

し、p53 陽性例の半数で AID は強陽性を示した。

D. 考察

ダイオキシンは種々の活性酸素種を産生し、生体に誘導された酸化ストレスが発癌に強く関連することが広く認められるようになってきた。一方、潰瘍性大腸炎では好中球活性酸素産生の亢進、抗酸化機構の低下、酸化 DNA 損傷マーカーの増加が報告され、同疾患における炎症ならびに発癌に酸化ストレスが強く関連することが示唆されている。今回、このような酸化ストレスによる DNA 損傷との関連も示唆されている AID の炎症部や腫瘍部における発現を検討することで、炎症性発癌における酸化ストレスの影響を評価した。

その結果、潰瘍性大腸炎合併大腸癌部における AID の発現は散発性大腸癌と比較して差を認めなかった。一方、AID は非炎症部では殆ど発現を認めなかったのに対し、炎症部粘膜では陽性率が上昇し、陽性率は高度炎症部で高かった。このことは、既に炎症部粘膜で既に体細胞突然変異のリスクが上昇していることを示唆しており、炎症により惹起された酸化ストレスが発癌を誘導し可能性が推測された。このような潰瘍性大腸炎粘膜における AID の発現については、臨床経過や罹病期間との関連も検討していく必要があると思われる。

なお、慢性炎症持続による発癌は、*Helicobacter pylori* 感染による慢性胃炎からの胃癌発生にも共通する経路と考えられる。同様の手法を用いて胃癌症例における AID 発現と胃炎重症度の関連についても今後検討を加えたい。

E. 結論

潰瘍性大腸炎の炎症部粘膜において AID 発現を認めることから、本症発癌における酸化ストレスの関与が示唆された。

F. 健康危険情報

現時点ではない。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

分担研究報告書

2,2',3,3',4,4',5-七塩素化ビフェニル(PCB170)の動物肝マイクロゾームによる代謝

研究分担者 古賀 信幸 中村学園大学栄養科学部 教授
 研究協力者 太田 千穂 中村学園大学栄養科学部 講師

PCB170 は、PCB153、PCB180 および PCB138 とともに高残留性の PCB 異性体として知られている。本研究では、PCB170 が代謝されるか否かについて、ラット、モルモットおよびヒト肝マイクロゾーム(Ms)を用いて調べた。その結果、ラットおよびヒト肝 Ms では、代謝物は全く生成されなかった。一方、モルモット肝 Ms では、phenobarbital 前処理の場合のみ、代謝物が極微量検出された。以上の結果から、PCB170 は非常に代謝されにくいことが明らかになった。また、既報を総合すると、PCB170 代謝物の化学構造は、5'-OH 体であり、モルモット肝での生成には CYP2B18 が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

2,2',4,4',5,5'-hexachlorobi-phenyl (PCB153)、2,2',3,4,4',5,5'-heptachloro-biphenyl (PCB180) および 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl (PCB138)は、ヒト血液中や肝臓中に高濃度検出されるPCB異性体である¹⁻³⁾。このような高残留性PCB異性体は、いずれも共通して、2,4,5-三塩素置換ベンゼンあるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有している。戸高ら⁴⁾は1968年のカネミ油症発生以来35年後の油症患者血液中のPCB異性体を調べ、その結果、油症患者および健常者のいずれも、上記のPCB異性体が最も多いこと、しかも油症患者で健常者の1.6~2.2倍多いことを報告した。また、本研究のPCB170はヒト血液中において5番目に多いPCB異性体で、しかも健常者の2.5倍の高濃度であることも報告した。これらの結果から、PCB170が難代謝性であることが示唆されたが、その代謝については全く報告がなかった。そこで本研究では、PCB170の代謝について、ラット、モルモットおよびヒト肝マイクロゾーム(Ms)を用いて調べた。また、代謝に関与するチトクロムP450 (CYP) 分子種を明らかにするため、代表的なCYP誘導剤で前処理した動物でも同様に検討した。

B. 研究方法

① PCB170 合成 : 2,3,4-trichloroaniline および 1,2,3,4-tetrachlorobenzene を tetrachloroethylene に溶解し、isopentyl nitrite を添加後、100℃で 24 時間反応させた。反応液を chloroform で抽出後、アルミナカラムおよびシリカゲルカラムにかけ、最終的に分取用 HPLC で精製した。PCB170 のピークを分取し濃縮したところ、白色結晶が得られた。GC-MS の結果、分子量 392 であることを確認した。収量は 47.3mg (収率 4.7%) で純度は 98.0%であった。以下、これを用いて、代謝研究を行った。② 動物肝 Ms の調製 : Wistar 系雄性ラット(体重約 220g)および Hartley 系モルモット(体重約 320g)を用いた。動物肝 Ms は、未処理、phenobarbital (PB)および 3-methylcholanthrene (MC) 前処理のラットとモルモットから調製した。PB および MC はそれぞれ 80 および 20 mg/kg/day の用量で 3 日間腹腔内投与した。最終投与後翌日に屠殺し、直ちに肝を摘出した。③ ヒト肝 Ms : 白人男性 10 名から調製されたものを BD Gentest 社より購入した。④ 代謝物の定量 : 肝 Ms を 40 μM PCB170、NADPH 生成系、100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)、MgCl₂ とともに、好氣的に 37℃で 1 時間インキュベートした後、chloroform-methanol (2:1,

v/v) および *n*-hexane で抽出し、さらに diazomethane でメチル化後、GC-ECD および GC-MS に供した。PCB170 代謝物の定量は PCB170 の検量線を用いて行った。

(倫理面への配慮)

「中村学園大学における動物実験のための指針」に従い、ラットの屠殺に際しては、苦痛をできるだけ軽減するため、軽くエーテル麻酔後後頭部を強打して気絶させ、頸動脈からの脱血により死亡させた。

C. 研究結果

まず、ラット肝MsによるPCB170の代謝を調べた。Fig. 1に、代謝物(メチル化体)のGC-ECDクロマトグラムを示した。未処理Ms、PB前処理MsおよびMC前処理Msでは、未変化体であるPCB170以外に、代謝物は全く検出されなかった。一方、モルモットの場、未処理Ms およびMC前処理Msでは全く代謝物ピークが生成されなかったが、PB前処理Msでは保持時間25.5 minに微量の代謝物M-1が19.8 pmol/hr/mg proteinの活性で検出された(Fig. 2)。なお、ヒト肝でも同様に検討したが、代謝物は全く生成されなかった。

次に、M-1の化学構造を明らかにするため、2,3,4-Trichloroanisole および 1,2,3,4-Tetrachloroanilineを原料とし、Cadoganの方法により、予想代謝物5'-CH₃O-PCB170の合成を試みた。その結果、5'-CH₃O-PCB170あるいは副産物2'-CH₃O-PCB189と思われる分子量422の合成品S-1を1種類得ることができた。GC-MSの結果、S-1は422[M]⁺に加え、[M-50]⁺の大きなフラグメントイオンを示した。これまでの報告⁵⁾によると、この[M-50]⁺のイオンは、MeO基がオルト位、すなわち2(2')位あるいは6(6')位に置換されていることを示している。結局、S-1は2'-CH₃O-PCB189であり、当初の目的の5'-CH₃O-PCB170ではなかった。以上のことから、GC-ECDにおけるM-1の保持時間を5'-CH₃O-

PCB170と比較するには至らなかった。

D. 考察

PCB170 は非常に代謝されにくいと予想されたが、今回用いたラット肝 Ms およびヒト肝 Ms では全く代謝されなかった。ただ、PB 前処理モルモットでのみ、5'-OH 体と思われる代謝物が極微量生成された(Fig. 3)。この結果から、PCB170 は難代謝性であるものの、PB 誘導性のモルモット CYP2B18⁶⁾により代謝されることが示唆された。これらの結果から、PCB170 を含め高残留性の PCB 異性体は、非常に代謝されにくいことが改めて示唆された。

E. 結論

PCB170は、PB前処理モルモット肝Msでのみ、5'-OH体と思われる代謝物へと代謝された。ただし、微量代謝物の同定は今後の課題である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. O. Kimura, K. Haraguchi, C. Ohta, N. Koga, Y. Kato, and T. Endo, Uptake of aristolochic acid I into Caco-2 cells by monocarboxylic acid transporters. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**(9), 1475-1479 (2014).
2. Y. Kato, K. Haraguchi, M. Onishi, S. Ikushiro, T. Endo, C. Ohta, N. Koga, S. Yamada and M. Degawa, 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl-mediated decrease of serum thyroxine level in C57BL/6 and DBA/2 mice occurs mainly through enhanced accumulation of thyroxine in the liver. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**(3), 504-509 (2014).
3. C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, T. Endo, O. Kimura, and N. Koga, Distribution and

excretion of 2,2',3,4',5,5',6-heptachloro-biphenyl (CB187) and its metabolites in rats and guinea pigs. *Chemosphere*, **118**, 5-11 (2015).

2. 学会発表

1. 山本健太、緒方 瞳、太田千穂、原口浩一、遠藤哲也、木村 治、加藤善久、古賀信幸、Kaempferol tetramethylether のラット肝ミクロゾームによる代謝. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会(酪農学園大学、江別市) 平成 26 年 5 月 30 日～6 月 1 日
2. C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, T. Endo, N. Koga, The participation of rat CYP3A enzymes in the metabolism of 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (CB101). *Organohalogen Compounds*, **76**, 466-469 (2014). 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Melia Castella Hotel, Madrid, Spain) 平成 26 年 8 月 31 日～9 月 5 日
3. 西村恵理、太田千穂、山本健太、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、古賀信幸、海洋生物由来 2,2'-dimethoxy-BB80 のラットにおける *in vivo* 代謝. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー(つくば国際会議場、つくば市) 平成 26 年 9 月 19, 20 日
4. 緒方 瞳、太田千穂、山本健太、加藤善久、原口浩一、木村 治、遠藤哲也、古賀信幸、トリメチル化された apigenin と genistein のラット肝ミクロゾームによる代謝. 日本栄養食糧学会九州支部会(熊本県立大、熊本市) 平成 26 年 10 月 11,12 日
5. 太田千穂、西村恵理、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、山本健太、古賀信幸、海洋生物由来の Tetrabromo-1,4-dimethoxybenzene (TDB)の動物肝ミクロゾームによる代謝. 日本薬学会第 135 年会(神戸学院大学等、神戸市) 平成 27 年 3 月 25～28 日
6. 久我歩佳、木下真璃伽、藤井由希子、櫻田

司、原口浩一、太田千穂、古賀信幸、遠藤哲也、メチルトリクロサンのマウス代謝活性化と乳汁分泌. 日本薬学会第 135 年会(神戸学院大学等、神戸市) 平成 27 年 3 月 25～28 日

7. 小柳侑平、河野龍海、高木雅恵、森山綾香、藤井由希子、松原 大、原口浩一、太田千穂、古賀信幸、海藻で生産される臭素化ビフェノール類の機能性評価. 日本薬学会第 135 年会(神戸学院大学等、神戸市) 平成 27 年 3 月 25～28 日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

I. 参考文献

- 1) A. Sjödin, L. Hagmar, E. Klasson-Wehler, J. Björk and Å. Bergman, *Environ. Health Perspect.*, **108**(11), 1035-1041 (2000).
- 2) D. M. Guvenius, P. Hassanzadeh, Å. Bergman and K. Norèn, *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**, 2264-2269 (2002).
- 3) 古賀信幸, 太田千穂, 油症研究Ⅱ(古江増隆, 赤峰昭文, 佐藤伸一, 山田英之, 吉村健清 編)九州大学出版会, pp. 200-218 (2010).
- 4) T. Todaka, T. Hori, H. Hirakawa, J. Kajiwara, D. Yasutake, D. Onozuka, T. Iida and M. Furue, *Chemosphere*, **74**(7), 902-909 (2009).
- 5) M. Th. M. Tulp, K. Olie and O. Hutzinger, *Biomed. Mass Spectr.*, **4**, 310-316 (1977).
- 6) N. Koga, T. Kanamaru, N. Kikuichi, N. Oishi, S. Kato and H. Yoshimura, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **60**, 898-903 (1998).

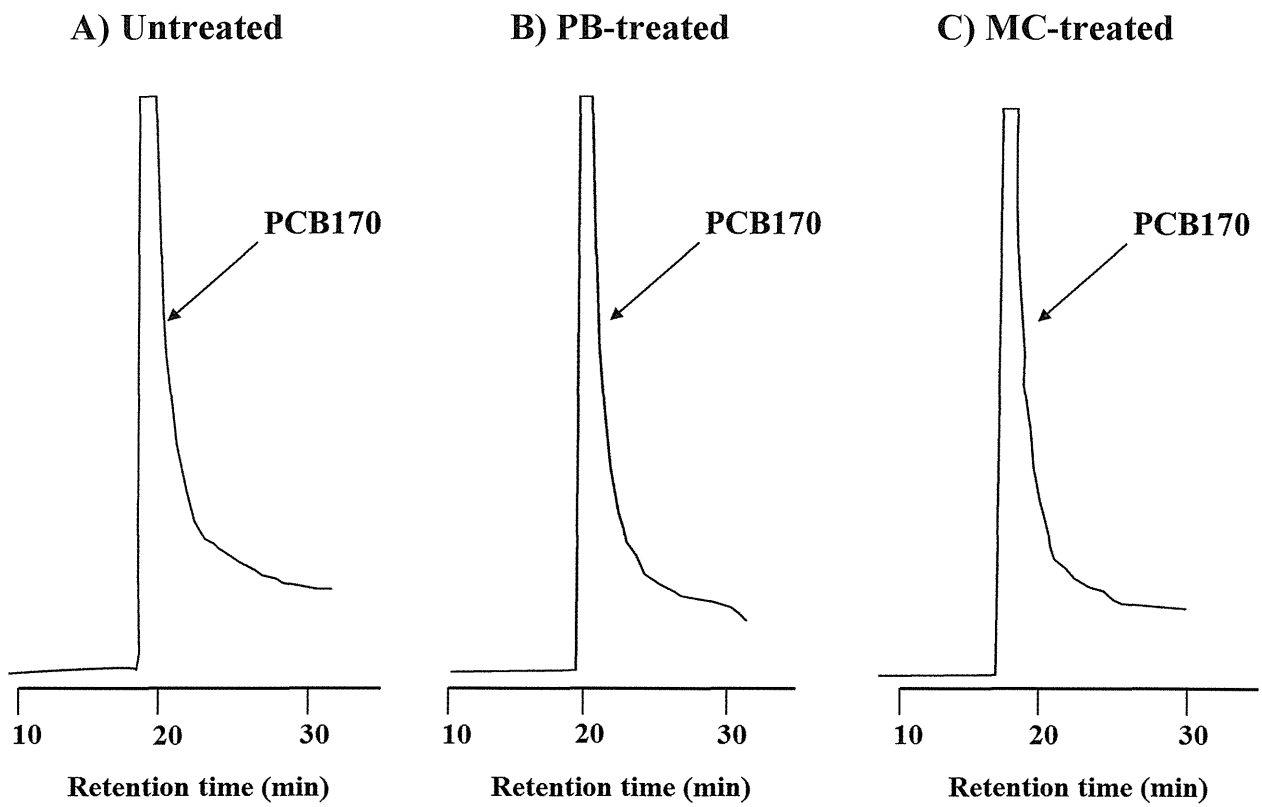


Fig. 1 ラット肝ミクロゾームによる PCB170 の代謝

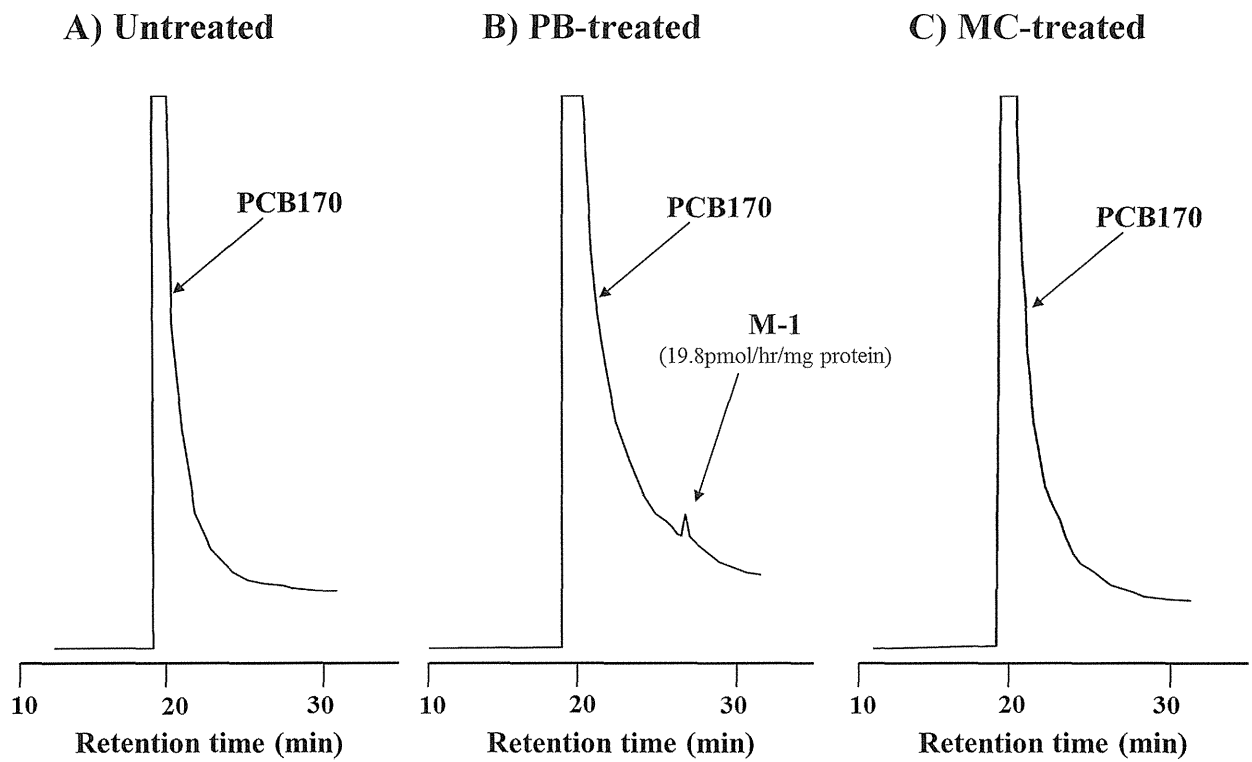


Fig. 2 モルモット肝マイクロゾームによる PCB170 の代謝

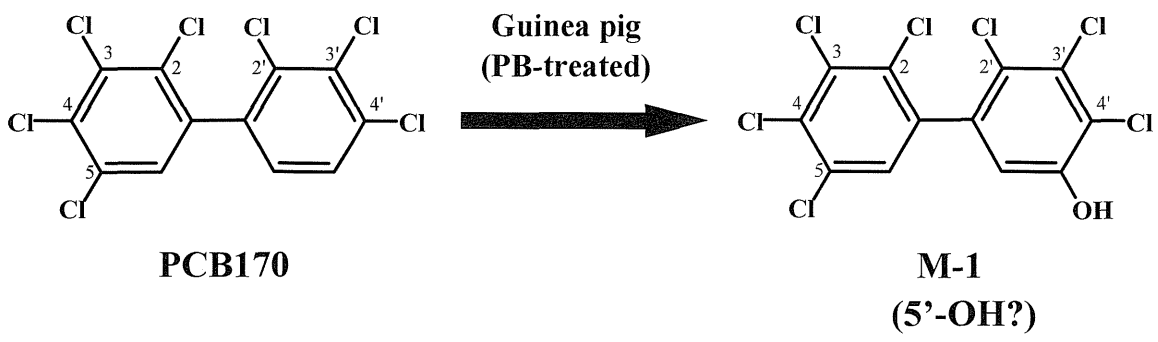


Fig. 3 PCB170 の予想代謝経路

分担研究報告書

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による leukotriene B4 蓄積の毒性学的意義と機構の解析：遺伝子改変動物での検討

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
 研究協力者 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 昨年度までの解析により、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) がラット肝臓において leukotriene (LT) B4 合成系亢進を介して LTB4 を蓄積させ、好中球を活性化させる可能性を見出した。LTB4 は好中球活性化を通して炎症反応に重要であるため、この異常蓄積は TCDD による炎症亢進ひいては肝毒性に直結する可能性が高い。そこで本研究では、LTB4 受容体 (BLT1) 遺伝子欠損マウスを用いてこの可能性を検証した。BLT1 欠損マウスへの TCDD 投与も、野生型マウスと同様に LTB4 合成酵素である 5-lipoxygenase の誘導が惹起し、LTB4 合成が増加していることが示唆された。しかし、野生型マウスへの TCDD 投与で見られる顕著な好中球浸潤ならびに炎症および肝障害マーカーの増大は、BLT1 欠損によって大きく抑制された。さらに、芳香族炭化水素受容体 (AhR) の遺伝子欠損ラットを用いて、LTB4 合成酵素である 5-lipoxygenase 誘導状況を検討した。その結果、野生型ラットで見られる TCDD 依存的な 5-lipoxygenase の誘導は、AhR 遺伝子欠損によって完全に消失した。以上の結果から、ダイオキシンは AhR を介する 5-lipoxygenase 誘導によって LTB4 を肝臓に蓄積させ、これが好中球浸潤による炎症亢進ひいては肝毒性を規定する一つの要因であるとの新規機構が明らかになった。

A. 研究目的

ダイオキシンは、芳香族炭化水素受容体 (AhR) の活性化を起点とした遺伝子発現変動に基づいて、肝障害や免疫抑制等の様々な毒性を生起すると考えられている (1, 2)。ダイオキシン依存的に変動する遺伝子は 200 種類以上も存在するが (3)、どの変動が毒性に直結するかは十分に理解されていない。我々はこの問題解決を目指し、超分解能液体クロマトグラフィー／飛行時間型質量分析計を用いたメタボローム解析に基づく研究を展開している。その結果、最強毒性のダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) がラット肝臓に leukotriene (LT) B4 を蓄積させる可能性 (平成 23 年度分担研究

報告書)、ならびに本蓄積には LTB4 合成酵素である 5-lipoxygenase の誘導と、LTC4 synthase の減少が寄与すること (平成 24 年度分担研究報告書) を見出してきた。LTB4 は、強力な好中球遊走作用を有する脂質炎症メディエーターであるため (4)、これの肝への蓄積は好中球浸潤を通して炎症を亢進し、障害を惹起する可能性が考えられる。これを支持して、昨年度の研究では LTB4 増加を通して好中球活性化が惹起する可能性を見出した (平成 25 年度分担研究報告書)。そこで本年度の研究では、LTB4 増加の毒性学的意義を更に明確にするため、LTB4 受容体遺伝子欠損 (BLT1-KO) マウスを用いた検討を実施した。さらに、AhR 遺伝子欠損

(AhR-KO) ラットを用いて、5-lipoxygenase 誘導における AhR 活性化の寄与も検討した。

B. 研究方法

1. AhR-KO ラットの作製

AhR 遺伝子の欠失には、XTNTM TAL nuclease を用いた。AhR 遺伝子の exon 2 領域を標的として合成した DNA 結合配列を Fok I ヌクレアーゼと融合させることで XTNTM mRNA を作製した。これをベクターに導入して作製した XTNTM 発現ベクターを、常法 (5) に従って前核期胚に注入した。XTNTM によって標的遺伝子の部分欠失が生じた受精卵を偽妊娠ラットに移植し、キメララットを作製したのち、野生型との交配によってヘテロ複合体を得た。これらの交配により KO ラットを作製し、実験に用いた。

2. 動物処理

5 週齢の雄性 AhR-KO および野生型ラット (Wistar 系ラット; 九動社) に、TCDD を 60 µg/kg/2 mL の用量で単回経口投与した。また、5 週齢の雄性 BLT1-KO マウスおよび野生型マウス (C67BL/6J 系統; 日本クレア社) に、5 あるいは 100 µg/kg/5 mL TCDD を単回経口投与した。それぞれ対照群にはコーン油を投与した。投与 7 日後に肝臓ならびに血液を採取し実験に供した。

3. リアルタイム RT-PCR 法

摘出した肝臓より total RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent kit with gDNA eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (6)。これを鋳型として、Fast SYBR Green[®] Master Mix (Life Technologies 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現を定量した。標準遺伝子として β-actin を使用し、目的タンパク質の mRNA 発現水準を β-actin に対する相対比として算出したのち、control に対する割合として解析した。

4. 免疫組織染色

スライドガラス上に貼付した肝臓の凍結切片 (切片厚: 5 µm) を、氷冷アセトンで 10 分間固定し、phosphate-buffered saline (PBS) で 5 分間 × 3 回洗浄したのち、3% bovine serum albumin-PBS で室温、1 時間ブロッキングした。PBS で 5 分間 × 2 回洗浄したのち、rat anti-Ly6g IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (abcam 社) または rabbit anti-5-lipoxygenase IgG (Sigma-Aldrich 社) を滴下し、4°C で一晩反応させた。翌日、0.05% Tween 20-PBS を用いて 5 分間 × 6 回洗浄したのち、0.1% 4',6'-diamidino-2-phenylindole を含む Alexa Fluor[®] 647-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology 社) を滴下し、室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween 20-PBS で 5 分間 × 6 回洗浄後に封入し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

5. 血清トランスアミナーゼ活性

血清中の aspartate transaminase (AST) および alanine transaminase (ALT) 活性は、市販のキット (和光純薬工業) を用いて測定した。なお、AST 測定にあたっては、血清を水にて 10 倍希釈して使用した。

(倫理面への配慮)

本研究における全ての動物実験は、「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た上で、動物の苦痛を排除して実施した (動物実験承認番号: A25-037-0、A25-251-0 および A26-151-0~2)。

C. 研究結果

LTB4 増加の意義を検証する前に、BLT1-KO マウスにおいてもダイオキシンによる LTB4 合成系の誘導が起ることを確認するため、LTB4 合成酵素である 5-lipoxygenase の mRNA 発現変動を解析した。その結果、BLT1-KO マウスにおいても野生型マウスと同様に、100 µg/kg

TCDD によって 5-lipoxygenase の誘導が観察され (Fig. 1)、TCDD による LTB4 合成亢進は BLT1 欠損によっても生じることが確認された。

そこで、TCDD による LTB4 増加が肝臓への好中球浸潤を惹起するか否かを免疫染色法により検証した。5-Lipoxygenase は、先の mRNA 誘導を支持して野生型および BLT1-KO マウス両方において TCDD 投与により同様の誘導が観察された (Fig. 2)。さらに好中球のマーカータンパク質である ly-6g を解析した結果、野生型マウスにおいては TCDD 投与により顕著に増加したが、BLT1-KO マウスではその程度は明らかに減少した (Fig. 2)。さらに、炎症応答因子である tumor-necrosis factor α (TNF α および cyclooxygenase 2 (COX2) の肝臓中 mRNA 発現量を検討した結果、野生型マウスでは高用量の TCDD 曝露により顕著な誘導が生じたが、BLT1-KO マウスにおいてはそれらが顕著に抑制された (Fig. 3)。また、炎症反応の抑制と合致して、BLT1 欠損は肝障害マーカーである血清 ALT および AST 増加も有意に抑制した (Fig. 4)。これらの結果から、肝 LTB4 増加が TCDD による炎症亢進ならびに肝障害の一つの要因であることが実証された。

次に、AhR-KO ラットを用いて、TCDD による 5-lipoxygenase 誘導における AhR 活性化の寄与を検討した。本検討を行うにあたり、AhR 欠損を確認するために、AhR ならびに AhR 依存的な誘導遺伝子である cytochrome P450 (CYP) 1A1 を指標に検討した。その結果、KO ラットでは AhR の発現を認めず (成績未掲載)、TCDD による CYP1A1 誘導も起こらなかった (Fig. 5)。そこで、5-lipoxygenase の発現を解析した結果、AhR KO ラットでは、野生型ラットで認められる 5-lipoxygenase の誘導が消失した (Fig. 5)。この結果から、TCDD による肝

5-lipoxygenase 誘導は、AhR 依存的に起こることが明らかになった。

D. 考察

本年度の研究では、TCDD による肝 LTB4 増加が、好中球浸潤を通して炎症応答を亢進し、肝障害を惹起するとの一連の機構を検証するため、BLT1-KO マウスを用いて TCDD に対する障害性が消失するか否かを解析した。その結果、BLT1-KO マウスにおいては TCDD 依存的な好中球浸潤が顕著に抑制され、炎症マーカーである TNF α および COX2 の発現誘導も大きく抑制された。さらに、これらを支持して、肝障害マーカーの誘導も有意に抑えられた。さらに、AhR-KO ラットを用いた検討の結果、AhR 欠損により 5-lipoxygenase 誘導は消失した。以上の結果から、TCDD は AhR 依存的に 5-lipoxygenase を誘導することで肝臓に LTB4 を蓄積し、これによって引き起こされる好中球浸潤と炎症反応の亢進が、ダイオキシンによる肝毒性の一端を担うとの新たな毒性機構が実証された。LTB4 は好中球に高発現する BLT1 との結合によって、炎症応答における重要な転写因子である nuclear factor (NF)- κ B を活性化する (7)。活性化した NF- κ B は、TNF α や COX2 等の炎症因子の発現を誘導し、炎症応答が亢進する (8)。TNF α および COX2 の誘導が BLT1 欠損によって大きく抑制された事実から、肝臓に浸潤した好中球において BLT1 を介して NF- κ B 経路が活性化し、TNF α /COX2 等の炎症性因子増加によって障害へと至ると推定される。

TCDD による肝障害マーカーの誘導は BLT1-KO マウスにおいて完全には抑制されず、LTB4-BLT1 以外の因子による障害性の関与が示唆された。他の因子については今後の課題であるが、第一には LTB4 の低親和性受容体である BLT2 (9) が考えられる。BLT2 は、肝臓を含む多くの組

織に発現しており、NADPH oxidase 誘導による活性酸素種の増加を介して NF- κ B を活性化する (10)。従って、LTB4 は BLT1 だけでなく BLT2 にも作用することで炎症応答を引き起こす可能性がある。また、ダイオキシンは AhR 依存的に xanthine dehydrogenase および NADPH oxidase の発現を誘導し、肝臓において活性酸素種を増加させるため (11, 12)、これらの誘導も NF- κ B 経路の活性化を介して肝障害に寄与することが示唆される (12)。以上のように、LTB4 の毒性学的意義をより明確に提示するためには、BLT2 と共に LTB4 非依存的な他の炎症誘発因子の肝毒性への寄与を明らかにしていくことが重要である。

本研究では、5-lipoxygenase 誘導が AhR 活性化に基づいて生起することは明らかにできたが、詳細な機構を解明するまでには至らなかった。ダイオキシン-AhR 複合体が結合する DNA 応答配列 (5'-CACGC-3') の存在を、5-lipoxygenase の 5'-遺伝子上流ならびに遺伝調節への関与が示唆されるイントロン領域 (13) について探索したところ、複数の存在が確認された。従って、AhR がこれらを介して直接的に遺伝子発現を誘導する可能性が十分に考えられる。また、5-lipoxygenase の発現誘導因子として重要である transforming growth factor β (TGF β) および calcitriol (14) は、TCDD 依存的に増加するとの報告があり (12, 15)、これらを介して間接的に誘導される可能性もある。特に、TGF β は AhR 依存的に誘導する遺伝子であることも示されている (12)。従って、5-lipoxygenase の誘導に対する AhR の寄与を分子レベルで明らかにするためには、直接作用の可能性と共に、これらの刺激因子に着目した解析を行うことが重要であろう。

E. 結論

TCDD は AhR 依存的な 5-lipoxygenase 誘導を通して肝臓に LTB4 を蓄積させ、これ通して好中球浸潤ならびに炎症反応の亢進、ひいては肝毒性の発現・増悪を惹起するとの新規機構が明らかになった。

F. 研究発表

1. 50th Congress of the European Societies of Toxicology (Edinburgh, September 2014)
2. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー (つくば、2014 年 9 月)
3. 第 31 回日本薬学会九州支部大会 (福岡、2014 年 12 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

H. 参考文献

- 1) Poland A, Knutson JC. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **26**: 371-399 (1982).
- 2) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-179 (1996).
- 3) Frueh FW, Hayashibara KC, Brown PO, Whitlock JP Jr. *Toxicol Lett*, **122**, 189-203 (2001).
- 4) Yokomizo T. *Fukuoka Acta Med*, **97**: 183-191 (2006).
- 5) Geurts AM, Cost GJ, Remy S, Cui X, Tesson L, Usal C, Menoret S, Jacob HJ, Anegon I, Buelow R. *Methods Mol Biol*, **597**: 211-225 (2010).
- 6) 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).
- 7) McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. *Blood*, **89**: 3421-3433 (1997).
- 8) Tak PP, Firestein GS. *J Clin Invest*,

- 107**: 7-11 (2001).
- 9) Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T. *J Exp Med*, **192**: 421-432 (2000).
- 10) Cho KJ, Seo JM, Kim JH. *Mol Cells*, **32**: 1-5 (2011).
- 11) Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**: 1093-1099 (2001).
- 12) Matsubara T, Tanaka N, Krausz KW, Manna SK, Kang DW, Anderson ER, Luecke H, Patterson AD, Shah YM, Gonzalez FJ. *Cell Metab*, **16**: 634-644 (2012).
- 13) Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. *Trends Biochem Sci*, **32**: 332-341 (2007).
- 14) Brungs M, Rådmark O, Samuelsson B, Steinhilber D. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 107-111 (1995).
- 15) Nishimura N, Nishimura H, Ito T, Miyata C, Izumi K, Fujimaki H, Matsumura F. *Toxicol Appl Pharmacol*, **236**: 301-309 (2009).

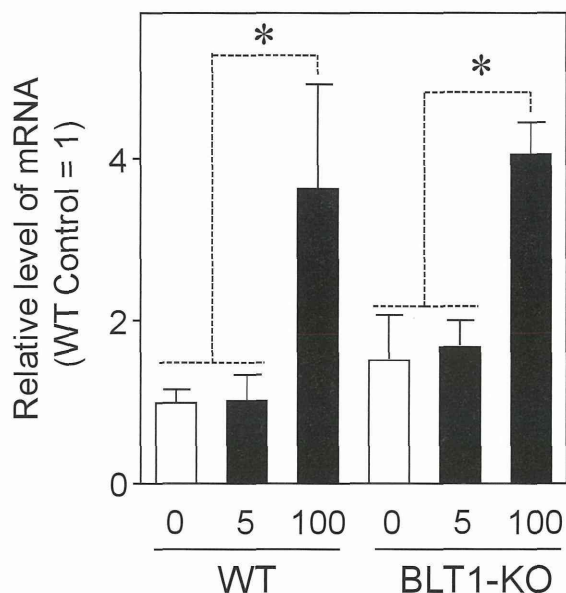


Fig. 1. Effect of TCDD on the hepatic expression of 5-lipoxygenase mRNA in male wild-type (WT) and BLT1-KO mice. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 4-5 mice. Significantly different from control; *, $p < 0.05$. Control value of 5-lipoxygenase mRNA level for wild-type (% of β -actin; mean \pm S.E.M., $N=5$) was $2.30 \times 10^{-3} \pm 3.70 \times 10^{-4}$.

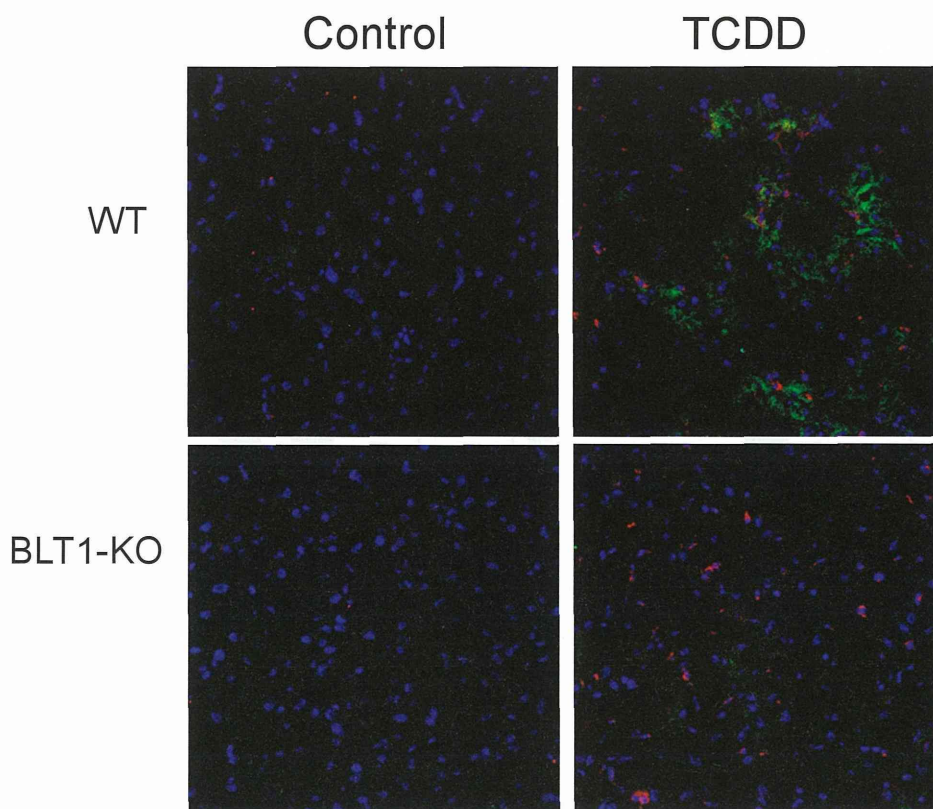


Fig. 2. Effect of TCDD on the infiltration of neutrophils to the liver in male wild-type (WT) and BLT1-KO mice. Liver sections were stained by anti-ly-6g (green), anti-5-lipoxygenase (red) and 4'6'-diamino-2-phenylindole (blue).

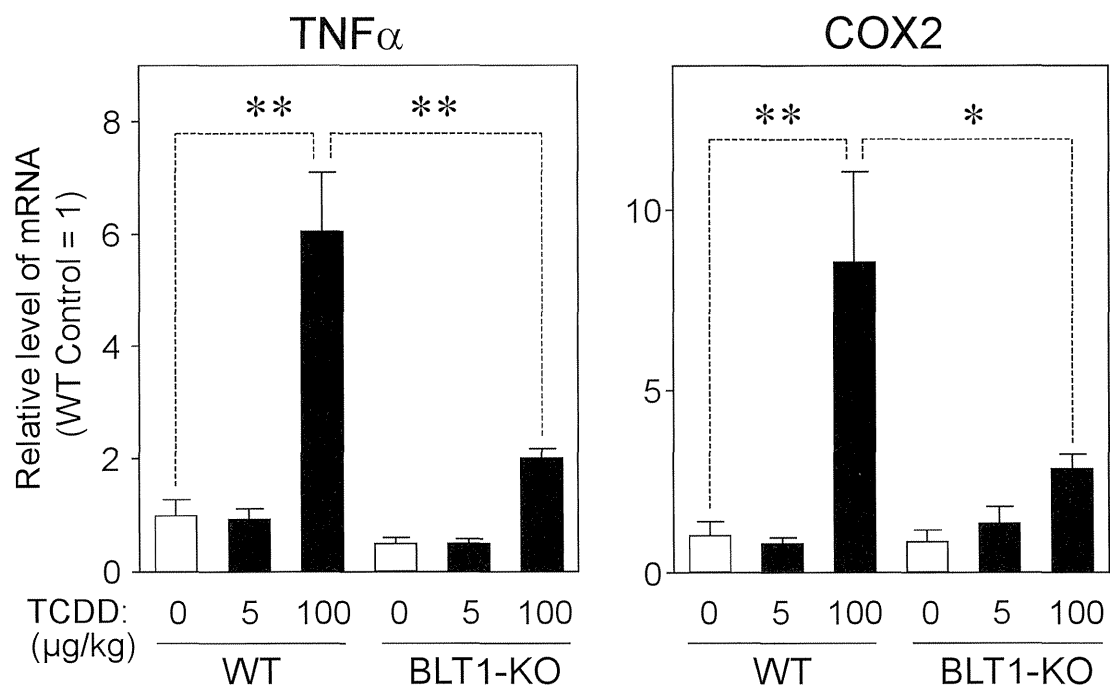


Fig. 3. Effect of TCDD on the hepatic expression of mRNAs coding for tumor-necrosis factor α (TNF α) and cyclooxygenase 2 (COX2) in male wild-type (WT) and BLT1-KO mice. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 4-5 mice. Significantly different between the pair indicated; *, $p < 0.01$ and **, $p < 0.001$. Control values of mRNA level for wild-type (% of β -actin; mean \pm S.E.M., $N = 5$) were as follows: TNF α ($3.99 \times 10^{-3} \pm 1.13 \times 10^{-3}$) and COX2 ($1.12 \times 10^{-3} \pm 4.20 \times 10^{-4}$).

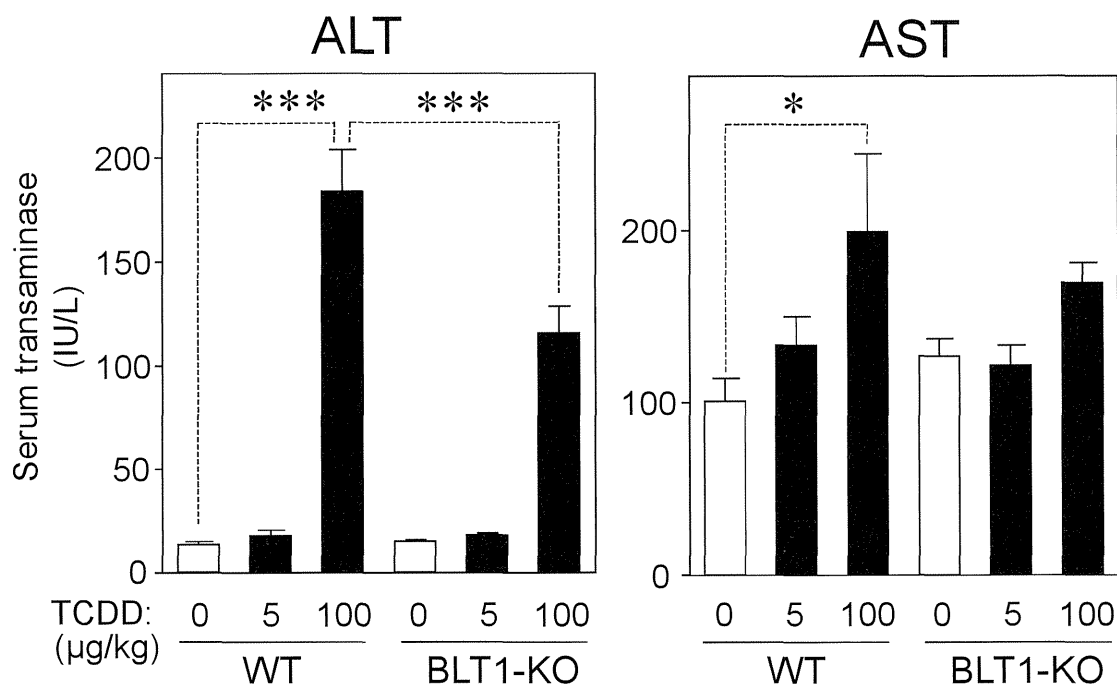


Fig. 4. Effect of TCDD on the serum transaminases in male wild-type and BLT1-KO mice. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 4-10 mice. Significantly different between the pair indicated; *, $p < 0.05$ and ***, $p < 0.001$.

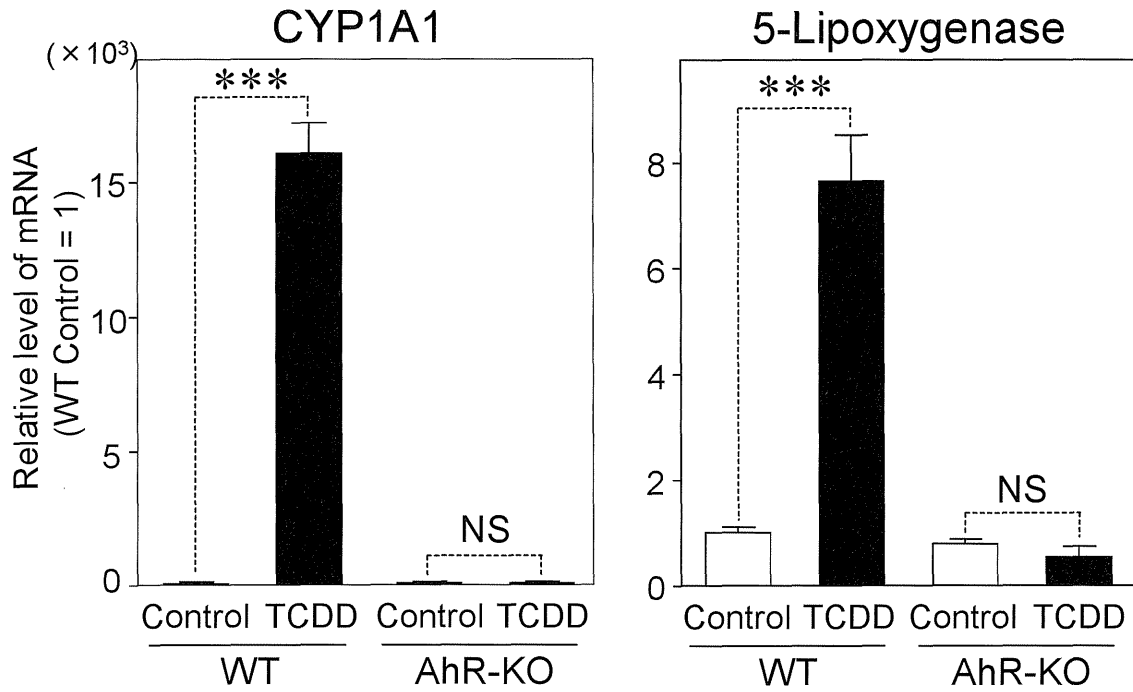


Fig. 5. Effect of TCDD on the hepatic expression of mRNAs coding for CYP1A1 and 5-lipoxygenase in male wild-type and AhR-KO rats. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 3-6 rats. Significantly different between the pair indicated; ***, $p < 0.001$. Control values of mRNA level for wild-type (% of β -actin; mean \pm S.E.M., $N=6$) were: CYP1A1, $3.13 \times 10^{-2} \pm 5.18 \times 10^{-3}$ and 5-lipoxygenase, $8.50 \times 10^{-4} \pm 9.08 \times 10^{-5}$.

分担研究報告書

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による胎児脳下垂体ホルモンへの影響：機構解析および改善方策についての検討

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
研究協力者	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 我々は、妊娠ラットへの 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 曝露により、胎児脳下垂体の黄体形成ホルモン (LH) 低下を起点として性ホルモン合成が障害され、成長後の性未成熟が固着されることを実証している。さらに、TCDD 曝露母体にクエン酸回路の必須補酵素である α -リボ酸 (LA) を補給することで、胎児視床下部におけるクエン酸回路の停滞および ATP 減少のみならず、上記の LH 低下も回復することを明らかにしている。しかし、LA による LH 低下の回復機構は不明である。そこで本研究では、LA と同様にクエン酸回路の必須補酵素である thiamine を用いて、LA による回復機構におけるエネルギー産生低下の寄与を検討した。検討の結果、TCDD による ATP 産生低下は、胎児視床下部および全脳において認められたが、TCDD 曝露母体への thiamine の補給によって LA 同様に改善することが明らかになった。しかし、胎児 LH ならびに性ホルモン合成系に対しては、thiamine 補給は部分的な回復効果を示すに止まった。これらの結果から、胎児 LH 低下に対する LA の回復機構は、ATP 増加と LA 特異的機能の複合的な作用に基づくことが示唆された。さらに、胎児脳 LA 低下の機構解析のため、合成ならびに利用に関わる酵素の発現水準を検討した結果、いずれの発現にも影響を認めなかった。従って、少なくとも TCDD はこれらの酵素の変動以外によって LA を減少させ、LH 低下を惹起することが示された。

A. 研究目的

ダイオキシンの妊娠期曝露によって出生児に生起する性未成熟等の発育障害は、発現に要する用量が小さく、生涯にわたって影響が継続するため問題が大きい (1)。当研究室では、この問題解決を目指して研究を行っており、最強のダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 1 μ g/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) が低下し、出生・成熟後の交尾行動障害が規定されることを明らかにしている (2, 3)。さらに、TCDD が胎児視床下部においてクエン酸回路の

補酵素である α -リボ酸 (LA) 減少と共にクエン酸回路停滞を惹起すること、ならびに TCDD 曝露母体に LA を補給することによりクエン酸回路の停滞のみならず LH 低下も改善することを報告している (4)。しかし、LA は生体内においてクエン酸回路以外にも様々な機能を有するため (5-8)、LH 低下に対するリボ酸の保護効果の機構は不明である。本機構を明確にすることは、ダイオキシンの障害機構解明、ならびに LA を基盤とする改善方策構築に向けて重要と考えられる。そこで本研究では、クエン酸回路停滞の寄与を検討するために、LA と共にクエン酸回路の必須補酵

素である thiamine を用いて、LH 低下に対する効果を検証した。さらに、胎児脳における LA 低下の機構に関する検討も加えた。

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、翌日膈内に精子が確認された場合、その日を妊娠 0 日目とした。妊娠 15 日目に LA を 20 mg/kg/100 μ L DMSO の用量で尾静脈内投与したのち、TCDD (1 μ g/kg/2 mL コーン油) を単回経口投与した。また、対照群には、LA の代わりには DMSO、ダイオキシンの代わりにはコーン油を投与した。妊娠 16~20 日目に、一日一回初回と同用量の LA を尾静脈内投与したのち、妊娠 20 日目の雄胎児より組織を採取した。Thiamine 投与群については、妊娠 14 日目の夕方より妊娠 20 日目までの間、thiamine 誘導体である thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide (以下 thiamine, 1 mg/mL) 含有水を自由に摂取させた。同様に、GD20 に胎児より組織を採取し、解析に供した。

2. 組織中 ATP 濃度

組織をホモジナイズしたのち、1,000 x g で 10 分間遠心分離した。上清を H₂O にて 100 倍希釈したのち、ATP 測定キット (東洋ビーネット社) を用いて測定した。

3. リアルタイム RT-PCR 法

抽出した組織より total RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (9)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies 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解析した。

4. イムノブロット解析

胎児視床下部をホモジナイズしたのち、1,000 x g にて 10 分間遠心分離した。得られた上清を用いて、LA 合成酵素タンパク質の発現量を解析した。一次抗体は、rabbit anti-rat LA synthase IgG (GeneTex 社) および mouse anti- β -actin monoclonal antibody (BioVision 社) を用いた。LA 合成酵素の発現は 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。

5. LA 定量

胎児視床下部を 50 μ L の氷冷水にてホモジナイズし、6 倍量のアセトニトリルを加えて激しく攪拌した。11,400 x g で 10 分間遠心分離したのち、上清を回収した。ペレットは、再度アセトニトリルによる抽出を行い、一回目の上清と合わせて遠心エバポレーターを用いて溶媒を留去した。残渣を 40% アセトニトリルに再溶解させたのち、UPLC-TOF-MS 装置に付して LA 含量を定量した。

(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もとに、動物の苦痛を可能な限り軽減して実施した。動物実験承認番号:A25-061-0~3。

C. 研究結果

まず、thiamine 処理により胎児視床下部においてエネルギー産生が促進されることを確認するため、TCDD 依存的な ATP 減少に対する thiamine および LA 補給の効果を検討した。検討の結果、thiamine の併用によっても、LA と同様に TCDD 依存的な ATP 減少は正常水準にまで復帰した (Fig. 1)。また、TCDD による ATP 減少が他の組織においても起こるか否かを検討したところ、全脳においても有意な低下が認められたが、末梢組織である脳下垂体、肝臓および腎臓においては変動しなかった (Fig. 1)。これらの結果から、TCDD

による胎児 ATP 減少は脳・視床下部に特異的であり、thiamine 補給によっても LA と同様にエネルギー産生を改善することが明らかになった。

次に、性ホルモン合成系低下に対する thiamine 併用の効果を検討するため、脳下垂体 LH ならびに精巣の性ホルモン合成系タンパク質の発現を解析した。LH 水準に対する影響を解析した結果、thiamine 補給によって胎児脳下垂体 LH ならびに血中 LH 濃度の低下は有意に改善したが、正常水準にまでは回復しなかった (Fig. 2)。さらに、同様の改善傾向は、精巣の性ホルモン合成の律速段階に関与するタンパク質である steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) の mRNA 低下に対しても確認された (Fig. 3)。一方、過去の成果 (4) と合致して、LA の補給は LH および StAR を共に正常水準にまで改善させた (Figs. 2 and 3)。

LA 濃度を定量した結果、本検討においても全脳において LA の低下が観察された (Fig. 4A)。そこで、LA 低下の機構解析のため、LA 合成酵素ならびに LA の利用に関わる酵素の発現変動を解析した。その結果、TCDD は胎児視床下部の LA 合成酵素 (Fig. 4B) ならびに LA 利用酵素の発現 (Fig. 4C) 共に影響を与えず、LA 低下はこれらの変動以外によって起こることが示唆された。

D. 考察

本年度の研究では、LA による胎児のホルモン合成低下に対する回復機構にエネルギー産生賦活化が寄与するか否かを明らかにするため、LA と共にクエン酸回路の必須補酵素である thiamine を用いて検討した。その結果、TCDD 曝露母体への thiamine の補給によっても、胎児 LH ならびに StAR 低下に対する有意な効果が認められた。しかし、TCDD による胎児視床下部 ATP 産生低下は、thiamine の補

給によってほぼ正常レベルにまで回復したが、LH や StAR の回復は完全ではなかった。一方、LA 補給によっても、ATP のみならず LH 低下も正常レベルに改善した。これらの結果から、LA による LH 減少に対する回復効果は、1) クエン酸回路賦活化を通じた ATP 産生促進、ならびに 2) thiamine に依存しない LA 特異的作用の複合的な機構に基づくことが示唆された。

LA はクエン酸回路の必須補酵素としての機能以外に、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性抑制 (5)、tumor necrosis factor (TNF) α および nuclear factor (NF)- κ B 経路の阻害 (6)、グリシン開裂反応 (7)、ならびに抗酸化作用 (8) 等の多彩な機能を有する。当教室ではこれまでに、数種類の抗酸化物質を用いた比較検討によって、LA による効果には抗酸化作用の寄与は小さいことを示している (4)。最近我々は、TCDD が胎児視床下部において AMPK を活性化することを示唆する結果を得ている (成績未掲載)。AMPK は、LH 発現および分泌を抑制することが報告されており (10, 11)、TCDD は AMPK 活性化に基づいて LH 発現を低下させ、LA はこれを抑制することで効果を示す可能性が考えられる。また、ダイオキシンは TNF α 誘導によって NF- κ B 経路を活性化し細胞障害性を示すが (12)、脳内における TNF α 増加は LH 合成/分泌を低下させると言う (13)。従って、LA は TCDD による脳内の TNF α 増加に対して拮抗することで LH 低下を抑制した可能性もある。今後、これらの点に着目して、TCDD による LH 抑制とこれに対する LA 効果の機構を明らかにしていくことが重要である。

LA 減少の機構解析のため、LA 合成酵素ならびに利用酵素の発現水準に対する影響を解析したが、いずれも TCDD による変動は観察されなかった。従って、

TCDD はこれらの酵素水準への影響以外によって胎児脳内の LA を減少させ、性ホルモン合成系低下を惹起することが示唆された。LA は、ミトコンドリアにおける脂肪酸酸化によって供給されるオクタン酸を原料として LA 合成酵素等によって生合成される (14, 15)。思春期ラット脳下垂体を用いて行ったメタボローム解析において、TCDD によるオクタン酸レベルの増加が推定されており (H24 年度分担研究報告)、TCDD は オクタン酸からの変換活性を低下させることで LA を減少させる可能性が考えられる。現在のところ、LA 合成酵素の活性制御に関しては不明な点が多いが、少なくとも活性中心に鉄-硫黄クラスターを有することが明らかにされている (15)。TCDD は、腎臓細胞において貯蔵や取り込み異常によって鉄の恒常性を破綻させるため (16)、胎児脳においても同様のことが起こることで酵素活性が抑制される可能性がある。また、LA は胎盤に発現する sodium-dependent multivitamin transporter によって胎児への循環が起こるため (17)、TCDD が母体の LA 量に及ぼす影響についても無視はできない。いずれにせよ、TCDD は LA 減少に基づいて胎児障害性を惹起すると考えられるため、引き続き LA 減少の機構解析を行うことが重要である。

E. 結論

TCDD 依存的な胎児・性ホルモン合成障害に対する LA の保護効果は、クエン回路賦活化によるエネルギー産生促進と LA 特異的な他の作用の複合的な機構に基づくことが示唆された。

F. 研究発表

1. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー (つくば、2014 年 9 月 19 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) Mutoh, J., Taketoh, J., Okamura, K., Kagawa, T., Ishida, T., Ishii, Y., Yamada, H. *Endocrinology*, **147**: 927-936 (2006).
- 3) 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).
- 4) Koga, T., Ishida, T., Takeda, T., Ishii, Y., Uchi, H., Tsukimori, K., Yamamoto, M., Himeno, M., Furue, M., Yamada, H. *PLoS ONE*, **7**: e40322 (2012).
- 5) Kim, M. S., Park, J. Y., Namkoong, C., Jang, P. G., Ryu, J. W., Song, H. S., Yun, J. Y., Namgoong, I. S., Ha, J., Park, I. S., Lee, I. K., Viollet, B., Youn, J. H., Lee, H. K., Lee, K. U. *Nat. Med.*, **10**: 727-733 (2004).
- 6) Vig-Varga, E., Benson, E. A., Limbil, T. L., Allison, B. M., Goebel, M. G., Harrington, M. A. *Gynecol. Oncol.*, **103**: 45-52 (2006).
- 7) Fujiwara, K., Motokawa, Y. *J. Biol. Chem.*, **258**: 8156-8162 (1983).
- 8) Rosenberg, H. R., Culik, R. *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**: 86-93 (1959).
- 9) 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).
- 10) Lu, M., Tang, Q., Olefsky, J. M., Mellon, P. L., Webster, N. J. *Mol. Endocrinol.*, **22**: 760-771 (2008).
- 11) Wen, J. P., Lv, W. S., Yang, J., Nie, A. F., Cheng, X. B., Yang, Y., Ge, Y., Li, X. Y., Ning, G. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun., **371**: 756-761 (2008).
- 12) Fan, F., Yan, B., Wood, G., Viluksela, M., Rozman, K. K. *Toxicology*, **116**: 9-16 (1997).
- 13) Watanobe, H., Hayakawa, Y. *Endocrinology*, **144**: 4868-4875 (2003).
- 14) Parry, R. J. *Tetrahedron*, **39**: 1215-1238 (1983).
- 15) Cronan, J. E., Zhao, X., Jiang, Y. *Adv. Microb. Physiol.*, **50**: 103-146 (2005).
- 16) Santamaria, R., Fiorito, F., Irace, C., De Martino, L., Maffettone, C., Granato, G. E., Di Pascale, A., Iovane, V., Pagnini, U., Colonna, A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**: 704-712 (2011).
- 17) Prasad, P. D., Ramamoorthy, S., Leibach, F. H., Ganapathy, V. *Placenta*, **18**: 527-533 (1997).