

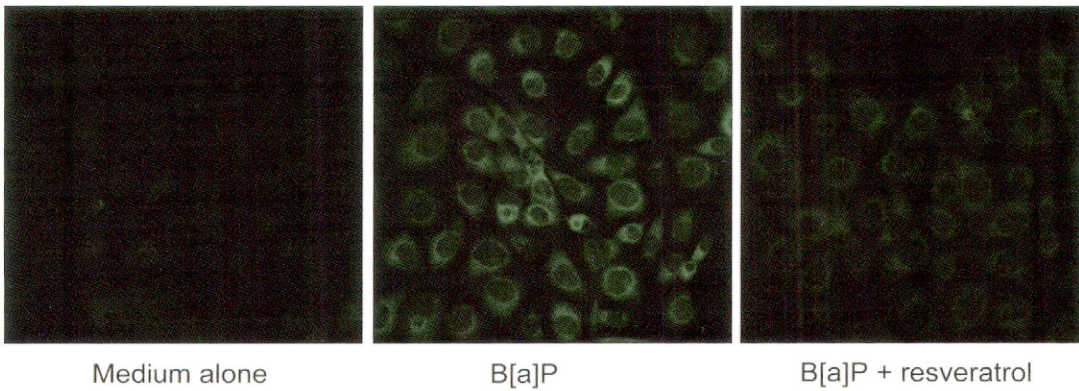
cells induces MUC5AC via reactive oxygen species (ROS) production. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010 (in press)

2、学会発表

千葉貴人、辻 学、内 博史、師井洋一、古江増隆 ベンゾピレンによるヒト気道上皮からのムチン産生機構 アレルギー・好酸球研究会 2010.6.19 (東京)

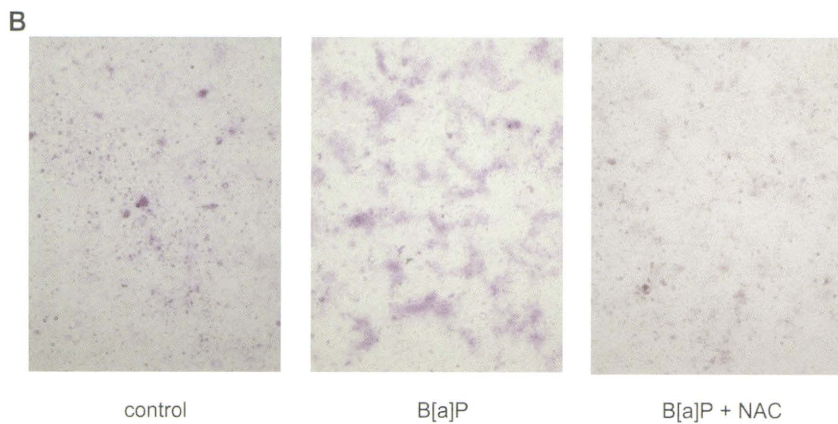
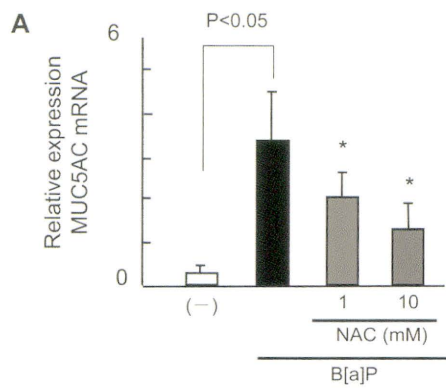
参考文献

1. 小栗一太他：油症研究 30 年の歩み 2004
2. Baginski TK, Dabbagh K, Satjawatcharaphong C, Swinney DC. Cigarette smoke synergistically enhances respiratory mucin induction by proinflammatory stimuli. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 165-174
3. Wong PS, Vogel CF, Kokosinski K, Matsumura F. Arylhydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 42: 210-217
4. Sprenger L, Goldmann T, Vollmer E, Steffen A, Wollenberg B, Zabel P, Hauber HP. Dexamethasone and N-acetyl-cysteine attenuate *Pseudomonas aeruginosa*-induced mucus expression in human airways. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010 (in press)
5. Mata M, Ruíz A, Cerdá M, Martínez-Losa M, Cortijo J, Santangelo F, Serrano-Mollar A, Llombart-Bosch A, Morcillo EJ. Oral N-acetylcysteine reduces bleomycin-induced lung damage and mucin Muc5ac expression in rats. *Eur Respir J.* 2003; 22: 900-905



Medium alone B[a]P B[a]P + resveratrol

B[a]P: AhR アゴニスト
Resveratrol : AhR アンタゴニスト
図 1



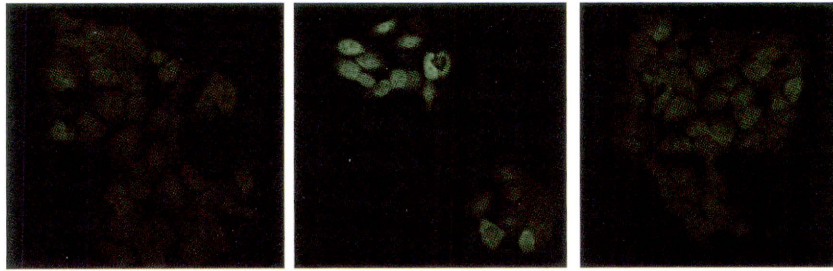
(*p < 0.05 vs. B[a]P alone)

B[a]P: AhR アゴニスト

NAC : 抗酸化剤

図 2

B



Scrambled siRNA

Scrambled siRNA

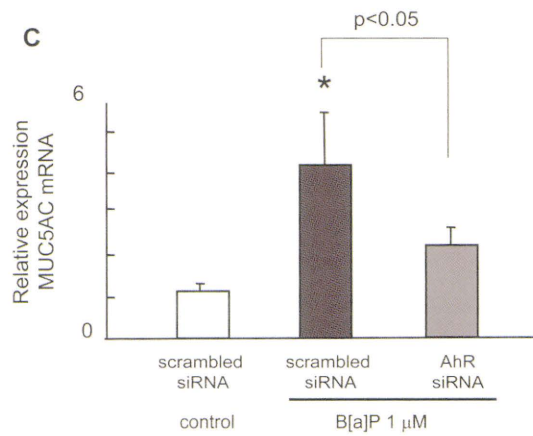
AhR siRNA

control

B[a]P 1 μ M

B[a]P 1 μ M

C



B[a]P:AhR アゴニスト

Scrambled siRNA:通常 NCI-H₂₉₂ 細胞

AhR siRNA:AhR ノックアウト NCI-H₂₉₂ 細胞

図 3

分担研究報告書

ヒト表皮細胞におけるケトコナゾールによる AhR を介した Nrf2 活性化による抗炎症作用

研究分担者 古江 増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 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
 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
 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

研究要旨 我々は、抗真菌薬であるケトコナゾール (ketoconazole: KCZ) に抗炎症作用があることに着目し、そのメカニズムについて研究を行ってきた。前年度の研究報告で、ヒト表皮細胞において KCZ はダイオキシン類の受容体である aryl hydrocarbon receptor (AhR) の核内移行を誘導し、AhR signaling を活性化することを報告した。さらに、KCZ は AhR 依存性に解毒性酵素を誘導する Nrf2 を活性化することを報告し、ダイオキシン類による酸化ストレスを軽減する可能性を示した。本年度は、KCZ によるこれらの効果を検証し、また炎症性サイトカイン (TNF- α) による酸化ストレスに対する効果について検討を行った。KCZ は、タバコに含まれるダイオキシン類であるベンゾピレン (benzo(a)pyrene: BaP) による活性酸素の産生を抑制し、BaP 誘導性の IL-8 (炎症反応に関わるケモカイン)、8-OHdG (DNA 障害のマーカー) 産生を抑制した。さらに TNF- α 誘導性の活性酸素の産生、IL-8 の産生も抑制した。TNF- α 誘導性の酸化ストレスを軽減するメカニズムについては、RNA 干渉によって AhR、Nrf2 の発現が抑制されたヒト表皮細胞では、KCZ はその抑制効果を発揮しないことから、AhR と Nrf2 が重要である可能性が示唆された。これらの結果は、AhR を介した Nrf2 活性化による抗炎症作用というメカニズムを示すものであり、このメカニズムを発揮する薬剤・化学物質を検証していくことで、ダイオキシン類を含め様々な要因による酸化ストレスに効果のある薬剤の開発につながるものと考えられる。

A. 背景と目的

前年度の研究成果で、抗真菌薬であるケトコナゾール (ketoconazole: KCZ) は、ダイオキシン類の受容体である aryl hydrocarbon receptor (AhR) の核内移行を誘導し、AhR signaling を活性化することを報告した。さらに、KCZ は AhR 依存性に解毒性酵素を誘導する Nrf2 を活性化することを報告し、ダイオキシン類による酸化ストレスを軽減する可能性を示した。

本年度は、まず KCZ によるダイオキシン類による酸化ストレスの軽減効果を検証した。具体的には、タバコに含まれるダイオキシン類であるベンゾピレン (benzo(a)

pyrene: BaP) によって活性酸素を誘導し、これに対する KCZ の抑制効果を確認した。また、BaP 誘導性の IL-8 (炎症反応に関わるケモカイン) 及び 8-OHdG (DNA 障害のマーカー) に対する抑制効果を検証した。

次に、炎症性サイトカインによる酸化ストレスに対して KCZ が抑制効果を発揮するかを検討した。具体的には、代表的な炎症性サイトカインである TNF- α によって活性酸素及び IL-8 の産生を誘導し、KCZ がこれらを抑制するかを検討した。さらに、KCZ による抑制効果が AhR・Nrf2 によるものかを確かめるため、RNA 干渉によってこれらの発現を抑制したヒト表皮細胞を用

いて検証を行った。

B. 研究方法

○ 使用した薬剤

BaP 及び 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、BaP と KCZ の最終濃度は、 100nM ~ $1\mu\text{M}$ 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。

○ 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。

○ H2DCF による細胞内活性酸素の測定

H2DCF を加えて細胞内の活性酸素を測定した。H2DCF は細胞内に活性酸素が存在すると、 450nm 波長で励起する化合物を生じるため、これを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

○ ELISA 法による 8-OHdG、IL-8 産生の測定

8-OHdG は 8-OHdG ELISA kit (日本加齢制御研究所社) を用いて、細胞溶解液中の濃度を測定した。IL-8 は、培養液を回収し IL-8 ELISA kit (invitrogen 社) を用いて測定を行った。

○ ウェスタンブロット

ヒト表皮細胞より蛋白の抽出を行った。BCA 法で、各群の蛋白濃度を測定し、 $20\mu\text{g}$ 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 (Santa cruz 社)、抗 Nrf2 抗体 (Santa cruz 社) 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。

○ siRNA (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・Nrf2 の siRNA (Ambion 社) 及び Control siRNA (Ambion 社) 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。siRNA の導入効率は、ウエスタンブロット法で確認した。(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

KCZ は BaP 誘導性の活性酸素、IL-8、8-OHdG の産生を抑制した

ヒト表皮細胞に BaP ($1\mu\text{M}$) を 24 時間投与すると活性酸素の産生が認められた (図 1 b)。しかしながら、KCZ を 48 時間前投与したヒト表皮細胞では、この BaP による活性酸素の産生は抑制された (図 1 c)。さらに、ヒト表皮細胞に BaP ($1\mu\text{M}$) を 24 時間投与すると、培養液中の IL-8、細胞内の 8-OHdG の産生が誘導されるが、これらは KCZ を 48 時間前投与することで、KCZ の用量依存性に抑制が認められた (図 1 d, e)。なお、KCZ 単独投与による活性酸素、IL-8 及び 8-OHdG の産生の増加は認められなかった。

KCZ は AhR 及び Nrf2 依存性に TNF- α 誘導性の活性酸素、IL-8 の産生を抑制した

ヒト表皮細胞に TNF- α (50ng/ml) を 3 時間投与すると活性酸素の産生が認められた (図 2 b)。しかしながら、KCZ を 48 時間前投与したヒト表皮細胞では、この TNF- α 誘導性の活性酸素の産生は抑制が認められた。さらに、この KCZ による抑制は、AhR 及び Nrf2 の発現を siRNA のトランスフェクションによって低下させた細胞ではキャンセルされ、これらの細胞では TNF- α によって活性酸素の産生が認められた。(図 f, g) 培養液中の IL-8 の産生について検討を行ったところ、TNF- α は

IL-8 の産生を増加させたが、KCZ を 48 時間前投与することで、KCZ は用量依存性に IL-8 の産生を抑制した。また、前述した活性酸素の産生と同様に、AhR 及び Nrf 2 の発現を低下させた細胞では TNF- α 誘導性の IL-8 産生に対する KCZ による抑制効果はキャンセルされた。

D. 考察

本年度は、前年度の研究成果を踏まえ、KCZ によって活性化された Nrf 2 がどの程度、抗炎症効果を発揮するかについて評価を行った。

図 1 に示したように、KCZ は BaP 誘導性の酸化ストレスを軽減する可能性が示された。この効果については KCZ が BaP の AhR への結合を競合的に阻害すること、また KCZ が Nrf 2 を活性化することが大きな要因であると考えられる。しかしながら、後者については BaP も同様に Nrf 2 を活性化することが報告されている⁽¹⁾ことから、この実験系では正確に検証を行うことは困難であると考えられる。また、最近の報告では、AhR を不活化させる要素である AhRR (AhR repressor) の存在が指摘されており⁽²⁾、KCZ が AhRR を誘導して BaP による酸化ストレスを抑制している可能性もあり、今後の検討課題であると考えられる。

さらに、本年度は、ダイオキシン類のみならず炎症性サイトカインによる酸化ストレスを KCZ が軽減するかについて検討を行った。TNF- α は代表的な炎症性サイトカインであり、ヒト表皮細胞において活性酸素を産生し、酸化ストレスを生じることが既にヒト表皮細胞では示されている⁽³⁾。図 2 に示すように、KCZ は AhR 及び Nrf 2 の発現を抑制した細胞では TNF- α 誘導性の酸化ストレスに対して抑制効果を示さないことから、AhR 及び Nrf 2 依存性に抗炎症作用を発揮することが明らかとなった。このメカニズムは、AhR を介して Nrf

2 を活性化して抗炎症作用を発揮するという新しいものである。今後、このメカニズムを発揮する薬剤・化学物質を探索・効果検証していくことで、ダイオキシン類を含め様々な要因による酸化ストレスに効果のある薬剤の開発につながるものと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Tsuji G, Takahara M, Uchi H, Takeuchi S, Mitoma C, Moroi Y and Furue M. An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *J Dermatol Sci.* (in press, 2011)

2. 学会発表

(国内学会)

2010 年 1 月 23 日、
第 30 回福岡臨床免疫研究会、福岡市

2010 年 9 月 3-4 日、
第 25 回日本乾癬学会学術大会、宇部市

2010 年 10 月 19 日、
第 156 回福岡アレルギー研究会、福岡市

(国際学会)

2010. 5. 5-8,
Society of Investigative Dermatology
2010 Annual Meeting Atlanta, USA,

2010. 8. 22-27,
14TH International Congress of
Immunology Kobe, Japan,

2010. 9. 12-17,
DIOXIN 2010 San Antonio, USA,

2010. 9. 30-10. 1

The First Eastern Asia Dermatology
Congress, Fukuoka, Japan,

2010. 12. 3-5

The 35th annual meeting of Japanese
Society for Investigative
Dermatology, Wakayama, Japan

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 参考文献

1. Benzo[a]pyrene increases the Nrf2 content by downregulating the Keap1 message. Nguyen PM, Park MS, Chow M, Chang JH, Wrischnik L, Chan WK. Toxicol Sci. 2010 Aug;116(2):549-61.
2. Single and concerted effects of benzo[a]pyrene and flavonoids on the Ahr and Nrf2-pathway in the human colon carcinoma cell line Caco-2. Niestroy J, Barbara A, Herbst K, Rode S, van Liempt M, Roos PH. Toxicol In Vitro. 2011 Jan 20.
3. Reactive oxygen species in tumor necrosis factor- α -activated primary human keratinocytes: implications for psoriasis and inflammatory skin disease. Young CN, Koepke JI, Terlecky LJ, Borkin MS, Boyd Savoy L, Terlecky SR. J Invest Dermatol. 2008 Nov;128(11):2606-14.

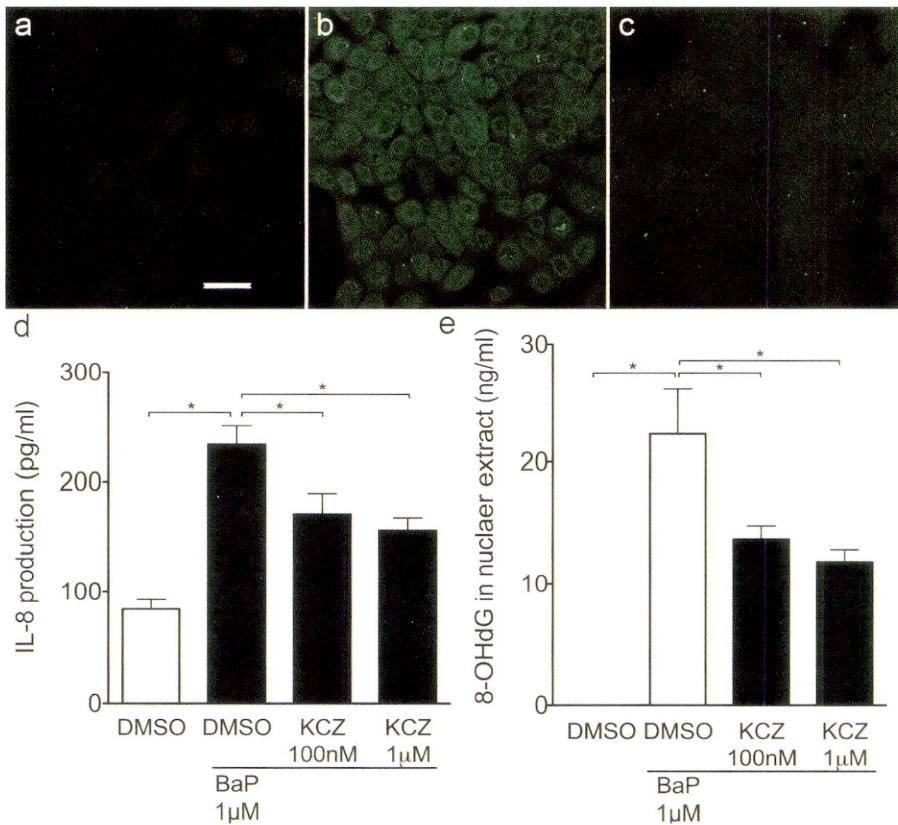


図 1 KCZ inhibited BaP-induced reactive oxygen species-IL-8 production in NHEKs.

After treatment with KCZ (100 nM, 1 μ M) or DMSO (control) for 48 h, normal human keratinocytes (NHEKs) were exposed to BaP (1 μ M) for 24 h. Reactive oxygen species production was evaluated using DCFH-DA. (a) Confocal laser scanning microscopic analysis. Scale bar = 50 μ m. DMSO (control) did not induce reactive oxygen species production in NHEKs. (b) BaP induced reactive oxygen species production in DMSO-treated NHEKs (control). (c) BaP-induced reactive oxygen species production was inhibited in KCZ (100 nM)-treated NHEKs. Data represent experiments repeated three times with similar results (a-c). (d) ELISA for 8-OHdG production in nuclear extract from NHEKs. BaP induced 8-OHdG production in DMSO (control)-treated NHEKs, which was inhibited in KCZ (100 nM, 1 μ M)-treated NHEKs in a dose-dependent manner. * $p < 0.05$. (e) ELISA for IL-8 production in culture supernatant. BaP induced IL-8 production in DMSO-treated NHEKs (control), which was inhibited in KCZ (100 nM, 1 μ M)-treated NHEKs in a dose-dependent manner. Representative results (means in triplicates \pm SD) from three separate experiments are shown (d, e). * $p < 0.05$.

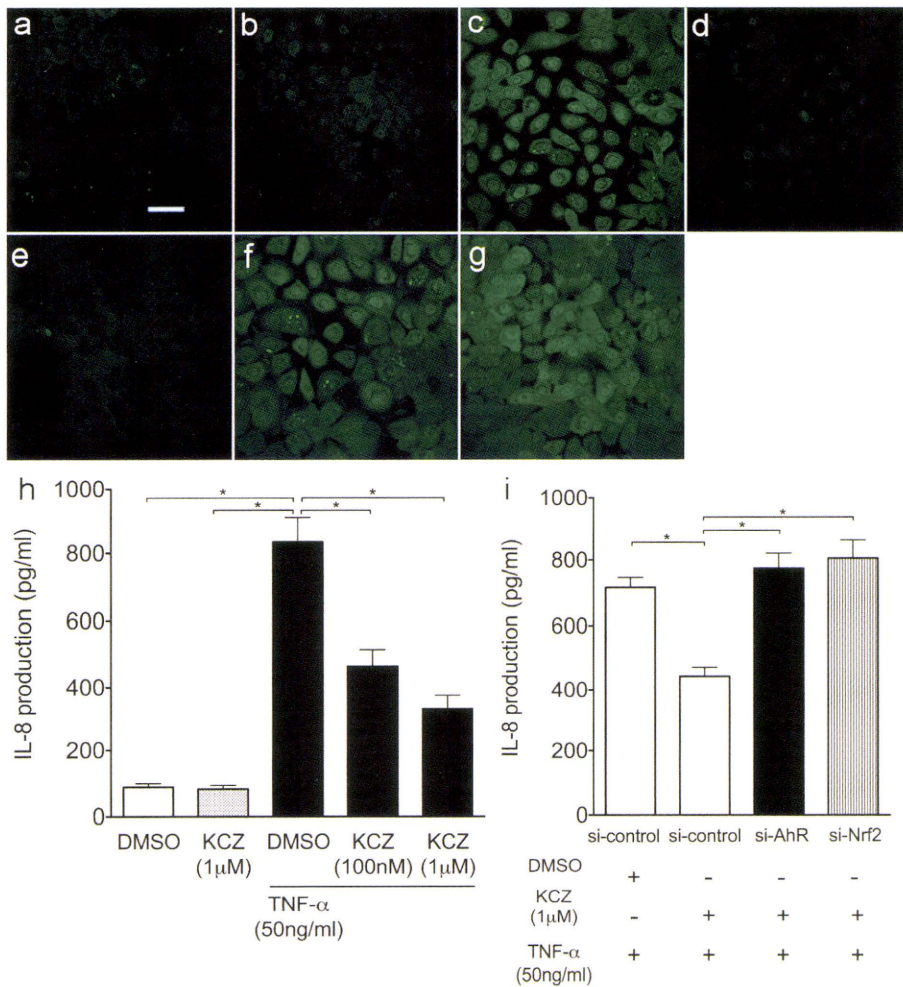


図 2 AhR and Nrf2 accounted for the inhibitory effect of KCZ on TNF- α -induced reactive oxygen species-IL-8 production.

After treatment with DMSO (control) or KCZ (1 μ M) for 48 h, NHEKs were exposed to TNF- α (10 ng/ml) for 30 min. Reactive oxygen species production of NHEKs was evaluated. In NHEKs treated with DMSO (control) (a) or KCZ (1 μ M) alone (b), reactive oxygen species production was undetectable. TNF- α induced reactive oxygen species production in DMSO-treated NHEKs (control) (c) but not in KCZ-treated NHEKs (d). Compared with si-control-transfected NHEKs (e), KCZ-inhibited reactive oxygen species production was restored in si-AhR- (f) or si-Nrf2- (g) transfected NHEKs in the presence of TNF- α . Data represent experiments repeated three times with similar results (a-g).

TNF- α -induced IL-8 production in the culture supernatant was measured by ELISA. After treatment with DMSO (control) or KCZ (100 nM, 1 μ M) for 48 h, NHEKs were exposed to TNF- α (50 ng/ml) for 3 h. (h) TNF- α treatment induced IL-8 production, which was inhibited by KCZ in a dose-dependent manner. * $p < 0.05$. (i) After si-control-, si-AhR- or si-Nrf2-transfected NHEKs were treated with DMSO or KCZ (1 μ M) for 48 h, NHEKs were exposed to TNF- α (50 ng/ml) for 3 h. TNF- α induced IL-8 production in si-control-transfected NHEKs treated with DMSO, which was inhibited by KCZ treatment. However, such inhibition was restored in si-AhR- or si-Nrf2-transfected NHEKs. Representative results (means in triplicates \pm SD) from three separate experiments are shown (h, i). * $p < 0.05$.

分担研究報告書

2,3,4,7,8-PenCDF および 2,3,7,8-TCDD 母体曝露による胎児脳下垂体／性腺・性ホルモン合成系への影響

研究分担者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野 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分野 准教授
 武田 知起 九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野 助教

研究要旨 当研究室のこれまでの研究により、ダイオキシンの一種である 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD: 1 µg/kg) の妊娠ラットへの投与により、胎児脳下垂体ゴナドトロピンの発現が低下し、精巣における性ホルモン合成系が障害されることを既に見出している。本研究では、同様の障害が 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) においても認められるか否かを検証した。妊娠 15 日目の Wistar rat に、PenCDF (1, 2, 5, 10, 15, 25 および 50 µg/kg) あるいは TCDD (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 および 3 µg/kg) を経口投与し、妊娠 20 日目の雄胎児より臓器を摘出し解析を行った。その結果、PenCDF による性ホルモン合成系の低下は 5 µg/kg より有意に観察された。一方、TCDD による障害出現は、0.1 µg/kg より認められ、両者の障害発現に要する用量には少なくとも 20 倍以上の差があることが明らかとなった。このように、PenCDF も TCDD と同様の機構により胎児障害を発現するものの、その効果発現には従来の毒性等価係数では説明できない要因が存在することが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシソ類による毒性は多岐にわたるが、中でも生殖毒性は妊娠期の比較的低用量の曝露により児に生じることから問題が大きい。代表的な生殖毒性としては精子産生能の低下、性周期異常、排卵低下(妊娠率低下)、あるいは性行動障害等が知られている(1)。これらの毒性発現機構としては、性ホルモンあるいはそのレセプターに対する影響を介する機構を推定している研究例が多い。具体的には、性ホルモンレセプターに対する作用を介したシグナル伝達経路への影響(2,3)、性ホルモンレセプターの発現低下(4,5)、あるいはステロイド代謝酵素の誘導(6)等による可能性である。しかし、いずれの機構も毒性に直結するとの証拠までは得られておらず、毒性への寄与はよく理解されていない。

当研究室では、ダイオキシソの生殖毒性

発現機構の解明を目指して研究を行っており、最強のダイオキシソである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 1 µg/kg、経口) の妊娠ラットへの曝露により、胎児脳下垂体において luteinizing hormone (LH) の発現が β サブユニット特異的に低下することを報告した(7)。更に、これを起点として精巣の steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) 等の性ホルモン合成系タンパク質の発現低下ならびに成長後の性行動障害が生じることを実証した(7-9)。しかし、LH や StAR 等の発現に与える障害が TCDD 以外のダイオキシソ類においても同様に発現するか否かは明らかではない。そこで本研究では、油症の主要な原因物質である 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) に注目し、TCDD と同様な機構で障害を発現するか否かを検討するとともに、これらの効果

の強弱を比較することを目的とした。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物処理

Wistar 系雌性ラット (7-10 週齢) を、雄性ラット (10-30 週齢) と一晚交配し、翌日に膣内精子が確認された場合、その日を妊娠 0 日目とした。全ての実験において、妊娠 15 日目に PenCDF (1, 2, 5, 10, 15, 25 および 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/2 \text{ mL}$ コーン油) あるいは TCDD (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 および 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/2 \text{ mL}$ コーン油) を経口投与した。また、対照群には、ダイオキシンの代わりにコーン油を投与した。妊娠 20 日目の雄胎児および母体より臓器 (精巣および脳下垂体) を摘出し、解析に供した。

2. リアルタイム RT-PCR 法

摘出臓器より total RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ社) を用いて cDNA を調製した (10)。これを鋳型とし、SYBR Green I Master Mix (Applied Biosystems 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。解析は、ターゲット mRNA の threshold cycle (Ct) 値を β -actin mRNA の Ct 値で補正したのち、対照群に対する割合として算出した。

3. ウエスタンブロット解析

Steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) の発現を、 β -actin を内部標準として解析した。母体一匹分の胎児精巣をまとめてホモジナイズし、1,000 x g、10 分間、次いで 9,000 x g、25 分間遠心分離した。得られたペレットを PBS 溶液 (5 mM EDTA, 1% nonidet P-40; 10 $\mu\text{L}/\text{one testis}$) に懸濁してミトコンドリア画分を調製し、Bradford 法にてタンパク定量を行った。

電気泳動に用いるミトコンドリア画分のタンパク質量は、StAR は 20 μg 、 β -actin は 4 μg とした。一次抗体は、Rabbit anti-rat StAR antibody (Abcam 社) および Anti- β -Actin Mouse Mono antibody (BioVision 社)

を用いた。各 StAR 発現は β -actin で補正したのち、対照群に対する割合として算出した。PCR 増幅には以下の配列のプライマーを使用した: StAR (forward), 5'-ACACTTTGGGGAGATGCCTG-3'; StAR (reverse): 5'-CGTGAGTTTGGTCTTTGAGG-3'; CYP1A1 (forward): 5'-CCATGACCA GGA ACTATGGG-3'; CYP1A1 (reverse): 5'-ATGACCTTCTCACTCAGGTG-3'; β -actin (forward): 5'-CACCATGTACCCAGGCATCGC-3'; β -actin (reverse): 5'-AGCCACCAATCCACACAGAG-3'。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認の下に、動物の苦痛を可能な限り軽減して実施した。

C. 研究結果

TCDD の用量は、すでに当研究室において影響が確認されている 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を基準とし、これより低用量 (0.05, 0.1, 0.25 および 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) および高用量の 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を使用した。PenCDF に関しては、毒性等価係数 (TEF) が 0.3 であることを考慮し、2 および 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を基準として用量を設定し解析を行った。

まず、胎児組織へのダイオキシンの移行性を確認するために、ダイオキシン曝露により顕著に誘導されることが知られている cytochrome P450 (CYP) 1A1 の mRNA 発現変動を解析した。その結果、胎児精巣および脳下垂体において用量依存的な CYP1A1 mRNA の発現誘導が観察され (Fig. 1)、母体に投与した両ダイオキシンは胎児にも用量依存的に移行することが示唆された。

次に、性ホルモン合成系への影響を検討するために、性ステロイドホルモン合成の律速段階に関与する StAR の mRNA 発現変動を解析した。その結果、胎児精巣の

StAR 発現は 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の PenCDF により有意に抑制された (Fig. 2A)。一方、TCDD による StAR 発現低下は 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より有意に認められた (Fig. 2B)。StAR 発現低下はタンパク質レベルにおいても確認されたが、この場合は mRNA 変動よりも低用量で効果が出現した。すなわち、PenCDF は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、TCDD は 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より有意な発現抑制が観察された (Fig. 3)。さらに、性ホルモン合成の制御因子である脳下垂体 LH の mRNA 発現変動を解析したところ、PenCDF では 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、TCDD では 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より β サブユニット特異的に発現低下が認められた (Figs. 4 および 5)。

D. 考察

PenCDF 母体曝露による胎児精巣 StAR mRNA 発現低下は、15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より認められ、PenCDF においても TCDD と同様に性ホルモン合成系障害を引き起こすことが明らかとなった。さらに、性ホルモン合成の制御因子である脳下垂体 LH の mRNA 発現低下も、15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より β サブユニット特異的に認められ、精巣における StAR mRNA 発現低下とよく符合した。これらの結果から、PenCDF も TCDD と同様に脳下垂体 LH β 発現低下を起点として障害を発現することが示唆された。一方、StAR タンパク質レベルでの低下は、mRNA 低下よりもさらに低用量の 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より認められ、ダイオキシン類は LH 非依存的な機構に対しても作用し、ステロイドホルモン合成系タンパク質の発現量を低下させる可能性が考えられた。ダイオキシンは、ユビキチン・プロテアソーム系に作用してタンパク質分解を促進することが示唆されており (3)、同様の現象が胎児精巣の StAR にも起こっている可能性がある。今後、この影響に注目して解析を進める必要がある。

TCDD による胎児精巣 StAR mRNA

および脳下垂体 LH β mRNA の発現低下はともに、0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より観察されたが、PenCDF による有意な減少の惹起には 20 倍以上もの高用量を要することが明らかとなった。従来、ダイオキシン類の TEF は TCDD=1 に対して PenCDF=0.3 とされており (12)、胎児脳下垂体-性腺制御系への影響に関する量-作用関係は、従来の TEF とは大きく乖離する。つまり、ダイオキシン類による生殖毒性に関しては従来の TEF での評価が問題であることが示唆された。

PenCDF の胎児脳下垂体-性腺への効果が弱い理由の一つとして、本ダイオキシンの体内動態特性が考えられる。すなわち、PenCDF は母体肝臓への集積性が TCDD よりも高く、そのため他組織への分布や胎児への移行性が低いことが示唆されている (13, 14)。PenCDF の肝臓への蓄積に深く関与すると推定されているのが、肝臓中に高発現する CYP1A2 である。CYP1A2 は、PenCDF に対する吸着能が高く (15)、また CYP1A2 ノックアウトマウスを用いた解析から、CYP1A2 を欠損することによりダイオキシンの肝臓集積、ならびにダイオキシン間での体内分布の差が消失する (14)。これらのことから、ダイオキシン類による胎児毒性の発現には、母体 CYP1A2 の発現状況が深く関わると考えられた。

E. 結論

PenCDF 母体曝露も、TCDD と同様に胎児脳下垂体 LH 分泌低下を介して精巣における性ホルモン合成系障害を引き起こすことが示唆された。しかし、その効果発現には TCDD の少なくとも 20 倍以上の高用量を要することが明らかとなった。またその用量差として、母体肝臓への蓄積性の違いによる可能性が考えられた。

以上の結果より、生殖/後世代に対する毒性に注目した場合、従来の TEF で評価

するのには問題があることが示された。

F. 研究発表

1. フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (東京、2010 年 9 月 9 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

- 1) Peterson, R. E., Theobald, H. M., Kimmel, G. L., *Crit. Rev. Toxicol.*, **23**: 283-335 (1993).
- 2) Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y, Kato, S., *Nature*, **423**: 545-550 (2003).
- 3) Khan, S., Barhoumi, R., Burghardt, R., Liu, S., Kim, K., Safe, S., *Mol. Endocrinol.*, **20**: 2199-2214 (2006).
- 4) Ohsako, S., Miyabara, Y., Nishimura, N., Kurosawa, S., Sakaue, M., Ishimura, R., Sato, M., Takeda, K., Aoki, Y., Sone, H., Tohyama, C., Yonemoto, J., *Toxicol. Sci.*, **60**: 132-143 (2001).
- 5) Ohtake, F., Baba, A., Takeda, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., *Nature*, **446**: 562-566 (2007).
- 6) Badawi, A. F., Cavalieri, L. C., Rogan, E. G., *Carcinogenesis*, **21**: 1593-1599 (2000).
- 7) Mutoh, J., Taketoh, J., Okamura, K., Kagawa, T., Ishida, T., Ishii, Y., Yamada, H., *Endocrinology*, **147**: 927-936 (2006).
- 8) Taketoh, J., Mutoh, J., Takeda, T., Ogishima, T., Takeda, S., Ishida, T., Ishii, Y., Yamada, H., *Life Sci.*, **80**: 1259-1267 (2007).
- 9) Takeda, T., Matsumoto, Y., Koga, T., Mutoh, J., Nishimura, Y., Shimazoe, T., Ishii, Y., Ishida, T., Yamada, H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **329**: 1091-1099 (2009).
- 10) Matsumoto, Y., Ishida, T., Takeda, T., Koga, T., Fujii, M., Ishii, Y., Fujimura, Y., Miura, D., Wariishi, H., Yamada, H., *J. Toxicol. Sci.*, **35**: 365-373 (2010).
- 11) Bose, M., Whittal, R. W., Miller, W. L., Bose, H. S., *J. Biol. Chem.*, **283**: 8837-8845 (2008).
- 12) Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Trischer, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., Peterso, R. E., *Toxicol. Sci.*, **93**: 223-241 (2006).
- 13) Chen, C. Y., Hamm, J. T., Hass, J. R., Birnbaum, L. S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **173**: 65-88 (2001).
- 14) Diliberto, J. J., Burgin, D. E., Birnbaum, L. S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **159**: 52-64 (1999).
- 15) Kuroki, J., Koga, N., Yoshimura, H., *Chemosphere*, **15**: 731-738 (1986).

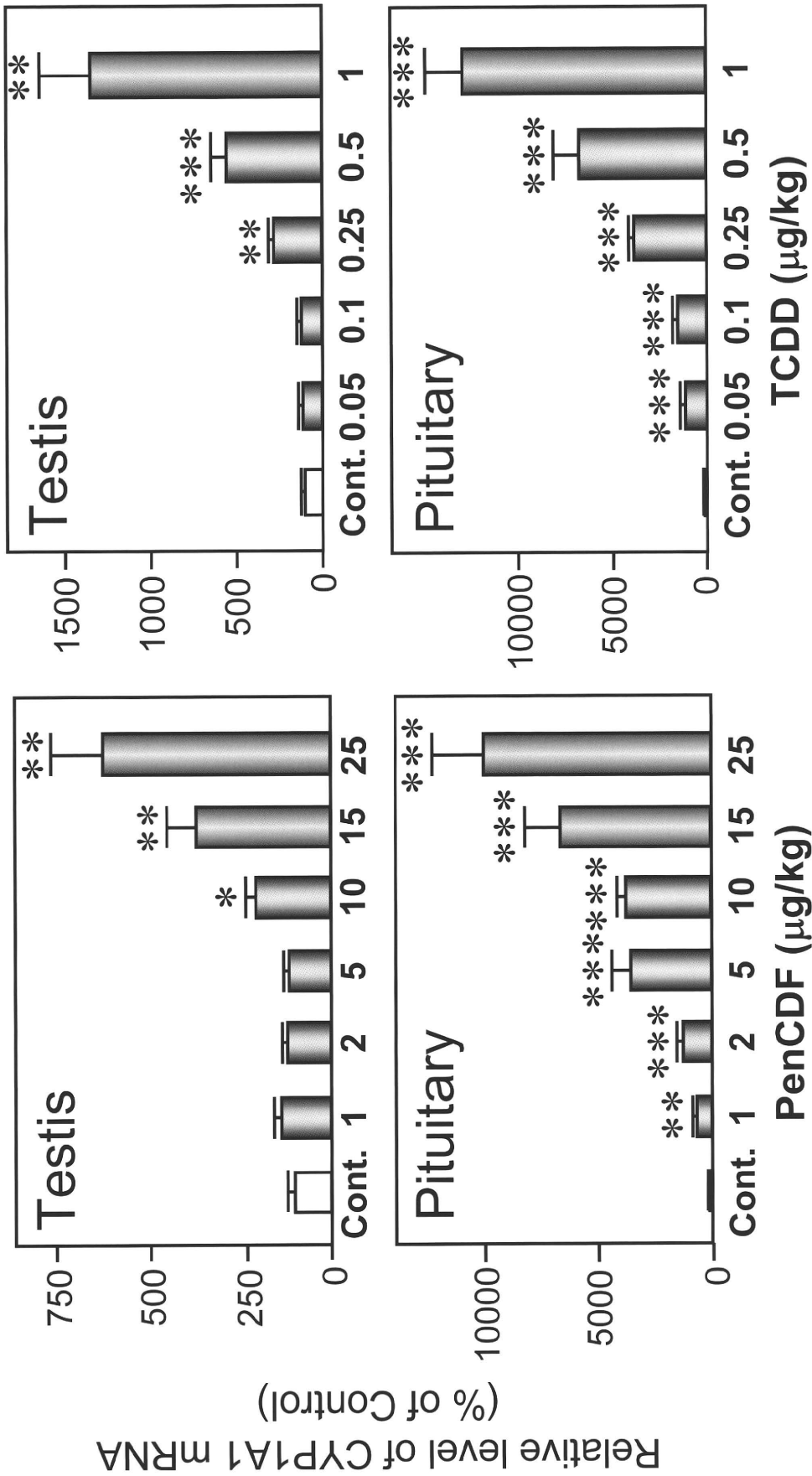


Fig. 1. Dose-dependent change in the expression of testicular and pituitary CYP1A1 mRNA in male fetal rats by maternal exposure to PenCDF or TCDD. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 12 fetuses each 2 of which were removed from 6 different dams. Significantly different from control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

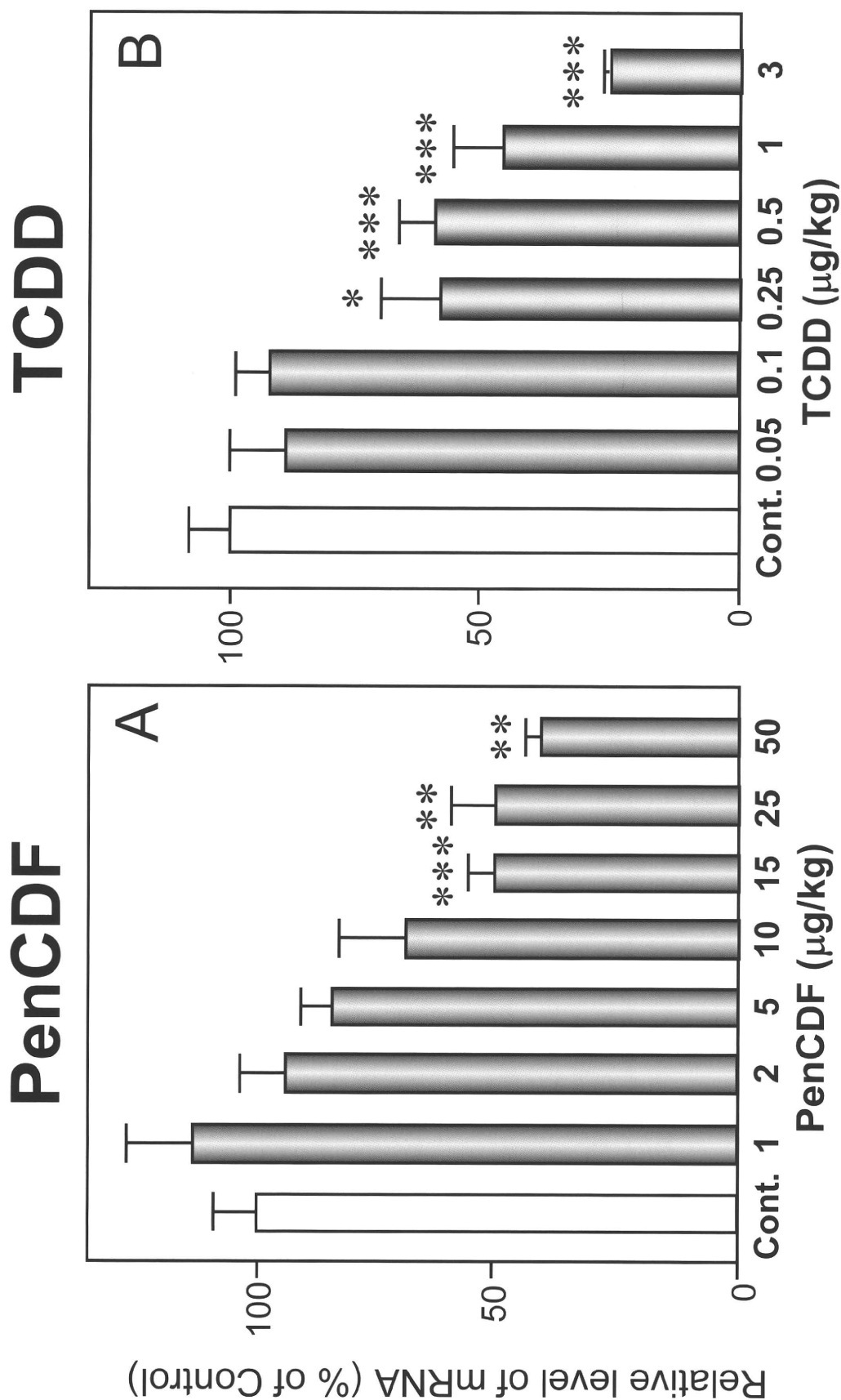


Fig. 2. Dose-dependent change in the expression of testicular StAR mRNA in male fetal rats by maternal exposure to PenCDF (A) or TCDD (B). Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 6-12 fetuses each 2 of which were removed from 3-6 different dams. Significantly different from Control: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

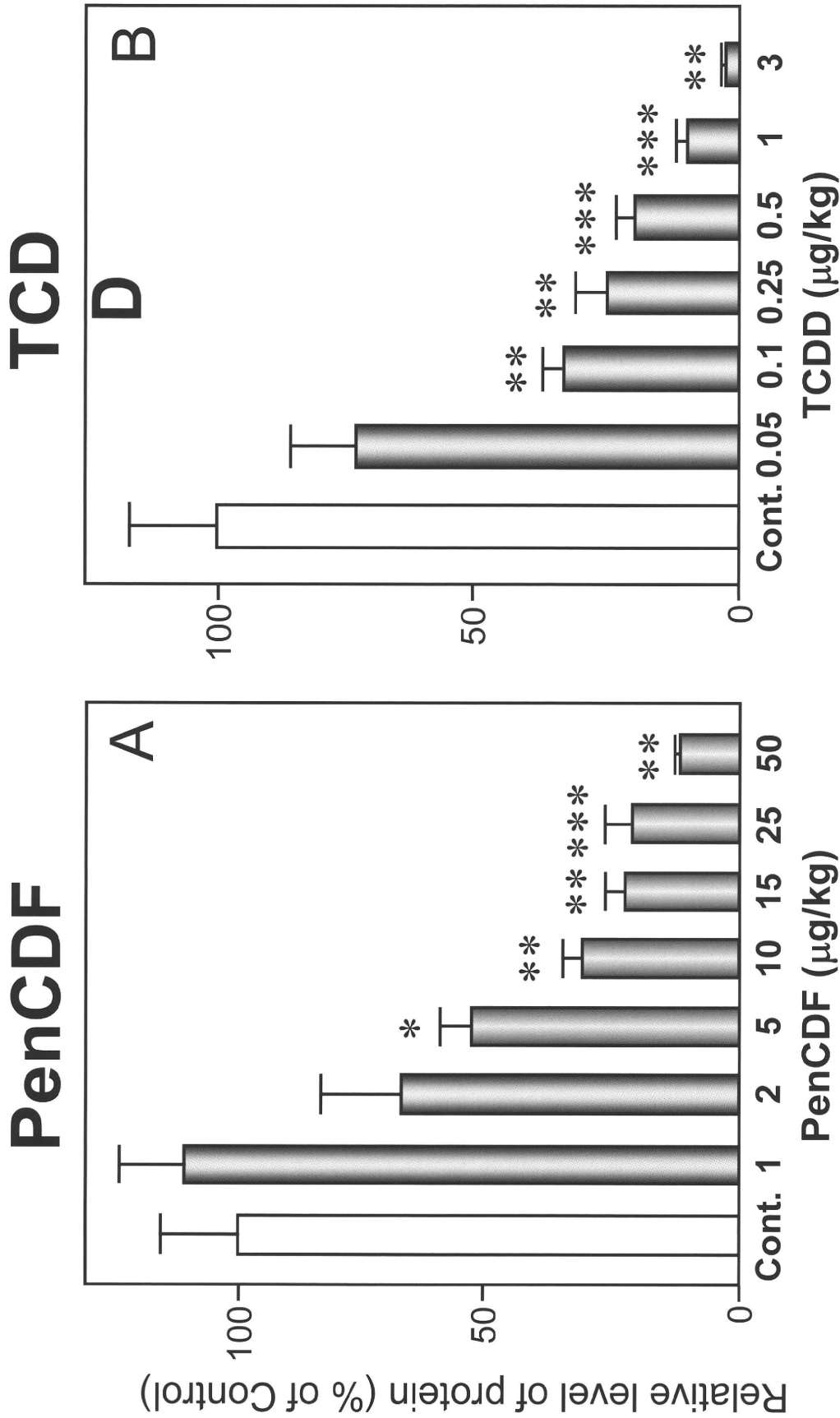


Fig. 3. Dose-dependent change in the expression of testicular StAR protein in male fetal rats by maternal exposure to PenCDF (A) or TCDD (B). Each bar represents the mean \pm S.E.M. of pooled fetal testes which were removed from 3-6 different dams. Significantly different from control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

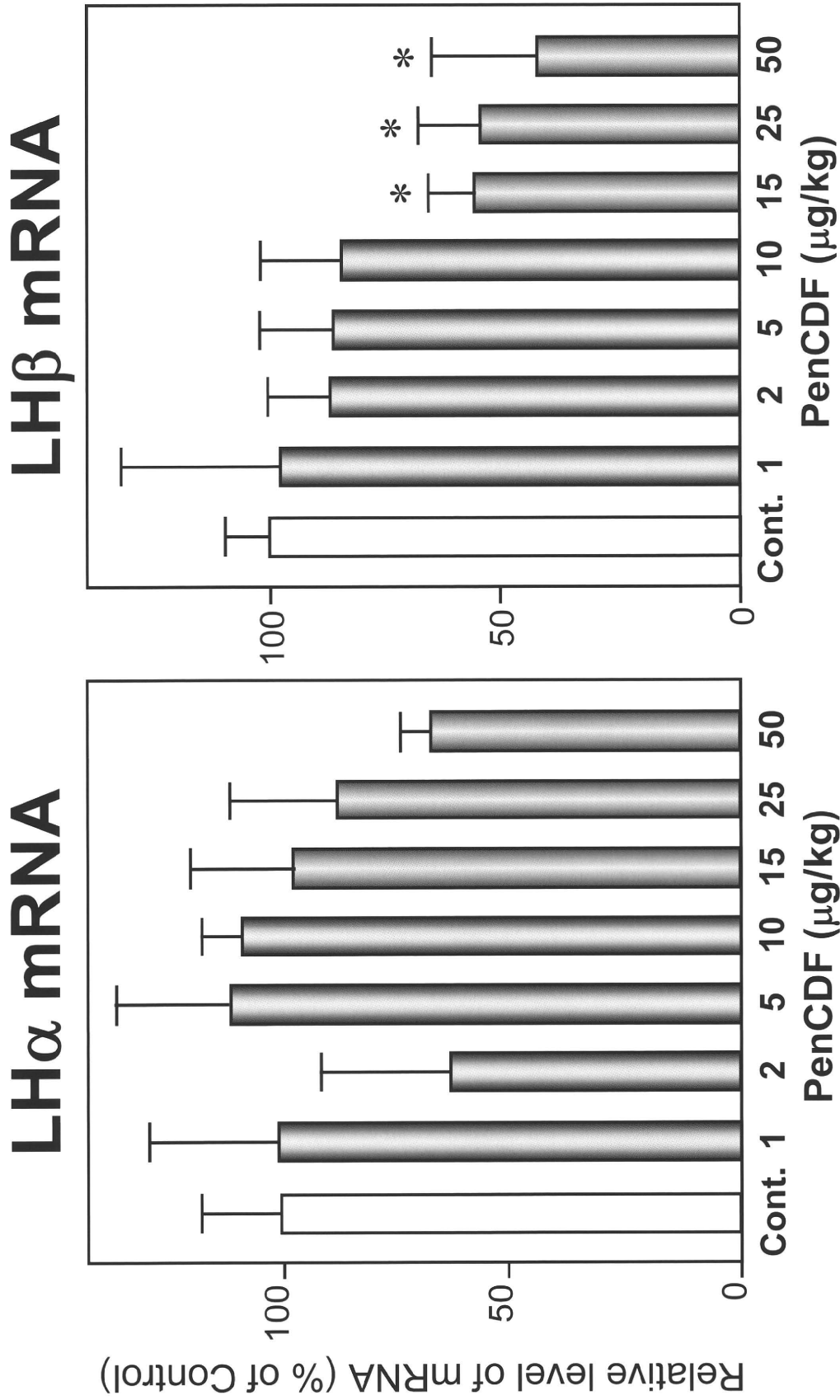


Fig. 4. Dose-dependent change in the expression of pituitary LH subunit mRNAs in male fetal rats by maternal exposure to PenCDF. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 3-12 pooled fetal pituitaries which were removed from 3-12 different dams. Significantly different from control: * $p < 0.05$.

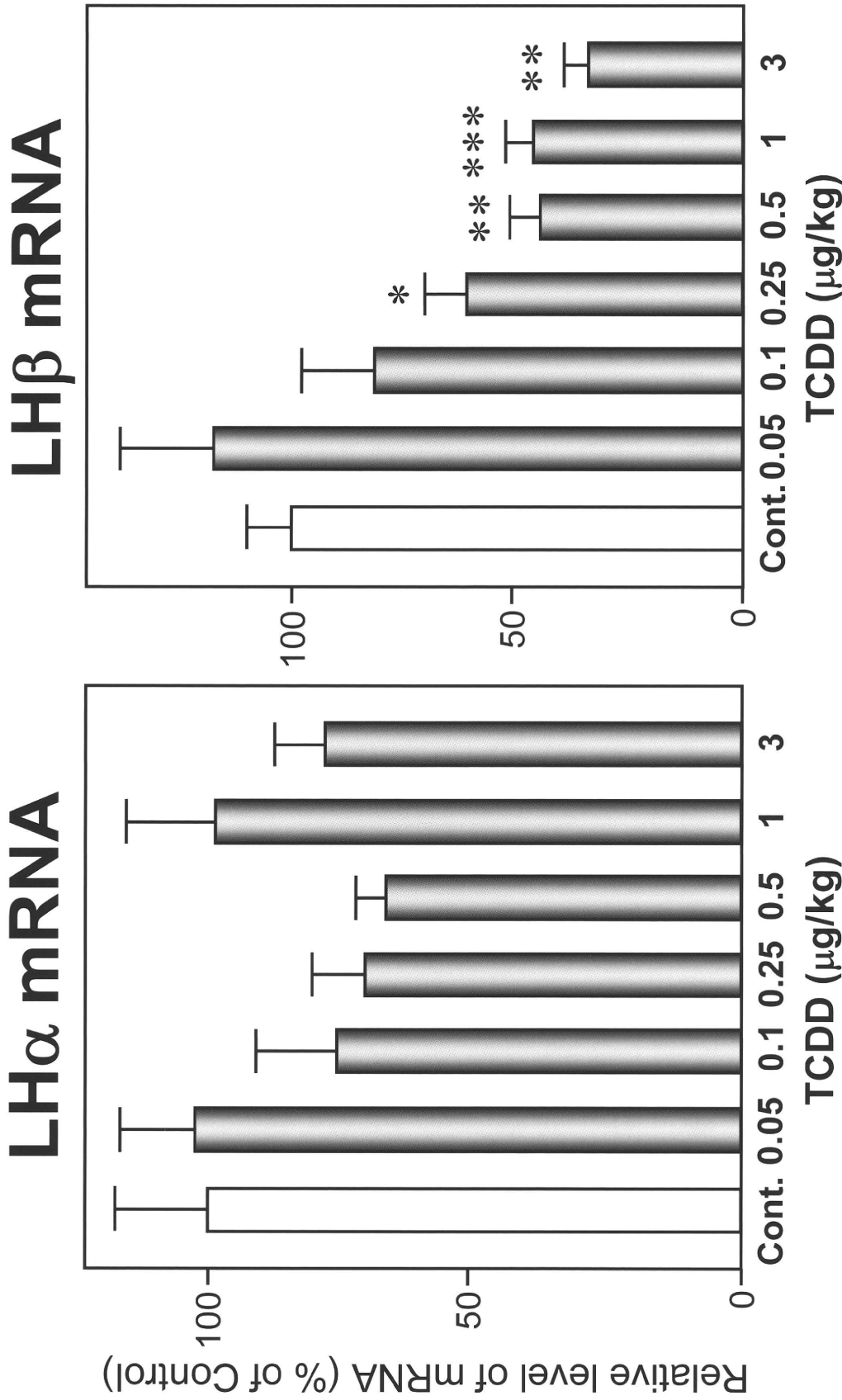


Fig. 5. Dose-dependent change in the expression of pituitary LH subunit mRNAs in male fetal rats by maternal exposure to TCDD. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 3-12 pooled fetal pituitaries which were removed from 3-12 different dams. Significantly different from Control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

分担研究報告書

ダイオキシンおよび 3-メチルコランスレンによるマウス・セレン結合性タンパク質の誘導とその機構

研究分担者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野 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分野 准教授
 武田 知起 九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野 助教

研究要旨 当研究室では、ラットへのダイオキシン曝露により肝臓においてセレン結合性タンパク質 (SeBP1) が顕著に誘導されることを見出している。本研究では、その機構を明らかにすることを目的として検討を行った。リガンドとの親和性が異なるダイオキシン受容体 (AhR) を発現する二系統のマウス (C57BL/6J: 高親和性 AhR, DBA/2J: 低親和性 AhR) に、3-methylcholanthrene あるいは 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin を腹腔内投与し、肝臓中の SeBP1 mRNA を解析した。その結果、C57BL/6J マウスの方に顕著な誘導が観察され、ダイオキシンは AhR を介して SeBP1 を誘導することが示された。

A. 研究目的

セレン結合性タンパク質 (SeBP1) は、肝臓、腎臓および性腺などに多く発現するサイトゾルタンパク質である (1)。SeBP1 は、その名の通り、セレンとの結合能を有し、セレンの生理的役割に関わるものと推定されている。これまでに、本タンパク質は抗酸化作用 (2)、増殖抑制作用 (3)、あるいはゴルジ層板間のタンパク質構成因子 (4) 等に関与することが推定されているが、決定的証拠に乏しく、その生理的機能は未だ明確には理解されていない。当研究室では、ダイオキシン類の一種である 3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl (PCB126)、および多環芳香族炭化水素の 3-methylcholanthrene (3MC) がラット肝臓の SeBP1 タンパク質および mRNA 発現を顕著に誘導することをすでに報告している (5-7)。

ダイオキシン類は、免疫抑制、肝障害、発がんプロモーション作用等、多彩な毒性を引き起こすが (8)、それらは細胞の可溶性画分に存在する芳香族炭化水素受容体 (AhR) の活性化を通して生起すると考え

られている (9)。ダイオキシン類は細胞質の AhR に結合してこれの核への移行を促進し、AhR は核内で AhR nuclear translocator とヘテロダイマーを形成する。この複合体が様々な遺伝子上流に存在するコンセンサス配列 [xenobiotic responsive element (XRE)] に結合することでそれらの遺伝子発現を変動させることが知られている (10)。ダイオキシン類により変動する遺伝子は数百種類にもものぼるが、どの遺伝子変動が毒性発現に重要であるのかなど詳細は未だ明らかではない。

前述の通り、ラット肝臓の SeBP はダイオキシン類によって顕著に発現増加する。しかし、SeBP の生理的意義が不明確なため、これがダイオキシンによって増加することの意義もよく分からない。一方、ダイオキシン毒性には AhR が中心的な役割を果たし、多く場合、活性化 AhR は遺伝子転写促進を惹起することも知られている。従って、もし SeBP の誘導が AhR 活性化を介するのであれば、本誘導は毒性発現に寄与する可能性が浮上してくる。そこで本研究では、SeBP 誘導と

AhR の関連性を明らかにすることを目的に検討を行った。検討の方法としては、ダイオキシン類に高感受性の AhR を発現するマウス (C57BL/6J 系統) と低感受性 AhR 発現マウス (DBA/2J 系統) を用い、SeBP 誘導の系統差の有無を調べることに解析した。本法は、古くから知られる AhR 関与の判別法であり (11)、ダイオキシンへの感受性に系統差が認められれば、AhR の関与が示唆される。

マウスにおいては SeBP1 と異なる遺伝子の産物であり臓器分布等も多少異なる SeBP2 (SeBP1 のアミノ酸配列との相同性: 97%) が存在することが知られている (12)。SeBP2 も肝臓に多く発現し、アセトアミノフェン代謝物との結合を介して肝障害発現に関わると推定されているが (13)、その相同性の高さから SeBP1 との機能的な関連性も示唆されている。したがって、本研究で注目する SeBP1 のダイオキシン毒性に対する意義を知る上で、SeBP2 の発現状況も明らかにしておくことが望ましいと考えられる。については、本研究では 2 系統マウスにダイオキシン類を処理後、SeBP1 のみならず、SeBP2 の状況についても併せて検討を加えた。

B. 研究方法

3 週齢の C57BL/6J および DBA/2J 雄性マウスを一週間馴化させたのち、3MC あるいは最強毒性のダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を腹腔内投与した。3MC は、10, 50 および 100 mg/kg/10 mL corn oil で一日一回、3 日間連続投与を行った。TCDD に関しては、C57BL/6J マウスには 10, 50 および 100 µg/kg/10 mL、DBA/2J マウスには 50, 100 および 500 µg/kg/10 mL の投与量でそれぞれ単回投与を行った。また、対照群には、corn oil を投与した。最終投与 24 時間後に臓器を摘出し、解析に供した。

SeBP1 および 2 の mRNA 発現変動

は、リアルタイム reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて解析した。摘出した肝臓より、total RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ社) を用いて cDNA を調製した (14)。これを鋳型とし、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現を定量した。解析は、ターゲット mRNA の Ct 値を β-actin mRNA の Ct 値で補正したのち、対照群に対する割合として算出した。PCR 増幅には以下の配列のプライマーを使用した: SeBP1 (forward), 5'-GCACGAAGTCACGCAACAAGC-3'; SeBP1 (reverse): 5'-AGCCCACATCCACCACGTA-3'; SeBP1 (probe): 5'-CTGCTGTCTCATCTCCTCCCGC-3'; SeBP2 (forward): 5'-CATCACTGTACAGCGACTGG-3'; SeBP2 (reverse): 5'-AGCCCACATCCACCACGTA-3'; SeBP2 (probe): 5'-CCCTGACCTCATTAGGGAAGGCTCC-3'; β-actin (forward): 5'-GCAAGCAGGAGTACGATGAG-3'; β-actin (reverse): 5'-CCATGCCAATGTTGTCTCTT-3'; β-actin (probe): 5'-TCCA TCGTGCACCGCAAGTG-3'。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認を受け、可及的に動物の苦痛を排除して実施した。

C. 研究結果

まず、AhR のリガンドである 3MC 処理による検討を行った。C57BL/6J マウスでは、3MC の用量に依存して有意な体重増加抑制が観察されたが、DBA/2J マウスにおいては、投与期間中における有意な影響は観察されなかった (Fig. 1)。臓器重量に関しても、C57BL/6J マウスでは、10 mg/kg で有意な肝臓肥大および脾臓、胸腺萎縮が認められ、用量依存的に変化が増