

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名

内分泌かく乱物質の生体毒性発現の分子メカニズムとモニター系の開発

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者	藤井 義明	筑波大学	先端学際領域研究センター	客員教授
主たる研究参加者	鎌滝 哲也	北海道大学	大学院薬学研究科	教授
〃	菅野 雅元	広島大学	大学院医歯薬学総合研究科	教授
〃	山下 敬介	広島大学	大学院医歯薬学総合研究科	助教授
〃	本橋 ほづみ	筑波大学	基礎医学系	講師
〃	十川 和博	東北大学	大学院生命科学研究科	教授
〃	梅園 和彦	京都大学	大学院生命科学研究科	教授

(～平成11年4月)

3. 研究内容及び成果：

内分泌かく乱物質の生体影響は、主として受容体（エストロゲン受容体ER、アンドロゲン受容体AR、アрилヒドロカーボン受容体AhR等）を介して発現すると考えられてきた。しかし、内分泌かく乱作用の本質を理解する為には、各々の化合物について、どの受容体を介して毒性を発現するのか、或いは受容体を介さない毒性発現機構が存在するのか、を解明する必要がある。本研究代表者らは、AhRの同定・構造決定、機能解析等、AhR関連研究で世界をリードする実績を残して来た。

これらの背景から、本研究ではAhRに焦点を当て、①ダイオキシン（TCDD）等の化合物の示す多岐に渡る生体反応にAhRがどのように、どの程度関与しているかを分子生物学的手法と発生工学的手法を用いて解明する、②内分泌かく乱物質に対して感受性の高いモニターマウスを作成する、事を目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

(1) AhRとAhRR（AhR repressor）の機能調節（藤井グループ）

AhRの新しい転写活性化機構として、直接DNAに結合するのではなく、DNA結合性転写因子に結合して、コアクチベーター的に作用する機構を明らかにした。AhRは、通常は細胞質にHSP90、XAP2、P23との複合体として存在しているが、ダイオキシン等が結合すると核内に移行し、HSP90複合体から解離してArntとヘテロ2量体を形成し、標的遺伝子プロモーター領域のXRE配列に結合して活性化する。標的遺伝子CYP1A2等にはXRE配列は存在しないが、新規なエンハンサー配列CATGN₆CTTGが存在し、この配列にLBP-1転写因子が結合する。AhR/ArntはこのLBP-1に結合して転写を活性化する。

外来異物のエストロゲン作用発現機構として、AhRを介する第2のメカニズムが存在する事を明らかにした。AhRとERは転写制御複合体を形成し、AhRがリガンド未結合のERの転写活性化能を促進する事を確認した。この事は、ダイオキシン類と女性ホルモンシグナルとの間に、受容体同士の相互作用を介した転写制御機構の攪乱というクロストー

ク経路が存在する事を示している。また、リガンドの結合したAhRはユビキチン化されて速やかに分解されるが、ユビキチン化AhRはERのユビキチン化、分解を促進する事も確認された。

外来異物のエストロゲン作用発現機構の第3のメカニズムを明らかにした。アロマターゼ遺伝子の発現がAhRを介して外来異物によって活性化される事が確認された。AhR欠損マウスの不妊の原因の一つはアロマターゼ遺伝子の発現低下にある事を示した。

AhR類似因子として単離したAhRRは、Arntとヘテロ2量体を形成してXRE配列に結合する事を明らかにした。AhRRの抑制作用は、AhRとのArntの取り合い及びAhR/ArntとAhRR/ArntのXRE配列への結合の拮抗に基づくものである事を明らかにした。AhRR欠損マウスは外見上正常で、生育も野生型と変わらず、生殖能力も殆ど変わらない事が観察されている。今後さらに機能解析を進める予定である。

(2) 内分泌攪乱物質の代謝に係るP450の検討 (鎌滝グループ)

野生型及びAhR欠損マウスを用いたDNAマイクロアレイ解析により、代表的な多環芳香族炭化水素 (PHA) である3MCが、AhR依存的に、脂質代謝に関与するPPAR α シグナル伝達系を抑制する事を明らかにした。また、PPAR α シグナル伝達の抑制が、肝臓における脂質代謝異常引いては脂肪肝にも関与する事を明らかにした。PPAR α シグナル伝達系の抑制は、ヘテロ2量体形成パートナーであるレチノイドX受容体 (RXR) の抑制である事を明らかにした。RXRは多くの核内受容体のヘテロ2量体のパートナーとして働き、ホルモンバランスのマスターレギュレーターである事が知られている為、他の多くの核内受容体シグナル伝達系にも当てはまる可能性が高く、PHAによる多岐に渡る毒性発現を説明し得る機構と考えられる。

(3) ダイオキシンによる胸腺縮退のメカニズム (菅野グループ)

ダイオキシンによる胸腺萎縮、免疫不全の作用点は、従来言われている「アポトーシス・細胞周期停止」によるものではなく、ミトコンドリアの膜電位を介したCaspase非依存性細胞死機構にある事を明らかにした。T細胞の多様性形成に重要なpreTCRシグナル伝達系を制御する事に依って、結果的に免疫系の多様性を喪失させる事が示唆された。自己免疫疾患・アレルギーとの関係が無視出来ないことが判った。

(4) ダイオキシンと発生・生殖 (山下グループ)

ダイオキシンによる奇形 (口蓋裂、水腎症) 誘発にAhRが関与している事を明らかにした。AhR欠損マウスでは口蓋裂、水腎症の発症は全く認められなかった。また、AhRR欠損マウスのダイオキシン感受性に変化は認められなかった。

(5) AhRR、AhR/Nrf2欠損動物の作成と機能解析 (本橋グループ)

異物代謝系第2相酵素群遺伝子の発現が、転写因子Nrf2により統一的に調節されている事を明らかにした。Nrf2による異物代謝系第2相の活性化が発癌抑制に重要であり、Keap1がNrf2を負に制御しているため、Nrf2-Keap1相互作用が薬剤に対するセンサー機能を果たしている可能性が示唆された。

AhR分子の性質は種差が大きく、芳香族炭化水素に対する反応性は、種により質的・量的に異なっている事が知られている。ヒトAhRをマウスに導入し、ダイオキシン感受性が低感受性のDBA/2マウスと同程度かそれ以下である事を明らかにした。

(6) AhRの作用メカニズム (十川グループ)

AhRのPAS-B領域は、Arntとの相互作用に不要であるばかりでなく、DNA結合活性にリン酸化も関与していない事を明らかにした。また、AhRR遺伝子はAhR遺伝子の下流に位置し、フィードバック的に転写を阻害している事を明らかにした。

XRE配列はコア配列内にメチル化を受けるCpG配列を有しており、メチル化に伴ってAhR/Arntとの結合が弱まり、転写活性が低下する事を明らかにした。ヒトを含む動物の組織では、加齢に伴って薬物代謝活性が弱まるが、その原因の一つが上記の機構によるものである事が示唆された。CYP1A2が(1)で述べた間接的相互作用機構を採用している理由は不明であるが、老化に伴ったCpGのメチル化に関係なく薬物代謝を行うのに有利な機構と考えられる。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

AhRと結合したダイオキシンがエストロゲンと結合していないERと結合して転写活性を促進する事、ヒトAhR導入マウスはダイオキシン感受性が低下する等、AhR欠損マウスはベンツピレンの代謝活性化が起こらず発癌が生じない事、AhRがアロマトーゼの発現を調節している事、AhRRによるAhR機能の調節機構等、ダイオキシンの作用機構を明確に説明し、AhRの本来の機能に迫り、さらにダイオキシンのヒトに対するリスク評価にも示唆を与える極めてインパクトの高い成果を挙げている。世界をリードする研究成果と言えよう。

研究成果は論文(海外172報、国内6報)、学会(国内42件、国際学会24件)発表されている。Nature、Science、Nature Genetics、Cell、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、等々国際的に高く評価されている一流誌に掲載されたものが多い事からも、研究水準の高さが伺える。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

「EDに対して感受性の高いモニター・マウスを作製」するまでには至らなかったが、ダイオキシンの作用機構やAhR機能の基礎的な理解を深め、ダイオキシンに対するリスク評価にもインパクトを与える目覚ましい成果を挙げた。研究目標は略達成しており、高く評価される。得られた成果は基礎科学としても、また、レギュラトリー・サイエンスの観点から社会的にもインパクトの高い成果と言える。

ダイオキシンの作用機構のみならず、AhRの本態を明らかにする研究にまで発展した。AhRの機能として、AhRとArntのdimerが直接XREに結合して転写を調節する機構以外に、DNAの特定領域に結合するLBP-1にcoactivatorとして結合して転写を調節する新たな機構を明らかにし、AhRのリン酸化による転写調節の可能性を探る等、基礎生物学にも大き

な貢献を果たしたと言えよう。このような成果を基に、ダイオキシン等の作用機構をERとの関連から、hijacking、kidnapping、invadingの三つの機構に分類する事を提唱したが、極めて大きなインパクトを与えるものであると言えよう。

AhRは生理的リガンドが不明な、所謂オーファン受容体であるが、系統発生の初期から種を超えて保存されているため、生物にとって重要な蛋白であると推定されている。AhRは生殖・免疫・発癌等でも中心的役割を果たしている可能性が示唆されているが、研究代表者は今後もAhR機能の解析に取り組む予定であり、本研究の成果が存分に生かされるであろう。今後の進展に期待したい。

ダイオキシン等に対する感受性の動物種間差異を検定する系も開発しており、ヒトや野生生物に対する耐容量の設定等にも応用可能である。今後の、技術的な側面での進展にも期待したい。

4-3. その他の特記事項（受賞歴など）

本研究課題は平成15年度の「継続研究課題」に採択され、研究代表者は引き続き研究を継続中である。

研究期間中に、山本雅之筑波大学基礎医学系教授が、平成14年度総括実施型研究（ERATOタイプ）「山本環境応答」の研究総括に選ばれ、他プロジェクトに転進した。同プロジェクトでは、研究代表者も研究顧問として参画しており、引き続き密接な関係を維持して、インパクトの高い研究成果を挙げる事を期待したい。