

高感度レポーター遺伝子アッセイ法を用いた 環境化学物質の核内受容体転写活性の検出 及びダイオキシン類簡易測定法の開発

学位論文内容の要旨

【はじめに】

内分泌攪乱物質やダイオキシン類は、核内受容体や芳香族炭化水素受容体(AhR)などの「リガンド依存性の転写因子」とそれぞれ特異的に結合し、遺伝子発現を介して内分泌系をはじめ、神経系、免疫系などの様々な生理機能に被害を及ぼす。現在ヒトでは48種類の核内受容体が知られている。人の産業活動などにより環境中には5万種類以上の化学物質が存在するといわれるが、核内受容体やAhRを介したこれらの化学物質による作用はほとんど明らかにされていない。したがって、人が曝露する化学物質、食品、環境試料について、これらの受容体活性を明らかにすることは、人の健康を守るために重要である。本研究では、化学物質による核内受容体を介した作用を検出できる高感度なレポーター遺伝子アッセイ系を確立し、ヒトが曝露する可能性が高いと考えられる253物質について、9種類の核内受容体を介した作用を調べた。

食品や環境中に広く存在するダイオキシン類の測定は、従来の機器分析法では多大な費用と労力を要していた。そこで本研究では、ダイオキシン類が特異的に結合するAhRを介した活性を高感度に検出できるレポーター遺伝子アッセイ系を確立し、ダイオキシン類の主要な曝露源である食品や環境試料中のダイオキシン類の簡便で迅速な簡易測定法の開発を試みた。

【結果と考察】

1. 植物由来成分31物質の核内受容体を介した作用

野菜、果物、穀物などに広く含まれる植物由来化学物質及びその代謝物31物質の核内受容体活性を調べたところ、エストロゲン受容体(ER) α アゴニスト活性が18物質、ER β アゴニスト活性が20物質に認められた。エストロゲン活性を示した20物質のうち19物質が、ER β の方がER α よりも強い活性を示した。これらの活性の発現には7-位及び4'-位の水酸基が重要であることが示唆された。ER β は、ER α を介した乳ガン細胞の増殖を抑制することが報告されており、上記の化合物の乳ガン予防作用が期待される。さらに、プレグナンX受容体(PXR)アゴニスト9物質、ER β アンタゴニスト1物質、アンドロゲン受容体(AR)アンタゴニスト2物質、PPAR α アゴニスト1物質を新たに見出した。

2. フタル酸エステル類22物質の核内受容体を介した作用

可塑剤としてプラスチックなどに広く使用されるフタル酸エステル類22物質について、核内受容体活性を調べた。その結果、芳香環の側鎖を有するフタル酸ジフェニルを除いた、側

鎖の炭素鎖長が 3~6 の範囲に入るフタル酸ジエステル類が、ER α に対してアゴニスト活性、ER β 及び AR に対しては、アンタゴニスト活性を示すことが明らかになった。これらの分子サイズが ER や AR のリガンド結合部位に適合するためと考えられる。また、既に報告がある PPAR α アゴニスト 1 物質の活性を確認し、新たに PXR アゴニスト 14 物質を見出した。

3. 農薬 200 物質の ER α / β 、AR を介した作用

過去に使用されたものを含む代表的な農薬 200 物質について ER α / β 、AR を介した作用を調べたところ、ER α アゴニスト活性が 47 物質、ER β アゴニスト活性が 33 物質に認められた。さらに、ER α アンタゴニスト活性が 5 物質、ER β アンタゴニスト活性が 2 物質に認められた。

一方、AR へのアゴニスト活性を示した農薬は全く認められなかったが、66 物質もの農薬に AR アンタゴニスト活性が認められた。本研究により、農薬 200 物質のうち 34 農薬が、ER アゴニスト活性及び AR アンタゴニスト活性を併せ持つことが明らかになり、これらの農薬が環境中で生物を雌性化の方向に導く可能性が示唆された。

4. 農薬 200 物質のペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体(PPAR) α/γ 、PXR、甲状腺ホルモン受容体(TR) $\alpha 1/\beta 1$ 、レチノイド X 受容体(RXR) α を介した作用

3. と同じ農薬 200 物質の PPAR α/γ を介した作用を調べたところ、PPAR γ アゴニスト活性を示す農薬は認められなかったものの、PPAR α アゴニスト活性が 3 物質に認められた。これら 3 物質を C57BL/6 マウスに腹腔内投与し、肝臓における PPAR α 誘導性 CYP4As の発現を調べた結果、ジクロホップメチルは、*in vitro* では陽性対照物質(WY14643)と比較して 1/7 以下の活性であったが、*in vivo* では WY-14643 に匹敵する活性が認められ、生体内でより強い活性を有する化学物質に変化する可能性が考えられた。他の核内受容体活性については、116 物質に PXR アゴニスト活性が認められたものの、TR $\alpha 1/\beta 1$ 、RXR α 、PPAR γ を介した作用を示した農薬は全く認められなかった。

5. 高感度な AhR アッセイ系の開発と農薬 200 物質の AhR を介した作用

7つのダイオキシン応答配列を組み込んだレポータープラスミドを Hepa-1c1c7 細胞に導入し、DR 細胞株を確立した。この DR 細胞はダイオキシン類に対して高感度であり、アッセイ時の煩雑な操作を省略でき簡便性にも優れていた。DR 細胞を用いて前述の農薬 200 物質の AhR 活性を調べたところ、11 物質に AhR アゴニスト活性を認めた。このうち強い活性を示した 3 農薬について、C57BL/6 マウスを用いて肝臓における AhR 誘導性 CYP1As の発現を調べたところ、いずれも CYP1As mRNA の有意な発現を認め、生体内においても AhR のリガンドとして作用することが示唆された。

6. AhR 活性を指標とした魚介類、大気、排ガス、燃え殻・ばいじん中ダイオキシン類の測定

5. で述べた DR 細胞を応用し、AhR 活性を指標としたダイオキシン類の測定法(DR 細胞アッセイ法)を開発した。魚介類(25 試料)、大気試料(80 試料)、大気中ダイオキシン類の主要な発生源である焼却炉の試料(排出ガス(31 試料)、ばいじん・燃え殻(44 試料))について、DR 細胞アッセイ法による測定値と機器分析法による測定値を比較したところ、極めて高い相関($r=0.96, 0.98, 0.94, 0.96$)が認められた。このことから、DR 細胞アッセイ法はダイオキシン類簡易測定法として使用できることが示唆された。

【結語】

本研究により、多くの化学物質が核内受容体(特に ER α / β 、AR、PXR)を介した作用を有すること、複数の核内受容体を介した作用を併せ持つことが明らかになった。核内受容体は様々

な医薬品のターゲットにもなっており、本研究で得られた知見は創薬の面からも有用と考えられる。一方、現在の法規制に関わる毒性評価では、化学物質によるリガンド依存性転写因子を介した作用の評価項目が無いことから、これらの作用はチェックがほとんどなされていない。今後はヒトが曝露する可能性が高いより多くの化学物質や、食品や環境試料について、核内受容体及び AhR を介した作用を明らかにしていくことが衛生化学的に重要と考える。

AhR 活性を高感度に検出できる DR 細胞を確立し、ヒトが曝露する可能性のある食品や環境試料に含まれるダイオキシン類の迅速で簡便な測定法を開発した。本法は、これらの試料中ダイオキシン類の測定への適用が十分に可能と考えられ、コストと労力がかかる機器分析法に先立つスクリーニング法として期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 正
副 査 教 授 三 浦 敏 明
副 査 講 師 南 保 明日香
副 査 研究主査 小 島 弘 幸 (北海道立衛生研究所)

学 位 論 文 題 名

高感度レポーター遺伝子アッセイ法を用いた 環境化学物質の核内受容体転写活性の検出 及びダイオキシン類簡易測定法の開発

核内受容体や芳香族炭化水素受容体(AhR)は、特定の化学物質と結合し、内分泌系をはじめ、神経系、免疫系などの様々な生理作用に関わっている。人の産業活動などにより非常に多くの化学物質が環境中に存在するが、それらの化学物質による核内受容体やAhRを介した作用は、これまでほとんど明らかにされていない。本研究では、化学物質による核内受容体を介した作用を検出できる高感度なレポーター遺伝子アッセイ系を確立し、ヒトが曝露する可能性が高いと考えられる253物質について、9種類の核内受容体を介した作用を調べた。

物の燃焼などで発生するダイオキシン類は、食品や環境中に広く存在することが知られているが、ダイオキシン類の測定は、従来の機器分析法では多大な費用と労力を要していた。そこで本研究では、ダイオキシン類が特異的に結合するAhRを介した活性を高感度に検出できるレポーター遺伝子アッセイ系を確立し、ダイオキシン類の主要な曝露源である食品や環境試料中のダイオキシン類の簡便で迅速な簡易測定法の開発を試みた。

野菜、果物、穀物などに広く含まれるフラボノイドやリグナンなど31物質の核内受容体活性を調べたところ、エストロゲン活性を示した20物質のうち19物質が、ER β の方がER α よりも強い活性を示した。ER β は、ER α を介した乳ガン細胞の増殖を抑制することが報告されており、上記の化合物の乳ガン予防作用が期待される。

可塑剤として広く使用されるフタル酸エステル類22物質について、核内受容体活性を調べた。その結果、側鎖の炭素鎖長が3~6の範囲に入るフタル酸ジエステル類の多くが、ER α に対してアゴニスト活性、ER β 及びARに対しては、アンタゴニスト活性を併せ持つことが明らかになった。これらの分子サイズがERやARのリガンド結合部位に適合するためと考えられる。

過去に使用されたものを含む代表的な農薬200物質についてER α/β 、ARを介した作用を調べたところ、ER α アゴニスト活性が47物質、ER β アゴニスト活性が33物質に認められた。さらに、ER α アンタゴニスト活性が5物質、ER β アンタゴニスト活性が2物質に認められ、66物質もの農薬にARアンタゴニスト活性が認められた。多くの農薬がERアゴニスト活性及びARアンタゴニスト活性を

併せ持つことが明らかになり、これらの農薬が環境中で生物を雌性化の方向に導く可能性が示唆された。

同じ農薬200物質において、PPAR α アゴニスト活性が3物質に認められた。特にジクロホップメチルは、in vitroでは陽性対照物質(WY14643)と比較して1/7以下の活性であったが、in vivoではWY-14643に匹敵する活性が認められ、生体内でより強い活性を有する化学物質に変化する可能性が考えられた。また、PXRアゴニスト活性が116物質もの農薬に認められた。

7つのダイオキシン応答配列を組み込んだレポータープラスミドをHepa-1c1c7細胞に導入し、DR細胞株を確立した。このDR細胞はダイオキシン類に対して高感度であり、アッセイ時の煩雑な操作を省略でき簡便性にも優れていた。DR細胞を用いて前述の農薬200物質のAhR活性を調べたところ、11物質にAhRアゴニスト活性を認めた。このことから、DR細胞は化学物質のAhR活性のスクリーニングにおいても有用であることが示された。

このDR細胞を応用し、AhR活性を指標としたダイオキシン類の測定法(DR細胞アッセイ法)を開発した。魚介類、大気試料、大気中ダイオキシン類の主要な発生源である焼却炉の試料(排出ガス、ばいじん・燃え殻について、DR細胞アッセイ法による測定値と機器分析法による測定値を比較したところ、いずれも極めて高い相関を認めた。このことから、DR細胞アッセイ法はダイオキシン類簡易測定法として使用できることが示唆された。

本研究により、多くの化学物質が核内受容体やAhRを介した作用を有すること、複数の核内受容体やAhRを介した作用を併せ持つことが明らかになった。したがって、ヒトが曝露する可能性が高い化学物質や、食品や環境試料について、核内受容体及びAhRを介した作用を明らかにしていくことは衛生化学的に重要と考えられる。また、核内受容体は様々な医薬品のターゲットにもなっており、本研究で得られた知見は創薬の面からも有用と考えられる。さらに、AhR活性を高感度に検出できるDR細胞を確立し、ヒトが曝露する可能性のある食品や環境試料に含まれるダイオキシン類の迅速で簡便な測定法を開発した。本法は、これらの試料中ダイオキシン類の測定への適用が十分に可能と考えられ、コストと労力がかかる機器分析法に先立つスクリーニング法として期待できる。