

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890224

研究課題名(和文) 新規モデルマウスを用いた母乳性黄疸発症メカニズムの解明とその応用

研究課題名(英文) Importance of UGT1A1 in breast milk-induced neonatal hyperbilirubinemia

研究代表者

藤原 亮一 (Fujiwara, Ryoichi)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：40631643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT) 1A1はビリルビンの唯一の代謝酵素である。本研究では、主要な代謝臓器である肝臓や小腸に加え、皮膚にもUGT1A1が発現しており、ビリルビン代謝に寄与していることを明らかにした。また、母乳に含まれる脂肪酸であるDHAやリノール酸、オレイン酸はUGT1A1阻害能を有しており、母乳性黄疸の発症原因となっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 is the sole enzyme that can metabolize bilirubin. In the present study, we demonstrated that UGT1A1 is expressed not only in the liver and small intestine, but also in the skin. It was further demonstrated that oleic acid, linoleic acid, and docosahexaenoic acid (DHA), which are fatty acids included in the human breast milk, can strongly inhibit the UGT1A1 activity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ビリルビン 新生児黄疸 薬物代謝酵素 UGT1A1 グルクロン酸抱合

1. 研究開始当初の背景

UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) は様々な内因性、外因性化合物にグルクロン酸を転移する代謝酵素である (Pharmacogenet Genomics 15:677-685, 2005)。UGT 分子種の一つである UGT1A1 はビリルビンの唯一の代謝酵素として知られている (J Biol Chem 269:17960-17964, 1994)。ヒト新生児は生理的に高ビリルビン血症 (黄疸) を発症するが、これは新生児期において UGT1A1 が十分に機能していないためであると考えられている。黄疸の程度は母乳を摂取する新生児において特に高いことから母乳は黄疸発症のリスクファクターであると考えられているが、そのメカニズムは不明である。また、古くより日光浴は新生児黄疸の治療や予防に有効であると考えられていたが、日光浴がどのように黄疸を抑制するかについては不明である。

2. 研究の目的

母乳成分による UGT1A1 の阻害

薬物代謝酵素である UGT1A1 は薬物の代謝に関与する一方、薬物を含む様々な化合物によって酵素阻害を受けることが知られている。母乳を摂取する新生児において特に高ビリルビンが認められることから、母乳中には UGT1A1 によるビリルビン代謝能を阻害する物質が含まれている可能性が考えられた。そこで、母乳に多く含まれる脂肪酸による UGT1A1 阻害能を明らかにすることを目的とした。リノール酸やオレイン酸など、特に母乳に多く存在する脂肪酸 15 種を研究対象とした。

グルコースによる UGT1A1 発現の制御

新生児黄疸は様々な条件下で発症するが、発症原因の一つにカロリー摂取不足が考えられている。これは、十分に母乳を摂取していない新生児において重度の黄疸発症が認められるからである。UGT1A1 は黄疸の原因物質であるビリルビンの唯一の代謝酵素である。また、現在までの研究により、グルコースは転写調節因子である SP1 を活性化し、特定の遺伝子を誘導することが知られている。従って、カロリー摂取量の違いは SP1 を介した UGT1A1 の発現量に影響を与え、新生児黄疸の発症原因となっている可能性が考えられた。そこで、黄疸モデルマウスであるヒト化 UGT1 マウスや培養細胞を用い、グルコースによる UGT1A1 発現への影響を明らかにすることを目的とした。

皮膚における UGT1A1 の発現と機能

肝臓は主要な代謝臓器として知られており、実際にビリルビン代謝には肝臓に発現する UGT1A1 が大きく貢献していることが明らかとなっている。しかし新生児期には肝における UGT1A1 発現は極めて低く、肝外組織も新生児期のビリルビン代謝に関与している可能性が考えられた。皮膚は肝臓に次いで二番目に大きな組織であることから、皮膚に UGT1A1 が発現する場合には皮膚もビリルビ

ン代謝に重要な組織となる可能性が考えられた。また、日光浴は黄疸発症の治療や予防に有効であるとされている。日光には紫外線が含まれており、現在までに紫外線は芳香族炭化水素受容体 (AhR) を活性化し、そのターゲット遺伝子を誘導することが知られている。従って、AhR のターゲット遺伝子でもある UGT1A1 は紫外線によって誘導する可能性が考えられた。そこで、皮膚における UGT1A1 の発現と機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

母乳成分による UGT1A1 の阻害

UGT1A1 の酵素活性は、ヒト肝臓ミクロソームと UGT1A1 発現系を酵素源とし、エストラジオールを基質として用い、生成するエストラジオール 3-グルクロン酸抱合体を HPLC により定量することで測定した。母乳に多く含まれる脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸、ステアリン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ベヘン酸、アラキジン酸、リグノセリン酸、デカン酸、パルミトレイン酸、リノレン酸、アラキドン酸、EPA、DHA の 15 種類を阻害剤として用いた。

グルコースによる UGT1A1 発現の制御

新生児黄疸モデルマウスであるヒト化 UGT1 マウスはカリフォルニア大サンディエゴ校より入手した。飼育、繁殖、およびグルコース投与は北里大学薬学部動物実験委員会が承認した実験計画書に基づいて行った。また、ヒト小腸由来の培養細胞である Caco-2 細胞を用い、グルコースによる UGT1A1 の誘導について検討した。グルコースを含む培地および含まない培地を用い Caco-2 細胞を 3、5、7 日間培養した。細胞より Total RNA を抽出した後、RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法により UGT1A1 の発現量を定量した。さらに、ヒト UGT1A1 のプロモーター領域を含むレポーターベクターを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行うことで、グルコースによる UGT1A1 発現制御に関与するプロモーター領域の同定を行った。

皮膚における UGT1A1 の発現と機能

ヒト皮膚、ヒト皮膚由来の培養細胞である HaCaT 細胞やヒト化 UGT1 マウスの皮膚より RNA を抽出し、UGT1A1 の発現量を RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法により定量した。また HaCaT 細胞やヒト化 UGT1 マウスに紫外線を照射し、同様に UGT1A1 の発現量を定量することで、紫外線による UGT1A1 発現への影響を明らかにした。さらに、ヒト化 UGT1 マウス由来の皮膚より調製したミクロソームを用い、UGT1A1 酵素活性を測定した。測定は で記載した方法に従って行った。

4. 研究成果

母乳成分による UGT1A1 の阻害

15 種の脂肪酸を阻害剤として用い、UGT1A1 酵素活性に対する影響を調べた結果、図 1 に

示すようにオレイン酸、リノール酸、DHA や EPA など、特定の脂肪酸は強く UGT1A1 を阻害することが明らかとなった。

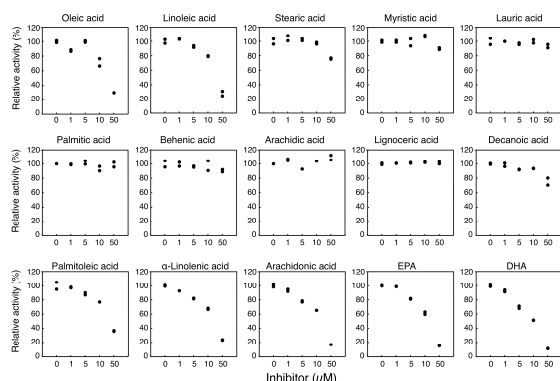


図 1 15 種の脂肪酸による UGT1A1 酵素活性の阻害

特に強く阻害効果を示したオレイン酸、リノール酸、DHA の阻害定数 (K_i) や阻害様式を求めた結果、オレイン酸、リノール酸、DHA の K_i 値はそれぞれ 23.4 μ M、22.1 μ M、1.8 μ M であり、DHA が最も強く UGT1A1 を阻害することが明らかとなった。阻害様式はどれも非競合阻害 (Non-competitive inhibition) であった。

以上の成果により、母乳に含まれる脂肪酸による UGT1A1 酵素活性の阻害が母乳性黄疸発症メカニズムの一因であることが明らかとなった。

グルコースによる UGT1A1 発現の制御

新生児ヒト化 UGT1 マウスにグルコースを投与した後、主要な代謝臓器である肝臓と小腸を回収し、UGT1A1 の発現量を定量した。肝臓における UGT1A1 の発現は顕著に低く、グルコース処置群、未処置群ともに発現量に違いは認められなかった (図 2A)。その一方で小腸における UGT1A1 発現量は高く、その発現はグルコースによりさらに誘導されていることが明らかとなった (図 2B)。

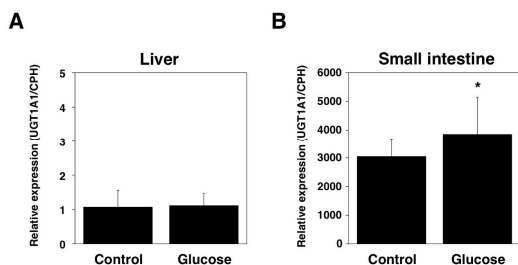


図 2 グルコース投与による肝 (A) および小腸 (B) UGT1A1 発現への影響

Caco-2 細胞をグルコースを含む培地と含まない培地で培養したところ、グルコースを含む培地で培養した細胞にはより多くの UGT1A1 が発現していることが明らかとなった。この UGT1A1 の誘導能はグルコース濃度

依存的であり、処置日数依存的であることも示された。

UGT1A1 のプロモーター領域 (-10,000~-1) に SP1 結合領域が存在するか否かを TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) を用い解析したところ、UGT1A1 の上流 -5,500~-1 bp に 7 箇所の SP1 結合領域が存在することが明らかとなった。UGT1A1 のプロモーター領域を含むレポーターベクターを 3 種構築しルシフェラーゼアッセイを行ったところ、-6500~-4050 に最もグルコースによって転写を活性化する因子が含まれることが明らかとなった。

以上の研究成果により、グルコースは小腸における UGT1A1 の発現誘導に重要な役割を担っていることが明らかとなった。カロリー摂取不足による新生児黄疸の発症に対して、グルコースの投与は小腸の UGT1A1 を誘導しビリルビン代謝を促進することで、黄疸を抑制する可能性が考えられた。

皮膚における UGT1A1 の発現と機能

ヒト皮膚由来の HaCaT 細胞およびヒト皮膚の RNA を用い、RT-PCR を行った。HaCaT 細胞には UGT1A1 だけでなく、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A8 も発現していることが明らかとなった (図 3A)。ヒト皮膚 2 検体の RNA を用い同様の解析を行ったところ、HaCaT 細胞で認められた分子種に加え、UGT1A7 や UGT1A10 の発現も認められた (図 3B)。

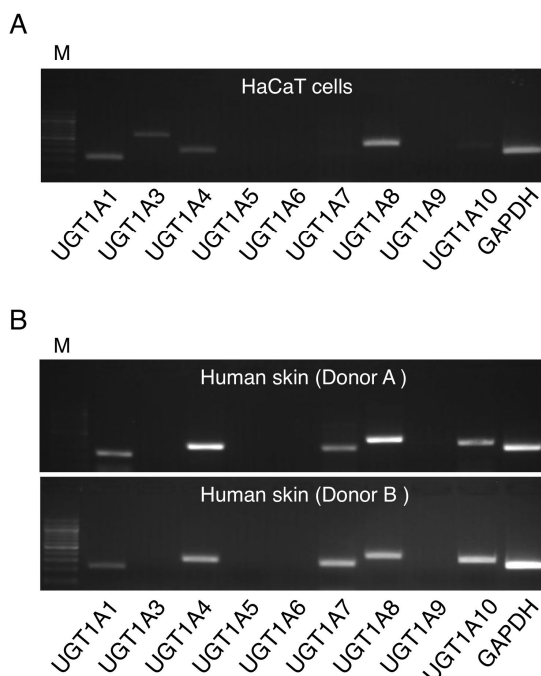


図 3 HaCaT 細胞 (A) およびヒト皮膚 (B) における UGT1 分子種の発現

紫外線を照射したマウス皮膚や HaCaT より調製した RNA においては、UGT1A1 発現量の有意な上昇が認められた。また、紫外線を照射したマウス皮膚より調製したミクロソーム

を用い UGT1A1 酵素活性を測定したところ、コントロール群と比べ高い活性が認められた。以上のことより、皮膚には UGT1A1 が発現しており、その発現や機能は紫外線によって誘導されることが明らかとなった。

紫外線によってトリプトファンから生成される FICZ は AhR のリガンドとなることが知られている。FICZ を処置した HaCaT 細胞には、未処置群と比べ高い UGT1A1 の発現が認められた(図4)。従って、紫外線による UGT1A1 の誘導には FICZ による AhR の活性化が関与していると考えられた。

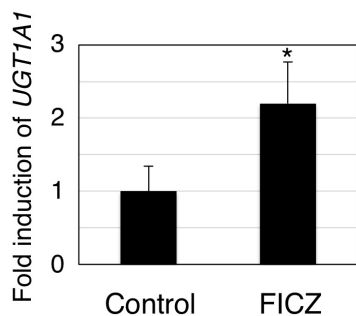


図4 FICZ による HaCaT 細胞に発現する UGT1A1 の誘導

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2件)

Kyohei Sumida, Makiko Kawana, Emi Kouno, Tomoo Itoh, Shuhei Takano, Tomoya Narawa, Robert H. Tukey, and Ryoichi Fujiwara. Importance of UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Expression in Skin and Its Induction by UVB in Neonatal Hyperbilirubinemia. *Molecular Pharmacology*. 84: 679-686 (2013). 査読有

Ayako Shibuya, Tomoo Itoh, Robert H. Tukey, and Ryoichi Fujiwara. Impact of fatty acids on human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 activity and its expression in neonatal hyperbilirubinemia. *Scientific Reports*. 3:2903 (2013). 査読有

〔学会発表〕(計10件)

藤原亮一, The importance of gastrointestinal UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 in bilirubin metabolism in neonatal hyperbilirubinemia, 日本薬物動態学会第27回年会, 2012年11月20-22日, 千葉

Ryoichi Fujiwara, Ultraviolet B-irradiated L-tryptophan induces human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and 1A8 expressed in the human skin, SOT 2013 52nd Annual Meeting, 2013年3月10-14日, San Antonio (Texas)

藤原亮一, 母乳に含まれる遊離脂肪酸による UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 阻害, 日本薬学会第133年会, 2013年3月27-30日, 神奈川
青島直也, 藤江恵子, 伊藤智夫, 藤原亮二, 転写因子 SP-1 を介したグルコースによる UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1A1 の誘導, 第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2013年11月23-24日, 仙台

澄田恭平, 伊藤智夫, 藤原亮二, 皮膚に発現する UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1A1 のビリルビン代謝への寄与, 第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2013年11月23-24日, 仙台

Yuki Kutsuno, Ryoichi Fujiwara, Kyohei Sumida, Tomoo Itoh, Glucuronidation of drugs in humanized

UDP-glucuronosyltransferase 1 mice: similarity with glucuronidation in human liver microsomes, 日本薬物動態学会第28回年会, 2013年10月9-11日, 東京

久津野友貴, 藤原亮一, 澄田恭平, 伊藤智夫, ヒト化 UGT1 マウスにおける薬物のグルクロン酸抱合能の評価, P450 と UGT/SULT 研究会, 2013年6月1-2日, 宮崎

Ryoichi Fujiwara, Ayako Shibuya, Robert H. Tukey, Tomoo Itoh, Impact of fatty acids on human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 activity and its expression in neonatal hyperbilirubinemia. SOT 2014 53rd Annual Meeting, 2014年3月23-27日, Phoenix (Arizona)

藤原亮一, ヒト化 UGT1 マウスにおける薬物のグルクロン酸抱合能の評価, 日本薬学会第134年会, 2014年3月27-30日, 熊本

久津野友貴, 藤原亮一, 伊藤智夫, ヒト化 UGT1 マウスを用いた薬物のグルクロン酸抱合能及び毒性の評価, 日本薬学会第134年会, 2014年3月27-30日, 熊本

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 亮一 (FUJIWARA, Ryoichi)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号: 40631643

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし