

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク 研究事業

ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山下 敬介

平成17年(2005年) 3月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

ダイオキシン類の生体毒性発現
機構の解析

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山下 敬介

平成17年(2005)3月

目次

I. 主任研究報告書 ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析 山下 敬介	————— 1
II. 分担研究報告書	
1. ダイオキシンの免疫毒性発現機構の解析 菅野 雅元	————— 6
2. 細胞外基質認識受容体、インテグリンの研究 横崎 恭之	————— 13
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	————— 15
IV. 研究成果の刊行物・別刷	————— 16

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析

主任研究者 山下敬介

広島大学大学院医歯薬学総合研究科（解剖学および発生生物学研究室）助教授

研究要旨

アリール炭化水素受容体、別名ダイオキシン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)はダイオキシンと結合して、ダイオキシンによる毒性の発現に関与する。しかしながら、AhRの生体内リガンド（結合物質）は同定されていない。AhR遺伝子欠損マウスの表現型を解析することにより、AhRの生体内作用を解析できるはずである。この作業仮説のもとに、表現型解析を行った。AhR欠損ホモマウス(AhR^{-/-})マウスは加齢に伴い、背曲がりを起こしてくる。これは、AhR^{-/-}マウスでは、エストロゲンが低値であるために、骨粗鬆症が誘発されるのではないかと推測された。そこで、メスの野生型マウスとAhR^{-/-}マウスのそれぞれに卵巣摘出手術を施し、低エストロゲン状態を起こすことにより、骨粗鬆症がおこるかどうかを見た。まず、野生型マウスの卵巣を摘出することにより、骨粗鬆症を誘発することができ、骨粗鬆症モデルとなることが確認された。AhR^{-/-}マウスの卵巣を摘出することによって、骨密度は一層低下することが明らかになった。このことは、AhR^{-/-}マウスの背曲がり現象は、不完全なもので、卵巣摘出によって、一層の骨粗鬆症が起こることを意味した。無処置群のAhR^{-/-}マウスの骨密度は、野生型マウスのそれよりも低値であることが予想されたが、両マウスの遺伝的バックグラウンドの相違により、その予想を証明することはできなかった。

A. 研究目的

ダイオキシンをはじめとする芳香族炭化水素は、細胞内でアリール炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor, 以下AhRと略)を介して種々の毒性を発揮することが明らかにされてきた。AhRはbasic helix-loop-helix(bHLH)ドメインをもつ転写調節型の受容体である。

(目的)

アリール炭化水素受容体遺伝子欠損ホモ(AhR^{-/-})マウスを飼育している最中に、背曲がりマウスが見つかった。これは、骨

粗鬆症によるものではないかどうかを検証する目的で実験を行った。

(実験デザイン)

野生型マウスに卵巣摘出手術を施すと、エストロゲン低下状態がおこる。エストロゲンの低下は、骨粗鬆症発症の要因であることから、椎骨と脛骨をマイクロCTで、骨密度を測定し、骨粗鬆症がおこることを確認する。これを基本的な実験系として用いる。

AhR^{-/-}マウスを通常飼育していると、野生型と同等の骨粗鬆症が起こっているとす

ると、これは表現型として、遺伝子欠損により、骨粗鬆症が起こるといえる。さらに AhR^{-/-}マウスに卵巣摘出手術を施すと、骨粗鬆症が一層重篤化するかどうかを確認する。一層重篤化するとなると、AhR^{-/-}に表現型として見られる骨粗鬆症は、不完全なものであることが考えられ、AhR 欠損の他にもエストロゲン代謝に関係する代謝経路があることが予想される。

B. 研究方法

(材料と方法)

7 週齢のメスマウスを用いた。使用したマウスは、C57BL/6J:Jcl は日本クレアから購入した。AhR^{-/-}マウスは、Mimura ら (1997) が作製したマウスを継代したマウスを用いた。

1) 卵巣摘出手術

Roggia ら (2001) にならって、卵巣摘出手術を施した。ペントバルビタールによりマウスを麻酔した。開腹を行い、両側の卵巣を摘出した。シャム手術群として、開腹は行ったが、卵巣は摘出しない実験群を設けた。シャム手術群は、開腹手術が実験結果に及ぼす影響を評価するための群である。各群 5 匹のマウスを用いた。

ア) C57BL/6J マウスをそのまま 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。(野生型マウス無処置群)

イ) C57BL/6J マウスに卵巣摘出手術を施して、その後 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。(野生型マウス卵巣摘出群)

ウ) C57BL/6J マウスに開腹手術を行ったが、卵巣は摘出しないシャム手

術を施して、その後 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。(野生型マウスシャム手術群)

エ) AhR^{-/-}マウスをそのまま 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。

(AhR^{-/-}マウス無処置群)

オ) AhR^{-/-}マウスに卵巣摘出手術を施して、その後 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。(AhR^{-/-}マウス卵巣摘出群)

カ) AhR^{-/-}マウスに開腹手術は行ったが、卵巣は摘出しないシャム手術を施して、その後 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。(AhR^{-/-}マウスシャム手術群)

2) 骨密度測定

6 群のマウスの胸椎と腰椎を連続した椎骨として摘出した。さらに、脛骨を摘出した。腰椎は、第 2 腰椎を測定に供した。第 1 腰椎であることを確認するために、肋骨と腰椎を一塊として摘出し、第 1 腰椎のみを測定の対象とした。骨は周囲の軟部組織を剥離し、ホルマリン固定した。測定したスライス断面は第 1 腰椎で頭側と尾側の 2 つのスライス、脛骨で骨幹端部と中央部の 2 つのスライスを用いた。

骨密度測定は、エルク・コーポレーション (〒113-0034 東京都文京区湯島 2 丁目 17 番 4 号) (<http://www.elkc.co.jp/business/bone.html>) に依頼した。

測定の方法は、pQCT 法 (peripheral quantitative computed tomography) を用いて骨密度を測定した (Ferretti, 2000)。基本的には、骨の海綿骨と皮質骨を区別して、それぞれ骨体積密度 (g/cm^3) を解析す

るものである。

C. 研究結果

1) 野生型マウスにおける卵巣摘出が骨密度に及ぼす影響

野生型マウスに卵巣摘出を行うことにより、腰椎と脛骨の骨密度が有意に低下した。これは、卵巣摘出手術により、骨粗鬆症が誘発されたことを意味する(図1、AからC、図には脛骨の結果のみを示す)。これにより、卵巣摘出術による、骨粗鬆症誘発の実験系が確立した。

2) AhR^{-/-}マウスにおける卵巣摘出が骨密度に及ぼす影響

AhR^{-/-}マウスに卵巣摘出を行うことにより、腰椎と脛骨の骨密度が有意に低下した(図1、DからF、図には脛骨の結果のみを示す)。

3) 野生型マウスと AhR^{-/-}マウスの腰椎と脛骨の骨密度の比較

両者の腰椎と脛骨の骨密度を、無処置群同士で比較した。両マウスでの骨密度は、腰椎および脛骨のそれぞれで、異なっていた。そのため、両マウス間での比較はできなかった。

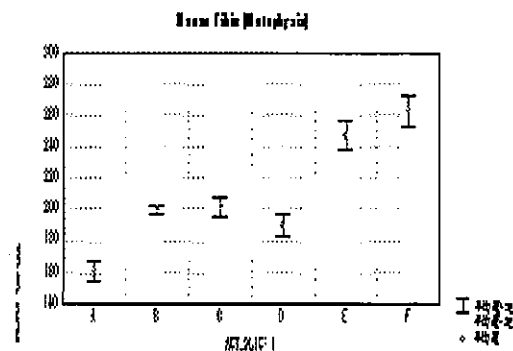


図 1. 脛骨の骨端部における海綿骨の密度の変化 (AからCは野生型マウス、Dから

Fは AhR^{-/-}マウスの脛骨

A : 卵巣摘出をした野生型

B : シャム手術をした野生型

C : 無処置の野生型

D : 卵巣摘出をした AhR^{-/-}マウス

E : シャム手術をした AhR^{-/-}マウス

F : 無処置の AhR^{-/-}マウス

D. 考察

1) 野生型マウスにおける卵巣摘出が骨密度に及ぼす影響

野生型マウスに卵巣摘出手術を行うことにより、骨粗鬆症のモデルを作製することができた。

2) AhR^{-/-}マウスにおける卵巣摘出が骨密度に及ぼす影響

AhR^{-/-}マウスに卵巣摘出を行うことにより、骨密度は低下した。このことは、卵巣摘出により、低エストロゲン状態をおこすと、骨密度が低下することを意味する。

3) 野生型マウスと AhR^{-/-}マウスの腰椎と脛骨の骨密度の比較

実験を行う前の作業仮説として、無処置群において、野生型マウスの骨密度よりも、AhR^{-/-}マウスの骨密度が低いことが、AhR^{-/-}マウスの骨粗鬆症の原因であるとの仮説を立てて、実験をおこなった。

しかし、実際に実験を行ってみると、結果は逆であった。無処置群の野生型マウスの骨密度が、AhR^{-/-}マウスの骨密度よりも低いことが判明した。

これは、両マウスの遺伝的背景が異なることが骨密度に反映したことが考えられる。野生型として、今回は日本クレアから購入

した C57BL/6J を用いた。AhR^{-/-}マウスは、作製された当初のマウスの AhR^{-/-}マウスのオスとメスの交配により得られたマウスを実験に用いた。作製された当初のマウスの遺伝的背景としては、S129 マウスと C57BL/6J の両方の遺伝形質を持っていることが考えられる。

以上の問題点を解決するためには、野生型マウスと AhR^{-/-}マウスの遺伝的背景を完全に一致させて、実験に臨むことが必須となる。

今年度の実験では、AhR^{-/-}マウスのバッククロスが進まず、野生型マウスと AhR^{-/-}マウスのバックが揃わなかったために、正確な比較ができなかった。

問題解決の具体策は以下の通りである。C57BL/6J:Jcl を用いて、AhR^{-/-}マウスを 10 世代以上にわたり、バッククロスする。10 世代以上のバッククロスができた後、AhR^{+/-}マウス（ヘテロ型）同士を交配し、その F1 世代に AhR の遺伝子型が +/+（野生型）、+/-、-/-（ノックアウトホモ）のマウスを得る。この F1 世代のマウスを用いて、本年度行った実験を同様に行う。これにより、AhR^{-/-}マウスの腰椎と脛骨の骨密度は、AhR^{+/+}マウスの腰椎と脛骨の骨密度と比較して、有意に低いことが証明できれば、AhR^{-/-}マウスの表現型として、骨粗鬆症が見られることが結論できる。

E. 結論

1) 野生型マウスを用いた卵巣摘出実験により、マウスの骨粗鬆症のモデルが作製された。

2) AhR^{-/-}マウスの卵巣を摘出することに

より、骨密度はさらに低下した。このことは、AhR^{-/-}マウスに見られた骨粗鬆症が完全なものではないことを意味する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Okayama T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T (2004) Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo. BBRC 318: 571-578.

・ Fukui Y, Ema M, Fujiwara M, Higuchi H, Inouye M, Iwase T, Kihara T, Nishimura T, Oi A, Ooshima Y, Otani H, Shinomiya M, Sugioka K, Yamano T, Yamashita KH, Tanimura T (2004) Comments from the behavioral teratology committee of the Japanese Teratology Society on OECD guideline for the testing of chemicals, proposal for a new guideline 426, developmental neurotoxicity study, draft document (September 2003). Cong. Anom. 44: 172-177.

2. 学会発表等

なし。

H. 参考文献

Ferretti JL (2000) Peripheral quantitative computed tomography for evaluating structural and mechanical properties of small bone. IN: (An YH, Draughn RA, eds) Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface. CRC: Boca Raton (FL), pp. 385-405.

Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. Genes to Cells. 2: 645-654.

Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R (2001) Up-regulation of TNF-producing Tcells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 13960-13965.

Parfitt AM, Drezner MK, Clorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987) Bone histomorphometry: standaridization of nomenclature, symbols, and units. Journal of Bone and Mineral Research 2: 595-610.

I. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

ダイオキシンの免疫毒性に関する研究

分担研究報告書

分担研究者 菅野 雅 元

広島大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

本研究では、「ダイオキシン類の免疫系・血球系への作用を解析する」という目的でスタートした。数年前までは、ダイオキシン類の免疫系に及ぼす作用の分子免疫学的解析は殆ど行われていなかったが、最近いくつかの免疫学的報告がなされるようになってきた。しかし、報告されている各研究間で結果・解釈が異なるなど、まだ正確な解析が行われているとは言い難い。前年度までに、ダイオキシンを1回経口投与しただけで、（1）免疫系にとって非常に重要な胸腺が劇的に萎縮し、細胞数が激減し、効果が1か月以上持続すること。（2）造血系幹細胞の機能・性状が変化することが分かった。この様な複数の異常により免疫不全症になると考えられる。以上より、今年度は「どのような細胞数減少機構が関与しているのか?」、「レセプターとダイオキシン投与による胸腺萎縮作用との関連は?」、などの問いに答えることを目的とした。将来的には、「この免疫不全症に対処する方法は何か?」の問いに対する答えの基盤を提供出来たと思う。

A. 研究目的

ダイオキシン類の免疫系に及ぼす作用の分子免疫学的解析は殆ど行われていない。前年度までの研究で、ダイオキシンを1回経口投与しただけで、免疫系にとって非常に重要な胸腺が劇的に萎縮し、細胞数が激減し、効果が1か月以上持続することがわかった。さらに血球系にとって最も重要な骨髄中の造血幹細胞の性状も変化することが分かった。これらの異常により免疫不全症になることが分かった。以上より、「どのような細胞数減少機構が関与し

ているのか?」、「どのような幹細胞自己複製能制御機構が関与しているのか?」、「レセプターとダイオキシン投与によるこれらの異常との関連は?」、などの問いに答えることを全体計画とし、将来的には、「この免疫不全症に対処する方法は何か?」の問いに対する答えの基盤を提供することを目的とした。

ヒトの胸腺は10歳ごろまでは増加しなければならない臓器であり、ダイオキシン類の影響により胸腺の萎縮が起きれば、結果として小児のアレルギーやアトピーの増加を招く可能性が非常に高いと思われる。そのような観点から、

小児で増加しているアレルギーやアトピーの原因の一つとしてダイオキシン類をターゲットとして考え、その対応法を探るための基礎実験の必要性は非常に高く、社会的なニーズも高いと考えられる。大人でもアレルギー性の疾患は年々増加しており、ダイオキシン類との関係は無視できない。さらに、最近の再生医療が注目を集める中、造血幹細胞を用いた各種の再生医療の試み等も盛んになってきているが、この幹細胞がダイオキシン投与でどのような影響があるのかについてはほとんど報告が無い。本研究を遂行することで、小児のアレルギーやアトピーに対処する新しい方法論や幹細胞生物学に対する新しいアプローチ、再生医療への応用、などが生まれる基礎研究になることを目指した。

B. 研究方法

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

(倫理面への配慮)

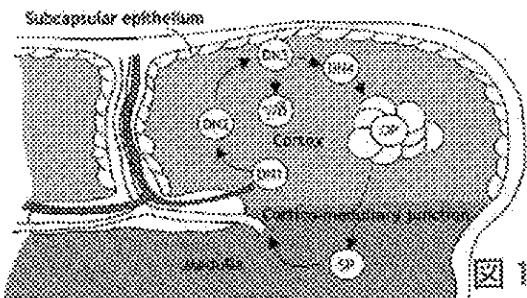
マウスを用いた実験は、広島大学動物実験指針に基づき実験計画書の審査がなされ、許可されたものであり、倫理面の審査も問題がないとされた。

C. 研究結果

実験 1 (胸腺萎縮)；

胸腺という器官はTリンパ球の発生・分化に重要な器官であるだけでなく、免疫系全体にとっても、「自己・非自己の識別」をリンパ球が学習する教育機関として非常に重要である。ここで正しく「自己同一性」を教育されなければ、外部からの感染症に対応出来なくなる。さらに間違った教育 (正・負の選択) から自己反応性

リンパ球の排除が適切に行われなかったために、自己反応性リンパ球が末梢に出現し、自己組織を攻撃してしまう。これらの要因が重なった結果として、「感染症」「自己免疫疾患」「免疫不全」「アレルギー・アトピー」をとらえることが出来るため、これらの疾患との関係を考えるうえで、中心的な器官である。その胸腺の中で、



リンパ球は、図 1 の様に胸腺の中を移動しながら分化・成熟し、末梢・全身へと運ばれてゆく。さらに詳しくその分化段階を見ると下の図2の様に細胞の選択と運命づけの段階が判明してお

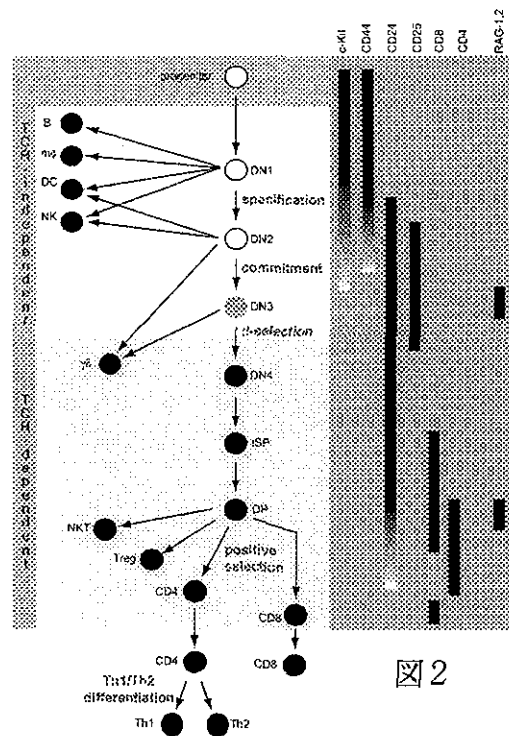


図 2

り、ほぼ各段階ごとに細胞死のルートが設定さ

れていると考えられている。

研究の経過：

ヒトの体内に普通にダイオキシンが入ってくるのと同じ経路（経口投与）でマウスに投与したときに、「マウス個体（特に免疫系）に何か起きているのか？」という事を正確に記述・解析することにフォーカスを絞った。免疫学的には、最近リンパ球の発生・分化に核内受容体ファミリーが重要な役割を果たしていることが少しずつ明らかになってきているが、AhRが胸腺内T細胞分化にどのような役割を果たしているのか、という点に研究的を絞った（生体内のリガンドは不明?）。とにかく、ダイオキシンによる免疫不全（胸腺萎縮を含む）に関して、あまりにも様々な報告（中には間違った情報もある）がされている。実際、ダイオキシンによる胸腺萎縮、免疫不全の作用点は、「アポトーシス・細胞周期停止だ」としてin vitroの実験をしている論文・報告があるが、今回の我々の研究から、それは間違いである可能性が高くなった。

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

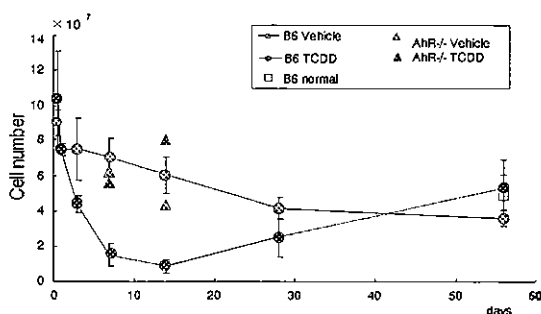


図3 細胞数の推移

も症状が顕著である3日—2週間の時期について、注目すると、この時期の胸腺は正常の1/10の大きさになり、遺伝子再構成を起こす分化段階（図2のDN3とDN4の間；）が最も影響が強い事などがわかった。このことから、DN3細胞で、pre-T CR シグナルが入り細胞増殖が起きるステージから後のT細胞分化段階においてTCDD投与による異常（細胞数の減少）が起こることが判明した。その分子機構としては、DN3細胞の増殖（またはサバイバル障害）と細胞死のバランスの破綻が起きていることが考えられた。

2) この時期のダイオキシンの作用点は細胞周期ではなく、細胞死調節機構であることが判明した。ダイオキシンによる胸腺細胞死は、DNA分断非依存性、Bcl-2非依存性（Bcl-2 Tgマウスでレスキュー出来ない）、Caspase非依存性、であるが、ミトコンドリア膜電位依存性、の細胞死であることが分かり、一般的「アポトーシス」とは異なるタイプの細胞死である事が分かった（データは示しません）。形態学的にも、電子顕微鏡観察を行ったところ、ミトコンドリアの膨化や、小胞体（ER）が空胞化している像が多く見られ、死細胞の割合も多かった（昨年度に示した）。特にこのステップの細胞死はp53依存性の細胞死であることが判明してきており、AhR依存性の細胞死の経路とp53依存性細胞死が交差している可能性が考えられた。

3) リセプター遺伝子欠損マウスにおいて同様の実験を行うと、胸腺萎縮が90%以上回復することから、ミトコンドリアの膜電位を介したCa

spase非依存性の細胞死機構がAhR依存性である事が判明した。この経路・機構にAhRの標的遺伝子群が関与していると考えられた。この事は逆にいうと、この時期(図1 CD 3のからCD 4への移行期)にSubcapsularリンパ球が滞在しているリガンドが存在している可能性も示唆している。細胞死の様式に関する検討は「考察」の所で述べる。

キシシン投与群(黒三角)の幹細胞分画はその能力をほとんど失っていた。この結果は単にダイオキシシン類が幹細胞の自己複製能をも標的にしているという毒性学的な観点だけでなく、AhRとその自然リガンド系が幹細胞の自己複製制御機構に関与していると考えることが出来る。最近の自己複製制御(不均等細胞分裂制御機構)との関係を「考察」で論じる。

実験2 (造血幹細胞):

免疫系・血球系細胞の基になる

「造血幹細胞」に対するTCDDの影響は何であろうか? ほとんど報告がなされていないのが現状である。

そこで、ダイオキシシン投与による造血幹細胞の機能を骨髓移植の実験系を用いて解析を始めた。その結果、表面マーカーは造血幹細胞であるが、まったく再構築能を失っていることが判明した(図5参照)。図

5Aの様に、ダイオキシシン経口投与1週間後のマウス骨髓より、CD34⁺, c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lineage marker-negativeの造血幹細胞分画をFACS Vantage/ cell sor

terで単離し、その細胞100個を、致死量の放射線を照射し、血球系を破壊しておいたレシピエント・マウスに骨髓移植を行った。その後140日まで、観察し長期再構築能を検討した。図5Cのグラフで分かるように、コントロール群(白丸)は正常に血球系が再構築されたが、ダイオ

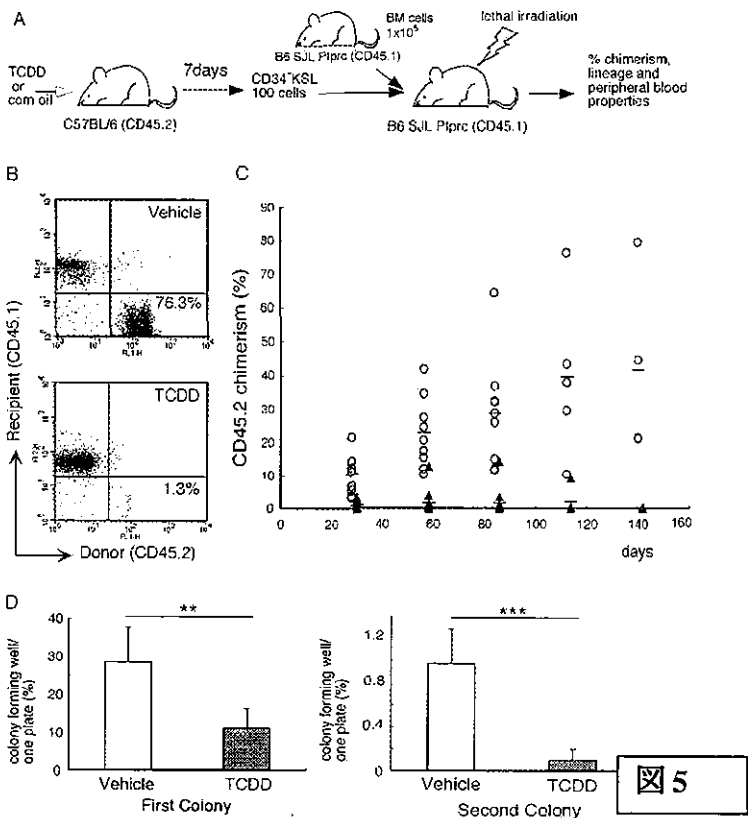


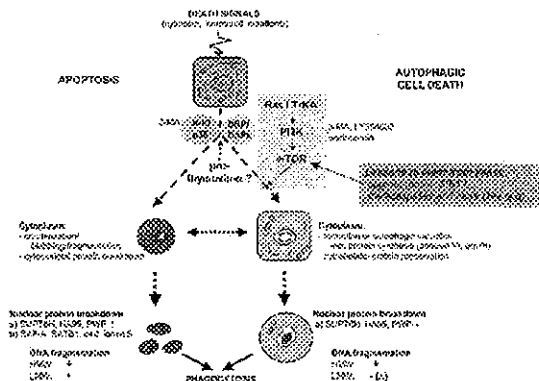
図5

D. 考察

実験1 (胸腺萎縮)

今回の研究から、AhR/Arnt系(またはTCDDの作用)は、T細胞のDiversity形成に重要なpreTCRからのシグナルを受

け取った後の細胞増殖 (beta-selection) を制御していることがわかった。少なくともそのシグナル伝達分子の遺伝子発現が AhR/Arnt により制御されていることがわかった。結果的に免疫系の Diversity が正常よりかなり小さくなることから、自己免疫疾患・アレルギーとの関係について無視できないことがわかった。また、その際に起きる細胞死はアポトーシスとは異なる細胞死であることが判明した。DAP-Kinase 群の発現上昇 (DNA Tip 解析の結果より)、電子顕微鏡を用いた細胞形態の解析、ミトコンドリア膜電位の変化 (MMP)、などの解析結果を総合すると、「Autophagy」タイプの細胞死 (下図参照) が起きていると考えられる。この人工的制御技術の開発、または TCDD の作用を阻害する手段の開発につながる分子標的



を示すことが出来たと思う。

実験 2 (造血幹細胞):

この研究結果は、AhR/Arnt を介して、造血幹細胞の自己複製能を制御できる可能性が存在する事を意味している。最近、ポリコム遺伝子群による造血幹細胞の不均等細胞分裂の制御が自己複製能の制御に非常に重要であることが示され、AhR/Arnt システムはそれらの遺伝子発現を制御している可能性が非常に高くなってきた。このことは将来的には患者自身の造血幹細胞を用いた再生医療を考える上で、そ

の人工的制御技術の開発という観点からは非常にインパクトが大きいと思われる。さらに TCDD が造血幹細胞の機能にも致命的な障害を与えているという、全く初めての研究結果なので、その意味でも初回の影響は大きいと思われる。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Miyazaki M, Kawamoto H, Kato Y, Itoi M, Miyazaki K, Masuda K, Tashiro S, Ishihara H, Igarashi K, Amagai T, Kanno R, and Kanno M. Polycomb group gene mel-18 regulates early T progenitor expansion by maintaining the expression of Hes-1, a target of Notch pathway. **J.Immunol.** 174 : 2507-2516, 2005
- Kajiume T, Ninomiya Y, Ishihara H, Kanno R, and Kanno M The Polycomb group gene mel-18 modulates the self-renewal activity and cell-cycle status of hematopoietic stem cells. **Exp. Hematol.** 32: 571-578, 2004

2. 学会発表 など

(国外：シンポジウム・学会発表、など)

・ Masamoto Kanno¹, Masaki Miyazaki,¹ Hiroshi Kawamoto,² Yuko Kato,¹ Manami Itoi,³ Kyoko Masuda,² Takashi Amagai,³ and Rieko Kanno¹ POLYCOMB GROUP GENE MEL-18 CONTROLS NOTCH SIGNALING IN EARLY T-CELL PROGENITOR EXPANSION.

The 69th Symposium Epigenetics, Cold Spring Harbor Symposium, Cold Spring Harbor, NY, 2-7 June 2004

・ Masamoto Kanno¹, Masaki Miyazaki,¹ Hiroshi Kawamoto,² Yuko Kato,¹ Manami Itoi,³ Kyoko Masuda,² Takashi Amagai,³ and Rieko Kanno¹ POLYCOMB GROUP GENE MEL-18 CONTROLS NOTCH SIGNALING IN EARLY T PROGENITOR EXPANSION. CSHL meeting; Gene Expression & Signaling in the immune system, Cold Spring Harbor, NY, 28 April-2 May 2004

Masaki Miyazaki,¹ Hiroshi Kawamoto,³ Yuko Kato,¹ Manami Itoi,⁴ Kazuko Miyazaki,⁵ Kyoko Masuda,⁶ Satoshi Tashiro,² Hiroto Ishihara,¹ Kazuhiko Igarashi,² Takashi Amagai,⁴ Rieko Kanno,¹ and Masamoto Kanno¹ Polycomb group gene mel-18 controls Notch signaling in early T progenitor expansion. 12th International Congress of Immunology Montreal Quebec, Canada 18-23 July 2004

Hiroko Inoue ^{*,†}, Rieko Kanno ^{*,†}, Ruriko Sakai ^{*,†}, Saori Okamura^{†,‡}, Yuichi Ninomiya ^{*,†}, Keisuke H. Yamashita ^{†,‡} and Masamoto Kanno After Activation by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin, AhR Induces Developmental Defect in DN3 Thymocyte and Caspase-independent Cell Death 12th International Congress of Immunology Montreal Quebec, Canada 18-23 July 2004

Teruyuki Kajiume a,b, Yuichi Ninomiya b, Rieko Kanno b, and Masamoto Kanno The Polycomb group gene mel-18 modulates the self-renewal activity and cell-cycle status of hematopoietic stem cells by controlling Hoxb4 expression Death 12th

International Congress of Immunology Montreal Quebec, Canada 18-23 July 2004.

・ Masaki Miyazaki,* Hiroshi Kawamoto,[‡] Yuko Kato,* Manami Itoi,[§] Kazuko Miyazaki,[¶] Kyoko Masuda,^{||} Satoshi Tashiro,[†] Hiroto Ishihara,* Kazuhiko Igarashi,[†] Takashi Amagai,[§] Rieko Kanno,* and Masamoto Kanno¹ Epigenetic Regulation in the Immune System: Polycomb group gene mel-18 regulates early T progenitors expansion by maintaining the expression of Hes-1, a target of Notch pathway The Second International Symposium on COE "DNA Metabolism and Chromatin Dynamics in Cellular Responses" Hiroshima Japan, 16-17 Dec 2004

・ Masamoto Kanno¹, Teruyuki Kajiume¹, Hideaki Tgami², Mari Kimura¹, Rieko Kanno¹, and Yoshihiro Nakatani² Epigenetic regulation of tumorigenicity by Polycomb protein complexes Hiroshima Cancer seminar & Tottori Bioscience seminar/ International Symposium; Hiroshima Japan 30 Oct-1 Nov, 2004

M.Kanno Epigenetic Regulation on Immune System POLYCOMB GROUP GENE CONTROLS NOTCH SIGNALING IN EARLY T PROGENITOR EXPANSION; CSHL meeting; SYSTEM BIOLOGY Global Regulation of Gene Expression Cold Spring Harbor, NY, 17-20 March 2005

M.Miyazaki and M.Kanno. Stability of Polycomb protein complexes influences intrathymic T cell development during DN to DP transition. 4th International Workshop of Kyoto Tcell Conference Shiran-Kaikan Kyoto Japan 8-10 April 2005

(国内：シンポジウム・特別講演)

・ 菅野雅元 ポリコム遺伝子群 mel-18 による T 前駆細胞の増殖制御 転写研究会 2004 年 1 月 15-17 日 筑波

・ 菅野雅元 井上洋子 チンパンジーを用いた、HCV 感染初期免疫応答の解析 血液事業研究会

・ 菅野雅元 ポリコーム遺伝子群 meI-18 による T 前駆細胞の増殖制御 大阪大学 2004 年 8 月 2 日

・ 菅野雅元 組織障害とアレルギー : Danger 仮説と自然 / 獲得免疫系 シンポジウム 3 「気道感染とアレルギー・最近の知見」 第 41 回日本小児アレルギー学会 都市センターホテル 2004 年 11 月 27 日 - 28 日

・ 宮崎正輝 河本宏 加藤裕子 宮崎和子 糸井マナミ 増田喬子 雨貝孝 菅野理恵子 菅野雅元 ポリコーム遺伝子群 meI-18 による T 前駆細胞の増殖制御 第 27 回日本分子生物学会ワークショップ W1Q 免疫系細胞の発生分化の分子機構 神戸ポートアイランド 神戸 2004 年 12 月 8 日 - 11 日

知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究協力者

井上洋子 (広島大学 医学部・教務員)

菅野理恵子 (広島大学 医学部・研究員)

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク安全事業)
分担研究報告書

オステオポンチンの酵素切断による受容体選択性の変化

分担研究者 横崎 恭之
広島大学医歯薬学総合研究科
病態情報医科学 講師

研究要旨

オステオポンチンは免疫、炎症の調整因子である。その作用は主に受容体インテグリンを介して発揮されるものと考えられるが複数のインテグリンのうち生体内でどれが使用されているか不明である。そこで、オステオポンチンの酵素切断により結合するインテグリンが変化することを確かめた。

A. 緒言

酸性糖蛋白オステオポンチンは、細胞外マトリックスにもサイトカインにも分類される多彩な機能を持つ分子である。組織のリモデリングや免疫反応、炎症反応の修飾をおこなうが、その機能は受容体インテグリンあるいは CD44 と結合することによって発揮される。オステオポンチンは多くのインテグリンが好んで結合する RGD 配列を有しており、 $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ がここに結合する。また $\alpha 4\beta 1$ と $\alpha 9\beta 1$ が RGD に隣接した SVVYGLR 配列に結合する。マイクロアレイを使用した近年の報告によれば、オステオポンチン発現は環境刺激により劇的に誘導される。インテグリン $\alpha v\beta 6$ も同様に環境刺激で上昇するが、ブレオマイシン刺激におけるオステオポンチン上昇は、 $\alpha v\beta 6$ 欠損マウスでは生じないため、 $\alpha v\beta 6$ に依存した上昇機構が存在すると思われる。そこで、今回私たちはオステオポンチンとインテグリン $\alpha v\beta 6$ の相互作用に関して検討した。次に、オステオポンチンは生体内で、トロンビン、MMP-3 および MMP-7 により切断されることが示されており、トロンビン配列と MMP-3,7 の切断部位の差はアミノ酸 2 残基と非常に近接している。また MMP-3,7 の切断部位は上記の SVVYGLR 配列の中にある。従って、これらの切断により、結合できる受容体の種類が変化すると仮説を立て、切断型のリコンビナント蛋白を作製し結合性を検討した。

B. 方法

全長オステオポンチン cDNA に deletion mutation を施し、酵素分解産物をコードした cDNA を作製し、発現ベクターに組み込み大腸菌に GST 融合蛋白として発現させ精製した。オステオポンチンとインテグリンの結合は、インテグリン $\alpha 9$, $\beta 3$, $\beta 6$ cDNA を遺伝子導入した SW480 細胞を用い、SW480 の発現するオステオポンチン受容体、 $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ の阻害抗体存在下で接着アッセイを行った。また、 $\alpha v\beta 6$ とオステオポンチンの結合はオステオポンチンを結合させたカラムを作製し、可溶性 $\alpha v\beta 6$ の結合性を確かめた。

C. 結果および考察

可溶性 $\alpha v\beta 6$ はオステオポンチンカラムから EDTA により溶出され、このインテグリンがオステオポンチンの受容体であることを新しく同定した。また、RGD 配列近傍の配列を変化させる事により、 $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ の結合性は大きく低下したが、 $\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ は変化を認めなかった。トロンビン切断型は全長型に比べて、 $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ との結合性は著変なかったが、 $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 5$ の結合性は大きく上昇していた。一方、MMP 切断型では、 $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 5$ の結合性は低下していた。以上より、全長オステオポンチンに対しては、 αv -インテグリンが (RGD 部位のコンフォメーションによっては $\alpha v\beta 3$ 優位に) 働き、トロンビン存在下では $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ が働き、MMP 存在下では、また αv -インテグリン優位となるものと考えられ

た。オステオポンチンのインテグリンとの結合性は酵素の翻訳後修飾により変化し、その機能に影響を与える物と考えられた。

D. 文献

1. Yokosaki Y, et al: *J. Biol. Chem.* 274: 36328-36334, 1999.
2. Yokosaki Y, et al: *Trend. Cardiovasc. Med* 10: 155-159, 2000.
3. Yokosaki Y, et al: *Matrix biology* (in press)
4. 横崎恭之他、日本臨床（印刷中）

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) Yokosaki Y, Tanaka K, Higashikawa F, Yamashita K, Eboshida A

Distinct structural requirements for binding of the integrins $\alpha v \beta 6$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha 9 \beta 1$ to osteopontin'

Matrix Biology（印刷中、2005）

- 2) 横崎恭之、東川史子

日本臨床特集号：臨床分子内科学3

VII. 特論 オステオポンチン

オステオポンチン受容体とシグナル伝達。

日本臨床（印刷中、2005）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

ア) 主任研究者：山下敬介

- 1) Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Okayama T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T (2004) Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo. *BBRC* 318: 571-578. (原著論文)
- 2) Fukui Y, Ema M, Fujiwara M, Higuchi H, Inouye M, Iwase T, Kihara T, Nishimura T, Oi A, Ooshima Y, Otani H, Shinomiya M, Sugioka K, Yamano T, Yamashita KH, Tanimura T (2004) Comments from the behavioral teratology committee of the Japanese Teratology Society on OECD guideline for the testing of chemicals, proposal for a new guideline 426, developmental neurotoxicity study, draft document (September 2003). *Cong. Anom.* 44: 172-177. (原著論文)

イ) 分担研究者：菅野雅元

3) なし

ウ) 分担研究者：横崎恭之

- 4) Yokosaki Y, Tanaka K, Higashikawa F, Yamashita K, Eboshida A (2005, in press) Distinct structural requirements for binding of the integrins $\alpha v \beta 6$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha 9 \beta 1$ to osteopontin. *Biomatrix Biology*. (原著論文)

5) 横崎恭之

横崎恭之、東川史子(2005 印刷中)オステオポンチン受容体とシグナル伝達。

Osteopontin receptors and signal transduction. (2005 印刷中)

日本臨床 臨床分子内科学 3

VII.特論 -オステオポンチン- (原著論文)



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

Kazumi Sugihara,^a Shigeyuki Kitamura,^{a,*} Tsuyoshi Yamada,^a Takashige Okayama,^a Shigeru Ohta,^a Keisuke Yamashita,^a Mineo Yasuda,^b Yoshiaki Fujii-Kuriyama,^c Ken'ich Saeki,^d Saburo Matsui,^e and Tomonari Matsuda^e

^a Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Japan

^b Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, Japan

^c Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, Japan

^d Nagoya City University, Japan

^e Department of Environmental Engineering, Kyoto University, Japan

Received 19 March 2004

Available online 22 April 2004

Abstract

Indirubin and indigo, which are thought to be natural ligands for aryl hydrocarbon receptor (AhR), showed marked AhR ligand activities in a reporter gene assay using recombinant yeast. Their activities were comparable with or more potent than that of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. When indirubin and indigo were administered to mice, ethoxyresorufin-*O*-dealkylase and methoxyresorufin-*O*-dealkylase activities in the liver were increased, but subsequently decreased within 2 days. Indirubin was more potent than indigo. Levels of cytochrome P450 1A1/2 proteins and mRNAs in the liver of mice dosed with indirubin were also enhanced. These enhancing effects of indirubin and indigo were not observed in *AhR* knock-out mice. Ethoxyresorufin-*O*-dealkylase and methoxyresorufin-*O*-dealkylase activities in rat hepatocytes and HepG2 cells were enhanced by the addition of indirubin or indigo, but less potently than by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Indigocarmine, a sulfate derivative of indigo, which is used as food additive, did not show these inducing effects on drug-metabolizing enzymes. Our results suggest that indirubin and indigo act as inducers for cytochrome P450 1A1/2 mediated by AhR in mammals *in vivo*.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cytochrome P450; Indirubin; Indigo; Induction; Aryl hydrocarbon receptor; Ethoxyresorufin-*O*-dealkylase; Methoxyresorufin-*O*-dealkylase

Indigo, which is produced by fermentation of plant material from *Isatis tinctoria*, *Indigofera tinctoria*, and *Polygonum tinctorium*, has been used as dye for cloth used in denims, blue jeans, and other fabrics [1]. The chromophore consists of a single C=C linkage substituted by two donor groups (NH) and two acceptor groups (CO), which are linked by hydrogen-bonding. Indigo-producing

plants have also been used in traditional Chinese medicine [2]. Indirubin is a pink-colored by-product of indigo synthesis, and contaminates indigo dye. It was also identified as an anti-leukemia active ingredient [3,4] and shown to be an inhibitor of cyclin-dependent kinases [5]. Gillam et al. [6,7] proposed that indirubin and indigo are formed endogenously in the human body. They demonstrated that human cytochrome P450s (P450s) catalyze the formation from indole of indoxyl and isatin, which could then undergo dimerization to form indigo and indirubin (Fig. 1). Recently, Adachi et al. [8] proposed that indirubin and indigo are endogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor (AhR), using a recombinant yeast assay. The ligands were extracted from acid-treated

[☆] Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor; EROD, ethoxyresorufin-*O*-dealkylase; MROD, methoxyresorufin-*O*-dealkylase; P450, cytochrome P450; PROD, pentoxyresorufin-*O*-dealkylase; 3-MC, 3-methylcholanthrene; TCDD, 2,3,7,8-tetrachloro-*p*-dioxin; HPLC, high-performance liquid chromatography.

* Corresponding author. Fax: +81-82-257-5329.

E-mail address: skitamu@hiroshima-u.ac.jp (S. Kitamura).

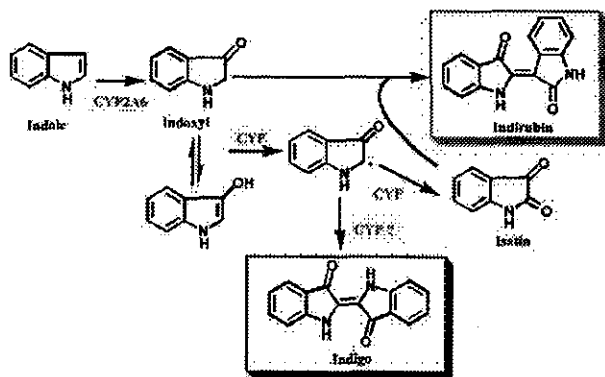


Fig. 1. Postulated scheme for the formation of indigo and indirubin in the body.

human urine and fetal bovine serum, and their levels in the body were shown to be high enough to activate AhR, i.e., 0.2 and 0.07 nM, respectively.

AhR is a ligand-binding transcription factor which was isolated as a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) receptor. Binding of TCDD to cytosolic AhR is considered to be the initial event leading to the manifestation of the biological and toxicological responses elicited by TCDD [9]. AhR exists as cytoplasmic aggregates bound to heat-shock protein 90. Upon TCDD binding, AhR dissociates from heat-shock protein 90 and the ligand–receptor complex translocates to the nucleus. Then, the activated AhR dimerizes with the AhR nuclear translocator protein, and this complex recognizes and binds to the xenobiotic response element sequence upstream of the target genes to activate their transcription. Several xenobiotic-metabolizing enzymes, such as UDP-glucuronosyltransferase, specific forms of P450, NAD(P)H-quinone oxidoreductase, and aldehyde dehydrogenase-3, have the XRE sequence in the 5'-upstream region of their genes, and they exhibit AhR-mediated induction of gene expression by TCDD. Recently, it has been reported that AhR-null mice (*AhR*^{-/-}) do not exhibit TCDD-induced liver toxicity or teratogenicity, such as cleft palate and enlarged renal pelvis [10,11]. AhR is thus one of the key molecules mediating the toxicity of dioxins. AhR-mediated signaling is known to be required for xenobiotic ligands such as TCDD, 3-methylcholanthrene (3-MC), and β -naphthoflavone [12,13], but AhR remains an orphan receptor, because its physiological ligand and its function are not known. The AhR ligand activity of indigo was similar to that of TCDD, while indirubin was 50 times more potent [8]. Thus, these compounds are likely to have an important physiological role, and may have the potential to decrease the AhR-mediated toxicity of dioxins in vivo. In this study, we examined the inducing effects of indirubin and indigo on the P450 system in mice in vivo and in rat hepatocytes and HepG2 cells.

Materials and methods

Chemicals and animals. Indigo and 3-MC were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Indigocarmine and 5,7,5',7'-tetrabromoindigo were purchased from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). Indirubin was synthesized as described by Hoessel et al. [5].

Male C57BL/6JJcl mice (5–6 weeks old) from CLEA Japan (Tokyo, Japan) and male Slc:SD rats (6–7 weeks old) from Japan SLC (Shizuoka, Japan) were housed in cages at 22 °C with a 12-h light/dark cycle, with free access to tap water and a standard pellet diet. The generation of *AhR*-deficient mice (*AhR*^{-/-}) and checking of genotypes of mice were done as previously reported [11]. *AhR*^{-/-} mice were maintained in the Research Facilities for Laboratory Animal Science, Hiroshima University.

Treatment of animals. Male mice were given indirubin or indigo (1–50 mg/kg body weight) dissolved in Panacete 810 (a mixture of medium-chain triglycerides, Nippon Oils and Fats, Tokyo, Japan) at 5 ml/kg by gavage for three days. These mice were killed one day after the last dose. Vehicle control mice were given the same volume of Panacete 810. Male *AhR*^{-/-} mice (5–6 weeks old) were treated with indirubin (50 mg/kg body weight) in the same manner as *AhR*^{+/+} (wild: C57BL/6JJcl) mice.

Preparation of liver microsomes. One day after the last dose, the livers were excised from exsanguinated male mice and immediately perfused with 1.15% KCl. The livers were homogenized in four volumes of the KCl solution using a Potter–Elvehjem homogenizer. The microsomal fraction was obtained from the homogenate by successive centrifugation at 9000g for 20 min and at 105,000g for 60 min. The fraction was washed by resuspension in the KCl solution and resedimentation. The pellets of microsomes were resuspended in the solution to make 1 ml equivalent to 1 g liver. Protein contents in the liver microsomal preparations were determined by the method of Lowry et al. [14].

Enzyme assays of liver microsomes. Ethoxyresorufin-*O*-dealkylase (EROD), methoxyresorufin-*O*-dealkylase (MROD), and pentoxyresorufin-*O*-dealkylase (PROD) activities in liver microsomes were assayed by a fluorometric method [15]. The amount of resorufin was determined using about 0.1–0.5 mg protein of liver microsomes. Resorufin formation was linear with time for the 20-min duration of incubation.

Hepatocyte preparation and incubation. Rat hepatocytes were isolated from male rats by collagenase perfusion as described previously [16]. Hepatocytes (2×10^6 cells/ml) were suspended in Williams' E medium supplemented with 7% fetal calf serum in collagen I coated dishes. After 7 h of incubation at 37 °C under an atmosphere of 5% CO₂/95% air, the cells were harvested and the medium was changed. After an additional 17 h of incubation, the enzyme inducers were added to cell suspensions. Dimethyl sulfoxide was used as the solvent of these inducers. After treatment of hepatocytes with the enzyme inducers for 24 h, EROD activities in hepatocytes were assayed by micro-EROD analysis. The medium was removed, 8 μ M ethoxyresorufin was added, and the amount of resorufin was measured after 1 h. Cell viability after isolation, estimated by means of the trypan blue exclusion test, was always greater than 90%.

Assays of EROD and MROD activities in HepG2 cells. Human liver cancer cell-line HepG2 cells were grown to confluence at 37 °C under 5% CO₂ in MEM (Sigma Chemical) containing penicillin and streptomycin with 5% fetal bovine serum (Life Technologies, Rockville, MD). The cells were seeded in 24-well plates at 2.5×10^4 cells/well and chemicals were added the next day. One hour after addition of the enzyme inducers, the EROD and MROD activities were assayed.

Immunoblot analysis of cyp 1a1/2. The levels of cyp 1a1/2 proteins were determined by immunoblot analysis of microsomal protein from mouse liver. Mouse microsomal proteins (5 μ g) were separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% gel) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) by electroblotting. Membranes were then incubated with 5% skimmed