

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。

2. 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。

3. 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。

4. 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 欠損は肝臓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、肝臓 LTB4 増加が TCDD による炎症亢進ならびに肝臓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. 6)。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 による肝臓 LTB4 増加が、好中球浸潤を通して炎症応答を亢進し、肝臓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、肝臓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 による肝臓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).