

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07202

研究課題名(和文) PXRとCARによる肝成熟・肝機能調節に着目した薬物の次世代・遅発性影響の解析

研究課題名(英文) Investigation of the next-generation and late-onset effects of drugs focusing on liver maturation and liver function regulated by the nuclear receptors PXR and CAR

研究代表者

吉成 浩一 (Yoshinari, Kouichi)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：60343399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核内受容体CARの活性化が乳幼児期マウスの発達に及ぼす影響を解析した。生後15日齢及び8週齢の雄性マウスにCAR活性化薬を腹腔内投与したところ、乳幼児期特異的に内分泌代謝関連遺伝子の発現が変動し、甲状腺ホルモン代謝酵素の発現亢進と甲状腺ホルモンシグナル標的遺伝子の発現低下が認められた。次に、生後15日齢の野生型及びCAR欠損型雄性マウスにCAR活性化薬を投与したところ、処置に伴う体重増加率及び握力の低下、ならびに血漿TSHレベルの増加が野生型マウスでのみ認められた。以上より、乳幼児期におけるCAR活性化は、甲状腺ホルモンシグナルの抑制に伴う成長遅延を引き起こす可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、胎児期や乳幼児期における化学物質のばく露が発達や成長に及ぼす影響が社会的な問題となっている。肝に高発現する核内受容体CARは、多種多様な化学物質により活性化されて種々の代謝酵素の発現を誘導し、ホルモン代謝やエネルギー代謝にも影響を与える。そこで本研究では、CAR活性化が乳幼児期マウスの発達に及ぼす影響の解明を目指した。その結果、乳幼児期における化学物質曝露によるCARの活性化は、甲状腺ホルモンの代謝を亢進し、甲状腺ホルモンシグナルの抑制に伴う成長遅延を引き起こす可能性が示された。これらの結果は、化学物質の発生・発達毒性の分子機序を理解する上で有用な知見を提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of the nuclear receptor CAR activation on the development of infant mice. Intraperitoneal administration of a CAR activator to 15-day-old and 8-week-old male mice induced changes in the expression of endocrine metabolism-related genes in an infant-specific manner, including upregulation of thyroid hormone-metabolizing enzymes and down-regulation of target genes of thyroid hormone signaling. Next, a CAR activator was administered to 15-day-old wild-type and CAR-null male mice. We observed treatment-associated decreases in body weight gain and grip strength and increases in plasma TSH levels only in wild-type mice. These results suggest that CAR activation during infancy causes growth retardation associated with the suppression of thyroid hormone signaling.

研究分野：毒性学

キーワード：核内受容体 化学物質 肝臓 甲状腺ホルモン 薬物代謝酵素 成長障害 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、「胎児期や乳幼児期における健康・栄養状態が成長後の様々な疾病の発症リスクに影響を及ぼす」という Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 仮説の概念が広く受け入れられている。乳幼児は成体に比べて化学物質への感受性が高く、乳幼児期にある種の化学物質に曝露されると、その後の生体システムに有害な影響が生じる可能性がある。サリドマイド薬害やカネミ油症事件、水俣病などの歴史的背景もあり、化学物質が胎児や小児の発達に及ぼす影響に対する社会的関心は高く、近年日本では大規模疫学調査(エコチル調査等)が実施され、胎児期、乳幼児期の化学物質曝露と健康、発達・成長、疾患発症との関連について調査が進んでいる。

核内受容体 CAR は肝臓に高発現し、医薬品や食品、環境化学物質などにより活性化され、標的遺伝子の転写を促進する。この標的遺伝子には、シトクロム P450 をはじめとする薬物代謝酵素や、薬物排泄トランスポーター等が含まれ、CAR は生体外異物の代謝・排泄を介して生体防御において中心的な役割を果たしている。他方、CAR の活性化はホルモンや成長因子等の内因性物質の代謝も亢進することが示されており、マウスへの CAR 活性化薬であるフェノバルビタールや 1,4-bis(3,5-dichloro-2-pyridinyloxy)benzene (TCPOBOP) の投与は、血中の種々のホルモンレベルを変動させる。さらに、CAR は SREBP1 や HNF4 α 、FOXO1 などの転写因子との相互作用を介して、エネルギー代謝にも影響を及ぼすことが示されている。

2. 研究の目的

CAR は異物代謝、ホルモン代謝及びエネルギー代謝の制御を介して様々な生理機能を調節している。そのため、化学物質曝露による CAR の持続的な活性化は、これらの内因性物質レベルを変動させることで乳幼児期におけるホルモン依存的な発達を抑制し、成長障害や関連疾患を引き起こす可能性がある。そこで本研究では、乳幼児期における CAR 活性化がマウスの発達に及ぼす影響とその分子機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

乳幼児期における CAR 活性化の影響を明らかにするため、15 日齢(乳幼児)及び 8 週齢(成体)の雄性 C57BL/6N マウスに CAR 活性化薬 TCPOBOP を単回腹腔内投与し、48 時間後の肝遺伝子発現への影響をトランスクリプトーム解析により解析した。得られた結果について Metascape を用いて Gene Ontology (GO) 解析を行った。

15 日齢及び 8 週齢の雄性 C57BL/6N マウスに、TCPOBOP を腹腔内投与し、3 日後に肝と血液を採取した。肝 RNA を用いた定量的逆転写 PCR 法により、CAR 標的遺伝子の *Cyp2b10* 及び *Gadd45b*、並びに性ホルモンや甲状腺ホルモンシグナル関連遺伝子の mRNA レベルを測定した。ELISA 法により血漿中甲状腺刺激ホルモン (TSH) 及びサイロキシン (T4) レベルを測定した。

15 日齢の野生型雄性 C57BL/6N マウス及び CAR 欠損型マウスに TCPOBOP を 15 日間隔で 2 回腹腔内投与し、45 日齢に肝及び血漿を採取した。また、体重と握力を経時的に測定した。

4. 研究成果

15 日齢と 8 週齢の雄性マウスに TCPOBOP を投与し、48 時間後の肝重量と CAR 標的遺伝子の肝 mRNA レベルを測定したところ、乳幼児、成体マウスともに、肝重量を体重で除した肝相対重量が増加し、また肝肥大が確認された。また *Cyp2b10* 及び *Gadd45b* の mRNA レベルも TCPOBOP 投与により増加した。以上より、両週齢における TCPOBOP 投与による CAR の活性化が確認された。そこでこのサンプルを用いて遺伝子発現変動 (DEG) 解析を行い、TCPOBOP 投与に伴い発現が 2 倍以上に増加又は 1/2 以下に低下した遺伝子を探索したところ、成体マウスでは 1175 種、乳幼児マウスでは 1564 種の遺伝子が抽出された。これらの遺伝子セットを用いた GO 解析の結果、乳幼児、成体マウスに共通して「Xenobiotic metabolic process」が抽出され、CAR の代表的な生理機能である代謝酵素の誘導が成体マウスと同様に乳幼児マウスでも起こることが示唆された。一方、乳幼児マウスでのみ変動が見られた遺伝子セットとして「Regulation of small molecule metabolic process」が抽出され、脂質代謝やホルモン代謝に関する遺伝子の乳幼児期特異

的な発現変動が示唆された。一方で、成体マウスのみで変動が見られた遺伝子セットでは「Mitotic cell cycle」や「Cell cycle DNA replication initiation」など、細胞周期関連のタームが多かったことから、CAR 活性化による肝細胞増殖促進は成体マウス特異的に起こる可能性が示された。以上のように、乳幼児期特異的に CAR 活性化に伴い発現変動する遺伝子群として、低分子代謝プロセスの制御に関わる遺伝子セットが抽出されたことから、乳幼児期における CAR 活性化は、ホルモン代謝や脂質代謝において、成体マウスとは異なる影響を及ぼす可能性が示された。実際、甲状腺ホルモン及び性ホルモン代謝酵素遺伝子の肝 mRNA レベルを調べたところ、*Cyp3a11*、*Ugt1a1*、*Ugt1a6*、*Ugt1a9* 及び *Sult1e1* の mRNA レベルは、いずれも TCPOBOP 投与により増加していた。

次に、CAR 活性化に伴いエストロゲンやアンドロゲン等の性ホルモン代謝が亢進すると考え、アンドロゲン受容体の標的遺伝子 *Klkb1* とエストロゲン受容体(ER)の標的遺伝子 *Tff* の肝 mRNA レベルを測定したところ、前者は TCPOBOP 投与により低下したが、後者は予想に反して増加した。CAR 活性化はエストロゲン硫酸抱合酵素 SULT1E1 の誘導を引き起こすが、*Sult1e1* のプロモーター領域上で ER と相互作用することが報告されている。今回、TCPOBOP 投与により *Tff* の mRNA レベルが増加した理由は不明であるが、CAR が ER と何らかの相互作用を介して *Tff* の転写を亢進させた可能性がある。

さらに、甲状腺ホルモン受容体 (TR) の標的遺伝子である *Klf9* の肝 mRNA レベルを調べたところ、TCPOBOP 投与により顕著に低下していた。また、血漿中 T4 レベルは減少傾向、TSH レベルは有意な増加を示した。甲状腺ホルモンは、成長ホルモン (GH) の分泌を促進する GH 放出ホルモンや GH 受容体の遺伝子発現増加を介して、乳幼児期の成長に関与することが知られている。GH シグナル関連遺伝子である *Igf1* の肝 mRNA レベルも TCPOBOP 投与により低下していたことから、TCPOBOP 投与により甲状腺ホルモンシグナルが減弱し、それに伴い IGF-1 をはじめとする成長因子の発現が低下することが示唆された。

以上より、乳幼児マウスにおける CAR 活性化により、甲状腺ホルモン代謝が亢進し、IGF-1 をはじめとする成長因子の発現が低下する可能性が示された。通常、マウスでは、生後約 2 週で血中甲状腺ホルモンレベルがピークに達し、それに伴って成長速度が最大になることが知られている。そのため、乳幼児期から青年期にかけての CAR 活性化は、甲状腺ホルモンシグナルを持続的に減弱させ、成長を抑制する可能性が考えられた。

そこで次に、15 日齢の野生型マウス及び CAR 欠損型マウスに TCPOBOP を 15 日間で 2 回投与し、45 日齢の時点での肝を用いて解析した。その結果、TCPOBOP 投与による肝相対重量の増加と、*Cyp2b10* 及び *Gadd45b* の mRNA レベルの増加が認められ、15 日齢における TCPOBOP 曝露から持続的に CAR が活性化されていたことが確認された。そして、TCPOBOP 投与後の体重及び握力の経時的な変化を調べたところ、野生型マウスでは、成長に伴う体重増加が TCPOBOP 投与により顕著に抑制され、30 日齢及び 45 日齢における握力も低下していた。一方、CAR 欠損型マウスでは、TCPOBOP 依存的なこれらの変化は認められなかった。肝 RNA を用いた定量的逆転写 PCR により、野生型マウスにおいて、TCPOBOP 投与に伴う *Cyp3a11*、*Ugt1a1* 及び *Sult1e1* の mRNA レベルの増加、並びに甲状腺ホルモンシグナル関連遺伝子の *Igf1*、*Klf9*、*Dbp* 及び *Igfals* の mRNA レベルの低下も確認された。さらに血漿中 TSH レベルも野生型マウスにおいてのみ TCPOBOP 依存的に増加した。

以上の結果より、乳幼児期から青年期にかけての持続的な CAR の活性化により、甲状腺ホルモン代謝の亢進と甲状腺ホルモンシグナルの減弱が維持的に起こり、乳幼児マウスの成長が抑制されることが示唆された。一方、15 日齢においてフェノバルビタールを投与して CAR を一過性で活性化した場合には、投与直後に顕著な体重減少が見られたが、その後は溶媒処置群と同様の体重推移をたどったことから、一時的な CAR の活性化は、成長障害を引き起こさないと考えられた。

また、TCPOBOP 処置群では 30 日齢 (乳幼児) 頃までは顕著な体重増加率の低下が見られたが、離乳後、週齢が上がるにつれて体重増加率が徐々に上昇していく様子が観察された。TCPOBOP の体重増加への影響をより詳細に調べるために、前週の体重に対する 1 週間ごとの体重増加率を算出したところ、対照群では投与 7~14 日後の体重増加率が高値であったが、TCPOBOP 処置群では、この期間の体重増加率は対照群に比べ顕著に低く、14~21 日後の体重増

加率が高値であったことから、TCPOBOP 処置群では対照群に比べて体重増加が遅れて起こることが示唆された。これらのことから、TCPOBOP 処置群では CAR 活性化に伴う成長の抑制は起こるが、その後急速な体重増加が起こり正常レベルに近づく、いわゆるキャッチアップ現象が起こっている可能性が考えられた。

以上、本研究において、乳幼児期の持続的な CAR 活性化は、甲状腺ホルモンシグナルを減弱することで成長障害を引き起こす可能性が示された。これらの結果は、乳幼児期における化学物質曝露の生体影響とその発現機序の理解に有用な知見を提供するものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ryota Shizu, Kanako Ezaki, Takumi Sato, Ayaka Sugawara, Takuomi Hosaka, Takamitsu Sasaki, Kouichi Yoshinari	4. 巻 10
2. 論文標題 PXR suppresses PPAR α -dependent HMGCs2 gene transcription by inhibiting the interaction between PPAR α and PGC1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10123550	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ryota Shizu, Mai Ishimura, Sumihito Nobusawa, Takuomi Hosaka, Takamitsu Sasaki, Satoru Kakizaki, Kouichi Yoshinari	4. 巻 95
2. 論文標題 The influence of the long term chemical activation of the nuclear receptor pregnane X receptor (PXR) on liver carcinogenesis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Toxicology	6. 最初と最後の頁 1089-1102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00204-020-02955-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maya Okamura, Ryota Shizu, Taiki Abe, Susumu Kodama, Takuomi Hosaka, Takamitsu Sasaki, Kouichi Yoshinari	4. 巻 9
2. 論文標題 PXR functionally interacts with NF- κ B and AP-1 to downregulate the inflammation-induced expression of chemokine CXCL2 in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9102296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ryota Shizu, Yuta Otsuka, Kanako Ezaki, Chizuru Ishii, Shingo Arakawa, Yuto Amaike, Taiki Abe, Takuomi Hosaka, Takamitsu Sasaki, Yuichiro Kanno, Masaaki Miyata, Yasushi Yamazoe, Kouichi Yoshinari	4. 巻 98
2. 論文標題 Antiepileptic drug-activated constitutive androstane receptor inhibits peroxisome proliferator-activated receptor α - and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α -dependent gene expression to increase blood triglyceride levels.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 634-647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/molpharm.120.000103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryota Shizu, Kouichi Yoshinari	4. 巻 16
2. 論文標題 Nuclear receptor CAR-mediated liver cancer and its species differences	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology	6. 最初と最後の頁 343-351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17425255.2020.1746268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryota Shizu, Yuta Otsuka, Chizuru Ishii, Kanako Ezaki, Kouichi Yoshinari	4. 巻 24
2. 論文標題 PPAR Induces the Expression of CAR That Works as a Negative Regulator of PPAR Functions in Mouse Livers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043953	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kouichi Yoshinari, Ryota Shizu	4. 巻 50
2. 論文標題 Distinct Roles of the Sister Nuclear Receptors PXR and CAR in Liver Cancer Development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6. 最初と最後の頁 1019-1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/dmd.121.000481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田代紗莉依、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 乳幼児期における化学物質曝露はCAR活性化を介して成長遅延を引き起こす
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田代紗莉依、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 化学物質曝露による核内受容体CAR活性化が乳幼児の発達に及ぼす影響
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田代紗莉依、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 乳幼児期マウスにおける核内受容体CARの活性化が甲状腺ホルモンシグナルに及ぼす影響
3. 学会等名 第4回医薬品毒性機序研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田代紗莉依、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 乳幼児期における核内受容体CAR活性化の甲状腺ホルモンシグナルに対する影響
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉成浩一
2. 発表標題 核内受容体PXRと肝細胞増殖・肝発がん
3. 学会等名 環境ホルモン学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田尚輝、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 ラット反復投与毒性試験データベースを利用した小葉中心性肝細胞肥大の発現機序解析
3. 学会等名 第38回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志津怜太、石村麻衣、信澤純人、保坂卓臣、佐々木崇光、柿崎暁、吉成浩一
2. 発表標題 化学物質によるPXR活性化の Maus 肝発がんへの影響解析
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志津怜太、江崎香奈子、保坂卓臣、佐々木崇光、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 抗てんかん薬によるCARの活性化はPPAR の抑制を介して血中脂質レベルを増加させる
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	志津 怜太 (Shizu Ryota) (50803912)	静岡県立大学・薬学部・助教 (23803)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	保坂 卓臣 (Hosaka Takuomi) (30611579)	静岡県立大学・薬学部・助教 (23803)	
研究分担者	柿崎 暁 (Kakizaki Satoru) (80344935)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関