

ダイオキシン低用量曝露母体の肝薬物代謝酵素活性 に対するシークワサー由来ポリメトキシフラボノ イド：ノビレチンのin vitro阻害効果

池田，佳乃子
九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野

佐野，宏江
九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野

宮内，優
九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野

太田，千穂
中村学園大学栄養科学部

他

<https://doi.org/10.15017/4483201>

出版情報：福岡醫學雑誌. 112 (2), pp.136-147, 2021-06-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



**ダイオキシン低用量曝露母体の肝薬物代謝酵素活性に対する
シークワサー由来ポリメトキシフラボノイド：
ノビレチンの *in vitro* 阻害効果**

¹⁾九州大学大学院薬学研究院 細胞生物薬学分野

²⁾九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

³⁾崇城大学薬学部

⁴⁾中村学園大学栄養科学部

池田佳乃子¹⁾²⁾, 佐野 宏 江¹⁾²⁾, 宮内 優¹⁾³⁾, 太田 千穂⁴⁾,
古賀 信幸⁴⁾, 田中 嘉孝¹⁾, 石井 祐次¹⁾²⁾

***The in Vitro* Inhibitory Effects of Nobiletin, a Polymethoxyflavonoid
from *Citrus Depressa*, on the Hepatic Enzyme Activity of
Dams Maternally Exposed to Low-Dose
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin**

Kanoko IKEDA¹⁾²⁾, Hiroe SANO¹⁾²⁾, YUU MIYAUCHI¹⁾³⁾, Chiho OHTA⁴⁾,
Nobuyuki KOGA⁴⁾, Yoshitaka TANAKA¹⁾ and Yuji ISHII¹⁾²⁾

¹⁾*Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University*

²⁾*Laboratory of Molecular Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University*

³⁾*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University*

⁴⁾*Faculty of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University*

Abstract

In this study, we examined the effects of nobiletin, a polymethoxyflavonoid derived from *Citrus depressa*, on cytochrome P450 (CYP, P450) activity in the livers of dams maternally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Pregnant Wistar rats received TCDD (1 µg/kg, p.o.) on gestational day 15 (GD15), and at GD20, we examined hepatic P450 activity and its inducibility by TCDD. Ethoxyresorfin-*O*-deethylase (EROD) activity, a marker activity of CYP1A1, was found to be significantly induced in TCDD-treated rats, whereas although CYP1A2 activity also increased by TCDD, the effect was less pronounced than that observed for CYP1A1. In contrast, CYP3A and CYP2C6 activities were significantly higher in the TCDD group than in the control group. These results suggest that maternal exposure to TCDD elicits changes in the levels of drug-metabolizing enzyme activities, including those of CYP1A1, CYP3A, and CYP2C6. To examine the effect of nobiletin, P450-dependent activity was assayed *in vitro* in the presence or absence of this flavonoid. Although the effects differed depending on P450 isoform, nobiletin exhibited inhibitory effects on CYP1A1, CYP1A2, CYP2C6, and CYP3A. We accordingly anticipate that nobiletin will reduce the adverse effects of maternal exposure to TCDD via its modulation of P450 activity.

Corresponding author : Yuji ISHII

Division of Pharmaceutical Cell Biology, 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

Key words : Nobiletin, TCDD, CYP, mother, liver

はじめに

1968年、西日本一帯に発生した奇病、油症では、皮膚症状や脂質代謝異常を始めとする多岐にわたる障害が発生し、発生後53年以上経過した現在もなお、多くの患者が苦しんでいる。油症原因物質は、ライスオイルの加熱脱臭時の熱媒体として用いられた polychlorinated biphenyl (PCB) およびその加熱により生じた非意図的生成物であるダイオキシン類であると考えられている¹⁾²⁾。

ダイオキシン類は多様な毒性を有する環境汚染物質でもあり、現在の我が国ではその80~90%が一般ごみ焼却施設での燃焼によって非意図的に発生している。それらダイオキシン類の中でも2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (Fig. 1) は最強毒性を有し、極めて微量で皮膚障害、生殖障害、肝障害、がん、奇形などの原因となることが知られている。ダイオキシン類の多様な毒性の多くは、転写因子である芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR)³⁾ に結合して核内因子 AhR nuclear translocator とヘテロダイマーを形成し⁴⁾、cytochrome P450 (P450, CYP) 1ファミリーなどの標的遺伝子の転写を活性化することによって生じる。現在、ダイオキシン類対策特別措置法によってダイオキシン類対策が進められており、排出削減目標は達成されたことが評価され、1日摂取量は年々減少傾向にある。しかし、ダイオキシン類は化学的安定性、脂溶性が高く、難分解性であるため、いったん排出されたダイオキシン類の環境からの除去は困難であり、生物学的半減期は極めて長い。そのため、ダイオキシン類の慢性的な低用量曝露による影響と対策を構築することは、現在もなお重要であると考えられる。

当研究室では、TCDD 次世代毒性の解析のため、妊娠母ラットへの TCDD (1 μ g/kg, gestational day (GD) 15) 投与による検討を行っている^{5)~8)}。妊娠母体への TCDD 低用量曝露によっては、その胎児に対して成長障害や性成熟障害^{9)~12)} といった次世代毒性を生じさせることが広く知られている。ダイオキシン類の多様な毒性のなかには

代謝酵素の誘導に起因するものがある²⁾。TCDD による CYP1A1 の誘導による心血管疾患の発症や¹³⁾、酸化ストレスの増加¹⁴⁾ は TCDD による毒性の一端を担っていると考えられている。生体内での薬物代謝には P450 による酸化をはじめとした第 I 相反応、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) によるグルクロン酸抱合をはじめとした第 II 相反応が関与しており、TCDD は AhR を介した誘導により、その中でも第 I 相薬物代謝酵素として CYP1A1, 1B1, 2A8 等、第 II 相薬物代謝酵素として NAD(P)H : キノンオキシドレダクターゼ (Nqo1), UGT1A6/7, グルタチオン S-トランスフェラーゼ a1 (Gsta1) などの多数の代謝酵素を誘導する¹⁵⁾¹⁶⁾。また、妊娠母体への TCDD 低用量曝露 (妊娠 15 日目, 1 μ g/kg, 経口投与) の場合での代謝酵素活性の変動については、妊娠 20 日目における母体肝臓でマーカーとなる CYP1A1 活性の誘導が確認されている¹⁷⁾。しかしその他の代謝酵素については、児の発育障害に母体側での代謝酵素の変動も一因と推測されているにもかかわらず¹⁸⁾、mRNA レベルでの検討にとどまり、これまで詳しい研究がなされていない。よって、妊娠 15 日目の母ラットへの TCDD (1 μ g/kg) 投与の母体肝臓での代謝酵素への影響を解析し、基礎的検討を行うことは、TCDD による次世代毒性発現に対する改善策の構築につながると考えられる。そのため、本研究ではラット妊娠母体に TCDD 低用量曝露させた際の肝臓での薬物代謝酵素の活性の変動とそれら変動に対する防御策の検討を行った。

先行研究により、GD15 妊娠母体への TCDD 低用量曝露 (1 μ g/kg) によって GD18 において母体でのコルチコステロンレベル低下が生じることが確認されている¹⁸⁾。コルチコステロンはラットやマウスなどにおいて副腎皮質束状層から分泌される糖質 (グルコ) コルチコイドのひとつであり、妊娠中は胎盤を介して母体-胎児間を循環している。また、コルチコステロンは胎児の成長に不可欠なホルモンである growth hormone (GH) 細胞の成熟¹⁹⁾²⁰⁾ や GH 産生の開始の誘発に関与する²¹⁾²²⁾。よって、一般に知られている妊娠母体

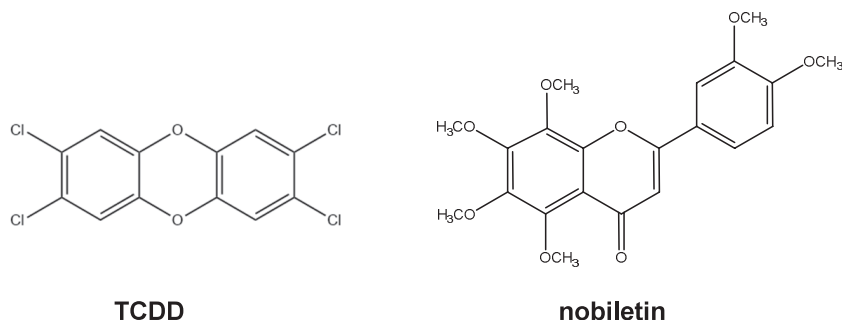


Fig. 1 Structures of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and nobiletin.

への TCDD 曝露による胎児での成長障害の発生は、その原因として胎児での GH レベルの低下が考えられ、当研究室ではその胎児での GH レベル低下に母体でのコルチコステロンレベル低下が関係しているという仮説に基づいた検討を行っている。コルチコステロンレベル低下の原因のひとつとしてコルチコステロン代謝の亢進が考えられる。コルチコステロンは 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) または 20-hydroxysteroid dehydrogenase (20-HSD) によってそれぞれ 11 β -デヒドロコルチコステロン、20-デヒドロコルチコステロンに代謝されることが広く認められている²³⁾²⁴⁾。さらに、CYP3A²⁵⁾²⁶⁾、CYP2A²⁷⁾ がコルチコステロン代謝に関与しているという報告もある。しかし、CYP3A 及び CYP2A 以外の P450 アイソフォームにおいてコルチコステロンに対する代謝の有無は未だ不明である。

ダイオキシン毒性に対しては多数のフラボノイドがその防御策として検討されている。例えば、柑橘系に含まれるヘスペリジン²⁸⁾²⁹⁾、ホップ系植物由来のキサントフモール³⁰⁾、甘草由来のグラブリジン³¹⁾などがその例である。本研究では TCDD 毒性に対する防御策として期待されるノビレチン (NBL, 5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone) (Fig. 1) を *in vitro* での検討に用いた。ノビレチンは柑橘系植物、特にシークワーサーに多く含まれるポリメトキシフラボノイドの一種であり、抗炎症作用³²⁾³³⁾、抗認知症作用³⁴⁾、抗がん作用³⁵⁾³⁶⁾ 及び抗肥満作用³⁷⁾³⁸⁾ などの多様な作用が報告されている。また、ノビレチンはラットにおいて複数の P450 分子種 (CYP1A1, 1A2, 2A1, 2B1, 2C11, 2C12, 2D1, 2E1, 3A1, 3A2) によって代謝されることがわかっている¹⁷⁾。しかし、

TCDD 毒性に関する分野に限れば、MCF7 ヒト乳がん細胞において自身が CYP1A の基質となることで TCDD によって誘導された CYP1A を阻害すること³⁹⁾、U937 ヒトマクロファージにおいて TCDD によって誘導された CYP1A1 mRNA 発現を抑制すること⁴⁰⁾ が認められている一方で、その他の代謝酵素への影響や TCDD の妊娠曝露母体での代謝酵素にもたらす影響については情報が皆無である。よって本研究では、まず *in vitro* でのノビレチンの影響を検討した。即ち、妊娠母体への TCDD 低用量曝露による代謝酵素活性変動への *in vitro* でのノビレチン添加効果を解析することで、ノビレチンの TCDD 毒性に対する有用性について検討した。

実験方法

1. 試薬

ノビレチンは、INDOFINE Chemical Company のものをフナコシ(株)より購入して使用した。

2. 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。雌雄の Wistar 系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 0 日目とした。妊娠 15 日目に、TCDD (1 μ g/kg/2 mL コーン油) を単回経口投与した。対照群には、コーン油のみを投与した。胎生 20 日 (GD20) の胎児は母体から摘出し、次世代毒性の解析に供した⁴¹⁾。また、母体の肝臓を摘出し、液体窒素にて凍結したのち、使用まで -80°C にて凍結保存した。

Table 1 The kinetics parameters for cytochrome P450 activity toward 7-ethoxyresorufin, luciferin-ME, luciferin-H and luciferin-PFBE in hepatic S9

Substrate	Km	Vmax (nmol/min/mg protein)
7-Ethoxyresorufin	41.1 ± 9.3 ^a	1.25 ± 0.19
Luciferin-ME	29.8 ± 5.0 ^b	223 ± 11
Luciferin-H	311 ± 192 ^b	6.67 ± 2.90
Luciferin-PFBE	112 ± 22 ^b	25.7 ± 3.2

^anM ; ^bμM. S9 samples were prepared from the liver homogenate of pregnant rats (GD20) orally treated with TCDD (1 μg/kg). S9 samples of 5 rats were pooled and subjected to the assay. Each value represents the mean ± S.E.M. of triplicate assay.

3. S9 サンプル調製

GD20 母体 1 匹当たり肝臓 1 g を 0.25 M sucrose 3 mL でホモジナイズした。そのうち、9,000 × g, 4℃で 20 分間遠心分離した。得られた上清 (S9) を分注し、使用するまで -80℃にて保存した。タンパク質定量は、Lowry らの方法に基づいて行った⁴²⁾。なお、標準タンパク質として bovine serum albumin (BSA) を用い、吸光度測定には HITACHI U-1800 Spectrophotometer を用いた。

4. P450 活性測定

1) Ethoxyresorfin-*O*-deethylase (EROD) assay

Burke らの方法に従って⁴³⁾、7-ethoxyresorufin の *O*-脱アルキル化反応により生じる resorufin の蛍光を測定した (励起光, 544 nm ; 測定光, 590 nm)。

2) CYP1A2, 2C6 and 3A assay

それぞれの活性は P450-Glo™ CYP1A2 Assay, P450-Glo™ CYP2C9 Assay, P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Promega 社) を用いて測定した。NADPH (終濃度 0.1 mM) の存在下、CYP1A2 測定では luciferin-ME, CYP2C6 測定では luciferin-H, CYP3A 測定では luciferin-PFBE を基質として使用した。発光測定及びインキュベーション、攪拌にはフルオロスキャンアセント FL (Thermo Labsystems 社) を使用し、付属のコンピュータソフトウェア (Ascent software) にてデータ解析を行った。なお、標準物質としては luciferin を用いた。

5. 統計処理

すべての 2 群間の比較については、Student's *t* test を用いて解析した。また、他群間の比較については、1-way ANOVA 及び Turkey の多重比較検定を用いて解析した。なお、有意水準は $p < 0.05$ とした。また、kinetics の結果は Michaelis-Menten 式に非線形回帰を行い、各パラメーターを算出した。

実験結果

1. TCDD 低用量曝露母体肝での薬物代謝酵素活性の基礎的研究

CYP1A1 の指標となる EROD 活性、及び CYP1A2, 2C6 及び 3A の活性測定を実施した。S9 のタンパク量を EROD 活性では 500 μg/100 μL, その他の assay では 40 μg/well として解析を行った。その結果、算出されたキネティックパラメーター (Km, Vmax) は Table 1 に示す通りである。速度論的解析の実施後、EROD 活性を TCDD 低用量曝露妊娠母体及び非曝露妊娠母体の間で比較することで、CYP1A1 活性の変動を解析した。7-Ethoxyresorufin 濃度は Table 1 の Km 値を基に、40 nM で使用した。その結果、Control 群と比較して、TCDD 曝露群では有意な EROD 活性の誘導が確認された (Fig. 2)。さらに、TCDD 低用量曝露妊娠母体及び非曝露妊娠母体の間で比較することで、CYP1A2, 2C6 及び 3A 活性の変動を解析した。基質の終濃度は luciferin-ME, luciferin-H 及び luciferin-PFBE それぞれ 30 μM, 300 μM 及び 100 μM として使用した。基質濃度は実施した速度論的解析によって明らかにされた Km 値を基に決定した (Table 1)。

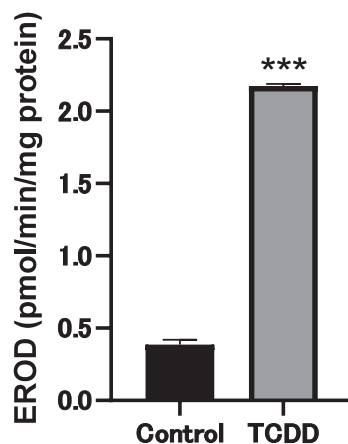


Fig. 2 Effect of maternal exposure to TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at GD15) on hepatic EROD activity of dams at GD20.

EROD activity in the S9 is used as index of the induction of CYP1A1. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 5 rats, respectively. Significantly different from Control : *** $p < 0.001$.

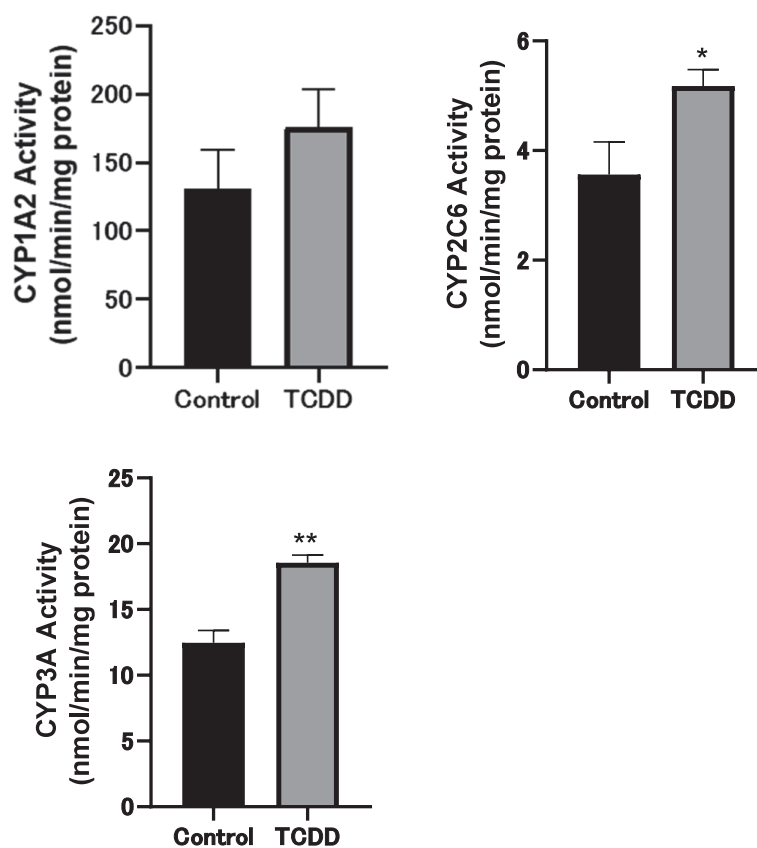


Fig. 3 Effect of maternal exposure to TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at GD15) on hepatic CYP1A2, 2C6 and 3A activity of dams at GD20.

Control group was treated with corn oil at GD15. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 5 rats. Significantly different from Control : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

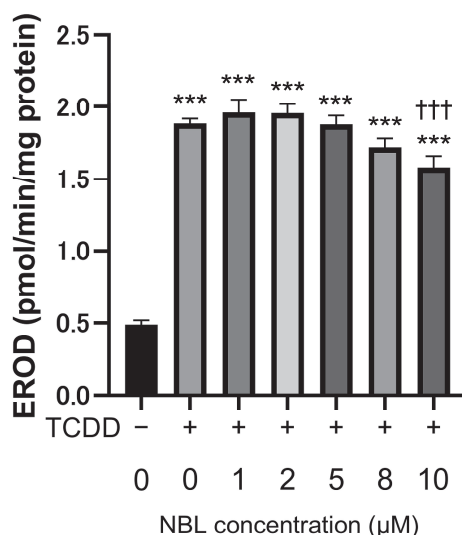


Fig. 4 Effect of nobiletin (NBL) *in vitro* on hepatic EROD activity of pregnant rats (GD20) exposed to TCDD (1 µg/kg at GD15).

EROD activity in the S9 is used as index of the induction of CYP1A1. S9 samples of 5 rats of control and TCDD-treated group were pooled and subjected to the assay, respectively. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of triplicate assays. Significantly different from TCDD (-) group : ***, $p < 0.001$. Significantly different from {TCDD (+), NOB concentration 0 µM} group : †††, $p < 0.001$.

その結果, CYP2C6 及び 3A において TCDD 曝露群での有意な活性の増加が確認された (Fig. 3). CYP1A2 については活性の上昇傾向があったものの有意ではなかった.

2. ノビレチンによる *in vitro* での薬物代謝酵素活性への阻害効果

次に, EROD 活性を用いてノビレチンの CYP1A1 に対する阻害効果を検討した. 7-Ethoxyresorufin 濃度は Fig. 2 の EROD 活性解析と同じ 40 nM で用いた. ノビレチンは 7-ethoxyresorufin と同じ DMSO に溶解し, 7-ethoxyresorufin と同時に終濃度 1, 2, 5, 8 及び 10 µM となるようにサンプルに添加することで反応を開始させた. なお, ここでは酵素源として, 5 匹の母ラット肝臓のサンプルを等量混和したプールド S9 サンプルを用いている. 上述 (Fig. 2) と同じく, EROD 活性は TCDD 曝露により対照と比較して有意に高く, ノビレチンの終濃度 10 µM で有意に活性を抑制することが示された (Fig. 4). これは基質濃度 40 nM の 250 倍の濃度である. 次に, CYP1A2, 2C6 及び 3A の活性について, ノビレ

チンの阻害効果を解析した (Fig. 5). それぞれの基質濃度は終濃度 30 µM, 300 µM 及び 100 µM で用いた. その結果, CYP1A2 活性は TCDD 曝露により対照と比較して有意に高く, ノビレチンの終濃度 80 µM 以上で有意に活性を抑制することが示された. これは基質濃度 30 µM の約 2.7 倍の濃度である. また, CYP2C6 活性は TCDD 曝露により対照と比較して有意に高く, 最低でもノビレチンの終濃度 10 µM 以上で有意に活性を抑制することが示された. これは基質濃度 300 µM の 1/30 の濃度である. さらに, CYP3A 活性は TCDD 曝露により対照と比較して有意に高く, ノビレチンの終濃度 50 µM 以上で有意に活性を抑制することが示された. これは基質濃度 100 µM の 1/2 の濃度である. このように, ラット肝臓 S9 分画を用いた *in vitro* での検討では, ノビレチンは, CYP1A1, 1A2, 2C6 及び 3A を *in vitro* で阻害するものの, 阻害の強さは分子種ごとに異なることが示唆された. 今回検討した条件では, CYP2C6 に対する阻害効果が最も高かった (Fig. 5).

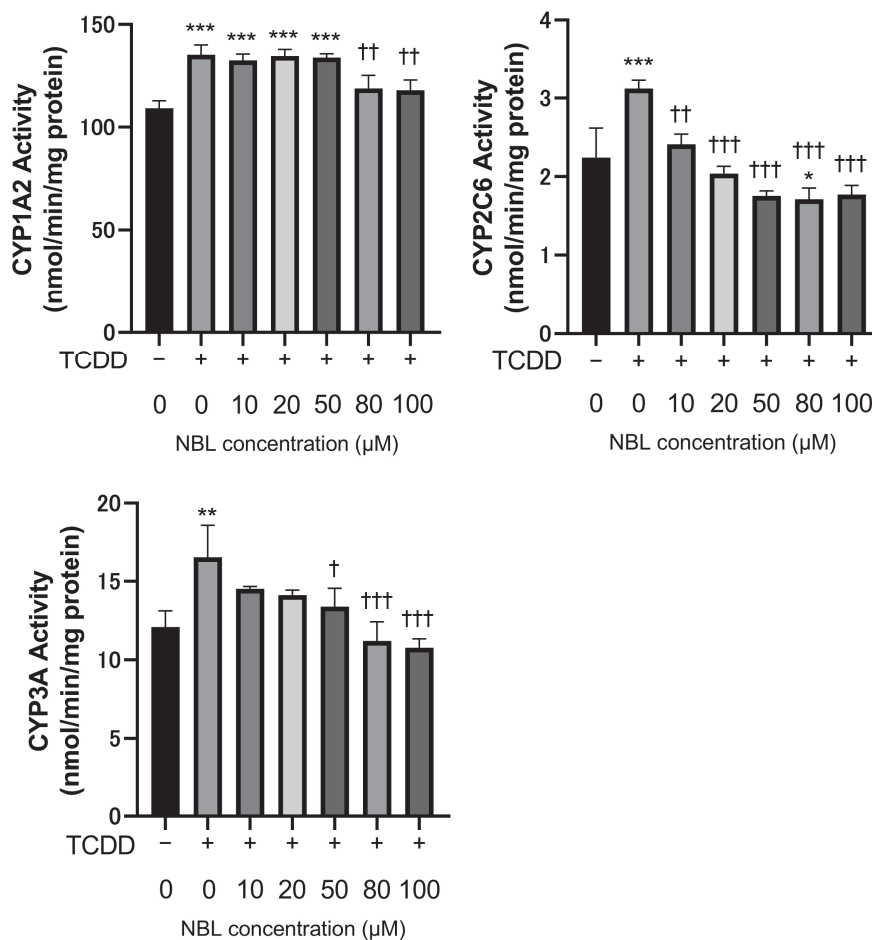


Fig. 5 Effect of nobiletin (NBL) *in vitro* on hepatic CYP1A2, 2C6 and 3A activity of pregnant rats (GD20) exposed to TCDD (1 $\mu\text{g/kg}$ at GD15).

TCDD (-) group was treated with corn oil at GD15. S9 samples of 5 rats were pooled and subjected to the assay. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of triplicate assays. Significantly different from TCDD (-) group : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Significantly different from {TCDD (+), NOB concentration 0 μM } group : †, $p < 0.05$; ††, $p < 0.01$; †††, $p < 0.001$.

考 察

本研究では、TCDD 妊娠期低用量暴露した母ラットの肝臓の P450 活性を比較し、それへのノビレチンの影響について検討した。P450 分子種のなかでも CYP1A1 の活性が TCDD 曝露によって著しく誘導されることが示された (Fig. 2)。TCDD による CYP1A の誘導については広く知られており、AhR 活性化を介したそのメカニズムについても考察されている³⁾⁴⁴⁾。また、ラット肝において TCDD による誘導は CYP1A2 に比べて CYP1A1 がより強く誘導されることがわかっ

ている⁴⁵⁾。TCDD と同じダイオキシン類であり、油症原因物質である 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran がラット CYP1A2 に対して高親和性で結合していることが当研究室の先行研究によって示されており⁴⁶⁾、TCDD についても CYP1A2 と結合することでその活性を抑制する作用を持つことが認められている⁴⁷⁾。本研究では、western blotting によるタンパク質レベルの変動を確認していないが、TCDD 低用量曝露によっても、CYP1A2 が誘導されている可能性は否めない。しかし、誘導されると同時に TCDD との結合による活性阻害も起こっているとすれば、

本研究の結果と矛盾しない。これらの要因により、TCDD 低用量曝露によって CYP1A2 活性は増加傾向にとどまったと推定される (Fig. 3)。

さらに、TCDD 低用量曝露によって CYP3A 活性の有意な誘導が確認された (Fig. 3)。当研究室の先行研究において妊娠 15 日目母体への TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与により CYP3A1 mRNA レベルの GD17, GD18 の母体では増加傾向、GD19 の胎児では有意な増加が認められている¹⁸⁾。そのため、本研究の結果は先行研究の結果と矛盾しない。

次いで、TCDD によって CYP2C6 活性の有意な上昇が示された (Fig. 3)。CYP2C サブファミリーについては、これまでに TCDD を含む aromatic hydrocarbons による抑制は分かっていたが⁴⁸⁾⁴⁹⁾、誘導については、筆者が知る限り報告されておらず、本研究によってはじめて CYP2C6 の TCDD による誘導の可能性が示唆された。なお、本研究では、CYP1A2 特異的な luciferin-ME と CYP2C6 特異的な luciferin-H を用いた結果を基に、それぞれを CYP1A2 および CYP2C6 活性として取り扱った。TCDD 母体暴露による luciferin-ME 代謝活性への影響が上昇傾向にとどまり、luciferin-H 代謝活性の上昇が有意であることから CYP1A2 による活性上昇と CYP2C6 の誘導が示唆されたとの観点で考察を加えている。但し、luciferin-H は CYP2C6 に次いで CYP1A2 により代謝を受けることから、CYP1A2 および CYP2C6 の誘導については今後 mRNA レベルやタンパク質レベルで精査する必要がある。

前述の通り、当研究室での先行研究により、母体への TCDD 低用量曝露によって母体でのコルチコステロンレベル、胎児での GH 産生が低下することが明らかにされている¹⁸⁾。ラット CYP3A1/2 mRNA レベルの下垂体切除による増加、GH 添加による減少は報告されており⁵⁰⁾、CYP2C6 は GH によって mRNA とタンパク質レベルで抑制されることがわかっている⁵¹⁾。よって、妊娠母体への TCDD 低用量曝露によって母体でのコルチコステロンレベルの低下が生じているとすれば、胎児のみならず母体での GH 産生についても低下していると推定される。それにより CYP3A 及び 2C6 がアップレギュレーションされた可能性が考察できる。ただし、ラットのグルココルチコイドであるコルチコステロンレベルは

GD15 に TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 母体曝露後 GD18 では母体で低下が認められているが、GD19 では有意な変動はない¹⁸⁾。本研究では、P450 分子種のマーカー活性を調べたが、今後、P450 のタンパク質発現レベルについても検討することが望まれる。また、妊娠母体への TCDD 低用量曝露による母体での GH への影響の研究は、現時点では不十分であるため、今後、母体における GH レベルの変動についても検討が望まれる。よって、母体肝での CYP3A 及び 2C6 活性上昇の機構に関する考察は、仮説にとどまる。

次に、Fig. 4 及び 5 より、TCDD 低用量曝露した妊娠母体肝において誘導された CYP1A1, 1A2, 2C6 及び 3A はノビレチンによって有意に阻害されることが示された。また、活性を有意に阻害できるノビレチン濃度はそれぞれ異なるが、基質濃度を K_m を基に設定していることを考慮すると基質濃度の 1/30 の濃度でも有意な阻害が確認された CYP2C6 がノビレチンによる阻害効果が最も高いことが示唆された。ノビレチンは P450 による酸化によって、4'-OH, 7-OH, 6-OH, 3', 4'-diOH 及び 6, 7-diOH に代謝される¹⁷⁾。ラットでは、4'-OH 代謝には CYP2C11 の寄与が最も大きく、次いで CYP1A1 が主として関与している¹⁷⁾。また、7-OH 生成に対しても CYP2C11 の寄与が特出して大きく、次いで CYP3A1 及び 3A2 が関与している¹⁷⁾。さらに、6-OH 生成には CYP2C11, 2D1, 3A1 及び 3A2 がほぼ同程度の寄与で関与している¹⁷⁾。ラットでは 4'-OH が主要代謝物であることを考慮しても、ラットにおいてノビレチン代謝への寄与が大きい P450 分子種は CYP2C11 であると推察される¹⁷⁾。ラット CYP2C 分子種のうち、CYP2C11 は雄に特異的、CYP2C12 が雌に特異的である一方で、本研究において検討を行った CYP2C6 については性差がない⁵²⁾。CYP2C6 については先に示したノビレチンの代謝寄与について検討されていないが、雌に特異的である CYP2C12 はほとんどノビレチン代謝に関与していないことから¹⁷⁾、本検討で用いたラットの雌においては CYP2C6 が CYP2C11 に代わりノビレチンの酸化的代謝に関与している可能性が考えられる。このことから、本研究で検討した CYP1A1, 1A2, 2C6 及び 3A の分子種のうち、CYP2C6 が最もノビレチンによる阻害作用

が高かったことは過去の研究を考慮しても矛盾しない。

また、CYP1A1 はベンゾ[a]ピレンや 7,12-ジメチルベンズアントラセン, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) などの発がん物質への代謝に関与している⁵³⁾⁵⁴⁾。よって、TCDD により誘導された CYP1A1 活性に対するノビレチンの阻害 (Fig. 4) は発がんリスクの抑制に有効であることが示唆される。さらに、現段階では仮説にとどまるが、先に述べた通りコルチコステロン代謝に CYP1A2 が関与している可能性を考慮すると、ノビレチンによる CYP1A2 活性の抑制は胎児における成長障害の改善につながることを期待される。

さらに CYP2C6 はラットに特異的に発現する酵素であり、ヒトアイソフォームでは CYP2C9 に対応する。CYP2C6 の役割の一つにはアラキドン酸代謝がある。アラキドン酸は ω -6 多価不飽和脂肪酸であり、シクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ、P450 によって代謝される。ラットでの P450 による代謝には主に CYP2C11, 2C6, 1A1 及び 1A2 が関係しており、エポキシ化またはヒドロキシ化によってエポキシエイコサトリエン酸 (EET) またはヒドロキシエイコサテトラエン酸 (HETE) に代謝される⁵⁵⁾。CYP2C6 は mid-chain (m) HETE を 48.3%, EET を 29.4% 生成する⁵⁵⁾。mHETE の中でも特に 12 位が水酸化された 12-HETE の産生が一番多く、12-HETE は炎症促進作用、アテローム性動脈硬化症の発生、腫瘍細胞のアポトーシスの抑制、血管新生、増殖の促進などに関わっている^{56)~59)}。このことから、CYP2C6 活性の増加は細胞へ悪影響をもたらす mHETE の産生につながり、ノビレチンはその毒性に対する改善効果を示すことが予想される。これまでに TCDD による HETE 量変動への影響は HETE 種全体、18, 19, 20-HETE の増加については検討されているが^{60)~62)}、TCDD による 12-HETE の変動については未だ情報が不十分である。そのため、CYP2C6 によるアラキドン酸代謝を介した毒性発現については、今後検討の余地があると考えられる。

結 論

TCDD 低用量曝露母体肝臓では多種の P450 に

よる薬物代謝活性の増加が確認されたため、それによる内因性の生理活性物質の変動や発がん物質の代謝活性化等が起こり得ると推察された。ノビレチンには、*in vitro* で CYP1A1, 1A2, 2C6 及び 3A 活性の阻害効果が確認された。これにより、ノビレチンが TCDD により誘導された P450 活性を抑制することで、代謝酵素活性上昇に起因する種々の毒性に対する防御策になり得ると期待され、今後 *in vivo* でのダイオキシン次世代毒性への効果検証が望まれる。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業) (課題番号: H30-食品-指定-005) および科学研究費補助金基盤研究 A (17H00788) によった。

参 考 文 献

- 1) Masuda Y : Behavior and toxic effects of PCBs and PCDFs in Yusho patients for 35 years. J. Dermatological Sci. 1 : S11-S20, 2005.
- 2) Furue M, Ishii Y, Tsukimori K and Tsuji G : Aryl Hydrocarbon Receptor and Dioxin-Related Health Hazards-Lessons from Yusho. Int. J. Mol. Sci. 22 : 708, 2021.
- 3) Poland A and Knutson JC : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 26 : 517-554, 1982.
- 4) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35 : 307-340, 1995.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y and Yamada H : Dioxin silences gonadotropin expression in perinatal pups by inducing histone deacetylases : a new insight into the mechanism for the

- imprinting of sexual immaturity by dioxin. *J. Biol. Chem.* 287 : 18440-18450, 2012.
- 8) 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.
 - 9) Mably TA, Moore RW and Peterson RE : In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114 : 97-107, 1992.
 - 10) Gray LE Jr and Ostby JS : In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133 : 285-294, 1995.
 - 11) Gray LE Jr, Ostby JS and Kelce WR : A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146 : 11-20, 1997.
 - 12) Hurst CH, DeVito MJ, Setzer RW and Birnbaum LS : Acute administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in pregnant Long Evans rats : association of measured tissue concentrations with developmental effects. *Toxicol. Sci.* 53 : 411-420, 2000.
 - 13) Kopf PG, Scott JA, Agbor LN, Boberg JR, Elased KM, Huwe JK and Walker MK : Cytochrome P4501A1 is required for vascular dysfunction and hypertension induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Sci.* 117 : 537-546, 2010.
 - 14) Denison MS, Soshilov AA, He G, DeGroot DE and Zhao B : Exactly the same but different : promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol. Sci.* 124 : 1-22, 2011.
 - 15) Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y and Dalton TP : Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59 : 65-85, 2000.
 - 16) Emi Y, Ikushiro S and Kato Y : Thyroxine-metabolizing rat uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A7 is regulated by thyroid hormone receptor. *Endocrinology.* 148 : 6124-6133, 2007.
 - 17) Koga N, Matsuo M, Ohta C, Haraguchi K, Matsuoka M, Kato Y, Ishii T, Yano M and Ohta H : Comparative study on nobiletin metabolism with liver microsomes from rats, Guinea pigs and hamsters and rat cytochrome p450. *Biol. Pharm. Bull.* 30 : 2317-2323, 2007.
 - 18) 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.
 - 19) Lacroix MC, Guibourdenche J, Frendo JL, Pidoux G and Evain-Brion D : Placental growth hormones. *Endocrine.* 19 : 73-79, 2002.
 - 20) Jesus KD, Wang X and Liu JL : A general IGF-I overexpression effectively rescued somatic growth and bone deficiency in mice caused by growth hormone receptor knockout. *Growth. Factors.* 27 : 438-447, 2009.
 - 21) Porter TE : Regulation of pituitary somatotroph differentiation by hormones of peripheral endocrine glands. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29 : 52-62, 2005.
 - 22) Nogami H and Hisano S : Functional maturation of growth hormone cells in the anterior pituitary gland of the fetus. *Growth. Horm. IGF. Res.* 18 : 379-388, 2008.
 - 23) Vylitová M, Miksik I and Pácha J : Metabolism of corticosterone in mammalian and avian intestine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109 : 315-324, 1998.
 - 24) Kucka M, Vagnerová K, Klusonová P, Miksik I and Pácha J : Corticosterone metabolism in chicken tissues : evidence for tissue-specific distribution of steroid dehydrogenases. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147 : 377-383, 2006.
 - 25) Watlington CO, Atkins JL, McNeil JS, Grogan WM and Johnson JP : Corticosterone is converted to 6 beta-hydroxycorticosterone in rat : effects of the metabolite on urinary electrolyte excretion. *J. Steroid. Biochem.* 31 : 947-954, 1988.
 - 26) Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP and Lapenson DP : Human liver microsomal steroid metabolism : identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 263 : 424-436, 1988.
 - 27) Negishi M, Uno T, Honkakoski P, Sueyoshi T, Darden TA and Pedersen LP : The roles of individual amino acids in altering substrate specificity of the P450 2a4/2a5 enzymes. *Biochimie.* 78 : 685-694, 1996.

- 28) Bentli R, Ciftci O, Cetin A, Unlu M, Basak N and Cay M : Oral administration of hesperidin, a citrus flavonone, in rats counteracts the oxidative stress, the inflammatory cytokine production, and the hepatotoxicity induced by the ingestion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Eur. Cytokine. Netw.* 24 : 91-96, 2013.
- 29) Tan YQ, Chiu-Leung LC, Lin SM and Leung LK : The citrus flavonone hesperetin attenuates the nuclear translocation of aryl hydrocarbon receptor. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 210 : 57-64, 2018.
- 30) Suh KS, Choi EM, Kim HS, Park SY, Chin SO, Rhee SY, Pak YK, Choe W, Ha J and Chon S : Xanthohumol ameliorates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced cellular toxicity in cultured MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J. Appl. Toxicol.* 38 : 1036-1046, 2018.
- 31) Choi EM, Suh KS, Jung WW, Park SY, Chin SO, Rhee SY, Pak YK and Chon S : Glabridin attenuates antiadipogenic activity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in murine 3T3-L1 adipocytes. *J. Appl. Toxicol.* 38 : 1426-1436, 2018.
- 32) Guo S, Qiu P, Xu G, Wu X, Dong P, Yang G, Zheng J, McClements DJ and Xiao H : Synergistic anti-inflammatory effects of nobiletin and sulforaphane in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Agric. Food. Chem.* 60 : 2157-2164, 2012.
- 33) Wu X, Song M, Rakariyatham K, Zheng J, Guo S, Tang Z, Zhou S and Xiao H : Anti-inflammatory effects of 4'-demethylnobiletin, a major metabolite of nobiletin. *J. Funct. Foods.* 19 : 278-287, 2015.
- 34) Nakajima A, Ohizumi Y and Yamada K : Anti-dementia Activity of Nobiletin, a Citrus Flavonoid : A Review of Animal Studies. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 12 : 75-82, 2014.
- 35) Liu J, Wang S, Tian S, He Y, Lou H, Yang Z, Kong Y and Cao X : Nobiletin inhibits breast cancer via p38 mitogen-activated protein kinase, nuclear transcription factor-kappaB, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathways in MCF-7 cells. *Food. Nutr. Res.* 21 : 62, 2018.
- 36) Sp N, Kang DY, Kim DH, Park JH, Lee HG, Kim HJ, Darvin P, Park YM and Yang YM : Nobiletin inhibits CD36-dependent tumor angiogenesis, migration, invasion, and sphere formation through the Cd36/Stat3/Nf-K b signaling axis. *Nutrients.* 10 : 772, 2018.
- 37) He B, Nohara K, Park N, Park YS, Guillory B, Zhao Z, Garcia JM, Koike N, Lee CC, Takahashi JS, Yoo SH and Chen Z : The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome. *Cell. Metab.* 23 : 610-621, 2016.
- 38) Lone J, Pararray HA and Yun JW : Nobiletin induces brown adipocyte-like phenotype and ameliorates stress in 3T3-L1 adipocytes. *Biochimie.* 146 : 97-104, 2018.
- 39) Surichan S, Androutsopoulos VP, Sifakis S, Koutala E, Tsatsakis A, Arroo RR and Boarder MR : Bioactivation of the citrus flavonoid nobiletin by CYP1 enzymes in MCF7 breast adenocarcinoma cells. *Food. Chem. Toxicol.* 50 : 3320-3328, 2012.
- 40) Sciallo EM, Vogel CF, Wu D, Murakami A, Ohigashi H and Matsumura F : Effects of selected food phytochemicals in reducing the toxic actions of TCDD and p, p'-DDT in U937 macrophages. *Arch. Toxicol.* 84 (12) : 957-966, 2010.
- 41) 佐野宏江, 李任時, 陳宏斌, 古賀貴之, 松下武志, 松尾友樹, 武田知起, 田中嘉孝, 石井祐次 : ダイオキシン母体曝露による胎児ゴナドトロピン低下機構 : 胎児視床下部の葉酸代謝系の亢進と α -リボ酸補給による回復. フォーラム 2019 : 衛生薬学・環境トキシコロジー, 京都. 8月31日, 2019.
- 42) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 43) 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.
- 44) Fujii-Kuriyama Y and Mimura J : Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 : 311-337, 2005.
- 45) Xu L, Li AP, Kaminski DL and Ruh MF : 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction of cytochrome P4501A in cultured rat and human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 124 : 173-189, 2000.
- 46) Kuroki J, Koga N and Yoshimura H : High affinity of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran to cytochrome P-450 in the hepatic microsomes of rats. *Chemosphere.* 15 : 731-738, 1986.
- 47) Staskal DF, Diliberto JJ, Devito MJ and Birn-

- baum LS : Inhibition of Human and Rat CYP1A2 by TCDD and Dioxin-like Chemicals. *Toxicol. Sci.* 84 : 225-231, 2005.
- 48) Yeowell HN, Waxman DJ, Wadhera A and Goldstein JA : Suppression of the constitutive, male-specific rat hepatic cytochrome P-450 2c and its mRNA by 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl and 3-methylcholanthrene. *Mol. Pharmacol.* 32 : 340-347, 1987.
 - 49) Bhathena A, Lee C and Riddick DS : Suppression of Cytochrome P450 2C11 by Aromatic Hydrocarbons : Mechanistic Insights from Studies of the 5-Flanking Region of the CYP2C11 Gene. *Drug. Metab. Dispos.* 30 : 1385-1392, 2002.
 - 50) Oinonen T and Lindros KO : Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem. J.* 329 : 17-35, 1998.
 - 51) Banerjee S, Das RK and Shapiro BH : Feminization imprinted by developmental growth hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 479 : 27-38, 2019.
 - 52) Kato R and Yamazoe Y : Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex-and species-related differences in drug toxicity. *Toxicol. Lett.* 64-65 : 661-667, 1992.
 - 53) Crofts FG, Sutter TR and Strickland PT : Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. *Carcinogenesis.* 19 : 1969-1973, 1998.
 - 54) Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM and Spandidos DA : Cytochrome P450 CYP1A1 : wider roles in cancer progression and prevention. *BMC. Cancer.* 9 : 187, 2009.
 - 55) El-Sherbeni AA and El-Kadi AO : Characterization of Arachidonic Acid Metabolism by Rat Cytochrome P450 Enzymes : The Involvement of CYP1As. *Drug. Metab. Dispos.* 42 : 1498-1507, 2014.
 - 56) Manega CM, Fiorelli S, Porro B, Turnu L, Cavalca V, Bonomi A, Cosentino N, Di Minno A, Marenzi G, Tremoli E and Eligini S : 12(S)-Hydroxyeicosatetraenoic acid downregulates monocyte-derived macrophage efferocytosis : New insights in atherosclerosis. *Pharmacol. Res.* 144 : 336-342, 2019.
 - 57) Zhang XJ, Cheng X, Yan ZZ, Fang J, Wang X, Wang W, Liu ZY, Shen LJ, Zhang P, Wang PX, Liao R, Ji YX, Wang JY, Tian S, Zhu XY, Zhang Y, Tian RF, Wang L, Ma XL, Huang Z, She ZG and Li H : An ALOX12-12-HETE-GPR31 signaling axis is a key mediator of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Nat. Med.* 24 : 73-83, 2018.
 - 58) Liu Q, Tan W, Che J, Yuan D, Zhang L, Sun Y, Yue X, Xiao L and Jin Y : 12-HETE facilitates cell survival by activating the integrin-linked kinase/NF- κ B pathway in ovarian cancer. *Cancer. Manag. Res.* 10 : 5825-5838, 2018.
 - 59) Honn KV, Tang DG, Gao X, Butovich IA, Liu B, Timar J and Hagmann W : 12-lipoxygenases and 12(S)-HETE : role in cancer metastasis. *Cancer. Metastasis. Rev.* 13 : 365-396, 1994.
 - 60) Diani-Moore S, Ma Y, Gross SS and Rifkind AB : Increases in levels of epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids (EETs and DHETs) in liver and heart *in vivo* by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and in hepatic EET : DHET ratios by cotreatment with TCDD and the soluble epoxide hydrolase inhibitor AUDA. *Drug. Metab. Dispos.* 42 : 294-300, 2014.
 - 61) Wiest EF, Walsh-Wilcox MT, Rothe M, Schunck WH and Walker MK : Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Prevent Vascular Dysfunction and Attenuate Cytochrome P4501A1 Expression by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin. *Toxicol. Sci.* 154 : 43-54, 2016.
 - 62) Labitzke EM, Diani-Moore S and Rifkind AB : Mitochondrial P450-dependent arachidonic acid metabolism by TCDD-induced hepatic CYP1A5; conversion of EETs to DHETs by mitochondrial soluble epoxide hydrolase. *Arch. Biochem. Biophys.* 468 : 70-81, 2007.

(Received for publication March 9, 2021)