望まれている。これまでの

実験動物を用いた研究から、ダイオキシン類の毒性発現機構には arylhydrocarbon receptor (AhR) が深く関与していることが明らかにされており、その機構は以下のように考えられている (Fig. 1)。通常、AhR は heat shock protein (HSP) の一種である HSP90 と結合し、不活性状態で細胞質に存在しているが、ダイオキシン類が結合すると核内に移行する。核内に移行したダイオキシン類 - AhR 複合体は、AhR nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマーを形成し、遺伝子上流のプロモーター領域に存在する xenobiotic responsive element (XRE) と呼ばれるエレメントに結合して、その下流にある cytochrome P450 (CYP) 1A1 を始めとする種々の遺伝子の発現を変動させる。AhR ノックアウトマウスではダイオキシン類の毒性の多くが軽減されることなどから、AhR を介した転写活性化がダイオキシン類の毒性発現に関与していると考えられているが、どの遺伝子発現が毒性発現と直結しているかについては、今なお明らかにされていない。

当研究室では、これまでにダイオキシン類によって変動するタンパク質の同定を行ってきた。その中で、ダイオキシン類の一種である 3,3',4,4',5-pentachloro-biphenyl (IUPAC No. PCB126) を処理した Wistar 系雄性ラットの肝臓において、分子シャペロンの一つである HSP70 が誘導されるという実験結果が得られている。¹⁾ また、当研究室における研究から、HSP70 の誘導剤である geranylgeranylacetone (GGA) が C57BL/6J 雄性マウスにおいて体重増加抑制などのダイオキシン類の毒性の一部を

軽減する可能性を明らかにしている。²⁾ この機構として、HSP70 と AhR のタンパク質間相互作用により、ダイオキシン類などのリガンド存在下に起こる AhR 活性化を HSP70 が抑制する可能性が想定された (Fig. 1)。つまり、AhR を介した転写活性化が抑制され、その結果毒性が軽減されるのではないかと考えられた。そこで本研究ではこれらの背景のもと、HSP70 の特異的誘導剤である N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN)³⁾ を用い、HSP70 過剰発現が AhR を介した転写活性化に及ぼす影響についてレポーター遺伝子アッセイ法を用い検討を行った。

B. 方法

AhR を介した転写活性化評価系の確立

AhR を介した転写活性化を評価するため、まずルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとする pGL3-promoter vector の SV40 プロモーターの上流に XRE 配列を組み込んだ AhR 応答性レポータープラスミド (pGL3-XRE) を構築した。また、コントロールとして、XRE に mutation を入れた配列を組み込んだレポータープラスミド (pGL3-mtXRE) も併せて構築した。構築したレポータープラスミドを、AhR 高発現細胞として報告されているヒト乳癌細胞 (T47D 細胞) にリポフェクション法にてトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。

ALLN による HSP70 の誘導

HSP70 誘導剤である ALLN を処理して内在性 HSP70 の誘導をイムノプロットにて確認した。その際、AhR を介した転写活性化機構の一端を担っている HSP90 の発現についても、ALLN が及ぼす影響について検討を加えた。

AhR を介した転写活性化への HSP70 の影響

構築した XRE を有するレポータープラスミドを、T47D 細胞にトランスフェクション後、ALLN を 4 時間前処理して HSP70 を誘導させたのち、AhR のリガンドである 3-methylcholanthrene (3MC)、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)、PCB126 あるいは 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (IUPAC No. PCB52 と ALLN を含む培地に置換して培養を継続した。12 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定し ALLN 未処理の細胞と比較することにより AhR を介した転写活性化に及ぼす HSP70 の影響について検討した。

ALLN が AhR 支配下のタンパク質発現変動に及ぼす影響

ALLN が AhR 支配下のタンパク質発現変動にも影響を及ぼすか否かを検討するため、AhR を介して誘導される CYP1A1 の発現をイムノプロットにより確認した。

C. 結果・考察

構築したレポータープラスミドをそれぞれ T47D 細胞にトランスフェクションし、3MC 処理の影響を比較した。XRE の変異

により、3MC に対する応答性が有意に減少したことから、この実験系が AhR を介した転写活性化の評価系として適していることが確認された (Fig. 2)。

次に、T47D 細胞における HSP70 の誘導条件について検討した。T47D 細胞を 40 $\mu\text{g/ml}$ の ALLN で 4 時間処理した場合、コントロールに比べ約 9 倍の HSP70 が誘導された。12 時間処理後では、20、40 および 80 $\mu\text{g/ml}$ の ALLN によって約 30~50 倍の HSP70 が誘導された (Fig. 3)。HSP90 についても同様に検討を行った結果、4 時間後には、40 $\mu\text{g/ml}$ の ALLN 処理で誘導傾向が見られ、12 時間処理後では、20、40 および 80 $\mu\text{g/ml}$ の ALLN によって 2 倍程度の誘導傾向が認められた (Fig. 4)。しかし、HSP70 に比べるとその程度は遥かに弱く、HSP90 誘導の影響を無視することはできなくとも ALLN を用いて HSP70 過剰発現下における AhR を介した転写活性化の変化を十分に解析することができると考えられた。

pGL3-XRE を用いたルシフェラーゼ活性の測定を行った結果、20、40 および 80 $\mu\text{g/ml}$ の ALLN を併用処理することにより、3MC による転写活性化は約 50%まで減少した (Fig. 5)。また、20 $\mu\text{g/ml}$ の ALLN 処理により、TCDD、PCB126 による転写活性化も ALLN 未処理時の約 60% および 45%まで抑制された (Fig. 5)。一方、ダイオキシン様作用をほとんど示さないことが知られている PCB52 では、AhR を介した転写活性化能は認められず、これに対する HSP70 誘導の効果も観察されなかった (Fig. 5)。

さらに、CYP1A1の発現についてイムノブロットにて解析した結果、20 および 80 $\mu\text{g/ml}$ の ALLN を併用処理することにより 3MC による CYP1A1 の誘導が ALLN 未処理時の約 50%以下まで抑制され、これらの結果より ALLN により誘導された HSP70 によって AhR を介した転写活性化が抑制される可能性が強く示唆された (Fig. 6)。

ダイオキシン類の毒性発現機構における HSP の関与について、代表的な HSP の一つである HSP90 はその関与が明らかにされているが、種を超えて最もよく保存されており、ストレス誘導性が高い分子種である HSP70 については殆ど報告がない。

今回、HSP70 特異的な誘導剤である ALLN を用いた検討により、HSP70 過剰発現下において AhR を介した転写活性化が抑制されることが明らかとなり、HSP70 が AhR 系に対して抑制的に働いている可能性が強く示唆された。HSP はその名の由来の通り、熱ストレスを始め、その他の種々のストレスにより誘導されるタンパク質である。今回用いた T47D 細胞においても、42°C 2 時間の heat shock を行った場合、コントロールに比べて約 9 倍の HSP70 発現が見られることを確認している (成績未掲載)。今後、heat shock など ALLN 以外の方法により HSP70 を過剰発現させた場合にも同様の転写活性化の抑制が見られるか否かの検討を行うことが望まれる。また、今回用いた T47D 細胞においては ALLN によって HSP90 の発現も増加していることが明らかとなった。転写活性化の抑制における HSP90 の関与は現時点では無視できないので、今後その抑制への寄与

について明らかにする必要があると考えられる。

ダイオキシン類は、カネミ油症の原因物質であり、その生体へ及ぼす影響および毒性発現機構の解明が切に望まれる。本研究成果が、詳細なダイオキシン類の毒性発現機構の解明および毒性軽減法の開発のための手がかりとなることが期待される。

D. 参考文献

- 1) 福田亜弥子, 石井祐次, 田崎健二, 松末公彦, 石田卓巳, 小栗一太, 福岡医誌 **90**, 259-271 (1999)
- 2) Ishida, T., Oshimo, T., Nishimura, A., Mutoh, J., Ishii, Y., Koga, N., Yamada, H., Hashiguchi, I., Akamine, A., and Oguri, K., *Biol. Pharm. Bull.*, **9**, 1397-1402 (2004)
- 3) Zhou, M., Wu, X. and Ginsberg, H. N., *J. Biol. Chem.*, **271**, 24769-24775 (1996)

E. 研究発表

- 1) 第 21 回日本薬学会九州支部大会 (長崎, 2004 年 12 月) (本発表は、平成 16 年度日本薬学会九州支部優秀発表賞 物理・環境系 を受賞した。)

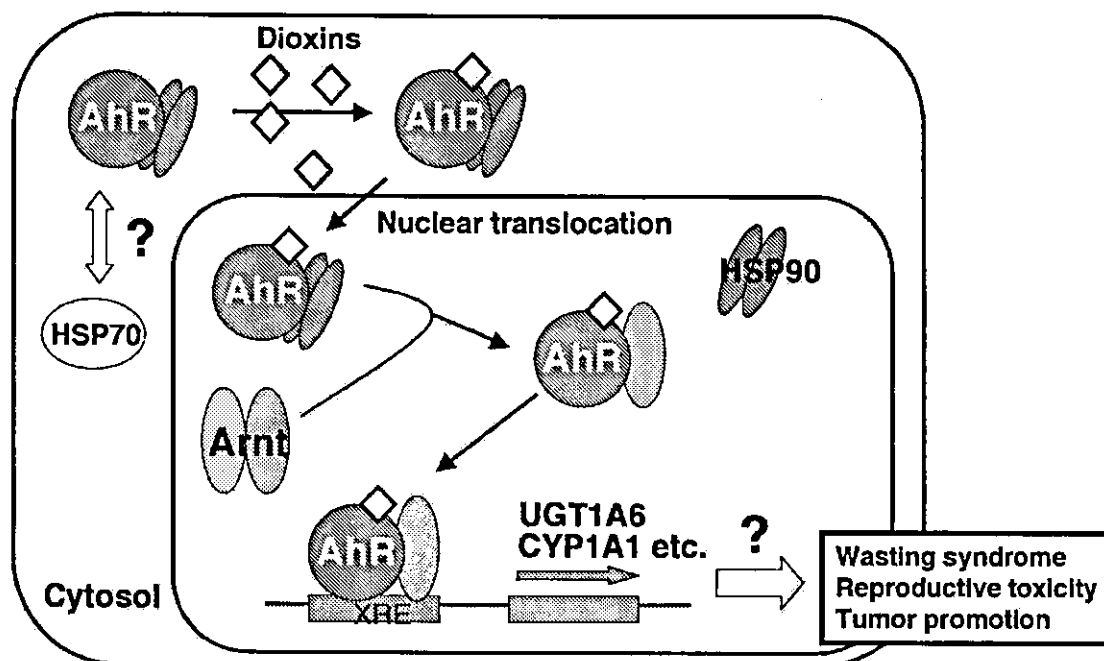


Fig. 1 Postulated mechanism of transcriptional activation by AhR system.

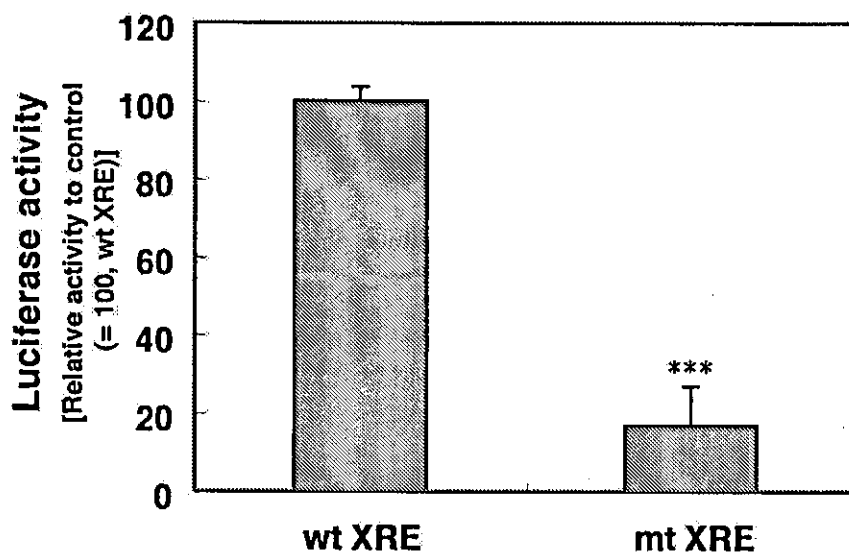


Fig. 2 3MC-induced activation of AhR-dependent gene transcription. T47D cells in a well of 6-well plates were co-transfected with 2 μ g reporter plasmid (pGL3-wt XRE or pGL3-mt XRE) and pRL-TK, and cultured for 24 h. The cells were treated with 1 μ M 3MC for 24 h, and then the expression of reporter genes was assayed. Each bar represents the mean \pm S.E. of three dishes. ***: Significantly different from pGL3-wt XRE; $p < 0.001$.

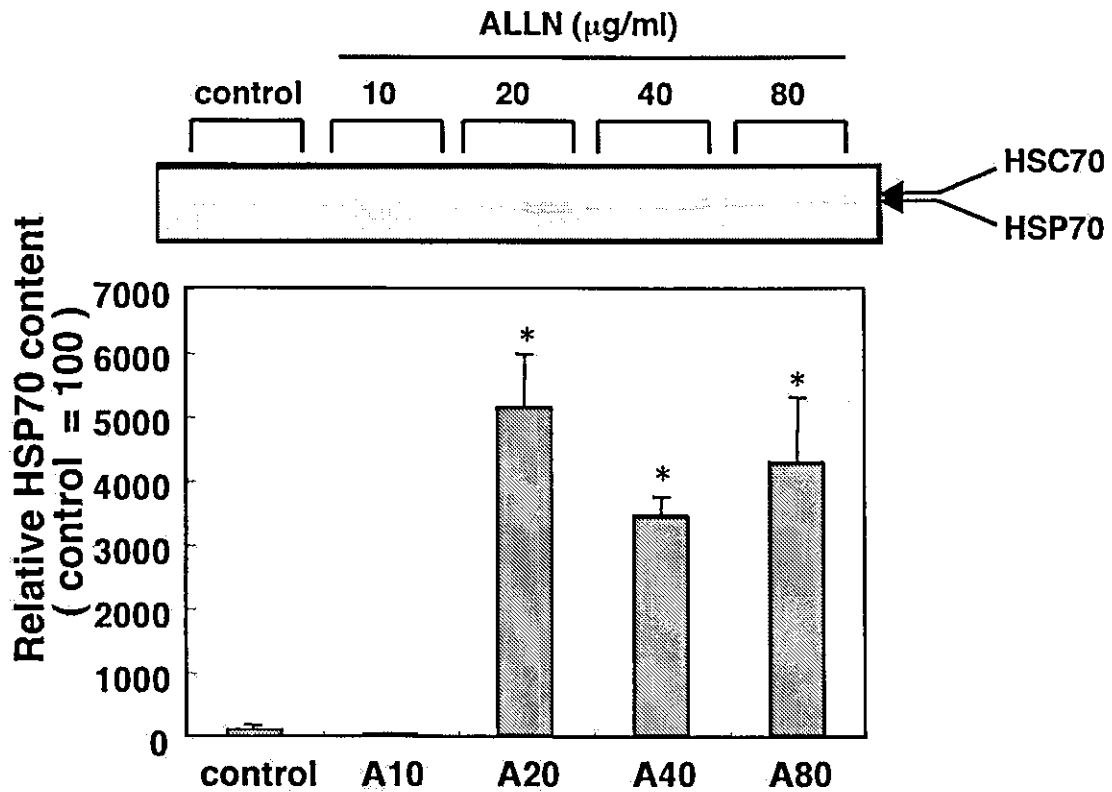


Fig. 3 Induction of HSP70 by ALLN in T47D cells.

- (A) T47D cells were grown up to 90% confluence and treated with vehicle alone or different concentration of ALLN as indicated for 12 hours. After treatment, each whole cell lysate (3 μ g protein) was subjected to SDS-PAGE (10% gel) and immunoblotting with mouse anti-HSP70 antibody.
- (B) The expression level of HSP70 was quantitated by extracting band image and calculating it using a software, NIH image (ver. 1.62). Each bar represents the mean (percentage of control) \pm S.E. of three dishes.
 *; Significantly different from control; $p < 0.05$

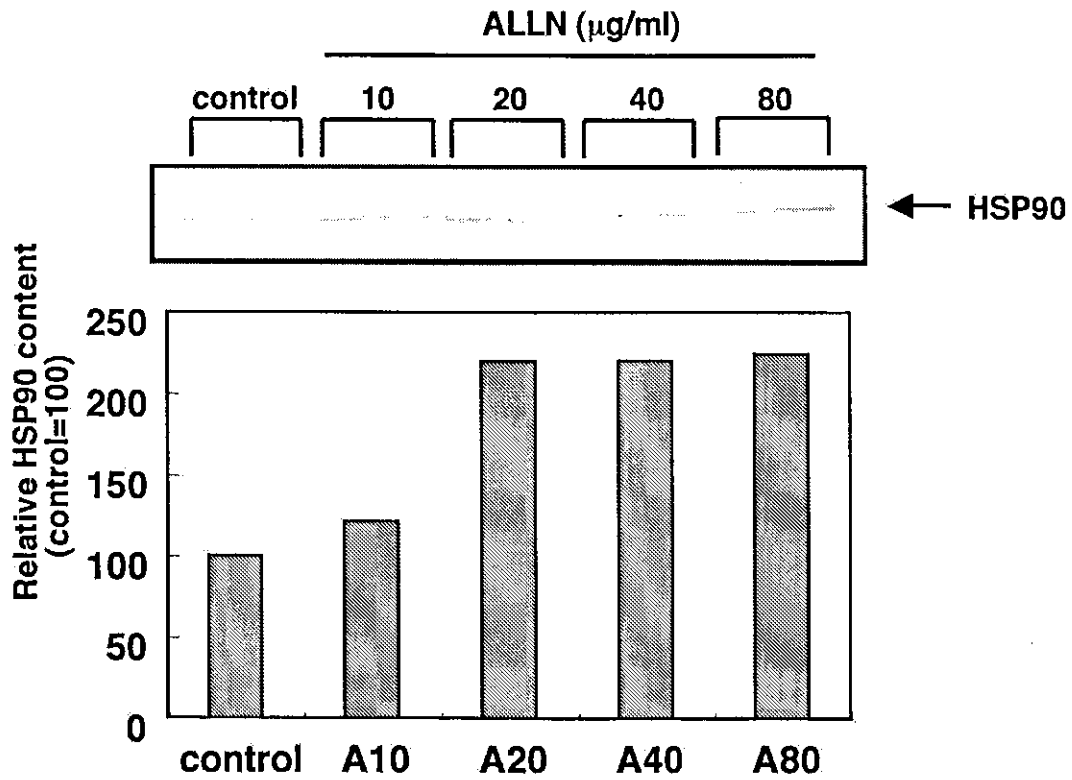


Fig. 4 Effect of ALLN on HSP90 expression (12h culture).

- (A) T47D cells were grown up to 90% confluence and treated with vehicle alone or different concentration of ALLN as indicated for 12 hours. After treatment, each whole cell lysate (5 μg protein) was subjected to SDS-PAGE (7.5% gel) and immunoblotting with anti-HSP90 antibody.
- (B) The expression level of HSP90 was quantitated by extracting band image and calculating it using a software, NIH image (ver. 1.62). Each bar represents the mean of two dishes.

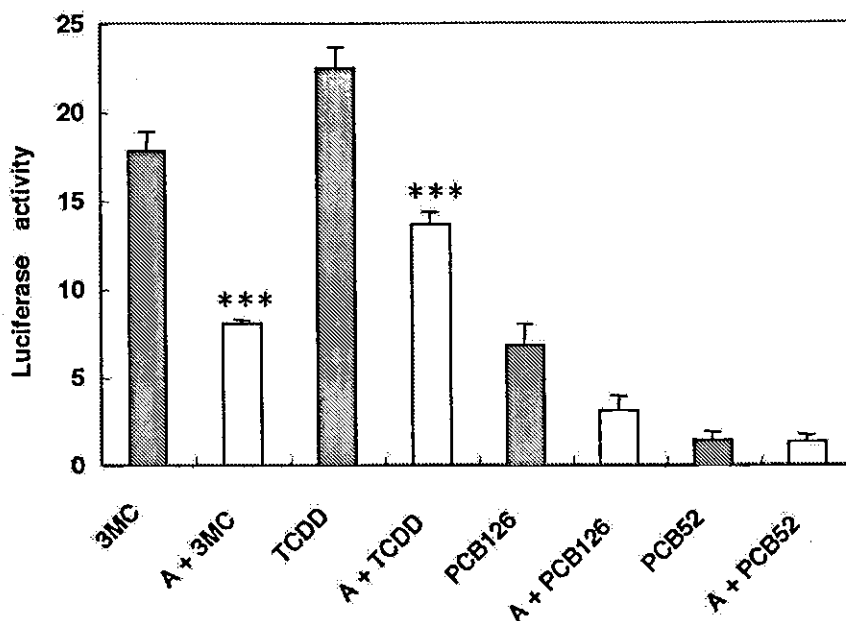


Fig. 5 Effect of HSP70 overexpression on AhR signaling.

T47D cells plated in a well of 6-well plates were co-transfected with 2 μ g pGL3-wt XRE and pRL-TK, and cultured for 24 h. The cells were then treated with ALLN (20 μ g/ml medium) for 4 h. After pretreatment with ALLN, the cells were continuously cultured for 12 h in the medium containing 20 μ g/ml ALLN and either 1 μ M 3MC, 0.05 μ M TCDD, 0.5 μ M PCB126 or 0.05 μ M PCB52. The cells were treated, and the activity of expressed reporter gene was determined. Each bar represents the mean \pm S.E. of three assays.

***; Significantly different from the control (=each ligand without ALLN); $p < 0.001$

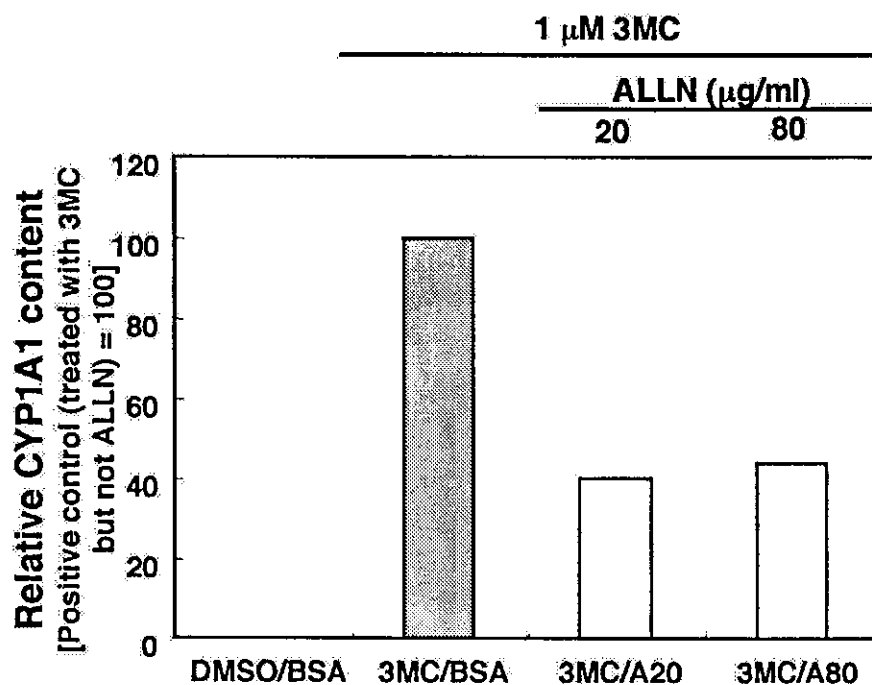


Fig. 6 Effect of ALLN on the induction of CYP1A1 by 3MC.

T47D cells were grown up to 90% confluent, and pretreated with 20 or 80 $\mu\text{g/ml}$ ALLN for 4 h. The cells were then cultured in the medium containing 3MC and ALLN for 12 h. Whole cell lysate (107 μg protein) was applied to SDS-PAGE (10% gel) and

immunoblotting with anti-CYP1A antibody. The expression level of CYP1A1 was quantitated by extracting band image and calculating it using a software, NIH image (ver. 1.62). The data were expressed as the relative intensity to positive control (=100) which was obtained by culturing cells in the medium containing 3MC but not ALLN. BSA is bovine serum albumin, a carrier for ALLN. Each bar represents the mean of two experiments.

分担研究報告書

高残留性PCB、2,2',3,4',5,5',6-七塩素化ビフェニルのin vitro代謝

分担研究者 古賀 信幸 中村学園大学栄養科学部 教授

研究要旨 ヒトを含む哺乳動物の血液中において、PCB 代謝物のうち、4-hydroxy(OH)-2,2',3,4',5,5',6-heptaCB(CB187)が最も高濃度で検出されている。そこで本年度は、CB187 の代謝をラット、モルモットおよびハムスター肝ミクロゾーム(Ms)を用いて、上記代謝物が CB187 から生成されるかどうかを調べた。その結果、モルモット肝 Ms により、3種の代謝物が生成され、それらは 4'-OH-2,2',3,5,5',6-hexaCB (CB151)、4'-OH-2,2',3,3',5,5',6-heptaCB (CB178)および上記の 4-OH-CB187 であることが明らかとなった。また、これらは、PB 前処理 Ms で増加したことから、PB 誘導性のチトクロム P450(CYP2B18)の強い関与が示唆された。なお、ラットでは PB 前処理 Ms でのみ、4'-OH-CB178 と 4-OH-CB187 の生成が見られたが、この活性はモルモットに比べ、低かった。また、ハムスターでは PB 前処理 Ms で 4'-OH-CB178 が生成されただけであった。以上の結果から、4-OH-CB187 はモルモットおよびラット肝により CB187 から生成されることが明らかとなった。

A. 研究目的

2,4,5-三塩素置換 PCB の CB138、153 および 187 は、毒性学的評価は低いものの、ヒトを含む哺乳動物の肝、脂肪組織、血液、母乳において高濃度で検出されている。一方、このうち CB187 代謝物の 4-水酸化(OH)体は、哺乳動物血中において最も高濃度で局在していることが報告されている¹⁻³⁾。当研究室ではこれまでに、CB138⁴⁾および 153⁵⁾の代謝を調べ、いずれの代謝活性もモルモットで高いこと、また、CYP2B subfamily のチトクロム P450(P450)が強く関与することを明らかにした。そこで本研究では、動物肝ミクロゾーム(Ms)による CB187 の代謝について調べた。

B. 研究方法

① **実験動物および薬物処理**: 実験動物は Wistar 系雄性ラット(体重約 200 g)、Hartley 系雄性モルモット(体重約 280 g)および Golden syrian 雄性ハムスター(体重約 80 g)を用いた。肝 Ms の調製は、未処理、フェノバルビタール(PB)または 3-メチルコラントレン(MC)を前処理した実験動物より肝を摘出し、常法により行った。

② **CB187 代謝**: CB187 を NADPH 存在下、好氣的に動物肝 Ms とともに HEPES 緩衝液(pH 7.4)中で、37°C、60 分間インキュベート後、有機溶媒で抽出し、GC-ECD にて測定した。

C. 研究結果

GC-ECD の結果、未処理肝 Ms の場合、モルモットでのみ3種類の代謝物が保持時間 17.6min(M-1)、21.5min(M-2) および 22.5min(M-3)に検出された(Fig. 1)。これらの生成量は M-2>M-1>M-3 の順であった。なお、ラットおよびハムスターでは代謝物ピークは検出されなかった。PB 前処理の場合、モルモットでは M-1 と M-2 が未処理の 1.9 倍と 3.4 倍に増加したが、M-3 は全く変化なかった。ラットでは M-2 と M-3 が、ハムスターでは M-2 が新たに生成されたが、主代謝物 M-2 の生成量はモルモット>ラット>ハムスターの順であった。MC 前処理の場合、モルモットでは M-1 と M-2 の生成が激減したが M-3 は未処理の 1.2 倍であった。ラットとハムスターでは代謝物は見られなかった。次に、GC-MS を用いて、別途合成した予想代謝物と比較したところ、M-1 は 4'-OH-