

## G. 研究発表

### 書籍

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.

### 雑誌

Takagi, A., Hirabayashi, Y., Ema, M. and Kanno, J.: Attenuation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced cleft palate by dimethyl sulfoxide. *Organohalogen Compounds*, 67, 2552-2555, 2005

Takagi A, Sekita K, Saitoh M and Kanno J: Acute, subchronic and chronic toxicity studies of a synthetic antioxidant, 2,2'-isobutylidenebis(4,6-dimethylphenol) in rat. *The Journal of Toxicological Sciences*, 30 (4) 275-285, 2005.

### 学会発表

Effects of TCDD on mouse embryonic stem cells in culture. A. Takagi and J. KANNO. 45<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2006年3月

マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマイクロアレイ解析、高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野純、第28回日本分子生物学会、2005年12月、福岡

Attenuation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-

induced cleft palate by dimethyl sulfoxide.

Atsuya Takagi, Makoto Ema and Jun Kanno The 25<sup>th</sup> International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Canada, 2005年8月

発生毒性解析のための無血清培地を用いたマウス ES 細胞培養系の検討、高木篤也、菅野純、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、2005年6月

鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小原有弘、本間正充、林 真、高木篤也、菅野 純、「GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か Use of the gene expression analysis by the GeneChip for a prediction of the target organs in Aristolochic acid-induced genotoxicity in mice.」第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日～10月1日、福岡

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 23<sup>rd</sup>

International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. USA, 2003年8月

ES細胞の遺伝子発現に及ぼすTCDDの影響。高木篤也、五十嵐勝英、菅野純、金子豊蔵、井上達、第29回日本トキシコロジー学会

学術年会、東京 2002 年 6 月

Effects of TCDD and polychlorinated terphenyls (PCTs) on the development of cleft palate in mouse embryos. Atsuya Takagi, Toyozo Kaneko, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno and Tohru Inoue, The 22nd International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Spain, 2002 年 8 月

Effects of TCDD on the gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. TAKAGI, A., MATSUDA, N., KANEKO, T., KANNO, J. and INOUE T., 米国奇形学会, 2002 年 6 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

#### 4. 受容体原性シグナルを介したエピジェネティック発がんの分子機能解析

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

##### 研究要旨

短期発がんモデルとして、Tg. ACに C57Bl/6 を7世代戻し交配して得られた雌雄マウスを用い、2, 3, 7, 8-TCDD を1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 体重の用量で週2回3ヶ月間経口投与した。前胃の乳頭腫が各群とも高頻度で見られたが、TCDD の影響は明らかではなかった。一方、胸腺腫が TCDD 投与群で見られ、1ng/kg 群では有意に増加したことから、本マウスが TCDD による胸腺腫の検出に有用であると思われた。

##### A. 研究目的

p53 ヘテロ欠失マウスを用いた検討で見られたダイオキシンによる発がんの非単調用量反応性（逆U字型反応）の再現性を、短期発がんモデルマウスの Tg. AC マウスを用いて確認すると共に、その発がん用量相関性の分子機構を解析する。これまでの解析で、プロモーター物質高感受性遺伝子改変モデルとして Tg. AC マウスを C57Bl/6 マウスに継続して back cross することにより胸腺腫及び前胃の squamous papilloma（乳頭腫）が高頻度に自然発生することが示された。そこで、このマウスを用いて TCDD の3ヶ月間経口投与実験を行った。

##### B. 研究方法

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 C57Bl/6 マウスに7世代戻し交配した雌雄マウス（一群8匹）に、2, 3, 7, 8-TCDD を1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 体重の用量で週2回3ヶ月間経口投与した。対照群にはコーン油を投与した。投与終了後、病理組織学的検査を実施し、生じてくる腫瘍の種類並びに発生頻度を解析し、その用量反応性の非単調性を確認した。Tg. AC マウスに一定の頻度で出現する nonresponder は、サザンブロッティングにより排除した。

（倫理面への配慮）

使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸部脱臼

方法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。ダイオキシン類の実験に際しては、専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

##### C. 研究結果

Tg. AC に C57Bl/6 を7世代戻し交配して得られた雌雄マウス（6-7週齢、1群8匹）に、2, 3, 7, 8-TCDD を1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 体重の用量で週2回3ヶ月間経口投与した結果、雄では1, 10ng/kg 群に死亡が見られ、投与終了時の0, 1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 群の生存率はそれぞれ、100, 62.5, 100, 75, 100, 100%、雌では0, 1, 3, 10, 30, 100ng/kg 群に死亡が見られ、投与終了時の0, 1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 群の生存率はそれぞれ、87.5, 75, 100, 100, 87.5, 75%であった。体重及び摂餌量、臓器重量には差は認められなかった。外見として口唇周囲の乳頭腫がいずれの群とも散発性に認められたが、TCDD による影響は見られなかった。剖検による肉眼所見では、前胃の乳頭腫が対照群を含む各群でほとんどのマウスで見られたが、TCDD 投与による影響は明らかでなかった。一方、胸腺の肥大あるいは腫瘍が対照群を除く各投与群で低頻度ながら見られ、雄と雌を合わせて計算すると 1ng/kg 群で有意に増加し、組織学的には thymic lymphoma であることが確認された。

## D. 考察

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新たなマウスモデルの樹立のため、Tg.AC マウスの C57BL/6 (TCDD 高感受性マウス) へ戻し交配を行い、これまでに、皮膚乳頭腫誘発感受性が C57BL/6 背景でも保たれることを確認したと共に、前胃の乳頭種の自然発生が高率に認められることを見出した。さらに、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、歯芽腫及び前胃乳頭腫と近い発生率・発生時期を示すようになった。そこで、このマウスを用いた逆 U 字型用量相関の有無の追試検証を行った結果、前胃の乳頭腫に関しては TCDD の影響は明らかでなかった。一方、胸腺腫が低用量群で有意に増加したことから、このマウスは TCDD の発癌促進作用の検出に優れていることが示唆された。米国 NTP による発がん性試験でもマウスにリンパ腫が発生することが報告されていることから、TCDD が実際に、本マウスで胸腺リンパ腫を誘導した可能性が高いものと思われた。今後、さらに動物数を増やして、その再現性を確認する予定である。

## E. 結論

Tg.AC を C57BL/6 に 7 世代戻し交配して得られた雌雄マウスに、2, 3, 7, 8-TCDD を 1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 体重の用量で、週 2 回で 3 ヶ月間の経口投与実験を実施した結果、低用量群で胸腺腫が有意に増加し、TCDD 投与の低濃度影響の検出系としての有用性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kanno, J., Aisaki, K., Igarashi, K., Nakatsu, N., Ono, A., Kodama, Y. and Nagao, T., "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics, 7, 64-77, 2006

Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jan 3;103(1):224-9. Epub 2005 Dec 22. Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa

S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S.

Mespl1-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. Dev Dyn. 2006 Feb;235(2):395-402. Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J, Saga Y.

Acute, subchronic and chronic toxicity studies of a synthetic antioxidant, 2,2'-isobutylidenebis(4,6-dimethylphenol) in rats. J Toxicol Sci. 2005 Dec;30(4):275-85. Takagi A, Sekita K, Saitoh M, Kanno J

Differential contribution of Mespl1 and Mesp2 to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites. Development, 132, 787-796, 2005 Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y.

五十嵐勝秀、菅野 純：内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞分化に及ぼす影響、生体統御システムと内分泌攪乱、シュープリンガー・フェアラーク東京 2005 年 p79-88

### 2. 学会発表

菅野 純、毒性メカニズム解析を目指した"Per cellome"トキシコゲノミクス、東京大学分子細胞生物学研究所セミナー、2005 年 4 月 12 日、東京

菅野 純、五十嵐勝秀、松島裕子、相 健一、中津則之、トキシコゲノミクスからのアプローチ、第 15 回環境ホルモン学会講演会、2005 年 6 月 2 日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Per cell" mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. Gordon Research Conference "Toxicogenomics", Jun 5-10, 2005, NH, USA

菅野 純、神経幹細胞モデルに於けるエピジェネティック制御機構障害のPer cellome トキシコゲノミクス研究、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1～3日、東京

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、飼料中植物性エストロジェンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の Percellome 手法を用いた解析、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1~3 日、東京

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津 則之、相賀裕美子、菅野 純 Gene expression profiling of a gene targeted mouse embryo using the “Percellome” system as a model for molecular developmental toxicity、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1~3 日、東京

小川幸男、関田清司、北嶋聡、斉藤実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、菅野純、Toxicity study of Garcinia cambogia extract : Testicular toxicity of Hydroxycitric acid in mice、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1~3 日、東京

中津則之、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、児玉幸夫、菅野純、Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた手法、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1~3 日、東京

菅野純、WHO Children’s Program の概説と本邦での現状と取り組みについて、第 17 回神経行動毒性研究会、2005 年 8 月 5 日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama, Percellome and Mille-Feuille data system for toxicogenomics, 5th World Congress on Alternatives”, August 21-25, 2005, Berlin, Germany

Jun Kanno, Expression Profiling in Mechanistic Toxicology, 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

Jun Kanno, Ken-Ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, “Percellome” mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. 9th ICEM Satellite

Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

中津則之、相崎健一、菅野純、Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発現変動解析、第 64 回日本癌学会学術総会、2005 年 9 月 14-16 日、札幌

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、飼料中の植物エストロジェンがトランスクリプトームに及ぼす影響、環境ホルモン学会第 8 回研究発表会、2005 年 9 月 27-29 日、東京

菅野純、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、五十嵐勝秀、雌生マウスにおける視床下部-下垂体-性腺系の性周期遺伝子発現の Percellome 解析、環境ホルモン学会第 8 回研究発表会、2005 年 9 月 27-29 日、東京

Jun Kanno, Approaches by Basic Biology to Reinforce the Screening and Testing Strategy for the Endocrine Disruptors, KFPA/NITR International Symposium, Oct 11-12, 2005, Korea

菅野 純、ナノマテリアルの安全性確認に関する課題、三菱安全化学研究所講演会、2005 年 12 月 1 日、東京

Shinya Matsumoto, Kenichi Aisaki, Jun Kanno, Mass Distributed Clustering : A New Clustering Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data, The 16<sup>th</sup> International Conference on Genome Informatics, Dec 19-21, Yokohama

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸夫、菅野純、Diethylnitrosamine 及び N-ethyl-N-nitrosourea によるマウス肝遺伝子発現変動解析、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野純、マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマイクロアレイ解析、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

北嶋 聡、Glenn I. Fishman、富田幸子、井上 達、菅野 純、相賀裕美子、転写因子 *Mesp1* 非発現細胞はマウス刺激伝導系細胞に寄与する、第 28 回日本分子生

物学会、2005年12月7-10日、福岡

安彦 行人、原口 清輝、高橋 雄、菅野 純、相賀 裕美子、Notch シグナルは Tbx6 依存的に *Mesp2* 発現を活性化する、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

Shinya Matsumoto, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Mass Distiributed Clustering : A New Clustering Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data The 16th International Conference on Genome

Informatics Dec 19-21, 2005, Yokohama.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

国内特許申請中 (特願 2003-317031、特願 2004-219285)

4317031、特願 2004-219285)

## 5. 細胞アレイを指標とした内分泌攪乱物質の影響

分担研究者 矢守 隆夫

財団法人癌研究会 癌化学療法センター分子薬理部 部長

**研究要旨** ヒトがん細胞パネルは、抗がん物質の分子メカニズム予測システムとしてその有用性が証明されている。本研究では、ヒトがん細胞パネルが内分泌かく乱化学物質の分子メカニズム予測にも使えるかどうかを検討した。本年度は、核内受容体アゴニスト約20種について取得したFingerprintのクラスター解析を行なった。ターゲットの核内受容体を同じくする物質同士がクラスターを形成する傾向が見られた。ターゲット既知の内分泌かく乱化学物質をレファレンスとすることによりヒトがん細胞パネルは内分泌かく乱化学物質の分子メカニズム予測に使える可能性が示唆された。がん細胞パネル39細胞中のヒト前立腺癌細胞株PC-3を用いTributyltinの分子メカニズム解析を行った。Tributyltinによる発現変動をGene Chipにより検出し、Gene Springを用いて解析した。この情報に基づくTributyltinの分子メカニズム解析を展開したい。

### A. 研究目的

新規化学物質の作用メカニズムを予測するシステム「Cancer Cell Informatics」を用い、内分泌かく乱物質の評価を行う。データベース内の機能既知の化学物質との比較検討を行い、細胞増殖阻害の分子機構解析を通じて内分泌かく乱分子機構の推測を行う。さらに標的依存性とリガンド依存性の両面に関する生物学的意義を明らかにする。

### B. 研究方法

ダイオキシン類を含む種々の内分泌攪乱化学物質、核内受容体アゴニストをヒトがん細胞パネルに対する増殖阻害活性の強弱を調べることにより、その毒性(増殖阻害)評価を行った。「Cancer Cell Informatics」により、その作用メカニズムについて既知の抗がん剤や阻害剤との比較検討を行った。また、ヒト癌細胞に対する化学物質曝露の影響を、遺伝子発現プロファイルの変化によって調べた。濃度時間依存的な変動をGeneChipを用いて取得した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞株を用いるものなので、倫理的問題が発生することはなかった。

### C. 研究結果

得られたフィンガープリントを解析した結果レチノイン酸アゴニストの9-cis, all-trans retinoic acid, TTNPBが強固なクラスターを形成した。また、エストロゲンアゴニストestradiol, dieldrinやPPARアゴニストであるBis (2-ethylhexy) phthalate, troglitazoneもそれぞれクラスターを形成した。Tributyltinが各種の内分泌かく乱化学物質と比較して、高い感受性を示した。ヒト前立腺癌培養細胞株PC-3において、Tributyltin曝露による遺伝子発現変動を検討した結果、濃度、時間依存的な発現変動を示す遺伝子が多数抽出された。その中には3T3-L1細胞でTributyltinによる発現誘導が報告されているap2遺伝子も含まれていた。Tributyltin処理後時間依存的に発現レベルの上昇が見られた遺伝子はIL1下流の遺伝子群やMAPK系などさまざま観察された。

### D. 考察

「Cancer Cell Informatics」による解析結果からTTNPB, 9-cis, all-trans retinoic acidなどのレチノイン酸アゴニストやPPARアゴニストであるBis (2-ethylhexy) phthalate, troglitazoneが同一のクラスターを形成した。このことから、ヒトがん細胞パネルを用いたこれらのシステムが新規化学物質に対しての内分泌攪乱化学物質、核内受容体アゴニスト評価系としての有効性が期待されるが、さらに多くの核内受容体アゴニストをこの系で評

価して有用性の検証を行う必要がある。さらに、がん細胞パネルにおいて低用量で細胞増殖阻害活性を示した Tributyltin に着目し、その分子メカニズムの解析を目的とし、GeneChip による遺伝子発現解析を行った。その結果、既に変動することが報告されている遺伝子がヒト前立腺癌 PC-3 細胞においても同様な変動を観察することができ、この系は Tributyltin の作用メカニズムのモデル解析系として使える可能性がある。変動が確認された数 100 の遺伝子の文献調査をすすめ Tributyltin の作用メカニズムに関連する可能性のある遺伝子を絞り込み、RNAi 等でその機能解析を進めてゆきたい。

#### E. 結論

Cancer Cell Informatics による解析の結果、核内受容体アゴニストの特徴ごとにいくつかのクラスターを形成した。今後さらに多くの披験化学物質の種類をがん細胞パネルにかけ Fingerprint データベースの充実を図り検討をすすめていく。Tributyltin の分子メカニズム解析にがん細胞パネルの中の前立腺癌 PC-3 細胞株がモデル系として使える見込みである。Tributyltin の分子メカニズム解析をさらに進めていく。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表 (過去3年間)

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

なし

###### 2) 雑誌

1. Nakatsu, N., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Nakamura, T., Dan, S., Fukui, Y., and Yamori, T. Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining the chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays. *Mol Cancer Ther*, in press, 2005.
2. Lai, Y. Y., Huang, L. J., Lee, K. H., Xiao, Z., Bastow, K. F., Yamori, T., and Kuo, S. C.

Synthesis and biological relationships of 3',6-substituted 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid derivatives as antimitotic agents. *Bioorg Med Chem*, 13:265-275, 2005.

3. Tanaka, R., Wada, S., Aoki, H., Matsunaga, S., and Yamori, T. Spiromarienols A and B: two new 7(8 → 9)abeo-lanostane-type triterpene lactones from the stem bark of *Abies mariesii*. *Helvetica Chimica Acta*, 87:240-249, 2004.
4. Mimaki, Y., Yokosuka, A., Hamanaka, M., Sakuma, C., Yamori, T., and Sashida, Y. Triterpene Saponins from the Roots of *Clematis chinensis*. *J Nat Prod*, 67:1511-1516, 2004.
5. Park, H. R., Tomida, A., Sato, S., Tsukumo, Y., Yun, J., Yamori, T., Hayakawa, Y., Tsuruo, T., and Shin-ya, K. Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. *J Natl Cancer Inst*, 96:1300-1310, 2004.
6. Saito, H., Honma, T., Minamisawa, T., Yamazaki, K., Noda, T., Yamori, T., and Shiba, K. Synthesis of functional proteins by mixing peptide motifs. *Chem Biol*, 11:765-773, 2004.
7. Komuro, A., Imamura, T., Saitoh, M., Yoshida, Y., Yamori, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene*, 2004.
8. Sakai, K., Fukuda, Y., Matsunaga, S., Tanaka, R., and Yamori, T. New Cytotoxic Oleanane-Type Triterpenoids from the Cones of *Liquidambar styraciflua*. *J Nat Prod*, 67:1088-1093, 2004.
9. 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*, 279:17634-17639, 2004.



10. Mizui, Y., Sakai, T., Iwata, M., Uenaka, T., Okamoto, K., Shimizu, H., Yamori, T., Yoshimatsu, K., and Asada, M. Pladienolides, new substances from culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107. III. In vitro and in vivo antitumor activities. *J Antibiot (Tokyo)*, *57*:188-196, 2004.
11. Bai, J., Kitabatake, M., Toyoizumi, 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.
12. 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*:289-297, 2004.
13. Andoh, T., Umemura, K., Yanase, K., and Yamori, T. Development of new topoisomerase II-targeting compounds as candidate anticancer drugs, p. 167-188. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
14. 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*:4395-4397, 2003.
15. 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*:5589-5600, 2003.
16. 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*:1074-1082, 2003.
17. 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*:8592-8595, 2003.
18. 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*:751-758, 2003.
19. 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.
20. 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*:13-19, 2003.
21. 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*:481-487, 2003.
22. Suzuki, M., Watanabe, K., Fujiwara, S., Kurasawa, T., Wakabayashi, T., Tsuzuki, M., Iguchi, K., and Yamori, T. Isolation of Peridinin-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), 51:724-727, 2003.
23. Yamori, T. Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother Pharmacol*, 52 Suppl 1:74-79, 2003.
  24. 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*, 63:831-837, 2003.
  25. 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*, 63:831-837, 2003.
  26. Iwashima, M., Matsumoto, Y., Takenaka, Y., Iguchi, K., and Yamori, T. New Marine Diterpenoids from the Okinawan Soft Coral *Clavularia koellikeri*. *J Nat Prod*, 65:1441-1446, 2002.
  27. Iwashima, M., Terada, I., Iguchi, K., and Yamori, T. New biologically active marine sesquiterpenoid and steroid from the okinawan sponge of the genus *axinyssa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 50:1286-1289, 2002.
  28. Inoue, A., Yoshida, N., Omoto, Y., Oguchi, S., Yamori, T., Kiyama, R., and Hayashi, S. Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J Mol Endocrinol*, 29:175-192, 2002.
  29. Umemura, K., Mizushima, T., Katayama, H., Kiryu, Y., Yamori, T., and Andoh, T. Inhibition of DNA topoisomerases II and/or I by pyrazolo[1,5-a]indole derivatives and their growth inhibitory activities. *Mol Pharmacol*, 62:873-880, 2002.
  30. Sasaki, T., Yamazaki, K., Yamori, T., and Endo, T. Inhibition of proliferation and induction of differentiation of glioma cells with *Datura stramonium* agglutinin. *Br J Cancer*, 87:918-923, 2002.
  31. Owa, T., Yokoi, A., Yamazaki, K., Yoshimatsu, K., Yamori, T., and Nagasu, T. Array-Based Structure and Gene Expression Relationship Study of Antitumor Sulfonamides Including N-[2-[(4-Hydroxyphenyl)amino]-3-pyridinyl]-4-methoxybenzenesulfonamide and N-(3-Chloro-7-indolyl)-1,4-benzenedisulfonamide. *J Med Chem*, 45:4913-4922, 2002.
  32. Hashimoto, S., Xu, Y., Masuda, Y., Aiuchi, T., Nakajo, S., Uehara, Y., Shibuya, M., Yamori, T., and Nakaya, K. *b*-Hydroxyisovalerylshikonin Is a Novel and Potent Inhibitor of Protein Tyrosine Kinases. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93:944-951, 2002.
  34. Umezū-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., Aoki, J., and Arai, H. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol*, 158:227-233, 2002.
  35. Naasani, I., Yamori, T., and Tsuruo, T. Screening with COMPARE analysis for telomerase inhibitors. *Methods Mol Biol*, 191:197-207, 2002.
  36. Uesato, S., Kitagawa, M., Nagaoka, Y., Maeda, T., Kuwajima, H., and Yamori, T. Novel histone deacetylase inhibitors: N-hydroxycarboxamides possessing a terminal bicyclic aryl group. *Bioorg Med Chem Lett*, 12:1347-1349, 2002.
  37. Yamada, T., Iwamoto, C., Yamagaki, N., Yamanouchi, T., Minoura, K., Yamori, T., Uehara, Y., Toshiwo, A., Umemura, K., and Numata, A. Leptosins M-N1, cytotoxic metabolites from a *Leptosphaeria* species separated from a marine

- alga. Structure determination and biological activities. *Tetrahedron*, 58:479-487, 2002.
38. Sawada, M., Moriya, S., Saito, S., Shineha, R., Satomi, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Kannagi, R., and Miyagi, T. Reduced sialidase expression in highly metastatic variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression. *Int J Cancer*, 97:180-185, 2002.
39. Iguchi, K., Sawai, H., Nishimura, H., Fujita, M., and Yamori, T. New Dolabellane-Type Diterpenoids from the Okinawan Soft Coral of the Genus *Clavularia*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 75:131-136, 2002.
40. Dan, S., Tsunoda, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Zembutsu, H. Katagiri, T., Yamazaki, K., Nakamura, Y., and Yamori, T. An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Research*, 62:1139-1147, 2002.
- (総説)
1. 中津則之, 矢守隆夫 ヒトがん細胞パネルによる化合物の分子薬理の評価と抗がん剤感受性関連遺伝子. *がん分子標的治療*, 2:54-60, 2004.
2. 矢守隆夫 *Cancer Cell Informatics* —抗がん剤探索とポストゲノム研究への応用. *バイオサイエンスとインダストリー* 62:445-449, 2004.
3. 矢守隆夫 *癌分子標的と創薬スクリーニング*. *現代医療*, 36:1339-1346, 2004.
2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)
1. 山崎佳波、中津則之、菅野純、矢守隆夫. *Cancer Cell Informatics* による毒性物質の評価. *In: 日本癌学会 第63回学術総会*, 福岡, 2004.
2. 中津則之、吉田陽子、山崎佳波、旦慎吾、中村知己、関万里子、福井泰久、菅野純、矢守隆夫. ヒトがん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. *In: 日本癌学会 第62回学術総会*, 名古屋, 2003.
- H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 6. ヒト型モデル動物による AhR の分子基盤解と AhR の生理的プロセスへの関与

分担研究者： 藤井 義明 筑波大学先端学際領域研究センター・客員教授

### 研究要旨

ダイオキシンは、催奇型性、発癌のプロモーション作用、クローラクネの発症、内分泌攪乱作用など多岐に渡る生体毒作用を示すが、この毒性の殆どが生体内因子 AhR によって仲介されることが知られている。この毒性発現は AhR の正常な働きの裏面の作用と考えられるので、AhR の毒性発現の関与のメカニズムを明らかにするためには、AhR の正常の働きを理解する必要がある。そのような観点から AhR の癌抑制因子としての働き及びマクロファージ及び T 細胞分化における AhR の機能の解析を行っている。今回は、AhR の癌抑制因子としての働きとマクロファージにおける AhR の役割について検討した結果を報告する。

### A. 研究目的

AhR の発生及び正常時における機能について明らかにし、外来異物の毒性発現における AhR の役割の理解を深める。特に、AhR の転写因子としての分子メカニズムにさらに検討を加えると共に、AhR の炎症及び癌抑制因子としての機能について現象の解析から始めて分子レベルでのメカニズムまで明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

AhR 欠失マウス及び野性型マウスを用いて、マクロファージあるいは、腸組織について遺伝子発現変化、形態学的変化などについて DNA マイクロアレイ、RT-PCR、抗体染色法や分子生物学的手法を用いて総合的に解析する。動物を扱う実験においては、筑波大学動物実験規則に従って行なっている。

### C. 研究結果

AhR 欠失マウスは、15 週令を過ぎると脱肛が顕著に認められるようになる。腸を解剖し

てみると癌化病変が認められたので、さらに多くの AhR 欠失マウスについて、特に大腸、小腸に癌化病変が見られるか検討を加えたところマウスの 11 週令を過ぎると殆どすべてのマウスについて癌化病変が認められることが分かった。これらの事柄は AhR が癌抑制因子として働いていることを示している。現在大量のマウスを用いて癌性変化の経過と Kaplan-Meier 曲線を取りつつある。この時に腸に好中球、マクロファージなどの炎症性の浸潤が認められた。

今後は、AhR 欠失マウスの大腸の炎症の原因及び癌の発症との関係を検討することにしていく。

チオグリコール酸処理の腹腔浸出液中のマクロファージを LPS 処理すると AhR の発現が誘導され、6 時間と 24 時間にピークを持つ 2 相性の発現が観察される。この時に TNF $\alpha$ 、IL6、CXCL10、IFN $\gamma$ などの多くのサイトカインやケモカインが大体6時間をピークに誘導される。この時に MMP8、Sca1 や AhRR が AhR 依存的に誘導されることが分かった。AhR の誘導の 2

相性の中、遅い誘導は他のサイトカインの生成による 2 次的誘導の可能性が考えられた。実際に AhR は IFN $\gamma$  や TNF $\alpha$  によって誘導される。興味あることは、AhR に強く依存している AhRR の発現は IFN $\gamma$  や TNF $\alpha$  によっても誘導されるが AhR 欠失マクロファージでは誘導されない。また CYP1A1 は 3MC によって AhR に依存して誘導的に発現されるが、LPS や IFN $\gamma$  あるいは TNF $\alpha$  によって CYP1A1 の発現誘導はひきおこされないことが分かった。このように AhR はサイトカインや 3MC によって活性化され、標的遺伝子の発現が活性化されるが AhR の活性化の仕方によって標的遺伝子に違いがある可能性があることが分かって来た。

#### D. 考察及び E. 結論

AhR 欠失マウスの約 50% にマウスが 15 週令を過ぎると脱肛がおこることは報告されていた、その理由は不明であったが AhR 欠失マウスの組織を詳細に調べると腸に癌性変化が発見され、11 週令を過ぎると殆どすべての AhR 欠失マウスに癌性変化が認められることが分かって来た。現在その統計と組織の変化を経時的に追求している。また、AhR 欠失マウスは 10 週令を過ぎると脾臓の肥大が認められ、腸に炎症が起こっていることが確かめられた。炎症とマクロファージの関係及び炎症と癌性変化の関係について、今後研究を集中したい。

#### F. 健康危惧情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

なし

##### 2) 雑誌

Negishi T, Kato Y, Ooneda O, Mimura J, Takada T, Mochizuki H, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y, and Furusako S, Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on modulation of Th1/Th2 balance, *J. Immunol.*, 175, 7348-7356 (2005)

Baba T, Mimura J, Nakamura N, Harada N, Yamamoto M, Morohashi K and Fujii-Kuriyama Y, Ah (dioxin) receptor as a key factor in the regulation of female reproduction. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10040-10051 (2005)

Tauchi M, Hida A, Negishi T, Katsuoka F, Noda S, Mimura J, Hosoya T, Yanaka A, Aburatani H, Fujii-Kuriyama Y, Motohashi H, and Yamamoto. M, Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9360-9368 (2005)

Fujii-Kuriyama Y and Mimura J, Molecular Mechanisms of AhR Functions in the Regulation of Cytochrome P450 Genes, *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 311-317 (2005)

Tanaka G, Kanaji S, Hirano A, Arima K, Shinagawa A, Goda C, Yasunaga S, Ikizawa K, Yanagihara Y, Kubo M, Kuriyama-Fujii Y, Sugita Y, Inokuchi A, Izuhara K. Induction and activation of the aryl hydrocarbon receptor by IL-4 in B cells. *Int Immunol.* 17, 797-805 (2005)

- Kawane T, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Horiuchi N. Identification of the promoter region of the parathyroid hormone receptor gene responsible for transcriptional suppression by insulin-like growth factor-I. *Arch Biochem Biophys.* 439, 61-9 (2005)
- Nishimura N, Yonemoto J, Miyabara Y, Fujii-Kuriyama Y, Tohyama C. Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *Arch Toxicol.* 79, 260-7 (2005)
- Nohara K, Pan X, Tsukumo S, Hida A, Ito T, Nagai H, Inouye K, Motohashi H, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y, Tohyama C. Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes. *J Immunol.* 174, 2770-7 (2005)
- Kuroda M, Oikawa K, Ohbayashi T, Yoshida K, Yamada K, Mimura J, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y, Mukai K. A dioxin sensitive gene, mammalian WAPL, is implicated in spermatogenesis. *FEBS Lett.* 579, 167-72 (2005)
- Ogiso H, Kagi N, Matsumoto E, Nishimoto M, Arai R, Shirouzu M, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Yokoyama S. Phosphorylation analysis of 90 kDa heat shock protein within the cytosolic arylhydrocarbon receptor complex. *Biochemistry.* 43, 15510-9 (2004)
- Nishimura N, Yonemoto J, Miyabara Y, Fujii-Kuriyama Y, Tohyama C. Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *Arch Toxicol.* 17, in print (2004)
- Nakatsuru Y, Wakabayashi K, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T, Kusama K, Ide F. Dibenzo[A,L]pyrene-induced genotoxic and carcinogenic responses are dramatically suppressed in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Int J Cancer.* 112, 179-83 (2004)
- Fukuzawa NH, Ohsako S, Wu Q, Sakaue M, Fujii-Kuriyama Y, Baba T, Tohyama C. Testicular cytochrome P450scc and LHR as possible targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the mouse. *Mol Cell Endocrinol.* 221, 87-96 (2004)
- Kinoshita K, Kikuchi Y, Sasakura Y, Suzuki M, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. Altered DNA binding specificity of Arnt by selection of partner bHLH-PAS proteins. *Nucleic Acids Res.* 32, 3169-79 (2004)
- Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Takahashi T, Matsushita N, Miura C, Nikawa J, Gotoh O, Kikuchi Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel induction mechanism of the rat CYP1A2 gene mediated by Ah receptor-Arnt heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun.* 318, 746-55 (2004)

Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Okayama T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo. *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 571-8 (2004)

Fetissov SO, Huang P, Zhang Q, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Rannug A, Hokfelt T, Ceccatelli S. Expression of hypothalamic neuropeptides after acute TCDD treatment and distribution of Ah receptor repressor. *Regul Pept.* **119**, 113-24 (2004)

Ito T, Tsukumo S, Suzuki N, Motohashi H, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y, Mimura J, Lin TM, Peterson RE, Tohyama C, Nohara K. A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of Jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest. *J Biol Chem.* **24**, 25204-10 (2004)

Shimada T and Fujii-Kuriyama Y, 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)

Fujii-Kuriyama Y and Mimura J, Transcriptional roles of AhR in expression of biological effects induced by endocrine disruptors. *Pure Appl. Chem.*, **75**, 1819-1826 (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)

Moriguchi T, Motohashi H, Hosoya T, Nakajima O, Takahashi S, Ohsako S, Aoki Y, Nishimura N, Tohyama C, Fujii-Kuriyama Y and Yamamoto M, Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse, *Proc. Natl Acad. Sci. U SA.*, **100**, 5652-5657 (2003)

Noda S, Harada N, Hida A, Fujii-Kuriyama Y, Motohashi M and Yamamoto M, Gene expression of detoxifying enzymes in AhR

and Nrf2 compound null mutant mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**, 105-111 (2003)

Morita M, Ohneda O, Yamashita T, Takahashi S, Suzuki N, Nakajima O, Kawauchi S, Ema M, Shibahara S, Udono T, Tomita K, Tamai M, Sogawa K, Yamamoto M and Fujii-Kuriyama Y, HLF/HIF2a is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO J.*, **22**, 1134-1146 (2003)

Mimura J and Fujii-Kuriyama Y, Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD, *Bioch. Biophys. Acta*, **1619**, 263-268 (2003)

## 2. 学会発表

(国内)

### 第3回 ながの遺伝子発現調節研究会

「アリルヒドロカーボン (ダイオキシン) 受容体の薬理的及び生理学的機能」まつもと市民・芸術館 (松本市) 2005年12月17日 (土)

ミニ国際シンポジウム「Pharmacogenomics と Toxicogenomics」かでの2・7 ホール (札幌) 2006年2月11日 (土)

(国外)

Sixth Duesseldorf Symposium on Immunotoxicology (AHR 2005 in Düsseldorf) Biochemistry and Function of the Arylhydrocarbon Receptor and other PAS-bHLH Proteins "Physiological role of AhR in reproductive process of female mice" Duesseldorf, (September, 28-30, 2005)

## 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



## 7. ヒト型モデル試験系による内分泌かく乱化学物質の影響解析

分担研究者 鎌滝 哲也

北海道大学大学院薬学研究科 教授

### 研究要旨

昨年度までに我々は多環芳香族炭化水素類 (PAHs) が芳香族炭化水素受容体 (AHR) を介してコレステロールのホメオスタシスに深く関与する核内受容体 liver X receptor (LXR) シグナル伝達経路を抑制することを見出した。本年度は PAHs が LXR シグナル伝達経路を抑制する機構をさらに検討し、PAHs の代謝的な活性化に関与し、AHR の典型的な標的遺伝子である CYP1A1 が PAHs による LXR 抑制機構に関与することを見出した。

### A. 研究目的

これまでの研究で PAHs はアテローム性動脈硬化を誘発することおよび PAHs が誘発するアテローム性動脈硬化には CYP による代謝的な活性化が重要となることが明らかとなっている。我々は昨年度までに PAHs が AHR を介してコレステロールのホメオスタシスにおいて非常に重要である LXR シグナル伝達経路を抑制することを明らかにし、その結果、アテローム性動脈硬化が引き起こされるといふ機構を提唱してきた。そこで本年度は PAHs の代謝的な活性化に関与し、AHR の典型的な標的遺伝子である CYP1A1 が PAHs によって引き起こされる LXR シグナル伝達経路の抑制に関与するか否かヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いて検討し、その役割を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

TK プロモータに LXR 応答配列を連結させたレポータープラスミドを HepG2 細胞に導入し、CYP1A1 によって代謝される PAHs (MC、B[a]P) および CYP1A1 によって代謝されない HAHs (TCDD、PCB) の LXR 転写活性に及ぼす影響を検討した。CYP1A1 の阻害剤である  $\alpha$ -ナフトフラボン (ANF) が MC による LXR 転写活性の抑制に与える影響を HepG2 細胞を用いて検討した。CYP1A1 の発現を抑制する siRNA (siCYP1A1) が MC による LXR 転写活性および LXR 標的遺伝子の発現の抑制効果に与える影響を HepG2 細胞を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

該当なし

### C. 研究結果

HepG2 細胞を CYP1A1 によって代謝される PAHs である MC および B[a]P で処置した場合、LXR を介した転写活性はコントロール群と比較して 40~50% まで低下した。しかしながら、CYP1A1 によって代謝を受けない HAHs である TCDD および PCB では LXR を介した転写活性は抑制されなかった。さらに CYP1A1 の阻害剤である ANF を MC と共処置した場合、MC による LXR を介した転写活性の抑制は解除された。CYP1A1 の発現を抑制する siRNA である siCYP1A1 を一過的に発現させた HepG2 細胞では MC による LXR を介した転写活性の抑制および LXR 標的遺伝子の発現の抑制は認められなかった。このことから PAHs による LXR シグナル伝達経路の抑制には CYP1A1 が重要となることが明らかとなった。

### D. 考察

これまでの報告で肝臓における PAHs の代謝能が低い実験動物では PAHs が誘発するアテローム性の動脈硬化に対して耐性を示すことが明らかとなっている。これらの知見と上述の実験結果を考え合わせると PAHs は CYP1A1 によって代謝的に活性化を受け、LXR シグナル伝達経路を抑制し、その結果、アテローム性の動脈硬化を誘発する可能性が示唆された。

### E. 結論

PAHs による LXR を介した転写活性化に対する抑制効果は CYP1A1 の阻害剤との共処置および siCYP1A1 を発現させることで解除された。また siCYP1A1 が発現する細胞では

PAHs は LXR 標的遺伝子の発現を抑制しなかった。以上のことから PAHs が誘発するアテローム性の動脈硬化の発症機構の一つと考えられる LXR シグナル伝達経路の抑制には CYP1A1 が重要となることが明らかとなった。

#### F. 健康危惧情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

山崎浩史、藤枝正輝、鎌滝哲也：薬物・外来異物に対する生体の代謝機構、「分子予防環境医学」、本の泉社、分子予防環境医学研究会編、111-120、東京、2003

大村恒雄、青山由利、石塚真由美、石村巽、板倉隆夫、今井嘉郎、大川秀郎、太田明徳、大村恒雄、岡本光弘、鎌滝哲也、神谷勇治、北島正人、楠瀬正道、桑野栄一、小暮高久、後藤修、小林カオル、佐上郁子、清水透、祥雲弘文、城宜嗣、木正道、高久洋暁、田辺忠、根岸正彦、能城光秀、堅中泰樹、藤井義明、藤田正一、三村純正、山添康、吉田雄三、渡辺芳人：「P450 の分子生物学」、大村恒雄、石村巽、藤井義明編、株式会社講談社サイエントフィク、p144-156、東京、2003

千葉寛、有吉範高：「くすりの効き方は人によって違うの?」、丸善、鎌滝哲也監、日本薬学会編、東京、2003

###### 2) 雑誌

Shunsuke Iwano, Fumie Asanuma, Manabu Nukaya, Tetsuya Saito and Tetsuya Kamataki: CYP1A1-mediated mechanism for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337(2):708-712, 2005

Shunsuke Iwano, Manabu Nukaya, Tetsuya Saito, Fumie Asanuma and Tetsuya Kamataki: A possible mechanism for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 335(1):220-226, 2005

Miyuki Kimura, Hiroshi Yamazaki, Masaki Fujieda, Kazuma Kiyotani, Goro Honda, Junji Saruwatari, Kazuko Nakagawa, Takashi Ishizaki and Tetsuya Kamataki: CYP2A6 is a principal enzyme involved in hydroxylation of 1,7-dimethylxanthine, a main caffeine metabolite, in humans, *Drug Metab. Dispos.*, 33(9):1361-1366, 2005

Hijiri Takeuchi, Kousuke Saoo, Yoko Matsuda, Masanao Yokohira, Keiko Yamakawa, Yu Zeng, Masafumi Miyazaki, Masaki Fujieda, Tetsuya Kamataki and Katsumi Imaida: Dose dependent on inhibitory effects of dietary 8-methoxypsoralen on NNK-induced lung tumorigenesis in female A/J mice, *Cancer Letters*, In press, 2005

Masafumi Miyazaki, Hiroshi Yamazaki, Hijiri Takeuchi, Kousuke Saoo, Masanao Yokohira, Ken-ichi Masumura, Takehiko Nohmi, Yoshihiko Funae, Katsumi Imaida and Tetsuya Kamataki: Mechanisms of chemopreventive effects of 8-methoxypsoralen against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung adenomas, *Carcinogenesis*, 26(11):1947-55, 2005

Megumi Endo, Yoshiki Takahashi, Yasumasa Sasaki, Tetsuya Saito and Tetsuya Kamataki: Novel gender-related regulation of CYP2C12 gene expression in rats, *Mol. Endocrinol.*, 19(5):1181-1190, 2005

Katsunori Nakamura, Noritaka Ariyoshi, Takashi Iwatsubo, Yasuyuki Fukunaga, Saburo Higuchi, Kunio Itoh, Noriaki Shimada, Kazuo Nagashima, Tsuyoshi Yokoi, Koujiro Yamamoto, Ryuya Horiuchi and Tetsuya Kamataki: Inhibitory effects of Nicardipine to CYP in Human Liver Microsomes, *Biol. Pharm. Bull.*, 28(5):882-885, 2005

Satoshi Yamaori, Hiroshi Yamazaki, Shunsuke Iwano, Kazuma Kiyotani, Keiko Matsumura, Tetsuya Saito, Andrew Parkinson,

- Kazuko Nakagawa and Tetsuya Kamataki: Ethnic Differences between Japanese and Caucasians in the Expression Levels of mRNAs for CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7: Lack of Co-regulation of CYP3A Expression in Japanese Livers, *Xenobiotica*, 35(1):69-83, 2005
- Masafumi Miyazaki, Eika Sugawara, Teruki Yoshimura, Hiroshi Yamazaki and Tetsuya Kamataki: Mutagenic activation of betel quid-specific N-nitrosamines catalyzed by human cytochrome P450 coexpressed with NADPH-cytochrome P450 reductase in *Salmonella typhimurium* YG7108, *Mutat. Res.*, 581(1-2):165-171, 2004
- Masuhiko Nishimura, Teruko Imai, Yujiro Morioka, Shunji Kuribayashi, Tetsuya Kamataki and Shinsaku Naito: Effects of NO-1886 (Ibrolipim), a Lipoprotein Lipase-Promoting Agent, on Gene Induction of Cytochrome P450s, Carboxylesterases, and Sulfotransferases in Primary Cultures of Human Hepatocytes, *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19(6):422-429, 2004
- Maxwell Afari Gyamfi, Masaki Fujieda, Kazuma Kiyotani, Hiroshi Yamazaki and Tetsuya Kamataki: High prevalence of cytochrome P<sub>450</sub> 2A6\*1A alleles in a black African population of Ghana, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 60(12):855-857, 2005
- Hiroshi Yamazaki, Masaki Fujieda, John R. Cashman, and Tetsuya Kamataki: Mild Trimethylaminuria Observed in a Japanese Cohort with Liver Damage, *Am. J. Med.*, 118(7):803-805, 2005
- Masaki Fujieda, Hiroshi Yamazaki, Tetsuya Saito, Kazuma Kiyotani, Maxwell A Gyamfi, Masaharu Sakurai, Hirotohi Dosaka-Akita, Yuichi Sawamura, Jun Yokota, Hideo Kunitoh and Tetsuya Kamataki: Evaluation of CYP2A6 Genetic Polymorphisms as Determinants of Smoking Behavior and Tobacco-related Lung Cancer Risk in Male Japanese Smokers, *Carcinogenesis*, 25(12):2451-2458, 2004
- Yoshiyuki Yamazaki, Ken-ichi Fujita, Kazuo Nakayama, Akihiro Suzuki, Katsunori Nakamura, Hiroshi Yamazaki and Tetsuya Kamataki: Establishment of ten strains of genetically engineered *Salmonella typhimurium* TA1538 each co-expressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase sensitive to various promutagens, *Mutat. Res.*, 562(1-2):151-62, 2004
- Noritaka Ariyoshi, Hiromi Sekine, Kazuo Nakayama, Katsuhiko Saito, Atsushi Miyamoto and Tetsuya Kamataki: Identification of deletion-junction site of CYP2A6\*4B allele lacking entire coding region of CYP2A6 in Japanese, *Pharmacogenetics*, 14(10):701-705, 2004
- Motonobu Furukawa, Masuhiko Nishimura, Daisuke Ogino, Ryoji Chiba, Iwao Ikai, Nobuhiko Ueda, Shinsaku Naito, Shunji Kuribayashi, Mohsen A. Moustafa, Takafumi Uchida, Hideki Sawada, Tetsuya Kamataki, Yoshihiko Funae and Manabu Fukumoto: Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver, *Cancer Sci.*, 95(6):520-529, 2004
- Kenji Toide, Yoshiaki Terauchi, Toshihiko Fujii, Hiroshi Yamazaki and Tetsuya Kamataki: Uridine diphosphate sugar-selective conjugation of an aldose reductase inhibitor (AS-3201) by UDP-glucuronosyltransferase 2B subfamily in human liver microsomes, *Biochem. Pharmacol.*, 67: 1269-1278, 2004
- Tsutomu Sakuma, Tsukasa Shimojima, Kiyoshi Miwa and Tetsuya Kamataki: Cloning of CYP2D21 and CYP3A22 cDNAs from liver of miniature pigs, *Drug Metab. Dispos.*, 32: 376-378, 2004
- Satoshi Yamaori, Hiroshi Yamazaki, Shunsuke Iwano, Kazuma Kiyotani, Keiko Matsumura, Goro Honda, Kazuko Nakagawa,

- Takashi Ishizaki and Tetsuya Kamataki: CYP3A5 contributes significantly to CYP3A-mediated drug oxidations in liver microsomes from Japanese subjects, *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19(2): 120-129, 2004
- 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*, 558(1-3):96-100, 2004
- Hiroshi Yamazaki, Masaki Fujieda, Masahiro Togashi, Tetsuya Saito, George Preti, b, John R. Cashman and Tetsuya Kamataki: Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients, *Life Sci.*, 74(22):2739-2747, 2004
- Keiko Matsumura, Tetsuya Saito, Yoshiki Takahashi, Takeshi Ozeki, Kazuma Kiyotani, Masaki Fujieda, Hiroshi Yamazaki, Hideo Kunitoh, Marie-Anne Loriot, Isabella Stücker, Philippe Beaune and Tetsuya Kamataki: Identification of a novel polymorphic enhancer of the human *CYP3A4* gene, *Mol. Pharmacol.*, 65(2):326-334, 2004
- Hijiri Takeuchi, Kousuke Saoo, Masanao Yokohira, Mico Ikeda, Hajime, Maeta, Masafumi Miyazaki, Hiroshi Yamazaki, Tetsuya Kamataki and Katsumi Imaida: Pretreatment with 8-methoxypsoralen, a potent human CYP2A6 inhibitor, strongly inhibits lung tumorigenesis induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in female A/J mice, *Cancer Res.*, 63(22):7581-7583, 2003
- Poh-Sing Ng, Susumu Imaoka, Toyoko Hiroi, Mayuko Osada, Toshio Niwa, Tetsuya Kamataki and Yoshihiko Funae: Production of inhibitory polyclonal antibodies against cytochrome P450s, *Drug Metab. Pharmacokin.*, 18(3):163-172, 2003
- Kazuma Kiyotani, Hiroshi Yamazaki, Masaki Fujieda, Shunsuke Iwano, Keiko Matsumura, Soisungwan Satarug, Pailin Ujtin, Tsutomu Shimada, F. Peter Guengerich, Andrew Parkinson, Kazuko Nakagawa, Takashi Ishizaki and Tetsuya Kamataki: Decreased coumarin 7-hydroxylase activities and CYP2A6 expression levels in humans caused by genetic polymorphism in *CYP2A6* promoter region (*CYP2A6\*9*), *Pharmacogenetics*, 13(11):689-695, 2003
- Satoshi Yamaori, Hiroshi Yamazaki, Akihiro Suzuki, Ayako Yamada, Hirofumi Tani, Tamio Kamidate, Ken-ichi Fujita and Tetsuya Kamataki: Effects of cytochrome *b5* on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: Similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7, *Biochem. Pharmacol.*, 66(12):2333-2340, 2003
- Masaki Fujieda, Hiroshi Yamazaki, Masahiro Togashi, Tetsuya Saito and Tetsuya Kamataki: Two novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *FMO3* gene in Japanese, *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 18(5):SNP35(333)-SNP37(335), 2003
- Hiroshi Yamazaki, Kazuma Kiyotani, Satoshi Tsubuko, Masayuki Matsunaga, Masaki Fujieda, Tetsuya Saito, Jun Miura, Shinichi Kobayashi and Tetsuya Kamataki: Two novel haplotypes of CYP2D6 gene in a Japanese population: *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 18(4):SNP26(269)-SNP28(271), 2003
- Dai Mizuno, Yoshiki Takahashi, Toyoko Hiroi, Susumu Imaoka, Tetsuya Kamataki and Yoshihiko Funae: A novel transcriptional element which regulates expression of the CYP2D4 gene by Oct-1 and YY-1 binding, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Structure and Expression*, 1627(2-3):121-128, 2003
- Kenji Toide, Hiroshi Yamazaki and Tetsuya Kamataki: Response to the Letter to the Editor (Reply): Aryl hydrocarbon