

2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-p-dioxinのダイオキシン毒性に対する拮抗作用

武田, 知起
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

人見, 将也
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

山田, 英之
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

石井, 祐次
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

<https://doi.org/10.15017/2328867>

出版情報：福岡醫學雑誌. 110 (2), pp.122-127, 2019-06-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin の ダイオキシン毒性に対する拮抗作用

九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

武田 知起, 人見 将也, 山田 英之, 石井 祐次

The effect of 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin on Dioxin Toxicity

Tomoki TAKEDA, Masaya HITOMI, Hideyuki YAMADA and Yuji ISHII

*Laboratory of Molecular Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University*

Abstract

Maternal exposure to dioxin produces a number of developmental toxicity, such as growth retardation and defects in sexual dimorphic behaviors in offspring. Our previous studies have found that the toxic effects induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), a highly toxic congener of dioxins, are due to a reduction in the pituitary expression of growth hormone (GH) and luteinizing hormone (LH) during the fetal period, via activation of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). In this study, we examined whether 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD), the analog of TCDD in which chlorine atoms are replaced with fluorine atoms, can antagonize dioxin toxicity. In T47D cells, TCDD (0.5 nM) dramatically increased the activity and expression of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), a representative gene induced by AHR activation. However, TFDD co-treatment suppressed the induction in a dose-dependent manner. Its median effective dose (ED₅₀) was estimated as 45.9 nM. In contrast, although exposing 1 μg/kg TCDD to pregnant rats attenuated the expression of LHβ and GH mRNA and induced the expression of CYP1A1 mRNA in the male fetal pituitary, daily oral administration of TFDD (1 mg/kg/day) to the TCDD-exposed dams did not have any suppressive effects. These results suggest that maternal treatment with TFDD, even at 1,000 times the dose of TCDD, cannot block dioxin-produced developmental toxicity in fetuses.

Key words: dioxin, fetus, pituitary, 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD), Ah-receptor (AHR)

はじめに

ダイオキシンは、妊娠期母体への比較的低用量の曝露によって、出生児に成長遅延や性特異的行動障害などの様々な発育障害を惹起する¹⁾。カネミ油症の被害者追跡調査や出生コホート研究から、ダイオキシンがヒトこどもの発達に及ぼす影響が懸念されており²⁾³⁾、早期の治療・予防法の確立が求められている。

一般に、ダイオキシン毒性には、受容体型転写

因子である芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor ; AHR) が重要な役割を演じることが明らかにされている^{4)~6)}。すなわち、AHRはダイオキシンとの結合により核内に移行し、cytochrome P450 (CYP) 1A1等の標的遺伝子の転写調節領域に存在する xenobiotic responsive element への結合を介して、これらの発現を変動させる。変動遺伝子は数百種類も存在し^{7)~9)}、これらが複合的に毒性に寄与すると考えられている。当研究室では最近、AHRを標的としたダイオキ

Corresponding author : Yuji ISHII
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan
Tel : + 81-92-642-6586 E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp

シン拮抗剤の創製を目指し、強毒性ダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の塩素原子を全てフッ素原子に置換した 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD) を合成した¹⁰⁾。さらに、思春期ラットに高用量の TFDD を経口投与しても、ダイオキシン様の急性毒性を示さないことを確認した¹⁰⁾。そこで本研究では、TFDD がダイオキシンによる毒性作用に対して拮抗できるか否かを細胞および動物レベルで検討することを目的とした。当研究室ではこれまでに、妊娠ラットへの TCDD 曝露が胎児脳下垂体において成長ホルモン (growth hormone ; GH) ならびに黄体形成ホルモン (luteinizing hormone ; LH) の合成を低下させることで出生後に低体重や交尾行動障害を引き起こすことを見出している^{11)~13)}。そこで、生体内における TFDD の拮抗作用の検討には、上記の胎児のホルモンレベルの低下を指標とした。

実験方法

1. 実験材料

TFDD (purity : > 99%) は、林純薬工業株式会社に委託して合成したものを使用した¹⁰⁾。Corn oil は、味の素株式会社の市販品を使用した。抗ラット CYP1A1 抗体は当研究室において合成されたもの、および抗 β -actin 抗体は Biovision 社の市販品を購入して使用した。その他の試薬は、実験に適した純度のものを使用した。TFDD は、100 μ g TFDD/mL acetone 溶液として使用まで -30°C に保存した。投与時に必要量 corn oil と混和したのち、窒素ガス噴射にて acetone を留去した。

2. 細胞培養

ヒト乳がん細胞株である T47D 細胞は、48 穴プレートに播種し、Dulbecco's modified eagle medium (10%牛胎児血清含有) 中にて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。プレート底面への細胞の接着を確認したのち、TCDD (0.5 nM、0.5% DMSO にて溶解) を添加した培地に置換して培養を継続した。TCDD 処理 1 時間後、TFDD (10⁻⁴ nM~10⁴ nM、0.5% DMSO に溶解) を培地中に添加してさらに 23 時間培養を続けたのち、細胞を回収した。なお、対照群は 0.5% DMSO の

みを処理して同様に培養した。培養後の細胞は、50 mM Tris-HCl にて懸濁し、以下の実験に供した。

3. CYP1A1 活性測定

T47D 細胞における CYP1A1 活性は、既報¹⁴⁾ に従い、7-ethoxyresorufin の O-脱アルキル化反応により生じる resorufin の蛍光強度を測定することにより算出した (励起光 : 544 nm ; 測定光 : 590 nm)。細胞溶解液のタンパク質濃度は、Lowry 法¹⁵⁾ にて定量した。反応に用いたタンパク質量および反応時間は、あらかじめ条件検討によって決定し、50 μ g および 2 時間とした。

4. CYP1A1 タンパク質発現

T47D 細胞溶解液中の CYP1A1 の発現量は、イムノブロット法によって解析した¹²⁾。また、loading control として β -actin のタンパク質を同時に検出した。電気泳動に用いた細胞溶解液のタンパク質量は、5 μ g/lane とした。

5. 動物実験

本研究における動物実験は、九州大学動物実験委員会による実験計画の承認を受けた上で実施した。Wistar 系ラットは、九動株式会社より購入した。雌雄のラットを一晩交配し、翌朝膈内に精子が確認された場合、その日を妊娠 (gestational day ; GD) 0 日目とした。GD15 に、TCDD (1 μ g/kg/2 mL Corn oil) を単回経口投与した。対照群には、Corn oil のみを投与した。GD16 から GD19 の母体に対して、一日一回 TFDD (1 mg/kg/day/2 mL Corn oil) あるいは Corn oil を経口投与したのち、GD20 の雄胎児より脳下垂体を採取した。

6. リアルタイム RT-PCR 法

RNeasy kit (QIAGEN 社) にて胎児脳下垂体より total RNA を抽出したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した¹⁶⁾。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Thermo-Fisher Scientific 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。ターゲット mRNA の相対的発現量は、それぞれの遺伝子の threshold cycle

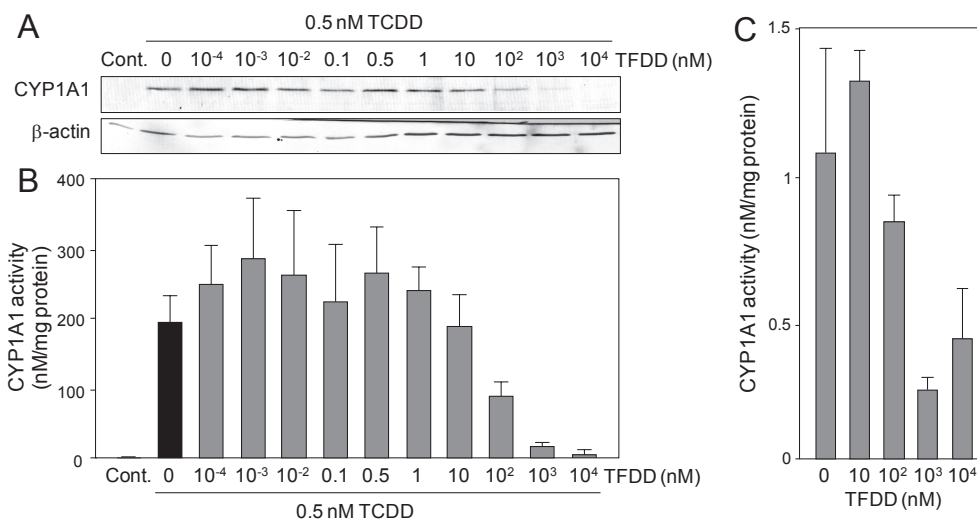


Fig. 1 Effect of TFDD on the TCDD-produced induction of the expression (A) and activity (B) of CYP1A1 protein and the constitutive activity of CYP1A1 (C) in T47D cells. (A) The level of CYP1A1 protein was determined by immunoblotting. (B and C) The CYP1A1 activity was analyzed by an ethoxyresorufin-*O*-deethylase assay. Bars are the means \pm S.E.M. of 4 cultures.

(Ct) 値を β -actin mRNA の Ct 値で補正したのち、control に対する割合として解析した。

結 果

TFDD が細胞レベルでダイオキシン依存的な AHR 活性化に対して拮抗作用を示すか否かを検討するため、代表的な AHR 標的遺伝子である CYP1A1 のタンパク質発現ならびに酵素活性を指標として検討を行った。検討の結果、T47D 細胞への 0.5 nM の TCDD 処理による CYP1A1 タンパク質発現ならびに酵素活性の誘導は、TFDD 併用によって 100 nM 以上では用量依存的に抑制される傾向が観察された (Fig. 1A and B)。本検討により、TCDD 依存的な CYP1A1 活性誘導に対する TFDD の 50% 阻害濃度は、 45.9 ± 3.1 nM と算出された。一方、TFDD 単独処理では CYP1A1 の基礎的活性に影響は与えなかった (Fig. 1C)。

妊娠期の TCDD 曝露による胎児のホルモン水準の低下に対する TFDD の効果を検証した。その結果、GD15 の妊娠ラットへの TCDD 単回経口投与によって雄胎児脳下垂体の GH ならびに LH β mRNA 発現は低下ないし低下傾向を示したが、これらに対して TFDD 併用による抑制効果は観察されなかった (Fig. 2)。さらに、TFDD の併用は TCDD 依存的な CYP1A1 mRNA 発現誘

導に対しても影響を示さなかった (Fig. 2)。加えて、本検討では TCDD 曝露が生存胎児数を有意に減少させることを確認したが、TFDD の併用はこれに対しても影響しなかった (Table 1)。なお、TCDD および TFDD は、胎児体重、胎盤重量ならびに性比には有意な影響を与えなかった (Table 1)。

考 察

本研究では第一に、AHR を発現しダイオキシン応答性を示す細胞株である T47D 細胞を用いて、TFDD のダイオキシンに対する拮抗作用を検討した。その結果、TFDD は処理濃度依存的に TCDD 依存的な CYP1A1 レベルの誘導を抑制することが明らかになった。さらに、その 50% 効果量は 45.9 nM であり、TCDD のおよそ 90 倍高用量を要することが確認された。TFDD は、マウス腹腔内への投与によって 24 時間後に肝臓中レベルが投与量の 1~2% 程度にまで減少するが¹⁷⁾、TCDD は投与量の 10% 程度が肝臓に貯留する¹⁸⁾。これらの知見を踏まえ、本研究では妊娠母体への TCDD 投与量の 1,000 倍高用量の TFDD を一日一回反復経口投与し、TCDD の次世代毒性に対する拮抗作用を検討した。その結果、本研究で用いた投与条件下においては、胎児の GH/LH β mRNA 発現低下ならびに CYP1A1 mRNA 発現

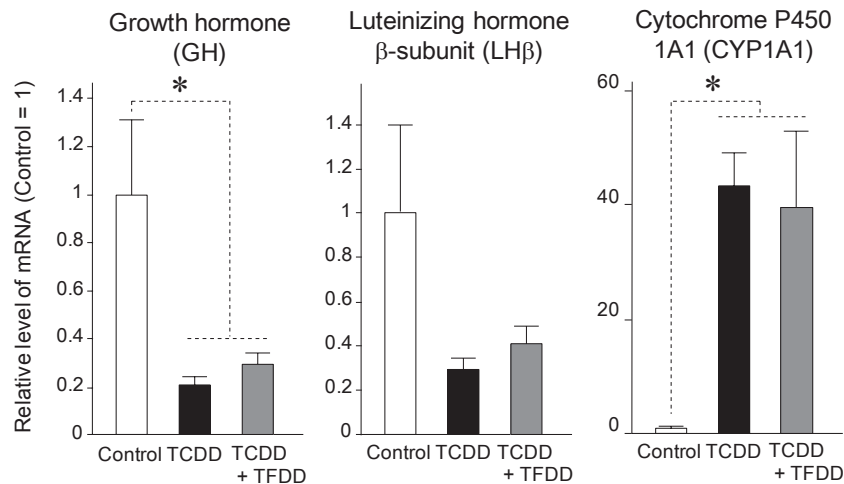


Fig. 2 Effect of maternal exposure to TCDD and TFDD on the pituitary expression of mRNAs coding for GH, LH β , and CYP1A1 in male fetuses at gestational day (GD) 20. Pregnant rats at GD15 were orally treated with 1 μ g/kg TCDD or corn oil and treated with TFDD (1 mg/kg/day) during GD16 and GD19. Bars are the means \pm S.E.M. of 3 pooled fetal pituitaries, which were removed from different dams. Significant difference between the pair indicated : * $p < 0.05$.

Table 1 Effects of maternal exposure to TCDD and TFDD on the litter size, sex ratio, and body and placental weight of fetuses.

Treatment	Sex	Litter Size	Sex ratio (% male)	Body weight (g)	Placental weight (mg)	% of BW
Control		13.7 \pm 0.9	48.6 \pm 7.0			
	Male	6.7 \pm 1.2		3.83 \pm 0.11	488 \pm 3	12.8 \pm 0.3
	Female	7.0 \pm 1.0		3.62 \pm 0.14	453 \pm 2	12.6 \pm 0.4
TCDD		11.3 \pm 1.2*	52.8 \pm 7.4			
	Male	6.0 \pm 1.2		3.74 \pm 0.10	510 \pm 18	13.7 \pm 0.7
	Female	5.3 \pm 1.2		3.45 \pm 0.07	487 \pm 58	14.1 \pm 1.6
TCDD + TFDD		11.7 \pm 1.3*	57.6 \pm 4.2			
	Male	6.7 \pm 1.2		3.75 \pm 0.22	528 \pm 15	14.2 \pm 0.5
	Female	5.0 \pm 0.3		3.57 \pm 0.14	471 \pm 44	13.2 \pm 0.8

Each value represents the mean \pm S.E.M. of 3 dams. *Significantly different from the control ($p < 0.05$).

誘導のいずれに対しても TFDD は拮抗することができなかった。胎児脳下垂体は、AHR mRNA 基礎発現が胎児脳組織の中でも比較的高い水準で発現しており、LH β mRNA の発現低下は AHR 依存的に起こる¹⁹⁾。従って、本研究における細胞での検討で 100 倍量の TFDD によって拮抗作用が見られた事実を合わせて考えると、母体に投与された TFDD が、胎児組織中で拮抗作用を示す

レベルに達していないために効果が見られなかった可能性が考えられる。母体に投与された TCDD は、投与量の 0.01~0.1% が胎児に移行することが報告されているが²⁰⁾、TFDD の胎盤透過性および胎児移行性に関する知見は筆者の知る限り存在しない。TFDD は、生体内において比較的代謝されやすいことが報告されており¹⁷⁾²¹⁾、母体における易代謝性によって胎児への移行量が予

想以上に小さかった可能性がある。TFDDの生体内での効果の有無を結論づけるため、胎児組織中のTFDDレベルを正確に定量することが今後必要である。

結 論

TCDD曝露を受けた妊娠ラットに対して、1,000倍量のTFDDを一日一回経口投与しても、TCDD依存的な胎児GH/LH mRNA発現低下に対して拮抗できないことが確認された。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)(課題番号:H24-食品-指定-014およびH27-食品-指定-017)によった。

参 考 文 献

- 1) Peterson RE, Theobald HM and Kimmel GL : Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds : cross-species comparisons. Crit. Rev. Toxicol. 23 : 283-335, 1993.
- 2) Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Chiba T, Todaka T, Kajiwara J, Yoshimura T, Hirata T, Fukushima K, Wake N and Furue M : Maternal exposure to high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by Yusho disease. Environ. Int. 38 : 79-86, 2012.
- 3) Nishijo M, Tawara K, Nakagawa H, Honda R, Kido T, Nishijo H and Saito S : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in maternal breast milk and newborn head circumference. J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 18 : 246-251, 2008.
- 4) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ : Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 140 : 173-179, 1996.
- 5) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M and Fujii-Kuriyama Y : Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. Genes Cells. 2 : 645-654, 1997.
- 6) Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y and Ishikawa T : Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97 : 779-782, 2000.
- 7) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35 : 307-340, 1995.
- 8) Mimura J and Fujii-Kuriyama Y : Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. Biochim. Biophys. Acta. 1619 : 263-268, 2003.
- 9) Whitlock JP Jr : Induction of cytochrome P4501A1. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39 : 103-125, 1999.
- 10) Hitomi M, Takeda T, Yamada H and Ishii Y : The effect of 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin on pubertal rats : an analysis focusing on the dioxin-like acute toxicity. Fukuoka Acta Med. 108 : 68-74, 2017.
- 11) Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, Kagawa T, Ishida T, Ishii Y and Yamada H : Fetal pituitary gonadotropin as an initial target of dioxin in its impairment of cholesterol transportation and steroidogenesis in rats. Endocrinology 147 : 927-936, 2006.
- 12) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T and Yamada H : Maternal exposure to dioxin disrupts gonadotropin production in fetal rats and imprints defects in sexual behavior. J. Pharmacol. Exp. Ther. 329 : 1091-1099, 2009.
- 13) Hattori Y, Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y and Yamada H : Dioxin-induced fetal growth retardation : the role of a preceding attenuation in the circulating level of glucocorticoid. Endocrine. 47 : 572-580, 2014.
- 14) Burke MD and Mayer RT : Inherent specificities of purified cytochromes P-450 and P-448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation. Drug Metab. Dispos. 3 : 245-253, 1975.
- 15) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275, 1951.
- 16) Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Yamamoto M, Shimazoe T, Ishii Y, Himeno M and Yamada H : Maternal exposure to dioxin imprints sexual immaturity of the pups through fixing the status of the reduced expression of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. Mol. Pharmacol. 85 : 74-82, 2014.
- 17) Weber R, Schrenk D, Schmitz HJ, Hagenmaier

- A and Hagenmaier H : Polyfluorinated dibenzodioxins and dibenzofurans--synthesis, analysis, formation and toxicology. *Chemosphere*. 30 : 629-639, 1995.
- 18) MacKenzie SA, Thomas T, Umbreit TH and Gallo MA : The potentiation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity by tamoxifen in female CD1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 116 : 101-109, 1992.
- 19) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H and Ishii Y : The aryl hydrocarbon receptor is indispensable for dioxin-induced defects in sexually-dimorphic behaviors due to the reduction in fetal steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis in rats. *Biochem. Pharmacol.* 154 : 213-221, 2018.
- 20) Van den Berg M, Heeremans C, Veenhoven E and Olie K : Transfer of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans to fetal and neonatal rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 9 : 635-644, 1987.
- 21) Schmitz HJ, Weber R, Hagenmaier A, Hagenmaier H, Poellinger L and Schrenk D : 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin : a potent agonist of the murine dioxin receptor. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3 : 105-113, 1997.

(Received for publication March 15, 2019)