

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659053

研究課題名(和文)ダイオキシン毒性機構の新展開：ロイコトリエンB4増加の毒性的意義と油症との関連

研究課題名(英文)A new insight into the mechanism of dioxin toxicity: relevance of leukotrien B4 accumulation to toxicity and Yusho incident

研究代表者

山田 英之(Yamada, Hideyuki)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40142351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ダイオキシン(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)による肝臓のロイコトリエンB4(LTB4)の蓄積についてラットおよびマウスでの研究を行った。研究の結果、この変化の機構は、前駆体合成酵素の発現増加と前駆体を別経路に導く酵素の低下によると結論された。また、LTB4増加には芳香族炭化水素受容体の関与が示唆された。

LTB4は好中球を誘引し、それに高発現するmyeloperoxidase(MPO)から遊離される因子を介して細胞障害に関わる。これと符合して、TCDD処理ラット肝では、好中球集積によるとみられるMPOの有意な増加が認められた。

研究成果の概要(英文)：A reduction in hepatic leukotrien B4 (LTB4) by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) was studied in rats and mice. The results showed that this alteration is caused by a combination of the increased expression of 5-lipoxygenase (5-LOX), a precursor-synthesizing enzyme, and the reduced expression of leukotrien C4 synthase, an enzyme which leads the precursor to the different pathway. The aryl hydrocarbon receptor (Ahr) is suggested to play a role in 5-LOX induction. This is because 5-LOX induction occurred at fewer TCDD doses in C57BL/6J mice expressing Ahr with high affinity to TCDD than in DBA/2J mice with low affinity Ahr. LTB4 is an inflammatory factor. This mediator draws neutrophils expressing myeloperoxidase (MPO) the products of which serve in cell-killing effects. In accordance with this, TCDD increased the hepatic level of MPO.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ダイオキシン ロイコトリエンB4 5-リポキシゲナーゼ メタボロミクス 芳香族炭化水素受容体

## 1. 研究開始当初の背景

環境汚染・食品汚染物質であるダオキシン類は、芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AhR) との結合によってこれを活性化し、種々の毒性を惹起すると考えられている。AhR は遺伝子転写因子であることから、ダイオキシンは本受容体の活性化によって200種にも登る遺伝子の発現を変動させ、これが障害性に直結すると推定されている。しかし、どの遺伝子の変動が障害発現に寄与するかはまだ多くが未解明である。

## 2. 研究の目的

遺伝子にコードされるタンパク質には多くの酵素やトランスポーター等も含まれることから、ダイオキシンによる遺伝子発現変動はこれらの機能の変化を通して生体内低分子成分の水準を変動させ、これが生体機能失調の最終的な原因となる可能性がある。これの検証のため、メタボロームの解析を実施したところ、最強毒性ダイオキシンである2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は、炎症誘起に深く関与すると言われるロイコトリエン B4 (LTB4)の肝臓中蓄積を増加させることが示唆された。本研究はこれの確認を行うと共に、その機構と毒性への関与を明らかにすることを目的として実施した。また、TCDDによるLTB4増加にAhRが関与するかどうかは、この現象の毒性学的意義付けにおいて重要な情報となる。そこで本研究では、この点の解析も目的に加えて研究を行った。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 動物と処理

5週齢のWistar系雄性ラットに1-60 µg/kgのTCDDを単回経口投与し、投与7日後に肝臓を採取した。対照群にはコーン油を投与した。また、摂餌量低下による影響を評価するため、TCDD曝露群と摂餌量を合致させた対照群 (pair-fed 群) も作成し、同様に処理した。また、5週齢のC57BL/6J (高親和性 AhR) および DBA/2J (低親和性 AhR) 雄性マウスにそれぞれ以下の用量でTCDDを投与し、同様に実験に供した。C57BL/6J: 1.0, 5.0, 10, 20, 50 および 100 µg/kg、DBA/2J: 5.0, 10, 20, 100, 500 および 1,000 µg/kg。

### 3-2. メタボロミクス

肝臓を採取したのち、直ちに4倍量の50 mM Tris-HCl (pH 7.4) でホモジナイズした。これを、2,000 x g、4°Cにて10分間遠心分離し、上清を回収した。これに3倍量のメタノールを加えて2回抽出したのち、遠心エバポレーターにて溶媒を留去した。残渣を10%メタノールに再溶解させたのち、超分解能液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析 (UPLC-TOF・MS) に付してメタボローム変動を解析した。UPLCの条件は以下の通り：機器、LCT-Premier XE (Waters)；イオン化、electrospray ionization；カラム、ACQUITY UPLC® HSS T3 (2.1x100 mm, 1.8 mm i.d.

(Waters)；カラム温度、40°C；注入口温度、10°C；注入量、10 µl；流速：0.2 ml/min；移動相、(A) 0.1% formic acid (positive ion mode) または 10 mM 4-methylmorpholin (negative ion mode) と (B) acetonitrile の単独または混合によるグラジエントプログラム [% of B in A (min)]: 0% (0-5)、0-40% (5-20)、40-90% (20-29)、90% (29-30)、90-0% (30-31) および 0% (31-35)。TOF・MSの条件は以下の通り：capillary voltage、3 kV (positive ion mode) または 2.5 kV (negative ion mode)、sample cone voltage、50 V；cone gas flow、50 l/hr；desolvation gas flow、600 l/hr；desolvation temperature、350°C；source temperature、120°C。

### 3-3. 多変量解析

ソフトウェア MarkerLynx™ XS (Waters) を用いた主成分分析法 (Principal Component Analysis, PCA) および直交型部分的最小二乗法 (Orthogonal Partial Least Squares, OPLS) により解析を行った。

### 3-4. mRNA 発現量解析

肝臓より total RNA を抽出し、リアルタイム reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法を用いて mRNA 発現量を定量した。目的遺伝子の発現は β-actin で補正した。

### 3-5. イムノブロットング

肝臓を 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) でホモジナイズし、2,000 x g で 10 分間遠心分離した。得られた上清をさらに 105,000 x g で 60 分間遠心分離し、サイトゾルおよびミクロソーム画分を調製した。これらをそれぞれ用いて [サイトゾル：5-lipoxygenase、ミクロソーム：LTC4 synthase]、イムノブロット法によりタンパク質発現量を定量した。目的タンパク質の発現は β-actin (5-lipoxygenase) および β-tubulin (LTC4 synthase) で補正した。

### 3-6. Myeloperoxidase (MPO) 活性

肝 2,000 x g 上清を反応溶液 [50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0)、0.157 mg/ml o-dianisidine および 0.0005% hydrogen peroxide] に加え、5分間反応後 450 nm の吸光度を測定した。

## 4. 研究成果および考察

### 4-1. TCDD による肝メタボロームの変動

UPLC-TOF・MS を用いてラット肝臓のメタボローム変動を分析し、PCA 解析に付した結果、スコアプロットにおいて3群間でプロットクラスターが大きく乖離し、TCDD 処理および pair-fed 処理は顕著なメタボローム変動を惹起することが示唆された (Fig. 1)。さらに、OPLS 法により得られる S-プロットでは、pair-fed 群および TCDD 群において多くのフラグメントイオンの増減が確認された (Fig 未掲載)。増減イオンの保持時間と質量情報をデータベースと照合して成分を推定したところ、多くの組織成分の変動が推定された。TCDD 群および pair-fed 群の両群に共通して認められた成分も多く見られ、TCDD に

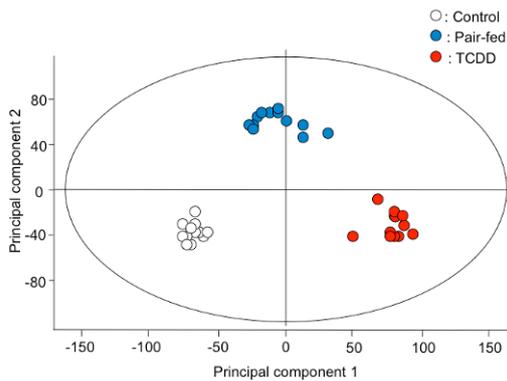


Fig. 1. Score plot of PCA analysis in terms of change in metabolomic profile produced by TCDD treatment and restricting food

よるメタボローム変動には、摂餌量減少に起因するものも多いことが示唆された (Table 1)。TCDD によって顕著に増加する成分の一つに LTB4 が見出され、本物質は pair-fed によってもある程度増加するが、増加率は TCDD 群の方が明らかに大きかった (Table 1)。LTB4 は炎症の誘発に関わることが知られており、TCDD 毒性との関連性に興味を持たれたので、本研究では以後 LTB4 増加に焦点を絞り、毒性への寄与と変動機構について検討を加えた。

#### 4-2. TCDD による MPO 活性の変動

LTB4 は好中球等の走化因子として広く知られている。従って、組織中の LTB4 が増加すると、誘引された好中球等が細胞浸潤し、結果として炎症を惹起することが予想される。そこで、これの検証のため炎症のマーカーである MPO 活性を指標として、検討を加えた。その結果、TCDD は肝 MPO 活性を有

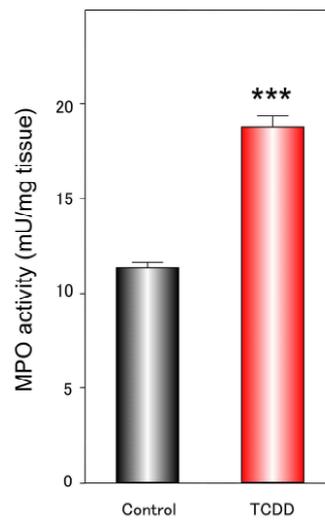


Fig. 2. Change in hepatic MPO activity following TCDD treatment. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 4-6 rats. Significantly different from control group; \*,  $p < 0.05$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ .

意に上昇させ、炎症応答の亢進が示唆された (Fig. 2)。また、腹腔内に LTB4 を持続投与し、同様に肝 MPO 活性の変動を解析した結果、用量依存的な MPO 活性の上昇が認められた (図表未掲載)。これらのことから、TCDD による肝 LTB4 増加は好中球を活性化することで炎症応答を引き起こし、肝障害を誘発する可能性が考えられた。

#### 4-3. LTB4 増加の機構

LTB4 増加の機構を解析するため、肝臓において LTB4 合成/代謝酵素の mRNA 発現変動を解析した結果、TCDD は LTB4 の合

Table 1. Representative ingredients the hepatic levels of which are altered by TCDD treatment and restricting food

Increase by >20-fold	Increase by $\leq$ 20-fold	Decease to <1/20 level	Decease to $\geq$ 1/20 level
<b>TCDD vs. Control</b>			
<b>LTB4</b> D-Galactosamine Saccharopine Oleic acid Coproporphyrinogen I Sialate	Taurine Histidine 5-Dodecenoic acid Arachidic acid Pyridoxal Flavin adenine dinucleotide Guanosine Gluconate dCMP Glucose-6-phosphate AMP	<b>LTC4</b> <b>20-OH-LTB4</b> Glycochenodeoxycholate Taurochenodeoxycholate Glycocholate Taurocholate Arginine 2-Ketobutyric acid $\alpha$ -Linolenic acid Progesterone L-Stercobilin Acetyl muramic acid	5-Hydroxyeicosatetraenoate L-Kynurenine 11-Dehydrocorticosterone Biotin Methyl tetrahydrofolate
<b>Pair-fed vs. Control</b>			
Acetylarnitine D-Galactosamine	<b>LTB4</b> L-Methionine Histidine Adenosine dCMP Glucose-6-phosphate AMP	2-Ketobutyric acid $\alpha$ -Linolenic acid Capric acid 11-Dehydrocorticosterone Progesterone Estrone Cytidine	<b>LTC4</b> 5-Hydroxyeicosatetraenoate Glycochenodeoxycholate Taurochenodeoxycholate Biotin Acetyl muramic acid

A change in LTB4 and related substances is highlighted by red character.

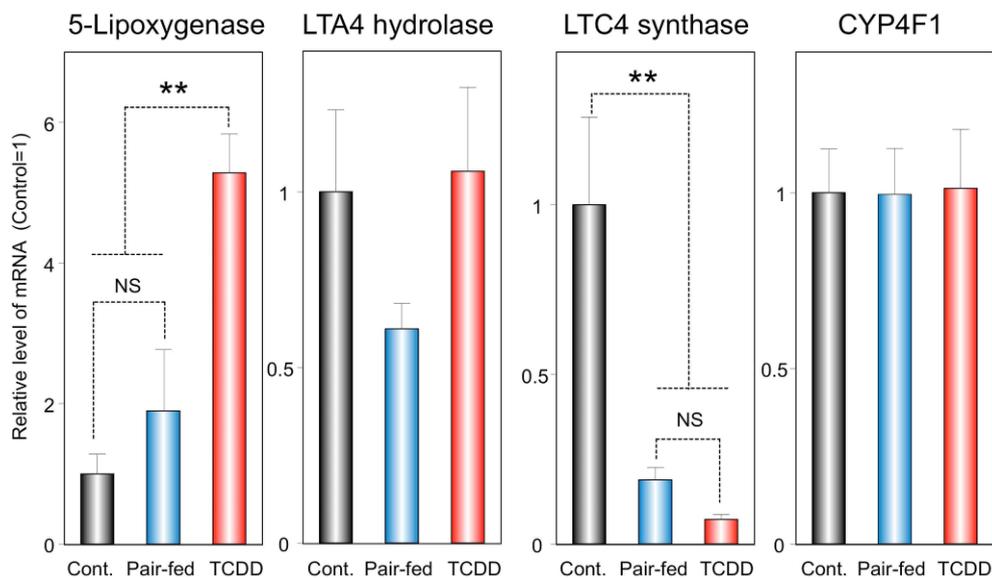


Fig. 3. Change in mRNAs coding for hepatic LTB<sub>4</sub>-synthesizing enzymes and related enzymes by treating with TCDD (red) and restricting food (blue). Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-10 rats. Significantly different between the pair indicated; \*\*,  $p < 0.01$ . N.S.: not significant.

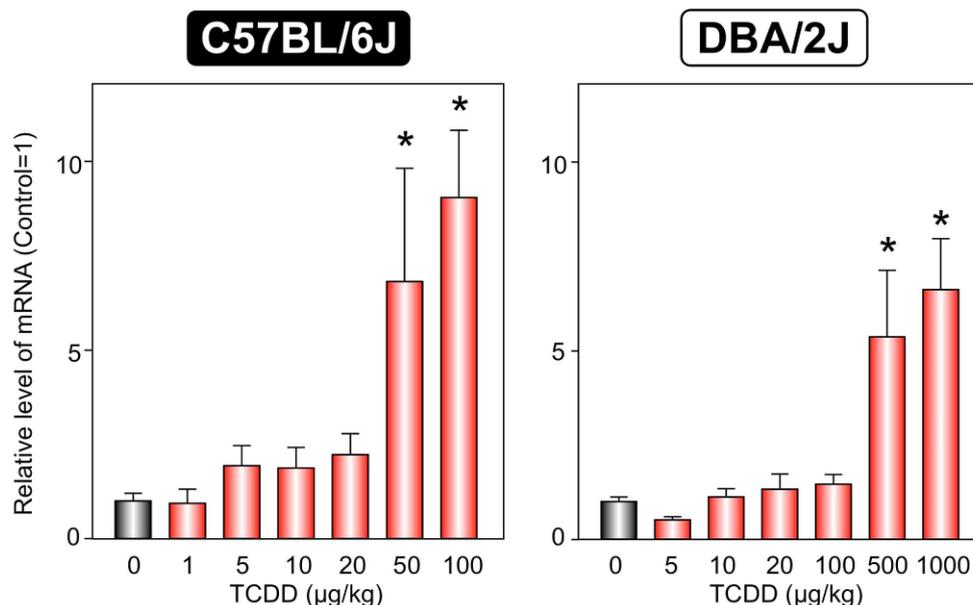


Fig. 4. Effect of TCDD on the hepatic expression of 5-lipoxygenase mRNA in male C57BL/6J and DBA/2J mice. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 4-9 mice. Significantly different from control group; \*,  $p < 0.05$ .

成律速酵素である 5-lipoxygenase を摂食量非依存的に誘導した。また、前駆物質である LTA<sub>4</sub> を LTB<sub>4</sub> とは別経路の代謝物である LTC<sub>4</sub> に変換する LTC<sub>4</sub> synthase を摂餌量減少に基づいて減少させることが明らかになった (Fig. 3)。5-Lipoxygenase と LTC<sub>4</sub> synthase の変動はイムノブロッティングによって、タンパク質レベルでも確認された (図未掲載)。LTA<sub>4</sub> の LTB<sub>4</sub> への変換を触媒する LTA<sub>4</sub> hydrolase および LTB<sub>4</sub> 代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) 4F1 は TCDD や摂餌量減少によっては変動しなかった (Fig. 3)。5-Lipoxygenase (増加) と LTC<sub>4</sub> synthase (減少) は、5 µg/kg 以上の TCDD で有意に変動し、

用量依存性が観察された (図表未掲載)。同様の用量依存性で肝肥大が惹起されることから、LTB<sub>4</sub> 蓄積が TCDD による肝障害と関連する可能性が考えられた。

5-Lipoxygenase 誘導に対する AhR 活性化の関与を検討するため、TCDD に対する親和性が異なる AhR を発現する 2 系統のマウス (C57BL/6J: 高親和性系統、DBA/2J: 低親和性系統) を用いて、mRNA 発現誘導に対する応答性の違いを比較した。その結果、C57BL/6J マウスの方が DBA/2J マウスよりもより低用量から誘導が認められ (Fig. 4)、5-lipoxygenase の誘導には AhR 活性化が関与することが示唆された。

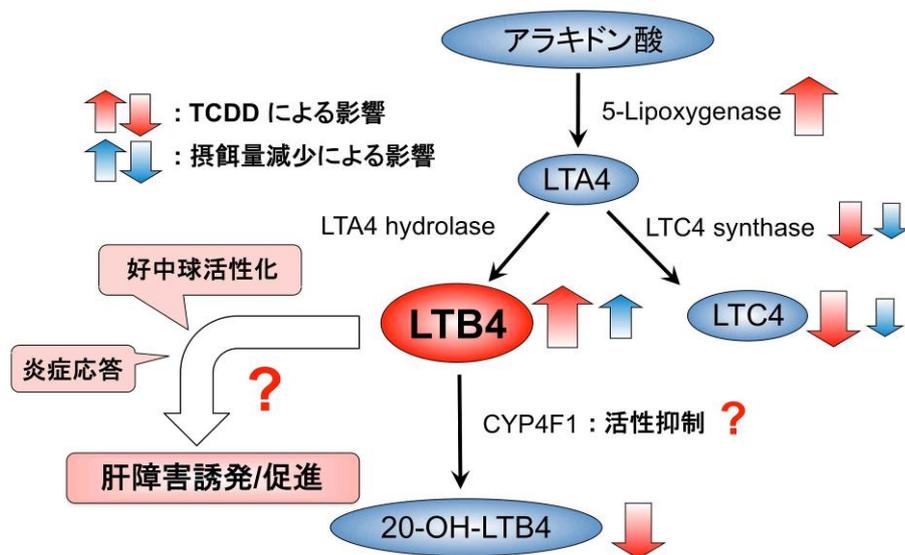


Fig. 5. Summary of TCDD effects on LTB4 synthesis and related pathways, and their possible relevance to toxicity

本研究で得られた成果を Fig. 5 に要約して示す。TCDD は肝の 5-lipoxygenase 誘導と LTC4 synthase の発現抑制を介して、LTB4 の蓄積をもたらすことが明らかとなった。LTB4 の高蓄積は細胞障害性の血球成分の浸潤を誘起して、炎症を増加させ、組織障害性につながる可能性がある。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 小宮由季子, 武田知起, 木庭彰彦, 石井祐次, 菊田安至, 内博史, 古江増隆, 山田英之, ダイオキシシンによる肝ロイコトリエン B4 合成系への影響: 肝障害との関連性. 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014 年 03 月.
- ② 小宮由季子, 武田知起, 木庭彰彦, 石井祐次, 菊田安至, 内博史, 古江増隆, 山田英之. ダイオキシシンによる肝ロイコトリエン B4 増加: 機構とその毒性学的意義. フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 福岡, 2013 年 09 月.
- ③ 碓塚早希, 小宮由季子, 武田知起, 木庭彰彦, 古賀貴之, 石井祐次, 内博史, 古江増隆, 山田英之, ダイオキシシンが思春期ラットの脳および排泄物のメタボロームに及ぼす影響. フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 福岡, 2013 年 09 月.
- ④ 小宮由季子, 木庭彰彦, 田浦順樹, 武田知起, 古賀貴之, 石井祐次, 菊田安至, 内博史, 古江増隆, 山田英之, ダイオキシシンによる肝臓ロイコトリエン B4 蓄積とその機

構: 用量依存性および動物種差の比較検討. 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013 年 03 月.

- ⑤ 小宮由季子, 木庭彰彦, 武田知起, 古賀貴之, 石井祐次, 菊田安至, 内博史, 古江増隆, 山田英之, ダイオキシシンが思春期ラットの肝臓メタボロームに及ぼす影響: ロイコトリエン B4 蓄積とその機構. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 名古屋, 2012 年 10 月.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://eisei.phar.kyushu-u.ac.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山田 英之 (YAMADA HIDEYUKI)  
研究者番号: 40142351

##### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号:

##### (3) 連携研究者

古江 増隆 (FURUE MASUTAKA)  
研究者番号: 70134583  
内博史 (UCHI HIROSHI)  
研究者番号: 50437787  
武田 知起 (TAKEDA TOMOKI)  
研究者番号: 60596831