

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510075
 研究課題名 (和文) 内分泌攪乱物質のビタミン D および骨 Ca 代謝に及ぼす影響と毒性発現メカニズムの解明
 研究課題名 (英文) Studies on the effects of dioxin on bone mineralization, vitamin D metabolism and calcium(Ca) homeostasis in the growing mouse
 研究代表者
 西村 典子 (NISHIMURA NORIKO)
 独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・主任研究員
 研究者番号：10097800

研究成果の概要：内分泌攪乱物質のダイオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) によるビタミン D、骨 Ca 代謝および骨形成に及ぼす影響とその毒性発現メカニズムを解明するために研究をおこなった。出産 1 日目に体重 kg 当たり 15 μ g の TCDD を経口的に投与した母マウスの母乳を介して仔マウスに TCDD を曝露し、検体を採取して骨代謝関連因子を組織学的、生化学的、分子生物学的に分析しその発現機構を総合的に解析した。本研究は、TCDD が活性型ビタミン D 合成を促進させる結果、血中のビタミン D の恒常的な高濃度をもたらし、この高ビタミン D 血症が骨芽細胞の活性抑制と骨の石灰化を阻害するというダイオキシンの骨毒性発現の本態を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：ダイオキシン、腎臓、Ca 吸収、ビタミン D 代謝、骨形成、

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) は腎臓の遠位尿細管を特異的に障害することを我々はこれまでの一連の研究から明らかにしてきた。この部位はミ

ネラル代謝、特にカルシウム (Ca) の吸収に極めて重要な役割を果たしているだけでなく、活性型ビタミン D の合成部位でもあることに我々は関心を持った。この部位が TCDD の標的部位であるならば当然 TCDD に

より骨代謝が攪乱されることが想定された。事実、骨や歯が TCDD 毒性に極めて敏感であることが疫学調査や動物実験から示唆されていた。TCDD が骨代謝と密接な関連性があるビタミン D 代謝と Ca 代謝攪乱に関与するかどうか、また関与する場合はそのメカニズムを明らかにすることがこの研究の発端となり一連の実験を開始した。

2. 研究の目的

TCDD は化学的に安定でしかも毒性が極めて強い環境汚染物質で、内分泌攪乱化学物質としても知られている。その毒性は甲状腺、肝臓、腎臓など様々な組織で、また免疫機能、催奇性など多様な毒性を発揮する。一方、骨はダイオキシンの標的器官であり骨の成長抑制や強度の低下などをもたらすことが動物実験で明らかにされている。にもかかわらず、その作用メカニズムはほとんど分かっていない。TCDD による骨毒性の病態を明らかにするためには、骨代謝に関係するビタミン D 代謝関連酵素、Ca 代謝関連酵素、骨の細胞（骨芽細胞、破骨細胞）の動態を解析することで全貌が明らかとなる。そのため、マウスを用いて、それらのパラメーターの変化に関して生化学的、分子生物学的、組織病理的、免疫組織学的観点から総合的に解析してその作用メカニズムの全貌を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

以下に述べる各種パラメーターの変動を骨、腎臓、小腸、副甲状腺、血液、尿などの標的組織において分子生物学的、免疫組織学的、生化学的に分析した。

遺伝子発現量の解析: ビタミンD活性化酵素 (1α -ヒドロキシラーゼ)、活性型ビタミン D 分解酵素 (24-ヒドロキシラーゼ)、Ca 輸送系酵素 (カルビンデイン- D^{28K} 、カルビンデイン- D^{9K} 、NCK、PMCA1b、TRPV5、TRPV6)、骨代謝マーカー (アルカリフォスファターゼ、I 型コラーゲン、RANK、RANKL)、Ca および P 調節遺伝子 (FGF23) などの遺伝子発現を RT-PCR 法で分析した。

免疫組織学: ゼンボニー液で固定した後組織の薄切片を作製した。各種一次抗体 (カルビンデイン- D^{28K} 、カルビンデイン- D^{9K} 、副甲状腺ホルモン、 1α -ヒドロキシラーゼなど) と反応させた後、ABC法でその局在性を顕微鏡下で観察した。

骨組織学及び形態計測: 骨塩量、骨密度、皮質骨の厚さは二重 X 線吸収法にて測定した。骨形態計測は 70%エタノールで固定後、メタ

アクリル樹脂に法埋した組織を薄切片し、Villanueva's Goldner 染色して解析した。

4. 研究成果

腎臓の病理組織所見を図 1A に示した。TCDD

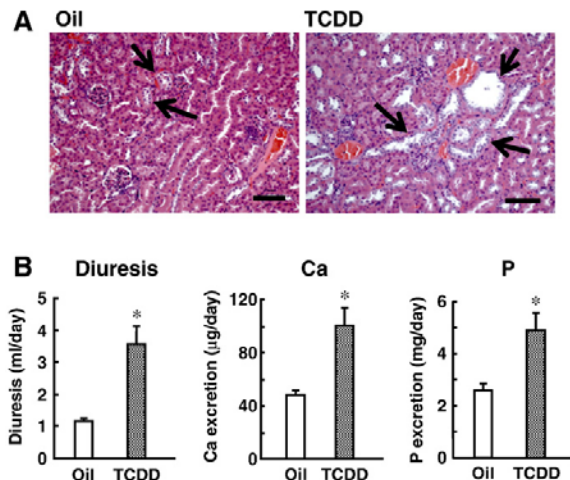


図 1、TCDD による腎組織及び腎機能の変化

が特に遠位尿細管 (矢印) を障害することが明瞭に認められた。尿分析の結果 TCDD は多尿、Ca および P の排泄増加をもたらすことが分かった (図 1B)。

ところが、血中 Ca 濃度は対照群との間に差はなかった (図 2A)。Ca 代謝と密接な関連性がある副甲状腺の機能と形態に及ぼす TCDD の影響を調べた。副甲状腺ホルモンの発現および組織学的にもダイオキシンの影響は認められなかった (図 2C-F)。

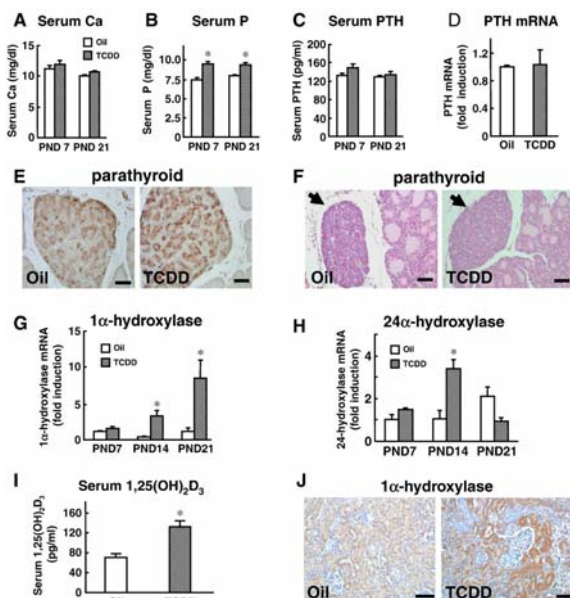


図 2、Ca と P の血清レベルと副甲状腺機能の TCDD による影響

次にビタミン D 活性化酵素の発現、血中ビタ

ミンD濃度、ビタミンD活性化酵素の腎臓組織内局在性を投与群と対照群で比較検討した。その結果、実験群でビタミンD合成活性が著明に亢進することが遺伝子レベルと蛋白レベルで明らかとなった(図2G-J)。

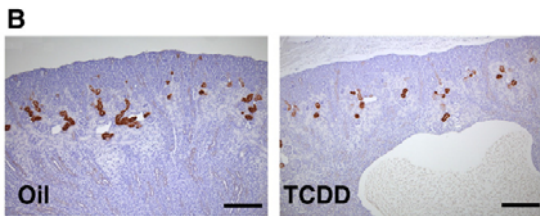
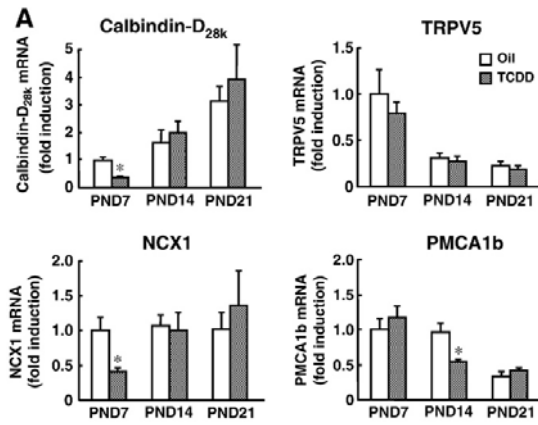


図3、TCDDによる腎中Ca輸送に関する影響

Caの吸収に係っている腎臓内Ca吸収関連遺伝子に及ぼすTCDDの影響を遺伝子レベルと蛋白レベルで比較した。TCDDは腎臓においてCaの吸収阻害をもたらした(図3A,B)。一方、小腸においては代償的促進をもたらし、この代償作用により血中Caの恒常性を維持していることが示唆された(図4A,B)。

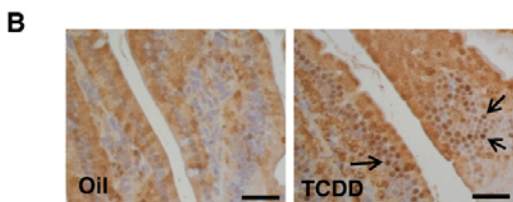
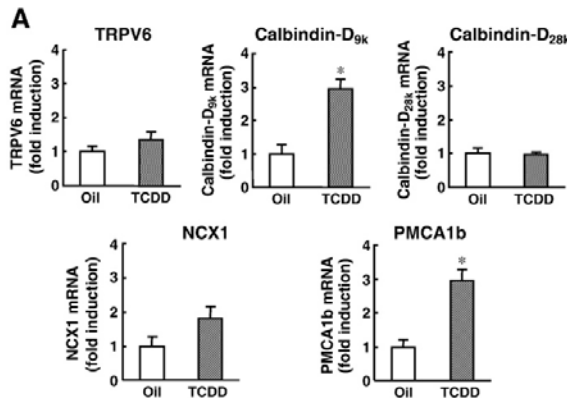


図4、TCDDによる小腸のCa吸収に関する遺伝子発現量および蛋白量の変化

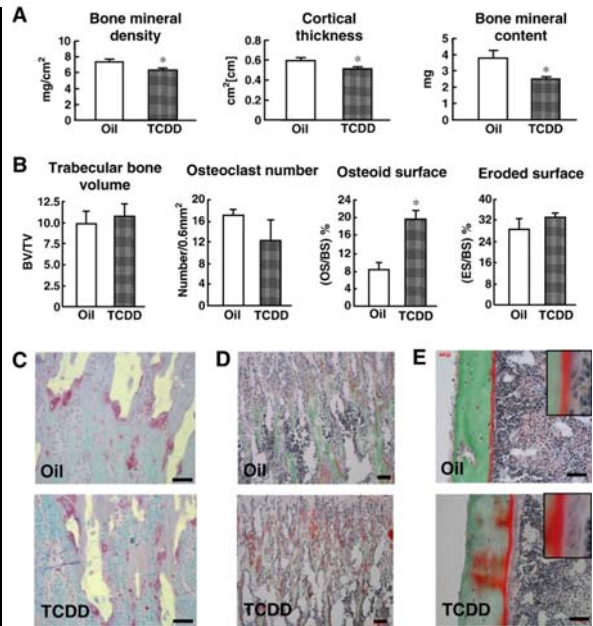


図5、TCDDによる骨形成への影響

次にTCDDの骨への影響を生化学的、分子生物学的、形態的に解析した。骨塩量、骨密度、皮質骨の幅のいずれもがTCDDにより減少していた(図5A-C)。Villanueva's Goldner染色を行ったところTCDDによる海綿骨及び皮質骨において類骨の著しい拡大が認められた(図5B-E)。骨の形態計測から破骨細胞数を

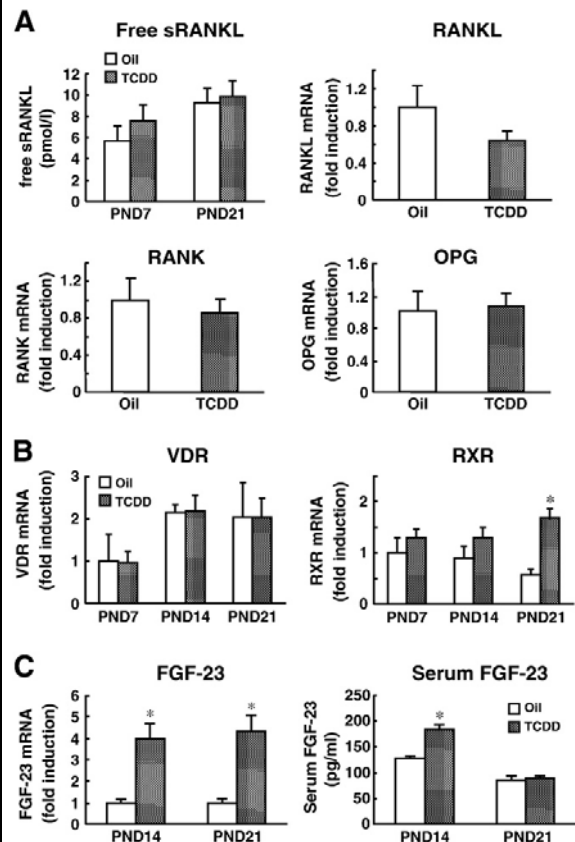


図6、TCDDの破骨細胞関連遺伝子への影響

含め破骨細胞への影響は見られなかった(図5-C)。

また破骨細胞のマーカー蛋白の遺伝子発現に対する TCDD の影響を調べたところ RANK、RANKL、OPG のいずれのマーカーの発現に対して TCDD による影響は認められず形態計測的分析データと一致した結果が得られた(図6A)。

FGF23 はビタミンD濃度の調節遺伝子として知られている遺伝子である。その発現を比較検討したところ、TCDD がその発現を有意に誘導することが明らかとなった(図)。さらにビタミンD受容体発現に及ぼす TCDD の影響を調べたが VDR、RXR とともに影響は見られなかった(図6B,C)。

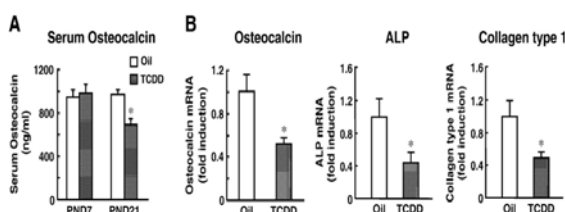


図7、TCDDの骨芽細胞関連遺伝子への影響

以上の実験結果は TCDD の骨毒性は破骨細胞の活性促進によるものではなく骨形成の活性を阻害することにより発現することを強く示唆するものであった。そこで骨芽細胞活性を調べるためにその代表的なマーカーであるオステオカルシン、アルカリフォスファターゼ、1型コラーゲンの発現に対する TCDD の影響を分析した。その結果、TCDD によりいずれのマーカー蛋白の発現が抑制されることが明らかとなった(図7A,B)。以上の実験結果から我々は TCDD による骨病態の発現機構を次のように結論づけた。

すなわち、TCDD はまず初めに腎臓においてビタミンD活性化酵素を著名に誘導する。この遺伝子の活性化が異常な高ビタミンD血症を惹起する。この結果、骨芽細胞の活性化を著しく阻害する。による骨の石灰化を阻害することが TCDD の骨毒性の本態であるとの結論を導いた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Nishimura N, Nishimura H, Ito T, Miyata C, Izumi K, Fujimaki H, Matsumura F, Dioxin-induced up-regulation of the

active form of vitamin D is the main cause for its inhibitory action on osteoblast activities leading to developmental bone toxicity, Toxicology and Applied Pharmacology, 236, 301-309, 2009年、査読有

- ② Nishimura N, Matsumura F, Vogel FA, Nishimura H, Yonemoto J, Yoshioka W, Tohyama Critical role of cyclooxygenase-2 activation in pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin, Toxicology and Applied Pharmacology, 231, 374-383, 2008, 査読有
 - ③ Shibuya K, Nishimura N, Suzuki J, Tohyama C, Naganuma A, Satoh M, Role of metallothionein as a protective factor against radiation carcinogenesis, The Journal of Toxicological Sciences, 33(5):651-655, 2008, 査読有
 - ④ Nishimura N, Ito T, Fujimaki H, Nishimura H, Defect of mineralization as a possible cause of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced bone toxicity in early postnatal development in mice, 28th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs), 70:1924-1927, 2008, 査読無
 - ⑤ Vogel C, Nishimura N, Sciallo E, Wong P, Li W, Matsumura F.: Modulation of the chemokines KC and MCP-1 by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Mice. Arch. Biochem Biophys. 461:169-175, 2007 査読有
 - ⑥ Noriko N, Miyata C, Ito T, Izumi K, Fujimaki H, Nishimura H, Up-regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1-hydroxylase and disruption of calcium metabolism by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in developing mouse kidney, Organohalogen Compounds, 69: 1079-1082, 2007 査読無
- [学会発表] (計23件)
- ① Nishimura N, Bone toxicity through dioxin-mediated disorders of vitamin D metabolism and Ca reabsorption in mouse kidney, Gordon Research

- Conferences Environmental Endocrine Disruptors, 2008年6月11日、Boston
- ② Nishimura N, Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on bone mineralization, vitamin D metabolism and calcium(Ca)homeostasis in the growing mouse, 5th SETAC World Congress, 2008年8月5日、Sydney
- ③ Nishimura N, Defect of mineralization as a possible cause of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced bone toxicity in early postnatal development in mice, 28th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs), 2008年8月19日、Birmingham
- ④ Nishimura N, Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on born development in mouse pups, Eurotox 2008, 2008年10月6日、Rhodes
- ⑤ Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on bone mineralization in the growing mouse. Nishimura N, Ito T, Izumi K, Fujimaki H, Nishimura H, SOT Annual meeting, 2008, Seattle, USA
- ⑥ 西村典子、宮田千恵、伊藤智彦、泉恵子、藤巻秀和、西村久雄、マウス腎臓のビタミンD代謝およびカルシウム輸送に及ぼす 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin の攪乱作用、第34回日本トキシコロジー学会、Vol.32, P. S98 2007、3、東京
- ⑦ 西村典子、伊藤智彦、泉恵子、藤巻秀和、西村久雄、マウス腎におけるダイオキシンによるビタミンD代謝攪乱と骨形成への影響、第78回日本衛生学会総会、2008年3月、熊本
- ⑧ Nishimura N, Miyata C, Ito T, Izumi K, Fujimaki H, Nishimura H, Changes of gene expression involved in vitamin D metabolism and transcellular Ca²⁺ transport by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in developing mouse kidney. International Congress of Toxicology, 2007, Montréal, Canada,
- ⑨ 西村典子、伊藤智彦、宮田千恵、泉恵子、藤巻秀和、西村久雄、発育期マウスにおけるダイオキシンのビタミンD代謝攪乱と骨毒性、日本内分泌攪乱化学物質

第10回研究発表会 p179, 2007, さいたま市

〔図書〕(計2件)

- ① 遠山千春、大迫誠一郎、石村隆太、西村典子、吉岡亘、ダイオキシンの生殖発生影響とその病態発症のメカニズム、細胞工学 Vol.26、No. 12, p1380-1385, (2008)
- ② 西村典子、周産期ダイオキシン曝露がもたらす甲状腺毒性発現メカニズム、Biophilia Vol.4 No.1, p30-34, (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 典子 (NISHIMURA NORIKO)
独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・主任研究員
研究者番号：10097800

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし