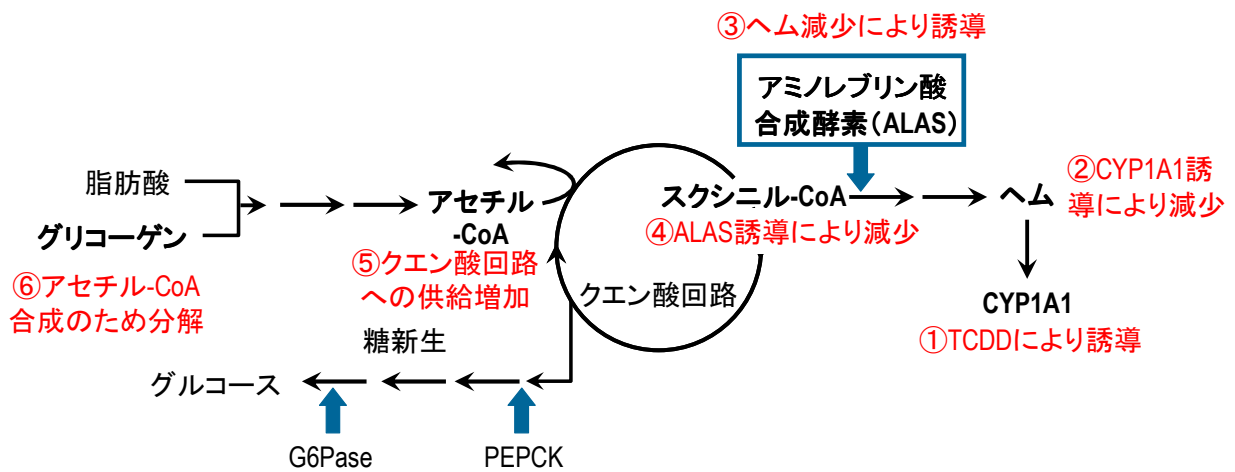




的とすることとした。

ダイオキシン (TCDD) による消耗性症候群に関する病態には、摂餌量や血中グルコース濃度の低下、肝臓中のグリコーゲン量が減少することなどが報告されている。また TCDD による消耗性症候群の発症には、第一相薬物代謝酵素の CYP1A1 が関与することが報告されている。CYP1A1 は TCDD により肝臓において顕著に誘導されることから、肝臓における CYP1A1 の誘導が TCDD によるエネルギー代謝異常に関与していると考えられるが、CYP1A1 誘導後の分子メカニズムは明らかにされていない。そこで、ヘムタンパク質である CYP1A1 の誘導以降の分子メカニズムとして、ヘム合成系の関与に着目した。

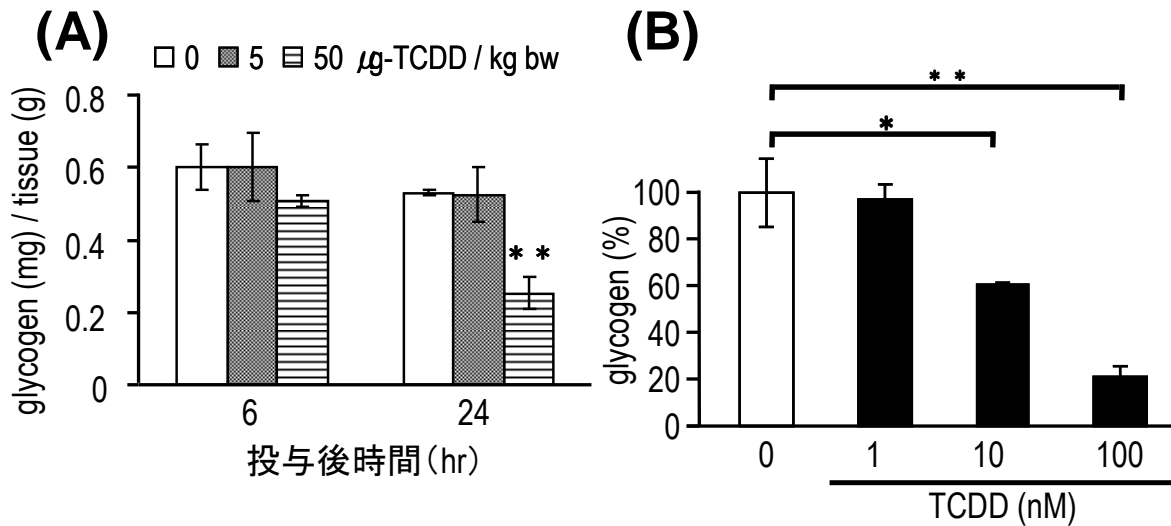
ヘムは補欠分子族の一つであり、様々な生体内反応を制御しており生命維持にとって必要不可欠である。ヘム合成系の異常により発症するポルフィリン症の患者を対象とした臨床検査の結果では高インスリン血症やインスリン抵抗性、糖尿病発症頻度が高いことが報告されており、ヘム合成系がエネルギー代謝を制御している可能性が考えられる。ヘム合成過程における律速酵素であるアミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) の発現制御には、ヘム分子によるネガティブフィードバック抑制機構が想定されており、本研究では TCDD 曝露時の肝臓では CYP1A1 の誘導によりヘムが消費され、ALAS1 が誘導されていると考えた。ALAS1 はクエン酸回路の中間体であるスクシニル-CoA を基質としてアミノレブリン酸を合成するため、TCDD 曝露時の肝臓では CYP1A1 の誘導を介して ALAS1 が誘導され、クエン酸回路を介した作用によりグリコーゲンが分解されるという仮説を立てた (Figure 1)。そこで本研究では、TCDD 曝露により起きる肝細胞内のグリコーゲン量の減少と CYP1A1、ALAS1 の関与を明らかにすることを目的とし、マウスに対する TCDD 投与実験及びヒト肝臓ガン細胞株 HepG2 を用いた siRNA によるノックダウン及び強制発現により、TCDD によるグリコーゲン量の減少における CYP1A1、ALAS1 の関与を検証した。



### Figure 1. TCDD によるグリコーゲン減少仮説

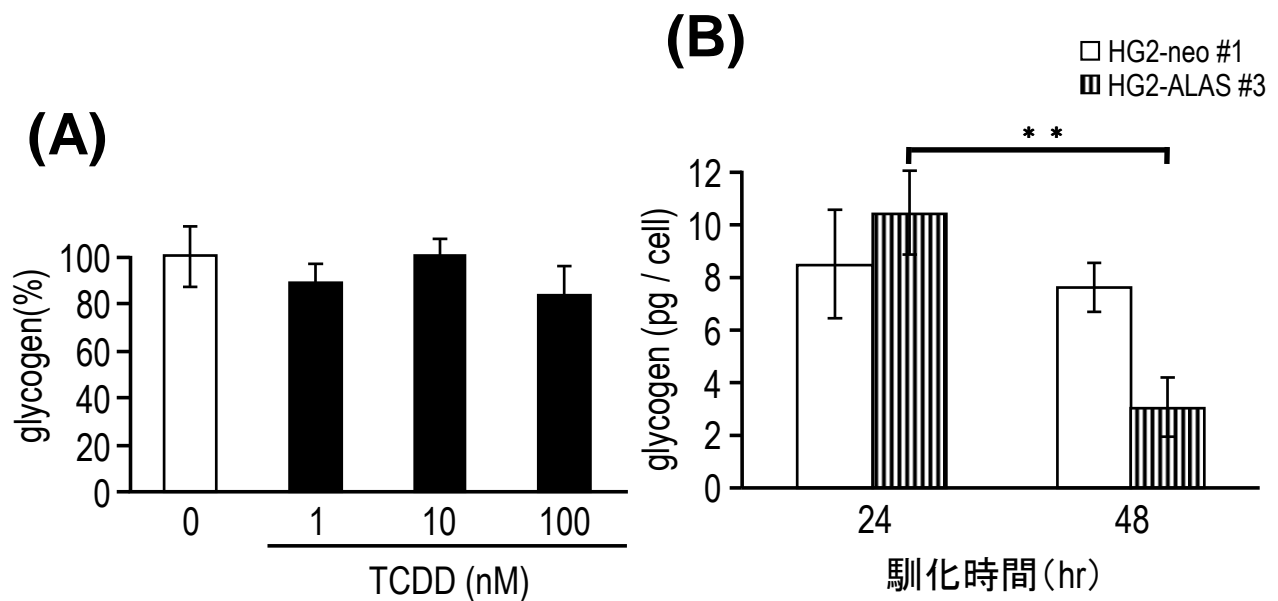
ダイオキシン曝露により細胞内では①～⑥の順に変化が起き、結果としてグリコーゲンが減少するという仮説を立てた。

BALBc/AJcl (11 週齢の雄) マウスに TCDD を 50  $\mu\text{g} / \text{kg-b.w.}$  の用量で経口単回投与したところ、肝臓中において、グリコーゲン量は、投与 24 時間後において対照群に比べて有意に減少していた (Figure 2A)。また、ALAS1 mRNA の発現量は、投与 24 時間後に、対照群に比べて有意に誘導されていた。これらの結果から、ALAS1 の誘導及び肝臓中グリコーゲン量の減少が、共に 24 時間で観察され、両者の関連が示唆された。続いて、グリコーゲン量の減少が TCDD による肝細胞への直接的な作用なのか、それとも個体全体への間接的な作用なのかを確認するため、ヒト肝臓ガン細胞株 HepG2 を用いた *in vitro* 試験を行った。HepG2 細胞をグルコース・牛胎仔血清不含培地で 24 時間馴化させ、その後 1、10、100 nM の TCDD を 24 時間曝露したところ、細胞内のグリコーゲン量が TCDD 用量依存的に減少していた (Figure 2B)。この結果より、TCDD は肝細胞に直接作用し、細胞内のグリコーゲン量を減少させると考えられた。



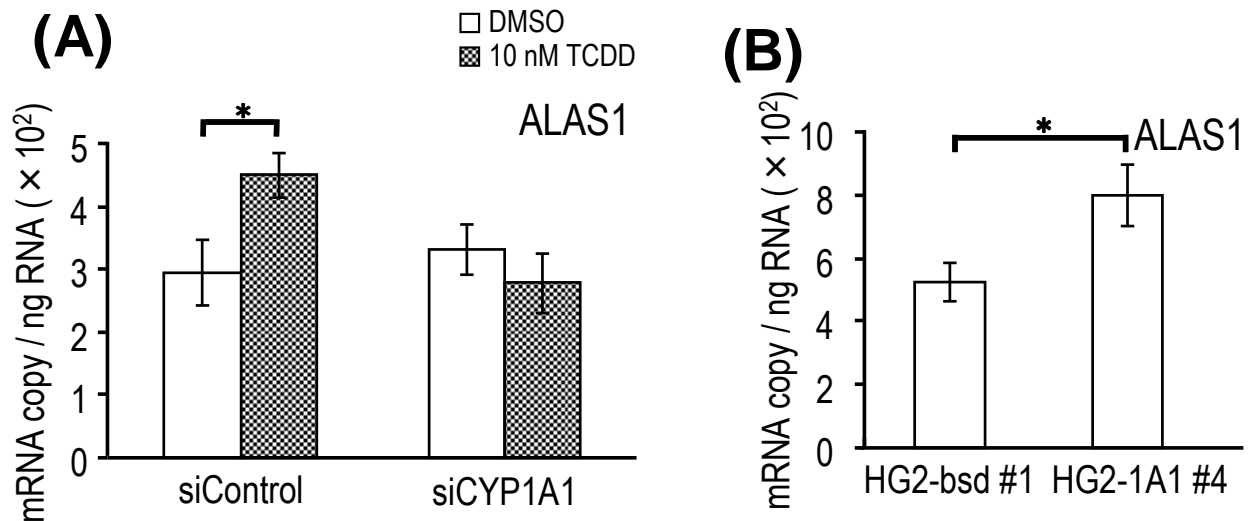
**Figure 2.** (A) TCDD による BALBc/AJcl マウスにおける肝臓中グリコーゲン量の減少 (B) TCDD による HepG2 細胞における細胞内グリコーゲン量の減少

次に TCDD によるグリコーゲン減少に対する ALAS1 の関与を検討するため、HepG2 に対し ALAS1 特異的な siRNA を一過性導入し、10 nM の濃度で TCDD を 24 時間曝露した細胞内のグリコーゲン量を測定したところ、TCDD による細胞内のグリコーゲン量は減少しなかった (Figure 3A)。さらに、ALAS1 強制発現ベクターを HepG2 細胞に安定導入し株化した細胞 (HG2-ALAS #3) をグルコース・血清不含培地で 24 時間馴化させ、さらに 24 時間培養したときの細胞内グリコーゲン量を測定したところ、24 時間培養の間に細胞内グリコーゲン量が有意に減少していたが (Figure 3B)、コントロールベクターを導入した細胞 (HG2-neo #1) ではグリコーゲン量に変化はなかった。これらの結果より、ALAS1 発現量が増加することで細胞内のグリコーゲン量が減少することが示唆された。



**Figure 3. (A)** ALAS1 ノックダウン細胞における TCDD による細胞内グリコーゲン量変化 **(B)** ALAS1 強制発現細胞における細胞内グリコーゲン量変化

次に細胞内グリコーゲン量の減少ならびに ALAS1 の誘導が CYP1A1 依存的であるかを検討した。HepG2 に対し CYP1A1 特異的 siRNA を一過性導入し、10 nM TCDD 曝露 24 時間後における細胞内のグリコーゲン量を測定したところ、TCDD による細胞内グリコーゲン量の減少は認められなかった。またこの時 ALAS1 mRNA の発現量を測定したところ、コントロール siRNA 導入細胞では 10 nM TCDD 24 時間曝露により ALAS1 mRNA の有意な誘導が確認されたが、siCYP1A1 導入細胞では TCDD による誘導は認められなかった (Figure 4A)。また CYP1A1 強制発現ベクターを HepG2 細胞に安定導入し株化した細胞 (HG2-CYP1A1 #4) をグルコース・血清不含培地に交換し 24 時間馴化させ、さらに 24 時間培養したときの細胞内グリコーゲン量を測定したところ、24 時間培養の間に細胞内グリコーゲン量が有意に減少していたが、コントロールベクターを導入した細胞 (HG2-bsd #1) ではグリコーゲン量の減少に変化はなかった。この時 HG2-bsd #1 及び HG2-CYP1A1 細胞の定常状態における ALAS1 mRNA の発現量を測定したところ、HG2-bsd に比べ HG2-CYP1A1 #4 では有意に高くなっていることが認められた (Figure 4B)。これらの結果より、TCDD による ALAS1 の誘導は、CYP1A1 の誘導を介していると考えられた。



**Figure 4.** (A) CYP1A1 ノックダウン細胞における TCDD による ALAS1 mRNA の誘導 (B) CYP1A1 強制発現細胞における ALAS1 mRNA 発現量

TCDD 曝露による ALAS1 の誘導が、どのような分子を活性化して細胞内グリコーゲン量の減少を引き起こすかを検討するため、siALAS 及び siControl 細胞におけるグリコーゲン合成酵素 Glycogen Synthase (GS) のタンパク質量及びリン酸化状態をウエスタンブロッティングにより測定した (Figure 5)。HepG2 に対してを siControl もしくは siALAS を導入し、10 nM TCDD を 24 時間曝露したところ、siControl 導入細胞では TCDD による不活性型 GS (p-GS) の増加が認められ、その作用はインスリンにより消失したが、siALAS 導入細胞では TCDD による p-GS の増加は認められなかった。また GS 全体量は siControl、siALAS 導入細胞いずれにおいても TCDD 及びインスリンによる変化は無かった。この結果から、TCDD 曝露細胞では ALAS1 依存的に活性型 GS が減少し、グリコーゲンの合成量が減少したと考えられた。

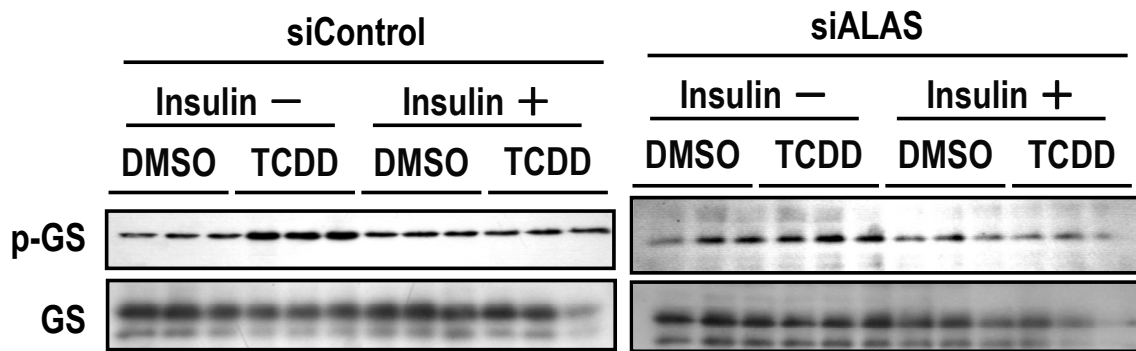


Figure 5. siControl 及び siALAS 細胞における TCDD による GS リン酸化への影響

本研究の結果、ダイオキシンは CYP1A1 を介して ALAS1 を誘導することにより GS を不活性化させ、肝細胞内のグリコーゲン量を減少させると考えられた (Figure 6)。本研究で明らかとなった CYP1A1 の誘導による ALAS1 の誘導は、今後 TCDD 毒性の分子メカニズムの解明に繋がることが期待できる。さらに ALAS1 の発現量がグリコーゲン代謝や糖新生などのエネルギー代謝の調節に関与することを示す知見も得た。今後、本研究によって得られたヘム合成系とエネルギー代謝が関連するという結果は、ダイオキシン毒性のみならずメタボリックシンドロームの基礎的研究にも寄与することが期待される。



Figure 6. 本研究の結論