

血症や脂肪肝は、重篤な症状ではないものの、放置すると肝硬変や肝障害、さらに認知症リスクの増加など重篤な症状に発展する可能性を秘めている(1)。当研究室における昨年度の結果は、resveratrol が、この症状に対して有効な予防薬となりうる可能性を示したものであると考えられた。

以上のような背景のもと、本年度は、resveratrol の効果をさらに検証するため、resveratrol の長期間投与及び単回投与による TCDD 毒性への影響を、特に誘発性脂肪肝および酸化ストレス発生を中心として検討した。

## B. 方法・結果

### Resveratrol 長期間投与による TCDD 毒性への影響の検討

4 週齢 C57BL/6J 系雄性マウスを、1 群 8 匹として 1 週間程度馴化した。その後 resveratrol を経口投与し、その 90 分後に TCDD を単回経口投与した。Resveratrol、並びに TCDD の投与量は、昨年度と同一条件にするため、それぞれ 20 mg/kg、並びに 100 µg/kg とした。また、コントロール群として、resveratrol に対しては 0.2% Tween80/0.5% Methylcellulose 溶液を、TCDD に対しては corn oil をそれぞれ投与した。投与翌日より、同量の resveratrol を 1 日 1 回、28 日間連続経口投与し、各群 5 匹については、最終投与 30 分後に採血したのち、臓器の摘出を行った。摘出した肝臓については、1.15% KCl 溶液で 10% ホモジネー

トを調製し、その一部を 9,000xg で 20 分間遠心して上清を分取した。また、血液については、2,500 r.p.m. で 10 分間遠心し、その上清を分取した。いずれのサンプルも、使用するまで -80 °C に保存した。一方、残りの 3 匹については、肝臓を摘出したのち、脂肪滴観察のための肝切片の作製に用いた。

Fig. 2 に、各群の経日的体重変化を示す。図中 27 日目の矢印は、この日に TCDD 投与群のマウスが 1 匹死んだことを示している。検討の結果、TCDD 投与群に比べ併用群において、投与 16 日目以降には体重増加抑制が軽減される傾向にあった。次に、投与 28 日目における臓器重量を測定した結果、TCDD によって惹起される肝肥大、胸腺の萎縮に対して resveratrol の併用による軽減効果は認められなかった (Table 1)。さらに、各群の肝 9,000xg 上清における ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) 活性を測定した結果、TCDD 投与群で EROD 活性の顕著な上昇が観察されると共に、併用群では TCDD 投与群に比べ低値を示す傾向が観察された (Fig. 3)。以上の結果は、昨年度の結果とほぼ同じであった。各群 3 匹の肝臓より肝切片を作製し、oil red 染色にて脂肪滴の分布を観察した結果、control 群と resveratrol 投与群では、油滴 (写真中の赤色部分) はほとんど観察されなかった (Fig. 4)。これに対し、TCDD 投与群では、肝臓全体が赤く染まっており、油滴の蓄積、すなわち脂肪肝が発症しているものと推測された。一方、併用群においては、コントロール群や resveratrol 投与群に比べて油滴の蓄積が起こっているものの、

TCDD 投与群に比べその量が軽減していることが明らかとなった。しかし、肝トリグリセリド含量、並びに酸化ストレスの指標であるチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) 値を測定したところ、resveratrol の併用による軽減効果は認められなかった (Fig. 5 および 6)。以上の結果から、resveratrol の長期間併用は、TCDD 誘発性脂肪肝を軽減することが示唆されたが、これは単純な中性脂肪蓄積抑制では説明が難しいと考えられた。次に、脂肪肝の軽減が肝障害の軽減を引き起こしているか否か検討するため、血清中の Alanin amino transferase (ALT) 及び Aspartate amino transferase (AST) 活性を測定したが、いずれの指標とも、resveratrol による軽減効果は観察されなかった (Fig. 7)。

#### Resveratrol 単回投与による TCDD 毒性への影響の検討

次に、resveratrol 投与による肝臓での効果をより詳細に検討するため、resveratrol 単回投与実験を計画し、その日内変動を観察した。5 週齢 C57BL/6J 系雄性マウスを馴化後、TCDD を 100 µg/kg 単回経口投与し、その 5 日後に resveratrol を 20 mg/kg 経口投与した。コントロールとして、TCDD に対しては corn oil を、resveratrol に対しては 0.5% Methylcellulose/0.2% Tween80 溶液をそれぞれ投与した。resveratrol 投与後、その血中濃度がほぼ最大となることが報告されている投与 30 分後 (2)、もしくは

は、血中からほぼ消失すると予想される投与 3 時間後 (2) に、採血、並びに臓器の摘出を行った。摘出した肝臓および血液は、長期間投与実験と同様の処理を行い、使用するまで -80 °C に保存した。

Fig. 8 および Table 2 には、最終投与 30 分後に採血及び臓器摘出を行った群 (以下、0.5 hr 処理群とする)、および、最終投与 3 時間後に採血及び臓器摘出を行った群 (以下、3 hr 処理群とする) における経日的体重変化および臓器重量を示している。Fig. 8 に示されるように、両時間処理群とも、各群の経日的体重変化に大きな差は見られなかった。また、これまでの報告と同様、TCDD 投与群において肝肥大および胸腺の萎縮が観察された (Table 2)。肝トリグリセリド含量と TBARS 値を測定した結果、肝トリグリセリド含量については、長期間投与実験の場合と同様、両時間処理群において TCDD 投与群と併用群との間に差は見られなかった (Fig. 9)。一方、TBARS 値については、3 hr 処理群において、併用群で TCDD 処理群に比べ有意な低下が観察された (Fig. 10)。前述の様に、resveratrol の血中濃度は投与後約 0.5 時間で最大となり、3 時間後にはほぼ 0 になることが報告されている (2)。従って、resveratrol の酸化ストレスに対する軽減効果は、血中濃度ピーク時から遅延して引き起こされ、しかも一過性である可能性が示唆された。また、両時間投与群において顕著な酸化ストレスの低下が見られなかったことから、resveratrol による TCDD 誘発性脂肪肝の軽減に、酸化ストレスの関与は低いと考えられた。

### C. 考察

本研究では、昨年度の研究結果を基に、TCDD 毒性に対する resveratrol の軽減効果を、特に誘発性脂肪肝と酸化ストレスの発生に注目し検討した。その結果、resveratrol の長期間投与が TCDD による体重増加抑制を軽減する傾向にあると共に、TCDD による肝臓への脂肪滴蓄積を軽減することが明らかとなった (Fig. 2 および 4)。しかし、肝トリグリセリド含量および酸化ストレスについては、顕著な効果を観察することはできなかった (Fig. 5 および 6)。今回使用した肝トリグリセリド含量測定キットは、その測定原理として肝グリセロール含量を測定するものである。このため、グリセロールより加水分解された脂肪酸含量を反映するものではない。Resveratrol の併用による肝臓中の脂肪酸含量の変化については、異なる測定法による検討が必要であると考えられる。しかし、少なくとも、resveratrol は、酸化ストレスの低下以外の機構を介して TCDD 誘発性脂肪肝を軽減している可能性が考えられた。また、resveratrol は、TCDD による肝障害に対して軽減効果を示さなかった (Fig. 7)。これまでに、TCDD による肝障害と Cyp1a1 もしくは Cyp1a2 活性との間に何らかの関連性があるとする報告がなされている (3, 4)。また、昨年度および本年度の検討から、resveratrol の長期間投与は、TCDD による EROD 活性の上昇を 10% 前後低下させることが明らかとなっており

(Fig. 3)、resveratrol が、EROD 活性を直接的に低下させるという報告 (5, 6) とも一致している。このため、resveratrol の併用が TCDD による肝障害を軽減するという可能性が十分に予想されたが、本検討において観察することはできなかった。この原因は不明であるが、EROD 活性の低下率が肝障害の軽減を引き起こすには不十分であったこと、もしくは、resveratrol の体内からの消失速度が速いため作用発現時間が短かったことなどの要因が考えられる。次に、resveratrol の影響の日内変動を調べるため、resveratrol 単回投与実験を行った。その結果、resveratrol は TCDD 誘発性の酸化ストレスを僅かに軽減するものの、その効果と血中濃度との間に相関性は認められなかった (Fig. 10)。この結果は、resveratrol による TCDD 誘発性脂肪肝の軽減効果が、resveratrol 自身の抗酸化ストレス作用に起因するものではないことを示すものであり、長期間投与実験の結果と一致するものである。また、この結果から、resveratrol による TCDD 誘発性脂肪肝の軽減効果は、resveratrol 自身の性質によるものではなく、それにより惹起される二次的な要因によるものである可能性が考えられた。

本検討では肝臓への脂肪滴の蓄積を除いて、resveratrol による TCDD 毒性に対する顕著な軽減効果は見られなかった。しかし、今回用いた TCDD は比較的高用量であったため、毒性の方が強く発現してしまった可能性も否めない。今後、油症患者への適応を考える上で、低用量の TCDD 曝露に

対する resveratrol の効果の検討も有効であると考えられる。さらに、resveratrol による脂肪肝軽減機構の解明、もしくは、resveratrol の投与形態の変更など、今後にも更なる研究が必要であると考えられる。

#### D. 参考文献

- 1) Zuliani, G., Ble`A, Zanca, R., Munari, M. R., Zurio, A., Vavalle, C., Atti, A. R. and Fellin, R., Lipoprotein profile in older patients with vascular dementia and Alzheimer's disease. *BioMed. Centr. Geriatr.*, 1, 5 (2001).
- 2) Yu, C., Shin, Y. G., Chow, A., Li, A., Kosmeder, J. W., Lee, Y. S., Hirschelman, W. H., Pezzuto, J. M., Mehta, R. G. and Breemen, R. B., Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol, *Pharm. Res.*, 19, 1907-1914 (2002).
- 3) Uno, S., Dalton, T. P., Sinclair, P. R., Gorman, A., Wang, B., Smith, A., Miller, M. L., Shertzer, H. G. and Nebert, D. W., Cyplal (-/-) male mice: protection against high-dose TCDD-induced lethality and wasting syndrome, and resistance to intrahepatocyte lipid accumulation and uroporphyrinuria, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 196, 410-421 (2004).
- 4) Smith, A. G., Clothier, B., Carthew, P., Childs, N. L., Sinclair, P. R., Nebert, D. W. and Dalton, T. P., Protection of Cyplal2 (-/-) null mouse against uroporphyrinuria and hepatic injury

exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 173, 89-98 (2001).

- 5) Ciolino, H. P. and Yeh, G. C., Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol, *Mol. Pharmacol.*, 56, 760-770 (1999).
- 6) Chang, T. K. H., Chen, J. and Lee, W. B. K., Differential inhibition and inactivation of human CYP1 enzymes by trans-resveratrol: evidence for mechanism-based inactivation of CYP1A2, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 874-882 (2001).

#### E. 研究発表

- 1) 日本薬学会第 127 年会 (富山、2007 年 3 月) 予定

**Table 1. Effects of resveratrol on tissue weights of C57BL/6J mice treated with TCDD.**

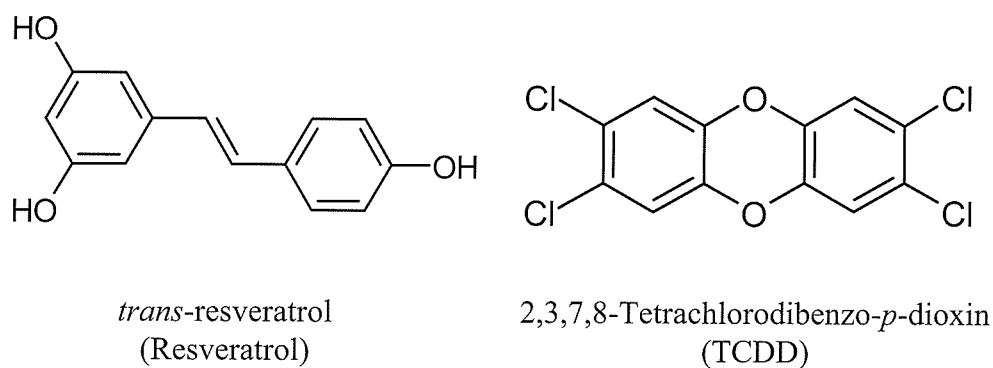
	Liver	Spleen	Thymis
	(% of body weight)		
Control (5)	5.18±0.13	0.268±0.012	0.176±0.010
Resveratrol (5)	5.14±0.10	0.239±0.007	0.153±0.008
TCDD (4)	8.59±0.15*	0.192±0.050	0.031±0.009*, <sup>a</sup>
TCDD+resveratrol (5)	8.58±0.50*	0.239±0.036	0.042±0.008*

The values represent the mean ± S.E. of 3-5 mice. The numbers of sample show in parenthesis. \*, Significantly different from the control ( $p<0.05$ ). a, n=3.

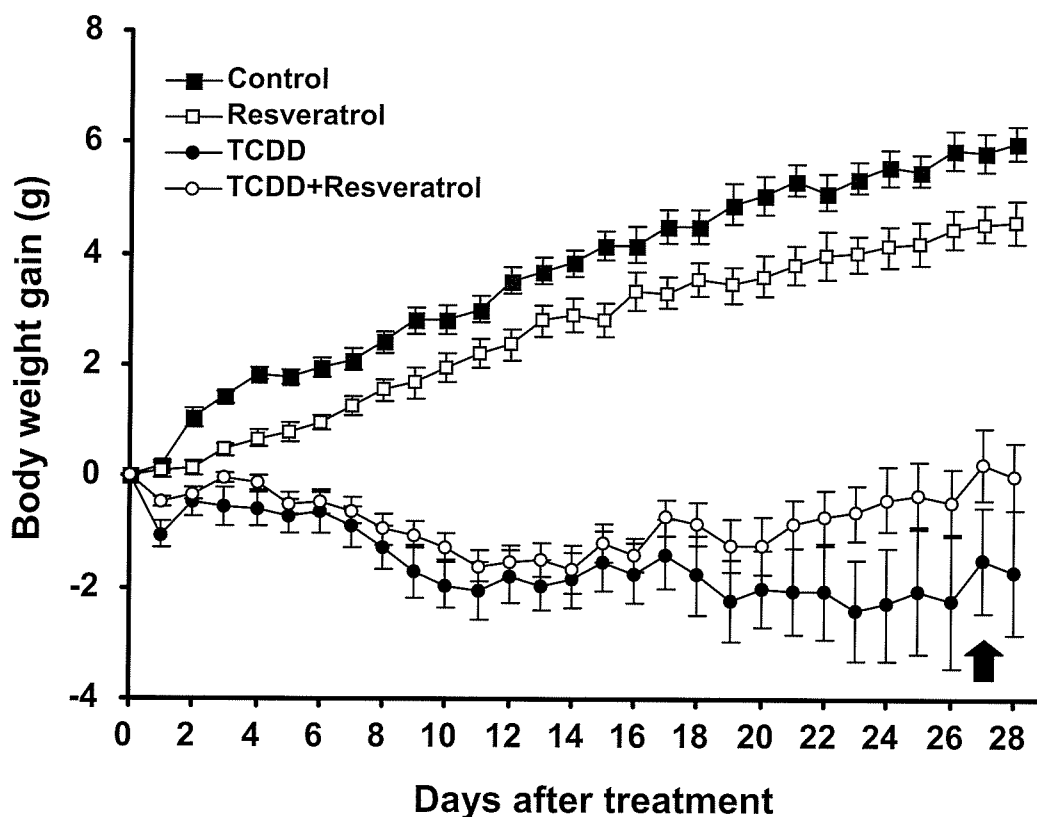
**Table 2. Effects of resveratrol on tissue weights of C57BL/6J mice treated with TCDD.**

	Liver	Spleen	Thymis
	(% of body weight)		
(A) 0.5 hr treatment group			
Control	5.25±0.05	0.257±0.005	0.223±0.021
Resveratrol	5.58±0.11	0.291±0.012	0.244±0.021
TCDD	7.47±0.17*	0.280±0.020	0.092±0.012*
TCDD+resveratrol	7.80±0.13*	0.285±0.007	0.096±0.006*
(B) 3 hr treatment group			
Control	5.29±0.20	0.276±0.013	0.260±0.017
Resveratrol	5.81±0.12	0.333±0.025	0.205±0.027
TCDD	6.92±0.12*	0.257±0.005	0.098±0.003*
TCDD+resveratrol	7.21±0.07*	0.256±0.009	0.102±0.009*

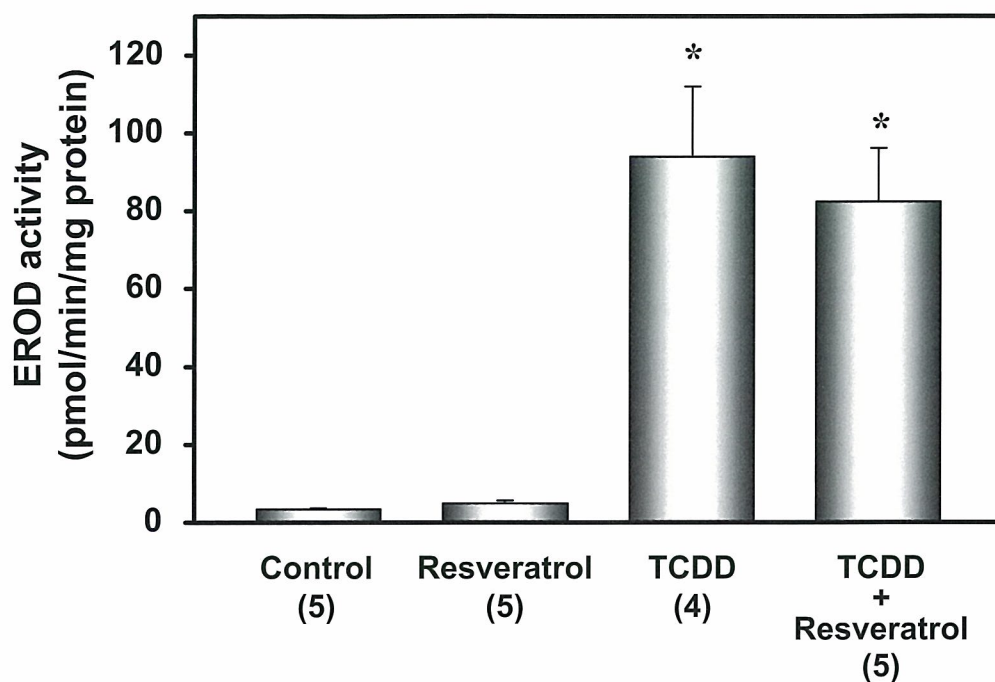
The values represent the mean ± S.E. of 4 mice. \*, Significantly different from the control ( $p<0.05$ ).



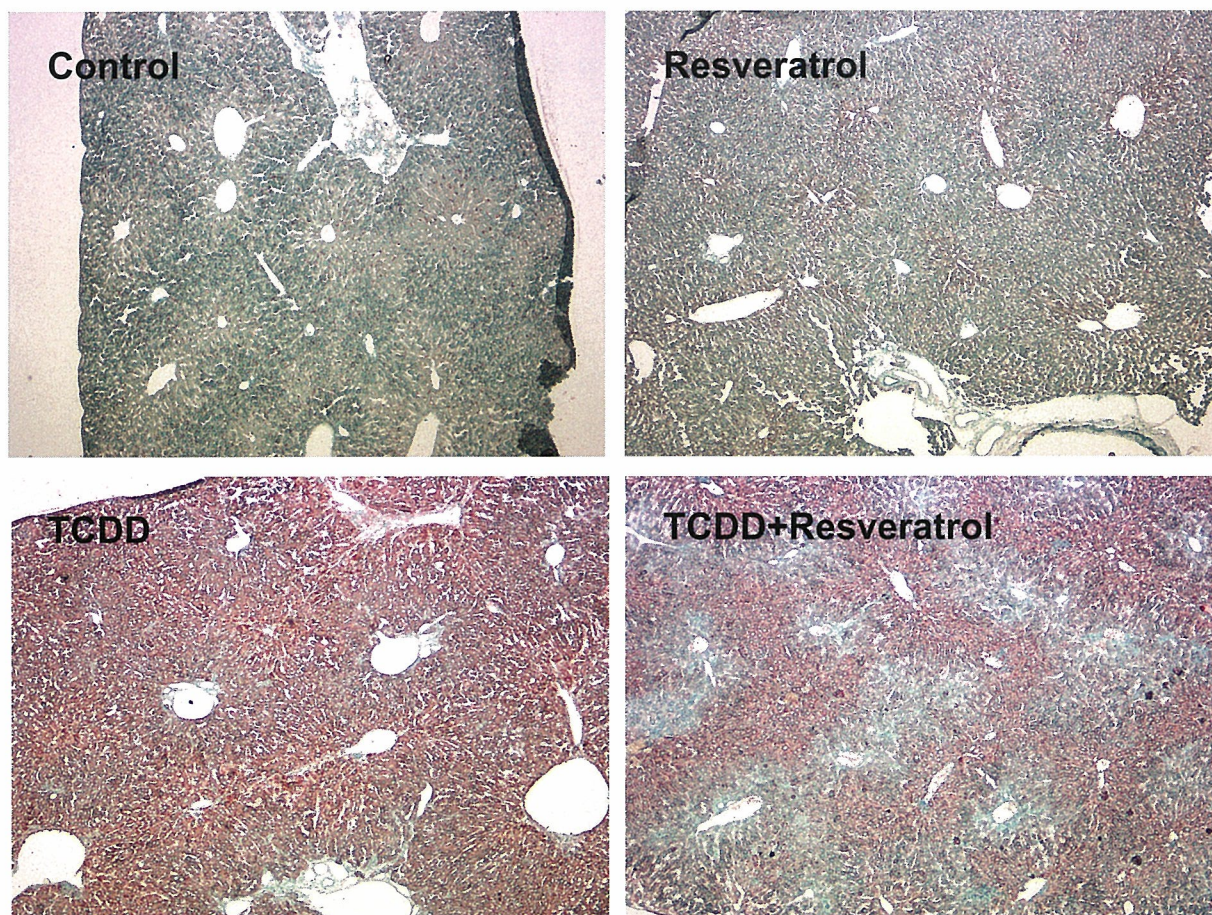
**Fig. 1. Structures of resveratrol and TCDD**



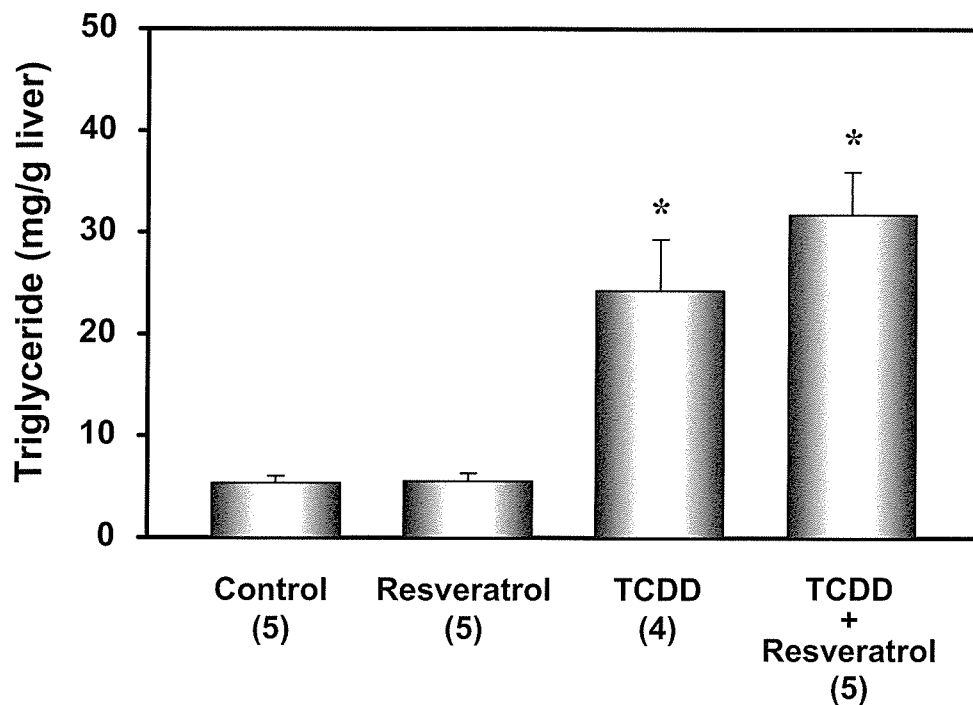
**Fig. 2. Effects of resveratrol on body weight gain of C57BL/6J mice treated with TCDD.** The values represent the mean  $\pm$  S.E. of 7-8 mice. The arrow represents the day when mouse died in the TCDD-treated group. The initial body weights (mean  $\pm$  S.E.) of mice in control, resveratrol-treated, TCDD-treated and TCDD+resveratrol-treated mice were  $18.9 \pm 0.29$ ,  $19.4 \pm 0.20$ ,  $20.2 \pm 0.39$  and  $21.0 \pm 0.33$  g, respectively.



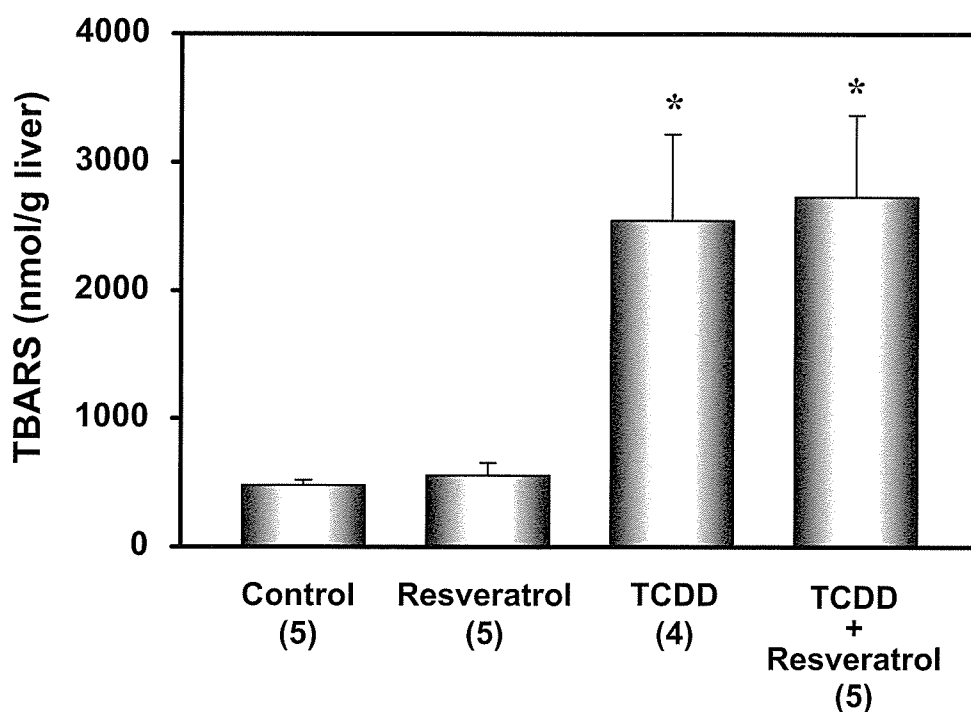
**Fig. 3. Effects of resveratrol on hepatic EROD activity of C57BL/6J mice treated with TCDD.** The values represent the mean  $\pm$  S.E. The numbers of sample show in parenthesis. Significantly different from control: \*,  $p < 0.05$ .



**Fig. 4. Histological analysis of hepatic lipid from mice treated with resveratrol and TCDD.**

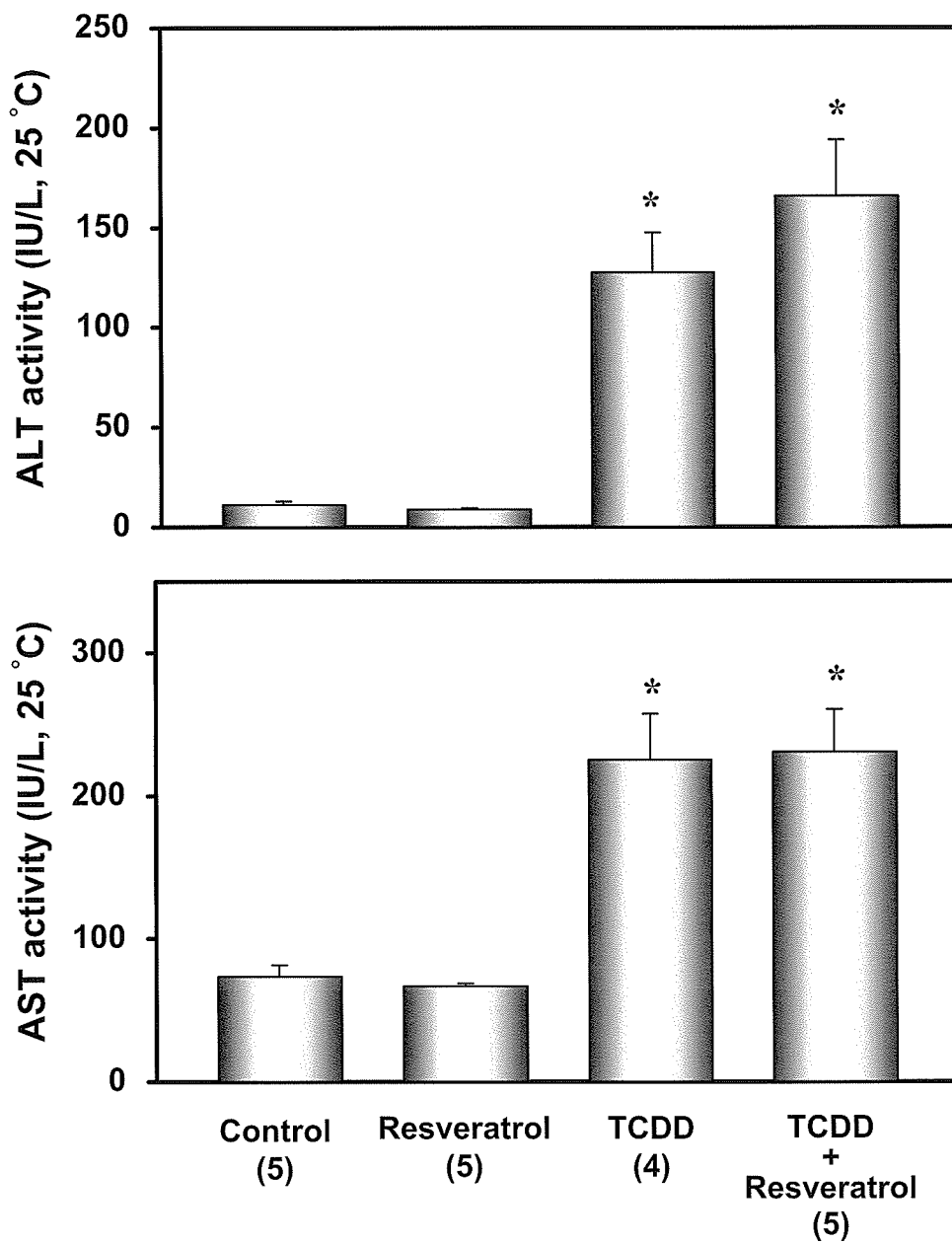


**Fig. 5.** Effects of resveratrol on hepatic triglyceride content of C57BL/6J mice treated with TCDD. The values represent the mean  $\pm$  S.E. The numbers of sample show in parenthesis. Significantly different from control: \*,  $p < 0.05$ .

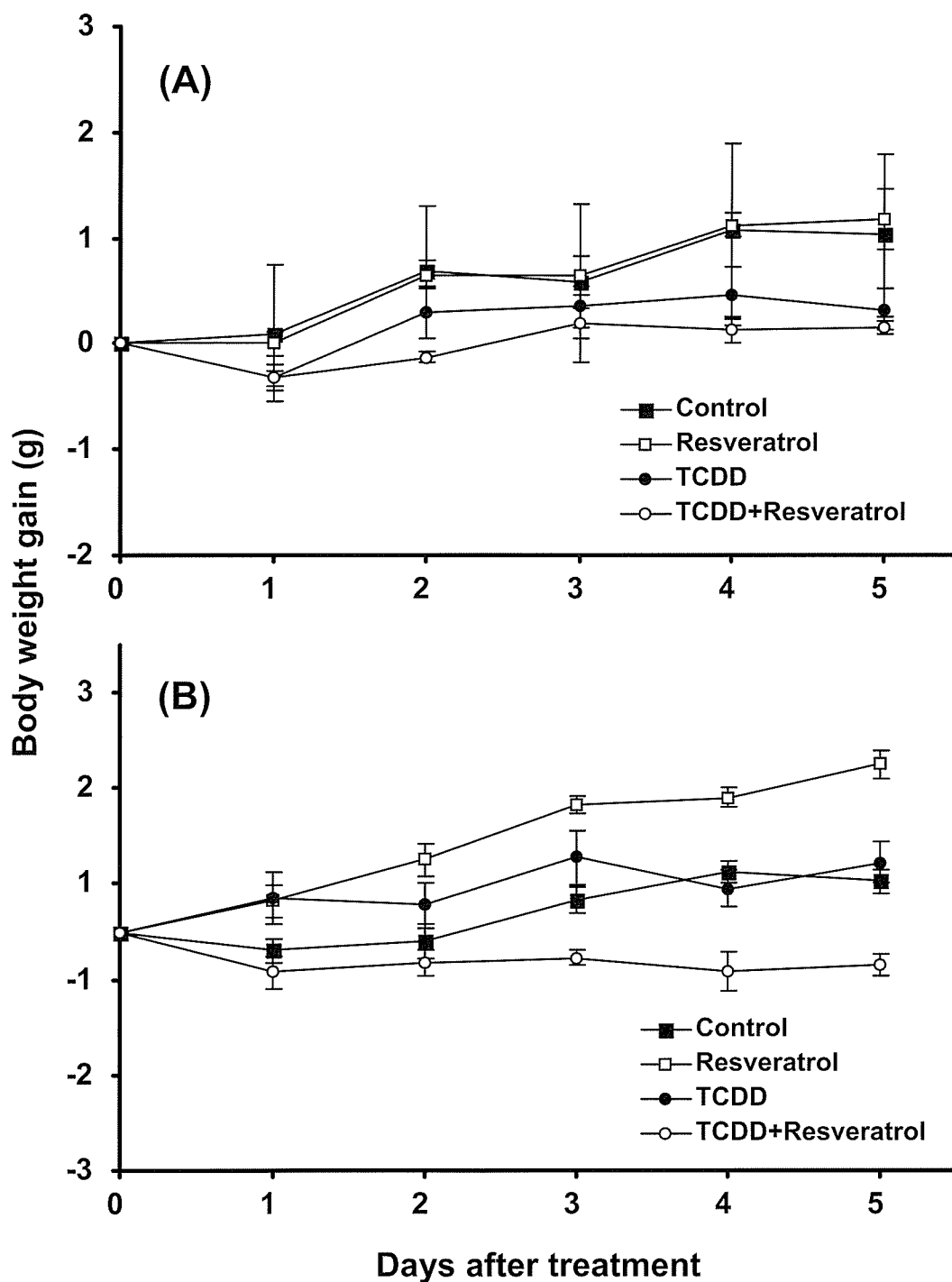


**Fig. 6.** Effects of resveratrol on hepatic TBARS content of C57BL/6J mice treated with TCDD. The values represent the mean  $\pm$  S.E. The numbers of sample show in parenthesis. Significantly different from control: \*,  $p < 0.05$ .

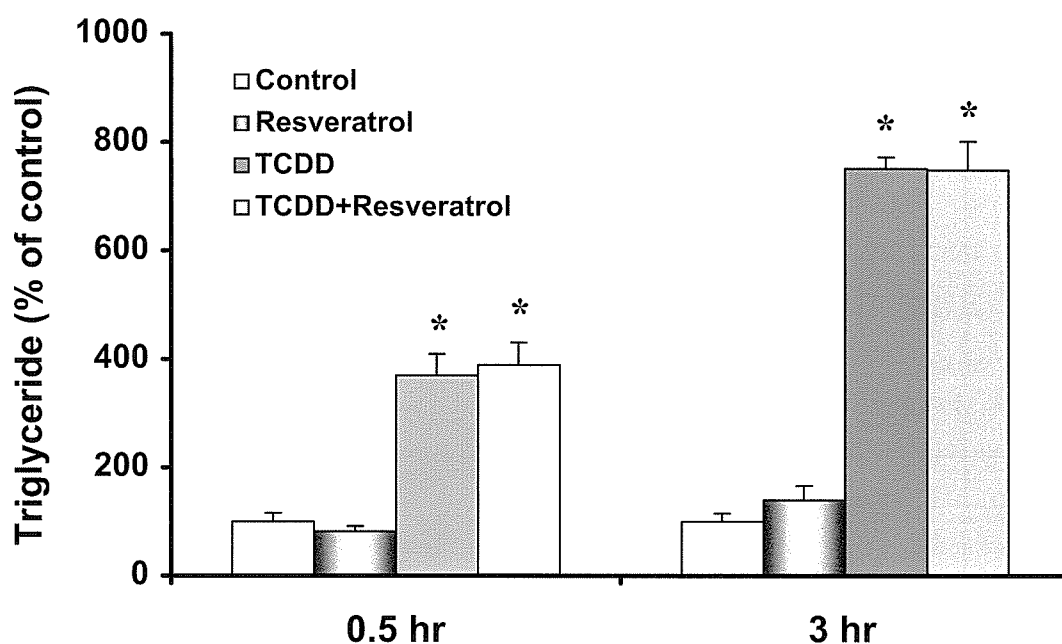




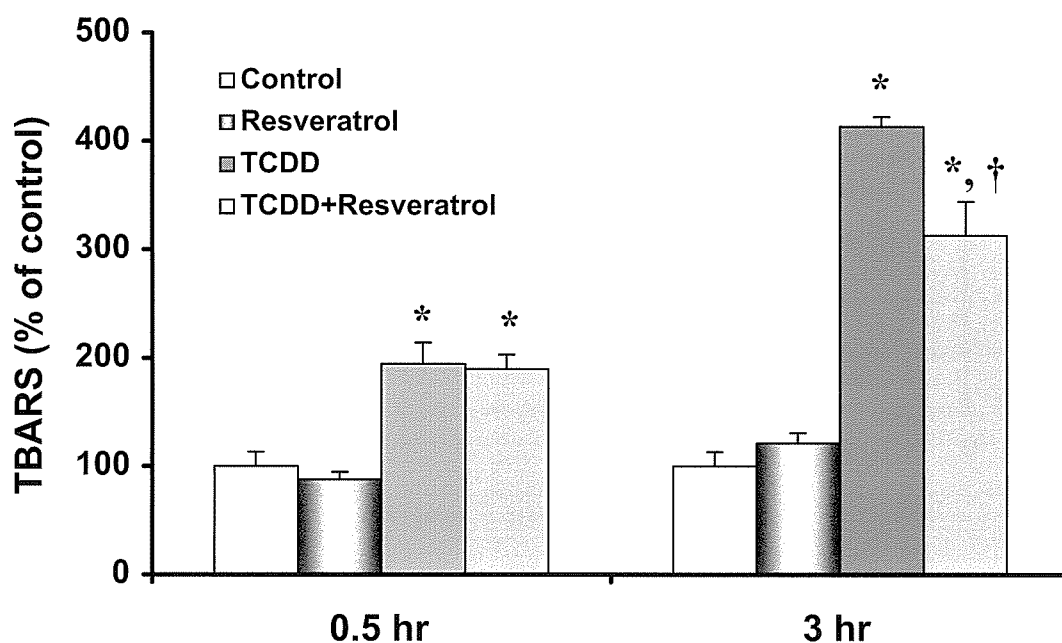
**Fig. 7. Effects of resveratrol on serum ALT and AST activities of C57BL/6J mice treated with TCDD.** The values represent the mean  $\pm$  S.E. The numbers of sample show in parenthesis. Significantly different from control: \*,  $p < 0.05$ .



**Fig. 8. Body weight gain of C57BL/6J mice treated with TCDD.** The values represent the mean  $\pm$  S.E. of 4 mice. (A) 0.5 hr treatment group. The initial body weights (mean  $\pm$  S.E.) of mice in control, resveratrol-treated, TCDD-treated and TCDD+resveratrol-treated mice were  $19.6 \pm 0.32$ ,  $20.1 \pm 0.51$ ,  $20.3 \pm 0.36$  and  $20.4 \pm 0.37$  g, respectively. (B) 3 hr treatment group. The initial body weights (mean  $\pm$  S.E.) of mice in control, resveratrol-treated, TCDD-treated and TCDD+resveratrol-treated mice were  $19.8 \pm 0.37$ ,  $19.6 \pm 0.31$ ,  $19.1 \pm 0.36$  and  $19.7 \pm 0.32$  g, respectively.



**Fig. 9. Relative hepatic triglyceride contents of C57BL/6J mice after exposure to resveratrol and TCDD.** The values represent the mean  $\pm$  S.E. of 4 mice. The control values of 0.5 and 3 hr treatment are  $6.67 \pm 1.04$  and  $3.62 \pm 0.52$  mg/g liver, respectively. Singnificantly different from the control; \*,  $p < 0.05$ .



**Fig. 10. Relative hepatic TBARS contents of C57BL/6J mice after exposure to resveratrol and TCDD.** The values represent the mean  $\pm$  S.E. of 4 mice. The control values of 0.5 and 3 hr treatment are  $1132 \pm 150$  and  $875 \pm 115$  nmol/g liver, respectively. Singnificantly different from the control; \*,  $p < 0.05$ . Singnificantly different from the TCDD group; †,  $p < 0.05$ .

## 分担研究報告書

### Proteasome 阻害剤が芳香族炭化水素レセプターを介したシグナル伝達に及ぼす影響

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

#### 研究要旨

当研究室におけるこれまでの研究から、HSP70 誘導能と proteasome 阻害能をもつ N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN) により、AhR 依存的なタンパク質発現が抑制されることが明らかとなっている。AhR による遺伝子発現活性化は、ダイオキシン類の毒性発現において最も重要な要因の一つである。このため、この制御機構を明らかにすることは、その毒性発現機構の解明に新たな知見を与えると共に、ダイオキシン類中毒の治療法、もしくは予防法の開発に向けて重要な知見となると考えられる。以上のような背景のもと、本研究では、ALLN による AhR を介したシグナル伝達に対する影響の詳細を明らかにするため検討を行った。ヒト乳ガン細胞である T47D 細胞に AhR のリガンドである 3-methylcholanthrene (3MC) および ALLN を処理し、AhR の細胞内動態と発現量変動、並びに CYP1A/1B を標的とした転写活性化能を検討した。その結果、ALLN は AhR の発現量に変化を与えることなく、3MC による AhR の核内蓄積を促進することが明らかとなった。一方、ALLN は、CYP1A1 および 1B1 の mRNA の発現量に影響しないにもかかわらず、その活性指標である ethoxyresorufin O-deethylase 活性の AhR 依存的な増加を抑制することも明らかとなった。また、このような現象は、proteasome 阻害剤である lactacystin を処理した場合では観察されたが、HSP70 のシャペロン機能阻害剤 gentamicin では観察されなかった。以上の結果から、ALLN による AhR のシグナル伝達に対する影響は、proteasome 阻害作用に起因している可能性が示唆された。

#### A. 研究の目的

2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) に代表されるダイオキシン類は、多岐に亘る毒性をもつことが知られている (1)。しかし、これらの毒性の発現機構は未だに不明な部分も多く、その解明ならびに健康障害に対する治療・予防法の開発が望まれている。これまでの研究から、ダイオキシン類の毒性発現には、

細胞の可溶性画分に存在する芳香族炭化水素レセプター (AhR ; aryl hydrocarbon receptor) が重要な役割を演じると考えられている (2, 3)。AhR は受容体型転写因子であり、通常は heat shock protein の一つである HSP90 や、その他のコシャペロンと結合し、不活性状態で存在している (4, 5)。これにダイオキシン類や多環芳香族炭化水素などの外因性リ

ガンドが結合すると、活性化され核内へ移行し、下流にコードされるタンパク質の発現を制御すると考えられている (6)。また、機能を果たした AhR については、細胞質へ排出され proteasome において分解されることも明らかとなっている (Fig. 1) (7, 8)。

当研究室ではこれまでに、heat shock protein 70 (HSP70) を誘導することが知られている抗胃潰瘍薬

geranylgeranylacetone (GGA) を前処理することにより、C57BL/6J マウスにおける TCDD の毒性の一部が軽減されることを明らかにしている (9)。さらに、その機構を明らかにするため、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ法を用いて検討を行った結果、HSP70 誘導能と proteasome 阻害能をもつ

N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN) により、AhR 依存的なタンパク質発現が抑制されることが明らかとなった (平成 16 年度分担研究報告書にて報告済み)。AhR による遺伝子発現を安全にかつ確実に制御する方法を明らかにすることは、ダイオキシン類中毒の治療法、もしくは予防法の開発に向け重要な知見となると考えられる。以上のような背景のもと、本研究では、ALLN による AhR シグナル伝達に対する影響を詳細に明らかにするため検討を行った。

## B. 方法・結果

### ALLN 処理が AhR の発現量および細胞内動態に及ぼす影響

前述の様に、当研究室では、これまでの研究から、ALLN が AhR によるタンパク質発現活性化を抑制する可能性を示す結果を得ている。このような ALLN の性質は、ALLN

の HSP70 誘導能に起因する可能性が考えられたが、一方で ALLN は、タンパク質の分解に深く関与する proteasome の阻害剤でもある。このため、この作用が関与している可能性も否定できない。事実、AhR は、転写活性化後、proteasome により分解されることが知られており (7, 8)、その部分の機能障害が AhR による転写活性化の抑制に関与する可能性も十分に予想される。前述の用に、AhR による転写活性化には、その開始から終了までにいくつかのステップが存在する (リガンド結合→核内移行→転写調節領域への結合→核外移行→分解)。そこで、本研究では、AhR による転写活性化の抑制がどのステップで起きているのかを明らかにするため、AhR の細胞内局在および発現量に対する ALLN の影響について検討を行った。

ヒト乳癌由来 T47D 細胞に 12 時間 ALLN を処理した結果、これまでの結果と同様、20、40 および 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のいずれの濃度においても顕著な HSP70 の誘導が認められた (Fig. 2)。そこで、細胞毒性を与えないことが確認されている 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を ALLN の処理濃度と決定した。次に、AhR の細胞内動態を Immunofluorescence (IMF) 法を用いて解析した。細胞に AhR のリガンドである 3-methylcholanthrene (3MC) 1  $\mu\text{M}$  および ALLN 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を一定時間処理し (2-16 時間)、AhR と HSP70 の細胞内動態を蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、3MC 単独処理では、処理時間 2-16 時間のいずれにおいても AhR の核内移行が観察された (Fig. 3A-D)。これに対し、ALLN を前処理した場合、3MC による AhR の核への集積は、ALLN 未処理時に比べ増加する傾向にあることが観察された (Fig. 3A-D)。この ALLN 併用による核集積の増加は、処理 8-16 時間でより顕著であった (Fig. 3C, D)。また、AhR の核内への蓄積の増加

は、ALLN 濃度を 80  $\mu\text{g/ml}$  に増加した場合でも同様であった (成績未掲載)。HSP70 の局在については、ALLN 処理による変化は見られなかった (Fig. 3E)。一方、proteasome 特異的阻害剤である lactacystin 1 $\mu\text{M}$  を処理した場合、ALLN の場合と同様の効果が観察された (Fig. 3F)。以上の結果から、少なくとも細胞内局在を見る限り、ALLN 処理による AhR の核内蓄積は、proteasome 阻害効果に起因しており、HSP70 の誘導は直接的な因子ではない可能性が示唆された。次に、AhR の発現量に対する ALLN の影響を検討するため、細胞内における AhR 量をイムノブロット法にて定量した。その結果、whole cell lysate において、3MC 処理細胞では、総 AhR 量は検出できない程度まで低下していた (Fig. 4)。多くの細胞において、AhR はリガンド処理後 4 時間以内にその 80-90% が減少することが報告されている (10)。また、リガンド結合に伴う活性化シグナルの発動後も AhR の mRNA 量は変動しないことから (11)、リガンド結合後に AhR の細胞内発現量は分解の促進によって低下すると考えられている。これらの知見は、本研究で観察された結果とよく符合している。これに対し、ALLN を前処理した場合、ALLN の用量依存的に総 AhR の増加が観察された (Fig. 4)。また、ALLN のみの処理では総 AhR 量に顕著な変動が見られなかった (Fig. 5)。以上の結果は、ALLN が、AhR のリガンド依存的な分解を特異的に阻害している可能性を強く示唆している。一方、細胞質および核画分の AhR 量を解析した結果、ALLN の前処理により、3MC 単独処理と比べ AhR が核内に蓄積する傾向にあることも明らかとなった (Fig. 6B)。この結果も、我々の結果 (Fig. 3) を支持するものであると考えられた。

### Proteasome 阻害剤が AhR を介した遺伝子発現に及ぼす影響

以前の研究で観察された ALLN の AhR シグナル伝達に対する抑制作用は、AhR 応答配列だけを上流に持つ人工遺伝子系 (luciferase reporter 系) を使用して得られたものであった。しかし、転写調節領域の機能は複雑であり、ALLN が他の上流エレメントを介して AhR シグナル伝達に影響を与える可能性も十分に考えられる。そこで、代表的な AhR 応答性遺伝子である cytochrome P450 (CYP) 1A/1B に着目し、これらの酵素活性および mRNA レベルに対する ALLN の影響について検討を行った。96 穴プレート上にて培養した T47D 細胞に ALLN 40  $\mu\text{g/ml}$  を 4 時間処理し、ALLN 40  $\mu\text{g/ml}$  と 3MC 1  $\mu\text{M}$  を含む培地に置換して 2、4、8 および 12 時間培養した。培養後、96 穴プレート上にて CYP1A subfamily の活性指標である ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) 活性を測定した。その結果、3MC のみを処理した場合、多くの既報成果と合致していずれの処理時間でも顕著な EROD 活性の増加が見られた。これに対し、ALLN を併用した場合、3MC 依存的な EROD 活性の増加は顕著に抑制され、かつその抑制作用は時間依存的に増強された (Fig. 7)。EROD 活性測定時にのみ ALLN を添加しても、活性低下は観察されず (Fig. 8)、ALLN が CYP1A を直接阻害する単純な可能性は否定された。以上の結果から、ALLN は、T47D 細胞ゲノムに存在する AhR 応答性遺伝子のリガンド依存的な発現も抑制することが明らかとなった。さらに、ALLN 以外のタンパク質分解酵素阻害剤 (Lactacystin および Leupeptin) について同様な検討を行った結果、proteasome 特異的阻害剤である lactacystin では、1  $\mu\text{M}$  処理において

ALLN と同様に 3MC 依存的な EROD 活性の増加を抑制した (Fig. 9)。これに対し、cysteine protease 阻害剤である leupeptin では抑制は観察されなかった。以上の結果から、ALLN による AhR 応答性遺伝子の発現抑制には proteasome 阻害が関与している可能性が示唆された。次に、この機構を明らかにするため、半定量的 RT-PCR 法を用いて CYP1A/1B mRNA 量を解析した。その結果、3MC 依存的な CYP1A1 および CYP1B1 mRNA の増加は、ALLN の併用により低下しなかった (Fig. 10B, D)。また、CYP1A2 mRNA 量は、有意な低下が認められたものの、その低下はわずかであり (Fig. 10C)、ALLN による EROD 活性低下 (Fig. 7) を説明するには至らなかった。また、AhR 応答性遺伝子として知られる Ah receptor repressor (AhRR)、NAD(P)H : quinone oxidoreductase (NQO1) および selenium-binding protein (SeBP) の mRNA 量の解析も行ったが、これらの場合、いずれにおいても 3MC による誘導が ALLN との併用により有意に低下していた (Fig. 11B)。以上の結果から、ALLN による AhR 応答性遺伝子発現の抑制は、ALLN が AhR シグナル伝達のうち転写活性化以降のステップに作用して出現したものであり、かつ、ALLN が発現を抑制する遺伝子には選択性があることが示唆された。

#### ALLN の AhR シグナリング抑制における HSP70 の役割

これまでの結果から、ALLN による AhR シグナル伝達の抑制は、HSP70 の細胞内分布とは無関係に (Fig. 3E)、proteasome 阻害を起点として (Fig. 3F)、転写以降の段階が抑制されることにより引き起こされる (Fig. 10) 可能性が示唆された。しかし、proteasome の阻害は、多くの場合結果とし

て HSP70 誘導を惹起することから (12)、ALLN の AhR 応答性遺伝子の発現低下に HSP70 の誘導が寄与する可能性も完全には否定できない。そこで、AhR シグナル伝達に対する HSP70 の影響をさらに検証するため、HSP70 のシャペロン機能に対する特異的な阻害剤である gentamicin (GM) を用いて検討を行った。GM による阻害作用は、HSP70 に特異的であると言われている (13)。事実、我々が行った予備検討においても、GM は、HSP70 による変性 luciferase の refolding 作用を特異的に阻害することが確認された (Fig. 12)。そこで、T47D 細胞に ALLN 40  $\mu\text{g/ml}$  と GM を 4 時間前処理し、その後、3MC 1  $\mu\text{M}$  と ALLN および各濃度の GM を含む培地に置換して培養を継続し、12 時間後に EROD 活性を測定した。なお、GM が抗生物質として使用される際、至適濃度は 10-100  $\mu\text{M}$  といわれており、今回使用した 0.2-2 mM は細胞に作用し得る十分な濃度であると考えられた。その結果、ALLN により、3MC による EROD 活性の増加は抑制されるが、GM を重複処理しても活性の回復は認められなかった (Fig. 13)。また、GM を 1 および 2 mM の濃度で単独処理した場合では、EROD の活性の増加が認められた (Fig. 13)。以上の結果から、ALLN による AhR 応答性遺伝子誘導の抑制は、HSP70 シャペロン機能に依存しない可能性が示唆された。

#### ALLN による AhR シグナル伝達の抑制機構の解析

前述の様に、AhR による CYP1A/1B 誘導に対する ALLN の影響は、mRNA レベルとタンパク質レベルで異なるものであった。このため、mRNA の翻訳段階における抑制がタンパク質レベルでの発現抑制を引き起こしている可能性が考えられた。そこで、これを検

証するため、以前当研究室で作製したルシフェラーゼ発現プラスミドを用いて検討を行った。T47D 細胞にルシフェラーゼ発現プラスミドをトランスフェクションし、先程と同様に ALLN、GM および 3MC を処理した後、 $[^{35}\text{S}]$ methionine を含む培地で 30 分培養した。その後、細胞を回収し、luciferase に対する抗体にて免疫沈降を行い、30 分間に合成された細胞内の  $[^{35}\text{S}]$ ラベル化 luciferase を定量した。なお、内標準として  $\beta$ -tubulin も同様の方法で定量した。その結果、HSP70 阻害剤である GM の有無にかかわらず、新生 luciferase の発現量に変化は認められなかった (Fig. 14)。従って、ALLN による AhR 応答性遺伝子誘導の抑制において、mRNA の翻訳過程の関与は低いものである可能性が示唆された。

### C. 考察

本研究では、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確立のため、ALLN が AhR シグナル伝達に及ぼす影響について検討を行った。その結果、ALLN は、AhR の核内蓄積を促進させることが明らかとなった (Fig. 3 および 6)。このような AhR の核内への蓄積は、AhR による転写活性を促進させると考えられる。しかし、当研究室における検討結果はこれを支持せず、逆に AhR 応答性遺伝子の発現増加を抑制する結果となった (Fig. 7)。また、この機構について検討した結果、ALLN による proteasome 阻害作用が深く関与している可能性が示唆された (Fig. 3F)。今回使用した ALLN は、proteasome 以外に calpain や cystein protease の阻害作用をもつと言われている (14)。Calpain 阻害剤を用いた研究では、リガンドにより誘導された CYP1A1 の発現が、calpain 阻害剤により抑制されること、また同阻害剤は核に移行し

た AhR の細胞質への排出を促進することが報告されている (15)。従って、ALLN の calpain 阻害効果が AhR のシグナル伝達活性化の抑制に関与している可能性も予想された。しかし、AhR の核からの排出が ALLN により促進されない以上、この機構の寄与が大きいとは考え難かった。また、本研究において、proteasome 特異的阻害剤である lactacystin により、ALLN と同様な AhR の核内蓄積が観察された (Fig. 3F)。このことから、少なくとも AhR の核内蓄積の促進には、ALLN の proteasome 阻害作用が大きく寄与していると考えられた。次に、研究当初よりの作業仮説である HSP70 の誘導と AhR シグナル伝達との関連性について検討したが、HSP70 の細胞内動態およびシャペロン機能のいずれとも関連性は見出せなかった (Fig. 3E および 14)。これまでに、リガンド非存在下の AhR と HSP70 との相互作用は確認されていない (16, 17)。このため、リガンド存在下においても AhR と HSP70 が直接に相互作用する可能性は低いと考えられた。さらに、ALLN 処理により、3MC による EROD 活性の増加が抑制されることが認められたが (Fig. 7)、この現象は、proteasome 特異的阻害剤である lactacystin を処理した場合でも観察された (Fig. 9)。また、3MC による CYP1A1 および 1B1 mRNA の誘導は、ALLN によって抑制されなかった (Fig. 10)。このタンパク質と mRNA の発現量変動の矛盾は、CYP1A2、AhRR、NQO1 および SeBP では観察されなかったことから、ALLN による AhR 応答性遺伝子誘導の抑制には遺伝子選択性があることが示唆された。

本研究から、AhR の ubiquitin/proteasome 経路による制御・分解に、未同定の因子が存在することが示唆された。また、この部分の制御が、その上流に位置する AhR による転写活性化を制御する可能性も十分に予



想された。今後の研究でこの点が明らかになれば、新規の AhR シグナリング制御機構の解明に繋がるのではないかと期待される。

#### D. 参考文献

- 1) Poland, A. and Knutson JC., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22, 517-554 (1982).
- 2) Poland, A., Glover, K. and Kende, AS., *J. Biol. Chem.*, 251, 4936-4946 (1976).
- 3) Hankinson, O., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35, 307-340 (1995).
- 4) Whitelaw, ML., Gustafsson, JA. and Poellinger, L., *Mol. Cell Biol.*, 14, 8343-8355 (1994).
- 5) Antonsson, C., Whitelaw, ML., McGuire, J., Gustafsson, JA. and Poellinger, L., *Mol. Cell Biol.*, 15, 756-765 (1995).
- 6) Reyes, H., Reisz-Porszasz, S. and Hankinson, O., *Science*, 256, 1193-1195 (1992).
- 7) Pollenz, RS., *Chem. Biol. Interact.*, 141, 41-61 (2002).
- 8) Davarionos, NA. and Pollenz, RS., *J. Biol. Chem.*, 274, 28708-28715 (1999).
- 9) Ishida, T., Oshimo, T., Nishimura, A., Mutoh, J., Ishii, Y., Koga, N., Yamada, H., Hashiguchi, I., Akamine, A. and Oguri, K., *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 1397-1402 (2004).
- 10) Pollenz, RS., *Mol. Pharmacol.*, 49, 391-398 (1996).
- 11) Giannone, JV., Li, W., Probst, M. and Okey, AB., *Biochem. Pharmacol.*, 55, 489-497 (1998).
- 12) Bush, KT., Goldberg, AL. and Nigam, SK., *J. Biol. Chem.*, 272, 9086-9092 (1997).
- 13) Miyazaki, T., Sagawa, R., Honma, T., Noguchi, S., Harada, T., Komatsuda, A.,

Ohtani, H., Wakui, H., Sawada, K., Otake, M., Watanabe, S., Jikei, M., Ogawa, N., Hamada, F. and Itoh, H., *J. Biol. Chem.*, 279, 17295-17300 (2004).

14) Griscavage, J.M., Wilk, S. and Ignarro, L.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 3308-3312 (1996).

15) Dale, YR. and Eltom, SE., *Mol. Pharmacol.*, 70, 1481-1487 (2006).

16) de Moraes, SM., Giannone, JV. and Okey AB., *J. Biol. Chem.*, 269, 12129-12136 (1994).

17) Shetty, PV., Wang, X. and Chan, WK., *Arch. Biochem. Biophys.*, 429, 42-49 (2004).

#### E. 研究発表

- 1) 日本薬学会第 127 年会 (富山、2007 年 3 月) 予定

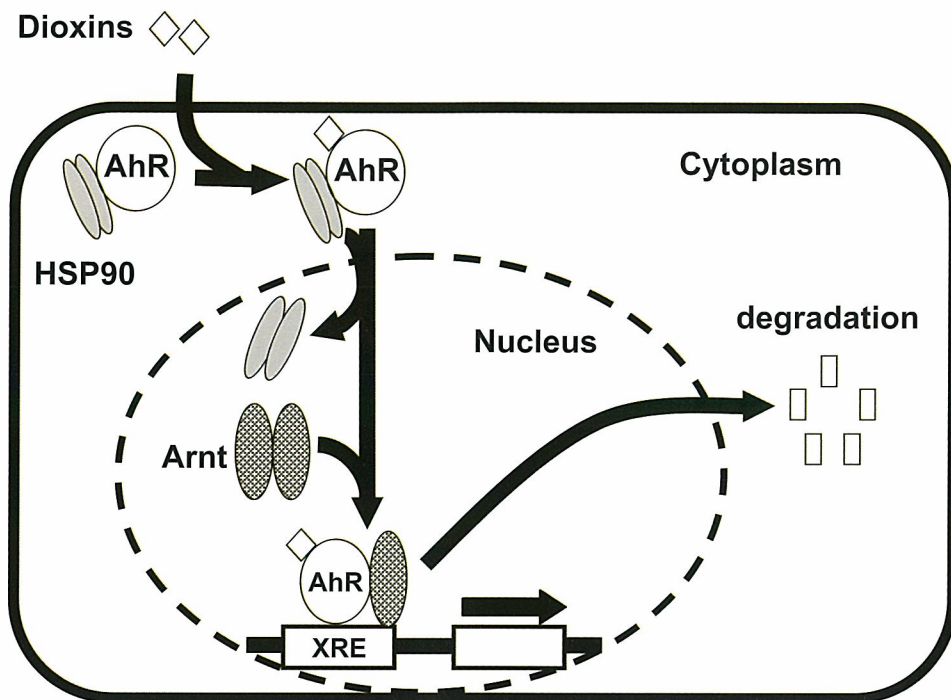
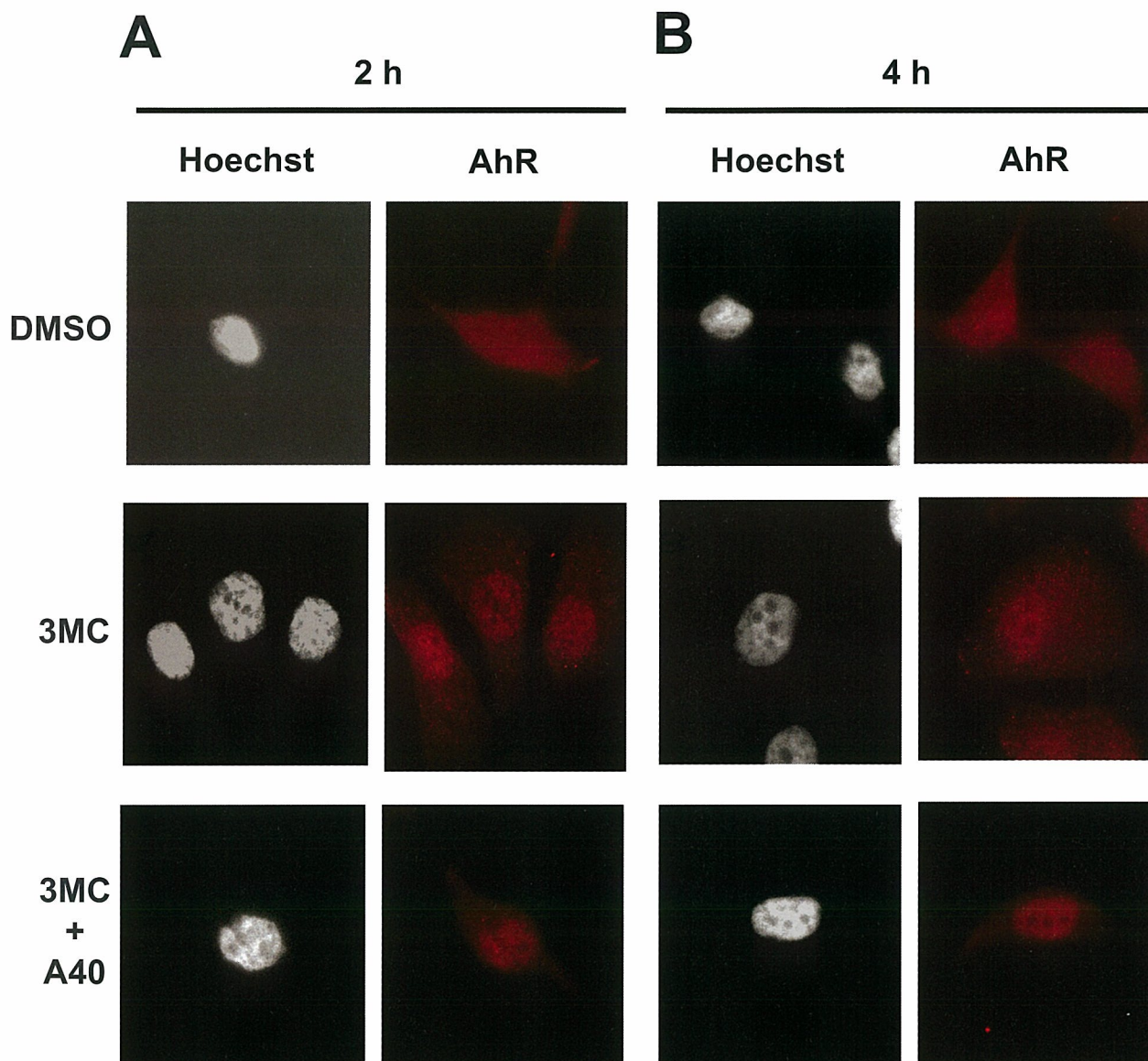


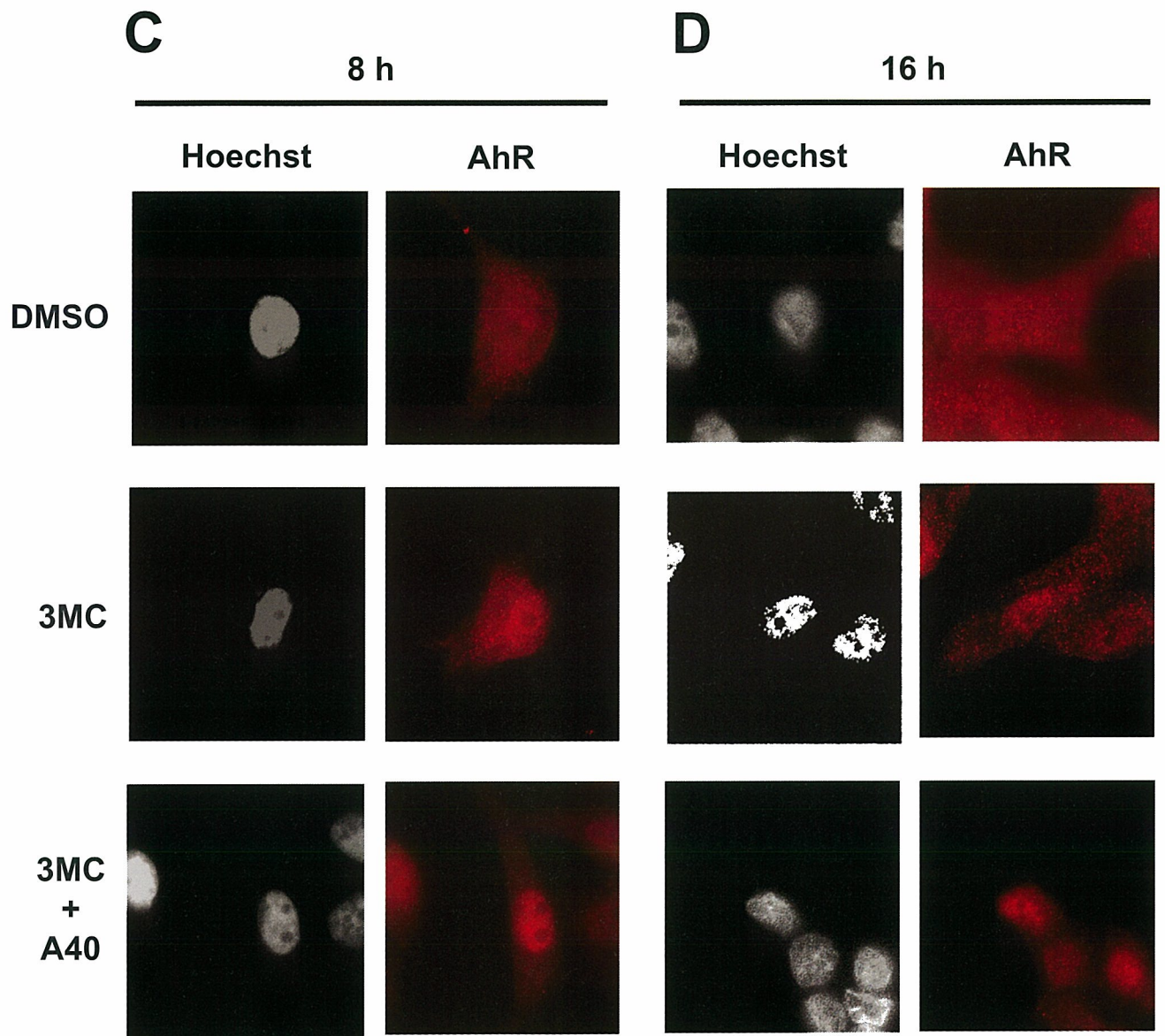
Fig. 1. Postulated mechanism of transcriptional activation by AhR system.



Fig. 2. Induction of HSP70 by ALLN in T47D cells. T47D cells were grown up to 90% confluence and treated with different concentrations of ALLN as indicated for 12h. After treatment, whole cell lysate (3 mg protein) was subjected to SDS-PAGE (10% gel) and immunoblotted with anti-HSP70 monoclonal antibody.



**Fig. 3. The effect of proteasome inhibitors on the nuclear accumulation of AhR in T47D cells.** T47D cells were treated with 1  $\mu$ M 3MC and either with 40  $\mu$ g/ml ALLN (A40) (panels A-E) or 1  $\mu$ M Lactacystin (Lac) (panel F) for a period indicated before fixation. For comparison, the cells were also treated with vehicle alone (DMSO) and AhR ligand alone (3MC). The distribution of AhR (A-D and F) and HSP70 (E) was observed immunocytochemical staining with each primary antibody followed by Cy3-conjugated secondary antibody. In panels of 'Hoechst', DNA was stained with 20 $\mu$ g/ml Hoechst 33242.



**Fig. 3. continued.**