

6. ヒト型モデル動物による AhR の分子基盤解析と 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。この生体毒性の発現は、AhR の正常な生理機能の裏面の作用と考えられるので、AhR の毒性発現の関与メカニズムを理解するためには、AhR の正常な働きを理解することが重要である。そのような観点から AhR の癌抑制因子としての働き、AhR の免疫細胞における働き及び AhR と他の受容体型転写因子との相互作用について研究している。今回は、AhR の盲腸癌における働き、及び炎症における働きについて報告する。

A. 研究目的

AhR 欠失マウスでは、生後 11 週を過ぎると殆どすべてのマウスに盲腸癌を発症し、大腸の DSS (dextran sodium sulfate) 投与による大腸炎に対し易炎症性であることが明らかになった。AhR の大腸癌抑制と抗炎症作用の分子メカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

AhR 欠失マウス及び野性型マウスからマクロファージや腸組織を用いて遺伝子発現の変化や形態学的変化などについて DNA-マイクロアレイ法、RT-PCR 法、抗体染色法や生化学的・分子生物学的方法を用いて総合的に解析する。

(倫理面への配慮)

動物を扱う実験においては、筑波大学「動物実験規則」に従って行う。

C. 研究結果

AhR 欠失マウスの大腸癌の発症については、大量の AhR 欠失マウス、ヘテロ欠失マウス、野性型マウスを用いて癌の発生、癌の成長、マウスの死亡率について検討した結果、AhR 欠失マウスについては生後 8 週で大腸癌、特に回盲部に癌の発生が認められ、生後 11 週で 100% の AhR 欠失マウスに癌の発生が認められることが明らかになった。癌は殆どすべて回盲部に発生し、成長は比較的遅く 30~40 週でプラトーに達する。癌は腺腫、腺癌に移

行し、筋肉層への浸潤が認められ、Kaplan-Meyer 曲線でも明らかに AhR 欠失マウスは AhR ヘテロ欠失マウスや野性型マウスと比較して短命になっていることが判明した。興味あることに癌の発生は殆どすべて回盲部である。組織標本をβ-カテニン抗体で免疫染色すると、AhR 欠失マウスではβ-カテニンのタンパク質レベルでの発現が顕著に高くなっていた。AhR 欠失マウスでのβ-カテニンの高い発現は癌の発生がまだ検出されない生後 6 週でも認められた。さらにβ-カテニンの mRNA の発現は野性型マウスと比較して殆ど変わらないことから、β-カテニンのタンパク質の蓄積はタンパク質の安定化によることが示唆された。大腸癌の発生では APC 遺伝子がβ-カテニンのユビキチン化とプロテアソームによる分解に働き、癌抑制因子として働いていることが良く知られている。つまり、APC の欠失変異によるβ-カテニンの安定化と蓄積によって大腸細胞の癌化が惹き起こされる。一方、東大分生研の加藤、大竹は我々との共同研究によって、AhR がリガンド依存的に ERα、ERβ と AR のユビキチン化とプロテアソームによる分解に関与していることを今年度明らかにした。これはダイオキシンやメチルコラントレンによる内分泌かく乱作用を説明する重要なメカニズムであるが、AhR 欠失マウスにおけるβ-カテニンの蓄積は、β-カテニンの分解にも AhR が働いている可能性があることを示していると考えられた。その可能性を APC が変異を起こしている DLD-1 や SW480 細胞で調べるとβ-カ

テニン は AhR のリガンドである 3MC に依存してユビキチン化され、分解されることが示された。この分解が AhR の siRNA によって阻止されることから、AhR は β -カテニンの分解にも関与していることが確認された。AhR にはリガンド依存的に Arnt の他に Cul4B、DDB1、TBL3、Rbx1 などが結合してユビキチン化複合体を形成することが ER α 、ER β などのユビキチン化では示されるが、 β -カテニンのユビキチン化も Cul4B の siRNA によって阻害されることから同じ複合体が、 β -カテニンのユビキチン化にも関与していることが示唆された。

ヒトの盲腸癌においても β -カテニンの異常蓄積と AhR の顕著な発現低下が観察されたので、ヒトの盲腸癌の場合にも AhR が癌抑制因子として働いていることが示唆された。

AhR 欠失マウスは、DSS による大腸炎や LPS による敗血症ショックに対し、高感受性になっていることが発見され、AhR が抗炎症的に働くことが明らかになった。LPS を投与したマウスでは、TNF- α の血中濃度が野性型マウスに対し、AhR 欠失マウスでは、投与後 2 時間で顕著に上昇し、続いて向炎症性サイトカインである IL-6 や IFN- γ の血中濃度も急速に増加することが分った。さらに常在性の腹腔マクロファージでも AhR 欠失細胞では、LPS 刺激に対して向炎症性サイトカインの合成に関して過敏になっていることが明らかになった。

D. 考察及び E. 結論

AhR がリガンド依存的に ER α 、ER β 及び AR のユビキチン化に働き、続くプロテアソームによる分解に関与していることが明らかになった。さらに AhR 欠失マウスは、11 週令になると殆どすべてのマウスで盲腸癌が発症することが明らかになり、AhR が大腸、特に盲腸において癌抑制因子として働いていることが認められた。AhR は小腸、回盲部ではパネート細胞と幹細胞に強く発現しており、AhR 欠失マウスの腸では β -カテニンのタンパク質の異常蓄積が起こり、腸は“Cancer-prone”の状態になっていることが分った。AhR 欠失マウスの腸における β -カテニンの異常蓄積は、 β -カテニンの AhR による分解が停止したことによることが示された。AhR と APC の両者は共に β -カテニンのユビキチン化と分解に関与していることが明らかになったが、APC の機能欠失マウス min は主に小腸に癌が発生し、AhR の欠失マウスは主として回盲部に癌が発

生するが、その理由は現在のところ不明である。また AhR 欠失マウスは LPS による敗血症ショック (Septic shock) や DSS による大腸炎モデルに過敏になっており、AhR が抗炎症作用に働いていることが明らかになって来た。現在その分子機構についても研究を進めている。

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

Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y and Kato S, Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase, *Nature* in print

Kawajiri K and Fujii-Kuriyama Y, Cytochrome P450 Gene Regulation and Physiological Functions mediated by the Aryl Hydrocarbon Receptor, *Arch. Biochem. Biophys.* (invited review) in print

Goryo K, Suzuki A, Carpio CA, Siizaki K, Kuriyama E, Mikami Y, Kinoshita K, Yasumoto K, Rannug A, Miyamoto A, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. Identification of amino acid residues in the Ah receptor involved in ligand binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 354, 396-402 (2007)

Sagredo C, Ovrebo S, Haugen A, Fujii-Kuriyama Y, Baera R, Botnen IV, Mollerup S. Quantitative analysis of benzo[a]pyrene biotransformation and adduct formation in Ahr knockout mice. *Toxicol Lett.*, 167, 173-182 (2006)

Sekine H, Mimura J, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y. Unique and overlapping transcriptional roles of Arnt (Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator) and Arnt2 in xenobiotic and hypoxic responses. *J Biol Chem.*, 281,

37507-37516 (2006)

2. 学会発表

(国外)

Yoshiaki Fujii-Kuriyama,
EUROTOX 2006/6CTDC Congress (43rd Congress
of the European Societies of Toxicology and
6th Congress of Toxicology in Developing
Countries) “Physiological roles of AhR in
murine reproductive and immunological

processes” Cavtat/Dubrovnik, Croatia,
September 20-24 2006.

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攪乱化学物質の影響解析

分担研究者 鎌滝 哲也

高崎健康福祉大学 薬学部 教授

研究要旨

これ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、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。本年度は活性化された p53 による RXR の発現抑制が PAHs による LXR シグナル伝達経路の抑制の原因となることを明らかにした。

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が明らかとなっている。我々は昨年度までに PAHs が AhR および CYP1A1 の活性に依存的に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機構を提唱してきた。そこで本年度は PAHs がこれらの経路を介して誘発する DNA 損傷によって活性化された p53 が LXR シグナル伝達経路を抑制に関与するか否かを検討し、その役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

PAHs が LXR α 標的遺伝子 (ABCA1 および SREBP1c) mRNA 発現に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。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 細胞および Hep3B 細胞に導入し、MC の LXR α 転写活性に及ぼす影響を検討した。RXR α タンパク質の発現量は HepG2 細胞から調製した核抽出液を用い、ウエスタンブロット法により定量した。

(倫理面への配慮)
該当しない

C. 研究結果

PAHs の一つである MC で HepG2 細胞を処置した場合、ABCA1 および SREBP1c mRNA 発現量は濃度依存的に抑制された。LXR α を介して誘導された転写活性は MC によって抑制された。AhR および CYP1A1 に対する siRNA

を発現させた HepG2 細胞を用いた場合、MC によって LXR α を介した転写活性は抑制されなかった。p53 変異株である Hep3B 細胞では MC は LXR α を介した転写活性を抑制しなかった。MC による RXR α タンパク質の発現量の抑制はプロテアソーム阻害剤である MG132 共処置によって解除された。以上のことから LXR α シグナル伝達経路は PAHs によって活性化された p53 を介して RXR α タンパク質のプロテアソームによる分解が促進されることで抑制される可能性が示唆された。

D. 考察

LXR α 欠損マウスにおいてコレステロール代謝のバランスが著しく低下し、肝臓へのコレステロールの蓄積および血漿コレステロール濃度の上昇が報告されている。また PAHs はタバコ煙中に多く含まれ、動脈硬化を誘発することが知られている。以上のことから、PAHs は LXR α シグナル伝達系を抑制することでコレステロールのホメオスタシスを阻害し、その結果、動脈硬化が誘発されると考えられた。

E. 結論

PAHs による LXR を介して誘導された転写活性は p53 依存的に抑制された。これは、LXR のヘテロ二量体のパートナーである RXR のタンパク質の分解は DNA 損傷によって活性化された p53 により促進された。以上に示す PAHs による LXR シグナルの抑制は、タバコによる動脈硬化誘発機序の一つであることが示唆された。

F. 健康危惧情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

該当しない

2) 雑誌

Mitani Y, Lezhava A, Kawai Y, Kikuchi T, Oguchi-Katayama A, Kogo Y, Itoh M, Miyagi T, Takakura H, Hoshi K, Kato C, Arakawa T, Shibata K, Fukui K, Masui R, Kuramitsu S, Kiyotani K, Chalk A, Tsunekawa K, Murakami M, Kamataki T, Oka T, Shimada H, Cizdziel PE, Hayashizaki Y.: Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nat Methods*, 4(3):257-262 (2007).

Uno Y, Kumano T, Kito G, Nagata R, Kamataki T, Fujino H.: CYP2C76-mediated species difference in drug metabolism: A comparison of pitavastatin metabolism between monkeys and humans. *Xenobiotica*, 37(1):30-43 (2007).

Yamazaki H, Fujita H, Gunji T, Zhang J, Kamataki T, Cashman JR, Shimizu M.: Stop codon mutations in the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene responsible for trimethylaminuria in a Japanese population. *Mol. Genet. Metab.*, 90(1):58-63 (2006).

Peamkrasatam S, Sriwatanakul K, Kiyotani K, Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T, Yoovathaworn K.: *In vivo* evaluation of coumarin and nicotine as probe drugs to predict the metabolic capacity of CYP2A6 due to genetic polymorphism in Thais. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21(6):475-484 (2006).

Saruwatari J, Matsunaga M, Ikeda K, Nakao M, Oniki K, Seo T, Mihara S, Marubayashi T, Kamataki T, Nakagawa K.: Impact of CYP2D6*10 on H1-antihistamine-induced hypersomnia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*,

62(12):995-1001 (2006).

Sarikaya D, Bilgen C, Kamataki T, Topcu Z.: Comparative cytochrome P450 -1A1, -2A6, -2B6, -2C, -2D6, -2E1, -3A5 and -4B1 expressions in human larynx tissue analysed at mRNA level. *Biopharm. Drug Dispos.*, 27(8):353-359 (2006).

Takasuna K, Hagiwara T, Watanabe K, Onose S, Yoshida S, Kumazawa E, Nagai E, Kamataki T.: Optimal antidiarrhea treatment for antitumor agent irinotecan hydrochloride (CPT-11)-induced delayed diarrhea. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 58(4):494-503 (2006).

Uno Y, Fujino H, Kito G, Kamataki T, Nagata R.: CYP2C76, a novel cytochrome P450 in cynomolgus monkey, is a major CYP2C in liver, metabolizing tolbutamide and testosterone. *Mol. Pharmacol.*, 70(2):477-486 (2006).

Kuribayashi S, Ueda N, Naito S, Yamazaki H, Kamataki T.: Species differences in hydrolase activities toward OT-7100 responsible for different bioavailability in rats, dogs, monkeys and humans. *Xenobiotica*, 36(4):301-314 (2006).

2. 学会発表

Iwano S, Shibahara N, Saito T, Kamataki T.: Activation of p53 as a cause of atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. 日本薬物動態学会第21回年回, 東京, 2006年12月.

Shibahara N, Iwano S, Kamataki T.: Anti tumor protein p53 activates the transcription of the human CYP1A1 gene. 日本薬物動態学会第21回年回, 東京, 2006年12月.

Marubashi H, Shibahara N, Iwano S, Kamataki T.: Polycyclic aromatic hydrocarbons increases phospholipids transfer protein gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. 日本薬物動態学会第21回年回, 東京, 2006年12月.

岩野 俊介, 柴原 憲仁, 浅沼 文恵, 糠谷 学, 斎藤 鉄也, 鎌滝 哲也.: 多環芳香族炭化水素類が誘発するアテローム性動脈硬化の毒性発現機構. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 2006 年 7 月.

柴原 憲仁, 増永 結子, 岩野 俊介, 鎌滝 哲也.: 高コレステロール食摂取による多環芳香族炭化水素類の発がん作用増強機構. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 2006 年 7 月.

Iwano S, Asanuma F, Nukaya M, Saito T, Kamataki T.: CYP1A1-mediated Mechanism for Atherosclerosis Induced by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, Korea, May 2006.

Shiabahara N, Masunaga Y, Iwano S, Kamataki T.: The Transcriptional Activation of the CYP1A1 Gene by LXR α . The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, Korea, May 2006.

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他

該当しない

8. 齧歯類前立腺を用いた内分泌かく乱化学物質の新生仔暴露の作用 (H18 年度)

分担研究者 藤本 成明 広島大学原爆放射線医科学研究所放射線再生医学研究部門 助教授

研究要旨

新生仔期のマウス前立腺発達に関わると考えられるアンドロゲン応答性遺伝子をプロテオームおよび cDNA マイクロアレイで同定した。発現解析と遺伝子プロモーター解析の結果、これらアンドロゲン応答は、3 メチルコランスレンおよびエストロゲンにより修飾され EDC のターゲットであると考えられた。また新生仔マウスへの低用量 TCDD 投与により PSP94、defensin β 、PCP4 発現の異常亢進が認められ、ヒトリスク推定に有用なターゲット遺伝子と考えられた。

A. 研究目的

新生仔マウス (PND0-15) の前立腺に対する内分泌かく乱物質の障害作用は、前立腺腺管分岐発達へ関わるものである。これはアンドロゲンにより惹起される過程であるので、まずこの時期の前立腺におけるアンドロゲンに反応する遺伝子群を検索同定する。さらに、それらの遺伝子発現に対するダイオキシン類およびエストロゲン作用物質応答性を検討することにより、障害作用に関わるターゲット遺伝子を同定する。

本年度は、1) これまでに同定された新生仔期応答遺伝子のうち、PSP94、EAPA 2 のプロモーターを同定し、アンドロゲンと、3-メチルコランスレン (3MC)、エストロゲンとの相互作用を明らかにした。また、2) 本研究で解明してきた前立腺分泌タンパク質の mRNA 発現を指標にして、前立腺機能に対する TCDD/3MC の新生仔期投与の影響を解析した。

B. 研究方法

1) 動物： 生後 5 日目の C57BL 雄マウスを Charles River Japan より購入した。生後 6 日目で、テストステロンプロピオネイト (T) 4 mg/kg bw、3MC 0.2, 1 mg/kg bw および 2, 3, 7, 8- TCDD 10-1000 ng/kg bw を i.p. 投与した (それぞれ、TCDD10, TCDD100, TCDD1000)。前立腺組織については、腹葉 (VP)、背側葉 (DLP)、前葉 (AP) を解剖学的に区別して保存した。

2) mRNA 定量： 前立腺の各組織および培養片から RNA 抽出キットにより全 RNA を精製し

cDNA 化後、Sybr Green による real time PCR 法により mRNA の発現レベルを測定した。内部標準として β actin の mRNA を定量した。

3) *in vitro* プロモーター解析

これまでのプロテオームおよび cDNA マイクロアレイ解析により同定された新生仔期アンドロゲン応答遺伝子である PSP94, probasin, SPI-KT3, EAPA2, SPI-KT3, Defensin b1 についてその遺伝子上流域を含む luc レポーターを作製した。これらを、CHO、HepG2、DT3 細胞株にトランジェントに導入して、デハイドロテストステロン (DHT)、3MC 及びエストラジオール (E2) を添加し、それらのアンドロゲン応答性に対する修飾作用を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては、苦痛の少ない方法を用いるなど、本大学の動物取り扱い倫理規定に沿って行った。

C. 研究結果

1) 前立腺機能を指標とした、TCDD/3MC の新生仔投与の影響検討： これまでに本研究で同定されてきた新生仔マウス前立腺でアンドロゲン応答遺伝子群を指標として、新生仔期 TCDD 投与の影響を 6 週齢前立腺で検討した。主要な分泌タンパク質である腹葉の SPI-KT3、SBP、背側葉前葉の EAPA2、IgGBLP の発現量は、TCDD1000 群でも有意な変化が見られなかった。一方で、PSP94、defensin β 、PCP4 の発現は、TCDD 投与量に依存して有意に発現上昇していた。特に defensin β は、TCDD10 群でも有意な発現上昇が見られ

た。

2) 同定した新生仔期前立腺でのアンドロゲン応答遺伝子の 5' 上流域のプロモーター活性

2a) mPSP94 プロモーター: mPSP94 の転写開始点上流-562bp を含む luc レポーターを複製し、アンドロゲン受容体 (AR) とともに細胞株へ導入したところ、この領域がアンドロゲン応答性転写活性化を示した。そこで、このアンドロゲン応答に対する 3MC の作用を Ahr/Arnt (+) である HepG2 細胞により検討した結果、3MC 10^{-8} M ~ 10^{-6} M は、アンドロゲン応答性を増強することが示された。一方で、コンセンサスのアンドロゲン応答配列を有する (ARE)₂-luc による応答は、3MC により濃度依存性に抑制された。

エストロゲン受容体 (ER) のアンドロゲン応答性転写に与える影響を検討するため、CHO 細胞株を用いて ER α ・ β をコトランスフェクションした。PSP94 プロモーター活性は、ER α の存在下で 2-7 倍になった。一方で、ER β による転写活性化促進は弱いことが示された。

2b) EAPA2 プロモーター: mEAPA2 の転写開始点上流-1200bp を含む luc レポーターを複製した。このレポーターは単独では、アンドロゲン応答性を示さなかったが、ER α 存在下では、応答性を発揮した。ER β のコトランスフェクションではアンドロゲン応答を示さなかった。

(倫理面への配慮)

動物を扱う実験においては、広島大学「動物取り扱い倫理規定」に従って行った。

D. 考察

TCDD の新生仔期投与により、成体 (6 週齢) の前立腺において、PSP94、defensin β 、PCP4 の mRNA の発現が異常亢進していた。すなわち、低用量の TCDD の新生仔期暴露により、前立腺の分泌機能の一部が不可逆的に影響されることが示された。

前立腺分泌タンパク質である PSP94 は、アポトーシスの促進作用などにより癌抑制遺伝子として機能することが知られる。また、前立腺から分泌されて精液に抗菌活性を付与すると考えられる defensin についても、癌抑制遺伝子としての機能が見いだされている。従って、これらの遺伝子発現の異常上昇によ

り、前立腺の正常発達が阻害されることが考えられる。6 週齢時の前立腺重量は、TCDD 群において変化していないが、増殖指標である Ki67 発現は TCDD 用量依存的に低下していた。機能の不明な PCP4 は、中枢神経細胞に特異的に発現しているタンパク質として見いだされたが、前立腺、腎、子宮においても高発現している。

昨年度の本研究で、新生仔前立腺のアンドロゲン応答性遺伝子について、3MC の発現修飾作用を検討した。その結果、多くの遺伝子について、3MC の同時投与により T 依存性発現変化が抑制されることが示された。すなわち、3MC の作用は、遺伝子転写レベルでのアンドロゲン応答性の抑制であることが示唆された。今回、ARE-luc レポーターを用いた検討においても、3MC は AR-ARE 応答性転写活性を阻害することが示された。しかし、PSP94 プロモーターを介したアンドロゲン応答性転写活性を見てみると、3MC は、むしろ促進的に作用することが示された。このことから、TCDD による PSP94 遺伝子の発現亢進作用は、PSP94 プロモーターを介した直接的な作用であることが示唆される。

前立腺のアンドロゲン応答性増殖や癌化には、エストロゲンが相乗的に作用することが知られてきた。本研究においても、ER α が存在することで、PSP94 プロモーターを介したアンドロゲン応答性転写が増強されることが示された。また、EAPA2 プロモーターにおいては、アンドロゲン応答性が明確に ER α の存在に依存していた。この相乗作用は、エストロゲンを投与しても影響されないかむしろ低下することから、リガンド非依存性のメカニズムと考えられた。

E. 結論

新生仔期マウス前立腺における、アンドロゲン応答性遺伝子群の発現の多くは、TCDD/3MC により抑制されるが、PSP94 で例示されるようにプロモーターによっては発現促進がされた。また ER が関与する相乗作用も重要な役割を果たしていることが示された。TCDD の新生仔期暴露実験により PSP94、defensin β 、PCP4 発現の異常亢進がみられた。これらの 3 つの前立腺タンパク質は、全てヒトホモログがありヒト前立腺での発現も知られていることから、ヒトリスク推定の指標として有用性であると考えられる。

F. 健康危惧情報
なし。

G. 研究発表

G1. 書籍

1) Kitamura, S., Sugihara, K., Fujimoto, N. Endocrine Disruption by organophosphate and Carbamate pesticides In: R. C. Gupta (ed.) *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*, Elsevier Academic Press, London, pp481-494 (2006).

G2. 論文発表

Fujimoto, N., Nakajima, O., Suzuki, T., Kitamura, S., Ohta, S. *In vivo* function of the 5' flanking region of mouse estrogen receptor beta gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* In press (2007).

Suzuki, T., Fujimoto, N., Kitamura, S., Ohta, S. Quantitative determination of lobe specificity of mRNA expression of androgen-dependent genes in the rat prostate gland. *Endocr. J.* In press (2007).

Fujimoto, N., Akimoto, Y., Suzuki, T., Kitamura, S., Ohta, S. Identification of prostatic-secreted proteins in mice by mass spectrometric analysis and evaluation of lobe-specific and androgen-dependent mRNA expression. *J. Endo.* 190, 793-803 (2006).

Kuwahara, S., Ikei, A., Taguchi, Y., Tabuchi, Y., Fujimoto, N., Obinata, M., Uesugi, S., Kurihara, Y. PSPC1, NONO, and SFPQ are expressed in mouse Sertoli cells and may function as coregulators of androgen receptor-mediated transcription. *Biol. Reprod.* 75, 352-359 (2006).

G3. 学会発表

篠原 聖治、丹下智子、北村繁幸、杉原数美、藤本成明、太田茂、難燃剤ポリブrom化ジフェニルエーテルのエストロゲンおよび甲状腺ホルモン攪乱作用 日本薬学会第 127 年会 富山 2007 (要旨集 30T-am01)

丹下智子、中村優里、杉原数美、藤本成明、

太田茂、北村繁幸 cis および trans-permethrin の代謝とそれによる内分泌攪乱活性変動 日本薬学会第 127 年会富山 2007 (要旨集 30T-am02)

藤本成明、秋元志美、鈴木文男 プロテオーム解析による新規マウス前立腺分泌タンパク質同定とそのアンドロゲン依存性前立腺増殖への関与 第 65 回日本癌学会学術総会 横浜 2006 (総会記事 0-179)

藤本成明 マウス前立腺分泌タンパク質の同定とそのアンドロゲン応答性転写、前立腺生物学シンポジウム 2006、鳥羽 2006.

藤本成明、鈴木智晴 シンポジウム X: マスペクトロメトリー(MS)解析によるマウス前立腺分泌タンパク質の同定、第 79 回日本内分泌学会学術総会、神戸 2006 (日本内分泌学会雑誌 82 S10-1)

Fujimoto, N. *In vivo* functional analysis of the estrogen receptor β gene promoter (招待講演) 13th Asia-Oceania Congress of Endocrinology (Abstract book S2-1) Tehran, Iran (2006)

北村 繁幸、杉原数美、北村繁幸、藤本成明、太田茂 ブロム化難燃剤の甲状腺ホルモン攪乱作用の構造的要因 第 9 回日本環境ホルモン学会研究発表会、東京 2006 (要旨集 PB-15) .

丹下智子、中村優里、杉原数美、藤本成明、太田茂、北村繁幸 pyrethroids および carbamate 系殺虫剤の代謝とそれに伴う内分泌攪乱活性変動 第 9 回日本環境ホルモン学会研究発表会、東京 2006 (要旨集 PB-16) .

柳田 真希、杉原数美、山崎 岳、藤本成明、北村繁幸、太田茂 環境化学物質曝露によるラット新生仔脳および生殖器官におけるエストロゲンレセプターの発現への影響 第 9 回日本環境ホルモン学会研究発表会、東京 2006 (要旨集 PD-35) .

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：
特になし

2. 実用新案登録
該当しない

該当しない

3. その他（データベース等）

9. 甲状腺ホルモンかく乱物質の作用機構の解明：ラットからヒトへ

分担研究者 加藤 善久 徳島文理大学香川薬学部 助教授

研究要旨

本研究では、トランスサイレチン (TTR) 遺伝子欠損マウスを用いて polychlorinated biphenyl (PCB) による実験動物における血清中サイロキシン (T_4) 濃度低下作用機構を解明し、その低下作用機構をヒトに適用できるか否かを追究した。これまで、PCB による血中 T_4 濃度低下は、肝臓の T_4 -UDP-グルクロン酸転移酵素 (UDP-GT) の誘導、血中 TTR を介した T_4 の輸送の攪乱が主因とされてきたが、本研究結果は、それらは単に 1 つの要因であるにすぎないことを示唆し、その低下の主因は、 T_4 の血中から肝臓への移行によることが示された。また、この低下作用機序はヒトにおいても適用できるものと考えられる。

A. 研究目的

ラットでは、polychlorinated biphenyl (PCB) の投与により血中サイロキシン (T_4) 濃度が低下することが報告されている。ヒトにおいても PCB 曝露により甲状腺ホルモンの攪乱が引き起こされている可能性が指摘されている。一般に、PCB によるラットでの血中 T_4 濃度の低下は、肝臓の UDP-グルクロン酸転移酵素 (UDP-GT) が誘導され、 T_4 のグルクロン酸抱合化が促進されること、あるいは PCB の水酸化代謝物が血中 T_4 の輸送タンパクであるトランスサイレチン (TTR) と親和性を持ち、 T_4 と競合的に結合することが、血中 T_4 の標的器官への輸送を攪乱し、血中 T_4 濃度を低下させると報告されている。しかし、ヒトのみならず実験動物においても PCB による血中 T_4 濃度の低下作用機構は十分に解明されていない。そこで、本研究ではヒトにおいて T_4 の

代謝を担う UGT 分子種を明らかにするとともに、TTR 遺伝子欠損マウスを用いて PCB による実験動物における血清中 T_4 濃度低下作用機構を解明し、その低下作用機構をヒトに適用できるか否かを追究した。

B. 研究方法

昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種、ヒト肝ミクロソーム及びヒト小腸ミクロソームについて、 T_4 -UDP-GT 活性及び UGT 分子種の発現量を解析した。また、TTR 遺伝子欠損マウスに Kanechlor-500 (KC500、100 mg/kg) あるいは 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (PentaCB、112 mg/kg) を投与し、4 日後に、血清中甲状腺ホルモン濃度、肝ミクロソームにおける UGT 分子種の発現量及び血中 PCB 水酸化体濃度を測定した。また、TTR 遺伝子欠損マウスに KC500 あるいは PentaCB を投与し、最終投与

後 4 日に $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ を静脈内投与し、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の血清クリアランス、血清タンパクとの結合率及び組織分布量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、*in vivo*での甲状腺ホルモンに対する影響を再現しうる培養系細胞あるいはそれに代わる実験系がないため、やむを得ず実験動物を使用した。その使用数は最小限にとどめ、実験動物に対して苦痛を与えない十分な配慮をし、静岡大学の「動物実験ガイドライン」に従って行った。また、実験者及び飼育者は PCB による汚染を受けないように十分に保護対策を施し、また PCB 曝露動物、廃液等は保管し、曝露・漏洩を防止する対策についても万全を期して実施した。

C. 研究結果

昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A8 の T_4 -UDP-GT 活性は、高値を示した。ヒト肝ミクロソームの T_4 -UDP-GT 活性における個人間変動の大きさは、UGT1A1、UGT1A3 の発現量と相関していた。また、ヒト肝ミクロソームの T_4 -UDP-GT 活性は、ST232(UGT1A3 の特異的基質)及び bilirubin(UGT1A1 の特異的基質)により阻害された。また、ヒト腸ミクロソームにおいて T_4 -UDP-GT 活性が認められ、ヒト腸 UGT1A の発現量はヒト肝よりも高かった。

C57BL/6 系 (野生型)マウスに KC500 (100 mg/kg) 及び PentaCB (112 mg/kg) を投与した時、血清中総 T_4 濃度はいずれも著しく低下した。一方、TTR 遺伝子欠損マウスでは、KC500 を投与した時にのみわずかに低下した。この

時、両マウスにおいて肝臓の Ugt1a1 の発現量は、両 PCB により同程度に増加した。一方、両 PCB 投与による TTR 遺伝子欠損マウスの血中 PCB 水酸化体濃度は、野生型マウスの場合と比較して著しく低下した。

また、KC500 及び PentaCB を処置した両マウスに $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ を静脈内投与した時、血中から $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の消失は、両 PCB を投与した野生型マウスにおいて著しく促進したが、TTR 遺伝子欠損マウスではその促進はわずかであった。この時、野生型マウスでは、両 PCB の投与により $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の分布容積 (Vd) は有意に増加した。一方、TTR 遺伝子欠損マウスでは KC500 においてのみ Vd が増加した。

さらに、両マウスに KC500 及び PentaCB を処置した場合、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の肝臓への移行量及び $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の肝臓における血清-組織間分配係数 (Kp 値) は顕著に増加した。この時、両マウスに KC500 を投与した時、相対肝臓重量は有意に増加したが、PentaCB を投与した場合、相対肝臓重量は変化しなかった。

また、野生型マウスにおいて、KC500 を処置した場合、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ と TTR との結合率は変化しなかったが、PentaCB を処置した場合、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ と TTR との結合率は減少した。一方、TTR 遺伝子欠損マウスでは、KC500 処置により、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ とアルブミンとの結合率は増加したが、PentaCB 処置により、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ と血清タンパクとの結合率は変化しなかった。

D. 考察

昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種、ヒト肝ミクロソーム及びヒト小腸ミクロソームを用い

た実験結果から、ヒト肝臓における T_4 のグルクロン酸抱合は、主に UGT1A1 及び UGT1A3 により触媒されること、またヒトの T_4 -グルクロン酸抱合には、肝臓に加え小腸の UGP-GT も関与していることが示唆された。

TTR 遺伝子欠損マウスに KC500 あるいは PentaCB を投与し、血清中甲状腺ホルモン濃度を測定した *in vivo* の実験結果から、血中 T_4 濃度の低下に、KC500 投与では TTR を介する作用機序以外の存在が示唆され、PentaCB 投与では TTR を介する作用機序を含むことが示唆された。また、TTR 遺伝子欠損マウスに両 PCB を投与したときの肝臓の *Ugt1a1* の発現量の結果を考え合わせると、PCB による血中 T_4 濃度の低下と T_4 -UDP-GT 活性の増加に定量的関連性は見られないことが示された。

TTR 遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* と *ex vivo* の実験結果を考え合わせると、野生型マウスにおいて、KC500 及び PentaCB 投与による血清中 T_4 濃度の低下は、血中 T_4 の肝臓への速やかな移行量の増加が主因であることが示された。また、PentaCB では、この肝臓への移行量の増加に加えて、 T_4 と TTR との結合阻害も血中 T_4 濃度の低下に関与していることが示唆された。また、KC500 投与による血中 T_4 の肝臓への移行量の増加には、肝肥大による血中 T_4 の肝臓への輸送の増加の可能性が示唆される。一方、PentaCB 投与では、血中 T_4 の肝臓への能動輸送の増加が原因である可能性が示唆された。

E. 結論

ヒト肝臓における T_4 のグルクロン酸抱合

は UGT1A1、1A3 及び 1A9 に触媒され、その寄与は、UGT1A1、1A3 が 1A9 より高いこと、また、ヒト肝臓における T_4 -UDP-GT 活性の個人間変動は UGT1A1 の発現量に依存していること、またヒトの T_4 のグルクロン酸抱合には肝臓に加えて、小腸の UDP-GT も関与していること、その分子種は UGT1A1、1A8 及び 1A10 である可能性が示唆された。

これまで、PCB による血中 T_4 濃度低下は、肝臓の T_4 -UDP-GT の誘導、血中 TTR を介した T_4 の輸送の攪乱が主因とされてきたが、本研究結果は、それらは単に 1 つの要因であるにすぎないことを示唆し、その低下の主因は、 T_4 の血中から肝臓への移行によることが示された。また、この低下作用機序はヒトにおいても適用できる可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1) 書籍

1. 加藤善久：甲状腺ホルモン攪乱物質の生体作用の動物種差. 井上 達、井口泰泉編、生体統御システムと内分泌攪乱、シュプリンガー・フェアラーク東京、東京、2005、pp. 123-129

2) 雑誌

Shin-ichi Ikushiro, Yoshikazu Emi, Yoshihisa Kato, Shizuo Yamada and Toshiyuki Sakaki: Monospecific

antipeptide antibodies against human hepatic UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily (UGT1A) isoforms. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21, 70-74 (2006)

Yoshihisa Kato, Shin-ichi Ikushiro, Rie Takiguchi, Sekihiro Tamaki, Koichi Haraguchi, Toshiyuki Sakaki, Shizuo Yamada, Jun Kanno and Masakuni Degawa : A possible mechanism for the decrease in serum thyroxine level by polychlorinated biphenyls in Wistar and Gunn rats. *Organohalogen Compd. (proceedings)*, 68, 1442-1445 (2006)

Chiho Ohta, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Ozaki Mari and Nobuyuki Koga : In vitro metabolism of 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl (CB183) with liver microsomes from rats, guinea pigs and hamsters. *Organohalogen Compd. (proceedings)*, 68, 1733-1736 (2006)

2. 学会発表

玉置尺尋、滝口理恵、生城真一、出川雅邦、山田静雄、加藤善久 : PCB による血中サイロキシン濃度低下作用機構の解明. 第 127 年会日本薬学会 (富山)、講演要旨集、2007 年 3 月 29 日

太田千穂、原口浩一、加藤善久、忝岡樹子、古賀信幸 : 七塩素化ビフェニルのヒト肝における in vitro 代謝. 第 127 年会日本薬学会

(富山)、講演要旨集、2007 年 3 月 28 日

太田千穂、尾崎真理、原口浩一、加藤善久、古賀信幸 : 2,2',3,4,4',5',6-七塩素化ビフェニル (PCB183) の in vivo 代謝の動物種差. 第 126 年会日本薬学会 (仙台)、講演要旨集 3、p179、2006 年 3 月 29 日

加藤善久、玉置尺尋、久保田万紀子、生城真一、原口浩一、山田静雄 : 4-OH-2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl の血中甲状腺ホルモン濃度におよぼす影響. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 (名古屋)、*J. Toxicol. Sci.*, 31 (Supple.), S221, 2006, July, 5

尾崎真理、太田千穂、忝岡樹子、古賀信幸、原口浩一、加藤善久 : 2,2',4,5,5'-五塩素化ビフェニル (PCB101) の in vitro 代謝. 日本食品衛生学会第 92 回学術講演会 (愛知)、講演要旨集、p. 52、2006 年 10 月 27 日

太田千穂、尾崎真理、忝岡樹子、古賀信幸、原口浩一、加藤善久 : 高残留性七塩素化ビフェニル 4-水酸化体の生成メカニズム. 日本食品衛生学会第 92 回学術講演会 (愛知)、講演要旨集、p. 53、2006 年 10 月 27 日

太田千穂、原口浩一、加藤善久、古賀信幸 : 2,2',3,4,4',5',6-七塩素化ビフェニル (PCB183) のラットにおける in vivo 代謝. フォーラム 2006 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (東京)、講演要旨集、p. 143、2006 年 10

月 30 日

Shin-ichi Ikushiro, Yoshikazu Emi,	H. 知的所有権の取得状況
Yoshihisa Kato, Shizuo Yamada and	1. 特許取得
Toshiyuki Sakaki: Development of	なし
isoform-specific antipeptide antibodies	2. 実用新案登録
against human UDP-glucuronosyltrans-	なし
ferase 1A subfamily (UGT1A). 21st JSSX	3. その他 (データベース等)
Annual Meeting (Tokyo), Abstract p.353,	なし
2006, November, 30.	

10. 受容体シグナルを介する毒性評価に関するリスクコミュニケーション

分担研究者 井上 達 国立衛生研・安全性生物試験研究センター長

研究要旨

本研究は、内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の生体作用及びその作用機構に関する新たな科学的知見を一般社会にリスク情報として還元してゆくための要件を整理し、化学物質危害情報に関する適切な一般社会への対応、すなわちダイオキシン対応研究と行政に対する、適切な危機管理と信頼を醸成する方途を提供するものである。従前年度に引き続き、リスクの質に関する考察と、先進科学の普及のこの課題に果たす役割の両面に焦点をあてて考察を加えた。

A. 研究目的

本研究は、内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の生体作用及びその作用機構に関する新たな科学的知見を一般社会にリスク情報として還元してゆくための要件を整理し、ダイオキシン対応研究と行政に向けて、適切な危機管理と信頼を醸成する方途を提供するものである。

B. 研究方法

国際機関や各国政府機関で採用している化学物質の安全性評価に関する情報を収集し、また化学物質の生体影響に関する基礎研究成果をトランスレーショナルに社会に対して公表するなど、情報の質に応じた開示を進めるべく戦略的に考察する。

C, D. 結果と考察

1. AhR の生理機能とダイオキシン研究のリスクコミュニケーション

昨年度に引き続いて、生体と異物の相互作用について、AhR の生物機能に関して最近得

られた知見がダイオキシン研究のリスクコミュニケーションに果たす役割を考察する。

芳香族炭化水素受容体 (AhR) 環境化学物質をめぐる生体異物応答研究で、ダイオキシンとダイオキシン受容体の相互作用機構の占める位置は、ダイオキシン対応研究という応用研究の中で基礎研究の果たす役割の意義を明らかにした点で特筆される。ダイオキシン受容体は、シトクローム p450 の 1A1 の発現を促すモデルとしてリガンドを探索する中で藤井ら（東北大・理、当時）によってクローニングされた転写因子であり、芳香族炭化水素受容体 (AhR) として見いだされた¹。惹起される CYP1A1 はダイオキシンを水解できないし、AhR が 20 世紀の非意図的生成物としてのダイオキシンを想定して数 10 万年かけて分子進化を遂げてきたとは考えにくいので、この結合関係は偶発性のものと考えられる。しかし藤井教授も強調するように、AhR の変異や

¹ Ema M, Sogawa K, Watanabe N, et al. cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 184:246-253.

欠失により、ダイオキシンによって誘発される毒性の発現の修飾はかなりよく説明されるので、AhR の生物機能とその発現機構の研究は、生体の異物相互作用研究にとって重要な鍵になるものと考えられる。

2. 組織未分化細胞での AhR の発現

当研究者らは、B 細胞系の未熟前駆細胞が未熟度に応じて高い AhR の発現を示すことを見いだした²。おそらく各種の組織未分化細胞での AhR の発現は組織毎に異なり、また生理学的な生体の状態によっても大きく異なるのではなかろうか。そして未知の生理的リガンドや、こうしたダイオキシンのような異物リガンドとの相互作用の程度も様々に異なっているものと推測される。かねてより注目されてきたモルモットのハムスターの間の 1 万倍に近い半数致死量 (LD50) の種差 (0.6µg/kg 対 5051.0µg/kg) や、Long-Evans ラットと Han/Wistar ラットとの間の同 LD50 の千倍あまりの系統差 (10.0µg/kg 対 9600.0µg/kg) など、発生学的な AhR の発現レベルに応じたメカニズムの違いに基づいているものと考えられる。

3. ダイオキシンの肝発がん AhR

ダイオキシンの肝発がんは、受容体原性の微量リガンドによる CYP1A1 の活性化にリンクしたエピジェネティック発がんに基づく。リスクが低値となるのはこの受容体原性に起因しており、“低値ゆえに猛毒”と受け止める見方はやゝ本質からはずれる。しかしながら、そうなるとこれは直接型遺伝子傷害性化学物

² Hirabayashi Y, Miyajima A, Yokota T, et al. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on B cell differentiation in mouse pre-B colonization model regulated by artificially introduced human IL-3 receptors. *Organohalogen Compounds*. 2002; 55:359-362.

質と同様に振る舞うことを意味し、それがあたかも毒性のない環境化学物質として環境中に蔓延するものとするれば、その恐ろしさは計り知れない。ダイオキシンはこれを人類に知らしめた点でまたとない負の教訓になった。AhR によって誘発されるダイオキシンの毒性に対しては、守りの枠組みが次第に整い始めている。しかしリスクの遞減にはまだほど遠いものがある。今後の取り組みの求められる所以である。

AhR のこうした代謝機能に基づく発がん性 2 次産物による発がん、いわゆる代謝性発がん、の実験的裏付けとしては石川ら (東京大・医、当時) による AhR のノックアウトを用いたベンツピレン (benzo[a]pyrene; B[a]P) による発がん実験がある。B[a]P は AhR 結合性で CYP1A1 および 1A2 の発現を促し、その代謝性エポキシサイドの DNA アダクツ形成が発がんの遠因となるものと考えられているが、AhR ノックアウトマウスでは、この発がんが殆ど発生しなかったと報告されている³。他方、当筆者らは、ベンゼン誘発による胸腺リンパ腫が、チオレドキシシン遺伝子の過剰発現マウスではまったく発生しないことを観察し、これが、ベンゼン曝露条件下でのこのマウスでの AhR の発現の低下に関連していることを見いだしている⁴。これらの発がん機構が直接性の遺伝子傷害性発がんを意味するかは正確

³ Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, et al. Benzo [a] pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Nat'l Acad Sci U.S.A.* 2000; 97:779-782.

⁴ Li GX, Hirabayashi Y, Yoon BI, et al. Thioredoxin overexpression mice, model of attenuation of oxidative stress, prevent benzene-induced hematotoxicity and thymic lymphoma. *Exp Hematol*. 2006; in press.

には明らかでないが、CYP の誘導を通じた発がん母地を提供しているということであろう。

4. 抑制遺伝子としての AhR とその生物作用

かくして AhR のノックアウト状態や低発現状態の動物を参照することによって様々の AhR の生物学的機能が分かってきたのであるが、こうした実験を進めてゆく内に筆者らは AhR の意外な機能に気がついた⁵。無処置の各種 AhR 遺伝型、つまりホモおよびヘテロの AhR 欠失マウス (AhR^{-/-}, AhR^{+/-}) および野生型 (AhR^{+/+}) の死亡曲線を比較すると、AhR の欠失群の寿命が明らかに短かった。AhR の欠失が何らかの欠失病を惹起して AhR 欠失動物を短命化している可能性を想起させるわけであるが、結果としては野生型における死因スペクトラムの早期発現、もしくはその頻度上昇以外の特徴は見いだされなかった。ゴンザレスら⁶の作成した AhR 欠失マウスでは原因不明の肝内胆管炎が観察されているが、当系統ではそうした胆管炎も、その結果として発症の想定されるリトコル酸のような胆汁酸による内因性発がん、胆管癌⁷も肝胆管癌⁸も認められない。そして何よりも、①このものでの主要な死因である非胸腺リンパ腫や肝癌の発症とこれによる死亡が、生後約2年を経て発症に至る遅発性の腫瘍であること、②そして

⁵ Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, et al. Tumor suppressor function of aryl hydrocarbon (AhR) receptor: Early onset of spontaneous lymphomas and hepatomas, and consequent a shortened lifespan observed in Ah receptor deficient mice. Organohalogen compounds. 2006: in press.

⁶ Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. Science. 1995; 268:722-726.

⁷ Cholangiocarcinoma.

⁸ Hepatocholangiocarcinoma.

そのゴンペルツ表現による発症函数をグラフ化すると、エピジェネティックな促進加齢型を示すことが注目された。誘発がんへの影響はまだ確かめられていないが、AhR はがん抑制遺伝子である可能性が高い。

実は AhR にそうした機能が認められることには矛盾がない。いずれも AhR-KO マウスを参照しつつ明らかになったことであるが、前項でも述べたとおり、AhR は幹細胞、特に造血幹細胞の抑制などに発現していて、未分化な造血幹細胞の細胞周期を緩徐化し、より大きな休止期細胞分画 (quiescent / dormant fraction) を維持しているという事実がある⁹。その結果、AhR が機能していると幹細胞分画の健康な状態が保持され、遺伝学的な安定性の維持に寄与するものと推測される。

今回見いだされた、同じ AhR が一方で発がんを促進し、他方で抑制する事象は、環境科学における生体異物応答の研究の複眼的視点の必要性を教えており、そのことはとりもなおさず、リスクコミュニケーションが新しい科学と密接な連関をもって進められるべきことを示唆しているように思われる。

E. 結論

受容体シグナルを介する毒性評価に関するリスクコミュニケーションについて、AhR をめぐる最近の知見に即して、ダイオキシン研究関連の事象について考察した。

F. 健康危惧情報

なし

⁹ Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, et al. AhR suppresses hemopoiesis during steady state but accelerates cell cycle as an early response: a study of AhR-knockout mice. Organohalogen Compounds. 2003; 64: 270-273.

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著

Yoshida, K., Hirabayashi, Y., Watanabe, F., Sado, T., and Inoue, T. (2006). Caloric restriction prevents radiation-induced myeloid leukemia in C3H/HeMs mice and inversely increases incidence of tumor-free death: implications in changes in number of hemopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 34, 274-83.

Nishikawa, A., Sai, K., Okazaki, K., Son, H. Y., Kanki, K., Nakajima, M., Kinae, N., Nohmi, T., Trosko, J. E., Inoue, T., and Hirose, M. (2006). MX, a by-product of water chlorination, lacks in vivo genotoxicity in gpt delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells. *Environ Mol Mutagen* 47, 48-55.

2) 総説

Corvi, R., Ahr, H. J., Albertini, S., Blakey, D. H., Clerici, L., Coecke, S., Douglas, G. R., Gribaldo, L., Groten, J. P., Haase, B., Hamernik, K., Hartung, T., Inoue, T., Indans, I., Maurici, D., Orphanides, G., Rembges, D., Sansone, S. A., Snape, J. R., Toda, E., Tong, W., van Delft, J. H., Weis, B., and Schechtman, L. M. (2006). Meeting report: Validation of toxicogenomics-based test systems: ECVAM-ICCVAM/NICEATM considerations for regulatory use. *Environ Health Perspect* 114, 420-9.

2. 学会発表

Inoue T: Effect of endocrine disruptors on health: possible underlying mechanistic background of low-dose and synergistic actions. Weybridge+10 Workshop "Impacts of Endocrine Disruptors" (2006. 11.10) [Helsinki, Finland, Meeting abstract, 7: 2006]

Inoue T, Yoon BI, Igarashi K, Kanno J, Yodoi J, Hirabayashi Y Global Gene-Expression Profilings of Steady-State Mice Carrying A Graded Dosage of Trx-Gene Elucidate Major Principal Gene-Component for the ROS-removal and for Trx-Dependent Anti-Oxidative Stress. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2006.6.23) [Kyoto, Meeting abstract pp 797]

Inoue T: Summary and Future Directions "Regulation of hematopoiesis". Pathophysiology & Molecular Biology of Hematopoiesis, Malignancy & Radiation Response "International Symposium in Memory of Eugene P. Cronkite, M.D." (2006.5.12) [Brookhaven National Laboratory, NY, No abstract]

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

11. 受容体シグナルを介する毒性物質の有害性評価法および一般化スクリーニング試験スキームの国際動向に関する研究

分担研究者 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究協力者 高橋美加 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究要旨

海外における最新の内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）のヒトへの健康影響評価、特に胎児・新生児暴露によるリスク予測に関する研究の国際的な進展状況に関する情報を収集し、本基盤研究の実験部分や事実上情報が不足している低用量効果の毒性評価のための背景的な支援を行うことを目的としている。18年度は、2006年8月にオスロで行われた第26回ハロゲン化有機環境汚染物質とPOPSに関する国際シンポジウム「DIOXIN' 2006」に参加し、最新の2005年にWHO/IPCSで行われたダイオキシン類の毒性評価上重要なTEFの再評価や、非ダイオキシン様PCBの健康影響評価に関する最新の国際動向について情報収集した。

A. 研究目的

海外における最新の内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）のヒトへの健康影響評価、特に胎児・新生児暴露によるリスク予測に関する研究の国際的な進展状況に関する情報を収集し、本基盤研究の実験部分や事実上情報が不足している低用量効果の毒性評価のための背景的な支援を行うことを目的としている。本研究は、国際学会やシンポジウム等に参加し最新の内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する国際動向について情報収集すると共に、内分泌かく乱化学物質を評価するために重要であると考えられる受容体シグナルを介するスクリーニング試験法の確立に関する国際動向を調査・整理する。

B. 研究方法

平成18年度は、2006年8月にオスロで

行われた第26回ハロゲン化有機環境汚染物質とPOPSに関する国際シンポジウム「DIOXIN' 2006」に参加し、最新の内分泌かく乱物質の健康影響に関する国際動向について情報収集した

C. 研究結果

本国際シンポジウムでは、WHO/IPCSプロジェクトである”ダイオキシン及びダイオキシン様PCBのヒト及び哺乳動物におけるTEFの再評価”において、2005年6月28～30日WHOのジュネーブ本部で、で開催され、その後検討された結果や、飼料と食物中の非ダイオキシン様PCB（NDL-PCB）に関する欧州食品安全局の見解についての発表があった。以下に、TEFの評価やPCBリスク評価に関する発表について概要をまとめた。