

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510073

研究課題名：ダイオキシン暴露による新規のアカゲザル腎形成異常とその発生機序の解析

研究課題名：Pathogenesis of newly described developmental abnormality induced in the kidney of rhesus monkey offspring by in utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

研究代表者

福里 利夫 (FUKUSATO TOSHIO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：50134531

研究成果の概要（和文）：内分泌かく乱物質の次世代への影響が問題になって久しいが、その実体や機序は未だ明らかでない。特にヒトやほ乳類におけるデータは乏しい。本研究で私どもは、胎生期および授乳期に 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) に暴露された仔アカゲザルに新規腎形成異常を高頻度に見出し、その障害部位の同定と発生機序を解析した。同時に、生殖器を含む他臓器の病変との関連も検討した。

研究成果の概要（英文）：We for the first time described developmental abnormality with renal dysplasia induced in the kidney of rhesus monkey offspring exposed during prenatal and lactational period to TCDD. The renal lesions developed exclusively in offspring of dams exposed to relatively high dose (300ng/kg) of TCDD. We disclosed disturbed cox2-prostaglandin system as pathogenesis of the renal lesion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
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：内分泌かく乱物質、ほ乳類

1. 研究開始当初の背景

内分泌かく乱物質の次世代への影響が問題になって久しいが、その実体や機序は未だ明らかでない。特にヒトやほ乳類におけるデータは乏しい。これまでに私どもは、より有効なダイオキシン対策をたてるため、またヒトにおける妥当な TDI（耐容 1 日摂取量）の設定のため、ヒトに最も近縁の霊長類で低用量（30 および 300ng/kg 体重）の 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

D) を妊娠雌親の皮下に投与し、雌親および次世代（F1）に与える影響を検討してきた。その過程で F1 の腎に高頻度（55%以上）の新規腎形成異常を初めて見だし、同時に長期の観察を行ってきた。

2. 研究の目的

5 年以上の観察期間を終えた仔アカゲザル群全体の病理学的・分子病理学的検討が可能になったため、それらを対象に新規腎形成異常の発生機序を解析し、さらにはダイオキシン

が胎生期および授乳期のほ乳類の形態形成に与える影響とその機序を解析する。腎形成異常の発生機序に関して特に、レニン・アンギテンシン系の異常、cox2-prostaglandin系、下垂体後葉浸透圧系かく乱との関連を解析するとともに、新規機序を見出す。

3. 研究の方法

妊娠20日目のアカゲザルにTCDDを0, 30, 300ng/kgBW (3群各20頭)を皮下投与し、妊娠中および出産後授乳中は30日まで初回投与の5%を維持量として投与した。5-7年経過観察。その間に性成熟および生殖能を評価した。最終的に剖検後腎組織が観察可能な3群の仔アカゲザルはそれぞれ28, 26, 29頭で、合計83頭であった。腎組織について、①マクロ・ミクロの病理学的解析、免疫組織化学的解析、②電子顕微鏡的検索、③蛋白質解析、④マイクロアレイ及びRT-PCRによる遺伝子発現解析、⑤microRNAの網羅的解析を行った。

4. 研究成果

(1)83頭の仔アカゲザルを7年間経過観察し、比較的高用量(300ng/kgBW)のTCDDを投与された母体から生まれた仔アカゲザルにのみ29頭中17頭(58.6%)で腎病変の出現が認められた。30ng/kgBW群ではみられず、現在本邦で設定されているダイオキシン類の耐容一日摂取量(TDI, 4 pg/kg/日)の妥当性を示唆していた。

表1. 仔アカゲザルの腎病変

	TCDD 0ng/kg	TCDD 30ng/kg	TCDD 300ng/kg
実験1	0/16	0/13	11/17
実験2	0/11	0/10	5/11
実験3	0/1	0/3	1/1
合計	0/28	0/26	17/29

(2)この腎病変はヒトのrenal dysplasiaに近い病変と判断され、TCDDによる腎障害としてこれまで報告されていない病変であった。
(3)障害部位:近位尿細管の最も高度にみられたが、糸球体の形成異常も伴っており、ネフロン単位の脱落および形成不全が明らかにされ、同時に、血管内膜の病変が同定された。

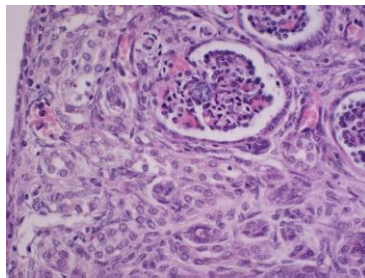


図1. 高度形成不全

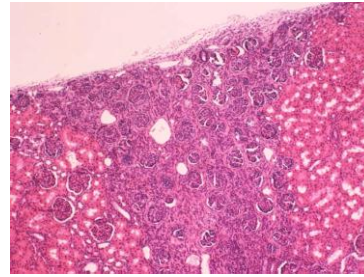


図2. 限局性形成不全

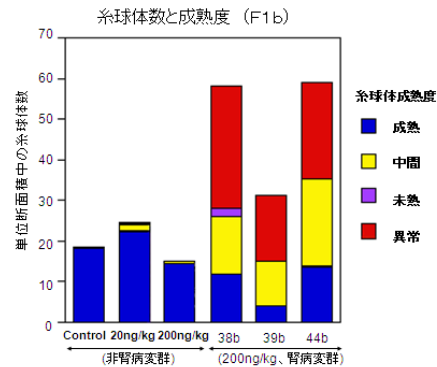


図3. 糸球体数と形態

(4)障害機序:レニン陽性細胞の増加と糸球体内異所性出現がみられたが、病変部に限局しており、腎全体におけるレニン・アンギオテンシン系の異常を示す所見はなかった。従って、レニン系の異常は二次的な変化と考えられた。しかし、生後早期死亡例の腎内動脈内皮細胞および緻密斑におけるCOX-2、CYP1A1の発現増強が認められ、腎病変の発生機序にCOX-2-prostaglandin系が関与している可能性が明らかにされた。

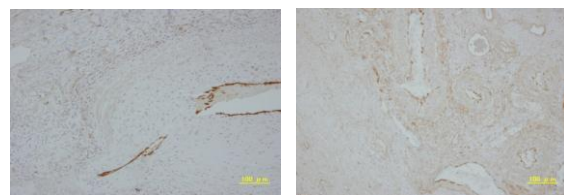


図4. 血管内皮におけるCYP1A1とCOX-2の発現

表2. 腎組織内CYP1A1、Cox2、HSP70の発現

	早期死亡群(剖検群)				長期観察群(7歳群)			
	Macula densa		Endothelium		Macula densa		Endothelium	
	病変群 (5頭)	非病変群 (3頭)	病変群 (5頭)	非病変群 (3頭)	病変群 (4頭)	非病変群 (8頭)	病変群 (4頭)	非病変群 (8頭)
CYP1A1	-	-	++(動脈)	-	-	-	-	-
Cox2	+++	±	+(動静脈)	-	±	±	-	-
HSP70	軽度+	軽度+	-	-	軽度+	軽度+	-	-

(5)腎組織内 mRNA 及び microRNA の網羅的解析結果：腎病変の病態を反映し、mRNA の網羅的発現解析：病変腎における kallikrein 1、podocin、Wilms tumor 1mRNA の発現減少、osteopontin、uroplakinmRNA の発現増加が明らかとなった。オス腎組織で miR-141、miR-192、miR-200c の増加が明らかにされた。

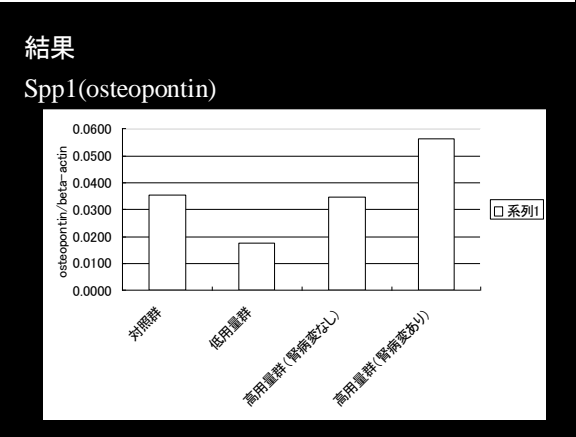


図 5. osteopontin mRNA 量 (定量 RT-PCR)

(6)腎病変は、既に報告してきた歯の形成異常を伴う例に多くみられた。しかし、本実験系で明らかにされた唾液腺病変あるいは骨組織の病変、及び前立腺および睾丸・副睾丸における病変さらには生殖能力との関連は明らかでなかった。

(7)まとめ：新たに見出された仔アカゲザル腎の形成異常は齧歯類でこれまで報告されている腎病変の形態と異なること、また、COX-2-prostaglandin 系が関与する可能性が明らかにされた。さらに、本邦における耐容一日摂取量の妥当性を評価する一つの目安となり得る可能性も示していた。

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 3 件)

- ① Toshio Fukusato, Masato Watanabe, Shunichiro Kubota, Akihiro Arima, Atsunobu Muneoka, Hiroshi Sumida, Mineo Yasuda. Enhanced expression of cox2 and cypl1 in early active renal lesions developed in offspring of rhesus monkeys with exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) during gestation and lactation. Organohalogen Compounds 査読有, 74, 2012, pp.989-992.
- ② Masato Watanabe, Shunichiro Kubota, Akihiro Arima, Atsunobu Muneoka, Hiroshi Sumida, Mineo Yasuda, Toshio

Fukusato. Gestational and lactational exposure to

2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces abnormal development of the kidney in offspring of rhesus monkeys. Organohalogen Compounds 査読有, 73, 2011, pp.1480-148.

- ③ Akihiro Arima, Hirohito Kato, Ryota Ise, Yojiro Ooshima, Ayumi Inoue, Atsunobu Muneoka, Shunichi Kamimura, Toshio Fukusato, Shunichiro Kubota, Hiroshi Sumida, Mineo Yasuda. In utero and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces disruption of glands of the prostate and fibrosis in rhesus monkeys. Reproductive Toxicology 査読有 29, 2010, pp.317-322.

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① Toshio Fukusato, Masato Watanabe, Shunichiro Kubota, Akihiro Arima, Atsunobu Muneoka, Hiroshi Sumida, Mineo Yasuda. Enhanced expression of cox2 and cypl1 in early active renal lesions developed in offspring of rhesus monkeys with exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) during gestation and lactation. 32nd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants-Dioxin 2012, 26-31August, 2012, Cairns, Australia.
- ② 渡邊雅人、高橋芳久、有馬昭宏、宗岡篤信、墨田 寛、安田峯生、久保田俊一郎、福里利夫：ダイオキシンの胎生期および授乳期暴露後の仔アカゲザル腎における Cox2、CYP1A1、HSP70 の発現, 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 2012 年 4 月 26-28 日
- ③ 渡邊雅人、高橋芳久、近藤福雄、福里利夫、有馬昭宏、宗岡篤信、隅田寛、安田峯生、久保田俊一郎。ダイオキシンのよる次世代アカゲザルの腎形成異常と CD110 免疫染色。第 100 回日本病理学会総会、横浜、2011 年 4 月 28～30 日
- ④ Masato Watanabe, Shunichiro Kubota, Akihiro Arima, Atsunobu Muneoka, Hiroshi Sumida, Mineo Yasuda, Toshio Fukusato. Gestational and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces abnormal development of the kidney in offspring of rhesus monkeys. 31st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants - Dioxin 2011, 21-25 August 2011, Brussels, Belgium.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福里 利夫 (FUKUSATO TOSHIO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：50134531

(2) 研究分担者

久保田 俊一郎 (KUBOTA SHUNICHIROU)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00260480

(3) 研究分担者

近藤 福雄 (KONDO FUKUO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：80186858

(4) 研究分担者

高橋 芳久 (TAKAHASHI YOSHIHISA)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：70334381