博士論文

論文題目　　ダイオキシン毒性の発症機序における

$cPLA_2\alpha$ および AhR の役割

氏　　名　　藤澤　希望

要旨

2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン(TCDD)がプロスタノイド合成経路を活性化し毒性を発現させる作用が近年報告された。私の学位論文研究において、プロスタノイド合成経路最上流の $cPLA_2\alpha$ 欠損マウスを用い複数種の TCDD 毒性について検討したところ、胎生致死、授乳期水腎症、体重減少の発症に $cPLA_2\alpha$ が関与することが明らかになった。さらに、AhR の核移行機能が欠如したマウスでは TCDD 曝露によるプロスタノイド合成経路の活性化および水腎症の発症が認められなかった。ゆえに TCDD 曝露による AhR の核移行およびプロスタノイド合成経路の活性化が授乳期水腎症の発症に必要なことが示唆された。

目次

略語一覧 1

第１章　序論 3

1.1.　ダイオキシン類 3

1.2.　AhR の XRE を介する古典的な転写活性化経路および AhR を介さない毒性発現経路 5

1.3.　$cPLA_2\alpha$ 6

1.4.　ダイオキシン毒性発現におけるプロスタノイド合成経路の役割 9

1.5.　AhR 遺伝子変異マウスにおける TCDD 毒性 9

1.6.　AhR の XRE を介さない作用 11

1.7.　本研究の目的 13

第２章　方法 15

2.1.　試薬 15

2.2.　動物 15

2.2.1　胎仔期曝露実験 17

2.2.2　経母乳曝露実験 20

2.2.3　成獣期曝露実験 21

2.3.　組織解析 21

2.4.　RNA 抽出および定量 RT-PCR 23

2.5.　ALT 測定 25

2.6.　統計解析 25

第３章　結果 26

3.1.　多様な TCDD 毒性の発症における $cPLA_2\alpha$ の役割について 26

3.1.1.　胎仔期曝露による TCDD 毒性 26

3.1.2.　経母乳曝露による TCDD 毒性 35

3.1.3.　成獣期曝露による TCDD 毒性 40

3.2.　授乳期水腎症の発症における AhR 核移行機能の役割について 46

3.2.1.　授乳期水腎症発症率・重症度 47

3.2.2.　TCDD 経母乳曝露マウスの腎臓での mRNA 発現量および尿中 PGE_2 濃度 52

3.2.3.　TCDD 経母乳曝露マウスの腎臓での炎症性サイトカイン mRNA 発現量 55

3.2.4.　TCDD 経母乳曝露マウスの腎臓での Src およびその活性調節に関わる遺伝子の mRNA 発現量 58

第４章　考察 60

4.1.　TCDD 胎仔期曝露による胎生致死には $cPLA_2\alpha$ が関与する 60

4.2.　TCDD 曝露時期・経路によって水腎症の発症機序が異なる 61

4.3.　TCDD 成獣期曝露による体重減少に $cPLA_2\alpha$ が関与する 63

4.4.　TCDD 成獣期曝露による肝毒性および胸腺萎縮には $cPLA_2\alpha$ は関与しない 64

4.5.　TCDD 経母乳曝露による水腎症の発症には AhR の核移行が必要である 66

4.6.　TCDD 曝露による PGE_2 合成経路の活性化には AhR の核移行を要する 67

4.7.　TCDD 曝露による AhR の活性化からプロスタノイド合成経路の活性化に至る機序 68

4.8.　XRE を介さない AhR による PGE_2 合成経路の関連遺伝子の転写活性化 72

4.9.　AhR による Src の活性化による PGE_2 合成経路の活性化 72

4.10.　AhR と NF-κB の相互作用による PGE_2 合成経路の関連遺伝子の転写活性化 74

4.11. TCDD 曝露により AhR の核移行を介して腎臓にマクロファージが誘導される 75

4.12. TCDD 毒性発現に関与しうるサイトカインの発現誘導は AhR の核移行を要する 76

4.13. 今後の課題 77

4.14. 結論 78

引用文献 79

謝辞 99

略語一覧

AhR; aryl-hydrocarbon receptor

AhRR; aryl-hydrocarbon receptor repressor

ALT; alanine transaminase

b.w.; body weight

Cbp; Csk-binding protein

COX-2; cyclooxygenase-2

Csk; C-terminal Src kinase

$cPLA_2\alpha$; cytosolic phospholipase $A_2\alpha$

CYP1A1; cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1

dbd; DNA binding domain

GD; gestation day

HSP90; heat shock protein 90

IL-1β; interleukin-1β

KC; keratinocyte-derived chemokine

LOX; lipoxygenase

MAPK; mitogen-activated protein kinase

MCP-1; monocyte chemoattractant protein 1

mPGES-1; microsomal prostaglandin E synthase-1

NF-κB; nuclear factor kappa B

nls; nuclear localization sequence

PGE_2; prostaglandin E_2

PND; post natal day

Src; proto-oncogene tyrosine-protein kinase

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

TEQ; toxic equivalent

TXA_2; Thromboxane A_2

TNF-α; tumor necrosis factor-α

XAP2; X-associated protein 2

XRE; xenobiotic responsive element

第１章　序論

1.1.　ダイオキシン類

ダイオキシン類とは、ポリ塩素化ジベンゾパラダイオキシン (PCDDs)、ポリ塩素化ジベンゾフラン (PCDFs)、およびコプラナーポリ塩素化ビフェニル (Co-PCBs) の総称である。これらダイオキシン類の中でも、2, 3, 7, 8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン (TCDD) は最も低用量で毒性を引き起こすことで知られ、ダイオキシン毒性の研究においてしばしば用いられる。ダイオキシン類の 419 種の同族体のうち 29 種類の化合物は aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介して毒性反応を引き起こすことで知られ、リスク評価の対象とされている [1]。環境中に存在するダイオキシン類はこれらの異なる同族体の混合物で構成されており、各々の同族体をそれぞれ個別に管理することは不可能である。そのためダイオキシン類は、各同族体の量に毒性の強さを示す毒性等価係数 (TEF) を乗じた毒性等量 (TEQ) で、ダイオキシン類総体として管理されている [1]。

ダイオキシン類は廃棄物処理場での燃焼や産業過程で非意図的に産生され、空気中、水中、土壌中などの環境中に放出される [2, 3]。難分解性で半減期は土壌中で 10 年以上とも報告されるダイオキシン類は、その高い環境残留性から環境中に広く分布している [4]。また、体内でも難代謝性であるダイオキシン類は、ヒ

トにおける代謝半減期が 7 年から 10 年にものぼると言われており [5]、このように難分解性・難代謝性のダイオキシン類は生体内に蓄積されやすく、スジイルカでは PCBs が食物連鎖により水中濃度の 1,000 万倍にも生物濃縮されていたと報告された [6, 7]。ヒトの場合、ダイオキシン類は食肉、魚類、乳製品などの食物を介して体内に取り込まれ、253 人の日本人を対象に 2011 年から 2013 年に行われた環境省のモニタリング調査では、食事経由のダイオキシン類摂取量は平均 0.56 pg-TEQ/kg body weight (b.w.)/日、血液中ダイオキシン類濃度が平均 12 pg-TEQ/g-fat であると報告された [8]。また、母から子への胎盤や母乳を介した TCDD 曝露も報告されており、特に経母乳曝露は周産期における主要な曝露経路である [9]。

1976 年に起きたセベソ事故では農薬工場の爆発事故により TCDD が広く飛散し、流産率の上昇や女児出生率の増加 [10] に加え、TCDD の発癌性も報告された [11, 12]。また、実験動物を使用した先行研究 [13] によって、ダイオキシン類が催奇形性、繁殖毒性、免疫毒性、発癌性、神経毒性などの多様な毒性を引き起こすことが明らかになった。この中でも、げっ歯類において低用量の TCDD 曝露によって発症する免疫毒性や繁殖毒性は、10 ng/kg b.w.の用量の TCDD 単回投与によって発症すると報告された [5]。これら多様なダイオキシン毒性の多くは、AhR を欠損したマウスでは発症しないことが明らかになっており [14-16]、AhR はダイオキシン毒性の発現に必須の役割を担う受容体として長年注目されている。

1.2. AhR の XRE を介する古典的な転写活性化経路および AhR を介さない毒性発現経路

AhR は basic-helix-loop-helix/PAS ファミリーに属す転写因子である[17]。AhR は非活性時、heat shock protein 90 (HSP90) や X-associated protein 2 (XAP2)、p23 などと結合し細胞質に留まっている[18, 19]が、リガンドと結合し活性化することで核内に移行し[20]、核内に存在する転写因子である AhR nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマーを形成する。こうして核内で形成された AhR-Arnt ヘテロダイマーは xenobiotic responsive element (XRE) と結合し、CYP1A1 や AhR repressor (AhRR) などの AhR 標的遺伝子の転写を活性化する[21] (Figure 1)。この XRE を介する AhR の転写活性化経路は、TCDD 毒性発現に主要な役割を担うとして着目されている。ところが近年、Arnt ノックダウンや XRE decoy によって Arnt や XRE を介する転写活性化経路を阻害しても、TCDD 曝露により数々の遺伝子が発現誘導され、炎症性反応が引き起こされることが報告された[22-25]。この XRE を介さない AhR による炎症性反応が、TCDD 毒性を引き起こす要因の一つである可能性が考えられている[26]。

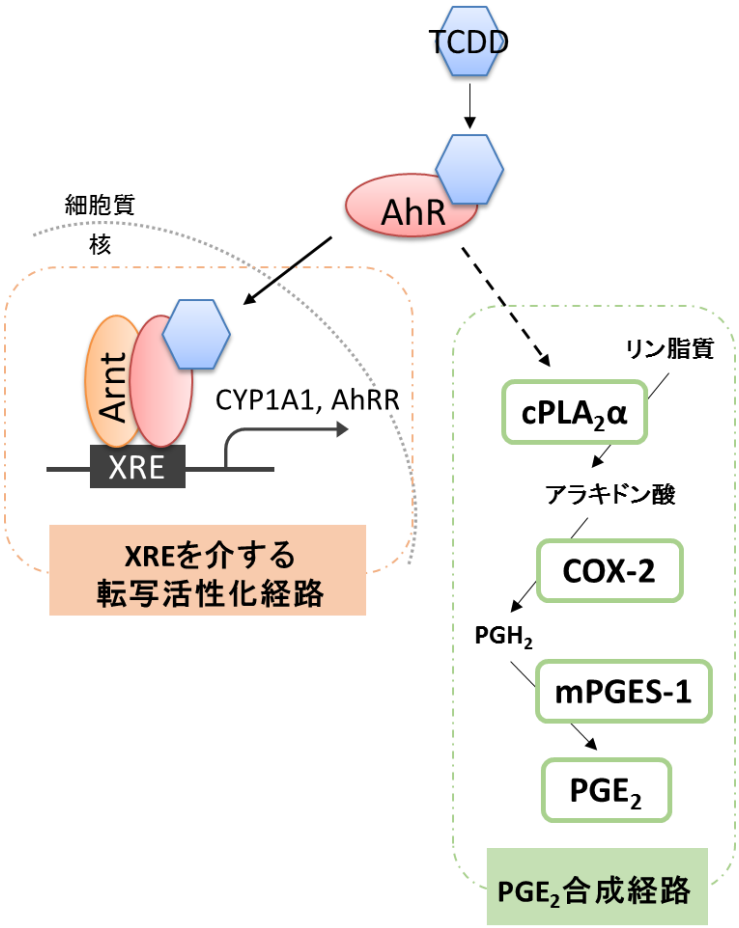

Figure 1. TCDD による AhR の XRE を介する転写活性化および PGE_2 合成経路活性化機序

1.3. cPLA$_2$α

近年、TCDD 毒性の発現の際に上記 (1.2.) の XRE を介さない経路が報告され[22-26]、本研究ではその中でも特に、cytosolic phospholipase A$_2$α (cPLA$_2$α) に焦点を当てた。Phospholipase A$_2$ (PLA$_2$) はグリセロリン脂質を加水分解しリゾリン脂質と脂肪酸を産生する酵素であり、30 種類以上の分子種が報告されている[27]。中

でも全身の様々な細胞で発現している $cPLA_2\alpha$ は、全ての PLA_2 ファミリーの中でも唯一アラキドン酸を含むリン脂質に対して基質特異性を示し、エイコサノイド合成経路の最上流でエイコサノイドによる多様な生理反応を調節している[27](Figure 1)。

$cPLA_2\alpha$ の活性化機序には、Ca^{2+}依存性のものと Ca^{2+}非依存性のものが存在する。Ca^{2+}依存性の $cPLA_2\alpha$ の活性化機序では、一過性の細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇により細胞質内の $cPLA_2\alpha$ が活性化され、核膜をはじめ、小胞体膜やゴルジ体などに移行する[28-30]。活性化した $cPLA_2\alpha$ によって産生されたアラキドン酸は、同じく核膜上に存在する cyclooxygenase (COX) によりプロスタノイドに、lipoxygenase (LOX) によりロイコトリエンに変換され、産生されたエイコサノイドは生体内で多様な生理作用を引き起こす[29]。このような Ca シグナルを介した $cPLA_2\alpha$ の核膜への移行によりエイコサノイド合成経路の活性化が開始される。Ca^{2+}非依存性の $cPLA_2\alpha$ 活性化機序では、mitogen-activated protein kinase (MAPK) によって $cPLA_2\alpha$ の Ser505 がリン酸化される。Ser505 がリン酸化されることで $cPLA_2\alpha$ はより安定的に核膜と結合し、$cPLA_2\alpha$ による核膜からのアラキドン酸の切り出しはより活性化する。その他、$cPLA_2\alpha$ の Ser515 や Ser727 のリン酸化によっても $cPLA_2\alpha$ の酵素活性が上昇することが明らかになっている[29,31,32]。この

ような、Ca シグナルを介した $cPLA_2\alpha$ の核膜への移行、および $cPLA_2\alpha$ のリン酸化という二つの機構によって $cPLA_2\alpha$ は活性化される。

$cPLA_2\alpha$ 欠損マウスではエイコサノイドの産生が著しく低下しており、それに伴う様々な表現型が認められる[27,32]。平均寿命、形態的外観、ホルモン値などは $cPLA_2\alpha$ 欠損マウスと野生型マウスの間で差はみられなかった[33]。しかし PGE_2 産生低下に起因し、$cPLA_2\alpha$ 欠損マウスは加齢に伴い近位尿細管での水チャネル発現量が低下し、高齢 $cPLA_2\alpha$ 欠損マウスにおいては尿濃縮障害が認められた[34]。また、$cPLA_2\alpha$ を欠損した妊娠マウスでは、PGF_2 産生低下による分娩障害や、胚形成および着床障害による産子数の低下が報告されている[35]。その一方で、$cPLA_2\alpha$ 遺伝子が欠損することによりアレルギー性気管支喘息、腸管ポリープ形成、関節リウマチなどの発症が軽減されるなど、$cPLA_2\alpha$ 欠損マウスでの表現型は多岐にわたる[27,32]。このように全身様々な臓器で多様な反応を引き起こす $cPLA_2\alpha$ の毒性発現への関与を明らかにすることは、多様なダイオキシン毒性の発症機序の解明に加え、プロスタノイド合成系のかく乱によって引き起こされる様々な病態形成メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。

1.4. ダイオキシン毒性発現におけるプロスタノイド合成経路の役割

これまでの研究[36, 37]により、TCDD 曝露による授乳期水腎症の発症には COX-2 や mPGES-1 といった、PGE_2 合成経路に関わる酵素が必須であることが明らかになった。また、魚類においても COX-2 を介したプロスタノイド合成経路が TCDD 毒性の発症に密接に関与し、ゼブラフィッシュの胚では TCDD 曝露によって背部中脳の局所血流量が減少するが、COX-2 をノックダウンしプロスタノイドの一種である Thromboxane A_2 (TXA_2) の合成を阻害することで、この TCDD 毒性が緩和されるという報告がある[38]。このような、プロスタノイド合成経路の活性が TCDD 毒性の発現に必要であるという報告に加え、TCDD 曝露によって $cPLA_2\alpha$ 活性、アラキドン酸産生量、COX-2 や $cPLA_2\alpha$ の mRNA 発現量、PGE_2 濃度などが上昇することが複数の異なる種類の細胞において確認されている[22, 25, 39](Figure 1)。さらに、プロスタノイドのみならず、ロイコトリエンを含む数種のエイコサノイドが TCDD 曝露により増加することが複数の臓器において認められた[40]。

1.5. AhR 遺伝子変異マウスにおける TCDD 毒性

前述 (1.1.) のように、AhR は TCDD 毒性の発現に主要な役割を果たし、TCDD 毒性への感受性の種差には AhR の遺伝子型が大きく関与することが報告されて

いる。マウスでは、TCDD 感受性の系統差は TCDD 高感受性の C57BL/6 系統マウスが保有する b1 型 AhR (AhR^{b1}) と低感受性の DBA/2 系統マウスが保有する d 型 AhR (AhR^{d}) との間で、AhR のリガンド結合能に約 10 倍の差がある [41, 42]。また、*in vivo* 実験系においても、C57BL/6 系統マウスと、AhR^{d} を保有する C57BL/6 バックグラウンドのコンジェニックマウスを比較したところ、TCDD 曝露した AhR^{d} コンジェニックマウスでは CYP1A1 誘導能が低く、口蓋裂の発症率や胎仔期水腎症の重症度も低いと報告された [43]。

また前述 (1.2.) のように、AhR はリガンドと結合し活性化すると、核内に移行し様々な AhR 標的遺伝子の転写を活性化する [20]。本研究で用いた $AhR^{nls/nls}$ マウスは AhR の nuclear localization sequence (nls) を遺伝子工学技術により変異させており、AhR が活性化しても核内に移行しないため、リガンドとの結合があっても標的遺伝子の転写は活性化されない [44]。先行研究 [44] により、この $AhR^{nls/nls}$ マウスでは TCDD 曝露による肝障害や胸腺萎縮が発症しないことが明らかになっており、これら毒性の発症には AhR の核移行が重要な役割を果たすことが示されている。さらに、AhR の DNA binding domain (dbd) 遺伝変異マウス ($AhR^{dbd/dbd}$ マウス) に TCDD を投与して肝肥大、胸腺萎縮、脂肪肝、口蓋裂、および胎仔期水腎症を検討した実験 [45] では、これら TCDD 毒性の発症に AhR の転写活性化が必須であることが明らかにされた。

1.6. AhR の XRE を介さない作用

上述 (1.5.) のように、TCDD 毒性の発現に AhR が必須であることが広く認められている [21]。しかし、AhR 標的遺伝子の転写が誘導される TCDD 用量とリンパ球細胞毒性などの毒性を引き起こす TCDD 用量の間に差があるなど、AhR の XRE を介した標的遺伝子の転写活性化だけでは説明のつかない TCDD 毒性も存在し [26]、AhR の活性化から毒性発現までの分子メカニズムは完全には解明されていなかった。近年、AhR 活性化後の作用として AhR 標的遺伝子の XRE を介した転写活性化以外に、AhR の proto-oncogene tyrosine-protein kinase (Src) や nuclear factor kappa B (NF-κB) との相互作用が着目されている [46-50]。

細胞質に存在する非活性型 AhR は Src と複合体を形成しており、AhR が活性化し核内に移行する際に AhR-Src 結合は解消され Src が活性化されることが、2 種の異なる大腸癌細胞株を用いた *in vitro* の実験から明らかにされた (Figure 2) [49]。さらに、TCDD 曝露による $cPLA_2$ の活性化を介して Src が活性化される経路も報告されている [23, 26] (Figure 2)。このような AhR 活性化による Src の活性化は他の種類の細胞でも報告されており [25, 51, 52]、また、TCDD 曝露による COX-2 の mRNA 発現誘導も Src の活性化を介していることが示された [25, 49, 53]。この TCDD 曝露による COX-2 の mRNA 発現誘導は AhR 核移行機能を欠如した $AhR^{nls/nls}$ マ

ウスにおいても確認されており [22, 23]、AhR の核移行や転写活性化を介さずに引き起こされる作用として注目されている。

また、AhR は RelA および RelB といった NF-κB ファミリータンパク質とも核内で複合体を形成することが知られており [24, 46, 47, 54, 55]、この AhR と NF-κB との相互作用によって TNF-α や IL-1β などの NF-κB 標的遺伝子の転写が活性化されることが様々な種類の細胞において報告されている [54-57] (Figure 2)。さらに *in vivo* 実験系においても、NF-κB 阻害剤を投与することで TCDD 曝露による KC、IL-1β、COX-2 などの mRNA 発現誘導が抑制されることが明らかにされた [23]。

上述のような Src や NF-κB などが関与する作用は XRE や Arnt をノックダウンしても活性化する [22, 23, 25] ことが示されており、これら Src や NF-κB が介する経路は XRE を介さずに TCDD 曝露によりプロスタノイド合成経路を活性化する可能性がある。

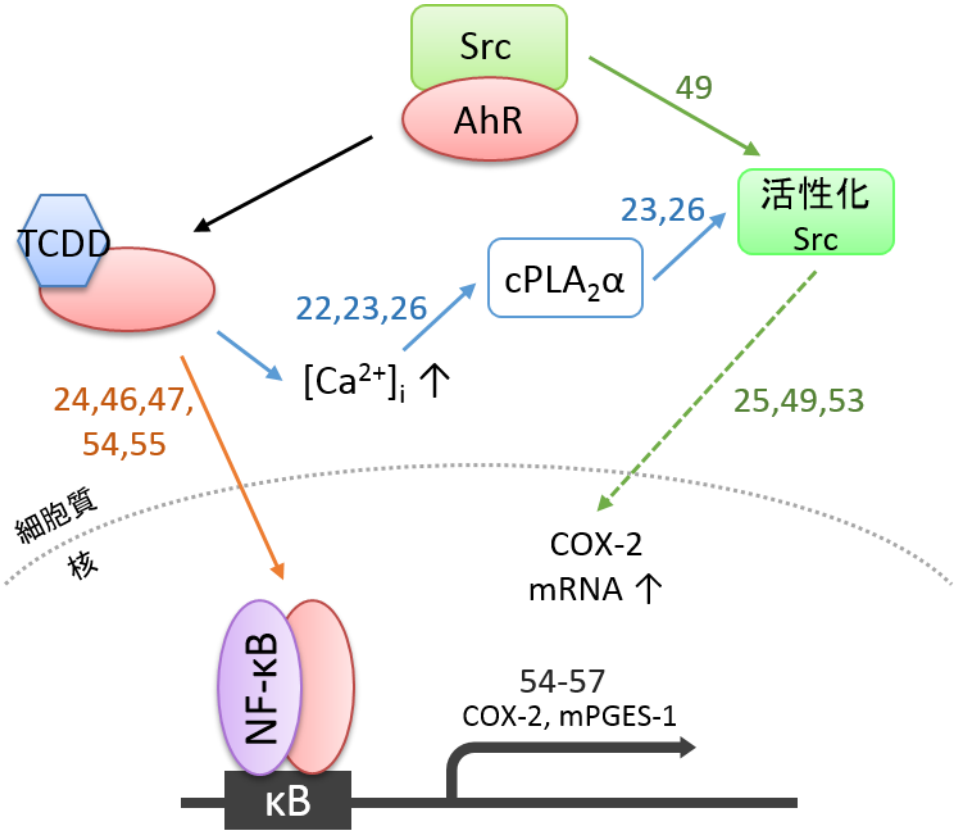

Figure 2. TCDD による AhR の XRE を介さない作用
図中の数字は本文中の引用文献番号を示す。

1.7. 本研究の目的

本研究ではまず、cPLA$_2$α ノックアウトマウスにおいて異なる複数の曝露経路・曝露時期で TCDD 毒性が発症するか否か検討し、TCDD の多様な毒性の発症に cPLA$_2$α が関与するかどうかを検証する。次に、上記の実験において cPLA$_2$α の毒性発症への関与が最も明快な TCDD 毒性を研究対象とし、TCDD 曝露により

AhR が活性化されてから $cPLA_2\alpha$ が活性化されるまでの機序について検討する。これまで、TCDD 曝露による $cPLA_2\alpha$ の活性化機序として、Ca シグナルを介する AhR の核外作用が注目されてきた[22, 23, 26]。一方で、前述 (1.6.) の Src や NF-κB を介するプロスタノイド合成経路の活性化は、AhR の核移行が伴う。そこで本研究においては、AhR の核移行が TCDD による $cPLA_2\alpha$ 活性化、さらには $cPLA_2\alpha$ を介して発症する毒性の発現に関与するか否かを AhR 核移行機能欠損マウス ($AhR^{nls/nls}$ マウス) を用いて検証する。

第２章　方法

2.1.　試薬

TCDD (純度 99.1%) は AccuStandard (New Haven, CT, USA) より購入し、2%または 3%ノナン (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) を含むコーン油 (Wako Pure Chemicals) に溶解した。

腹腔マクロファージを使用した実験では、最終濃度 0.1% DMSO (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) になるように TCDD (純度 98%、Cerilliant Corporation, Round Rock, TX, USA) を PBS に溶解した。

2.2.　動物

$cPLA_2\alpha$ ノックアウトマウス、$AhR^{nls/nls}$ マウス、AhR ノックアウトマウスはそれぞれ東京大学の清水孝雄先生、Wisconsin 大学の Christopher Bradfield 先生、筑波大学の藤井義明先生よりご供与頂いた [33, 44, 58]。$AhR^{d/d}$ マウスは Jackson Laboratory (Bar Harbor, MA, USA) より購入した。$cPLA_2\alpha$ ノックアウトマウスは 18 世代以上 C57BL/6J 系統マウスと戻し交配した。

マウスにおいては d 型、b1 型、b2 型、b3 型の 4 つの AhR 遺伝多型が知られている [59]。前述 (1.5.) のように、その中でも AhR^{d} は AhR^{b1} よりもリガンド結合

能が低い低感受性型 AhR である[41,42]。本研究で用いた $AhR^{d/d}$ マウスは、AhR^{d} を保有する DBA/2 マウスと、C57BL/6 マウスを 30 代以上戻し交配し、AhR^{d} 以外の遺伝的背景を C57BL/6 マウスと同一にした AhR^{d} コンジェニックマウスである[60]。この $AhR^{d/d}$ マウスを AhR ノックアウトホモ ($AhR^{-/-}$) マウスと交配し、得られた AhR d 型と AhR ノックアウトのヘテロマウスを $AhR^{d/-}$マウスとした。

AhR の核移行機能を欠損させるため、AhR の nuclear localization sequence (nls) 上の 3 つのアミノ酸を置換し、nls 以外の遺伝配列を AhR^{d} と同一にした AhR が AhR^{nls} である。AhR^{nls} はリガンド、Arnt、さらに HSP90 や XAP2 などの分子シャペロンとの結合が確認されたが、リガンドに曝露しても核移行は認められなかった[44]。私の学位論文研究では、AhR^{nls} を保有する $AhR^{nls/nls}$ マウスを 6 世代以上 C57BL/6 マウスと戻し交配して使用した。

先行研究[44]により AhR のタンパク発現量およびリガンド結合能は、d 型 AhR の $AhR^{nls/nls}$ マウスと、片方の AhR 遺伝子を欠損させた $AhR^{d/-}$マウスで同程度であることが明らかにされていたため、本研究では AhR のリガンド結合能などの条件をそろえるために $AhR^{nls/nls}$ マウスと $AhR^{d/-}$マウスの結果を比較した。

飲料水および固形飼料 (ラボ MR ストック, Nosan, Yokohama, Japan) を自由摂取させ、室温 23 ± 1 °C、明暗周期 12 時間で飼育した。各遺伝子変異マウスの遺伝子型は、ゲノム DNA を用いた PCR で判定した。PCR で用いたプライマー

配列はそれぞれ、$cPLA_2\alpha^{+/+}$；CTCTGGTGTGATGAAGGCACTCTATGAGTC および CCCTACCTACAATGTTCACCCAAAACTAGC、$cPLA_2\alpha^{-/-}$；TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT および CCCTACCTACAATGTTCACCCAAAACTAGC、AhR^{nls} 変異；CAAATCCTTCTAAGGCAGGATC および CAACATTTGCACTCATGGATA、AhR^{nls} 野生型；CAAATCCTTCTAAGCGACACAG および CAACATTTGCACTCATGGATA、$AhR^{+/+}$；CGCGGGCACCATGAGCAG および CATTGGTTGAGACTCAGCTCCT、$AhR^{-/-}$；CGCGGGCACCATGAGCAG および CGGGCCTCTTCGCTATTAC、であった。

TCDD 曝露したマウスの屠体は、東京大学大学院医学系研究科と契約している廃棄業者に処分を依頼した。また、私の学位論文における動物実験は東京大学の動物実験指針に従って、東京大学医学系研究科動物実験委員会の承認 (承認番号 医-P11-055; H23.11.11 承認) を得て行った。

2.2.1 胎仔期曝露実験

複数の先行研究[14, 15, 43, 61]において、口蓋裂および水腎症の両方の発症が 60% 以上であった曝露時期・曝露用量などの曝露条件で実験を行った。雌雄の $cPLA_2\alpha^{+/-}$マウスを一晩交配し、翌朝、膣栓を確認した雌マウスを gestation day

(GD) 0 の妊娠マウスとした。0 または 40 μg/kg b.w.の TCDD を GD 12.5 で母マウスに単回強制経口投与し、GD 18.5 に母マウスを頸椎脱臼により処理したのち、胎仔を子宮内より取り出し、氷上 PBS で洗浄した。胎仔の左腎は液体窒素で凍結し、RNA を抽出するまで-80°C で保存し、右腎および口蓋を含む頭部は 10% 中性緩衝ホルマリン液 (Wako Pure Chemicals) で固定した。またこの際、水尿管症および口蓋裂の発症・非発症を実体顕微鏡下で判定した (Figure 3)[61]。水尿管症の診断は先行研究 [61] にならい、尿管が著しく拡張している場合、水尿管症が発症していると判定した (Figure 3C, D)。

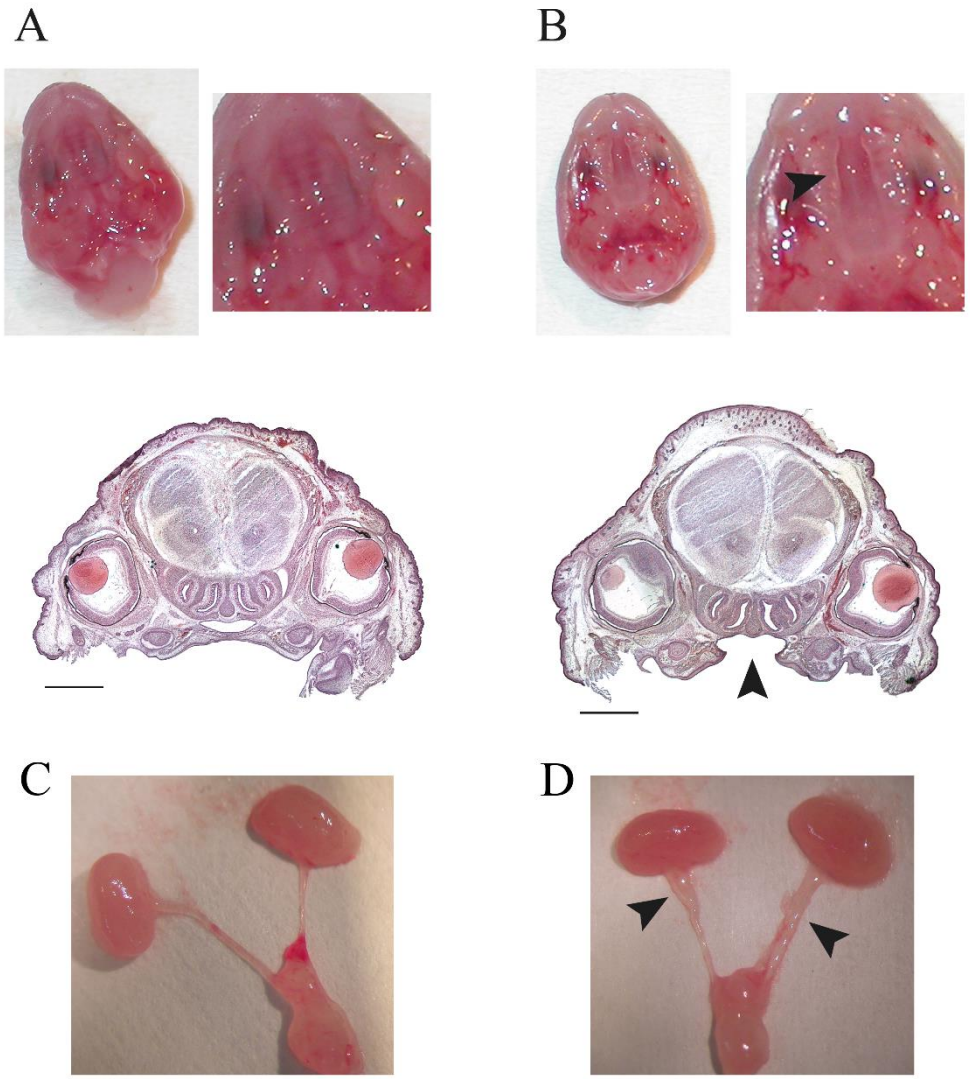

Figure 3.口蓋裂発症個体の頭部および水尿管症発症個体の左右尿管

0 または 40 μg/kg b.w.の TCDD を GD 12.5 の $cPLA_2\alpha^{+/-}$母マウスに経口投与し、GD 18.5 で胎仔の頭部および左右腎臓・尿管を採取した。(A) 正常口蓋、(B) 口蓋裂、(C) 正常尿管、(D) 水尿管症。矢頭は口蓋裂または水尿管症を示す。Bar = 1.0 mm

2.2.2　経母乳曝露実験

GD 16 で TCDD を 25 μg/kg b.w.の用量で母マウスへ単回経口投与した場合、経母乳での母から仔の腎臓への TCDD 移行量は 1.24 ng/g 腎重量であったのに対し、経胎盤での母から仔の腎臓への TCDD 移行量は 0.13 ng/g 腎重量に留まった[9]。この結果を参考にして、授乳期曝露実験では、母マウスへの TCDD 投与量を胎仔期曝露実験の投与量よりも低用量にして実施した。さらに、TCDD 曝露による水腎症の発症、mRNA 発現誘導、PGE_2 産生増加が最も顕著になるように、先行研究[36, 37, 62]の結果をもとに曝露用量・曝露時期・観察時期などの曝露条件を決定した。

$cPLA_2\alpha$ ノックアウトマウスを用いた実験では雌雄の $cPLA_2\alpha^{+/-}$マウスを、$AhR^{nls/nls}$ マウスおよび $AhR^{d/-}$マウスを用いた実験では雌の $AhR^{nls/d}$ マウスと雄の $AhR^{nls/-}$マウス、もしくは雌雄の $AhR^{d/-}$マウスを交配させた。朝晩 2 回出産を確認し、出産確認時を post natal day (PND) 0.5 とした。$cPLA_2\alpha$ ノックアウトマウスを用いた実験では 0 または 20 μg/kg b.w.、$AhR^{nls/nls}$ マウスおよび $AhR^{d/-}$マウスを用いた実験では 0 または 300 μg/kg b.w.の用量で TCDD を PND 1 で母マウスに単回強制経口投与し、授乳を介して仔に曝露した。PND 7 または 14 に仔を解剖し、尿、尾、腎臓を採取した。左腎は液体窒素で凍結し、RNA を抽出するまで-80°C で保存し、右腎は 10%中性緩衝ホルマリン液 (Wako Pure Chemicals) で固定した。

2.2.3　成獣期曝露実験

TCDD 曝露による肝毒性は、先行研究[63]において詳細な実験がなされており、用量反応関係や曝露後経過時間による毒性の変化が明らかになっている。この先行研究[63]の結果をもとに、肝肥大、肝臓への炎症性細胞の集積、肝細胞への脂肪蓄積、血漿中 ALT 値の上昇等が認められる曝露条件にて実験を行った。10−12 週齢の雄の $cPLA_2\alpha^{+/+}$ または $cPLA_2\alpha^{-/-}$ マウスに TCDD を 0 または 50 µg/kg b.w.の用量で腹腔内投与し、投与 0 日目から隔日で尾静脈より採血した。投与 8 または 10 日目に肝臓および胸腺を採取し重量を測定した。肝臓の一部は 10%中性緩衝ホルマリン液 (Wako Pure Chemicals) で固定し、残りは液体窒素で凍結させ、RNA を抽出するまで-80°C で保存した。

2.3.　組織解析

10%中性緩衝ホルマリン液 (Wako Pure Chemicals) で固定した組織を 20%ショ糖溶液に一晩浸漬させ、O.T.C. compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) で包埋した。包埋した組織を、液体窒素に沈めたアルミブロック上で凍結させた。この凍結組織ブロックより 5 µm 厚の組織切片を作成し、腎臓および頭部はヘマトキシリン・エオジン染色 (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) し、肝臓はオイル・レッド O 染色 (Muto Pure Chemicals) した。

水腎症の重症度の判定は既報の方法に従った[61]。腎乳頭が発達し腎盂の空隙がほとんどない正常な腎臓を重症度 0、腎乳頭と腎実質の間にわずかな空隙がみられる腎臓を重症度 1、腎乳頭が退縮し腎盂に顕著な空隙がみられる腎臓を重症度 2、腎乳頭が著しく短く腎実質が退縮し、本来の腎実質部分に大きな空隙がみられる腎臓を重症度 3、腎乳頭がほとんど認められず実質が著しく菲薄化した最も重篤な水腎症を重症度 4 とし、重症度 2 以上のものを水腎症に罹患していると判定した (Figure 4)。

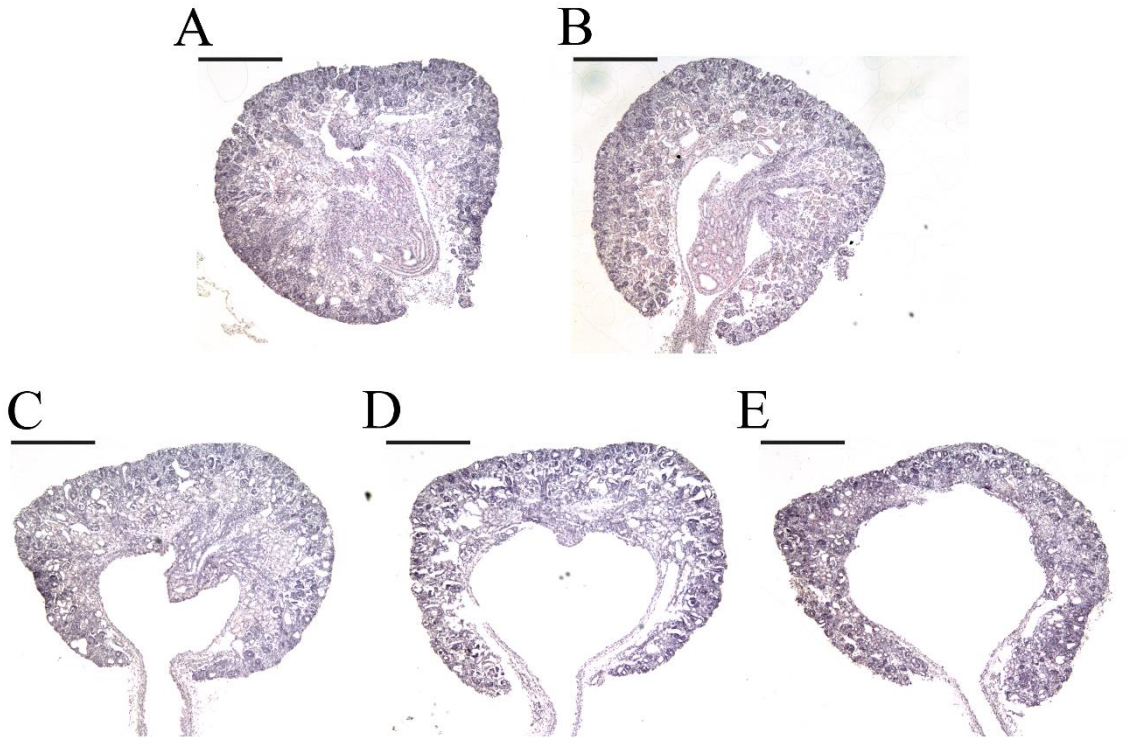

Figure 4. 各重症度の水腎症組織像

0 または 40 μg/kg b.w.の用量で TCDD を GD 12.5 の $cPLA_2\alpha^{+/-}$母マウスに経口投与し、GD 18.5 で胎仔の右腎を採取した。それぞれ (A) 重症度 0、(B) 重症度 1、(C) 重症度 2、(D) 重症度 3、(E) 重症度 4 の腎臓の代表的組織像。Bar = 1.0 mm

2.4. RNA 抽出および定量 RT-PCR

TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) および RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出し、Prime Script RT-PCR kit (Takara Bio, Otsu, Japan) のプロトコルに従い cDNA に逆転写した。この逆転写反応液に対し、Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて PCR 反応を行い、Light Cycler System (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) にて測

定した。各遺伝子の mRNA 発現量は Cyclophilin B を内在性コントロールとし、ΔCt 法を用いて算出した。RT-PCR は 2 回以上の独立した実験を行い、再現性を確認した。使用したプライマー配列を Table 1 に示した。

Table 1. qPCR で用いたプライマー配列

Target Gene		Primer Sequences (5' to 3')
AhRR	Forward	CAG GGC AGA CAT TGT GGT TA
	Reverse	CTC CAT TGC TCT TTC CTG CT
Cbp	Forward	TAC TGA GCA GTG GGC AGA TG
	Reverse	GGA AGG CAC ATT CAT CAG GT
COX-2	Forward	TGT GAA CAA TCA AAC AAA ATG ATG
	Reverse	GCG TAA ATT CCA ACA GCC TAA GT
$cPLA_2\alpha$	Forward	AGC ATT CAA AAG GCT TCA CG
	Reverse	GGG AAA CAG AGC AAC GAG AT
Csk	Forward	ATC TAT TCC TTC GGG CGA GT
	Reverse	TGC CAG CAG TTC TTC ATC AC
Cyclophilin B	Forward	GAC TTC ACC AGG GGA GAT GG
	Reverse	TGT GAG CCA TTG GTG TCT TTG
CYP1A1	Forward	GGC ACC TCT GTT CAC CCT A
	Reverse	GAA TCT CTC CCT CTG TTC TTG
F4/80	Forward	TGC ATC TAG CAA TGG ACA GC
	Reverse	GCC TTC TGG ATC CAT TTG AA
IL-1β	Forward	CAA GGA GAA CCA AGC AAC GA
	Reverse	GCC GTC TTT CAT TAC ACA GGA
KC	Forward	CTT GAA GGT GTT GCC CTC AG
	Reverse	TGG GGA CAC CTT TTA GCA TC
MCP-1	Forward	ACT GAA GCC AGC TCT CTC TTC CTC
	Reverse	TTC CTT CTT GGG GTC AGC ACA GAC
mPGES-1	Forward	CTC AAG CCC TGC TAC CAC A
	Reverse	GGC CTC AGA CAA GAG ACC AT
Src	Forward	TGT AAG GTG GGC AGT TGA TG
	Reverse	CTG GGA TAG AGT AGG GAT GTT C
TNF-α	Forward	CAC CAC CAT CAA GCA CTC AA
	Reverse	GAC AGA GGC AAC CTG ACC AC

2.5. ALT 測定

尾静脈より採血した血液から血漿を分離し、生化学自動分析装置 (Dri-Chem, model 7000V, Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて ALT 値を測定した。

2.6. 統計解析

母親による影響を最小にするため、同腹の同性、同遺伝子型の仔について、腹内で平均した値をさらに腹間で平均した。統計検定は、mRNA 発現量、臓器重量の場合に Unpaired *t*-test を用い、同遺伝子型間もしくは TCDD 曝露群同士で比較し有意差を検定した。体重および ALT 値のような繰り返しの比較の場合は、Repeated measures ANOVA の後 Bonferroni correction で多重検定を行った。数値を腹補正していない生存胎仔数の検定には χ^2 test を用いた。産子数、水腎症の重症度のように数値が連続していない場合や、水腎症の発症率のように腹ごとの数値が正規分布しない場合、Mann-Whitney U-test を用いた。p 値が 0.05 未満の場合、有意差があるとした。

第３章　結果

3.1.　多様な TCDD 毒性の発症における $cPLA_2\alpha$ の役割について

ダイオキシン毒性を引き起こす要因の一つとして近年着目されつつあるものとして、プロスタノイド合成経路がある[26]。本研究ではプロスタノイド合成経路の中でも最上流で最も主要な役割を担う $cPLA_2\alpha$ に着目し、$cPLA_2\alpha$ ノックアウトマウスを用いることで種々の TCDD 毒性発現に $cPLA_2\alpha$ が関与するかを検証した。

3.1.1.　胎仔期曝露による TCDD 毒性

$cPLA_2\alpha^{+/-}$の雌雄マウスを交配し、GD 12.5 の母マウスに TCDD を 40 μg/kg b.w. の用量で単回経口投与した。GD 18.5 で母体から胎仔を摘出し、生存胎仔数、口蓋裂発症率、水腎症発症率および重症度を検討した。

3.1.1.1.　生存胎仔数

胎仔期の TCDD 曝露による胎生致死が報告されているため[64-68]、本研究では TCDD による胎生致死に $cPLA_2\alpha$ が関与するかを検証した。GD 12.5 で TCDD を 40 μg/kg b.w. の用量で妊娠母マウスに単回経口投与した場合、GD 18.5 の一腹あ

たりの雄の生存胎仔数は cPLA$_2$α$^{+/+}$マウス (1.37 ± 0.26) に比べて cPLA$_2$α$^{-/-}$マウス (0.53 ± 0.20) で有意に少なかった (Table 2)。また、対照群と曝露群で比較した場合でも、TCDD 曝露した雄の cPLA$_2$α$^{-/-}$マウスの一腹あたり生存胎仔数 (0.53 ± 0.20) は、TCDD 非曝露の cPLA$_2$α$^{-/-}$マウス胎仔数 (1.13 ± 0.26) より少ない傾向にあった。この結果より、cPLA$_2$α が TCDD による胎生致死に関与することが示唆された。一方で、雌では TCDD 曝露による生存胎仔数の変化はどの遺伝子型でも確認されなかった (Table 2)。

Table 2. TCDD 曝露による cPLA$_2$α 遺伝子型別の生存胎仔数の変化 [a]

TCDD dose (μg/kg)	Number of dams	cPLA$_2$α genotype	Male		Female	
			Fetus	Litter size	Fetus	Litter size
40	29	+/+	41	1.37 ± 0.26	28	0.93 ± 0.18
		+/-	42	1.40 ± 0.27	57	1.90 ± 0.30
		-/-	16**	0.53 ± 0.20††	28	0.93 ± 0.26
0	16	+/+	16	1.00 ± 0.21	15	0.94 ± 0.21
		+/-	23	1.44 ± 0.22	26	1.63 ± 0.22
		-/-	18	1.13 ± 0.26	10	0.63 ± 0.20

a: TCDD を 0 または 40 μg/kg b.w.の用量で GD 12.5 の cPLA$_2$α$^{+/-}$母マウスに経口投与したときの、GD 18.5 における生存胎仔数。Litter size は同腹の同性、同遺伝子型の仔について、腹内で平均した値をさらに腹間で平均した (means ± SEM)。

**: TCDD 曝露した雄の cPLA$_2$α$^{+/+}$マウスと比較した際に有意差あり (χ^2 test、$p < 0.01$)

††: TCDD 曝露した雄の cPLA$_2$α$^{+/+}$マウスと比較した際に有意差あり (Mann-Whitney U-test、$p < 0.01$)

3.1.1.2. 催奇形性

口蓋裂と水腎症は TCDD が引き起こす催奇形性の中でも特に代表的なものである [15, 43, 69]。本研究でも、胎仔期の TCDD 曝露によりいずれの性別および遺伝子型においても、約 90%以上のマウスで口蓋裂が発症し、60%以上のマウスで水腎症の発症が確認された (Table 3)。水腎症の重症度に関しては、TCDD 曝露した雌の $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスの重症度 (1.79 ± 0.30) が $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウス (2.55 ± 0.29) より低い傾向にあった (Mann-Whitney U-test; p=0.082)。

Table 3. cPLA$_2$α ノックアウトマウスにおける TCDD 胎仔期曝露による口蓋裂の発症率および水腎症の発症率と重症度 [a]

TCDD dose (μg/kg)	cPLA$_2$α genotype	n (fetus (dam))	Cleft palate incidence (%)	Hydronephrosis						
				Severity						Incidence (%)
				0	1	2	3	4	Average	
Male										
40	+/+	41 (25)	94.0 ± 5.2	4	5	15	12	5	2.21 ± 0.20	75.0 ± 8.2
	-/-	16 (11)	100 ± 0	2	3	5	6	0	1.83 ± 0.27	65.2 ± 13.6
0	+/+	16 (11)	0	11	5	0	0	0	0.33 ± 0.14	0
	-/-	18 (10)	0	13	4	1	0	0	0.42 ± 0.20	10.0 ± 10.0
Female										
40	+/+	28 (22)	89.4 ± 8.0	3	1	9	7	8	2.55 ± 0.29	81.8 ± 8.4
	-/-	29 (16)	90.6 ± 9.1	7	3	8	10	1	1.79 ± 0.30	63.5 ± 10.7
0	+/+	14 (9)	0	11	3	0	0	0	0.22 ± 0.12	0
	-/-	10 (7)	0	7	3	0	0	0	0.26 ± 0.14	0

a: TCDD を 0 または 40 μg/kg b.w.の用量で GD 12.5 の cPLA$_2$α$^{+/-}$母マウスに経口投与したときの、GD 18.5 における口蓋裂および水腎症の発症率と重症度。同腹の同性、同遺伝子型の仔について、腹内で平均した値をさらに腹間で平均した (means ± SEM)。

また、TCDD 胎仔期曝露による水腎症では水尿管症が併発するという報告から[70,71]、水尿管症についても検証した。水腎症の発症率が 63.5%から 81.8%であったのに対し、水尿管症の発症率は 90%以上であり、水腎症の発症・非発症に関わらず、ほぼ全ての TCDD 曝露マウスで $cPLA_2\alpha$ の遺伝子型や性別に関わらず水尿管症が発症していた (Table 4)。

Table 4. $cPLA_2\alpha$ ノックアウトマウスにおける TCDD 曝露による水尿管症の発症率 [a]

	TCDD dose (μg/kg)	$cPLA_2\alpha$ genotype	n (fetus (dam))	Hydroureter incidence (%)
Male				
	40	+/+	27 (14)	100
		+/-	28 (14)	92.9 ± 4.9
		-/-	12 (7)	92.9 ± 7.1
	0	+/+	13 (9)	0
		+/-	20 (12)	0
		-/-	17 (9)	0
Female				
	40	+/+	15 (13)	92.3 ± 7.7
		+/-	35 (14)	100
		-/-	18 (11)	90.0 ± 10.0
	0	+/+	14 (9)	0
		+/-	24 (14)	0
		-/-	10 (7)	0

a: TCDD を 0 または 40 μg/kg b.w.の用量で GD 12.5 の $cPLA_2\alpha^{+/-}$母マウスに経口投与したときの、GD 18.5 における水尿管症の発症率。同腹の同性、同遺伝子型の仔について、腹内で平均した値をさらに腹間で平均した (means ± SEM)。

3.1.1.3. TCDD 胎仔期曝露したマウスの腎臓での mRNA 発現量

TCDD 胎仔期曝露による水腎症の発症に関わる分子メカニズムを明らかにするために、GD 12.5 から GD 18.5 まで TCDD を経胎盤曝露した胎仔の腎臓における様々な遺伝子の mRNA 発現量を測定した。まず、AhR の XRE を介した転写活性化の代表的マーカー遺伝子であり TCDD 曝露の指標となる、CYP1A1 と AhRR[72] の mRNA 発現量は、$cPLA_2\alpha$ 遺伝子型に関わらず TCDD 曝露によって有意に上昇していた (Figure 5A, B)。

次に、胎仔期曝露の場合 PGE_2 合成経路関連酵素の mRNA 発現量がどのような挙動を示すか検証した。その理由は、これまでの研究で COX-2 や mPGES-1 といったプロスタノイド合成経路に関与する酵素が TCDD 経母乳曝露による水腎症の発症に必須の役割を担うことが明らかになっているからである [36, 37]。その結果は、$cPLA_2\alpha$ の mRNA 発現量は TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスで対照群に比べ約 1.8 倍の上昇傾向が認められたが有意差はなかった (Unpaired *t*-test; p=0.156)(Figure 5C)。TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスの $cPLA_2\alpha$ mRNA 発現量は TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスの約 0.2 倍に有意に減少しており、TCDD 曝露による $cPLA_2\alpha$ の mRNA 発現誘導は $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスで消失していた (Unpaired *t*-test; p=0.039)(Figure 5C)。COX-2 mRNA 発現量も TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスでは対照群に比べ約 5.0 倍の上昇傾向が認められたが有意差はなく (Unpaired *t*-test;

p=0.110)、TCDD 曝露 cPLA$_2$α$^{-/-}$マウスに比べ約 2.7 倍の増加傾向が認められた (Unpaired *t*-test; *p*=0.178)(Figure 5D)。一方 mPGES-1 の mRNA 発現量は cPLA$_2$α 遺伝子型に関わらず、胎仔期の TCDD 曝露による mRNA 発現量の変化は認められなかった (Figure 5E)。さらに、TCDD 経母乳曝露によって腎臓での炎症性サイトカインの mRNA 発現量が増加することが明らかになっていた[36, 37]ため、本研究では炎症性サイトカインとして IL-1β および TNF-α の発現量の変化について検証した。IL-1β (Figure 5F) および TNF-α (Figure 5G) いずれも、TCDD 曝露 cPLA$_2$α$^{+/+}$マウスでそれぞれ約 8.6 倍および約 2.7 倍に有意に mRNA 発現量が誘導されたが、TCDD 曝露 cPLA$_2$α$^{-/-}$マウスにおいてはそれぞれ約 2.2 倍、約 1.7 倍の発現誘導に留まり有意差は認められなかった。また、TCDD 曝露 cPLA$_2$α$^{-/-}$マウスの IL-1β mRNA 発現量は TCDD 曝露 cPLA$_2$α$^{+/+}$マウスの約 0.5 倍に有意に減少しており、TCDD 曝露による IL-1β の mRNA 発現誘導は cPLA$_2$α$^{-/-}$マウスで減弱していた (Unpaired *t*-test; *p*=0.011)(Figure 5F)。

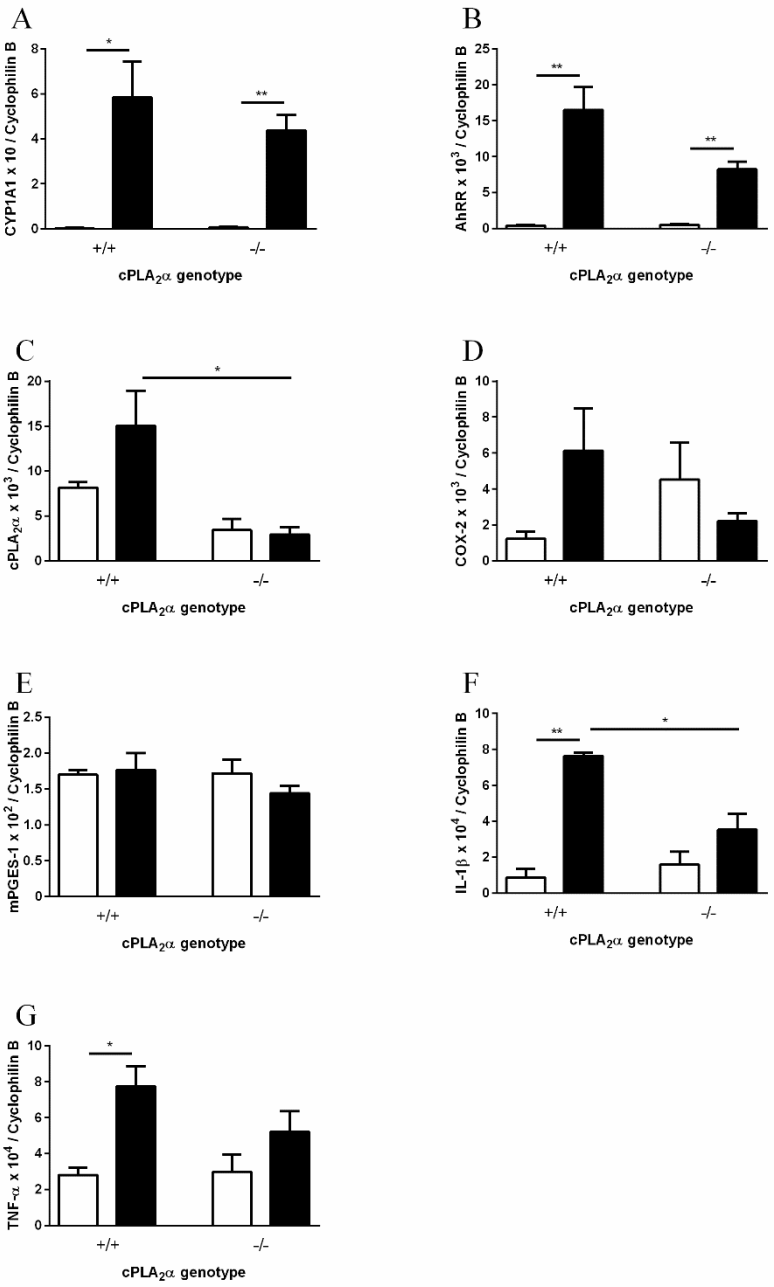

Figure 5. cPLA$_2$α ノックアウトマウス胎仔の腎臓における TCDD 曝露による mRNA 発現量の変化

TCDD を 0 または 40 μg/kg b.w.の用量で GD 12.5 の cPLA$_2$α$^{+/-}$母マウスに経口投与し、GD 18.5 で採取した胎仔腎での CYP1A1 (A)、AhRR (B)、cPLA$_2$α (C)、COX-2 (D)、mPGES-1 (E)、IL-1β (F)、TNF-α (G) の mRNA 発現量 (means ± SEM, n=3)。*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, 同遺伝子型間もしくは TCDD 曝露群同士で比較した際に有意差あり (Unpaired *t*-test)。白色バー；対照群、黒色バー；TCDD 曝露群。

3.1.2. 経母乳曝露による TCDD 毒性

$cPLA_2\alpha^{+/-}$の雌雄マウスを交配し、PND 1 の母マウスに TCDD を 20 μg/kg b.w. の用量で単回経口投与した。PND 7 もしくは 14 で仔の腎臓での mRNA 発現量、尿中 PGE_2 濃度、および水腎症の発症率と重症度を検討した。

3.1.2.1. 授乳期水腎症発症率・重症度

先行研究[36, 37]により、COX-2 や mPGES-1 といった PGE_2 合成経路に関わる酵素が授乳期水腎症の発症に必須であることが明らかになっていたことから、PGE_2 合成経路においてこれら酵素のさらに上流に位置する $cPLA_2\alpha$ が TCDD による授乳期水腎症の発症に関与する可能性が考えられた。PND 14 での水腎症発症率および重症度を調べたところ、TCDD 曝露した全ての $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスで水腎症が発症していたのに対し、$cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスでは雌雄共に 3 分の 1 でしか発症していなかった (Table 5)。また、重症度に関しても TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウス (雄；3.43 ± 0.30、雌；3.92 ± 0.08) で $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウス (雄；1.00 ± 0.44、雌；0.83 ± 0.54) より有意に高いという結果が得られた (Table 5)。コーンオイルのみ投与した対照群では全てのマウスにおいて水腎症の発症が認められなかった (Table 5)。

Table 5. cPLA$_2$α ノックアウトマウスにおける TCDD 曝露による授乳期水腎症の発症率 [a]

TCDD dose (μg/kg)	cPLA$_2$α genotype	n (fetus (dam))	Hydronephrosis						
			Severity						Incidence
			0	1	2	3	4	Average	(%)
Male									
20	+/+	8 (7)	0	0	1	2	5	3.43 ± 0.30	100
	-/-	8 (7)	4	1	2	1	0	1.00 ± 0.44*	35.7 ± 18.0*
0	+/+	5 (5)	3	2	0	0	0	0.25 ± 0.25	0
	-/-	5 (5)	4	1	0	0	0	0.20 ± 0.20	0
Female									
20	+/+	9 (6)	0	0	1	0	8	3.92 ± 0.08	100
	-/-	8 (6)	6	0	1	1	0	0.83 ± 0.54*	33.3 ± 21.1
0	+/+	6 (5)	4	2	0	0	0	0.30 ± 0.20	0
	-/-	5 (4)	4	1	0	0	0	0.11 ± 0.11	0

a: TCDD を 0 または 20 μg/kg b.w.の用量で PND 1 の cPLA$_2$α$^{+/-}$母マウスに経口投与したときの、PND 14 における仔の水腎症の発症率および重症度。同腹の同性、同遺伝子型の仔について、腹内で平均した値をさらに腹間で平均した (means ± SEM)。

*: TCDD 曝露した同性の cPLA$_2$α$^{+/+}$マウスと比較した際に有意差あり (Mann-Whitney U-test、$p < 0.05$)。

3.1.2.2. TCDD を経母乳曝露したマウスの腎臓における mRNA 発現量および尿中 PGE_2 濃度

経母乳による TCDD 曝露マウスの腎臓の場合、CYP1A1、AhRR、$cPLA_2\alpha$、COX-2、mPGES-1 などの遺伝子は PND 7 で最も顕著に TCDD によって mRNA 発現が誘導されることが既に報告されていたことから[36]、同様の曝露条件で PND 1 から PND 7 まで TCDD に曝露された仔マウスの腎臓でのこれら遺伝子の発現量を測定した。まず、CYP1A1 や AhRR といった AhR 転写活性化マーカー遺伝子は、$cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスおよび $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスのいずれでも TCDD 曝露により有意に発現が上昇していた (Figure 6A, B)。また、TCDD 経母乳曝露による水腎症の発症には PGE_2 合成経路が密接に関わっていることが明らかになっていたため[36, 37]、$cPLA_2\alpha$、COX-2、mPGES-1 の 3 遺伝子の mRNA 発現量を測定した。$cPLA_2\alpha$ mRNA 発現量は TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスでは対照群に比べ約 2.4 倍有意に発現誘導されたが、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスでは有意な発現誘導は認められなかった (Figure 6C)。COX-2 および mPGES-1 mRNA 発現量は TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスでは対照群のそれぞれ約 5.1 倍および約 2.4 倍、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスでそれぞれ約 1.54 倍および約 1.3 倍の発現誘導が認められたが、いずれの遺伝子の mRNA 発現量も TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスの方が TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスより有意に低かった (Unpaired *t*-test; $p<0.0005$)(Figure 6D, E)。

これら PGE_2 合成経路に関与する遺伝子群の発現誘導の結果を受け、尿中 PGE_2 濃度を測定したところ、mRNA 発現量の結果にたがわず、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$ マウスでは尿中 PGE_2 濃度が対照群より約 8.7 倍上昇したのに対し、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスでは約 2.5 倍の上昇に留まり、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスの尿中 PGE_2 濃度は TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスのそれよりも有意に低かった (Unpaired *t*-test; $p<0.0005$)(Figure 6F)。

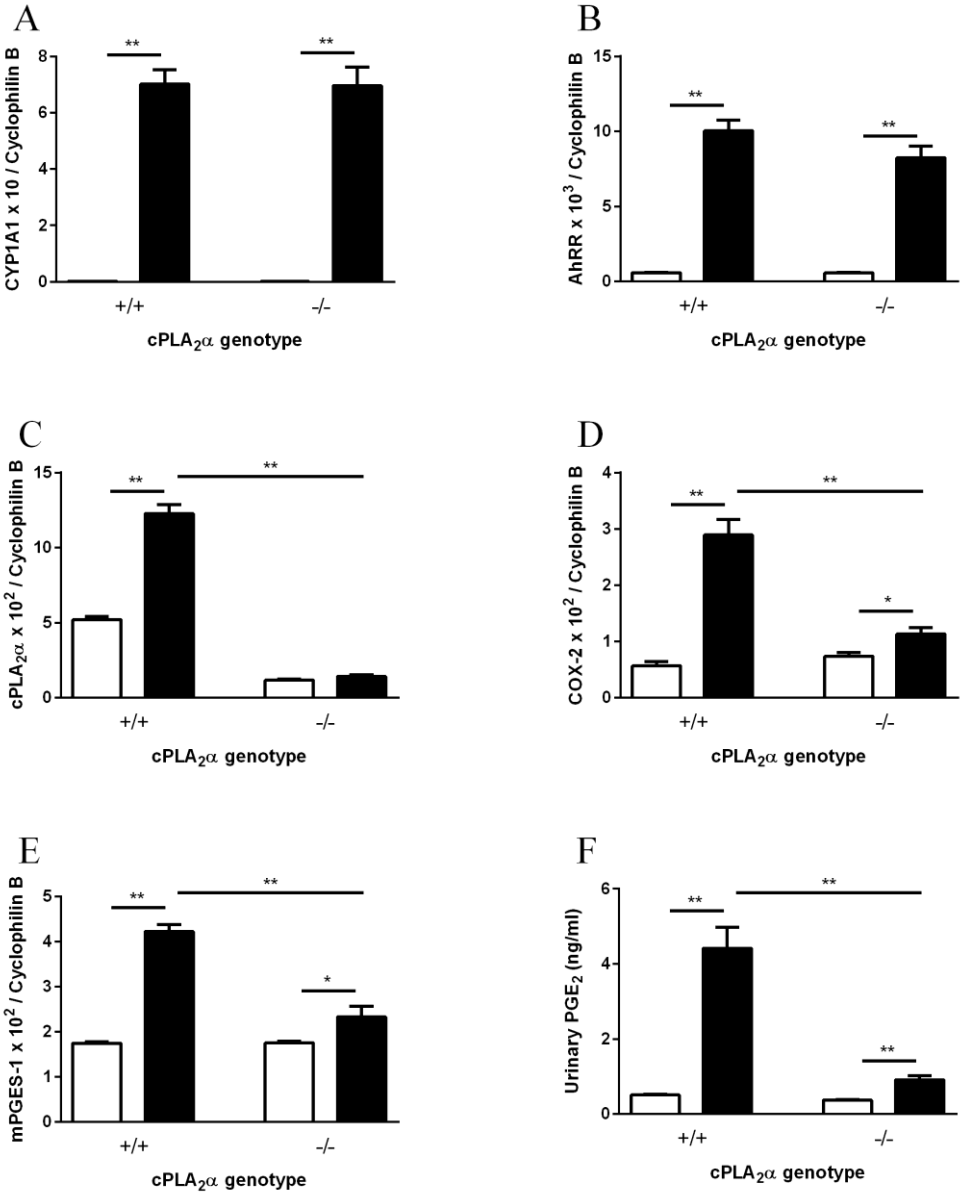

Figure 6. cPLA$_2$α ノックアウトマウスにおける mRNA 発現量および尿中 PGE$_2$ 濃度の TCDD 経母乳曝露による変化

TCDD を 0 または 20 µg/kg b.w.の用量で PND 1 の cPLA$_2$α$^{+/-}$母マウスに経口投与し、PND 7 で採取した仔の腎臓での CYP1A1 (A)、AhRR (B)、cPLA$_2$α (C)、COX-2 (D)、mPGES-1 (E) の mRNA 発現量と尿中の PGE$_2$ 濃度 (F)(means ± SEM, n=4−6)。 *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, 同遺伝子型間もしくは TCDD 曝露群同士で比較した際に有意差あり (Unpaired *t*-test)。白色バー ; 対照群、黒色バー ; TCDD 曝露群。

3.1.3. 成獣期曝露による TCDD 毒性

$cPLA_2\alpha^{+/+}$もしくは $cPLA_2\alpha^{-/-}$の 10−12 週齢の雄に TCDD を 50 μg/kg b.w.の用量で腹腔内投与し、8 ないし 10 日後に肝毒性および胸腺萎縮を検討した。

3.1.3.1. 体重・臓器重量

体重減少、肝肥大、胸腺萎縮はどれも高用量 TCDD の成獣期曝露で認められる代表的な TCDD 毒性である [73, 74]。成獣マウスに TCDD を 50 μg/kg b.w の用量で投与したところ、$cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスでのみ投与後 2 日目から 8 日目まで、投与 0 日目に比べて有意に体重が減少していた (Repeated measures ANOVA; $p<0.05$) が、$cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスでは体重減少は観察されなかった (Figure 7A)。一方で、TCDD 投与後 8 日目 (Figure 7B, C)、10 日目 (Figure 7D, E) の 2 時点において、いずれの $cPLA_2\alpha$ 遺伝子型においても肝重量/体重は TCDD 曝露群で対照群より有意に増加し、胸腺重量/体重は有意に減少していた。

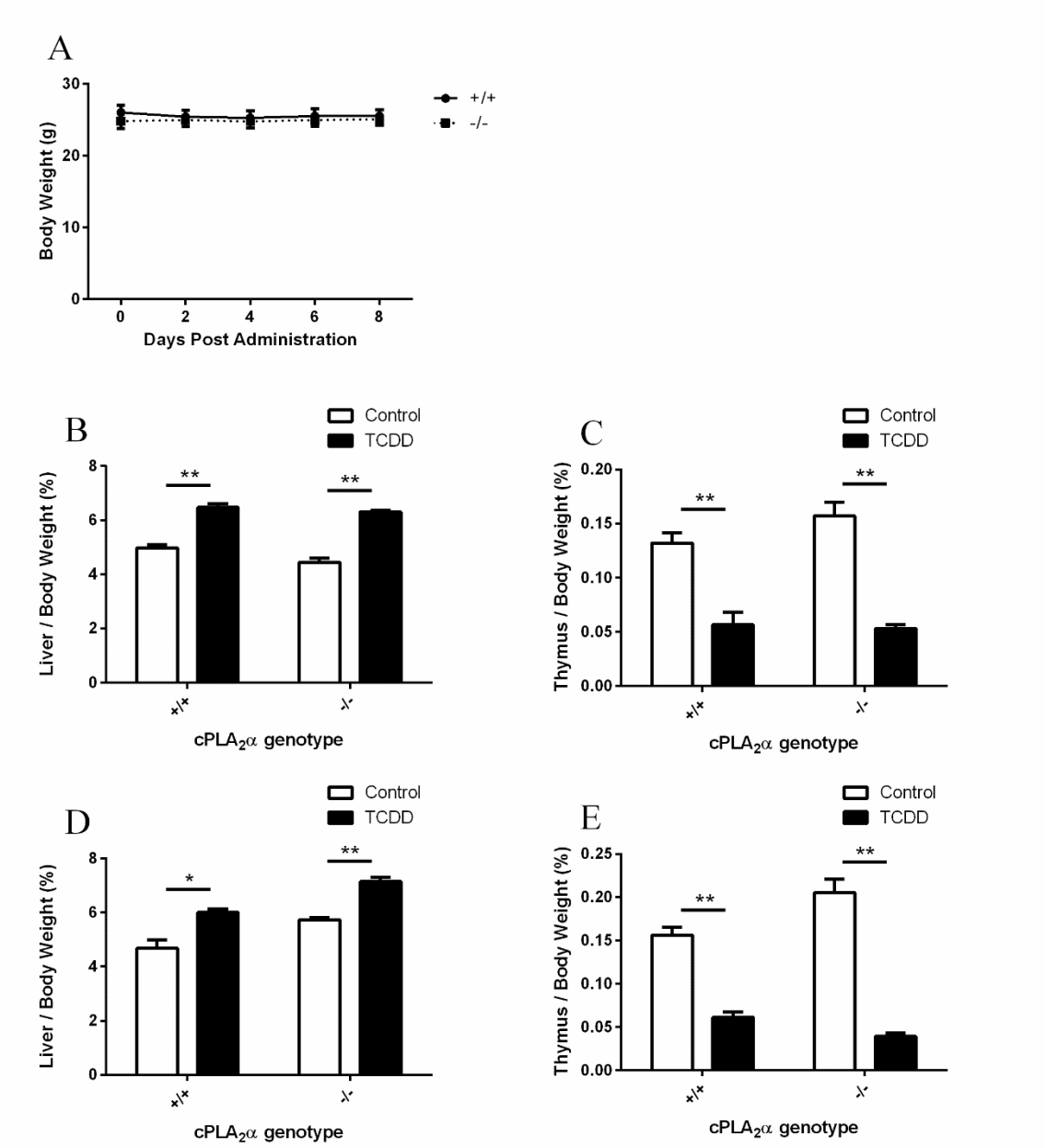

Figure 7. cPLA₂α ノックアウトマウスにおける体重および臓器重量の TCDD 成獣期曝露による変化

TCDD を 0 または 50 µg/kg b.w.の用量で成獣雄マウスに腹腔内投与した日を 0 日目とし、隔日で体重を測定した (A)。TCDD 投与 8 日目 (B, C) または 10 日目 (D, E) に肝臓 (B, D) および胸腺 (C, E) の重量を測定し、体重で除した (means ± SEM, A; n=4−5, B−E; n=3−4)。A は 2 回の異なる実験で再現性を確認した。**; $p < 0.01$, 同遺伝子型間で比較した際に有意差あり (Unpaired *t*-test)。白色バー；対照群、黒色バー；TCDD 曝露群。

3.1.3.2. 肝毒性

$cPLA_2\alpha$ の遺伝子型に関わらず、成獣マウスへの TCDD 曝露により投与後 6 日目から 8 日目まで ALT 値は有意に上昇しており (Repeated measures ANOVA; $p<0.05$)、各時点での ALT 値に遺伝子型間での有意な差は認められなかった (Figure 8A)。また、TCDD による肝毒性として既報の脂肪肝 [74] について、オイル・レッド O 染色を用いて肝臓の中性脂肪を染色して検証した (Figure 8B, C, D, E) ところ、TCDD に曝露された $cPLA_2\alpha^{+/+}$ および $cPLA_2\alpha^{-/-}$成獣マウスの肝臓では中性脂肪の増加、空胞化、および炎症性細胞の集積が認められた (Figure 8B, C)。以上の肝毒性は ALT 値上昇の結果と同様に、$cPLA_2\alpha$ の遺伝子型に関わらず TCDD 曝露群の全ての個体で観察された。

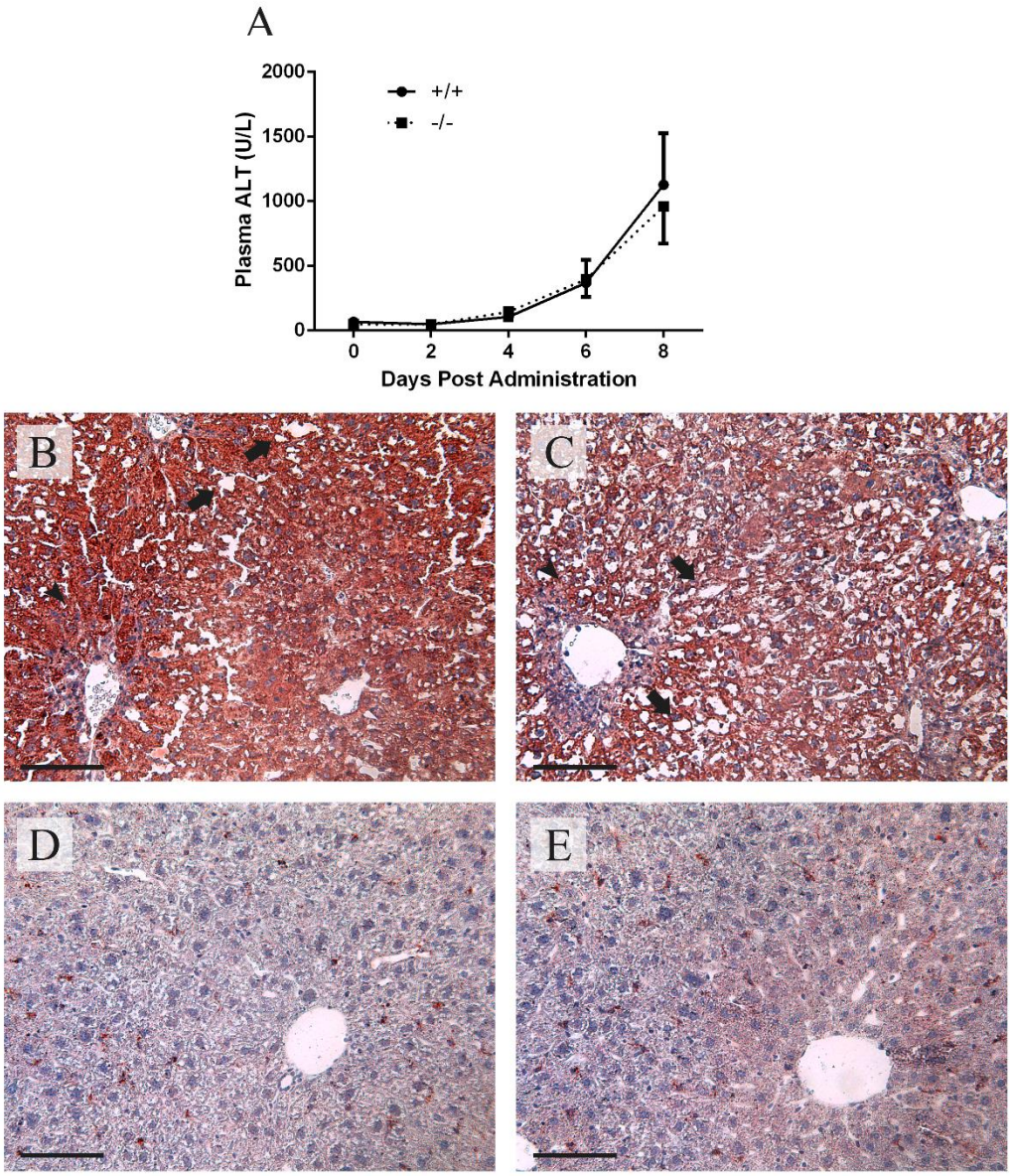

Figure 8. TCDD 成獣期曝露した cPLA$_2$α ノックアウトマウスにおける ALT 値および肝臓の組織像

成獣雄マウスに TCDD を 0 または 50 µg/kg b.w.の用量で腹腔内投与した日を 0 日目とし、隔日で 8 日目まで尾静脈から採血した血漿中 ALT 値を測定した(A)(means ± SEM, n=4−5)。TCDD 投与 8 日目に採取した肝臓をオイル・レッド O 染色した。2 回の異なる実験で再現性を確認した。(B) 50 µg/kg b.w.の用量の TCDD を投与した cPLA$_2$α$^{+/+}$マウス、(C) 50 µg/kg b.w.の用量の TCDD を投与した cPLA$_2$α$^{-/-}$マウス、(D) コーンオイルを投与した cPLA$_2$α$^{+/+}$マウス、(E) コーンオイルを投与した cPLA$_2$α$^{-/-}$マウス。矢印；空胞変性、矢頭；炎症性細胞の集積。Bar = 100 µm

3.1.3.3. 成獣期肝での mRNA 発現量

TCDD 投与 10 日後の肝臓における CYP1A1、$cPLA_2\alpha$、COX-2、および mPGES-1 の mRNA 発現量を測定した。CYP1A1 の mRNA 発現量は $cPLA_2\alpha$ の遺伝子型に関わらず TCDD 曝露により有意に上昇した (Figure 9A)。$cPLA_2\alpha$ の mRNA 発現量は TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスでは対照群の約 3.4 倍誘導された。Unpaired *t*-test では曝露群と対照群の間で有意差は認められなかった (p=0.060) が、数値のばらつきが大きいためノンパラメトリック検定したところ、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスで有意な $cPLA_2\alpha$ mRNA 発現誘導が認められた (Mann-Whitney U-test; p<0.05)(Figure 9B)。$cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスでは曝露による $cPLA_2\alpha$ mRNA 発現量の差は認められなかったが、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスの方が TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスより低い傾向が認められた (Unpaired *t*-test; p=0.055)(Figure 9B)。一方、COX-2 の mRNA 発現量は、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスでのみ対照群の約 5.4 倍、有意な発現誘導が認められ (Unpaired *t*-test; p<0.01)、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスでは対照群の約 2.9 倍の上昇傾向に留まり、有意差は認められなかった (Unpaired *t*-test; p=0.174)(Figure 9C)。また CYP1A1 同様、mPGES-1 の mRNA 発現量は $cPLA_2\alpha$ の遺伝子型に関わらず TCDD 曝露により対照群の約 4.2 倍 ($cPLA_2\alpha^{+/+}$) から 4.6 倍 ($cPLA_2\alpha^{-/-}$) 有意に上昇した (Figure 9D)。

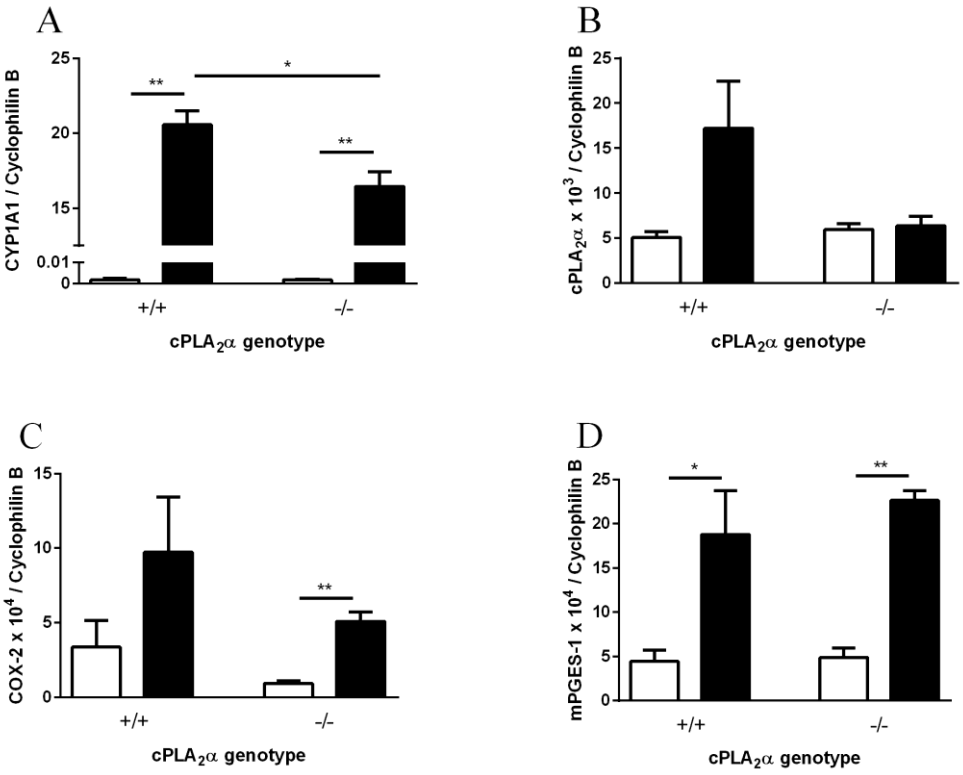

Figure 9. cPLA$_2$α ノックアウトマウスにおける mRNA 発現量の TCDD 成獣期曝露による変化

TCDD を 0 または 50 µg/kg b.w.の用量で成獣雄マウスに腹腔内投与した日を 0 日目とし、投与 10 日目に採取した肝臓での CYP1A1 (A)、cPLA$_2$α (B)、COX-2 (C)、mPGES-1 (D) の mRNA 発現量 (means ± SEM, n=4−5)。*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, 同遺伝子型間もしくは TCDD 曝露群同士で比較した際に有意差あり (Unpaired *t*-test)。白色バー；対照群、黒色バー；TCDD 曝露群。

3.2. 授乳期水腎症の発症における AhR 核移行機能の役割について

cPLA$_2$α ノックアウトマウスを用いて検討した胎生致死・口蓋裂・水腎症・体重減少・肝障害・胸腺萎縮といった TCDD 毒性は、いずれも AhR を介して発症することが明らかになっている[14-16, 66]。また私のこの研究において、これら多様な TCDD 毒性の中でも胎生致死、体重減少、および授乳期水腎症の発症には cPLA$_2$α の有無が影響することを明らかにした。そこで AhR が活性化されてからどのようにして cPLA$_2$α が媒介する毒性発現経路が活性化されるのかを探るために、前項 (3.1.) で発症へのプロスタノイド合成経路の関与が最も明快であった授乳期水腎症をエンドポイントに設定して検証した。

近年、cPLA$_2$α を含むプロスタノイド合成経路は XRE や Arnt を阻害しても TCDD 曝露により活性化することが様々な種類の細胞で報告された[22, 25, 26, 39, 75]。このような XRE や Arnt を介さないプロスタノイド合成経路の活性化は、核外に局在する AhR が Ca シグナルを介して引き起こす反応であると考えられていた[22, 23, 26]。一方で、最近になって報告された、TCDD が Src や NF-κB を介してプロスタノイド合成経路を活性化する経路は、AhR の核移行を要することに私は着目した[23, 25, 49, 53]。プロスタノイド合成経路の活性化機序として、これまで定説となってきた Ca シグナルを介する経路と、前述の Src や NF-κB を介する経路を検討するにあたり、相違点として AhR の核移行を伴うか否かという点が挙げられ

たため、私のこの研究では、TCDD 曝露によるプロスタノイド合成経路の活性化および授乳期水腎症の発症に AhR の核移行が関与するか、AhR の核移行機能を欠損している $AhR^{nls/nls}$ マウスを用いて検証した。

3.2.1. 授乳期水腎症発症率・重症度

以降 (3.2.) で用いたマウスは全て AhR が d 型のマウスである。d 型の AhR は、通常 C57BL/6 マウスが保有する b1 型 AhR の約 10 分の 1 のリガンド結合能の低感受性型 AhR である [41, 42]。ここまでの実験 (3.1.) で用いた $cPLA_2\alpha$ ノックアウトマウスの AhR は $AhR^{b1/b1}$ であったのに対し、以降 (3.2.) で用いる AhR 遺伝子変異マウスの AhR は低感受性型の $AhR^{d/d}$ であり、しかも片方の遺伝子を欠損させたヘテロマウス ($AhR^{d/-}$) であることから、水腎症発症に要する TCDD 用量は $cPLA_2\alpha$ ノックアウトマウスを用いた実験 (3.1.2.1) で投与した、20 μg/kg b.w.以上になることが予想された。そこでまず、150、300、600 μg/kg b.w.の 3 つの異なる TCDD 投与量における水腎症発症率を検討した。$cPLA_2\alpha$ ノックアウトマウスを使用した実験と同様に、PND 1 で母マウスに TCDD を単回経口投与し仔に経母乳曝露し、PND 14 での水腎症発症率・重症度について検証した。TCDD を 150 μg/kg b.w.の用量で母マウスに経口投与した場合、PND 14 の雄の仔マウスでは全く水腎症が発症せず、雌の仔マウスでも 30%ほどの発症率であった。TCDD を

600 μg/kg b.w.の用量で PND 1 で投与した場合、すべての $AhR^{d/-}$マウスにおいて重症度 4 の水腎症が発症していた。しかし、PND 14 までに死に至る個体も多く、実験の実施が困難であると考えた。そこで約半数の TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスで水腎症が発症した、300 μg/kg b.w.の用量の TCDD を母マウスに経口投与する条件にて実験を行った。

次に AhR 欠損マウスで水腎症が発症しないことを確認し、一方、$AhR^{d/-}$マウスで発症することを確認するために、雌雄の $AhR^{d/-}$マウスを掛け合わせた仔の $AhR^{d/d}$、$AhR^{d/-}$、$AhR^{-/-}$マウスについてそれぞれの水腎症発症率を求めた。TCDD を経母乳曝露した $AhR^{d/d}$ マウスではほぼ全ての仔 (雄 ; 100%、雌 ; 97%) で水腎症の発症が認められたが、$AhR^{-/-}$マウスではほとんどの仔で発症せず (雄 ; 14.3%、雌 ; 12.5%)、また $AhR^{d/-}$マウスでは雌雄共に 60%前後の発症率であった (Table 6)。雌の $AhR^{d/d}$ マウス以外の対照群では 5%以下の発症率であり、対照群の中で最も発症率の高かった雌の $AhR^{d/d}$ マウスでも 16.7%の発症率であった (Table 6)。また、雄では TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスの平均水腎症重症度 (1.99 ± 0.33) が $AhR^{d/d}$ マウス (3.44 ± 0.29) よりも有意に低く、$AhR^{-/-}$マウス (0.57 ± 0.43) よりも有意に高かった。一方雌では、TCDD 曝露した $AhR^{d/-}$マウスの重症度 (1.68 ± 0.41) は $AhR^{d/d}$ マウス (3.42 ± 0.27) よりも有意に低かったが、$AhR^{-/-}$マウス (0.94 ± 0.20) との間に有意な差は認められなかった (Table 6)。

Table 6. AhR ノックアウトマウスにおける TCDD 経母乳曝露による水腎症の発症率および重症度 [a]

TCDD dose (μg/kg)	AhR genotype	n (pup (dam))	Hydronephrosis						
			Severity						Incidence (%)
			0	1	2	3	4	Average	
Male									
	d/d	12 (9)	0	0	2	1	9	3.44 ± 0.29**	100**
300	d/-	45 (18)	11	5	9	5	15	1.99 ± 0.33	61.6 ± 9.7
	-/-	7 (7)	5	1	0	1	0	0.57 ± 0.43*	14.3 ± 14.3*
	d/d	13 (8)	7	5	1	0	0	0.44 ± 0.15	4.2 ± 4.2
0	d/-	18 (11)	15	2	1	0	0	0.14 ± 0.10	3.0 ± 3.0
	-/-	14 (10)	7	6	1	0	0	0.52 ± 0.18	5.0 ± 5.0
Female									
	d/d	18 (11)	1	0	3	3	11	3.42 ± 0.27**	97.0 ± 3.0**
300	d/-	24 (14)	11	1	7	2	3	1.68 ± 0.41	58.3 ± 12.7
	-/-	9 (8)	2	6	1	0	0	0.94 ± 0.20	12.5 ± 12.5*
	d/d	12 (9)	4	6	2	0	0	0.83 ± 0.24	16.7 ± 11.8
0	d/-	23 (13)	15	7	1	0	0	0.35 ± 0.11	2.6 ± 2.6
	-/-	7 (5)	4	3	0	0	0	0.47 ± 0.23	0

a: TCDD を 0 または 300 μg/kg b.w.の用量で PND 1 の $AhR^{d/-}$母マウスに経口投与したときの、PND 14 における仔の水腎症の発症率および重症度。同腹の同性、同遺伝子型の仔について、腹内で平均した値をさらに腹間で平均した (means ± SEM)。

*: TCDD 曝露した同性の $AhR^{d/-}$マウスと比較した際に有意差あり (Mann-Whitney U-test、$p < 0.05$)。

**: TCDD 曝露した同性の $AhR^{d/-}$マウスと比較した際に有意差あり (Mann-Whitney U-test、$p < 0.01$)。

同じ曝露条件の実験を雄の $AhR^{nls/-}$マウスと雌の $AhR^{nls/d}$ マウスを掛け合わせた、$AhR^{d/-}$および $AhR^{nls/nls}$ の仔で行ったところ、雌雄共に半数の TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$ マウス (雌雄共に 50.0%) で水腎症の発症が認められたが、$AhR^{nls/nls}$ マウスでは全く発症しなかった (Table 7)。TCDD 非曝露群では、雄の $AhR^{nls/nls}$ マウス 1 匹でのみ水腎症が認められたが、それ以外の非曝露マウスでは発症しなかった。また、雌の TCDD 曝露群では、水腎症重症度の平均値は $AhR^{d/-}$マウス (1.78 ± 0.45) において $AhR^{nls/nls}$ マウス (0.35 ± 0.15) よりも有意に高かった。雄では TCDD 曝露した $AhR^{d/-}$マウス (1.72 ± 0.53) と $AhR^{nls/nls}$ マウス (0.30 ± 0.20) の間で有意な差は認められなかったものの、雌とほぼ同程度の平均重症度を示した (Table 7)。この結果から、授乳期水腎症の発症には AhR の核移行を要することが考えられた。

Table 7. AhR$^{nls/nls}$ マウスにおける TCDD 経母乳曝露による水腎症の発症率および重症度 [a]

TCDD dose (μg/kg)	AhR genotype	n (pup (dam))	Hydronephrosis						
			Severity						Incidence
			0	1	2	3	4	Average	(%)
Male									
300	d/-	10 (9)	3	2	2	0	3	1.72 ± 0.53	50.0 ± 16.7
	nls/nls	6 (5)	4	2	0	0	0	0.30 ± 0.20	0
0	d/-	12 (9)	10	2	0	0	0	0.22 ± 0.15	0
	nls/nls	8 (6)	4	3	1	0	0	0.67 ± 0.21	8.3 ± 8.3
Female									
300	d/-	15 (10)	4	4	4	1	2	1.78 ± 0.45	50.0 ± 14.9
	nls/nls	12 (10)	8	4	0	0	0	0.35 ± 0.15*	0*
0	d/-	12 (9)	8	4	0	0	0	0.28 ± 0.12	0
	nls/nls	11 (8)	8	3	0	0	0	0.15 ± 0.10	0

a: TCDD を 0 または 300 μg/kg b.w.の用量で PND 1 の AhR$^{nls/d}$ 母マウスに経口投与したときの、PND 14 における仔の水腎症の発症率および重症度。同腹の同性、同遺伝子型の仔について、腹内で平均した値をさらに腹間で平均した (means ± SEM)。

*: TCDD 曝露した同性の AhR$^{d/-}$ マウスと比較した際に有意差あり (Mann-Whitney U-test、$p < 0.05$)。

3.2.2. TCDD 経母乳曝露マウスの腎臓での mRNA 発現量および尿中 PGE_2 濃度

以上、3.1.2 および 3.2.1 までで、TCDD による授乳期水腎症の発症に PGE_2 合成経路が関与すること、ならびに AhR の核移行が関与することを明らかにした。そこで次に、AhR の核移行から PGE_2 合成経路の活性化までをつなぐために、AhR の核移行機能を欠損させることによる PGE_2 合成経路への影響を調べた。CYP1A1 および AhRR の mRNA 発現量はいずれも TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスでは有意に発現誘導されていたが、TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$ マウスでは全く誘導されなかった (Figure 10A, B)。さらに、TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$ マウスの CYP1A1 および AhRR の mRNA 発現量はいずれも、TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスよりも有意に低かったことから、$AhR^{nls/nls}$ マウスにおいて AhR の XRE を介した転写活性化機能が欠如していることを確認できた。$cPLA_2\alpha$ の mRNA 発現量も同様に、TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスで対照群に比べ約 1.5 倍程度の有意な mRNA 発現増加が認められたが、TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$ マウスでは発現誘導が認められなかった (Figure 10C)。TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$ マウスの $cPLA_2\alpha$ mRNA 発現量は TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスの約 0.7 倍に有意に減少しており、TCDD 曝露による $cPLA_2\alpha$ の mRNA 発現誘導は $AhR^{nls/nls}$ マウスで消失していた (Unpaired *t*-test; $p<0.01$)(Figure 10C)。また、COX-2 も TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスでのみ対照群に比べ約 1.9 倍程度の有意な発

現誘導がみられたが、TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$ マウスでは有意な発現誘導は認められなかった (Figure 10D)。COX-2 mRNA 発現量は TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$ マウスの方が TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$ マウスより低い傾向があった (Unpaired *t*-test; p=0.054)(Figure 10C)。一方で、mPGES-1 は AhR の遺伝子型に関わらず TCDD 曝露による mRNA 発現誘導は無く (Figure 10E)、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスでのみ対照群の約 2.4 倍程度の発現誘導が認められた $cPLA_2\alpha$ ノックアウトマウスの実験とは異なる結果が得られた (Figure 6E)。このように、PGE_2 合成酵素である mPGES-1 の mRNA 発現量はいずれの AhR 遺伝子型マウスの腎臓でも TCDD 曝露によって変化しなかったが、尿中の PGE_2 濃度は TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスで対照群の約 4.0 倍程度有意に上昇し、一方で $AhR^{nls/nls}$ マウスでは有意な変化が認められなかった (Figure 10F)。また、TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$ マウスの尿中 PGE_2 濃度は TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスの約 0.4 倍に有意に減少しており、TCDD 曝露による PGE_2 合成の促進は $AhR^{nls/nls}$ マウスで消失していた (Unpaired *t*-test; p<0.005)(Figure 10F)。$cPLA_2\alpha$、COX-2 の mRNA 発現量および尿中 PGE_2 濃度が $AhR^{d/-}$マウスでは TCDD 曝露により上昇したのに対し、$AhR^{nls/nls}$ マウスでは有意な変化がなかった (Figure 10C, D, F) ことから、AhR の核移行機能が欠損することで、$cPLA_2\alpha$ を欠損させた場合と同様、TCDD 曝露されても PGE_2 合成が亢進しなくなることが示唆された。

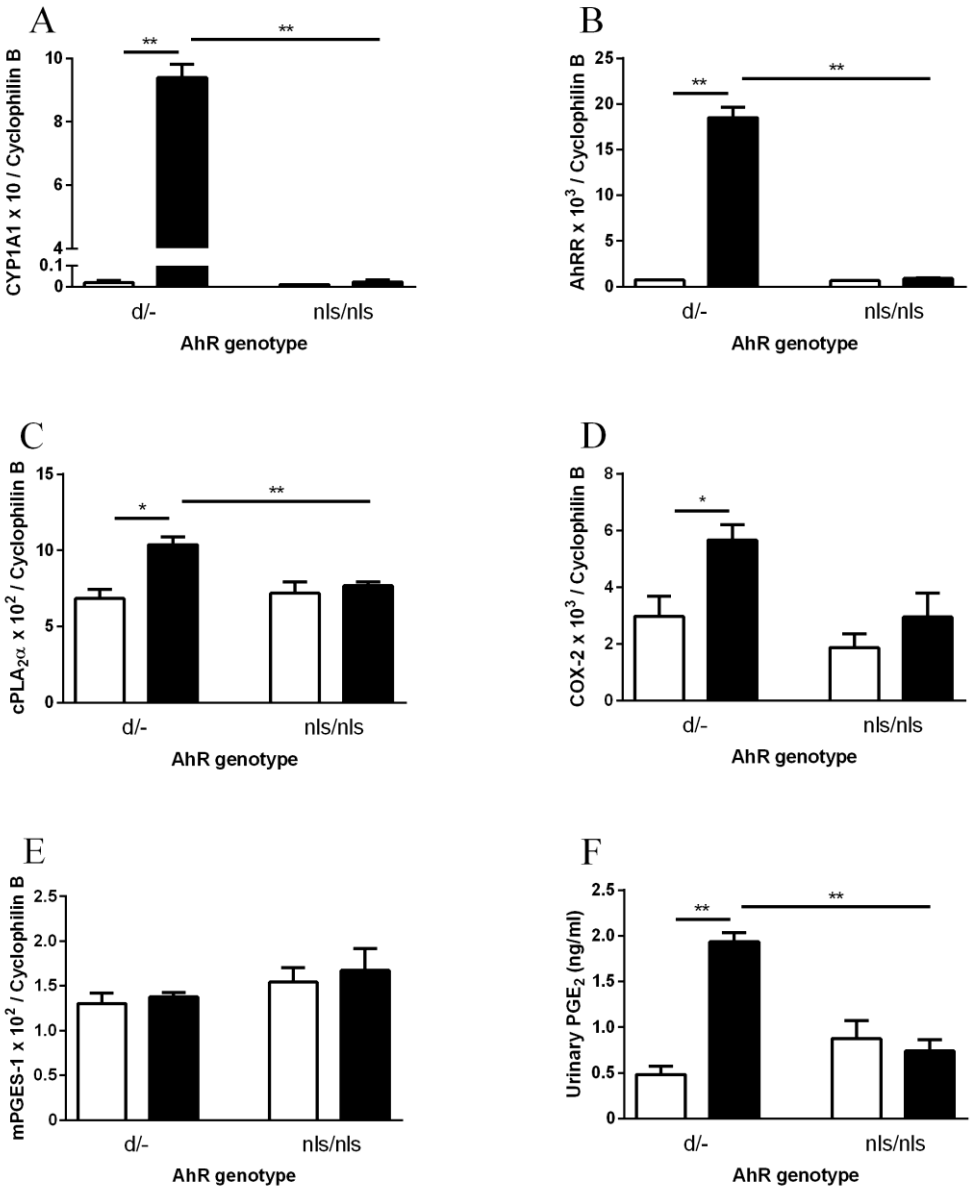

Figure 10. AhR$^{nls/nls}$ マウスにおける mRNA 発現量および尿中 PGE$_2$ 濃度の TCDD 経母乳曝露による変化

TCDD を 0 または 300 µg/kg b.w.の用量で PND 1 の AhR$^{nls/d}$ 母マウスに経口投与し、PND 7 で採取した仔の腎臓での CYP1A1 (A)、AhRR (B)、cPLA$_2$α (C)、COX-2 (D)、mPGES-1 (E) の mRNA 発現量と尿中の PGE$_2$ 濃度 (F)。同腹の同性、同遺伝子型の仔について、腹内で平均した値をさらに腹間で平均した (means ± SEM, n=3)。*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, 同遺伝子型間もしくは TCDD 曝露群同士で比較した際に有意差あり (Unpaired *t*-test)。白色バー；対照群、黒色バー；TCDD 曝露群。

3.2.3. TCDD 経母乳曝露マウスの腎臓での炎症性サイトカイン mRNA 発現量

上記 (3.2.2.) において、TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスでみられた $cPLA_2\alpha$ および COX-2 の mRNA 発現誘導や PGE_2 産生の上昇が $AhR^{nls/nls}$ マウスでは認められなかった原因を探るために、IL-1β および TNF-α の mRNA 発現量を測定した。先行研究 [76] によると、IL-1β および TNF-α はいずれも COX-2 や $cPLA_2\alpha$ の mRNA 発現を誘導し、PGE_2 産生を上昇させる。本研究の結果では、TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$ マウスでは対照群に比べて IL-1β は 3.3 倍 (Figure 11A)、TNF-α は 3.0 倍 (Figure 11B) の有意な mRNA 発現誘導が認められた。他方、AhR の核移行機能が欠損している $AhR^{nls/nls}$ マウスでは、いずれの 2 遺伝子の mRNA 発現量も TCDD 曝露群と対照群で差は認められず、TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$ マウスの方が TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスより有意に低かった (Figure 11A, B)。

さらに、C57BL/6 マウスの腎臓において TCDD 曝露による mRNA の発現誘導が報告されている [77]、KC および MCP-1 の mRNA 発現量を測定した。その結果、TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスでは対照群に比べて KC は 1.7 倍 (Figure 11C)、MCP-1 は 7.5 倍 (Figure 11D) 程、有意な mRNA の発現誘導が認められた。一方 $AhR^{nls/nls}$ マウスでは、KC の mRNA 発現量は TCDD 曝露群と対照群で差が認められなかった (Figure 11C)。MCP-1 の mRNA 発現量は、TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$ マウスで発現増加する傾向が認められた (Unpaired *t*-test; p=0.090) が、TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$

マウスの方が TCDD 曝露 AhR$^{d/-}$マウスより有意に mRNA 発現量が低かった (Figure 11D)。

また、このようにマクロファージの遊走を誘導する MCP-1 の mRNA 発現量が TCDD 曝露により有意に上昇していたことに加え、先行研究[77,78]において TCDD 曝露による mRNA 発現誘導が報告されていたことから、マクロファージおよび単球マーカーである F4/80[79] の mRNA 発現量を測定した。MCP-1 の mRNA 発現量の結果に沿い、F4/80 も TCDD 曝露 AhR$^{d/-}$マウスで約 2.9 倍有意に mRNA 発現誘導されていたのに対し、TCDD 曝露 AhR$^{nls/nls}$ マウスでは発現量の変化が認められなかった (Figure 11E)。また、TCDD 曝露 AhR$^{nls/nls}$ マウスの F4/80 mRNA 発現量は TCDD 曝露 AhR$^{d/-}$マウスより有意に減少しており、TCDD 曝露による F4/80 mRNA 発現誘導は AhR$^{nls/nls}$ マウスで消失していた (Figure 11E)。

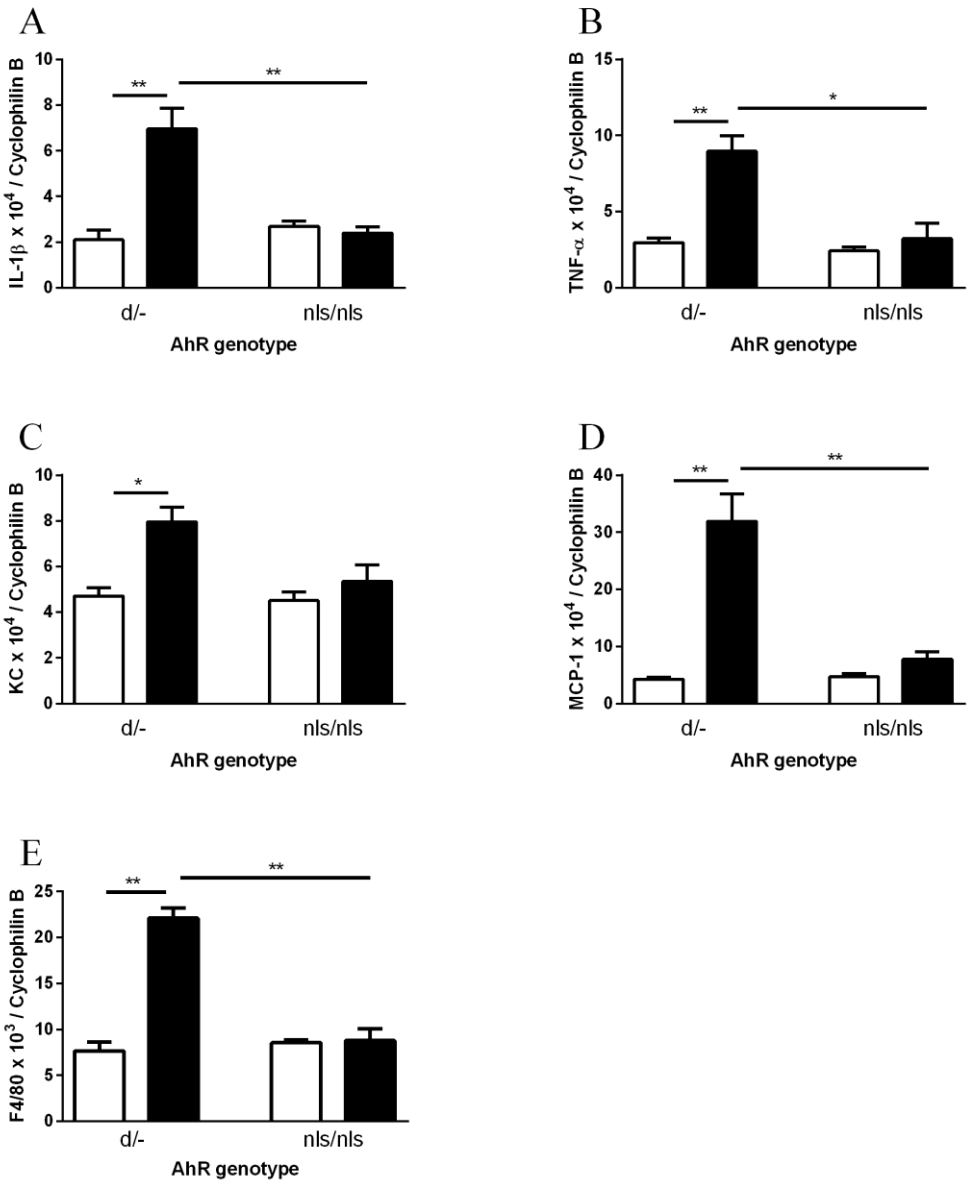

Figure 11. AhR$^{nls/nls}$ マウスにおける mRNA 発現量の TCDD 経母乳曝露による変化

TCDD を 0 または 300 μg/kg b.w.の用量で PND 1 の AhR$^{nls/d}$ 母マウスに経口投与し、PND 7 で採取した仔の腎臓での IL-1β (A)、TNF-α (B)、KC (C)、MCP-1 (D)、F4/80 (E) の mRNA 発現量。同腹の同性、同遺伝子型の仔について、腹内で平均した値をさらに腹間で平均した (means ± SEM, n=3)。*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, 同遺伝子型間もしくは TCDD 曝露群同士で比較した際に有意差あり (Unpaired *t*-test)。白色バー；対照群、黒色バー；TCDD 曝露群。

3.2.4. TCDD 経母乳曝露マウスの腎臓での Src およびその活性調節に関わる遺伝子の mRNA 発現量

次に、AhR の核移行を伴い、かつ XRE を介さないプロスタノイド合成経路の活性化機序として、Src を介する経路[25, 49, 53]を検討した。先行研究[36, 37]により、授乳期 TCDD 曝露により Src の腎臓での mRNA 発現量が誘導されることが報告されている。さらに、マウス乳腺の間質線維芽細胞を用いた実験[52]では、Src の活性制御に関与する Cbp の mRNA 発現量が AhR を介して調節されていることが明らかになった。そこで TCDD 曝露に伴う Src (Figure 12A)、ならびに Src の活性調節に関わる Csk (Figure 12B) および Cbp (Figure 12C) の mRNA 発現量を測定したところ、AhR の遺伝子型に関わらずいずれの mRNA の発現誘導も認められなかった。このとき、Csk の mRNA 発現量のみ、TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$ マウスの方が TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$ マウスより有意に低かった (Unpaired *t*-test; p=0.035)(Figure 12B)。

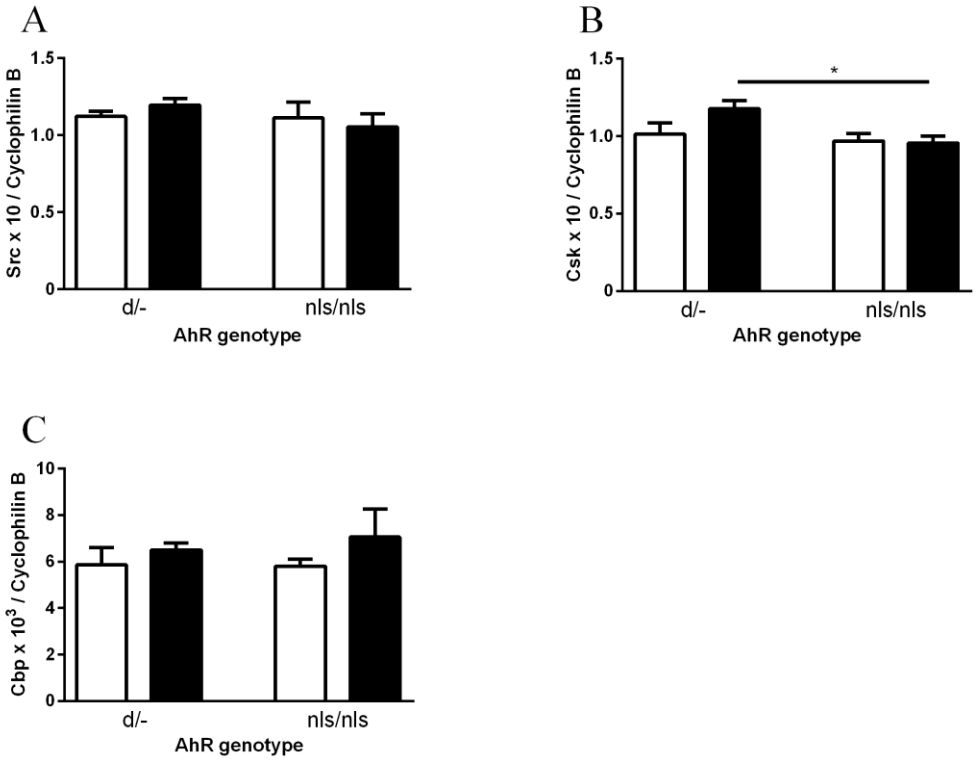

Figure 12. AhR$^{nls/nls}$ マウスにおける mRNA 発現量の TCDD 経母乳曝露による変化

TCDD を 0 または 300 μg/kg b.w.の用量で PND 1 の AhR$^{nls/d}$ 母マウスに経口投与し、PND 7 で採取した仔の腎臓での Src (A)、Csk (B)、Cbp (C)の mRNA 発現量。同腹の同性、同遺伝子型の仔について、腹内で平均した値をさらに腹間で平均した (means ± SEM, n=3)。*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, 同遺伝子型間もしくは TCDD 曝露群同士で比較した際に有意差あり (Unpaired *t*-test)。白色バー；対照群、黒色バー；TCDD 曝露群

第４章　考察

私の学位論文研究では、AhR の核移行に主眼を置き、TCDD 毒性発現機序および TCDD 曝露によるプロスタノイド合成経路の活性化機序を研究した。

4.1.　TCDD 胎仔期曝露による胎生致死には $cPLA_2\alpha$ が関与する

本研究では、胎仔期に曝露された場合の代表的な TCDD 毒性である胎生致死、口蓋裂、および水腎症の発症に $cPLA_2\alpha$ が関与するかを検証した。その結果、雄の胎生致死に $cPLA_2\alpha$ の有無が影響することが示唆された (Table 2)。他方、口蓋裂、水腎症、および胎仔期水腎症に併発する水尿管症[70, 71]の発症には $cPLA_2\alpha$ は影響を及ぼさないことが明らかになった (Table 3, 4)。

$cPLA_2\alpha$ は妊娠や分娩に重要な役割を担っており[80]、$cPLA_2\alpha$ ノックアウト母マウスにおいて分娩障害や産子数の低下等が報告されている[32, 81]。このように母マウスの $cPLA_2\alpha$ 遺伝子型により産子数に差が生じるが、本研究のように遺伝子型が同じ母マウスを用いた場合、TCDD 非曝露では仔の $cPLA_2\alpha$ 遺伝子型が生存胎仔数に影響しないことが確認された (Table 2)。

また、妊娠期の TCDD 曝露が胎生致死を引き起こすことがマウスやラットで報告されている[64-68]が、本研究の TCDD 用量・曝露時期などの実験条件では、

$cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスにおいて TCDD 曝露・非曝露間で生存胎仔数に差が認められなかった (Table 2)。ところが雄の TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスにおいては、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスに比べ有意に生存胎仔数が減少していたことから、この用量・曝露時期の TCDD 曝露の場合、TCDD 曝露および $cPLA_2\alpha$ 遺伝子欠損の両者がそろって初めて胎生致死に至る可能性が高く、どちらか一方の要因だけでは発症しにくいことが考えられる。雌の TCDD 曝露した $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスでは生存胎仔数が減少しなかったことから、性ホルモンなどの雌雄差のある因子が TCDD 曝露による胎生致死の発症に関与する可能性が考えられ、今後のさらなる研究が必要である。

4.2. TCDD 曝露時期・経路によって水腎症の発症機序が異なる

胎仔期水腎症、水尿管症、および口蓋裂は胎仔期の TCDD 曝露により多くの胎仔で発症が認められたが、$cPLA_2\alpha$ 遺伝子型間での差が見られなかった (Table 3, 4)。このことは、これらの胎仔期 TCDD 毒性が $cPLA_2\alpha$ 遺伝子の有無と関わりなく現れることを示している。一方、授乳期水腎症は $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスでのみ全ての個体で発症が認められ、$cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスではその発症率や重症度が有意に低下していた (Table 5)。すなわち、胎仔期水腎症の発症には $cPLA_2\alpha$ が関与しないのに対し、授乳期水腎症では $cPLA_2\alpha$ が主要な役割を果たしていることが明らか

になった。このことから、本研究によって TCDD の曝露時期や曝露経路によって $cPLA_2\alpha$ が水腎症の発症に関与するか否かが異なることを見出した。

このような授乳期および胎仔期水腎症の発症機序の違いはどのようにして生じたのだろうか？授乳期水腎症と胎仔期水腎症との相違点としてまず挙げられるのが、PGE_2 合成経路に関わる酵素の mRNA 発現量の挙動の違いである。胎仔期に TCDD に曝露したマウスの腎臓では、$cPLA_2\alpha$ および COX-2 の mRNA 発現量は増加傾向があったものの有意差は認められず、mPGES-1 は mRNA 発現誘導が認められなかった (Figure 5C, D, E)。これに対し授乳期に TCDD 曝露した腎臓では、$cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスで認められたこれら 3 遺伝子の曝露による有意な mRNA 発現誘導は、$cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスにおいては減弱していた (Figure 6C, D, E)。さらに、上記 3 遺伝子の中でも特に COX-2 は胎仔期と授乳期で腎臓発達に及ぼす影響が大きく異なり、COX-2 欠損マウスの腎臓が出生直後は正常であるのに対し PND 10 ごろから腎皮質の異常な菲薄化が見られるなど、授乳期で腎臓発達においてより重要な役割を果たすことが報告されている [82]。腎臓の発達段階において COX-2 の生理的役割の違いがあることが、胎仔期水腎症ではなく授乳期水腎症の発症にのみプロスタノイド合成経路が関与する要因の一つである可能性が考えられる。また、水尿管症併発の有無も、胎仔期および授乳期水腎症の発症機序の違いに関与する可能性が考えられる。これまでの研究 [36, 83] により、TCDD 曝

露による授乳期水腎症においては尿管閉塞が見られないことが報告されている。一方、本研究の結果によると、ほぼ全ての TCDD 胎仔期曝露マウスにおいて水尿管症の発症が確認された (Table 4)。さらに先行研究[70,71]でも、胎仔期の TCDD 曝露が尿管の上皮過形成による尿管内腔の閉塞を引き起こすことが報告されている。

以上のように、TCDD 経母乳曝露でのみ PGE_2 合成経路に関わる酵素の mRNA 発現が誘導されたことや、COX-2 が授乳期の腎臓の発達に重要な役割を担うこと、そして胎仔期水腎症でのみ水尿管症のような尿管の物理的な閉塞が伴うことなどが、胎仔期および授乳期の水腎症発症機序の違いを生む要因になっている可能性が考えられる。

4.3. TCDD 成獣期曝露による体重減少に $cPLA_2\alpha$ が関与する

私のこの研究において、高用量 TCDD の成獣期曝露でみられる典型的な TCDD 毒性の中でも、$cPLA_2\alpha$ 遺伝子型の違いにより毒性の発現に差が認められた表現型は、体重減少のみであった。上記の結果 (3.1.3.1.) より、$cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスでは TCDD 投与後 2 日目から体重が減少していたのに対し、$cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスでは有意な変化が認められなかった (Figure 7A)。このように TCDD 曝露による体重減少に $cPLA_2\alpha$ が関与する要因の一つとして、Src の存在が挙げられる。

Src 欠損マウスに TCDD を単回腹腔内投与しても体重は減少しない[84, 85]ことから、TCDD 曝露による体重減少の発症には Src を要することが明らかにされている。さらに、cPLA$_2$α の活性化によるアラキドン酸放出量の増加を介する Src の活性化が報告されており[26]、乳腺上皮細胞株の MCF10A 細胞を用いた先行研究[25]では、cPLA$_2$α を阻害することで TCDD 曝露による Src の活性化が消失することが明らかにされている。以上のことから cPLA$_2$α$^{-/-}$マウスでは、TCDD 曝露によるアラキドン酸放出量の増加が消失し、それに伴い Src も活性化しなかったため、cPLA$_2$α$^{-/-}$マウスでは Src 欠損マウス同様に、TCDD 曝露による体重減少が認められなかった可能性が考えられる。一方、先行研究[84, 85]で体重減少が観察されたのは、115 μg/kg b.w.という極めて高い用量の TCDD を投与したことによる可能性が考えられる。TCDD 曝露による体重減少に Src や cPLA$_2$α が関与するか否か、より詳細な検討が必要である。

4.4. TCDD 成獣期曝露による肝毒性および胸腺萎縮には cPLA$_2$α は関与しない

成獣マウスに TCDD を曝露した際に見られる肝毒性および胸腺萎縮は cPLA$_2$α$^{+/+}$および cPLA$_2$α$^{-/-}$マウスで同様に発現したことから (Figure 7, 8)、これら TCDD 毒性の発現に cPLA$_2$α が関与しないことが示唆された。TCDD 曝露による肝障害は COX-2 阻害剤である NS398 の投与により軽減されることが報告され

ている[78]ため、肝毒性の発現にプロスタノイド合成経路が関与することが考えられた。私のこの研究では、TCDD 曝露 $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスにおける COX-2 mRNA 発現誘導は有意ではなかったものの、COX-2 および mPGES-1 mRNA の発現誘導はいずれの $cPLA_2\alpha$ 遺伝子型のマウスでも認められた (Figure 9C, D)。COX-2 や mPGES-1 といった $cPLA_2\alpha$ よりも下流のプロスタノイド合成に関わる酵素が、$cPLA_2\alpha^{+/+}$および $cPLA_2\alpha^{-/-}$のいずれの遺伝子型のマウスでも TCDD 曝露により同様の挙動を示したため、発現した肝毒性にも $cPLA_2\alpha$ 遺伝子型による差が出なかったと考えられる。

また、TCDD による肝毒性は AhR ノックアウトマウスでは発症せず、AhR を介して発症することが明らかになっている[16]。Angrish らの報告[86]によると、TCDD は AhR を介し脂肪酸合成に関わる酵素の転写調節を乱し、肝臓の脂質代謝異常を引き起こすことで脂肪肝を発症させる。この報告[86]では、脂肪酸合成に関わる酵素の一つである Scd1 のプロモーター領域に、XRE を含まないながらも AhR と DNA の結合が頻繁に認められる箇所が 2 か所存在することを見出した。さらに、AhR の XRE との結合能を欠損させた[87]A78D-AhR 遺伝子変異マウスにおいて、野生型 AhR マウスと同様の脂質合成やコレステロール生合成の TCDD 曝露による異常が認められた[88,89]。以上より、TCDD による脂肪肝の発症には AhR を要するが、AhR の XRE との結合は介さないと考えられた。しかし、

AhR の DNA binding domain を遺伝子工学技術により変異させ、AhR の転写活性化機能を欠損させた $AhR^{dbd/dbd}$ マウスを用いた先行研究[45]では、TCDD に曝露した野生型 AhR マウスで認められた肝肥大、胸腺萎縮、脂肪肝のいずれも、$AhR^{dbd/dbd}$ マウスでは発症しないという結果が報告された。A78D-AhR マウス[87]もしくは $AhR^{dbd/dbd}$ マウス[45]を用いた研究で、AhR と XRE の結合は確認されているものの、XRE 以外の DNA と AhR との結合は検証されていない。上述のように AhR が XRE を介さず転写を活性化することで TCDD 毒性を引き起こす場合、A78D-AhR マウスおよび $AhR^{dbd/dbd}$ マウスで XRE を介さない AhR の転写活性化を検証することが、TCDD による肝毒性発症機序を解明する糸口になるのではないかと考える。

4.5. TCDD 経母乳曝露による水腎症の発症には AhR の核移行が必要である

上述 (4.2.) のように、TCDD 経母乳曝露による水腎症の発症率は $cPLA_2\alpha$ が欠損することで大きく低下することを本研究によって明らかにした。さらに、先行研究[36, 37]により TCDD 経母乳曝露による水腎症の発症には COX-2 および mPGES-1 が必須の役割を果たすことが示されている。以上より授乳期水腎症の発症には PGE_2 合成経路が関わっていることが明らかになったため、本研究では授乳期水腎症をエンドポイントにすえ、同じ TCDD 曝露時期・曝露経路の実験

を $AhR^{nls/nls}$ マウスを用いて行うことで、AhR の核移行がプロスタノイド合成経路の活性化および授乳期水腎症の発症に関与するか検討した。その結果、対照群の $AhR^{d/-}$マウスで 50%発症していた水腎症が $AhR^{nls/nls}$ マウスでは全く発症しなかった (Table 7)。このことから、授乳期水腎症の発症には AhR の核移行が必要であると考えられた。

4.6. TCDD 曝露による PGE_2 合成経路の活性化には AhR の核移行を要する

次に、$AhR^{nls/nls}$ マウスを用いることで AhR の核移行がプロスタノイド合成経路の活性化に関与するかを検証した (3.2.2.)。TCDD 経母乳曝露した $AhR^{nls/nls}$ マウスの腎臓においては、$cPLA_2\alpha$ (Figure 10C)、COX-2 (Figure 10D)、mPGES-1 (Figure 10E) といった PGE_2 合成関連遺伝子の有意な mRNA 発現誘導が認められず、尿中 PGE_2 濃度も TCDD 曝露によって変化が認められなかった (Figure 10F)。以上より、TCDD 曝露による PGE_2 合成経路の活性化には AhR の核移行が関与することが示唆された。しかしながら、$AhR^{nls/nls}$ マウスを使用した先行研究[22]では、AhR の核移行機能が欠損した場合でも腎臓での COX-2 の mRNA 発現量は TCDD により誘導されていた。本研究では TCDD を授乳期に経母乳曝露したのに対し、先行研究では成獣期に腹腔内投与により曝露していたことから、TCDD

の曝露経路や曝露時期の違いがこのような研究結果の違いを導いた可能性が考えられる。

4.7. TCDD 曝露による AhR の活性化からプロスタノイド合成経路の活性化に至る機序

AhR ノックアウトマウスでは TCDD による COX-2 の mRNA 発現誘導や尿中 PGE_2 の増加が見られないという報告がある [22, 36]。さらに、腎臓緻密斑細胞株である MMDD1 細胞を使った *in vitro* 研究 [22] によって、AhR アンタゴニストの MNF と TCDD の共曝露では COX-2 の mRNA 発現誘導やアラキドン酸放出量の増加が認められないことが明らかになった。また乳腺上皮細胞株の MCF10A 細胞を用いた実験では、同じく MNF を用いて AhR を阻害することで TCDD による $cPLA_2\alpha$ 活性化が見られなくなることが報告された [25]。以上より、TCDD 曝露によるプロスタノイド合成経路の活性化には AhR の存在が必須であり、TCDD による AhR の活性化がプロスタノイド合成経路の活性化に先立つと考えられる。ところが、MMDD1 細胞 [22] や MCF10A 細胞 [25, 75] 等の複数種類の細胞において、DNA decoy や siRNA を用いて XRE や Arnt をノックダウンすることで Arnt や XRE を介した AhR の転写活性化機能を欠損させても、TCDD 曝露による COX-2 の mRNA 発現誘導やアラキドン酸放出量の上昇が確認された。これより、AhR

が Arnt とヘテロダイマーをつくり XRE に結合する AhR の Arnt や XRE を介した転写活性化経路ではプロスタノイド合成経路が活性化されないと考えられた (Figure 13E)。

さらに本研究の結果 (3.1.2.2.) においても、授乳期に TCDD を経母乳曝露した $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスで $cPLA_2\alpha$ (Figure 6C)、COX-2 (Figure 6D)、mPGES-1 (Figure 6E) といったプロスタノイド合成関連遺伝子の TCDD 曝露による mRNA 発現誘導が減弱していた一方で、CYP1A1 (Figure 6A) や AhRR (Figure 6B) といった AhR の標的遺伝子は $cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスにおいても有意に発現誘導されていたことから、XRE や Arnt を介する AhR の転写活性化はプロスタノイド合成経路を介さないことが示された (Figure 13E)。さらに、$cPLA_2\alpha^{-/-}$マウスにおいて AhR の標的遺伝子の転写活性化が $cPLA_2\alpha^{+/+}$マウスと同様に認められたにも関わらず、授乳期水腎症の発症が有意に抑制されていた (Table 5) ことから、AhR の XRE を介する転写活性化経路が授乳期水腎症の発症に関与しないことが示唆された。加えて、本研究 (3.2.) によりプロスタノイド合成経路の活性化や授乳期水腎症の発症に AhR の核移行を要することを示したことから、TCDD 曝露によるプロスタノイド合成経路の活性化には、これまで定説となってきた Ca シグナルを介する経路 (Figure 13A) 以外の、AhR の核移行を伴う新たな経路が必須であることを明らかにした。

そこで、AhR が活性化された後 XRE や Arnt、さらにはこれまで TCDD 曝露によるプロスタノイド合成経路の主な活性化機序として考えられてきた Ca シグナルを介さない、AhR の核移行を伴うメカニズムでいかにしてプロスタノイド合成経路を活性化したのかを検討した。TCDD による PGE_2 合成経路の活性化機序として、第一に AhR による PGE_2 合成経路の関連遺伝子の転写活性化 (Figure 13C)、次に Src の活性化による PGE_2 合成経路の活性化 (Figure 13B)、第三に AhR と NF-κB の相互作用による PGE_2 合成経路の関連遺伝子の転写活性化 (Figure 13D)、の 3 つの可能性が考えられた。

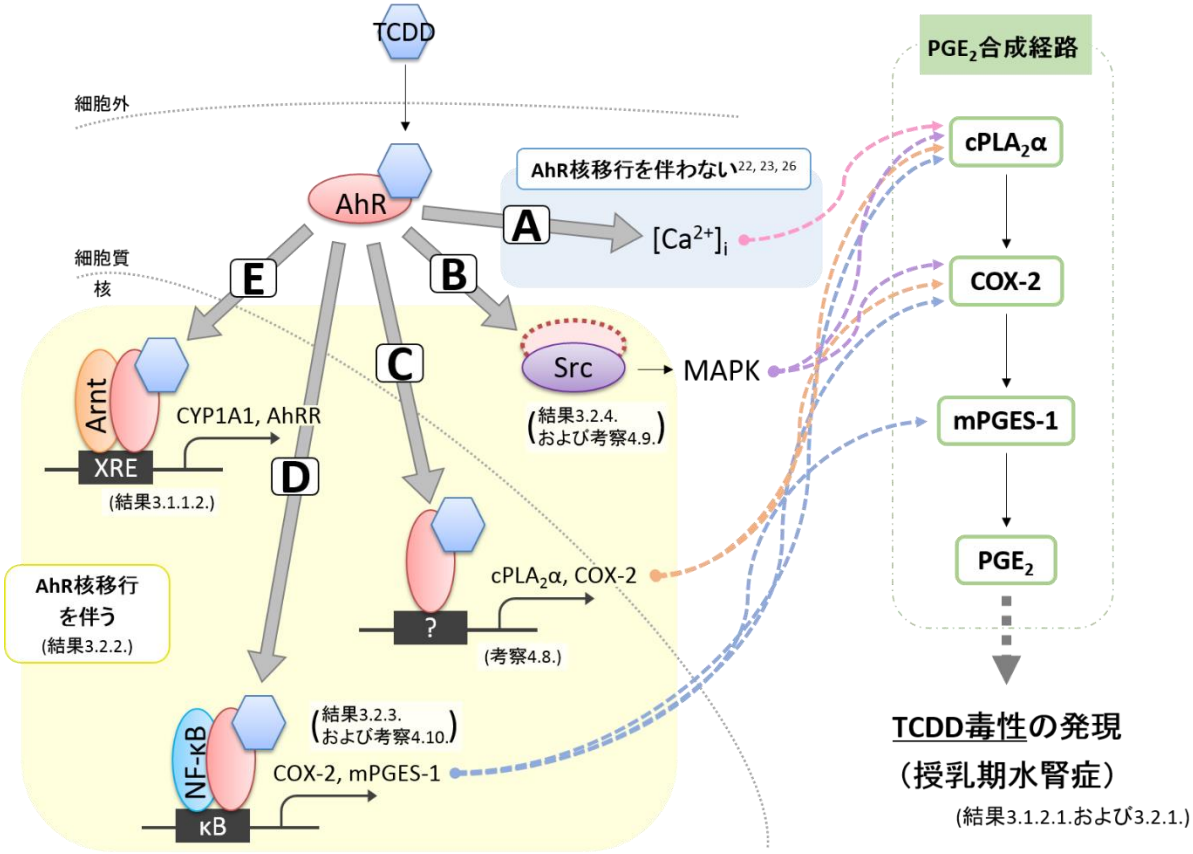

Figure 13. AhR を介した TCDD 曝露による PGE_2 合成経路活性化機序

(A) Ca シグナルを介する $cPLA_2\alpha$ の活性化；これまでプロスタノイド合成経路の活性化は、核外に局在する AhR が Ca シグナルを介して引き起こす反応であると考えられてきた [22, 23, 26]。

(B) Src の活性化による PGE_2 合成経路の活性化；AhR が核移行することで AhR-Src ダイマーが分断され、遊離された Src が活性化する [49]。Src の活性化によって $cPLA_2\alpha$ の活性化 [27, 29] や COX-2 の転写活性化が引き起こされる [49, 90]。(結果 3.2.4. および考察 4.9.)

(C) AhR による XRE を介さない PGE_2 合成経路の関連遺伝子の転写活性化；$cPLA_2\alpha$ と COX-2 の遺伝子のそれぞれ、second イントロン [91, 92] とプロモーター領域 [93] に AhR binding site が存在する。(考察 4.8.)

(D) AhR と NF-κB の相互作用による PGE_2 合成経路の関連遺伝子の転写活性化；AhR と NF-κB が核内で複合体を形成し、NF-κB 標的遺伝子の転写を活性化する [24, 46, 47, 54-57]。(結果 3.2.3.および考察 4.10.)

(E) Arnt や XRE を介した転写活性化；AhR と Arnt が核内で複合体を形成し、XRE に結合して AhR 標的遺伝子の転写を活性化する [21]。(結果 3.1.2.2.)

図中の上付き数字は本文中の引用文献番号を示す。

4.8. XRE を介さない AhR による PGE_2 合成経路の関連遺伝子の転写活性化

第一の AhR による PGE_2 合成経路の関連遺伝子の転写活性化 (Figure 13C) では、$cPLA_2\alpha$ と COX-2 の遺伝子のそれぞれ、second イントロン [91, 92] とプロモーター領域 [93] に AhR binding site が存在することで知られていることから、TCDD 曝露による AhR の転写活性化によって PGE_2 合成経路関連遺伝子が誘導されると考えられる。中でも $cPLA_2\alpha$ の second イントロンではその配列に XRE を保有しないながらも AhR と DNA の結合が確認されており、AhR の核移行が PGE_2 合成経路の活性化に必要であるという本研究結果 (3.2.2.) と、XRE や Arnt がノックダウンされてもプロスタノイド合成経路が活性化されるという先行研究の結果 [22, 75] と一致する。

4.9. AhR による Src の活性化による PGE_2 合成経路の活性化

近年、Src 活性化を介した TCDD による COX-2 mRNA 発現誘導が報告された [49](Figure 13B)。AhR は非活性時には細胞質内で Src とヘテロダイマーを形成しているが、TCDD 曝露による AhR の核移行で AhR-Src ダイマーは分断され遊離された Src が活性化する。Src の活性化によって、MAPK を介して $cPLA_2\alpha$ の Ser505 がリン酸化されたり [27, 29]、COX-2 の転写が活性化される [49, 90](Figure 13B)。このような AhR リガンド曝露による Src の活性化は他の様々な種類の細胞でも報告

されいる[25, 51, 94]。私のこの研究 (3.2.2.) においては、TCDD 曝露による細胞質内での AhR-Src ダイマーの解離が $AhR^{nls/nls}$ マウスで起こらなかったため、PGE_2 合成経路が活性化しなかった可能性が考えられた。

そこで本研究 (3.2.4.) では、TCDD 曝露による Src の活性化の有無を検討した。Src は活性化すると Cbp に結合し、この際 Csk も Cbp にリクルートされる。Cbp 上の活性型 Src は、Csk によって Tyr527 がリン酸化されることで不活性化する。このように、Src は負の調節機構にて活性が制御されている[95]。この研究では、Src ならびにその活性調節に関わる Csk および Cbp について mRNA 発現量を測定したところ、$AhR^{d/-}$ と $AhR^{nls/nls}$ のいずれのマウスでも TCDD 曝露による発現量の変化は認められなかった (Figure 12)。このように TCDD 曝露により Src の活性化に関わる遺伝子の mRNA 発現量が変化しなかったにも関わらず、$AhR^{d/-}$ マウスにおいてプロスタノイド合成経路の活性化および授乳期水腎症の発症が認められたことから、TCDD 曝露によるプロスタノイド合成経路の活性化は Src を介さない可能性が考えられる。

4.10. AhR と NF-κB の相互作用による PGE_2 合成経路の関連遺伝子の転写活性化

本研究において AhR の核移行機能を欠損させたことで核内での AhR と他タンパク質との相互作用が欠損したことも、$AhR^{nls/nls}$ マウスで TCDD による PGE_2 合成経路の活性化が見られなかった一因として考えられる。核内で AhR と相互作用する主なタンパク質として挙げられるのが、Arnt や NF-κB である。複数種類の細胞を用いた先行研究[26]において、Arnt をノックダウンしても TCDD による PGE_2 合成経路の活性化が確認されたことから、本研究では NF-κB が PGE_2 合成経路の活性化に関与している可能性を検討した。

TCDD 曝露による NF-κB の活性化[55, 57]や、NF-κB を介した mPGES-1 や COX-2 などの転写活性化[96]、さらに、NF-κB 標的遺伝子である IL-1β[97] や TNF-α[98, 99] による $cPLA_2α$ や COX-2 の発現誘導および PGE_2 産生亢進[76]が報告されており、核移行後の AhR と NF-κB との相互作用が TCDD 曝露によるプロスタノイド合成経路に関与する可能性が考えられた (Figure 13D)。また、水腎症発症に重要な役割を果たすマクロファージの浸潤[100]に、同じく NF-κB の標的遺伝子である MCP-1[101, 102] が密接に関与するという報告がある。さらに、IL-1β、TNF-α、KC、MCP-1 といった NF-κB 標的遺伝子に加え、COX-2 や $cPLA_2$ などの mRNA 発現量の TCDD 曝露による発現誘導は、NF-κB 阻害剤で抑制されることが、*in vitro*

および *in vivo* 実験系にて明らかにされている [23]。上述の結果 (3.2.3.) より、これら 4 つの NF-κB の標的遺伝子および COX-2 や $cPLA_2\alpha$ が、いずれも TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスでは mRNA 発現誘導されていたのに対し、TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$ マウスではその誘導が見られなかった (Figure 10, 11) ことから、AhR の核移行機能欠損によって NF-κB 経路が活性化されなかったため、プロスタノイド合成経路の活性化や授乳期水腎症の発症が起こらなかった可能性が考えられた。

4.11. TCDD 曝露により AhR の核移行を介して腎臓にマクロファージが誘導される

水腎症で認められる過剰なアラキドン酸産生とプロスタノイド産生にはマクロファージの集積が重要な役割を担うことが報告されている [100]。尿管を閉塞させた腎臓では、無処置の腎臓に比べてプロスタノイドの産生量が増加するが [103]、このうち特に顕著な産生増加が認められる PGE_2 や TXA_2 は、マクロファージの浸潤を阻害することで尿路閉塞による産生増加が抑制されると報告された [100]。この先行研究 [100] により、尿管が閉塞することで腎臓にマクロファージが集積し、浸潤したマクロファージと腎臓の間質細胞が相互に作用し合うことで PGE_2 および TXA_2 の産生を促進させることが明らかになった。こうして産生された

PGE_2 および TXA_2 は、それぞれ尿量の増加および血管収縮を引き起こし、水腎症発症の原因となることが考えられる。

私のこの実験 (3.2.3.) では、マクロファージの遊走を誘導する MCP-1 の mRNA 発現量が TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスでは有意に増加していたのに対し、TCDD 曝露 $AhR^{nls/nls}$マウスではその発現増加が有意に減弱していた (Figure 11D)。さらに、直接マクロファージ数を反映するものではないが、マクロファージおよび単球マーカーである F4/80[79] の mRNA 発現量も、TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスで発現誘導されていたのに対し $AhR^{nls/nls}$マウスでは変化が認められなかった (Figure 11E)。このことから、TCDD 曝露によるマクロファージの集積には AhR の核移行を要することが推察され、このように誘導されたマクロファージと腎臓間質細胞の相互作用により PGE_2 が過剰に産生され、水腎症の発症に至った可能性が考えられた。

4.12. TCDD 毒性発現に関与しうるサイトカインの発現誘導は AhR の核移行を要する

前述 (3.2.3.および 4.10.) のように、TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$マウスにおいて IL-1β、TNF-α、MCP-1、KC などのサイトカインの mRNA 発現量は、有意に誘導されていた (Figure 11)。IL-1α, β および TNF-α, β の受容体欠損マウスを使用した先行研

究[104]では、ダイオキシン曝露による ALT 値の上昇や肝臓における炎症性細胞の浸潤、および肝細胞のアポトーシスなどの TCDD 毒性の発症に IL-1 や TNF などの炎症性サイトカインを要することが明らかになった。さらに前述 (4.11.) のように、MCP-1 が水腎症の発症に関与することが報告されている[105, 106]。これら TCDD 毒性の発現に関与するサイトカインの mRNA 発現量が、TCDD 曝露 $AhR^{d/-}$ マウスでは誘導されたのに対し $AhR^{nls/nls}$ マウスでは変化が認められなかった (Figure 11) ことから、AhR の核移行を介して誘導されたサイトカインが、水腎症をはじめとする TCDD 毒性の発症に関与する可能性が考えられた。

4.13. 今後の課題

本研究 (3.1.2.) およびこれまでの先行研究[36, 37]により、TCDD 曝露による授乳期水腎症の発症には PGE_2 合成経路が密接に関与することが明らかになった。さらに、$AhR^{nls/nls}$ マウスを用いることで、AhR は TCDD による活性化後、核内に移行することでプロスタノイド合成経路の活性化および授乳期水腎症の発症に関与する可能性を提示した (3.2.)。しかしながら、AhR が核移行後のどのような作用で PGE_2 合成経路を活性化するのかは明らかにできておらず、今後は上述 (4.7. ~ 4.10.) の、AhR による PGE_2 合成経路の関連遺伝子の転写活性化 (Figure 13C)、Src の活性化による PGE_2 合成経路の活性化 (Figure 13B)、AhR と NF-κB

の相互作用による PGE_2 合成経路の関連遺伝子の転写活性化 (Figure 13D)、などの可能性を検討していく必要がある。

4.14. 結論

本研究では、数ある TCDD 毒性の中でも、口蓋裂、水腎症、胎生致死、体重減少、肝障害、胸腺萎縮に着目し、$cPLA_2\alpha$ の有無が授乳期水腎症、体重減少および胎生致死の毒性発現に影響を及ぼすことを明らかにした。中でも、特に $cPLA_2\alpha$ の毒性発症への関与が明快な授乳期水腎症を $cPLA_2\alpha$ を介して発症する典型的疾患として位置づけ、同条件の実験を $AhR^{nls/nls}$ マウスを用いて行うことで、TCDD 曝露による AhR 活性化から PGE_2 合成経路の活性化までの未知の毒性発現機序を検討した。その結果、TCDD 曝露による PGE_2 合成経路の活性化および授乳期水腎症の発症には AhR の核移行を要するということが示唆された。これにより、TCDD 曝露による PGE_2 合成経路の活性化機序として、既報の Ca シグナルを介する AhR の核外作用とは別の新たな可能性として、NF-κB が関与する PGE_2 合成経路の活性化を提示した。このように PGE_2 合成経路の活性化および TCDD 毒性の発現に AhR 核移行を要するという事実は、TCDD の多様な毒性の発現機序を解明していく上で、重要な手がかりとなることが期待される。

引用文獻

1. Van den Berg M, Birnbaum LS, 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 RE. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. Toxicol Sci. 2006;93(2):223-241.

2. Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunstrom B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, Kubiak T, Larsen JC, van Leeuwen FX, Liem AK, Nolt C, Peterson RE, 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. 1998;106(12):775-792.

3. Gilpin RK, Wagel DJ, Solch JG. Dioxins and Health. 2nd ed. In: Schecter A, Gasiewicz TA, editors. Ch. 2. p. 55-88. 2003.

4. Kulkarni PS, Crespo JG, Afonso CA. Dioxins sources and current remediation technologies--a review. Environment international. 2008;34(1):139-153.

5. Webster TF, Commoner B. Dioxins and Health. 2nd ed. In: Schecter A, Gasiewicz TA, editors. Ch. 1. p. 1-54. 2003.

6. Tanabe S, Tanaka H, Tatsukawa R. Polychlorobiphenyls, Sigma-Ddt, and Hexachlorocyclohexane Isomers in the Western North Pacific Ecosystem. Arch Environ Con Tox. 1984;13(6):731-738.

7. Tanabe S. PCB problems in the future: foresight from current knowledge. Environ Pollut. 1988;50(1-2):5-28.

8. Environmental Risk Assessment Office EHD, Ministry of the Environment. The Exposure to chemical compounds in the Japanese People -Survey of the Exposure to chemical compounds in Human (2011 ~)-. 2014:5-7.

9. Nau H, Bass R, Neubert D. Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) via placenta and milk, and postnatal toxicity in the mouse. Arch Toxicol. 1986;59(1):36-40.

10. Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG, Jr., Needham LL. Change in sex ratio with exposure to dioxin. Lancet. 1996;348(9024):409.

11. Bertazzi PA, Zocchetti C, Pesatori AC, Guercilena S, Sanarico M, Radice L. Ten-year mortality study of the population involved in the Seveso incident in 1976. Am J Epidemiol. 1989;129(6):1187-1200.

12. Bertazzi A, Pesatori AC, Consonni D, Tironi A, Landi MT, Zocchetti C. Cancer incidence in a population accidentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin. Epidemiology. 1993;4(5):398-406.

13. Pohjanvirta R, Tuomisto J. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. Pharmacological reviews. 1994;46(4):483-549.

14. Peters JM, Narotsky MG, Elizondo G, Fernandez-Salguero PM, Gonzalez FJ, Abbott BD. Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. Toxicol Sci. 1999;47(1):86-92.

15. Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, 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. 1997;2(10):645-654.

16. Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 1996;140(1):173-179.

17. Burbach KM, Poland A, Bradfield CA. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(17):8185-8189.

18. Denis M, Cuthill S, Wikstrom AC, Poellinger L, Gustafsson JA. Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor. Biochem Biophys Res Commun. 1988;155(2):801-807.

19. Perdew GH. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. J Biol Chem. 1988;263(27):13802-13805.

20. Whitelaw ML, Gottlicher M, Gustafsson JA, Poellinger L. Definition of a novel ligand binding domain of a nuclear bHLH receptor: co-localization of ligand and hsp90 binding activities within the regulable inactivation domain of the dioxin receptor. EMBO J. 1993;12(11):4169-4179.

21. Gasiewicz TA, Park S. Dioxins and Health. 2nd ed. In: Schecter A, Gasiewicz TA, editors. Ch. 12. p. 491-532. 2003.

22. Dong B, Nishimura N, Vogel CF, Tohyama C, Matsumura F. TCDD-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by the nongenomic pathway in mouse

MMDD1 macula densa cells and kidneys. Biochem Pharmacol. 2010;79(3):487-497.

23. Li W, Vogel CF, Wu D, Matsumura F. Non-genomic action of TCDD to induce inflammatory responses in HepG2 human hepatoma cells and in liver of C57BL/6J mice. Biol Chem. 2010;391(10):1205-1219.

24. Vogel CF, Sciullo E, Matsumura F. Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of chemokines. Biochem Biophys Res Commun. 2007;363(3):722-726.

25. Dong B, Matsumura F. Roles of cytosolic phospholipase A2 and Src kinase in the early action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through a nongenomic pathway in MCF10A cells. Mol Pharmacol. 2008;74(1):255-263.

26. Matsumura F. The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. Biochem Pharmacol. 2009;77(4):608-626.

27. Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K. Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans. Progress in lipid research. 2011;50(2):152-192.

28. Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. Cell. 1991;65(6):1043-1051.

29. Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. J Biol Chem. 1997;272(27):16709-16712.

30. Evans JH, Spencer DM, Zweifach A, Leslie CC. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. J Biol Chem. 2001;276(32):30150-30160.

31. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. Cell. 1993;72(2):269-278.

32. Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. Biol Pharm Bull. 2004;27(8):1168-1173.

33. Uozumi N, Kume K, Nagase T, Nakatani N, Ishii S, Tashiro F, Komagata Y, Maki K, Ikuta K, Ouchi Y, Miyazaki J, Shimizu T. Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. Nature. 1997;390(6660):618-622.

34. Downey P, Sapirstein A, O'Leary E, Sun TX, Brown D, Bonventre JV. Renal concentrating defect in mice lacking group IV cytosolic phospholipase A(2). Am J Physiol Renal Physiol. 2001;280(4):F607-618.

35. Song H, Lim H, Paria BC, Matsumoto H, Swift LL, Morrow J, Bonventre JV, Dey SK. Cytosolic phospholipase A2alpha deficiency is crucial for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. Development. 2002;129(12):2879-2889.

36. Nishimura N, Matsumura F, Vogel CF, 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. 2008;231(3):374-383.

37. 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. 2012;127(2):547-554.

38. Teraoka H, Kubota A, Dong W, Kawai Y, Yamazaki K, Mori C, Harada Y, Peterson RE, Hiraga T. Role of the cyclooxygenase 2-thromboxane pathway in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced decrease in mesencephalic vein

blood flow in the zebrafish embryo. Toxicol Appl Pharmacol. 2009;234(1):33-40.

39. Sciullo EM, Vogel CF, 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. 2008;480(2):143-155.

40. Bui P, Solaimani P, Wu X, Hankinson O. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment alters eicosanoid levels in several organs of the mouse in an aryl hydrocarbon receptor-dependent fashion. Toxicol Appl Pharmacol. 2012;259(2):143-151.

41. Ema M, Ohe N, Suzuki M, Mimura J, Sogawa K, Ikawa S, Fujii-Kuriyama Y. Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. J Biol Chem. 1994;269(44):27337-27343.

42. Okey AB, Vella LM, Harper PA. 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. 1989;35(6):823-830.

43. 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. 2003;100(10):5652-5657.

44. Bunger MK, Moran SM, Glover E, Thomae TL, Lahvis GP, Lin BC, Bradfield CA. Resistance to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity and abnormal liver development in mice carrying a mutation in the nuclear localization sequence of the aryl hydrocarbon receptor. J Biol Chem. 2003;278(20):17767-17774.

45. Bunger MK, Glover E, Moran SM, Walisser JA, Lahvis GP, Hsu EL, Bradfield CA. Abnormal liver development and resistance to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in mice carrying a mutation in the DNA-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor. Toxicol Sci. 2008;106(1):83-92.

46. Puga A, Barnes SJ, Chang C, Zhu H, Nephew KP, Khan SA, Shertzer HG. Activation of transcription factors activator protein-1 and nuclear factor-kappaB by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Biochem Pharmacol. 2000;59(8):997-1005.

47. Tian Y, Ke S, Denison MS, Rabson AB, Gallo MA. Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. J Biol Chem. 1999;274(1):510-515.

48. Vogel CF, Khan EM, Leung PS, Gershwin ME, Chang WL, Wu D, Haarmann-Stemmann T, Hoffmann A, Denison MS. Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor-kappaB. J Biol Chem. 2014;289(3):1866-1875.

49. Xie G, Peng Z, Raufman JP. Src-mediated aryl hydrocarbon and epidermal growth factor receptor cross talk stimulates colon cancer cell proliferation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012;302(9):G1006-1015.

50. Vogel CF, Matsumura F. A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-kappaB family. Biochem Pharmacol. 2009;77(4):734-745.

51. Tomkiewicz C, Herry L, Bui LC, Metayer C, Bourdeloux M, Barouki R, Coumoul X. The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. Oncogene. 2013;32(14):1811-1820.

52. Rey-Barroso J, Colo GP, Alvarez-Barrientos A, Redondo-Munoz J, Carvajal-Gonzalez JM, Mulero-Navarro S, Garcia-Pardo A, Teixido J, Fernandez-Salguero PM. The dioxin receptor controls beta1 integrin activation in fibroblasts through a Cbp-Csk-Src pathway. Cell Signal. 2013;25(4):848-859.

53. Vogel C, Boerboom AM, Baechle C, El-Bahay C, Kahl R, Degen GH, Abel J. Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induction by dioxin in rat hepatocytes: possible c-Src-mediated pathway. Carcinogenesis. 2000;21(12):2267-2274.

54. Kim DW, Gazourian L, Quadri SA, Romieu-Mourez R, Sherr DH, Sonenshein GE. The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. Oncogene. 2000;19(48):5498-5506.

55. Chen PH, Chang H, Chang JT, Lin P. Aryl hydrocarbon receptor in association with RelA modulates IL-6 expression in non-smoking lung cancer. Oncogene. 2012;31(20):2555-2565.

56. Kobayashi S, Okamoto H, Iwamoto T, Toyama Y, Tomatsu T, Yamanaka H, Momohara S. A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2008;47(9):1317-1322.

57. Xu G, Li Y, Yoshimoto K, Chen G, Wan C, Iwata T, Mizusawa N, Duan Z, Liu J, Jiang J. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced inflammatory activation is mediated by intracellular free calcium in microglial cells. Toxicology. 2013;308:158-167.

58. Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(2):779-782.

59. Thomas RS, Penn SG, Holden K, Bradfield CA, Rank DR. Sequence variation and phylogenetic history of the mouse Ahr gene. Pharmacogenetics. 2002;12(2):151-163.

60. Poland A, Glover E. 2,3,7,8,-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: segregation of toxicity with the Ah locus. Mol Pharmacol. 1980;17(1):86-94.

61. Bryant PL, Schmid JE, Fenton SE, Buckalew AR, Abbott BD. Teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the expression of EGF and/or TGF-alpha. Toxicol Sci. 2001;62(1):103-114.

62. Couture-Haws L, Harris MW, Lockhart AC, Birnbaum LS. 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. 1991;107(3):402-412.

63. Boverhof DR, Burgoon LD, Tashiro C, Sharratt B, Chittim B, Harkema JR, Mendrick DL, Zacharewski TR. Comparative toxicogenomic analysis of the

hepatotoxic effects of TCDD in Sprague Dawley rats and C57BL/6 mice. Toxicol Sci. 2006;94(2):398-416.

64. 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-teterachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) despite the identical primary structure of the aryl hydrocarbon receptor. Toxicol Appl Pharmacol. 2006;212(3):224-236.

65. Couture LA, Abbott BD, Birnbaum LS. A critical review of the developmental toxicity and teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: recent advances toward understanding the mechanism. Teratology. 1990;42(6):619-627.

66. Ishimura R, Ohsako S, Miyabara Y, Sakaue M, Kawakami T, Aoki Y, Yonemoto J, Tohyama C. Increased glycogen content and glucose transporter 3 mRNA level in the placenta of Holtzman rats after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Toxicol Appl Pharmacol. 2002;178(3):161-171.

67. 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. 2002;185(3):197-206.

68. Ishimura R, Kawakami T, Ohsako S, Nohara K, Tohyama C. Suppressive effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on vascular remodeling that takes place in the normal labyrinth zone of rat placenta during late gestation. Toxicol Sci. 2006;91(1):265-274.

69. Theobald HM, Kimmel GL, Peterson RE. Dioxins and Health. 2nd ed. In: Schecter A, Gasiewicz TA, editors. Ch. 9. p. 329-432. 2003.

70. Abbott BD, Birnbaum LS, Pratt RM. TCDD-induced hyperplasia of the ureteral epithelium produces hydronephrosis in murine fetuses. Teratology. 1987;35(3):329-334.

71. Abbott BD, Birnbaum LS. Effects of TCDD on embryonic ureteric epithelial EGF receptor expression and cell proliferation. Teratology. 1990;41(1):71-84.

72. Kerzee LK, Xia Y, Puga A. Dioxins and Health. 2nd ed. In: Schecter A, Gasiewicz TA, editors. Ch. 13. p. 533-558. 2003.

73. Harris MW, Moore JA, Vos JG, Gupta BN. General biological effects of TCDD in laboratory animals. Environ Health Perspect. 1973;5:101-109.

74. Jones G, Greig JB. Pathological changes in the liver of mice given 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Experientia. 1975;31(11):1315-1317.

75. Dong B, Matsumura F. The conversion of rapid TCCD nongenomic signals to persistent inflammatory effects via select protein kinases in MCF10A cells. Mol Endocrinol. 2009;23(4):549-558.

76. Newton R, Kuitert LM, Slater DM, Adcock IM, Barnes PJ. Cytokine induction of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 mRNA is suppressed by glucocorticoids in human epithelial cells. Life Sci. 1997;60(1):67-78.

77. Vogel CF, Nishimura N, Sciullo E, Wong P, Li W, Matsumura F. Modulation of the chemokines KC and MCP-1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice. Arch Biochem Biophys. 2007;461(2):169-175.

78. Yoshioka W, Higashiyama W, Tohyama C. Involvement of microRNAs in dioxin-induced liver damage in the mouse. Toxicol Sci. 2011;122(2):457-465.

79. McKnight AJ, Macfarlane AJ, Dri P, Turley L, Willis AC, Gordon S. Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. J Biol Chem. 1996;271(1):486-489.

80. Helliwell RJ, Berry EB, O'Carroll SJ, Mitchell MD. Nuclear prostaglandin receptors: role in pregnancy and parturition? Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 2004;70(2):149-165.

81. Bonventre JV, Huang Z, Taheri MR, O'Leary E, Li E, Moskowitz MA, Sapirstein A. Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. Nature. 1997;390(6660):622-625.

82. Loftin CD, Tiano HF, Langenbach R. Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. Prostaglandins & other lipid mediators. 2002;68-69:177-185.

83. Gibson JE. Perinatal nephropathies. Environ Health Perspect. 1976;15:121-130.

84. Dunlap DY, Ikeda I, Nagashima H, Vogel CF, Matsumura F. Effects of src-deficiency on the expression of in vivo toxicity of TCDD in a strain of c-src knockout mice procured through six generations of backcrossings to C57BL/6 mice. Toxicology. 2002;172(2):125-141.

85. Matsumura F, Enan E, Dunlap DY, Pinkerton KE, Peake J. Altered in vivo toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in C-SRC deficient mice. Biochem Pharmacol. 1997;53(10):1397-1404.

86. Angrish MM, Jones AD, Harkema JR, Zacharewski TR. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of Stearoyl-CoA desaturase 1 alters hepatic fatty acid composition in TCDD-elicited steatosis. Toxicol Sci. 2011;124(2):299-310.

87. Levine SL, Petrulis JR, Dubil A, Perdew GH. A tetratricopeptide repeat half-site in the aryl hydrocarbon receptor is important for DNA binding and trans-activation potential. Mol Pharmacol. 2000;58(6):1517-1524.

88. Tanos R, Patel RD, Murray IA, Smith PB, Patterson AD, Perdew GH. Aryl hydrocarbon receptor regulates the cholesterol biosynthetic pathway in a dioxin response element-independent manner. Hepatology. 2012;55(6):1994-2004.

89. Tanos R, Murray IA, Smith PB, Patterson A, Perdew GH. Role of the Ah receptor in homeostatic control of fatty acid synthesis in the liver. Toxicol Sci. 2012;129(2):372-379.

90. Enan E, Matsumura F. Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. Biochem Pharmacol. 1996;52(10):1599-1612.

91. Kinehara M, Fukuda I, Yoshida K, Ashida H. High-throughput evaluation of aryl hydrocarbon receptor-binding sites selected via chromatin immunoprecipitation-based screening in Hepa-1c1c7 cells stimulated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Genes & genetic systems. 2008;83(6):455-468.

92. 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. J Biosci Bioeng. 2009;108(4):277-281.

93. Yang F, Bleich D. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 gene in pancreatic beta-cells. J Biol Chem. 2004;279(34):35403-35411.

94. Pena D, Pontillo C, Garcia MA, Cocca C, Alvarez L, Chiappini F, Bourguignon N, Frahm I, Bergoc R, Kleiman de Pisarev D, Randi A. Alterations in c-Src/HER1 and estrogen receptor alpha signaling pathways in mammary gland and tumors of hexachlorobenzene-treated rats. Toxicology. 2012;293(1-3):68-77.

95. Kawabuchi M, Satomi Y, Takao T, Shimonishi Y, Nada S, Nagai K, Tarakhovsky A, Okada M. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. Nature. 2000;404(6781):999-1003.

96. Diaz-Munoz MD, Osma-Garcia IC, Cacheiro-Llaguno C, Fresno M, Iniguez MA. 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. 2010;22(10):1427-1436.

97. Hiscott J, Marois J, Garoufalis J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G, et al. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. Mol Cell Biol. 1993;13(10):6231-6240.

98. Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. Mol Cell Biol. 1990;10(4):1498-1506.

99. Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. The Journal of experimental medicine. 1990;171(1):35-47.

100. Lefkowith JB, Okegawa T, DeSchryver-Kecskemeti K, Needleman P. Macrophage-dependent arachidonate metabolism in hydronephrosis. Kidney Int. 1984;26(1):10-17.

101. Ueda A, Ishigatsubo Y, Okubo T, Yoshimura T. Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-

kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity. J Biol Chem. 1997;272(49):31092-31099.

102. Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T. NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. J Immunol. 1994;153(5):2052-2063.

103. Nishikawa K, Morrison A, Needleman P. Exaggerated prostaglandin biosynthesis and its influence on renal resistance in the isolated hydronephrotic rabbit kidney. J Clin Invest. 1977;59(6):1143-1150.

104. Pande K, Moran SM, Bradfield CA. Aspects of dioxin toxicity are mediated by interleukin 1-like cytokines. Mol Pharmacol. 2005;67(5):1393-1398.

105. Diamond JR, Kees-Folts D, Ding G, Frye JE, Restrepo NC. Macrophages, monocyte chemoattractant peptide-1, and TGF-beta 1 in experimental hydronephrosis. Am J Physiol. 1994;266(6 Pt 2):F926-933.

106. Floege J, Grone HJ. Progression of renal failure: what is the role of cytokines? Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 1995;10(9):1575-1586.

謝辞

本研究を遂行するにあたり研究の機会・場を与えて下さり、多大なご指導とご鞭撻を賜りまし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遠山千春教授に謹んで感謝の意を申し上げます。また、実験遂行にあたり的確なご指摘、ご助言を賜りました東京薬科大学薬学部医療薬学科病態生理学教室の吉岡亘助教に深く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行に際し、的確なご助言をして下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。