

26. Clements JA, Matheson BA, Wines DR, Brady JM, MacDonald RJ, Funder JW (1988) Androgen dependence of specific kallikrein gene family members expressed in rat prostate. *J Biol Chem* 263: 16132–16137.
27. Onozawa M, Fukuda K, Watanabe M, Ohtani M, Akaza H, Sugimura T, Wakabayashi K (2001) Detection and cloning of a protein recognized by anti-human prostate-specific antigen (PSA) antibody in the rat ventral prostate. *Jpn J Cancer Res* 92: 863–868.
28. Byrne RL, Leung H, Neal DE (1996) Peptide growth factors in the prostate as mediators of stromal epithelial interaction. *Br J Urol* 77: 627–633.
29. Nishi N, Oya H, Matsumoto K, Nakamura T, Miyataka H, Wada F (1996) Changes in gene expression of growth factors and their receptors during castration-induced involution and androgen-induced regrowth of rat prostates. *Prostate* 28: 139–152.
30. Topping N, Jorgensen PE, Poulsen SS, Nexø E (1998) Epidermal growth factor in the rat prostate: production, tissue content and molecular forms in the different prostatic lobes. *Prostate* 35: 35–42.
31. Marengo SR, Chung LW (1994) An orthotopic model for the study of growth factors in the ventral prostate of the rat: effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor. *J Androl* 15: 277–286.
32. Zhu N, Pewitt EB, Cai X, Cohn EB, Lang S, Chen R, Wang Z (1998) Calreticulin: an intracellular Ca⁺⁺-binding protein abundantly expressed and regulated by androgen in prostatic epithelial cells. *Endocrinology* 139: 4337–4344.
33. Jiang F, Yang L, Cai X, Cyriac J, Shechter I, Wang Z (2001) Farnesyl diphosphate synthase is abundantly expressed and regulated by androgen in rat prostatic epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78: 123–130.
34. Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M, Gustafsson JA (2001) A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6330–6335.
35. Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, Quinn DI, Makela S, Delprado W, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill G, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ, Gustafsson JA, Sutherland RL (2001) Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer Res* 61: 5331–5335.
36. Banerjee PP, Banerjee S, Tilly KI, Tilly JL, Brown TR, Zirkin BR (1995) Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. *Endocrinology* 136: 4368–4376.
37. Zhang J, Thomas TZ, Kasper S, Matusik RJ (2000) A small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids in vitro and in vivo. *Endocrinology* 141: 4698–4710.
38. Gubits RM, Shaw PA, Gresik EW, Onetti-Muda A, Barka T (1986) Epidermal growth factor gene expression is regulated differently in mouse kidney and submandibular gland. *Endocrinology* 119: 1382–1387.
39. Fujimoto N, Asano K, Usui T, Honda H, Kitamura S (2005) Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat estrogen receptor beta gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94: 15–21.
40. Claessens F, Rushmere NK, Davies P, Celis L, Peeters B, Rombauts WA (1990) Sequence-specific binding of androgen-receptor complexes to prostatic binding protein genes. *Mol Cell Endocrinol* 74: 203–212.

特集I

T細胞レセプターからのシグナル伝達

T細胞レセプター
シグナルとNF- κ B*石丸直澄**
岸本英博***
林良夫****Key Words** : NF- κ B, T cell receptor, I κ B, activation, NF- κ B2(p100/p52)

はじめに

T細胞の活性化や増殖にはT細胞そのものが産生するサイトカインや増殖因子が必須である。そのサイトカインや増殖因子の転写を制御している転写因子の中でもっとも重要な位置に存在しているのがnuclear factor(NF)- κ Bである。NF- κ Bは、IL-2をはじめとしたサイトカインおよびサイトカインレセプター、増殖因子、細胞接着分子、細胞周期に関連する遺伝子、アポトーシス関連遺伝子などT細胞の生死にかかわる重要な遺伝子の転写調節を司っている¹⁾。一般的にT細胞受容体(T cell receptor; TCR), CD28を中心とした副刺激分子およびサイトカインレセプターなどを介した刺激からさまざまなシグナル分子を経由してNF- κ Bの内在性阻害因子であるI κ Bのリン酸化, ユビキチン化および断片化によってI κ Bから解離したNF- κ B分子のヘテロおよびホモダイマーが細胞質から核内に移行し, 標的遺伝子上に存在する κ Bサイトを介して転写が調節され, さまざまな重要因子が合成されT細胞の機能獲得に用いられている。最近, I κ BによるNF- κ Bの制御機構に加えて新たにNF- κ B2による

調節機構が明らかにされ, 自己免疫疾患の病態発症におけるNF- κ Bシグナルの謎が解き明かされようとしている。

2つのNF- κ B経路

転写因子であるNF- κ Bは免疫細胞における多くの炎症反応を制御している。NF- κ BにはN末にDNA結合に重要な共通のRelホモロジー領域を有するNF- κ B1(p105-p50), NF- κ B2(p100-p52), RelA(p65), RelB, c-Relの5つのサブユニットがあり(図1), それらのサブユニットがヘテロダイマーあるいはホモダイマーとなり核内移行し, 細胞の活性化や増殖などに重要な遺伝子の転写調節を司ることが知られている²⁾。NF- κ B経路にはNF- κ B1とRelAの複合体によって調節される古典的経路(classical NF- κ B pathway)と, NF- κ B2とRelBの複合体によって調節される非古典的経路(non-classical NF- κ B pathway)が報告されている³⁾(図2)。

TCR/CD3関連シグナルとNF- κ B

T細胞では主にTCRからの刺激がさまざまな伝達分子を介して古典的NF- κ Bの活性化につながるということがよく知られている⁴⁾。まず, TCRからの抗原刺激によりTCR/CD3分子複合体に連動してZAP70, Fyn, Vavやposphoinositide 3-kinase

* The critical NF- κ B pathway through T cell receptor.

** Naozumi ISHIMARU, D.D.S., Ph.D. & Yoshio HAYASHI, D.D.S., Ph.D.: 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子病態学分野〔〒770-8504 徳島市蔵本町3-18-15〕; Department of Oral Molecular Pathology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8504, JAPAN

*** Hidehiro KISHIMOTO, M.D., Ph.D.: 東京理科大学生命科学研究所免疫生物学研究部門

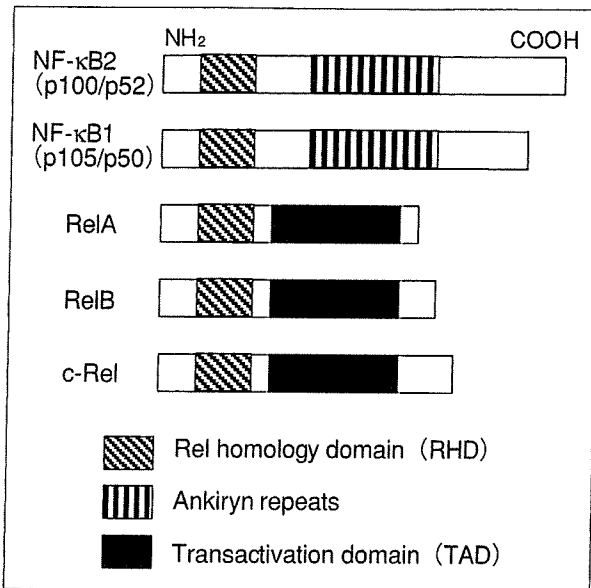


図1 NF-κBサブユニットの構造

(PI3K)といったアダプター分子を介して, protein kinase C θ (PKCθ), caspase-recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein 1 (CARMA1)のリン酸化へと進んでいく. PKCθより上流のシグナルはAP-1, NFATといったNF-κBとは別のルートによる T細胞の

活性化経路と共通しているが, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)から引き続いて誘導されるPKCθとCARMA1のリン酸化はNF-κBの活性化に重要な起点となっている. PKCθのリン酸化に続いてCARMA1, B-cell lymphoma 10 (Bcl-10), mucosa-associated-lymphoid-tissue lymphoma-translocation gene 1 (MALT-1)複合体を介してIκB kinase (IKK)の活性化につながっていく⁵⁾⁶⁾. また, PKCθが直接IKKに結合してIKKの活性を調節していることも明らかにされている⁷⁾. 一方, 副刺激分子であるCD28からのシグナルに関しては, TCRの刺激がない状態でCD28刺激を入れてもNF-κBの活性化は不十分であり, T細胞の活性化および増殖といった正常な機能獲得には至らない. CD28分子からのシグナルはTCRの下流のPI3KやAKTなどのアダプター分子を経由して上記のPKC/CARMA1/Bcl-10/MALT-1を介してIKKの活性化につながり, TCRからのNF-κBシグナルを量的に調節しているものと考えられる. IL-2レセプターなどのサイトカインレセプターからのシグナルについてもTCRの下流のシグナル分子と合流していることが知られている⁸⁾⁹⁾.

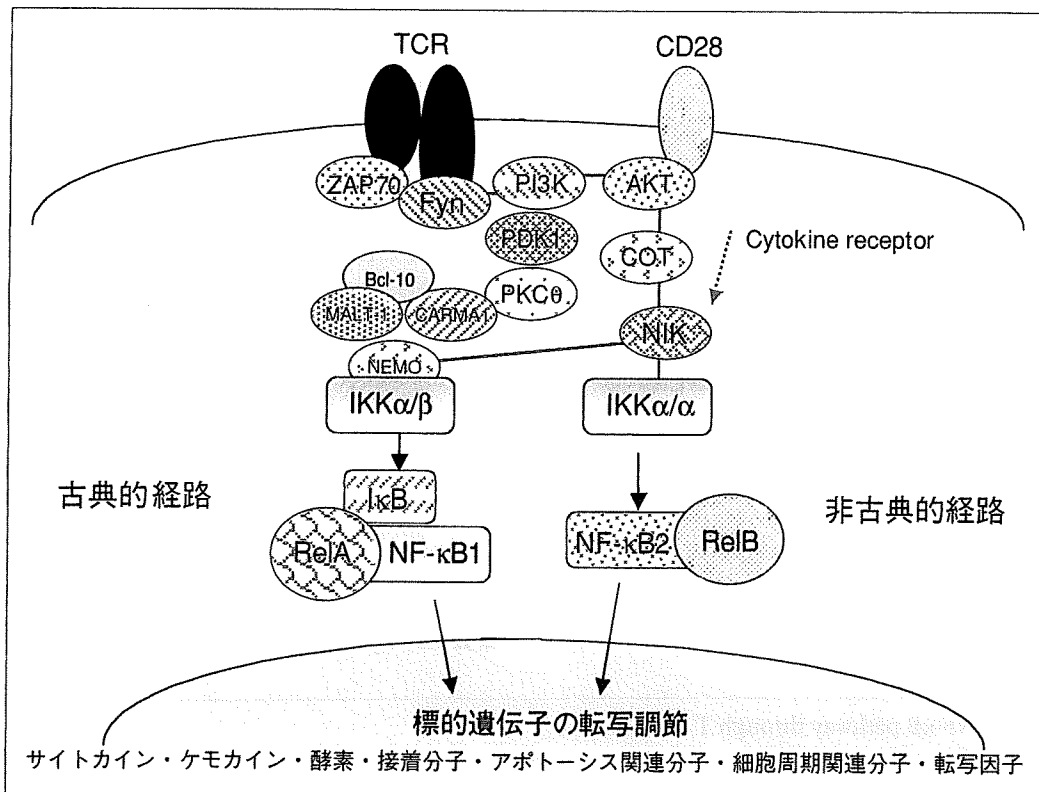


図2 T細胞レセプターと古典的NF-κB経路および非古典的(新規)NF-κB経路 T細胞あるいはCD28の下流におけるNF-κBの転写活性に至る過程の概略図を示す.

I κ Bによる制御システム

NF- κ Bの活性化の引き金となるのが、NF- κ B分子と結合しているI κ Bのリン酸化から始まるユビキチン化、断片化である。通常はNF- κ B分子は細胞質でI κ Bと結合することによって核内に移行しないように制御されている⁵⁾。CARMA1/Bcl-10/MALT-1複合体の活性化からIKKのキナーゼ活性が高まりI κ Bのリン酸化が誘導されると、I κ B分子はユビキチン化を受けた後プロテアソームにより断片化されることによりNF- κ Bの核内移行を阻害できなくなる。つまり、I κ Bによる制御が解除されるときにNF- κ Bの活性化は開始される。正常マウスのCD4陽性T細胞を抗TCR抗体および抗CD28抗体により刺激すると、I κ Bのリン酸化および断片化、さらに、NF- κ B分子の核内移行が観察される(図3)。I κ B分子をリン酸化するのがIKK複合体であり、2つのキナーゼと調節蛋白であるNF- κ B essential molecule (NEMO)から構成されるIKKはCARMA1/Bcl-10/MALT-1を介してNEMOのユビキチン化、IKK α またはIKK β のリン酸化を通じたキナーゼ活性の上昇によりI κ Bのリン酸化に結びついていく¹⁰⁾。シグナルを制御する

分子を各ステップで解除していくことにより、NF- κ Bの活性化が開始される。逆に言えば、NF- κ Bはいくつもの制御システムにより精巧に調節されていると言ってよい。ひとたび、NF- κ B分子が核内に移行するとT細胞の機能にきわめて重要な遺伝子の転写調節が進行するのである。

NF- κ Bの核内移行

NF- κ B分子が核内移行すると標的遺伝子のプロモーター領域に存在する κ B結合部位にNF- κ B分子が直接結合することにより、その遺伝子の転写活性が開始される。5つのNF- κ Bサブユニットの中で実際に標的遺伝子の転写を司るのはC末に転写活性領域を有するRelA(p65)、RelB、c-Relである(図1)。一方、NF- κ B1(p105/p50)とNF- κ B2(p100/p52)には転写活性領域は存在しないが、核内移行に重要なシグナルモチーフを有していることから、NF- κ B1およびNF- κ B2は他の3つのサブユニットとのヘテロダイマーの形成により核内移行を最終的に調節していると考えられる³⁾。NF- κ BはT細胞の活性化や増殖に重要なIL-2およびその受容体の一つであるCD25などのようなサイトカインやサイトカイン受容体、ケ

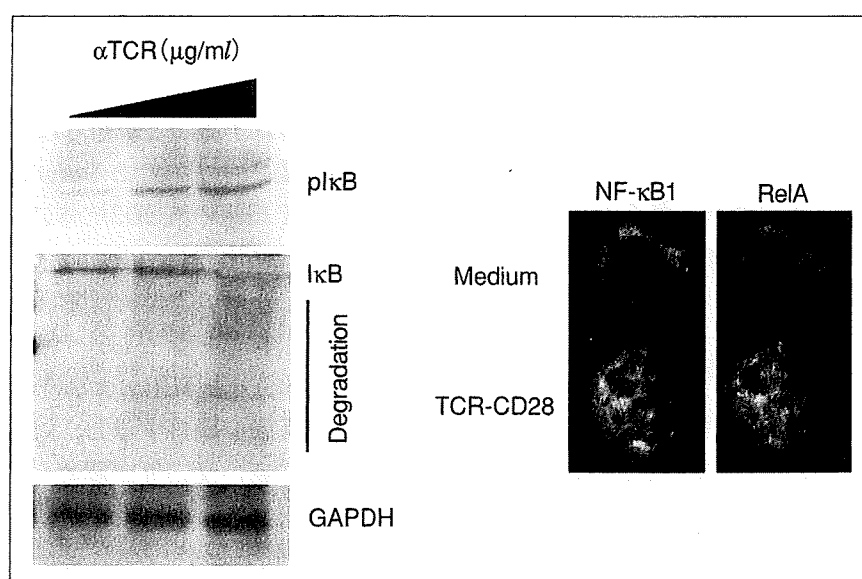


図3 NF- κ Bの活性化

左：正常マウス脾臓からのCD4陽性細胞に抗TCR抗体(0~1 μ g/ml)および抗CD28抗体(20 μ g/ml)で刺激し、抗リン酸化I κ B抗体によりウエスタンブロットを行った。さらに、I κ Bの断片化を確認した。ローディングコントロールとしてglyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。

右：刺激後のCD4陽性T細胞のNF- κ B1およびRelAの核内移行をコンフォーカル顕微鏡解析により確認した。

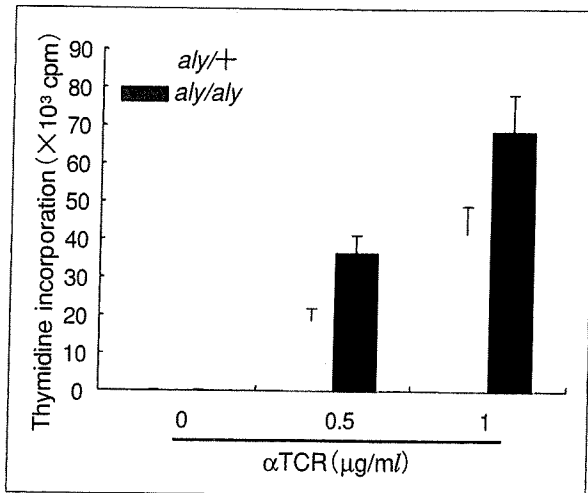


図4 NF- κ B2不全マウスのナイーブT細胞の反応性 *aly/aly*マウスと対照マウスの脾臓CD4陽性細胞に抗TCR抗体(0~1 μ g/ml)および抗CD28抗体(20 μ g/ml)で48時間刺激し、培養の最終12時間における 3 H標識チミジンの取り込みをシンチレーションカウンターにより計測した。

モカイン、接着分子、アポトーシス関連因子、細胞周期関連因子などT細胞の分化、維持および機能獲得に重要な遺伝子群を標的としている¹¹⁾。さらに、NF- κ B遺伝子自体をNF- κ Bが転写調節していることが知られており、転写因子自体の発現調節を自身で制御しているという点はNF- κ Bそのものの動態を知る上で重要である¹²⁾。また、各サブユニットがどの標的遺伝子の転写調節に関連しているのかの区別は明確にできていない。各サブユニットの組み合わせや、シグナルカスケードの各中継ポイントにおけるシグナルの質的および量的な違いなど複雑な因子の影響によりNF- κ Bの活性システムが調節されていることが想定される。

T細胞における非古典的経路

では、T細胞の活性化に非古典的NF- κ B経路は関与してないのであろうか。NF- κ B2およびRelBの遺伝子欠損マウスでもT細胞に機能不全や自己免疫病変の発症が報告されている¹³⁾¹⁴⁾。

正常マウスのCD4陽性T細胞への抗TCR抗体および抗CD28抗体による活性化におけるNF- κ Bの動態を観察すると、活性の初期段階ではNF- κ B1/RelAのヘテロダイマーの核内移行が中心であり、非古典的経路であるNF- κ B2/RelBの核内移行はほとんど認められず、増殖期を含む後期段階で

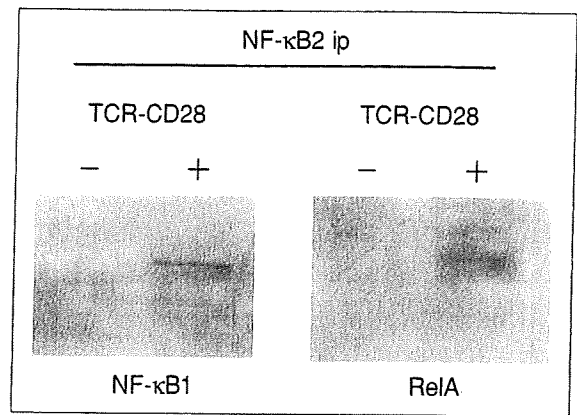


図5 NF- κ B2分子とNF- κ B1およびRelAとの結合 正常マウス脾臓からのCD4陽性細胞に抗TCR抗体(1 μ g/ml)および抗CD28抗体(20 μ g/ml)で刺激し、細胞質分画蛋白質を抽出後、NF- κ B2抗体で免疫沈降(ip)を行い、ウエスタンブロット法によりNF- κ B1およびRelAを検出した。

はNF- κ B2/RelBの核内移行が確認されるが¹⁵⁾、その役割は不明であった。非古典的NF- κ B経路ではTCRおよびCD28からのシグナル伝達に関しては古典的経路ほど明らかにされていない。PKC θ 、PI3KおよびAKTからNF- κ B-inducing kinase (NIK)を活性化し、NIKはIKK α をリン酸化することによりNF- κ B2(p100)のI κ B様配列をリン酸化、ユビキチン化する。古典的NF- κ B経路と同様にプロテアソームにより断片化され、p52にプロセッシングされることによりp52/RelBヘテロダイマーが核内に移行することが知られている⁹⁾。NIK遺伝子の点変異マウスである*aly/aly*マウスは末梢CD4陽性T細胞の抗CD3抗体による増殖反応が対照マウスに比較して低下していることが報告されているが¹⁶⁾、CD4陽性T細胞の中で、メモリー型のT細胞を除去し、ナイーブ型のCD4陽性T細胞のみを抗TCRおよび抗CD28抗体で刺激して増殖反応を観察すると、対照マウスに比較して有意に高い反応性が認められた(図4)。一方で、*aly/aly*マウスのメモリー型のみ増殖反応はきわめて低くなっていることが判明した¹⁵⁾。NIK欠損マウスにおいてもナイーブ型CD4陽性T細胞の増殖活性は有意に上昇していることを確認した。さらに、NF- κ B2欠損マウスにおいてもT細胞の過剰増殖が報告されていることから、ナイーブCD4陽性T細胞の活性化における非古典的NF- κ B経路(NF- κ B2/RelB)の負の制御機構が存

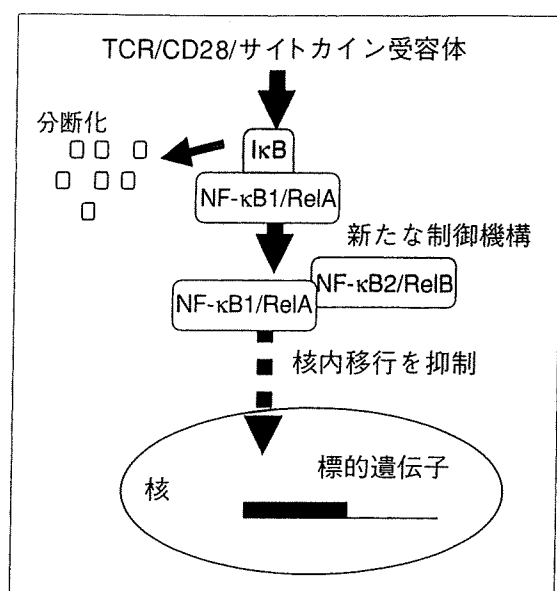


図6 NF-κB2による古典的NF-κB経路の新たな制御機構

在することが明らかになった。また、T細胞のナイーブからメモリー型に至る段階でNF-κBのサブユニットの役割が分担されている可能性が示された。

NF-κBサブユニット間のクロストーク

NF-κBのサブユニット間での結合に関しては、RelA, RelBおよびc-Relでのホモダイマー以外は5つのサブユニット間でヘテロダイマー、ホモダイマーを形成しうることが知られているが、それらのT細胞における生理的および機能的役割は明らかにされていなかった。上述のNF-κB2の制御機構の細胞内での機序を知るために、正常マウスからナイーブ型(CD44^{low})のCD4陽性T細胞を用いて抗TCRおよび抗CD28抗体で刺激した後、細胞質分画の蛋白質を抽出し、NF-κB2抗体で免疫沈降して各NF-κBサブユニットに対する抗体でウエスタンブロット法により各サブユニットとNF-κB2の直接の結合を確認したところ、NF-κB1およびRelA蛋白が検出された(図5)。一方、*aly/aly*マウスではナイーブ型CD4陽性細胞に刺激を加えると、NF-κB2の合成が阻害されることも判明し、NF-κB2とNF-κB1およびRelAとの結合は観察されなかった¹⁵⁾。この所見は*aly/aly*マウスのナイーブ型CD4陽性T細胞の過剰な反応性がNF-κB2分子を介した制御機構の異常により生

じていることを示唆している。従来のIκBによるNF-κBの活性化制御機構に加え、NF-κB2分子がNF-κB1/RelA複合体と細胞質で直接結合することにより、その複合体の核内移行を阻害することでNF-κBの活性化シグナルを調節する新たな免疫制御機構が明らかにされた(図6)。一方で、メモリー型(CD44^{high})CD4陽性T細胞に関してはこの制御システムは働いていないことから、T細胞の活性化段階でNF-κBの各サブユニットの役割が異なっている可能性が示された。非古典的NF-κB経路と古典的NF-κB経路のクロストークはT細胞のみではなく、たとえば、破骨細胞の活性化過程においても報告されていることから、別の細胞種においても、このシステムがなんらかの機能調節に関与している可能性がある¹²⁾¹⁷⁾。

NF-κBと免疫疾患

これまでにNF-κB各サブユニットの遺伝子欠損マウスの解析からT細胞におけるNF-κBの生体内での役割が明らかにされている。たとえば、NF-κB1欠損マウスのT細胞では増殖の抑制およびTh₂タイプのサイトカインの産生減少が観察され、ヒト多発性硬化症の疾患モデル(EAE)での病態感受性の上昇および*Leishmania major*への易感染性がみられ、また、RelA欠損マウスは胎生致死であるが、胎児肝細胞キメラを用いた実験でT細胞の機能低下が報告されている^{18)~22)}。一方、RelB欠損マウスは2~3か月齢で重度の自己免疫性貧血および全身の炎症で死亡し、T細胞の機能低下も観察されている¹³⁾。さらに、NF-κB2欠損マウスではT細胞の過反応がみられ、c-Rel欠損マウスではT細胞の反応性の低下やEAEに対する疾患感受性の低下が知られている²³⁾²⁴⁾。加えて、NF-κB2分子を調節する因子であるNIKの欠損マウスおよびNIK遺伝子の変異マウスにおいてT細胞の増殖は抑制され、多臓器に自己免疫病変が発症することが報告されている²⁵⁾。しかし、T細胞の各活性化段階でのNF-κBの詳細な役割や各サブユニット同士の相互作用と自己免疫との関係は不明な点が多かった。

*aly/aly*マウスやNIK欠損マウスにおける自己免疫病変の発症には胸腺由来のCD25⁺CD4⁺調節性T細胞の数的な減少および質的な障害が自己免

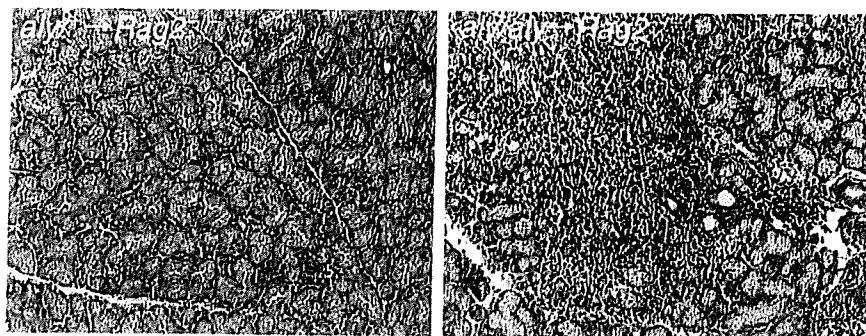


図7 NF- κ B2機能不全と自己免疫

*aly/aly*マウスと対照マウスのナイーブ型CD4陽性T細胞を*Rag2*遺伝子欠損マウスに移入後6週における涙腺の病理組織像を示す。*aly/aly*→*Rag2*^{-/-}群では腺組織の破壊を伴ったリンパ球浸潤が認められる。

疫の発症に重要であることが報告されている¹⁶⁾²⁶⁾。

しかし、*aly/aly*マウスのナイーブ型CD25⁻CD4⁺T細胞を*Rag2*遺伝子欠損マウスに移入すると、本来の*aly/aly*マウスに発症する自己免疫病変よりもはるかに激しい自己免疫性病変が肺や涙腺に認められたことから、調節性T細胞の制御異常に加えて、NF- κ B2によるT細胞の制御機構に障害をきたすと自己免疫疾患の発症に結びつくことが示された(図7)。

まとめ

Nuclear factor(NF)- κ Bによる標的遺伝子の転写活性システムはT細胞にとって必須であるといえる。しかし、5つのサブユニットでどれが重要であるのかはいまだ解明されていない。NF- κ Bのサブユニット遺伝子のそれぞれの欠損マウスの中にはT細胞の分化や末梢トレランスは正常に維持され、T細胞になんらかの刺激が加えられたときにのみ特定の機能に異常が生じている場合がある。また、なんら機能的異常が見出せない場合も報告されている。サブユニットのどれかが欠損しても別のサブユニットが代替的に機能していることも考えられる。実際の免疫反応においてもT細胞にとってNF- κ Bシグナルに障害が生じれば、別のサブユニットが動員され、過剰なシグナルが伝われば各サブユニットを介して制御的に働くNF- κ Bネットワークシステムが免疫トレランスの維持に働いているのではなからうか。今後、NF- κ Bシグナルと免疫疾患との関係を明らかにすることは臨床的にもきわめて有用であるといえる。

文 献

- 1) Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination : the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000 ; 18 : 621.
- 2) Karin M. How NF-kappaB is activated : the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999 ; 18 : 6867.
- 3) Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004 ; 25 : 280.
- 4) Kahn-Perles B, Lipcey C, Lecine P, et al. Temporal and subunit-specific modulations of the Rel/NF-kappaB transcription factors through CD28 costimulation. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 21774.
- 5) Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, et al. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 2000 ; 404 : 402.
- 6) Lee K, D'Acquisto F, Hyden M, et al. PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF- κ B activation. *Science* 2005 ; 308 : 114.
- 7) Trushin SA, Pennington KN, Algeciras-Schimnich A, et al. Protein kinase C and calcineurin synergize to activate IkB kinase and NF- κ B in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 22923.
- 8) Pimentel-Muinos FX, Mazana J, Fresno M. Regulation of interleukin-2 alpha chain expression and nuclear factor kappa B activation by protein kinase C in T lymphocytes. Autocrine role of tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 24424.

- 9) Prasad AS, Bao B, Beck FW, et al. Zinc enhances the expression of interleukin-2 and interleukin-2 receptors in HUT-78 cells by way of NF-kappaB activation. *J Lab Clin Med* 2002 ; 140 : 272.
- 10) Rawlings DJ, Sommer K, Moreno-Garcia ME. The CARMA1 signalosome links the signaling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2006 ; 6 : 799.
- 11) Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-κB and immune response. *Oncogene* 2006 ; 25 : 6758.
- 12) Novack DV, Yin L, Hagen-Stapleton A, et al. The IκB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2003 ; 198 : 771.
- 13) Weih F, Carrasco D, Durham SK, et al. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* 1995 ; 80 : 331.
- 14) Kajiura F, Sun S, Nomura T, et al. NF-kappa B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic stroma-dependent manner. *J Immunol* 2004 ; 172 : 2067.
- 15) Ishimaru N, Kishimoto H, Hayashi Y, et al. Regulation of naïve T cell function by the NF-κB2 pathway. *Nat Immunol* 2006 ; 7 : 763.
- 16) Matsumoto M, Yamada T, Yoshinaga SK, et al. Essential role of NF-kappa B-inducing kinase in T cell activation through the TCR/CD3 pathway. *J Immunol* 2002 ; 169 : 1151.
- 17) Speirs K, Lieberman L, Caamano J, et al. Cutting edge : NF-kappa B2 is a negative regulator of dendritic cell function. *J Immunol* 2004 ; 172 : 752.
- 18) Artis D, Speirs K, Joyce K, et al. NF-kappa B1 is required for optimal CD4⁺ Th1 cell development and resistance to *Leishmania major*. *J Immunol* 2003 ; 170 : 1995.
- 19) Erdman S, Fox JG, Dangler CA, et al. Typhlocolitis in NF-kappa B-deficient mice. *J Immunol* 2001 ; 166 : 1443.
- 20) Hilliard B, Samoiloa EB, Liu TS, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice : roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol* 1999 ; 163 : 2937.
- 21) Beg AA, Sha WC, Bronson RT, et al. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 1995 ; 376 : 167.
- 22) Doi T, Takahashi T, Taguchi O, et al. NF-κB RelA-deficient lymphocytes : Normal development of T cells and B cells, impaired production of IgA and IgG1 and reduced proliferative responses. *J Exp Med* 1997 ; 185 : 953.
- 23) Hilliard BA, Mason N, Xu L, et al. Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J Clin Invest* 2002 ; 110 : 843.
- 24) Franzoso G, Carlson L, Poljak L, et al. Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J Exp Med* 1998 ; 187 : 147.
- 25) Tsubata R, Tsubata T, Hiai H, et al. Autoimmune disease of exocrine organs in immunodeficient alymphoplasia mice : a spontaneous model for Sjogren's syndrome. *Eur J Immunol* 1996 ; 26 : 2742.
- 26) Lu L, Gondek DC, Scott ZA, et al. NF-κB-inducing kinase deficiency results in the development of a subset of regulatory T cells, which shows a hyperproliferative activity upon glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene stimulation. *J Immunol* 2005 ; 175 : 1651.

* * *

特集 環境化学物質の作用メカニズムを解き明かす

トキシコゲノミクスの新展開

Percellome プロジェクトによる 2,3,7,8-TCDD - 2,3,7,8-TCDF 比較

An Attempt for Adding a New Dimension to Toxicogenomics Research : 2,3,7,8-TCDD-2,3,7,8-TCDF Comparison Trial in The Percellome Project

菅野 純 相崎健一 五十嵐勝秀 北嶋 聡 中津則之 児玉幸夫 高木篤也

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Noriyuki Nakatsu, Yukio Kodama, Atsuya Takagi

Percellome トキシコゲノミクスはマイクロアレイという数万遺伝子の発現レベルを一気に測定するハイスループット技術を利用し、全遺伝子のカスケード解明を最終目標としつつ、従来に比べてより早く安くかつ正確な毒性評価系の確立を目指すものである。筆者らはこのような次世代の毒性評価・予測技術を開発するために、細胞1個当たりの mRNA コピー数を測定する Percellome 法を開発した。今までに 90 以上の化学物質についての網羅的遺伝子発現情報を得て、なお追加中である。本稿では環境化学物質の一例としてダイオキシンの分子毒性に関わる知見を紹介する。

key words

Percellome Project, 遺伝子発現カスケード, 分子毒性学

□ 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 E-mail: kanno@nihs.go.jp

1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了。人体病理学、実験病理学専攻。国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長を経て、2002年より同部長。内分泌攪乱関連などの分子毒性学研究、Percellome トキシコゲノミクスプロジェクトなどを厚生労働所掌業務の一環として有機的に推進。

相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋 聡、中津則之*、児玉幸夫、高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部
*現(独) 医薬基盤研究所 基盤的研究部

はじめに

毒性学は生体 (Biosphere) と外来性物質 (Chemosphere) との相互作用を研究する分野であり、目的は“ヒトの安全”である。日常遭遇する化学物質 (生活化学物質、環境化学物質、医薬品や食品を含む) が摂取された際の安全性を担保するため (毒性評価) に、人体実験が困難な場合、身代わりとしての実験動物の毒性所見をヒトに外挿することが行われてきた。これは両者が基本的に同等の生体反応を示すという前提に基づいている。そして、酵素、膜、DNA など比較の普遍的かつ基本的な標的が主な検討対象となってきた。現在の分子毒性学は、生体反応メカニズムに踏み込み、受容体、転写因子などとの選択的結合によるシグナル伝達障害などの標的の特異性の高いものや、エピジェネティックな遅発影響なども直接的な対象とするようになり、基礎分子生物学と直結する時代に入っている。古い話ではあるもののいまだに分子機構の解明が完結していないサリドマイドの催奇形性問題、あるいは、最近の健康人ボランティアに対するバイオ医薬品 (治療薬) の微量投与がその全員を集中治療室送りにした事件は、種差問題の解決を含む分子毒性評価法の確立の重要性と、その現状を示していると考えられる。

I. トキシコゲノミクス

分子毒性メカニズム解析のためのツールの1つに mRNA を対象とするトキシコゲノミクスがあり、見落としのない網羅性が要求される毒性学では全遺伝子のカスケード解明がそ

の最終目標となる。これにより従来に比べて早く安く正確な毒性評価を目指すことができる。そして、種差・個体差、一生涯の反応性を修飾する胎生期・周産期影響、あるいは複合作用などを包括的に扱う際には、生命科学の各分野との緊密な連携が必須となる。また、従来の毒性学に対してのトキシコゲノミクスは、例えとしては光学顕微鏡に対しての電子顕微鏡のような立場にあると考えられる。電子顕微鏡が広く用いられるようになるには、教科書や図譜が必要であったように、トキシコゲノミクスの実用化にはある程度の量のデータの蓄積と解析のための基礎研究 (関連分野との連携を含む) が必要である。そこで、筆者らは、情報の互換性を確保するために細胞1個当たりの mRNA 発現コピー数を得る Percellome 手法を開発した。これを基盤としたプロジェクトを展開中であり、今までに 90 以上の化合物についてのデータを蓄積し、その解析ツールを開発している。

II. Percellome 法

原理は単純で、サンプルの細胞数を測る代わりに DNA 濃度を精密に計測し、それをもとに外部標準 mRNA (スパイク RNA) を細胞1個当たり決まった分子数だけそのサンプルに添加し、そして RNA 抽出・測定に移る。スパイク RNA の測定値を基準に、サンプルの各 RNA の測定値を細胞1個当たりのコピー数に換算する^{1)~3)}。これにより、実験操作、試薬やマイクロアレイのロット差などによる系統誤差を相殺するという本来の目的が果されるほか、測定過程における各種の異常が高感度に検出されることから、品質管理精

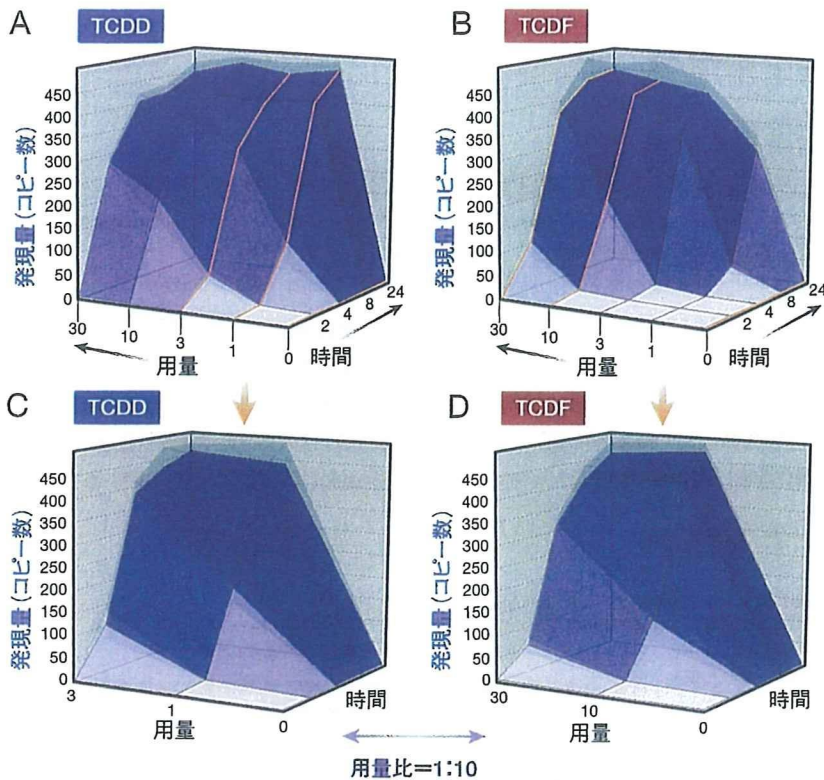


図1. TCDDとTCDFのPercellomeデータ：
TEF依存遺伝子の抽出法(1)

TCDDおよびTCDFの単回経口投与をC57BL/6雄マウスに行った。用量は両実験とも0(溶媒対照), 1, 3, 10, および30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし, 投与後2, 4, 8, および24時間後に肝を採取しマイクロアレイ解析を行った(両動物実験は1カ月を隔てて, 国立医薬品食品衛生研究所, 環境保全型動物実験施設内にて厳重管理の下に実施された)。代表例としてcytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp1a1; Affymetrix probe ID 1422217_a_at)を示す。

A: TCDDによるCyp1a1の発現変動のSurface(反応曲面)表示。

B: TCDFによるCyp1a1の発現変動のSurface表示。

丁度, 用量について10倍ずれた反応を示している。

C: TCDDの3, 1, 0から作製したSurfaceとD:

TCDFの30, 10, 0から作製したSurfaceが形状および発現値ともにほぼ完全に一致している。このよ

うな遺伝子をTEF依存性とした。

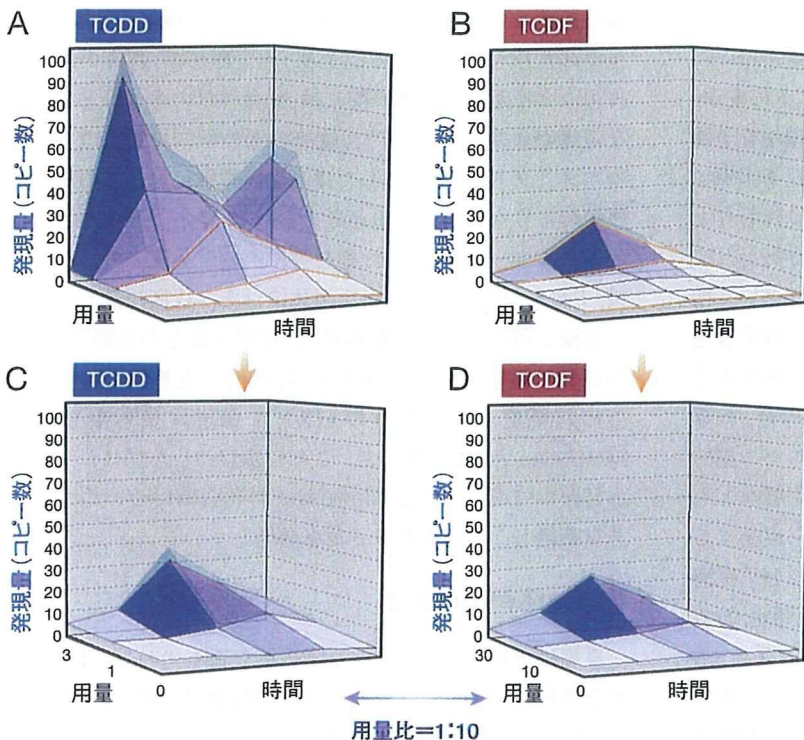


図2. TCDDとTCDFのPercellomeデータ：
TEF依存遺伝子の抽出法(2)

TEFに従うもう1つの例としてTCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase (Tiparp; 1452160_at)を示す。A, B, C, Dは図1と同様の表示。AとBを比較すると一見違った反応をしているようだが, CとDを比較するとTEF依存性であることがわかる。

度の向上が図られている。例えば, 高密度マイクロアレイで問題となるプローブの飽和によるダイナミックレンジの狭小化の検証・回避に役立っている。新世代Affymetrix GeneChipにおいて高発現遺伝子プローブが容易に飽和し高用量域で定量性を失う現象は, 一般的なデータ標準化手法

では検出困難であり, Percellome法を用いて初めて直接的に感知することができる。現在, 筆者らはサンプルRNA量をメーカー推奨プロトコルの半量にすることなどにより効率的にこれを回避している。

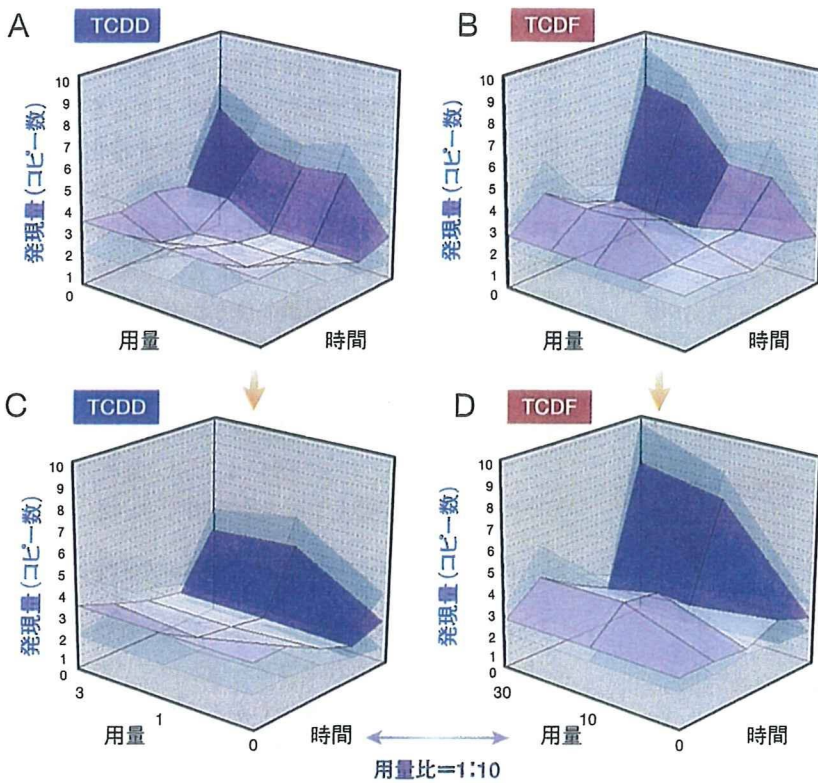


図4. TEF 非依存遺伝子

TEF に従わない遺伝子の一例として, Hectd2 (HECT domain containing 2, 1433944_at) の Surface を示す. A, B, C, D は図1と同様の表示. 2時間目の応答の違いのほか, 24時間目の応答が TCDF > TCDD である.

factor) ⁶⁾ に従う遺伝子と従わない遺伝子を検討した事例を紹介する.

ダイオキシン類, すなわちダイオキシン, ジベンゾフラン, およびコプラナーPCBは, そのいずれにもベンゼン環に結合する塩素の数の違う異性体や同族体が多数あり, 個々はそれぞれダイオキシンとしての生物活性の強さ, 例えば *in vitro* 実験系で Cyp1a1 の発現を誘導する能力に違いがある. 他方, 環境中では, これらダイオキシン類の同族体などを様々な比率で含む混合物として検出されることから, その生物影響の総体強度を推定するために, 個々の同族体の活性を合計して評価することが行われている. その際の強度の単位に TEF が用いられる. TEF は最も活性が強い 2,3,7,8-TCDD を 1 とし, 2,3,7,8-TCDF は 0.1, 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuran は 0.05, などとして表す. なお, TEF の値は, ほぼ, AhR 結合能に比例していることが経験的に知られている.

ダイオキシン毒性は, 受容体原性毒性の典型であり, その説明には "AhR ノックアウトマウスがダイオキシン投与に対し事実上無反応" であることが用いられる. すなわち, このノックアウトマウスでは, 体中に広がった TCDD はそこにある酵素や膜などの生体分子に対して何の影響も与えないということを示している. 野生型のマウスが TCDD で死ぬのは AhR が存在するからであり, 言い換えれば, AhR からの異常なシグナルによるという

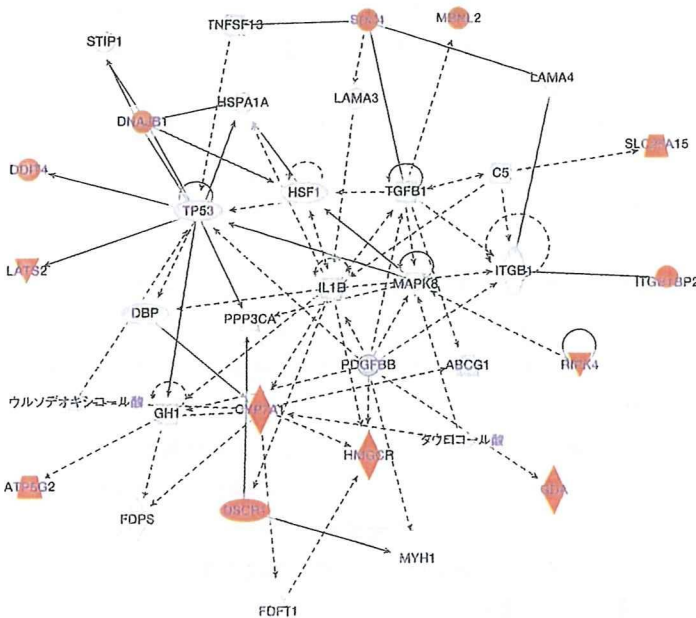


図5: TEF 非依存遺伝子の描く Pathway

図1の方法を利用して抽出された TEF 非依存遺伝子約 20 を Ingenuity Pathways Analysis 5.5 (Ingenuity Systems, Inc.) に投入し, 得られる Pathway の代表的なものを示す. AhR は含まれず, p53, TGF-β, MAPK8 などが見られる. 赤色; 計算に投入した TEF 非依存遺伝子のうち, この Pathway に含まれるもの. 灰色; Pathway のメンバーとしてソフトウェアが拾ったもの.

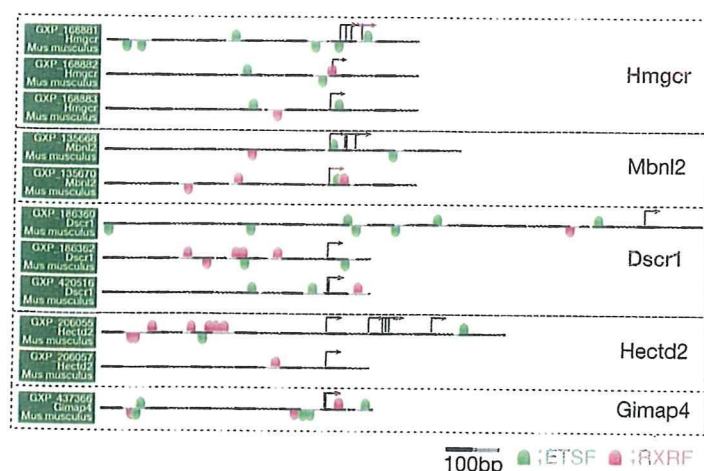


図6：TEF非依存遺伝子の *in silico* プロモーター解析

TEF非依存遺伝子約20のうち、TCDF優位の5遺伝子を絞り込み、Genomatix Software GmbHの提供する *in silico* プロモーター解析の結果を示す。5つの遺伝子に共通して、ETSファミリーとRXRファミリーの転写因子の結合配列を認めた。Hmgcr; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, Mbnl2; muscleblind-like 2, Dscr1; Down syndrome critical region homolog 1 (human), Hectd2; HECT domain containing 2, Gimap4; GTPase, IMAP family member 4.

ことになる。この際の毒性も概してTEFに従うことが知られており、TCDDの1に対してTCDFの10が同等の影響を及ぼす。しかし、リガンド分子個有の作用には受容体毒性学上、興味があるところであり、培養細胞に対する影響を検討した際にこの値が逆転する場面があることを見いだしたことから、TCDF特有の作用がある可能性をマウス肝において遺伝子発現レベルで検討することとした。

TCDDとTCDFについて、以下のような同一プロトコルを用いての実験を行った。12週齢雄C57BL/6マウスの1群3匹、20群を用意し、0, 1, 3, 10, および30 μ g/kgの用量で単回強制経口投与後、2, 4, 8, および24時間後に肝を採取し、Affymetrix GeneChip, MOE430 2.0によりPercllome遺伝子発現データを得た。2時間目の反応を見やすくするために、仮想0時間に2時間溶媒対照群の値を流用し、用量軸5点、時間軸5点から成る5×5の三次元Surfaceを作製した。さらに、TCDD = 1, TCDF = 0.1というTEF値に従った反応を示す遺伝子を抽出するために、TCDDの0, 1, 3 μ g/kg群から成る3×5のSurfaceとTCDFの0, 10, 30 μ g/kg群から成る3×5のSurfaceを用意した。そして、この3×5のSurface同士について、上述のtmfアルゴリズムにより類似度を計算し、類似性の十分に高い遺伝子のリストを得た。次にコピー数が同等であるか、反応が投与依存的変動として生物学的蓋然性があるかを3×5および5×5のSurfaceにより確認し、TEFに忠実に従うTEF依存遺伝子(図1, 2)を約140, 従わないTEF非依存遺伝子を約20得た。TEFに従うと判定

された遺伝子群を、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Inc.)により既知情報と照合するとAhRの下流の第1相代謝酵素やNrf2下流の第2相代謝酵素を中心に、AhRを中心としたPathwayの構成要員であることが示され(図3)、上述したTEFについて現在想定されている分子背景に合致するものであった。従わない遺伝子についても、5×5のSurface同士を比較し、TCDDとTCDFで反応のパターンが異なるもの、および類似していてもTEF値の10倍差を説明できないもの、すなわち、TCDFが同等あるいはより強い反応を示すものを抽出した(図4)。TEF非依存遺伝子群は既知情報との照合で予想どおりAhRを含まないPathwayを描き出した(図5)。 *In silico* プロモーター解析ソフトウェア(Genomatix Software GmbH)に甘い条件で遺伝子リストを投入した結果、すべてに共通するものとして多数のエレメント、例えば、E2F, EKL, ETS, HES, NR2, RXR, SP1, TBPなどのファミリーが見いだされたが、AhR結合配列は抽出されなかった。さらに、非依存遺伝子のうちTCDF優位の5遺伝子を絞り込みパスウェイ解析を行った結果、TNFを中心とし、ESR1やABCA1を含むネットワークが描かれ、 *in silico* プロモーター解析では5遺伝子に共通するものとしてETSファミリーとRXRファミリーの結合部位が選択された(図6)。ETSはERK/MAPKシグナル系の下流に位置し、その1つであるETS2の強制発現系の実験などからp53系を介する胸腺系のアポトーシス、あるいはダウン症候群との関連性などが指摘される。これらの既知情報ベースの解析結果は限られた共通の公開情報源を基にしているため、概して同じリストに収束する。しかし、得られたリストのうち、この検索に投入しなかった遺伝子(図5中の灰色)について、再度Surfaceを吟味すると選定基準ぎりぎりでは排除されていた遺伝子が見つかる。ここでは、図5中のTgfb1 (transforming growth factor beta 1), Hspa1a (heat shock protein 1A), およびFdft1 (farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1)が該当する。このような既知情報と実際のデータとの往復が、データ解釈の向上と今後の検証実験の計画立案に役立つものと見込まれる。

おわりに

このTCDDとTCDFの実験結果の比較によるダイオキシン類化合物の生体影響に関わる分子メカニズム解析はいまだ途上にあり、追加としてAhRノックアウトマウスを用いた投与実験やChIP(クロマチン免疫沈降)解析などによる確認作業が考えられる。ここでは、Percllome Projectの投与実験の組み合わせと、それらに対するPercllome法の利点を生かした網羅的な解析が、環境化学物質をはじめとする外来性化学

物質 (Xenobiotics) の生体影響に関する分子生物学的メカニズム解明研究のユニークな糸口を提供する手段としても利用可能であることを示すことができたと考える。誌面の都合上、他に譲るが、ヒトに対する催奇形性があり使用禁止となっていたが、癌や難治性炎症性疾患の治療薬として再登場したサリドマイドについて、成獣雄マウスの肺に及ぼす影響と経胎盤的にマウス胎仔に及ぼす影響とを Percellome 解析により対比すると、間葉系成分に対する共通の抑制シグナルの存在が示唆される事例を見いだした。異なったプロトコルで異なった組織に対して行われた実験の間でも、このように共通のメカニズムを抽出しうる可能性を見ており、今後の複合的展開に大きな期待を抱いているところである。今後、本法の利点を生かした解析をさらに進めるとともに、データ・

解析ツールの公開Webサイトの充実、および、実験のみならずデータ解析・データマイニングについての共同研究を含めた展開を加速させていきたい。

謝辞 本Percellome Projectの遂行にあたっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻昌貴、森田紘一、今井あや子、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、近藤優子、青柳千百合、相原妃佐子、渡辺忍の各氏の卓越した働きに深謝する。三次元Surface可視化およびそれを用いた解析ツール群のアルゴリズム開発は共筆者の相崎健一主任研究官による。データベース関連、MADIC実装などのIT開発はNTTコムウェア、日本NCR (日本テラデータ) との共同研究に負うところ大である。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012, H13-生活-013, H14-トキシコ-001, H15-化学-002, H18-化学-一般-001などによる。

文献

- 1) Kanno J, et al: BMC Genomics (2006) 7: 64
- 2) 菅野 純ら: 細胞工学 (2004) 23: 685-693
- 3) 菅野 純ら: 細胞工学 (2007) 26: 71-77
- 4) Matsumoto S, et al: Genome Informatics (2005) 16: 183-194
- 5) 相崎健一ら: 細胞 (ニュー・サイエンス社), 印刷中
- 6) Van den Berg M, et al: Toxicol Sci (2006) 93: 223-241

特集 環境化学物質の作用メカニズムを解き明かす

重金属汚染による生物攪乱作用の分子基盤

Molecular Targets of Organotin Compounds in Endocrine Disruption

中西 剛 西川淳一

Tsuyoshi Nakanishi, Jun-ichi Nishikawa

重金属は生物に対し強い毒性を示すものが多いが、一般的にこのような低分子化合物の毒性は作用点が多岐に渡っており、分子レベルでの毒性発現機構の解明は困難であることが多い。一方で、近年の内分泌攪乱物質問題で話題となった有機スズ化合物は、貝類などの特定の生物種に特徴的な生殖毒性を誘引するが、最近、有機スズ化合物が核内受容体であるRXRやPPAR γ の強力なアゴニストとして作用することで、その毒性を発揮することが明らかとなってきた。本稿では、有機スズ化合物の核内受容体を介した生物攪乱作用について概説する。

key words

有機スズ, アロマトラーゼ, インボセックス, RXR, PPAR γ , 内分泌攪乱

i 中西 剛 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野 E-mail: nakanishi@phs.osaka-u.ac.jp
1998年3月大阪大学大学院薬学研究科修了(薬学博士)後、同年4月より助手として現研究室に着任。2007年4月より助教。

西川淳一 武庫川女子大学薬学部 衛生化学研究室 E-mail: nisikawa@mukogawa-u.ac.jp
1987年3月大阪大学大学院薬学研究科修了(薬学博士)、2007年4月より教授として現研究室に着任。

はじめに

重金属は生物に対し強い毒性を示すものが多く、鉱山や工場、産業廃棄物などから排出される重金属が、しばしば水源や土壌などの環境中に放出されてヒトの健康に影響を与えるなど、公害の原因となったりする。我々日本人にとって重金属毒性と言えば、おそらく多くの人がタイタイ病や水俣病といった公害を思い浮べるだろう。現在では、これら公害は過去に起こった歴史上の出来事であり、その作用機構の解明を含め、すでに解決した問題であるかのように認識されているかもしれない。しかしながら、低分子化合物の毒性発現には多くの分子や作用が関わっていると考えられ、その分子レベルでの作用機構解明は一般的に非常に困難である。タイタイ病や水俣病においても、これらの原因物質がカドミウムやメチル水銀であることは明らかとなっているが、その分子レベルでの毒性発現機構について解明されたとは言いがたいのが現状である。

一方で、近年話題となった内分泌攪乱物質 (endocrine disrupting chemical; EDC) 問題においても、船底塗料や漁網防汚剤などに使用されてきたトリブチルスズ (tributyltin; TBT) やトリフェニルスズ (triphenyltin; TPT) に代表される有機スズ化合物 (図1) が、貝類に対してではあるものの、極低濃度で雌を雄性化し、繁殖不能にする状態 (インボセックス) を誘導する^{1)~3)}ことから、ヒトを含めた生物へのEDC作用が懸念されてきた。このような有機スズ化合物の貝類への影響は、EDC問題が提唱される以前から問題視されていたが、EDC問題が社会問題化してか

らは、有機スズ化合物の性ステロイドホルモンの受容体や合成経路に対する影響を中心に研究が行われてきた。これまでも有機スズ化合物の毒性発現機構については様々な仮説が提唱されてきたが、有機スズ化合物においても他の重金属化合物と同様に、インボセックスの分子メカニズムやそれ以外の生物への毒性発現作用については不明な点が多く残されていた。しかしながら最近、これらの有機スズ化合物については、その毒性発現に関わる分子メカニズムが明確化しつつある。本稿では、有機スズ化合物の生物攪乱作用とその分子メカニズムについて、筆者らが最近得た知見を含めて紹介したい。

I. 有機スズ化合物のアロマトラーゼ阻害説

有機スズ化合物は、スズ原子にアルキル基やフェニル基が共有結合する構造を有し、官能基が1個結合するモノ体から4個結合するテトラ体まで多くの化合物から構成される人工化合物群である (図1)。これらの有機スズ化合物は、プラスチックの可塑剤や化学反応の触媒として各種化学工業で使用されるとともに、その殺生物能を利用して農薬や木材防腐剤、船底塗料、漁網防汚剤として使用されてきた。しかしながら、世界各地でこれらの化合物の水域汚染 (主に海洋汚染) が顕在化し、また有機スズ化合物が貝類の雌に対してペニス様の突起を発生させるインボセックスを誘導することが明らかとなってからは、有機スズ化合物の水棲生態系へのみならず、汚染した海産物を食したヒトへの影響も問題視されるようになってきた。さらに有機スズ化合物は、元来毒性が強いことから、比較的古くから哺乳動物に対し

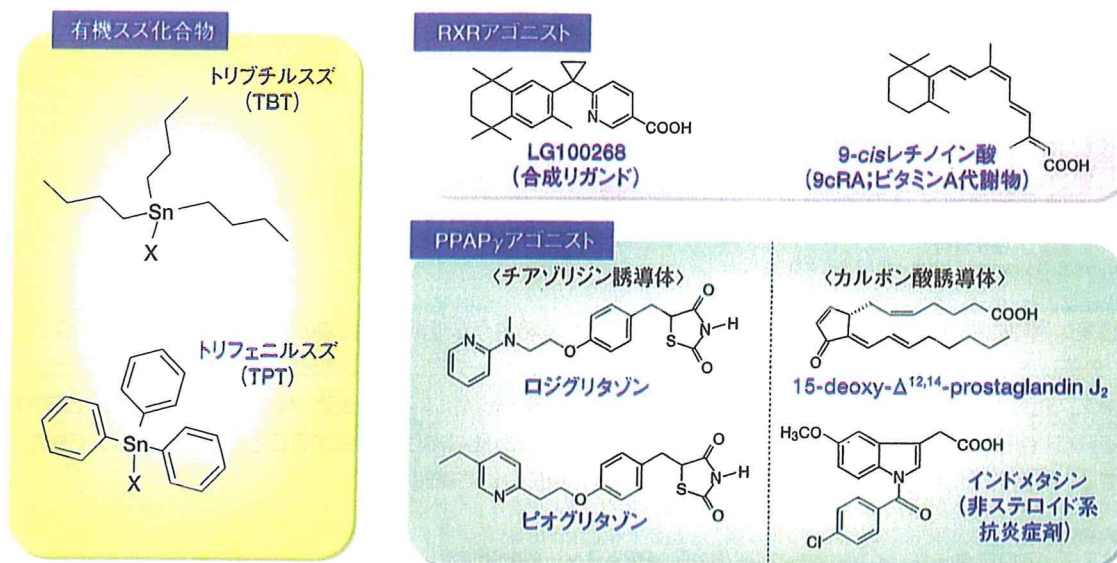


図1. RXR, PPAR γ アゴニストと有機スズ化合物の化学構造

TBTやTPTなどの有機スズ化合物は、スズ原子(Sn)にアルキル基やフェニル基が共有結合する構造を有している。官能基が1個結合するモノ体から4個結合するテトラ体まで存在している。RXRアゴニストは、一般的に極性官能基と疎水性炭化水素基をリンカーで連結したような構造を有しているが、有機スズ化合物はそのような構造を有していない。またPPAR γ アゴニストであるインスリン抵抗性糖尿病治療薬のようなチアゾリジンジオン構造も有していない。

て神経毒性や免疫毒性などを示すことが知られていた⁴⁾が、その毒性発現機構についてはこれまでに統一した見解は得られていない。

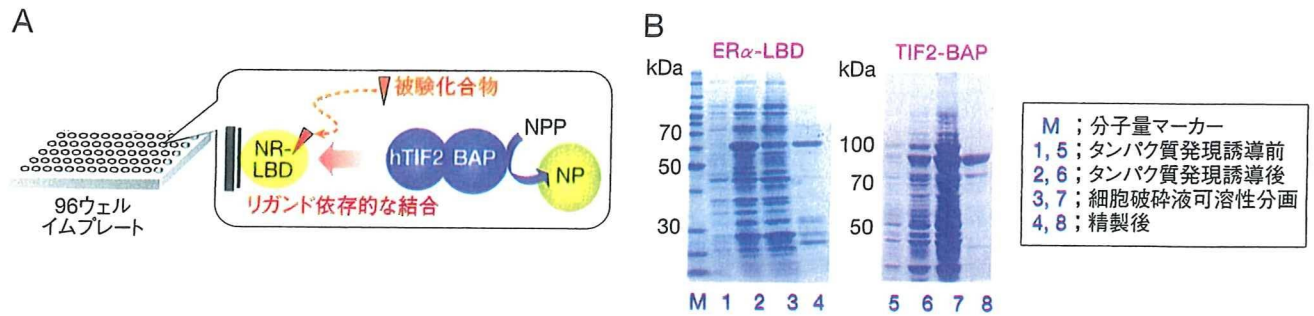
一方で、有機スズ化合物の毒性発現には、いくつかのユニークな点が認められる。それは、①特定の生物種(貝類)に対して明確な生殖異常(インボセックス)を誘導する、②EDC問題においては、大部分の化合物が雌性化またはエストロゲン様作用が疑われているのに対し、雄性化作用が疑われている、③雄性化作用が疑われているが、エストロゲンレセプター(estrogen receptor: ER)やアンドロゲンレセプター(androgen receptor: AR)にはまったく親和性を示さない、④非特異的な細胞毒性を示す濃度よりも、かなり低濃度でインボセックスを誘導する、という点である。有機スズ化合物のインボセックスにおけるメカニズムについては様々な仮説が提唱されているが、②や③の観点から、有機スズ化合物はホルモンレセプターに直接作用するのではなく、ステロイドホルモン代謝に影響を与えることで誘導されるという説が有力視されていた^{1), 2)}。

エストロゲンおよびアンドロゲンは、コレステロールを出発物質とし、モノオキシゲナーゼであるシトクロムP450と水酸基またはケト基の酸化または還元を触媒する脱水素酵素により生成されるが、有機スズ化合物はアンドロゲンからエストロゲンへの変換酵素であるアロマターゼの活性を阻害するのではないかと考えられた(図2)。すなわち、アロマターゼの酵素活性を阻害することで、体内のエストロ

ゲン濃度の上昇を抑制し、アンドロゲンの濃度を上昇させる結果、雄性化を引き起こすのではないかとという“アロマターゼ阻害説”である²⁾。では、有機スズ化合物は本当にアロマターゼの活性を阻害するのであるだろうか？

CookeやHeidrichらのグループは、ヒトアロマターゼタンパク質を用いて、TBTがアロマターゼ活性を基質競合的に阻害することを報告している^{5), 6)}。筆者らもヒト絨毛細胞株のミクロソーム分画を用いて、同様の検討を行ったが、確かにTBTおよびTPTともにアロマターゼの活性を阻害する⁷⁾。しかし、いずれの実験においても、その作用濃度は数 μ M~数十 μ Mとかなり高濃度であり、通常の動物細胞は完全に死滅する濃度である⁷⁾。またこの他にも、高濃度のTBTおよびTPTが、アロマターゼ以外のステロイドホルモン合成関連酵素の活性を阻害するという報告が多数存在する^{8), 9)}ことを考慮すると、有機スズ化合物のアロマターゼに対する酵素特異性についてはかなり疑問が残るところである。

インボセックスのアロマターゼ阻害説は、同じ水棲動物である魚類が、性ステロイドホルモンにより雌雄の表現型が決定されることに加え、貝類にTBTを投与すると体内のテストステロン濃度が上昇したり、またテストステロンやアロマターゼ阻害剤などで処理をするとインボセックスが誘導されるという結果に基づいている^{1), 2)}。しかしながら、同じ水棲動物でもステロイドホルモンの生理的意義は、脊椎動物と無脊椎動物では大きく異なっていると考えられており、少なくとも無脊椎動物においては、古典的ステロイド

図3. CoA-BAP法¹⁴⁾

A: CoA-BAP (coactivator-bacterial alkaline phosphatase) 法概念図。核内受容体のリガンド結合領域 (LBD) にアゴニストが結合したときに、コアクチベーターが結合できるようになる性質を利用している。精製したGST (glutathione-S-transferase) と核内受容体 (NR) のLBDの融合タンパク質 (NR-LBD) をGSH (glutathione) で固相化したマイクロプレートのウェルに、コアクチベーターであるTIF2とBAP (bacterial alkaline phosphatase) の融合タンパク質 (TIF2-BAP) および被験化合物を加え、一定時間反応させる。被験化合物が核内受容体アゴニストとして機能する場合には、TIF2がNR-LBDに結合し、TIF2とBAPの融合タンパク質がウェル内に留まる。反応後、未反応の融合タンパク質を除き、BAPの基質であるNPP (*p*-nitrophenyl phosphate) を加える。NPPは無色であるが、BAPによって黄色の*p*-nitrophenolへと変換される。被験化合物の核内受容体に対する親和性が強いほどウェルに留まるTIF2とBAPの融合タンパク質は増加するため、*p*-nitrophenolによる発色の程度によって、被験化合物の核内受容体に対するアゴニスト活性を評価することができる。**B**: ER α に対する評価系を作成した際に用いた精製タンパク質の電気泳動像。**C**: 構築したER α に対する評価系におけるエストラジオールの反応性。

トとするRXR (retinoid X receptor) と、インスリン抵抗性糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体をアゴニストとするPPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) のアゴニストとしての作用を有する可能性を見いだした¹⁵⁾。これらの知見をもとに、ヒトやマウスの細胞を用いた検討を行ったところ、TBTとTPTは各受容体を介する転写を活性化し、そのEC₅₀は10~20nMであった^{12), 15)}。また、精製タンパク質を用いた各受容体のLBDに対する解離定数の検討においては、RXR α , β , γ に対しては既知のアゴニストである9cRAの各々約5, 15, 11倍¹²⁾、PPAR γ に対してはチアゾリジン誘導体であるロジグリタゾンとほぼ同等であった (中西ら; 未発表データ)。既知のPPAR γ やRXRアゴニストとは構造がまったく異なるTBTやTPTが、これほどまでに強力なアゴニスト活性を示すのは驚きである (図1)。さらにTBTやTPT以外の有機スズ化合物についても検討を行ったところ、スズ原子に結合している官能基の構造や官能基の数によって、各受容体に対する転写活性化能や親和性が変動し、そのアゴニスト活性には明確な構造相関が認められた¹²⁾。

有機スズ化合物のこのようなアゴニスト活性が与える細胞機能への影響についても検討を行った。PPAR γ とRXRは互いにヘテロ二量体を形成し、各々のアゴニスト依存的に転写を活性化することで、支配遺伝子の発現や脂肪細胞分化を誘導するが、TBTとTPTは前述の結果を反映して、マウスの脂肪細胞分化をPPAR γ /RXRの支配遺伝子の発現

上昇を伴って誘導することも確認された¹⁵⁾。では、ヒト胎盤に対する影響はどうであろうか? ヒト絨毛細胞株に、PPAR γ アゴニストを添加しても、アロマターゼのmRNA発現や胎盤型のアロマターゼプロモーターの転写活性には影響は認められない¹²⁾。このことは、ヒト胎盤のアロマターゼの発現にはPPAR γ /RXRは関わっていないことを示唆している。しかしながら、RXR特異的アゴニストを添加した場合には、ヒト絨毛細胞株のアロマターゼ発現が上昇するうえ、胎盤型のアロマターゼプロモーターの活性も上昇する¹²⁾。RXRは、PPAR γ 以外にもPPAR α , PPAR β , FXR (farnesoid X receptor), LXR (liver X receptor) とともにヘテロ二量体を形成したり、またRXR自身でホモ二量体も形成する。これらの二量体も、PPAR γ /RXRと同様にRXRアゴニストで転写が活性化されるが、胎盤のアロマターゼ発現には前述のヘテロ二量体は関与していない¹²⁾。したがって、RXRアゴニストによるヒト胎盤でのアロマターゼ発現誘導は、RXRホモ二量体を介した作用であると考えられる。このことは、有機スズ化合物によるアロマターゼの発現誘導においても同様であり、有機スズ化合物はRXRホモ二量体を介して、ヒト胎盤のアロマターゼ発現を誘導するものと考えられる (図4)¹²⁾。

IV. 核内受容体を介した有機スズ化合物の毒性

冒頭にも述べたとおり、有機スズ化合物は前述のEDC作用以外にも様々な毒性を誘導することが報告されているが、

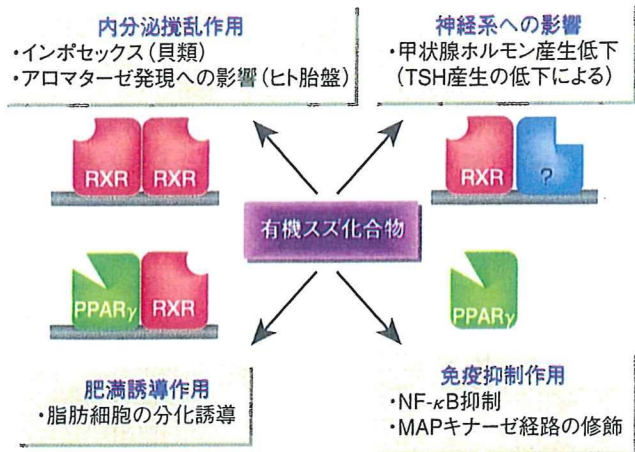


図4. 核内受容体を介した有機スズ化合物の様々な生物攪乱作用
 有機スズ化合物はPPAR γ やRXRを介することで、これらの受容体を有する動物に様々な影響を与える可能性がある。

これらの毒性発現においてもPPAR γ やRXRが関わっている可能性がある(図4)。TBTは、ラットにおいて甲状腺刺激ホルモン(thyroid stimulating hormone; TSH)の産生低下を伴う甲状腺機能低下症を引き起こすことが報告されている⁴⁾が、その一方で、RXR特異的アゴニストがマウスやラットにおいて同様の作用を引き起こす¹⁶⁾ことから、TBTによるTSHや甲状腺ホルモンの産生低下はRXRを介して誘導されている可能性が考えられる。また有機スズ化合物は、免疫抑制作用やアレルギー反応の誘導などの免疫毒性も有する⁴⁾が、PPAR γ が転写制御因子であるNF- κ B(nuclear factor- κ B)の転写活性を抑制したり、MAPキナーゼ(mitogen-activated protein kinase)経路によるシグナル伝達を修飾したりすることで、免疫担当細胞のサイトカイン産生などに影響を与えることが報告されている¹⁷⁾ことから、有機スズ化合物による免疫毒性においてはPPAR γ が関わっている可能性が考えられる。さらに有機スズ化合物は、前述のとおり、PPAR γ /RXRを介してマウスの脂肪細胞分化を誘導する¹⁵⁾が、妊娠マウスにTBTを投与すると胎仔の肝臓などで脂肪組織の過形成が認められることも報告されていることから、最近では肥満誘導因子として作用する可能性も指摘されている¹⁸⁾。これらの知見は、有機スズ化合物がPPAR γ やRXRを介することで、これらの受容体を有する動物に様々な影響を与える可能

性があることを示唆している。

V. インボセックスとRXR

RXRは、核内受容体ファミリーの中でも例外的に種を超えて保存されている受容体であり、昆虫類などの下等無脊椎動物においてもUSP(ultraspiracle)と呼ばれるオルソログが存在する。しかしながら、これら受容体のLBDは動物種によって大きく異なり、哺乳動物の内因性アゴニストとされている9cRAなどに対してUSPは応答しない。その一方で、最近イボニシなどの貝類においては、脊椎動物のRXR-LBDと相同性の高いRXRが存在することが報告された(図5)^{19), 20)}。これらの貝類のRXRは、ヒトのRXRと同じく9cRAや有機スズ化合物と高い結合能を有する。また興味深いことに、これらの貝類に9cRAを投与すると、有機スズ化合物と同様にインボセックスが誘導されることから(図5)、貝類のインボセックスはRXRを介して誘導されている可能性が示唆された(図4)^{19), 20)}。有機スズ化合物を妊娠マウスなどに投与しても、インボセックスのような表現型は認め

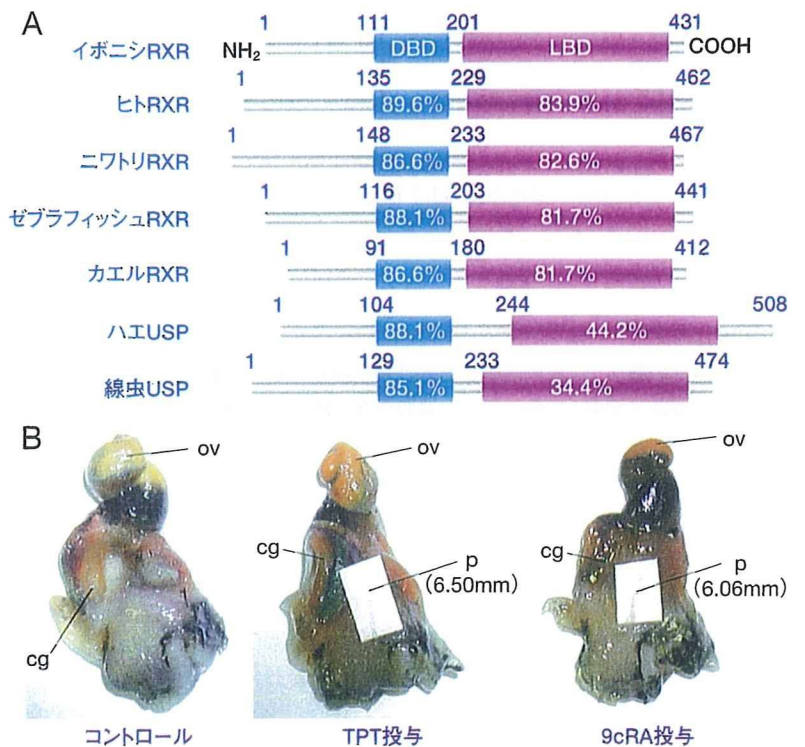


図5. 貝類のRXRと9cRAによるインボセックスの誘導

A: 様々な生物種におけるRXR(USP)の構造の比較。すべての生物種においてDNA結合領域(DBD)の相同性は高いが、LBDの相同性はRXRとUSPでは大きく異なる。
 B: 9cRAとTPTによるイボニシのインボセックスの写真。各被験物質(1 μ g/g wet wt.)をそれぞれ足部に注射して、人工海水中で1カ月間飼育後、取り上げて解剖した。ペニス部分には、ペニスを際立たせるために白い紙をのせている。cg; capsule gland(卵嚢腺), ov; ovary(卵巣), p; penis(ペニス: 数値はペニス長)。Nishikawa J, et al: Environ Sci Technol (2004) 38: 6271-6276 を一部改変。
 写真提供: 国立環境研究所 堀口敏宏先生

られないが、おそらくそれは、生殖器官形成などにおけるRXRの生理的意義が、生物種によって大きく異なるからであると考えられる。

おわりに

本稿では、有機スズ化合物の貝類とヒトアロマトーゼへの影響を中心に、その分子メカニズムについて概説した。有機スズ化合物は、EDC作用が疑われている化学物質の中でも、きわめて低濃度で明確なEDC作用を誘導するが、それは核内受容体アゴニストとして作用することに起因することが明らかとなった。本来アゴニストとなることを意図されていない合成化学物質が、このように生理的アゴニストや合成アゴニストに匹敵するような影響を示す例はきわめ

てまれである。有機スズ化合物は、生物種によって誘発する表現型は異なるものの、様々な生物種に対してRXRまたはPPAR γ を介した毒性を引き起こす可能性が考えられる。今後は、PPAR γ やRXRなどの核内受容体に対する化学物質の作用や、様々な生物種におけるこれらの核内受容体の生理的意義を解明することによって、有機スズ化合物の生物攪乱作用がより明確になることを期待したい。

謝辞 本稿で紹介した成果は、大阪大学大学院薬学研究科 田中慶一先生（現・大阪大谷大学薬学部）のご指導とご助言により成し遂げられた成果であり、ここに深謝致します。また、研究を遂行してくれた廣森洋平君をはじめとする多くの学生に深謝致します。本稿を執筆するにあたり、イボニシの写真のご提供を賜りました国立環境研究所 堀口敏宏先生に深謝致します。

文献

- 1) Matthiessen P, et al: Environ Toxicol Chem (1998) 17: 37-43
- 2) Bettin C, et al: Helgol Meeresunters (1996) 50: 299-317
- 3) Horiguchi T, et al: Environ Pollut (1997) 95: 85-91
- 4) Benya TJ: Drug Metab Rev (1997) 29: 1189-1284
- 5) Cooke GM: Toxicol Lett (2002) 126: 121-130
- 6) Heidrich DD, et al: Steroids (2001) 66: 763-769
- 7) Nakanishi T, et al: J Clin Endocrinol Metab (2002) 87: 2830-2837
- 8) Doering DD, et al: Steroids (2002) 67: 859-867
- 9) Lo S, et al: J Steroid Biochem Mol Biol (2003) 84: 569-576
- 10) Escriva H, et al: Proc Natl Acad Sci USA (1997) 94: 6803-6808
- 11) Shozu M, et al: J Clin Endocrinol Metab (1991) 72: 560-566
- 12) Nakanishi T, et al: Mol Endocrinol (2005) 19: 2502-2516
- 13) Nakanishi T, et al: Biochem Pharmacol (2006) 71: 1349-1357
- 14) Kanayama T, et al: J Biochem (Tokyo) (2003) 133: 791-797
- 15) Kanayama T, et al: Mol Pharmacol (2005) 67: 766-774
- 16) Macchia PE, et al: Am J Physiol Endocrinol Metab (2002) 283: E326-331
- 17) Zhang X, et al: Int Immunopharmacol (2002) 2: 1029-1044
- 18) Grun F, et al: Mol Endocrinol (2006) 20: 2141-2155
- 19) Nishikawa J, et al: Environ Sci Technol (2004) 38: 6271-6276
- 20) Castro LF, et al: Aquat Toxicol (2007) 85: 57-66

for beginners

本稿では誌面の都合上、核内受容体の転写調節機能に関する基本的な事項の説明については割愛したが、以下の総説を参考にされたい。
・「核内受容体と創薬」山岡一良ら：実験医学（増刊）24: 152-160 (2006)