

博士論文

経母乳ダイオキシン曝露によるマウス新生仔水腎症発症
への PGE₂ 合成系の関与と感受性因子の発見

安岡（相田）圭子

目次

要旨	5
略語一覧	6
第1章 はじめに	9
1.1 ダイオキシンとは	9
1.2 ダイオキシン毒性と芳香族炭化水素受容体(aryl hydrocarbon receptor; AhR) .	13
1.3 AhR 下流のシグナルと TCDD 毒性に関わる因子との関連—授乳期水腎症を中心 に	14
1.4 研究の目的	18
第2章 方法	20
2.1 実験動物	20
2.2. 新生仔期経母乳曝露実験	24
2.3 遺伝子型解析	27
2.4 腎組織解析	29
2.5 RNA 抽出と quantitative real-time reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR)....	30
2.6 尿浸透圧測定	31
2.7 クロマチン免疫沈降法	32
2.8 PGE ₂ ASSAY	34
2.9 EP1 免疫染色	35
2.10 統計解析	35
第3章 結果	36
3.1 PGE ₂ 合成酵素 mPGES-1 発現と水腎症発症との関連	36

3.1.1	mPGES-1 遺伝子型と水腎症発症率	36
3.1.2	PGE ₂ 誘導における mPGES-1 の役割	39
3.1.3	TCDD 曝露による新生仔腎臓での遺伝子発現の変化	40
3.2	PGE ₂ 以降のシグナル伝達を担う PGE ₂ 受容体と TCDD 曝露における水腎症発症との関連	45
3.2.1	EP 受容体と水腎症発症率	45
3.2.2	EP1 免疫染色	53
3.3	TCDD 高感受性マウス 2 系統を用いた水腎症発症率の比較	55
3.3.1.	C57BL/6J 並びに BALB/cA 仔マウスの水腎症発症率	55
3.3.2.	TCDD 経母乳曝露マウスの腎臓における AhR 標的遺伝子の発現	57
3.3.3	C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスにおける尿中 PGE ₂ 濃度と PGE ₂ 合成に影響を及ぼす遺伝子発現	60
3.3.4	TCDD 曝露での mPGES-1 遺伝子発現を調節する因子の探索	64
3.3.5	C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウス腎臓における水チャンネル、電解質輸送体遺伝子発現と尿浸透圧	69
第 4 章	考察	72
4.1	TCDD による PGE ₂ 合成ならびに PGE ₂ 合成酵素 mPGES-1 誘導と水腎症発症との関連	72
4.1.1	mPGES-1 遺伝子欠損マウス実験の妥当性	73
4.1.2	TCDD 曝露による PGE ₂ 産生増加が水腎症を引き起こす	74
4.1.3	PGE ₂ 以外のプロスタノイドと TCDD 曝露による水腎症発症との関連	74
4.2	PGE ₂ 以降のシグナル伝達を担う PGE ₂ 受容体と水腎症発症との関連	78
4.2.1	授乳期 TCDD 曝露における水腎症発症に関連する EP 受容体	79
4.2.2	EP1 受容体が新生仔集合管における水および電解質輸送体に及ぼす影響	81

4.2.2.1	EP1 受容体と AQP2.....	81
4.2.2.2	EP1 受容体と epithelial sodium channel (ENaC)	83
4.3	TCDD 高感受性マウス 2 系統を用いた水腎症発症率の比較	84
4.3.1	AhR 以外の TCDD 毒性感受性因子	84
4.3.2	TCDD 曝露における mPGES-1 誘導.....	86
4.3.3	ダイオキシン経母乳曝露と水電解質輸送体.....	91
	引用文献.....	96

要旨

環境中化学物質のダイオキシン(TCDD)は、発がんならびに免疫機能、生殖機能、高次脳機能の攪乱など多彩な毒性を示す。毒性発現には aryl hydrocarbon 受容体 (AhR)を要するが、これらの毒性の分子基盤はほとんど解明されていない。本研究では、TCDD による授乳期水腎症の発症のメカニズムを検討した。その結果、prostaglandin E₂ 合成系が TCDD による授乳期水腎症に関わり、prostaglandin E₂受容体のうち EP1 が発症に関与していることが明らかとなった。

略語一覽

AA; afferent arteriole

AhR; aryl hydrocarbon receptor

AhRE; aryl hydrocarbon receptor responsive element

AhRR; aryl hydrocarbon receptor repressor

AIP; AhR-interacting protein

AQP2; aquaporin 2

Arnt; arylhydrocarbon receptor nuclear translocator

AVP; arginine vasopression

bHLH-PAS; basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim

cPLA₂ α ; cytosolic phospholipase A₂ alpha

CD; collecting duct

COX-1; cyclooxygenase-1

COX-2; cyclooxygenase-2

CYP1A1; cytochrome P450 1A1

DNA; deoxyribonucleic acid

DRE; dioxin responsive element

EA; efferent arteriole

ENaC; epithelial sodium channel

EP; prostaglandin E₂ receptor

G; glomerulus

KO; knockout

LD; lethal dose

LRP6; low-density lipoprotein receptor-related protein 6

MAP; mitogen activated protein

mPGES-1; microsomal prostaglandin E₂ synthase-1

NKCC2; sodium-potassium-chloride transporter 2

PCB; polychlorinated biphenyl

PCDD; polychlorinated dibenzodioxin

PCDF; polychlorinated dibenzofuran

PGE₂; prostaglandin E₂

PKC; protein kinase C

PM_{2.5}; particulate matter less than 2.5 micrometer in diameter

qRT-PCR; quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain
reaction

RAA ; renin-angiotensin-aldosterone

ROMK; renal outer-medullary K

SK channel; ROMK-like small-conductance K channel

TAL; thick ascending limb

TCDD; 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

TDL; thin descending limb

TEF; toxicity equivalency factor

WHO; world health organization

Wnt; wingless-related MMTV integration site

WT; wild type

XRE; xenobiotic response element

第1章 はじめに

1960年代から70年代はダイオキシン類による環境汚染^aが報告され、1990年代ではダイオキシン類も内分泌攪乱物質としてその生体への影響が世界中で懸念された^b。ダイオキシン毒性の発症に芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AhR) ^cが必須であることが研究で明らかになっている¹⁻³。しかしながら、AhR 下流の標的遺伝子を介した細胞情報伝達の攪乱が、さらにその下流でどのようなメカニズムを介して多種多様な毒性を生じるかは未解明な点が多い。本研究では、TCDD 毒性の典型である水腎症に着目し、水腎症発症における感受性因子の探求を博士論文のテーマとした。以下にこの研究に関わる背景情報を記す。

1.1 ダイオキシンとは

ダイオキシン類および関連化合物は、ポリ塩化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン (PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)、およびポリ塩化ビフェニル(PCB)

^a ベトナム戦争で使われた枯葉剤、1968年日本のカネミ油症事件、1976年イタリア北部セベソの農薬工場爆破によるダイオキシン汚染が挙げられる。

^b 化学物質がホルモン受容体に結合または阻害することで現れる生殖毒性、催奇形性、発がんなどがシーア・コルボーンらの「奪われし未来」で指摘された。1992年の国連環境開発会議（地球サミット）では世界レベルでの化学物質対策が行動計画に採択され、2001年にはダイオキシン類を含む残留性汚染物質の削減を進めるストックホルム条約が採択された。

^c ダイオキシン類の毒性を決定する因子。Poland らによりクローニングされ、ダイオキシン類と結合することが証明された。詳細は 1.2 を参照。

の 3 つの骨格の同族体^dの総称である⁴。これらは塩素で置換された 2 つのベンゼン環という共通の骨格を持つ化合物群である。ダイオキシン類は廃棄物焼却施設などから環境中に排泄され、大気中に排出されたものが土壌に蓄積したり、また水域に排出されたものが食物連鎖によって濃縮される⁵。ダイオキシン類が体内に取り込まれると脂肪にとどまるため体外への排出速度は遅く、蓄積されたダイオキシン類が体内で半分の量になるために約 7 年かかる⁶。

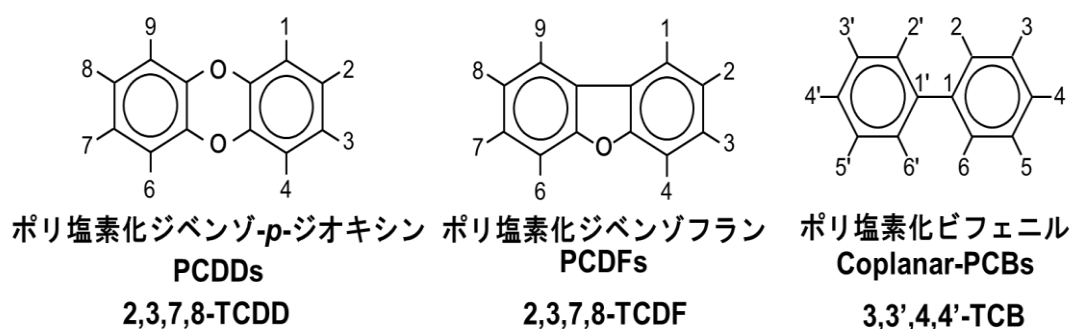


図 1 ダイオキシン類の構造式

ダイオキシン類の異性体^e419 種類のうち、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は最も毒性の強い同族体であり、この同族体を基準に他のダイオキシン同族体の総体毒性が表示される。そのため、TCDD には毒性等価係数 Toxicity equivalency factor (TEF)^f1 が付与されている^{7, 117}。ダイオキシン

^d 置換基の数が異なる化合物の一群。

^e 置換基の位置が異なる化合物の一群。

^f 最も毒性の強い TCDD の TEF を 1 として、他のダイオキシン類の毒性の強さを換算した値。値は毒性学的研究をもとに 0 から 1 で示される。

類の環境汚染に関する報告ならびにそのリスク評価の検討が求められ、1998年 WHO での会議において TEF が見直された。また PCDD と PCDF に加えてコプラナーPCB^gもダイオキシン類に加わり、TCDD と類似の毒性を持つ同族体 29 種類がダイオキシン類としてリスク評価と管理の対象になった⁸。また2006 年には難燃剤に含まれる物質を燃焼することで産生される臭素化ダイオキシン類^hも PCDD 同様の毒性を持つと報告されている⁹。

ダイオキシン類の耐容一日摂取量 (Tolerable daily intake; TDI)は1998年 WHOでは体重1 kgあたり最大4 pg-TEQⁱである。(目標は1 pg-TEQに設定された。) 日本では、調査開始後間もない平成10年のTDIが1.75 pg-TEQ/kg bw/日、平成9年の計測地点における大気中のダイオキシン類(PCDD+PCDF)濃度が0.6 pg-TEQ/m³であった。しかし、廃棄物焼却施設でのダイオキシン類の測定義務やダイオキシン類の排出量の目録を制定し定期的に見直す作業といった対策が講じられた結果、平成25年度食品からのダイオキシン類一日摂取量は平均0.32-pg TEQ/kg bw/日、大気中のダイオキシン類(PCDD+PCDF)濃度は平成

^g PCB の中で平面構造を取るもの。

^h 臭素系ダイオキシン類は PCDDs または PCDFs の塩素が一つ以上臭素に置換されたもの。このうち、全ての塩素が臭素に置換されたものを臭素化ダイオキシン類と呼ぶ。国際化学安全性計画 (International Programme on Chemical Safety; IPCS)において、臭素化ダイオキシン類の同族体に対応する塩素化ダイオキシン類の TEF を暫定的に当てはめてリスク評価をすることが提言されている。

ⁱ毒性等量 (Toxicity equivalency quantity; TEQ)。ダイオキシン類の異性体ごとの TEF に存在量を考慮して算出した値。

15年度以降0.02 pg-TEQ/m³未満を推移している^{10,11}。

上記のようなダイオキシン類の排出規制やダイオキシン類一日摂取量の減少により、日本におけるヒト血漿や母乳中のダイオキシン類濃度も著明に低下した¹³²。血漿中のダイオキシン類濃度と母乳中のダイオキシン類濃度の相関が指摘され、かつ血漿中ダイオキシン類濃度と母乳中ダイオキシン類濃度の比はダイオキシン類の体内負荷量を示す指標として用いられている¹³³。マウスを含む齧歯類を用いたダイオキシン類曝露実験では母マウスから直接搾乳することは難しく、母乳中のTCDD濃度の測定は困難である。一般的にマウスでは母乳中のTCDD濃度を測定する代わりに、TCDDの受容体である芳香族炭化水素受容体が発現を調節する遺伝子を用いて仔のTCDD曝露の程度を評価する手法が用いられる¹³。（芳香族炭化水素受容体については次章で述べる。）所属教室の先行研究で出産後TCDD曝露された母マウスの仔の胃内容物TCDD濃度を測定したところ、仔マウス胃内容物TCDD濃度は高濃度で、仔マウスはTCDD経母乳曝露を受けていることが明らかになった¹³⁴。

1.2 ダイオキシン毒性と芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AhR)

TCDD は脂溶性で細胞膜を容易に通過し、細胞質では TCDD が AhR, heat shock protein 90, AHR-interacting protein (AIP), p23 と結合することで複合体を活性化し核内へ移行する¹²。核内では TCDD-AhR 複合体が核内に存在する転写因子である Arnt とヘテロ二量体を形成後、種々の遺伝子の転写調節領域に存在する異物応答配列に結合し¹²、Sp1 等転写活性化因子と共に遺伝子の転写を促進する¹² (図 1-1)。AhR によって転写が促進される遺伝子の代表に cytochrome P450 1A1、UDP-glucuronosyltransferase、aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) などがあり¹³、AhR 標的遺伝子数は C57BL/6 系統マウス肝細胞における DNA マイクロアレイ解析で 1752 遺伝子が AhR 活性化で誘導され、1100 遺伝子が抑制された¹⁴。

^j xenobiotic response element ; XRE,ダイオキシン応答配列 dioxin responsive element; DRE、またはアリール炭化水素受容体応答配列 aryl hydrocarbon receptor responsive element; AhRE と呼ばれる。

1.3 AhR 下流のシグナルと TCDD 毒性に関わる因子との関連—授乳期水腎症を中心に

AhR 遺伝子の存在が TCDD 毒性の発現にとって必須であることは AhR 欠損マウスを用いて証明されている¹⁻³が、AhR の下流でどのようにして TCDD 毒性の発現に至るのかということについては不明な点が多い (図 1-1)。胎児期や乳幼児期の臓器の発育・再生過程において、活性化 AhR を介した TCDD 毒性発現にある種の因子が関与するとの報告がある (図 1-2)。例えば、マウス胎児期 TCDD 曝露による前立腺の形成不全には、TCDD によって活性化した AhR が wingless-related MMTV integration site (Wnt)シグナルを攪乱すること^{15,16}や、ゼブラフィッシュの尾鰭再生や顎の形成不全が活性化 AhR から R-spondin 1 を介して生じると報告されている¹⁷。

本研究で着目した齧歯類における授乳期水腎症も AhR 欠損マウスで発症しない典型的な TCDD 毒性である²。水腎症は、腎盂・腎杯が拡張している症状で、ヒト新生児における発症の原因は 62%が尿路の閉塞である¹⁸。TCDD 曝露による授乳期水腎症については、尿路が閉塞しないことが腎盂・尿管の組織学的解析と腎盂からのインク注入実験によって証明されている¹⁹。従って、尿

路閉塞が発症の原因でなく、何らかの腎機能の異常^kが原因だと考えられた。

TCDD 曝露による水腎症発症腎において COX-2 の発現上昇が AhR 依存的に生じること、さらに COX-2 酵素活性の阻害が発症を抑制することが明らかになっている²¹ことから、COX-2 活性の下流で産生される生理活性物質が発症の原因となると推定されるが、そのような生理活性物質は明らかになっていなかった。

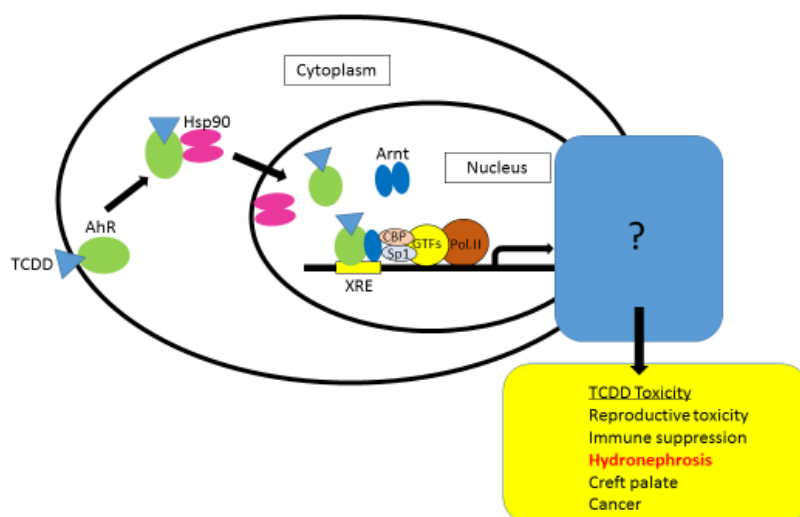


図 1-1 AhR の活性化による genomic pathway と多様な TCDD 毒性現象。
AhR 活性化以降、TCDD 毒性を引き起こす分子機序は不明である。

^k電解質輸送体 NKCC2, ROMK 遺伝子異常を原因とする Bartter 症候群や Gitelman 症候群、そして中枢性(抗利尿ホルモン分泌低下)または腎性尿崩症(抗利尿ホルモン受容体機能異常)による尿濃縮異常による尿量の増加も水腎症の原因に挙げられる²⁰。

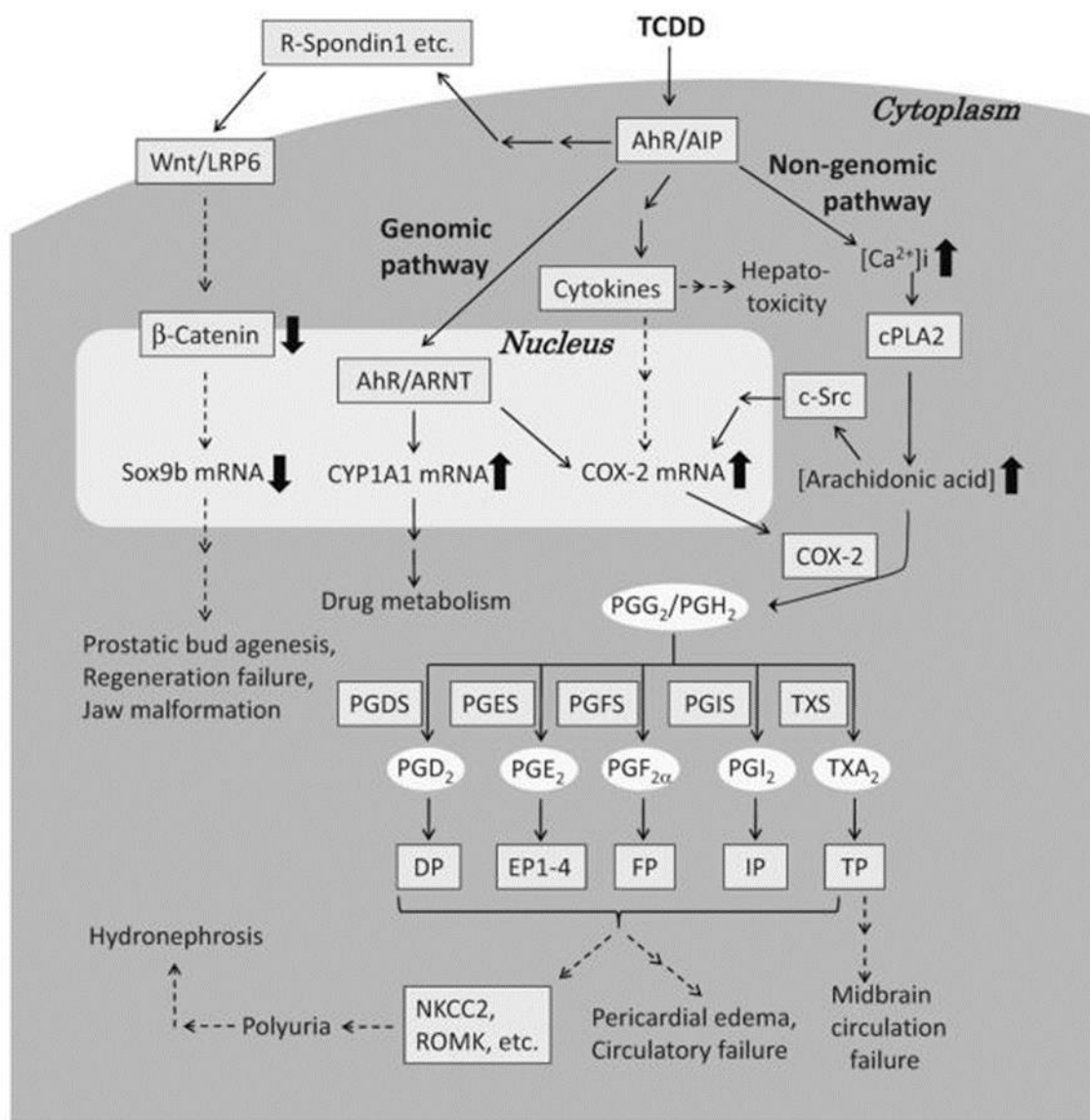


図 1-2 TCDD 毒性における毒性現象とその分子機序に関する提言 (Yoshioka et al., 2012, J Steroid Biochem Mol Biol. ²² より)。

COX-2 下流の生理活性物質には、PGE₂をはじめ PGD₂、PGF_{2α}、PGI₂、TXA₂ といったプロスタノイドが挙げられる (図 1-2)。これらは生体内で合成されると、autocrine/paracrine に標的の細胞に到着し、それぞれの受容体を介して様々な生理活性を示す。例えば、PGE₂は体温中枢である視索前野にある PGE₂

受容体 EP3 を介して発熱に関与したり¹³⁶、脂肪組織で産生される PGE₂ は前駆脂肪細胞の EP4 受容体を介して脂肪細胞の分化を抑制する¹³⁷。卵巣で作られる PGF₂α は、卵巣 FP 受容体を介して黄体退縮を促進させることで分娩を誘発する¹³⁸。プロスタノイド生理作用の特徴は、各プロスタノイド産生細胞の近隣で、それぞれのプロスタノイド受容体を有する組織が生理活性の対象であることである。この特性を活かし、ダイオキシン曝露による水腎症に関わるプロスタノイドを明らかにすることで、標的となるプロスタノイドの受容体の局在へ研究がつながり、更に受容体の局在と病態を結ぶことで、ダイオキシン毒性の分子学的機序が明らかになると私は考える。

1.4 研究の目的

ダイオキシン類により発がん、免疫抑制、生殖・発生異常、口蓋列や水腎症などの奇形といった多様な毒性現象が生じること、さらにその発症に AhR が必須であることが研究で明らかになっている。しかしながら、AhR 下流の標的遺伝子を介した細胞情報伝達の攪乱が、さらにその下流でどのようなメカニズムを介して、このような多種多様な毒性を生じるかは未解明な点が多い。これらの毒性現象のうち、私はダイオキシン類の毒性の典型例である授乳期水腎症に焦点を当てた。不明点の多い TCDD の毒性発現機序研究の中で、授乳期 TCDD 曝露による水腎症の発現の原因となる酵素 cyclooxygenase-2 (COX-2)¹ が特定されている¹⁹という特筆すべき点があった。本研究では、授乳期 TCDD 曝露による水腎症発症について、COX-2 が産生に関与するプロスタノイド^mが授乳期 TCDD 曝露による水腎症発症の感受性決定因子であるという仮説を立て、水腎症発症における感受性決定因子の探求を博士論文のテーマとした。COX-2 より下流にあるプロスタノイド合成経路、特に腎臓で多様な役割をもつ PGE₂ に着目し以下の 3 つの実験研究を行った。

1) PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 発現と水腎症発症との関連

¹ 細胞膜リン脂質から生理活性物質であるプロスタノイド産生に至る経路（アラキドン酸カスケード）に存在する酵素。アラキドン酸からプロスタグランジン G₂/H₂ を合成する。
^m プロスタグランジン、プロスタサイクリン、トロンボキサンより成る生理活性物質。循環動態、炎症、発がん等、役割は各臓器で多岐にわたる。

mPGES-1 野生型マウスと欠損マウスを用いて授乳期に TCDD 曝露を行い、仔マウスの水腎症発症率を比較した。mPGES-1 が授乳期 TCDD 曝露における水腎症発症に必須であるか否かを検討した。

2) PGE₂ 以降のシグナル伝達を担う PGE₂ 受容体と水腎症発症との関連

PGE₂ 受容体(EP1, EP2, EP3, EP4)のいずれが水腎症発症に関連するのかを、欠損マウス(EP1, EP2, EP3)または阻害剤(EP4)を用いて検証した。

3) TCDD 高感受性マウス 2 系統を用いた水腎症発症率の比較

AhR 一次構造や解離定数が同等である C57BL/6J マウスと BALB/cA マウスを用い、授乳期 TCDD 曝露による水腎症発症率および発症機序を検討した。

第 2 章 方法

2.1 実験動物

mPGES-1 ならびに PGE₂ 受容体 (EP1 から EP4) と水腎症発症との関連を調べるために、各欠損マウスを用いた。mPGES-1 欠損マウスは昭和大学原俊太郎先生より EP1, EP2 ならびに EP3 欠損マウスは京都大学成宮周先生よりご提供いただいた。下記の C57BL/6J 野生型マウス、C57BL/6J 妊娠マウス、BALB/cA 妊娠マウスは日本クレア（東京、日本）より購入した。

固形試料および水は自由飲水させ、明暗周期 12 時間（明周期午前 8 時から午後 8 時、暗周期午後 8 時から翌朝 8 時）、室温 23°C の環境で飼育した。実験動物における試験プロトコールは東京大学大学院医学系研究科長によって承認された。（承認番号 医-P 11-055, 医-H 14-205）

2.1.1 PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 発現と水腎症発症との関連

mPGES-1 欠損マウスは遺伝背景が BALB/cA である。私の実験では BALB/cA マウスでは TCDD 80 µg TCDD/kg を出産後 1 日の母マウスに経口投与しても仔マウスは水腎症を発症しなかった（実験プロトコールは図 2-6、結果は図 3-10、表 3-6）。従って、遺伝背景が BALB/cA 由来の mPGES-1 欠損マウスと C57BL/6J 野生型マウスとの交配によって mPGES-1 ヘテロマウス F1 を作成

し、ヘテロマウス雌雄を交配させて生まれた雄仔 F2 を用いた (図 2-1)。mPGES-1 遺伝子型における水腎症重症度を比較検討した。遺伝背景に関する考察ならびに本実験系の妥当性は 4.1.1 で述べる。

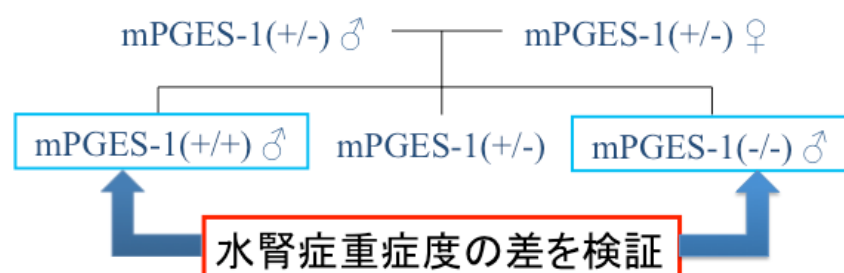


図 2-1 mPGES-1 遺伝子と水腎症発症に関する実験デザイン

また、本研究は BALB/cA (AhR 遺伝子型は AhRb2) と C57BL/6J (AhR 遺伝子型は AhRb1) の交配で得た F1 世代マウス (AhR 遺伝子型は AhRb1/b2) 同士を交配させて得られた F2 世代を用いているので、解析対象の雄仔の AhR 遺伝子型は AhRb1/b1, AhRb1/b2, AhRb2/b2 の 3 通りである。AhR 遺伝子型は序章で述べたように TCDD 毒性において大きな役割を担うことより、AhR 遺伝子型と授乳期 TCDD 曝露における水腎症発症率との関連も同様に解析した。(図 2-2)

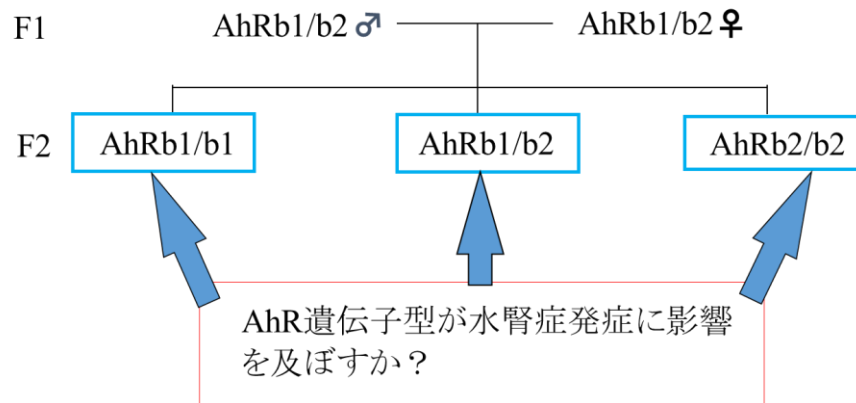


図 2-2 AhR 遺伝子型と水腎症発症との関連の解析。mPGES-1 ヘテロマウスを得るにあたり、C57Bl/6J マウスと BALB/cA マウスを交配した。更に mPGES-1 ヘテロマウスを交配し、F2 世代を実験に用いた。mPGES-1 遺伝子と水腎症発症の関連を検討する際に AhR 遺伝子型の違いが水腎症発症率や重症度に影響を与えないか分析する必要がある。F2 世代の mPGES-1 野生型ならびに mPGES-1 欠損マウスの AhR 遺伝子型を解析し、水腎症発症との関連を調べた。

2.1.2 PGE₂ 以降のシグナル伝達を担う PGE₂ 受容体と水腎症発症との関連

2.1.2.1 PGE₂ 受容体 EP1, EP2 および EP3 と水腎症発症との関連

水腎症発症への PGE₂ 受容体(EP)のサブタイプの関与を解明するためには、EP 遺伝子型以外の遺伝背景が均一とみなすことができる仔マウス 2 群 (EP 野生型と EP 欠損型) を作成する必要がある。まず、譲り受けた EP 欠損マウス (C57BL/6J に戻し交配されている。) と野生型 C57BL/6J マウスを交配し、EP1、EP2、EP3 のヘテロマウスを得た。次に図 2-3 に示すように、各 EP ヘテロマウス雌雄を交配することで各 EP での野生型、ヘテロ、欠損型の 3 種の遺伝子型をもった仔マウスを作成した。各 EP 野生型仔マウスと各 EP 欠損型

仔マウスの水腎症発症率を比較することで、水腎症発症に関与する EP を検索した。

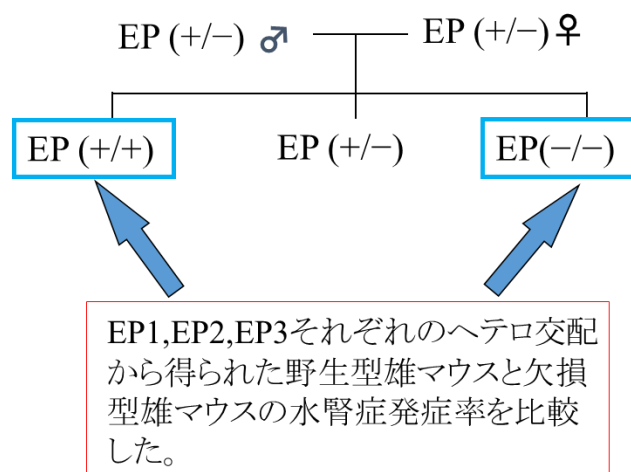


図 2-3 PGE₂ 受容体 EP1, EP2, EP3 と水腎症発症に関する実験デザイン

2.1.2.2 PGE₂ 受容体 EP4 と水腎症発症との関連

EP4 欠損マウスは出生後動脈管開存により致死であるため、C57BL/6J 妊娠マウスを日本クレアより購入し、EP4 阻害剤である ONO AE3-208 (Cayman Chemical, San Diego, CA, USA) を生後 1 日から 13 日まで連日投与し、生後 14 日の雄を解析対象にした。

2.1.3 TCDD 高感受性マウス 2 系統を用いた水腎症発症率の比較

TCDD 高感受性マウス 2 系統を用いた水腎症発症率の比較には C57BL/6J マウスと BALB/cA マウスを使用した。

2.2. 新生仔期経母乳曝露実験

2.2.1 PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 発現と水腎症発症との関連

mPGES-1 ヘテロ妊娠マウスをそれぞれ TCDD 曝露群と対象群に分け、母マウスの出産後 1 日目に 10 µg TCDD/kg ないし 1% n-nonane を含む corn oil を経口投与した。仔マウスは TCDD を経母乳曝露し、生後 7 日および 21 日で雄マウスの両腎臓と尿を採取した。右腎は組織学的解析、左腎は遺伝子解析に用いた。以下に実験スケジュールを示す (図 2-4)。

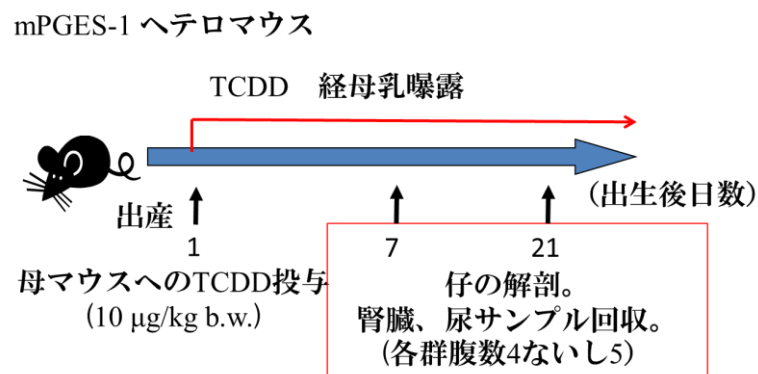


図 2-4 mPGES-1 と水腎症発症に関する TCDD 曝露実験図

2.2.1 PGE₂以降のシグナル伝達を担う PGE₂受容体と水腎症発症との関連

PGE₂ 受容体ヘテロ妊娠マウスを TCDD 曝露群と対象群に分け、母マウスの出産後 1 日目に 20 µg TCDD/kg ないし 1% n-nonane を含む corn oil を経口投与した。仔マウスは TCDD を経母乳曝露し、生後 14 日で雄マウスの両腎臓を採取した。EP4 に関しては、母マウスの出産後 1 日目に 20 µg TCDD/kg ないし 1% n-nonane を含む corn oil を経口投与と共に、EP4 阻害剤である ONO AE3-208 を生後 1 日から 13 日まで連日投与し、生後 14 日の雄マウスの両腎臓を解析対象にした (図 2-5)。

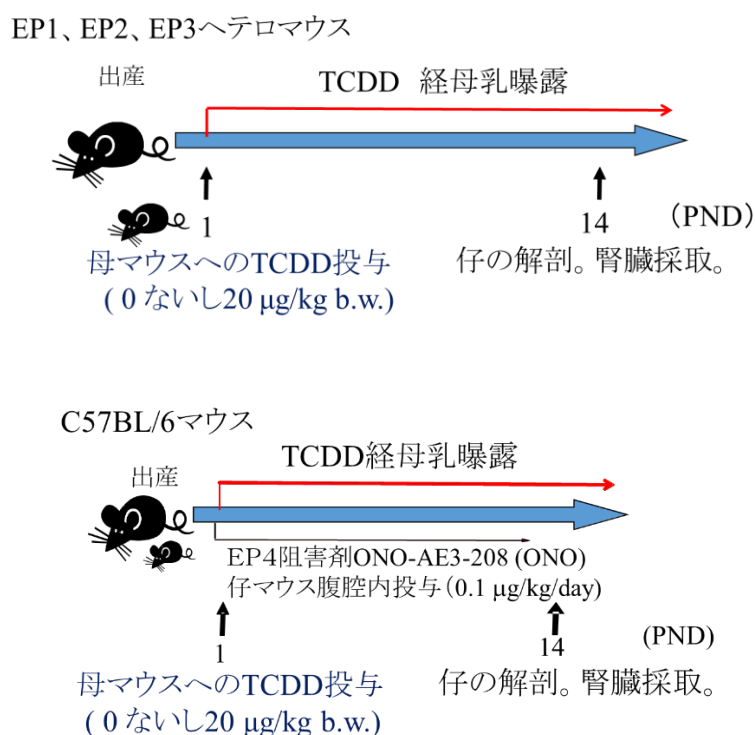


図 2-5 PGE₂ 受容体と水腎症発症に関する TCDD 曝露実験図

2.2.3 TCDD 高感受性マウス 2 系統を用いた水腎症発症率の比較

C57BL/6J 妊娠マウスと BALB/cA 妊娠マウスをそれぞれ TCDD 曝露群と対象群に分け、母マウスの出産後 1 日目に TCDD (AccuStandard, New Haven, MA, USA) 15 または 80 μg TCDD/kg ないし 1% n-Nonane を含む corn oil (和光純薬, 大阪, 日本) を経口投与した。仔マウスは TCDD を経母乳曝露し、生後 7 日で雄マウスの腎臓と尿を採取した。右腎臓の組織学的解析、左腎臓の遺伝子発現量、尿浸透圧を解析した。図 2-6 に実験スケジュールを示す。

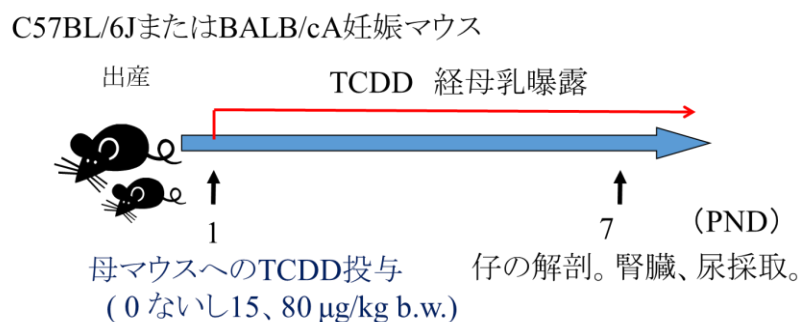


図 2-6 TCDD 高感受性マウス 2 系統における水腎症発症の検討のための実験スキーム。

2.3 遺伝子型解析

雄仔マウスの尾の末端 3 mm 程度をカットし、1.5 ml チューブに入れた後 50 mM NaOH 180 μ l を加え 95°C で溶解した。1.0 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μ l を加えた後、脱イオン水で 5 倍に希釈したものを遺伝子型解析に用いた。PCR は mPGES-1 遺伝子型および AhR 遺伝子型解析には Taq DNA polymerase (New England Biolabs, MA, USA)を用い、EP 受容体遺伝子型解析には KAPA2G robust hotstart redy mix with dye (日本ジェネティクス、東京、日本)を用いた。使用したプライマー配列は以下の通りである (表 2-1)。PCR 産物をアガロースゲルに電気泳動し、遺伝子型を決定した。ここで各遺伝子野生型および欠損型を示した雄仔マウスを水腎症発症の解析に用いた。

表 2-1 遺伝子型解析で用いたプライマー配列

Region Name	Primer Sequence (5'→3')
mPGES-1 WT	5'-CAGTATTACAGGAGTGACCCAGATGTG-3' (sense) 5'-GGAAAACCTCCCGGACTTGGTTTTTCAG-3' (antisense)
mPGES-1 KO	5'-ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG-3' (sense) 5'- GGAAAACCTCCCGGACTTGGTTTTTCAG-3' (antisense)
AhRb1(C57BL/6J)	5'-TCCGGATAATAAAAATAATGACTTGTACAG-3' (sense) 5'-CACAGGATGATGATGGCAAGCCGAGTTCAG-3' (antisense)
AhRb2(BALB/cA)	5'-ATAATAAAAATACTGACGTGTACAA-3' (sense) 5'-GCTGCTGCTGGCAAGCGGAGTTCA-3' (antisense)
EP1 WT	5'-GCGGAGAGTCCGGCTAGAGAAG-3' (sense) 5'-TGAGCCTAGCGGATGAGGCAGC-3' (antisense)
EP1 KO	5'-GCGGAGAGTCCGGCTAGAGAAG-3' (sense) 5'-TGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCG-3' (antisense)
EP2 WT	5'-CTGGCCATTATGACCATCACCTTCGCCA-3' (sense) 5'-CTGAGCAACACCCATGTTTCTATCCTGG-3' (antisense)
EP2 KO	5'-CTGGCCATTATGACCATCACCTTCGCCA-3' (sense) 5'-TATCAGGACATAGCGTTGGCT-3' (antisense)
EP3 WT	5'-GAGTCCTCCACTTTGGTGTACACAGTAC-3' (sense) 5'-AAAGTGACTACCCAGAATTCCTGCC-3' (antisense)
EP3 KO	5'- GAGTCCTCCACTTTGGTGTACACAGTAC-3' (sense) 5'-TGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCG-3' (antisense)

2.4 腎組織解析

採取した右腎臓は 10%中性緩衝ホルマリン液 (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) で固定後、氷晶防止のため 10%スクロースに 5 時間、20%スクロースに一晩置いた。スクロース置換した腎臓を O.T.C. compound に包埋し、液体窒素で凍結ブロックを作成した。腎臓を尿管の位置で横断面が最大となるようにクライオトームで 5 μm に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色後水腎症発症の有無を調べた。水腎症の程度は Bryant らの報告²³をもとに、0 から+4 までに分類し、+2 以上を水腎症発症と判定した²⁴。

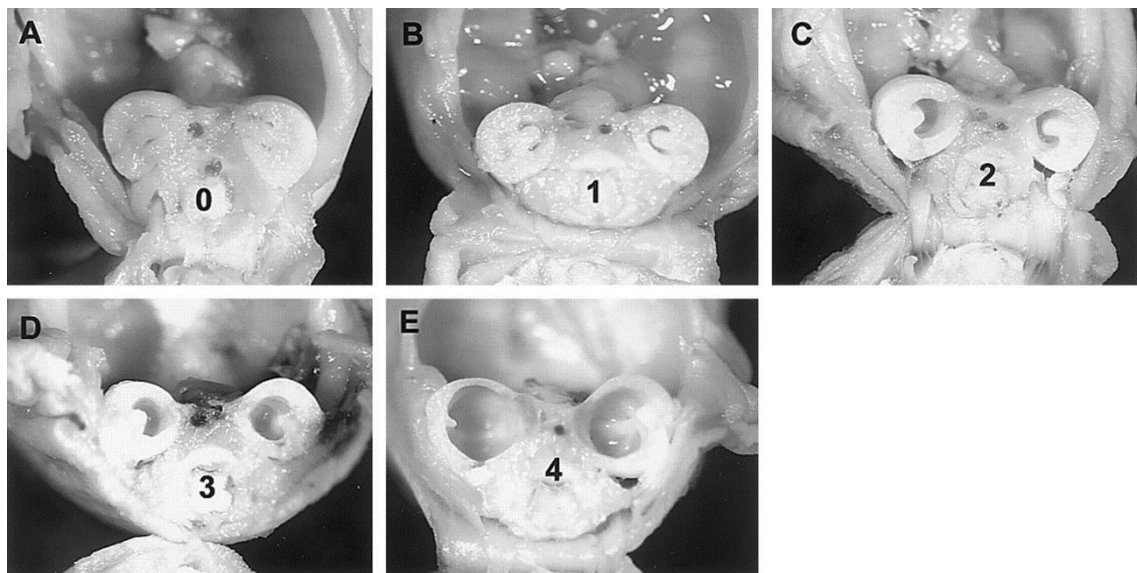


図 2-7 Bryant et al²³による水腎症の程度。数字は水腎症の程度を数値化し、2 以上を水腎症発症としている。

2.5 RNA 抽出と quantitative real-time reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR)

仔マウス左腎を、Polytron ホモジナイザーを用いて TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と共に粉碎後、NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) で total RNA を抽出した。cDNA の作成には oligo-dT20 primer と SuperScript® III (Invitrogen) を用いた。遺伝子発現解析は SYBR® Green を含むプレミックス Thunderbird (東洋紡, 大阪, 日本) を用い、LightCycler System (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) で測定した。特異的プライマーは Primer3 software で作成した²⁵。プライマー配列は表 2-2 に示す^{26,27}(図 3-11B のみ COX-2 forward: 5'-TGTGAACAATCAAACAAAATGATG-3', COX-2 reverse: 5'-GCGTAAATTCCAACAGCCTAAGT-3')。サンプル間の汚染や非特異的増幅の有無を評価するため、ネガティブコントロールを置いた。それぞれの PCR において、特異的増幅がなされていることを確認するために融解曲線分析法を施行した。mRNA 発現は delta Ct 法を用いて計算し、cyclophilin B で補正した。母親の違いによるバラツキを最小化するために腹内で平均した値を腹間で平均してその群の平均値とした。

表 2-2 qRT-PCR で用いたプライマー配列²⁶

target name		Primer sequences (5' to 3')
<i>AhRR</i>	Forward	CAG GGC AGA CAT TGT GGT TA
	Reverse	CTC CAT TGC TCT TTC CTG CT
<i>COX-2</i>	Forward	TGT GAA CAA TCA AAC AAA ATG ATG
	Reverse	GCG TAA ATT CCA ACA GCC TAA GT
<i>cPGES</i>	Forward	ATT TGG ACT GGT CCT GTT TGA
	Reverse	GCC CAC AGC TTC CCA TTT AC
<i>cPLA₂α</i>	Forward	AGC ATT CAA AAG GCT TCA CG
	Reverse	GGG AAA CAG AGC AAC GAG AT
<i>c-Src</i>	Forward	ATC TAT TCC TTC GGG CGA GT
	Reverse	TGC CAG CAG TTC TTC ATC AC
<i>Cyclophilin-B</i>	Forward	GAC TTC ACC AGG GGA GAT GG
	Reverse	TGT GAG CCA TTG GTG TCT TTG
<i>CYP1A1</i>	Forward	GGC ACC TCT GTT CAC CCT A
	Reverse	GAA TCT CTC CCT CTG TTC TTG
<i>IL-1β</i>	Forward	CAA GGA GAA CCA AGC AAC GA
	Reverse	GCC GTC TTT CAT TAC ACA GGA
<i>IL-6</i>	Forward	ATA CCA CTC CCA ACA GAC CT
	Reverse	TTC TGC AAG TGC ATC ATC GT
<i>mPGES-1</i>	Forward	CTC AAG CCC TGC TAC CAC A
	Reverse	GGC CTC AGA CAA GAG ACC AT
<i>mPGES-2</i>	Forward	TGA CAG CCG TGG GTA AAG A
	Reverse	CTC CAG ACC CTC CAT CAC TC
<i>NKCC2</i>	Forward	GCT TTA GAC AAC GCT CTG GAA
	Reverse	CGC CTG TTA AGA CAA TGC AC
<i>ROMK</i>	Forward	GCC AAG CCC ATT CCT TAG AC
	Reverse	TCT TCA GCC TCT TCA CCA ACA
<i>TNF-α</i>	Forward	CAC CAC CAT CAA GCA CTC AA
	Reverse	GAC AGA GGC AAC CTG ACC AC

2.6 尿浸透圧測定

尿浸透圧は、氷点降下法の原理に基づく機器 Fiske 210 Micro-Sample Osmometer (Advanced Instruments, Norwood, MA, USA) を用い測定した。

2.7 クロマチン免疫沈降法

TCDD による水腎症発症率と AhR 標的遺伝子 (CYP1A1 や AhRR) や COX-2, mPGES-1 などの水腎症発症関連因子の遺伝子発現に関して性差がないこと²⁶ から、雌仔マウスの腎臓をクロマチン免疫沈降法に用いた。SimpleChIP® Plus kit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用い、プロトコルを一部改変して実験した。採取した日齢 7 両腎臓 (計 25 mg) を 60 mm プレートに置いて氷上で細かくすり潰し、2 ml チューブに移した。各サンプルに PBS+プロテアーゼ阻害剤混合液 1 ml に 7%ホルムアルデヒド 45 μ l を加え、室温で 20 分間振盪し、タンパク質と DNA をクロスリンクさせた。10 x グリシン 100 μ l で各サンプルのクロスリンクを停止し、1500 rpm で遠心して上清を除いた組織に PBS+プロテアーゼ阻害剤混合液 1 ml を加え、Dounce homogenizer (Wheaton, Millville, NJ) で組織を破碎した。光学顕微鏡で単細胞懸濁液になったことを確認し、micrococcal nuclease によるクロマチン断片化を行う前にキット添付の溶液で細胞の透過性を高めた。クロマチン断片化は各サンプルに micrococcal nuclease 2000 gel units/ μ l を 0.5 μ l 加えて、37°C 20 分間インキュベートした。そして断片化クロマチンを溶液に放出するため、細胞膜や核膜を緩やかなソニケーション(コスモバイオ社 bioruptor を用い、medium on 30 秒、off 30 秒を 5 セット) により破碎した。DNA が 100–500 bp に断片化されてい

ることをアガロースゲル電気泳動法で確認後、添付の 1 x ChIP バッファーで 4 倍希釈し、サンプルに以下の抗体を加え、4°C で一晩回転撹拌した。用いた抗体は Egr-1 (Santa Cruz Biotechnology)、Histone H3 (Cell Signaling Technology)、Normal Rabbit IgG (Cell Signaling Technology)である。抗体反応後、添付の ChIP-grade protein G 磁気ビーズを各免疫沈降反応液に加え、4°C で 2 時間回転撹拌した。Magnetic separation rack にチューブを立て、磁気ビーズを沈殿させ、上清を除去した。ビーズに low salt wash (1 x ChIP バッファー)を加え 5 分回転撹拌を 3 回繰り返した後、high salt wash (1 x ChIP バッファー 1 ml+ 5.0 M NaCl, 70 μ l)でビーズを洗浄し、Magnetic separation rack にチューブを立て、上清を除去した。各免疫沈降サンプルに 1 x 溶出バッファー 150 μ l を加え、65°C 30 分間、抗体/Protein G 磁気ビーズからクロマチンを溶出した。Magnetic separation rack にチューブを立て、上清を新しいチューブに移した。5.0 M NaCl 6 μ l と proteinase K 2 μ l を加え、65°C で 2 時間インキュベートし脱クロスリンク後、添付キットで DNA を精製した。mPGES-1 promoter は LA Taq Hot Start Version (タカラバイオ, 滋賀, 日本)を用い、semi-quantitative PCR を行った。PCR は下記の条件で 25, 30, 32, 35, 37, 38, 40 サイクルを行い、増幅期にあることをもって 35 サイクルが定量に適していると判断した。PCR 産物は 2%アガロースゲルに電気泳動し、ImageJ ソフトウェア (US National

Institutes of health, Bethesda, Maryland, USA) を用いてバンド密度解析を行った。COX-2 promoter は LA Taq Hot Start Version と、CYBR Green を含むプレミックス Thunderbird (東洋紡) で定量 PCR を施行した。定量結果はインプットクロマチン量に対する各 IP で得られたクロマチン量の割合で評価をした。使用したプライマー配列は以下の通りである (表 2-3)。

表 2-3 ChIP PCR で用いたプライマー配列

Region Name	Primer Sequence (5'→3')
mPGES-1 promoter	5'-CACCTCCATTCCTCTGCTTC-3' (sense)
	5'-CGGGCCAAGTCCTGAGTAG-3' (antisense)
COX-2 promoter	5'-CCCGGAGGGTAGTTCCATGAAAGACTTCAAC-3' (sense)
	5'-GGTGGAGCTGGCAGGATGCAGTCCTG-3' (antisense)

2.8 PGE₂ assay

仔マウスの膀胱から 29 ゲージ針を装着した注射器を用いて尿を採取した。尿中 PGE₂ 濃度を、Prostaglandin E₂ EIA kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) を用い、プロトコールに従って測定した。日齢 7 の曝露群尿サンプルは 10 倍、非曝露群尿サンプルは 4 倍に希釈して尿中 PGE₂ 濃度を測定し、各値が検量線内にあることを確認した。

2.9 EP1 免疫染色

凍結切片を風乾後、HistoVT one（ナカライテスク、京都）を用いて抗原の賦活化をし、さらに 0.3% H_2O_2 （和光純薬）で内在性ペルオキシダーゼを不活性化した。1%ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich）で組織をブロッキング後、抗 EP1 抗体（Cayman; Ann Arbor, MI, USA、Cat No 101740）で一次抗体反応、Avidin-biotinylated peroxidase complex 法のためのビオチン化二次抗体 goat anti-rabbit（Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA）で二次抗体反応を行った。Vectastain ABC kit（Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA）を用い、avidin/biotinylated enzyme 複合体を組織に反応させた後、3, 3'-diaminobenzidine (DAB) 基質溶液（Dako Denmark; Glostrup, Denmark）によって発色させた。ヘマトキシリンによる核染色後、脱水、透徹、封入し、光学顕微鏡下にて顕鏡した。

2.10 統計解析

実験データは平均値±標準誤差で表示し、有意水準 $P < 0.05$ で有意差があるとした。群間比較は one-way ANOVA 実行後 Bonferroni 法による多重比較検定を行った。統計解析は SPSS Ver. 22.0 J (SPSS Inc.) を使用した。

第3章 結果

3.1 PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 発現と水腎症発症との関連

3.1.1 mPGES-1 遺伝子型と水腎症発症率

mPGES-1 ヘテロマウス同士を交配させ、雄仔の mPGES-1 遺伝子型と水腎症発症率を日齢 7 と 21 で調べた。腎盂の拡張並びに腎乳頭の短縮という水腎症の組織学的所見をもとに水腎症発症の有無を判定した。mPGES-1 野生型では日齢 7 で 75%、日齢 21 で 67%と所属教室の既報の結果¹⁹と同等であった。一方、mPGES-1 欠損型では、日齢 7、21 共に発症率は 0%であった。それぞれの日齢での対照群は、mPGES-1 遺伝子型に関わらず水腎症は発症しなかった。(表 3-1、図 3-1)

表 3-1 日齢 7 および 21 雄仔マウスの TCDD 経母乳曝露による水腎症発症率ならびに重症度

PND	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	mPGES-1 genotype	N (pup(dam))	Severity				Incidence (%)
				0	1	2	3	
7	0	+/+	3 (3)	2	1	0	0	0
	0	-/-	3 (3)	3	0	0	0	0
	10	+/+	5 (4)	0	1	4	0	75
	10	-/-	4 (4)	3	1	0	0	0
21	0	+/+	16 (7)	11	5	0	0	0
	0	-/-	15 (7)	11	4	0	0	0
	10	+/+	19 (15)	0	5	12	2	67
	10	-/-	10 (10)	8	2	0	0	0

既報 (Bryant et al. 2001) の判断規準に基づき、Grade 2 (腎盂の拡張と腎乳頭の短縮) 以上を水腎症発症と判定した。水腎症発症率は、まず発症率を腹内で算出し、次に腹間で平均したものをを用いた。

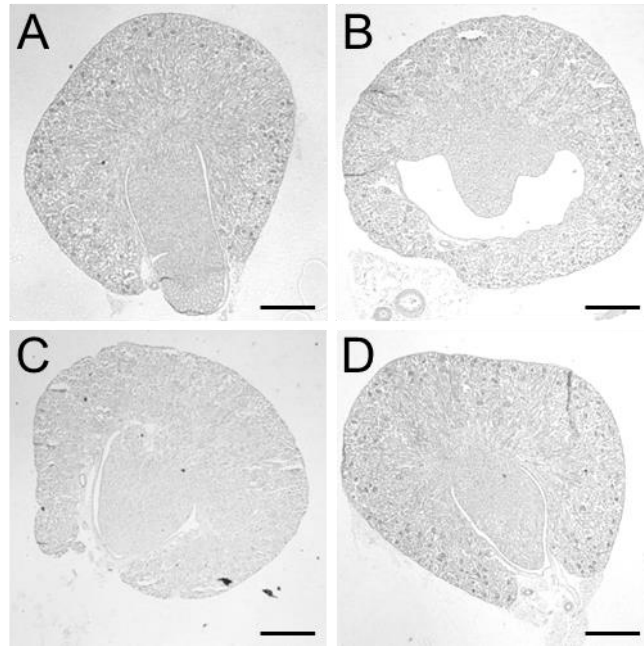


図 3-1 mPGES-1 遺伝子型と水腎症発症における組織写真（ヘマトキシリン・エオジン染色）。出産後 1 日に母マウスに $10 \mu\text{g TCDD/kg}$ を経口投与し、TCDD を経母乳曝露された雄仔マウス右腎臓（日齢 7）。(A) 対照群 mPGES-1 野生型、(B) TCDD 曝露群 mPGES-1 野生型、(C) 対照群 mPGES-1 欠損型、(D) TCDD 曝露群 mPGES-1 欠損型。Scale bars = $500 \mu\text{m}$.

本研究は BALB/cA (AhR 遺伝子型は AhRb2/b2) と C57BL/6J (AhR 遺伝子型は AhRb1/b1) の交配で得た F1 世代マウス (AhR 遺伝子型は AhRb1/b2) 同士を交配させて得られた F2 世代を用いているので、解析対象の雄仔の AhR 遺伝子型は AhRb1/b1, AhRb1/b2, AhRb2/b2 の 3 通りである。AhR 遺伝子型が水腎症発症に影響を及ぼすか否かを確認するため、TCDD 経母乳曝露を受けた mPGES-1 野生型マウスが日齢 21 日目に水腎症の有無と重症度を調べ、各 AhR 遺伝子型における水腎症重症度の平均を求めた。水腎症重症度の平均±標

準誤差は AhRb1/b1 が 1.6 ± 0.3 、AhRb1/b2 が 1.8 ± 0.2 、AhRb2/b2 が 2.0 ± 0.0 となり、各群での水腎症重症度に有意差を認めなかった ($p=0.656$)。

3.1.2 PGE₂ 誘導における mPGES-1 の役割

次に mPGES-1 が腎臓での PGE₂ 産生に及ぼす影響について検討した。その理由は、序文 1.9 で述べたように、授乳期 TCDD 曝露における COX-2 の誘導が水腎症発症に必須である¹⁹が、その下流の機序が未だ明らかにされていなかったからである。mPGES-1 野生型マウスでは、TCDD 曝露により尿中 PGE₂ 濃度は対照群に比し約 7 倍と有意に上昇した。一方、mPGES-1 欠損型マウスでは TCDD 曝露群での PGE₂ 濃度の増加を認めなかった (図 3-2A)。PGE₂ を合成する 3 種類の酵素のうち、mPGES-1 mRNA 量は TCDD によって対照群に比べて 4 倍と有意に誘導された (図 3-2B)。mPGES-2 や cPGES の mRNA 量は mPGES-1 野生型、欠損型ともに対照群と TCDD 曝露群で変わりなかった (図 3-2C, and D)。このことから TCDD による尿中 PGE₂ 濃度の増加は mPGES-1 に起因することが分かった。

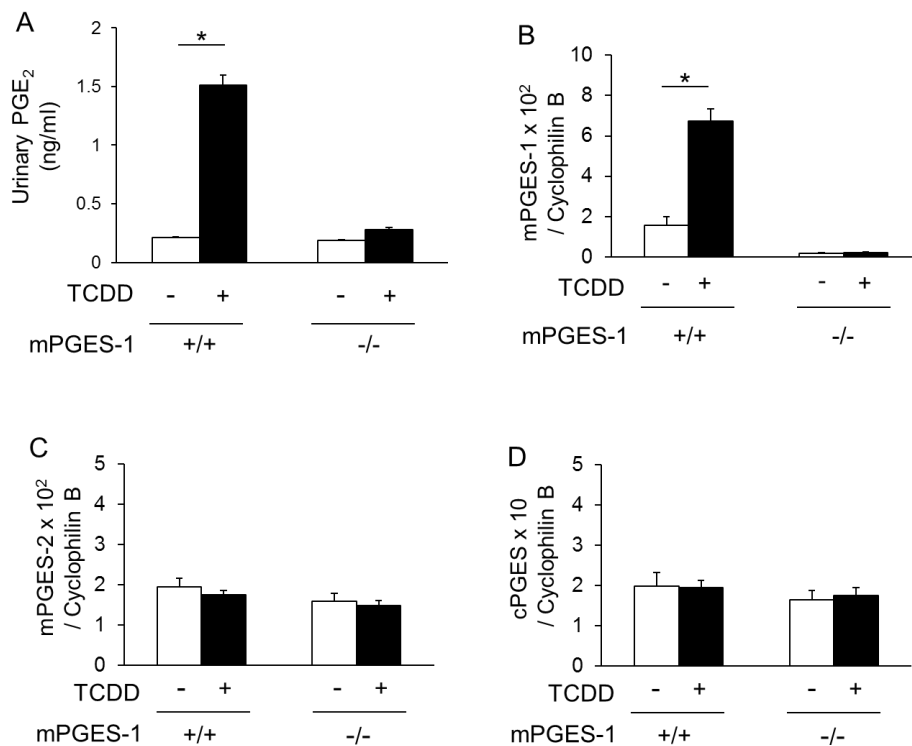


図 3-2 mPGES-1 依存的に誘導される尿中 PGE₂ 濃度。出産後 1 日に母マウスに 10 μ g TCDD/kg を経口投与し、TCDD を経母乳曝露された雄仔マウス(日齢 7)の尿中 PGE₂ 濃度 (A)、腎臓 mPGES-1 mRNA (B)、腎臓 mPGES-2 mRNA (C)、腎臓 cPGES mRNA (D)。mRNA は cyclophilin B mRNA で補正された値を示す。棒グラフは平均±標準誤差で表記した。各群 N= 3-4 腹。

3.1.3 TCDD 曝露による新生仔腎臓での遺伝子発現の変化

次に、TCDD 毒性と相関する AhR の転写活性化を見るため、AhR 活性化を示す代表的な遺伝子 CYP1A1 (図 3-3A)と AhRR (図 3-3B)の遺伝子発現を調べた。これらの mRNA は mPGES-1 の有無にかかわらず、TCDD 曝露により上昇した。また、細胞膜リン脂質からアラキドン酸を産生する酵素である cPLA₂ α ^{28,29} も mPGES-1 非依存的に TCDD によって遺伝子発現が誘導された (図 3-3C)。

ところが、COX-2 mRNA 発現は mPGES-1 野生型マウスでは TCDD によって 4 倍に上昇するが、mPGES-1 欠損マウスでは TCDD 曝露を行っても COX-2 遺伝子は誘導されなかった(図 3-3D)。Kamei ら³⁰は lipopolysaccharide (LPS) による COX-2 遺伝子の誘導が mPGES-1 遺伝子の有無に依存することを報告している。TCDD 曝露における COX-2 誘導と mPGES-1 との関連について報告はないが、今回の結果と過去の報告より LPS または TCDD による COX-2 の誘導に mPGES-1 が関与することが示された。

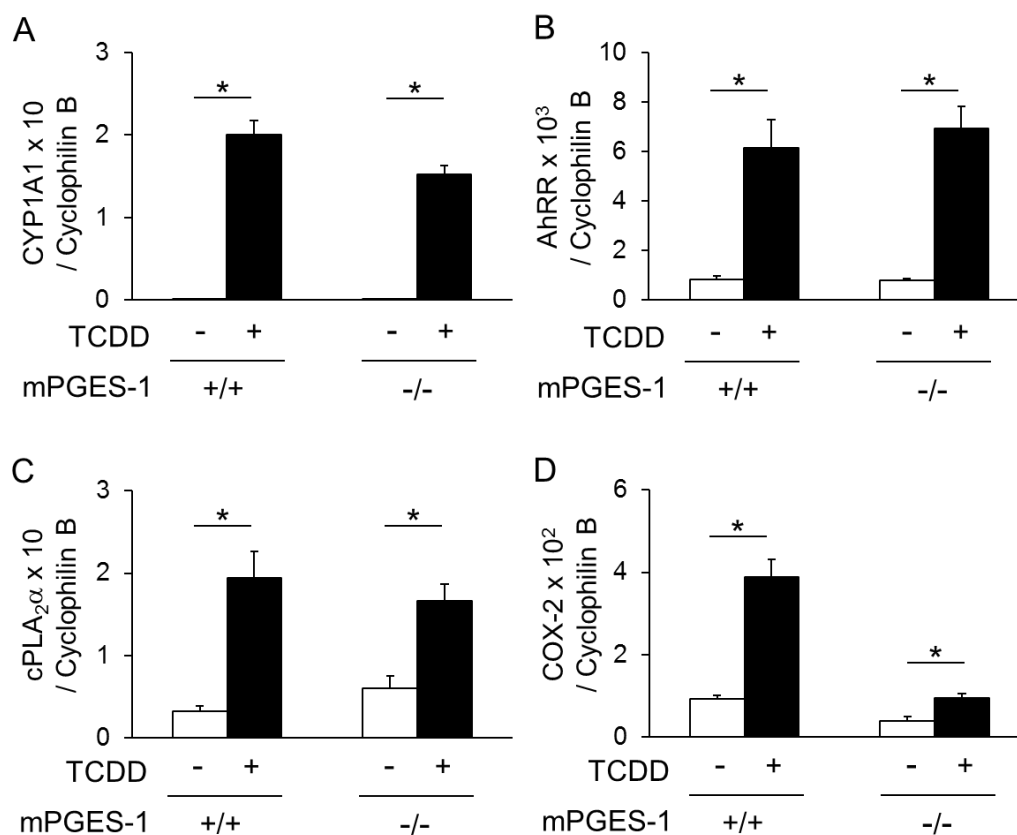


図 3-3 授乳期 TCDD 曝露腎臓（日齢 7）における mPGES-1 依存的または非依存的な遺伝子発現。出産後 1 日に母マウスに 10 μ g TCDD/kg を経口投与し、TCDD を経母乳曝露された雄仔マウス腎臓における CYP1A1 mRNA (A)、AhRR mRNA (B)、cPLA2 mRNA (C)、COX-2 mRNA (D)。mRNA は cyclophilin B mRNA で補正された値を示す。棒グラフは平均±標準誤差で表記した。各群 N= 3-4 腹。

TCDD は IL-1 β , TNF- α , IL-6 といった炎症に関連するサイトカインを誘導することが知られている³¹。授乳期 TCDD 曝露された仔マウス腎臓においても、これらのサイトカインの誘導が認められている¹⁹。私は、これらのサイトカインが mPGES-1 依存的に誘導されるのか否かを調べるために、各サイトカインの mRNA 発現を検討した。mPGES-1 野生型マウスでは TCDD によって

IL-1 β は5倍(図 3-4A)、TNF- α は2倍(図 3-4B)に上昇した。IL-6においても有意差はないが TCDD 曝露によって上昇傾向にある(図 3-4C)。一方、mPGES-1 欠損マウスでは TCDD 曝露によるこれらのサイトカインの誘導は見られなかった(図 3-4A,B,C)。すなわち mPGES-1 は TCDD による炎症性サイトカインの誘導を調節する因子であることがいえる。

また、腎臓での電解質輸送体で尿濃縮にも影響を及ぼす NKCC2 や ROMK 遺伝子発現も、TCDD 曝露群で有意に低下する¹⁹。今回、mPGES-1 野生型 TCDD 曝露群で NKCC2 mRNA 量は 36%低下したが、mPGES-1 欠損型では対照群と TCDD 曝露で NKCC2 mRNA 量に違いを認めなかった(図 3-4D)。ROMK mRNA 量も NKCC2 同様、mPGES-1 野生型 TCDD 曝露群で ROMK mRNA 量は 42%低下し、mPGES-1 欠損型では TCDD 曝露による ROMK mRNA 量の低下を認めなかった(図 3-4E)。

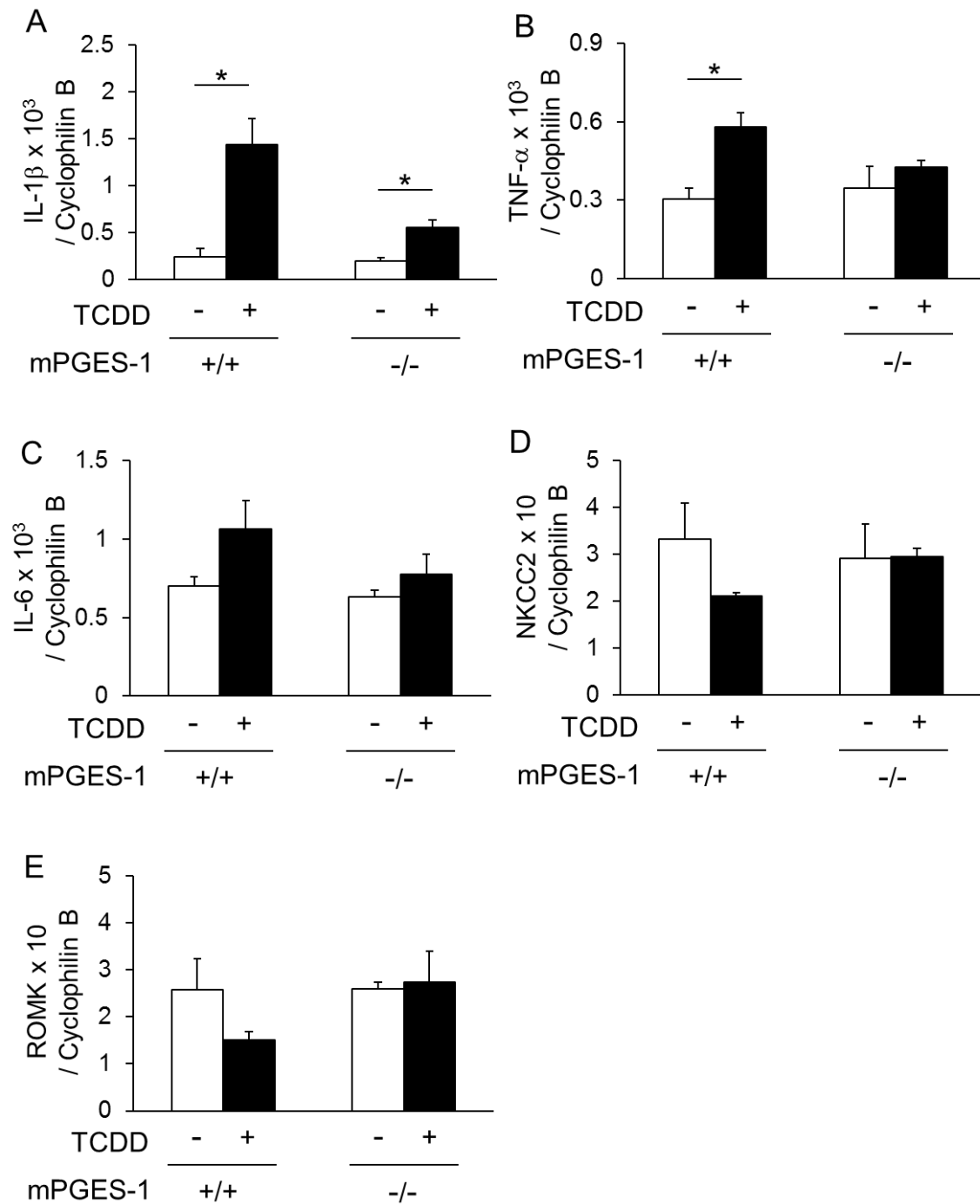


図 3-4 授乳期 TCDD 曝露腎臓（日齢 7）における mPGES-1 依存的な遺伝子発現。出産後 1 日に母マウスに 10 μ g TCDD/kg を経口投与し、TCDD を経母乳曝露された雄仔マウス腎臓における(A)IL-1 β mRNA、(B)TNF- α mRNA、(C)IL-6mRNA、(D)NKCC2mRNA、(E)ROMK mRNA。mRNA は cyclophilin B mRNA で補正された値を示す。棒グラフは平均 \pm 標準誤差で表記した。各群 N= 3-4 腹。

3.2 PGE₂以降のシグナル介達を担う PGE₂受容体と TCDD 曝露における水腎症発症との関連

3.2.1 EP 受容体と水腎症発症率

EP1 ヘテロマウス同士を交配させ、仔の EP1 遺伝子型と TCDD 曝露における水腎症発症率を調べたところ、EP1 野生型では 80%と研究室の既報と同程度であった。一方、EP1 欠損型では 28%と低率であった(表 3-2)。また、水腎症の重症度も EP1 野生型は 33%が Grade3 を呈したが、EP1 欠損型では Grade 3 を認めず、野生型に比べて軽症であった (表 3-2)。同様に、EP2 ならびに EP3 ヘテロマウス同士も交配させ、各遺伝子型と水腎症発症率を調べた。EP2 野生型は発症率が 80%を示し、EP1 と同程度であった。そして、EP2 欠損型においても発症率は 100%と高かった(表 3-3)。EP3 野生型も発症率は 89%と高値を示し、欠損型も発症率は 100%で発症率および重症度に違いを認めなかった (表 3-4)。EP4 においても、TCDD 曝露一対照群で水腎症発症率は 93%、TCDD 曝露一阻害剤投与群では 100%と同様で、重症度も差はなかった (表 3-5)。これらの結果から EP1 が TCDD 経母乳曝露による水腎症発症に関与する可能性の高いことが明らかになった。

表 3-2 EP1 野生型ならびに欠損型仔マウスにおける水腎症発症率と重症度

PND	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	EP1 genotype	N ^a (pup(dam))	Severity ^b				Incidence ^c (%)
				0	1	2	3	
14	0	+/+	4(4)	3	1	0	0	0
	0	-/-	9(5)	8	1	0	0	0
	20	+/+	6(5)	0	1	3	2	80
	20	-/-	8(7)	4	2	2	0	28

既報 (Bryant et al. 2001) の判断規準に基づき、Grade 2 (腎盂の拡張と腎乳頭の短縮) 以上を水腎症発症と判定した。^a 各群での腹数と仔の数、^b 各重症度での仔の数、^c 水腎症発症率 (第 2 章方法 2.4 を参照)。水腎症発症率は、まず発症率を腹内で算出し、次に腹間で平均したものを用いた。

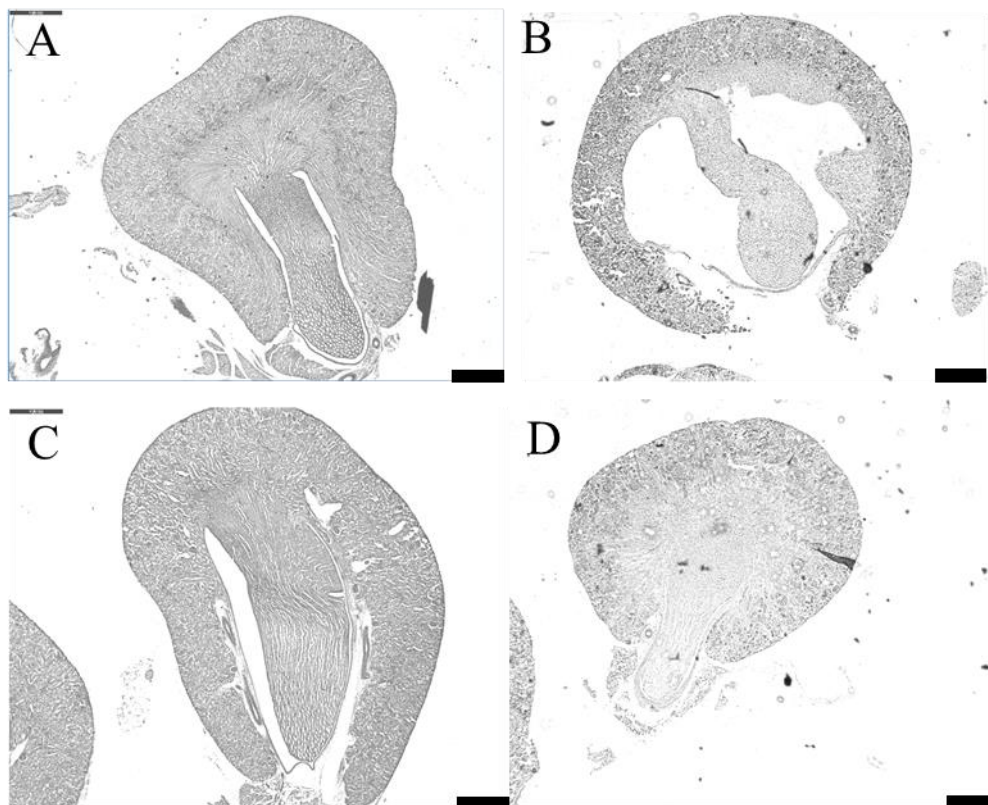


図 3-5 EP1 遺伝子型と水腎症発症における組織写真 (ヘマトキシリン・エオジン染色)。出産後 1 日に母マウスに $20 \mu\text{g TCDD/kg}$ ないし corn oil を経口投与し、経母乳曝露された雄仔マウス腎臓 (日齢 14)。A) EP1 野生型対照群 B) EP1 野生型 TCDD 曝露群 C) EP1 欠損型対照群 D) EP1 欠損型 TCDD 曝露群。Scale bars = $500 \mu\text{m}$. 既報 (Bryant et al. 2001) の判断規準に基づき、Grade 2 (腎盂の拡張と腎乳頭の短縮) 以上を水腎症発症と判定した。

表 3-3 EP2 野生型ならびに欠損型仔マウスにおける水腎症発症率と重症度

PND	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	EP2 genotype	N ^a (pup(dam))	severity ^b				Incidence ^c (%)
				0	1	2	3	
14	0	+/+	6(4)	5	1	0	0	0
	0	-/-	5(5)	5	1	0	0	0
	20	+/+	5(5)	0	1	2	2	80
	20	-/-	8(5)	0	0	5	3	100

既報 (Bryant et al. 2001) の判断規準に基づき、Grade 2 (腎盂の拡張と腎乳頭の短縮) 以上を水腎症発症と判定した。^a 各群での腹数と仔の数、^b 各重症度での仔の数、^c 水腎症発症率 (第 2 章方法 2.4 を参照)。水腎症発症率は、まず発症率を腹内で算出し、次に腹間で平均したものを用いた。

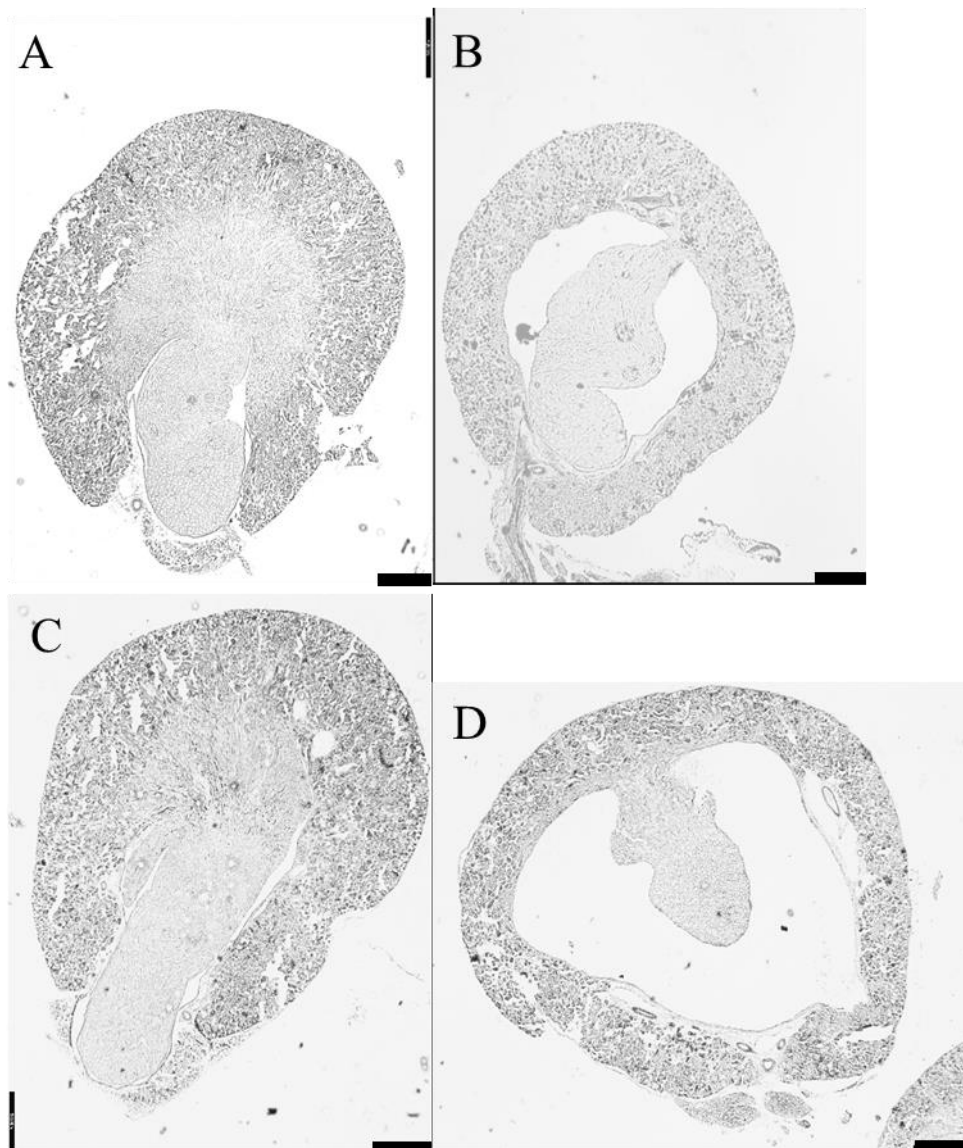


図 3-6 EP2 遺伝子型と水腎症発症における組織写真 (ヘマトキシリン・エオジン染色)。出産後 1 日に母マウスに $20 \mu\text{g TCDD/kg}$ ないし corn oil を経口投与し、経母乳曝露された雄仔マウス腎臓 (日齢 14)。A) EP2 野生型対照群 B) EP2 野生型 TCDD 曝露群 C) EP2 欠損型対照群 D) EP2 欠損型 TCDD 曝露群。Scale bars = $500 \mu\text{m}$. 既報 (Bryant et al. 2001) の判断規準に基づき、Grade 2 (腎盂の拡張と腎乳頭の短縮) 以上を水腎症発症と判定した。

表 3-4 EP3 野生型ならびに欠損型仔マウスにおける水腎症発症率と重症度

PND	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	EP3 genotype	N ^a (pup(dam))	severity ^b				Incidence ^c (%)
				0	1	2	3	
14	0	+/+	9(9)	6	3	0	0	0
	0	-/-	9(9)	7	2	0	0	0
	20	+/+	9(9)	0	1	5	3	89
	20	-/-	9(9)	0	0	5	4	100

既報 (Bryant et al. 2001) の判断規準に基づき、Grade 2 (腎盂の拡張と腎乳頭の短縮) 以上を水腎症発症と判定した。^a 各群での腹数と仔の数、^b 各重症度での仔の数、^c 水腎症発症率 (第 2 章方法 2.4 を参照)。水腎症発症率は、まず発症率を腹内で算出し、次に腹間で平均したものを用いた。

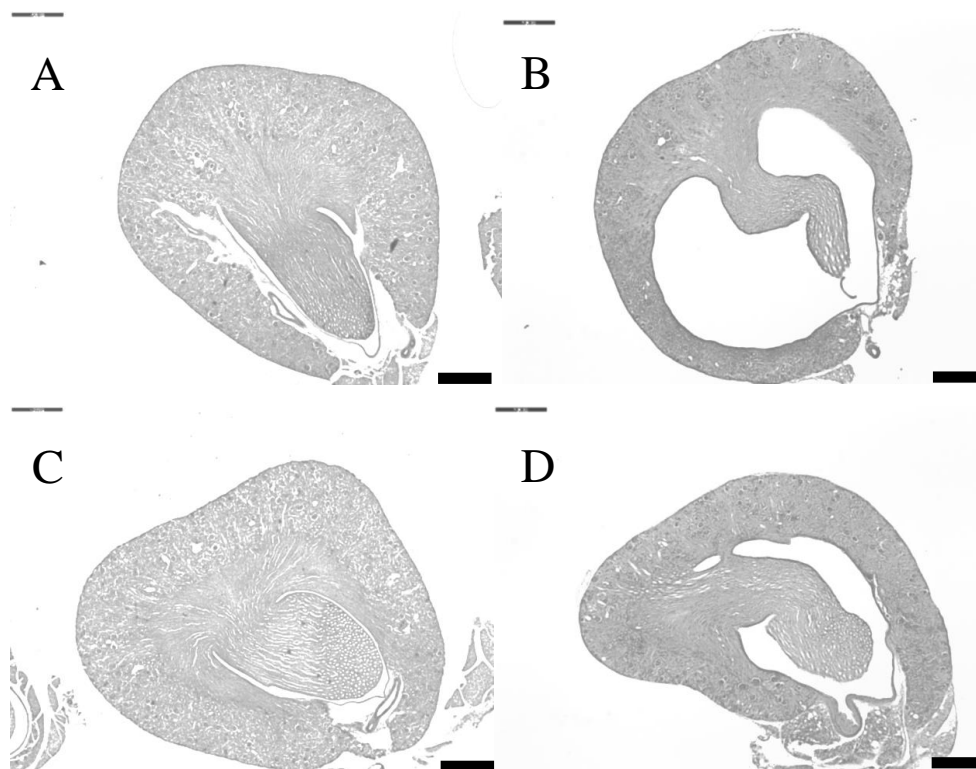


図 3-7 EP3 遺伝子型と水腎症発症における組織写真 (ヘマトキシリン・エオジン染色)。出産後 1 日に母マウスに $20 \mu\text{g TCDD/kg}$ ないし corn oil を経口投与し、経母乳曝露された雄仔マウス腎臓 (日齢 14)。A) EP3 野生型対照群 B) EP3 野生型 TCDD 曝露群 C) EP3 欠損型対照群 D) EP3 欠損型 TCDD 曝露群。Scale bars = $500 \mu\text{m}$. 既報 (Bryant et al. 2001) の判断規準に基づき、Grade 2 (腎盂の拡張と腎乳頭の短縮) 以上を水腎症発症と判定した。

表 3-5 授乳期 EP4 阻害剤 ONO AE3-208 投与仔マウスならびに対照群仔マウスにおける水腎症発症率と重症度

PND	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	EP4 Antagonist	N ^a (pup(dam))	severity ^b				Incidence ^c (%)
				0	1	2	3	
14	0	Saline	9(9)	7	2	0	0	0
	20	Saline	15(9)	0	1	4	10	93
	20	ONO	15(9)	0	0	3	12	100

既報(Bryant et al. 2001)の判断規準に基づき、Grade 2（腎盂の拡張と腎乳頭の短縮）以上を水腎症発症と判定した。^a各群での腹数と仔の数、^b各重症度での仔の数、^c水腎症発症率（第2章方法2.4を参照）。水腎症発症率は、まず発症率を腹内で算出し、次に腹間で平均したものを用いた。

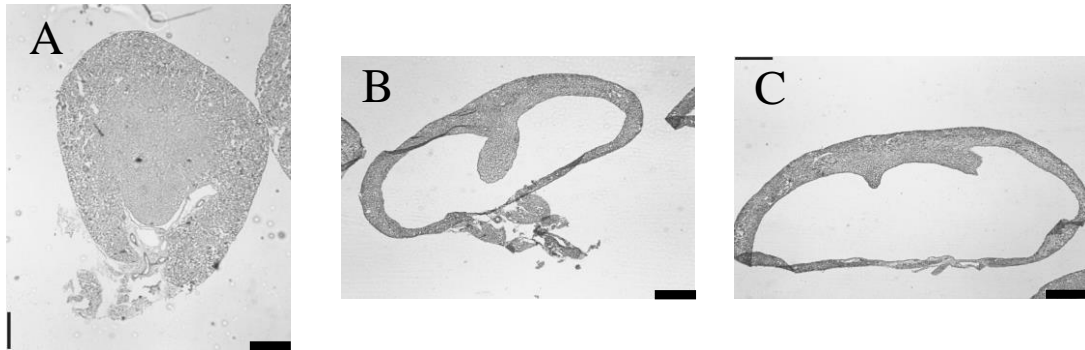


図 3-8 EP4 阻害剤 ONO AE3-208 投与仔マウスと水腎症発症における組織写真 (ヘマトキシリン・エオジン染色)。出産後 1 日に母マウスに 20 μg TCDD/kg ないし corn oil を経口投与し、経母乳曝露された雄仔マウス腎臓 (日齢 14)。A) 生理食塩水投与対照群 B) 生理食塩水投与 TCDD 曝露群 C) EP4 阻害剤 ONO AE3-208 投与 TCDD 曝露群。Scale bars = 500 μm 。既報 (Bryant et al. 2001) の判断規準に基づき、Grade 2 (腎盂の拡張と腎乳頭の短縮) 以上を水腎症発症と判定した。

3.2.2 EP1 免疫染色

腎臓における EP1 は、ヒトやマウス、ラット、ウサギでいずれも腎集合管に局在を認めるが、新生仔期の EP1 に関する報告はない³²⁻³⁶。今回、新生仔腎臓での EP1 の局在を明らかにするため、酵素抗体法による EP1 免疫染色を行った (図 3-9)。集合管上皮細胞は単層円柱上皮で細胞質が明るいのが組織学的特徴である。EP1 野生型では対照群、TCDD 曝露群、共に腎髄質集合管上皮細胞質内に EP1 染色を認めた (図 3-9A, B, F, G)。一方、EP1 欠損マウスでは TCDD 曝露、非曝露を問わず EP1 は同定されなかった (図 3-9C, D, H, I)。今回の免疫染色では従来 of 報告通り、腎集合管 (腎髄質集合管) に EP1 を認めた。

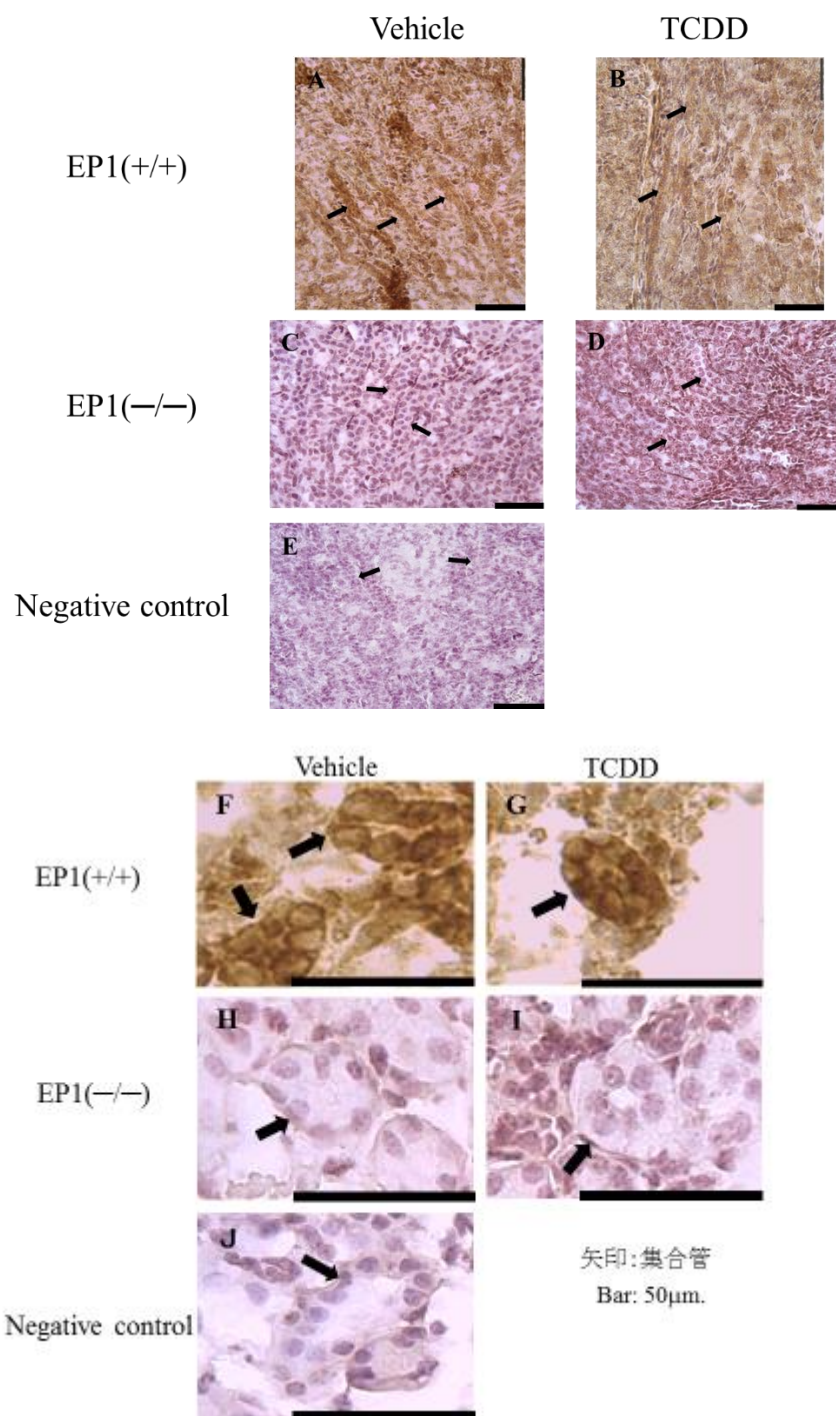


図 3-9 EP1 野生型と欠損型腎髄質における EP1 免疫染色。出産後 1 日に母マウスに 20 μg TCDD/kg ないし corn oil を経口投与し、経母乳曝露された雄仔マウス腎臓 (日齢 14)。A, F) EP1 野生型対照群 B, G) EP1 野生型 TCDD 曝露群 C, H) EP1 欠損型対照群 D, I) EP1 欠損型 TCDD 曝露群 E, J) Negative control. Scale bars = 50 μm .

3.3 TCDD 高感受性マウス 2 系統を用いた水腎症発症率の比較

3.3.1. C57BL/6J 並びに BALB/cA 仔マウスの水腎症発症率

出産後 1 日目の C57BL/6J 並びに BALB/cA の母マウスに TCDD を投与し、
出産仔を日齢 7 で解剖した。両系統のマウスともに、corn oil を投与した対照群
において腎盂腎杯の拡張ならびに腎乳頭の短縮を認めず、水腎症の発症は観察
されなかった（表 3-6、図 3-10）。TCDD 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では C57BL/6J 仔マウ
スで水腎症発症率は 64%であった。一方、BALB/cA 仔マウスでは TCDD 15 μg
/kg 投与群ならびに TCDD 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で発症率は 0%であった。C57BL/6J
仔マウスが発症率は 64%で、既報および前出の mPGES-1 と水腎症との関連を
示した研究とほぼ一致した^{19,26}。この実験結果から、BALB/cA 仔マウスは TCDD
による水腎症発症に著しく抵抗性を有すること明らかになった（表 3-6、図 3-
10）。

表 3-6 C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスにおける水腎症発症率と重症度

	Dose (μg/kg)	N ^a [pups(dams)]	Severity ^b			Incidence ^c (%)
			0	1	≥2	
C57BL/6J	0	13(4)	11	2	0	0
	15	11(5)	0	4	7	64
BALB/cA	0	12(4)	11	1	0	0
	15	11(4)	9	2	0	0
	80	8(4)	6	2	0	0

既報 (Bryant et al. 2001) の判断規準に基づき、Grade 2 (腎盂の拡張と腎乳頭の短縮) 以上を水腎症発症と判定した。^a 各群での腹数と仔の数、^b 各重症度での仔の数、^c 水腎症発症率 (第 2 章方法 2.4 を参照)。水腎症発症率は、まず発症率を腹内で算出し、次に腹間で平均したものをを用いた。

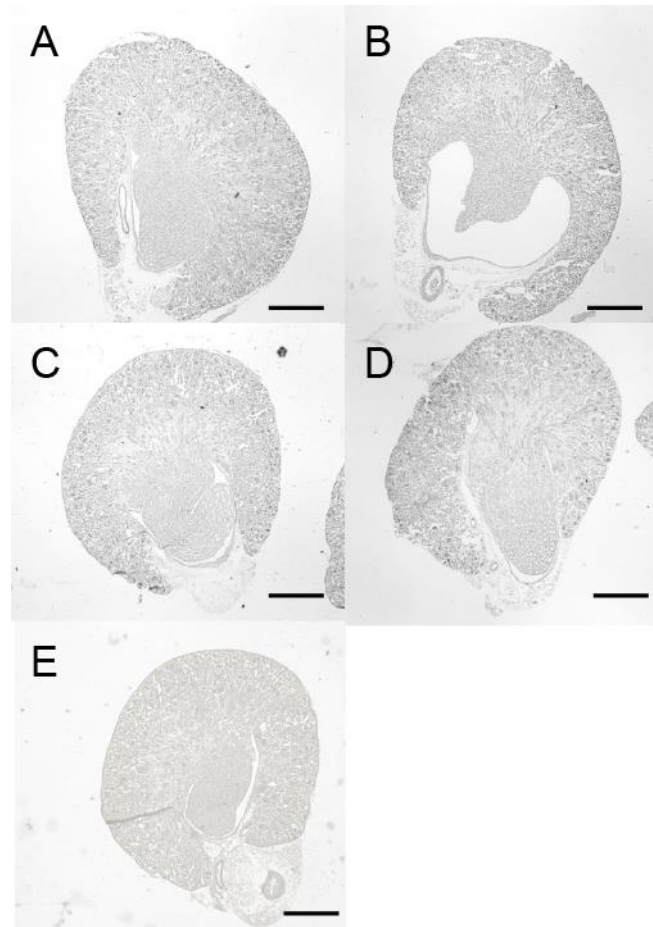


図 3-10 生後 7 日の C57BL/6J および BALB/cA 仔マウスの腎組織 (ヘマトキシリン・エオジン染色)。出生 1 日に母マウスに TCDD (15 µg/kg または 80 µg/kg) ないし vehicle を経口投与し、仔マウスに TCDD を経母乳曝露した。C57BL/6J 仔マウス対照群(A) C57BL/6J 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群 (B), BALB/cA 仔マウス対照群(C) BALB/cA 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群 (D), BALB/cA 仔マウス 80 µg TCDD/kg 曝露群 (E). Scale bars; 500 µm. Bryant et al. 2001 に基づき、Grade 2 (腎盂の拡張と腎乳頭の短縮)以上を水腎症発症と判定した。

3.3.2. TCDD 経母乳曝露マウスの腎臓における AhR 標的遺伝子の発現

TCDD 毒性の発現機序に関して、TCDD と結合した AhR が Arnt と二量体を形成し、その複合体が遺伝子プロモーター領域で dioxin responsive element と命名された部位に結合することでその遺伝子発現を活性化させ、毒性発現に至

るという考えが通説である³⁷。このような性質を有する遺伝子は、AhR 標的遺伝子と呼ばれる。そこで、私は TCDD 曝露により発現が誘導される AhR 標的遺伝子 CYP1A1 と AhRR に着目し、TCDD 経母乳曝露ないし非曝露マウスの腎臓におけるこれらの遺伝子発現を RT-PCR 法で定量し、TCDD による AhR 転写活性化能の指標とした。対照群では C57BL/6J, BALB/cA 両系統ともに CYP1A1 (図 3-11A) 及び AhRR (図 3-11B) の発現レベルは極めて低かった。TCDD 曝露群では両系統ともに CYP1A1 で対照群の 700 倍から 900 倍 (図 3-11A)、AhRR では対照群の 30 倍から 50 倍 (図 3-11B) と有意に高かった。C57BL/6J 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群と BALB/cA 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群を比較すると、CYP1A1, AhRR ともに C57BL/6J 曝露群で遺伝子発現が 2 倍に高かった (図 3-11A, B)。また、BALB/cA 仔マウス 80 µg TCDD/kg 曝露群で C57BL/6J 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群と同等に CYP1A1 遺伝子、AhRR 遺伝子が誘導された (図 3-11A, B)。これらの結果から、15 µg TCDD/kg 曝露による AhR 活性化能は C57BL/6J 仔マウスのほうが BALB/cA 仔マウスよりも高いが、BALB/cA 仔マウス 80 µg TCDD/kg 曝露群では C57BL/6J 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群と同等であることが確認できた (図 3-11)。

C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスが AhR 活性化能の程度に差はある

ものの、共に TCDD 曝露によって AhR 活性化能を示すにも関わらず、TCDD における水腎症発症率が系統間で大幅に異なること（表 3-6）より、AhR 転写活性化を表す標的遺伝子は TCDD による水腎症発症に関与しないことが明らかになった。

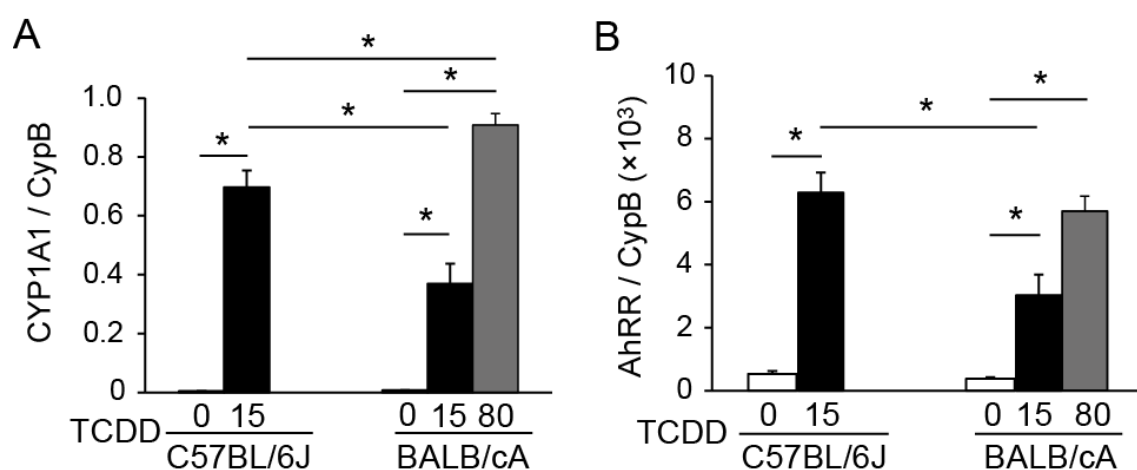


図 3-11 生後 7 日仔マウス腎臓における AhR により転写調節を受ける遺伝子 CYP1A1 及び AhRR の mRNA 発現量。生後 1 日母マウスに TCDD 15 µg/kg ないし 80 µg/kg を経口投与し、仔マウスを TCDD 経母乳曝露した。RT-PCR 法により CYP1A1 (A)、AhRR (B) mRNA を測定し、Cyclophilin B (CypB)で補正した。

3.3.3 C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスにおける尿中 PGE₂ 濃度と PGE₂ 合成に影響を及ぼす遺伝子発現

水腎症感受性因子を同定するために、私はプロスタノイド合成系に着目した。その理由は、プロスタノイド合成において合成の律速段階を担う重要な酵素である COX-2 に加え¹⁹、mPGES-1 が TCDD 経母乳曝露によって生じる水腎症発症に関与することを明らかにしたからである。mPGES-1 が律速酵素として合成される尿中 PGE₂ が水腎症発症の感受性因子であるか否かを同定することで、TCDD による水腎症発症の機序の理解を深めることができると考え、PGE₂ に着目した。

プロスタノイド 5 種の中で PGE₂ は新生仔期初期の腎血流量や水電解質再吸収といった腎生理に大きな影響を及ぼす生理活性物質である³⁸。尿中 PGE₂ 濃度を EIA 法で測定したところ(図 3-12A)、対照群の尿中 PGE₂ 濃度は、C57BL/6J 仔マウスが BALB/cA 仔マウスの約 2 倍と高く、C57BL/6J 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群も BALB/cA 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群の約 3.5 倍と有意に上昇した。BALB/cA 仔マウス 80 µg TCDD/kg 曝露群でも C57BL/6J 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群に比して有意に低く、尿中 PGE₂ 濃度は約半分であった。

新生仔において PGE₂ が水腎症発症に関係する生理活性物質であるかどうか

を、C57BL/6J 仔マウス TCDD 曝露群における尿中 PGE₂ 濃度と水腎症発症の関連を調べることにより検証した。水腎症発症の判定は、既報²³に基づき、Grade 2（腎盂の拡張と腎乳頭の短縮）以上を水腎症発症と判定した。TCDD 曝露により水腎症を発症した群と非発症群の尿中 PGE₂ 濃度を比較したところ、水腎症発症群で有意に高かった（図 3-13）。このことから、PGE₂ 産生が高いことが発症の原因である可能性が示唆された。

次に、PGE₂ 産生に関わる COX-2 及び PGE₂ 合成酵素 3 種の遺伝子発現を RT-PCR で調べた。まず、COX-2 mRNA 量（図 3-12B）は、C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスの対照群間での有意差を認めず、両系統仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群間においても発現量は同等であった。BALB/cA 仔マウス 80 µg TCDD/kg 曝露群では COX-2 発現は BALB/cA 仔マウス対照群に比べ、3 倍に誘導された（図 3-12B）。mPGES-1 mRNA 量（図 3-12C）においても、C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスの対照群間での有意差を認めなかった。両系統仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群間においては、C57BL/6J 仔マウス曝露群は BALB/cA 仔マウス曝露群と比べて 2 倍に上昇した。BALB/cA 仔 80 µg TCDD/kg 曝露群においても、BALB/cA 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群と発現量は同等であった（図 3-12C）。mPGES-2 mRNA 量（図 3-12D）は C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスの対照群間での有意差を認めず、15 µg TCDD/kg

曝露群間においても両系統仔マウスで mPGES-2 mRNA 量は各系統対照群と同等であった。BALB/cA 仔マウス 80 μ g TCDD/kg 曝露群においても、BALB/cA 仔マウス 15 μ g TCDD/kg 曝露群と違いを認めなかった。cPGES mRNA 量（図 3-12E）も mPGES-2 mRNA 量と同様に、両系統仔マウス対照群間、15 μ g TCDD/kg 曝露群間において発現量は同じであった。BALB/cA 仔マウス 80 μ g TCDD/kg 曝露群においても、BALB/cA 仔マウス 15 μ g TCDD/kg 曝露群と同等であった。以上より、TCDD における mPGES-1 の誘導の違いが尿中 PGE₂ 濃度に影響を及ぼし、水腎症発症における系統差を引き起こすことが推察された。

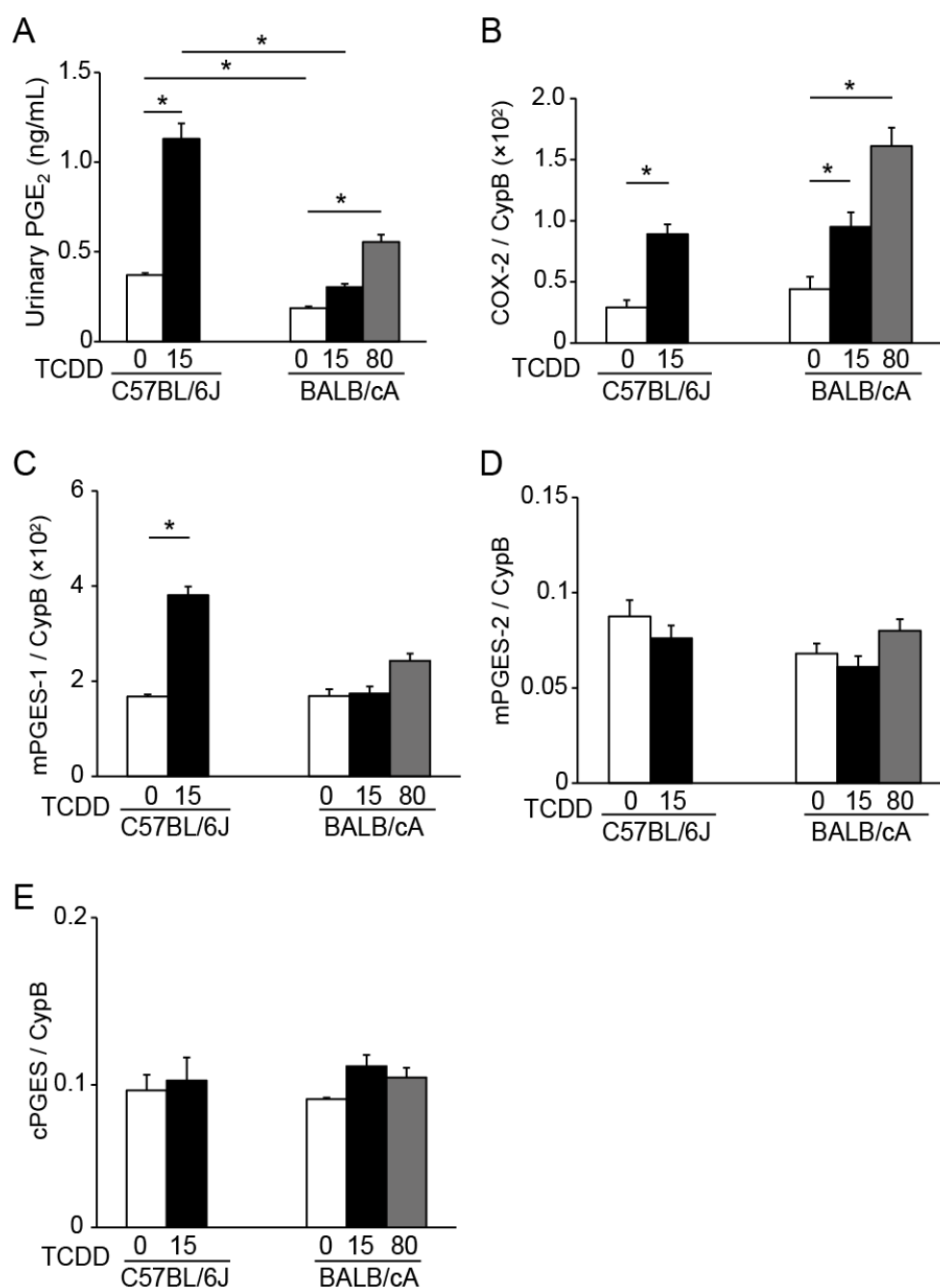


図 3-12 生後 7 日 C57BL/6J および BALB/cA 仔マウスの尿中 PGE₂ 濃度(A)、COX-2 mRNA 発現量 (B)、 mPGES-1 mRNA 発現量 (C)、 mPGES-2 mRNA 発現量 (D)と cPGES mRNA 発現量 (E)。出生 1 日に母マウスに TCDD (15 µg/kg または 80 µg/kg) ないし vehicle を経口投与し、仔マウスを経母乳曝露した。RT-PCR 法で得た mRNA 発現量は cyclophilin B (CypB) で補正した。棒グラフは平均±標準誤差を示す。各群 $N = 4-5$ 。

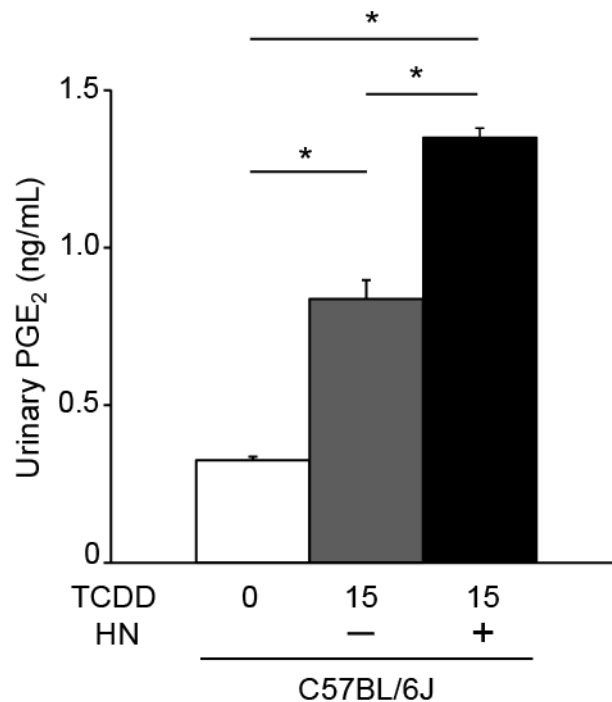


図 3-13 生後 7 日 C57BL/6J TCDD 曝露群仔マウスのうち、水腎症発症群と非発症群それぞれにおける尿中 PGE₂ 濃度。棒グラフは平均 ± 標準誤差を示す。水腎症発症群 $N = 7$ 。水腎症非発症群 $N = 4$ 。

3.3.4 TCDD 曝露での mPGES-1 遺伝子発現を調節する因子の探索

上記 3.3.3 にて mPGES-1 遺伝子発現に系統差を見出したことより、mPGES-1 遺伝子転写開始点から 2kb 上流のシスエレメントに C57BL/6J マウスと BALB/cA マウスの間で塩基配列の違いがあるかどうかを、the mouse SNP database of the Center for Genome Dynamics of the Jackson laboratory を用いて調べた³⁹。しかし、予想に反してこの部分の配列には両系統の間に相違を認めなかったため、両系統のシスエレメントの違いでなくトランスエレメントの

違いによって mPGES-1 の誘導性の違いが生じるものと考えた。そのようなトランスエレメントの候補として mPGES-1 発現に関連するサイトカイン interleukin-1 β (IL-1 β)、tumor necrosis factor (TNF)- α や転写因子に着目し、系統差の有無を検討した。interleukin-1 β (IL-1 β)や tumor necrosis factor (TNF)- α は、COX-2 や mPGES-1 を誘導することで知られる⁴⁰⁻⁴³。C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスの腎臓におけるこれらの遺伝子発現を調べたところ、両系統ともに対照群に比し TCDD 曝露群で有意に上昇し、系統差を認めなかった(図 3-14)。

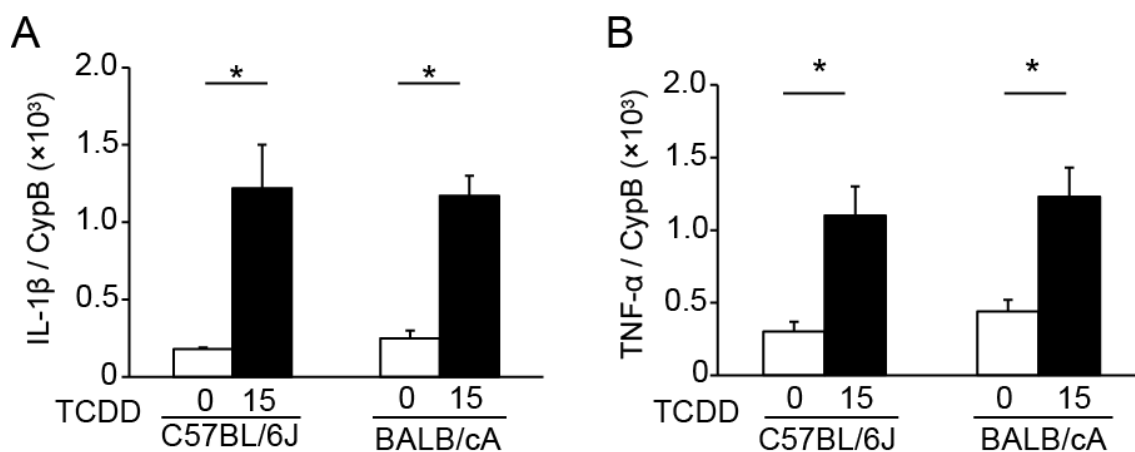


図 3-14 生後 7 日 C57BL/6J および BALB/cA 仔マウスの(A) IL-1 β mRNA 発現量と (B) TNF- α mRNA 発現量。出生 1 日に母マウスに TCDD (15 $\mu\text{g/kg}$ または 80 $\mu\text{g/kg}$) ないし vehicle を経口投与し、仔マウスを経母乳曝露した。RT-PCR 法で得た mRNA 発現量は cyclophilin B (CypB) で補正した。棒グラフは平均 \pm 標準誤差を示す。各群 $N = 4-5$ 。

次に mPGES-1 遺伝子発現を調節する転写因子 Egr-1 の遺伝子発現を調べた (図 3-15A)。Egr-1 は mPGES-1 遺伝子発現を調節する転写因子の中で、TCDD によってその発現の誘導が報告されている⁹⁶。Egr-1 mRNA 量は C57BL/6J ならびに BALB/cA 仔マウス対照群間で有意差を認めなかった。一方、両系統仔マウス 15 μ g TCDD/kg 曝露群間において Egr-1 mRNA 量は、C57BL/6J 仔マウス曝露群は BALB/cA 仔マウス曝露群群と比べて 1.5 倍に上昇した。BALB/cA 仔マウス 80 μ g TCDD/kg 曝露群でも BALB/cA 仔マウス 15 μ g TCDD/kg 曝露群と同様に TCDD による Egr-1 の誘導を認めなかった (図 3-15A)。さらに Egr-1 が mPGES-1 転写における系統差に関与するかを検討するため、TCDD 曝露した腎臓の mPGES-1 プロモーター領域での Egr-1 結合を ChIP アッセイにより調べた (図 3-15B)。免疫沈降後、quantitative PCR を行ったが融解曲線に安定性を欠いたため、semi-quantitative PCR を行った (図 3-15B)。mPGES-1 プロモーターへの Egr-1 結合は C57BL/6J 仔マウス 15 μ g TCDD/kg 曝露群のみで認め、BALB/cA 仔マウスでは対照群、15 μ g TCDD/kg 曝露群共にバンドはなかった (図 3-15B)。また Diaz-Munoz ら⁴⁴は LPS 刺激により Egr-1 は COX-2 プロモーターに結合し COX-2 転写を促進することを報告している。よって TCDD 曝露における COX-2 プロモーター領域への Egr-1 結合を免疫沈降後 quantitative PCR で確認した (図 3-15D)。COX-2 プロモーター領域への Egr-

1 結合は C57BL/6J 仔マウス、BALB/cA 仔マウス共に対照群で同等に認め、15 μg TCDD/kg 曝露群で共に対照群より 2.3 倍から 2.5 倍に増強した (図 3-15D, E)。

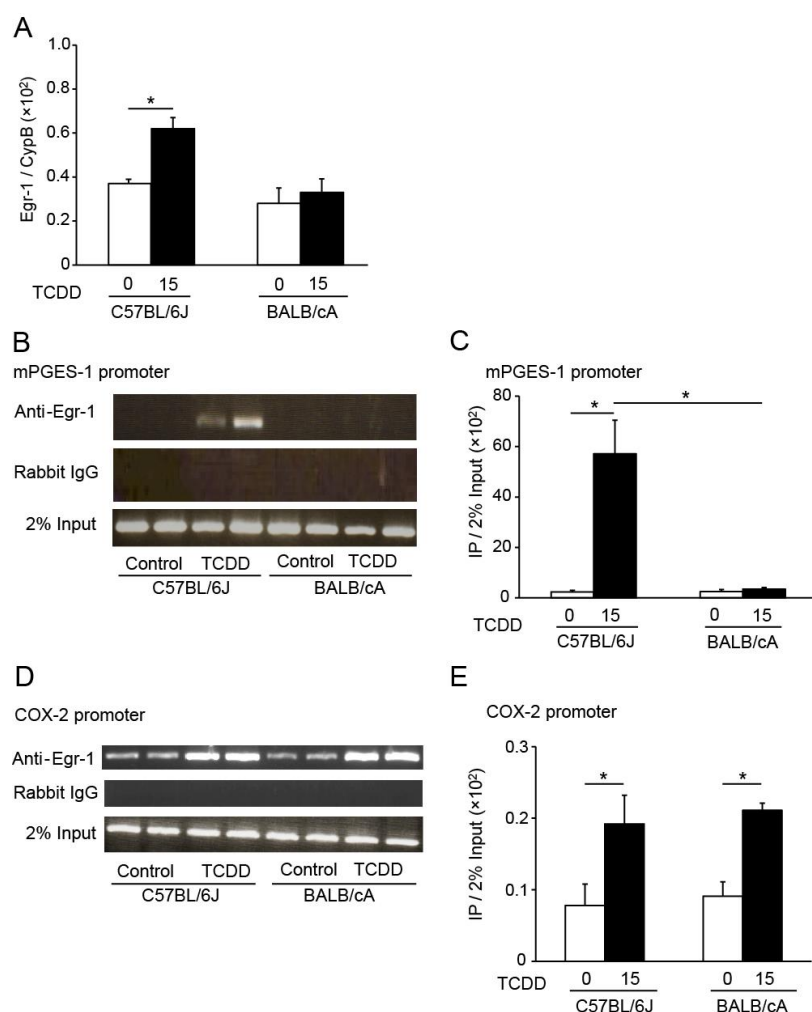


図 3-15 生後 7 日 C57BL/6J および BALB/cA 仔マウス腎臓 (各群 N=4) の Egr-1 mRNA 発現量と mPGES-1 ないし COX-2 プロモーター領域への Egr-1 結合。出生 1 日に母マウスに TCDD (15 $\mu\text{g/kg}$ または 80 $\mu\text{g/kg}$) を経口投与し、仔マウスに TCDD を経母乳曝露した。対照群には vehicle を投与した。(A) Quantitative RT-PCR 法で得た Egr-1 mRNA 発現量は cyclophilin B (CypB) で補正した。(B) mPGES-1 プロモーターへの Egr-1 結合量は ChIP assay を用いて評価した。抗 Egr-1 抗体の対照群として rabbit IgG を用いた。異なる仔マウスより得た、抗 Egr-1 抗体で免疫沈降する前後のクロマチンフラグメントを用いて semi-quantitative PCR を施行した。(C) それぞれの PCR 産物 10 μl を各レーンで電気泳動した。得られたバンド密度は ImageJ ソフトウェアで測定した。COX-2 プロモーターへの Egr-1 結合量も(B)同様 ChIP assay を用いて評価した。(D) 抗 Egr-1 抗体で免疫沈降する前後のクロマチンフラグメントを用いて quantitative PCR を施行した。各 PCR 産物 5 μl を電気泳動した。(E) インプットクロマチン量に対する各 IP で得られたクロマチン量の割合は Cell Signaling Technology のプロトコールにある式を用いて求めた。方法 2.7 参照。

3.3.5 C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウス腎臓における水チャンネル、電解質輸送体遺伝子発現と尿浸透圧

所属研究室では、TCDD による水腎症を発症したマウスの腎臓で水チャンネル aquaporin 2 (AQP2) と電解質輸送体 NKCC2 と ROMK の遺伝子発現が低下し、非発症例で低下しないことを発見した^{19,26,45}。今回もこれらの遺伝子発現を確認したところ、AQP2 遺伝子発現は C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスの対照群間で有意差を認めず、15 µg TCDD/kg 曝露群間においては BALB/cA 仔マウスで AQP2 mRNA 量は C57BL/6J 仔マウスの 2.2 倍であった(図 3-16A)。NKCC2 mRNA 量(図 3-16B) は C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスの対照群間、15 µg TCDD/kg 曝露群間ともに同等であった(図 3-16B)。ROMK mRNA 量(図 3-16C) は C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスの対照群間で同等で、C57BL/6J 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群で対照群に比べ有意に低下した。BALB/cA 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群では対照群との違いを認めなかった(図 3-16C)。尿濃縮能の指標である尿浸透圧を測定すると、C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスの対照群間で同等で、C57BL/6J 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群の尿浸透圧は対照群と比べて有意に低下した。それに比べて BALB/cA 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群は対照群との違いを認めなかった(図 3-16 D)。

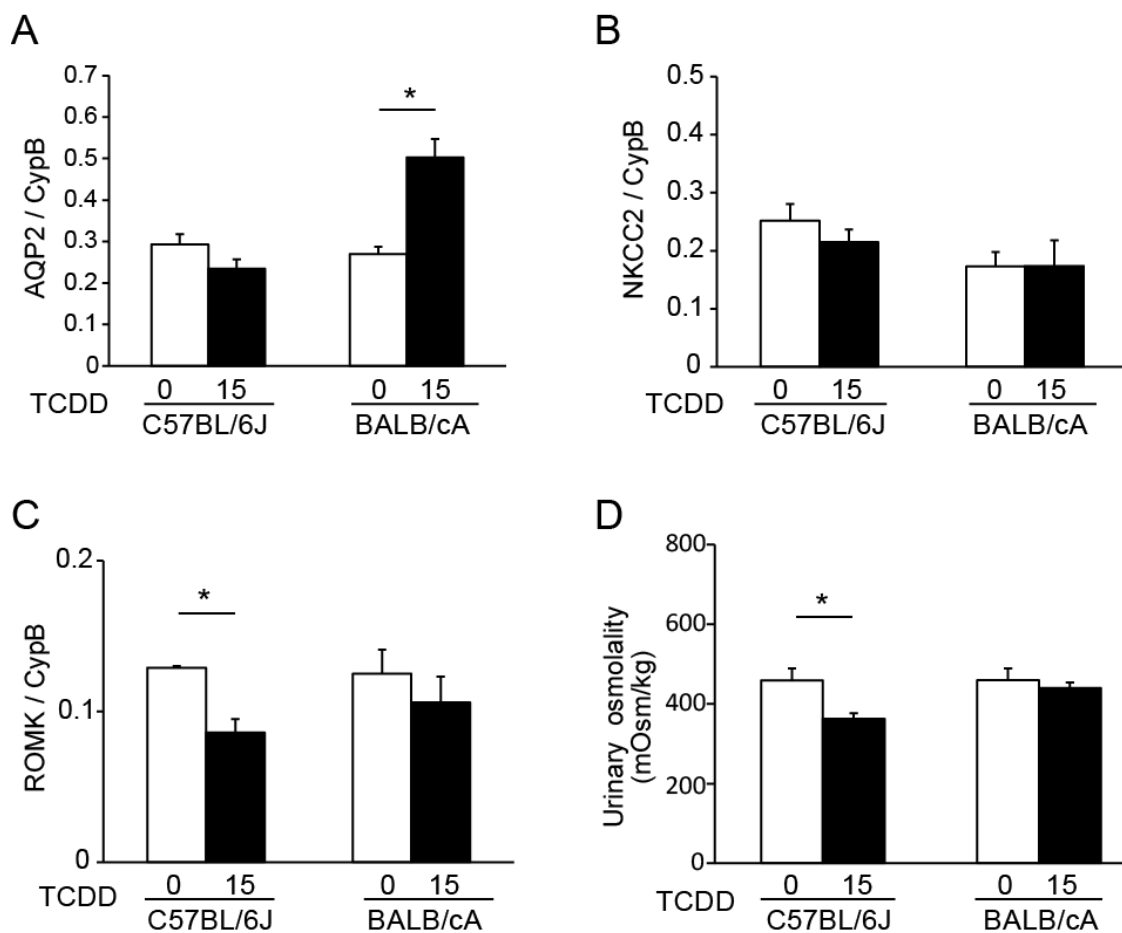


図 3-16 生後 7 日 C57BL/6J および BALB/cA 仔マウス腎臓の AQP2 mRNA 発現量(A)、NKCC2 mRNA 発現量(B)、ROMK mRNA 発現量(C)。出生 1 日に母マウスに TCDD (15 µg/kg または 80 µg/kg)ないし vehicle を経口投与し、仔マウスを経母乳曝露した。qRT-PCT 法で得た各 mRNA 発現量は cyclophilin B (CypB)で補正した。尿浸透圧は氷点降下法で測定した(D)。

PGE₂ が EP2 や EP4 を介して腎臓 AQP2 蛋白質の発現と AQP2 の局在に影響を及ぼすことが知られている^{46,47}。そこで、私は C57BL/6J ならびに BALB/cA 仔マウス 15 µg TCDD 曝露群における AQP2 遺伝子発現と尿中 PGE₂ 濃度の関係を調べた。C57BL/6J、BALB/cA マウスともに AQP2 遺伝子発現と尿中 PGE₂ 濃度は逆相関を示した (R=-0.92, -0.90) (図 3-17A, B)。

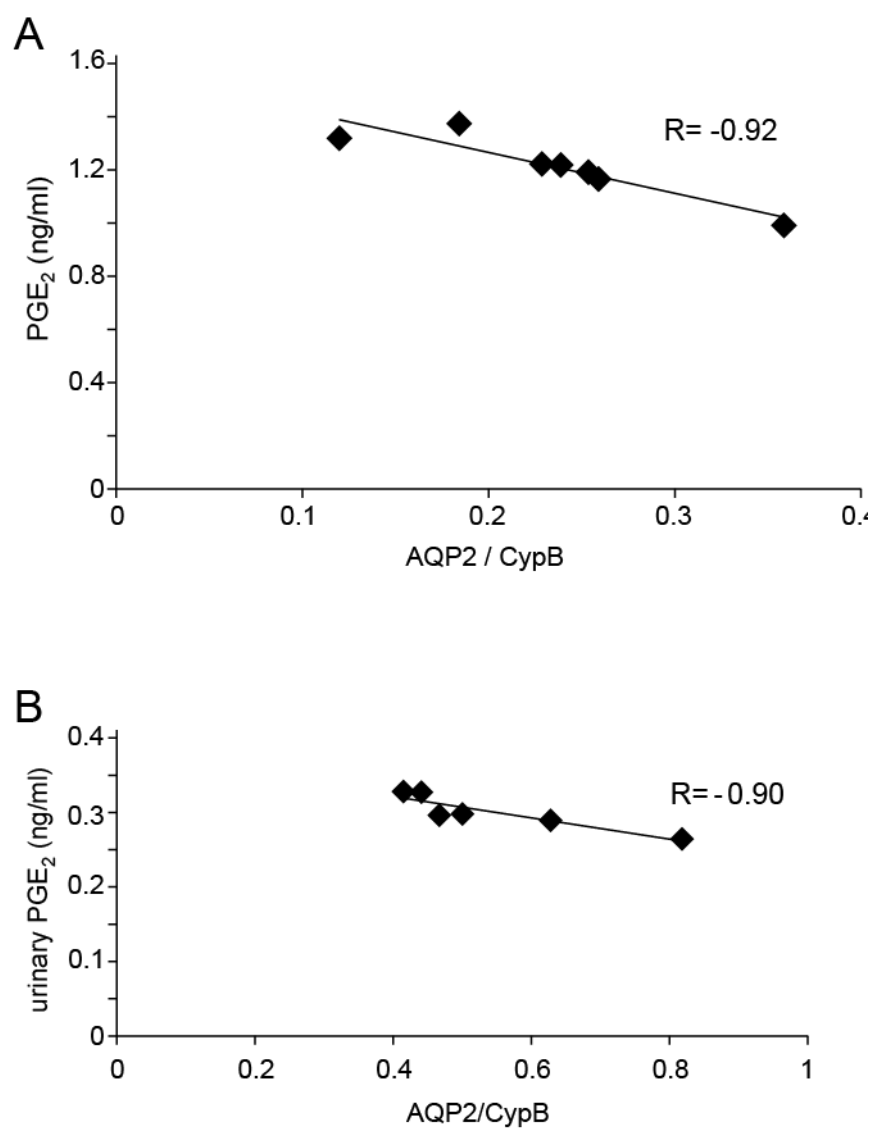


図 3-17 A) 生後 7 日 C57BL/6J TCDD 曝露群仔マウス ($N=7$) ならびに B) 生後 7 日 BALB/cA TCDD 曝露群仔マウス ($N=6$)における AQP2 遺伝子発現と尿中 PGE_2 濃度の相関。

第 4 章 考察

TCDD 毒性の機序は AhR が決定するという考えが定説であった^{1-3,7,48}。今回、私は TCDD 毒性の典型例である授乳期水腎症に着目し、この毒性の発症機序を検討した。その結果、PGE₂ 合成系が TCDD による水腎症発症に関与すること、そして PGE₂ 受容体のうち EP1 が発症に関与していることが明らかになった。また、AhR と TCDD の親和性が同程度であることから定説に則れば TCDD 毒性も同等であると考えられる 2 系統のマウスが、実際には、TCDD 授乳期曝露における水腎症発症率が大幅に異なること、そして TCDD によって誘導される PGE₂ 合成の相違が 2 系統間での水腎症発症率の差を導くことを明らかにした。それぞれの新知見について、以下に考察する。

4.1 TCDD による PGE₂ 合成ならびに PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 誘導と水腎症発症との関連

mPGES-1 発現と水腎症発症との関連において、本研究の主要な成果は次の 2 点である。1 つは、TCDD が引き起こす授乳期水腎症は生理活性物質 PGE₂ の過剰産生が原因であると解明したこと (図 3-2A, 3-12A, 3-13)、もう 1 つは、PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 の誘導能の有無がこの TCDD 毒性の感受性に影響を及ぼす因子であると解明したことである (図 3-2B, 3-12C)。

4.1.1 mPGES-1 遺伝子欠損マウス実験の妥当性

TCDD がマウス新生仔に引き起こす水腎症の原因分子の候補として、プロスタグランジン類やトロンボキサンの産生に携わる COX-2 が挙げられていた¹⁹。本研究ではプロスタグランジン類の中でも、腎臓において多様な役割を持つ PGE₂ に着目し、PGE₂ が発症の原因となるか検証した。検証実験を行うために、PGE₂ 合成酵素である mPGES-1 欠損マウスを利用した。本研究で用いた mPGES-1 欠損マウスは C57BL/6J 系統野生型マウスと BALB/cA 系統 mPGES-1 ホモ欠損マウスを F0 として交配した F2 世代の個体である。このことに起因して、系統間の遺伝的背景の違いが水腎症発症率や重症度に影響を与えないか分析する必要があった。今回の研究では C57BL/6J 由来 mPGES-1(+/+)型雄マウスと BALB/cA 由来 mPGES-1(+/-)雌マウスを交配させて得た mPGES-1(+/-)マウスを F1 世代として用いた。F1 世代 mPGES-1(+/-)型は C57BL/6J 由来の野生型遺伝子と BALB/cA 由来の変異を加えた遺伝子を引き継ぐ。この F1 世代の雌雄を交配させると、F2 世代では mPGES-1(+/+)、mPGES-1(+/-)、mPGES-1(-/-)の 3 つの遺伝型が得られ(図 2-1)、F2 世代 mPGES-1(+/+)は C57BL/6J 由来の mPGES-1 野生型遺伝子を引き継ぐホモ接合である。

TCDD 毒性で重要な要因は AhR 遺伝子型である。C57BL/6J (AhR 遺伝子型

は AhRb1/b1)と BALB/cA (AhR 遺伝子型は AhRb2/b2)との交配で得た F1 世代マウス (AhR 遺伝子型は AhRb1/b2) 同士を交配させて得られた F2 世代を用いているので、解析対象の雄仔の AhR 遺伝子型は AhRb1/b1, AhRb1/b2, AhRb2/b2 の 3 通りである (図 2-2)。TCDD 曝露による AhR 活性化の指標となる CYP1A1 や AhRR の遺伝子発現は、AhRb1/b1 を持つ F2 仔マウスも AhRb2/b2 を持つ F2 仔マウスも Poland ら^{49,50} の報告と同様の結果になった (図 3-3 A, B)。また、今回の水腎症発症率と水腎症発症に必要な COX-2 の誘導も Nishimura et al.¹⁹ による C57BL/6J マウス由来の結果と同等で、かつ AhR 遺伝子型間での重症度に相違を認めなかった。よって私が用いた実験モデルは、mPGES-1 遺伝子由来、AhR 活性、COX-2 誘導の点から TCDD 曝露による水腎症発症における mPGES-1 の役割を検討するのに妥当である。

4.1.2 TCDD 曝露による PGE₂ 産生増加が水腎症を引き起こす

本研究によって私は TCDD 曝露が引き起こす授乳期水腎症と PGE₂ 産生との関係を明らかにした。まず、3 種存在する PGE₂ 合成酵素の中で TCDD 曝露が mPGES-1 の遺伝子発現を顕著に誘導 (図 3-2B, 3-12C) し、TCDD 曝露による PGE₂ 産生量の増加が mPGES-1 遺伝子に依存すること (図 3-2A, 3-12A) を証明した。mPGES-1 欠損マウスでも尿中 PGE₂ 濃度がわずかに上昇しているのは

mPGES-2 や cPGES によるものと考えられる(図 3-2A)。次いで、PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 遺伝子が水腎症発症に重要な遺伝子であること(表 3-1, 図 3-2B, 図 3-11C)、ならびに PGE₂ 産生量の指標である尿中 PGE₂ 濃度と水腎症発症が相関すること(図 3-1, 図 3-2A, 3-12A, 3-13)から TCDD による尿中 PGE₂ 濃度上昇が水腎症発症に関与することが明らかになった。以上の結果を総合して、TCDD 曝露による授乳期水腎症を引き起こす因子として生理活性物質 PGE₂ が明らかになった。TCDD が引き起こす毒性現象は TCDD をリガンドとする転写因子 AhR が仲介することが判明していた¹⁻³が、AhR の下流で個別の毒性現象に至るパスウェイは不明であった⁷。本研究は、この毒性発現に至るパスウェイが水腎症においては PGE₂ 合成経路であることを初めて明らかにした。

次に PGE₂ の上昇がどのように水腎症を引き起こすのかを考察する。水腎症を引き起こす原因に、(1) 尿路の物理的狭窄¹²⁰、(2) 糸球体濾過量の上昇、(3) 中枢性ならびに腎性尿崩症⁴⁶や遺伝的尿細管障害²¹にみられる尿濃縮能の低下が挙げられる。(1)に関して、PGE₂が尿路の物理的閉塞を引き起こす報告は今までになく、また TCDD 曝露腎臓において腎盂から膀胱までに尿路の物理的閉塞は認められていない¹⁹。(2)に関して、PGE₂は輸入細動脈を拡張させて腎血流量を増やす(表 4-1)ことより、糸球体濾過量は TCDD 曝露腎で増えている可能性がある。しかし本研究の対象は授乳期仔マウスで、糸球体濾過量の検証は困難であり

実現できなかった。(3)に関して、尿濃縮力の指標である尿浸透圧を測定したところ、TCDD 曝露によって水腎症を発症した C57BL/6J 仔マウスでは対照群よりも有意に低下した (図 3-16D)。また、PGE₂ は尿濃縮に関与する AQP2 発現や集合管上皮細胞小胞体内から管腔側膜への AQP2 の移動に関与し、集合管での水の再吸収に影響を及ぼす^{47, 57}。本研究では尿中 PGE₂ 濃度と AQP2 mRNA に逆相関を認めた (図 3-17A, B)。TCDD 曝露群の解剖時膀胱内尿量は対照群に比べて 2 倍から 3 倍に上昇している¹¹⁹。以上より、糸球体濾過量が増加したことの寄与の可能性もあるが、TCDD 経母乳曝露による PGE₂ の上昇が尿濃縮能を低下させることで尿量が増加し、水腎症を引き起こすと考えられる。

4.1.3 PGE₂ 以外のプロスタノイドと TCDD 曝露による水腎症発症との関連

腎臓に作用するプロスタノイドは、PGE₂ 以外に prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α})、prostaglandin I₂ (PGI₂)、thromboxane A₂ (TXA₂) が挙げられる。PGF_{2α} は遠位尿細管や集合管に存在する PGF_{2α} 受容体^{121, 122} を介して Na や Ca 再吸収に関与する報告がある^{123, 124}。PGI₂ は輸入細動脈や糸球体に存在する PGI₂ 受容体^{121, 122} と結合し、腎血管を拡張させて腎血流量を増やし、レニン分泌を増やす役割を持つ^{125, 126}。TXA₂ は PGI₂ とは逆に、糸球体に存在する TXA₂ 受容体^{121, 122} を介して腎血管を収縮させ、腎血流を減らして糸球体濾過量を減少

させる¹²⁷⁻¹²⁹。これらのことから $\text{PGF}_2\alpha$ や PGI_2 も利尿に影響を及ぼす可能性が示唆される。しかし、ネフロンをアラキドン酸で培養する実験で各プロスタノイドの産生量をみると PGE_2 は総プロスタノイドの 60% を占め、腎臓の主要な生理活性物質である¹³⁰。また、mPGES-1 欠損マウスでは、尿中 PGE_2 濃度が mPGES-1 野生型マウスの 2 割に減少し、 PGI_2 が 1.6 倍と大幅に誘導される¹³¹。本研究で用いた mPGES-1 欠損マウス TCDD 曝露群においても、 PGE_2 産生が抑制される代わりに PGI_2 をはじめとする他のプロスタノイド産生が増加することが推察される。もし PGE_2 以外のプロスタノイドが水腎症を発症に関与するのであれば、TCDD を曝露した mPGES-1 欠損マウスにおいて水腎症発症率が 0% にはならないと考えられる。従って PGE_2 が TCDD による水腎症を発症させるもっとも主要なプロスタノイドであるとの結論に達した。

4.2 PGE₂以降のシグナル伝達を担う PGE₂ 受容体と水腎症発症との関連

PGE₂ が腎臓で腎血流や腎糸球体濾過、水電解質の吸収、レニン分泌など多くの生理作用に影響を及ぼす^{51,52} ことより、本研究では腎臓での PGE₂ シグナルを受ける PGE₂ 受容体の役割に着目した。腎臓における各 EP 受容体 4 サブタイプの役割を表 4-1 に示す⁵¹。腎臓での発現量や分布が各サブタイプで異なり、また血管作用や利尿作用も多岐にわたる。

表 4-1 PGE₂ 受容体と腎臓：発現と機能（Antonucci et al., 2007, Brayer et al. 2000 より）

PGE ₂ 受容体	腎での発現	局在	血管作用	レニン分泌	尿細管作用	循環動態への影響
EP1	高	CD, AA, EA	収縮	なし	Na 利尿	なし
EP2	低	G, AA, CD, TDL	弛緩	分泌	Na 再吸収	血圧調節
EP3	高	CD, TAL, AA?	収縮	なし	Na 利尿	なし
EP4	高	G, AA, CD	弛緩	分泌	水 Na 再吸収	血圧調節 動脈管閉鎖

CD;集合管、AA;輸入細動脈、EA;輸出細動脈、G;糸球体、TDL;ヘンレの係蹄下行脚、TAL;ヘンレの係蹄太い上行脚

PGE₂ 以降のシグナル伝達を担う PGE₂ 受容体と水腎症発症との関連に関する主要な成果は、(1) PGE₂ 受容体サブタイプのうち、EP1 が授乳期 TCDD 曝露における水腎症発症に関与する可能性が高いこと (2) 新生仔期腎においても既報³²⁻³⁶と同様に EP1 が集合管に発現することの 2 点である。

4.2.1 授乳期 TCDD 曝露における水腎症発症に関連する EP 受容体

PGE₂ 受容体 4 サブタイプはそれぞれ腎臓での発現が報告されている。表 4-1 に示すように、EP1 は腎集合管や輸入細動脈に多く発現する³²⁻³⁴。今回の実験においても、新生仔マウスにおいて EP1 は腎集合管に局在することが認められた (図 3-9)。EP2 は腎皮質集合管や腎乳頭間質細胞^{53,54}、EP3 はヘンレの係蹄太い上行脚や腎皮質および髄質集合管^{55,56}、EP4 は腎皮質集合管^{32,53}と、各 EP 受容体で発現部位が多岐にわたる。それぞれの受容体は G タンパク質やβ-arrestin と結合し、その下流のシグナル経路が異なる。また各 EP 受容体を介した腎生理作用は相補性を持つ⁵²。例えば、腎集合管において EP1 と EP3 は尿濃縮を抑制し、EP2 と EP4 は尿濃縮を促進する^{47,57}。腎血管においては EP1 と EP3 は血管を収縮させ腎血流を抑制し、EP2 と EP4 は血管を拡張し血流を増やす⁵⁷。つまり、腎における血圧調節や水電解質再吸収は EP1/EP3 と EP2/EP4 のバランスによって決まるとされている。今回私は EP1、2、3 受容体各欠損マ

ウス、ならびに EP4 阻害剤投与マウスを用いて、授乳期 TCDD 曝露による水腎症発症に關与する PGE₂ 受容体を探索した。腎生理における均衡が前述のように EP1/EP3 と EP2/EP4 のバランスによって決まる中、授乳期 TCDD 曝露による水腎症モデルにおいて他のサブタイプに比し EP1 単独で水腎症発症にかかわる可能性が有意に高いことが示唆された(表 3-2, 図 3-5)ことは予想外であった。ただ、EP1 野生型 TCDD 曝露群における水腎症発症率が 80%と 100%に満たないこと、そして EP1 欠損型 TCDD 曝露群における発症率が 28%と完全に抑制されないこと(表 3-2)から、授乳期 TCDD 曝露での水腎症発症において、EP1 以外の受容体、あるいは未だ解明されていない調節因子が關与することを完全に否定できない。しかし、今回の結果から EP 受容体の中でも、水腎症発症への寄与は EP1 が最も大きいこと (表 3-2, 図 3-5)、そして新生仔腎臓における EP1 の局在が集合管であること(図 3-9)が明らかになったことは、新生仔腎臓におけるダイオキシン毒性の機序の解明において意義がある。さらに EP1 は発がん⁵⁸、がん免疫⁵⁹、行動^{60,61}、日内変動など多くの分野でも注目されている。また、これらの領域は AhR との関連も示唆されている⁶²⁻⁶⁵。TCDD によって活性化された AhR が EP1 を介して表現形に影響を及ぼすことが本研究で明らかになり、この新知見が TCDD 毒性の理解のみならず、これらの分野の発展にも寄与することが期待される。

4.2.2 EP1 受容体が新生仔集合管における水および電解質輸送体に及ぼす影響

本研究では、従来の報告³²⁻³⁶同様、新生仔腎臓においても EP1 受容体が腎集合管に存在することが明らかになった。授乳期 TCDD 曝露による水腎症発症に EP1 が関わること、そして EP1 の局在が集合管であることから、TCDD によって活性化された AhR 下流のシグナルが EP1 を介して集合管における尿濃縮を妨げることが水腎症発症の原因であると推測できる。尿濃縮を司る集合管において、EP1 が水、Na 再吸収に関与することも報告されている^{36,66,67}が、その機序は明らかになっていない⁵²。ここでは、水や Na 再吸収に関連する輸送体の発現や機能に EP1 がどのようにかわるかを既報よりまとめ、TCDD が集合管の作用をどのように攪乱する可能性があるのかを考察する。

4.2.2.1 EP1 受容体と AQP2

新生仔期の尿濃縮力に大きな役目をもつのが集合管の水輸送体 AQP2 である。集合管での水再吸収は、AQP2 発現ならびに AQP2 の細胞質内小胞体から管腔側細胞膜への移動に依存している⁶⁸。

私が所属していた研究室の既報では AQP2 mRNA 発現は、授乳期に TCDD 曝露された生後 7 日の新生仔マウスの腎において対照群に比べ約 1/2 に低下した⁴⁵。AQP2 遺伝子発現を調節するプロモーター領域には NFκB, Tonicity-responsive enhancer (TonE)、AP1 や CRE といったシスエレメントがある⁶⁹。

水制限等で体液が高浸透圧であることや下垂体後葉より分泌される抗利尿ホルモン arginine vasopressin (AVP)が刺激となり Tonicity-responsive enhancer (TonE)、AP1 や CRE を介して AQP2 転写が促進する^{69,70}。一方、lipopolysaccharide 刺激では κ B エlement に p50/p52 が結合し AQP2 転写を抑制する^{69,71}。EP1 が Gq タンパク質と結合することで細胞内 Ca や protein kinase C (PKC)を上昇させることは知られており⁷²、また EP1 が G₁₂を介した Rho 活性化によってリン酸化 NF κ B や CREB が増え、それぞれの結合サイト κ B や CRE を経て標的遺伝子の転写を抑制することも報告されている⁷³。このことより、AhR より下流のシグナルが EP1 を介して NF κ B や CRE を増やし AQP2 発現に影響を及ぼす可能性が示唆される。これらのシグナル伝達に関する研究は、授乳期 TCDD 曝露における水腎症の機序の解明に向けて今後の課題である。

AQP2 遺伝子発現のみならず、AQP2 リン酸化による AQP2 の細胞質内小胞体から管腔側細胞膜への移動も集合管における尿濃縮能に影響を与える。PGE₂/EP3 が adenylylate cyclase を阻害することで cAMP を低下させ、AQP2 リン酸化を抑制することは既報で明らかになっている¹³⁹が、EP1 との関係はまだ不明である。TCDD 曝露腎における AQP2 の post translational modification に関する研究も今後の検討事項である。

4.2.2.2 EP1 受容体と epithelial sodium channel (ENaC)

新生仔期の尿濃縮において水再吸収同様に Na 再吸収も重要な役割を担うⁿ。生後 1 日から 7 日のラット尿濃縮能は Na の再吸収に依存し、Na と同様に尿浸透圧を決定する尿素透過性は極めて低い^{75,76}。ヒトにおいても、新生児期前半は Na が尿浸透圧を決定する主要な溶質である^{75,77}。EP1 が存在する集合管において、集合管の管腔側で Na 再吸収に関与する電解質輸送体は epithelial sodium channel (ENaC) が代表である^{74,118}。Sprague-Dawley ラットにおいて、アンギオテンシン II による腎集合管 ENaC の誘導を EP1 アゴニスト sulprostone が抑制することが報告されており³³、マウスにおいても ENaC の発現に EP1 が関与する可能性がある。

TCDD 経母乳曝露による水腎症発症は生後 1 日から 4 日と時期特異的で、生後 8 日以降の TCDD 経母乳曝露では水腎症を発症しない⁷⁸。Liu ら⁷⁶がラット新生仔腎髄質の ENaC mRNA 発現を生後 1 日、4 日、7 日、14 日、成獣で確認したところ、生後 1 日より 7 日では発現を認めたが生後 14 日以降では認めなかった。ENaC の発現時期は水腎症発症の高感受性時期と極めて重なるため、

ⁿ ヘンレの係蹄太い上行脚での sodium-potassium-chloride transporter 2 (NKCC2) を中心とした Na イオン能動輸送と下行脚での Na イオンの流入によって、腎髄質内の Na 濃度勾配ができる。水透過性の高い集合管ではこの濃度勾配によって水が再吸収され尿が濃縮される。これは腎髄質対向流増幅系と呼ばれ、新生仔後半の尿素による尿濃縮に比べると水再吸収の効率は極めて低い⁷⁴。

ENaC は TCDD 経母乳曝露による水腎症発症の時期特異性を説明する因子として今後の研究対象になり得る。

4.3 TCDD 高感受性マウス 2 系統を用いた水腎症発症率の比較

4.3.1 AhR 以外の TCDD 毒性感受性因子

口蓋裂と水腎症を含むダイオキシンの様々な毒性は、TCDD を含むダイオキシンをリガンドとする細胞内転写因子 AhR によって仲介され、AhR 欠損マウスではダイオキシン毒性はほとんど観察されないことから、AhR はダイオキシン毒性の決定要因であると考えられてきた^{1,2,79}。実際に、動物種と系統間で異なる AhR 型を有し、ダイオキシン毒性における感受性差は各 AhR 遺伝子型の TCDD 結合親和性に起因する^{82,83}。しかし、本研究では同等の TCDD 結合能を有する C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウスで、TCDD によって引き起こされた水腎症の発症率に著しい相違を認めた (表 3-11)。また、腎臓での mPGES-1 遺伝子発現や尿中 PGE₂ の違いが系統差に正に相関することがわか

。例えば、近交系マウスでは AhR の対立遺伝子は AhRb1, AhRb2, AhRb3, AhRd の 4 つから成る^{49, 80}。TCDD に対する AhR の解離定数は、AhRb1 が 6 pM であるのに対し AhRd は 37 pM と 6 倍の開きがある⁵⁰。AhRb1 を有する C57BL/6J と AhRd を有する DBA/2 は、胎児期 TCDD 曝露での口蓋裂発症率において C57BL/6J は 100%であるのに対し DBA/2 は 30%で前者は後者と比べて感受性が高い⁸¹。TCDD に対する解離定数が小さく親和性が高い AhR を有する系統は TCDD 毒性への感受性が高いものと理解されている。

った。CYP1A1 や AhRR、COX-2 などの AhR 標的遺伝子発現は両系統に差を認めなかったことより、TCDD の AhR への結合能や AhR 標的遺伝子発現にみる AhR 転写活性といった従来の TCDD 毒性のメカニズムでは説明できないことが明らかになった。このことから、AhR 以外に重要な感受性決定因子が存在すると推定された。

AhR 以外の感受性因子に関して、AhR 結合能 および AhR 転写活性以外にダイオキシン毒性に影響を及ぼす要因が存在することを示唆した研究が本研究以外にも存在する。TCDD 曝露で誘発される肝ポルフィリン症は、同一の AhR 遺伝子型 (AhRd) を持つ SWR と DBA/2 マウスで発症率が異なる⁸⁴。更にポルフィリン症に関連する遺伝子座を QTL 解析したところ、AhR 遺伝子のある第 12 染色体のみならず第 11、14 染色体上の遺伝子も挙げられた⁸⁵。Keller⁸⁶ らは 歯牙の発達を TCDD 高感受性 AhR 型 (AhRb1/b1 または AhRb2/b2) を持つ 5 系統 (C57BL/6J, BALB/cByJ, A/J, CBA/J, C3H/HeJ, C57BL/10J) で検討した。いずれも TCDD の AhR 結合能は同等であるにもかかわらず、TCDD による第三臼歯の欠損や第一下顎臼歯の相違は系統間で異なった。ラットの例では、ホルツマンと Sprague-dawley ラットは同一の AhR 遺伝子を持つが、子宮動脈結紮による低酸素下での TCDD 誘発胎児死亡率に有意な差が認められている^{87,88}。齧歯動物を使用したこれらの研究は AhR 遺伝子

以外の遺伝的要因が TCDD 毒性に影響を与えることを示している。本研究では、AhR 以外の感受性因子が存在することを明らかにしたのみならず、PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 や Egr-1 が感受性に影響を及ぼす因子である可能性を示した (図 3-11C) という点で、TCDD 毒性の感受性に関する研究を大きく進展させた。

4.3.2 TCDD 曝露における mPGES-1 誘導

次に、AhR 以外の TCDD 毒性の感受性に関わる因子 mPGES-1 遺伝子発現が TCDD 経母乳曝露新生仔腎臓において誘導される機序を検討した。ここでの主要な成果は、(1) TCDD 曝露における mPGES-1 誘導は、従来の TCDD 毒性に関わる AhR/Arnt 経路以外である可能性を示唆したこと (2) 転写因子 Egr-1 の遺伝子発現と mPGES-1 シスエレメントへの Egr-1 リクルートが mPGES-1 発現を調節する候補であることの二点である。

mPGES-1 遺伝子は NF- κ B, Egr-1, hypoxia inducible factor (HIF), C/EBP, AP-1, CACCC-binding factor といった様々な転写因子によって発現量が調節されている^{44,89,90}。転写因子ならびにシスエレメントに関するデータベースである TRANSFAC には xenobiotic response element (XRE) や、XRE の別名である DRE, AhRRE が mPGES-1 プロモーター領域に存在するとの情報はない。また、CYP1A1 や AhRR といった AhR 活性に依存する遺伝子発現は両系統間で違い

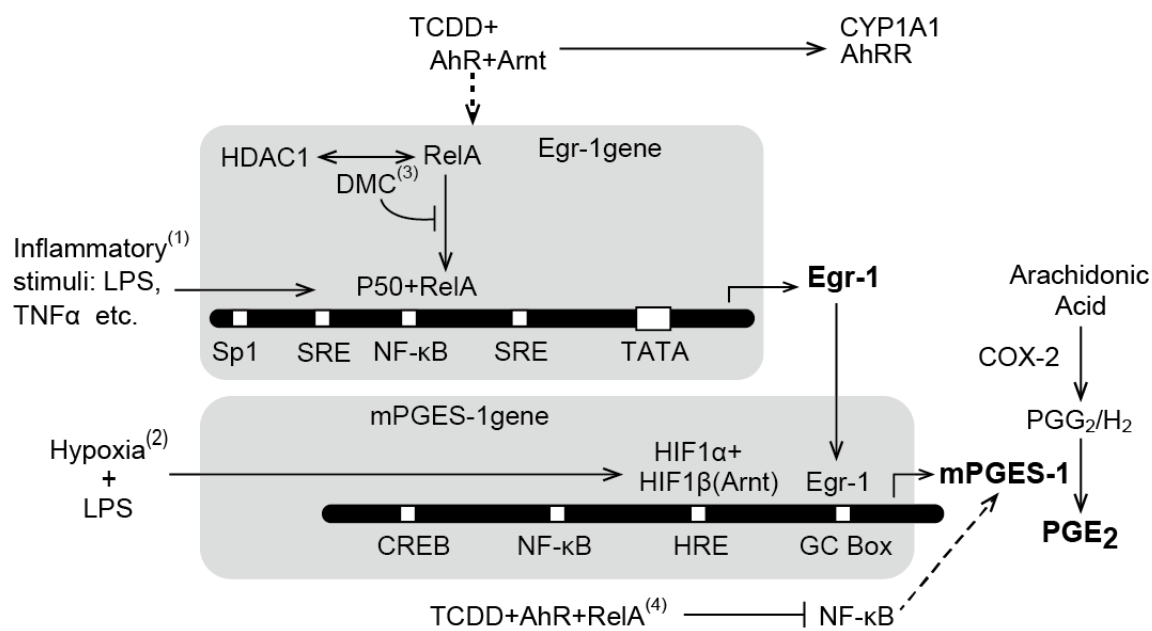
はなかった。これらは、mPGES-1 の誘導には古典的な AhR/Arnt 経路以外の因子が関与する可能性を示唆している。AhR/Arnt 以外の経路の可能性として、少なくとも以下の四点が考えられる。一点目が AhR と NF- κ B のクロストークである。これまでに、炎症に関与する NF- κ B サブユニットの RelA が AhR 発現を調節したり、リガンドで活性化した AhR が RelA や RelB と結合することが報告されている⁹¹⁻⁹⁴。これらの AhR/NF- κ B クロストークが TCDD による mPGES-1 誘導に関与し、系統差の原因になっていることが考えられる。二点目は AhR/HIF クロストークである。AhR は TCDD と結合後に核内で Arnt とヘテロ二量体を形成する。Arnt は HIF-1 β とも称されるように、AhR シグナル経路と hypoxia sensing 経路双方の調節に重要な役割を担うことが報告されている¹⁴⁰。TCDD によって活性化された AhR が Arnt (HIF-1 β)を介して、mPGES-1 遺伝子発現を調節している可能性も示唆される。三点目は AhR/Egr-1 クロストークである。ヒト血管内皮細胞を高グルコース下で培養すると、AhR と Egr-1 の複合体が GC ボックスに結合し、下流の遺伝子発現を調節していることが報告されている⁹⁵。このことより TCDD により活性化された AhR が Egr-1 と結合し、mPGES-1 発現を調節している可能性がある。C57BL/6 仔マウスと BALB/cA 仔マウスでの mPGES-1 プロモーター領域への Egr-1 結合に著明な違いを認めたことも、まだ解明されていない AhR/Egr-1 クロストークや、

TCDD/AhR シグナル以降の Egr-1 リン酸化等の翻訳後修飾が Egr-1 リクルートにおける系統差に関与する可能性を示唆する。三点目は Egr-1 mRNA の安定性である。Martinez らは TCDD が Egr-1 mRNA の安定性を増すことを報告している⁹⁶。この機序の詳細は未だ不明であるが、Egr-1 mRNA の安定性において系統差があるのであれば、これも mPGES-1 遺伝子発現での系統差に寄与するかもしれない。いずれにせよ、Egr-1 が TCDD による水腎症発症に関与するかどうか、そして関与する場合は水腎症発症メカニズムにどの程度寄与するのかは更なる研究を要する。

mPGES-1 と Egr-1 遺伝子調節に関わる転写因子を図にまとめる (図 4-1)。

マウスマクロファージを lipopolysaccharide 処理、またはマウス *in vivo* で IL-1 β や TNF- α といった炎症関連因子を投与すると、COX-2 プロモーターと mPGES-1 プロモーターに共通する転写因子 NF- κ B や Egr-1 を介して、COX-2 と mPGES-1 が共に誘導される^{44,97}。対照的に、COX-2 と mPGES-1 が同時に誘導されない例がある。例えば、dimethylcelecoxib は mPGES-1 発現のみを阻害することによって PGE₂ 合成を阻害するが COX-2 は抑制しない⁹⁸。この mPGES-1 抑制は、HDAC1 が NF- κ B RelA と結合し、NF- κ B binding site に結合する Rel A と競合することで Egr-1 転写を抑制することにより生じる。今回の実験では C57BL/6J 仔マウスでは TCDD 曝露で COX-2 と mPGES-1 が同時

に誘導されるが、BALB/cA 仔マウスでは COX-2 のみの誘導であった。この結果は 2 系統間の Egr-1 誘導の違いに起因する可能性がある。しかし、COX-2 ならびに mPGES-1 誘導における系統差にこれらの転写因子がどのように寄与するかは不明である。授乳期 TCDD 曝露での mPGES-1 誘導のメカニズムは今後の解明が必要である。



	C57BL/6	BALB/cA
CYP1A1	Up	Up
AhRR	Up	Up
Egr-1	Up	N.C.
mPGES-1	Up	N.C.
PGE ₂	Up	N.C.

Up, Upregulation; N.C., Not changed

図 4-1 mPGES-1 と Egr-1 発現量に関する転写因子のまとめ。図の下にある表は本研究での結果 (CYP1A1, AhRR, Egr-1, mPGES-1 mRNA 発現量と尿中 PGE₂ 濃度) を各系統でまとめたものである。Up; upregulated. NC, not changed. (1) ⁹⁹ (2) ¹⁰⁰ (3) ⁹⁸ (4) ⁹².

4.3.3 ダイオキシン経母乳曝露と水電解質輸送体

NKCC2 と ROMK は、遠位尿細管やヘンレのループ太い上行脚の管腔側に存在し NaCl の吸収や K の排泄を行う電解質輸送体である¹⁰¹⁻¹⁰³。これらは尿濃縮に重要な役割を持ち、これらの遺伝子異常が Bartter 症候群や Gitelman 症候群（尿濃縮障害をはじめとする代謝性アルカローシス、低カリウム血症、高レニンアルドステロン血症を呈する）の原因であることが分かった¹⁰⁴。また、高橋らや Lorenz らの報告でも NKCC2 または ROMK 遺伝子欠損マウスで水腎症を呈している^{105,106}。私の実験でも、TCDD 曝露で NKCC2 や ROMK mRNA 発現は低下傾向にあり、Nishimura ら¹⁹の TCDD 曝露における水腎症実験と同様であった。また TCDD 経母乳曝露した C57BL/6J 仔マウスでは ROMK が低下したが、BALB/cA 仔マウスでは変化はなく、ROMK 遺伝子発現と水腎症発症との関連が示唆された。TCDD による COX-2/mPGES-1 の誘導とこれらの電解質輸送体の遺伝子発現の低下との関連や、これらの現象がどのような機序で水腎症を引き起こすのかはまだ研究の余地がある。しかし今回の結果で、TCDD 毒性のエンドポイントに関連する候補因子が挙げたことは機序を解明する上で有意義であると考ええる。

C57BL/6J 仔マウスと BALB/cA 仔マウス両系統における AQP2 mRNA 発現は、もうひとつの顕著な違いである（図 3-14A）。PGE₂ は AQP2 誘導や集合管

上皮細胞小胞体内から管腔側膜への移動に関与し、集合管での水の再吸収に影響を及ぼす^{47,57}。本研究では TCDD 曝露 C57BL/6J 仔マウス、BALB/cA 仔マウス共に、尿中 PGE₂ と AQP2 mRNA に逆相関を認めた(図 3-16A, B)。従って、C57BL/6J 仔マウスでは Egr-1 依存的に mPGES-1 が誘導され、それによって増加した尿中 PGE₂ が EP1 を介して集合管での AQP2 の発現や局在を低下させ、水再吸収を抑制する一方、BALB/cA 仔マウスでは mPGES-1 由来の PGE₂ が C57BL/6J 仔マウスよりも少ないことより AQP2 発現が抑制されないのかもしれない。

TCDD 授乳期曝露モデルによる水腎症は、躁うつ病で用いられるリチウムにおける腎毒性と似ている。リチウムは、AQP2 や NKCC2 といった水電解質輸送体の発現低下によって多尿を呈する薬剤である^{107,108}。リチウムの腎毒性は授乳期においても顕著で、吉岡ら¹⁰⁹の報告では授乳期仔マウスへのリチウム腹腔内投与により仔マウスは水腎症を発症する。またリチウム曝露により尿中 PGE₂ 濃度も高まる¹¹⁰⁻¹¹³。これらの知見は、私が用いた TCDD 授乳期曝露モデルにおいても認める。リチウムの腎毒性の機序を TCDD のそれと比較することで、水電解質輸送体における PGE₂ の役割を以下に考察する。

Jia ら¹¹³は、リチウムによって誘導される PGE₂ が AQP2 の発現を抑制するという仮説を立て、mPGES-1 欠損マウスにリチウムを投与して尿中 PGE₂ 濃

度、AQP 遺伝子発現、尿濃縮の程度を検討した。mPGES-1 欠損マウスにリチウムを投与したところ、尿中 PGE₂ 濃度は低く、また AQP2 の発現が抑制されないことより多尿を呈さなかった。COX-2 阻害剤投与マウスにリチウムを投与しても AQP2 や NKCC2 発現は低下せず、多尿は生じなかった¹¹²。この二つの例より、リチウム曝露において産生された PGE₂ が水電解質輸送体の発現を抑制して多尿を引き起こすと考えられる。一方、リチウムにおける AQP2 発現低下が PGE₂ に依存しない報告もある。集合管主細胞において、抗利尿ホルモン arginine vasopressin (AVP) が Gsk3 β を活性化することで AQP2 遺伝子発現を誘導する¹¹⁴ が、リチウムが PGE₂ 非依存的に Gsk3 β 活性を抑制して AQP2 発現を抑えること¹¹⁵ が報告されている。また、リチウムが多尿を引き起こす機序に関わる P2Y₂ 受容体をノックアウトしたマウスでは、PGE₂ 非依存的に EP₃ 受容体発現が抑えられることで AQP2 合成や AQP2 の管腔側細胞膜への移動が保たれること¹¹⁶ も明らかになっている。TCDD 授乳期曝露による水腎症においても、TCDD によって誘導された PGE₂ が水電解質役割に及ぼす影響と同様に、AhR 以降のシグナルが PGE₂ に依存せずに直接水電解質輸送体の発現や機能に影響を与える可能性が示唆される。AhR 以降のシグナルで、PGE₂ 非依存的な未知の因子の存在は、EP1 欠損マウスにおける TCDD 曝露群の水腎症発症率が 28% と完全に抑制されない理由のひとつに挙げられる。

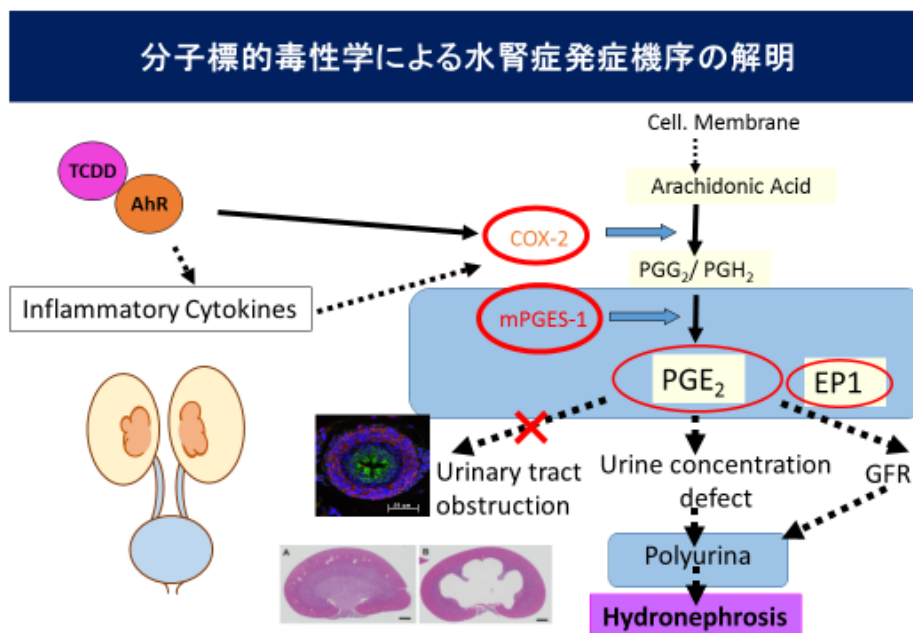


図 4-2 ダイオキシン経母乳曝露による新生仔水腎症発症機序のまとめ。本研究で明らかになった経路は水色枠内である。水腎症を発症するプロスタノイドは PGE₂ であること、PGE₂ 下流の EP1 受容体が水腎症発症に関与すること、ダイオキシンによる水腎症の感受性因子は AhR 構造でなく、PGE₂ 合成系の応答性であることが本研究によって明らかにされた。

4.4 ダイオキシン毒性の評価—マウスで得た毒性とヒトへの外挿性

マウスにおいてダイオキシン高感受性ならびに低感受性は AhR 構造によることは既に述べてきた。では、マウスでのダイオキシン毒性をヒトに外挿することはできるのであろうか。森口ら⁸¹はダイオキシン高感受性マウスである C57BL/6J にヒト型 AhR を挿入し、胎児期ダイオキシン毒性のひとつである口蓋裂の発症率を調べたところ、C57BL/6J マウスは 100% の発症率であるが、

ヒト型 AhR を導入されたトランスジェニックマウスは全く口蓋裂を発症しなかった。ダイオキシン低感受性である DBA/2 マウスで発症率が 30%である⁸¹ ので、この結果よりヒトはダイオキシンに対して感受性が低いということになる。だが、毒性影響を考察するときに、毒性影響はダイオキシン投与量でなく、体内濃度に依存することを考慮にいれる必要があり⁷、この点について森口らの報告は検討すべき余地がある。

ダイオキシンの蓄積性や生体濃縮により、ヒトは成人で 2-6 ngTEQ/kg 体重程度のダイオキシンを有している⁸。また、曝露量と耐容一日摂取量の間には 2 から 2.5 倍と極めて狭く¹⁴¹、ゆとりの幅がきわめて狭い。また、ヒト母乳栄養では一日摂取量が 60 ng TEQ/kg 体重/日と、成人の耐容一日摂取量より 15 倍も高い¹⁴¹。ヒトにおけるダイオキシン濃度のゆとりの幅の狭さや蓄積性を考慮しながら、実験動物での毒性結果をヒトに外挿する必要があり、単なるダイオキシン投与量とダイオキシン毒性のエンドポイントを種間で比較することはできない。消失半減期が大きく違い体内残留性があるダイオキシンのような化学物質の場合、WHO リスク評価^{8,9}の方法にある体内負荷量を用いるのが妥当と見なされている。すなわち、ヒトのダイオキシン体内負荷量が、動物実験での毒性影響が観察されたダイオキシン濃度と同等である場合、動物実験と同様の影響がヒトで発現すると考えられている。

引用文献

- 1 Schmidt, J. V., Su, G. H., Reddy, J. K., Simon, M. C. & Bradfield, C. A. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6731-6736(1996).
- 2 Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T. N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* **2**, 645-654(1997).
- 3 Gonzalez, F. J. & Fernandez-Salguero, P. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab. Dispos.* **26**, 1194-1198(1998).
- 4 Organization, W. H. Polybrominated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Environmental Health Criteria* **205**(1998).
- 5 Uemura, H. [Associations of exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls with diabetes: based on epidemiological findings]. *Nihon Eiseigaku Zasshi* **67**, 363-374(2012).
- 6 Milbrath, M. O., Wenger, Y., Chang, C. W., Emond, C., Garabrant, D., Gillespie, B. W. & Jolliet, O. Apparent half-lives of dioxins, furans, and polychlorinated biphenyls as a function of age, body fat, smoking status, and breast-feeding. *Environ. Health Perspect.* **117**, 417-425(2009).
- 7 Schecter, A. & Gasiewicz, T. A. *Dioxins and health*. 2nd edn, (Wiley-Interscience, 2003).
- 8 Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A. T., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J. P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S. W., Kubiak, T., Larsen, J. C., van Leeuwen, F. X., Liem, A. K., Nolt, C., Peterson, R. E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F. & Zacharewski, T. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* **106**, 775-792(1998).
- 9 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., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N. & Peterson, R. E. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* **93**, 223-241(2006).
- 10 厚生労働省. 平成 23 年度食品からのダイオキシン類一日摂取量調査等の調査結果について. (2012).

- 11 環境省環境保健部環境リスク評価室. 日本人における化学物質のばく露量について 化学物質の人へのばく露量モニタリング調査 (2011～) . (2014).
- 12 Mimura, J. & Fujii-Kuriyama, Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* **1619**, 263-268(2003).
- 13 Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* **13**, 20-25(1999).
- 14 Flaveny, C. A., Murray, I. A. & Perdew, G. H. Differential gene regulation by the human and mouse aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci.* **114**, 217-225(2010).
- 15 Vezina, C. M., Lin, T. M. & Peterson, R. E. AHR signaling in prostate growth, morphogenesis, and disease. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 566-576(2009).
- 16 Mathew, L. K., Simonich, M. T. & Tanguay, R. L. AHR-dependent misregulation of Wnt signaling disrupts tissue regeneration. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 498-507(2009).
- 17 Xiong, K. M., Peterson, R. E. & Heideman, W. Aryl hydrocarbon receptor-mediated down-regulation of sox9b causes jaw malformation in zebrafish embryos. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1544-1553(2008).
- 18 Brenner, B. M. *Brenner and Rector's The Kidney*. 8th edition edn, (2007).
- 19 Nishimura, N., Matsumura, F., Vogel, C. F., Nishimura, H., Yonemoto, J., Yoshioka, W. & Tohyama, C. Critical role of cyclooxygenase-2 activation in pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **231**, 374-383(2008).
- 20 Belarmino, J. M. & Kogan, B. A. Management of neonatal hydronephrosis. *Early Hum. Dev.* **82**, 9-14(2006).
- 21 Yan, Q., Yang, X., Cantone, A., Giebisch, G., Hebert, S. & Wang, T. Female ROMK null mice manifest more severe Bartter II phenotype on renal function and higher PGE2 production. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R997-R1004(2008).
- 22 Yoshioka, W., Peterson, R. E. & Tohyama, C. Molecular targets that link dioxin exposure to toxicity phenotypes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **127**, 96-101(2011).
- 23 Bryant, P. L., Schmid, J. E., Fenton, S. E., Buckalew, A. R. & Abbott, B. D. Teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the expression of EGF and/or TGF-alpha. *Toxicol. Sci.* **62**, 103-114(2001).
- 24 Ananth, C., Demissie, K., Smulian, J. & Vintzileos, A. Relationship among placenta previa, fetal growth restriction, and preterm delivery: a population-based study. *Obstet. Gynecol.* **98**, 299-306(2001).
- 25 Rozen, S. & Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**, 365-386(2000).

- 26 Yoshioka, W., Aida-Yasuoka, K., Fujisawa, N., Kawaguchi, T., Ohsako, S., Hara, S., Uematsu, S., Akira, S. & Tohyama, C. Critical role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the hydronephrosis caused by lactational exposure to dioxin in mice. *Toxicol. Sci.* **127**, 547-554(2012).
- 27 Yoshioka, W., Endo, N., Kurashige, A., Haijima, A., Endo, T., Shibata, T., Nishiyama, R., Takeyama, M. & Tohyama, C. Fluorescence laser microdissection reveals a distinct pattern of gene activation in the mouse hippocampal region. *Sci. Rep.* **2**, 783(2012).
- 28 Kinehara, M., Fukuda, I., Yoshida, K. & Ashida, H. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the cytosolic phospholipase A(2)alpha gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mouse hepatoma Hepa-1c1c7 cells. *Journal of bioscience and bioengineering* **108**, 277-281(2009).
- 29 Sciullo, E. M., Vogel, C. F., Li, W. & Matsumura, F. Initial and extended inflammatory messages of the nongenomic signaling pathway of the TCDD-activated Ah receptor in U937 macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* **480**, 143-155(2008).
- 30 Kamei, D., Yamakawa, K., Takegoshi, Y., Mikami-Nakanishi, M., Nakatani, Y., Oh-Ishi, S., Yasui, H., Azuma, Y., Hirasawa, N., Ohuchi, K., Kawaguchi, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Murakami, M. & Kudo, I. Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin e synthase-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 33684-33695(2004).
- 31 Puga, A., Ma, C. & Marlowe, J. L. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 713-722(2009).
- 32 Morath, R., Klein, T., Seyberth, H. W. & Nusing, R. M. Immunolocalization of the four prostaglandin E2 receptor proteins EP1, EP2, EP3, and EP4 in human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 1851-1860(1999).
- 33 Gonzalez, A. A., Cespedes, C., Villanueva, S., Michea, L. & Vio, C. P. E Prostanoid-1 receptor regulates renal medullary alphaENaC in rats infused with angiotensin II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **389**, 372-377(2009).
- 34 Nasrallah, R., Laneuville, O., Ferguson, S. & Hebert, R. L. Effect of COX-2 inhibitor NS-398 on expression of PGE2 receptor subtypes in M-1 mouse CCD cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **281**, F123-132(2001).
- 35 Ankorina-Stark, I., Haxelmans, S. & Schlatter, E. Receptors for bradykinin and prostaglandin E2 coupled to Ca²⁺ signalling in rat cortical collecting duct. *Cell Calcium* **22**, 269-275(1997).
- 36 Guan, Y., Zhang, Y., Breyer, R. M., Fowler, B., Davis, L., Hebert, R. L. & Breyer, M. D. Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na⁺ absorption by activating the

- EP1 receptor. *J. Clin. Invest.* **102**, 194-201(1998).
- 37 Denison, M. S. & Nagy, S. R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 309-334(2003).
- 38 Agostiniani, R., Mariotti, P., Cataldi, L., Fanos, V., Sani, S., Zaccaron, A. & Cuzzolin, L. Role of renal PGE2 in the adaptation from foetal to extrauterine life in term and preterm infants. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **67**, 373-377(2002).
- 39 the Mouse Genome Informatics, T. J. L. *Mouse Genome Database (MGD) at the Mouse Genome Informatics website, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine*, <<http://informatics.jax.org>> (2014).
- 40 Rzymkiewicz, D. M., DuMaine, J. & Morrison, A. R. IL-1 beta regulates rat mesangial cyclooxygenase II gene expression by tyrosine phosphorylation. *Kidney Int.* **47**, 1354-1363(1995).
- 41 Srivastava, S. K., Tetsuka, T., Daphna-Iken, D. & Morrison, A. R. IL-1 beta stabilizes COX II mRNA in renal mesangial cells: role of 3'-untranslated region. *Am. J. Physiol.* **267**, F504-508(1994).
- 42 Wang, D., Pedraza, P. L., Abdullah, H. I., McGiff, J. C. & Ferreri, N. R. Calcium-sensing receptor-mediated TNF production in medullary thick ascending limb cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **283**, F963-970(2002).
- 43 Subbaramaiah, K., Yoshimatsu, K., Scherl, E., Das, K. M., Glazier, K. D., Golijanin, D., Soslow, R. A., Tanabe, T., Naraba, H. & Dannenberg, A. J. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 12647-12658(2004).
- 44 Diaz-Munoz, M. D., Osma-Garcia, I. C., Cacheiro-Llaguno, C., Fresno, M. & Iniguez, M. A. Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages. *Cell. Signal.* **22**, 1427-1436(2010).
- 45 Yoshioka, W., Kawaguchi, T., Fujisawa, N., Aida-Yasuoka, K., Shimizu, T., Matsumura, F. & Tohyama, C. Predominant role of cytosolic phospholipase A2alpha in dioxin-induced neonatal hydronephrosis in mice. *Sci. Rep.* **4**, 4042(2014).
- 46 Li, J. H., Chou, C. L., Li, B., Gavrilova, O., Eisner, C., Schnermann, J., Anderson, S. A., Deng, C. X., Knepper, M. A. & Wess, J. A selective EP4 PGE2 receptor agonist alleviates disease in a new mouse model of X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J. Clin. Invest.* **119**, 3115-3126(2009).
- 47 Olesen, E. T., Rutzler, M. R., Moeller, H. B., Praetorius, H. A. & Fenton, R. A.

- Vasopressin-independent targeting of aquaporin-2 by selective E-prostanoid receptor agonists alleviates nephrogenic diabetes insipidus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12949-12954(2011).
- 48 Denison, M. S., Soshilov, A. A., He, G., DeGroot, D. E. & Zhao, B. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol. Sci.* **124**, 1-22(2011).
- 49 Poland, A. & Glover, E. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: segregation of toxicity with the Ah locus. *Mol. Pharmacol.* **17**, 86-94(1980).
- 50 Poland, A., Palen, D. & Glover, E. Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* **46**, 915-921(1994).
- 51 Antonucci, R., Cuzzolin, L., Arceri, A. & Fanos, V. Urinary prostaglandin E2 in the newborn and infant. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **84**, 1-13(2007).
- 52 Olesen, E. T. & Fenton, R. A. Is there a role for PGE2 in urinary concentration? *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 169-178(2013).
- 53 Jensen, B. L., Stubbe, J., Hansen, P. B., Andreassen, D. & Skott, O. Localization of prostaglandin E(2) EP2 and EP4 receptors in the rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280**, F1001-1009(2001).
- 54 Guan, Y., Stillman, B. A., Zhang, Y., Schneider, A., Saito, O., Davis, L. S., Redha, R., Breyer, R. M. & Breyer, M. D. Cloning and expression of the rabbit prostaglandin EP2 receptor. *BMC Pharmacol.* **2**, 14(2002).
- 55 Breyer, M. D., Jacobson, H. R., Davis, L. S. & Breyer, R. M. In situ hybridization and localization of mRNA for the rabbit prostaglandin EP3 receptor. *Kidney Int.* **44**, 1372-1378(1993).
- 56 Breyer, M. D. & Breyer, R. M. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, F12-23(2000).
- 57 Jia, Z., Liu, G., Downton, M., Dong, Z., Zhang, A. & Yang, T. mPGES-1 deletion potentiates urine concentrating capability after water deprivation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **302**, F1005-1012(2012).
- 58 von der Emde, L., Goltz, D., Latz, S., Muller, S. C., Kristiansen, G., Ellinger, J. & Syring, I. Prostaglandin receptors EP1-4 as a potential marker for clinical outcome in urothelial bladder cancer. *Am. J. Cancer Res.* **4**, 952-962(2014).
- 59 O'Callaghan, G., Ryan, A., Neary, P., O'Mahony, C., Shanahan, F. & Houston, A. Targeting the EP1 receptor reduces Fas ligand expression and increases the antitumor immune response in an in vivo model of colon cancer. *Int. J. Cancer* **133**, 825-834(2013).
- 60 Furuyashiki, T. & Narumiya, S. Roles of prostaglandin E receptors in stress

- responses. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 31-38(2009).
- 61 Tanaka, Y., Furuyashiki, T., Momiyama, T., Namba, H., Mizoguchi, A., Mitsumori, T., Kayahara, T., Shichi, H., Kimura, K., Matsuoka, T., Nawa, H. & Narumiya, S. Prostaglandin E receptor EP1 enhances GABA-mediated inhibition of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and regulates dopamine level in the dorsal striatum. *Eur. J. Neurosci.* **30**, 2338-2346(2009).
- 62 Hahn, M. E., Allan, L. L. & Sherr, D. H. Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 485-497(2009).
- 63 Esser, C. & Rannug, A. The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. *Pharmacol. Rev.* **67**, 259-279(2015).
- 64 Frye, C. A., Bo, E., Calamandrei, G., Calza, L., Dessi-Fulgheri, F., Fernandez, M., Fusani, L., Kah, O., Kajta, M., Le Page, Y., Patisaul, H. B., Venerosi, A., Wojtowicz, A. K. & Panzica, G. C. Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J. Neuroendocrinol.* **24**, 144-159(2012).
- 65 Wang, C., Zhang, Z. M., Xu, C. X. & Tischkau, S. A. Interplay between Dioxin-mediated signaling and circadian clock: a possible determinant in metabolic homeostasis. *International journal of molecular sciences* **15**, 11700-11712(2014).
- 66 Hebert, R. L., Jacobson, H. R. & Breyer, M. D. Prostaglandin E2 inhibits sodium transport in rabbit cortical collecting duct by increasing intracellular calcium. *J. Clin. Invest.* **87**, 1992-1998(1991).
- 67 Hebert, R. L., Jacobson, H. R., Fredin, D. & Breyer, M. D. Evidence that separate PGE2 receptors modulate water and sodium transport in rabbit cortical collecting duct. *Am. J. Physiol.* **265**, F643-650(1993).
- 68 Pearce, D., Soundararajan, R., Trimpert, C., Kashlan, O. B., Deen, P. M. & Kohan, D. E. Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 135-146(2015).
- 69 Hasler, U., Leroy, V., Jeon, U. S., Bouley, R., Dimitrov, M., Kim, J. A., Brown, D., Kwon, H. M., Martin, P. Y. & Feraille, E. NF-kappaB modulates aquaporin-2 transcription in renal collecting duct principal cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 28095-28105(2008).
- 70 Lam, A. K., Ko, B. C., Tam, S., Morris, R., Yang, J. Y., Chung, S. K. & Chung, S. S. Osmotic response element-binding protein (OREBP) is an essential regulator of the urine concentrating mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 48048-48054(2004).
- 71 Grinevich, V., Knepper, M. A., Verbalis, J., Reyes, I. & Aguilera, G. Acute endotoxemia

- in rats induces down-regulation of V2 vasopressin receptors and aquaporin-2 content in the kidney medulla. *Kidney Int.* **65**, 54-62(2004).
- 72 Katoh, H., Watabe, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. & Negishi, M. Characterization of the signal transduction of prostaglandin E receptor EP1 subtype in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1244**, 41-48(1995).
- 73 Ji, R., Sanchez, C. M., Chou, C. L., Chen, X. B., Woodward, D. F. & Regan, J. W. Prostanoid EP(1) receptors mediate up-regulation of the orphan nuclear receptor Nurr1 by cAMP-independent activation of protein kinase A, CREB and NF-kappaB. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 1033-1046(2012).
- 74 今井正. in ソルト・サイエンス・シンポジウム 2009 「塩と生物」 (東京, 2009).
- 75 Edwards BR, M. D., LaRoche FT Jr. *Postnatal development of urinary concentrating ability in rats: challenges in renal anatomy and neurohypophysial hormones, in The Kidney During Development: morphogeny and Function.* (Masson, 1981).
- 76 Liu, W., Morimoto, T., Kondo, Y., Iinuma, K., Uchida, S. & Imai, M. "Avian-type" renal medullary tubule organization causes immaturity of urine-concentrating ability in neonates. *Kidney Int.* **60**, 680-693(2001).
- 77 Spitzer A, S. G. *The kidney during development, in Handbook of Physiology: Renal Physiology.* Vol. 1 (Oxford University Press, 1992).
- 78 Couture-Haws, L., Harris, M. W., Lockhart, A. C. & Birnbaum, L. S. Evaluation of the persistence of hydronephrosis induced in mice following in utero and/or lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **107**, 402-412(1991).
- 79 Peters, J. M., Narotsky, M. G., Elizondo, G., Fernandez-Salguero, P. M., Gonzalez, F. J. & Abbott, B. D. Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicol. Sci.* **47**, 86-92(1999).
- 80 Okey, A. B., Vella, L. M. & Harper, P. A. Detection and characterization of a low affinity form of cytosolic Ah receptor in livers of mice nonresponsive to induction of cytochrome P1-450 by 3-methylcholanthrene. *Mol. Pharmacol.* **35**, 823-830(1989).
- 81 Moriguchi, T., Motohashi, H., Hosoya, T., Nakajima, O., Takahashi, S., Ohsako, S., Aoki, Y., Nishimura, N., Tohyama, C., Fujii-Kuriyama, Y. & Yamamoto, M. Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5652-5657(2003).
- 82 Bank, P. A., Yao, E. F., Phelps, C. L., Harper, P. A. & Denison, M. S. Species-specific binding of transformed Ah receptor to a dioxin responsive transcriptional enhancer. *Eur. J. Pharmacol.* **228**, 85-94(1992).

- 83 Burbach, K. M., Poland, A. & Bradfield, C. A. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8185-8189(1992).
- 84 Smith, A. G., Clothier, B., Robinson, S., Scullion, M. J., Carthew, P., Edwards, R., Luo, J., Lim, C. K. & Toledano, M. Interaction between iron metabolism and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice with variants of the Ahr gene: a hepatic oxidative mechanism. *Mol. Pharmacol.* **53**, 52-61(1998).
- 85 Robinson, S. W., Clothier, B., Akhtar, R. A., Yang, A. L., Latour, I., Van Ijperen, C., Festing, M. F. & Smith, A. G. Non-ahr gene susceptibility Loci for porphyria and liver injury induced by the interaction of 'dioxin' with iron overload in mice. *Mol. Pharmacol.* **61**, 674-681(2002).
- 86 Keller, J. M., Huet-Hudson, Y. M. & Leamy, L. J. Qualitative effects of dioxin on molars vary among inbred mouse strains. *Arch. Oral Biol.* **52**, 450-454(2007).
- 87 Ishimura, R., Ohsako, S., Kawakami, T., Sakaue, M., Aoki, Y. & Tohyama, C. Altered protein profile and possible hypoxia in the placenta of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **185**, 197-206(2002).
- 88 Kawakami, T., Ishimura, R., Nohara, K., Takeda, K., Tohyama, C. & Ohsako, S. Differential susceptibilities of Holtzman and Sprague-Dawley rats to fetal death and placental dysfunction induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) despite the identical primary structure of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **212**, 224-236(2006).
- 89 Maxwell, P. H. The HIF pathway in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 523-530(2005).
- 90 Naraba, H., Yokoyama, C., Tago, N., Murakami, M., Kudo, I., Fueki, M., Oh-Ishi, S. & Tanabe, T. Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E2 synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1. *J. Biol. Chem.* **277**, 28601-28608(2002).
- 91 Vogel, C. F., Khan, E. M., Leung, P. S., Gershwin, M. E., Chang, W. L., Wu, D., Haarmann-Stemmann, T., Hoffmann, A. & Denison, M. S. Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* **289**, 1866-1875(2014).
- 92 Jensen, B. A., Leeman, R. J., Schlezinger, J. J. & Sherr, D. H. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists suppress interleukin-6 expression by bone marrow stromal cells: an immunotoxicology study. *Environ. Health* **2**, 16(2003).
- 93 Tian, Y., Ke, S., Denison, M. S., Rabson, A. B. & Gallo, M. A. Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J. Biol. Chem.* **274**, 510-515(1999).

- 94 Vogel, C. F., Sciallo, E., Li, W., Wong, P., Lazennec, G. & Matsumura, F. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.* **21**, 2941-2955(2007).
- 95 Dabir, P., Marinic, T. E., Krukovets, I. & Stenina, O. I. Aryl hydrocarbon receptor is activated by glucose and regulates the thrombospondin-1 gene promoter in endothelial cells. *Circ. Res.* **102**, 1558-1565(2008).
- 96 Martinez, J. M., Baek, S. J., Mays, D. M., Tithof, P. K., Eling, T. E. & Walker, N. J. EGR1 is a novel target for AhR agonists in human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.* **82**, 429-435(2004).
- 97 Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S. & Kudo, I. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **275**, 32783-32792(2000).
- 98 Deckmann, K., Rorsch, F., Geisslinger, G. & Grosch, S. Dimethylcelecoxib induces an inhibitory complex consisting of HDAC1/NF-kappaB(p65)RelA leading to transcriptional downregulation of mPGES-1 and EGR1. *Cell. Signal.* **24**, 460-467(2012).
- 99 Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E. & Baltimore, D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science* **309**, 1854-1857(2005).
- 100 Grimmer, C., Pfander, D., Swoboda, B., Aigner, T., Mueller, L., Hennig, F. F. & Gelse, K. Hypoxia-inducible factor 1alpha is involved in the prostaglandin metabolism of osteoarthritic cartilage through up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **56**, 4084-4094(2007).
- 101 Ares, G. R., Caceres, P. S. & Ortiz, P. A. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **301**, F1143-1159(2011).
- 102 Lee, W. S. & Hebert, S. C. ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. I. Expression in rat distal nephron segments. *Am. J. Physiol.* **268**, F1124-1131(1995).
- 103 Xu, J. Z., Hall, A. E., Peterson, L. N., Bienkowski, M. J., Eessalu, T. E. & Hebert, S. C. Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am. J. Physiol.* **273**, F739-748(1997).
- 104 Shaer, A. J. Inherited primary renal tubular hypokalemic alkalosis: a review of Gitelman and Bartter syndromes. *Am. J. Med. Sci.* **322**, 316-332(2001).
- 105 Takahashi, N., Chernavvsky, D. R., Gomez, R. A., Igarashi, P., Gitelman, H. J. & Smithies, O. Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5434-5439(2000).
- 106 Lorenz, J. N., Baird, N. R., Judd, L. M., Noonan, W. T., Andringa, A., Doetschman, T.,

- Manning, P. A., Liu, L. H., Miller, M. L. & Shull, G. E. Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. *J. Biol. Chem.* **277**, 37871-37880(2002).
- 107 Kwon, T. H., Laursen, U. H., Marples, D., Maunsbach, A. B., Knepper, M. A., Frokiaer, J. & Nielsen, S. Altered expression of renal AQP2 and Na(+) transporters in rats with lithium-induced NDI. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, F552-564(2000).
- 108 Marples, D., Christensen, S., Christensen, E. I., Ottosen, P. D. & Nielsen, S. Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J. Clin. Invest.* **95**, 1838-1845(1995).
- 109 Yoshioka, W., Akagi, T., Nishimura, N., Shimizu, H., Watanabe, C. & Tohyama, C. Severe toxicity and cyclooxygenase (COX)-2 mRNA increase by lithium in the neonatal mouse kidney. *J. Toxicol. Sci.* **34**, 519-525(2009).
- 110 Nally, J. V., Rutecki, G. W. & Ferris, T. F. The acute effect of lithium on renal renin and prostaglandin E synthesis in the dog. *Circ. Res.* **46**, 739-744(1980).
- 111 Rao, R., Zhang, M. Z., Zhao, M., Cai, H., Harris, R. C., Breyer, M. D. & Hao, C. M. Lithium treatment inhibits renal GSK-3 activity and promotes cyclooxygenase 2-dependent polyuria. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **288**, F642-649(2005).
- 112 Kim, G. H., Choi, N. W., Jung, J. Y., Song, J. H., Lee, C. H., Kang, C. M. & Knepper, M. A. Treating lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus with a COX-2 inhibitor improves polyuria via upregulation of AQP2 and NKCC2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **294**, F702-709(2008).
- 113 Jia, Z., Wang, H. & Yang, T. Mice lacking mPGES-1 are resistant to lithium-induced polyuria. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **297**, F1689-1696(2009).
- 114 Rao, R., Patel, S., Hao, C., Woodgett, J. & Harris, R. GSK3beta mediates renal response to vasopressin by modulating adenylate cyclase activity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 428-437(2010).
- 115 Kortenoeven, M. L., Schweer, H., Cox, R., Wetzels, J. F. & Deen, P. M. Lithium reduces aquaporin-2 transcription independent of prostaglandins. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C131-140(2012).
- 116 Zhang, Y., Pop, I. L., Carlson, N. G. & Kishore, B. K. Genetic deletion of the P2Y2 receptor offers significant resistance to development of lithium-induced polyuria accompanied by alterations in PGE2 signaling. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **302**, F70-77(2012).
- 117 Barnes, D. G. Toxicity equivalents and EPA's risk assessment of 2,3,7,8-TCDD. *Sci. Total Environ.* **104**, 73-86(1991).
- 118 Pearce, D., Soundararajan, R., Trimpert, C., Kashlan, O. B., Deen, P. M. & Kohan, D.

- E. Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 135-146(2015).
- 119 Yoshioka W, Aida-Yasuoka K., Kawaguchi T, Fujisawa N, Ohsako S, Hara S, Tohyama C. Involvement of PGE2 and urine volume increased in the onset of dioxin-induced hydronephrosis in mice. *The Toxicologist, Suppl. Toxicol. Sci.* **126**, 408(2012).
- 120 Chevalier, R. L. Congenital Urinary Tract Obstruction: The Long View. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **22**, 312-319(2015).
- 121 Coleman, R. A., Smith, W. L. & Narumiya, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* **46**, 205-229(1994).
- 122 Narumiya, S., Sugimoto, Y. & Ushikubi, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* **79**, 1193-1226(1999).
- 123 Hasumoto, K., Sugimoto, Y., Gotoh, M., Segi, E., Yamasaki, A., Yamaguchi, M., Honda, H., Hirai, H., Negishi, M., Kakizuka, A. & Ichikawa, A. Characterization of the mouse prostaglandin F receptor gene: a transgenic mouse study of a regulatory region that controls its expression in the stomach and kidney but not in the ovary. *Genes Cells* **2**, 571-580(1997).
- 124 Stokes, J. B., 3rd. Modulation of vasopressin-induced water permeability of the cortical collecting tubule by endogenous and exogenous prostaglandins. *Miner. Electrolyte Metab.* **11**, 240-248(1985).
- 125 Bugge, J. F., Stokke, E. S., Vikse, A. & Kiil, F. Stimulation of renin release by PGE2 and PGI2 infusion in the dog: enhancing effect of ureteral occlusion or administration of ethacrynic acid. *Acta Physiol. Scand.* **138**, 193-201(1990).
- 126 Ito, S., Carretero, O. A., Abe, K., Beierwaltes, W. H. & Yoshinaga, K. Effect of prostanoids on renin release from rabbit afferent arterioles with and without macula densa. *Kidney Int.* **35**, 1138-1144(1989).
- 127 Abe, T., Takeuchi, K., Takahashi, N., Tsutsumi, E., Taniyama, Y. & Abe, K. Rat kidney thromboxane receptor: molecular cloning, signal transduction, and intrarenal expression localization. *J. Clin. Invest.* **96**, 657-664(1995).
- 128 Batshake, B., Nilsson, C. & Sundelin, J. Structure and expression of the murine thromboxane A2 receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 391-397(1999).
- 129 Wilkes, B. M., Solomon, J., Maita, M. & Mento, P. F. Characterization of glomerular thromboxane receptor sites in the rat. *Am. J. Physiol.* **256**, F1111-1116(1989).
- 130 Farman, N., Pradelles, P. & Bonvalet, J. P. PGE2, PGF2 alpha, 6-keto-PGF1 alpha, and TxB2 synthesis along the rabbit nephron. *Am. J. Physiol.* **252**, F53-59(1987).
- 131 Cheng, Y., Wang, M., Yu, Y., Lawson, J., Funk, C. D. & Fitzgerald, G. A.

- Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *J. Clin. Invest.* **116**, 1391-1399(2006).
- 132 関係省庁共通パンフレット.ダイオキシン類 2012(2012).
- 133 Lorber, M. & Phillips, L. Infant exposure to dioxin-like compounds in breast milk. *Environ. Health Perspect.* **110**, A325-332(2002).
- 134 Nishimura, N., Yonemoto, J., Nishimura, H. & Tohyama, C. Localization of cytochrome P450 1A1 in a specific region of hydronephrotic kidney of rat neonates lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology* **227**, 117-126(2006).
- 135 Abbott, B. D., Diliberto, J. J. & Birnbaum, L. S. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters embryonic palatal medial epithelial cell differentiation in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **100**, 119-131(1989).
- 136 Sugimoto, Y., Shigemoto, R., Namba, T., Negishi, M., Mizuno, N., Narumiya, S. & Ichikawa, A. Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP3 in the mouse nervous system. *Neuroscience* **62**, 919-928(1994).
- 137 Tsuboi, H., Sugimoto, Y., Kainoh, T. & Ichikawa, A. Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1066-1072(2004).
- 138 Hasumoto, K., Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Morimoto, K., Kakizuka, A., Negishi, M. & Ichikawa, A. Association of expression of mRNA encoding the PGF2 alpha receptor with luteal cell apoptosis in ovaries of pseudopregnant mice. *J. Reprod. Fertil.* **109**, 45-51(1997).
- 139 Maeda, Y., Terada, Y., Nonoguchi, H. & Knepper, M. A. Hormone and autacoid regulation of cAMP production in rat IMCD subsegments. *Am. J. Physiol.* **263**, F319-327(1992).
- 140 Mandl, M. & Depping, R. Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1beta): is it a rare exception? *Mol. Med.* **20**, 215-220(2014).
- 141 遠山, 千春 ダイオキシンの毒性と健康:「神話」から科学へ. *科学* **74**, 59-63.

謝辞

本研究を遂行するにあたり貴重な研究の機会を与えていただき、また多大なご指導とご鞭撻を賜りました前・東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター健康環境医工学部門、遠山千春教授に謹んで感謝の意を申し上げます。また遠山教授退任後の指導教員を快くお引き受けいただき、学位論文のご指導を賜りました分子予防医学教室、松島綱治教授に謹んで感謝の意を申し上げます。

実験や執筆にあたり終始的確なご指導、ご助言を賜りました同部門（現東京薬科大）の吉岡亘先生に感謝いたします。実験デザインや執筆に関し、ご指導、ご助言くださった同部門の大迫誠一郎准教授に感謝いたします。また、解剖に際し快く協力くださった同部門の川口達也さん、そして論文の図作成にお力添えくださった奥原由枝さんに感謝いたします。

最後に、本研究の遂行に際し、ご助言くださった東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター健康環境医工学部門の皆様に感謝いたします。