

論文の内容の要旨

論文題目 ダイオキシン毒性の発症機序における cPLA₂α および AhR の役割

氏名 藤澤希望

ダイオキシン類は難分解性で広く環境中に残留する化学物質である。廃棄物処理場での燃焼などによって非意図的に産生されるダイオキシン類は、脂溶性であることから体内に蓄積、濃縮されやすく、催奇形性、免疫毒性、繁殖毒性、神経毒性など生体に多種多様な毒性をおよぼす。これら多様な毒性の多くは aryl hydrocarbon receptor (AhR) を欠損したマウスでは発症しないことが報告されており、AhR を介して発症することが明らかである。しかしながら、AhR がダイオキシン類などのリガンドと結合し活性化してから毒性が発現するまでの分子メカニズムは未だほとんど解明されていない。

AhR は非活性時に細胞質に局在しているが、リガンドと結合し活性化することで核内に移行し、Ahr nuclear translocator (Arnt) と複合体を形成する。この AhR-Arnt 複合体は xenobiotic responsive element (XRE) に結合し、CYP1A1をはじめとする AhR 標的遺伝子の転写を活性化する。このような XRE を介した AhR の転写活性化経路は、AhR を介した毒性発現の分子メカニズムとして定説になってきた。しかし近年、XRE decoy や Arnt ノックダウンによってこの XRE を介した転写活性化経路を阻害しても、ダイオキシン曝露によりプロスタノイド合成経路が活性化されることが報告された。さらに、COX-2 や mPGES-1 といったプロスタノイド合成経路に関わる酵素が一部のダイオキシン毒性の発現に必須であることが明らかになった。

本研究では、プロスタノイド合成経路の最上流に位置する cPLA₂α に着目し、cPLA₂α ノックアウトマウスを用いることで、1) 胎仔期曝露、2) 授乳期曝露、3) 成獣期曝露の 3 つの異なる曝露経路、曝露時期の複数種類のダイオキシン毒性の発症に cPLA₂α もしくはプ

ロスタノイド合成経路が関与するか否かを、ダイオキシン類の中でも AhR との結合力が最も強い 2, 3, 7, 8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン (TCDD) を使用して検証した。1) TCDD 胎仔期曝露による毒性として、胎生致死、口蓋裂、胎仔期水腎症の発症への cPLA₂α の関与を検討した。cPLA₂α^{+/+}の雌雄マウスを交配し、GD 12.5 の母マウスに TCDD を 40 μg/kg 体重の用量で単回経口投与した。GD18.5 で母体から胎仔を摘出し、生存胎仔数、胎仔の水腎症重症度、発症率および口蓋裂発症率を調べたところ、雄の cPLA₂α^{-/-}マウスで TCDD 曝露群の生存胎仔数が有意に低下していた。胎仔期水腎症の重症度、発症率および口蓋裂発症率は、cPLA₂α 遺伝子型の違いによる差異は認められなかった。2) TCDD 経母乳曝露による毒性として、授乳期水腎症の発症への cPLA₂α の関与を検討した。cPLA₂α^{+/+}の雌雄マウスを交配し、PND 1 で母マウスに TCDD を 20 μg/kg 体重の用量で単回経口投与した。PND 14 での仔の水腎症発症率を調べたところ、cPLA₂α^{+/+}マウスは TCDD 曝露により全てのマウスで水腎症が発症したのに対し、cPLA₂α^{-/-}マウスでは雌雄共に 3 分の 1 でしか発症しなかった。3) TCDD 成獣期曝露による体重減少、肝毒性および胸腺萎縮を検討した。cPLA₂α^{+/+}もしくは cPLA₂α^{-/-}の 10~12 週齢の雄に TCDD を 50 μg/kg 体重の用量で腹腔内投与し、8 ないし 10 日後に肝臓および胸腺を採取した。この間、隔日で尾採血を行い、経時的に血中 ALT を測定した。体重減少、肝障害、肝肥大、脂肪肝、胸腺萎縮について検討したところ、cPLA₂α^{+/+}マウスでは TCDD 投与後 2 日目から有意に体重が減少していたのに対し、cPLA₂α^{-/-}マウスでは体重変化は認められなかった。一方、TCDD 曝露による血中 ALT の上昇、肝臓重量の増加、胸腺重量の減少、および肝細胞への中性脂肪の蓄積は cPLA₂α 遺伝子型による差異が認められなかった。以上より、TCDD 曝露による胎生致死、授乳期水腎症、および体重減少の発症に cPLA₂α が関与し、他方、口蓋裂、胎仔期水腎症、脂肪肝、肝障害、肝肥大、胸腺萎縮の発症には cPLA₂α が影響しないことが示された。

これまでの先行研究により、TCDD 曝露による授乳期水腎症の発症に COX-2 や

mPGES-1 が必要であることが分かっていた。本研究によってさらに cPLA₂α の関与を明らかにしたことで、授乳期水腎症の発症にプロスタノイド合成経路が重要な役割を果たすことが明確になった。そこで、プロスタノイド合成経路の関与が明快な授乳期水腎症を対象に、TCDD 曝露による AhR の活性化から cPLA₂α 含むプロスタノイド合成経路の活性化までの未知の毒性発現メカニズムを検討した。これまで、TCDD 曝露による cPLA₂α 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。一方で、近年報告された、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作用は、AhR の核移行を要する。そこで本研究では、TCDD によるプロスタノイド合成経路活性化への AhR 核移行の必要性を検討するために、AhR の核移行機能が欠如している AhR^{nls/nls} マウスを用いた。雄の AhR^{nls/-}マウスと雌の AhR^{nls/d} マウスを交配し、PND 1 で母マウスに TCDD を 300 μg/kg 体重の用量で単回経口投与した。PND 14 での AhR^{nls/nls} マウスとその比較対象の AhR^{d/-}マウスの水腎症発症率を調べたところ、AhR^{d/-}マウスでは TCDD 曝露により約半数のマウスで水腎症が発症していたのに対し、AhR^{nls/nls} マウスでは全く発症が認められなかった。TCDD 経母乳曝露マウスの腎臓の場合、プロスタノイド合成経路関連酵素の mRNA 発現量や尿中 PGE₂ 濃度は PND 7 で最も顕著に TCDD により誘導されることが報告されていたことから、同様の曝露条件で PND 1 から PND 7 まで TCDD に経母乳曝露された仔マウスにおけるこれら遺伝子の mRNA 発現量や尿中 PGE₂ 濃度を測定したところ、TCDD 曝露 AhR^{d/-}マウスでは cPLA₂α および COX-2 の mRNA 発現量や尿中 PGE₂ 濃度が有意に上昇していたのに対し、AhR^{nls/nls} マウスでは有意な変化が認められなかった。このように、核移行機能が欠損した AhR^{nls/nls} マウスでは TCDD 曝露による授乳期水腎症が発症せず、さらに、TCDD 曝露によるプロスタノイド合成経路の活性化も認められなかった。以上より、TCDD 曝露による授乳期水腎症の発症およびプロスタノイド合成経路の活性化には AhR の核移行が必要であることが示唆された。

本研究では、TCDD の多種多様な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 cPLA₂α が重要な役割を果たすことを明らかにし、さらに、TCDD 曝露による授乳期水腎症の発症やプロスタノイド合成経路の活性化に AhR の核移行が必要であることを明らかにした。これにより、TCDD 曝露によるプロスタノイド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、NF-κB などの新たな機序が関与する可能性を提示した。この結果は、長年の間解明されなかった、TCDD 曝露により AhR が活性化されてから毒性が発現するまでの分子メカニズムを探る足掛かりとなることが期待される。