

氏 名	あ だ ち じゅん 足 立 淳
学 位 の 種 類	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2373 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 環 境 工 学 専 攻
学位論文題目	AhR 内因性リガンド候補 Indirubin に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 松 井 三 郎 教 授 森 澤 眞 輔 教 授 内 山 巖 雄

論 文 内 容 の 要 旨

ダイオキシン (TCDD) は多様な生体影響や毒性を及ぼすことが知られており、そのメカニズムの開始点となる AhR はダイオキシンの毒性を解き明かす鍵であるため注目されてきた。本論文は、未だに同定されていない AhR の内因性リガンドを、尿から単離・同定すること、内因性リガンドと TCDD の体内残留性、遺伝子発現レベルの相違を明らかにすることで、両者の毒性差の原因を明らかにするとともに、AhR の生理機能を解明することを目標に掲げて、研究を遂行した結果をまとめたものであって、7 章からなっている。

第 1 章は序論であり、研究背景、研究目的、論文構成について述べている。

第 2 章において、TCDD の多様な生体影響・毒性、またこれらの特性が AhR 自身に関する分子構造・転写機構・生体内での機能・リガンドについて記述している。

第 3 章では、ヒト尿中に存在する AhR リガンドを、液体クロマトグラフィーと酵母レポータージーンアッセイを組み合わせたシステムを用いて、単離・同定することを試みた結果、AhR リガンド indirubin, indigo の同定に成功している。定量の結果、indirubin は尿中に 0.2nM、牛血清中に 0.07nM と、AhR シグナル経路を活性化するために十分な indirubin が生物サンプル中に含まれていることを示している。これらの結果は、indirubin が生体内で AhR と結合し、なんらかの作用を及ぼしていることを示唆している。

第 4 章では、indirubin の CYP1A1, 1A2 誘導能をヒト肝臓癌細胞株を用いて調査し、その誘導特性を TCDD と比較している。その結果 indirubin は 1 pM から CYP1A1, 1A2 を有意に誘導したが、TCDD は 100pM 以上でのみ誘導した。このように、ヒト細胞においても indirubin は強い AhR リガンド活性を持つことを明らかにしている。次いで、ヒト組み換え型 CYP1A1 を用いて、indirubin と TCDD の EROD 活性阻害効果を測定し、CYP1A1 との結合、また代謝のされやすさを比較した結果、indirubin は CYP1A1 によって容易に代謝されて AhR リガンド活性を失うこと、TCDD は CYP1A1 の基質結合部位には結合しないことを解明している。

第 5 章では、indirubin の生理的役割、また生体への作用点に関する TCDD との相違を調べるために、マイクロアレイを用いて indirubin と TCDD による発現遺伝子の相違を解析している。その結果、ヒト肝臓癌細胞株 HepG2 において遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子が indirubin と TCDD でそれぞれ 4 個、11 個見つかり、0.5 倍以下であった遺伝子はそれぞれ 21 個、17 個見つかった。それらの遺伝子は薬物代謝酵素サイトカインや細胞内シグナル伝達、ステロイドホルモンや性分化、細胞周期、細胞接着、転写、DNA の複製・修復、コレステロール、グルコースの輸送に関わる遺伝子であり、indirubin, TCDD が様々な機能をもつ遺伝子を動かすことがわかった。なお CYP1A1, CYP1A2, CYP19A1, IGFBP1, IGFBP10 について、real-time RT-PCR 法を用いて発現変動を確認している。また indirubin と TCDD による発現変動遺伝子群は極めて類似しており、発現遺伝子レベルで TCDD と AhR の毒性レベルを説明することはできなかった。

第 6 章では、indirubin の生理的役割に関して、細胞周期調節機能にターゲットを絞り、indirubin とサイトカインの一種

である TNF- α がヒト白血病細胞株の細胞増殖，細胞周期，細胞分化に与える影響について調査している。その結果 indirubin と TNF- α は ML-1 細胞の増殖抑制，p21 mRNA とそのタンパクの発現に関して相乗的に作用し，G1 期での細胞周期停止，分化を引き起こすことを明らかにしている。さらに阻害剤をもちいた実験により，p21 mRNA，タンパクの誘導に関して，転写因子 NF- κ B が関わっていることを証明している。これらの結果は indirubin が AhR を介して免疫細胞の増殖，分化に関わっている可能性を示唆するものである。

第 7 章は結論であり，本論文で得られた成果について要約し，今後の研究の展開について述べている。

論文審査の結果の要旨

本論文は，ダイオキシン（TCDD）の受容体である AhR（arylhydrocarbon receptor）の内因性リガンド候補 indirubin の発見と，indirubin とダイオキシンの生体作用を比較検討し，ダイオキシンの毒性メカニズムを分子生物学的に解明した成果をまとめたものであり，得られた主な結果は次のとおりである。

1. 尿中に存在する AhR リガンドは indirubin と indigo であると同定し，indirubin は TCDD の約 50 倍強い AhR 活性を持つことを明らかにした。尿中，牛血清中には AhR シグナル経路を活性化するために十分な indirubin，indigo が含まれていることを示し，これらのリガンドが，生体内で AhR と結合し，なんらかの作用を及ぼしていることを示唆している。
2. CYP1A1，CYP1A2 遺伝子誘導に関して indirubin，TCDD の LOEC（Lowest Observed Effect Concentration）はそれぞれ 1 pM，100 pM であり，ヒト細胞においても indirubin は強い AhR リガンド活性を持つことを示した。
3. TCDD の体内での残留性が問題となっているが，indirubin は CYP1A1 によって容易に代謝され，AhR リガンド活性を失うことを証明した。ヒト CYP1A1 と indirubin の結合解離定数が 2.9 nM であるが，TCDD は 775 nM でも CYP1A1 との結合による酵素活性の阻害が観察されず，indirubin ほど CYP1A1 に強く結合せず，代謝されにくいことが裏付けられた。この代謝されやすさの差異は，両者の毒性差の一因であると考えられる。
4. Indirubin と TCDD による発現変動遺伝子群は極めて類似しており，発現遺伝子レベルでは両者の毒性差を示唆するデータは得られなかった。
5. Indirubin と TNF- α は ML-1 細胞の増殖抑制，p21 mRNA とそのタンパクの発現に関して相乗的に作用し，細胞周期の G1 期での停止，分化を引き起こすことを発見し，p21 mRNA とそのタンパクの誘導に関して，転写因子 NF- κ B が関わっていることを示した。

以上，本論文は，尿中から極めて強い新規 AhR リガンド indirubin を発見し，TCDD と比較検討することで，両者の毒性差の一因を明らかにした。また indirubin の細胞周期調節に及ぼす影響を解明したものであり，学術上，實際上寄与するところが少なくない。よって本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また，平成 16 年 2 月 20 日，論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果，合格と認めた。