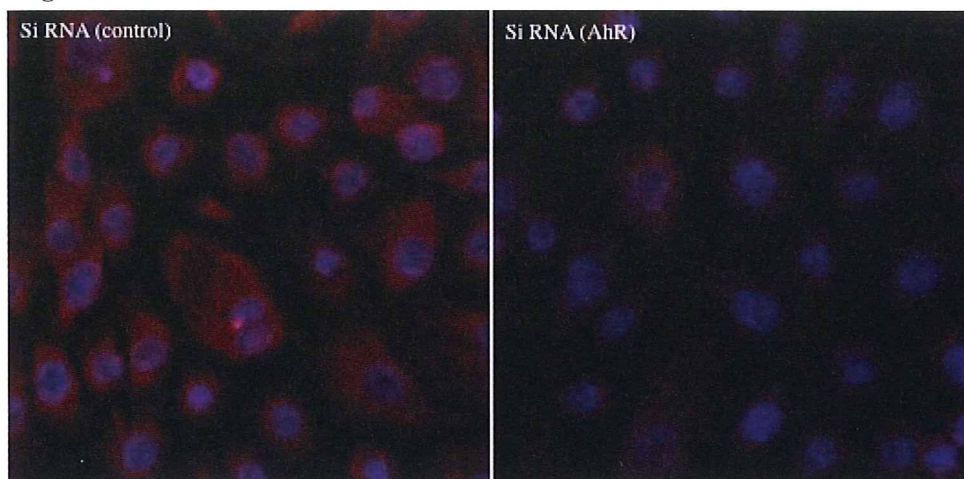


neutrophils in psoriasis. J
Dermatol Sci. 2001 26:119-24

12. Nakatsuji T et al.

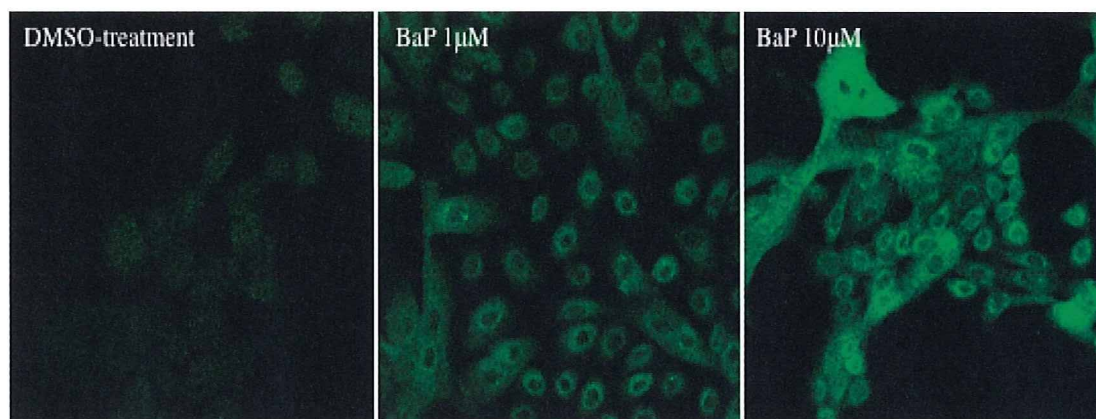
Antibodies elicited by inactivated
propionibacterium acnes-based
vaccines exert protective immunity
and attenuate the IL-8 production
in human sebocytes: relevance to
therapy for acne vulgaris. J Invest
Dermatol. 2008 128: 2451-7

Figure 1



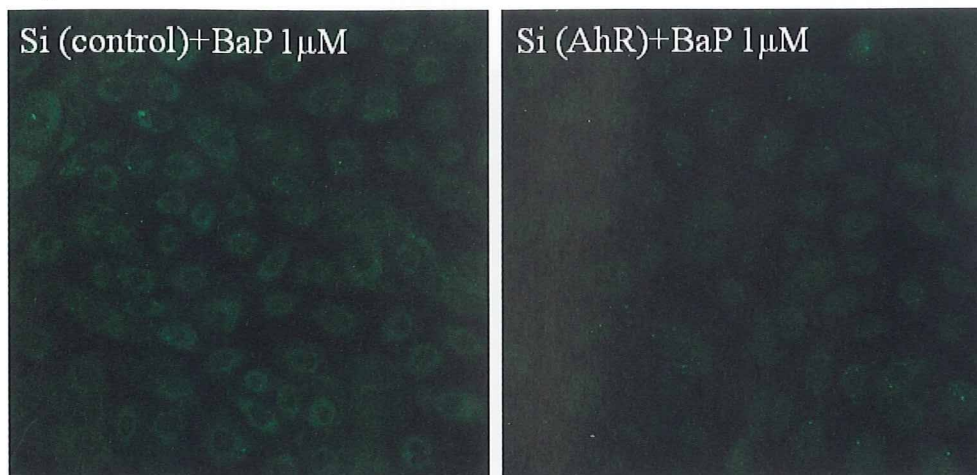
Normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) were transfected with Si RNA against AhR using by HiPerFect reagent. After 48 h transfection, NHEKs were fixed by cold acetone and incubated with anti-AhR antibody for 24 h. The distribution of AhR was observed by con-focal laser scanning microscope. The protein level of AhR was clearly reduced by transfection of Si RNA (AhR) compared with NHEKs transfected Si RNA (control). (Red : AhR, Blue : DAPI) (original magnification $\times 400$)

Figure 2



NHEKs on glass chamber slides were incubated with BaP ($1 \mu\text{M}$ and $10 \mu\text{M}$) or DMSO (control) for 24 h. As described in Material and Method, NHEKs were incubated with DCFH-DA that is a cell-permeable non-fluorescent probe and rapidly oxidized to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of ROS. Green fluorescence intensity that reflected intracellular ROS (especially hydrogen peroxide) was detected by using con-focal laser scanning microscope. BaP induced ROS generation in dose-dependent manner. (original magnification $\times 400$)

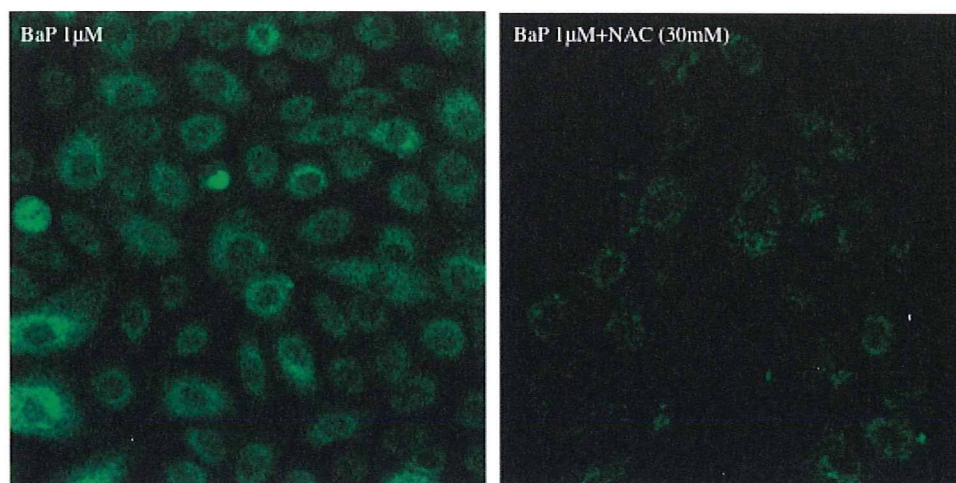
Figure 3



Si RNA (AhR)-NHEKs were incubated with BaP ($1\mu\text{M}$) for 24 h and then intracellular ROS levels were examined. ROS generation induced by BaP administration in Si RNA (AhR)-NHEKs were inhibited compared with that in Si RNA (control)-NHEKs. The data are representative experiments repeated three times with similar results. (original magnification $\times 400$)

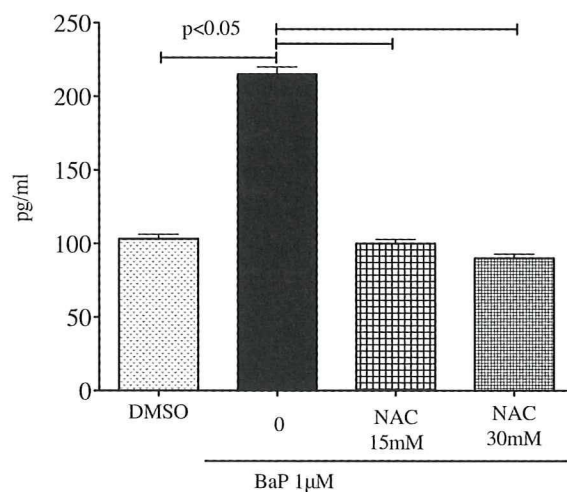
Figure 4

a



NHEKs were administrated with BaP ($1\ \mu\text{M}$) and NAC (30mM) at the same time and incubated for 24 h. NAC was used to reduce the intracellular ROS levels by an independent mechanism from AhR signaling pathway. After administration, NHEKs were treated with 2',7'-DCF and examined green fluorescence intensity that reflected intracellular ROS. NAC (30mM) administration clearly inhibited ROS generation induced by BaP ($1\ \mu\text{M}$). The data is representative data repeated three times with similar results.

b



NHEKs were treated with NAC (15mM or 30mM) and BaP ($1\ \mu\text{M}$) for 24 h and IL-8 production in culture supernatant were measured. IL-8 production was significantly decreased compared to NHEKs incubated with BaP only. NAC inhibited IL-8 production induced by BaP. The data represent the mean \pm S.D of three separate experiments. IL-8 production in each group was analyzed by unpaired student's t-test compared with BaP ($1\ \mu\text{M}$)-treatment group.

分担研究報告書

ヒト細胞におけるケトコナゾール (ketoconazole : KCZ) の新しい効果 :
KCZ は aryl hydrocarbon receptor signaling を介して Nuclear Factor-Erythroid 2-related factor 2 の発現を誘導し、酸化・電子ストレスに対する解毒酵素群を発現する。

研究分担者 内 博史 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 准教授
研究協力者 辻 学 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野
高原 正和 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 講師
師井 洋一 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 准教授
古江 増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 教授
三苫 千景 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教

研究要旨 ケトコナゾール (ketoconazole : KCZ) は抗真菌薬である一方で、殺真菌性以外にも、抗炎症作用を有するとする報告も数多い。しかし、その機序に関しては、明らかではない。今回我々は、ヒト表皮細胞において、KCZ によって活性化される代謝経路と抗炎症作用を発揮するタンパクについての検討を行い、KCZ による抗炎症作用のメカニズムを解明することを試みた。

KCZ によって活性化される代謝経路については、ヒト肝細胞においてダイオキシン類の代謝経路である aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling を活性化する報告があった。そこで表皮細胞に KCZ を投与し、AhR 及び CYP1A1 の発現を評価した。KCZ によって AhR 及び CYP1A1 は mRNA・タンパクレベルで誘導されたことより、表皮細胞においても KCZ によって AhR signaling が活性化されることが示された。

次に、AhR signaling はダイオキシン類によって生じる細胞内の酸化・電化ストレスを軽減するために働く代謝経路であることから、酸化・電化ストレスを軽減するのに重要なタンパクである Nuclear Factor-Erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の発現を評価した。KCZ は、Nrf2 の発現を誘導し、さらに Nrf2 は核内に移動して解毒酵素の一つである NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1) を産生した。

KCZ による AhR signaling 活性化と Nrf2 の誘導のメカニズムを明らかにするため、表皮細胞に AhR の mRNA を干渉する遺伝子 (small interfering RNA : Si RNA) を遺伝子導入し、AhR の発現が著しく低下した状態を作り出した。AhR の Si RNA を遺伝子導入した表皮細胞は、KCZ を投与しても Nrf2 の発現を誘導せず、Nrf2 の核内への移動も阻害された。これらの結果により、KCZ は AhR signaling を介して、Nrf2 を誘導し、酸化・電子ストレスに対する解毒酵素群を発現することが分かった。さらに、KCZ はダイオキシン類の 1 つである benzo(a)pyrene 誘導性の酸化・電子ストレスによる IL-8 (炎症反応に関わるケモカイン) および 8-OhdG (DNA 障害のマーカー) 産生を抑制した。

KCZ のこれらの作用は、これまで報告されていない新しいメカニズムによる抗炎症作用であり、ダイオキシン類あるいはその他の原因による酸化・電子ストレスの影響を軽減する有用な薬剤である可能性が示唆された。

A. 背景と目的

ケトコナゾール (ketoconazole : KCZ) は優れた殺真菌作用を有する抗真菌薬である。白癬・皮膚カンジダ症・癬風といった皮膚真菌症と、脂漏性皮膚炎という真菌が関与する炎症性皮膚疾患に保険適応があり、皮膚科診療ではしばしばその外用薬が使用される。しかし、KCZ は殺真菌作用を期待して使用される一方で、炎症性皮膚疾患の治療に一定の効果があつたという報告もある。1) 2) この現象は、従来、常在する真菌であるマラセチアが何らかのかたちで炎症反応に関与しており、KCZ によってマラセチアが除去されることにより、炎症反応が抑制されるという機序が考えられていた。しかし近年、KCZ は真菌に働く以外に炎症反応自体に関与している可能性があることが明らかになった。3) 今日までに、KCZ はヒト培養リンパ球において活性酸素 (Reactive oxygen species: ROS) 産生を抑制するという報告 4) や、ヒト表皮細胞においてプロスタグランジン E2 放出を促進することで抗炎症作用を発揮する機序 5) が既に報告されている。しかし、その詳細な機序に関しては、未だに明らかではない部分が多かった。そこで今回我々は、ヒト表皮細胞における KCZ の代謝経路と抗炎症作用を発揮するタンパクについて検討を行い、KCZ による抗炎症作用のメカニズムを詳細に解明することを試みた。

KCZ は、ヒト肝細胞において、KCZ はダイオキシン類の代謝経路である aryl hydrocarbon receptor (AhR) に結合し、その下流である AhR signaling を活性化することが報告 6) されている。また、AhR signaling は、本来、ダイオキシン類の代謝経路であるが、近年、ダイオキシン類以外の化合物 (植物性フラボノイド 7)、一部の薬剤 8) も AhR に結合し、この代謝経路を活性化することも報告されている。

AhR signaling について詳説する。AhR

signaling は、まず ligand が細胞膜を透過することから始まる。細胞内に入った ligand は、細胞質に存在する AhR と結合する。ligand と結合した AhR は、AhR nuclear translocator (ARNT) と多量体を形成し、核内へ移動する。核内で多量体は、Xenobiotic response elements (XRE) 領域に結合し、CYP1A1 酵素という薬物代謝酵素の mRNA を誘導する。細胞質で作られた CYP1A1 酵素は、細胞内の ligand を代謝する。9) (図 1)

AhR signaling は ligand を代謝するだけではなく、ligand がダイオキシン類の場合には、多量の活性酸素 (Reactive oxygen species : ROS) を生じ、細胞に酸化・電子ストレスを与え、発癌や炎症を来す原因となる。酸化・電子ストレスは、ダイオキシン類の代謝だけが原因ではなく、近年では、紫外線もヒト表皮細胞内に活性酸素を産生し、酸化・電子ストレスを生じることが報告され、紫外線による発癌或いは光老化の主な原因の一つと考えられている。10)

ダイオキシン類が酸化・電子ストレスを生じる一方で、ligand が植物性ポリフェノールの場合には、ほとんど ROS を生じることはない。むしろ、酸化・電子ストレスを軽減させることが知られている。7) この相反する効果を説明する正確なメカニズムは分かっていない。現在のところ、CYP1A1 酵素による代謝で生じた酸化・電子ストレスを軽減する解毒酵素群が関与している可能性が指摘されている。11) 解毒酵素群には、NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (Nqo1)、UDP-glucuronosyltransferase 1 (Ugt1)、glutathione S-transferase a1 (Gsta1) があり、これらの発現を調節するタンパクとしては、Nuclear Factor-Erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) が重要な働きをすることが知られている。12) Nrf2 は、定常状態では Keap 1 (Kelch-like

ECH-associated protein1) というアンカータンパクと結合して細胞質に固定されている。細胞内に ROS が生じた場合、Keap1 との結合が解除され、Nrf2 は核内へ移動する。この Keap1 との結合は、ROS のみならず、Ligand の分解産物による修飾や、酸化・電子ストレスそのものによっても解除されることが報告されている。12)核内へ移動した Nrf2 は、Antioxidant response element (ARE) に結合し、解毒酵素群である NQO1、Ugt1、Gsta1 を誘導し、酸化・電子ストレスを軽減する。(図 2) Nrf2 は一部の植物性ポリフェノールで誘導されることが報告されているが、KCZ が Nrf2 を誘導するかについてはこれまで検討されていない。

また、AhR と Nrf2 は協調的に働くことは知られているが、両者の調節機構については不明な点が多い。そこで、我々はヒト表皮細胞に AhR の mRNA を干渉する遺伝子 (small interfering RNA : Si RNA) を遺伝子導入することで、AhR が著しく低下した状態を作り出し、AhR の低下が KCZ による Nrf2 の誘導にどのような影響を及ぼすのか検討し、調節機構について検討を行った。

最後に、AhR signaling によって誘導された Nrf2 が酸化・電子ストレスを軽減するかを検討するため、ダイオキシン類の 1 つである benzo(a)prene を表皮細胞に投与し、炎症反応において重要な働きをするケモカインである IL-8 及び DNA 障害の指標となる 8-OhdG の産生を誘導し、KCZ によって抑制されるかを検討した。

B. 研究方法

○ 細胞及び細胞培養

細胞は、新生児包皮から初代培養されたヒト表皮細胞 (normal human epidermal keratinocyte、LONZA 社) を用いた。細胞培養は、48 時間おきに keratinocyte growth medium (抗真菌剤、抗生物質含ま

ない) を交換しておこなった。

○ 使用した薬剤

KCZ は Sigma Aldrich 社より購入した。DMSO に溶解した状態で -20 度下に保存した。ヒト表皮細胞に投与する際は、KCZ の最終濃度が 100nM~10 μ M になるように調整した。培養液中の DMSO 濃度は、0.5%未満になるようにした。

○ 蛍光抗体法

AhR の細胞内局在は、KCZ100nM をヒト表皮細胞に投与し、3, 6 時間後に抗 AhR 抗体を用いて、蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

Nrf2 の細胞内局在は、KCZ1 μ M をヒト表皮細胞に投与し、12, 24 時間後に抗 Nrf2 抗体を用いて、上と同様の操作で観察した。

○ リアルタイム PCR

AhR signaling) AhR、CYP1A1 の mRNA についてリアルタイム PCR を行った。24 穴シャーレに培養した 1.0 \times 10⁵ 個のヒト表皮細胞に KCZ (100 nM-1 μ M) 投与し、1, 3, 6 時間後に細胞を回収した。各投与群の遺伝子発現量 (Ct 値) とコントロール群 (DMSO1, 3, 6 時間投与群) の Ct 値とを GAPDH で補正を行い、比較を行った。

Nrf2, NQO1) 24 穴シャーレに培養した 1.0 \times 10⁵ 個のヒト表皮細胞に KCZ (1 μ M) を投与し、6, 12, 24 時間後に細胞を回収した。Nrf2, NQO1 の遺伝子発現量 (Ct 値) とコントロール群 (DMSO6, 12, 24 時間投与群) の Ct 値とを GAPDH で補正を行い、比較を行った。

○ ウェスタンブロット

KCZ (10nM-1 μ M) をヒト表皮細胞に投与し、24 時間後に蛋白の抽出を行った。BCA 法で、各群の蛋白濃度を測定し、20 μ g の蛋白質が泳動されるようにサンプルを調整した。電気泳動した蛋白は、PVDF 膜に転写し、目的に応じて 1 次抗体に抗 AhR 抗体、抗 CYP1A1 抗体、抗 Nrf2 抗体、抗 NQO1 抗体のいずれかを用い、化学発光標識された 2 次抗体をさらに反応させて、X 線フィルム

上に検出した。

○Si RNA (small interfering RNA) による RNA 干渉

24 穴シャーレに 6.0×10^4 個のヒト表皮細胞を培養した。AhR の Si RNA (Santa cruz 社) 及び Control Si RNA (Santa cruz 社。ランダムに mRNA の発現を抑制する Si RNA) と トランスフェクション試薬 (Quiagen 社 Hiperfect®) を培養液に加えて投与し、48 時間培養して実験に用いた。Si RNA の導入効率は、リアルタイム PCR 及び蛍光抗体法で確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は、培養細胞を用いた実験系で構成されており、倫理面の特別な配慮は必要ないと考えた。

C. 結果

ヒト表皮細胞に KCZ を投与し、AhR の細胞内局在について検討した。ヒト表皮細胞に KCZ100nM を投与し、6 時間後に細胞を固定し、1 次抗体に抗 AhR 抗体を用いて蛍光抗体法を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。別系統の抗真菌薬である塩酸テルビナフィン 100nM も投与して観察を行った。投与前 (non-treatment) の状態では、細胞質が染色され、AhR が定常状態では細胞質にあることが確認された。KCZ 投与 6 時間後では、核が染色され、これは細胞質の AhR が核へ移動したものと考えられた。一方、塩酸テルビナフィンでは、核が染色されることはなかった。(図 3)

次に、KCZ による AhR と CYP1A1 の発現について、リアルタイム PCR とウェスタンブロットで検討した。KCZ は AhR と CYP1A1 を遺伝子レベルでもタンパクレベルでも発現の増加が認められた。(図 4 A, B)

さらに、KCZ が Nrf2 の発現を誘導するかを検討した。KCZ を投与して 24 時間後に細胞を固定し、1 次抗体に抗 Nrf2 抗体を用いて蛍光抗体法を行い、共焦点レーザ

ー顕微鏡で観察した。定常状態では、Nrf2 は細胞質に認められた。KCZ 投与 24 時間後では、細胞質ではなく核が濃染された。(図 5)

次に KCZ によって、Nrf2 が核内で生成する解毒酵素の一つである Nqo1 の発現が誘導されるか、リアルタイム PCR とウェスタンブロットで検討した。Nqo1 は遺伝子レベルでもタンパクレベルでも発現の誘導が認められた。(図 6 A, B)

Nrf2 の発現が、AhR によって制御されているかを調べるため、AhR の発現を short interference RNA (SiRNA) を遺伝子導入することによって特異的に抑制した。AhR が抑制されているかは、抗 AhR 抗体を用いた蛍光抗体法で、AhR の染色性を評価した。Control の SiRNA (ランダムに遺伝子の発現を抑制する SiRNA) を遺伝子導入した場合と較べて、AhR の染色性が低下しており、AhR の SiRNA を遺伝子導入することにより、AhR のタンパク量が低下した状態となることを確認した。(図 7 A) AhR の SiRNA を遺伝子導入した状態で、KCZ の投与を行い、24 時間後に観察した。Control の SiRNA を遺伝子導入した場合に較べて、AhR の SiRNA を用いた方では細胞質の Nrf2 の染色性は著しく低下した。また、AhR の SiRNA を用いた方では、KCZ を投与したにもかかわらず、核は染色されなかった。(図 7 B)

さらに、KCZ がダイオキシンの毒性を軽減するかを検討した。すでに我々はタバコの中に含まれるベンゾピレン (Benzopyrene : BaP) というダイオキシン類が、ヒト表皮細胞において、AhR signaling を介して IL-8 という炎症性サイトカインを産生しうることを報告している。そこで、KCZ を BaP と同時に投与し、IL-8 の産生が抑制されるか検討した。図 8 に示すように、BaP による IL-8 の産生は KCZ によって有意に抑制された。

また、BaP は ROS 産生によって細胞内の DNA に障害を与えることにより発癌性を

発揮することが報告されているが、KCZがDNA障害を軽減するかを検討した。8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)は、先に述べたようにBaPといったダイオキシン類あるいは、紫外線によって生じるROSによってDNAが障害された場合に生じる参加ストレスマーカーの一つである。図9に示すように、KCZは8-OHdGを生じなかった。また、KCZをBaPと同時に投与した場合、BaPによる8-OHdGの産生は有意に抑制された。これらにより、KCZはダイオキシン類の酸化ストレスによる毒性を軽減する働きがある可能性が示唆された。

D. 考察

まず、KCZがヒト表皮細胞において、AhR signalingを活性化するか検討を行った。蛍光抗体法を用いた共焦点レーザー顕微鏡による観察では、AhRは定常状態では細胞質に認められた。次に、KCZを投与したところ、AhRは6時間で核内に移動した。これはKCZと結合したAhR多量体が核内のXRE領域に結合し、CYP1A1のmRNA合成へと進んだものと考えた。また、塩酸テルピナフィンの投与ではAhRは細胞質から移動せず、KCZによって生じるAhRの細胞質から核内への移動は、KCZに特異的な現象であると考えられた。次に、KCZを投与して、AhR signalingの標的タンパクであるAhR、CYP1A1について検討した。AhR、CYP1A1は遺伝子レベルでもタンパクレベルでも容量依存性に増加が認められ、これらの結果は、KCZがAhR signalingによって代謝されることを示した。

次に我々は、KCZがヒト表皮細胞において、Nrf2の発現を誘導するかを検討した。共焦点レーザー顕微鏡による観察では、定常状態ではNrf2は細胞質に認められた。KCZを投与し、24時間後に観察したところ、Nrf2は核に認められた。これは、KCZによって細胞質のNrf2が核内へ移動し、ARE領域に結合したものと考えた。さらに、解

毒酵素群の一つであるNQO1の発現の誘導について検討したところ、Nqo1は遺伝子レベルでもタンパクレベルでも発現の誘導が認められた。これらの結果より、KCZは1. Nrf2の発現を誘導する、2. 細胞質のNrf2を核内へ移動させる、3. 核内へ移動したNrf2は、解毒酵素群の発現を誘導する、ことが示された。

さらに、Nrf2の発現の誘導がAhRによって制御されているか検討した。ControlのSiRNAを遺伝子導入したヒト表皮細胞では、KCZの投与によって、先に示したと同様の実験結果が得られた。しかし、AhRのSiRNAを遺伝子導入したヒト表皮細胞では、KCZを投与したにもかかわらず、Nrf2の発現の誘導は認められなかった。また、Nrf2の細胞質から核への移動も認められなかった。(図7B)これらの結果により、AhRはNrf2の発現の誘導及び細胞質から核内への移動(ARE領域への結合)になくはない存在であることが示された。

以上の結果から、ヒト表皮細胞において、KCZはAhRに結合し、AhR signalingを介してNuclear Factor-Erythroid 2-related factor 2(Nrf2)の発現を誘導するものと考えられる。これにより、KCZは酸化・電子ストレスを軽減しうる解毒酵素群の発現を誘導することが可能となり、抗炎症作用を発揮しているものと考えられる。現在、酸化・電子ストレスは、DNAの障害や、生体に重要なタンパクを修飾して本来の機能を損なわせる作用などにより、様々な炎症性疾患や悪性腫瘍を生じる原因の一つと考えられている。一方で、この酸化・電子ストレスを軽減させるという根拠のある有効な薬剤の報告は非常に少ない。今回報告したKCZのこのメカニズムは、ダイオキシン類を含め、様々な要因によって生じる酸化・電子ストレスが病態形成に寄与すると考えられている炎症性疾患や悪性腫瘍の治療の一助になりうる

考えられる。

E. 研究発表

学会発表

2009年5月17日

第72回九州真菌懇話会(佐賀市)

2009年5月25-29日

The XVII Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009) (Tokyo)

F. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

発明名称:ヒト細胞におけるケトコナゾールの新しい効果

発明者:辻学、高原正和、古江増隆

出願日:2009年12月10日

出願番号:61/285249

G. 参考文献

1. Framing the future of antifungals in atopic dermatitis. Nikkels AF, Piérard GE. *Dermatology*. 2003;206(4):398-400.
2. Atopic dermatitis and fungi. Faergemann J. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Oct;15(4):545-63.
3. A new ketoconazole topical gel formulation in seborrhoeic dermatitis: an updated review of the mechanism. Faergemann J, Borgers M, Degreef H. *Expert Opin Pharmacother*. 2007 Jun;8(9):1365-71.
4. Inhibitory or scavenging action of ketoconazole and ciclopiroxolamine against reactive oxygen species released by primed inflammatory cells. Nakashima T, Sato E, Niwano Y, Kohno M, Muraoka W, Oda T. *Br J Dermatol*. 2007 Apr;156(4):720-7.
5. Suppressive effects of antimycotics

on tumor necrosis factor- α -induced CCL27, CCL2, and CCL5 production in human keratinocytes. Kanda N, Watanabe S. *Biochem Pharmacol*. 2006 Aug 14;72(4):463-73. Epub 2006 Jun 19.

6. Induction of cytochrome P450 1A1 by ketoconazole and itraconazole but not fluconazole in murine and human hepatoma cell lines. Korashy HM, Shayeganpour A, Brocks DR, El-Kadi AO. *Toxicol Sci*. 2007 May;97(1):32-43. Epub 2007 Feb 5.

7. An update on the dietary ligands of the AhR. Ashida H, Nishiumi S, Fukuda I. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008 Nov;4(11):1429-47.

8. The induction of CYP1A1 by oltipraz is mediated through calcium-dependent-calpain. Dale Y, Eltom SE. *Toxicol Lett*. 2006 Oct 10;166(2):150-9. Epub 2006 Aug 7.

9. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. Safe S. *Toxicol Lett*. 2001 Mar 31;120(1-3):1-7.

10. Protecting effect of phytoncide solution, on normal human dermal fibroblasts against reactive oxygen species. Fujimori H, Hisama M, Shibayama H, Iwaki M. *J Oleo Sci*. 2009;58(8):429-36.

11. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*. 2009 Jun 16;9:187.

12. A protective role of nuclear erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. Kim J, Cha YN, Surh YJ. *Mutat Res*. 2009 Sep 30.

13. Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery". *Toxicol Sci*. 2009 Oct;111(2):238-46. Epub 2009 May 27.

図1 AhR signaling について

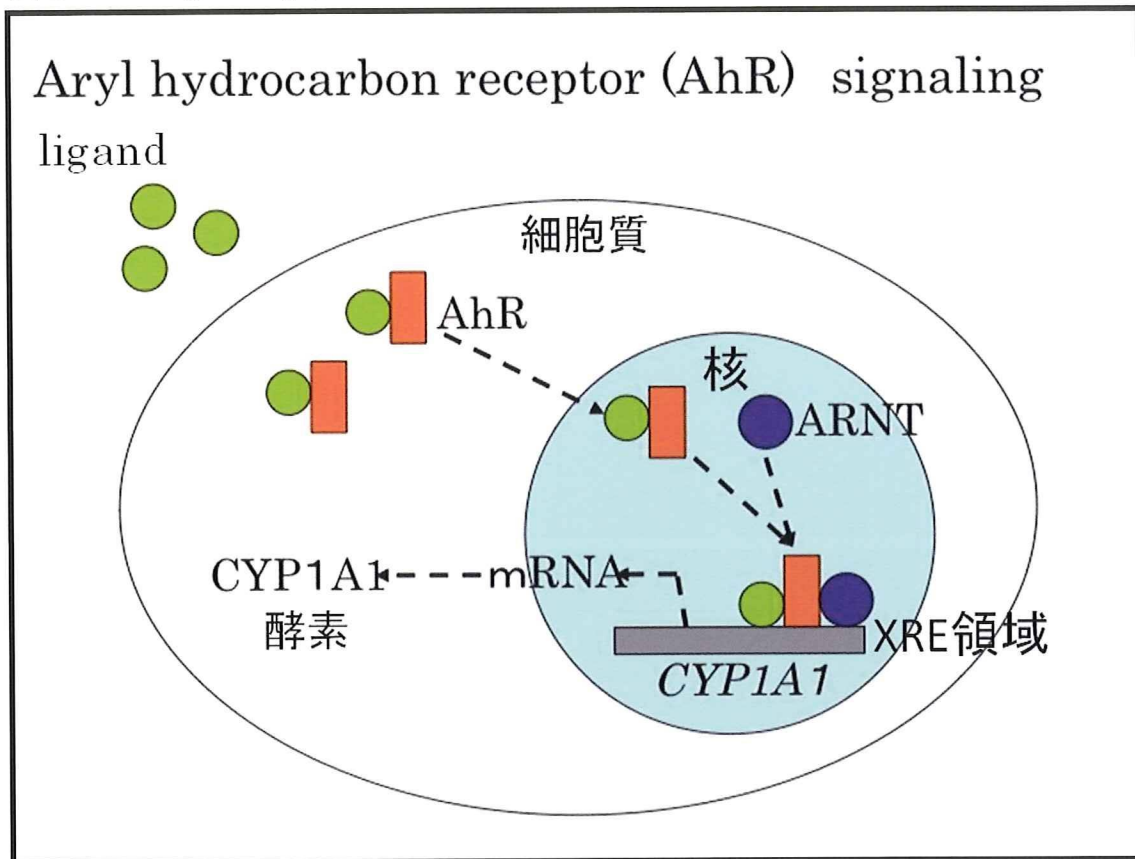


図2 Nrf2 について

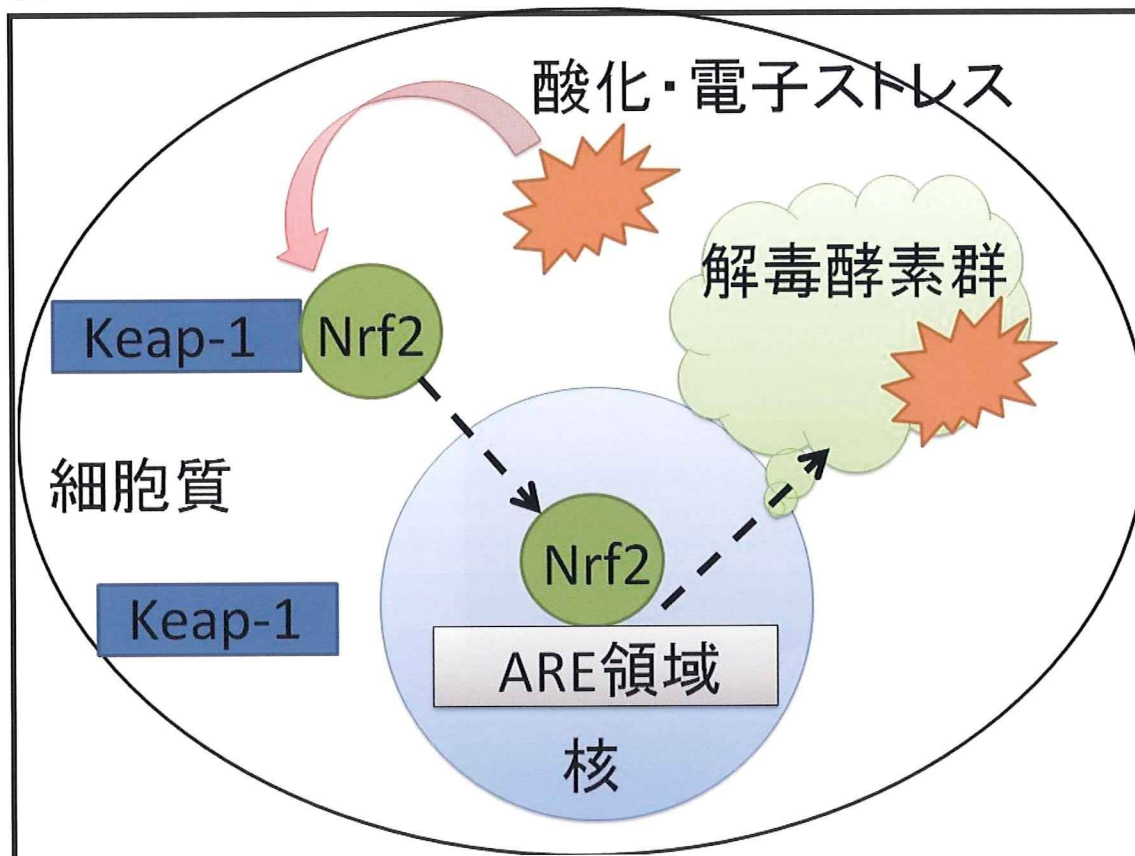


図3 KCZによるAhRの細胞内局在

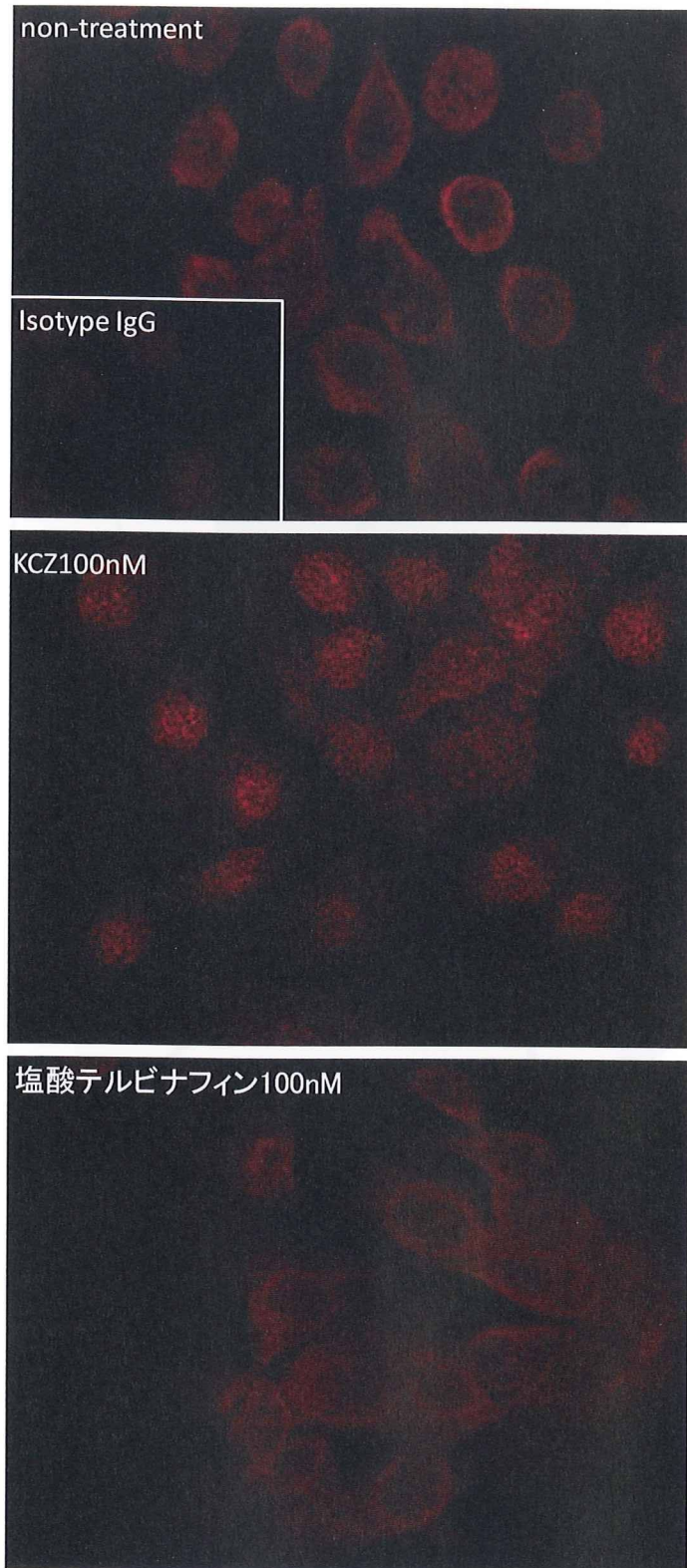


図 4A リアルタイム PCR による AhR、CYP1A1 遺伝子発現の評価

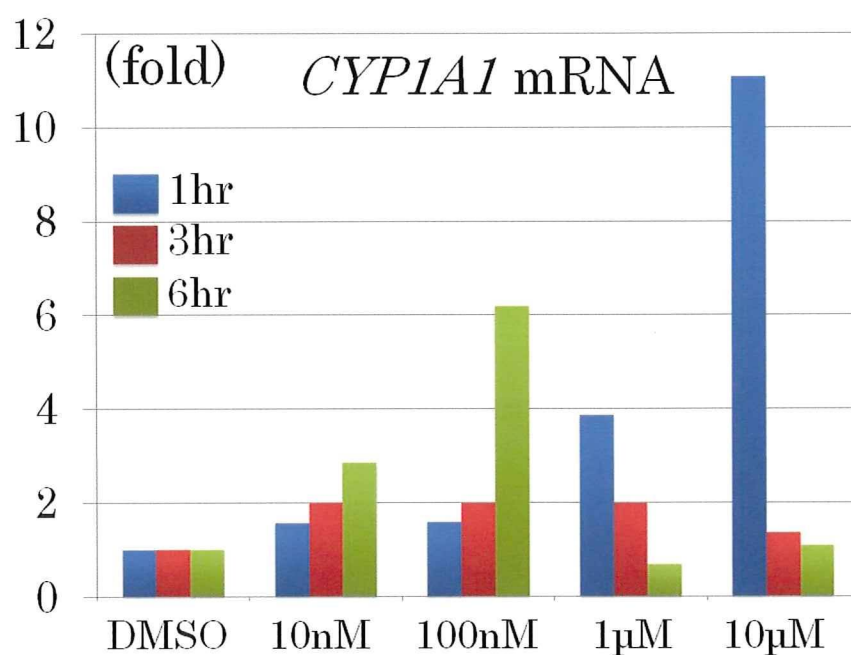
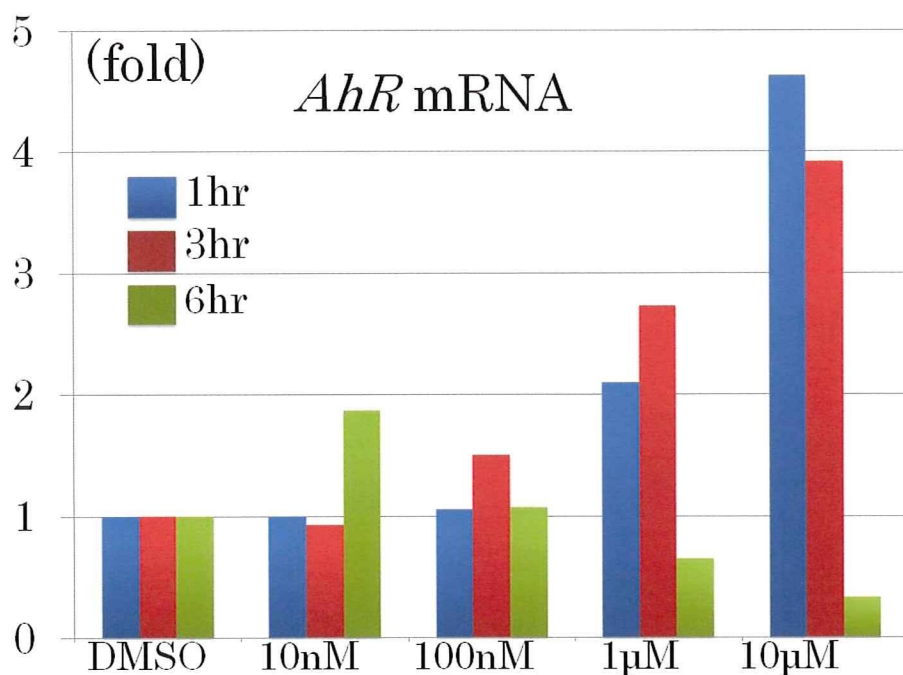


図4B ウェスタンブロットによる AhR、CYP1A1 のタンパク量の評価

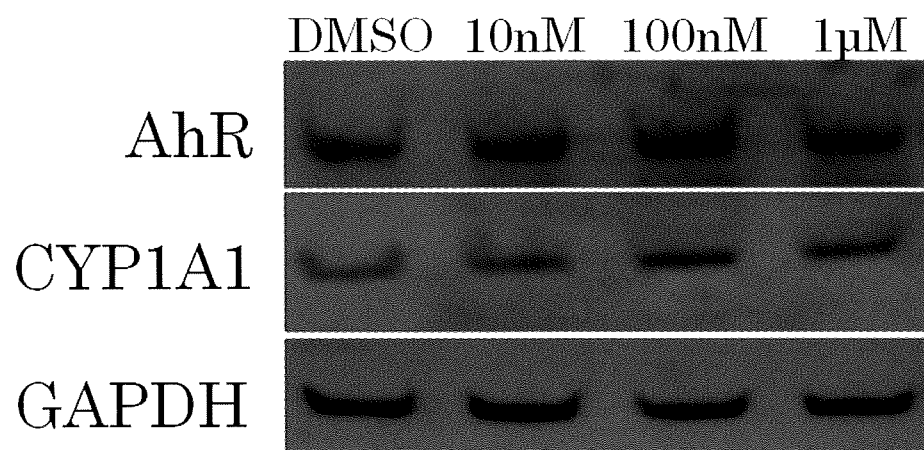


図 5 Nrf2 の細胞内局在

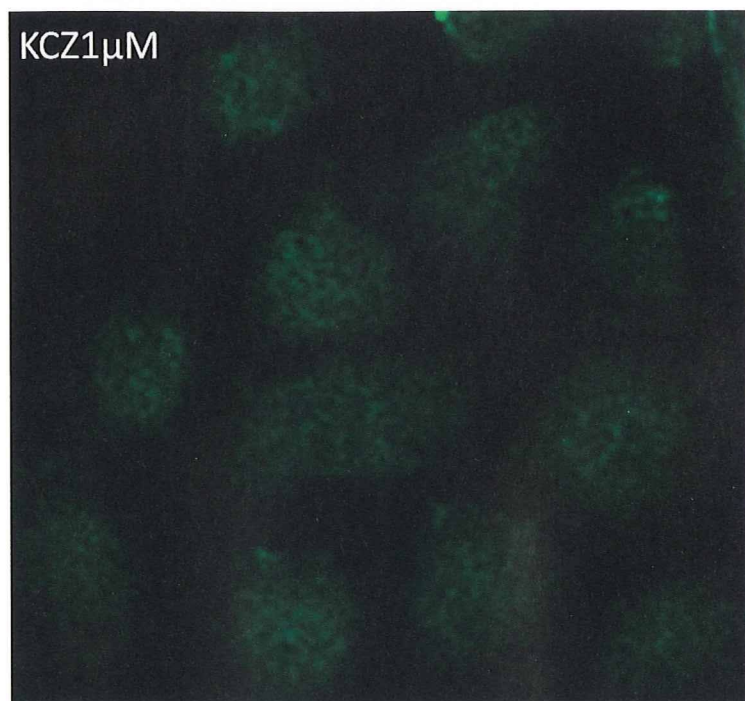
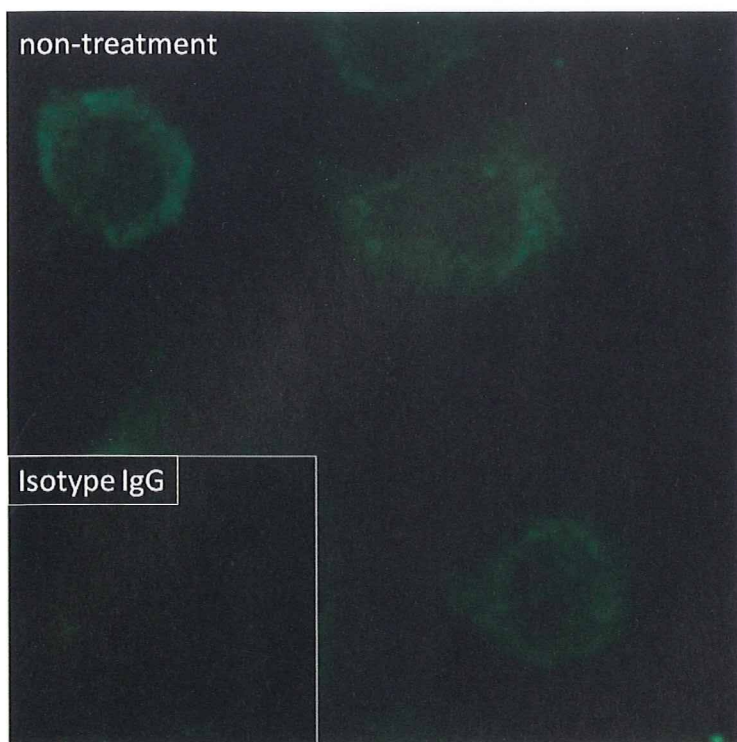


図 6A リアルタイム PCR による Nrf2、Nqo1 遺伝子発現の評価

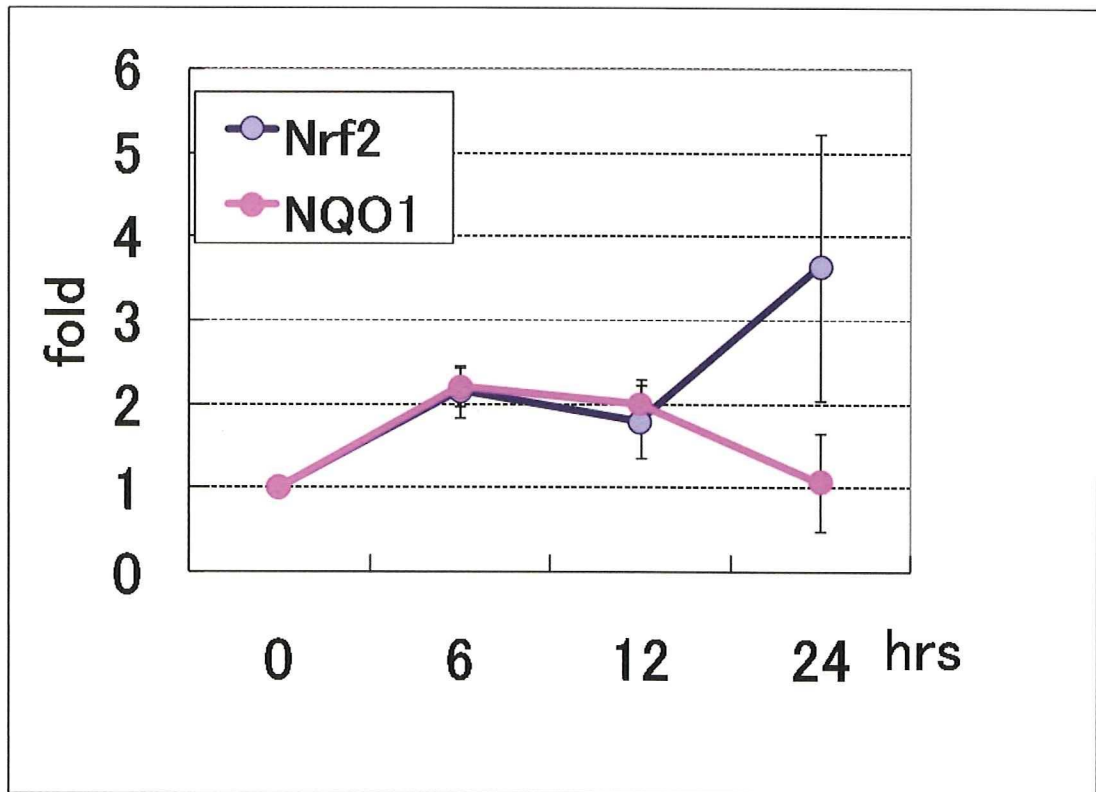


図 6B ウェスタンブロットによる Nrf2、Nqo1 のタンパク量の評価

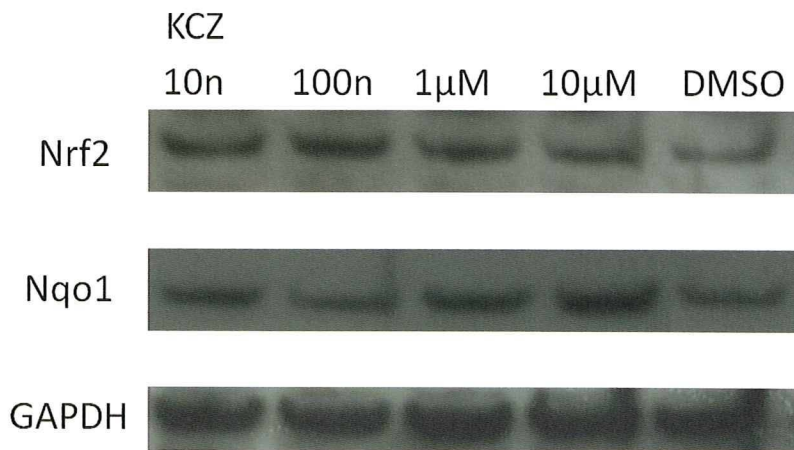


図7A AhRのSiRNAを遺伝子導入し、AhRの染色性を評価
赤：AhR 青：核染色

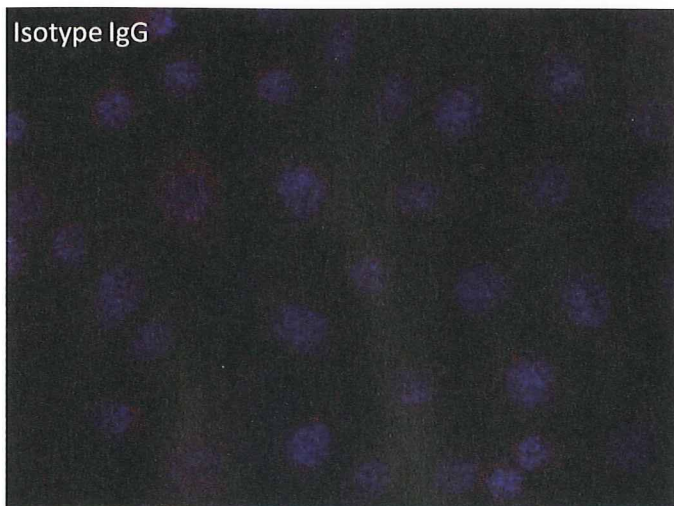
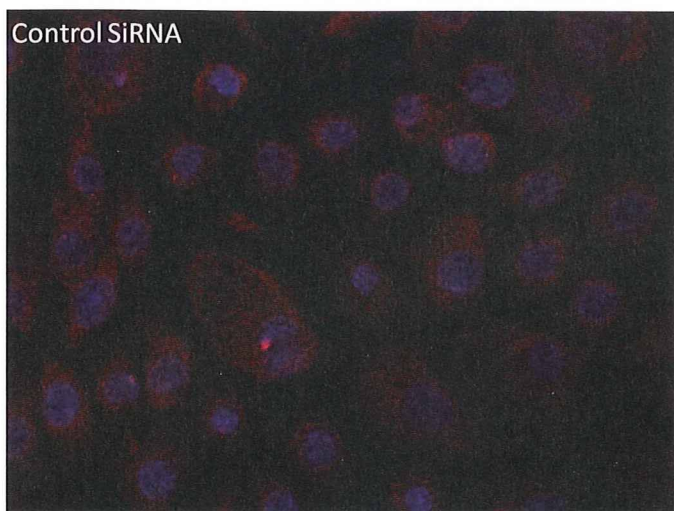
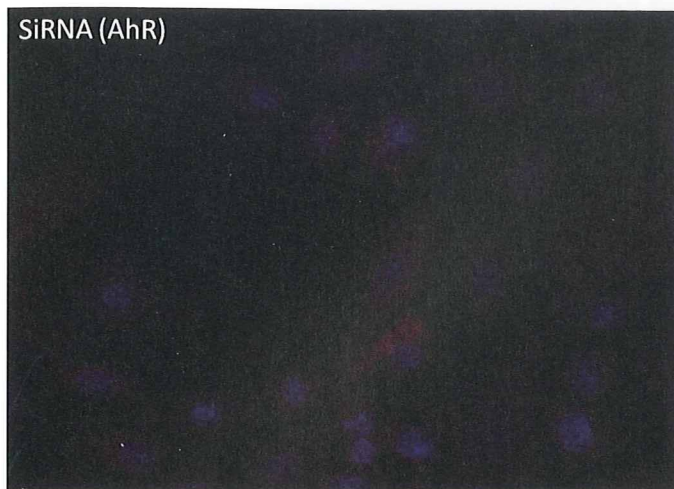


図 7B Nrf2 の細胞内局在

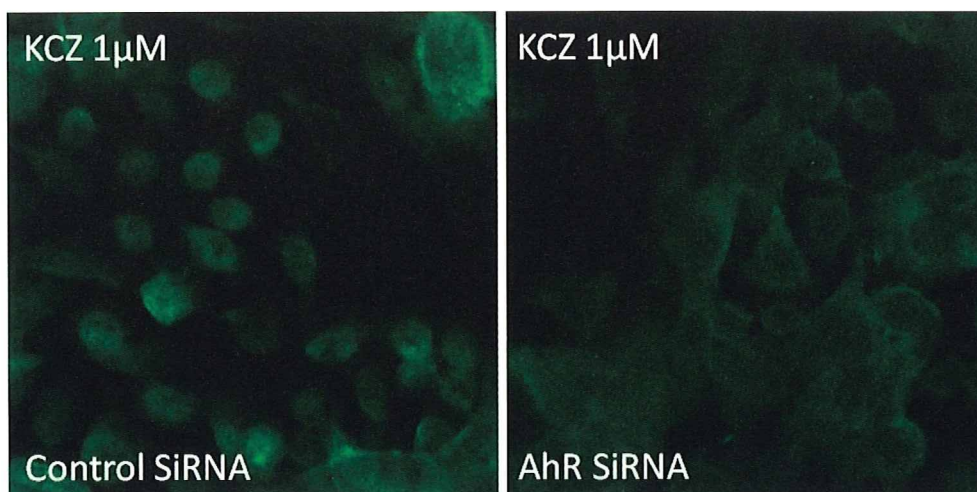
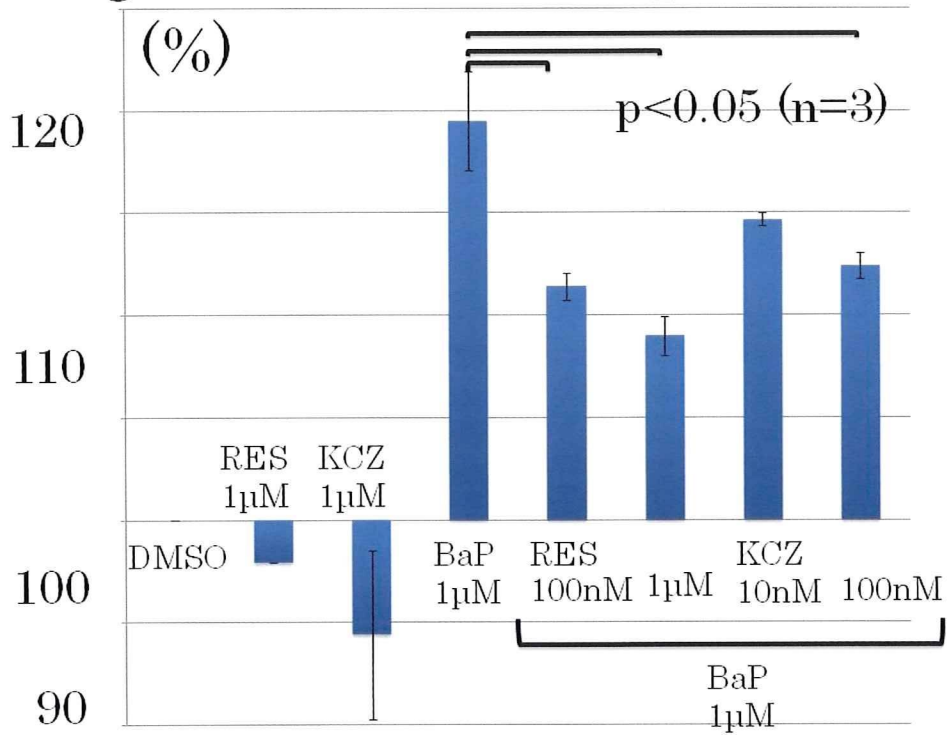
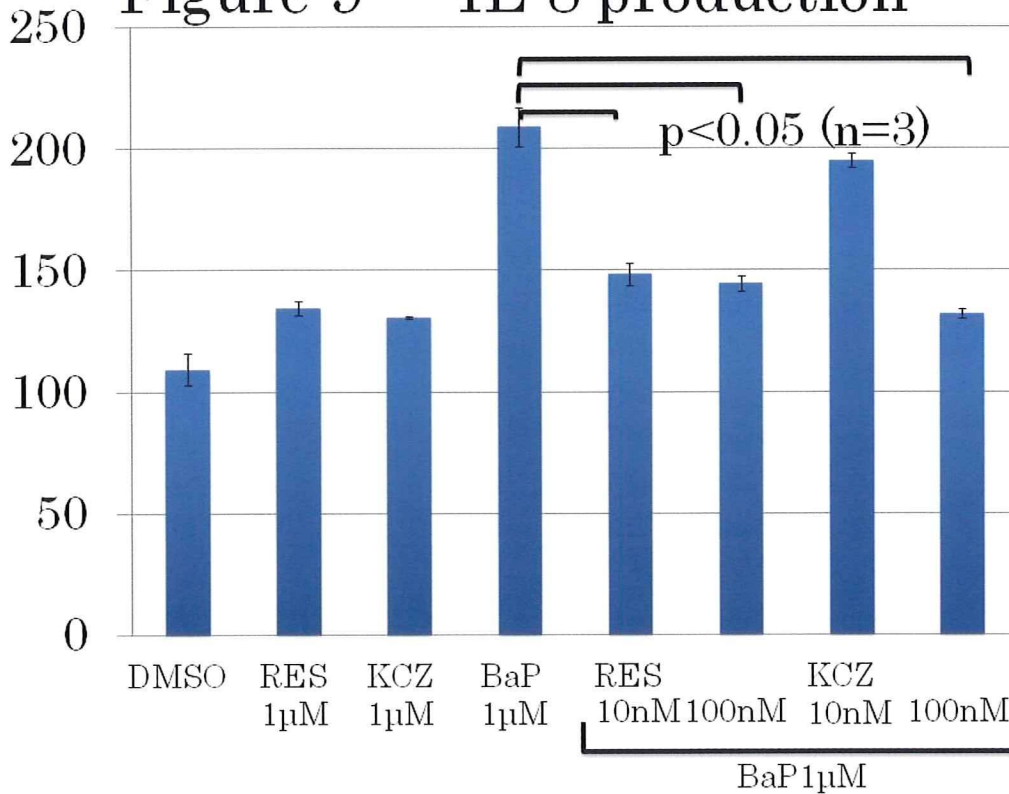


Figure 8 8-OHdG production



RES : resveratrol

Figure 9 IL-8 production



分担研究報告書

ダイオキシン受容体 (aryl hydrocarbon receptor) シグナルによる 気道上皮細胞の機能解析

研究分担者 内 博史 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 准教授
研究協力者 千葉 貴人 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 特任助教・学術研究員
三苫 千景 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教

研究要旨 ダイオキシン類化合物が気道上皮細胞に与える影響について検討した。ダイオキシン類化合物受容体である Arylhydrocarbon Receptor (AhR)を刺激し、ヒト気道上皮細胞株 (NCI-H292) からの接着分子・サイトカイン産生・ムチン産生を測定した。AhR 刺激によりヒト気道上皮細胞株からムチン産生の増強が認められた。測定したサイトカイン産生・接着分子には影響を与えなかった。以上より、ダイオキシン類化合物による AhR の活性化が気道粘液産生増強を介し、咳・痰などの呼吸器障害に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

煙草、環境ホルモンや油症による中毒事件で知られているダイオキシン類化合物は、呼吸器系にも種々の作用を及ぼすことが分かっている。肺腫瘍のプロモーター作用の他、近年、慢性閉塞性呼吸器疾患のリスクが高まるという報告もあり、慢性気道炎症性疾患への関与が示唆されている。

事実、喫煙者・油症患者において、咳嗽・喀痰・喘鳴などの気道症状、いわゆる慢性閉塞性気道疾患や慢性気管支炎の症状があらわれることがわかっている¹⁾が、ダイオキシン類化合物による呼吸器症状(咳・痰)への関与については不明な点が多い。

本研究の目的は、ダイオキシン類化合物が、呼吸器症状に与える影響について検討することである。特に、咳・痰症状に関与する気道上皮細胞からのムチン産生について検討する。

B. 研究方法

1、気道上皮細胞株 (NCI-H292) および正常ヒト気道上皮細胞におけるダイオキシン類化合物受容体 (AhR) 発現

気道上皮細胞株 (NCI-H292) および正常ヒト気道上皮細胞の AhR 発現を RT-PCR 法および Western blot 法にて、メッセージ・タンパクレベルで解析を行った。

2、気道上皮細胞株 (NCI-H292) からのサイトカイン産生

気道上皮細胞株 (NCI-H292) を AhR agonist であるベンゾピレン (BaP) で 24 時間刺激し、その後上清中のサイトカインを cytokine array (ELISA) 法で測定した。

3、気道上皮細胞株 (NCI-H292) の接着分子 E-cadherin 発現

気道上皮細胞株 (NCI-H292) を AhR agonist であるベンゾピレン (BaP) で 24 時間刺激し、その後 E-cadherin 発現を RT-PCR 法および Western blot 法にて、メッセージ・タンパクレベルで解析を行った。

4、気道上皮細胞株 (NCI-H292) からのムチン産生

気道上皮細胞株 (NCI-H292) を AhR agonist であるベンゾピレン (BaP) で刺激し、その後ムチン発現を real time RT-PCR 法および PAS 染色法にて、メッセージ・タンパクレベルで解析を行った。