

平成21年 5月 25日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590553  
 研究課題名（和文）喫煙の血管新生に対する影響 ―アレルハイドロカーボン受容体の役割の解明―  
 研究課題名（英文） A role for the aryl hydrocarbon receptor in regulation of ischemia-induced angiogenesis

研究代表者 市原 佐保子（ICHIHARA SAHOKO）  
 三重大学・生命科学研究支援センター・助教  
 研究者番号：20378326

研究成果の概要：タバコの粒子相成分の1つであるベンツピレン等が結合するアレルハイドロカーボン受容体（Ah 受容体）に着目し、喫煙に起因する疾患発症や進展過程における分子メカニズムの解明を行った。Ah 受容体が欠損すると、Ah 受容体と2量体を形成するARNTが低酸素反応性因子であるHIF1Aとの2量体形成に移行し、血管内皮細胞増殖因子の転写活性を高めることにより、血管新生を促進することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	540,000	4,140,000

研究分野：環境医学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：アレルハイドロカーボン受容体・喫煙・血管新生・酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

日本は既に高齢化社会に移行しており、医学・医療における課題は、健康寿命の延長即ち「健康な高齢者を増やす」ことである。高齢者のADL (activities of daily living) を損なう最大の原因は循環器系疾患であるため、動脈硬化の予防・治療がきわめて重要である。動脈硬化には「病変形成」と「修復」に対する要因があり、組織修復には血管新生の役割が重要である。また、近年、ダイオキシン類や内分泌攪乱化学物質の環境汚染問題やタバコの成分による健康への影響に社会的関心が高まり、毒性リスク評価や環境基準値の設定が求められている。ダイオキシン

類はアレルハイドロカーボン受容体(Ah 受容体)と結合し、代謝されるが、Ah 受容体にはダイオキシン類だけではなく、タバコの粒子相成分であるベンツピレンや3-メチルコラントレン等も結合するため、環境化学物質だけではなく、喫煙などの生活習慣を視野に入れた Ah 受容体を介する混合暴露として毒性を総合的に評価しなければならない。

## 2. 研究の目的

Ah 受容体は種々の環境汚染物質の毒性に関与し、発癌との関連が報告されているが、血管新生における Ah 受容体の役割は明らかではない。本研究は、低酸素ストレスやベン

ツピレン投与における Ah 受容体の発現調節機構を明らかにすることにより、喫煙が原因と考えられる心血管系疾患の発症進展過程のメカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子欠損マウスを用いた血管新生の機序の解明

12 週齢の Ah 受容体欠損マウス 8 匹と野生型 C57BL/6N マウス 8 匹に対し、下肢虚血モデルを作成する。Ah 受容体欠損マウスと野生型マウスで血管新生の程度を比較する。さらに、血管新生の定量的評価を行うために、マウス CD31 抗体を用いた組織免疫染色により微小血管を染色し、定量的に解析する。血管新生に関連する遺伝子およびタンパク質の発現を検討する。また、Ah 受容体と核内で 2 量体を形成する Arnt ならびに HIF-1 $\alpha$  の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法で検討する。Arnt と HIF-1 $\alpha$  の複合体は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の遺伝子発現を促進するため、クロマチン免疫沈降法により VEGF のプロモーター領域に結合しているこの複合体を Ah 受容体欠損マウスと野生型マウスで定量的に解析し比較する。

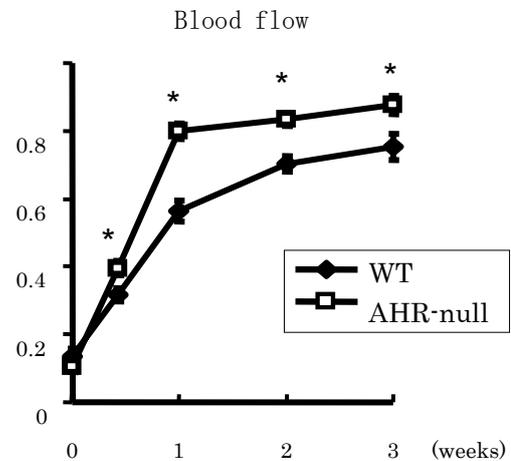
#### (2) Ah 受容体を介するタバコ成分の血管新生に対する影響の解明

ベンツピレンの下肢虚血に及ぼす影響を調べるため、野生型マウスに対し、0.1, 1, 2.5, 5 mg/kg の濃度のベンツピレンを下肢虚血モデル作成直前より胃ゾンデで毎週投与し、ベンツピレンを投与しないマウスと血管新生の程度を比較する。この実験で他の臓器障害が認められず、最も下肢血管新生への影響が顕著な濃度のベンツピレンを Ah 受容体欠損マウスと野生型マウス各 8 匹に投与し、下肢虚血モデルを作成する。血流や微小血管を定量的に評価し、Ah 受容体欠損マウスと野生型マウスでベンツピレン投与による血管新生への影響を比較し、そのメカニズムを検討する。

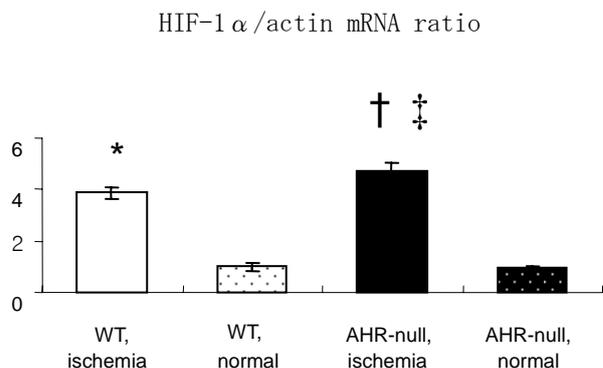
### 4. 研究成果

12 週齢の Ah 受容体遺伝子欠損マウス (AHR-/-) マウス (n = 8) と野生型マウス (WT マウス) (n = 8) に対し、大腿動脈結紮を施行し下肢虚血モデルを作成した。手術前と手術後 4 週の間、WT マウスと AHR-/-マウスとで、体重および収縮期血圧の差は認められなかった。手術後 1 週間後より、AHR-/-マウスにて血流の著しい改善がレーザー Doppler 法にて確認され、4 週間後まで有意な差が

認められた。CD31 抗体を用いた組織免疫染色により測定した微小血管の密度も、WT マウスと比較して、AHR-/-マウスで有意な上昇が認められた。血管新生が WT マウスより AHR-/-マウスで亢進していることを示していた。



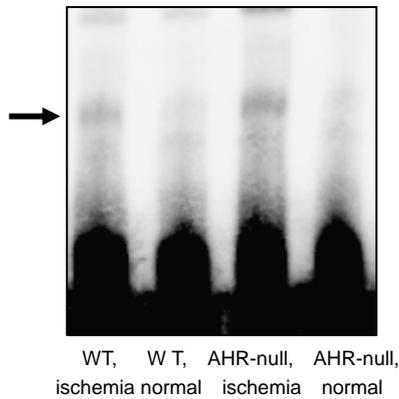
血管新生に関与する因子である VEGF や PDGF-B の遺伝子発現やタンパク発現を下肢虚血後 3 日目の大腿筋で検討したところ、WT マウスと比較して、AHR-/-マウスの虚血後大腿筋で有意な増加が認められた。また、VEGF の受容体である Flt-1 や Flk-1 の遺伝子発現も WT マウスと比較し、AHR-/-マウスで有意に亢進していた。Ah 受容体と核内で 2 量体を形成する Arnt ならびに HIF-1 $\alpha$  の発現は AHR-/-マウスにおいて、虚血後に有意に増加していた。



HIF1A-ARNT 複合体の DNA 結合活性は、WT マウスに比べ、AHR-/-マウスにて有意に増加していた。さらに、Arnt と HIF-1 $\alpha$  の複合体は VEGF の遺伝子発現を促進するため、クロマチン免疫沈降法により VEGF のプロモーター領域に結合しているこの複合体を Ah 受容体欠損マウスと野生型マウスで比較検討したところ、クロマチン免疫沈降法でも、AHR-/-マウスにおける VEGF のプロモーター

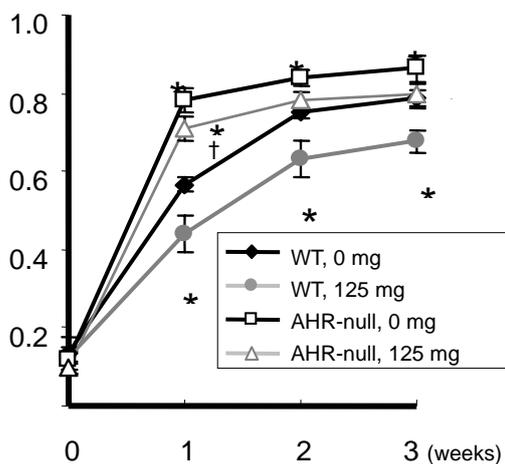
領域への ARNT の結合活性の増加が確認された。

DNA binding activity of HIF1A-ARNT



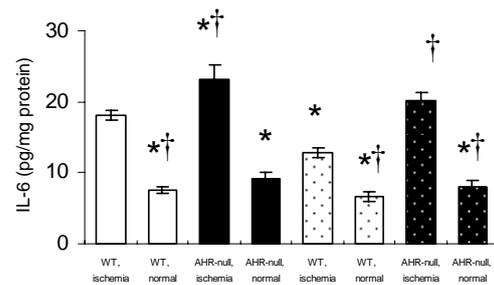
AHR<sup>-/-</sup>マウスを用いて、タバコの粒子相成分の1つであるベンツピレンによる血管新生に対する影響と Ah 受容体を介する喫煙の血管新生に及ぼす影響を検討した。まず、12週齢の WT マウスに対し、5, 25, 125 mg/kg のベンツピレンを胃ゾンデで投与後、下肢虚血モデルを作成し、4週間観察したところ、125 mg/kg 投与にて有意に血管新生が減弱した。この濃度のベンツピレンを12週齢の WT マウスと AHR<sup>-/-</sup>マウスに投与し、血管新生の程度を比較したところ、AHR<sup>-/-</sup>マウスにおいて、血管新生の減弱が有意に軽減していた。

Blood flow



野生型マウスへベンツピレンを125 mg/kg 投与すると、虚血下肢においてメタロチオネインの発現が更新し、有意に血管新生が減弱した。また、サイトカインの一種である interleukin-6 (IL-6) や VEGF の発現も有意に減少したが、AHR<sup>-/-</sup>マウスでは、これらの効果が有意に軽減していた。

IL-6 activity



本研究において、AHR<sup>-/-</sup>マウスでは、ベンツピレン投与後のサイトカインや成長ホルモンの発現の減少が抑制されているため、血管新生が維持されたと考えられた。これまでベンツピレンの毒性機序は P450 1A1 によって代謝された後の DNA 付加物形成によるものと理解されてきたが、ベンツピレン暴露に起因する HIF-1 $\alpha$  を介した VEGF 転写活性の抑制という別の機序を明らかにしたことに、本研究の意義がある。Ah 受容体を介するタバコの成分の直接的な血管新生への影響を解明したことにより、喫煙を原因とする生活習慣病の病態解明や発症予防に貢献できると考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

- ① Ichihara S, Yamada Y, Gonzalez FJ, Nakajima T, Murohara T, Ichihara G. Inhibition of ischemia-induced angiogenesis by benzo[a]pyrene in a manner dependent on the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 381(1):44-49. 2009 査読有
- ② Ichihara S, Yamada Y, Kato K, Hibino T, Yokoi K, Matsuo H, Kojima T, Watanabe S, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Aoyagi Y, Yasunaga A, Park H, Tanaka M, Nozawa Y. Association of polymorphism of ABCA1 with obesity in Japanese individuals. *Genomics* 91(6):512-516 2008 査読有
- ③ Banu S, Ichihara S, Huang F, Ito H, Inaguma Y, Furuhashi K, Fukunaga Y, Wang Q, Kitoh J, Ando H, Kikkawa F, Ichihara G. Reversibility of the Adverse Effects of 1-Bromopropane Exposure in Rats. *Toxicol Sci* 100(2):504-512 2007 査読有

- ④ Matsushita A, Iwase M, Kato Y, Ichihara S, Ichihara G, Kimata H, Hayashi K, Hashimoto K, Yokoi T, Noda A, Koike Y, Yokota M, Nagata K. Differential cardiovascular effects of endotoxin derived from *Escherichia coli* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp Anim* 56(5):339-348 2007 査読有
- ⑤ Ichihara S, Yamada Y, Kawai Y, Osawa T, Furuhashi K, Duan Z, Ichihara G. Roles of oxidative stress and Akt signaling in doxorubicin cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 359(1):27-33 2007 査読有
- ⑥ Ichihara S, Yamada Y, Ichihara G, Nakajima T, Kondo T, Gonzalez FJ, Murohara T. A role for the aryl hydrocarbon receptor in regulation of ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(6):1297-1304 2007 査読有
- ⑦ Ichihara S, Yamada Y, Ichihara G, Kanazawa H, Hashimoto K, Kato Y, Matsushita A, Oikawa S, Yokota M, Iwase M. Attenuation of oxidative stress and cardiac dysfunction by bisoprolol in an animal model of dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 350(1):105-113 2006 査読有
- ⑧ Saka M, Obata K, Ichihara S, Cheng XW, Kimata H, Noda A, Izawa H, Nagata K, Yokota M. Attenuation of ventricular hypertrophy and fibrosis in rats by pitavastatin: potential role of RhoA-extracellular signal-regulated kinase- serum response factor signaling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(12):1164-1171 2006 査読有
- ⑨ Ichihara S, Obata K, Yamada Y, Nagata K, Noda A, Ichihara G, Yamada A, Kato T, Izawa H, Murohara T, Yokota M. Attenuation of cardiac dysfunction by a PPAR-alpha agonist is associated with down-regulation of redox-regulated transcription factors. *J Mol Cell Cardiol* 41(2):318-329 2006 査読有
- ⑩ Saka M, Obata K, Ichihara S, Cheng XW, Kimata H, Nishizawa T, Noda A, Izawa H, Nagata K, Murohara T, Yokota M. Pitavastatin improves cardiac function and survival in association with suppression of the myocardial endothelin system in a rat model of hypertensive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 47(6):770-779 2006 査読有
- ⑪ Furuhashi K, Kitoh J, Tsukamura H, Maeda KI, Wang H, Li W, Ichihara S, Nakajima T, Ichihara G. Effects of exposure of rat dams to 1-bromopropane during pregnancy and lactation on growth and sexual maturation of their offspring. *Toxicology* 224:(3)219-228 2006 査読有
- ⑫ Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara S, Noda A, Kimata H, Kato T, Izawa H, Murohara T, Yokota M. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension* 47(4):656-664 2006 査読有
- [学会発表] (計 52 件)
- ① Sahoko Ichihara, Yoshiji Yamada, Gaku Ichihara, Tamie Nakajima, Frank J Gonzalez, Toyoaki Murohara. Inhibition of ischemia-induced angiogenesis by benzo[a]pyrene in a manner dependent on the aryl hydrocarbon receptor. The 48th Annual Meeting of the Society of Toxicology, March 16 2009 Baltimore, USA
- ② Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara, Fang Liu, Toyoaki Murohara, Yoshiji Yamada. Ablation of Nrf2 resulted in enhancement of ischemia-induced angiogenesis. The 81th Scientific Sessions of American Heart Association, November 11 2008 New Orleans, USA
- ③ Sahoko Ichihara. Research strategy for cardiovascular effects of manufactured nanomaterials. China-Japan Collaboration Workshop, July 31 2008 Shanghai, China
- ④ Sahoko Ichihara. Cardiovascular effects of 1-bromopropane. China-Japan Collaboration Workshop, July 30 2008 Shanghai, China
- ⑤ S. Sheik Mohideen, Sahoko Ichihara, F. Liu, Koichi. Furuhashi, Weihua Li, Gaku Ichihara. Effect of 1-bromopropane exposure on gene expression of neurotransmitter receptors in rat. The 47th Annual Meeting of Society of Toxicology, March 18 2008 Seattle, USA
- ⑥ Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara, Toyoaki Murohara, Yoshiji Yamada.

- Protective effect of metallothionein in ischemic hindlimb against oxidative stress induced by benzo[a]pyrene. The 80th Scientific Sessions of American Heart Association, November 7 2007 Orlando, USA
- ⑦ Fen Huang, Sahoko Ichihara, Emiko Kitagawa, Satomi Mizukami, Hitoshi Iwahashi, Junzoh Kitoh, Koichi Furuhashi, Shameema Banu, Mari Iida, Gaku Ichihara. DNA microarray study with two dimensional analysis on susceptibility to 1-bromopropane exposure. International Congress of Toxicology, July 17 2007 Montreal, Canada
- ⑧ Shameema Banu, Sahoko Ichihara, Fen Huang, Hidenori Ito, Yutaka Inaguma, Koichi Furuhashi, Suminobu Fukunaga, Qiangyi Wang, Gaku Ichihara. Reversibility of the adverse effects of 1-bromopropane exposure in rats. The 46th Annual Meeting of Society of Toxicology, March 26 2007 Charlotte, USA
- ⑨ Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara, Yoshichika Kawai, Toshihiko Osawa, Yoshiji Yamada. Regulatory role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and redox-regulated transcription factor in doxorubicin cardiotoxicity. The 79th Scientific Sessions of American Heart Association, November 12 2006 Chicago, USA
- ⑩ Sahoko Ichihara, Yoshiji Yamada, Kimihiko Kato, Takeshi Hibino, Kiyoshi Yokoi, Hitoshi Matsuo, Tomonori Segawa, Sachiro Watanabe, Hidemi Yoshida, Kei Satoh, Yoshinori Nozawa. Prediction of genetic risk for metabolic syndrome. The 79th Scientific Sessions of American Heart Association, November 14 2006 Chicago, USA
- ⑪ Kazuya Kitamori, Masashi Kobayashi, Gaku Ichihara, Sahoko Ichihara, Satoshi Tsuchikura, Junko Hiraoka-Yamamoto, Naoto Yasui, Naoko Yasuo, Kohzo Ikeda, Yukio Yamori, Tamie Nakajima. Development of renal injury and lipid metabolic disorder in obese and hypertensive SHR/NDmcr-cp(cp/cp). The 12th International Symposium on SHR, October 20 2006 Kyoto, Japan
- ⑫ Gaku Ichihara, Weihua Li, Eiji Shibata, Xuncheng Ding, Jiefei Li, Hailan Wang,

Fen Huang, Simeng Peng, Biao Gu, Sahoko Ichihara, Maiko Miyata, Yasuhiro Takeuchi. Adverse effects of exposure to 1-bromopropane on central nervous system and perioheral nerve in human. The 28th International Congress on Occupational Health, June 13 2006 Milan, Italy

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
市原 佐保子 (ICHIHARA SAHOKO)  
三重大学・  
生命科学研究支援センター・助教  
研究者番号：20378326
- (2) 研究分担者  
山田 芳司 (YAMADA YOSHIJI)  
三重大学・  
生命科学研究支援センター・教授  
研究者番号：90333286
- (3) 連携研究者  
室原 豊明 (MUROHARA TOYOAKI)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：90299503
- 市原 学 (ICHIHARA GAKU)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：90252238