

## 分担研究報告書

### 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin の生体影響とダイオキシンに対する拮抗作用

研究分担者 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** 本研究では、ダイオキシン毒性の新たな軽減策の創出を目指す取り組みとして、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の 4 つの塩素原子をフッ素原子に置換した 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD) を合成し、その生体毒性ならびにダイオキシンに対する拮抗作用を検討した。雄ラットに TFDD (1~1000 µg/kg) を単回経口投与し、投与 1 日後および 7 日後において体重変化、臓器重量およびダイオキシンにより誘導する遺伝子である cytochrome P450 (CYP) 1A1 の酵素活性を測定した。その結果、TCDD によって起こる肝肥大、胸腺萎縮、体重増加抑制ならびに CYP1A1 活性誘導のいずれに関しても、TFDD 投与によっては全く観察されなかった。さらに、ヒト乳がん細胞株である T47D 細胞に対して、TCDD (500 pM) と共に TFDD (100 fM~10 µM) を併用処理したところ、100 nM 以上の TFDD 併用によって TCDD 依存的な CYP1A1 発現誘導が抑制された。これらの結果から、TFDD はラットへの単回経口投与によってはダイオキシン様の急性毒性を示さないこと、ならびに細胞レベルで TCDD に対して拮抗作用を持つことが明らかになった。

#### A . 研究目的

ダイオキシン類は、消耗症状、肝毒性ならびに免疫毒性などの様々な急性毒性を惹起する (1)。また、妊娠期母体の比較的低用量の曝露によって、出生児に種々の発育障害が生起する (2)。カネミ油症等の被害者の追跡調査や疫学的研究の蓄積から、ダイオキシンが人体に及ぼす影響の大きさが危惧されており、早期の治療および予防法の確立が求められている。

ダイオキシンによる毒性発現には、芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AHR) が重要な役割を担うと考えられている (3)。すなわち、AHR はダイオキシンとの結合により核内へと移行し、cytochrome P450 (CYP) 1A1 等の標的遺伝子の転写調節領域に存在する xenobiotic responsive element (XRE) への結合を介して、これらの発現を変動させる。変動遺伝子は数百種類も存在し (4)、これ

らが複合的に毒性に寄与すると考えられている。従って、ダイオキシン類の治療方策を考える上では、AHR を標的とした戦略が有効であることは論を待たない。このような背景のもと、現在までに多くの研究が行われており、複数の食品成分が AHR 活性化を抑制し、ダイオキシン毒性を抑制する可能性が見出されている (5)。しかし、バイオアベイラビリティや AHR に対する親和性あるいは特異性の問題等から、いずれも生体内において十分な軽減効果は得られていない。

本研究では、AHR への親和性が最も高いダイオキシン同族体として知られる 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (1) (Fig. 1) の構造上の利点に着目し、TCDD の塩素原子を全てフッ素原子に置換した 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD) (Fig. 1) を新規に合成した。通常、ダイオキシン類は生体への高い蓄積性に

よって強い毒性作用を示すが、TFDD は生体内において比較的代謝されやすいことが報告されている (6)。従って、もし TFDD が TCDD と同様に AHR への高い親和性や特異性を有する一方で、体内貯留性が低いならば、より低毒性かつ選択的なダイオキシン拮抗剤として期待される。しかし、TFDD 自身の AHR 結合力や活性化能力ならびに生体影響は全く不明である。そこで本研究では、TFDD 自身がダイオキシン様の急性毒性を惹起するか否かを検証すると共に、TCDD による AHR 活性化に対する拮抗作用を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 動物実験

TFDD は、林純薬工業株式会社に委託して合成した。5 週齢の Wistar 系雄性ラットに、TFDD (1, 10, 100 および 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、TCDD (60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) あるいは対照群としてコーン油を単回経口投与し、投与翌日より 1 日 1 回体重を測定した。投与 1 日後または 7 日後に組織を採取したのち、肝臓は 4 倍量の 1 M Tris-HCl (pH7.4) にてホモジナイズした。9,000 x g で 25 分間遠心分離したのち、得られた上清 (S9) を以下の実験に供した。

### 2. 細胞培養

T47D 細胞は、48 穴プレートに播種し、DMEM (10% 牛胎児血清含有) 中にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。接着を確認したのち、TCDD (500 pM) を添加した DMEM に置換して継続培養した。1 時間後、TFDD (100 fM~10  $\mu\text{M}$ ) を培地中に添加してさらに 23 時間培養したのち、細胞を回収した。細胞は、50 mM Tris-HCl にて懸濁し、以下の実験に供した。

### 3. CYP1A1 活性測定

肝 S9 および T47D 細胞における CYP1A1 活性は、7-ethoxyresorufin の O-脱アルキル化反応により生じる resorufin の蛍光測定により算出した (励起光: 544

nm; 測定光: 590 nm) (7)。反応に用いたタンパク質量および反応時間はそれぞれ以下の通りである。肝 S9: 200  $\mu\text{g}$ 、3 分; T47D 細胞: 50  $\mu\text{g}$ 、2 時間。

### 4. CYP1A1 タンパク質発現

T47D 細胞溶解液を用い、イムノブロット法によって CYP1A1 タンパク質発現を解析した。さらに、標準タンパク質として  $\beta$ -actin も検出した。電気泳動に用いた細胞溶解液のタンパク質量: 5  $\mu\text{g}$ 。

(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: A28-209-0。

## C. 研究結果

まず、TFDD が AHR 活性化を通して生体毒性を示すか否かを明らかにするため、ダイオキシン曝露によって起こる肝肥大、胸腺萎縮、体重増加抑制ならびに CYP1A1 の活性誘導を指標として検討を実施した。ラットに TFDD を 1~1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量で単回経口投与したのち、投与 1 日後および 7 日後に組織を摘出して解析を行った。その結果、肝肥大、胸腺萎縮ならびに体重増加抑制のいずれの急性毒性も、TFDD によっては全く認められなかった (Fig. 2A and 2B)。さらに、これらと合致して、AHR 活性化によって誘導される CYP1A1 の酵素活性にも変化は観察されなかった (Fig. 2C)。

一方、TFDD が肝臓および胸腺以外の臓器重量に与える影響を調べた結果、投与 1 日後においては腎臓および心臓の萎縮と肺の肥大化が確認された (Fig. 3)。また、投与 7 日後においては心臓の萎縮のみは継続して見られ、加えて脾臓の肥大が惹起された (Fig. 3)。

次に、TCDD による AHR 活性化に対

する TFDD の拮抗作用を調べるため、T47D 細胞を用いて CYP1A1 のタンパク質発現ならびに活性を指標として検討を行った。その結果、500 pM の TCDD 処理によって、CYP1A1 発現ならびに酵素活性は顕著に誘導したが、どちらも TFDD 併用によって 100 nM 以上では用量依存的に抑制される傾向が観察された。本検討において、CYP1A1 活性を指標とする TFDD の 50% 阻害濃度は、 $45.9 \pm 3.1$  nM と算出された。一方、TFDD の単独処理においては、CYP1A1 活性に対する影響は観察されなかった (Fig. 4C)。

#### D. 考察

本研究では、ラットへの TCDD の単回経口投与によって起こる体重増加抑制や CYP1A1 発現誘導の 50% 効果量が、10  $\mu$ g/kg 前後であるとの知見 (8) に基づき、同様な TFDD 処理によっても急性毒性が惹起するか否かを検討した。その結果、1 mg/kg までの用量の TFDD の単回経口投与によっては、肝肥大、胸腺萎縮、体重増加抑制および CYP1A1 活性の誘導のいずれも観察されず、TFDD は生体内においてダイオキシン様の急性毒性を示さないことが示唆された。本研究では、組織中の TFDD レベルは測定しておらず、投与した TFDD が充分ではなかった可能性は否定できない。事実、マウス腹腔内に TFDD を投与した場合、24 時間後には肝臓中レベルが投与量の 1~2 % 程度にまで減少することが報告されている (9)。しかし、毒性が十分に認められる TCDD 量の 100 倍量の TFDD を与えても全く影響が見られなかったことを踏まえ、一過的な TFDD 処理によっては、ダイオキシン様の急性毒性作用を有さないか、あるいは非常に弱いと考えるのが妥当と思われる。新たなダイオキシン拮抗剤としての TFDD の有用性を提示するため、引き続き組織中の TFDD レベルを正確に把握

すると共に、長期的または継続的な処理による影響の有無についても精査していくことが必要であろう。

本研究では、AHR を発現するヒト乳腺がん細胞株である T47D 細胞を用いて、TCDD による AHR 活性化に対する TFDD の拮抗作用を検討した。その結果、TFDD は TCDD 依存的な CYP1A1 の誘導を用量依存的に抑制することが明らかになった。また、500 pM TCDD による CYP1A1 誘導に対する TFDD の 50% 阻害濃度は 45.9 nM であったことから、TFDD は TCDD の約 100 倍高い濃度を処理することで拮抗作用を示すことも確認された。一方、10  $\mu$ M までの TFDD 単独処理では、CYP1A1 の誘導は全く観察されなかった。従って、TFDD 自身は AHR 活性化を起こさず、ダイオキシンによる AHR 活性化に対して拮抗作用を持つことが示唆された。先述の通り、本研究では TCDD が毒性を惹起する用量の 100 倍量の TFDD をラットに与えてもダイオキシン様の急性毒性が見られなかった事実を合わせて考えると、TFDD は生体に対して毒性を示さず、ダイオキシン毒性を軽減しうることが期待される。今後、阻害効果を示す用量関係を踏まえ、生体毒性に対する拮抗作用について検証を進めていきたい。

本研究においては、TFDD が腎臓、心臓、肺および脾臓の萎縮あるいは肥大化を惹起することを確認した。しかし、その殆どが軽微な重量変化であった。ただし、心臓の萎縮のみは、投与 1 日後に止まらず、投与 7 日後にまで継続して見られたため、この点については注視すべきであるかもしれない。関連して、フッ素化炭化水素は、心臓の機能を障害することが報告されており (10)、フッ素化合物の中には心臓において酸化的ストレスを亢進させ、ミトコンドリア機能障害を惹起するものもあるという (11)。従って、TFDD も同様の機

構によって心臓に影響を及ぼす可能性は否定できない。これらの組織への影響の実態を明確にしていくことも、ダイオキシン毒性軽減剤としての有用性を担保する上で重要と思われる。

#### E. 結論

TFDD の単回経口投与は、1 mg/kg までの用量では AHR 活性化作用を示す可能性は低く、典型的なダイオキシン様急性毒性を示さないことが確認された。さらに、細胞レベルにおいては、TFDD は TCDD 依存的な AHR 活性化に対して抑制作用を持つことが明らかになった。

#### F. 研究発表

特になし。

#### 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. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **22**: 517-554 (1982).
- 2) Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. *Crit Rev Toxicol*, **23**: 283-335 (1993).
- 3) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-179 (1996).
- 4) Frueh FW, Hayashibara KC, Brown PO, Whitlock JP Jr. *Toxicol Lett*, **122**: 189-203 (2001).
- 5) Amakura Y, Tsutsumi T, Sasaki K, Nakamura M, Yoshida T, Maitani T. *Phytochemistry*, **69**: 3117-3130 (2008).
- 6) Schmitz HJ, Weber R, Hagenmaier A, Hagenmaier H, Poellinger L, Schrenk D. *Environ Toxicol Pharmacol*, **3**: 105-113 (1997).
- 7) Burke MD, Mayer RT. *Drug Metab Dispos*, **3**: 245-253 (1975).
- 8) Taura J, Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Ishii Y, Kuroki H, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Yamada H. *Toxicol Appl Pharmacol*, **281**: 48-57 (2014).
- 9) Weber R, Schrenk D, Schmitz HJ, Hagenmaier A, Hagenmaier H. *Chemosphere*, **30**: 629-639 (1995).
- 10) Uttamsingh V, Iyer RA, Baggs RB, Anders MW. *Anesthesiology*, **89**: 1174-1183 (1998).
- 11) Miltonprabu S, Thangapandiyan S. *J Trace Elem Med Biol*, **29**: 321-335 (2015).