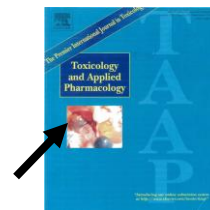


受容体AhRの転写活性化を伴わないダイオキシン類の新たな毒性発現メカニズムの解明

研究実施期間 平成21～23年度



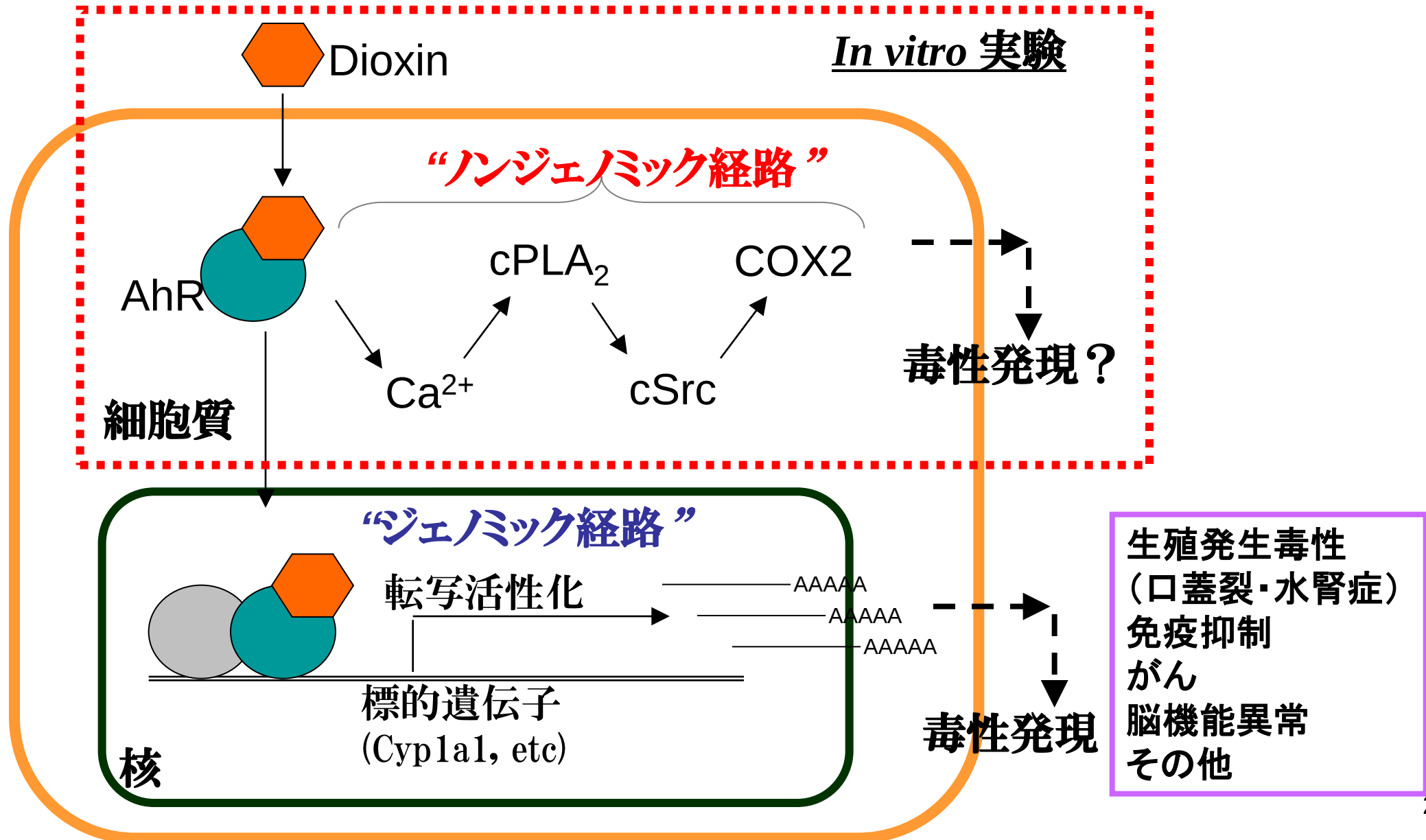
(Nishimura et al., 2008)

課題代表者 遠山千春 (東京大学医学系研究科)

西村典子 (独立行政法人国立環境研究所)

研究協力者 吉岡 亘 (東京大学医学系研究科)

ダイオキシン毒性発現メカニズムの定説‘ジェノミック経路’と 新たな仮説 ‘ノンジェノミック経路’



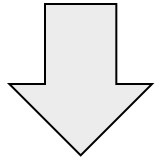
研究目的

全体の目的： ダイオキシン類の多様な毒性メカニズムを解明するため、ノンジェノミックな作用に着目し、水腎症を対象として新たな分子メカニズムを解明すること

- 1-1: cPLA₂遺伝子欠損マウスにおけるダイオキシン曝露による水腎症に関する研究
- 1-2: ダイオキシン曝露マウス腎臓におけるサイトカインの解析に関する研究

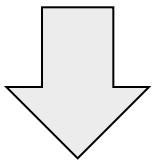
2: ダイオキシン曝露マウス尿管の形態と機能の解析に関する研究

ダイオキシン



AhR

↓
ノンジェノミッ
ク経路

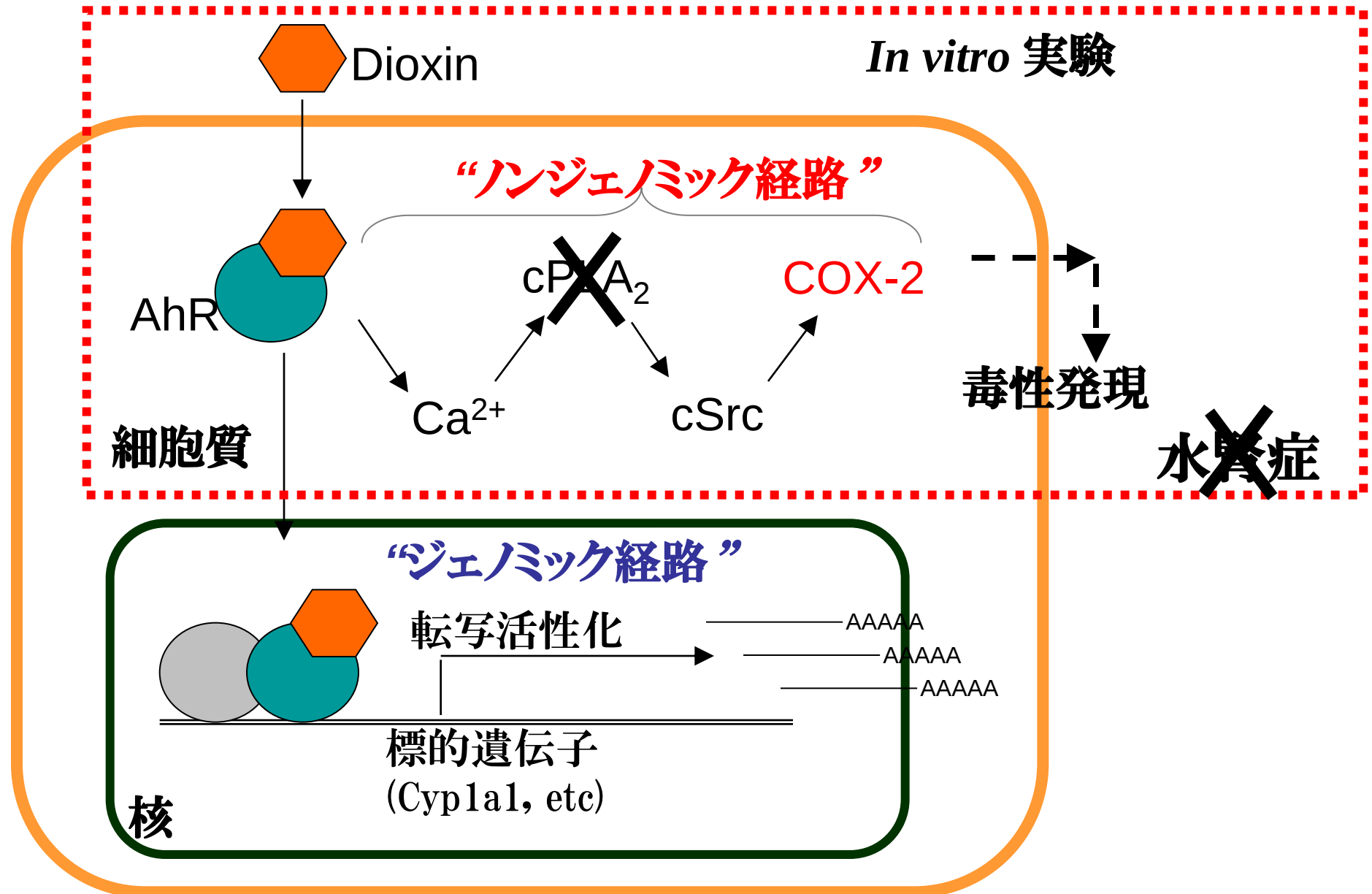


Prostanoids
Cytokines



水腎症

ダイオキシン毒性発現メカニズムの定説‘ジェノミック経路’と 新たな仮説 ‘ノンジェノミック経路’

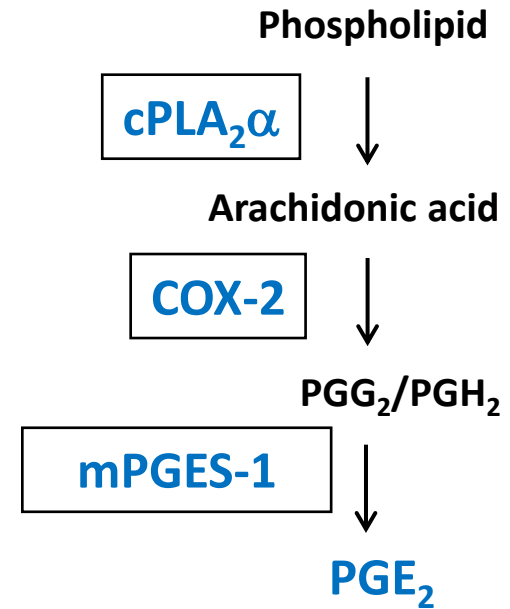


サブテーマ1-1: cPLA₂がTCDDによる水腎症発症に及ぼす影響 1

cPLA₂遺伝子の欠損は、水腎症発症率と重篤度を顕著に抑制

TCDD →→ cPLA₂ →→ 水腎症

サブテーマ1-1: cPLA₂がTCDDによる水腎症発症に及ぼす影響 2

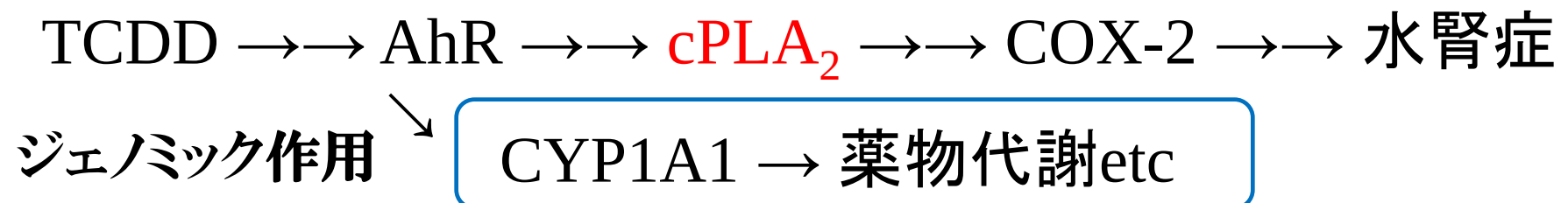


TCDDによる水腎症の原因となるCOX-2・mPGES-1の活性を、
cPLA₂欠損が顕著に抑制

TCDD →→ cPLA₂ →→ COX-2 →→ 水腎症

サブテーマ1-1: cPLA₂がTCDDによる水腎症発症に及ぼす影響 3

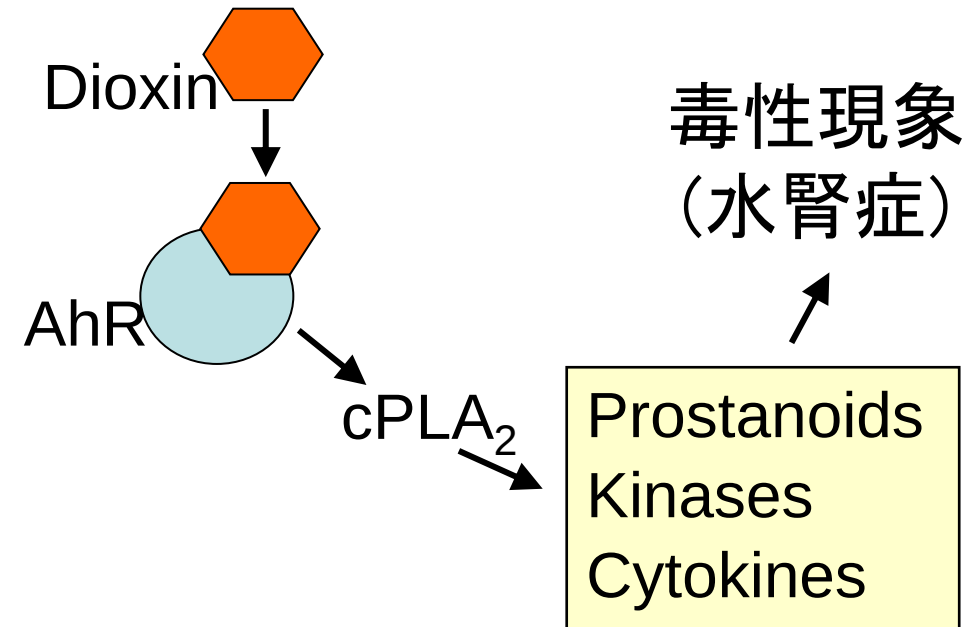
cPLA₂はdioxin曝露マーカーCYP1A1やAhRRの発現調節をしない。
(CYP1A1が水腎症と関係ないことは、Dragin et al. 2006により証明されている。)



サブテーマ1-2:ダイオキシン曝露マウス腎臓におけるサイトカインの解析 (ノンジェノミック経路と毒性現象をつなぐ分子の探索)

*in vitro*で発見されたノンジェノミック経路のcPLA₂は、*in vivo*で毒性現象(水腎症)の原因分子であると判明。

↓
ノンジェノミック経路が誘導するキナーゼ・サイトカイン・プロスタノイドが、毒性現象を引起こす実体であり、多様な毒性現象の原因と想定。



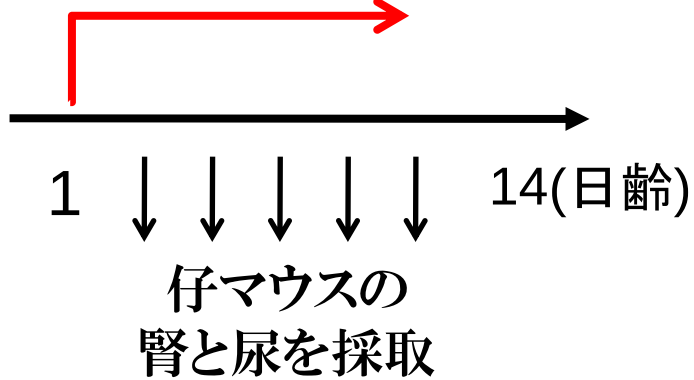
目的

1. 水腎症に伴って変化するcytokineを探索
2. cSrcは水腎症の発症に関与するkinaseか？

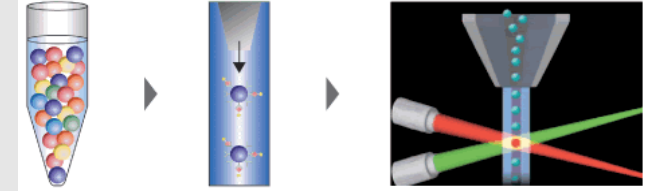
サブテーマ1-2: ノンジェノミック経路と毒性現象をつなぐ分子の探索

経母乳曝露

出産1日目に、母マウス
にTCDDを経口投与

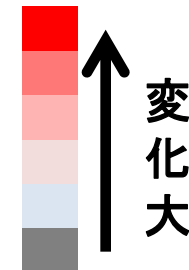


Luminex®システムによるサイトカイン測定



蛍光標識した多種のプローブビーズをフローメトリーの技術を利用して検出することで、少量のサンプルでも多項目同時高速解析が可能

腎臓における各種cytokine量の変化



サブテーマ1-2: ノンジェノミック経路と毒性現象をつなぐ分子の探索

Cytokinesと水腎症の関係

cPLA₂の有無と連動しないので、水腎症の必須因子ではない

TCDD →→ cPLA₂ →→ COX-2 →→ 水腎症

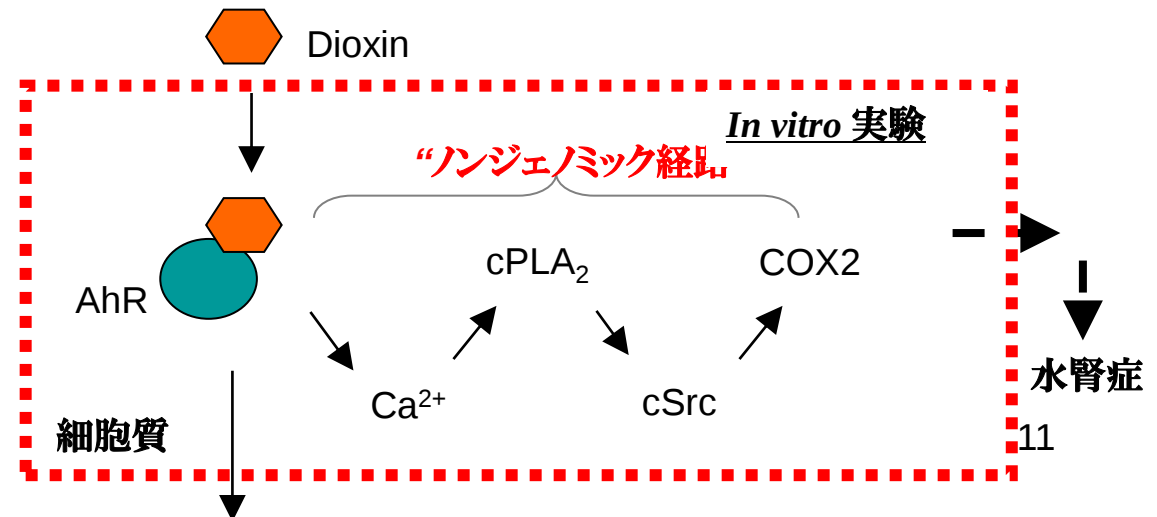
サブテーマ1-2: ホンジェノミック経路と毒性現象をつなぐ分子の探索

*in vitro*で発見されたホンジェノミック経路のcPLA₂は、*in vivo*で毒性現象(水腎症)の原因分子であると判明。

↓
ホンジェノミック経路が誘導するキナーゼ・サイトカイン・プロスタノイドが、毒性現象を引起こす実体であり、多様な毒性現象の原因と想定。

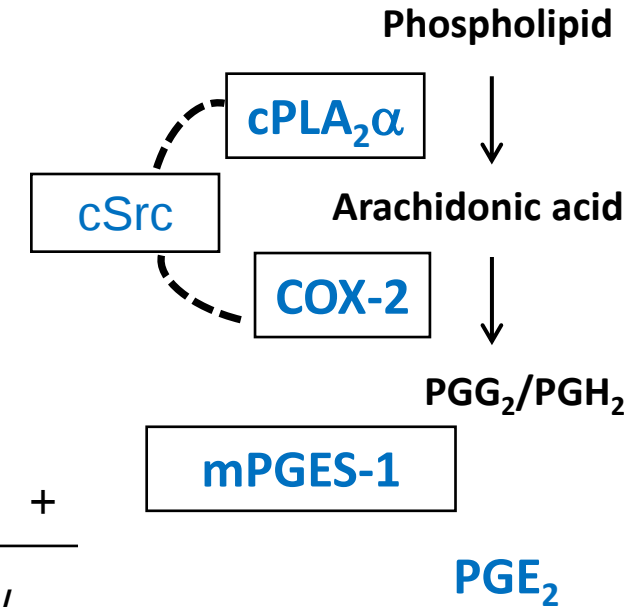
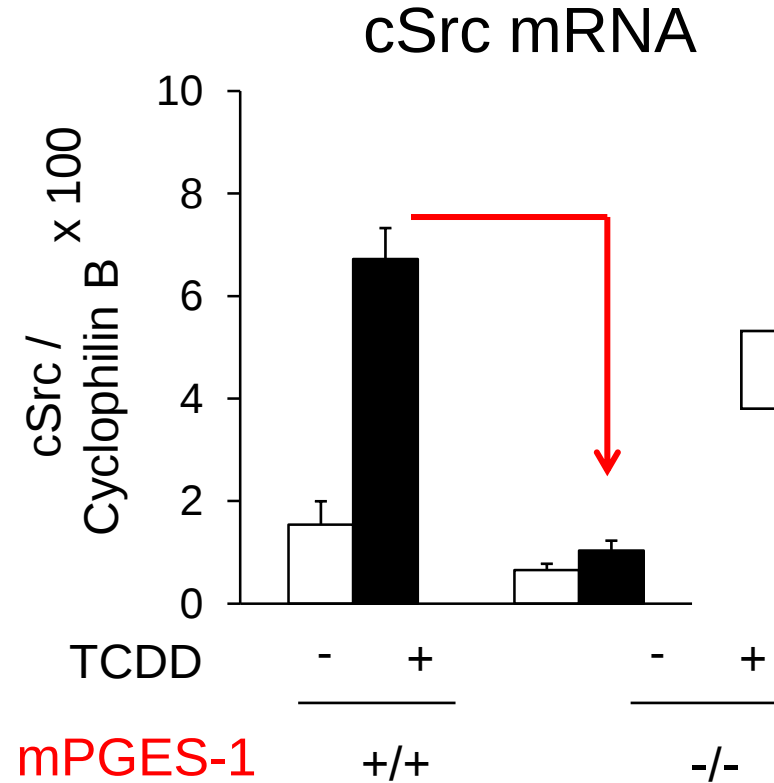
目的

1. 水腎症に伴って変化するcytokineを探索
2. cSrcは水腎症の発症に関与するkinaseか？



サブテーマ1-2: ノンジェノミック経路と毒性現象をつなぐ分子の探索

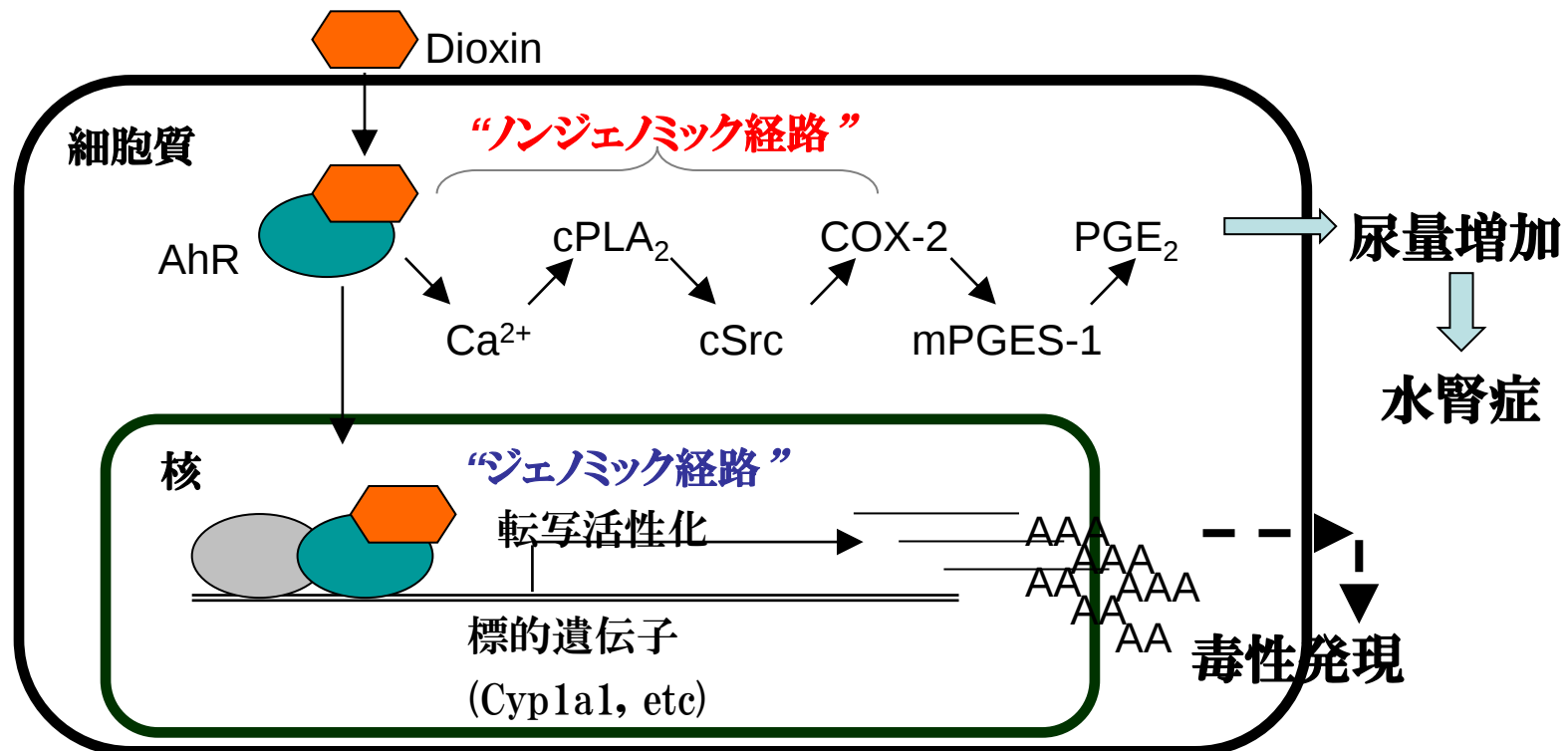
cSrc mRNA



TCDD曝露によるcSrcの誘導は、cPLA₂及び mPGES-1に依存し、水腎症の発症に関与

サブテーマ1: まとめ

1. ホンジェノミック経路を介した毒性発現機序 → cPLA₂ 重要な役割
2. 水腎症に伴って変化する cytokine を探索 → IL-1 β , IP-10 毒性との関係?
3. 水腎症の原因となる prostanoid の特定 → PGE₂ 毒性発現の要因
4. cSrcは水腎症の発症に関与する kinase か? → 可能性、大。



サブテーマ2:ダイオキシン曝露マウス尿管の形態と機能の解析 (水腎症はどのようにして発症するか)

目的

AhRのノンジェノミック作用がどのようにして毒性現象を引き起こすのかについて、水腎症を直接引き起こす組織学生理学的変化を探索した

内容

発達段階腎臓の構造の計測法の確立

尿管断面構造の解析方法の確立

尿管蠕動運動の解析

尿の産生量の解析

結果

尿管の構造と機能に顕著な異常はない

尿の産生と濃縮の攪乱が発症の直接の原因である

サブテーマ2：発達段階の腎臓の構造の計測法の確立

非曝露マウス(生後7日齢)を用いて、尿排出に重要な腎構造のPapillaの発達の程度の指標として、腎横断面に占めるPapilla長を計測する形態解析系を構築した。

TCDD曝露マウスでは、腎臓髓質の先端部に位置する腎乳頭の発達不全が観察された。

サブテーマ2：尿管断面構造の解析方法の確立

非曝露マウス(生後7日齢)を用いて、尿管上皮のマーカーとしてgalectin-3(緑)、尿管筋肉層のマーカーとしてactin(赤)、核をDAPI(青)で、3重染色し、尿管の3層構造を解析できる系を確立した。

TCDD曝露群では、間質層、上皮層の尿管全体に占める割合に、変化が認められた。しかし、尿管の組織学的な顕著な異常は認められなかった。

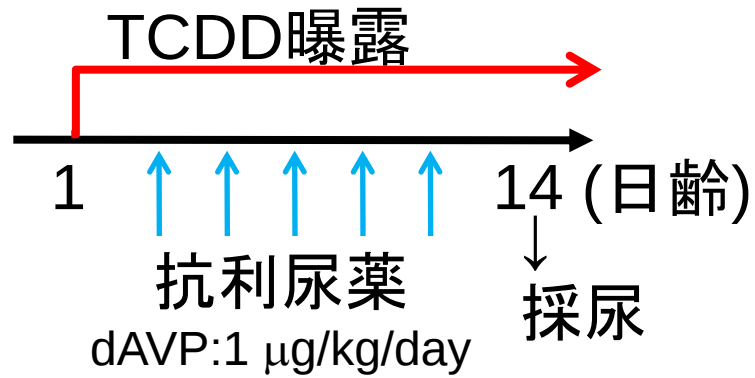
サブテーマ2: 尿管蠕動運動の解析

方法: 蠕動運動の起点になる腎杯周辺部分の収縮を顕微鏡下で記録し、その頻度を計測した。



尿管の蠕動運動の頻度は、TCDD曝露による変化が無いことが分かった。

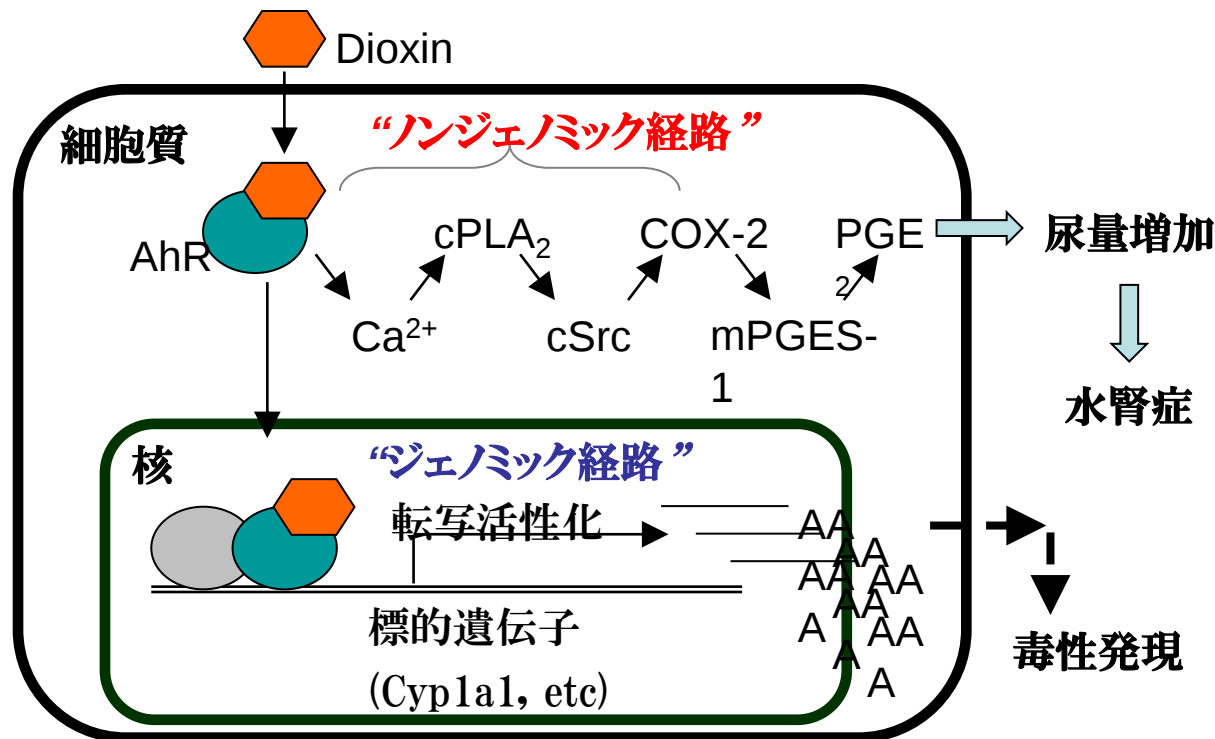
サブテーマ2: 水腎症はどのようにして発症するか



TCDDによる水腎症発症の
抗利尿薬投与による抑制

まとめ

- ホンジェノミック経路を構成する酵素cPLA₂がダイオキシン曝露による水腎症を引き起こす.
- cPLA₂/COX-2/mPGES-1によるPGE₂合成が、尿量の異常な増加を引き起こすことで水腎症が発症する.
- ダイオキシン毒性の新たな分子基盤を発見した. ダイオキシン曝露に伴って生じる多様なダイオキシン毒性に共通する可能性がある.



研究成果(アウトプット)、 環境改善への貢献(アウトカム)及び波及効果(インパクト)

アウトプット

ダイオキシン類による毒性発現メカニズムに関わる‘ノンジェノミック’経路の解明

ダイオキシンによる発達時期特異的毒性である水腎症の発症メカニズムの解明

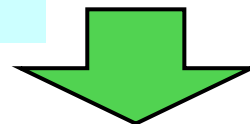
アウトカム



培養細胞を用いたAhR依存性の発現ベクターを用いるダイオキシンのアッセイは、ジェノミック作用を前提。今後、ノンジェノミックな作用を取り入れたアッセイ系を考慮することが必要



水腎症以外のダイオキシン毒性影響に関する研究モデルとして有用。
cPLA2やcSrcが毒性の新たな分子マーカーとして有用



インパクト

ダイオキシン類の毒性の実体に即した理解と、より適切なリスク管理