

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 安岡（相田）圭子

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が報告され、1990 年代より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ている。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) 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発がん、免疫抑制、生殖・発生異常、口蓋裂や水腎症などの奇形といった多様な毒性現象を生じるかは未解明な点が多い。

TCDD の毒性発現機序研究において、授乳期 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 曝露による水腎症研究では、TCDD 曝露による水腎症発症腎において cyclooxygenase-2 (COX-2) が AhR 依存的に誘導されること、そして COX-2 阻害剤によって水腎症発症が抑えられることが報告されていた。このことより、COX-2 活性の下流で産生される生理活性物質が水腎症を引き起こす原因であると推定された。私は COX-2 より下流にあるプロスタノイド合成経路のうち、腎臓で多様な役割を担う PGE₂ 合成系に着目し、PGE₂ が水腎症発症に関わる生理活性物質であるかを明らかにすることを研究目的のひとつとした。

水腎症発症に関わる生理活性物質を探索する上で、TCDD 高感受性マウス BALB/cA 由来の PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 欠損マウスを譲り受けたため、mPGES-1 野生型 BALB/cA 仔マウスを用いて TCDD 曝露による水腎症発症を試みた。ところが、予想に反して TCDD 経母乳曝露をおこなっても水腎症を発症しなかった。TCDD の AhR への解離定数や AhR 転写活性が TCDD 毒性発現を規定する定説では説明ができず、AhR 下流に水腎症発症における新たな毒性感受性因子が存在する可能性が示唆された。授乳期 TCDD 曝露による水腎症発症における感受性決定因子を探求し、TCDD 毒性の機序を明らかにすることを更なる目的にした。

方法

1) PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 発現と水腎症発症との関連

mPGES-1 野生型マウスと欠損マウスを用いて、出産後 1 日目に母マウスに 10 µg TCDD/kg ないし vehicle を単回経口投与し、仔マウスに TCDD の経母乳曝露を行った。仔マウスの水腎症発症率を 7 日齢および 21 日齢で比較した。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。尿中 PGE₂ 量と水腎症発症の関連も検討した。

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、欠損仔マウス(EP1, EP2, EP3)または日齢 1 から 13 まで EP4 阻害剤(ONO-AE3-208; ONO)を連日腹腔内投与して検証した。出産後 1 日目に母マウスに 20 µg TCDD/kg ないし vehicle を単回経口投与し、仔マウスに経母乳曝露した。仔マウスの水腎症発症率を 14 日齢で比較した。

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 (15 または 80 µg TCDD/kg)による 7 日齢の水腎症発症率および発症機序を検討した。mPGES-1 遺伝子発現量や尿中 PGE₂ 量と水腎症発症との関連も検討した。

結果

1) PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 発現と水腎症発症との関連

mPGES-1 野生型仔マウスでの TCDD 曝露群では、生後 7 日での水腎症発症率が 75%、生後 21 日での水腎症発症率は 67%と所属教室の既報と同程度であった。一方、mPGES-1 欠損仔マウスでの TCDD 曝露群では、生後 7 日、21 日共に水腎症発症率は 0%であった。mPGES-1 野生型仔マウス腎臓では、TCDD 曝露により mPGES-1 遺伝子が vehicle 群の約 4 倍、尿中 PGE₂ 量は vehicle 群の約 7 倍に上昇した。mPGES-1 欠損型仔マウス腎臓では TCDD 曝露群で mPGES-1 遺伝子や尿中 PGE₂ 量は vehicle 群と変わらなかった。

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

EP1 野生型仔マウスでの TCDD 曝露群では水腎症発症率が 80%であったが、EP1 受容体欠損仔マウスでは 28%と有意な低下を示した。他方、EP2 並びに EP3 受容体の野生型発症率と欠損型発症率は EP2 野生型 80%、EP2 欠損型 100%、EP3 野生型 89%、EP3 欠損型 100%であった。EP4 受容体では、TCDD 曝露後生理食塩水投与群 93%、ONO 投与群 100%であった。

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

水腎症発症率は C57BL/6J 仔マウスでは 67%、BALB/cA 仔マウスでは 0%であった。AhR 活性化の指標である CYP1A1 や AhRR 遺伝子発現は両系統共に同等で、発症の原因

である COX-2 遺伝子発現も両系統共に TCDD 曝露群で誘導された。一方、mPGES-1 mRNA 量は C57BL/6J 仔マウス TCDD 曝露群で vehicle 群に比し有意に上昇したが、BALB/cA 仔マウス TCDD 曝露群では増加しなかった。また mPGES-1 の転写誘導因子である early growth response 1 (Egr-1) について、mRNA 量と mPGES-1 プロモーター領域への結合量が C57BL/6J 仔マウスでのみ TCDD 曝露で増加し、BALB/cA 仔マウス TCDD 曝露群では増加しなかった。尿中 PGE₂ 量は C57BL/6J 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群で vehicle 群の約 3 倍に上昇した。一方、BALB/cA 仔マウスでは C57BL/6J 仔マウスに比べて vehicle 群の尿中 PGE₂ 値が低く、BALB/cA 仔マウス 80 µg TCDD/kg 曝露群の尿中 PGE₂ 値は C57BL/6J 仔マウス 15 µg TCDD/kg 曝露群の半分であった。C57BL/6J 仔マウス TCDD 曝露群において、水腎症発症群と非発症群での尿中 PGE₂ 量を比較すると水腎症発症群の尿中 PGE₂ 量は非発症群より有意に高かった。

考察

本研究により、TCDD 経母乳曝露による水腎症発症には mPGES-1 が重要な要因であり、過剰な PGE₂ 産生が水腎症発症に関与することが明らかになった。さらに PGE₂ 受容体のうち EP1 が発症に関与することが示唆された。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おいて、2 系統間の AhR 転写活性は同等であっても水腎症発症率の違いが顕著であった。さらに 2 系統間の mPGES-1 遺伝子発現量や mPGES-1 遺伝子発現を調節する転写因子 Egr-1 の遺伝子発現量ならびにプロモーター領域への結合量に有意差をみとめた。この知見は、TCDD の AhR への解離定数や AhR 転写活性が毒性発現を規定するという従来の TCDD 毒性のメカニズムでは説明できず、AhR 以外に TCDD 毒性の感受性を規定する因子の存在を明らかにした点で TCDD 毒性の感受性に関する研究を大きく進展させた。