

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590150

研究課題名(和文) 化学物質の肝毒性発現におけるNMDA型グルタミン酸受容体の役割に関する研究

研究課題名(英文) Study on a role of NMDA receptor in chemical-induced hepatotoxicity

研究代表者

根本 清光 (NEMOTO, Kiyomitsu)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：90189366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系で重要な役割を果たすNMDA型グルタミン酸受容体(NMDAR)の2Cサブユニットの遺伝子(Grin2c)が、肝細胞肥大誘発作用、肝細胞傷害性あるいは肝細胞増殖性肝肥大誘発作用を示す化学物質の投与ラット肝臓で顕著に発現亢進することを見だし、これら化学物質の作用にNMDARが何らかの役割を果たすものと推定された。しかし、肝細胞株でこのような化学物質によるGrin2c遺伝子の発現亢進を見いだすことができず、他の細胞種から産生される因子など間接的な要因で発現亢進が引き起こる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present studies demonstrated that the treatments with chemicals inducing hepatocellular hypertrophy, hepatocyte injury, and/or liver hypertrophy resulted in super-induction of NMDA receptor 2C subunit gene (Grin 2c) expression in the rat livers, suggesting that NMDA receptor plays an important role in chemical-induced hepatotoxicity. However, induced Grin2c gene expression could not be found in chemical-treated hepatic cell lines. The induction of Grin2c gene expression might result from certain cellular factors produced from different types of hepatic cells from parenchymal hepatocytes.

研究分野：分子毒性学

キーワード：NMDA受容体 肝臓 肝肥大 環境化学物質 肝がん細胞 肝毒性 肝細胞障害 肝発がん

1. 研究開始当初の背景

化学物質の中には、遺伝毒性を示さないが、肝肥大(肝細胞肥大)、さらには肝がんを惹起するものが数多く知られている。しかしながら、肝肥大は形態学的定義に止まっており、非遺伝毒性物質による肝肥大誘発作用と肝発がん性との関連性は明確にされていない。そこで、本研究者は、これまでに、肝肥大誘発作用を有する非遺伝毒性物質の肝発がん予測系の構築、すなわち、肝肥大過程で肝発がん性を予測する科学的指標の検索を行い、化学物質の安全性評価に貢献することを研究テーマの1つとして研究を遂行している。

その一環として、肝細胞肥大誘発作用を有する非遺伝毒性物質による肝臓での特徴的な遺伝子発現を検索すべく、フェノバルビタール(PB)、クロフィブレート(CF)、ピペロニルブトキシド(PBO)(共力剤)を選択し、それぞれ肝細胞肥大を誘発する用量である2,500 ppm、500 ppm、20,000 ppmの混餌食を6週齢雄性F344ラットに、3日間、4週間、13週間与えた(基礎飼料摂食群を対照群とした)。そのうち、13週間投与群については、その肝臓RNAを用いて、DNAマイクロアレイ法による遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、中枢神経細胞で発現し、記憶や学習、神経興奮毒性に重要な役割を果たすことが知られているNMDA型グルタミン酸受容体(NMDAR)の2Cサブユニット(NR2C)遺伝子(Grin2c遺伝子)が、用いた化合物中3化合物で著しく発現亢進すること、すなわち、対照群に対する発現上昇率の高い順に遺伝子を並べると、Grin2c遺伝子は、PB、CF、PBO投与群において最上位にランク付けされた。

NMDARは、中枢神経系のみならず、最近、骨形成や腎機能制御など非神経組織での機能発現やがん細胞の増殖に対する重要性が注目されるようになってきている。Grin2c子発現亢進の機序やそれに伴うNMDARの機能変化が、肝臓機能および化学物質による肝毒性発現とどのように関連しているかを明らかにすることは極めて重要であると思われる、これを根拠として本研究立案に至る。

2. 研究の目的

(1) 先に検討したPB、CF、PBOに加えて、その他の肝肥大誘発作用を有する化学物質をラットに投与し、肝臓でのGrin2c遺伝子の発現レベルを検討することにより、化学物質の肝肥大誘発や肝細胞障害性、肝発がんへのGrin2c遺伝子発現亢進の重要性を考察することを最大の目的とした。

(2) 肝肥大誘発作用を有する化学物質で培養細胞株を処理し、NR2Cを含むNMDARの発現がどのように変化するかを検討し、化学物質によるNMDARサブユニット遺伝子の発現機構を解明することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝肥大誘発化学物質投与ラット肝臓RNAの調製

6週齢雌雄性F344/DuCrjラットを、基礎飼料、あるいは、クロフィブレート(CF)を2,500 ppm、フェノバルビタール(PB)を500 ppm、ピペロニルブトキシド(PBO)を20,000 ppm、βナフトフラボン(BNF)を5,000 ppm、インドール-3-カルビノール(I3C)を2,000 ppm、アセトアミノフェン(AA)を10,000 ppmの濃度で作製した混餌食を3日間、4週間、13週間投与した群(1群5匹)から摘出した肝臓からトータルRNAを調製した(動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物センター病理部にて実施された)。

また、7週齢雄性Sprague-Dawleyラット(SDラット)、Wistar-Kyotoラット(WKYラット)ならびに脳卒中易発性高血圧自然発症ラット(SHRSP)に硝酸鉛を0.1 mmol/kgの用量で単回尾静脈内投与後、3、6、12、24、48、96時間で屠殺し、各動物より肝臓のtotal RNAを調製した(動物実験は、静岡県立大学で実施した)。

(2) 遺伝子発現の検討

DNAマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析は、アジレント・テクノロジー社のWhole Rat 4x44K oligo DNA microarraysを用いて実施した。

NR2C遺伝子(Grin2c遺伝子)の発現は、Real time RT-PCRによって検討した。

4. 研究成果

(1) 肝細胞肥大誘発化学物質BNF、I3C、AA投与13週間のラット肝臓でのGrin2c遺伝子の発現(DNAマイクロアレイによる解析)

AA投与群では、全解析遺伝子のうち、Grin2c遺伝子の発現亢進量(vs対照群)が約150倍となり最上位(2番目の遺伝子は約20倍)となった。I3C投与群では、Cyp1a1遺伝子(約200倍)に次いで2番目の発現亢進量(約40倍)となった。一方、BNF投与群でのGrin2c遺伝子の発現亢進量は約3倍程度で、顕著な発現亢進は認められなかった。

(2) PB、CF、PBO、BNF、I3C、AA投与ラット肝臓でのGrin2c遺伝子の発現(Real time RT-PCRによる解析)

PB、CF、PBO、BNF、I3C、AA投与3日、4週間、13週間後のラット肝臓でのGrin2c遺伝子の発現をReal time RT-PCRにより検討した。その結果、PB、CF、PBO投与群では、3日から発現が亢進し、13週間では発現が最大(それぞれ約500倍、200倍、600倍)となった(図1)。また、I3CおよびAA投与では、やはり3日目から発現が亢進したが、図2で示すように、4週間投与群での発現亢進率が高くなった(それぞれ約60倍、130倍)。一方、BNF投与群では、投与3日

目に約 3 倍の有意な発現亢進が見られたが、4 週間、13 週間の投与では有意な発現亢進は見られなかった (図 2)

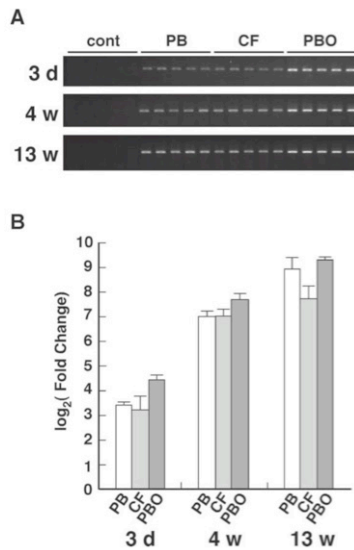


図 1 PB、CF、PBO 投与ラット肝臓での Grin2c 遺伝子の発現

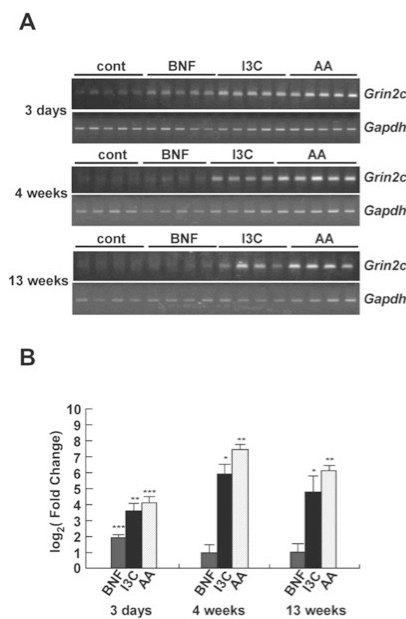


図 2 BNF、I3C、AA 投与ラット肝臓での Grin2c 遺伝子の発現

(3) 肝細胞増殖型肝肥大誘発物質である硝酸鉛投与でのラット肝臓での Grin2c 遺伝子の発現検討

ラットへの硝酸鉛投与により、肝細胞増殖を伴う肝肥大が惹起される。本研究代表者は、その感受性が SD ラット > Wistar-Kyoto (WKY) ラット > 脳卒中易発性高血圧自然ラット (SHRSP) であることを既に報告している。これら系統へ硝酸鉛を単回投与し、肝臓での Grin2c 遺伝子の発現を検討した (図 3)。その結果、SD ラットでは投与 6 時間後から顕著な発現亢進が見られ、48 時間後には約 70 倍に達した。一方、WKY ラットでは投与 12 時間後に約 20 倍の一過的な発現亢進が

見られたのみであった。また、SHRSP では Grin2c 遺伝子の有意な発現亢進は認められなかった。

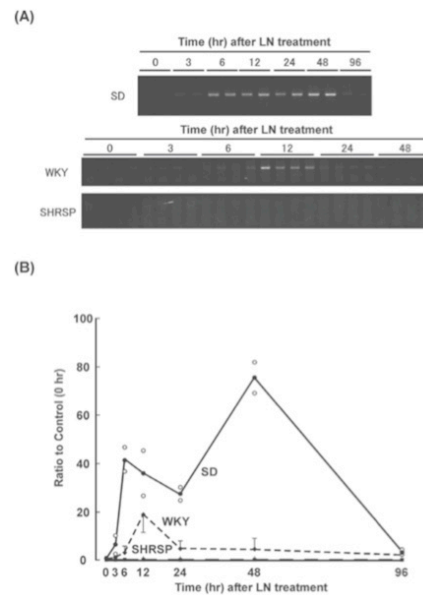


図 3 硝酸鉛投与ラット肝臓での Grin2c 遺伝子の発現

(4) 肝がん由来細胞株での NMDA 受容体発現の検討

ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞と HuH7 細胞について、NMDA 受容体のサブユニットをコードしている Grin2c 遺伝子と Grin1 遺伝子の発現を RT-PCR 法により検討した。その結果、HepG2 細胞にはこれら両遺伝子が、HuH7 細胞には Grin1 遺伝子が発現していること明らかとなった。さらに、これら細胞株に NMDA 受容体に対する阻害剤であるメマンチンの暴露がそれら細胞の増殖抑制を引き起こした。

(5) 肝肥大誘発物質処理肝がん細胞株での Grin2c 遺伝子の発現誘導性の検討

HepG2 細胞および Huh7 細胞に PB、CF あるいは PBO を処理し、Grin2c 遺伝子の発現誘導性を検討したが、その誘導性は確認できなかった。

(1)、(2) の結果から、肝細胞肥大誘発性化学物質の多くは、投与後 3 日目から NMDA 受容体の NR2C サブユニットをコードする Grin2c 遺伝子の発現亢進を引き起こし、その発現亢進レベルは、肝細胞肥大とそれに伴う肝肥大が観察される投与後 4 週間後あるいは 13 週間後に顕著なものとなること明らかとなった。しかし、BNF 投与では有意な発現亢進が見られなかったことから、特定の肝肥大タイプに依存して Grin2c 遺伝子の発現が誘導される可能性が考えられた。また、AA 投与でがん細胞傷害性が認められたことから、Grin2c 遺伝子の発現亢進は肝細胞傷害においても引き起こる可能性が考えられた。

(3)の結果から、肝細胞肥大を伴う肝肥大のみならず、肝細胞増殖を伴う肝肥大でも NMDA 受容体が何らかの機能を発揮するものと推定された。

(4)の結果から、肝がん細胞でも機能を発揮しうる NMDA 受容体が発現し、その発現は少なくともその増殖に関わる可能性が示唆された。したがって、肝発がん過程での NMDA 受容体の機能に興味を持たれた。

しかしながら、(5)のように肝がん細胞株への肝肥大誘発性物質処理は Grin2c 遺伝子の発現を誘導しなかった。この理由として、1 つには、Grin2c 遺伝子の発現亢進は、肝肥大誘発性化学物質の直接的作用で引き起こるものではなく、肝実質細胞以外の肝臓内細胞種から肝肥大誘発性化学物質の刺激により産生された何らかの因子が肝実質細胞に作用することにより引き起こる可能性が想定された。また、がん細胞あるいは株化細胞における Grin2c 遺伝子は、化学物質に対して転写応答性を失ってしまった可能性も考えられた。今後は、初代肝細胞や種々肝臓内の細胞種を混合させた培養、肝細胞以外の非神経系由来細胞株などを用いて、Grin2c 遺伝子の化学物質による応答性を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kiyomitsu Nemoto, Takahiro Tanaka, Ayaka Ikeda, Sei Ito, Masanori Mizukami, Tokihiro Hikida, Toshie Gamou, Wataru Habano, Shogo Ozawa, Kaoru Inoue, Midori Yoshida, Akiyoshi Nishikawa, Masakuni Degawa. Super-induced gene expression of the N-methyl-D-aspartate receptor 2C subunit in chemical-induced hypertrophic liver in rats. *J Toxicol Sci* (査読有) 2011; 36(5): 507-514. DOI: 10.2131/jts.36.507
- ② Kiyomitsu Nemoto, Ayaka Ikeda, Tokihiro Hikida, Misaki Kojima, Masakuni Degawa. Induced expression of hepatic N-methyl-D-aspartate receptor 2C subunit gene during liver enlargement induced by lead nitrate, a hepatocellular mitogen. *J Toxicol Sci* (査読有) 2013; 38(1): 127-129. DOI: 10.2131/jts.38.127
- ③ Kiyomitsu Nemoto, Ayaka Ikeda, Takahiro Tanaka, Kaoru Inoue, Midori Yoshida, Akiyoshi Nishikawa, Toshie Gamou, Wataru Habano, Shogo Ozawa, Masakuni Degawa. Change in the gene expression of the N-methyl-D-aspartate receptor 2C subunit by dietary β -naphthoflavone, indole-3-carbinol, or acetaminophen in the rat liver. *J*

Toxicol Sci (査読有) 2013; 38(4): 611-617.

DOI: 10.2131/jts.38.611

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kiyomitsu Nemoto, Masashi Sekimoto, Kaoru Inoue, Midori Yoshida, Akiyoshi Nishikawa, Wataru Habano, Shogo Ozawa, Masakuni Degawa. Super-induced gene expression of the NMDA receptor 2C subunit in chemical-induced hypertrophic liver in rats. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (名古屋)、2011 年 10 月 5 日
- ② 池田絢香、根本清光、関本征史、小島美咲、出川雅邦. 硝酸鉛で誘発されるラット肝肥大過程での NMDA 受容体 2C サブユニット遺伝子の発現亢進. フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー (金沢)、2011 年 10 月 28 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根本 清光 (NEMOTO, Kiyomitsu)
静岡県立大学・薬学部・准教授
研究者番号: 90189366