

平成21年 6月18日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590134

研究課題名 (和文) Ah レセプターの発現と機能解析

研究課題名 (英文) Expression and Function of the Ah receptor.

研究代表者

生田 統悟 (IKUTA TOGO)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・主任研究員

研究者番号：00262072

研究成果の概要：

生体は絶えず下界との相互作用の中で、生命活動を営んでいる。皮膚は体外との接点であり、また消化管は体内にありながらも腸内細菌などと接する場所である。Ah レセプターは環境中の化学物質と結合し、また外来の物質とは独立に、さまざまな役割をもつことが明らかにされつつある。本研究は、Ah レセプターの新規標的遺伝子を明らかにし、また腸における働きを解析するための培養方法を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：薬学・環境薬学

キーワード：AhR、皮膚、Blimp1、腸

1. 研究開始当初の背景

Ah レセプター(AhR)は、環境中に放出されたダイオキシンなどの変異原物質と結合する細胞内蛋白質である。ダイオキシンの毒性は生殖器官や免疫機能、形態形成の異常など多岐に及び、AhR はこれらの生体反応を仲介すると考えられる。AhR の細胞内機能解明に向けての基礎的な研究はダイオキシン毒性発現機構のみならず、生体防御についての新たな知見を与えることが期待される。AhR は広く組織に分布し、また AhR 欠損マウスは複数の組織で異形成がみられる(1)ことから、組織の恒常性にとって不可欠な機能をもつと考えられる。我々は、細胞内局在機構に基

づいた AhR の機能解析をおこなってきた。この間に、AhR の核移行および核外移行シグナルを同定し、シャトル蛋白質としての性質を明らかにした。さらに表皮角化細胞を用いて AhR/ARNT 複合体による転写調節能が細胞密度により調節されること、活性化された AhR が Slug の転写を活性化し、上皮-間葉転換にかかわることを見いだした。これらは細胞が本来備えている AhR 機能の反映と考えられる。本研究は、AhR が上皮-間葉転換を制御する一因子として捉え、皮膚組織の創傷治癒の中で、AhR の発現と機能がどのように変化するのかを知りたいと考えた。また、AhR KO マウスの盲腸に癌が自然発生する

事がわかり、発癌に至る過程を解明しようとした。

2. 研究の目的

AhR が皮膚や腸組織の形成や維持において、果たす役割を調べる。

3. 研究の方法

(1) 皮膚組織における役割

①AhR KO マウスは、AhR 遺伝子を delete した位置に b-gal 遺伝子が挿入されている。これをレポーターとし、AhR の発現する部位を調べた。

②①の結果から、ヒト脂腺細胞株である SZ95 とヒト表皮角化細胞株 HaCaT を用いて、Blimp1 の発現を RT-PCR で調べた。

③剃毛したマウス皮膚を直径 5mm の円形に切除し、24 時間後に発現する遺伝子を野生型マウスと AhR KO マウスとの間で gene tip を使って比較した。

④マウス組織における AhR 活性の検出を可能にするために、XRE-Luciferase を導入した transgenic マウスを作成した。体外受精卵の前核に XRE-luciferase を含む遺伝子断片を顕微注入法により導入した。生存卵子の中で形態学的に正常な 2-4 細胞期の卵をレシピエントマウスに移植した。その後、自然分娩により遺伝子導入候補マウスを得た。

(2) 腸組織における役割

マウス胎児または 1-3 日齢の個体の腸組織をコラゲナーゼ処理し、得られた細胞を DMEM/F12 をベースとする培地で初代培養した。細胞の性質は、免疫染色や RT-PCR、MTT アッセイ等により解析した。

4. 研究成果

(1) 皮膚組織における役割

①AhR の発現部位

AhR は、表皮、毛包の上部、皮脂腺に認められた (図 1 A, B)。特に皮脂腺では、1-3 個程度の細胞が強く染色され、これは既に報告されている Blimp1 の発現様式と似ていた。Blimp1 は、脂腺細胞の運命決定に関わる因子である。二重染色の結果、AhR と Blimp1 とを同時に発現する細胞の存在が示された (図 1 C-E)。

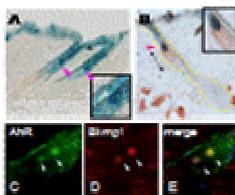


図 1

②AhR による Blimp1 の誘導

AhR と Blimp1 との相関を解析するため、SZ95 ならびに HaCaT を AhR リガンド処理

すると、既知の標的遺伝子 CYP1A1 と同様に Blimp1 発現が誘導された (図 2)。さらに、HaCaT を紫外線照射した場合にも誘導された (図 3)。これはアクチノマイシン感受性であり (図 4)、また AhR と ARNT の両者に依存した反応であった (図 5)。一方、Blimp1 の誘導はスタウロスポリンによって阻害され、TPA で促進された。これは、CYP1A1 の誘導にはみられなかった (図 6)。これらの結果は、AhR による Blimp1 の誘導は、何らかの kinase を介していることを示唆している。Blimp1 は、皮膚のバリア形成に必要な事、また p53 の発現を抑制することが報告されている。AhR は Blimp1 発現をコントロールすることで、これらの現象の上流に位置し、皮膚組織の形成、さらには発癌にも関与する可能性がある。

図 2

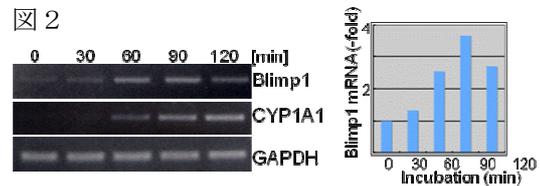


図 3

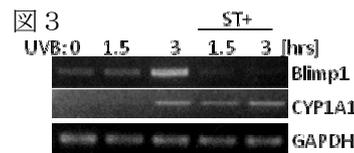


図 4

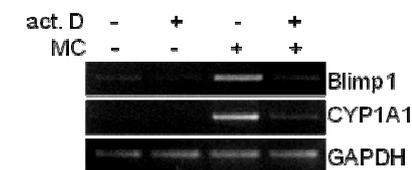


図 5

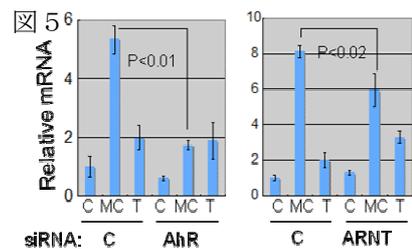
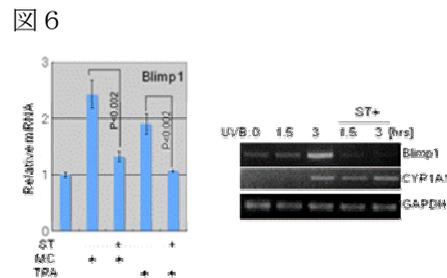


図 6



③創傷治癒における AhR 標的遺伝子
皮膚組織における AhR 機能を解析するため、
創傷治癒の過程を野生型と AhR-/-マウスと
で比較した。背部皮膚に作った直径 5 mm の
傷の面積が 50%になるまでの時間は、野生型
で 74 時間、AhR-/-マウスでは 48 時間であり、
後者が有意(P<0.0001)に短かった。

この過程における AhR の役割を検討する
ため、4 群のマウス(野生型-無傷、野生型-
皮膚切除 24 時間、AhR-/-無傷、AhR-/-皮
膚切除 24 時間)の皮膚から RNA を抽出し、
発現する遺伝子を網羅的に解析した。遺伝子
型間で発現に差があり、かつ文献的に創傷治
癒に関連する遺伝子として、IL-1a と Leptin
の 2 つが示された。

	野生型		AhR-/-	
傷	-	+	-	+
IL-1a	1	5.66	1.23	1.52
Leptin	1	1.52	4.29	6.96

(-fold)
IL-1a の発現により、下流の免疫反応が引き
起こされると考えられる。AhR-/-マウスでは
これが誘導されないという結果は、免疫反応
の低下を示唆しており、このことが比較的初
期の治癒過程において速い修復をもたらして
いる可能性がある。また Leptin は、傷の
修復を促進する作用が報告されており、
AhR-/-マウスでみられた結果と一致してい
る。これまでに行った RT-PCR では、これら
遺伝子発現の変動を再現出来ないが、上記の
ように興味深い遺伝子であり、AhR との関
連を引き続き解析したい。

④XRE-Luciferase transgenic マウスの作成
マウスの尾から抽出した genomic DNA を用
いて、Luciferase 遺伝子の導入が確認された
個体に、AhR リガンドであるメチルコラン
トレンを腹腔投与し、24 時間後に組織を採
取して Luciferase の活性測定を行った。肝、
心、肺、脾、腎の抽出液を調べた結果、メ
チルコラントレン非投与に比較し、luciferase
活性の上昇はみられなかった。今後、
luciferase が導入された雌雄を親に持つ個
体を増やし、再検討したい。

(4) 腸上皮細胞における Ah レセプター
の役割の検討

AhR の生物機能を調べる目的で、AhR ノック
アウト(AhR KO)マウスの表現形を調べたこ
ろ、盲腸に癌を生じる事がわかった。正常な
組織では、AhR が細胞の増殖を抑制し癌の発
生を抑えているという仮説をたて、これを検
証したい。

腸組織における AhR の役割を解析するた
めに、腸上皮細胞の初代培養を試みた。正常
マウス胎児または出生直後の腸を酵素処理
し、low-binding plate に培養すると(図 7)、
球状の細胞塊が得られた(図 8)。これは、

神経や乳腺上皮、前立腺などに由来する幹細
胞を培養してみられる spheroid と呼ばれる
球状の構造とよく似ていた。培養開始から 4
日後の直径は 0.1-0.15 mm であり、また MTT
assay により、細胞の増殖が認められた(図
9)。得られた細胞塊の凍結切片を作製し構
造を調べると、外側は E-cadherin を発現す
る上皮由来の細胞から、内側は間葉由来と思
われる細胞から構成されていた。腸の幹細胞
マーカーの発現をみると、CD133 は上皮細胞
が発現する E-cadherin と同様に分布し(図
10)、さらに RT-PCR によって Msi1、Lgr5、
Tcf4 の発現が認められた(図 11)。これら
の結果は、培養された細胞の中に、CD133 等
の幹細胞マーカーを発現する細胞が含まれ
る事を示唆している。

図 7

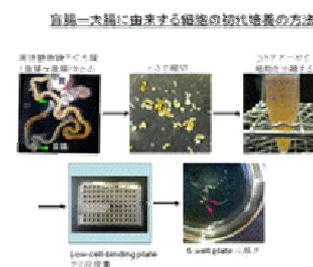


図 8

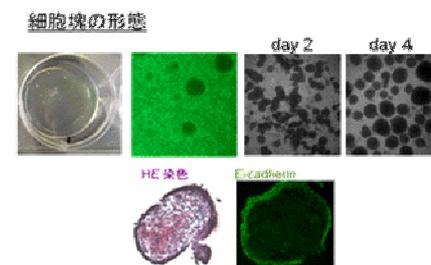


図 9

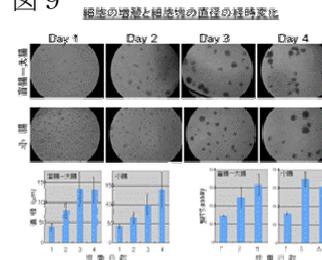


図 10

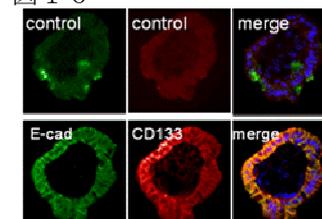
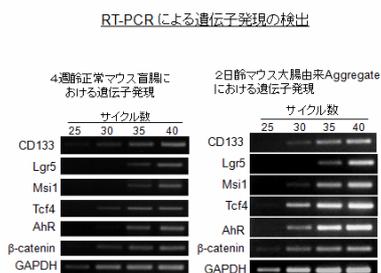


図 1 1



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 1 件)

AhR protein trafficking and function in the skin.

Ikuta T, Namiki T, Fujii-Kuriyama Y, Kawajiri K.

Biochem Pharmacol. 2009, 77(4):588-596.

査読有り

[学会発表] (計 2 件)

生田 統悟

皮膚組織における Ah receptor の発現

日本分子生物学会

H19年12月、パシフィコ横浜

生田 統悟

AhR リガンドによる Blimp1 mRNA の増加

日本分子生物学会

H20年12月、神戸国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生田 統悟 (IKUTA TOGO)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・

主任研究員

研究者番号：00262072

(2) 研究分担者

小池 学 (KOIKE MANABU)

放射線医学総合研究所・研究員

研究者番号：70280740