

学位論文題名

多環芳香族炭化水素による毒性発現の 分子機構に関する研究

学位論文内容の要旨

1. はじめに

3-メチルコランスレン (MC) やベンゾ[a]ピレンなどの多環芳香族炭化水素 (PAH) は内分泌攪乱物質として知られており、生体内において発がん促進、生殖障害、成長遅延、高血圧や脂質代謝異常などの様々な毒性を引き起こす。これらの PAH の毒性発現は、細胞質に存在する転写活性化因子である芳香族炭化水素受容体 (AHR) を介して起こると考えられている。PAH は AHR を介してチトクローム P450 (CYP) の 1 分子種である *CYP1A1*, *CYP1B1* や *CYP1A2* などの薬物代謝酵素遺伝子の発現を誘導することが報告されている。しかし、PAH の多岐にわたる毒性発現は、これら薬物代謝酵素遺伝子の誘導だけでは説明することは困難である。すなわち、これら薬物代謝酵素遺伝子の他に PAH の毒性発現に関与している新規の AHR 標的遺伝子が存在している可能性が考えられた。そこで本研究では、ディファレンシャルディスプレイ (DD) 法や DNA マイクロアレイを用いて PAH の毒性発現に関与する新たな AHR 標的遺伝子を探索し、これらの標的遺伝子を解析することにより、今までほとんど明らかになっていない PAH の毒性発現機構を分子レベルで解明することを目的とした。

2. DD 法を用いた新規 AHR 標的遺伝子の探索および機能解析

無処置の野性型マウスと MC 処置した野性型マウスの肝における遺伝子の発現パターンを DD 法により比較した。その結果、MC により発現が抑制される遺伝子として、血圧の調節に重要なブラジキニンを発現する low molecular weight (LMW) prekininogen 遺伝子および成長ホルモン (GH) 応答遺伝子である major urinary protein (MUP) 遺伝子が得られた。MC 処置した AHR 欠損マウスでは、LMW prekininogen および MUP 遺伝子の発現は抑制されなかった。したがって、これらの遺伝子は新規 AHR 標的遺伝子であることが明らかになった。さらに、これら新規 AHR 標的遺伝子の発現抑制により引き起こされる生体への影響について検討した。その結果、マウス血漿中のブラジキニン濃度が MC 処置によって AHR 依存的に減少することが明らかになった。また、MUP 遺伝子の発現は、GH 応答に関与している転写因子 signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) シグナル伝達系によって制御されていることより、MC による STAT5 シグナル伝達系への影響について検討した。MC 処置により STAT5 シグナル伝達の構成因子である GH 受容体 および janus kinase 2 mRNA の発現および STAT5 の STAT5 結合配列に対する結合活性が

AHR 依存的に減少することが明らかになった。以上の結果より、MC による MUP 遺伝子の発現抑制には、STAT5 シグナル伝達の抑制が重要であることが明らかになった。LMW prekininogen 欠損ラットでは著しい高血圧を示し、また、STAT5 欠損マウスでは、成長遅延、骨形成異常および乳腺発達異常を示すことより、今回得られた新規 AHR 標的遺伝子の発現抑制は PAH による高血圧、成長遅延、骨形成異常および乳腺発達異常の原因の一つである可能性が示唆された。

3. DNA マイクロアレイを用いた新規 AHR 標的遺伝子の探索および機能解析

無処置の野性型マウスと MC 処置した野性型マウスの肝における遺伝子の発現パターンを DNA マイクロアレイにより比較した。その結果、いくつかの脂肪酸分解に関与する遺伝子の発現が MC により抑制されることが明らかになった。また、AHR 欠損マウスを用いて同様の検討を行った結果、これらの遺伝子の発現抑制は AHR 依存的であった。これらの遺伝子は共通して核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の標的遺伝子であることが報告されている。そのため、PPAR α を介するシグナル伝達について検討したところ、PPAR α シグナル伝達は MC により AHR 依存的に阻害されることが明らかになった。また、MC による PPAR α シグナル伝達の抑制は、肝小葉における脂肪滴の発生を引き起こすことがわかった。脂肪滴の発生は脂肪肝の特徴的な症状であることより、MC による PPAR α シグナル伝達の抑制ならびに PPAR α 標的遺伝子の発現抑制は PAH による脂肪肝の原因であることが示唆された。

4. PAH による PPAR α シグナル伝達抑制機構の解明

MC による PPAR α シグナル伝達抑制の原因について検討した結果、この抑制には PPAR α のパートナー因子である retinoid X receptor α (RXR α) のタンパク質が MC により AHR 依存的に減少することが大きな原因であることを明らかにした。また、RXR α タンパク質の減少は、PPAR α シグナル伝達のみならず、RXR α がパートナーとなる様々な核内受容体シグナル伝達に影響を及ぼすことが明らかとなった。このため、MC による RXR α の抑制は脂肪肝のみならず、PAH による多様な毒性発現に関与している可能性が示唆された。また、MC による RXR α タンパク質の減少には 26S プロテアソームを介するタンパク質の分解経路が重要であり、この分解には p38 mitogen-activated protein kinases を介するリン酸化が関与している可能性が示唆された。

5. まとめ

- 1) AHR の新規標的遺伝子として LMW prekininogen 遺伝子、GH 応答遺伝子および PPAR α 標的遺伝子を同定した。
- 2) MC による LMW prekininogen 遺伝子の発現抑制は、LMW prekininogen 由来のブラジキニン量の減少を引き起こすことを明らかにした。
- 3) MC による GH 応答遺伝子の発現抑制には AHR を介した STAT5 シグナル伝達系の抑制が重要であることを見出した。
- 4) MC による PPAR α 標的遺伝子の発現抑制には PPAR α シグナル伝達の抑制が原因であることを見出した。この抑制には AHR を介した RXR α タンパク質の減少が重要であることを明らかにした。また、MC による AHR を介した RXR α タンパク質の減少は、PPAR α 以外の核内

受容体によるシグナル伝達も阻害することを明らかにした.

- 5) 今回得られた新規 AHR 標的遺伝子の PAH による発現抑制は, PAH による高血圧, 成長遅延, 骨形成異常, 乳腺発達異常や脂肪肝の原因となり得ることが示唆された.

学位論文審査の要旨

主査	教授	鎌	滝	哲	也
副査	教授	有	賀	寛	芳
副査	助教授	平		敬	宏
副査	助教授	山	崎	浩	史

学位論文題名

多環芳香族炭化水素による毒性発現の 分子機構に関する研究

3-メチルコランスレン (MC) やベンゾ[a]ピレンなどの多環芳香族炭化水素 (PAH) は内分泌攪乱物質として知られており、生体内において様々な毒性を引き起こす。これらの PAH の毒性発現は、細胞質に存在する転写活性化因子である芳香族炭化水素受容体 (AHR) を介して起こると考えられている。PAH は AHR を介してチトクローム P450 (CYP) の 1 分子種である *CYP1A1*, *CYP1B1* や *CYP1A2* などの薬物代謝酵素遺伝子の発現を誘導することが報告されている。しかし、PAH の多岐にわたる毒性発現は、これら薬物代謝酵素遺伝子の誘導だけでは説明することは困難である。すなわち、これら薬物代謝酵素遺伝子の他に PAH の毒性発現に関与している新規の AHR 標的遺伝子が存在している可能性が考えられた。そこで本研究では、ディファレンシャルディスプレイ (DD) 法や DNA マイクロアレイを用いて PAH の毒性発現に関与する新たな AHR 標的遺伝子を探索し、これらの標的遺伝子を解析することにより、今までほとんど明らかになっていない PAH の毒性発現機構を分子レベルで解明することを目的とした。

(1) DD 法を用いた新規 AHR 標的遺伝子の探索および機能解析

無処置の野性型マウスと MC 処置した野性型マウスの肝における遺伝子の発現パターンを DD 法により比較した。その結果、MC により発現が抑制される遺伝子として、血圧の調節に重要なブラジキニンを発現する low molecular weight (LMW) prekininogen 遺伝子および成長ホルモン (GH) 応答遺伝子である major urinary protein (MUP) 遺伝子が得られた。MC 処置した AHR 欠損マウスでは、LMW prekininogen および MUP 遺伝子の発現は抑制されなかった。したがって、これらの遺伝子は新規 AHR 標的遺伝子であることが明らかになった。さらに、これら新規 AHR 標的遺伝子の発現抑制により引き起こされる生体への影響について検討した。その結果、マウス血漿中のブラジキニン濃度が MC 処置によって AHR 依存的に減少することが明らかになった。また、MUP 遺伝子の発現は、GH

応答に関与している転写因子 signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) シグナル伝達系によって制御されていることより, MC による STAT5 シグナル伝達系への影響について検討した. MC 処置により STAT5 シグナル伝達の構成因子である GH 受容体および janus kinase 2 mRNA の発現および STAT5 の STAT5 結合配列に対する結合活性が AHR 依存的に減少することが明らかになった. 以上の結果より, MC による MUP 遺伝子の発現抑制には, STAT5 シグナル伝達の抑制が重要であることが明らかになった. LMW prekininogen 欠損ラットでは著しい高血圧を示し, また, STAT5 欠損マウスでは, 成長遅延, 骨形成異常および乳腺発達異常を示すことより, 今回得られた新規 AHR 標的遺伝子の発現抑制は PAH による高血圧, 成長遅延, 骨形成異常および乳腺発達異常の原因の一つである可能性が示唆された.

(2) DNA マイクロアレイを用いた新規 AHR 標的遺伝子の探索および機能解析

無処置の野性型マウスと MC 処置した野性型マウスの肝における遺伝子の発現パターンを DNA マイクロアレイにより比較した. その結果, いくつかの脂肪酸分解に関与する遺伝子の発現が MC により抑制されることが明らかになった. また, AHR 欠損マウスを用いて同様の検討を行った結果, これらの遺伝子の発現抑制は AHR 依存的であった. これらの遺伝子は共通して核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の標的遺伝子であることが報告されている. そのため, PPAR α を介するシグナル伝達について検討したところ, PPAR α シグナル伝達は MC により AHR 依存的に阻害されることが明らかになった. また, MC による PPAR α シグナル伝達の抑制は, 肝小葉における脂肪滴の発生を引き起こすことがわかった. 脂肪滴の発生は脂肪肝の特徴的な症状であることより, MC による PPAR α シグナル伝達の抑制ならびに PPAR α 標的遺伝子の発現抑制は PAH による脂肪肝の原因であることが示唆された.

(3) PAH による PPAR α シグナル伝達抑制機構の解明

MC による PPAR α シグナル伝達抑制の原因について検討した結果, この抑制には PPAR α のパートナー因子である retinoid X receptor α (RXR α) のタンパク質が MC により AHR 依存的に減少することが大きな原因であることを明らかにした. また, RXR α タンパク質の減少は, PPAR α シグナル伝達のみならず, RXR α がパートナーとなる様々な核内受容体シグナル伝達に影響を及ぼすことが明らかとなった. このため, MC による RXR α の抑制は脂肪肝のみならず, PAH による多様な毒性発現に関与している可能性が示唆された. また, MC による RXR α タンパク質の減少には 26S プロテアソームを介するタンパク質の分解経路が重要であり, この分解には p38 mitogen-activated protein kinases を介するリン酸化が関与している可能性が示唆された.

以上, AHR の新規標的遺伝子および PAH による毒性発現機構に関する新しい重要な概念を提案することに成功した. 本論文『多環芳香族炭化水素による毒性発現の分子機構に関する研究』に含まれる研究成果は環境薬学研究における基礎および応用のいずれにおいても優れており, 博士 (薬学) の学位を受けるに充分値するものと認めた.